

酸枣仁汤对老年失眠模型大鼠学习记忆能力及脑内神经递质含量的影响

郭杰^{1*}, 尹晓刚^{2#} (1. 南阳医学高等专科学校第一附属医院门诊部, 河南南阳 473000; 2. 南阳医学高等专科学校第一附属医院神经内科, 河南南阳 473000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3085-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.18

摘要 目的: 研究酸枣仁汤对老年失眠模型大鼠学习记忆能力及脑内神经递质含量的影响。方法: 将大鼠随机分为正常组、模型组、阳性组[艾司唑仑片, 2×10^{-3} g/(kg·d)]和酸枣仁汤低、中、高剂量组[5、10、15 g/(kg·d)], 每组10只。除正常组外, 其余各组大鼠均于颈背部ih D-半乳糖+睡眠剥夺以复制老年失眠模型, 造模6周后各给药组大鼠连续ig相应药物1周, 正常组和模型组大鼠ig生理盐水。观察大鼠逃避潜伏期、原平台象限游泳时间百分比、穿过原平台位置的次数, 测定大鼠脑组织中谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)和下丘脑中白细胞介素 1β (IL- 1β)、5-羟色胺(5-HT)含量。结果: 与正常组比较, 各组大鼠逃避潜伏期延长、原平台象限游泳时间百分比降低、穿过原平台位置的次数减少, 脑组织中Glu、GABA含量增加, 下丘脑中IL- 1β 、5-HT含量减少($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠上述指标均得到明显改善, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与阳性组比较, 酸枣仁汤中、高剂量组大鼠上述指标变化更为明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 酸枣仁汤可明显增加老年失眠模型大鼠的学习记忆能力, 且可降低脑内神经递质含量、减轻Glu、GABA参与的迟发性神经元损害。

关键词 酸枣仁汤; 老年失眠模型大鼠; 学习记忆能力; 神经递质

Effects of Suanzaoren Decoction on Learning and Memory Ability and Brain Neurotransmitters Content of Senile Insomnia Model Rats

GUO Jie¹, YIN Xiaogang² (1. Outpatient Department, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Henan Nanyang 473000, China; 2. Dept. of Neurology, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Henan Nanyang 473000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of Suanzaoren decoction on learning and memory ability and brain neurotransmitters content of senile insomnia model rats. **METHODS:** Rats were randomly divided into normal group, model group, positive group [Estazolam tablet, 2×10^{-3} g/(kg·d)] and Suanzaoren decoction low-dose, middle-dose and high-dose groups [5, 10, 15 g/(kg·d)], with 10 rats in each group. Except for normal group, those groups were given D-galactose ih on the back+sleep deprivation to induce senile insomnia model. 6 weeks after modeling, treatment groups were given relevant medicine intragastrically for one week, and normal group and model group were given normal saline intragastrically. The escape latency, the percentage of swimming time and the time of original platform crossing were observed, and the contents of Glu and GABA in cerebral tissue were determined as well as the contents of IL- 1β and 5-HT in hypothalamus. **RESULTS:** Compared with normal group, escape latency of rats prolonged and the contents of IL- 1β and 5-HT in hypothalamus decreased, while the percentage of swimming time of original platform quadrant, the time of original platform crossing and the contents of Glu and GABA in cerebral tissue increased ($P < 0.05$). Compared with model group, above index of treatment groups improved significantly, with statistical significance ($P < 0.05$). Compared with positive group, the changes of above index were more significant in Suanzaoren decoction middle-dose and high-dose groups, with statistical significance ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Suanzaoren decoction could markedly enhance the learning and memory ability of senile insomnia model rats, and reduce neurotransmitters content and relieve the delayed neuronal damage which led by Glu and GABA.

KEYWORDS Suanzaoren decoction; Senile insomnia model rats; Learning and memory ability; Neurotransmitter

失眠是最常见的一种睡眠障碍类型, 一般指睡眠时间和(或)质量不满足且影响白天社会功能的一种主观体验^[1]。流行病学调查研究发现, 失眠发病率呈不断上升趋势, 且常见于老年人, 其中40%~50% 65岁以上的老年人都表现出失眠的相关症状^[2]。失眠是一个复杂的过程, 近年有学者研究发现神经递质参与了睡眠机制的调节^[3]。酸枣仁汤载于《金匱要

略》, 由酸枣仁、甘草、知母、茯苓、川芎等5味药材组成, 具有明显的镇静、催眠、抗焦虑、抗抑郁以及改善睡眠等作用^[4], 但目前对其作用机制尚不明确。故在本研究中作者拟考察酸枣仁汤对老年失眠模型大鼠学习记忆能力和脑组织中谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)、5-羟色胺(5-HT)以及下丘脑中白细胞介素 1β (IL- 1β)含量的影响, 以进一步探讨酸枣仁汤的作用, 为其基础研究和临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

* 主治中医师。研究方向: 神经内科。E-mail: nywx@163.com

通信作者: 副主任医师, 硕士。研究方向: 神经内科。电话: 0377-63328308

7180全自动生化分析仪(日本日立公司);TGL-160台式高速离心机(上海医用分析仪器厂);MP31001电子天平(上海舜宇恒平科技仪器有限公司);Waters e2695高效液相色谱仪(美国Waters公司)。

1.2 药材、药品与试剂

酸枣仁、甘草、知母、茯苓、川芎均来自南阳医药高等专科学校第一附属医院中药房,经该院主任中医师王书梅鉴定均为合格药材;艾司唑仑片(焦作市博爱药业有限公司,批号:20140806,规格:1 mg/片);IL-1 β 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海星科生物科技有限公司);5-HT ELISA试剂盒(上海远慕生物科技有限公司);醋酸钠缓冲液、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF级SD大鼠60只,♂,体质量(180±20)g,由北京维通利华公司提供[合格证号:SCXK(京)2007-0001]。常规饲养2周,室温为23~25℃,相对湿度为40%~70%。

2 方法

2.1 酸枣仁汤的制备^[4]

称取酸枣仁15g、甘草3g、知母6g、茯苓6g、川芎6g,加适量冷水浸泡30min,再以“武火”煮沸约10min后改为“文火”慢煎30min,煎煮2次;分别滤出药液,将2次药液混匀,浓缩,得每1ml含生药2g的药液,即得。

2.2 实验分组、造模与给药

将60只健康SD大鼠随机分为6组,即正常组、模型组、阳性组[艾司唑仑片,2×10⁻³g/(kg·d)]和酸枣仁汤低、中、高剂量组[5、10、15g/(kg·d)],每组10只。除正常组外,其余各组大鼠均于颈背部连续ih D-半乳糖[60mg/(kg·d)]6周复制急性衰老模型^[5]。然后将大鼠放入自制睡眠剥夺箱中给予睡眠剥夺,睡眠剥夺时间为1周[当大鼠进入眼球快速运动睡眠时相时肌张力减弱,掉入水环境中,然后会迅速爬上平台,处于一种想睡而不能睡的状态。实验时保持水环境和实验室温度相同(均保持在22~25℃),实验箱每日换水;睡眠剥夺从早晨6:00开始,每天1h],以大鼠呵欠、瞌睡、精神不振、活动量少、目光呆滞为造模成功。造模成功后,各给药组大鼠ig相应药物,正常组和模型组大鼠ig等量生理盐水,连续1周。艾司唑仑片给药剂量为人临床用量的6倍,酸枣仁汤高、中、低剂量分别为人临床用量的18、9、4.5倍。

2.3 各组大鼠学习记忆能力的考察

给药结束后,采用Morris水迷宫对各组大鼠进行定位航行实验和空间探索实验,考察大鼠的学习记忆能力。本实验所用水迷宫为高50cm、直径120cm的圆形水池,分4个象限,池中水温控制在20~23℃。将直径为12cm的圆形平台固定于某一象限,使平台面低于水面1cm,实验前先将大鼠放入水中适应环境。(1)定位航行实验:该试验分别以4个象限的某一固定点为起点、平台为终点,然后面向池壁将大鼠放入水池中,记录大鼠由起点游至终点的时间,即逃避潜伏期。实验允许最大逃避潜伏期为60s。(2)空间探索实验:将平台撤去,于水池中任意一点将大鼠放入水中游泳,记录大鼠在120s内穿过原平台位置的次数,并记录大鼠在原平台象限游泳的时间占总游泳时间的百分比。

2.4 各组大鼠脑组织中Glu、GABA含量的测定

各组大鼠禁食、禁水24h后,采用断头法处死。取大鼠左侧脑组织,以离心半径为10cm、3000r/min离心15min,重复操作2次,收集上清液。采用高效液相色谱法检测脑组织中

Glu、GABA含量^[6]。

2.5 各组大鼠下丘脑中IL-1 β 、5-HT含量的测定

取上述处死的大鼠,迅速剪断延髓,将脑组织快速去除,分离出下丘脑,洗净血液,于-80℃条件下保存。采用ELISA法测定下丘脑IL-1 β 、5-HT含量,具体操作按照相应试剂盒说明书进行。

2.6 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠学习记忆能力考察结果

与正常组比较,模型组及各给药组大鼠逃避潜伏期延长,穿过原平台位置的次数减少,原平台象限游泳时间百分比降低($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠逃避潜伏期缩短,穿过原平台位置的次数增加,原平台象限游泳时间百分比升高($P < 0.05$);与阳性组比较,酸枣仁汤中、高剂量组大鼠逃避潜伏期缩短,穿过原平台位置的次数增加,原平台象限游泳时间百分比升高($P < 0.05$)。各组大鼠学习记忆能力考察结果见表1。

表1 各组大鼠学习记忆能力考察结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 The learning and memory ability of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量, g/(kg·d)	逃避潜伏期, s	穿过原平台位置的次数	原平台象限游泳时间百分比, %
正常组		36.28±1.76	5.89±1.32	36.28±1.76
模型组		54.38±2.14 [*]	0.00±0.00 [*]	26.94±3.10 [*]
阳性组	2×10 ⁻³	40.39±2.13 ^{**}	1.94±0.34 ^{**}	34.67±2.71 ^{**}
酸枣仁汤低剂量组	5	41.31±2.09 ^{**}	1.89±0.41 ^{**}	35.03±3.14 ^{**}
酸枣仁汤中剂量组	10	39.39±2.19 ^{**Δ}	2.63±0.37 ^{**Δ}	37.99±2.91 ^{**Δ}
酸枣仁汤高剂量组	15	36.03±1.58 ^{Δ}	3.56±0.48 ^{**Δ}	41.63±2.58 ^{Δ}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与阳性组比较, ^{Δ} $P < 0.05$

Note: vs. normal group, ^{*} $P < 0.05$; vs. model group, ^{*} $P < 0.05$; vs. positive group, ^{Δ} $P < 0.05$

3.2 各组大鼠脑组织中Glu、GABA含量测定结果

与正常组比较,模型组及各给药组大鼠脑组织中Glu、GABA含量增加($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠脑组织中Glu、GABA含量减少($P < 0.05$);与阳性组比较,酸枣仁汤中、高剂量组大鼠脑组织中Glu、GABA含量减少($P < 0.05$)。各组大鼠脑组织中Glu、GABA含量测定结果见表2。

表2 各组大鼠脑组织中Glu、GABA含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10, g/L$)

Tab 2 The contents of Glu and GABA in cerebral tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10, g/L$)

组别	剂量, g/(kg·d)	Glu	GABA
正常组		0.28±0.06	0.24±0.05
模型组		0.59±0.14 [*]	0.42±0.08 [*]
阳性组	2×10 ⁻³	0.46±0.10 ^{**}	0.35±0.06 ^{**}
酸枣仁汤低剂量组	5	0.49±0.08 ^{**}	0.36±0.07 ^{**}
酸枣仁汤中剂量组	10	0.40±0.06 ^{**Δ}	0.32±0.05 ^{**Δ}
酸枣仁汤高剂量组	15	0.35±0.05 ^{**Δ}	0.27±0.04 ^{**Δ}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与阳性组比较, ^{Δ} $P < 0.05$

Note: vs. normal group, ^{*} $P < 0.05$; vs. model group, ^{*} $P < 0.05$; vs. positive group, ^{Δ} $P < 0.05$

3.3 各组大鼠下丘脑中 IL-1 β 、5-HT 含量测定结果

与正常组比较,模型组各给药组大鼠下丘脑中 IL-1 β 、5-HT 含量均减少($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠下丘脑中 IL-1 β 、5-HT 含量增加($P<0.05$);与阳性组比较,酸枣仁汤中、高剂量组大鼠下丘脑中 IL-1 β 、5-HT 含量增加($P<0.05$)。各组大鼠下丘脑中 IL-1 β 、5-HT 含量测定结果见表3。

表3 各组大鼠下丘脑中 IL-1 β 、5-HT 含量测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 3 The contents of IL-1 β and 5-HT in hypothalamus of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量, g/(kg·d)	IL-1 β , pg/ml	5-HT, ng/g
正常组		180.45 \pm 15.45	315.42 \pm 25.23
模型组		108.49 \pm 12.89 [*]	228.94 \pm 14.35 [*]
阳性组	2 \times 10 ⁻³	143.29 \pm 15.69 ^{**}	259.89 \pm 16.42 ^{**}
酸枣仁汤低剂量组	5	140.39 \pm 16.42 ^{**}	254.48 \pm 19.48 ^{**}
酸枣仁汤中剂量组	10	156.32 \pm 18.32 ^{**Δ}	276.39 \pm 15.40 ^{**Δ}
酸枣仁汤高剂量组	15	168.49 \pm 14.26 ^{**Δ}	293.56 \pm 17.65 ^{**Δ}

注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, [#] $P<0.05$;与阳性组比较, ^{Δ} $P<0.05$

Note: vs. normal group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$; vs. positive group, ^{Δ} $P<0.05$

4 讨论

中医学认为失眠属“不得眠”“不寐”等范畴;中医理论认为该病实证多因邪热扰心引起,虚证多因心失所养、阴血不足引起,故而肝血虚所致的失眠较为常见^[7-8]。酸枣仁汤中酸枣仁具有养血补肝、宁心安神的作用,茯苓宁心安神,知母滋阴润燥、清热除烦,川芎调肝血而疏肝气,甘草调和诸药,故该方为治疗失眠的一剂良方。艾司唑仑片是常用的一种抗失眠药物,具有较强的镇静催眠作用。夏路风等^[9]报道,其治疗失眠症患者的总有效率达91.83%,故笔者在本实验中选其作为阳性对照药物。

Morris 水迷宫是一种通过强迫实验动物游泳来学习寻找隐藏于水中平台的操作过程,是世界上公认的较为客观的学习记忆能力的评价方法。在本实验中,与正常组比较,模型组大鼠的学习记忆能力明显减弱,具体表现为潜伏期延长、穿过原平台位置的次数减少、原象限游泳时间百分比降低,结果表明本实验造模成功。与模型组比较,酸枣仁汤各剂量组大鼠逃避潜伏期缩短、穿过原平台位置的次数增加、原象限游泳时间百分比升高,提示给药后大鼠的学习记忆得到了改善。

神经递质是机体信息传递的物质基础,同时还参与机体很多生理、病理过程,具有调节睡眠的作用^[10]。机体中枢神经兴奋和抑制功能失调与失眠有密切关系,其中 Glu 和 GABA 是哺乳动物中枢神经系统的重要神经递质^[6]。Glu 作为兴奋性氨基酸,能够引起觉醒增多、总睡眠时间与健康睡眠减少^[11]。GABA 是一种抑制性神经递质,广泛分布于外周神经系统和中枢神经系统,对哺乳动物中枢神经系统具有普遍的抑制作用^[12]。本研究结果显示,与模型组比较,酸枣仁汤各剂量组大鼠脑内 Glu、GABA 含量均显著减少,且随着给药剂量的增加脑内 Glu、GABA 含量减少越明显。近年研究发现,细胞因子可作用于中枢神经系统参与睡眠的调节。大鼠下丘脑中的

IL-1 表达存在昼夜规律,表达高峰相与睡眠高反抑制,通过外源性补充 IL-1 后能够延长大鼠的快速动眼睡眠时间。5-HT 神经元胞体主要集中于中缝核群,中缝核头部的 5-HT 能神经元能够参与维持和产生非快速动眼睡眠,并且 5-HT 神经元在觉醒时兴奋性最高,兴奋 5-HT 能神经元能够使觉醒时间延长。本研究结果显示,与模型组比较,酸枣仁汤各剂量组大鼠脑内 IL-1 β 、5-HT 含量均显著增加($P<0.05$)。

综上所述,酸枣仁汤可明显改善老年失眠模型大鼠的学习记忆能力,其机制可能与降低脑内 Glu、GABA 含量,减轻 Glu、GABA 参与的迟发性神经元损伤,增加下丘脑 IL-1 β 、5-HT 含量有关。但其更多的可能作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 游秋云.老年失眠的中医发病机制及防治探讨[J].时珍国医国药,2010,21(11):2966.
- [2] 邹艳群,杨晓苏,蔺芳菊,等.失眠模型大鼠脑干 γ -氨基丁酸转运体-1表达的变化[J].国际神经病学神经外科学杂志,2013,40(1):14.
- [3] 周艳丽,叶险峰.针刺不同腧穴对失眠模型大鼠脑内细胞因子 IL-1、TNF- α 含量影响的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,2012,17(4):419.
- [4] 游秋云,王平,黄攀攀,等.酸枣仁汤对老年失眠证候模型大鼠脑皮质超微结构及星形胶质细胞表达的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2010,19(9):827.
- [5] 徐智,吴国明,钱桂生,等.大鼠衰老模型的初步建立[J].第四军医大学学报,2003,25(4):312.
- [6] 蒋洁,赵百孝,哈略,等.不同波形电针对 PCPA 致失眠大鼠下丘脑 5-HT 和 Glu、GABA 含量的影响[J].上海针灸杂志,2015,12(7):678.
- [7] 侯桂平.酸枣仁汤合交泰丸治疗老年失眠症临床观察[J].山西中医,2013,29(10):10.
- [8] 王燕,张岗强,张楠,等.肝胆两益汤对失眠模型大鼠不同脑区中单胺类神经递质的影响[J].中国药物应用与监测,2015,12(4):215.
- [9] 夏路风,李六水,张琪,等.舒眠胶囊与艾司唑仑治疗失眠症的临床疗效比较[J].安徽医药,2015,19(2):367.
- [10] 涂星,郜红利,卢映,等.荧光高效液相色谱法测定3种失眠模型大鼠脑组织氨基酸类神经递质的含量[J].中国实验动物学报,2013,21(5):74.
- [11] 游秋云,王平,吴丽丽,等.舒郁安神方对老年肝郁失眠证候模型大鼠学习记忆及脑组织谷氨酸、 γ -氨基丁酸含量的影响[J].中国老年学杂志,2011,31(6):1006.
- [12] 王冰梅,于江波,王永彬,等.安神补脑软胶囊对老年失眠模型大鼠下丘脑 5-羟色胺 1a、5-羟色胺 2a、 γ -氨基丁酸表达量的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(17):4784.

(收稿日期:2016-01-16 修回日期:2016-06-25)

(编辑:林 静)