

人参皂甙对睡眠剥夺大鼠学习记忆和活动性的影响

杨国愉^{1,2}, 皇甫恩*, 张大均², 冯正直¹, 苗丹民*, 王家同*

(1.第三军医大学心理学教研室, 重庆 400038; 2.西南大学教育科学研究所, 重庆 400715)

【摘要】 目的:探讨人参皂甙(ginsenosides, GS)对睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)大鼠学习记忆和活动性的影响。**方法:**用小平台水环境法建立 SD 模型。选用 Sprague-Dawley 大鼠,根据 SD 时间的不同(0~96h),随机分为 5 组,每组又分为实验组(E)和对照组(C),实验组给予 GS,观察各组大鼠 SD 前后“Y”迷宫、跳台和旷场实验中的行为变化。**结果:**①“Y”迷宫实验:24h、48h、72h 和 96h 的正确反应率,E 显著高于 C($P<0.05$),48h、72h 和 96h 的触电时间,E 显著低于 C($P<0.05$),72h 差别最为明显($P<0.01$);②跳台实验:48h、72h 和 96h 的第一次触电潜伏期,E 显著高于 C($P<0.05$),触电时间,E 显著低于 C($P<0.05$),72h 和 96h 的触电次数,E 显著低于 C($P<0.05$),72h 的差别最为显著($P<0.01$);③旷场实验:72h 和 96h 的中央格停留时间,E 显著低于 C($P<0.05$);48h 和 72h 的水平活动得分和垂直活动得分,E 显著高于 C($P<0.05$),72h 差别最为明显($P<0.01$)。**结论:**GS 对 SD 造成的大鼠学习记忆和活动性的损害有明显保护作用。在一定 SD 时间内,这种保护作用随 SD 时间的延长而增强。

【关键词】 人参皂甙;睡眠剥夺;大鼠;学习;记忆;活动性

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2007)01-0081-04

Effect of Ginsenosides on Learning, Memory and Activity of Rats During Sleep Deprivation

YANG Guo-yu, HUANGFU En, ZHANG Da-jun, FENG Zheng-zhi, et al

Department of Psychology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective: To explore the effects of ginsenosides (GS) on learning, memory and activity of rats during sleep deprivation(SD). **Methods:** SD was induced in Sprague-Dawley rats by employing “flower pot” technique. The rats were randomly divided into five groups according to the time of SD (0-96h), and every group was also divided into two sub-groups: experimental group (E) and control group (C). Forced feeding of GS to the experimental rats for 5 d before the rats were deprived of sleep. Before and after SD immediately, the behaviors of rats were studied in “Y” maze test, step-down test and open-field test. **Results:** ① “Y” maze test: As compared with those of the controls, the accuracy of response of experimental groups increased significantly in 24h, 48h, 72h and 96h ($P<0.05$), and the time of shock decreased markedly in 48h, 72h and 96h ($P<0.05$). The difference reached the climax in 72h ($P<0.01$). ② Step-down test: As compared with those of the controls, the latency of first shock of experimental groups increased significantly in 48h, 72h and 96h($P<0.05$), and the time of shock decreased markedly in 48h, 72h and 96h ($P<0.05$); The difference reached the climax in 72h ($P<0.01$). ③ Open-field test: As compared with those of the controls, the time of centering of experimental groups increased significantly in 72h and 96h($P<0.05$), and the crossing score and rearing score increased significantly in 48h and 72h($P<0.05$). The difference reached the climax in 72h ($P<0.01$). **Conclusion:** GS can improve the rat’s impairment of learning, memory and activity induced by SD, and the effect may enhance with the increase of SD time to a certain extent.

【Key words】 Sleep deprivation; Ginsenosides; Rat; Learning; Memory; Activity

睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)是指因环境或自身的原因丧失了所需要的睡眠量的过程或状态^[1]。既往研究^[2,3]发现 SD 对动物的学习、记忆、主动和被动回避反应、兴奋性和自发活动等行为产生明显的损害。在战争环境下或特殊职业里,睡眠剥夺是不可避免的。为了保证人员的安全与健康,保证作战和特殊职业工作的需要,探讨减少睡眠剥夺对机体影响的措施具有十分重要的意义。既往对 SD 的对抗措施的研究主要针对药物应用、睡眠卫生、作息制度及训练等方面^[4-6]。其中对药物应用的研究主要针对镇静催眠药、中枢兴奋药^[6]等西药,对中药的探讨较少。

人参皂甙(ginsenoside)是人参的主要药理成分,研究^[7,8]显示,人参皂甙对电休克、药物和脑缺血等造成的动物学习记忆等脑功能的受损均有明显保护作用,但对 SD 状态下的动物学习记忆的影响,报道较少。因此,本研究用动物行为学的方法,初步探讨不同 SD 时间下人参皂甙对大鼠学习记忆和活动性的影响。

1 对象与方法

1.1 动物及分组

成年、雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 $180\pm 15\text{g}$,由第四军医大学实验动物中心提供。对电击不敏感和在跳台上停留时间 1 分钟以上的大鼠予以删

【基金项目】 全军“十五”指令性课题资助项目(项目号:01L072)

* 第四军医大学航空航天医学系心理学教研室

除。120 只大鼠随机分为三个训练组,每组 40 只,分别进行不同行为训练及测试。每个训练组 40 只大鼠又随机分为 5 组:00SD (未剥夺睡眠组)、24SD (24hSD 组)、48SD (48hSD 组)、72SD (72hSD 组)、96SD (96hSD),每组 8 只。每组大鼠又随机分为实验组和对照组,每组 4 只。实验前,让大鼠熟悉适应环境一周。以 50mg/kg 灌胃给药,每日一次,连续 5d,对照组以同样方式给予等量生理盐水,然后进入行为训练。

1.2 睡眠剥夺模型的建立

采用小平台水环境法(flower pot)建立大鼠 SD 模型。根据文献^[9],制作 30×30×30cm 的鼠箱,其中有一直径为 6.3cm,高 8.0cm 的平台,在平台周边注满水,水面距平台面约 1.0cm,水温保持在 20℃ 左右。鼠在平台上可自行饮食饮水。若其睡眠,则由于肌肉张力松弛而落入水中,大鼠只能重振精神爬上平台,这样反复多次达到 SD 的效果。在大鼠活动空间内给予 12hr/12hr 明暗交替,室内温度控制在 18~22℃。

1.3 药品

人参茎叶皂甙(ginseng stem-leaves saponins, GSLS),由白求恩医科大学植物化学教研室提供,为粉剂,经鉴定,GSLS 质量分数为 90%以上。实验时,以生理盐水稀释成适当浓度。

1.4 实验装置及训练方法

“Y”迷宫(“Y” maze test)由第四军医大学预防医学系防原教研室提供,大鼠跳台(Step-down test)和旷场反应箱(open field test, OFT)根据文献^[10]自制。

1.4.1 “Y”迷宫 由三个相互连通的臂组成,底面为可以通电的铜栅,周壁为绝缘塑料板,每臂顶设一个可以活动的安全板,实验测试时,三臂轮流作起步区、安全区和危险区,以灯光作为条件刺激,非条件刺激为足底电击。电流强度为 0.7mA,工作电压为 36 伏。观察指标:以正确反应次数占总训练次数的百分率为正确反应率(accuracy);10 次训练的总触电时间为触电时间(time of shock)。训练开始时,将大鼠放入起步区,适应环境 60s,在安全区给予灯光信号,灯光照射 5s 后通电(起步区、危险区带电),直到大鼠逃到安全区,灯光继续亮 15s 后熄灭,结束一次训练。此时又以安全区为下次训练的起步区,依次类推进行训练。以电击后一次性跑入安全区为正确反应,否则为错误反应。以 10 次训练为一训练单元,中间休息 15min,每日每鼠训练 40 次,共训练 3d,然后给予不同时间的 SD。各组动物均于 SD 前后立即进

行测试。

1.4.2 大鼠跳台 规格为 30cm×30cm×30cm,周壁为绝缘塑料板,底面铺设可以通电的铜栅,箱内有一高和直径均为 10cm 的跳台(绝缘)。训练时,以铃声作为刺激,非条件刺激为足底电击。电流强度为 0.7mA,工作电压为 36 伏。观察指标:以将大鼠放在跳台上到第一次跳下的时间为第一次触电潜伏期(latency of first shock),5min 内的触电次数(times of shock)及触电时间(time of shock)。跳台训练开始时,将大鼠放入箱内适应环境 3min,铃响 5s 后,电击 10s,间歇 20s。大鼠受到电击后跳上绝缘跳台为被动回避反应;听到铃声而未受到电击即跳上跳台者为主动回避反应。如此训练,直到大鼠在绝缘跳台上停留时间超过 5min,作为大鼠跳台回避反应达到巩固水平(学会标准)。以 10 次训练为一训练单元,中间休息 15min,每日每鼠训练至学会(在绝缘跳台上停留时间超过 5min),共训练 3d。测试时,将大鼠放在跳台上,立即通电,观察大鼠的行为反应。

1.4.3 旷场反应箱 高为 40cm,长宽各 100cm,周壁为黑色,底面由面积相等的 25 块黑白相间的方格组成旷场。观察指标:以大鼠在中央格(反应箱中间九格为中央格)停留的时间为中央格停留时间(time of centering),以大鼠穿越(三爪以上跨入邻格)底面的方格数为水平运动得分(crossing score),以后肢站立(两前肢离地 1cm)的次数为垂直活动得分(rearing score)。测试时,将大鼠置于旷场反应箱底面中心,观察其 3min 的行为。

1.5 数据处理

实验数据用 SPSS 11.0 for windows 进行统计,进行单因素方差分析和组间 *t* 检验。

2 结 果

2.1 人参皂甙对 SD 大鼠空间分辨学习的作用

各组大鼠 SD 后 Y-迷宫学习正确反应率均下降,触电时间均增加,实验组和对照组不同 SD 时间之间差异显著($P<0.01$)。SD 前实验组和对照组的正确反应率和触电时间无显著差别($P>0.05$)。24h、48h、72h 和 96h 的正确反应率,实验组显著高于对照组($P<0.05$);48h、72h 和 96h 的触电时间,实验组显著低于对照组($P<0.05$)。这种差别随 SD 时间的延长而加大,以 72h 差别最为明显($P<0.01$)。见表 1、2。

2.2 人参皂甙对 SD 大鼠记忆的作用

各组大鼠 SD 后第一次触电潜伏期均下降,触电次数和触电时间均增加,实验组和对照组不同 SD

时间之间差异显著($P<0.01$)。SD 前实验组和对照组的第一次触电潜伏期、触电次数和触电时间无显著差别 ($P>0.05$);48h、72h 和 96h 的第一次触电潜伏期,实验组显著大于对照组($P<0.05$),实验组显著低于对照组($P<0.05$),2h 和 96h 的触电时间。24SD 的第一次触电潜伏期,实验组显著大于对照组 ($P<0.05$)。第一次触电潜伏期、触电次数和触电时间,以 72SD 两组的差别最为显著($P<0.01$)。见表 3-5。

表 1 SD 大鼠 Y-迷宫测试的正确反应率比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

	00SD	24SD	48SD	72SD	96SD	F
实验组	96.00±5.48	98.00±4.47	94.00±5.47	88.00±8.37	46.00±5.48	65.94**
对照组	96.67±5.77	86.67±5.77	76.67±5.77	50.00±10.00	33.33±5.77	44.50**
t	0.16	3.140*	4.26**	5.18**	3.11*	

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 下同。

表 2 SD 大鼠 Y-迷宫测试的触电时间比较($\bar{x}\pm s, s, n=4$)

	00SD	24SD	48SD	72SD	96SD	F
实验组	31.30±2.99	29.74±7.35	35.14±5.69	68.96±2.82	96.36±8.25	126.21**
对照组	28.90±2.75	40.57±4.05	67.13±10.45	119.30±12.64	122.93±12.75	62.81**
t	1.15	2.30	5.75**	6.80**	3.65*	

表 3 SD 大鼠跳台测试第一次触电潜伏期比较($\bar{x}\pm s, s, n=4$)

	00SD	24SD	48SD	72SD	96SD	F
实验组	288.08±15.65	134.04±48.78	43.58±14.34	31.98±9.16	12.40±1.85	111.41**
对照组	283.63±20.46	76.73±27.22	12.97±8.76	7.43±0.67	8.47±1.89	170.33**
t	0.35	1.83	3.29*	5.97**	2.89*	

表 4 SD 大鼠跳台测试的触电次数(5min)比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

	00SD	24SD	48SD	72SD	96SD	F
实验组	0.20±0.45	1.00±0.71	2.00±1.22	3.00±0.71	7.40±1.67	36.15**
对照组	0.33±0.58	1.33±0.58	3.67±0.58	7.00±1.00	11.00±1.73	57.33**
t	0.37	0.69	2.17	6.71**	2.91*	

表 5 SD 大鼠跳台测试触电时间(5min)比较($\bar{x}\pm s, s, n=4$)

	00SD	24SD	48SD	72SD	96SD	F
实验组	0.19±0.22	1.68±0.89	3.52±1.62	7.48±3.42	22.12±4.97	49.42**
对照组	0.23±0.20	2.27±0.81	7.03±1.26	28.83±5.20	31.13±4.38	68.80**
t	0.27	0.926	3.18*	7.13**	2.58*	

表 6 SD 大鼠旷场测试中央格停留时间比较($\bar{x}\pm s, s, n=4$)

	00SD	24SD	48SD	72SD	96SD	F
实验组	6.74±3.53	4.22±3.28	1.12±0.13	1.48±0.49	2.36±0.36	5.72**
对照组	7.97±4.59	3.46±1.30	1.57±0.45	3.83±1.97	3.40±0.80	3.04
t	0.43	0.37	2.18	2.67*	2.61*	

表 7 SD 大鼠旷场测试的水平活动和垂直活动得分比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

	00SD	24SD	48SD	72SD	96SD	F
水平活动实验组	13.20±4.44	44.20±6.67	50.60±3.51	91.60±12.76	57.40±9.84	58.80**
对照组	14.33±5.51	46.67±7.77	41.00±4.58	49.33±9.71	42.33±7.51	11.28**
垂直活动实验组	6.40±2.30	12.60±2.88	17.33±4.92	20.20±6.80	11.00±2.55	8.34**
对照组	6.33±3.06	11.00±4.58	10.33±3.06	6.67±2.31	7.33±1.53	1.50
t1	0.32	0.48	3.37*	4.89**	2.26	
t2	0.04	0.62	2.65*	3.25*	2.22	

注: t1 水平活动得分比较, t2 垂直活动得分比较。

随着 SD 时间的延长, 各组大鼠中央格停留时间先下降, 后增加; 垂直活动得分和水平活动得分先增加, 后下降。除水平活动得分, 实验组和对照组不同 SD 时间之间差异显著($P<0.01$)。SD 前, 实验组和对照组的中央格停留时间、垂直活动得分和水平活动得分无显著差别($P>0.05$)。72SD 的中央格停留时间, 实验组显著低于对照组($P<0.05$); 48h 和 72h 的水平活动得分和垂直活动得分, 实验组显著高于对照组($P<0.05$), 以 72SD 差别最为明显($P<0.01$)。见表 6、表 7。

3 讨 论

小平台水环境法(“flower pot” technique)是研究 SD 的常用方法, 该方法主要剥夺大鼠的 REM 睡眠。既往研究^[9, 12]认为 REM 睡眠对学习记忆的获得有重要意义, REM 睡眠剥夺影响学习记忆能力。Smith, Youngblood 等的研究表明, REM 睡眠剥夺对大鼠在 Morris 迷宫中的空间学习、参照性空间记忆产生明显损害, 而对非空间学习、工作记忆则无明显影响。本研究使用的“Y”迷宫考察的主要是大鼠的空间分辨学习能力, 跳台实验主要测量大鼠的记忆保持能力。旷场实验主要测量大鼠的兴奋性和活动性。研究结果表明, 大鼠经过 SD 后, 其学习记忆能力受影响, 表现为 Y-迷宫的空间分辨学习中正确反应率下降, 触电时间增加。短时间 SD(24h)对大鼠学习记忆能力影响不大, 随着 SD 时间的延长, 其影响程度逐渐增加, 尤其是 72h 后, 正确反应率显著下降, 触电时间明显增加。在跳台实验中, SD 后, 大鼠触电次数和触电时间增加, 第一次触电潜伏期很快下降, 24h 已下降至 SD 前的 50% 左右, 这可能与短时间 SD 使大鼠中枢兴奋性增加有关。旷场测试结果提示, 短时间的 SD 能提高大鼠的兴奋性, 增加其活动能力, 既往研究^[13]认为, 这可能与 SD 大鼠脑内的 c-fos 蛋白表达增加有关。随着 SD 时间的延长, 大鼠兴奋性降低, 自发活动减少。

给大鼠口服 GS 在一定程度上能改善 SD 造成的学习记忆功能下降, 使其正确反应率提高、触电次数和触电时间减少, 跳台第一次触电潜伏期延长。这种保护作用在短时间 SD(24h)下表现不明显, 随 SD 时间的延长逐渐增强, 以 72h 最为明显, 这可能与中药起效慢、作用缓和、作用时间持久有关。96hSD, 尽管实验组和对照组比较, 统计上仍显示有显著差异, 但两组的正确反应率均下降至不足 SD 前的 50%; 记忆保持能力已很低, 第一次触电潜伏期显著减低, 触电次数和触电时间显著增加。由此看来, GS 对 SD

2.3 人参皂甙对 SD 大鼠活动性的作用

大鼠学习记忆功能的保护作用有一定时限性,似乎对 48~72h 效果较好。研究也显示,GS 对正常大鼠(SD 前)的学习记忆促进作用不明显。旷场反应测试结果提示,GS 对短时间 SD(如 24h、48h)的自发活动无明显影响,但对较长时间(72h)的 SD,却可显著提高其自发活动和探究行为。这可能是 24h、48 小时的 SD 可使大鼠兴奋性增强,72hSD 后,大鼠的兴奋性逐渐下降,但此时 GS 可起作用,提高大鼠的兴奋性。这说明 GS 可提高大鼠在 SD 状态下,尤其是较长时间的 SD 的中枢兴奋性,从而提高其反应能力和抗应激能力。

学习、记忆是脑认知功能的重要组成部分,是通过神经系统突触部位的一系列生理、生化和组织学的可塑性变化而实现。它们的完成不仅需要机体充足的血液和营养供应,也需要充足而高效的睡眠作保证。SD 可引起 CNS 电生理和生化的变化,如 REM SD 可使海马 θ 波的丢失,同时伴有记忆的损害;SD 也可导致 CNS 的神经递质(如 Ach、5-HT 等)发生紊乱,从而使学习、记忆能力受损。GS 是人参的主要药理成分,它含有多种单体,如 Ra、Rb、Rf、Rg、Rh、Po、F4 等。GS 对动物的学习记忆有促进作用,这种作用对学习记忆受损的动物更为明显^[8]。本研究表明,GS 对 SD 大鼠的学习记忆受损具有一定的保护作用,GS 提高大鼠的活动能力、反应性和中枢兴奋性,这与 GS 的抗疲劳、抗应激和中枢兴奋作用有关。研究^[14]发现,GS 的主要促智成分 Rb1 和 Rg1 可增强胆碱能系统的功能,增加脑突触受体对 ^3H -胆碱的摄取,增加乙酰胆碱的合成与释放。GS 也可提高大鼠脑中去甲肾上腺素、多巴胺的含量。而对 5-HT 的影响则成双向性,因此认为 GS 可能调节各递质的水平,使其达到平衡状态而促进学习记忆。研究还发现,GS 中的 Rg 类有兴奋作用,Rb 类有抑制作用,小剂量主要是中枢兴奋作用,大剂量则转为抑制。小剂量 GS 可能通过兴奋 CNS 而提高动物的觉醒程度和动机水平来加速条件反射的形成,进一步非特异性地易化学习记忆的获得。另外,GS 还可通过增加脑血流、增强脑核酸和蛋白质的合成、影响第二信使 c-AMP 的含量,增加海马突触的数目和面积,从而诱发海马长时程突触效应增强(long term potentiation, LPT)现象,并促进大鼠的学习记忆行为^[15]。(致谢:本研究在第四军医大学心理学教研室完成,特别感谢宋国平、李强、甘洪全、齐建林、吴彦卓、陈足怀和谢小平在动物行为实验中给予的帮助。)

参 考 文 献

- 1 Benington JH and Heller HC. Does the function of REM sleep concern non-REM sleep or waking? *Progressive Neurobiology*, 1994, 44: 433-449
- 2 Datta S, Mavanji V, Ulloor J, et al. Activation of phasic pontine-wave generator prevents rapid eye movement sleep deprivation-induced learning impairment in the rat: A mechanism for sleep-dependent plasticity. *J Neurosci*, 2004, 24(6): 1416-1427
- 3 Moreira KM, Hipolide DC, Nobrega JN, et al. Deficits in avoidance responding after paradoxical sleep deprivation are not associated with altered [^3H]pirenzepine binding to M1 muscarinic receptors in rat brain[J]. *Brain Res*, 2003, 977(1): 31-37
- 4 张舒,吴兴裕.睡眠剥夺对工作能力影响的防护研究进展. *解放军预防医学杂志*, 1998, 16(1): 74-77
- 5 宋国萍,皇甫恩,苗丹民.小睡对 40 小时睡眠剥夺条件下连续计算. *中国临床心理学杂志*, 2003, 11(3): 185-188
- 6 孙云锋,皇甫恩,苗丹民.安慰剂期望和或咖啡因对 30 小时睡眠剥夺下警觉性的影响. *中国心理卫生杂志*, 2005, 19(7): 442-444
- 7 邵碧霞,白洁,孙文虹,等.人参根和茎叶皂苷对大鼠学习记忆功能的影响. *中草药*, 2005, 36(6): 895-898
- 8 曹颖林,VD Petcov, I Todorov, et al. 中国 GSLS 对大鼠行为的影响. *沈阳药科大学学报*, 1996, 13(3): 185-188
- 9 Youngblood BD, Zhou J, Smagi GN, et al. Sleep deprivation by the "flower pot" technique and spatial reference memory. *Physiol Behav*, 1997, 61(2): 249-256
- 10 徐叔云,卞如廉,陈修,主编. *药理实验方法学*(第二版). 北京:人民卫生出版社,1991. 642-643
- 11 Smith CT, Conway JM, Rose GM. Brief paradoxical sleep deprivation impairs reference, but not working memory in the radial arm maze task. *Neurobiol Learn Mem*, 1998, 69(2): 211-217
- 12 Beaulieu I, Godbout R. Spatial learning on the Morris Water Maze Test after a short-term paradoxical sleep deprivation in the rat. *Brain Cognition*, 2000, 43(1-3): 27-31
- 13 宋国萍,苗丹民,皇甫恩,陈足怀.连续及部分睡眠剥夺 96 小时后大鼠脑中 c-Fos 蛋白的表达. *中国临床心理学杂志*, 2003, 11(1): 9-11
- 14 Salim KN, McEwen BS, Chao HM. Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain. *Brain Res*, 1997, 47(12): 177-182
- 15 汪健,娄艾琳.人参总皂甙对大鼠海马突触影响的形态定量研究. *基础医学与临床*, 1998, 18(3): 61-63

(收稿日期:2006-07-27)