

基础研究·论著

人参皂甙对睡眠剥夺大鼠行为的影响

杨国愉、皇甫恩、苗丹民、王家同、谢小平、李强、陈足怀、齐建林、王伟

(中国人民解放军第四军医大学航空航天医学系心理学教研室, 陕西 西安 710032)

摘要:目的 探讨人参皂甙(ginsenosides, GS)对睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)大鼠行为的影响。方法 用小平台水环境法(flower pot)建立大鼠SD模型。选择Sprague-Dawley大鼠24只,随机分为三组:24小时SD组,48小时SD组和72小时SD组,每组又设实验组和对照组。其中,实验组用GS连续灌胃5天,对照组灌生理盐水,然后给予不同时间的SD观察各组SD前后“Y”迷宫和旷场反应中的行为变化。结果 ①“Y”迷宫学习:24SD、48SD和72SD的正确反应率,实验组显著高于对照组($P < 0.05$);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,72SD差别最为明显($P < 0.01$)。②旷场反应测试:72SD的中央格停留时间和垂直活动得分,实验组显著低于对照组($P < 0.05$);24SD和48SD,二组无显著差异($P > 0.05$)。48SD和72SD的水平活动得分,实验组显著高于对照组($P < 0.05$);24SD,实验组和对照组无显著差异($P > 0.05$)。这种差别也随SD时间的延长而加大,72SD差别最为明显($P < 0.01$)。结论 连续口服GS对SD造成的大鼠学习记忆能力受损有明显保护作用。在一定睡眠剥夺时间内,这种保护作用随SD时间的延长而增强。

关键词:睡眠剥夺;人参皂甙;大鼠;学习;记忆;活动性

Effects of ginsenosides on behaviors of rats in sleep deprivation YANG Guo-yu, HUANGFU En, MIAO Dan-min, et al. Department of Psychology, Faculty of Aerospace Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi, 710032

Abstract: Objective To explore the effects of ginsenosides(GS) on the behaviors of rats in sleep deprivation(SD). **Methods** SD was induced in male Sprague-Dawley rats by employing "flower pot" technique. 24 rats were divided into three groups randomly: 24SD(being deprived of sleep for 24 hours), 48SD(being deprived of sleep for 48 hours), 72SD(being deprived of sleep for 72 hours), and every group was also divided into two subgroups: experimental group and control group. Ginsenosides were forced fed to the experimental groups continuously for 5 days, and normal saline, to the controls, then the rats were being deprived of sleep for different time. Before and after SD immediately, the behaviors of rats were studied in "Y" maze test and open-field test. **Results** ①"Y" maze test. Compared with control groups, the accuracy of reaction of experimental groups increased significantly in 24SD, 48SD and 72SD($P < 0.05$), and the time of electrification, decreased markedly($P < 0.05$). The difference enhanced with the increase of SD time, and reached to the most in 72SD($P < 0.01$). ② Open-field test. Compared with the control groups, the time of staying in center and the Rearing of experimental groups increased significantly in 72SD($P < 0.05$), and there was no obvious difference between 24SD and 48SD($P > 0.05$), the Crossing of experimental groups increased significantly in 48SD and 72SD($P < 0.05$), and there were no obvious difference in 24SD($P > 0.05$). **Conclusion** GS can improve the disorder of learning, memory and activity of rats induced by SD, and the effect may enhance with the increase of SD time to a certain extent.

Key words: Sleep deprivation; Ginsenosides; Rats; Learning; Memory; Activity

中图分类号: Q428 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8559(2001)02-0084-03

睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)可引起机体认知功能、情绪、行为及免疫功能等一系列改变。在战争环境下或特殊职业里,睡眠剥夺是不可避免的。因此,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对药物应用、睡眠卫生、作息制度、及训练等方面^[1]。其中对药物应用的研究主要针对西药,如镇静催眠药、中枢兴奋药等,而对中药的探讨很少见。本研究着眼于中药领域,用动物行为学的方法,初步探讨人参皂甙(ginsenosides, GS)对睡眠剥夺的对抗作用。

材料和方法

一、实验动物及分组:成年、雄性、健康上海产Sprague-Dawley大鼠27只,体重 (180 ± 15) g(由第四军医大学动物研究所提供)。删除对电击不敏感的大鼠3只。将余下的24只大鼠随机分为3组,每组8只:24SD为24小时SD组,48SD为48小时SD组,72

SD为其中72小时SD组。各组动物又随机分为实验组和对照组,其中,实验组5只,对照组3只。

二、睡眠剥夺模型的建立:采用小平台水环境法(flower pot)^[2]建立大鼠SD模型。本教研室根据文献,制作 $30 \times 30 \times 30$ cm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,水温保持在 20°C 左右,水面距平台面约1.0cm。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12h/12h明暗交替,室内温度控制在 $18 \sim 22^\circ\text{C}$ 。实验前,让大鼠熟悉适应环境一周。

三、药物来源及给药方法:人参皂甙,由白求恩医科大学植物化学教研室提供,为人参茎叶皂甙(ginseng stem-leaves saponins, GSLS),粉剂,GS含量为90%以上。实验时,以生理盐水稀释成适当浓度,以 50mg/kg 灌胃给药,每日1次,连续5日,对照组以同样方式给予等量生理盐水。然后给予不同时间的SD。

四、行为实验:"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,旷场反应箱(open field test, OFT)由本室根据文献^[3]自制。

1. “Y”迷宫 三个相互连通的臂,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。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。以给电击后一次性跑入安全区为正确反应,否则为错误反应。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 训练的总触电时间为触电时间(time of electrification)。

2. 旷场反应箱高 40cm,直径 80cm,周壁为黑色,地面由面积相等的 25 块黑白相间的方格组成旷场。测试时,将大鼠置于旷场反应箱底面中心,观察其 3min 的行为。观察指标:以大鼠在中央格停留的时间为中央格停留时间(time of staying in center),以大鼠穿越底面的方格数为水平运动得分,以后肢站立的次数为垂直活动得分。记录垂直活动得分、水平活动得分和中央格内停留时间。

3. 行为实验程序 学习:各组大鼠均适应环境后开始进行“Y”迷宫空间分辨学习训练。以 10 次训练为一训练单元,中间休息 15 分钟,每日每鼠训练 40 次,共训练 3 天。行为测试:各组动物均于 SD 前和 SD 后立即测试其“Y”迷宫学习成绩和旷场反应情况。

五、数据处理

“Y”迷宫正确反应率、触电时间及旷场反应实验水平活动得分、垂直作用得分和中央格停留时间取每组中各只大鼠的平均值,实验数据采用 SPSS 软件包进行单因素方差分析,两两比较用 Neuman-Keuls 检验。

结 果

一、“Y”迷宫学习成绩

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。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($P > 0.05$)。24SD、48SD 和 72SD 大鼠的正确反应率,实验组显著高于对照组($P < 0.05$);触电时间,实验组显著低于对照组($P < 0.05$)。而且这种差别随 SD 时间的延长而加大,72SD 差别最为明显($P < 0.01$)(见表 1、表 2)

表 1 不同时间 SD 大鼠在“Y”迷宫训练中的正确反应率(%)

组 别	00SD	24SD	48SD	72SD
实验组	97.50±5.00	97.50±5.00*	92.50±4.51*	85.00±7.91**
对照组	95.00±5.77	87.50±5.00	80.50±4.78	50.00±8.25

与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

二、旷场反应测试情况

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 的中央格停留时间和垂直活动得分,实验组显著

低于对照组($P < 0.05$);24SD 和 48SD,实验组和对照组无显著差异($P > 0.05$)。48h 和 72hSD 的水平活动得分,实验组显著高于对照组($P < 0.05$);24SD,实验组和对照组无显著差异($P > 0.05$)。同样,这种差别随 SD 时间的延长而明显,72SD 差别最为明显($P < 0.01$)(见表 3~表 5)。

表 2 不同时间 SD 大鼠在“Y”迷宫训练中的触电时间(s)

组 别	00SD	24SD	48SD	72SD
实验组	31.23±2.67	29.75±4.49*	34.13±2.73*	40.03±6.53**
对照组	28.98±2.80	41.40±3.70	62.75±4.94	115.97±4.12

与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 3 不同时间 SD 大鼠在旷场反应中的中央格停留时间(s)

组 别	00SD	24SD	48SD	72SD
实验组	6.74±0.53	4.22±0.28	1.12±0.13	1.68±0.80*
对照组	7.97±0.59	3.47±0.30	1.57±0.45	2.83±0.84

与对照组比较 * $P < 0.05$

表 4 不同时间 SD 大鼠在旷场反应中的垂直活动得分

组 别	00SD	24SD	48SD	72SD
实验组	6.40±0.65	12.80±0.61	17.80±1.67	20.60±2.40**
对照组	6.33±0.57	11.33±0.93	8.00±3.67	6.67±2.30

与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 5 不同时间 SD 大鼠在旷场反应中的水平活动得分

组 别	00SD	24SD	48SD	72SD
实验组	13.40±1.67	45.80±1.13	45.60±4.98*	91.60±1.65**
对照组	14.33±1.17	46.00±1.52	41.33±5.13	49.33±1.21

与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

讨 论

SD 是一种特殊的心理、生理状态,它可造成动物情绪不稳、易激惹,学习、记忆能力下降。本实验采用的 SD 装置—小平台水环境法是研究 SD 的常用方法。它是利用面积有限的小平台使大鼠只能立于其上,当其进入快速眼动(rapid eye move, REM)睡眠时,大鼠神志消失,全身肌肉松弛骤然落水而惊醒,只好爬上平台以维持清醒状态,再进入 REM 睡眠又落水,如此反复导致 SD。该方法主要剥夺 REM 睡眠。既往研究认为 REM 睡眠对学习记忆的获得有重要意义,REM 睡眠 SD 影响学习记忆能力。Smith^[4], Youngblood^[2] 等的研究表明,REM 睡眠 SD 对大鼠在 Morris 迷宫中的空间学习(spatial learning)、参照性空间记忆(reference spatial memory)产生明显损害,而对非空间学习、工作记忆(working memory)则无明显影响。

本研究结果表明,大鼠经过 SD 后,其学习、记忆能力均受影响,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。且其影响程度随 SD 时间的延长而加大。这与以往研究结果相一致^[5]。SD 前给大鼠连续口服 GS 可有效的改善 SD 造成的学习记忆功能下降,GS 对其学习记忆能力损害有明显保护作用,使其正确反应率提高,触电时间减少。这种对抗作用随 SD 时间的延长而增强。但 GS 对正常大鼠(SD 前)的学习记忆促进作用不明显。这可能与中药起效慢,作用缓和,作用时间持久有关。旷场反应测试结果提示,GS 对短时间 SD(如 24、48 小时)的自发活动和探究反射无明显影响,但对较长时间(72 小时)的 SD,却可显著提高其自发活动和探究行为。这可能是

24、48 小时的 SD 可使大鼠兴奋性增强,72 小时 SD 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。

学习、记忆脑的最高级机能—智能的重要组成部分,它们是两个不同而密切联系的神生物和生理、心理过程。学习与记忆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 睡眠 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,近年来的研究发现,它含有多种单体,如 Ra、Rh、Rl、Rg、Rh、Po、F4 等。GS 对学习记忆的促进作用,国内外学者已进行了大量研究^[1]。发现 GS 对正常动物和学习记忆受损动物(如休克、脑缺血、药物等)的学习记忆均有促进作用。有的研究还发现,这种作用对学习记忆受损动物更为明显^[7]。本研究表明,GS 对 SD 大鼠的学习记忆受损有明显保护作用,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。这在既往的研究中也已得到证实。GS 促进学习记忆的中枢机制已有大量文献报道^[8-9]。研究认为,GS 的主要促智成分 Rh1 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。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^[10]。

在军事等特殊领域里,睡眠剥夺是不可避免的。寻找有效的 SD 对抗措施有重要意义。人参皂甙作为中药,有其优越性,如能平衡治病、易得、无短长期副作用、无成瘾性等,应大力倡导在中医中药领域对 SD 对抗措施的研究,以满足作战等特殊职业的需要。

[参考文献]

- [1] 张舒,吴兴桥.睡眠剥夺对工作能力影响的防护研究进展[J].解放军预防医学杂志,1998,16(1):74~77.
- [2] Youngblood BJ, Zhou J, Smagin GN, et al. Sleep deprivation by the "flower pot" technique and spatial reference memory[J]. Physiol Behav, 1997, 61(2):249~256.
- [3] 徐叔云,卜如康,陈修主编.药理实验方法学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1991:642~643.
- [4] Smith CJ, Conway JM and Rose GM. Brief paradoxical sleep deprivation impairs reference, but not working memory in the radial arm maze task[J]. Neurobiol Learn Mem, 1998, 69(2):211~217.
- [5] 丁朝阳,姜兰君.睡眠剥夺对大鼠行为和脑电图的影响[J].解放军预防医学杂志,1996,13(6):430~432.
- [6] MA Tianan, YU Qinghai, CHEN Minghua. Effect of ginseng saponins on one-way avoidance behavior in rats[J]. Acta Pharmacologica, 1991, 12(5):403~406.
- [7] 曹颖林, Petrov VD, Radarov L, et al. 中国 GSLS 对大鼠行为的影响[J].沈阳药科大学学报,1996, 13(3):185~188.
- [8] 陈嘉峰,崇瑞义,秦宸.人参皂甙对实验性脑缺血组织内 Ach、ChAT 的影响[J].Chin J Neurosci, 1995, 2(2):90~92.
- [9] Salim KN, McEwen BS, Chao HM. Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1997, 47(12):177~182.
- [10] 刘健,姜艾琳.人参总皂甙对大鼠海马突触影响的形态定量研究[J].基础医学与临床,1998,18(3):61~63.

作者简介:杨国榆(1970-),男,云南昆明人,1995年毕业于第三军医大学后攻医学系,现为第四军医大学在读研究生。

收稿日期:2000-09-11

编辑校对:匡江涛

《国外医学精神病学分册》征订

《国外医学精神病学分册》是由卫生部主管,湖南医科大学主办的医学信息期刊,主要登载综述类文章,全面介绍国外在精神卫生领域内的新成果、新进展、新技术和新观念。该刊以临床实用为原则,兼顾最前沿的基础学说,适合各级精神科医务工作者和医学心理从业人员参阅。该刊为季刊,每期4元,全年16元。邮发代号42-12,欢迎到各地邮局订阅。

《中国神经精神疾病杂志》征订

《中国神经精神疾病杂志》是卫生部属学术期刊,为核心期刊之一,主要报道国内神经系统疾病治疗的新成果,介绍较成熟的临床经验,及成功的技术革新方法。有著名专家撰文,阐述现代神经科的热点问题,及学术讨论,有助于读者深入认识神经科学的现状和发展趋势。该刊坚持面向临床,注重科学性和先进性,适合各级临床医生订阅。作为中国科技论文统计源期刊亦是有关科研机构 and 医学情报所、图书馆需要收藏的期刊。该刊为双月刊,每期7.5元,邮发代号46-45,欢迎到各地邮局订阅。也可以直接向中山医科大学期刊服务中心邮购,地址:广州市中山二路74号。邮编:510080,联系人:胡小姐。