天王补心丹通过调节生物钟反馈环路治疗失眠的作用机制

马小涵[1]，高毅东[2]，杨嘉誉[1]，林如辉[1,3*]，尹鹭峰[2*]

（1. 福建中医药大学中西医结合研究院，福建 福州 350122；2. 福建中医药大学附属第三人民医院，福建 福州 350122；3. 福建中医药大学科技创新与转化中心，福建 福州 350122）

摘要 目的：探讨天王补心丹通过调节生物钟反馈环路治疗失眠的作用机制。方法：40 只 SD 大鼠分为正常组、模型组、天王补心丹低、高剂量组，每组 10 只。除正常组外，其他各组腹腔注射 4 - 氯 - DL - 苯丙氨酸（PCPA）2 d 构建失眠大鼠模型。造模后天王补心丹组分别予以低剂量（2.2 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$）、高剂量（8.7 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$）灌胃，正常组和模型组给予等量生理盐水灌胃，共 7 d。采用翻正实验检测模型制备是否成功。干预第 3 天采用 Morris 水迷宫测试。干预第 7 天进行旷场实验。Western Blot 法检测下丘脑组织中时钟基因蛋白 Clock、Bmal1、Per1、Cry2 表达水平。q - PCR 检测下丘脑组织中 Clock、Bmal1、Per1、Cry2 mRNA 相对表达水平。结果：（1）翻正实验中，与正常组比较，模型组睡眠潜伏期延长，且睡眠时长缩短（$P<0.05$）。（2）Morris 水迷宫实验中，与正常组比较，模型组大鼠逃避潜伏期延长（$P<0.05$），穿越逃生平台次数减少（$P<0.05$）；与模型组比较，天王补心丹各剂量组逃避潜伏期均下降，穿越逃生平台次数增多（$P<0.05$）。（3）旷场实验中，与正常组比较，模型组大鼠中央网格活动路程与总活动路程减少（$P<0.05$）；与模型组比较，天王补心丹各剂量组大鼠的中央网格活动路程与总活动路程明显增加（$P<0.05$）。（4）与正常组比较，模型组大鼠 Clock、Bmal1 蛋白表达量下降（$P<0.05$），Per1、Cry2 蛋白表达升高（$P<0.05$）；与模型组比较，天王补心丹高剂量组 Clock、Bmal1 蛋白表达上调（$P<0.05$），天王补心丹低剂量组 Bmal1 蛋白表达上调（$P<0.05$），Clock 表达呈上升趋势，各剂量组 Per1、Cry2 蛋白表达下降（$P<0.05$）；（5）与正常组比较，模型组大鼠 Clock、Bmal1 mRNA 表达量下降（$P<0.05$），Per1、Cry2 mRNA 表达量升高（$P<0.05$）；与模型组比较，天王补心丹各剂量组大鼠下丘脑组织中 Clock、Bmal1 mRNA 表达量上调（$P<0.05$），Per1、Cry2 mRNA 表达量有所下降（$P<0.05$）。结论：天王补心丹改善失眠大鼠的睡眠状态，其作用机制可能与调节时钟基因反馈环路有关。

关键词 天王补心丹；睡眠 - 觉醒节律；失眠；学习认知功能

中图分类号：R285.5 **文献标识码**：A **文章编号**：1002 - 2392（2025）02 - 0030 - 07

DOI：10.19664/j.cnki.1002 - 2392.250027

失眠作为一种常见的睡眠障碍疾病，通常指难以进入睡眠或保持良好的睡眠状态，全球约超过 30% ~ 35% 的人出现失眠，我国患病率亦高达 15%，并呈逐年上升势态[1-2]。长期缺乏睡眠是导致消化系统、呼吸系统及代谢综合征等多种疾病发生的重要诱因，也可导致轻度认知功能障碍、老年痴呆等精神疾病的发生[3]。失眠在中医范畴属于“不寐”，认为其发生与“阳不能归阴，阴阳失调”有关，阴阳失衡从而导致昼夜节律的紊乱，引起失眠[4]。临床发现失眠病人的主要表现为睡眠 - 觉醒时相的前移、滞后以及不规律的睡眠时相，认为睡眠节律不仅受到自然界的影响，同时又有内在节律基因调控，而睡眠（寐）与觉醒（寤）的周期与人体内阴阳消长的节律密切相关，故治疗失眠不能只是单纯地消除病因，应调和阴阳，从而形成良好的睡眠 - 觉醒节律。

天王补心丹作为养心安神的代表方，由丹参、炒酸枣仁、柏子仁、五味子、制远志、麦冬、石菖蒲等 16 味中

收稿日期：2024 - 04 - 10 **修回日期**：2024 - 09 - 12

基金项目：福建省卫健委科技计划项目（2021zyc37）；福建省自然科学基金计划项目（2022J01887）

作者简介：马小涵（1996 - ），女，硕士研究生，从事脑卒中相关疾病防治研究。

*** 通信作者**：林如辉（1980 - ），男，博士，副研究员，硕士生导师，主要从事脑卒中疾病防治研究。

尹鹭峰（1967 - ），男，主任医师，主要从事神经系统疾病的临床研究。

药组成,其以滋阴养血,补心安神为功效,标本兼顾,阴阳调和,故能有效治疗失眠,同时可以调节植物神经功能紊乱,改善人体微循环,提高记忆力[5]。周映君等[6]采用匹兹堡睡眠质量指数量表(PSQI)结合患者症状,检测天王补心丹治疗失眠的临床疗效,治疗后显效 40 例,有效 4 例,无效 2 例。谭喜云等[7]选取 46 例心肾阴虚型失眠患者分别行天王补心丹加按摩或艾司唑仑治疗,结果发现艾司唑仑组总有效率(74%)低于天王补心丹加按摩组总有效率(91%)。以上皆证明天王补心丹可明显改善睡眠质量,提高睡眠效率,减轻睡眠严重指数。因此课题组利用失眠大鼠模型,通过检测天王补心丹干预对大鼠行为学、生物钟相关基因及蛋白表达情况的影响,探讨失眠与睡眠 - 觉醒节律之间的联系,并以天王补心丹为治疗手段,研究其改善失眠大鼠睡眠 - 觉醒节律紊乱的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只,体质量(240 ± 20)g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2019 - 0005。动物饲养于福建中医药大学动物实验中心,许可证号:SYXK(闽)2019 - 0007,每笼 5 只,室内保持恒温(22 ℃)恒湿,实验过程中不干预动物饮食习惯,于动物中心适应性喂养 1 周,随后用随机数字法将大鼠编号。本动物实验经福建中医药大学伦理委员会批准,伦理批件文号:3W20022005。

1.2 药物

天王补心丸(浓缩丸)(批号:Z62020800)由福建省第三人民医院药剂科提供,由丹参、炒酸枣仁、柏子仁、五味子、制远志、麦冬、石菖蒲等 16 味中药组成,符合现行《中华人民共和国药典》标准;对氯苯丙氨酸(PCPA,品牌:源叶,批号:S27337);戊巴比妥钠(品牌:上海新亚,批号:H31021725)。

1.3 主要试剂

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(ThermoFisher,23225);Clock 抗体(immunoway,YT0978);Bmal1 抗体(immunoway,YT5423);Per1 抗体(武汉三鹰,13463 - 1 - AP);Cry2 抗体(武汉三鹰,13997 - 1 - AP);GAPDH 抗体(武汉三鹰,60004 - 1 - Ig);山羊抗鼠二抗(Cohesion Biosciences,CSA2108);山羊抗兔二抗(Cohesion Biosciences,CSA2115);异氟烷(深圳瑞沃德,R510 - 22);RNA 快速提取试剂盒(思科捷,AC0202);2 × SYBR GREEN qPCR MIX (思科捷,AH0104);SPARK script Ⅱ All - in - one RT SuperMix for qPCR(思科捷,AG0305)。

1.4 主要仪器

Morris 水迷宫(上海欣软,XR - XM101);旷场实验测试系统(上海欣软,XR - XX117);多功能酶标仪(奥地利帝肯,TECAN SPARK);小动物呼吸麻醉机(深圳瑞沃德,R540IE);BIO - RAD 电泳仪(伯乐,Mini - PROTEAN Tetra);高速冷冻离心机(eppendorf,5810R);Milli - Q 超纯水机(默克,IQ7000);凝胶成像系统(伯乐,BIO - RAD ChemiDoc)。

1.5 分组及给药

40 只大鼠随机分为正常组、模型组、天王补心丹低剂量组和高剂量组,每组 10 只。除正常组外,其他各组腹腔注射 PCPA 450 mg/kg 2 d,构建失眠大鼠模型[8]。按照动物与人的药物剂量转换公式[9],天王补心丹组按低剂量组(2.2 g/kg)、高剂量组(8.7 g/kg)灌胃,正常组和模型组给予等量生理盐水,各组连续干预 7 d。

1.6 翻正实验检测模型制备

末次注射 PCPA 的 48 h 内采取翻正实验进行模型验证[10]。用生理盐水配置浓度为 1% 的戊巴比妥钠溶液,腹腔注射剂量为 35 mg/kg,记录大鼠的睡眠潜伏期和睡眠时长。注射后至翻正反射消失 1 min 以上记录为睡眠潜伏期。进入睡眠后至其翻正反射恢复记录为睡眠时长。相较于正常组,模型组大鼠的睡眠潜伏期延长,睡眠时长缩短,由此证明失眠大鼠造模成功,造模失败予以剔除。

1.7 一般状态观察

每日注射 PCPA 后,观察大鼠毛发、精神状态和体质量等一般情况变化。

1.8 行为学测定

1.8.1 水迷宫实验

干预第 3 天,采用 Morris 水迷宫实验,即测试其定位航行与空间探索能力。每日实验时段为上午9:00—12:00。Morris 水迷宫为圆桶形黑色水池(直径 160 cm,深 50 cm),水温保持在 23 ℃左右,空间环境内需处于避光状态,将水池分为面积相等的 4 个象限,逃生平台安装在第三象限。平台直径为 12 cm,高 28 cm,置于水面下 1.5 cm。

1.8.1.1 定位航行实验

分别将大鼠顺时针方向放入水池的 4 个象限,观察其在 90 s 内寻找到逃生平台所需时间,记录为逃避潜伏期;在 90 s 内未找到逃生平台,记录其逃避潜伏期为 90 s,将大鼠放至逃生平台停留学习 15 s,实验于干预的第 3 ~ 6 天进行,共历时 4 d。

1.8.1.2 空间探索实验

干预第 7 天,撤下逃生平台,分别将大鼠放入第二象限,记录其在 90 s 内穿越原逃生平台区域的次数。采用动物行为跟踪分析系统对数据进行分析和处理。

1.8.2 旷场实验

干预第 7 天进行旷场实验。旷场实验箱体积为 100 cm × 100 cm × 45 cm,将大鼠放置于旷场正中格,由系统自动记录大鼠 5 min 内的总路程(垂直得分与水平得分之和)以及中央网格路程(垂直得分与水平得分之和)。在每次记录结束后,清除动物粪便并消毒,以免干扰下一只动物测试。实验期间需保持周围环境安静,房间内各参照物不变,实验人员不变。

1.9 Western Blot 法检测下丘脑组织中昼夜节律基因 Clock、Bmal1、Per1、Cry2 蛋白表达水平

取大鼠下丘脑组织,称重后加入裂解液,匀浆、离心,BCA 测定蛋白浓度后进行凝胶电泳,室温下封闭 1 h,放入相应一抗[Clock(1∶2 000)、Bmal1(1∶2 000)、Per1(1∶1 000)、Cry2(1∶1 000)、GAPDH(1∶50 000)],4 ℃摇床孵育过夜;洗膜后加入相应二抗(1∶10 000)室温下摇床孵育 1 h;使用凝胶成像系统成像,将 GAPDH作为内参,计算目的蛋白的相对表达水平。

1.10 q-PCR 检测下丘脑组织中 Clock、Bmal1、Per1、Cry2 mRNA 相对表达水平

按试剂盒说明提取 RNA,合成 cDNA,逆转录的反应体系为 20 μL。引物序列以 GAPDH 为内参基因,引物由亚尚生物有限公司合成,引物序列如下:Clock 正向:5′-GACACAGTCAGCCAACGTCT-3′;Clock 反向:5′-TGCGGCATACTGGATGGAAT-3′;Bmal1 正向:5′-CACAGGATAAGAGGGTCATCAC-3′;Bmal1 反向:5′-CGGAAGGAATGTCTGGAGTC-3′;Per1 正向:5′-TCCAGTGACCTGCTAGAGTTAC-3′;Per1 反向:5′-TTGCTTGTATGGCTGCTCTG-3′;Cry2 正向:5′-CTACATCCGGCGATACCTGC-3′;Cry2 反向:5′-ATGATGCACTTAGCGGCCTT-3′;GAPDH 正向:5′-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3′;GAPDH 反向:5′-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3′。设定反应条件为 95 ℃ 10 min,变性反应为 95 ℃ 10 sec,退火延伸 60 ℃ 30 sec,循环 40 次。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算分析指标特异性变化,检测 Clock、Bmal1、Per1、Cry2 基因的相对表达情况。

1.11 统计学处理方法

采用 SPSS27.0 软件分析,以($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据正态性和方差齐性检验,组间方差齐采用 LSD 法比较,方差不齐采用盖姆斯-豪厄尔检验,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态观察

正常组大鼠毛发有光泽,精神状态好,性格温顺,体质量增加。与正常组比较,模型组大鼠毛发枯槁,精神亢奋,易激怒,体质量下降。

2.2 PCPA 对大鼠睡眠节律的影响

通过翻正实验观察 PCPA 对大鼠睡眠节律的影响,与正常组比较,造模组大鼠睡眠潜伏期显著延长($P < 0.05$),睡眠持续时间显著缩短($P < 0.05$),证明 PCPA 失眠大鼠造模成功。见表 1。

表 1 PCPA 对正常大鼠睡眠节律的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, min)

组别	睡眠潜伏期	睡眠时长
正常组	4.68 ± 0.94	76.04 ± 6.52
模型组	10.68 ± 2.51 *	31.45 ± 7.27 *

注:与正常组比较,* $P < 0.05$。

2.3 天王补心丹对失眠大鼠行为学的影响

2.3.1 Morris 水迷宫测试结果

在 Morris 水迷宫定位航行实验中,与正常组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长($P < 0.05$);与模型组相比,天王补心丹各剂量组大鼠逃避潜伏期均呈下降趋势($P < 0.05$)。在空间探索实验中,与正常组比较,模型组大鼠穿越逃生平台的次数明显减少($P < 0.05$),与模型组相比,天王补心丹各剂量组大鼠穿越逃生平台的次数有所增加($P < 0.05$)。提示天王补心丹可能改善失眠大鼠的空间记忆能力。见表 2、3,图 1。

表 2 各组大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, s)

组别	D1	D2	D3	D4
正常组	47.38 ± 4.62	26.32 ± 9.63	10.03 ± 6.36	4.67 ± 0.84
模型组	85.73 ± 5.44 *	41.60 ± 17.22 *	31.96 ± 3.51 *	21.35 ± 2.87 *
天王补心丹低剂量组	70.40 ± 8.66 a	38.88 ± 7.48	24.68 ± 5.59 a	15.15 ± 1.26 a
天王补心丹高剂量组	54.14 ± 11.29 a	32.06 ± 2.21	13.37 ± 1.01 a	8.55 ± 1.34 a

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,a $P < 0.05$。

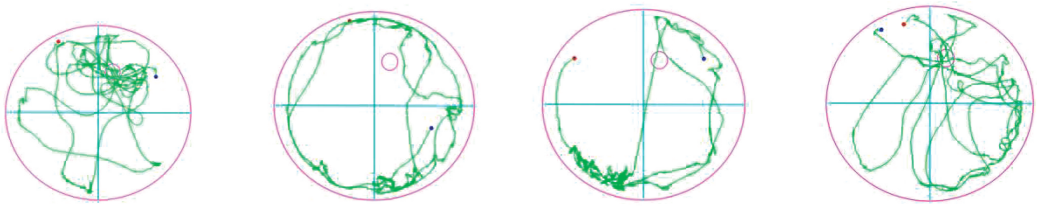


图 1 空间探索—各组大鼠穿越平台图

表 3 PCPA 对大鼠 Morris 水迷宫的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	穿越逃生平台次数/次
正常组	5.20 ± 1.03
模型组	1.60 ± 0.84 *
天王补心丹低剂量组	3.30 ± 0.67 [a]
天王补心丹高剂量组	4.20 ± 0.63 [a]

注：与正常组比较，* $P < 0.05$；与模型组比较，[a] $P < 0.05$。

2.3.2 旷场实验测试结果

在旷场实验中，与正常组比较，模型组大鼠中央网格活动路程与总活动路程减少（$P < 0.05$）；与模型组比较，天王补心丹各剂量组大鼠的中央网格活动路程与总活动路程明显增加（$P < 0.05$）。提示天王补心丹可能改变失眠大鼠的恐惧焦虑情绪。见表 4、图 2。

表 4 旷场实验各组大鼠运动轨迹比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, mm)

组别	中央网格路程	总活动路程
正常组	2 290.76 ± 253.16	50 293.31 ± 2211.98
模型组	680.08 ± 82.05 *	24 869.06 ± 2 666.43 *
天王补心丹低剂量组	1 294.62 ± 83.31 [a]	39 244.25 ± 1 775.65 [a]
天王补心丹高剂量组	1 703.16 ± 140.08 [a]	44 508.80 ± 1 640.82 [a]

注：与正常组比较，* $P < 0.05$；与模型组比较，[a] $P < 0.05$。

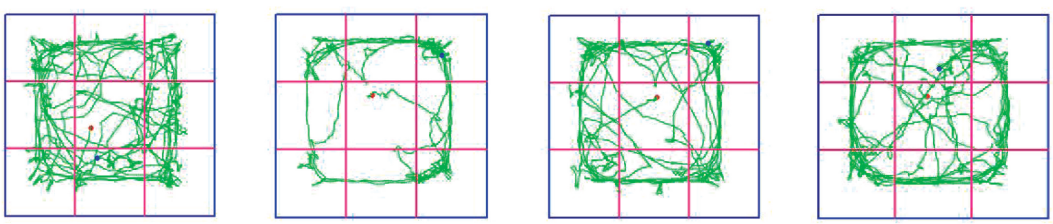


图 2 旷场实验各组大鼠运动轨迹图

2.4 Western Blot 法检测下丘脑组织中 Clock、Bmal1、Per1、Cry2 蛋白表达水平

与正常组比较，模型组大鼠 Clock、Bmal1 蛋白表达量下降（$P < 0.05$），Per1、Cry2 蛋白表达量升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，天王补心丹高剂量组大鼠下丘脑组织中 Clock、Bmal1 蛋白表达量上调（$P < 0.05$），低剂量组 Bmal1 蛋白表达量上升（$P < 0.05$），Clock 蛋白呈上升趋势，天王补心丹各剂量组大鼠 Per1、Cry2 蛋白表达量有所下降（$P < 0.05$）。提示失眠大鼠出现生物节律紊乱，天王补心丹可能对其起到改善作用，见表 5。

表 5 各组大鼠下丘脑 Clock、Bmal1、Per1、Cry2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	Clock	Bmal1	Per1	Cry2
正常组	1.40 ± 0.16	0.90 ± 0.03	1.01 ± 0.05	1.13 ± 0.10
模型组	0.83 ± 0.04 *	0.73 ± 0.07 *	1.57 ± 0.26 *	1.53 ± 0.17 *
天王补心丹低剂量组	0.92 ± 0.12	0.89 ± 0.09 [a]	1.22 ± 0.12 [a]	1.17 ± 0.03 [a]
天王补心丹高剂量组	1.06 ± 0.05 [a]	0.86 ± 0.04 [a]	1.13 ± 0.12 [a]	1.15 ± 0.05 [a]

注：与正常组比较，* $P < 0.05$；与模型组比较，[a] $P < 0.05$。

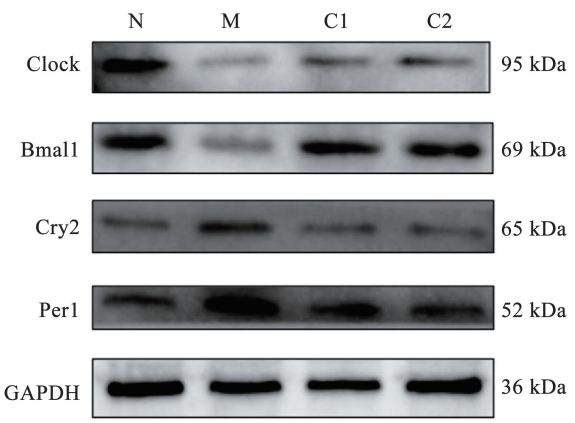
2.5 q－PCR 法检测下丘脑组织中 Clock、Bmal1、Per1、Cry2 mRNA 相对表达水平

与正常组比较，模型组大鼠 Clock、Bmal1 mRNA 表达量下降（$P < 0.05$），Per1、Cry2 mRNA 表达量升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，天王补心丹各剂量组大鼠下丘脑组织中 Clock、Bmal1 mRNA 表达量上调（$P < 0.05$），Per1、Cry2 mRNA 表达量有所下降（$P < 0.05$）。进一步验证天王补心丹对失眠大鼠生物钟节律的调控作用。见表 6。

表 6　各组大鼠下丘脑 Clock、Bmal1、Per1、Cry2 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	Clock	Bmal1	Per1	Cry2
正常组	1.63 ± 0.16	1.01 ± 0.10	0.10 ± 0.03	0.94 ± 0.09
模型组	0.47 ± 0.06 *	0.36 ± 0.09 *	1.85 ± 0.07 *	1.74 ± 0.11 *
天王补心丹低剂量组	0.62 ± 0.09[a]	0.60 ± 0.03[a]	1.26 ± 0.05[a]	1.40 ± 0.08[a]
天王补心丹高剂量组	1.01 ± 0.07[a]	0.78 ± 0.05[a]	1.11 ± 0.05[a]	1.15 ± 0.11[a]

注：与正常组比较，* $P < 0.05$；与模型组比较，[a] $P < 0.05$。



注：N. 正常组；M. 模型组；C1. 天王补心丹低剂量组；C2. 天王补心丹高剂量组。

图 3　各组大鼠下丘脑生物钟相关蛋白表达印迹图

3　讨论

天王补心丹的主要功效是滋阴、补心、养血。方中生地黄补血益气、补肾养阴，为君药。天冬、麦冬滋阴退热，酸枣仁、柏子仁养心安神，当归益气血，养阴填精，均为臣药。玄参养阴清热，远志、茯苓养心安神，人参补气血、宁神醒脑；五味子敛心安神；丹参清热活血，朱砂镇心宁神，均为佐药。橘携药而上，为使药。基于现代药理学研究，生地黄能引起大鼠 TNF - α、IL - 1 下降、IL - 10 升高，促进腺苷合成，增加 γ - 氨基丁酸(GABA)及 5 - 羟色胺(5 - HT)释放，改善大鼠睡眠状态[11]。其不仅能够有效调整患者的负性情绪，减轻患者的失眠症状，同时能够提升睡眠质量，让患者逐步恢复睡眠[12]。酸枣仁总皂苷可通过调节烟酸、烟酰胺、酪氨酸通路平稳大鼠昼夜节律，减少其攻击性，延长睡眠时间[13]。酸枣仁 - 柏子仁有效组分能通过增强 5 - HT能神经系统的效应，达到宁心安神、改善睡眠的作用[14]。酸枣仁 - 茯苓可调节失眠小鼠下丘脑组织中 5 - HT 和去甲肾上腺素(NE)含量，以及海马中谷氨酸(Glu)和 GABA 含量来促使睡眠 - 觉醒状态的恢复，维持稳态平衡[15]。五味子木脂素通过调节失眠大鼠觉醒核团神经元活性及血清素能中缝背核区 5 - HT 能神经元兴奋性，降低其觉醒水平达到治疗失眠的效果[16]。由此可见，天王补心丹可发挥其补益心肾、滋阴养血、调和阴阳之功效改善失眠引起的睡眠 - 觉醒节律紊乱，达到治疗效果。

PCPA 通过抑制脑内 5 - HT 合成，使机体出现昼夜节律紊乱，从而诱发失眠[17]。本课题组采用腹腔注射 PCPA 的方法制备失眠模型。通过翻正反射观察到失眠大鼠睡眠状态的改变，与正常组比较，其睡眠节律紊乱、精神兴奋亢进。通过旷场实验观察到，在天王补心丹干预后失眠大鼠的活动频率较高，有效缓解其因失眠导致的恐惧、焦虑情绪。在水迷宫实验中，模型组大鼠逃避潜伏期明显增加，穿越逃生平台次数较少，无法快速寻找到平台，证明失眠可能导致学习认知能力下降。天王补心丹组在中药干预后逃避潜伏期有所下降，穿越逃生平台次数增多，这提示天王补心丹可改善失眠大鼠的学习记忆功能以及恐惧、焦虑等不良情绪。

导致失眠的因素有很多，其中生物钟基因发挥着不可或缺的作用。生物钟是由视交叉上核中枢节律中心(SCN)和外周节律构成的生物节律体系，Clock 和 Bmal1 等生物节律相关的转录 - 翻译负反馈通路构成了一种分子振动机制，调节中心和周围生物钟的节律，从而维持机体代谢、免疫、生理及行为等生理活动。生物节律环路是一条闭合的负反馈调控环路，其中 Clock 与 Bmal1 形成二聚体，活化生物钟负调控因子 Per、Cry 等，并通过调控 SCN 的节律性振荡，引起代谢紊乱、氧化应激和炎性损伤[18]，这种正负反馈的循环维持了机体的睡眠 - 觉醒周期。反馈环路中的正调节因子(Clock 和 Bmal1 异二聚体)与负调节因子(Per、Cry)表达的周期性升降，犹如一阳一阴，二者的相互作用，正所谓“阳入于阴则寐，阴出于阳则寤”。因此，推测寤寐失常的调节与生物钟基因负反馈环路密切相关。本研究结果表明，失眠能够改变大鼠节律基因的表达，模型组大鼠下丘脑组织中 Clock 和 Bmal1 表达水平下降，说明失眠大鼠生物钟基因核心元件的表达出现了异常，促进大脑意识清醒状态增强，导致大鼠处于觉醒状态，与过往研究报道一致[19-20]。而 Per1 和 Cry2 蛋白表达水平的上调，致使机体不易进入睡眠状态，也更加促进了觉醒的发生。本研究中，天王补心丹干预后发现失眠小鼠下丘脑中 Clock、Bmal1、Per1 和 Cry2 的

表达水平有一定的恢复,因此推测天王补心丹能够改善失眠大鼠的静止与活动作息节律,具有睡眠保护作用,且该作用与恢复下丘脑组织中的生物钟基因表达水平有关。

综上所述,本研究发现天王补心丹干预 PCPA 失眠大鼠后,大鼠精神状态及其空间认知能力有所改善。同时,天王补心丹干预组生物钟相关蛋白表达有一定的平衡,故推测天王补心丹通过调控生物钟基因达到治疗失眠的效果。但在实验过程中存在一定的不足,动物具有个体差异性,模拟实验可能具有一定的偏差,后期可补充生物钟基因上下游相关指标以更加详细准确地阐述其作用机制。同时,本研究缺乏对造模动物的睡眠时相分析,目前,脑电图是检测睡眠效率的最为直观与准确的方式[21],且动物睡眠生物解析系统也可实时自动记录机体的睡眠结构变化,对模型制备的把控更加客观,将在后续研究中进行完善。

参考文献:

[1] MORIN C M, DRAKE C L, HARVEY A G, et al. Insomnia disorder[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015(1): 15026.
[2] CAO X L, WANG S B, ZHONG B L, et al. The prevalence of insomnia in the general population in China: a meta - analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0170772.
[3] MANOOGIAN E N C, PANDA S. Circadian rhythms, time - restricted feeding, and healthy aging[J]. Ageing Res Rev, 2017, 39: 59 - 67.
[4] 王书君,刘西建,刘蕾蕾,等. 中医药调控生物钟基因防治失眠的研究进展[J]. 世界中医药,2023,18(5):734 - 738.
[5] 赵倩,李劲草,王洛萱,等. 天王补心丹加减方改善大鼠睡眠剥夺损伤的作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2023,34(8):1025 - 1033.
[6] 周映君,叶翠河,欧雄书,等. 天王补心丹治疗失眠症 46 例的疗效观察[J]. 深圳中西医结合杂志,2020,30(12):67 - 68.
[7] 谭喜云,黄飞. 天王补心丹联合穴位按摩治疗阴虚型失眠的疗效观察[J]. 实用医技杂志,2021,28(10):1254 - 1256.
[8] 刘景峰,宋伟伟,李宝栋,等. 夜预汤对卒中后失眠模型大鼠的治疗作用及其对 NF - κB/NLRP3 信号通路的影响[J]. 中医药导报,2022,28(12):11 - 16.
[9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:1103.
[10] 王承灏,廖雪晶,孙资金,等. 双夏秫米汤对大鼠睡眠改善作用的研究[J]. 环球中医药,2023,16(6):1074 - 1083.
[11] 李尧善,申旻,王盼. 生地黄水提物对大鼠睡眠的影响及其机制研究[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(11):1911 - 1918,1977.
[12] 孔卫平. 血府逐瘀汤重用地黄治疗顽固性失眠 50 例[J]. 实用中西医结合临床,2023,23(20):17 - 20.
[13] 张文明,唐静月,费倩倩,等. 基于 UHPLC - Q - Exactive - MS/MS 的酸枣仁总皂苷对失眠大鼠血清代谢物的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2022,29(7):86 - 92.
[14] 倪雨婷,张欢欢,赵丹丹,等. 酸枣仁 - 柏子仁组分调控睡眠障碍中神经递质的研究[J]. 黑龙江医药,2023,36(5):1000 - 1004.
[15] 魏嵘,王振,李怀平,等. 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对失眠模型小鼠的改善睡眠作用[J]. 食品工业科技,2023,44(7):359 - 366.
[16] 李玟玟. 基于觉醒水平探讨五味子木脂素改善睡眠剥夺大鼠的睡眠作用[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2023.
[17] 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.
[18] EDGAR D M, DEMENT W C, FULLER C A. Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: evidence for opponent processes in sleep - wake regulation[J]. J Neurosci, 1993, 13(3): 1065 - 1079.
[19] 区浩松,杨阳,金如意,等. 交泰丸水煎液腹腔注射对失眠小鼠昼夜节律紊乱的改善作用及其机制[J]. 山东医药,2023,63(27):7 - 11.
[20] 吕梦圆. 杜仲水提物对小鼠失眠的改善作用及机制研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2023.
[21] LIU Z, XU X H, LIU T Y, et al. Safranal enhances non - rapid eye movement sleep in pentobarbital - treated mice[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(8): 623 - 630.

Mechanism of Tianwang Buxin Pellet in Treating Insomnia by Regulating the Biological Clock Feedback Loop

MA Xiaohan[1], GAO Yidong[2], YANG Jiayu[1], LIN Ruhui[1,3], YIN Lufeng[2]

(1. *Institute of Integrative Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou* 350122, *China*; 2. *The Third People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou* 350122, *China*; 3. *Center for Scientific Innovation and Transformation, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou* 350122, *China*)

Abstract Objective: To investigate the mechanism by which Tianwang Buxin Pellet treats insomnia by regulating the biological clock feedback loop. Methods: Forty SD rats were divided into a normal group, a model group, and low - and high - dose Tianwang Buxin Pellet groups, with 10 rats in each group. Except for the normal group, the other groups received intraperitoneal injections of 4 - chloro - DL - phenylalanine (PCPA) for 2 days to establish the insomnia rat model. After modeling, the Tianwang Buxin Pellet groups were administered low - dose (2.2 g/kg/d) or high - dose (8.7 g/kg/d) by gavage, while the normal and model groups received an equal volume of saline by gavage for a total of

7 days. The success of model preparation was verified by the righting reflex test. On the 3rd day of intervention, the Morris water maze test was performed. On the 7th day of intervention, the open field test was conducted. Western blot analysis was used to detect the expression levels of clock genes Clock, Bmal1, Per1, and Cry2 proteins in the hypothalamic tissue. q – PCR was used to measure the relative mRNA expression levels of Clock, Bmal1, Per1, and Cry2 in the hypothalamic tissue. Results: (1) In the righting reflex test, compared to the normal group, the model group had prolonged sleep latency and reduced sleep duration ($P < 0.05$). (2) In the Morris water maze test, compared to the normal group, the model group rats had prolonged escape latency and fewer crossings of the escape platform ($P < 0.05$); compared to the model group, both low – and high – dose Tianwang Buxin Pellet groups showed reduced escape latency and increased number of crossings of the escape platform ($P < 0.05$). (3) In the open field test, compared to the normal group, the model group rats had decreased central grid activity distance and total activity distance ($P < 0.05$); compared to the model group, the Tianwang Buxin Pellet groups showed significantly increased central grid activity distance and total activity distance ($P < 0.05$). (4) Compared to the normal group, the model group rats had decreased expression of Clock and Bmal1 proteins ($P < 0.05$) and increased expression of Per1 and Cry2 proteins ($P < 0.05$); compared to the model group, the high – dose Tianwang Buxin Pellet group showed upregulated Clock and Bmal1 protein expression ($P < 0.05$), while the low – dose Tianwang Buxin Pellet group showed upregulated Bmal1 protein expression ($P < 0.05$) and a trend toward increased Clock expression, with decreased Per1 and Cry2 protein expression in all dose groups ($P < 0.05$). (5) Compared to the normal group, the model group rats had decreased Clock and Bmal1 mRNA expression levels ($P < 0.05$) and increased Per1 and Cry2 mRNA expression levels ($P < 0.05$); compared to the model group, both dose groups of Tianwang Buxin Pellet showed upregulated Clock and Bmal1 mRNA expression levels ($P < 0.05$) and decreased Per1 and Cry2 mRNA expression levels ($P < 0.05$) in the hypothalamic tissue. Conclusion: Tianwang Buxin Pellet improves the sleep state in insomnia rats, and its mechanism of action may be related to the regulation of the clock gene feedback loop.

Key words Tianwang Buxin Pellet; Sleep – wake rhythm; Insomnia; Learning and cognitive function