

# 睡眠剥夺动物模型及其在中医药改善睡眠研究中的应用

魏砚君, 卞宏生, 叶晓楠, 吴传芳, 李廷利\*  
(黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 整理国内外常用的睡眠剥夺模型建立方法,并探讨其在中医药改善睡眠研究中的应用,为从中医药角度建立新型且更可靠的睡眠剥夺模型做好理论基础。查阅近 15 年内睡眠剥夺模型建立及应用的相关文献,归纳总结国内外主要的睡眠剥夺模型及其原理和优缺点并给出模型的改进方法,并结合其在中医药改善睡眠相关研究中的应用,比较模型在中医证型方面中各自的不同之处。结果表明啮齿类动物睡眠剥夺模型主要有水平剥夺模型、应激剥夺模型、强迫运动剥夺模型、化学刺激剥夺模型、轻柔刺激剥夺模型等;果蝇睡眠剥夺模型主要有机械剥夺模型、夜间重复光照剥夺模型、基因修饰法等;中医药改善睡眠研究中的睡眠剥夺动物模型主要包括阴虚失眠模型、肝郁失眠模型、心肾不交失眠模型等。不同动物睡眠剥夺模型有各自优缺点,在进行中医药改善睡眠研究时需根据具体情况灵活选择,其与中医证型结合方面有待完善;现有的睡眠剥夺模型大多在准确性和稳定性方面均有欠缺,影响实验结果的可靠性;睡眠剥夺模型致力于结合基本模型与中医失眠证型表现,而睡眠剥夺模型在中医药方面的应用尚不十分广泛,建立符合中医药研究思路的睡眠剥夺模型应是中医药改善睡眠研究中的重点。

**[关键词]** 睡眠;睡眠剥夺;中医药;动物模型

**[中图分类号]** R2-0;R24;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0227-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20180945

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180227.0833.002.html>

**[网络出版时间]** 2018-02-27 13:54

## Animal Models of Sleep Deprivation and Application in Studies of Traditional Chinese Medicine with Improving Sleep Function

WEI Yan-jun, BIAN Hong-sheng, YE Xiao-nan, WU Chuan-fang, LI Ting-li\*  
(School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** To summarize the common methods of establishing the animal models of sleep deprivation, investigate their application in the studies of traditional Chinese medicine (TCM) with improving sleep function, and make a theoretical basis for establishment of a novel and more reliable sleep deprivation model from the aspect of TCM. Relevant papers on the establishment and application of sleep deprivation models in the past 15 years were consulted. Then the principles, advantages and disadvantages of the animal models of sleep deprivation were summarized to provide improving methods. Based on their application in the study of TCM with improving sleep function, the models were compared between various TCM syndromes. The results showed that the main models of sleep deprivation in rodents (rats or mice) included horizontal stand deprivation model, stress deprivation model, forced motion deprivation model, chemical stimulation deprivation model and gentle stimulation deprivation model, etc. The drosophila models of sleep deprivation mainly included mechanical deprivation model, repeated light stimulation model at night and gene modification method, etc. The animal models of sleep deprivation in TCM mainly included Yin deficiency insomnia model, liver depression insomnia model and heart-kidney incoordination

**[收稿日期]** 20171107(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81274114)

**[第一作者]** 魏砚君,在读博士,从事中药及复方的药理作用机制及安全性评价研究, E-mail:weiyanjun212@126.com

**[通信作者]** \*李廷利,博士,教授,从事中药及复方的药理作用机制及安全性评价研究, E-mail:lthlj@126.com

insomnia model etc. The models have their respective advantages and disadvantages, so in the studies of TCM with improving sleep function, the model should be chosen flexibly according to specific conditions. It also needed to be improved in the combination with TCM syndrome patterns. The existing models of sleep deprivation were mostly lacking of accuracy and stability, affecting the reliability of the experiment results. Sleep deprivation model was focusing on the combination of basic model and TCM syndromes of insomnia. The sleep deprivation models were not widely used in research of TCM, so establishing a sleep deprivation model conforming to the thought of TCM should be the key point in the study of improving sleep by TCM.

[Key words] sleep; sleep deprivation; traditional Chinese medicine; animal models

世界贸易组织(WTO)研究指出,睡眠障碍是当今世界一个应该得到重视和解决的公共卫生现状问题。目前,有睡眠障碍的人占全球人口约 27%<sup>[1]</sup>。而现代研究表明,睡眠不足会大大增加患代谢综合征、心血管疾病以及代谢异常等疾病的风险。尽管睡眠如此重要,睡眠障碍的发生如此普遍,睡眠障碍的危害如此之大,人们对睡眠及睡眠障碍的生理机制却知之甚少。

要想切实解决人们的睡眠障碍,首先要进行的就是严谨的基础实验研究,需要研究者建立合适的睡眠剥夺模型,再结合行为药理学、皮层脑电描记与分析、生物化学及分子生物学等实验方法与技术,分析动物行为改变及体内的物质变化,阐明药物发挥药效的作用途径,以此为睡眠机制的探究及相关药物的临床使用提供依据。因此,睡眠剥夺模型的选择将直接影响实验研究结果的准确性。

基于睡眠剥夺模型在睡眠研究中的重要地位,现将近年来研究者们所采用的睡眠剥夺动物模型及其原理和优缺点做简要综述。

## 1 睡眠剥夺动物模型的建立

研究人类睡眠问题,除了临床研究外,最为常用的是基础实验研究,而建立恰当的睡眠剥夺模型则是决定实验是否能够成功的前提。因为生物的睡眠结构存在差异,大脑体积与睡眠周期中各阶段的长度呈正相关<sup>[2]</sup>,所以各种实验动物的睡眠时相及睡眠周期均与人类有差异,不能完全模拟临床失眠症状。啮齿类动物和人类存在相似的睡眠稳态和神经生化调节机制,加之容易繁殖及饲养、麻醉及手术操作也相对简单,因而较适合于失眠模型的建立。也有研究者使用果蝇等动物建立睡眠剥夺模型。

### 1.1 啮齿动物睡眠剥夺模型建立

1.1.1 水平台环境剥夺法 Cohen 等<sup>[3]</sup>于 1966 年最先将平台剥夺法用于大鼠的睡眠剥夺实验,至此共经历了单平台、多平台及改良多平台 3 个阶段,是完全睡眠剥夺(total sleep deprivation, TSD)和选择

性睡眠剥夺(selective sleep deprivation, SSD)的常用方法。目前,实验研究选取动物为大、小鼠。其中大鼠<sup>[4]</sup>平台直径多选用 6.5 cm,小鼠<sup>[5]</sup>多选用 2.4 cm,且直径 10 cm 的平台可用于大鼠快速动眼睡眠(rapid eyes movement, REM)的选择性剥夺,直径 6~7 cm 的可用于最大程度的 REM 睡眠剥夺<sup>[6]</sup>。见表 1。

该睡眠剥夺模型主要用于研究 REM 睡眠被剥夺后,实验动物的机体状况及变化。如朱蕾等<sup>[7]</sup>利用该模型进行了刺五加对睡眠剥夺大鼠学习记忆及海马单胺类神经递质的影响研究;张晓双等<sup>[8]</sup>使用该方法进行了酸枣仁汤对睡眠剥夺大鼠学习记忆的影响及机制研究;李云等<sup>[9]</sup>利用该平台进行了姜黄素对间歇性睡眠剥夺大鼠特定肠道菌群的影响研究。

1.1.2 化学试剂刺激法 化学试剂刺激法是通过向大鼠体内注射特定化学试剂,使其体内发生相应变化,达到剥夺睡眠的目的。

该类方法通常具有特定实验目的,实验的前提是所使用的化学试剂不会影响实验结果。如 LU 等<sup>[13]</sup>向大鼠下丘脑腹外侧视前区(VLPO)注射鹅膏蕈氨酸,探究 VLPO 缺失对大鼠 NREM(除了 REM 以外的睡眠)及 REM 睡眠的影响;成光宇等<sup>[14]</sup>通过向大鼠腹腔注射氯苯丙氨酸,以探究和解安神汤对肝郁脾虚证候失眠大鼠模型的影响。见表 1。

1.1.3 轻柔刺激剥夺法 轻柔刺激剥夺法广泛应用于动物的短时睡眠剥夺实验中,此方法可结合睡眠监测系统对 REM 睡眠的剥夺。见表 1。

该类模型适用于睡眠剥夺时间较短的实验。如买文丽等<sup>[15]</sup>利用该模型进行了开心散对睡眠剥夺小鼠学习记忆的影响研究。

1.1.4 应激刺激睡眠剥夺法 临床上相当一部分失眠症状都源自不同方面的应激反应。从这一角度建立的应激刺激睡眠剥夺模型,主要有电刺激模型、慢性束缚应激模型、慢性情绪应激模型及冲突性心理应激模型 4 类。见表 2。

表 1 水平台环境剥夺法、化学试剂刺激法、轻柔刺激剥夺法建立睡眠剥夺模型简介

Table 1 Introduction to model of platform technique model, chemical stimulation model and soft irritation of sleep deprivation

名称	实验动物	原理	剥夺形式	优点	缺点	改进方法
水平台环境剥夺法	大/小鼠	大鼠(或小鼠)进入 REM 睡眠时,全身肌紧张性下降,其面部接触水面则会突然惊醒,从而达到选择性剥夺实验动物 REM 睡眠的目的	TSD/SSD	改良多平台剥夺方法在选择性剥夺 REM 睡眠的同时,减少了单只大鼠与群体隔离所带来的影响,有效降低大鼠的应激性和群体不稳定性	大鼠天生的畏水性本身就是造成实验动物睡眠剥夺的应激因素之一	对照组在水面上放置铁网 <sup>[10]</sup> ,使大鼠不存在落入水中的危险
化学试剂刺激法	大鼠	将化学试剂(多为中枢兴奋剂)灌胃或注射于大鼠特定脑区,改变脑内睡眠相关的化学物质,从而影响实验动物睡眠时间或时相 <sup>[6]</sup> 。其中应用最广泛的是对氯苯丙氨酸(PCPA)剥夺法	TSD	造模原因确定,能定向改变脑内递质或其他化学物质,对实验动物睡眠的影响都能得到肯定结果	化学试剂剥夺睡眠有局限性,而且无论是给药部位的选择,还是给药剂量的控制,研究者操作的精准要求很高	熟练掌握中枢微量注射技术
轻柔刺激剥夺法	大鼠	研究者通过肉眼观察大鼠行为或通过脑电监测观察到大鼠进入睡眠时,通过人为因素的刺激促使大鼠保持清醒,使大鼠无法进入睡眠 <sup>[11]</sup>	TSD/SSD	轻柔刺激法操作简单,在脑电监测下可进行完全睡眠剥夺或部分睡眠剥夺 <sup>[12]</sup>	人工刺激剥夺方法要求研究者连续观察实验动物行为或脑电波变化,工作量较大,不适合长时间造模	减少每天连续剥夺时间,改为增加造模天数

表 2 4 类应激刺激睡眠剥夺法介绍

Table 2 Introduction to emotional and physical stress models

名称	实验动物	原理	优点	共同缺点	共同改进方法
电刺激法	大鼠	用电栅定时刺激足底部,使因疼痛而无法入睡,最终造成睡眠-觉醒周期被应激过程改变	操作简单,曾被认为是最接近于人类失眠的合适病理模型 <sup>[16]</sup>	研究采用的应激方法,其强度很难标准化,不同动物对各种刺激的个体差异也很大,实验结果可重复性较低	将刺激的强度尽可能标准化,设置预实验,对相应刺激基本无反应的个体排除在外
慢性束缚应激法	大/小鼠	将实验动物束缚在有限空间内一段时间,引发其机体应激反应,导致入睡困难,睡眠时间减少	能较好地突出情绪因素,也可以结合其他方法进行复合束缚 <sup>[17]</sup>		
慢性情绪应激法	大鼠	在原喂水时间给予空瓶刺激,诱发大鼠愤怒等负面情绪,导致由应激反应引起的睡眠时间缩短	更接近纯粹的心理应激,简单易行,稳定可靠 <sup>[18]</sup>		
冲突性心理应激法	大鼠	将饮水器与电流联通,使大鼠在固定时间段内饮水被电击,使其处于一种烦渴欲饮,但又惧怕电击的矛盾心理状态,从而诱发睡眠障碍	对躯体的刺激相对较小,更接近人类的焦虑心理和精神障碍的发病机制		

注:剥夺形式均为 TSD。

该类睡眠剥夺方法大多是通过外界刺激,使实验动物产生恐惧、焦虑、愤怒等负面情绪从而达到剥夺睡眠的目的。如王莹等<sup>[19]</sup>利用足底电刺激法剥夺大鼠睡眠,进行了熊果酸的镇静催眠作用研究;张斌等<sup>[20]</sup>通过对大鼠进行慢性束缚,研究该方法对睡眠时相的影响及酸枣仁汤的干预作用;叶晓楠等<sup>[21]</sup>利用空瓶刺激法诱导大鼠产生慢性情绪应激,从而进行四逆散有效组分对慢性情绪应激所致大鼠睡眠

障碍的改善作用研究,陈光等<sup>[22]</sup>利用上述方法研究了慢性情绪应激对单胺类递质的影响及四逆散有效组分的干预作用;徐瑞鑫<sup>[23]</sup>利用饮水器电击法进行了冲突性心理应激所致大鼠睡眠障碍的中枢 5-羟色胺(5-HT)的机制研究。

**1.1.5 强迫运动剥夺法** 强迫运动剥夺法(forced locomotion technique)多应用于大鼠,此类睡眠剥夺方法形式多样,其基本原理为采用动力装置,强迫实

验动物在装置内不间断运动,从而达到睡眠剥夺的目的。目前较为常用的是旋转圆筒剥夺法和水平转台剥夺法。

①旋转圆筒剥夺法,由 Borbély 等<sup>[24]</sup>于 1979 年最先应用于睡眠研究实验中,通过圆筒的转动带动大鼠不停运动导致睡眠剥夺。装置经改良

后,可根据程序设定转动速度和方向随时间推移递增,增加大鼠自主活动,减小其在实验过程的离群感,有效降低应激反应,是较为理想的强迫运动剥夺方法<sup>[25]</sup>。

②水平转台剥夺法,由 Rechtschaffen 等<sup>[26]</sup>于 1983 年最先应用在睡眠剥夺实验中。见表 3。

表 3 强迫运动剥夺法介绍

Table 3 Introduction to forced motion models of sleep deprivation

名称	原理	剥夺形式	优点	缺点	改进方法
旋转圆筒剥夺法	通过圆筒的转动带动大鼠不停运动导致睡眠剥夺	TSD	强迫运动法睡眠剥夺效果明显,剥夺时间及强度易于掌握,重复性好,无须实验人员随时观察实验情况,减轻了实验人员工作强度 <sup>[6]</sup>	长时间运动引起机体的一系列应激反应,可能干扰睡眠剥夺的实验结果	装置转动速度和方向随时间推移递增 <sup>[25]</sup>
水平转台剥夺法	在大鼠颈部植入微电极,当电脑显示其进入睡眠时触发转盘转动 6 s,大鼠被动随着转盘转动并有可能落入水中,进而造成睡眠剥夺	TSD/SSD			

注:实验动物均为大鼠(表 5 同)。

该类睡眠剥夺方法主要是通过强迫动物运动,从而使其无法睡眠,造成虚劳失眠模型。如张林挺<sup>[27]</sup>利用跑台运动剥夺法进行了酸枣仁汤对虚劳失眠大鼠干预机制的研究。

**1.2 果蝇睡眠剥夺模型建立** 自 2000 年以来,果蝇作为一种用于睡眠研究的模型生物,为揭示睡眠的作用和机制提供了一个新的思路<sup>[28]</sup>。其不仅具有类似于哺乳动物的睡眠或睡眠相似状态,而且具有常规啮齿类和灵长类动物所不具备的研究优势。通过研究者的不断实践,果蝇的睡眠模型建立方法已经相对成熟,鉴于其对睡眠研究的高可行性及创新性意义,本文将目前建立果蝇睡眠剥夺模型的方法单独介绍。

**1.2.1 机械睡眠剥夺法** 机械睡眠剥夺法用于对果蝇进行睡眠剥夺,主要用于对药物作用机制的初步探究。见表 4。

此睡眠剥夺方法适用于药物作用机制的初步探究,多用于大样本筛选。如刘美玉等<sup>[33]</sup>利用该方法进行了酸枣仁皂苷 A 对机械刺激剥夺果蝇睡眠节律变化的干预作用研究。

**1.2.2 夜间重复光照刺激剥夺法** 夜间重复光照刺激剥夺法是利用改变环境内光照周期从而干扰果蝇的睡眠,适用于光照引起的睡眠障碍研究。见表 4。

该方法是通过扰乱实验动物的光周期,从而达到睡眠剥夺的目的,适用于生物节律紊乱对体内物质变化的实验研究。如许光辉等<sup>[34]</sup>利用该方法进

行了刺五加对果蝇睡眠剥夺模型及全基因表达谱的影响的研究;李玉萍等<sup>[35]</sup>使用该方法探究了四逆散冻干粉对睡眠剥夺果蝇头部 5-HT 含量及 5-HT<sub>1A</sub> 受体表达的影响。

**1.2.3 利用基因修饰培育失眠症果蝇** 随着基因修饰技术的成熟,研究者们已经培育出失眠症果蝇 (insomnia-like, ins-1)。利用该方法可以从基因角度进行睡眠障碍发生的机制研究。见表 4。

该类方法适用于从基因角度探讨失眠的机制。如刘思琦等<sup>[36]</sup>利用该方法探究了野生型 2 号染色体上不同基因片段缺失对其 24 h 睡眠总时间的影响;张迪等<sup>[37]</sup>进行了 Df(3R) Esp13/TM6C 片段 RNA 干扰不同基因对黑腹果蝇睡眠时间的研究。

## 2 睡眠剥夺动物模型在中医药改善睡眠研究中的应用

中药有重镇安神药和养心安神药之分,而具有改善睡眠作用的方剂也针对于不同的失眠证型,如阴虚失眠、肝郁失眠等。在中医药改善睡眠的基础研究中,如果只采用以上介绍的几种睡眠剥夺模型,虽然可以从睡眠时间与时相的比较中验证单味药或方剂改善睡眠的有效性,却不能体现其对不同失眠证型的针对性。

为了满足研究的需要,国内学术界借鉴西医动物模型的理论与方法,发展出包括自然衰老在内的证候动物模型,集中在常见的气、血、阴、阳虚证和实热、血瘀等实证。同时肖芸等<sup>[38]</sup>通过长期实验研究初步建立了小鼠的诊法及辨证标准,对建立结合中

表 4 机械睡眠剥夺法、夜间重复光照刺激剥夺法、基因修饰法介绍

Table 4 Mechanical deprivation model, Repeated light stimulation model and Gene modification model of sleep deprivation

名称	原理	优点
机械睡眠剥夺法	利用自主睡眠剥夺装置通过机械刺激干扰果蝇入睡造成睡眠剥夺。装置在发动机控制下沿主轴转动,顺时针旋转 180°至最低点使欲入睡的果蝇落至管底,之后再逆时针返回,每 30 s 可反复 3 次,每小时中只有 12 min 进行睡眠剥夺,这样连续刺激 4 h,造成果蝇睡眠总时间减少以及记忆功能损失 <sup>[29]</sup>	此方法造模效果显著,且可明显观测到造模结束后果蝇的睡眠反弹现象
夜间重复光照刺激剥夺法	通过光刺激对生物钟调节的干扰引起果蝇夜间睡眠量的减少,在果蝇培养箱中安置光照控制器,日间正常光照,夜间熄灯后,每个整点恢复光照 10 min,有研究比较了果蝇夜晚睡眠时间和睡眠深度指数,结果显示夜间重复光照可以显著减少雌雄果蝇夜间睡眠时间,降低睡眠强度 <sup>[30]</sup>	此方法可以显著剥夺果蝇睡眠,具有可重复性强、影响因素少、自动控制、操作简单等优点
基因修饰法	Ins-1 果蝇差异表达基因主要参与代谢,神经元活动和感官知觉 <sup>[31]</sup> ,连续繁衍 60 代后,Ins-1 果蝇可以稳定地表现出失眠症状,包括睡眠总时间明显减少,睡眠开始和维持困难,并伴有日间功能损害	失眠症果蝇模型的建立使果蝇睡眠研究的结果更加精准,有说服力。具对于新型镇静催眠药物研究的开展及揭示失眠对机体的长期及短期影响研究有着重要意义 <sup>[32]</sup> 。但该方法研究成本高,针对性强,对研究结果有局限性

注:实验动物均为果蝇;剥夺形式均为 SSD。

医证候的动物模型有一定借鉴意义。

目前在睡眠研究方向的中医失眠动物模型主要有阴虚失眠模型、肝郁失眠模型及心肾不交失眠模型。研究者多采用多种因素干预实验动物睡眠,造成其睡眠剥夺或入睡障碍,并兼具中医失眠相应临床指标变化,如体质质量、心率、血压等。现将这几种模型的建立方法、效果及经验小结简述。

**2.1 阴虚失眠模型** 在 D-半乳糖制作亚急性衰老模型基础上,采用咖啡因腹腔注射叠加多平台水环境持续睡眠剥夺法制作老年阴虚失眠大鼠模型<sup>[39]</sup>。以天王补心丹为模型验证药物,可有效缓解上述症状。虽然其他指标显示造模后大鼠同时出现其他证型特征,但主体上为阴虚之证。

阴虚血少证失眠大鼠模型在原有的 D-半乳糖制加多平台水环境持续睡眠剥夺法基础上,增加咖啡因腹腔注射,可以更好地模拟失眠患者睡眠节律紊乱的特点。

**2.2 肝郁失眠模型** 采用大鼠慢性夹尾刺激和 PCPA 腹腔注射复合因素建立大鼠肝郁失眠模型<sup>[40]</sup>,本模型基本上成功模拟了肝郁失眠的宏观体征,同时酸枣仁汤组对上述生化指标均有改善,也进一步佐证肝郁失眠模型的建立,该方法可行。

肝郁证的产生多因消极应激及不良情绪体验所致,中医学情志致病中以郁怒伤肝为最常见<sup>[41]</sup>,故本实验采用夹尾刺激法复制肝郁证动物模型。要想验证中医失眠模型的是否成功建立,可以选择针对

该证型的中药来佐证。

**2.3 心肾不交失眠模型** 儿童受虐待是一个常见的可能导致个体在成人期易患失眠症的早期应激,在早期母婴分离的基础上,采用多种物理刺激法结合腹腔注射 PCPA 剥夺睡眠法可制作下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴紊乱的失眠大鼠模型<sup>[42]</sup>。研究表明,交泰丸可以有效缓解大鼠的以上症状<sup>[43]</sup>。本模型较成功地模拟出经幼年受虐而导致成人期失眠的相关证候,基本符合中医心肾不交失眠的特点。

研究表明失眠与 HPA 轴亢进有关,而环境应激所致心理层面反应以及生理层面的 HPA 轴内分泌紊乱可能成为失眠的主要原因<sup>[44-45]</sup>。见表 5。

### 3 结果与讨论

目前基础研究中常用的啮齿类动物睡眠剥夺方法主要有水平台剥夺法、应激剥夺法、化学试剂剥夺法、轻柔刺激剥夺法和强迫运动剥夺法。果蝇睡眠剥夺方法主要有机械剥夺法、夜间重复光照剥夺法以及失眠症果蝇模型建立。结合脑电图监测技术,可以根据实验需要对实验动物进行完全睡眠剥夺或者使选择性睡眠剥夺。

睡眠剥夺动物模型的建立方法在不断地实践中得到了完善。比如改良多平台水环境睡眠剥夺模型和改良旋转圆筒睡眠剥夺模型,在保留原有模型的剥夺原理的基础上,大大降低了实验动物的离群感和应激反应,减少无关因素对实验动物的影响,增加了实验方案的灵活性。在中医药改善睡眠相关研究

表 5 失眠证候的睡眠剥夺动物模型的应用

Table 5 Applications of sleep deprivation model for insomnia syndrome in TCM

名称	造模方法	造模表现	应用药物
阴虚失眠模型	咖啡因腹腔注射叠加多平台水环境持续睡眠剥夺法	模型组动物睡眠时间显著减少,精神萎靡,行动迟缓,心率加快,血压升高,体质量减轻	天王补心丹
肝郁失眠模型	慢性夹尾刺激与 PCPA 腹腔注射复合法	睡眠节律消失,精神萎靡但极易受惊,对激惹常呈逃避状态,贴边弓背活动或扎堆蛰伏在角落,进食明显减少,大便较稀,毛发散乱枯燥、胡须下垂、眼角有分泌物;血液流变学高、中、低切全血黏度均升高,电镜观察肝细胞相对缺血缺氧的超微结构改变,下丘脑、海马组织的五羟色胺(5-HT)及去甲肾上腺素(NE)含量紊乱	酸枣仁汤
心肾不交失眠模型	物理刺激法结合腹腔注射 PCPA 剥夺睡眠法	睡眠时间显著减少,目光呆滞,双目、口唇呈苍白色,爪甲较光滑,皮毛重度枯槁蓬乱;血象检查血浆中红细胞数目和血红蛋白水平显著降低;血浆中促肾上腺皮质激素(ACTH),促食欲素(Orexin),促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)水平显著性升高	交泰丸

中,实验者可根据实验目的调整剥夺,控制睡眠剥夺强度,得到更准确的实验结果。而结合中医证型的睡眠剥夺模型建立,是近年来研究者们不断尝试的内容,比如肝郁证失眠大鼠模型、心肾不交失眠大鼠模型、阴虚血少证失眠大鼠模型等。

中医的证的理念,本就是对人整体病理生理的概括。一个证的表现往往涉及到多个器官或机体功能的生理或者病理变化,而证的形成,又可能源于人的不同时期。所以,如果想真正复制具有特定中医证候表现的失眠模型,就要全面考虑所采用实验动物的种类,年龄,生长环境,尽可能地还原证候产生的全部病因。如此建立规范标准的实验动物模型,才能保证中医药改善睡眠现代化研究的可靠性、重复性和科学性。睡眠剥夺动物模型在中医药改善睡眠研究领域的发展过程中还有很多需要改进的地方:①动物睡眠剥夺模型表现与人类失眠表现的贴合度不够。基本的睡眠剥夺动物模型虽然可以复制实验动物想睡但环境限制不能入睡、极度疲乏的状态,但临床中的失眠患者会同时伴有不易入睡、醒后不易再入睡的症状,这就需要实验者结合多种实验因素建立模型,尤其是结合中医失眠证型表现的睡眠剥夺模型,不能以睡眠总时间的减少作为造模成功唯一标准。②睡眠剥夺动物模型的标准化是难题。除了睡眠总时间长短以外,睡眠各时相的发生次数、每次睡眠的维持时间、实验动物的心率、血压、呼吸频率等在建立睡眠剥夺动物模型时都应得到关注,而实验动物的失眠在这些指标的变化上不能得到统一的标准,也就给结合中医证型的睡眠剥夺模型的标准化造成了阻碍。③很多中医失眠证型尚未有可行的睡眠剥夺建立方法。总结近年来各界医者

对中医失眠证型的分类,包括心火炽盛、肝郁化火、痰热内扰、阴虚火旺、心脾两虚、心胆气虚等多种<sup>[46]</sup>,还需要大量的实验研究才能探索出针对不同中医证型建立科学睡眠剥夺动物模型和完善的研究思路。

未来睡眠剥夺模型的发展,必将把重点集中在困扰特定人群或年龄阶段人群的睡眠障碍病因,以多因素造模方法为主,尽可能地减少模型建立过程中实验动物的无关应激反应,在建立符合某一类睡眠障碍特点而非单纯的睡眠时间减少的睡眠剥夺模型的基础上开展科学研究。

[参考文献]

[1] 翟艳. 失眠的药物治疗[J]. 淮海医药, 2016, 34(1):126-128.

[2] Datta S, Maclean R R. Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2007, 31(5):775-824.

[3] Cohen H B, Dement W C. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase[J]. Science, 1965, 150(3701):1318-1319.

[4] 袁蓉, 王阶, 郭丽丽, 等. 睡眠剥夺应激对心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22):16-20.

[5] 杨秦, 吕学远, 敖艳肖, 等. 玛咖脂溶性提取物对睡眠剥夺小鼠学习记忆的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2):97-102.

[6] 刘臻, 谢晨, 赵娜, 等. 失眠动物模型的制作与评价

- [J]. 中医学报, 2013, 28(12):1846-1848.
- [7] 朱蕾, 张茹, 李廷利. 刺五加对睡眠剥夺大鼠学习记忆及海马单胺类神经递质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4):219-223.
- [8] 张晓双, 孙建宁, 白黎明. 酸枣仁汤对睡眠剥夺大鼠学习记忆的影响及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(4):8-11.
- [9] 李云, 周明眉, 苟小军, 等. 姜黄素对间歇性睡眠剥夺大鼠特定肠道菌的影响[J]. 中草药, 2016, 47(5):794-798.
- [10] 徐小文. 慢性睡眠剥夺对大鼠骨量及骨代谢影响的实验研究[D]. 北京:解放军医学院, 2016.
- [11] XIE M, LI C, HE C, et al. Short-term sleep deprivation disrupts the molecular composition of ionotropic glutamate receptors in entorhinal cortex and impairs the rat spatial reference memory [J]. Behav Brain Res, 2016, 300: 70-76.
- [12] 芮霞, 游秋云, 王平. 3种不同睡眠剥夺小鼠模型的建立及其在中医药研究中的应用[J]. 湖北中医药大学学报, 2014, 16(6):8-10.
- [13] LU J, Greco M A, Shiromani P, et al. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep[J]. J Neurosci, 2000, 20(10):3830-3842.
- [14] 成光宇, 丁云录, 赵德喜, 等. 和解安神汤对肝郁脾虚证候失眠大鼠模型的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(13):3160-3162.
- [15] 买文丽, 王琼, 孙丽华, 等. 开心散对睡眠剥夺小鼠学习记忆的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10):2331-2333.
- [16] James G W L, Piper D C. A method for evaluating potential hypnotic compounds in rats[J]. J Pharmacol Met, 1978, 1(2):145-154.
- [17] 于鑫. 慢性情绪应激所致大鼠睡眠剥夺模型复制及酸枣仁的干预作用研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2012.
- [18] 张冰, 李廷利. 知母水煎剂对空瓶刺激诱发的慢性情绪应激的干预作用[J]. 中医药学报, 2012, 40(5):22-24.
- [19] 王莹, 黄莉莉, 李廷利. 熊果酸的镇静催眠作用研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(25):13584-13585.
- [20] 张斌, 张乔, 马英男. 慢性束缚应激对大鼠睡眠时相的影响及酸枣仁汤的干预作用[J]. 中医药信息, 2014, 31(4):126-129.
- [21] 叶晓楠, 陈光, 卞宏生, 等. 四逆散有效组分对慢性情绪应激所致大鼠睡眠障碍的改善作用研究[J]. 中医药学报, 2017, 45(2):6-10.
- [22] 陈光, 叶晓楠, 李廷利. 空瓶刺激诱导的慢性情绪应激对单胺类递质的影响与四逆散有效组分干预作用的研究[J]. 中医药学报, 2016, 44(2):33-36.
- [23] 徐瑞鑫. 冲突性心理应激所致大鼠睡眠障碍的中枢5-HT的机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2013.
- [24] Borbély A A, Neuhaus H U. Sleep-deprivation: effects on sleep and EEG in the rat [J]. J Compar Physiol, 1979, 133(1):71-87.
- [25] Leenaars C H, Dematteis M, Joosten R N, et al. A new automated method for rat sleep deprivation with minimal confounding effects on corticosterone and locomotor activity [J]. J Neur Meth, 2011, 196(1):107-117.
- [26] Rechtschaffen A, Gilliland M A, Bergmann B M, et al. Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats [J]. Science, 1983, 221(4606):182-184.
- [27] 张林挺. 酸枣仁汤对虚劳失眠大鼠干预机制的研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2009.
- [28] Greenspan R J, Tononi G, Cirelli C, et al. Sleep and the fruit fly [J]. Trends Neurosci, 2001, 24(3):142-145.
- [29] Eric L G, Laurent S, Shaw P J, et al. Circadian modulation of consolidated memory retrieval following sleep deprivation in drosophila [J]. Sleep, 2012, 35(10):1377-1384.
- [30] 许光辉, 李廷利. 夜间重复光照刺激建立果蝇睡眠剥夺模型的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8):2044-2045.
- [31] Laurent S, Yasuko S, Matthew T, et al. Identifying sleep regulatory genes using a drosophila model of insomnia[J]. J Neurosci, 2009, 29(22):7148-7157.
- [32] 黄莉莉, 冯湘雯, 卞宏生, 等. 果蝇作为睡眠模型的研究进展[J]. 中国药物依赖性杂志, 2014, 23(3):166-169.
- [33] 刘美玉, 刘晓岩, 卞宏生, 等. 酸枣仁皂苷 A 对机械刺激剥夺果蝇睡眠节律变化的干预[J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(4):679-680.
- [34] 许光辉, 李廷利. 刺五加对果蝇睡眠剥夺模型睡眠及全基因表达谱的影响[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5):119-122.
- [35] 李玉萍, 徐瑞鑫, 李廷利, 等. 四逆散冻干粉对睡眠剥夺果蝇头部5-HT含量和5-HT1A受体表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20):2749-2751.
- [36] 刘思琦, 李廷利. 野生型果蝇的2号染色体上不同基因片段缺失对其24h睡眠总时间的影响[J]. 中医药学报, 2014, 42(5):20-23.
- [37] 张迪, 张可兴, 黄莉莉, 等. Df(3R)Esp13/TM6C片段RNA干扰不同基因对黑腹果蝇睡眠时间的影响[J]. 中国药物依赖性杂志, 2013, 22(2):112-115.
- [38] 肖芸, 方肇勤. 中医证候动物模型的研究进展[J].

- 内蒙古中医药, 2008(10):64-66.
- [39] 黄攀攀, 王平, 李贵海, 等. 老年阴虚失眠动物模型的建立与评价[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1719-1723.
- [40] 朱洁, 申国明, 汪远金, 等. 肝郁证失眠大鼠模型的建立与评价[J]. 中医杂志, 2011, 52(8):689-692.
- [41] 马作峰, 姜瑞雪, 王平, 等. 《内经》制怒方法初探[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(2): 149-150.
- [42] 郜红利, 涂星, 卢映, 等. 心肾不交所致失眠大鼠模型[J]. 中成药, 2014, 36(6):1138-1141.
- [43] 王红丹. 交泰丸“交通心肾”的配伍机制研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2008.
- [44] Nutt D, Wilson S, Paterson L. Sleep disorders as core symptoms of depression[J]. Dialogues Clin Neurosci, 2008, 10(3):329-336.
- [45] 毛昌淳, 方肇勤, 吴敦序, 等. 补肾定喘汤对哮喘大鼠血 CORT、下丘脑 CRH mRNA 表达的影响[J]. 中成药, 2003, 25(6):468-470.
- [46] 元启祥. 失眠的病因病机及辨证分型的研究[D]. 天津:天津中医学院, 2005.

[责任编辑 全燕]