

安寐丹对睡眠剥夺大鼠自发活动昼夜节律的调节及对生物钟蛋白的影响

谢光璟, 徐波, 黄攀攀, 王平*

(湖北中医药大学老年医学研究所, 武汉 430065)

[摘要] 目的:探讨安寐丹(AMD)对睡眠剥夺大鼠生物节律及相关蛋白表达的影响。方法:80只大鼠随机分为空白组、模型组、安寐丹组和褪黑素组。自制睡眠剥夺箱进行睡眠剥夺4周,正常与模型组给予等容生理盐水,安寐丹组给药 $9.09\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。褪黑素组给药 $0.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。自发活动视频分析系统评价自发活动昼夜节律,苏木素-伊红(HE)染色观察下丘脑组织形态,尼氏染色观察下丘脑组织神经元及尼氏小体,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测下丘脑cAMP反应元件结合蛋白(CREB)/近日钟基因(Per)通路蛋白表达,免疫组化检测生物钟蛋白核心时钟基因1(Bmal1)、时钟基因(Clock)、Per1、隐花色素1基因(Cry1)的表达。结果:模型组昼夜节律相对紊乱,在6个节点活动时间较空白组显著增加,活动速度及活动次数增加($P<0.01$);同时神经元数量减少,排列稀疏,胞核皱缩或碎裂;尼氏体数量减少,出现明显丢失,尼氏体着色变淡;p-CREB、Per1蛋白相对表达降低,Bmal1、Clock、Per1、Cry1蛋白阳性率下降($P<0.01$)。与模型组比较,安寐丹组大鼠活动时间、活动速度及活动次数均下降($P<0.01$);神经元损伤减轻,数量增加,部分核仁清晰,胞浆明显,尼氏体数量增加;p-CREB、Per1蛋白相对表达升高,Bmal1、Clock、Per1、Cry1蛋白阳性率上升($P<0.01$)。结论:安寐丹改善睡眠剥夺大鼠自发活动昼夜节律,其作用可能通过调节CREB/Per信号通路,增加生物钟蛋白Bmal1、Clock、Per1、Cry1表达有关。

[关键词] 安寐丹;睡眠剥夺;昼夜节律;生物钟蛋白;视交叉上核(SCN)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0033-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212309

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200724.1428.004.html>

[网络出版日期] 2020-07-24 15:04

Anmeidan Modulates Circadian Rhythm of Spontaneous Activity and Influences Clock Proteins in Sleep-deprived Rats

XIE Guang-jing, XU Bo, HUANG Pan-pan, WANG Ping*

(Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Anmeidan (AMD) on biological rhythm and related protein expression in sleep-deprived rats. **Method:** A total of 80 SD rats were randomized into control group (Ctrl, equivalent volume of saline), model group (SD, equivalent volume of saline), AMD group ($9.09\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and melatonin group (MT, $0.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Insomnia was induced in rats by self-made sleep deprivation box (4 weeks). Circadian rhythm of spontaneous activity was evaluated by spontaneous activity video analysis system. Morphology of hypothalamus was observed based on hematoxylin-eosin (HE) staining, and the histomorphology of hypothalamus neurons and the Nissl's bodies based on Nissl staining. Western blotting was employed to detect the expression of hypothalamic proteins in cAMP-response element binding protein (CREB)/clock gene period (Per) pathway, and immunohistochemistry the expression of brain and

[收稿日期] 2021-08-15

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1705600)

[第一作者] 谢光璟,博士,讲师,从事中医药防治老年病研究,Tel:027-68890123,E-mail:397525306@qq.com

[通信作者] *王平,教授,主任医师,博士生导师,从事中医衰老理论及老年病证治规律研究,E-mail:pwang54@163.com

muscle ARNT-like protein 1 (Bmal1), Clock, Per1, and cryptochrome circadian regulator 1 (Cry1). **Result:** The model group demonstrated circadian rhythm disorder, as manifested by the significant increase in activity time in 6 designated time periods compared with the control group, and the rise in the activity speed and frequency ($P<0.01$). Moreover, model group showed decrease in number of neurons which were sparsely arranged with shrunken or fragmented nuclei, reduction in number and loss of Nissl's bodies with light color, and drop in the relative expression of p-CREB and Per1, and the positive rate of Bmal1, Clock, Per1, and Cry1 ($P<0.01$). Compared with model group, AMD group demonstrated reduction in time, speed, and frequency of activity ($P<0.01$). Moreover, the AMD group also showed alleviation of neuronal damage ($P<0.01$), and increase in the number of neurons with clear nuclei and cytoplasm in some, and the number of Nissl's bodies. AMD raised the expression of p-CREB and Per1 proteins, and the positive rate of Bmal1, Clock, Per1, and Cry1 ($P<0.01$). **Conclusion:** AMD ameliorated spontaneous circadian rhythm of sleep-deprived rats by regulating CREB/Per signaling pathway and further increasing the expression of Bmal1, Clock, Per1, and Cry1.

[Keywords] Anmeidan; sleep deprivation; circadian rhythm; Clock proteins; suprachiasmatic nucleus (SCN)

睡眠缺失已经成为当今社会发展中的普遍现象。有报道发现35%~40%的成年人工作日每晚睡眠不足7 h^[1],而睡眠缺失会对身体产生广泛的生理和神经行为损害,其中睡眠剥夺是最为常见的诱发因素,其不仅可以造成认知功能和代谢水平的紊乱^[2-3],长期睡眠不足还会造成大脑及周围组织的昼夜节律紊乱,引发失眠等神经系统疾病^[4]。最近研究证实了睡眠剥夺会增加稳态睡眠驱动力,并降低清醒的神经行为功能,涉及昼夜节律基因差异化的表达^[5]。动物实验同样发现睡眠剥夺小鼠脑中接近3 000个基因的昼夜表达出现紊乱,并与多个代谢相关信号通路及蛋白磷酸化水平密切相关^[6]。这一系列研究也揭示了睡眠平衡和昼夜节律在大脑代谢中的潜在关联。

昼夜节律作为自然演变下机体自发的内在生命活动,通过生物钟以大约24 h节律性的方式协调全基因组表达,下丘脑视交叉上核(SCN)充当起搏器,同步全身的外周时钟振荡,并与正负性成分生物钟基因组成调控环路而发挥作用。安寐丹作为中医经典名方,出自清代专著《石室秘录》,是一首针对睡眠障碍的代表方。课题组前期开展了安寐丹对睡眠剥夺模型动物的机制研究,发现安寐丹可以改善睡眠剥夺模型的学习记忆损伤,及线粒体功能及细胞凋亡等^[7-8],而无论是动物的睡眠觉醒、学习记忆、代谢过程等都受到昼夜节律的调控而实现。据此,本次实验拟在前期研究的基础上,进一步探讨睡眠剥夺过程中的昼夜节律改变,并研究安寐丹对睡眠剥夺大鼠自发活动昼夜节律的影响,期望挖掘睡眠觉醒与昼夜节律的关系,并为安寐丹防

治睡眠障碍性疾病提供支持。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠,SPF级别,体质量(210±10) g,购于湖北省实验动物研究中心,合格证号SCXK(京)2016-0002。整个饲养过程中保持动物房恒温,恒湿,光照时间为8:00-20:00,大鼠可正常饮水、摄食。实验同时获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准([2018]IEC(018)号)。

1.2 药物及试剂 安寐丹水煎液:生酸枣仁、熟酸枣仁各19 g,人参、麦冬、茯神、当归各11 g,丹参7 g,石菖蒲、五味子、甘草各4 g(饮片购于湖北中医药大学国医堂,经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定符合药用标准)。所有药物以15倍水浸泡30 min后武火煮沸,继用文火煎煮30 min,过滤药液。第2次煎煮加10倍水后煎煮合并2次药液,浓缩药液(0.91 g·mL⁻¹)后备用。褪黑素(美国Sigma公司,批号M5250);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、尼氏染色液(南京生航生物技术有限公司,批号分别为BC-DL-139、BC-DL-082);一抗环磷腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(CREB)、磷酸化(p)-CREB、核心时钟基因1(Bmal1)、时钟基因(Clock)抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab32515、ab32096、ab230822、ab3517);近日钟基因period1(Per1)、隐花色素1基因(Cry1)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(武汉ABclonal生物科技有限公司,批号分别为A8449、A18028、AC038);其余试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 ZZ-6型自制睡眠剥夺箱、自主活动视频分析系统(安徽正华生物仪器设备有限公司);IX71

型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);EG1140H 型包埋机、RM2245 型切片机、DVM6 型透射电镜(德国 Leica 公司);GelDoc XR+型电泳槽、转印槽、凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 本实验采用国际公认的改良多平台水环境法制备睡眠剥夺模型^[9]。所用装置为实验室自制箱体(长×宽×高 75 cm×50 cm×36 cm),内放连体金属圆台(直径 8 cm,高 8 cm,间隔 15 cm)。实验中箱内注水(低于圆台 1 cm),大鼠可在圆台上活动,当其进入 REM 睡眠期因肌张力下降跌入水中造成睡眠剥夺。空白组在水平台上放置铁丝网,保证在网格上自由活动。适应性喂养 7 d 后开始造模,实验持续 4 周,剥夺时间为每日 12:00-次日 8:00,每天清洗实验装备。

2.2 分组及给药 课题组前期已开展了安寐丹药理学研究^[8],对安寐丹量效关系进行了探索,故本实验选择安寐丹有效剂量进行干预,随机数表分为空白组、模型组、安寐丹组和褪黑素组,每组 20 只。依据中药药理研究方法学(第 2 版)^[10]大鼠与人药物剂量折算,安寐丹组给药量 9.09 g·kg⁻¹·d⁻¹。褪黑素组给药量 0.27 g·kg⁻¹·d⁻¹,模型组、空白组给予等容生理盐水,睡眠剥夺开始时进行药物干预,连续给药 4 周。

2.3 自发活动昼夜节律检测 实验结束前 2 d 进行自发活动检测。检测时将各组大鼠从睡眠剥夺箱中移入自发活动检测箱中进行实时监测。实验检测保持周围环境安静密闭,防止外界干扰。各组大鼠在自主活动箱中自由活动,监测 24 h 内的自发活动情况,每 3 h 记录 1 次,分别在 8:00、11:00、14:00、17:00、20:00、23:00、2:00、5:00 时间点各记录 1 次,包括总时间(TT)、日间活动时间(LT)、夜间活动时间(DT)、活动速度、活动次数等,每次 3 min,实验期间大鼠可自由活动、摄食。

2.4 样本采集 取材前 1 d 动物禁食不禁水,次日以 10% 水合氯醛 3 mL·kg⁻¹ 麻醉大鼠,于冰上剥离全脑后,HE 染色、尼氏染色、免疫组化等样本置于 4% 多聚甲醛中固定备用,其余样本分离脑组织分别置于灭菌离心管冻存备用。

2.5 下丘脑形态学检测 选择 HE 染色法,组织经脱蜡,切片,二甲苯(10 min/次×2 次),乙醇梯度洗脱,磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗 3 次,苏木素染核 5 min,1% 盐酸-乙醇分化,清洗后 0.6% 氨水返蓝。伊红染液染色 3 min,梯度乙醇、二甲苯脱水透明,中

性树脂封片镜下观察。

2.6 神经元功能检测 固定后的全脑经过 PBS 冲洗后连续冠状切片,PBS 清洗,1% 尼氏染色液染色 10 min。洗片,梯度乙醇脱水,二甲苯脱水透明,中性树脂封片,光镜下观察尼氏小体变化。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 CREB/Per 通路蛋白 提取下丘脑蛋白,根据分子量选择对应 SDS-PAGE 凝胶,制备分离胶与浓缩胶,依次上样,电泳,转膜,标记,封闭,PBST 漂洗 3 次,加 p-CREB, CREB, Per1, β -actin 抗体稀释液(1:1 000),4 °C 冰箱孵育过夜;滴加二抗(1:1 万)后室温下孵育 2 h,洗涤后经 ECL 液显影拍照后通过 Image J 软件进行统计分析。

2.8 免疫组化检测生物钟蛋白表达 切片固定抗原修复后,孵育 30 min;滴加一抗 Bmal1(1:1 000), Clock(1:1 000), Per1(1:100), Cry1(1:200)孵育过夜;复温后 PBS 洗涤 5 min,晾干;滴加二抗(1:1 000),37 °C 孵育 1 h,DAB 显色,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,拍照观察,并通过 Image J 软件进行积分吸光度 IA 统计分析。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件处理数据,结果 $\bar{x} \pm SE$ 表示,两两比较运用 *t* 检验;两组以上比较运用单因素方差分析,并进行 Bonferroni 组间事后比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对睡眠剥夺大鼠自发活动昼夜节律的影响

空白组昼夜节律特征较好,大鼠夜间活动较日间活动趋势明显,符合啮齿类动物的活动习性;与空白组比较,模型组昼夜节律相对紊乱,TT、LT、DT 均显著延长($P < 0.01$)。8 个节点比较,与空白组比较,除 20:00 及 8:00,其余节点模型组活动时间均显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,安寐丹组及褪黑素组在 11:00 至 20:00 的 4 个时间节点活动时间显著缩短($P < 0.01$)。见表 1 和表 2。各组大鼠白天活动速度较夜间速度均显著降低。与空白组比较,模型组白天、夜间活动速度增加($P < 0.01$);与模型组比较,安寐丹组夜间活动平均速度显著降低($P < 0.01$),白天速度差异无统计学意义。同时,各组日间活动次数均少于夜间活动次数($P < 0.01$)。与空白组比较,模型组在日间及夜间活动次数均显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,安寐丹组及褪黑素组日间及夜间活动次数均降低($P < 0.01$)。见表 3 和表 4。

3.2 对睡眠剥夺大鼠下丘脑神经元细胞形态的影响 光镜下观察发现,空白组大鼠脑组织结构较完

表1 安寐丹对睡眠剥夺大鼠不同活动时间的影(̄x±SE, n=20)

Table 1 Effect of Anmeidan (AMD) on different activity times in sleep deprived rats (̄x±SE, n=20)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TT	LT	DT
空白组		724.27±36.25	286.14±18.11	438.13±22.81
模型组		928.90±43.18 ²⁾	410.86±25.21 ²⁾	518.04±28.49 ²⁾
安寐丹组	9.09	816.34±30.58 ⁴⁾	346.85±18.18 ⁴⁾	469.49±18.57 ⁴⁾
褪黑素组	0.27	838.04±32.57 ⁴⁾	361.67±18.15 ⁴⁾	476.37±21.18

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表2、表5、表6同)

表2 安寐丹对睡眠剥夺大鼠自发活动8个节点时间的影(̄x±SE, n=20)

Table 2 Effect of AMD on spontaneous activity time of 8 nodes in sleep deprived rats (̄x±SE, n=20)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	20:00	23:00	2:00	5:00	8:00	11:00	14:00	17:00
空白组		104.35±8.85	104.65±10.12	118.36±13.14	110.77±9.58	95.34±8.36	86.35±8.57	48.37±7.25	56.08±6.25
模型组		116.71±12.68	130.58±12.36 ¹⁾	141.57±12.01 ¹⁾	136.18±9.48 ¹⁾	104.87±9.48	118.39±8.50 ²⁾	89.36±9.14 ²⁾	98.24±7.36 ²⁾
安寐丹组	9.09	89.58±8.20 ⁴⁾	110.54±10.57	135.36±15.30	134.01±14.08	110.45±9.14	94.36±8.33 ⁴⁾	68.35±6.54 ⁴⁾	73.69±8.63 ⁴⁾
褪黑素组	0.27	85.04±7.83 ⁴⁾	108.36±12.71	130.50±15.04	115.47±7.05 ⁴⁾	100.58±8.47	90.26±9.30 ⁴⁾	60.47±5.05 ⁴⁾	66.36±6.87 ⁴⁾

表3 安寐丹对睡眠剥夺大鼠平均速度的影(̄x±SE, n=20)

Table 3 Effect of AMD on mean speed of sleep deprived rats (̄x±SE, n=20)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	白天	夜间
空白组		2.45±0.13	4.08±0.28 ⁶⁾
模型组		3.28±0.22 ²⁾	6.87±0.39 ^{2,6)}
安寐丹组	9.09	2.96±0.28	5.42±0.45 ^{4,6)}
褪黑素组	0.27	2.63±0.28 ⁴⁾	4.88±0.18 ^{4,6)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与白天比较⁵⁾P<0.05,⁶⁾P<0.01(表4同)

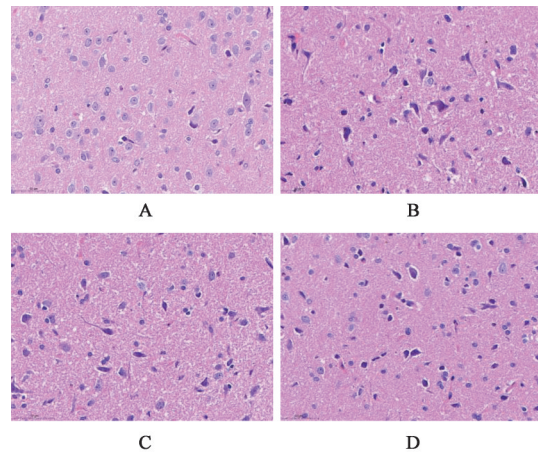
表4 安寐丹对睡眠剥夺大鼠活动次数的影(̄x±SE, n=20)

Table 4 Effect of AMD on mean activity times of sleep deprived rats (̄x±SE, n=20)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	白天	夜间
空白组		3.14±0.21	5.08±0.38 ⁶⁾
模型组		5.26±0.40 ²⁾	8.27±0.45 ^{2,6)}
安寐丹组	9.09	4.28±0.28 ³⁾	7.16±0.32 ^{4,6)}
褪黑素组	0.27	4.01±0.20 ⁴⁾	6.84±0.27 ^{4,6)}

整,神经细胞数量较多,胞浆丰富,呈淡染,胞核居中,核仁清楚,核浆比正常。与空白组比较,模型组神经元数量较少,排列稀疏而不规则,部分神经细胞核皱缩或碎裂,核染色质致密深染,形成致密质块。与模型组比较,安寐丹组及褪黑素组大鼠下丘脑神经元损伤得到改善,细胞结构完整,部分神经核仁清晰,胞浆明显。见图1。

3.3 对睡眠剥夺大鼠神经元功能的影响 空白组可见神经细胞胞浆中分布有较多的尼氏体,呈蓝色颗粒状或块状;与空白组比较,模型组尼氏体数量减



注:A. 空白组;B. 模型组;C. 安寐丹组;D. 褪黑素组(图2和图3同)

图1 安寐丹对睡眠剥夺大鼠下丘脑神经细胞形态的影响(HE, ×300)

Fig. 1 Effect of AMD on hypothalamic cell morphology of sleep deprived rats (HE, ×300)

少,出现明显丢失,存在的尼氏体着色变淡;与模型组比较,安寐丹组及褪黑素组神经元损伤改善,同时尼氏体数量有所增加,提示神经元功能损伤得以恢复。见图2。

3.4 对睡眠剥夺大鼠CREB/Per信号通路蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组p-CREB、Per1蛋白相对表达量显著减少(P<0.01);与模型组比较,安寐丹组及褪黑素组同时升高了p-CREB、Per1蛋白的相对表达(P<0.01)。见图3和表5。

3.5 对睡眠剥夺大鼠生物钟蛋白表达的影响 可见阳性细胞为棕褐色蛋白包裹蓝色细胞核,呈椭圆形或梭形,以胞浆表达为主。与空白组比较,模型

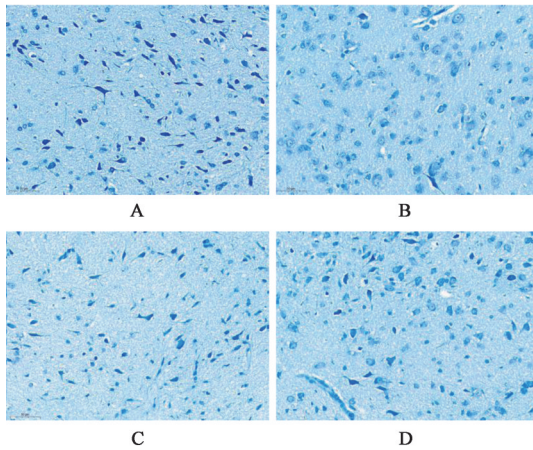


图2 安寐丹对睡眠剥夺大鼠尼氏小体的影响(尼氏,×300)
Fig. 2 Effect of AMD on nieves of sleep deprived rats (Nissl,×300)

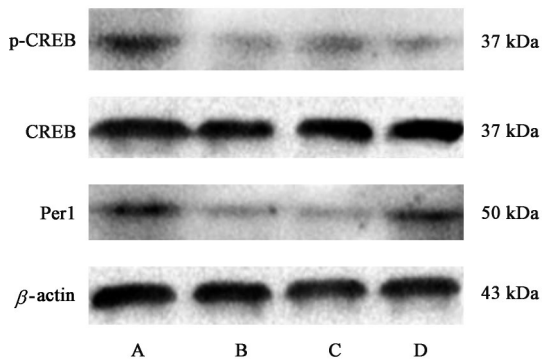


图3 各组大鼠CREB/Per信号通路蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of CREB/Per signaling pathway protein expression in each group

表5 安寐丹对睡眠剥夺大鼠CREB/Per信号通路的影响($\bar{x} \pm SE, n=3$)

Table 5 Effect of AMD on CREB/Per signaling pathway of sleep deprived rats ($\bar{x} \pm SE, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-CREB/CREB	Per1/ β -actin
空白组		0.85±0.07	0.90±0.10
模型组		0.23±0.04 ²⁾	0.18±0.05 ²⁾
安寐丹组	9.09	0.51±0.06 ⁴⁾	0.38±0.06 ⁴⁾
褪黑素组	0.27	0.49±0.10 ⁴⁾	0.65±0.08 ⁴⁾

组 Bmal1、Clock、Cry1、Per1 蛋白表达显著降低, IA 显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 安寐丹组及褪黑

表6 安寐丹对睡眠剥夺大鼠生物钟蛋白IA的影响($\bar{x} \pm SE, n=3$)

Table 6 Effect of AMD on biological clock protein IA of sleep deprived rats ($\bar{x} \pm SE, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bmal1	Clock	Cry1	Per1
空白组		78.25±3.65	89.32±5.15	93.15±6.15	76.20±3.87
模型组		28.36±2.36 ²⁾	29.10±1.58 ²⁾	18.36±2.01 ²⁾	20.15±3.48 ²⁾
安寐丹组	9.09	38.25±2.30 ⁴⁾	44.58±3.87 ⁴⁾	42.64±4.95 ⁴⁾	46.87±4.39 ⁴⁾
褪黑素组	0.27	45.69±3.95 ⁴⁾	58.36±4.51 ⁴⁾	46.87±4.39 ⁴⁾	45.36±5.20 ⁴⁾

素组 Bmal1、Clock、Cry1、Per1 蛋白表达显著增加, IA 显著升高 ($P < 0.01$)。见表6和图4。

4 讨论

本次实验在前期研究基础上,进一步发现安寐丹可以改善睡眠剥夺大鼠的自发活动昼夜节律紊乱,同时调节生物钟蛋白 Bmal1、Clock、Cry1、Per1 的表达,证实了睡眠剥夺参与昼夜节律的变化过程。

昼夜节律的研究一直是生物医学界的热点,2017年诺贝尔生理学或医学奖授予的三位科学家,正是奖励其发现了控制昼夜节律的分子机制。从单细胞到哺乳动物再到人类,其共同存在的生理或行为上的24h周期性变化是昼夜节律最为普遍的特征,而睡眠觉醒又是昼夜节律活动系统中最显著的表现之一^[11]。大脑的视交叉上核(SCN)存在中央起搏器,是负责包括睡眠觉醒在内的多种昼夜节律活动的核心区域,SCN支配参与睡眠觉醒的多个脑区,研究较为深入的如腹外侧视前核(VLPO)、正中视前核(MnPO)等^[12-13],可诱导松果体在夜间合成褪黑激素,帮助睡眠。另一方面,睡眠质量下降影响昼夜节律特征,加重睡眠障碍。有报道在长时间睡眠剥夺后,睡眠恢复期SCN电活动的昼夜振幅受到抑制,睡眠稳态受到破坏,还直接影响生物钟基因的节律表达^[14-15]。为此,在本次实验通过检测大鼠的自发活动昼夜节律活动评价其特征性变化,发现睡眠剥夺导致大鼠昼夜活动节律紊乱,活动时间延长,活动速度增加;而安寐丹干预后昼夜活动得以改善,在多个节点的活动时间、活动速度出现下降。为了进一步明确其内在的机制,对下丘脑相关生物钟蛋白进行了检测。

在SCN内部同时存在多种生物钟基因参与昼夜节律的主要调节过程,包括正性成分 Clock、Bmal1 以及负性成分 Cry、Per 组成的调控环路,在24h内的周期性波动产生相互抑制及互相调控,产生了肉眼可见的昼夜节律特征。CREB是一种选择性的核蛋白,既往的研究证实其主要影响脑细胞的

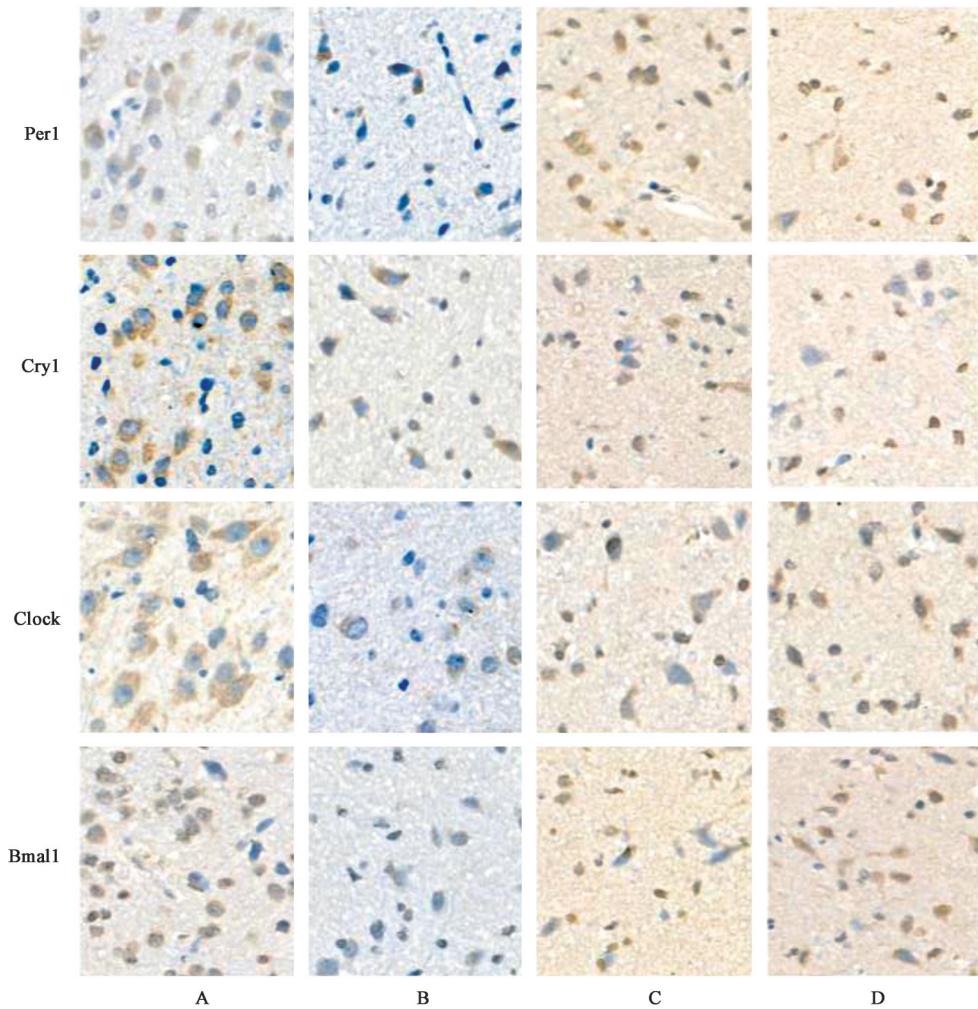


图4 安寐丹对睡眠剥夺大鼠生物钟蛋白表达的影响(免疫组化,×500)

Fig. 4 Effect of AMD on biological clock protein expression of sleep deprived rats (IHC,×500)

活力,并与学习记忆密切相关^[16],与此同时CREB也可能参与到昼夜节律调节过程,并主要通过参与Per基因的调控而发挥作用^[17]。而如所说,Per基因与其他3种生物钟基因组成的调控网络是昼夜节律调节的最主要形式,研究就发现Per基因突变的小鼠,昼夜节律特征减弱或消失,脑电图记录无异常^[18],类似的结果还见于Cry基因敲除小鼠,表现为NREM睡眠持续时间增加大约40%^[19]。说明这两种基因可能互相协同作用参与到昼夜节律活动的控制。因为Cry和Per基因的表达均受Clock/NPAS2和Bmal1异源二聚体影响,故研究人员也发现,睡眠剥夺导致Bmal1敲除小鼠的REM睡眠反弹减弱,活动水平降低,证实Bmal1在睡眠动态中的积极作用^[20]。而Clock是第一个被确认对正常昼夜节律功能重要的哺乳动物基因,Clock突变杂合子和纯合子的小鼠的总睡眠时间分别减少了1h和2h^[21]。结合研究结果证实,4种生物钟蛋白的表达

水平在睡眠剥夺后出现异常,相对表达下降,而安寐丹干预后能够一定程度改善由于睡眠剥夺导致的生物钟蛋白异常表达,说明睡眠剥夺大鼠的昼夜节律紊乱与生物钟蛋白表达有关,为下一步深入研究睡眠与节律基因的内在机制奠定了基础,也为安寐丹从改善昼夜节律角度防治睡眠障碍性疾病提供了新的思考路径。

在本次实验中,选用的安寐丹系清代医家陈士铎所创制,收载于其所著《石室秘录》。此方固本培元,养心安神,主要用于气血亏虚之失眠症。此方借鉴了生脉散(人参、麦冬、五味子)、酸枣仁汤(酸枣仁、茯苓、甘草)的用药思路及组方配伍,通过运用大量补气培元,养血安神之品,佐以丹参、当归、石菖蒲开通心窍、养血活血,共同达到养心助眠的目的。

综上,安寐丹可改善睡眠剥夺大鼠的自发活动昼夜节律紊乱,可能与影响CREB/Per信号通路,调

节生物钟蛋白 Bmal1、Clock、Per1、Cry1 的表达有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WHEATON A G, LIU Y, PERRY G S, et al. Effect of short sleep duration on daily activities-United States, 2005-2008[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2011, 60(8):239-242.
- [2] ZHOU H R, WU J R, BEI L, et al. Hydroalcoholic extract from *Abelmoschus manihot* (Linn.) Medicus flower reverses sleep deprivation-evoked learning and memory deficit[J]. Food Funct, 2020, 11(10): 8978-8986.
- [3] ZHU B, SHI C, PARK C G, et al. Effects of sleep restriction on metabolism-related parameters in healthy adults: a comprehensive review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Sleep Med Rev, 2019, 45:18-30.
- [4] HOR C N, YEUNG J, JAN M, et al. Sleep-wake-driven and circadian contributions to daily rhythms in gene expression and chromatin accessibility in the murine cortex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(51):25773-25783.
- [5] OROZCO-SOLIS R, MONTELLIER E, AGUILAR-ARNAL L, et al. A circadian genomic signature common to ketamine and sleep deprivation in the anterior cingulate cortex[J]. Biol Psychiatry, 2017, 82(5):351-360.
- [6] LU Y, LIU B, MA J, et al. Disruption of circadian transcriptome in lung by acute sleep deprivation[J]. Front Genet, 2021, 12:664334.
- [7] 徐波.《内经》生命周期理论探讨及安寐丹对睡眠剥夺模型 Orexin 信号通路作用研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2019.
- [8] 谢光璟,徐波,黄攀攀,等.安寐丹通过线粒体介导的海马神经细胞凋亡改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆水平[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(24):38-44.
- [9] MCDERMOTT C M, LAHOSTE G J, CHEN C, et al. Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons[J]. J Neurosci, 2003, 23(29):9687-9695.
- [10] 陈奇.中药药理研究方法学(精)[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006.
- [11] 王静,侯婉婷,秦雪梅,等.昼夜节律的相关研究进展[J].中国中药杂志,2021,46(13):3240-3248.
- [12] DEURVEILHER S, SEMBA K. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state [J]. Neuroscience, 2005, 130(1):165-183.
- [13] HASTINGS M H, MAYWOOD E S, BRANCACCIO M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus[J]. Nat Rev Neurosci, 2018, 19(8):453-469.
- [14] JHA P K, H BOUÂOUDA H, GOURMELEN S, et al. Sleep deprivation and caffeine treatment potentiate photic resetting of the master circadian clock in a diurnal rodent [J]. J Neurosci, 2017, 37(16): 3241-3216.
- [15] DEBOER T, DÉTÁRI L, MEIJER J H. Long term effects of sleep deprivation on the mammalian circadian pacemaker[J]. Sleep, 2007, 30(3):257-262.
- [16] LAVIV T, SCHOLL B, PARRA-BUENO P, et al. *In vivo* imaging of the coupling between neuronal and CREB activity in the mouse brain[J]. Neuron, 2020, 105(5):799-812.
- [17] YOKOTA S, YAMAMOTO M, MORIYA T, et al. Involvement of calcium-calmodulin protein kinase but not mitogen-activated protein kinase in light-induced phase delays and Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hamster [J]. J Neurochem, 2001, 77(2):618-627.
- [18] KOPP C, ALBRECHT U, ZHENG B, et al. Homeostatic sleep regulation is preserved in mPer1 and mPer2 mutant mice[J]. Eur J Neurosci, 2002, 16(6):1099-1106.
- [19] WISOR J P, O'HARA B F, TERAOKA A, et al. A role for cryptochromes in sleep regulation[J]. BMC Neurosci, 2002, 3(1):20.
- [20] BUNGER M K, WILSBACHER L D, MORAN S M, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals [J]. Cell, 2000, 103(7):1009-1017.
- [21] NAYLOR E, BERGMANN B M, KRAUSKI K, et al. The circadian clock mutation alters sleep homeostasis in the mouse [J]. J Neurosci, 2000, 20(21): 8138-8143.

[责任编辑 周冰冰]