

老年肝郁失眠证候大鼠模型的建立和评价

游秋云^{1,2}, 王平^{2*}, 田代志², 张舜波¹, 黄攀攀²

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065;

2. 湖北中医药大学国家中医药管理局老年性痴呆醒脑益智重点实验室, 武汉 430065)

[摘要] 目的:建立并评价复合型老年肝郁失眠证候大鼠模型。方法:Wistar 大鼠随机分为环境对照组,单因素模型组(睡眠剥夺组),复合型模型组,复合型模型+舒郁安神方 35 g·kg⁻¹·d⁻¹治疗组。采用 D-半乳糖腹腔注射 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 大鼠 6 周致亚急性衰老模型,然后采用夹尾刺激法致肝郁,每次刺激 30 min,1 日 2 次,持续 1 周,最后放入自制睡眠剥夺箱中进行快速眼动睡眠(REMS)剥夺 48 h,制作老年肝郁失眠证候大鼠复合型模型。观测大鼠体征、脑部自由基水平及血浆 6-酮-前列腺素 F1a(6-keto-PGF1a)、血栓素 B₂(TXB₂)含量。结果:与环境对照组、单因素模型组、舒郁安神方组比较,老年肝郁失眠证候复合型模型组大鼠丙二醛(MDA)、TXB₂ 含量均显著升高(P<0.01),而超氧化物歧化酶(SOD)活性、6-keto-PGF1a 含量及 6-keto-PGF1a/TXB₂ 均显著降低(P<0.01)。结论:老年肝郁失眠证候大鼠模型具有临床证候病理特征,是可行、可靠的复合型动物模型。

[关键词] 大鼠模型;睡眠剥夺;肝郁

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0222-04

[收稿日期] 20120626(017)

[基金项目] 湖北省科技厅研究与开发计划项目(2010BCB004)

[第一作者] 游秋云,博士,副教授,从事失眠等神经精神类相关中药药理学研究,Tel:15337237059,E-mail:youqiuyun@126.com

[通讯作者] *王平,教授,博士生导师,从事老年脑病及失眠等心身疾病的中医药防治研究,Tel:027-68890008,E-mail:pwang54@yahoo.com.cn

[参考文献]

- [1] 于普林,李增金. 老年人便秘流行病学特点的初步分析[J]. 中华老年医学杂志,2001,20(2):132.
- [2] 阙志超,姚宏昌,龙治平,等. 天津市成年人慢性便秘调查及相关因素分析[J]. 中华消化杂志,2004,24(10):612.
- [3] Motola G, Mazzeo F, Rinaldi B, et al Self-prescribed laxative use: a drug-utilization review[J]. Adv Ther, 2002,19:203.
- [4] 童卫东,张胜本,刘宝华,等. 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响[J]. 世界华人消化杂志,2003,11(5):665.
- [5] Rumessen J J, Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal in human small intestine. Ultrastructural identification and organization between the main smooth muscle layers[J]. Gastroenterology,1991,100(5 Pt 1):1417.
- [6] Rich A, Miller S M, Gibbons S J, et al. Local presentation of Steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(2):G313.
- [7] Wedel T, Spiegler J, Soellner S, et al. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon [J]. Gastroenterology,2002,123(5):1459.
- [8] Lyford G L, He C L, Soffer E, et al. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation[J]. Gut,2002,51(4):496.
- [9] Lee J I, Park H, Kamm M A, et al. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon [J]. J Gastroenterol Hepatol,2005,20(8):1292.
- [10] 蒋卫忠. 益气养血法对小鼠胃肠动力影响的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(1):46.

[责任编辑 聂淑琴]

Establishment and Evaluation of the Old Rat Model with Ganqi Stagnation Syndromes of Insomnia

YOU Qiu-yun^{1,2}, WANG Ping^{2*}, TIAN Dai-zhi², ZHANG Shun-bo¹, HUANG Pan-pan²

(1. Pharmacy Institute of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Key Laboratory of Dementia on Xingnao Yizhi, The National Chinese Medicine Administrative Bureau, Wuhan 430065, China)

[Abstract] Objective: To establish and evaluate the old rat model with Ganqi stagnation syndromes of insomnia. **Method:** Wistar rats were randomly divided into 4 groups: control, single-factor model, the multi-factor model, the multi-factor model + Shuyu Anshen Fang treatment. The old rat model with Ganqi stagnation Syndromes of insomnia was induced by intraperitoneal injection of *D*-galactose 60 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ for six weeks, and then clamping tail stimulus for one week was used to establish Ganqi stagnation model, and REM sleep deprivation for 48 hours was carried out by using modified multiple platform method (MPPM). Then features of physical sign, free radicals in brain, and the contents of 6-keto-prostaglandin F1a (6-keto-PGF1a), thromboxane B₂ (TXB₂) in blood plasma were analyzed. **Result:** Compared with all the other groups (control group, treatment group and single-factor model group), the multi-factor model group with Ganqi stagnation showed the higher levels of malondialdehyde (MDA) and TXB₂ ($P < 0.01$), and the lower levels of superoxide dismutase (SOD), 6-keto-PGF1a and the ratio of 6-keto-PGF1a/TXB₂ ($P < 0.01$). **Conclusion:** The composite animal model showed pathological features of clinical Ganqi stagnation syndromes. It is a feasible and reliable composite animal model.

[Key words] rat model; sleep deprivation (SD); Ganqi stagnation

老年失眠作为临床常见病及多发病,正日益受到关注。从本人临床跟师治疗老年失眠症的经验来看,老年肝郁型失眠患者所占比例相对较多。目前国内实验研究报道相对最多的失眠动物模型是采用单因素睡眠剥夺模型^[1],而证候模型作为中医理论和中药研究不可缺少的技术平台一直倍受关注。因此,本实验针对老年人多闲思杂虑、易表现为肝郁失眠之临床特点,以病、证结合动物模型为基础,运用情志因素首次建立了老年肝郁型失眠证候大鼠模型,并将这种复合型模型与传统单因素睡眠剥夺模型进行对照比较,且以临床有效验方舒郁安神方防治给药测证,以确认这种模型的证候属性,为老年失眠证候模型进行有意义的探索,为中医药防治失眠的进一步研究提供良好的实验基础。

1 材料

1.1 动物及分组 健康雌雄各半 Wistar 大鼠 32 只,体重(200 ± 20) g,由湖北省实验动物研究中心提供,许可证号 SCXK(鄂)2003-0005。

1.2 药品与试剂 *D*-半乳糖(上海试剂二厂,批号 070124);6-酮-前列腺素 F1a(6-keto-PGF1a) 放免试剂盒、血栓素 B₂(TXB₂)放免试剂盒(由北京普尔伟

业生物科技有限公司提供,20080302);考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、丙二醛(SOD)试剂盒、超氧化物歧化酶(MDA)试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所,20080324)。

1.3 仪器 睡眠剥夺箱(自制),为长 72 cm,宽 48 cm、高 30 cm 的鼠箱,内置 6 个连体直径为 8 cm,高为 8 cm 的小平台(呈 2 × 3 排列)。给箱体内部注水,使水面距箱体内平台面约 1.0 cm,大鼠在平台上可自行饮食饮水,并可在不同平台上自由活动。于平台之上放笼罩,罩笼以平行的不锈钢丝制成,上面放水和食物。环境对照箱(自制),与睡眠剥夺箱相似,但在距其底部 8.0 cm 处不放置平台,而是放置一面细密铁丝网,大鼠在网上可自行饮食饮水及自由活动,以形成与模型组相似的水环境。2K15 型超速低温冷冻离心机, NP-R20 型三星笔记本电脑, KingstonFL-300SI 型摄像头。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠随机分成 4 组,环境对照组;单因素模型组(睡眠剥夺组);复合型模型组;复合型模型 + 舒郁安神方 35 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 治疗组。

2.2 老年肝郁失眠证候模型的制作 按文献[2-4]

复制复合型老年肝郁失眠证候模型。大鼠腹腔注射 *D*-半乳糖 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 6 周,以制备亚急性衰老动物模型;然后采用夹尾刺激法致肝郁,即用尖端包裹纱布的大弯止血钳夹住其中一只大鼠的尾巴,令其与笼中其他大鼠撕打,从而激怒全笼大鼠,令全笼大鼠处于对峙状态,每次夹尾刺激 30 min,1 日 2 次,持续 1 周;最后放入自制睡眠剥夺箱中进行快速眼动睡眠(REMS)剥夺 48 h。当大鼠在睡眠剥夺箱中小平台上进入 REMS 时相时,全身肌肉松弛,会落入平台下面的水中而惊醒,再重新爬上平台,维持清醒状态站立。

2.3 单因素模型(睡眠剥夺组)及环境对照 睡眠剥夺组大鼠放入睡眠剥夺箱仅给予 REMS 剥夺 48 h 处理。环境对照组大鼠放入环境对照箱,给等容量的生理盐水。

2.4 给药 造模结束后开始给药,根据人和动物按体表面积折算的等效剂量,舒郁健脑方组给药剂量为 $35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。其他组给予等体积生理盐水,连续灌服 2 周,每日 1 次。

2.5 检测指标 对各组大鼠进行体表特征观测并通过监控摄像记录睡眠剥夺期间各组大鼠的睡眠时间,每隔 2 周用电子秤测量体重 1 次。最后 1 次灌

胃给药后将各组大鼠摘眼球取血,低温离心后取上清液,样本送交湖北省中医院同位素测定室,放免法检测大鼠血浆中的 6-keto-PGF1a 以及 TXB₂ 的含量,然后立即处死实验大鼠取出全脑,分别采用黄嘌呤氧化酶法及硫代巴比妥酸法测定脑组织中 SOD,MDA^[5],所有指标当天测完。操作方法严格按照试剂盒说明书进行。

2.6 统计学方法 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据采用 SPSS 12.0 统计软件包软件分析,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 造模期间各组大鼠的体表特征及总睡眠量 *D*-半乳糖造模期间,观察到老年肝郁失眠模型组大鼠普遍出现食少、拱背嗜睡、毛色发黄及严重掉毛等衰老特征,体重明显下降($P < 0.01$),见表 1。而其他组大鼠表现健康正常。肝郁造模期间,观察到老年肝郁失眠模型组大鼠逐渐出现活动明显减少,眼色暗红,激惹呈回避反应等表现。通过摄像记录观察 REMS 剥夺期间,与环境对照组比较,单因素模型组及老年肝郁失眠模型组大鼠表现出 REMS 被完全剥夺,总睡眠量明显减少。

表 1 各组大鼠造模期间不同时间点的体重变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	第 0 周	第 3 周	第 6 周
环境对照	207.31 ± 11.05	332.75 ± 20.40	410.77 ± 16.86
单因素模型	205.89 ± 13.41	327.38 ± 21.10	423.56 ± 24.25
老年肝郁失眠模型	205.43 ± 15.69	275.04 ± 24.21 ^{1,3)}	327.71 ± 24.98 ^{1,2)}

注:与环境对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与单因素模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 SOD 活性和 MDA 含量的测定 与环境对照组、单因素模型组、舒郁健脑方组比较,老年肝郁失眠模型组大鼠脑组织 SOD 活性显著降低、MDA 含量显著升高($P < 0.01$),提示 *D*-半乳糖造亚急性衰老模型成功。见表 2。

3.3 血浆 6-keto-PGF1a, TXB₂ 含量的测定 与环境对照组、单因素模型组、舒郁健脑方组比较,老年肝郁失眠模型组大鼠血浆中 TXB₂ 明显升高,6-keto-

表 2 各组大鼠脑组织 SOD 活性,MDA 含量测定($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD	MDA
		$/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	$/\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
环境对照	-	216.74 ± 15.81	12.12 ± 1.45
单因素模型	-	217.41 ± 14.80	14.24 ± 2.19
老年肝郁失眠模型	-	125.63 ± 18.34 ^{1,2,3)}	23.45 ± 1.84 ^{1,2,3)}
舒郁健脑方	35	160.45 ± 17.74	18.47 ± 1.78

注:与环境对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与单因素模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与舒郁健脑方组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 各组大鼠血浆中 6-keto-PGF1a, TXB₂ 及 6-keto-PGF1a/TXB₂ 的变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	6-keto-PGF1a/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	TXB ₂ / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	6-keto-PGF1a/TXB ₂
环境对照	-	66.45 ± 4.92	184.28 ± 9.06	0.36 ± 0.02
单因素模型	-	65.13 ± 6.24	189.69 ± 5.06	0.36 ± 0.03
老年肝郁失眠模型	-	43.54 ± 8.72 ^{1,2,3)}	286.76 ± 5.01 ^{1,2,3)}	0.15 ± 0.10 ^{1,2,3)}
舒郁健脑方	35	55.54 ± 7.02	230.46 ± 4.81	0.24 ± 0.07

PGF1a 及 6-keto-PGF1a/TXB₂ 明显下降 ($P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

中医学认为老年失眠的病因病机比较复杂,前期已对此做相关探讨^[6]。常见病因为由于老年人思虑太过或情志不遂,肝气郁结,气机失调,郁滞不畅;加之脏腑功能减退,脾失健运,水谷运化失常。津液潴留,则凝聚生痰,痰浊直迷心窍,蔽阻心神,也可上蒙清空,伤及元神,神不安则不寐,因此病机为肝气郁结,痰迷心窍。现代医学认为,自由基学说是目前解释衰老的重要学说,因此本实验用 *D*-半乳糖制作亚急性衰老模型,并通过自由基水平的改变来评价亚急性衰老模型。另外,^[7]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,故本实验采用夹尾刺激法复制肝郁证动物模型。肝郁与血瘀是郁证中两个紧密相关的病理过程,即所谓“肝郁致瘀”。血瘀证与血浆中前列环素(PGI₂)、血栓素 A₂(TXA₂)的平衡失调密切相关。PGI₂是强烈的血小板聚集抑制剂和血管舒张剂, TXA₂与其作用相反,有强烈的促血小板聚集、收缩血管及溶细胞作用。通过观察 PGI₂和 TXA₂的稳定代谢产物 6-keto-PGF1a 和 TXB₂的变化,可反映 PGI₂, TXA₂的水平^[3]。因此,本实验根据中医辨证论治的指导思想,结合现代医学首次采用了 *D*-半乳糖 + 夹尾刺激 + 睡眠剥夺来建立复合型老年肝郁失眠证候大鼠模型。

已有研究证实了复方中药对抑郁症引起的失眠具有良好疗效,并探索了相关作用机制^[8-9]。舒郁安神方是我校王平教授针对老年肝郁失眠的病因病机,结合长期的临床实践组配而成的有效验方,以柴胡、酸枣仁为君药,配伍陈皮、白芍、茯神、夏枯草等组方,具有舒肝解郁,化痰安神之功,用于治疗思虑过伤,痰迷心窍引起的失眠多梦、神疲乏力、头晕健忘等症。前期实验已证实该方具有较好的镇静催眠作用,能增强老年肝郁型失眠证候模型大鼠学习记忆能力,其机制可能与减少脑内氨基酸毒性作用有关^[10]。

本实验从宏观和微观的角度对模型进行了评价。在宏观上,通过目测、体重、及对睡眠总时间的监控录像等进行动态跟踪观测,研究结果发现大鼠

作为实验动物是存在证候和证候演变的,并且表现出与临床相应证候一致的体征;在微观上,对自由基, PGI₂, TXA₂等相关指标进行了较为全面的检测,本实验研究结果显示该复合型模型与单因素模型相比,大鼠出现脑内自由基浓度明显升高、血浆中 TXB₂明显升高, 6-keto-PGF1a 明显降低等病理表现,符合老年失眠的发病规律和临床表现,而且具有制作规范、可复制性强等特点,从而成功确认了这一老年肝郁型失眠证候模型。本实验建立的复合型老年肝郁失眠证候大鼠模型,可为今后探索建立其他证型的老年失眠动物模型奠定重要基础,为治疗老年失眠的中药新药开发提供更加科学的动物模型。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 刘晓秋,李卫东,唐惠琼,等. *D*-半乳糖衰老模型大鼠的羰基毒化机理初步探讨[J]. 中国实验动物学杂志,2002,12(3):141.
- [3] 吕志平,刘承才. 肝郁致瘀机理探讨[J]. 中医杂志,2000,41(6):367.
- [4] 刘利兵,刘芳娥,张磊,等. 褪黑素对睡眠剥夺大鼠胃黏膜损伤的影响及其机制[J]. 第四军医大学学报,2008,29(7):613.
- [5] 熊雅婷,黄芳,徐丽华,等. 五味子提取物对小鼠睡眠剥夺后脑组织自由基和一氧化氮的影响[J]. 中国药科大学学报,2006,37(3):255.
- [6] 游秋云. 老年失眠的中医发病机制及防治探讨[J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2966.
- [7] 马作峰,姜瑞雪,张六通,等. 《内经》制怒方法初探[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(2):149.
- [8] 孔梅,邢长永,舒晓春. 逍遥散干预抑郁症睡眠障碍模型大鼠海马 5-HT_{1A}受体, 5-HT_{2A}受体的变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):157.
- [9] 孔梅,舒晓春,邢长永. 抑郁症睡眠障碍模型大鼠甲状腺激素变化及逍遥散干预的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):147.
- [10] 游秋云,王平,吴丽丽,等. 舒郁安神方对老年肝郁失眠证候模型大鼠学习记忆及脑组织 Glu、GABA 含量的影响[J]. 中国老年学杂志,2011,31(6):1006.

[责任编辑 聂淑琴]