论著

文章编号:1000-5404(2013)19-2014-05

快速眼动期睡眠剥夺对大鼠海马齿状回神经元增殖与凋亡的影响

梁小敏,陈 甲,许志强 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科)

[摘要] **目的** 探讨快速眼动期(rapid eye movement,REM)睡眠剥夺(sleep deprivation,SD)对大鼠海马齿状回神经元增殖与凋亡的影响。**方法** 45只Sprague-Dawley大鼠按随机数字表法分为3组:①普通鼠笼对照组(CC,$n=15$);②睡眠剥夺组(SD,$n=15$);③睡眠恢复组(RS,$n=15$)。采用改良多平台睡眠剥夺法连续72 h剥夺大鼠REM睡眠后,利用BrdU标记增殖细胞,运用免疫组织化学方法观察大鼠海马齿状回神经元增殖情况,并利用免疫荧光染色检测大鼠海马齿状回新生神经元标记物微管相关蛋白(doublecortin,DCX)和星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)的表达情况。采用TUNEL法观察大鼠海马神经元凋亡情况。**结果** 免疫组化结果显示SD组及RS组每张切片BrdU阳性细胞平均数均明显少于CC组($P<0.01$),但是RS组与SD组相比无显著性差异($P>0.05$)。免疫荧光染色结果显示,DCX阳性细胞在BrdU阳性细胞中所占比例最大,各组间BrdU/DCX、BrdU/GFAP双阳性细胞的百分比相差不显著($P>0.05$)。CC组、SD组及RS组各组海马区均未见TUNEL阳性细胞。**结论** REM睡眠剥夺抑制海马齿状回神经元增殖,短期睡眠恢复后无显著改善。REM睡眠剥夺对海马齿状回神经元的分化和凋亡无影响。

[关键词] 快速眼动期睡眠剥夺;海马齿状回;神经元增殖;凋亡
[中图法分类号] R329.28; R338.26; R338.63 [文献标志码] A

Effects of rapid eye movement sleep deprivation on proliferation and apoptosis of hippocampal dentate gyrus neurons in rats

Liang Xiaomin, Chen Jia, Xu Zhiqiang (Department of Neurology, Daping Hospital, Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on the proliferation and apoptosis of hippocampal dentate gyrus neurons in rats. **Methods** Forty-five Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: cage control group (CC), sleep deprivation group (SD) and sleep revival group (RS). The modified multiple platform method was used to establish sleep deprivation model for 72-hour REM sleep deprivation in rats. Immunohistochemical assay was used to observe the neuron proliferation and differentiation in the dentate gyrus of rats, while the apoptosis of hippocampal neuron was detected by TUNEL assay. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of newborn neurons' biomarker, microtubule-associated protein, doublecortin (DCX), and astrocytes' biomarker, glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampal dentate gyrus. **Results** The average numbers of BrdU positive cells were significantly lower in SD and RS groups than in CC group ($P<0.01$), but there was no significant difference between the former 2 groups. Immunofluorescence staining showed that the majority of BrdU positive cells were DCX positive cells. There was no significant difference in the phenotype of BrdU positive cells (BrdU/DCX and BrdU/GFAP) between each group. No TUNEL positive cells were seen in the hippocampus of all groups. **Conclusion** REM sleep deprivation inhibits the neuron proliferation in the dentate gyrus of rats, and there is no significant improvement after short-term sleep revival. However, the sleep deprivation has no effect on the differentiation and apoptosis in hippocampal neurons.

[**Key words**] rapid eye movement sleep deprivation; hippocampal dentate gyrus; neuron proliferation; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271411) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10098). Corresponding author: Xu Zhiqiang, E-mail: xzq881@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271411);重庆市自然科学基金面上项目(CSTC2012jjA10098)
[通信作者] 许志强,E-mail: xzq881@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130910.0906.001.html(2013-09-06)

睡眠剥夺(sleep deprivation,SD)已成为现代社会的一个常见现象,研究表明,长时间的睡眠剥夺可以造成心血管、免疫、内分泌以及认知功能等方面的显著损害,甚至增加死亡的风险[1]。有研究发现,海马依赖的记忆巩固对快速眼动期(rapid eye movement,REM)睡眠剥夺特别敏感,Maquet等[2]研究证实,REM睡眠剥夺可造成神经行为机能损伤,导致机体情绪与行为变化、记忆力与认知功能减退。海马齿状回是与空间学习和记忆相关的重要脑区。研究证实哺乳动物海马齿状回的颗粒下区存在着干细胞,它具有增殖和分化成为神经细胞的潜能[3]。近年来,睡眠剥夺对海马神经元增殖和凋亡的影响日益受到重视。国外研究普遍认为REM睡眠剥夺抑制海马神经细胞增殖[4],而邹俊华等[5]实验结果显示REM睡眠剥夺可引起海马齿状回神经细胞增殖数目增多。程江涛等[6]实验结果表明睡眠剥夺可引起大鼠海马神经元凋亡,而Hipolide等[7]研究结果表明REM睡眠剥夺不影响大鼠海马神经元凋亡。因此,本实验采用改良多平台睡眠剥夺法剥夺青年大鼠REM睡眠,采用免疫组织化学方法以及TUNEL法观察连续72 h REM睡眠剥夺以及睡眠恢复12 h后大鼠海马齿状回新生神经元以及海马神经元凋亡数目的变化,探讨REM睡眠剥夺对大鼠海马齿状回神经元增殖与凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性Sprague-Dawley大鼠45只,体质量(100±10)g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,按随机数字表法分为普通鼠笼对照组、睡眠剥夺组和睡眠恢复组,每组15只。每组再分为BrdU注射组(n=10)和未注射药物组(n=5)。普通鼠笼对照组大鼠正常饲养于鼠笼中,自然昼夜光照。睡眠剥夺组大鼠连续72 h REM睡眠剥夺,予以日光灯持续照射72 h,排除昼夜明暗交替。睡眠恢复组大鼠REM睡眠剥夺72 h后自由恢复睡眠12 h。

1.2 主要试剂

BrdU、鼠抗-BrdU抗体购于Sigma公司,兔抗-微管相关蛋白(doublecortin,DCX)抗体、鼠抗-胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)抗体购于Abcam公司,TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 动物模型制备

采用改良多平台睡眠剥夺法[8]连续72 h剥夺大鼠REM睡眠。自制REM睡眠剥夺箱:鼠箱110 cm×60 cm×40 cm,其中设置15个直径为6.5 cm,高8.0 cm的平台,平台间隔15 cm。箱中装水,水面低于平台面约1.0 cm,平台上方笼盖处放水和食物,大鼠可自行摄食饮水,并且可以在各个平台间自由活动。

1.4 BrdU注射剂量和方法

BrdU按浓度20 mg/mL溶于含0.007 mol/L NaOH的无菌生理盐水中。BrdU注射组大鼠从实验第1天开始腹腔注射BrdU(100 mg/kg,2次/d),持续7 d,第8天取材行免疫组织化学染色观察大鼠海马齿状回神经元增殖、分化情况。

1.5 组织制备

大鼠常规麻醉、固定、取材,脱水完全的脑组织经OCT包埋急冻后用冰冻切片机(CM1850、Leica,Germany)行冠状面切片,厚40 μm,按顺序分4套放置。切片依次用含1% H_2O_2的50%乙醇PBS溶液,70%乙醇PBS溶液,50%乙醇PBS溶液和PBS溶液洗涤各30 min,置于含0.2%叠氮钠中于4 ℃保存。

1.6 免疫组织化学染色

1.6.1 免疫组化ABC法 取脑组织切片于0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次后置于2 mol/L HCl/PBS溶液中37 ℃孵育30 min以解开DNA双链,暴露BrdU位点,然后用0.1 mol/L硼酸缓冲液漂洗3 min×3次以恢复碱性环境,PBS缓冲液清洗后,置于封闭缓冲液(0.01 mol/L PBS/0.5% Triton X-100/1% BSA/1.5%马血清)中37 ℃孵育30 min以封闭非特异性位点,加入封闭缓冲液配制的一抗鼠抗BrdU单克隆抗体(1∶1 000),4 ℃冰箱过夜,二抗为PBS配制生物素标记抗鼠IgG(1∶200),室温孵育2 h,PBS配制ABC溶液(1∶100,加入前30 min配制),室温孵育1 h,加入DAB-葡萄糖氧化酶显色溶液进行染色。贴片烘干后梯度酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照以PBS代替一抗,其余步骤完全相同。

1.6.2 免疫荧光染色 暴露BrdU位点以及封闭非特异性位点步骤与1.6.1相同,加入封闭缓冲液配制的一抗鼠抗BrdU单抗(1∶1 000)/兔抗DCX(1∶1 000),4 ℃冰箱过夜,二抗为PBS配制[Cy3-羊抗鼠IgG1(1∶200)/488-驴抗兔IgG(1∶200)],室温避光孵育2 h,避光条件下,PBS清洗后加入封闭缓冲液,室温孵育2 h,再加入封闭缓冲液配制的一抗鼠抗GFAP(1∶1 000),4 ℃冰箱过夜;避光条件下清洗后,PBS配制二抗Cy5标记羊抗鼠IgG(1∶200),室温避光孵育2 h,避光条件下,贴片、阴干、甘油封片,4 ℃避光保存。阴性对照以PBS代替一抗,其余步骤完全相同。

1.6.3 细胞计数 每个鼠脑切片间隔3张取1张计数,每个鼠脑计数8张切片,在显微镜高倍镜下由其他实验者计数海马齿状回BrdU阳性细胞数,得到每张切片BrdU阳性细胞数,每只大鼠BrdU阳性细胞数为8张切片总和。使用共聚焦显微镜对切片进行观察,计算BrdU/DCX阳性、BrdU/GFAP阳性双标记细胞占BrdU阳性细胞的比例。

1.7 TUNEL法观察大鼠海马神经元凋亡情况

1.7.1 TUNEL法 取脑组织切片于0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次后置于0.1% Triton X-100/PBS室温孵育20 min,然后用胃蛋白酶工作液37 ℃孵育30 min,4%多聚甲醛固定5 min,清洗后加入TUNEL反应混合液(50 μL TdT+450 μL荧光素标记的dUTP液混匀),暗湿盒中37 ℃反应1 h,清洗后DAPI液(1∶5 000)室温孵育5 min,抗淬灭封片剂封片;在荧光显微镜下计数凋亡细胞(激发光波长为450~500 nm,检测波长为515~565 nm)。阴性对照仅加荧光素标记的dUTP液,阳性对照先加入DNase Ⅰ,15~25 ℃反应10 min,其余步骤完全相同。

1.7.2 TUNEL阳性细胞计数 TUNEL阳性细胞计数由不知道实验分组的实验者完成,每次随机选取5个视野进行细胞计数,细胞凋亡的百分比=细胞凋亡数/细胞总数。

1.8 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件,所有计量单位以$\bar{x}\pm s$表示,行独立样本t检验。

2 结果

2.1 REM睡眠剥夺对大鼠生理行为学的影响

REM睡眠剥夺72 h后大鼠生理行为发生变化,随REM睡眠剥夺时间的延长,这种变化更加明显,主要表现为大鼠倦怠,

皮毛暗淡、黄涩、松散蓬乱，兴奋性增加易激惹，对环境刺激的警觉性、反应性及进攻性增强。睡眠恢复组大鼠恢复睡眠12 h，所有大鼠睡眠增加，上述表现大多消失。

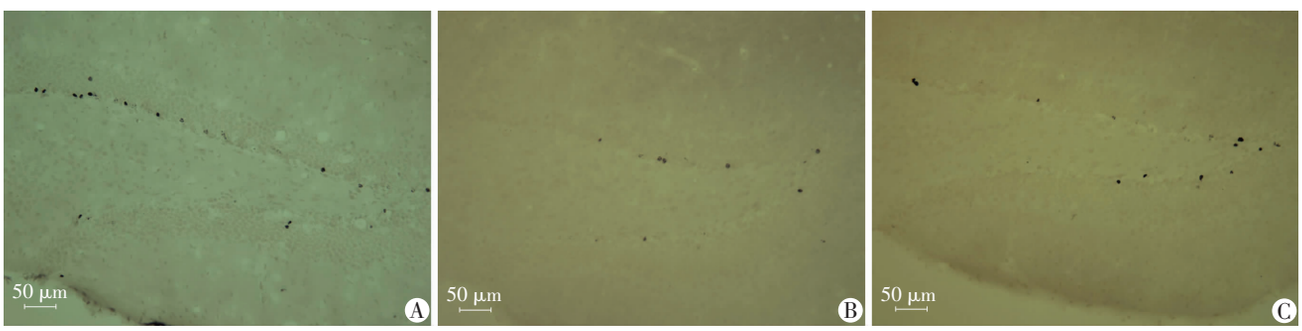
2.2 REM睡眠剥夺对大鼠海马齿状回神经元增殖、分化的影响

2.2.1 REM睡眠剥夺对大鼠海马齿状回细胞增殖的影响

免疫组织化学结果显示，镜下海马齿状回区可见典型的BrdU阳性细胞，胞核内着色，呈蓝黑色颗粒，无胞质及胞膜着色，细胞形状不规则，沿海马齿状回分散排列（图1）。睡眠剥夺组每张切片BrdU阳性细胞平均数为（21.24±1.37）个，睡眠恢复组为（22.01±0.61）个，与普通鼠笼对照组（40.54±0.55）相比，睡眠剥夺组和睡眠恢复组每张切片BrdU阳性细胞平均数均明显减少（$P<0.01$）。与睡眠剥夺组相比，睡眠恢复组每张切片BrdU阳性细胞平均数虽稍有增多，但差异不显著（$P>0.05$）。

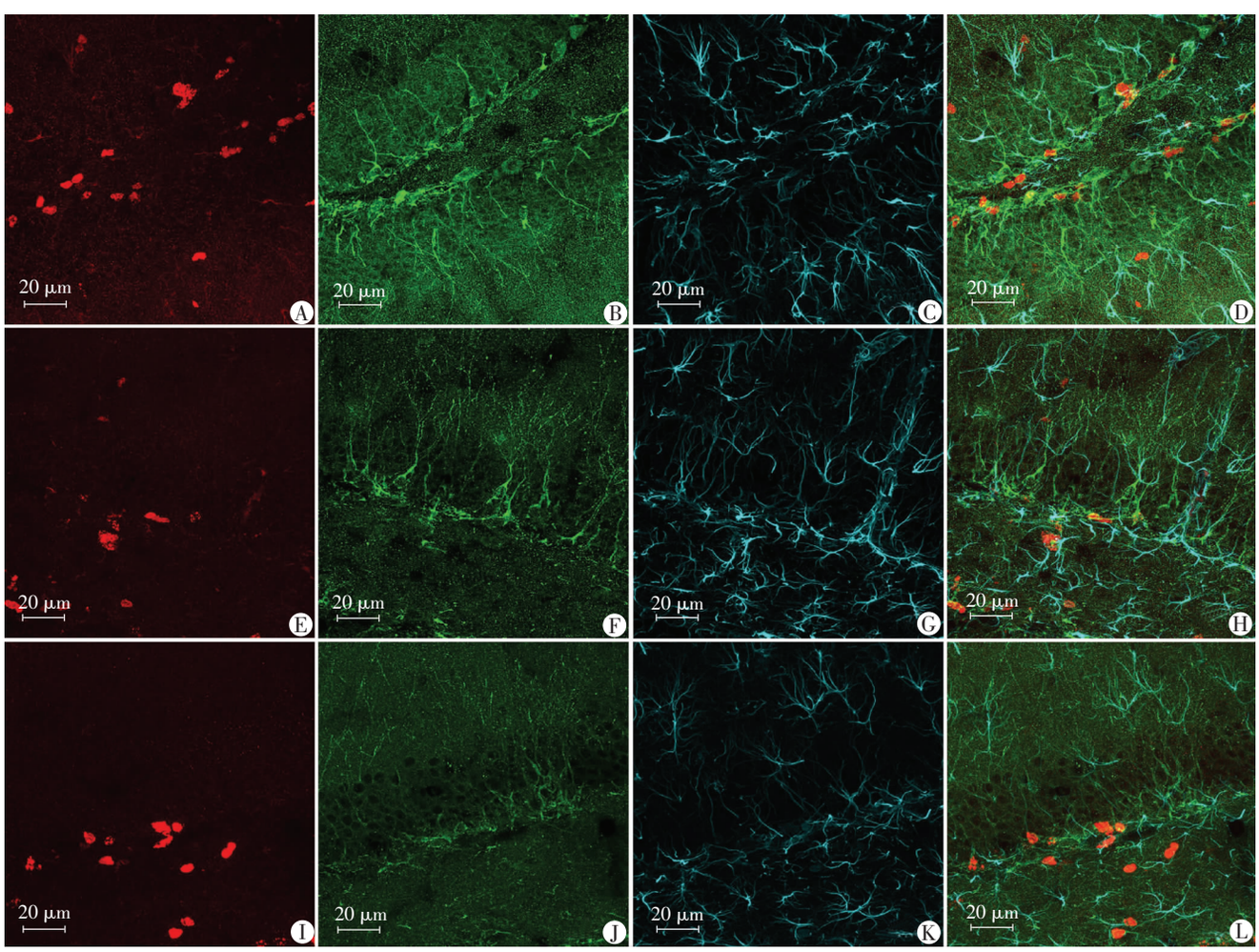
2.2.2 REM睡眠剥夺对大鼠海马齿状回细胞分化的影响

免疫荧光染色结果表明，DCX阳性细胞在BrdU阳性细胞中所占比例最大。普通鼠笼对照组、睡眠剥夺组以及睡眠恢复组各组间BrdU/DCX、BrdU/GFAP双阳性细胞的百分比相差不显著（$P>0.05$）。我们观察到有部分BrdU阳性细胞既不表达DCX也不表达GFAP（图2，表1）。



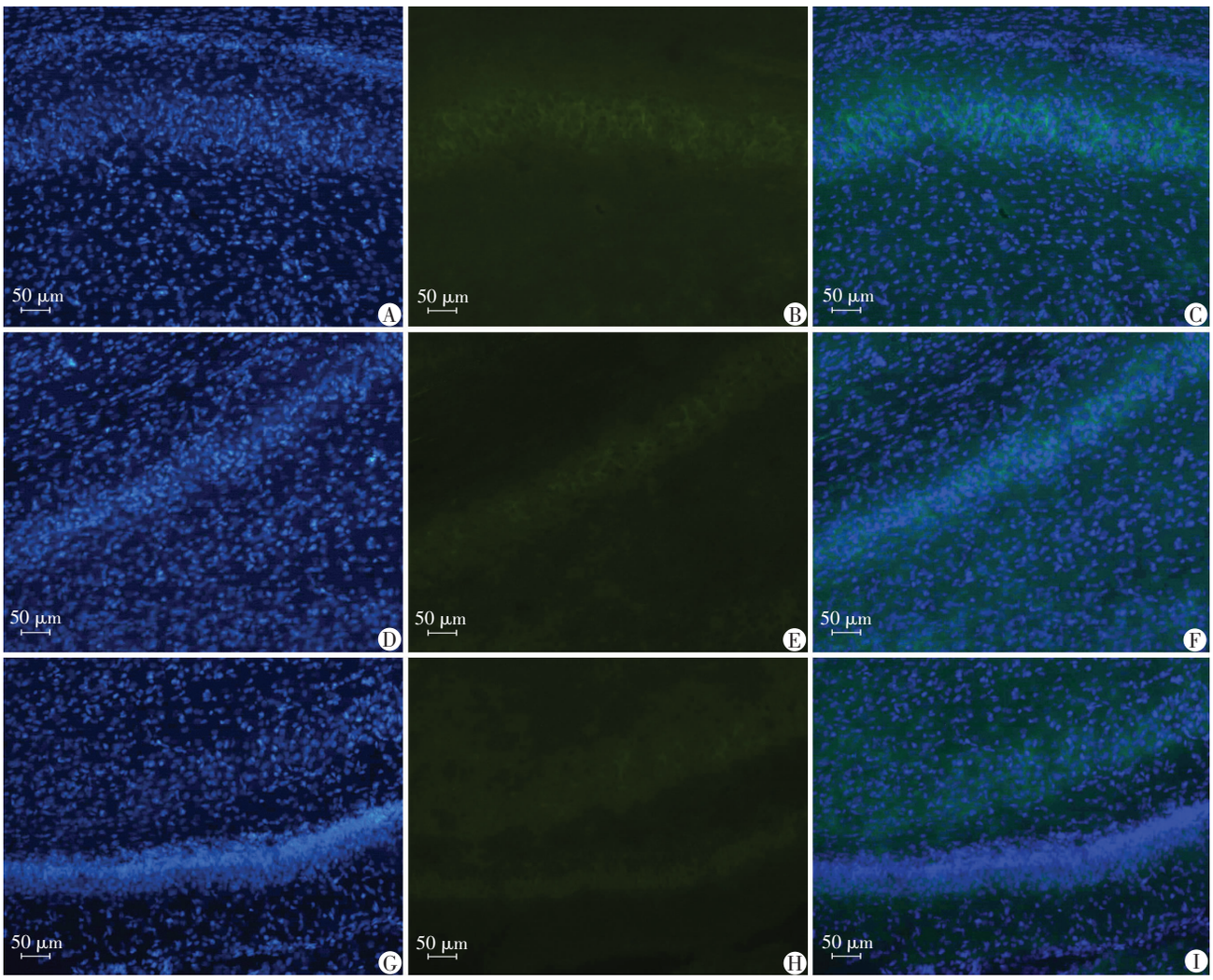
A：普通鼠笼对照组；B：睡眠剥夺组；C：睡眠恢复组

图1 各组大鼠海马齿状回BrdU免疫组织化学染色观察（ABC）



A～D：普通鼠笼对照组；E～H：睡眠剥夺组；I～L：睡眠恢复组；A、E、I：BrdU；B、F、J：DCX；C、G、K：GFAP；D、H、L：合并

图2 各组大鼠海马齿状回BrdU阳性细胞的鉴定（免疫荧光）



A～C:普通鼠笼对照组;D～F:睡眠剥夺组;G～I:睡眠恢复组;A、D、G:DAPI染色(蓝色);B、E、H:TUNEL阳性细胞核(绿色);C、F、I:合并

图3 各组大鼠睡眠剥夺对海马神经元凋亡的影响 (免疫荧光)

表1 各组大鼠海马齿状回BrdU阳性细胞的类型比较[$n=10,(\bar{x}\pm s)\%$]

组别	BrdU/DCX	BrdU/GFAP	BrdU/Neither
普通鼠笼对照组	77.42±1.68	10.74±1.23	11.84±0.65
睡眠剥夺组	78.25±1.30	10.48±1.10	11.27±1.03
睡眠恢复组	78.42±0.96	10.43±0.72	11.15±1.27

2.3 睡眠剥夺对大鼠海马神经元凋亡的影响

普通鼠笼对照组、睡眠剥夺组及睡眠恢复组各组海马区均未见TUNEL阳性细胞(图3)。

3 讨论

本实验采用改良多平台睡眠剥夺法剥夺大鼠REM睡眠,睡眠剥夺持续时间可以进行1 d或几天,而研究者只需要间歇性的进行观察。此方法是利用大鼠畏水原理,动物被放置在多个小平台上,周围被水包围,当动物进入REM睡眠时,由于肌张力降低,动物掉入水中而觉醒,使之不能进入REM睡眠。此方法既克服了单平台睡眠剥夺法中大鼠与群体分离及活动空间受限的缺点,也考虑了大鼠群体的稳定性。Machado等[9]指出虽然改良多平台睡眠剥夺法会减少约31%慢波睡眠,但是能完全废除REM睡眠。Mueller等[10]使用EEG记录也证明平台睡眠剥夺法能剥夺约95% REM睡眠。因此这是选择性剥夺动物REM睡眠的最佳方法。本实验采用此法制备大鼠REM睡眠剥夺模型,观察大鼠REM睡眠剥夺72 h后生理学行为学改变。睡眠剥夺后大鼠表现为倦怠,皮毛暗淡、黄涩、松散蓬乱,兴奋性增加易激惹,对环境刺激的警觉性、反应性及进攻性增强。这说明本实验采用改良多平台睡眠剥夺法能够较好复制REM睡眠剥夺。

哺乳动物海马齿状回的颗粒下区存在着干细胞,它具有增殖和分化成为神经细胞的潜能。海马齿状回颗粒细胞下层的干细胞生成新细胞,新生的细胞经过短暂的迁移进入颗粒细胞层,分化成颗粒细胞,它们具有与成熟颗粒细胞相同的形态和功能特征,成熟的神经元在分子层及多形层产生树突、轴突,形成突触联

系,最终整合至海马功能的神经环路中,参与海马的各种功能活动[11]。本实验选择 BrdU 标记大鼠海马齿状回神经细胞增殖情况,结合未成熟神经元标志物 DCX 以及星型胶质细胞标志物 GFAP 鉴定大鼠海马齿状回神经细胞分化情况。免疫组化结果显示,REM 睡眠剥夺 72 h 后大鼠海马齿状回细胞增殖较普通鼠笼对照组减少 52.39%,说明 REM 睡眠剥夺对大鼠海马齿状回神经细胞增殖的抑制作用是比较明显的,这与多数研究相符,而与邹俊华等[5]的研究结果有差异。对比两者可以发现,虽然睡眠剥夺时间均为 72 h,但是在邹俊华的研究中使用的小水台剥夺法剥夺成年大鼠,并且 BrdU 给药每天 1 次,连续 3 d,睡眠剥夺后立即处死,这或许是造成两者结果差异的原因。本实验另外一个结果是睡眠恢复组大鼠海马齿状回增殖细胞与睡眠剥夺组相比,虽稍有增多,但相差不显著,说明睡眠恢复 12 h 后并不能缓解 REM 睡眠剥夺 72 h 造成的神经细胞增殖的抑制,睡眠剥夺对海马齿状回细胞增殖的影响是比较持久的,Tung 等[12]研究发现和本实验结果是相吻合的,支持这一结论。这个结论提出几个有趣的问题,睡眠剥夺对神经细胞增殖的抑制是永久的还是和睡眠恢复时间相关呢?或者使用其他药物干预是否能缓解这种抑制?这有待进一步研究。

免疫荧光染色对 BrdU 阳性细胞进行鉴定结果表明,大鼠海马齿状回增殖细胞大部分是未成熟神经元。普通鼠笼对照组、睡眠剥夺组以及睡眠恢复组中 BrdU/DCX、BrdU/GFAP 双阳性细胞的百分比相差不显著,说明 REM 睡眠剥夺不影响大鼠海马齿状回神经细胞的分化。这说明睡眠剥夺导致的海马相关功能减退的可能原因是由于海马神经细胞增殖的减少而不是新增殖细胞分化为神经元的比例减少。本实验中观察到有部分 BrdU 阳性细胞既不表达 DCX 也不表达 GFAP,可能是未分化的前体细胞。

凋亡是由基因介导的一系列变化,细胞依靠它来主动地引起它自身的破坏,通过凋亡过程机体能清除衰老及异常细胞,并在维持很多细胞功能方面有重要作用。本实验采用 TUNEL 法检测大鼠海马神经元凋亡情况,结果发现普通笼对照组、睡眠剥夺组及睡眠恢复组海马区均未见 TUNEL 阳性细胞,我们考虑其原因可能是与大鼠年龄有关。年龄因素在大鼠细胞凋亡的进程中可能起很大作用,Naidoo 等[13]研究发现促凋亡因子水平随着年龄的增加显著提高。本实验中使用的是体质量为 100 g 左右的大鼠,比较年轻(4 周),得到的结果与 de-Souza 等[14]研究结果一致。这说明睡眠剥夺不会促进青年大鼠海马细胞凋亡。

综上所述,本实验通过改良多平台睡眠剥夺法成功制备 REM 睡眠剥夺模型,达到了较好的效果。REM 睡眠剥夺可以抑制青年大鼠海马齿状回神经元增殖,但是不影响其分化和凋亡,短期睡眠恢复后神经元增殖抑制不能得到有效改善。由于海马在学习记忆中发挥着重要作用,因此我们认为 REM 睡眠剥夺对海马神经元增殖的抑制作用可能是睡眠剥夺导致机体认知功能损害的机制之一。

参考文献:

[1] Hublin C, Partinen M, Koskenvuo M, *et al*. Heritability and mortality risk of insomnia-related symptoms: a genetic epidemiologic study in a population-based twin cohort[J]. Sleep, 2011, 34(7): 957-964.

[2] Maquet P. The role of sleep in learning and memory [J]. Science, 2001, 294(5544): 1048-1052.

[3] 许志强, 李静, 邓娟, 等. 脑源性神经营养因子前体对阿尔茨海默病大鼠海马齿状回神经元增殖和分化的影响[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(19): 1353-1356.

[4] Mueller A D, Mear R J, Mistlberger R E. Inhibition of hippocampal neurogenesis by sleep deprivation is independent of circadian disruption and melatonin suppression[J]. Neuroscience, 2011, 193: 170-181.

[5] 邹俊华, 章茜, 朱海浩, 等. 睡眠剥夺引起成年大鼠脑海马神经细胞增殖及干细胞因子的表达[J]. 中国临床康复, 2005, 9(16): 95-97.

[6] 程江涛, 章茜, 乔鹏, 等. 睡眠剥夺促进大鼠海马神经元凋亡及相关基因表达[J]. 基础医学与临床, 2004, 24(2): 205-208.

[7] Hipolide D C, D'Almeida V, Raymond R, *et al*. Sleep deprivation does not affect indices of necrosis or apoptosis in rat brain[J]. Int J Neurosci, 2002, 112(2): 155-166.

[8] 荣霏, 程滨, 温晓飒, 等. 慢性睡眠剥夺对大鼠学习记忆功能及不同脑区 5-羟色胺 1A 受体蛋白表达的影响[J]. 上海医学, 2012, 35(5): 425-429.

[9] Machado R B, Hipolide D C, Benedito-Silva A A, *et al*. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery[J]. Brain Res, 2004, 1004(1/2): 45-51.

[10] Mueller A D, Pollock M S, Lieblich S E, *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.

[11] Ben-Abdallah N M, Slomianka L, Vyssotski A L, *et al*. Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice[J]. Neurobiol Aging, 2010, 31(1): 151-161.

[12] Tung A, Takase L, Fornal C, *et al*. Effects of sleep deprivation and recovery sleep upon cell proliferation in adult rat dentate gyrus[J]. Neuroscience, 2005, 134(3): 721-723.

[13] Naidoo N, Ferber M, Master M, *et al*. Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling[J]. J Neurosci, 2008, 28(26): 6539-6548.

[14] de-Souza L, Smaili S S, Ureshino R P, *et al*. Effect of chronic sleep restriction and aging on calcium signaling and apoptosis in the hippocampus of young and aged animals[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012, 39(1): 23-30.

(**收稿**:2013-06-28;**修回**:2013-08-01)

(编辑　王小宴)