

# 酸枣仁汤对睡眠剥夺模型大鼠学习记忆的影响<sup>△</sup>

张晓双<sup>1,2,\*</sup>, 白黎明<sup>2</sup>, 孙建宁<sup>1#</sup> (1.北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2.陕西中医学院药理教研室, 陕西咸阳 712046)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0915-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.15

**摘要** 目的:研究酸枣仁汤对睡眠剥夺模型大鼠学习记忆的影响。方法:采用改良多平台法复制大鼠睡眠剥夺模型。50只SD大鼠随机均分为正常对照(等容蒸馏水)组、模型(等容蒸馏水)组与酸枣仁汤高、中、低剂量[21.00、10.50、5.25 g(生药)/kg]组,复制模型的同时ig给药,每天1次,连续7d。观察大鼠一般状态,测定体质量;Y型迷宫测定大鼠错误反应次数与主动回避率;检测大鼠海马组织乙酰胆碱酯酶(AChE)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)活性与血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠一般状态欠佳,体质量减少;错误反应次数增加,主动回避率降低;海马组织AChE活性增强、ChAT活性减弱,血清SOD活性减弱、MDA含量增加,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。与模型组比较,酸枣仁汤高剂量组大鼠体质量增加;错误反应次数减少,主动回避率增加;高、中剂量组大鼠海马组织AChE活性减弱、ChAT活性增强,血清SOD活性增强;高、中、低剂量组大鼠血清MDA含量减少,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。结论:酸枣仁汤能改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆下降,其机制可能与保护胆碱能系统和抗氧化作用有关。

**关键词** 酸枣仁汤;睡眠剥夺;学习记忆;大鼠

## Effects of *Ziziphus jujuba* Decoction on the Learning and Memory in Sleep Deprivation Model Rats

ZHANG Xiao-shuang<sup>1,2</sup>, BAI Li-ming<sup>2</sup>, SUN Jian-ning<sup>1</sup> (1.School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2.Dept. of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the effects of *Ziziphus jujuba* decoction on the learning and memory in sleep deprived rats. **METHODS:** The model rats of sleep deprivation were established with modified multiple platform method. 50 SD rats were randomly divided into normal control (isovolumic distilled water) group, model (isovolumic distilled water) group and *Z. jujuba* decoction high-dose, medium-dose and low-dose [21.00, 10.50, 5.25 g (medicinal materials)/kg] groups. Replication model was conducted with intragastric administration for 7 d, once a day. General conditions of rats were observed, and body mass was weighed. The error response times and active avoidance rate of rats were tested by Y-maze. The activity of ChAT and AChE in rat hippocampal, SOD activity and MDA content in rat serum were determined. **RESULTS:** Compared with normal control group, rats had poor general conditions, the weight decreased, the error response times increased, the active avoidance rate decreased, AChE activity increased, ChAT activity in hippocampal and SOD activity in serum decreased, and MDA content in serum increased in model group. There was statistical significant difference ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Compared with model group, weight of rats increased, active avoidance rate and the error response times decreased in *Z. jujuba* decoction high-dose group. AChE activity in hippocampal decreased, ChAT activity in hippocampal and SOD activity in serum increased in *Z. jujuba* decoction high-dose group and medium-dose group. the MDA content in serum decreased in *Z. jujuba* decoction high-dose group, medium-dose and low-dose groups. There was statistical significant difference ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** *Z. jujuba* decoction can improve the learning and memory in model rats after sleep deprivation. It is possibly related to the protection of cholinergic system and its antioxidant effect.

**KEYWORDS** *Ziziphus jujuba* decoction; Sleep deprivation; Learning and memory; Rats

睡眠剥夺是指因环境或自身原因丧失了所需睡眠量的过程或状态。一般在24 h内总睡眠时间少于4 h,则认为发生了睡眠剥夺,可导致机体认知及学习记忆功能损害<sup>[1-2]</sup>。酸枣仁汤出自《金匱要略》,由炒枣仁、茯苓、川芎、知母、甘草5味中药组成,具有养心安神等功效。现代研究表明,酸枣仁汤有镇静催眠和抗惊厥、焦虑作用,临床上广泛用于治疗心悸、失眠等

症。目前侧重于对酸枣仁汤镇静催眠效应机制的探讨,关于其对睡眠剥夺后学习记忆能力的影响鲜有报道。本研究通过复制大鼠睡眠剥夺模型,考察酸枣仁汤对睡眠剥夺模型大鼠学习记忆的影响及其作用机制,为临床应用提供理论依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

睡眠剥夺箱(笔者自制);Y迷宫(张家港市生物仪器厂);UV1102型紫外分光光度仪(上海天美科学仪器有限公司);电动玻璃匀浆器(上海康华生化仪器制造有限公司);KDC-160HR型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

△基金项目:陕西省教育厅专项科研项目(No.2013JK0827)

\*讲师,博士研究生。研究方向:心脑血管药理学。电话:029-38185177。E-mail:sxzyxyzs@126.com

#通信作者:教授,博士生导师。研究方向:心脑血管药理学。电话:010-84738627。E-mail:jn\_sun@sina.com

## 1.2 药材

炒酸枣仁(批号:20120509)、茯苓(批号:20120723)、川芎(批号:20120308)、知母(批号:20120417)、炙甘草(批号:20120321)均购自陕西省药材公司,并经陕西中医学院生药学教研室鉴定为真品。

## 1.3 药品与试剂

酸枣仁汤[陕西中医学院中药药理学重点学科实验室制备,含量:2.1 g(生药)/ml];乙酰胆碱酯酶(AChE)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、考马斯亮兰测试盒均购自南京建成生物工程研究所。

## 1.4 动物

SPF级SD大鼠50只,♂,体质量250~270 g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(陕)2007-001]。

## 2 方法

### 2.1 复制模型<sup>[2]</sup>与分组、给药

在睡眠剥夺箱(90 cm×70 cm×50 cm)中放置10个平台(直径6.5 cm,高8.0 cm),平台之间间隔15 cm,平台周边注满水,水面距平台面约1.0 cm,水温保持在20~22℃,每天换水1次。大鼠在平台上可自行饮食饮水,若其睡眠,则因肌肉松弛垂头触水而醒,大鼠只能重振精神爬上平台,这样反复多次达到剥夺睡眠的效果,连续7 d以复制大鼠睡眠剥夺模型。为减少水环境法造成的应激干扰,采用水环境法大平台作为对照:该平台直径12 cm,大鼠可在平台上睡眠,其他环境同模型组。50只SD大鼠随机均分为正常对照(等容蒸馏水)组、模型(等容蒸馏水)组与酸枣仁汤高、中、低剂量[21.00、10.50、5.25 g(生药)/kg]组,复制模型的同时ig给药,每天1次,连续7 d。酸枣仁汤成人口服日用量为15 g,选择临床剂量7~28倍作为大鼠ig剂量,即5.25~21.00 g(生药)/kg。

### 2.2 指标的检测

2.2.1 一般情况观察 观察大鼠一般情况(毛发、神态、活动、食欲等),记录并比较各组大鼠体质量变化情况。

2.2.2 各组大鼠Y迷宫实验 参照文献方法<sup>[3]</sup>,实验开始时,让大鼠在起步区(大鼠开始所在的臂)适应3~5 min,然后按改良“不固定次数随机不休息法”<sup>[4]</sup>转换按键开关以变换安全区与电击区的位置,观察大鼠学会逃离电击区而进入安全区的反应能力。开始测试时,大鼠受电击逃离起步区后可能跑向非安全区,并在电击作用下最终才跑至安全区(被动回避反应),故会出现错误反应。多次训练后安全区灯亮,电刺激尚未开始时大鼠立即逃往安全区,即为形成明暗辨别条件反射(主动回避反应)。此次测试分别在复制模型的第0、7天进行。大鼠在每个测试日的20次测试中总错误次数为错误反应次数;大鼠在灯亮但未通电的5 s内完成正确逃避反应的次数占总测试次数的百分率为主动回避率。

2.2.3 各组大鼠海马组织AChE和ChAT活性的检测 末次给药后,大鼠断头取脑海马组织,在冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称定质量后,加入冷生理盐水,于匀浆管中充分研碎,制成10%的脑匀浆。以离心半径为6 cm、3 000 r/min离心15 min,取上清液,测定大鼠海马组织AChE和ChAT活性。

2.2.4 各组大鼠血清SOD活性和MDA含量的检测 大鼠用10%水合氯醛钠(300 mg/kg) ip给药麻醉于后腹主动脉动脉

取血,以离心半径为6 cm、3 500 r/min离心10 min,取血清,然后按测试盒说明书测定大鼠血清SOD活性和MDA含量。

### 2.3 统计学方法

采用SPSS 13.0软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠一般情况观察与体质量的测定结果

睡眠剥夺前,各组大鼠一般状态良好,精神良好,皮毛光亮、无脱毛,活泼好动,大小便正常。睡眠剥夺后,正常对照组大鼠进食正常,体质量上升,眼睛有神,安静,反应灵敏,毛柔顺、色光亮;模型组大鼠精神萎靡,眼神迷离,进食少,经常打盹、落水,反应迟钝,易激惹,毛杂乱、无光泽;酸枣仁汤高、中、低剂量组大鼠精神不振,活动较少,进食稍减,眼神正常,不易攻击人,毛柔顺。与正常对照组比较,模型组大鼠给药7 d时的体质量减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,酸枣仁汤高剂量组大鼠给药7 d时的体质量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组大鼠体质量的测定结果见表1。

表1 各组大鼠体质量的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 1 Results of weight of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量,g/kg	体质量,g	
		0 d	7 d
正常对照组		270.3 ± 8.50	294.5 ± 16.76
模型组		272.9 ± 10.62	235.2 ± 15.55*
酸枣仁汤高剂量组	21.00	265.6 ± 7.01	249.5 ± 12.99 <sup>#</sup>
酸枣仁汤中剂量组	10.50	269.2 ± 12.35	240.4 ± 18.14
酸枣仁汤低剂量组	5.25	264.9 ± 9.11	238.7 ± 16.76

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$

### 3.2 各组大鼠Y迷宫实验结果

与正常对照组比较,模型组大鼠错误反应次数增加,主动回避率降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,酸枣仁汤高剂量组大鼠错误反应次数减少,主动回避率升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组大鼠Y迷宫实验结果见表2。

表2 各组大鼠Y迷宫实验结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 2 Results of Y-maze test of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量,g/kg	错误反应次数	主动回避率,%
正常对照组		2.4 ± 0.97	53.7 ± 13.05
模型组		8.8 ± 1.81*	28.5 ± 5.30*
酸枣仁汤高剂量组	21.00	5.8 ± 1.48 <sup>#</sup>	42.5 ± 10.07 <sup>#</sup>
酸枣仁汤中剂量组	10.50	6.8 ± 1.32	37.0 ± 12.06
酸枣仁汤低剂量组	5.25	7.3 ± 2.21	35.5 ± 11.65

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$

### 3.3 各组大鼠海马组织AChE和ChAT活性的检测结果

与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织AChE活性增强,ChAT活性减弱,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,酸枣仁汤高、中剂量组大鼠组织AChE活性减弱,ChAT活性增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组大鼠海马组织AChE和ChAT活性的检测结果见表3。

表3 各组大鼠海马组织AChE和ChAT活性的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 3 Results of AChE and ChAT activity of rats hippocampal in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量,g/kg	AChE,U/g	ChAT,U/g
正常对照组		334.25 ± 60.68	47.95 ± 10.91
模型组		562.18 ± 73.22*	30.06 ± 5.36*
酸枣仁汤高剂量组	21.00	382.38 ± 70.77 <sup>#</sup>	38.26 ± 4.46 <sup>#</sup>
酸枣仁汤中剂量组	10.50	425.44 ± 72.39 <sup>#</sup>	36.96 ± 9.58 <sup>#</sup>
酸枣仁汤低剂量组	5.25	450.37 ± 79.76	33.56 ± 6.15

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$

### 3.4 各组大鼠血清SOD活性和MDA含量的检测结果

与正常对照组比较,模型组大鼠血清SOD活性减弱,MDA含量增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。与模型组比较,酸枣仁汤高、中剂量组大鼠血清SOD活性增强;酸枣仁汤高、中、低剂量组大鼠血清MDA含量增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。各组大鼠血清SOD活性和MDA含量的检测结果见表4。

表4 各组大鼠血清SOD活性和MDA含量的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 4 Results of SOD activity and MDA content of rats serum in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量,g/kg	SOD,U/ml	MDA,nmol/ml
正常对照组		155.56 ± 5.69	14.33 ± 1.47
模型组		78.92 ± 34.88**	17.66 ± 3.20*
酸枣仁汤高剂量组	21.00	132.42 ± 26.69 <sup>#</sup>	12.25 ± 2.92 <sup>#</sup>
酸枣仁汤中剂量组	10.50	128.52 ± 33.54 <sup>#</sup>	13.92 ± 3.27 <sup>#</sup>
酸枣仁汤低剂量组	5.25	114.05 ± 38.53	15.86 ± 2.53 <sup>#</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$

Note: vs. normal control group, \* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$

## 4 讨论

随着社会节奏的加速、竞争压力的加大、网络的普及、持续性加班、不健康的生活方式等,致使越来越多的人处于不同程度的睡眠剥夺状态,尤其是某些特殊职业(如医务人员、执勤人员、航空航海乘务人员),或在某些极端情况下(如灾害救援、物资抢运、战时状态等),睡眠剥夺现象就会时常发生。睡眠可影响动物的行为和生理功能,如学习记忆和认知能力<sup>[5]</sup>。睡眠剥夺对脑功能以及学习记忆的影响显著,并且已经得到了公认。

海马区神经元的变化是学习记忆功能改变的基础。中枢乙酰胆碱(ACh)是参与学习记忆的重要神经递质,海马边缘系统有丰富的胆碱能神经纤维分布,与学习记忆关系密切。睡眠剥夺大鼠学习能力指标下降,海马ACh含量减少。在大脑内,AChE和ChAT共同维持着ACh的动态平衡。ChAT是ACh生物合成的关键酶,其表达可作为评价胆碱能神经元功能的重要指标<sup>[6]</sup>。当AChE活性增强时,其水解ACh的速率将增加,脑组织中的ACh含量就会下降<sup>[7]</sup>,中枢胆碱能系统就会

出现障碍,从而出现学习记忆功能的障碍<sup>[8]</sup>。根据研究结果推断,酸枣仁汤提高睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆能力可能是通过增强海马组织ChAT活性、降低AChE活性而实现的,其使突触间隙ACh生成增多、水解减少、在突触间隙的含量增加、与ACh受体结合而改善胆碱能神经突触的传递效应。

SOD是重要的金属酶,为机体直接清除自由基的重要酶类,通过歧化反应清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和OH·的前身O<sub>2</sub>,从而保护细胞免受毒性氧自由基的损坏。睡眠剥夺后脑组织SOD活性降低,提示脑内氧自由基的含量升高,由此推测氧自由基增加及被清除能力减弱可能是睡眠剥夺后脑功能损害、学习记忆能力下降的重要原因之一。MDA是脂质过氧化物的分解产物,是一种重要的生物大分子交联剂。MDA能交联蛋白质与核酸,使DNA发生突变,影响信息传递、转录和复制,导致蛋白质合成能力下降或合成蛋白质功能紊乱,从而引起记忆力和智力下降,故其含量间接地反映了自由基损害程度<sup>[9]</sup>。根据研究结果提示,酸枣仁汤能清除氧自由基,减轻睡眠剥夺中自由基对神经细胞的损伤,具有良好的脑保护作用。

综上所述,酸枣仁汤对睡眠剥夺造成的大鼠学习记忆功能损害具有改善作用,其改善睡眠剥夺模型大鼠学习记忆能力的机制可能与保护胆碱能系统和抗氧化有关,然而确切机制仍需进一步探讨。

## 参考文献

- [1] Giam GCK. Effects of sleep deprivation with reference to military operations[J]. *Ann Acad Med Singapore*, 1997, 26(1):88.
- [2] 范新六,李峰,宋月晗,等.加味四逆散对睡眠剥夺大鼠PFC和海马CA3区NMDA受体表达的调节作用[J]. *世界中医药*, 2012, 7(3):261.
- [3] 王跃春.Y型电迷宫在大鼠学习记忆功能测试中的合理运用[J]. *中国行为医学科学*, 2005, 14(1):69.
- [4] 王跃春.大鼠Y型迷宫测试法的筛选与优化[J]. *中国行为医学科学*, 2005, 14(1):50.
- [5] Villalobos C, Andrade R. Visinin-like neuronal calcium sensor proteins regulate the slow calcium-activated after-hyperpolarizing current in the rat cerebral cortex[J]. *Neurosci*, 2010, 30(43):14 365.
- [6] 刘彤,徐淑梅.睡眠剥夺对大鼠学习能力及海马乙酰胆碱含量的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2007, 6(3):13.
- [7] 秦海强,李亚,田苏平,等.β-淀粉样蛋白及D-半乳糖对大鼠学习记忆和胆碱酯酶活性的影响[J]. *南京医科大学学报*, 2000, 22(3):195.
- [8] 穆俊霞,李新毅.聪脑汤对AD大鼠学习记忆和胆碱酯酶活力的影响[J]. *山西中医学院学报*, 2006, 7(1):21.
- [9] 王博文,徐兆慧,杜勇,等.不同方式的睡眠剥夺对大鼠学习记忆的影响[J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2014, 35(2):213.

(收稿日期:2014-03-04 修回日期:2014-08-28)

(编辑:张静)