

本文引用: 顾鑫, 安晶, 张洪艳, 张明雪, 娄展. 温胆汤调控 p38 MAPK 磷酸化对睡眠剥夺大鼠失眠及伴发不良情绪的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(8): 1420-1426.

温胆汤调控 p38 MAPK 磷酸化对睡眠剥夺大鼠失眠及伴发不良情绪的影响

顾鑫^{1*}, 安晶², 张洪艳¹, 张明雪³, 娄展¹

1. 河北北方学院附属第一医院神经内科, 河北 张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院检验科, 河北 张家口 075000;
3. 重庆市合川区中医院神经内科, 重庆 401520

[摘要] **目的** 研究温胆汤调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)磷酸化对睡眠剥夺大鼠失眠及伴发不良情绪的影响。**方法** 将SD雄性大鼠随机分为对照组、模型组、西药组、低剂量温胆汤组、中剂量温胆汤组、高剂量温胆汤组, 对照组不进行睡眠剥夺, 其余五组进行21 d睡眠剥夺。建模成功后进行灌胃治疗, 对照组和模型组给予生理盐水, 西药组给予艾司西酞普兰(0.9 mg/kg·d), 低、中、高剂量温胆汤组给予温胆汤(0.5 g/100 g, 1 g/100 g, 2 g/100 g), 连续14 d。采用睡眠潜伏时间、睡眠持续时间评价失眠, 采用旷场实验和蔗糖水偏好实验评价抑郁, 采用高架十字迷宫实验评价焦虑, 采用酶联免疫吸附法检测血清5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平以及海马组织中5-HT、NE水平, 采用Western blot检测脑源性神经营养因子(BDNF)表达水平及p-p65核因子- κ B(NF- κ B)和p38 MAPK磷酸化水平。**结果** 与对照组比较, 模型组睡眠潜伏时间延长($P<0.05$), 睡眠持续时间缩短($P<0.05$), 旷场实验得分、蔗糖水偏好率、开臂入臂次数百分比、开臂滞留时间百分比、血清和海马组织5-HT及NE水平、海马组织BDNF表达水平降低($P<0.05$), 血清TNF- α 、IL-6水平及海马组织p-p65 NF- κ B/p65 NF- κ B、p-p38 MAPK/p38 MAPK蛋白表达水平比值升高($P<0.05$)。与模型组比较, 西药组及中、高剂量温胆汤组睡眠潜伏时间缩短, 睡眠持续时间延长($P<0.05$); 西药组及低、中、高剂量温胆汤组, 旷场实验得分、蔗糖水偏好率、开臂入臂次数百分比、开臂滞留时间百分比、血清和海马组织5-HT及NE水平、海马组织BDNF表达水平升高, 血清TNF- α 、IL-6水平及海马组织p-p65 NF- κ B/p65 NF- κ B、p-p38 MAPK/p38 MAPK蛋白表达水平比值降低($P<0.05$); 西药组与高剂量温胆汤组的上述指标比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 不同剂量温胆汤改善睡眠剥夺大鼠的睡眠及情绪, 且高剂量温胆汤的改善作用与西药艾司西酞普兰相当; 抑制p38 MAPK磷酸化是温胆汤发挥改善作用的可能分子机制。

[关键词] 失眠; 睡眠剥夺; 抑郁; 焦虑; 温胆汤; p38 MAPK

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.08.004

Effects of Wendan Decoction on insomnia and associated negative emotions in sleep-deprived rats via regulation of p38 MAPK phosphorylation

GU Xin^{1*}, AN Jing², ZHANG Hongyan¹, ZHANG Mingxue³, LOU Zhan¹

1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

2. Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

3. Department of Neurology, Chongqing Hechuan Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 401520, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Wendan Decoction (WDD) on insomnia and associated negative emotions in sleep-deprived rats via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) phosphorylation. **Methods** Male SD rats

[收稿日期] 2025-02-14

[基金项目] 张家口市 2024 年市级科技计划自筹经费项目(2421040D)。

[通信作者] * 顾鑫, 女, 主治医师, 硕士, E-mail: 15530391527@163.com。

were randomly divided into six groups: control, model, Western medicine, low-, medium-, and high-dose WDD groups. The control group was not subjected to sleep deprivation, while the other five groups underwent sleep deprivation for 21 days. After successful modeling, treatments were administered by gavage: animals in the control and model groups received normal saline; Western medicine group received escitalopram (0.9 mg/kg·d); WDD groups received low, medium, or high doses (0.5 g/100 g, 1 g/100 g, 2 g/100 g) of WDD for 14 consecutive days. Sleep latency and sleep duration were measured to evaluate insomnia. The open field test and sucrose preference test were used to assess depressive-like behavior, while the elevated plus maze test was employed to evaluate anxiety-like behavior. Serum levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), norepinephrine (NE), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6), as well as hippocampal levels of 5-HT and NE, were determined by ELISA. The expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), phosphorylated p65 nuclear factor- κ B (p-p65 NF- κ B), and p38 MAPK in the hippocampus were detected by Western blot analysis. **Results** Compared with the control group, the model group exhibited prolonged sleep latency ($P<0.05$) and reduced sleep duration ($P<0.05$). The model group also had lower scores in the open field test, decreased sucrose preference rate, decreased percentage of open arm entries and time spent in open arms in the elevated plus maze test, reduced 5-HT and NE levels in serum and hippocampal tissue, and decreased hippocampal BDNF expression ($P<0.05$). Additionally, serum TNF- α and IL-6 levels, as well as the ratios of p-p65 NF- κ B/p65 NF- κ B and p-p38 MAPK/p38 MAPK in hippocampal tissue, were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the Western medicine group and the medium-, and high-dose WDD groups showed reduced sleep latency and prolonged sleep duration ($P<0.05$), the Western medicine group and the low-, medium-, and high-dose WDD groups showed had higher scores in the open field test, increased sucrose preference rate, higher percentage of open arm entries and time spent in open arms, elevated levels of 5-HT and NE in serum and hippocampal tissue, and increased expression of BDNF in the hippocampus ($P<0.05$). Furthermore, serum TNF- α and IL-6 levels, as well as the ratios of p-p65 NF- κ B/p65 NF- κ B and p-p38 MAPK/p38 MAPK in the hippocampus, were significantly decreased ($P<0.05$). There were no significant differences in these indicators between the Western medicine group and the high-dose WDD group ($P>0.05$). **Conclusion** WDD at different doses can improve sleep and emotion in sleep-deprived rats, and the effects of the high-dose WDD are comparable to those of the Western medicine escitalopram. Inhibition of p38 MAPK phosphorylation may be a potential molecular mechanism underlying the therapeutic effects of WDD.

[**Keywords**] insomnia; sleep deprivation; depression; anxiety; Wendan Decoction; p38 MAPK

失眠是常见的睡眠障碍,患者表现为对睡眠时间和/或睡眠质量不满足的主观体验,会影响日常生活和工作,同时也促进焦虑和抑郁等不良情绪的产生;不良情绪又会影响失眠患者的睡眠时间或质量、加重失眠。在临床实践中,失眠与不良情绪互相促进,不仅影响患者身心健康,也增加治疗难度^[1-2]。p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的磷酸化参与失眠、抑郁、焦虑等疾病的发生发展,研究显示失眠、抑郁、焦虑等疾病模型中 p38 MAPK 的磷酸化水平增加,磷酸化的 p38 MAPK 会加重神经元损伤、炎症反应、细胞凋亡^[3-4]。因此,抑制 p38 MAPK 磷酸化是改善失眠、抑郁、焦虑重要分子生物学靶点。

失眠属于中医理论“不寐”范畴,其病机在于胆胃不和、痰热内扰。温胆汤是用于痰热内扰证治疗的经典中药方剂,具有理气化痰、健脾安神,临床实践中被用于失眠的治疗^[5]。相关的动物实验表明,温胆汤对焦虑性失眠大鼠的焦虑情绪及脑组织损伤具有改善作用^[6];网络药理学分析表明,温胆汤治疗失眠

的潜在生物学靶点包括 p38 MAPK、炎症因子、凋亡因子等^[7]。目前,温胆汤在失眠并发不良情绪中的治疗价值及分子机制尚缺乏研究证据。因此,本研究拟通过动物实验观察温胆汤调控 p38 MAPK 磷酸化对睡眠剥夺大鼠失眠及伴发不良情绪的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

成年雄性 SD 大鼠购自远大赛威信生命科学(南京)有限公司,体质量(200±20) g、8~10 周龄,共 60 只。使用许可证号:SYXK(苏)2022-0018,生产许可证号:SCXK(苏)2025-0006。研究经河北北方学院附属第一医院医学伦理委员会批准(K2024158)。

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)(批号:D751013)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)(批号:D711249)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(批号 D741029)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)(批号 D721022)的 ELISA 试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司,脑源性神

经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)(批号 ab108319)、磷酸化 p65 核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)(批号 ab76302)、p38 MAPK(批号: ab178867)、磷酸化 p38 MAPK(phosphorylated p38 MAPK, p-p38 MAPK)(批号 ab195049)的兔抗大鼠特异性一抗购自美国 Abcam 公司。

旷场(型号 YAN-COF-02)、高架十字迷宫(型号 YAN-EPR)购自上海玉研科学仪器有限公司,电泳系统(型号 VE 680)、凝胶成像系统(型号 Tanon 4600SF)均购自上海天能生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物造模及评价 参照陈雨菲^[6]的研究,采用改良多平台法制备睡眠剥夺大鼠模型,将大鼠放置在睡眠剥夺箱的平台上,保持水温 23~25 °C、40 W 日光灯照射,大鼠进行自由活动、摄食和饮水,当大鼠进行快动眼睡眠期时会因肌肉松弛而发生鼻尖触碰水面或跌入水中,进而惊醒并维持清醒状态,每天进行 1 次睡眠剥夺、时间 12 h(6:50—18:50),连续进行 21 d。

10 只大鼠作为对照、不进行睡眠剥夺;50 只大鼠作为造模组,进行睡眠剥夺。造模结束后,各组大鼠采用戊巴比妥钠睡眠实验对模型进行评价,方法如下:均给予 2%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射,而后将大鼠腹部向上、身体垂直放置在平板上,观察大鼠保持不动超过 60 s 为翻正反射消失,从腹腔注射戊巴比妥钠到翻正反射消失为睡眠潜伏时间;观察大鼠 60 s 内翻转 2 次以上为翻正反射恢复,从翻正反射消失至翻正反射恢复的时间为睡眠持续时间。根据大鼠睡眠潜伏时间、睡眠持续时间/旷场实验得分、蔗糖水偏好率、开臂入臂次数百分比、开臂滞留时间百分降低判断造模成功,具体见表 1。

1.2.2 动物分组及给药 50 只进行睡眠剥夺的大鼠随机分为模型组、西药组、低剂量温胆汤组、中剂量温胆汤组、高剂量温胆汤组,每组各 10 只;另 10 只不进行睡眠剥夺的对照大鼠作为对照组。建模成功后各组大鼠进行灌胃治疗,对照组和模型组给予生理盐水 10 mL/(kg·d)灌胃,西药组给予艾司西酞普兰 0.9 mg/(kg·d)灌胃,低、中、高剂量温胆汤组参照张慧^[6]的研究给予温胆汤 0.5 g/100 g、1 g/100 g、2 g/100 g 灌胃,每天 1 次,连续 14 d。

1.2.3 旷场实验 完成药物干预后进行旷场实验,将大鼠放入旷场箱中央的方格,记录大鼠 5 min 内水平穿越的格数,即为旷场实验水平运动得分;记录大

鼠 5 min 内后肢直立次数,即为旷场实验垂直运动得分。

1.2.4 高架十字迷宫实验 完成旷场实验后进行高架十字迷宫实验,将大鼠放入 100 cm×100 cm×40 cm 塑料盒内自由探索 5 min,而后迅速将大鼠头朝迷宫开臂 A 放入高架十字迷宫,记录 5 min 内大鼠开臂进入次数、闭臂进入次数、开臂滞留时间、闭臂滞留时间,计算:(1)开臂进入次数百分比=开臂进入次数/(开臂进入次数+闭臂进入次数)×100%;(2)开臂滞留时间百分比=开臂滞留时间/(开臂滞留时间+闭臂滞留时间)×100%。

1.2.5 蔗糖水偏好实验 完成旷场实验和高架十字迷宫实验后进行蔗糖水偏好实验,禁食禁水 24 h,然后给予 2 瓶饮用水,一瓶为 1%蔗糖水、一瓶为纯净水,大鼠自由饮水 30 min 后调换蔗糖水和纯净水位置,继续自由饮水 30 min。记录大鼠摄入蔗糖水和纯净水的体积,计算蔗糖水偏好率=蔗糖水消耗量/(蔗糖水消耗量+纯净水消耗量)×100%。

1.2.6 血清指标检测 完成蔗糖水偏好实验后腹腔注射 2 %戊巴比妥钠 30 mg/kg,麻醉后经腹主动脉取血 3 mL,静置 1 h 后离心分离血清,采用酶联免疫吸附法检测 5-HT、NE、TNF- α 、IL-6 的水平。

1.2.7 海马组织中蛋白表达的检测 完成腹主动脉采血后解剖脑组织,分离海马并加入裂解液进行匀浆,匀浆液进行离心并取上清液,检测上清液的蛋白浓度并将 20 μ g 蛋白用于 Western blot 实验,依次电泳、电转膜、5%脱脂牛奶室温封闭,4 °C 孵育 BDNF 一抗(1:1 000)、p-p65 NF- κ B 一抗(1:800)、p38 MAPK 一抗(1:800)、p-p38 MAPK 一抗(1:600)、 β -actin 一抗(1:4 000)过夜。次日室温孵育辣根过氧化物酶二抗(1:2 000)60 min。将膜放入凝胶成像系统,采用增强化学发光显影液对 BDNF、NF- κ B、p-p38 MAPK 和 β -actin 进行化学显影,计算显影条带灰度值,以 β -actin 为内参,对 BDNF 的蛋白表达水平进行定量分析,对 NF- κ B、p38 MAPK 的磷酸化水平进行定量分析。

1.2.8 海马组织中 5-HT、NE 的检测 取海马组织的匀浆液,采用 ELISA 法检测 5-HT、NE 的水平,计算每克匀浆液蛋白中 5-HT、NE 的水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行实验数据的统计学处理,计量资料首先进行正态性检验和方差齐性检验,对符合正态分布且方差齐的计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,

表1 药物干预前对照大鼠与睡眠剥夺大鼠各项指标的比较($\bar{x}\pm s$)Table 1 Comparison of various indicators between control rats and sleep-deprived rats before drug intervention ($\bar{x}\pm s$)

分类	<i>n</i>	睡眠潜伏时间/min	睡眠持续时间/min	旷场实验水平运动得分	旷场实验垂直运动得分	蔗糖水偏好率/%	开臂入臂次数百分比/%	开臂滞留时间百分比/%
对照组	10	4.26±0.72	69.93±10.14	47.93±5.14	14.12±1.71	62.62±5.23	21.83±3.84	22.09±3.85
造模组	50	5.95±0.88*	49.44±6.93*	20.14±2.46*	6.77±0.82*	38.04±4.11*	16.93±2.11*	17.42±2.14*

注:与对照大鼠比较,* $P<0.05$ 。

通过 *t* 检验进行两组间比较,通过单因素方差分析进行多组间比较并通过 *LSD-t* 检验进行两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 睡眠剥夺模型的评价

50 只大鼠进行 21 d 睡眠剥夺,与对照组比较,造模组大鼠睡眠潜伏时间延长,睡眠持续时间缩短,旷场实验水平运动得分、旷场实验垂直运动得分、蔗糖水偏好率、开臂入臂次数百分比、开臂滞留时间百分比降低,差异有统计学意义($P<0.05$),表明睡眠剥夺造模成功且模型大鼠合并焦虑、抑郁情绪。详见表 1。

2.2 各组大鼠一般情况的比较

对照组大鼠的精神状态好、反应灵敏、毛发有光泽,体质量在实验过程中有所增加;模型组大鼠的精神状态不佳、焦躁,毛发晦暗,取材前体质量较对照组减轻($P<0.05$);西药组和不同剂量温胆汤组的精神状态改善,焦躁行为减轻,取材前体质量较模型组增加($P<0.05$)。详见表 2。

表2 各组大鼠体质量的比较($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 2 Comparison of the body weights among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	分组前体质量/g	造模前体质量/g	取材前体质量/g
对照组	231.22±8.71	249.55±7.72	266.31±8.94
模型组	229.58±7.94	251.24±8.69	243.65±7.74*
低剂量温胆汤组	233.51±8.61	248.35±8.14	250.15±7.95 ^{ab}
中剂量温胆汤组	228.46±8.25	250.29±7.78	255.79±7.41 ^{ab}
高剂量温胆汤组	232.71±7.79	253.07±8.45	259.48±8.15 ^{ab}
西药组	230.52±6.94 [#]	251.72±8.15 [#]	260.11±8.44 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与西药组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠睡眠情况的比较

与对照组比较,模型组的睡眠潜伏时间延长,睡眠持续时间较对照组缩短($P<0.05$)。与模型组比较,低剂量温胆汤组的睡眠潜伏时间、睡眠持续时间无显著性差异($P>0.05$);西药组和中剂量、高剂量温胆汤组的睡眠潜伏时间缩短,睡眠持续时间延长

($P<0.05$)。与西药组比较,低剂量和中剂量的睡眠潜伏时间延长,睡眠持续时间缩短($P<0.05$);高剂量温胆汤组的睡眠潜伏时间、睡眠持续时间无显著性差异($P>0.05$)。详见表 3。

表3 各组大鼠睡眠潜伏时间、睡眠持续时间的比较($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 3 Comparison of sleep latency and sleep duration among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	睡眠潜伏时间/min	睡眠持续时间/min
对照组	4.52±0.79	71.31±11.32
模型组	6.09±0.94*	52.45±7.74*
低剂量温胆汤组	5.65±0.85	56.65±8.12
中剂量温胆汤组	5.11±0.65 ^{ab}	63.12±8.95 ^{ab}
高剂量温胆汤组	4.49±0.71 ^{ab}	70.32±10.12 ^{ab}
西药组	4.31±0.67 [#]	71.14±10.84 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与西药组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠不良情绪的比较

与对照组比较,模型组的旷场实验得分、蔗糖水偏好率、开臂入臂次数百分比、开臂滞留时间百分比降低($P<0.05$)。与模型组比较,西药组和不同剂量温胆汤组的旷场实验得分、蔗糖水偏好率、开臂入臂次数百分比、开臂滞留时间百分比增加($P<0.05$)。与西药组比较,低剂量和中剂量温胆汤组的旷场实验得分、蔗糖水偏好率、开臂入臂次数百分比、开臂滞留时间百分比显著降低($P<0.05$);高剂量温胆汤组的旷场实验得分、蔗糖水偏好率、开臂入臂次数百分比、开臂滞留时间百分比无显著性差异($P>0.05$)。详见表 4。

2.5 各组大鼠血清 5-HT、NE、TNF- α 、IL-6 水平的比较

与对照组比较,模型组的血清 5-HT、NE 水平降低($P<0.05$),TNF- α 、IL-6 水平较对照组升高($P<0.05$);与模型组比较,西药组和不同剂量温胆汤组的血清 5-HT、NE 水平升高($P<0.05$),TNF- α 、IL-6 水平降低($P<0.05$);与西药组比较,低剂量和中剂量温

表 4 各组大鼠不良情绪的比较($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 4 Comparison of negative emotions among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	旷场实验水平运动得分	旷场实验垂直运动得分	蔗糖水偏好率/%	开臂入臂次数百分比/%	开臂滞留时间百分比/%
对照组	49.59±5.52	14.52±1.78	64.41±5.69	22.12±3.94	22.85±4.04
模型组	21.47±2.95*	6.95±0.85*	39.36±4.48*	17.34±2.29*	18.11±2.45*
低剂量温胆汤组	30.41±3.91 ^{ak}	8.94±1.07 ^{ak}	46.72±5.24 ^{ak}	19.25±2.57 ^{ak}	20.14±3.29 ^{ak}
中剂量温胆汤组	34.75±4.22 ^{aka}	10.03±1.22 ^{aka}	50.12±5.17 ^{aka}	19.79±2.35 ^{aka}	20.49±3.19 ^{aka}
高剂量温胆汤组	42.29±4.41 ^{ab}	12.25±1.38 ^{ab}	59.37±5.91 ^{ab}	21.82±3.19 ^{ab}	22.19±3.45 ^{ab}
西药组	42.58±5.38 [#]	12.19±1.42 [#]	58.68±6.14 [#]	21.77±3.25 [#]	22.04±3.37 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,^a $P<0.05$;与西药组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 5 各组大鼠血清 5-HT、NE、TNF- α 、IL-6 的比较($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 5 Comparison of serum 5-HT, NE, TNF- α , and IL-6 among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	5-HT/(pg/mL)	NE/(ng/mL)	TNF- α /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)
对照组	1 713.42±213.23	1 337.67±164.49	101.32±14.76	91.36±12.68
模型组	294.58±41.23*	175.57±22.59*	227.61±31.23*	209.45±26.51*
低剂量温胆汤组	893.12±103.25 ^{ak}	695.57±94.52 ^{ak}	181.51±19.83 ^{ak}	162.68±19.23 ^{ak}
中剂量温胆汤组	978.45±107.68 ^{aka}	775.14±98.14 ^{aka}	172.47±18.79 ^{aka}	157.67±18.12 ^{aka}
高剂量温胆汤组	1 429.37±185.57 ^{ab}	1 146.65±145.52 ^{ab}	133.41±16.58 ^{ab}	119.48±14.52 ^{ab}
西药组	1 465.95±179.67 [#]	1 109.85±145.28 [#]	129.57±16.62 [#]	114.62±15.52 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,^a $P<0.05$;与西药组比较,[#] $P<0.05$ 。

胆汤组的血清 5-HT、NE 水平降低($P<0.05$), TNF- α 、IL-6 水平升高($P<0.05$);高剂量温胆汤组的血清 5-HT、NE、TNF- α 、IL-6 水平无显著性差异($P>0.05$)。详见表 5。

2.6 各组大鼠海马组织中 5-HT、NE 水平的比较

与对照组比较,模型组海马组织中 5-HT、NE 的水平较对照组降低($P<0.05$)。与模型组比较,西药组和不同剂量温胆汤组海马组织中 5-HT、NE 的水平升高($P<0.05$)。与西药组比较,低剂量和中剂量温胆汤组海马组织中 5-HT、NE 的水平降低($P<0.05$);高剂量温胆汤组海马组织中 5-HT、NE 的水平无显著性差异($P>0.05$)。详见表 6。

表 6 各组大鼠海马组织中 5-HT、NE 水平的比较

($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Comparison of 5-HT and NE levels in hippocampal tissues among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	5-HT/(ng/g)	NE/(μ g/g)
对照组	526.62±20.77	314.62±18.95
模型组	229.14±13.94*	181.35±12.34*
低剂量温胆汤组	289.52±23.15 ^{ak}	203.25±16.25 ^{ak}
中剂量温胆汤组	331.71±29.25 ^{aka}	243.75±17.44 ^{aka}
高剂量温胆汤组	409.95±25.94 ^{ab}	281.12±19.45 ^{ab}
西药组	411.14±29.32 [#]	284.84±18.84 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,^a $P<0.05$;与西药组比较,[#] $P<0.05$;与低剂量组比较,^k $P<0.05$;与中剂量组比较,^b $P<0.05$ 。

2.7 各组大鼠海马组织 BDNF、p-p65 NF- κ B 及 p38 MAPK 蛋白表达水平的比较

与对照组比较,模型组的脑组织 BDNF 蛋白表达水平较对照组降低($P<0.05$), p-p65 NF- κ B/p65 NF- κ B、p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白表达水平比值升高($P<0.05$)。与模型组比较,西药组和不同剂量温胆汤组的海马组织 BDNF 蛋白表达水平升高($P<0.05$), p-p65 NF- κ B/p65 NF- κ B 及 p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白表达水平比值降低($P<0.05$)。与西药组比较,低剂量和中剂量温胆汤组的 BDNF 蛋白表达水平降低($P<0.05$), p-p65 NF- κ B/p65 NF- κ B、p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白表达水平比值升高($P<0.05$);高剂量温胆汤组的海马组织 BDNF、p-p65 NF- κ B/p65 NF- κ B、p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白表达水平比值无显著性差异($P>0.05$)。详见图 1。

3 讨论

失眠是一种影响正常工作及生活的生理心理疾患,失眠患者常常伴有焦虑、抑郁等不良情绪。本研究采用改良多平台法制备睡眠剥夺大鼠模型,该模型不仅能够有效的进行睡眠剥夺,还能通过设置多平台避免单个大鼠因群体分离产生应激刺激,进而排除睡眠剥夺以外的因素对情绪造成影响。陈雨菲

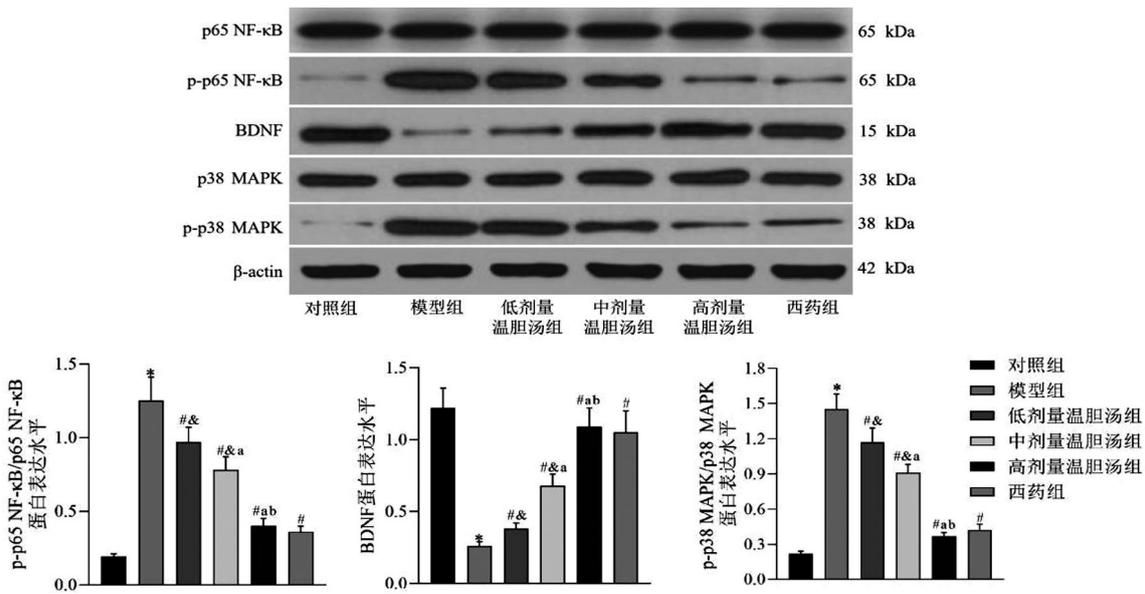


图1 各组大鼠海马组织 BDNF、p-p65 NF-κB/p65 NF-κB 及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白表达水平的比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig.1 Comparison of the protein expression levels of BDNF, p-p65 NF-κB/p65 NF-κB, p-p38 MAPK/p38 MAPK in hippocampal tissues among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与西药组比较,# $P<0.05$;与低剂量组比较,# $P<0.05$;与中剂量组比较,# $P<0.05$ 。

等研究发现,通过改良多平台法可制备睡眠剥夺大鼠模型,大鼠表现出失眠以及抑郁情绪^[8]。本研究对睡眠剥夺大鼠睡眠情况及抑郁情况的检测结果与陈雨菲的研究结果一致,即睡眠剥夺大鼠的睡眠潜伏时间延长、睡眠持续时间缩短并且在反映抑郁的实验中旷场实验得分、蔗糖水偏好率均降低。此外,本研究还对焦虑情绪进行检测,结果显示:在反映焦虑的高架十字迷宫实验中睡眠剥夺大鼠的开臂入臂次数百分比、开臂滞留时间百分比降低,提示模型大鼠出现显著焦虑情绪。以上结果表明,本研究通过改良多平台法制备的睡眠剥夺大鼠出现失眠以及抑郁、焦虑的不良情绪,与临床实践中失眠患者容易并发焦虑、抑郁的特点一致。

神经递质紊乱、炎症反应激活是失眠以及抑郁、焦虑过程中重要的生物学改变。p38 MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶家族的成员之一,研究资料显示:中枢神经系统中 p38 MAPK 参与炎症反应、神经递质、BDNF 的调控^[9-10]。另有网络药理学分析的结果显示,p38 MAPK 是温胆汤治疗失眠的潜在作用靶点^[7]。温胆汤是临床治疗痰热内扰证的经典方,由半夏、竹茹、麸炒枳实、陈皮、炙甘草及茯苓 6 种中药组成,该方兼具改善失眠以及情志双相调节的治疗价值,相关的临床研究资料显示:温胆汤治疗失眠伴焦虑抑郁共病患者能够改善失眠、抑郁及焦虑^[11-12]。但

相关的分子生物学机制尚不清楚。因此,本研究旨在以 p38 MAPK 为切入点,对温胆汤在失眠中的治疗价值及相关分子机制展开探索。

中医学认为失眠以及不良情绪病机在于胆胃不和、痰热内扰、食滞内扰。温胆汤的功效是调胆和胃、理气化痰。根据《三因极一病证方论》卷八的记载,温胆汤对胆胃不和、痰热内扰引起的虚烦、不得眠具有治疗价值。该方的君药为半夏,能燥湿化痰、降逆和胃;臣药为竹茹,能除烦止呕、解少阳腑热;辅以枳实、陈皮、炙甘草及茯苓能调和脾胃和胆气,中和诸味药物的药性^[12-13]。张慧的动物实验使用温胆汤治疗焦虑性失眠大鼠,结果显示温胆汤具有抗焦虑作用^[6]。本研究使用温胆汤治疗睡眠剥夺大鼠,对失眠及不良情绪的观察结果显示:中剂量和高剂量温胆汤改善睡眠,低、中、高 3 种剂量温胆汤改善焦虑和抑郁,并且高剂量温胆汤对睡眠及焦虑、抑郁的改善作用与西药艾司西酞普兰的治疗效果相当。以上结果表明温胆汤在睡眠剥夺大鼠中发挥改善睡眠以及抗焦虑、抗抑郁作用。

本研究进一步对温胆汤改善睡眠以及抗焦虑、抗抑郁相关的分子机制进行探索。炎症反应激活、神经递质释放紊乱、突触可塑性受损等是影响睡眠和情绪的生物学过程。研究资料显示,促进神经递质 5-HT 和 NE 的分泌能够改善睡眠、减轻抑郁^[14];BDNF

调控神经元分化和再生,增加 BDNF 表达能够增加突触可塑性、改善抑郁和焦虑^[15];NF- κ B 是调控炎症因子表达的转录因子,通过增加 TNF- α 、IL-6 等炎症因子表达影响神经递质释放,进而参与失眠及不良情绪的产生^[16]。p38 MAPK 的磷酸化抑制 BDNF 释放、引起神经元损伤、降低突触可塑性,同时也引起 NF- κ B 磷酸化、激活炎症反应^[17]。本研究中,睡眠剥夺大鼠的血清 5-HT、NE 水平及海马组织 BDNF 表达下降,血清 TNF- α 、IL-6 水平及海马组织 p65 NF- κ B 和 p38 MAPK 的磷酸化水平增加,与既往研究中相应神经递质、细胞因子、转录因子参与失眠、抑郁、焦虑的结果一致;使用不同剂量温胆汤治疗睡眠剥夺大鼠后,血清神经递质、炎症因子的水平以及海马组织 BDNF 的表达及 p65 NF- κ B 和 p38 MAPK 的磷酸化水平均明显改善,并且高剂量温胆汤的改善作用与西药艾司西酞普兰相当。

综上所述,温胆汤对睡眠剥夺大鼠的睡眠、抑郁、焦虑具有改善作用,同时调控神经递质、炎症反应、细胞因子,高剂量温胆汤在睡眠剥夺大鼠中的调控作用与西药艾司西酞普兰相当,进而对临床使用温胆汤治疗失眠并发不良情绪提供依据。此外,本研究还证实温胆汤对睡眠剥夺大鼠睡眠、抑郁、焦虑的改善作用与抑制 p38MAPK 磷酸化相关,进而为今后研究睡眠并发不良情绪的分子机制提供了新的分子靶点。

参考文献

- [1] LIU X, LI C, CHEN X, et al. Social support and sleep quality in people with schizophrenia living in the community: the mediating roles of anxiety and depression symptoms[J]. *Front Public Health*, 2024, 30(12): 1414868.
- [2] ZHAN N, XU Y, PU J, et al. The interaction between mental resilience and insomnia disorder on negative emotions in nurses in Guangdong Province, China[J]. *Front Psychiatry*, 2024, 29(15): 1396417.
- [3] AFIF Z, EDDY SANTOSO M I, NURDIANA, et al. Effect of *Centella asiatica* ethanol extract on zebrafish larvae (*Danio rerio*) insomnia model through inhibition of Orexin, ERK, Akt and p38 [J]. *F1000Res*, 2024, 18(13): 107.
- [4] LI X, TENG T, YAN W, et al. AKT and MAPK signaling pathways in hippocampus reveals the pathogenesis of depression in four stress-induced models[J]. *Transl Psychiatry*, 2023, 13(1):200.
- [5] PAN L M, HONG Z B, GUAN R Q. Research progress on insomnia treated by traditional Chinese medicine and acupuncture based on microbial-gut-brain axis theory[J]. *World Journal of Clinical Cases*, 2024, 12(18): 3314-3320.
- [6] 张 慧, 冯卫星, 张焕超, 等. 温胆汤对焦虑性失眠大鼠即刻早期基因表达的影响[J]. *陕西中医*, 2016, 37(7): 931-933.
- [7] 李 莉, 刘 茹, 何 晶, 等. 基于网络药理学及动物实验探究温胆汤治疗失眠潜在靶点[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2023, 25(7): 2450-2464.
- [8] 陈雨菲, 李 飞, 李晓路, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤改善睡眠剥夺大鼠失眠及伴发不良情绪的研究[J]. *四川中医*, 2024, 42(5): 73-78.
- [9] FOUAD M A, TADROS M G, MICHEL H E. Etanercept ameliorates chronic mild stress-induced depressive-like behavior in rats: Crosstalk between MAPK and STAT3 pathways and norepinephrine and serotonin transporters [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2024, 5(978): 176801.
- [10] KWATRA M, AHMED S, GAWALI B, et al. Hesperidin alleviates chronic restraint stress and lipopolysaccharide-induced Hippocampus and Frontal cortex damage in mice: Role of TLR4/NF- κ B, p38 MAPK/JNK, Nrf2/ARE signaling[J]. *Neurochemistry International*, 2020, 140: 104835.
- [11] 沈顶茂, 何月敏. 加味温胆汤治疗痰湿内阻型失眠症疗效观察及对血清 5-HT、Glu 水平的影响[J]. *新中医*, 2024, 56(15): 13-18.
- [12] 沈祥立, 赖 星. 温胆汤化痰联合脐针治疗痰热内扰型失眠的临床研究[J]. *广州医科大学学报*, 2023, 51(5): 33-37.
- [13] 蒋进珍, 陈国华, 宋昕桦, 等. 加味温胆汤联合西药治疗痰热内扰失眠伴焦虑抑郁的临床观察[J]. *医药导报*, 2024, 43(2): 221-227.
- [14] WANG M, LI N, JING S, et al. Schisandrin B exerts hypnotic effects in PCPA-treated rats by increasing hypothalamic 5-HT and gamma-aminobutyric acid levels[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 20(6): 142.
- [15] BORROTO-ESCUELA D, SERRANO-CASTRO P, SÁNCHEZ-PÉREZ J A, et al. Enhanced neuronal survival and BDNF elevation via long-term co-activation of galanin 2 (GALR2) and neuropeptide Y1 receptors (NPY1R): potential therapeutic targets for major depressive disorder[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2024, 28(4): 295-308.
- [16] XIONG F, LV X. Luteolin reversed anxiety and depressive-like behavior via modulation of the NF- κ B/NLRP3 inflammatory axis in the hippocampus of rats subjected to sleep deprivation[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2024, 27(8): 1050-1058.
- [17] YOSHIDA T, DAS NA, CARPENTER AJ, et al. Minocycline reverses IL-17A/TRAF3IP2-mediated p38 MAPK/NF- κ B/iNOS/NO-dependent cardiomyocyte contractile depression and death[J]. *Cell Signal*, 2020, 73: 109690.