

左归丸对慢性睡眠剥夺老年大鼠学习记忆及海马组织炎症因子的影响

刘家峰¹, 胡金莲¹, 张颖², 刘展会³

(西安市第九医院中西医结合康复科¹, 神经内科², 神经外科³, 陕西 西安 710054)

摘要:目的 观察左归丸对慢性睡眠剥夺老年大鼠学习记忆及海马炎症因子的影响,探讨其对慢性睡眠剥夺老年大鼠学习记忆作用机制的研究。**方法** SPF级老年Wistar雄性大鼠40只,随机数字表法分成正常组、模型组、中药低剂量组、中药高剂量组、西药组,每组8只。正常组和模型组给等量生理盐水灌胃,中药低、中、高剂量组给予相应剂量的左归丸稀释液灌胃,西药组给予艾司唑仑片稀释液灌胃。采 Morris 水迷宫实验评价大鼠的记忆能力,ELISA 法测定各组大鼠血清及海马炎症因子的表达。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠在呼吸频率、心率、收缩压均增多,睡眠时间减低,穿越平台次数减少,逃避潜伏期时间延长,血清 IL-1、IL-6 水平升高,IL-10 水平降低,脑组织 GDNF 水平降低($P<0.05$);与模型组比较,中药低、高剂量组在呼吸频率、心率、收缩压均、睡眠时间均改善,穿越平台次数增多,逃避潜伏期时间减少,血清 IL-1、IL-6 水平降低,IL-10 水平升高,脑组织 GDNF 水平升高($P<0.05$);西药组大鼠在穿越平台次数及逃避潜伏期时间无明显变化,血清 IL-1、IL-6、IL-10 无明显变化,脑组织 GDNF 无明显变化($P>0.05$)。**结论** 左归丸可改善老年大鼠水迷宫穿越平台次数及逃避潜伏期时长、改善睡眠时间,可能与其降低血清 IL-1、IL-6,上调 IL-10,进而改善大鼠脑组织中 GDNF 水平有关。

关键词:慢性睡眠剥夺;老年大鼠;海马;左归丸;炎症因子;GDNF

中图分类号:R74

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.06.015

文章编号:1006-1959(2023)06-0073-04

Effects of Zuogui Pill on Learning and Memory and Inflammatory Factors in Hippocampus of Elderly Rats with Chronic Sleep Deprivation

LIU Jia-feng¹, HU Jin-lian¹, ZHANG Ying², LIU Zhan-hui³

(Rehabilitation Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine¹, Department of Neurology²,

Department of Neurosurgery³, Xi'an Ninth Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Zuogui pill on learning and memory and hippocampal inflammatory factors in elderly rats with chronic sleep deprivation, and to explore its mechanism of learning and memory in elderly rats with chronic sleep deprivation. **Methods** A total of 40 SPF aged Wistar male rats were randomly divided into normal group, model group, low-dose Chinese medicine group, high-dose Chinese medicine group and western medicine group, with 8 rats in each group. The normal group and the model group were given the same amount of normal saline by gavage. The low, medium and high dose groups of traditional Chinese medicine were given the corresponding dose of Zuogui pill diluted solution by gavage. The western medicine group was given estazolam tablets diluted solution by gavage. Morris water maze test was used to evaluate the memory ability of rats. The expression of inflammatory factors in serum and hippocampus of rats in each group was determined by ELISA. **Results** Compared with the normal group, the respiratory rate, heart rate and systolic blood pressure of the rats in the model group were significantly increased, the sleep time was significantly reduced, the number of crossing platforms was significantly reduced, the escape latency time was significantly prolonged, the levels of serum IL-1 and IL-6 were increased, the level of IL-10 was decreased, and the level of GDNF in brain tissue was decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the respiratory rate, heart rate, systolic blood pressure and sleep time of the low and high dose groups were significantly improved, the number of crossing the platform was significantly increased, the escape latency time was significantly reduced, the levels of serum IL-1 and IL-6 were decreased, the level of IL-10 was increased, and the level of GDNF in brain tissue was increased ($P<0.05$). In the western medicine group, there was no significant change in the time of crossing the platform and escape latency, serum IL-1, IL-6 and IL-10, and GDNF in brain tissue ($P>0.05$). **Conclusion** Zuogui pill can improve the times of crossing the platform and the escape latency in the water maze of elderly rats, and improve the sleep time, which may be related to the decrease of serum IL-1 and IL-6, the up-regulation of IL-10, and the improvement of GDNF level in brain tissue of rats.

Key words: Chronic sleep deprivation; Aged rats; Hippocampus; Zuogui pill; Inflammatory factor; GDNF

慢性失眠(chronic insomnia)是指睡眠障碍持续6个月以上,其特征为无法入睡或无法保持睡眠状

态,导致睡眠不足,又称入睡和维持睡眠障碍。失眠是引起认知功能障碍的重要原因之一,尤其是慢性失眠的老年人,其认知功能损害的风险增加了将近2倍^[1]。目前对失眠引起的认知功能障碍的发病原因及发病机制尚不清楚。研究显示^[2,3],慢性失眠的发病伴随机体的慢性免疫炎症反应,海马是学习记忆中枢,失眠可导致海马依赖的学习记忆功能下降。炎症因子可诱发海马的小胶质细胞活化导致神经元的

基金项目:陕西省重点研发计划项目(编号:2021SF-400)

作者简介:刘家峰(1979.2-),男,辽宁盖州人,硕士,副主任医师,主要从事中医治疗睡眠障碍及脑卒中后期康复

通讯作者:刘展会(1964.1-),男,陕西西安人,本科,主任医师,主要从事颅内肿瘤、颅内动脉瘤、重型颅脑损伤以及脑卒中的临床治疗

损伤^[4,5]。中医认为脑髓空虚是本病的基本病理变化,肾精亏虚是其基本病机。肾虚患者大多脑功能下降、大脑神经细胞减少、内分泌功能紊乱、炎症因子和变态反应增加,其中高炎症因子水平占主导地位^[6,7],从“阴虚”论治该病效果显著。左归丸是治疗肾阴虚的代表方剂,用于改善认知功能疗效显著,但机制未明^[8-10]。本实验从慢性失眠炎症因子角度阐述左归丸的有效性,为左归丸介导调节睡眠防治认知障碍提供科学依据,旨在为临床从睡眠预防认知障碍疾病的发生发展提供理论依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选40只24月龄老年Wistar大鼠,全部雄性,购自西安交通大学实验动物中心。合格证号:SYXK(陕)2021-005。大鼠饲养于SPF级实验动物中心,给普通饲料。西安市第九医院实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 D-半乳糖(上海试剂二厂生产,货号A100028,规格:1 kg/袋),用生理盐配成1.5%的溶液,4℃冷藏;咖啡因(美国Sigma公司,规格:50 g/袋),用灭菌注射用水配成浓度为1.5%,4℃冷藏;左归丸(北京同仁堂股份有限公司,国药准字Z11020735,规格:54 g/瓶),将水丸研碎后溶于蒸馏水中制成0.3 g/ml混悬液;艾司唑仑片(湖北制药有限公司生产,国药准字H42021522,规格:1 mg/片),将片剂研碎后溶于灭菌注射用水中制成1 g/ml混悬液。白介素1 β (IL-1 β)、白介素6(IL-6)、白介素10(IL-10)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(武汉恩菲生物科技有限公司,货号分别为ER1094、ER0042、ER0033;上海泽叶生物技术有限公司,货号ZY-E6025R)。

1.3 仪器 电泳仪(上海天能科技有限公司,型号EPS300);低温高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司,型号:GL-21MC);水平摇床(北京六一仪器厂,型号WD-9405B);电热恒温培养箱(上海博讯公司医疗设备,型号HXP-9052MBE);恒温水浴振荡器(常州国华电器有限公司,型号:SHA-B);高速电动匀浆机(江苏金坛市环宇科学仪器,型号:FSH-II);全自动酶标仪(奥地利Antho-sLabtec Instruments,型号:anthos 2010);电热恒温培养箱(上海博讯公司医疗设备,型号:HXP-9052MBE);Morris水迷宫(型号:上海移数鼠博士RD1101MWM-G)。

1.4 方法

1.4.1 分组及造模 40只老年Wistar雄性大鼠,适应性喂养1周后,按照随机数字表法分成正常组、模型

组、中药低剂量组、中药高剂量组、西药组,每组8只。造模采用D-半乳糖+咖啡因诱导:大鼠腹腔注射D-半乳糖60 mg/(kg·d)连续21 d,第21~28天联合腹腔注射咖啡因30 mg/(kg·d),第29~35天采用旋转圆筒方法行睡眠剥夺7 d。

1.4.2 给药 灌服剂量根据实验动物与人相同体表面积折算,即200 g大鼠所需剂量相当于成人药量 $\times 0.018$ 。其剂量随病鼠体重增加而适当增加饲服剂量。具体给药量如下:中药低剂量组:约6.89 mg/(kg·d);中药高剂量组:约20.66 mg/(kg·d);西药组:0.01 mg/(kg·d);正常对照组与模型组每日灌服等体积双蒸水,每日1次灌胃,共灌胃14 d。灌胃期大鼠模型给药、饲料及饮用水处理同前。

1.4.3 Morris水迷宫实验 第15天给药结束后进行Morris水迷宫实验。水迷宫共采用空间探索实验和定位航行评价大鼠的学习记忆力。先做连续5 d的适应性训练,2次/d,第6天进行定位航行及空间探索实验。具体方法为依次取各组大鼠进行水迷宫实验,Morris水迷宫设备由圆形的水池及水池上的摄像系统两部分组成,在实验前实验者先把水池分为4个象限,做好标记(N、W、S、E);平台放在1个象限内,水池内放入水,水温保持在24℃~26℃,水平面淹没平台,大鼠面朝水池壁依次从1个依次从4个点中的1个放入,如在规定1 min内找不到平台则由实验人员引导至平台,并休息1 min,2次/d,进行训练5 d。第6天开始进行测试。完成上述实验后,进行空间探索,撤掉平台,让大鼠在水池内游泳,并记录游泳穿过原所在平台的次数。

1.4.4 ELISA指标检测 完成认知功能评价后,禁食不禁水24 h,处死全部大鼠,心脏取血,分离血清,取脑海马组织均浆用于ELISA检测。实验前用去离子水制备溶液仅配制实验当天所需的足够试剂,经加样、洗板、上机等严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作,最后读取吸光度结果进行统计。

1.5 统计学方法 采用SPSS 26.0统计学软件分析。计数资料以(n)或(%)表示,用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,比较用独立样本t检验,多组间比较单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 左归丸对老年慢性失眠大鼠睡眠时间、呼吸频率、心率、收缩压的影响 与正常组比较,模型组大鼠在呼吸频率、心率、收缩压均增多,睡眠时间减低($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组指标均有改善($P < 0.05$),见表1。

2.2 左归丸对老年慢性失眠大鼠学习记忆的影响与正常组比较,模型组大鼠穿越平台次数减少,逃避潜伏期时间延长($P<0.05$);与模型组比较,中药低剂

量组及中药高剂量组大鼠穿越平台次数增加,逃避潜伏期时间缩短($P<0.05$),西药组大鼠穿越平台次及逃避潜伏期时间无明显变化($P>0.05$),见表 2。

表 1 各组大鼠睡眠时间、呼吸频率、心率、收缩压的比较 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	心率(次/min)	呼吸频率(次/min)	收缩压(mmHg)	睡眠时长(min)
正常组	337.18±20.52	80.26±2.42	109.37±8.21	66.19±24.38
模型组	453.26±20.74*	107.05±3.45*	125.34±6.35*	33.43±18.19*
中药低剂量组	405.74±18.14 [#]	81.22±2.17 [#]	110.72±9.32 [#]	56.82±17.64 [#]
中药高剂量组	365.32±18.81 [#]	80.20±2.04 [#]	108.45±5.93 [#]	50.83±15.24 [#]
西药组	388.19±28.42 [#]	84.5±2.16 [#]	115.59±8.29 [#]	48.25±14.82 [#]

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

表 2 各组大鼠定位巡航及空间探索的比较 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	穿越平台次数(次)	逃避潜伏期(s)
正常组	5.65±0.32	9.15±1.31
模型组	0.97±0.21*	25.38±4.37*
中药低剂量组	3.87±0.84 [#]	17.27±3.38 [#]
中药高剂量组	5.45±0.95 [#]	9.56±2.49 [#]
西药组	0.98±1.04	23.46±3.18

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

2.3 左归丸对老年慢性失眠大鼠血清中 IL-1、IL-6、IL-10 及脑组织中 GDNF 的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清 IL-1、IL-6 水平明显升高,IL-10 水平明显降低($P<0.05$),脑组织 GDNF 水平明显降低;与模型组比较,中药低剂量组及中药高剂量组大鼠血清 IL-1、IL-6 水平明显降低,IL-10 水平升高,脑组织 GDNF 水平升高($P<0.05$),西药组大鼠血清 IL-1、IL-6、IL-10 无明显变化($P>0.05$),脑组织中 GDNF 无明显变化($P>0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠血清 IL-1、IL-6、IL-10、GDNF 比较 ($\bar{x}\pm s, \text{ng/L}$)

组别	IL-1	IL-6	IL-10	GDNF
正常组	8.67±0.51	49.28±2.46	185.24±19.57	1034.02±233.45
模型组	18.23±0.74*	75.84±3.37*	138.72±11.54*	524.78±99.57*
中药低剂量组	16.72±1.71 [#]	68.40±2.98 [#]	163.61±14.72 [#]	784.35±84.96 [#]
中药高剂量组	8.55±0.82 [#]	49.52±2.21 [#]	171.27±13.72 [#]	998.64±85.23 [#]
西药组	17.99±1.15	74.33±2.59	140.04±22.13	538.19±64.31

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

3 讨论

目前我国约有 4.8%老年人患有不同程度认知损伤,并呈逐年年轻化的趋势^[11]。慢性失眠被认为是痴呆独立危险因素,这种认知功能的损伤常常以记忆力减退及情感行为障碍为首发症状,目前认为与慢性失眠致认知功能障碍发生的机制有氧化应激、炎症反应、脑内的 A β 及 tau 蛋白的清除等因素,其介导的炎症反应是多种神经系统发病的关键环节^[1,2,12]。持续的炎症状态会导致大鼠行为学的改变,定位巡航、空间探索、学习记忆能力的减低^[13-15]。这些异常与大脑海马区的长时程(LTP)增强相关。本研究从慢性失眠状态下致炎症的角度阐述慢性失眠与认知功能

障碍的关系。脑组织小胶质细胞处在激活期,释放炎症因子 IL-1 β 、IL-6,同时这种炎症的级联反应抑制小胶质的激活期,导致了 IL-10、抑炎因子的减少,胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)分泌减少。小胶质细胞释放毒性因子(IL-1、IL-6)、增强小胶质细胞的炎症反应进而影响海马的长时程改变^[15,16]。

脑髓空虚是本病的基本病理变化,肾精亏虚是其基本病机。大量研究表明^[7-9],肾虚患者大多脑功能下降、大脑神经细胞减少、内分泌功能紊乱、炎症因子和变态反应增加,其中高炎症因子水平导致体内自由基的容量及过氧化物激增,加速了 A β 在大脑的沉积。这些变化说明肾虚是痴呆的重要病因病

机,始终贯穿老年性痴呆的整个病程,是其最本质的特征。只要以补肾填精益髓立方防治健忘症,就能取得较好疗效。慢性失眠作为原发病中医病机以阴虚为本,尤以肾阴虚为突出的证候特点,临床上从“阴虚”论治该病效果显著。慢性失眠的病机为阴虚为本,燥热为标,两者互为因果,阴愈虚则燥热愈盛,燥热愈盛则阴愈虚,病变脏腑主要在肺、胃、肾,以肾为关键。慢性失眠的发生发展与肾阴虚衰密切相关。肾为先天之本,主藏精而寓元阴元阳,肾主骨生髓与脑髓密切相关,阴虚精亏髓减,清窍失充。明代医学家张景岳从《小儿药证直决》六味地黄丸中化裁出左归丸,为滋肾补阴的代表方剂。左归丸中的熟地、山药、山萸肉、枸杞子、菟丝子、鹿角胶此六味药物以甘温性味为重,是填精补肾之上品。加入龟板胶、川牛膝重在滋阴补肾,填精益髓,方中鹿角胶、龟板胶,阴阳双补,补阴药中佐以扶阳药,可起“阳中求阴”之效。诸药合用,共奏滋肾补阴,益精填髓之功。

本实验中模型组大鼠睡眠时间明显减低,说明老年慢性失眠模型成立。Morris 水迷宫实验是评价大鼠记忆能力的一个动物实验指标,本实验中模型组大鼠穿越平台次数减少、逃避潜伏期时间延长提示慢性失眠大鼠存在记忆并能减退,同时其血清 IL-1、IL-6 水平升高、IL-10 水平降低,提示在模型组脑组织及血清中炎性指标异常,这与相关文献报道一致^[1,7],最终导致脑组织中 GDNF 水平降低,这可能是慢性失眠致记忆力减退的发病机制。在本实验中观察了中药的有效性或与西药比较的疗效,结果显示与模型组比较,中药低、高剂量组在呼吸频率、心率、收缩压均、睡眠时间明显均改善,穿越平台次数增多,逃避潜伏期时间减少,血清 IL-1、IL-6 水平降低,IL-10 水平升高,脑组织 GDNF 水平升高。西药组大鼠在穿越平台及逃避潜伏期时间无明显变化,血清 IL-1、IL-6、IL-10 无明显变化,脑组织 GDNF 无明显变化。提示中药及西药组在改善睡眠方面均有疗效,但在改善记忆功能方面,中药疗效优于西药,同时也说明中药左归丸除了具有改善睡眠作用外,还具有改善慢性失眠大鼠记忆功能的作用。

综上所述,老年慢性失眠致认知功能障碍与肾阴不足,脑虚髓减有关,滋肾补阴,益精填髓为治疗慢性失眠致认知功能障碍的有效方法,但疗效机制不清楚,仍有待进一步研究。本研究从炎性因子角度阐述了经方左归丸治疗老年慢性失眠致认知功能障碍,验证了左归丸可改善老年大鼠水迷宫穿越平台次数及逃避潜伏期时长、改善睡眠时间,可能与其

降低血清 IL-1、IL-6,上调 IL-10,尽而改善大鼠脑组织中 GDNF 水平有关。

参考文献:

- [1]范清雨,杨新利,张桂莲.慢性失眠患者认知功能与睡眠质量、血清 t-Tau、p-Tau 的关系[J].神经损伤与功能重建,2021,16(10):593-596.
- [2]郑新伟,李冬,耿丽娟,等.慢性失眠伴轻度认知功能障碍患者血清细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的变化[J].中华行为医学与脑科学杂志,2020,29(8):700-705.
- [3]张萍.慢性失眠障碍患者血清神经损伤标志物水平的改变及与认知功能和睡眠的联系[D].合肥:安徽医科大学,2016.
- [4]Baratta AM,Buck SA,Buchla AD,et al.Sex Differences in Hippocampal Memory and Kynurenic Acid Formation Following Acute Sleep Deprivation in Rats[J].Sci Rep,2018,8(1):6963.
- [5]程越.补脾醒神益智法对脾虚认知功能障碍大鼠 TREM2/NF- κ b 信号通路作用机制的研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2021.
- [6]司芸芳.认知障碍患者睡眠特征及其与中医证候的相关性研究[D].北京:北京中医药大学,2021.
- [7]张俊杰,刘茜辰,王婧懿.加减玉肾露联合自助认知行为疗法对肾虚型原发性失眠患者临床疗效观察[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(8):169-173.
- [8]张颖,舒庆,刘家峰.基于 PI3K/Akt 信号通路探讨左归丸改善大鼠睡眠剥夺所致认知障碍的分子机制[J].临床医学研究与实践,2021,6(34):6-9.
- [9]赵玉洁,颜凯,陈圣敏,等.左归丸对 D-半乳糖致老化小鼠模型认知功能和听功能损伤的干预作用[J].中国老年学杂志,2017,37(12):2864-2866.
- [10]Liu H,Dai Q,Yang J,et al.Zuogui Pill Attenuates Neuroinflammation and Improves Cognitive Function in Cerebral Ischemia Reperfusion-Injured Rats[J].Neuroimmunomodulation,2022,29:143-150.
- [11]瞿萍.慢性紧张型头痛和慢性失眠患者认知功能,神经内分泌激素和细胞因子变化的比较研究[D].合肥:安徽医科大学.
- [12]郑新伟,李冬,耿丽娟,等.慢性失眠伴轻度认知功能障碍患者血清细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的变化[J].中华行为医学与脑科学杂志,2020,29(8):700-705.
- [13]李莉,刘茹,何晶,等.温胆汤方剂对睡眠剥夺小鼠氧化应激及炎症反应的影响[J].中国免疫学杂志,2022,38(3):308-312.
- [14]张曼,戴建业,唐乾利.白背桐黄钻方调控失眠剥夺大鼠脑电活动、神经递质、炎症因子和氧化应激的促眠机制研究[J].辽宁中医杂志,2019,46(11):2432-2435.
- [15]陈建,陈敏捷.黄连阿胶汤对老年慢性失眠大鼠血清 Th1/Th2 平衡的影响[J].长春中医药大学学报,2014,30(5):779-781.
- [16]Brown MD,Sacks DB.Compartmentalized MAPK pathways[J].Handb Exp Pharmacol,2008,186:205-235.

收稿日期:2022-05-10;修回日期:2022-07-01

编辑/肖婷婷