

本文引用:魏歆然,郑雪娜,裴芸,吴雪芬,刘丽,陈小丽,文琪琦,岳增辉,魏高文.大鼠失眠模型造模中对氯苯丙氨酸混悬液改良法的探讨[J].湖南中医药大学学报,2018,38(9):986-989.

大鼠失眠模型造模中对氯苯丙氨酸混悬液改良法的探讨

魏歆然¹,郑雪娜²,裴芸²,吴雪芬²,刘丽²,陈小丽²,文琪琦²,岳增辉^{2*},魏高文^{2*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

〔摘要〕目的 探讨大鼠失眠模型造模中对氯苯丙氨酸(para-chlorophenylalanine,PCPA)混悬液配制的改良方法,并对造模效果进行评价。**方法** 98只SD大鼠中50只用NaOH溶液配制法,24只用NaHCO₃溶液配制法和24只用改良法进行失眠大鼠造模,探讨制作PCPA致失眠模型的最佳方法。**结果** NaOH溶液配制法50只大鼠造模失败,NaHCO₃溶液配制法24只大鼠造模失败,改良法24只大鼠造模成功,且PCPA剂量以0.5 g/kg造模效果最好($P<0.05$)。**结论** 改良的PCPA混悬液的配制法可以成功制作大鼠失眠模型。

〔关键词〕 对氯苯丙氨酸;失眠;造模

〔中图分类号〕R332

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.09.004

An Improved Method for the Preparation of Para-chlorobenzalanine Suspension in a Rat Model of Insomnia

WEI Xinran¹, ZHENG Xuena², PEI Yun², WU Xuefen², LIU Li², CHEN Xiaoli², WEN Qiqi²,
YUE Zenghui^{2*}, WEI Gaowen^{2*}.

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan College of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the improved method of preparing para-chlorophenylalanine (PCPA) suspension in a rat model of insomnia, and evaluate the effect of modeling. **Methods** In the 98 SD rats, 50 rats were treated with NaOH solution preparing method, 24 SD rats were modeled with NaHCO₃ solution preparing method, and 24 SD rats were treated with the improved method to establish the model of insomnia rats. **Results** There were 50 failed model rats with NaOH solution preparing method, 24 failed model rats with NaHCO₃ solution preparing method. The 24 model rats succeeded by the improved method, and the 0.5 g/kg of PCPA was the best dose to establish the model ($P<0.05$). **Conclusion** The improved preparing method of PCPA suspension can successfully make the rat model of insomnia.

〔Keywords〕 para-chlorophenylalanine; insomnia; model

失眠大鼠模型的制作主要可以分为物理造模法和化学造模法:物理造模法包括强迫运动、水平台

环境、旋转圆筒睡眠剥夺、水上转盘法等;化学造模法是腹腔或皮下注射中枢兴奋类药物进行部分

〔收稿日期〕2017-03-30

〔基金项目〕国家重点基础研究发展计划(973计划)(2014CB543102)。

〔作者简介〕魏歆然,女,硕士,研究方向:针灸治病的临床与实验研究。

〔通讯作者〕*岳增辉,男,教授,博士研究生导师,E-mail:624755064@qq.com;*魏高文,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:407423581@qq.com。

或全部睡眠剥夺,目前国内外较为常用的失眠造模药物为对氯苯丙氨酸(*dl*-4-chlorophenylalanine, PCPA),是一种5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)合成抑制剂,可以抑制大鼠大脑5-HT合成,造成睡眠昼夜节律消失,几乎达到完全失眠^[1],并且造模时间短,费用较低,可重复性好,但鲜少有文献详细描述PCPA混悬液的配制过程。本课题组根据改良PCPA混悬液配置方法成功制作了24只大鼠失眠模型,现将相关结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF级SD雄性大鼠98只,体质量220~250 g/只。由湖南中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(湘)2013-0004。

1.1.2 主要药物与仪器 PCPA由美国Sigma公司生产,批号为SHBC0245V;碳酸氢钠片由成都市科龙化工试剂厂生产,批号为2014120601;氢氧化钠片由成都市科龙化工试剂厂生产;戊巴比妥钠由merck公司生产,批号为908M034;阿拉伯胶由天津市光复精细化工研究所生产,批号为204-2000;动物型超纯水机由摩尔公司生产;PHSJ-3F型pH笔由上海精密科学仪器有限公司生产;pH精密试纸(5.5-9.0)由杭州富阳特产纸业有限公司生产;电热水恒温杯由垫中垫公司生产,货号QC2016030801。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 先将98只SD大鼠随机分为3组,其中50只用NaOH溶液配制法、24只用NaHCO₃溶液配制法和24只用改良法进行失眠大鼠造模,造模成功后再将SD雄性大鼠采用随机数字表法随机分为4组:空白组、模型A组(PCPA 0.3 g/kg)、模型B组(PCPA 0.4 g/kg)、模型C组(PCPA 0.5 g/kg)进行失眠模型评价。

1.2.2 NaOH溶液配制弱碱性生理盐水溶解PCPA法^[2] 将NaOH片剂溶于水,配成5%NaOH溶液,在0.9%NaCl溶液中缓慢滴入NaOH溶液,用pH笔调节至pH 7~8之间,加入PCPA,搅拌后用超声机超声15 min后,进行腹腔注射,连续注射2 d;空白组腹腔注射同体积的生理盐水。

1.2.3 NaHCO₃溶液配制弱碱性生理盐水溶解PC-

PA法^[3] 将NaHCO₃片剂溶于水,配成5%NaHCO₃水溶液,在0.9%NaCl溶液中缓慢滴入NaHCO₃水溶液,用PH笔调节至PH 7-8之间,加入PCPA,搅拌后用超声机超声15 min后,进行腹腔注射,连续注射2 d;空白组腹腔注射同体积的生理盐水。

1.2.4 PCPA混悬液配制的改良法 通过分析前2种方法的不足而探索出来的方法。用电热水恒温杯配置30~40 °C的温水,将NaHCO₃片剂溶于温水,配成5%NaHCO₃水溶液,在0.9%NaCl溶液中缓慢滴入NaHCO₃水溶液,用pH精密试纸测试,根据pH精密试纸变色值调节滴入的NaHCO₃溶液量,直至pH 7~8之间,加入PCPA,搅拌后加入10%阿拉伯胶,用超声机超声15 min后,制成弱碱性生理盐水,按1 mL/100 g进行腹腔注射,连续注射2 d;空白组腹腔注射同体积的生理盐水。

1.2.5 模型成功的判定^[4] 首次注射后36 h观察模型组大鼠昼夜节律消失,日间与夜晚皆活动不断,结合采用经典的戊巴比妥钠翻正实验进行失眠模型评价,戊巴比妥钠剂量35 mg/kg(预实验测得出引起100%大鼠睡眠的最小阈剂量)按50 mg/mL溶于生理盐水进行腹腔注射,记录大鼠的睡眠潜伏期及睡眠持续时间,若模型组与空白组对比,差异具有统计学意义,提示造模成功。

1.3 统计学方法

数据的统计分析采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析。计量资料满足正态性以 $\bar{x} \pm s$ 描述,不满足正态性时以(Me, Q)描述,组间对比首先进行正态性、方差齐性检验,满足正态性、方差齐性采用单因素方差分析,否则采用Kruskal-Wallis H检验,假设检验水准 $\alpha=0.05$ ^[5]。

2 结果

2.1 大鼠失眠模型造模方法

2.1.1 NaOH溶液配制弱碱性生理盐水溶解PCPA法 PCPA难溶于冷水,混悬液有大量颗粒样沉淀;NaOH碱性偏强,而pH笔读数很不稳定,依据pH笔结果持续滴入NaOH溶液,50只大鼠连续腹腔注射2 d后,45只大鼠死亡,5只精神萎靡;此外预实验中由于错误使用药品致死50只大鼠。

2.1.2 NaHCO₃溶液配制弱碱性生理盐水溶解PC-

PA法 PCPA 难溶于冷水,混悬液有大量颗粒样沉淀;pH 笔读数不稳定,无法调节到适宜的 pH 7~8 之间,24 只大鼠连续腹腔注射 2 d 后,模型组行为学没有表现出昼夜节律消失,大鼠日间精神萎靡不振,睡眠潜伏期与睡眠时间比较模型组和空白组差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 PCPA 混悬液配制的改良法

PCPA 溶于温水后混悬液颗粒样沉淀以及乳白色浮沫较少,24 只大鼠连续腹腔注射 2 d 后,0.5 g/kg 模型组大鼠出现昼夜节律消失、白天活动不停、对外界的声、光等刺激异常敏感,兴奋性增高、攻击性增强、毛硬粗糙、毛竖起无光泽,持续观察 1 个周期间体质量增加缓慢、饮食量明显减少、饮水量明显增多。

2.2.1 改良法造模组的戊巴比妥钠睡眠实验比较

注射 PCPA 36 h 后,用经典的戊巴比妥钠翻正实验进行失眠模型评价,0.5 g/kg 模型组大鼠与空白组对比,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示造模成功。结果见表 1。

表 1 造模前后戊巴比妥钠睡眠实验的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	潜伏期/s		睡眠时间/min	
		造模前	造模后	造模前	造模后
空白组	6	223.50±22.56	240.33±29.14	49.58±5.43	45.75±1.81
模型 A 组	6	233.75±22.67	260.33±26.22	49.33±5.36	41.45±1.68
模型 B 组	6	226.75±23.59	261.67±23.38*	48.80±6.36	39.34±1.88*
模型 C 组	6	230.50±22.27	362.25±36.49*#	49.33±5.36	31.58±1.37*#

注:潜伏期指标自身前后配对的均数比较协方差分析;协变量 $P=0.399$,组别 $F=86.09$, $P=0.000$;睡眠时间指标自身前后配对的均数比较协方差分析;协变量 $P=0.175$,组别 $F=35.46$, $P=0.000$;与造模前比较 * $P<0.05$;与空白组比较,# $P<0.05$ 。

2.2.2 改良法造模组的饮食量与饮水量比较 大鼠入代谢笼观察,记录饮食量与饮水量,模型组的饮食量低于空白组,饮水量高于空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$),结果见表 2。

表 2 造模后饮食量与饮水量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	饮食量/g	饮水量/mL
空白组	6	41.80±2.78	40.8±2.66
模型组	18	30.10±1.59#	62.0±5.70#

注:与空白组比较,# $P<0.05$ 。

2.2.3 改良法造模组的体质量比较 比较造模前后大鼠体质量增长值的变化,模型组的体质量增长量明显低于空白组,差异有统计学意义($P<0.05$),结果

见表 3。

表 3 造模后体质量增长值的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	造模前/g	造模后/g
空白组	6	255.06±8.67	279.05±3.20*
模型组	18	251.56±6.47	257.69±3.21*#

注:与造模前比较 * $P<0.05$,与空白组比较 # $P<0.05$ 。

3 讨论

失眠是最常见的睡眠障碍,又称入睡和维持睡眠障碍 (disorder of initiating and maintaining sleep, DIMS),患者持续长时间不能获得正常睡眠,对睡眠质量不满意,轻者入睡困难,时寐时醒,或寐而不酣,或醒后不能再寐,重则可彻夜不寐^[6],中医学称之为“不寐”,是当前社会的一种常见病。

为寻求治疗失眠的有效方法,国内外研究者广泛采用 PCPA 失眠模型,即采用 PCPA 对实验动物(如大鼠)进行造模。PCPA 是一种选择性很高的脑内色氨酸羟化酶的抑制剂,能阻滞脑内 5-HT 的生物合成,使脑内的 5-HT 的含量显著下降,一般于造模后 26~30 h 可使大鼠昼夜节律消失,从而达到几乎完全睡眠剥夺(SD)状态,且其造模时间短、经济、可重复性强,目前对于失眠动物模型的造模国内外多采用此法^[7-8]。如廖小英等^[9]研究交泰丸对 PCPA 大鼠失眠模型镇静催眠的效果发现:5-HT 合成抑制剂对氯苯丙氨酸(PCPA)可以通过消除脑内 5-HT 从而达到致失眠目的,大鼠通常白昼睡眠,夜间活动,用对氯苯丙氨酸(PCPA)注射大鼠腹腔,28~30 h 后,大鼠昼夜节律消失,几乎达到完全睡眠结果。张亚宁等^[10]研究发现采用每天 1 次连续 2 d 腹腔注射 PCPA (300 mg/kg) 建立失眠大鼠模型,失眠大鼠自主活动明显增加,步态行为学出现异常,主要体现在步速、步行周期、步幅、步宽、侧向移动标准偏差等指标上,以上检测指标可为评价失眠动物模型提供依据。吴巧敏等^[11]建立失眠大鼠模型时,将 PCPA 用生理盐水(pH 7~8)溶解,配制成浓度为 0.03 g/mL 混悬液,给予大鼠腹腔注射(300 mg/kg),1 次/d,连续 2 d,造模后可见模型组大鼠出现昼夜节律消失,白天活动不停,性情烦躁、攻击性增强,表明造模成功。

本研究实验过程中发现在配制 PCPA 混悬液时,因 PCPA 难溶于冷水,国内外研究主要是将 PC-

PA 弱碱性溶于生理性盐水,主要方法是采用 NaOH 溶液或 NaHCO₃ 溶液配制弱碱性生理盐水^[2-3],但大部分文献鲜少提及弱碱性生理盐水的具体配制方法。本文通过总结实验造模失败的不足,认为弱碱性生理盐水的配制是 PCPA 能否有效溶解的关键,也是影响失眠效果的直接因素。

国内 PCPA 用于失眠模型的剂量基本为 0.30~0.45 g/kg,国外研究则有用至 0.80 g/kg^[12-15],本文通过行为学观察以及戊巴比妥钠实验的比较,选择了 0.5 g/kg 的剂量,在药性 7 d 内观察,无大鼠死亡,证明在剂量选择方面可以有所调整。本实验通过改良弱碱性生理盐水,以及选择稳定的实验仪器,结合戊巴比妥钠睡眠实验以及饮水量、饮食量比较和体重增长值的对比,判定改良法可以成功制作大鼠失眠模型。

参考文献:

- [1] PROSPERO-GARDA O, JIMENEZ-ANGUIANO A, DRUCKER-COHN R. The Combination of VIP and Atropine Induces REM Sleep in Cats Rendered Insomniac by PCPA[J]. *Neuropsychopharmacology*, 1993, 8(4): 387-390.
- [2] 侯小斌,宋美卿,贾力莉,等.蛇床子催眠活性组分对睡眠剥夺大鼠学习记忆的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(3): 837-840.
- [3] 许峰.基于 5HT_{1a}、5HT_{2a}、DD2 受体系统以及 HPA 轴的“熟眠方”治疗失眠机制研究[D].长春:长春中医药大学, 2014: 36-37.
- [4] 刘臻,谢晨,赵娜,等.失眠动物模型的制作与评价[J]. *中国学报*, 2013, 187(28): 1846-1848.
- [5] 魏高文.卫生统计学[M].北京:中国中医药出版社, 2014: 118-129.
- [6] 许晓伍,黄妙纯,刘凤岚,等.失眠的病因学研究进展[J]. *世界睡眠医学杂志*, 2017, 4(5): 307-312.
- [7] 孙存济,张隽彝.对氯苯丙氨酸及其酯的制备[J]. *化学试剂*, 1981(5): 57, 28.
- [8] 顾思臻,窦丹波.中医中药对 PCPA 失眠大鼠模型 HPA 轴相关单胺类神经递质及激素影响的研究进展[J]. *上海中医药大学学报*, 2015, 29(1): 83-86.
- [9] 廖小英,周慧,全世建.交泰丸对 PCPA 大鼠失眠模型镇静催眠的效果研究[J]. *现代医院*, 2015, 15(7): 35-36.
- [10] 张亚宁,张军武,张胜威,等.基于步态分析系统的 DL-4-氯苯基丙氨酸致大鼠失眠模型的研究[J]. *现代中医药*, 2014, 34(2): 80-83.
- [11] 吴巧敏,赵艺初,韩艺凡,等.生酸枣仁、炒酸枣仁、酸枣果肉对 PC-PA 失眠模型大鼠学习记忆能力影响的对比研究[J]. *中医药导报*, 2016, 22(5): 72-75.
- [12] 贾利利,周宁,李凯,等.黄连阿胶汤对对氯苯丙氨酸致失眠模型小鼠神经递质的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(22): 240-242.
- [13] 任俊华.基于质谱分析技术的针刺对失眠模型大鼠脑组织蛋白差异表达的研究[D].郑州:河南中医学院, 2014: 7-8.
- [14] 全世建,林杏娥,刘妮.PCPA 大鼠失眠模型的证候属性研究[J]. *中医药学刊*, 2006, 24(3): 450-451.
- [15] MURRAY N M, BUCHANAN G F, RICHERSON G B. Insomnia Caused by Serotonin Depletion is Due to Hypothermia [J]. *SLEEP*, 2015, 38(12): 1985-1993.

(本文编辑 李杰)