

· 经典名方 ·

圣愈汤通过调节海马区单胺类神经递质水平改善睡眠剥夺小鼠学习、记忆能力

魏丹丹¹, 李玉洁¹, 王永杰², 李闪闪¹, 张明昊¹, 蒋士卿^{3*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 河南省第三人民医院, 郑州 450000;

3. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:通过研究圣愈汤对海马区单胺类神经递质水平的影响,探讨圣愈汤改善睡眠剥夺(SD)小鼠学习、记忆能力的可能机制。方法:建立SD小鼠模型,将50只成功造模的小鼠随机分为正常组,模型组,艾司唑仑组,圣愈汤低、高剂量组,每组10只。圣愈汤低、高剂量组分别以12.5,25 g·kg⁻¹灌胃,模型组小鼠每日给予等剂量的生理盐水灌胃,连续灌胃8周。采用Morris水迷宫实验观察各组SD小鼠逃避潜伏期时间、穿越平台次数、目标象限停留时间等行为学变化情况;苏木素-伊红(HE)染色观察各组SD小鼠海马组织的病理形态学改变情况;高效液相色谱法检测5-羟色胺(5-HT),多巴胺(DA),肾上腺素(EP),去甲肾上腺素(NE),5-羟吲哚乙酸(5-HIAA),高香草酸(HVA),左旋多巴(L-DOPA)和3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)等8种单胺类神经递质指标的表达水平;免疫组化法检测海马组织中c-Fos蛋白的表达水平。结果:与正常组比较,模型组SD小鼠一般状态较差,出现严重疲劳状态;与模型组比较,圣愈汤各剂量组SD小鼠进食、活动、睡眠、毛色、对外界刺激反应等均有所改善。与正常组比较,模型组SD小鼠体重质量明显降低($P<0.05$);与模型组比较,圣愈汤高剂量组升高最明显($P<0.05$)。与正常组比较,模型组SD小鼠海马组织中细胞排列紊乱,形态不完整,间隙增大,神经元细胞数量减少;与模型组比较,圣愈汤各剂量组SD小鼠海马组织中神经元细胞均增多。与正常组比较,模型组SD小鼠逃避潜伏期时间明显延长,穿越平台次数、目标象限停留时间均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,圣愈汤各剂量组小鼠穿越平台次数、目标象限停留时间均明显增加($P<0.05, P<0.01$)。与正常组比较,模型组小鼠5-HT,5-HIAA,L-DOPA,DOPAC,EP,NE,HVA,DA水平均明显降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,圣愈汤各剂量组5-HT,5-HIAA,L-DOPA,DOPAC,EP,NE,HVA,DA水平均明显提高($P<0.05$)。与正常组比较,模型组海马组织的c-Fos蛋白平均MD值显著升高($P<0.01$);与模型组比较,圣愈汤各剂量组海马组织中c-Fos蛋白表达显著降低($P<0.01$)。结论:圣愈汤能改善SD大鼠的学习、记忆能力,其作用机制可能与降低单胺类神经递质和c-Fos蛋白表达相关。

[关键词] 圣愈汤; 睡眠剥夺; 单胺类神经递质; 学习能力; 记忆能力

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)07-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210402

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210203.1135.003.html>

[网络出版日期] 2021-2-3 14:47

Shengyutang Improves Learning and Memory Ability of Sleep Deprived Mice by Regulating Levels of Monoamine Neurotransmitters in Hippocampus

WEI Dan-dan¹, LI Yu-jie¹, WANG Yong-jie², LI Shan-shan¹, ZHANG Ming-hao¹, JIANG Shi-qing^{3*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. The Third People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450000, China;

3. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[收稿日期] 20201104(013)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373790)

[第一作者] 魏丹丹,在读博士,从事中医药治疗中医内科及肿瘤相关疾病的实验和临床研究,E-mail:1617924593@qq.com

[通信作者] *蒋士卿,博士,主任医师,教授,博士生导师,从事中医药治疗中医内科及肿瘤相关疾病的实验和临床研究,

Tel:0371-66289009,E-mail:jiangshiqing66@163.com

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shengyutang on the levels of monoamine neurotransmitters in the hippocampus, and explore its possible mechanism on improving the learning and memory abilities of sleep deprivation (SD) mice. **Method:** The 50 mice were divided into normal group, model group, estazolam group, Shengyutang low and high dose groups, with 10 mice in each group. A multi-platform water environment was used to prepare SD mouse models. The low and high-dose Shengyutang groups received intragastric administration of 12.5, 25 g·kg⁻¹, respectively. The mice in the model group were intragastrically administered with the same dose of normal saline daily for 8 weeks. Morris water maze experiment was used to observe the behavioral changes of SD mice in the evasion latency period, the number of crossing platforms, and the stay time in the target quadrant of each group. HE staining was used to observe the pathomorphological changes of the hippocampal tissue of each group. The expression levels of eight monoamine neurotransmitters including serotonin (5-HT), dopamine (DA), epinephrine (EP), norepinephrine (NE), 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), high vanillic acid (HVA), levodopa (L-DOPA), and 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were detected by high performance liquid chromatography, and the expression levels of c-Fos protein in hippocampus were detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the normal group, the SD mice in the model group were in a poorer general state and severe fatigue was observed. Compared with the model group, SD mice in each dose group of Shengyutang got improved in eating, activity, sleep, hair color, and response to external stimuli. Compared with the normal group, the body weight of SD mice in the model group was significantly reduced ($P<0.05$), but the body weight in the Shengyutang high-dose group increased the most as compared with the model group ($P<0.05$). Compared with the normal group, the hippocampal cells in the model group were disorderly arranged, incomplete in shape, increased in gap and decreased in number. Compared with the model group, the number of neurons in the hippocampus of SD mice in each dose group of Shengyutang increased. Compared with the normal group, the escape latency time of SD mice in the model group was significantly prolonged, the times of crossing platform and the residence time in the target quadrant significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the times of crossing platform and the residence time in the target quadrant of mice in each dose group of Shengyutang significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the normal group, the levels of 5-HT, 5-HIAA, L-DOPA, DOPAC, EP, NE, HVA and DA in the model group significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$); but these levels in each dose group of Shengyutang were higher than those in model group ($P<0.05$). Compared with the normal group, the average MD value of c-Fos protein in the hippocampus of the model group significantly increased ($P<0.01$), and the expression levels of c-Fos protein in the hippocampus of Shengyutang groups were significantly lower than those in model group ($P<0.01$). **Conclusion:** Shengyutang can improve the learning and memory abilities of SD rats, and its mechanism may be related to the decrease of monoamine neurotransmitter and c-Fos protein expression.

[Key words] Shengyutang; sleep deprivation; monoamine neurotransmitter; learning ability; memory ability

睡眠是人类正常的生理现象,良好的睡眠是人类维持生命活动的基础,但由于社会和生活压力的增加,全球约30%的人在经受睡眠不足的威胁,睡眠剥夺(SD)已成为威胁人类健康的重大问题。虽然睡眠的功能及生理机制尚不清楚,但目前研究普遍认为睡眠对大脑的正常功能有重要影响,特别是认知、学习和记忆能力密切相关,即使只是短暂的睡眠剥夺也会损害学习和记忆功能。目前研究普

遍认为,学习和记忆能力由海马体的形态和功能介导,SD会改变海马形态,损害海马功能^[1-2]。因此,SD引起的学习、记忆能力减退是一个日益增加的健康问题,对SD进行干预具有重要意义。

圣愈汤出自《医宗金鉴》,具有益气、补血、摄血之功效,主要用于心烦不安,不得眠等症状的治疗。圣愈汤乃气血亏虚的代表方,目前临床用于治疗各科疾病,如肿瘤、银屑病、月经病、缺血性脑卒中和

膝骨性关节炎等均取得较好的疗效^[3-6],但对于圣愈汤在SD所致学习、记忆方面的疗效及机制的研究较少。本团队长期致力于学习、记忆和情绪应激方面的研究,前期研究发现具有“清热养阴、益气生津”作用的经典名方竹叶石膏汤能改善2型糖尿病大鼠记忆功能衰退症状,但临床研究还发现“气血双补”的圣愈汤对学习、记忆能力亦有明显的改善作用。

本研究选用昆明种小鼠制作SD模型,经圣愈汤高、低剂量的圣愈汤水煎剂治疗后,观察一般状态,对小鼠的海马体进行苏木素-伊红(HE)染色,通过行为学实验评估小鼠的学习、记忆能力,检测海马体中去5-羟色胺(5-HT),多巴胺(DA),肾上腺素(EP),去甲肾上腺素(NE),5-羟吲哚乙酸(5-HIAA),高香草酸(HVA),左旋多巴(L-DOPA)和3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)等8项单胺类神经递质水平的变化情况,及海马组织中c-Fos蛋白含量的变化。旨在进一步明确SD诱导的学习、记忆功能的降低,探讨圣愈汤通过调节单胺类神经递质对SD小鼠学习、记忆能力改善的作用及其机制,为临床应用提供新思路。

1 材料

1.1 动物 本研究选取昆明种SPF级雄性小鼠50只,6周龄,体质量20~25 g,由河南省实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(豫)2015-0004,于河南中医药大学动物实验中心饲养。本研究动物实验获河南中医药大学实验动物伦理委员会批准(DWLL20180022)。

1.2 药物 圣愈汤组成的中药饮片熟地黄、白芍、川芎、人参、当归、黄芪,均购自河南中医药大学第一附属医院,经河南中医药大学药学院中药资源与鉴定系两名副高级以上职称人员鉴定为正品。艾司唑仑片(华中药业股份有限公司,批号H42021522)。

1.3 试剂 NE, EP, DA, DOPAC, 5-HT, 5-HIAA, HVA, 氯化钾, 乙二胺四乙酸二钠, L-DOPA(美国Sigma公司,批号分别为36H0770, SL07091, BCBC7614V, 0001364209, 091M1128V, 046K1520, 080M1406V, 080M0091V, 080M0013V, D9628-5G); 辛烷磺酸钠, 磷酸二氢钠, 磷酸(北京迪科马科技有限公司,批号分别为7876976, 2461229, 4103512); 苏木素、伊红染色液(上海尚宝生物有限公司,批号分别为S2020, S2030); 兔抗大鼠c-Fos抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号bs-

0469R); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号G1213-100UL); DAB显色试剂盒(丹麦DAKO公司,批号K5007)。

1.4 仪器 Sykam型高效液相色谱仪[德国SYKAM(赛卡姆)公司]; WMT-100型Morris水迷宫视频分析系统(成都泰盟科技有限公司); JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司); RM2016型切片机(上海徠卡仪器有限公司); KD-P型组织摊片机(浙江金华科迪仪器设备有限公司); Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 圣愈汤药液的制备 按照《医宗金鉴》原书记载的药物剂量进行研究,方剂组成为熟地黄20 g,白芍15 g,川芎8 g,人参20 g,当归15 g,黄芪18 g,以上药材加8倍量水,浸泡40 min,武火加热至沸腾后转文火40 min。再加5倍量水,武火加热至沸腾后转文火40 min。2次药液混匀,浓缩为含生药 $1.25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的水煎剂,4℃保存备用。

2.2 动物分组及给药 50只昆明种小鼠,雄性,随机抽出10只作为正常组,其余40只进行造模。造模后按照随机数字表法分为模型组、圣愈汤高、低剂量组、艾司唑仑组,共4组,每组10只。实验药物用量参照《中药药理研究方法学》^[7],中药给药剂量根据人鼠换算公式 $S_{\text{小鼠}/20\text{g}}=0.002\ 6\times S_{\text{人}/70\text{kg}}$,得圣愈汤给药剂量(口服剂量)为 $12.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,故圣愈汤低剂量组小鼠按 $12.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃圣愈汤;故圣愈汤高剂量组小鼠按 $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (低剂量的2倍)灌胃圣愈汤,分别相当于临床成人日用剂量的约10,20倍;艾司唑仑组按 $0.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,正常组、模型组小鼠每日予等量生理盐水灌胃,连续灌胃8周。实验期间,观察并记录各组小鼠的一般情况和体质量变化。

2.3 动物模型制备 本研究除正常组外,其他组均参照文献^[8]的方法,采用多平台水环境法进行SD造模,每天剥夺睡眠12 h(8:00至当日20:00),持续21 d。造模后直接给药,每日下午14:00灌胃1次。

2.4 Morris水迷宫行为学实验 参照文献^[9]的实验条件和训练方法。本实验主要分为定位航行和空间探索实验,连续5 d完成。定位航行实验主要用于评价小鼠的学习、记忆能力,该实验在前4 d进行。实验主要是观察小鼠的逃避潜伏期,即记录动物从投放入水至寻找到站台,并爬上站台所需时间。如小鼠60 s内未找到站台,潜伏期记录为60 s。空间搜索实验主要观察小鼠的对平台位置的记忆,

评价记忆保持能力。于实验第5天将站台撤掉,记录小鼠60 s内穿越平台次数,站台直径2倍范围的有效区域的停留时间和游泳路程。

2.5 标本采集与处理 末次给药后,禁食,自由饮水24 h,各组大鼠雌雄各取3只,使用颈椎脱臼法处死小鼠,处死后立即在枕骨大孔边缘处迅速剪断颈部,去除颅骨,暴露出大脑组织,用小勺子将脑组织完整取出,在冰培养皿上去除小脑,分离出大脑后,在冰冷生理盐水中洗去血液、组织分离海马。每组剪取的2个海马组织放入4%的多聚甲醛固定液中,常温保存。剩余海马组织放入离心管中,将其编码并放至-20℃环境冷冻存放;待测小鼠全部处理完毕后,精密称取海马组织,加入5倍量的生理盐水,匀浆,制备组织匀浆液;精密吸取50 μL匀浆液,置1.5 mL离心管中,加三倍量1%甲酸乙腈溶液,涡旋5 min混匀沉淀蛋白,低温3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径10 cm),取上清,将取得的上清液二次低温3 000 r·min⁻¹离心5 min再次收集上清液。取上清液置于-80℃超低温冰箱中待分析(检测前1%甲酸生理盐水稀释5倍)。

2.6 HE染色观察海马病理形态学改变 将多聚甲醛固定液中的海马组织取出,进行脱水、透明后,石蜡包埋,切片切成3~5 μm。切片脱蜡后进行HE染色,然后风干、封片,在显微镜下观察各组小鼠海马组织结构的变化情况。

2.7 高效液相色谱法检测单胺类神经递质指标的表达 使用Sykam高效液相色谱仪,流动相为水-甲醇90:10(含0.74 mmol·L⁻¹辛烷磺酸钠,80 mmol·L⁻¹二水合磷酸二氢钠,0.027 mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸二钠和2 mmol·L⁻¹氯化钾),磷酸调pH 3.0, Waters X Select@HSST3色谱柱(2.1 mm×50 mm,2.5 μm),0.20 mL·min⁻¹等度洗脱,柱温35℃;Antec Decad II SDC电化学检测器,柱前连有ADF滤波器(0.05 Hz)和脉冲阻尼器,工作电压为+0.56 V测量时间15 min,样品20 μL直接进样分析。

2.8 免疫组化法检测海马组织c-Fos蛋白的表达 海马组织病理切片经脱蜡、水化后,封闭,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,柠檬酸盐缓冲液热修复,滴加山羊血清封闭液,室温孵育,倾去液体,分别滴加c-Fos抗体(1:100),4℃孵育过夜,二抗(1:200)37℃孵育40 min,DAB显色,自来水冲洗,苏木素复染2~3 min,盐酸-乙醇分化,自来水再次冲洗,脱水、透明、封片、镜检。每只小鼠海马组织留取3张切片,200倍显微镜下每张切片选取3个视野,结果用

Image Pro Plus 6.0软件计算各组的平均积分吸光度AA。

2.9 统计学分析 采用SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用LSD检验或Dunnett T3检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对SD小鼠一般状态的影响 正常组精神状态良好,活动敏捷,毛发光亮,体质量明显增加。建模及干预期间所有大鼠均无死亡。模型小鼠均出现毛发干枯、无光亮,形体消瘦,对外界刺激反应减弱,疲劳状态严重。艾司唑仑组和圣愈汤组小鼠进食、活动、睡眠、毛色、体质量和对外界刺激反应均有所改善,而模型组部分大鼠状态无变化,且部分小鼠状态更差。

3.2 对SD小鼠体质量的影响 与正常组比较,模型组小鼠第4,8周体质量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,第4周圣愈汤高剂量组明显升高,第8周圣愈汤高、低剂量组明显升高($P<0.05$)。见表1。

表1 圣愈汤对SD小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第4周	第8周
正常		23.74±0.56	23.79±0.53
模型		21.84±0.35 ²⁾	20.79±0.71 ²⁾
艾司唑仑	0.6	23.90±0.47	23.94±0.55 ³⁾
圣愈汤	12.5	24.26±0.76	24.91±1.32 ³⁾
	25	25.50±0.54 ³⁾	26.18±0.72 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$ 。

3.3 对SD小鼠Morris水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的影响 与正常组比较,第2,3,4天模型组小鼠逃避潜伏期时间显著延长($P<0.01$);与模型组比较,第3,4天圣愈汤各剂量组及艾司唑仑组小鼠的逃避潜伏期时间显著缩短($P<0.01$),第2天圣愈汤高剂量组及艾司唑仑组小鼠的逃避潜伏期明显缩短($P<0.05, P<0.01$)。见表2。

3.4 对SD小鼠Morris水迷宫空间探索实验的影响 与正常组比较,模型组小鼠穿越平台次数、目标象限停留时间均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,圣愈汤各剂量组及艾司唑仑组小鼠穿越平台次数、目标象限停留时间均显著增加($P<0.01$)。见表3。

3.5 对SD小鼠海马区病理形态学的影响 正常组

表 2 圣愈汤对 SD 小鼠在水迷宫测试中逃避潜伏期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Shengyutang on escape latency in Morris water maze test of SD mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常		58.33±2.08	52.67±2.31	31.67±1.53	32.67±0.58
模型		59.75±0.50	57.75±0.96 ²⁾	54.75±0.96 ²⁾	53.75±0.96 ²⁾
艾司唑仑	0.6	59.75±0.50	54.75±0.96 ⁴⁾	43.00±1.41 ⁴⁾	40.75±0.96 ⁴⁾
圣愈汤	12.5	59.75±0.50	56.50±0.58	45.75±0.96 ⁴⁾	42.50±0.58 ⁴⁾
	25	59.00±1.00	55.67±1.15 ³⁾	44.67±1.53 ⁴⁾	42.00±1.00 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表 3~6 同)。

表 3 圣愈汤对 SD 小鼠在水迷宫测试中空间探索的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

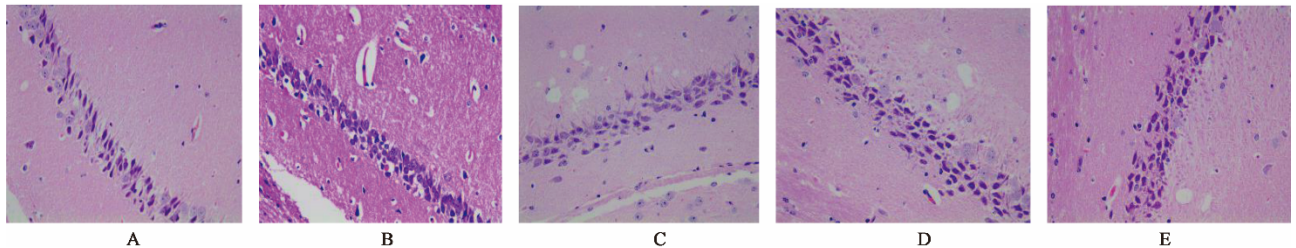
Table 3 Effect of Shengyutang on space exploration in Morris water maze test of SD mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	目标象限停留时间/s	穿越平台次数/次
正常		27.67±1.15	8.67±0.58
模型		7.50±1.29 ²⁾	3.00±0.82 ²⁾
艾司唑仑	0.6	21.00±1.83 ⁴⁾	6.25±0.50 ⁴⁾
圣愈汤	12.5	16.75±0.96 ⁴⁾	5.25±0.50 ⁴⁾
	25	18.67±0.58 ⁴⁾	5.67±0.58 ⁴⁾

小鼠海马组织中神经元结构正常,细胞排列整齐,形态完整,细胞核清晰可见,神经元细胞数量较多;模型组小鼠海马组织细胞排列紊乱,形态不完

整,间隙增大,神经元细胞数量减少;圣愈汤各剂量组和艾司唑仑组的神经元细胞均增多,形态结构也较模型组改善。各给药组比较,圣愈汤高剂量组和艾司唑仑组的改善最明显。见图 1。

3.6 对 SD 小鼠海马组织中神经递质 5-HT, 5-HIAA, L-DOPA, DOPAC 的影响 与正常组比较,模型组小鼠 5-HT, 5-HIAA, L-DOPA, DOPAC 水平明显降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,圣愈汤高、低剂量组及艾司唑仑组小鼠 5-HT 水平明显升高($P<0.05$),圣愈汤高剂量组及艾司唑仑组 5-HIAA 水平均显著升高($P<0.01$);圣愈汤高、低剂量组及艾司唑仑组 L-DOPA 水平均明显升高($P<0.05, P<0.01$);圣愈汤高剂量组及艾司唑仑组 DOPAC 水平明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表 4。



A. 正常组; B. 模型组; C. 艾司唑仑组; D. 圣愈汤低剂量组; E. 圣愈汤高剂量组(图 2 同)

图 1 圣愈汤对 SD 小鼠海马组织病理形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Shengyutang on morphology of SD mice (HE, ×400)

表 4 圣愈汤对 SD 小鼠海马组织中神经递质 5-HT, 5-HIAA, L-DOPA, DOPAC 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Shengyutang on levels of 5-HT, 5-HIAA, L-DOPA, DOPAC in hippocampus of SD mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5-HT	5-HIAA	L-DOPA	DOPAC
正常		1 962.33±42.82	1 627.13±196.25	136.21±13.60	459.11±34.06
模型		1 756.76±70.53 ²⁾	1 328.20±75.59 ¹⁾	110.99±6.43 ²⁾	365.26±29.05 ²⁾
艾司唑仑	0.6	1 877.80±56.20 ³⁾	1 864.56±212.95 ⁴⁾	152.72±16.99 ⁴⁾	499.82±63.65 ⁴⁾
圣愈汤	12.5	1 878.17±109.23 ³⁾	1 494.63±45.43	127.60±4.77 ³⁾	399.62±13.64
	25	1 900.92±11.83 ³⁾	1 666.27±1.56 ⁴⁾	136.34±1.34 ⁴⁾	426.52±3.84 ³⁾

3.7 对 SD 小鼠海马组织中神经递质 EP, NE, HVA, DA 的影响 与正常组比较,模型组小鼠 EP, NE, HVA, DA 水平均明显降低,差异有明显统计学意义

($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,圣愈汤高、低剂量组及艾司唑仑组小鼠 NE 水平显著升高($P<0.01$),圣愈汤高剂量组及艾司唑仑组 EP, HVA, DA 水平明

显升高,差异有明显统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

表5 圣愈汤对SD小鼠海马组织中神经递质EP, NE, HVA, DA的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	EP	NE	HVA	DA
正常		149.10 \pm 17.71	46.06 \pm 2.49	1 258.39 \pm 142.28	399.78 \pm 48.16
模型		121.06 \pm 6.18 ¹⁾	35.33 \pm 3.82 ²⁾	1 016.09 \pm 53.60 ¹⁾	321.46 \pm 12.74 ²⁾
艾司唑仑	0.6	170.42 \pm 20.53 ⁴⁾	48.41 \pm 5.11 ⁴⁾	1 434.26 \pm 166.19 ⁴⁾	446.22 \pm 20.47 ⁴⁾
圣愈汤	12.5	136.94 \pm 4.37	47.06 \pm 3.28 ⁴⁾	1 150.24 \pm 34.88	343.69 \pm 52.29
	25	147.85 \pm 2.15 ³⁾	46.92 \pm 0.36 ⁴⁾	1 263.89 \pm 68.60 ⁴⁾	376.87 \pm 1.64 ³⁾

3.8 对SD小鼠海马组织中c-Fos蛋白含量的影响

正常组小鼠海马组织中表达c-Fos的细胞染色较深,模型组小鼠阳性细胞染色较正常组明显增加;经圣愈汤干预后,c-Fos在海马组织的表达较模型组均有不同程度的降低,阳性细胞染色数量减少、变

浅,见图2。与正常组比较,模型组海马组织的c-Fos蛋白AA值显著升高($P<0.01$);与模型组比较,圣愈汤高、低剂量组及艾司唑仑组海马组织的c-Fos蛋白表达明显降低,差异有明显统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表6。

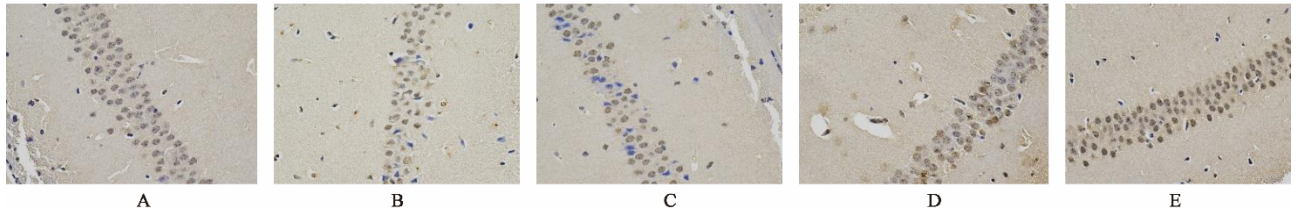


图2 圣愈汤对SD小鼠海马组织c-Fos蛋白表达的影响(免疫组化, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Shengyutang on levels of c-Fos protein expression in hippocampus of SD mice (IHC, $\times 400$)

表6 圣愈汤对SD小鼠海马组织c-Fos蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of Shengyutang on levels of c-Fos protein expression in hippocampus of SD mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	c-Fos($\times 10^{-2}$)
正常		23.63 \pm 1.96
模型		33.75 \pm 1.50 ²⁾
艾司唑仑	0.6	28.04 \pm 2.17 ⁴⁾
圣愈汤	12.5	22.49 \pm 3.20 ³⁾
	25	26.40 \pm 1.84 ⁴⁾

4 讨论

中医学中并没有SD病名的记载,根据临床症状归属于“失眠”“不寐”“不得卧”等范畴。中医学对SD的记载最早见于马王堆汉墓出土的《足臂十一脉灸经》中之“皆有此五病者……不得卧”。后《黄帝内经》中又有“不卧”“不瞑”“不眠”等论述,认为“不眠”以“四时五脏阴阳”为基础,与卫气、营血密切相关,认为营卫的运行失调可导致不寐。如《黄帝内经·灵枢·大惑论》曰:“夫卫气者,昼日常行于阳,夜行于阴,故阳气尽则卧,阴气尽则寐。”《伤寒论》秉承《黄帝内经》对“不卧”的病理认识,认为

气血阴阳失调、脾胃不和、阴虚火旺、阳虚等均可导致“卧不安”。后世医家对“不眠”的认识也多以营卫、脏腑失调,直至明清时期进入百家争鸣的“大综合”时期,发展了“不眠”与脑病的新理论。现代医家研究认为,气、血是脑功能活动的物质基础^[10],并采用补益作用的补骨脂、滋肾方、天王补心丹,及肝脾同调的当归芍药散^[8,11-13]等均取得了较好的疗效。

本研究在古今医家不寐研究的基础上,选用经典名方圣愈汤进行研究。该方出自《医宗金鉴》主治一切失血太多,阴亏气弱,气虚血少,为补气养血的代表方,但《医宗金鉴·删补名医方论》亦认为该方可用于“睡卧不宁”的治疗,如有“治一切失血过多,阴亏气弱,烦热作渴,睡卧不宁等证”的记载。本研究选用圣愈汤之原方原量原剂型,由熟地黄20 g,白芍15 g,当归15 g,川芎8 g,人参20 g,黄芪18 g组成,选用传统水煎剂进行实验。目前,圣愈汤在不寐的研究较少,文献只见圣愈汤用于治疗更年期综合征合并失眠的临床研究。该研究发现,圣愈汤在更年期综合征合并失眠患者的治疗中具有较好的治疗效果。因此,本研究拟通过实验研究探讨圣愈汤通过调节海马区单胺类神经递质水平改善

SD小鼠学习、记忆能力的机制。

单胺类神经递质的代谢产物对神经系统、心血管系统等有重要的调节作用,对睡眠、情绪和应激行为等机体的多种生理活动均有重要影响。目前研究认为,单胺神经递质与学习、记忆能力等中枢神经系统的高级神经功能密切相关^[14-15]。目前研究认为,海马组织中的5-HT, DA, NE和EP是中枢神经系统中重要的单胺神经递质,与神经功能、衰老、学习和记忆功能密切相关^[16]。深入研究发现,5-HT有促进学习和记忆的功能的作用^[17-18]。5-HIAA作为5-HT的主要代谢产物,其含量表达的增加,能直接加强5-HT的合成和代谢,对学习、记忆功能有重要影响^[19]。DA, EP和NE等是儿茶酚胺,NE在中枢神经系统内分布最为广泛,且含量较多。因此,NE能调节大脑皮层的兴奋,影响觉醒,感觉,情绪和高级认知功能。研究也证实,NE兴奋性的提高改善了学习和记忆能力^[20]。DA主要参与记忆痕迹的再现,并对整体行为均有兴奋作用。海马组织中EP水平增强在大鼠的学习能力中起重要作用已经被研究者证实^[21]。L-DOPA是DA的前体,对恐惧认知缺陷及学习、记忆能力均有改善作用^[22]。目前研究已经证实,c-Fos蛋白表达与学习、记忆相关,c-Fos蛋白表达的增加意味着神经元激活。可见,海马区单胺类神经递质主要参与学习和记忆的过程,c-Fos蛋白的表达对学习、记忆功能有重要影响。

本研究中以SD小鼠为模型,评估名方圣愈汤对SD小鼠学习和记忆能力的影响。干预8周后,圣愈汤能改善SD小鼠的一般状态及体质量。圣愈汤干预后Morris水迷宫定位航行实验显示,SD小鼠逃避潜伏期明显缩短;空间探索实验显示,SD小鼠穿越平台次数、目标象限停留时间均显著增加。圣愈汤干预后SD小鼠海马组织中细胞增多,形态结构也较模型组改善,细胞核与细胞质的界限也较模型组较清晰。圣愈汤干预SD小鼠海马组织中单胺类神经递质5-HT, 5-HIAA, EP, NE, HVA, DA, L-DOPA, DOPAC等8项指标均有改善。圣愈汤干预后免疫组化结果也显示,c-Fos蛋白在海马组织中均有不同程度的升高,平均MD值显著增加。

综上所述,圣愈汤能通过调节单胺类神经递质及c-Fos蛋白,改善SD小鼠学习、记忆功能。海马组织中5-HT, 5-HIAA, EP, NE, HVA, DA, L-DOPA, DOPAC等8项单胺类神经递质作为学习、记忆功能的微观物质,为气血双补治疗不寐提供实验依据。然而本研究只对海马组织中的单胺类神经递质进

行研究,对蛋白和机制研究不够深入,以后的研究将开展更为深入的研究,为气血双补(圣愈汤)在SD小鼠学习、记忆功能方面的应用提供更多实验依据。

[参考文献]

- [1] ABEL T, HAVEKES R, SALETIN J M, et al. Sleep, plasticity and memory from molecules to whole-brain networks[J]. *Curr Biol*, 2013, 23(17): 774-788.
- [2] WHITNEY P, HINSON J M. Measurement of cognition in studies of sleep deprivation [J]. *Prog Brain Res*, 2010, 185: 37-48.
- [3] 李圆圆,王诗煜,张步鑫,等. 圣愈汤加味治疗进行期寻常型银屑病气血两虚证的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20202322.
- [4] 齐敬东,刘裔荣. 圣愈汤联合早期康复运动对缺血性脑卒中患者恢复期肢体及语言功能影响的研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(10): 2093-2096.
- [5] 赵路红,董彦. 圣愈汤早期应用对缺血性脑卒中患者吞咽功能及语言功能改善作用的研究[J]. *四川中医*, 2017, 35(5): 136-140.
- [6] 孙立哲,李磊强,耿翠翠,等. 圣愈汤联合放射治疗对人宫颈癌荷瘤小鼠脾脏DCs细胞功能的影响[J]. *陕西中医*, 2019, 40(9): 1162-1164.
- [7] 陈奇. *中药药理研究方法学*[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006: 18.
- [8] 黄晓宇,谢光璟,李浩,等. 天王补心丹加减通过Orexin-A/OX1R对慢性睡眠剥夺小鼠糖脂代谢的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20202242.
- [9] 李斌,谢淑玲,彭丽燕,等. 3种拟痴呆动物模型在Morris水迷宫行为学测试中学习记忆行为的差异[J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(7): 683-685.
- [10] 周少峰,施润瑾,高嘉骏. 浅谈补液充髓养脑对神志活动的作用[J]. *福建中医药*, 2019, 50(3): 47-48.
- [11] 佟玉良,关雨佳,孙慧峰,等. 补骨脂提取物对APP/PS1小鼠学习记忆能力的改善作用[J]. *中药材*, 2020, 43(4): 948-952.
- [12] 林来祥,张媛,孙兵,等. 滋肾方对衰老大鼠模型学习记忆能力的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2004, 43(3): 82-83.
- [13] 李富周,贺春香,余婧萍,等. 当归芍药散改善APP_(swe)/PS1_(ΔE9)转基因小鼠学习记忆能力及机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(9): 1094-1100.
- [14] ZHU L, ZHANG R, LI T L. Effects of Acanthopanax on learning and memory ability and hippocampal

- monoamine neurotransmitters in sleep-deprived rats [J]. *Chin J Exp Formula Chin Med*, 2012, 18: 219-222.
- [15] BIRTHELMER A, STEMMELIN J, JACKISCH R, et al. Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenalin, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory impairments [J]. *Brain Res Bull*, 2003, 60(3):283-296.
- [16] NAZARALI A J, REYNOLDS G P. Monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain regions in Alzheimer's disease: a postmortem study [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 1992, 12(6):581-587.
- [17] YAN J J, LIU M, HU Y, et al. Effect and mechanism of dingzhixiao wan on scopolamine-induced learning-memory impairment in rats [J]. *China J Chin Mater Med*, 2012, 37(21):3293-3296.
- [18] MENESES A, LIY-SALMERON G. Serotonin and emotion, learning and memory [J]. *Rev Neurosci*, 2012, 23(5/6):543-553.
- [19] AYŞEGÜL K, ASUMAN G, RECEP S, et al Effects of age and anxiety on learning and memory [J]. *Behav Brain Res*, 2008, 195(1):147-152.
- [20] HARLEY C W. Norepinephrine and dopamine as learning signals [J]. *Neural Plast*, 2004, 11 (3/4) : 191-204.
- [21] NASSER A, HOJJATALLAH A, OSMO H. Effect of exercise on learning, memory and levels of epinephrine in rats' hippocampus [J]. *J Sports Sci Med*, 2003, 2 (3): 106-109.
- [22] WANG W Z, LIU L X, JIANG P, et al. Levodopa improves learning and memory ability on global cerebral ischemia-reperfusion injured rats in the Morris water maze test [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 636:233-240.

[责任编辑 周冰冰]