

结论:

1. 32 小时的 SD 使反应时间显著延长, 而正确率无明显改变, 说明受试者在一定作业难度内, 可以通过代偿机制, 牺牲反应时间而保证正确率。
2. SD 后 N270 和 P300 的峰潜伏期均显著延迟, 而实验任务的完成过程体现了工作记忆的工作机制, 因此提出 SD 对工作记忆具有损害作用。
3. 冲突处理系统和相同信息处理系统的活动受 SD 的影响不同, 冲突系统活动的代偿能力较强, 不易受 SD 的影响。

安神补脑液对睡眠剥夺模型大鼠学习记忆能力的作用及其机制研究

魏海峰 叶翠飞 吴燕川 丁月霞 赵宁 李林

首都医科大学宣武医院药物研究室, 教育部神经变性病重点实验室,

北京脑老化重点实验室, 北京 100053

摘要 目的: 研究安神补脑液对睡眠剥夺大鼠的学习记忆能力影响, 并从一氧化氮合成酶、神经营养因子和褪黑素等角度探讨其机理。方法: SD 大鼠, 随机分成正常对照+蒸馏水组, 正常对照+补脑液组, 模型+蒸馏水组, 模型+安神补脑液小、大剂量组。灌胃给予安神补脑液 2 周后, 用多站台水环境法进行睡眠剥夺造模 4 天, 用避暗法测试其学习记忆能力, 并用 Western blot 法测定海马组织 BDNF 表达量, 高效液相色谱电化学法测定脑内褪黑素的含量。结果: 与正常对照组比较, 睡眠剥夺大鼠避暗测试潜伏期显著减短, 表明出现学习记忆能力障碍; 大剂量安神补脑液给药能显著延长模型大鼠的潜伏期, 表明该药可有效减轻大鼠睡眠剥夺后的学习记忆障碍。安神补脑液也能延长正常大鼠避暗试验的潜伏期。在睡眠剥夺大鼠海马组织 BDNF 表达量显著减低, 而用安神补脑液干预后模型大鼠海马组织的 BDNF 表达量增加, 在大剂量组出现显著性差异。松果体褪黑素在睡眠剥夺大鼠有减低的趋势, 但是大剂量安神补脑液可以显著提高模型鼠褪黑素的含量。结论: 安神补脑液能提高睡眠剥夺鼠的学习记忆能力, 其机理之一可能与提高海马 BDNF 含量、松果体褪黑素有关。

关键词: 安神补脑液; 睡眠剥夺; 学习记忆; 脑源性神经营养因子; 褪黑素; 大鼠

Effects of An-Shen-Bu-Nao Syrup on the learning and memory, and BDNF expression in the hippocampus of sleep deprivation rats

WEI Hai-feng, YE Cui-fei, LI Chun-yang, DING Yue-xia, ZHAO Ning, LI Lin.

Department of Pharmacology, Xuan-wu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Key laboratory of the Ministry of Education in neuro-degeneration diseases, Beijing 100053

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of An-Shen-Bu-Nao Syrup (AS) on the learning & memory ability and BDNF expression in the hippocampus of sleep deprivation (SD) rats. **METHODS:** 75 rats were divided into groups of control, control+AS (0.02ml/kg), SD+ Distillated water (D. W.), SD+AS (0.02ml/kg), and SD+ AS (0.06ml/kg). All rats were fed with AS or D. W. for 2 weeks and

they were subjected to sleep deprivation for 4 days, and then the passive avoidance for learning and memory test. Melatonin in the pineal gland was analyzed with HPLC, and the BDNF expression in the hippocampus was tested with western blot after sacrifice. RESULTS: Compared with the control rats, SD rats had the significantly reduced latency in passive avoidance test, showing the decreased learning and memory ability. SD+AS (0.06ml/kg) rats showed significantly longer latency than the SD rats ($P < 0.05$), indicating the better learning and memory ability than the sleep deprivation rats; BDNF expression was significant higher in the rats of SD + AS (0.06ml/kg) than the SD rats. SD rat shows the decreased melatonin in pineal glands than control rats, and the rats treated with AS (0.06ml/kg) had significantly more melatonin than that of SD rats. CONCLUSION: An-Shen-Bu-Nao Syrup can effectively improve the learning & memory ability of sleep deprivation rats, and the enhancement of BDNF expression and melatonin secretion may contribute to this effect.

KEY WORDS: An-Shen-Bu-Nao Syrup; sleep deprivation; learning and memory; BDNF; melatonin, hippocampus; rat.

睡眠是人体重要的身心调节方式,对人体各系统功能有重要的作用。许多研究表明睡眠剥夺可以导致免疫功能减低、认知功能下降、反应迟钝等现象^[1]。神经营养因子是脑内神经元赖以存活的重要因素,与学习记忆能力有密切的关系^[2]。安神补脑液是由吉林敖东延边药业股份有限公司开发的中药复方,含何首乌、淫羊藿、鹿茸等中药,现已广泛用来治疗睡眠障碍引起的失眠和神经衰弱。研究证实对睡眠障碍引起的神经衰弱有良好治疗作用^[3],但是其治疗机制尚不清楚,本课题拟进一步观察敖东安神补脑液对睡眠剥夺大鼠引起的学习记忆能力、神经营养因子表达和褪黑素分泌水平的影响。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

敖东安神补脑液(以下简称补脑液),由吉林敖东延边药业股份有限公司提供 35 倍用液,用之前用蒸馏水稀释。神经营养因子(BDNF)多克隆抗体购自中山试剂公司(Santa Cruz 产品分装)。Western blotting marker,购自 invitrogen 公司,Western blotting 荧光剂购自 Santa Cruz 公司。褪黑素(Melatonin, MT)购自 Sigma 公司,乙腈购自 Invitrogen 公司。

1.2 动物以及分组

75 只 SD 大鼠,雄性,体重 250 ± 30 g,购于北京维通利华实验动物中心,合格证号:SCXK(京)2002-003。每次购进 25 只大鼠,在 SPF 级动物房适应性饲养一周后,随机分成:正常对照组,正常对照+补脑液小剂量组,睡眠剥夺模型+蒸馏水组,模型+补脑液小剂量(0.2ml 人体用药原液/100g)组,模型+补脑液大剂量组,每组 15 只,分 3 批进行实验。按人一大鼠等效剂量换算法,补脑液小剂量(0.2ml 人体用药原液/100g 体重)相当于成人每日用量,大剂量(0.6ml 人体用药原液/100g 体重)相当于成人每日用量的 3 倍,正常对照和模型组给等量的蒸馏水。各组每天分别灌胃给药或蒸馏水 1 次,给药 2WK 后进行实验造模,造模以及行为学测试期间仍继续给药。

1.3 造模方法

睡眠剥夺箱参考巴西 Hipolide 等^[4]的多站台水环境法,委托中国医学科学院药物研究所加工制成。水箱规格:127(长)×44(宽)×44(高)cm,其内放置 13 个站台,站台高 20cm,上面直径 7cm,实验造模时以水面至站台下 1cm,将需睡眠剥夺大鼠放入睡眠箱,每箱放入 10 只,正常对照组以及正常对照+补脑液组保留在放在同一实验室内的笼内。各组动物自由进食和水,前后经历 4 天,进行避暗行为学试验。

1.4 避暗测试

研究报道鼠长时间睡眠剥夺可以出现记忆存留障碍^[5]。避暗测试参考以往的方法有所改动[6]，装置分明暗两间，明室上方置一40W白炽灯，暗间底部设有40V电网，两室间有一直径3cm圆孔相通，并有活动板隔开。箱外连接一计算机采集数据。测定分两天，第1天将大鼠背对洞口放入明室，10s后将中间隔板打开，等动物全部进入暗室后，将隔板关上。之后每隔15s给一次1s的电刺激，总共4次电击。将大鼠取出暗室，放回笼内休息24h。第2天，重新将动物放入明室，记录动物自放入明室至完全进入暗室所需要的潜伏期。

1.5 脑源性神经营养因子表达测定

行为学试验后再按造模期间方法将鼠放入剥夺箱，24小时后以10%水合氯醛过量麻醉处死，在冰冻条件下快速分离海马组织经液氮转入-80℃冰箱保存。每组随机取3只大鼠海马，以1:5匀浆液(0.05M Tris-HCL)处理后高速匀浆，12,000g/min离心15分钟，取上清。Folin酚法测定蛋白浓度，常规制备12%分离胶，上样，转移到硝酸纤维素膜，加入脑源性神经营养因子(BDNF)多克隆抗体(兔抗大鼠1:500)，TBST洗膜3次，加二抗，TBST洗膜3次，X光片曝光，显影。用NIH的ImagJ软件进行图像分析，测量各组大鼠海马BDNF表达条带的面积与平均光密度计算平均光密度总合，并以正常对照组均值为参照，比较各组BDNF的表达量。计算公式为：

$$\text{平均光密度总合} = \text{条带面积} \times (\text{条带光平均密度} - \text{背景平均光密度})$$

1.6 褪黑素含量测定

高效液相色谱仪(HPLC, Hewlett Packard1050型)，包括HP1050泵、HP1049A电化学检测器、HP1050手动进样器、HP化学工作站。HPLC色谱条件：Waters C18反相柱，250×4.6mm，5μm，灵敏度为1nA。流动相：乙酸钠50mM，乙酸100mM，Na₂-EDTA 0.1mM，乙腈(70:30v/v)，柱温为室温，流速为1ml/min，电压0.9V，进样量为50μl。样品处理：取出冰冻的松果体，每组9只，置于聚丙烯离心管中，加90μl 0.1N高氯酸溶液，在超声处理机下粉碎5s，间隔20s，重复3次。置于低温离心机4℃条件下12,000g高速离心10min，取上清液备用(图1)。褪黑素标准品以双蒸水进行浓度梯度稀释成100μg/ml储存液，-80℃-冰箱保存；用之前，稀释成0.78、1.56、3.125、6.25、12.5μg/ml浓度测定标准曲线，其回归方程式为 $y = 1.349x + 5.400$ ， $r = 0.9994$ 。

1.6 统计学处理

数据结果以均数 ± 标准误($\bar{x} \pm S.E.M$)表示，用SPSS统计软件单因素方差分析(One-way ANOVA)法进行组间比较。

2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆能力比较

避暗测试结果示，睡眠剥夺大鼠进入暗盒潜伏期显著减短($P < 0.05$)，提示出现学习记忆能力障碍；而大剂量补脑液给药能显著延长睡眠剥夺大鼠的潜伏期($P < 0.05$)，恢复到与正常大鼠相近水平(表1)。提示安神补脑液可有效减轻大鼠睡眠剥夺后的学习记忆障碍，而且也能提高正常大鼠的学习记忆能力。

表1 安神补脑液对睡眠障碍大鼠避暗反应潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm S.E.M$, n=15)

分 组	剂 量	潜伏期 (秒)
正常对照组		156.5 ± 23.0*
正常对照+补脑液小剂量组	0.2ml/100g	215.9 ± 32.3*
睡眠剥夺模型+蒸馏水组		73.8 ± 19.2
模型+补脑液小剂量组	0.2ml/100g	90.7 ± 24.7
模型+补脑液大剂量组	0.6ml/100g	142 ± 20.4*

与模型组比较：* $P < 0.05$,

2.2 各组大鼠海马脑源性神经营养因子表达比较

与正常对照组比较,睡眠剥夺大鼠海马组织 BDNF 表达量显著减低 ($P < 0.01$),而服用安神补脑液的模型大鼠海马组织 BDNF 表达量增加,在大剂量组出现显著性差异 ($P < 0.05$),表明安神补脑液能提高睡眠剥夺大鼠海马 BDNF 蛋白表达水平(图 1)。

2.3 各组大鼠松果体内褪黑素含量的比较

与正常对照组比较,睡眠剥夺大鼠松果体内褪黑素含量有减低的趋势,但未达到显著性意义;服用安神补脑液可使该模型松果体内褪黑素含量增加,在大剂量组出现显著性差异 ($P < 0.05$),表明安神补脑液能提高睡眠剥夺大鼠松果体内褪黑素含量(图 2)。

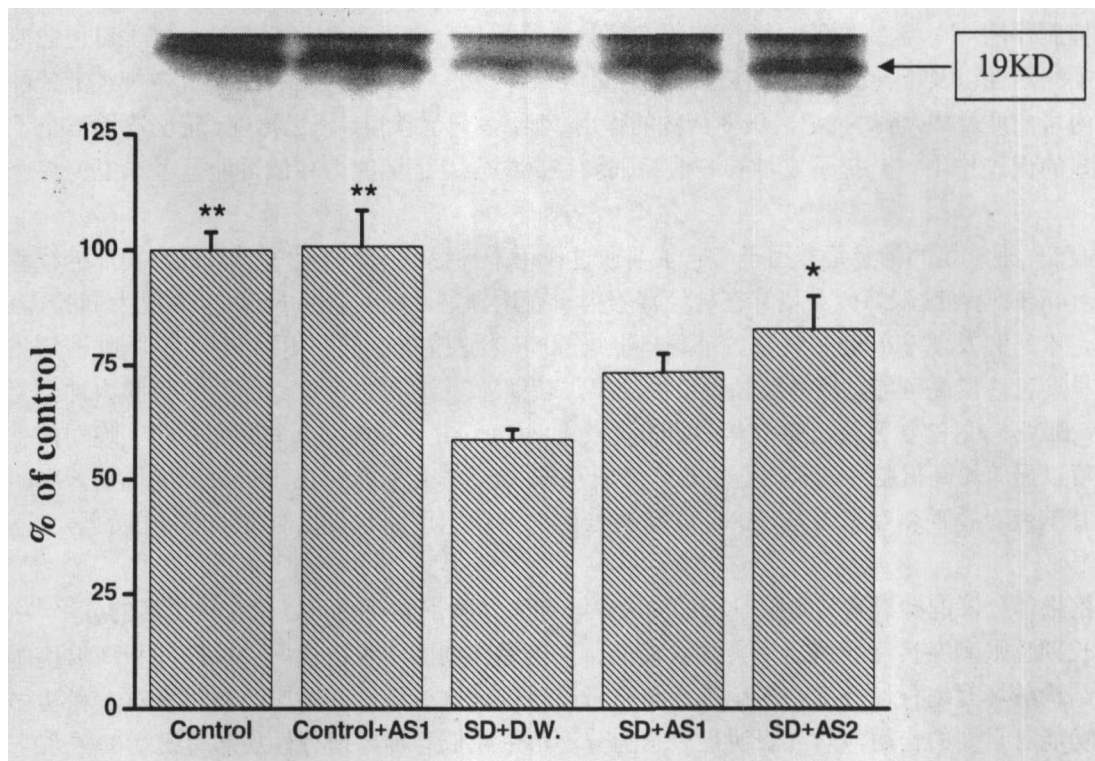


图 1 安神补脑液对睡眠剥夺大鼠海马 BDNF 表达量的影响

$\bar{x} \pm S. E. M.$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 与模型组比较。

Control: 正常对照组; Control+AS1: 正常对照+补脑液小剂量组; SD+D.W.: 睡眠剥夺模型+蒸馏水组; SD+AS1: 模型+补脑液小剂量组; SD+AS2: 模型+补脑液大剂量组。

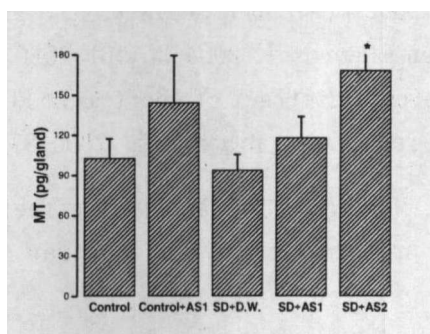


图 2. 安神补脑液对睡眠剥夺大鼠松果体褪黑素含量的影响

讨论

睡眠是人及动物的重要生理功能,长期睡眠障碍可导致脑功能紊乱表现为学习记忆能力减退和其他复杂的神经生理与生化改变^[6]。本研究证实安神补脑液可以有效减轻大鼠睡眠剥夺引起的学习记忆能力和脑内神经营养因子表达降低。

睡眠导致学习记忆能力减低的机制尚不清楚,研究表明睡眠剥夺可以引起人或动物脑电活动异常、免疫功能、一氧化氮神经毒性作用增强以及神经递质产生异常等多种改变。这些异常改变会影响脑神经细胞状态,导致学习记忆功能减退。安神补脑液中由淫羊藿、何首乌、鹿茸等中药组成。本室以往的研究表明,何首乌二苯乙烯苷对 β 淀粉样多肽、D-半乳糖等病理因素导致的鼠模型学习记忆能力减低有较好的抑制作用^[7,8]。孟宪丽等报道淫羊藿多糖、总黄酮复合物可有效改善老年大鼠学习记忆能力下降、胆碱酯酶活性以及下丘脑单胺类神经递质含量减低等改变^[9]。徐惠波等报道鹿茸中神经节甙酯能促进小鼠脑内蛋白质合成,可对抗记忆破坏药物的作用,对小鼠记忆获得、记忆再现、记忆巩固三个不同阶段均有明显的促进作用^[10]。提示安神补脑液睡眠剥夺鼠的学习记忆能力减低可能是多味中药综合性作用结果。

BDNF 是重要的神经营养因子,它主要通过作用于神经细胞表面的受体 TrkB 发挥神经营养作用。Hairston 报道在睡眠障碍大鼠存在神经营养因子表达异常,睡眠剥夺 6h 可以表现为 BDNF 表达轻度增高^[11],本研究发现 96h 睡眠剥夺大鼠海马组织 BDNF 表达显著减低,提示 BDNF 与睡眠密切相关。睡眠剥夺早期表达增高可能是机体反馈调节的结果,长期睡眠剥夺 BDNF 表达下降导致脑内神经营养障碍。同时,BDNF 与鼠的学习记忆能力有密切的关系^[12],如 BDNF 对鼠海马长时程电位早、晚期都有密切的关系,可以显著增高鼠脑片的长时程电位,在脑局部 BDNF 基因敲除鼠出现长时程电位显著减弱。因此,安神补脑液对睡眠剥夺鼠海马 BDNF 含量减低的防治作用可能与其提高睡眠剥夺鼠的学习记忆能力有关。

松果体分泌的褪黑素与睡眠有密切的关系。在人体睡眠剥夺后可以引起褪黑素的分泌节律紊乱^[13],大鼠长期睡眠剥夺后可导致褪黑素含量减低^[14],松果体细胞出现内质网、线粒体和高尔基体扩张、细胞膜结构破坏等退行性改变,而褪黑素补充可以减轻这些改变^[15]。同时,褪黑素对人和动物维持正常的脑功能有重要的作用,研究表明褪黑素的分泌水平减低与神经退行性疾病有密切的关系^[16],补充褪黑素可以改善动物脑损伤模型的学习记忆能力^[17]。这些研究结果提示,安神补脑液对睡眠剥夺大鼠松果体内褪黑素水平的升高作用,可能与改善睡眠剥夺后的脑功能减退有关。

参考文献

- 1 Yamanaka K, Mishory A, Koola J, Hill S, Horner MD, Bohning DE, George MS. Decreased cortical response to verbal working memory following sleep deprivation. *Sleep*. 2005;28(1):55-67.
- 2 Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*. 2004;20(10):2580-90. Sei H, Saitoh D, Yamamoto K, Morita K, Morita Y. Differential effect of short-term REM sleep deprivation on NGF and BDNF protein levels in the rat brain. *Brain Res*. 2000;877(2):387-90.
- 3 Sei H, Saitoh D, Yamamoto K, Morita K, Morita Y. Differential effect of short-term REM sleep deprivation on NGF and BDNF protein levels in the rat brain. *Brain Res*. 2000;877(2):387-90.
- 4 马岳青. 安神补脑液治疗神经衰弱 184 例. *吉林中医药*, 1998;(4): 62.
- 5 Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain*

- Res. 2004;1004(1-2):45-51.
- 6 Dubiela FP, de Oliveira MG, Moreira KD, Nobrega JN, Tufik S, Hipolide DC. Learning deficits induced by sleep deprivation and recovery are not associated with altered [(3)H]muscimol and [(3)H]flunitrazepam binding. *Brain Res.* 2005;1037(1-2):157-63.
 - 7 叶翠飞, 魏海峰, 张丽, 张兰, 李林. 何首乌提取物二苯乙烯苷对东莨菪碱致学习记忆障碍模型小鼠的影响. *中国药房*, 2004;15(11):658-660
 - 8 楚晋, 叶翠飞, 李林, 张丽. 二苯乙烯苷对 D-半乳糖致老化小鼠学习记忆及神经营养因子的影响. *中国药房*, 2005;16(1):13-16
 - 9 孟宪丽, 曾南, 张艺, 赖先荣, 任长茂, 程龙琼. 淫羊藿有效成分对老龄雄性大鼠下丘脑单胺类神经递质及其他脑功能作用的研究. *中国中药杂志*, 1996; 21(11):683-686
 - 10 徐惠波, 王本祥, 张洁. 鹿茸神经节甙酯对小鼠学习记忆功能的影响. *中国药理学通报*, 1991; 7(5) :385-388.
 - 11 Hairston IS, Peyron C, Denning DP, Ruby NF, Flores J, Sapolsky RM, Heller HC, O'Hara BF. Sleep deprivation effects on growth factor expression in neonatal rats: a potential role for BDNF in the mediation of delta power. *J Neurophysiol.* 2004;91(4):1586-95.
 - 12 Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 2005;76(2):99-125.
 - 13 Cajochen C, Jewett ME, Dijk DJ. Human circadian melatonin rhythm phase delay during a fixed sleep-wake schedule interspersed with nights of sleep deprivation [J]. *J Pineal Res.* 2003, 35(3):149-57.
 - 14 余晓俊, 韦京豫, 李慧琴, 等. 睡眠剥夺大鼠松果体中褪黑素含量测定 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2002, 20(5): 343-345.
 - 15 Lan CT, Hsu JC, Ling EA. Influence of sleep deprivation coupled with administration of melatonin on the ultrastructure of rat pineal gland [J]. *Brain Res.* 2001, 910(1-2):1-11.
 - 16 Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJ, et al. Role of melatonin in neurodegenerative diseases [J]. *Neurotox Res.* 2005, 7(4):293-318.
 - 17 Feng Z, Qin C, Chang Y, Zhang JT. Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Free Radic Biol Med.* 2006, 40(1):101-9.

Adenosine A_{2A}, but not A₁, receptors are important in sleep-wake regulation

Yoshihiro Urade,¹ Wei-Min Qu,¹ Zhi-Li Huang,^{1,2} Naomi Eguchi,^{1,3} Osamu Hayaishi¹

¹Department of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute, Osaka 565-0874, Japan. ²State Key