

胡金, 韦姗姗, 邱祥玉, 等. 筛选镇静催眠药物的动物实验评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 133–140.

Hu J, Wei SS, Qiu XY, et al. A review of animal experiments used for sedative-hypnotic drug screening [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 133–140.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.04.019

筛选镇静催眠药物的动物实验评价

胡 金¹, 韦姗姗^{1*}, 邱祥玉¹, 徐 磊², 蒋 艳³, 曹蓓苓¹, 陈文丽¹

(1. 云南中医药大学基础医学院, 昆明 650500; 2. 云南中医药大学第一临床医学院, 昆明 650021;
3. 云南中医药大学护理学院, 昆明 650500)

【摘要】 失眠在现代社会广泛存在, 影响近 1/3 的人口, 进一步寻找安全有效的镇静催眠药物是人民健康和市场的共同需求。尽管研究手段众多, 但动物实验仍然是发现、验证与评价镇静催眠药物的常用手段, 主要包括旷场实验、戊巴比妥钠阈下/阈剂量协同受试药物诱导翻正反射实验、基于诱导失眠模型的验证实验以及脑电图检测等。其中, 旷场实验通过观察动物的自主活动初步判断受试药物的镇静效应; 戊巴比妥钠协同诱导翻正反射实验所产生的睡眠指标(睡眠潜伏期、睡眠时间)可初步揭示受试药物的催眠作用; 某些应激方式或药物能够使动物在一段时间内持续处于失眠状态, 可判断受试药物对失眠的防治情况; 脑电图是睡眠评价的金指标, 可观察受试药物对睡眠结构的调整, 进一步筛选能够恢复生理性睡眠的受试药物。笔者对常用的筛选评价手段进行综述, 为镇静催眠药物的研究和开发提供参考。

【关键词】 镇静催眠药物; 动物实验; 评价方法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 04-0133-08

A review of animal experiments used for sedative-hypnotic drug screening

HU Jin¹, WEI Shanshan^{1*}, QIU Xiangyu¹, XU Lei², JIANG Yan³, CAO Beiling¹, CHEN Wenli¹

(1. School of Basic Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China.

2. the First Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021.

3. School of Nursing, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500)

【Abstract】 Insomnia is very common in modern society, affecting approximately one third of the general population. Developing safe and effective sedative-hypnotic medication is a basic need for people's health and an attractive goal for pharmaceutical companies. Although many research methods are available, animal experiments are still used regularly to discover, verify, and evaluate sedative-hypnotic drugs that include open field test, pentobarbital subthreshold/threshold dose-induced righting reflex test, insomnia animal model, and electroencephalogram (EEG). Among these, the open field test is used to evaluate the sedative effect of drugs through observations of autonomic activities. The sleep indexes generated in the pentobarbital-induced righting reflex, such as sleep latency and sleep time, are used to preliminarily reveal the hypnotic effects. Some kinds of stress paradigms or medications could induce insomnia for a period of time, and thus they are used to estimate the effect of drugs on improving insomnia. EEG, which is the gold standard, can reflect the adjustment effect of drugs on sleep structure and further screen the test drug's ability to restore physiological sleep. Therefore, this paper reviews commonly used screening method to provide references for the research and development of sedative-hypnotic drugs.

【Keywords】 sedative-hypnotic drugs; animal experiments; screening method

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

【基金项目】 云南省“高层次人才引进计划”入选人才专项项目支持经费(30171101300)。

【作者简介】 胡金(1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 云南失眠民族药实验筛选研究。E-mail: 2660829195@qq.com

【通信作者】 韦姗姗(1987—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 证候的现代生物学基础研究。E-mail: weiss814@163.com

人的一生中大约有 1/3 的时间处于睡眠状态,睡眠在记忆、学习、情绪、行为等多种生理过程中发挥着重要作用。失眠除了睡眠数量或质量的降低,以及伴有白天的躯体和精神症状外,还通过影响众多生理过程大大增加了神经精神疾病、心血管病等的患病风险及死亡率^[1]。针对失眠的治疗手段中,虽然认知行为疗法安全有效,但在目前的医疗环境下难以广泛开展,因此患者多求助于药物治疗。 γ -氨基丁酸受体激动剂(包括苯二氮䓬类和非苯二氮䓬类)是治疗失眠最常用的药物,如艾司唑仑、唑吡坦等,能够延长睡眠时间和/或缩短睡眠潜伏期,然而因其具有残余镇静效应、成瘾、依赖、停药后反跳等副作用,并且对睡眠结构影响较大,患者接受度不高。因此一种理想的镇静催眠药物,不仅需要对睡眠时间和睡眠潜伏期有所改善,且需要尽量接近生理性睡眠微观和宏观的睡眠轮廓,以改善失眠患者的日间后果^[2]。

尽管啮齿类动物的睡眠结构与人类有诸多不同,但其仍然是目前最常用的镇静催眠药物筛选与评价的模式动物。研究者利用旷场实验、戊巴比妥钠诱导翻正反射实验、失眠动物模型、脑电图检测技术,获得了大量潜在的具有镇静催眠作用的候选药物及活性分子。本文对常用镇静催眠药物的筛选和评价方法的原理以及运用过程中存在的问题、注意事项等展开讨论,为开发安全有效且能恢复生理性睡眠的镇静催眠药物提供支持。

1 筛选镇静作用药物的动物实验

自发活动实验是神经科学研究的常用方法,可间接反映药物对中枢神经系统的作用。目前对自发活动的测定方法有多种,包括抖笼法、抖笼滴水法、转轮法、斜笼法、运动计量法以及视频跟踪系统分析法等。其中旷场实验通过记录不被干扰的大/小鼠的自发活动来评价药物的镇静作用,是最为常用的^[3]。具体来说,将动物放置于旷场中央位置适应一定时间后,记录其运动轨迹,计算特定时间内动物的活动总路程、平均速度、跨越格子数,此外动物的站立、清洁等动作也可纳入考量范围,从而评价待测药物的镇静作用^[4]。如 Vinkers 等^[5]证实经典催眠药物地西洋的镇静作用,目前地西洋也成为旷场实验常用的阳性药物。与此同时,Vinkers 等^[5]还发现了地西洋急性慢性给药会对旷场实验的结果

造成不同的影响。地西洋急性给药能够明显缩短动物的运动路程和活动时间比率,而慢性给药 28 d 反而延长了动物在旷场实验中的路程。因此,在地西洋作为旷场实验的阳性药时,需要考虑给药时间对其结果造成的干扰。

尽管旷场实验是一个标准化的测试,但其容易受到众多因素(如旷场大小、旷场形状、光线、气味、测试前动物的居住环境等)影响,实验过程中动物表现出的镇静相关行为并不是特异性的,可能造成结果的不准确。因此,旷场实验仍需与其它实验结合使用,才能更加准确的反应药物的镇静作用。

2 筛选催眠作用药物的动物实验

戊巴比妥钠诱导动物翻正反射实验是初步判断受试药物是否具有催眠作用的经典实验。翻正反射依赖于感知头部运动的前庭迷路感受器的输入,反射性地使动物头部复正,它的出现与否是评估啮齿动物觉醒/意识恢复的金指标^[6]。简单来说,当动物腹面朝上 1 min 以上时,可认为动物翻正反射消失(即动物进入睡眠),若动物不能保持该姿势,右倾至正常体位即可认为动物翻正反射恢复(即动物处于觉醒状态)。戊巴比妥钠是诱导翻正反射的常用药物。在戊巴比妥钠的诱导下,动物很快进入睡眠,如果受试药物与其产生协同作用,则睡眠参数如潜伏期、睡眠总时间发生改变,以此评价药物的催眠作用。睡眠潜伏期是指动物开始注射戊巴比妥钠到翻正反射消失所持续的时间,而睡眠时间是指翻正反射的持续时间,即从右倾运动的丧失到恢复所经过的时间^[7]。要说明的是,统计时应排除注射戊巴比妥钠后 15 min 内无法入睡的动物^[8]。戊巴比妥钠诱导翻正反射实验通常使用阈下剂量和阈剂量诱导。阈下剂量是指使 90% 以上的动物翻正反射不消失的戊巴比妥钠最大剂量,而戊巴比妥钠阈剂量是指使动物全部入睡的最小剂量。戊巴比妥钠阈下剂量旨在排除戊巴比妥钠与受试药物协同作用时产生肝药酶抑制活性的可能性。因为戊巴比妥钠生物转化的主要部位是肝,若待测药物对肝药酶微粒体系统有抑制作用时,往往会出现睡眠时间延长的假象。因此,戊巴比妥钠阈下剂量实验排除受试药物的肝药酶抑制活性是戊巴比妥钠诱导翻正反射实验的关键,在此基础上探讨药物的催眠特性才是有意义的。戊巴比妥钠阈

剂量诱导动物翻正反射实验的目的是探讨受试药物与其是否具有协同作用,进而可推测受试药物有潜在的镇静催眠作用。该方法已经被大量运用到镇静催眠药物的动物实验评价当中。如市场上经典催眠药物苯二氮草受体激动剂佐匹克隆、唑吡坦、溴替唑仑和氟硝西泮、食欲肽受体拮抗剂食欲素 A 和食欲素 B、褪黑素均在戊巴比妥钠诱导翻正反射实验中出现了阳性结果,表明戊巴比妥钠诱导翻正反射实验是一个可靠的在动物身上验证药物催眠作用的方法^[9-11]。

然而,该实验易受到众多因素的干扰,可能造成结果的偏差。比如动物的个体差异也会对实验结果产生影响,研究表明,长睡眠小鼠对戊巴比妥钠的敏感性低于短睡眠小鼠^[12]。不同品系啮齿类动物对戊巴比妥钠的易感性也不同。一般来说,DBA/2J>C57BL/6J>ICR(易感性由高到低),为避免戊巴比妥钠协同干扰受试药物的作用,因此大多数实验者多采用对戊巴比妥钠不太敏感的 ICR 小鼠诱导翻正反射^[13]。另外,动物 1 d 内对戊巴比妥钠的敏感性在各个时间段不同,也会造成实验结果的不同。Nelson 等^[14]发现了小鼠高易感性和低易感性的时间点分别为 08:00 和 20:00,在高易感性和低易感性的时间点上,可以得到平均 12% 的差异。特别地,环境温度对戊巴比妥钠干预动物的体温有明显影响,体温的剧烈下降延缓了组织中戊巴比妥钠浓度的下降,也能产生延长睡眠时间的假象^[15]。此外,在戊巴比妥钠诱导翻正反射实验方面,尽管研究者们并没有对禁食做出明确的要求,但是为了减少个体的差异以及保证药物的吸收,应该在实验前对动物进行 24 h 禁食。虽然翻正反射实验可初步获得潜在的具备镇静催眠作用的物质,但待测药物的作用机制和对人类可能的镇静催眠作用仍需要动物模型初步揭示,对睡眠结构的调整仍需通过脑电图进一步阐释和验证。

3 基于诱导失眠模型的验证实验

针对失眠的发病原因和发病机制,研究者们利用物理因素、化学因素或者多因素结合的方式使得动物总睡眠时间减少、入睡困难、觉醒增加,从而建立失眠动物模型。其干预方法具体来说包括固定法、换笼法、花盆法、足部电击法、对氯苯丙氨酸(p-Chlorophenylalanine, PCPA)诱导失眠动物模型法、

咖啡因诱导失眠动物模型法等^[16]。虽然复制失眠动物模型的方法很多,在一定程度上能增加动物觉醒时间,甚至干扰动物特定的睡眠阶段,但是其对睡眠的干预仍然难以囊括人类失眠的所有特征,也难以让动物长时间处于失眠状态并且如实地反应镇静催眠药物的作用特性^[16]。其中应激模型(如束缚、足底电击、换笼、平台法、声音刺激、天敌暴露、冷暴露、母婴分离等)还存在睡眠反弹即停止造模后动物睡眠增加的问题,给失眠药物研究造成了一定的困扰。各种模型的比较详见表 1。

咖啡因是一种众所周知的腺苷受体拮抗剂^[17]。咖啡因失眠模型是一个在人类和动物身上经过双重证实的睡眠中断模型,研究表明,睡前摄入咖啡会延长睡眠潜伏期,增加清醒,从而导致总睡眠时间和效率的整体下降^[18]。Paterson 等^[19]用咖啡因复制失眠动物模型,并用唑吡坦、曲唑酮对其治疗,结果表明,唑吡坦显著缩短了咖啡因引起的睡眠潜伏期的增加,并恢复到与单独使用唑吡坦相似的水平,而曲唑酮使睡眠潜伏期减少了一半。

PCPA 是一种五羟色胺合成抑制剂,在给予 PCPA 48 h 后能够延长睡眠潜伏期并减少快速动眼睡眠(rapid eye movement, REM)和非快速动眼睡眠(non-rapid eye movement, NREM)^[20]。De 等^[21]用 PCPA 复制失眠动物模型,并与催眠药物氟硝西泮对其治疗,结果显示,与模型组相比,氟硝西泮能够减少动物觉醒时间,增加 REM 和 NREM 时间,逆转 PCPA 引起的失眠。

总之,咖啡因、PCPA 诱导的失眠动物是作用机制清楚、操作简单、比较稳定的模型。但模型验证镇静催眠药物的作用和预测人类对药物的反应时,应该采取多种方法结合造模或者多个模型进行验证,尽可能地反应镇静催眠药物的作用特性。

4 镇静催眠作用药物对睡眠脑电图的调整

睡眠的好坏不仅取决于睡眠时长,还取决于睡眠结构。睡眠结构由定量结构(即宏观结构)和模式结构(即微观结构)两部分组成。定量结构是指睡眠时间、睡眠周期和不同的睡眠阶段^[22]。而微观结构是指睡眠阶段脑电图 α 、 β 、 δ 、 θ 波功率密度的变化^[23]。人类多导睡眠图和脑电图谱功率分析是评估客观睡眠质量的金标准。人类多导睡眠图除了能反映总睡眠时间、睡眠潜伏期、开始睡眠

表 1 常用失眠动物模型的比较
Table 1 Advantages and disadvantages of common insomnia animal models

模型 Model	方法 Methods	优势 Advantages	缺点 Disadvantages
束缚 Immobilization	束缚 1~2 h Restraint for 1~2 hours	造模简单,束缚时间可控,类似压力引起的急性失眠 Simple, controllable restraint time, similar to acute insomnia caused by pressure	可能在束缚结束后增加睡眠 May increase sleep after restraint
足底电击 Foot electroshock	用 1 mA 电流连续刺激 0.2 s,间隔 1 s 后继续电刺激,直到 0.5 min 后结束 Foot shock (1 mA, 0.2 s duration, lasted for 0.5 min with 1 s interval)	造模简单,电流大小及持续时间可控,模型稳定 Simple, controllable electricity intensity and duration, stable model	造成疼痛、惊吓等的干扰,不是生理性失眠 Interfered by pain and shock, not representative of physiological insomnia
换笼 Cage exchange	放入之前由另一雄性啮齿类动物占据的肮脏的笼子中 1 周 Rodent was placed in a dirty cage previously occupied by another male rodent for 1 week	脑电图特征和神经元激活模式明确,睡眠障碍类似于压力引起的人类失眠 EEG features and pattern of neuronal activation defined, sleep disturbances similar to those of stress-induced human insomnia	增加气味暴露因素的干扰 Increase the interference of odor exposure factors
水上铁网法 Grid-over-water	置于距离水面 1 cm 的网格上 Animals were placed on a grid 1 cm above from the water surface	适合用于评估药物的催眠特性,有可能区分对睡眠诱导、维持和质量的不同影响 Suitable for evaluating the hypnotic properties of drugs, and may distinguish different effects on sleep induction, maintenance and quality	主要剥夺快速动眼睡眠 Specific REM deprivation
声音刺激 Auditory stimulation	暴露于环境噪音中 24 h Exposed to ambient noise for 24 h	造模简单 Simple	不适宜的声音刺激可能造成动物听觉损伤 Inappropriate sound stimulation may cause hearing damage to animals
天敌暴露 Exposure of natural enemies	暴露于天敌的气味中 Expose to the smell of natural enemies	造模简单,睡眠破碎程度较大,可模仿人类创伤后应激障碍中观察到的睡眠障碍 Simple, sleep fragmentation, can imitate the sleep disorder observed in human post-traumatic stress disorder	难以控制气味的扩散和集中 Difficulty in controlling odour spreading and concentration
冷暴露 Cold exposure	暴露于低温环境 (范围: -10~10℃) 24~48 h Exposed to low temperature environment (range: -10~10℃) for 24~48 h	造模简单,可用于研究睡眠障碍与温度关系 Simple, used to study the relationship between sleep disorder and temperature	催眠药物尚未证实,继发性代谢改变 Not yet validated with hypnotic drugs, secondary metabolic changes
母婴分离 Maternal deprivation	将出生 14 d 内的幼龄啮齿类动物与其母亲分离 Separating young rodents within 14 days of birth from their mothers	造模简单,类似于抑郁症睡眠障碍表型 Simple, similar to depressive sleep disorder phenotype	心理因素居多 Most psychological factors
咖啡因 Caffeine	腹腔注射咖啡因 (7.5 mg/kg) 1 次 Intraperitoneal injection of caffeine at a dose of 7.5 mg/kg	单次给药,成本低,应用广泛,对药物的催眠效果具有预测性 Single administration, low cost, widely used, predictive of hypnotic properties of drugs	个体对咖啡因对睡眠影响的不同敏感性 Variable individual sensitivity to caffeine effect on sleep
对氯苯丙氨酸 PCPA	连续 2 d 上午 8:00~9:00 腹腔注射对氯苯丙氨酸 (300 mg/kg) Intraperitoneal injection of PCPA at a dose of 300 mg/kg between 8:00~9:00 am for two consecutive days	给药方式简单,可使动物长时间处于失眠状态,模型可逆 Simple administration method, long-lasting insomnia, reversible	很强的副作用和毒性 Strong side effects and toxicity

后醒来和睡眠效率等常用睡眠指标,还提供了睡眠宏观结构的信息,如 NREM 睡眠(N1、N2、N3 期)和 REM 时间^[24]。而脑电频谱功率分析可以对睡眠深度、强度、结构和连续性做出更加准确的判断,从而识别失眠患者的特点,对恢复患者生理性睡眠起到了关键的作用^[25]。Spiegelhalder 等^[26]通过比较原发性失眠患者和睡眠良好对照者的脑电图发现,原发性失眠症患者睡眠结构在定量结构和模式结构方面均有改变。不仅睡眠潜伏期延长和睡眠时间缩短、睡眠效率降低、慢波睡眠(NREM N3)和 REM 时长减少,而且在 NREM N2 期睡眠阶段的脑电图 β 频段的频谱功率值显著升高。Merica 等^[27]分别对 NREM 和 REM 中的 α 、 β 、 δ 、 θ 频带进行分析,结果表明,对于低于 β 范围的所有频率,NREM 功率的上升速度较慢,而在失眠组中达到较低水平, β 功率显著增加。在 REM 中,失眠症患者在 δ 和 θ 频带中表现出较低的水平,而在较快频带中的功率显著增加。该研究表明慢波活动的缺乏和快速脑电图频率的增加是失眠的特征。虽然巴比妥类药物和苯二氮草类药物会增加人的第二阶段睡眠(NREM N2)和总睡眠时间,但并不能增加深度睡眠,恢复失眠患者的生理性睡眠^[28]。基于以上可知,失眠的治疗不仅要关注睡眠的定量结构,更值得注意的是恢复其模式结构,才能恢复生理性睡眠。

啮齿类动物是目前研究镇静催眠药物对睡眠结构干预作用的常用动物。与人类相似,啮齿类动物睡眠模式也分为定量结构和微观结构。正常状态下,人类睡眠呈单向模式,而啮齿类动物呈多相^[29]。在人类的睡眠中,一个晚上可以观察到 4~6 个完整的 NREM-REM 周期。第一个周期通常为 70~100 min,之后为 90~120 min。慢波睡眠周期在夜晚的前 1/3 最长,而 REM 周期在夜晚的后三分之一达到峰值^[30]。在大鼠和小鼠中,大约 2/3 的睡眠时间发生在光照时间,1/3 的睡眠发生在黑暗阶段。睡眠周期远远超过人类,高达 125 个周期/24 h^[31]。此外,人类的 NREM 睡眠可分为 3 个逐步的睡眠深度阶段:N1 阶段(觉醒与睡眠之间的过渡),N2 阶段(浅睡)和 N3 阶段。而在啮齿动物中还没有类似于人类的 NREM 细分。目前,使用慢波睡眠作为表征啮齿类动物 NREM 的指标。尽管啮齿类动物的睡眠与人类存在着上述差异,但是啮齿类动物能够

很容易的测量出睡眠潜伏期、睡眠时间、慢波睡眠活动、快速动眼睡眠活动、觉醒次数、睡眠波转换次数及占比等相关睡眠指标,而这些睡眠参数能够很好的运用到镇静催眠药物的筛选当中和预测人类对镇静催眠药物可能的反应^[32]。

啮齿类动物是夜间活动的生物,睡眠主要集中在白天,但在白天的短时间内,也伴有频繁的短时间觉醒,因此睡眠研究通常需要关注 24 h 的明暗期。在实验动物中常采用 12:12 光照模式,包括 12 h 光照(非活动)保持相位和 12 h 暗(活动)相位^[33]。研究者们用脑电图技术在啮齿类动物身上检测了目前广泛使用的经典催眠药物。如苯二氮草受体激动剂能明显缩短睡眠潜伏期,增加 NREM,但对 REM 有很强的抑制作用^[34]。褪黑素激动剂治疗能缩短睡眠潜伏期,促进 NREM,而对 REM 和 δ 或 θ 频带无影响,但其增加了 NREM 睡眠期间 γ 频带^[35-36]。食欲素拮抗剂主要表现为 REM 睡眠的增加^[37]。

受试药物对睡眠结构的调整应该用正常动物即未造模的动物进行脑电图测试,才能更加准确的反应药物对睡眠结构的作用。对于脑电图检测技术来说,研究者们多采用手术植入电极的方法来检测脑电图,可能引起炎症指标肿瘤坏死因子和白介素的增加,进而促进 NREM 睡眠对动物的睡眠脑电图产生影响^[38]。而在术后恢复 7 d 及 7 d 以上可避免该影响^[39]。因此,在测试脑电图时应保证在动物恢复 7 d 或 7 d 以上进行,以避免炎症因子的升高造成睡眠结构的干扰。此外,脑电图检测房间内的光照强度应为 90~110 lux,光照期间笼内约为 60 lux,黑暗期间<1 lux,避免光线对动物睡眠造成影响,而不能如实地反映地受试药物的作用^[39]。与植入式检测脑电图相比,遥测具有重量轻、不影响动物自主活动的特点,在必要时可用此方法来检测脑电图^[40]。最后,视频遥测脑电图能够使用视频跟踪技术和无线电遥测的电生理活动对动物的自主活动睡眠脑电图进行系统分析,在检测脑电图的同时,还能评估自由活动大鼠的动物行为,能够代替旷场实验,减少实验过程中的动物数量^[41]。以下是本文所提到的实验流程图,见图 1。基于上述方法所筛选和评价的部分天然药物见表 2。

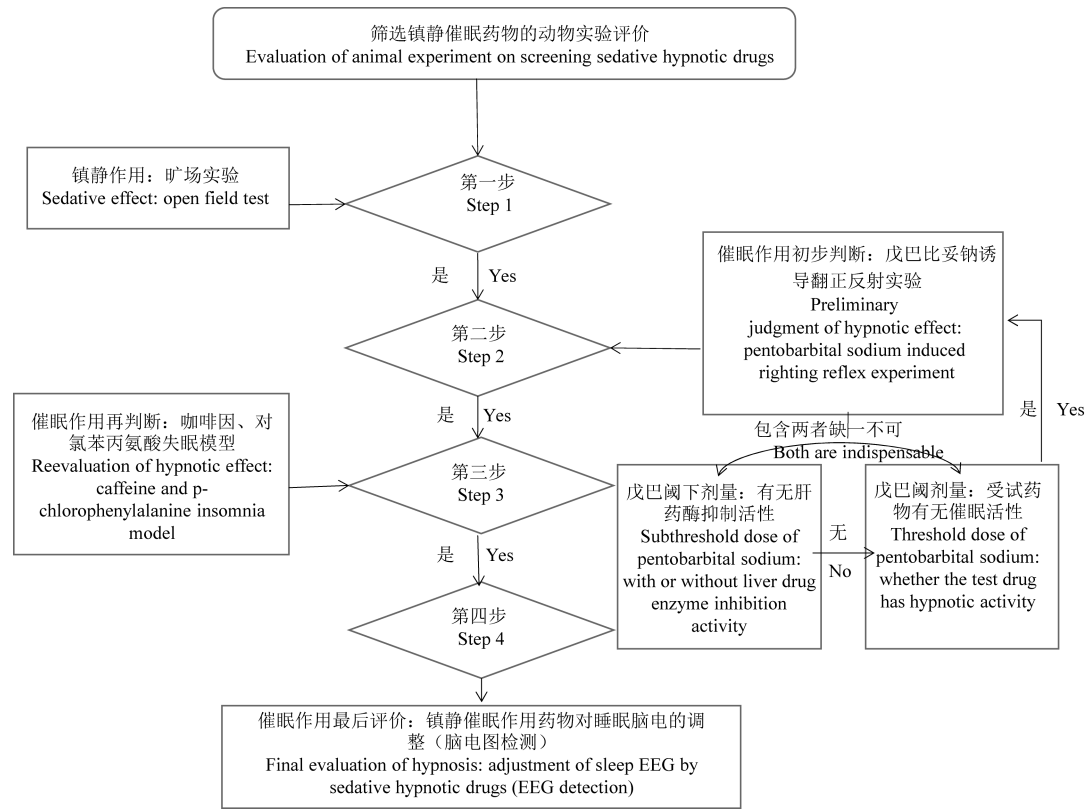


图 1 镇静催眠药物的动物筛选与评价流程图

Figure 1 Flow chart of screening and evaluation of sedative-hypnotic drugs

表 2 部分经动物实验筛选和评价的天然药物

Table 2 Some drugs screened and evaluated by animal experiments

受试药物 Test drug	旷场实验 Open-field test	翻正反射实验 Righting reflex experiment	咖啡因模型 Caffeine induced insomnia animal model	对氯苯丙氨酸模型 p-chlorophenylalanine induced insomnia animal model	脑电图特征 EEG features
山茱萸 ^[42] Corni Fructus	活动减少 Active reduction	缩短睡眠潜伏期和延长睡眠时间 Decreased sleep latency and increase sleep time	缩短睡眠潜伏期 Decreased sleep latency	缩短潜伏期, 延长睡眠时间 Decreased sleep latency and increased sleep time	非快速动眼睡眠和快速动眼睡眠时间增加 Increased NREM sleep and REM sleep duration
五味子 ^[43-44] Schisandra	同上 Ditto	同上 Ditto	缩短睡眠潜伏期 延长睡眠时间 Decreased sleep latency and increase sleep time	缩短潜伏期, 延长睡眠时间 Decreased sleep latency and increase sleep time	非快速动眼睡眠增加, 潜伏期减少 Increased NREM sleep and decreased REM latency
酸枣仁汤 ^[45-46] Suanzaoren Decoction	同上 Ditto	同上 Ditto	/	缩短潜伏期, 延长睡眠时间 Decreased sleep latency and increase sleep time	/
四逆散 ^[47] Sinisan powder	/	同上 Ditto	/	/	/

5 结语

失眠是发生在神经网络的复杂过程,其机制复杂,体外研究难以直接说明镇静催眠效果,因此,动

物实验研究在临床前研究当中仍然占据重要地位。旷场实验、戊巴比妥钠诱导翻正反射实验、咖啡因失眠动物模型、PCPA 失眠动物模型、脑电图检测技术是研究者在动物身上发现潜在镇静催眠药物

的常用方法。并且这些方法经过经典镇静催眠药物的证实,证明其实验方法的可靠性。脑电图虽然结果准确,能更真实地反映镇静催眠药物的作用特性,但耗时长、成本高、过程繁琐,因此旷场实验、戊巴比妥钠诱导翻正反射实验、动物模型验证可作为受试药物筛选和评价的首选方法,但这 3 个实验易受多方面实验因素的影响。为了保证实验结果的可靠性,研究者在实验的过程中应该严格遵守前文提到的注意事项。经过旷场实验、戊巴比妥钠诱导翻正反射实验、动物模型筛选到的受试药物应进一步通过脑电图的检测,以更加真实地反应药物的作用特性。近年来,筛选药物的方法逐渐增加,如基于天然产物数据库的计算机辅助药物虚拟筛选、基于微流控技术的高通量细胞药物筛选、G 蛋白偶联受体筛选方法等已被大量运用于药物的筛选当中,可以利用这些先进技术更快的筛选到具有潜在镇静催眠作用的受试药物,再运用本文所谈到的方法对受试药物进行体内再评价和筛选,以便找到符合临床预期的候选药物^[48]。

参考文献:

- [1] Patel D, Steinberg J, Patel P. Insomnia in the elderly: a review [J]. J Clin Sleep Med, 2018, 14(6): 1017-1024.
- [2] Palagini L, Bianchini C. Pharmacotherapeutic management of insomnia and effects on sleep processes, neural plasticity, and brain systems modulating stress: a narrative review [J]. Front Neurosci, 2022, 16: 893015.
- [3] Abdollahnejad F, Mosaddegh M, Kamalinejad M, et al. Investigation of sedative and hypnotic effects of *Amygdalus communis* L. extract: behavioral assessments and EEG studies on rat [J]. J Nat Med, 2016, 70(2): 190-197.
- [4] Zhong Y, Zheng Q, Hu P, et al. Sedative and hypnotic effects of compound Anshen essential oil inhalation for insomnia [J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 306.
- [5] Vinkers CH, van Oorschot R, Nielsen EØ, et al. GABA(A) receptor α subunits differentially contribute to diazepam tolerance after chronic treatment [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43054.
- [6] Gao S, Calderon DP. Robust alternative to the righting reflex to assess arousal in rodents [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 20280.
- [7] Kitamura Y, Hongo S, Yamashita Y, et al. Influence of lipopolysaccharide on diazepam-modified loss of righting reflex duration by pentobarbital treatment in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 842: 231-238.
- [8] Darias V, Abdala S, Martin-Herrera D, et al. CNS effects of a series of 1, 2, 4-triazolyl heterocarboxylic derivatives [J]. Pharmazie, 1998, 53(7): 477-481.
- [9] Kushikata T, Hirota K, Yoshida H, et al. Orexinergic neurons and barbiturate anesthesia [J]. Neuroscience, 2003, 121(4): 855-863.
- [10] Tanaka M, Suemaru K, Watanabe S, et al. Behavioral pharmacological properties after recovery from the loss of righting reflex induced by benzodiazepine receptor agonists in mice [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2008, 30(8): 607-613.
- [11] Wang F, Li JC, Wu CF, et al. Hypnotic activity of melatonin: involvement of semicarbazide hydrochloride, blocker of synthetic enzyme for GABA [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(9): 860-864.
- [12] Keir WJ, Deitrich RA. Development of central nervous system sensitivity to ethanol and pentobarbital in short- and long-sleep mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1990, 254(3): 831-835.
- [13] Nabeshima T, Ho IK. Pharmacological responses to pentobarbital in different strains of mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1981, 216(1): 198-204.
- [14] Nelson W, Halberg F. An evaluation of time-dependent changes in susceptibility of mice to pentobarbital injection [J]. Neuropharmacology, 1973, 12(6): 509-524.
- [15] Arvela P, Sotaniemi E. The influence of environmental temperature on the concentration of pentobarbitone in the liver and brain of rats [J]. Br J Pharmacol, 1968, 34(1): 210.
- [16] Revel FG, Gottowik J, Gatti S, et al. Rodent models of insomnia; a review of experimental procedures that induce sleep disturbances [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2009, 33(6): 874-899.
- [17] Lazarus M, Chen JF, Huang ZL, et al. Adenosine and Sleep [J]. Handb Exp Pharmacol, 2019, 253: 359-381.
- [18] Kim D, Kim J, Kim S, et al. Arousal-inducing effect of *Garcinia cambogia* peel extract in pentobarbital-induced sleep test and electroencephalographic analysis [J]. Nutrients, 2021, 13(8): 2845.
- [19] Paterson LM, Wilson SJ, Nutt DJ, et al. A translational, caffeine-induced model of onset insomnia in rats and healthy volunteers [J]. Psychopharmacology (Berl), 2007, 191(4): 943-950.
- [20] Zhong Y, Zheng Q, Hu P, et al. Sedative and hypnotic effects of *Perilla frutescens* essential oil through GABAergic system pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 113627.
- [21] De St Hilaire-Kafi S, Gaillard JM. Hypnotic action of flunitrazepam in the rat: does 5-HT mechanism play a role? [J]. Neuropharmacology, 1988, 27(12): 1227-1230.
- [22] Nunn CL, Samson DR. Sleep in a comparative context: Investigating how human sleep differs from sleep in other primates [J]. Am J Phys Anthropol, 2018, 166(3): 601-612.
- [23] Yiallourou SR, Arena BC, Wallace EM, et al. Being Born Too Small and Too Early May Alter Sleep in Childhood [J]. Sleep, 2018, 41(2): zsx193.
- [24] Vazsonyi AT, Liu D, Javakhishvili M, et al. Sleepless: The developmental significance of sleep quality and quantity among adolescents [J]. Dev Psychol, 2021, 57(6): 1018-1024.
- [25] Liu S, Shen J, Li Y, et al. EEG power spectral analysis of abnormal cortical activations during REM/NREM sleep in

- obstructive sleep apnea [J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 643855.
- [26] Spiegelhalter K, Regen W, Feige B, et al. Increased EEG sigma and beta power during NREM sleep in primary insomnia [J]. *Biol Psychol*, 2012, 91(3): 329–333.
- [27] Merica H, Blois R, Gaillard JM. Spectral characteristics of sleep EEG in chronic insomnia [J]. *Eur J Neurosci*, 1998, 10(5): 1826–1834.
- [28] Radulovacki M, Sreckovic G, Zak R, et al. Diazepam and midazolam increase light slow-wave sleep (SWS₁) and decrease wakefulness in rats [J]. *Brain Res*, 1984, 303(1): 194–196.
- [29] Le Bon O. Relationships between REM and NREM in the NREM-REM sleep cycle: a review on competing concepts [J]. *Sleep Med*, 2020, 70: 6–16.
- [30] Dimanico MM, Klaassen AL, Wang J, et al. Aspects of tree shrew consolidated sleep structure resemble human sleep [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 722.
- [31] Le Bon O, Popa D, Streel E, et al. Ultradian cycles in mice: definitions and links with REMS and NREMS [J]. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 2007, 193(10): 1021–1032.
- [32] Han HB, Kim B, Kim Y, et al. Nine-day continuous recording of EEG and 2-hour of high-density EEG under chronic sleep restriction in mice [J]. *Sci Data*, 2022, 9(1): 225.
- [33] Northeast RC, Huang Y, McKillop LE, et al. Sleep homeostasis during daytime food entrainment in mice [J]. *Sleep*, 2019, 42(11): zsz157.
- [34] Renger JJ, Dunn SL, Motzel SL, et al. Sub-chronic administration of zolpidem affects modifications to rat sleep architecture [J]. *Brain Res*, 2004, 1010(1–2): 45–54.
- [35] Fisher SP, Davidson K, Kulla A, et al. Acute sleep-promoting action of the melatonin agonist, ramelteon, in the rat [J]. *J Pineal Res*, 2008, 45(2): 125–132.
- [36] Yoshimoto A, Yamashiro K, Suzuki T, et al. Ramelteon modulates gamma oscillations in the rat primary motor cortex during non-REM sleep [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 145(1): 97–104.
- [37] Gotter AL, Garson SL, Stevens J, et al. Differential sleep-promoting effects of dual orexin receptor antagonists and GABAA receptor modulators [J]. *BMC Neurosci*, 2014, 15: 109.
- [38] Giordano KR, Denman CR, Dollish HK, et al. Intracerebral hemorrhage in the mouse altered sleep-wake patterns and activated microglia [J]. *Exp Neurol*, 2020, 327: 113242.
- [39] Tang X, Yang L, Sanford LD. Sleep and EEG spectra in rats recorded via telemetry during surgical recovery [J]. *Sleep*, 2007, 30(8): 1057–1061.
- [40] Jeutter DC. Biomedical telemetry techniques [J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 1982, 7(2): 121–174.
- [41] Moscardo E, Rostello C. An integrated system for video and telemetric electroencephalographic recording to measure behavioural and physiological parameters [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2010, 62(1): 64–71.
- [42] 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.
- [43] Zhang C, Mao X, Zhao X, et al. Gomisins N isolated from *Schisandra chinensis* augments pentobarbital-induced sleep behaviors through the modification of the serotonergic and GABAergic system [J]. *Fitoterapia*, 2014, 96: 123–130.
- [44] Huang F, Xiong Y, Xu L, et al. Sedative and hypnotic activities of the ethanol fraction from *Fructus Schisandrae* in mice and rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 110(3): 471–5.
- [45] Ren XJ, Wang GY, Zhang XP, et al. Sedative and hypnotic effects and transcriptome analysis of *Polygala tenuifolia* in aged insomnia rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(6): 434–441.
- [46] Zhan LH, Dong YJ, Yang K, et al. Soporific effect of modified Suanzaoren Decoction and its effects on the expression of CCK-8 and orexin-A [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 6984087.
- [47] Li Y, Wu P, Ning Y, et al. Sedative and hypnotic effect of freeze-dried paeoniflorin and *Sini San* freeze-dried powder in pentobarbital sodium-induced mice [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(2): 184–187.
- [48] Chen L, Jin L, Zhou N. An update of novel screening methods for GPCR in drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7(9): 791–806.

[收稿日期]2022-06-04