

## · 酸枣仁汤治疗老年慢性睡眠剥夺大鼠的研究专题 ·

[编者按] 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,照明时间的延长及夜班次数的增加等都致使睡眠剥夺的发生常态化。随着年龄的增长,中枢神经系统会发生退行性改变,因此,睡眠剥夺在老年人群中更容易发生。长期的睡眠剥夺会引起能量代谢的异常。本课题组临床实践发现,血亏阴虚是老年失眠的中医常见证型,对于老年血亏阴虚型失眠,治宜养血安神、滋阴清热、引卫入阴,酸枣仁汤为该治法的经典代表方剂;同时,前期研究结果证实,下丘脑视交叉上核(SCN)系统功能的降低,能明显造成老年慢性失眠昼夜节律紊乱,而酸枣仁汤可通过调控睡眠昼夜节律来改善睡眠及脑损伤。基于此,本课题组从能量代谢角度,采用PCR和Western blot等技术对酸枣仁汤的药理作用机制进行研究,探索老年失眠模型中枢SCN系统昼夜节律与不同部位(脑、心、肝)组织细胞线粒体能量代谢的关系,阐明中医病机“肝血不足,阴虚内扰”造成心烦不寐的科学内涵,探索“养血滋阴安神”治法代表方酸枣仁汤对昼夜节律及能量代谢的并联调控机制,丰富和发展中医不寐及其治则治法理论。

# 酸枣仁汤对老年慢性快动眼睡眠剥夺模型大鼠心肌线粒体能量代谢的影响

刘鑫, 王平, 丁莉, 张舜波, 石坤, 杨恣旻, 游秋云\*  
(湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] 目的:从去乙酰化酶沉默信息调节因子3(SIRT3)/超氧化物歧化酶2(SOD2)信号通路研究酸枣仁汤对老年慢性快动眼睡眠剥夺模型大鼠心肌线粒体能量代谢的作用机制。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。采用透射电镜观察心脏线粒体形态,采用比色法检测大鼠下丘脑三磷酸腺苷(ATP)含量的变化,采用分光光度法检测大鼠心肌丙二醛(MDA)含量,SOD活性,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠心肌SIRT3,SOD2 mRNA和蛋白表达水平,采用免疫荧光染色法检测心肌SIRT3的定位表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠心肌组织肌丝排列紊乱,伴有肌丝断裂与溶解,线粒体肿胀明显,线粒体排列紊乱,多数线粒体嵴模糊甚至断裂,心肌ATP含量和SOD活性显著降低( $P<0.01$ ),MDA含量显著升高( $P<0.01$ ),SIRT3,SOD2 mRNA和蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),SIRT3蛋白平均荧光强度显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,酸枣仁汤高剂量组肌丝排列较整齐,线粒体损伤减轻,仅见部分嵴断裂,肿胀程度亦相对较轻,大鼠心肌ATP含量和SOD活性显著升高( $P<0.01$ ),MDA含量显著降低( $P<0.01$ ),SIRT3,SOD2 mRNA和蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ),SIRT3蛋白平均荧光强度明显升高( $P<0.05$ ),舒乐安定组心肌线粒体损伤也具有一定的改善作用,大鼠心肌SOD活性显著升高( $P<0.01$ ),MDA含量显著降低( $P<0.01$ ),SIRT3,SOD2 mRNA和蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );酸枣仁汤低剂量组心肌线粒体损伤改善作用不明显,但大鼠心肌SOD活性显著升高( $P<0.01$ ),SOD2蛋白表达明显升高( $P<0.05$ )。结论:酸枣仁汤可以改善老年慢性快动眼睡眠剥夺诱导的心肌线粒体所伤以及能量代谢异常,其机制可能与上调SIRT3,SOD2表达增加有关。

[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;R284;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)16-0040-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211206

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210423.1437.003.html>

[网络出版日期] 2021-04-23 15:40

[收稿日期] 20210216(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473560)

[第一作者] 刘鑫,在读硕士,从事治疗失眠相关的中药药理学研究,E-mail:741248163@qq.com

[通信作者] \*游秋云,教授,博士生导师,从事治疗失眠等疾病的神经精神类相关中药药理学研究,E-mail:youqiuyun@126.com

## Effect of Suanzaoren Tang on Energy Metabolism of Myocardial Mitochondria in Aged Rats with Chronic Rapid Eye Movement Sleep Deprivation

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

**[Abstract]** **Objective:** To study the mechanism of Suanzaoren Tang in regulating the energy metabolism of myocardial mitochondria in aged rats with chronic rapid eye movement (REM) sleep deprivation through the sirtuin 3 (SIRT3)/superoxide dismutase2 (SOD2) signaling pathway. **Method:** Fifty male Wistar rats were randomly divided into the control group, model group, estazolam group ( $0.18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), and low- ( $6.48 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and high-dose ( $12.96 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 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 myocardial mitochondria was observed under a transmission electron microscope. The content of adenosine triphosphate (ATP) in rat hypothalamus was detected by colorimetry, while the malondialdehyde (MDA) content and the SOD activity in myocardium were measured by spectrophotometry. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were conducted to determine the mRNA and protein expression levels of SIRT3 and SOD2 in rat myocardium. The localization of SIRT3 was detected by immunofluorescence staining. **Result:** Compared with the control group, the model group exhibited a disordered arrangement of myocardial filaments, accompanied by filament rupture and dissolution, obviously swollen mitochondria arranged in disorder, and blurring and even rupture of most mitochondrial cristae. Besides, the content of ATP and SOD activity in the myocardium decreased significantly ( $P<0.01$ ), whereas that of MDA increased significantly ( $P<0.01$ ). The mRNA and protein expression levels of SIRT3 and SOD2 were down-regulated significantly ( $P<0.01$ ), and the average fluorescence intensity of SIRT3 protein declined significantly ( $P<0.01$ ). The comparison with the model group revealed that high-dose Suanzaoren Tang enabled the myocardial filaments to be neatly arranged, relieved the mitochondrial damage and swelling, only manifested as partial mitochondrial cristae rupture, significantly increased ATP content, SOD activity, as well as SIRT3 and SOD2 mRNA and protein expression levels ( $P<0.01$ ), reduced the content of MDA ( $P<0.01$ ), and enhanced the average fluorescence intensity of SIRT3 protein ( $P<0.05$ ). The myocardial mitochondrial injury in the estazolam group was also alleviated. The activity of SOD and the SIRT3 and SOD2 mRNA and protein expression levels in the myocardium were significantly elevated ( $P<0.01$ ), while the activity of MDA was significantly lowered ( $P<0.01$ ). In the low-dose Suanzaoren Tang group, the improvement in myocardial mitochondrial injury was not obvious. However, both the SOD activity and SOD2 protein expression were significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Suanzaoren Tang ameliorates the myocardial mitochondria injury and abnormal energy metabolism induced by chronic REM sleep deprivation in aged rats possibly by up-regulating the SIRT3 and SOD2 expression.

**[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,在某些职业或人群中,睡眠剥夺不可避免<sup>[1-3]</sup>。老年人因中枢神经系统会发生退行性

改变,更容易发生睡眠剥夺。有研究表明,我国失眠症平均发病率为38.2%,而在年龄>65岁老年群体中,失眠症发病率高达57%<sup>[4]</sup>。长期睡眠剥夺会使

心肌缺血缺氧,并且随着时间的延长会加重<sup>[5-6]</sup>。心脏作为人体血液循环动力的中心,具有高耗能的特点,当供血、供氧无法满足心肌能量所需,能量代谢就会发生异常,影响心肌发挥正常功能<sup>[7]</sup>。

酸枣仁汤出自《金匱要略》,具有养血滋阴、宁心安神的功效<sup>[8]</sup>。团队前期研究发现,酸枣仁汤可以改善老年慢性睡眠剥夺模型大鼠心肌凋亡<sup>[9]</sup>,在此基础上,本实验采用酸枣仁汤对注射D-半乳糖及慢性睡眠剥夺的Wistar大鼠进行干预,观察酸枣仁汤对心肌线粒体结构,三磷酸腺苷(ATP)含量,丙二醛(MDA)含量,超氧化物歧化酶(SOD)活性,以及去乙酰化酶沉默信息调节因子3(SIRT3),SOD2 mRNA和蛋白表达的影响,以此来研究酸枣仁汤对老年慢性快动眼睡眠剥夺模型大鼠心肌线粒体能量代谢的影响。

## 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。实验动物均饲养在湖北中医药大学老年医学研究所,所有动物均自由摄食、饮水,饲料和垫料均经紫外线照射灭菌,饲养房间温度23~26℃,相对湿度50%~70%,房间设置独立通风系统。本实验获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准,严格执行实验伦理委员会要求,伦理审批号为202011010。

**1.2 药物与试剂** 参考本课题组前期药物剂量<sup>[10]</sup>,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。加8倍药材量的水,将上述所有药材浸泡30 min后,加热煮开后武火煎煮40 min,趁热过滤,再加6倍药材量的水,加热煮开后文火煎煮30 min,滤出药渣,合并2次所得滤液,之后用旋转蒸发仪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<sup>[11]</sup>。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试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号E-BC-K157-S);MDA,SOD测试盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A003-1,A001-1);二甲苯,3%双氧水,三氯甲烷,异丙醇,无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为10023418,10011208,10006818,80109218,10009218);trizol RNA提取试剂(美国赛

默飞世尔科技公司,批号223306);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);SOD2兔源抗体(武汉亚可因生物技术有限公司,批号ABP57241);逆转录试剂盒,2×Mix实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒,SIRT3兔源抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗,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G3330,G3322,GB11354,GB23303,G2703);SIRT3,SOD2引物序列均由武汉赛维尔生物科技有限公司合成并经质量检测,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
GADPH	上游 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'	138
	下游 5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-3'	
SIRT3	上游 5'-TCTGGTATCCCTGCCTCAAAG-3'	108
	下游 5'-CACGTCAGCCCGTATGTCTTC-3'	
SOD2	上游 5'-TCTGTGGGAGTCCAAGGTTTC-3'	101
	下游 5'-CAGTGGAATAAGGCTGTGG-3'	

**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);Nikon Eclipse C1型正置荧光显微镜(日本Nikon公司);HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi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);1580R型多用途高速冷冻离心机(中国GENE有限公司);UA-1800型紫外分光光度计(上海翱艺仪器有限公司);Epoch型酶标仪(美国BioTek有限公司);CFX96型Real-time PCR仪(美国伯乐公司)。

## 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 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>剂量给药,给药容量均为5 mL·kg<sup>-1</sup>,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>[12-15]</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 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>剂量给药,酸枣仁汤高、低剂量组分别按等效剂量的2,1倍换算为12.96,6.48 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>

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 透射电镜观察大鼠心肌超微结构** 固定的心脏分别经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗30 min,1%四氧化锇固定2 h,依次用梯度乙醇脱水处理,环氧树脂浸透,包埋,超薄切片(70 nm)铀染、铅染处理,透射电镜下观察并拍照。

**2.3 比色法检测大鼠心肌ATP含量的变化** 将大鼠麻醉后,取出心脏,置于超低温冰箱 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取心脏组织100 mg剪碎放入2 mL离心管中(或经多次清洗的试管),加入9倍体积双蒸水,机械匀浆,制备成10%的匀浆液,插在浮漂上放入沸水中水浴10 min,取出后在涡旋混匀1 min, $1\text{ 万}\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径10 cm,下同),取上清,按照比色法ATP试剂盒说明书进行操作。

**2.4 分光光度法检测大鼠心肌MDA含量,SOD活性** 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出心脏组织,称质量,并用眼科剪将心脏组织剪碎,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, $2\text{ 500}\sim\text{3 000}\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,按照MDA,SOD试剂盒说明书进行测定。

**2.5 Real-time PCR法检测大鼠心肌SIRT3,SOD2 mRNA表达** 将大鼠麻醉后,取出心脏,置于超低温冰箱 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将心脏组织研碎进行mRNA提取,再按逆转录试剂盒中说明书的步骤进行逆转录,反应条件为 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温60 min,结束后 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温5 min灭活反转录酶。每个步骤均在超净台上操作,保证整个操作过程处于无菌环境。将逆转录后的cDNA按mix荧光定量试剂盒添加完试剂后,放入Real-time PCR仪进行反应,反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火10 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共进行40个循环。结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行数据分析。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠心肌SIRT3,SOD2蛋白质表达水平** 称取心脏组织50 mg,加入10倍组织体积的裂解液,将匀浆管放在提前预冷的底座上,开启高速组织匀浆机,振动频率为60 Hz,每次60 s,匀浆2次。取出匀浆管,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心机中, $12\text{ 万}\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清。按照SDS-PAGE试剂盒制备10% SDS-PAGE凝胶,上样,电泳,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SIRT3,SOD2(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,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。

**2.7 免疫荧光法观察大鼠心肌SIRT3的定位表达**

首选心肌组织切片脱蜡,然后进行抗原热修复,之后封闭2 h;去除封闭液,分别滴加TBS缓冲液配制的SIRT3抗体稀释液(1:200)孵育过夜;复温去除抗体工作液,TBST洗涤1次,5 min,晾干;避光滴加荧光二抗(1:300), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,避光,孵育1 h TBST洗涤1次,5 min;缓冲液TBS洗涤3次,5 min/次;滴加DAPI复染细胞核,去除工作液,缓冲液TBST洗涤3次,5 min/次;荧光显微镜下观察,其中蓝色为细胞核,红色为蛋白表达。

**2.8 统计学处理** 实验所测数据均采用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进行检验,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  $T_2$ 法, $P<0.05$ 为差异有统计意义。

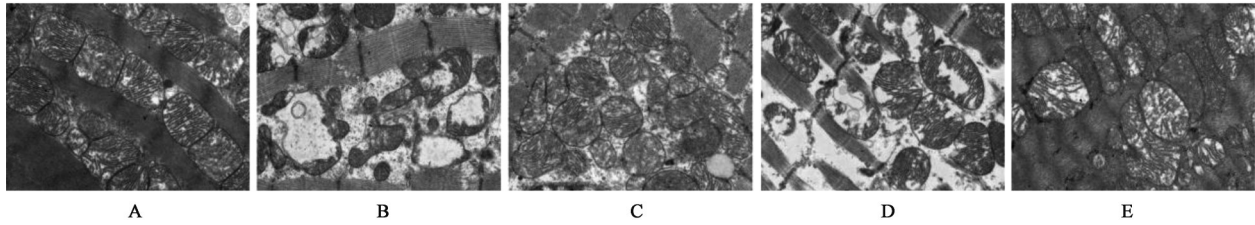
### 3 结果

**3.1 对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌超微结构的影响** 透射电子显微镜下可见,正常组大鼠心肌细胞结构清楚,Z线清晰,粗细肌丝排列整齐、有序,细胞核形态规整,大小相对均一的线粒体在肌丝之间密集分布,线粒体形状多为圆形或椭圆形,线粒体膜完整,线粒体嵴保存相对完好;与正常组比较,模型组大鼠心肌组织肌丝排列紊乱,伴有肌丝断裂与溶解,线粒体肿胀明显,线粒体排列紊乱,多数线粒体嵴模糊甚至断裂;与模型组比较,舒乐安定组、酸枣仁汤高剂量组肌丝排列较整齐,线粒体损伤减轻,仅见部分嵴断裂,肿胀程度亦相对较轻,其中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心肌ATP含量的影响** 与正常组比较,模型组大鼠心肌ATP含量显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,酸枣仁汤高剂量组大鼠心肌ATP含量显著升高( $P<0.01$ ),差异有显著统计学意义。见表2。

**3.3 对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌MDA,SOD水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠心肌MDA含量显著升高,SOD活性显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,舒乐安定组、酸枣仁汤高剂量组心肌MDA含量显著降低,SOD活性显著升高( $P<0.01$ ),酸枣仁汤低剂量组SOD活性显著升高( $P<0.01$ )。见表3。

**3.4 对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌SIRT3,SOD2 mRNA表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠心



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2~3同)

图1 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌超微结构的影响(电镜扫描, ×6 000)

Fig. 1 Effect of Suanzaoren Tang on myocardial ultrastructure of rats in chronic sleep deprivation of older adults (CSDO) (SEM, ×6 000)

表2 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌ATP含量的影响(̄x±s, n=6)

Table 2 Effect of Suanzaoren Tang on myocardial ATP content of rats in CSDO (̄x±s, n=6)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ATP/mmol·kg <sup>-1</sup>
正常		2.55±0.55
模型		0.47±0.23 <sup>2)</sup>
舒乐安定	1.8×10 <sup>-4</sup>	0.97±0.47
酸枣仁汤	6.48	0.65±0.40
	12.96	1.49±0.48 <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3~6同)。

表3 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌MDA, SOD水平影响(̄x±s, n=6)

Table 3 Effects of Suanzaoren Tang on MDA and SOD levels in myocardium of rats in CSDO (̄x±s, n=6)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MDA/μmol·g <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>
正常		0.64±0.06	46.09±1.92
模型		1.09±0.13 <sup>2)</sup>	30.48±6.75 <sup>2)</sup>
舒乐安定	1.8×10 <sup>-4</sup>	0.77±0.09 <sup>4)</sup>	39.16±2.37 <sup>4)</sup>
酸枣仁汤	6.48	1.04±0.14	39.23±3.26 <sup>4)</sup>
	12.96	0.69±0.08 <sup>4)</sup>	43.87±2.36 <sup>4)</sup>

肌SIRT3, SOD2 mRNA表达显著降低(P<0.01);与模型组比较,舒乐安定组、酸枣仁汤高剂量组心肌SIRT3, SOD2 mRNA表达显著升高(P<0.01)。见表4。

3.5 对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌SIRT3, SOD2蛋白表的影响 与正常组比较,模型组大鼠心肌SIRT3, SOD2蛋白表达显著降低(P<0.01);与模型组比较,舒乐安定组、酸枣仁汤高剂量组心肌SIRT3, SOD2蛋白表达显著升高(P<0.01),酸枣仁汤低剂量组SOD2蛋白表达明显升高(P<0.05)。见表5,图2。

3.6 对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌SIRT3定位表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠心肌SIRT3

表4 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌SIRT3, SOD2 mRNA表达的影响(̄x±s, n=3)

Table 4 Effect of Suanzaoren Tang on SIRT3 and SOD2 mRNA expression in myocardium of rats in CSDO (̄x±s, n=3)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SIRT3	SOD2
正常		2.07±0.06	1.78±0.22
模型		1.00±0.04 <sup>2)</sup>	1.00±0.04 <sup>2)</sup>
舒乐安定	1.8×10 <sup>-4</sup>	1.46±0.11 <sup>4)</sup>	1.49±0.16 <sup>4)</sup>
酸枣仁汤	6.48	1.13±0.10	0.88±0.04
	12.96	1.73±0.19 <sup>4)</sup>	1.67±0.07 <sup>4)</sup>

表5 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌SIRT3, SOD2蛋白表达的影响(̄x±s, n=3)

Table 5 Effect of Suanzaoren Tang on SIRT3 and SOD2 protein expression in myocardium of rats in CSDO (̄x±s, n=3)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SIRT3/GAPDH	SOD2/GAPDH
正常		1.33±0.08	1.40±0.18
模型		0.57±0.08 <sup>2)</sup>	0.52±0.10 <sup>2)</sup>
舒乐安定	1.8×10 <sup>-4</sup>	0.81±0.04 <sup>4)</sup>	0.88±0.08 <sup>4)</sup>
酸枣仁汤	6.48	0.68±0.10	0.74±0.07 <sup>3)</sup>
	12.96	1.03±0.08 <sup>4)</sup>	1.09±0.03 <sup>4)</sup>

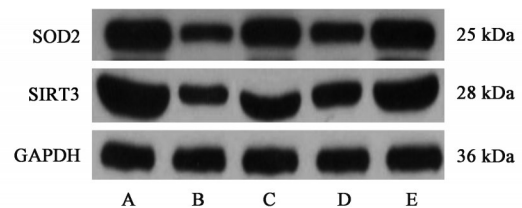


图2 各组大鼠心肌SIRT3, SOD2蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of SIRT3 and SOD2 protein expression in myocardium of rats in each group

蛋白平均荧光强度显著降低(P<0.01);与模型组比较,酸枣仁汤高剂量组心肌SIRT3蛋白表达明显升高(P<0.05)。见图3,表6。

#### 4 讨论

线粒体是细胞内氧化磷酸化和合成ATP的主要场所,是细胞的“动力工厂”。成人心脏中线粒体占心肌细胞体积的1/3<sup>[16-17]</sup>,正常的能量代谢是维持

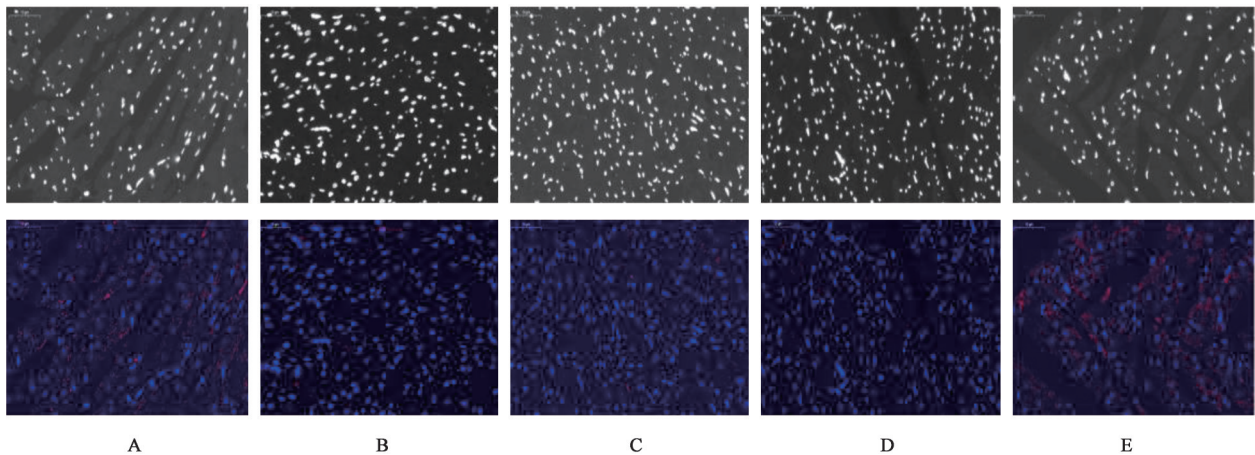


图3 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌SIRT3定位表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of Suanzaoren Tang on SIRT3 expression in myocardium of rats in CSDO (IF, ×400)

表6 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠心肌SIRT3平均荧光强度的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 6 Effect of Suanzaoren Tang on average fluorescence intensity of SIRT3 in myocardium of rats in CSDO ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SIRT3
正常		43.25±5.70
模型		32.53±3.09 <sup>2)</sup>
舒乐安定	1.8×10 <sup>-4</sup>	31.78±5.33
酸枣仁汤	6.48	35.96±5.90
	12.96	40.21±3.06 <sup>3)</sup>

心脏泵血功能及细胞活力的重要基础,能量的产生、储存及利用中任何一个环节发生异常,均可导致能量代谢障碍,进而影响心脏各项生命活动,最终导致心血管疾病的发生<sup>[18]</sup>。研究通过观察模型组大鼠心肌超微结构发现,模型组大鼠心肌细胞线粒体结构受到了损伤,此外通过检测大鼠心肌ATP也发现,模型组大鼠ATP含量显著下降,这些都说明了老年慢性快动眼睡眠剥夺引起了模型组大鼠心肌细胞能量代谢异常。

睡眠剥夺类似于缺氧和低温等刺激,可对心血管系统产生一系列的负向调控,如氧化应激<sup>[19]</sup>。氧化应激会产生超量的活性氧(ROS),ROS在体内过多产生或者消除减少,会直接引起生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白及酶变性,DNA受损,细胞死亡或凋亡,造成组织损伤。SOD具有清除活性氧簇的能力,是机体内重要的抗氧化作用的酶;MDA是细胞发生脂质过氧化的最终产物,脂质过氧化作用可把活性氧转化为非自由基性的脂类分解产物,还能增加其过氧化作用,故MDA水平能显示脂质过氧化程度,间接反映细胞损伤或坏死的程度<sup>[20-22]</sup>。本研究中,模型组大鼠心肌SOD活性降低,MDA水平升

高,提示心肌细胞受到损伤。

另外,线粒体还是细胞内活性氧产生的最主要场所,正常细胞产生的ROS中有95%来源于线粒体<sup>[23]</sup>。在抗氧化系统中,SOD2是唯一存在于线粒体中的抗氧化酶,其表达增多或活性提高可以降低心脏细胞中的活性氧含量<sup>[24]</sup>,另有研究表明,SOD2可以改善线粒体功能,保护心肌细胞形态和收缩力<sup>[25]</sup>。

SIRT3在调节能量代谢中也发挥着重要作用。SIRT3通过脱乙酰基调节氧化磷酸化关键酶的酶活性,从而调节线粒体能量代谢。而且在多器官中已证明SIRT3与线粒体结构和功能的稳定有关,SIRT3的缺乏会损害心脏的线粒体和心肌收缩功能,当SIRT3缺乏时心肌细胞会出现ATP基础水平降低的现象,敲除SIRT3后也表现为呼吸链活性降低、线粒体氧耗减低以及ATP合成减少,这些都说明了心肌能量的供给与SIRT3密切相关<sup>[26]</sup>。另有研究表明,在心肌增加SIRT3则能够及时清除细胞大量ROS,SIRT3参与了应激状态下心肌保护<sup>[27]</sup>。

本研究中,在给予酸枣仁汤干预后,老年慢性快动眼睡眠剥夺模型大鼠线粒体结构得到了改善,心肌细胞内ATP水平升高,SOD酶活性升高,MDA含量降低,而且发现,在给予酸枣仁汤干预后,SOD2和SIRT3 mRNA和蛋白表达增加,这些结果说明了酸枣仁汤保护了老年慢性快动眼睡眠剥夺诱导的心肌线粒体损伤,调节了能量代谢,而其改善心肌能量代谢的机制可能与上调SOD2和SIRT3有关,根据酸枣仁汤的功效,推测酸枣仁汤中酸枣仁、茯苓、川芎在保护心肌细胞线粒体,调节能量代谢中发挥了重要作用。

[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(41): 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] 战伟, 吕双双, 周鑫, 等. 五音疗法结合耳穴贴压护理模式对老年失眠症患者睡眠和生活质量的影响[J]. *中国医药科学*, 2020, 10(15): 113-115, 148.
- [5] 方舟. 睡眠剥夺对心脏部分功能的影响和机制研究及其药物干预[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2011.
- [6] 韩颖. 心脏重症监护室患者睡眠剥夺的研究进展[J]. *中国误诊学杂志*, 2018, 13(6): 273-275.
- [7] 周婧. 养心氏片对稳定性冠心病合并睡眠障碍患者的疗效观察及对急性心肌缺血大鼠心肌能量代谢的影响[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [8] 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- $\kappa$ B信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(6): 18-24.
- [9] 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Bcl-2、Bax表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4): 1691-1693.
- [10] 郭帆, 吴东南, 刘玲, 等. 酸枣仁汤防治睡眠剥夺性大鼠学习记忆功能变化及其对NLRP3通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(2): 22-27.
- [11] 龙清华, 赵宾宾, 丁莉, 等. 基于PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ 信号通路探讨酸枣仁汤对APP/PS1双转基因痴呆小鼠海马神经元突触损伤的改善作用[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2546-2551.
- [12] 张如意. 酸枣仁汤对基于5HT $\rho$ 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 孙爱军, 葛均波, 姜红, 等. 线粒体代谢异常致心力衰竭的机制及其防治策略[J]. *上海医学*, 2019, 42(7): 435-436.
- [17] 唐兰, 俞捷, 许洁. 环境内分泌干扰物暴露致心肌线粒体损伤的研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(4): 123-128.
- [18] 孙大伟, 张铎, 陈海鹏, 等. 益气活血法改善心肌细胞能量代谢作用机制的研究进展[J]. *中医导报*, 2020, 26(14): 111-114.
- [19] 李伟, 张海峰, 王森, 等. 黄芪注射液对睡眠剥夺大鼠心脏的保护作用及其机制[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2020, 46(5): 998-1003, 1114.
- [20] 范辉, 韩毅, 马骏. 天麻钩藤汤对自发性高血压模型大鼠的疗效及其对血管壁氧化应激的干预作用[J]. *世界中医药*, 2019, 14(3): 593-597.
- [21] 关婷, 刘佳馥, 王思思. 丹参川芎嗪注射液治疗脑血栓患者的临床疗效及SOD、MDA、LPA和内皮素的作用分析[J]. *世界中医药*, 2019, 14(9): 2309-2312.
- [22] 吴华英, 夏帅帅, 黄惠勇, 等. 加味生脉补心丹对2型糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(4): 453-458.
- [23] 马淇, 刘垒, 陈佳. 活性氧、线粒体通透性转换与细胞凋亡[J]. *生物物理学报*, 2012, 28(7): 523-536.
- [24] 牛明明, 张贺芳, 吴媛. 锰超氧化物歧化酶在糖尿病心病中的保护作用[J]. *医学研究杂志*, 2020, 49(11): 158-160, 107.
- [25] SHEN X, ZHENG S R, METREVELI N S, et al. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of Mn SOD reduces diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes*, 2006, 55(3): 798-805.
- [26] 罗义萍, 张琳, 邓胜利, 等. 去乙酰化酶3在心肌保护中作用及与心肌疾病研究进展[J]. *临床军医杂志*, 2020, 48(10): 1257-1260.
- [27] PILLAI V B, SUNDARESAN N R, JEEVANANDAM V, et al. Mitochondrial SIRT3 and heart disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(2): 250-256.

[责任编辑 周冰冰]