

脾阳虚证失眠大鼠模型的建立和附子理中汤的干预效应

韦祎¹, 唐汉庆^{2*}, 李克明², 李晓华², 朱晓莹²

(1. 海南医学院, 海口 571199; 2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

[摘要] **目的:**探讨附子理中汤对脾阳虚证失眠大鼠下丘脑增食素(orexin) mRNA 表达及下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA axis)的影响及机制。**方法:**100 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、附子理中汤低剂量组, 中剂量组和高剂量组 5 组, 每组 20 只。模型组按 400 mg·kg⁻¹ ip 对氯苯丙氨酸(PCPA)每天 1 次, 连续 2 d, 建立脾阳虚证失眠模型。低剂量组、中剂量组、高剂量组分别以附子理中汤 10, 20, 40 g·kg⁻¹ ig, 每日 1 次, 连续 7 d。疗程结束后对各组大鼠用 ELISA 法检测下丘脑 5-羟色胺(5-HT)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)及血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)含量, RT-PCR 法检测下丘脑 orexin mRNA 表达。**结果:**与正常组相比, 模型组 orexin mRNA 表达量显著升高($P < 0.01$), 5-HT 含量显著降低($P < 0.01$); CRH, ACTH 含量显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比, 附子理中汤高剂量组 orexin mRNA 表达量显著降低($P < 0.01$), 附子理中汤高、中剂量组 5-HT 含量显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$); 高剂量组 CRH, ACTH 含量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**附子理中汤下调 orexin mRNA 表达, 抑制 HPA 轴激活, 降低应激反应性, 可能是其治疗失眠的机制之一。

[关键词] 附子理中汤; 增食素; 失眠; 脾阳虚证

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0289-04

[doi] 10.11653/syfj2013160289

Establishment of Rat Spleen Yang Deficiency Syndrome Insomnia Model and Effect of Fuzi Lizhong Decoction on it

WEI Yi¹, TANG Han-qing^{2*}, LI Ke-ming², LI Xiao-hua², ZHU Xiao-ying²

(1. Hainan Medical University, Haikou 571199, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effect of Fuzi Lizhong decoction on the expression of hypothalamic orexin mRNA and hypcthalamopitutory-adrenol (HPA) axis in insomnia rats with spleen Yang deficiency syndrome and therapeutic mechanism. **Method:** Handred rats were randomly divided into control group, model group, low-dose group, middle-dose group, and high-dose group 5 groups. each group included 20 rats. Model rats were ip p-chlorophenylalanine (PCPA) according to 400 mg·kg⁻¹, once a day for two days to establish insomnia model. low-dose group, middle-dose group, and high-dose group were ig given Fuzi Lizhong decoction respectively with 10, 20, 40 g·kg⁻¹ based on model group for 7 days. **Result:** Compared with control group, expression of orexin mRNA of model group increased significantly ($P < 0.01$). Compared with control group, content of 5-hydroxy tryptamine (5-HT) of model group reduced significantly ($P < 0.01$). Compared with control group, content of corticotropin-releasing bormone (CRH) of model group increased ($P < 0.05$). Compared with control group, content of adrenocorticotropic hormone (ACTH) of model group increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, expression of orexin mRNA of treatment group reduced significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, content of 5-HT of treatment group increased significantly ($P < 0.01$) and content of 5-HT in middle-dose group increased ($P < 0.05$). Compared with model group, content of CRH of treatment group reduced ($P < 0.05$). Compared with model group, content of ACTH of treatment group reduced significantly ($P <$

[收稿日期] 20130318(028)

[通讯作者] * 唐汉庆, 副教授, 医学博士, 从事中西医结合基础研究, Tel: 0776-2849479, E-mail: iloveyouverymuch0000@yahoo.com.cn

0.01)。 **Conclusion:** Fuzi Lizhong decoction can reduce expression of Orexin mRNA and so that inhibit HPA axis to reduce stress reaction, which perhaps is one of mechanisms for insomnia treatment.

[**Key words**] Fuzi Lizhong decoction; orexin; insomnia; spleen yang deficiency syndrome

对氯苯丙氨酸(PCPA)腹腔注射法复制失眠大鼠模型,具有模拟临床失眠症状程度较高、可重复性较好、造模时间较短等优点,是目前比较得到认可的大鼠失眠模型造模法^[1],国内在开展中医药治疗失眠的研究时也有部分采用此造模法,但中医学重视辨证论治,以复合因素建立病与证结合的动物模型或许更能体现中医科研的特点。《内经》主要以营卫运行、阴阳变化阐释睡眠生理,“阳虚不寐”是失眠的病机之一,其中阳虚有心阳虚、肾阳虚、脾阳虚等之分,如果脾阳不足,清阳不升,胃失和降,“胃不和则卧不宁。”表现为入睡困难或多梦易醒,因此,本工作探索建立脾阳虚证失眠大鼠模型,以附子理中汤进行干预,观察与失眠相关的下丘脑增食素(orexin) mRNA、下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA axis)递质 5-羟色胺(5-HT)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)的变化,探讨其干预机制,为失眠从脾论治提供思路。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠,雌雄兼用,体质量 180~210 g,本院科学实验中心提供,动物许可证号 SCXK(桂)2010-0007。

1.2 药物 附子理中汤由炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草组成,实验所用单味药由本校药理教研室提供。经本院药理教研室鉴定:附子为毛茛科植物乌头(*Aconitum carmichaeli* Debx.)的子根;党参为桔梗科植物党参 [*Codonopsis pilosula* (franch.) Nannf.] 的干燥根;白术为菊科植物白术 (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) 的干燥根;干姜为姜科植物姜 (*Zingiber officinale* Rosc.) 的干燥根茎;甘草为乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 的根。

1.3 试剂 PCPA(Sigma 公司,批号 64898MJ);乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司,批号 20080610);氯仿(批号 20110322)、异丙醇(批号 20100811)、75%乙醇(批号 102110)(北京化学试剂公司);Trizol(Gibcobl 公司);M-MLV(Piomegan 公司);Tag 酶、DNAMark(北京博奥公司);Orexin 基因引物(Invitrogen 公司)。5-HT, CRH, ACTH ELISA 试剂盒(R&B 公司,USA)。

1.4 仪器 AE160 型电子天平(瑞士 Mettler 公司);DY-89 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝公司);PK121R

型高速低温离心机(ALC 公司);MDF-U72V 型超低温冰箱(日本三洋公司);MK3 型酶标仪(Thermo Labsystem 公司);7900HT 型 PCR 仪(ABI 公司);DU530 型紫外分光光度仪(Beckman 公司)。

2 方法

2.1 动物分组和造模 100 只大鼠适应性喂养 1 周后,随机数字表法分为正常组、模型组、附子理中汤低剂量组,中剂量组和高剂量组 5 组,每组 20 只。
①正常组:普通饲料,自由饮水摄食,常态环境喂养。
②模型组:施行肩胛骨间棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)切除术,术后饲以高脂饲料(83%基本饲料,15%甘油三酯,2%胆固醇),19℃环境喂养 3 周。3 周后第 1 天 PCPA 400 mg·kg⁻¹ ip (PCPA 临用前以弱碱性生理盐水配置成 40 g·L⁻¹ 混悬液),每天 1 次,连续 2 d,正常组以生理盐水替代 PCPA 进行 ip。第 2 天 PCPA ip 后 30 h,大鼠白天夜晚活动不停,而对照组昼夜节律正常,表明模型复制成功。
③低剂量组:在模型组基础上,附子理中汤按 10 g·kg⁻¹ ig,每日 1 次,连续 ig 7 d。
④中剂量组:附子理中汤按 20 g·kg⁻¹ ig,余同③。
⑤高剂量组:附子理中汤按 40 g·kg⁻¹ ig,余同③。对照组和模型组给予等容积的生理盐水 ig。全部 5 组在第 8 天断头取血及脑组织。在冰床上分离下丘脑,液氮冻存备用。

2.2 附子理中汤制备 炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草按照原方 3:5:4:3:2 的比例,诸药分开均先经蒸馏水浸泡 30 min,炮附子先煎 1 h,后纳入其余诸药,煎煮两次(40 min/次),期间将两次药液纱布过滤,合并,水浴加热浓缩至含生药量为 2 g·mL⁻¹ 浓度的药液,杀菌,贮存于 4℃冰箱内备用。

2.3 ELISA 法检测 5-HT, CRH, ACTH 含量 取下丘脑 1.5 mm×1.5 mm×1.5 mm 组织,称重后立即标记置于 3 mL 冻存管,按照 5-HT 及 CRH ELISA 试剂盒说明书要求进行检测。取血 3 mL,3 000 r·min⁻¹,离心 20 min,分离血清,取 100 μL, -70℃冻存,按照 ACTH ELISA 试剂盒说明书要求进行检测。

2.4 RT-PCR 法检测下丘脑 orexin mRNA 表达 取 100 μL 下丘脑组织匀浆,用 Trizol 试剂提取总 RNA,氯仿和异丙醇抽提。紫外分光光度仪和琼脂糖电泳鉴定 RNA 的浓度和纯度,取 10 μL 根据逆

转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA, -70 °C 冻存备用。取 5 μL 逆转录产物进行 PCR 扩增反应,并以 GAPDH 为内对照。orexin 基因引物由 Invitrogen 公司设计合成。

PCR 反应条件:92 °C 预变性 2 min→92 °C 变性 45 s→60 °C 退火 45 s→72 °C 延伸 50 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。具体序列及扩增长度见表 1。

表 1 引物序列及扩增长度

引物	引物序列(5'-3')	扩增长度 /bp
orexin	CGTGGACCGATATGCCAGTG	312
	GCGACTGCCTTAGGCCTAAG	
GAPDH	CCTGCATAGCCATGCGCCAAGT	112
	GGACGTTTCAGATCGGGGATCA	

PCR 扩增反应产物经 2% 琼脂糖电泳,溴化乙锭染色,通过凝胶电泳分析系统读取目的基因灰度值,将目的基因灰度值与 GAPDH 基因灰度值的比

值作为目的基因 mRNA 的表达量,目的基因 mRNA 的表达量 = 目的基因灰度值/GAPDH 基因灰度值。

2.5 统计学处理 数据统计采用 SPSS 13.0 软件。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。*t* 检验分析组间差异。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 全部大鼠纳入统计分析,没有脱落。

3.2 各组大鼠 orexin mRNA 表达及 5-HT, CRH, ACTH 含量 与正常组 orexin mRNA 表达量相比,模型组显著升高(*P* < 0.01);与正常组 5-HT 含量相比,模型组显著降低(*P* < 0.01);与正常组 CRH 含量相比,模型组升高(*P* < 0.05);与正常组 ACTH 含量相比,模型组显著升高(*P* < 0.01)。

与模型组 orexin mRNA 表达量相比,高剂量组显著降低(*P* < 0.01);与模型组 5-HT 含量相比,高剂量组显著升高(*P* < 0.01),中剂量组升高(*P* < 0.05);与模型组 CRH 含量相比,高剂量组降低(*P* < 0.05);与模型组 ACTH 含量相比,高剂量组显著降低(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 各组大鼠 orexin mRNA 表达及 5-HT, CRH, ACTH 含量($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	orexin mRNA 相对表达	5-HT /ng·mg ⁻¹	CRH /pg·mg ⁻¹	ACTH /ng·L ⁻¹
正常	-	0.602 ± 0.008	53.02 ± 4.96	20.12 ± 7.86	26.03 ± 2.96
模型	-	6.865 ± 0.226 ²⁾	21.36 ± 2.02 ²⁾	32.21 ± 9.26 ¹⁾	56.28 ± 3.65 ²⁾
附子理中汤	40	0.968 ± 0.012 ⁴⁾	50.86 ± 4.16 ⁴⁾	23.25 ± 8.23 ³⁾	24.35 ± 3.08 ⁴⁾
	20	5.847 ± 0.215	34.86 ± 3.01 ³⁾	30.25 ± 9.18	49.35 ± 5.32
	10	6.211 ± 0.254	25.86 ± 2.64	31.66 ± 9.22	53.35 ± 5.86

注:与正常组比较¹⁾*P* < 0.05,²⁾*P* < 0.01;与模型组比较³⁾*P* < 0.05,⁴⁾*P* < 0.01。

4 讨论

中医学称失眠为“不寐”或“目不瞑”,《素问·生气通天论篇》指出:“因于寒,欲如运枢,起居如惊,神气乃浮……,阳气者,精则养神,柔则养筋。”说明阳气在养神定志方面的重要作用,如果机体阴寒内盛,阳气衰弱,虚阳浮越,则心神得不到基本的温煦濡养,由此造成“虚烦不得眠”的情形,因此《证治要诀·不寐》有“病后虚弱及年高人阳衰不寐”的论说,认为“阳虚”是“不寐”的重要病机之一,中医临床治疗阳虚不寐,有从心、从肾论治,然从脾论治不应忽略,脾阳升清不足,清窍失养,也可导致虚烦不眠。本工作从这些论说和思路出发,结合与失眠相关的递质等变化探讨脾阳虚失眠的证治和机制。

4.1 脾阳虚失眠动物模型的建立 中医学强调辨证论治,建立与证结合的动物模型更能体现中医科

研的特点,笔者在以往有关脾阳虚证的研究中^[2-4],参考有关脾阳虚大鼠造模文献和评价标准^[5-7],采用 BAT 切除术,由于 BAT 是成年动物主要的产热物质^[8-9],切除 BAT 后,减少大鼠产热物质,大幅衰减其阳气,而后采用高脂饮食并置大鼠于较低温度环境下,模拟“肥甘厚赋”、“寒伤中阳”导致的脾虚,使脾虚和阳虚症状同时具备,从而制备了脾阳虚大鼠模型。由于 PCPA 腹腔注射法复制失眠大鼠模型是目前国内外应用较多的方法,因此,本实验工作采用“BAT 切除术”加上 PCPA 腹腔注射法建立脾阳虚失眠动物模型,其效果有待实践检验。

4.2 orexin 对正常睡眠-觉醒周期的调控 orexin 是觉醒通路中一种重要的下丘脑神经肽,对正常睡眠-觉醒周期的调控起着关键的作用,研究证实 orexin 使大鼠的觉醒时间增长,慢波睡眠和快眼动

睡眠减少^[10], orexin 促觉醒作用的具体表现就是兴奋脑干 REM-off 神经元,引起组胺释放,促进觉醒^[11],在本实验工作中观察到,模型组的 orexin mRNA 表达量与正常组相比显著升高($P < 0.01$),提示 orexin 是维持觉醒状态的重要因素,也启示 orexin 有可能作为发作性睡病诊断的一个特异性指标。

4.3 orexin 与下丘脑 5-HT, CRH 及 ACTH 的关联性 HPA axis 激活引起的应激是失眠的重要原因,HPA axis 激活使 CRH 及 ACTH 含量升高,orexin 的促觉醒作用主要通过激活 5-HT 能神经元,进而激活 HPA axis, CRH, ACTH 合成和分泌增多,提高应激性,抑制睡眠活动,促进并维持觉醒^[12]。因此推测 orexin 表达增高应同时伴随有 5-HT, CRH 及 ACTH 的升高,在本实验工作中观察到,和正常组 orexin mRNA 表达, CRH, ACTH 含量相比,模型组均增高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),但 5-HT 含量降低,推测这是由于腹腔注射 PCPA 所致,PCPA 是一种 5-HT 合成抑制剂,抑制大鼠下丘脑 5-HT 的合成。高剂量组和模型组比较,orexin mRNA 表达, CRH 含量, ACTH 含量均降低,趋向于正常组水平,5-HT 含量升高,也趋向于正常组水平,提示 orexin mRNA 表达和 CRH 含量, ACTH 含量可能存在正相关,推测附子理中汤下调 orexin mRNA 表达,抑制 HPA 轴激活,降低应激反应性,促进觉醒向睡眠的转化过程,有可能是其治疗失眠的一个机制。

[参考文献]

[1] Revel F G, Go ttowik J, Gatt I S, et al. Rodent models of insomnia: A review of experimental procedures that induce sleep disturbances [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009, 33(6):874.

[2] 唐汉庆,张文通,王勇,等.脾阳虚证大鼠胃生长素改变的实验研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(12):1136.

[3] 吴云起,唐汉庆,吴翠松,等.脾阳虚证大鼠棕色脂肪组织和解偶联蛋白 1 关联性的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(14):206.

[4] 唐汉庆. 附子理中汤对脾阳虚证大鼠血糖、甘油三酯及总胆固醇的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(15):230.

[5] 张文通,唐汉庆,卢阿娜,等. 附子理中丸对脾阳虚证大鼠肝脏能荷的下调机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(35):3782.

[6] 杨雪,杨文思,王勇,等. 脾阳虚证中阳虚症状群的实验评价[J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(3):244.

[7] 杨雪,杨文思,王勇,等. 脾阳虚消化不良症状群客观评价的实验研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2008, 14(4):271.

[8] Smith R E, Horwitz B A. Brown fat tissue and thermogenesis [J]. *Physiol Rev*, 1969, 49(2):330.

[9] Nicholls D G, Locke R M. Thermogenic mechanisms in brown fat [J]. *Physiol Rev*, 1984, 64(1):1.

[10] Gerashchenko D, Kohls M D, Greco M, et al. Hypocretin-2 saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(18):7273.

[11] Sakurai T. Roles of orexins in regulation of feeding and wakefulness [J]. *Neuroreport*, 2002, 13(8):987.

[12] Martins P J, Marques M S, Tufik S, et al. Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia, and metabolic changes in response to sleep deprivation [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298(3):E726.

[责任编辑 聂淑琴]

天津中医药大学期刊编辑部 2014 年征订启事

《天津中医药》月刊,每期 8 元,年定价 96 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-83 电子邮件:zhongyiyao@vip.126.com, xuebaobj@126.com,网址:http://www.tjzhongyiyao.com,地址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。

《天津中医药大学学报》双月刊,每期 6 元,年定价 36 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-153,电子邮件:xuebaobj@vip.126.com, xuebaotxd@126.com,网址:http://www.tjzhongyiyao.com,地址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。