

# 基于 OXA/CREB/PER1 信号通路探讨疏肝健脾养心方对失眠障碍小鼠的改善作用

杨晶<sup>1,2</sup>, 何宗卿<sup>1,2</sup>, 霍畅<sup>1,2</sup>, 孙意<sup>1,2</sup>, 刘飞祥<sup>1</sup>, 王小燕<sup>1</sup>, 赵敏<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一临床医学院, 河南 郑州 450046; 3. 中西医防治重大疾病河南省协同创新中心, 河南 郑州 450000)

**摘要:** **目的** 探讨疏肝健脾养心方改善小鼠失眠障碍的作用。**方法** 60只ICR雌性小鼠随机选取10只作为正常组, 剩余小鼠连续3d腹腔注射300mg/kg对氯苯丙氨酸(PCPA)建立失眠模型。将模型小鼠随机分为模型组、右佐匹克隆组(0.13mg/kg)及疏肝健脾养心方低、中、高剂量组(3.1、6.2、12.4g/kg), 每组10只, 连续给药14d后, 戊巴比妥钠翻正实验检测睡眠潜伏期与睡眠持续时间; 糖水偏好实验和旷场实验评估焦虑抑郁样行为及自主活动; ELISA法检测血清皮质醇(CORT)及褪黑素(MT)水平; 透射电镜观察下丘脑神经元及线粒体超微结构; 免疫荧光染色和Western blot法检测下丘脑OXA、OX1R、PER1、CRY1蛋白定位与表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠入睡潜伏期延长( $P<0.01$ ), 睡眠维持时间缩短( $P<0.01$ ), 糖水偏好率降低( $P<0.01$ ), 旷场总活动距离、平均速度、理毛次数、中央区域探索时间百分比均增加( $P<0.01$ ); 血清CORT水平升高( $P<0.01$ ), MT水平降低( $P<0.01$ ); 下丘脑神经元及线粒体损伤严重; 下丘脑OXA和OX1R共定位、PER1和CRY1核内共定位表达增加( $P<0.01$ ), OXA、OX1R、PER1、p-CREB/CREB蛋白表达升高( $P<0.01$ )。与模型组比较, 疏肝健脾养心方可缩短入睡潜伏期( $P<0.01$ ), 延长睡眠维持时间( $P<0.01$ ), 升高糖水偏好率( $P<0.01$ ), 降低旷场总活动距离、平均速度、理毛次数、中央区域探索时间百分比( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 降低血清CORT水平( $P<0.01$ ), 升高MT水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 改善神经元超微结构及线粒体损伤; 减少下丘脑OXA和OX1R共定位、PER1和CRY1核内共定位表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 降低OXA、p-CREB/CREB蛋白表达( $P<0.01$ )。**结论** 疏肝健脾养心方可有效改善小鼠失眠障碍, 其机制可能与调控OXA/CREB/PER1信号通路有关。

**关键词:** 疏肝健脾养心方; 失眠; OXA/CREB/PER1信号通路; 昼夜节律

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)06-1857-09

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.06.011

## Improvement effects of Shugan Jianpi Yangxin Prescription on insomnia in mice based on OXA/CREB/PER1 signaling pathway

YANG Jing<sup>1,2</sup>, HE Zong-qing<sup>1,2</sup>, HUO Chang<sup>1,2</sup>, SUN Yi<sup>1,2</sup>, LIU Fei-xiang<sup>1</sup>, WANG Xiao-yan<sup>1</sup>, ZHAO Min<sup>1,2,3\*</sup>

(1. The First Affiliated Hospital to Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. The First Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Collaborative Innovation Center of Prevention and Treatment of Major Diseases by Chinese and Western Medicine of Henan Province, Zhengzhou 450000, China)

**ABSTRACT: AIM** To explore the effects of Shugan Jianpi Yangxin Prescription on improving insomnia in mice.

**METHODS** Ten of sixty ICR female mice were randomly selected as normal group, and the rest mice were injected with 300 mg/kg PCPA intraperitoneally for 3 days to establish insomnia model. The model mice were randomly divided into model group, dextropropionylone group (0.13 mg/kg) and low, medium and high dose groups

收稿日期: 2025-07-25

基金项目: 河南省科技研发计划联合基金(232301420022); 国家中医药传承创新(2022CCCX008)

作者简介: 杨晶(1996—), 女, 博士在读, 研究方向为中西医结合防治神经退行性疾病。E-mail: 2020012010@hactcm.edu.cn

\*通信作者: 赵敏(1968—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中西医结合防治神经退行性疾病研究。E-mail: byst1969@

126.com

of Shugan Jianpi Yangxin Prescription (3.1, 6.2 and 12.4 g/kg), with 10 mice in each group. After 14 days of continuous administration, the sleep latency and sleep duration were detected by pentobarbital sodium righting test. Sugar preference test and open field test were used to evaluate anxiety and depression-like behavior and autonomous activities. Serum cortisol (CORT) and melatonin (MT) levels were detected by ELISA. The ultrastructure of hypothalamic neurons and mitochondria was observed by transmission electron microscope. Immunofluorescence staining and Western blot were used to detect the localization and expressions of OXA, OX1R, PER1 and CRY1 proteins in hypothalamus. **RESULTS** Compared with the normal group, the latency of falling asleep in the model group was prolonged ( $P < 0.01$ ), the sleep maintenance time was shortened ( $P < 0.01$ ), the preference rate of sugar water was decreased ( $P < 0.01$ ), and the total moving distance, average speed, grooming times and the percentage of central area exploration time in the open field were all increased ( $P < 0.01$ ). Serum CORT level increased ( $P < 0.01$ ) and MT level decreased ( $P < 0.01$ ). The hypothalamic neurons and mitochondria were seriously damaged. The expressions of co-localization of OXA and OX1R in hypothalamus, the co-localization of PER1 and CRY1 in nuclei increased ( $P < 0.01$ ), and the protein expressions of OXA, OX1R, PER1 and p-CREB/CREB increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, Shugan Jianpi Yangxin Prescription could shorten the sleep latency ( $P < 0.01$ ), prolong the sleep maintenance time ( $P < 0.01$ ), increase the preference rate of sugar water ( $P < 0.01$ ), and reduce the total activity distance, average speed, grooming times and the percentage of central area exploration time ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The serum CORT level decreased ( $P < 0.01$ ) and the MT level increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The ultrastructure of neurons and mitochondrial damage were improved. The expressions of co-localization of OXA and OX1R in hypothalamus and the co-localization of PER1 and CRY1 in nucleus were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The expressions of OXA and p-CREB/CREB protein were decreased ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** Shugan Jianpi Yangxin Prescription can effectively improve insomnia in mice, and its mechanism may be related to regulating OXA/CREB/PER1 signaling pathway.

**KEY WORDS:** Shugan Jianpi Yangxin Prescription; insomnia; OXA/CREB/PER1 signaling pathway; circadian rhythms

失眠作为全球高发的睡眠障碍性疾病,其病理机制涉及神经递质失衡、昼夜节律紊乱及下丘脑-垂体-肾上腺轴功能异常等多重因素<sup>[1-2]</sup>。其中,维持机体生理活动与睡眠-觉醒周期的核心生物钟——昼夜节律系统的稳定性,对于失眠的发生发展至关重要<sup>[3]</sup>。传统苯二氮草类药物虽能短期缓解症状,但存在依赖性和认知损害风险<sup>[4]</sup>。最新研究有力支持了利用昼夜节律调控机制干预失眠障碍的可行性<sup>[5]</sup>。以下丘脑食欲素(orexin)为核心的神经调控系统被证实与睡眠-觉醒周期密切相关,其中食欲素A(orexin A, OXA)介导的cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)/周期蛋白1(period circadian regulator 1, PER1)信号通路,作为连接分子机制与行为表型的关键枢纽,通过调控下丘脑神经元活性,在维持昼夜节律稳态改善失眠中发挥核心作用<sup>[6-7]</sup>。该通路的异常是导致昼夜节律紊乱进而诱发失眠的重要分子基础。

疏肝健脾养心方是河南省名中医赵敏教授根据

失眠邪实正虚病机,结合长期临床实践所得的有效验方,具有调和肝脾、宁心安神之效,正合肝郁脾虚、心神失养致失眠之病因病机,其临床疗效确切,可显著改善临床患者睡眠潜伏期和持续时间。前期研究表明,其机制涉及5-羟色胺(5-HT)水平升高及下丘脑Orexin信号抑制,不仅降低下丘脑OXA、食欲素受体1(orexin receptor 1, OX1R)/食欲素受体2(orexin receptor 2, OX2R)mRNA表达,还通过提升5-HT水平恢复睡眠稳态<sup>[8]</sup>。基于此,本研究采用对氯苯丙氨酸(PCPA)诱导建立失眠小鼠模型,聚焦OXA/CREB/PER1信号通路探究疏肝健脾养心方调控昼夜节律治疗失眠的机制,以期为该方临床应用提供实验依据。

## 1 材料

1.1 实验动物 8周龄雌性ICR小鼠60只,体质量(30±2)g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供[实验动物生产许可证号SCXK(辽)2020-0001,动物质量合格证号210726241101701618],

饲养于河南中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房 [实验动物使用许可证号 SYXK (豫) 2021-0015], 饲养环境温度 ( $23 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 ( $55 \pm 5$ )%, 昼夜光照 12 h/12 h 交替。本实验方案通过河南中医药大学实验动物福利伦理委员会审查 (伦理审查号 IACUC-202312056)。

**1.2 药物** 右佐匹克隆 (规格 3 mg/片, 国药准字 H20213830, 批号 240801) 购于北京斯利安药业有限公司。疏肝健脾养心方由柴胡 10 g、当归 10 g、白芍 15 g、黄芩 9 g、炒白术 15 g、茯苓 15 g、栀子 10 g、党参 10 g、龙眼肉 15 g、炒酸枣仁 15 g、炙甘草 10 g 组成, 中药颗粒剂均购于江阴天江药业有限公司 (批号 21032211、21096624、21076574、21036191、2107010w、21056414、21007191、21000352、201201、21046514、21096504), 由河南中医药大学第一临床附属医院中药房提供, 经鉴定符合 2020 年版《中国药典》标准。全方含生药饮片质量共 134 g (颗粒剂质量 40 g), 根据《药理研究方法学》<sup>[9]</sup>人与小鼠体表面积等效剂量系数折算法 (系数 9.1), 采用临床等效剂量为小鼠灌胃中剂量 6.2 g/kg, 高、低剂量分别为临床 2、0.5 倍剂量 (12.4、3.1 g/kg)。根据小鼠灌胃体积 (10 mL/kg), 使用时将配方颗粒溶于纯净水中, 制成给药质量浓度分别为 0.31、0.62、1.24 g/mL (低、中、高剂量) 的溶液灌胃。

**1.3 试剂** PCPA (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号 C6506); OXA 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 bs-15509R); 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, CREB)、磷酸化 CREB (p-CREB) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 9197S、9198S); PER1、隐花色素昼夜节律调节器 1 (cryptochrome 1, CRY1)、GAPDH、OX2R 抗体 (武汉爱博泰克生物科技有限公司, 货号 A8449、A13662、AC054、A3057); OX1R 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 18370-1-AP); 皮质醇 (cortisol, CORT)、褪黑素 (melatonin, MT) ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 货号 ml001959、ml002209)。

**1.4 仪器** Smart V3.0 视频红外线摄像旷场实验视频分析系统 (深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司); Fresco21 型冷冻离心机、Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); RM2245 型轮转式石蜡切片机、EM UC7 型全自动

超薄切片机、EM TP 型全自动树脂处理机 (德国 Leica 公司); VE-180 型垂直电泳仪 (上海天能科技有限公司); ChemiDoc™ 型蛋白印迹成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); JEM-1400 型生物透射电镜 (日本电子株式会社)。

## 2 方法

**2.1 分组、造模与给药** 小鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分为正常组 (10 只) 和造模组 (50 只)。参考文献 [10] 报道, 正常组每日上午 8:00 腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液 (10 mL/kg), 其余各组腹腔注射 300 mg/kg PCPA 溶液复制失眠小鼠模型, 连续造模 3 d。将造模成功的小鼠按随机数字表法分为模型组、右佐匹克隆组和疏肝健脾养心方低、中、高剂量组。疏肝健脾养心方低、中、高剂量组给予 3.1、6.2、12.4 g/kg 疏肝健脾养心方混悬液, 右佐匹克隆组给予 0.13 mg/kg 右佐匹克隆混悬液, 正常组和模型组给予等量生理盐水, 连续灌胃给药 14 d。给药结束后, 先进行戊巴比妥钠翻正实验, 待小鼠休息后进行糖水偏好实验和旷场实验适应性训练; 实验第 18 天开始进行连续 3 d 的旷场实验, 并在小鼠休息期维持糖水实验训练; 第 21 天记录糖水消耗, 行为学期间连续给药, 第 22 天将所有小鼠麻醉后取血、断头取脑, 进行后续实验。

**2.2 戊巴比妥钠阈上剂量协同睡眠实验** 根据预实验和高翰博等<sup>[8,11]</sup>实验结果, 给予戊巴比妥钠阈上剂量 50 mg/kg; 前期预实验确定给药第 13 天, 80% 小鼠翻正反射不消失的戊巴比妥钠阈下用量为 30 mg/kg, 小鼠 100% 入睡但又不使睡眠时间过长甚至死亡的戊巴比妥钠剂量为 50 mg/kg。正式实验中, 用药后立即开始计时 (记为  $T_0$ ), 待小鼠基本停止运动时, 将其体位翻转呈仰卧位, 若 3 min 内仰卧位达 60 s 以上, 判断其翻正反射消失进入睡眠状态, 此时记录为睡眠起始时间 (记为  $T_{\text{loss}}$ )。当翻正反射首次恢复时, 立即将其翻转成仰卧位, 30 s 内若再次恢复, 判断为动物觉醒, 并记录首次恢复翻正反射的时间为睡眠终止时间 (记为  $T_{\text{awake}}$ ); 若 30 s 内未恢复, 则在翻正反射再次恢复后重复翻转, 直至判定为睡眠结束。计算公式为入睡潜伏期 =  $T_{\text{loss}} - T_0$ ; 睡眠持续时间 =  $T_{\text{awake}} - T_{\text{loss}}$ 。

**2.3 旷场实验** 旷场实验箱规格 100 cm×100 cm×40 cm, 箱体由黑色硬塑料构成, 参考文献 [12] 报道进行实验。开始实验后将小鼠放置于中央区域, 让其随意探索, 观察时间为 5 min。由 Smart

V3.0 视频追踪系统进行录像、轨迹提取和数据记录,分析小鼠探索的总路程、平均速度、理毛次数、中央区域探索时间百分比、边缘区域静止时间百分比,以此评价小鼠的自主活动能力及情绪状态。

2.4 糖水偏好实验 参考文献 [13] 报道进行糖水偏好训练。第1天,每只小鼠给予2瓶等体积的1%蔗糖水;第2天换成1瓶1%蔗糖水和1瓶纯净水,每4h调换1次水瓶位置;第3天停止供水,24h后正式开始糖水偏好实验。测试时给予200 mL 1%蔗糖水+200 mL 纯净水,每隔2h调换1次水瓶位置,共观察12h。记录蔗糖水及纯净水的消耗量,以糖水偏好率为评价指标。公式为糖水偏好率=蔗糖水消耗量/(蔗糖水消耗量+纯净水消耗量)×100%。

2.5 ELISA 法检测血清 CORT 和 MT 水平 严格按照试剂盒说明书操作步骤,取各组小鼠血清,检测血清 CORT、MT 水平。

2.6 透射电镜观察下丘脑神经元超微结构 小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠进行麻醉,断头取脑后分离下丘脑组织,置于2.5%戊二醛溶液中固定、漂洗,再置于1%锇酸中固定,乙醇、丙酮梯度脱水,包埋后切片染色。在30 000倍视野下每组随机观察5个神经元,计算线粒体平均数量、正常线粒体百分比、单个线粒体的截面轮廓面积和内外膜间隙。

2.7 免疫荧光染色检测下丘脑 OXA 与 OX1R、PER1 与 CRY1 共定位表达 在行为学测试结束后,每组随机挑选3只小鼠,麻醉、断头取脑固定后用于石蜡包埋。参考文献 [14] 报道,脑组织切片脱蜡脱水后置于0.01 mol/L 抗原修复缓冲液中微波修复,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温封闭后,加入一抗工作液4℃冰箱孵育过夜,次日滴加二抗工作液室温避光孵育2h,DAPI 染核后封片、拍照,计算阳性染色的平均光密度(average optical density, AOD) 值。

2.8 Western blot 法检测下丘脑组织 OXA、OX1R、CREB、p-CREB、PER1 蛋白表达 行为学测试结束后,每组随机挑选4只小鼠,麻醉后断头取脑,剥离新鲜下丘脑组织,使用 RIPA 高效组织裂解液将其充分裂解,离心后取上清,根据 BCA 蛋白检测试剂盒说明书测定蛋白质浓度。蛋白上样,电泳,转膜,使用5%脱脂奶粉封闭液室温摇床封闭约1.5h,加一抗孵育过夜,次日加二抗孵育后使用发光成像显影仪进行成像,使用 Image J v1.8.0 软件分析条带灰度值。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理,满足正态性和方差齐性的计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用 LSD 法检验,方差不齐时采用 Tamhane T2 法检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 疏肝健脾养心方对失眠小鼠睡眠情况的影响 实验第14天给药结束1h后,与正常组比较,模型组小鼠睡眠潜伏期延长( $P < 0.01$ ),睡眠持续时间缩短( $P < 0.01$ );与模型组比较,疏肝健脾养心方各剂量组及右佐匹克隆组小鼠睡眠潜伏期缩短( $P < 0.01$ ),睡眠持续时间延长( $P < 0.01$ ),见表1。

表1 各组小鼠睡眠潜伏期和睡眠持续时间比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

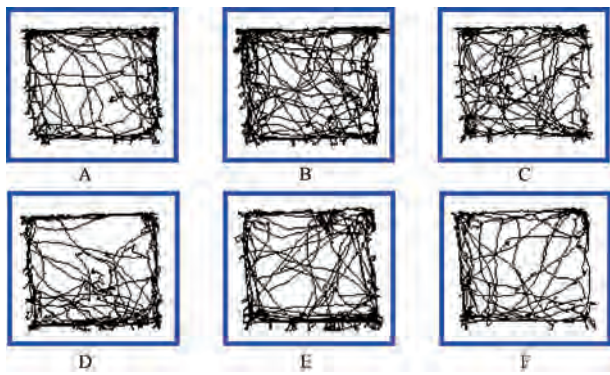
组别	睡眠潜伏期/min	睡眠持续时间/min
正常组	3.94±0.20	54.77±1.01
模型组	9.45±0.31 <sup>###</sup>	17.61±1.63 <sup>##</sup>
疏肝健脾养心方低剂量组	5.50±0.10 <sup>**</sup>	27.83±0.53 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方中剂量组	5.67±0.30 <sup>**</sup>	34.47±1.29 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方高剂量组	4.13±0.11 <sup>**</sup>	31.28±1.48 <sup>**</sup>
右佐匹克隆组	3.67±0.14 <sup>**</sup>	36.88±1.47 <sup>**</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

3.2 疏肝健脾养心方对失眠小鼠自发活动和焦虑抑郁行为的影响 实验第18天,与正常组比较,模型组小鼠总活动距离、平均速度、理毛次数、中央区域探索时间百分比均增加( $P < 0.01$ ),边缘区域静止时间百分比降低( $P < 0.01$ ),活动轨迹稀疏,自发活动减少;与模型组比较,疏肝健脾养心方低、高剂量组小鼠理毛次数、中央区域探索时间百分比均减少( $P < 0.01$ ),疏肝健脾养心方中剂量组小鼠总活动距离、平均速度、理毛次数、中央区域探索时间百分比均减少( $P < 0.01$ ),边缘区域静止时间百分比增加( $P < 0.05$ ),见图1、表2~3。

3.3 疏肝健脾养心方对失眠小鼠糖水偏好的影响 实验第21天,与正常组比较,模型组小鼠糖水偏好率降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,疏肝健脾养心方各剂量组及右佐匹克隆组小鼠糖水偏好率升高( $P < 0.01$ ),见表4。

3.4 疏肝健脾养心方对失眠小鼠血清 CORT 和 MT 水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 CORT 水平升高( $P < 0.01$ ),MT 水平降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,疏肝健脾养心方各剂量组及右佐匹克隆组 CORT 水平降低( $P < 0.01$ ),MT 水平升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见表5。



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为疏肝健脾养心方低、中、高剂量组，F 为右佐匹克隆组。

图 1 各组小鼠旷场运动轨迹图

Fig. 1 Track diagram of open-field movement of mice in each group

表 2 各组小鼠总活动距离、平均速度、理毛次数比较 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab. 2 Comparison of total moving distance, average speed and grooming times of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	总活动距离/ cm	平均速度/ ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ )	理毛次数/ 次
正常组	1 302±232	15.24±3.42	17.2±4.8
模型组	2 472±154 <sup>##</sup>	26.55±2.65 <sup>##</sup>	43.2±6.4 <sup>##</sup>
疏肝健脾养心方低剂量组	1 950±213	19.30±1.08	22.7±5.0*
疏肝健脾养心方中剂量组	1 559±159 <sup>**</sup>	15.45±2.11 <sup>**</sup>	19.9±3.3 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方高剂量组	1 925±131	19.47±1.49	22.2±3.1*
右佐匹克隆组	1 715±78*	24.84±2.30	31.8±4.7

注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，\* $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

表 3 各组小鼠中央区域探索时间、边缘区域静止时间百分比比较 ( $\%, \bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab. 3 Comparison of exploration time in central area and percentage of rest time in peripheral area of mice in each group ( $\%, \bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	中央区域探索 时间百分比	边缘区域静止 时间百分比
正常组	0.13±0.06	39.39±8.89
模型组	1.18±0.23 <sup>##</sup>	14.22±0.94 <sup>##</sup>
疏肝健脾养心方低剂量组	0.34±0.22*	26.81±5.54
疏肝健脾养心方中剂量组	0.30±0.10 <sup>**</sup>	33.70±5.66*
疏肝健脾养心方高剂量组	0.49±0.25*	30.29±2.58
右佐匹克隆组	0.52±0.18	21.70±3.06

注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，\* $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

3.5 疏肝健脾养心方对失眠小鼠下丘脑神经元和线粒体结构的影响 与正常组比较，模型组下丘脑神经元超微结构损伤，线粒体数量减少 ( $P<0.01$ )，单位面积正常线粒体密度降低 ( $P<0.01$ )，

表 4 各组小鼠糖水偏好率比较 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab. 4 Comparison of sugar water preference rate of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	糖水偏好率/%
正常组	69.00±1.16
模型组	33.00±1.73 <sup>##</sup>
疏肝健脾养心方低剂量组	54.33±1.45 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方中剂量组	56.67±5.24 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方高剂量组	53.33±3.84 <sup>**</sup>
右佐匹克隆组	60.33±2.33 <sup>**</sup>

注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

表 5 各组小鼠血清 CORT 和 MT 水平比较 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Tab. 5 Comparison of serum CORT and MT levels in mice of each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

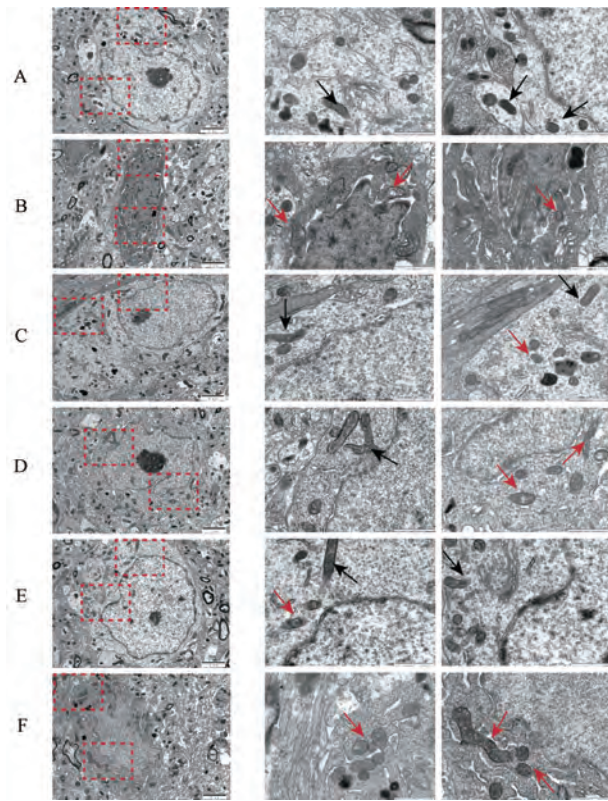
组别	CORT/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	MT/( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
正常组	148.30±0.86	144.30±2.08
模型组	204.70±7.85 <sup>##</sup>	99.09±2.24 <sup>##</sup>
疏肝健脾养心方低剂量组	147.80±9.03 <sup>**</sup>	117.10±2.03 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方中剂量组	172.80±3.28 <sup>**</sup>	108.40±2.16*
疏肝健脾养心方高剂量组	165.00±2.93 <sup>**</sup>	128.50±2.15 <sup>**</sup>
右佐匹克隆组	160.90±2.60 <sup>**</sup>	122.20±1.38 <sup>**</sup>

注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，\* $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

平均截面积增加 ( $P<0.01$ )，肿胀变形；嵴结构嵴模糊、断裂、溶解甚至消失，部分呈空泡状，部分线粒体膜完整性受损，内外膜间隙增加 ( $P<0.01$ )。与模型组比较，疏肝健脾养心方高、低剂量组神经元结构接近正常，胞质水肿和内质网扩张缓解，线粒体数量增加 ( $P<0.05, P<0.01$ )，恢复至接近正常水平，正常线粒体百分比增加 ( $P<0.01$ )；线粒体形态结构恢复良好，肿胀减轻，平均截面积缩小 ( $P<0.05, P<0.01$ )；嵴结构清晰，内外膜间隙缩小 ( $P<0.01$ )。结果见图 2 和表 6。

3.6 疏肝健脾养心方对失眠小鼠下丘脑 OXA 与 OX1R、PER1 与 CRY1 在核内外共定位表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠下丘脑区 OXA、OX1R、PER1、CRY1 及 OXA 与 OX1R、ER1 与 CRY1 共定位荧光信号均增强 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，疏肝健脾养心方各剂量组和右佐匹克隆组小鼠下丘脑区 OXA、OX1R、PER1、CRY1 及 OXA 与 OX1R、PER1 与 CRY1 共定位荧光信号均减弱 ( $P<0.05, P<0.01$ )，见图 3~4、表 7。

3.7 疏肝健脾养心方对失眠小鼠下丘脑 OXA、OX1R、CREB、p-CREB、PER1 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠下丘脑 OXA、OX1R、p-CREB/CREB、PER1 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，疏肝健脾养心方高、低剂量组和右佐匹克隆组小鼠下丘脑 OXA、p-CREB/CREB、PER1



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为疏肝健脾养心方低、中、高剂量组，F 为右佐匹克隆组。左侧为神经元轮廓形态图，右侧为红色虚线框的局部放大图，黑色箭头指正常线粒体，红色箭头指受损伤或修复中的线粒体。

图2 各组小鼠下丘脑神经元和线粒体形态图（透射电镜，×30 000）

Fig. 2 Morphological map of hypothalamic neurons and mitochondria in each group of mice (TEM, ×30 000)

表6 各组小鼠神经元线粒体变化 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Tab. 6 Mitochondrial changes of mouse neurons in each group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	线粒体数量/个	正常线粒体百分比/%	平均截面积/nm <sup>2</sup>	内外膜间隙宽度/nm
正常组	67.00±5.57	96.17±0.98	59 750±4 490	7.22±0.38
模型组	15.67±2.33 <sup>##</sup>	19.84±5.57 <sup>##</sup>	254 336±41 676 <sup>##</sup>	16.21±2.20 <sup>##</sup>
疏肝健脾养心方低剂量组	49.00±5.13 <sup>**</sup>	83.26±2.49 <sup>**</sup>	87 904±8 035 <sup>**</sup>	8.94±0.32 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方中剂量组	29.33±2.96	29.70±1.81	105 844±22 662 <sup>**</sup>	8.83±0.25 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方高剂量组	33.33±5.55 <sup>*</sup>	66.46±4.80 <sup>**</sup>	132 308±35 410 <sup>*</sup>	10.15±0.55 <sup>**</sup>
右佐匹克隆组	25.33±2.91	52.78±16.90 <sup>*</sup>	138 694±26 263 <sup>*</sup>	7.51±0.34 <sup>**</sup>

注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

表7 各组小鼠下丘脑 OXA、OX1R、PER1、CRY1 及 OXA 与 OX1R、ER1 与 CRY1 共定位荧光信号强度比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Tab. 7 Comparison of fluorescence signal intensities of OXA, OX1R, PER1, CRY1 and co-localization of OXA and OX1R, PER1 and CRY1 in hypothalamus of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	OXA	OX1R	OXA 与 OX1R	PER1	CRY1	PER1 与 CRY1
正常组	35.51±2.24	29.73±3.33	29.24±2.21	27.22±1.15	41.66±3.68	42.07±6.25
模型组	81.07±3.28 <sup>##</sup>	85.28±1.86 <sup>##</sup>	129.60±9.55 <sup>##</sup>	72.87±6.35 <sup>##</sup>	78.55±3.26 <sup>##</sup>	130.60±2.23 <sup>##</sup>
疏肝健脾养心方低剂量组	57.27±2.07 <sup>**</sup>	61.94±7.54 <sup>**</sup>	62.03±6.76 <sup>**</sup>	36.71±4.60 <sup>**</sup>	63.11±4.03 <sup>*</sup>	81.20±4.87 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方中剂量组	72.37±1.87 <sup>*</sup>	67.16±2.29 <sup>*</sup>	85.63±11.39 <sup>*</sup>	54.13±4.71 <sup>*</sup>	56.51±1.61 <sup>**</sup>	55.28±2.93 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方高剂量组	64.78±1.58 <sup>**</sup>	67.55±4.54 <sup>*</sup>	76.29±9.72 <sup>**</sup>	53.83±1.62 <sup>*</sup>	64.92±3.27 <sup>*</sup>	83.22±3.05 <sup>**</sup>
右佐匹克隆组	63.06±0.74 <sup>**</sup>	63.01±5.26 <sup>**</sup>	81.19±10.43 <sup>**</sup>	35.94±1.76 <sup>**</sup>	58.37±2.89 <sup>**</sup>	65.46±4.71 <sup>**</sup>

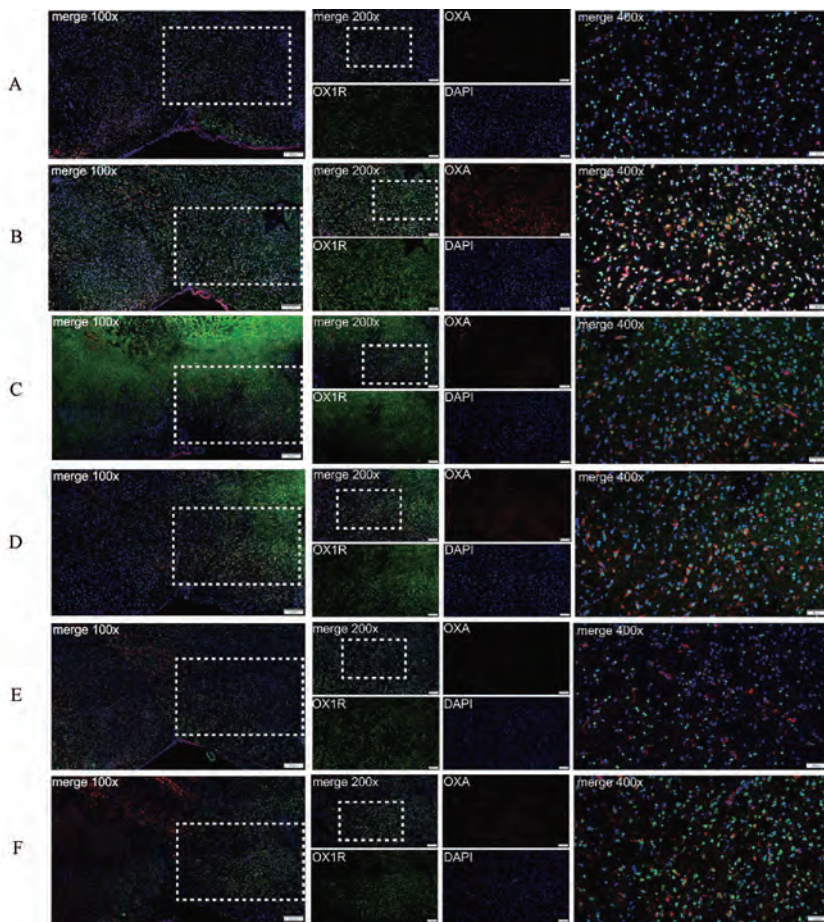
注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

蛋白表达降低 ( $P<0.05, P<0.01$ )，疏肝健脾养心方中剂量组小鼠下丘脑 OXA、OX1R 蛋白表达降低 ( $P<0.05, P<0.01$ )，p-CREB/CREB 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )，提示中剂量可能对 CREB 通路具有阶段性激活作用。

#### 4 讨论

失眠障碍是常见的睡眠-觉醒节律紊乱性疾病<sup>[15]</sup>，属中医学“不寐”，核心病机为“阴阳失交，心神失养或心神被扰”。中医药治疗失眠具有独特优势<sup>[16-17]</sup>，正如《类经·疾病类·情志九气》<sup>[18]</sup>云：“虽五脏各有所属，然求其所由，则无不从心而发”。河南省名中医赵敏结合临床经验指出“情志不畅、肝失疏泄”是其关键病因，提出“疏肝、健脾、养心”治法，创制疏肝健脾养心方，契合“肝郁脾虚、心神失养”之证。前期研究显示，该方可通过增加 5-HT 表达，抑制下丘脑 OXA 及其受体表达，发挥镇静催眠作用<sup>[8]</sup>，与 OXA 在睡眠-觉醒节律调控中角色相符<sup>[19]</sup>。研究表明，OXA 神经元活性与 PER1 等时钟基因昼夜振荡同步，共同调节觉醒-睡眠周期<sup>[20]</sup>。基于此，本研究进一步探讨该方是否通过调控下丘脑 OXA/CREB/PER1 信号通路，改善睡眠-觉醒节律及伴随的情绪行为异常，以深入揭示其多靶点作用机制。

本研究发现，模型组表现出入睡潜伏期延长和睡眠持续时间缩短等核心症状，并伴有糖水偏好率降低及旷场实验中的自主活动亢进与探索行为异常，提示模型成功模拟了失眠及其伴随的快感缺失



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为疏肝健脾养心方低、中、高剂量组，F 为右佐匹克隆组。

图 3 各组小鼠下丘脑 OXA 和 OX1R 免疫荧光染色图

Fig. 3 Immunofluorescence staining of OXA and OX1R in hypothalamus of mice in each group

表 8 各组下丘脑 OXA、OX1R、p-CREB/CREB、PER1 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

Tab. 8 Comparison of OXA, OX1R, p-CREB/CREB and PER1 protein expressions in hypothalamus of each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

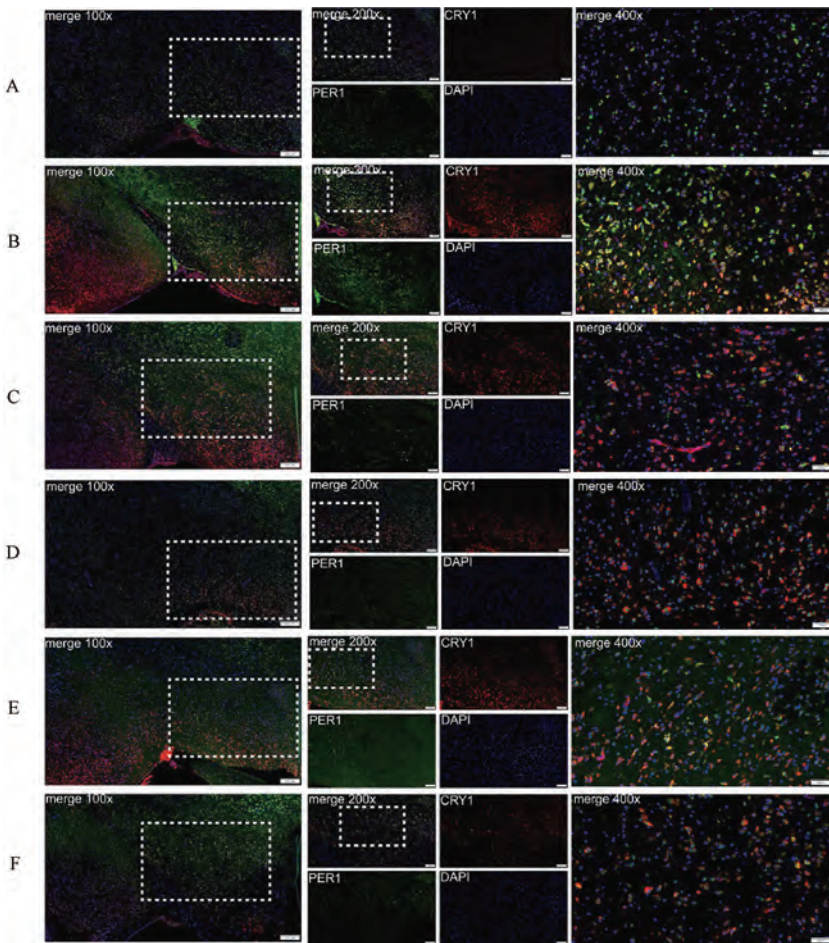
组别	OXA	OX1R	p-CREB/CREB	PER1
正常组	0.47±0.01	0.67±0.04	1.00±0.02	1.00±0.02
模型组	1.11±0.02 <sup>##</sup>	1.06±0.05 <sup>##</sup>	1.84±0.04 <sup>##</sup>	1.41±0.03 <sup>##</sup>
疏肝健脾养心方低剂量组	0.75±0.02 <sup>**</sup>	0.92±0.02 <sup>*</sup>	1.22±0.02 <sup>**</sup>	0.71±0.02 <sup>**</sup>
疏肝健脾养心方中剂量组	0.85±0.03 <sup>**</sup>	0.91±0.01 <sup>*</sup>	3.64±0.09 <sup>**</sup>	1.50±0.03
疏肝健脾养心方高剂量组	0.93±0.04 <sup>**</sup>	1.03±0.03	1.58±0.03 <sup>**</sup>	1.22±0.03 <sup>**</sup>
右佐匹克隆组	0.90±0.04 <sup>**</sup>	0.93±0.02	1.64±0.03 <sup>**</sup>	1.28±0.03 <sup>*</sup>

注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

与焦虑样行为，与文献 [21] 报道一致。疏肝健脾养心方干预后逆转上述行为异常，同步改善睡眠与情绪障碍，与其“疏肝健脾、养心安神”的中医治法内涵相符。模型组血清 CORT 水平升高，而 MT 水平降低，提示 HPA 轴过度激活与昼夜节律紊乱<sup>[22]</sup>；疏肝健脾养心方干预后，CORT 与 MT 水平趋于正常，表明该方具有调节 HPA 轴与恢复节律功能的作用，从内分泌角度佐证其整体调节优势<sup>[23-24]</sup>，且与其“疏肝解郁”以调节情志，“健脾养心”以调和阴阳的中医功效相契合。病理观察

显示，模型组下丘脑神经元出现胞质水肿、内质网扩张及线粒体损伤（数量减少、嵴结构模糊）<sup>[25-27]</sup>；疏肝健脾养心方干预后能有效改善线粒体形态与数量，减轻神经元结构损伤。

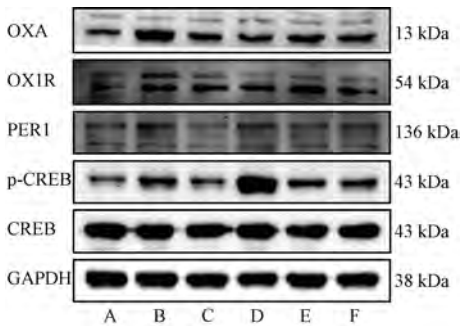
模型组下丘脑 OXA 表达及 PER1 蛋白表达异常升高，PER1 与 CRY1 核内共定位增强，提示 Orexin 系统过度活化并引发生物钟负反馈环路紊乱，与睡眠时相偏移的机制相符<sup>[28]</sup>；疏肝健脾养心方可降低 OXA 表达及 OXA/OX1R 共定位，阻断 Orexin 信号通路过度激活，但中剂量组效果较弱，



注：A为正常组，B为模型组，C为疏肝健脾养心方低、中、高剂量组，F为右佐匹克隆组。

图4 各组小鼠下丘脑PER1和CRY1免疫荧光染色图

Fig. 4 Immunofluorescence staining of PER1 and CRY1 in hypothalamus of mice in each group



注：A为正常组，B为模型组，C为疏肝健脾养心方低、中、高剂量组，F为右佐匹克隆组。

图5 各组小鼠下丘脑OXA、OX1R、p-CREB、CREB、PER1蛋白条带图

Fig. 5 Protein bands of OXA, OX1R, p-CREB, CREB and PER1 in hypothalamus of mice in each group

呈现非单调剂量效应，提示存在成分间复杂互作或剂量依赖性调控差异。Orexin信号通常通过激活CREB调控下游基因<sup>[29]</sup>，本研究显示，模型组p-CREB与PER1表达均升高，进一步证实OXA/p-

CREB/PER1通路异常活化，与Orexin系统激活后通过p-CREB促进PER1基因转录相符<sup>[30]</sup>；而疏肝健脾养心方可有效降低p-CREB及PER1蛋白表达，减少其核内异常聚集。以上结果说明该方改善失眠的重要机制为抑制OXA过度激活，下调p-CREB磷酸化，进而恢复PER1节律，纠正生物钟紊乱，从而改善睡眠结构。

本研究中剂量组呈现行为与分子反应差异，其改善糖水偏好最优，而对下丘脑OXA和p-CREB的调控弱于低、高剂量。这一现象反映了中药复方多靶点、整体调节的药理特性<sup>[31]</sup>。中剂量可能优先通过5-HT等通路改善情绪行为，而对Orexin/生物钟通路的调控需更高剂量或存在时序差异；或处于“U型”剂量效应平衡点，可调节HPA轴却不足以抑制高度激活的OXA神经元<sup>[32]</sup>；亦或行为改善先于分子调控。该差异提示复方存在多通路协同机制，有待后续通过成分分析与多模型验证系统阐明。

综上所述,疏肝健脾养心方可通过调控 OXA/CREB/PER1 信号通路保护神经元结构,有效改善失眠障碍,体现了中医药整体调节、标本兼治的特色优势,具有良好的研究价值和应用前景。

### 参考文献:

[1] 傅晗昕,张 蕊,胡霖霖.失眠过度觉醒状态的中西医研究进展[J].中华全科医学,2025,23(7):1098-1102.

[2] Chang H, Tang W, Wulf A M, et al. Sleep microstructure organizes memory replay[J]. *Nature*, 2025, 637(8048): 1161-1169.

[3] Harvey A G, Agnew E R, Esteva Hache R, et al. A randomized trial of adapted versus standard versions of the transdiagnostic intervention for sleep and circadian dysfunction implemented via facilitation and delivered by community mental health providers: improving the “fit” of psychological treatments by adapting to context[J]. *Implement Sci*, 2025, 20(1): 32.

[4] 夏立博.基于 Orexin 信号通路探讨参动夜安片治疗老年慢性失眠障碍的作用及机制[D].长春:长春中医药大学,2024.

[5] Kragh M, Dyrberg H, Kristiansen S T, et al. Efficacy of a transdiagnostic sleep and circadian intervention for outpatients with sleep problems and depression, attention deficit disorder, or bipolar disorder: a randomised controlled trial[J]. *J Sleep Res*, 2026, 35(1): e70088.

[6] 徐 波.《内经》生命周期理论探讨及安寐丹对睡眠剥夺模型 Orexin 信号通路作用研究[D].武汉:湖北中医药大学,2019.

[7] Wei X Y, Xu F P, Chen X B, et al. Peiyuan Ningshen-ointment alleviates learning and memory impairment induced by sleep deprivation through activating the cAMP/PKA signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2025, 142: 156469.

[8] 王 震,张 杰,刘飞祥,等.疏肝健脾养心方对失眠模型小鼠食欲素 A 及其受体的干预作用[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(10):54-61.

[9] 陈镜宇.大型学术著作《药理研究方法学》出版发行[J].中国药理学通报,2022,38(3):481.

[10] 夏天吉,闫明珠,王 智,等.大小鼠失眠模型和评价方法研究进展[J].中国实验动物学报,2022,30(3):428-435.

[11] 高翰博,王广政,巩晴晴,等.基于下丘脑-垂体-肾上腺轴对比杂交天麻及其亲本醇提物镇静催眠药效学研究[J].中南药学,2024,22(4):871-877.

[12] 杨 晶,王世界,郝 莉,等.六味地黄丸对老龄小鼠海马突触可塑性的作用[J].中成药,2023,45(4):1093-1100.

[13] 马 骏,王怀弟,郭 影,等.元胡止痛滴丸对慢性不可预知性温和刺激大鼠抗抑郁作用及机制研究[J].中成药,2025,47(4):1326-1330.

[14] 李庆龙,贺巧荣,王 辉,等.古汉养生精口服液调控 NF- $\kappa$ B/IL-6/MMP-1 信号通路对慢性阻塞性肺疾病大鼠的影响[J].中成药,2025,47(7):2383-2388.

[15] 孙晓萌,樊 旭,周 歆,等.中医药治疗失眠合并情绪障

碍的临床及机制研究进展[J].世界中医药,2025,20(9):1600-1609;1617.

[16] 侯苏寓,罗丹丹,高相焯,等.中医药调控 PI3K/Akt 信号通路治疗失眠的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2026,32(3):284-293.

[17] 綦向军,林 檉,史佩玉,等.《新编国家中成药》中治疗失眠成方规律的分析[J].中成药,2019,41(8):2017-2021.

[18] 杨运劼,余永鑫,罗 京,等.浅析“脑为精、气、神汇聚之官,神明出焉”[J].北京中医药大学学报,2024,47(9):1229-1235.

[19] Zhang Z, Wang S, Gao L. Circadian rhythm, glucose metabolism and diabetic complications: the role of glucokinase and the enlightenment on future treatment[J]. *Front Physiol*, 2025, 16: 1537231.

[20] Jiang Y, Shi J, Tai J, et al. Circadian regulation in diurnal mammals: neural mechanisms and implications in translational research[J]. *Biology (Basel)*, 2024, 13(12): 958.

[21] 李 悦,王 慧,姚欣雨,等.酸枣仁汤对 PCPA 失眠大鼠焦虑样行为的影响[J].中成药,2023,45(6):1816-1822.

[22] 马小涵,高毅东,杨嘉誉,等.天王补心丹通过调节生物钟反馈环路治疗失眠的作用机制[J].中医药学报,2025,53(2):30-36.

[23] 舒 一,刘德果,李姿蓉,等.复方柴金解郁方调控 AMPK/FOXO3a 信号改善抑郁合并失眠模型大鼠线粒体自噬损伤[J].中国医院药学杂志,2025,45(10):1112-1123.

[24] 方 圆,唐宜春,郝晓东.基于“HPA 轴”探讨龙胆泻肝汤蜡炙灸治疗失眠伴抑郁障碍的疗效机制[J].中医药临床杂志,2024,36(12):2401-2405.

[25] 黄梦莹,王 平.三草安神方调控 cAMP/PKA 信号通路改善 SD 模型斑马鱼睡眠及抑郁状态的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2026,32(1):180-190.

[26] 冯庭宇,叶笑寒,李盛青,等.安寐汤对失眠大鼠心肌线粒体 COX I、IV mRNA 和蛋白表达的影响[J].时珍国医国药,2023,34(2):325-327.

[27] 李梓荣,王妙然,吴宇飞,等.基于“昼精夜瞑”理论探讨线粒体动力学与失眠日间功能受损的关系[J].时珍国医国药,2025,36(8):1513-1515.

[28] Sun Y, Tisdale R K, Kilduff T S. Hypocretin/orexin receptor pharmacology and sleep phases[J]. *Front Neurol Neurosci*, 2021, 45: 22-37.

[29] 陈俊逾,王庆全,常春雷,等.补虚安神膏对阳虚体质不寐患者血清相关睡眠调节因子的影响[J].中医药学报,2025,53(3):92-96.

[30] 夏天吉.慢性束缚应激致小鼠睡眠障碍模型的建立及参远提取物改善睡眠作用与机制研究[D].北京:北京协和医学院,2024.

[31] 许海玉,杨洪军.整合药理学:中药现代研究新模式[J].中国中药杂志,2014,39(3):357-362.

[32] 鄢良春,华 桦,田韦韦,等.基于模式生物费氏弧菌 Hormesis 效应的中药非典型剂量-反应关系与定量表征[J].中药药理与临床,2022,38(3):2-8.