

· 论著 ·

# 和胃安神方对失眠模型大鼠血浆及下丘脑胆囊收缩素 8 的影响

黎发根 李绍旦 杨明会 周建平 曹科 刘毅

**【摘要】 目的** 探讨和胃安神方对失眠大鼠血浆及下丘脑胆囊收缩素 8(CCK-8)的影响。**方法** 将 30 只雄性 wistar 大鼠随机分为正常对照组、失眠模型组、和胃安神方中药组。采用放射免疫分析法检测血浆及下丘脑组织 CCK-8 的含量。**结果** 和胃安神方中药组血浆 CCK-8 含量为  $(19.320 \pm 4.577)$  pg/ml, 高于模型组  $(12.924 \pm 5.132)$  pg/ml, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与正常组  $(23.718 \pm 6.917)$  pg/ml 比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 和胃安神方中药组下丘脑 CCK-8 含量为  $(1.655 \pm 0.415)$  pg/mg, 高于模型组  $(1.058 \pm 0.398)$  pg/mg, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与正常组  $(1.936 \pm 0.652)$  pg/mg 比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。**结论** 和胃安神方治疗失眠症的疗效机制可能与其上调 CCK-8 水平有关。

**【关键词】** 和胃安神方; 失眠; 血浆; 下丘脑; 胆囊收缩素 8

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.09.006

**Effect of Hewei Anshen Decoction on cholecystokinin-8 levels in plasma and hypothalamus of insomnic rats** LI Fa-gen, LI Shao-dan, YANG Ming-hui, et al. Institute of Traditional Chinese Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LI Shao-dan, E-mail: lsd301@126.com

**【Abstract】 Objective** To study the effect of Hewei Anshen Decoction (HWASD) on CCK-8 levels in plasma and hypothalamus of insomnic rats. **Methods** Thirty healthy male wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group, insomnia model group and HWASD treatment group. Radio-immunoassay was used to measure the levels of CCK-8 in plasma and hypothalamus. **Results** The concentration of CCK-8 in the plasma of HWASD treatment group was  $(19.320 \pm 4.577)$  pg/ml, significantly higher than that of insomnia model group  $(12.924 \pm 5.132)$  pg/ml ( $P < 0.05$ ), similar to normal control group  $(23.718 \pm 6.917)$  pg/ml ( $P > 0.05$ ). The level of CCK-8 in the hypothalamus of HWASD treatment group was  $(1.655 \pm 0.415)$  pg/mg, significantly higher than that of insomnia model group  $(1.058 \pm 0.398)$  pg/mg ( $P < 0.05$ ), similar to normal control group  $(1.936 \pm 0.652)$  pg/mg ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The therapeutic effect of Hewei Anshen Decoction on insomnia is partially attributed to increased content of CCK-8.

**【Key words】** Hewei Anshen Decoction; Insomnia; Plasma; Hypothalamus; Cholecystokinin-8

失眠是一种常见的睡眠障碍性疾病,其发生率高,长期的失眠会严重影响人们的身心健康<sup>[1-2]</sup>。目前西医对失眠症的治疗以镇静催眠药物为主,而

长期应用此类药物具有诸多毒副作用,如宿醉、共济失调、戒断反应或依赖成瘾等<sup>[3]</sup>,临床疗效尚不理想。在既往研究中应用中药和胃安神方治疗失

基金项目:国家自然科学基金(81173429);首都医学发展基金(SF-2009-II-16)

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院中医研究所[黎发根(硕士研究生)、李绍旦、杨明会、曹科、刘毅];军事医学科学院毒物药物研究所(周建平)

作者简介:黎发根(1985-),2010 级在读硕士研究生。研究方向:中西医结合老年病。E-mail: lifagen5@163.com

通讯作者:李绍旦(1976-),博士,副主任医师。研究方向:中西医结合基础与临床。E-mail: lsd301@126.com

文献标引:

黎发根,李绍旦,杨明会,等.和胃安神方对失眠模型大鼠血浆及下丘脑胆囊收缩素8的影响[J].环球中医药,2012,5(9):663-665.

眠症取得良好效果,能明显改善患者的临床症状和睡眠质量<sup>[2,4]</sup>,但其作用机制尚不清楚。本研究应用失眠大鼠模型,通过观察其血浆及下丘脑胆囊收缩素 8(CCK-8)的变化,来探讨和胃安神方治疗失眠症的可能疗效机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康清洁级 wistar 雄性大鼠 30 只,体重(200±20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(医学动物合格证 SCXK 京 2012-0001)。提前 1 周将大鼠饲养在 12 小时光照(7:00~19:00)、12 小时黑暗(19:00~7:00)的安静环境下,自由摄食饮水,室温(24±2)℃,相对湿度 40%~50%。

### 1.2 主要试剂

对氯苯丙氨酸(PCPA)购自美国 Sigma 公司(C6506)。CCK-8 放射免疫试剂盒购自北京华埠力特生物技术研究所以。

### 1.3 方药

中药和胃安神方由半夏 10 g、薏苡仁 15 g、陈皮 15 g、茯苓 15 g、石菖蒲 10 g、合欢皮 10 g、炒枣仁 15 g、夜交藤 15 g 组成,所有饮片均经中国人民解放军总医院中药房提供并鉴定。

将上述诸药按传统煎药法获取汤剂,以恒温水浴锅浓缩成含生药 1.75 g/ml 的药液,玻璃瓶密闭盛装,4℃冰箱保存备用。

### 1.4 动物分组与造模

将 30 只大鼠按随机数字表法分为 3 组,即正常对照组(正常组)、失眠模型组(模型组)、和胃安神方组(中药组),每组 10 只。采用目前公认的 PCPA 失眠模型。除正常对照组外,其余各组大鼠参照文献<sup>[5-6]</sup>并结合预实验结果,按 300 mg/kg 体质量以 10 ml/kg 体积腹腔注射 PCPA,于每天上午 8:00~8:30 进行,每天 1 次,连续 2 天。于第 1 次腹腔注射 28~30 小时后,动物出现昼夜节律消失,白天也活动不停,整体观察与正常组有明显不同,表明模型复制成功<sup>[7]</sup>。

### 1.5 动物给药

于第 3 天开始每天上午 8:00 灌胃给药,中药组大鼠给予 10 ml/kg 体积 1.75 g/ml 中药水煎液(17.5 g/kg 生药);正常组和模型组给予同体积的生理盐水,每天 1 次,连续灌胃 6 天。

### 1.6 一般状况观察

实验期间每日观察并记录各组大鼠毛发、饮食、活动及睡眠情况。

### 1.7 指标检测

于末次给药后,次日上午 8:00 开始,用 10% 水合氯醛以 0.3 ml/100 g 体重腹腔注射麻醉各组大鼠。麻醉后迅速剖开胸腔,暴露心脏,用 EDTA-2K 真空抗凝管采血 3 ml,采血后每管加抑肽酶 40 μl,并立即置 4℃冰箱,3 小时内 3500 r/min 低温离心 5 分钟,分离血浆,于-20℃保存待测。采血后立即将大鼠脱颈处死,迅速断头,取大脑,在沸生理盐水中煮 5 分钟,分离下丘脑,用电子天平称量下丘脑的重量,将下丘脑置于玻璃匀浆管内,加入 1 mol/L HCl 1 ml,充分匀浆后转入到塑料试管中,室温下放置 100 分钟,再加入 1 mol/L NaOH 1 ml,4000 r/min 低温离心 10 分钟,取上清液于-20℃保存待测。用放射免疫法检测 CCK-8 的含量。具体操作严格参照 CCK-8 放射免疫试剂盒说明书进行。

### 1.8 统计学处理

运用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析进行组间比较。

## 2 结果

### 2.1 大鼠行为学变化

模型组和中药组连续 2 天腹腔注射 PCPA 后,大鼠毛发杂乱,昼夜节律消失,白天活动不停,易激惹,进食及饮水增多,睡眠减少直至消失,与正常组有明显差异。中药组治疗 3 天后,大鼠毛发光整,白天活动减少,进食及饮水亦较前减少,睡眠时间增加,治疗第 6 天时,昼夜节律已基本恢复。

### 2.2 各组大鼠血浆及下丘脑组织 CCK-8 含量比较

模型组大鼠血浆及下丘脑 CCK-8 含量较正常组显著下降,差异具有统计学意义( $P<0.01$ );中药组大鼠血浆及下丘脑 CCK-8 含量明显高于模型组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。中药组与正常组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠血浆及下丘脑组织 CCK-8 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	血浆 CCK-8(pg/ml)	下丘脑 CCK-8(pg/mg)
正常组	10	23.718±6.917	1.936±0.652
模型组	10	12.924±5.132 <sup>a</sup>	1.058±0.398 <sup>a</sup>
中药组	10	19.320±4.577 <sup>b</sup>	1.655±0.415 <sup>b</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

### 3 讨论

随着生活、工作节奏的加快以及各种社会压力的增大,失眠发生率逐渐上升,已经成为现代社会的流行病,严重影响人们的生活和工作。经过长期的理论研究和临床实践,笔者发现原发性失眠与“胃”密切相关,失眠的基础在于“胃”<sup>[7]</sup>,认为当前导致失眠最主要的直接因素就是现代生活方式改变和饮食结构习惯变化,从而引起人体脾胃、肠道的消化功能紊乱,意即众多原发性失眠者多存在“胃不和”,因此针对原发性失眠者的“胃不和”采用和胃安神方以治之。前期的临床研究证实其对失眠症的治疗效果良好<sup>[2,4]</sup>,但其疗效机制尚不明确。

胆囊收缩素(CCK)是一种具有多种生理功能的脑肠肽,广泛分布于消化系统、中枢及外周神经系统、外周血液等组织器官中<sup>[8]</sup>。目前已知 CCK 的形式有多种,其中以胆囊收缩素 8(CCK-8)含量最高,并且具有胆囊收缩素全部生物活性。在中枢神经系统中 CCK 60%~70%以 CCK-8 形式存在,在外周组织和血液中,CCK-8 也是主要存在形式之一<sup>[9]</sup>。有研究证实,CCK 与睡眠关系密切,是调节睡眠的重要物质之一<sup>[10-12]</sup>。Levente 等<sup>[13]</sup>研究发现 CCK 能够缩短大鼠和家兔非快速动眼睡眠的潜伏期,并增加非快速动眼睡眠时间。这说明 CCK 在调节胃肠道功能的同时,也能够对睡眠结构产生影响。对于 CCK 调节睡眠的机制,进一步研究<sup>[14]</sup>发现,硫化胆囊收缩素 8(CCK-8S)能够增加抑制性神经递质  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)在脑内的释放,而且这一效应能够被 CCK<sub>B</sub>受体拮抗剂所阻断,表明 CCK 对睡眠的调节可能是通过影响脑内 GABA 的含量来实现的。

本研究采用广泛应用的对氯苯丙氨酸(PCPA)腹腔注射诱导的失眠大鼠模型,其结果显示,模型组大鼠血浆及下丘脑中 CCK-8 的含量显著减少,中药组大鼠经和胃安神方治疗后,其血浆及下丘脑中 CCK-8 的含量明显高于模型组( $P<0.05$ ),且大鼠睡眠节律得以恢复。结果提示,对 CCK-8 的调节作用很可能是和胃安神方治疗失眠的内在机制之一。对于和胃安神方调节胆囊收缩素的具体途径以及胆囊收缩素促进睡眠的内在机制,还需进一步深入

研究。

### 参 考 文 献

- [1] 共识专家组. 失眠定义、诊断及药物治疗专家共识(草案)[J]. 中华神经科杂志,2006,39(2):141-143.
- [2] 罗海鸥,李绍旦,杨明会,等. 和胃安神汤对失眠症患者睡眠及生活质量的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(6):18-20.
- [3] 张丽萍,夏猛. 失眠症的治疗现状分析及思考[J]. 环球中医药,2011,4(1):66-69.
- [4] 李绍旦,杨明会. 和胃安神汤治疗亚健康失眠的临床研究[J]. 中国全科医学,2010,13(22):2519-2520.
- [5] 肖成荣,马增春,李海静,等. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制[J]. 药理毒理学杂志,2007,21(4):326.
- [6] 余敏,唐成林,刘祖丽,等. 不同强度电针刺激对失眠大鼠下丘脑 orexinA 的影响研究[J]. 医学分子生物学杂志,2011,8(1):70-74.
- [7] 李绍旦,杨明会. 不寐之中医“脑”、“胃”学说体系构建的理论初探[J]. 中医杂志,2010,51(2):25-26.
- [8] Hadjiivanova C, Belcheva S, Belcheva I. Cholecystokinin and learning and memory processes[J]. Aeta Physiol Pharmacol Buk, 2003,27(2-3):83.
- [9] 李俊川,姜淮范. 胆囊收缩素临床研究进展[J]. 现代医药卫生,2012,28(3):407-408.
- [10] Crespi F. Cholecystokinin-B (CCK-B) receptor antagonists improve “aged” sleep: a new class of sleep modulators? [J]. Methods and findings in experimental and clinical pharmacology, 1999,21(1):31-38.
- [11] Shemyakin A, Kapás L. L-364, 718, a cholecystokinin-A receptor antagonist, suppresses feeding-induced sleep in rats[J]. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 2001,280(5):R1420-1426.
- [12] Kronenberg G, Schredl M, Fiedler K, et al. In healthy volunteers responses to challenge with cholecystokinin tetrapeptide differ between administration during REM and delta sleep [J]. Depression and anxiety, 2001,14(2):141-144.
- [13] Levente Kapás, Ferenc Obál Jr, Mark R. Opp, et al. Intraperitoneal injection of cholecystokinin elicits sleep in rabbits [J]. Physiology & Behavior,1991,50(6):1241-1244.
- [14] Marco Lanza, Francesco Makovec. Cholecystokinin (CCK) increases GABA release in the rat anterior nucleus accumbens via CCK<sub>B</sub> receptors located on glutamatergic interneurons [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol,2000,361:33-38.

(收稿日期: 2012-08-10)

(本文编辑: 刘群)