

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.18.014

固本健脑安神方对衰老失眠模型大鼠学习记忆及海马生物钟基因 Clock、Bmal1 表达的影响

沈奎¹, 袁德培¹✉, 袁林^{1,2}, 曾楚华¹, 向阳¹, 赵芬¹, 田俸禄¹, 洪岚^{1,2}, 刘菁¹, 黄晓雪¹

1. 湖北民族大学医学部, 湖北省恩施市学院路 39 号, 445000; 2. 湖北民族大学风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室

[摘要] **目的** 观察固本健脑安神方对衰老失眠模型大鼠学习记忆的影响, 并探讨其可能作用机制。**方法** 将 60 只 SD 大鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖 40 天建立衰老大鼠模型, 造模后随机分为衰老组、模型组、固高组、固低组和西药组, 每组 12 只。除衰老组外其余各组大鼠腹腔注射 DL-4-氯苯丙氨酸混悬液 400 mg/(kg·d), 连续给药 2 天建立衰老失眠模型。造模结束后, 固高组、固低组大鼠分别给予固本健脑安神方 1.8、0.9 g/(kg·d) 灌胃, 西药组大鼠给予艾司唑仑 0.09 mg/(kg·d) 灌胃, 衰老组、模型组给予生理盐水 0.1 ml/kg 灌胃, 每日 1 次, 连续给药 7 天。7 天后采用 Morris 水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力, 包括定位航行实验连续 5 天, 记录每天逃避潜伏期; 休息 1 天后, 第 7 天进行空间探索实验, 记录大鼠 60 s 内穿越第三象限平台区域次数。HomeCageScan 睡眠分析大鼠睡眠时间、睡眠节律, RT-PCR 法和免疫组化法检测大鼠脑海马体 CA1 区 Clock、Bmal1 mRNA 及蛋白表达水平, 尼氏染色观察海马体 CA1 区尼氏小体病理变化。**结果** 与模型组同时间比较, 第 3、4、5 天固高组逃避潜伏期明显缩短 ($P<0.05$); 模型组大鼠穿越第三象限平台区域次数明显少于衰老组, 固高组和西药组大鼠穿越第三象限平台区域次数较模型组明显增多 ($P<0.05$)。与衰老组比较, 模型组大鼠日间睡眠时间和总时间明显减少, 脑海马体 CA1 区 Clock、Bmal1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 固高组和西药组大鼠日间睡眠时间和总时间明显增加, 脑海马体 CA1 区 Clock、Bmal1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$); 各组大鼠夜间睡眠时间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。尼氏染色和免疫组化结果显示, 衰老组大鼠海马体 CA1 区尼氏小体丰富, 而模型组大鼠海马体 CA1 区染色浅, 部分尼氏小体溶解, Clock、Bmal1 阳性颗粒显著减少; 各给药组大鼠海马体 CA1 区尼氏小体数量, Clock、Bmal1 蛋白表达显著增高, 且以固高组效果明显。**结论** 固本健脑安神方能改善衰老失眠模型大鼠睡眠节律紊乱, 修复海马神经细胞元, 提高学习记忆能力, 调节脑海马区 Clock、Bmal1 表达可能是其重要机制。

[关键词] 失眠; 衰老; 学习记忆能力; Morris 水迷宫实验; 生物钟基因; 固本健脑安神方

记忆在睡眠阶段进行整合和巩固, 失眠患者更容易出现记忆衰退、注意力下降及决策困难, 增加认知障碍风险^[1-2]。昼夜节律系统是调节人体生理周期的重要系统, 研究^[3]表明, 学习记忆能力与昼夜节律密切相关, 阿尔茨海默病模型动物学习和记忆能力受到破坏, 会出现昼夜节律紊乱, 表现为睡眠和行为节律紊乱。睡眠剥夺则会导致阿尔茨海默病 β -淀粉样蛋白 (A β) 的沉积, 导致认知能力下降^[4], 且昼夜节律具有年龄依赖性, 老年人群失

眠发生率更高^[5]。昼夜节律调控睡眠从哺乳动物的视交叉上核为节律起搏点, 通过生物钟基因脑和肌肉组织芳香烃受体和转运蛋白的类似蛋白 1 基因 (Bmal1) 和昼夜节律运动输出周期故障基因 (Clock) 的转录/翻译反馈环路进行调控^[6]。我们既往研究针对老年人认知功能障碍, 治疗采用固本健脑法^[7], 其具有健脾补肾、补脑安神之效, 主治神衰、善忘^[8-9]。我们结合土家医验方益脑安神汤^[10], 创立了固本健脑安神方。本实验以生物钟基因为切入点, 探讨固本健脑安神方对睡眠和学习记忆能力的影响及其可能作用机制。本研究经湖北

基金项目: 国家自然科学基金 (81860811, 82060831)

✉ 通讯作者: ydp7880@163.com, (0718)8437810

民族大学生物医学科研伦理委员会审批 [审批号: (2021) 49 号]。

1 材料与方法

1.1 动物

60 只健康 SPF 级雄性 SD 大鼠, 3 月龄, 体重 (250±50) g, 由湖北省实验动物研究中心提供, 实验动物使用许可证号: SCXK (鄂) 2020-0018, 饲养于 12 h/12 h 明暗交替动物房, 避免强光、噪音等刺激, 适应性喂养 1 周后进行实验。

1.2 药物

固本健脑安神方组成: 党参、酸枣仁、枸杞子、首乌藤、花生叶各 15 g, 茯苓、山楂各 12 g。购于湖北民族大学附属民大医院, 煎煮浓缩至含生药浓度 1 g/ml 溶液, 冷却后 4 °C 冷藏备用。

1.3 主要试剂及仪器

DL-4-氯苯丙氨酸 (PCPA, 批号: K1912044), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 用生理盐水配置成浓度为 40 mg/ml 的混悬液, 现配现用。艾司唑仑片 (批号: H42021522), 华中药业股份有限公司; D-半乳糖 (批号: RH285728), 武汉科瑞生物技术有限公司; 乌来糖 (批号: 20130315), 国药集团化学试剂有限公司; TRIzol 裂解液 (批号: 113605), 美国 Ambion 公司; TB Green Premix Ex Tap II (批号: A162517A)、PrimeScript RT reagent Kit with Gdnase Eraser (批号: AJG2280A), TaKaRa 公司; Clock 抗体 (批号: BA09085603)、Bmal1 抗体 (批号: AB03284578), 北京博奥森生物技术有限公司; 4% 多聚甲醛通用型组织固定液 (批号: 70071800)、甲苯胺蓝 (批号: G1032)、冰醋酸 (批号: G10000218)、DAB 显色液 (批号: G1211)、苏木素 (批号: G1340), Servicebio 公司。

HomeCageScan 3.0 型动物精细行为分析系统, 美国 CleverSys 公司; Eclipse 80i 型荧光显微镜, 日本尼康公司; Multiskan FC 型多功能酶标仪, Thermo Scientific 公司; MagNA Lyser 型全自动组织匀浆仪、LightCycler480 II 型实时荧光定量 PCR 仪, Roche 公司。

1.4 分组与造模

所有大鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖 125 mg/(kg·d) 制备衰老大鼠模型^[11], 每日 1 次, 连续注射 40 天。造模后大鼠出现毛色枯黄、脱毛、活动减少、牙齿松动等特征即造模成功^[11]。将造模成功的 60 只大鼠采用随机数字表法分为衰老组、模

型组、固高组、固低组、西药组, 每组 12 只。除衰老组外, 其余各组在衰老模型造模 40 天后再进行失眠模型制备: 每日上午 9: 00 对大鼠进行腹腔注射 PCPA 混悬液 400 mg/(kg·d), 连续给药 2 天, 大鼠性情烦躁, 活动亢奋, 对外界刺激敏感, 攻击性强, 睡眠时间减少, 昼夜节律消失, 失眠模型造模成功^[12]。衰老组腹腔注射 10 ml/(kg·d) 生理盐水。

1.5 干预方法

造模结束第 2 天, 根据“常用实验动物及人的体表面积比例 (剂量换算用)”^[13], 固高组大鼠给予固本健脑安神方 1.8 g/(kg·d) 灌胃, 固低组大鼠给予固本健脑安神方 0.9 g/(kg·d) 灌胃, 其中固低组给药量为临床等效剂量; 西药组大鼠给予艾司唑仑 0.09 mg/(kg·d) 灌胃, 衰老组、模型组给予生理盐水 0.1 ml/kg 灌胃, 每日 1 次, 连续给药 7 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 Morris 水迷宫实验 给药第 1 天开始, 每组采用随机数字表法抽取 8 只进行水迷宫实验。每天下午开始进行水迷宫实验, 定位航行实验训练大鼠学习记忆能力, 平台置于第三象限, 分别从一、二、四象限将大鼠放入水池寻找平台, 每次 60 s, 若未找到平台则引导至平台停留 10 s 熟悉环境, 连续 5 天, 系统自动识别并记录每天逃避潜伏期。休息 1 天后, 第 7 天进行空间探索实验, 将水中平台撤去, 记录大鼠从第一象限出发后 60 s 内穿越第三象限平台区域次数。

1.6.2 HomeCageScan 睡眠分析 给药第 1 天开始, 每组剩余 4 只大鼠每天 24 小时进行睡眠监测, 连续 7 天。将大鼠放入活动笼, 由独立摄像头追踪大鼠行为, 分析躯体动作识别睡眠等行为并进行记录, 观察周期为 24 h (12 h 光照: 12 h 黑暗), 分析昼夜节律, 取 7 天均值。

1.6.3 RT-PCR 法检测大鼠海马组织 Clock、Bmal1 mRNA 表达 末次干预结束后, 采用随机数字表法每组抽取 3 只大鼠, 禁食不禁水 12 h, 腹腔注射 20% 乌来糖 0.05 g/kg 麻醉大鼠, 迅速取出脑组织, 分离出海马组织, 放入 -80 °C 保存备用。取 0.1 g 海马组织, 加入 1 ml TRIzol 裂解液, 放入全自动组织匀浆仪 6000 r/min 匀浆 20 s, 吸取匀浆液后提取 mRNA 进行逆转录, PCR 仪扩增 Clock、Bmal1 基因, PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 序列详见表 1。

表1 PCR引物序列表

基因		引物序列 (5' to 3')	产物长度/bp
β-actin	上游	CCCCCAATGTATCCGTTGTG	102
	下游	TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT	
Clock	上游	GCCGCAGAATAGCACCCAGAGT	80
	下游	ACTTGCCACCATGACGGCCC	
Bmal1	上游	GCGACTCATCGATGCGAA	65
	下游	AACAGGTGGAGGCGAAGT	

注: Bmal1, 脑和肌肉组织芳香烃受体和转运蛋白的类似蛋白1; Clock, 昼夜节律运动输出周期故障基因。

1.6.4 脑组织尼氏染色 将多聚甲醛固定后的脑组织进行脱水及包埋, 切片脱蜡后用甲苯胺蓝染色 5 min, 1% 的冰醋酸分化后水洗, 烘干透明后封片, 显微镜下进行观察。

1.6.5 免疫组化检测 Clock、Bmal1 蛋白表达 将石蜡切片脱蜡后进行抗原修复, 3% 双氧水孵育 25 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 血清封闭后加入一抗 Clock(1: 200) 和 Bmal1(1: 100), 4 °C 下孵育过夜, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加入稀释二抗(1: 1000) 室温孵育 50 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 DAB 显色液, 苏木素复染返蓝后脱水透明, 晾干后封片显微镜下观察。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 对实验数据进行统计分析, 本研究计量资料均符合正态分布用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, Morris 水迷宫实验数据采用重复测量方差分析和单因素方差分析, 其余数据采用单因素方差分析, 组间两两比较, 方差齐采用 LSD 法, 方差不齐采用进行 Tamhane's T^2 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间逃避潜伏期及第 7 天穿越第三象限平台区域次数比较

表 2 示, 采用重复测量方差分析大鼠 5 天逃避潜伏期变化, 符合球形检验 (Mauchly $W = 0.899$,

$P = 0.207 > 0.05$), 主旨内效应 $P < 0.001$, 可见大鼠逃避潜伏期随训练时间有缩短趋势。与模型组同时时间比较, 第 3、4、5 天固高组逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$)。衰老组、固低组、西药组逃避潜伏期时间与模型组各时间点比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组大鼠穿越第三象限平台区域次数明显少于衰老组, 固高组和西药组大鼠穿越第三象限平台区域次数较模型组明显增多 ($P < 0.05$), 固低组与模型组大鼠穿越第三象限平台区域次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠 HomeCageScan 睡眠分析结果比较

表 3 示, 与衰老组比较, 模型组、固高组、固低组日间睡眠时间和总时间明显减少 ($P < 0.05$), 西药组与衰老组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 固高组、固低组、西药组大鼠日间睡眠时间和总时间明显增加 ($P < 0.05$)。各组大鼠夜间睡眠时间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。图 1 为各组大鼠 24 h 间每个小时的睡眠情况, 体现了睡眠节律, 发现与衰老组比较, 模型组大鼠昼夜节律消失, 而各给药组大鼠昼夜节律恢复。

表3 各组大鼠 24 小时平均睡眠累计时间比较 (h, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	日间	夜间	总时间
衰老组	4	8.373±0.103	5.712±1.195	14.452±1.338
模型组	4	3.889±0.712 ^{a)}	4.767±0.652	8.656±0.982 ^{a)}
固高组	4	6.314±0.652 ^{a) b)}	6.266±0.705	12.540±0.688 ^{a) b)}
固低组	4	6.202±0.723 ^{a) b)}	5.047±1.008	11.249±0.744 ^{a) b)}
西药组	4	7.467±0.796 ^{b)}	6.035±0.478	13.502±0.643 ^{b)}

注: a) 与衰老组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠海马体 CA1 区 Clock、Bmal1 mRNA 表达比较

表 4 示, 与衰老组比较, 模型组、固高组、固低组 Clock mRNA 表达显著降低, 模型组、固低组、西药组 Bmal1 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 固高组、西药组 Clock、Bmal1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠不同时间逃避潜伏期及第 7 天穿越平台次数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	逃避潜伏期/s					穿越第三象限平台 区域次数/次
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
衰老组	8	51.76±14.61	42.52±19.18	40.00±21.00	35.26±20.16	29.33±19.20	3.50±1.41 ^{a)}
模型组	8	52.97±14.57	44.35±21.14	41.31±18.34	41.87±17.62	37.41±16.06	1.13±1.36
固高组	8	50.85±15.79	37.53±19.65	29.44±18.29 ^{a)}	26.18±18.13 ^{a)}	24.28±19.52 ^{a)}	4.00±2.14 ^{a)}
固低组	8	53.98±15.07	37.69±19.95	44.95±21.25	31.63±22.10	34.72±20.08	2.50±1.77
西药组	8	49.08±17.67	40.91±18.23	45.39±17.06	36.48±17.67	34.40±21.19	3.50±1.60 ^{a)}

注: a) 与模型组同时时间比较, $P < 0.05$ 。

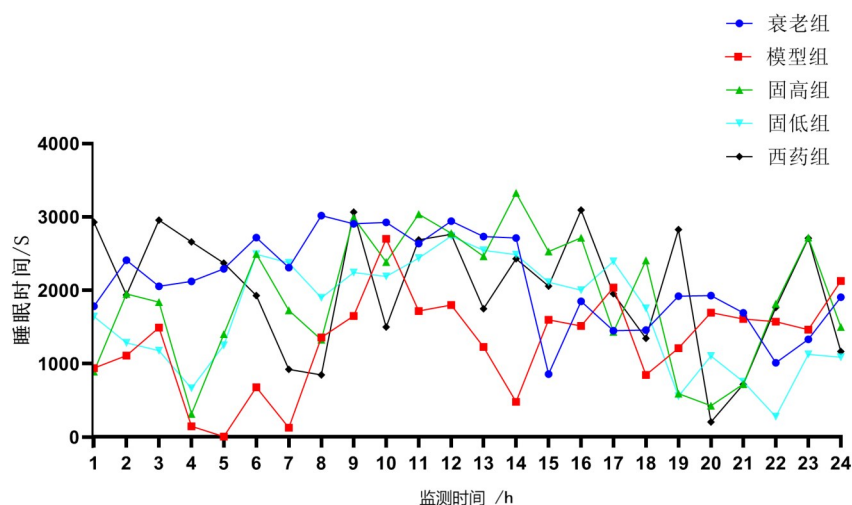


图1 各组大鼠24 h睡眠节律变化图

表4 各组大鼠海马体CA1区Clock、Bmal1 mRNA表达
($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Clock mRNA	Bmal1 mRNA
衰老组	3	1.000 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000
模型组	3	0.747 $\pm$ 0.011 ^{a)}	0.819 $\pm$ 0.04 ^{a)}
固高组	3	0.919 $\pm$ 0.15 ^{a) b)}	0.975 $\pm$ 0.057 ^{b)}
固低组	3	0.794 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.808 $\pm$ 0.045 ^{a)}
西药组	3	1.014 $\pm$ 0.017 ^{b)}	0.909 $\pm$ 0.052 ^{a) b)}

注: Bmal1, 脑和肌肉组织芳香烃受体和转运蛋白的类似蛋白1; Clock, 昼夜节律运动输出周期故障基因。

a) 与衰老组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

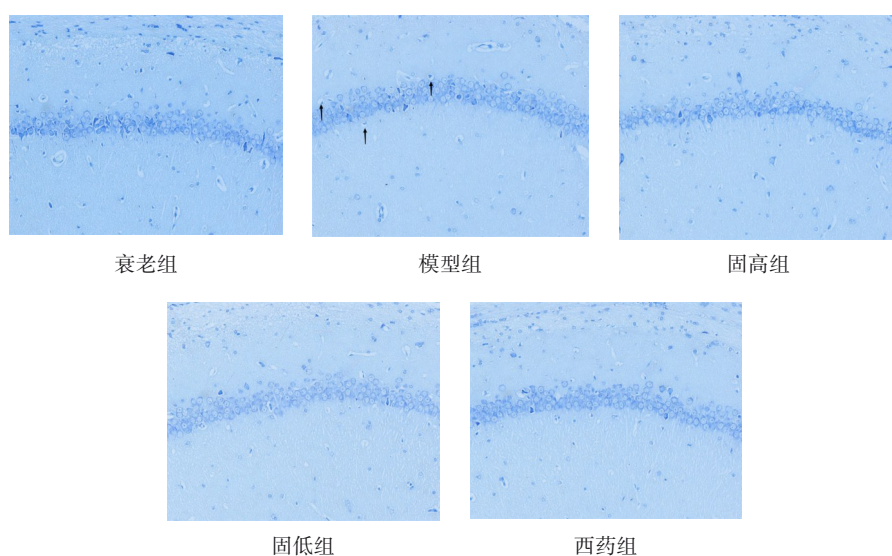
2.4 各组大鼠脑海马体CA1区尼氏染色结果

甲苯胺蓝染色后尼氏小体呈紫蓝色。图2示,

衰老组大鼠海马体CA1区尼氏小体丰富。模型组大鼠海马体CA1区部分神经元细胞出现核固缩, 甚至尼氏小体溶解。各给药组大鼠海马体CA1区尼氏小体数量升高, 且以固高组效果明显。

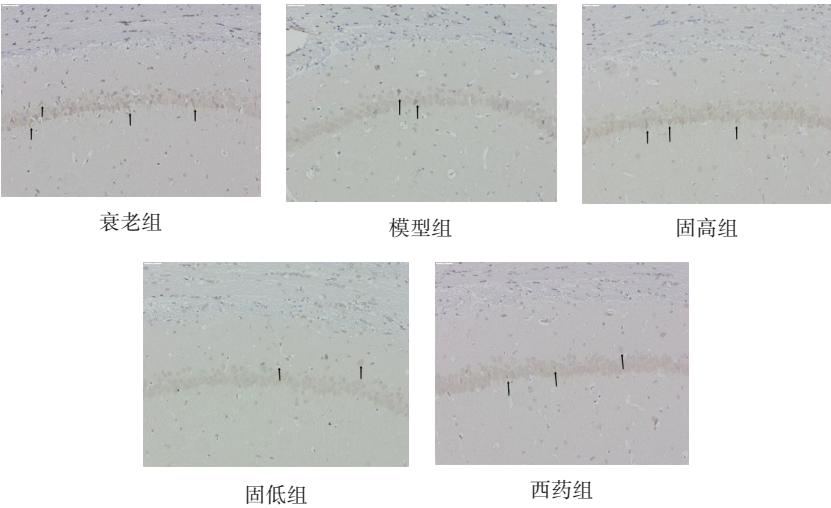
2.5 各组大鼠脑海马体CA1区Clock、Bmal1蛋白表达比较

免疫组化结果显示Clock、Bmal1蛋白阳性颗粒为棕黄色。图3、图4示, Clock、Bmal1蛋白表达在衰老组海马体CA1区细胞膜上表达明显, 模型组Clock、Bmal1蛋白表达显著减少, 固高组、固低组和西药组干预后Clock、Bmal1蛋白表达显著增高, 以固高组、西药组尤为明显。

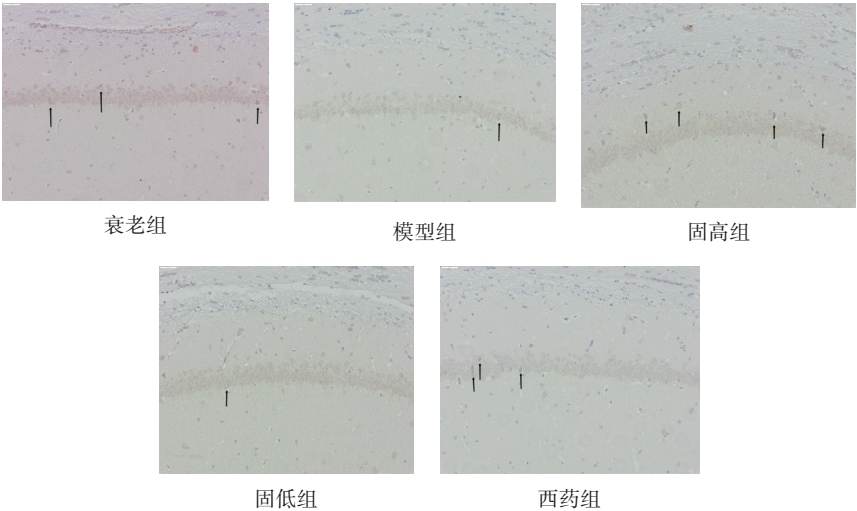


注: 图中箭头表示神经元细胞核固缩, 尼氏小体溶解。

图2 各组大鼠脑海马CA1区尼氏染色结果(尼氏染色, $\times 200$)



注：图中箭头表示 Clock 蛋白阳性表达颗粒。
图3 各组大鼠脑海马体CA1区 Clock 蛋白表达（免疫组化，×200）



注：图中箭头表示 Bmal1 蛋白阳性表达颗粒。
图4 各组大鼠脑海马体CA1区 Bmal1 蛋白表达（免疫组化，×200）

3 讨论

《素问·四气调神大论篇》指出：“从阴阳则生，逆之则死，从之则治，逆之则乱。反顺为逆，是谓内格。”顺应自然的阴阳变化，遵从自然节律是维持人体正常功能的前提。昼夜节律发生改变甚至消失，则会严重影响记忆、认知能力，导致记忆障碍和痴呆症的发生^[14]。中医称失眠为“不寐”，责之于脾肾亏虚，心失所养，气虚痰瘀，髓窍失养，神机失用。固本健脑安神方中党参、枸杞子为君，健脾补肝肾；茯苓、酸枣仁辅以健脾宁心安神，山楂助党参、茯苓以消积化痰祛瘀，共为臣佐；花生叶补益心脾、镇静安神，首乌藤补益肝肾、活血化瘀通络，花生叶与首乌藤昼开夜合，有助于安神入眠，均为使药。全方配伍使脾肾互济，

痰瘀得消，髓窍清明得以益智。

本实验通过注射 D-半乳糖和 PCPA 建立衰老失眠大鼠模型^[15]，造模后大鼠出现毛色萎黄、脱毛、行动迟缓、牙齿松动等衰老表现。采用非侵入性动物精细行为智能分析系统—HomeCageScan，可在减少动物创伤情况下研究啮齿动物的睡眠，且准确度与大鼠脑电图的测量所定义的睡眠高度一致^[16]。HomeCageScan 检测结果显示，模型组大鼠日间睡眠时间和 24 h 内睡眠总时间减少，而固本健脑安神方高、低剂量和西药艾司唑仑干预后日间睡眠时间和总时间均较模型组增加，说明固本健脑安神方高、低剂量和西药艾司唑仑均能改善睡眠情况。各组大鼠夜间睡眠时间比较差异无统计学意义，主要差距在日间睡眠，大鼠昼伏夜出，睡眠时间主要集

中在白天,夜间活跃。另外,模型组大鼠昼夜节律紊乱,而各给药组大鼠睡眠节律恢复,呈正常作息。水迷宫测试结果显示,模型组大鼠逃避潜伏期延长,穿越第三象限平台区域次数减少,说明学习记忆能力明显下降;当神经元受到损伤,尼氏小体减少甚至消失,损伤修复后可重新出现增多,海马体 CA1 区尼氏染色亦显示神经元受损,尼氏小体大量减少。而固本健脑安神方高剂量干预后第 3、4、5 天学习记忆情况得到明显改善,固本健脑安神方高剂量组、西药组穿越第三象限平台区域次数较模型组明显增多,表明其空间学习记忆能力得到明显改善,海马 CA1 区尼氏小体增多,说明固本健脑安神方可有效修复受损神经,提高学习记忆能力。

随年龄增长,睡眠节律改变是正常的衰老过程,老年失眠患者生物钟基因核心转录因子 Clock、Bmal1 表达明显下降,出现睡眠碎片化和睡眠质量降低等问题^[17-18]。本研究 PCR 和免疫组化结果提示,固本健脑安神方高剂量和艾司唑仑均可能通过上调海马体 CA1 区 Clock、Bmal1 mRNA 和蛋白表达,从而调节大鼠睡眠节律改善睡眠。

综上所述,固本健脑安神方可能通过调节衰老失眠模型大鼠生物钟基因 Clock、Bmal1 表达,调整昼夜节律改善睡眠,促进受损神经细胞自我修复,从而提高学习记忆能力。生物钟基因调控涉及多种时间节段,如小时、日、月、年等,本实验以 24 h 为时间节点进行研究还存在一定局限,因此今后对不同时间节点、不同周期对其影响还需进一步研究,为固本健脑安神方治疗老年失眠和预防阿尔茨海默病提供依据。

参考文献

- [1] RAWASHDEH O, PARSONS R, MARONDE E. Clocking in time to gate memory processes: the circadian clock is part of the ins and outs of memory [J]. *Neural Plast*, 2018;6238989. doi: 10.1155/2018/6238989.
- [2] ZIELINSKI MR, SYSTROM DM, ROSE NR. Fatigue, sleep, and autoimmune and related disorders [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1827. doi: 10.3389/fimmu. 2019. 01827.
- [3] LI X, GUAN J, SUN T, et al. Circadian learning and memory changes in Abeta1-42 induced Alzheimer's mice [J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(3): 463-471.
- [4] BISHIR M, BHAT A, ESSA MM, et al. Sleep deprivation and neurological disorders [J]. *Biomed Res Int*, 2020; 5764017. doi: 10.1155/2020/5764017.
- [5] BUBBICO G, DI IORIO A, LAURIOLA M, et al. Subjective cognitive decline and nighttime sleep alterations, a longitudinal analysis [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 142. doi: 10.3389/fnagi. 2019. 00142.
- [6] HIDA A, KITAMURA S, KATAYOSE Y, et al. Screening of clock gene polymorphisms demonstrates association of a PER3 polymorphism with morningness-eveningness preference and circadian rhythm sleep disorder [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6309. doi: 10.1038/srep06309.
- [7] 袁林, 朱云峰, 王平, 等. 固本健脑法治疗轻度认知障碍的理论探讨 [J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38(8): 1520-1521.
- [8] 易慧芳. 固本健脑液联合右佐匹克隆治疗原发性失眠(脾肾亏虚型)的临床观察 [D]. 恩施: 湖北民族学院, 2018.
- [9] 王艳琼. 固本健脑法及其组方对老年失眠大鼠脑组织细胞因子和神经递质的影响 [D]. 恩施: 湖北民族学院, 2014.
- [10] 彭芳胜. 土家医方剂学 [M]. 北京: 中国古籍出版社, 2007: 428-429.
- [11] 徐智, 吴国明, 钱桂生, 等. 大鼠衰老模型的初步建立 [J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25(4): 312-315.
- [12] 肖成荣, 马增春, 李海静, 等. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制 [J]. *毒理学杂志*, 2007, 21(4): 326.
- [13] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [14] BEYDOUN HA, BEYDOUN MA, WEISS J, et al. Insomnia as a predictor of diagnosed memory problems: 2006-2016 health and retirement study [J]. *Sleep Med*, 2021, 80: 158-166. doi: 10.1016/j. sleep. 2021. 01. 038.
- [15] REN XJ, WANG QQ, ZHANG XP, et al. Establishment of a rat model with ageing insomnia induced by D-galactose and parachlorophenylalanine [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4): 3228-3236.
- [16] SARÉ RM, LEMONS A, TOROSSIAN A, et al. Noninvasive, high-throughput determination of sleep duration in rodents [J]. *J Vis Exp*, 2018, 134: 57420. doi: 10.3791/57420.
- [17] BÖHMER MN, OPPEWAL A, BINDELS PJE, et al. Comparison of sleep-wake rhythms in elderly persons with intellectual disabilities and the general population [J]. *Sleep Med*, 2020, 76: 148-154. doi: 10.1016/j. sleep. 2020. 10. 019.
- [18] CANALES MT, HOLZWORTH M, BOZORGMEHRI S, et al. Clock gene expression is altered in veterans with sleep apnea [J]. *Physiol Genomics*, 2019, 51(3): 77-82.

Effects of *Guben Jiannao Anshen Formula* (固本健脑安神方) on Learning and Memory Ability Hippocampal Clock and Bmal1 Genes Expression in Aging Insomnia Model Rats

SHEN Xi¹, YUAN Depei¹, YUAN Lin^{1,2}, ZENG Chuhua¹, XIANG Yang¹, ZHAO Fen¹, TIAN Fenglu¹, HONG Lan^{1,2}, LIU Jing¹, HUANG Xiaoxue¹

1. Medical School, Hubei Minzu University, Enshi, 445000; 2. Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Disease, Hubei Minzu University

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of *Guben Jiannao Anshen Formula* (固本健脑安神方, GJAF) on learning and memory in aging insomnia rats, and to explore the possible mechanism. **Methods** Sixty SD rats were subcutaneously injected with D-galactose on the back of the neck for 40 days to establish the aging rat model. After modelling, the rats were randomly divided into aging group, model group, GJAF high dose group, GJAF low dose group and estazolam group, with 12 rats in each group. Except for the aging group, the rats in the other groups were intraperitoneally injected with 400 mg/(kg·d) of DL-4-chlorophenylalanine suspension for two consecutive days to establish the aging insomnia model. After modelling, GJAF at the dose of 1.8 g/(kg·d) and 0.9 g/(kg·d) were given into the rats in the high- and low-dose GJAF group by gavage, respectively; 0.09 mg/(kg·d) of estazolam was given into the estazolam group by gavage, while 0.1 ml/kg of normal saline was given to the aging group and model group by gavage. All the interventions were administered once daily for seven consecutive days. Afterwards, Morris water maze test was used to detect the learning and memory ability of rats, including positioning navigation test for five consecutive days to record the daily escape latency, and space exploration experiment on the 7th day to record the times that the rats crossed the platform area in the third quadrant within 60 seconds after a day of rest. HomeCageScan was used to analyze the sleep time and sleep rhythm of rats, while RT-PCR and immunohistochemical methods were used to detect the mRNA and protein expression levels of Clock and Bmal1 in the CA1 region. Nissl staining was used to observe the pathological changes of Nissl bodies in the CA1 region of the hippocampus. **Results** The escape latency of the GJAF high-dose group was significantly reduced on the 3rd, 4th and 5th day compared to that of the model group ($P < 0.05$). The times of platform crossing the third quadrant of the model group was less than that of the aging group, while those of the GJAF high dose group and the estazolam group were more markedly increased than the model group ($P < 0.05$). The daytime sleep time and the total sleep time of the model group, as well as the Clock and Bmal1 mRNA expression in the CA1 region of the hippocampus decreased significantly compared to those of the aging group ($P < 0.05$). Compared to those of the model group, the daytime sleep time and total sleep time of the GJAF high dose group and estazolam group, as well as the Clock and Bmal1 mRNA expression in the CA1 hippocampus region increased significantly ($P < 0.05$). There was no significant difference in nighttime sleep time among the groups ($P > 0.05$). The results of Nissl staining and immunohistochemistry showed that there was rich Nissl bodies in the CA1 region of the aging group, while the hippocampus CA1 region was lightly stained in the model group, where certain Nissl bodies were dissolved, and the positive particles of Clock and Bmal1 reduced. The number of Nissl bodies and the expressions of Clock and Bmal1 proteins in the hippocampus CA1 region significantly increased in all medicated groups, and the GJAF high dose group had most obvious effect. **Conclusion** GJAF can improve the sleep rhythm disorder, repair hippocampal neurons and improve the ability of learning and memory. The mechanism may be related to regulating the expression of Clock and Bmal1.

Keywords insomnia; aging; learning and memory ability; Morris water maze test; clock genes; *Guben Jiannao Anshen Formula* (固本健脑安神方)

(收稿日期: 2022-01-20; 修回日期: 2022-04-29)

[编辑: 邓媛]