

PCPA 致失眠大鼠的时钟基因表达变化

杨 阳 杨晓敏 胡秀华 曹 奕 简郭血骄 杨向竹 郭 健 赵俊云

摘 要 **目的** 探讨 PCPA 致失眠大鼠的时钟基因表达变化。**方法** 雄性 SD 大鼠一次性腹腔注射 PCPA 复制失眠动物模型,采用旷场实验评价失眠大鼠的行为学变化,采用 ELISA 法检测外周血清中 HPA 轴激素水平,采用 RT-qPCR 技术检测大鼠脑部、肝脏核心时钟基因(Clock、Bmal1、Per1、Per2、Cry1 和 Cry2)的转录水平。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠行为学得分显著升高($P < 0.01$);脑部 Clock、Bmal1、Cry1 表达下调($P < 0.05$),Cry2 的表达显著上升($P < 0.05$);肝脏 Per1 表达上升($P < 0.01$)。**结论** PCPA 诱导的大鼠失眠可能与脑部 Clock、Bmal1、Cry1 和 Cry2 基因和肝脏 Per1 基因的表达改变有关。

关键词 失眠 动物模型 时钟基因

中图分类号 R332

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.03.022

Changes of Clock Gene Expression in Brain and Liver of the Insomnia Rats Induced by PCPA. Yang Yang, Yang Xiaomin, Hu Xiuhua, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract **Objective** To investigate the changes of clock gene expressions of brain and liver in the insomnia rats induced by PCPA. **Methods** Male SD rats were intraperitoneally injected with PCPA to establish the insomnia animal model. The behavioral changes of insomnia rats were evaluated by open field experiment. The levels of HPA axis hormones in peripheral serum were detected by ELISA. The transcription levels of core clock genes (Clock, Bmal1, Per1, Per2, Cry1 and Cry2) in brain and liver of rats were detected by RT-qPCR. **Results** Compared with the control group, the behavioral score of rats in the model group was significantly higher ($P < 0.01$). The expressions of Clock, Bmal1 and Cry1 in brain were down-regulated ($P < 0.05$). Moreover, the expression of Per1 in the liver was up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** PCPA-induced insomnia in rats may be associated with altered expressions of Clock, Bmal1, Cry1 and Cry2 genes in the brain and Per1 genes in the liver.

Key words Insomnia; Animal model; Clock genes

失眠是众多睡眠障碍中最为常见的一种,主要表现为入睡难、清醒早、睡眠质量低和睡眠时间短等特点。长时间的失眠状态将导致严重的后果,如记忆力或注意力的下降、各种慢性疾病或精神疾病,包括阿尔茨海默病、衰老等^[1]。对氯苯丙氨酸(para-Chlorophenylalanine, PCPA)是经典失眠动物模型的诱导因素。PCPA 可以通过抑制色氨酸羟化酶以阻碍 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的合成进而导致失眠,目前对 PCPA 致失眠的机制研究也多集中在 5-HT 方面。失眠与多种因素有关,其中控制昼夜节律的生物钟系统起着主导作用。生物钟系统包括位于下丘脑的主钟以及外周各器官的外周时钟,其中主钟于视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)产生节律信号并通过神经和体液的方式送往全身。机体

的自主性节律主要是由时钟基因 Clock、Bmal1、Per 和 Cry 基因通过负反馈调节所形成的。肝脏是涉及糖代谢和脂代谢,并与时钟基因联系紧密的重要时钟器官之一,其功能的发挥受到主钟和外周时钟的精密调控。本研究采用经典失眠动物模型(PCPA 致失眠大鼠),探究 PCPA 致失眠大鼠中脑部和肝脏时钟基因的表达变化,进一步探讨失眠与时钟基因表达变化的关系。

材料与方法

1. 材料:16 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,年龄 6~8 周,体质量 200 ± 20 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物许可证号为 SCXK(京)2015-0015。其他主要材料:PCPA(美国 Ark PharmLnc. 公司,批号:AK-80383,纯度 > 98%),Trizol(美国 Invitrogen 公司),M-MLV 反转录酶、dNTP(10mmol/L)、2(Ex TaqMix[宝生物工程(大连)有限公司],DNase I、RNase Inhibitor、6 × Loading Buffer[美国 Fermentas(MBI)公司],引物(北京中美泰和生物技术有限公司)

基金项目:北京中医药大学横向基金资助项目(2170071720009)

作者单位:100029 北京中医药大学生命科学院生物科学系

通讯作者:赵俊云,副教授,电子信箱:junyunzhao@126.com

司), ELISA 检测试剂盒(北京奇松生物科技有限公司)。实验仪器:大鼠旷场实验箱, Safire2 酶标仪(瑞士 Tecan 公司), 3K15 高速冷冻离心机(美国 Eppendorf 公司), S-18KS 手持电动微量组织匀浆机(莱普特公司), 2720 型 PCR 仪(美国 ABI 公司), Roche LightCycler® 480II 实时荧光定量 PCR 系统(德国 Roche 公司)。

2. 方法:(1)模型动物的喂养:适应性喂养 16 只 SD 雄性大鼠, 1 周后将其随机分为对照组(8 只)和模型组(8 只), 模型组一次性腹腔注射 PC-PA300mg/kg, 对照组腹腔注射等体积 0.9% 氯化钠溶液, 饲养过程中采取正常环境光照, 给予大鼠正常饮食。(2)旷场实验:实验第 3 天进行旷场实验。旷场实验箱体积为 100cm × 100cm × 45cm, 将大鼠轻轻放在旷场正中格, 系统自动记录大鼠 3min 内行为的垂直得分(穿过地面方块的数量)与水平得分(前爪腾空或攀附动作的次数), 以大鼠活动的总路程(垂直得分与水平得分之和)作为本实验的检测指标。在每次实验结束后, 将动物粪便清除并擦拭实验箱底部及内壁, 75% 乙醇擦拭消毒, 乙醇挥发无味后进行下一次操作。实验期间保持安静, 周围参照物不变, 实验者不变。(3)ELISA 法检测 HPA 轴激素水平:实验第 3 天, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠。腹主动脉采血, 4℃ 下静置 1h; 3500r/min 离心 15min, 收集血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。(4)RT-qPCR 检测时钟基因转录水平:采血后, 从大脑皮层和肝右叶靠近门静脉处取样, 匀浆处理。从对照组和模型组中各取 3 只大鼠的脑、肝脏匀浆样品, 每个样品进行 1 次 RT-qPCR 试验。采用 Trizol 法提取脑部、肝脏 mRNA, RNA 琼脂糖凝胶电泳观察其浓度和纯度。将 RNA 提取物反转录为 cDNA。RT-qPCR 反应条件为 95℃ 5min 预变性后, 95℃ 15s, 62℃ 30s(荧光检测), 45 个循环。引物序列详见表 1。

3. 统计学方法:采用 SAS 8.2 统计学软件对数据进行统计分析, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据不符合正态分布使用非参数检验;数据符合正态分布且方差齐者采用独立 *t* 检验, 数据符合正态分布且方差不齐者采用近似 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 自主活动:与对照组比较, 模型组大鼠行为学得分(大鼠 3min 内活动的总路程, 即穿过地面方块的

表 1 RT-qPCR 引物序列

名称	引物序列(5'→3')
β -actin	GAAGTGTGACGTTGACATCCG
	GCCTAGAAGCATTTCGCGGTG
Clock	GCGAGAACTTGGCGTTGAGGAG
	TGGAGGAGGCAGAAGGAGTTGG
Bmal1	AAACTACAAGCCAACATTTCTATCC
	ATCTTCCTCGGTCACATCC
Per1	AGACCTCGGCAGGCTTCG
	GCGAGAACGCTTTGCTTTAGAT
Per2	GGGAGGTTTAGGAGGAAATACG
	TGGAAGAGGCTCTCATGGAGGT
Cry1	CAGCGGTGGCAGTGGTG
	TTCTTCCTTGCTTTAGTGGGTTAG
Cry2	TGGTTCGCAAAGGACTACG
	GGTGATGCCCACTGACGAG

格数与前爪腾空或攀附动作的次数之和)显著升高($P < 0.01$), 详见表 2。

表 2 PCPA 对失眠大鼠旷场行为学得分和 HPA 轴血清水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	对照组	模型组
行为学得分	387.60 ± 77.39	290.60 ± 79.51 *
CRF	208.75 ± 30.13	218.87 ± 64.06
ACTH	53.63 ± 9.81	57.22 ± 17.50
CORT	172.90 ± 28.66	189.45 ± 32.22

与对照组比较, * $P < 0.01$

2. HPA 轴激素水平变化:两组比较差异无统计学意义, 详见表 2。

3. 脑部时钟基因转录水平:与对照组比较, 模型组脑部 Clock、Bmal1、Cry1 的表达显著下降($P < 0.05$); Cry2 的表达显著上升($P < 0.05$), Per1、Per2 的表达变化不显著, 详见表 3。

表 3 PCPA 对失眠大鼠脑部时钟基因表达情况的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

基因	对照组	模型组
Clock	0.67 ± 0.21	0.48 ± 0.11 *
Bmal1	0.54 ± 0.02	0.31 ± 0.07 *
Per1	0.40 ± 0.08	1.02 ± 0.61
Per2	0.47 ± 0.18	0.71 ± 0.07
Cry1	0.93 ± 0.04	0.60 ± 0.05 **
Cry2	0.56 ± 0.06	0.83 ± 0.10 *

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4. 大鼠肝脏时钟基因转录水平:与对照组比较, 模型组肝脏 Clock、Cry2、Bmal1、Per2、Cry1 的表达变化不显著, Per1 的表达显著上升($P < 0.01$), 详见

表 4。对比脑部与肝脏时钟基因转录水平的变化趋势,发现脑部与肝脏的 Bmal1、Per1、Cry1、Cry2 的变化趋势一致(Per1、Cry2 上升,Bmal1、Cry1 下降);而 Clock、Per2 的变化趋势相反,脑部 Clock 基因表达下降,Per2 基因表达上升;肝脏 Clock 基因表达上升,Per2 基因表达下降。

表 4 PCPA 对失眠大鼠肝脏时钟基因表达情况的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

基因	对照组	模型组
Clock	0.74 ± 0.05	0.81 ± 0.24
Bmal1	0.50 ± 0.02	0.32 ± 0.13
Per1	0.37 ± 0.05	0.66 ± 0.02 *
Per2	0.56 ± 0.12	0.40 ± 0.19
Cry1	0.32 ± 0.04	0.28 ± 0.02
Cry2	0.40 ± 0.26	0.59 ± 0.12

与对照组比较, * $P < 0.01$

讨 论

PCPA 在啮齿类动物致失眠中的作用显著,操作简便,被广泛应用于失眠研究中。中枢 5-HT 水平与睡眠有密切的联系,若脑内 5-HT 水平降低,则动物会出现失眠症状。5-HT 以体内的色氨酸为原料进行生物合成。色氨酸羟化酶是 5-HT 生物合成中的限速酶,而 PCPA 是色氨酸羟化酶的选择性抑制剂,PCPA 可通过抑制色氨酸羟化以降低 5-HT 的合成。研究表明,大鼠腹腔注射 PCPA 后,大鼠脑中的 5-HT 水平会逐渐下降,在第 3 天达到峰值,同时大鼠会表现出昼夜节律消失、攻击性增加、活动增加等症状^[2]。旷场实验能够评价动物活动的主动性,本实验发现模型组行为学得分显著高于对照组,符合 PCPA 模型症状^[3]。

下丘脑中有多种 5-HT 能纤维,参与 HPA 轴的调节。目前认为 HPA 轴的过度激活是失眠的生理学基础之一,失眠中的生理兴奋一部分通过 HPA 轴的过度激活体现。生理条件下 HPA 轴通过负反馈调节,对维持正常的睡眠-清醒节律有一定意义^[4]。另外,昼夜节律与 HPA 轴之间相互作用,糖皮质激素可通过与糖皮质激素反应元件结合改变生物钟基因,参与外周时钟与主钟的节律同步调节^[5]。睡眠时间还和炎症因子、HPA 轴的激活和外周皮质醇的释放有一定的关系^[6]。有研究发现,失眠者的 ACTH 和皮质醇水平有一定升高^[7]。本实验中 HPA 轴的变化差异无统计学意义,基本符合临床中失眠患者的 HPA 轴激素变化趋势^[8]。结合旷

场实验中大鼠兴奋性的显著提升与大鼠 HPA 轴活跃度的上升,说明 PCPA 诱导失眠是有效的。

在哺乳动物中,时钟基因几乎存在于所有组织和细胞中。在 SCN 区的主钟主要受到来自视网膜神经细胞的光-电信号调节,而外周时钟则既受到来自主钟的调节,同时也受到其他诸多外界因素的调控,如温度、进食模式、营养条件等。在动物试验中,当 SCN 被破坏时昼夜节律完全消失。SCN 区含有约 20000 个能够自主调节节律的细胞,通过神经调节和体液调节等方式将节律信号传递到全身各处^[9]。SCN 区细胞的自主节律由时钟基因调控,时钟基因是机体自身调节的重要基础部分之一,与生命的各种活动密切相关^[10]。在生理条件下,时钟基因在一天中的表达波动通过负反馈调节。Clock 和 Bmal1 基因的优势表达导致清醒,Per 和 Cry 基因的优势表达导致睡眠。在 11:00 ~ 14:00 时,Clock 和 Bmal1 基因表达量逐渐升高并产生峰值,从而产生了清醒^[11]。Clock 和 Bmal1 基因表达量的升高激活了 Per 和 Cry 基因的表达,Per 和 Cry 基因产物能进入细胞核并抑制 Clock 和 Bmal1 基因的转录,导致了睡眠^[12]。Per 和 Cry 产物会被自行降解,降解后则又迎来下一轮清醒-睡眠周期。如此交替,形成了昼夜节律性变化^[13]。

本实验中脑部主钟的时钟基因呈现了有规律性的变化,正向调控因子 Clock 基因和 Bmal1 基因表达下调,负向调控因子 Per 和 Cry 基因表达上调。相较于其他造模方式无规律的时钟基因变化,PCPA 造模法体现出了独特的意义。然而造成这种规律的机制还不明确,有待于进一步研究。但是在本实验大鼠脑部各时钟基因的规律性变化中,Cry1 基因的表达出现了反常。Cry1 的反常表达可能与细胞自噬有一定联系。化合物 2-PCPA 具有促进细胞自噬功能,而 PCPA 与 2-PCPA 在结构上相似,提示 PCPA 可能具有类似 2-PCPA 的促进细胞自噬作用^[14]。

每个器官协调主钟与外周时钟的机制都有所不同,有时甚至能够拒绝来自主钟的调控。肝脏是涉及糖代谢和脂代谢的重要器官,其功能的发挥受到主钟和外周时钟的精密调控,故本实验选择肝脏作为子钟器官的代表进行研究。本研究中,肝脏外周时钟基因变化的规律性较脑部主钟的变化规律性低,正向调控因子与负向调控因子均各有升降。除肝脏的 Clock、Per2 的表达趋势与脑部不同之外,其他时钟基因的表达均与脑部时钟基因的变化趋势一致。肝脏除了受到时钟基因的调控之外,胰岛素、生长素、肠源性激

素、催产素等,都会对肝脏的时钟基因产生影响^[15]。肝脏的时钟基因表达还与循环胰岛素水平有关,当给予大鼠高脂饮食时,大鼠的 Clock 和 Bmal1 基因表达会出现紊乱。

综上所述,本研究发现,PCPA 致失眠大鼠的脑部 Clock、Bmal1、Cry1 基因表达下降,Per1、Per2、Cry2 基因表达提高;肝脏 Clock、Per1、Cry2 的表达上升,Bmal1、Per2、Cry1 基因表达下降。本研究中还存在着有待于进一步研究的问题,如取材时间、蛋白水平等,后续工作将进一步阐明失眠动物模型的相关机制,为失眠研究提供多层次的实验依据。

参考文献

- 1 Buysse DJ. Insomnia[J]. JAMA, 2013, 309(7): 706–716
- 2 郭海波,王慧. 对氯苯丙氨酸在动物失眠模型中的应用概述[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 135–140
- 3 蔡思琪,李沅衡,黎嘉,等. 鼠类行为学实验方法研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(5): 916–920
- 4 吕鑫,合浩,李晓霞,等. HPA 轴与失眠障碍的相关性研究进展[J]. 世界睡眠医学杂志, 2019, 6(7): 1009–1012
- 5 Koch CE, Leinweber B, Drengberg BC, *et al.* Interaction between circadian rhythms and stress[J]. Neurobiol Stress, 2017, 6(C): 57–67
- 6 D'Aurea C, Poyares D, Piovezan Ronaldo D, *et al.* Objective short sleep duration is associated with the activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in insomnia[J]. Arquivos de Neuro-psiquiatria, 2015, 73(6): 516–519

(上接第 90 页)

- 7 Trojnar M, Patro–Malysza J, Kimber–Trojnar Z, *et al.* Associations between fatty acid–binding protein 4–a proinflammatory adipokine and insulin resistance, gestational and type 2 diabetes mellitus [J]. Cells, 2019, 8(3): 227
- 8 Garin–Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil GS, *et al.* FABP4 attenuates PPAR and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR in adipose tissues [J]. Diabetes, 2013, 63(3): 900–911
- 9 Rodríguez–Calvo R, Girona J, Rodríguez M, *et al.* Fatty acid binding protein 4 (FABP4) as a potential biomarker reflecting myocardial lipid storage in type 2 diabetes [J]. Metabolism, 2019, 96(1): 12–21
- 10 Mankowska–Cyl A, Krintus M, Rajewski P, *et al.* A–FABP and its association with atherogenic risk profile and insulin resistance in young overweight and obese women [J]. Biomark Med, 2013, 7(5): 723–730
- 11 Horakova D, Pastucha D, Stejskal D, *et al.* Adipocyte fatty acid binding protein and C–reactive protein levels as indicators of insulin resistance development [J]. Biomedical Papers, 2011, 155(4): 355–359

- 7 Walsh CP, Alvin L, Anna L, *et al.* Circulating Interleukin–6 concentration covaries inversely with self–reported sleep duration as a function of polymorphic variation in the glucocorticoid receptor[J]. Brain Behavior Immun, 2019, 78: 21–30
- 8 赵俊云,杨晓敏,胡秀华,等. 失眠动物模型 HPA 轴和表观遗传修饰的变化及交泰丸的干预作用[J]. 中医药学报, 2018, 46(4): 19–21
- 9 Dardente H, Dardente H, Cermakian N. Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals [J]. Chronobio Int, 2007, 24(2): 195–213
- 10 Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock[J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(3): 164–179
- 11 Koike N, Yoo SH, Huang HC, *et al.* Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals[J]. Science, 2012, 338(6105): 349–354
- 12 Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FRA, *et al.* Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock[J]. Cell, 2001, 107(7): 855–867
- 13 江杭,金凤. 时钟基因的研究进展及临床应用[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(4): 641–644
- 14 Wang Z, Long QY, Chen L, *et al.* Inhibition of H3K4 demethylation induces autophagy in cancer cell lines[J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1864(12): 2428–2437
- 15 Zhang S, Dai M, Wang X, *et al.* Signalling entrains the peripheral circadian clock[J]. Cell Signal, 2020: 69

(收稿日期: 2020–10–19)

(修回日期: 2020–11–21)

- 12 Arman Y, Kirna K, Ugurlukisi B, *et al.* The effects of blood glucose regulation in Omentin–1 levels among diabetic patients [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2017, 125(4): 262–266
- 13 Sperling M, Grzelak T, Pelczyńska M, *et al.* Concentrations of omentin and vaspin versus insulin resistance in obese individuals [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83(10): 542–547
- 14 Zhou JY, Chan L, Zhou SW. Omentin: linking metabolic syndrome and cardiovascular disease [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2014, 12(1): 136–143
- 15 Tso AWK, Xu A, Sham PC, *et al.* Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10–year prospective study in a Chinese cohort [J]. Diabetes Care, 2007, 30(10): 2667–2672
- 16 Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, *et al.* Fatty acid–binding protein 4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases [J]. Clin Med Insights Cardiol, 2015, 2(2): 23–33

(收稿日期: 2020–11–02)

(修回日期: 2020–11–17)