

L-苹果酸及苹果对睡眠剥夺小鼠记忆的影响

卢超银¹, 沈雨莎¹, 张烨¹, 倪焯钦¹, 印媛君²

1.浙江中医药大学第二临床学院, 浙江杭州 310053; 2.浙江中医药大学基础医学院, 浙江杭州 310053

[摘要] 目的 探讨不同浓度 L-苹果酸以及苹果对睡眠剥夺小鼠学习记忆的影响。方法 15 只小鼠随机分为对照组(ICR + 生理盐水组)和实验组(ICR + 高、中、低浓度 L-苹果酸组, ICR + 苹果组)。用 Morris 水迷宫测出睡眠剥夺前后小鼠的空间学习记忆。结果 ICR + 高浓度 L-苹果酸组学习记忆并没有明显改善; ICR + 中、低浓度 L-苹果酸组学习记忆明显改善; ICR + 苹果汁组学习记忆得到明显改善, 且效果优于 ICR + 中、低浓度 L-苹果酸组。结论 适当浓度的 L-苹果酸和苹果都能够起到改善学习记忆的作用, 但是苹果改善学习记忆的机制是否仅同 L-苹果酸相关还需要进一步的研究。

[关键词] 睡眠剥夺; L-苹果酸; 苹果; 学习记忆

[中图分类号] R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-5654(2016)11(b)-0016-03

Effect of L-malic Acids and Apples on the Sleep Deprivation of Memory of Mice

LU Chao-yin¹, SHEN Yu-sha¹, ZHANG Ye¹, NI Ye-qin¹, YIN Yuan-jun²

1.Second Clinical College, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang Province, 310053 China; 2.College of Basic Medicine, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang Province, 310053 China

[Abstract] Objective To study the effect of different concentrations of l-malic acids and apples on the sleep deprivation of memory of mice. **Methods** 15 mice were randomly divided into the control group(ICR + normal saline group) and the experiment group (ICR + high, middle and low concentrations of l-malic acid group, ICR + apple group), and the spatial learning and memory of mice before and after the sleep deprivation was tested by the Morris water maze. **Results** The learning memory of ICR + high concentration of l-malic acid group was not obviously improved, and the learning memory of ICR + middle concentration of l-malic acid group and ICR + low concentration of l-malic acid group was obviously improved, and the learning memory effect of ICR + apple juice group was better than that of middle concentration of l-malic acid group and ICR + low concentration of l-malic acid group. **Conclusion** The appropriate concentration of l-malic acids and apple can have an effect of improving the learning memory, but whether the improvement mechanism of apples on learning memory is only related to the l-malic acid needs the further study.

[Key words] Sleep deprivation; L-malic acid; Apple; Learning memory

睡眠是维持人类许多生理功能稳态所必需的, 睡眠对记忆的形成、存储等都具有重要的作用^[1-3]。睡眠剥夺是指人因环境的需要丧失了所需睡眠量的状态^[4]。随着现代社会的高速发展, 生活节奏的日益加快, 人们持续性工作的状态愈来愈普遍, 继而导致了剥夺的睡眠量增

加。睡眠剥夺或者睡眠抑制可引起学习记忆的损害, 这一点已有广泛的研究证实^[3,5-8]。邓龙祥等人的研究中^[10]指出苹果中的 L-苹果酸能改善睡眠剥夺的小鼠学习记忆能力。但是不同浓度的苹果酸对小鼠睡眠剥夺后空间学习记忆具体影响的不同并未有进一步的研究。且成熟的苹果中含有一定量的 L-苹果酸, 苹果对小鼠是否也同样能够起到改善睡眠剥夺后学习记忆的作用也未见研究。该实验拟通过研究 L-苹果酸以及苹果对睡眠剥夺后大鼠学习记忆的影响, 以对以上内容做进一步的探

[作者简介] 卢超银(1995.7-), 女, 浙江临海人, 本科在读, 研究方向: 行为医学。

[通讯作者] 印媛君(1971.11-), 女, 浙江浦江人, 硕士研究生, 副教授, 研究方向: 心肌缺血, 邮箱: hzyyjun@126.com。

究。

1 资料和方法

1.1 实验动物和分组

选用健康成年 ICR 小鼠 17 只,体重(20±2)g(浙江中医药大学实验动物中心提供)。经 Morris 水迷宫训练之后,筛选出成绩相近的小鼠 15 只,随机分为 5 组,每组 3 只。对照组:ICR + 生理盐水组;实验组:ICR+高浓度(0.7 mg/mL)L-苹果酸组,ICR +中浓度(0.35 mg/mL)L-苹果酸组,ICR+低浓度(0.175 mg/mL)L-苹果酸组,ICR +苹果汁组(苹果汁为直接榨取苹果而来,未添加其他物品)。

1.2 药品与仪器

Morris 水迷宫(浙江中医药大学实验动物中心提供),L-苹果酸(药品源自常茂生物化学工程有限公司,纯度为 99.86%),灌胃针等。

1.3 睡眠剥夺模型的建立

实验人员于 Morris 水迷宫训练后一天的 8:00 至次日 8:00 这段时间内监测小鼠的活动情况,阻止小鼠入睡,以达到对小鼠进行睡眠剥夺的目的。

1.4 给药

从睡眠剥夺期间开始给药,睡眠剥夺期间于下午 17:00 对实验组和对照组同时按 0.4 mL 的剂量灌胃。睡眠剥夺之后,依然按分组于每天下午 17:00 进行灌胃,剂量同睡眠剥夺期间一样,1 次/d,连续进行 5 d。

1.5 学习记忆的测试

用 Morris 水迷宫法进行小鼠学习记忆的测试。睡眠剥夺前对小鼠进行水迷宫学习训练。训练时,将小鼠面向池壁从 4 个入水点分别放入水池,采集控制仪自动记录小鼠的路线。小鼠找到平台后,让其在平台上站立 10 s,然后进行下一次的训练。每只小鼠从四个入水点分别放入水池为一轮训练,训练 4 轮,共训练 16 次。训练成功的标志是小鼠已经形成一定的寻找平台的路线。淘汰训练未成功的小鼠,本实验 15 只小鼠训练成功,淘汰 2 只。对小鼠进行连续 5 d 灌胃后进行水迷宫测量一次。测量时,将小鼠面向池壁从 4 个入水点分别放入,反

应时(s)取平均数,作为测试成绩,若小鼠 60 s 内未找到平台,则以 60 s 计。

1.6 统计方法

所有数据采用 SPSS 19 软件进行统计,计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

将实验组和对照组小鼠在水迷宫中的反应时数据进行单因素方差分析,结果如表 1。

3 讨论

已有研究表明,睡眠对记忆的形成、储存等都有密切关系^[1-3],而睡眠剥夺会对记忆造成一定损害。鉴于睡眠剥夺对记忆的影响已有大量的实验证明,所以本实验在设计时,未设置正常对照组,即肯定了睡眠剥夺对学习记忆的不良作用。该实验中 Morris 水迷宫法进行小鼠学习记忆的测试显示,睡眠剥夺后,高浓度 L-苹果酸灌胃组的小鼠在苹果酸灌胃后学习记忆能力并没有得到明显的改善;中、低浓度 L-苹果酸灌胃组的小鼠在苹果酸灌胃后学习记忆能力得到了明显的改善;苹果汁灌胃组的小鼠在苹果汁灌胃后学习记忆能力得到了明显的改善,且改善效果优于中、低浓度苹果酸灌胃组。从总体的实验结果来看,适当的苹果酸浓度的确能够起到改善学习记忆的作用,同时苹果也的确有一定的改善学习记忆的作用。但是苹果是否仅通过 L-苹果酸来改善学习记忆,即苹果中是否还存在其他可以改善学习记忆的物质还需要进行进一步的研究。

睡眠剥夺可打乱人体的生物钟,干扰脑内神经递质的含量及分布,诱导某些异常基因的特异性表达,使脑内的神经网络结构偏离平衡,从而导致学习和记忆功能障碍。海马—边缘系统中有丰富的胆碱能纤维分布,与学习记忆关系密切。睡眠剥夺后的 SD 大鼠学习能力明显下降,海马乙酰胆碱含量明显降低^[9]。有研究表明 L-苹果酸对睡眠剥夺小鼠的学习记忆能力具有明显的改善作用,可以通过改善脑组织的能量代谢,调整脑内神经递质帮助学习记忆功能的恢复^[10-11]。但 L-苹果酸通过影响海马乙酰胆碱来达到改善学习记忆能力作用的具

表 1 睡眠剥夺前后各组小鼠空间学习记忆测定的结果[($\bar{x}\pm s$),s]

项目	生理盐水	0.7 mg/mL L-苹果酸组	0.35 mg/mL L-苹果酸组	0.175 mg/mL L-苹果酸组	苹果汁组
睡眠剥夺前	56.95±5.32	49.38±9.98	48.85±6.16	51.77±7.62	50.18±9.05
睡眠剥夺后	57.15±8.99	52.18±7.17	36.3±16.42	47.13±23.17	32.82±3.61
P 值	0.975	0.714	0.284	0.758	0.037

体机制还有待进一步证实和研究。

实验中高浓度的苹果酸并没有起到明显的改善学习记忆的作用,可能是由于小鼠个体对苹果酸敏感度的差异,苹果酸无法作用于相应靶点来达到改善学习记忆的作用引起,也可能是由其他原因造成,该实验并未对此进行深入的研究。实验中,由于采用的样本含量较小,存在着统计学误差,建议对实验进行进一步的完善,扩大样本的含量,来为该实验的实验结果提供更可靠的数据支持。L-苹果酸及苹果对于睡眠剥夺后学习记忆功能的影响对于夜间作业人员的保健具有重要意义,提供了一条新的思路。

[参考文献]

- [1] Yoo SS, Hu PT, Gujar N, et al. A deficit in the ability to form new human memories without sleep[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(3):385-392.
- [2] Mueller AD, Pollock MS, Lieblisch SE, et al. Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis Independent of adrenal stress hormones[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(5):R1693-R1703.
- [3] 刘艳, 吴卫平. 慢性睡眠限制对幼鼠空间学习记忆能力的影响[J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(6):620-622.
- [4] 宋国萍, 张侃, 苗丹明. 睡眠剥夺后清醒程度和困倦程度变

化[J]. *中国临床心理学杂志*, 2004, 12(3):290-292.

- [5] Walsh CM, Booth V, Poe GR. Spatial and reversal learning in the Morris water maze are largely resistant to six hours of REM sleep deprivation following training[J]. *Learn Mem*, 2011, 18(7):422-434.
- [6] Hagewoud R, Bultsma LJ, Barf RP, et al. Sleep deprivation impairs contextual fear conditioning and attenuates subsequent behavioural, endocrine and neuronal responses [J]. *J Sleep Res*, 2011, 20(2):259-266.
- [7] 杨遥, 刘静, 徐江涛. 睡眠剥夺对认知功能的影响研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(4):791-794.
- [8] 赵忠新, 张红菊. 重视睡眠剥夺导致认知功能障碍机制的脑功能成像研究[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2013, 13(5):359-362.
- [9] 刘彤, 徐淑梅. 睡眠剥夺对大鼠学习能力和海马乙酰胆碱含量的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2007(3):12-13.
- [10] 邓龙祥, 陈况, 叶处阳. L-苹果酸对睡眠剥夺小鼠学习记忆的影响[J]. *中国现代药物应用*, 2012(20):12-13.
- [11] Morris R. Development of a water maze procedure for studying spacial learning in the rat[J]. *Neurosci Methods*, 1984, 11:47.

(收稿日期:2016-08-11)

(上接第3页)

- [1] H R, et al. Prevalence of Chronic Kidney Disease in an Adult Population[J]. *Archives of Medical Research*, 2014, 45(6):507-513.
- [2] 朱梦, 王梅红, 刘健. 乌市体检人群高尿酸血症患病率及其肾损害相关分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(2):125-128.
- [3] Chiu H Y, Huang H L, Li C H, et al. Increased risk of glomerulonephritis and chronic kidney disease in relation to the severity of psoriasis, concomitant medication, and comorbidity: a nationwide population-based cohort study[J]. *British Journal of Dermatology*, 2015, 173(1):146-154.
- [4] 杨沿浪, 钟正灵, 汪裕伟, 等. 芜湖市健康体检人群慢性肾脏疾病患病率及相关危险因素调查[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 19(4):430-436.
- [5] 杨沿浪, 邹和群, 张道友, 等. 两种 GFR 计算公式评价芜湖市健康体检人群 CKD 患病率对比研究[C]. *中国中西医结合学会肾脏病专业委员会 2013 年学术年会暨山西省肾脏病学术会议血液净化质量培训会议*, 2013.

- [6] 叶瑞印, 陈建胜, 陈谦, 等. 浙江瑞安市近 3 年健康体检人群慢性肾脏疾病流行情况分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2012, 13(8):733-735.
- [7] 杨沿浪, 邹和群, 张道友, 等. 芜湖市中老年健康体检人群代谢综合征和慢性肾脏疾病的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(10):941-945.
- [8] Winter C F D, Echteid M A, Evenhuis H M. Chronic kidney disease in older people with intellectual disability: Results of the HA-ID study[J]. *Research in Developmental Disabilities*, 2014, 35(3):726-732.
- [9] 曹霞, 谢秀梅, 徐果, 等. 长沙市体检人群正常高值血压与慢性肾脏疾病的横断面研究[J]. *中南大学学报:医学版*, 2014, 39(6):582-590.
- [10] 廖艳, 薛晟, 贺聪, 等. 钟祥城区人群代谢综合征与慢性肾脏疾病相关性的流行情况调查[J]. *临床肾脏病杂志*, 2015, 15(12):729-733.

(收稿日期:2016-08-12)