

夏天吉,闫明珠,王智,等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 428-435.

Xia TJ, Yan MZ, Wang Z, et al. Research progress on animal models of insomnia and evaluation methods [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 428-435.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.017

大小鼠失眠模型和评价方法研究进展

夏天吉,闫明珠,王智,靳苏维,刘新民,潘瑞乐,常琪*

(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193)

【摘要】 中国睡眠研究会2021年发布的数据显示我国超过3亿人存在睡眠障碍,而失眠是最常见的睡眠障碍。有关失眠发生机制和治疗药物的研究需涉及失眠动物模型及其相关的评价方法。本文结合文献,总结了近十年国内外常用的失眠动物模型,从物理因素、化学因素、病理因素和复合因素进行分类,分析总结其原理和特点,整理收集失眠模型的评价方法,为失眠的研究提供基础。

【关键词】 失眠;动物模型;评价方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0428-08

Research progress on animal models of insomnia and evaluation methods

XIA Tianji, YAN Mingzhu, WANG Zhi, JIN Suwei, LIU Xinmin, PAN Ruile, CHANG Qi*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Corresponding author: Chang Qi. E-mail: qchang@implad.ac.cn

【Abstract】 Data released by the Chinese Sleep Medicine Congress in 2021 showed that more than 300 million people in China have sleep disorders, of which insomnia is the most common. Research into the mechanisms of insomnia and candidate therapeutic drugs needs to involve insomnia animal models and appropriate evaluation method. This article summarizes aspects of the insomnia animal models commonly used in the past 10 years and classifies them from the perspective of physical, chemical, pathological, and multiple factors. The method used to evaluate the insomnia models are also outlined. This paper provides a resource for studies of insomnia.

【Keywords】 insomnia; animal models; evaluation methods

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

睡眠是维持机体正常功能的重要生理活动,充足、良好的睡眠可以使人恢复精力和体力。随着人们生活节奏的加快以及人口老龄化的加剧,失眠已成为当今社会普遍存在的健康问题。

失眠是指患者对睡眠时间和(或)质量不满足并影响日间社会活动的一种主观体验,主要表现为入睡困难、睡眠难以维持、过早苏醒、醒后伴有烦躁、意识不清或疲劳等^[1],长期失眠可能会引起记

忆减退、免疫功能降低、情绪障碍,甚至引发抑郁症、焦虑症、糖尿病、高血压、肥胖症、心脑血管疾病等。我国2017年大于10万样本量的流行病学统计^[2-3],失眠患病率为15%,其中老年人患病率为35.9%。失眠问题日益显著,因此研发能够改善睡眠的药物或保健品已成为当今热点,而相关研究需涉及动物实验,主要包括失眠动物模型的建立和评价方法。目前文献中使用较多的动物模型为大鼠

【基金项目】国家重点研发计划(2018YFC1602105)。

Funded by National Key Research and Development Program of China (2018YFC1602105).

【作者简介】夏天吉(1997—),女,博士研究生,研究方向:神经药理学。Email: xiatj718@163.com

【通信作者】常琪(1962—),女,研究员,博士生导师,研究方向:神经药理、药代动力学。Email: qchang@implad.ac.cn

和小鼠。针对大小鼠失眠模型,构建方法甚多,各具特点,可应用不同角度的评价方法判断造模是否成功,同时可采用这些评价方法进行镇静催眠药物药效学的评价。本文将对常用的大小鼠失眠模型和评价方法进行综述,以期对失眠的研究提供参考。

1 失眠模型的文献分析

利用中国知网和 PubMed 数据库对近 10 年(2010.01 ~ 2021.06)发表的文献进行检索,关键词为“失眠动物模型(insomnia animal model)”、“失眠(insomnia)”、“睡眠障碍(sleep disorders)”、“睡眠剥夺(sleep deprivation)”和“睡眠干扰(sleep disturbance)”合并“大鼠(rats)”或“小鼠(mice)”,搜索后得到中文文献 1145 篇、英文文献 3470 篇。在共计 4615 篇的文献中,大部分是利用失眠动物模型进行认知、焦虑、抑郁、血压、血糖等方面的研究,而与睡眠直接相关的文献仅 506 篇,约占 11%。在 506 篇研究睡眠相关的文章中,应用物理因素造模共 213 篇,主要通过轻柔刺激法(83 篇)和平台水环境法(69 篇);化学因素造模有 227 篇,其中采用最多的是对氯苯丙氨酸(190 篇),也可利用咖啡因(20 篇)干扰睡眠;病理因素造模的文章较少,仅 20 篇;亦有采用上述多个因素相结合的造模方法,即复合因素法,有 38 篇。下面对用于睡眠相关研究的大小鼠失眠模型进行总结介绍。

2 大小鼠失眠模型的构建方法

2.1 物理因素

2.1.1 触碰法

触碰法指通过轻柔触碰动物、晃动或拍打鼠笼以干扰动物的睡眠造成动物失眠的方法。触碰的方式可为人工手动触碰,也可利用仪器,选取毛刷、杠杆或木棒进行自动触碰^[4]。晃动笼具既可手动摇晃,也可将其放在摇床或可移动的平面上以达到使动物保持清醒的目的。该方法具有刺激强度小、对动物干扰小的优点,且无持续性压力。人工干预的方法较易实施,但对实验者的专注力、体力要求较高,只适合短时间造模。若采用仪器进行自动干扰,短期或长期造模均可。Wallace 等^[5]利用此方法研究睡眠碎片化对小鼠的影响。动物放入含杠杆的鼠笼中,杠杆每 2 min 自动转动 10 s,当触碰到动物时,动物被唤醒。脑电监测结果显示,这一过程中动物的非快眼睡眠(nonrapid eye movements

sleep, NRMS) 和快眼睡眠(rapid eye movement sleep, REMS) 时间显著减少,觉醒次数明显增加。研究多利用此方法观察不同处理的小鼠在短时睡眠剥夺后,睡眠恢复的差异性。现已成为最常用的睡眠剥夺方法。

2.1.2 平台水环境法

平台水环境法的原理是动物进入 REM 睡眠后肌肉张力消失,从平台掉落水中惊醒,造成 REM 睡眠剥夺。造模方法为将动物放在实验箱内直径较小的平台上,平台对于小鼠多设定为直径约 2 cm、高约 5 cm;对于大鼠直径约 6.5 cm,高约 8 cm。实验箱内注入自来水,水面高度距离平台约 0.5 ~ 1 cm。此方法包括:(1)单平台法即实验笼内仅设置一个平台,可避免动物相互干扰,但会造成单笼饲养的隔离应激,甚至出现社交障碍;(2)多平台法可同时进行多只动物的 REM 睡眠剥夺^[6],并且动物可在各平台上自由活动。故多平台法应用较广泛。该方法可针对性剥夺 REM 睡眠,缺点是若造模时间过长或强度过大,可能出现动物掉落水中因体力不支无法返回平台而死亡的现象。故不适合长期且高强度造模^[7]。Machado 等^[8]应用直径为 6.5 cm 的平台,对大鼠进行单平台法和多平台法的睡眠剥夺,发现在造模期间,两种方法不仅能基本完全剥夺动物的 REM 睡眠,更显著减少慢波睡眠。

2.1.3 滚筒法

滚筒法(转轮法)的原理是将动物放入滚筒等装置中,装置自动旋转,动物被迫随装置转动而运动,导致无法入睡或短暂睡眠后觉醒。实验除设有对照组和睡眠剥夺组外,常增加强迫运动组,目的在于排除运动对动物睡眠相关指标的影响。强迫运动组的装置转速多设置为睡眠剥夺组的两倍,时间减少一半,保证充足的睡眠^[9]。此方法的特点为造模强度大,可实现完全睡眠剥夺,重复性和可靠性高,但对动物的体力消耗大,对仪器的稳定性要求较高。Dispersyn 等^[10]将小鼠放入滚筒(外径 35.6 cm,内径 20.9 cm)中,滚筒以 3 m/min 转 3 s,停 12 s 的方式自动旋转,以探究睡眠剥夺 24 h 和恢复期 48 h 内小鼠睡眠的变化。结果表明小鼠 24 h 内觉醒时间达 97%,恢复期第 1 天 7:00 ~ 19:00,小鼠 NREM 和 REM 睡眠明显反弹。

除触碰法、平台水环境法和滚筒法外,水上网格法、水上转盘法等也可应用于失眠动物的造模,但据近十年文献统计发现已较少应用。

2.1.4 慢性不可预知温和应激

慢性不可预知温和应激模型 (chronic unpredictable mild stress, CUMS), 早期又名慢性温和应激模型 (CMS), 由 Katz 等^[11] 于 1981 年首先建立。造模期间动物历经潮湿垫料、空瓶、禁食、冰水游泳、热水游泳、夹尾、昼夜颠倒、电击等操作, 最终造成快感缺失、焦虑、抑郁和学习记忆障碍等^[12]。此模型大多用于焦虑、抑郁、认知等方面的研究, 也有研究显示其会对睡眠造成影响。Mou 等^[13] 对 SD 大鼠进行 28 d 的慢性不可预知温和应激后, 向大鼠腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠, 观察到模型大鼠的睡眠时间显著缩短。Nollet 等^[14] 对小鼠进行 9 周的 CUMS 造模, 并间隔进行脑电监测。结果显示, 造模仅 3 d 即可使小鼠的 REMS 时间显著增加, 并持续至造模结束; NREMS 在整个周期内时长无显著变化, 但呈碎片化。

2.1.5 慢性束缚

束缚是将动物放入狭小的束缚装置中, 限制动物的运动空间和范围, 造成心理和生理的双重压力, 具有简单易操作、无痛且持久的特点^[15]。慢性束缚不仅使动物情绪、学习记忆等行为学指标、炎症指标发生变化^[16-17], 也可造成睡眠障碍。陆婷婷^[18] 将 ICR 小鼠放入 50 mL 离心管制成的束缚器中, 进行 3、5 或 7 d 的束缚造模, 每天 9 h 或 12 h, 并于束缚结束后腹腔注射戊巴比妥钠诱导动物入睡, 观察睡眠潜伏期和睡眠时间。束缚后的各组小鼠睡眠潜伏期均延长, 睡眠时间均缩短, 以每天束缚 9 h, 持续 7 d 最为显著。Yasugaki 等^[19] 对 C57BL/6J 小鼠进行 3 周的浸水和束缚实验, 将小鼠放入束缚管内, 垂直放入水中。每天 2 h, 每周 6 d, 并于每周第 7 天进行脑电监测。小鼠在给予 1、2 和 3 周的压力刺激后 24 h 内均显示出觉醒时间减少, NREMS 和 REMS 时间增加, 其中第 1 周结果最显著, 同时伴随 REMS 次数明显增加。

2.1.6 慢性社会挫败

慢性社会挫败动物模型模拟人在社会环境中因社会地位等问题产生的心理压力, 最终导致社交恐惧和兴趣缺失^[20]。动物模型常采用 C57BL/6J 小鼠, 将其放入 CD1 小鼠的笼中, 因 CD1 小鼠的领地中突然出现其他动物, 会攻击 C57BL/6J 小鼠。造模一般采用每天攻击 10 min, 其余时间用透明隔板隔开的方式。该方法不仅会引起动物的社交障碍, 同时会改变其睡眠节律。Henderson 等^[21] 对

C57BL/6J 小鼠进行 10 d 慢性社会挫败造模, 在第 1、3、10 天进行脑电监测。结果显示 1、3、10 d 社会挫败后 3 h 内觉醒时间显著增加, REMS 时间显著减少, NREM 睡眠减少; 造模后 10 ~ 22 h 出现睡眠反弹, 觉醒时间极显著减少, NREM 睡眠极显著增加, REM 睡眠增加。Wells 等^[22] 同样用 C57BL/6J 小鼠造成社会挫败模型, 并每日监测脑电变化。发现造模期间, 模型组 REMS 平均时间显著增加, 在第 4、5、6、7、9 天与对照组有显著性差异, REMS 次数对应增加。慢波睡眠时间也呈上升趋势, 同时伴随觉醒时间减少。

2.1.7 空瓶刺激

空瓶刺激模型由林文娟等^[23] 建立, 指动物经过定时喂水训练后, 形成条件反射, 随后进行不定时空瓶刺激, 1 d 内 1 ~ 2 次, 以诱发其情绪应激。于鑫^[24] 应用慢性情绪应激造大鼠失眠模型。大鼠经历 10 d 定时喂水训练后, 进行 14 d 空瓶刺激, 应激后大鼠睡眠总时间、慢波睡眠、REM 睡眠均缩短。

2.1.8 电击

电击是可使动物产生恐惧的压力源, 大量研究表明其会对动物的睡眠产生影响。王芳等^[25] 通过电刺激造大鼠失眠模型, 参数为电流 0.5 mA, 频率 1 Hz, 刺激 30 s 间隔 30 min, 观察到 8 h 电刺激后 SD 大鼠睡眠总时间、慢波睡眠、REM 睡眠均减少, 觉醒时间增加。Yan 等^[26] 也应用相同参数电击造模, 观察大鼠经受刺激前后睡眠的变化, 结果与上述研究一致。

触碰法、平台水环境法和滚筒法模拟因为外界环境干扰所致的睡眠不足, 根据造模时间可造成完全睡眠剥夺或部分睡眠剥夺, 使动物表现出以睡眠时间减少为特征的失眠症状。慢性不可预知温和应激、慢性束缚、慢性社会挫败、空瓶刺激和电击是通过心理和生理的双重应激, 造成动物睡眠障碍, 普遍表现为觉醒时间增加, 睡眠时间减少。然而, 经历慢性社会挫败应激的动物多表现为睡眠时间增加。此外, 创伤后应激、冲突性心理应激也可造成动物睡眠障碍, 出现失眠症状^[27-28]。

2.2 化学因素

2.2.1 对氯苯丙氨酸诱导失眠模型

对氯苯丙氨酸 (4-chloro-DL-phenylalanine, PCPA) 是色氨酸羟化酶的选择性和不可逆性抑制剂, 色氨酸羟化酶是合成 5-HT 的起始酶和限速酶。5-HT 已被证实是在睡眠-觉醒的调节中发挥重

要作用,而 PCPA 可有效阻断 95% 以上 5-HT 合成^[29]。腹腔注射 PCPA 造成失眠模型,常用的剂量为 300 ~ 500 mg/(kg · d),连续注射 1 ~ 3 d。注射 PCPA 后,动物体内 5-HT 在至少 7 d 内维持较低水平,9 d 后可基本恢复正常^[30]。该方法造模

成功率高,稳定性好,动物出现的失眠症状与人类相似,目前已广泛用于失眠动物实验的研究。本文从动物品系、周龄或体重、给药剂量和方式等方面总结近几年 PCPA 造成大小鼠失眠模型的方法,见表 1。

表 1 PCPA 造大/小鼠失眠模型的方法

Table 1 Methods of insomnia models of rats and mice caused by PCPA

类型 Type	品系 Strains	性别 Gender	周龄或体重 Age or weight	给药方式 Administration	剂量(mg/kg) Dose(mg/kg)	给药时间 Administration time	造模结果 Results of the model	参考文献 References
小鼠 Mice	KM	雄 M	8 周 8 weeks	腹腔注射 i. p.	350	2 d	5-HT 含量下降,睡眠潜伏期延长,睡眠时间减少,慢波睡眠减少,REMS 减少,昼夜节律消失,烦躁,精神亢奋,毛发竖起且无光泽,摄食量少于正常动物。	[31]
小鼠 Mice	ICR	雄 M	18 ~ 22 g	皮下注射 i. h.	350	检测前 24 h 24 h before test		[32]
小鼠 Mice	ICR	雄 M	5 周 5 weeks	皮下注射 i. h.	200	2 d	Animals showed that the content of 5-HT, the duration of sleep, slow-wave sleep, REMS reduced. Their sleep latency prolonged and circadian rhythm disappeared. Animals were irritability and hyperactive. Erect and dull hair and less food intake of the animals were observed.	[33]
小鼠 Mice	ICR	雄/雌 M /F	6 ~ 8 周 6 ~ 8 weeks	腹腔注射 i. p.	300	2 d		[34]
大鼠 Rats	SD	雄 M	230 ~ 270 g	腹腔注射 i. p.	300	1 d		[35]
大鼠 Rats	SD	雄 M	8 ~ 9 周 8 ~ 9 weeks	腹腔注射 i. p.	300	2 d		[36]
大鼠 Rats	SD	雄 M	180 ~ 220 g	腹腔注射 i. p.	350	6 d		[37]

2.2.2 咖啡因诱导失眠模型

咖啡因是腺苷 A₁ 和 A_{2A} 受体的拮抗剂,其对二者的亲和力相似,无选择性。咖啡因在体内进一步被代谢为黄嘌呤和茶碱,其代谢物可更有效地拮抗 A₁ 和 A_{2A} 受体^[38]。腺苷通过与 A₁ 和 A_{2A} 受体结合发挥促进睡眠的作用,故摄入咖啡因后会对睡眠造成影响。该方法非常经典,具有安全性高、成本低、作用明确的优点。但腺苷 A_{2A} 受体基因的功能多态性会导致咖啡因损害睡眠质量的个体差异^[39],造成实验数据波动较大。咖啡因的造模剂量多选用 5 ~ 15 mg/kg,也可使用 25、30 或 50 mg/kg 等较高剂量。在睡眠实验检测前 30 ~ 60 min 腹腔注射咖啡因,可成功影响动物的睡眠。总结近几年采用咖啡因造模的文献,如表 2 所示。

PCPA 和咖啡因造模都会导致动物觉醒时间增加,入睡潜伏期延长和睡眠时间减少,其中 REMS、NREMS 均减少。除腹腔注射 PCPA 和咖啡因外,给予动物乙醇,形成乙醇依赖,戒断后可造成动物觉醒时间增加,REM、NREM 睡眠时间显著减少^[46]。

中枢微量注射去甲肾上腺素、食欲素或促肾上腺皮质激素释放激素等,皮下注射阿朴吗啡、氟西汀或育亨宾等同样可导致动物失眠^[47]。

2.3 病理因素

慢性疼痛常引发失眠,现常采用坐骨神经部分结扎造神经痛模型,研究动物睡眠的变化。模型动物表现出觉醒时间、次数增加,NREM、REM 睡眠时间及其次数减少^[48-49]。

此外,精神类疾病如抑郁症、焦虑症、创伤后应激综合症、癫痫、自闭症等也会引发失眠,高血压、缺血性中风同样会抑制睡眠。

2.4 复合因素

根据研究目的不同,常采用多种诱因的复合因素造成失眠模型。应用线栓法(MCAO)和 PCPA 联合造模研究脑缺血后睡眠障碍,双侧颈总动脉闭塞(BCCAO)和平台水环境法造模研究慢性脑缺血伴发失眠,去势或卵巢切除联合电刺激或触碰等方法研究激素水平降低导致的失眠。负重游泳和 PCPA 模拟运动性失眠大鼠。

表 2 咖啡因造大/小鼠失眠模型的方法

Table 2 Methods of insomnia models of rats and mice caused by caffeine

类型 Type	品系 Strains	性别 Gender	周龄或体重 Age or weight	给药方式 Administration	剂量(mg/kg) Dose(mg/kg)	给药时间 Administration time	造模结果 Results of the model	参考文献 References
小鼠 Mice	ICR	雄 M	18 ~ 22 g	腹腔注射 i. p.	7.5	检测前 30 min 30 min before test		[32]
小鼠 Mice	ICR	雄 M	4 周 4 weeks	腹腔注射 i. p.	10,50	检测前 Before test	觉醒时间增加,睡眠潜伏期延长,总睡眠时间减少,NREMS 减少,空场实验运动路程增加。	[40]
小鼠 Mice	C57BL/6N	雄 M	11 周 11 weeks	灌胃 i. g.	25	检测前 Before test	Animals showed that the duration of wake and sleep latency prolonged,	[41]
小鼠 Mice	C57BL/6	雄 M	6 周 6 weeks	腹腔注射 i. p.	15	检测前 10 min 10 min before test	the sleep time and NREM sleep time	[42]
小鼠 Mice	KM	雄 M	23 ~ 27 g	腹腔注射 i. p.	7.5	检测前 30 min 30 min before test	reduced. In open field test, the animals' movement distance	[43]
大鼠 Rats	SD	雄 M	8 周 8 weeks	灌胃 i. g.	10	检测前 Before test	increased.	[44]
大鼠 Rats	SD	雄 M	260 ~ 320 g	腹腔注射 i. p.	7.5	检测前 Before test		[45]

此外,郜红利等^[50]采用母乳鼠分离、多种焦虑刺激和注射 PCPA 造心肾不交大鼠失眠模型,动物表现为睡眠时间减少,血象水平降低,下丘脑-垂体-肾上腺轴紊乱。何博赛^[51]通过对 Wistar 大鼠连续 5 d 腹腔注射 50 mg/(kg·d) 氢化可的松,再连续 4 d 腹腔注射 300 mg/(kg·d) PCPA,动物出现弓腰无力、毛发少光泽、睡眠减少等现象,造成肝阴虚-失眠模型。林腊梅^[52]建立肝血虚失眠模型,切除 SD 大鼠全肝的 70%且恢复后,利用平台水环境法进行 72 h REM 睡眠剥夺,动物呈现口唇、爪甲淡粉色,爪甲欠光滑,目光呆滞、反应迟钝等状态。黄攀攀等^[53]对动物连续 28 d 皮下注射 D-半乳糖 60 mg/(kg·d),叠加 8 d 腹腔注射咖啡因 30 mg/(kg·d),再利用多平台水环境法进行 7 d 睡眠剥夺,造成大鼠的睡眠时间减少、心率加快、血压升高、耳温升高,成功建立老年阴虚失眠动物模型。朱洁等^[54]采用夹尾和注射 PCPA 复合法造大鼠肝郁证失眠模型,连续 20 d 每天夹尾 45 min,叠加连续 2 d 腹腔注射 400 mg/(kg·d) PCPA。何林熹等^[55]采用慢性束缚法复合夹尾 15 d 造成肝郁化火证失眠大鼠模型。

3 评价方法

常用的评价方法为巴比妥类药物协同睡眠实验,空场实验和脑电、肌电或眼动监测。这些方法既可用于评价失眠模型,也可用于药效学评价。巴比妥类药物协同睡眠实验可初步判断动物的睡眠情况,实验操作简单、成本低,但结果指标较少。空场实验是通过观察动物一定时间内的运动参数,判断其生理状态,多用于镇静催眠药物的评价。脑电

和肌电监测可直接将动物的睡眠状态通过波形、波频率等指标呈现,但实验操作复杂,对实验环境要求高。

3.1 巴比妥类药物协同睡眠实验

巴比妥类药物是常用的催眠药物,可应用其来诱导动物入睡,通过观察动物的行为得到有效结果。实验分为 3 类:戊巴比妥钠阈下剂量协同睡眠实验观察动物的入睡率、戊巴比妥钠阈上剂量协同睡眠实验观察睡眠时间、巴比妥钠(或戊巴比妥钠)实验观察入睡潜伏期。阈下剂量指 80% ~ 90% 动物翻正反射不消失的戊巴比妥钠最大剂量,阈上剂量指动物 100% 入睡的戊巴比妥钠最小剂量。此外,巴比妥类药物硫喷妥钠等也可用于该实验。

动物入睡以翻正反射消失为判断标准。给药后待动物基本停止运动时,对其体位进行翻转,即呈仰卧位,若动物 30 min 内仰卧位达 60 s 以上,判断其翻正反射消失进入睡眠状态。一段时间后,当翻正反射首次恢复时,立即将其翻转成仰卧位,30 s 内若再次恢复,判断为动物觉醒,并记录首次恢复翻正反射的时间为睡眠终止时间;若 30 s 内未恢复,则在动物翻正反射再次恢复后重复翻转,直至判定为睡眠结束^[56]。

3.2 空场实验

空场实验是将动物放入实验箱的中心,适应 2 ~ 5 min 后,记录并分析动物在一段时间内(一般为 5 ~ 15 min)的运动路程、运动时间、站立次数和运动轨迹等指标,或对动物穿越网格数或直立次数进行水平、垂直评分以反映动物的自主活动情况。失眠动物常表现为自主活动增加,而给予动物镇静催

眠药物后,则表现为自主活动减少。

3.3 脑电图、肌电图、眼点图

脑电图(EEG)和肌电图(EMG)监测是将动物麻醉,插入电极,恢复 7 ~ 14 d 后,通过 EEG、EMG 观察并统计动物觉醒、REM 睡眠、NREM 睡眠时长,时相出现次数、持续时间、转换次数等指标。失眠动物常表现为睡眠总时间缩短,觉醒增加,各相睡眠时间不同程度缩短;睡眠呈碎片化,即时相出现次数、转换次数增多,持续时间缩短;波形与正常动物存在差异。脑电图(EEG)和肌电图(EMG)可准确反映睡眠过程,为最直接、可靠的评价方法,同时也可应用眼点图(EOG)进行辅助研究。

4 小结和展望

理想的动物模型需遵循以下原则,动物疾病模型与人类疾病具有相似的发生、发展过程,具备该疾病的主要症状和体征,针对药物治疗,与人类疾病具有相似的反应,模型可重复。常用的大鼠、小鼠失眠模型从不同角度模拟人类失眠特征。物理因素造模模拟外界环境刺激,例如触碰、滚筒、束缚和社会挫败等模拟心理生理压力造成的失眠;化学因素造模针对特异性靶点,使动物出现失眠症状;病理、复合因素模拟各种原因伴发的失眠。然而,人类的失眠原因复杂,失眠动物模型仍存在一定局限性,需进一步研发和摸索。仅应用物理因素或化学因素造模,无法全面模拟人类失眠的特征,可依据不同的实验要求选择复合因素造模。复合因素造模应明确各个因素的意义,避免盲目选择。针对方法学研究,应进一步详细和清晰造模方法的时间和强度以及影响睡眠的程度,为今后的科学研究提供有力的理论依据。

常用的评价方法为巴比妥类药物协同睡眠实验、空场实验和脑电、肌电监测。目前的评价手段较单一,且存在诸多问题。巴比妥类药物协同睡眠实验中,关键的判断指标为翻转反射消失,但手动翻转动物这一操作对实验数据有一定主观影响。空场实验中,若采用常规实验时长 5 ~ 15 min,无法全面反映动物在整个睡眠周期中的行为学改变,无法真实反映动物的睡眠情况。脑电、肌电监测需在动物脑内插入电极,会造成创伤而影响实验结果。故针对现存的问题,需研发新型仪器设备或改进实验方法。例如通过仪器对动物进行翻转以判断是否入睡,进行长时间睡眠监测;研究新的实验方法,

通过动物的行为学指标判断睡眠情况,避免造成创伤,更加科学地进行评价,为失眠动物模型、新型镇静催眠药物的研发和睡眠的相关研究奠定基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Cunnington D, Junge MF, Fernando AT. Insomnia: Prevalence, consequences and effective treatment [J]. *Med J Aust*, 2013, 199(8): 36-40.
- [2] Cao XL, Wang SB, Zhong BL, et al. The prevalence of insomnia in the general population in China: A meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0170772.
- [3] Li L, Wang SB, Rao W, et al. The prevalence of sleep disturbances and sleep quality in older chinese adults: a comprehensive meta-analysis [J]. *Behav Sleep Med*, 2019, 17(6): 683-697.
- [4] Lemons A, Saré RM, Beebe Smith C. Chronic sleep deprivation in mouse pups by means of gentle handling [J]. *J Vis Exp*, 2018, 140: 58150.
- [5] Wallace E, Kim DY, Kim KM, et al. Differential effects of duration of sleep fragmentation on spatial learning and synaptic plasticity in pubertal mice [J]. *Brain Res*, 2015, 1615: 116-128.
- [6] Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Comparison of the sleep pattern throughout a protocol of chronic sleep restriction induced by two methods of paradoxical sleep deprivation [J]. *Brain Res Bull*, 2006, 70(3): 213-220.
- [7] Mehta R, Khan S, Mallick BN. Relevance of deprivation studies in understanding rapid eye movement sleep [J]. *Nat Sci Sleep*, 2018, 10: 143-158.
- [8] Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA, et al. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery [J]. *Brain Res*, 2004, 1004(1-2): 45-51.
- [9] Roman V, Van der Borght K, Leemburg SA, et al. Sleep restriction by forced activity reduces hippocampal cell proliferation [J]. *Brain Res*, 2005, 1065(1-2): 53-59.
- [10] Dispersyn G, Sauvet F, Gomez-Merino D, et al. The homeostatic and circadian sleep recovery responses after total sleep deprivation in mice [J]. *J Sleep Res*, 2017, 26(5): 531-538.
- [11] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247-251.
- [12] Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage [J]. *Neurobiol Stress*, 2017, 6: 78-93.
- [13] Mou Z, Huang Q, Chu SF, et al. Antidepressive effects of ginsenoside Rg1 via regulation of HPA and HPG axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 962-971.
- [14] Nollet M, Hicks H, McCarthy AP, et al. REM sleep's unique associations with corticosterone regulation, apoptotic pathways, and behavior in chronic stress in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U*

- S A, 2019, 116(7): 2733–2742.
- [15] Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009, 33(7): 1089–1098.
- [16] Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2012, 39(1): 112–119.
- [17] Ngoupaye GT, Yassi FB, Bahane D, et al. Combined corticosterone treatment and chronic restraint stress lead to depression associated with early cognitive deficits in mice [J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(2): 421–431.
- [18] 陆婷婷. 佩兰和远志精油的镇静催眠功效研究 [D]. 上海: 上海交通大学; 2017.
- Lu TT. Sedative-hypnotic efficacy of *Eupatorium Fortunei* Turcz. and *Polygala tenuifolia* Willd. essential oil research [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University; 2017.
- [19] Yasugaki S, Liu CY, Kashiwagi M, et al. Effects of 3 weeks of water immersion and restraint stress on sleep in mice [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1072.
- [20] Berton O, McClung CA, Dileone RJ, et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress [J]. *Science*, 2006, 311(5762): 864–868.
- [21] Henderson F, Vialou V, El Mestikawy S, et al. Effects of social defeat stress on sleep in mice [J]. *Front Behav Neurosci*, 2017, 11: 227.
- [22] Wells AM, Ridener E, Bourbonnais CA, et al. Effects of chronic social defeat stress on sleep and circadian rhythms are mitigated by kappa-opioid receptor antagonism [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(32): 885–817.
- [23] 林文娟, 王玮雯, 邵枫. 慢性情绪应激对大鼠行为、神经内分泌和免疫反应的影响: 一个新的情绪应激模型 [J]. *科学通报*, 2003, 48(9): 926–929.
- Lin WX, Wang WW, Shao F. The effect of chronic emotional stress on rat behavior, neuroendocrine and immune response: a new emotional stress model [J]. *Sci Bull*, 2003, 48(9): 926–929.
- [24] 于鑫. 慢性情绪应激所致大鼠睡眠剥夺模型复制及酸枣仁的干预作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2012.
- Yu X. Replicate the rats sleep deprivation model induced by chronic emotional stress and study on the interventional effect of *Semen Ziziphi Spinosae* [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2012.
- [25] 王芳, 刘子冬, 张星, 等. 柴桂安神胶囊治疗失眠的药效学研究 [J]. *西北药学杂志*, 2014, 29(3): 270–272.
- Wang F, Liu ZD, Zhang X, et al. Pharmacodynamic study of Chaigui Anshen Capsules in the treatment of insomnia [J]. *Northwest Pharm J*, 2014, 29(3): 270–272.
- [26] Yan X, Zhang Z, Xu F, et al. Effect of Sini San Freeze-dried powder on sleep-waking cycle in insomnia rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(5): 572–575.
- [27] Philbert J, Pichat P, Beeské S, et al. Acute inescapable stress exposure induces long-term sleep disturbances and avoidance behavior: A mouse model of post-traumatic stress disorder (PTSD) [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221(1): 149–154.
- [28] 徐瑞鑫. 冲突性心理应激所致大鼠睡眠障碍的中枢 5-HT 的机制研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2013.
- Xu RX. The mechanism of 5-HT in conflictive psychological stress on rats' sleep phrase and sleep rhythm [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2013.
- [29] Khanna JM, Kalant H, Le AD, et al. Effect of modification of brain serotonin (5-HT) on ethanol tolerance [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1979, 3(4): 353–358.
- [30] 郭海波, 王慧. 对氯苯丙氨酸在动物失眠模型中的应用概述 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(6): 135–140.
- Guo HB, Wang H. Application of para-chlorophenylalanine in animal models of insomnia [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(6): 135–140.
- [31] Lv YB, Zhou Q, Yan JX, et al. Enzymolysis peptides from *Mauremys mutica* plastron improve the disorder of neurotransmitter system and facilitate sleep-promoting in the PCPA-induced insomnia mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 274: 114047.
- [32] Shi R, Han Y, Yan Y, et al. Loganin exerts sedative and hypnotic effects via modulation of the serotonergic system and GABAergic neurons [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 409.
- [33] Oh DR, Kim Y, Jo A, et al. Sedative and hypnotic effects of *Vaccinium bracteatum* Thunb. through the regulation of serotonergic and GABAergic systems; Involvement of 5-HT1A receptor agonistic activity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2218–2227.
- [34] Zhong Y, Zheng Q, Hu P, et al. Sedative and hypnotic effects of *Perilla frutescens* essential oil through GABAergic system pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 279(6): 113627.
- [35] He W, Liu G, Cai H, et al. Integrated pharmacokinetics of five protoberberine-type alkaloids in normal and insomnic rats after single and multiple oral administration of Jiao-Tai-Wan [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(3): 635–644.
- [36] 曾雪爱, 周春权, 张一帆, 等. 松郁安神方镇静催眠作用及对失眠模型大鼠前列腺素 D₂ 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(9): 4646–4648.
- Zeng XA, Zhou CQ, Zhang YF, et al. Hypnotic effect of Songyu Anshen Formula and effect on levels of hypothalamic PGD2 in insomnia rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(9): 4646–4648.
- [37] 石鹏, 滕柳, 郭海波, 等. PCPA 对大鼠大脑皮质 P450_{scc}、CB1R、MAP2 基因表达的影响及酸枣仁汤的干预作用研究 [J]. *亚太传统医药*, 2021, 17(2): 14–17.
- Shi P, Teng L, Guo HB, et al. The effect of PCPA on the expression of P450_{scc}, CB1R, MAP2 genes in the cerebral cortex of rats and the intervention of Suanzaoren decoction [J]. *Asia Pac Tradit Med*, 2021, 17(2): 14–17.

- [38] Lazarus M, Chen JF, Huang ZL, et al. Adenosine and sleep [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2019, 253: 359–381.
- [39] Landolt HP. Individuelle Koffeinempfindlichkeit: Implikationen für eine personalisierte Schlafmedizin? [Self-rated Caffeine Sensitivity: Implications for Personalized Sleep Medicine?] [J]. *Praxis (Bern 1994)*, 2016, 105(10): 563–568.
- [40] Ko YH, Shim KY, Lee SY, et al. Evodiamine reduces caffeine-induced sleep disturbances and excitation in mice [J]. *Biomol Ther*, 2018, 26(5): 432–438.
- [41] Kwon S, Yoon M, Lee J, et al. A Standardized phlorotannin supplement attenuates caffeine-induced sleep disruption in mice [J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 556.
- [42] Lin A, Shih CT, Huang CL, et al. Hypnotic effects of lactobacillus fermentum PS150TM on pentobarbital-induced sleep in mice [J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2409.
- [43] Zhang C, Zhao X, Mao X, et al. Pharmacological evaluation of sedative and hypnotic effects of schizandrin through the modification of pentobarbital-induced sleep behaviors in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 744: 157–163.
- [44] Kim S, Jo K, Hong KB, et al. GABA and l-theanine mixture decreases sleep latency and improves NREM sleep [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 65–73.
- [45] Jang HS, Jung JY, Jang IS, et al. L-theanine partially counteracts caffeine-induced sleep disturbances in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 101(2): 217–221.
- [46] Sharma R, Engemann S, Sahota P, et al. Role of adenosine and wake-promoting basal forebrain in insomnia and associated sleep disruptions caused by ethanol dependence [J]. *J Neurochem*, 2010, 115(3): 782–794.
- [47] Hajnik T, Tóth A, Szalontai Ö, et al. Sleep loss and recovery after administration of drugs related to different arousal systems in rats [J]. *Physiol Int*, 2016, 103(3): 271–289.
- [48] Wu YE, Li YD, Luo YJ, et al. Gelsemine alleviates both neuropathic pain and sleep disturbance in partial sciatic nerve ligation mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(11): 1308–1317.
- [49] 王天笑. 普瑞巴林对神经病理性疼痛模型小鼠镇痛催眠作用的影响 [D]. 芜湖: 皖南医学院; 2014.
Wang TX. Antinociceptive and hypnotic activities of pregabalin in a neuropathic pain-like model of mice [D]. Wuhu: WanNan Medical College; 2014.
- [50] 郜红利, 涂星, 卢映, 等. 心肾不交所致失眠大鼠模型 [J]. *中成药*, 2014, 36(6): 1138–1141.
Gao HL, Tu X, Lu Y, et al. Rat model for insomnia caused by heart-kidney imbalance [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2014, 36(6): 1138–1141.
- [51] 何博赛. 基于内源性物质的酸枣仁汤有效部位确定与相关成分药动学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学; 2013.
He BS. Screening of active fractions in Suanzaoren decoction according to endogenous substance and study on pharmacokinetics in rats [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University; 2013.
- [52] 林腊梅. 酸枣仁汤对肝血虚失眠模型大鼠神经递质的影响 [D]. 武汉: 湖北中医药大学; 2014.
Lin LM. Effects of Suanzaorentang on neurotransmitters expression in the Liver blood deficiency insomnia model rats [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine; 2014.
- [53] 黄攀攀, 王平, 李贵海, 等. 老年阴虚失眠动物模型的建立与评价 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(8): 1719–1723.
Huang PP, Wang P, Li GH, et al. Establishment and evaluation on a Yin-weakness syndrome model of insomnia in senile rats [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2010, 28(8): 1719–1723.
- [54] 朱洁, 申国明, 汪远金, 等. 肝郁证失眠大鼠模型的建立与评价 [J]. *中医杂志*, 2011, 52(8): 689–692.
Zhu J, Shen GM, Wang YJ, et al. Establishment and evaluation of insomnia rat model with liver depression syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 52(8): 689–692.
- [55] 何林熹, 诸毅晖, 杨翠花, 等. 失眠肝郁化火证大鼠模型的建立及其评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(9): 3890–3894.
He LX, Zhu YH, Yang CH, et al. Establishment and evaluation of insomnia rat model with syndrome of liver depression transforming into fire [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(9): 3890–3894.
- [56] Crabbe JC, Metten P, Ponomarev I, et al. Effects of genetic and procedural variation on measurement of alcohol sensitivity in mouse inbred strains [J]. *Behav Genet*, 2006, 36(4): 536–552.