



北京中醫藥大學

BEIJING UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE

# 硕士学位论文

THESIS OF MASTER'S DEGREE

题目：宁心安神方调控失眠大鼠  
Glu/GABA-Gln 代谢环路失衡的机制研究

专    业：中医学（七年制）

研究方向：中医内科脑病

学位类型：专业型

学生姓名：郭  晓

导    师：郭蓉娟  教授

二〇一六年五月

## 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得北京中医药大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：郭晓

签字日期：2016.5.20

## 学位论文版权使用授权书

本人完全了解北京中医药大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人授权北京中医药大学将本人学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，并允许提交杂志社出版。

公开    保密(\_\_\_\_年\_\_月)(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

学位论文作者签名：郭晓

导师签名：

签字日期：2016.5.20

签字日期：2016.5.20

# 目 录

摘 要.....	1
ABSTRACT.....	3
中英文缩略词对照表.....	5
第一部分 文献综述.....	7
综述一 失眠的现代医学研究进展.....	7
1 失眠的定义、诊断.....	7
2 失眠的流行病学调查.....	7
3 睡眠分期.....	8
4 睡眠-觉醒的神经生化机制.....	8
5 失眠的发病机制.....	13
6 失眠的治疗.....	14
参考文献.....	16
综述二 失眠的中医研究概况.....	22
1 病因病机.....	22
2 证候分型.....	24
3 临床治疗.....	24
参考文献.....	26
综述三 酸枣仁治疗失眠的研究进展.....	28
1 酸枣仁功效与主治.....	28
2 古方应用.....	28
3 酸枣仁炒用和生用.....	29
4 酸枣仁现代临床应用.....	30
5 酸枣仁药理成分研究.....	30
6 酸枣仁镇静催眠作用的机制.....	32
7 问题与展望.....	33
参考文献.....	33
前 言.....	37
第二部分 实验研究.....	39

实验一 宁心安神方对失眠大鼠的疗效评价.....	39
1 实验材料.....	39
2 实验方法.....	40
3 实验结果.....	41
实验二 宁心安神方对失眠大鼠各脑组织中 Glu、GABA 的影响.....	43
1 实验材料.....	43
2 实验方法.....	43
3 实验结果.....	46
实验三 宁心安神方对失眠大鼠各脑组织中 GAD、GS 的影响.....	50
1 实验材料.....	50
2 实验方法.....	51
3 实验结果.....	52
讨 论.....	56
结 语.....	61
参考文献.....	62
致 谢.....	64
在学期间主要研究成果.....	65
个人简历.....	66

## 摘要

目的:

本实验通过观察宁心安神方对失眠模型大鼠各脑组织谷氨酸 (Glu)、 $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 及谷氨酸脱羧酶 (GAD) 和星形胶质细胞谷氨酰胺合成酶 (GS) 的影响,旨在明确宁心安神方对失眠的治疗作用,阐明宁心安神方对失眠大鼠 Glu/GABA-Gln 代谢环路的调控机制。

方法:

本实验采用改良多平台水环境睡眠剥夺法建立失眠模型,将大鼠随机分为正常对照组、模型组、西药组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组。观察大鼠一般情况,利用戊巴比妥钠协同睡眠实验观察大鼠的睡眠潜伏时间和睡眠持续时间,进行模型评价及宁心安神方治疗失眠的疗效评价。高效液相色谱法检测脑干、下丘脑、额叶皮质、海马等脑组织内神经递质 Glu、GABA 的含量。利用 Western Blot 法对脑干、下丘脑、额叶皮质、海马等脑组织内蛋白 GAD、GS 表达水平进行测定。

结果:

1 大鼠睡眠剥夺 21 天后,睡眠潜伏时间延长、睡眠持续时间减少,同时出现昼夜节律紊乱、白天活动不停等现象,提示失眠模型复制成功。

2 宁心安神方可以明显缩短失眠大鼠睡眠潜伏时间、延长失眠大鼠睡眠持续时间,中、高剂量组与西药组未见明显差异。随着用药时间的逐渐延长,大鼠白天活动量逐渐减少,与模型组比较有明显的差异。提示宁心安神方可有效改善失眠症状。

3 高效液相色谱法结果表明,与正常对照组相比,失眠大鼠各脑组织 Glu 水平有升高趋势,但均差异不明显 ( $P>0.05$ );各脑组织 GABA 水平下降、Glu/GABA 比例明显升高,其中脑干、下丘脑表现较为显著 ( $P<0.05$ )。宁心安神方可提高失眠大鼠脑干、下丘脑 GABA 水平,降低 Glu/GABA 的比值。

4 Western Blot 法结果表明,与正常对照组相比,失眠大鼠脑干、下丘脑 GAD 蛋白表达均明显降低,GS 的蛋白表达有升高趋势,其中下丘脑表现显著 ( $P<0.05$ )。各组大鼠额叶皮质、海马中 GAD、GS 的蛋白表达变化不明显。宁心安神方各组均可明显升高脑干、下丘脑中蛋白 GAD 表达,脑干变化趋势更显著 ( $P<0.05$ );下丘脑蛋白 GS 的表达与模型组、西药组比较则明显减弱 ( $P<0.05$ )。

结论:

1 改良多平台水环境睡眠剥夺法可成功复制失眠大鼠模型；

2 脑干、下丘脑的功能异常与失眠的发生关系密切；

3 宁心安神方治疗失眠的疗效作用与地西洋相当，宁心安神方与地西洋都可以升高失眠大鼠 GABA 的含量；

4 宁心安神方可改善 Glu/GABA-Gln 代谢环路中蛋白 GAD、GS 的异常表达，其中对于 GS 的改善明显优于西药组，体现出中药治疗失眠的多靶点作用。宁心安神方通过调控 Glu/GABA-Gln 代谢环路从而影响 Glu、GABA 的合成和分解，影响 Glu、GABA 的表达水平，改善 Glu/GABA 的兴奋/抑制代谢失衡，这可能与宁心安神方镇静催眠的疗效机制有关。

**关键词：**谷氨酸； $\gamma$ -氨基丁酸；宁心安神；失眠

## ABSTRACT

### Objective:

It is investigated in our research that the content changes of Glu, GABA and the changes of protein expression of GAD, GS in the brain of the insomnia rats caused by the Ningxin Anshen Decoction. It is designed to clear the treatment effect of insomnia of Ningxin Anshen Decoction, to clarify the regulatory mechanism of the Ningxin Anshen Decoction on Glu/GABA-Gln metabolic loop in insomnia rats.

### Methods:

The method of modified multiple water platform sleep deprivation was employed in our project to build the animal model of insomnia. The rats were divided into six groups: normal control group, model group, diazepam group, Ningxin Anshen low dose group, Ningxin Anshen medium dose group, and Ningxin Anshen high dose group. The general state of the rats was observed, and the rats' sleep latency and total sleep time by pentobarbital sodium was recorded. These methods were used to evaluate the insomnia models and the efficacy of Ningxin Anshen Decoction treatment of insomnia. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to detect the contents of Glu, GABA in brainstem, hypothalamus, frontal cortex and hippocampus regions. Western Blot was used to detect the proteins GAD, GS in brainstem, hypothalamus, frontal cortex and hippocampus regions.

### Results:

1. After the 21 days of sleep deprivation, the sleep latency prolonged and the total sleep time decreased. Meanwhile, the rats appeared circadian rhythm disorder and kept active in daytime, suggesting that the insomnia model was made successfully.

2. Ningxin Anshen medium dose group, Ningxin Anshen high dose group and diazepam group can reduce the sleep latency and increase the total sleep time of the rats, and the three groups' effect was basically the same. With gradual extension of treatment time, rats reduced the time of activity during the day significantly, compared with the model group, which implied that Ningxin Anshen Decoction could improve the insomnia.

3. HPLC results showed that contents of Glu in the brain of insomnia rats tended to increase, but there were no significant changes compared with normal control group. In brainstem and hypothalamus, contents of GABA decreased and Glu/GABA increased significantly ( $P < 0.05$ ). Ningxin Anshen Decoction diazepam group could increase contents of GABA and reduce Glu/GABA in brainstem and hypothalamus of insomnia rats.

4. Western Blot results showed that compared with normal control group, the proteins

GAD expression was significantly lower in the brainstem and hypothalamus of insomnia rats, and the proteins GS expression tended to increase, which was especially obvious in the hypothalamus. And the proteins GAD and GS expression in frontal cortex and hippocampus regions of insomnia rats appeared no obvious changes. Ningxin Anshen Decoction could significantly increase the proteins GAD expression in brainstem, and reduce the proteins GS expression in hypothalamus, compared with model group and diazepam group.

Conclusions:

1. The method of modified multiple water platform sleep deprivation is resultful for establishing the the animal model of insomnia.

2. The brainstem, hypothalamus' dysfunction has an important relationship with the occurrence of insomnia.

3. The treatment effect of insomnia of Ningxin Anshen Decoction is equal to diazepam. Ningxin Anshen Decoction and diazepam could increase the contents of GABA in rats insomnia.

4. Ningxin Anshen Decoction could improve the abnormal expression situation of GAD and GS in the Glu/GABA-Gln metabolic loop, and was significantly better than than diazepam in GS, which reflects the multi-target regulatory mechanism of the traditional Chinese medicine treatment of insomnia. Ningxin Anshen Decoction affected synthesis and decomposition of Glu, GABA by regulating Glu/GABA-Gln metabolic loop, and normalized the metabolic imbalance between Glu and GABA, which is related to the Ningxin Anshen Decoction' mechanisms of sedative and hypnotic.

**KEY WORDS:** Gamma-aminobutyric acid, Glutamic acid, Insomnia, Ningxin Anshen Decoction

## 中英文缩略词对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
Ach	acetylcholine	乙酰胆碱
AD	adenosin	腺苷
BDZ	benzediazePines	苯二氮卓类
DA	dopamine	多巴胺
DAT	dopamine transporter	多巴胺转运体
DR	nueus raphes dorsalis	中缝背核
EEG	electroencephalogram power	脑电图
FDA	food and drug administration	食品药品监督管理局
GABA	gamma aminobutyric acid	$\Gamma$ -氨基丁酸
Glu	glutamate	谷氨酸
Gln	glutamine	谷氨酰胺
GAD	glutamate decarboxylase	谷氨酸脱羧酶
GS	glutamine synthetase	谷氨酰胺合成酶
GAT	gama-aminobutyric acid transporte	GABA 转运体
HA	histamine	组胺
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal	下丘脑-垂体-肾上腺
IL-1	interleukin-1	白细胞介素-1
LDT	laterodorsal tegmental nucleus	外背侧被盖核
LC	loeus caeruleus	蓝斑
LDA	lateral hypothalamus	外侧下丘脑
MT	melatonin	褪黑素
MnPN	median preoptic area	中位视前核区
NA	norepinephrine	去甲肾上腺素
NREM	non rapid eye movement	非快速眼动
PPT	pedunclopontine tegmental nucleus	桥脚被盖核
REM	rapid eye movement	快速眼动
SCN	suprachiasmatic nuclei	视上交叉核

SD	Sprague-Dawley	SD 大鼠
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TMN	tuberomammillary nucleus	结节乳头体
VLPO	ventrolateral preoptic area	腹外侧视前区
5-HT	5-hydroxytryptamine	5-羟色胺

# 第一部分 文献综述

## 综述一 失眠的现代医学研究进展

失眠是临床中较为常见的一种睡眠障碍类疾病，临床表现以入睡困难、睡眠维持困难、早醒为主，同时伴有日间功能障碍。失眠可以伴发或诱发多种躯体和精神疾病，严重影响人们的身心健康。近年来，随着各种竞争日益激烈、各种压力日渐增大，失眠的发病率不断升高。如今失眠已经引起国内外的高度关注。

### 1 失眠的定义、诊断

中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组参考美国精神障碍诊断和统计手册第4版(DSM-IV)、国际疾病分类第十版(ICD-10)和国际睡眠障碍分类法第二版(ICSD-2)等国内外较公认的失眠诊治指南，同时遵循循证医学原则、兼顾我国国情，于2012年制订了《中国成人失眠诊断与治疗指南》<sup>[1]</sup>，其中指出：失眠通常指患者对睡眠时间和(或)质量不满足并影响日间社会功能的一种主观体验。失眠的表现为人睡困难(入睡时间超过30 min)、睡眠维持障碍(整夜觉醒次数 $\geq 2$ 次)、早醒、睡眠质量下降和总睡眠时间减少(通常少于6h)，同时伴有日间功能障碍。

### 2 失眠的流行病学调查

睡眠是人们恢复体力和精力必要的生理状态，世界卫生组织(WHO)和世界睡眠研究组织(WFSRS)联合发表的《睡眠和健康》报告中指出，睡眠和空气、食物及水一样，是人类生活的基本必需品。现代生活的加班、倒班、时差及各种社会压力使失眠现象显著增加。2007年美国国家睡眠基金会<sup>[2]</sup>关于美国的睡眠民意调查显示，48%的人有不同程度的睡眠问题。基于数据分析<sup>[3]</sup>，2008至2010年，约有28%美国成年人睡眠时间少于6个小时；2006年美国参加行为风险因素监测(BRFSS)<sup>[4]</sup>的成年人，一个月内睡眠不足大于等于14天的人约占28%。在国内，课题组国家“十一五”科技支撑计划《亚健康状态中医辨识与分类研究》<sup>[5]</sup>对所调查的8438例体检亚健康人群进行身心健康辨识，结果显示失眠人群占16.61%，居第二位。据全球失眠调查显示，2002年有43.4%的中国人经历了不同程度的失眠。国内国外及各研究组织有关失眠患病率的调查结果有较大差异，主要是因为关于失眠评估工具的不完善及研究背景、调查方法的不同。

长时间失眠可以导致一系列健康问题，如日间疲劳、情绪低落及职业技能、学习成绩、生活水平等下降。失眠可以诱发一系列躯体疾病及各种心理障碍，造成交通事故、酒精或药物的滥用及依赖。失眠经常是精神疾病(如重度抑郁症)的伴发症，使

疾病管理更为复杂,且经常成为残留症状而增加自杀和精神疾病复发的风险<sup>[6]</sup>。这些对社会产生各种直接或者间接的影响。据美国统计<sup>[7]</sup>,仅1995年失眠患者用于处方安眠药花费超过2.85亿美元,而美国经济失眠的年总直接成本预计超过900亿美元,这些成本的90%以上是由于旷工降低生产率造成的<sup>[8]</sup>。目前,失眠已经成为一个医疗及公共卫生问题,而对于失眠的机制研究以及有效的防治已经成为研究热点。

### 3 睡眠分期

对于睡眠的经典描述为:睡眠是循环出现的一种以意识降低乃至缺失同时伴有随意肌活动停止为特征的生物现象,有非快速眼动(NREM)睡眠和快速眼动(REM)睡眠两种状态。睡眠期间这两种状态有规律的进行往复交替。

人的睡眠始于NREM睡眠,这一时期人体全身代谢减慢,代谢率可降低10%-20%,与安静状态比较,神经、循环、呼吸等系统的活动水平都有不同程度的降低。NREM睡眠又分为四期(S1、S2、S3、S4)。S1期是清醒转入睡眠的过渡期。S2期紧接在S1期后,脑电图(EEG)出现睡眠纺锤波和 $\kappa$ 复合波,标志真正入睡,该期肌张力减低,意识逐渐降低。随之进入S3+S4期,即深睡眠期,此期全身肌肉放松,但仍保持有一定的张力,没有快速的眼球运动,意识完全消失,对一般强度的刺激不会产生反应。NREM睡眠主要是促进生长、消除疲劳、恢复体力的作用。

REM睡眠出现在NREM睡眠之后,该期出现阵发性的或单个的快速眼动往复运动,EEG呈现类似清醒时的脑电波。此期除眼肌和中耳肌外肌张力完全消失,交感神经活动增强。REM睡眠对于学习、记忆和情感等大脑高级功能具有重要的意义,是人体精力恢复的主要形式,同时与体温调节、阴茎勃起、做梦有密切关系<sup>[9]</sup>。

在正常人一夜的睡眠中,NREM睡眠和REM睡眠周期性交替发生。正常人由清醒到NREM睡眠后,依次S1、S2、S3、S4期,由浅到深,深到浅,持续70-120min后,进入REM睡眠,随后再从NREM睡眠开始。如此,每晚反复循环3-5个周期。人的睡眠受多种因素影响,个体之间、个体的不同时期均有所差异,如年轻人S1、S2期持续时间短,而老年人S3、S4持续时间较短;睡前有感情活动者,则REM睡眠出现频率可能增加。

### 4 睡眠-觉醒的神经生化机制

通过对转基因动物、健康人、睡眠患者的神经化学调节机制的研究<sup>[10]</sup>,发现多巴胺、5-羟色胺、去甲肾上腺素、食欲素、谷氨酸、乙酰胆碱、褪黑素、 $\gamma$ -氨基丁酸、腺苷等神经物质对于调节睡眠-觉醒神经元活动变化有着重要的作用,这些神经化学调节机制

的失常将导致睡眠-觉醒障碍。下面就这些物质在睡眠觉醒中的作用机制分别进行论述。

#### 4.1 谷氨酸能系统

谷氨酸 (Glu) 是哺乳动物体内最重要的兴奋性神经递质, 在大脑中的分布以大脑皮质、海马、纹状体的含量最高, 其次为脑干和丘脑。Glu 不能透过血脑屏障, 其来源是葡萄糖经三羧酸循环产生的  $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酰胺, 以后者为主。Glu 对中枢神经系统所有神经元均有兴奋作用, 作用快且短, 引起神经元去极化, 产生兴奋性突触后电位。谷氨酸作用的受体主要分为两大家族: 离子型谷氨酸受体 (iGluR) 和代谢性型谷氨酸受体 (mGlu)。iGlu 根据配体的特性分为 NMDA、AMPA 和 KA<sup>[11]</sup> 等三种。

存在于脑干的网状结构上行激活系统中的 Glu 对动物觉醒及肌张力的维持起着重要的作用。脑干网状是脑干中轴内呈弥散分布的胞体和纤维交错排列的“网状”区域, 与大脑皮质、间脑、小脑、边缘系统及脊髓均有广泛的联系。网状结构中的一些核团接受各种信息, 传至丘脑, 再经丘脑内非特异核团传至大脑皮层的广泛区域, 以维持意识人的清醒状态, 因此被称为上行网状激活系统<sup>[12]</sup>。1949 年, Moruzzi 和 Magoun 通过电刺激、毁损网状结构等一系列研究证实网状结构是机体维持活动和觉醒内源性机制的重要结构。早期研究发现, 位于脑桥喙部旁臂核和毗邻蓝斑前区的谷氨酸能神经元参与脑干网状结构-丘脑-皮层通路, 从而影响大脑皮层的功能活动。这些 Glu 神经元控制清醒的发生, 同时调节 REM 睡眠的脑电并引起肌无力调节<sup>[13]</sup>。Glu 参与了桥脚被盖核和外背侧被盖核 (PPT/LDT) 胆碱能神经元的激活, 促进 REM 睡眠的产生和维持。同时, 网状结构中有少量神经元可以合成  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA), 这些 GABA 能与 Glu 能系统相互抑制, 实现对睡眠觉醒的调控作用<sup>[14]</sup>。

位于外侧下丘脑的 Glu 神经元可以调节 Orexin 神经元活动参与促觉醒活动<sup>[15]</sup>。基底前脑的 Glu 神经元可兴奋胆碱能神经元, 脑电去同步化并抑制睡眠<sup>[16]</sup>。位于大脑皮层的 Glu 神经元是促觉醒系统的最终作用靶点, 同时也参与促觉醒的调节。

#### 4.2 单胺能系统

4.2.1 去甲肾上腺素能 (NA) 主要来源于脑桥蓝斑 (LC)。NA 与上行网状激活系统的形成有关, 是促觉醒系统的主要神经递质, 在觉醒时高度活跃, NREM 睡眠期不大活跃, REM 睡眠期几乎处于沉默状态<sup>[17]</sup>。蓝斑神经元主要在应激状态下或交感神经系统兴奋时, 参与刺激和增强皮质活动和觉醒, 发出纤维投射至下丘脑、丘脑、基底前脑和皮层等其它觉醒调节相关脑区。将 NA 或 NA 受体激动剂异丙肾肾上腺素注射入侧脑室或基底前脑, 可引起觉醒 EEG 指标的增强<sup>[18]</sup>。腹侧髓质也能生成去甲肾上腺素<sup>[19]</sup>。在刺激、

压力、挑战等应激状态下，LC 和腹侧髓质的 NA 能神经元活动活跃<sup>[20]</sup>。抑制 NA 的合成可导致轻微的嗜睡，而 NA 过多时可引起焦虑、失眠，其  $\alpha 1$  受体拮抗剂哌唑嗪可以减少创伤后精神障碍引起的噩梦和夜间觉醒<sup>[21]</sup>。

4.2.2 多巴胺 (DA) 为腹侧中脑神经元的神经递质，腹侧中脑主要分布于黑质、腹侧被盖区及红核后区，发射上行纤维沿着腹侧通路经过内侧前脑束投射到纹状体、基底前脑、大脑皮质等多个与睡眠-觉醒周期相关的皮层及皮层下结构<sup>[22]</sup>。细胞外 DA 水平在觉醒期很高，在 NREM 期较低，但整个睡眠-觉醒周期的多巴胺能神经元的平均放电频率没有明显的变化<sup>[23]</sup>。DA 的重摄取主要依靠多巴胺转运体 (DAT)，从而及时终止其作用。传统的兴奋剂如哌醋甲酯和安非他命，可以通过紊乱 DAT 的功能从而增加细胞外 DA 水平<sup>[24]</sup>，经常用于改善日间嗜睡。

4.2.3 5-羟色胺(5-HT)主要分布在脑干中缝核，是中枢神经系统中重要的神经递质，5-HT 至少有 7 种受体亚型，通过与不同功效的受体结合，参与情感、认知、摄食、体温等多方面的行为活动。5-HT 能神经元沿着脑干中线投射纤维至基底前脑、丘脑、下丘脑等区域影响睡眠觉醒。5-HT 可促进觉醒，抑制 REM 睡眠的发生。5-HT 转运体多态性通过调节突触中的 5-HT 的水平，直接增加生理应激反应，导致下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴活动增加来干扰睡眠<sup>[25]</sup>。

4.2.4 组胺 (HA) 能系统对于脑觉醒及皮层神经元兴奋性具有关键的作用。位于后侧下丘脑腹外侧的结节乳头体 (TMN) 以 HA 为神经递质，TMN 组胺能神经元是唯一刺激脑干和前脑系统的 HA 来源。与其他单胺类相似，在觉醒期 TMN 放电频率和 HA 表达量最高，NREM 睡眠期较少，REM 睡眠期最少<sup>[26]</sup>。HA 可以促进精神运动性能，缺乏 HA 的老鼠在活动开始时意识减弱，说明 HA 对于觉醒启动很重要<sup>[27]</sup>。

### 4.3 胆碱能系统

基底前脑和脑干含有大量的胆碱能神经元，这些神经元可以促进头脑清醒、REM 睡眠，还参与学习、记忆和认知。基底前脑胆碱能神经元包括内侧隔-斜角带核团、巨细胞视前核、无名质及苍白球等区域。基底前脑是脑内尤其是皮层乙酰胆碱 (ACh) 的主要来源，可直接促进皮层和海马的 EEG 节律，对于促进清醒及 REM 睡眠时的皮层兴奋中起着关键作用<sup>[28,29]</sup>。

脑干胆碱能神经元位于吻侧脑桥和尾侧中脑水平的 PPT 和 LDT。与基底前脑相比，PPT/LDT 胆碱能神经元首先投射到皮质下的丘脑、外侧下丘脑和基底前脑等区域。PPT/LDT 胆碱能神经元活跃于清醒及 REM 睡眠期，通过释放 ACh 到丘脑促进皮层激活，

并产生 REM 睡眠期肌肉松弛。

基底前脑和 PPT/LDT 有产生抑制作用的  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 和甘氨酸的神经元, 这些神经元可能通过抑制皮质的中间神经元而产生抑制作用<sup>[30,31]</sup>。

#### 4.4 Orexin 系统

Orexin 神经元主要位于下丘脑后侧区, 包括 OrexinA 和 OrexinB。Orexin 通过激活细胞表面的 OX1 和 OX2 受体而在睡眠觉醒中发挥重要的作用。Orexin 神经元广泛投射纤维到脑干、基底前脑、丘脑、大脑皮层等促觉醒区域, 尤其高度密集投射到 PPT/LDT、LC、TMN 和中缝核等。Orexin 神经元在觉醒时最活跃, NREM 和 REM 睡眠期几乎静止。动物实验发现<sup>[32]</sup>, 当大鼠缺乏 Orexin 或 Orexin 神经元时将出现嗜睡和猝倒症状; 而且, 患有严重嗜睡症或猝倒的患者, 脑脊液中 OrexinA 表达很低, 且 Orexin 神经元有 85%-95% 的损伤<sup>[33]</sup>。这些提示 Orexin 系统是启动和维持觉醒重要因素。Orexin 对其他觉醒系统有强烈的兴奋作用, 包括下丘脑组胺能系统、基底前脑胆碱能系统、脑干单胺能系统及蓝斑去甲肾上腺素能系统, 对正常的睡眠-觉醒周期的调控起着关键作用。

#### 4.5 $\gamma$ -氨基丁酸能系统

GABA 是哺乳动物脑内最主要的抑制性神经递质, 据估计, 脑内有超过 30% 的突触是以 GABA 作为神经递质传递信息的。其在黑质和苍白球含量最高, 其次为下丘脑、中脑、小脑。Glu 和 Gln 是 GABA 合成的前体, Glu 在谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的作用下生成 GABA, 突触释放的 GABA 主要是由位于神经元或神经胶质细胞膜上的  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  依赖性 GABA 转运体 (GAT) 来代谢清除的<sup>[34]</sup>; GABA 转氨酶 (GABA-T) 可降解 GABA 成琥珀酸参加三羧酸循环。

GABA 具有重要的生理功能<sup>[35]</sup>, 如降血压、安神镇痛、增强脑活力、抗衰老、抗焦虑、营养神经细胞等。Kinjevic 在 1966 年就证明了 GABA 系神经组织释放起着广泛中枢抑制作用的氨基酸, 在睡眠调节中发挥重要作用。John W.Winkelman 等<sup>[36]</sup>利用质子磁共振谱得出原发性失眠患者 GABA 水平较对照组低 30%。程伟等<sup>[37]</sup>小鼠侧脑室注射 GABA, 可有效延长小鼠睡眠时间, 并与注射剂量呈正相关。张瑾等<sup>[38]</sup>发现大鼠海马 CA1 区注射 GABA 后觉醒时间增加, 睡眠时间减少; 而注射 GABAa 受体拮抗剂荷包牡丹碱(Bic)后觉醒时间减少, 睡眠时间增多注射 GABA<sub>b</sub> 受体激动剂氯苯氨基丁酸(Bac)对睡眠-觉醒周期无直接影响。

有学者<sup>[39]</sup>损伤老鼠下丘脑视前区导致严重的持续性失眠, 而电刺激或药物刺激这一区域则能快速引起睡眠, 提示下丘脑视前区是睡眠产生的关键结构。中位视前核 (MnPN)

区神经元放电频率在 NREM 和 REM 睡眠期最高,腹外侧视前区(VLPO)神经元在 NREM 和 REM 睡眠期 C-Fos 蛋白阳性表达数量较觉醒期明显增加<sup>[40]</sup>。解剖学表明<sup>[41]</sup>, VLPO 和 MnPN 神经元投射到所有的促觉醒区域,包括 PPT/LDT、LC、中缝背核(DR)、TMN、Orexin 神经元。下丘脑视前区中的 VLPO 和 MnPN 存在高密度的 GABA 神经元<sup>[42]</sup>, VLPO 亦包含抑制性神经肽甘丙肽。1998 年 Sherin 等用与 GAD 相偶联的 C-Fos 蛋白和甘丙肽 mRNA 探针对 VLPO 区神经元进行标定,实验发现在睡眠期间 VLPO 区中的 C-Fos 免疫阳性神经元大多数呈现出 GABA 能活性。下丘脑视前区对睡眠的调控主要以 GABA 作为神经递质对多个促觉醒系统产生抑制作用。同时 VLPO 区神经元接受包括 LC、DR、TMN 和中脑导水管灰质等区域的神经纤维投射,可以被 Ach、NA、DA、5-HT 等神经递质识别抑制<sup>[43]</sup>。下丘脑视前区与觉醒区域神经元之间的这种相互作用保证的睡眠与觉醒之间的稳定转换。

GABA 的生理功能主要通过 GABA 受体特异性结合而产生。GABA 受体分为 GABA<sub>A</sub>、GABA<sub>B</sub> 和 GABA<sub>C</sub> 三种亚型受体,其中占主导地位的是 GABA<sub>A</sub> 受体,约占所有 GABA 受体亚型的 40%左右,少量是 GABA<sub>B</sub> 受体, GABA<sub>C</sub> 受体目前仅发现存在于视网膜。GABA<sub>A</sub> 受体属 Cl<sup>-</sup>通道受体,是由 5 个亚单位( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ )构成的糖蛋白,5 个亚单位围城一个中空的 Cl<sup>-</sup>通道,每个亚基都有一个大的细胞外 N 末端,是激动剂和拮抗剂结合位点所在区域。GABA<sub>A</sub> 受体可看成是一种由 GABA 识别位点、苯二氮卓类(BDZ)识别位点及氯离子通道组成的复合体,这一复合体有五个主要结合位点:GABA、BDZ、巴比妥类、印防己毒素(Pic)和神经甾体类结合位点。这些结合位点的作用是调制受体对 GABA 刺激的效应。这复合体的 Cl<sup>-</sup>离子贯穿膜结构,GABA 结合位点处于直接开启 Cl<sup>-</sup>通道的位置。GABA 的抑制作用与 GABA<sub>A</sub> 受体结合,引起突触后膜 Cl<sup>-</sup>从胞外内流,引起突触后膜超极化,产生一种快的抑制性突触后电位(IPSP),抑制神经元放电,这一突触后抑制效应可被荷包牡丹碱(Bic)特异性阻断。GABA<sub>A</sub> 受体功能障碍与神经和精神紊乱症如失眠、抑郁、焦虑、癫痫等密切相关。目前临床应用广泛的 BDZ 和非 BDZ 药物就是以 GABA<sub>A</sub> 受体为靶点起到镇静催眠的作用。

#### 4.6 褪黑素

外侧下丘脑的 Orexin 神经元中混合有大量的促 REM 睡眠的褪黑素(MT)和 GABA 神经元<sup>[44]</sup>。这些神经元投射区域与 Orexin 神经元投射区几乎相同<sup>[45]</sup>,但 Orexin 神经元是兴奋作用,MT 和 GABA 神经元为抑制作用。神经电生理记录到 MT 神经元在 REM 睡眠期最活跃,NREM 睡眠期次之,觉醒期静止<sup>[46]</sup>。研究<sup>[47]</sup>发现缺乏 MT 的小鼠,NREM

和 REM 睡眠时间减少；侧脑室注入 MT 激动剂 REM 睡眠时间延长，而注入褪黑素拮抗剂减少<sup>[48]</sup>。

#### 4.7 其他

腺苷（AD）主要是由于机体组织的代谢活动引起大量的 ATP 分解产生的，广泛存在于神经系统细胞内外，在促睡眠的神经化学过程中发挥着重要作用<sup>[49]</sup>。AD 通过与受体结合对基底前脑胆碱能、外侧下丘脑 Orexin 能、TMN 区组胺能等促觉醒神经元系统产生抑制作用，同时兴奋下丘脑、基底前脑的促睡眠神经元而调控睡眠<sup>[50,51]</sup>。

细胞因子是由免疫细胞、神经细胞、星形胶质细胞等合成释放的细胞间的物质，与睡眠有关的细胞因子有白细胞介素-1（IL-1）、肿瘤坏死因子（TNF），可以促进睡眠的发生<sup>[52]</sup>。国内学者<sup>[53]</sup>检测原发性失眠患者日间血清 TNF 水平，发现日间 TNF 水平升高，且与失眠程度、日间功能损害有关。应用显微注射技术发现<sup>[54]</sup>，大鼠下丘脑视前区注射如 IL-1 后，促觉醒神经元放电率减少，促进 NREM 睡眠。

#### 4.8 小结

睡眠-觉醒过程是一个涉及多中枢、多系统调节整合的主动调节的节律性生理行为。由以上论述可以知道，觉醒的产生和维持与下丘脑外侧区 Orexin 神经元系统启动脑干、基底前脑、下丘脑等神经元产生 Glu、ACh、NA、DA、5-HT、HA 等关系密切；睡眠主要由下丘脑视前区的 GABA 神经元系统抑制上行激活系统产生。促觉醒系统可以抑制 VLPO 和 MnPO 形成的促睡眠系统，同时促睡眠系统也能抑制下丘脑和脑干的上行觉醒系统。促觉醒系统和促睡眠系统之间的这种相互抑制的关系，保证了睡眠和觉醒状态之间的快速完全转换。

### 5 失眠的发病机制

#### 5.1 行为认知方面

1987 年 Spielman 和他的同事<sup>[55]</sup>根据失眠的病程将失眠影响因素分为三类，即所谓的 3P 模式。一是素质因素（Predisposing Factor），如容易过度焦虑多想的性格、较为脆弱的睡眠系统、生理时钟缺乏弹性、遗传体质等容易产生失眠的个体潜在特性；二是诱发因素（Precipitating Factor），如生活事件压力、身体生理疾病等促使失眠的发生；三是持续因素（Perpetuating Factor），如白天睡太多、生理过度亢奋、安眠药物的不当使用等持续的不恰当地应对策略，长此以往导致慢性失眠的发生。这三个因素在失眠的持续发展过程中，相互影响作用，使急性的短暂失眠发展为慢性失眠。

有学者<sup>[56]</sup>在此基础上又提出关于睡眠认知的因素，失眠患者往往过分关注睡眠并且

对第二天的情况产生恐惧和顾虑的情绪，刺激脑皮质觉醒，恶化失眠症状而干扰睡眠。失眠患者往往过度夸大失眠对自己的身心影响，不能认识到过度关注睡眠问题是导致失眠的根源<sup>[57]</sup>。近年来提出<sup>[58]</sup>的治疗失眠的非药物治疗-认知行为疗法（CBT-I）就是针对失眠患者各种病因，治疗导致失眠的长期性因素，从而改变关于睡眠的不合理信念和态度，减弱唤醒状态，最终建立条件化、程序化的睡眠行为。

## 5.2 神经生理方面

动物实验发现<sup>[59]</sup>，正常睡眠小鼠入睡后，下丘脑视前区的促睡眠系统的 C-Fos 蛋白表达明显增高，而失眠小鼠表现为入睡后促觉醒与促睡眠系统同时兴奋。亦有学者<sup>[60]</sup>在临床研究的基础上提出促觉醒系统在白天和晚上均保持高激活状态造成失眠。失眠患者在各种诱因作用下出现基础性内在的睡眠-觉醒系统紊乱，表现为促觉醒系统在白天和晚上均保持高度激活状态<sup>[61]</sup>。觉醒、睡眠系统相互抑制的平衡状态被破坏，遂出现脑皮质过度觉醒的生理学特征。

血压、体温、睡眠觉醒周期、激素水平等变化受机体的生物节律调节。研究表明，生物节律的异常与睡眠的启动及维持密切相关。而人的生物节律与自然环境的昼夜循环相吻合，形成白天觉醒、夜间睡眠。光刺激与生物节律关系密切。有些失眠患者由于环境所需长时间暴露在光线下，破坏觉醒-睡眠的生物节律，从而导致了失眠。光线经视神经至下丘脑的视上交叉核（SCN）对生物节律进行调节。其中，光线和 SCN 对 MT 的合成和分泌的影响对人体昼夜节律有重要的作用。光线通过时神经传至 SCN，再至双侧颈上神经（SCG），引起交感神经末梢释放肾上腺素，使松果体合成释放褪黑素，MT 活化 MT 受体，抑制 SCN 促觉醒神经元的活动，从而使睡眠发生<sup>[62]</sup>。当 MT 系统功能下降时就会出现失眠。一项关于 MT 水平降低患者的研究中发现，睡眠缺乏与体内褪黑素水平下降呈正相关。

## 6 失眠的治疗

美国食品药品监督管理局（FDA）目前批准的治疗失眠的药物<sup>[63]</sup>主要包括 GABA<sub>A</sub> 受体激动剂、褪黑素受体激动剂、组胺受体拮抗剂和 orexin 受体拮抗剂等。

目前临床上应用较为广泛的是 BDZ 受体激动剂，包括 BDZ 和非 BDZ，二者均是与 GABA<sub>A</sub> 受体结合，促进 GABA 与 GABA<sub>A</sub> 受体的结合，引起氯离子内流，使细胞膜发生超极化而产生抑制效应。GABA<sub>A</sub> 受体亚单位上有 BDZ1 和 BDZ2 受体，BDZ1 受体与镇静、催眠作用有关，BDZ2 受体与记忆、情绪有关。BDZ1、BDZ2 亚型在中枢神经系统分布有相对特异性，小脑内主要为 BDZ1 受体，大脑皮质区和海马则两者亚型共存，

脊髓只有 BDZ2 受体。BDZ 对两型受体均有一定亲和力，选择性不高，除了镇静、催眠作用外，还有记忆力和情绪障碍等副作用<sup>[64]</sup>。非苯二氮卓类药物选择性的与 BDZ1 受体结合，如常用的唑吡坦和左匹克隆的半衰期较短（分别为 3 小时和 6 小时），这些要不影响快动眼睡眠，同时增加慢波频率，与半衰期短的 BDZ 药比较，对睡眠结构影响小，撤药后焦虑失眠反弹可能性低，但其长期的治疗效果尚有待探索。

MT 是一种神经激素，由松果体在夜间分泌，其对动物的作用主要是调节睡眠的昼夜节律和控制生殖繁殖的季节性，但因其半衰期太短（20-30 分钟），睡前给予 MT 只是缩短睡眠潜伏期，对大多数睡眠障碍疗效受限，近年研发的 MT 受体激动剂应用更广泛<sup>[65]</sup>。MT 受体激动剂常用的为雷美替胺，其对 MT1 和 MT2 受体有高亲和力，可缩短入睡时间、增加总的睡眠时间，常见的副作用有嗜睡、疲劳和头晕<sup>[66]</sup>。

HA 具有促觉醒作用。其受体有 H1、H2、H3 亚型，抗组胺药物如 H1 受体拮抗剂苯海拉明、比拉明、低剂量的多虑平，可引起 HA 信号表达减少，从而导致机体出现嗜睡<sup>[67]</sup>。

研究发现，动物或人的 Orexin 神经元损伤后会出现嗜睡症状，Orexin 被认为是启动和维持觉醒的重要调节因素。Orexin 有 OX1 和 OX2 两种受体，为下丘脑外侧神经元中的 2 个 G 蛋白偶联受体。Orexin 受体在睡眠-觉醒中同样发挥着重要的作用。OX1 和 OX2 受体基因同时缺失时，小鼠出现类似 Orexin 神经元损伤后会出现嗜睡、猝倒症状<sup>[68]</sup>；而 OX1 受体基因缺失无明显变化，OX2 受体被阻断则出现嗜睡症状<sup>[69]</sup>。近年来，Orexin 受体拮抗剂治疗失眠已经成为研究热点。默克公司研发的 Suvorexant 于 2014 年 8 月获得 FDA 批准上市，低剂量下用于治疗入睡困难和睡眠维持困难的失眠患者。Suvorexant 为非选择性 OX1R/OX2R 双重拮抗剂<sup>[70]</sup>。临床实验中<sup>[71]</sup>，受试者服药后睡眠时间明显增加，连续服用 3 个月后其入睡时间亦缩短，常见的不良反应有口干、乏力、困倦。

镇静类抗抑郁药常被用在传统催眠药物治疗无效或由抑郁症引起的失眠的情况下。国内<sup>[72]</sup>有关于评价舍曲林对重性抑郁障碍且伴有失眠患者多导睡眠的影响，结果发现患者睡眠潜伏期明显缩短、深睡眠时间增加、睡眠效率提高。舍曲林为选择性 5-HT 再摄取抑制剂，其改善睡眠可能与抗抑郁疗效有关。米氮平是 NA 和特异性 5-HT 能抗抑郁药，主要通过促进 NA 和 5-HT 能神经递质释放而发挥作用而发挥抗抑郁作用，通过阻断 5-HT<sub>2</sub> 和 5-HT<sub>3</sub> 受体而改善焦虑与失眠症状。三环类抗抑郁药（如阿米替林、多虑平）通过阻断 5-HT 和 NA 再摄取发挥抗抑郁作用，同时阻断组胺 H1 受体而有镇静、促睡眠的作用。

## 参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组.中国成人失眠诊断与治疗指南[J].中华神经科杂志,2012,45(7):10-12.
- [2] Baker FC, Wolfson AR, Lee KA. Association of Sociodemographic, Lifestyle, and Health Factors with Sleep Quality and Daytime Sleepiness in women: Findings from the 2007 National Sleep Foundation "Sleep in America Poll" [J]. Womens Health, 2009,18(6):841-9.
- [3] Schoenborn CA, Adams PE. Health behaviors of adults: United States, 2005-2007 [J]. Vital Health Stat, 2010,10:1-132.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. Perceived insufficient rest or sleep among adults—United States, 2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009, 58:1175-9.
- [5] 徐福平.舒心安神膏治疗阳虚失眠的疗效观察及机制研究[D].广州中医药大学,2014.
- [6] Nierenberg AA, Keefe BR, Leslie VC, etc. Residual symptoms in depressed patients who respond acutely to fluoxetine [J]. Journal of Clinical Psychiatry, 1999,60(4):221-5.
- [7] Walsh J, Engelhardt C. The direct economic costs of insomnia in the United States for 1995 [J]. Sleep, 1999,22(2):S386-93.
- [8] Daley M, Morin CM, Leblanc M, etc. The economic burden of insomnia: direct and indirect costs for individuals with insomnia syndrome, insomnia symptoms, and good sleepers [J]. Sleep, 2009,32(1):55-64.
- [9] Wells JE, Porter JT, Agmon A. GABAergic inhibition suppresses paroxysmal network activity in the neonatal rodent hippocampus and neocortex [J]. Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience, 2000,20(23): 8822-30.
- [10] Holst SC, Valomon A, Landolt HP. Sleep Pharmacogenetics: Personalized Sleep-Wake Therapy [J]. Annual Review of Pharmacology, 2016,56(1):577-603.
- [11] 阮怀珍,蔡文琴.医学神经生物学基础[M].北京:科学出版社,2015:66-67.
- [12] 吴江.神经病学[M].北京:人民卫生出版社.2005:42-43.
- [13] 石玉锋,虞燕琴.谷氨酸在睡眠和觉醒中的作用研究进展[J].浙江大学学报:医学版,2013,42(5):583-590.
- [14] Saper C, Chou T, Scammell T. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness [J]. Trends in Neurosciences, 2001,24(12):726-731.
- [15] Li Y, Gao XT, An VDP. Hypocretin/Orexin Excites Hypocretin Neurons via a Local Glutamate Neuron-A Potential Mechanism for Orchestrating the Hypothalamic Arousal System [J]. Neuron, 2003,36(6):1169-81.

- [16] Fournier G N, Materi L M, Semba K, etc. Cortical acetylcholine release and electroencephalogram activation evoked by ionotropic glutamate receptor agonists in the rat basal forebrain[J]. *Neuroscience*,2004,123(3):785-792.
- [17] Gottesmann C. Noradrenaline involvement in basic and higher integrated REM sleep processes[J]. *Progress in Neurobiology*,2008,85(3): 237-72.
- [18] Berridge C W, Isaac S O, España R A. Additive wake-promoting actions of medial basal forebrain noradrenergic alpha1- and beta-receptor stimulation[J]. *Behavioral Neuroscience*, 2003,117(2):350-9.
- [19] España RA,Vlasaty J,McCormack SL, etc.Aminergic inputs to the hypocretin/orexin neurons.Washington,DC:Society for Neuroscience Meeting,2005.
- [20] Dayas C V,Buller K M, Crane J W, etc. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups[J]. *European Journal of Neuroscience*,2001, 14(7):1143-1152.
- [21] Byers M G, Lee J K. Prazosin Versus Quetiapine for Nighttime Posttraumatic Stress Disorder Symptoms in Veterans An Assessment of Long-Term Comparative Effectiveness and Safety[J]. *Journal of Clinical Psychopharmacology*,2010, 30(3):225-9.
- [22] Monti J M,Monti D.The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking[J]. *Sleep Medicine Reviews*,2007,11(2):113-133.
- [23] Schultz W. Multiple dopamine functions at different time courses.[J]. *Annual Review of Neuroscience* ,2007,30(30):259-88.
- [24] Schmitt K C, Reith M E A. Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse.[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010,1187(1187):316-40.
- [25] Perlis M L, Corbitt C B, Kloss J D. Insomnia research: 3Ps and beyond[J]. *Sleep Medicine Reviews*,2014,18(3):191-193.
- [26] Mochizuki T, Yamatodani A,Okakura K, etc. Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats[J]. *Physiology & Behavior*, 1992,51(2):391-4.
- [27] Régis P, Hiroshi O, Zahia D H, etc. Anatomical,physiological,and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control[J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2002,22(17):7695-7711.
- [28] Maan Gee L, Manns I D, Angel A, etc. Sleep-wake related discharge properties of basal forebrain neurons recorded with micropipettes in head-fixed rats[J]. *Journal of*

Neurophysiology, 2004,92(2):1182-98.

[29] Boucetta S, Jones B. Activity profiles of cholinergic and intermingled GABAergic and putative glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of urethane-anesthetized rats [J]. Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience,2009,29(14):4664-74.

[30] Gritti I, Mainville L, Mancina M, etc. GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat[J]. Journal of Comparative Neurology,1997, 383(2):163-177.

[31] Pablo H, Jones B E. Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic , GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons[J]. Cancer Forum,2008,27(3):1589-1596.

[32] España RA , McCormack S L,Takatoshi M, etc. Running promotes wakefulness and increases cataplexy in orexin knockout mice[J]. Sleep, 2007,30(11):1417-25.

[33] Thannickal T C, Moore R Y, Nienhuis R, etc. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy[J].Neuron,2000,27(3):469-474.

[34] Meldrum B S, Rogawski M A. Molecular targets for antiepileptic drug development[J]. Revista Brasileira De Cirurgia Cardiovascular,2007,4(1):18-61.

[35] Yang R, Yin Y, Guo Q, et al. Purification, properties and cDNA cloning of glutamate decarboxylase in germinated faba bean (*Vicia faba* L.)[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3): 1945-51.

[36] Winkelman J,Buxton O,Jensen J K, etc. Reduced brain GABA in primary insomnia: preliminary data from 4T proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS)[J]. Sleep, 2008,31(11):1499-506.

[37] 程伟,文静,戴体俊,等. GABA 的镇痛、催眠、遗忘作用及其与 GABA<sub>A</sub> 受体的关系[J]. 中国药理学通报,2008,24(6):757-761.

[38] 张瑾,李春华,尹豆,等.大鼠海马 CA1 区 GABA 能神经元在睡眠调节中的作用[J].动物学杂志,2010,45(3):148-153.

[39] Szymusiak R, Gvilia I, Mcginty D. Hypothalamic control of sleep[J].Sleep Medicine, 2007,8(4):291-301.

[40] Sunil , Seema Rai,Kung-Chiao Hsieh. Adenosine A2A receptors regulate the activity of sleep regulatory GABAergic neurons in the preoptic hypothalamus[J].Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2013,305(1):31-41.

[41] Saper C B, Fuller P M, Pedersen N P, etc. Sleep State Switching[J]. Neuron, 2010,

68(6):1023-1042.

[42] Gong H, Mcginty D, Stewart D, etc. Activation of c - fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation[J]. *Journal of Physiology*, 2004, 556(Pt 3):935-46.

[43] Lu J, Zhou TC, Saper CB. Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter[J]. *Neurosci*, 2006, 26:193-202.

[44] Alam M N, Gong H, Alam T, etc. Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area[J]. *Journal of Physiology*, 2002, 538(2): 619-31.

[45] Kilduff T S, Lecea L D. Mapping of the mRNAs for the hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone receptors: networks of overlapping peptide systems[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2001, 435(1):1-5.

[46] Oum Kaltoum H, Pablo H, Maan Gee L, etc. GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2010, 32(3):448-57.

[47] Willie J T, Sinton C M, Maratos-Flier E, etc. Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression[J]. *Neuroscience*, 2008, 156(4):819-29.

[48] Ahnaou A, Drinkenburg W H I M, Bouwknecht J A, etc. Blocking melanin-concentrating hormone MCH 1 receptor affects rat sleep-wake architecture[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 579(1):177-188.

[49] Jr O F, Krueger J M. Biochemical regulation of non-rapid-eye-movement sleep[J]. *Frontiers in Bioscience A Journal & Virtual Library*, 2003, 8(8):d520-50.

[50] Radhika B, Strecker R E, Thakkar M M, etc. Adenosine and sleep-wake regulation[J]. *Progress in Neurobiology*, 2004, 73(6):379-396.

[51] Zhi-Li H, Yoshihiro U, Osamu H. Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2007, 7(1):33-38.

[52] Luca I, Opp M R. How (and why) the immune system makes us sleep[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009, 10(3):199-210.

[53] 黄艳,夏兰,陈贵海. 原发性失眠患者肿瘤坏死因子- $\alpha$  改变的研究[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7(7):87-89.

[54] Md Noor A, Dennis M G, Tariq B, etc. Interleukin-1beta modulates state-dependent discharge activity of preoptic area and basal forebrain neurons: role in sleep regulation[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2004, 20(1):207-16.

- [55] Spielman A J. Assessment of insomnia[J]. *Clinical Psychology Review*, 1986, 6(1):11-25.
- [56] Kryger M H, Roth T, Dement W C. Principles and Practice of Sleep Medicine[J]. Saunders, 2010, 13(3):1475-1475(1).
- [57] Belleville G, Cousineau H, Levrier K. Meta-analytic review of the impact of cognitive-behavior therapy for insomnia on concomitant anxiety[J]. *Clinical Psychology Review*, 2011, 31(4):638-652.
- [58] Morin C, Hauri P C, Spielman A, etc. Nonpharmacologic treatment of chronic insomnia. An American Academy of Sleep Medicine review[J]. *Sleep*, 1999, 22(8):1134-1156.
- [59] Perlis M L, Merica H, Smith M T, etc. Beta EEG activity and insomnia[J]. *Sleep Medicine Reviews*, 2001, 5(5):365-376.
- [60] Buysse D J, Germain A, Hall M, etc. A neurobiological model of insomnia[J]. *Drug Discovery Today Disease Models*, 2011, 8(4):129-137.
- [61] Buysse D J, Germain A, Hall M, etc. A neurobiological model of insomnia[J]. *Drug Discovery Today Disease Models*, 2011, 8(4):129-137.
- [62] Srinivasan V, Brzezinski A, Pandi-Perumal S R, etc. Melatonin agonists in primary insomnia and depression-associated insomnia: are they superior to sedative-hypnotics[J]. *Progress in euro-psycho pharmacology & biological psychiatry*, 2011, 35(4):913-23.
- [63] Neubauer D N. Chronic insomnia[J]. *Continuum*, 2013, 19.
- [64] 钱之玉.失眠及其药物治疗(续)[J].*中国药师*,2005,8(1):18-21.
- [65] 贾娇,任燕,杨红.褪黑素及褪黑素能药物临床应用的研究进展[J].*国际精神病学杂志*,2014(3):185-188.
- [66] Koki K, Keisuke H, Keiji N, etc. Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist[J]. *Neuropharmacology*, 2005, 48(2):301-310.
- [67] Lin J S, Sakai K, Jouvet M. Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat[J]. *Neuropharmacology*, 1988, 27(2):111-122.
- [68] Hondo M, Nagai K, Ohno K, et al. Histamine-1 receptor is not required as a downstream effector of orexin-2 receptor in maintenance of basal sleep/wake states[J]. *Acta Physiologica*, 2010, 198(3):287-294.
- [69] Peltonen H M, Magga J M, Genevieve B, etc. Involvement of TRPC3 channels in calcium oscillations mediated by OX(1) orexin receptors[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2009, 385(3):408-12.
- [70] Bergman J M, Roecker A J, Mercer S P, etc. Proline bis-amides as potent dual orexin receptor antagonists[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(4):1425-30.

[71] Michelson D, Snyder E, Paradis E, etc. Safety and efficacy of suvorexant during 1-year treatment of insomnia with subsequent abrupt treatment discontinuation: A phase 3 randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Journal of Parasitology*, 2010, 96(3):569-79.

[72] Bin Zhang, Yanli Hao, Li X, etc. An 8-week, open-label study to evaluate the effect of sertraline on the polysomnogram of depressive patients with insomnia[J]. *Sleep & Biological Rhythms*, 2013, 11(3):165-175.

## 综述二 失眠的中医研究概况

在中医学中,失眠有多个称谓,马王堆医书中以不卧、不得卧、不能卧称谓,《内经》延用了这些,并且还出现了目不合、目不瞑、夜不瞑等称谓。《难经》记载有:“老人卧而不寐,少壮寐而不寤”。开始出现了不寐之称。《外台秘要》首次出现了“失眠”的病名。明清时期,不寐病名应用较为广泛,在医著中出现频率较高。近现代中医临床多应用不寐或失眠,1997年我国颁布的《中医临床诊疗术语》中将“不寐”定为法定病名。

### 1 病因病机

#### 1.1 阳不入阴

天人相应,《内经》中强调人体阴阳二气的运动变化、昼夜节律的规律,与自然界昼夜节律变化相一致,同时又决定着人体的寤寐周期。卫气日行于阳经(六腑),阳经气盛而主动,神动出于舍则寤;夜行于阴经(五脏),阴经气盛而主静,神入于舍则寐。营卫失度,阴阳失调则会出现睡眠障碍。《灵枢》云:“卫气不得入于阴,常留于阳,留于阳则阳气满,阳气满则阳蹻盛,不得入于阴则阴气虚,故目不瞑矣。”是说卫气夜不能入阴,阳蹻盛则不能入寐,确立了阳不入阴的病机理论。

#### 1.2 心神不安

《内经》云:“心者,君主之官,神明出焉”,张仲景的《伤寒论》中关于失眠的诊治记载有热扰胸膈、心神不宁的栀子豉汤证,心肾不交、阴虚阳亢的黄连阿胶汤证,及心肝血虚的酸枣仁汤证。心为五脏六腑之大主也,精神之所舍也,失眠与脏腑阴阳气血的失调关系密切,其中以心神为病机中心。《景岳全书》中记载:“神安则寐,神不安则不寐”、“盖心藏神,为阳气之宅也,卫主气,司阳气之化也。凡卫气入阴则静,静则寐,正以阳有所归,是固神安而寐也。”张景岳认为阳有所归、心神得安而寐,失眠是由心神所主。

#### 1.3 五脏失调

五脏藏神,脏腑功能失调直接影响着人的睡眠。李东垣《脾胃论》:“百病皆由脾胃衰而生也。”《类证治裁》云:“思虑伤脾,脾血亏损,经年不寐。”《内经》中亦有:“胃不和则卧不安。”脾胃为气血生化之源,若脾胃虚弱,气血亏虚,心神失养则发不寐。宋代的许叔微对于失眠的病因在《普济本事方》中说:“平人肝不受邪,故卧则魂归于肝,神静而得寐。今肝有邪,魂不得归,是以卧则魂扬若离体也。”提出肝经血虚、魂不守舍、心神不安而至失眠。《辨证录》中说:“气郁既久,则肝气不舒,肝

气不舒，则肝血必耗，肝血既耗，则木中之血上不能润于心则不寐。”肝主疏泄，调节一身气机，肝气郁结，疏泄不利，气血运行不畅，对外不能濡养心神，对内不能藏魂于肝，则致失眠。《古今医统》曰：“有因肾水不足，其阴不升而心火独亢不得眠者”。是说肾阴虚不能上济于心，心火独亢而发为失眠，同仲景的黄连阿胶汤证。明清医家对于心肾不交的理论作了发挥，如陈士铎在《辨证录》中也提到：“人有昼夜不能寐，心甚烦躁，此心肾不相交耳。夫心肾之所以不交者，心过于热，而肾过于寒也。”是说肾水过盛沉于下，心肾不交，心火独亢于上而失眠。

#### 1.4 痰火扰心

《景岳全书·不寐》记载：“痰火扰乱，心神不宁，思虑过伤，火炽痰郁而致不眠者多矣。”“百病兼痰。”失眠的发生和反复迁延与痰热相关。痰既是病理产物又是致病因素，饮食不节、外感六淫、肝气郁结等皆可生痰，痰湿日久化热，痰热内扰，心神不安则失眠，而且痰热为阳邪，阳盛则阴病，阳不入阴而失眠。

#### 1.5 近现代理论的发展

近现代医家对于失眠的病因病机的认识，在对古代医家阴阳、营卫、心神、五脏、痰火等理论继承的同时又有了新的发展。

《伤寒论》提到“怵怵不得眠”，明确了情志病症为失眠的发病病因。在现代社会，精神情志和心理因素在失眠的发病中占据着越来越重要的位置。有调查研究<sup>[1]</sup>显示精神情志因素占失眠发病因素 76.66%。齐向华教授<sup>[2]</sup>发现失眠患者不仅有晚间的失眠症状，其白天的心理状态也与常人相异，提出了“烦躁焦虑、惊悸不安、郁闷不舒、思虑过度、精神萎靡”5种“中医心理紊乱状态”。赵绍琴<sup>[3]</sup>在治疗失眠时善用小柴胡汤，主要就是考虑到现代社会的快节奏导致的精神压力，复杂的人际关系造成的心情郁闷，郁怒不能发泄，形成肝胆郁热，木盛火亦旺，故形成心肝火旺，从而导致失眠。《王孟英医案》：“肝主一身之气，七情之病必由肝起。”肝的疏泄功能异常，临床常常表现为情绪抑郁、烦躁易怒等精神情志异常，而精神情志异常，首先伤肝。精神紧张、情志刺激等是失眠的常见病因，反之失眠可引起精神情志异常，进而诱发和加重肝失疏泄，气机失调，脏腑功能紊乱，使失眠持续存在。

失眠与心关系密切。有学者<sup>[4]</sup>通过对肝论治失眠的文献研究，发现 425 篇文献中多数医家从心神入手治疗失眠，以安神定志为治法收效颇丰。田令群等<sup>[5]</sup>认为失眠病在心神，其病机主要为心神失养和心神受扰两大类。从心神角度认识失眠<sup>[6]</sup>，其病位主要在心，内因源于心气被伐，心主血脉功能失调而波及心藏神主神志，张景岳言“神安则寐，

神不安则不寐”，神识扰动则不寐。

王宏翰在《医学原始》中首次明确提出了知觉和睡眠皆由脑所主的生理病理观。西方医学认为失眠是由于大脑皮层兴奋-抑制失衡导致大脑皮层功能活动紊乱所致。《本草纲目》提出“脑为元神之府”，而心藏后天之神，脑神和心神相辅相成，相互协调，共同调控人体的生理功能和精神心理活动，现代针灸医家<sup>[7]</sup>在治疗失眠时，除选取心经、心包经穴外，神庭、百会等头阵穴位也是常用穴。如曾伶<sup>[8]</sup>取额中线、额旁一线应用头针治疗失眠，疗效显著。

赵玉庸<sup>[9]</sup>认为顽固性的失眠往往由顽痰作祟、肝经郁热、痰火内扰、心神不安所致。清代医家王清任于《医林改错》中记载：“夜睡梦多是血瘀”。“久病必有瘀”、“久病必兼痰”、“久病入络”。脏腑功能失调导致机体产生失眠，失眠日久机体产生痰浊瘀血，同时痰瘀作为机体内的病理产物，亦可使阴阳营卫运行紊乱加重失眠，从而形成顽固性失眠<sup>[10]</sup>。

## 2 证候分型

《中医内科学》将失眠分为肝火扰心、痰热扰心、心脾两虚、心肾不交、心胆气虚等 5 种证型。《中药新药治疗失眠的临床研究指导原则》<sup>[11]</sup>中将失眠分为 6 型：肝郁化火、痰热内扰、阴虚火旺、心脾两虚、心胆气虚、其他证型。

通过对全国 4 地 7 个中心的 913 例失眠患者进行问卷调查<sup>[12]</sup>，发现失眠患者主要证型有阴虚火旺、心脾两虚、肝郁化火、痰热内扰、心胆气虚和其他证型，其中以阴虚火旺和心脾两虚 2 个证型最为常见。1989 年至 2007 年中医诊治失眠的文献研究<sup>[13]</sup>发现失眠患者常见证型为痰火扰神、心脾气血虚、肝郁气滞、阴虚火旺、肝火炽盛和心肾不交。

失眠人群中<sup>[14]</sup>，大学生中医证型以肝郁化火、阴虚火旺为主，其次为心脾两虚、痰热内扰、心胆气虚。老年人失眠以虚实分型<sup>[15]</sup>，虚证有心脾气血两虚、心肝血虚、心胆气虚、肾阴虚火旺；实证有肝郁气滞、痰火内扰、食滞内扰。运动员失眠的中医分型以筋肉疲劳型、脾胃失调型、肾阴虚型为主<sup>[16]</sup>。

## 3 临床治疗

### 3.1 古方的应用

#### 3.1.1 半夏汤

半夏汤为“内经十三方”之一，本方以调和阴阳为治则，半夏（五合）辛温通阳，秫米（一升）甘寒，泄阳补阴，甘澜水补助肾气，全方补虚泻实、调和阴阳，治疗阳不入阴、阴阳失交之失眠。正如《内经》所言：“厥气客于五藏六腑，则卫气独卫其外，

行于阳不得入于阴，行于阳则阳气盛，阳气盛则阳跷满，不得入于阴，阴虚故目不瞑……补其不足，泻其有余，调其虚实，以通其道而去其邪，饮以半夏汤一剂，阴阳已通，其卧立至。”王东明以半夏汤为基础方，随证加减治疗失眠 40 例，总有效率为 92.5%，疗效显著<sup>[17]</sup>。

### 3.1.2 张仲景治疗失眠

《伤寒杂病论》中多次记载有不得眠、不得卧、不能卧等失眠的症状，方剂有酸枣仁汤、黄连阿胶汤、栀子豉汤、甘麦大枣汤、桂枝去芍药加蜀漆牡蛎龙骨救逆汤等，其中酸枣仁汤、黄连阿胶汤现代临床引用较为广泛。

酸枣仁汤：《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治》曰：“虚劳虚烦不得眠，酸枣汤主之。”酸枣仁汤为治疗失眠的经典方剂，方中重用酸枣仁养血安神，辅以茯苓健脾安神，知母清热除烦，川芎行血通经，甘草和中缓急，诸药合用有养血宁心、清热除烦之功，临床常用于治疗失眠伴有虚烦、头晕、口干等的肝血不足、阴虚内热之证。张压西等<sup>[18]</sup>在酸枣仁汤基础上加味夜交藤、龙骨、牡蛎等镇静安眠之药治疗肝血亏虚证失眠患者，发现加味酸枣仁汤可有效改善失眠患者失眠症状，同时发现可以调节失眠患者单胺类神经递质的紊乱情况。

黄连阿胶汤：黄连阿胶汤首见于《伤寒论·少阴篇》：“少阴病，得之二三日以上，心中烦，不得卧，黄连阿胶汤主之。”此方主治阴虚火旺、心肾不交之失眠，方中黄连、阿胶相配，滋阴补肾、清心降火，芍药养血敛阴、黄芩清热泻火、鸡子黄养心安中，诸药相伍，使阴复火降、心肾相交，则心烦除、夜寐安。何丰华<sup>[19]</sup>观察黄连阿胶汤治疗阴虚火旺型失眠，发现其可以改善患者症状，提高患者生活质量，临床疗效显著。

### 3.1.3 温胆汤

温胆汤最早见于《集验方》，由生姜、半夏、橘皮、竹茹、枳实等组成。治疗胆寒之虚烦不得眠。而现今应用较为广泛的温胆汤是陈无择化裁来的，组成为半夏、竹茹、枳实、橘皮、甘草、茯苓等，功效以理气化痰、清胆和胃为主，主治虚烦不眠伴有心悸、呃逆等胆胃不和、痰热内扰证。孙思邈又在此方基础上加黄连、枣仁等演化为黄连温胆汤，使气顺火降，热清痰消，气血阴阳调和，安然入眠。陈治林<sup>[20]</sup>以黄连温胆汤为基础方，治疗失眠症 32 例，睡眠改善总有效率为 90.6%。

## 3.2 辨证论治

祝谌予<sup>[21]</sup>治疗失眠常分为五种类型辨证施治：肝郁血虚，选方逍遥散加减；痰热内扰，方用自拟十味温胆汤加减；瘀血阻滞，方选经验方广当益芎芍；心肾不交，选用孔

圣枕中丹；阴虚内热，选用六味地黄丸加减。田令群教授认为失眠为心神受扰，当从心火、肝火、痰火、虚火四方面辨治，选方分别为二阴煎、龙胆泻肝汤、黄连温胆汤、六味地黄丸<sup>[22]</sup>。张毅之从六经辨治失眠：太阳经分别为卫强营弱致失眠选方桂枝甘草龙骨牡蛎汤加味，膀胱蓄水致失眠选方五苓散；阳明经分别为热扰胸膈致失眠选方栀子豉汤，胃热失降致失眠选方调胃承气汤，邪热结肠致失眠选方大承气汤；少阳经分别为胆郁化火致失眠选方小柴胡汤等，三焦失枢致失眠选方柴胡桂枝干姜汤加味；太阴经为寒湿停聚于中焦选方理中汤加味；少阴经为阴虚阳亢致失眠选方猪苓汤，阳虚阴盛致失选方四逆汤加味；厥阴经为肝失所养、相火亢盛、肝火上逆、上扰心神致失眠选方干姜黄芩黄连人参汤加味<sup>[23]</sup>。

### 3.3 自拟方

朱良春治疗慢肝所致的失眠，自拟半夏枯草煎，药用姜半夏、夏枯草、薏苡仁(代秫米)、珍珠母，临床以此为基础方，随证加减，疗效满意；自创“甘麦芪仙磁石汤”，药用甘草、淮小麦、炙黄芪、淫羊藿、五味子、灵磁石、枸杞子、丹参、远志、茯苓，治疗顽固性失眠虚多实少<sup>[24]</sup>。吕同杰根据五子衍宗丸、酸枣仁汤、甘麦大枣汤三方之精自拟“滋肾安神汤”，治疗老年人肝肾阴虚之失眠<sup>[25]</sup>。

### 参考文献

- [1] 黄韬,唐文超,安圣海,等. 170 例失眠症患者病机特点分析[J]. 江西中医药, 2009, 40(8):49-50.
- [2] 吴慧慧,齐向华.齐向华教授基于五种“中医心理紊乱状态”辨治失眠症[J].浙江中医药大学学报,2013(8):990-992.
- [3] 彭建中.赵绍琴教授临床活用经方验案举隅[J].国医论坛,1994(4):17-18.
- [4] 马捷,李峰,宋月晗,等.从肝论治失眠的文献研究[J].中华中医药杂志, 2012(4):1076-1080.
- [5] 崔春风.田令群从火论治不寐的经验[J].新中医,1998(9):9-10.
- [6] 杨翠花,魏琴,何林熹,等.从心神治疗失眠症探讨[J].时珍国医国药, 2015(9):2211-2212.
- [7] 郭静,王麟鹏.“心神”与“脑神”在针刺治疗失眠中的重要意义[C].2007 年全国针灸减肥美容与治疗亚健康学术研讨会. 2007.
- [8] 曾伶.头针为主治疗少寐 48 例[J].Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion, 2005, 21(8):17-17.
- [9] 赵红,董尚朴.赵玉庸教授治疗顽固不寐的经验[J].河北中医药学报, 1997(4):42-42.

- [10] 杨丽, 张荣华, 蔡宇,等.痰瘀与顽固性失眠[J].陕西中医,2004,25(5):431-434.
- [11] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则[M].中国医药科技出版社,2002.
- [12] 袁拯忠,叶人,项祖闯,等. 913 例失眠患者中医证型分布规律[J].中华中医药学刊, 2011(7):1508-1510.
- [13] 司富春.失眠中医证型和方药分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(9):520-523.
- [14] 孙晓雪,董继辉,田家莉.大学生亚健康失眠中医证型调查[J].中国煤炭工业医学杂志, 2010, 13(5):781-782.
- [15] 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):2966-2967.
- [16] 高虹,付乙,蓝肇熙.运动性失眠的中医辨证分型治疗观察[J]. 四川中医, 2001, 19(4):8-9.
- [17] 王东明.半夏治疗失眠疗效观察及临床机制分析[J]. 内蒙古中医药,2014(5):17-17.
- [18] 张压西,向婷婷,王奕. 加味酸枣仁汤治疗肝血亏虚证失眠患者 60 例临床观察[J]. 中医杂志,2013,54(9):750-753.
- [19] 何丰华. 黄连阿胶汤治疗阴虚火旺型失眠 80 例疗效观察[J]. 云南中医中药杂志,2010,31(2):27-27.
- [20] 陈治林.加味黄连温胆汤治疗失眠症 32 例[J]. 云南中医中药杂志,2010, 31(10):34-35.
- [21] 杨兵.祝谌予治疗不寐证经验[J]. 中华中医药杂志,2002,37(9):551-552.
- [22] 崔春风.田令群从火论治不寐的经验[J]. 新中医,1998(9):9-10.
- [23] 张毅之,王评.《伤寒论》六经辨治失眠探讨[J]. 江苏中医药,2010,42(9):1-2.
- [24] 邱志济,朱建平.朱良春治疗顽固失眠的用药经验和特色[J].辽宁中医杂志,2001,28(4):205-206.
- [25] 阎琴,姜锡斌.吕同杰辨治顽固性失眠经验[J].山东中医药大学学报,1995(3):168-169.

### 综述三 酸枣仁治疗失眠的研究进展

#### 1 酸枣仁功效与主治

酸枣仁为鼠李科落叶灌木或乔木植物酸枣的成熟种子，首载于《神农本草经》曰：“酸枣，味酸，平。主心腹寒热，邪结气聚，四肢酸痛湿痹，久服安五脏，轻身延年”，被列为上品。归心、脾、肝、胆经。

酸枣仁功效以养心安神、益肝养血为主。安五脏：“酸枣仁，均补五藏，如心气不足，惊悸怔忡，神明失守；或腠理不密，自汗盗汗；肺气不足，气短神怯，干咳无痰；肝气不足，筋骨拳挛，爪甲枯折；肾气不足，遗精梦泄，小便淋漓；脾气不足，寒热结聚，肌肉羸瘦；胆气不足，振悸恐惧，虚烦不寐等症，是皆五脏偏失之病，得酸枣仁之酸甘而温，安乎血气，敛而能运者也”（《本草汇言》）。同时酸枣仁还有益阴、敛汗、生津等功效。《本草再新》曰：“平肝理气，润肺养阴，温中利湿，敛气止汗，益志，聪耳明目。”

临床多用于失眠、心悸、自汗、盗汗等证。《名医别录》：“主烦心不得面，脐上下痛，血转久泄，虚汗烦渴，补中，益肝气，令人肥健。”

#### 2 古方应用

酸枣仁汤出自张仲景《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治》：“虚劳虚烦不得眠，酸枣仁汤主之。酸枣仁汤方：酸枣仁二升、茯苓二两、知母二两、川芎二两、甘草一两。”此方以酸枣仁为君药，益肝养血、宁心安神，配伍宁心安神之茯苓、滋阴清热之知母，佐以活血行气之川芎，甘草和中缓急。酸枣仁与知母，酸苦泻热除烦；酸枣仁长于养神敛阴，川芎长于活血行气，二药相配，酸辛并用，动静得配，化瘀生新，引药上行，滋养心肝之阴血，阳升阴潜，养血安神；酸枣仁与甘草，酸甘化阴以志其阴亏。诸药配伍，共奏宁心安神、益肝养血、调摄阴阳之效。酸枣仁汤主治心肝血虚之失眠，如《古今名医方论》曰：“枣仁酸平，应少阳木化，而治肝极者，宜收宜补，用枣仁至二升，以生心血，养肝血，所谓以酸收之，以酸补之是也。顾肝郁欲散，以川芎之辛散，使辅枣仁通肝调营，所谓以辛补之。肝急欲缓，缓以甘草之甘缓，防川芎之疏肝泄气，所谓以土葆之。然终恐劳极，则火发于肾，上行至肺，则卫不合而仍不得眠，故以知母崇水，茯苓通阴，将水壮、金清而魂自宁，斯神凝、魂藏而魄且静矣。此治虚劳肝极之神方也。”喻昌用其治疗心肾不交之失眠，如他在《医门法律》中论述：“虚劳虚烦，为心肾不交之病，肾水不上交心火，心火无制，故烦而不得眠，不独夏月为然也。方用：酸枣仁为君，而兼知母之滋肾为佐，茯苓、甘草调和其间，川芎入血分，而解心火之躁烦也。”

石贯卿教授认为酸枣仁汤为治疗失眠的良方，该方体现了《内经》“肝欲急，急食甘以缓之”的原则，方中酸收之品、辛散之品、甘平之品，具有养肝宁心、清热除烦之效。临床中，酸枣仁主要用于心肝血虚之失眠，临床表现为失眠、同时兼见头晕目眩、情绪激动，口渴咽干，舌红而少苔等症状。此外，酸枣仁汤对于焦虑障碍、各种恐惧症、精神衰弱及更年期综合症等也有一定的疗效。

对劳伤心脾，惊悸怔忡，不眠食少者，常配伍黄芪、白术、当归、白芍、党参、远志等补气养血药，补气养心安神，如出自陈士铎《石室秘录》的安寐丹主要治疗心血少所致心经之病症怔忡、不寐，归脾汤治疗心脾两虚所致的失眠；对于心肾不足、阴血亏少导致的失眠多梦、心悸健忘、大便干燥，可与当归、党参、麦冬、地黄等滋阴养血药同用，如出自《摄生总要》的天王补心丸；与柏子仁、远志等养心安神药配伍，增强安神定志之效，如《证治准绳》中的酸枣仁丸治疗胆气实热、神思不眠；对体虚自汗、盗汗者，可配伍白芍、五味子、牡蛎等，补虚益肾固精，如《世医得效方》中十味温胆汤，《得配本草》亦曰：“得生地、五味子敛自汗，配地黄、粳米治骨蒸不眠。”

### 3 酸枣仁炒用和生用

关于酸枣仁生用、炒用之论述，古代文献论述较多，如《本草纲目》：“酸枣仁甘而润，故熟用疗胆虚不得眠，烦渴虚汗之证；生用疗胆热好眠。”《本草逢原》“酸枣仁，熟则收敛精液，故疗胆虚不得眠，烦渴虚汗之证，生则导虚热，故疗胆热好眠，神昏倦怠之证。”《医林纂要》亦曰：“炒用则平，甘多而补，能补心和脾，缓肝养阴，治胆寒不寐并虚烦；生用微寒，酸多而敛，能止渴生津，治胆热好眠。”均认为酸枣仁炒用治疗胆虚失眠，生用治疗胆热嗜睡。

但也有医家对酸枣仁生熟异治提出质疑，如《本草从新》：“生用疗胆热好眠之说未可信也，盖胆热必有心烦、口苦之证，何以反能好眠乎？若肝火郁于胃中以致倦怠嗜卧，则当用辛凉透发肝火，如柴、薄荷之属，非枣仁所得司也。”《本草便读》：“炒熟治胆虚不眠，生用治胆热好眠之说，亦有习俗相沿，究竟不眠好眠，各有成病之因，非一物枣仁可以通也”。

现代医家对于酸枣仁生用和熟用亦存在分歧。赵志付、周绍华教授均认为治疗失眠一定要用炒酸枣仁，酸温而香，醒脾宁心。贾春华教授<sup>[1]</sup>临床应用酸枣仁治疗失眠，认为酸枣仁生用、捣碎后效果更加。有些学者<sup>[2-3]</sup>则认为酸枣仁生用、熟用均有助眠的疗效，没有区别。动物实验发现<sup>[4]</sup>，炒酸枣仁与生酸枣仁均可抑制小鼠自发活动，并且协同阈下剂量戊巴比妥钠镇静催眠，二者无显著差异。郭永奇<sup>[5]</sup>临床研究亦发现，生、熟

酸枣仁治疗失眠的总有效率无显著性差异。李玉娟的研究发现<sup>[6]</sup>生、炒酸枣仁均有明显的镇静催眠作用，化学成分未见差异，相同剂量时药理作用相同。李廷利的研究<sup>[7]</sup>则发现生酸枣仁的催眠作用比炒酸枣仁起效快。

#### 4 酸枣仁现代临床应用

有学者<sup>[8]</sup>统计近 10 年治疗失眠症相关文献中药物的使用情况，发现酸枣仁使用频率最高（67.3%）。吴嘉瑞<sup>[9]</sup>利用中医传承辅助系统软件分析颜正华教授治疗失眠的用药经验，选方 170，发现酸枣仁是颜老治疗失眠处方中最常用药。贾春华教授<sup>[11]</sup>临床应用酸枣仁治疗失眠，建议睡眠 1-2 小时应用治疗失眠的药物。赵志付教授<sup>[10]</sup>授用酸枣仁治疗心肝阴虚之不寐；可配伍白芍、丹参、柏子共用，取天王补心丹滋阴养血、补心安神之效。周绍华教授<sup>[11]</sup>将酸枣仁用于治疗心肾不交、阴虚有热之失眠。周老认为此证系因情志不舒、肝郁日久，而致心肾不交之证，本为肾阴亏虚，标为心火内盛。酸枣仁敛液藏魂，专治因阴液不足，心不藏神，肝不藏魂，神魂不藏之虚烦不得眠。赵宪荣<sup>[12]</sup>发现酸枣仁可以作为治疗失眠症和对西药安眠药依赖成瘾戒断治疗的可靠的方药。

临床中常用的治疗失眠的中成药分为滋养安神和重镇安神两种，酸枣仁以前者为主，如以养血安神为主的枣仁安神胶囊、枣仁安神液、酸枣仁合剂、酸枣仁糖浆等，以安神定志为主的解郁安神颗粒。

张仲景酸枣仁汤中酸枣仁用量为 2 升，换算为现代约为 180 克。仝小林教授<sup>[13]</sup>在治疗一些长期顽固性失眠或重症性失眠时应用大剂量酸枣仁往往能速获奇效，他认为长期失眠的患者精神极度焦虑不安，气血已亏，五脏不和，治疗首务是迅速安神宁心，重剂专攻，或可速安心神，力挽沉珂，酸枣仁用量为 120-180 克，临床效果显著未见任何毒副作用。赵志付教授<sup>[10]</sup>亦认为大剂量应用是安全有效的，使用剂量在 15-60 克，临床大剂量使用未见腹痛、腹泻等不适症状，但需注意酸甘滋腻。导师郭蓉娟教授亦认为酸枣仁治疗失眠 60 克以下临床疗效一般或不佳。中药学教科书中酸枣仁用量范围为 10-30 克。大剂量酸枣仁的使用，需要临床继续探索，同时相关的动物、药理学实验可提供一些参考价值。

现代药理研究<sup>[14]</sup>发现酸枣仁具有镇静、催眠的作用，同时还有抗焦虑、镇痛、降压、降脂、降温、抗氧化、增强免疫力、保护心脏等作用。

#### 5 酸枣仁药理成分研究

早期研究<sup>[15]</sup>发现酸枣仁煎剂对小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猫、犬等均有镇静催眠作用，可使大鼠深睡眠发生频率、持续时间均延长，慢波睡眠脑电波幅度明显增大<sup>[16]</sup>。酸枣仁

的镇静催眠作用主要是影响深睡眠阶段，深睡眠的时间延长，发作频率增加。对慢波睡眠中的浅睡眠阶段和快波睡眠无明显影响。主要对中枢神经起到抑制作用<sup>[17]</sup>。

通过对酸枣仁药理成分二十几年的探索研究，发现酸枣仁中有多种化学成分，其中黄酮类和皂苷类是其镇静催眠作用的主要有效成分，其他生物碱、脂肪酸、氨基酸、多糖等也有一定功效。

### 5.1 黄酮类

Woo SW 通过对酸枣仁有效成分的一系列研究<sup>[18]</sup>，认为黄酮类和皂苷类为酸枣仁镇静催眠的有效成分，其中黄酮类起主要作用。酸枣仁中有多种黄酮类化合物，如斯皮诺素、酸枣黄素、6-芥子酰斯皮诺素、6-阿魏酰斯皮诺素、6"-对香豆酰斯皮诺素、当药素、6, 8-二-碳葡萄糖基芹菜素等等，其中斯皮诺素较多研究与镇静催眠有关。

最近有学者<sup>[19]</sup>基于“病证-效应-生物样本分析”方法分析酸枣“安神”药性物质及归经，实验结果证明酸枣仁有抗焦虑的功效，同时通过对大鼠含酸枣仁组织器官的化学分析，认识到酸枣仁皂苷 A、斯皮诺素是酸枣仁安神的功效物质，这两种成分在体内分布与传统归心、肝经关系密切。Wang 等研究<sup>[20]</sup>表明斯皮诺素可以显著增强戊巴比妥诱导的睡眠，缩短睡眠潜伏期，延长睡眠时间，而这些效应是在 5-HT 的前体 5-羟色氨酸 (5-HTP) 的存在为前提，考虑斯皮诺素通过 5-HT 能系统加强戊巴比妥诱导的睡眠。

### 5.2 皂苷类

皂苷类是酸枣仁中重要的镇静催眠成分。酸枣仁皂苷的苷元为枣仁苷元，枣仁苷元属于新的达玛树脂烷系的四环三萜皂苷，五元环上的一个碳原子连接着两个活泼氧原子，具有较强的还原性，容易被氧化开环形成三环化合物，对中枢具有较强的抑制作用。王旭峰等<sup>[21]</sup>给予小鼠不同剂量的酸枣仁皂苷提取液，结果表明酸枣仁皂苷可以协同小鼠戊巴比妥钠睡眠试验，缩短小鼠睡眠潜伏期、延长睡眠时间，并呈一定的量小关系。

酸枣仁皂苷 A、B 是最早被发现的皂苷类化合物。酸枣仁中酸枣仁皂苷 A 的含量大于皂苷 B 的含量，酸枣仁皂苷 A 可以在酶的作用下水解，容易失去一分子葡萄糖而转变为酸枣仁皂苷 B。通过睡眠剥夺果蝇实验发现酸枣仁皂苷 A 可明显延长果蝇睡眠剥夺后夜间的睡眠时间，酸枣仁皂苷 B 主要改善果蝇白天睡眠，另外发现酸枣仁皂苷 A 可缩短正常雌果蝇的睡眠时间，具有双向调节作用<sup>[22]</sup>。

### 5.3 生物碱

酸枣仁中所含生物碱主要有环肽生物碱和异喹啉生物碱两大类<sup>[23]</sup>，系统分析鉴别则是 8 个 14 元环肽类生物碱和 7 个阿朴菲类生物碱。符敬伟等<sup>[24]</sup>用酸枣仁总生物碱灌胃

小鼠,发现小鼠自发活动减少,阈上剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间延长,并能对抗士的宁引起的惊厥作用,说明生物碱为酸枣仁中枢抑制作用的有效部位。

#### 5.4 脂肪酸

近几年研究发现,酸枣仁中的脂肪油同样具有镇静、催眠作用。酸枣仁中大约有 60% 为脂肪油,有 12 种脂肪酸,含量最多的为油酸(38.73%)、亚油酸(37.14%)<sup>[25]</sup>。李宝莉等<sup>[26]</sup>研究发现酸枣仁油可使小鼠的自主活动次数减少,睡眠潜伏期缩短,睡眠持续时间延长,增加小鼠入睡数,并且认为脂肪油是酸枣仁发挥镇静催眠作用的主要有效成分。赵启铎的研究<sup>[27]</sup>亦表明酸枣仁油具有镇静和催眠作用。

### 6 酸枣仁镇静催眠作用的机制

李陆等<sup>[28]</sup>基于均匀设计法对酸枣仁中总皂苷、总黄酮、总生物碱等 3 中具有镇静催眠作用的有效组分进行配伍,观察分别对于小鼠活动次数、站立次数、睡眠潜伏期及睡眠时间等药效学指标的影响,结果表明酸枣仁有效组分的最佳配伍组合可以达到与原药材相同的疗效。从古代文献研究、临床研究及现代药理研究等均提供了有利的证据,证明酸枣仁的镇静催眠作用,但具体的作用机制仍不甚明确。

有学者<sup>[29]</sup>采用戊巴比妥钠睡眠实验,通过给予小鼠酸枣仁乙酸乙酯、正丁醇提取物及总提取物,筛选酸枣仁镇静催眠作用的活性成分,实验结果表明酸枣仁乙酸乙酯部位和正丁醇部位是酸枣仁镇静催眠活性部位。

利用皮层脑电记录和海马谷氨酸浓度检测<sup>[30]</sup>,发现酸枣仁皂苷 A 可明显抑制青霉素钠对神经元细胞的兴奋作用,降低谷氨酸水平的升高。张舜波等<sup>[31]</sup>发现酸枣仁总皂苷对老年阴血亏虚型失眠有确切的疗效,并观察到可以降低下丘脑及皮质的 Glu、GABA 含量。酸枣仁皂苷 A 对于 GABA<sub>A</sub> 受体各个亚基的表达与地西洋相似但又有所不同<sup>[32]</sup>。酸枣仁皂苷 A 的水解产物酸枣仁皂苷元透过血脑屏障与 GABA<sub>A</sub> 受体结合位点上的关键残基  $\beta$  2-Thr266 和  $\beta$  2-Tyr229 形成氢键结合,而发挥镇静催眠的作用<sup>[33]</sup>。寿彩华<sup>[34]</sup>对酸枣仁皂苷 A 的镇静催眠作用进行了较为系统研究,其研究首先发现酸枣仁皂苷 A 可以抑制青霉素诱导的兴奋性放电,降低兴奋性神经递质谷氨酸的释放,起到突触前抑制的作用,进一步研究发现,酸枣仁皂苷 A 抑制谷氨酸诱导的神经元细胞  $Ca^{2+}$  的升高,说明酸枣仁皂苷 A 通过阻断兴奋性神经信号传递,抑制兴奋性神经递质的释放,降低兴奋性放电,从而起到镇静催眠的作用。

斯皮诺素可以增强非快动眼睡眠时相的慢波睡眠(SWS)<sup>[35]</sup>,还可以对戊巴比妥诱导睡眠后用 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂拮抗导致的睡眠总时间、NREM 和 REM 睡眠期的 SWS

睡眠时间的缩短进行逆转, 延长睡眠时间和 SWS 睡眠时间。说明斯皮诺素可能是 5-HT<sub>1A</sub> 受体的拮抗剂。杨波等<sup>[36]</sup>观察以酸枣仁为君药的复方酸枣仁汤对睡眠剥夺大鼠海马与睡眠相关的神经递质 NA、GABA、5-HT 的影响, 结果与睡眠剥夺组比较 NA 降低, GABA 和 5-HT 升高。

马元<sup>[37]</sup>的研究发现生物碱类中的酸枣仁碱 A 有类似 GABA<sub>A</sub> 受体激动剂的效应, 可以增加小脑细胞 Cl<sup>-</sup>向细胞内转入, 说明具有催眠作用。另一项研究<sup>[38]</sup>发现酸枣仁碱 A 可以增强 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha$ 、 $\gamma$  亚基和 GAD65/67 的表达。

由以上论述可以看出, 斯皮诺素和酸枣仁皂苷为酸枣仁镇静催眠的主要有效成分, 是多靶点、多效应的, 从分子、细胞、组织、整体等不同水平, 从神经递质及其受体、神经电活动、睡眠结构等不同方向, 产生镇静催眠效应。但是对于酸枣仁的研究远远不够, 如对于机体激素或炎性因子等其他系统的影响、机体代谢变化过程、酸枣仁不同成分之间相互作用、单味及复方制剂作用的异同等等, 这些都需要我们进一步探索。

## 7 问题与展望

中医对于失眠的治法、方药繁多, 而酸枣仁有养心安神益肝之效, 治疗失眠历史悠久, 疗效显著, 应用广泛。但关于酸枣仁的生熟之用、剂量等仍存在争议, 需要更多、更长久的临床观察及更深入的实验研究。并且对于酸枣仁镇静催眠作用的生物学机制虽有所突破, 但研究的不够系统、细致、深入, 还需要我们系统科学的进行更深入的探索, 对失眠的治疗提供更多的启发与帮助, 帮助更多的人摆脱失眠的困扰。

## 参考文献

- [1] 刘立杰,侯星宇,贾春华教授治疗失眠用药经验[J].现代中医临床,2009, 16(4):19-20.
- [2] 周珩.生熟枣仁异治质疑[J].浙江中医杂志,1998(4).
- [3] 金辉,许韵梅.酸枣仁并非生熟异治[J].辽宁中医杂志,1993(2):40-40.
- [4] 吴玉兰,许惠琴,陈说.酸枣仁不同炮制品及炒酸枣仁中总黄酮与总皂苷的镇静催眠作用比较[J].时珍国医国药,2005,16(9):868-869.
- [5] 郭永奇,杨帆.生、熟酸枣仁治疗失眠的临床及药理学观察[J].陕西中医,2008, 29(11):1538-1539.
- [6] 李玉娟,梁鑫淼,肖红斌,等.生、炒酸枣仁镇静催眠作用及化学成分比较[J].沈阳药科大学学报,2003,20(1):35-37.
- [7] 李廷利,孙加源.生、炒酸枣仁催眠作用的实验研究[J].中医药学报,2001, 29(5):35-36.
- [8] 周琴,曹艳,陈科力.中医药治疗失眠症的研究和分析[J].中国医药指南,2012,

10(6):209-211.

- [9] 吴嘉瑞,张冰,杨冰,等.基于关联规则和复杂系统熵聚类的颜正华诊疗失眠用药规律研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):1-5.
- [10] 李健,赵志付.赵志付教授重用酸枣仁治疗不寐经验初探[J].世界中西医结合杂志,2012,07(5):382-383.
- [11] 毛丽军.周绍华神经科方药心得[M].科学出版社,2010.
- [12] 赵宪荣,刘国.热浸酸枣仁戒断治疗镇静药物依赖性成瘾 42 例[J].山东中医杂志,2005,24(11):661-662.
- [13] 金川,甄仲,仝小林.仝小林运用大剂量酸枣仁治疗失眠经验举隅[J].辽宁中医杂志,2012(2):343-344.
- [14] 田秀红,黎梅.酸枣活性成分分析及药理作用研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(23):11555-11557.
- [15] 丘明明,黎有新.酸枣仁研究近况[J].中医药研究,1995(4):60-62.
- [16] 朱国庆,张景行.炒枣仁煎剂灌胃对大鼠睡眠的影响[J].安徽医科大学学报,1990(1):1-5.
- [17] 胡明亚.酸枣仁的药理作用及现代临床应用研究[J].中医临床研究,2012(19):20-20.
- [18] Won Sick Woo, Sam Sik Kang, Sang Hyuck Shim, etc. The structure of spinosin (2"-O- $\beta$ -glucosylswertisin) from *Zizyphus vulgaris* var *Spinosus*[J]. *Phytochemistry*, 1979,18(2):353-355.
- [19] 崔瑛,杨晶晶,郭敏娟,等.基于“病证-效应-生物样本分析”方法的酸枣仁“安神”药性物质及归经的研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(3):569-577.
- [20] Wang L E, Bai Y J, Shi X R, etc. Spinosin, a C-glycoside flavonoid from semen *Ziziphii Spinozae*, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system[J]. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 2008, 90(3):399-403.
- [21] 王旭峰,何计国,陈阳,等.酸枣仁皂苷的提取及改善睡眠功效的研究[J].食品科学,2006,27(4):226-229.
- [22] 杨波,张爱华,王萍,等.基于果蝇模型的酸枣仁皂苷 A、B 治疗失眠症的实验研究[J].中医药信息,2013,30(5):55-57.
- [23] 张军武,赵琦.酸枣仁的生物学特征及化学成分研究进展[J].中医学报,2013,28(4):550-552.
- [24] 符敬伟,乔卫,陈朝晖.酸枣仁总生物碱镇静催眠作用的实验研究[J].天津医科大学学

报,2005,11(1):52-54.

- [25] 张军武,赵琦.酸枣仁的生物学特征及化学成分研究进展[J].中医学报,2013,28(4):550-552.
- [26] 李宝莉,夏传涛,袁秉祥.不同提取工艺的酸枣仁油对小鼠镇静催眠作用的影响[J].西安交通大学学报:医学版,2008,29(2):227-229.
- [27] 赵启铎.酸枣仁油中不饱和脂肪酸的药理实验研究[J].天津中医药,2005,22(4):331-333.
- [28] 李陆,刘桂友,刘婧姝,等.基于均匀设计法对酸枣仁镇静催眠有效组分的配伍研究[J].中草药,2011,42(7):1374-1377.
- [29] 崔思娇,贾英,罗洁,等.酸枣仁镇静催眠活性部位的筛选[J].中国药房,2013(23):2128-2129.
- [30] Lu YJ,Zhou J,Zhang SM, etc. Inhibitory effects of jujuboside A on EEG and hippocampal glutamate in hyperactive rat[J]. Journal of Zhejiang University B, 2005, 6(4):265-271.
- [31] 张舜波,游秋云,吴丽丽.酸枣仁总皂苷对老年阴血亏虚型失眠证候模型大鼠脑组织 Glu 及 GABA 含量的影响[C].中华中医药学会第二次中医元气学术会议暨湖北省中医中药学会老年医学专业委员会成立大会.2013.
- [32] You Z L, Xia Q, Liang F R, etc. Effects on the expression of GABA A receptor subunits by jujuboside A treatment in rat hippocampal neurons[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128(2):419-423.
- [33] Chen C, Chen Y H. What is the effective component in suanzaoren decoction for curing insomnia? Discovery by virtual screening and molecular dynamic simulation[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2008, 26(1):57-64.
- [34] 寿彩华.酸枣仁皂甙 A 对实验大鼠的中枢镇静抑制作用及机制研究[D].浙江大学,2002.
- [35] Wang L E, Cui X Y, Cui S Y, etc. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of Semen Ziziphi spinosae, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors[J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, 2010, 17(6):404-9.
- [36] 杨波,岳明.酸枣仁汤对睡眠剥夺大鼠认知功能及海马 NA,GABA,5-HT 的影响[J].陕西中医,2015(1):123-124.
- [37] Yuan M, Huishan H, Jae Soon E, etc. Sanjoinine A isolated from Zizyphi Spinosi Semen

augments pentobarbital-induced sleeping behaviors through the modification of GABA-ergic systems[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30(9):1748-1753.

[38] Huishan H, Yuan M, Jae Soon E, etc. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi Semen*: possible involvement of GABAergic transmission[J]. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 2009, 92(2):206-13.

## 前言

Glu 和 GABA 是哺乳动物中枢神经系统内最重要的氨基酸类神经递质。Glu 是哺乳动物脑内最重要兴奋性神经递质,对脑中几乎所有的神经元都具有兴奋作用。GABA 是哺乳动物中枢神经系统内最重要的抑制性神经递质,在大脑神经系统中 GABA 几乎对所有的神经元都有抑制作用。

现在的研究越来越明确的显示,大脑兴奋系统和抑制系统之间的平衡是避免病态发生的一个重要途径。而以兴奋作用为主的 Glu 和以抑制作用为主的 GABA 在脑的正常功能活动中起着十分重要的作用。适度应激之所以不会引起精神情感障碍,其重要原因之一是当应激导致这种平衡被破坏时,通过 Glu 能突触和 GABA 能突触之间互相调节使兴奋和抑制保持平衡。当这一平衡不能维持时,就会导致神经精神性疾病。

失眠多伴有情绪障碍,失眠多与情绪障碍共病或关系密切。王升旭发现<sup>[1]</sup>将大鼠连续 96 小时睡眠剥夺后各脑组织(脑干、大脑额叶皮质及下丘脑等)GABA、GABA/Glu 的比值均显著增高。尚有研究提示<sup>[2]</sup>大鼠睡眠剥夺 1 天、3 天、5 天以及恢复睡眠后 6 小时大鼠下丘脑 GABA 表达较正常睡眠组显著增高。涂星等<sup>[3]</sup>复制药物诱导失眠动物模型、平台水环境诱导失眠动物模型、刺激诱导失眠动物模型,利用荧光高效液相色谱法测定三种失眠模型大鼠脑组织氨基酸类神经递质的含量,实验结果发现 Glu/GABA 比例增大。可以看出, Glu/GABA 的兴奋/抑制功能失衡与失眠的发生密切相关。而 Glu 可以合成 GABA, GABA 在消除过程中也可以转化为 Glu,两者在代谢上密切相关。GABA 和 Glu 合成消除和转移等方面的稳态对于维持大脑中兴奋和抑制的平衡至关重要。

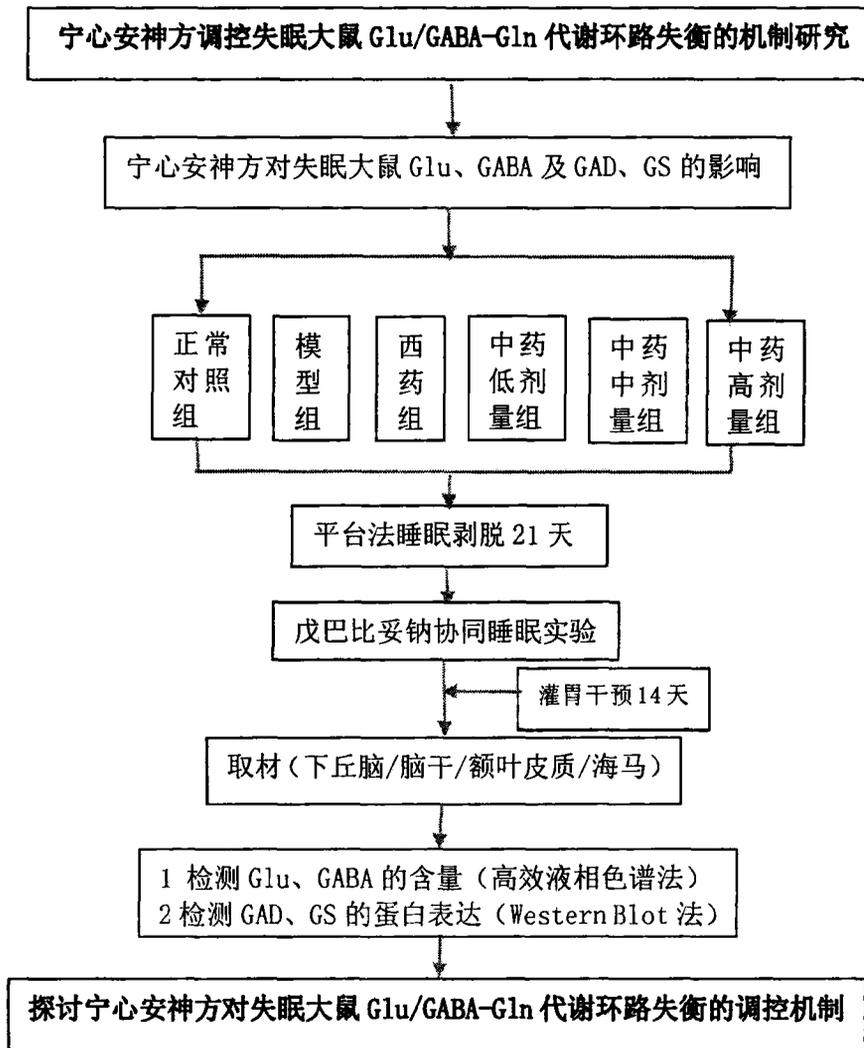
Glu/GABA-Gln 代谢环路是脑内 Glu 和 GABA 代谢转换的主要途径<sup>[4]</sup>。这条代谢环路中,神经元通过 GAD 将 Glu 转化为 GABA,星形胶质细胞通过 GS 将 Glu 或 GABA 转化为 Gln, Gln 再传递回神经元供其转化为 Glu 重复利用。因而, GAD 和 GS 是调控 Glu/GABA-Gln 代谢环路的关键因子。因此,通过 Glu/GABA-Gln 代谢环路,调控 Glu 和 GABA 系统可能成为治疗失眠的新靶点。

失眠已经成为一个严重的全球问题。失眠的发生受多种因素的影响,长期的临床观察及前期的动物实验均证实,中医药治疗失眠有着不同于西医的、独特的优势。中医认为天人相应,阳气入于阴则寐,阳气出于阴则寤,正常的睡眠需要阴平阳秘、气血调和、神静魂安。失眠总的病机为阳盛阴衰,阴阳失交。中医治疗失眠以补虚泻实、调整脏腑阴阳为原则。宁心安神方为导师郭蓉娟临床治疗失眠的经验方,以酸枣仁为主,有养心

安神益肝的作用，配伍刺五加、夏枯草等辅以宁心安神、清肝泻火。全方补心肝之血虚、泻肝胆之实火，养血安神、育肝安魂，阴血既充，阳气得藏，则神魂安宁，阳气入于阴则寐。

本次研究应用宁心安神方进行动物实验，以 GAD、GS 为切入点，探讨宁心安神方调整失眠大鼠的 Glu/GABA-Gln 代谢环路机制，旨在初步探索 Glu/GABA-Gln 代谢环路与失眠的关系，希望为临床治疗失眠症提供实验依据，期待能为药物开发提供新靶点。

**技术路线图:**



## 第二部分 实验研究

### 实验一 宁心安神方对失眠大鼠的疗效评价

#### 1 实验材料

##### 1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级成年 8 周龄 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 体重  $200 \pm 20\text{g}$ , 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。实验动物饲养于北京中医药大学东方医院动物实验室, 室温控制在  $21\text{-}25^\circ\text{C}$ , 相对湿度为  $40\%\text{-}70\%$ , 正常光照时间  $12\text{h/d}$ , 提供充足饲料和水, 定期清洁和消毒。

##### 1.2 实验药品

戊巴比妥钠 (编号 AS5062-5)

地西洋片: 北京益民药业有限公司 (国药准字 H11020898),  $2.5\text{mg/片}$

宁心安神方: 酸枣仁、刺五加、夏枯草。购自北京康仁堂药业有限公司颗粒剂

##### 1.3 实验仪器

1.3.1 ACS-2EAS 型电子秤 (北京市菲姆斯科技开发公司)

AE160 型电子分析天平 (瑞士 Mettler 公司)

##### 1.3.2 睡眠剥脱箱

自制改良的多平台睡眠剥夺箱 (如图 1.1 所示), 该剥脱箱由亚克力塑料板制成, 长  $110\text{cm}$ 、宽  $60\text{cm}$ 、高  $40\text{cm}$ , 15 个直径  $6.5\text{cm}$ 、高  $8.0\text{cm}$  的圆柱平台固定于其底部, 平台间间距纵向  $10\text{cm}$ 、横向  $13\text{cm}$ , 水箱中注满水, 水面约在平台下  $1.0\text{cm}$ , 水温保持在  $23\text{-}25^\circ\text{C}$ 。不锈钢丝网盖住箱顶, 防止大鼠逃逸, 盖上放置充足食物和水。睡眠剥脱箱中的水每天更换, 保持清洁。

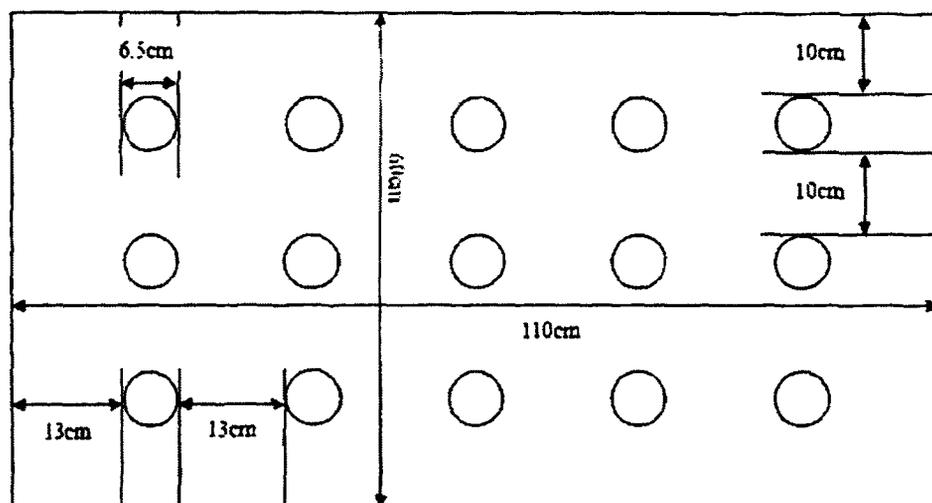


图 1.1 睡眠剥夺箱

## 2 实验方法

### 2.1 动物分组

将 54 只 SD 大鼠称重标记, 按体重拉丁方分组分为 6 组, 每组 9 只, 分别为正常对照组、失眠模型组、西药组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组。

### 2.2 失眠动物模型的建立

本实验采用改良多平台水环境睡眠剥夺法建立失眠动物模型<sup>[5]</sup>。方法如下: 将大鼠分别放入睡眠剥夺箱内的平台上, 大鼠可自由进食、饮水、转身、抬头、舔毛等活动, 当其进入快速动眼相睡眠(REM), 由于全身肌张力降低、肌肉松弛, 大鼠将垂头触水或落入水中而惊醒, 从而继续在维持清醒状态下站立。

动物适应性饲养 7 天, 这期间, 除正常对照组外, 其余各组大鼠进行适应性训练, 让大鼠在睡眠剥夺箱中进行站立训练, 每天 1 次, 每次 1 小时。第 7 天开始造模, 将大鼠放置于睡眠剥夺箱中, 进行睡眠剥夺, 第一周, 每天 1 次, 每次剥夺 12 小时 (8: 00-20: 00), 第二周, 隔天 1 次。每次剥夺 24 小时 (8: 00-8: 00), 第三周, 每天 1 次, 每次剥夺 15 小时 (6: 00-21: 00)。正常对照组不接受睡眠剥夺。

### 2.3 失眠大鼠模型评价方法

#### 2.3.1 一般情况观测

造模期间及结束后, 观察各组大鼠的精神状况、昼夜活动程度、对外刺激反应、皮毛色泽等的变化。

#### 2.3.2 戊巴比妥钠睡眠协同实验

造模结束后, 各组大鼠均腹腔注射戊巴比妥钠 45mg/kg (预实验测得大鼠的戊巴

比妥钠阈剂量为 45mg/kg)。让大鼠腹部向上身体保持垂直放在平板上,保持 60 秒以上为翻正反射消失,从腹腔注射时间至翻正反射消失时间记为睡眠潜伏时间;大鼠 60 秒内翻转过来两次以上视为翻正翻身恢复,翻正反射消失时间翻正反射恢复时间为睡眠持续时间。

采用 SPASS 20.0 统计软件,对正常对照组与造模组大鼠的睡眠潜伏时间与睡眠持续时间进行统计分析,评价造模是否成功。

## 2.4 给药方法

于造模结束后第 2 天开始每日 8:00 给药,连续给药 14 天。

中药各组给予相应中药颗粒剂混悬液灌胃,每天 1 次。

西药组给予地西泮片混悬液灌胃,每天 1 次。

模型组和正常对照组给药时间和途径同中药组和西药组,以蒸馏水代替药液。

给药浓度和剂量:剂量根据人与大鼠体表面积公式换算: $dB(mg/kg)=dA \times (RB/RA) \times (WA/WB)^{1/3}$ 。其中 dB 是欲求算的大鼠的公斤体重剂量, dA 是已知人的公斤体重剂量, WA、WB 是已知人和大鼠的体重, RB 和 RA 是体型系数 (RB=0.09, RA=0.1)。

## 3 实验结果

### 3.1 模型评价

#### 3.1.1 一般情况

正常对照组大鼠正常活动,毛色光泽,喜聚集在一起规律睡眠。造模结束后,造模组大鼠昼夜节律消失、白天活动不停,精神亢奋、狂躁,易激惹,在睡眠剥夺箱中跳跃、互相撞击、后肢站立于平台上、左右张望、逃离欲望强烈,消瘦,毛枯无泽,掉毛。

#### 3.1.2 戊巴比妥钠睡眠协同实验

慢性睡眠剥夺 21 天后,与正常对照组比较,造模组睡眠潜伏时间延长,睡眠持续时间缩短,具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。如表 1.1 和图 1.2、1.3。

表 1.1 大鼠造模结束时戊巴比妥钠实验的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	睡眠潜伏时间 (s)	睡眠持续时间 (s)
正常对照组	252.875 ± 8.704	3394.750 ± 267.888
造模组	344.667 ± 15.393*	2466.095 ± 170.675*

注: \* $P < 0.05$  与正常对照组组比较。

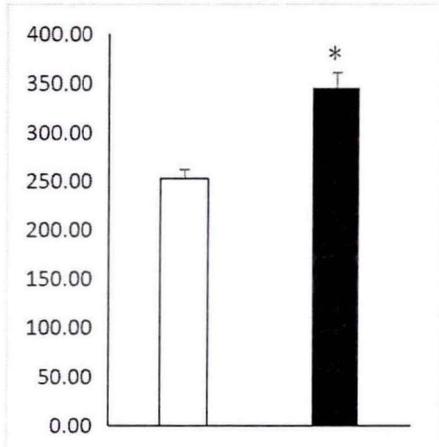


图 1.2 大鼠造模结束时睡眠潜伏时间 (s)

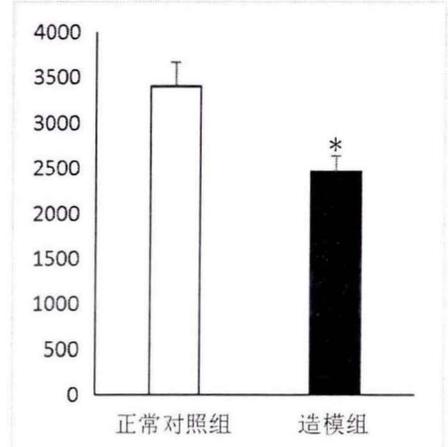


图 1.3 大鼠造模结束时睡眠持续时间 (s)

综上所述, 大鼠睡眠剥夺 21 天后, 睡眠潜伏时间延长、睡眠持续时间减少, 同时出现昼夜节律紊乱、白天活动不停等现象, 提示失眠模型复制成功。

### 3.2 宁心安神方对失眠大鼠的疗效评价

#### 3.2.1 一般情况

开始给药后, 模型组大鼠攻击性强, 撕咬打架, 同性骑行行为, 白天晚上均活动不停, 消瘦。西药组、中药中剂量组、中药高剂量组大鼠白天活动量减少, 跳跃、撞击动作明显减少, 亢奋、狂躁减弱, 反应较灵敏。

#### 3.2.2 宁心安神方对失眠大鼠睡眠潜伏时间的影响

治疗结束后, 与正常对照组比较, 模型组大鼠的睡眠潜伏时间显著延长, 睡眠持续时间显著缩短 (均  $P < 0.01$ ); 与空白模型组比较, 中药中、高剂量组和西药组的睡眠潜伏时间明显缩短, 睡眠持续时间明显延长 (均  $P < 0.05$ ); 中药中、高剂量组与西药组亦未见明显差异。

表 1.2 大鼠治疗结束时戊巴比妥钠实验的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	睡眠潜伏时间 (s)	睡眠持续时间 (s)
正常对照组	243.444 ± 10.863	3457.00 ± 312.096
模型组	421.778 ± 20.797**	1817.000 ± 92.473**
西药组	266.333 ± 12.431 <sup>+</sup>	3168.333 ± 165.889 <sup>+</sup>
中药低剂量组	398.778 ± 34.707	2346.333 ± 258.596
中药中剂量组	267.222 ± 10.646 <sup>+</sup>	3049.667 ± 154.967 <sup>+</sup>
中药高剂量组	278.889 ± 12.320 <sup>+</sup>	2743.111 ± 176.516 <sup>+</sup>

注: 与正常对照组比较\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>+</sup> $P < 0.05$ , <sup>++</sup> $P < 0.01$ 。

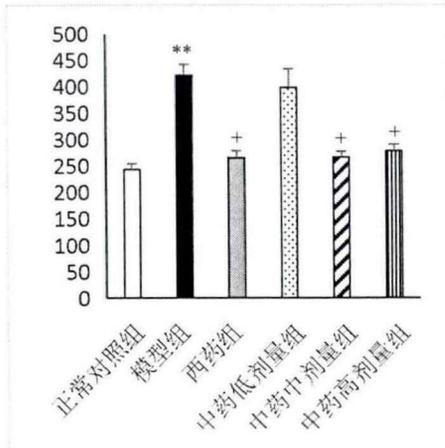


图 1.4 大鼠治疗结束时睡眠潜伏时间 (s)

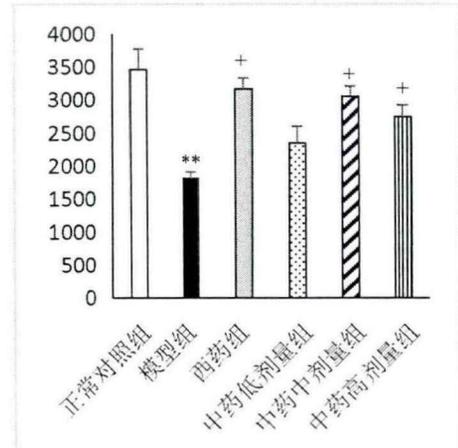


图 1.5 大鼠治疗结束时睡眠持续时间 (s)

## 实验二 宁心安神方对失眠大鼠各脑组织中 Glu、GABA 的影响

### 1 实验材料

#### 1.1 实验仪器

Synapt G2 超高效液相飞行时间质谱 (UPLC-Q-ToF, 美国 Waters 公司); Fresco 低温冷冻离心机 (美国 Thermo); 电动组织匀浆器 (美国 Fluka)。

#### 1.2 实验试剂

Glu 标准品 (中检院, 批号 140690-201203); GABA 标准品 (Aladdin 公司, 批号 E1427036); 质谱级甲醇 (Fisher 公司, lot 143684); 屈臣氏蒸馏水。

### 2 实验方法

#### 2.1 组织取材

将大鼠断头处死, 迅速剥取全脑, 放置于冰盘上, 分离取出脑干、下丘脑、皮质、海马, 冰冻生理盐水漂洗后滤纸拭干表面水分, 装入冻存管中,  $-80^{\circ}\text{C}$  冰冻保存。

#### 2.2 标本处理

在分析前室温下解冻, 取待测脑组织 0.1g 左右, 放入 1.5ml EP 管。加入 0.4ml 甲醇, 冰浴中匀浆机匀浆, 加入 10ul 内标 (欧前胡素  $0.31\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 涡旋 1min。将处理后的匀浆液放置于冰盒中静置 30min 去除蛋白。将匀浆液于  $4^{\circ}\text{C}$ 、大于 13000r/min 的离心机中离心 10min。取上清液 0.4ml 于干净的 EP 管中, 然后放置于氮吹仪中加热并氮气吹干。再加入 0.1ml 甲醇, 涡旋 10min 复溶后, 于  $4^{\circ}\text{C}$ 、大于 13000r/min 离心机中离心 10min。取 80ul 上清液到进样小瓶中待测, 进样量: 2ul。

#### 2.3 色谱条件

①色谱柱: Acquity UPLC HSS PFP ( $2.1 \times 100\text{mm}, 1.8\mu\text{m}$ ), lot No 0107352041; ②柱温

40℃; ③流动相: 甲醇-水; ④梯度洗脱 (A:水, B:甲醇): 0-1min 5%流动相 B, 1-3min 5%-10%流动相 B, 3-5min 10-90%流动相 B, 6-6.1min 90-5%流动相 B, 6.1-9min 5%流动相 B; ⑤流速:  $0.4\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。⑥进样量: 2ul。

## 2.4 质谱条件

电喷雾电离源 (ESI), 扫描方式: 正离子模式, sensitivity 模式, 选择离子扫描 (m/z) 104.072 (GABA), 160.076 (5-HT), 203.035 (ou)。毛细管电压 2.7KV, 锥孔电压: 15V; 离子源温度: 120℃; 脱溶剂温度: 500℃; 脱溶剂气体流速:  $800\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

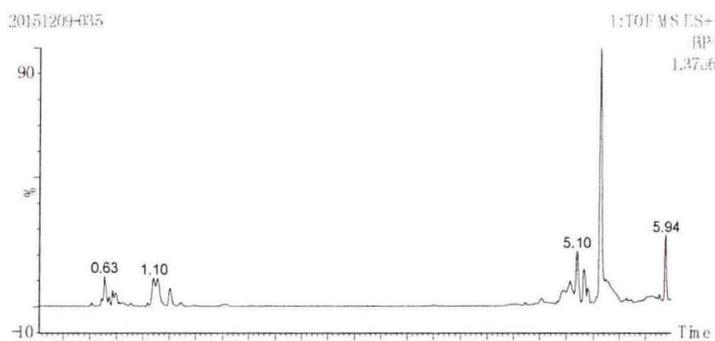
## 2.5 标准曲的制备

### 2.5.1 标准品溶液的配制

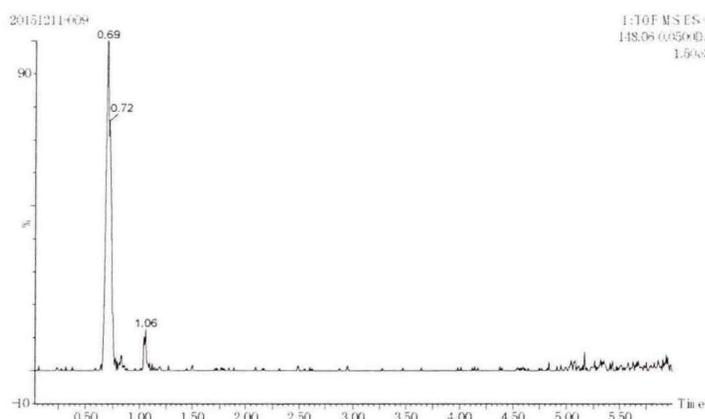
分别精密称取 Glu、GABA 及欧前胡素 (内标) 标准品 0.0549g、0.03482g、0.0155g, 用甲醇溶解并定容至 50ml, 配成浓度  $0.6964\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Glu);  $1.098\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (GABA);  $0.31\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (ou) 的标准品溶, 作为混合标准品储备液, 4℃ 冰箱中储存, 备用。

### 2.5.2 方法专属性

在本实验所采用的 UPLC-Q-ToF/MS 进样条件下, 发现 Glu、GABA、内标等各组份分离度较好, 互不干扰, 峰形良好、大小合适, 无杂峰干扰, 基线平稳, 保留时间(min) 分别为: 0.68、0.89、5.32。



A.



B.

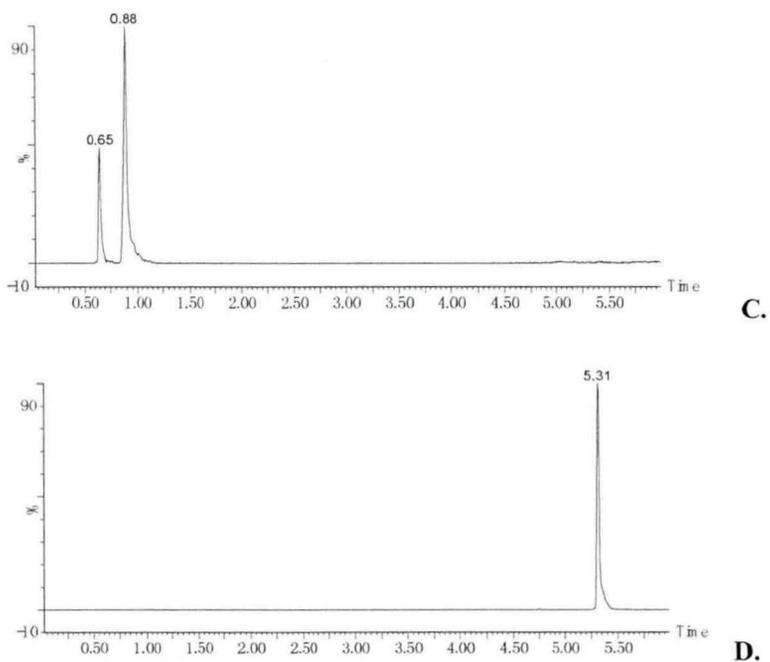
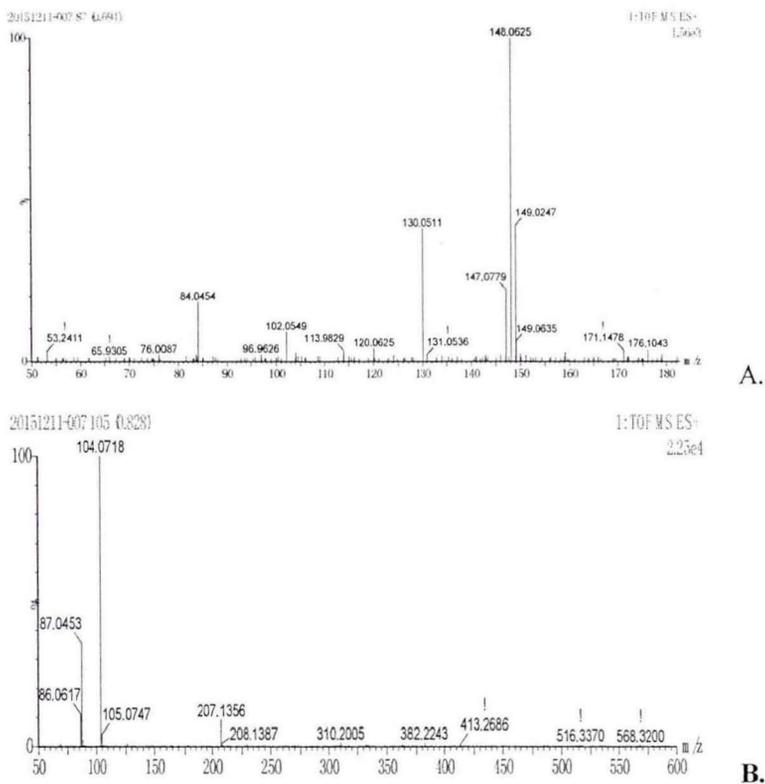


图 2.1 液相色谱图 (注: A.总离子流; B.Glu; C.GABA; D.内标)



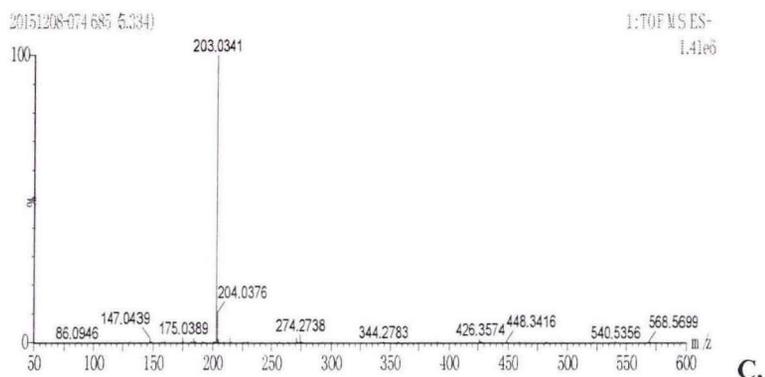


图 2.2 液相质谱图 (注: A.Glu; B.GABA; C.内标)

### 2.5.3 标准曲线的绘制

精密吸取标准品溶液各 200 $\mu$ L 配制成混合原液,按等比稀释法加入甲醇稀释得到一系列倍比关系浓度的混合标准品溶液,各取 100 $\mu$ L 样品,在上述色谱条件下,按照 2.2 步骤操作进样测其峰面积,以样品与内标峰面积比值为纵坐标 (Y),以进样浓度为横坐标 (X),进行线性回归,求得相关系数 r。结果见表 2.1。

表 2.1 神经递质标准曲线

神经递质	保留时间 (min)	回归方程	相对系数 $r^2$
Glu	0.68	$Y=0.02209X+0.00584$	0.99687
GABA	0.89	$Y=0.033X+0.000008$	0.99331

## 3 实验结果

### 3.1 脑干

治疗结束后,与正常对照组比较,模型组大鼠脑干中 Glu 水平有升高趋势,但无统计学差异 ( $P>0.05$ ),GABA 水平显著降低 ( $P<0.01$ ),Glu/GABA 比值显著升高 ( $P<0.01$ )。与模型组比较,治疗各组的 Glu 水平有下降趋势,但无统计学差异 ( $P>0.05$ );治疗各组 GABA 水平均有明显升高,其中中药高、中剂量组和西药组有显著差异 ( $P<0.05$ );治疗各组 Glu/GABA 比值均有不同程度的降低,但中药高、中剂量组和西药组有统计学差异 ( $P<0.05$ )。中药各组的 Glu、GABA、Glu/GABA 与西药组比较均无统计学差异 ( $P>0.05$ )。

表 2.2 不同组大鼠脑干组织 Glu、GABA、Glu/GABA 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Glu (ng/g)	GABA (ng/g)	Glu/GABA
正常对照组	0.0630±0.0200	7.0668±0.9905	0.0090±0.0036
模型组	0.0851±0.0222	4.6849±0.7330**	0.0189±0.0068**
西药组	0.0682±0.0281	6.9527±1.7668 <sup>+</sup>	0.0102±0.0046 <sup>+</sup>
中药低剂量组	0.0737±0.0520	6.2163±3.0698	0.0116±0.0049
中药中剂量组	0.0685±0.0193	7.0269±0.9307 <sup>++</sup>	0.0100±0.0039 <sup>+</sup>
中药高剂量组	0.0689±0.0355	7.0668±0.9905 <sup>++</sup>	0.0097±0.0049 <sup>+</sup>

注：与正常对照组比较\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ ；与模型组比较<sup>+</sup> $P<0.05$ ，<sup>++</sup> $P<0.01$ 。

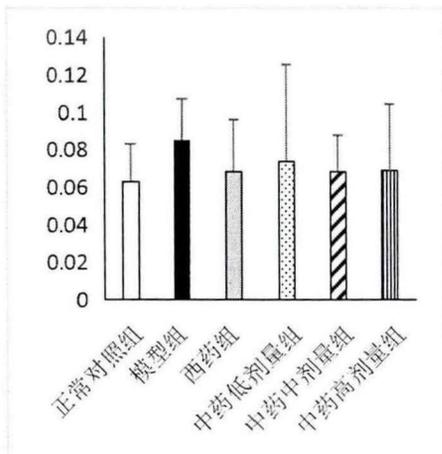


图 2.3 脑干 Glu 含量 (ng/g)

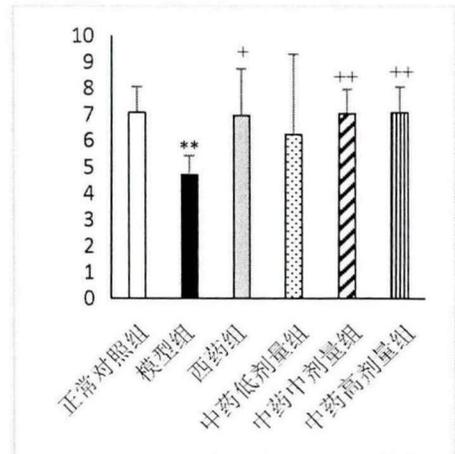


图 2.4 脑干 GABA 含量 (ng/g)

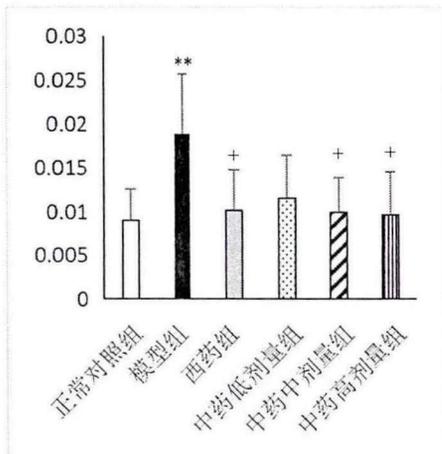


图 2.5 脑干 Glu / GABA

### 3.2 下丘脑

治疗结束后，与正常对照组比较，模型组大鼠下丘脑 Glu、GABA 水平及 Glu/GABA 比值均有明显差异 ( $P<0.05$ )。与模型组比较，治疗各组的 Glu 水平有下降趋势，但无统计学差异 ( $P>0.05$ )；治疗各组 GABA 水平均有明显升高，其中中药高、中剂量组和

西药组有显著差异 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )；治疗各组 Glu/GABA 比值均有不同程度的降低,但中药高、中剂量组和西药组有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。中药各组的 GABA、Glu/GABA 与西药组比较均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

表 2.3 不同组大鼠下丘脑组织 Glu、GABA、Glu/GABA 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Glu (ng/g)	GABA (ng/g)	Glu/GABA
正常对照组	0.0840 ± 0.0159	5.5632 ± 0.7602	0.0150 ± 0.0038
模型组	0.1069 ± 0.0015*	4.4920 ± 0.4041*	0.0241 ± 0.0051*
西药组	0.1031 ± 0.0169	5.5861 ± 0.6901 <sup>++</sup>	0.0186 ± 0.0031 <sup>+</sup>
中药低剂量组	0.0923 ± 0.0180	4.7469 ± 1.014	0.0203 ± 0.0059
中药中剂量组	0.0977 ± 0.0038	5.4252 ± 0.6556 <sup>+</sup>	0.0182 ± 0.0028 <sup>+</sup>
中药高剂量组	0.0936 ± 0.0174	5.4398 ± 0.7123 <sup>+</sup>	0.0174 ± 0.0038 <sup>+</sup>

注：与正常对照组比较\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较+ $P < 0.05$ ，++ $P < 0.01$ 。

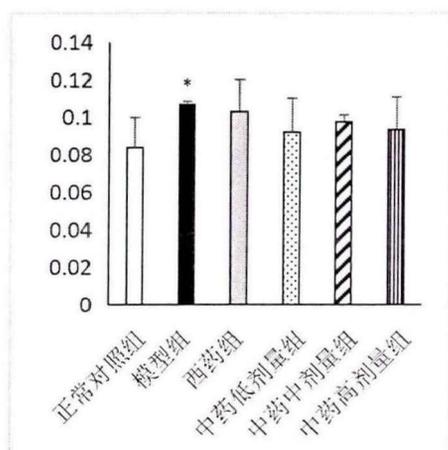


图 2.6 下丘脑 Glu 含量 (ng/g)

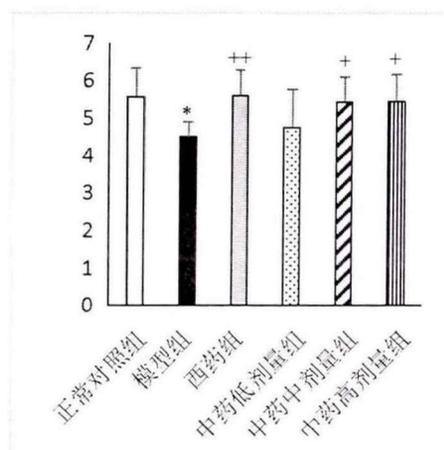


图 2.7 下丘脑 GABA 含量 (ng/g)

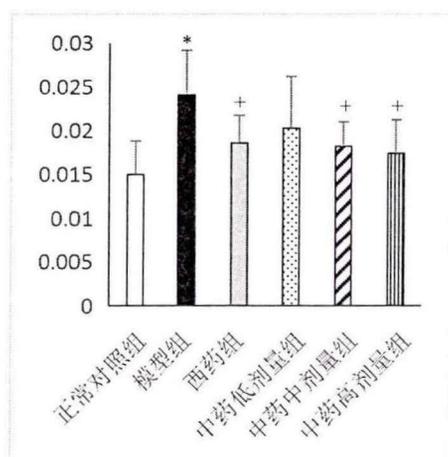


图 2.8 下丘脑 Glu / GABA

### 3.3 额叶皮质

治疗结束后, 各组大鼠额叶皮质中 Glu、GABA 水平比较均无统计学差异 ( $P>0.05$ )。与正常对照组比较, 模型组大鼠 Glu/GABA 比值有明显的升高 ( $P<0.05$ )。治疗各组 Glu/GABA 比值与模型组比较均无统计学差异 ( $P>0.05$ )。

表 2.4 不同组大鼠额叶皮质组织 Glu、GABA、Glu/GABA 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Glu (ng/g)	GABA (ng/g)	Glu/GABA
正常对照组	0.2140±0.0271	3.7341±0.4088	0.0574±0.0048
模型组	0.2460±0.0870	3.0893±0.8298	0.0790±0.0120*
西药组	0.2573±0.0988	3.8600±0.9761	0.0662±0.0169
中药低剂量组	0.2878±0.0895	3.7154±0.9203	0.0769±0.0071
中药中剂量组	0.2461±0.0716	3.6085±1.0678	0.0672±0.0134
中药高剂量组	0.2463±0.0481	3.7697±0.9628	0.0665±0.0087

注: 与正常对照组比较\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较+ $P<0.05$ , ++ $P<0.01$ 。

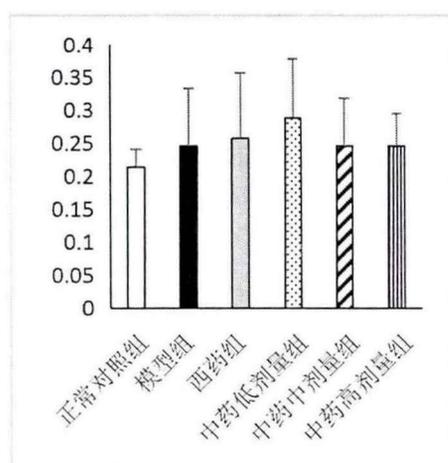


图 2.9 额叶皮质 Glu (ng/g)

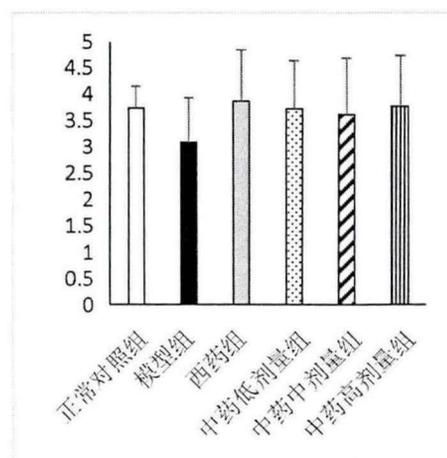


图 2.10 额叶皮质 GABA (ng/g)

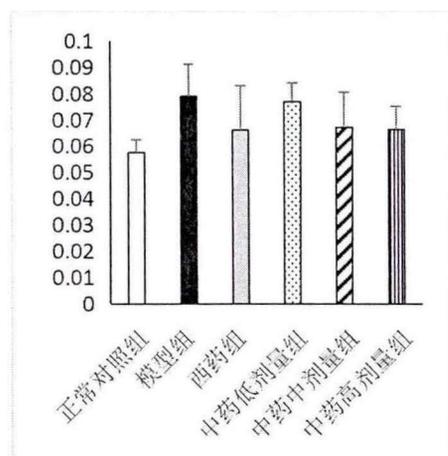


图 2.11 额叶皮质 Glu / GABA

### 3.4 海马

治疗结束后, 各组大鼠海马中 Glu、GABA 水平和 Glu/GABA 比值比较均无统计

学差异 ( $P>0.05$ )。

表 2.5 不同组大鼠海马组织 Glu、GABA、Glu/GABA 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Glu (ng/g)	GABA (ng/g)	Glu/GABA
正常对照组	0.1486±0.0299	3.9917±0.9646	0.0378±0.0058
模型组	0.1631±0.0276	3.4573±0.5271	0.0486±0.0127
西药组	0.1477±0.0392	3.6723±0.4669	0.0409±0.0128
中药低剂量组	0.1383±0.0573	3.2684±0.1844	0.0428±0.0182
中药中剂量组	0.1444±0.0328	3.5666±0.5572	0.0424±0.0127
中药高剂量组	0.1334±0.0405	3.3939±0.1476	0.0396±0.0134

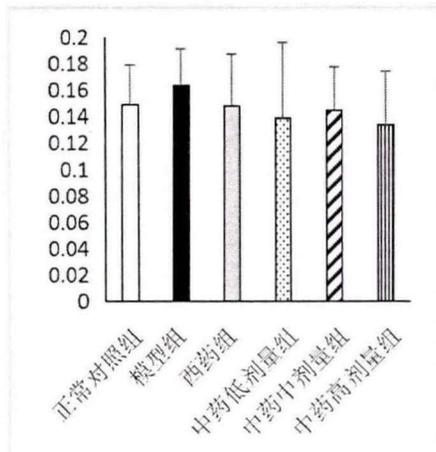


图 2.12 海马 Glu 含量 (ng/g)

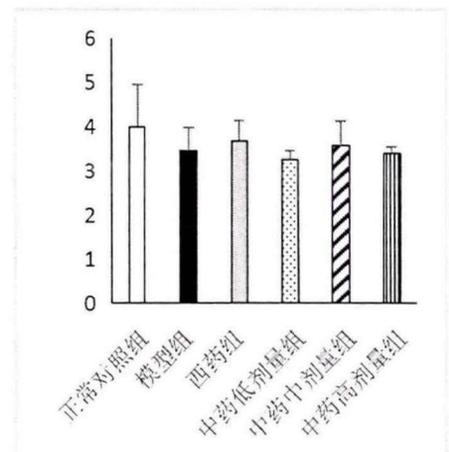


图 2.13 海马 GABA 含量 (ng/g)

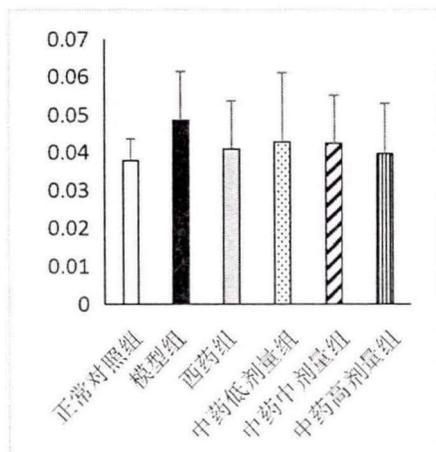


图 2.14 海马 Glu / GABA

### 实验三 宁心安神方对失眠大鼠各脑组织中 GAD、GS 的影响

#### 1 实验材料

##### 1.1 实验仪器

Fresco 低温冷冻离心机 (美国 Thermo); MultiSkan3 酶标仪 (美国 Thermo);

Mini P-4 电泳槽 (Cavoy)；湿转电泳槽 (Cavoy)；电泳仪 (Bio-Rad)；酸度计 pH211 (Hanna)；电动组织匀浆器 (美国 Fluka)。

## 1.2 实验试剂

牛血清白蛋白 (BSA)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、过硫酸铵 (APS)、四甲基乙二胺 (TEMED) 均购自美国 Amresco 公司, 货号分别为 0332、0754、0341、0172; 十二烷基硫酸钠 (SDS)、购自美国 Sigma 公司, 货号分别是 T1503; 蛋白抽提试剂、BCA 蛋白定量试剂盒均购自北京博奥龙免疫技术有限公司; GS、GAD 抗体抗体为 Abcam 公司产品, 货号分别为 Ab49873、Ab11070; GAPDH 抗体为 Immunoway 公司产品, 货号是 YM3029。

## 2 实验方法

采用 Western Blot 法测定大鼠各脑组织中蛋白 GAD、GS 的表达水平。

### 2.1 蛋白抽提

预冷 RIPA 蛋白抽提试剂, 加入蛋白酶抑制剂 (磷酸化蛋白需要同时加入磷酸酶抑制剂)。在蛋白抽提开始前加入 0.1M PMSF 母液, PMSF 终浓度 1mM。称取组织重量以重量: 裂解液体积=1:9 比例加入裂解液, Fluka 电动组织匀浆器 15000rpm 转速进行匀浆, 每次 10s, 间隔 10s; 进行三次匀浆。匀浆时 EP 管需要浸入冰水混合物中进行降温。匀浆完成后在冰上孵育 20min, 4 度离心, 13000rpm, 20min。离心完成后取上清, 分装保存, 待测。

### 2.2 BCA 法蛋白定量

准备 BCA 工作液 A 液: B 液=50:1, 稀释好各个提取 BSA 标准品。样品用 PBS 进行稀释。样品: BCA 工作液=1:8, 混匀后 37 度孵育 30min 或者室温孵育 60min, 酶标仪 570nm 波长滤光片读取 OD 值。

### 2.3 蛋白浓度调整

以 RIPA 调整蛋白浓度, 加入 5×还原样品缓冲液后样品终浓度: 4mg/ml。

### 2.4 目的蛋白 WB 正式实验

根据目的蛋白的分子量, 配制 12%的分离胶, 浓缩胶浓度为 5%。待检测蛋白样品上样量: 20ug/孔。电泳条件: 浓缩胶恒压 90V, 约 20min; 分离胶恒压 160V, 通过预染蛋白 marker 来确定电泳停止时间。湿转法, 转膜条件: 300mA 恒流, 0.45um 孔径 NC 膜, 转膜时间 1h。转膜完成后丽春红染色试剂对膜进行染色, 观察转膜效果。封闭: 将膜完全浸没 3%BSA-TBST 中室温轻摇 30min。一抗孵育: 用 3%BSA-TBST 稀释一抗,

GS 按比例 1:50000 稀释成 4ml, GAD 按比例 1:5000 稀释成 4ml, 室温孵育 10min, 放 4℃ 过夜。第二天从 4 度拿出膜, 在室温孵育 30min。洗膜: TBST 洗膜 5 次, 每次 3min。二抗孵育: 用 5%脱脂奶粉-TBST 稀释二抗, 山羊抗兔 IgG (H+L) HRP, 1:10000, 室温轻摇 40min。洗膜: TBST 洗膜 6 次, 每次 3min。ECL 加到膜上后反应 3-5min, 胶片曝光: 10s-5min (曝光时间随不同光强度而调整), 显影 2min, 定影。

## 2.5 内参蛋白 WB 正式实验

Stripping Buffer 洗膜, 37℃洗膜 30min (如果目的蛋白与内参蛋白分子量相差在 10K 以上, 可以不用 stripping buffer 洗膜这一步)。洗膜: 去离子水洗膜 3 次。洗膜: TBST 洗膜 3 次, 每次 3min。将膜完全浸没 5%脱脂奶粉-TBST 中室温轻摇 30min。孵育内参: 加 GAPDH 鼠单抗, 用 5%脱脂奶粉-TBST 稀释抗体, 1: 20000 稀释, 室温孵育 40min。洗膜: TBST 洗膜 5 次, 每次 3min。二抗孵育: 用 5%脱脂奶粉-TBST 稀释二抗, 山羊抗小鼠 IgG (H+L) HRP, 1:10000, 室温轻摇 40min。洗膜: TBST 洗膜 5 次, 每次 3min。ECL 加到膜上后反应 3-5min, 胶片曝光: 10s-5min (曝光时间随不同光强度而调整), 显影 2min, 定影。胶片扫描, 用凝光图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

## 3 实验结果

### 3.1 脑干

治疗结束后, 与正常对照组比较, 模型组大鼠脑干中 GAD 水平明显降低 ( $P<0.05$ ), GS 无统计学差异 ( $P>0.05$ )。与模型组比较, 中药各组和西药组大鼠脑干中的 GAD 水平均明显升高 ( $P<0.05$ ), GS 无统计学差异 ( $P>0.05$ )。

表 3.1 不同组大鼠脑干组织 GAD、GS 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	GAD	GS
正常对照组	0.6809±0.0902	0.6115±0.0764
模型组	0.4254±0.0563*	0.6414±0.1222
西药组	0.6694±0.0376 <sup>+</sup>	0.6806±0.0875
中药低剂量组	0.6465±0.0785 <sup>+</sup>	0.6322±0.0812
中药中剂量组	0.6623±0.0720 <sup>+</sup>	0.6488±0.1222
中药高剂量组	0.6720±0.0361 <sup>+</sup>	0.6115±0.0764

注: 与正常对照组比较\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较<sup>+</sup> $P<0.05$ , <sup>++</sup> $P<0.01$ 。

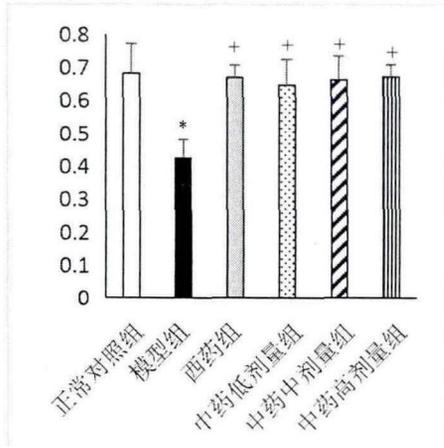


图 3.1 脑干 GAD 蛋白表达

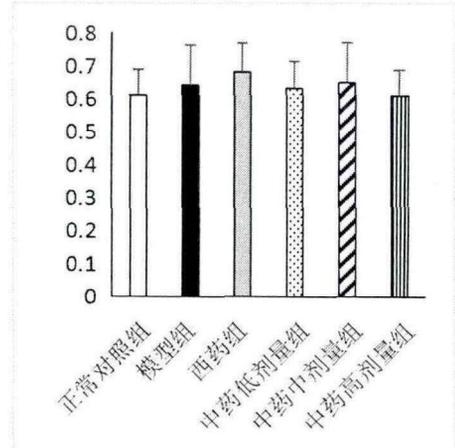


图 3.2 脑干 GS 蛋白表达

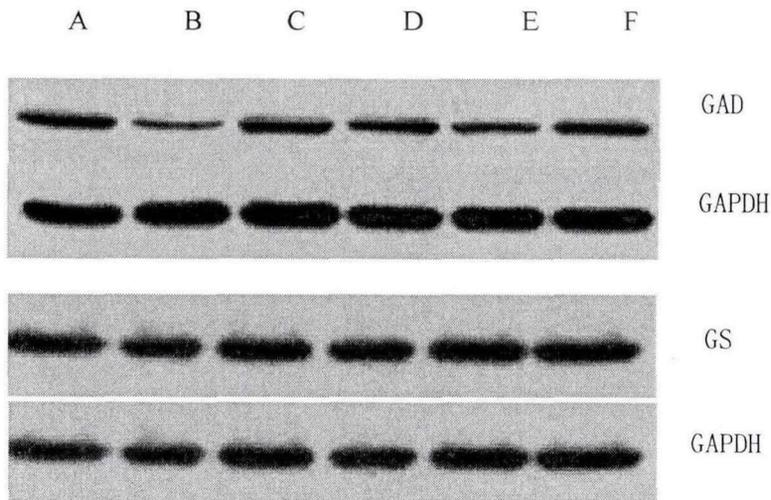


图 3.3 脑干 GAD、GS 蛋白水平表达条带图 (注: A 正常对照组 B 模型组 C 西药组 D 中药低剂量组 E 中药中剂量组 F 中药高剂量组)

### 3.2 下丘脑

治疗结束后, 与正常对照组比较, 模型组大鼠下丘脑 GAD 水平明显降低, 但 GS 明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 治疗各组大鼠 GAD 水平明显升高, 其中中药高剂量组和西药组有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。中药各组大鼠下丘脑 GS 水平与模型组、西药组大鼠比较均有明显的降低 ( $P < 0.05$ ), 与正常对照组无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 西药组 GS 水平与模型组比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

表 3.2 不同组大鼠下丘脑组织 GAD、GS 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	GAD	GS
正常对照组	0.7177±0.0177	0.4696±0.1421
模型组	0.5381±0.0953*	0.6994±0.0999*
西药组	0.7087±0.0398 <sup>+</sup>	0.6520±0.0695*
中药低剂量组	0.6579±0.2216	0.4266±0.1012 <sup>+#</sup>
中药中剂量组	0.6794±0.1120	0.4222±0.0712 <sup>+#</sup>
中药高剂量组	0.7037±0.0161 <sup>+</sup>	0.3743±0.0761 <sup>+#</sup>

注：与正常对照组比较\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较+ $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$ ；与西药组比较## $P < 0.05$ , # $P < 0.01$ 。

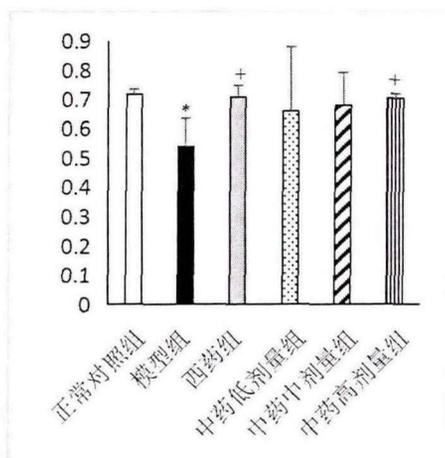


图 3.4 下丘脑 GAD 蛋白表达

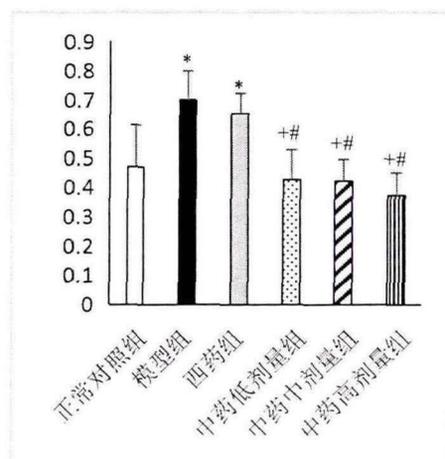


图 3.5 下丘脑 GS 蛋白表达

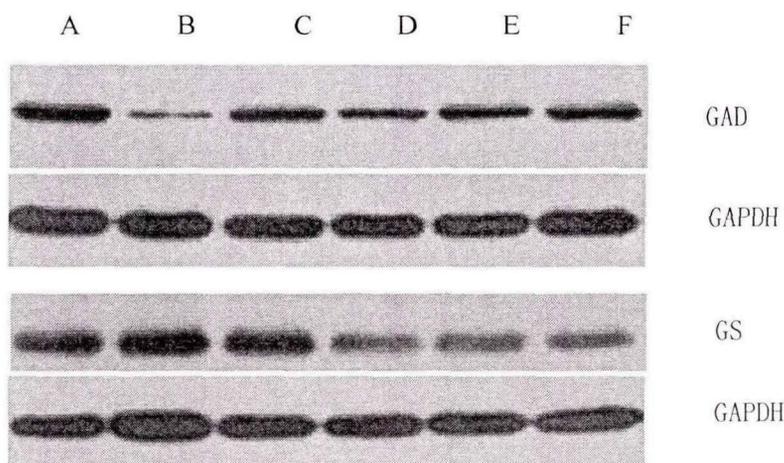


图 3.6 下丘脑 GAD、GS 蛋白水平表达条带图（注：A 正常对照组 B 模型组 C 西药组 D 中药低剂量组 E 中药中剂量组 F 中药高剂量组）

### 3.3 额叶皮质

治疗结束后，各组大鼠额叶皮质中 GAD、GS 水平比较均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

表 3.3 不同组大鼠额叶皮质组织 GAD、GS 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	GAD	GS
正常对照组	0.5461 ± 0.1096	0.7393 ± 0.0304
模型组	0.5465 ± 0.0715	0.6757 ± 0.1565
西药组	0.5386 ± 0.0511	0.7267 ± 0.1349
中药低剂量组	0.5763 ± 0.1330	0.6709 ± 0.1169
中药中剂量组	0.6091 ± 0.0855	0.7231 ± 0.0960
中药高剂量组	0.5809 ± 0.0677	0.6742 ± 0.1197

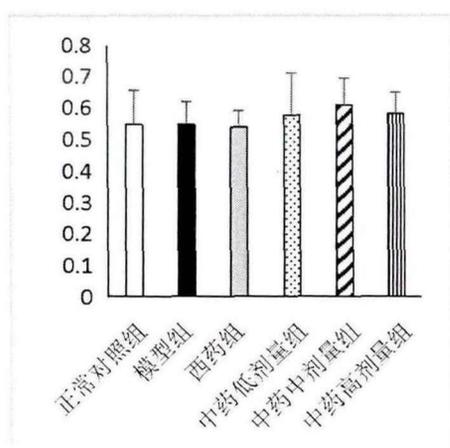


图 3.7 额叶皮质 GAD 蛋白表达

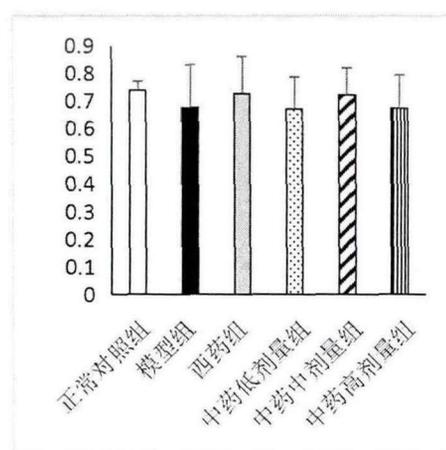


图 3.8 额叶皮质 GS 蛋白表达

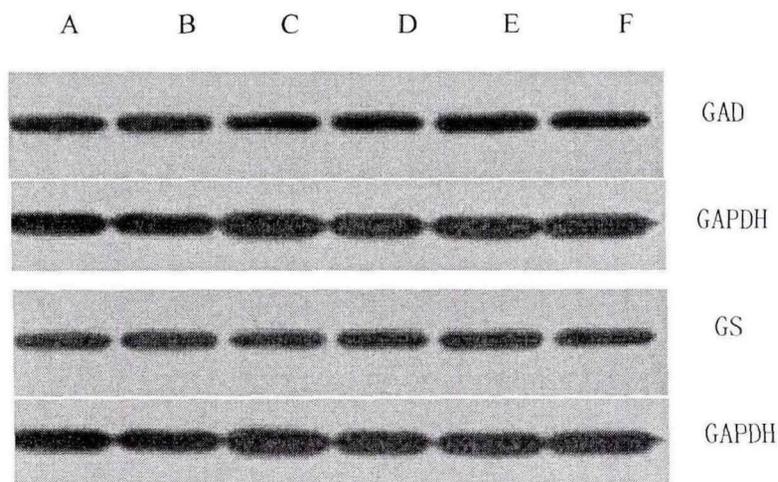


图 3.9 额叶皮质 GAD、GS 蛋白水平表达条带图 (注: A 正常对照组 B 模型组 C 西药组 D 中药低剂量组 E 中药中剂量组 F 中药高剂量组)

### 3.4 海马

治疗结束后, 各组大鼠海马中 GAD、GS 水平比较均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

表 3.4 不同组大鼠海马组织 GAD、GS 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	GAD	GS
正常对照组	0.5573±0.0412	0.8376±0.1246
模型组	0.4742±0.0749	0.8017±0.1052
西药组	0.5460±0.0645	0.8583±0.0863
中药低剂量组	0.5730±0.1608	0.7839±0.1754
中药中剂量组	0.5700±0.1048	0.8639±0.0936
中药高剂量组	0.6246±0.0304 <sup>+</sup>	0.8502±0.1246

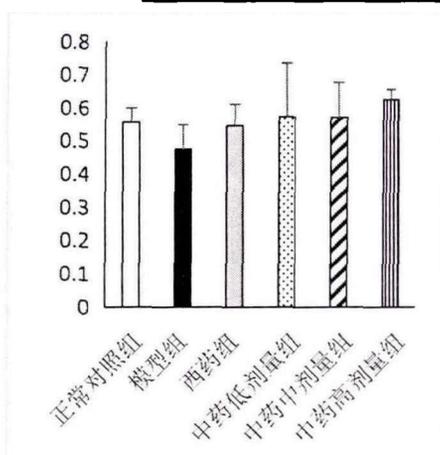


图 3.10 海马 GAD 蛋白表达

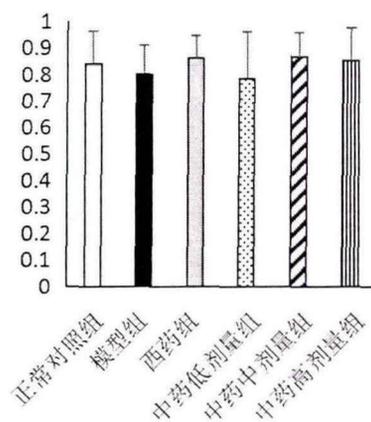


图 3.11 海马 GS 蛋白表达

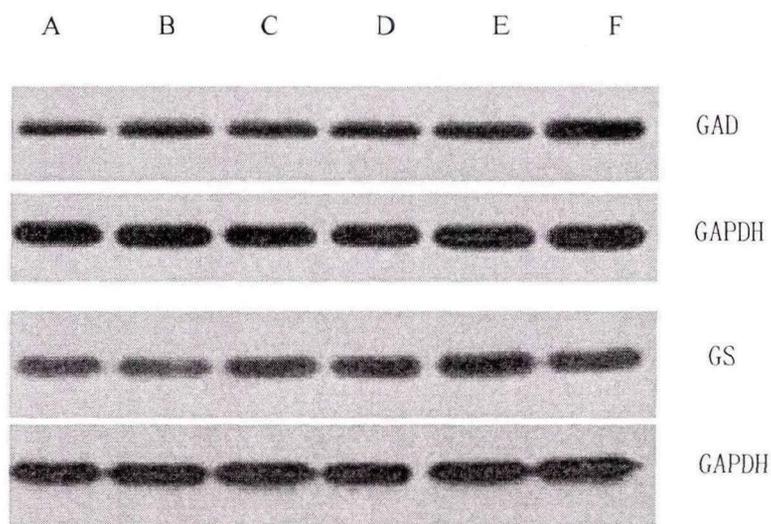


图 3.12 海马 GAD、GS 蛋白水平表达条带图 (注: A 正常对照组 B 模型组 C 西药组 D 中药低剂量组 E 中药中剂量组 F 中药高剂量组)

## 讨论

### 1. 失眠动物模型的建立及评估

在医学研究中, 为了有效的认识疾病的发生、发展规律以及预防和治疗, 需要适合的动物模型作为研究载体。所以动物模型的建立和评估对于疾病的机理研究和防治至关

重要。目前，失眠动物模型的建立主要有：强迫运动法、平台法、认为刺激法等物理因素，和通过注射对氯苯丙氨酸（PCPA）、5-羟色胺 7（5-HT7）受体拮抗剂 SB-269970、硒化物等化学因素建立失眠动物模型的方法<sup>[6]</sup>。失眠动物模型常用的评价方法一种是睡眠检测：通过描述睡眠时间、睡眠质量来检测模型是否成功；戊巴比妥钠协同睡眠实验亦为常用的简单便行的方法，主要以睡眠潜伏时间、睡眠持续时间、睡眠率等指标判断模型动物是否失眠。

本实验采用改良多平台水环境睡眠剥夺法建立失眠模型。该方法操作简单便行，成本低，重复性强，是目前建立失眠模型常用的方法。如孟玲欣等发现<sup>[7]</sup>该方法所造模型效果更加，可以有效降低大鼠应激性和群体不稳定性；游秋云等<sup>[8]</sup>将该方法与夹尾刺激法结合制造老年肝郁失眠大鼠模型，模型可行、可靠。装置是由水槽和 15 个平台组成的睡眠剥脱箱，大鼠可在平台上站立、进食、饮水、转身等活动，但当其进入快速动眼睡眠气时，全身肌张力明显降低引起低头、接触或是落入平台下 1cm 的水中而惊醒，如此反复达到睡眠剥脱的目的。本研究通过 21 天间断反复的睡眠剥脱，大鼠出现昼夜节律紊乱、白天活动频繁，戊巴比妥钠协同睡眠实验发现，造模结束后睡眠潜伏时间延长，睡眠持续时间缩短。本研究模型评价方法采用动物行为与戊巴比妥钠睡眠实验相结合的方法，从结果可以看出造模组与正常对照组差异明显，说明失眠模型造模成功。

## 2. 脑干、下丘脑功能异常与失眠的关联性

有实验发现<sup>[9]</sup>，脑干轻度损伤会永久性的终止 REM 睡眠。张强等<sup>[10]</sup>对 258 例不同类型的脑梗死患者睡眠结构的差异和改变与睡眠障碍、抑郁的相关性进行探讨，发现脑干和皮层梗死患者出现觉醒时间、NREM1+2 期延长，NREM3+4 期及 REM 期缩短。脑干对睡眠的调节主要在脑干网状结构系统。脑干网状结构中存在着对大脑皮层有上行唤醒作用的“脑干网状上行激活系统”，主要通过丘脑非特异性投射到大脑皮层发挥作用，如乙醚等麻醉药就是抑制上行激活系统发挥麻醉作用的；脑干的中缝核头部、孤束核及其临近的网状神经系统能诱发产生慢波睡眠（SWS），共同组成了网状上行抑制系统。

下丘脑通过调控神经内分泌网络而维持内环境的稳定，参与人体的睡眠、体温、摄食、内分泌、情绪反应等重要的生理功能的调节。大量的研究已经发现<sup>[11]</sup>，当电机或损伤动物下丘脑视前区后，可导致动物睡眠减少或失眠。1998 年，Sherin 等研究发现下丘脑腹外侧视前区（VLPO）神经元含有抑制性神经递质 GABA 和甘丙肽（Gal），是维持正常睡眠的主要神经递质。下丘脑视前区神经元发出抑制性纤维投射到多个促觉醒

系统（PPT/PLT 胆碱能神经系统、中缝核和蓝斑 5-HT 和 NA 单胺能神经系统、TMN 组胺能神经系统），并接受来自于下丘脑外侧区（LHA）Orexin 能神经元、中缝核 5-HT 能神经元、蓝斑 NA 能神经元、TMN 组胺能神经元的纤维投射<sup>[12]</sup>。下丘脑的睡眠中枢 VLPO 与主要的觉醒系统之间解剖上相互联系，功能上相互抑制，形成睡眠-觉醒两种状态稳定交替出现。

大脑皮质是 Glu、GABA、5-HT 等多种神经递质的主要投射目标，整合各种感觉信号的输入，皮质神经元的兴奋性决定着机体的精神意识状态。海马属于大脑边缘系统一部分，与下丘脑、中缝核等睡眠相关结构存在着联系，参与了 NREM 睡眠的发生和维持。

鉴于脑干、下丘脑、皮质、海马与睡眠关系密切，所以本课题将脑干、下丘脑、额叶皮质、海马等脑组织作为研究失眠的关键脑区。从研究结果可以看出，失眠大鼠脑干和下丘脑 GABA 水平明显下降，而额叶皮质和海马 GABA 未见明显差异；脑干、下丘脑、额叶皮质 Glu/GABA 比值明显升高，海马 Glu/GABA 比值未见明显差异。而相关蛋白 GAD、GS 的表达，脑干和下丘脑的失眠大鼠与正常大鼠差异较明显。可见，失眠的发生与脑干、下丘脑功能异常关系更密切。

### 3. Glu/GABA 失衡与失眠的相关性

Glu 与 GABA 是脑内最重要的兴奋性和抑制性神经递质，Glu 与 GABA 的代谢平衡是维持大脑正常生理功能的生理基础。已有较多的研究显示失眠的发生与 Glu 和 GABA 神经兴奋/抑制功能失衡有着密切的关系。目前对于失眠大鼠脑内 Glu、GABA 的含量变化的研究并不统一：一类研究<sup>[13,14,15]</sup>发现睡眠剥夺后下丘脑 Glu、GABA 升高，给予中药治疗后下降并趋于正常水平；一类研究<sup>[16,17,18]</sup>发现睡眠剥夺大鼠下丘脑 GABA 下降，Glu、Glu/GABA 比值升高。

本研究结果发现失眠大鼠各脑组织 Glu 水平有升高趋势，但均差异不明显。各脑组织 GABA 水平下降、Glu/GABA 比例明显升高，其中脑干、下丘脑表现较为显著。由此可知，脑干和下丘脑的 GABA 水平的异常变化，导致 Glu/GABA 神经兴奋/抑制功能失衡，可能在失眠的发生过程中具有关键作用。

### 4. Glu/GABA-Gln 代谢环路是逆转失眠 Glu 和 GABA 失衡的关键

由以上论述可以看出 Glu、GABA 及 Glu/GABA 与失眠关系密切，而脑内的 Glu 和 GABA 代谢主要通过 Glu/GABA-Gln 代谢环路进行循环<sup>[19]</sup>，近年来的研究提示，这条代谢环路可能与多种神经精神疾病有关。可见失眠的发生与 Glu/GABA-Gln 代谢环路的

异常可能有密切的关系。在这条代谢环路中, 第一步反应是  $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -KG) 经氨基反应生成 Glu,  $\alpha$ -酮戊二酸是三羧酸循环的中间代谢产物, 由葡萄糖分解生成; Glu 在谷氨酸脱羧酶 (GAD) 催化下, 脱羧生成 GABA; 从神经末梢释放的 GABA 由星形胶质细胞摄取, GABA 再通过 GABA 降解酶 (GABA-T)、琥珀酸半醛脱氢酶 (SSADH) 的催化, 生成琥珀酸 (Suc), 这样又回到三羧酸循环, 生成 Glu, 星形胶质细胞缺乏 GAD, Glu 不能转变成 GABA, 而是在谷氨酰胺合成酶 (GS) 的作用下转变成谷氨酰胺 (Gln), Gln 再回到神经末梢, 在谷氨酰胺酶 (PAG) 的催化下生成 GABA 的前体 Glu。在 Glu/GABA-Gln 代谢环路中, Glu 转化为 GABA 的主要代谢酶是蛋白 GAD, 而星形胶质细胞特异性酶类 GS 负责将 Glu 转化为 Gln<sup>[20]</sup>, 从而维持神经元 Glu 的突触传递<sup>[21]</sup>。

本研究发现失眠大鼠脑干、下丘脑 GAD 蛋白表达均明显降低, 造成 Glu 向 GABA 转化出现障碍, 导致 GABA 水平降低。谷氨酸的过多释放或摄取, 导致谷氨酸能神经元系统功能紊乱, 引起兴奋性氨基酸毒性, 与许多神经系统疾病的发生有关<sup>[22]</sup>。已经发现, 星形胶质细胞对胞外 Glu 的清除和转化具有重要的作用<sup>[23]</sup>, GS 是星形胶质细胞中一种特异性酶类, 可将神经元释放的 Glu 转化为 Gln, 然后将 Gln 传递回神经元供其生成 Glu 重复利用, 从而维持神经元之间 Glu 的突触传递。本实验发现脑干、下丘脑的 GS 的蛋白表达有升高趋势, 其中下丘脑表现显著。GS 的蛋白表达升高, 使更多的 Glu 转化为 Gln, 从而确保了 Glu 水平保持稳定。

### 5 宁心安神方对 Glu/GABA-Gln 代谢环路的影响

宁心安神方是导师使用多年的经验方剂, 本组方是在古代经典组方“酸枣仁汤”的基础上, 经临床不断探索创新而成。本方由酸枣仁、刺五加、夏枯草组成, 三味中药相配, 具有宁心安神、疏肝清热之功效, 以酸枣仁养心益肝、益气健脾为主药, 用量可稍大, 刺五加又入肾经, 可调节心肾不交; 夏枯草疏泄肝热相对为辅, 疏肝之性可使得全方滋养之中不至于壅滞, 泄热之中不伤正气, 逐渐宣泄肝胆蓄积之火热, 使得脏腑功能紊乱状态得以调整, 失眠症得以纠正, 标本兼顾, 疗效肯定。经过长期临床观察发现, 酸枣仁用量是本方取效的关键环节, 常规用量 60g 以下效果一般或较差, 因此采用了较大的酸枣仁; 酸枣仁汤中用茯苓、川芎、甘草健脾养血活血, 该方将其改为刺五加一味, 健脾益肾、养血活血且安神。另将清虚热药知母改为夏枯草, 以疏肝清热散结。宁心安神方自 2010 年开始在东方医院门诊及病房应用, 至今应用已近 7 万剂, 临床疗效显著。2014 年该方已获得专利。

本实验药效学研究结果表明, 宁心安神方可以明显缩短失眠大鼠睡眠潜伏时间、延

长失眠大鼠睡眠持续时间,中、高剂量组与西药组未见明显差异。随着用药时间的逐渐延长,大鼠白天活动量逐渐减少,跳跃、撞击等动作减少,亢奋、狂躁减弱,可见到安静蹲在平台上的时间延长,时有眯眼动作,与西药组比较起效较缓慢。提示宁心安神方可有效改善失眠症状。

高效液相色谱实验结果证实,宁心安神方可提高脑干、下丘脑 GABA 水平,与空白模型组比较有显著差异,与西药组、正常对照组无明显差异;同时降低失眠大鼠各脑区 Glu/GABA 的比值,与正常对照组无明显差异。在相关蛋白的表达上,宁心安神方各组均可明显升高脑干、下丘脑中蛋白 GAD 表达,脑干变化趋势更显著。脑干中 GS 的蛋白表达各组差异不明显;但在下丘脑中,宁心安神方高、中、低剂量组蛋白 GS 的表达与模型组、西药组比较则明显减弱,与正常对照组无统计学差异。西药地西洋治疗失眠主要是通过促进 GABA 与 GABA<sub>A</sub> 受体的结合产生抑制效应而起到镇静催眠的作用,由本实验结果可以看出,地西洋对于 GAD 的蛋白表达有一定影响,这可能与其升高 GABA 水平有关,但对于 GS 的蛋白水平表达影响不明显。宁心安神方在改善 GAD 的蛋白表达异常降低的同时,对于蛋白 GS 表达的异常升高也有影响。从以上结果可以看出,宁心安神方高、中剂量组通过调控 Glu/GABA-Gln 代谢环路中蛋白 GAD、GS 的表达,影响 Glu、GABA、Glu/GABA 的表达水平。

综上所述,改良多平台水环境睡眠剥夺法导致大鼠脑组织 Glu/GABA-Gln 代谢环路上神经元 GAD 和 GS 的蛋白表达异常,可能导致 Glu 和 GABA 的代谢失衡,使脑内促觉醒系统和促睡眠系统的相对平衡状态被打破,出现失眠。宁心安神方可有效改善 Glu/GABA-Gln 代谢环路中的 GAD 和 GS 的异常蛋白表达,改善 Glu/GABA 代谢失衡,这可能与宁心安神方镇静催眠的疗效机制有关。

## 结 语

1.改良多平台水环境法剥夺大鼠睡眠，可成功复制失眠大鼠模型；

2.脑干、下丘脑的功能异常与失眠的发生关系密切；

3.失眠的发生机制可能与 Glu/GABA-Gln 代谢环路异常导致 Glu/GABA 比例失衡有关，宁心安神方治疗失眠的疗效作用与地西洋相当，宁心安神方与地西洋都可以升高失眠大鼠 GABA 的含量；

4.实验发现宁心安神方可改善 Glu/GABA-Gln 代谢环路中蛋白 GAD、GS 的异常表达，其中对于 GS 的改善明显优于西药组，体现出中药治疗失眠的多靶点作用。宁心安神方通过调控 Glu/GABA-Gln 代谢环路从而影响 Glu、GABA 的合成和分解，影响 Glu、GABA 的表达水平，改善 Glu/GABA 的兴奋/抑制代谢失衡，这可能与宁心安神方镇静催眠的疗效机制有关。

**问题与不足：**本课题由于实验条件、时间、资金等的限制，仍存在许多尚待完善的地方：1.动物模型，本实验采取改良多平台水环境法成功复制了失眠动物模型，但环境变化对于动物的影响仍存在，需要进一步研究排除。2.实验设计：实验的样本量偏小，实验统计误差较大。以后的实验可在造模、用药的不同时间点取材检测，动态观察神经生理变化与失眠程度、用药长短的关系；另外可在一天中的不同时间点取材检测，观察失眠大鼠一天之中神经生理的变化。3.研究角度，缺少动物脑电、脑组织病理形态学的观察。对于 Glu/GABA-Gln 的探讨，不够深入、细致，以后的实验可对其相关受体的表达进行研究；可以借助相关的拮抗剂、激动剂等更为深入、准确研究；可以对其神经递质、关键蛋白、受体等相关性进行进一步的探讨。

## 参考文献

- [1] 王升旭,李求实.睡眠剥夺对大鼠脑组织氨基酸类神经递质含量的影响[J].南方医科大学学报,002,22(10):888-890.
- [2] 李振.GABA 能药物干预对 REM 睡眠剥夺大鼠认知功能影响的实验研究[D].第二军医大学,2008.
- [3] 涂星,郜红利,卢映,等.荧光高效液相色谱法测定三种失眠模型大鼠脑组织氨基酸类神经递质的含量[J].中国实验动物学报,2013,21(5):74-77.
- [4] Bak L K, Arne S, Waagepetersen H S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer[J]. Journal of Neurochemistry, 2006, 98(3):641-53.
- [5] Suchecki D , Tufik S . Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat[J]. Physiology & Behavior, 2000, 68(3):309-16.
- [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] 孟玲欣,范贵民,王景涛.改良多平台水环境法制作大鼠 REM 睡眠剥夺模型的研究[J].黑龙江医药科学,2013,36(2):99-100.
- [8] 游秋云,王平,田代志,等.老年肝郁失眠证候大鼠模型的建立和评价[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(2):222-225.
- [9] Ward S L D. Principles and practice of sleep medicine, third edition. Edited by Meir H. Kryger, Thomas Roth, and William C. Dement. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 2000, 1,336 pp.[J]. Pediatric Pulmonology, 2001, 31(5):398-398.
- [10] 张强,高薇薇.脑梗死分型与睡眠结构的相关研究[J].卒中与神经疾病, 2015, 22(3).
- [11] Saper C, Chou T, Scammell T. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness.[J]. Trends in Neurosciences, 2001, 24(12):726-731.
- [12] Chou T C, Bjorkum A A, Gaus S E, etc. Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus [J]. Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience, 2002, 22(3): 977-90.
- [13] 游秋云,王平,吴丽丽,等.舒郁安神方对老年抑郁失眠证候模型大鼠学习记忆及脑组织谷氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸含量的影响 [J] . 中国老年学杂志, 2011,31(6):1006- 1009.

- [14] 游秋云,王平,孔明望,等.酸枣仁汤对老年血亏阴虚失眠证候模型大鼠脑组织谷氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸及 $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体表达的影响 [J].中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):119- 123.
- [15] 张林挺. 酸枣仁汤对虚劳失眠干预机理的研究 [D].广州:广州中医药大学,2009.
- [16] 兰妮.失眠大鼠电针后不同时间单胺类和氨基酸类递质的变化 [D].广州:暨南大学, 2010.
- [17] 刘祖丽, 唐成林, 余敏, 等.不同强度电针对 PCPA 失眠大鼠下丘脑 $\gamma$ -氨基丁酸及受体的影响 [J].生命科学研究,2011,15 (3) :236- 240.
- [18] 王振华.枣参安神颗粒治疗失眠的药效学实验研究及机制探讨 [D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2011.
- [ 19 ] Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer [J]. J Neurochem, 2006,98(3):641-53.
- [ 20 ] Martinez-Hernandez A ,Bell K P, Norenberg M D. Glutamine synthetase: glial localization in brain.[J]. Science, 1977, 195(4284):1356-8.
- [21] Waagepetersen H S, Ursula S, Arne S. Compartmentation of glutamine, glutamate, and GABA metabolism in neurons and astrocytes: functional implications[J]. Neuroscientist A Review Journal Bringing Neurobiology Neurology & Psychiatry, 2003, 9(5):398-403.
- [22] 承欧梅, 胡常林.兴奋性氨基酸及其受体与中枢神经系统疾病[J]. 临床神经病学杂志,1999(2):123-125.
- [23] Yudkoff M, Nissim I, Daikhin Y, etc . Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships.[J]. Developmental Neuroscience, 1993, 15(3-5):343-350.

## 致谢

首先，我感谢我的导师郭蓉娟教授！感谢老师在硕士的这两年里，学业上孜孜不倦的教诲，生活上无微不至的关怀。老师渊博的学识、高尚的医德、开阔的胸怀、敏捷的思维、敏锐的洞察力、严谨的治学态度使我受益终生，激励着我在学习、生活中不断进取。能够成为郭老师的学生，是我莫大的荣幸。

再者感谢实验中心的王新祥老师、闫妍老师、温彬宇老师、唐旭老师，在实验过程中给予了我很多指导和帮助。

感谢脑病二科金香兰老师、韩刚老师、邢佳师姐、贺立娟师姐、陈宝鑫师姐、朱晓晨师姐、张志辰师兄在临床实习过程中的帮助和教导。

感谢康复科王嘉麟师兄、姜思源老师以及张迎、秦裕驹、郑建颖等大夫在临床课题中提供了我极大的帮助。

感谢同门师兄赵振武、史华伟、王建伟，师姐袁清洁，师妹高维，师弟高东阳、郭凯航，在我完成学业过程中给予了我无私的帮助和贴心的关怀。

感谢 09 七 A 班全体同学，七年的大学生活，我们一起努力，共同成长。

最后，感谢我的父母和家人，感谢你们多年辛勤的培养，给予我信心和支持，你们是我一直奋斗的动力。

## 在学期间主要研究成果

### 科研学术

1. 2014.12-2016.05 参与北京市科委重点项目“调和肝脾法治疗原发性失眠的多中心随机对照临床研究” (No.Z13110200680000)
2. 2014.12-2015.12 参与国家自然科学基金课题“从 TLR4 炎性信号通路调控失衡研究肝郁化火焦虑症的生物学机制以及丹栀逍遥散干预的整合机理” (No.81273624)
3. 2015.01-2015.12 参与国家自然科学基金重点项目“阶梯递进的辨证论治疗效评价方法研究” (No.81230086 )

### 发表论文

1. 史华伟, 邢佳, 王嘉麟, 郭晓, 王惠等. 节气穴位贴敷对失眠患者睡眠质量的影响[J]. 中医学报, 2016, 31(1):135-137.
2. 王嘉麟, 邢佳, 贺立娟, 朱晓晨, 郭蓉娟, 张允岭, 金香兰, 王玲玲, 孟宪慧, 张志军, 胡皓, 张岩, 吴业清, 池学洋, 高明超, 吴浩, 段锦秀, 郭晓, 董洪坦. 针灸治疗脑卒中后认知障碍研究进展[J]. 环球中医药, 2015, 09:1140-1144.

