

天王补心丹加减对睡眠剥夺大鼠学习记忆及炎症因子表达的影响

黄晓宇¹, 谢光璟¹, 李浩^{1,2}, 朱博宽¹, 高寒¹, 黄攀攀^{1*}

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065;

2. 中国船舶重工集团公司第七一二研究所, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**通过研究天王补心丹对睡眠剥夺模型大鼠睡眠质量、认知功能、炎症因子及免疫相关基因表达的影响,探讨天王补心丹对睡眠剥夺状态下学习记忆过程产生干预及发挥抗炎作用的可能机制。**方法:**40只雄性SPF级大鼠采用多平台水环境法模拟睡眠剥夺模型,随机分为模型组,天王补心丹组(20 g·kg⁻¹),艾司唑仑组(0.1 mg·kg⁻¹),另设空白组,每组10只。共予以4周的睡眠剥夺造模,后2周进行药物干预,模型组与空白组灌服等体积纯水。脑电图(EEG)评估造模情况、分析大鼠睡眠结构及质量;Morris水迷宫定位航行与空间探索实验分析大鼠学习记忆能力;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),单核细胞趋化因子-1(MCP-1)的表达;应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测EB病毒诱导基因3(EBI3),细胞外信号调节激酶5(ERK5),p21活化蛋白激酶4(PAK4)的mRNA表达水平。**结果:**睡眠剥夺模型造模成功,与空白组比较,模型组大鼠的总睡眠时间,慢波睡眠总时长与慢波睡眠第1,第2阶段时长均明显缩短($P<0.01$),上平台潜伏期、游泳总路程和第1次抵达原平台时间明显增加,而穿越平台次数和目标象限时间明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),血清中IL-1 β , TNF- α , MCP-1水平显著上升($P<0.01$),大鼠下丘脑中EBI3, ERK5与PAK4的mRNA表达水平显著下降($P<0.01$);与模型组比较,天王补心丹组大鼠的睡眠质量改善明显,总睡眠时间,慢波睡眠总时长与慢波睡眠第1阶段时长显著增加($P<0.01$),认知能力有一定的提升,上平台潜伏期、游泳总路程和第1次抵达原平台时间缩短,穿越平台次数和目标象限时间明显延长($P<0.05$, $P<0.01$);血清中IL-1 β , TNF- α , MCP-1水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),大鼠下丘脑中EBI3, ERK5与PAK4的mRNA表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**天王补心丹可提高睡眠剥夺模型大鼠的睡眠质量与学习记忆能力,推测可能与其升高相关炎症因子表达水平,发挥抗炎作用有关。

[关键词] 天王补心丹; 睡眠剥夺; 认知功能; 炎症; 炎症因子

[中图分类号] R2-0;R289;R338.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)23-0056-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202338

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200925.1751.005.html>

[网络出版日期] 2020-9-27 09:55

Effect of Modified Tianwang Buxindan on Learning and Memory Function and Expression of Inflammatory Factors in Sleep Deprived Rats

HUANG Xiao-yu¹, XIE Guang-jing¹, LI Hao^{1,2}, ZHU Bo-kuan¹, GAO Han¹, HUANG Pan-pan^{1*}

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. 712 Research Institute Hospital, China Shipbuilding Industry Corporation, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** By studying the effects of Tianwang Buxindan on sleep quality, cognitive function, inflammatory factors and immune-related gene expression in sleep deprivation model rats, explore the effect of Tianwang Buxindan on the learning and memory process under sleep deprivation and its anti-inflammatory effects possible mechanism. **Method:** The 40 male SPF rats were used to simulate the sleep

[收稿日期] 20200521(030)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874414);武汉市科技计划项目(2019020701011433)

[第一作者] 黄晓宇,在读硕士,从事中医药防治睡眠疾病研究,E-mail:huangxy1021@stmail.hbctm.edu.cn

[通信作者] *黄攀攀,博士,副研究员,硕士生导师,从事中医药防治睡眠疾病研究,E-mail:panpanhuang@hbctm.edu.cn

deprivation model by multi-platform water environment method, and were randomly divided into model group, Tianwang Buxindan group ($20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and estazolam group ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), set up a normal group, 10 in each group. A total of 4 weeks of sleep deprivation modeling was performed, and drug intervention was performed 2 weeks later. The model group and the blank group were given equal volumes of pure water. Electroencephalogram (EEG) evaluation of modeling and analysis of sleep structure and quality of rats, Morris water maze positioning navigation and space exploration experiment analysis of learning and memory ability of rats, application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum inflammatory factor interleukin- 1β (IL- 1β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemokine-1 (MCP-1) expression, Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA levels of EB virus inducible gene 3 (EBI3), extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5), and p21 activated protein kinase 4 (PAK4). **Result:** The sleep deprivation model was successfully built. Compared with blank group, the total sleep time, total duration of slow wave sleep and the duration of the first and second phases of slow wave sleep in the model group were significantly shortened ($P<0.01$). The incubation period on the upper platform, the total swimming distance and the time to reach the original platform for the first time increased significantly, while the number of times to cross the platform and the target quadrant significantly decreased ($P<0.05, P<0.01$). The expression levels of IL- 1β , TNF- α and MCP-1 increased significantly ($P<0.01$), the mRNA expression levels of EBI3, ERK5 and PAK4 in the hypothalamus of the model group decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, the sleep quality of the rats in the Tianwang Buxindan group was significantly improved. The total sleep time, the total duration of slow wave sleep and the duration of the first phase of slow wave sleep were significantly increased ($P<0.01$). The incubation period on the platform, the total swimming distance and the time to reach the original platform for the first time are shortened, the number of times to cross the platform and the target quadrant time are extended ($P<0.05, P<0.01$), IL- 1β , TNF- α , MCP-1 expression levels were significantly reduced ($P<0.05, P<0.01$), mRNA expression levels of EBI3, ERK5 and PAK4 in rat hypothalamus were significantly increased ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** Tianwang Buxindan can improve the sleep quality and learning and memory ability of sleep deprivation model rats, which may be related to the increase of the expression level of related inflammatory factors and its anti-inflammatory effect.

[Key words] Tianwang Buxindan; sleep deprivation; cognitive function; inflammation; inflammatory factor

睡眠是一项不可或缺的生命活动,充足且高质量的睡眠有助于恢复机体体能,促进青少年大脑发育,以及增强机体免疫能力。慢波睡眠(SWS)作为睡眠质量的重要指标,在体内可发挥储存能量,清洗代谢物,调节激素,修复免疫等生理功能^[1]。睡眠与免疫系统之间存在着一种双向调节关系,主要表现为睡眠剥夺中促炎症因子的过表达会使机体产生炎症反应;长时间炎症状态又愈发加重神经元组织损伤,最终导致睡眠障碍与认知损伤等病理现象的进一步加重^[2]。脑电波实验表明在睡眠缺乏情况下,大脑认知能力与学习记忆水平显著下降^[3]。课题组前期研究也发现睡眠剥夺模型大鼠血清中炎症因子的表达水平明显上调,被认为与应激状态下炎症反应的触发有关^[4]。

天王补心丹以安神为主,兼具补养滋阴之功。

一项天王补心丹临床大样本 Meta 分析证实其对于患者睡眠质量及日间功能的治疗效果显著^[5],体外实验也表明此方具有改善睡眠剥夺大鼠的学习记忆与抗炎抗氧化作用^[6-7]。本实验使用大鼠进行睡眠剥夺造模并分别予以天王补心丹和艾司唑仑干预后,描绘睡眠时相,通过行为学实验评估大鼠学习记忆能力,检测血清中促炎因子白细胞介素- 1β (IL- 1β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),单核细胞趋化因子-1 (MCP-1)的表达;检测下丘脑中 EB 病毒诱导基因 3 (EBI3),细胞外信号调节激酶 5 (ERK5), p21 活化蛋白激酶 4 (PAK4) 的 mRNA 表达水平,探讨天王补心丹对大鼠睡眠结构与质量的改善效果,进一步讨论学习记忆与炎症反应间存在的联系,为进行深层次的通路蛋白表达研究提供前期理论依据。

1 材料

1.1 动物 6周龄雄性SPF级大鼠40只,购自湖北省实验动物研究中心,合格证号SCXK(鄂)2018-0049,饲养于湖北中医药大学老年医学研究所动物房,温度(24±2)℃,湿度50%~60%,光照/黑暗周期12/12 h。动物实验在湖北中医药大学老年医学研究所进行,实验前适应性喂养7 d,本实验获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂 天王补心丹加减制备水煎剂,静置滤过后4℃冰箱保存备用。参考课题组前期研究基础^[8]确定天王补心丹加减组成及剂量为生地黄12 g,酸枣仁、柏子仁、天冬、麦冬、当归各9 g,人参片、丹参、玄参、五味子、茯苓、远志、桔梗各5 g,朱砂有毒故去之,复方浓缩制成含生药2 g·mL⁻¹的水煎剂。中药饮片均购自湖北中医药大学国医堂,由湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定为正品。艾司唑仑(济川药业集团有限公司,批号H44021098);戊巴比妥钠,青霉素,trizol试剂(武汉Bioswamp公司,批号分别为2018102218,20181017,201808);IL-1 β ,TNF- α ,MCP-1酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为ml064292,ml037361,ml084571);逆转录试剂盒,Qubit™双链DNA高灵敏度荧光定量试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为1841432,1894705)。

1.3 仪器 51600型大鼠脑立体定位仪(美国Stoelting公司);RM-6280C型通道生理信号记录仪(中国成都仪器仪表厂);ZH-Morris型水迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司);TGL-16M型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机有限公司);iMark型多功能酶标仪(美国Bio-Rad公司);EF4577型热循环仪(德国Eppendorf公司);Rotor-Gene Q型Real-time PCR仪(德国Qiagen公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模 40只大鼠随机分为空白组、模型组、天王补心丹组、艾司唑仑组,每组10只,除空白组外均采用多平台水环境法进行睡眠剥夺造模。在睡眠剥夺箱(72 cm×48 cm×30 cm)中放置排列规格为3行2列、直径8 cm的联体圆形不锈钢平台,箱中注水直至水面低于平台1 cm,平台上方平行不锈钢丝制成的笼罩上嵌夹有饮水、饲料,每日对大鼠睡眠剥夺20 h(14:00至次日10:00)。为排除水环境可能产生的压力影响,空白组注水箱中设置直径16 cm的宽平台,下方覆盖有不锈钢丝网,

其他实验条件各组完全相同。造模共持续28 d,脑部电极植入手术完成后,采用睡眠脑电图描记法评价模型,记录大鼠的睡眠时相。与空白组比较,模型组总睡眠时间和SWS时间均有明显缩短,表明造模成功^[9]。

2.2 给药 根据《中药药理研究方法学》^[10]中人与大鼠的给药剂量换算,确定天王补心丹的大鼠给药有效剂量为17.6 g·kg⁻¹,考虑到大鼠耐药性较人稍强,故最终确定的天王补心丹给药剂量为20 g·kg⁻¹。造模14 d后给予天王补心丹组中药水煎剂灌胃,艾司唑仑组按0.1 mg·kg⁻¹剂量水溶剂灌胃,空白组与模型组灌服等体积纯净水,每天下午1次,给药持续14 d。

2.3 脑部电极植入 造模7 d后参考前人实验方法^[9]对大鼠进行脑部皮层电极植入,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后开始手术,大鼠脑立体定位仪固定头部,头顶去毛,消毒后剪开头部皮肤,使颅骨充分暴露,将与电极连接的不锈钢螺钉(长2 mm,直径1.2 mm)植入到脑部额-顶叶皮质上方的颅骨中,使之与硬脑膜接触但不穿透硬脑膜。接地电极放置在冠状缝正中前部约2 mm处,2个记录电极放置在前囟的右侧及左侧3 mm处,通过微型连接器进行EEG记录。手术完成后大鼠单笼饲养,连续3 d注射4万U青霉素,给予7 d恢复时间。

2.4 指标检测

2.4.1 睡眠脑电图分析 每天11:00至15:00连续4 h进行EEG记录,脑电信号被放大和筛选(1~30 Hz)后进行数字化记录,导出波形表进行下一步分析,每30 s为一统计分段。大鼠脑电波可综合分为4个频率区域: δ 波(1~4 Hz), θ 波(4~10 Hz), α 波(10~15 Hz), β 波(15~30 Hz)。根据不同波频将大鼠的睡眠觉醒周期分为①觉醒期,以输出不规则的低幅快波脑电或 θ 波占主导为特征,可观察到大鼠处于静立状态或活动状态;②慢波睡眠第1阶段, δ 波和 α 波同期出现,其中 δ 波在各统计分段中占比低于50%,相当于浅睡眠阶段,可观察到大鼠侧卧或蜷缩,时有小幅肢体活动;③慢波睡眠第2阶段,波频同第1阶段,但 δ 波在统计分段中占比超过50%,相当于深睡眠阶段,可观察到大鼠头朝下闭目,几乎无任何肌肉活动;④快速眼动睡眠阶段(REM),出现低幅 θ 波,与觉醒期脑电波活动相似,可观察到大鼠偶有肌肉抽动。本实验统计的总睡眠时间包括SWS期与REM期。

2.4.2 Morris水迷宫实验 给药1周后开始进行

Morris水迷宫,采用空间探查实验和定位航行实验评价大鼠的学习记忆能力。先做连续5 d的适应性训练,每天训练2次,每次给予大鼠60 s自由探查空间及寻找平台,若超过60 s则将其引导至平台并给予10 s熟悉周围环境,第6天休息,第7天上午随机选择一个象限放置平台,进行定位航行考试,第7天下午撤出平台后进行空间探查实验。

2.4.3 ELISA检测血清中IL-1 β , TNF- α , MCP-1表达水平 末次灌胃给药后24 h将大鼠和浸有乙醚的棉球放入大烧杯中,封口,麻醉后使用真空管于腹主动脉采血10 mL,12 000 r \cdot min⁻¹离心10 min,取上清。按照ELISA试剂盒检测步骤进行操作。

2.4.4 Real-time PCR检测大鼠下丘脑中EBI3, ERK5和PAK4的mRNA表达水平 大鼠取血后断头处死,冰上迅速分离下丘脑,放入冻存管后液氮保存。取组织剪碎后加入trizol裂解液1 mL,研磨,4 $^{\circ}$ C下高速冷冻离心机12 000 r \cdot min⁻¹离心15 min,取上清,匀浆提取总mRNA并进行质检,逆转录,加样,扩增。Real-time PCR仪扩增条件为95 $^{\circ}$ C 10 min,5个循环,95 $^{\circ}$ C 15 s,58 $^{\circ}$ C 1 min,65 $^{\circ}$ C 30 s,40个循环,采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法表示各mRNA表达。大鼠EBI3, ERK5, PAK4及内参 β -肌动蛋白(β -actin)引物均由上海其明基因技术有限公司设计合成,引物序列见表1。

2.5 统计学分析 所有数据采用SPSS 19.0统计软件处理,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用*t*检验或单因素

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
EBI3	上游 GCTCCTCCTGTCACCTGCTC	175
	下游 AATGAAGGACATGGCTCTGG	
ERK5	上游 GGGATAAGGCGTCCAGAACT	141
	下游 GAAGCAGGACCTAGGCAACA	
PAK4	上游 GGATGAACGAGGAGCAGAT	124
	下游 GAGCGGTTAGAACTACTTC	
β -actin	上游 ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	119
	下游 TCCATATCGTCCCAGTTGGT	

方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态 实验结束后,空白组大鼠精神状态极佳,皮毛柔顺有光泽,打湿后会及时清理,活动意愿强,动作敏捷;模型组大鼠精神状态差,易被激惹,皮毛脏乱无光泽,打湿后不愿及时清洁,活动意愿差,常蜷卧在角落,尾巴及身上有打斗受伤痕迹;与模型组比较,天王补心丹组及艾司唑仑组在精神状态、皮毛色泽、活动意愿等方面都有所好转。

3.2 对大鼠睡眠情况的影响 与空白组比较,模型组大鼠的总睡眠时间,慢波睡眠总时间,慢波睡眠第1,2阶段时间均显著缩短($P<0.01$),提示造模成功;与模型组比较,天王补心丹组大鼠的总睡眠时间,慢波睡眠总时间,慢波睡眠第1阶段时间均显著延长($P<0.01$),艾司唑仑组总睡眠时间和慢波睡眠总时间明显延长($P<0.05$)。见表2。

表2 天王补心丹对睡眠剥夺大鼠睡眠时间的影($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Tianwang Buxindan on sleep time in sleep deprived rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	总睡眠时间	慢波睡眠时间		
			总时间	第1阶段时间	第2阶段时间
空白	-	15 230 \pm 236	15 203 \pm 317	8 028 \pm 707	7 175 \pm 356
模型	-	7 032 \pm 387 ¹⁾	7 011 \pm 479 ¹⁾	4 577 \pm 397 ¹⁾	2 434 \pm 583 ¹⁾
天王补心丹	20	10 275 \pm 296 ³⁾	10 138 \pm 317 ³⁾	6 824 \pm 433 ³⁾	3 314 \pm 502
艾司唑仑	1 \times 10 ⁻⁴	8 521 \pm 373 ²⁾	8 496 \pm 391 ²⁾	5 388 \pm 426	3 108 \pm 470

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表4~5同)。

3.3 对睡眠剥夺模型大鼠学习记忆的影响 与空白组比较,模型组大鼠上平台潜伏期、游泳总路程和首次抵达原平台时间明显增加,而穿越平台次数和目标象限时间明显减少($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,天王补心丹组大鼠上平台潜伏期和首次抵达原平台时间缩短,穿越平台次数和目标象限时间明显延长($P<0.05, P<0.01$),游泳总路程减少。艾司

唑仑组上平台潜伏期明显减少,穿越平台次数和目标象限时间明显延长($P<0.05$)。见表3。

3.4 对睡眠剥夺模型大鼠血清中IL-1 β , TNF- α , MCP-1表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中IL-1 β , TNF- α , MCP-1的水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,天王补心丹组及艾司唑仑组大鼠血清中IL-1 β , TNF- α , MCP-1表达水平均明显

表3 天王补心丹对睡眠剥夺模型大鼠定位航行及空间探索的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Tianwang Buxindan on localization navigation and spatial exploration in sleep deprivation model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	定位航行实验		空间探索实验		
		上平台潜伏期/s	游泳总路程/cm	穿越平台次数/次	目标象限时间/s	首次抵原平台时间/s
空白	-	12.87±5.14	242.57±115.82	6.58±1.29	43.71±8.36	8.27±1.05
模型	-	44.70±9.20 ²⁾	492.16±299.20 ¹⁾	2.67±1.62 ²⁾	23.01±15.45 ²⁾	15.36±6.89 ²⁾
天王补心丹	20	23.77±14.67 ³⁾	388.05±108.66	5.80±0.34 ⁴⁾	41.29±12.11 ⁴⁾	10.30±2.72 ³⁾
艾司唑仑	1×10 ⁻⁴	27.19±14.61 ³⁾	418.70±95.03	4.49±0.37 ³⁾	36.27±11.63 ³⁾	13.47±2.64

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01。

降低,差异具有统计学意义(P<0.05, P<0.01)。 见表4。

表4 天王补心丹对睡眠剥夺大鼠血清中IL-1β, TNF-α, MCP-1表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Tianwang Buxindan on serum IL-1β, TNF-α, MCP-1 expression in sleep deprivation model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β	TNF-α	MCP-1
空白	-	265.13±15.70	724.81±36.45	994.62±42.85
模型	-	583.22±20.28 ¹⁾	1 669.77±57.97 ¹⁾	2 761.11±111.32 ¹⁾
天王补心丹	20	406.74±11.94 ²⁾	946.31±39.32 ³⁾	1 683.45±69.37 ³⁾
艾司唑仑	1×10 ⁻⁴	427.39±14.41 ²⁾	1 217.18±41.04 ²⁾	2 108.06±72.38 ²⁾

3.5 对睡眠剥夺大鼠下丘脑中EBI3, ERK5与PAK4的mRNA表达影响 与空白组比较,模型组大鼠下丘脑中EBI3, ERK5与PAK4的mRNA表达水平显著下降(P<0.01);与模型组比较,天王补心丹组大鼠下丘脑中EBI3, ERK5与PAK4的mRNA表达水平有明显上升(P<0.05, P<0.01),艾司唑仑组ERK5与PAK4的mRNA表达水平明显升高(P<0.05, P<0.01)。见表5。

表5 天王补心丹对睡眠剥夺大鼠下丘脑中EBI3, ERK5与PAK4的mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Tianwang Buxindan on mRNA expression of EBI3, ERK5 and PAK4 in hypothalamus of sleep deprived rat ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EBI3	ERK5	PAK4
空白	-	1.87±0.12	1.91±0.11	6.73±3.20
模型	-	0.69±0.11 ¹⁾	0.52±0.13 ¹⁾	0.81±0.40 ¹⁾
天王补心丹	20	1.17±0.18 ²⁾	1.16±0.18 ³⁾	2.77±1.94 ³⁾
艾司唑仑	1×10 ⁻⁴	0.86±0.17	0.89±0.19 ²⁾	2.24±2.68 ³⁾

4 讨论

SWS在睡眠中扮演着重要的恢复性角色,有助于巩固陈述性记忆力和学习结果,临床实验表明当受试者在SWS阶段花费的时间越多,在日间迷宫实验里越能够更好地发现其中隐藏的规律性^[11-12]。本研究发现与空白组比较,模型组总睡眠时间与SWS总时间都明显下降50%以上,在此基础上天王补心

丹的干预有效缓解了这种趋势,特别是SWS第1期时间出现显著延长;同时与模型组比较,天王补心丹组大鼠在Morris水迷宫实验中空间探索与定位航行的结果也有明显改善。

认知能力,睡眠情况与炎症反应这三者相互作用,关系密不可分,且往往伴有细胞器与组织的损伤。睡眠不足可激活小胶质细胞使TNF-α, IL-1β等促炎因子表达增加,直接引起炎症反应,导致细胞凋亡与免疫损伤,国内外均有相关课题探讨过睡眠剥夺后TNF-α, IL-1β的高表达现象,从5-羟色胺、环磷酸腺苷、胰岛素脂肪代谢等方向提出多种猜想^[2,13-14]。当机体组织受损时,血管内皮细胞、白细胞也会通过与补体的结合启动先天免疫应急反应即释放促炎因子TNF-α, IL-1β,而后共同促进白细胞介素-6(IL-6), MCP-1等趋化因子的分泌^[15]。MCP-1由血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等多处分泌,可影响溶酶体与过氧化物阴离子的释放,加重组织损伤,且对炎症反应细胞具有明显的趋化作用,许多慢性炎症中MCP-1的高表达都可导致病情加重^[16-17]。同时,新近研究表明睡眠质量的下降低会增强下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的应激反应,进而带动脑部海马区MCP-1的过表达持续4周之久^[18-19]。本研究通过ELISA检测发现与空白组比较,睡眠剥夺后模型组血清中可指示全身性炎症水平的TNF-α, IL-1β, MCP-1表达均出现成倍升高,大鼠处于慢性低度炎症状态,经天王补心丹给药后

3个促炎因子的表达水平均有明显回降,表明天王补心丹可改善睡眠剥夺诱导的炎症反应。

为探究该现象背后有哪些可能作用的免疫抗炎通路,笔者参考同批实验大鼠中天王补心丹组与模型组已完成的基因芯片测序结果^[20],显示共有差异基因321个,涉及代谢、抗炎等多种生物学功能。HPA轴是神经系统的重要组成部分,又有研究表明炎症因子可能对下丘脑区产生刺激作用^[21-22],因此从基因芯片结果中选择差异性显著且与TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1相关度较高的3个参与免疫进程的基因EBI3、ERK5、PAK4进行下丘脑区mRNA表达的检测。EBI3是近年来最新发现的2个白细胞介素因子IL-27与IL-35的唯一组成亚基之一,属于白细胞介素12家族,均能够发挥强大的抗炎作用,主要是通过激活信号传导及转录激活蛋白(STAT)通路抑制效应T细胞的激活,从而阻断白细胞介素家族炎症因子的释放来实现^[23-24]。由于对这2个白细胞介素因子的动物实验结果还不够充分,对于其是否能同时发挥促炎作用目前仍有争论。ERK5是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族中一个重要的大分子蛋白,在细胞静息状态下位于细胞质,磷酸化时会位移至细胞核,刺激细胞因子与部分趋化因子分泌^[15],其主要通过MEK5/ERK5/MAPK信号级联通路激活关键下游靶点KLF4,作用于血管内皮细胞。有研究采用Real-time PCR与Western blot对该通路的转录蛋白进行表达量测定后发现,ERK5可诱导一种主要表现为细胞凋亡抵抗力增强,血管生成和炎症潜能降低的内皮细胞保护性表型,从而发挥抗炎作用^[25-26]。医学界对内源性PAK4的关注始于一项发现其在完全激活TNF- α 与ERK通路上具有必需性的早期研究^[27],然而近年来也涌现出许多新的研究角度,如PAK4可以通过上调实现对P13K/Akt/mTOR通路的激活,调节细胞增殖与凋亡,抑制细胞的氧化应激反应与炎症反应^[28]。此外,PAK4还能作用于其他凋亡因子,如半胱氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3, Caspase-7, Caspase-8拮抗线粒体凋亡和受TNF- α 干预细胞中的炎症反应^[27,29]。

本实验结果显示与空白组比较,模型组EBI3、ERK5、PAK4的mRNA表达水平呈现显著下调,而与模型组比较,天王补心丹组表达水平则有明显回升。表明天王补心丹改善睡眠剥夺大鼠学习记忆可能通过升高抗炎因子EBI3、ERK5、PAK4表达,抑制促炎因子TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1分泌,发挥抗炎作用,推测涉及STAT、MEK5/ERK5/MAPK与

P13K/Akt/mTOR这3条信号通路。在此基础上,后期可以选择模型鼠的脑部海马区进行更加深入的炎症信号通路机制研究。

[参考文献]

- [1] LEGER D, DEBELLEMANIERE E, RABAT A, et al. Slow-wave sleep: from the cell to the clinic[J]. Sleep Med Rev, 2018, 41: 113-132.
- [2] 陈书丽. pCREB在小鼠REM睡眠剥夺模型中对海马PSD-95及炎症因子影响的研究[D]. 天津:天津医科大学, 2017.
- [3] KAM K, PETTIBONE W, SHIM K, et al. Dynamics of sleep spindles and coupling to slow oscillations following motor learning in adult mice[J]. Neurobiol Learn Mem, 2019, 166: 107100.
- [4] 吴东南, 丁瑞丛, 纪可, 等. 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺大鼠学习记忆及TLR4/NF- κ B信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 18-24.
- [5] 杨希茜. 天王补心丹加减治疗失眠疗效与安全性的Meta分析[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2017.
- [6] 谢光璟, 薄文集, 黄攀攀, 等. 天王补心丹对慢性睡眠剥夺模型大鼠心肌、下丘脑视交叉上核VIP、AVP表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 323-326.
- [7] 张泰, 杨楠, 康琳, 等. 天王补心丹的临床和药理研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(18): 2765-2769.
- [8] 谢光璟, 黄攀攀, 王平. 天王补心丹加减改善PCPA失眠大鼠Trx系统氧化损伤的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 32-38.
- [9] 闫立地. 养心安神药与重镇安神药对失眠大鼠睡眠时相影响的比较研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2008.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2006.
- [11] ZHANG Y, GRUBER R. Can slow-wave sleep enhancement improve memory? A review of current approaches and cognitive outcomes [J]. Yale J Biol Med, 2019, 92(1): 63-80.
- [12] LERNER I, GLUCK M. Individual differences in slow-wave-sleep predict acquisition of full cognitive maps [J]. Front Hum Neurosci, 2018, 12: 404.
- [13] VENANCIO D, SUCHECKI D. Prolonged REM sleep restriction induces metabolic syndrome-related changes: mediation by pro-inflammatory cytokines [J]. Brain Behav Immun, 2015, 47: 109-117.
- [14] 张曼, 戴建业, 唐乾利. 白背桐黄钻方调控失眠剥夺大鼠脑电活动、神经递质、炎症因子和氧化应激的促

- 眠机制研究[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(11): 2432-2435.
- [15] WILHELMSEN K, XU F, FARRAR K, et al. Extracellular signal-regulated kinase 5 promotes acute cellular and systemic inflammation [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(391): 86.
- [16] 韩书芝, 平芬, 李萍, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者单核细胞趋化蛋白-1水平的变化[J]. 中国全科医学, 2009, 12(20): 1844-1846.
- [17] 刘杰, 孙晗笑. 单核细胞趋化蛋白-1生物学特性及应用研究[J]. 生命的化学, 2006, 21(6): 464-467.
- [18] VAN DALFSEN J H, MARKUS C R. The influence of sleep on human hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity: a systematic review [J]. *Sleep Med Rev*, 2018, 39: 187-194.
- [19] NEMETH C L, NEIGH G N. Microemboli alter the acute stress response and cause prolonged expression of MCP-1 in the hippocampus [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2015, 54: 71-77.
- [20] 黄晓宇, 谢光璟, 黄攀攀. 天王补心丹加减干预睡眠剥夺大鼠能量代谢机制的生物信息学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20202239.
- [21] YUAN Y, WEI W, MING C, et al. Reward inhibits paraventricular CRH Neurons to relieve stress [J]. *Current Biology*, 2019, 29(7): 1243-1251.
- [22] 蒲博轩, 李欣颖, 张雯齐, 等. 铅暴露促进高脂饮食小鼠下丘脑炎症损伤[J]. 中国职业医学, 2019, 46(6): 655-661.
- [23] MA N, FANG Y, XU R, et al. EBI3 promotes T-and B-cell division and differentiation via STAT3 [J]. *Mol Immunol*, 2019, 107: 61-70.
- [24] 王贝, 黄娜. IL-27在T细胞中的作用机制[J]. 生命的化学, 2018, 38(1): 144-149
- [25] OHNESORGE N, VIEMANN D, SCHMIDT N, et al. Erk5 activation elicits a vasoprotective endothelial phenotype via induction of Kruppel-like factor 4 (KLF4) [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (34) : 26199-26210.
- [26] CLARK P, JENSEN T, KLUGER M, et al. MEK5 is activated by shear stress, activates ERK5 and induces KLF4 to modulate TNF responses in human dermal microvascular endothelial cells [J]. *Microcirculation*, 2011, 18(2): 102-117.
- [27] LI X, MINDEN A. PAK4 functions in tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced survival pathways by facilitating TRADD binding to the TNF receptor [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(50): 41192-41200.
- [28] 杨曦艳, 关晓楠, 赵文淑, 等. miR-214-5p靶向PAK4对缺血再灌注大鼠的心肌损伤和免疫反应的调节作用[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(3): 394-400.
- [29] LI Q, ZHANG X, WEI N, et al. p21-activated kinase 4 as a switch between Caspase-8 apoptosis and NF- κ B survival signals in response to TNF- α in hepatocarcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 3003-3010.

[责任编辑 孙丛丛]