

酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺小鼠肝功能和特定肠道菌的影响

任晓宇, 李廷利*

黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 从肠道菌群角度探讨酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺小鼠肝功能的影响。方法 C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组、模型组和酸枣仁汤组。采用强迫运动睡眠剥夺法建立 14 d 的慢性睡眠剥夺模型, 酸枣仁汤组在睡眠剥夺同时给予酸枣仁汤, 对照组正常饲养, 不作处理。观察造模前后小鼠体质量和摄食量变化; 收集粪便样本, 提取粪便基因组 DNA, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测特定肠道菌的差异; 同时收集血清样本, 试剂盒检测丙氨酸转氨酶 (ALT) 和总胆红素 (TBIL) 的活性, 进而指示各组肝功能的改变。结果 与对照组比较, 模型组小鼠的摄食量显著增加 ($P < 0.05$), 体质量显著下降 ($P < 0.05$), 给予酸枣仁汤显著增加睡眠剥夺小鼠的进食量 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 睡眠剥夺小鼠的 TBIL 结果未见明显差异; 而模型组 ALT 明显升高 ($P < 0.05$), 同时给予酸枣仁汤可逆转 ALT 的升高 ($P < 0.05$)。qRT-PCR 结果显示, 模型组小鼠粪便中大肠杆菌属和产气荚膜梭菌与对照组比较显著增加 ($P < 0.05$), 而双歧杆菌属、罗氏菌属、乳酸菌属与对照组比较显著降低 ($P < 0.05$)。同时给药可以逆转特定肠道菌大肠杆菌属、产气荚膜梭菌和乳酸菌属的变化 ($P < 0.05$), 对双歧杆菌属、罗氏菌属没有显著影响。睡眠剥夺小鼠粪便拟杆菌门/厚壁菌门比有下降趋势, 酸枣仁汤组该趋势升高, 没有显著性差异。结论 酸枣仁汤可能通过改善肠道菌群, 缓解慢性睡眠剥夺导致的肝损伤。

关键词: 酸枣仁汤; 睡眠剥夺; 肝损伤; 肠道菌; 大肠杆菌属; 产气荚膜梭菌; 双歧杆菌属; 罗氏菌属; 乳酸菌属

中图分类号: R285.5, R289 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 02-0226-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.009

Effect of Suan-Zao-Ren Decoction on liver function and specific gut microbiota in mice with chronic sleep deprivation

REN Xiaoyu, LI Tingli

School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Suan-Zao-Ren Decoction (SZRD) on liver function in mice with chronic sleep deprivation from the perspective of gut microbiota. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: control group, model group, SZRD group. A 14-day chronic sleep deprivation model was established by using the forced exercise sleep deprivation method. SZRD was given once a day during the 14-day sleep deprivation. The changes of body weight and food intake of mice before and after modeling was observed. Fresh fecal samples were collected for each mouse at the end of the experiment. Fecal genomic DNA was extracted to analyze the gut microbiota by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). Serum samples were collected, and the activity of ALT and TBIL indicating changes in liver function were detected. **Results** The average food intake of all sleep-deprived mice was significantly increased ($P < 0.05$), while the weight has no obvious increase ($P < 0.05$) compared to the control mice. SZRD treatment further increased the food intake of sleep-deprived mice ($P < 0.05$). Compared with control group, there was no significant difference in TBIL activity in sleep-deprived mice. ALT activity was significantly increased in model group ($P < 0.05$), and SZRD treatment reversed the increase in ALT activity ($P < 0.05$). qPCR results showed that *E. coli* and *Clostridium perfringens* in the feces of model group were significantly increased compared with the control group ($P < 0.05$), while *Bifidobacteria*, *Roseburia* and *Lactobacillus* were significantly decreased ($P < 0.05$). Meanwhile, SZRD treatment reversed the changes of *E. coli*, *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus* ($P < 0.05$), but had no effect on the changes of *Bifidobacteria* and *Roseburia*. The ratio of Bacteroidetes to Firmicutes in the feces of sleep-deprived mice decreased, SZRD treatment increased it. And

收稿日期: 2019-09-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81274114)

第一作者: 任晓宇, 在读博士, 研究方向为中药药理学。Tel: 18817939697 E-mail: renxiaoyu8346@163.com

*通信作者: 李廷利, 博士, 教授, 研究方向为中药药理学。Tel: 13804527211 E-mail: 13804527211@126.com

the changes had no statistical significance. **Conclusion** SZRD can alleviate liver injury caused by chronic sleep deprivation by improving gut microbiota.

Key words: Suan-Zao-Ren decoction; sleep deprivation; liver injury; specific gut microbiota; *Escherichia coli*; *Clostridium perfringens*; *Bifidobacterium*; *rhodobacteria*; *Lactobacillus*

睡眠是恢复精力体力所必需的生理活动,与人类的高级思维、学习记忆密不可分,充足的睡眠是人类敏捷思维及疾病预防的保证。睡眠剥夺是指各种原因所导致的睡眠减少或睡眠时间严重不足,是由于生理、病理因素或环境的影响而丧失了所需睡眠量的状态。睡眠剥夺可导致机体认知功能及身体机能的损害,包括肝损伤,可以通过对丙氨酸转氨酶(ALT)和总胆红素(TBIL)等生化指标的检测来确定^[1-2]。近年来也有研究表明,不同的睡眠剥夺方法和强度可导致肠道菌群发生不同程度的改变^[3-9]。

酸枣仁汤源于《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治第六》,原名酸枣汤,《医门法律》卷6始称之为酸枣仁汤,主治虚劳病不得眠,方证病机虽与心、肝二脏有关,但病变核心在肝。该方具有养血安神、清热除烦之效。现代医学研究已表明酸枣仁汤在抗焦虑、镇静催眠和抗惊厥等方面的作用明显,尤其被广泛地用于慢性肝炎导致的睡眠障碍的治疗^[10-15]。近年来,从肠道菌群改变的角度去诠释中药的作用机制成为新的热点。然而对于酸枣仁汤而言,该领域的探究尚属空白。肠道菌群是否可以帮助我们解开诸多疑问?《医门法律》所谈“虚劳不得眠,病变核心在肝”又是否存在一定的依据?如果存在,酸枣仁汤是否是通过改善肠道菌群来逆转“虚劳不眠”对于肝脏的损伤呢?

本研究以C57BL/6小鼠作为研究对象,拟从睡眠剥夺与肝脏炎症的相关性、睡眠剥夺与特定肠道菌的相关性、酸枣仁汤对于睡眠剥夺小鼠肝脏炎症改善及特定肠道菌调节的角度,对酸枣仁汤缓解肝损伤进行初步探究。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级C57BL/6雄性小鼠24只,体质量(20±2)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号SCXK(辽)2015-0001。饲养于黑龙江中医药大学清洁级动物实验室,温度(23±1)℃,相对湿度(55±5)%,12h/12h循环照明,自由饮食饮水。所有动物实验在黑龙江中医药大学伦理委员会批准下开展。

1.2 药物及主要试剂

1.2.1 酸枣仁汤的制备 称取酸枣仁(炒)40g、川芎6g、知母6g、茯苓6g、甘草3g,共计61g药材。酸枣仁(炒)以及药材总量8倍的蒸馏水先倒入锅中煎煮,30min后加入其它药材,煮至药液体积的一半,滤去药渣,浓缩药液至61mL,得1.0g/mL药液,封口,4℃保存,备用。

根据前期预实验结果,以酸枣仁皂苷A、B作为酸枣仁汤(减压干燥后干品,含水量<7%)的质控指标。采用高效液相色谱法测定,酸枣仁皂苷A、B含量应分别不低于0.038%及0.023%。

1.2.2 主要试剂 ALT试剂盒(C009-2-1)、TBIL检测试剂盒(C019-1),均购自南京建成生物工程研究所;粪便基因组DNA提取试剂盒(DP328-02),购自天根生化科技(北京)有限公司;TB Green Premix Ex Taq™II(RR820A),购自宝日医生生物技术(北京)有限公司。

1.3 主要仪器

大鼠独立通气笼IVC(RU25H5),苏州市苏杭科技器材有限公司;睡眠剥夺仪(BW-NSD404),上海软隆科技发展有限公司;分析天平(MS105),梅特勒-托力多仪器上海有限公司;荧光定量PCR仪(ABI 7900HT),赛默飞世尔科技公司;高速冷冻离心机(5415R),德国艾本德(Eppendorf)公司;多功能酶标仪(Synergy HT),美国伯腾仪器有限公司。

2 方法

2.1 动物分组、睡眠剥夺模型的建立及给药

小鼠适应性饲养7d后,置于睡眠剥夺仪上,5min on/5min off,1.5m/min,每天持续1h,连续2d,对动物进行仪器适应性测试。适应结束后随机分为3组,每组8只:对照组、模型组和酸枣仁汤组。对照组小鼠每2只一笼,独立饲养;模型组小鼠每2只置于睡眠剥夺仪上一个空间,1.5m/min,连续24h,睡眠剥夺14d;酸枣仁汤组睡眠剥夺的同时ig给药,每天1次,连续14d。给药剂量为5.78g/kg^[16]。实验期间和结束后,对各组别小鼠进行处理、取材以及指标检测。实验期间各组别小鼠自由饮食饮水。

2.2 体质量和摄食量称取

实验开始后,于每日7:00称量小鼠体质量和摄

食量。

2.3 粪便样本收集及DNA提取

第14天7:00实验结束后,将小鼠放入小鼠固定器,立即收集新鲜粪便放入无菌1.5 mL离心管中,−80 °C冻存。按照粪便基因组DNA提取试剂盒说明书,称取粪便180~200 g后提取基因组DNA,测定浓度以及吸光度值(A_{260}/A_{280})比值确定DNA纯度合格。将所得DNA浓度稀释到15 ng/ μ L,−80 °C保存备用。

2.4 外周血采集及肝功能生化指标检测

粪便样本收集后,无菌弯头镊子摘除眼球取血,血滴沿1.5 mL离心管管壁滴下,尽量减少溶血。

室温放置1~2 h后4 °C、12 000 r/min离心10 min,取上清分装,于−80 °C冻存备用。每个样本取冻存的血清10 μ L用PBS以1:3稀释,3个复孔,按照ALT测试盒说明书检测ALT酶活性;取冻存的血清原液21 μ L,3个复孔,按照TBIL测定试剂盒说明书检测TBIL含量。

2.5 对特定肠道菌群的检测

2.5.1 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)引物设计 查阅文献,确定特定菌群的引物序列,详见表1。

表1 特定肠道菌及其引物

Table 1 Specific gut microbiota and their primers

肠道菌	正向引物	反向引物
大肠杆菌 ^[17]	CCCTTATTGTTAGTTGCCAT	ACTCGTTGTA CTTCCCATTG
双歧杆菌属 ^[18]	TCGCGTCYGGTGTGAAAG	CCACATCCAGCRTCCAC
罗氏菌属 ^[19]	GCGGTRCGGCAAGTCTGA	CCTCCGACACTCTAGTMCGA
产气荚膜梭菌 ^[20]	GCGTAGAGATTAGGAAGAACCACG	TATTCATCGTTTACGGCGTGGACTA
乳酸杆菌属 ^[18]	CACCGCTACACATGGAG	AGCAGTAGGGAATCTTCCA
拟杆菌门 ^[18]	ACGCTAGCTACAGGCTTAACA	ACGCTACTTGGCTGGTTCA
厚壁菌门 ^[19]	GCGTGAGTGAAGAAGT	CTACGCTCCCTTTACAC
总细菌 ^[19]	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	ATTACCGCGGCTGCTGGC

2.5.2 qRT-PCR反应 qPCR反应体系:八联管中每管中加入20 μ L反应体系,包括10 μ L的TB Green Premix Ex Taq II、0.8 μ L的正向引物、0.8 μ L的反向引物、0.4 μ L的Rox Reference Dye,2 μ L的样本DNA和6 μ L的灭菌水。每个样本设置1个复孔。详见TB Green Premix Ex Taq™ II说明书。

二步法qRT-PCR反应条件:95 °C预变性60 s;95 °C变性15 s,60 °C退火45 s,共40个循环。60~95 °C进行融解曲线分析,确定qRT-PCR反应条件合适。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对数据进行统计分析。

2.6 统计学分析

应用SPSS 19.0软件处理数据,各指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,先进行方差齐性检验,用各组间均数的两两比较方法LSD进行统计;对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换,待满足正态或者方差齐要求后,用转换后的数据进行统计;若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的,改用秩和检验进行统计。

3 结果

3.1 对动物体质量和摄食量的影响

造模结束(14 d)后,与对照组比较,模型组和酸枣仁汤组小鼠体质量显著下降($P < 0.05$),模型组和酸枣仁汤组小鼠体质量比较差异无统计学意义。

模型组和酸枣仁汤组小鼠睡眠剥夺前(0 d)和睡眠剥夺后(14 d)体质量没有明显增长。结果表明,慢性睡眠剥夺导致了体质量下降,酸枣仁汤并没有发挥逆转作用,结果见表2。

表2 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of SZRD on weight in mice exposed chronic sleep deprivation ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	体质量/g	
	0 d	14 d
对照	21.17±0.43	24.26±0.84
模型	21.03±1.21	21.08±0.87*
酸枣仁汤	21.43±0.51	20.71±1.05*

与同时期对照组比较:* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group in the same period

造模结束(14 d)后,与对照组比较,模型组和酸枣仁汤组小鼠平均摄食量显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,酸枣仁汤小鼠平均摄食量显著增加($P < 0.05$)。慢性睡眠剥夺导致了小鼠进食量的增加,酸枣仁汤并没有逆转这种增加,反而使进食量增加更多,结果见表3。

3.2 肝功能检测实验

TBIL检测结果显示,对照组与模型组、酸枣仁

表3 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺小鼠摄食量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 3 Effect of SZRD on average food intake in mice exposed chronic sleep deprivation ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	平均摄食量/g
对照	3.58±0.49
模型	4.84±0.78*
酸枣仁汤	5.75±1.10 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

汤组没有显著差异。与对照组比较,模型组小鼠外周血中ALT水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,酸枣仁汤组ALT水平显著降低($P < 0.05$),结果见表4。血清中ALT升高,表明肝细胞坏死,肝脏出现损伤。TBIL升高在肝损伤的情况下最常见,但是不是所有的肝损伤都会出现TBIL升高的表型。结果表明,慢性睡眠剥夺导致了肝损伤,给予酸枣仁汤对肝脏具有保护作用。

表4 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺小鼠肝功能的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 4 Effect of SZRD on liver function in mice exposed chronic sleep deprivation ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	ALT(卡门氏单位)	TBIL/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	23.51±5.26	3.86±1.66
模型	60.60±6.72*	3.43±1.77
酸枣仁汤	24.56±10.88 [#]	3.77±1.25

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

3.3 特定肠道菌DNA表达量

将对照组均值设为100,模型组和酸枣仁汤组取其相对值,得出各组间特定肠道菌DNA表达量变化,详见表5。

与对照组比较,慢性睡眠剥夺导致小鼠粪便大肠杆菌属、产气荚膜梭菌显著增加($P < 0.05$);双歧杆菌属、乳酸杆菌属以及罗氏菌属显著减少($P < 0.05$)。同时给予酸枣仁汤显著逆转了特定肠道菌

大肠杆菌属、乳酸杆菌属、产气荚膜梭菌的改变($P < 0.05$),但是对双歧杆菌属以及罗氏菌属没有作用。而睡眠剥夺小鼠肠道拟杆菌门/厚壁菌门(B/F)比值有下降趋势,同时给予酸枣仁汤,下降趋势有所缓解,但是没有统计学意义。

4 讨论

睡眠剥夺是睡眠机制研究较常用的技术手段。本文应用睡眠剥夺仪使小鼠强迫运动进而形成慢性睡眠剥夺模型。同时考察了强迫运动慢性睡眠剥夺模型组及酸枣仁汤组小鼠的体质量以及摄食量的变化。结果表明,睡眠剥夺后小鼠的平均摄食量增加,这与Benedict C^[7]的实验结果一致。酸枣仁汤组小鼠的平均摄食量比较模型组显著增加,说明酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺小鼠摄食有促进作用。值得一提的是,本实验对睡眠剥夺前后小鼠的体质量进行了观察。结果显示,除对照组实验前后体质量正常增加外,模型组与酸枣仁汤组摄食量增加的同时,体质量与睡眠剥夺前比较没有明显差异。笔者认为,虽然睡眠限制后出现的代谢异常并不是由运动引起的,运动只会引起应激激素皮质酮轻微增长^[20-21],但是持续睡眠剥夺导致了严重身体压力,体质量不会增长^[22],而本实验是强迫运动造的慢性睡眠剥夺模型,强迫运动也会引起能量的大量消耗,体质量也不会增长。

现代研究表明,睡眠剥夺是机体损伤最为直接的应激源,可以刺激机体产生多向的应激反应,最终导致机体及脏器损伤,而肝脏就是受到影响最直接的器官之一。6 h的睡眠剥夺显著增加了肝脏三酰甘油含量,并诱导了肝脏胰岛素抵抗^[22]。Hsieh等报道称,人的睡眠不足与脂肪肝有关^[23],还有学者证明许多生物钟基因突变与肝脏脂肪变性有关^[24]。另外还有数据表明快速眼动睡眠(NEM)剥夺对肝脏造成了严重的影响^[25]。但是睡眠导致肝损伤的机制还不清楚,更没有学者从肠道菌群的角度去分析。本实验动物模型结果表明,比较对照组,睡眠剥夺组血清ALT指标明显升高,证明睡眠

表5 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺小鼠特定肠道菌的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effects of SZR on DNA expression in specific gut microbiota in mice exposed chronic sleep deprivation ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	大肠杆菌属	双歧杆菌属	罗氏菌属	产气荚膜梭菌	乳酸杆菌属	拟杆菌门/厚壁菌门
对照	100±16.78	100±72.61	100±46.57	100±47.41	100±40.26	100±73.04
模型	117.2±51.32*	9.43±7.73*	9.39±5.77*	251.83±83.25*	17.61±17.22*	61.35±44.74
酸枣仁汤	45.86±30.63 [#]	6.10±2.21	12.59±8.74	143.17±51.65 [#]	93.54±46.82 [#]	80.24±73.84

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

剥夺过程对肝脏造成了一定程度的损伤,进而间接证实《医门法律》所谈“虚劳不得眠病变核心在肝”存在科学依据。当同时给予酸枣仁汤对睡眠剥夺过程进行干预后,血清ALT指标明显低于模型组,差异具有统计学意义。表明具有改善睡眠作用的中药酸枣仁汤也可保护肝脏,逆转了睡眠剥夺造成的肝损伤过程。

产气荚膜梭菌能分解肌肉和结缔组织中的糖,产生大量气体,导致组织严重气肿,继而影响血液供应,造成组织大面积坏死。而大肠杆菌属在一定条件下可引起肠道外感染,某些血清型菌株的致病性强,引起腹泻。两种菌种/属是公认的有害菌。罗氏菌属、双歧杆菌和乳酸杆菌是公认的有益菌。拟杆菌门和厚壁菌门为肠道微生物在系统发育地位上的主要优势菌群,拟杆菌门/厚壁菌门一般作为肠道菌群紊乱的重要指标。因此,在本研究中,研究者以粪便菌群DNA qRT-PCR分析作为重要手段,以肠道4种特定菌属,1种特定菌种以及2种特定菌门为研究对象,证实了在慢性睡眠剥夺应激影响下,4种特定菌属和1种特定菌种在睡眠剥夺前后发生了数量变化,差异具有统计学意义。而拟杆菌门/厚壁菌门(B/F)有下降趋势,但是没有统计学意义。结果表明,睡眠剥夺过程与肠道菌群的数量及比例结构直接相关,为从肠道菌群角度探讨睡眠剥夺引起肝损伤的机制提供了重要的依据。

中药的药理作用机制的研究一直是一个瓶颈无法突破,中药和肠道菌群的互作一般被忽略。笔者先前发表的文章^[26]已经提及,肠道菌群、睡眠与中药三者之间的相互作用关系也许是一个更为关键的切入点;以肠道菌群作为新的作用靶点,或许可以为相关失眠药物的开发及其药理作用机制的阐述提供新的方向和思路。酸枣仁汤主治因肝血不足,虚热内扰所致的虚烦不寐证。本研究表明,酸枣仁汤干预能在一定程度上调整睡眠剥夺应激引起的特定肠道菌紊乱,增加肠道中有益菌数量,减少肠道有害菌数量,改变肠道菌群结构。笔者推测,酸枣仁汤改善睡眠剥夺导致的肝损伤作用可能与其调节肠道菌群水平有关。

慢性睡眠剥夺导致了小鼠肝损伤和特定肠道菌紊乱,而酸枣仁汤逆转或改善了这种现象,这可能是酸枣仁通过改善肠道菌群,缓解了睡眠剥夺导致的肝损伤。本实验只是一个初步的探索性实验,下一步需要加大样本量,改善实验方法,找到睡眠与肠道菌群的因果关系,为“虚劳不得眠病变核心

在肝”提供更强有力的科学依据,从而进一步阐明酸枣仁缓解睡眠剥夺导致肝损伤的机制,推测其可能与肝-肠轴有关。

参考文献

- [1] Periasamy S, Hsua D Z, Fu Y H, et al. Sleep deprivation-induced multi-organ injury: role of oxidative stress and inflammation [J]. EXCLI J, 2015, 14: 672-683.
- [2] Pandey A K, Kar S K. REM sleep deprivation of rats induces acute phase response in liver [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 410(2): 242-246.
- [3] Bergmann B M, Gilliland M A, Feng P F, et al. Are physiological effects of sleep deprivation in the rat mediated by bacterial invasion? [J]. Sleep, 1996, 19(7): 554-562.
- [4] 李 云,周明眉,苟小军,等. 姜黄素对间歇性睡眠剥夺大鼠特定肠道菌的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 794-798.
- [5] 王 慧,张艳鹤,杨记康,等. 小檗碱调节睡眠剥夺大鼠的肠道菌群结构以及Th17/Treg细胞平衡 [J]. 基础医学与临床, 2017, 13(6): 860-864.
- [6] Dhaliwal J, Singh D P, Singh S, et al. Lactobacillus plantarum MTCC 9510 supplementation protects from chronic unpredictable and sleep deprivation-induced behaviour, biochemical and selected gut microbial aberrations in mice [J]. J Appl Microbiol, 2018, 125(1): 257-269.
- [7] Benedict C, Vogel H, Jonas W, et al. Gut microbiota and glucometabolic alterations in response to recurrent partial sleep deprivation in normal-weight young individuals [J]. Mol Metab, 2016, doi: 10.1016/j.molmet.2016.10.003.
- [8] Zhang S L, Bai L, Goel N, et al. Human and rat gut microbiome composition is maintained following sleep restriction [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(8): E1564-E1571.
- [9] Poroyko V A, Carreras A, Khalyfa A, et al. Chronic sleep disruption alters gut microbiota, induces systemic and adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice [J]. Sci Rep, 2016, 6: 35405.
- [10] 房蕴歌,商利娜,田 雷,等. 酸枣仁汤研究进展 [J]. 医学研究与教育, 2017, 34(3): 61-67.
- [11] 李玉娟,刘 雯,杨静玉,等. 酸枣仁汤的镇静催眠作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 2: 115-117.
- [12] 戴 琦,王文英,甘 可. 加味酸枣仁汤对肝血亏虚证失眠的临床疗效观察 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 11: 1577-1578.
- [13] 张压西,向婷婷,王 奕. 加味酸枣仁汤治疗肝血亏虚证失眠患者 60 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2013, 9: 750-753.
- [14] 张诗军,陈泽雄,林佑武,等. 加味酸枣仁汤治疗慢性乙

- 型肝炎失眠症临床疗效观察 [J]. 中药材, 2007, 30(11): 1482-1484.
- [15] 朱海鹏, 高志良, 谭德明, 等. 酸枣仁汤辅助治疗慢性重型肝炎的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(4): 303-305.
- [16] 李福元, 陈容, 姚淑琼. 小酸枣仁汤与酸枣仁汤对小鼠镇静催眠作用的比较研究 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(11): 130-131.
- [17] Singh D P, Khare P, Bijalwan V, et al. Coadministration of isomalto-oligosaccharides augments metabolic health benefits of cinnamaldehyde in high fat diet fed mice [J]. *Biofactors*, 2017, 43(6): 821-835.
- [18] Baboota R K, Murtaza N, Jagtap S, et al. Capsaicin-induced transcriptional changes in hypothalamus and alterations in gut microbial count in high fat diet fed mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25: 893-902.
- [19] Murtaza N, Baboota R K, Jagtap S, et al. Finger millet bran supplementation alleviates obesity-induced oxidative stress, inflammation and gut microbial derangements in high-fat diet-fed mice [J]. *Br J Nutr*, 2014, 19: 1-12.
- [20] Weljie A M, Meerlo P, Goel N, et al. Oxalic acid and diacylglycerol 36:3 are cross-species markers of sleep debt [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(8): 2569-2574.
- [21] Roman V, Walstra I, Luiten P G M, et al. Too little sleep gradually desensitizes the serotonin 1A receptor system [J]. *Sleep*, 2005, 28(12): 1505-1510.
- [22] Shigiyama F, Kumashiro N, Tsuneoka Y, et al. Mechanisms of sleep deprivation-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 315(5): 848-858.
- [23] Hsieh S D, Muto T, Murase T, et al. Association of short sleep duration with obesity, diabetes, fatty liver and behavioral factors in Japanese men [J]. *Intern Med*, 2011, 50: 2499-2502.
- [24] Mazzocchi G, Vinciguerra M, Oben J, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: the role of nuclear receptors and circadian rhythmicity [J]. *Liver Int*, 2014, 34: 1133-1152.
- [25] Pandey A K, Kar S K. REM sleep deprivation of rats induces acute phase response in liver [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(2): 242-246.
- [26] 任晓宇, 李廷利. 睡眠剥夺与肠道菌群紊乱的关系及改善睡眠药物研发的探讨 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(7): 1257-1263.