DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.019
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
158 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0158-03

人参皂甙对睡眠剥夺下大鼠脑干中缝核群5-HT的影响

杨国愉[1],冯正直[1],皇甫恩[2],苗丹民[2],王家同[2] ([1]第三军医大学心理健康教育中心,重庆 400038;[2]第四军医大学航空航天医学系心理学教研室,西安 710032)

提 要:目的 探讨人参皂甙(Ginsenosides, GS)对睡眠剥夺(Sleep deprivation, SD)大鼠脑干中缝核群五羟色胺(Serotonin, 5-HT)的影响。方法 用小平台水环境法建立大鼠SD模型。选用Sprague-Dawley大鼠56只,随机分为未剥夺睡眠组(Non-SD)、SD 12、24、36、48、72、96 h组,每组又设GS用药组和生理盐水对照组。GS用药组用GS连续灌胃5 d,然后给予不同时间的SD。SD结束后,以4%多聚甲醛灌注固定,ABC法组化染色,图像分析法分析5-HT含量,用D_λ表示。结果 各组大鼠SD后中缝核群各核团的5-HT D_λ值均升高,48 h以前升高较慢,72 h后明显升高。未剥夺睡眠组大鼠,用药组D_λ显著高于对照组($P<0.05$);SD 48 h,两组无显著性差异($P>0.05$);SD 72、96 h,用药组显著低于对照组($P<0.05$);SD 12、24和36 h,各核团的D_λ值变化不一,其中在中缝隐核,用药组显著高于对照组($P<0.05$);在中缝大核和中缝正中核,两组无显著性差异($P>0.05$);在中缝背核,12和24 h,用药组显著高于对照组($P<0.05$),36 h,两组无显著性差异($P>0.05$);在中缝苍白核和中缝桥核,12 h用药组显著高于对照组($P<0.05$),24和36 h,两组无显著性差异($P>0.05$)。结论 SD后,大鼠中缝核群5-HT明显增加,其程度随SD时间的延长而加大。连续口服人参皂甙可使短时间SD大鼠中缝核群5-HT增加;对长时间SD,则使5-HT累积程度减轻,这种对抗作用在72 h SD后最为明显。

关键词:睡眠剥夺;人参皂甙;大鼠;五羟色胺
中图法分类号:R282.71;R338.2;R363.15 文献标识码:A

Effects of ginsenosides on rats' serotonin of raphe ceruleus during sleep deprivation

YANG Guo-yu, FENG Zheng-zhi, HUANG-FU En, MIAO Dan-ming, WANG Jia-tong (Educational Center of Mental Health, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ginsenosides (GS) on rats' serotonin of raphe ceruleus during sleep deprivation (SD). Methods SD was induced in male Sprague-Dawlay rats by using "Flower Pot" technique. Fifty-six rats were divided into 7 groups randomly: Non-SD (not deprived of sleep), 12SD (deprived of sleep for 12 h), 24SD (for 24 h), 36SD (for 36 h), 48SD (for 48 h), 72SD (for 72 h), and 96SD (for 96 h), and each group was divided into two subgroups: experimental and control. Forced feeding of GS to the experimental rats for 5 d before the rats were deprived of sleep. Then the SD rats were fixed with paraformaldehyed perfusion, and stained with ABC staining method. Rats' serotonin of raphe ceruleus was evaluated by using immunocytochemistry and image analysis system. Results Among all groups, the optical density (D_λ) of raphe ceruleus increased following SD, and the D_λ increased rapidly after 72 h of SD. Compared with controls, the D_λ of the experimentals increased significantly in Non-SD groups ($P<0.05$), while decreased significantly in 72SD and 96SD groups ($P<0.05$). There were no obvious difference between the experimentals and the controls in 48SD groups ($P>0.05$). Different changes on the D_λ of raphe ceruleus were observed in 12SD, 24SD and 36SD groups. Compared with controls, the experimentals' D_λ of raphe obscurus nucleus (ROb) increased significantly in 12SD, 24SD and 36SD groups ($P<0.05$), and no difference between experimentals and controls in raphe magnus nucleus (RMg) and median raphe nucleus (MnR) ($P>0.05$); the experimentals' D_λ of dorsal raphe nucleus (DR) increased significantly in 12SD and 24SD groups ($P<0.05$), and no difference in 36SD groups ($P>0.05$); the experimentals' D_λ of raphe pallidus nucleus (RPa) and raphe pontis nucleus (RPn) increased significantly in 12SD groups ($P<0.05$), and no difference observed in 24SD and 36SD groups ($P>0.05$). Conclusion Seretonin significantly increases after SD, and the effect enhances with the increase of SD time. Feeding GS orally can improve rats' seroronin level of raple ceruleus in a short period of time after SD, but long-term SD decreases accumilation of serotonin, the impairment, and the decrease reaches its climax after 72 h of SD.

Key words: sleep deprivation; ginsenosides; rats; serotonin

睡眠剥夺(Sleep deprivation, SD)影响机体的学习记忆等认知功能、情绪反应和免疫功能等,我们研究[1,2]发现,连续口服小剂量人参皂甙(Ginsenosides, GS)对SD造成的大鼠分辨学习、记忆保持能力的降低有明显保护作用。中枢胆碱能系统和单胺类递质与学习记忆有密切关系。既往研究表明,动物SD后中枢5-HT发生明显的累积,这可能是SD后动物躯体疲劳、脑功能下降的重要因素;有关GS促智机制的研究发现,GS可引起包括5-HT在内的中枢神经递质的变化,因此,GS促进学习记忆可能与其引起中枢神经递质系统的协调变化有关。5-HT是一个与睡眠和学习记忆都密切相关的中枢神经递质。因此,本实验选用免疫细胞化学和图像分析法,在不同SD时间下,观察SD后对大鼠中枢5-HT含量和分布的变化及GS对其的影响。

基金项目:全军"九五"科研基金资助项目(96L050)
作者简介:杨国愉(1970-),男,云南省施甸县人,硕士,讲师,主要从事军事医学心理学方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752268
收稿日期:2001-06-19;修回日期:2001-08-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　实验材料和方法

1.1　实验动物及分组

成年、雄性、健康 Sprague-Dawley 大鼠 56 只, 体重(180±15) g(由第四军医大学实验动物中心提供)。将大鼠用完全随机化方法分为 7 组: 未剥夺睡眠组(Non-SD)、SD 12、24、36、48、72、96 h 组, 每组 8 只。各组大鼠又被随机分为 GS 用药组和生理盐水对照组, GS 用药组和对照组各 4 只。实验前让其适应环境 1 周。

1.2　睡眠剥夺模型的建立

采用小平台水环境法建立大鼠 SD 模型。本教研室根据文献[3], 制作一 30 cm×30 cm×30 cm 的鼠箱, 其中有一直径 6.3 cm、高 8.0 cm 的平台, 在平台周边注满水, 水温保持在 20 ℃左右, 水面距平台面约 1.0 cm。大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 效果。在大鼠活动空间内给予 40 W 日光灯持续照明, 室内温度控制在 18~22 ℃。

1.3　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 50 mg/kg 的剂量灌胃给药, 每日 1 次, 连续 5 d。对照组以同样方式给予等量生理盐水, 给药完毕进入 SD。

1.4　主要生物试剂

兔抗鼠 5-HT 抗体, 第四军医大学组织学与胚胎学教研室生产, 其特异性和敏感性已通过鉴定[4,5](使用效价 1∶1 000); ABC 试剂盒, Sigma 公司; 生物素化的羊抗兔 IgG(B-IgG)(使用效价1∶500), ABC 复合物(使用效价 1∶500)。

1.5　免疫细胞化学染色

各组大鼠 SD 结束后, 以 4% 多聚甲醛灌注固定, 灌注结束小心取出完脑, 置于 20% 蔗糖磷酸缓冲液中, 4 ℃存放 12~24 h, 至组织完全沉底。用 Leica JUNGSM200R 恒冷箱切片机作连续冠状切片, 片厚 40 μm, 隔 3 取 1, 切片收集于 0.01 mol/L PBS 中, 4 ℃存放。ABC 法染色, 将处理过的漂片浸入兔抗鼠 5-HT 抗体(1∶1 000), 孵育 24~48 h(4 ℃), 再依次在生物素化的羊抗兔 IgG(1∶500)和 ABC 复合物(1∶500)室温下分别孵育 2 h, 最后用硫酸镍胺葡萄糖氧化酶加强的 DAB 蓝色反应法显色, 脱水透明后封片, 实验中同时设立空白和替代对照实验。

1.6　数据处理和统计学分析

免疫组化结果用 LEICAQ500MC 图像分析系统对阳性细胞染色强度进行定量分析。采用双盲法(图像分析者和数据分析者不知道实验分组), 输入方式为普通光源照明, 显微镜放大倍数为 100 倍, 固定输入条件后, 在高分辨率图像监视器上每个核团同高度选择一固定区域, 测定每个视野阳性细胞的平均灰度(Mean grey), 以光密度值(Optical density, D_λ)表示 5-HT 的含量, 计算其均值。实验数据采用 SPSS 统计软件包进行单因素方差分析, 两两比较用 Neuman-Keuls 检验。

2　结果

免疫细胞化学染色结果发现, 5-HT 阳性细胞主要分布于脑干中缝核群, 以中缝背核(DR)、中缝大核(RMg)、中缝正中核(MnR)、中缝隐核(ROb)、中缝苍白核(RPa)和中缝桥核(RPn)分布最多, 见表 1。

表 1　不同时间 SD 大鼠中缝核群 5-HT 的 D_λ 值($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The rats' optical density of raphe ceruleus during SD($\bar{x}\pm s$)

	Group	Non-SD	Time after SD(h)					
			12	24	36	48	72	96
DR	GS	4.36±0.27[a]	4.39±0.27[a]	4.39±0.26[a]	4.56±0.28	4.67±0.33	4.80±0.34[b]	5.23±0.41[b]
	Control	4.00±0.25	4.07±0.18	4.14±0.17	4.45±0.25	4.73±0.22	5.46±0.30	7.07±0.32
RMg	GS	3.41±0.20[b]	3.56±0.28	3.64±0.29	3.82±0.28	4.00±0.29	4.05±0.24[b]	4.50±0.24[b]
	Control	3.06±0.20	3.34±0.30	3.61±0.26	3.87±0.28	4.09±0.25	4.45±0.25	5.27±0.26
MnR	GS	3.72±0.24[b]	3.91±0.18	4.14±0.22	4.17±0.20	4.25±0.30	4.28±0.26[b]	4.65±0.23[b]
	Control	3.14±0.38	3.89±0.21	4.00±0.17	4.19±0.20	4.29±0.29	4.71±0.22	5.74±0.24
ROb	GS	3.68±0.18[b]	3.78±0.21[b]	3.83±0.14[b]	3.96±0.25[a]	4.09±0.15	3.97±0.17[b]	4.53±0.52[b]
	Control	3.25±0.28	3.30±0.18	3.45±0.15	3.65±0.15	3.99±0.21	4.68±0.20	5.56±0.22
RPa	GS	3.32±0.24[b]	3.59±0.22[b]	3.60±0.23	3.79±0.18	3.98±0.19	4.02±0.20[a]	4.45±0.29[b]
	Control	2.90±0.20	3.05±0.16	3.48±0.25	3.74±0.20	3.84±0.26	4.32±0.23	5.57±0.40
RPn	GS	3.26±0.23[a]	3.47±0.24[a]	3.66±0.33	3.74±0.18	3.94±0.15	4.11±0.23[b]	4.59±0.46[b]
	Control	2.98±0.25	3.21±0.20	3.57±0.25	3.62±0.27	3.90±0.22	4.60±0.22	5.42±0.35

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$ *vs* control

各组大鼠 SD 后中缝核群各核团的 D_λ 值均升高, 48 h 以前升高较慢, 72 h 后明显升高。Non-SD 组各核团的 D_λ 值, 用药组显著高于对照组($P<0.05$); SD 48 h, 两组无显著性差异($P>0.05$); SD 72 和 96 h, 用药组显著低于对照组($P<0.05$)。12、24 和 36 h, 各核团的 D_λ 值变化不一。中缝隐核, 用药组显著高于对照组($P<0.05$); 中缝大核和中缝正中核, 两组无显著性差异($P>0.05$); 中缝背核, 12 和 24 h, 用药组显著高于对照组($P<0.05$), 36 h, 两组无显著性差异($P>0.05$); 中缝苍白核和中缝桥核, 12 h 用药组显著高于对照组($P<0.05$), 24 和 36 h, 两组无显著性差异($P>0.05$)。

3　讨论

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, 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[3,6]。文献[7]研究显示, 50 mg/kg、1 次/d 的给药剂量对动物学习记忆受损的保护

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

作用较好。由于中药起效慢,作用时间长,研究认为一般用药时间至少 3 ~ 7 d。因此,本实验选择 50 mg/kg 为给药剂量,每日给药 1 次,连续给药 5 d,给药完毕即进行 SD。

以上实验结果表明,SD 后用药组 5-HT 含量缓慢上升, 72 h 后两组 5-HT 含量均迅速升高,对照组 5-HT 含量显著高于用药组。由此可以看出,SD 使大鼠中枢 5-HT 增加,短时间 SD(24 ~48 h)5-HT 增加不明显,长时间 SD(72 ~96 h)中枢 5-HT 显著增加,这在既往研究中已得到证实。Asikainen 等[8] 的实验表明,大鼠 SD 后前皮层、海马、下丘脑和脑干中 5-HT 与其代谢产物五羟吲哚乙酸(5-hydroxyindole acetic acid 5-HIAA)之比明显增大,而在其恢复睡眠后该比例同正常大鼠相同,并认为短期 SD 只提高大鼠在 SD 期间脑内 5-HT 的转化率。国内学者郑乐颖等[9] 也发现,5-HT 向 5-HIAA 转化经过 24 h SD 后显著增高,但在 48 h 此转化率开始下降,72 h 后出现大幅下降。本研究认为,长时间 SD 对大鼠行为的影响是一个由兴奋到抑制的过程,这种变化可能与下丘脑和脑干的 5-HT 代谢有关。由此可见,短时间 SD 中枢 5-HT 无明显累积,长时间 SD 后,中枢 5-HT 即发生明显累积。

SD 后随着 SD 时间的增加,两组大鼠中枢 5-HT 含量增加的速度是不同的,尤其是 72 和 96 h,对照组大鼠 5-HT 含量迅速增加,用药组则增加不多。由此我们可以推断,短时间 SD(24 ~48 h),由于中枢 5-HT 含量逐渐增加,动物产生疲劳感和睡意,但由于 SD 的持续进行,动物只有依靠脑内 MAO 活性的增强,加速中枢 5-HT 的降解,以减少 5-HT 累积,维持清醒状态。本实验也表明, 12 ~48 h SD,无论用药组还是对照组,脑干中缝核群各核团 5-HT 含量变化不明显,两组无明显差异。随着 SD 时间的延长,中枢 5-HT 的增加超过了 MAO 对 5-HT 的降解转化能力,动物脑内 5-HT 即发生明显累积,行为能力也出现明显的抑制趋势。此时,GS 即发挥其调节递质的作用,抑制 5-HT 的过快增加。72 和 96 h,用药组中枢 5-HT 的增加速度和量均明显低于对照组。同时,动物的行为能力也保持在一定水平。

从实验结果还可看出,GS 能提高正常(SD 前)大鼠中缝核群 5-HT 的含量,这与既往研究结果一致。曾有文献[7] 报道,GRS 和 GSLS 对大鼠学习记忆有明显促进作用,使正常大鼠不同脑区的单胺类递质的含量明显增多,并认为 GS 能明显提高动物脑干、纹状体、海马等部位 5-HT 的含量,脑干 5-HT 含量的增多还可进一步影响额叶、纹状体的多巴胺能神经元的功能,引起尾核等脑区胆碱能神经功能的改变,从而促进学习记忆。但也有研究认为,尽管 5-HT 与学习记忆密切相关,但与学习记忆无明确的剂量-效应关系[3]。GS 还能提高短时间 SD 大鼠中缝核群 5-HT 的含量,而对长时间 SD,则抑制其过快增长,这可能与 GS 对中枢 5-HT 的双相调节有关。脑干中缝各核团 5-HT 的变化不尽相同,这提示,5-HT 在中缝核群的分布不均匀,GS 对各核团的调节也有一定差异。但是,Non-SD,用药组 5-HT 所有核团均显著高于对照组;随着 SD 时间的延长,各核团变化逐渐趋于一致,72 和 96 h,用药组 5-HT 所有核团均显著低于对照组。由此看来,GS 主要影响正常(SD 前)和长时间 SD 动物中枢 5-HT 的变化。

GS 对学习记忆的影响较复杂。文献[10 ~ 12] 报道,GS 对中枢 5-HT 的影响呈双向性,中枢 5-HT 能系统对学习记忆的影响是与胆碱能系统交互作用的结果,5-HT 不但作为递质,而且作为调质作为神经调节剂发挥作用。在 SD 下,GS 对动物的影响也呈双向性调节。SD 前和短时间 SD,GS 提高中枢 5-HT 的含量。SD 后,GS 则抑制 5-HT 的过快增加,这种作用对短时间 SD(24 ~48 h)的动物影响不明显;对长时间 SD(72 ~96 h),则充分显示出其调节作用。SD 下 GS 以何种机制对中枢 5-HT 进行调节,这正是下一步需要研究的内容。

参考文献:

[1] 杨国愉, 皇甫恩, 苗丹民, 等. 人参皂甙对睡眠剥夺大鼠行为的影响[J]. 中国行为医学科学, 2001, 10(2): 84—86.

[2] 杨国愉, 皇甫恩, 苗丹民, 等. 人参皂甙对睡眠剥夺大鼠记忆保持的影响[J]. 中国心理卫生杂志, 2001, 15(3): 150—152.

[3] Youngblood B D, Zhou J, Smagin G N, *et al*. Sleep deprivation by "Flower Pot" technique and spatial reference memory[J]. Physiol Behav, 1997, 61(2): 249—256.

[4] 黄威权, 孙 岚, 王百忍, 等. 5-HT 抗独特性抗体的免疫组织化学鉴定及 5-HT 定位的研究[J]. 第四军医大学学报, 1995, 16(3): 195—198.

[5] 黄威权, 习玉灿, 王文超. 自制 5-HT 抗体的特异性和敏感性[J]. 第四军医大学学报, 1987, 8(4): 220—224.

[6] Smith C T, Conway J M, Rose G M. 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.

[7] 王爱明, 曹颖林, 王玉坤, 等. 中国人参根、茎叶皂甙对大鼠学习记忆及脑内胺类递质含量的影响[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(8): 493—495.

[8] Asikainen M, Toppila J, Alanko L, *et al*. Sleep deprivation increases brain serotonin turnover in the rat[J]. Neuroreport, 1997, 8(7): 1 577—1 582.

[9] 郑乐颖, 季红光, 王海明, 等. 睡眠剥夺对大鼠脑 5-HT 代谢及行为的影响[J]. 中国行为医学科学, 1997, 6(4): 256—257.

[10] Thakkar M, Mallick B N. Effect of rapid eye movement sleep deprivation on rat brain monoamine oxidases[J]. Neurosci, 1993, 55(3): 677—683.

[11] 张中启. 学习记忆中的胆碱能机制与去甲肾上腺素能和 5-羟色胺介质系统的关系[J]. 中国药理学通报, 1994, 10(2): 81—83.

[12] 程秀娟, 邸 琳, 宋丽晶, 等. 人参茎叶皂甙对记忆及脑内单胺类递质的影响的研究[J]. 老年病杂志, 1989, 9(6): 369—372.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net