

# 天王补心丹加减通过 orexin A/OX1R 对慢性睡眠剥夺小鼠糖脂代谢的干预作用

黄晓宇<sup>1</sup>, 谢光璟<sup>1</sup>, 李浩<sup>1,2</sup>, 高寒<sup>1</sup>, 黄攀攀<sup>1\*</sup>

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065;

2. 中国船舶重工集团公司 第七一二研究所, 武汉 430065)

**【摘要】** 目的:从食欲素 A(orexin A)/食欲素受体 1(OX1R)信号通路探讨天王补心丹加减改善慢性睡眠剥夺小鼠糖脂代谢异常的作用机制。方法:6周龄雄性 C57BL/6 小鼠 50 只,随机分为空白组,模型组,艾司唑仑组及天王补心丹加减低、高剂量组,每组 10 只。对除空白组外采用多平台水环境法睡眠剥夺 8 周,后 4 周予天王补心丹水煎剂(8.5, 17 g·kg<sup>-1</sup>)与艾司唑仑溶液(9.1 mg·kg<sup>-1</sup>)灌胃,空白、模型组灌服等体积纯水。每周测量 2 次小鼠摄食量与体质量;第 49 天尾静脉采血进行葡萄糖耐受实验(GTT),第 52 天尾静脉采血进行胰岛素耐受实验(ITT);应用全自动生化分析仪检测血清中总胆固醇(TCH),甘油三酯(TG)与游离脂肪酸(FFA)表达;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清及下丘脑中 orexin A 表达量;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)检测下丘脑中 OX1R mRNA 和蛋白表达水平。结果:给药后各组小鼠的食物摄入量出现差异;与空白组比较,模型组体质量明显降低( $P<0.05$ ),糖耐量出现明显异常,TCH, TG, FFA 水平显著升高( $P<0.01$ ),同时血清及下丘脑中 orexin A 表达量显著升高( $P<0.01$ ),下丘脑中 OX1R mRNA 和蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,天王补心丹加减各组体质量明显升高( $P<0.05$ ),具有更好的葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性,TCH, TG, FFA 水平均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),并伴有血清及下丘脑中 orexin A 表达量明显下降( $P<0.05, P<0.01$ ),OX1R 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。结论:天王补心丹加减可以保护慢性睡眠剥夺诱导的小鼠糖脂代谢异常,推测其机制可能与 orexin A/OX1R 信号表达下调有关。

**【关键词】** 天王补心丹; 睡眠剥夺; 糖脂代谢; 食欲素 A(orexin A); 食欲素第 1 受体(OX1R)

**【中图分类号】** R2-0;R289;R338.63 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2021)01-0121-07

**【doi】** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202242

**【网络出版地址】** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201015.1404.006.html>

**【网络出版日期】** 2020-10-15 15:15

## Intervention Effect of Modified Tianwang Buxindan on Glucose and Lipid Metabolism in Mice with Chronic Sleep Deprivation Through Orexin A/OX1R

HUANG Xiao-yu<sup>1</sup>, XIE Guang-jing<sup>1</sup>, LI Hao<sup>1,2</sup>, GAO Han<sup>1</sup>, HUANG Pan-pan<sup>1\*</sup>

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. 712 Research Institute Hospital, China Shipbuilding Industry Corporation, Wuhan 430065, China)

**【Abstract】** **Objective:** to explore the mechanism of modified Tianwang Buxindan in improving abnormal glucose and lipid metabolism in mice with chronic sleep deprivation from the signal pathway of orexin A/ orexin receptor 1 (OX1R). **Method:** The 50 6-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, estazolam group and Tianwang Buxindan low and high dose groups, for ten mice of each group. Except the blank group, rats were deprived of sleep for 8 weeks by the method of multi-platform water environment. In the last 4 weeks, Tianwang Buxindan (8.5, 17 g·kg<sup>-1</sup>) and estazolam solution (9.1 mg·kg<sup>-1</sup>)

**【收稿日期】** 20200521(029)

**【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.hbctm.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@hbctm.edu.cn

were given to the stomach, and the blank group and the model group were fed with pure water of the same volume. The food intake and body weight of mice were measured twice a week, on the 49<sup>th</sup> day, blood samples were collected from the tail vein for glucose tolerance test (GTT), on the 52<sup>nd</sup> day for insulin tolerance test (ITT), was used to detect the expression of total cholesterol (TCH), triglyceride(TG) and free fatty acid(FFA) in serum, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of orexin A in serum and hypothalamus. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of OX1R in hypothalamus. **Result:** After administration, the food intake of mice in each group was different, compared with the blank group, the body weight of model group was significantly reduced ( $P<0.05$ ), the glucose tolerance was significantly abnormal, and the TCH, TG, FFA values were significantly increased ( $P<0.01$ ). The expression of orexin A in serum and hypothalamus increased significantly ( $P<0.01$ ), and the mRNA and protein expression levels of OX1R in hypothalamus increased significantly ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the body weight of each group of Tianwang Buxindan was significantly increased ( $P<0.05$ ), with better glucose tolerance and insulin sensitivity, TCH, TG, FFA values were significantly reduced ( $P<0.05, P<0.01$ ), accompanied by serum and the expression of orexin A in the hypothalamus was significantly decreased ( $P<0.05, P<0.01$ ), the mRNA and protein expression levels of OX1R were significantly decreased ( $P<0.05, P<0.01$ ). **Conclusion:** Tianwang Buxindan can protect mice from abnormal glucose and lipid metabolism induced by chronic sleep deprivation, and its mechanism may be related to the down-regulation of orexin A/OX1R signal expression.

**[Key words]** Tianwang Buxindan; sleep deprivation; glucose and lipid metabolism; orexin A; orexin receptor 1

睡眠是许多生理活动的重要调节者,失眠障碍往往伴随着对患者家庭、职业、学业等重要社会功能的损害,且其患者群的分布较为广泛<sup>[1]</sup>。大量对慢性睡眠剥夺(CSD)人群的调查以及在健康成年人中进行的睡眠剥夺(SD)临床实验发现,患者胰岛素、胆固醇、瘦素、皮质醇等糖脂代谢指标可发生明显变化<sup>[2]</sup>。食欲素A(orexin A)是一种具有兴奋刺激性的重要神经递质,在下丘脑外侧区分泌丰富,其波动会对睡眠/觉醒周期产生影响<sup>[3]</sup>,且能够参与进食行为和糖脂代谢<sup>[4-5]</sup>。orexin A通过激活其受体食欲素受体1(OX1R),进而上调丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB),腺苷酸环化酶(AC)等激酶的表达水平,达到调节相关生理功能的目的,前期研究发现SD大鼠模型下丘脑中 orexin A的合成、释放和受体表达均明显增强<sup>[6]</sup>。

天王补心丹是养心安神的代表方剂之一,原方出自《校注妇人良方》,临床研究表明其在失眠、焦虑、抑郁等心神疾病的治疗中效果显著、安全性高<sup>[7-8]</sup>,但对于天王补心丹在睡眠障碍所致代谢疾病方面的效用及可能机制的认知尚少。本研究选用C57BL/6小鼠制作CSD模型,参考课题组前期研究<sup>[9]</sup>选用艾司唑仑为阳性药组,在给予低、高两种剂

量的天王补心丹水煎剂治疗后,测定摄食量与体质量,糖脂代谢相关指标,orexin A在血清和下丘脑中的表达以及OX1R在下丘脑中mRNA和蛋白表达量。旨在进一步明确CSD诱导的糖脂代谢异常发生,并探讨天王补心丹通过orexin A/OX1R信号通路对其发挥的改善作用。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级6周龄雄性C57BL/6小鼠50只,购自湖北省实验动物研究中心,许可证号SYXK(鄂)2019-0008。小鼠饲养在标准环境控制下的动物房内,温度(24±2)℃,湿度(60±5)%,昼夜节律12/12h。本实验在湖北中医药大学老年医学研究所进行,并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。

**1.2 药品及试剂** 参考课题组前期研究<sup>[9]</sup>确定天王补心丹水煎剂的药物组成及剂量为生地黄12g,酸枣仁、柏子仁、天冬、麦冬、当归各9g,人参片、丹参、玄参、五味子、茯苓、远志、桔梗各5g,朱砂有毒故去之,所有中药均购自中国北京同仁堂药业(批准编号Z11020140),经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定符合药用标准。药材加8倍量水浸泡60min,加热至沸腾保持40min,倒出备用,再加6倍量水加热煮沸30min,混匀2次药液浓缩为含生

药质量浓度为  $0.084 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的水煎剂,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用;艾司唑仑(济川药业集团有限公司,批号 H44021098);小鼠 orexin A 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号 E-EL-R0693C);trizol 试剂(武汉 Bioswamp 公司,批号 201808),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)逆转录试剂盒,2×PCR Mix 荧光定量试剂盒, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)兔抗鼠抗体(美国 ABclonal 公司,批号分别为 RK19306, RK19365, A104531);OX1R 兔抗鼠抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab77370),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠二抗,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(武汉 Servicebio 公司,批号分别为 GB24301, G2703)。

**1.3 仪器** GT-1640 型血糖仪(日本京都公司);Chemray 240/800 型全自动血清生化分析仪(深圳雷杜生命科技);TGL-16M 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机有限公司);CFX96 型 Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);DU730 型核酸蛋白分析仪(美国 Beckman Coulter 公司);WD-9405FN 型脱色摇床, DYCZ-40K 型电泳仪, DYCZ-24D 型电泳槽, WD-9413C 型凝胶成像分析系统(北京六一仪器厂);Odyssey 型红外成像仪(美国 LI-COR Biosciences 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及模型制备** 50 只小鼠适应性喂养 7 d 后随机分为 5 组:空白组、模型组、艾司唑仑组及天王补心丹低、高剂量组,每组 10 只。采用多平台水环境法对除空白组以外的小鼠进行慢性睡眠剥夺造模。小鼠被放置在睡眠剥夺箱中直径 6 cm 的平台上,箱中注水,使水面低于平台 1 cm,平台上方放置有平行不锈钢丝制成的笼罩,嵌夹饮水、饲料,每日对小鼠睡眠剥夺 18 h(16:00 至次日 10:00),持续 56 d。为排除水环境可能产生的压力影响,将空白组注水箱中的小平台替换为直径 12 cm 宽平台,下方有不锈钢丝网覆盖,小鼠可在不掉入水中的情况下睡觉,其他实验条件各组完全相同。造模 28 d 后开始给药,每日下午 18:00 灌胃 1 次。依据《中药药理研究方法学》<sup>[10]</sup>人与小鼠的给药剂量折算,确定小鼠的有效给药剂量为  $8.372 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,故在实验选定  $8.5, 17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  作为天王补心丹的低、高剂量给药组;艾司唑仑组每日按  $9.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃;模型组与空白组给予等体积纯水,持续 28 d。动物实验程序由湖北省科学技术厅发布的《湖北省实

验动物管理条例》批准和监督。

## 2.2 指标检测

**2.2.1 摄食量与体质量称定** 每周将小鼠从睡眠剥夺箱中取出后称定体质量 2 次,并记录摄食量,摄食量测定依据为前 1 日 16:00 放置的饲料质量减去当日 10:00 残留的饲料质量。

**2.2.2 葡萄糖耐受试验(GTT)和胰岛素耐受试验(ITT)** 造模 49 d 后进行 GTT,小鼠禁食过夜,空腹尾静脉采血测血糖,腹腔注射 20% 葡萄糖  $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  后,分别在 30, 60, 90, 120 min 时尾静脉采血测血糖。GTT 3 d 后进行 ITT,空腹 6 h 测定基线血糖水平,各造模小鼠腹腔注射  $0.5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$  胰岛素(用生理盐水配置成  $0.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液),在 30, 60, 90, 120 min 时尾静脉采血测血糖。

**2.2.3 小鼠总胆固醇(TCH),甘油三酯(TG),游离脂肪酸(FFA)检测** 末次灌胃给药 24 h 后,无菌弯头镊子摘除小鼠眼球取血,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清于全自动生化分析仪上样检测。余下血清置  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱冻存。

## 2.2.4 ELISA 检测血清及下丘脑 orexin A 含量

小鼠取血后将其与浸有乙醚的棉球放入大烧杯中,封口,麻醉后断头处死。冰盘上迅速剥离大脑取出下丘脑部分,液氮速冻后置  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱冻存。实验时将制备好的血清及下丘脑取出,室温解冻,样本匀浆后取上清。在 96 孔板依次加样  $100 \mu\text{L}$ ,按试剂盒说明书操作后,在 450 nm 波长处测吸光度  $A$ ,计算 orexin A 含量。

**2.2.5 Real-time PCR 检测下丘脑中 OX1R 的 mRNA 表达** 取下丘脑样本加入 trizol 1 mL 匀浆提取总 mRNA,核酸分析仪检测样本中 mRNA 的质量;对检测合格的样本进行逆转录;按 Real-time PCR 试剂盒说明书依次添加试剂后进行扩增,条件为  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min,循环 5 次; $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s,  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min,  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,循环 40 次。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析所得数据。通过 Primer Premier 5.0 软件设计目的基因 OX1R 及内参基因  $\beta$ -actin 的引物序列,由武汉 Servicebio 公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
OX1R	上游 5'-AGAGAGCAGAGAGCGTTGTAAACC-3'	116
	下游 5'-TTCACAGGGACACATTGGTG-3'	
$\beta$ -actin	上游 5'-GGCTGTATCCCTCCATCG-3'	129
	下游 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	

**2.2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测下丘脑中 OX1R 蛋白表达** 取下丘脑样本于研磨仪匀浆, 4 °C, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 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 T-TBS (含 5% 脱脂奶) 封闭 1 h, 加入一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜; PBST 洗膜 3 次, 加入二抗 (1:1 万) 室温孵育 1 h; PBST 洗膜 3 次, 滴加显色液, 置成像仪下使条带可视化, 应用 Image Pro Plus 软件计算各条带灰度值。

**2.3 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 并进行方差同质性检验, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 CSD 小鼠食物摄入量的影响** 随时间推移各组小鼠摄食量均有升高, 给药前各组小鼠的摄食量比较, 差异无统计学意义。给药后与空白组比较, 造模各组的摄食量升高; 与模型组比较, 天王补心丹各组的摄食量降低, 但差异无统计学意义。见表 2。

**3.2 对 CSD 小鼠体质量的影响** 随时间推移各组小鼠体质量均有升高, 给药 28 d 后, 与空白组比较, 模型组体质量明显降低 (*P* < 0.05); 与模型组比较, 天王补心丹各组小鼠体质量明显升高 (*P* < 0.05)。见表 3。

**3.3 对 CSD 小鼠葡萄糖代谢的影响** 与空白组比较, GTT 测试中模型组小鼠血糖在不同时间点均有

表 2 天王补心丹对 CSD 小鼠食物摄入量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	造模前	给药前	给药 28 d 后
空白		2.42±0.42	3.15±0.23	3.44±0.19
模型		2.46±0.51	3.44±0.39	4.05±0.42
艾司唑仑	9.1×10 <sup>-4</sup>	2.53±0.39	3.47±0.50	3.72±0.46
天王补心丹	8.5	2.48±0.80	3.53±0.92	3.76±1.03
	17	2.51±0.35	3.43±0.27	3.60±0.27

表 3 天王补心丹对 CSD 小鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	造模前	给药前	给药 28 d 后
空白		21.15±1.12	27.67±1.20	33.69±1.19
模型		22.18±0.96	24.72±0.93	27.19±1.35 <sup>1)</sup>
艾司唑仑	9.1×10 <sup>-4</sup>	21.43±0.84	27.24±0.76	31.77±0.77 <sup>2)</sup>
天王补心丹	8.5	22.08±1.27	28.15±1.52	29.54±0.82 <sup>2)</sup>
	17	21.46±0.90	27.84±0.79	31.24±1.44 <sup>2)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.05; 与模型组比较<sup>2)</sup>*P* < 0.05。

显著增高 (*P* < 0.01), 且血糖趋势极不稳定; 在 ITT 测试中腹腔注射胰岛素 60 min 后血糖值上升速率显著升高。与模型组比较, GTT 测试中天王补心丹各组血糖在不同时间点有所降低, 血糖趋于稳定; 在 ITT 测试中腹腔注射胰岛素 60 min 后血糖值上升速率明显降低, 120 min 后血糖值明显降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。表明天王补心丹各组具有更好的葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性。见表 4、5。

表 4 天王补心丹对 CSD 小鼠葡萄糖耐受性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of Tianwang Buxindan on glucose tolerance in CSD mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	血糖/mmol·L <sup>-1</sup>				
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
空白		5.68±0.08	9.76±0.19	7.71±0.52	7.03±0.21	6.14±0.04
模型		8.51±0.24	17.65±0.47 <sup>1)</sup>	14.93±1.38 <sup>1)</sup>	13.69±0.94 <sup>1)</sup>	12.48±1.17 <sup>1)</sup>
艾司唑仑	9.1×10 <sup>-4</sup>	6.61±1.30	16.11±1.81	13.27±2.03	12.55±1.10	11.83±1.49
天王补心丹	8.5	6.54±0.22	14.17±0.66 <sup>2)</sup>	12.63±0.68	11.30±0.53	10.41±0.65
	17	6.29±0.45	13.26±0.72 <sup>2)</sup>	10.84±0.81 <sup>2)</sup>	9.19±0.41 <sup>2)</sup>	8.75±0.11 <sup>2)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.01; 与模型组比较<sup>2)</sup>*P* < 0.05。

**3.4 对 CSD 小鼠脂代谢的影响** 与空白组比较, 模型组小鼠 TCH, TG, FFA 水平显著升高 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 天王补心丹各组 TCH, TG, FFA 水平明显降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 表明天王补心丹可有效减轻 CSD 诱导的脂质代谢紊乱。见表 6。

**3.5 对 CSD 小鼠血清及下丘脑中 orexin A 水平的**

**影响** 与空白组比较, 模型组血清及下丘脑中 orexin A 表达量显著升高 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 天王补心丹各组在血清及下丘脑中的 orexin A 表达量明显下降 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见表 7。

**3.6 对 CSD 小鼠下丘脑中 OX1R 的 mRNA 和蛋白表达的影响** 与空白组比较, 模型组 OX1R 的

表5 天王补心丹对CSD小鼠胰岛素敏感性的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 5 Effect of Tianwang Buxindan on insulin sensitivity of CSD mice ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	血糖/mmol·L <sup>-1</sup>				
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
空白		6.01±0.06	4.60±0.67	4.31±0.62	4.85±0.49	5.16±0.30
模型		8.14±0.25	6.33±0.80	7.76±0.40	9.46±0.71	11.62±1.83 <sup>1)</sup>
艾司唑仑	9.1×10 <sup>-4</sup>	6.89±1.06	5.13±0.33	4.82±0.28	6.87±0.28	8.12±0.24 <sup>2)</sup>
天王补心丹	8.5	6.72±0.21	5.26±0.21	4.83±0.24	6.19±0.23	7.14±0.20 <sup>3)</sup>
	17	6.76±0.35	5.29±0.24	4.88±0.24	5.62±0.20	6.67±0.19 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01(表6~8同)。

表6 天王补心丹对CSD小鼠血清中TCH, TG, FFA水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 6 Effect of Tianwang Buxindan on serum TCH, TG and FFA in CSD mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TCH	TG	FFA
空白		2.03±0.49	1.57±0.31	1 362.08±272.42
模型		4.58±0.77 <sup>1)</sup>	2.95±0.53 <sup>1)</sup>	2 843.27±445.83 <sup>1)</sup>
艾司唑仑	9.1×10 <sup>-4</sup>	3.49±1.12 <sup>2)</sup>	2.34±0.80 <sup>2)</sup>	2 377.63±664.27 <sup>2)</sup>
天王补心丹	8.5	3.06±0.69 <sup>3)</sup>	1.80±0.42 <sup>3)</sup>	2 190.40±477.12 <sup>3)</sup>
	17	2.51±0.36 <sup>3)</sup>	1.62±0.29 <sup>3)</sup>	1 805.32±218.26 <sup>3)</sup>

表7 天王补心丹对小鼠血清及下丘脑 orexin A 表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 7 Effect of Tianwang Buxindan on expression level of orexin A in serum and hypothalamus of mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	血清 orexin A	下丘脑 orexin A
空白		0.73±0.14	1.33±0.25
模型		1.79±0.27 <sup>1)</sup>	2.50±0.31 <sup>1)</sup>
艾司唑仑	9.1×10 <sup>-4</sup>	1.40±0.42 <sup>2)</sup>	2.23±0.53 <sup>2)</sup>
天王补心丹	8.5	1.25±0.28 <sup>3)</sup>	2.08±0.35 <sup>2)</sup>
	17	0.81±0.11 <sup>3)</sup>	1.74±0.24 <sup>3)</sup>

mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 天王补心丹各组 OX1R 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见表 8, 图 1。

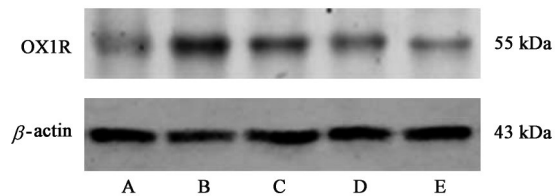
#### 4 讨论

睡眠是人体维持正常功能所必须的生理过程, 可随着现代生活节奏的加快, 工作压力的升高, 电子产品的广泛使用, 大多数人长期无法获得足够的睡眠, 从而经常处于 CSD 状态。CSD 不仅影响睡眠质量, 而且被认为与高血压及 2 型糖尿病等内分泌代谢紊乱疾病密切相关<sup>[11]</sup>。研究表明, 慢性睡眠不足可导致机体的瘦素分泌水平下降, 生长素释放肽与脂肪因子增多, 进而直接诱发瘦素抵抗、胰岛素

表8 天王补心丹对CSD小鼠下丘脑OX1R mRNA和蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 8 Effect of Tianwang Buxindan on hypothalamic OX1R mRNA and protein expression in CSD mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	OX1R mRNA	OX1R/ $\beta$ -actin
空白		1.00	1.00
模型		3.14±0.37 <sup>1)</sup>	3.81±0.45 <sup>1)</sup>
艾司唑仑	9.1×10 <sup>-4</sup>	2.38±0.43 <sup>2)</sup>	2.64±0.27 <sup>2)</sup>
天王补心丹	8.5	1.90±0.22 <sup>3)</sup>	2.53±0.35 <sup>2)</sup>
	17	1.83±0.26 <sup>3)</sup>	1.92±0.22 <sup>3)</sup>



A. 空白组; B. 模型组; C. 艾司唑仑组; D. 天王补心丹低剂量组; E. 天王补心丹高剂量组

图1 小鼠下丘脑OX1R蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of OX1R protein expression in hypothalamus of mice

抵抗与葡萄糖代谢紊乱等问题<sup>[12-15]</sup>。对睡眠不足患者进行的口服葡萄糖耐量测试(OGTT)结果佐证了这一说法<sup>[16]</sup>, 也有实验表明SD会影响多项血脂指标出现异常波动<sup>[17]</sup>。

作为一种下丘脑神经递质, Orexin于1998年被首次发现, 包括 orexin A 与 orexin B 两种分型, orexin B 只能结合于 orexin 受体 2(OX2R), orexin A 则可与 OX1R, OX2R 两者结合, 其中以与 OX1R 的亲和力更强。与 OX1R 结合后可作用于 Gq, Gs, Gi 亚基, 并分别进一步激活下游 MAPK, period1 基因 (PER1), 环磷酸腺苷 (cAMP), 细胞外调节信号激酶 (ERK) 等信号转导级联反应<sup>[6]</sup>。研究表明, orexin A 可能是通过支配蓝斑神经元影响到睡眠/觉醒周期的稳态及大脑前额叶皮层的激活<sup>[18]</sup>。一方面, 对临

床失眠患者的测试显示其血浆中 orexin A 的表达水平明显升高<sup>[19]</sup>;另一方面, Orexin 基因敲除小鼠可出现严重的发作性嗜睡,具体表现为睡眠/觉醒周期变化,如在活跃时间内频繁嗜睡。有趣的是在进行 Orexin 基因治疗后,小鼠则能够保持长时间的清醒,并拥有正常的昼夜唤醒方式,协调快速眼动睡眠和非快速眼动睡眠之间的平衡<sup>[20]</sup>。

Orexin 能够调节摄食行为<sup>[21]</sup>,其表达量的增加会延迟机体的正常饱腹感,提高血糖水平,从而导致失眠加剧;相反,OX1R 的选择性拮抗剂则可以阻断 Orexin 在食物摄取中的作用,加速饱腹感并最终达成改善睡眠质量的目的<sup>[22]</sup>。下丘脑区域中 Orexin 神经元的广泛投射还使它们能够与其他神经元,如  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)能神经元产生相互作用,参与到下丘脑区的代谢回路,不仅在葡萄糖稳态中起到重要的中心作用和外围作用,并且增加了使用 Orexin 作为代谢紊乱的治疗性生物标志物的可能性<sup>[23]</sup>。此外, Orexin 及其受体还可参与调节下丘脑垂体肾上腺轴(HPA 轴)中的皮质醇应激性释放,这对碳水化合物的代谢至关重要,并且直接关系到高血糖症<sup>[24]</sup>。最后值得一提的是新近研究发现 orexin A 似乎与酒精的主动摄入也关系密切<sup>[25]</sup>。Orexin 在能量稳态的维持上发挥着不可或缺的作用,而能量平衡的改变可以直接影响到睡眠/觉醒周期与睡眠质量<sup>[26]</sup>。

天王补心丹是治疗失眠的经典方剂,有养心安神,滋阴清热之功,课题组前期研究证实天王补心丹可以有效作用于 SD 引发的病理损伤<sup>[9]</sup>,本实验选用天王补心丹作为干预药物,并试图探究其在不同剂量下对模型小鼠的改善效果。本次实验中, CSD 小鼠与空白组的食物摄入和体质量增长展现出较大差异,并伴有血糖代谢紊乱及脂代谢的异常增强,与指导理论相一致。本实验结果显示,天王补心丹可明显改善 CSD 模型引发糖脂代谢异常,并降低血清和下丘脑中 orexin A 表达水平,下调下丘脑中 OX1R mRNA 和蛋白表达,且显示出一定的剂量相关性。综上,笔者推测天王补心丹可以通过调节 orexin A/OX1R 有效改善 CSD 诱导的糖脂代谢异常。然而 OX1R 所指向的下游多条信号通路中究竟哪条在糖脂代谢中起到关键调控作用,又是如何进行级联反应的问题,还有待进一步的研究和探讨。

#### [参考文献]

[1] KERKHOF G A. Shift work and sleep disorder

comorbidity tend to go hand in hand [J]. *Chronobiol Int*, 2018, 35(2):219-228.

[2] LEPROULT R, CAUTER E V. Role of sleep and sleep loss in hormonal release and metabolism [J]. *Endocr Dev*, 2010, 17: 11-21.

[3] ZHONG Y, FENG Z, WANG L. Wake-promoting actions of median nerve stimulation in TBI-induced coma: an investigation of orexin A and orexin receptor 1 in the hypothalamic region [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3):4441-4447.

[4] WANG C, HAN X, GUO F, et al. Orexin A signaling in the paraventricular nucleus modulates spontaneous firing of glucose-sensitive neurons and promotes food intake via the NPY pathway in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(1): 162-167.

[5] SHEN Y, ZHAO Y, ZHENG D, et al. Effects of orexin A on GLUT4 expression and lipid content via MAPK signaling in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 138: 376-383.

[6] 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.

[7] 冷雷. 天王补心丹加减治疗更年期抑郁症的临床研究[J]. *实用妇科内分泌电子杂志*, 2019, 6(33): 90.

[8] 杨希茜. 天王补心丹加减治疗失眠疗效与安全性的 Meta 分析[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2017.

[9] 谢光璟, 黄攀攀, 王平. 天王补心丹加减改善 PCPA 失眠大鼠 Trx 系统氧化损伤的机制探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6): 32-38.

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

[11] OLIVERIA R, DANIELE T, FACANHA C, et al. Adiponectin levels and sleep deprivation in patients with endocrine metabolic disorders [J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2018, 64(12): 1122-1128.

[12] PADILHA H, CRISPIM C, ZIMBERG I, et al. A link between sleep loss, glucose metabolism and adipokines [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2011, 44(10): 992-999.

[13] POROYKO V, CARRERAS A, KHALYFA A, et al. Chronic sleep disruption alters gut microbiota, induces systemic and adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35405.

[14] CUI H, LOPEZ M, RAHMOUNI K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(6): 338-351.

[15] MOTIVALA S, TOMIYAMA A, ZIEGLER M, et al. Nocturnal levels of ghrelin and leptin and sleep in

- chronic insomnia [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, 34(4): 540-545.
- [16] BENEDICT C, VOGEL H, JONAS W, et al. Gut microbiota and glucometabolic alterations in response to recurrent partial sleep deprivation in normal-weight young individuals[J]. *Mol Metab*, 2016, 5(12): 1175-1186.
- [17] SHE M, HU X, SU Z, et al. Piromelatine, a novel melatonin receptor agonist, stabilizes metabolic profiles and ameliorates insulin resistance in chronic sleep restricted rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 727: 60-65.
- [18] PELLITERO E, GARZON M. Hypocretin1/OrexinA-containing axons innervate locus coeruleus neurons that project to the rat medial prefrontal cortex. Implication in the sleep-wakefulness cycle and cortical activation[J]. *Synapse*, 2011, 65(9): 843-857.
- [19] TANG S, HUANG W, LU S, et al. Increased plasma orexin A levels in patients with insomnia disorder are not associated with prepro-orexin or orexin receptor gene polymorphisms[J]. *Peptides*, 2017, 88: 55-61.
- [20] KANTOR S, MOCHIZUKI T, LOPS S, et al. Orexin gene therapy restores the timing and maintenance of wakefulness in narcoleptic mice [J]. *Sleep*, 2013, 36(8): 1129-1138.
- [21] ARDIANTO C, YONEMOCHI N, YAMAMOTO S, et al. Opioid systems in the lateral hypothalamus regulate feeding behavior through orexin and GABA neurons [J]. *Neuroscience*, 2016, 320: 183-193.
- [22] LEBOLD T P, BONAVENTURE P, SHIREMAN B T. Selective orexin receptor antagonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(17): 4761-4769.
- [23] RANI M, KUMAR R, KRISHAN P. Role of orexins in the central and peripheral regulation of glucose homeostasis: evidences & mechanisms [J]. *Neuropeptides*, 2018, 68: 1-6.
- [24] STEINER M, SCIARRETTA C, BRISBARE C, et al. Examining the role of endogenous orexins in hypothalamus pituitary adrenal axis endocrine function using transient dual orexin receptor antagonism in the rat [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38(4): 560-571.
- [25] MENDOZA L, VAZQUEZ P, MARTINEZ-MOT L, et al. Forced ethanol ingestion by Wistar rats from a juvenile age increased voluntary alcohol consumption in adulthood, with the involvement of orexin A [J]. *Alcohol*, 2018, 70: 73-80.
- [26] COLLET T, KLAAUW A, HENNING E, et al. The sleep/wake cycle is directly modulated by changes in energy balance [J]. *Sleep*, 2016, 39(9): 1691-1700.

[责任编辑 孙丛丛]