

· 论 著 ·

疏肝补肾法对睡眠剥夺大鼠学习记忆及前额叶皮质 BDNF 蛋白表达的影响

冯婷 李峰 宋月晗 刘晓兰 马捷 毛萌 吴凤芝 刘晶

【摘要】 目的 研究疏肝补肾法对睡眠剥夺大鼠学习记忆及前额叶皮质脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 蛋白表达的变化。**方法** 以成年雄性 SD 大鼠 36 只, 随机分为对照组、模型组、疏肝补肾治疗组。应用 168 小时睡眠剥夺法复制模型, Y 迷宫成绩评定学习记忆能力, 以血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水平反映脑组织的损害。取大鼠前额叶皮质冰冻切片, 以免疫组织化学法检测 BDNF 的蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组的 Y 迷宫成绩显著下降 ($P < 0.01$), 血清 SOD 含量明显减少 ($P < 0.01$), 前额叶皮质 BDNF 免疫阳性物明显减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 疏肝补肾治疗组 Y 迷宫成绩明显提高 ($P < 0.01$), 血清 SOD 含量显著增多 ($P < 0.01$), BDNF 蛋白表达也显著提高 ($P < 0.01$)。**结论** 睡眠剥夺能造成加重脑损伤、学习记忆能力减退以及 BDNF 表达的减少, 而疏肝补肾法能改善学习记忆和脑损伤, 可能是通过上调 BDNF 蛋白的表达以及相关通路蛋白所致。

【关键词】 睡眠剥夺; 疏肝补肾法; 脑源性神经营养因子; 超氧化物歧化酶; Y 迷宫

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.04.006

Effects of learning and memory in rats with sleep deprivation and BDNF protein expression in the prefrontal cortex with soothing the liver and kidney method FENG Ting, LI Feng, SONG Yue-han, et al. Department of TCM Diagnostics, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Corresponding author: LI Feng, E-mail: lifeng95@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To study changes of learning and memory and brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex on rats with sleep deprivation through the method of soothing the liver and tonifying the kidney. **Methods** 36 adult male Spargue-Dawley rats are randomly divided into control group, model group, and treated group. Applying the model of 168 hours sleep deprivation to reflect brain damage with levels of serum SOD and evaluate learning and memory abilities with the results of Y-maze. Using frozen sections in the prefrontal cortex of rats to detect protein expression of BDNF with immuno-histochemical. **Results** Compared with the control group, Y-maze's results reduced remarkably ($P < 0.01$), serum SOD declined ($P < 0.01$), and the immune reactive BDNF in prefrontal cortex declined ($P < 0.01$) in the model group; compared with the model group, treated groups improved the Y-maze result ($P < 0.01$), significantly increased serum SOD content ($P < 0.01$), the expression of BDNF protein is also significantly enhanced ($P < 0.01$). **Conclusion** Sleep deprivation can result in learning and memory loss and brain damage, reduction in the expression of BDNF; the method of soothing the liver and kidney can recover learning and memory and brain injury, possibly through increasing BDNF protein expression and relative pathways of protein.

【Key words】 Sleep deprivation; Soothing the liver and tonifying the kidney; Brain-derived neurotrophic factor (BDNF); Superoxide dismutase (SOD); Y-maze

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30873217)

作者单位: 100029 北京中医药大学中医诊断系 [冯婷 (博士研究生)、李峰、宋月晗、马捷 (博士研究生)、毛萌 (博士研究生)、吴凤芝 (博士研究生)、刘晶 (博士研究生)], 科研中心 (刘晓兰)

作者简介: 冯婷 (1982-), 女, 2009 级在读博士研究生。研究方向: 病证结合的辨证规律研究。E-mail: 07fing@163.com

通讯作者: 李峰 (1966-), 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 病证结合的辨证规律研究。E-mail: lifeng95@vip.sina.com

文献标引格式:

冯婷, 李峰, 宋月晗, 等. 疏肝补肾法对睡眠剥夺大鼠学习记忆及前额叶皮质 BDNF 蛋白表达的影响 [J]. 环球中医药, 2012, 5 (4): 255-259.

睡眠的作用是调节丘脑—皮层以及海马—新皮质网络神经元之间同步化作用,可以根据神经元的活动性来促进不同程度的突触效应,将短时记忆碎片再次激活、分析,并逐渐组合,融合成长时程记忆。不同时间的睡眠剥夺对学习记忆有不同程度的影响,对动物进行中长期睡眠剥夺能显著造成学习记忆障碍,脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 作为第二个被发现的神经营养因子也参与长时程增强的产生和维持。本实验通过疏肝补肾方药干预睡眠剥夺造成学习记忆障碍,观察 BDNF 的蛋白表达,研究疏肝补肾法的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年雄性 SD 大鼠 36 只,清洁级,体重 (270 ± 20) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号为 SCXK(京)2006-0009。饲养于室内温度 (22 ± 2) °C、相对湿度在 30% ~ 40% 的动物房,光照节律 12L:12D (6:00 ~ 18:00),适应性饲养 3 天,期间自由饮水、进食,同时进行站平台训练。随机将大鼠分为 3 组,每组 12 只,分别为对照组 (正常环境饲养)、模型组 (睡眠剥夺)、疏肝补肾治疗组 (模型组基础上给予四逆散和生慧汤合方)。

1.2 动物模型制备

采用改良的多平台 (MMPM) 睡眠剥夺法^[1]复制模型,将模型组和疏肝补肾治疗组从造模第 1 天早 8:00 开始放入睡眠剥夺箱,连续 7 天,至第 8 天早 8:00 结束。使用自制睡眠剥夺箱,规格 110 cm (长) × 60 cm (宽) × 40 cm (高),塑料箱内壁为灰色,其底面均匀固定 15 个直径 6.5 cm、高 8 cm 的有机玻璃平台。造模开始前在箱内注水,水平面应在平台下 1 cm 处,水温保持在 28 ~ 30 °C。箱顶置铁丝网,大鼠在平台间可自由活动和饮食。

1.3 药物制备与给药方法

疏肝补肾治疗组采用四逆散和生慧汤的 1:1 合方。四逆散:选用《伤寒论》的四逆散 (由柴胡、枳实、赤芍、炙甘草各 6 g 组成);生慧汤:选用《辨证录·健忘门》的生慧汤 (由熟地黄 30 g、远志 6 g、山茱萸 12 g、柏子仁 15 g、菖蒲 1.5 g、炒枣仁 15 g、茯苓 9 g、红参 9 g、白芥子 6 g 组成)。方药均为北京中医药大学东直门医院提供的免煎颗粒 (北京康仁堂药业有限公司生产),按人体用药量换成大鼠等

效剂量作为大鼠用药量,每天给予生药量为 13.38 g/kg,灌胃容积 1 ml/kg,时间点为睡眠剥夺的 4、28、52、76、100、124、148 小时。对照组和模型组同时给予等体积蒸馏水。

1.4 试剂

抗原修复液 (北京普利莱基因技术有限公司), ABC 试剂盒 (VECTOR 公司,美国), BDNF 兔来源多克隆抗体 (Abcam 公司,美国), DAB 试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司),超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (南京建成科技有限公司)。

1.5 学习记忆评定

采用 Y 迷宫评定大鼠的记忆能力。各组造模前 3 天进行每天 20 次的训练,取第 3 天成绩,造模最后一天再进行测试。设备由三等分迷路箱和控制仪组成。迷路箱为等长的 I、II、III 臂和三者的交界区;箱底铺设间距 1 cm 的电栅,每臂顶端各装一盏 15 W 的刺激信号灯。Y 迷宫的控制仪有电压控制按钮、延时控制按钮和 I、II、III、0 四个按钮,当分别按下 I、II、III 按钮时,相应臂的信号灯亮,此时该臂不通电为安全区,另外无灯光的两臂及交界区均通电而成为非安全区;按下 0 按钮,则三臂均不通电,但交界区通电,信号灯亮后,稍停片刻电栅才开始通电^[2]。根据文献研究,本实验采用“固定次数随机不休息法”^[3],实验时先将大鼠放入迷宫适应 3 分钟,然后无规则变换安全区次序,大鼠受电击后逃到安全区,灯光持续 10 秒,然后再以所在臂作为下次测试的起始位置进行下一次测试。每个实验日连续测试 20 次,连续 10 次中有 9 次或者以上正确反应,则为达标。本实验每组筛选出 9 只进行测试。所用参数:电压 50 ~ 70 V,延时 5 秒。

1.6 血清 SOD 检测

造模结束后,用 10% 水合氯醛溶液以 0.3 ml/100 g 体重腹腔麻醉,断头取血,置于冰上,使用 4 °C 低温离心机以 3000 转/分离心 15 分钟,取得上清置于 Eppendorf 管中,保存于 -20 °C 冰箱待用。采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力。每组选取 9 只离心效果好的血清进行检测。

1.7 前额叶皮质区 BDNF 蛋白检测

1.7.1 组织切片 造模结束麻醉后,于冰上取每组半数大鼠的全脑,去除嗅球及小脑后,用液氮迅速冷冻,待脑组织变白置于 -80 °C 冰箱待用。从 -80 °C 冰箱取出组织,在 -20 °C 冰冻切片机内

进行组织切片,参考脑部定位图谱在前额叶皮质区连续切片,厚度为 8 μm ,贴于载玻片,在混合固定液^[4]中固定切片 5 分钟后放置于-20℃冰箱待用。

1.7.2 免疫组化检测 从-20℃冰箱取出冰冻切片,室温平衡 2 分钟,按照说明采用微波热修复法置于抗原修复液(1:100)中进行修复,待修复液自然冷却至室温,将玻片取出,PBS 漂洗 3 分钟×3 次,去离子水冲洗;以 0.3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶(室温、避光、30 分钟),PBS 漂洗 5 分钟×3 次;羊血清封闭(3:200、37℃、30 分钟);倾去多余血清,滴加 BDNF 兔来源的多克隆一抗(1:60、4℃过夜),PBS 漂洗 5 分钟×3 次;滴加二抗(1:200、37℃、45 分钟),PBS 漂洗 5 分钟×3 次;滴加 A、B 液(1:100、37℃、45 分钟),PBS 漂洗 5 分钟×3 次;DAB 显色(1:20),显色过程中可一边观察脑片阳性物质的显色情况,最后进行上行酒精脱水、二甲苯透明,封片,镜下观察、照相,每组随机抽取 3 只大鼠,每只大鼠每个部位 9 个视野,应用 NIS-Elements BR 3.1 软件进行图像分析,结果以平均光密度值表示蛋白表达相对量。

1.8 数据统计

运用 SPSS 17.0 软件分析,Y 迷宫成绩、血清 SOD、海马各 BDNF 蛋白表达均用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way-ANOVA)检验,以 $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 Y 迷宫测试结果

Y 迷宫结果显示,造模前最后一次各组间错误反应次数和主动回避率基本无差异。造模第 7 天,从错误反应次数显示,与对照组比较,模型组明显增多,有非常显著差异($P < 0.01$),疏肝补肾治疗组也多于对照组,有显著差异($P < 0.05$);与模型组比较,疏肝补肾治疗组的错误反应次数明显减少($P < 0.01$)。主动回避率结果显示,与对照组比较,模型组降低,具有非常显著差异($P < 0.01$);与模型组比较,疏肝补肾治疗组增多,差异非常显著($P < 0.01$)。说明睡眠剥夺对机体产生明显的学习记忆力障碍,疏肝补肾方药可调节学习记忆能力。见表 1。

表 1 各组大鼠造模第 0、7 天测试结果($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	错误反应次数		主动回避率(%)	
	0 天	7 天	0 天	7 天
对照组	1.22±0.97	1.89±1.05	57.22±16.42	59.44±19.44
模型组	1.78±1.20	8.56±3.01 ^a	56.67±16.01	25.56±20.07 ^a
疏肝补肾治疗组	1.56±1.24	4.89±3.10 ^{ab}	52.22±14.60	47.22±11.76 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与对照组比较,^b $P < 0.05$;与模型组比较,^a $P < 0.01$ 。

2.2 血清 SOD 含量

结果显示,与对照组比较,模型组 SOD 的含量减少,差异非常显著($P < 0.01$);与模型组比较,疏肝补肾治疗组 SOD 含量明显增多,差异非常显著($P < 0.01$)。说明睡眠剥夺后机体的 SOD 不能有效的消除应激产生的氧自由基,机体组织细胞损伤明显加重,而疏肝补肾中药能显著增多 SOD 的含量。见表 2。

表 2 各组大鼠血清学指标的对比($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	超氧化物歧化酶(U/ml)
对照组	79.26±6.68
模型组	64.78±5.49 ^a
疏肝补肾治疗组	83.34±2.84 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组相比,^b $P < 0.01$ 。

2.3 前额叶皮质 BDNF 蛋白表达变化

在冰冻切片进行免疫组织化学检测中,BDNF 阳性反应物呈圆形、软圆形或梭形颗粒,染色为棕黄色,分布在胞浆中,所有阴性对照切片均无特异性着色。比较 BDNF 阳性反应物平均密度值,模型和疏肝补肾治疗组与对照组相比明显减少,具非常显著差异($P < 0.01$);与模型组比较,疏肝补肾治疗组阳性反应物增多,具有非常显著差异($P < 0.01$)。说明睡眠剥夺减少 BDNF 在前额叶皮质的蛋白表达,而疏肝补肾治疗组能显著调节 BDNF 的减少趋势。见表 3、图 1。

表 3 大鼠前额叶皮质 BDNF 免疫阳性反应物的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	平均光密度值
对照组	6	0.55±0.09
模型组	5	0.36±0.09 ^a
疏肝补肾治疗组	6	0.49±0.08 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$ 。

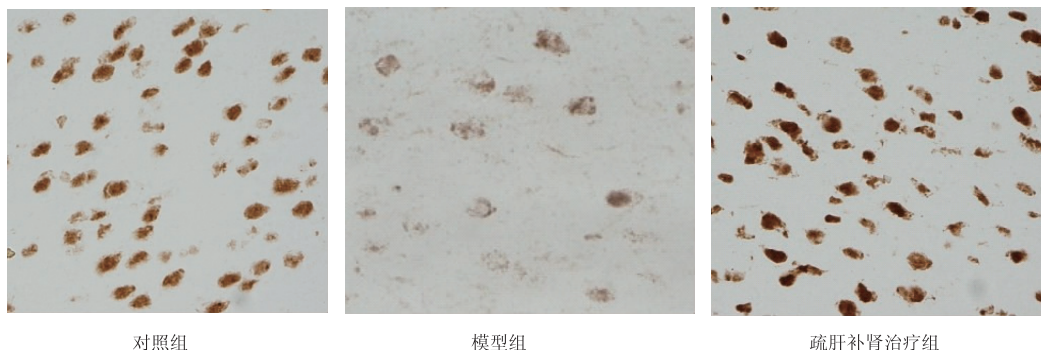


图1 各组冰冻切片大鼠前额叶皮质 BDNF 表达

3 讨论

BDNF 广泛存在于脑的各个区域,以大脑皮层和海马居多。在成年中枢系统,BDNF 的表达受一系列因素的调节,也表现为以活动依赖性的方式。它是一个重要的能够调节突触可塑性,从而影响学习记忆的中介^[5],BDNF 依赖性信号传导途径通过活化 TrkB 受体,使水解磷脂酶 C、磷脂酰环己六醇激酶-3、细胞外信号调节激酶、促细胞分裂活性蛋白激酶等的信号通路激活,通过细胞内 Ca^{2+} 发挥作用,且也调节 BDNF、TrkB mRNA 的转化和蛋白向树突的运输,这些机制是负责蛋白翻译并调节突触传递和突触形成,从而增强和维持学习记忆功能^[6]。Mizun 等^[7]实验提出 BDNF-TrkB 信号通路与 N-甲基-D-天冬氨酸(NDMA)受体存有内在联系,这种联系在海马空间记忆中起到了重要作用。

实验结果证明,与对照组比较,模型组 Y 迷宫成绩下降,血清 SOD 水平降低,前额叶皮质 BDNF 免疫阳性物质表达显著减少,说明中长期睡眠剥夺能造成脑损伤,有可能通过 BDNF 介导的神经通路影响突触可塑性;经过疏肝补肾方药的干预,与模型组比较,SOD 增多,氧自由基对脑功能损伤的趋势减弱,Y 迷宫学习成绩提高,同时 BDNF 在前额叶皮质的表达上调,说明同时应用疏肝法和补肾法能调节机体的代谢状态,保护脑功能,并通过诱发长时程增强增强学习记忆能力。在以往的研究中,多采用安神、补脑、补肾、益气的方法改善睡眠剥夺等应激后所致的学习记忆能力障碍,本研究考虑到,睡眠剥夺作为一种目前生活中常见的应激方式,肝主疏泄功能的影响贯穿整个造模过程中,可以认为是一种主要的影响因素,所以本实验设计运用疏肝、补肾结合的方法观察大鼠学习记忆能力的改善。

睡眠剥夺模型模拟的是“想睡而不能睡”的病

因病理过程,大鼠在睡眠剥夺箱内虽然可以自由活动、饮食,因受水的刺激,欲逃窜的心理很明显,在笔者相关试验中也发现,大鼠在睡眠剥夺期间的攻击性增强。根据中医理论,肝主疏泄、调畅气机,“所欲不得”,气血运行不畅,诸阳气会诸于头,气机失调则脑失濡养而影响神经相关功能,所以通过疏肝调畅气机,肝肾同源,又肾主骨生髓,脑为髓海,疏肝的同时予以补肾,则髓海充养,学习记忆功能增强。

针对实验所复制的造模方法,本研究首先选用《伤寒论》中的四逆散以疏肝郁、调畅气机,正如《素问·四时刺逆从论》所述“血气上逆,令人善忘”,陈士铎在《辨证录》中所说“气郁不舒,忽忽如有所失,目前之事竟不记忆,乃肝气之滞”,并结合具有补肾养心作用的生慧汤,通过肝、心、肾的交互作用,说明睡眠剥夺过程及造成学习记忆障碍的证候。应用疏肝补肾方药调节大鼠的学习记忆功能,影响 BDNF 的分布和表达,该通路其他递质、受体是否也参与对 LTP 的调节,待后续研究。

参考文献

- [1] Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA, et al. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery [J]. Brain Research, 2004, 1004(1-2):45-51.
- [2] 王跃春,王子栋,孙黎明,等. 动物学习记忆能力的 Y-型迷宫测试法 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2001, 22(5): 137-140.
- [3] 王秀丽,唐洪丽,索国玲. 癫痫持续状态对发育期大鼠学习记忆及海马磷酸化的 CAMP 反应元件结合蛋白表达的影响 [J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(22): 1723-1725.
- [4] 邱前程,卢善明,黄杰雄,等. 不同固定剂对冰冻切片免疫组化结果的影响 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(4): 250-252.
- [5] Musumeci G, Sciarretta C, Rodríguez-Moreno A, et al. TrkB Modulates Fear Learning and Amygdalar Synaptic Plasticity by Specific Docking Sites [J]. J Neurosci, 2009, 29 (32):

- 10131-10143.
- [6] Poulin B, Butcher A, McWilliams P, et al. The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(20): 9440-9445.
- [7] Angelucci F, Mathé AA, Aloe L. Neurotrophic factors and CNS disorders: findings in rodent models of depression and schizophrenia[J]. Pro Brain Res, 2004, 146(3): 151-165.
- (收稿日期: 2012-02-19)
(本文编辑: 钮丽霞)

解毒护肝饮药物血清对异烟肼致 HepG2 坏死和凋亡的干预

杨铂 刘靛雯 王小利 袁成民 安勇

【摘要】 目的 观察解毒护肝饮药物血清对异烟肼致人肝癌细胞株 (human hepatocellular carcinoma cell lines, HepG2) 病变的干预, 并分析其机制。**方法** 制备解毒护肝饮和甘草酸二铵的药物血清, 建立异烟肼致 HepG2 细胞损伤模型, 以解毒护肝饮和甘草酸二铵药物血清加入 HepG2 培养液, 观察对 HepG2 坏死和凋亡的干预, 以及对 HepG2 Fas/FasL 表达的影响, 以评价解毒护肝饮的疗效机制。**结果** 解毒护肝饮药物血清对异烟肼致 HepG2 损伤有明显抑制作用, 可以减少 HepG2 细胞凋亡和坏死, 并减少其 Fas/FasL 表达, 效果优于甘草酸二铵胶囊组。**结论** 以清热利湿解毒兼养阴化痰为治法的解毒护肝饮有确切的减少异烟肼致 HepG2 坏死和凋亡的作用, 其抗细胞凋亡作用与减少 HepG2 的 Fas/FasL 的表达有关。

【关键词】 解毒护肝饮; 药物性肝炎; 异烟肼; 药物血清; 凋亡; 人肝癌细胞株; 体外培养; Fas/FasL

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.04.007

Effect of Jiedu Hupan Decoction containing serum on the death and apoptosis of HepG2 which were damaged by isoniazid YANG Bo, LIU Jing-wen, WANG Xiao-li, et al. Liver Disease Units, Ji'nan Infectious Hospital, Ji'nan 250021, China

Corresponding author: AN Yong, E-mail: an-yong666@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of Jiedu Hupan Decoction containing serum on HepG2 damaged by isoniazid, and reveal the mechanism of it. **Methods** Establish iv vitro HepG2 cell damaged by isoniazid culture experiment model. The serum was collected from the rats using Jiedu Hupan Decoction and Gancaosuaneran and incubated with the HepG2 model. After 24 hours, observe the death and apoptosis of HepG2. And the expressions of Fas/FasL were measured by flow cytometry. **Results** Culture experiment model of iv vitro HepG2 cell damaged by isoniazid was established successfully. Jiedu Hupan Decoction containing serum significantly inhibited apoptosis and necrosis of the HepG2 cells and the expression of Fas/FasL. The curative effect of this is better than control group which were given Gancaosuaneran decoction containing serum. **Conclusion** Jiedu Hupan Decoction according to qingre lishi jiedu can evidently reduce the hepatitis by decrease the expression of the factor associated with apoptosis. So it can improve the syndromes and experimental index of hepatitis induced by anti-tubercular drug.

基金项目: 财政部、国家中医药管理局 2009 年中医药行业科研专项 (200907001-1)

作者单位: 250021 济南市传染病医院 (杨铂、刘靛雯、袁成民、安勇); 济南护理职业学院 (王小利)

作者简介: 杨铂 (1979-), 硕士, 主治医师。研究方向: 中西医结合肝病传染病的防治。E-mail: optyb@sina.com

通讯作者: 安勇 (1967-), 硕士, 主任医师。研究方向: 中西医结合肝病传染病的防治。E-mail: an-yong666@163.com

文献标引格式:

冯婷, 李峰, 宋月晗, 等. 疏肝补肾法对睡眠剥夺大鼠学习记忆及前额叶皮质 BDNF 蛋白表达的影响 [J]. 环球中医药, 2012, 5 (4): 255-259.