

·方药研究·

本文引用:张付民,冉仁国,赵宾宾.酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺大鼠视交叉上核生物钟基因 Clock 和 Bmal1 表达的影响[J].湖南中医药大学学报, 2019,39(1):19-22.

酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺大鼠视交叉上核生物钟基因 Clock 和 Bmal1 表达的影响

张付民¹,冉仁国^{1*},赵宾宾²

(1.湖北省恩施州中心医院,湖北 恩施 445000;2.湖北中医药大学基础医学院,湖北 武汉 430065)

〔摘要〕目的 观察酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺大鼠视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)生物钟基因 Clock 和 Bmal1 蛋白表达的影响。**方法** 将实验大鼠随机分为空白组、模型组、舒乐安定组和酸枣仁汤组,除空白组外,其他各组用多平台水环境法制定慢性睡眠剥夺模型并予以相应干预。采用自主活动测试仪记录大鼠自主活动时间,免疫组化和 Western blot 检测 SCN 中 Clock 和 Bmal1 蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠自主活动时间 T_L (光照时段4个点之和)、 T_D (黑暗时段4个点之和)、 T_{ALL} (光照+黑暗8个时段之和)明显增加($P<0.01$);SCN 中 Clock 和 Bmal1 蛋白表达水平下降($P<0.01$)。干预后,与模型组比较,舒乐安定组和酸枣仁汤组大鼠 T_L 、 T_D 、 T_{ALL} 均减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。舒乐安定组和酸枣仁汤组大鼠 SCN 中 Clock 和 Bmal1 蛋白表达上升($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** 酸枣仁汤能改善慢性睡眠剥夺大鼠的睡眠状态,其机制可能与酸枣仁汤调节大鼠 SCN 中 Clock 和 Bmal1 的表达有关。

〔关键词〕 视交叉上核;酸枣仁汤;睡眠剥夺;生物钟基因;Clock;Bmal1;自主活动时间

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.01.005

Effect of Suanzaoren Decoction on Expression of Circadian Genes Clock and Bmal1 in the Suprachiasmatic Nucleus in Chronically Sleep-Deprived Rats

ZHANG Fumin¹, RAN Renguo^{1*}, ZHAO Binbin²

(1. Enshi Central Hospital of Hubei Province, Enshi, Hubei 445000; 2. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430065, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of Suanzaoren Decoction on the protein expression of circadian genes Clock and Bmal1 in the suprachiasmatic nucleus (SCN) in chronically sleep-deprived rats. **Methods** The experimental rats were randomly divided into blank group, model group, Eurodin group, and Suanzaoren Decoction group. All rats except those in the blank group were subjected to a multi-platform water bath to establish a model of chronic sleep deprivation, and each group received the corresponding treatment. An autonomic activity recorder was used to record the time of autonomic activities of the rats. Immunohistochemistry and Western blot were used to measure the protein expression of Clock and Bmal1 in the SCN. **Results** Compared with the blank group, the model group showed significantly increased T_L (sum of automatic activity time recorded at four time points in the light), T_D (sum of automatic activity time recorded at four time points in the dark), and T_{ALL} (sum of automatic activity time recorded at eight time points in the light and dark) ($P<0.01$), and significantly decreased protein expression levels of Clock and Bmal1 in the SCN ($P<0.01$). Compared with the model group, the Eurodin group and Suanzaoren Decoction group showed significantly decreased T_L , T_D , and T_{ALL} after administration ($P<0.01$ or $P<0.05$), and significantly increased protein expression levels of Clock and Bmal1 in the SCN ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** Suanzaoren Decoction can improve the sleep state of chronically

〔收稿日期〕2018-05-31

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81703973);湖北省教育厅科研项目(Q20172003)。

〔作者简介〕张付民,男,学士,主治医师,主要从事中医药防治疑难杂病的研究。

〔通讯作者〕*冉仁国,男,学士,主治医师,E-mail:643443817@qq.com。

sleep-deprived rats, which may be related to its regulation of the expression of Clock and Bmal1 in the SCN of rats.

[**Keywords**] suprachiasmatic nucleus; Suanzaoren Decoction; sleep deprivation; circadian gene; Clock; Bmal1; time of autonomic activity

失眠是以入睡难、易醒、睡眠欠深度为主要症状的临床常见病症^[1],严重困扰着患者的生活和工作,已成为一种新的流行病^[2]。据中国睡眠研究会2016年公布的睡眠调查结果显示,中国成年人失眠发生率高达38.2%,明显高于发达国家,超过3亿中国人有睡眠障碍^[3]。近年研究发现^[4],失眠与生物钟调节基因失调有关。视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)是哺乳动物昼夜节律调节系统的中枢结构,可调节身体内各种昼夜节律活动^[5]。研究发现,SCN中Clock和Bmal1的表达失调与失眠症密切相关^[6]。酸枣仁汤是临床治疗慢性失眠的常用方,能显著改善患者的睡眠质量,但其作用机制尚未完全明确。为进一步探明酸枣仁汤改善睡眠的作用机制,本实验拟采用多平台水环境睡眠剥夺法建立慢性睡眠剥夺大鼠模型,用免疫组化和Western blot检测SCN中Clock和Bmal1蛋白的表达,以期为酸枣仁汤治疗失眠提供部分实验依据。

1 材料

1.1 动物

成年健康SPF级SD雄性大鼠40只,体质量为200~250 g,由湖北省实验动物研究中心提供,动物许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。

1.2 主要药品及试剂

酸枣仁汤由湖北省恩施州中心医院中药房提供,酸枣仁汤按方剂学^[7]计量配伍,即酸枣仁30 g,知母9 g,茯苓6 g,川芎6 g,甘草3 g。煎煮前用纯水将药物浸泡20 min,浸泡好后,先后用武火和文火煎煮20 min,滤出药液,再次加水煮开,滤出药液,混匀2次煎取的药液,用旋蒸仪浓缩药液至每毫升药液含生药0.486 g。舒乐安定,北京益民药业有限公司,批号H20170625。Clock一抗兔抗鼠抗体,美国Chemi-Con公司,批号:H77260。Bmal1一抗兔抗鼠抗体,美国Chemi-Con公司,批号:H47110。二抗羊抗兔抗体,武汉科瑞生物技术有限公司,批号20170315。Dako LSAB2通用性免疫组化试剂盒,丹麦Dako公司,批号SU187565。DAB浓缩型显色试剂盒,北京杰辉博高生物技术有限公司,批号KS214968。

1.3 主要仪器

参考文献[8]自制睡眠剥夺箱,箱体大小为72 cm×48 cm×50 cm,箱内置6个连体直径为8 cm,高为8 cm的圆形平台,呈2×3排列。ZZ-6型自主活动测试仪(安徽正华生物仪器设备有限公司)、Universal Hood III型凝胶图像成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物分组

适应性饲养1周后将大鼠随机分为空白组、模型组、舒乐安定组和酸枣仁汤组,每组10只,除空白组外,其他各组用多平台水环境法以制定慢性睡眠剥夺模型^[9]。

2.2 慢性睡眠剥夺模型的建立及干预

将模型组、舒乐安定组和酸枣仁汤组3组大鼠放在多平台水环境中进行睡眠剥夺,于15时到次日8时连续18 h睡眠剥夺,连续剥夺21 d。大鼠入睡或肌肉松弛时就会掉入水中,以此达到睡眠剥夺的目的。

造模完成后,根据“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值”计算动物给药剂量,舒乐安定组大鼠按0.18 mg/(kg·d)给药,酸枣仁汤组按4.86 g/(kg·d)给药,给药容量均为1 mL/100 g,定于每天中午12时给药,连续灌胃2周,1次/d。空白组和模型组给予等体积的生理盐水,疗程同酸枣仁汤组。

2.3 动物取材及处理

自主活动实验完成后取材,用10%水合氯醛(4 mL/kg)腹腔注射麻醉,麻醉好后断头取脑,冰上分离大鼠下丘脑,镜下再分离SCN脑组织,置液氮速冻,24 h内移于-80 °C冰箱保存。

2.4 指标检测

2.4.1 自主活动时间检测 末次灌胃结束后12 h,应用自主活动测试仪观察大鼠自主活动时间。实验前将自主活动测试仪设置为12D/12L光暗循环,即8:00-20:00为光照时间,21:00-7:00为黑暗时间。分别于0:00、3:00、6:00、9:00、12:00、15:00、18:00和21:00观察大鼠自主活动时间,每次观察3 min。用 T_{ALL} 表示大鼠8个时点自主活动时间之和, T_L 表示光照时段4个时点自主活动时间之和, T_D 表示黑暗时段4个时点自主活动时间之和。分析和比较4

组 T_{ALL} 、 T_L 和 T_D 。

2.4.2 免疫组化检测 SCN 中 Clock、Bmal1 蛋白表达水平 自主活动时间检测完毕后取材,用 10%水合氯醛经腹腔注射麻醉(4 mL/kg),麻醉好后用 4%多聚甲醛经心脏灌注,断头取脑,置于 4%多聚甲醛中固定 48 h。固定好后,石蜡包埋切片和脱水,用 3% H_2O_2 浸泡 15 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;分别加入一抗 Clock 和一抗 Bmal1(Clock 稀释度为 1:400, Bmal1 稀释度为 1:200),37 °C 孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;加入二抗(稀释度为 1:3 000),37 °C 孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;DAB 显色 5 min,依次水洗、复染、脱水、透明、封片和观察。每张切片随机选取 5 个高倍($\times 400$)视野,用 Image Pro-Plus 6.0 软件进行图像处理。获取累积光密度(IOD),进行数据分析。

2.4.3 Western blot 检测 SCN 中 Clock、Bmal1 蛋白表达水平 用 Western blot 检测 4 组大鼠 SCN 中 Clock 和 Bmal1 的蛋白表达量,内参为 β -actin。取 SCN 脑组织 20 mg,加蛋白裂解液,冰上研磨,以 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,取上清,用 BCA 蛋白质试剂盒分别测定 4 组蛋白量;依次加样、凝胶电泳、转膜和室温封闭;按抗体说明书加入一抗 Clock 和一抗 Bmal1(Clock 稀释度为 1:400, Bmal1 稀释度为 1:200),置 4 °C 冰箱过夜,洗膜,再加入二抗(稀释度为 1:3 000),ECL 显色;置于凝胶图像成像分析系统,曝光各组蛋白条带,拍照,分析灰度值。

2.5 统计学方法

所有数据均运用统计软件 SPSS 19.0 处理,实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差分析,多组间比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

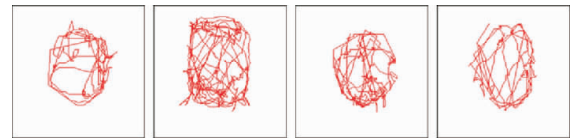
3.1 自主活动时间检测结果

从表 1 和图 1 可以看出,与空白组比较,模型组大鼠 T_L 、 T_D 、 T_{ALL} 明显增加($P<0.01$);与模型组比较,舒乐安定组和酸枣仁汤组大鼠 T_L 、 T_D 、 T_{ALL} 均有减少($P<0.01$, $P<0.05$)。

表 1 酸枣仁汤对睡眠剥夺大鼠自主活动时间的影晌($\bar{x}\pm s, s$)

组别	<i>n</i>	T_L	T_D	T_{ALL}
空白组	10	267.63±35.43	378.77±39.37	646.40±57.11
模型组	10	323.87±42.10**	440.64±29.76**	764.50±48.63**
舒乐安定组	10	289.13±30.27#	404.69±24.77#	693.82±46.41##
酸枣仁汤组	10	280.55±38.24#	400.41±29.69##	680.96±52.90##
<i>F</i> 值		4.28	6.69	9.31
<i>P</i> 值		0.011	0.001	0.000

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$



注:从左至右依次为空白组、模型组、舒乐安定组、酸枣仁汤组

图 1 各组大鼠活动轨迹图

3.2 免疫组化实验结果

从图 2、图 3 和表 2 可以看出,空白组大鼠 SCN 中 Clock 和 Bmal1 蛋白表达水平较高;造模后,模型组大鼠 SCN 中 Clock 和 Bmal1 蛋白表达水平相比,模型组下降($P<0.01$);给药后,舒乐安定组和酸枣仁汤组大鼠相比,模型组 SCN 中 Clock 和 Bmal1 蛋白表达均上升($P<0.01$, $P<0.05$)。

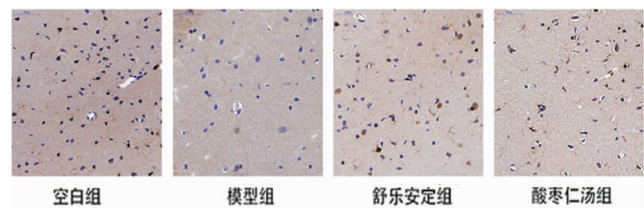


图 2 酸枣仁汤对睡眠剥夺大鼠 SCN 中 Clock 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

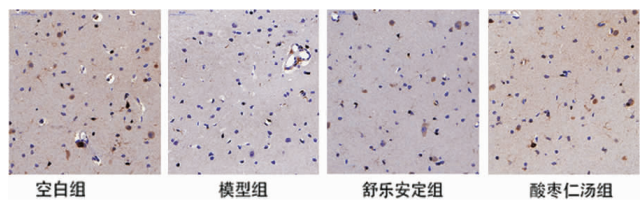


图 3 酸枣仁汤对睡眠剥夺大鼠 SCN 中 Bmal1 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

表 2 各组大鼠 SCN 中 Clock 和 Bmal1 的 IOD (累积光密度)值($\bar{x}\pm s, \times 10^3$)

组别	<i>n</i>	Clock	Bmal1
空白组	10	3.31±0.87	2.66±0.48
模型组	10	1.49±0.38**	1.52±0.59**
舒乐安定组	10	2.23±0.49##	2.04±0.44##
酸枣仁汤组	10	2.02±0.41#	2.01±0.28##
<i>F</i> 值		17.70	10.28
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

3.3 Western blot 实验结果

从图 4 和表 3 可以看出,空白组大鼠 SCN 中 Clock 和 Bmal1 蛋白表达水平较高;造模后,模型组大鼠 SCN 中 Clock 和 Bmal1 蛋白表达水平下降($P<0.01$);给药后,舒乐安定组和酸枣仁汤组大鼠相比模型组 SCN 中 Clock 和 Bmal1 蛋白表达均上升($P<0.01$, $P<0.05$)。



注:从左至右分别为空白组、模型组、舒乐安定组、酸枣仁汤组

图4 各组大鼠SCN中Clock和Bmal1蛋白条带

表3 各组大鼠SCN中Clock和Bmal1灰度值分析($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Clock	Bmal1
空白组	10	1.94±0.29	1.59±0.32
模型组	10	1.17±0.29**	1.17±0.28**
舒乐安定组	10	1.69±0.31 [#]	1.50±0.16 [#]
酸枣仁汤组	10	1.61±0.32 [#]	1.46±0.25 [#]
F值		11.51	4.85
P值		0.000	0.006

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

4 讨论

酸枣仁汤出自《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治》^[10],由酸枣仁、川芎、茯苓、知母和炙甘草组成,主治“虚劳虚烦不得眠”,方中酸枣仁养血补肝、宁心安神,为君药;茯苓宁心安神,知母滋阴清热,二者共为臣药;川芎调畅肝气,为佐药;炙甘草调和诸药,为使药,全方共奏养血滋阴、除烦安神之功。失眠患者常有烦躁不安的行为表现,尤其是夜晚入睡时^[11]。这种“烦躁不安”在睡眠剥夺动物模型身上就表现为昼夜活动节律失调^[12]。本实验发现,通过睡眠剥夺,模型组大鼠活动时间明显增加($P < 0.01$),与正常组比较,模型组大鼠昼夜活动节律失调明显,而给与酸枣仁汤后,睡眠剥夺模型大鼠自主活动时间明显减少($P < 0.01$, $P < 0.05$),昼夜活动节律失调明显好转,这说明酸枣仁汤可以改善睡眠剥夺模型大鼠的睡眠状态。

SCN是哺乳动物昼夜节律调节系统的中枢结构,可调节身体内各种昼夜节律活动^[5]。研究发现^[13],SCN中存在多种与睡眠节律相关的基因,如Per1、Per2、Clock、Bmal1等,其中已明确证实^[14]Clock和Bmal1可以控制睡眠的稳态,二者的表达紊乱可导致睡眠-觉醒失调。有研究发现^[15],失眠患者SCN中Clock和Bmal1表达明显低于正常人,而本实验发

现,空白组大鼠SCN中Clock和Bmal1表达水平较高。造模后,模型组大鼠SCN中Clock和Bmal1表达水平下降。给药后,舒乐安定组和酸枣仁汤组大鼠SCN中Clock和Bmal1表达上升。

综合分析,课题组认为酸枣仁汤能改善慢性睡眠剥夺大鼠的睡眠状态,其机制可能与酸枣仁汤调节大鼠SCN中Clock和Bmal1的表达有关。这为酸枣仁汤防治失眠提供了新思考和新靶点。

参考文献

- [1] 乔静,刘伟.中风病失眠的中医辨证论治[J].内蒙古中医药,2017,36(2):53.
- [2] 刘珏,刘民.失眠的流行病学研究进展[J].中华健康管理学杂志,2013,7(1):60-62.
- [3] 黄霖雨.如何睡得更好[N].中国青年报,2017-2-23(5).
- [4] QIN X M, GUO J H. Synchronization of the mammalian central and peripheral circadian clocks[J]. Chinese Science Bulletin, 2017,62(25):2849-2856.
- [5] WING C. Impact of Medicaid Managed Care Program on the State Cost and Medical Care Expenditures: Evidence from a Pilot Program in Illinois[J]. European Journal of Neuroscience, 2015, 12(8):2865-2870.
- [6] KOJIMA S, Green C B. Circadian genomics reveal a role for post-transcriptional regulation in mammals[J]. Biochemistry, 2015, 54(2):124-133.
- [7] 谢鸣.方剂学[M].北京:人民卫生出版社,2010:258.
- [8] 龙清华.郁证失眠的理论探讨及三草安神方对抑郁症失眠大鼠的干预作用[D].武汉:湖北中医药大学,2017.
- [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] 王思宇,杨学,何园.酸枣仁汤方证探微[J].上海中医药杂志,2016,50(7):30-34.
- [11] 陈军.失眠的针灸治疗和自我调理[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(2):124.
- [12] 丁莉.昼夜节律的中医理论探讨及生慧汤对APP/PS1痴呆小鼠昼夜节律的影响[D].武汉:湖北中医药大学,2016.
- [13] RESZKA E, PEPLONSKA B, WIECZOREK E, et al. Rotating night shift work and polymorphism of genes important for the regulation of circadian rhythm[J]. Scandinavian Journal of Work Environment & Health, 2013, 39(2):178-186.
- [14] 魏敬然,魏高文,郑雪娜,等.不同经穴组合针刺对失眠大鼠下丘脑生物钟基因Clock和Bmal1表达的影响[J].针刺研究,2017,42(5):429-433.
- [15] CHEN H, ZHAO L, KUMAZAWA M, et al. Downregulation of core clock gene Bmal1 attenuates expression of progesterone and prostaglandin biosynthesis-related genes in rat luteinizing granulosa cells [J]. AM J Physiol Cell Physiol, 2013, 304(12):1131-1140.