基于 5- 羟色胺及其受体探讨益神宁心方对光照诱导斑马鱼睡眠剥夺模型昼夜节律的影响

史佳宁[1]，张振贤[1*]，叶映晖[2]，伞雨晴[1]，刘兰英[3]，诸燕英[1]
（1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院中医内科，上海 200437；2. 复旦大学附属中山医院国际医疗部，上海 200032；3. 上海市中医神志病研究所，上海 200030）

摘要：目的 探讨益神宁心方（Yishen Ningxin decoction，YSNX）对睡眠剥夺模型斑马鱼昼夜节律行为学的影响及其作用机制。**方法** 采用光照法建立斑马鱼睡眠剥夺模型。通过斑马鱼行为学分析仪采集并分析斑马鱼 36 h 昼夜移动距离、移动时间和睡眠时间。酶联免疫吸附试验法检测斑马鱼观察期内 5 个时间点 5- 羟色胺（hydroxytryptamine，HT）、5-HT 受体（HT receptor，HTR）1A 的表达水平；定量聚合酶链反应法检测 *htr1aa* 信使 RNA（messenger RNA，mRNA）和 *htr1ab* mRNA 的昼夜相对表达量。**结果** 与模型组相比，YSNX 高剂量组斑马鱼昼夜移动距离及移动时间均减少（$P < 0.05$），昼夜睡眠时间增加（$P < 0.05$）。YSNX 高剂量组斑马鱼平均移动距离的昼夜节律可恢复至与空白组相近水平。与模型组同期相比，YSNX 组斑马鱼白昼期 5-HT 水平均升高、黑夜期降低；白昼期 HTR1A 水平均降低、黑夜期升高；白昼期 *htr1aa* mRNA 平均相对表达量降低；黑夜期 *htr1ab* mRNA 平均相对表达量升高（$P < 0.05$）。与模型组同期相比，YSNX 组白昼各时间点 5-HT 水平均升高，黑夜各时间点均降低；白昼各时间点 HTR1A 水平均降低，黑夜各时间点均升高；D1 授时因子时间（zeitgeber time，ZT）14 和 ZT20 的 *htr1aa* mRNA 相对表达量降低，D2 ZT2 时升高；D2 ZT2 时 *htr1ab* mRNA 相对表达量升高（$P < 0.05$）。**结论** YSNX 可能通过调节 5-HT、HTR1A、*htr1aa* mRNA 以及 *htr1ab* mRNA 表达的昼夜节律，改善睡眠剥夺模型斑马鱼的睡眠 - 觉醒昼夜节律。

关键词： 睡眠剥夺；昼夜节律；5- 羟色胺；5- 羟色胺受体 1A；益神宁心方；斑马鱼
中图分类号： R-33 **文献标志码：** A **文章编号：** 1672-9188（2026）02-0132-011
引用： 史佳宁, 张振贤, 叶映晖, 等. 基于 5-羟色胺及其受体探讨益神宁心方对光照诱导斑马鱼睡眠剥夺模型昼夜节律的影响[J]. 世界临床药物, 2026, 47（2）: 132-142. DOI：10.13683/j.wph. 2026.02.004

Discussion on the effects of Yishen Ningxin decoction on the circadian rhythm of light-induced sleep deprivation model in zebrafish based on 5-hydroxytryptamine and its receptors

SHI Jianing[1], ZHANG Zhenxian[1*], YE Yinghui[2], SAN Yuqing[1], LIU Lanying[3], ZHU Yanying[1]
（*1. Department of Traditional Chinese Medicine, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. International Medical Center, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Shanghai Institute of Traditional Chinese Medicine for Mental Health, Shanghai 200030, China*）

Abstract: ***Objective*** To explore the effect of Yishen Ningxin decoction（YSNX） on circadian rhythm behavior in zebrafish sleep deprivation model and its potential mechanism. ***Methods*** The zebrafish sleep deprivation model was established by light exposure method. The zebrafish behavioral analysis system was used to collect and analyze the 36 h circadian moving distance, moving time and sleeping time of zebrafish. Enzyme linked immunosorbent assay was used

收稿日期： 2025-07-21
作者简介： 史佳宁，主治医师，研究方向：中医神志病。
通信作者： 张振贤，主任医师，教授，博士生导师，研究方向：中医神志病及心血管病。
基金项目： 国家自然科学基金（82505449）；上海市中医神志病研究所 2024 年度开放科研项目（SZB2024102）；岳阳医院“揭榜挂帅”转化医学研究基金项目（2024YJJB03）

to measure the circadian expression levels of 5-hydroxytryptamine（HT）and 5-HT receptor（HTR）1A at five time points during the observation period. The quantitative polymerase chain reaction was used to detect the relative expression levels of *htr1aa* messenger RNA（mRNA）and *htr1ab* mRNA. ***Results*** Compared with the model group, both day and night moving distance and moving time in YSNX high-dose group decreased, while sleeping time increased. The circadian rhythm of average moving distance of zebrafish in YSNX high-dose group was restored to the level similar to that in the blank group. Compared with the model group in the same period, the level of 5-HT in zebrafish in YSNX group increased during the daytime period and decreased during the night period, the level of HTR1A decreased during the daytime period and increased during the night period, the average relative expression level of *htr1aa* mRNA decreased during the daytime period while that of *htr1ab* mRNA increased during the night period. Compared with the same time point in the model group, the content of 5-HT in YSNX group increased at all time points during the day, but decreased at all time points during the night, the HTR1A content decreased at all time points during the day, but increased at all time points during the night, the relative expression level of *htr1aa* mRNA decreased at zeitgeber time（ZT）14 and ZT20 on the first day and increased at ZT2 on the second day, while that of *htr1ab* mRNA increased at ZT2 on the second day. ***Conclusion*** Yishen Ningxin decoction may improve sleep-wake circadian rhythm in sleep-deprived zebrafish by regulating the circadian rhythm of 5-HT, HTR1A, *htr1aa* mRNA and *htr1ab* mRNA.

Key words: sleep deprivation; circadian rhythm; 5-hydroxytryptamine; 5-hydroxytryptamine receptor 1A; Yishen Ningxin decoction; zebrafish

内源性昼夜节律是调控人类睡眠 - 觉醒的关键因素[1]。前期临床研究[2]证实，益神宁心方（Yishen Ningxin decoction，YSNX）能有效改善心脾两虚型原发性失眠患者的临床症状，提升睡眠质量及睡眠效率，改善日间功能障碍及唾液褪黑素、皮质醇水平的昼夜节律，提出顺应并调节昼夜阴阳消长以达“昼精夜瞑”是治疗失眠的核心策略。心脾两虚型失眠的机制研究涉及 5- 羟色胺（hydroxytryptamine，HT）的调控[3-4]，但鲜有关注昼夜节律。本研究基于“昼精夜瞑”理论探讨 YSNX 通过调节 5-HT、5-HT 受体（HT receptor，HTR）1A 昼夜节律治疗失眠的可能作用机制，为恢复昼夜节律治疗失眠提供科学依据。本研究经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物伦理委员会批准（YYLAC-2023-ZN）。

1 材料与方法

1.1 材料

采用野生型 AB 系斑马鱼，购自杭州环特生物科技股份有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（浙）2022-0003。饲养、繁殖于上海交通大学医学院附属新华医院斑马鱼研究平台并开展研究。参照 WESTERFIELD[5] 的养殖法，采用自动计时器维持 14 h ： 10 h 光暗循环，光照时间为 8:00—22:00。养殖系统保持日夜循环水，水温 28.5 ℃，维持 pH 值在 7.0 ～ 8.0，盐度在 0.25‰ ～ 0.50‰。本研究选用受精后 7 d 斑马鱼共计 1 870 尾。

YSNX 由黄芪、麦冬、牡蛎、地龙、黄连以及肉桂等组成（国家发明专利号：ZL202211433531.0）[6]。中药饮片来自上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科，加水浸泡、煎煮、过滤、醇沉后浓缩至生药含量为 1 g/mL 的水煎液。褪黑素（纯度 98%，25 g/ 瓶，北京索莱宝科技有限公司，M8600）；二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO，500 mL/ 瓶，国药集团化学试剂有限公司，XW00676852）。褪黑素粉末由 DMSO 配置成 10 mmol/L 母液，用时以 Holt Buffer 液配置至合适浓度。

斑马鱼 5-HT 和 HTR1A 酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（F35906、F36100，上海西唐生物科技有限公司）；ReverTra Ace 实时荧光定量聚合酶链反应（real time

quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）试剂盒、SYBR Green 荧光探针（Realtime PCR Master Mix，FSQ-101、QPK-201，日本 TOYOBO）。

集中式斑马鱼养殖系统（JS/BMY-JZ，上海海圣生物实验设备有限公司）；斑马鱼行为分析仪（DanioVision EthoVision XT，荷兰 Noldus）；全波长酶标仪（Mutiskan GO，芬兰 Thermo Fisher）；RT-qPCR 系统（AriaMx Real-Time，美国 Agilent）；电泳仪系统（Powerpac Basic，美国 BIO-RAD）。

1.2 筛选 YSNX 最大耐受浓度（maximum tolerated concentration，MTC）及高、中及低剂量

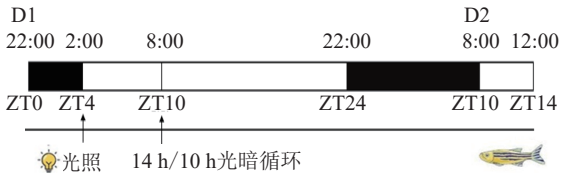
根据动物药物毒理学和经济合作与发展组织化学品测试方法，确定 YSNX 的药物 MTC [7]。随机选取 160 尾斑马鱼，根据预试验结果初设 8 组 YSNX 浓度梯度，分别为 250、500、750、1 000、1 250、1 500、1 750 和 2 000 μg/mL，每组 20 尾，统计在各浓度持续暴露 36 h 后斑马鱼的死亡量及存活率。以 3 为浓度间隔系数 [8]，选定 MTC、1/3MTC 和 1/9MTC 分别设为高、中及低剂量。

1.3 斑马鱼睡眠剥夺模型的建立

采用光照法构建斑马鱼睡眠剥夺模型 [9]。D1 2:00 开始予 176 lux 光照条件（设置强度等级为 4%）刺激 6 h，至晨 8:00 释放入与客观昼夜同步的光暗循环，见图 1。以行为学观察下斑马鱼睡眠时间减少判定为造模成功。

1.4 分组与干预方法

行为学研究将 90 尾显微镜下发育正常的斑马鱼随机分为空白组、模型组、褪黑素（melatonin，MT）组和 YSNX 高剂量组（1 600 μg/mL）、中剂量组（533 μg/mL）及低剂量组（178 μg/mL），每组 15 尾。空白组和模型组予正常养鱼水；MT 组在造模基础上于试验当晚熄灯前 1 h 加入 10 μmol/L MT 溶液，给药浓度参考文献 [10] 及课题组前期浓度梯度试验结果设定；YSNX 高、中及低剂量组在造模基础上分别按设定浓度加入 YSNX 水溶液。空白组设定 14 h ： 10 h 光暗循环；模型组、MT 组、YSNX 高、中及低剂量组光暗条件参照造模方案。



注：授时因子时间（zeitgeber time，ZT）。

图 1 斑马鱼睡眠剥夺模型光照法造模方案

Figure 1 Light-induced sleep deprivation protocol for zebrafish

ELISA 和 qPCR 试验中，分别将 240 尾斑马鱼随机分为空白组、模型组、MT 组和 YSNX 组，每组 60 尾。空白组、模型组、MT 组干预方法同行为学研究。YSNX 组根据行为学研究结果选取优效的高剂量浓度干预。

1.5 斑马鱼行为学检测

将各组斑马鱼移至 96 孔板，每孔 1 尾，每孔总溶液量为 300 μL，置于斑马鱼行为分析仪记录 36 h 睡眠 - 觉醒昼夜行为节律。维持温度在 28 ℃左右，保持室内安静。以计算机控制程序设置明暗循环，最大探测阈值为 40、最小为 4，运动活力爆发值为 25，每间隔 1 min 和 2 h 生成数据。定量并比较各组斑马鱼黑夜（D1 0:00—8:00 以及 D2 22:00—8:00）和白昼（D1 8:00—22:00 以及 D2 8:00—12:00）的平均移动距离、移动时间和睡眠时间。连续静止时间＞ 1 min 判定斑马鱼进入睡眠状态 [11-12]。

1.6 ELISA 法检测斑马鱼 5-HT、HTR1A 昼夜表达水平

设定 D1 22:00 为 ZT0，选 24 h 昼夜周期内 5 个时间点取材，分别为 D1 ZT14（12:00）、ZT20（18:00）、D2 ZT2（0:00）、ZT8（6:00）及 ZT14（12:00），每组每时间点取 12 尾斑马鱼组织。加入 TRIzol 试剂，经超声粉粹形成匀浆，离心 5 min 后，去除上清液保留沉淀组织。根据 ELISA 试剂盒操作说明检测斑

马鱼 5-HT、HTR1A 的昼夜表达水平。重复 3 次试验，取平均值。

1.7 qPCR 法检测斑马鱼 *htr1aa*、*htr1ab* 信使 RNA（messenger RNA，mRNA）昼夜相对表达量

向各组加入 TRIzol 抽提总 RNA，采用 TOYOBO ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒将其逆转录为互补 DNA。以无 RNA 酶水、2×Realtime PCR Master Mix、目的基因及其内参基因引物和互补 DNA 模型配置 PCR 反应体系。热循环参数：预变性 95 ℃ 30 s，循环 1 次；变性 95 ℃ 20 s，退火 61 ℃ 30 s，降温至 4 ～ 10 ℃，循环 40 次。以 *rpl13a* 为内参基因，根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *htr1aa*、*htr1ab* mRNA 相对表达量。重复 3 次试验，取平均值。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	碱基序列（5' to 3'）	产物长度/bp
htr1aa-F	ACGAGTGTCAGCGAAGTT	119
htr1aa-R	CTCTCCAAGGCGATAGCA	
htr1ab-F	TGCTGATTATGAAGTCTCAACC	174
htr1ab-R	TCTCAGGCTTGCGAACAG	
rpl13a-F	TGGAGGACTGTAAGAGGTATG	147
rpl13a-R	CAGACGCACAATCTTGAGAG	

1.8 统计学方法

数据处理采用统计分析软件 SPSS25.0，以 GraphPad Prism9.5.1 绘图。数据以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，符合正态分布和方差齐性采用 *t* 检验；多组间比较采用单因素方差分析，方差齐时，组间比较采用 LSD 检验；方差不齐，采用 Welch's ANOVA 检验，组间比较采用 Tamhane's *t*2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 YSNX 的 MTC

当 YSNX 给药浓度≤ 1 500 μg/mL 时，斑马鱼全部存活；浓度为 1 750 μg/mL 时，1 尾斑马鱼出现死亡。故细化并提升浓度、重复试验以确定 YSNX 的 MTC，见表 2。选定 MTC（1 600 μg/mL）、1/3MTC（533 μg/mL）和 1/9MTC（178 μg/mL）分别设为高剂量组、中剂量组和低剂量组。

表 2 YSNX 不同药物浓度下斑马鱼存活情况

Table 2 Survival status of zebrafish under different drug concentrations of YSNX

YSNX药物浓度/μg·mL^{-1}	斑马鱼总数/尾	死亡数量/尾	存活率/%
1 500	20	0	100
1 550	20	0	100
1 600	20	0	100
1 650	20	1	95
1 700	20	1	95
1 750	20	1	95
2 000	20	2	90
2 400	20	5	75
2 800	20	20	0

2.2 各组斑马鱼昼夜行为学比较

2.2.1 各组斑马鱼移动距离比较

与空白组相比，模型组斑马鱼昼夜移动距离均增多（$P < 0.01$）。与模型组相比，MT 组和 YSNX 高剂量组斑马鱼昼夜移动距离均减少（$P < 0.01$）；中剂量组白昼移动距离减少（$P < 0.05$）。见图 2 ～ 3，表 3。

模型组平均移动距离昼夜节律整体振幅较空白组明显升高，提示模型组斑马鱼始终异常活跃。MT 组各时间段、YSNX 高剂量组除 D2 6:00—8:00 与 10:00—12:00 外各时间段斑马鱼平均移动距离均较模型组降低。YSNX 高剂量组平均移动距离昼夜节律恢复至与空白组相近水平。

2.2.2 各组斑马鱼移动时间比较

与空白组相比，模型组斑马鱼昼夜移动时间均延长（$P < 0.01$）。与模型组相比，MT 组和 YSNX 高剂量组斑马鱼昼夜移动时间均缩短（$P < 0.01$），

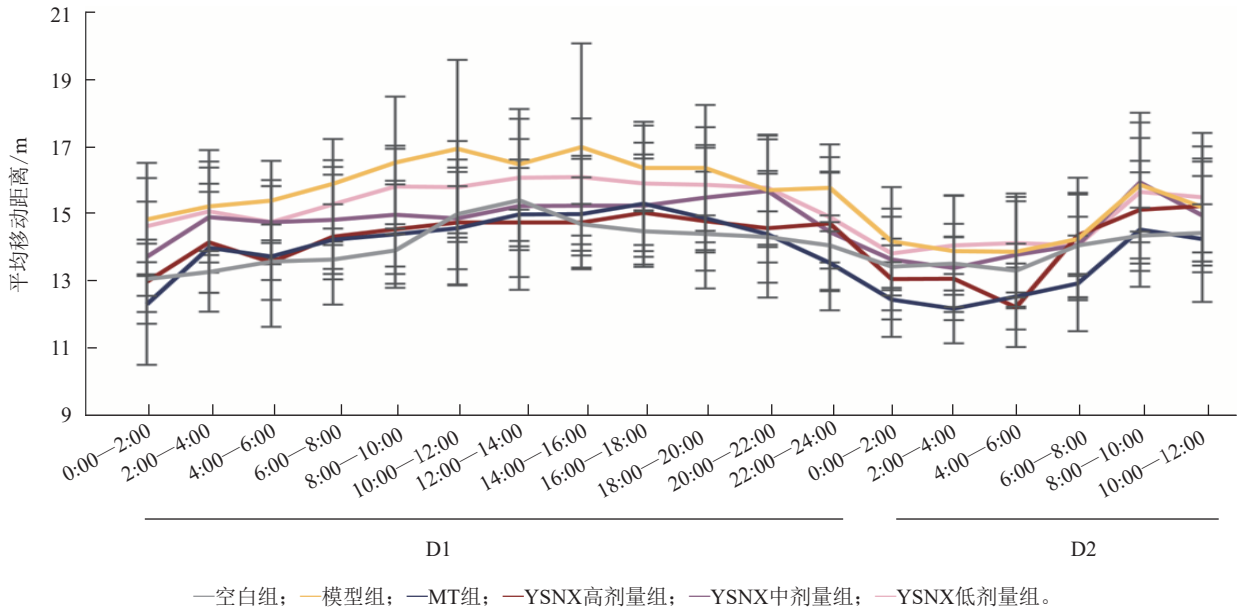


图 2　各组斑马鱼每 2 h 平均移动距离折线图

Figure 2　Line graph of average movement distances of zebrafish every 2 hours in each group

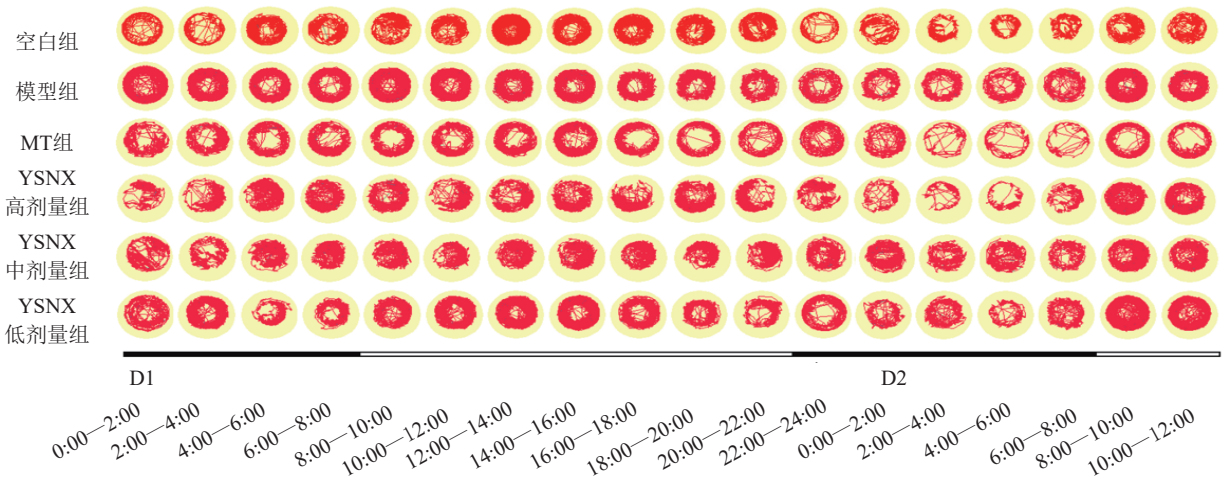


图 3　各组斑马鱼每 2 h 行为学轨迹图

Figure 3　Behavioral trajectory maps of zebrafish every 2 hours in each group

见表 4。

2.2.3　各组斑马鱼睡眠时间比较

与空白组相比，模型组斑马鱼昼夜睡眠时间减少（$P < 0.01$），提示睡眠剥夺造模成功；与模型组相比，MT 组和 YSNX 高剂量组斑马鱼昼、夜睡眠时间增加（$P < 0.01$），见表 5。

2.3　各组斑马鱼 5-HT、HTR1A 昼夜表达水平比较

2.3.1　各组斑马鱼 5-HT 水平比较

与空白组同期（即各组白昼期、黑夜期分别比较）相比，模型组斑马鱼白昼期 5-HT 水平降低、

表 3 各组斑马鱼移动距离比较（$\bar{x}\pm s$，单位：m）

Table 3 Comparison of movement distances of zebrafish in each group ($\bar{x}\pm s$, unit: m)

组别	白昼移动距离	黑夜移动距离
空白组（n=15）	131.25±4.30	122.24±3.29
模型组（n=15）	146.67±11.11**	133.57±9.37**
MT组（n=15）	132.56±13.97$^{\#\#}$	118.18±8.46$^{\#\#}$
YSNX高剂量组（n=15）	133.78±11.96$^{\#\#}$	122.75±8.62$^{\#\#}$
YSNX中剂量组（n=15）	137.86±10.95$^{\#}$	127.88±9.34$^{\blacktriangle\blacktriangle}$
YSNX低剂量组（n=15）	142.75±13.36**$^{\blacktriangle※}$	131.01±9.66**$^{\blacktriangle\blacktriangle※※}$
F值	4.37	7.27

注：与空白组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与MT组比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$；与YSNX高剂量组比较，$^{※}P<0.05$，$^{※※}P<0.01$。

Note: vs. the blank group, **$P<0.01$; vs. the model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$; vs. the MT group, $^{\blacktriangle}P<0.05$, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$; vs. the high-dose YSNX group, $^{※}P<0.05$, $^{※※}P<0.01$.

表 4 各组斑马鱼移动时间比较（$\bar{x}\pm s$，单位：min）

Table 4 Comparison of movement time of zebrafish in each group ($\bar{x}\pm s$, unit: min)

组别	白昼移动时间	黑夜移动时间
空白组（n=15）	833.80±53.60	757.27±36.58
模型组（n=15）	973.73±48.77**	901.13±73.56**
MT组（n=15）	891.76±85.21*$^{\#\#}$	767.32±78.65$^{\#\#}$
YSNX高剂量组（n=15）	880.49±81.08$^{\#\#}$	785.37±81.07$^{\#\#}$
YSNX中剂量组（n=15）	927.89±85.88**	855.94±96.83**$^{\blacktriangle\blacktriangle※}$
YSNX低剂量组（n=15）	964.34±86.30**$^{\blacktriangle※※}$	905.93±67.08**$^{\blacktriangle\blacktriangle※※}$
F值	7.60	12.24

注：与空白组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与MT组比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$；与YSNX高剂量组比较，$^{※}P<0.05$，$^{※※}P<0.01$。

Note: vs. the blank group, *$P<0.05$, **$P<0.01$; vs. the model group, $^{\#\#}P<0.01$; vs. the MT group, $^{\blacktriangle}P<0.05$, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$; vs. the high-dose YSNX group, $^{※}P<0.05$, $^{※※}P<0.01$.

黑夜期升高；与模型组同期相比，MT 组和 YSNX 组白昼期 5-HT 水平升高、黑夜期降低（F = 12 486.09、8 727.58，$P<0.01$）。与同组白昼相比，黑夜期空白组 5-HT 水平降低（t = 7.19，$P<0.05$），黑夜期模型组升高，MT 组和 YSNX 组降低（t = −108.39、106.69、186.72，$P<0.01$），见图 4。

与空白组同时间点相比，模型组 D1 ZT14、ZT20 的 5-HT 水平降低，ZT2、ZT8 时升高；与模型组同时间点相比，MT 组 5-HT 水平在 D1 ZT14、ZT20 升高，ZT2、ZT8 和 D2 ZT14 时降低；YSNX 组白昼各时间点升高，黑夜各时间点降低（F =

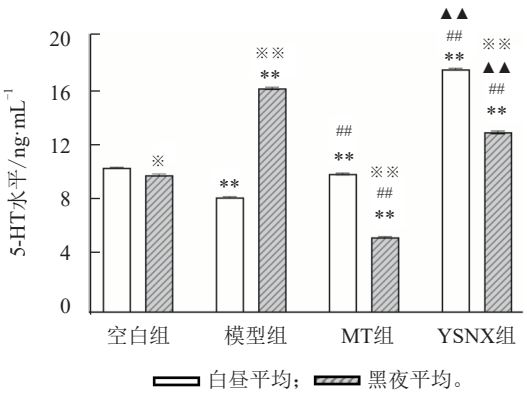
表 5 各组斑马鱼睡眠时间比较（$\bar{x}\pm s$，单位：min）

Table 5 Comparison of sleep time of zebrafish in each group ($\bar{x}\pm s$, unit: min)

组别	白昼睡眠时间	黑夜睡眠时间
空白组（n=15）	188.67±56.94	260.40±64.63
模型组（n=15）	82.60±52.34**	133.27±78.35**
MT组（n=15）	161.93±74.79$^{\#\#}$	240.27±89.13$^{\#\#}$
YSNX高剂量组（n=15）	166.87±79.10$^{\#\#}$	215.27±96.71$^{\#\#}$
YSNX中剂量组（n=15）	128.27±88.51*	165.53±87.56**$^{\blacktriangle}$
YSNX低剂量组（n=15）	94.53±68.58**$^{\blacktriangle※※}$	129.80±76.89**$^{\blacktriangle\blacktriangle※※}$
F值	5.35	6.80

注：与空白组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与 MT 组比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$；与 YSNX 高剂量组比较，$^{※※}P<0.01$。

Note: vs. the blank group, *$P<0.05$, **$P<0.01$; vs. the model group, $^{\#\#}P<0.01$; vs. the MT group, $^{\blacktriangle}P<0.05$, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$; vs. the high-dose YSNX group, $^{※※}P<0.01$.



注：与空白组同期比较，**$P<0.01$；与模型组同期比较，$^{\#\#}P<0.01$；与 MT 组同期比较，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$；与同组白昼期比较，$^{※}P<0.05$，$^{※※}P<0.01$。

Note: vs. the blank group in the same period, **$P<0.01$; vs. the model group in the same period, $^{\#\#}P<0.01$; vs. the MT group in the same period, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$; vs. the same group during the daytime period, $^{※}P<0.05$, $^{※※}P<0.01$.

图 4 各组斑马鱼昼夜 5-HT 水平比较

Figure 4 Comparison of diurnal and nocturnal 5-HT levels in zebrafish among the groups

1 949.22、8 148.71、6 567.56、5 190.44、1 675.58，$P < 0.01$），见图 5。

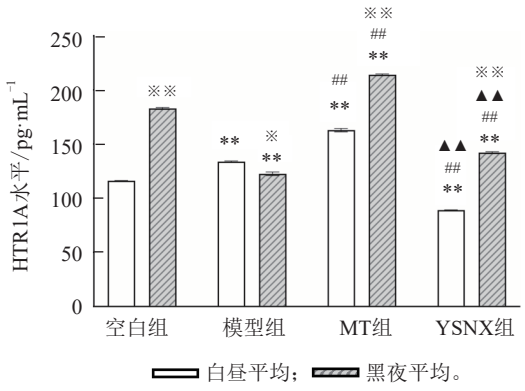
2.3.2 各组斑马鱼 HTR1A 水平比较

与空白组同期相比，模型组斑马鱼白昼 HTR1A 水平升高、黑夜降低；与模型组同期相比，MT 组昼夜 HTR1A 水平均升高，YSNX 组白昼降低、黑夜升高（$F = 3\ 710.99$、$3\ 723.25$，$P < 0.01$）。与同组白昼相比，模型组黑夜 HTR1A 水平降低（$t = -8.42$，$P < 0.05$），空白组、MT 组和 YSNX 组升高（$t = 102.38$、36.66、84.66，$P < 0.01$），见图 6。

与空白组同时间点相比，模型组 D1 ZT14 和 ZT20 的 HTR1A 水平升高，ZT2、ZT8 及 D2 ZT14 时降低；与模型组同时间点相比，MT 组各时间点 HTR1A 水平均升高；YSNX 组白昼各时间点降低，黑夜各时间点升高（$F = 1\ 239.55$、$3\ 457.69$、$4\ 600.92$、$2\ 725.24$、863.82，$P < 0.01$），见图 7。

2.3.3 各组斑马鱼 *htr1aa* mRNA 相对表达量比较

与模型组同期相比，空白组、MT 组和 YSNX 组白昼期斑马鱼 *htr1aa* mRNA 相对表达量均降低（$F = 4.11$，$P < 0.05$），见图 8。



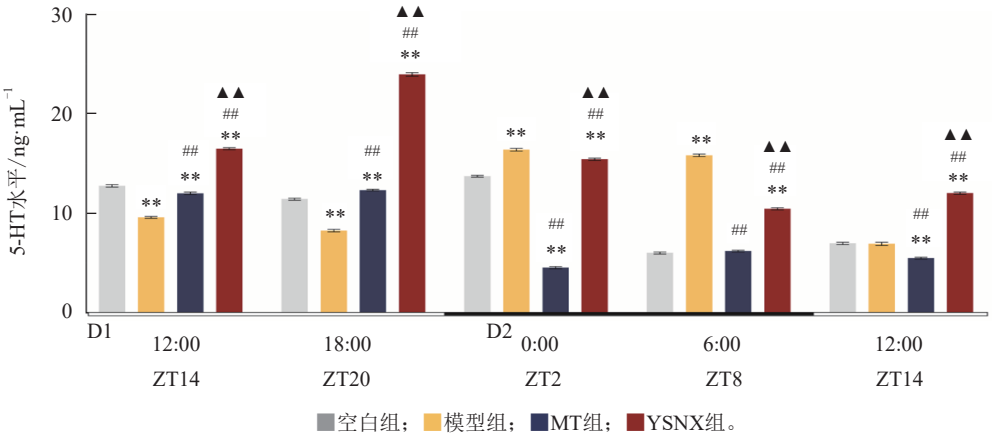
注：与空白组同期比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组同期比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与 MT 组同期比较，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$；与同组白昼期比较，$^{※}P < 0.05$，$^{※※}P < 0.01$。

Note: vs. the blank group in the same period, $^{**}P < 0.01$; vs. the model group in the same period, $^{\#\#}P < 0.01$; vs. the MT group in the same period, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$; vs. the same group during the daytime period, $^{※}P < 0.05$, $^{※※}P < 0.01$.

图 6 各组斑马鱼昼夜 HTR1A 水平比较

Figure 6 Comparison of diurnal and nocturnal HTR1A levels in zebrafish among the groups

与空白组同时间点相比，模型组斑马鱼 D1 ZT14、ZT20 的 *htr1aa* mRNA 相对表达量升高（$P <$

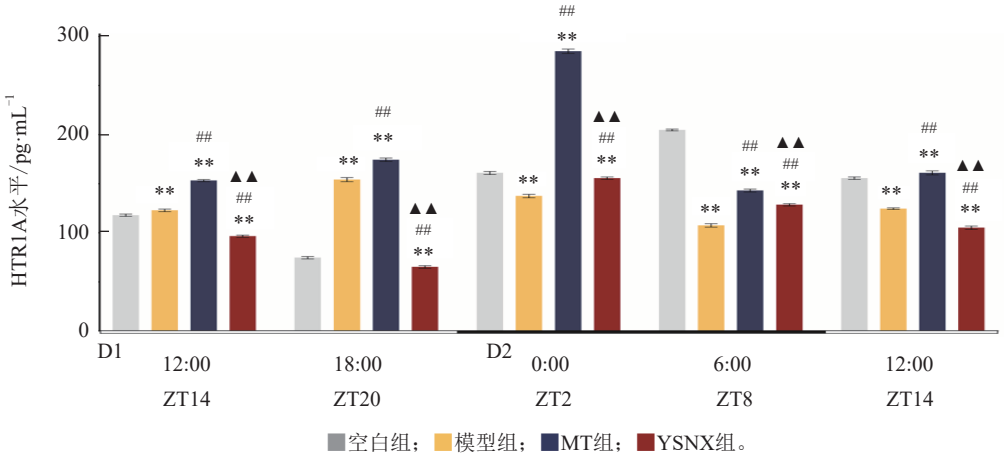


注：与空白组同时间点比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组同时间点比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与 MT 组同时间点比较，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$。

Note: vs. the blank group at the same time point, $^{**}P < 0.01$; vs. the model group at the same time point, $^{\#\#}P < 0.01$; vs. the MT group at the same time point, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$.

图 5 各组斑马鱼各时间点 5-HT 水平比较

Figure 5 Comparison of 5-HT levels at each time point in zebrafish among the groups

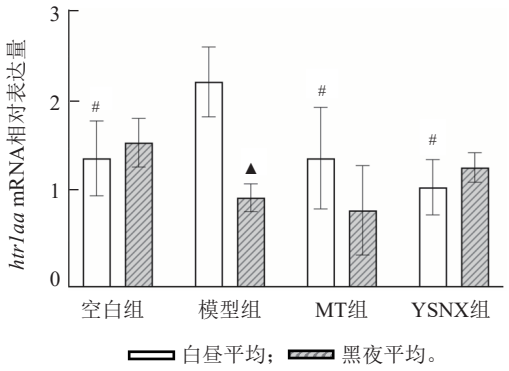


注：与空白组同时间点比较，**$P < 0.01$；与模型组同时间点比较，##$P < 0.01$；与 MT 组同时间点比较，▲▲$P < 0.01$。

Note: vs. the blank group at the same time point,**$P < 0.01$; vs. the model group at the same time point, ##$P < 0.01$; vs. the MT group at the same time point, ▲▲$P < 0.01$.

图 7 各组斑马鱼各时间点 HTR1A 水平比较

Figure 7 Comparison of HTR1A levels at each time point in zebrafish among the groups



注：与模型组同期比较，#$P < 0.05$；与同组白昼期比较，▲$P < 0.05$。

Note: vs. the model group in the same period, #$P < 0.05$; vs. the same group during the daytime period, ▲$P < 0.05$.

图 8 各组斑马鱼 *htr1aa* mRNA 昼夜平均相对表达量比较

Figure 8 Comparison of diurnal and nocturnal relative expression levels of *htr1aa* mRNA in zebrafish among the groups

0.05)。与模型组同时间点 *htr1aa* mRNA 相对表达量相比，YSNX 组 D1 ZT14 时降低（$P < 0.05$），D2 ZT2 时升高（$P < 0.01$），MT 组和 YSNX 组 ZT20 时均降低（$P < 0.01$）。D1 ZT14 时 $F = 4.56$，$P = 0.04$；ZT20 时 $F = 10.10$，$P = 0.00$；D2 ZT2 时 $F = 4.16$，$P = 0.00$。见图 9。

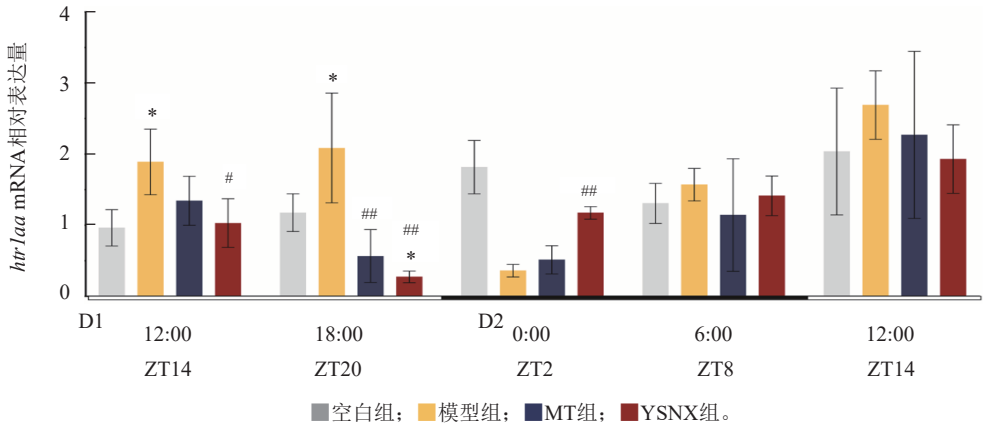
2.3.4 各组斑马鱼 *htr1ab* mRNA 相对表达量比较

与空白组同期相比，模型组斑马鱼白昼期 *htr1ab* mRNA 平均相对表达量升高、黑夜期降低（$P < 0.01$）；与模型组同期相比，YSNX 组黑夜期 *htr1ab* mRNA 平均相对表达量升高（$P < 0.05$）。白昼期 $F = 4.14$，$P = 0.04$；黑夜期 $F = 4.12$，$P = 0.01$。见图 10。

与空白组同时间点相比，模型组斑马鱼 ZT2 的 *htr1ab* mRNA 相对表达量降低（$P < 0.01$）；与模型组同时间点相比，ZT2 时 YSNX 组 *htr1ab* mRNA 相对表达量升高（$P < 0.05$）。ZT2 时 $F = 8.05$，$P = 0.01$。见图 11。

3 讨论

《灵枢 · 营卫生会》云：“老者之气血衰，其肌肉枯，气道涩，五脏之气相搏，其营气少而卫气内伐，故昼不精，夜不瞑”。因而，不寐之治当养气血、通气道、畅营卫、调五脏，令昼精而夜瞑。YSNX 立足气血共荣、阴阳同调，视昼精与夜瞑并重。方中黄芪补气荣血，麦冬养阴清心，地龙、牡蛎定惊

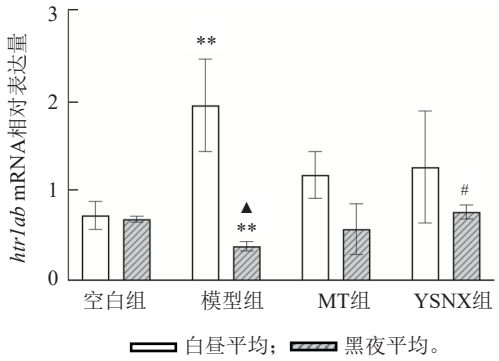


注：与空白组同时间点比较，*$P < 0.05$；与模型组同时间点比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note: vs. the blank group at the same time point, *$P < 0.05$; vs. the model group at the same time point, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

图 9　各组斑马鱼各时间点 *htr1aa* mRNA 相对表达量比较

Figure 9　Comparison of relative expression levels of *htr1aa* mRNA at each time point in zebrafish among the groups



注：与空白组同期比较，**$P < 0.01$；与模型组同期比较，$^{\#}P < 0.05$；与同组白昼期比较，$^{\blacktriangle}P < 0.05$。

Note: vs. the blank group in the same period, **$P < 0.01$; vs. the model group in the same period, $^{\#}P < 0.05$; vs. the same group during the daytime period, $^{\blacktriangle}P < 0.05$.

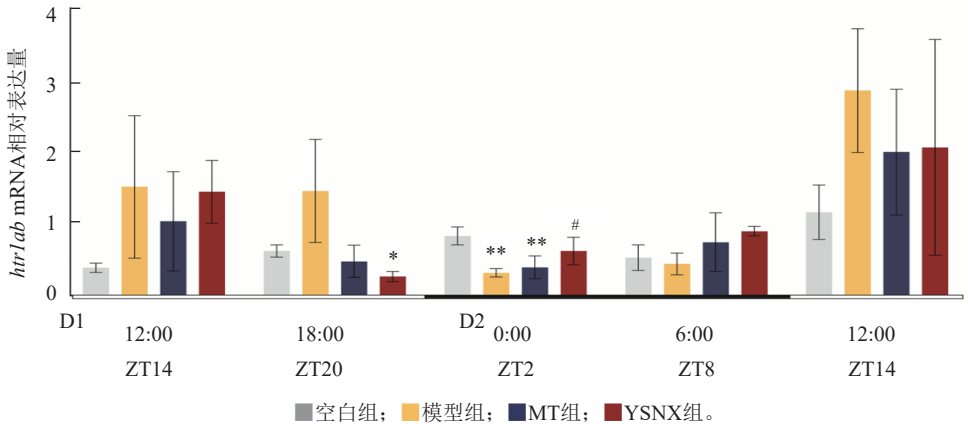
图 10　各组斑马鱼 *htr1ab* mRNA 昼夜平均相对表达量比较

Figure 10　Comparison of diurnal and nocturnal relative expression levels of *htr1ab* mRNA in zebrafish among the groups

通络、潜阳滋阴，佐以黄连、肉桂泻南补北，共奏日间固卫气、充阳位，夜间实营阴、敛浮阳以归宁入寐之效，实现昼精夜瞑。

本研究采用斑马鱼为模式动物。研究[13]表明，发育 D5 的幼鱼已可表现出强健清晰的睡眠 - 觉醒周期。恒定光照下，斑马鱼睡眠受抑制，持续活跃状态可致睡眠 - 觉醒行为节律丧失；当生物夜晚的最后 6 h 暴露在 150 lux 光线下，其睡眠时间缩短 90%，若长时间暴露于恒光，其睡眠在 1 ～ 2 周方可逐渐恢复[14]。本课题组造模时发现，光照法能模拟斑马鱼长效睡眠剥夺模型，其睡眠剥夺表现可持续至 36 h。行为学观察显示，高剂量 YSNX 可显著减少睡眠剥夺模型斑马鱼昼夜移动距离和移动时间、增加睡眠时间；其 36 h 平均移动距离节律趋势与空白组、MT 组相似，能有效恢复模型斑马鱼睡眠 - 觉醒的昼夜行为节律，符合昼精夜瞑状态。根据斑马鱼转换人用剂量的换算方法[15]，YSNX 高剂量组浓度 1 600 μg/mL 等效于理论人用剂量一日 9.6 g，约为临床实际人用剂量的 0.21 倍，符合 0.1 ～ 4 倍的优选倍数关系，具备临床可及性。

5-HT 是合成 MT 的前体，呈昼夜节律性分泌，在清醒活动期信号更强[16]，可促进觉醒、抑制快速眼动睡眠（rapid eye movement sleep，REMS）[17]。而中缝核产 5-HT 基因消融后的斑马鱼睡眠总量、深度和睡眠剥夺后的内稳态反应均下降[18]。5-HT



注：与空白组同时间点比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$；与模型组同时间点比较，$^{\#}P < 0.05$。

Note: vs. the blank group at the same time point, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$; vs. the model group at the same time point, $^{\#}P < 0.05$.

图 11 各组斑马鱼各时间点 *htr1ab* mRNA 相对表达量比较

Figure 11 Comparison of relative expression levels of *htr1ab* mRNA at each time point in zebrafish among the groups

影响睡眠 - 觉醒取决于 HTR 亚型系统是否被激活、5-HT 能系统被激活的程度以及激活发生的明暗循环时期[17,19-20]。上述研究提示，基于昼精夜瞑理论的 YSNX 通过调整昼夜节律治疗失眠的研究关键当聚焦 5-HT 及相关受体表达的昼夜节律，而非某一时点的分泌水平。

HTR1A 的功能与调节睡眠 - 觉醒节律密切相关。HTR1A 缺失小鼠在光暗阶段均表现出更多的 REMS，可能是由于被盖背外侧核 / 脑桥被盖核的 REMS 启动细胞神经元突触后抑制作用的缺乏，突触后全身给药 HTR1A 激动剂可增加觉醒，并减少慢波睡眠和 REMS[17,21]。本研究所用阳性对照药 MT 是一种由脑松果体分泌的激素。动物试验[22]表明，当被持续光照干扰时，夜间定时摄入 MT 可调节昼夜节律，改善斑马鱼的睡眠。

本研究表明，睡眠剥夺模型斑马鱼出现 5-HT、HTR1A 水平和 *htr1aa* mRNA 相对表达量昼夜倒置，HTR1A 表达峰值前移，YSNX 能恢复昼夜节律，使其表达趋势与空白组一致。同时，YSNX 可整体提升 5-HT 水平，*htr1aa*、*htr1ab* mRNA 各时间点相对表达量趋势与 MT 组基本一致。

4 结论

综上，YSNX 可恢复光照诱导睡眠剥夺模型斑马鱼睡眠 - 觉醒的昼夜节律，回归昼精夜瞑，其作用机制可能与调节 5-HT 和 HTR1A 水平的昼夜节律有关。未来，课题组将从时钟基因节律调控靶点深入探索。

致谢：感谢上海交通大学医学院附属新华医院斑马鱼研究中心对本研究的技术指导与帮助！

参考文献：

[1] BORBELY AA. A two process model of sleep regulation[J]. Hum Neurobiol, 1982, 1(3): 195-204.

[2] 史佳宁, 柴瑞佳, 黄瑶, 等. 益神宁心方对原发性失眠心脾两虚型患者唾液褪黑素、皮质醇水平的影响[J]. 中医杂志, 2021, 62(24): 2157-2163.

[3] 张珣, 刘颖慧, 李玲, 等. 健脾养心安神方联合认知行为疗法治疗老年失眠症的临床疗效及对血清5-羟色胺、食欲素A水平的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2023, 40(8): 1902-1910.

[4] 杨铭, 于德伟, 赫慧, 等. 人参白术枣仁颗粒对心脾两虚证失眠小鼠睡眠的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(10): 6128-6131.

[5] WESTERFIELD M. The zebrafish book: a guide for the

laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. 4th ed. Eugene: University of Oregon Press, 2000.

[6] 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院. 一种治疗失眠的中药组合物: ZL202211433531.0[P]. 2023-09-26.

[7] RAMDAS NAIR A, DELANEY P, KOOMSON AA, *et al*. Systematic evaluation of the effects of toxicant exposure on survival in zebrafish embryos and larvae[J]. Curr Protoc, 2021, 1(9): e231.

[8] 中华中医药学会. 团体标准中药生物效应评价技术规程斑马鱼模型(征求意见稿)[EB/OL]. (2023-05-31)[2024-05-25].https://www.zhunter.com/static/upload/file/20230531/1685515776188938.pdf.

[9] 伞雨晴, 史佳宁, 张振贤. 光照、咖啡因及联合法诱导建立斑马鱼失眠模型的比较研究[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 59-67.

[10] 梁吸敏. 基于模式生物平台研究桂甘龙牡汤类方对斑马鱼失眠模型睡眠节律的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.

[11] PROBER DA, RIHEL J, ONAH AA, *et al*. Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish[J]. J Neurosci, 2006, 26(51): 13400-13410.

[12] ELBAZ I, YELIN-BEKERMAN L, NICENBOIM J, *et al*. Genetic ablation of hypocretin neurons alters behavioral state transitions in zebrafish[J]. J Neurosci, 2012, 32(37): 12961-12972.

[13] OIKONOMOU G, PROBER DA. Attacking sleep from a new angle: contribution from zebrafish[J]. Curr Opin Neurobiol, 2017, 44: 80-88.

[14] YOKOGAWA T, MARIN W, FARACO J, *et al*. Characterization of sleep in zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants[J]. PLoS Biol, 2007, 5(10): e277.

[15] 杭州环特生物科技股份有限公司. 用于功效评价的斑马鱼转换人用剂量的换算方法: ZL202010256107.8[P]. 2024-07-30.

[16] DAUT RA, FONKEN LK. Circadian regulation of depression: a role for serotonin[J]. Front Neuroendocrinol, 2019, 54: 100746.

[17] MONTI JM. Serotonin control of sleep-wake behavior[J]. Sleep Med Rev, 2011, 15(4):269-281.

[18] OIKONOMOU G, ALTERMATT M, ZHANG RW, *et al*. The serotonergic raphe promote sleep in zebrafish and mice[J]. Neuron, 2019, 103(4): 686-701.

[19] IMERI L, MANCIA M, BIANCHI S, *et al*. 5-Hydroxytryptophan , but not L-tryptophan, alters sleep and brain temperature in rats[J]. Neuroscience, 2000, 95(2): 445-452.

[20] MORROW JD, VIKRAMAN S, IMERI L, *et al*. Effects of serotonergic activation by 5-hydroxytryptophan on sleep and body temperature of C57BL/6J and interleukin-6-deficient mice are dose and time related[J]. Sleep, 2008, 31(1): 21-33.

[21] BOUTREL B, MONACA C, HEN R, *et al*. Involvement of 5-HT1A receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT1A knock-out mice[J]. J Neurosci, 2002, 22(11): 4686-4692.

[22] ZHDANOVA IV. Sleep and its regulation in zebrafish[J]. Rev Neurosci, 2011, 22(1): 27-36.

(编辑：沈佳婕)