

坤泰胶囊对初老雌性小鼠的戊巴比妥钠睡眠增强作用及其机制研究

岳小芳¹, 李帅帅², 刘杰³, 范坤^{1*}

1. 上海交通大学附属第六人民医院东院, 上海 201306

2. 中国科学院神经科学研究所, 上海 200031

3. 同济大学附属东方医院, 上海 200120

摘要: 目的 评价坤泰胶囊对初老雌性小鼠戊巴比妥钠催眠作用的影响及其促睡眠机制。方法 采用翻正反射试验考察坤泰胶囊 0.8 g/kg 对阈剂量戊巴比妥钠诱导的小鼠入睡潜伏期和睡眠时间的影响; 采用 RT-PCR 技术检测坤泰胶囊 0.8 g/kg 对盐诱导激酶 3 (Sik3) 和 G 蛋白偶联雌激素受体 (Gper1) 基因 mRNA 在不同睡眠状态下表达情况的影响。结果 坤泰胶囊 0.8 g/kg 可以显著延长阈剂量戊巴比妥钠诱导小鼠的睡眠时间 ($P < 0.05$), 缩短睡眠潜伏期 ($P < 0.05$); 坤泰胶囊 0.8 g/kg 可升高视前区内 Sik3 mRNA 在 6 h 急性睡眠剥夺后的表达 ($P < 0.05$)。坤泰胶囊 0.8 g/kg 可一致性地降低大脑视前区和腹侧纹状体以及卵巢内 Gper1 mRNA 的表达, 坤泰胶囊睡眠剥夺组显著降低腹侧纹状体和卵巢的雌激素受体基因 Gper1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。结论 坤泰胶囊可增强初老雌性小鼠的戊巴比妥钠催眠作用, 其睡眠改善功效可能是通过提高 Sik3 和降低 Gper1 的表达而发挥作用。

关键词: 坤泰胶囊; 戊巴比妥钠; 睡眠剥夺; Sik3; Gper1

中图分类号: R966; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)03-0433-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.03.008

Potentiating effect of Kuntai Capsules on sleep induced by pentobarbital sodium in primary and old female mice and its mechanism

YUE Xiao-fang¹, LI Shuai-shuai², LIU Jie³, FAN Kun¹

1. East Hospital of the Sixth Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201306, China

2. Institute of Neuroscience, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

3. East Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China

Abstract: Objective To study the effect of Kuntai Capsules on sleep induced by pentobarbital sodium in primary and old female mice and its mechanism. **Methods** The effect of Kuntai Capsules 0.8 g/kg on latency to persistent sleep and sleep time induced by pentobarbital sodium at threshold dose in mice and its possible mechanism by righting reflection test. The effect of Kuntai Capsules 0.8 g/kg on expression of Sik3 and Gper1 mRNA in different sleep states were detected by RT-PCR method. **Results** Kuntai Capsules 0.8 g/kg could significantly prolong sleep time induced by pentobarbital sodium at threshold dose in mice ($P < 0.05$), and decrease sleep latency ($P < 0.05$). Kuntai Capsules 0.8 g/kg could increase the expression of Sik3 mRNA in preoptic area after 6 h of acute sleep deprivation ($P < 0.05$). Kuntai Capsules 0.8 g/kg could coincidentally decrease the expression of Gper1 mRNA in preoptic area, ventral striatum, and ovary. Kuntai Capsules sleep-deprived group could significantly decrease the expression of Gper1 mRNA in ventral striatum and ovary ($P < 0.05$). **Conclusion** Kuntai Capsules can increase sleep induced by pentobarbital sodium in primary and old female mice, and the sleep improvement effect is likely mediated by upregulating Sik3 and downregulating Gper1 mRNA expression.

Key words: Kuntai Capsules; pentobarbital sodium; sleep deprivation; Sik3; Gper1

围绝经期卵巢功能衰退引起雌激素水平波动或下降, 导致内分泌和自主神经系统功能紊乱, 产生一系列严重影响患者健康和生活质量的症状, 其中失眠症状较为突出, 占 37%~74.4%, 显著高于绝

收稿日期: 2019-11-02

作者简介: 岳小芳, 女, 主治医师, 研究方向睡眠机制。E-mail: 249167658@qq.com

*通信作者 范坤, 主治医师。E-mail: fankunmazui@hotmail.com

经前^[1-4]。睡眠不足可损害大脑和心血管系统,导致免疫力降低,情感障碍等,加剧远期风险,严重影响女性生命后期生活质量^[5-8]。研究显示围绝经期激素替代疗法(HRT)在短期内会增加静脉栓塞、乳腺癌等患病几率^[9-11],因此不被广泛接受。坤泰胶囊源自张仲景《伤寒论》中的“黄连阿胶汤”,主要功效为滋阴清热、安神除烦。现代研究显示坤泰胶囊具有保护卵巢功能^[12-14]、调节神经内分泌平衡^[15]、改善围绝经期失眠症状^[16-18]的作用。本研究通过观察自然衰老雌性小鼠戊巴比妥钠所致睡眠时间的变化,并检测脑内盐诱导激酶 3(Sik3)和 G 蛋白偶联雌激素受体(Gper1)的表达情况,探讨坤泰胶囊改善围绝经期失眠症状的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物

12 月龄 SPF 级 C57BL/6/Bkl 雌性小鼠,体质量 20~35 g,动物使用许可证号 SYXK(沪)2014-0029,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。动物饲养在温度 21~23 °C,相对湿度 50%~60%,明暗周期为 12 h(7:00 开灯,19:00 关灯)的环境中,可自由进食和进水。

1.2 药物与试剂

坤泰胶囊,由贵阳新天药业股份有限公司提供,规格 0.5 g/粒,产品批号 181127;地西洋片,由上海药信谊药厂有限公司提供,2.5 mg/片,产品批号 14180401;戊巴比妥钠由 Merck 公司提供;qPCR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 对阈剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间的影响

适应性饲养 1 周后,取 21 只小鼠随机分为 3 组,分别为对照组、地西洋组、坤泰胶囊组,每组 7 只。对照组和地西洋组用双蒸水、坤泰胶囊组用坤泰胶囊 ig 两周(每天在 7:00~7:30 操作),于第 15 天分别给予双蒸水、地西洋 4 mg/kg^[19-20]或坤泰胶囊 0.8 g/kg^[12-13, 21-22],并在 1 h 后 ip 阈剂量戊巴比妥钠 50 mg/kg,记录翻正反射消失的时间和消失的持续时间,即睡眠潜伏期和睡眠时间。给药容量为 0.1 mL/10 g,均用双蒸水在使用前配制。

1.4 脑和卵巢组织的制备

另取 16 只小鼠随机分为对照组、夺眠组、坤泰睡眠组、坤泰夺眠组,每组 4 只。ig 双蒸水或坤泰胶囊 0.8 g/kg 2 周,两组夺眠动物于第 15 天进行为期 6 h(7:00~13:00)的急性睡眠剥夺,并在 12:30~13:30 收集所有动物大脑的视前区、腹侧下丘

脑及卵巢,迅速放入液氮,之后转入-80 °C 冻存。

1.5 RNA 的提取和反转录

将冻存的样品迅速研磨破碎,用 RNA 抽提试剂盒(Qiagen,批号 74104)提取样品的总 RNA。采用 4 代反转录试剂盒(Invitrogen)对总 RNA 进行反转录合成 cDNA,编号后置于-20 °C 保存备用。

1.6 实时荧光定量 PCR

根据 Sik3 和 Gper1 两个基因序列和内参基因 Rpl27a(NM_011975.3)设计荧光定量 PCR 引物,引物序列见表 1。以每个个体的大脑和卵巢组织 cDNA 为模板,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 ik3 和 Gper1 基因在大脑和卵巢组织中的相对表达量。试验重复 3 次。反应体系为 10 μL:SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞公司,货号 Q511-02)5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.25 μL,cDNA 模板(10 ng RNA 上样量)+ddH₂O 4.5 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C、5 s,退火温度(T_m)10 s,40 个循环;熔解曲线分析:95 °C、1 min,55 °C、1 min,然后以 0.5 °C/10 s 的速率从 65 °C 缓慢递增到 95 °C。反应在 QuantStudio™ 6 Flex 实时荧光定量 PCR 系统(Applied Biosystems)上进行。

表 1 内参和目的基因的引物序列

Table 1 Primer sequences involved in the genes of interest

基因	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
<i>Rpl27a</i>	F: TATCACCCAGGTTACTTTGGGA	100
	R: ATGTCCACAGTTTATCCAGGTTG	
<i>Sik3</i>	F: GCCATCCACACATCATCAGAC	102
	R: CCAAGTGGTCAAATATCTCCCC	
<i>Gper1</i>	F: ATGGATGCGACTACTCCAGC	179
	R: AAGAGGGCAATCACGTAAGTC	

1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 One-way ANOVA 分析,进一步两两比较采用 Tukey's test 方法分析。

2 结果

2.1 坤泰胶囊对阈剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间的影响

与对照组相比,坤泰胶囊 0.8 g/kg 可以显著延长阈剂量戊巴比妥钠诱导小鼠的睡眠时间($P < 0.05$),缩短睡眠潜伏期($P < 0.05$),见表 2。

表 2 坤泰胶囊对阈剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Table 2 Effect of Kuntai Capsules on sleep time of mice induced by threshold dose of pentobarbital sodium ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/mg kg ⁻¹	睡眠时间/min	睡眠潜伏期/min
对照	—	38.14 ± 25.10	7.00 ± 2.00
地西洋	4	120.00 ± 24.98**	1.14 ± 0.38**
坤泰胶囊	800	72.71 ± 23.01*	5.14 ± 0.90*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.2 坤泰胶囊对 Sik3 mRNA 相对表达量的影响

对初老小鼠进行 6 h 急性睡眠剥夺不影响 Sik3 mRNA 的表达, 同时坤泰胶囊预处理在生理睡眠状态下也不影响大脑视前区和腹侧纹状体 Sik3 mRNA 的表达, 但在 6 h 急性夺眠后, 与夺眠组和坤泰胶囊睡眠组比较, 坤泰胶囊夺眠组视前区的 Sik3 mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 腹侧纹状体内则有升高趋势, 见表 3。

表 3 坤泰胶囊对 Sik3 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Table 3 Effect of Kuntai Capsules on relative expression of Sik3 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(g kg ⁻¹)	Sik3	
		视前区	腹侧纹状体
对照	—	1.00 ± 0.05	1.02 ± 0.26
夺眠	—	1.08 ± 0.13	1.22 ± 0.27
坤泰胶囊睡眠	0.8	1.00 ± 0.15	1.19 ± 0.25
坤泰胶囊夺眠	0.8	1.32 ± 0.06*##	1.40 ± 0.31

与夺眠组比较: * $P < 0.05$; 与坤泰胶囊睡眠组比较: ## $P < 0.01$ * $P < 0.05$ vs sleep-deprived group; ## $P < 0.01$ vs normal sleep Kuntai Capsules group

2.3 坤泰胶囊对 Gper1 mRNA 相对表达量的影响

坤泰胶囊预处理一致性地降低视前区、腹侧纹状体和卵巢的雌激素受体基因 Gper1 mRNA 的表达, 并在睡眠剥夺情况下进一步降低, 与夺眠组比较, 坤泰胶囊夺眠组显著降低腹侧纹状体和卵巢的雌激素受体基因 Gper1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。见表 4。

3 讨论

早期的损毁实验显示睡眠的产生与下丘脑前部、视前区、基底前脑相关^[23], 因此本实验选取视前区和腹侧纹状体这两个脑区来考察坤泰胶囊预处理在生理睡眠和急性睡眠剥夺状态下对睡眠基因

表 4 坤泰胶囊对 Gper1 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Table 4 Effect of Kuntai Capsules on relative expression of Gper1 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(g kg ⁻¹)	Gper1		
		视前区	腹侧纹状体	卵巢
对照	—	1.0 ± 0.39	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.14
夺眠	—	1.31 ± 1.09	1.64 ± 1.08	1.23 ± 0.76
坤泰胶囊睡眠	0.8	0.78 ± 0.22	0.50 ± 0.19	0.16 ± 0.07*
坤泰胶囊夺眠	0.8	0.34 ± 0.07	0.28 ± 0.35*	0.16 ± 0.02*

与夺眠组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs sleep-deprived group

Sik3 和雌激素受体基因 Gper1 mRNA 表达量的影响。结果显示坤泰胶囊预处理可延长戊巴比妥钠睡眠时间, 缩短睡眠潜伏期, 并在睡眠剥夺情况下上调 12 月龄类围绝经期雌性小鼠脑内视前区的非快眼动睡眠基因 Sik3 mRNA 的表达, 下调膜结合 G 蛋白偶联雌激素受体基因 Gper1 mRNA 的表达; 且坤泰胶囊对卵巢 Gper1 mRNA 水平的调节方向与脑内视前区一致。

睡眠剥夺引起大脑蛋白质组的累积磷酸化, 可随着睡眠进程而消失。SIK3 调节位点在睡眠剥夺时发生磷酸化, 且抑制 SIK3 减少了睡眠恢复期非快眼动睡眠中的慢波活动, 表明 SIK3 在睡眠量和睡眠需求的稳态调节中发挥作用^[24-25]。坤泰胶囊在睡眠剥夺情况下提高 SIK3 的表达水平, 表明其有利于睡眠内稳态的修复, 提高了机体对急性睡眠缺失的耐受性。SIK3 是丝氨酸/苏氨酸激酶成员, 属于 AMPK 家族, 同时还是能量传感器, 调节脊椎动物和无脊椎动物新陈代谢的各个方面。沉默或抑制脂肪细胞内的 SIK3, 可引起 HDAC 4 和 PKB/AKT 磷酸化降低, 质膜 GLUT 4 减少, 脂肪细胞基础葡萄糖和胰岛素刺激的葡萄糖摄取降低, 从而推测, 提高 SIK3 水平可能促进葡萄糖的代谢。

雌激素及其受体网络也是脑神经回路生物能量系统的重要调节因子, 可促进葡萄糖转运、葡萄糖代谢、线粒体呼吸和 ATP 生产^[26]。觉醒期 ATP 释放能量, 进一步代谢分解为腺苷, 而腺苷是目前公认的内源性睡眠内稳态调节物质。围绝经期雌激素受体网络与大脑生物能量系统脱离, 出现与神经功能障碍相关的代谢低下状态^[26], 从而可能导致腺苷产生不足, 使得睡眠缺失后无法完全恢复。雌激素经受体介导激活胞内信使和 cAMP 反应元件结合

蛋白 (CREB), 从而促进基因转录。雌激素受体包括 3 种亚型, ER α 、ER β 和 GPER。各种亚型的占比及对雌激素的敏感性随着年龄的变化而变化, 并可影响雌激素信号通路, 如海马 ER α 水平和反应性的降低可能导致认知损害和痴呆症; 在老化过程中, 尽管 ER β 对 E2 仍然有反应, 但它无法代偿 ER α 的缺失。因此, GPER1 亚型表达水平的改变可影响其他两种受体亚型的占比, 从而使雌激素信号发生变化。为探索 GPER 在其中的具体作用, 还需要进一步借用更客观、直接的脑电波记录技术、药理学方法/基因操控方法来进行研究。

综上所述, 坤泰胶囊可增强初老雌性小鼠的戊巴比妥钠催眠作用, 其睡眠改善功效可能是通过提高睡眠因子 SIK3 和降低雌激素受体 GPER1 的表达而发挥作用。

参考文献

- [1] 全国围绝经期妇女健康调查协作组. 妇女更年期症状及有关因素的调查分析 [J]. 中华医学杂志, 1991, 71(10): 585-587.
- [2] Pan H A, Wu M H, Hsu C C, *et al.* The perception of menopause among women in Taiwan [J]. *Maturitas*, 2002, 41(4): 269-274.
- [3] Huang K E. Menopause perspectives and treatment of Asian women [J]. *Semin Reprod Med*, 2010, 28(5): 396-403.
- [4] Baker F C, De Zambotti M, Colrain I M, *et al.* Sleep problems during the menopausal transition: prevalence, impact, and management challenges [J]. *Nat Sci Sleep*, 2018, 10: 73-95.
- [5] Dominguez F, Fuster V, Fernandez-Alvira J M, *et al.* Association of sleep duration and quality with Subclinical atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(2): 134-144.
- [6] Cheng W, Rolls E T, Ruan H, *et al.* Functional connectivities in the brain that mediate the association between depressive problems and sleep quality [J]. *JAMA Psychiatry*, 2018, 75(10): 1052-1061.
- [7] Cope T E, Rittman T, Borchert R J, *et al.* Tau burden and the functional connectome in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy [J]. *Brain*, 2018, 141(2): 550-567.
- [8] Besedovsky L, Lange T, Haack M. The sleep-immune crosstalk in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(3): 1325-1380.
- [9] Santen R J. Menopausal hormone therapy and breast cancer [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 142: 52-61.
- [10] 陈 蓉. 对围绝经期妇女心血管疾病危险的处理: 欧洲心脏病医生与妇科医生的一项共识声明 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2008, 2(5): 510-528.
- [11] Wang Y, Yang X, Li X, *et al.* Knowledge and personal use of menopausal hormone therapy among Chinese obstetrician-gynecologists: results of a survey [J]. *Menopause*, 2014, 21(11): 1190-1196.
- [12] Zhang J, Fang L, Shi L, *et al.* Protective effects and mechanisms investigation of Kuntai capsule on the ovarian function of a novel model with accelerated aging ovaries [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 173-181.
- [13] Zhang B, Chu N, Qiu X M, *et al.* Effects of Heyan Kuntai Capsule on follicular development and oocyte cohesin levels in aged mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(10): 768-776.
- [14] 徐文君, 高 慧, 李 杨, 等. 和颜坤泰胶囊对卵巢早衰大鼠性激素水平和 VEGF、bFGF mRNA 表达的影响 [J]. 重庆医学, 2017, 46(6): 738-741.
- [15] 张青霞, 张德芹, 黄春丽, 等. 和颜坤泰胶囊对初老大鼠神经递质的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2016, 35(3): 173-175.
- [16] 李军振. 坤泰胶囊治疗女性更年期失眠且伴有焦虑及抑郁的临床分析 [J]. 世界睡眠医学杂志, 2019, 6(1): 63-64.
- [17] 汪福媛. 坤泰胶囊治疗女性更年期失眠且伴有焦虑及抑郁的临床价值研究 [J]. 实用妇科内分泌杂志: 电子版, 2018, 5(27): 82-83.
- [18] 史党民, 孙国珍. 坤泰胶囊治疗女性更年期失眠伴有焦虑及抑郁的临床观察 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3531-3533.
- [19] Flaishon R, Halpern P, Sorkine P, *et al.* Cross-sensitivity between isoflurane and diazepam: evidence from a bidirectional tolerance study in mice [J]. *Brain Res*, 1999, 815(2): 287-293.
- [20] 张 睿, 李廷利, 陈宏昌, 等. 刺五加叶茶调节戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间的影响 [J]. 黑龙江中医药 2015, 44(1): 52-53.
- [21] Zhang H, Qin F, Liu A, *et al.* Kuntai capsule attenuates premature ovarian failure through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 239: 111885.
- [22] 陈淑萍, 孙玉英, 谈 勇. 坤泰胶囊对卵巢储备功能下降大鼠的影响 [J]. 中成药, 2019, 41(9): 2229-2232.

- [23] Jones B E. Principal cell types of sleep-wake regulatory circuits [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2017, 44: 101-109.
- [24] Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, *et al.* Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice [J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 378-383.
- [25] Wang Z, Ma J, Miyoshi C, *et al.* Quantitative phosphoproteomic analysis of the molecular substrates of sleep need [J]. *Nature*, 2018, 558(7710): 435-439.
- [26] DiNuzzo M, Nedergaard M. Brain energetics during the sleep-wake cycle [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2017, 47: 65-72