文章编号:1000-5404(2006)06-0569-04

论著

睡眠剥夺对大鼠空间学习记忆的影响及其LTP机制的研究

刘国龙[1],赵明亮[1],万子兵[1],宋文强[2],隋建峰[1],熊 鹰[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室,[2]计算机学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究长时间睡眠剥夺对大鼠空间学习记忆及NMDA受体介导的LTP的影响。**方法** 采用侧脑室注射PCPA(15 μg/kg,1次/d,连续5 d)和阿托品(15 μg/kg,从第8天开始注射,1次/d,连用2 d)制作大鼠睡眠剥夺模型,于注药的第2天起同步连续采集8 d脑电(EEG)、肌电(EMG)、眼电(EOG)对睡眠剥夺模型进行鉴定,Morris水迷宫检测大鼠空间学习记忆,以脑片盲法膜片钳全细胞技术记录兴奋性突触后电流(EPSCs)观察海马CA1区锥体细胞由NMDA受体介导的LTP变化。**结果** 睡眠剥夺组与对照组相比觉醒(Waking)明显延长,慢波睡眠(SWS),快波睡眠(PS),总睡眠时间(TST)明显减少($P<0.01$)。在水迷宫实验中睡眠剥夺组大鼠的逃避潜伏期延长,穿过原平台位置次数和在原平台象限探索时间百分率下降($P<0.05$),睡眠剥夺组大鼠海马脑片CA1区锥体细胞由NMDA受体介导的LTP诱出率,非常显著低于对照组($P<0.01$)。**结论** 侧脑室注射PCPA与阿托品导致的睡眠剥夺显著的影响了大鼠空间学习记忆能力其机制与NMDA受体介导的LTP有关。

关键词: 睡眠剥夺;学习记忆;LTP
中图法分类号: R338.63;R338.64;R338.8 **文献标识码:** A

Effect of sleep deprivation on space learning and memory and its mechanism of long-term potentiation in rats

LIU Guo-long[1], ZHAO Ming-liang[1], WAN Zi-bing[1], SONG Wen-qiang[2], SUI Jian-feng[1], XIONG Ying[1] ([1]Department of Physiology, [2]Department of Computer Science, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of long-term sleep deprivation on learning and memory and NMDA receptor-mediated long time potentiation (LTP). **Methods** Rat model of sleep deprivation was established by intracerebroventricular injection of PCPA at dose of 10 μg/kg once a day for five days, atropine at dose of 20 μg/kg once a day from day 8 to 9. The electroencephalogram (EEG), electromyogram (EMG), electrooculogram (EOG) were recorded for 8 d from the second day after the first injection. The space learning and memory was tested with Morris water maze, the excitatory postsynaptic currents (EPSCs) amplitude of the NMDA receptor-mediated LTP index was observed in CA1 region pyramid cells by the blind patch clamp whole-cell recording technique. **Results** Waking prolonged and slow wave sleep, paradoxical sleep, total sleep time markedly decreased in the sleep deprivation group ($P<0.01$). In the Morris water maze test, escape latency to find a hidden platform increased and the times of crossing target platform and the percent of swimming in northeast obviously decreased in sleep deprivation group ($P<0.05$). The NMDA receptor-mediated LTP of sleep deprivation group was inhibited ($P<0.01$). **Conclusion** Long-term sleep deprivation may cause an evident learning and memory disturbance and markedly decrease the NMDA receptor-mediated LTP in rat hippocampal CA1 pyramidal cells.

Key words: sleep deprivation; learning and memory; long time potentiation

睡眠是生理需要,睡眠障碍会影响人类的工作和生活,睡眠障碍中最常见的是失眠症(insomnia)。睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)可导致大鼠记忆力下降,SD能明显破坏参照记忆,长期SD对空间记忆及

作者简介:刘国龙(1978-),男,湖北省建始县人,硕士研究生,主要从事学习记忆的电生理机制方面的研究。电话:(023)68752254-276,E-mail: long9807@163.com
通讯作者:熊 鹰,电话:(023)68752227,E-mail: xiongying2001@163.com
收稿日期:2005-08-29;修回日期:2005-11-12

参照性空间记忆都有明显的影响，但其确切的机制还未阐明。腹腔注射色胺酸羟化酶抑制剂－对氯苯丙胺酸（PCPA）可致大鼠完全失眠。但长期给 PCPA，虽脑内 5－HT 持续低水平，但发生了睡眠反弹[1]。另有报道指出阿托品可抑制快速眼球运动（rapid eye movements，REM）睡眠[2]，这与 Steriade 和 McCarly 提出的“脑桥胆碱感受机制是 REM 睡眠的最后效应通路”的观点相吻合[3]。本实验采用侧脑室注射 PCPA 与阿托品制作大鼠长时间睡眠剥夺的模型，用 Morris 水迷宫检测大鼠的空间学习记忆，用盲法脑片膜片钳全细胞记录技术检测海马 CA1 区锥体细胞长时程突触增强（long-term potentiation，LTP），以探讨长时间睡眠剥夺对学习记忆的影响及 LTP 机制，为睡眠障碍与学习记忆关系的研究提供实验资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年 SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠（第三军医大学实验动物中心提供）32 只，体质量（180±30）g，雌雄不限。

1.2 主要试剂和仪器

PCPA、Atropine、ATP、GTP、Hepes、APV、K-gluconate 均为美国 Sigma 公司产品，余为国产分析纯试剂。SM-21 型脑立体定位仪（日本）；RM-6240 多道生理记录仪暨生物信号采集与处理系统（成都仪器厂）；Axopatch200B，Digidatal1322A（美国 Axon 公司）；玻璃微电极，P-97 电极拉制仪（美国 Sutter 公司）；Morris 水迷宫（中国医学科学院药物研究所制）。

1.3 实验方法

1.3.1 模型的鉴定　11 只大鼠随机分到睡眠剥夺组（$n=6$）和对照组（$n=5$），每只大鼠单独饲养于玻璃圆筒内，活动不受限制，自由食水，12 h 明/12 h 暗。戊巴比妥钠麻醉（40 mg/kg，ip）后行侧脑室（P 1.5 mm，R 1.5 mm，H 3.5 mm）埋置导管，以备注药用。在 A1、R1 交叉点 与 R9、L1 交叉点处分别安钨丝电极，用于记录皮层脑电（EEG）活动，在颈肌和眼外眦分别埋钨丝电极用于记录肌电（EMG）和眼电（EOG）[4]，接皮肤参考电极，插管和电极固定于颅骨上，恢复 1 周后连续记录 48 h EEG、EMG、EOG，选择结果稳定者进行实验。用针尖外径为 0.3 mm 的微量注射器通过引导管向侧脑室注射。睡眠剥夺组，每天上午 8:00 按照 15 μg/kg 的剂量注射 PCPA（按 1 μg/10 μl 溶于人工脑脊液，pH 值 7.4，新鲜配制），1 次/d，连用5 d，从第 8 天起按 15 μg/kg 的剂量注射阿托品（按 1 μg/10 μl 溶于人工脑脊液），1 次/d，连用 2 d。对照组则注射 30 μl 人工脑脊液，注射时间和方法同实验组。记录电极通过导线连接到 RM6240 多导生理记录仪上，以开始注射药物的第 2 天起连续同步记录 8 d 的 EEG、EMG 和 EOG。以 30 s 为分段，按照时频分析理论，以 Visual Basic 语言自编程序分析 EEG，同时综合分析 EMG 和 EOG 对睡眠-觉醒周期进行分类：① 觉醒期（Waking）：以额-顶叶引出低幅快波 EEG 和明显的 EMG 活动为特征。② 慢波睡眠（SWS）：当进入睡眠的第Ⅰ期时，肌肉开始松弛，EEG 逐渐变为混合频率的电压，α 波消失，当进入睡眠的第Ⅱ期时顶叶发放睡眠梭形波和高波幅尖慢复合波，睡眠的第Ⅲ和第Ⅳ期时，EEG 上高电压波（＞75 μV）增加，δ 波明显，肌肉的紧张度进一步降低。③ 异相睡眠（PS）：以低幅快波的 EEG 和明显的 EOG 为特征，除偶有肌肉抽动外，无明显 EMG 活动。总睡眠时间（TST）为 SWS 和 PS 之和，计算每 24 h 内 Waking、SWS、PS、TST 各占的百分比。

1.3.2 学习记忆的检测　12 只大鼠随机分到睡眠剥夺组（$n=6$）和对照组（$n=6$），每只大鼠按照前述方法侧脑室埋管但不埋电极，两组动物也分别按前述方法注射药物或人工脑脊液，末次给药的第 2 天采用 Morris 水迷宫实验[5]检测大鼠的空间学习记忆能力。将水池等分为 SW、NW、SE 及 NE 象限，在 NE 象限正中离池壁 20 cm 处放透明平台，平台顶低于水面 2 cm。训练期间迷宫外参照物保持不变。①定位航行实验（place navigation test）：实验历时 4.5 d，每天上、下午 2 个时间段，每个时间段训练 4 次。记录大鼠找到平台的时间，即逃逸潜伏期（escape latency），120 s 找不到平台，潜伏期记为 120 s。②空间探索实验（spatial probe test）：训练完毕当天下午进行空间探索实验，撤除平台，记录大鼠 120 s 内穿过原平台位置的次数和在原平台象限即 NE 象限探索时间占总时间的百分比。

1.3.3 脑片的制备及 LTP 的检测　9 只大鼠随机分别睡眠剥夺组（$n=5$）和对照组（$n=4$），每只大鼠侧脑室埋管，不安装电极，实验组同上注射 PCPA 与阿托品造睡眠障碍模型，对照组同前注射 30 μl 人工脑脊液。每只大鼠均在末次给药后的第 2 天经戊巴比妥钠麻醉（50 mg/kg，*ip*）后用 0～4 ℃氧饱和（95% O_2 +5% CO_2）的蔗糖脑脊液（sucrose-CSF）50 ml 行脑灌注。Sucrose-CSF 和 ACSF 的成分与文献[5]报道相同。然后在振动切片机（MA752）上水平连续切成 350～500 μm 厚的脑片，将其移入氧饱和的 ACSF 中，室温下（20～25 ℃）孵育 1 h 待用。在 Leica 体视显微镜直视下，将双极钨丝电极置于 CA3 区的 Schaffer 侧支上，以 Master-8 刺激器给刺激脉冲。应用电极拉制器拉制玻璃微电极，拉制好的电极尖端直径 1～2 μm，阻抗 6～10 MΩ，电极内液参照文献[6]配制。记录微电极用微推进器推到海马 CA1 区锥体层，利用特定的测试方波脉冲以“盲法”寻找细胞，记录电极与刺激电极之间的距离≤500 μm，参照文献[7]判断锥体细胞。应用 Axon 公司的 pClamp 9.0 软件中的 Clampex 采集数据。测试刺激为低频方波刺激，波宽 100 μs，频率为 0.1 Hz，强度为能引出 EPSC 强度的 2 倍。条件刺激也采用低频方波刺激，强度和波宽同测试刺激，频率为 5 Hz，5 串×10 个脉冲/串，串间隔为 10 s，同时将细胞钳制在－50 mV，刺激时间 60 s，条件刺激结束后，以测试刺激诱导并记录兴奋性突触后电流（EPSCs）[8]。以 30 min 以上的超过 30% 的 EPSCs 幅度为 LTP 的引出[9]。记录中串联电阻和输入阻抗超过

20% 的数据舍弃。

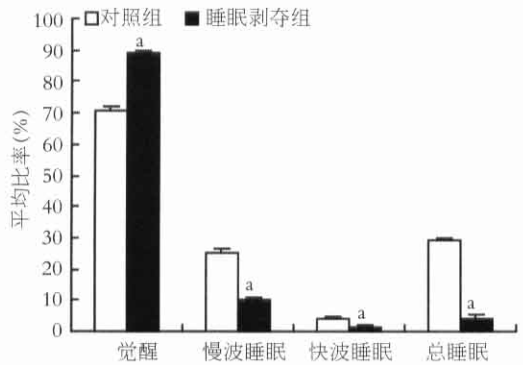
1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 Clampfit 9.0，Excel 2003，SPSS 10.0，行方差分析。

2　结果

2.1　模型的鉴定结果

给药后的第 2 天开始连续同步采集 8 d 数据，以 24 h 为段，比较大鼠的 Waking、SWS、PS、TST 各占的百分比，睡眠剥夺组与对照组相比 Waking 明显延长，SWS、PS、TST 明显减少（$P<0.01$），说明侧脑室注射 PCPA 与阿托品制备的大鼠长时间睡眠剥夺模型已成功建立。见图 1。

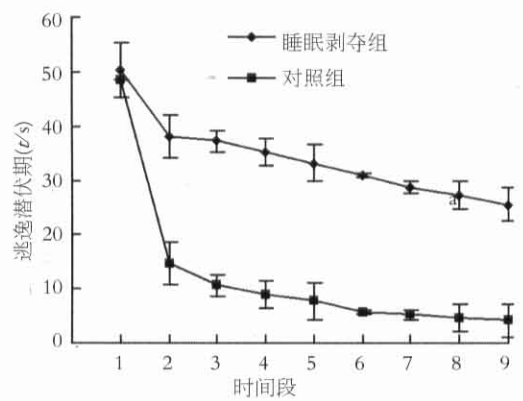


a：$P<0.01$，与对照组比较

图 1　侧脑室注射 PCPA 与阿托品对大鼠睡眠和觉醒的影响

2.2　睡眠剥夺对学习记忆的影响

定位航行实验中，睡眠剥夺组平均逃逸潜伏期每个时间段均长于对照组（$P<0.05$，图 2）。空间探索实验中，睡眠剥夺组原平台象限探索时间百分率（42.31 ± 2.98）% 明显小于对照组（54.63 ± 3.42）%（$P<0.05$）；睡眠剥夺组穿过原平台位置次数（6.96 ± 1.55）明显少于对照组（12 ± 1.77）（$P<0.05$）。

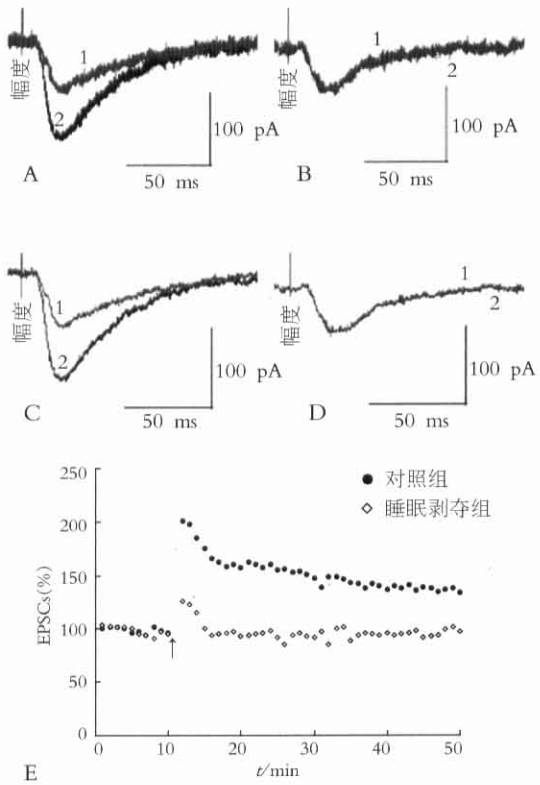


a：$P<0.05$，与对照组比较

图 2　9 个训练期逃逸潜伏期的变化

2.3　对海马 CA1 区锥体细胞 LTP 的影响

对照组大鼠的脑片海马 CA1 区锥体细胞可见条件刺激后 EPSC 的幅度明显大于刺激前的 EPSCs 幅度（图 3A），LTP 的稳定引出（图 3E），诱出率达到 88.89%（8/9）；在对照组大鼠的 5 例脑片上滴加 APV（50 μmol/L）后在海马 CA1 区锥体细胞不能引诱出 LTP（图 3B），另 6 例脑片上滴加 APV 3 min 后用正常 ACSF 冲洗后又能够引出 LTP（图 3C），诱出率为 83.33%。在睡眠剥夺组的 21 个脑片上均未能发现条件刺激前后 EPSCs 的幅度的变化（图 3D、E）。睡眠剥夺组与对照组 LTP 的诱出率具有非常显著的差异（$P<0.01$），然而睡眠剥夺组与对照组滴加 APV 的 LTP 诱出率并无显著性差异（$P>0.05$）。



1：刺激前；2：刺激后；A：对照组海马 CA1 区锥体细胞在条件刺激前后的 EPSCs；B：对照组的 CA1 区锥体细胞加入 50 μmol/L 的 APV 后在条件刺激前后的 EPSCs；C：冲洗掉 APV 后，对照组 CA1 区锥体细胞在条件刺激前后的 EPSCs；D：睡眠剥夺组海马 CA1 区锥体细胞在条件刺激前后的 EPSCs；E：与条件刺激（箭头所示）前的基线水平相比，条件刺激后 EPSCs 幅度的变化

图 3　睡眠剥夺对大鼠海马 CA1 区锥体细胞 EPSCs 幅度的影响

3　讨论

研究表明，长期 SD 对空间记忆有明显的影响。另据文献[10]报道不足 24 h 的 SD 大鼠学习能力完全下降，而大于 24 h 的短期（一般小于 72 h）SD 则可增加大鼠的探究行为，逃避反射能力增强。在作 SD 研

究时，小站台水环境法成为应用最多的方法，但是此方法只能剥夺 REM，且不能排除应激因素；另有毛刷法，电击法等方法应用在 SD 的研究中，但这些方法都不能排除外界因素的干扰。在有关 SD 方法的研究中都报道了脑内神经递质的改变[10]。本实验在此基础上通过侧脑室注射 PCPA 和阿托品影响脑内 5-HT 及 Ach 的水平而达到长时间剥夺睡眠同时又显著的降低了应激干扰因素的目的，但此种 SD 方法不易在行为学上对睡眠和觉醒定量，我们通过连续同步采集，分析 EOG，EMG，EEG 以判断睡眠剥夺中有关睡眠和觉醒的定量问题提出了新方法。

我们采用 Morris 水迷宫检测睡眠障碍对空间学习记忆的影响。本实验观察到所有大鼠在定位航行实验中逃逸潜伏期均随训练次数增加而下降，但睡眠剥夺组大鼠的平均逃逸潜伏期显著长于对照组，提示其学习和记忆的获得与巩固过程下降；在空间探索实验中，睡眠剥夺组大鼠在平台象限探索时间百分率和穿过原平台位置次数均明显少于对照组，提示睡眠剥夺组大鼠已存储记忆的读出或提取能力显著下降。

睡眠障碍对学习记忆是有影响的，SD 可导致大鼠的学习记忆能力下降，但其具体的机制未能完全阐明。我们应用膜片钳技术以 EPSCs 的幅度作为 LTP 的检测指标对学习记忆下降的机制进行研究。学习记忆是脑的高级功能之一，其基础是中枢神经系统的可塑性，海马 LTP 作为一种经典的电生理指标被应用到神经系统可塑性的研究中，LTP 一直以来都被认为是学习记忆的功能基础和细胞分子机制。文献[8]报道膜片钳记录 EPSC 对海马 CA1 区锥体细胞 LTP 进行研究发现低频刺激配合不同的突触后去极化水平所诱导的 LTP 存在两种类型：一种是依赖 NMDA 受体的 LTP，另一种是非依赖 NMDA 受体的 LTP。现已阐明 NMDA 受体通道开放所引起的 Ca^{2+} 内流既是递质门控性的，又是电压依赖性的，NMDA 受体通道的激活是 LTP 形成的前提条件[11]。Morris[12] 也曾报道慢性脑室注入 APV 导致空间学习的损害，能明显地抑制在体海马的 LTP 的诱导，但对正常的突触传递没有影响，提示 NMDA 受体参与空间学习，且空间学习与海马的 LTP 有关。本实验在作 Morris 水迷宫实验发现长时间睡眠剥夺可导致空间学习记忆下降，我们采用低频刺激配合突触后去极化（钳制在 -50 mV），对依赖 NMDA 受体的 LTP 进行研究，发现对照组海马 CA1 区锥体细胞 LTP 易引出，且可为 NMDA 受体阻断剂 APV 所阻断，而在睡眠剥夺组则难以诱导出 LTP，说明侧脑室注射 PCPA 与阿托品致大鼠长时间睡眠剥夺可明显的抑制海马 CA1 区锥体细胞由 NMDA 受体介导的 LTP 诱出。

本实验证实了长时间睡眠剥夺能够显著的影响大鼠的空间学习记忆能力，其机制是抑制了海马 CA1 区锥体细胞由 NMDA 受体介导的 LTP。

（致谢：本文承蒙李希成教授指导，特此致谢！）

参考文献：

[1] JOUVET M. Sleep and Serotonin: an unfinished story[J]. Neuropsychopharmacology, 1999, 21(2 Suppl): 24S-27S.

[2] DOLLGLAS C L, BOWMAN G N, BAGHDOYAN H A. C57BL/6J and Bb. V-LEP^{OB} mice differ in the Cholinergic modulation of sleep and brathing[J]. J Applied Physiol, 2005, 98(3): 918-929.

[3] STERIADE M, DATTA S, PARE D, *et al*. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems[J]. J Neurosci, 1990, 10(8): 2541-2559.

[4] ROBERT C, GUILPIN C, LIMOGE A. Automated sleep staging systems in rats[J]. J Neurosci Methods, 1999, 88(2): 111-122.

[5] 康健捷，黎海蒂，徐海伟，等. 小剂量梭曼对大鼠学习记忆和海马脑片 LTP 的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(3)：230-233.

[6] MOYER J R, Jr., BROWN T H. Methods for whole-cell recording from visually preselected neurons of perirhinal cortex in brain slices from young and aging rats[J]. J Neurosci Methods, 1998, 86(1): 35-54.

[7] SCHWARTZKROIN P A. Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal *in vitro* slice preparation[J]. Brain Res, 1975, 85(3): 423-436.

[8] KRASTENIAKOV N V, MARTINA M, BERGERON R. Subthreshold contribution of N-methyl-d-aspartate receptors to long-term potentiation induced by low-frequency pairing in rat hippocampal CA1 pyramidal cells[J]. Neuroscience, 2004, 126(1): 83-94.

[9] REID C A, DIXON D B, TAKAHASHI M, *et al*. Optical quantal analysis indicates that long-term potentiation at single hippocampal mossy fiber synapses is expressed through increased release probability, recruitment of new release sites, and activation of silent synapses[J]. J Neurosci, 2004, 24(14): 3618-3626.

[10] SMITH R L, KENNEDY C H. Increases in avoidance responding produced by REM sleep deprivation or serotonin depletion are reversed by administration of 5-hydroxytryptophan[J]. Behav Brain Res, 2003, 140(1-2): 81-86.

[11] 熊 鹰，李希成，蔡文琴，等. 大鼠脑发育不同时期学习记忆的变化及与 NMDA 受体通道动力学特性的关系[J]. 中国应用生理学杂志，2000，16(1)：18-21.

[12] MORRIS R G. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation *in vivo* by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5[J]. J Neurosci, 1989, 9(9): 3040-3057.

（编辑 薛国文）