

酸枣仁汤对PCPA失眠大鼠学习记忆功能及海马突触可塑性相关蛋白表达的影响

李悦¹, 王慧^{1*}, 姚欣雨², 杨婷婷¹, 杜敏¹, 涂小华¹, 杨光勇¹

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025;

2. 承德医学院, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的:观察酸枣仁汤对对氯苯丙氨酸(PCPA)失眠大鼠行为学,海马突触神经生长相关蛋白-43(GAP-43)、突触后密度蛋白-95(PSD-95)、突触素 I (Syn I) 的影响,探讨酸枣仁汤改善PCPA失眠大鼠行为学的机制。方法:取72只SD大鼠,每组12只随机分为6组,空白组(生理盐水),PCPA(0.35 g·kg⁻¹·d⁻¹)组,艾司唑仑(2.7×10⁻⁴ g·kg⁻¹·d⁻¹)组,酸枣仁汤低、中、高剂量(3.25、7.5、15 g·kg⁻¹·d⁻¹)组。腹腔注射PCPA建立失眠大鼠模型,造模结束后各治疗组分别给与酸枣仁汤和艾司唑仑共7 d,采用Moriss水迷宫和Y迷宫检测学习记忆功能,旷场检测焦虑样行为。苏木素-伊红(HE)染色观察海马组织病理变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫组化(IHC)检测海马GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA和蛋白表达。结果:与空白组比较,PCPA组大鼠Moriss水迷宫逃避潜伏期时间显著延长,平台所在象限停留时间和穿越平台次数显著下降,Y迷宫交替正确率显著下降,旷场运动距离、平均速度和中心区停留时间显著提高(P<0.01),海马病理损伤明显,海马GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA和蛋白表达显著下调(P<0.01);与PCPA组比较,酸枣仁汤低、中、高剂量组及艾司唑仑组大鼠Moriss水迷宫逃避潜伏期时间降低,平台所在象限停留时间和穿越平台次数提高,Y迷宫交替正确率提高,旷场运动距离、平均速度和中心区停留时间明显降低(P<0.05, P<0.01),海马病理损伤有所改善,海马GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA和蛋白表达提高(P<0.05, P<0.01)。结论:酸枣仁汤可能通过上调海马突触可塑性相关蛋白GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA和蛋白表达改善PCPA失眠大鼠学习记忆障碍和焦虑水平。

[关键词] 睡眠; 酸枣仁汤; 5-羟色胺; 突触可塑性

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R256.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0012-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220836

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220218.1606.005.html>

[网络出版日期] 2022-02-21 9:26

Effect of Suanzaoren Tang on Learning, Memory and Expression of Proteins Related to Hippocampal Synaptic Plasticity in PCPA-induced Insomnia Rat Model

LI Yue¹, WANG Hui^{1*}, YAO Xin-yu², YANG Ting-ting¹, DU Min¹, TU Xiao-hua¹, YANG Guang-yong¹

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;

2. Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Suanzaoren Tang on the behavior, growth-associated protein-43 (GAP-43), postsynaptic density protein-95 (PSD-95), and synaptophysin I (Syn I) of insomniac rats induced by p-chlorophenylalanine (PCPA), and to investigate the mechanism of Suanzaoren Tang in improving the behavior of the insomniac rats. **Method:** Seventy-two SD rats were randomly assigned into 6 groups (12 rats in each group): control group (normal saline), PCPA (0.35 g·kg⁻¹·d⁻¹) group, estazolam (2.7×10⁻⁴ g·kg⁻¹·d⁻¹) group, and low-, medium-, and high-dose (3.25, 7.5, 15 g·kg⁻¹·d⁻¹, respectively) Suanzaoren

[收稿日期] 2022-01-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760816)

[第一作者] 李悦,在读硕士,医师,从事中医药作用的脑机制研究,E-mail:852269229@qq.com

[通信作者] *王慧,博士,教授,从事中医药作用的脑机制研究,E-mail:517634846@qq.com

Tang groups. The rat model of insomnia was established by intraperitoneal injection of PCPA and then the rats were administrated with corresponding drugs for 7 continuous days. The Morris water maze and Y-maze were used to test the learning and memory functions, and the open field to test anxiety. Histopathological changes in the hippocampus were observed via hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA and protein levels of GAP-43, PSD-95, and Syn I in hippocampus were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), Western blot, and immunohistochemistry (IHC). **Result:** Compared with the control group, the PCPA group showcased long escape latency, shortened time in the quadrants, and decreased times of crossing the platform in Morris water maze, decreased alternation correct rate was significantly Y-maze, and increased distance, mean velocity, and time in center of the open field test ($P<0.01$). Furthermore, the PCPA-treated rats showed obvious pathological damage in the hippocampus and down-regulated mRNA and protein levels of GAP-43, PSD-95, and Syn I in hippocampus ($P<0.01$). Compared with the PCPA group, the treatments with estazolam and different doses of Suanzaoren Tang improved the rat performance in Morris water maze, Y-maze, and open field test ($P<0.05$, $P<0.01$), alleviated the hippocampal damage, and up-regulated the mRNA and protein levels of GAP-43, PSD-95, and Syn I ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Suanzaoren Tang may alleviate the learning and memory disorders and anxiety in PCPA-induced insomnia rat model by up-regulating the mRNA and protein levels of hippocampal synaptic plasticity-associated proteins GAP-43, PSD-95, and Syn I.

[Keywords] sleep; Suanzaoren Tang; 5-hydroxytryptamine; synaptic plasticity

睡眠是高等脊椎动物生存发育必需的生理过程,睡眠障碍会影响学习记忆的形成和巩固,并引发焦虑、抑郁等精神疾病,严重影响工作和生活^[1-2]。目前普遍认为突触可塑性是学习记忆的神经基础,参与睡眠调节,突触功能障碍会导致精神疾病^[3-4]。突触作为神经元之间传递信息的桥梁,其结构和功能会发生改变以适应环境变化。突触可塑性相关蛋白的表达变化反映突触功能并影响突触传递,其中分布于突触前膜的神经生长相关蛋白-43(GAP-43),位于突触后膜的突触后密度蛋白-95(PSD-95)和位于突触前囊泡膜上的突触素 I (Syn I)在轴突生长和突触发生事件中高表达,有利于突触连接的形成和神经环路的精确整合^[5-7],对学习记忆的形成、焦虑情绪和睡眠稳态具有调控作用^[8-9]。学习记忆功能和焦虑情绪由多个脑区参与,神经病理学发现,海马突触可塑性对睡眠剥夺引起的学习记忆障碍和焦虑情绪十分敏感^[10-11]。进一步通过透射电镜技术发现,睡眠剥夺大鼠海马突触间隙变宽,突触后密度(PSD)厚度变薄^[12],提示突触传递效能降低,GAP-43、PSD-95、Syn I 是否参与其中有待研究。

酸枣仁汤作为治疗失眠的经典名方出自《金匮要略·血痹虚劳病脉证并治》,目前对酸枣仁汤的研究主要侧重于睡眠调节机制,对改善认知功能和焦虑情绪的研究较少,尤其在海马突触可塑性方面。研究发现,脑内 5-羟色胺(5-HT)含量的变化影响睡

眠-觉醒周期^[13]。本实验通过腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)使脑内 5-HT 含量下降制备长时间睡眠障碍大鼠模型^[14],行为学实验评估学习记忆功能和焦虑情况,基于海马突触可塑性相关蛋白 GAP-43、PSD-95、Syn I 探讨酸枣仁汤干预失眠导致学习记忆障碍和焦虑情绪的中枢机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只,体质量(160 ± 20) g,购于斯贝福生物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2021-0010。实验前将动物置于室温(21 ± 3) °C、相对湿度 50%~60%、自由摄食饮水、垫料定期更换、避免强光、清洁干燥、安静的环境中适应性饲养 1 周。本实验经贵州中医药大学伦理委员会批准(编号 20210028)。

1.2 药品及试剂 酸枣仁汤由酸枣仁、川芎、甘草、知母、茯苓组成,购自北京同仁堂,所有饮片由贵州中医药大学王慧教授鉴定为正品;艾司唑仑(北京斯利安药业有限公司,国药准字 H11020249);PCPA、兔单抗 PSD-95、兔单抗 GAP-43、兔单抗 Syn I (英国 Abcam 公司,批号分别为 C6505、238135、75810、254349);兔多抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(杭州贤至生物有限公司,批号 AB-P-R001);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA1054);TRIzol 试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号 15596-

018);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京百奥莱博生物公司,批号YT165);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(中国 Servicebio 公司,批号G3320)。

1.3 仪器 HM450型切片机、Histo Star型包埋机(赛默飞世尔科技中国有限公司);Real-time PCR仪(美国ABI公司);DYCP-44P型电泳仪(北京佳航博创科技有限公司);GelDoc XR凝胶成像系统(上海伯乐生命医学产品有限公司);WFH-203型紫外分析仪(上海圣科仪器设备有限公司);BE525LMS0W型抗原修复用微波炉(德国西门子公司);SMA4000型微量分光光度计(北京科誉兴业科技发展有限公司);旷场、Y迷宫、XR-XM101型Morris水迷宫(上海欣软科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备 酸枣仁汤药液制备,称取酸枣仁18 g、知母10 g、茯苓10 g、炙甘草3 g、川芎5 g,15剂,共690 g,分批次用8倍于药材体积的纯水浸泡1 h后煎煮,先用文火煎煮,煮开后武火煎煮40 min,纱布过滤,药渣加6倍纯水待沸腾后煎煮30 min,纱布过滤,混匀2次滤液,蒸浓缩成分别含生药1.5、0.75、0.375 g·mL⁻¹的水煎液,浸膏得率21.58%,灭菌分装。PCPA悬浮液制备,用0.9%氯化钠注射液并加入适量聚山梨酯80,将PCPA配成质量浓度为35 g·L⁻¹的药液。艾司唑仑以纯水制备,质量浓度为0.027 g·L⁻¹。以上药液均置于4℃冰箱储存备用。

2.2 分组、造模与给药 SD大鼠共72只,随机选取12只大鼠作为空白组,剩余大鼠进行造模,参照课题组前期实验^[15],PCPA按350 mg·kg⁻¹(10 mL·kg⁻¹)体积每天8:00腹腔注射1次,连续3 d。除空白组外其余大鼠造模过程中逐渐出现撕咬,攻击性增强,毛发稿枯不荣,昼夜节律紊乱等表现,符合PCPA失眠大鼠一般特征。造模结束后将60只大鼠随机分为5组,PCPA组、艾司唑仑组、酸枣仁汤低、中、高剂量组,每组12只。造模分组后第2天,依据人和动物等效用药剂量换算及参考课题组前期实验有效药量^[15-17],酸枣仁汤低、中、高剂量分别按3.25、7.5、15 g·kg⁻¹,以10 mL·kg⁻¹体积每天8:00灌胃1次,连续7 d;艾司唑仑按2.7×10⁻⁴ g·kg⁻¹,以10 mL·kg⁻¹体积每天8:00灌胃1次,连续7 d;空白组腹腔注射等体积生理盐水,灌胃等体积生理盐水。

2.3 行为学检测

2.3.1 Morris水迷宫实验 Morris水迷宫[直径

160 cm,高度60 cm,水温(22±3)℃]均分为4个象限,内设圆形平台(直径12 cm)略低于水面,正上方为视频采集装置。给药第6~9天,每日药物干预后2 h进行定位巡航训练:将大鼠按顺序依次放入象限内,每次间隔30 min,记录找到平台时间即为逃逸潜伏期,时间设定为90 s,若90 s之内未找到平台,引导大鼠到达平台并停留10 s其潜伏期记为90 s,记录第9天逃逸潜伏期时间。给药第10天,药物干预后2 h进行空间探索实验:撤去平台,并在平台对侧象限放入大鼠,记录大鼠90 s内在原平台象限活动时间及穿越平台次数。

2.3.2 Y迷宫实验 空间探索试验结束后,次日上午8:00进行Y迷宫实验。Y迷宫由夹角为120°的三叉臂通道组成,每个臂长宽高为30 cm×8 cm×15 cm,正上方为视频采集装置。将大鼠置于一个臂的末端,连续进入3个不同的臂记为一次正确交替,每次记录8 min的探索行为,每只大鼠测试结束后用75%乙醇擦拭内臂,去除遗留气味。通过交替指数评估工作记忆能力,交替正确率=正确交替次数/(总进臂次数-2)×100%。

2.3.3 旷场实验 Y迷宫实验结束后进行旷场实验。旷场敞開箱长宽高为50 cm×50 cm×50 cm,箱底中心区25 cm×25 cm,正上方为视频采集装置,将大鼠放置在敞開箱正中央后立即利用动物轨迹行为分析系统采集10 min的大鼠运动轨迹。整体实验结束后通过Top Scan Lite Version 2.0软件计算出每只大鼠运动总距离、平均速度和中心区停留时间。实验期间保持安静,光线无变化,每只大鼠结束后用75%乙醇擦拭旷场,去除遗留气味。

2.4 取材 旷场实验结束后2 h,每组随机取6只大鼠,吸入异氟烷(2%~4%)麻醉,每只大鼠经左心室灌注预冷生理盐水100 mL,再灌注4%多聚甲醛溶液250 mL,取整脑经固定液[4%多聚甲醛+磷酸缓冲液(PBS)]浸泡后置于4℃冰箱备用。剩余大鼠吸入异氟烷(2%~4%)麻醉,于冰上迅速取海马组织,置于-80℃超低温冰箱备用。

2.5 HE染色观察大鼠海马病理形态变化 脑组织经4%多聚甲醛固定48 h后,进行石蜡包埋处理,沿冠状位进行连续切片,厚度1~2 μm,切片在65℃烤箱内烘烤1 h,二甲苯中脱蜡5~10 min,梯度乙醇脱水,苏木素染色1~2 min,分化液(1%盐酸乙醇)冲洗切片,碱性促蓝溶液冲洗细胞核数秒,再次冲洗切片,经伊红染色10 min,梯度乙醇脱水,中性树脂密封后,置于光学显微镜(×200)观察组织形态。

2.6 免疫组化检测大鼠海马CA1区GAP-43、PSD-95和Syn I蛋白表达 脑组织石蜡切片经脱蜡水化、高压抗原修复(10 min)、洗片(PBS×3次)、封闭(10 min)、滴加一抗(GAP-43、PSD-95、Syn I, 1:200)、37℃孵育1 h、4℃冰箱过夜、滴加二抗(HRP标记羊抗兔, 1:500)、37℃孵育1 h、DAB显色、苏木素浸泡1 min、封片,镜下观察拍照(×400),深棕色细胞为阳性细胞,采用Image Pro Plus 6.0软件进行分析。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织GAP-43、PSD-95和Syn I蛋白表达 取冻存样本50 mg,经蛋白提取,BCA蛋白浓度定量,煮水沸10 min变性,上样40 μg,10% SDS-PAGE电泳分离(分离胶100 V,浓缩胶80 V),PVDF转膜(200 mA, 30 min),5%脱脂奶粉封闭60 min,加入一抗(GAP-43、PSD-95、Syn I、GAPDH, 1:1 000)4℃孵育过夜,加入二抗(HRP标记羊抗兔, 1:1 000)室温孵育60 min,洗涤后暗室内采用ECL法,荧光化学发光凝胶成像系统检测目的条带, Lane 1D软件处理系统分析目标带灰度值。

2.8 Real-time PCR检测大鼠海马GAP-43、PSD-95和Syn I mRNA表达 取冻存样本50 mg, TRIzol法提取总RNA,依据Real-time PCR试剂盒说明,将SYBR Green Master Mix、ddH₂O、模板、引物按比例配成体系20 μL。采用两步法PCR反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性15 s;60℃退火延伸30 s,共40个循环。获得原始GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA及GAPDH的C_t值,采用2^{-ΔΔC_t}相对定量法计算各组mRNA相对表达水平,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAP-43	上游 CACTGCTGCTTCCTCACTCCA	229
	下游 AGGGTTCAGGTGCTCTGTTCG	
PSD-95	上游 CTCATACGACACGTCCTAAGCG	264
	下游 GACGGATGAAGATGGCGATG	
Syn I	上游 AGGGCCTATGATGGACTTTCTG	185
	下游 AAGTCACAGGGTCCCTCAGTTC	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

2.9 统计学分析 应用SSPS 22.0软件进行数据分析,所得实验数据结果采用均数 标准差表示,组间

比较采用单因素方差分析,事后分析方差齐时组间比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验,方差不齐时组间比较采用Dunnett's *T*₃法,以*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠Moriss水迷宫逃逸潜伏期时间、原平台象限活动时间、穿越平台次数的影响 在定位巡航实验中,与空白组比较,PCPA组逃逸潜伏期时间显著提高(*P*<0.01);与PCPA组比较,酸枣仁汤低、中、高剂量组和艾司唑仑组逃逸潜伏期时间显著降低(*P*<0.01)。在空间探索实验中,与空白组比较,PCPA组原平台象限活动时间和穿越平台次数均显著下降(*P*<0.01);与PCPA组比较,酸枣仁汤低、中、高剂量组和艾司唑仑组原平台象限活动时间和穿越平台次数均明显提高(*P*<0.05, *P*<0.01)。见表2。

表2 酸枣仁汤对大鼠逃逸潜伏期时间、原平台象限活动时间和穿越平台次数的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Effect of Suanzaoren Tang on latency time of escape, activity time of original platform quadrant and number of times of crossing platform in rats ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	逃逸潜伏期 时间/s	原平台象限 活动时间/s	穿越平台 次数/次
空白组		17.17±2.23	41.17±3.76	5.83±1.19
PCPA组		38.50±6.42 ¹⁾	22.00±4.77 ¹⁾	2.33±0.89 ¹⁾
艾司唑仑组	2.7×10 ⁻⁴	25.75±4.29 ³⁾	31.17±6.26 ³⁾	4.08±0.90 ³⁾
酸枣仁汤低剂量组	3.25	29.25±3.39 ³⁾	26.67±6.43 ²⁾	3.25±1.29 ²⁾
酸枣仁汤中剂量组	7.5	27.17±3.21 ³⁾	28.33±5.30 ³⁾	3.83±1.03 ³⁾
酸枣仁汤高剂量组	15.0	26.33±3.26 ³⁾	29.08±4.80 ³⁾	3.92±1.08 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾*P*<0.01;与PCPA组比较²⁾*P*<0.05, ³⁾*P*<0.01(表3-表5同)

3.2 对大鼠Y迷宫交替正确率的影响 与空白组(58.78±3.60)比较,PCPA组(41.27±3.27)交替正确率显著下降(*P*<0.01);与PCPA组比较,酸枣仁汤低剂量组(44.03±2.77)交替正确率明显提高(*P*<0.05),酸枣仁汤中(46.03±3.07)、高剂量组(46.80±2.89)和艾司唑仑组(46.55±4.25)交替正确率显著提高(*P*<0.01)。

3.3 对大鼠旷场运动距离、平均速度、中心区停留时间的影响 与空白组比较,PCPA组旷场运动距离、平均速度、中心区停留时间均显著提高(*P*<0.01);与PCPA组比较,酸枣仁汤低、中、高剂量组和艾司唑仑组旷场运动距离、平均速度、中心区停留时间均明显降低(*P*<0.05, *P*<0.01)。见表3。

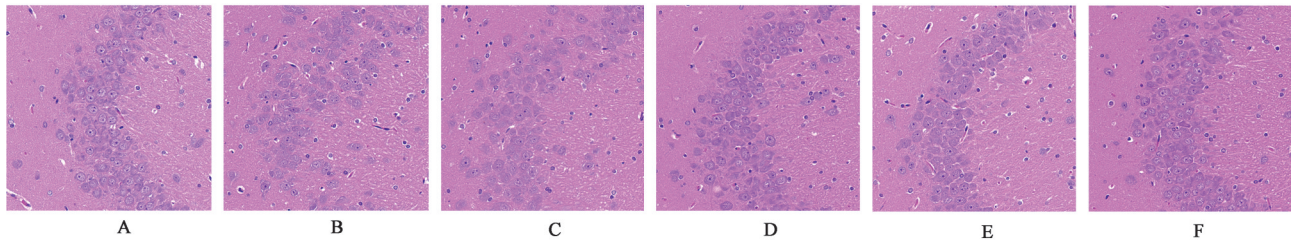
表3 酸枣仁汤对大鼠旷场运动距离、平均速度和中心区停留时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Effect of Suanzaoren Tang on distance, mean velocity and residence time in central area of open field of exercise in rats ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	运动距离/cm	平均速度/cm·s ⁻¹	中心区停留时间/s
空白组		3 524.58±287.38	5.97±0.48	11.75±2.63
PCPA组		4 522.50±369.92 ¹⁾	7.54±0.62 ¹⁾	31.75±6.66 ¹⁾
艾司唑仑组	2.7×10 ⁻⁴	3 879.25±276.76 ³⁾	6.47±0.46 ³⁾	22.25±3.72 ³⁾
酸枣仁汤低剂量组	3.25	4 142.58±309.15 ³⁾	6.90±0.52 ³⁾	27.25±4.35 ²⁾
酸枣仁汤中剂量组	7.5	4 084.08±339.58 ³⁾	6.80±0.57 ³⁾	23.75±3.96 ³⁾
酸枣仁汤高剂量组	15	4 004.25±362.46 ³⁾	6.60±0.63 ³⁾	23.08±4.74 ³⁾

3.4 对大鼠海马组织病理学的影响 HE染色显示空白组海马椎体神经元,排列整齐紧密,形态规整。与空白组比较,PCPA组椎体神经元排列紊乱疏松,

胞体较大,存在神经元丢失现象。与PCPA组比较,酸枣仁汤低、中、高剂量组和艾司唑仑组染色较为清晰,锥体神经元数量增加,排列较整齐。见图1。



注:A. 空白组;B. PCPA组;C. 酸枣仁汤低剂量组;D. 酸枣仁汤中剂量组;E. 酸枣仁汤高剂量组;F. 艾司唑仑组(图2和图3同)

图1 酸枣仁汤对大鼠海马组织病理形态学的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Suanzaoren Tang on histomorphology of rat hippocampus (HE,×200)

3.5 对大鼠海马CA1区GAP-43、PSD-95、Syn I表达的影响 与空白组比较,PCPA组GAP-43、PSD-95、Syn I的表达显著降低($P<0.01$);与PCPA组比较,酸枣仁汤低剂量组GAP-43、PSD-95的表达明显

提高($P<0.05$),Syn I的表达显著提高($P<0.01$),酸枣仁汤中、高剂量组和艾司唑仑组GAP-43、PSD-95、Syn I的表达显著提高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。见图2。

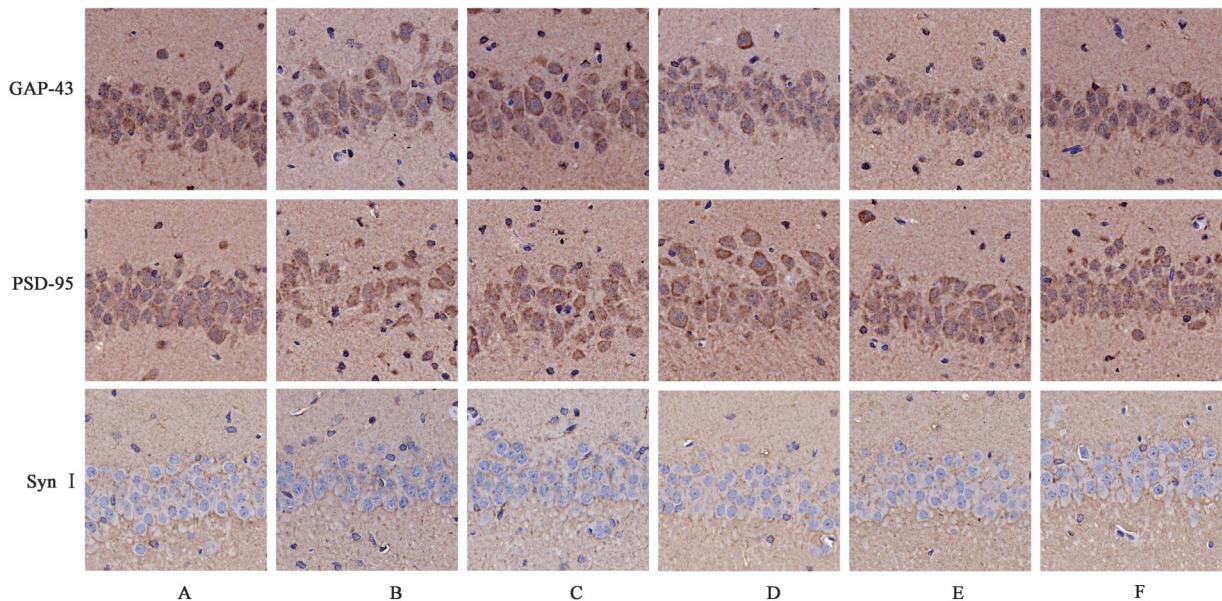


图2 酸枣仁汤对大鼠海马CA1区GAP-43、PSD-95、Syn I蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 2 Effect of Suanzaoren Tang on expression of GAP-43, PSD-95 and Syn I proteins in CA1 region of rat hippocampus (IHC,×400)

3.6 对大鼠海马 GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA 表达的影响 与空白组比较,PCPA 组 GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA 表达显著降低($P<0.01$);与 PCPA 组比较,酸枣仁汤低剂量组 PSD-95、Syn I mRNA

表达明显提高($P<0.05$),GAP-43 mRNA 表达显著提高($P<0.01$),酸枣仁汤中、高剂量组和艾司唑仑组 GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA 表达显著提高($P<0.01$)。见表4。

表4 酸枣仁汤对大鼠海马 GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Suanzaoren Tang on expression of GAP-43, PSD-95 and Syn I mRNA in rat hippocampus ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	GAP-43	PSD-95	Syn I
空白组		0.99±0.04	0.96±0.13	1.03±0.06
PCPA 组		0.75±0.05 ¹⁾	0.70±0.04 ¹⁾	0.83±0.06 ¹⁾
艾司唑仑组	2.7×10 ⁻⁴	1.27±0.05 ³⁾	0.90±0.06 ³⁾	0.91±0.04 ³⁾
酸枣仁汤低剂量组	3.25	1.20±0.07 ³⁾	0.81±0.07 ²⁾	0.88±0.03 ²⁾
酸枣仁汤中剂量组	7.5	1.23±0.02 ³⁾	0.86±0.07 ³⁾	0.90±0.03 ³⁾
酸枣仁汤高剂量组	15	1.24±0.04 ³⁾	0.90±0.09 ³⁾	0.92±0.03 ³⁾

3.7 对大鼠海马 GAP-43、PSD-95、Syn I 蛋白表达的影响 与空白组比较,PCPA 组 GAP-43、PSD-95、Syn I 蛋白表达显著降低($P<0.01$);与 PCPA 组比较,酸枣仁汤低剂量组 GAP-43、PSD-95、Syn I 蛋白

表达明显提高($P<0.05$),酸枣仁汤中、高剂量组和艾司唑仑组 GAP-43、PSD-95、Syn I 蛋白表达显著提高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。见表5、图3。

表5 酸枣仁汤对大鼠海马 GAP-43、PSD-95、Syn I 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Suanzaoren Tang on expression of GAP-43, PSD-95 and Syn I proteins in rat hippocampus ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	GAP-43/GAPDH	PSD-95/GAPDH	Syn I /GAPDH
空白组		0.81±0.05	0.86±0.04	0.76±0.03
PCPA 组		0.66±0.02 ¹⁾	0.70±0.03 ¹⁾	0.58±0.02 ¹⁾
艾司唑仑组	2.7×10 ⁻⁴	0.75±0.02 ³⁾	0.80±0.04 ³⁾	0.65±0.03 ³⁾
酸枣仁汤低剂量组	3.25	0.70±0.01 ²⁾	0.75±0.05 ²⁾	0.62±0.01 ²⁾
酸枣仁汤中剂量组	7.5	0.72±0.01 ³⁾	0.77±0.05 ³⁾	0.64±0.02 ³⁾
酸枣仁汤高剂量组	15	0.73±0.01 ³⁾	0.78±0.06 ³⁾	0.65±0.03 ³⁾

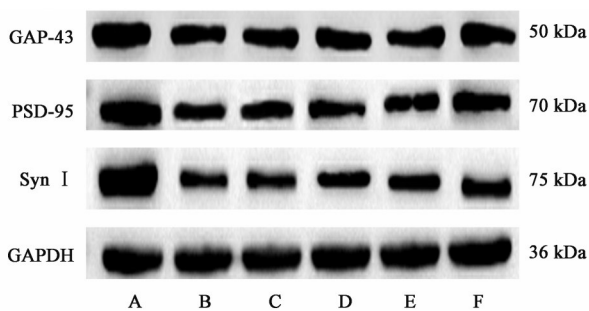


图3 各组大鼠海马 GAP-43、PSD-95、Syn I 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of GAP-43, PSD-95 and Syn I proteins expression in hippocampus of various groups of rats

4 讨论

高质量的睡眠有助于学习时信息的获取和记忆的编码,在学习之后睡眠参与记忆痕迹转化,有助于长期记忆的巩固。大量实验发现长期睡眠不足会导致学习效率降低^[1]并产生烦躁焦虑情绪^[18],严重影响日常生活。5-HT 是睡眠相关神经递质,提

高脑内 5-HT 含量有助于改善患者睡眠障碍^[19]。位于中缝核团的 5-HT 能纤维投射到与高级认知功能密切相关的海马,参与突触可塑性的调节^[20]。脑内 5-HT 含量下降被认为是焦虑症的生理病理基础^[21]。PCPA 是合成 5-HT 的关键限速酶-色氨酸羟化酶 (TPH) 的抑制剂,能降低脑内 5-HT 含量,本实验通过制备 PCPA 失眠大鼠模型,研究失眠与学习记忆障碍和焦虑样行为之间的关系。本实验发现,PCPA 组大鼠 Moriss 水迷宫逸潜伏期时间增高,原平台象限活动时间和穿越平台次数降低;Y 迷宫交替正确率下降;旷场运动距离,平均速度和中心区停留时间增加。大鼠在 Moriss 水迷宫中通过多次训练寻找到隐蔽平台位置,形成空间识别记忆,空间学习记忆受损表现为逸潜伏期时间提高,原平台象限活动时间和穿越平台次数降低。在 Y 迷宫中,大鼠进入新异环境,通过记住已进入的臂,避免重复进入

同一臂,形成空间识别记忆从而指导行为,空间学习记忆受损表现为交替正确率下降^[22]。旷场实验用于观察大鼠在新异环境中的自主行为和兴奋性,大鼠运动距离,平均速度和中心区停留时间反映兴奋性和紧张度^[23]。本实验结果表明,PCPA失眠大鼠具有空间学习记忆障碍和焦虑样行为,与文献报道相一致^[24]。

海马突触可塑性是学习记忆形成和巩固的基础,对睡眠稳态具有调节作用^[1],海马突触可塑性受损也被认为是导致焦虑的重要过程^[25]。GAP-43、PSD-95、Syn I 是检测海马突触可塑性的重要标志物,本实验通过观察海马 GAP-43、PSD-95、Syn I ,探讨 PCPA 失眠大鼠产生学习记忆障碍和焦虑样行为的机制。本实验发现,PCPA 失眠大鼠海马组织损伤明显,GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA 和蛋白表达下调。GAP-43 分布于突触前膜,属于神经元特异性磷蛋白,调控由 G 蛋白介导的细胞内信号转导,神经递质释放和突触连接等方面具有重要功能^[5]。睡眠剥夺导致海马 GAP-43 表达降低^[26],海马 GAP-43 表达上调有助于改善睡眠剥夺导致的学习记忆障碍和焦虑样行为^[27]。PSD-95 是膜结合鸟苷酸激酶(MAGUKs)家族成员之一,位于突触后膜内侧,对突触可塑性的调节具有重要作用^[6]。海马 BDNF/PSD-95/q-CREB 信号通路参与睡眠剥夺导致的认知障碍^[28]。睡眠剥夺通过增加氧化应激和炎症反应,降低 PSD-95 表达,引起突触损伤,进而导致焦虑^[29]。Syn I 是与突触囊泡相连含量丰富的整合膜蛋白,突触素(Synaptophysin)家族成员之一,选择性地表达在成熟神经元神经末梢,在蛋白激酶的作用下通过与细胞骨架蛋白和突触囊泡膜脂质、蛋白质组分之间的相互作用,调节神经递质释放,是突触形成的标志^[7]。BDNF 和神经营养因子-3(NT-3)参与睡眠剥夺导致的 Syn I 表达下降^[30],海马 Syn I 表达增加能够改善睡眠剥夺导致的空间学习记忆障碍^[31]。通过激活 mTOR 信号通路,上调海马 Syn I 表达,可能改善小鼠的焦虑样行为^[32]。综上所述,海马 GAP-43、PSD-95、Syn I 可通过多种途径参与调节睡眠、学习记忆和焦虑情绪。研究发现,通过使用 5-HT 再摄取抑制剂(SSRIs),提高突触间隙 5-HT 浓度,能增加海马突触密度,这可能与 GAP-43、PSD-95、Syn I 表达上调有关^[33]。然而,尚未有研究报道脑内 5-HT 含量下降是否对海马 GAP-43、PSD-95、Syn I 表达有调控作用。结合本实验结果,PCPA 失眠大鼠表现出的空间学习记忆障碍和烦躁

焦虑样行为可能与海马 GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA 和蛋白表达下调有关。

酸枣仁汤由酸枣仁、茯苓、川芎、知母、甘草 5 味中药组成,重用酸枣仁为君药起到宁心安神、补血养肝的功效,尤其适用于心肝血虚型失眠,可改善 SD 导致的认知障碍和烦躁、焦虑样行为^[34-35]。本实验发现,经酸枣仁汤和艾司唑仑干预后大鼠 Morris 水迷宫逃逸潜伏期时间降低,原平台象限活动时间和穿越平台次数提高;Y 迷宫交替正确率提高;旷场运动距离,平均速度和中心区停留时间减少。提示酸枣仁汤能改善 PCPA 失眠大鼠学习记忆障碍和焦虑样行为。本实验还发现酸枣仁汤能够减轻 PCPA 导致的海马损伤,上调海马 GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA 和蛋白表达。解剖和电生理学研究发现,海马-前额叶神经回路参与睡眠、学习记忆和精神疾病^[36-37]。前期实验发现,酸枣仁汤能增加 PCPA 失眠大鼠前额叶蛋白激酶 C(PKC)、钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 表达^[38],GAP-43 是 PKC 突触前底物,CaMK II 分别是 Syn I 突触前底物,PSD-95 突触后底物。酸枣仁汤能提高 PCPA 失眠大鼠脑内 5-HT 含量^[39]。结合本实验结果,酸枣仁汤可能通过激活 PKC、CaMK II ,促进 GAP-43、PSD-95、Syn I mRNA 和蛋白表达,调节海马突触可塑性,促进神经递质释放,提高脑内 5-HT 含量,改善 PCPA 失眠大鼠学习记忆障碍和焦虑样行为。

长期失眠易引起神疲乏力,烦躁焦虑情绪,注意力和记忆力下降,严重危害日常生活。对失眠及其并发症的治疗尤为重要,本实验为酸枣仁汤临床治疗失眠导致的学习记忆障碍和焦虑情绪提供了新的理论依据。但不能排除 PCPA 可能通过调节脑内其他神经递质导致上述结果,其机制还需进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CORDEIRA J, KOLLURU S S, ROSENBLATT H, et al. Learning and memory are impaired in the object recognition task during metestrus/diestrus and after sleep deprivation [J]. Behav Brain Res, 2018, 339: 124-129.
- [2] 李雪丽,张斌. 睡眠障碍与焦虑抑郁障碍的联系[J]. 中国临床医生杂志,2018,46(2): 131-133.
- [3] 李运,王海云. Homer1a 在睡眠剥夺损伤学习和记忆功能中的研究进展[J]. 临床麻醉学杂志,2021,37(8): 891-894.

- [4] YIN D M, CHEN Y J, SATHYAMURTHY A, et al. Synaptic dysfunction in schizophrenia [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 970:493-516.
- [5] CHUNG D, SHUM A, CARAVEO G. GAP-43 and BASP1 in axon regeneration: Implications for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:567537.
- [6] VALLEJO D, CODOCEDO J F, INESTROSA N C. Posttranslational modifications regulate the postsynaptic localization of PSD-95 [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(3):1759-1776.
- [7] FORNASIERO E F, BONANOMI D, BENFENATI F, et al. The role of synapsins in neuronal development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(9):1383-1396.
- [8] SEIBT J, RICHARD C J, SIGL-GLÖCKNER J, et al. Cortical dendritic activity correlates with spindle-rich oscillations during sleep in rodents[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):684.
- [9] LEUNER B, SHORS T J. Stress, anxiety, and dendritic spines: What are the connections? [J]. *Neuroscience*, 2013, 251:108-119.
- [10] LOPEZ J, ROFFWARG H P, DREHER A, et al. Rapid eye movement sleep deprivation decreases long-term potentiation stability and affects some glutamatergic signaling proteins during hippocampal development [J]. *Neuroscience*, 2008, 153(1):44-53.
- [11] PENG Y, WANG W, TAN T, et al. Maternal sleep deprivation at different stages of pregnancy impairs the emotional and cognitive functions, and suppresses hippocampal long-term potentiation in the offspring rats[J]. *Mol Brain*, 2016, 9:17.
- [12] 范新六. 基于突触可塑性的加味四逆散对睡眠剥夺大鼠学习记忆障碍的调控机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2011.
- [13] 黄琴, 刘海军, 徐平. 神经递质与 OSAS 相关认知障碍的研究进展[J]. *遵义医科大学学报*, 2020, 43(2): 254-258.
- [14] 梁薇. 针刺对 PCPA 失眠 PCPA 大鼠行为学及下丘脑 5-HT、Glu、GABA 递质含量影响研究[D]. 南宁:广西中医药大学, 2019.
- [15] 曹敏玲, 王慧, 史琴, 等. PCPA 失眠大鼠大脑皮质星形胶质细胞 GFAP 和 P2X7 受体表达的变化及酸枣仁汤的干预作用[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(11): 2442-2444, 2466.
- [16] 王慧, 罗坤, 武静. 酸枣仁汤对失眠大鼠中脑中缝背核神经胶质细胞的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(21):235-239.
- [17] 王慧, 藏印竹, 武静, 等. 酸枣仁汤对 PCPA 失眠大鼠大脑皮质代谢型谷氨酸受体和受体后 cAMP、PKA 的干预作用[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(1): 34-37, 93.
- [18] SCULLY T. Sleep [J]. *Nature*, 2013, 497 (7450) : S1-S3.
- [19] 李梦华. 百合地黄汤合酸枣仁汤对失眠模型大鼠下丘脑中 5-HT 和 NE 影响研究[J]. *中医临床研究*, 2016, 8(28):10-12.
- [20] TEIXEIRA C M, ROSEN Z B, SURI D, et al. Hippocampal 5-HT input regulates memory formation and schaffer col lateral excitation[J]. *Neuron*, 2018, 98 (5):992-1004.
- [21] AMIGÓ J, DIAZ A, PILAR-CUÉLLAR F, et al. The absence of 5-HT receptors modulates depression- and anxiety-like responses and influences the response of fluoxetine in olfactory bulbectomised mice: Adaptive changes in hippocampal neuroplasticity markers and 5-HT autoreceptor [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 111: 47-58.
- [22] 孔林林, 张军, 乔枫, 等. 基于小鼠 Morris 水迷宫和 Y 迷宫联合试验的多任务行为学测试研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29(4):365-368.
- [23] 蒋征奎, 宁二娟, 王学方, 等. 柏子仁抗焦虑作用评价及机制探究[J]. *中南药学*, 2021, 19(12):2540-2544.
- [24] 郭晋良, 仲启明, 吉海杰, 等. 探讨蛇床子催眠活性组分对 PCPA 失眠大鼠褪黑素合成限速酶 AANAT 的调控作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(14): 47-52.
- [25] KANDOLA A, ASHDOWN-FRANKS G, HENDRIKSE J, et al. Physical activity and depression: Towards understanding the antidepressant mechanisms of physical activity[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 107:525-539.
- [26] FERNANDES J, BALIEGO L G, PEIXINHO-PENA L F, et al. Aerobic exercise attenuates inhibitory avoidance memory deficit induced by paradoxical sleep deprivation in rats [J]. *Brain Res*, 2013, 1529: 66-73.
- [27] MISHRA R, MANCHANDA S, GUPTA M, et al. *Tinospora cordifolia* ameliorates anxiety-like behavior and improves cognitive functions in acute sleep deprived rats [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25564.
- [28] 王博. 睡眠剥夺对小鼠术后认知功能和海马 BDNF/ PSD-95/p-CREB 蛋白表达的影响[D]. 北京:中国人民解放军医学院, 2018.
- [29] ATROOZ F, LIU H, KOCHI C, et al. Early life sleep deprivation: Role of oxido-inflammatory processes [J]. *Neuroscience*, 2019, 406:22-37.

- [30] HAMATAKE M, MIYAZAKI N, SUDO K, et al. Phase advance of the light-dark cycle perturbs diurnal rhythms of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 protein levels, which reduces synaptophysin-positive presynaptic terminals in the cortex of juvenile rats [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(24):21478-21487.
- [31] 吴建丽,袁珍,王永亮,等. 电项针对慢性睡眠剥夺轻度认知障碍大鼠海马突触可塑性相关蛋白的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(3):370-375.
- [32] WANG A, ZOU X, WU J, et al. Early-life stress alters synaptic plasticity and mTOR signaling: Correlation with anxiety-like and cognition-related behavior [J]. *Front Genet*, 2020, 11:590068.
- [33] REINES A, CERESETO M, FERRERO A, et al. Maintenance treatment with fluoxetine is necessary to sustain normal levels of synaptic markers in an experimental model of depression: Correlation with behavioral response [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(8):1896-1908.
- [34] 吴东南,丁瑞丛,纪可,等. 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺大鼠学习记忆及TLR4/NF- κ B信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(6):18-24.
- [35] 李素英,韩君. 加味酸枣仁汤对焦虑性失眠患者焦虑状态及血清5-HT、DA的影响[J]. *光明中医*, 2020, 35(17):2636-2638.
- [36] WIERZYNSKI C M, LUBENOV E V, GU M, et al. State-dependent spike-timing relationships between hippocampal and prefrontal circuits during sleep [J]. *Neuron*, 2009, 61(4):587-596.
- [37] LI M, LONG C, YANG L. Hippocampal-prefrontal circuit and disrupted functional connectivity in psychiatric and neurodegenerative disorders [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:810548.
- [38] 王慧,曹敏玲,左文彪,等. 嘌呤P2X7受体介导对氯苯丙酸致大鼠前额皮质蛋白激酶的变化[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(30):1-6.
- [39] 张军武,田凡,邹文信,等. 酸枣仁汤对DL-4-氯苯基丙氨酸所致失眠的药效学研究[J]. *河南中医*, 2016, 36(6):985-987.

[责任编辑 孙丛丛]