

逍遥散干预交感神经系统 TH/ADRA2A 轴改善慢性睡眠剥夺小鼠的异常糖代谢

刘利萍, 沈洪昇, 陈冠, 袁玲, 崔晓雪, 张婷, 蔡隽, 刘洪斌* (天津市医药科学研究所, 天津 300020)

摘要: 目的 从酪氨酸羟化酶/ α 2 肾上腺素能受体(tyrosine hydroxylase/ α -2a adrenergic receptor, TH/ADRA2A)轴探讨逍遥散改善慢性睡眠剥夺(chronic sleep deprivation, CSD)小鼠糖代谢异常的作用机制。方法 将雄性 6 周龄 C57BL/6 小鼠 50 只随机分为 2 组: 对照组 10 只, 造模组 40 只。造模组采用多平台水环境法睡眠剥夺 4 周。每周测量 1 次空腹血糖值(fasting plasma glucose, FPG)与体质量, 连续 3 周。然后根据 FPG 随机均分为 4 组, 即模型组, 胍乙啶组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)及逍遥散低、高剂量组($33.88, 101.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。此后, 继续造模 1 周。然后给药 4 周, 对照组、模型组灌服等体积纯水, 给药期间继续造模。第 53 天尾静脉采血进行葡萄糖耐受实验; 第 56 天小鼠目内眦取血, ELISA 检测血清胰岛素(insulin, INS)、去甲肾上腺素(noradrenaline, NE)、皮质酮(corticosterone, CORT)的表达情况; HE 染色观察胰岛的病理改变; 免疫荧光染色检测胰腺组织中 TH 和 INS 的共表达情况; Real-time PCR 和 Western blotting 检测胰腺中 ADRA2A mRNA 和蛋白表达水平。结果 在 CSD 造模过程中, 与初始体质量相比, 模型组小鼠的体质量在第 1 周造模结束时明显降低($P < 0.05$), FPG 明显升高($P < 0.01$)。给药后, 与对照组比较, 模型组糖耐量明显异常, NE、CORT、INS 水平明显升高($P < 0.01$), 胰腺中 ADRA2A mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 逍遥散各组具有更好的葡萄糖耐受性, NE、CORT、INS 水平显著降低($P < 0.05$), 胰腺中 ADRA2A mRNA 和蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。HE 染色结果显示模型组胰岛中间部位细胞数量较对照组明显减少, 各给药组的这种情况均有改善。免疫荧光染色结果显示模型组 TH 的蛋白含量表达增强, 给药后各组 TH 的蛋白含量表达均减弱。结论 逍遥散可以改善 CSD 诱导的糖代谢异常, 推测其机制可能和降低 TH/ADRA2A 表达有关。

关键词: 逍遥散; 慢性睡眠剥夺; 糖代谢; 酪氨酸羟化酶; α 2 肾上腺素能受体

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2023)19-2628-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223404

引用本文: 刘利萍, 沈洪昇, 陈冠, 等. 逍遥散干预交感神经系统 TH/ADRA2A 轴改善慢性睡眠剥夺小鼠的异常糖代谢[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2628-2634.

Xiaoyaosan Intervenes in TH/ADRA2A Axis of Sympathetic Nervous System to Improve Abnormal Glucose Metabolism in Chronic Sleep Deprived Mice

LIU Liping, SHEN Hongsheng, CHEN Guan, YUAN Ling, CUI Xiaoxue, ZHANG Ting, CAI Juan, LIU Hongbin* (Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mechanism of Xiaoyaosan in improving the abnormal glucose metabolism in chronic sleep deprivation(CSD) mice based on tyrosine hydroxylase/ α -2a adrenergic receptor(TH/ADRA2A) signal pathway. **METHODS** Fifty six-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into two groups: 10 in the control group and 40 in the model group. The rats in the model group were deprived of sleep for 4 weeks by the method of multi-platform water environment. Fasting plasma glucose(FPG) and body mass were measured once a week for three consecutive weeks. Then, according to FPG, they were randomly divided into four groups, namely model group, guanethidine group($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and Xiaoyaosan low and high dose groups($33.88, 101.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). After grouping, continue modeling for a week. Then the drug was administered for 4 weeks. The control group and model group were treated with pure water of the same volume. Modeling continued during the administration period. On the 53rd day, blood was collected from the tail vein for the glucose tolerance test. On the 56th day, the expression of insulin(INS), noradrenaline(NE) and corticosterone(CORT) in serum was detected by ELISA. HE staining was used to observe the pathological changes of pancreatic islets. Detection of co expression of TH and INS in pancreatic tissues by immunofluorescence staining. Real-time PCR and Western blotting were used to detect the expression of ADRA2A mRNA and protein in the pancreas. **RESULTS** In the process of CSD modeling, compared with the initial body mass, the body mass of the model group mice decreased significantly at the end of the first week of modeling($P < 0.05$), and FPG increased significantly($P < 0.01$). After administration, compared with the control group, the glucose tolerance of the model group was significantly abnormal. The levels of NE, CORT and INS increased significantly($P < 0.01$), the expression level of ADRA2A

基金项目: 天津市卫生健康委员会科技人才培养项目(KJ20087)

作者简介: 刘利萍, 女, 硕士, 助理研究员 E-mail: glory_2004@126.com

*通信作者: 刘洪斌, 男, 博士, 研究员

E-mail: jtss@sina.com

mRNA and protein in the pancreas was significantly increased($P<0.01$). Compared with the model group, Xiaoyaosan groups had better glucose tolerance, the levels of NE, CORT and INS decreased significantly($P<0.05$), and the expression of ADRA2A mRNA and protein in the pancreas decreased significantly($P<0.05$ or $P<0.01$). HE staining results showed that the number of cells in the islets of the model group was significantly reduced compared with the control group, and the situation was improved in all drug groups. The results of immunofluorescence staining showed that the protein content of TH in the model group increased, and the expression of TH in each group decreased after administration. **CONCLUSION** Xiaoyaosan can improve the abnormal glucose metabolism induced by CSD, and its mechanism may be related to the reduction of TH/ADRA2A expression.

KEYWORDS: Xiaoyaosan; chronic sleep deprivation; glucose metabolism; tyrosine hydroxylase; alpha-2a adrenergic receptor

睡眠是调节人体健康的重要生理过程,睡眠障碍常常和很多疾病密切相关,如阻塞性睡眠呼吸暂停、情绪紊乱、阿尔茨海默病、肥胖、代谢综合征和2型糖尿病等^[1-4]。已知皮质醇水平加上交感迷走神经平衡的变化为睡眠障碍改变葡萄糖代谢提供了可能的机制^[5]。一夜失眠或睡眠障碍期间,来自交感神经系统的神经纤维将神经递质去甲肾上腺素(noradrenaline, NE)释放到初级和次级淋巴器官中,并刺激肾上腺将储存的肾上腺素释放到全身循环中^[6]。肾上腺素是胰高血糖素分泌的强大刺激物,它通过激活 β -肾上腺素能受体,使细胞内cAMP升高,并最终导致细胞质游离 Ca^{2+} 浓度产生对胰高血糖素分泌的 Ca^{2+} 依赖性刺激,从而导致血糖升高^[7]。

逍遥散出自宋代的《太平惠民和剂局方》,属于和解剂,主要功效是调和肝脾。研究表明逍遥散在失眠、焦虑、抑郁等精神情志类疾病中疗效显著^[7-9]。已知道逍遥散可以调节慢性应激导致的糖代谢异常。那么逍遥散对睡眠障碍导致的糖代谢异常是否有效,其作用机制是否与调节交感神经的激活有关尚未见到相关报道。本研究选用C57BL/6小鼠制作慢性睡眠剥夺(chronic sleep deprivation, CSD)模型,选用胍乙啶为阳性药物,在给予高、低2种剂量的逍遥散水煎剂治疗后,测定糖耐量及交感神经激活相关指标。从而明确两大问题:一是CSD致交感神经激活是不是会引起糖代谢异常;二是进一步研究逍遥散是否通过作用于酪氨酸羟化酶/ α 2肾上腺素能受体(tyrosine hydroxylase/ α 2a adrenergic receptor, TH/ADRA2A)信号通路调节异常葡萄糖代谢。

1 材料

1.1 动物

SPF级6周龄雄性C57BL/6小鼠50只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0008。小鼠饲养在标准环境控制下的动物房内,温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(60 ± 5)%,昼夜节

律12/12 h。本实验在天津市医药科学研究所动物房进行,并获得天津市医药科学研究所实验动物伦理委员会批准,严格执行伦理委员会的要求。伦理审查批准编码为IMPS-EAEP-E-KJ20087-01。

1.2 药品及试剂

逍遥散水煎剂的药物组成及剂量为当归30 g,白芍30 g,柴胡30 g,茯苓30 g,白术30 g,甘草15 g,生姜10 g,薄荷10 g,所有中药均购自天津中新药业集团股份有限公司达仁堂和平店。胍乙啶(上海麦克林生化科技有限公司,批号:C12225944);血糖试纸(山东远航健康管理有限公司);小鼠胰岛素(insulin, INS)、NE、皮质酮(corticosterone, CORT)ELISA试剂盒(江苏宝莱生物科技有限公司,批号:20211102NC);INS鼠单克隆抗体(Proteintech,货号:66198-1-Ig);TH兔多克隆抗体(货号:PB9449)、浓缩型正常山羊血清(货号:AR1009)、荧光(DyLight 488,绿色)标记羊抗小鼠IgG(货号:BA1126)、荧光(DyLight 594,红色)标记羊抗兔IgG(货号:BA1142)、DAPI(货号:AR1176)、抗荧光淬灭封片剂(货号:AR1109)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(货号:AR0138)、BCA蛋白定量试剂盒(货号:AR0146)、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(货号:BA1054)、 β -Actin(货号:BM0627)均购自BOSTER;trizol试剂(Invitrogen, 15596026);逆转录酶RevertAid Reverse Transcriptase(Thermo scientific, 货号:EP0442);ADRA2A一抗(AFFINITY, 货号:DF3076)。

1.3 仪器

TGL-16型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,离心半径5.34 cm);LightCycler[®] 96荧光定量PCR仪(Roche瑞士罗氏公司);基因扩增仪TC-XP(杭州博日科技);Infinite M200多功能酶标仪(瑞士TECAN公司);APERIO VERSA 8扫描仪(德国徕卡微系统有限公司);BX51显微镜(日本奥林巴斯公司);Tanon5200全自

动化学发光成像分析系统、VE-180 电泳槽(上海天能科技有限公司); DYY-7C 电泳仪(北京六一生物科技股份有限公司); SK-O180-E 摇床[兴创实验仪器(北京)股份公司]。

2 方法

2.1 逍遥散水煎剂的制备

依据《药理实验方法学》第一版, 根据人和动物体表面积换算, 确定小鼠的有效给药剂量为 $33.88 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 故在实验中选定 33.88, $101.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 作为逍遥散的低、高剂量给药组。药材加 8 倍量水浸 60 min, 加热至沸腾保持 40 min, 倒出备用, 再加 6 倍量水加热沸 30 min, 将 2 次水煎液混匀浓缩成药膏, 每克药膏含 2.35 g 生药, 4°C 冷藏保存备用。

2.2 模型制备

对造模组小鼠采用多平台水环境法行慢性睡眠剥夺造模。小鼠被放置在睡眠剥夺箱中直径 4.5 cm 的平台上, 箱中注水, 使水面低于平台 1 cm, 平台上方放置有平行不锈钢丝制成的笼罩, 嵌夹饮水、饲料。每日对小鼠睡眠剥夺 18 h(16:00 至次日 10:00), 持续 56 d。

2.3 分组及给药

50 只小鼠适应性喂养 1 周后随机分为对照组和造模组, 其中对照组 10 只, 造模组 40 只。造模组采用多平台水环境法睡眠剥夺 4 周, 造模开始后每周测 1 次空腹血糖值(fasting plasma glucose, FPG)与体质量, 连续 3 周。然后根据血糖值随机分为 4 组, 分别是模型组、胍乙啶组及逍遥散低、高剂量组, 每组 10 只。分组完成后, 继续造模 1 周。随后给药 4 周, 予逍遥散水煎剂($33.88, 101.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)与胍乙啶溶液($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃, 对照组、模型组灌服等体积纯水。每日上午 10:00 灌胃 1 次。给药期间继续造模。

2.4 指标检测

2.4.1 体质量和 FPG 实验前及多平台水环境法睡眠剥夺前 3 周每周试验结束时测量 1 次小鼠的体质量和 FPG。

2.4.2 葡萄糖耐受试验 实验第 53 天各组动物均经腹腔注射 20%葡萄糖 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别在 30, 60, 90, 120 min 时尾静脉采血测血糖。

2.4.3 交感神经激活相关激素的测试 实验结束目内眦取血, 常温下 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 次分离血清, 得到的上清液分别用相应的 ELISA 试剂盒测定 INS、CORT、NE 指标。

2.4.4 胰腺组织 HE 染色及观察 冰上分离获得完整胰腺组织, 利用甲醛进行固定, 双蒸水浸泡 3 次, 每次 15 min, 梯度乙醇进行脱水、石蜡包埋后切片, 苏木精-伊红染色, 在显微镜下观察胰腺组织病理改变。

2.4.5 免疫荧光检测 TH 和 INS 共表达情况 将胰腺组织标本脱蜡和水化, 微波抗原修复, 滴加山羊血清封闭液(原液用 PBS 按 1:9 稀释), 37°C 孵育 30 min, 甩去多余液体, 不洗, 一抗孵育。实验片滴加适当稀释的一抗 TH、INS(1:100), 4°C 过夜, 取出后 37°C 复温 30 min, PBS(pH 7.2~7.6)洗 5 min $\times$ 3 次, 荧光二抗孵育。滴加 DyLight 488 荧光素标记羊抗小鼠和荧光 DyLight 594 标记羊抗兔 IgG 混合二抗(2 种二抗的稀释比例都是 1:100), 37°C 孵育 45 min, PBS(pH 7.2~7.6)洗 5 min $\times$ 3 次, 复染。滴加 DAPI 染色液, 室温孵育 3 min, PBS(pH 7.2~7.6)清洗, 抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜观察结果及拍照。

2.4.6 Real-time PCR 检测胰腺中 ADRA2A mRNA 的表达 取胰腺样本 20 mg 加入 1 mL trizol 匀浆提取总 mRNA, 核酸分析仪检测样本中 mRNA 的质量, 对检测合格的样本进行逆转录。按试验常规依次添加试剂后进行扩增, 条件为预变性 95°C , 1 min; 95°C , 15 s $\rightarrow$ 58°C , 20 s $\rightarrow$ 72°C , 20 s 循环 40 次; 末段延伸 72°C , 5 min; 溶解曲线 $72^{\circ}\text{C} \rightarrow 95^{\circ}\text{C}$, 每 20 s 升温 1°C 。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析所得数据。目的基因 ADRA2A 及内参 GAPDH 的引物序列由 Invitrogen 中国设计合成, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
ADRA2A	上游 5'-GCCTGCTCATGCTGTTCACAGTA-3'	176
	下游 5'-CCAGTAACCCATAACCTCGTTGG-3'	
GAPDH	上游 5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3'	133
	下游 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTCTGT-3'	

2.4.7 Western blotting 检测胰腺中 ADRA2A 蛋白的表达 取胰腺组织称质量, 加入蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂, 在冰上进行超声破碎, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清。按照 SDS-PAGE 试剂盒制备 10% SDS-PAGE 凝胶, 上样, 电泳, 转 NC 膜。转膜结束后, 于摇床上用 TBST 洗膜 5~10 min $\times$ 3 次, 加入封闭液室温封闭 1~2 h。抗体孵育(倒掉封闭液, 加入用抗体稀释液按比例稀释的相应抗体, 在摇床上 4°C 过夜。TBS-T 洗

膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗), ECL 发光显色, 置印迹膜于成像分析仪自动成像, 软件 ImageJ 分析蛋白条带灰度值。

2.5 统计学分析

实验数据采用 SPSS 19 软件进行统计学分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 并进行方差同质性检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CSD 对体质量和 FPG 的影响

造模前各组小鼠一般情况无明显差别, 各组体质量和血糖值较为平稳。造模后造模组体质量在短暂的降低后[在第 1 周造模结束时, 模型组体质量较对照组明显下降($P < 0.05$)]恢复增长但趋势缓慢。前 2 周造模组小鼠 FPG 随着 CSD 造模时间的推进逐步升高[造模组在造模 1 周后 FPG 明显升高, 与初始 FPG 相比有明显差异($P < 0.01$)], 但是随后 2 周的 FPG 基本保持在与第 1 周结束时持平的状态。结果见图 1。

3.2 CSD 对小鼠葡萄糖代谢的影响

与对照组比较, 葡萄糖耐受试验中模型组小鼠血糖在不同时间点均有显著增高($P < 0.01$), 随着时间的推移, 血糖虽有下降趋势但较对照组而言下降

较为缓慢; 与模型组比较, 葡萄糖耐受试验中逍遥散各组血糖在不同时间点有所降低, 血糖趋于稳定。结果见表 2。

3.3 小鼠 CSD 试验后与应激相关的 CORT、NE、INS 水平变化的结果

与对照组比较, 模型组血清中 CORT、NE 及 INS 表达量显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组血清中 NE 表达量明显下降($P < 0.05$); 虽然各给药组 CORT 表达量均下降, 但只有胍乙啶组和逍遥散高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$); 各给药组的 INS 含量较模型组有所降低, 只有逍遥散高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 2。

3.4 胰腺组织 HE 染色

高倍镜下观察, 对照组可观察到胰腺胰岛边界清晰。模型组胰岛中细胞数量减少, 其他与对照组相比, 未见明显差异。与模型组相比, 各给药组胰岛中细胞数量明显增加, 其他变化未能观察到。结果见图 3。

3.5 免疫荧光分析 TH 和 INS 蛋白表达

与对照组比较, 模型组胰岛中 TH 的荧光强度表达增强, INS 的荧光表达无明显差异。与模型组相比, 各给药组的 TH 的荧光强度均减弱; 各给药组胰岛中 INS 的荧光表达亦无明显差异。结果见图 4。

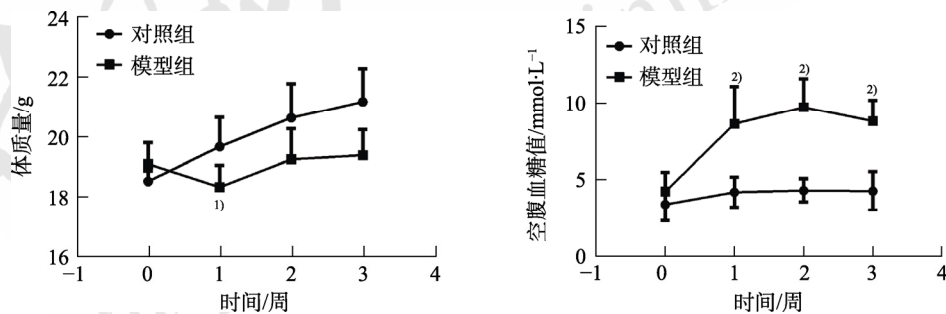


图 1 造模组小鼠造模期间体质量和空腹血糖变化情况($\bar{x} \pm s$, 对照组 $n=10$, 模型组 $n=40$)

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与初始值比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Changes of body mass and fasting blood glucose of mice in the modeling group during the modeling period($\bar{x} \pm s$, control group $n=10$, model group $n=40$)

Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the initial value, ²⁾ $P < 0.01$.

表 2 逍遥散对 CSD 小鼠葡萄糖耐受性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=9$ 或 10)

Tab. 2 Effect of Xiaoyaosan on glucose tolerance in CSD mice($\bar{x} \pm s$, $n=9$ or 10)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$				
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
对照组	—	5.14 $\pm$ 1.03	9.64 $\pm$ 0.58	7.91 $\pm$ 0.54	7.11 $\pm$ 0.49	6.39 $\pm$ 0.63
模型组	—	9.38 $\pm$ 2.24 ¹⁾	17.47 $\pm$ 2.45 ¹⁾	13.61 $\pm$ 2.26 ¹⁾	12.93 $\pm$ 1.65 ¹⁾	12.85 $\pm$ 1.24 ¹⁾
胍乙啶组	0.03	6.86 $\pm$ 1.34 ²⁾	11.98 $\pm$ 2.63 ³⁾	11.87 $\pm$ 2.19	11.35 $\pm$ 1.42 ²⁾	9.15 $\pm$ 2.85 ³⁾
逍遥散低剂量组	33.88	7.31 $\pm$ 2.63 ²⁾	14.69 $\pm$ 2.98 ³⁾	11.78 $\pm$ 2.38	11.05 $\pm$ 1.34 ³⁾	9.59 $\pm$ 2.21 ³⁾
逍遥散高剂量组	101.64	8.72 $\pm$ 3.70	14.79 $\pm$ 1.73 ³⁾	12.10 $\pm$ 2.34	9.71 $\pm$ 2.30 ³⁾	8.18 $\pm$ 2.07 ³⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

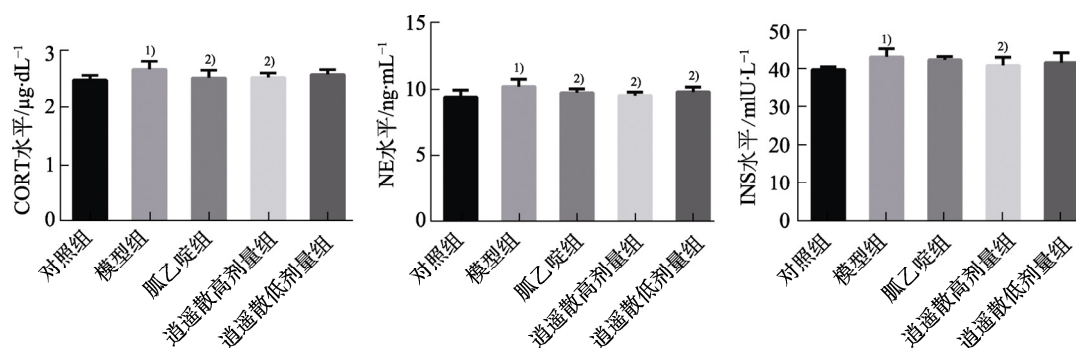


图2 逍遥散对CSD小鼠血清CORT、NE、INS蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=9$ 或 10)
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effect of Xiaoyaosan on the expression of serum CORT, NE and INS proteins in CSD mice($\bar{x} \pm s$, $n=9$ or 10)
Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

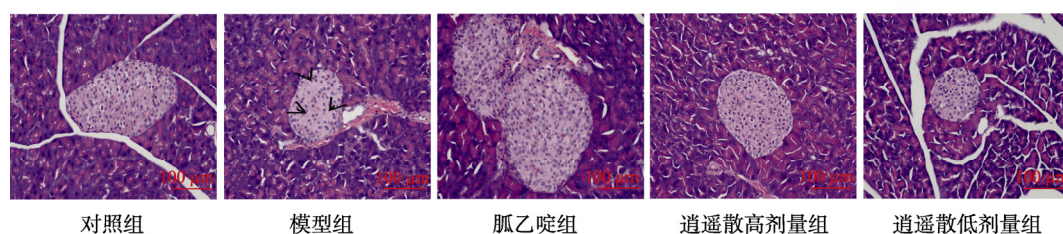


图3 各组小鼠胰岛组织病理结果比较(HE, 200×)
模型组黑色箭头标示的位置是细胞数量减少的区域。

Fig. 3 Comparison of pathological results of mouse pancreas in each group(HE, 200×)
Position of the black arrow mark in the model group is the area where the number of cells decreases.

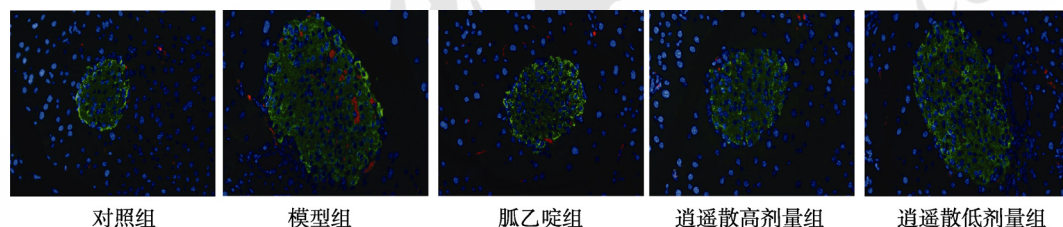


图4 各组小鼠TH和INS免疫荧光染色图(400×)
红色-TH; 绿色-INS; 蓝色-DAPI。

Fig. 4 Immunofluorescence staining of TH and INS in mice of each group(400×)
Red-TH; green-INS; blue-DAPI.

3.6 各组小鼠胰腺中ADRA2A mRNA和蛋白表达比较

与对照组比较, 模型组小鼠胰腺组织中ADRA2A mRNA和蛋白水平显著升高($P<0.01$)。与模型组相比, 逍遥散低、高剂量组ADRA2A mRNA水平均下调(其中低剂量组 $P<0.01$, 高剂量组 $P<0.05$); 逍遥散低、高剂量组ADRA2A蛋白表达均下调。结果见图5~7。

4 讨论

睡眠是一个恢复过程, 其失调会对血糖水平、情绪、认知和卡路里消耗有影响^[10-11]。失眠通过多种途径导致代谢失调, 包括交感神经过度刺激、激素失衡和亚临床炎症等^[12]。睡眠不足可以增加交感神经系统活动, 葡萄糖感应神经元在交感神

经刺激下释放NE以抑制INS分泌并促进胰高血糖素分泌^[13-15]。中枢交感神经外流增加产生的代谢效应取决于靶器官中存在的肾上腺素能受体及募集的神经元数量。在胰腺中, 内脏交感神经系统的激活通过 α -肾上腺素能受体激活抑制INS分泌, 进而使胰岛细胞上的 β -肾上腺素能受体促进胰高血糖素分泌^[16]。已知ADRA2A表达增加与葡萄糖刺激的INS分泌受损、FPG升高和2型糖尿病风险增加有关^[17]。NE的局部积累可导致突触前神经末梢中ADRA2A的表达上调, 交感神经系统通过胰岛 β 细胞中的ADRA2A信号传导抑制INS分泌^[18]。

心理因素引发的应激反应, 经常引发失眠、抑郁症、恶性肿瘤、代谢综合征等疾病^[19]。目前, 心理疾病的动物模型制作多采用慢性不可预知

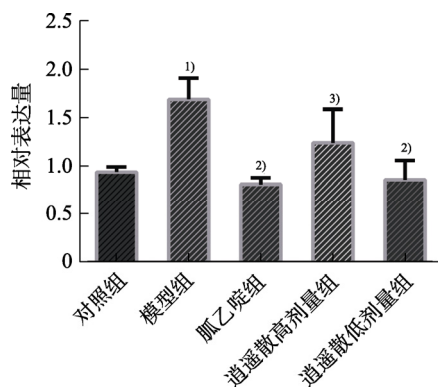


图 5 ADRA2A mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$ 。
Fig. 5 Relative expression of ADRA2A mRNA($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$.

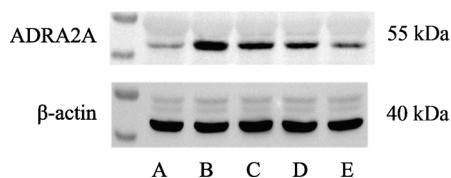


图 6 小鼠胰腺 ADRA2A 蛋白表达电泳
A-对照组; B-模型组; C-胍乙啶组; D-逍遥散低剂量组; E-逍遥散高剂量组。
Fig. 6 Electrophoresis of ADRA2A protein expression in pancreas of mice
A-control group; B-model group; C-guanethidine group; D-Xiaoyaosan low dose group; E-Xiaoyaosan high dose group.

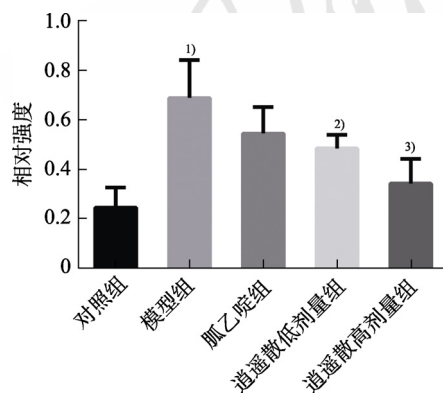


图 7 小鼠胰腺 ADRA2A 蛋白表达相对强度
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 7 Relative intensity of ADRA2A protein expression in mouse pancreas
Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

温和应激和慢性束缚应激的方法造模^[20-21]。CSD 常常作为慢性不可预知温和应激的一种形式参与其中。并且有众多文献报道失眠会引发情志疾病^[22-24]。黄晓宇等^[25]研究显示多平台水环境法睡眠剥夺可以导致 C57BL/6 小鼠血糖升高。本研究也证实了这一点。逍遥散是中医调节情志疾病的

首选方剂,具有疏肝解郁、调和肝脾、养血健脾之功效,临床广泛应用于焦虑、抑郁、经前期紧张症等心理应激相关疾病^[26]。近年有文献报道逍遥散可以改善慢性束缚应激大鼠的异常糖代谢^[27]。

本研究发现,模型组应激激素 CORT、NE 的表达较对照组明显升高;模型组交感神经激活标志物 TH 和 ADRA2A 的表达较对照组增强。除此以外,造模动物的 FPG 和血清 INS 蛋白表达较对照组有所升高。众所周知,INS 的升高可以分为生理性和病理性 2 种。病理性的升高提示虽然患者体内的 INS 水平很高,但由于利用率下降,往往血糖值很高,这种情况在临床上表明患者已经处于 INS 抵抗的状态,糖代谢出现异常。经过逍遥散干预后,动物应激激素水平下降,血糖值趋于稳定。交感神经激活状态明显改善。

综上所述,逍遥散能改善 CSD 小鼠的异常糖代谢,其作用机制可能与抑制应激激素 CORT、NE 升高,降低交感神经系统 TH/ADRA2A 轴激活有关。该研究为千年古方逍遥散治疗 CSD 致糖代谢异常提供了新思路和作用靶点,为逍遥散的新应用提供了可靠的证据。

REFERENCES

- [1] WHITE D P. Advanced concepts in the pathophysiology of obstructive sleep apnea[J]. Adv Otorhinolaryngol, 2017(80): 7-16.
- [2] WIRZ-JUSTICE A. Seasonality in affective disorders[J]. Gen Comp Endocrinol, 2018(258): 244-249.
- [3] PETER-DEREX L, YAMMINE P, BASTUJI H, et al. Sleep and Alzheimer's disease[J]. Sleep Med Rev, 2015(19): 29-38.
- [4] DONGA E, VAN DIJK M, VAN DIJK J G, et al. A single night of partial sleep deprivation induces insulin resistance in multiple metabolic pathways in healthy subjects[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(6): 2963-2968.
- [5] STAMATAKIS K A, PUNJABI N M. Effects of sleep fragmentation on glucose metabolism in normal subjects[J]. Chest, 2010, 137(1): 95-101.
- [6] IRWIN M R. Why sleep is important for health: A psychoneuroimmunology perspective[J]. Annu Rev Psychol, 2015(66): 143-172.
- [7] HAMILTON A, ZHANG Q, SALEHI A, et al. Adrenaline stimulates glucagon secretion by Tpc2-dependent Ca^{2+} mobilization from acidic stores in pancreatic α -cells[J]. Diabetes, 2018, 67(6): 1128-1139.
- [8] YAN Z Y, JIAO H Y, DING X F, et al. Xiaoyaosan improves depressive-like behaviors in mice through regulating apelin-APJ system in hypothalamus[J]. Molecules, 2018, 23(5): 1073.
- [9] HU J, TENG J, WANG W Y, et al. Clinical efficacy and safety of traditional Chinese medicine Xiao Yao San in insomnia combined with anxiety[J]. Medicine (Baltimore), 2021,

- 100(43): e27608.
- [10] DAZA E J, WAC K, OPPEZZO M. Effects of sleep deprivation on blood glucose, food cravings, and affect in a non-diabetic: An N-of-1 randomized pilot study[J]. *Healthcare (Basel)*, 2019, 8(1): 6.
 - [11] WHEELER N D, ENSMINGER D C, ROWE M M, et al. Alpha- and beta- adrenergic receptors regulate inflammatory responses to acute and chronic sleep fragmentation in mice[J]. *PeerJ*, 2021(9): e11616.
 - [12] DEPNER C M, STOTHARD E R, WRIGHT K P Jr. Metabolic consequences of sleep and circadian disorders[J]. *Curr Diab Rep*, 2014, 14(7): 507.
 - [13] TIEMEIER H, PELZER E, JÖNCK L, et al. Plasma catecholamines and selective slow wave sleep deprivation[J]. *Neuropsychobiology*, 2002, 45(2): 81-86.
 - [14] MISHRA I, PULLUM K B, THAYER D C, et al. Chemical sympathectomy reduces peripheral inflammatory responses to acute and chronic sleep fragmentation[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2020, 318(4): R781-R789.
 - [15] PORTE D Jr, WILLIAMS R H. Inhibition of insulin release by norepinephrine in man[J]. *Science*, 1966, 152(3726): 1248-1250.
 - [16] THORP A A, SCHLAICH M P. Relevance of sympathetic nervous system activation in obesity and metabolic syndrome[J]. *J Diabetes Res*, 2015(2015): 341583.
 - [17] FAGERHOLM V, HAAPARANTA M, SCHEININ M. α 2-Adrenoceptor regulation of blood glucose homeostasis[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011, 108(6): 365-370.
 - [18] GANIC E, SINGH T, LUAN C, et al. MafA-controlled nicotinic receptor expression is essential for insulin secretion and is impaired in patients with type 2 diabetes[J]. *Cell Rep*, 2016, 14(8): 1991-2002.
 - [19] WANG H, WANG S X. Discussion of correlation between chronic psychological stress induced liver depression and spleen deficiency syndrome and microbiota-gut-brain axis and study on intervention mechanism of Xiaoyaosan[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2020, 26(24): 193-200.
 - [20] LÓPEZ-LÓPEZ A L, JAIME H B, ESCOBAR VILLANUEVA M D C, et al. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats[J]. *Physiol Behav*, 2016(161): 15-23.
 - [21] LIANG B, ZHENG X, XIA W W, et al. Establishment of chronic constraint stress animal model and its application in the study of hyperglycemia[J]. *J Sichuan Univ Med Sci Ed(四川大学学报: 医学版)*, 2013, 44(3): 470-475.
 - [22] LI T M H, CHAN N Y, LI C T, et al. The associations of electronic media use with sleep and circadian problems, social, emotional and behavioral difficulties in adolescents[J]. *Front Psychiatry*, 2022(13): 892583.
 - [23] DABIRI R, MONAZZAM ESMAIELPOUR M R, SALMANI NODOUSHAN M, et al. The effect of auditory stimulation using delta binaural beat for a better sleep and post-sleep mood: A pilot study[J]. *Digit Health*, 2022(8): 20552076221102243.
 - [24] REID M J, OMLIN X, ESPIE C A, et al. The effect of sleep continuity disruption on multimodal emotion processing and regulation: A laboratory-based, randomised, controlled experiment in good sleepers[J]. *J Sleep Res*, 2023, 32(1): e13634.
 - [25] HUANG X Y, XIE G J, LI H, et al. Intervention effect of modified Tianwang Buxindan on glucose and lipid metabolism in mice with chronic sleep deprivation through orexin A/OX1R[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2021, 27(1): 121-127.
 - [26] TIAN J S, QIN X M, GAO Y, et al. Research progress on antidepressant therapeutic biomarkers of Xiaoyaosan[J]. *World J Tradit Chin Med*, 2020, 6(2): 171.
 - [27] PAN Q X, WU J J, LIU Y Y, et al. Involvement of hepatic SHIP₂ and PI3K/Akt signalling in the regulation of plasma insulin by Xiaoyaosan in chronic immobilization-stressed rats[J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 480.

收稿日期: 2022-09-30
(本文责编: 沈倩)