岭南陈氏针法对失眠小鼠 5-TH 影响的实验研究

王婷婷　冯晓燕(通讯作者)　顾 鸿
贵州中医药大学，贵州 贵阳 550002

摘要：目的：探讨岭南陈氏针法不同等级补泻手法对心肾不交型失眠小鼠下丘脑和结肠中 5-HT 的影响。方法：采用多种焦虑刺激联合对氯苯丙氨酸（PCPA）进行心肾不交型失眠造模；陈氏针法各组分别按照相应的手法进行针刺治疗，西药组使用艾司唑仑片进行灌胃治疗，7 天后采用酶联免疫法（ELISA）检测小鼠下丘脑和结肠组织中 5-HT 含量。结果：小鼠下丘脑中 5-HT 含量,与模型组（6.320±0.257）ng/ml 比较，轻补组（8.013±1.488）ng/ml、轻泻组（7.368±0.484）ng/ml、大泻组（6.471±0.269）ng/ml 显著升高（P<0.05），其中大补组（8.932±1.461）ng/ml 与西药组（8.559±0.867）ng/ml 极显著升高（P<0.001）。各治疗组结肠中 5-HT 的含量较模型组（6.762±0.358）ng/ml 均有提升,其中大补组（9.538±1.585）ng/ml 升高最明显（P<0.05），其次是西药组（8.406±1.126）ng/ml、轻泻组（8.244±1.286）ng/ml、轻补组（7.549±1.055）ng/ml、大泻组（7.708±1.249）ng/ml。结论：岭南陈氏针法对多重焦虑刺激联合 PCPA 致心肾不交型失眠小鼠具有治疗作用，该作用可能是通过调节下丘脑和结肠中的 5-HT 含量实现。此外，不同等级的补泻手法对心肾不交型失眠之间存在疗效差异，大补手法的疗效更好。

关键词：岭南陈氏针法；失眠小鼠；脑；肠；5-HT

失眠是现代医学中常见的睡眠障碍,其发病率高且对患者的生活质量、心理健康和生理功能产生显著影响。根据《中国成人失眠诊断与治疗指南（2023）》[1]失眠的发病机制复杂，涉及神经递质紊乱、心理生理因素、遗传因素等。调查研究发现，全球大约有 27% 的人群面临失眠的困扰，且发病率呈明显上升趋势[2]。中国睡眠研究会发布的一项调查结果显示，我国约有 38.2% 的成年人遭受失眠困扰，已经高于欧美等发达国家或地区[3]。我国一项在线调查结果显示，COVID-19 大流行期间 的失眠患病率为 29.2%[4]。研究表明[5-6]长期失眠影响个体的正常生活和工作，增加罹患各种健康问题的风险。因此，失眠相关的研究越来越受到人们的关注。近年来，随着对失眠病理生理机制的深入研究，神经递质 5-羟色胺（5-HT）在失眠中的作用逐渐受到关注，是脑内的“致眠因子”[7]。在调节睡眠、情绪和认知功能中发挥重要作用，其在下丘脑和结肠组织中的分布与功能异常可能与失眠的发生发展密切相关。

岭南陈氏针法是重要的针灸流派之一,是广东省和国家级非物质文化遗产,国家中医药管理局中医适宜技术立项推广项目。临床研究表明岭南陈氏针法治疗失眠效果显著，经济方便，副作用小，有着不同于药物治疗的独特优势[8-9]。本研究旨在通过动物实验，探讨岭南陈氏针法对心肾不交型失眠小鼠下丘脑、结肠组织中 5-HT 的影响，以揭示其治疗失眠的潜在机制,为针灸治疗失眠提供更深入的理论依据和临床指导。

1 实验材料

1.1 实验动物

健康 SPF 级 KM 小鼠，雌雄不限，质量 22—30g，由重庆腾鑫生物技术有限公司提供，合格证号：SCXK（川）2018-18。

1.2 主要药品

艾司唑仑片：华中药业股份有限公司，批号：20220203，规格；1mg/片；

1.3 主要试剂

PCPA（上海易恩化学技术有限公司，货号：R022012-5g）；5-HT ELISA 检测试剂盒（武汉云克隆科技股份有限公司，货号：CEA808Ge）。

1.4 主要仪器器材

汉医牌 0.20×25mm 一次性使用无菌针灸针（长春爱康医疗器械有限公司，生产批次；HY210501）；台式高速冷冻离心机（HR/T16M）；电子天平（天津天马工艺有限公司，批号：ELECTRONICSCACET5000）；Biosharp2ml 圆底离心管（货号：BS-20-M）；Biosharp15ml 螺口尖底离心管（货号：BS-150-M）

2 实验方法

2.1 动物分组

SPF 级 KM 小鼠 70 只，适应性饲养 5 天后，随机分为空白组（KB 组）、模型组（ZM 组）、轻补组（QB 组）、大补组（DB 组）、轻泻组（QX 组）、大泻组（DX 组）、西药组（XY 组）共 7 组，每组 10 只。实验室温度 22～25℃，湿度 45%～70%，雌雄分笼喂养，每日自由饮水、进食，每日更换垫料。

2.2 模型建立

采用多重焦虑刺激法结合腹腔注射 PCPA 复制心肾不交型小鼠失眠模型[10]。小鼠适应性喂养 5 天后，第 6～19 天除空白组正常饮食不做任何处理外，其余各组每天随机给予以下刺激：4℃冰水游泳 5min、禁食 24h、禁水 24h、夹尾 1min、明暗颠倒 24h、鼠笼倾斜 45°24h、潮湿垫料 24h。每天 1 种且每种不连续使用，每种刺激平均出现 2 次。第 20～21 天上午各组按 300mg/kg 量腹腔注射 PCPA 混悬液，空白组腹腔注射同体积的弱碱性生理盐水。当小鼠整体与正常组有明显不同，饮水、饮食量减少，出现毛发变黄，易惊觉，体重减轻，白日夜晚持续活动，则造模成功。

2.3 治疗方法

2.3.1 岭南陈氏针法干预

根据《岭南陈氏针法技术操作安全指南》[11]中失眠章节的穴位选取，结合全国中医药行业高等教育“十四五”规划教材《实验针灸学》[12]中实验小鼠穴位表，选取神门穴和三阴交穴。于造模成功后次日开始进行针刺干预治疗，常规消毒后，用 0.20×25mm 一次性使用无菌针灸针，于上肢神门穴、下肢三阴交穴斜刺 2～3mm 后，对各组小鼠进行相应的补泻手法操作行针 1min，待 4min 后取针，每天 1 次，连续治疗 7 天。

2.3.2 西药干预

艾司唑仑片给药剂量根据人与小鼠体表面积公式计算：小鼠给药剂量 =人给药剂量×0.9×（人体重/小鼠体重）×1/3 计量，用蒸馏水制成 0.2mg/10g 的混悬液灌胃给药，1 次/天，连续 7 天。

2.4 指标检测

2.4.1 一般情况观察

每天观察小鼠饮水量、饮食量、体重变化、毛发等情况，以及行为学变化，包括精神状态、活动情况、反应灵敏度、警惕性等。

2.4.2 下丘脑脑组织中 5-HT 的含量检测

实验结束后第二天，断颈后快速撬开颅骨，取出脑组织，取适量生理盐水冲洗样本周围的血迹，切去脑组织多余部分，留下下丘脑备用。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法（ELISA），按照试剂盒说明的操作程序检测 5-HT 含量。

2.4.3 结肠组织 5-HT 含量检测

实验结束后第二天，开腹取小鼠结肠组织。采用双抗体夹心酶联免疫法（ELISA），按照试剂盒操作程序检测 5-HT 含量。

2.5 统计学分析

采用 SPSS26.0 软件，柱状图作图采用 Graphpad Prism9 软件，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般情况变化

实验过程中，除模型组小鼠死亡 2 只，轻泻组、轻补组各死亡 1 只外，其余各组没有小鼠死亡。整个实验过程空白组小鼠的活动昼夜节律正常，精神良好，皮毛光亮；与空白对照组比较，失眠模型组小鼠昼夜节律紊乱甚至消失，精神萎靡，攻击性增强，皮毛发黄变暗、掉毛；与失眠模型组比较，大补组、轻补组、西药组、轻泻组上述情况有不同程度改善。

3.2 各组小鼠体重变化

实验前各组小鼠体重差异无统计学意义（$P > 0.05$），实验结束时，各组小鼠体重均有所增加，但空白组增加最为明显。与模型组比较，各治疗组小鼠重均增加明显，其中以大补组和西药组增加最明显（$P < 0.01$）。陈氏针法各组中，体重增加以大补组最多，其次是轻补组、大泻组，轻泻组增加最少，但各组间的差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见表 1。

表 1 各组小鼠体重变化表（$\bar{x} \pm s$ 单位：g）

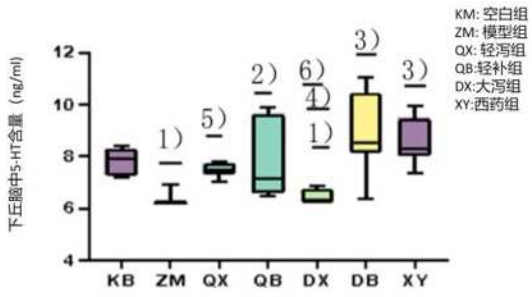
组别	数量	实验前	治疗后
空白组	10	25.9 ± 2.644	37.8 ± 3.048
模型组	8	24.3 ± 2.003	29.4 ± 4.406[1)]
轻泻组	9	23.5 ± 3.719	30.7 ± 2.236[1)]
大泻组	10	22.7 ± 2.263	31.7 ± 3.917[1)]
轻补组	9	23.9 ± 2.558	32.8 ± 5.019[1)2)]
大补组	10	26.4 ± 2.591	34.4 ± 4.502[3)]
西药组	10	24.3 ± 3.129	34.4 ± 3.406[3)]

注：与治疗后空白组比较，[1)] $P<0.01$；
与治疗后模型组比较，[2)] $P<0.05$；[3)] 与治疗后模型组比较 $P<0.01$

3.3 陈氏针法对心肾不交失眠小鼠下丘脑 5-HT 的影响

与空白组比较，模型组小鼠下丘脑中的 5-HT（6.320 ± 0.257）ng/ml 明显降低（$P < 0.05$）；与模型组比较，轻

补组（8.013 ± 1.488）ng/ml、轻泻组（7.368 ± 0.484）ng/ml、大泻组（6.471 ± 0.269）ng/ml 显著升高（P < 0.05），大补组（8.932 ± 1.461）ng/ml 与西药组（8.559 ± 0.867）ng/ml 极显著升高（P < 0.001）；陈氏针法各组间，大补组、轻补组含量升高比轻泻组、大泻组明显；大补组与大泻组比较，有显著差异（P < 0.001）。见图 1。

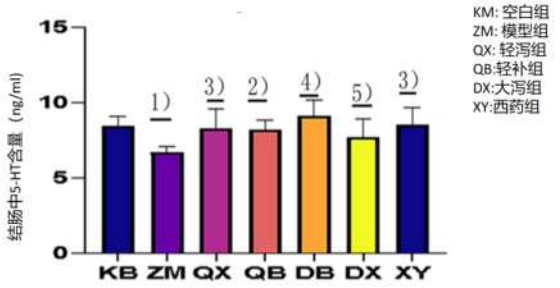


注：与空白组比较，[1] P<0.05；
与模型组比较，[2] P<0.01；[3] P<0.001；
与西药组比较，[4] P<0.001；
与大补组比较，[5] P<0.05；[6] P<0.001

图 1　陈氏针法对失眠小鼠下丘脑 5-HT 的影响

3.4 陈氏针法对心肾不交失眠小鼠结肠 5-HT 的影响

与空白对照比较，各组小鼠结肠中 5-HT 含量均降低，模型组（6.762 ± 0.358）ng/ml 显著降低（P < 0.01），轻泻组（8.244 ± 1.286）ng/ml、轻补组（7.549 ± 1.055）ng/ml、大泻组（7.708 ± 1.249）ng/ml 有降低，没有统计学意义（P > 0.05），大补组（9.538 ± 1.585）ng/ml、西药组（8.406 ± 1.126）ng/ml 的含量升高，但无统计学意义（P > 0.05）；与模型组比较，各治疗组结肠中 5-HT 的含量均升高，轻泻组、大补组、西药组升高显著（P < 0.05），大泻组升高不明显（P > 0.05）；陈氏针法各组间，大补组升高最明显、其次是轻补组、轻泻组、大泻组。见图 2。



注：与空白组比较，[1] P<0.01
与模型组比较，[2] P<0.05；[3] P<0.01[4] P<0.001
与大补组比较，[5] P<0.05

图 2　陈氏针法对失眠小鼠结肠 5-HT 的影响

4 讨论

失眠作为一种常见的睡眠障碍，已经成为全球性的健康问题。根据《精神障碍诊断与统计手册（DSM-5）》，失眠主要表现为入睡困难、睡眠维持困难或早醒，导致患者白天疲劳、注意力不集中、情绪低落等问题，严重影响患者的生活质量和社会功能[13]。现代医学研究表明，失眠的发生与多种因素有关，包括心理压力、神经递质失衡、内分泌紊乱等。有研究证实[14]失眠动物模型在经过有效的干预治疗后，脑中 5-HT 含量会比没有经过有效干预治疗的明显高。同时，5-HT 是参与调节胃肠道运动、内脏敏感性、分泌等功能的重要神经递质和信号分子，主要在肠道中产生[15]，之后通过血脑屏障进入脑中，分布于下丘脑，当肠道菌群不平衡，5-HT 的新陈代谢无法正常进行，从而导致 5-HT 的分泌减少，进而导致失眠的发生。

在中医学中，失眠属于“不寐”范畴，心主神明，肾藏精，心肾不交会导致心火亢盛、肾水不足，从而出现失眠、心烦、头晕、耳鸣等症状。中医临床通过辨证施治，将失眠分为肝郁脾湿、气阴两虚、瘀血内阻、心肾不交等失眠证候，其中“心肾不交”是常见的证型之一[16]。

岭南陈氏针法[17]历经五代人逾百年的学术传承，2015 年入选广东省省级非遗项目，2021 年入选国家级非遗项目，是国家中医药管理局 50 项中医适宜技术之一。治疗睡眠障碍在手法上实现无痛、准确、快速进针、防止污染等效果，疗效明显优于其他相关疗法[18]。

本研究显示，岭南陈氏针法对多重焦虑刺激联合 PCPA 致心肾不交型失眠小鼠具有显著的治疗作用，具体表现为，经过针刺干预后，小鼠的昼夜节律紊乱、精神萎靡、皮毛发黄等失眠症状得到了不同程度的改善。其治疗作用可能与调节 5-HT 等神经递质有关。此外，本研究表明，不同分级补泻手法之间在治疗中疗效存在差异，大补手法的疗效最好，而轻泻和大泻手法的效果相对较弱。这一结果从实验研究角度为岭南陈氏针法“分级补泻”理论提供了科学依据，提示在临床治疗过程中运用中医的辨证论治思维，根据患者的具体病情选择合适的补泻手法，可以取得更好的治疗效果。

参考文献：

[1]中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组。中国成人失眠诊断与治疗指南(2023 版)J. 中华神经科杂志,2024,57(6):560-584.

[2]CUNNINGTON D,JUNGE MF,FERNADO AT.Insomnia: prevalence,consequences and effective treatment[J].Med J Aus,2013,199(8):36 -40.

[3]中国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.

[4]Shi L, Lu ZA, Que JY, et al. Prevalence of and risk factors associated with mental health symptoms among the general population in China during the coronavirus disease 2019 pandemic[J]. JAMA Netw Open,2020,3(7):e2014053.DOI:10.1001/jamanetworkopen.2020.14053.

[5]赵忠新,张照环.应给予睡眠更多的关注[J].中华神经科学杂志,2011,44(8):513-515.DOI:10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2011.08.001.

[6]Laugsand LE, Strand LB, Vatten LJ, et al. Insomnia symptoms and risk for unintentional fatal injuries-the HUNT Study[J].Sleep,2014,37(11):1777-1786.DOI:10.5665/sleep.4170.

[7]林殷利.五羟色胺与睡眠[J].上海第二医科大学学报,1988,8(2):185.

[8]陈秀华.针药结合治疗失眠的疗效观察[A].广东省针灸学会.广东省针灸学会第九次学术交流会暨“针灸治疗痛症及特种针法”专题讲座论文汇编[C].广东省针灸学会,2004:5.

[9]莫昊风.岭南陈氏安神针法治疗失眠的临床观察[D].广东:广州中医药大学,2015.

[10]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.

[11]陈秀华,李颖,岭南陈氏针法技术操作安全指南,中国医药科技出版社,2021,北京,ISBN:9787521430806.

[12]郭义,实验针灸学,全国中医药行业高等教育“十四五”规划教材,中国中医药出版社,2021年6月,北京,ISBN:9787513268189.

[13]American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)[M].Arlington,VA:American Psychiatric Publishing, 2013.

[14]刘彬,臧佩林.保神开郁冲剂影响失眠鼠中枢递质的实验研究[J].辽宁中医杂志,2000,27(2):92.

[15]林懋惺,杨正兵.5-HT受体调节剂在肠易激综合征治疗中的应用进展[J].现代临床医学,2008,34(2):148-151.

[16]王硕,钱晶,齐文升.心肾不交之不寐证辨证治疗体会[J].北京中医药,2013,32(2):111.

[17]罗健雄,“岭南陈氏针法”学术流派的传承研究[D].广东:广州中医药大学,2018.

[18]陈秀华,国家中医药管理局农村中医适宜技术推广专栏(57)“陈氏飞针”刺法治疗睡眠障碍技术,中国乡村医药,2020,27(9):79-80.

作者简介：王婷婷（2002-），女，贵州中医药大学2020级中医学专业在校本科学生。通讯作者：冯晓燕（1979-），女，土家族，硕士研究生学历，副教授，研究方向：针灸理论与临床研究。

基金项目：2022年国家级大学生创新创业训练计划项目（编号：202210662064）；贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目[贵中医大创合字〔2022〕18号]；贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题（QZYY-2022-028）。