

· 数据挖掘 ·

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

黄晓宇, 谢光璟, 黄攀攀*

(湖北中医药大学基础医学院, 武汉 430065)

[摘要] 目的:使用基因芯片测序技术测定睡眠剥夺大鼠模型被天王补心丹干预前后,能量代谢相关差异基因功能表达谱的变化,为睡眠剥夺的防治提供可能思路及理论依据。方法:采用多平台水环境法对大鼠进行睡眠剥夺造模后随机分为天王补心丹组和模型组,天王补心丹组按照 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量灌服天王补心丹水煎剂,模型组给予等体积纯水,连续灌胃14 d。取肝、心、下丘脑为样本,高通量测序获取差异基因,采用基因本体(GO)数据库与京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)通路富集分析,并构建与lncRNA的共表达网络,应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测其中3个差异性显著的能量代谢关键基因神经肽Y(NPY),双特异性磷酸酶1/丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶1(DUSP1/MKP-1), α -L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)的mRNA表达水平。结果:得到321个差异基因,其中表达上调231个,下调90个,主要促进脂代谢、糖代谢与蛋白代谢进程;参与纤维蛋白原、维生素B₆与星形胶质细胞源性神经营养因子(MANF)的合成表达;涉及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),p53基因(p53),环磷酸腺苷(cAMP)等信号通路。与模型组比较,天王补心丹组IDUA表达水平明显增加($P<0.05$),NPY和DUSP1表达水平显著降低($P<0.01$)。结论:天王补心丹从多方面干预睡眠剥夺大鼠的能量代谢机制,通过下调NPY, DUSP1的mRNA表达水平,可能激活参与p38 MAPK信号通路,影响脂质代谢。

[关键词] 天王补心丹; 睡眠剥夺; 能量代谢; 生物信息学; 差异基因

[中图分类号] R2-0;R289;R338.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)22-0172-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202239

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200925.1751.005.html>

[网络出版日期] 2020-9-27 09:55

Bioinformatics Analysis on Mechanism of Modified Tianwang Buxindan Intervention on Energy Metabolism in Sleep Deprived Rats

HUANG Xiao-yu, XIE Guang-jing, HUANG Pan-pan*

(School of Basic Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the changes of functional expression profile of energy metabolism related differential genes in sleep deprived rats before and after intervention by Tianwang Buxindan by microarray sequencing technology, so as to provide possible ideas and theoretical basis for the prevention and treatment of sleep deprivation. **Method:** The rats were randomly divided into two groups: the Tianwang Buxindan group and the model group. The Tianwang Buxindan group was given the decoction of Tianwang Buxindan at the dose of $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, and the model group was given the pure water of equal volume for 14 days. Taking liver, heart and hypothalamus as samples, high-throughput sequencing was used to obtain differential genes. Gene Ontology (Go) classification and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were used to construct a co expression network with lncrna. Real-time fluorescence

[收稿日期] 20200408(028)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874414);武汉市科技计划项目(2019020701011433)

[第一作者] 黄晓宇,在读硕士,从事中医药防治睡眠疾病研究,E-mail:huangxy1021@stmail.hbctcm.edu.cn

[通信作者] *黄攀攀,博士,副研究员,硕士生导师,从事中医药防治睡眠疾病研究,E-mail:panpanhuang@hbctcm.edu.cn

quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression levels of neuropeptide Y (NPY), bispecific phosphatase 1/mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (DUSP1/MKP-1) and alpha-L-iduronidase (IDUA), three key genes with significant differences in energy metabolism. **Result:** The 321 differentially expressed genes were obtained, 231 of which were up-regulated and 90 down regulated, which mainly promoted the process of lipid metabolism, glucose metabolism and protein metabolism, participated in the synthesis and expression of fibrinogen, vitamin B6 and mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF), and involved mitogen activated protein kinases (MAPK), p53 gene (p53), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and other signal pathways. Compared with the model group, the expression of IDUA significantly increased in the Tianwang Buxindan group ($P < 0.05$), but decreased significantly in NPY and DUSP1 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tianwang Buxindan can interfere with the energy metabolism mechanism of sleep deprived rats in many ways. By down regulating the mRNA expression level of NPY and DUSP1 genes, it may activate the p38 MAPK signal pathway and affect the lipid metabolism.

[Key words] Tianwang Buxindan; sleep deprivation; energy metabolism; bioinformatics; differential gene

睡眠是生命活动的重要组成部分,全球性社会交往如今深刻改变了人类的生活方式,工作时间延长、夜班及照明时间增加等,导致睡眠时间逐渐减少,各种因素使睡眠剥夺的发生成为常态化^[1-3]。据流行病学统计全球约有1/3的人口受睡眠问题困扰^[4]。睡眠剥夺与能量代谢之间关系密切^[5],可引发线粒体^[6]、糖脂代谢^[7]机制异常,进而导致病理反应。如神经肽Y (NPY)过表达可诱发2型糖尿病及心血管并发症^[8];瘦素(leptin)水平下降会产生脂肪肝、肥胖型肾病^[9]等病理表现。

天王补心丹最早见于元代危亦林所著《世医得效方》,是滋养安神的代表方剂,具有滋阴养血、补心安神之功,常用于治疗阴亏血虚、心神不安所导致的睡眠不安、心悸怔忡、神疲健忘等一系列病症^[10],在临床上取得良好效果^[11]。体外实验表明,天王补心丹中部分药物成分在能量代谢中发挥重要作用,如君药生地黄的地黄多糖可改善线粒体的过氧化损伤,从而调节细胞能量代谢^[12];臣药酸枣仁冻干粉与下丘脑内leptin, NPY及阿片-促黑素细胞皮质素原(POMC)的表达水平密切相关^[13];佐药丹参所含有的丹参素异丙酯能够有效提升维生素B₈总量、调控脂肪酸和葡萄糖底物代谢,保护心肌的细胞器结构与代谢^[14]。但天王补心丹组方成分复杂,作用靶点较多,在干预睡眠剥夺诱导能量代谢类病理反应中的有效基因靶点及其信号通路尚无系统阐释。本研究对大鼠进行睡眠剥夺造模及天王补心丹给药后,使用基因芯片测序技术在宏观上对组间的差异基因及其信号通路进行富集分析,构建与lncRNA的共表达网络图,并筛选其中

3个差异基因进行实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)验证,为进一步研究天王补心丹改善SD诱导的病理反应提供可行的理论思路。

1 材料

1.1 动物 成年健康雄性SPF级SD大鼠16只,体重(200±20)g,由湖北省实验动物研究中心提供,实验动物合格证号SCXK(鄂)2018-0049。实验过程在湖北中医药大学老年医学研究所进行,大鼠自由摄食、饮水。饲料、垫料经紫外线照射灭菌处理。动物房温度控制在(24±2)℃,湿度控制在50%~60%。光照/黑暗周期为12h/12h,定期更换垫料并及时添加饲料、饮水。动物饲养于湖北中医药大学老年医学研究所动物房。本实验获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准,并严格执行伦理委员会的要求。

1.2 药品及试剂 天王补心丹加减组成及剂量参照课题组前期研究^[15-16],由生地12g,酸枣仁9g,柏子仁9g,天门冬9g,麦门冬9g,当归9g,人参片5g,丹参5g,玄参5g,五味子5g,茯苓5g,远志5g,桔梗5g组成,朱砂有毒故去之,药材规格为中药饮片,均购自湖北中医药大学国医堂,并由湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定均为正品。制备水煎剂,纯水没过药材2~3cm浸泡30min,滤过后再加纯水没过药材3~5cm,煎煮2次,每次30min,合并2次煎液浓缩,去渣滤净后静置,4℃冰箱保存备用。trizol试剂(武汉Bioswamp公司,批号201808);DEPC(上海翊圣生物科技有限公司,批号211640);miRNA提取试剂盒,RNase-Free DNase Set(德国Qiagen公司,批号分别为217004,79254);

Qubit™RNA高灵敏度荧光定量试剂盒, Qubit™双链DNA高灵敏度荧光定量试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号分别为 1875983, 1841432); 高灵敏度 RNA 筛查带, D1000 ScreenTape(美国 Agilent Technologies 公司, 批号分别为 5067-5579, 5067-5582); NEBNext rRNA 去除试剂盒, NEBNext®Ultra™ I RNA 文库制备试剂盒, NEBNext 多样本接头引物试剂盒 1, 试剂盒 2(美国 New England Biolabs 公司, 批号分别为 E6310L, E7760L, E7335L, E7500L); cDNA 和 cRNA 体系纯化试剂盒, 核酸纯化试剂盒(德国 Beckman Coulter 公司, 批号分别为 A63987, A63881); 5×protein Loading buffer(武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号 186231); 大鼠 NPY, 双特异性磷酸酶 1/丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1(DUSP1/MKP-1), α -L-艾杜糖酶(IDUA)引物及内参 β -肌动蛋白(β -actin)引物均由上海其明基因技术有限公司设计验证。

1.3 仪器 TGL-16M 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机有限公司); EPS100 型核酸电泳仪(上海天能科技有限公司); Agilent 2100 型生物分析仪(美国 Agilent Technologies 公司); Nanodrop 2000 型超微量紫外/分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BioSens SC805 凝胶成像系统(上海山富科学仪器有限公司); Oven 645 型基因芯片杂交箱, 450 基因芯片洗涤工作站(美国昂飞公司); EF4577 型热循环仪(德国 Eppendorf 公司); Rotor-Gene Q 型 PCR 仪(德国 Qigaen 公司); 自制睡眠剥夺箱(长 72 cm, 宽 48 cm, 高 30 cm), 当中设置 3×2 联体直径 8 cm, 高 8 cm 的平台。

2 方法

2.1 动物造模 适应性喂养 7 d 后采用多平台水环境法对大鼠进行睡眠剥夺。睡眠剥夺箱中放入联体平台后注水, 使水面低于平台 1 cm, 平台上方放置由平行不锈钢丝制成的笼罩, 嵌夹饮水和饲料。大鼠可在平台间自由活动, 当大鼠进入深睡眠阶段时全身肌肉松弛, 即会从窄小的平台上落入水中。每日对大鼠睡眠剥夺 20 h(当日 14:00 至次日 10:00), 水温控制在(24±2)℃。

2.2 动物分组及给药 造模 7 d 后将 16 只大鼠随机分为天王补心丹组与模型组, 每组 8 只。分组完成后开始给药, 根据《中药药理研究方法学》^[17]中人与大鼠药物剂量折算标准, 确定大鼠的有效剂量为 17.6 g·kg⁻¹, 由于大鼠耐药性较人稍强, 按 20 g·kg⁻¹ 的剂量给予天王补心丹组含生药 2 g·mL⁻¹ 的天王补

心丹水煎剂灌胃; 模型组灌服等体积纯水。每日下午灌胃 1 次, 持续给药 14 d。

2.3 动物取材 末次灌胃给药后 24 h 将大鼠和浸有乙醚的棉球放入大烧杯中, 封口。麻醉后断头处死, 剪开胸腔, 分离心脏, 生理盐水冲洗, 选取相同部位剪取 1 cm×1 cm 组织, 放入冻存管后, -80℃ 保存待检; 肝脏取材方法同上。断头于冰盘上迅速剥离下丘脑, 处理方法同上。

2.4 基因芯片测序天王补心丹组与模型组差异基因

2.4.1 RNA 抽提 取 1 cm×1 cm 心脏组织匀浆器磨碎, 加入 trizol 裂解液 1 mL, 震荡 5 min, 静置 5 min, 4℃ 下高速冷冻离心机 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min; 取上清液, 加入三氯甲烷 200 μ L, 剧烈震荡震荡 15 s, 静置 15 min, 直至呈乳白色, 4℃ 下高速冷冻离心机 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min; 取上清液, 加入异丙醇 500 μ L, 颠倒 10 次, 冰上放置 20 min, 4℃ 下高速冷冻离心机 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min; 弃上清液, 加入 75% 乙醇 1 mL, 4℃ 下高速冷冻离心机 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取底部乳白色絮状物, 室温干燥 5 min; 加入 DEPC 水 20 μ L 65℃ 溶解洗脱, 恢复室温后静置沉淀, -80℃ 保存待检。肝脏、下丘脑组织操作同上。

2.4.2 RNA 质检 取提取好的 RNA 溶液 2 μ L, 于 Nanodrop 2000 测定 A_{260}/A_{280} , 质控标准: NanoDrop 2000: 1.9< A_{260}/A_{280} <2.1, 电泳检测, 凝胶成像系统观察。合格样品送上海其明基因技术有限公司进行基因芯片分析。

2.5 差异基因与 lncRNA 共表达网络构建 基于加权基因共表达网络分析(WGCNA)对差异基因进行分析。计算基因与基因之间的相关性系数, 筛选条件为>0.92; 使基因满足 scale-free 网络分布, 并计算网络中基因之间的加权值; 通过分层聚类对整个基因集进行模块分析, 将具有相同表型或功能的基因聚类至同一模块中, 使用 cytoscape 软件生成图片。

2.6 检测 NPY, DUSP1, IDUA 的 mRNA 表达水平

RNA 抽提: 使用 2.4 项同批样品, 方法同 2.4.1 项。逆转录: 依次加入 5×gDNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L, 总 RNA 1 μ L, RNase Free dH₂O 6 μ L 后, 室温静置 10 min; 再依次加入 Prime Script RT Enzyme Mix I 1 μ L, RT Prime mix 1 μ L, 5×Prime Script buffer 2 4 μ L, RNase Free dH₂O 4 μ L 后, 以条件 37℃ 15 min, 85℃ 5 s 进行逆转录。扩增: 每孔取 2 μ L 逆转录反应产物, 依次加入 Reverse Primer 0.4 μ L, SYBR Premix Ex Taq™ (2×) 10 μ L,

ddH₂O 7.2 μL 和 Forward Primer 0.4 μL。置入 PCR 仪,扩增条件:95 °C 10 min,循环5次,95 °C 15 s,58 °C 1 min,65 °C 30 s,循环40次。使用 2^{-ΔΔC_t}法进行数据分析,各引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IDUA	上游 CCTGGAGAACCACTGTCCTG	151
	下游 GGGCTGCTGAGTTGATTGTC	
NPY	上游 CACCGGTGGAGCTCATTG	127
	下游 ATAGAGCGAGGGTCAGTCCA	
DUSP1	上游 TCTGGATTGTCGCTCCTTCT	129
	下游 GTGTTCGGCACGATATGCT	
β-actin	上游 ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	119
	下游 TCCATATCGTCCCAGTTGGT	

2.7 统计学方法 生物信息学分析采用独立样本 *t*

检验,筛选条件 *P*-value<0.05, Fold change>1.2 或 <0.833 33,由上海其明基因技术有限公司作协作分析。使用统计软件 SPSS 19.0 对 Real-time PCR 实验数据进行处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 天王补心丹组与模型组的差异基因筛选 通过 R 语言 3.5.1 软件将原始数据进行处理,利用 limma 包对收集到的天王补心丹组与模型组数据信息进行差异表达分析,共测序得到 32 883 个基因。其中 321 个为差异表达基因,表达性上调 231 个,表达性下调 90 个。利用 R 语言中的 gplots 工具绘制聚类热图,其中红色表示上调差异基因,绿色表示下调差异基因;火山图中红色表示上调差异基因,蓝色表示下调差异基因,其余基因用灰色代替。见图 1。

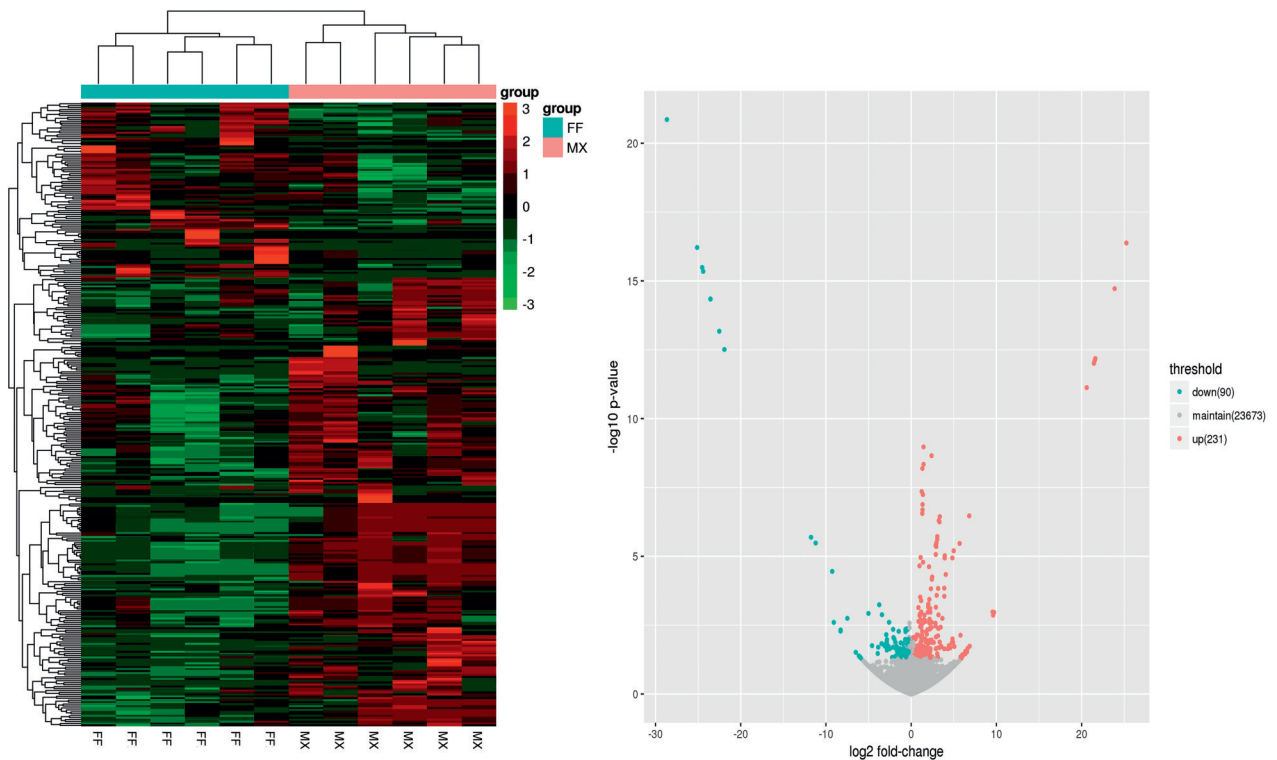


图1 天王补心丹组与模型组的差异基因测序

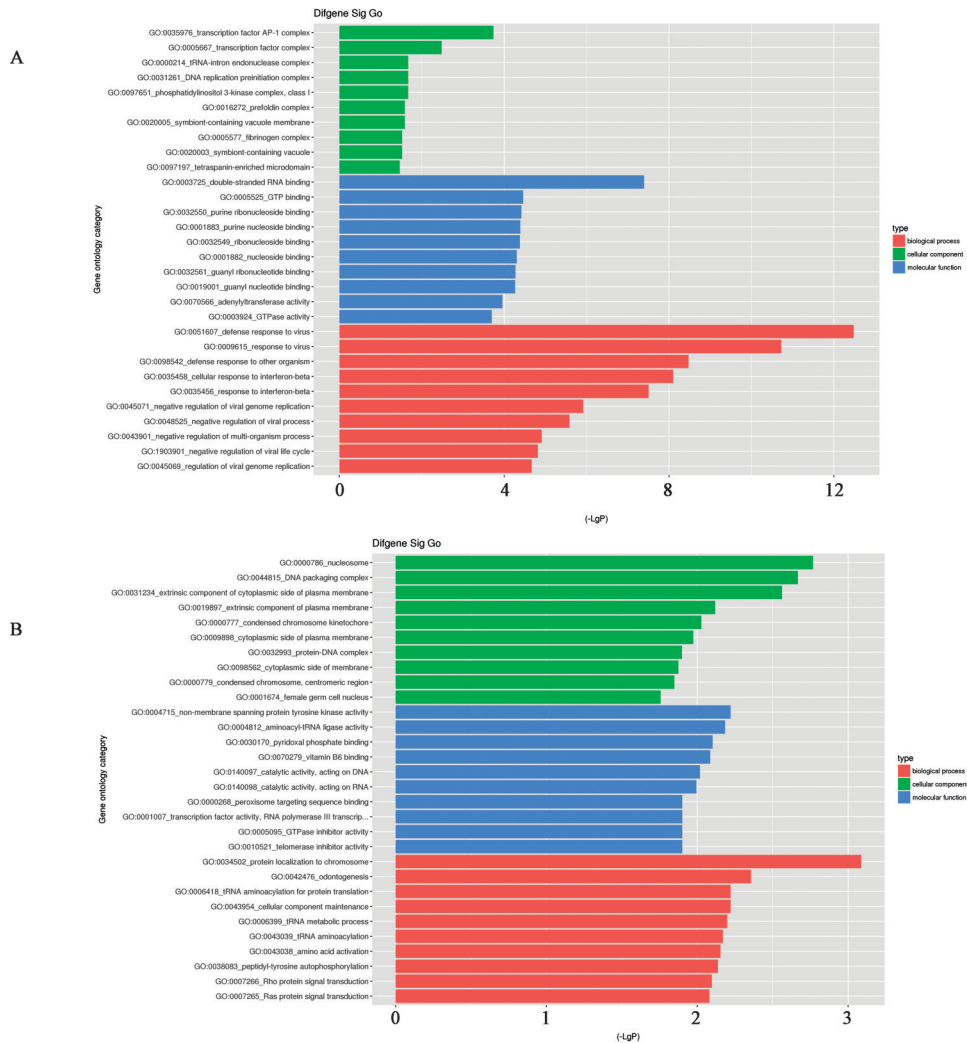
Fig. 1 Sequence of differential genes between Tianwang Buxindan group and model group

3.2 差异基因基因本体(GO)富集分析 对差异基因中表达上调和下调的基因分别进行 GO 富集分析,从分子功能(MF),生物学过程(BP)及细胞组成(CC)3个层面分别展示天王补心丹干预 SD 大鼠的生物学进程中前 10 位显著性差异基因,结果显示主要包括多生物体进程的负性调节(negative

regulation of multi-organism process),氨基酸活化(amino acid activation),tRNA 代谢过程(tRNA metabolic process)等生物学进程;并参与转录因子 AP-1 复合物(transcription factor AP-1 complex),纤维蛋白原复合物(fibrinogen complex),细胞质膜外成分(extrinsic component of plasma membrane)的组

成;还可以促进维生素 B₆ 结合 (vitamin B₆ binding), 腺苷酸转移酶活性 (adenylate transferase activity),

嘌呤核苷及嘌呤核糖核苷的结合 (purine nucleoside/purine ribonucleoside binding)。见图 2。



A. 上调差异基因; B. 下调差异基因 (图 3 同)

图 2 差异基因密切参与生物学进程的前 10 条 GO 富集通路

Fig. 2 Top ten GO enrichment pathways closely involved in biological processes

3.3 京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析

基于 KEGG 数据库,对差异基因参与的通路进行显著性分析,根据通路中的显著性水平 (P -value) 和差异基因数量,构建部分上调和下调差异基因信号通路气泡图。发现差异基因主要集中在 p53 信号通路 (p53 signaling pathway), 环磷酸腺苷 (cAMP) 信号通路 (cAMP signaling pathway), 丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK signaling pathway), 硒化合物代谢 (selenocompound metabolism), Nod 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway)。见图 3。

3.4 差异基因与 lncRNA 的共表达网络 将上述筛选出的差异基因进行编码蛋白转换后构建与 lncRNA 的共表达网络,共包含 134 个节点,365 条

边。圆点为 lncRNA,上调用红色表示,下调用蓝色表示;直线表示两者间的调控关系,实线代表正调控,虚线代表负调控。圆点被链接的线越多,代表与其有上下游调控关系的 RNA 数目更多,其在表达调控机制上的作用更关键,同时已知核心 RNA 的空间定位及功能,可以推测在共表达网络中其周边 RNA 的功能。发现一些在能量代谢中参与度较高的基因如 IDUA, NPY, DUSP1, G 蛋白信号通路调节因子 1 (RGS1) 等。见图 4。

3.5 对 SD 大鼠 NPY, DUSP1, IDUA mRNA 表达的影响 与模型组比较,天王补心丹组 IDUA 表达量明显增加 ($P < 0.05$), NPY 和 DUSP1 表达量上明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

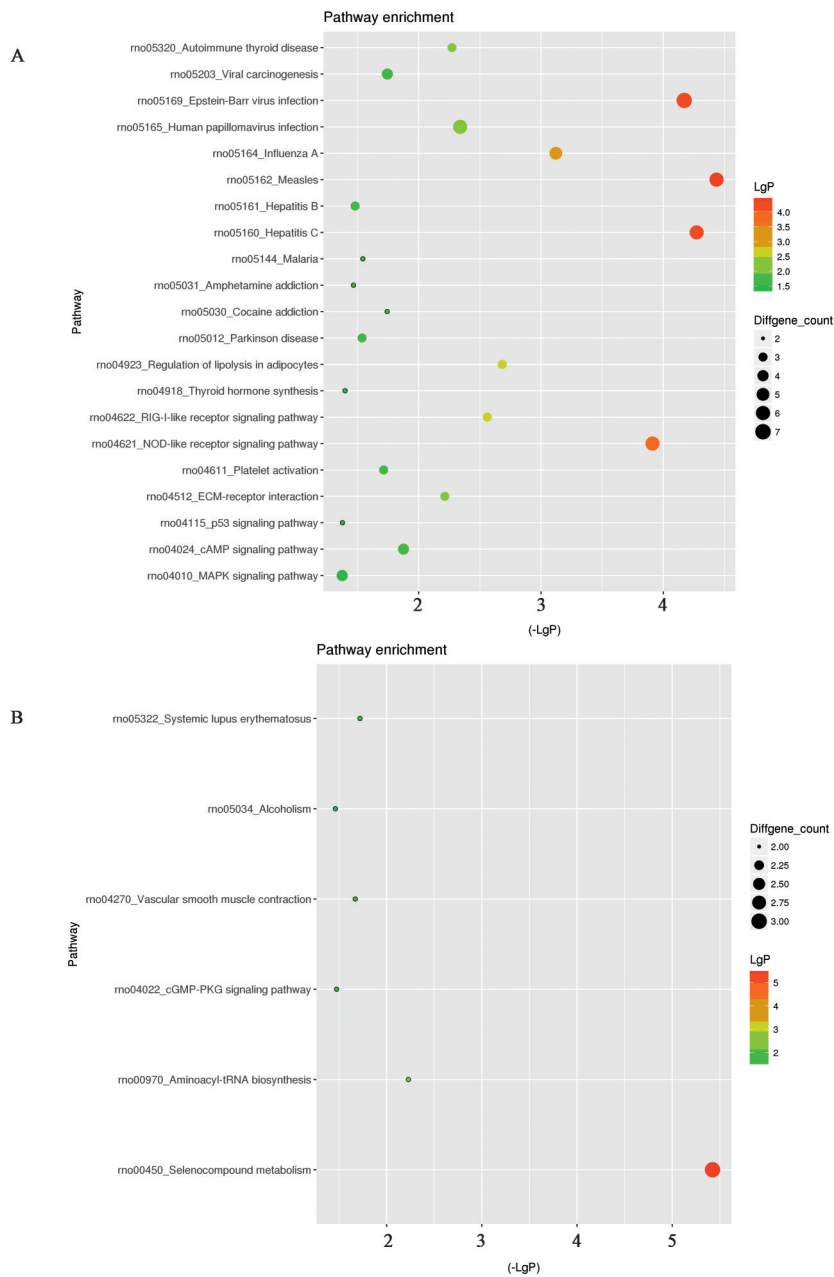


图3 差异基因参与度显著的信号通路及通路中的基因数量

Fig. 3 Signal pathways with significant different gene participation and number of genes in pathway

4 讨论

近年来,睡眠剥夺愈发受到社会各界的关注和重视,临床调查发现睡眠障碍发病人群呈现出平均年龄年轻化、疾病表型多样化的趋势^[18]。中医认为睡眠由心神主导和控制,贯穿睡眠活动的多个环节,失眠病位多在心,心神失养或心神不宁是其主要病机^[19]。天王补心丹是养心安神法的代表方,课题组前期研究发现,与模型组比较,天王补心丹给药组大鼠的体质量明显增加、耳温显著降低、呼吸频率与心率都显著减缓^[20]。

体外实验证实,睡眠不足会增加功能代谢相关

障碍的发作风险^[21]。一方面,睡眠剥夺状态下的脂肪细胞,会在减少 leptin 分泌的同时增强促食欲因子(ghrelin)的分泌,两者表现出极强的相关性,使个体产生明显的饥饿感并主动进食^[22-23]。同时,细胞线粒体中的内膜相关蛋白表达水平也会受到影响,如阴离子转运蛋白超家族和线粒体呼吸链复合物等,造成线粒体功能紊乱及体内氧化应激水平升高,从而干预细胞能量代谢^[7]。另一方面,睡眠剥夺所导致的交感神经活性增强伴随副交感神经活性减低,使胰岛β细胞活性受到抑制,血糖值和胰岛素水平降低^[8],葡萄糖代谢率明显下降^[24];同时甲状腺激

织脂质代谢的候选靶点^[36]。NPY可参与哺乳动物的睡眠调节,与食欲素(orexin)共同维持睡眠时间与能量摄入之间的稳态平衡,睡眠剥夺时下丘脑NPY的表达水平呈现过表达,与其受体Y₁Y₅的结合度增强^[8],从而直接影响饮食摄入,使热量摄取增加,脂肪消耗量上升,相反,睡眠恢复则可以减少NPY的表达,使机体转为低摄入状态^[37-38]。IDUA与黏多糖贮积症I型(MPS1)密切相关,当其表达量过低时直接影响到对代谢硫酸皮肤素(DS)和硫酸乙酰肝素(HS)的分解,致使DS、HS大量沉积于体内发生代谢疾病^[39],流行病学调查显示MPS患者往往伴随有不同程度的睡眠障碍问题^[40]。代谢组学、蛋白质组学、基因组学等多组学联用实验发现, IDUA作为骨质疏松症的潜在靶点之一出现在交叉区,推测其可能参与骨代谢^[41]。

本研究使用基因芯片技术对两组大鼠的差异表达基因进行生物信息学分析,发现天王补心丹从多方面干预睡眠剥夺大鼠的能量代谢机制。差异基因可促进脂代谢、糖代谢与蛋白代谢进程;参与纤维蛋白原、维生素B₆与MANF的合成表达;涉及MAPK, p53, cAMP等信号通路。对SD大鼠采用天王补心丹干预后,心、肝、下丘脑组织中NPY和DUSP1的mRNA表达量均有明显降低, IDUA的mRNA表达量明显增高。笔者推测天王补心丹可能通过调节NPY, DUSP1 mRNA表达水平,参与p38 MAPK信号通路的激活,影响SD大鼠的脂质代谢。今后将开展进一步的实验,研究其在能量代谢信号通路中的蛋白表达等具体情况。

[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] 叶增杰, 梁木子, 胡蕙, 等. 失眠障碍的国内外研究进展 [J]. *医学与哲学*, 2017, 38(5): 60-63.

[5] 赵典. 慢性睡眠剥夺对小鼠认知功能与 β 样淀粉蛋白及代谢相关分子表达影响[D]. 遵义: 遵义医学院, 2016.

[6] 郭兴道, 李炜, 张癸荣, 等. 睡眠剥夺对学习记忆及中枢神经系统相关分子的影响 [J]. *神经药理学报*, 2014, 4(1): 34-51.

[7] 王帆, 张媛, 陈钊, 等. 完全睡眠剥夺对大鼠糖代谢的影响及其机制研究 [J]. *中国慢性病预防与控制*, 2015, 23(5): 354-356.

[8] 张晨亮, 林树, 宋治远. 神经肽Y在2型糖尿病及其心血管并发症中的作用 [J]. *心血管病学进展*, 2017, 38(1): 106-109.

[9] 蒋丹丹, 曹兰凤, 许朝霞, 等. 瘦素受体基因敲除SD大鼠的表型及病理观察 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(3): 331-338.

[10] 谢光璟, 薄文集, 黄攀攀, 等. 天王补心丹源流探讨与组方评析 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(11): 2699-2700.

[11] 白华, 董永书. 快捻久留针刺法结合天王补心丹治疗阴虚火旺型失眠症 [J]. *吉林中医药*, 2019, 39(6): 813-816.

[12] 朱敏丰. 地黄多糖对局灶性脑缺血小鼠线粒体过氧化损伤的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(2): 40-43.

[13] 阮养春. 酸枣仁对持续黑暗条件下大鼠觉醒一睡眠周期中能量代谢率的干预作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.

[14] 钟伟, 王永刚, 李彩虹, 等. 益气活血类中药干预心肌能量代谢的实验研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(3): 689-691.

[15] 谢光璟, 黄攀攀, 王平. 基于cAMP/CREB信号通路探讨天王补心丹对复合失眠模型大鼠学习记忆水平及神经因子的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(9): 1991-1994.

[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 中国医药科技出版社, 2015: 585-586.

[17] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.

[18] 郝荻. 失眠患者中医体质辨析与睡眠质量及心理状况关系初探 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[19] 鄢奉斌, 陈虹, 祝娅, 等. 家庭医生制度下的中医适宜技术服务模式在睡眠障碍治疗中的应用 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2020, 18(15): 71-73.

[20] 黄攀攀. 从“心藏神”探讨《内经》睡眠理论及天王补心丹干预老年失眠大鼠作用机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2010.

[21] COLWELL C, MATVEYENKO A. Timing is everything: implications for metabolic consequences of

- sleep restriction [J]. *Diabetes*, 2014, 63 (6) : 1826-1828.
- [22] SPIEGEL K, TASALI E, PENEV P, et al. Brief communication: sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite [J]. *Ann Intern Med*, 2004, 141(11):846-850.
- [23] PEJOVIC S, VGONTZAS A, BASTA M, et al. Leptin and hunger levels in young healthy adults after one night of sleep loss [J]. *Sleep Res*, 2010, 19(4) : 552-558.
- [24] 李雁鹏,赵忠新. 睡眠剥夺对内分泌功能及能量代谢的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(6) : 703-705.
- [25] BELLESI M, DEVIVO L, CHINI M, et al. Sleep loss promotes astrocytic phagocytosis and microglial activation in mouse cerebral cortex [J]. *Neurosci*, 2017, 37(21):5263-5273.
- [26] SENGUPTA A, RHOADES S, KIM E, et al. Sleep restriction induced energy, methylation and lipogenesis metabolic switches in rat liver [J]. *Biochem Cell Biol*, 2017, 93:129-135.
- [27] 张彦. 纤维蛋白原与脂代谢及冠心病关系的临床研究 [D]. 北京:北京协和医学院, 2016.
- [28] 李艳. 祛痰抵方对2型糖尿病高凝状态纤维蛋白原影响的临床研究 [D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2013.
- [29] 凌娟,李军晖,罗建波,等. 维生素B₆对动物免疫功能影响的研究进展 [J]. 饲料研究, 2017, doi: 10.13557/j.cnki.issn1002-2813. 2017. 18. 003.
- [30] 王昌会. 转录因子AP-1通过增强新型神经营养因子MANF表达抑制肝癌细胞的增殖和迁移 [D]. 合肥:安徽医科大学, 2016.
- [31] HAKONEN E, CHANDRA V, FOGARTY C, et al. MANF protects human pancreatic beta cells against stress-induced cell death [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(10):2202-2214.
- [32] XU S, DI Z, HE Y, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) protects against A β toxicity via attenuating A β -induced endoplasmic reticulum stress [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 2(1): 13-16.
- [33] 温晓梨. 调控DUSP1(MKP-1)基因表达的特异性RNA结合蛋白及microRNA的筛选 [D]. 广州:南方医科大学, 2013.
- [34] CUI L, XUE R, ZHANG X, et al. Sleep deprivation inhibits proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells by a mechanism involving IL-17 and p38 MAPK [J]. *Brain Res*, 2019, 1714:81-87.
- [35] ANTLE M C, TSE F, KOKE S, et al. Non-photic phase shifting of the circadian clock: role of the extracellular signal-responsive kinases I/II/mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 28(12):2511-2518.
- [36] RUIZ M, CODERRE L, ALLEN B, et al. Protecting the heart through MK2 modulation, toward a role in diabetic cardiomyopathy and lipid metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864: 1914-1922.
- [37] DENNIS L, SPAETH A, GOEL N. Phenotypic stability of energy balance responses to experimental total sleep deprivation and sleep restriction in healthy adults [J]. *Nutrients*, 2016, 8(12):823.
- [38] MARTINS P, MARQUES M, TUFIK S, et al. Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia, and metabolic changes in response to sleep deprivation [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298(3):E726-E734.
- [39] 曹健,齐晓丽,刘卫德,等. 亚洲地区黏多糖贮积症的研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36(25): 3847-3850.
- [40] RAPOPORT D, MITCHELL J. Pathophysiology, evaluation, and management of sleep disorders in the mucopolysaccharidoses [J]. *Mol Genet Metab*, 2017, 122:49-54.
- [41] KODRIC K, ČAMERNIK K, ČERNE D. P4 medicine and osteoporosis: a systematic review [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2016, 128:480-491.

[责任编辑 孙丛丛]