

人参皂苷 Rb1 对睡眠剥夺大鼠学习记忆及脑内生长抑素表达的影响

董静尹, 王俊波, 方洁, 袁张根, 陆柯洁, 金怡, 曾玲晖
(浙江大学城市学院, 浙江 杭州 310015)

[摘要] 目的:研究人参皂苷 Rb1 (ginsenosides Rb1, GSRb1) 对睡眠剥夺 (sleep deprivation, SD) 大鼠学习记忆与海马及额叶生长抑素 (somatostatin, SS) 表达的影响。方法:大鼠随机分为睡眠剥夺 2 d 组、4 d 组、6 d 组和未睡眠剥夺 (SD 0 d) 组, 每组再分为 GSRb1 用药组和生理盐水对照组, 共 8 组。采用改良小平台水环境法制作 SD 大鼠模型。造模前大鼠分别腹腔内注射 GSRb1 30 mg/(kg · d) 或生理盐水 7 d。睡眠剥夺 2 d、4 d 和 6 d 后采用 Morris 迷宫检测各组大鼠学习记忆能力, 免疫组织化学法结合图像分析脑内 SS 阳性神经元数量及 SS 平均光密度。结果:与 SD0d 组大鼠比较, SD 各组大鼠游泳平均速度减慢 ($P < 0.01$), 逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$); 海马 CA4&DG 区 SS 表达下降 ($P < 0.05$); SD 2 d 组大鼠额叶 SS 表达无明显变化 ($P > 0.05$), 而 SD 4 d、6 d 组 SS 表达减少明显 ($P < 0.05$)。与生理盐水对照组比较, SD 组同时段的 GSRb1 用药组大鼠游泳平均速度显著加快 ($P < 0.05$), 逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$), 用药组各时段海马内 SS 阳性神经元数量均明显增多, SS 表达增强 ($P < 0.05$)。结论:人参皂苷 Rb1 能显著改善 SD 大鼠认知功能, 该作用可能与增加海马内 SS 密切相关。

[关键词] 人参皂甙/治疗应用; 生长抑素; 学习障碍/药物治疗; 记忆障碍/药物治疗; 迷宫学习; 海马/细胞学; 额叶/细胞学; 神经元/细胞学; 睡眠剥夺

[中图分类号] R 338.63 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2013)02-0197-08

Effects of ginsenosides Rb1 on learning and memory and expression of somatostatin in sleep deprivation rats

DONG Jingyin, WANG Junbo, FANG Jie, YUAN Zhanggen, LU Kejie, JIN Yi, ZENG Linghui (City College, Zhejiang University, Hangzhou 310015, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the effects of ginsenosides Rb1 (GSRb1) on learning and memory and expression of somatostatin (SS) in the hippocampus and the frontal cortex in rat model of sleep deprivation (SD). **Methods:** Rats were randomized into groups of SD 2 d, SD 4 d, SD 6 d, and SD 0 d, while each group was sub-divided into GSRb1 group and normal saline (NS) sub-groups. Rats were intraperitoneal administered with 30 mg/(kg · d) of GSRb1 or NS for 7 d, then the learning and memory abilities were examined by measuring average swimming speed and mean escape latency using Morris

收稿日期:2012-01-04 修回日期:2012-04-16

基金项目:浙江大学城市学院大学生科研项目(X2011562098);浙江省教育厅科研基金项目(Y200909882);浙江省自然科学基金项目(Y2100417)。

作者简介:董静尹(1976-),女,基础医学硕士,讲师,从事神经系统疾病形态学研究。

通讯作者:曾玲晖(1972-),女,药理学博士,教授,从事神经系统疾病药理学研究;E-mail:zenglh@zucc.edu.cn

maze. Expression of somatostatin was detected with immunohistochemical method and image analysis in the hippocampus and the frontal cortex. **Results:** Compared with SD 0 d rats, SD rats exhibited significant decrease in the average swimming speed and increase in the escape latency ($P < 0.01$). The expression of somatostatin in the hippocampus was decreased significantly in SD 2 d, SD 4 d and SD 6 d rats ($P < 0.05$). However, decrease was only observed in SD 4 d and SD 6 d rats in the frontal cortex ($P < 0.05$). Parallel comparison between NS control and GSRb1 treated rats demonstrated that rats treated with GSRb1 in each subgroup exhibited faster swimming speed and shorter escape latency ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression of somatostatin was increased in SD 2 d, SD 4 d and SD 6 d rats in the hippocampus and in SD 4 d and SD 6 d rats in the frontal cortex ($P < 0.05$), respectively. **Conclusion:** GSRb1 enhances the expression of somatostatin in sleep deprivation rats and subsequently may improve learning and memory abilities of rats.

[**Key words**] Ginsenoside/therapeutic use; Somatostatin; Learning disorders/pharmacology; Memory disorders/pharmacology; Maze learning; Hippocampus/cytology; Frontal lobe/cytology; Neurons/cytology; Sleep deprivation

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2013, 42(2):197-204.]

睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)是指机体因各种原因致部分或全部丧失正常睡眠量的状态,可通过脑内多种神经递质的介导引起感觉、直觉、认知和精神活动等方面的复杂变化,对人体心理、生理、生活、工作多方面造成严重影响,在我国因睡眠障碍引起的疾病占各类疾病总数 80% 以上^[1]。因此,SD 对机体的影响及防治研究已成为研究热点之一。已有研究表明,SD 对动物的学习记忆有明显影响^[2]。

脑内生长抑素(somatostatin, SS)具有激素和神经递质的双重作用,在中枢神经系统内参与了多种生理功能的活动和调节,如调节递质和激素的释放及神经元的兴奋点燃活动等;近年来,SS 对学习记忆的作用受到密切关注,如 Alzheimer 病变严重的脑区 SS 神经元数量减少,SSmRNA 表达下降^[3],脑室内注射 SS 能明显增加电惊厥休克后大鼠的被动回避潜伏期。传统中药人参有效成分人参皂苷 Rb1 (ginsenosides Rb1, GSRb1)有明显促智效应^[4],能显著改善电休克、缺血、药物所致等脑功能受损动物的学习记忆功能。本研究通过行为学方法结合免疫组化,探讨 GSRb1 对 SD 大鼠学习记忆能力及脑内生长抑素表达的影响,为临床防治 SD,改善患者认知功能提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 仪器、药品与试剂 Morris 水迷宫(深圳瑞沃德公司);Nikon50i 显微镜(日本 Nikon 公司);Microm 石蜡切片机(德国美康公司);GSRb1(上海融禾医药科技发展有限公司,批号 110520);生长抑素抗体(somatostatin, SS)(北京中山生物公司);即用型 SP 试剂盒(福建迈新公司)。

1.2 实验动物及分组 清洁级 1~2 月龄健康雄性 SD 大鼠 80 只,体重 120~140 g,由浙江省医科院提供[许可证号:SCXK(浙)2008-0033]。动物自由进食、饮水,室温保持在 23℃~25℃,给予 12 h/12 h 明暗交替(光照时间为 8:00~20:00)。适应性饲养 1 周,观察状态良好。其后进行首次 Morris 水迷宫行为训练。

根据睡眠剥夺时间的不同将大鼠随机分 4 组:SD 0 d 组(未剥夺睡眠组)、SD 2 d 组、SD 4 d 组和 SD 6 d 组;每组再分为 GSRb1 用药组和生理盐水对照组(NS),共 8 组,每组 10 只。

1.3 造模与给药 根据文献^[5],制作 78 cm × 52 cm × 28 cm 剥夺箱,采用改良小平台水环境法(flow pot)建立 SD 大鼠模型,剥夺箱内分布直径 8.5 cm,高 8 cm 平台 8 个,在平台周围注满水,水距平台约 3 cm,水温保持在 20℃ 左右。

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。为减少水环境法造成的应激干扰,SD0d 组采用水环境法大平台作为对照,该平台直径 15 cm,大鼠可以在平台上睡眠,其它环境与其余 SD 组相同。造模前,GSRb1 组大鼠以 30 mg/(kg·d)腹腔注射给药,每日 1 次,连续 7 d,对照组以同样方式给予等量生理盐水。在 SD 2 d、4 d 和 6 d 之后进行 Morris 水迷宫测试。

1.4 Morris 水迷宫行为训练及测试 首次训练之前,大鼠分笼饲养以适应实验室环境。每日逐一给予适当抓摸以消除其恐惧感。实验前将大鼠置于平台上适应 10 s,随后将大鼠随机从不同象限面壁置入池内,大鼠登上平台 5 s 后终止记录,最长记录时间为 120 s,若大鼠在 120 s 内不能上台,引导其爬上平台适应 10 s,最后将大鼠擦干放回鼠笼。如此将大鼠置入游泳池,每天 4 次,每次间隔 1 h,训练 4 d,其间保持水温恒定,水下平台位置固定不变。记录大鼠游泳平均速度 (average speed) 及逃避潜伏期 (escape latency),以评判大鼠的学习记忆能力。在 SD 2 d、4 d、6 d 后进行测试,每只大鼠从不同象限中点面壁入水 4 次,计算机自动跟踪记录游泳轨迹。检测完成之后,采用灌注固定法取脑。

1.5 免疫组织化学方法 将大鼠以 1% 戊巴比妥那腹腔麻醉 (30 mg/kg) 后,打开胸腔,经左心室升主动脉 4% 多聚甲醛 (pH 7.2) 灌流取脑。取前脑至小脑前全脑,以视交叉后 4 mm 为界,切开脑组织置于相同固定液内后固定 4~8 h,石蜡包埋制片。连续切片,隔 3 取 1,片厚 5 μm。每只大鼠额叶,海马切片分为 2 套,分别进行 HE 染色及免疫组织化学染色方法。

应用免疫组织化学 SP 法检测各组大鼠额叶,海马 CA4&DG 区 SS 表达水平。染色步骤按照生长抑素测定试剂盒说明书进行。SS 抗体浓度为 1:50。阴性对照以 0.01 mol/L PBS 代替一抗进行免疫组织化学染色,余步骤相同。

1.6 SS 阳性神经元计数及统计学处理 光镜下观察 SS 阳性神经元的分布,应用 Nikon 显微镜 Image-Pro Plus (IPP) 分析软件计数额叶和海

马 CA4&DG 区 SS 阳性神经元数量及平均光密度。每只大鼠额叶和海马区各取 2 张不同断面切片,并使切片在各组间保持断面一致。所得数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。结果采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及共同对照 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SD 大鼠精神状态 SD 大鼠从睡眠剥夺开始出现自主活动明显增加,对外界刺激较为明显,易激惹,表明大鼠兴奋性明显提高。SD 4 d 始激惹征显著,大鼠全身毛竖起,难于抓取,轻微刺激后互相撕咬,探究行为和攻击性增强,SD 6 d 大鼠转为抑制状态,无刺激时低头思睡,但情绪紧张,警惕性极强,轻微刺激激惹明显,攻击性强。SD 0 d 组大鼠虽然处于水环境中,早期有自主活动增加现象,但程度轻,大鼠基本无互相撕咬和攻击等易激惹表现。

2.2 Morris 迷宫测定结果 与 SD 0 d 大鼠相比,SD 2 d 组、SD 4 d 组和 SD 6 d 组大鼠游泳平均速度减慢 ($P < 0.01$),逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$)。与生理盐水对照组相比,同时段 SD 用药组大鼠的游泳平均速度加快 ($P < 0.05$),逃避潜伏期变短 ($P < 0.05$),差异具有统计学意义 (表 1)。

表 1 大鼠 Morris 迷宫平均速度和逃避潜伏期检测数据

Table 1 Average speed and escape latency detected in Morris maze

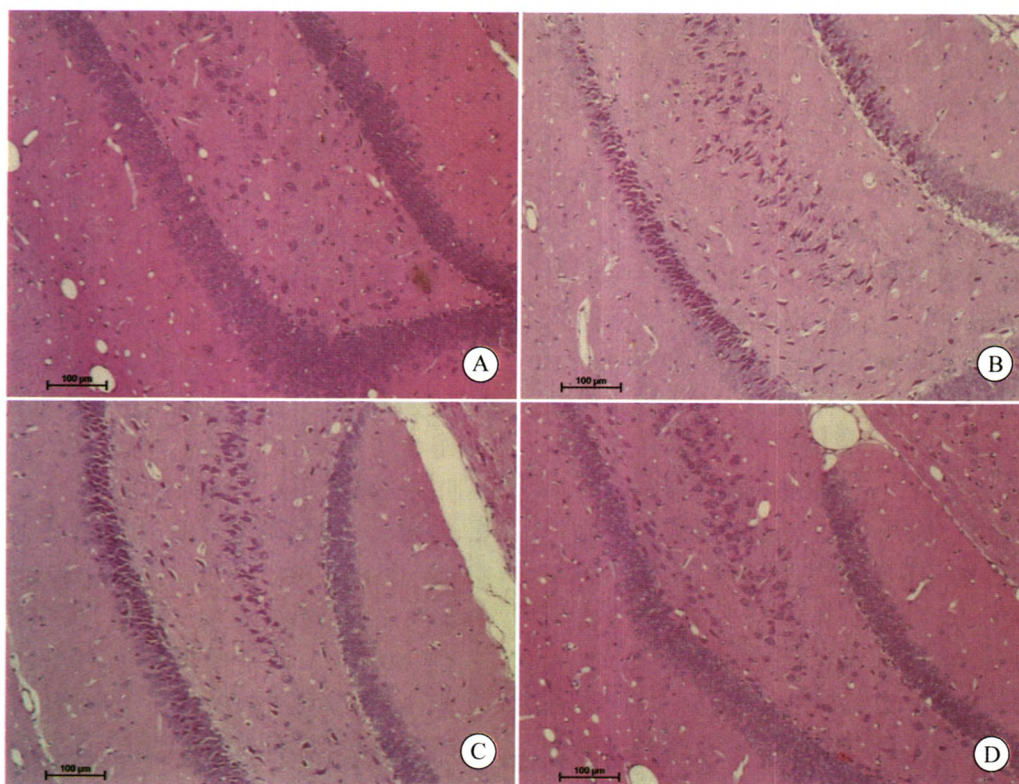
(n = 10, $\bar{x} \pm s$)		
组别	游泳速度/(m·min ⁻¹)	逃避潜伏期/s
SD 2 d + NS	50.62 ± 3.30**	9.23 ± 1.10**
SD 2 d + GSRb1	54.50 ± 2.16 [△]	7.83 ± 0.91 [△]
SD 4 d + NS	45.73 ± 2.26**	15.56 ± 2.09**
SD 4 d + GSRb1	49.15 ± 1.70 [△]	11.91 ± 1.35 ^{△△}
SD 6 d + NS	42.32 ± 2.15**	16.41 ± 2.58**
SD 6 d + GSRb1	46.08 ± 2.70 [△]	13.02 ± 1.38 ^{△△}
SD 0 d + NS	58.71 ± 3.72	7.21 ± 0.96
SD 0 d + GSRb1	63.82 ± 6.68 ^{△△}	5.27 ± 0.76 ^{△△}

与 SD 0 d + NS 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同时段 NS 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。

2.3 光镜下 HE 切片观察 光镜下,SD 0 d 组大鼠海马组织结构基本正常,细胞排列整齐,形态无殊,细胞着色均匀,胞质呈淡红色,胞核呈蓝色并较清亮;而 SD 4 d 和 6 d 组大鼠海马 CA4 和齿状回区(DG 区)细胞排列紊乱,细胞间隙增宽,神经元发生明显变性和坏死,出现胞

质红染,胞核固缩,碎裂,溶解等;SD 2 d 组大鼠海马内神经元分布,形态特点与 SD 0 d 组基本相近(图 1)。

对于额叶而言,HE 镜下该区神经元数量,分布,形态在各组间大鼠无明显差异。



A:SD 2 d + NS 组;B:SD 4 d + NS 组;C:SD 6 d + NS 组;D:SD 0 d + NS 组(HE 染色, $\times 100$)。

图 1 大鼠海马 CA4&DG 区 HE 染色

Fig. 1 Representative sections of HE staining of CA4&DG region in the hippocampus

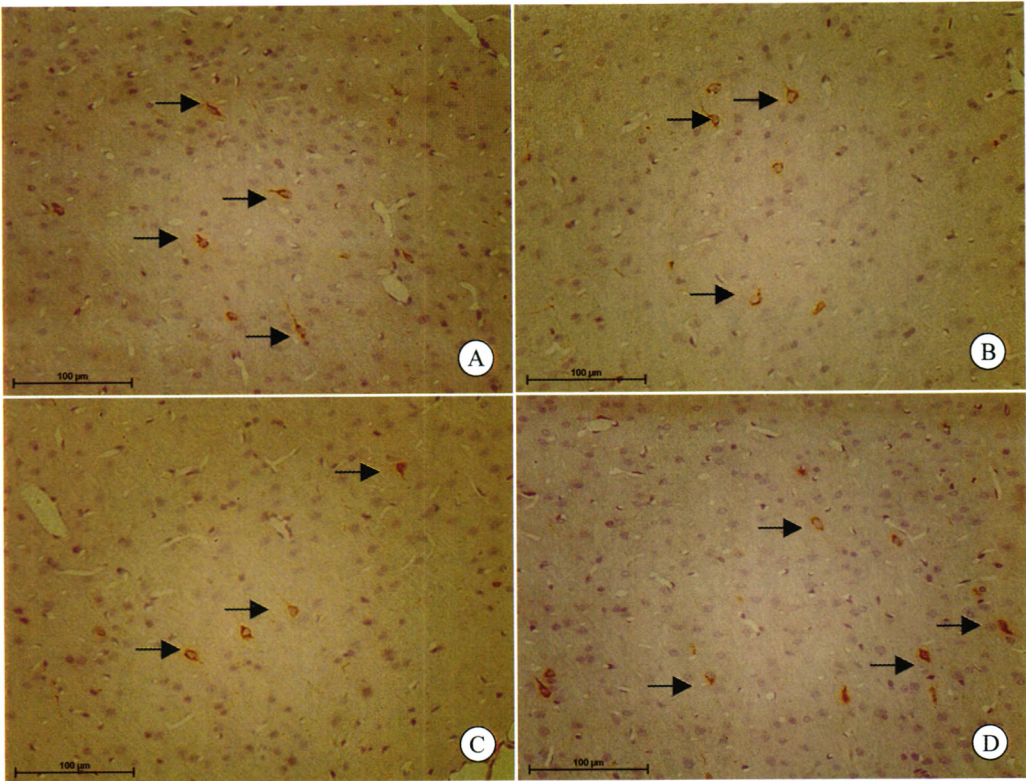
2.4 SS 神经元计数及平均光密度测定 SS 阳性产物为棕黄色点状或颗粒状沉积,主要分布于神经元胞浆,突起和神经纤维内,颗粒大小不一,胞核不着色,苏木素复染后呈蓝色。

在细胞形态和 SS 免疫阳性产物的表达强弱方面亦有相应改变,主要表现为随 SD 时间的延长,SS 阳性细胞胞体轮廓稍显模糊,突起变短或消失,胞质着色不均,阳性产物染色变浅(图 2,图 3)。

与 SD 0 d 组比较显示,SD 4 d 组,SD 6 d 组额叶 SS 神经元数量减少($P < 0.05$),SS 平均光密度明显下降($P < 0.01$)。与同时段生理盐

水对照组相比,SD 4 d 组和 SD 6 d 用药组大鼠 SS 阳性神经元及表达差异显著($P < 0.05$),而 SD 2 d 用药组无明显变化($P > 0.05$,表 2)。

海马 CA4&DG 区 SS 阳性神经元比较显示,SD 2 d 组,SD 4 d 组,SD 6 d 组和 SD 0 d 组比较,均有统计学意义($P < 0.01$)。与同时段生理盐水对照组比较,SD 2 d,SD 4 d,SD 6 d 三组用药大鼠亦有显著差异($P < 0.05$);值得注意的是 SD 0 d 用药组与 SD 0 d 生理盐水组比较,SS 神经元数量及表达差异显著($P < 0.01$,表 3)。



A:SD 2 d + NS 组;B:SD 4 d + NS 组;C:SD 6 d + NS 组;D:SD 0 d + NS 组(免疫组化染色, × 200 倍;箭头标示为 SS 阳性细胞).

图 2 大鼠额叶 SS 免疫阳性神经元

Fig. 2 Representative sections of immunohistochemical staining showing somatostatin positive neurons in the frontal cortex

表 2 各组大鼠额叶 SS 神经元数量及平均光密度

Table 2 Number of SS neurons and mean optical density in the frontal cortex (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组 别	Number of neurons	Mean optical density
SD 2 d + NS	22.83 ± 1.72	228.39 ± 16.94
SD 2 d + GSRb1	23.47 ± 1.60	231.59 ± 17.83
SD 4 d + NS	21.64 ± 1.53 *	182.93 ± 11.75 **
SD 4 d + GSRb1	22.98 ± 1.73 ^Δ	218.82 ± 13.67 ^Δ
SD 6 d + NS	19.02 ± 1.68 **	156.32 ± 13.26 **
SD 6 d + GSRb1	22.06 ± 1.94 ^{ΔΔ}	173.69 ± 12.73 ^Δ
SD 0 d + NS	24.33 ± 2.49	235.07 ± 14.31
SD 0 d + GSRb1	29.15 ± 1.93	247.69 ± 16.736 ^{ΔΔ}

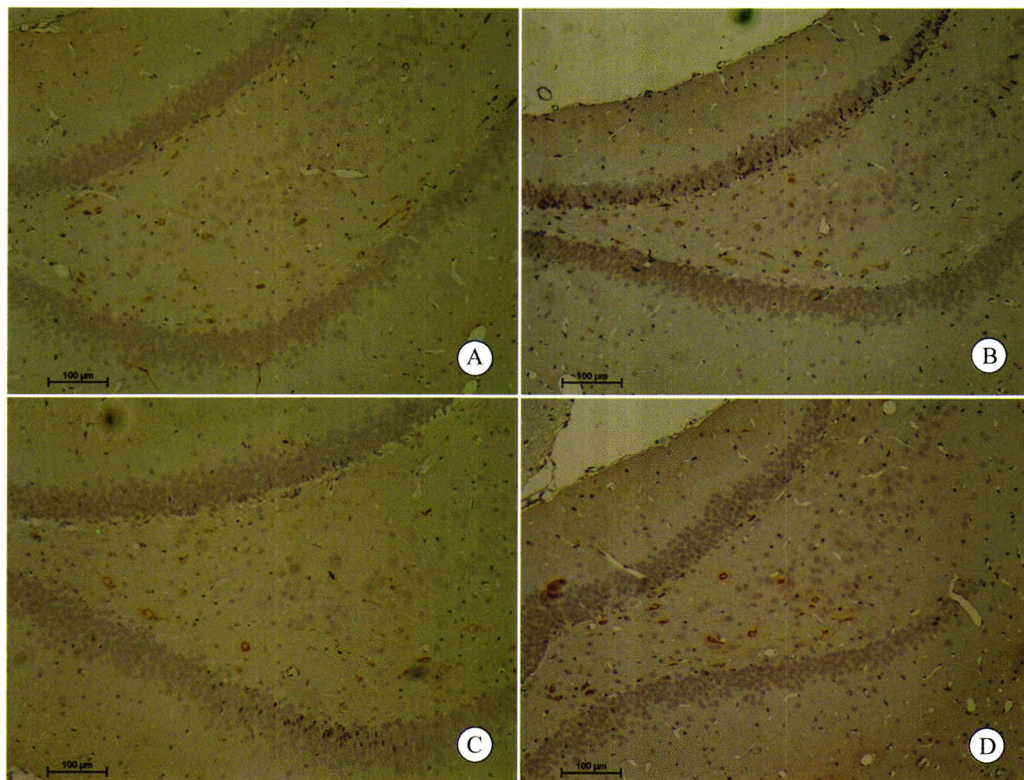
与 SD 0 d + NS 组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01; 与同时段 NS 组比较, ^Δ P < 0.05, ^{ΔΔ} P < 0.01.

表 3 各组大鼠海马 CA4&DG 区 SS 神经元数量及平均光密度

Table 3 Number of SS neurons and mean optical density in the hippocampus CA4&DG region (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组 别	Number of neurons	Mean optical density
SD 2 d + NS	20.65 ± 2.73 **	208.13 ± 22.69 *
SD 2 d + GSRb1	23.01 ± 2.09 ^Δ	221.78 ± 23.83 ^Δ
SD 4 d + NS	16.89 ± 1.73 **	175.49 ± 13.58 **
SD 4 d + GSRb1	19.45 ± 1.97 ^Δ	192.71 ± 19.80 ^Δ
SD 6 d + NS	12.06 ± 2.04 **	157.07 ± 18.32 **
SD 6 d + GSRb1	14.82 ± 1.99 ^Δ	175.71 ± 19.01 ^Δ
SD 0 d + NS	24.76 ± 2.43	226.83 ± 19.67
SD 0 d + GSRb1	27.75 ± 2.34 ^{ΔΔ}	256.72 ± 18.96 ^{ΔΔ}

与 SD 0 d + NS 组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01; 与同时段 NS 组比较, ^Δ P < 0.05, ^{ΔΔ} P < 0.01.



A:SD 2 d + NS 组;B:SD 4 d + NS 组;C:SD 6 d + NS 组;D:SD 0 d + NS 组(免疫组化染色, × 100 倍).

图 3 大鼠海马 CA4&DG 区生长抑素免疫阳性神经元

Fig. 3 Representative sections of immunohistochemical staining showing somatostatin positive neurons in CA4&DG region of the hippocampus

3 讨论

小平台水环境法是研究 SD 的常用方法, Machado 等^[6]通过脑电记录发现此法剥夺了大鼠的全部快波睡眠,慢波睡眠减少了 37%,具有简单可靠之优点。与此同时,水环境、一定程度的隔离和限制活动也会使动物产生一定程度应激反应。本研究显示睡眠剥夺大鼠早期即可出现自主行为增多,兴奋性增强行为学变化,同时伴有学习记忆能力显著下降,显示上述应激对于 SD 来说是次要的,并不至于影响实验结果^[7]。

已知睡眠具有抗氧化自由基作用,促进 γ -氨基丁酸(GABA)能神经递质的释放、对抗谷氨酸的兴奋毒性作用^[8],故在正常状态及睡眠剥夺初期机体能有效动用应激反应机制,产生保护作用。睡眠剥夺可致人体记忆力下降、情

绪与行为变化,造成脑损伤^[9,10]。本实验发现,大鼠自睡眠剥夺 2 d 起学习记忆能力即有明显减退,显示虽然睡眠剥夺早期机体能有效调动应激反应,逃避反射能力增强,仍不足以避免其认知减退,随着睡眠剥夺时间的延长,这种差别随之加大;显示长期的睡眠剥夺可致机体代偿机制逐渐紊乱,出现各种生理生化反应异常及相关神经元及神经递质的病变,进而导致认知功能的衰退。

SS 属于脑肠肽,除消化系统外,SS 神经元广泛分布于大脑皮层、海马及纹状体等区域中。SS 能易化海马长时程增强(long-term potentiation, LTP)的产生,促进学习记忆,使用半胱氨酸耗竭脑内 SS,可使大鼠学习记忆能力受损,而海马内注射 SS 能提高小鼠的空间学习能力^[11]。额叶 SS 神经元已证实与学习、认知等高级神经活动有关。本实验显示 SD 2 d 大

鼠额叶 SS 神经元数量及 SS 表达无显著变化,但学习记忆能力显著下降,可能是 SD 早期机体的一种代偿反应,虽然此时 SS 神经元及递质含量未明显减少,但 SS 表达可能较多出现于神经组织肿胀或受损的区域,因而不能发挥正常活性^[12]。作为信息储存的重要部位,海马区 SD 组大鼠 SS 神经元数量改变及递质含量变化颇为显著。自 SD 2 d 始,随剥夺时间的延长,神经元数量及 SS 表达减少渐趋显著,与 SD 大鼠行为学改变高度一致,提示海马 SS 神经元对 SD 颇为敏感,可能由于在脑神经环路中,神经元突起对环境因素较为敏感,而海马神经元树突发达有关^[13]。研究表明,睡眠剥夺可影响凋亡相关基因 bcl-2 和 bax mRNA 的表达,对于本实验显示的 SD 4 d 和 SD 6 d 组大鼠海马和额叶 SS 神经元数量减少和 SS 表达下降是否与此相关则有待证实。

与同时段生理盐水对照组相比, GSRb1 组大鼠学习记忆能力有不同程度改善,尤以 SD 4 d 和 SD 6 d 较为显著。对于海马 CA4&DG 区而言, GSRb1 可明显减轻 SD 各时段 SS 阳性神经元减少及 SS 表达下降,增加未剥夺睡眠组大鼠 SS 表达;对于额叶而言, GSRb1 仅对 SD 4 d, 6 d 组大鼠 SS 表达有明显影响,显示 GSRb1 改善 SD 大鼠 SS 相关的认知功能主要影响的是海马内神经元,或可能与海马神经元对 GSRb1 较为敏感有关。 GSRb1 是人参二醇系皂苷,研究显示 GSRb1 对动物的学习记忆有促进作用,尤其是对于学习记忆受损的动物更为明显。在抗氧化,清除自由基,抑制神经毒性,促进蛋白质合成等方面均有较强活性。 GSRb1 还可通过促进乙酰胆碱释放,增加神经末梢摄取乙酰胆碱,及营养神经,促进轴突生长等作用,发挥其促智效应^[14-15]。

目前,有关 GSRb1 促智机制研究已深入到分子水平。 GSRb1 可激活 cAMP 蛋白激酶途径,调节神经突触素磷酸化以改善大鼠空间学习记忆能力^[16];亦可通过激活蛋白激酶 A,增加大鼠皮质突触小体内 Ca^{2+} 依赖型谷氨酸释放以发挥其生理效应^[17]。已知神经营养因子对神经元的存活与突起生长至关重要, Gao 等研究显示, GSRb1 可增加脑缺血大鼠脑源性神

经营养因子 (BDNF) 及抑制 capase-3 表达,促进神经再生以改善其空间学习和记忆能力^[18]。不过, GSRb1 对 SD 大鼠海马 SS 神经元及神经递质表达影响的机制尚未明确。离体实验结果表明, GSRb1 可改善海马神经元增殖活力,并通过可能具有的保护线粒体功能以改善海马神经元产生 ATP 的能力^[19]。最新研究显示, GSRb1 可激活 Akt 和 ERK1/2 信号通路,促进海马神经元存活,诱导神经元突起生长以改善认知功能^[20-21]。结合本实验所显示的用药组 SD 大鼠海马 SS 神经元数量增多, SS 表达明显增加,我们推测 GSRb1 有可能通过改善 SS 神经元增殖活力,减少海马内 SS 神经元凋亡坏死,通过激活某种蛋白激酶影响信号传导通路以增加 SS 神经递质的表达发挥促智作用,具体作用机制尚待今后进一步深入研究。

References:

- [1] LI Haijing, GAO Yue, LIU Ping, et al (李海静,高月,刘萍,等). Progress in the study on insomnia animal model [J]. **Chinese Pharmacological Bulletin** (中国药理学通报), 2007, 23 (4): 437-440. (in Chinese)
- [2] STICKGOLD R, Walker M P. Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation [J]. **Sleep Med**, 2007, 8 (4): 331-343.
- [3] DONG Jingyin, SUN Baiqiang, ZHU Xi, et al (董静尹, 孙百强, 朱 晞, 等). Effects of ginsenosides on somatostatin mRNA expression in rat Alzheimer's disease model [J]. **Chinese Journal Of Anatomy** (解剖学杂志), 2005, 28 (4): 446-448. (in Chinese)
- [4] KHVOTCHEV M V, SUDHOF T C. Stimulus-dependent dynamic homo- and hetero-multimerization of synaptobrevin/VAMP and synptophysin [J]. **Biochemistry**, 2004, 43 (47): 15037-15043.
- [5] JIANG Peifang, XIA Zhezhi, JIANG Kewen, et al (江佩芳, 夏哲质, 江克文, 等). The relationship between neuronal apoptosis and expression of cannabinoid receptor 1 after epilepsy in sleep [J]. **Chin J Emerg Med** (中华急诊医学杂志), 2007, 16 (7): 711-715. (in Chinese)
- [6] MCHADO R B, HIPOLIDE D C, BENEDITO-

- SILVA A A, et al. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery [J]. **Brain Res**, 2004, 1004(1-2): 45-51.
- [7] YOUNGBLOOD B D, ZHOU J, SMAGIN G N, et al. Sleep deprivation induced by the Flower Pot technique and spatial reference memory [J]. **Physiol Behav**, 1997, 2: 249-256.
- [8] MODIRROUSTA M, MAINVILLE L, JONES B E. Dynamic changes in GABAA receptors on basal forebrain cholinergic neurons following sleep deprivation and recovery [J]. **BMC Neurosci**, 2007, 8: 15.
- [9] SCHUSSLER P, YASSOURIDIS A, UHR M, et al. Growth hormone-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone enhance non-rapid-eye -movement sleep after sleep deprivation [J]. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2006, 291(3): 549-556.
- [10] RUIZ F S, ANDERSEN M L, ZAGER A, et al. Sleep deprivation reduces the lymphocyte count in a non-obese mouse model of type 2 diabetes mellitus [J]. **Braz J Med Biol Res**, 2007, 40(5): 633-637.
- [11] LAMIRAULT L, GUILLOU J L, MICHEAU J, et al. Intrahippocampal injections of somatostatin dissociate acquisition from the flexible use of place responses [J]. **Eur J Neurosci**, 2001, 14(3): 567-570.
- [12] LI Jisheng, CHEN Jun, WANG Huaren, et al(李积胜, 陈俊, 王华仁, 等). Effects of zinc on NNOS and SS positive neurons in cerebral cortex of rats after sleep deprivation [J]. **Acta Nutrimenta Sinica**(营养学报), 2006, 28(1): 43-46. (in Chinese)
- [13] HAN Taizhen, WU Fumei(韩太真, 吴馥梅). **Neurobiology of learning and memory**(学习与记忆的神经生物学)[M]. Beijing: Publishing House of Peking Union Medical College and China Medical University, 1998: 208-209. (in Chinese)
- [14] WANG Q, SUN LH, JIA W, et al. Comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 for their effects on improving scopolamine-induced learning and memory impairment in mice [J]. **Phytother Res**, 2010, 24(12): 1748-1754.
- [15] LAI Hong, WANG Tieming, ZHAO Haihua, et al(赖红, 王铁民, 赵海花, 等). Effects of ginsenosides on cholinergic fiber of aged rats in hippocampus [J]. **Chinese Journal of Anatomy**(解剖学杂志), 2006, 29(2): 249-251. (in Chinese)
- [16] XUE J F, LIU Z J, HU J F, et al. Ginsenoside Rb1 promotes neurotransmitter release by modulating phosphorylation of synapsins through a cAMP-dependent protein kinase pathway [J]. **Brain Res**, 2006, 1106(1): 91-98.
- [17] CHANG Y, HUANG W J, TIEN L T, et al. Ginsenosides Rg1 and Rb1 enhance glutamate release through activation of protein kinase A in rat cerebrocortical nerve terminals (synaptosomes) [J]. **Eur J Pharmacol**, 2008, 578(1): 28-36.
- [18] GAO X Q, YANG C X, CHEN G J, et al. Ginsenoside Rb1 regulates the expressions of brain-derived neurotrophic factor and caspase-3 and induces neurogenesis in rats with experimental cerebral ischemia [J]. **J Ethnopharmacol**, 2010, 132(2): 393-399.
- [19] KE Lining, WANG Wei, ZHAO Xiaozhen, et al(柯荔宁, 王伟, 赵小贞, 等). Effect of ginsenoside Rb1 on hypoxia-induced damage of hippocampal neurons in SD rats [J]. **Journal Shanxi Med Univ**(山西医科大学学报), 2009, 40(8): 688-692. (in Chinese)
- [20] LIU Juan, QIU Ying, HE Jing, et al(刘娟, 裘莹, 何晶, 等). Effects of ginsenoside Rb1 and Rg1 on hippocampal neurons [J]. **Journal Of Tongji University: Medical Sciences**(同济大学学报: 医学版), 2011, 32(3): 1-6. (in Chinese)
- [21] LIU L, HOANG - GIA T, WU H, et al. Ginsenoside Rb1 improves spatial learning and memory by regulation of cell genesis in the hippocampal subregions of rats [J]. **Brain Res**, 2011, 1382: 147-154.

[责任编辑 黄晓花]