

加味四逆散对异相睡眠剥夺大鼠前额叶 皮质突触可塑性改变的研究

范新六, 李峰*, 宋月晗, 关静, 冯婷, 吴凤芝
(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨加味四逆散对异相睡眠剥夺 168 h 大鼠的学习记忆能力及前额叶皮质突触结构可塑性的作用。方法:以多平台法复制睡眠剥夺模型,药物干预组以加味四逆散灌胃,分别在睡眠剥夺 6,30,54,78,102,126,150 h 时间点给药,每次用药量为 $16.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。应用 Y 迷宫评估动物学习与记忆能力的变化,并使用透射电镜观察动物前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)突触结构可塑性的改变。结果:加味四逆散组大鼠 Y 迷宫成绩明显高于模型组大鼠($P < 0.05$)。与模型组比较,加味四逆散组大鼠 PFC 神经元突触间隙明显变窄($P < 0.05$),突触后膜致密物(post synaptic density, PSD)厚度明显变厚($P < 0.01$)。结论:加味四逆散能改善异相睡眠剥夺模型大鼠学习与记忆能力,与其影响前额叶皮质神经元突触结构可塑性,从而增强其突触传递效能有关。

[关键词] 睡眠剥夺;加味四逆散;前额叶皮质;学习与记忆;突触可塑性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-150-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110809.1704.004 **[网络出版时间]** 2011-08-09 17:04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1704.004.html>

Effect of Jiawei Sini Powder on Learning and Memory in Sleep Deprived Rats

FAN Xin-liu, LI Feng*, SONG Yue-han, GUAN Jing, FENG Ting, WU Feng-zhi
(Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Jiawei Sini powder on learning and memory ability and synaptic plasticity in prefrontal cortex of sleep deprived rats. **Method:** Experimental model of sleep deprivation was established by use of multi-platform method. The intervention group were fed with Jiawei Sini powder, and the dosage is $16.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The variation of learning and memory was detected by Y maze method at pre and post sleep deprivation. The changes of the ultrastructure of rat prefrontal cortex were observed by using transmission electron microscopy. **Result:** The percentage of correct responses of intervention group was significantly higher than those in model group($P < 0.05$). Compared with the model group, the post synaptic density (PSD) in prefrontal cortex areas in the intervention group was significantly thickened($P < 0.01$). **Conclusion:** Jiawei Sini powder could improve the ability of learning and memory in sleep deprived rats via increasing synaptic plasticity in prefrontal cortex.

[Key words] sleep deprivation; Jiawei Sini powder; prefrontal cortex; learning and memory; synaptic plasticity

[收稿日期] 20110103(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873217);北京中医药大学自主选题项目(2011JYBZZ-XS002)

[第一作者] 范新六,在读博士研究生 Tel:15101198231, E-mail: thisfan@126.com

[通讯作者] *李峰, Tel:010-64286153, E-Mail: Lifeng95@vip.sina.com

学习与记忆是脑的高级功能,海马、前额叶皮质、杏仁核、基底神经节等脑区都参与其过程^[1],突触可塑性的变化是其主要机制。异相睡眠剥夺(paradoxical sleep deprivation)能损害大鼠的空间学习与记忆能力,并损害其海马区的突触可塑性^[2-3]。本研究观察异相睡眠剥夺168 h大鼠学习记忆能力及PFC突触结构可塑性的变化,并观察加味四逆散对其影响。

1 材料

1.1 动物 二级SD雄性成年大鼠15只,体重(250±10)g,购自北京维通利华实验动物有限公司。合格证号SCXK(京)2006-0009。

1.2 中药制备 实验所用的中药复方由《伤寒论》的四逆散加味组成(柴胡6g,芍药6g,枳实6g,炙甘草6g,熟地黄30g,山茱萸12g,远志6g,炒枣仁15g,柏子仁15g,茯神9g,红参9g,菖蒲1.5g,白芥子6g),上述复方由北京东直门医院制成免煎颗粒。

1.3 试剂 25%戊二醛(汕头市西陇化工厂有限公司,批号0903012),锇酸(99.6% crystals, JMC LTD产品,批号081101),丙酮(国药集团化学试剂北京有限公司)。

1.4 仪器 NOVA型超薄切片机(瑞典LKB公司),H-7650透射电子显微镜(日本HITACHI公司),Y迷宫(张家港市生物仪器厂)。

2 方法

2.1 分组 大鼠适应性喂1周后,将其随机分为正常对照组、模型组、加味四逆散组,每组5只。饲养于清洁级动物房,光照节律12L:12D(6:00~18:00),室内温度控制在22.0~24.0℃,相对湿度30%~40%,自由饮食饮水。

2.2 模型复制方法 采用D. Suchecki改良多平台法进行睡眠剥夺。在剥夺箱(110 cm×60 cm×40 cm)中放置15个平台(直径6.5 cm,高8.0 cm),在平台周边注满水,水温保持在20~22℃,水面低于平台表面1.0 cm,将大鼠放置平台上,大鼠在平台上可自行进食饮水,并可在平台间活动。当大鼠进入异相睡眠时,由于全身肌肉张力降低,节律性地垂头触水或落入水中觉醒,从而使动物始终不能进入异相睡眠。将大鼠置于睡眠剥夺平台,进行异相睡眠剥夺168 h。

2.3 给药 加味四逆散组分别在睡眠剥夺6,30,

54,78,102,126,150 h时间点给药,每次用药量为16.25 g·kg⁻¹,ig容积为10 mL·kg⁻¹。正常对照及模型组则ig等体积的蒸馏水。

2.4 Y迷宫测试 造模前对大鼠进行3 d Y迷宫训练,每天训练30次,记录正确反应率,淘汰正确率低于50%的大鼠,在睡眠剥夺160 h时间点,复查Y迷宫成绩。

2.5 取材 于异相睡眠剥夺168 h时点取材,用2%戊巴比妥钠麻醉(40 mg·kg⁻¹),断头冰上切取前额叶皮质,修成1 mm×1 mm×1 mm的组织块,迅速置入25%戊二醛固定液,待制备电镜超薄切片。

2.6 电镜观察 1%锇酸后固定2 h,丙酮逐级脱水,Epon812环氧树脂包埋,先制成半薄切片,并用1%甲苯胺蓝染色,光镜定位后,再做成超薄切片,捞片于铜网上,醋酸铀、枸橼酸铅双重染色。电子显微镜观察,每片铜网随机拍摄Gray I型突触图像4张,放大50×10³倍,共得60张图片。

2.7 突触界面结构参数测量方法 以Image-Pro Plus 6.0图像分析软件对突触界面参数进行分析。突触界面曲率的测量参照Jones^[4]等的方法,即界面曲率以突触界面弧长与弦长之比表示。突触活性区长度与PSD参考Guldner^[5]方法进行测量。突触间隙宽度用多点平均法测定。

2.8 统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析检验。运用SAS8.2软件进行分析,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 Y迷宫成绩比较 连续睡眠剥夺168 h后,模型组大鼠Y迷宫成绩较造模前明显下降($P < 0.05$),正常组和加味四逆散组大鼠Y迷宫成绩明显高于模型组大鼠($P < 0.05$)(表1)。

表1 各组大鼠Y迷宫正确率变化($\bar{x} \pm s, n=5$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前	造模后
对照	-	88.61±8.81	90.55±4.46 ²⁾
模型	-	87.55±12.05	79.39±9.63 ¹⁾
加味四逆散	16.25	86.65±10.53	87.08±7.69 ²⁾

注:与模型组造模前比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组造模后比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 前额叶皮质突触界面结构参数变化 与对照组比较,模型组大鼠PFC神经元突触间隙明显变宽($P < 0.05$),PSD厚度明显变薄($P < 0.01$),而突触界面曲率和突触活性带长度无明显变化。与模型组比较,加味四逆散组大鼠PFC神经元突触间隙明显

变窄 ($P < 0.05$), PSD 厚度明显变厚 ($P < 0.01$), 而突触界面曲率和突触活性带长度无明显的改变 (表 2)。

表 2 大鼠前额叶皮质 Gray I 突触界面结构参数变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	突触间隙厚度	PSD 厚度
	/g·kg ⁻¹	/nm	/nm
对照	-	18.90 ± 2.40 ¹⁾	49.14 ± 8.90 ²⁾
模型	-	24.99 ± 5.52	35.92 ± 5.29
加味四逆散	16.25	19.35 ± 2.67 ^{1,2)}	43.01 ± 5.31 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 前额叶皮质神经元细胞器变化 透射电镜下可见:对照组大鼠 PFC 神经元细胞核居中,核仁明显,粗面内质网在胞质聚集成片,微管、微丝排列整齐。模型组大鼠 PFC 神经元可见大量线粒体肿胀、其嵴消失,粗面内质网扩张,核膜皱褶,微管、微丝排列紊乱、缠结。加味四逆散组大鼠 PFC 神经元微量线粒体肿胀,少量粗面内质网扩张,微管、微丝排列较有序。

4 讨论

中医理论认为,肝主藏魂,认为魂是阳之精,气之灵,具体来说,魂与神有密切联系、对心理活动会产生较大影响^[6]。肝又主谋虑,认为肝具有主持思虑等思维活动。肾藏精,能充养脑髓,是精神情绪活动的物质基础。加味四逆散以四逆散为主,配以补肾、安神类中药组成,来调节 SD 模型大鼠的学习与记忆能力。

学习与记忆与突触可塑性密切相关。突触可塑性是指突触在一定条件下调整功能、改变形态及增减数目的能力,包括传递效能和形态结构的变化。突触界面曲率、活性带长度、突触间隙及 PSD 厚度是突触结构可塑性的重要参数。譬如,突触界面弯曲是扩大接触面的一种方式,弯曲的突触界面呈“袋状”更能保证其释放的递质到达靶部位,减少向周围间隙扩散,提高神经信息传递的有效性^[7]。

本实验观察到,异相睡眠剥夺 168 h 大鼠迷宫学习与记忆成绩明显损伤,PFC 突触间隙变宽、PSD 变薄,神经元有较多的线粒体肿胀、内质网扩张等水肿表现。文献报道,突触间隙内含有大量分解神经递质的降解酶,突触间隙越宽,神经递质传导所需的时间越长,在传导过程被降解的量越多。突触宽度的增大会导致突触传导效能降低。PSD 由 30 多种蛋白质组成,参与锚定突触后受体和组成骨架,介导和整合突触信号传递。这些蛋白质多聚体的聚合和

解聚使突触后致密物厚度发生变化^[8]。也有学者认为,突触后致密物形态变化反映了突触后膜上受体及离子通道的改变^[9]。突触后致密物的变化反映了突触传递功效的变化。线粒体是能量合成的场所,内质网为蛋白质合成的场所,线粒体和内质网的肿胀可影响突触前膜递质的释放,进而影响到突触的传递效能。异相睡眠剥夺模型大鼠学习记忆能力下降与 PFC 神经元水肿和突触结构可塑性改变有关。

本研究发现,加味四逆散组大鼠学习与记忆成绩较模型组明显提高,突触间隙较模型组变窄、PSD 较模型组变厚,神经元仅有轻微水肿。这说明加味四逆散改善异相睡眠剥夺模型大鼠学习与记忆能力,与其影响 PFC 神经元突触结构可塑性、增强其突触传递效能有关。

[参考文献]

- [1] Paymond P Kesner, Joe L Martinez J R. 学习与记忆的神生物学[M]. 2 版. 北京:科技出版社,2008:10.
- [2] Yang Rui-Hua Hu San-Jue. Paradoxical sleep deprivation impairs spatial learning and affects membrane excitability and mitochondrial protein in the hippocampus. [J]. Brain Res, 2008,1230:224.
- [3] Lopez J, Roffwarg H P, Dreher A. 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.
- [4] Jones D G, Decon R M. An ultra-structural study into the effects of pentobarbital on synaptic organization [J]. Brain Res, 1978,147(1):47.
- [5] Gulder F H. Increase in postsynaptic density material in optictarget neuron of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation[J]. Neurosci Lett,1980,17:27
- [6] 杨维益,王天芳,李峰,等. 肝脏在五脏中的地位演变[J]. 中国医药学报,1995,10(3):10.
- [7] 吴馥梅,杜红燕,章子贵. 突触界面曲率及其生理意义[J]. 神经解剖学杂志,1994,10(1):89.
- [8] Ziff E B. Enlightening the postsynaptic density [J]. Neuron, 1997,19(6):1163.
- [9] Kennedy M B. Signal processing machines at the postsynaptic density [J]. Science, 2000, 290 (5492):750.

[责任编辑 聂淑琴]