

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.08.014

更欣汤对围绝经期失眠模型大鼠 下丘脑生物钟基因表达的影响

王艺璇¹, 汤玲²✉, 孙天琳³, 史梅莹⁴, 陆义芹², 李修恒²

1. 成都中医药大学, 四川省成都市金牛区十二桥路37号, 610032; 2. 北京中医药大学东直门医院; 3. 北京市第一中西医结合医院; 4. 中国中医科学院望京医院

[摘要] **目的** 探讨更欣汤治疗围绝经期失眠的可能作用机制。**方法** 60只SD雌性大鼠筛选出动情周期规律的大鼠52只, 随机分为空白组13只和造模组39只。造模组大鼠采用雷公藤多苷片灌胃联合对氯苯丙氨酸(PCPA)混悬液腹腔注射建立围绝经期失眠大鼠模型。将26只造模成功的大鼠随机分为模型组和更欣汤组各13只。更欣汤组每日予更欣汤颗粒剂1.8 g/(kg·d)灌胃, 空白组和模型组大鼠每日予10 ml/(kg·d)生理盐水灌胃, 连续14天。观察大鼠一般行为学变化, 采用戊巴比妥钠协同实验检测大鼠睡眠情况(睡眠潜伏期、睡眠持续期), 采用Western blot法检测大鼠下丘脑生物钟基因CLOCK、芳基羟受体核转运体样蛋白(BMAL1)、Per1、Per2蛋白表达, RT-qPCR法检测大鼠下丘脑CLOCK、BMAL1、Per1、Per2 mRNA表达。**结果** 戊巴比妥钠协同实验结果显示, 模型组和更欣汤组大鼠睡眠持续期较空白组延长($P<0.05$), 各组大鼠睡眠潜伏期差异均无统计学意义($P>0.05$)。与空白组比较, 模型组大鼠精神状态差, 前期白天及夜间均活跃、呈觉醒状态, 摄食水减少, 毛发竖起、色淡黄、色泽干枯、易脱落, 大便呈黄绿色、质软或质稀不成形; 下丘脑CLOCK、BMAL1蛋白表达水平升高, Per1、Per2蛋白表达水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 更欣汤组大鼠精神状态明显好转, 白天活动较前减少, 毛色稍黄、但有光泽, 大便成形, 下丘脑Per2蛋白表达水平升高($P<0.01$), CLOCK、BMAL1及Per1蛋白表达水平均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠下丘脑CLOCK、BMAL1、Per1、Per2 mRNA相对表达量比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 更欣汤可改善围绝经期失眠模型大鼠睡眠状态, 其作用机制可能与上调下丘脑生物钟基因Per2蛋白表达有关。

[关键词] 围绝经期; 失眠; 更欣汤; 下丘脑; 生物钟基因; 昼夜节律

失眠是全球围绝经期女性报告最多的症状之一, 其发病率在人群中占比达16%~47%, 主要表现为入眠困难、睡眠维持困难、易觉醒和晨间早醒等, 严重影响中老年女性的生活满意度^[1]。女性围绝经期失眠不仅受该时期女性体内性激素水平的影响, 也受其他绝经综合征相关症状如潮热、汗出和情绪障碍等的影响^[2]。现代研究发现, 雌激素受体广泛存在于视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN), 并参与SCN调节睡眠昼夜节律的过程, 而

循环雌激素对其受体的反馈作用, 使循环雌激素直接或间接在这一调节中起到重要作用^[3], 包括诱导中枢系统中生物钟基因的转录和翻译^[4]。当雌激素处于波动的时期, 如围绝经期阶段等, 机体昼夜节律改变的发生率增加, 表现为睡眠-觉醒周期的改变。Quintela等^[5]研究发现, 雌激素通过与雌激素受体结合可以增加脉络丛芳基羟受体核转运体样蛋白(BMAL1)、Per1和Per2等生物钟基因的表达, 从而影响睡眠。

国医大师肖承棕教授以交通心肾为指导思想, 自拟更欣汤治疗女性围绝经期失眠, 在提高患者睡眠质量方面具有显著疗效, 且未见药物副反应^[6]。因此, 本研究观察更欣汤对围绝经期失眠模型大鼠

基金项目: 第四届国医大师传承工作室(401091401); 中国民族医药学会科研项目(2021Z1225-340102); 名医传承、薪火“3+3工程”(JX336)

✉ 通讯作者: tangling73@126.com, (010)84013040

下丘脑生物钟基因表达的影响,探讨更欣汤治疗女性围绝经期失眠的可能作用机制,为其治疗本病提供科学依据。本研究已通过首都医科大学附属胸科医院伦理委员会实验动物伦理审查,伦理批号: XK2021-109。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 60 只,7 周龄,体质量 (195 ± 15) g, 购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物使用许可证号: 北京 SYXK (京) 2017-0033。饲养于首都医科大学附属北京胸科医院内清洁级动物房,每笼 3 只,温度 22.0°C , 湿度 50.0%, 普通饲料正常饲养,自由摄食饮水, 12 h 明暗循环交替。

1.2 药物

更欣汤组方: 女贞子 15 g, 墨旱莲 15 g, 百合 15 g, 知母 12 g, 生地黄 15 g, 白芍 15 g, 枸杞子 15 g, 沙苑子 15 g, 蒺藜 10 g, 龙骨 30 g, 牡蛎 30 g, 丹参 15 g, 合欢皮 15 g, 莲子心 3 g, 夜交藤 15 g。颗粒剂由北京康仁堂药业有限公司生产,将 180 g 更欣汤颗粒溶于 1 L 蒸馏水中,水浴加热并搅拌至颗粒完全溶解,配置浓度为 0.18 g/ml, 4°C 冷藏保存。雷公藤多苷片 (浙江得恩德制药股份有限公司, 10 mg/片, 批号: Z33020422), 将 5 g 雷公藤多苷片碾碎为粉末状,加入 1 L 蒸馏水充分摇匀溶解,制备成浓度为 5 mg/ml 雷公藤多苷溶液。

1.3 主要试剂及仪器

氯苯丙氨酸 (PCPA, 上海易恩化学技术有限公司, 批号: RH319419); CLOCK 抗体 (康朗生物科技有限公司, 批号: KL10530-01); BMAL1 抗体 (Abcam 公司, 批号: ab230822); Per1 抗体 (批号: 13463)、Per2 抗体 (批号: 67513), 中国武汉三鹰生物技术有限公司; β -Actin (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号: 4967); 吐温 80 (CP 级, 批号: 2021040)、中性树胶 (批号: 10004160), 国药集团化学试剂有限公司; 95% 乙醇 (北京贞玉民生药业有限公司, 批号: 20210604); 5% 碳酸氢钠注射液 (黑龙江齐泰动物保健品有限公司, 批号: 080601569); BCA 蛋白检测试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司, 批号: 02912E); 山羊抗兔 IgG (H+L) (批号: 111-035-003)、山羊抗鼠 IgG (H+L) HRP (批号: 115-035-003), 美国 Jackson 公司; ECL (美国 Millipore

公司, 批号: WBKLS0500); Trizol (美国 Invitrogen 公司, 批号: 5346994); HE 染液 (珠海贝索生物技术有限公司, 批号: C220101)。

2720 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Mupid 2plus 型电泳槽 (日本 TAKARA 公司); Image system (EUV-LDUV) 凝胶成像系统 (韩国 Biotech 公司); MICRO 17TR 型离心机 (韩国 Hanil 公司); epMotion 5070 型自动加样工作站 (德国 Eppendorf 公司); DHG-9240A 型鼓风干燥箱 (上海一恒公司); BT-214 型天平 (美国 Denver 公司); Roche LightCycler® 480II 型实时荧光定量 PCR 系统 (瑞士 Roche 公司); ST5020 型自动染色机 (德国 Leica 公司); ECLIPSE 80i 型光学显微镜 (日本 Nikon 公司); H-1850R 型高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.4 实验动物筛选

60 只 SD 大鼠适应性饲养 3 天后,连续 10 天 (即 2 个完整动情周期) 每日 9:00 进行阴道角化上皮实验^[7], 留取大鼠阴道脱落细胞涂片。稍待风干后用 95% 乙醇溶液固定,进行 HE 染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察、拍照留存涂片。动情周期判断参考文献 [8] 中大鼠阴道涂片不同动情周期区分规则,动情间期: 阴道细胞涂片中见大量白细胞,或可见极少量有核上皮细胞;动情前期: 见大量有核上皮细胞,或伴见少量、分散的角化上皮细胞;动情期: 满视野均可见大量角化上皮细胞,呈堆积状;动情后期: 可见角化上皮细胞、有核上皮细胞和白细胞三者共同出现。最终纳入 52 只动情周期规律的雌性 SD 大鼠参与实验。

1.5 模型建立

将 52 只动情周期规律的 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白组 13 只、造模组 39 只。造模组大鼠采用雷公藤多苷片灌胃建立围绝经期大鼠模型,模型成功标准为大鼠动情周期紊乱,表现为动情周期延长或呈停滞现象^[9]。具体步骤如下: 造模组大鼠每日 9:00 以 50 mg/(kg·d) 雷公藤多苷溶液灌胃,空白组以同体积生理盐水灌胃。于造模第 5 天起继续对各组大鼠行阴道角化上皮实验,连续灌胃 14 天后见大鼠仍规律动情,考虑药物剂量不足,故提高雷公藤多苷溶液浓度 (7.5 mg/ml),共灌胃 30 天 (其中雷公藤多苷溶液 5 mg/ml 14 天, 7.5 mg/ml 16 天),隔日测量大鼠体质量以调整灌胃药物剂量。期间每日监测大鼠动情周期变化,空白组大鼠动情周期规律,造模组大鼠均出现动情周期紊乱,表现

为动情周期延长或呈停滞,行为躁动,毛色光泽度下降,体质量减轻,则说明造模成功^[10]。

围绝经期大鼠模型建立成功后第2天,采用腹腔注射PCPA混悬液法建立失眠大鼠模型^[11]:将PCPA溶于弱碱性生理盐水(pH值:7~8),加入适量吐温80,并于30~40℃的温水中进行水浴,充分摇匀。造模组大鼠于每日9:00以PCPA混悬液450 mg/(kg·d)进行腹腔注射,大鼠药物注射体积为10 ml/kg,连续给药2天。若造模大鼠情绪烦躁,活动亢进,攻击性强,睡眠时间减少,昼夜节律消失,提示失眠模型造模成功^[11]。

1.6 分组及给药

围绝经期模型及失眠模型建立过程中,空白组因灌胃死亡1只,造模组共死亡13只,考虑为雷公藤多苷药物持续毒副作用所致。最终空白组12只,造模成功大鼠26只。将26只造模成功大鼠再次按随机数字表法分为模型组和更欣汤组,每组13只。大鼠每日给药量参照《药理实验方法学》^[12]中等效剂量的比值计算。PCPA腹腔注射后第2天,更欣汤组大鼠于每日9:00以更欣汤颗粒剂溶液1.8 g/(kg·d)进行灌胃,灌胃体积为10 ml/kg。空白组和模型组大鼠均于每日9:00予同体积生理盐水灌胃。各组每日灌胃1次,连续14天。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 大鼠一般情况 实验过程中对大鼠的日间精神活动、饮食、排便、毛色、躁动状态等一般情况进行持续观察。

1.7.2 采用戊巴比妥钠协同实验检测大鼠睡眠情况 末次给药24 h后,行戊巴比妥钠协同实验^[13]:将戊巴比妥钠粉末溶于生理盐水中,配置浓度为1%的戊巴比妥钠溶液,腹腔注射能够使大鼠入睡剂量的戊巴比妥钠(35 mg/kg)。运用大鼠翻正反射,记录大鼠睡眠潜伏期(注射戊巴比妥钠后至大鼠翻正反射消失1 min以上的时间)和睡眠持续期(大鼠翻正反射消失至翻正反射恢复的时间)。

1.7.3 采用Western blot法检测大鼠下丘脑CLOCK、BMAL1、Per1、Per2蛋白表达 戊巴比妥钠实验结束24 h后,各组采用随机数字表法分别取3只大鼠予颈椎脱臼法处死,断头,于冰上分离大鼠脑内下丘脑组织,RIPA蛋白抽提试剂预冷,4℃、12 000 r/min离心15 min(离心半径8 cm)。取上清,按BCA蛋白定量试剂盒使用说明操作测定蛋白浓度。绘制标准曲线图并计算蛋白浓度。根据目的蛋白的分子量,配制10%分离胶,浓缩胶浓度为5%。待检测

蛋白样品上样量30 μg/孔。电泳条件:浓缩胶恒压90 V,约20 min;分离胶恒压120 V,通过预染蛋白标记来确定电泳停止时间。湿转法转膜条件:300 mA恒流;0.45 μm孔径PVDF膜,转膜时间60 min。封闭:将膜完全浸没于5% BSA-TBST中,水平摇床孵育1 h。分别予一抗(CLOCK 1:1000、BMAL1 1:1000、Per1 1:500、Per2 1:5000)和二抗(1:10 000)孵育后洗膜3次。ECL滴加到膜的蛋白面反应3~5 min;胶片曝光后显影、定影,BCA法定量。

1.7.4 采用RT-qPCR法检测下丘脑CLOCK、BMAL1、Per1、Per2 mRNA表达 戊巴比妥钠实验结束24 h后,各组采用随机数字表法分别选取4只大鼠,断头,剪开颅骨,于冰上分离大鼠脑内下丘脑组织,粉碎下丘脑组织,用Trizol提取样品RNA,溶解RNA,称取琼脂糖加入MOPS缓冲液和DEPC水,加热溶化。冷却至60℃左右时加入甲醛及核酸凝胶染料,凝固30 min。取各个RNA样品加入电泳上样缓冲液混匀,再加入变性胶加样孔中,电泳25 min。RNA反转录为cDNA,加入含染料Premix Taq、引物混合物、对应的cDNA,其中一管不加模板作为阴性对照,混匀后置于PCR仪中预变性,电泳20 min后观察照相。置于荧光定量PCR仪中预变性后,进行荧光检测,循环。溶解曲线65~95℃,得出数据并分析。引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成,引物及碱基序列如下:β-actin:上游GAAGTGTGACGTTGACATCCG,下游GCCTAGAAGCATTTGCGGTG;产物长度282 bp;CLOCK:上游GCGAGAAGCTTGGCGTTGAGGAG,下游TGGAGGAGGCAGAAGGAGTTGG,产物长度146 bp;BMAL1:上游AAACTACAAGCCAACATT-TCTATCC,下游ATCTTCCCTCGGTCACATCC,产物长度102 bp;Per1:上游AGACCTCGGCAGGCTTCG,下游GCGAGAACGCTTTGCTTTAGAT,产物长度102 bp;Per2:上游CAGCAGAAAGCAGC-CAGTGAACA,下游GAGGACCAGCAGCACAGAA-GA,产物长度159 bp。

1.8 统计学方法

采用SPSS 25.0软件分析数据。计量资料满足正态分布者以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐者多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验;方差不齐者的多组间比较采用Welch近似F检验,两两比较采用Dunnett's T⁶法。不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位数

$[M(Q_1, Q_3)]$ 表示, 正态分布数据与非正态分布数据之间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠精神状态良好, 摄食水正常, 白天活动少、呈睡眠状态, 夜间活跃、呈觉醒状态, 毛发顺、色白而有光泽, 大便呈褐色、质中等成形。模型组大鼠精神状态差, 摄食水减少, 前期白天及夜间均活跃、呈觉醒状态、易躁动、警觉性提高, 抓取时激惹、撕咬, 后期神情呆滞、喜蜷缩、警觉性下降, 毛发竖起、色淡黄、色泽干枯、易脱落, 大便呈黄绿色、质软或质稀不成形。更欣汤组大鼠精神状态较模型组明显好转, 摄食水正常, 白天活动较前减少, 抓取时未见撕咬与躁动, 毛色稍黄、但有光泽, 大便呈褐色、成形。

2.2 各组大鼠戊巴比妥钠协同实验结果比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组和更欣汤组大鼠睡眠持续期延长 ($P < 0.05$), 睡眠潜伏期差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组和更欣汤组大鼠睡眠持续期比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠下丘脑 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组大鼠下丘脑 CLOCK、BMAL1 蛋白表达水平升高, Per1、Per2 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 更欣汤组大鼠下丘脑 Per1 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$);

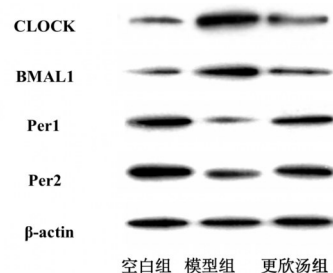
与模型组比较, 更欣汤组大鼠下丘脑 CLOCK、BMAL1 及 Per1 蛋白表达水平均无统计学意义 ($P > 0.05$), Per2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$)。各组蛋白电泳图见图 1。

表 1 各组大鼠戊巴比妥钠协同实验结果比较

Table 1 Comparison of results of the pentobarbital sodium synergistic experiment in rats of each group
[min, $\bar{x} \pm s/M(Q_1, Q_3)$]

组别	鼠数	睡眠潜伏期	睡眠持续期
空白组	12	8.50±3.61	294.08±106.19
模型组	13	5.00 (4, 11)	411.38±155.14 ^{a)}
更欣汤组	13	7.00 (4, 13)	407.00 (396, 627) ^{a)}

注: a) 与空白组比较, $P < 0.05$ 。



注: BMAL1, 芳基羟受体核转运体样蛋白。

图 1 各组大鼠下丘脑生物钟相关蛋白电泳图

Figure 1 Electrophoresis of hypothalamic biological clock proteins of rats in each group

2.4 各组大鼠下丘脑 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2 mRNA 表达比较

表 3 示, 各组大鼠下丘脑 CLOCK、BMAL1、Per1 及 Per2 mRNA 相对表达量比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠下丘脑 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2 蛋白表达比较

Table 2 Comparison of protein expression of CLOCK, BMAL1, Per1 and Per2 in the hypothalamus in three groups

[灰度值, $\bar{x} \pm s$ 或 $M(Q_1, Q_3)$]

组别	鼠数	CLOCK	BMAL1	Per1	Per2
空白组	3	0.15±0.07	0.30 (0.27, 0.53)	0.36±0.07	0.83±0.01
模型组	3	0.56±0.10 ^{a)}	0.60±0.07 ^{b)}	0.11±0.01 ^{a)}	0.19±0.07 ^{a)}
更欣汤组	3	0.36±0.19	0.34±0.09	0.21±0.09 ^{b)}	0.54±0.10 ^{c)}

注: BMAL1, 芳基羟受体核转运体样蛋白。

a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与空白组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠下丘脑 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2 mRNA 相对表达量比较

Table 3 Comparison of the relative mRNA expression of CLOCK, BMAL1, Per1 and Per2 in the hypothalamus in three groups

[灰度值, $\bar{x} \pm s$ 或 $M(Q_1, Q_3)$]

组别	鼠数	CLOCK	BMAL1	Per1	Per2
空白组	4	1.14 (1.03, 1.30)	1.08±0.15	1.17 (0.93, 1.49)	1.16±0.28
模型组	4	1.32±0.29	1.07±0.25	1.37±0.69	1.64±1.13
更欣汤组	4	1.13±0.08	0.88±0.17	1.26±0.29	1.19±0.53

注: BMAL1, 芳基羟受体核转运体样蛋白。

3 讨论

失眠属中医学“不寐”范畴。《难经·四十六难》曰：“老人血气衰，肌肉不滑，荣卫之道涩，故昼日不能精，夜不得寐也。故知老人不得寐也。”肖承棕教授认为，针对女子“七七”之年这一特殊转化时期，肾气渐衰，天癸无以滋养，冲任不足导致全身脏腑功能紊乱，该时期女性以肾虚为主，由肾及肝、心二脏，肝肾阴虚、心肾不交是围绝经期女性发病的基本病机，治疗以交通心肾为纲^[6]。更欣汤以二至丸、百合知母汤和百合地黄汤加减而成，方中女贞子、墨旱莲即二至丸组成，滋补肝肾、滋阴清热。白芍养肝血、平肝阳，又能调经；枸杞子滋补肝肾，养肝血，育肝阴；知母滋阴清心润燥，与百合合用，即百合知母汤，《金匱要略》中记载其用于治疗百合病的基本方剂。百合病是一类以精神异常为主的阴虚内热之证，其描述与围绝经期综合征中的精神情志方面的症状相似。生地黄清热养阴生津，百合清心安神、滋阴清热，二药合用即百合地黄汤。莲子心清心安神，交通心肾；合欢皮安神解郁，夜交藤养心安神；龙骨、牡蛎重镇安神、平肝潜阳、收敛固涩；丹参具有活血调经、清心除烦安神之功，此六味药合用，加强安神助眠之效。沙苑子、蒺藜二味均入肝、肾经，不仅防寒凉伤正，又合《景岳全书》中“善补阴者，必于阳中求阴，则阴得阳升而泉源不竭”之意。全方滋肾水以涵肝木，使肝得柔养，滋肾水以上济心火，使心火不亢，心肾水火既济，围绝经期女性肾阴阳平衡，全身脏腑功能恢复，则围绝经期诸症得消。

戊巴比妥钠协同实验能够客观评价大鼠的睡眠状态。本研究结果显示，与空白组相比，模型组大鼠睡眠持续期甚至超过空白组，与预期结果相反，分析可能是由于雷公藤多苷造模时累积的药物毒副作用导致造模大鼠出现精神状态差，恢复缓慢甚至出现大鼠死亡现象。戊巴比妥钠麻醉效果恢复后观察大鼠一般情况，发现模型组大鼠呈现持续躁动状态，白昼活动增多、易激惹，未见规律动情周期，提示睡眠状态紊乱。而更欣汤组大鼠睡眠持续期较空白组明显延长，且大鼠精神状态较模型组明显好转，摄食水正常，白天活动较前减少，说明更欣汤能够改善围绝经期失眠模型大鼠的睡眠质量。

研究显示，哺乳动物生物钟昼夜节律性的中央起搏器位于下丘脑 SCN，并接受视网膜所投射的光信号进行调控，与外界环境中的昼夜交替存在一致性^[14]。中枢神经系统内生物钟参与调节人体睡眠

稳态、激素、体温、情绪和认知等功能，女性衰老导致生物钟昼夜节律系统功能减弱，继而发生如失眠等相应的病理改变^[15]。其机制涉及生物钟基因的转录和翻译功能，其中 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2 是昼夜节律调节的主要基因，并且存在正负反馈回路^[16]。生理过程中，CLOCK 和 BMAL1 基因表达促进清醒，而 Per 基因表达诱导睡眠^[17]。当生物钟基因突变、缺失或者表达紊乱，可能都会造成上述反馈回路被打乱，表现为早醒或入睡困难等睡眠障碍^[18]。本研究结果显示，模型组大鼠下丘脑 CLOCK、BMAL1 蛋白表达升高，促进清醒增强，使大鼠处于觉醒状态；而 Per1、Per2 蛋白表达下降诱导睡眠作用减弱，进一步促进了觉醒的发生，与以往研究结果^[19-20]一致。与模型组比较，更欣汤组大鼠下丘脑内 CLOCK、BMAL1、Per1 蛋白和 mRNA 表达无明显变化，但 Per2 蛋白表达升高，其对大鼠睡眠正向调节作用增强，提示更欣汤能够在一定程度上调节大鼠的睡眠状态，促进睡眠，提高睡眠质量，具体参与调节睡眠的药物作用机制可能是通过增加 Per2 蛋白表达实现的。但本实验中各组间生物钟基因表达差异无统计学意义，可能与本实验采用雷公藤多苷药物造模周期长、大鼠死亡数量较多导致样本量偏少有关。

综上所述，更欣汤能够改善围绝经期失眠模型大鼠其睡眠状态，减少大鼠精神兴奋，使其白天睡眠增加，其机制可能是通过增加 Per2 负向调节因子表达实现的。本研究由于雷公藤多苷药物毒副作用，导致最终完成实验大鼠样本量较少，以后仍需扩大样本量并设置阳性对照组来进一步验证。

参考文献

- [1] PROSERPIO P, MARRA S, CAMPANA C, et al. Insomnia and menopause: a narrative review on mechanisms and treatments[J]. Climacteric, 2020, 23(6): 539-549.
- [2] TANDON VR, SHARMA S, MAHAJAN A, et al. Menopause and sleep disorders[J]. J Midlife Health, 2022, 13(1): 26-33.
- [3] HATCHER KM, ROYSTON SE, MAHONEY MM. Modulation of circadian rhythms through estrogen receptor signaling[J]. Eur J Neurosci, 2020, 51(1): 217-228.
- [4] BAILEY M, SILVER R. Sex differences in circadian timing systems: implications for disease[J]. Front Neuroendocrinol, 2014, 35(1): 111-139.
- [5] QUINTELA T, ALBUQUERQUE T, LUNDKVIST G, et al. The choroid plexus harbors a circadian oscillator modulated by estrogens[J]. Chronobiol Int, 2018, 35(2): 270-279.

- [6]贾林娜. 更欣汤治疗女性更年期失眠症(心肾不交型)的临床疗效评价[D]. 北京:北京中医药大学, 2021.
- [7]印丹丹, 封瑞, 任丽菲, 等. 阴道涂片法鉴定大鼠生理周期的应用评价[J]. 解剖科学进展, 2014, 20(4):360-363.
- [8]张婷, 王颖, 王莉. 大鼠阴道涂片两种染色方法比较[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12):98-101.
- [9]杨溢铎, 李倩. 围绝经期动物模型建立方法的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(6):176-180.
- [10]刘晓宇, 王娇, 钱欣, 等. 围绝经期大鼠动情周期变化的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014, 48(5):358-360.
- [11]肖成荣, 马增春, 李海静, 等. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4):326.
- [12]徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:203.
- [13]叶钰娟, 李昕蓉, 曹梦琪, 等. 中医失眠证候模型的研究述评[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(1):178-181.
- [14]COX KH, TAKAHASHI JS. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism[J]. J Mol Endocrinol, 2019, 63(4):R93-R102.
- [15]KONDRATOVA AA, KONDRATOV RV. The circadian clock and pathology of the ageing brain[J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(5):325-335.
- [16]魏文静, 仝立国, 仲启明, 等. 生物钟基因与睡眠障碍的研究进展[J]. 实用医药杂志, 2018, 35(5):455-457.
- [17]KOIKE N, YOO SH, HUANG HC, et al. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals[J]. Science, 2012, 338(6105):349-354.
- [18]MONTI JM, JANTOS H. The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking[J]. Prog Brain Res, 2008, 172(1):625-646.
- [19]肖迪, 刘俊, 郑桃云. 交泰丸对睡眠剥夺小鼠视交叉上核生物钟基因 Clock 及 Bmal 1 表达的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2019, 21(4):25-29.
- [20]魏文静, 仝立国, 仲启明, 等. 蛇床子催眠活性组分对氯苯丙氨酸致失眠大鼠海马钟基因与氨基酸类神经递质表达的影响[J]. 中草药, 2018, 49(11):2614-2619.

Effect of *Geng Xin Decoction* (更欣汤) on Hypothalamic Biological Clock Gene Expression in Perimenopausal Insomnia Model Rats

WANG Yixuan¹, TANG Ling², SUN Tianlin³, SHI Meiyang⁴, LU Yiqin², LI Xiuheng²

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610032; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Beijing First Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine; 4. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Science

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Geng Xin Decoction* (更欣汤, GXD) in treating perimenopausal insomnia. **Methods** Fifty-two out of 60 SD female rats with regular estrous cycle were selected and randomly divided into blank group (n=13) and modeling group (n=39). The rats in the modeling group were given tripterygium glycosides by gavage and intraperitoneal injection of p-chlorophenylalanine (PCPA) suspension to establish the perimenopausal insomnia rat model. Twenty-six successfully modeled rats were randomly divided into a model group and GXD group with 13 rats in each group. Rats in the GXD group were given 1.8 g/(kg·d) of *Geng Xin Decoction* granules by gavage every day, while those in the blank group and model group were given 10 ml/(kg·d) of normal saline by gavage every day, all for 14 days. The general behavioral changes of rats were observed. Pentobarbital sodium synergistic experiment was applied to detect the sleep status of the rats including sleep latency and sleep duration. Western blotting was used to detect the protein expression of biological clock gene CLOCK, BMAL1, Per1, and Per2 in the hypothalamus, and RT-qPCR method was used to detect the mRNA expression of CLOCK, BMAL1, Per1, and Per2. **Results** The results of pentobarbital sodium synergistic experiment showed that the sleep duration was prolonged in the model group and GXD group than in the blank group ($P<0.05$), while no significant difference was found among the three groups in the sleep latency ($P>0.05$). Compared to those in the blank group, the rats in the model group were in poor mental state and were active both in the daytime and at night in the early stage, showing an arousal state with decreased food and water intake, hair erection with light yellow, dry, and easy to fall off hair; the stool was yellow-green, soft or thin; the protein expression level of CLOCK and BMAL1 in hypothalamus increased, while the protein expression level of Per1 and Per2 decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to those in the model group, the mental state of the rats in GXD group was significantly improved, and the daytime activities of the rats decreased, with slightly yellow but shiny hair, and formed stool; the protein expression level of Per2 increased, while that of CLOCK, BMAL1 and Per1 protein was not statistically significant ($P>0.05$). There was no significant difference in the relative mRNA expression of CLOCK, BMAL1, Per1 and Per2 in the hypothalamus among the groups ($P>0.05$). **Conclusion** The mechanism of GXD in improving the sleep state of perimenopausal insomnia rats may be related to the up-regulation of protein expression of the biological clock gene Per2 in the hypothalamus.

Keywords perimenopause; insomnia; *Geng Xin Decoction* (更欣汤); hypothalamus; biological clock genes; circadian rhythm

(收稿日期: 2022-07-07; 修回日期: 2023-02-16)

[编辑: 王利芬]