

· 经典名方 ·

## 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

谢光璟, 徐波, 黄攀攀, 王平\*  
(湖北中医药大学基础医学院, 武汉 430065)

**[摘要]** 目的:探讨安寐丹通过线粒体介导海马神经细胞凋亡对睡眠剥夺大鼠学习记忆的影响。方法:48只SD大鼠随机分为正常组、模型组、安寐丹低、中、高剂量(4.86, 9.72, 19.44 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组和艾司唑仑组(0.1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),每组8只。通过自制睡眠剥夺箱进行持续性睡眠剥夺14 d。以Morris水迷宫检测大鼠的学习记忆水平,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测海马组织B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)的含量。透射电镜观察海马区神经元线粒体形态结构,免疫荧光和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分别检测海马区细胞色素C(Cyt-C),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白及Bcl-2,Bax mRNA表达。结果:与正常组比较,模型组上平台潜伏期、游泳总路程延长,初次到达平台时间延长,跨越平台次数减少,目标象限时间显著降低( $P<0.01$ ),Bcl-2蛋白及mRNA水平下降,Bax蛋白及mRNA水平显著升高( $P<0.01$ ),线粒体结构破坏,嵴断裂,肿胀变形;Cyt-C,Caspase-3蛋白及mRNA表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量组明显改善SD大鼠空间探索和定位航行水平( $P<0.05, P<0.01$ ),Bcl-2蛋白及mRNA水平升高,Bax蛋白及mRNA水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );线粒体损伤改善,水肿减轻;Cyt-C,Caspase-3蛋白及mRNA表达显著下降( $P<0.01$ )。结论:安寐丹能够改善睡眠剥夺大鼠学习记忆水平,其作用与线粒体介导的海马神经细胞凋亡,降低Cyt-C,Caspase-3等蛋白表达相关。

**[关键词]** 安寐丹;睡眠剥夺;细胞凋亡;学习记忆;细胞色素C(Cyt-C);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0038-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202280

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200724.1428.004.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-24 15:04

## Effect of Anmeidan in Improving Learning and Memory Levels of Sleep Deprived Rats Through Mitochondrial Mediated Hippocampal Neuronal Apoptosis

XIE Guang-jing, XU Bo, HUANG Pan-pan, WANG Ping\*

(School of Basic Medicine, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Anmeidan (AMD) on the learning and memory levels of sleep deprived rats through mitochondrial mediated hippocampal neuronal apoptosis pathway. **Method:** Forty-eight SD rats were randomly divided into blank group, model group, low, medium, high-dose AMD groups (4.86, 9.72, 19.44 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and estazolam group (0.1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). Insomnia model was prepared by self-made sleep deprivation box for 14 days. Morris water maze was used to detect learning and memory levels, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expressions of cytochrome C (Cyt-C), cysteine aspartic acid protease-3 (Caspase-3) in hippocampus. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the morphological structure of mitochondria in hippocampus. Protein and mRNA expressions of Cyt-C, Caspase-3, Bcl-2, Bax were detected by immunofluorescence (IF) and Real-time fluorescence

**[收稿日期]** 20200407(007)

**[基金项目]** 国家科技部重点研发计划“中医药现代化研究”项目(2018YFC1705600)

**[第一作者]** 谢光璟,在读博士,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

quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) respectively. **Result:** In the model group, the incubation period of the platform and the total distance of swimming and the time of first arriving platform were prolonged, the number of platform crossing and the time of target quadrant movement were reduced, protein and mRNA expressions of Bcl-2 dropped, protein and mRNA expressions of Bax increased ( $P<0.01$ ), and mitochondrial structure was abnormal with crista fracture, swelling and deformation. And protein and mRNA expressions of Cyt-C, Caspase-3 increased significantly ( $P<0.01$ ). Low, medium and high-dose AMD groups could improve levels of space exploration and navigation of SD rats ( $P<0.01$ ), increase protein and mRNA expressions of Bcl-2, decrease protein and mRNA expressions of Bax, improve the damage of mitochondria, and decrease the protein and mRNA expressions of Cyt-C, Caspase-3 ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** AMD can improve the learning and memory levels of SD rats, the effect is related to the mitochondrial mediated hippocampal neuronal apoptosis pathway and decrease of Cyt-C and Caspase-3 expressions.

**[Key words]** Anmeidan; sleep deprivation; apoptosis; learning and memory; cytochrome C (Cyt-C); cysteine aspartic acid protease-3 (Caspase-3)

失眠是以长期性的睡眠时间、睡眠质量的不满意并伴有日间功能障碍的睡眠障碍性疾病<sup>[1]</sup>。中国睡眠研究会公布的中国成人失眠患病率已经达到57%<sup>[2]</sup>。在日间功能障碍中,注意力及记忆水平下降因为隐匿性强而常常被人们忽视,成为影响学习、工作的潜在威胁。研究人员发现记忆的存储是在神经元之间的连接——突触中实现的<sup>[3]</sup>。睡眠中的可塑性规则可以提高突触连接强度的信噪比,对记忆的巩固至关重要,而失眠会导致记忆力下降<sup>[4-5]</sup>。WILCKENS等<sup>[6]</sup>调查了睡眠与认知功能的联系,发现老年人的认知功能会随着非快速眼动睡眠(NREM)结构的变化而改善。而一项针对41位受试者的神经心理学研究也发现失眠患者会表现出更加明显的认知功能障碍,其所表现出的受损方面都与主观或客观的睡眠连续性密切相关<sup>[7]</sup>。而如果慢性失眠不能引起足够重视,进一步会造成神经系统功能紊乱,增加患老年性痴呆<sup>[8-9]</sup>等疾病的风险。

安寐丹出自《石室秘录》,由人参片、丹参、麦冬、甘草片、茯神、生枣仁、熟枣仁、菖蒲、当归、五味子组成,具有养心安神、益智健脑的作用。团队前期研究发现安寐丹对不同年龄段的睡眠剥夺(SD)大鼠有改善睡眠以及学习记忆的作用<sup>[10]</sup>,在此基础上,本实验拟进一步运用行为学、病理学、分子生物学等方法,从细胞凋亡角度研究安寐丹对SD大鼠学习记忆水平及细胞色素C(Cyt-C),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)等蛋白表达的影响,为失眠及其日间功能障碍的防治提供思路。

## 1 材料

1.1 动物 Sprague Dawley大鼠48只,雄性,SPF

级,体质量(200~220)g,购于湖北省实验动物研究中心,合格证号SCXK(京)2016-0002。按照《实验动物管理条例》要求集中饲养。保持动物房恒温恒湿,饮水、饲料、垫料等灭菌处理。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 安寐丹由生、熟酸枣仁各20g,人参片、麦冬、茯神、当归各12g,丹参8g,石菖蒲、五味子、甘草片各4g组成(湖北中医药大学国医堂药剂科提供药材,经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定符合药用标准,最终浓缩成含生药 $2\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的煎剂, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存);艾司唑仑(湖北华龙生物制药有限公司,批号H42022458);大鼠B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),B淋巴细胞瘤-2关联X蛋白(Bax)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物研究所,批号分别为ml003257,ml028370);Cyt-C兔源抗体,Caspase-3兔源抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为A0225, A19654, AS011);trizol RNA提取试剂(美国赛默飞世尔科技公司,批号15596026);PCR反转录试剂盒,PCR反应体系(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为RK20400, RK20600)。

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);SpectraMax M5型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);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);AVANTI J-15R型高速冷冻离心机(美国Beckman Coulter有限公司);CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国伯乐

公司)。

## 2 方法

**2.1 SD模型制备** 参考相关文献进行多平台水环境睡眠剥夺<sup>[11]</sup>。睡眠剥夺箱为实验室自制,长75 cm,宽50 cm,高36 cm,内部放置6个连体直径8 cm,高8 cm金属平台,呈2×3排列,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,大鼠在平台上自由活动。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。每天打扫箱体,更换用水,定时将大鼠放回饲养笼内休息4 h,持续睡眠剥夺14 d。

**2.2 分组及给药** 大鼠随机数字表法分为正常组,模型组,艾司唑仑组和安寐丹低、中、高剂量组,每组8只。将生、熟枣仁各20 g,人参、麦冬、茯神、当归各12 g,丹参8 g,石菖蒲、五味子、甘草各4 g用纱布包裹,加水15倍量浸泡30 min用文火煎煮30 min,二煎加10倍量水,煎煮20 min后过滤,合并药液,浓缩至生药2 g·mL<sup>-1</sup>。依据《中药药理研究方法学》(第2版)<sup>[12]</sup>大鼠与人药物剂量折算,分别对低、中、高剂量(4.86,9.72,19.44 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组灌胃不同剂量的水煎剂。艾司唑仑组每日按0.1 mg·kg<sup>-1</sup>灌服,模型组、正常组给予等容生理盐水,连续给药14 d。对各组大鼠自发活动分析系统记录24 h内睡眠时间和活动路程。模型组对比正常组睡眠时间缩短,活动路程延长( $P<0.01$ ),说明模型成功<sup>[14]</sup>。见表1。

表1 自发活动实验结果( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 1 Experimental results of autonomous activities( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	睡眠时间/min	活动路程/cm
正常	389.20±13.01	598.63±16.24
模型	167.54±16.63 <sup>2)</sup>	896.12±20.17 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

**2.3 Morris水迷宫检测** 水迷宫分4个象限。定位航行实验分别从4个象限正中贴壁放入水中,记录大鼠90 s内找到平台时间,记为逃避潜伏期。超时未能找到则将大鼠引导至平台停留15 s强化。每天训练1次,持续5 d。空间探索实验为第6天移除平台后各组均同一点放入水中,记录大鼠90 s初次穿越平台时间,目标象限停留时间以及穿越平台次数。数据采集由Morris水迷宫图像采集分析系统

完成。实验过程中保持安静,维持水温在22~25℃。

**2.4 样本采集** 取材前1 d大鼠禁食不禁水,次日以10%水合氯醛3 mL·kg<sup>-1</sup>麻醉大鼠,冰盘上剥离全脑,电镜标本取1 mm×1 mm海马组织固定于2.5%的戊二醛溶液,荧光标本固定于4%的多聚甲醛溶液,其余样本冻存于-80℃冰箱备用。

**2.5 ELISA法检测大鼠海马Bcl-2, Bax含量** 将冻存的海马组织常温解冻后匀浆,低温离心机15 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,收集上清,根据所需试剂盒说明书严格操作,每孔分别加待测样品100 μL,于450 nm下检测Bcl-2, Bax的吸光度A。

**2.6 透射电镜观察海马线粒体结构** 固定的海马分别经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗30 min,1%四氧化锇固定2 h,依次用浓度梯度乙醇脱水处理,环氧树脂浸透,包埋,超薄切片(70 nm)轴染、铅染处理,透射电镜下观察并拍照,主要观察线粒体形状、大小、嵴的改变等。

**2.7 免疫荧光检测Cyt-C, Caspase-3的蛋白表达**

取出固定的全脑,制备切片,切片固定抗原修复后,封闭2 h;去除封闭液,分别滴加TBS缓冲液配制的Cyt-C, Caspase-3抗体稀释液(1:100)孵育过夜;复温去除抗体工作液, TBST洗涤1次,5 min,晾干;避光滴加荧光二抗(1:1 000),37℃,避光,孵育1 h, TBST洗涤1次,5 min;缓冲液TBS洗涤3次,5 min/次;滴加DAPI复染细胞核,去除工作液,缓冲液TBS洗涤3次,5 min/次;荧光显微镜下观察。

**2.8 Real-time PCR检测Bcl-2, Bax, Cyt-C, Caspase-3 mRNA的表达** 将海马组织使用RNA提取液(trizol)法提取总RNA。总RNA(0.5 mg·L<sup>-1</sup>) 1 μL,加入引物(0.2 mg·L<sup>-1</sup>) 1 μL逆转录cDNA, cDNA 2 μL继续扩增,步骤依次为预变性94℃ 3 min, 1个循环,变性94℃ 30 s,退火8℃ 30 s,延伸72℃ 45 s,循环40次。系统自动计算C<sub>t</sub>值。以β-actin为内参,采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>计算各组mRNA水平,引物设计运用Prime 5软件,利用Blast检测引物扩增后序列和基因序列的匹配程度,所需引物由武汉赛维尔生物技术有限公司代合成,序列见表2。

**2.9 统计学处理** SPSS 21.0统计软件处理所有数据,以 $\bar{x}\pm s$ 表示, Morris数据采用重复测量的方差分析,其余数据用单因素方差分析进行组间比较,  $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对SD大鼠学习记忆能力的影响** 定位航行实

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Cyt-C	上游 AGGAGGCAAGCATAAGACTGGA	215
	下游 GGTCTGCCCTTTCTCCCTTCT	
Caspase-3	上游 GAAAGCCGAAACTCTTCATCAT	93
	下游 ATGCCATATCATCGTCAGTTCC	
Bax	上游 GGTGGTTGCCCTTTTCTACTTTGC	113
	下游 GCTCCCGGAGGAAGTCCAGTG	
Bcl-2	上游 GGGATGCCTTTGTGGAAC	148
	下游 GTCTGCTGACCTCACTTG	
$\beta$ -actin	上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游 TTTAATGTCACGCACGATTTC	

验结果显示,与正常组比较,模型组上平台潜伏期明显延长,与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量组上平台潜伏期均显著缩短( $P<0.05, P<0.01$ );空间探索实验结果显示,与正常组比较,模型组初次到达

平台时间延长,跨越平台次数减少,目标象限运动时间减少( $P<0.01$ );与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量组穿越原平台次数和目标象限时间均增加,初次穿越平台时间缩短( $P<0.05, P<0.01$ )。见表 3, 4。

表 3 安寐丹对 SD 大鼠定位航行实验平台潜伏期的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of Anmeidai (AMD) on positioning experiment platform latency in SD rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常	-	20.40 $\pm$ 1.36	18.22 $\pm$ 1.25	17.21 $\pm$ 0.98	13.65 $\pm$ 1.42	10.40 $\pm$ 1.95
模型	-	60.63 $\pm$ 2.96 <sup>2)</sup>	61.03 $\pm$ 2.36 <sup>2)</sup>	58.36 $\pm$ 2.03 <sup>2)</sup>	60.93 $\pm$ 3.39 <sup>2)</sup>	59.52 $\pm$ 3.46 <sup>2)</sup>
艾司唑仑	$1\times 10^{-4}$	57.36 $\pm$ 3.21	55.36 $\pm$ 2.39 <sup>4)</sup>	47.69 $\pm$ 3.01 <sup>4)</sup>	42.87 $\pm$ 2.35 <sup>4)</sup>	36.23 $\pm$ 2.08 <sup>4)</sup>
安寐丹	4.86	59.63 $\pm$ 3.45	56.23 $\pm$ 2.02 <sup>3)</sup>	56.32 $\pm$ 2.29 <sup>3)</sup>	53.26 $\pm$ 3.13 <sup>3)</sup>	50.92 $\pm$ 2.21 <sup>4)</sup>
	9.72	58.66 $\pm$ 2.86	51.23 $\pm$ 3.23 <sup>4)</sup>	45.32 $\pm$ 2.01 <sup>4)</sup>	41.20 $\pm$ 2.36 <sup>4)</sup>	40.23 $\pm$ 1.06 <sup>4)</sup>
	19.44	59.63 $\pm$ 3.25	54.47 $\pm$ 3.51 <sup>3)</sup>	48.25 $\pm$ 3.15 <sup>4)</sup>	41.87 $\pm$ 3.14 <sup>4)</sup>	38.20 $\pm$ 3.01 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表 4~7 同)。

表 4 安寐丹对 SD 大鼠空间探索实验的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of AMD on space exploration experiment in SD rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	初次抵达时间/s	穿越次数/次	目标象限运动时间/s
正常	-	6.35 $\pm$ 1.12	6.63 $\pm$ 0.68	32.05 $\pm$ 3.45
模型	-	19.83 $\pm$ 1.91 <sup>2)</sup>	1.23 $\pm$ 0.29 <sup>2)</sup>	10.78 $\pm$ 3.53 <sup>2)</sup>
艾司唑仑	$1\times 10^{-4}$	11.88 $\pm$ 2.09 <sup>4)</sup>	3.20 $\pm$ 0.45 <sup>4)</sup>	20.12 $\pm$ 2.52 <sup>4)</sup>
安寐丹	4.86	16.56 $\pm$ 1.03 <sup>3)</sup>	1.69 $\pm$ 0.13 <sup>3)</sup>	16.01 $\pm$ 1.56 <sup>4)</sup>
	9.72	12.96 $\pm$ 1.05 <sup>4)</sup>	2.12 $\pm$ 0.36 <sup>4)</sup>	20.32 $\pm$ 2.01 <sup>4)</sup>
	19.44	12.05 $\pm$ 1.15 <sup>4)</sup>	2.25 $\pm$ 0.24 <sup>4)</sup>	24.30 $\pm$ 2.28 <sup>4)</sup>

表 5 安寐丹对 SD 大鼠海马 Bcl-2, Bax 水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

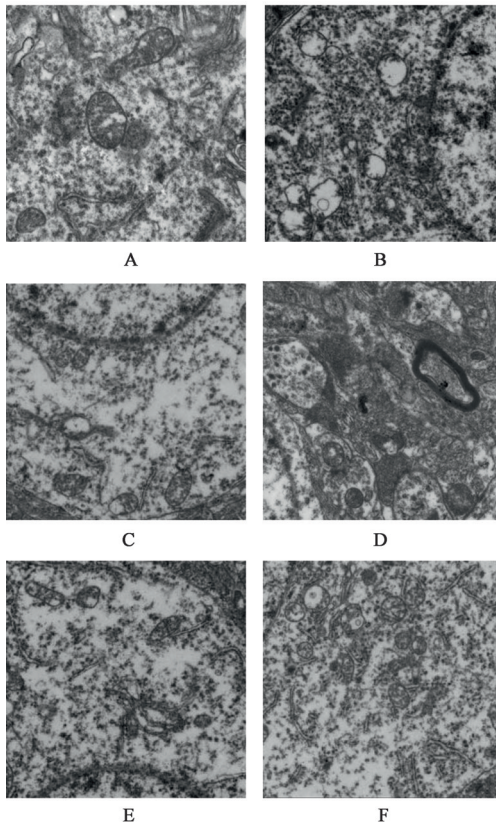
Table 5 Effect of AMD on hippocampus Bcl-2, Bax levels in SD rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	Bcl-2/ $ng\cdot L^{-1}$	Bax/ $ng\cdot L^{-1}$	Bcl-2/Bax
正常	-	24.75 $\pm$ 2.54	46.41 $\pm$ 3.78	0.53 $\pm$ 0.05
模型	-	6.23 $\pm$ 1.20 <sup>2)</sup>	106.33 $\pm$ 8.45 <sup>2)</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>
艾司唑仑	$1\times 10^{-4}$	13.20 $\pm$ 1.08 <sup>4)</sup>	75.29 $\pm$ 5.19 <sup>4)</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>4)</sup>
安寐丹	4.86	8.87 $\pm$ 0.42 <sup>3)</sup>	90.28 $\pm$ 4.16 <sup>3)</sup>	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>4)</sup>
	9.72	12.07 $\pm$ 1.16 <sup>4)</sup>	80.20 $\pm$ 4.17 <sup>4)</sup>	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>4)</sup>
	19.44	14.23 $\pm$ 1.10 <sup>4)</sup>	78.45 $\pm$ 3.56 <sup>4)</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>4)</sup>

**3.2 对 SD 大鼠海马 Bcl-2, Bax 水平的影响** 与正常组比较,模型组海马组织 Bcl-2 含量显著下降, Bax 水平显著升高,同时 Bcl-2/Bax 降低( $P<0.01$ );与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量不同程度升高了 Bcl-2 水平而降低了 Bax 水平, Bcl-2/Bax 升高( $P<0.01$ ),中、高剂量改善作用更加明显。见表 5。

**3.3 对 SD 大鼠海马线粒体形态的影响** 正常组细

胞结构较完整,线粒体未见明显病理改变,大小适中,形态椭圆或梭形,嵴排列较整齐。与正常组比较,模型组线粒体形态异常,存在明显肿胀伴有空泡化,出现了“髓鞘样”表现,嵴断裂且数量减少。与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量线粒体损伤减轻,仅见部分嵴断裂,肿胀程度亦相对较轻。其中高剂量组改善较为明显。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 艾司唑仑组; D. 安寐丹低剂量组; E. 安寐丹中剂量组; F. 安寐丹高剂量组(图2,3同)

图1 安寐丹对SD大鼠海马线粒体形态的影响(透射电镜,  $\times 5000$ )

Fig. 1 Effect of AMD on hippocampus mitochondrion in SD rats (TEM,  $\times 5000$ )

**3.4 对SD大鼠海马组织 Cyt-C, Caspase-3 蛋白表达的影响** 蓝色荧光为细胞核, 红色荧光为 Cyt-C, Caspase-3 蛋白表达, 主要呈现胞浆型表达。与正常组比较, 模型组 Cyt-C, Caspase-3 蛋白表达量均显著增加 ( $P < 0.01$ ), 海马区部分细胞损伤出现结构“断裂”; 与模型组比较, 安寐丹低、中、高剂量组 Cyt-C, Caspase-3 蛋白表达量不同程度下降 ( $P < 0.01$ ), 组间比较差异具有统计学意义。见图2, 3, 表6。

**3.5 对SD大鼠海马 Bcl-2, Bax, Cyt-C, Caspase-3 mRNA 表达的影响** 与正常组比较, 模型组 Bax, Cyt-C, Caspase-3 mRNA 相对表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2 mRNA 相对表达量显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 安寐丹低、中、高剂量组均使 Bax, Cyt-C, Caspase-3 mRNA 相对表达量下降 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2 mRNA 相对表达量升高 ( $P < 0.01$ )。中、高剂量组的效果要优于低剂量组。见表7。

#### 4 讨论

睡眠与记忆是大脑最基本的生理功能, 睡眠包

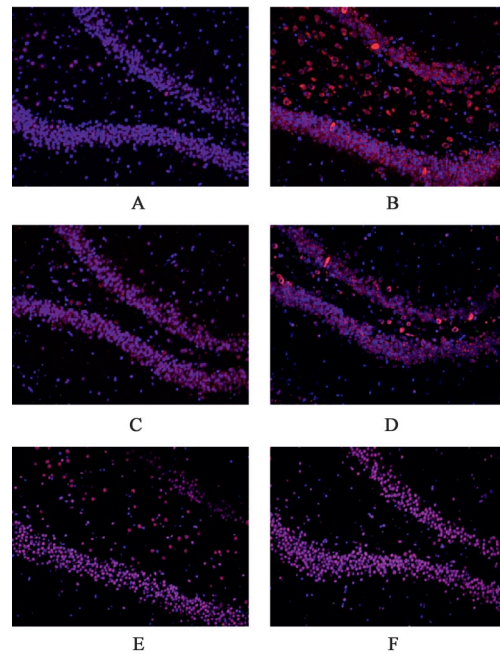


图2 安寐丹对SD大鼠海马 Cyt-C 蛋白表达的影响(免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of AMD on Cyt-C protein in hippocampus of SD rats (IF,  $\times 200$ )

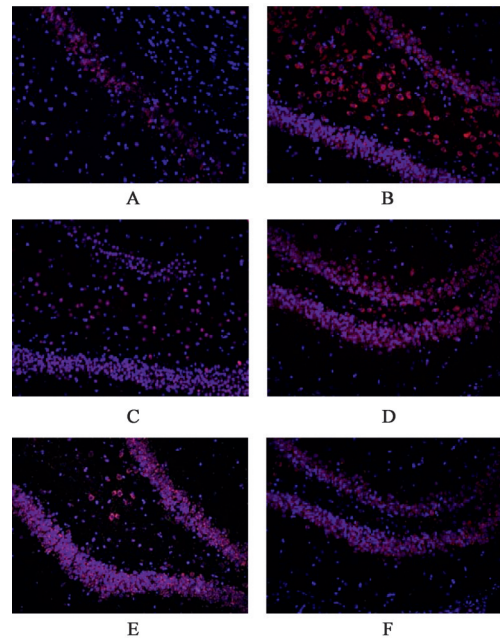


图3 安寐丹对SD大鼠海马 Caspase-3 蛋白表达的影响(免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of AMD on Caspase-3 protein in hippocampus of SD rats (IF,  $\times 200$ )

括了快速眼动睡眠(REM)和非快速眼动睡眠(NREM), 二者在睡眠周期中交替发生, REM睡眠有助于记忆的整合与存储, 突触在其中发挥了重要作用, 良好的睡眠通过提高突触可塑性进而帮助记忆的存储<sup>[13]</sup>。而睡眠剥夺会影响海马组织氧化应

表6 安寐丹对SD大鼠海马Cyt-C, Caspase-3蛋白表达灰度比较 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 6 Effect of AMD on hippocampus Cyt-C, Caspase-3 gray value in SD rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Cyt-C	Caspase-3
正常	-	28.82±3.65	32.26±2.48
模型	-	109.17±4.36 <sup>2)</sup>	98.43±4.25 <sup>2)</sup>
艾司唑仑	1×10 <sup>-4</sup>	54.69±2.18 <sup>4)</sup>	47.24±1.95 <sup>4)</sup>
安寐丹	4.86	88.07±3.32 <sup>4)</sup>	75.62±1.07 <sup>4)</sup>
	9.72	75.14±2.47 <sup>4)</sup>	69.21±2.17 <sup>4)</sup>
	19.44	69.47±1.90 <sup>4)</sup>	60.53±2.41 <sup>4)</sup>

表7 安寐丹对SD大鼠海马Bcl-2, Bax, Cyt-C, Caspase-3 mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 7 Effect of AMD on mRNA expression of Bcl-2, Bax, Cyt-C, Caspase-3 in hippocampus of SD rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2	Bax	Cyt-C	Caspase-3
正常	-	1.00±0.10	1.00±0.08	1.00±0.09	1.00±0.08
模型	-	0.23±0.02 <sup>2)</sup>	3.53±0.14 <sup>2)</sup>	2.96±0.13 <sup>2)</sup>	3.87±0.08 <sup>2)</sup>
艾司唑仑	1×10 <sup>-4</sup>	0.68±0.08 <sup>4)</sup>	1.96±0.06 <sup>4)</sup>	1.83±0.04 <sup>4)</sup>	2.07±0.07 <sup>4)</sup>
安寐丹	4.86	0.32±0.03 <sup>4)</sup>	2.57±0.11 <sup>4)</sup>	2.16±0.07 <sup>4)</sup>	2.88±0.11 <sup>4)</sup>
	9.72	0.51±0.08 <sup>4)</sup>	2.13±0.10 <sup>4)</sup>	1.90±0.10 <sup>4)</sup>	2.31±0.10 <sup>4)</sup>
	19.44	0.59±0.06 <sup>4)</sup>	2.06±0.07 <sup>4)</sup>	1.88±0.08 <sup>4)</sup>	2.17±0.07 <sup>4)</sup>

死亡,是机体为了更好地适应生存环境而争取的一种主动过程。但如果凋亡过程紊乱,如凋亡进程加快等,则会诱导疾病发生,如阿尔兹海默病(AD)证实与细胞凋亡密切相关,AD患者老年斑的主要成分β淀粉样蛋白(Aβ)可通过诱导凋亡基因,促进自由基产生、电解质紊乱、线粒体异常等多途径诱发凋亡,进而影响认知功能<sup>[17-18]</sup>。在整个凋亡过程中,Cyt-C和Caspase的激活是主要的作用途径<sup>[19]</sup>。其中线粒体作为细胞凋亡调控中心主要参与了这些细胞因子的调控与释放<sup>[20]</sup>。当Cyt-C从线粒体中释放到胞浆,并与凋亡相关因子1(Apaf-1)结合,凋亡性质的级联反应发生<sup>[21]</sup>,形成的聚合物进一步激活Caspase家族,其中包括起到关键作用的Caspase-3等<sup>[22]</sup>,他们一方面通过下调与DNA修复的有关酶类,阻断细胞DNA复制、修复<sup>[23]</sup>,同时直接破坏细胞结构,引起细胞皱缩,染色质固缩,形成凋亡小体<sup>[24]</sup>。

睡眠与记忆同属于中医“神”的范畴,心藏神,肾藏志,心肾相交睡眠与记忆才能健康,心肾不交则会失眠健忘。安寐丹作为一首治疗失眠的传统方剂,能够养心安神,改善睡眠,方中君药酸枣仁有效成分酸枣仁皂苷被证实具有较好的镇静催眠作用,兼能改善记忆缓解由Aβ<sub>1-42</sub>导致的认知功能障

碍水平,造成脑源性神经营养因子(BDNF)等表达下降,降低突触可塑性和长时程增强电位<sup>[14]</sup>,同时近期的研究也发现睡眠剥夺会引起海马神经元自噬异常,并认为这一现象可能与睡眠剥夺所致的认知功能下降相关<sup>[15]</sup>。本实验选用了国际公认的检测学习记忆水平方法Morris水迷宫,结果发现当REM睡眠剥夺后,SD大鼠出现明显的学习记忆障碍,而安寐丹干预后不同程度改善了SD大鼠的学习记忆水平。

细胞凋亡是在生物体内广泛存在的生命过程<sup>[16]</sup>,它是细胞对环境应答表现出的自主的有序的

碍<sup>[25]</sup>;人参片、麦冬、茯神、五味子合用可补气养阴,宁心安神;此方同时还配伍了当归、丹参、石菖蒲,所以兼具有化痰活血、醒脑开窍的作用,故认为该方不仅可以改善睡眠,同时还具有益智健脑,改善记忆的作用,是一首失眠健忘同治的方剂。实验结果也进一步证实了安寐丹可以提升SD大鼠的学习记忆水平,包括改善了海马区神经元线粒体的结构损伤,升高Bcl-2而降低Bax蛋白及mRNA的表达水平,并降低Cyt-C, Caspase-3蛋白及mRNA的表达水平,呈现出一定的量效关系。

综上所述,安寐丹可改善睡眠剥夺大鼠的学习记忆水平,其机制与线粒体介导的海马神经细胞凋亡,降低Cyt-C, Caspase-3等蛋白表达密切相关。其具体的作用机制有待下一步的研究。

[参考文献]

[1] BUYASSE D J, ANCOLI-ISRAEL S, EDINGER J D, et al. Recommendations for a standard research assessment of insomnia[J]. Sleep, 2006, 29(9): 1155-1173.  
[2] 中国睡眠研究会. 中国失眠症诊断和治疗指南[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(24): 1844-1856.  
[3] LISMAN J, COOPER K, SEHGAL M, et al. Memory

- formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(3):309-314.
- [ 4 ] 吴惠涓,赵忠新,黄流清. 睡眠对记忆巩固及突触可塑性影响的临床与实验研究进展[J]. *中华神经医学杂志*, 2009, 8(4):419-422.
- [ 5 ] FORTIER-BROCHU E, MORIN C M. Cognitive impairment in individuals with insomnia: clinical significance and correlates [J]. *Sleep*, 2014, 37(11):1787-1798.
- [ 6 ] WILCKENS K A, HALL M H, NEBES R D, et al. Changes in cognitive performance are associated with changes in sleep in older adults with insomnia [J]. *Behav Sleep Med*, 2016, 14(3):295-310.
- [ 7 ] FORTIER-BROCHU É, MORIN C M. Cognitive impairment in individuals with insomnia: clinical significance and correlates [J]. *Sleep*, 2014, 37(11):1787-1798.
- [ 8 ] OSORIO R S, PIRRAGLIA E, LUIS F, et al. Greater risk of Alzheimer's disease in older adults with insomnia [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2011, 59(3):559-562.
- [ 9 ] MALLE C, EUSTACHE F, RAUCHS G. The role of sleep in memory consolidation: effects of age and Alzheimer's disease [J]. *Biol Aujourd'hui*, 2015, 209(3):261-272.
- [10] 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.
- [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[M]. 2版. 人民卫生出版社, 2006.
- [13] IDAN E, DAVID Z, ADI T, et al. Sleep-dependent structural synaptic plasticity of inhibitory synapses in the dendrites of hypocretin/orexin neurons [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 54(8):6581-6597.
- [14] SAYGIN M, OZGUNER M F, ONDER O, et al. The impact of sleep deprivation on hippocampal-mediated learning and memory in rats [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2017, 118(7):408-416.
- [15] 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.
- [16] SINGH N. Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy: an overview [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2007, 22(2):6-16.
- [17] AHMAD RATHER M, JUSTIN THENMOZHI A, MANIVASAGAM T, et al. Neuroprotective role of asiatic acid in aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease [J]. *Front Biosci*, 2018, 10(1):262-275.
- [18] SALIMIAN N, PEYMANI M, GHAEDI K, et al. Modulation in miR-200a/SIRT1axis is associated with apoptosis in MPP+-induced SH-SY5Y cells [J]. *Gene*, 2018, 674(20):25-30.
- [19] JIANG W B, CHEN Y Y, LI B, et al. DBA-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through mitochondrial translocation of cyt-c in rat hippocampus [J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(9):1863-1873.
- [20] MAURYA S R, MAHALAKSHMI R. Mitochondrial VDAC2 and cell homeostasis: highlighting hidden structural features and unique functionalities [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2017, 92(4):1843-1858.
- [21] LUO J, YU L, XIE G, et al. Study on the mitochondrial apoptosis pathways of small cell lung cancer H446 cells induced by *Trichinella spiralis* muscle larvae ESPs [J]. *Parasitology*, 2017, 144(6):1-8.
- [22] JIANG W, CHEN Y, LI B, et al. DBA-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through mitochondrial translocation of cyt-c in rat hippocampus [J]. *Mol Bio Syst*, 2017, 13(9):1863-1873.
- [23] WANG Q E, HAN C, ZHANG B, et al. Nucleotide excision repair factor XPC enhances DNA damage-induced apoptosis by downregulating the antiapoptotic short isoform of Caspase-2 [J]. *Cancer Res*, 72(3):666-675.
- [24] CHOU W H, LIU K L, SHIH Y L, et al. Ouabain induces apoptotic cell death through Caspase- and mitochondria-dependent pathways in human osteosarcoma U-2 OS cells [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(1):169-178.
- [25] LIU Z, ZHAO X, LIU B, et al. Jujuboside A, a neuroprotective agent from semen *Ziziphi Spinosae* ameliorates behavioral disorders of the dementia mouse model induced by  $A\beta_{1-42}$  [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 738(1):206-213.

[责任编辑 周冰冰]