

异虎耳草素对PCPA致松果体损伤模型大鼠的改善作用及生物钟基因表达的影响^Δ

王丹妮*, 杨 铃, 仲启明, 宋美卿, 仝立国, 贾力莉, 牛艳艳, 冯玛莉[#](山西省中医药研究院, 太原 030012)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)17-2081-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.17.07

摘要 目的:研究异虎耳草素对对氯苯丙氨酸(PCPA)致松果体损伤模型大鼠的改善作用及其对生物钟基因表达的影响。方法:将60只大鼠随机分为空白对照组(2%聚山梨酯80溶液)、模型对照组(2%聚山梨酯80溶液)、阳性对照组(褪黑素,10 mg/kg)和异虎耳草素高、中、低剂量组(3、1.5、0.75 mg/kg),每组10只。除空白对照组外,其余各组大鼠均采用腹腔注射PCPA(450 mg/kg)的方法构建松果体损伤模型。造模结束后,各组大鼠灌胃给药,每天1次,连续7 d。在给药第6天,通过戊巴比妥钠协同睡眠实验考察各组大鼠的入睡潜伏期和睡眠持续时间;末次给药后,采用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中褪黑素水平,分别在荧光显微镜和电子显微镜下观察大鼠松果体组织的病理变化和细胞超微结构改变,并采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法测定大鼠松果体中生物钟基因 *Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Per2*、*Per3*、*Cry1*、*Cry2* mRNA 表达水平。结果:与空白对照组比较,模型对照组大鼠的入睡潜伏期显著延长($P<0.05$);血清中褪黑素水平和松果体中 *Bmal1*、*Per1* mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),*Per3* mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$);松果体细胞排列紊乱、核固缩,空泡变性明显增多,数目明显减少,线粒体多见肿胀、嵴断裂、固缩。与模型对照组比较,异虎耳草素高剂量组大鼠的入睡潜伏期显著缩短($P<0.05$)、睡眠持续时间显著延长($P<0.05$),血清中褪黑素水平和松果体中 *Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Cry1*、*Cry2* mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);异虎耳草素中剂量组大鼠的入睡潜伏期显著缩短($P<0.05$),血清中褪黑素水平和松果体中 *Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Cry1*、*Cry2* mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),*Per3* mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$);异虎耳草素低剂量组大鼠 *Clock*、*Bmal1*、*Per2*、*Cry2* mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$),*Per3* mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$);异虎耳草素各剂量组大鼠松果体细胞排列紊乱均有一定程度改善、核固缩空泡变性减少,线粒体肿胀、嵴断裂、固缩均有一定程度减少。结论:异虎耳草素对PCPA致大鼠松果体损伤具有一定的改善作用;其可上调松果体正向调节因子 *Clock*、*Bmal1* 和负向调节因子 *Per1*、*Per2*、*Cry1*、*Cry2* 的表达,下调负向调节因子 *Per3* 的表达。

关键词 异虎耳草素;松果体;生物钟基因;大鼠

- B7-H1 influences the accumulation of virus-specific tissue resident memory T cells in the central nervous system[J]. *Front Immunol*, 2017. DOI: 10.3389/fimmu. 2017. 01532.
- [20] JUN W, RUIRONG Y, WENRU S, et al. PD-1, PD-L1 (B7-H1) and tumor-site immune modulation therapy: the historical perspective[J]. *J Hematol Oncol*, 2017. DOI: 10. 1186/s13045-017-0403-5.
- [21] OTT PA, HODI FS. The B7-H1/PD-1 pathway in cancers associated with infections and inflammation: opportunities for therapeutic intervention[J]. *Chin Clin Oncol*, 2013. DOI: 10.3978/j.issn.2304-3865.2012.11.05.
- [22] 昭日格图, 张梅华, 贺艳霞, 等. 口腔扁平苔藓外周血 T 细胞 B7-H1/PD-1 信号的表达及其作用[J]. *中国临床研究*, 2017, 30(11): 1479-1480.
- [23] KALMARZI RN, FAKHIMI R, MANOUCHEHRI F, et al. The relationship between B7 homologous 1 with interleukin-4, interleukin-17 and interferon gamma in patients with allergic rhinitis[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2019, 15(8): 897-901.
- [24] LI N, WANG J, ZHANG N, et al. Cross-talk between TNF- α and IFN- γ signaling in induction of B7-H1 expression in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(2): 271-283.
- [25] QIAN J, WANG C, WANG B, et al. The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy[J]. *J Neuroinflammation*, 2018. DOI: 10.1186/s12974-018-1330-2.
- [26] LUCAS ED, FINLON JM, BURCHILL MA, et al. Type 1 IFN and PD-L1 coordinate lymphatic endothelial cell expansion and contraction during an inflammatory immune response[J]. *J Immunol*, 2018, 201(6): 1735-1747.
- [27] CHEN L, FLIES DB. Molecular mechanisms of T cell costimulation and co-inhibition[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(4): 227-242.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173574);山西省自然科学基金资助项目(No.201901D111427)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理。E-mail: wdn0125@163.com

[#] 通信作者:主任医师,硕士生导师,硕士。研究方向:中药药理。E-mail: fengmalil@163.com

(收稿日期:2020-02-05 修回日期:2020-06-05)

(编辑:张元媛)

Improvement Effects of Isopimpinelline on PCPA-induced Pineal Gland Injury Model Rats and Its Effects on Expression of Biological Clock Gene

WANG Danni, YANG Qian, ZHONG Qiming, SONG Meiqing, TONG Ligu, JIA Lili, NIU Yanyan, FENG Mali (Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the improvement effects of isopimpinelline on *p*-chlorophenylalanine (PCPA)-induced pineal injury model rats and its effect on expression of biological clock gene. **METHODS:** Totally 60 rats were divided into blank control group (2% polysorbate solution), model control group (2% polysorbate solution), positive control group (melatonin, 10 mg/kg) and isopimpinelline high-dose, medium-dose and low-dose groups (3, 1.5, 0.75 mg/kg). Except for blank control group, rats in other groups were given PCPA intraperitoneally (450 mg/kg) to establish pineal injury model. After modeling finished, they were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 7 d. On the 6th day of administration, the sleep latency and sleep duration of rats in each group were investigated by pentobarbital sodium coordination sleep test; after last administration, ELISA assay was used to determine the serum level of melatonin in rats. Fluorescence microscope and electron microscope were used to observe the pathological tissue and cell ultrastructure changes of the pineal gland. RT-qPCR was used to detect the mRNA expressions of biological clock gene *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* in pineal gland of rats. **RESULTS:** Compared with blank control group, model control group had significantly longer sleep latency ($P < 0.05$); serum melatonin, mRNA expressions of *Bmal1* and *Per1* in pineal gland were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) while mRNA expression of *Per3* was increased significantly ($P < 0.05$). The pineal gland cell arrangement disorder, nuclear pyknosis, vacuolar degeneration increased and cell number decreased significantly; mitochondria swollen, cristae broken and pyknosis were observed. Compared with model control group, the sleep latency of isopimpinelline high-dose group was shortened significantly ($P < 0.05$), sleep duration time was prolonged significantly ($P < 0.05$); the levels of melatonin in serum, mRNA expressions of *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Cry1* and *Cry2* in pineal gland of rats were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In isopimpinelline medium-dose group, the sleep latency was shortened significantly ($P < 0.05$); the levels of melatonin in serum and mRNA expressions of *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Cry1*, *Cry2* in pineal gland were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while mRNA expression of *Per3* was decreased significantly ($P < 0.05$). In isopimpinelline low-dose group, the levels of mRNA expressions of *Clock*, *Bmal1*, *Per2* and *Cry2* were increased significantly ($P < 0.05$), while mRNA expression of *Per3* was decreased significantly ($P < 0.05$). Cell arrangement disorder was improved and nuclear pyknosis vacuole degeneration was decreased to some extent in isopimpinelline groups; mitochondria swelled, cristae fractured, and pyknosis decreased to some extent. **CONCLUSIONS:** Isopimpinelline can improve PCPA-induced pineal gland injury in rats; it can up-regulate the expressions of positive regulators *Clock*, *Bmal1* and negative regulators *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, while down-regulate the expression of negative regulator *Per3*.

KEYWORDS Isopimpinelline; Pineal gland; Biological clock gene; Rats

松果体(Pineal gland)作为昼夜节律生物钟,主要通过合成、分泌褪黑素进而调节机体昼夜节律、促进睡眠,并且其分泌的褪黑素还具有抗氧化、调节免疫、降血压、抗肿瘤、延缓衰老等作用^[1-2]。松果体损伤会导致褪黑素合成、分泌减少,从而引起机体昼夜节律紊乱。钟振荡器由一组昼夜节律基因及其编码的蛋白组成,是维持内源性生物钟运作的核心元件^[3]。目前,针对哺乳动物研究较多的生物钟基因分别有 *Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Per2*、*Per3*、*Cry1*、*Cry2* 等,其对昼夜节律生物钟机能有着重要作用^[4]。

现代药理学研究表明,蛇床子具有中枢抑制作用,其主要活性成分为蛇床子香豆素类成分,包括异虎耳草素、蛇床子素、佛手柑内酯等^[5]。本实验室前期研究通过谱-效分析发现,异虎耳草素为蛇床子香豆素类主要活性成分之一,具有催眠、提高血清褪黑素水平的作用,并可下调原代海马神经元细胞 *Bmal1* 基因表达,上调 *Cry1*、*Per1*、*Per2* 基因表达,从而调节睡眠-觉醒周期^[6-8]。但其催眠活性是否通过改善松果体损伤及调控

松果体生物钟基因表达尚不明确。鉴于此,本研究通过腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)致大鼠松果体损伤后,观察异虎耳草素对松果体损伤大鼠的睡眠、血清褪黑素水平、松果体组织病理学、细胞超微结构和生物钟基因表达的影响,以期发现含异虎耳草素的中药材或植物药保护松果体的作用及催眠机制,进而为此类药物的临床应用、研发和资源利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

H1 型多功能微孔读板机(美国 Bio-Tek 公司);BX51 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);JEM-1011 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司);7500 型实时荧光定量-聚合酶链式反应(PCR)仪、9902 Veriti 型定性 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);H1 型全功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司)。

1.2 药品与试剂

异虎耳草素对照品(上海融合医药科技有限公司,

批号:150809,纯度:>98%);褪黑素对照品(北京索莱宝生物科技有限公司,批号:917D021,纯度:≥99.0%);PCPA,戊巴比妥钠(美国Sigma公司,批号:10026000696、57-30-0,纯度:100%、>99.0%);聚山梨酯80(湖北省医药公司化玻站,批号:080308,化学纯);褪黑素酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(德国IBL公司,批号:EME174);RNA提取试剂盒、实时荧光定量-PCR检测试剂盒(德国Qiagen公司,批号:160052260、163018617);cDNA合成试剂盒(瑞士Roche公司,批号:04379012001);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。PCR引物均由生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 动物

SPF级健康SD大鼠60只,雄性,体质量160~180g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0002。大鼠购入后饲养于山西省中医药研究院中心实验室,环境温度为22~24℃、相对湿度为40%~50%。本实验严格遵循科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》中对动物处理的有关规定进行操作。

2 方法

2.1 分组与造模

大鼠适应性喂养1周后,根据随机数字表法分为空白对照组、模型对照组、阳性对照组和异虎耳草素高、中、低剂量组,每组10只。除空白对照组外,其余各组大鼠均参考文献方法^[7]并进行优化后复制松果体损伤模型:腹腔注射PCPA混悬液450 mg/kg[按文献方法^[9]加入溶剂0.1 mol/L碳酸盐缓冲液(pH 10.1),80℃水浴加热30 min,超声(功率:250 W,频率:25 kHz)处理5 min,制成4.5%PCPA混悬液],每天1次,连续2 d。空白对照组大鼠腹腔注射等量、等pH的0.1 mol/L碳酸盐缓冲液。

2.2 给药

分别将褪黑素、异虎耳草素溶于2%聚山梨酯80溶液(量取2 mL聚山梨酯80加水至100 mL制得)中,制成褪黑素质量浓度为1 mg/mL和异虎耳草素质量浓度分别为0.3、0.15、0.075 mg/mL的溶液。在“2.1”项下造模后,阳性对照组大鼠灌胃褪黑素10 mg/kg^[10],异虎耳草素高、中、低剂量组大鼠分别灌胃异虎耳草素3、1.5、0.75 mg/kg^[7],空白对照组和模型对照组大鼠灌胃等体积2%聚山梨酯80溶液,每天给药1次,连续给药7 d。

2.3 指标检测

2.3.1 一般情况观察 腹腔注射PCPA混悬液完毕后,观察各组大鼠的精神状态及活动情况。

2.3.2 大鼠戊巴比妥钠协同睡眠实验 给药第6天,各组大鼠均腹腔注射戊巴比妥钠38 mg/kg。睡眠以翻正反射消失为指标;以大鼠背向下姿势保持30 s以上者判断为翻正反射消失。记录注射戊巴比妥钠后至大鼠翻

正反射消失的时间,作为入睡潜伏期;观察并记录大鼠翻正反射消失至觉醒的时间,作为睡眠持续时间。

2.3.3 大鼠血清中褪黑素水平测定 末次给药后2 h时,以10%水合氯醛腹腔内注射麻醉大鼠,然后于腹主动脉取血2 mL。将血样以3 000 r/min离心10 min,收集血清。采用ELISA双抗体夹心法检测血清中褪黑素水平,具体操作按试剂盒说明书进行。

2.3.4 大鼠松果体病理组织学观察 取血后,每组随机选3只大鼠处死并沿枕骨大孔开颅,将大脑人字缝上部充分暴露,可见椭圆形米粒大小的松果体。完整剖取松果体,置于10%甲醛溶液中固定48 h,常规脱水、石蜡包埋、切片(厚度5 μm),然后行苏木精-伊红(HE)染色,在显微镜下观察松果体病理组织学变化。

2.3.5 大鼠松果体超微结构观察 取血后,每组随机选2只大鼠,按“2.3.4”项下方法快速剖取松果体,于30 s内置于2%戊二醛溶液中固定2 h,然后转至0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)中,常规1%锇酸固定、脱水、包埋、切片(厚度70 nm)、电子染色后,置于电子显微镜下观察松果体超微结构变化。

2.3.6 大鼠松果体生物钟基因检测 取血后,取各组剩余的5只大鼠,按“2.3.4”项下方法快速剖取松果体,采用Trizol法分离提取其总RNA,检验纯度和浓度后,将总RNA逆转录为cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系:cDNA模板3 μL,上、下游引物各2.5 μL,2×QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μL、无酶水4.5 μL,总体积为25 μL。反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性5 min,95℃退火10 s,60℃延伸35 s,共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算Clock、Bmal1、Per1、Per2、Per3、Cry1和Cry2基因的mRNA表达水平(其中Ct表示每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环次数)。引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 引物序列及扩增产物长度

Tab 1 Primary sequence and length of amplification product

基因名称	上游(5'→3')	下游(5'→3')	产物长度, bp
Clock	GCCGCAGAATAGCACCCAGAGT	ACTTGGCACCATGACGGCCC	136
Bmal1	CCGATGACGAACTGAAACACC	TCTTCCCTCGGTACATCCT	78
Per1	AGCGCATCCACTCTGGTT	GTCGGTCTCAGGATGTA	183
Per2	GACACCCTACTGGTCAA	CATCCTGGAACAGGCAGT	164
Per3	CCGGGATGTGTGTTCTTGAAG	TGGTGTACTGCAACCATCAGAG	134
Cry1	AATGGAGCCCTGGAGAT	TGGTGTACTGCAACCATCAGAG	235
Cry2	GGCAGAAACCAACCCCTTA	CTAAGGAAGGCACGCCAT	159
GAPDH	ATGGGAAGCTGGTCATCAAC	CCACAGTCTTCTGAGTGGCA	375

2.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学

意义。

3 结果

3.1 一般情况

腹腔注射PCPA完毕后,空白对照组大鼠反应敏捷、迅速,皮毛柔顺光亮;其余大鼠较空白对照组大鼠白天活动增加,易激惹、打斗、嘶叫,头部可见多处皮肤撕咬破损出血,表明模型复制成功。

3.2 大鼠戊巴比妥钠协同睡眠实验结果

与空白对照组比较,模型对照组大鼠的入睡潜伏期显著延长($P<0.05$);睡眠持续时间有一定缩短,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型对照组比较,阳性对照组和异虎耳草素高、中剂量组大鼠的入睡潜伏期均显著缩短($P<0.05$),阳性对照组和异虎耳草素高剂量组大鼠的睡眠持续时间均显著延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠戊巴比妥钠协同睡眠实验结果见表2。

表2 各组大鼠戊巴比妥钠协同睡眠实验结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Results of pentobarbital sodium coordination sleep test in rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	入睡潜伏期,min	睡眠持续时间,min
空白对照组		7.1±3.2	80.2±15.0
模型对照组		12.6±6.9*	78.4±23.3
阳性对照组	10	6.1±2.7 [#]	135.9±25.8 ^{##}
异虎耳草素高剂量组	3	5.8±2.1 [#]	103.6±23.7 [#]
异虎耳草素中剂量组	1.5	6.1±2.9 [#]	84.0±28.4
异虎耳草素低剂量组	0.75	10.8±3.1	63.2±11.5

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. blank control group,* $P<0.05$; vs. model control group,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

3.3 大鼠血清中褪黑素水平测定结果

与空白对照组比较,模型对照组大鼠血清中褪黑素水平显著降低($P<0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组和异虎耳草素高、中剂量组大鼠血清中褪黑素水平显著升高($P<0.01$)。各组大鼠血清中褪黑素水平测定结果见表3。

表3 各组大鼠血清中褪黑素水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Levels of serum melatonin of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

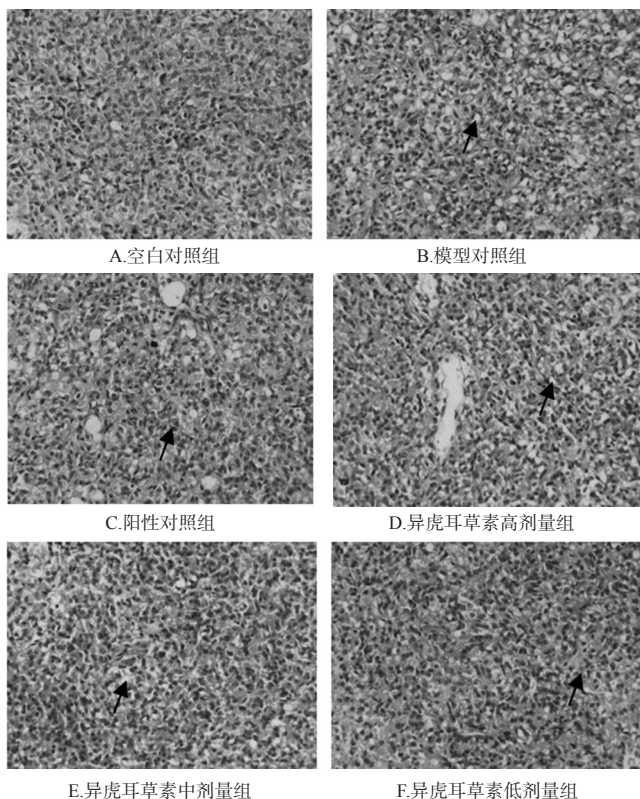
组别	剂量,mg/kg	褪黑素,pg/mL
空白对照组		186.6±18.1
模型对照组		112.1±25.6**
阳性对照组	10	368.1±48.3 ^{##}
异虎耳草素高剂量组	3	212.5±30.8 ^{##}
异虎耳草素中剂量组	1.5	202.4±47.4 ^{##}
异虎耳草素低剂量组	0.75	147.7±50.2

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型对照组比较,^{##} $P<0.01$

Note: vs. blank control group,** $P<0.05$; vs. model control group,^{##} $P<0.01$

3.4 大鼠松果体病理组织学观察结果

空白对照组大鼠松果体细胞和神经胶质细胞排列紧密、均匀分布、清晰可见。模型对照组大鼠松果体细胞排列紊乱、数目明显减少,空泡变性增多,细胞核固缩向周边移动,细胞界限模糊。阳性对照组大鼠松果体细胞排列紊乱、数目明显减少,空泡变性呈椭圆形,细胞核固缩向周边移动,细胞界限模糊。与模型对照组比较,异虎耳草素高、中剂量组大鼠松果体细胞排列均匀、清晰可见,数目明显增多,空泡变性、细胞核固缩向周边移动的情况明显减少,细胞界限清晰,且以高剂量组效果更为明显;异虎耳草素低剂量组大鼠松果体细胞排列稍均匀、数目略增多,空泡变性、细胞核固缩向周边移动的情况略减少,细胞界限稍清晰。各组大鼠松果体病理组织学显微图见图1。



注:图中箭头所指为松果体损伤空泡

Note: the arrow in the figure refers to the damaged vacuole of pineal gland

图1 各组大鼠松果体病理组织学显微图(HE染色,×400)

Fig 1 Micrographs of pathological tissue in the pineal gland of rats in each group(HE staining, ×400)

3.5 大鼠松果体超微结构观察结果

空白对照组大鼠松果体细胞体积较大,细胞核体积较大,细胞形状不规则,表面不光滑、多有凹陷,常染色质多、异染色质少;细胞质基质少,有较多线粒体、核糖体、粗面内质网、高尔基体、脂滴,这与文献报道^[11]相符。模型对照组大鼠松果体细胞体积较大,细胞核体积较大,细胞形状不规则,表面不光滑、多有凹陷,常染色

质多、异染色质少;细胞质基质少,有较多线粒体,且线粒体多肿胀、嵴断裂、固缩,游离核糖体、粗面内质网、高尔基体、溶酶体较多,有较少脂滴。阳性对照组大鼠松果体的线粒体肿胀、嵴断裂、固缩情况略减轻。与模型对照组比较,异虎耳草素高、中剂量组大鼠松果体的线粒体肿胀情况明显减轻,嵴断裂、固缩情况明显减少;异虎耳草素低剂量组松果体的线粒体肿胀略减轻,嵴断裂、固缩略减少。各组大鼠松果体细胞超微结构显微图见图2。

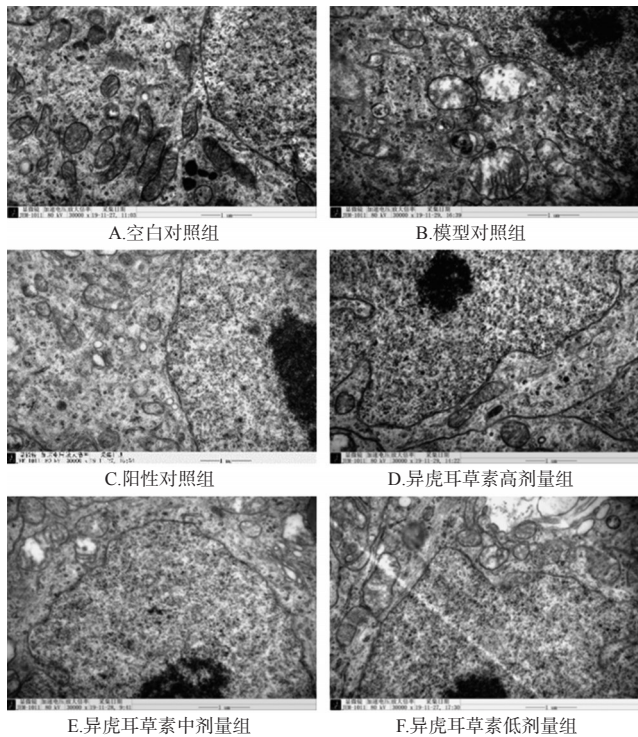


图2 各组大鼠松果体细胞超微结构透射电镜图($\times 30\ 000$)
Fig 2 Projection electron micrographs of ultrastructure of pineal gland of rats in each group($\times 30\ 000$)

3.6 大鼠松果体生物钟基因表达测定结果

与空白对照组比较,模型对照组大鼠松果体中 *Bmal1*、*Per1* mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$), *Per3* mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$)。与模型对照组比较,阳性对照组大鼠松果体中 *Clock*、*Per1*、*Per3*、*Cry1*、*Cry2* mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),

Per2 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$);异虎耳草素高剂量组大鼠松果体中 *Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Cry1*、*Cry2* mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);异虎耳草素中剂量组大鼠松果体中 *Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Cry1*、*Cry2* mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *Per3* mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$);异虎耳草素低剂量组大鼠松果体中 *Clock*、*Bmal1*、*Per2*、*Cry2* mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$), *Per3* mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$)。各组大鼠松果体中生物钟基因 mRNA 表达水平测定结果见表4。

4 讨论

松果体为实质性器官,主要由松果体细胞和神经胶质细胞构成,也称为明细胞和暗细胞,其中明细胞占90%以上^[12]。松果体是机体生物钟节律的重要组成部分,主要合成、分泌褪黑素,但褪黑素合成后并不储存于松果体细胞中,而是被迅速分泌到周围血液中,因此血液中褪黑素水平可以准确反映松果体合成、分泌褪黑素的能力^[13]。

目前,国内外针对松果体病理损伤的研究均较少。PCPA 多用于制备失眠模型,其是通过抑制色氨酸羟化酶合成来减少5-羟色胺生成,从而导致睡眠-觉醒周期紊乱^[14]。本课题组在前期采用PCPA腹腔注射致失眠模型研究中发现,PCPA对松果体组织病理及超微结构有损伤,且会降低血清中褪黑素水平,从而引起昼夜节律失调,但其损伤机制尚不清楚。外源性适量补充褪黑素可促进褪黑素分泌,改善机体的失眠^[15]。因此,本研究选择褪黑素为阳性对照药。检测结果显示,褪黑素可缩短PCPA致松果体损伤模型大鼠的入睡潜伏期、延长其睡眠持续时间、提高其血清褪黑素水平,但褪黑素对松果体结构损伤改善不明显;异虎耳草素可显著缩短大鼠的入睡潜伏期、延长其睡眠持续时间,有效改善其受损松果体细胞排列紊乱、数目减少、空泡变性及线粒体肿胀、嵴断裂、固缩等情况。

在哺乳动物中,昼夜节律钟机制由细胞自主转录-翻译反馈回路组成,在细胞质中 *mClock* 和 *mBmal1* 的产物蛋白形成异二聚体,作用于 *mPer* 和 *mCry* 启动子的 E-box 区,启动 *mPer* 和 *mCry* 的转录过程,为正反馈环

表4 各组大鼠松果体生物钟基因 mRNA 表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 4 mRNA expression levels of biologic clock gene in pineal gland of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量,mg/kg	<i>Clock</i>	<i>Bmal1</i>	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>	<i>Per3</i>	<i>Cry1</i>	<i>Cry2</i>
空白对照组		1.12±0.09	1.84±0.09	1.54±0.04	0.77±0.01	0.49±0.02	0.96±0.06	0.94±0.13
模型对照组		1.00±0.01	1.00±0.04*	1.00±0.02*	1.00±0.02	1.00±0.03*	1.00±0.10	1.00±0.03
阳性对照组	10	0.23±0.00**	0.84±0.02	0.27±0.01**	4.70±0.06**	0.13±0.01**	0.27±0.02*	0.39±0.02**
异虎耳草素高剂量组	3	1.95±0.02**	3.30±0.05**	1.53±0.04*	0.83±0.01	0.95±0.09	2.09±0.02*	1.57±0.01*
异虎耳草素中剂量组	1.5	1.87±0.00**	2.93±0.04**	1.78±0.06*	1.22±0.04	0.55±0.01*	1.82±0.03*	1.43±0.02*
异虎耳草素低剂量组	0.75	1.34±0.03*	2.21±0.11*	0.74±0.09	1.84±0.03*	0.51±0.01*	1.29±0.07	1.27±0.02*

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model control group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

路;随着PER和CRY蛋白增多,经磷酸化后转移至细胞核内,可有节奏地抑制CLOCK:BMAL1异二聚体介导的转录,从而抑制自身转录,为负反馈环路^[16]。两条环路共同调节机体昼夜节律。其中,Clock基因为最早发现的生物钟基因,主要维持睡眠稳态^[17];Bmal1基因是转录起始的主要调节因子,并激活昼夜节律生物钟基因表达^[18];Per1基因的多态性与机体极端昼夜偏好相关^[19];Per1和Per2基因共同调节昼夜节律振荡,并将昼夜节律周期限制在大约24 h内^[20];Per3基因与快速眼动睡眠行为障碍相关^[21];Cry1基因突变与家族性延迟睡眠障碍相关^[22];Cry2基因主要调节昼夜节律周期^[23]。在本研究中,腹腔注射PCPA后,大鼠松果体中Bmal1、Per1基因表达显著下调,Per3基因表达显著上调,导致其机体昼夜节律紊乱。给予褪黑素干预后,模型大鼠松果体中Per2基因表达显著上调,Clock、Per1、Per3、Cry1、Cry2基因表达显著下调,推测褪黑素可能是上调Per2表达后,抑制了Clock的表达,从而调节昼夜节律。给予异虎耳草素干预后,模型大鼠松果体中Clock、Bmal1、Per1、Per2、Cry1、Cry2表达均不同程度地上调,Per3表达不同程度地下调,笔者推测异虎耳草素可能是通过上调负反馈环路中Per、Cry的表达从而发挥昼夜节律调节作用,但在本研究结果中Clock、Bmal1表达出现上调,具体原因和调节机制有待进一步研究分析。

综上所述,异虎耳草素可改善大鼠松果体结构损伤,增加褪黑素的合成分泌,缩短大鼠入睡潜伏期、延长其睡眠持续时间,上调松果体正向调节因子Clock、Bmal1和负向调节因子Per1、Per2、Cry1、Cry2及下调负向调节因子Per3表达。

参考文献

- [1] 杨颖,陈黎,卢立志.松果体调控动物季节性繁殖概述[J].农业生物技术学报,2017,25(7):1086-1101.
- [2] 王国卿,童建.松果体昼夜节律生物钟分子机制的研究进展[J].生理科学进展,2004,35(3):210-214.
- [3] 王国卿.大鼠松果体生物钟基因的昼夜表达以及外周血淋巴细胞钟控基因的筛选与鉴定[D].苏州:苏州大学,2007.
- [4] 梅龙,桑迪,张二荃.生物钟研究方法综述:追求长程、实时的记录[J].中国生物化学与分子生物学报,2018,34(10):1021-1029.
- [5] 田斌,瞿孝兰,林义平,等.蛇床子化学成分及药理作用研究进展[J].中药与临床,2020,11(1):70-73,80.
- [6] 仝立国,宋美卿,冯玛莉,等.谱效关系分析蛇床子镇静催眠的活性物质[J].山西中医,2011,27(6):52-53.
- [7] 胡文卓.蛇床子香豆素类成分对失眠大鼠催眠作用及神经递质的影响[D].太原:山西省中医药研究院,2017.
- [8] 郝雨蒙.蛇床子催眠活性组分对原代海马神经元细胞神经递质及其受体与钟基因表达的影响[D].太原:山西省中医药研究院,2019.
- [9] 朱忠勇.实用医学检验学[M].北京:人民军医出版社,1992:1064.
- [10] 孙金鹏.褪黑素对高血压大鼠血压及其昼夜节律的影响[D].苏州:苏州大学,2015.
- [11] 牟丽.缰核对大鼠自发活动昼夜节律的影响及可能机制[D].长春:吉林大学,2010.
- [12] 樊宇兵,王保芝,侯广棋,等.大鼠松果体组织结构的增龄变化[J].解剖学杂志,2002,25(5):471-475.
- [13] 蒋南.单色光对鸡松果体和下丘脑生物钟昼夜节律系统的影响[D].北京:中国农业大学,2017.
- [14] 许峰.基于5HT_{1a}、5HT_{2a}、DD2受体系统及HPA轴的“熟眠方”治疗失眠机制研究[D].长春:长春中医药大学,2014.
- [15] FARHADI N, GHARGHANI M, FARHADI Z. Effects of long-term light, darkness and oral administration of melatonin on serum levels of melatonin[J]. *Biomed J*, 2016, 39(1):81-84.
- [16] TROTT AJ, MENET JS. Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1[J]. *PLoS Genet*, 2018. DOI:10.1371/journal.pgen.1007156.
- [17] FONTENOT MR, BERTO S, LIU Y, et al. Novel transcriptional networks regulated by CLOCK in human neurons[J]. *Genes Dev*, 2017, 31(21):2121-2135.
- [18] XIONG W, LI J, ZHANG E, HUANG H. BMAL1 regulates transcription initiation and activates circadian clock gene expression in mammals[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4):1019-1025.
- [19] CARPEN JD, VON SCHANTZ M, SMITS M, et al. A silent polymorphism in the PER1 gene associates with extreme diurnal preference in humans[J]. *J Hum Genet*, 2006, 51(12):1122-1125.
- [20] TAMIYA H, OGAWA S, OUCHI Y, et al. Rigid cooperation of Per1 and Per2 proteins[J]. *Sci Rep*, 2016. DOI:10.7554/eLife.16695.
- [21] WEISSOVÁ K, ŠKRABALOVÁ J, SKÁLOVÁ K, et al. Circadian rhythms of melatonin and peripheral clock gene expression in idiopathic REM sleep behavior disorder[J]. *Sleep Med*, 2018. DOI:10.1016/j.sleep.2018.07.019.
- [22] PATKE A, MURPHY PJ, ONAT OE, et al. Mutation of the human circadian clock gene CRY1 in familial delayed sleep phase disorder[J]. *Cell*, 2017, 169(2):203-215.
- [23] HIRANO A, SHI G, JONES CR, et al. A cryptochrome 2 mutation yields advanced sleep phase in humans[J]. *Elife*, 2016. DOI:10.7554/eLife.16695.

(收稿日期:2020-04-01 修回日期:2020-07-24)

(编辑:林 静)