

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

谢光璟, 黄攀攀, 王平*

(湖北中医药大学 基础医学院, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**探讨天王补心丹加减对对氯苯丙氨酸(PCPA)所致失眠大鼠硫氧还蛋白(Trx)系统抗氧化损伤的作用机制。**方法:**60只雄性SD大鼠随机分为空白组、造模组。造模组以腹腔注射PCPA造模,注射剂量为 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,间断注射7d。造模成功后,依次分为模型组(等容生理盐水),天王补心丹加减低、中、高剂量组($8.8, 17.6, 35.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和艾司唑仑组($0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),每组10只。自发活动视频分析系统监测大鼠昼夜活动节律,透射电镜观察大鼠下丘脑视交叉上核(SCN)形态及细胞器完整性,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的水平,免疫荧光(IF)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测SCN细胞硫氧还蛋白2(Trx2),硫氧还蛋白还原酶2(TrxR2)的表达。**结果:**与空白组比较,模型组大鼠活动时间显著增加($P < 0.01$),昼夜节律紊乱,线粒体嵴断裂,数量减少,排列紊乱,伴空泡化和髓鞘样变,SOD,GSH-Px活性下降且MDA含量显著升高($P < 0.01$),Trx2的蛋白表达量显著降低($P < 0.01$),TrxR2蛋白表达量显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,天王补心丹中、高剂量组能够明显改善大鼠昼夜节律紊乱,减少活动时间($P < 0.01$),同时线粒体水肿程度减轻,部分嵴尚完整,SOD,GSH-Px活性升高,MDA水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),Trx2蛋白表达明显升高,TrxR2蛋白表达明显下降($P < 0.05$)。**结论:**天王补心丹加减对失眠模型大鼠的改善作用与调控Trx抗氧化系统中Trx2与TrxR2的蛋白表达有关。

[关键词] 失眠;天王补心丹;视交叉上核(SCN);氧化应激;硫氧还蛋白系统

[中图分类号] R289;R289.5;R256.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0032-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190637

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181204.0944.002.html>

[网络出版时间] 2018-12-06 17:09

Mechanism of Modified Tianwang Buxindan on Trx System Oxidative Damage in PCPA Insomnia Model Rats

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

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

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of modified Tianwang Buxindan on oxidative damage of Trx system in parachlorophenylalanine (PCPA) insomnia model rats. **Method:** Sixty male SD rats were randomly divided into blank group and model group. Insomnia model was prepared through intraperitoneal injection with PCPA ($150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The discontinuous injection lasted for 7 d. After successful modeling, the rats were divided into model group (the same volume of normal saline), low, medium, high-dose Tianwang Buxindan groups ($8.8, 17.6, 35.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and estazolam group ($0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), with 10 in each group. Autonomous activity video was used to detect circadian activity rhythm. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe supra chiasmatic nucleus (SCN) morphology and Organelle integrity. Enzyme-linked immunosorbent assay

[收稿日期] 20181016(022)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573865,81874414);湖北省首届医学领军人才培养工程项目(5406-0063)

[第一作者] 谢光璟,在读博士,从事中医药防治老年病研究,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疗规律研究,E-mail:pwang54@163.com

(ELISA) was used to detect the expressions of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum. Expressions of Trx2, TrxR2 in SCN cells were detected by immunofluorescence (IF) and Western blot. **Result:** Compared with blank group, the activity rhythm of model group was irregular, the activity time increased ($P < 0.01$), the mitochondrial cristae were broken, the number was reduced, the arrangement was disorder, SOD and GSH-PX decreased, MDA increased ($P < 0.01$), the expression of Trx2 decreased, while the expression of TrxR2 increased ($P < 0.01$). Compared with model group, medium and high-dose Tianwang Buxindan groups could alleviate the circadian rhythm disorder and reduce the activity time ($P < 0.01$), the mitochondrial edema was relieved, part of the cristae were intact, the activities of SOD and GSH-PX were increased, the level of MDA was reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), expression of Trx2 was significantly increased, and expression of TrxR2 was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The effect of modified Tianwang Buxindan on insomnia model rats is related to the regulation of Trx2 and TrxR2 protein expressions in Trx system.

[Key words] insomnia; Tianwang Buxindan; supra chiasmatic nucleus (SCN); oxidative stress; thioredoxin system

睡眠与觉醒是人赖以生存的最重要和最基本的生理功能,与饮食摄取、体温调节、激素分泌一样,是适应昼夜节律变化最主要的生理表现之一。现代人频繁熬夜、摄入咖啡等生活方式加重了睡眠缺失,继而引发一系列睡眠障碍性疾病。失眠因病程长、复发率高、社会功能损伤的特点,发病率正逐年增高^[1-2]。下丘脑视交叉上核(SCN)作为哺乳动物的“昼夜节律起搏器”,其受到光照因素影响^[3],参与了哺乳动物包括睡眠/觉醒、体温、激素等多种昼夜节律的调控。SCN 功能紊乱会导致睡眠/觉醒节律破坏,进而引发失眠^[4]。

氧化应激的危害主要来自于机体氧自由基的过度生成,对细胞,DNA 以及蛋白质合成造成破坏,进而损伤组织器官。而睡眠可以增强人体抗氧化应激能力,维持人体氧化应激水平在正常范围。抗氧化系统是人体内重要的防御系统,硫氧环蛋白(Trx)作为该系统中一类高度保守的低分子蛋白,在清除自由基、调节细胞生长和抑制凋亡等方面发挥重要作用^[5-6]。研究发现,机体的氧化应激水平与神经系统疾病如睡眠障碍、阿尔兹海默病、帕金森病等密切相关^[7-8]。

失眠作为中医具有潜在治疗优势的病种正逐渐被关注,《黄帝内经》十三方中便有“半夏秫米汤”治疗失眠的记载。本课题组前期成功建立阴血亏虚型失眠大鼠模型,并观察了酸枣仁汤、天王补心丹等方对失眠大鼠行为学、神经递质的影响,取得了阶段性成果^[9-10]。天王补心丹加减由天王补心丹去朱砂组成,天王补心丹原方出自《校注妇人良方》,为治疗失眠的代表方,由酸枣仁、柏子仁、人参等 14 味中药

组成,对虚烦失眠,心悸怔忡证属阴虚血少型确有疗效^[11],同时此方还广泛应用于阿尔兹海默病、血管性痴呆、中风后遗症等多种神经系统疾病的治疗^[12-13]。基于此,本实验拟建立失眠大鼠模型,探讨失眠,Trx 系统功能及氧化应激三者之间的关联,并以天王补心丹为基础方,研究对失眠大鼠的抗氧化作用,冀希望找到干预失眠的新措施、新途径,为失眠的发病机理及治疗方法提供思路。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,体质量(200 ± 20) g,合格证号 SCXK(京)2016-0002。严格按照《实验动物管理条例》要求饲养于湖北中医药大学老年医学研究所动物房,大鼠自由摄食、饮水,饲料、垫料、饮水经灭菌处理。动物房温度(22 ± 2) °C,湿度 50%。本实验获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 对氯苯丙氨酸(PCPA,美国 Sigma 公司,批号 SHBD9164V),用生理盐水配成 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混悬液;天王补心丹加减方由酸枣仁、柏子仁、当归、天冬、麦冬各 9 g,人参片、丹参、玄参、茯苓、五味子、远志、桔梗各 5 g,生地黄 12 g 组成,朱砂有毒故去之,由湖北中医药大学附属医院药剂科提供实验药材,经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定符合药用标准,复方浓缩制成含生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水煎剂,置 4 °C 冰箱备用;艾司唑仑(济川药业集团有限公司,批号 H44021098);大鼠超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉优尔生命科学装备有限公司,批号

分别为 L180717245, L180717268, L180717202); 兔抗鼠 Trx2 抗体, 硫氧环蛋白还原酶 2 (TrxR2) 抗体, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 (Ig)G 二抗 (武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号分别为 GB32013, GB33006, GB12002, GB23303); FITC 免疫荧光检测试剂盒 (生工生物工程股份有限公司, 批号 E670006-0100); 其余试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 BW-ZFT 型自主活动视频分析系统 (上海软隆科技发展有限公司); DVM6 型透射电镜, Bond-Max 型全自动免疫组化染色仪 (德国 Leica 公司); SpectraMax M5 型多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); IX71 型荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); PowerPac 型电泳仪, Trans-Blot Plus 型转印槽, GelDoc XR + 凝胶图像分析系统 (美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 分组及模型制备 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为空白组, 模型组, 天王补心丹低、中、高剂量组和艾司唑仑组, 每组 10 只。1 周后进行腹腔注射 PCPA 造模, 注射剂量为 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 间隔性注射 7 d。造模第 4 天开始给药, 依据《中药药理研究方法学》^[14] 大鼠与人药物剂量折算, 分别对天王补心丹低、中、高剂量 ($8.8, 17.6, 35.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组给予不同剂量的含生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水煎剂。艾司唑仑组每日按 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌服, 模型组、空白组给予等体积生理盐水, 连续给药 14 d。采用翻正反射法评价模型, 腹腔注射戊巴比妥钠溶液 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 记录 15 min 内大鼠入睡潜伏期及睡眠维持时间。模型组较空白组睡眠维持时间缩短, 入睡潜伏期延长, 提示造模成功^[15]。

2.2 样本采集 10% 水合氯醛 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉大鼠, 断头取脑, 冰盘上剥离下丘脑。电镜标本用 2.5% 的戊二醛溶液固定, 免疫荧光标本用 4% 的多聚甲醛溶液灌注固定, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测样本每组取 3 只剥离下丘脑后迅速装入冻存管并置于液氮中冷冻备用。

2.3 自主活动视频分析系统监测昼夜节律 主要监测各组大鼠 1 d 内各个节点活动时间, 每次记录 2 min, 每 4 h 记录 1 次 (即 8:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00, 4:00⁺¹ 共 6 个时间点)。在正式检测前, 先进行 1 d 适应性训练。

2.4 透射电镜观察下丘脑细胞形态及线粒体结构 大鼠处死后取出下丘脑, 按常规程序依次脱水、包

埋、切片、染色, 切片厚度 50 nm, 在透射电镜下观察下丘脑超微结构, 具体观察细胞形态及细胞器完整性包括线粒体结构、高尔基体、内质网等。

2.5 ELISA 检测血清中的 SOD, MDA, GSH-Px 水平 从 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 低温冰箱中取出备用血清, 室温静置解冻, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作, 每孔加待测样品 $100 \text{ } \mu\text{L}$, 在 450 nm 波长处检测血清中的 SOD, MDA 及 GSH-Px 的吸光度 A , 并计算含量。

2.6 免疫荧光检测 Trx2, TrxR2 的阳性表达 取出在 4% 多聚甲醛中固定的下丘脑, 完成切片, 切片固定抗原修复后, 封闭 2 h; 吸去多余的封闭液, 分别滴加 Trx2, TrxR2 抗体稀释液 (1:1 000) 孵育过夜; 复温 PBST 漂洗 3 次, 晾干; 避光滴加 FITC, TRITC 荧光二抗 (1:10 000), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 2 h; 滴加 DAPI 复染细胞核, 漂洗 3 次, 于镜下观察。

2.7 Western blot 检测 Trx2, TrxR2 蛋白的表达 分别提取空白组, 模型组, 天王补心丹低、中、高剂量组和艾司唑仑组 SCN 组织蛋白, 以所测蛋白分子量为基础选用对应浓度的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶, 并制备分离胶与积层胶, 上样, 电泳, 转膜, 标记, 封闭 2 h, PBST 清洗 3 次, 分别加 Trx2, TrxR2, GAPDH 抗体稀释液 (1:1 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜; 洗涤, 滴加二抗 (1:10 000) 反应 1 h, 洗涤, 显色后进行显影, 拍照, AlphaView 图像分析软件进行分析。

2.8 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件处理所有采集数据, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组比较采用 t 检验, 两组以上组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模型评价 与空白组比较, 模型组大鼠睡眠维持时间显著缩短, 入睡潜伏期显著延长 ($P < 0.01$), 提示造模成功。见表 1。

表 1 翻正反射实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	入睡潜伏期	睡眠维持时间
空白	6.04 ± 0.88	25.36 ± 2.47
模型	$9.69 \pm 1.12^{1)}$	$18.76 \pm 1.82^{1)}$

注: 剂量均为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对大鼠自主活动的影响 空白组大鼠 24 h 自主活动时间有明显的昼夜节律性, 表现为白天活动时间缩短, 夜间逐渐延长。

与空白组比较, 模型组大鼠 24 h 自主活动不规

则,节律紊乱,表现为白天夜间活动时间均显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,天王补心丹加减中、高剂量组表现出一定的昼夜活动节律,并在各时间节

点活动时间均显著缩短 ($P < 0.01$),而天王补心丹加减低剂量组在 20:00 时活动时间显著缩短 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 天王补心丹加减对失眠模型大鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

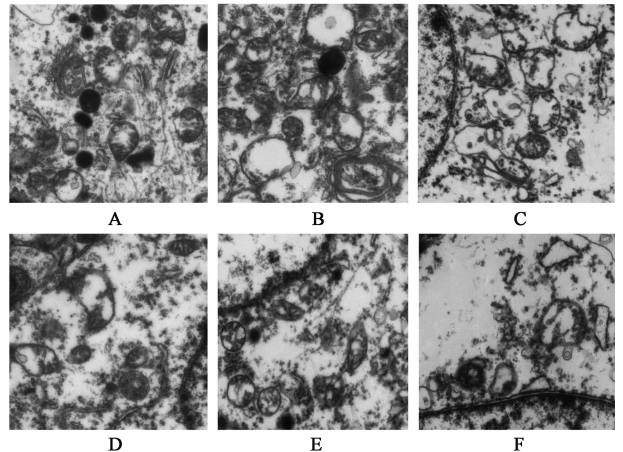
Table 2 Effect of modified Tangwang Buxindan on autonomic activity in insomnia model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	8:00	12:00	16:00	20:00	24:00	4:00 ⁺
空白	-	60.8 ± 3.35	53.04 ± 2.96	39.49 ± 4.37	55.63 ± 4.56	72.32 ± 3.59	65.26 ± 2.64
模型	-	79.41 ± 7.24 ¹⁾	85.25 ± 5.80 ¹⁾	87.80 ± 4.04 ¹⁾	98.32 ± 5.63 ¹⁾	99.79 ± 5.53 ¹⁾	98.45 ± 4.65 ¹⁾
艾司唑仑	0.1 ³⁾	68.36 ± 4.98 ²⁾	58.15 ± 2.15 ²⁾	65.32 ± 2.79 ²⁾	72.10 ± 4.01 ²⁾	80.23 ± 2.99 ²⁾	87.36 ± 3.56 ²⁾
天王补心丹加减	8.8	75.32 ± 9.26	82.21 ± 5.02	82.56 ± 4.05	89.69 ± 4.23 ²⁾	95.68 ± 5.56	97.06 ± 4.64
	17.6	68.87 ± 4.36 ²⁾	60.23 ± 3.69 ²⁾	68.32 ± 4.23 ²⁾	69.10 ± 5.01 ²⁾	87.36 ± 4.36 ²⁾	87.56 ± 2.35 ²⁾
	35.2	68.54 ± 5.64 ²⁾	68.33 ± 5.02 ²⁾	60.34 ± 5.01 ²⁾	70.23 ± 4.23 ²⁾	90.60 ± 3.30 ²⁾	88.32 ± 3.21 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; ³⁾表示剂量单位为 $mg \cdot kg^{-1}$ 。

3.3 对 SCN 形态结构的影响 空白组细胞器结构基本完整,未见明显肿胀及溶解。线粒体大小适中,嵴排列一般整齐。与空白组比较,模型组细胞器损伤严重,线粒体嵴断裂,数量减少,排列紊乱,内室肿胀伴空泡化,并有髓鞘样结构形成,内质网亦显著扩张,形成较大的空泡,出现脱颗粒现象。与模型组比较,天王补心丹加减低、中、高剂量组线粒体肿胀程度有所减轻,部分嵴尚完整,仅见于线粒体周边,高剂量组损伤相对较轻。见图 1。

3.4 对血清 SOD, MDA, GSH-Px 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 SOD, GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.01$),MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,天王补心丹加减中、高剂量组 SOD, GSH-Px 活性明显升高,MDA 含量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),天王补心丹加减低剂量组 MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3。



A. 空白组;B. 模型组;C ~ E. 天王补心丹低、中、高剂量组;F. 艾司唑仑组(图 2~4 同)

图 1 天王补心丹对失眠大鼠 SCN 形态结构的影响(透射电镜, $\times 5000$)
Fig.1 Effect of modified Tangwang Buxindan on SCN morphology in insomnia rats(TEM, $\times 5000$)

表 3 天王补心丹加减对失眠模型大鼠血清 SOD,MDA,GSH-Px 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of modified Tangwang Buxindan on serum SOD, MDA and GSH-Px levels in insomnia model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	SOD/ $U \cdot L^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	GSH-Px/ $U \cdot L^{-1}$
空白	-	364.75 ± 28.95	1.88 ± 0.14	122.56 ± 15.35
模型	-	189.23 ± 19.22 ¹⁾	3.17 ± 0.21 ¹⁾	68.58 ± 6.76 ¹⁾
艾司唑仑	0.1 ⁴⁾	284.01 ± 19.08 ³⁾	2.49 ± 0.19 ³⁾	95.63 ± 10.56 ³⁾
天王补心丹加减	8.8	198.47 ± 22.87	2.78 ± 0.16 ²⁾	73.32 ± 9.75
	17.6	256.97 ± 18.36 ³⁾	2.69 ± 0.17 ³⁾	88.54 ± 6.35 ³⁾
	35.2	278.54 ± 25.44 ³⁾	2.54 ± 0.15 ³⁾	97.32 ± 9.21 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; ⁴⁾表示剂量单位为 $mg \cdot kg^{-1}$ (表 4 同)。

3.5 对 Trx2, TrxR2 标记荧光蛋白表达的影响 与

空白组比较,模型组 Trx2 蛋白表达量降低,部分区

域甚至无表达,而 TrxR2 蛋白表达明显较多;与模型组比较,天王补心丹加减低、中、高剂量组 Trx2 阳性细胞有所增加,天王补心丹加减低、中、高剂量组 TrxR2 蛋白表达有所下降。见图 2,3。

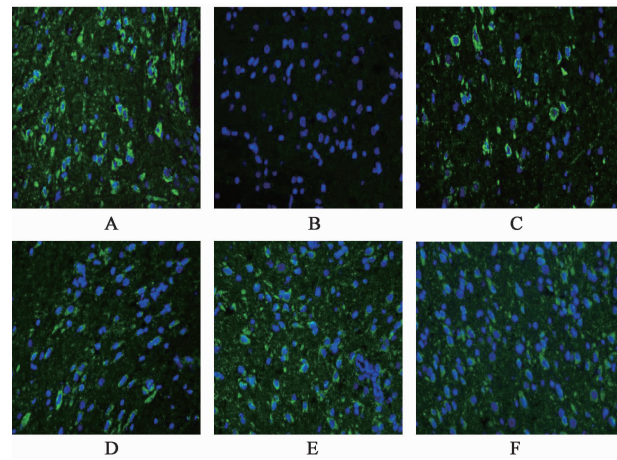


图 2 天王补心丹加减对失眠大鼠 SCN 中 Trx2 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 2 Effect of modified Tangwang Buxindan on Trx2 protein expression in SCN of insomnia rats (IF, ×400)

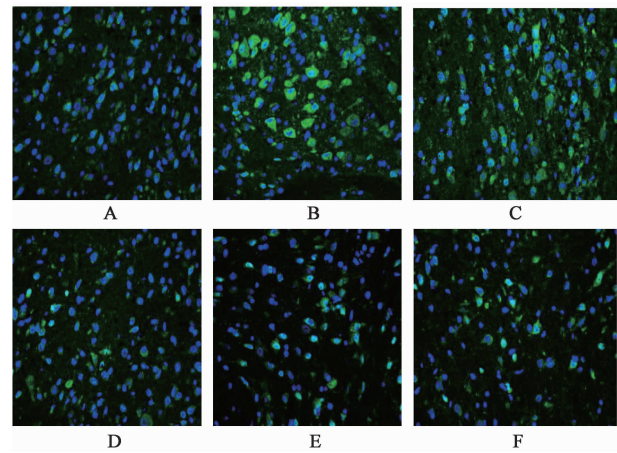


图 3 天王补心丹加减对失眠大鼠 SCN 中 TrxR2 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 3 Effect of modified Tangwang Buxindan on TrxR2 protein expression in SCN of insomnia rats (IF, ×400)

3.6 对 Trx2, TrxR2 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 Trx2 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), TrxR2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,天王补心丹加减各剂量组 Trx2 蛋白表达升高, TrxR2 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。见图 4,表 4。

4 讨论

睡眠觉醒是人类适应昼夜节律变化的最重要的生理功能之一。失眠是昼夜节律紊乱导致的一种常见的神经系统疾病,以入睡困难,容易醒,多梦为

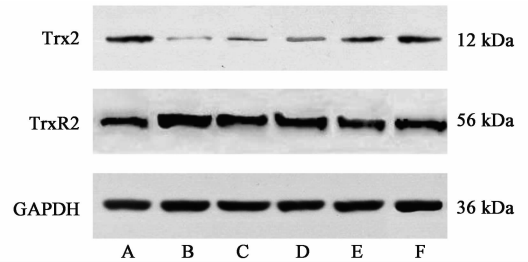


图 4 大鼠 SCN 中 Trx 系统相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Trx system related proteins in SCN

表 4 天王补心丹加减对失眠大鼠 SCN 中 Trx2, TrxR2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Tangwang Buxindan on protein expressions of Trx2, TrxR2 in SCN of in somnia rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Trx2/GAPDH	TrxR2/GAPDH
空白	-	0.231 ± 0.019	0.481 ± 0.018
模型	-	0.078 ± 0.029 ¹⁾	0.869 ± 0.046 ¹⁾
艾司唑仑	0.1 ⁵⁾	0.192 ± 0.008 ²⁾	0.638 ± 0.018 ²⁾
天王补心丹加减	8.8	0.091 ± 0.018	0.712 ± 0.025 ²⁾
	17.6	0.133 ± 0.008 ²⁾	0.615 ± 0.024 ²⁾
	35.2	0.176 ± 0.019 ³⁾	0.592 ± 0.028 ²⁾

表现,并伴有不同程度的日间功能障碍。中医称失眠为“不寐”,从《黄帝内经》“天人相应”“阳气主外”的观点开始即强调睡眠的昼夜节律性,如“阳气者,……平旦人气生,日中而阳气隆,日西而阳气已虚”“阳气尽则卧,阴气尽则寤”。现代医学研究发现睡眠的节律性来自人体内的生物钟基因调节,它不仅参与调控睡眠周期,还与新陈代谢和大脑功能紧密相关。课题组此次实验证实了失眠会出现昼夜节律紊乱,集中表现在失眠大鼠昼夜活动时间不规则,无节律特征。而天王补心丹加减能够缩短失眠大鼠在不同节点的活动时间,改善节律紊乱,证实了天王补心丹加减具有改善失眠的作用。

天王补心丹出自《校注妇人良方》,由酸枣仁、柏子仁、人参片等 14 味药组成,方中生地黄、玄参滋肾清热,壮水之主;天冬、麦冬补益肺肾,金水相生;人参片、当归、丹参气血双补,补而不滞;柏子仁、酸枣仁、五味子宁心安神,收敛心气;茯苓、远志安神益智,坎离交济;桔梗载诸药上行;朱砂有毒故去之。现代临床发现天王补心丹不仅对失眠确有疗效,同时对其他神经系统疾病如痴呆、中风后遗症、认知功能障碍等均有改善作用。

大脑参与控制睡眠昼夜节律的脑区很多,其中

SCN 区被誉为哺乳动物“昼夜节律起搏器”,在调节睡眠/觉醒功能上发挥关键作用。其主要通过突触或旁分泌的形式,对腹外侧视前区(VLPO),下丘脑背内侧(DMH)等区域进行投射,共同参与睡眠中枢和觉醒中枢调节。研究发现破坏大鼠 SCN 区会导致昼夜节律消失,表现为夜间非快动眼睡眠(NREM)时间和觉醒片段化增多,并且夜间较白天明显^[16]。本实验结果显示在天王补心丹干预后,失眠大鼠 SCN 细胞结构及线粒体、内质网等细胞器损伤均显著改善,说明天王补心丹可以改善由于失眠导致的 SCN 损伤,减少线粒体、内质网等细胞器的破坏。

良好的睡眠有助于机体发挥抗氧化应激效应^[17],而失眠会增加机体的能量代谢和活性氧生成,诱导氧化应激^[18]。人体内存在多种抗氧化系统,其中 Trx 抗氧化系统在生物体清除自由基、调节细胞生长和抑制凋亡等方面发挥重要作用^[3]。在 Trx 系统中,Trx 和 TrxR 是发挥抗氧化的关键蛋白,同时还需要还原型辅酶 II(NADPH)的催化作用。只有还原型 Trx 才具有抗氧化能力,而 TrxR 的活性会直接影响还原型 Trx 的合成,进而影响抗氧化应激效应^[19]。Trx2 及 TrxR2 因为只发现分布于线粒体中,故又称之为线粒体依耐型特种蛋白^[20]。线粒体是氧化应激的重要靶细胞器,对细胞变化最敏感。氧化应激条件下,线粒体融合与分裂加剧,ATP 产量减少,ROS 生成增多,氧化应激加速,造成恶性循环^[21]。本实验结果发现,天王补心丹可升高失眠大鼠 SOD,GSH-Px 活性,降低 MDA 的表达,说明天王补心丹具有抗氧化作用;同时,天王补心丹增加失眠大鼠 SCN 细胞中 Trx2 的表达,降低 TrxR2 蛋白的表达,并呈现出一定的剂量依赖性,说明天王补心丹可以参与调控 SCN 中 Trx 系统相关蛋白的表达而发挥抗氧化应激效应。据此,本实验可以明确,天王补心丹对失眠模型大鼠的改善作用与调控 Trx 系统 Trx2 与 TrxR2 的蛋白表达有关。但 Trx2 与 TrxR2 是否作为连接失眠与氧化应激的关键蛋白以及线粒体功能与 Trx 系统相关蛋白表达的因果关系有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Amatoury J, Azarbarzin A, Younes M, et al. Arousal intensity is a distinct pathophysiological trait in obstructive sleep apnea [J]. Sleep, 2016, 39(12): 2091-2100.

[2] 中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组. 中国成人失眠诊断与治疗指南[J]. 中华神经科杂志, 2012, 45(7): 534-540.

[3] Aggelopoulos N C, Meissl H. Responses of neurones of the rat suprachiasmatic nucleus to retinal illumination under photopic and scotopic conditions [J]. J Physiol, 2000, 523(1): 211-222.

[4] Vignatelli L, Masetti S, Amore M, et al. Insomnia cycling with a 42-day infradian period: evidence for two uncoupled circadian oscillators? [J]. Sleep Med, 2010, 11(4): 343-350.

[5] Patenaude A, Murthy M R, Mirault M E. Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system [J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(10): 1063-1080.

[6] HUANG J, XU J, TIAN L, et al. A thioredoxin reductase and/or thioredoxin system-based mechanism for antioxidant effects of ambroxol [J]. Biochimie, 2014, 97(1): 92-103.

[7] Macdonald R, Barnes K, Hastings C, et al. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? [J]. Biochem Soc Trans, 2018, 46(4): 891-909.

[8] Ganguly G, Chakrabarti S, Chatterjee U, et al. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. Drug Des Devel Ther, 2017, 11(11): 797-810.

[9] 黄攀攀,王平,李贵海,等. 老年阴虚失眠动物模型的建立与评价 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1719-1723.

[10] 谢光璟,薄文集,黄攀攀,等. 天王补心丹对慢性睡眠剥夺模型大鼠心肌、下丘脑视交叉上核 VIP、AVP 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 323-326.

[11] 吴宝金,陈志勇. 天王补心汤加减治疗阴虚火旺型失眠临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(9): 1147-1148.

[12] 胥丹,曲寿河,单爽,等. 天王补心丹的现代临床应用 [J]. 中国药理学杂志:网络版, 2018, 16(2): 26-34.

[13] 王广艳,腾名子,朱君. 天王补心丹加减治疗心房颤动合并冠心病阴虚火旺证的临床观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 189-194.

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

[15] 李越峰,张泽国,徐福菊,等. 白芍改善睡眠作用的药效物质基础研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20

- (15):127-130.
- [16] Walsh J K, Deacon S, Dijk D J, et al. The selective extrasynaptic GABAA agonist, gaboxadol, improves traditional hypnotic efficacy measures and enhances slow wave activity in a model of transient insomnia [J]. *Sleep*, 2007, 30(5):593-602.
- [17] Lira A B, Rodrigues C F D S. Evaluation of oxidative stress markers in obstructive sleep apnea syndrome and additional antioxidant therapy: a review article [J]. *Sleep Breath*, 2016, 20(4):1155-1160.
- [18] Korcarz C E, Stein J H, Peppard P E, et al. Combined effects of sleep disordered breathing and metabolic syndrome on endothelial function: the wisconsin sleep cohort study [J]. *Sleep*, 2014, 37(10):1707-1713.
- [19] LU J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66(8):75-87.
- [20] Ramus S M, Cilensek I, Petrovic M G, et al. Single nucleotide polymorphisms in the Trx2/TXNIP and TrxR2 genes of the mitochondrial thioredoxin antioxidant system and the risk of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(2):192-198.
- [21] Mcevoy B, Sumayao R, Slattery C, et al. Cystine accumulation attenuates insulin release from the pancreatic β -cell due to elevated oxidative stress and decreased ATP levels [J]. *J Physiol*, 2016, 593(23):5167-5182.

[责任编辑 孙丛丛]