

安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马CA1区细胞结构及神经元损伤的保护作用

谢光璟, 徐波, 夏婧, 王平*
(湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**探讨安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马神经元及相关蛋白表达的影响。**方法:**通过随机数字表法将SD大鼠分为空白组、模型组、安寐丹组和褪黑素组。空白与模型组给予等容生理盐水,安寐丹组给药 $9.09\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。褪黑素组给药 $0.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。自制睡眠剥夺箱造模4周。Ethovision XT视频分析系统监测大鼠自发活动状态,苏木素-伊红(HE)染色观察海马CA1区神经元形态,尼氏染色观察海马CA1区神经元及尼氏体变化,超微电镜观察海马细胞超微结构,免疫组化检测海马CA1区胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、微管相关蛋白2(MAP2)、巢蛋白(Nestin)、神经元特异核蛋白(NeuN)的表达。**结果:**与空白组比较,模型组中心点移动距离延长,平均活动速度增加,中心点累计持续时间增加,身体填充平均值增加,活动频率更高($P<0.01$),海马CA1区神经元数量减少,排列紊乱,核皱缩,细胞质深染,尼氏体数量减少,出现明显丢失,线粒体出现肿胀变形,嵴缩短,高尔基体囊泡肿胀,GFAP蛋白积分吸光度(IA)增加,MAP2、Nestin、NeuN蛋白IA下降($P<0.01$);与模型组比较,安寐丹组中心点移动距离缩短,平均活动速度降低,中心点累计持续时间缩短,身体填充平均值降低,活动频率降低($P<0.05$, $P<0.01$),海马CA1神经元损伤减轻,细胞数量增加,核仁清晰,胞浆明显,尼氏体数量增加,线粒体等细胞器损伤减轻,GFAP蛋白IA降低,MAP2、Nestin、NeuN蛋白IA升高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**安寐丹改善睡眠剥夺大鼠海马CA1神经元结构损伤,并可能通过降低GFAP蛋白表达,增加MAP2、Nestin、NeuN蛋白表达而实现。

[关键词] 安寐丹; 睡眠剥夺; 胶质纤维酸性蛋白(GFAP); 微管相关蛋白2(MAP2); 巢蛋白(Nestin); 神经元特异核蛋白(NeuN)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0026-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220704

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220124.2030.014.html>

[网络出版日期] 2022-01-26 14:18

Protective Effects of Anmeidan on Cell Structure Against Neuronal Damage in Hippocampal CA1 Region of Sleep-deprived Rats

XIE Guang-jing, XU Bo, XIA Jing, WANG Ping*
(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Anmeidan (AMD) on neuronal structure and neuronal marker protein expression in the hippocampal CA1 region of sleep-deprived (SD) rats. **Method:** Rats were randomly divided into control group, model group, an AMD group ($9.09\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and melatonin group ($0.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Rats in the control group and the model group received equal volumes of physiological saline. The SD model was induced by the self-made sleep deprivation box for four weeks. Ethovision XT system detected and analyzed the spontaneous behaviors of rats. The histomorphology of neurons in the hippocampal CA1 region was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining, and the changes in Nissl bodies were observed by Nissl staining. The ultrastructure of hippocampal cells was observed by transmission

[收稿日期] 2021-11-02

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1705600);国家自然科学基金青年基金项目(82104712)

[第一作者] 谢光璟, 博士, 讲师, 从事中医药防治老年病研究, Tel: 027-68890123, E-mail: 397525306@qq.com

[通信作者] *王平, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中医衰老理论及老年病证治规律研究, E-mail: pwang54@163.com

electron microscopy (TEM). Immunohistochemistry was used to detect the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), microtubule-associated protein 2 (MAP2), nestin, and neuronal nuclei (NeuN) in the CA1 region. **Result:** Compared with the control group, the model group showed longer distance, increased average activity speed, cumulative duration, average body fill, and higher activity frequency ($P<0.01$). Besides, the neurons in the CA1 region were reduced in number with disorganized arrangement, wrinkled nuclei, deeply stained cytoplasm, reduced Nissl bodies, swollen and deformed mitochondria, shortened cristae, and swollen Golgi vesicles. Furthermore, the mean integral absorbance (IA) value of GFAP increased and those of MAP2, nestin, and NeuN decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the AMD group showed shortened distance traveled, lower average activity speed, shorter cumulative duration, decreased average body fill, and reduced activity frequency ($P<0.05$, $P<0.01$). Moreover, the neurons in the CA1 region were relieved from damage with increased cell number, clear nuclei and cytoplasm, increased Nissl bodies, and relieved mitochondrial damage. The IA value of GFAP decreased and those of MAP2, nestin, and NeuN increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** AMD can improve structural damage of neurons in the hippocampal CA1 region of sleep-deprived rats, which may be achieved by decreasing GFAP expression and increasing MAP2, nestin, and NeuN expression.

[Keywords] Anmeidan; sleep deprivation; glial fibrillary acidic protein (GFAP); microtubule-associated protein 2 (MAP2); nestin; neuronal nuclei (NeuN)

睡眠是生命体最重要的生理活动之一,对于健康的重要性不言而喻。而随着社会的发展和科技的提升,睡眠缺失正成为愈发普遍的社会现象。国外流行病学研究发现35%的成年人1 d中睡眠时间少于7 h,而近73%的高中生夜间睡眠时间少于8 h,58%的中学生睡眠时间少于9 h^[1]。睡眠缺失对健康的损害是广泛而多维的,长期睡眠不足会造成体内慢性炎症,增加患阿尔茨海默病、糖尿病、动脉粥样硬化等疾病的风险,对神经系统、内分泌系统等多个系统的健康造成威胁^[2-3]。最新的研究发现长期睡眠不足会引发小鼠过度自噬和凋亡,进而损伤海马神经元^[4]。同时,长时间的睡眠剥夺还降低了雄性大鼠海马背侧和腹侧的细胞增殖和未成熟的新生神经元^[5],证实了睡眠剥夺与神经元损伤存在直接联系。

神经元作为大脑的基本信号组件,是神经系统的重要组成部分,睡眠觉醒与神经系统的联系可以体现在多个层面。一则神经系统内部存在多个脑区直接与睡眠觉醒关联,包括视交叉上核(SCN)、基底前脑(BF)、腹外侧视前核(VLPO)等^[6-7],同时,已发现的多种神经递质参与睡眠觉醒动态调节,包括了多种兴奋性及抑制性神经递质^[8],可见睡眠觉醒与神经元功能密切联系。安寐丹出自清代医家陈士铎的《石室秘录·卷一》,主要用于治疗失眠、怔忡等证。团队前期在国家科技部重点研发计划项目的支持下,开展了安寐丹相关临床及基础研究,分

别从昼夜节律稳态、睡眠与记忆的关系、能量代谢等多个角度阐释了该方的作用机制,同时发现安寐丹能够通过抗细胞凋亡等过程发挥神经保护作用等^[9-10],本次实验将围绕神经元功能在睡眠剥夺过程中的变化探讨中医古方安寐丹的作用,期望为防治睡眠障碍性疾病提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 选择SPF级别的雄性SD大鼠为研究对象,体质量200~210 g,购于湖北省实验动物研究中心,合格证号SCXK(京)2016-0002。动物集中饲养于湖北中医药大学老年医学研究所动物房,在整个实验过程中维持温度在22~25℃,湿度在50%~55%,光照/黑暗时间12 h/12 h,饮食、饮用水均经过无菌化处理。实验同时获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准([2018]IEC(018)号)。

1.2 药物及试剂 安寐丹组成:生酸枣仁、熟酸枣仁各19 g,人参、麦冬、茯神、当归各11 g,丹参7 g,石菖蒲、五味子、甘草各4 g(购于湖北中医药大学国医堂,批号分别为210401、20210501、200806039b、210403、211110064a、210628120a、211125、190829121b、210820,经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》项下外观和性状标准)。褪黑素(美国Sigma公司,批号M5250);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、尼氏染色液试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1005、G1036);一抗胶质纤维酸性蛋

白(GFAP)、微管相关蛋白2(MAP2)、巢蛋白(Nestin)、神经元特异核蛋白(NeuN)、二抗辣根过氧化物酶(HRP)标记的免疫球蛋白(Ig)G(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB11096、GB11128-2、GB11137、GB11138、GB23302);其余试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 自制睡眠剥夺箱, Ethovision XT 视频分析系统(荷兰Noldus公司), RM2245型切片机(德国Leica公司), EG1140H型包埋机、DVM6型透射电镜(德国Leica公司), IX71型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 模型制备 所采用的造模方法为改良多平台水环境睡眠剥夺法^[11]。装置系实验室自行定制,箱体长×宽×高为75 cm×50 cm×36 cm,内部放连体金属台,规格为直径8 cm,高8 cm。实验过程中保证水面低于圆台,大鼠在圆台上活动,借助大鼠恶水的习性造成持续性的REM睡眠剥夺。空白组其余设置同实验组,但在圆台上放置铁丝网可保证其正常睡眠。剥夺时间为首日12:00至次日8:00,实验持续时间4周,每天清洗箱体。

2.2 分组及给药 根据课题组前期开展的安寐丹相关药理学研究,已经确定了其有效剂量并开展相关实验^[9-10],随机分为空白组、模型组、安寐丹组和褪黑素组,每组15只。依据中药药理研究方法学(第2版)^[12]记载大鼠与人体表面积折算,得出安寐丹给药剂量为 $9.09 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。褪黑素给药剂量为 $0.27 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。药物以15倍水浸泡30 min后武火煮沸,继用文火煎煮30 min,过滤药液。第2次煎煮加10倍水后煎煮合并2次药液,最终浓缩为含生药 $1.82 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液,给药体积为 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。模型组、空白组给予等容纯水,自造模开始同时给以药物干预,连续4周。末次给药后,取全脑进行指标检测。

2.3 指标检测

2.3.1 行为学检测 应用Ethovision视频分析系统进行监测,取材前2 d将大鼠移入开场的黑色检测箱中,实验过程中保持周围环境安静,软件会自动捕捉大鼠并采集动物中心点位置进行数据监测,观察大鼠在2 min内的各项行为学指标,包括移动距离、活动速度等,并通过热图分析、身体填充平均值(动物在检测区域发生变化的持续时间)评价动物的活动特性、情绪表现等。

2.3.2 海马细胞结构观察 采用HE染色法将固定

后的全脑组织脱蜡,包埋,切片,二甲苯及梯度乙醇脱水处理,苏木素染核5 min,1%盐酸-乙醇分化3 s,清洗后0.6%氨水返蓝。伊红染液染色3 min,双蒸水清洗10 min,梯度乙醇、二甲苯脱水,中性树脂封片镜下观察海马CA1区神经元结构。

2.3.3 海马区尼氏体观察 固定组织经过脱蜡,包埋,切片后、磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,用1%尼氏染色液染色10 min。随后洗片,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察海马CA1区神经元及尼氏体变化。

2.3.4 透射电镜观察海马神经元超微结构 将海马组织从2.5%戊二醛溶液中取出,经过PBS冲洗后,用1%锇酸固定,并经过梯度乙醇脱水,树脂浸透,包埋,切片(70 nm),铀染、铅染处理,透射电镜下观察海马神经元超微结构及细胞器结构。

2.3.5 免疫组化检测海马神经元相关蛋白表达 固定的全脑经过脱蜡,包埋,切片,抗原修复后孵育1 h;随后滴加一抗GFAP、MAP2、Nestin、NeuN(稀释比1:500)孵育过夜;PBS洗涤5~10 min,滴加二抗(1:1 000)继续反应1 h,DAB显色,复染,脱水,透明,封片,荧光显微镜拍照观察,Image J软件分析阳性率。

2.3.6 统计学处理 SPSS 21.0软件处理数据,实验数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两两比较运用 t 检验;两组以上比较运用单因素方差分析,并进行Bonferroni组间事后比较,方差不齐用Dunnnett's T3检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对睡眠剥夺大鼠行为学的影响 通过检测开放空间下动物自发活动情况评价其活动状态及焦虑样表现。与空白组比较,模型组大鼠中心点移动距离延长,平均活动速度增加,中心点累计持续时间增加,身体填充平均值增加($P<0.01$);与模型组比较,安寐丹组及褪黑素组中心点移动距离缩短,平均活动速度降低,中心点累计持续时间缩短,身体填充平均值降低($P<0.01$)。热图反映活动频率及活动范围,蓝色至红色提示某区域的活动频率逐渐增加,热图面积越大提示活动更加频繁。结果提示了模型组活动频率更高,活动面积更大,与模型组比较,安寐丹组及褪黑素组活动频率降低,活动面积缩小。见表1和图1。

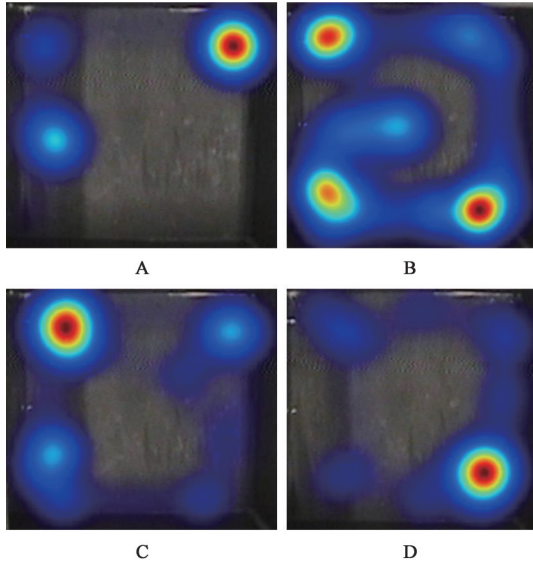
3.2 对睡眠剥夺大鼠海马神经元细胞结构的影响 空白组海马CA1区神经元细胞结构较为完整,神经细胞数量多,排列整齐而紧密,胞浆丰富而淡染,

表1 安寐丹对睡眠剥夺大鼠自发活动状态的影响 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 1 Effect of Anmeidan (AMD) on spontaneous activity status of sleep deprived rats ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	中心点移动距离/cm	速度/cm·s ⁻¹	中心点累计持续时间/s	身体填充值/%
空白组		88.07±12.47	0.74±0.10	6.37±1.18	1.61±0.08
模型组		432.58±19.41 ²⁾	3.61±0.16 ²⁾	51.20±2.81 ²⁾	3.47±0.15 ²⁾
安寐丹组	9.09	187.17±25.64 ⁴⁾	1.56±0.21 ⁴⁾	23.13±3.75 ⁴⁾	2.41±0.09 ⁴⁾
褪黑素组	0.27	250.32±23.38 ⁴⁾	2.09±0.30 ⁴⁾	30.22±5.08 ³⁾	2.51±0.15 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表2同)



注:A. 空白组;B. 模型组;C. 安寐丹组;D. 褪黑素组(图2-图5同)

图1 安寐丹对睡眠剥夺大鼠活动频率的影响

Fig. 1 Effect of AMD on activity frequency in sleep deprived rats

细胞核清晰,圆形而居中。与空白组比较,模型组神经元数量减少,且排列疏松而不规则,细胞形态不一,部分神经元皱缩,染色质明显深染,分布不均匀。与模型组比较,安寐丹组海马CA1神经元细胞结构损伤改善,细胞结构较完整,排列较为整齐,部分神经元胞浆丰富,核仁清晰。褪黑素组也可见部分完整的细胞质和细胞核。见图2。

3.3 对睡眠剥夺大鼠海马神经元尼氏体的影响

空白组见海马CA1神经元数量多,结构完整,胞浆中有明显的尼氏体分布,部分呈现“虎斑样”,部分呈现细颗粒状,胞核清晰可见,细胞膜完整。与空白组比较,模型组细胞结构不规则并出现不同程度损伤,尼氏体减少或消失,细胞膜破裂,细胞质深染成片。与模型组比较,安寐丹组及褪黑素组细胞形态结构改善,可见部分神经元锥体细胞存在少量尼氏体分布,细胞膜较完整。见图3。

3.4 对睡眠剥夺大鼠海马神经元超微结构的影响

空白组细胞结构完整,细胞膜完整,细胞核圆,核

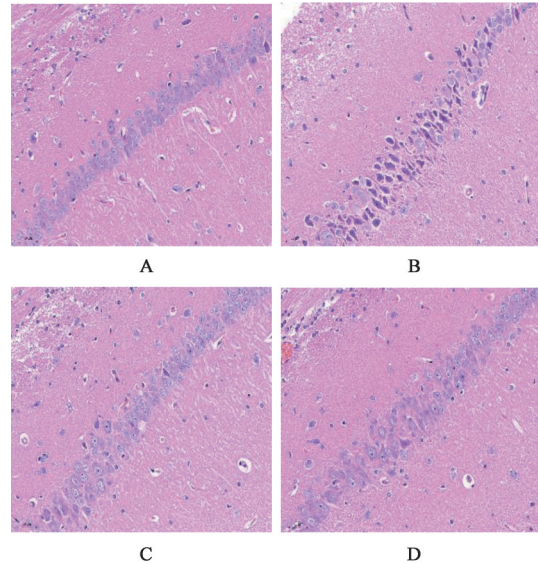


图2 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马神经元CA1区细胞形态的影响(HE,×300)

Fig. 2 Effect of AMD on hippocampus cellular morphology of CA1 region in sleep deprived rats (HE, ×300)

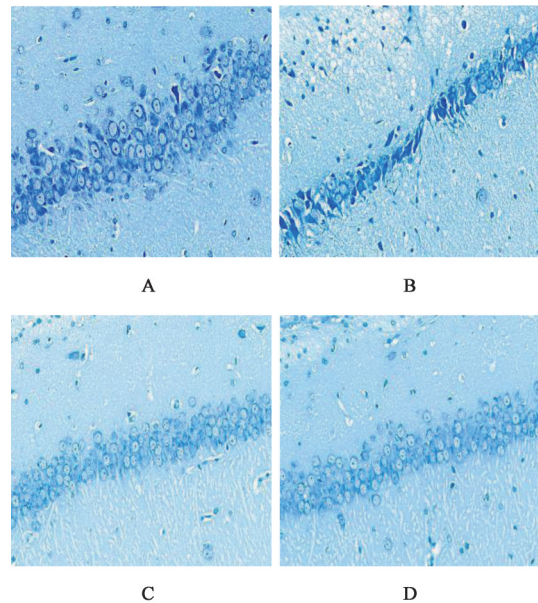


图3 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马CA1神经元尼氏染色的影响(尼氏,×300)

Fig. 3 Effect of AMD on Nissl staining of hippocampus CA1 region neurons in sleep deprived rats (Nissl, ×300)

周可见线粒体、溶酶体、粗面内质网、高尔基体等正常细胞器。模型组可见大量的初级溶酶体,线粒体肿胀变形,线粒体嵴缩短,高尔基体囊泡肿胀。与

模型组比较,安寐丹组及褪黑素组细胞结构改善,线粒体肿胀程度变轻,形态大小不一,嵴部分可见,嵴内部基质电子密度分布不均匀。见图4。

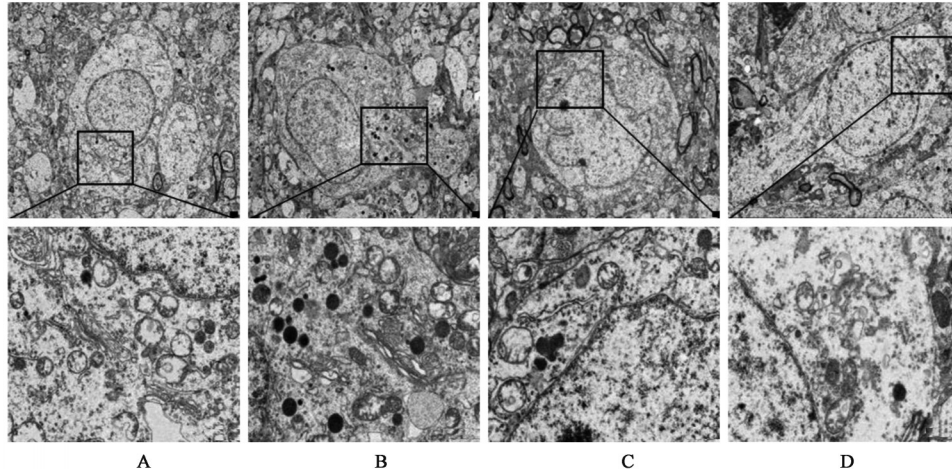


图4 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马CA1神经元超微结构的影响(超微电镜,×1 200,×5 000)

Fig. 4 Effect of AMD on ultrastructure of hippocampal CA1 neurons in sleep deprived rats (TEM, ×1 200, ×5 000)

3.5 对睡眠剥夺大鼠海马CA1神经元标志蛋白表达的影响 空白组神经元细胞数量较多,排列整齐,阳性细胞为棕褐色表达。与空白组比较,模型组细胞排列较紊乱,数量减少,可见GFAP蛋白表达升高,IA增加,MAP2、Nestin、NeuN蛋白表达降

低,IA下降($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,安寐丹组与褪黑素组GFAP蛋白表达降低,IA下降,同时MAP2、Nestin、NeuN蛋白表达增加,IA升高,差异有明显统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。见图5,表2。

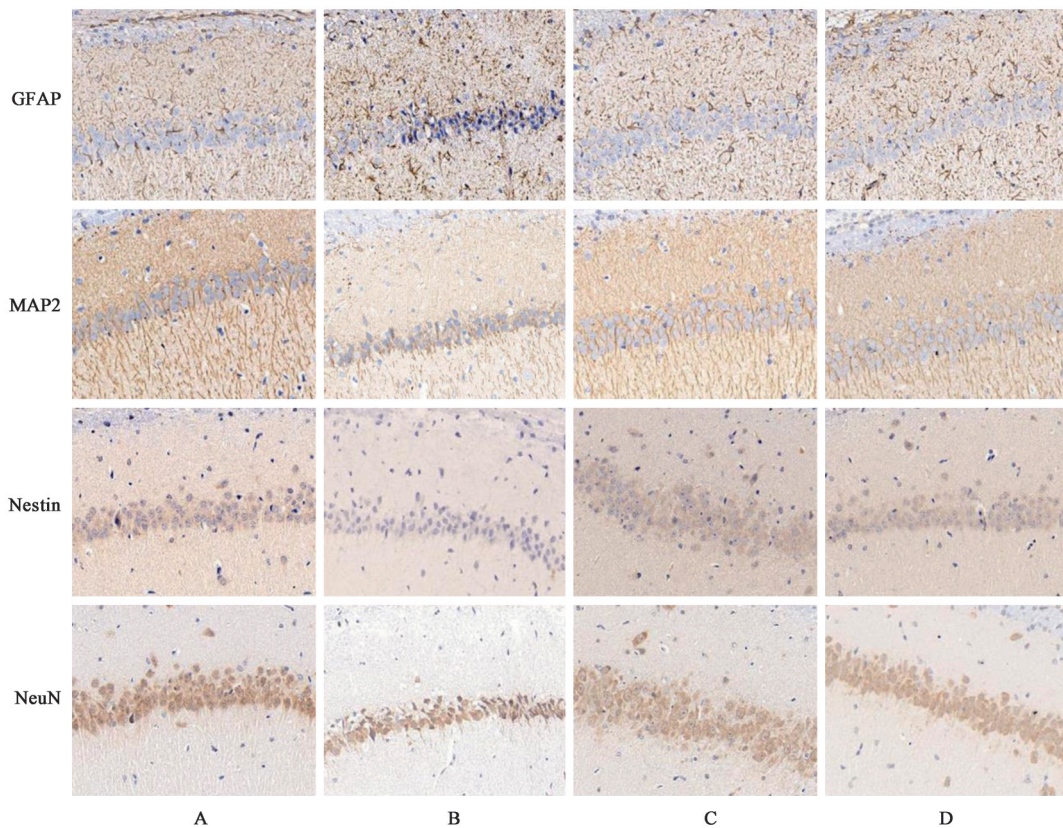


图5 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马CA1区GFAP、MAP2、Nestin、NeuN蛋白表达的影响(免疫组化,×300)

Fig. 5 Effect of AMD on hippocampal CA1 region GFAP, MAP2, Nestin, NeuN protein expression in sleep deprived rats (IHC, ×300)

表2 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马CA1区GFAP、MAP2、Nestin、NeuN积分吸光度的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of AMD on integral absorbance of GFAP, MAP2, Nestin, NeuN in sleep deprived rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GFAP	MAP2	Nestin	NeuN
空白组		20.87±1.62	22.34±2.10	21.64±1.78	19.68±0.37
模型组		31.64±1.28 ²⁾	13.88±1.99 ²⁾	12.93±2.19 ²⁾	12.64±0.38 ²⁾
安寐丹组	9.09	24.66±0.68 ⁴⁾	20.04±0.61 ³⁾	19.43±0.44 ³⁾	17.73±0.43 ⁴⁾
褪黑素组	0.27	25.69±0.27 ⁴⁾	20.12±0.85 ³⁾	18.72±0.97 ³⁾	16.06±0.62 ⁴⁾

4 讨论

睡眠仍是目前生命个体最为神秘且重要的生理活动之一,作为大脑神经活动的重要部分,睡眠对于学习认知、免疫功能和心理健康等多方面都至关重要,睡眠障碍会导致神经、免疫功能紊乱,这种改变可能与神经元功能异常紧密联系^[13]。为此通过实验发现,中医古方安寐丹可改善睡眠剥夺大鼠自发活动情况下的活动状态及焦虑样表现,缓解睡眠剥夺大鼠海马神经元结构损伤,改善神经元标记蛋白的表达。

睡眠状态与神经元功能常常互相影响,互为因果。睡眠障碍会影响神经元活性,导致神经元损伤、放电异常等改变,而神经元损伤也会影响睡眠状态,表现于外有活动的异常,兴奋性的增加以及焦虑紧张性表现。神经元参与组成中枢神经系统,根据信号的特征而分出兴奋性神经元和抑制性神经元,进而参与睡眠过程^[14]。常见的谷氨酸能神经元和多巴胺能神经元属于兴奋性质,具有促进觉醒的作用,如基底前脑区谷氨酸能神经元缺失的小鼠睡眠压力显著降低,睡眠稳态发生改变^[15]。而 γ -氨基丁酸能、甘氨酸能等属于抑制性神经元,这一类神经元则可能通过抑制促进觉醒的谷氨酸能或多巴胺能神经元来限制觉醒,帮助更好地入睡^[16]。行为学数据证实睡眠剥夺后的大鼠自发活动无论在速度、时间还是活动频率上均显著增加,提示兴奋性程度明显增加,而经过安寐丹干预后其自发活动中焦虑性表现改善。

为了进一步研究睡眠与神经元功能的内在机制,对神经元主要相关蛋白进行了检测。通过研究发现,睡眠剥夺大鼠GFAP表达升高,同时MAP2、Nestin、NeuN表达降低。其中,GFAP作为星形胶质细胞特异性标志物,参与细胞骨架形成,可以通过释放谷氨酸参与皮层神经元与睡眠环路的交流对话,对昼夜节律产生影响。之前有研究也报道创伤性脑损伤的睡眠限制小鼠在损伤部位附近显示GFAP表达增强^[17],说明GFAP升高可能与创伤、睡

眠剥夺等相关应激性变化有关。故推测GFAP的表达升高可能是由于睡眠剥夺激活星形胶质细胞,从而介导了谷氨酸参与的神经元环路影响了睡眠觉醒进程^[18-19],当然GFAP的上升也可能是神经元代偿应对睡眠剥夺引发的应激损伤,相关机制会在后续实验中进行验证。而MAP2、Nestin、NeuN表达的降低则证实了睡眠剥夺损伤了海马CA1神经元,因这三种蛋白参与维持神经元生理功能。如Nestin神经元主要分布于CA1、CA2和CA3区的锥体细胞层,作为神经元特异性标志物,与神经元分化和学习记忆等有关。MAP2作为神经元细胞骨架成分,能够维持神经系统发育、形成和再生,并可能在神经发育中对树突产生积极影响^[20]。而NeuN蛋白可以在中枢神经系统中与多种类型细胞发生特异性反应,在锥体层神经元和颗粒性神经元均有表达,调节神经细胞分化和神经系统发育^[21]。再结合病理形态学研究,进一步证实了睡眠剥夺导致大鼠海马神经元损伤,包括数量的减少,以及尼氏体、细胞器的破坏,确定了睡眠剥夺对于神经系统的发育及神经元分化产生的不利影响。以上的神经元异常变化在安寐丹干预后得到显著性改善,提示了安寐丹对于神经元结构及功能损伤具有一定的保护作用。

安寐丹作为清代医家陈士铎创制的古方,沿用至今,疗效明确。原方主要用于治疗气血亏虚之失眠症,以酸枣仁、茯神、甘草养心安神,丹参、当归、石菖蒲化痰活血,配伍生脉散补气养阴润燥,共同达到补气培元、养血安神的作用。现代研究也发现方中酸枣仁、人参等药物具有明显的镇静催眠、改善记忆以及神经保护作用^[22-23],所以该方是一首养心助眠、安神益智的代表方,值得深入研究。

综上,安寐丹能缓解睡眠剥夺大鼠自发活动频率,改善睡眠剥夺大鼠海马CA1区神经元结构损伤,并可能与降低海马GFAP蛋白表达,升高MAP2、Nestin、NeuN表达有关。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BANDYOPADHYAY A, SIGUA N L. What is sleep deprivation? [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(6): P11-P12.
- [2] BESEDOVSKY L, LANGE T, HAACK M. The sleep-immune crosstalk in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(3): 1325-1380.
- [3] HUANG T, MARIANI S, REDLINE S. Sleep irregularity and risk of cardiovascular events: the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(9): 991-999.
- [4] CAO Y, LI Q, LIU L, et al. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(9): 1282-1297.
- [5] MURATA Y, OKA A, ISEKI A, et al. Prolonged sleep deprivation decreases cell proliferation and immature newborn neurons in both dorsal and ventral hippocampus of male rats [J]. *Neurosci Res*, 2017, 131: 45-51.
- [6] COLLINS B, PIERRE-FERRER S, MUHEIM C, et al. Circadian VIPergic neurons of the suprachiasmatic nuclei sculpt the sleep-wake cycle [J]. *Neuron*, 2020, 108: 486-499.
- [7] LOMBARDI F, GÓMEZ-EXTREMERA M, BERNAOLA-GALVÁN P, et al. Critical dynamics and coupling in bursts of cortical rhythms indicate non-homeostatic mechanism for sleep-stage transitions and dual role of VLPO neurons in both sleep and wake [J]. *J Neurosci*, 2019, 40(1): 1278-1219.
- [8] OH J, PETERSEN C, WALSH C M, et al. The role of co-neurotransmitters in sleep and wake regulation [J]. *Mol Psychiatry*, 2018, 24(9): 1284-1295.
- [9] 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.
- [10] 谢光璟, 徐波, 黄攀攀, 等. 安寐丹通过线粒体介导的海马神经细胞凋亡改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆水平 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(24): 38-44.
- [11] FERREIRA L B, OLIVEIRA S L, RAYA J, et al. Bombesin administration impairs memory and does not reverse memory deficit caused by sleep deprivation [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 331: 20-24.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学(精) [M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [13] AAB A, ABAP B, MJR A, et al. Sleep and health among collegiate student athletes - sciencedirect [J]. *Chest*, 2019, 156(6): 1234-1245.
- [14] HASHIMOTO K, ANDRIANA B B, MATSUYOSHI H, et al. Discrimination analysis of excitatory and inhibitory neurons using Raman spectroscopy [J]. *Analyst*, 2018, 143(12): 2889-2894.
- [15] PENG W, WU Z, SONG K, et al. Regulation of sleep homeostasis mediator adenosine by basal forebrain glutamatergic neurons [J]. *Science*, 369, 6508: eabb0556.
- [16] XIAO Y, WEN L, YING M, et al. GABA and glutamate neurons in the VTA regulate sleep and wakefulness [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(1): 106-119.
- [17] TAPP Z M, KUMAR J E, WITCHER K G, et al. Sleep disruption exacerbates and prolongs the inflammatory response to traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2020, 37(16): 1829-1843.
- [18] MOLDAVAN M, CRAVETCHI O, WILLIAMS M, et al. Localization and expression of GABA transporters in the suprachiasmatic nucleus [J]. *Eur J Neurosci*, 2015, 42(12): 3018-3032.
- [19] BRANCACCIO M, PATTON A P, CHESHAM J E, et al. Astrocytes control circadian timekeeping in the suprachiasmatic nucleus via Glutamatergic signaling [J]. *Neuron*, 2017, 93(6): 1420-1435.
- [20] TEODOROF-DIEDRICH C, SPECTOR S A. Human immunodeficiency virus type 1 and methamphetamine-mediated mitochondrial damage and neuronal degeneration in human neurons [J]. *J Virol*, 94(20): e00924-20.
- [21] KIM K, ADELSTEIN R, KAWAMOTO S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 31052-31061.
- [22] WANG L E, CUI X Y, CUI S Y, et al. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Semen Ziziphi spinosae*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT (1A) receptors [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(6): 404-409.
- [23] HUANG X, LI N, PU Y, et al. Neuroprotective effects of ginseng phytochemicals: recent perspectives [J]. *Molecules*, 2019, 24(16): 2939-2959.

[责任编辑 周冰冰]