

·实验研究·

本文引用: 吴金鸿, 张星平, 梁政亭, 梁瑞宁, 陈旭, 贾宏林, 李振辉, 胡燕玲, 崔文军. 清心宁神汤对心不藏神不寐模型大鼠的药效实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(4): 588–597.

清心宁神汤对心不藏神不寐模型大鼠的药效实验研究

吴金鸿^{1,2}, 张星平^{1,2*}, 梁政亭^{1,2}, 梁瑞宁^{1,2}, 陈旭^{1,2}, 贾宏林^{1,2}, 李振辉^{1,2},
胡燕玲^{1,2}, 崔文军^{1,2}

1.新疆医科大学第四临床医学院,新疆 乌鲁木齐 830099;2.新疆医科大学附属中医医院,新疆 乌鲁木齐 830099

〔摘要〕目的 探讨清心宁神汤对于咖啡因联合 4-氯-DL-苯基丙氨酸(PCPA)所致心不藏神不寐模型大鼠的治疗作用。方法 将 36 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、唑吡坦组、清心宁神汤低剂量组、清心宁神汤高剂量组、通路抑制剂组,每组 6 只。利用咖啡因联合 PCPA 制备心不藏神不寐模型大鼠,正常组予等量生理盐水腹腔注射,1 次/d,连续 10 d;其余组于第 1~7 天予 60 mg/kg 咖啡因水溶液腹腔注射,1 次/d,第 8~10 天予 300 mg/kg PCPA 皮下注射。造模结束后,唑吡坦组予以 1.05 mg/(kg·d)酒石酸唑吡坦溶液灌胃,清心宁神汤低、高剂量组予 14.7、29.4 g/(kg·d)清心宁神汤灌胃,通路抑制剂组予 0.3 mg/(kg·d)三磷酸酰肌醇蛋白激酶抑制剂腹腔注射,正常组、模型组均以等体积生理盐水灌胃,各组均连续给药 14 d。干预结束后通过旷场实验评估大鼠的自发活动和焦虑水平,评价清心宁神汤对于心不藏神不寐大鼠的睡眠和焦虑障碍的改善作用;采用 ELISA 法检测大鼠血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、C 反应蛋白(CRP)的含量;免疫组织化学染色法检测大鼠脑组织中 IL-1 β 水平;采用 HE 染色、尼氏染色法、劳克坚牢蓝染色法观察大鼠脑组织的病理形态变化。**结果** 与正常组相比,模型组大鼠,总睡眠时间(TST)、慢波睡眠(SWS)时间、快速眼动睡眠(REM)时间、移动总路程、活动总时间、中央活动时间、爬壁站立时间减少($P<0.01$),粪便数量、血清中 IL-1 β 及 CRP 含量、脑组织中 IL-1 β 表达增加($P<0.01$),神经组织见一定程度的结构紊乱,可见炎症细胞浸润。与模型组比,清心宁神汤低剂量组、清心宁神汤高剂量组大鼠 TST、SWS 时间、REM 时间、移动总路程、活动总时间、中央活动时间、爬壁站立时间均增加($P<0.01$),粪便数量、血清中 IL-1 β 及 CRP 含量、脑组织中 IL-1 β 表达降低($P<0.01$)。综合 HE 染色、尼氏染色法、劳克坚牢蓝染色法结果示清心宁神汤低、高剂量组脑组织神经元排列基本整齐,细胞核大小、形态及位置基本正常,有少量胞核区域深染,可见少量胶质细胞增生,中央尼氏小体溶解较模型组均有所缓解,未见明显脱髓鞘灶,浅染区域有不同程度的改善。**结论** 清心宁神汤对于心不藏神不寐大鼠具有良好的治疗作用,能有效缓解失眠及焦虑障碍,降低血清中相关炎症因子的含量,改善失眠造成的脑组织中神经细胞的病理变化。

〔关键词〕 清心宁神汤;心不藏神不寐;炎症反应;白细胞介素-1 β ;药效学实验;神经组织病理变化;中医不寐五神分型

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.04.002

Pharmacodynamic study of Qingxin Ningshen Decoction on a rat model of insomnia due to heart not storing spirit

WU Jinhong^{1,2}, ZHANG Xingping^{1,2*}, LIANG Zhengting^{1,2}, LIANG Ruining^{1,2}, CHEN Xu^{1,2}, JIA Honglin^{1,2},
LI Zhenhui^{1,2}, HU Yanling^{1,2}, CUI Wenjun^{1,2}

〔收稿日期〕 2024-10-03

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(82160873, 81960837, 81560762, 81260526);国家中医药管理局“十四五”高水平中医药重点学科(国中医药人教函〔2023〕85 号);全国名老中医药专家传承工作室(国中医药人教函〔2022〕75 号);新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2022D01D48);新疆维吾尔自治区自然科学基金(2020D01C163);新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJEDU2021Y30)。

〔通信作者〕 * 张星平,男,硕士,主任医师,教授,E-mail: xjzyzxp@163.com。

1. The Fourth Clinical College of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830099, China; 2. Traditional Chinese Medical Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830099, China

[Abstract] **Objective** To explore the therapeutic effects of Qingxin Ningshen Decoction (QXNSD) on a rat model with insomnia due to heart not storing spirit, induced by caffeine combined with 4-chloro-DL-phenylalanine (PCPA). **Methods** Thirty-six SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a zolpidem group, low-dose and high-dose QXNSD groups, and a pathway inhibitor group, with six rats in each group. The rat model with insomnia due to heart not storing spirit was established using caffeine and PCPA. The normal group received an equal volume of saline via intraperitoneal injection once daily for 10 consecutive days; the remaining groups received an intraperitoneal injection of 60 mg/kg caffeine solution from days 1 to 7, followed by a subcutaneous injection of 300 mg/kg PCPA from days 8 to 10. After modeling, the zolpidem group was administered 1.05 mg/(kg·d) zolpidem tartrate solution by gavage; the low- and high-dose QXNSD groups were given 14.7 and 29.4 g/(kg·d) QXNSD by gavage; and the pathway inhibitor group was given 0.3 mg/(kg·d) phosphatidylinositol kinase inhibitor by intraperitoneal injection. The normal and the model groups were gavaged with an equal volume of normal saline. All interventions were administered for 14 consecutive days. After the intervention, the open field test was conducted to assess the spontaneous activity and anxiety level of the rats, evaluating the ameliorative effects of QXNSD on sleep and anxiety disorders of rats with insomnia due to heart not storing spirit. ELISA was used to measure the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and C-reactive protein (CRP) in the serum of rats; the immunohistochemical staining was applied to assess the IL-1 β levels. HE staining, Nissl staining, and Luxol fast blue staining were employed to observe pathological changes in brain tissue. **Results** Compared with the normal group, the model group showed significant reductions in total sleep time (TST), slow-wave sleep (SWS) time, rapid eye movement (REM) sleep time, total movement distance, total activity time, central activity time, and rearing time ($P<0.01$). Meanwhile, fecal pellet count, serum IL-1 β and CRP levels, and IL-1 β expression in brain tissue were significantly higher ($P<0.01$). Neurological tissue exhibited a certain degree of structural disorganization with inflammatory cell infiltration. Compared with the model group, both the low- and high-dose QXNSD groups showed significant increases in TST, SWS time, REM time, total movement distance, total activity time, central activity time, and rearing time ($P<0.01$), while fecal pellet count, serum IL-1 β and CRP levels, and IL-1 β expression in brain tissue were significantly lower ($P<0.01$). The results of HE staining, Nissl staining, and Luxol fast blue staining indicated that in both the low- and high-dose QXNSD groups, neuronal arrangement was largely intact, with basically normal nuclear size, shape, and position. Mild hyperchromatic nuclei and limited glial cell proliferation were observed, and central Nissl body dissolution was alleviated compared to the model group. No significant demyelination was noted, and lighter-stained areas showed varying degrees of improvement. **Conclusion** QXNSD exhibits significant therapeutic effects on rats with insomnia due to heart not storing spirit. It can effectively alleviate insomnia and anxiety disorders, reduce the levels of relevant inflammatory factors in the serum, and improve pathological changes in neuronal cells caused by insomnia.

[Keywords] Qingxin Ningshen Decoction; insomnia due to heart not storing spirit; inflammatory reaction; interleukin-1 β ; pharmacodynamics experiment; neuropathological changes; five spirit classification of insomnia in Chinese medicine

不寐,亦称“不得卧”“不得眠”,指经常不能获得正常睡眠为特征的一类病症^[1]。随着社会发展进程的加快,不寐的发病率逐年升高^[2]。相关研究表明,不寐是其他精神疾病的高危因素之一,并且对患者日间功能造成不良影响,如警觉性及记忆力降低等^[3]。因此,不寐的治疗十分必要。《中国失眠症诊断与治疗指南》中不寐的治疗方案包括心理治疗、药物治疗、物理治疗和中医治疗等^[4]。目前,失眠认知行为疗法是国际上多个睡眠障碍诊疗指南中推荐的一线治疗方案^[5]。但由于专业人员的缺乏、时空限制、成本高昂,以及患者对该治疗方法的了解严重不足等诸

多因素的影响,现阶段仍以药物治疗为主。药物治疗中镇静催眠类药占重要地位,包括苯二氮草类、非苯二氮草类等,这类镇静催眠药虽然可以改善总睡眠时间,但长期使用可改变睡眠结构,导致患者耐受性和依赖性增加,并出现停药反跳、日间残留效应、认知功能损害等不良反应^[6]。中医治疗不寐方式多且毒副作用少^[7-9]。清心宁神汤是全国名老中医药专家传承工作室指导老师张星平教授治疗心不藏神不寐的经验方和有效方,方中黄连为君药,黄芩为臣药,佐以夏枯草、郁金、醋柴胡、白芍、赤芍、炒白术、茯苓、陈皮、法半夏,全方共奏清心宁神之效,临床疗效

显著^[10-11]。课题组前期通过网络药理学及分子对接研究发现,该方能通过作用于多个靶点和多条信号通路,对人体的氧化应激反应产生影响,从而改善谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (super oxide dismutase, SOD) 及核因子 E2 相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) 的表达水平,并调节磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/叉头状转录因子 O (forkhead box transcription factor, FOXO) 信号通路中关键蛋白的表达,达到治疗心不藏神而不寐的效果^[12],但并未深入研究其药效学。心不藏神不寐是“中医不寐五神分型”中的常见临床分型之一,以“入寐维艰,甚则彻夜不寐”为主要特征表现^[13],本研究对清心宁神汤治疗心不藏神不寐大鼠的相关指标进行观察和检测,为课题组后续深入研究提供相关实验依据。

1 材料

1.1 实验动物与分组

36 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量 170~220 g,周龄 10~12 周,实验动物生产许可证号:SCXK(新)2023-0001。于新疆医科大学 SPF 级实验室中进行喂养,实验室条件设置:室温 (25±2) °C,相对湿度 45%~55%,光照与黑暗交替各 12 h,自由摄取食物及水。本实验操作过程中严格按照实验动物伦理标准,新疆医科大学动物伦理委员会批件号:IACUC-20210301-45。

1.2 主要药物与试剂

清心宁神汤饮片由新疆维吾尔自治区中医医院提供,药物组成:黄连 10 g、黄芩 10 g、白芍 15 g、赤芍 15 g、郁金 10 g、陈皮 10 g、法半夏 15 g、炒白术 10 g、茯苓 10 g、炙甘草 10 g (湖北道地药材科技有限公司,批号:240301、240401、240101、240401、231001、240401、240501、231201、240301、231101),夏枯草 15 g、醋柴胡 10 g (亳州市惠康堂中药科技有限公司,批号:2310032、2311030)。所有药材经医院药学部鉴定为正品,所有饮片煎煮浓缩至含药量 2.8 g/mL。

4-氯-DL-苯基丙氨酸 (parachlorophenylalanine, PCPA) (上海源叶生物科技有限公司,批号:

A12IS208585); 咖啡因 (成都德斯特生物技术有限公司,批号:DSTDK004902); 酒石酸唑吡坦片 (赛诺菲杭州制药有限公司,规格:5 mg/片,批号:JT1662); 三磷酸酰肌醇蛋白激酶抑制剂 (LY294002) (奥默生物技术上海有限公司,批号:M1925-08); PVDF 膜 (上海雅酶生物医药科技有限公司,批号:02741070); 三色预染蛋白 Marker (和元李记上海生物技术有限公司,批号:API3L062); 大鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β); C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) ELISA 检测试剂盒 (上海优选生物科技有限公司,批号:YX-E20958、YX-031816R); IL-1 β 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、二抗山羊抗兔 IgG (H+L) HRP 偶联抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:AF5103、AF7021、S0001); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司,批号:PC0020、P1200-2); 无水乙醇、二甲苯、冰醋酸 (国药集团化学试剂有限公司,批号:100092683、10023418、10000218); 髓鞘染液套装、伊红染液、环保型脱蜡液、通用型组织固定液、尼氏染液 (武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:G1030、G1002、G1128、G1101、G1036)。

1.3 主要仪器

脱水机 (意大利迪佩斯公司,型号:Donatello); 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5); 病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016); 全自动样品快速研磨仪 (上海净信实业发展有限公司,型号:JXFSTPRP-24); BIO RAD 蛋白电泳仪 (美国 BIO RAD 公司,型号:041BR319633); 蔡司全自动数字玻片扫描机 (德国卡尔蔡司公司,型号:Axioscan 7); 全波长酶标仪 (赛默飞世尔中国科技公司,型号:Multiskan GO)。

2 方法

2.1 模型复制、分组及给药

将 36 只大鼠根据随机数字表法分为正常组、模型组、唑吡坦组、清心宁神汤低剂量组、清心宁神汤高剂量组、通路抑制剂组,每组 6 只,适应性喂养 3 d。经网络药理学及分子对接研究发现该方能够通过调节 PI3K/Akt/FOXO 信号通路中关键蛋白的表达,达到治疗心不藏神不寐的作用,该信号通路的阻断

剂为 LY294002, 作为抑制剂组进行药效对比^[12]。参考本课题组前期研究制备心不藏神不寐大鼠模型^[14-15], 正常组予等量生理盐水腹腔注射, 1次/d, 连续 10 d; 其余组于第 1~7 天予 60 mg/kg 咖啡因水溶液腹腔注射, 1次/d, 第 8~10 天予 300 mg/kg PCPA 皮下注射。造模结束后, 唑吡坦组予 1.05 mg/(kg·d) 酒石酸唑吡坦溶液灌胃, 清心宁神汤低剂量组予 14.7 g/(kg·d) 清心宁神汤灌胃, 清心宁神汤高剂量组予 29.4 g/(kg·d) 清心宁神汤灌胃, 大鼠给药量按照人的 6.3 倍换算^[16], 其中清心宁神汤高剂量组的给药量是低剂量的 2 倍量^[17], 抑制剂组给予 LY294002 行腹腔注射 0.3 mg/(kg·d)^[18], 正常组与模型组均以同等体积生理盐水灌胃, 各组均连续给药 14 d。

2.2 脑电、肌电睡眠检测大鼠睡眠情况

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 进行麻醉, 并使用大鼠脑立体定位仪来安装脑电和肌电睡眠监测的电极。首先剃除大鼠头顶 1.3 cm×1.3 cm 区域的毛发以暴露皮肤, 并在颅顶正中线上切开约 2 cm, 钝性分离皮下组织以露出颅骨, 利用动物微型颅骨钻在特定的交点处钻 4 个孔, 然后将 4 枚脑电图螺钉旋入上述孔中, 将脑电电极的引线 with 颅骨上的螺钉焊接, 并剪掉多余的引线。肌电电极的引线则直接插入大鼠颈部后侧的肌肉中, 用牙科水泥将头盔固定在颅骨表面, 最后缝合切口。利用 Sirenia® Sleep Pro (v1.8.2) 软件对大鼠进行 24 h 的脑电和肌电监测。大鼠脑电、肌电图出现与心不藏神不寐患者多导睡眠图相似的特征: 总睡眠时间 (total sleep time, TST) 减少、睡眠潜伏期明显延长、慢波睡眠 (slow wave sleep, SWS) 时间明显减少、快速眼动睡眠 (rapid eye movement sleep, REM) 时间减少, 表明心不藏神不寐大鼠模型构建成功, 此与心不藏神主要症状“入寐维艰, 甚则彻夜不寐”相吻合^[19]。TST、SWS 时间越短, REM 时间越长则表明入睡时间延长, 总睡眠时间缩短^[19]。

2.3 旷场实验检测大鼠焦虑程度

实验前让大鼠适应实验环境, 随后将动物从一侧放入旷场箱的中心并让动物自由探索 5 min, 其间记录其行为。最后使用大鼠开放活动实验系统 (版本: JLBhw-coFG-1) 分析动物的活动轨迹和行为参数。注意事项: 实验过程中保持环境安静, 避免干扰; 每次实验后用 70% 乙醇清洁箱体, 避免气味

残留影响后续实验; 确保每次实验的条件一致, 如实验时间、动物放置位置等。测试指标: 移动总距离、活动总时间、中心活动时间、垂直活动时间和粪便数量等, 其中移动总距离、活动总时间、中心活动时间垂直活动时间越长, 粪便越少提示大鼠焦虑程度越低, 反之提示代表其越焦虑^[20]。

2.4 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、CRP 含量

取出板条, 放置室温中, 在规定好的标孔中加入梯度样品 50 μ L, 将 10 μ L 样本以及 40 μ L 样本稀释液加入规定的样本孔中, 各孔中加入 100 μ L HRP, 恒温箱温育 60 min, 重复洗板 5 次, 底物 A 和底物 B 各取 50 μ L 加入孔中, 避光恒温箱孵育 15 min, 终止反应为加终止液 50 μ L, 在 15 min 内于 450 nm 波长处测 OD 值。对血清样本中的 IL-1 β 及 CRP 含量进行计算。

2.5 免疫组织化学染色法检测大鼠脑组织中 IL-1 β 水平

烤片条件: 64 $^{\circ}$ C, 2 h。脱蜡条件: 二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 III 各 30 min, 无水乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇各 15 min。抗原修复条件: 微波炉高火 7.5 min。内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min。一抗配比: IL-1 β (1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 滴加酶标山羊抗兔 IgG 聚合物, 室温孵育 30 min, DAB 显色 1 min, 苏木素复染 10 s, 盐酸乙醇分化 1 s, 自来水返蓝, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。采集图像, Image J 软件分析结果。

2.6 HE 染色观察脑组织病理变化

石蜡切片依次放入二甲苯 I、二甲苯 II 中各 15 min, 无水乙醇 I、无水乙醇 II 中各 5 min, 95% 乙醇、85% 乙醇、70% 乙醇中各脱蜡 5 min, 自来水冲洗 2 min, 苏木素染液 5 min, 1% 盐酸乙醇分化 2 s, 1% 氨水溶液返蓝 2 s, 自来水冲洗 2 min, 切片依次放入 70% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇中脱水, 放入伊红染液 2 min, 切片依次放入无水乙醇 I、无水乙醇 II、无水乙醇 III 中各 5 min, 切片依次放入二甲苯 I、二甲苯 II 中各透明 5 min, 中性树胶封片。

2.7 尼氏染色法观察脑组织中尼氏小体的病理变化

石蜡切片脱蜡至水, 依次将切片放入环保型脱蜡液 I、环保型脱蜡液 II 各 20 min, 无水乙醇 I、无水乙醇 II 各 5 min, 75% 乙醇 5 min, 自来水洗。组织

切片入尼氏染液 2~5 min,水洗,0.1%冰醋酸稍分化,自来水洗终止反应,显微镜下控制分化程度,自来水洗后,将切片置于烤箱烤干。切片放入干净的二甲苯中透明 10 min,中性树胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。神经元内的尼氏小体呈深蓝色颗粒,细胞核呈淡蓝色,背景淡蓝色。

2.8 劳克坚牢蓝染色观察脑组织中神经髓鞘的病理变化

石蜡切片经二甲苯及梯度乙醇复水,依次将切片放入环保型脱蜡液 I、环保型脱蜡液 II 各 20 min,无水乙醇 I、无水乙醇 II 各 5 min,75%乙醇 5 min,自来水洗。髓鞘染液 A 置于 60 ℃烤箱预热 30 min,切片入髓鞘染液 A 加膜加盖浸染 1 h,取出切片快速自来水洗。切片浸入髓鞘染液 B 中稍分化 2 s(趁热),直接浸入髓鞘染液 C 分化 15 s,水洗终止分化,镜检,反复分化水洗和镜检,至髓鞘呈蓝色背景近无色即可。切片入 65 ℃烤箱烤干(约 30 min 至玻片干燥)拿出,冷却后进入 95%乙醇后复染伊红。切片依次放入无水乙醇 I、无水乙醇 II、无水乙醇 III 中各 5 min,切片依次放入二甲苯 I、二甲苯 II 中各 5 min 透明,中性树胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。

2.9 统计学分析

运用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析,分析数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,若结果满足正态性和方差齐性,多组间比较用单因素方差分析;组间两两比较,若方差齐则采用最小显著性差异法,若方差不齐采用 Dunnett's T3 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠脑电、肌电睡眠检测情况

与正常组相比,模型组 TST、SWS 时间、REM 时间显著减少($P < 0.01$);与模型组相比,唑吡坦组、通

路抑制剂组及清心宁神汤低、高剂量组 TST、SWS 时间、REM 时间显著增加($P < 0.01$),提示心不藏神不寐大鼠模型构建成功。与唑吡坦组相比,清心宁神汤低剂量组 TST、REM 时间明显减少($P < 0.05$),清心宁神汤高剂量组 TST、SWS 时间、REM 时间明显增加($P < 0.01$),通路抑制剂组 TST、SWS 时间、REM 时间明显减少($P < 0.01$);与清心宁神汤低剂量组相比,清心宁神汤高剂量组 TST、SWS 时间、REM 时间显著增加($P < 0.01$),通路抑制剂组 TST、SWS 时间、REM 时间减少($P < 0.05, P < 0.01$);与清心宁神汤高剂量组相比,通路抑制剂组 TST、SWS 时间、REM 时间显著减少($P < 0.01$)。详见表 1。

3.2 各组大鼠旷场实验情况

与正常组相比,模型组大鼠移动总路程、活动总时间、中央活动时间、爬壁站立时间均显著减少($P < 0.01$),粪便数量显著增多($P < 0.01$);与模型组相比,唑吡坦组、通路抑制剂组及清心宁神汤低、高剂量组大鼠移动总路程、活动总时间、中央活动时间、爬壁站立时间增加($P < 0.05, P < 0.01$),粪便数量显著减少($P < 0.01$)。与唑吡坦组、清心宁神汤低剂量组相比,清心宁神汤高剂量组大鼠移动总路程、活动总时间、中央活动时间、爬壁站立时间增加($P < 0.05, P < 0.01$),粪便数量减少($P < 0.05, P < 0.01$);通路抑制剂组大鼠移动总路程、活动总时间、中央活动时间、爬壁站立时间减少($P < 0.05, P < 0.01$),粪便数量显著增多($P < 0.01$)。与清心宁神汤高剂量组相比,通路抑制剂组移动总路程、活动总时间、中央活动时间、爬壁站立时间显著减少($P < 0.01$),粪便数量显著增多($P < 0.01$)。详见图 1、表 2。

3.3 各组大鼠血清 IL-1 β 及 CRP 的水平

与正常组相比,模型组大鼠血清中 IL-1 β 及 CRP

表 1 清心宁神汤对失眠大鼠脑电、肌电图各项指标的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of QXNSD on EEG and EMG indicators in insomnia rats ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	TST/s	SWS 时间/s	REM 时间/s
正常组	38 645.33 $\pm$ 229.65	36 449.50 $\pm$ 323.68	2 195.83 $\pm$ 165.71
模型组	24 693.50 $\pm$ 1 294.86**	23 643.00 $\pm$ 1 165.64**	1 050.50 $\pm$ 150.18**
唑吡坦组	33 623.67 $\pm$ 1 843.81***	31 958.67 $\pm$ 1 878.36***	1 665.00 $\pm$ 103.94***
清心宁神汤低剂量组	31 874.50 $\pm$ 2 014.97***◇	30 395.17 $\pm$ 1 970.13***	1 479.33 $\pm$ 95.18***◇
清心宁神汤高剂量组	36 316.33 $\pm$ 615.83***◇□□	34 435.17 $\pm$ 638.26***◇□□	1 881.17 $\pm$ 136.51***◇□□
通路抑制剂组	28 294.00 $\pm$ 1 571.12***◇□□△△	27 010.00 $\pm$ 1 541.2***◇□□△△	1 284.00 $\pm$ 75.22***◇□□△△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,*** $P < 0.01$;与唑吡坦组比较,◇ $P < 0.05$,◇◇ $P < 0.01$;与清心宁神汤低剂量组比较,□ $P < 0.05$,□□ $P < 0.01$;与清心宁神汤高剂量组比较,△△ $P < 0.01$ 。

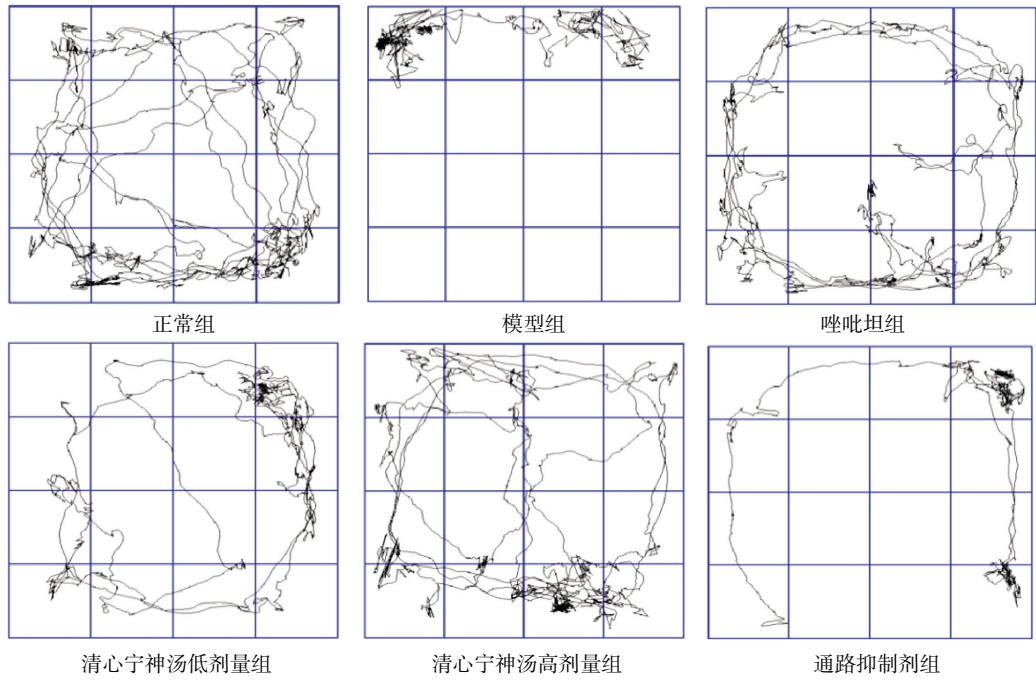


图 1 各组大鼠旷场实验轨迹图

Fig.1 Track chart of open field experiment of rats in each group

表 2 清心宁神汤对失眠大鼠旷场实验各项指标的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of QXNSD on various indexes in open field experiment of insomnia rats ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	移动总路程/mm	活动总时间/s	中央活动时间/s	爬壁站立时间/s	粪便数量/粒
正常组	28 674.03±3993.27	286.93±4.38	36.61±3.43	78.16±14.44	0.67±0.82
模型组	5 042.45±1500.86**	122.71±25.07**	1.83±1.21**	3.54±3.95**	9.17±1.72**
唑吡坦组	19 154.17±2 994.40** ^{##}	234.02±12.22** ^{##}	14.31±3.84** ^{##}	31.07±6.41** ^{##}	4.00±0.89** ^{##}
清心宁神汤低剂量组	17 090.79±2 831.58** ^{##}	226.94±14.52** ^{##}	12.21±2.82** ^{##}	28.81±6.28** ^{##}	4.17±1.17** ^{##}
清心宁神汤高剂量组	24 835.59±1 217.43** ^{##} ◇◇□□	263.10±8.46** ^{##} ◇◇□□	24.80±3.72** ^{##} ◇◇□□	47.89±4.09** ^{##} ◇◇□□	2.17±1.17** ^{##} ◇◇□□
通路抑制剂组	9 645.01±2 075.21** ^{##} ◇◇□□△△	183.06±10.35** ^{##} ◇◇□□△△	5.78±1.75** ^{##} ◇◇□□△△	13.98±4.3** ^{##} ◇◇□□△△	6.33±1.03** ^{##} ◇◇□□△△

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与唑吡坦组比较,◇ $P<0.05$,◇◇ $P<0.01$;与清心宁神汤低剂量组比较,□ $P<0.05$,□□ $P<0.01$;与清心宁神汤高剂量组比较,△ $P<0.01$ 。

水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,唑吡坦组、通路抑制剂组及清心宁神汤低、高剂量组大鼠血清中 IL-1 β 及 CRP 水平显著降低($P<0.01$);与唑吡坦组、清心宁神汤低剂量组相比,清心宁神汤高剂量组大鼠血清中 IL-1 β 及 CRP 水平降低($P<0.05, P<0.01$),通路抑制剂组大鼠血清中 IL-1 β 及 CRP 水平显著升高($P<0.01$);与清心宁神汤高剂量组相比,通路抑制剂组大鼠血清中 IL-1 β 及 CRP 水平显著升高($P<0.01$)。详见表 3。

3.4 各组大鼠脑组织 IL-1 β 表达情况

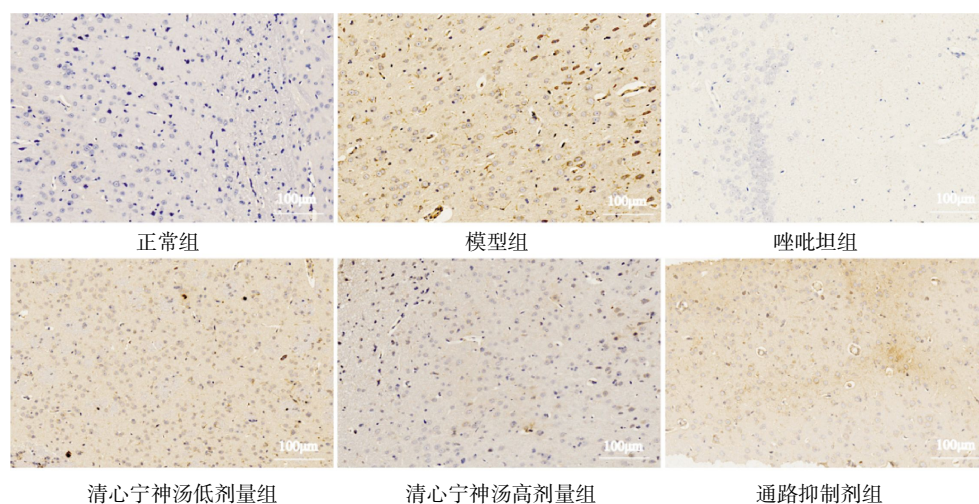
与正常组相比,模型组大鼠脑组织中 IL-1 β 表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,唑吡坦

表 3 清心宁神汤对失眠大鼠血清中 IL-1 β 及 CRP 的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of QXNSD on serum IL-1 β and CRP in insomnia rats ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β /(pg/mL)	CRP/(mg/L)
正常组	71.39±12.35	8.65±0.48
模型组	140.00±7.40**	12.34±0.50**
唑吡坦组	109.64±5.93** ^{##}	10.42±0.23** ^{##}
清心宁神汤低剂量组	111.12±5.61** ^{##}	10.55±0.29** ^{##}
清心宁神汤高剂量组	96.23±5.62** ^{##} ◇◇□□	9.87±0.21** ^{##} ◇◇□□
通路抑制剂组	125.18±6.95** ^{##} ◇◇□□△△	11.37±0.25** ^{##} ◇◇□□△△

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与唑吡坦组比较,◇ $P<0.05$,◇◇ $P<0.01$;与清心宁神汤低剂量组比较,□ $P<0.01$;与清心宁神汤高剂量组比较,△ $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠脑组织中 IL-1 β 表达情况(×200)Fig.2 IL-1 β expression in brain tissue of rats in each group (×200)

组、通路抑制剂组及清心宁神汤低、高剂量组大鼠脑组织中 IL-1 β 表达水平显著降低($P<0.01$);与唑吡坦组、清心宁神汤低剂量组相比,清心宁神汤高剂量组大鼠脑组织中 IL-1 β 表达水平显著降低($P<0.01$),通路抑制剂组大鼠脑组织中 IL-1 β 表达水平显著升高($P<0.01$);与清心宁神汤高剂量组相比,通路抑制剂组脑组织中 IL-1 β 表达水平显著升高($P<0.01$)。详见图 2、表 4。

表 4 清心宁神汤对失眠大鼠脑组织中 IL-1 β 表达水平的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of QXNSD on the IL-1 β expression level in the brain tissue of insomnia rats ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β
正常组	0.12±0.02
模型组	0.62±0.05**
唑吡坦组	0.32±0.03***
清心宁神汤低剂量组	0.38±0.04***
清心宁神汤高剂量组	0.22±0.05***◇◇□□
通路抑制剂组	0.49±0.05***◇◇□□△△

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,*** $P<0.01$;与唑吡坦组比较,◇◇ $P<0.01$;与清心宁神汤低剂量组比较,□□ $P<0.01$;与清心宁神汤高剂量组比较,△△ $P<0.01$ 。

3.5 各组大鼠脑组织 HE 染色病理变化情况

正常组与清心宁神汤高剂量组神经元排列整齐,形态清晰、完整,细胞核呈圆形或椭圆形,大小正常且位置居中,染色质分布均匀,少突胶质细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞未见明显增生、肿胀、坏死等表现,中央尼氏小体数量及形态正常,细胞间质内

未见炎症细胞浸润。模型组及通路抑制剂组显示神经元数量减少,排列松散,细胞胞体肿胀、变形,形态不规则,细胞核位置发生偏移,细胞核区域深染,细胞核肿胀、碎裂,可见小胶质细胞肿胀、增生,中央尼氏小体溶解,细胞间质可见炎症细胞浸润,以淋巴细胞为主。唑吡坦组及清心宁神汤低剂量组神经元数量、组织形态及结构损伤较模型组减轻,未见空泡样变性,神经元排列基本整齐,细胞核大小、形态及位置基本正常,有少量细胞核区域深染,可见少量胶质细胞增生,中央尼氏小体溶解较模型组有所缓解,细胞间质可见少量炎症细胞浸润。详见图 3。

3.6 各组大鼠脑组织中尼氏染色尼氏小体病理变化情况

正常组与清心宁神汤高剂量组大脑皮质和海马区域中尼氏小体数量丰富,细胞排列规则且紧密,结构清晰且完整,尼氏小体染色均匀,呈深蓝色。模型组及通路抑制剂组大脑皮质和海马区域中尼氏小体数量明显减少,细胞排列紊乱且间隙增宽,结构模糊且不完整,尼氏小体染色变浅且不均匀,部分出现空泡变性。唑吡坦组及清心宁神汤低剂量组大脑皮质和海马区域中尼氏小体数量较模型组均增加,细胞排列较为规则,结构较为完整,尼氏小体染色及形态较模型组均改善。详见图 4。

3.7 各组大鼠脑组织中劳克坚牢蓝染色神经髓鞘病理变化情况

正常组染色未见脱髓鞘灶,染色均匀,髓鞘呈亮蓝色,分界清晰,层次清楚,髓鞘及组织结构易于观

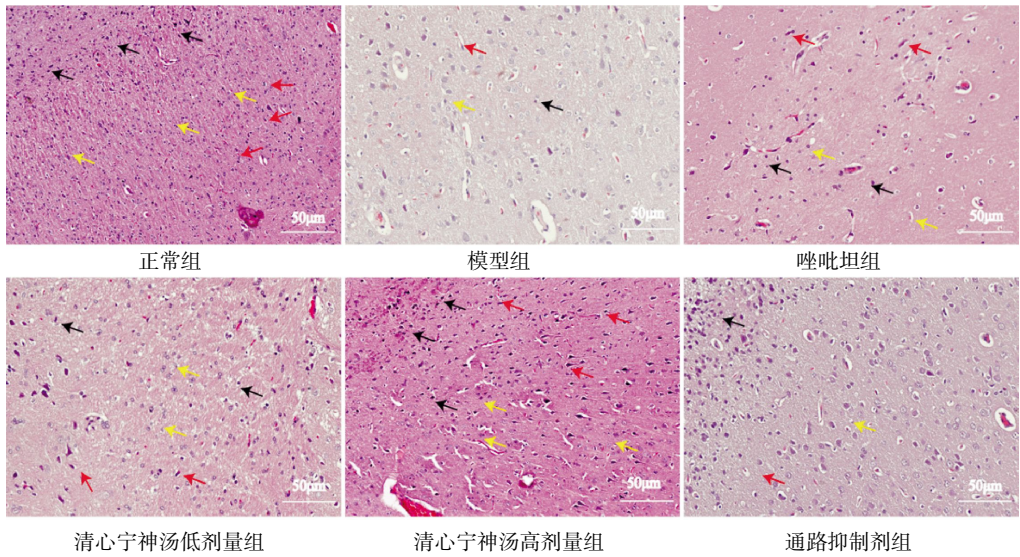


图 3 各组大鼠大脑皮质中 HE 染色病理变化(×400)

Fig.3 Pathological changes of HE staining in cerebral cortex of rats in each group (×400)
注:黑色箭头:少突胶质细胞;红色箭头:小胶质细胞;黄色箭头:星形胶质细胞。

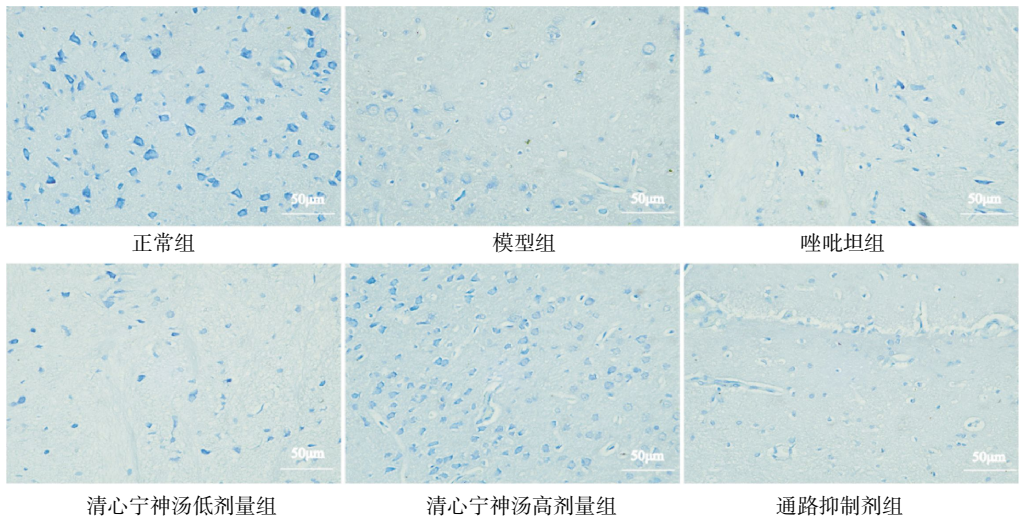


图 4 各组大鼠脑组织中尼氏小体尼氏染色病理变化(×400)

Fig.4 Pathological changes of Nissl bodies staining in brain tissue of rats in each group (×400)

察,神经元及尼氏小体数量丰富,排列整齐。模型组染色未见明显脱髓鞘灶,但出现一定面积的浅染区域,染色不均匀,炎性细胞浸润,蓝紫色细胞核与牢固蓝的亮蓝色界限不明显,髓鞘与神经纤维和髓鞘排列紊乱。唑吡坦组和清心宁神汤低、高剂量组染色未见明显脱髓鞘灶,浅染区域有不同程度的改善,染色稍均匀,神经元及尼氏小体数量较模型组增加,排列较整齐。详见图 5。

4 讨论

持续睡眠障碍是发生精神障碍和物质使用障碍的危险因素^[21]。本团队根据大量临床不寐的症状表

现特征,提出“中医不寐五神分型诊断法”^[22]。该法是依据单一症状从而确立不寐五脏病位诊断的辨证分型方法,以“入寐维艰,甚则彻夜不寐”为主要表现的心不藏神不寐是临床最常见的不寐类型之一。清心宁神汤是全国名老中医药专家传承工作室指导老师张星平教授治疗本病的有效方,本研究主要探讨清心宁神汤对于心不藏神不寐模型大鼠的治疗作用。

《本草纲目·草部第十三卷》曰:“五脏六腑皆有火,平则治,动则病,故有君火、相火之说,其实一气而已。黄连入手少阴心经,为治火之主药。”清心宁神汤中,黄连为君,其味苦、性寒,无毒,可清热燥湿、泻火解毒。臣以黄芩,与黄连配伍,清心安神,黄芩素是

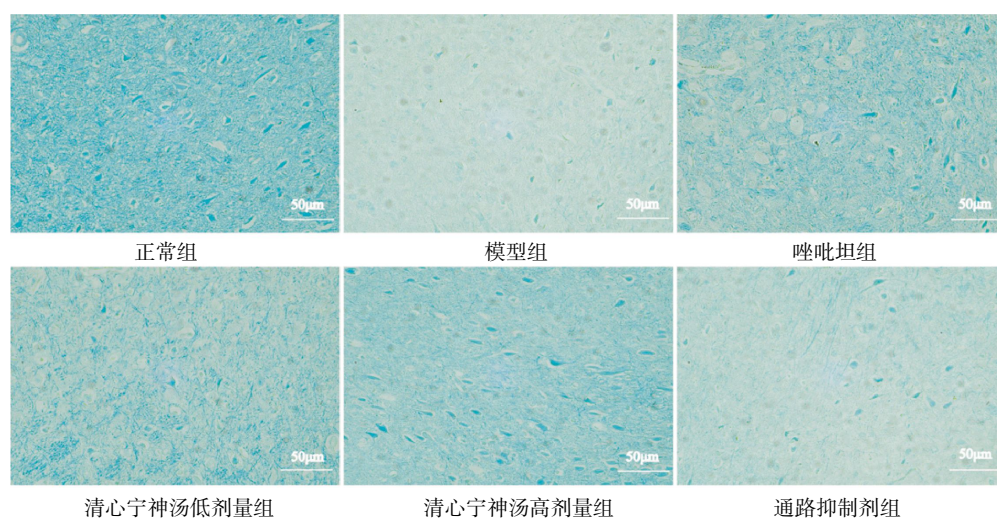


图5 各组大鼠脑组织神经髓鞘劳克坚牢蓝染色病理变化($\times 400$)

Fig.5 Pathological changes of nerve myelin Luxol fast blue staining in brain tissue of rats in each group ($\times 400$)

黄芩的有效成分,现代药理学研究表明,其能改善小鼠自身免疫性脑脊髓炎,纠正小胶质细胞失衡及调节炎症因子,具有神经保护作用^[23]。佐以夏枯草、郁金二药散气滞日久之郁热;醋柴胡、白芍、赤芍、炒白术、茯苓 5 药配伍,取“逍遥散”之意,《灵枢·平人绝谷》言:“神者,水谷之精气也。”芍药与醋柴胡同用,补肝体而助肝用,养血柔肝,5 药合用,使肝郁得疏,血虚得养,脾弱得复,气血兼顾,体用并调,肝脾同治;同时佐以陈皮配伍法半夏能行气和胃、清热化痰,对于不寐患者久病形成的气滞水停,炼湿成痰具有良好效果^[24]。

通过旷场实验结果分析可知,清心宁神汤给药组大鼠总路程增加,活动总时间、中央活动时间、爬壁站立时间增加,粪便数量减少。说明清心宁神汤能够改善不寐大鼠的睡眠情况,缓解大鼠的焦虑、抑郁行为,改善不寐带来的不良影响。课题组前期研究表明^[25],不寐会导致昼夜节律紊乱,导致炎症通路的激活,炎症因子在体内的表达升高。PI3K/Akt/FOXO 为炎症通路之一,参与机体的炎症反应,IL-1 β 为该通路的下游蛋白,且 IL-1 β 及 CRP 均属于炎症因子,IL-1 β 是 IL-1 的一种亚型,能够影响神经元的活性和突触传递,参与睡眠调节和炎症反应^[26]。因此,机体 IL-1 β 含量升高,可能引起神经炎症反应,干扰正常睡眠,导致睡眠障碍。CRP 对于体内炎症反应的严重程度具有重要的指导意义^[27]。本研究通过分析 ELISA 实验结果可知,模型组大鼠血清中

IL-1 β 及 CRP 水平显著升高,与模型组相比,清心宁神汤低、高剂量组大鼠血清中 IL-1 β 及 CRP 水平显著降低,Western blot 法、免疫组织化学染色实验结果同样证明清心宁神汤能够有效降低体内炎症因子 IL-1 β 的含量。

HE 染色、尼氏染色法、劳克坚牢蓝染色法均能反映神经组织的病理变化。神经元是神经系统的基本结构单位,神经结构的损伤,会导致神经营养物质的合成减少。尼氏体是神经元内蛋白质合成的场所,其数量的多少、体积的大小及分布情况反映神经元合成蛋白的能力及是否受损^[28]。髓鞘结构的完整性是保证有髓神经纤维结构和功能完整性的重要生理基础,所以髓鞘的结构改变是神经纤维病理改变的重要标志^[29]。本次实验结果证明,失眠会导致大鼠脑组织神经元数量减少,排列松散,细胞胞体肿胀、变形,形态不规则,细胞核位置发生偏移,细胞核区域深染,部分细胞核肿胀、碎裂,小胶质细胞肿胀、增生,中央尼氏小体数量减少甚至溶解,细胞间质可见炎症细胞浸润,而清心宁神汤可以有效改善失眠大鼠脑组织中神经元数量、组织形态及结构,缓解小胶质细胞异常肿胀及增生,有效避免中央尼氏小体溶解,减少细胞间质炎症细胞浸润。

综上,清心宁神汤对于心不藏神不寐大鼠具有良好的治疗效果,该方可能是通过降低不寐大鼠血清中相关炎症因子的含量,改善脑组织中神经细胞

的病理变化和炎症浸润,恢复神经细胞的功能,从而达到缓解失眠及焦虑障碍的作用。

参考文献

- [1] 科技部“十一五”国家科技支撑计划重点课题心理疾患防治研究与示范项目研究课题组. 基于个体化的失眠症中医临床实践指南[J]. 世界睡眠医学杂志, 2016, 3(2): 65-79.
- [2] 中医科学院失眠症中医临床实践指南课题组. 失眠症中医临床实践指南(WHO/WPO)[J]. 世界睡眠医学杂志, 2016, 3(1): 8-25.
- [3] SIVERTSEN B, LALLUKKA T, SALO P, et al. Insomnia as a risk factor for ill health: Results from the large population-based prospective HUNT Study in Norway[J]. Journal of Sleep Research, 2014, 23(2): 124-132.
- [4] 中国睡眠研究会. 中国失眠症诊断和治疗指南[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(24): 1844-1856.
- [5] RIEMANN D, BAGLIONI C, BASSETTI C, et al. European guideline for the diagnosis and treatment of insomnia[J]. Journal of Sleep Research, 2017, 26(6): 675-700.
- [6] 陈熙明. 苯二氮卓类药物长期应用对认知功能的影响及潜在相关机制[D]. 济宁: 济宁医学院, 2024.
- [7] 田楚娇, 王亮, 王硕, 等. 和胃安神方治疗应激性失眠男性患者52例随机对照试验[J]. 中医杂志, 2024, 65(22): 2326-2331.
- [8] 张涛, 欧阳青兰, 莫镜颖, 等. 国医大师熊继柏治疗失眠的方药规律分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(1): 93-100.
- [9] 朱丽颖, 陈坤, 姜同菲, 等. 调神方针刺改善慢性失眠患者入睡潜伏期及过度觉醒的临床研究[J]. 针灸临床杂志, 2024, 40(9): 10-15.
- [10] 李亚金, 张星平, 陈俊逾, 等. 心不藏神不寐刍议[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 947-949.
- [11] 郭晓航, 张星平, 梁政亨, 等. 中医从心论治不寐因机证治[J]. 中医学报, 2018, 46(6): 24-26.
- [12] 吴金鸿, 张星平, 梁政亨, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨清心宁神汤治疗心不藏神不寐的作用机制[J]. 海南医科大学学报, 2025, 31(2): 118-130.
- [13] 张星平, 刘在新, 黄刚. 根据失眠症状表现不同归属五脏辨识探析[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5): 554-557.
- [14] 王庆全. 心不藏神不寐的理论及实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [15] WANG Q Q, REN X J, ZHANG X P, et al. Therapeutic effect of berberine on insomnia rats by ErbB signaling pathway[J]. Medical Science Monitor, 2020, 26: e921831.
- [16] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1063-1064.
- [17] 浦华. 基于深度学习的中药处方生成与剂量预测的方法研究与实现[D]. 南京: 东南大学, 2023.
- [18] LIAO M S, LONG X Y, CHEN Y C, et al. PARP9 exacerbates apoptosis and neuroinflammation via the PI3K pathway in the thalamus and hippocampus and cognitive decline after cortical infarction[J]. Journal of Neuroinflammation, 2025, 22(1): 43.
- [19] 梁政亨, 安艳丽, 张星平, 等. 失眠症中医不寐五神分型非快速动眼睡眠结构分析[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 386-389.
- [20] 刘燕, 李宇轩, 李杰, 等. 基于动物运动轨迹分析系统探讨旷场实验的规范化研究[J]. 实验动物科学, 2024, 41(5): 55-58.
- [21] SUTTON E L. Psychiatric disorders and sleep issues[J]. Medical Clinics of North America, 2014, 98(5): 1123-1143.
- [22] 张星平, 范秀芳, 邓宁, 等. 中医不寐五神分型诊断法[J]. 中医杂志, 2011, 52(24): 2092-2093.
- [23] 王琳, 李作孝. 黄芩素对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的影响及机制研究[J]. 天津医药, 2022, 50(4): 381-387.
- [24] 唐箐, 梁绿圆, 曹佳蕾, 等. 经典方二陈汤的古今应用分析与关键信息考证[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 1-14[2024-09-26]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20241417>.
- [25] 吴金鸿, 张星平, 闫德祺, 等. 桂枝加龙骨牡蛎汤对肺不藏魄型不寐模型大鼠 IL-10 及 TNF- α 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(13): 20-27.
- [26] 陈园园, 应培挺, 翁雯雯, 等. 抑制 ABCC1/MRP1 转运体下调 IL-1 β 分泌的实验研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2024, 32(3): 911-919.
- [27] 黄晓斌. PCT、CRP、WBC 在全身炎症反应综合征诊疗中的临床意义[J]. 中国医药指南, 2024, 22(26): 107-110.
- [28] 金一丹, 沈俊媛, 解子璇, 等. 厚冰冻切片尼氏染色方法研究[J]. 湖州师范学院学报, 2023, 45(10): 68-71.
- [29] 杨德慧, 古梓婷, 赖胜敏, 等. 大鼠脑髓鞘蓝染色的两种不同复染方法比较[J]. 解剖学杂志, 2018, 41(3): 332-333, 369.

(本文编辑 田梦妍)