

中图分类号: R965; R285 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)24-0055-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.24.012



刺五加苷 B 对快动眼睡眠剥夺模型大鼠学习记忆能力的影响*

张博¹, 张可兴^{2△}, 侯立强¹, 关辉², 叶晓楠¹, 朱珊珊²

(1. 黑龙江中医药大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省医院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 探讨刺五加苷 B 对快动眼睡眠剥夺模型大鼠学习记忆能力的影响。方法 采用改进多平台水环境技术复制快动眼睡眠剥夺大鼠模型。实验分为两大组, 各小组又分为对照组(等体积蒸馏水)、模型组(等体积蒸馏水)和(刺五加苷 B)高、中、低剂量组(80, 40, 20 mg/kg), 各组大鼠均灌胃相应药物或蒸馏水, 每日 1 次, 连续 7 d。大鼠建模同时经六角迷宫箱进行学习记忆训练及巩固训练并测试, 记录寻找时间并计算寻找频率, 记录错误次数并计算认知率。结果 学习记忆获得方面, 与模型组比较, 高、中剂量组大鼠寻找时间显著缩短, 错误次数显著减少, 认知率显著升高($P < 0.05$); 学习记忆巩固方面, 与模型组比较, 高、中、低剂量组上述指标均显著改善($P < 0.05$)。结论 刺五加苷 B 对快动眼睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆障碍有一定改善作用。

关键词: 刺五加苷 B; 快动眼; 睡眠剥夺; 学习记忆; 大鼠

Effect of Eleutheroside B on the Learning and Memory Ability of Rats with Rapid Eye Movement Sleep Deprivation

ZHANG Bo¹, ZHANG Kexing², HOU Liqiang¹, GUAN Hui², YE Xiaonan¹, ZHU Shanshan²

(1. The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, China 150040; 2. Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin, Heilongjiang, China 150040)

Abstract: Objective To investigate the effect of eleutheroside B on the learning and memory ability of rats with rapid eye movement sleep deprivation (REMSD). **Methods** REMSD model rats were constructed by the modified multi-platform water environment method. The rats were divided into two groups, each of which was further divided into the control group (equal volume of distilled water), the model group (equal volume of distilled water), the high-, medium- and low-dose (eleutheroside B) groups (80, 40, 20 mg/kg). Rats in each group were given drugs or distilled water by gavage once a day for 7 d. Learning and memory training, consolidation training and testing were conducted by a hexagonal maze box during modeling, the search time and error frequency were recorded, the search frequency and cognitive rate were calculated. **Results** In terms of learning and memory acquisition, compared with those in the model group, the search time significantly shortened, the error frequency significantly decreased, and the cognitive rate significantly increased in the high- and medium-dose groups ($P < 0.05$); in terms of learning and memory consolidation, compared with those in the model group, the above indicators significantly improved in the high-, medium- and low-dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Eleutheroside B has a certain improvement effect on the learning and memory disorders in REMSD rats.

Key words: eleutheroside B; rapid eye movement; sleep deprivation; learning and memory; rat

睡眠是机体维持正常免疫功能、生长发育和心理健康的关键, 其对学习记忆形成与储存有重要作用^[1]。学习记忆是大脑的高级神经功能, 睡眠剥夺对学习记忆影响的机制复杂, 涉及众多环节^[2]。睡眠剥夺是指由于外界或自身原因导致睡眠部分或全部缺失, 以至无法满足正常睡眠的生理需求, 对认知功能有明显的负面影响, 已有研究表明, 睡眠剥夺影响记忆力、注意力、警觉性等多领域的认知功能^[3-6]。中医药防治失眠、健忘经验丰富、优势明显^[7]。刺五加系五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎, 在我国主要分布于黑龙江、吉林、辽宁等地^[8-9], 为固本强壮补益类药物, 有益气、健脾、补肾、

安神功效^[10]。现代临床和研究发现, 刺五加可改善心脑血管循环, 调节中枢神经和内分泌系统等^[11], 能促进正常睡眠-觉醒周期的重新建立^[12-13], 在抗疲劳、提高记忆能力和大脑工作效率, 改善大脑生命活动的的能力, 以及提高感觉中枢和运动中枢的稳定性方面效果较好^[14]。目前, 在刺五加的根部已经分离出 8 种成分, 其中以刺五加苷 B 含量最高(30%)^[15]。2020 年版《中国药典(一部)》仅将刺五加苷 B 认定为定量指标, 要求其含量不得低于 0.05%^[16], 但离综合评价刺五加质量的要求还有一定距离。整理文献及实验室前期研究发现, 以往研究多集中于刺五加水煎液及刺五加总苷对中枢神经系统的作用^[17-20], 而单独研究刺五加苷 B 对中枢神

*基金项目: 黑龙江省卫生健康委科研课题[20210202040313]。

第一作者: 张博, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药活性成分与作用机制, (电子信箱)zhangjicezb@163.com。

△通信作者: 张可兴, 男, 博士研究生, 副主任药师, 研究方向为中药学, (电子信箱)xingkezhangzb05@126.com。

经系统作用的报道较少^[21]。为此,本研究中拟采用睡眠剥夺法特异性剥夺大鼠快动眼(REM)睡眠,建立REM睡眠剥夺大鼠模型,从整体、细胞、分子水平等多个层面观察刺五加苷B的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:BL-420F型生物机能实验系统、DW-2000D型双臂数显脑立体定位仪(成都泰盟科技有限公司),睡眠剥夺箱及六角迷宫箱,均由黑龙江中医药大学中药药理学实验室自制;RU25H5型大鼠独立通气笼(苏州市苏杭科技器材有限公司)。

试剂:刺五加苷B对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号为WKQ-0000140,含量>98%);水为蒸馏水。

动物:SPF级SD大鼠90只,雄性,4周龄,体质量(200±20)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001]。本实验方案及操作规程经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会审批(编号:2023122941),实验设计及实施过程严格遵循3R原则。

1.2 方法

1.2.1 复制模型

向装有12个小平台(直径6.3 cm,下同)的睡眠箱(90 cm×70 cm×50 cm)中注入水,水温维持在(20±1)℃,水面比平台低1.0 cm。每日上午对大鼠进行记忆巩固训练,完毕后将其置于小平台上,当大鼠处于REM睡眠时,由于肌肉紧张度下降会掉进水里,强迫停止REM,从而导致其失去REM睡眠,以此复制REM睡眠剥夺大鼠模型。在实验过程中每日换水1次。对照组采用大平台(直径12.0 cm,下同),大鼠可正常入睡。

1.2.2 分组及给药

将50只SD大鼠随机分为对照组I(等体积蒸馏水)、模型组I(等体积蒸馏水)及(刺五加苷B)高、中、低剂量组I(80,40,20 mg/kg),各10只。各组大鼠均灌胃相应药物或蒸馏水(0.01 mL/g),每日1次,连续7 d。给药第4天灌胃30 min后,将大鼠置睡眠剥夺箱内6 h;给药第5天灌胃30 min后,采用学习记忆法训练,训练结束后将大鼠置于睡眠剥夺箱内6 h,建模结束后均将大鼠置于大平台上。

将40只SD大鼠随机分为对照组II及刺五加苷B高、中、低剂量组II,各8只,给药及灌胃方案同上。给药第1至3天灌胃30 min后,采用学习记忆法训练,训练结束后将大鼠置睡眠剥夺箱内6 h;给药第4天灌胃30 min后进行第1次测试。给药第5天开始,持续4 d进行巩固训练,末次训练结束后将大鼠置于睡眠剥夺箱内6 h,建

模结束后均将大鼠置于大平台上。次日进行第2次测试。

1.2.3 学习记忆训练及测试方法

训练过程:训练时间3 d,均将大鼠置六角迷宫箱中。第1天,无电击,大鼠若1次发现并逃离即可结束此项任务。第2天,大鼠入箱3 min后予铃声刺激,持续3 s;然后用50 V电压刺激,持续1 s,每间隔2 s 1次,直至其发现1个出口逃脱。第3天,大鼠入箱3 min后,响铃3 s,若大鼠仍未主动找到出路,电击(同第2天),待大鼠找到1个出口逃脱后,立刻将其封闭。直至找出全部6个出口,训练结束。淘汰训练中不积极找出口的大鼠。

测试过程及观察指标:与末次训练方法相同。观察大鼠找到6个出口的寻找时间(大鼠从找到第1个出口到最后1个出口所用的总时间),寻找频率[每分钟大鼠寻找的次数,公式为寻找频率=寻找总次数/寻找时间(min),其中寻找总次数=正确次数+错误次数(后者以大鼠用头撞已关闭的门次数计)],以及认知率,公式为认知率=正确逃出次数/寻找总次数。

1.3 统计学处理

采用SPSS 28.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行为学数据以单因素方差分析,组间比较行Newman-Keuls多项比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠学习记忆获得情况

各组寻找频率无显著差异($P > 0.05$)。与对照组I比较,模型组I大鼠寻找时间显著延长、错误次数显著增多、认知率显著降低($P < 0.01$);与模型组I比较,中、高剂量组I大鼠上述各项指标均显著改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。详见表1。

2.2 大鼠学习记忆巩固情况

各组大鼠寻找频率无显著差异($P > 0.05$)。与对照组II比较,模型组II大鼠寻找时间显著延长,错误次数显著

表1 各组大鼠学习记忆获得指标比较($\bar{X} \pm s, n = 8$)

Tab. 1 Comparison of learning and memory acquisition - related indicators among different groups ($\bar{X} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	寻找时间 (min)	寻找频率 (次/min)	错误数(次)	认知率(%)
对照组I		3.24±0.82	3.18±0.59	5.95±1.09	46.90±6.55
模型组I		5.39±1.07**	3.35±0.70	9.52±1.65**	30.37±4.93**
低剂量组I	20	4.52±1.01	3.47±0.72	9.62±1.49	39.12±6.77
中剂量组I	40	3.61±0.83##	3.25±0.84	6.72±1.45*	46.65±6.85##
高剂量组I	80	3.24±0.47##	3.23±0.61	4.58±1.15###	53.16±11.27###

注:与对照组I比较,** $P < 0.01$;与模型组I比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。表2同。

Note: Compared with those in the control group I, ** $P < 0.01$. Compared with those in the model group I, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ (for Tab. 1 - 2).

表2 各组大鼠学习记忆巩固指标比较($\bar{X} \pm s, n = 8$)

Tab. 2 Comparison of learning and memory consolidation - related indicators among different groups ($\bar{X} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	寻找时间 (min)	寻找频率 (次/min)	错误次数(次)	认知率(%)
对照组II		1.56 ± 0.67	0.42 ± 0.52	1.62 ± 10.30	8.15 ± 0.87
模型组II		2.26 ± 0.49**	0.44 ± 0.53	3.11 ± 0.78**	4.04 ± 0.52**
低剂量组II	20	1.41 ± 0.55***	0.48 ± 0.52	2.51 ± 1.22***	9.57 ± 0.88*
中剂量组II	40	1.07 ± 0.69***	0.56 ± 0.55	1.18 ± 0.29***	10.03 ± 0.67**
高剂量组II	80	0.48 ± 0.51***	0.45 ± 0.52	0.98 ± 0.73**	15.51 ± 0.89**

增多,认知率显著降低($P < 0.05$);与模型组II比较,刺五加高、中、低剂量组II大鼠寻找时间显著缩短,错误次数显著减少,认知率显著升高($P < 0.05$)。详见表2。

3 讨论

动物行为科学主要研究动物的学习与认知,内容包括交流行为、情感表达、社会行为、学习行为、繁殖行为等,反映了动物的整体状态,其中,学习记忆能力检测用于评价动物学习行为的高级中枢神经活动水平^[22]。长时间睡眠剥夺会对学习与记忆能力产生不良影响,特别是对空间记忆能力的影响最大,而与学习记忆关系尤为密切的是在记忆获得的存储过程中起重要作用的REM睡眠,如果动物学习后给予REM睡眠剥夺,将对空间参考记忆的形成和巩固造成障碍^[23]。而在动物行为学研究中,常使用六角迷宫训练法,该方法具有各种不同的回避形式,是更复杂类型记忆研究的基础。实验中的设备由俄罗斯阿穆尔大学医学院研制,并经多项实验验证,融合了各种实验方法的优势,可量化动物行为,并提供大量观察指标,因此利用此套实验设备能客观地反映动物的认知能力。

目前从刺五加中分离出了七种刺五加皂苷(A、B、C、D、E、F、G),其中刺五加苷B在刺五加总苷中的含量最高(约为45%)。课题组前期研究表明,大鼠在训练前进行REM睡眠剥夺,将会造成记忆获得障碍,导致其学习能力受阻,给予刺五加总苷后记忆获得障碍能明显改善。而刺五加总苷包含了大量苷类单体,为进一步确定是某个单体起作用还是所有单体的共同作用,首先选择了在刺五加总苷中含量最高且生物活性最强的刺五加苷B进行研究。

本研究在以上研究的基础上采用六角迷宫行为学测试系统,对大鼠分别进行学习训练、记忆巩固和记忆测试,比较寻找时间、寻找频率、错误次数及认知率4个指标。结果表明,5组寻找时间,错误次数及认知率比较,均有统计学意义;各组寻找频率间无显著差异。与对照组比较,模型组大鼠寻找时间显著延长,犯错误次数显著增多,总体认知率显著降低;中、高剂量组上述

各项指标均有显著改善,但学习记忆获得方面低剂量效果不显著。表明刺五加苷B可提高REM睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆能力,并提高其记忆巩固效果,但尚需进一步探讨。后期需深入探讨刺五加苷B的作用机制,并从细胞、分子、基因等多个方面进行研究。

参考文献

- [1] 叶子靖,徐波,夏婧,等. 安寐丹调控Orexin信号通路改善睡眠剥夺斑马鱼模型学习记忆的作用及机制研究[J]. 中医药现代化,2024,26(3):731-741.
- [2] 王欢欢,马青,于爽,等. 中药改善睡眠障碍动物学习记忆的物质基础及机制研究[J]. 中国药物依赖性杂志,2022,31(5):365-368.
- [3] ZHANG Y, YANG YB, YANG Y, et al. Alterations in cerebellar functional connectivity are correlated with decreased psychomotor vigilance following total sleep deprivation [J]. Front Neurosci, 2019, 21(13):134.
- [4] HUDSON AN, DONGEN HPAV, HONN KA. Sleep deprivation, vigilant attention, and brain function: a review [J]. Neuropsychopharmacology, 2020, 45(1):21-30.
- [5] COUSINS JN, WONG KF, CHEE MWL. Multi-night sleep restriction impairs long-term retention of factual knowledge in adolescents [J]. J Adolesc Health, 2019, 65(4):549-557.
- [6] KUSZTOR A, RAUD L, JUEL BE, et al. Sleep deprivation differentially affects subcomponents of cognitive control [J]. Sleep, 2019, 42(4):zsz016.
- [7] 向岁,王平. 培元安神法治疗失眠伴健忘经验[J]. 中华中医药杂志,2022,37(6):3207-3210.
- [8] 王丽红. 东北地区常见药用植物资源与分类[M]. 北京:化学工业出版社,2021:217.
- [9] 高彦宇,李文慧,寇楠,等. 刺五加化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息,2019,36(2):113-116.
- [10] 张宇航,邱智东,傅超美,等. 刺五加化学成分药理学特性及其体内代谢过程研究进展[J]. 食品工业科技,2020,41(16):334-339.
- [11] 王佳佳,王莹,谢莹,等. 刺五加药理作用研究进展[J]. 特产研究,2023,45(6):173-177.
- [12] 周兰云,张叶飞. 刺五加总苷对快速眼动睡眠剥夺幼鼠学习记忆的作用研究[J]. 中国临床药理学杂志,2021,37(6):703-706.
- [13] 杨悦,茅宏生,王艳艳,等. 状态性焦虑对小鼠睡眠-觉醒周期的影响[J]. 中国药理学通报,2022,38(5):749-755.
- [14] 王艳艳,汤威威,高琪,等. 基于GEO数据库挖掘与网络药理学探讨刺五加治疗阿尔茨海默病的机制[J]. 中国现代应用药学,2023,40(16):2192-2202.
- [15] 孙尚凡,陈静. 刺五加苷B抗肿瘤作用方式研究进展[J]. 华北理工大学学报,2022,24(1):80-84.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:215.
- [17] 郭冷秋,郭壮丽,叶晓楠,等. 刺五加总苷对REM睡眠剥夺所致大鼠记忆巩固障碍及海马群峰电位的影响[J]. 中国