



文章编号:1672-7134 (2017)07-0351

中图分类号:R965.2

文献标志码:B

DOI:10.16448/j.cjtc.2017.0351

化痰安神方治疗失眠症的药效学基础及其对失眠大鼠下丘脑食欲素表达影响的实验研究^{*}

韦启志¹, 陈少玫¹, 李世勇¹, 奚胜艳², 彭樱²

1 福建中医药大学附属厦门市中医院 福建厦门 361009

2 厦门大学医学院中医系 福建厦门 361102

摘要 目的:研究化痰安神方治疗失眠症的药效学基础及其对失眠大鼠下丘脑食欲素表达的影响,揭示本方部分药效学机制。方法:通过小鼠自发活动实验、戊巴比妥钠阈下及阈上睡眠协同实验探索化痰安神方治疗失眠症的药效学基础;通过对氯苯丙氨酸(PCPA)制造失眠大鼠模型,分为中药组、西药组、空白组、模型组,每组干预7天,使用免疫组化检测实验大鼠下丘脑食欲素(Orexin)。结果:①化痰安神方可抑制小鼠自发活动,与空白组比较,具有显著差异($P<0.01$);②对戊巴比妥钠阈下入睡率的影响:中药组、对照组、西药组实验小鼠入睡率分别为:65%、72%和100%,西药组入睡率明显高于中药组、对照组($P<0.01$);睡眠持续时间,中药组长于西药组($P>0.05$),西药组长于对照组($P<0.05$);③对戊巴比妥钠阈上睡眠情况的影响:中药组睡眠持续时间明显长于西药组($P<0.01$),西药组长于对照组($P<0.01$);④对氯苯丙氨酸(PCPA)致失眠大鼠各组下丘脑食欲素表达水平无差异($P>0.05$)。结论:化痰安神方具有一定的镇静催眠作用,可明显延长失眠患者的持续睡眠时间,其作用机理可能不是通过调节食欲素水平这一途径。

关键词 化痰安神方;失眠症;中医药;食欲素

Experimental Study on the Basic Effect of Huatan Anshen Decoction and on Orexin Expression in Hypothalamus of Insomnia Rats

WEI Qizhi¹, CHEN Shaomei¹, LI Shiyong¹, XI Shengyan², PENG Ying²

1. Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Xiamen 361009, China

2. Xiamen University, Fujian Xiamen 361102, China

ABSTRACT Objective: To study the basic effect of Huatan Anshen decoction and the effect on orexin expressions in Hypothalamus of insomnia rats and reveal the partial pharmacodynamics mechanism. Methods: Spontaneous activity in mice and synergistic action test of pentobarbital sodium were observed to study the basic effect of Huatan Anshen decoction. The second part, through para chlorophenylalanine (PCPA) making rat model of insomnia, divided into Chinese medicine group and Western medicine group, blank group, model group, each group of rats were intervened for 7 days, Hypothalamus Orexin was detected by immunohistochemistry. Results: ① Huatan Anshen Decoction can inhibit the spontaneous activity of mice, compared with the control group, with significant difference ($P<0.01$). ② Effect on the rate of sleep pentobarbital sodium: Chinese medicine group and control group, western medicine group mice sleep rates were: 65%, 72% and 100%. The rate of western medicine group was significantly higher than that of traditional Chinese medicine group and control group ($P<0.01$). Sleep duration: Chinese medicine group was longer than the western medicine group ($P>0.05$), the western medicine group was longer than the control group ($P<0.05$). ③ Sleep duration of Chinese medicine group was significantly longer than the western medicine group ($P<0.01$), and the

* 基金项目: 2013 福建省中医药科研课题 (批准号: wzn201311)

通讯作者: 陈少玫, 女, 主任医师, 研究方向: 中医脑病, E-mail: csmxm79@126.com

作者简介: 韦启志为厦门市中医院脑病科主治医师, 研究方向: 中医脑病。



western medicine group was significantly longer than the control group ($P < 0.01$). ④ There was no difference in the expression level of orexin ($P > 0.05$) in the hypothalamus of insomnia rats induced by phenylalanine (PCPA). Conclusion: Huatan Anshen decoction has sedative and hypnotic effects, can prolong the duration of sleep in patients within-somnia. The mechanism of Huatan Anshen decoction to prolong the duration of sleep in patients with insomnia may not be regulated by the level of orexin pathways.

KEYWORDS Huatan Anshen decoction; Insomnia; Traditional Chinese medicine; Orexin

睡眠是维持机体健康不可缺少的生理过程,是机体复原、整合和巩固记忆的重要环节。失眠症是指睡眠的始发和睡眠维持发生障碍,致使睡眠质量不能满足个体需要而明显影响患者白天活动(如精神萎靡不振、注意力下降、反应迟钝等)的一种睡眠障碍综合征^[1]。失眠给患者带来较严重的社会功能障碍^[2],造成了更多的工作失误或更严重的事故。随着时代发展,失眠发病率日益升高^[3-4],失眠成为一种常见的昂贵的社会公共健康问题。失眠发病机制^[5]尚不十分明确,其与神经内分泌紊乱及相关神经结构功能障碍或病变密切相关。目前基础有效治疗药物为苯二氮卓类药物,其通过选择性地抑制脑干网状结构的上行激活系统诱导睡眠,优点是起效快,弊端是具有一定的抑制性、成瘾性、依赖性、宿醉效应,影响临床运用。近年来,科学家将食欲素的拮抗剂开发为治疗失眠症的新药—Suvorexant^[6-9],其价格昂贵,且未在我国上市。

“失眠症”属于中医“不寐”范畴。中医多通过辨证论治实施个体化诊疗从而达到阴平阳秘、精神乃治的效果^[10]。在长期的临床实践中,我们发现厦门市失眠症患者中多为痰热内扰型,临床从痰热论治,自拟化痰安神方加减化裁,效果良好^[11-12]。为探讨本方治疗失眠症的药效学基础及可能的药理机制,我们进行了实验研究,现报道如下。

资料与方法

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级小鼠,雌雄各半,体重18~22g;Wistar大鼠32只,雌雄各半,7周龄,体重180~220g,来源于厦门大学实验动物中心,实验动物质量合格证2015000505392,使用许可证号SYXK(闽)2013-0006。

1.2 试验药物 实验用中药由厦门市中医院全成分颗粒药房提供,由北京康仁堂药业生产。化痰安神方基本组成:酸枣仁、黄连、竹茹、陈皮、茯苓、半夏、石菖蒲、川芎、远志、夜交藤、龙骨、珍珠母等。水煎,浓缩成1:1药液,4℃冰箱保存备用,临用时用蒸馏水配成50%溶液。艾司唑仑片:由厦门市中医院药房提供。按成人催眠剂量 $2\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$,用人鼠给药剂量体表面积

折算公式计算出小鼠给药剂量为 $0.26\text{mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$ 。将其溶于蒸馏水中,配制成水溶液备用。戊巴比妥钠(Pentobarbital sodium salt, Merck分装, CAS号57-33-0)。对氯苯丙氨酸(DL-4-氯苯丙氨酸, 4-Chloro-DL-phenylalanine),产品编号C136727, CAS号7424-00-2,批号201406,由Aladdin公司生产。0.9%氯化钠注射液,规格每瓶100mL,批号:1407312311,由辰欣药业股份有限公司(中国山东)生产。用0.9%氯化钠溶液将(PCPA)配制成 $0.1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混悬液。食欲素免疫组化试剂盒Anti-Orexin-A-Antibody来源于merckmillipore公司,货号AB3704,批号:AD092418。吐温80来源于Solarbio公司, CAS号9005-65-6,批号304A056。

1.3 主要仪器 ZZ-6小鼠自主活动测试仪(成都泰盟软件有限公司)。

2 实验方法

2.1 对实验小鼠自发活动的影响 实验在安静、通风、室温 26°C 左右的屏障环境下进行。取18~25g小鼠,称重、标记、雌雄各半,随机分组,化痰安神方组、艾司唑仑组30只,空白组各30只,适应性饲养一周后。将小鼠依次放入药理生理实验多用仪中,使其适应环境5min后,记录5min的自主活动数。之后,各组小鼠以 $0.2\text{mL}\cdot 10\text{g}^{-1}$ 体积灌胃给药,空白组给予蒸馏水,化痰安神方组给予50%浓度的化痰安神方煎液($10\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 生药),艾司唑仑组给予艾司唑仑水溶液,每天1次,共灌胃7天。第7天,灌胃给药60min后,以同样方法在同一时间记录小鼠的自主活动数。

2.2 对戊巴比妥钠阈上睡眠情况的影响 将24只小鼠随机分为3组,每组8只。正常对照组给予蒸馏水,化痰安神方组给予化痰安神方煎液,艾司唑仑组给予艾司唑仑水溶液,灌胃体积及剂量同上,连续7天。于末次给药60min后,小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (引起100%小鼠睡眠的最小阈剂量)。观察小鼠的睡眠潜伏期及睡眠持续时间。以翻正反射消失判定为发生睡眠。记录每只小鼠的睡眠潜伏期和睡眠持续时间,比较给药组与正常对照组的差异。

2.3 对戊巴比妥钠阈下睡眠情况的影响 小鼠60只,分组同上,每组20只。灌胃体积及剂量同上,连



续7天,于末次给药60min后,小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 $15\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (文献报道使90%–100%的小鼠翻正反射不消失的最大剂量),以30min内动物翻正反射消失达1min以上者,确认为已发生了睡眠。记录每只小鼠的睡眠情况。

2.4 对食欲素(Orexin)表达的影响 适应性饲养一周后,将大鼠随机分为4组,分别为空白组(K)、模型组(M)、化痰安神方组(Z)和艾司唑仑组(X)。除空白组外,其余3组大鼠于每日上午8:00腹腔注射PCPA混悬液 $400\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日1次,连续注射2日。于第一次腹腔注射24–28h后,动物出现昼夜节律消失,白天也活动不停,表明造模成功。空白组每日上午8:00腹腔注射 $400\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的0.9%氯化钠溶液,连续2日。于第3日开始每天早8:00灌胃给药,每日1次。化痰安神方组以 $1\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体积灌胃给予50%化痰安神方水煎液($10\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 生药);艾司唑仑组(X)以相同体积灌胃给予艾司唑仑水溶液;空白组(K)和模型组(M)灌胃同体积的蒸馏水。

2.5 取材及食欲素检测 连续灌胃给药7天,于末次给药60min后将大鼠脱颈椎处死,迅速取出脑组织,置于4%多聚甲醛溶液。浸泡8小时后,作常规固定、石蜡包埋,切片,用食欲素免疫组化试剂盒染色,光镜下拍片。使用Image-Pro Plus 6.0软件分析得出各组大鼠下丘脑食欲素免疫阳性细胞表达的积分光密度值(integrated optical density, IOD)。

3 统计学分析

所有数据经SPSS 22.0软件统计处理,结果采用($\bar{x}\pm s$)表示。各组间进行单因素方差分析下的多重比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1 对实验小鼠自发活动的影响

表1 对小鼠自发活动的影响(次数, $\bar{x}\pm s$)

分组	干预前活动次数	干预后活动次数
空白组	115.4 ± 20.7	117.6 ± 40.4
化痰安神方组	118.5 ± 8.8	$80.4\pm 16.1^{\Delta}$
艾司唑仑组	123.6 ± 20.7	$66.6\pm 17.5^{\Delta\Delta}$

干预前三组小鼠自发活动数无差异, $P>0.05$ 。干预后,化痰安神方组与正常对照组具有显著差异($^{\Delta}P=0.0<0.01$);艾司唑仑组与正常对照组具有显著差异($^{\Delta\Delta}P=0.0<0.01$);化痰安神方组与艾司唑仑组无显著差异, $P=0.051>0.05$ 。

2 对戊巴比妥钠阈下入睡率的影响

中药组、对照组、西药组实验小鼠入睡率分别为:

65%、72%与100%,西药组入睡率明显高于中药组、对照组($P<0.01$)。睡眠持续时间,中药组长于西药组($P<0.05$),西药组长于对照组($P<0.05$);

表2 戊巴比妥钠阈下实验小鼠半小时内入睡情况

分组	入睡/只	未入睡/只
化痰安神方组 $^{\Delta\Delta}$	13	7
艾司唑仑组 $^{\Delta}$	20	0
对照组	13	5

西药组与对照组、中药组比较具有显著差异, $^{\Delta}P<0.01$;中药组与对照组相比无差异, $^{\Delta\Delta}P>0.05$ 。

表3 戊巴比妥钠阈下实验小鼠睡眠持续情况(hh:mm:ss, $\bar{x}\pm s$)

分组	睡眠持续时间
化痰安神方组 $^{\Delta}$	0:49:37 \pm 2; 05:04
艾司唑仑组 $^{\Delta\Delta}$	0:14:37 \pm 0; 07:26
对照组	0:04:52 \pm 0; 05:20

睡眠持续时间, $^{\Delta}$ 中药组长于西药组($P<0.05$), $^{\Delta\Delta}$ 西药组长于对照组($P<0.05$);

3 对戊巴比妥钠阈上睡眠情况的影响

中药组睡眠持续时间明显长于西药组($P<0.01$),西药组长于对照组($P<0.01$)

表4 戊巴比妥钠阈上实验小鼠睡眠持续情况(hh:mm:ss, $\bar{x}\pm s$)

分组	睡眠持续时间
化痰安神方组 $^{\Delta}$	3:54:54 \pm 3; 56:20
艾司唑仑组 $^{\Delta\Delta}$	1:19:55 \pm 0; 44:34
对照组	0:56:56 \pm 0; 20:01

中药组睡眠持续时间明显长于西药组及对照组, $^{\Delta}P<0.01$;西药组睡眠持续时间长于对照组, $^{\Delta}P<0.01$ 。

4 对SD大鼠下丘脑食欲素表达量的影响

在光镜(400 \times)下观察,大鼠下丘脑食欲素蛋白阳性染色呈棕黄色,其主要表达于弯窿周区和下丘脑腹外侧区的神经元胞浆。免疫组化染色结果如图1所示。积分光密度值分析见表4。

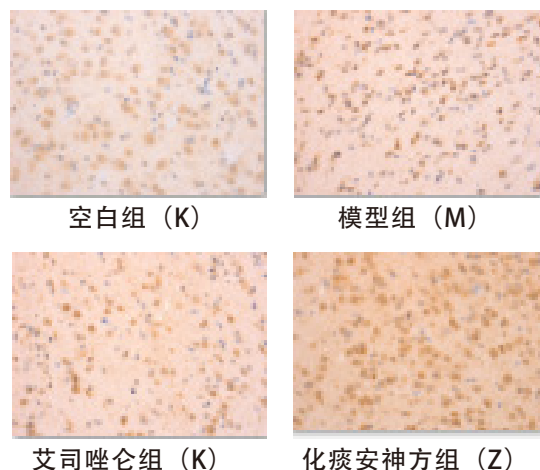


图1 各组大鼠下丘脑食欲素表达(400 \times)



表5 各组食欲素表达水平
(积分光密度 / $D \cdot \mu m^2$, $\bar{x} \pm s$)

分组	例数	orexin 积分光密度
化痰安神方组	8	481350.9 ± 42469.8
空白组	8	465184.4 ± 61539.6
艾司唑仑组	8	458181.9 ± 38226.5
模型组	8	478995.7 ± 35759.1

各组间 IOD 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

失眠病因复杂,与脑功能结构、疾病、精神应激、神经递质、药物食物摄入等因素相关。目前对相关神经结构及神经递质方面的探索为睡眠机制研究的热点。近年研究发现,食欲素是由外侧下丘脑产生的一种神经肽,它具有调节睡眠与清醒^[13]、摄食与能量代谢^[14]、药物与食物成瘾,促进癌细胞凋亡^[15]等生理功能。食欲素阻滞剂现已开发为治疗失眠症的新药—Suvorexant。

“失眠症”属于中医“不寐”范畴。中医通过辨证论治实施个体化诊疗从而达到阴平阳秘,精神乃治的效果,meta分析显示,中医治疗失眠较之西医具有较大的优势^[16]。在长期的临床实践中,我们发现厦门市失眠症患者中多为痰热内扰型,临床从痰热论治,自拟化痰安神方加减化裁,效果良好。本方以酸枣仁为君药,酸枣仁甘酸,性平,入心肝经,可收敛精气,宁心安神;臣以半夏、竹茹、黄连,半夏味辛,性温燥,善和胃燥湿,竹茹味甘性微寒,清热化痰除烦,黄连味苦性寒,归心肝经,可清热燥湿,泻火除烦,此三味相伍,可起清热燥湿之功;陈皮味辛苦性温可健脾燥湿,茯苓健脾渗湿,二味同用使脾健而绝湿热之源,同时也可避免龙骨、珍珠母伤及脾胃;龙骨、珍珠母重镇安神,远志、夜交藤养心安神,共助酸枣仁安神之用;石菖蒲具化湿豁痰辟秽之效,可开心窍,安心神,川芎可调肝血疏肝气,活血安神,此共为佐助。本方诸药相伍,标本兼治,共奏清热化痰安神之效。

目前中医对于不寐的诊治,存在以下方面的不足^[17]:诊断、辨证分型、疗效评价缺乏客观统一的标准;中药单方或复方药效机理及药效部位不明,缺乏有力的分子生物学等基础研究的支持,且临床医家临证处方多变,对于药理研究更加困难;对于不寐的病因缺乏神经递质等方面的研究;对于非药物疗法,缺乏大规模的随机双盲对照试验。本研究在中药复方干预失眠的药理机制方面进行了有益的探索。

本研究揭示化痰安神方具有一定镇静催眠作用,特别是可明显延长失眠小鼠的持续睡眠时间。证实

本方在改善持续睡眠方面具有优势,为临床治疗痰热内扰型失眠症的效方。各组间食欲素表达水平未见明显差异,揭示化痰安神方可能并非通过调节食欲素水平这一途径发挥其作用,其具体的作用机制有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] 失眠定义、诊断及药物治疗共识专家组. 失眠定义、诊断及药物治疗专家共识(草案). 中华神经科杂志, 2006, 39(2): 141.
- [2] Victoria Shahly, Patricia A. Berglund. The Associations of Insomnia With Costly Workplace Accidents and Errors[J]. American Medical Association, 2012, 69(10): 1054-1063.
- [3] Charles M Morin, Ruth Benca. Chronic insomnia[J]. Lancet, 2012, 379: 1129-1141.
- [4] Cochran H. Diagnose and treat primary insomnia[J]. Nurse Pract, 2003, 28: 15.
- [5] 王文骥, 杨玲. 失眠症及其治疗新进展 [J]. 中华现代临床医学杂志, 2008, 6(11): 981.
- [6] Winrow C J, Gotter A L, Cox C D, et al. Promotion of Sleep by Suvorexant—A Novel Dual Orexin Receptor Antagonist[J]. Journal of Neurogenetics, 2011, 25(1-2): 52-61.
- [7] Herring WJ, Snyder E, Budd K, et al. Orexin receptor antagonism for treatment of insomnia A randomized clinical trial of suvorexant[J]. Neurology, 2012, 79(23): 2265-2274.
- [8] Yin J, Mobarec J C, Kolb P, et al. Crystal structure of the human OX2 orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant[J]. Nature, 2015, 519(7542): 247-250.
- [9] Citrome L. Suvorexant for insomnia: a systematic review of the efficacy and safety profile for this newly approved hypnotic - what is the number needed to treat, numb[J]. International Journal of Clinical Practice, 2013, 66(4): 356-368.
- [10] 江丽杰, 何丽云, 周雪忠, 等. 基于复杂网络的失眠中医诊治规律研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015(12): 1540-1543.
- [11] 胡攀磊, 陈少玫. 化痰安神汤临床应用要点 [J]. 中国中医药咨讯, 2012, 4(1): 227.
- [12] 胡攀磊, 陈少玫. 化痰安神汤临床疗效分析 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(9): 104.
- [13] Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness[J]. Nature Review Neuroscience, 2007, 8(3): 171-181.
- [14] Sakurai T. Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior[J]. Regulatory Peptides, 1999, 85(1): 25-30.
- [15] Xu TR, Yang Y, Ward R, et al. Orexin receptors: Multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders[J]. Cellular Signalling, 2013, 25(12): 2413-2423.
- [16] 吴梅艳. 中医药治疗失眠的系统评价 [J]. 光明中医, 2013, 28(8): 1566-1569.
- [17] 王丹, 谢道俊. 失眠障碍的中医药研究进展 [J]. 中医临床杂志, 2016(4): 470-473.

收稿日期: 2016-11-30 审稿: 吴生兵 责任编辑: 吴倩