

# 酸枣仁汤对老年慢性快动眼睡眠剥夺模型大鼠中枢下丘脑 线粒体损伤及细胞凋亡的影响

杨志旻, 刘鑫, 游秋云, 张舜波\*  
(湖北中医药大学, 武汉 430065)

**[摘要]** 目的:探讨酸枣仁汤对线粒体介导的神经细胞凋亡的影响。方法:将50只雄性Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、舒乐安定组(0.18 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),酸枣仁汤低、高剂量组(6.48, 12.96 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),除正常组外,其余各组均皮下注射D-半乳糖,于末次给药后进行多平台水环境睡眠剥夺,造模结束后各组开始灌胃给药,连续给药7 d。采用透射电镜观察中枢下丘脑线粒体形态,采用分光光度法检测检测中枢下丘脑中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-三磷酸腺苷(ATP)酶, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP酶活性,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测中枢下丘脑细胞色素C(Cyt C), B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)蛋白表达水平的改变。结果:正常组线粒体未见明显病理改变,大小适中,形态多呈椭圆或梭形,嵴排列较整齐。与正常组比较,模型组线粒体形态异常,线粒体发生明显肿胀并且伴有空泡化,出现了“髓鞘样”,嵴发生断裂且数量减少;与模型组比较,舒乐安定组、酸枣仁汤高剂量组线粒体损伤减轻,空泡化现象减少,部分嵴断裂,并未出现明显肿胀,其中酸枣仁汤高剂量组改善较为明显。与正常组比较,模型组Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP酶活性显著降低(P<0.01), Bcl-2蛋白表达水平显著降低(P<0.01), Cyt C, Bax, Caspase-3蛋白表达水平显著升高(P<0.01);与模型组比较,舒乐安定组、酸枣仁汤高剂量组Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP酶活性均显著升高(P<0.01),舒乐安定组、酸枣仁汤高剂量组Bcl-2蛋白表达水平显著升高(P<0.01), Cyt C, Bax, Caspase-3蛋白表达水平明显降低(P<0.05, P<0.01),酸枣仁汤低剂量组Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性显著升高(P<0.01), Bcl-2蛋白表达水平明显升高(P<0.05), Bax蛋白表达水平明显降低(P<0.05)。结论:酸枣仁汤可以改善下丘脑神经细胞线粒体功能,抑制神经细胞凋亡。

**[关键词]** 酸枣仁汤; 睡眠剥夺; 透射电镜; 能量代谢

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)16-0047-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211304

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210520.1257.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-05-20 13:22

## Effect of Suanzaoren Tang on Mitochondrial Damage and Apoptosis in Hypothalamus of Elderly Rats with Chronic Rapid Eye Movement Sleep Deprivation

YANG Min-min, LIU Xin, YOU Qiu-yun, ZHANG Shun-bo\*  
(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Suanzaoren Tang on mitochondria-mediated neuronal apoptosis. **Method:** Fifty male Wistar rats were randomly divided into the control group, model group, estazolam group (0.18 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and low- (6.48 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and high-dose (12.96 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) Suanzaoren Tang groups. Rats in all groups except for the control group received subcutaneous injection of D-galactose and then were deprived of sleep using the multiple platform method after the last administration. Following successful modeling, the rats in each group were treated with intragastric administration of the corresponding drugs for seven consecutive days. The morphology of mitochondria in hypothalamus was observed under a transmission

**[收稿日期]** 20210216(010)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473560)

**[第一作者]** 杨志旻,在读硕士,从事药理学相关研究, E-mail:2794215262@qq.com

**[通信作者]** \*张舜波,讲师,从事中药学研究和新药开发, E-mail:693757317@qq.com

electron microscope. The activities of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  in hypothalamus were detected by spectrophotometry. Western blotting was conducted to determine the protein expression levels of cytochrome C (Cyt C), B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and cysteinyl aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) in hypothalamus. **Result:** In the control group, there was no obvious pathological change in mitochondria, which were moderate in size and oval or spindle in shape, with the cristae arranged orderly. Compared with the control group, the model group exhibited abnormal mitochondrial morphology, manifested as obvious swelling, vacuolation, myelin figures, and cristae rupture and reduction. The comparison with the model group revealed that both the estazolam group and high-dose Suanzaoren Tang group alleviated the mitochondrial damage and reduced the vacuolation and swelling. Only some cristae rupture was present. The improvements were more obvious in the high-dose Suanzaoren Tang group. Compared with the control group, the activities of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  and the Bcl-2 protein expression in the model group were significantly decreased ( $P<0.01$ ), whereas the protein expression levels of Cyt C, Bax, and Caspase-3 were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the activities of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  and the Bcl-2 protein expression in the estazolam group and the high-dose Suanzaoren Tang group were significantly elevated ( $P<0.01$ ), while the protein expression levels of Cyt C, Bax, and Caspase-3 were significantly lowered ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and the Bcl-2 protein expression in the low-dose Suanzaoren Tang group were increased significantly ( $P<0.01$ ), but the Bax protein expression was down-regulated ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Suanzaoren Tang is able to improve the mitochondrial function of hypothalamic nerve cells and inhibit their apoptosis.

**[Keywords]** Suanzaoren Tang; sleep deprivation; transmission electron microscope; energy metabolism

随着社会的进步与经济的发展,人们的生活方式发生了改变,夜班次数增加及照明时间延长等,这些都使睡眠剥夺的发生成为常态化<sup>[1-3]</sup>。随着年龄的增长,中枢神经系统会发生退行性改变,睡眠剥夺在老年人群中更容易发生。研究表明,睡眠剥夺与能量代谢具有一定的相关性,睡眠剥夺可以引发线粒体机制异常,进而导致病理反应的发生<sup>[4]</sup>。但是睡眠剥夺与下丘脑细胞线粒体机制相关研究较少。

酸枣仁汤出自《金匱要略》,由酸枣仁、知母、茯苓、川芎、甘草组成,具有养血滋阴、宁心安神的功效<sup>[5-6]</sup>。团队前期研究发现,酸枣仁汤可以对老年失眠大鼠模型起到促眠作用及发挥脑保护作用<sup>[7-8]</sup>。在此基础上,本实验采用酸枣仁汤对注射D-半乳糖以及慢性睡眠剥夺的Wistar大鼠进行干预,观察酸枣仁汤对下丘脑线粒体结构, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-三磷酸腺苷(ATP)}$ , $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP酶}$ 活性,以及凋亡相关指标的影响,从线粒体能量代谢方面探讨酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺诱导的下丘脑神经细胞损伤的保护作用及其机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 2月龄SPF级Wistar大鼠,体质量180~

220 g,均购于辽宁长生生物技术股份有限公司,合格证号SCXK(辽)2015-0001。实验动物均自由摄食、饮水,饲料和垫料均已灭菌,所在房间温度为23~26℃,相对湿度为50%~70%,内设有独立通风系统。本实验获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准,严格执行伦理委员会要求,伦理审批号为202011010。

**1.2 药物与试剂** 酸枣仁汤由酸枣仁30 g,知母12 g,茯苓12 g,川芎12 g,甘草6 g组成,购于湖北中医药大学附属医院药房,经湖北中医药大学药学院丁莉副教授鉴定符合用药标准。将上述所有药材浸泡30 min后,分别加10, 8, 6倍药材量的水,武火煎煮15 min,文火煎煮20 min,滤出药渣,合并3次所得滤液,之后用旋转蒸发器将药液浓缩成生药质量浓度为0.648 g·mL<sup>-1</sup>,置4℃冰箱保存备用;舒乐安定片(山东信谊制药有限公司,批号H37023047)由湖北中医药大学附属医院购得;D-半乳糖(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号E1927035);ATP酶测试盒(南京建成生物工程研究所,批号A016-2-2);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔,电镜固定液,RIPA裂解液,蛋白Marker,十二烷基苯磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒

(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB23303,G1102,G2002,26617,G2703);细胞色素C(Cyt C)兔源抗体,半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)兔源抗体,B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)鼠源抗体,Bcl-2相关X蛋白(Bax)鼠源抗体(武汉亚可因生物技术有限公司,批号分别为ABP57598,ABP0135,ABM0010,ABM0074);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)鼠源抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号60004-1-LG)。

**1.3 仪器** 自制睡眠剥夺箱,LDZX-50KBS型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械有限公司);E100型显微镜(日本Nikon公司);1580R型多用途高速冷冻离心机(中国GENE有限公司);BV-2型垂直电泳仪,BT-2型转印电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);UA-1800型紫外分光光度计(上海翊艺仪器有限公司);Epoch型酶标仪(美国BioTek有限公司);HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药** 将50只雄性Wistar大鼠,随机分为5组,分别为正常组、模型组、舒乐安定组、酸枣仁汤高、低剂量组,每组10只,除正常组外,其余各组均皮下注射D-半乳糖,各组大鼠按 $0.125\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量给药,给药容量均为 $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每日1次,连续40 d,于末次给药结束后进行多平台水环境慢性睡眠剥夺,每天剥夺18 h,连续剥夺21 d<sup>[9-12]</sup>。造模结束后,根据人和大鼠按体表面积折算的等效剂量,舒乐安定组大鼠按 $0.18\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量给药,酸枣仁汤高、低剂量组分别按等效剂量2,1倍换算为 $12.96,6.48\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 给药,给药容量均为 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每日1次,连续7 d,正常组、模型组给予等体积的生理盐水。

**2.2 动物取材** 自主活动检测结束后,用10%水合氯醛 $0.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量进行腹腔注射,将大鼠麻醉,用剪刀迅速断头。将大鼠头部置于冰袋上被生理盐水浸湿的滤纸上,剪开大鼠头部皮毛,暴露出头骨,沿枕骨大孔剪开颅骨,小心剥离脑壳,迅速取出大鼠大脑,分离出完整的下丘脑组织,将其立即放入准备好的冻存管中,然后用液氮急冻,待取完各组大鼠下丘脑后,将各组冻存管分装保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。

**2.3 透射电镜观察大鼠中枢下丘脑超微结构**  
将大鼠下丘脑取出后立即投入装有电镜固定液的培养皿内,用手术刀在培养皿的固定液中进行切

割成 $1\text{ mm}^3$ 的小组织块。再将切割好的小组织块转移至装有新的电镜固定液的离心管内继续固定,之后乙醇脱水、树脂包埋、超薄切片、最后铅铀染色后电镜观察分析。

**2.4 分光光度法检测检测中枢下丘脑中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ , $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性** 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出下丘脑,称质量,并用眼科剪将下丘脑组织剪碎,加入9倍体积的生理盐水,冰水浴条件下,机械匀浆,制备成10%的匀浆液, $2\ 500\sim 3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心10 min(离心半径10 cm,下同),取上清液,按照ATP酶试剂盒说明书进行测定。

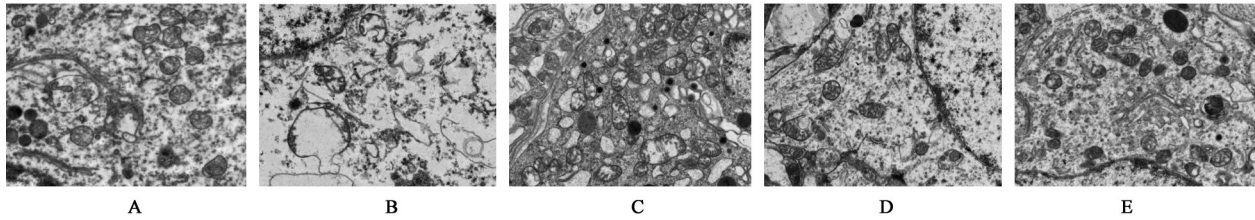
**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠下丘脑Cyt C, Bcl-2, Bax, Caspase-3蛋白表达水平** 取下丘脑组织,采用RIPA裂解液于冰上提取蛋白, $12\text{ 万}\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清。按照SDS-PAGE试剂盒制备凝胶,之后上样,电泳,最后转PVDF膜;室温下转至含5%脱脂牛奶封闭1 h, TBST洗膜3次;加入一抗Cyt C, Bcl-2, Bax及Caspase-3(1:1 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST洗膜3次,加入二抗(1:5 000),室温孵育1 h;TBST洗膜3次,向条带滴加发光液,置成像仪下使条带可视化,应用Image Pro Plus软件读取各条带灰度值。

**2.6 统计学处理** 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学处理,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,方差齐性时,组间比较采用最小显著性差异法(LSD)法,方差不齐时,组间比较采用Tamhane's T2法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对老年慢性睡眠剥夺大鼠下丘脑超微结构的影响** 正常组线粒体未见明显病理改变,大小适中,形态多呈椭圆或梭形,嵴排列较整齐。与正常组比较,模型组线粒体形态异常,线粒体发生明显肿胀并且伴有空泡化,出现了“髓鞘样”改变,嵴发生断裂且数量减少;与模型组比较,舒乐安定组、酸枣仁汤高剂量组线粒体损伤减轻,空泡化现象减少,部分嵴断裂,并未出现明显肿胀,其中酸枣仁汤高剂量组改善较为明显。见图1。

**3.2 对老年慢性睡眠剥夺大鼠下丘脑 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ , $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性的影响** 与正常组比较,模型组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ , $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,舒乐安定组、酸枣仁汤高剂量组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ , $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性均显著升高( $P<0.01$ ),酸枣仁汤低剂量组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性显著升高( $P<0.01$ )。见表1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 舒乐安定组; D. 酸枣仁汤低剂量组; E. 酸枣仁汤高剂量组(图2同)

图1 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠下丘脑线粒体形态的影响(电镜扫描, ×5 000)

Fig. 1 Effect of Suanzaoren Tang on morphology of hypothalamic mitochondria of rats in chronic sleep deprivation of older adults (CSDO)(SEM, ×5 000)

表1 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠下丘脑 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP酶活性的影响(̄x±s, n=6)

Table 1 Effect of Suanzaoren Tang on activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase in hypothalamus of rats in CSDO (̄x±s, n=6)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP酶	Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> -ATP酶
正常		6.78±0.19	5.02±0.15
模型		3.69±0.23 <sup>2)</sup>	2.19±0.09 <sup>2)</sup>
舒乐安定	1.8×10 <sup>-4</sup>	5.65±0.14 <sup>4)</sup>	3.53±0.20 <sup>4)</sup>
酸枣仁汤	6.48	5.85±0.14 <sup>4)</sup>	2.32±0.18
	12.96	6.62±0.37 <sup>4)</sup>	3.58±0.11 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01(表2同)。

3.3 对老年慢性睡眠剥夺大鼠下丘脑 Cyt C, Bcl-2, Bax 及 Caspase-3 蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低(P<0.01), Cyt C, Bax, Caspase-3 蛋白表达水平显著升高(P<0.01);与模型组比较,舒乐安定组、酸枣仁汤

高剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高(P<0.01), Cyt C, Bax, Caspase-3 蛋白表达水平明显降低(P<0.05, P<0.01),酸枣仁汤低剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高(P<0.05), Bax 蛋白表达水平明显降低(P<0.05)。见表2,图2。

表2 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠下丘脑 Cyt C, Bcl-2, Bax 及 Caspase-3 蛋白表达水平的影响(̄x±s, n=3)

Table 2 Effect of Suanzaoren Tang on Cyt C, Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein expression in hypothalamus of rats in CSDO (̄x±s, n=3)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Cyt C/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
正常		0.59±0.06	1.17±0.14	0.20±0.18	0.66±0.18
模型		1.21±0.30 <sup>2)</sup>	0.55±0.08 <sup>2)</sup>	0.95±0.16 <sup>2)</sup>	1.31±0.35 <sup>2)</sup>
舒乐安定	1.8×10 <sup>-4</sup>	0.83±0.22 <sup>3)</sup>	0.95±0.15 <sup>4)</sup>	0.41±0.05 <sup>4)</sup>	0.82±0.20 <sup>3)</sup>
酸枣仁汤	6.48	0.96±0.12	0.79±0.10 <sup>3)</sup>	0.69±0.09 <sup>3)</sup>	1.15±0.12
	12.96	0.65±0.11 <sup>4)</sup>	0.90±0.14 <sup>4)</sup>	0.55±0.07 <sup>4)</sup>	0.74±0.09 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

线粒体是机体细胞进行氧化磷酸化并产生ATP的场所。研究表明,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP酶是细胞膜及细胞器生物膜上的重要蛋白酶,在物质转运、信息传递、能量代谢等多方面发挥着重要作用<sup>[13]</sup>。因此,其酶的活性高低可以反映细胞代谢是否紊乱。Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶具有水解ATP的功能,在维持细胞内外离子梯度差,维护细胞稳态方面具有重要意义<sup>[14]</sup>。Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP酶在维持细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度稳定方面起到重要的作用<sup>[11]</sup>。在脑神经组织中,神经细胞最易受到线粒体功能障碍的影响。研究

指出,当Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP酶活性下降时会导致细胞内Na<sup>+</sup>浓度升高,这会使线粒体水钠滞留增加,线粒体发生肿胀<sup>[15-16]</sup>,同时Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交换,致细胞内Ca<sup>2+</sup>超载,损伤线粒体功能,增加线粒体中氧自由基含量<sup>[17]</sup>。这些最终都会使能量合成发生障碍,引起神经细胞损伤。

同时,线粒体也是细胞凋亡的中心。当细胞受到各种刺激因子作用时,会导致线粒体膜电位稳态被破坏、通透性增加,线粒体膜内的促凋亡因子释放到胞质,激活细胞线粒体凋亡途径,引起细胞死亡<sup>[18-19]</sup>。线粒体中Cyt C就是促凋亡因子<sup>[20]</sup>,其释放

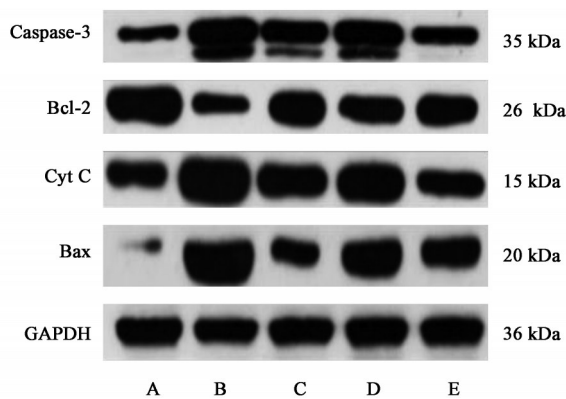


图2 各组大鼠下丘脑 Cyt C, Bcl-2, Bax 及 Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Cyt C, Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein expression in hypothalamus of rats in each group

主要受 Bcl-2 蛋白家族调控,具体机制是在凋亡信号刺激下, Bcl-2 作为细胞凋亡抑制基因,可抑制 Cyt C 从线粒体释放到胞质,而细胞凋亡促进基因 Bax 会从胞质转移到线粒体膜上,通过改变线粒体通透性、破坏氧化磷酸化和 ATP 的合成功能,使线粒体释放 Cyt C<sup>[21-22]</sup>,释放的 Cyt C 结合凋亡相关因子 1(Apaf-1)和 Caspase-9 形成“凋亡体”,进而激活 Caspase-3 最终引起细胞凋亡<sup>[22-24]</sup>。

本实验研究发现, D-半乳糖以及多平台水环境慢性睡眠剥夺联合诱导的老年慢性睡眠剥夺模型大鼠中枢下丘脑神经细胞线粒体受损,这可能是 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性下降引起的,同时 Cyt C, Bax, Caspase-3 蛋白表达水平显著升高, Bcl-2 蛋白表达水平显著降低,这意味着下丘脑神经细胞发生凋亡,而在给予酸枣仁汤干预后,模型大鼠中枢下丘脑神经细胞线粒体受损情况得到改善, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性显著提高,并且 Cyt C, Bax, Caspase-3 蛋白表达水平显著降低, Bcl-2 蛋白表达水平显著升高。

综上所述,酸枣仁汤可以改善 D-半乳糖以及多平台水环境慢性睡眠剥夺联合诱导的大鼠中枢下丘脑神经细胞线粒体功能,抑制神经细胞的凋亡。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[ 1 ] APPLETON S, GILL T, LANG C, et al. Prevalence and comorbidity of sleep conditions in Australian adults: 2016 Sleep Health Foundation national survey [J]. Sleep Health, 2018, 4(1): 13-19.  
[ 2 ] KUWAHARA K, IMAI T, MIYAMOTO T, et al. Sleep duration modifies the association of overtime work

with risk of developing type 2 diabetes: Japan epidemiology collaboration on occupational health study[J]. J Epidemiol, 2018, 28(7): 336-340.  
[ 3 ] WHEATON A, JONES S, COOPER A, et al. Short sleep duration among middle school and high school students-united states 2015 [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2018, 67(3): 85-90.  
[ 4 ] 黄晓宇,谢光璟,黄攀攀. 天王补心丹加减干预睡眠剥夺大鼠能量代谢机制的生物信息学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 172-180.  
[ 5 ] 吴东南,丁瑞丛,纪可,等. 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺大鼠学习记忆及 TLR4/NF-κB 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 18-24.  
[ 6 ] 王玉,杨雪,夏鹏飞,等. 酸枣仁汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2765-2771.  
[ 7 ] 张舜波,王平,田代志,等. 酸枣仁总皂苷对失眠老年大鼠脑氨基酸类神经递质及受体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 124-127.  
[ 8 ] 张如意,游秋云,王平,等. 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺老年失眠大鼠视交叉上核 c-fos 及 nNos 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(10): 2211-2213, 2243.  
[ 9 ] 张如意. 酸枣仁汤对基于 5HTR 调控老年失眠 SCN 及 VLPO 系统的作用及机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.  
[ 10 ] 张如意,游秋云,王平,等. 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺老年失眠大鼠心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl2、Bax 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1691-1693.  
[ 11 ] 赵凡凡,周玉枝,高丽,等. D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展[J]. 药学报, 2017, 52(3): 347-354.  
[ 12 ] 徐智,吴国明,钱桂生,等. 大鼠衰老模型的初步建立[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(4): 312-315.  
[ 13 ] 宾东华,何清湖,韩忠,等. 知柏地黄汤对解脲脲原体感染模型大鼠精子线粒体 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶及 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1528-1531.  
[ 14 ] 范颖,李楠,孙云峰,等. 黄芪有效部位对糖尿病大鼠 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性及 AMPK 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(10): 2660-2663.  
[ 15 ] 苑春元,周华,戎靖枫,等. 补心方对慢性心衰大鼠心肌 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶、Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶及琥珀酸脱氢酶的作用研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1374-1376.  
[ 16 ] 翟艺宗,黄昌林,常祺,等. 中频脉冲电流经皮刺激肝区对运动性疲劳大鼠肝细胞线粒体 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶及 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性的影响[J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(4): 327-330.

- [17] 徐炜棉,郭金莲,王燕琴,等. 苦参碱对阿霉素所致H9c2心肌细胞损伤的保护作用及与线粒体Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP酶关系的研究[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(9):941-944.
- [18] 李帅,张炳东. 细胞凋亡途径的研究进展[J]. 山东医药,2017,57(37):103-106.
- [19] MAURYA S R, MAHALAKSHMI R. Mitochondrial VDAC2 and cell homeostasis: highlighting hidden structural features and unique functionalities[J]. Biol Rev Camb Philos Soc,2017,92(4):1843-1858.
- [20] YANG Y Y, YU Y B, WANG J H, et al. Silica nanoparticles induced intrinsic apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells via Cyt C/Apaf-1 pathway[J]. Environ Toxicol Phar,2017,52:161-169.
- [21] OLTERS DORF T, ELMORE S W, SHOEMAKER A R, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours [J]. Nature, 2005, 435 (7042):677-681.
- [22] 汪枫,喻小兰,夏纪毅,等. 黄芩素、LY294002对人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 山东医药,2016,56(41):1-5.
- [23] LUO J, YU L, XIE G, et al. Study on the mitochondrial apoptosis pathways of small cell lung cancer H446 cells induced by *Trichinella spiralis* muscle larvae ESPs[J]. Parasitology,2017,144(6):1-8.
- [24] JIANG W, CHEN Y, LI B, et al. DBA-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through mitochondrial translocation of Cyt-c in rat hippocampus [J]. Mol Bio Syst, 2017, 13(9):1863-1873.

[责任编辑 周冰冰]