

· 安寐丹改善睡眠剥夺作用机制研究专题 ·

[编者按] 睡眠障碍已经成为全球关注的公共社会问题,且发病率呈现出不断上升的趋势,不仅严重影响患者生活质量和工作效率,长期的睡眠不足还是罹患阿尔茨海默病、抑郁症、代谢综合征等疾病的风险因素。针对睡眠障碍,目前西药治疗主要以镇静、安眠为主,近期疗效较好,但无法改善患者的睡眠结构,长期服用可产生耐药性或成瘾性。中医将睡眠障碍归于“不寐”范畴,强调从整体论治,具有多法联用、副作用小、容易坚持的优势。课题组负责人王平教授为国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项——“慢性失眠中医诊疗新方案及机制研究”首席科学家,带领团队前期围绕安神方剂开展了系列研究,发现安神方剂可以通过调节肠道菌群、能量代谢和昼夜节律等途径,改善睡眠质量,提高学习记忆,为深入研究安神方剂的内在机制奠定了良好的基础。本专题依托国家重点研发计划专项,进一步探讨安寐丹从改善神经元功能、昼夜节律紊乱等发挥作用的机制,将为睡眠障碍性疾病的研究提供新思路和新方法,有助于疾病防治关口前移。

安寐丹通过调控星形胶质细胞活性改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆能力

谭云霞¹, 纪可¹, 刘福贵¹, 方洁^{1,2}, 刘玲^{1,2*}

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北省中医院, 武汉 430061)

[摘要] 目的:探讨安寐丹对睡眠剥夺模型大鼠学习记忆能力的影响并探讨机制。方法:50只SD大鼠随机分为空白组、模型组、安寐丹低、高剂量组(4.55、18.18 g·kg⁻¹·d⁻¹)和艾司唑仑组(0.09 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组10只,用自制的睡眠剥夺箱进行持续性睡眠剥夺21 d。大鼠的学习记忆水平以Morris水迷宫来检测,免疫荧光检测大鼠海马N-myc下游调控基因2(NDRG2)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性细胞表达量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测海马区NDRG2、兴奋性谷氨酸转运体-1(GLT-1)、N-甲基-D-天(门)冬氨酸(NMDA)受体2个调节亚基GluNR2A、GluNR2B mRNA表达。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马NDRG2、GLT-1蛋白表达。结果:与空白组比较,模型组大鼠上平台的潜伏期、游泳总路程显著增加,穿越目标象限总路程、穿越目标象限时间、穿越平台次数显著减少($P<0.01$),海马CA1区NDRG2、GFAP阳性细胞数显著增加($P<0.01$),NDRG2、GluNR2B mRNA相对表达量增加,GLT-1、GluNR2A mRNA相对表达量下降,NDRG2蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),而GLT-1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,安寐丹低、高剂量组大鼠的学习记忆能力显著改善($P<0.01$),大鼠海马NDRG2、GFAP阳性细胞数显著减少($P<0.01$),NDRG2、GluNR2B mRNA相对表达量明显降低,GLT-1、GluNR2A mRNA相对表达量升高,NDRG2蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),而GLT-1蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。结论:安寐丹可改善睡眠剥夺大鼠的学习记忆能力,其机制可能与调控星形胶质细胞活性影响脑内神经递质水平及突触可塑性有关。

[关键词] 安寐丹; 睡眠剥夺; 学习记忆; 星形胶质细胞; 兴奋性毒性

[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)07-0018-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220202

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211122.1932.003.html>

[网络出版日期] 2021-11-23 10:56

Anmeidan Improves Learning and Memory Ability of Sleep-deprived Rats by Regulating Astrocyte Activity

TAN Yun-xia¹, JI Ke¹, LIU Fu-gui¹, FANG Jie^{1,2}, LIU Ling^{1,2*}

[收稿日期] 2021-09-27

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1705602)

[第一作者] 谭云霞,在读博士,从事中医药防治脑病研究,Tel:027-68890123,E-mail:13697186352@163.com

[通信作者] *刘玲,博士,教授、主任医师,博士生导师,从事中西医结合治疗神经及精神系统疾病的研究,Tel:027-68890123,E-mail:ling-liu07199@aliyun.com

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Anmeidan (AMD) on the learning and memory ability of sleep-deprived rats and the mechanism. **Method:** A total of 50 SD rats were randomized into control group, model group, low-dose AMD group ($4.55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), high-dose AMD group ($18.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and estazolam group ($0.09 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Insomnia was induced in rats with the self-made sleep deprivation box (21 days). The learning and memory ability of rats was measured by Morris water maze. Immunofluorescence method was employed to detect the number of cells expressing N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hippocampus of rats, real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) to determine the mRNA expression of hippocampal NDRG2, glial glutamate transporter-1 (GLT-1), and GluNR2A and GluNR2B *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor subunits, and Western blot to examine the protein expression of NDRG2 and GLT-1 in hippocampus. **Result:** Compared with control group, the model group showed increase in the latency to reach the platform and total swimming distance, significant decrease in the total distance moved in the target quadrant, time in target quadrant, and times of crossing the platform ($P < 0.01$), rise in the number of cells expressing NDRG2 and GFAP in the hippocampal CA1 region ($P < 0.01$) and the mRNA level of NDRG2 and GluNR2B, reduction in the mRNA level of GLT-1 and GluNR2A, elevation in NDRG2 protein expression ($P < 0.01$), and decrease in GLT-1 protein expression ($P < 0.01$). In contrast to the model group, low-dose and high-dose AMD improved the learning and memory levels of sleep-deprived rats ($P < 0.01$), reduced the number of cells expressing NDRG2 and GFAP ($P < 0.01$), significantly decreased the mRNA expression of NDRG2 and GluNR2B, increased the mRNA expression of GLT-1 and GluNR2A, reduced NDRG2 protein level ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and raised GLT-1 protein level ($P < 0.01$). **Conclusion:** AMD can improve the learning and memory ability of sleep-deprived rats. The mechanism is the likelihood that it regulates astrocyte activity, thereby affecting the neurotransmitter level and synaptic plasticity in the brain.

[Keywords] Anmeidan; sleep deprivation; learning and memory; astrocytes; excitatory toxicity

失眠是一种常见的临床症状,以睡眠难以启动或难以维持为主要特点,并伴有烦躁、疲劳、记忆障碍等症状^[1]。研究结果显示,睡眠剥夺严重影响人的认知功能、专注力、警觉性及情绪调节^[2-3]。随着睡眠剥夺持续时间的延长,长时记忆中编码新记忆的能力也会受到影响^[4]。睡眠-觉醒的调节受到中枢神经系统的调节,越来越多的研究发现星形胶质细胞、小胶质细胞等非神经元细胞在睡眠-觉醒调节中也发挥着重要作用,MOLDAVAN等^[5]的研究显示,星形胶质细胞可以通过释放谷氨酸调节皮层睡眠环路,对昼夜节律产生影响。目前,中医药在失眠治疗中的研究越来越受到关注,但其对星形胶质细胞活性的影响及机制尚不明确,深入研究神经网络在睡眠及睡眠障碍中发挥的作用,有助于为睡眠障碍提供新的治疗靶点。

安寐丹出自《石室秘录》,主治怔忡不寐,是治疗失眠的经典名方,团队前期研究发现安寐丹可改

善睡眠剥夺大鼠失眠症状和学习记忆能力,并对其量效关系做了相关研究^[6-7]。本研究拟从星形胶质细胞角度探讨安寐丹对睡眠剥夺大鼠的学习记忆水平及大鼠海马中 N-myc 下游调控基因 2 (NDRG2)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP) mRNA 和蛋白表达的影响,为临床研究提供基础数据。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠, SPF 级, 50 只, 体质量 200~220 g, 购于辽宁省实验动物质量检测中心, 合格证号 1107262011001043, 许可证号 SYXK(鄂) 2017-0067。恒温、恒湿饲养, 实验在国家中医药管理局老年性痴呆重点研究室进行, 严格遵照实验动物管理与保护相关准则进行操作。本实验获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 安寐丹的药物组成是生酸枣仁、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, 于湖北中医药大

学附属黄家湖医院购买,经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定符合药用标准,通过煎煮、过滤浓缩至1:1比例(100%浓度备用)的中药水煎剂^[6-7],冷却后存储于4℃冰箱备用;艾司唑仑(济川药业集团有限公司,批号H4302190);RNA提取试剂盒(武汉谷歌生物技术有限公司,批号1800714),反转录(RT)试剂盒(日本TaKaRa公司,批号RS4501),聚山梨酯-20(Tween-20,山东嘉颖化工科技有限公司,批号为20170918),兔抗NDRG2、兴奋性谷氨酸转运体-1(GLT-1)多克隆抗体、内参抗体 β -肌动蛋白(β -actin)、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔、HRP标记山羊抗大鼠(Servicebio公司,批号分别为GB111833、GB11096、GB12001、GB23303、GB23302)。

1.3 仪器 自制睡眠剥夺箱,ZH0065型Morris水迷宫视频分析系统(安徽正华生物仪器设备有限公司),MA-6000型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real time-PCR)仪(加拿大Molarray公司),ABI 2720型热循环仪(反转录PCR仪,美国Bio-Rad公司),IX71-A12FL/PH型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司),MLS-3781-PC型高压蒸汽灭菌锅(日本Panasonic公司),DYCZ-24KS型蛋白电泳仪和转膜仪(北京六一生物科技股份有限公司),WGXYQ0004型封口机(Servicebio公司),V370型扫描仪(日本Epson公司),6300型化学发光仪(得力集团有限公司),D3024R型台式高速冷冻离心机(Dragonlab公司)。

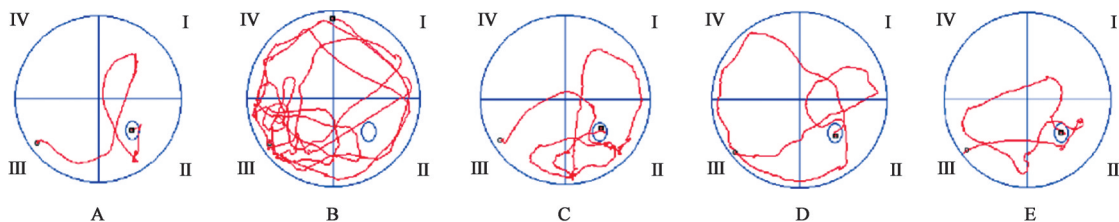
2 方法

2.1 动物模型制备 本研究通过多平台水环境法建立大鼠睡眠剥夺模型^[7-8],实验室自制睡眠剥夺箱,长75 cm×宽50 cm×高36 cm,箱内放置6个连体直径8 cm×高8 cm金属平台,平台间隔15 cm。实验过程中在箱内注满水,保持水面低于平台1 cm,水温22~26℃,箱顶盖上铁丝网,网上放置充足饲料和水。将大鼠放在圆形平台上,5只/每箱,大鼠可以

自由摄食、饮水、站立、转身,保持了大鼠群体的稳定性^[9]。当大鼠进入睡眠状态后因全身肌肉张力下降触碰水面惊醒,从而剥夺REM睡眠。环境对照箱与睡眠剥夺箱相似,但在金属平台上方放置铁丝网,保证大鼠自由活动,正常睡眠而不掉入水中。每天定时将大鼠放回饲养笼内休息4 h,持续睡眠剥夺14 d^[7]。利用自主活动分析仪记录大鼠的自主活动情况,将自发活动视频分析系统设置为12 h黑暗/12 h光照光暗循环^[10]。每天清洁睡眠剥夺箱,更换饲料及饮水。

2.2 分组与给药 大鼠被随机分为空白组,模型组,西药组(艾司唑仑)和安寐丹低、高剂量组,各10只,睡眠剥夺2周后开始给药,根据前期的临床观察和课题组的前期研究成果^[6],本研究中西药组给予艾司唑仑 $0.09 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,安寐丹低、高剂量组(4.55 、 $18.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)给予不同剂量的中药水煎剂灌胃,模型组、空白组给予等容0.9%NaCl灌胃,每天1次,连续2周。记录大鼠的自主活动情况,经睡眠剥夺后,大鼠饮食、饮水量显著增多,活动增多,白天也活动不停,躁动不安,自身白昼睡眠的昼夜节律消失,说明造模成功^[11]。

2.3 Morris水迷宫检测 定位航行实验:水迷宫分为4个象限,其中注满水,将圆形平台放于水迷宫的任意象限,水面高出平台约3 cm。分别从4个象限正中将大鼠贴壁放入水中,记录90 s内大鼠找到圆形平台的游泳时间、游泳路程和游泳轨迹,超时未能找到平台的大鼠,则将其引导至平台停留15 s。给药结束的第2天开始对各组大鼠进行行为学检测,连续5 d获得性训练,每天训练1次,第6天休息,第7天上午进行定位航行实验。空间探索实验:第7天下午撤掉圆形平台,各组大鼠于水迷宫的同一位置被放入水中,记录大鼠90 s初次穿越平台时间、穿越平台次数及目标象限停留时间。用Morris水迷宫图像采集分析系统完成数据采集,实验全程保持安静,大鼠的行动轨迹见图1和图2。



注:A. 空白组;B. 模型组;C. 艾司唑仑组;D. 安寐丹低剂量组;E. 安寐丹高剂量组(图2-图4同)

图1 定位航行实验大鼠行动轨迹

Fig. 1 Action track map of rats in positioning navigation experiment

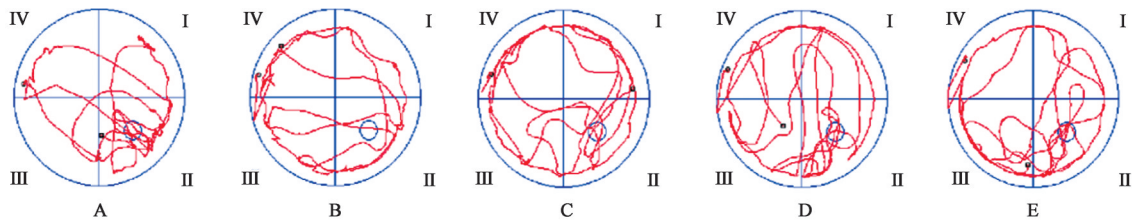


图2 空间探索实验大鼠行动轨迹

Fig. 2 Action trajectory plots of rats in spatially explored experiment

2.4 样本采集 取材前1 d给大鼠禁食,不禁水,次日10%水合氯醛麻醉,在冰上分离出皮质、海马组织,免疫荧光标本需用4%的多聚甲醛溶液固定,其余标本标注后存储于-80 °C冰箱备用。

2.5 免疫荧光检测大鼠海马 NDRG2、GFAP 阳性细胞表达 取出固定的脑组织,制备组织切片,完成抗原修复后封闭 2 h;去除封闭液,滴加 NDRG2 (1:100)、GFAP 抗体稀释液(1:100)孵育过夜;次日复温后,用 TBST 洗涤 1 次,5 min,晾干;荧光二抗(1:200),避光操作,37 °C 孵育 1 h, TBS 缓冲液洗涤 3 次,5 min/次;加 DAPI 复染细胞核,缓冲液 TBS 洗涤 3 次,5 min/次;在荧光显微镜下观察,完成采图,并利用 Image J 软件对荧光标记的细胞进行统计分析。

2.6 Real-time PCR 检测 NDRG2、GLT-1、GluNR2A、GluNR2B mRNA 的表达 根据 RNA 提取试剂盒操作步骤,完成海马组织中总 RNA 的提取,逆转录为 cDNA 后继续扩增,步骤:95 °C 预变性 10 min,1 个循环,95 °C 变性 15 s,39 个循环,58 °C 退火 60 s,65 °C 延伸 5 s。将 GAPDH 作为内参,用 PCR 仪检测目的基因的相对表达水平,系统自动计算 C_t 值,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因的表达水平,运用 Prime 5 软件设计引物,利用 Blast 检测引物扩增后序列和基因序列的匹配程度,引物由武汉谷歌生物技术有限公司代为合成,见表 1。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 NDRG2、GLT-1 蛋白的表达 取出冻存的大鼠海马组织,根据组织块的重量加相应体积的裂解液(1:9),并加入 PMSF 1 μ L 于裂解液 100 μ L 中(浓度为 100 mmol·L⁻¹),在冰上匀浆,制备蛋白样品。依 Western blot 步骤完成后续操作,其中,NDRG2、GLT-1 一抗的稀释倍数分别为 1:1 000、1:500,NDRG2、GLT-1 二抗的稀释倍数为 1:5 000。 β -actin 蛋白作为内参,蛋白条带的灰度值用 Image J 软件测定,计算目的蛋白与 β -actin 的比值,用于反映目的蛋白的相对表达水平。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
NDRG2	上游 AGAACTTCGTGCGGGTCCAT	163
	下游 GCTCCAACGCCAACTCCAAT	
GLT-1	上游 GAGCCAAAGCACCGAAACCT	114
	下游 AAGCAGCCC GCCACATACT	
GluNR2A	上游 CTCCTCACAGACTTTTATCCCATC	201
	下游 AAGTCTCGGTAGCCAGGGAAG	
GluNR2B	上游 TGGCATCAGTGTATGGTATCTC	127
	下游 GACAGCCACCGCAGAAACA	

2.8 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件统计分析数据,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐时,组间比较采用最小显著性差异法(LSD),方差不齐时,组间比较采用 Dunnett's T3 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义,采用 Graph Pad Prism 8 绘制图片。

3 结果

3.1 对睡眠剥夺大鼠自主活动的影响 光照环境中,与空白组比较,模型组大鼠的活动路程明显增加($P<0.01$),与模型组比较,艾司唑仑组和安寐丹低、高剂量组大鼠活动路程明显减少($P<0.01$)。黑暗环境中,与空白组比较,模型组大鼠的活动路程增加($P<0.05$),与模型组比较,安寐丹低剂量组大鼠活动路程减少($P<0.05$),艾司唑仑组和安寐丹高剂量组大鼠活动路程显著减少($P<0.01$)。见表 2。光照环境中,与空白组比较,模型组大鼠的活动时间显著增加($P<0.01$);与模型组比较,艾司唑仑组和安寐丹低、高剂量组大鼠活动时间有不同程度显著减少($P<0.05$)。黑暗环境中,6:00 左右模型组大鼠的活动时间较空白组显著增加($P<0.01$);与模型组比较,艾司唑仑组和安寐丹低、高剂量组大鼠活动时间有不同程度减少($P<0.05$)。见表 3。

表 2 安寐丹对睡眠剥夺大鼠黑暗/光照环境下自主活动路程的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Anmeidan (AMD) on autonomous activities distance of traveled independently in dark/light environments of sleep deprived rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) cm

组别	剂量/g·kg ⁻¹	黑暗环境活动路程		光照环境活动路程	
		0:00	6:00	12:00	18:00
空白组		908.62±82.55	596.80±127.00	585.85±61.06	608.08±87.91
模型组		1 042.80±272.40 ¹⁾	823.55±123.69 ²⁾	801.52±91.72 ²⁾	855.84±117.48 ²⁾
艾司唑仑组	0.9×10 ⁻⁴	743.34±101.2 ⁴⁾	637.00±134.01 ⁴⁾	686.50±107.64 ⁴⁾	692.05±165.82 ⁴⁾
安寐丹低剂量组	4.55	815.14±275.80 ³⁾	684.98±86.50 ³⁾	546.66±145.25 ⁴⁾	715.44±87.48 ⁴⁾
安寐丹高剂量组	18.18	715.695±163.30 ⁴⁾	604.50±159.77 ⁴⁾	577.76±96.44 ⁴⁾	692.13±92.04 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 3-表 8 同)

表 3 安寐丹对睡眠剥夺大鼠黑暗/光照环境下自主活动时间的的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of AMD on autonomous activities time of rats in dark/light environments of sleep deprived rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) s

组别	剂量/g·kg ⁻¹	黑暗环境活动时间		光照环境活动时间	
		0:00	6:00	12:00	18:00
空白组		114.19±3.20	100.21±8.94	89.81±3.73	97.45±5.42
模型组		119.50±1.07	110.41±4.23 ²⁾	106.01±4.00 ²⁾	111.71±3.23 ²⁾
艾司唑仑组	0.9×10 ⁻⁴	105.37±7.57 ⁴⁾	103.20±5.64 ³⁾	94.12±5.75 ⁴⁾	105.03±6.70 ³⁾
安寐丹低剂量组	4.55	107.50±6.73 ⁴⁾	102.65±8.60 ³⁾	95.79±6.82 ⁴⁾	105.62±4.74 ³⁾
安寐丹高剂量组	18.18	104.54±7.02 ⁴⁾	103.89±7.96 ³⁾	94.88±8.95 ⁴⁾	104.12±5.76 ⁴⁾

3.2 对睡眠剥夺大鼠学习记忆能力的影响 与空白组比较,模型组大鼠上平台的潜伏期延长,游泳总路程显著增加(P<0.01),大鼠穿越平台次数减少,目标象限运动时间减少,穿越目标象限总路程显著减少(P<0.01);与模型组比较,艾司唑仑组和安寐丹低、高剂量组的大鼠上平台的潜伏期和游泳总路程均显著缩短(P<0.01),艾司唑仑组和安寐丹低、高剂量组的大鼠穿越平台次数、目标象限运动时间均增加,穿越目标象限总路程明显延长(P<0.05, P<0.01)。见表 4 和表 5。

3.3 对睡眠剥夺大鼠海马中 NDRG2、GFAP 表达水平的影响 免疫荧光实验结果显示,与空白组比较,模型组大鼠海马 CA1 区 NDRG2(绿色荧光)、GFAP(红色荧光)阳性细胞数量显著增加(P<0.01);

表 4 安寐丹对睡眠剥夺大鼠上平台潜伏期及游泳总路程的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of AMD on positioning experiment platform latency and total swimming journey in sleep deprived rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	平台潜伏期/s	游泳总路程/cm
空白组		25.41±17.77	392.89±144.35
模型组		59.34±11.40 ²⁾	809.01±155.26 ²⁾
艾司唑仑组	0.9×10 ⁻⁴	35.43±16.35 ⁴⁾	577.71±105.50 ⁴⁾
安寐丹低剂量组	4.55	38.07±17.76 ⁴⁾	462.99±163.40 ⁴⁾
安寐丹高剂量组	18.18	31.16±14.27 ⁴⁾	456.79±106.45 ⁴⁾

与模型组比较,艾司唑仑组和安寐丹低、高剂量组大鼠海马 CA1 区 NDRG2 和 GFAP 阳性细胞数量均显著减少(P<0.01)。见图 3 和表 6。

表 5 安寐丹对大鼠空间探索能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of AMD on space exploration experiment in sleep deprived rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越平台数/次	目标象限时间/s	目标象限总路程/cm
空白组		4.80±1.69	27.77±5.46	381.23±91.23
模型组		1.70±1.16 ²⁾	20.99±6.71 ²⁾	285.63±73.64 ¹⁾
艾司唑仑组	0.9×10 ⁻⁴	3.40±1.51 ⁴⁾	29.83±6.76 ³⁾	392.66±103.35 ³⁾
安寐丹低剂量组	4.55	3.60±0.97 ⁴⁾	29.21±8.98 ³⁾	403.95±122.12 ³⁾
安寐丹高剂量组	18.18	4.60±1.17 ⁴⁾	28.65±6.32 ⁴⁾	386.12±46.75 ⁴⁾

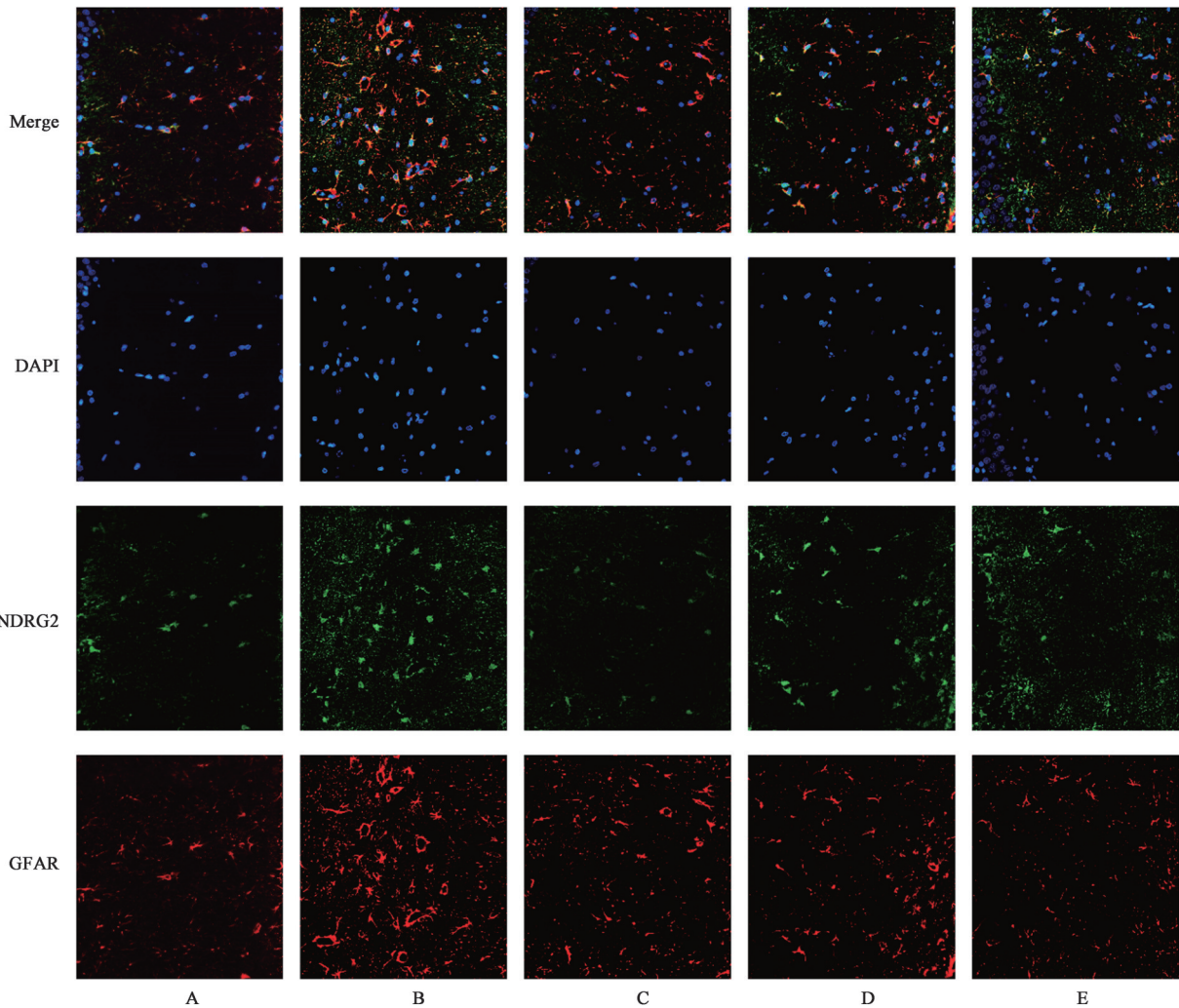


图3 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马NDRG2、GFAP表达水平的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of AMD on NDRG2, GFAP protein in hippocampus of sleep deprived rats (IF, ×400)

表6 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马NDRG2/GFAP共定位荧光强度的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of AMD on hippocampus NDRG2/GFAP fluorescence intensity in sleep deprived rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NDRG2/GFAP共定位 荧光强度
空白组		39.966±5.887
模型组		82.326±2.260 ²⁾
艾司唑仑组	0.9×10 ⁻⁴	64.941±5.145 ⁴⁾
安寐丹低剂量组	4.55	67.687±4.074 ⁴⁾
安寐丹高剂量组	18.18	56.877±4.831 ⁴⁾

3.4 对睡眠剥夺大鼠海马NDRG2、GLT-1、GluNR2A、GluNR2B mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马中NDRG2、GluNR2B mRNA相对表达量显著升高($P<0.01$),而GLT-1、GluNR2A mRNA相对表达量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,艾司唑仑和安寐丹低、高剂量组大鼠

海马NDRG2、GluNR2B mRNA相对表达量均显著降低,GLT-1、GluNR2A mRNA相对表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表7。

3.5 对睡眠剥夺大鼠海马NDRG2、GLT-1蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马NDRG2蛋白表达水平显著升高,GLT-1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,艾司唑仑组和安寐丹低、高剂量组大鼠海马NDRG2蛋白表达水平显著降低,GLT-1蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。见图4和表8。

4 讨论

睡眠是大脑的基本生理功能,能促进记忆的形成,睡眠剥夺对学习记忆、注意力、执行力等认知功能造成损害^[12]。动物的昼夜活动变化,反映了昼夜节律变化和中枢神经系统的兴奋状态,本研究结果显示,睡眠剥夺后,无论是黑暗环境还是光照环境,模型组大鼠的活动路程和活动时间较空白组均有

表7 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马NDRG2、GLT-1、GluNR2A、GluNR2B mRNA相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of AMD on relative expression of NDRG2, GLT-1, GluNR2A, GluNR2B mRNA in hippocampus of sleep deprived rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NDRG2	GLT-1	GluNR2A	GluNR2B
空白组		1.01±0.06	1.00±0.04	1.00±0.05	1.00±0.04
模型组		1.58±0.17 ²⁾	0.34±0.07 ²⁾	0.31±0.01 ²⁾	2.03±0.20 ²⁾
艾司唑仑组	0.9×10 ⁻⁴	1.30±0.09 ⁴⁾	0.67±0.16 ⁴⁾	0.46±0.04 ³⁾	1.91±0.25 ³⁾
安寐丹低剂量组	4.55	1.23±0.20 ⁴⁾	0.76±0.14 ⁴⁾	0.50±0.08 ⁴⁾	1.76±0.35 ³⁾
安寐丹高剂量组	18.18	1.30±0.22 ⁴⁾	0.80±0.13 ⁴⁾	0.57±0.04 ⁴⁾	1.12±0.14 ⁴⁾

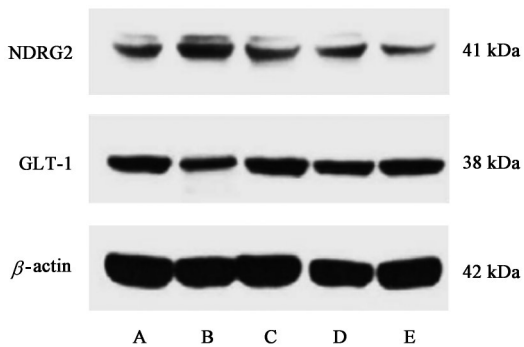


图4 各组大鼠海马NDRG2、GLT-1蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of NDRG2 and GLT-1 protein expression in hippocampus of rats in each group

表8 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马NDRG2、GLT-1蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of AMD on hippocampus NDRG2, GLT-1 gray value in sleep deprived rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NDRG2/ β -actin	GLT-1/ β -actin
空白组		0.305±0.075	0.650±0.230
模型组		0.615±0.175 ²⁾	0.345±0.095 ²⁾
艾司唑仑组	0.9×10 ⁻⁴	0.355±0.075 ⁴⁾	0.470±0.140 ⁴⁾
安寐丹低剂量组	4.55	0.370±0.080 ⁴⁾	0.485±0.145 ⁴⁾
安寐丹高剂量组	18.18	0.360±0.081 ⁴⁾	0.501±0.141 ⁴⁾

不同程度的增加,提示睡眠剥夺大鼠兴奋性增加,昼夜节律紊乱。Glu是中枢主要的兴奋性递质,GABA是中枢重要的抑制性递质,研究显示,Glu、GABA在星形胶质细胞调控生物节律过程中发挥重要作用,星形胶质细胞可以通过释放谷氨酸调节皮层睡眠环路,对昼夜节律产生影响^[5,13-14]。Glu通过激活N-甲基-D-天(门)冬氨酸(NMDA)受体发挥作用,研究发现NMDAR水平的变化可影响突触可塑性和记忆形成,其中尤以NMDAR的两个调节亚基Glu NR2A和Glu NR2B之间的比率平衡,在突触可塑性中发挥着重要作用^[15-16]。本研究观察了大鼠的自主活动情况,并利用Morris水迷宫实验检测了大鼠的学习记忆能力,结果显示睡眠剥夺后,大鼠

的自主活动明显增加,白天也表现出明显的躁动,昼夜节律消失,并且出现了明显的学习记忆功能障碍。安寐丹干预后,大鼠的自主活动时间不同程度减少,学习记忆能力得以改善^[6]。另外,本研究结果发现,睡眠剥夺大鼠海马内GluNR2B mRNA表达量升高,GluNR2A mRNA表达量则降低,GluNR2A/GluNR2B比率失衡,安寐丹干预后,调节了GluNR2A与GluNR2B之间的平衡。

研究表明,兴奋性毒性与阿尔茨海默病^[17]、肌萎缩侧索硬化症、帕金森病等多种神经系统疾病相关。GLT-1在中枢神经系统中主要分布于星形胶质细胞,GLT-1的失调可能造成谷氨酸兴奋性毒性作用,产生相关的神经病理表现。星形胶质细胞可通过GLT-1调节谷氨酸的扩散和溢出,调控突触内外谷氨酸受体的功能,促进突触可塑性^[18]。N-myc是Myc原癌基因家族的成员,在神经发生过程中负性调控靶基因的表达,其下游NDRG2在星形胶质细胞中特异性表达,研究发现NDRG2在皮层中表达较高,而GFAP在海马中表达相对较高^[19]。NDRG2含量的变化可以反映星形胶质细胞的活性变化,NDRG2可以抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)的表达,从而减少GLT-1的激活。研究表明,NDRG2的缺失减轻了反应性星形胶质细胞增生和炎症反应,对星形胶质细胞的形态具有调控作用,且显著降低了GFAP蛋白的表达^[20-21]。

安寐丹是治疗失眠的经典名方,临床应用中发现安寐丹可有效改善患者的失眠症状^[22]。其君药酸枣仁可有效地逆转睡眠剥夺大鼠机体的能量代谢和氨基酸代谢,具有较好的镇静催眠、改善焦虑状态和认知功能的作用^[23-24],全方配伍人参、麦冬、茯神、丹参及石菖蒲等药,起到了益气养阴、宁心安神及化痰开窍等作用,故对改善失眠、促进记忆恢复都有一定作用。本研究结果显示,安寐丹改善了睡眠剥夺大鼠的学习记忆能力,并调控了GluNR2A与GluNR2B的平衡,抑制了NDRG2 mRNA和蛋白

的表达,升高了GLT-1 mRNA和蛋白的表达水平。

综上所述,安寐丹可改善睡眠剥夺大鼠的自主活动和学习记忆能力,其作用机制可能与调控星形胶质细胞的活性有关,但星形胶质细胞、NMDA受体及其亚基在昼夜节律和认知功能调节中的作用机制仍有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BUYSSE D J. Insomnia[J]. JAMA, 2013, 309(7): 706-716.

[2] MCCARTER S J, ST LOUIS E K, BOEVE B F. Sleep disturbances in frontotemporal dementia[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2016, 16(9): 85.

[3] KUSZTOR A, RAUD L, JUEL B E, et al. Sleep deprivation differentially affects subcomponents of cognitive control[J]. Sleep, 2019, 42(4): 75-83.

[4] COUSINS J N, FEMANDEZ G. The impact of sleep deprivation on declarative memory[J]. Prog Brain Res, 2019, 246(5): 27-53.

[5] 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.

[6] 徐波,夏婧,蔡铭,等. 安寐丹对不同周期睡眠剥夺模型大鼠昼夜节律、学习记忆及食欲素的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1677-1682.

[7] 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.

[8] FERREIRA L B T, OLIVEIRA S L B, RAYA J, et al. Bombesin administration impairs memory and does not reverse memory deficit caused by sleep deprivation[J]. Behav Brain Res, 2017, 331(7): 20-24.

[9] 黄建欧,赵忠新. 大鼠睡眠剥夺方法的研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2004(3): 229-231.

[10] 薄文集,龙清华,王平. 酸枣仁汤对6月龄APP/PS1双转基因痴呆小鼠昼夜节律及视交叉上核节律基因mRNA表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 3960-3963.

[11] 高家荣,季文博,姜辉,等. 酸枣仁-五味子药对醇水双提物对PCPA致失眠大鼠氨基酸类神经递质的影响[J]. 中药材, 2013, 36(10): 1635-1639.

[12] 马哲,王平,游秋云. 睡眠及睡眠剥夺与学习记忆的

相关性探讨[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(4): 995-997.

[13] POSKANZER K E, YUSTE R. Astrocytes regulate cortical state switching *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016, 113(19): E2675-E2684.

[14] 王静,侯婉婷,秦雪梅,等. 昼夜节律的相关研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(13): 3240-3248.

[15] BAEZ M V, CERCATO M C, JERUSALINSKY D A. NMDA receptor subunits change after synaptic plasticity induction and learning and memory acquisition[J]. Neural Plast, 2018, 5(9): 3011-3048.

[16] HUANG Y, SHEN W, SU J, et al. Modulating the balance of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors shows positive effects against amyloid- β -induced neurotoxicity[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 57(3): 885-897.

[17] GARCIA-ESPARCIA P, DIAZ-LUCENA D, AINCIBURU M, et al. Glutamate transporter GLT1 expression in Alzheimer disease and dementia with lewy bodies[J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10(3): 122.

[18] 凌鹏,李月月,钱恒,等. 星形胶质细胞对兴奋性氨基酸神经递质的调控及与癫痫的关系[J]. 神经药理学报, 2015, 5(2): 46-53.

[19] 张增利,马玉龙,邓友良,等. NDRG2与GFAP在不同脑区星形胶质细胞的表达与分布[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(10): 1834-1837, 1869.

[20] TAKARADA-IEMATA M, KEZUKA D, TAKEICHI T, et al. Deletion of *N-myc* downstream-regulated gene 2 attenuates reactive astrogliosis and inflammatory response in a mouse model of cortical stab injury[J]. J Neurochem, 2014, 130(3): 374-387.

[21] ZHANG Z, MA Z, ZOU W, et al. *N-myc* downstream-regulated gene 2 controls astrocyte morphology via Rho-GTPase signaling[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 20847-20858.

[22] 徐波,刘保延,王平. 基于真实世界挖掘王平辨治失眠经验[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(7): 944-946, 970.

[23] 李旭,和建政,陈彻,等. 酸枣仁镇静催眠活性成分及药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 40(2): 31-39.

[24] 姚文强,赵宇浩,郑亚威,等. 酸枣仁类中成药治疗原发性失眠症的网状Meta分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(17): 4541-4554.

[责任编辑 周冰冰]