

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.20.013

和胃安神方对失眠模型大鼠下丘脑生物钟基因 CLOCK、BMAL1 表达的影响

王硕^{1,2}, 王长振³, 李志慧³, 黄天科³, 王亮¹, 田楚娇¹, 邹涛¹, 刘子涵¹, 陈琦¹, 李绍旦¹✉

1. 中国人民解放军总医院第六医学中心中医医学部, 北京市海淀区阜成路6号, 100048; 2. 中国人民解放军医学院; 3. 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

[摘要] **目的** 探讨和胃安神方治疗失眠的可能作用机制。**方法** 60只雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、艾司唑仑组与和胃安神方低、中、高剂量组。除正常组外其余各组大鼠采用腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA) 2天构建大鼠失眠模型。造模成功后, 艾司唑仑组予以0.33 mg/(kg·d)艾司唑仑水溶液灌胃, 和胃安神方低、中、高剂量组分别给予浓度为1、2、4 g/ml的和胃安神方10 ml/kg灌胃, 正常组和模型组大鼠给予10 ml/kg的生理盐水灌胃, 均每天1次, 连续7天。实验期间观察大鼠一般情况, 给药后每天测量大鼠体质量。最后一次给药后次日采用戊巴比妥钠协同实验观察各组大鼠睡眠情况, 记录睡眠潜伏期及睡眠时长; 采用免疫组化法和Western Blot法检测大鼠下丘脑时钟节律调节蛋白(CLOCK)、脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白1(BMAL1)表达情况。**结果** 模型组大鼠在各时间点体质量较正常组大鼠降低($P<0.01$); 与艾司唑仑组同时比较, 和胃安神方低剂量组大鼠在给药第5、6、7天体质量升高($P<0.05$)。与正常组比较, 模型组大鼠睡眠时长缩短($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠睡眠时长增加($P<0.01$); 和胃安神方高剂量组与艾司唑仑组睡眠时长比较差异无统计学意义($P>0.05$), 而和胃安神方中、低剂量组睡眠时长较艾司唑仑组缩短($P<0.01$)。各组大鼠睡眠潜伏期比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。免疫组化法和Western Blot法检测结果均显示, 与正常组比较, 模型组大鼠下丘脑中CLOCK、BMAL1表达显著减少($P<0.01$); 和胃安神方低、高剂量组大鼠下丘脑中CLOCK、BMAL1表达均较模型组增多($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 和胃安神方可改善模型大鼠的失眠状况, 其作用机制可能与上调下丘脑生物钟基因CLOCK、BMAL1蛋白表达有关。

[关键词] 失眠; 和胃安神方; 下丘脑; 生物钟; 时钟节律调节蛋白; 脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白1

失眠是临床最常见的睡眠障碍, 目前临床上西医治疗主要以镇静催眠药为主, 但可产生宿醉、跌倒、多梦等副作用和不良反应^[1]。中医通过中药、针灸、推拿等疗法, 调节机体阴阳平衡, 以达到治疗失眠的效果, 其疗效良好、毒副作用少^[2]。中药组方具有多层次、多靶点综合调理的特点, 能够在一定程度上恢复患者的正常睡眠^[3]。本课题组基于中医“胃不和则卧不安”(《素问·逆调论篇》)和“神不安则不寐”(《景岳全书》)理论, 提出

失眠是由“胃气不和、脑神不宁”所致, 并据此拟定和胃安神方^[4]。前期研究^[5]显示, 和胃安神方可有效提高失眠患者的睡眠质量, 且失眠复发率低, 远期疗效满意, 但其调节睡眠-觉醒节律的作用机制尚未完全明确。现代研究^[6]表明, 生物钟基因参与了睡眠-觉醒、记忆等过程, 其作用复杂多样, 影响脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白1(BMAL1)/时钟节律调节蛋白(CLOCK)复合体、视黄酸相关孤儿受体等许多分子途径与表型。本研究从生物钟基因角度, 探讨和胃安神方治疗失眠的可能作用机制, 旨在为其临床应用提供依据。本研究已通过中国人民解放军总医院医学伦理委员会审

基金项目: 国家自然科学基金(82174283)

✉ 通讯作者: lsd301@126.com

批(伦理审批号:2020-X16-102)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 健康雄性大鼠 60 只,6 周龄,体质量(200 ± 10) g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,实验动物合格证号:SCXK(京)2019-0010。在 12 h 光照、12 h 黑暗的安静环境下适应性饲养大鼠,自由进食饮水,室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(45 ± 5)%。

1.2 药物

和胃安神方组成:姜半夏 10 g,薏苡仁 15 g,白术 15 g,茯神 15 g,石菖蒲 15 g,炙远志 15 g,炒酸枣仁 15 g,柏子仁 15 g,甘草 5 g。饮片由中国人民解放军总医院中药房提供,将诸药煎煮浓缩成含生药 2 g/ml 的药液,室温冷却后 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。艾司唑仑片(山东信谊制药有限公司,批号:230520,规格 1 mg/片)。

1.3 主要试剂与仪器

对氯苯丙氨酸(PCPA, Sigma 公司,批号:C6506-25g); BMAL1 单克隆抗体(批号:ab230822)、 β -actin 兔多克隆抗体(批号:ab8227), Abcam 公司; CLOCK 多克隆抗体(Thermo Fisher Scientific 公司,批号:PA1-520、PA5-140985); 戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号:AM00469); 4% 多聚甲醛(Servicebio 公司,批号:G1101L); 过氧化氢溶液(上海懋康生物科技有限公司,批号:MM0707); 兔二步法检测试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司,批号:PV-9001); DAB 显色液(批号:P0203)、苏木素染色液(批号:C0107-100 ml), Beyotime 公司; 蛋白酶抑制剂(批号:GRF101)、磷酸酶抑制剂(批号:GRF102)、RIPA 蛋白裂解液(批号:PC101)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:ZJ101)、上样缓冲液(批号:LT101S)、显影液(批号:SQ201), Epizyme 公司; 辣根过氧化物酶偶联的第二抗体(Proteintech 公司,批号:SA00001-2)。

电泳仪(Servicebio 公司,型号:SVE-2); 正置光学显微镜(日本尼康公司,型号:Nikon Eclipse CI)。

1.4 分组与造模

将 60 只大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、艾司唑仑组及和胃安神方低、中、高剂量组,每组 10 只。除正常组外,其余各组大鼠构建大鼠失眠模型^[7]:按 500 mg/kg 体质量于每天上午腹腔注射 PCPA,每日 1 次,连续 2 天。PCPA 首次

注射 36 h 后观察造模组大鼠昼夜节律消失,日间与夜晚皆活动不断,再结合经典戊巴比妥钠协同实验进行失眠模型评价,与正常大鼠相比,造模大鼠睡眠时长显著降低,差异具有统计学意义,表明造模成功^[8]。

1.5 给药方法

造模成功后,根据大鼠与 60 kg 成人临床用量等效剂量^[9]进行换算,艾司唑仑组予以 0.33 mg/(kg·d)艾司唑仑水溶液灌胃,和胃安神方低、中、高剂量组分别按等效剂量的 0.5、1、2 倍换算为 1、2、4 g/ml 浓度和胃安神方 10 ml/kg 灌胃,正常组和模型组大鼠给予 10 ml/kg 的生理盐水灌胃,均每天 1 次,连续 7 天。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 大鼠一般情况观察 实验期间观察大鼠毛发、饮食、粪便、活动及睡眠等一般情况。给药后每天测量大鼠体质量。

1.6.2 戊巴比妥钠协同实验^[10] 观察睡眠情况 末次给药次日,根据大鼠体质量以 35 mg/kg 戊巴比妥钠进行腹腔注射,大鼠基本停止运动时,翻转其呈仰卧位,若仰卧位达 60 s 以上,则判定其翻正反射消失进入睡眠状态,从注射到翻正反射消失的时间即为睡眠潜伏期。翻正反射首次恢复时,立即将其翻转成仰卧位,30 s 内若再次恢复俯卧位,则判断为动物觉醒。记录从翻正反射消失到大鼠觉醒的时间为睡眠时长。

1.6.3 免疫组化法检测下丘脑组织中 CLOCK、BMAL1 蛋白表达 戊巴比妥钠协同实验次日,各组采用随机数字表法选取 3 只大鼠,戊巴比妥钠经腹腔注射麻醉后用 4% 多聚甲醛经心脏灌注,断头取全脑组织置于多聚甲醛中固定 48 h 后进行石蜡包埋,选取下丘脑组织石蜡切片脱蜡后进行抗原修复,3% 过氧化氢溶液孵育 20 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min,山羊血清封闭后加入一抗 CLOCK (1:200)、BMAL1 (1:1000),将玻片置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min,加入二抗室温孵育 60 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min,滴加 DAB 显色液显色 5 min,苏木素复染返蓝后脱水透明,晾干后中性树脂封片,随后将玻片置于显微镜下观察拍照,并通过 Image-Pro Plus 6.0 进行定量分析。

1.6.4 Western Blot 法检测下丘脑组织中 CLOCK、BMAL1 蛋白表达 各组剩余大鼠采用随机数字表法选取 3 只,戊巴比妥钠经腹腔注射麻醉后取材,

分离下丘脑组织。取大鼠下丘脑组织 40 mg，加入混合蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂（1：100）RIPA 蛋白裂解液 400 μ l，放入冷冻的匀浆盒中，以 30 Hz、7 min 的条件进行匀浆。匀浆结束后在冰上静置 30 min 使蛋白充分裂解。以 4 $^{\circ}$ C、转速 12 000 r/min 离心 15 min（离心半径为 8 cm），取上清液，将上清液 1：10 稀释后进行 BCA 蛋白定量。将上清液与蛋白上样缓冲液 1：4 混匀后，在金属浴 95~100 $^{\circ}$ C 变性 10 min。根据 CLOCK、BMAL1 蛋白的分子量，配制 10% 分离胶，浓缩胶浓度为 4.5%，上样量为 25 μ g/孔。电泳条件：浓缩胶恒压 80 V，约 20 min，分离胶恒压 120 V，根据预染蛋白 marker 以及蛋白样本，直到所有蛋白样本跑至凝胶底部停止电泳。通过湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上，200 mA 恒流转膜 150 min。将膜用 5% 脱脂牛奶封闭 2h，封闭结束后，分别一抗（CLOCK 1：1000、BMAL1 1：1000）4 $^{\circ}$ C 孵育 14 h，孵育结束后 TBST 清洗 3 次；与辣根过氧化物酶偶联的第二抗体（1：5000）室温孵育 1 h 后使用 TBST 清洗 3 次。将条带放入显影液中 30 s，进行显影；保存条带图像，用 ImageJ1. 8. 0 软件分析，计算其与内参 β -actin 的平均吸光度比值。

1. 7 统计学方法

应用 GraphPad Prism 9. 5、SPSS 16. 0 软件进行统计学分析，所有计量资料进行正态检验及方差齐性检验，结果均符合正态分布且方差齐，采用均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用最小显著差值（LSD）法。 $P<0. 05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2. 1 各组大鼠一般状态观察结果

正常组大鼠毛发顺滑、粪便黑色偏干，日间多蜷缩睡眠。模型组大鼠毛发杂乱粗糙，粪便灰白色，粪质溏稀，日间活动增加，惊恐易激惹，攻击性强。与模型组比较，各用药组在毛发、饮食、粪

便、睡眠等方面均有不同程度的改善，其中以和胃安神方低剂量组改善最为明显。表 1 示，模型组大鼠在各时间点体质量均较正常组大鼠降低（ $P<0. 01$ ）；与艾司唑仑组同时间比较，和胃安神方低剂量组给药第 5、6、7 天体质量升高（ $P<0. 05$ ）；和胃安神方各剂量组大鼠各时间点体质量组间比较，差异均无统计学意义（ $P>0. 05$ ）。

2. 2 各组大鼠戊巴比妥钠协同实验结果比较

表 2 示，与正常组比较，模型组大鼠睡眠时长缩短（ $P<0. 01$ ）。与模型组比较，各给药组大鼠睡眠时长显著增加（ $P<0. 01$ ）。与艾司唑仑组比较，和胃安神方低、中剂量组大鼠睡眠时间减少（ $P<0. 01$ ），而和胃安神方高剂量组差异无统计学意义（ $P>0. 05$ ）。各组大鼠睡眠潜伏期比较差异均无统计学意义（ $P>0. 05$ ）。

表 2 各组大鼠戊巴比妥钠协同实验结果比较
Table 2 Comparison of the results of pentobarbital sodium co-test in rats of each group (min, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	睡眠潜伏期	睡眠时长
正常组	10	4. 32 $\pm$ 0. 82	41. 12 $\pm$ 6. 75
模型组	10	4. 65 $\pm$ 0. 49	28. 54 $\pm$ 5. 44 ^{a)}
艾司唑仑组	10	5. 15 $\pm$ 0. 87	61. 47 $\pm$ 10. 76 ^{b)}
和胃安神方低剂量组	10	5. 91 $\pm$ 3. 59	47. 18 $\pm$ 5. 77 ^{b) c)}
和胃安神方中剂量组	10	4. 60 $\pm$ 0. 59	44. 92 $\pm$ 6. 45 ^{b) c)}
和胃安神方高剂量组	10	5. 55 $\pm$ 1. 27	54. 50 $\pm$ 5. 97 ^{b)}

注：a) 与正常组比较， $P<0. 01$ ；b) 与模型组比较， $P<0. 01$ ；c) 与艾司唑仑组比较， $P<0. 01$ 。

2. 3 各组大鼠下丘脑中 CLOCK、BMAL1 蛋白表达免疫组化结果比较

表 3 示，与正常组比较，模型组大鼠下丘脑中 CLOCK、BMAL1 蛋白阳性表达显著减少（ $P<0. 01$ ）；艾司唑仑组和胃安神方低、中、高剂量组大鼠下丘脑中 CLOCK、BMAL1 蛋白阳性表达均较模型组增多（ $P<0. 01$ ）。而各给药组大鼠下丘脑中 CLOCK、

表 1 各组大鼠不同时间体质量比较
Table 1 Comparison of body mass of rats at different times in each group (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	给药第 1 天	给药第 2 天	给药第 3 天	给药第 4 天	给药第 5 天	给药第 6 天	给药第 7 天
正常组	10	261. 65 $\pm$ 8. 31	267. 46 $\pm$ 10. 47	272. 61 $\pm$ 11. 78	278. 35 $\pm$ 12. 34	281. 41 $\pm$ 12. 65	289. 76 $\pm$ 15. 68	293. 19 $\pm$ 17. 43
模型组	10	225. 68 $\pm$ 8. 79 ^{a)}	232. 67 $\pm$ 11. 02 ^{a)}	241. 01 $\pm$ 12. 53 ^{a)}	247. 26 $\pm$ 14. 55 ^{a)}	252. 39 $\pm$ 15. 39 ^{a)}	259. 94 $\pm$ 15. 00 ^{a)}	265. 07 $\pm$ 14. 22 ^{a)}
艾司唑仑组	10	220. 98 $\pm$ 10. 02	228. 73 $\pm$ 9. 74	235. 55 $\pm$ 10. 27	240. 60 $\pm$ 10. 51	243. 16 $\pm$ 11. 23	252. 06 $\pm$ 9. 99	256. 98 $\pm$ 8. 83
和胃安神方低剂量组	10	236. 90 $\pm$ 8. 23	245. 33 $\pm$ 10. 17	250. 04 $\pm$ 10. 75	252. 36 $\pm$ 11. 82	264. 46 $\pm$ 11. 13 ^{b)}	272. 49 $\pm$ 11. 04 ^{b)}	278. 31 $\pm$ 10. 79 ^{b)}
和胃安神方中剂量组	10	227. 36 $\pm$ 12. 90	238. 31 $\pm$ 13. 17	246. 56 $\pm$ 12. 93	249. 16 $\pm$ 17. 17	254. 78 $\pm$ 18. 05	261. 89 $\pm$ 20. 10	265. 49 $\pm$ 22. 15
和胃安神方高剂量组	10	230. 23 $\pm$ 8. 06	239. 43 $\pm$ 11. 77	245. 88 $\pm$ 14. 48	248. 50 $\pm$ 17. 03	253. 55 $\pm$ 19. 17	257. 08 $\pm$ 19. 31	261. 51 $\pm$ 20. 69

注：a) 与正常组比较， $P<0. 01$ ；b) 与艾司唑仑组比较， $P<0. 05$ 。

表3 各组大鼠下丘脑CLOCK、BMAL1蛋白表达
免疫组化结果比较

Table 3 Comparison of positive protein expression of CLOCK
and BMAL1 in the hypothalamus of rats in each group
(IOD/Area, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CLOCK	BMAL1
正常组	3	0.85±0.08	0.86±0.02
模型组	3	0.23±0.18 ^{a)}	0.36±0.07 ^{a)}
艾司唑仑组	3	0.80±0.12 ^{b)}	0.81±0.20 ^{b)}
和胃安神方低剂量组	3	0.71±0.17 ^{b)}	0.84±0.02 ^{b)}
和胃安神方中剂量组	3	0.78±0.11 ^{b)}	0.79±0.15 ^{b)}
和胃安神方高剂量组	3	0.91±0.01 ^{b)}	0.85±0.10 ^{b)}

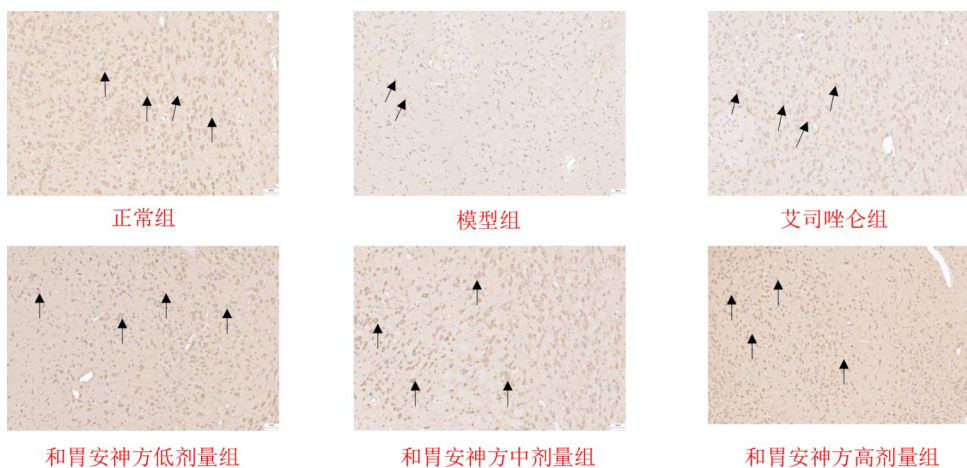
注：CLOCK，时钟节律调节蛋白；BMAL1，脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白1。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

BMAL1蛋白阳性表达组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠下丘脑CLOCK、BMAL1蛋白阳性表达免疫组化结果见图1、图2。

2.4 各组大鼠下丘脑中CLOCK、BMAL1蛋白表达Western Blot法检测结果比较

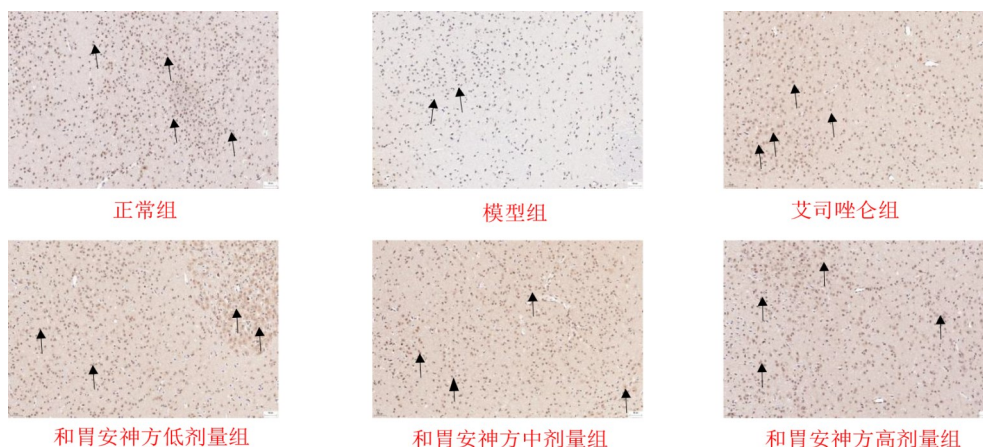
表4示，与正常组比较，模型组大鼠下丘脑中CLOCK、BMAL1蛋白表达均下降 ($P<0.01$)。与模型组比较，和胃安神方低、高剂量组大鼠下丘脑中CLOCK、BMAL1蛋白表达提高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，而各给药组大鼠下丘脑中CLOCK、BMAL1蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠下丘脑CLOCK、BMAL1蛋白电泳图见图3。



注：CLOCK，时钟节律调节蛋白；图中箭头指示CLOCK蛋白阳性表达颗粒。

图1 各组大鼠下丘脑CLOCK蛋白表达结果（免疫组化，×200）

Figure 1 Results of positive expression of CLOCK protein in the hypothalamus of rats in each group
(immunohistochemistry, ×200)



注：BMAL1，脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白1；图中箭头指示BMAL1蛋白阳性表达颗粒。

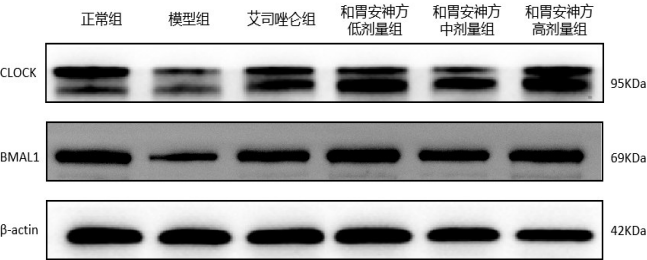
图2 各组大鼠下丘脑BMAL1蛋白性表达结果（免疫组化，×200）

Figure 2 Results of positive expression of BMAL1 protein in the hypothalamus of rats in each group
(immunohistochemistry, ×200)

表4 各组大鼠下丘脑CLOCK、BMAL1蛋白表达
Western Blot法检测结果比较

Table 4 Comparison of the results of Western Blotting for protein expression of CLOCK and BMAL1 in the hypothalamus of rats in each group		(灰度值, $\bar{x}\pm s$)	
组别	鼠数	CLOCK	BMAL1
正常组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	0.82±0.09 ^{a)}	0.59±0.05 ^{a)}
艾司唑仑组	3	1.11±0.25	0.83±0.10
和胃安神方低剂量组	3	1.22±0.22 ^{b)}	1.12±0.10 ^{c)}
和胃安神方中剂量组	3	1.09±0.36	0.74±0.16
和胃安神方高剂量组	3	1.37±0.20 ^{c)}	0.97±0.18 ^{b)}

注：CLOCK，时钟节律调节蛋白；BMAL1，脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白1。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；
c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。



注：CLOCK，时钟节律调节蛋白；BMAL1，脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白1。
图3 各组大鼠下丘脑生物钟相关蛋白电泳图
Figure 3 Electrophoresis of biological clock-related proteins in the hypothalamus of rats in each group

3 讨论

失眠已成为当前社会突出的公共卫生问题，中医药治疗失眠遵循整体观念、辨证论治的原则，通过调节脏腑、气血、阴阳的平衡从而提高睡眠质量^[11]。本团队认为通过“和胃”以达“胃和”，则“卧安”而夜寐成^[4]。和胃安神方中半夏性温味辛，通阳降逆，引胃气入阴经；薏苡仁味甘微寒，健脾益胃，顾护中气，两药合用取半夏秫米汤之意调中焦、和阴阳。白术性温味甘，健脾益气，安神助眠；茯神味甘性平，补益心脾，宁心安神；石菖蒲辛散温通、宁神益智，远志辛温行散、宁心安神，二药合用，开心窍、交心肾，增强安神益智之力；酸枣仁性平味甘酸，养心补肝安神；柏子仁性平味甘，养心安神；甘草调和诸药。全方共奏和胃安神之功。艾司唑仑为苯二氮卓类药物，通过增强γ-氨基丁酸（GABA）的作用，产生镇静和催眠效果，在临床上广泛使用^[12]，故本研究选为阳性对照药物。本研究结果显示，失眠模型大鼠体质量显著下

降，毛发杂乱粗糙，粪便灰白色，粪质溏稀，日间活动增加，惊恐易激惹，表明PCPA造模后大鼠昼夜节律紊乱，其行为学表现符合失眠模型的特征。而经和胃安神方低剂量干预后，大鼠一般状态显著改善，在给药第5、6、7天体质量较艾司唑仑组明显升高，提示和胃安神方在改善失眠模型大鼠状态及提高体质量方面效果明显。戊巴比妥钠协同实验是评价失眠模型以及初步判断药物是否具有催眠作用的经典方法^[13]。本研究结果显示，与正常组比较，模型组大鼠睡眠时长显著降低；与模型组相比，各给药组睡眠时长明显增加，其中以艾司唑仑组、和胃安神方高剂量组最为显著，且两组疗效相当，而和胃安神方低、中剂量组疗效略差，进一步证明了和胃安神方的疗效确切，其高剂量组效果最优，提示和胃安神方在对睡眠时间改善方面可能呈剂量依赖性。

研究证实，昼夜节律的多种生理和生物节律是由生物钟产生的，其中最具象征意义的便是睡眠-觉醒周期^[14]。生物钟由中枢以及外周生物钟共同构成，其自主调节生物体24 h周期节律的震荡^[15]。生物节律由生物钟相关基因及其相关蛋白的表达共同调控，下丘脑视交叉上核（SCN）是睡眠-觉醒节律调节的关键区域，其被视为昼夜节律的“起搏器”，通过调节自身组织节律，感知光照、温度等因素，影响内分泌及神经系统^[16]。在哺乳动物中，中央时钟通过与周期性的明暗循环同步化，协调其他组织节律的外周时钟接收中央及外部线索的信号（如进食、光照等），并更改为输出信号来内源性维持动物的日常节律^[17]。核心振荡器主要位于哺乳动物的SCN中，由一组时钟基因（CLOCK、BMAL1、周期基因Per和隐花色素基因Cry）形成的转录-翻译负反馈环路组成^[18]。在分子水平上，转录因子CLOCK、BMAL1形成异源二聚体，结合到Per和Cry基因的E-box启动子位点，激活Per和Cry基因的转录，转录过程中Per与Cry蛋白形成异源复合体在细胞质中积聚，达到阈值后转位至细胞核中，进而抑制CLOCK/BMAL1蛋白复合体的转录活性；当Per/Cry蛋白复合体逐步降解后，其抑制作用解除，CLOCK/BMAL1复合体恢复转录活性，从而形成转录-翻译负反馈调节环路^[19]。

免疫组化法和Western Blot法结果显示，与正常组相比，模型组生物钟基因CLOCK、BMAL1蛋白表达显著降低；和胃安神方低、高剂量组CLOCK、

BMAL1 蛋白表达显著升高, 与以往失眠与生物钟基因 CLOCK、BMAL1 研究结果^[20-21]一致, 表明和胃安神方可能通过调节 CLOCK、BMAL1 基因维持昼夜节律的规律循环, 从而调节睡眠-觉醒节律, 发挥镇静催眠作用。

综上所述, 和胃安神方能够改善失眠模型大鼠的睡眠状态, 其作用机制可能与上调下丘脑生物钟基因 CLOCK、BMAL1 的表达有关。本实验通过戊巴比妥钠协同实验, 可初步评价失眠模型与药物疗效, 但对大鼠睡眠结构的分析仍需通过脑电图和肌电图进一步阐释和验证, 以进一步为和胃安神方治疗失眠提供依据。

参考文献

- [1] 金欣, 李燕, 鲁瑾, 等. 中西医结合治疗失眠症的应用[J]. 浙江临床医学, 2024, 26(5): 776-778.
- [2] 中国中医科学院失眠症中医临床实践指南课题组. 失眠症中医临床实践指南(WHO/WPO)[J]. 世界睡眠医学杂志, 2016, 3(1): 8-25.
- [3] 胡金, 韦姗姗, 姜海洲, 等. 失眠的药物治疗研究进展[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(19): 5122-5130.
- [4] 李绍旦, 杨明会. “胃不和则卧不安”新悟[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(10): 2055-2056.
- [5] 罗海鸥, 杨明会, 李绍旦, 等. 和胃安神方治疗失眠 117 例临床观察[J]. 激光杂志, 2012, 33(5): 88-90.
- [6] BOLSUS YG, ZURBRIGGEN MD, KIM JK, et al. The role of clock genes in sleep, stress and memory [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 191: 114493. doi: 10.1016/j.bcp. 2021. 114493.
- [7] 郭海波, 王慧. 对氯苯丙氨酸在动物失眠模型中的应用概述[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 135-140.
- [8] 夏天吉, 闫明珠, 王智, 等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 428-435.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [10] KUSHIKATA T, HIROTA K, YOSHIDA H, et al. Orexinergic neurons and barbiturate anesthesia [J]. Neuroscience, 2003, 121(4): 855-863.
- [11] 彭彬, 王国为, 谷劫楠, 等. 基于“阳气升降圆运动”探讨失眠的四时病机及治法[J]. 中医杂志, 2023, 64(21): 2192-2196.
- [12] 刘岳, 刘晓慧, 齐文渊, 等. 艾司唑仑片在中国健康受试者中的药代动力学及生物等效性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(14): 1776-1779, 1784.
- [13] 胡金, 韦姗姗, 邱祥玉, 等. 筛选镇静催眠药物的动物实验评价[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 133-140.
- [14] FRANKEN P, DIJK DJ. Sleep and circadian rhythmicity as entangled processes serving homeostasis [J]. Nat Rev Neurosci, 2023, 25(1): 43-59.
- [15] WU J, ZHAO Z. Acupuncture in circadian rhythm sleep-wake disorders and its potential neurochemical mechanisms [J]. Front Neurosci, 2024, 18: 1346635. doi: 10.3389/fnins. 2024. 1346635.
- [16] ZHANG J, CHANG M, WANG X, et al. Pterostilbene targets the molecular oscillator ROR γ to restore circadian rhythm oscillation and protect against sleep restriction induced metabolic disorders [J]. Phytomedicine, 2024, 125: 155327. doi: 10.1016/j.phymed. 2023. 155327.
- [17] ZHU H, WU M, MOU J, et al. Behavior and physiology in female cricetus barabensis are associated with the expression of circadian genes [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1281617. doi: 10.3389/fendo. 2023. 1281617.
- [18] ASTAFEV AA, MEZHININA V, POE A, et al. Sexual dimorphism of circadian liver transcriptome [J]. iScience, 2024, 27(4): 109483.
- [19] WU Q, REN Q, WANG X, et al. Cellular iron depletion enhances behavioral rhythm by limiting brain Per1 expression in mice [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(2): e14592.
- [20] 魏歆然, 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.
- [21] 沈玺, 袁德培, 袁林, 等. 固本健脑安神方对衰老失眠模型大鼠学习记忆及海马生物钟基因 Clock、Bmal1 表达的影响 [J]. 中医杂志, 2022, 63(18): 1779-1785.

Effects of *Hewei Anshe Formula* (和胃安神方) on the CLOCK and BMAL1 Gene Expression of Hypothalamic Biological Clock in Insomnia Rat Models

WANG Shuo^{1,2}, WANG Changzhen³, LI Zhihui³, HUANG Tianke³, WANG Liang¹, TIAN Chujiao¹, ZOU Tao¹, LIU Zihan¹, CHEN Qi¹, LI Shaodan¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, The Sixth Medical Centre, The People's Liberation Army General Hospital, Beijing, 100048; 2. The People's Liberation Army Medical College; 3. The Academy of Military Medical Sciences of the People's Liberation Army Academy of Military Sciences

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Hewei Anshen Formula* (和胃安神方) in the

treatment of insomnia. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into the normal group, the model group, the eszopiclone group and the low-, medium- and high-dose *Hewei Anshen Formula* groups. The insomnia model was constructed by intraperitoneal injection of p-chlorophenylalanine (PCPA) for 2 days in all groups except the normal group. After successful modelling, the eszopiclone group was given 0.33 mg/(kg·d) eszopiclone aqueous solution by gavage, the low-, medium- and high-dose *Hewei Anshen Formula* groups were given 10 ml/kg of *Hewei Anshen Formula* with a concentration of 1, 2 and 4 g/ml, respectively, and the rats in the normal group and the model group were given 10 ml/kg of saline by gavage, once a day for 7 consecutive days. The general condition of the rats was observed during the experiment, and the body mass of the rats was measured every day after medication administration. The following day after the last medication administration, pentobarbital sodium co-test was used to observe the sleep condition, and the sleep latency and sleep duration were recorded; immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of hypothalamic clock rhythm regulating protein (CLOCK) and brain and muscle aromatic hydrocarbon receptor nuclear transporter-like protein 1 (BMAL1) in the rats. **Results** The body mass of rats in the model group was lower than that of rats in the normal group at all time points ($P < 0.01$); compared with the same time in the eszopiclone group, the body mass of rats in the low-dose *Hewei Anshen Formula* group was elevated on the 5th, 6th and 7th days of medication administration ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the sleep duration of rats in the model group was shortened ($P < 0.01$); compared with the model group, the sleep duration of rats in each dosage group increased ($P < 0.01$), and the difference between the high-dose *Hewei Anshen Formula* group and the eszopiclone group showed no statistically significant ($P > 0.05$), while the sleep duration of the low- and medium-dose *Hewei Anshen Formula* groups were shortened than the eszopiclone group ($P < 0.01$). The difference in sleep latency showed no statistically significant among each group ($P > 0.05$). The results of both immunohistochemistry and Western blotting showed that the expression of CLOCK and BMAL1 in the hypothalamus of rats in the model group was significantly reduced compared with that in the normal group ($P < 0.01$); the expression of CLOCK and BMAL1 in the hypothalamus of rats in the low- and high-dose *Hewei Anshen Formula* groups increased than that in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Hewei Anshen Formula* can improve insomnia in model rats, and its mechanism of action may be related to the up-regulation of the expression of the hypothalamic biological clock genes CLOCK and BMAL1 protein.

Keywords insomnia; *Hewei Anshen Formula* (和胃安神方); hypothalamus; biological clock; clock rhythm regulatory protein; brain and muscle aromatic hydrocarbon receptor nuclear transporter-like protein 1

(收稿日期: 2024-07-29; 修回日期: 2024-08-21)

[编辑: 邓媛]

广告

欢迎邮购《中医杂志》过刊

2000、2001 年合订本每本 100 元, 2002、2003 年合订本每本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本, 每本 140 元。2011(缺 5、6 期)—2013 年每册 9.80 元, 2014(缺 21 期)—2017 年(缺 3、5、15、18 期)每册 15 元, 2018 年(缺 5、7、9 期)每册 20 元, 2020 年(缺 7、8、9 期)每册 20 元, 2021 年每册 20 元。2022、2023 年每册 30 元。2011—2013 年合订本, 每年 4 本, 全年 280 元; 2014 年合订本, 共 4 本, 全年 400 元; 2018—2021 年合订本, 每年 4 本, 全年 600 元; 2022、2023 年合订本, 共 4 本, 全年 800 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。

以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信 (zyzzgz) 购买。邮编: 100700, 电话: (010)64089195。