

· 实验研究 ·

制远志对肾不藏志不寐大鼠脑组织 IL-4、IL-18 表达的差异研究

胡燕玲¹, 张星平^{1*}, 贾宏林¹, 吴金鸿¹, 梁瑞宁², 陈旭¹, 李振辉¹,
李海明¹, 崔文军¹, 左广珂¹

1. 新疆医科大学第四临床医学院, 新疆 乌鲁木齐 830099;

2. 新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830017

摘要 目的:探讨制远志对肾不藏志不寐大鼠脑组织中 IL-4、IL-18 表达水平的影响。方法:将40只SD雄性大鼠随机分为正常组(Normal)、模型组(Model)、艾司唑仑组(ESTZ)、制远志低剂量组(PT-LD)、制远志高剂量组(PT-HD),每组8只。采用D-半乳糖(D-gal)联合对氯苯丙氨酸(PCPA)制备肾不藏志不寐大鼠模型,艾司唑仑组予以艾司唑仑 $0.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,制远志低剂量组予以制远志 $2.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,制远志高剂量组予以制远志 $4.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,正常组和模型组予以等体积生理盐水灌胃。Morris水迷宫实验评价大鼠学习记忆能力,HE和Nissl染色观察大鼠脑组织中细胞形态及结构;IHC和Western blot检测大鼠脑组织中 IL-4、IL-18 的蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠潜伏期及运动总距离显著增加($P<0.01$),目标象限探索时间百分比显著降低($P<0.01$),脑组织中神经元核偏位,核仁增大,炎性细胞浸润,尼氏体数量显著减少($P<0.01$),神经元细胞胞体间间隙增宽,神经突触结构不完整,IL-4表达水平显著减少($P<0.01$),IL-18表达水平显著增加($P<0.01$);与模型组比较,制远志低剂量组、制远志高剂量组大鼠潜伏期及运动总距离显著降低($P<0.01$),目标象限探索时间百分比显著增加($P<0.01$),神经元损伤情况及炎性细胞浸润不同程度减轻,尼氏体数量不同程度增加($P<0.01$),神经元和胞体形态结构不同程度改善,IL-4表达水平显著增加($P<0.01$),IL-18表达水平显著降低($P<0.01$)。结论:制远志能够显著改善肾不藏志不寐大鼠的睡眠及学习记忆能力,并减轻肾不藏志不寐大鼠的神经元细胞炎症损伤状态,其改善睡眠机制可能与升高脑组织中 IL-4、降低 IL-18 表达水平有关。

关键词 制远志;肾不藏志;不寐;白细胞介素4;白细胞介素18

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2392(2026)05-0007-07

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.260089

失眠是指频繁且持久的难以入睡或难以维持睡眠

状态,和/或过早醒来,并因此造成睡眠质量下降,进而引发日间疲劳、情绪波动以及工作、学习和社交能力减退等特征的睡眠障碍^[1],属中医“不寐病”范畴^[2],流行病学研究显示,中国城市老年人群中患病率为43.9%~53.89%^[3]。长期失眠不仅会干扰失眠患者的日常活动,降低生活质量,还会增加患抑郁、焦虑等神经系统疾病的风险^[4],故开展失眠研究意义重大。张星平教授依据《黄帝内经》“五神藏”理论及自身临床经验,提出了依据不寐病直接症状主诉确立不寐五脏病位诊断的“中医不寐五神分型诊断法”^[5],该诊断法认为不寐病的病机为五神不安于五脏,即(神、魂、

收稿日期:2025-05-07 修回日期:2025-12-04

基金项目:国家自然科学基金项目(82160873,81960837,81560762,81260526);新疆自然科学基金重点项目(2022D01D48);全国名老中医药专家传承工作室(国中医药人教函[2022]75号);国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(国中医药人教函[2023]85号);新疆“十四五”中医学重点学科(新教函[2022]112号)

作者简介:胡燕玲(1997-),女,硕士研究生,从事中医神志病诊断及治疗研究。

***通信作者:**张星平(1961-),男,硕士,教授,主任医师,从事中医神志病诊断及治疗研究。

意、魄、志)五神不安舍于(心、肝、脾、肺、肾)五脏,其中肾不藏志不寐作为五神分型诊断法中的一种分型,其临床表现以夜寐早寤(早醒为主)为主症,病机为肾志不安于舍,治疗当以安肾志为核心。远志之药,首载于《神农本草经》,原文载:“味苦温……益智慧,耳目聪明不忘,强志倍力”,李时珍《本草纲目》言其:“远志入足少阴肾经……其功专于强志益精”,表明其有安肾志的作用;雷敦《雷公炮炙论》云:“远志凡使,先须去心,若不去心,服之令人闷。去心了,用熟甘草汤浸一宿,漉出,曝干用之也”,可见远志临床上多制用,张星平教授临床常用制远志治疗肾不藏志不寐,取得较好疗效,现代药理研究表明远志具有镇静安神的作用^[6]。然而制远志治疗失眠的具体作用机制尚不明确,故本研究旨在探究其可能的作用机制。

研究发现失眠会显著提升血液中炎症因子的水平,进而促使中枢神经系统内神经毒性物质累积,从而加剧失眠状况^[7]。另有研究^[8-9]显示,失眠大鼠脑组织中白细胞介素 4 (Interleukin 4, IL-4) 水平较正常组下降,睡眠剥夺后的小鼠脑组织中白细胞介素 18 (Interleukin 18, IL-18) 水平较正常组升高,这表明失眠可能与抗炎因子 IL-4 水平降低以及 IL-18 水平升高有关。本实验采用 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 联合对氯苯丙氨酸 (p-chlorophenylalanine, PCPA) 腹腔注射方法制备肾不藏志不寐大鼠模型^[10],通过制远志进行干预,以期探寻制远志对肾不藏志不寐大鼠脑组织中 IL-4、IL-18 的表达水平差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠购买于新疆医科大学动物实验中心,鼠龄为 10~12 周,体质量 200~220 g,动物合格证号:SYXK2023-0002。全部大鼠在 SPF 级条件下饲养,饲养室的温度为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 50%~60%,大鼠可以自由饮水和进食,适应性喂养持续 3 d。此实验获得新疆医科大学实验动物伦理委员会的正式批准,审批编号:IACUC-20210301-45。

1.2 主要仪器

水迷宫设备和软件(成都泰盟科技有限公司,型号为 WMT-100S);轮转式石蜡切片机(Leica 公司,型号为 RM2235);真空干燥箱(上海一恒有限公司,型号为 DZF-6090);全自动样品快速研磨仪(上海净信实业有限公司,型号为 JXFSTPRP-24);生物显微镜(Nikon 公司,型号为 ECLIPSE Ci-E);台式高速冷冻离心机(Sigma 有限公司,型号为 3-18KS);全波长酶标仪(Thermo Fisher 公司,型号为 Multiskan GO);

PowerPac Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司,型号为 041BR342214)。

1.3 主要药物与试剂

制远志颗粒由四川新绿色药业科技发展有限公司生产,批号为 21100045;制远志炮制方法为取甘草,加适量水煎汤,去渣,加入净远志,用文火煮至汤吸尽,取出,干燥,每 100 kg 远志,用甘草 6 kg;制远志颗粒制备工艺为取制远志饮片 2.3 kg,加水煎煮,滤过后,滤液浓缩成清膏,干浸膏出膏率为 23.5%~40.5%,加入适量辅料干燥混匀,制粒,制成 1 kg,即得。

IL-4、IL-18 一抗抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(沈阳万类生物科技有限公司,批号分别为 T11195916、T08291127、T10151372);二抗山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG(H+L)抗体[HRP, IgG(H+L)HRP]偶联抗体(江苏亲科有限公司,货号为 S0001);免疫组织化学染色兔二步法试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)试剂盒、封闭用山羊血清工作液(北京中杉金桥有限公司,货号分别是 PV-6001、ZLI-9018、ZLI-9056);二喹啉甲酸法(BCA)试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、5×蛋白上样缓冲液(北京索莱宝有限公司,货号分别为 PC0020、P1200、G2075),三色预染蛋白 Marker(和元李记上海有限公司,货号为 AP13L052)。

1.4 分组、造模及干预

将 40 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为正常组(Normal)、模型组(Model)、艾司唑仑组(ESTZ)、制远志低剂量组(PT-LD)、制远志高剂量组(PT-HD),每组 8 只。制备肾不藏志不寐大鼠模型^[10]:首先对大鼠进行连续 42 d 的颈背部皮下注射 D-半乳糖 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,结束后进行连续 3 d 的腹腔注射 PCPA $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。造模结束后艾司唑仑组(将艾司唑仑片溶于 0.9% 氯化钠溶液)以 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量进行灌胃,制远志低剂量组(将制远志颗粒溶于 0.9% 氯化钠溶液)以 $2.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量进行灌胃,制远志高剂量组(将制远志颗粒溶于 0.9% 氯化钠溶液)以 $4.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量进行灌胃,大鼠给药量依据《中药药理学研究方法学》^[11]大鼠与人药物剂量进行换算,正常组与模型组均以同等体积 0.9% 生理盐水灌胃,各组均连续给药 7 d;课题组前期研究发现^[10,12],与正常组大鼠相比,肾不藏志不寐大鼠觉醒期(Wake)延长,非快速眼动睡眠期(NREM)和快速眼动睡眠期(REM)缩短,表明肾不藏志不寐大鼠模型已成功建立。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 Morris 水迷宫实验

造模结束及相对应干预后,使用 Morris 水迷宫对 5 组大鼠均进行记忆学习能力测试,所有大鼠于第 52 天干预结束后逐一进行定位航行试验和空间探索试验。于定位航行试验中记录大鼠下水至找到水下平台的时间、路程;在进行空间探索试验时,移除藏匿在水下面的小平台,并在大鼠下水后 90 s 内记录其穿越原平台次数、停留在原平台象限的时间及路程,统计大鼠逃避潜伏期、运动总距离及目标象限探索时间。

1.5.2 苏木精-伊红(HE)染色法

石蜡切片置于 60 ℃ 恒温箱 2 h 后,经 2 次二甲苯,2 次无水乙醇,95%、90%、85%、80%、75% 梯度乙醇脱蜡复水,蒸馏水冲洗;苏木素染液浸染,1% 盐酸乙醇分化,0.6% 氨水返蓝,蒸馏水冲洗;使用 75%、80%、85%、90% 的梯度乙醇进行脱水处理;接着用伊红染液进行染色,用无水乙醇进行脱水,二甲苯透明;最后使用中性树胶进行封片,待树胶与玻片之间完全固化后在显微镜下观察脑组织切片的形态和结构。

1.5.3 尼氏(Nissl)染色

石蜡切片置于 60 ℃ 恒温箱 2 h 后,经 3 次二甲苯,1 次无水乙醇,90%、70% 乙醇脱蜡复水,蒸馏水冲洗;Nissl 染色液浸染后蒸馏水洗 2 次;95% 乙醇进行脱水处理、二甲苯透明后,用中性树胶进行封片,最后在显微镜下对脑组织形态结构进行观察,以评估神经元的状况、密度和分布。

1.5.4 免疫组织化学(IHC)染色

石蜡切片置于 60 ℃ 恒温箱 2 h 后,经 2 次二甲苯,2 次无水乙醇,95%、85%、75% 梯度乙醇脱蜡复水,磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)洗 3 次后,置入抗原修复液中微波炉修复,PBS 洗 3 次;内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 15 min,PBS 洗 3 次后;滴加相应的 IL-4(1:500)、IL-18(1:300)一抗孵育,4 ℃ 冰箱过夜,次日 PBS 洗 3 次,滴加二抗室温孵育 20 min,PBS 洗 3 次;滴加 DAB 显色液,显微镜下观察显色效果,若发现目标抗原所在区域的染色变为清晰可见的棕褐色或棕黄色,且背景未出现非特异性染色(如组织空白区域未泛黄),立即用蒸馏水终止显色;苏木素染色液染色 5 min 后,用 1% 盐酸乙醇分化 10 s,随后立即用自来水缓慢冲洗至呈淡蓝色,依次用梯度酒精和无水乙醇进行逐级脱水,接着用二甲苯进行透明,用中性树胶

对组织切片进行封片,最后在显微镜下观察脑组织中抗体表达情况,采集图片完成后,使用 Image-J 软件进行分析,计算平均光密度值(AOD)值。

1.5.5 蛋白质免疫印迹法(WB)检测 IL-4、IL-18 蛋白表达水平

每只大鼠称取脑组织 100 mg,称重后剪碎组织,加入 1 000 μ L 放射免疫沉淀试验裂解液(RIPA 裂解液)及研磨珠后进行充分研磨,离心,冰上静置后取上清液,提取脑组织总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒按照说明书步骤进行蛋白浓度的测定,制备 SDS-PAGE 凝胶,蛋白质上样及电泳,凝胶转膜,室温摇床缓慢摇动状态下使用快速封闭液封闭 30 min,封闭结束后用 1 $\times$ 含吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(TBST)洗膜 3 次,每次 10 min,按照各蛋白分子量大小剪裁目标蛋白所在条带并标记,将目标蛋白条带加入相对应的 IL-4(1:1 000)、IL-18(1:1 000)、 β -actin(1:1 000)一抗进行孵育,置于圆周摇床 40 r/min、4 ℃ 过夜,次日取出条带后,回收一抗,再次用 1 $\times$ TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min,二抗 37 ℃ 摇床孵育 1 h,1 $\times$ TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min,超敏型 ECL 化学发光液(ECL)曝光显影,采集图像后保存,运用 Image-J 软件进行分析测定条带的灰度值,计算目的条带与内参条带之间的相对蛋白表达量。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件对实验数据进行详细统计分析,统计数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经过正态性检验(Shapiro-Wilk/Kolmogorov-Smirnov 法)和方差齐性检验(Levene 法)后,若是多组数据则运用单因素方差(ANOVA)分析进行数据评估。采用两两比较,具有统计学差异数值进行事后检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果

Morris 水迷宫结果显示,与正常组比较,模型组大鼠潜伏期及运动总距离显著增加($P < 0.01$),目标象限(第二象限)探索时间百分比显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,艾司唑仑组、制远志低剂量组及制远志高剂量组潜伏期及运动总距离显著降低($P < 0.01$),目标象限(第二象限)探索时间百分比显著增加($P < 0.01$),见图 1、表 1。

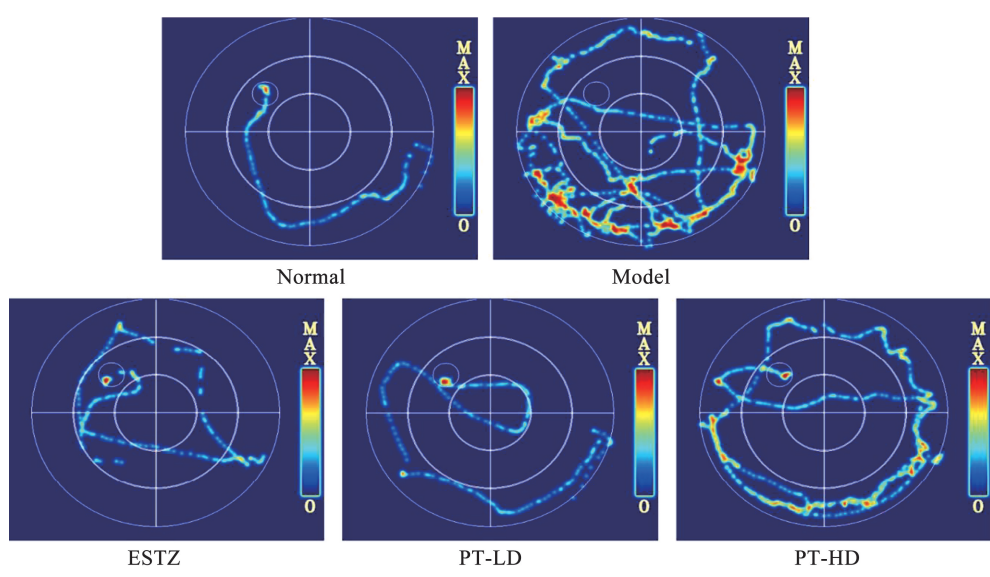


图 1 各组大鼠 Morris 水迷宫轨迹图

表 1 制远志对失眠大鼠 Morris 水迷宫各指标的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	潜伏期/s	运动总距离/ mm	目标象限探索 时间/%
Normal	25.87 ± 3.85	2 856.37 ± 320.58	63.00 ± 2.65
Model	88.53 ± 1.61 **	17 092.10 ± 1 698.30 **	18.67 ± 1.94 **
ESTZ	35.83 ± 3.50 ^{△△}	5 426.70 ± 708.07 ^{△△}	44.40 ± 0.92 ^{△△}
PT-LD	41.17 ± 0.91 ^{△△}	6 627.10 ± 563.04 ^{△△}	36.27 ± 1.53 ^{△△}
PT-HD	49.50 ± 1.41 ^{△△}	9 578.80 ± 30.83 ^{△△}	29.55 ± 0.64 ^{△△}

注:与 Normal 比较, ** $P<0.01$; 与 Model 比较, $\triangle\triangle P<0.01$ 。

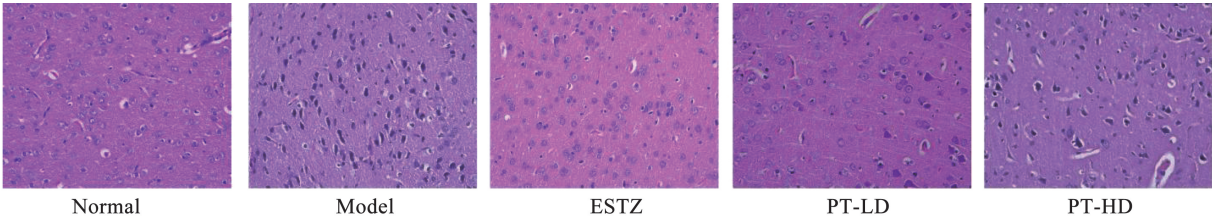


图 2 各组大鼠脑 HE 染色情况(×400)

2.3 各组大鼠 Nissl 染色结果

Nissl 染色结果显示,正常组大鼠脑组织中尼氏体分布密集,形态规则,边界清晰,排列整齐有序,神经元细胞核膜完整,未观察到核固缩或溶解现象;与正常组相比,模型组大鼠脑组织中尼氏体数量显著减少($P<0.01$),神经元细胞胞体间间隙增宽,神经突触结构不

2.2 各组大鼠 HE 染色结果

HE 染色结果显示,正常组大鼠脑组织中神经元细胞核居中,核仁大小正常,结构完整且较少出现炎性细胞浸润;模型组大鼠脑神经元核偏位,核仁增大,间质内较多炎性细胞浸润;与模型组比较,制远志低剂量组、制远志高剂量组及艾司唑仑组大鼠脑神经元细胞损伤、炎性细胞浸润出现不同程度的减轻,见图 2。

完整、出现神经元结构消失,胞核出现典型的固缩、崩解及拖尾等特征;与模型组相比,制远志低剂量组、制远志高剂量组、艾司唑仑组大鼠脑组织尼氏体数量存在不同程度的增加($P<0.01$),神经元形态结构的完整性,胞体之间的间隙以及神经突触结构的完整性存在不同程度的改善。见图 3,表 2。

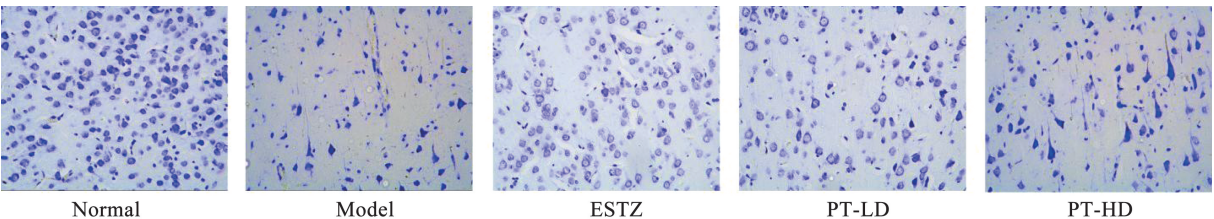


图 3 各组大鼠脑尼氏小体形态比较(×400)

表 2 各组大鼠脑尼氏小体数量比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	尼氏体数量
Normal	—	216.67 $\pm$ 7.77
Model	—	94.00 $\pm$ 8.72 **
ESTZ	0.2 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	173.33 $\pm$ 4.04 ^{△△}
PT-LD	2.1 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	155.67 $\pm$ 5.13 ^{△△}
PT-HD	4.2 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	153.73 $\pm$ 43.10 ^{△△}

注:与 Normal 比较, ** $P < 0.01$;与 Model 比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

2.4 免疫组织化学染色法检测各组大鼠脑组织中

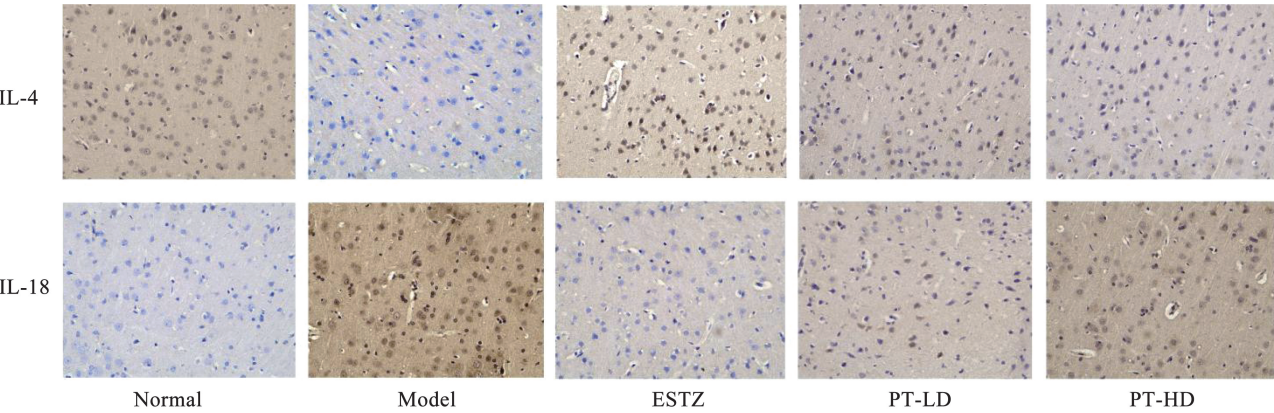


图 4 免疫组化检测制远志对失眠大鼠脑组织中 IL-4 及 IL-18 表达水平($\times 400$)

表 3 免疫组化检测制远志对失眠大鼠脑组织中 IL-4 及 IL-18 表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	IL-4	IL-18
Normal	—	0.57 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.02
Model	—	0.25 $\pm$ 0.01 **	0.60 $\pm$ 0.03 **
ESTZ	0.2 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	0.46 $\pm$ 0.01 ^{△△}	0.32 $\pm$ 0.02 ^{△△}
PT-LD	2.1 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	0.42 $\pm$ 0.01 ^{△△}	0.37 $\pm$ 0.02 ^{△△}
PT-HD	4.2 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	0.34 $\pm$ 0.03 ^{△△}	0.49 $\pm$ 0.01 ^{△△}

注:与 Normal 比较, ** $P < 0.01$;与 Model 比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

2.5 蛋白质免疫印迹法检测各组大鼠脑组织中 IL-4 及 IL-18 蛋白表达情况

Western blot 检测各组大鼠脑组织蛋白表达量结果显示,与正常组比较,模型组大鼠脑组织中 IL-4 蛋白表达显著降低($P < 0.01$),IL-18 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,制远志低剂量组、制远志高剂量组及艾司唑仑组大鼠脑组织中 IL-4 蛋白表达均显著升高($P < 0.01$);制远志低剂量组、制远志高剂量组及艾司唑仑组大鼠脑组织中 IL-18 蛋白表达均显著降低($P < 0.01$)。见图 5、表 4。

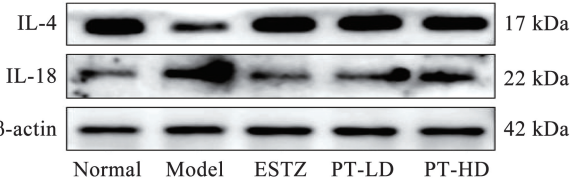


图 5 各组 IL-4 及 IL-18 蛋白表达印迹图($n = 3$)

IL-4 及 IL-18 表达情况

各组大鼠 IHC 染色结果显示,与正常组比较,模型组大鼠脑组织中 IL-4 的蛋白表达显著减少($P < 0.01$),IL-18 蛋白表达显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,制远志低剂量组、制远志高剂量组及艾司唑仑组大鼠脑组织中 IL-4 蛋白表达显著增加($P < 0.01$);制远志低剂量组、制远志高剂量组及艾司唑仑组大鼠脑组织中 IL-18 的蛋白表达均显著减少($P < 0.01$)。见图 4、表 3。

表 4 Western blot 检测制远志对失眠大鼠脑组织中 IL-4 及 IL-18 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	IL-4	IL-18
Normal	—	1.23 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.03
Model	—	0.41 $\pm$ 0.02 **	1.08 $\pm$ 0.05 **
ESTZ	0.2 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	0.96 $\pm$ 0.03 ^{△△}	0.56 $\pm$ 0.02 ^{△△}
PT-LD	2.1 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	0.90 $\pm$ 0.02 ^{△△}	0.63 $\pm$ 0.01 ^{△△}
PT-HD	4.2 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	0.77 $\pm$ 0.06 ^{△△}	0.76 $\pm$ 0.03 ^{△△}

注:与 Normal 比较, ** $P < 0.01$;与 Model 比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

3 讨论

失眠的危害性体现在注意力不集中、情绪波动(焦虑)、白天嗜睡等不适,长期失眠会对患者的日常活动造成干扰,降低生活质量,对社会的发展也会产生深远的影响,因此开展失眠诊治研究具有重要意义^[4]。目前治疗失眠的方案主要包括心理疗法中的认知行为疗法(CBT-I)以及药物疗法(如苯二氮䓬类药物),CBT-I 通常由在该领域接受过专业培训的临床医生进行操作实施,而长期应用镇静催眠类药物易使患者出现日夜颠倒、跌倒、失眠反弹、耐受性和依赖性增加等副作用^[13];中医治疗不寐具有独特的优势,其基于个体化的辨证干预模式具有疗效显著、副作用少的特征,患者接受程度高,然而由于中医师辨证思路的个体化差异、中医辨证方法不一等,致使治疗效果存

在明显差异,鉴于此,建立一种既简洁实用、方便客观,又能突出中医理论的中医不寐分型方法很有必要。张星平教授依据《黄帝内经》“五神藏”理论及自身临床经验,发现不寐病人表现出的不寐直接症状可归结于入寐维艰类、梦扰纷纭类、思虑纷纭类、轻浅易寤类、夜寐早寤类五类,或以上五类症状的不同排列组合^[14],且发现此五类直接症状分别与(神、魂、意、魄、志)五神不安舍于(心、肝、脾、肺、肾)五脏的中医不寐机制相关;即此五类不寐直接症状与不寐五脏病位诊断直接相关且一一对应,并据此提出了依据直接症状确立不寐五脏病位的诊断方法“中医不寐五神分型诊断法”^[5];其中肾不藏志不寐是中医不寐五神分型中的常见分型,临床以夜寐早寤为主症,且多见于老年人^[15];本课题组研究发现肾不藏志不寐的核心病机为肾之精气阴阳虚损或者邪气伤损肾之阴阳精气所致肾志不安于舍。制远志入肾经,具有安神益智之功效,最能补肾强志,安志,具有很好的安肾志作用^[15];细叶远志皂苷能减轻 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞的细胞炎症反应及氧化应激,从而发挥其细胞保护作用^[16]。故本次实验采用制远志对肾不藏志不寐大鼠进行干预,探讨安肾志药物制远志对肾不藏志不寐大鼠脑组织中 IL-4、IL-18 的表达水平差异。

水迷宫实验主要应用于学习记忆方面的研究,课题组前期在衰老失眠的大鼠模型进行 Morris 水迷宫测试,结果显示模型组大鼠的逃避潜伏期延长,目标象限探索时间百分比减少,促炎症因子表达增加,记忆认知能力下降。本研究结果显示,模型组大鼠潜伏期及运动总距离显著增加($P < 0.01$),目标象限探索时间百分比显著降低($P < 0.01$),表明肾不藏志不寐大鼠存在学习记忆功能障碍;制远志低剂量组及制远志高剂量组大鼠潜伏期及运动总距离显著降低($P < 0.01$),目标象限探索时间百分比显著增加($P < 0.01$),提示制远志能够改善肾不藏志不寐大鼠的学习和记忆能力。

失眠会触发神经元的炎症反应,进而导致神经元和突触受损,而神经元的损伤和突触功能障碍是失眠引起的记忆认知功能障碍的主要原因之一^[17],故本实验对脑组织进行 HE 和 Nissl 染色,观察其神经元功能和炎症情况,HE 染色结果提示模型组大鼠脑神经元核偏位,核仁增大,间质内较多炎性细胞浸润;制远志低剂量组、制远志高剂量组大鼠脑神经元细胞损伤、炎性细胞浸润出现不同程度的减轻;Nissl 染色结果提示模型组大鼠脑组织中尼氏体数量显著减少($P < 0.01$),神经元胞体排列疏松、间隙增宽,轴突、树突结构不完整,甚至出现神经元结构消失,细胞核出现固缩、

崩解及拖尾现象;制远志低剂量组、制远志高剂量组大鼠脑组织尼氏体数量存在不同程度的增加($P < 0.01$),神经元胞体形态结构存在不同程度的改善;本次实验结果表明制远志能够改善肾不藏志不寐大鼠神经元细胞炎症损伤状态。

睡眠对维持免疫功能稳态、促进炎症反应的平衡以及增强免疫防御机制至关重要^[18],失眠会导致免疫反应失调,促炎信号增加,从而发生炎症相关的慢性疾病。本研究结果显示,肾不藏志不寐模型大鼠脑组织中 IL-4 表达量较正常组降低,经制远志干预后脑组织 IL-4 表达量升高,这与 Belali 等^[8]对失眠大鼠进行干预后其大脑部分区域 IL-4 表达水平升高的结果存在一定吻合;本研究还发现肾不藏志不寐模型大鼠脑组织中 IL-18 表达量较正常组升高,这与 Fu 等^[9]发现 IL-18 在睡眠剥夺小鼠中较对照组显著升高这一结果有一定的吻合;本研究通过比较大鼠脑组织中炎症因子 IL-4 及 IL-18 的表达差异,发现肾不藏志不寐大鼠脑组织中 IL-4 表达量降低,IL-18 表达量升高,此炎症反应的失衡提示失眠可能与脑内中枢神经系统的炎症损伤密切相关;制远志低剂量组、制远志高剂量组及艾司唑仑组可不同程度升高肾不藏志不寐大鼠脑组织 IL-4 表达水平,抑制 IL-18 表达水平,表明安肾志药物制远志治疗肾不藏志不寐的机制可能与调节脑内炎症相关因子 IL-4 和 IL-18 表达有关。

综上所述,制远志能够显著改善肾不藏志不寐大鼠的睡眠及学习记忆能力,并减轻肾不藏志不寐大鼠的神经元细胞炎症损伤状态,其改善肾不藏志不寐大鼠的睡眠机制可能与升高脑组织中 IL-4、降低 IL-18 表达水平有关。

参考文献:

- [1] 中国睡眠研究会. 中国失眠症诊断和治疗指南[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(24): 1844-1855.
- [2] 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[J]. 世界睡眠医学杂志, 2016, 3(1): 8-25.
- [3] 李践一, 杨海燕, 王海荣. 上海某社区老年慢性失眠患者睡眠质量与家庭关联因素分析研究[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(19): 2854-2857.
- [4] RIEMANN D, BENZ F, DRESSLE R J, et al. Insomnia disorder: State of the science and challenges for the future[J]. J Sleep Res, 2022, 31(4): e13604.
- [5] 张星平, 朱奇, 梁政亭, 等. 依据单一症状的中医不寐病位诊断及价值[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1666-1668.
- [6] 韩晗, 张智华, 曹秋实, 等. 远志的药用分析[J]. 中医药导报, 2018, 24(24): 127-129.
- [7] MANCHANDA S, SINGH H, KAUR T, et al. Low-grade neuroinflammation due to chronic sleep deprivation results in anxiety and learning and memory impairments[J]. Mol Cell Biochem, 2018, 449(1/2): 63-72.
- [8] BELALI R, MARD S A, KHOSHNAMEH S E, et al. Anandamide attenua-

- tes neurobehavioral deficits and EEG irregularities in the chronic sleep deprivation rats; the role of oxidative stress and neuroinflammation[J]. *Neurochem Res*, 2024, 49(6):1541–1555.
- [9] FU X Y, YAN S Y, HU Z R, et al. Guhan Yangsheng Jing mitigates hippocampal neuronal pyroptotic injury and manifests learning and memory capabilities in sleep deprived mice via the NLRP3/Caspase1/GSDMD signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 326: 117972.
- [10] 任小娟, 张星平, 王庆全, 等. D-半乳糖联合对氯苯丙氨酸致肾不藏志不寐大鼠下丘脑神经递质和凋亡基因的实验研究[J]. *中医药学报*, 2020, 48(4):9–13.
- [11] 李仪奎. *中药药理实验方法学*[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006:1063–1064.
- [12] JIA H L, CHEN X, LIANG Z T, et al. Senegenin regulates the mechanism of insomnia through the Keap1/Nrf2/PINK1/Parkin pathway mediated by GAD67[J]. *J Sleep Res*, 2025, 34(3):e14354.
- [13] RIEMANN D, BAGLIONI C, BASSETTI C, et al. European guideline for the diagnosis and treatment of insomnia[J]. *J Sleep Res*, 2017, 26(6):675–700.
- [14] 陈旭, 张星平, 侯文, 等. 24690例不寐病患者临床症状表现特征分布的多中心横断面研究[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(5):2377–2381.
- [15] 张星平, 徐争光, 陈俊逾, 等. 肾不藏志不寐当议[J]. *中医药学报*, 2014, 42(6):1–3.
- [16] 刘艳丽, 梁小裕, 周妍妍. 细叶远志皂苷通过 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞损伤对氧化应激及炎症因子的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2022, 49(7):140–143.
- [17] WANG Z Y, WU D, HU X Y, et al. WuYou decoction effectively reduces neuronal damage, synaptic dysfunction, and $A\beta$ production in rats exposed to chronic sleep deprivation by modulating the $A\beta$ -related enzymes and SIRT1/Nrf2/NF- κ B pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337:118939.
- [18] IRWIN M R, OPP M R. Sleep health: reciprocal regulation of sleep and innate immunity[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(1):129–155.

Study on the Differential Expression of IL-4 and IL-18 in the Brain Tissue of Insomnia Model Rats with ‘Kidney Failing to Store Willpower’ Treated with the Processed Polygala tenuifolia

HU Yanling¹, ZHANG Xingping¹, JIA Honglin¹, WU Jinhong¹, LIANG Ruining², CHEN Xu¹,
LI Zhenhui¹, LI Haiming¹, CUI Wenjun¹, ZUO Guangke¹

1. The Fourth Clinical College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830099, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China

Abstract Objective: To investigate the difference of expression levels of IL-4 and IL-18 in the brain tissue of insomnia model rats with ‘kidney failing to store willpower’ Treated with the *Processed Polygala tenuifolia*. Methods: A total of 40 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, Esazolam group, Processed Polygala tenuifolia low-dose group and Processed Polygala tenuifolia high-dose group with 8 rats in each group. D-galactose (D-gal) combined with p-chlorophenylalanine (PCPA) was used to prepare the rats with ‘kidney failing to store willpower’. After successful modeling, the western medicine group was given Esazolam 0.2mg/kg/d by gavage, and the low dose Chinese medicine group was given Processed Polygala tenuifolia 2.1g/kg/d by gavage, the high dose group was given 4.2g/kg/d gavage, and the normal group and model group were given equal volume normal saline gavage for 7 days. Morris water maze test was used to evaluate the learning and memory ability of rats. HE and Nissl staining were used to observe the cell morphology and structure of rat brain. The expression levels of IL-4 and IL-18 in rat brain were detected by IHC and Western blot. Results: Compared with normal group, incubation period and total motor distance of rats in model group were significantly increased ($P < 0.01$), the percentage of exploration time in the target quadrant was significantly reduced ($P < 0.01$). The neuronal nucleus was dislocated, the nucleolus was enlarged, the inflammatory cells were infiltrated, and the number of nissl was significantly decreased ($P < 0.01$). The intercellular spaces of neuron cells are widened, and the synaptic structure is incomplete, and the expression level of IL-4 was significantly decreased ($P < 0.01$), the expression level of IL-18 was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, latency and total distance of movement of rats in low dose group and high dose group were significantly decreased ($P < 0.01$), the percentage of exploration time in the target quadrant significantly increased ($P < 0.01$). The neuronal damage and inflammatory cell infiltration were alleviated to varying degrees, and the number of nissl was increased to varying degrees ($P < 0.01$). The morphology and structure of neuronal nucleosomes were improved to varying degrees, and the expression level of IL-4 was significantly increased ($P < 0.01$), the expression level of IL-18 was significantly decreased ($P < 0.01$). Conclusion: The Processed Polygala tenuifolia can significantly improve the sleep, learning and memory ability of insomnia model rats with ‘kidney failing to store willpower’, and alleviate the inflammatory damage state of the neurons in rats with ‘kidney failing to store willpower’. The mechanism of improving the sleep of the rats with insomnia model rats with ‘kidney failing to store willpower’ may be related to the increase of IL-4 and the decrease of IL-18 expression level in the brain tissue.

Key words Processed polygala tenuifolia; Kidney failing to store willpower; Insomnia; IL-4; IL-18