

• 药理与临床 •

基于代谢组学与肠道菌群探讨炒酸枣仁治疗睡眠-觉醒昼夜节律障碍小鼠模型的作用机制

何 灵¹, 张圣美¹, 陶 宇², 裴香萍¹, 闫 艳^{2*}, 杜晨晖^{1*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 太原 030619

2. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 通过持续光照 4 周复制睡眠-觉醒昼夜节律障碍 (circadian rhythm sleep-wake disorder, CRSWD) 模型, 探讨炒酸枣仁对 CRSWD 小鼠的作用及作用机制。 **方法** 采用雄性 C57BL/6J 小鼠, 持续光照 4 周复制 CRSWD 模型, 给予炒酸枣仁进行干预, 期间测定小鼠的体质量和摄食量, 实验结束后分 4 个时间点 (ZT0、ZT6、ZT12、ZT18) 取材, 利用 qRT-PCR 检测小鼠下丘脑时钟基因 (circadian locomotor output cycles kaput, *Clock*)、脑和肌肉 ARNT 样蛋白 1 基因 (brain-muscle arnt-like protein 1, *Bmal1*)、周期基因 1 (period 1, *Per1*)、*Per2*、隐花色素基因 1 (cryptochrom 1, *Cry1*)、视黄酸受体相关孤儿受体基因 (retinoic acid receptor-related orphan, *RORα*)、孤束核基因 (reverse erythroblastosis virus, *Rev-erba*) 的表达; 利用 16S rRNA 测序和 GC-MS 技术研究小鼠肠道菌群及短链脂肪酸含量的变化; 采用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术研究模型小鼠大脑差异代谢物的变化。 **结果** 炒酸枣仁显著调控模型小鼠下丘脑中 *Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Per2*、*Cry1*、*RORα*、*Rev-erba* 7 个生物钟基因的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 使其恢复到与空白组昼夜节律振荡趋势一致。肠道菌群 16S rRNA 测序与短链脂肪酸含量测定结果表明, 炒酸枣仁可能通过升高梭状芽孢杆菌属 *Clostridium*、乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、罗氏菌属 *Roseburia* 相对丰度, 从而增加丁酸含量。脑代谢组学结果表明, ZT6 和 ZT18 时共有的代谢通路有三羧酸循环、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢。炒酸枣仁可以通过调节梭状芽孢杆菌属、乳酸杆菌属及其代谢产物丁酸的含量, 进一步影响体内氨基酸代谢通路, 从而恢复 CRSWD 小鼠模型睡眠-觉醒昼夜节律。 **结论** 从节律生物钟基因水平、肠道菌群、脑代谢组学等多角度, 揭示了炒酸枣仁治疗 CRSWD 小鼠模型的作用。

关键词: 炒酸枣仁; 睡眠-觉醒昼夜节律障碍; 生物钟基因; 16S rRNA 测序; 代谢组学; 乌药碱; 木兰花碱; 维采宁; 斯皮诺素; 6'-阿魏酰斯皮诺素; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)18-6208-18

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.011

Mechanism of fried *Ziziphi Spinosae Semen* on sleep-wake circadian rhythm disturbance in mice model based on metabolomics and gut microbiotaHE Ling¹, ZHANG Shengmei¹, TAO Yu², PEI Xiangping¹, YAN Yan², DU Chenhui¹

1. College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of fried Suanzaoren (*Ziziphi Spinosae Semen*) on circadian rhythm sleep-wake disorder (CRSWD) mice by replicating CRSWD model with continuous light exposure for four weeks. **Methods** C57BL/6J male mice were exposed to continuous light for four weeks to replicate CRSWD model, fried *Ziziphi Spinosae Semen* was

收稿日期: 2024-04-24

基金项目: 山西省科学技术厅山西省科技创新人才团队项目 (202304051001020); 山西省科学技术厅中央引导地方科技发展资金项目 (YDZJSX2021CO25); 山西省科学技术厅自然科学研究面上项目 (20210302123237); 山西省中医药管理局十大晋药资源评价与生态种植团队 (zyytd2024026); 山西省中医药重点研究室建设项目 (zyyjs2024024); 山西省科技成果转化引导专项计划项目 (202204021301063); 山西省基础研究计划自由探索类青年项目 (20210302124279)

作者简介: 何 灵 (1998—), 女, 硕士, 研究方向为中药新产品开发与应用。Tel: 13994154651 E-mail: 13994154651@163.com

***通信作者:** 闫 艳, 女, 副教授, 博士, 研究方向为中药质量控制及中药体内过程分析。Tel: (0351)7018379 E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn
杜晨晖, 男, 教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0351)3179982 E-mail: dch@sxtcm.edu.cn

given for intervention, during which the body weight and food intake of mice were measured. After the experiment, samples were collected at four time points (ZT0, ZT6, ZT12, ZT18). Expressions of circadian locomotor output cycles kaput (*Clock*), brain-muscle arnt-like protein 1 (*Bmal1*), period 1 (*Per1*), *Per2*, cryptochrom 1 (*Cry1*), retinoic acid receptor-related orphan (*Rora*) and reverse erythroblastosis virus (*Rev-erba*) genes in hypothalamus of mice were detected by qRT-PCR, 16S rRNA sequencing and GC-MS were used to study the changes in gut microbiota and contents of short-chain fatty acids in mice, UHPLC-Q-TOF-MS/MS was used to study the changes of brain metabolites in model mice. **Results** Fried *Ziziphi Spinosae Semen* significantly regulated the expressions of seven circadian clock genes such as *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Rora* and *Rev-erba* in hypothalamus of model mice ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), restored their circadian rhythm oscillation trend to be consistent with that of the blank group. Results of 16S rRNA sequencing of gut microbiota and determination of short chain fatty acid content indicated that fried *Ziziphi Spinosae Semen* may increase the content of butyric acid by increasing the relative abundance of *Clostridium*, *Lactobacillus* and *Roseburia*. The results of brain metabolomics indicated that the common metabolic pathways of ZT6 and ZT18 were tricarboxylic acid cycle, L-cysteine and methionine metabolism, niacin and nicotinamide metabolism. Fried *Ziziphi Spinosae Semen* could further affect the amino acid metabolism pathway in the body by regulating the abundance of *Clostridium*, *Lactobacillus* and their metabolite butyric acid content, thereby restoring the sleep wake circadian rhythm of CRSWD mice. **Conclusion** The therapeutic effect of fried *Ziziphi Spinosae Semen* on CRSWD mice model was revealed from multiple perspectives, such as the level of circadian clock genes, gut microbiota and brain metabolomics.

Key words: fried *Ziziphi Spinosae Semen*; sleep-wake circadian rhythm disorder; *Clock* gene; 16S rRNA sequencing; metabolomics; coclaurine; magnoflorine; vicenin; spinosyn; 6''-feruloylspinosin; jujuboside A; jujuboside A

酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。酸枣仁为安神类中药临床应用的首选，其用于改善睡眠从汉末便有记载^[1]。中医药认为“凡入药者必先炮”，药物的炮制既是为保证临床用药安全，也可以提高药物疗效，是中药应用中不可缺少的环节。《本草纲目》认为“酸枣仁甘而润，故熟用疗胆虚不得眠”^[2]。蔡宝昌团队^[3]对酸枣仁的炮制方法及炮制前后镇静催眠作用变化等方面进行总结，对酸枣仁药效基础进行了深入的研究，并提出“生效熟增”的理论。研究表明，酸枣仁炒制后总黄酮、总皂苷、脂肪酸类成分的含量均有所提高^[4]。《中国药典》2020 年版 158 个含生炒酸枣仁成方制剂中有 49 个与失眠有关的制剂，其中成方中用炒酸枣仁的有 40 个，用生酸枣仁有 9 个。目前，炒酸枣仁是中药复方制剂治疗失眠的首选药味。

睡眠-觉醒昼夜节律障碍 (circadian rhythm sleep-wake disorder, CRSWD) 是一种与睡眠结构紊乱和周期异常有关的问题，其主要临床表现是失眠和/或日间嗜睡，可能导致社会功能受损。其中睡眠时相延迟障碍患者表现为早晨嗜睡，极端难以醒来和醒后意识模糊，青少年患病率高达 7%~16%^[5]。目前，治疗 CRSWD 的药物有褪黑素及褪黑素受体激动剂雷美替胺、阿戈美拉汀、他司美琼。然而，化学药治疗起效快，但可能会引发血压升高、头痛、头晕、恶心和嗜睡等不良反应^[6]。通过文献调研表

明，刺五加可以改善持续光照条件下大鼠的睡眠-觉醒节律及脑内 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、L-谷氨酸 (*L*-glutamate, *L*-Glu) 含量^[7]。酸枣仁冻干粉通过升高下丘脑内瘦素 (lepin, LEP)、阿黑皮素原 (proopiomelanocortin, POMC) 含量并降低阿神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 的含量，从而纠正因 24 h 持续黑暗条件导致的大鼠睡眠-觉醒状态紊乱及能量代谢率的异常^[8]。然而目前炒酸枣仁治疗 CRSWD 的研究未见报道。

下丘脑视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 是哺乳动物的昼夜节律中枢，主要驱动所有生理和行为过程的昼夜节律性。SCN 的振荡特性依赖于时钟基因的转录翻译后反馈回路 [周期基因 1 (period 1, *Per1*)、*Per2*、*Per3*、隐花色素基因 1 (cryptochrom 1, *Cry1*)、*Cry2*、时钟基因 (circadian locomotor output cycles kaput, *Clock*)、脑和肌肉 ARNT 样蛋白 1 基因 (brain-muscle arnt-like protein 1, *Bmal1*)] 在单个细胞中产生 24 h 周期^[9]。光是昼夜节律系统中的关键授时因子，夜间灯光照射以及夜间的觉醒活动，可能会导致生物钟的时间信号发生冲突，并导致昼夜节律的表达受到干扰^[10]。肠道同样具有其自主生物钟即肠道子钟，“中枢时钟”的变化会对肠道子钟造成显著影响。肠道内约有 35% 菌群的相对丰度存在节律振荡，这些类群占总肠道菌群的 60%，被称为肠道菌群节律^[11]。同时，越来越多的证据表明，肠道微生物群产生的代谢物是促

进睡眠信号的重要来源,特别是短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs) [12]。

代谢组学技术是通过考察生物体受刺激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)相对分子质量为 1 000 以下的小分子物质的变化来研究生物体代谢途径,为人类表型提供了一种更直接的特征标签和更敏感的检测方法。已有研究通过代谢组学等方法,扩展了对分子节律性的理解,在小鼠组织样本中描述了代谢组中的每日节律[13]。分子时钟的基因破坏对代谢物谱有着深远的影响,从而加强了时钟和代谢组之间的功能联系。通过代谢组学分析炒酸枣仁干预后 CRSWD 模型小鼠脑代谢物的变化,鉴定筛选炒酸枣仁主要调控的代谢通路。

本研究以炒酸枣仁为研究对象,采用雄性 C57BL/6J 小鼠,持续光照 4 周造成小鼠昼夜节律紊乱,期间测定小鼠的体质量、摄食量,利用 qRT-PCR 检测小鼠下丘脑生物钟基因 *Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Per2*、*Cry1*、视黄酸受体相关孤儿受体基因(retinoic acid receptor-related orphan, *ROra*)、孤束核基因(reverse erythroblastosis virus, *Rev-erba*) mRNA 表达的变化,利用 16S rRNA 测序和 GC-MS 技术研究小鼠肠道菌群及 SCFAs 含量的变化,并进行菌群与 SCFAs 相关性分析,采用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术研究小鼠大脑代谢物的变化。本研究拟从节律生物钟基因水平、肠道菌群、脑代谢组学等多角度,揭示炒酸枣仁治疗 CRSWD 小鼠模型的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 128 只,6~8 周龄,体质量 18~20 g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于独立通风系统中适应性喂养 1 周,室温 24~26 ℃,相对湿度 35%~55%,光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗,光照强度为 300~400 lux。动物实验经山西中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 2022DW097)。

1.2 药材

酸枣仁(批号 210191015)购自河北安国,并由山西中医药大学裴香萍教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Z. jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。酸枣仁经检验质量符合《中国药典》2020 年版一部规定。

1.3 药品与试剂

质谱纯甲醇(批号 20211109)、乙腈(批号 194036)、甲酸(批号 207035)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;乙酸(批号 RH500027)购自上海易恩化学技术有限公司;丙酸(批号 P0500)、丁酸(批号 B0754)、异丁酸(批号 I0103)、戊酸(批号 V0003)、异戊酸(批号 M0182)、异己酸(批号 M0750)、二乙基丁酸(批号 M0750)购自梯希爱(上海)生化科技股份有限公司;Monzol™ Reagent(批号 110607)购自莫纳生物科技有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*)、*Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Per2*、*Cry1*、*ROra*、*Rev-erba* 引物由生工生物工程有限公司合成。

1.4 仪器

5600 Q-TOF 型高分辨质谱仪(美国 AB Sciex 公司);LC-20AD 型超高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);Gentier 48E 型 qRT-PCR 仪(西安天隆科技有限公司);Nano Drop-2000 型核酸蛋白仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);CPA225D 型十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司);7890b 型气相色谱仪、5977B 型质量选择检测器(美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 炒酸枣仁提取物的制备

参照课题组前期研究方法[14]制备炒酸枣仁。取自制的炒酸枣仁,粉碎(60%炒酸枣仁过一号筛),精密称定 200 g,加 10 倍量水,浸泡 30 min,武火加热至沸,转文火煎煮 30 min,用 8 层纱布滤过;滤渣再加 8 倍量水,武火加热至沸,转文火煎煮 20 min,用 8 层纱布滤过,合并 2 次滤液,减压浓缩至 1 g/mL(以生药量计),冻干成粉。采用课题组建立的 HPLC-UV-ELSD 法[15],测得炒酸枣仁提取物含乌药碱(0.253 ± 0.045) mg/g、木兰花碱(1.895 ± 0.272) mg/g、维采宁(0.023 ± 0.003) mg/g、斯皮诺素(1.181 ± 0.017) mg/g、6"-阿魏酰斯皮诺素(0.703 ± 0.121) mg/g、酸枣仁皂苷 A(0.441 ± 0.087) mg/g、酸枣仁皂苷 B(0.236 ± 0.055) mg/g(以生药量计)。

2.2 动物分组、造模、给药与取材

小鼠适应性饲养 1 周后随机分为空白组、模型组和炒酸枣仁低、高剂量(10、20 g/kg)组,每组 32 只。空白组以正常自然光照条件饲养,光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗(light-dark, LD)环境,LD

环境中的时间用授时时间 (zeitgeber time, ZT) 表示, ZT0 开灯、ZT12 关灯。ZT0~ZT12 为光照期, ZT12~ZT0 为黑暗期; 模型组和各给药组以 24 h 持续光照饲养, 各给药组每日 7:00 时 ig 相应药物, 连续给药 4 周, 空白组和模型组 ig 等体积的生理盐水。饲养期间测定体质量和摄食量, 实验结束后分 4 个时间点 (ZT0、ZT6、ZT12、ZT18) 收集小鼠下丘脑、大脑、结肠内容物、盲肠内容物^[6], 经液氮快速冷冻后于 -80 °C 保存。

2.3 qRT-PCR 检测下丘脑组织生物钟基因表达

取下丘脑组织 20 mg, 加入 1 mL 莫纳提取试剂以提取组织中总 mRNA。使用核酸蛋白仪检测样本纯度和浓度, A_{260}/A_{280} 值为 1.8~2.0。按照试剂盒说明书合成 cDNA, 并进行 qRT-PCR 分析, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 mRNA 相对表达水平。通过 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计引物, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>Clock</i>	F: AGACGGCGAGAACTTGGCATTG R: AACCTTTCAGTGCTTCCTTGAGAC
<i>Bmal1</i>	F: AGGACTTCGCCTCCACCTGTTC R: GCCCTCATTGTCTGGTCACTGTC
<i>Per1</i>	F: CCTGGGCTCTGGGTCTGGTTC R: TTGCTTGATGGCTGCTCTGACTG
<i>Per2</i>	F: GCTGCGGATGCTCGTGGAATC R: GGTGTGCTCTGCCTCTGTCATC
<i>Cry1</i>	F: ATCGTGCGCATTTACATAC R: TCCGCCATTGAGTTCTATGAT
<i>ROra</i>	F: GTGGAGACAAATCGTCAGGAAT R: TGGTCCGATCAATCAAACAGTTC
<i>Rev-erba</i>	F: TACATTGGCTCTAGTGGCTCC R: CAGTAGGTGATGGTGGGAAGTA
<i>Gapdh</i>	F: GGTGTCTCTCTGCGACTTCA R: TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC

2.4 盲肠内容物的 16S rRNA 高通量测序

将 ZT6 和 ZT18 的小鼠盲肠内容物置于冻存管中, 于 -80 °C 冷冻保存。交由上海百趣生物医学科技有限公司, 进行 16S rRNA 基因 V3~V4 区的测序分析。

2.5 GC-MS 测定结肠内容物中 SCFAs 含量

采用 Agilent-7890B 型 GC-MS 联用 Agilent-5977 型质量选择检测器, 测定 ZT6 和 ZT18 的小鼠结肠内容物中乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、异丁酸、异戊酸、异己酸含量。称取 50 mg 冻干的结肠内容物样本, 加入 250 μ L 纯水后充分涡旋 3 min 混匀,

用 10% H_2SO_4 (0.1 mol/L) 调节 pH 至 2~3, 充分涡旋混匀后放置 10 min, 加入 1.23 mL 75% 甲醇涡旋 1 min 混匀, 13 000 r/min 离心 10 min, 得到上清。每份样品取上清 1.1 mL, 加入 100 μ L 纯甲醇和 100 μ L 2-乙基丁酸 (内标), 充分涡旋混匀经 0.22 μ m 有机滤膜滤过, 取续滤液至进样小瓶待测。

2.6 脑代谢组学研究

2.6.1 样本预处理 取 50 mg 大脑组织, 加入 1.5 mL 预冷的甲醇, 手持匀浆器匀浆, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清, 离心浓缩后, 再加入 120 μ L 70% 甲醇复溶, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清于液相小瓶中待测。

2.6.2 色谱条件 正离子模式色谱柱为 Waters BEH C_8 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m), 负离子模式色谱柱为 Waters HSS T3 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~1 min, 5% B; 1~11 min, 5%~100% B; 11~13 min, 100% B; 13~15 min, 100%~5% B。体积流量 0.35 mL/min; 柱温 50 °C; 进样体积 5 μ L。

2.6.3 质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI); 毛细管电压为 +5 500 V/-4 500 V; 离子源温度 450 °C; 辅助气为 N_2 ; 气帘气 (CUR)、雾化气 (GS1) 及辅助气 (GS2) 压力分别为 30、55、55 psi (1 psi=6.895 kPa); 去簇电压 (DP) 为 60 V/-60 V; 碰撞能量 (CE) 为 (35 $\pm$ 15)/(-35 $\pm$ 15) eV。TOF-MS 扫描范围设定为 m/z 100~1 500, 模式选择数据依赖性采集 (IDA); 选择响应值超过 100 cps 的 10 个最高峰进行二级质谱扫描; Product Ion 扫描范围设定为 m/z 50~1 250, 并开启动态背景扣除 (DBS) 以减少干扰。

2.6.4 质控样品的处理 为了评估 UPLC-Q-TOF-MS 整个分析过程的稳定性和重现性, 将所有待测脑组织样本分别按“2.6.1”项下方法处理, 得到上清液, 各取 10 μ L 进行混合得到质控样品。在分析样品序列之前, 运行 6 个质控样品。进样时, 每进完其中 1 组样本后, 插入 1 针质控样品。

2.6.5 代谢组学数据处理 将采集所得的 LC-MS/MS 数据原始数据文件通过 Analysis Base File Converter 软件转化为.abf 格式的文件, 通过 MS-DAIL 4.60 软件进行色谱峰对齐以及归一化预处理。将峰面积归一化后的数据导入 SIMCA-P 14.1 软件, 得到包含序列号和相应离子强度的三维数据集。为

了跟踪内源性物质的变化轨迹,采用偏最小二乘法判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 对数据进行分析。根据变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) 值筛选潜在的生物标志物,用正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 构建的 S-Plot 图进行可视化。采用 Graphpad Prism 软件绘制柱状图进行独立样本 t 检验分析,以评估潜在生物标志物的显著差异。根据 $VIP > 1$ 和 $P < 0.05$ 筛选出差异代谢物。将筛选得到潜在生物标志物导入 MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 数据库进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and

genomes, KEGG) 代谢通路分析。

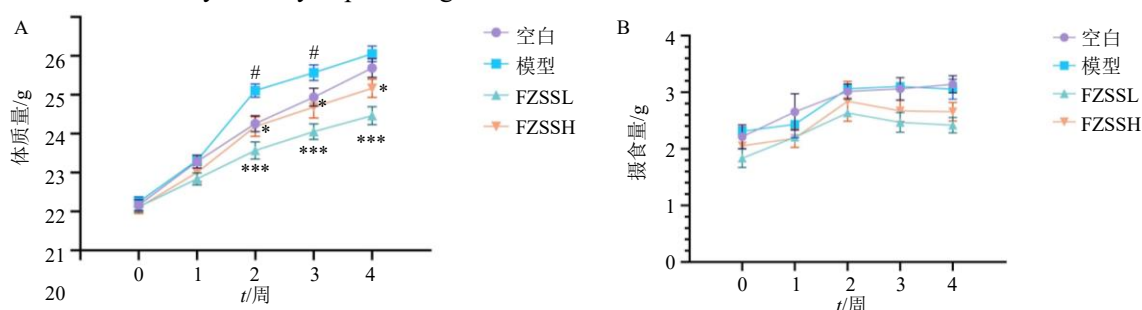
2.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据处理,单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行多组间差异比较。

3 结果

3.1 炒酸枣仁对 CRSWD 小鼠体质量和摄食量的影响

如图 1 所示,与空白组比较,造模第 2 周开始模型组小鼠的体质量显著增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,造模第 2 周开始炒酸枣仁各剂量组小鼠的体质量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001 , 图 1-A)。在饲养期间,各组小鼠的摄食量无显著差异 (图 1-B)。



FZSSL-炒酸枣仁低剂量组; FZSSH-炒酸枣仁高剂量组; 与空白组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。

FZSSL-fried Ziziphi Spinosae Semen low-dose group; FZSSH-fried Ziziphi Spinosae Semen high-dose group; $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs blank group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 炒酸枣仁对 CRSWD 小鼠体质量 (A) 和摄食量 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 32$)

Fig. 1 Effect of fried Ziziphi Spinosae Semen on body weight (A) and food intake (B) in CRSWD mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 32$)

3.2 炒酸枣仁对 CRSWD 小鼠下丘脑中生物钟基因表达的影响

Clock、*Bmal1*、*Rora* 基因是生物钟的正反馈基因。如图 2 所示,与空白组比较,模型组小鼠下丘脑中 *Clock* 基因表达在 ZT0 时显著上调 ($P < 0.001$), ZT18 时显著下调 ($P < 0.001$);与模型组比较,炒酸枣仁各剂量组 *Clock* 基因表达在 ZT0 时显著下调 ($P < 0.001$)。与空白组比较,模型组 *Bmal1* 基因表达在 ZT0、ZT6、ZT18 时显著下调 ($P < 0.01$ 、 0.001), ZT12 时显著上调 ($P < 0.001$);与模型组比较,炒酸枣仁各剂量组 *Bmal1* 基因表达在 ZT12 时显著下调 ($P < 0.001$),炒酸枣仁高剂量组 *Bmal1* 基因表达在 ZT0、ZT18 时显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.001)。与空白组比较,模型组 *Rora* 基因表达在 ZT0、ZT18 时显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.001), ZT6 时显著上调 ($P < 0.001$);与模型组比较,炒酸枣仁各剂量组 *Rora* 基

因表达在 ZT6 时显著下调 ($P < 0.001$), ZT18 时显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001),炒酸枣仁高剂量组 *Rora* 基因表达在 ZT0、ZT12 时显著上调 ($P < 0.001$)。

Per1、*Per2*、*Cry1*、*Rev-erba* 是生物钟的环路负调控因子,属于负反馈基因。如图 3 所示,与空白组比较,模型组小鼠下丘脑中 *Per1* 基因表达在 ZT6 时显著下调 ($P < 0.001$);与模型组比较,炒酸枣仁低剂量组 *Per1* 基因表达在 ZT6 时显著上调 ($P < 0.001$), ZT12 时显著下调 ($P < 0.001$),炒酸枣仁各剂量组 *Per1* 基因表达在 ZT0 时显著下调 ($P < 0.001$)。与空白组比较,模型组小鼠下丘脑中 *Per2* 基因表达在 ZT0 时显著上调 ($P < 0.001$), ZT6、ZT18 时显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.001);与模型组比较,炒酸枣仁高剂量组 *Per2* 基因表达在 ZT6、ZT18 时显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.001),炒酸枣仁各剂量组 *Per2* 基因表达在 ZT0 时显著下调 ($P < 0.001$)。与空白组

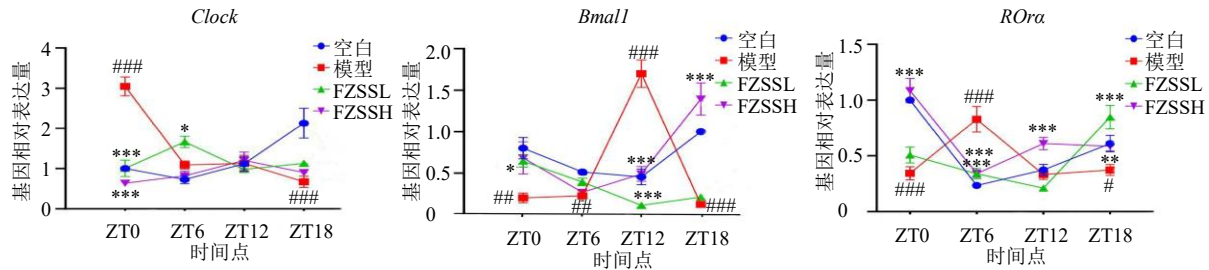


图 2 炒酸枣仁对 CRSWD 小鼠下丘脑中 *Clock*、*Bmal1*、*Rora* 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of fried *Ziziphi Spinosa* Semen on expressions of *Clock*, *Bmal1* and *Rora* genes in hypothalamus of CRSWD mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

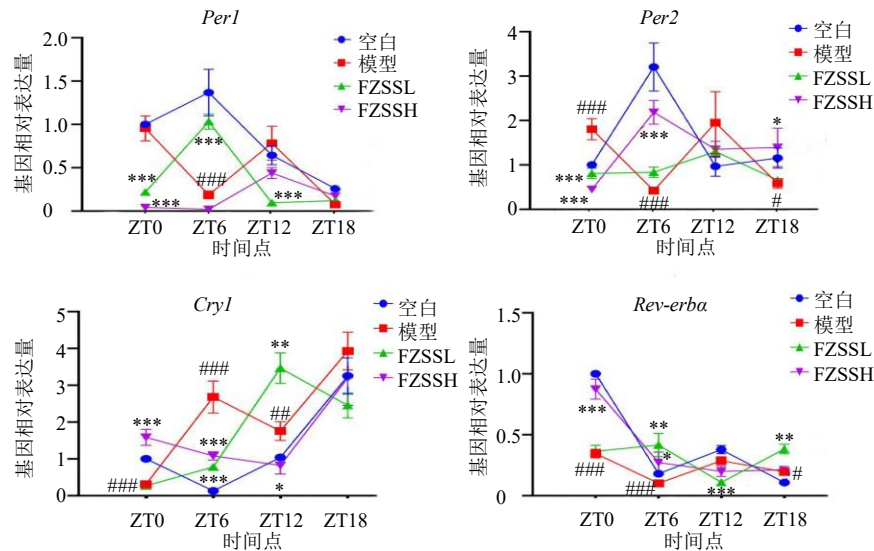


图 3 炒酸枣仁对 CRSWD 小鼠下丘脑中 *Per1*、*Per2*、*Cry1*、*Rev-erba* 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of fried *Ziziphi Spinosa* Semen on expressions of *Per1*, *Per2*, *Cry1* and *Rev-erba* genes in hypothalamus of CRSWD mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

比较, 模型组小鼠下丘脑中 *Cry1* 基因表达在 ZT0 时显著下调 ($P < 0.001$), ZT6、ZT12 时显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 炒酸枣仁高剂量组 *Cry1* 基因表达在 ZT0 时显著上调 ($P < 0.001$), ZT12 时显著下调 ($P < 0.05$), 炒酸枣仁各剂量组 *Cry1* 基因表达在 ZT6 时显著下调 ($P < 0.001$), 炒酸枣仁低剂量组 *Cry1* 基因表达在 ZT12 时显著上调 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组小鼠下丘脑中 *Rev-erba* 基因表达在 ZT0、ZT6 时显著下调 ($P < 0.001$), ZT18 时显著上调 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 炒酸枣仁高剂量组 *Rev-erba* 基因表达在 ZT0 时显著上调 ($P < 0.001$), 炒酸枣仁各剂量组 *Rev-erba* 基因表达在 ZT6 时显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01), 炒酸枣仁低剂量组 *Rev-erba* 基因表达在 ZT12 时显著下调 ($P < 0.001$), ZT18 时显著上调 ($P < 0.01$)。

以上结果表明炒酸枣仁低剂量组对 ZT0 和 ZT6

时间点的调控力较强, 炒酸枣仁高剂量组对 ZT0、ZT6、ZT18 的调控力较强, 炒酸枣仁高剂量组能够使 *Clock*、*Bmal1*、*Rora*、*Per2*、*Cry1*、*Rev-erba* 基因的表达量均得到恢复, 趋势与空白组一致。后续实验选择炒酸枣仁高剂量组进行研究, 同时考虑到实验涉及时间点的复杂性, 选取 ZT6 和 ZT18 时间点 (ZT6 为光照期的中间时间点, ZT18 为黑暗期的中间时间点) 进行肠道菌群、SCFAs、脑代谢组学研究。

3.3 炒酸枣仁对 CRSWD 小鼠肠道菌群结构的影响

3.3.1 ASV/分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 韦恩图分析 ZT6、ZT18 时空白组特有的菌群分别为 990、776 个, 共有的菌群有 1 313 个, 表明空白组小鼠的菌群结构随着昼夜节律发生振荡 (图 4-A)。此外, ZT6 时空白组与模型组共有的菌群有 927 个, 空白组与炒酸枣仁高剂量组共有

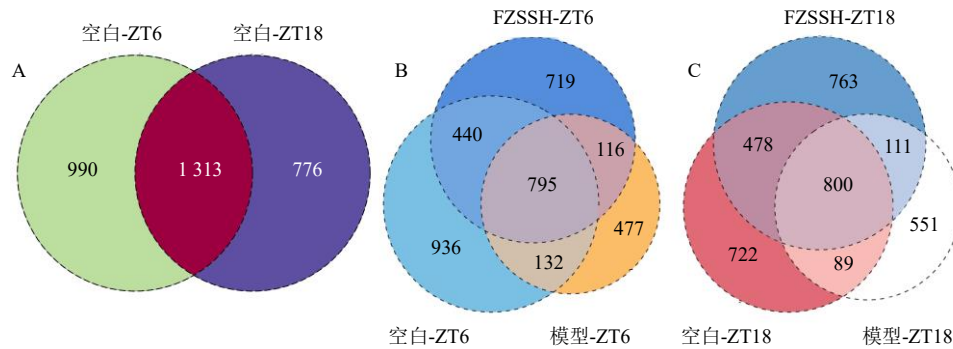


图 4 ZT6 和 ZT18 时空白组 (A)、ZT6 时各组 (B)、ZT18 时各组 (C) 的 ASV/OTU 韦恩图

Fig. 4 ASV/OTU Venn diagram of blank group at ZT6 and ZT18 (A), each group at ZT6 (B), each group at ZT18

的菌群有 1 235 个 (图 4-B); ZT18 时空白组与模型组共有的菌群有 889 个, 空白组与炒酸枣仁高剂量组共有的菌群有 1 278 个 (图 4-C)。表明炒酸枣仁对 CRSWD 小鼠的菌群结构具有较好的调控作用。

3.3.2 α 多样性分析 如图 5-A 所示, 在 ZT6 时小鼠肠道菌群中, 与空白组比较, 模型组 Observed_OTUs、Shannon、Simpson、Chao1、Goods_coverage、Pielou 指数显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明模型组小鼠肠道微生物菌群均匀度、丰富度、多样性以及测序深度显著降低; 与模型组比

较, 炒酸枣仁高剂量组 Simpson 和 Pielou 指数显著升高 ($P < 0.05$), 表明给予炒酸枣仁后小鼠肠道菌群的均匀度和多样性显著增加。如图 5-B 所示, 在 ZT18 时小鼠肠道菌群中, 与空白组比较, 模型组 Shannon、Goods_coverage、Pielou 指数均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001), 表明模型组小鼠肠道菌群多样性和均匀度显著降低; 与模型组比较, 炒酸枣仁高剂量组 Shannon、Goods_coverage、Pielou 指数显著升高 ($P < 0.05$), 表明给予炒酸枣仁后小鼠肠道菌群的测序深度显著增加。

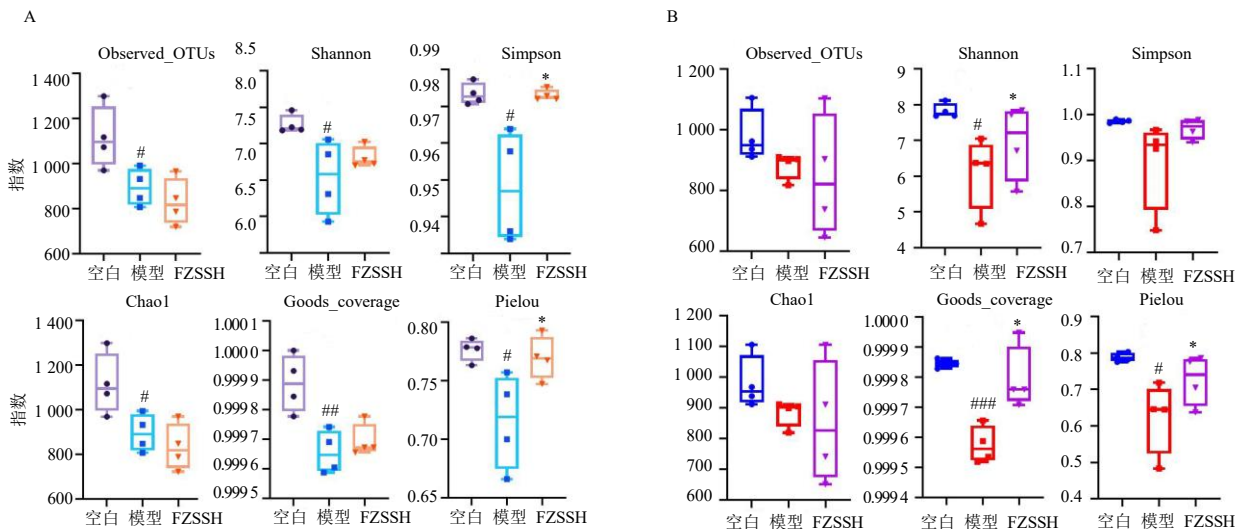


图 5 ZT6 (A)、ZT18 (B) 时各组小鼠肠道微生物的 α 多样性分析 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 5 Analysis of α diversity of gut microbiota of mice in each group at ZT6 (A) and ZT18 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.3.3 β 多样性分析 根据 Bray-Curtis 主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 图, 考察各组样本间群落结构的相似性。如图 6-A 所示, ZT6 时空白组与模型组沿 PCoA2 轴的中心线明显分开, 炒酸枣仁高剂量组与模型组沿 PCoA1 轴和 PCoA2 轴分开。如图 6-B 所示, ZT18 时空白组与模型组沿

PCoA2 轴的中心线明显分开, 炒酸枣仁高剂量组与模型组沿 PCoA1 轴和 PCoA2 轴分开。 β 多样性分析结果表明各组之间都形成了良好的聚类, 模型组与空白组显著分离, 说明 CRSWD 显著干扰了小鼠的肠道微生物结构, 炒酸枣仁干预后显著恢复了 CRSWD 小鼠的菌群结构。

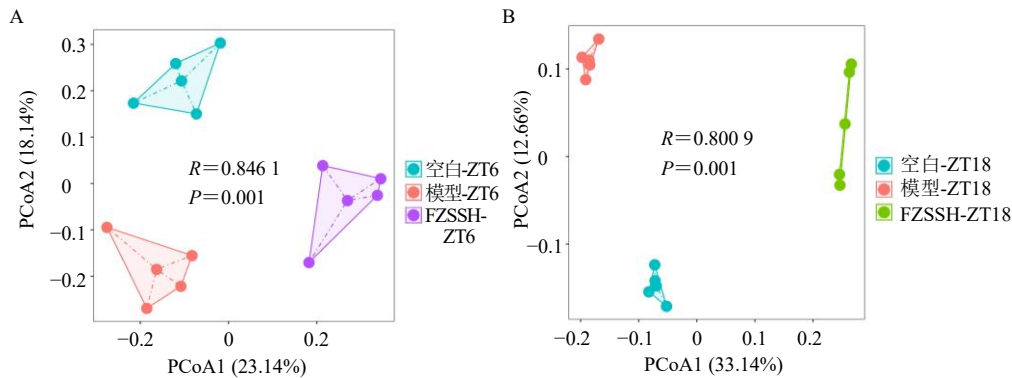


图 6 ZT6 (A)、ZT18 (B) 时各组小鼠肠道微生物的 PCoA 图 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

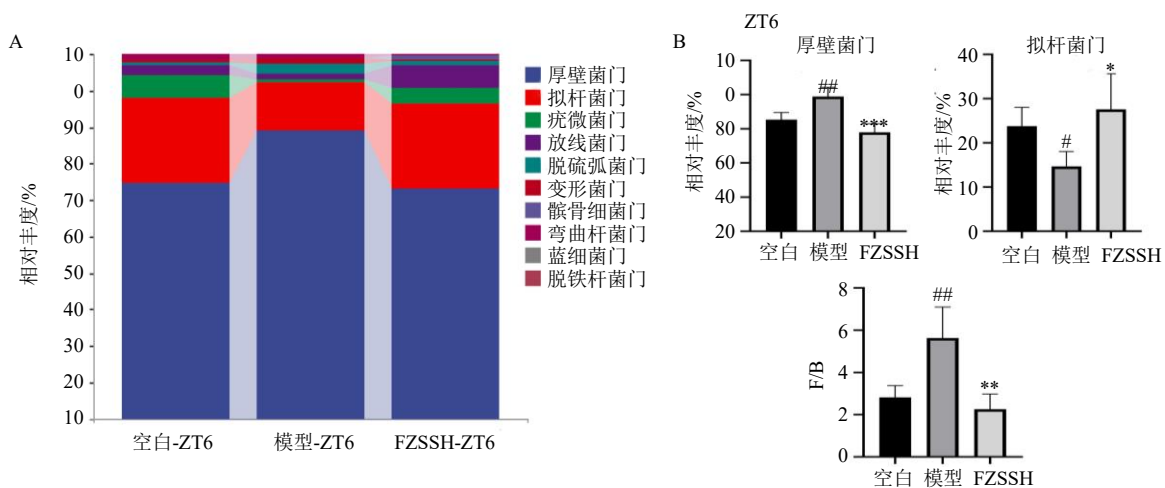
Fig. 6 PCoA of gut microbiota of mice in each group at ZT6 (A) and ZT18 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.3.4 门水平物种组成多样性分析 如图 7-A 所示, 在门水平物种组成分析中, ZT6 时空白组以厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、疣微菌门 (Verrucomicrobiota) 及放线菌门 (Actinobacteriota) 4 个菌群为主。如图 7-B 所示, 与空白组比较, 模型组厚壁菌门相对丰度显著升高 ($P < 0.01$), 拟杆菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.05$), 厚壁菌门/拟杆菌门 (F/B) 的值显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 炒酸枣仁高剂量组厚壁菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.001$), 拟杆菌门相对丰度显著升高 ($P < 0.05$), F/B 的值显著降低 ($P < 0.01$)。

如图 8-A 所示, ZT18 时空白组以厚壁菌门、拟杆菌门、疣微菌门、放线菌门 4 个菌群为主。如图 8-B 所示, 与空白组比较, 模型组拟杆菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 炒酸枣仁

高剂量组厚壁菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.01$), 拟杆菌门相对丰度显著升高 ($P < 0.05$), F/B 的值降低但没有显著性差异。

3.3.5 属水平物种组成多样性分析 如图 9-A 所示, ZT6 时空白组以 Lachnospiraceae_NK4A136_group、Muribaculaceae_unclassified、梭状芽孢杆菌属 *Clostridium* 等菌群为主。与空白组比较, 模型组 Lachnospiraceae_NK4A136_group、Lachnospiraceae_unclassified 相对丰度升高, Muribaculaceae_unclassified、梭状芽孢杆菌属相对丰度降低。与模型组比较, 炒酸枣仁高剂量组 Lachnospiraceae_NK4A136_group、Lachnospiraceae_unclassified 相对丰度降低, Muribaculaceae_unclassified、梭状芽孢杆菌属、联合乳酸杆菌属 *Ligilactobacillus* 相对丰度均升高。



F/B-厚壁菌门/拟杆菌门, 图 8 同。

F/B-Firmicutes/Bacteroidetes, same as Fig. 8.

图 7 ZT6 时门水平物种组成 (A) 以及厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 7 Species composition of phylum level at ZT6 (A) and relative abundance of Firmicutes and Bacteroidetes (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

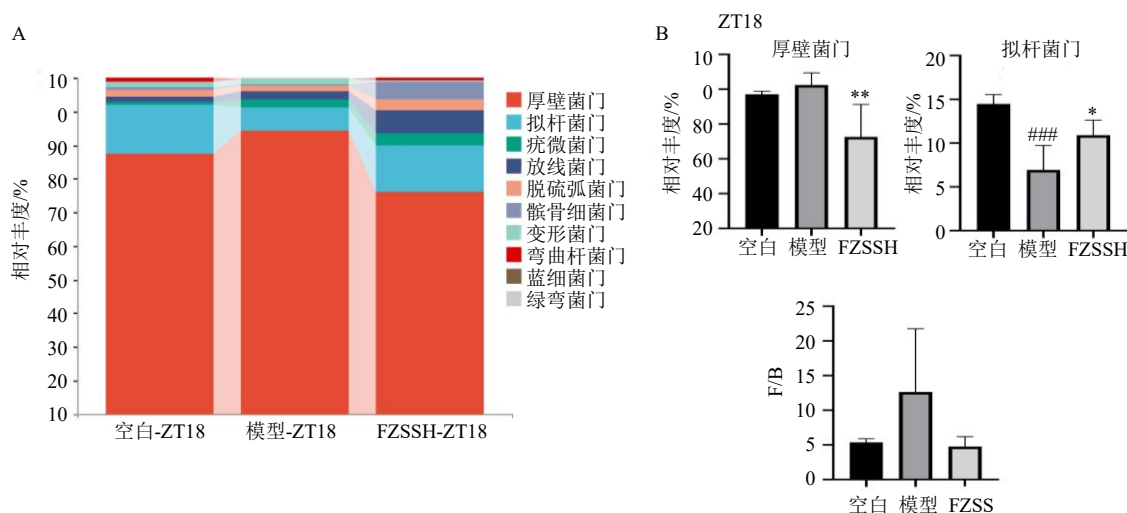


图 8 ZT18 时门水平物种组成 (A) 以及厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 8 Species composition of phylum level at ZT18 (A) and relative abundance of Firmicutes and Bacteroidetes (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

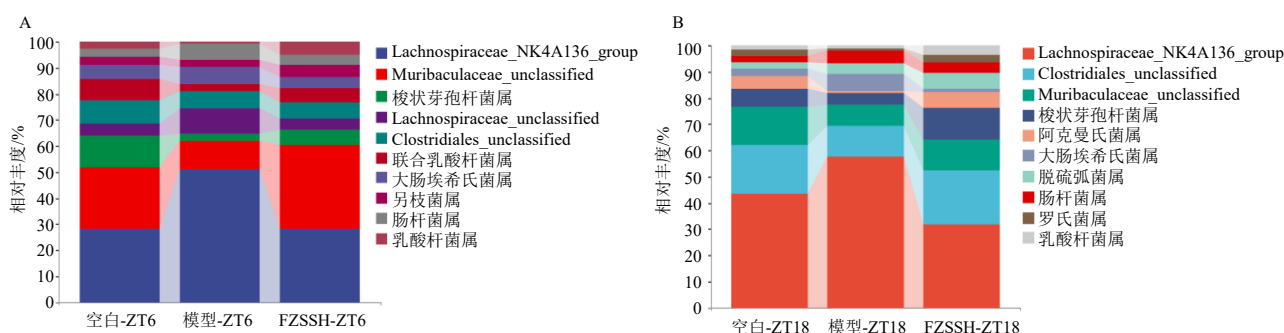


图 9 ZT6 (A)、ZT18 (B) 时属水平物种组成 ($n = 4$)

Fig. 9 Species composition of genus level at ZT6 (A) and ZT18 (B) ($n = 4$)

如图 9-B 所示, ZT18 时空白组以 Lachnospiraceae_NK4A136_group、Clostridiales_unclassified、Muribaculaceae_unclassified、梭状芽孢杆菌属、阿克曼氏菌属 *Akkermansia* 等菌群为主。与空白组比较, 模型组 Lachnospiraceae_NK4A136_group 相对丰度升高, Clostridiales_unclassified 相对丰度降低。与模型组比较, 炒酸枣仁高剂量组 Lachnospiraceae_NK4A136_group 相对丰度降低, Clostridiales_unclassified、梭状芽孢杆菌属、阿克曼氏菌属、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio*、罗氏菌属 *Roseburia*、乳酸杆菌属 *Lactobacillus* 的相对丰度升高。

3.4 结肠内容物中 SCFAs 含量测定

利用 GC-MS 技术对小鼠结肠内容物中 SCFAs 含量进行测定。如图 10-A 所示, 与空白组比较, ZT6 时模型组小鼠结肠内容物中乙酸、丙酸、丁酸、

戊酸、异戊酸、异己酸的含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 与模型组比较, 炒酸枣仁高剂量组乙酸、丁酸的含量显著升高 ($P < 0.05$)。

如图 10-B 所示, 与空白组比较, ZT18 时模型组小鼠结肠内容物中乙酸、丙酸、丁酸、异己酸的含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 炒酸枣仁高剂量组乙酸、丙酸、丁酸、异己酸的含量显著升高 ($P < 0.05$)。

3.5 肠道菌群与 SCFAs 的相关性分析

采用 Spearman 相关性分析, 将 ZT6 和 ZT18 时属水平相对丰度前 10 的肠道菌群与 SCFAs 进行相关性分析。如图 11-A 所示, ZT6 时 Lachnospiraceae_NK4A136_group、肠杆菌属 *Enterobacter* 与乙酸、异丁酸呈显著负相关。此外, 肠杆菌属还与丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、异己酸呈显著负相关。梭状芽孢杆菌属与乙酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、异

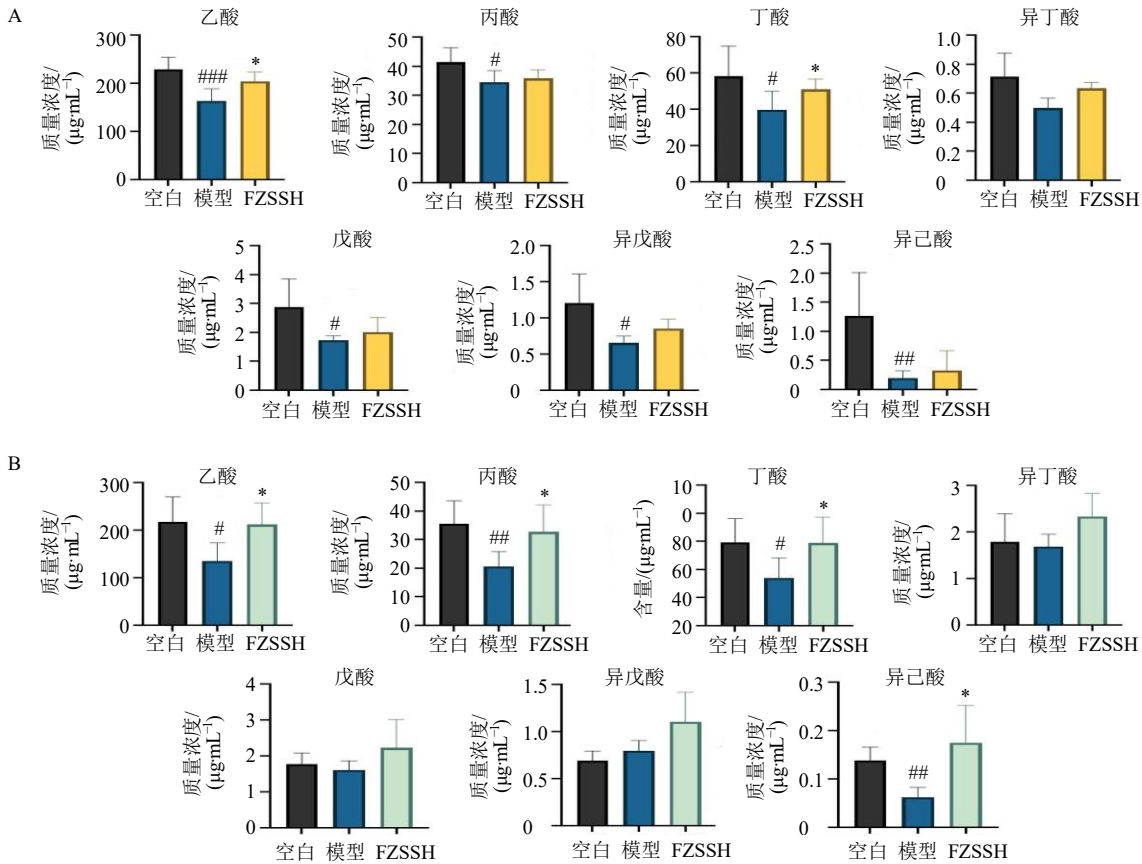
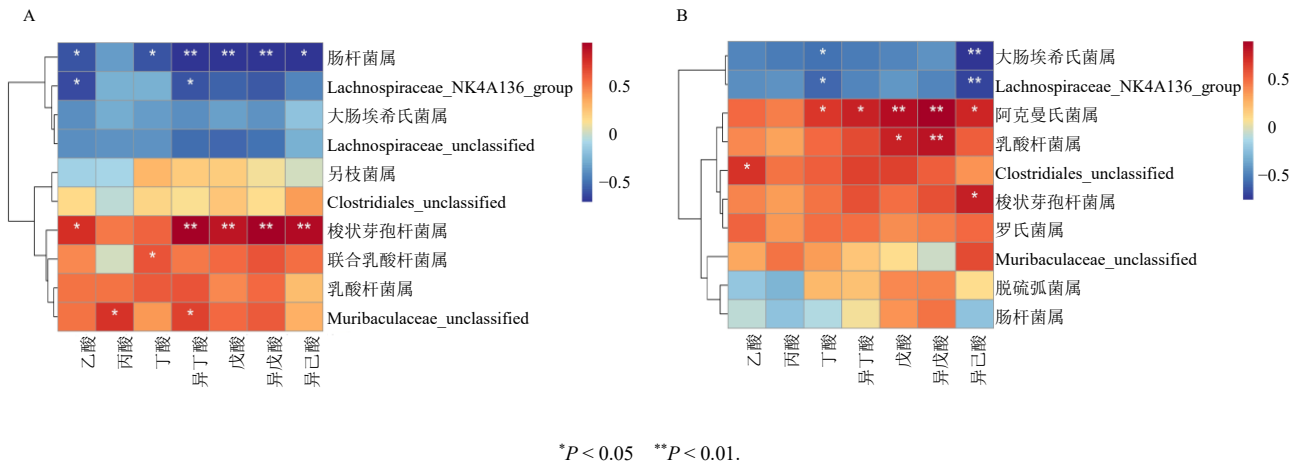


图 10 ZT6 (A)、ZT18 (B) 时小鼠结肠内容物 SCFAs 的含量 ($n = 4$)

Fig. 10 Contents of SCFAs in colonic contents of mice at ZT6 (A) and ZT18 (B) ($n = 4$)



* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

图 11 ZT6 (A)、ZT18 (B) 时小鼠肠道菌群与 SCFAs 相关性分析 ($n = 4$)

Fig. 11 Correlation analysis between gut microbiota and SCFAs in mice at ZT6 (A) and ZT18 (B) ($n = 4$)

己酸呈显著正相关, 联合乳酸杆菌属与丁酸呈显著正相关, Muribaculaceae_unclassified 与丙酸、异丁酸呈显著正相关。

如图 11-B 所示, ZT18 时大肠埃希菌 *Colidextribacter*、Lachnospiraceae_NK4A136_group

与丁酸、异己酸呈显著负相关。阿克曼氏菌属与丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、异己酸呈显著正相关。乳酸杆菌与戊酸、异戊酸呈显著正相关, Clostridiales_unclassified 与乙酸呈显著正相关, 梭状芽孢杆菌属与异己酸呈显著正相关。

3.6 脑代谢组学结果

3.6.1 质控样品评价 质控样品可用来评价整个分析过程及分析方法的重现性和稳定性。ZT6 和 ZT18 时正、负离子下质控样品均在 SD 的 2 倍范围内, 表明分析过程方法稳定性和重复性良好, 适合大批量进样。

3.6.2 代谢轮廓分析 采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术分别对空白组、模型组、炒酸枣仁高剂量组进行正、负离子模式下数据采集, 将获得的质谱原始

数据导入 SIMCA-P 14.1 软件进行 PLS-DA。如图 12-A、B 所示, ZT6 时正、负离子模式下空白组与模型组沿 $t[2]$ 轴明显分开, 表明空白组与模型组存在差异。正、负离子下炒酸枣仁高剂量组均位于空白组和模型组中间, 表明炒酸枣仁高剂量组有回调的趋势。图 12-C、D 显示各组数据均在 99% 的置信区间内, 表明数据可信。

如图 13-A、B 所示, ZT18 时正、负离子模式下空白组与模型组沿 $t[2]$ 轴明显分开, 表明空白组

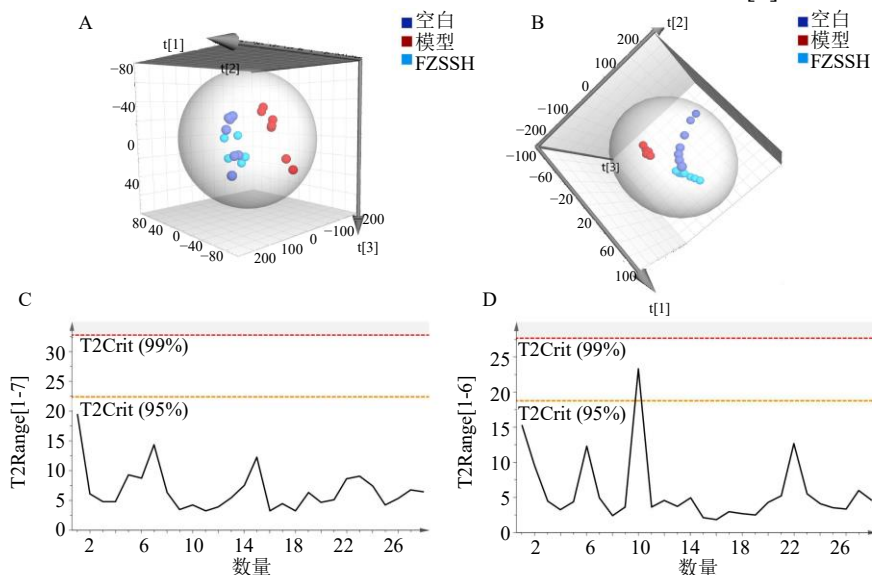


图 12 ZT6 时脑组织正、负离子下 PLS-DA 图 (A、B) 以及各组数据的置信区间 (C、D) ($n = 6$)

Fig. 12 PLS-DA (A, B) of brain tissue under positive and negative ions and confidence interval of data in each group at ZT6 (C, D) ($n = 6$)

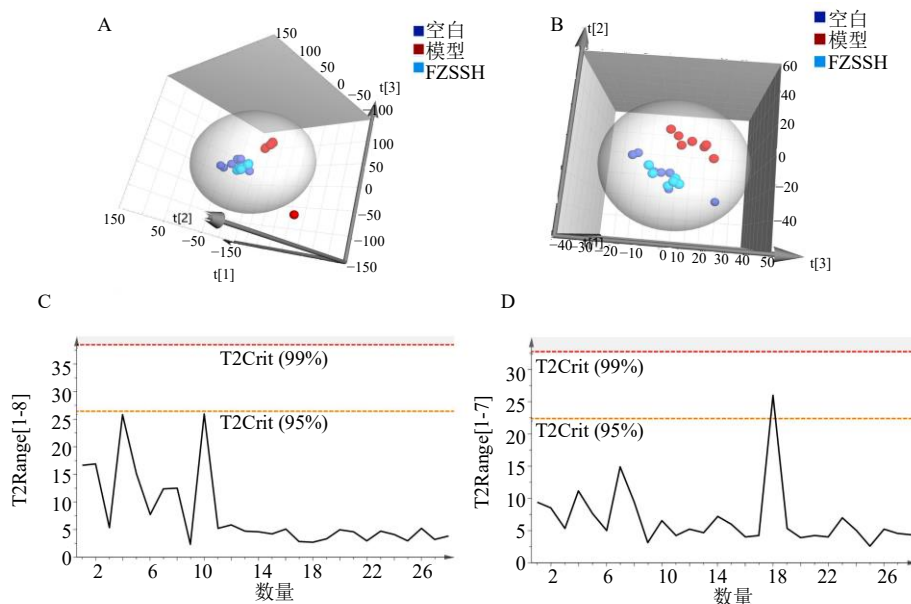


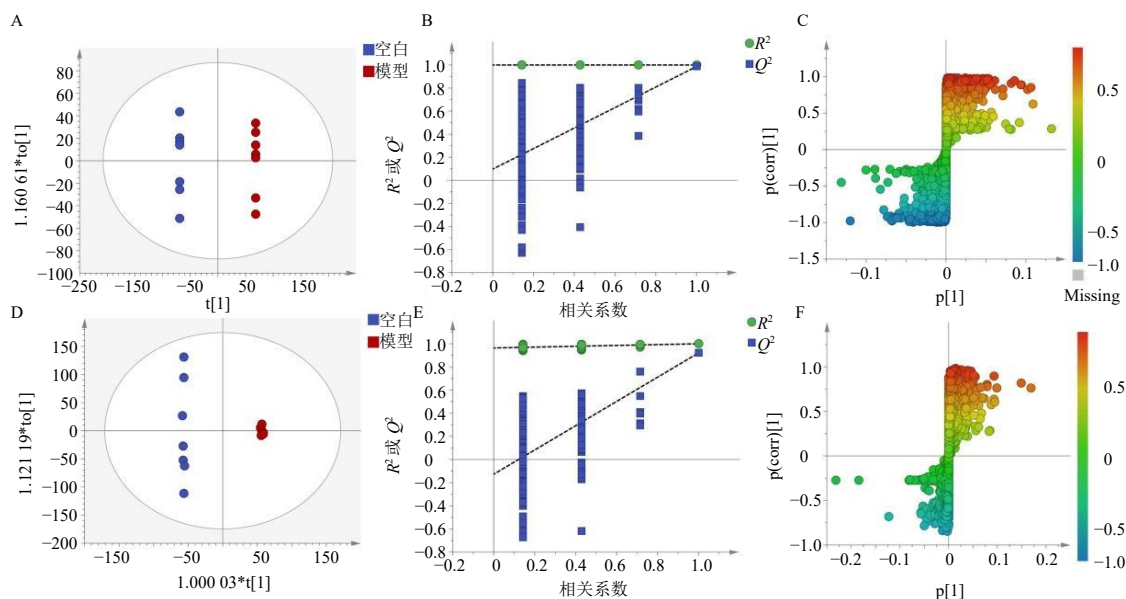
图 13 ZT18 时脑组织正、负离子下 PLS-DA 图 (A、B) 以及各组数据的置信区间 (C、D) ($n = 6$)

Fig. 13 PLS-DA (A, B) of brain tissue under positive and negative ions and confidence interval of data in each group at ZT18 (C, D) ($n = 6$)

与模型组存在差异。正、负离子下炒酸枣仁高剂量组均位于空白组和模型组中间,表明炒酸枣仁高剂量组有回调的趋势。图 13-C、D 显示各组数据均在 99% 的置信区间内,表明数据可信。从整体代谢物分析,CRSWD 干扰了小鼠的正常代谢,而炒酸枣仁高剂量组与模型组脑组织样本显著分开,且趋近空白组,提示炒酸枣仁对模型小鼠的代谢物有调控作用。

3.6.3 代谢轮廓分析 为进一步确定给药后小鼠

内源性代谢物的差异,对 ZT6 时模型组与空白组进行有监督的 OPLS-DA,如图 14 所示,从得分散点图可以看出模型组和空白组可以明显分开。所得模型参数 ZT6 时正离子模式下为 $R^2_Y=0.995$ 、 $Q^2=0.965$; 负离子模式下为 $R^2_Y=0.982$ 、 $Q^2=0.912$; 模型 R^2_Y 、 Q^2 均接近 1,表明模型具有较高的解释率及预测率。200 次模型验证结果表明,左边的 R^2 点和 Q^2 点低于右边, Q^2 点的回归线与纵轴相交于原点以下,表明未产生过分拟合,模型可靠。



A~C-正离子模式, D~F-负离子模式, 图 16 同。

A~C-positive ion mode, D~F-negative ion mode, same as Fig. 16.

图 14 ZT6 时正、负离子模式下脑组织的 OPLS-DA 得分图 (A、D) 及模型验证图 (B、C、E、F) ($n = 6$)

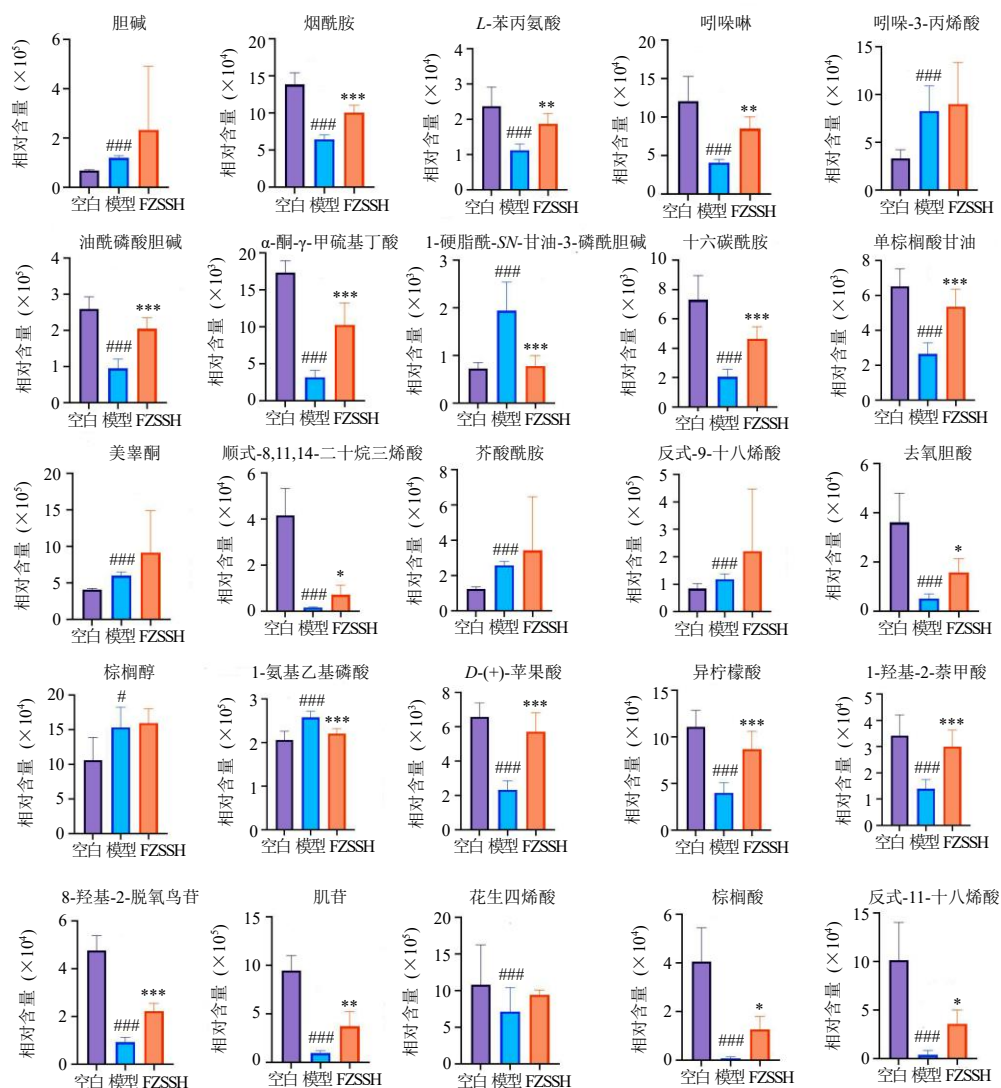
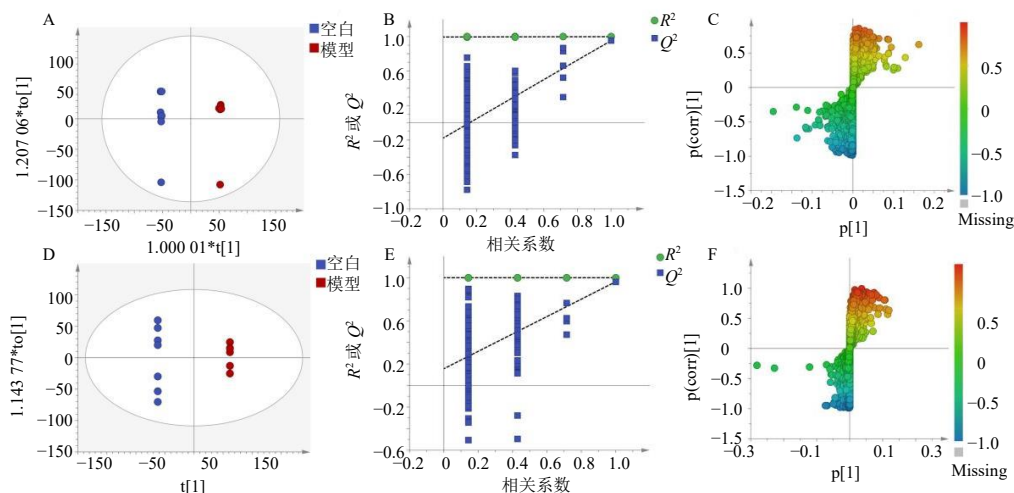
Fig. 14 OPLS-DA score map (A, D) and model validation diagram (B, C, E, F) of brain tissue in positive and negative ion modes at ZT6 ($n = 6$)

基于上述 OPLS-DA 模型,以 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 为筛选条件,结合数据库进行鉴定。ZT6 时模型组小鼠脑组织中共鉴定出 25 个与 CRSWD 相关的潜在生物标志物,其中正离子模式下 16 种差异代谢物,负离子模式下 9 种差异代谢物。如图 15 所示,与空白组比较,模型组胆碱、吡啶-3-丙烯酸等 8 个差异代谢物的水平显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.001),烟酰胺、L-苯丙氨酸等 17 个差异代谢物的水平显著下调 ($P < 0.001$)。与模型组比较,炒酸枣仁高剂量组 1-硬脂酰-SN-甘油-3-磷酸胆碱、1-氨基乙基磷酸 2 个差异代谢物的水平显著下调 ($P < 0.001$),烟酰胺、L-苯丙氨酸等 16 个差异代谢物的水平显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

对 ZT18 时模型组与空白组进行有监督的

OPLS-DA,如图 16 所示,ZT18 时正离子模式下为 $R^2_Y=1$ 、 $Q^2=0.952$,负离子模式下为 $R^2_Y=1$ 、 $Q^2=0.962$; 模型 R^2_Y 、 Q^2 均接近 1,表明模型具有较高的解释率及预测率。200 次模型验证结果表明,左边的 R^2 点和 Q^2 点低于右边, Q^2 点的回归线与纵轴相交于原点以下,表明未产生过分拟合,模型可靠。

ZT18 时模型组小鼠脑组织中共鉴定出 16 个与失眠相关的潜在生物标志物,其中正离子模式下 8 种,负离子模式下 8 种。如图 17 所示,与空白组比较,模型组十六碳酰胺、顺式-8,11,14-二十烷三烯酸等 16 个差异代谢物的水平显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 与模型组比较,炒酸枣仁高剂量组吡啶、烟酰胺等 9 个差异代谢物的水平显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

图 15 ZT6 时脑组织中差异代谢物相对含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 15 Changes in relative content of differential metabolites in brain tissue at ZT6 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)图 16 ZT18 时正、负离子模式下脑组织的 OPLS-DA 得分图 (A、D) 及模型验证图 (B、C、E、F) ($n = 6$)Fig. 16 OPLS-DA score map (A, D) and model validation diagram (B, C, E, F) of brain tissue in positive and negative ion modes at ZT18 ($n = 6$)

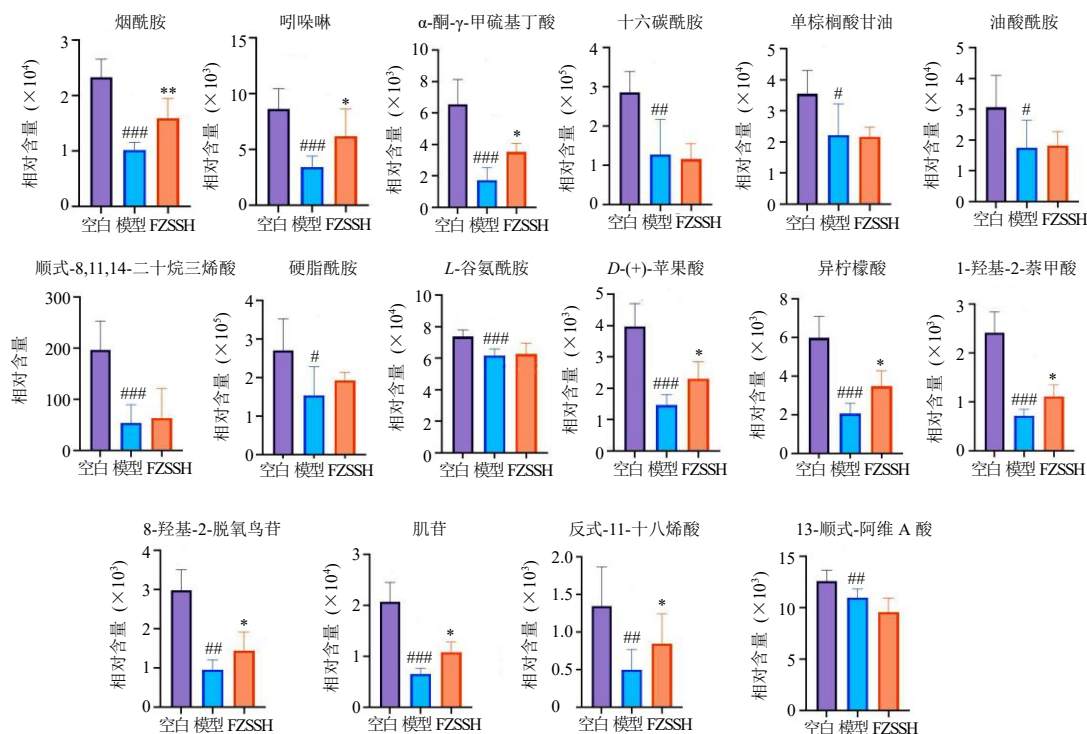


图 17 ZT18 时脑组织中差异代谢物相对含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 17 Changes in relative content of differential metabolites in brain tissue at ZT18 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.6.4 代谢通路分析 将以上筛选得到的潜在生物标志物分别输入 MetaboAnalyst 5.0 进行通路分析^[17]。ZT6 时空白组和模型组共得到苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 苯丙氨酸代谢等 7 条与 CRSWD 相关的代谢通路 (图 18-A)。炒酸枣仁高剂量组作用的 18 种生物标志物能调控其中 5 条代谢通路 (图 18-B), 分别为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 苯丙氨酸代谢, 烟酸和烟酰胺代谢, 半胱氨酸

和蛋氨酸代谢, 三羧酸循环。

ZT18 时空白组和模型组共得到 4 条与昼夜节律紊乱相关的代谢通路, 分别为烟酸和烟酰胺代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 三羧酸循环, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (图 19-A)。炒酸枣仁高剂量组作用的 9 种生物标志物能调控其中 3 条代谢通路 (图 19-B), 分别为烟酸和烟酰胺代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、三羧酸循环。

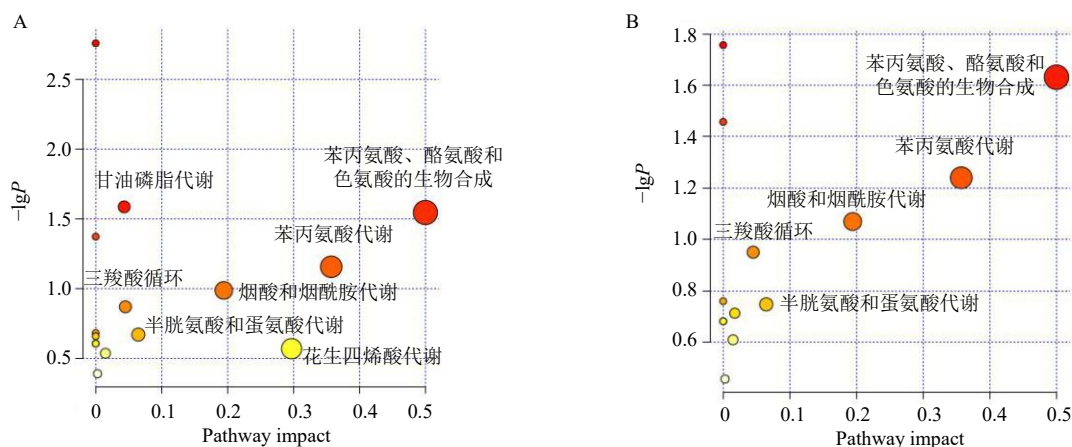


图 18 ZT6 时空白组与模型组 (A)、模型组与炒酸枣仁高剂量组 (B) 小鼠脑代谢通路分析

Fig. 18 Analysis of brain metabolic pathways in mice at ZT6 in blank group and model group (A), model group and fried *Ziziphi Spinosae Semen* high-dose group (B)

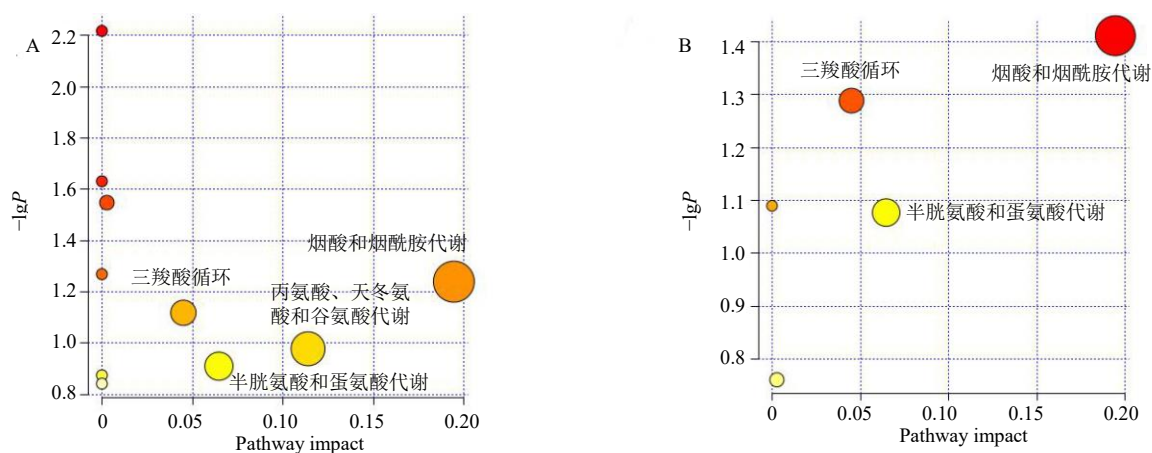


图 19 ZT18 时空白组与模型组 (A)、模型组与炒酸枣仁高剂量组 (B) 小鼠脑代谢通路分析

Fig. 19 Analysis of brain metabolic pathways in mice at ZT18 in blank group and model group (A), model group and fried *Ziziphi Spinosae Semen* high-dose group (B)

3.6.5 ZT6 和 ZT18 时差异代谢通路的韦恩图分析

将 ZT6 与 ZT18 的差异代谢物和代谢通路绘制韦恩图进行分析。如图 20 所示, ZT6 和 ZT18 共有的差异代谢物有 12 个, ZT6 特有的代谢物有 13 个, ZT18 特有的代谢物有 4 个。ZT6 和 ZT18 共有的代谢通路有 3 条, 分别为烟酸和烟酰胺代谢、三羧酸循环、半

胱氨酸和蛋氨酸代谢。ZT6 有特有的通路有 4 条, 分别为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、苯丙氨酸代谢、花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢。ZT18 有特有的通路有 1 条, 为丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。以上结果表明, 不论是差异代谢物还是代谢通路, 都随着昼夜节律的变化发生了改变。

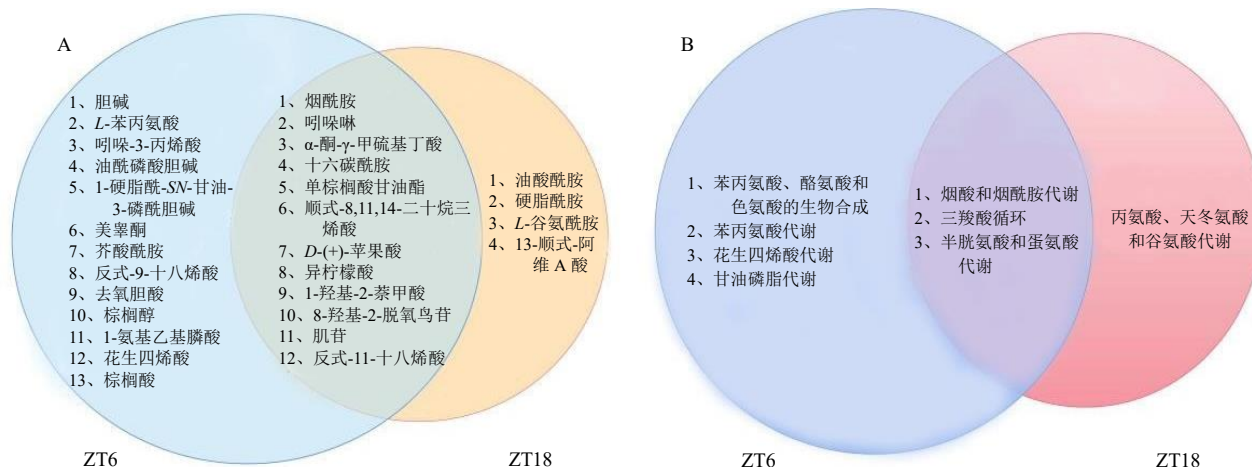


图 20 ZT6 和 ZT18 时差异代谢物 (A) 和差异代谢通路 (B) 的韦恩图

Fig. 20 Venn diagram of differential metabolite (A) and differential metabolic pathway (B) at ZT6 and ZT18

4 讨论

本研究从节律生物钟基因水平、肠道菌群、脑代谢组学等多角度, 揭示了炒酸枣仁治疗 CRSWD 小鼠模型的作用机制。本研究中, 空白组和模型组小鼠的摄食量并未发生明显的变化, 但模型组小鼠体质量出现显著升高, 这种体质量的变化可能是由于昼夜节律紊乱导致的体内代谢异常引起的。研究表明, 延长光照时间, 小鼠每天进食的比例改变,

小鼠体质量、脂肪含量升高, 褪黑素、糖皮质激素含量降低, 但小鼠总卡路里的摄入量保持不变^[18]。与模型组比较, 给予炒酸枣仁后小鼠摄食量没有显著变化, 但体质量降低, 可能是由于给药后, 昼夜节律紊乱有所改善, 引起代谢功能的恢复, 从而导致体质量的降低。

哺乳动物的分子生物钟由连锁的转录-翻译反馈回路形成。在生物钟核心反馈回路中, 转录因子

Clock-Bmal1 诱导其自身的负调控因子 Per 和 Cry 蛋白的表达。Per 和 Cry 通过抑制 Clock-Bmal1 的转录活性来抑制自身的表达^[19]。结果显示,空白组小鼠正反馈基因 *Clock*、*Bmal1*、*ROra* 的表达量在光期降低、暗期升高,而负反馈基因 *Per1*、*Per2* 的表达量在光期升高、暗期降低;而模型组小鼠的生物钟基因发生了紊乱。炒酸枣仁可以调控模型小鼠下丘脑中 *Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Per2*、*Cry1*、*ROra*、*Rev-erba* 7 个生物钟基因,使其恢复到与空白组昼夜节律振荡趋势一致。提示炒酸枣仁可能通过调控核心生物钟基因的表达,从而发挥治疗 CRSWD 的作用。

睡眠具有独特的昼夜节律特征,肠道微生物群也有昼夜节律。已有研究表明,昼夜节律紊乱会导致肠道菌群的丰度和多样性降低,且 F/B 的值升高,F/B 常作为判断肠道菌群失衡的重要指标之一^[20]。研究表明,毛螺菌科细菌丰度升高可能导致代谢综合征、肥胖、糖尿病、肝病、抑郁症、多发性硬化症综合征等炎症性疾病^[21]。本研究中模型组毛螺菌科菌群的相对丰度显著升高,而给予炒酸枣仁后毛螺菌科菌群相对丰度显著降低。此外,给予炒酸枣仁后,还显著增加了乳酸杆菌属、罗氏菌属和梭状芽孢杆菌属的相对丰度。研究表明,乳酸杆菌属丰度的变化可能会导致失眠等多种神经性疾病的发生^[22]。有文献报道乳酸杆菌属可产生丁酸,为肠嗜络细胞提供能量,从而产生 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)^[23-24]。本研究中炒酸枣仁可能通过调控乳酸杆菌属,促进肠道 5-HT 合成从而发挥调节睡眠-觉醒的作用。罗氏菌属和梭状芽孢杆菌属可以产生丁酸^[25-26],研究表明丁酸的增加可能有助于睡眠的改善^[27]。

睡眠障碍和肠道微生物群之间存在着牢固的联系,包括微生物群代谢物的调节。已有研究表明在 48 h 内,观察到了粪便丁酸盐的昼夜节律振荡,乙酸辅酶 A 转移酶在小鼠盲肠内容物中也表现出昼夜模式。乙酸和丁酸可以调节节律基因 *Per2* 和 *Bmal1* 的表达^[28]。SCFAs 在微生物-肠-脑轴通信中起着关键作用。SCFAs 通过与免疫细胞相互作用,减少炎症,防止细菌及其副产品的进入,从而增强肠道屏障,这些作用可能会减轻大脑中的神经炎症^[29]。本研究中,炒酸枣仁显著调节了乙酸、丁酸的含量。属水平研究中,梭状芽孢杆菌属、乳酸杆菌属、罗氏菌属相对丰度在炒酸枣仁高剂量组中显著升高,并

且已有文献报道上述 3 种肠道菌群均可产生丁酸,提示炒酸枣仁可能通过促进这些有益菌的生长,增加 SCFAs 的产生,从而维持宿主的昼夜节律稳态。

分子时钟的基因对代谢物谱有深远的影响。三羧酸循环、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢是 ZT6 和 ZT18 时共有的代谢通路。研究表明,生物节律和内稳态是调控睡眠的 2 大关键因素,二者又互为影响。一方面生物钟的节律表达参与了机体能量代谢的调控,另一方面昼夜节律的破坏是诱发代谢性疾病的危险因素^[30]。柠檬酸是三羧酸循环中的重要成分,维持三羧酸循环中的能量供应。刘鑫等^[31]发现老年慢性睡眠剥夺模型大鼠肝脏三羧酸循环速率减慢,继而导致能量代谢紊乱。半胱氨酸和蛋氨酸代谢在维持体内自由基的平衡和稳定方面发挥着重要作用^[32]。蛋氨酸作为体内最根本的含硫化合物,其代谢产生 α 酮丁酸可转变为琥珀酸单酰辅酶 A,进入能量代谢的三羧酸循环,而三羧酸循环是体内获取能量的主要方式^[33]。烟酰胺在烟酰胺单核苷酸腺苷酸转移酶的作用下产生烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺),NAD⁺通过沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)调节睡眠失常、机体紊乱的生物钟,改善昼夜节律颠倒或年龄增长引起的睡眠障碍^[34]。本研究提示炒酸枣仁在 ZT6 和 ZT18 时可通过回调异柠檬酸、烟酰胺等代谢物的含量调节以上循环途径发挥改善 CRSWD 作用。

肠道微生物群是胃肠道的重要组成部分,它作为人体的“微生物器官”,是脑-肠轴双向交流作用的重要参与者。本研究发现炒酸枣仁可以显著上调梭状芽孢杆菌属、乳酸杆菌属的丰度,已有研究报道在敲除 *Bmal1* 基因的小鼠中,梭状芽孢杆菌、乳酸杆菌属的丰度发生显著变化,梭状芽孢杆菌、乳酸杆菌属的微生物节律性受到宿主昼夜节律的控制^[35]。人体中 90% 的 5-HT 主要是由肠道中的嗜络细胞产生^[36],梭状芽孢杆菌、乳酸杆菌是肠道中产生丁酸的主要微生物,而丁酸是肠道嗜络细胞的主要能量来源,同时肠嗜络细胞亦是肠道中神经递质 5-HT 的主要分泌细胞^[24],肠道微生物群可能通过 5-HT 系统调节睡眠-觉醒的昼夜节律^[37]。此外,乳酸杆菌还可以产生乙酰胆碱,并通过迷走神经通路进入中枢神经系统,调节睡眠-觉醒昼夜节律^[37]。本研究中苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成途径是炒酸枣仁调控的脑代谢通路,该代谢通路与体内神经

递质水平密切相关, 苯丙氨酸经过苯丙氨酸羟化酶作用合成酪氨酸, 酪氨酸是产生多巴胺必须的氨基酸, 而色氨酸是 5-HT 的合成前体^[38]。多巴胺对去甲肾上腺素的产生至关重要。这些神经递质均参与睡眠-觉醒过程^[39]。因此, 本研究提示炒酸枣仁可能通过调节梭状芽孢杆菌、乳酸杆菌及其代谢产物丁酸的含量, 进一步影响体内氨基酸代谢通路, 从而干预睡眠-觉醒昼夜节律。

综上, 本研究从节律生物钟基因水平、肠道菌群、脑代谢组学等多角度, 揭示了炒酸枣仁治疗 CRSWD 小鼠模型的作用。炒酸枣仁治疗 CRSWD 的作用机制如炒酸枣仁如何影响肠道菌群, 调控生物钟基因及其蛋白的表达量, 进而发挥治疗 CRSWD 的作用仍需进一步深入研究。本研究为阐明炒酸枣仁治疗 CRSWD 的作用机制提供实验基础, 为炒酸枣仁的临床合理用药提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁·陶弘景撰, 尚志钧辑校, 尚元胜, 尚元藕, 黄自冲整理. 名医别录: 辑校本 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 20-21.
- [2] 明·李时珍. 本草纲目 (校点本第三册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 2088.
- [3] 朱晓钗, 刘晓, 汪小莉, 等. 基于“生效熟增”论探讨酸枣仁炮制方法历史沿革及其镇静催眠作用物质基础 [J]. 中药材, 2017, 40(8): 1991-1995.
- [4] 任天航, 李喆, 廉婧, 等. UPLC-MS 法测定酸枣仁炮制前后的 12 种成分 [J]. 华西药学杂志, 2023, 38(3): 300-305.
- [5] Sateia M J. International classification of sleep disorders-third edition: Highlights and modifications [J]. *Chest*, 2014, 146(5): 1387-1394.
- [6] Buscemi N, Vandermeer B, Hooton N, *et al*. Efficacy and safety of exogenous melatonin for secondary sleep disorders and sleep disorders accompanying sleep restriction: Meta-analysis [J]. *BMJ*, 2006, 332(7538): 385-393.
- [7] 张正一, 李廷利, 王艳艳, 等. 刺五加对大鼠睡眠-觉醒节律的影响及脑内 GABA、L-Glu 含量变化的研究 [J]. 中医药学报, 2022, 50(8): 17-21.
- [8] 徐文祥, 阮养春, 卞宏生, 等. 酸枣仁冻干粉对大鼠睡眠觉醒状态及能量代谢率的干预作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(2): 305-310.
- [9] Ko C H, Takahashi J S. Molecular components of the mammalian circadian clock [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15 Spec No 2: R271-R277.
- [10] Navara K J, Nelson R J. The dark side of light at night: Physiological, epidemiological, and ecological consequences [J]. *J Pineal Res*, 2007, 43(3): 215-224.
- [11] Paschos G K, FitzGerald G A. Circadian clocks and metabolism: implications for microbiome and aging. *Trends in Genetics*, 33(10): 760-769.
- [12] Silva Y P, Bernardi A, Frozza R L. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 25.
- [13] Fustin J M, Doi M, Yamada H, *et al*. Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: Temporal segregation of metabolites [J]. *Cell Rep*, 2012, 1(4): 341-349.
- [14] 李泽, 杜鹤, 解玉军, 等. 基于多元统计分析和网络药理学的炒酸枣仁饮片质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4811-4824.
- [15] 杨馥源. 采收期对酸枣仁品质影响研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [16] Song D, Ho C T, Zhang X, *et al*. Modulatory effect of *Cyclocarya paliurus* flavonoids on the intestinal microbiota and liver clock genes of circadian rhythm disorder mice model [J]. *Food Res Int*, 2020, 138(Pt A): 109769.
- [17] 衡依然, 段慧竹, 杜鹤, 等. 酸枣仁总皂苷改善对氯苯丙氨酸诱导失眠大鼠模型学习记忆损伤机制的研究 [J]. 中草药, 2022, 53(21): 6759-6770.
- [18] Wideman C H, Murphy H M. Constant light induces alterations in melatonin levels, food intake, feed efficiency, visceral adiposity, and circadian rhythms in rats [J]. *Nutr Neurosci*, 2009, 12(5): 233-240.
- [19] Frazier K, Frith M, Harris D, *et al*. Mediators of host-microbe circadian rhythms in immunity and metabolism [J]. *Biology*, 2020, 9(12): 417.
- [20] 李青, 王博, 邱弘毅, 等. 昼夜节律紊乱对肠道微生物和粪便代谢组学影响的实验研究 [J]. 国际消化病杂志, 2022, 42(2): 126-133.
- [21] Yang Y, Liu J, Ou H S, *et al*. Study on the mechanism of Jiaotai Pill intervention on insomnia animal model based on gut microbiome and metabolomics [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2023, 2023: 2442505.
- [22] Ho Y T, Tsai Y C, Kuo T B J, *et al*. Effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on depressive symptoms and sleep quality in self-reported insomniacs: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial [J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2820.
- [23] Zheng Y, Wang P, Yang X Y, *et al*. Metagenomics insight into bioaugmentation mechanism of *Propionibacterium acidipropionici* during anaerobic acidification of kitchen waste [J]. *Bioresour Technol*, 2022, 362: 127843.

- [24] Huang T T, Lai J B, Du Y L, *et al.* Current understanding of gut microbiota in mood disorders: An update of human studies [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 98.
- [25] Deng Z Z, Wu N, Wang J, *et al.* Dietary fibers extracted from *Saccharina japonica* can improve metabolic syndrome and ameliorate gut microbiota dysbiosis induced by high fat diet [J]. *J Funct Foods*, 2021, 85: 104642.
- [26] Mirzaei R, Dehkhodaie E, Bouzari B, *et al.* Dual role of microbiota-derived short-chain fatty acids on host and pathogen [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 145: 112352.
- [27] Yu L L, Han X, Cen S, *et al.* Beneficial effect of GABA-rich fermented milk on insomnia involving regulation of gut microbiota [J]. *Microbiol Res*, 2020, 233: 126409.
- [28] Leone V, Gibbons S M, Martinez K, *et al.* Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(5): 681-689.
- [29] Magzal F, Even C, Haimov I, *et al.* Associations between fecal short-chain fatty acids and sleep continuity in older adults with insomnia symptoms [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 4052.
- [30] 汪卿, 游秋云, 丁莉, 等. 安寐丹干预斑马鱼睡眠剥夺模型昼夜节律及能量代谢作用机制研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(12): 4873-4880.
- [31] 刘鑫, 游秋云, 王平, 等. 酸枣仁汤对老年慢性快动眼睡眠剥夺模型大鼠肝脏线粒体能量代谢及其机制的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16): 53-58.
- [32] Bin P, Huang R L, Zhou X H. Oxidation resistance of the sulfur amino acids: Methionine and cysteine [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 9584932.
- [33] Mato J M, Alvarez L, Ortiz P, *et al.* S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications [J]. *Pharmacol Ther*, 1997, 73(3): 265-280.
- [34] Levine D C, Hong H, Weidemann B J, *et al.* NAD⁺ controls circadian reprogramming through PER2 nuclear translocation to counter aging [J]. *Mol Cell*, 2020, 78(5): 835-849.
- [35] Parker S G, Kalsbeek A, Cheeseman J F. Potential role for the gut microbiota in modulating host circadian rhythms and metabolic health [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(2): 41.
- [36] Legan T B, Lavoie B, Mawe G M. Direct and indirect mechanisms by which the gut microbiota influence host serotonin systems [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2022, 34(10): e14346.
- [37] Xiang Q, Liu Y N, Wu Z F, *et al.* New hints for improving sleep: Tea polyphenols mediate gut microbiota to regulate circadian disturbances [J]. *Food Front*, 2023, 4(1): 47-59.
- [38] Maffei M E. 5-hydroxytryptophan (5-HTP): Natural occurrence, analysis, biosynthesis, biotechnology, physiology and toxicology [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 181.
- [39] 王宏斌, 杨如意, 曹昌霞, 等. 艾灸结合黄连阿胶汤对 PCPA 致失眠大鼠神经递质 5-HT、5-HIAA、NE、IL-6 水平的影响 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(7): 1623-1626.

[责任编辑 李亚楠]