

松郁安神方对失眠大鼠下丘脑生物钟基因表达及学习记忆能力的影响

王秀峰*, 张 瑜, 张一帆, 黄俊山

福建省中医药科学院基础研究所, 福建省中医睡眠医学重点实验室, 黄俊山全国名老中医药专家传承工作室, 福建 福州

收稿日期: 2025年4月25日; 录用日期: 2025年6月13日; 发布日期: 2025年6月30日

摘 要

目的: 观察松郁安神方对失眠大鼠下丘脑生物钟基因表达及学习记忆能力的影响。方法: 将40只雄性SD大鼠, 采用腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)建立失眠大鼠模型, 造模成功后随机分为模型组、松郁安神方(SYF)组、Luzindole (Luz)组、SYF + Luz组以及阿戈美拉汀组, 另设不造模的对照组, 每组8只。灌胃1次/d, 连续7d。大鼠空间学习记忆能力采用Morris水迷宫实验测试。下丘脑组织CLOCK和Per1蛋白表达水平采用Western Blotting实验检测。结果: 同模型组比较, SYF组和SYF + Luz组大鼠的体质量显著增加($P < 0.01$), SYF组大鼠的逃避潜伏期时间显著缩短($P < 0.01$), 跨越平台次数显著增加($P < 0.01$), SYF能够显著上调失眠大鼠下丘脑CLOCK蛋白表达($P < 0.01$), 下调Per1蛋白的表达($P < 0.01$)。同SYF组相比较, Luz组和SYF + Luz组大鼠的逃避潜伏期时间均显著延长($P < 0.01$), 跨越平台次数显著减少($P < 0.01$), Luz组和SYF + Luz组大鼠下丘脑CLOCK蛋白均被显著下调($P < 0.01$), Per1蛋白均被显著上调($P < 0.01$)。结论: 松郁安神方能够改善失眠大鼠的学习和记忆能力, 调节失眠大鼠下丘脑CLOCK和Per1蛋白表达变化, 恢复失眠大鼠的正常睡眠节律, 该作用可以被褪黑素受体拮抗剂阻断, 说明其机制可能与调控下丘脑褪黑素受体通路相关。

关键词

松郁安神方, 失眠, 生物钟基因, 学习记忆能力

The Effect of Songyu Anshen Prescription on the Expression of Biological Clock Genes and Learning and Memory Ability in the Hypothalamus of Insomniac Rats

Xiufeng Wang*, Yu Zhang, Yifan Zhang, Junshan Huang

*通讯作者。

文章引用: 王秀峰, 张瑜, 张一帆, 黄俊山. 松郁安神方对失眠大鼠下丘脑生物钟基因表达及学习记忆能力的影响[J]. 中医学, 2025, 14(6): 2577-2583. DOI: 10.12677/tcm.2025.146380

Institute of Basic Research, Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fujian Key Laboratory of Sleep Medicine of Traditional Chinese Medicine, The Inheritance Studio of National Famous Traditional Chinese Medicine Expert Huang Junshan, Fujian Fuzhou

Received: Apr. 25th, 2025; accepted: Jun. 13th, 2025; published: Jun. 30th, 2025

Abstract

Objective: To observe the effects of Songyu Anshen Prescription on the expression of biological clock genes and learning and memory abilities in the hypothalamus of rats with insomnia. **Method:** Forty male SD rats were used to establish the insomnia rat model by intraperitoneal injection of p-chlorophenylalanine (PCPA). After successful modeling, they were randomly divided into the model group, the Songyu Anshen Prescription (SYF) group, the Luzindole (Luz) group, the SYF + Luz group and the agomelatine group. Another control group without modeling was set up, with 8 rats in each group. They were gavaged once a day for 7 consecutive days. The spatial learning and memory ability of rats was tested by the Morris water maze experiment. The expression levels of CLOCK and Per1 proteins in hypothalamic tissues were detected by Western Blotting experiments. **Result:** Compared with the model group, the body weight of rats in the SYF group and the SYF + Luz group increased significantly ($P < 0.01$), the escape latency time of rats in the SYF group was significantly shortened ($P < 0.01$), and the number of platform crossings increased significantly ($P < 0.01$). SYF could significantly up-regulate the expression of CLOCK protein in the hypothalamus of insomniac rats ($P < 0.01$) and down-regulate the expression of Per1 protein ($P < 0.01$). Compared with the SYF group, the escape latency time of rats in both the Luz group and the SYF + Luz group was significantly prolonged ($P < 0.01$), the number of platform crossings was significantly reduced ($P < 0.01$), and the hypothalamic CLOCK protein of rats in both the Luz group and the SYF + Luz group was significantly down-regulated ($P < 0.01$). All Per1 proteins were significantly up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion:** Songyu Anshen Formula can improve the learning and memory abilities of insomniac rats, regulate the expression changes of CLOCK and Per1 proteins in the hypothalamus of insomniac rats, and restore the normal sleep rhythm of insomniac rats. This effect can be blocked by melatonin receptor antagonists, indicating that its mechanism may be related to the regulation of the hypothalamic melatonin receptor pathway.

Keywords

Songyu Anshen Prescription, Insomnia, Biological Clock Gene, Learning and Memory Ability

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

失眠作为睡眠障碍最主要的表现形式之一，影响患者的正常工作和生活，会给社会发展带来负面影响。近几年，我国失眠患者人数呈逐年增长趋势，其发病年龄亦趋于年轻化，失眠发生率高于国外发达国家[1][2]。中医药在失眠的临床治疗中具有一定优势。我们前期研究证实松郁安神方治疗失眠确有疗效，发现其机制与调节褪黑素水平相关[3]。本研究在课题组前期研究的基础上选取松郁安神方治疗失眠大鼠，探讨松郁安神方通过影响褪黑素受体途径调节失眠大鼠下丘脑生物钟基因表达及学习记忆能力的分子机制，为临床中医药诊治失眠症提供科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量(250 ± 10) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(许可证号: SCXK(沪) 20017-0005)。饲养于恒温、恒湿和 12 h:12 h 固定明暗节律的安静环境下, 自由摄取食物和水[4]。本研究所涉及动物实验, 经福建省中医药科学院实验动物福利伦理委员会批准(批准文号: FJATCM-IAEC2022031)。

2.1.2. 主要试剂

对氯苯丙氨酸(4-Chloro-DL-phenylalanine, PCPA) (C6506-25G) 购于 Sigma 公司。阿戈美拉汀片(批号: 131211003) 购于江苏豪森药业集团有限公司。Luzindole (货号: B6483) 购于美国 APEX BIO 生物科技有限公司。Per1(E-8) Mouse mAb (货号: sc-398890) 购于 SANTA CRUZ 公司。CLOCK (D45B10) Rabbit mAb (货号: #5157); GAPDH (14C10) Rabbit mAb (货号: #2118S); Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (货号: #7074S); Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (货号: #7076S) 购于 CST 公司。

2.1.3. 实验药物

松郁安神方药物组成: 甘松 10 g、郁金 15 g、玫瑰花 10 g、生龙骨 30 g、珍珠母 30 g、首乌藤 30 g、丹参 15 g、酸枣仁 15 g。购于鹭燕(福建)药业股份有限公司[4]。药物一次性煎煮, 分装后 -20°C 保存备用。大鼠用量为成人 6 倍(按体质量计算)剂量, 按 15 mL/kg 灌胃给药, 1 次/d, 给药时间 1 周[4]。

2.2. 治疗方法

2.2.1. 失眠大鼠模型的建立及分组

参考前期文献方法造模[4][5]: 给予实验大鼠连续腹腔注射 PCPA (300 mg/kg, 15 mL/kg) 2 d。造模成功后随机分为模型组、松郁安神方(SYF)组、Luzindole (Luz)组、SYF + Luz 组和阿戈美拉汀组, 每组 8 只。另设不参与造模的对照组实验大鼠 8 只。

2.2.2. 给药方法

SYF 组按 17 g/kg 灌胃给药, 1 次/d, 1 周[4]。阿戈美拉汀用量为 2.25 mg/kg, 灌胃给药, 1 次/天, 给药 1 周。Luz 组 1 mg/kg, 腹腔注射, 1 次/天, 给药 1 周。SYF + Luz 组用松郁安神方和 Luz 联合用药。对照组和模型组灌胃等容积生理盐水, 1 次/d, 1 周。

2.3. 检测指标与方法

2.3.1. 大鼠学习记忆能力测定

采用 Morris 水迷宫对大鼠进行定位航行和空间探索实验, 参照文献方法进行[6]。

2.3.2. 取材

大鼠称重后, 腹腔注射 1%戊巴比妥钠(45 mg/kg)进行麻醉。腹主动脉取血后, 迅速分离下丘脑组织, 置于液氮中保存[6]。

2.3.3. 大鼠下丘脑组织 CLOCK 和 Per1 蛋白表达检测

运用 Western Blotting 检测蛋白表达量。下丘脑组织经裂解、变性后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 封闭后分别上一抗 4°C 过夜, 二抗室温孵育 2 h, ECL 显色, 应用 Image J 进行分析[6]。

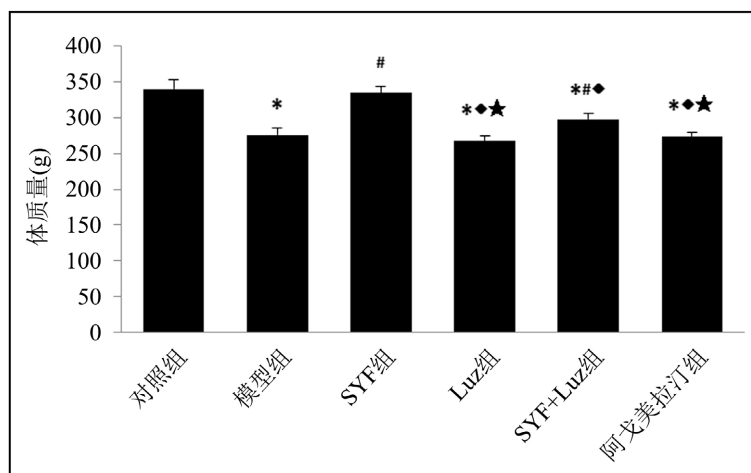
2.4. 统计学方法

采用 SPSS20.0 进行统计分析, 多组间比较使用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 具有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异显著, $P > 0.05$ 无统计学意义。

3. 结果

3.1. 实验药物对大鼠体质量的影响

对实验结束时各组大鼠的体质量进行统计分析, 结果如图 1 所示: 与对照组相比较, 模型组、Luz 组、SYF + Luz 组和阿戈美拉汀组大鼠的体质量均显著低于对照组($P < 0.01$)。与模型组比较, SYF 组和 SYF + Luz 组大鼠的体质量显著增加($P < 0.01$)。与 SYF 组相比较, Luz 组、SYF + Luz 组和阿戈美拉汀组大鼠的体质量均显著低于 SYF 组($P < 0.01$)。与 SYF + Luz 组相比较, Luz 组和阿戈美拉汀组大鼠的体质量均显著低于 SYF + Luz 组($P < 0.01$)。以上的实验结果表明, 失眠会引起大鼠体质量显著下降。而给予褪黑素受体抑制剂和阿戈美拉汀治疗的大鼠体质量也表现为显著下降。但是给予中药复方松郁安神方治疗失眠大鼠的体质量显著上升。表明松郁安神方在改善失眠引起的不良体征表现上具有一定优势。



注: 与对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.01$; 与 SYF 组比较: ◆ $P < 0.01$; 与 SYF + Luz 组比较: ★ $P < 0.01$

Figure 1. The effect of experimental drugs on the body weight of rats

图 1. 实验药物对大鼠体质量的影响

3.2. 实验药物对失眠大鼠学习记忆能力的影响

Morris 水迷宫实验检测结果如表 1 所示: 同对照组相比较, 模型组、Luz 组和 SYF + Luz 组大鼠的逃避潜伏期时间均显著延长($P < 0.01$), 跨越平台次数显著减少($P < 0.01$)。同模型组比较, SYF 组和阿戈美拉汀组大鼠的逃避潜伏期时间显著缩短($P < 0.01$), 跨越平台次数显著增加($P < 0.01$)。同 SYF 组相比较, Luz 组和 SYF + Luz 组大鼠的逃避潜伏期时间均显著延长($P < 0.01$)。Luz 组和 SYF + Luz 组大鼠跨越平台次数显著减少($P < 0.01$)。本实验结果表明, 失眠可以显著降低实验大鼠空间学习记忆能力。松郁安神方和阿戈美拉汀可以改善失眠引起的大鼠学习记忆能力下降, 该作用可以被褪黑素受体抑制剂阻断。

3.3. 实验药物对失眠大鼠下丘脑 CLOCK 和 Per1 蛋白表达的影响

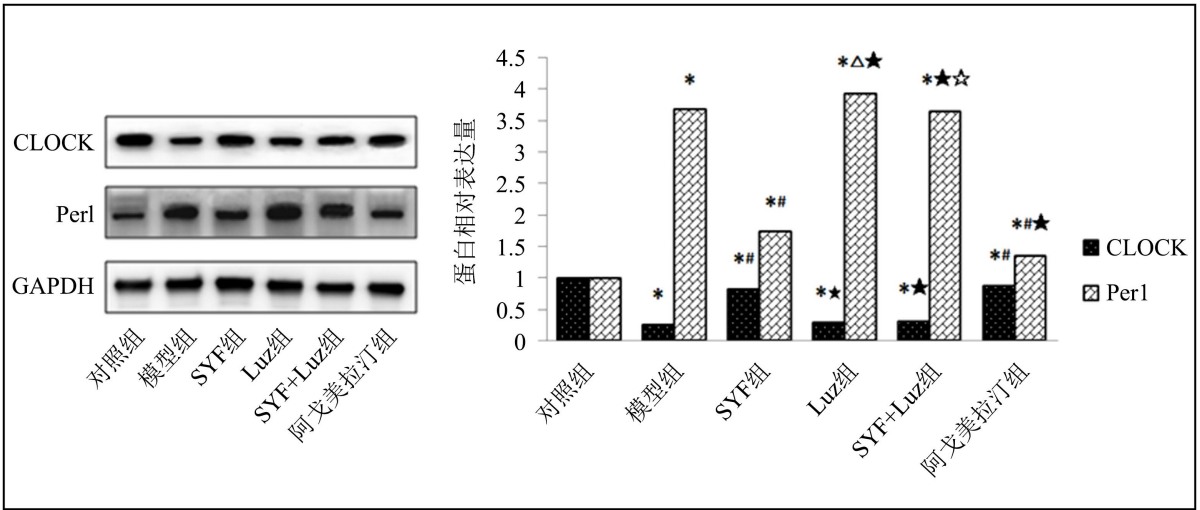
失眠会引起昼夜节律紊乱, 为了探索药物对失眠大鼠下丘脑时钟基因的影响, 我们运用 Western Blot-

ting 实验检测各组大鼠的下丘脑组织中时钟基因 CLOCK 和 Per1 的蛋白表达变化,检测结果如图 2 所示: 同对照组相比较, 模型组、Luz 组、SYF + Luz 组大鼠下丘脑 CLOCK 蛋白均被显著下调($P < 0.01$), Per1 蛋白均被显著上调($P < 0.01$)。同模型组比较, SYF 和阿戈美拉汀均能够显著上调失眠大鼠下丘脑 CLOCK 蛋白表达($P < 0.01$), 下调 Per1 蛋白的表达($P < 0.01$)。同 SYF 组相比较, Luz 组和 SYF + Luz 组大鼠下丘脑 CLOCK 蛋白均被显著下调($P < 0.01$), Per1 蛋白均被显著上调($P < 0.01$)。结果表明松郁安神方能够调节失眠大鼠下丘脑 CLOCK 和 Per1 蛋白表达变化, 其作用可以被褪黑素受体抑制剂阻断或降低。

Table 1. The influence of each medication group on the learning and memory ability of insomnia model rats
表 1. 各用药组对失眠模型大鼠学习记忆能力的影响

组别	例数	逃避潜伏(s)	跨越平台次数
对照组	8	10.92 ± 4.85	3.50 ± 1.31
模型组	8	45.42 ± 2.89 [*]	0.25 ± 0.46 [*]
SYF 组	8	18.03 ± 2.33 ^{▲◆}	3.38 ± 1.69 ^{▲▲}
Luz 组	8	47.10 ± 5.49 ^{★△}	0.63 ± 0.74 ^{★△}
SYF + Luz 组	8	40.18 ± 6.52 ^{★△}	0.50 ± 0.76 ^{★★△◆}
阿戈美拉汀组	8	11.86 ± 3.34 ^{▲◆}	2.75 ± 0.71 ^{▲△◆}

注: 与对照组比较: ^{*} $P < 0.01$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.01$, [★] $P < 0.05$; 与 SYF 组比较: [△] $P < 0.01$; 与 Luz 组比较: [◆] $P < 0.01$ 。



注: 与对照组比较: ^{*} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$, [△] $P < 0.05$; 与 SYF 组比较: [★] $P < 0.01$; 与 Luz 组比较: [★] $P < 0.05$ 。

Figure 2. The expression changes of CLOCK and Per1 proteins in the hypothalamus of rats in each experimental group
图 2. 各实验组大鼠下丘脑 CLOCK 和 Per1 蛋白表达变化

4. 讨论

失眠是一个全球性的公共问题, 长期失眠与多种疾病相关, 同时增加了患者和社会的经济负担。如果能够解决或缓解失眠引起的症状, 保证人们日常的生产和生活, 具有重要意义。

睡眠和觉醒是由生物钟基因调控的。褪黑素是一种具有明显昼夜节律的神经内分泌激素,在调控昼夜节律中起到重要作用[7]。在失眠的临床治疗中,褪黑素被广泛应用,有助于患者恢复正常昼夜节律[8]。褪黑素通过与其受体结合发挥生理功能,褪黑素受体可广泛地存在于人体的下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)、下丘脑前体以及垂体中。其中 SCN 是褪黑素受体最为集中的区域之一[9]。课题组前期研究及本研究也发现松郁安神方能够调节褪黑素的合成释放恢复失眠大鼠正常睡眠节律状态。

昼夜节律是最普遍的一种节律变化,哺乳动物的昼夜节律主要的控制中枢在 SCN, SCN 主导昼夜节律的产生、维持和调控[10]。昼夜节律系统参与睡眠觉醒周期,代谢,炎症反应等生理过程,周期大约 24 h [11]。昼夜节律的发生和变化受到核心生物钟基因调控,包括 CLOCK、BMAL1、PER 以及 CRY 基因[12]。其中, CLOCK 和 PER 基因是最核心的两个生物钟基因。另外,钟控基因还包括 Rev-Erb α 、ROR α 、dbp 等[13],协同核心生物钟基因一起参与了昼夜节律的调控。昼夜节律维持在 24 h 主要是靠生物钟的转录翻译负反馈环路(Transcription-Translation Feedback Loop, TTFL)机制调控[14]。本研究结果显示松郁安神方能够显著调节失眠大鼠下丘脑 CLOCK 和 Per1 蛋白表达变化($P < 0.01$),其作用可以被褪黑素受体抑制剂阻断或降低。

睡眠与学习记忆能力密切相关,足够的睡眠时间可以巩固和增强学习和记忆能力[15]。有文献报道,人体睡眠时间不足会损伤学习和记忆能力,睡眠障碍的人群,其反应速度、学习能力和准确记忆均显著性下降[16][17]。还有研究发现,每天晚上睡眠时间不足或超过 7~8 h 的人群中,大约有一半人数会表现出认知能力下降[18]。本研究发现,失眠显著影响实验大鼠空间学习和记忆能力,使得大鼠的该能力减弱($P < 0.01$)。松郁安神方和阿戈美拉汀可以显著改善失眠引起的大鼠空间学习和记忆能力下降($P < 0.01$),该作用可以被褪黑素受体抑制剂阻断。

5. 结论

综上所述,松郁安神方能够改善失眠大鼠的学习和记忆能力,调节失眠大鼠下丘脑 CLOCK 和 Per1 蛋白表达变化,恢复失眠大鼠的正常睡眠节律,其机制可能与调控下丘脑褪黑素受体通路相关。关于松郁安神方如何调控褪黑素受体发挥作用,还有待进一步深入研究。

基金项目

国家自然科学基金项目(81774285);福建省科技厅省属公益类科研院所基本科研专项(2022R1003001)。

参考文献

- [1] 赵运浩, 罗娴. 失眠的流行病学及发病机制研究进展[J]. 中国临床医生杂志, 2023, 51(12): 1397-1401.
- [2] 郝雅楠, 吴晓青. 中青年失眠的流行病学及发病机制研究进展[J]. 中国疗养医学, 2023, 32(5): 481-485.
- [3] 张一帆, 李星, 张瑜, 李璟怡, 王秀峰, 曾雪爱, 张娅, 黄俊山. 松郁安神方对肝郁证失眠大鼠机体褪黑素水平的影响[J]. 世界睡眠医学杂志, 2020, 7(3): 548-551.
- [4] 王秀峰, 张瑜, 张一帆, 黄俊山. 松郁安神方联合阿普唑仑对失眠大鼠基底核多巴胺受体和 γ -氨基丁酸受体的影响[J]. 世界睡眠医学杂志, 2023, 10(11): 2736-2739.
- [5] 全世建, 林杏娥, 刘妮. PCPA 大鼠失眠模型的证候属性研究[J]. 中医药学刊, 2006(3): 450-451.
- [6] 李星, 王秀峰, 张瑜, 曾雪爱, 张一帆. 睡眠剥夺对抑郁模型大鼠海马盐皮质激素受体的影响及其机制的探讨[J]. 中医学, 2020, 9(2): 217-224.
- [7] McCarthy, R., Jungheim, E.S., Fay, J.C., Bates, K., Herzog, E.D. and England, S.K. (2019) Riding the Rhythm of Melatonin through Pregnancy to Deliver on Time. *Frontiers in Endocrinology*, **10**, Article No. 616. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00616>
- [8] Zhang, W., Chen, X., Su, S., Jia, Q., Ding, T., Zhu, Z., et al. (2015) Exogenous Melatonin for Sleep Disorders in Neu-

- rodegenerative Diseases: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Neurological Sciences*, **37**, 57-65. <https://doi.org/10.1007/s10072-015-2357-0>
- [9] 李响, 马芙蓉, 李嘉伦, 李健成, 刘锦宇. 褪黑素和褪黑素受体对下丘脑-垂体-肾上腺轴作用的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(1): 197-200.
- [10] 徐晴, 付波, 杨丹凤, 彭晖. 昼夜节律紊乱的小分子调节剂研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(1): 1-7.
- [11] Harvey, J.R.M., Plante, A.E. and Meredith, A.L. (2020) Ion Channels Controlling Circadian Rhythms in Suprachiasmatic Nucleus Excitability. *Physiological Reviews*, **100**, 1415-1454. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2019>
- [12] Videnovic, A., Lazar, A.S., Barker, R.A. and Overeem, S. (2014) “The Clocks That Time Us”—Circadian Rhythms in Neurodegenerative Disorders. *Nature Reviews Neurology*, **10**, 683-693. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.206>
- [13] 邢陈, 宋伦. 昼夜节律产生和维持的调控系统[J]. 军事医学, 2017, 41(8): 698-702.
- [14] 周晓红, 李柏村, 李佳, 彭锐. 从肝论治取穴针灸治疗膝骨关节炎模型大鼠关节功能与昼夜节律的关系[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(14): 2192-2198.
- [15] Fenn, K.M. and Hambrick, D.Z. (2012) Individual Differences in Working Memory Capacity Predict Sleep-Dependent Memory Consolidation. *Journal of Experimental Psychology: General*, **141**, 404-410. <https://doi.org/10.1037/a0025268>
- [16] Kaplan, J., Ventura, J., Bakshi, A., Pierobon, A., Lackner, J.R. and DiZio, P. (2017) The Influence of Sleep Deprivation and Oscillating Motion on Sleepiness, Motion Sickness, and Cognitive and Motor Performance. *Autonomic Neuroscience*, **202**, 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.08.019>
- [17] Lim, J. and Dinges, D.F. (2010) A Meta-Analysis of the Impact of Short-Term Sleep Deprivation on Cognitive Variables. *Psychological Bulletin*, **136**, 375-389. <https://doi.org/10.1037/a0018883>
- [18] Wild, C.J., Nichols, E.S., Battista, M.E., Stojanoski, B. and Owen, A.M. (2018) Dissociable Effects of Self-Reported Daily Sleep Duration on High-Level Cognitive Abilities. *Sleep*, **41**, zsy182. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsy182>