

不同时段睡眠剥夺对大鼠脑内 c-fos 表达的影响

宋国萍, 皇甫恩, 苗丹民, 冯学文

(第四军医大学航空航天医学系心理教研室, 陕西 西安 710032)

【摘要】 目的: 探索睡眠剥夺的脑机制。方法: 该研究采用小平台水环境法建立大鼠睡眠剥夺模型, 用 fos 蛋白免疫组化的方法测量脑中 fos 蛋白的表达, 分组为白天睡眠剥夺 12h 组、夜晚睡眠剥夺 12 小时组、大平台对照组和正常单独饲养组, 每组 4 只。结果: 睡眠剥夺使 fos 蛋白在皮层的广泛区域表达, 脑中同异相睡眠有关的区域有较高表达, 同夜晚睡眠剥夺 12 小时相比, 白天睡眠剥夺 12 小时在视交叉上核同生物节律有关的区域表达。结论: 睡眠节律改变可影响脑内 fos 蛋白表达。

【关键词】 大鼠; c-fos 蛋白; 大脑; 睡眠剥夺

中图分类号: B845.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-3611(2002)02-0103-03

C-fos Protein Expression of the Rats on the Brain after 12 Hours Sleep Deprivation of Day and Night

SONG Guo-ping, HUANGFU-En, MIAO Dan-min FENG Xue-wen

Department of Psychology Faculty of Aviation Medicine Fourth Military Medical University, Xi'an 710032 China

【Abstract】 Objective: To investigate the brain mechanisms of sleep deprivation. **Methods:** Sprague-Dawley rats were sleep deprived by housing them on the small platforms over water. Controls were housed in the normal cage(CC) or on the large platforms over water(TC). The effects of SD on the expression of c-fos protein by immunocytochemistry were investigated. The duration of SD was about 12 hours. They were divided into two groups: early SD group (from 7:00 am) and the late SD group (from 19:00 pm). **Results:** SD resulted in different expression of c-fos protein at different fields of the brain. The main fields of brain stem were all connected with paradoxical sleep. Compared with the late SD, the early SD group showed higher fos protein expression on suprachiasmatic. **Conclusion:** The disruption of regular circadian rhythm may affect c-fos protein expression.

【Key words】 Rats; c-fos protein; Immunocytochemistry; Brain stem; Sleep deprivation; Circadian Rhythm

睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)是指由各种原因引起的睡眠丢失状态, 可引起情绪、学习记忆、免疫功能等一系列改变。在生活节奏日益加快的今天, 许多行业有完全或部分 SD 存在, 如交通、医务人员、电话员等等。在国外是研究的一个热点, 目前在我国也逐步引起重视。SD 会引起 c-fos 原癌基因快速、短暂地表达, 并表达在相应的脑功能区, 同动物的清醒水平有关^[1], 并且同 SD 的时间长短有关^[2]。SD 后不仅引起自身平衡状态的紊乱, 而且同生物的近日节律有一定关系。我们用 c-fos 免疫组化的方法, 研究大鼠在白天和夜晚睡眠剥夺 12h 后脑中 fos 蛋白的表达, 从而探索 SD 同生物近日节律之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

成年、雄性、健康上海产 Sprague-Dawley 大鼠 16 只, 体质量 180.0(5.0)g 由第四军医大学实验动物中心提供。将其随机分为 SD 白天 12h 组(SDd)、SD 夜晚 12h(SDn)组、大平台实验对照组(tank con-

trol, TC)和正常单独饲养组(normal cage, CC), 每组 4 只。SDd 组自早 7:00 开始剥夺睡眠到晚间 19:00, SDn 组自晚间 19:00 开始剥夺睡眠到第二天早晨 7:00。

1.2 睡眠剥夺模型的建立

采用小平台水环境法^[3](flower pot)建立大鼠 SD 模型, 制作 30.0×30.0×30.0cm 的鼠箱, 其中有一直径为 6.3cm, 高 8.0cm 的平台, 在平台周边注满水, 水温保持在 20℃左右, 水面距平台面约 1.0cm。鼠在平台上可自行饮食饮水。若其睡眠, 则由于肌肉张力松弛落入水中。大鼠活动空间内持续 40w 日光灯照射, 室内温度控制在 18~22℃。实验前, 让鼠熟悉适应环境 1 周。大平台直径为 18.0cm, 其余条件同上。对照组单独饲养于笼中, 其余条件同上。

1.3 脑组织标本采集

各组大鼠在实验后立即腹腔注射戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉, 开胸经升主动脉灌注生理盐水 100ml, 以快速冲洗全身组织血液, 随后灌注冷的(4℃)4%多聚甲醛(0.1mol/L, PB 配制, pH7.4)500ml, 先快后慢, 持续 90min~120min, 注毕取全脑置于 20%蔗糖磷酸缓冲液(pH7.4, 4℃)中, 放置 12

~24h 至其沉底。用 Leitz kryomat 1700 型组织冰冻切片机做连续冠状冰冻切片, 片厚 50 μ m, 隔 5 取 1, 切片收集于 0.01mol/LPBS 中。

1.4 免疫组织化学染色

室温下, 切片用 0.2% TritonX-100 液孵育 40min, 用羊抗 fos 抗体血清 (1:4000) 孵育 48h (37 $^{\circ}$ C), 0.01mol/L PBS (Ph 7.4) 漂洗 3 \times 10min; 用生物素结合兔抗羊 IgG 孵育 2~4h, 0.01mol/L PBS (Ph 7.4) 漂洗 3 \times 10min; 用链霉卵白素-HRP (1:300) 孵育 2~4h, 0.01mol/L PBS (Ph 7.4) 漂洗 3 \times 10min; 再用 AB (0.1M Ph 6.0) 漂洗 2 \times 10min, 用 DAB 呈色液染色 15~30min, 用 AB (0.1M Ph 6.0) 漂洗 2 \times 10min, 0.01 mol/LPBS (Ph 7.4) 漂洗 3 \times 10min; 常规铬明胶贴片, 空气干燥、脱水、透明, DPX 封片。

呈色结束后, Olympos 显微镜观察各脑片 fos 阳性神经元的标记, 摄片。

1.5 结果判定

以每个单位视野 (200 μ m) 内 fos 阳性神经元的数目来表示数量, 具体判断标准: 特高密度、高密度、中等密度、低密度、散在标记。31~40 个为++++, 21~30 个为+++, 11~20 个为++, 2~10 个为+, 2 个以下为一。

2 结 果

2.1 SD 后 fos 蛋白在大鼠脑干的表达

SDd 组在实验后, fos 蛋白在大鼠脑干各区均有表达, 同 CC 组及 TC 组相比, 脑桥网状结构、孤束核、臂旁核、脑桥被盖核、蓝斑下核及被盖背外侧核有较强表达, 其中以臂旁核与脑桥被盖核表达呈强阳性反应; 中缝苍白核、蓝斑核、背侧缝和内侧缝表达未见明显增加。SDn 组同 CC 组及 TC 组相比, 在脑干各区, fos 蛋白表达无明显差异 (见表 1)。

表 1 不同时间 SD 后大鼠脑干 fos 蛋白的表达

	SDd	SDn	TC	CC
孤束核	+++	++	++	++
小细胞核	++	++	++	++
中缝苍白核	+	-	+	-
蓝斑核	++	++	++	++
臂旁核	++++	++++	++++	++++
脑桥被盖核	++++	++++	++++	++
背侧缝	++	++	++	++
蓝斑下核	++	++	+	-
被盖背外侧核	++	+	+	+
内侧缝	+	+	+	+
脑桥网状结构	++	+	+	+

2.2 间脑

同 CC 组和 TC 组相比, SDd 组 fos 蛋白的表达在视交叉上核 (SCN)、下丘脑腹内侧核和丘脑网状核有明显的增加, 为中、高密度, 其他脑区未见明显增加。SDn 组仅在丘脑网状核有中密度表达。

2.3 端脑

同 CC 组和 TC 组相比, SDd 组在大脑皮层的广泛区域均见 fos 蛋白的表达, 其中杏仁基外侧核、基底神经节与杏仁核簇为高密度, 同 SDd 组相比, SDn 组在大脑皮层区域也有所表达, 但程度要低, 为低或中密度。

3 讨 论

3.1 关于动物睡眠剥夺模型的建立

SD 是研究睡眠的重要方法, 采用“小平台水环境法”进行 SD, 水环境会对大鼠有一定的兴奋作用, 一定程度的隔离和限制活动也会产生应激, 而 c-fos 对各种应激的反应不具有特异性。在实验设计上, 我们要求动物进入实验前 1 周充分适应 SD 实验环境, 以排除上述影响。并且除采用 CC 组作为对照外, 还采用了 TC 组作为对照。TC 组即平台直径增大, 其它条件与小平台相同, 大鼠可在平台上有一定的活动, 可进入睡眠, 排除了小平台对大鼠活动限制的应激。已有研究表明^[3], 平台面积与大鼠体重之比为 1:1 时不会产生 SD, 故本研究中大平台直径为 18.0cm。在前面的研究^[5]中, TC 组在实验前后体重无明显变化, 说明其有一定的应激, 但应激水平远远低于 SD 组。

CC 组和 TC 组的 fos 蛋白表达水平也有一定程度升高, CC 组的 fos 蛋白表达可视为大鼠在正常单独饲养情况下的表达情形, TC 组的 fos 蛋白表达是水环境及一定程度隔离所造成的。CC 组和 TC 的 fos 蛋白增高水平反映了非应激状态下清醒大鼠的正常基础水平^[1]。当然我们所用的 SD 的方法会产生一定的应激, 如: 水环境、一定程度的隔离和限制活动。这些应激也有可能引起 fos 蛋白的表达, 但此种方法不会引起血中皮质激素的升高, 说明其应激程度不是很高^[6]。

3.2 SD 后 fos 蛋白的表达

3.2.1 SD 的影响 动物 SD 后会导致一些行为的变化, 并且中枢神经系统的某些神经元处于一定的兴奋水平。早期基因在其他组织基因尚未发生变化时便会发生变化, 作为“第三信使”起作用。有理由认为中枢神经系统神经元的变化与行为及生理变化

有关,并且可能在未表现出某些行为之前,中枢神经系统的神经元已表现出某些变化,因此,用 fos 蛋白免疫组化的方法可以表示 SD 的影响。并且有证据^[4]表明在研究 SD 上, c-fos 表达水平优于其他即刻早期基因。

SD 时间的长短也会影响 fos 蛋白的表达^[3,8], SD 时间较短时,环境及移动造成的应激的影响还存在且较大,为了能够反映 SD 的影响,我们选用 12h 作为 SD 的时间,此时各种应激的影响就会减少。

3.2.2 相关的脑结构 SD 后, fos 蛋白在大脑的广泛区域均有表达,在间脑,下丘脑后部的视交叉上核有所表达,同 SDd 破坏动物的正常的生物节律有关,同以往的报道相符。但下丘脑内侧核和丘脑网状表达增强在既往研究中未见报导。

在端脑,杏仁基外侧核表达增加同先前的研究相一致^[13],已有研究表明,电刺激该区,REM 增加,桥脑—膝状体—枕叶的 PGO 波活动增强。基底神经节与杏仁核簇 fos 蛋白表达增强表明它们同睡眠有关。

脑干 fos 水平表达增高主要集中于 REM—ON 类细胞,如:臂旁核、脑桥被盖核、脑桥网状结构、蓝斑下核及被盖背外侧核,在以前的研究^[12]中也发现,REM 时被盖背外侧核、脑桥被盖核和臂旁核的葡萄糖利用率增加。孤束核虽然不含有 REM—ON 类细胞,在 Nos Jean 的研究中发现,电刺激孤束核的传入神经,REM 睡眠增加。我们知道,氯化铵甲酰胆碱会使 REM 增加,在应用该药后,背外侧核、连接部网状结构组织、角盖核和旁臂核的 fos 蛋白表达同样增多,这说明,这些集中于背内侧和背中线附近的结构同 REM 睡眠密切相关。在前人的研究^[10]中,大细胞核也有阳性表达,在本次实验中未发现明显表达,可能同实验方法有一定关系。

而主要含 REM—OFF 类细胞的脑区,如蓝斑、中缝大核、内侧缝、脑桥中缝核、中缝苍白核, fos 蛋白表达无明显变化,因为神经活动水平减低时不可能看到 fos 蛋白表达的降低,因此 fos 蛋白表达无变化代表了神经活动水平的降低。但也有人报道^[11], SD 后蓝斑核 fos 蛋白表达增加,在本实验未发现此现象。究其原因,可能同实验方法有关,在“小平台水环境”SD 中,还有部分 SWS 没有剥夺,而在前人的研究中,采用的方法是用手触动,完全剥夺睡眠。

3.2.3 fos 蛋白表达同生物节律之间的关系 我们已知大鼠的睡眠周期是自天亮时开始,并且以往的研究表明此时 EEG δ 波最强^[7],根据该特点,因此实

验安排自天亮 7:00 开始进行 SD 以破坏其生物节律。大鼠睡眠时间一般为 11 个半小时,因此我们选择自夜晚 19:00 开始夜间的 SD,此时为它的清醒周期。

视交叉上核是反映动物行为和生理的生物节律的关键性结构^[14],SDd 组为在其睡眠周期中进行剥夺的,表现为 SCN 的 fos 蛋白表达增高,SDn 组为在其清醒周期中进行剥夺的,SCN 的 fos 蛋白表达没有增高。反映了在动物睡眠期进行 SD 会使生物节律变化,这同以前的研究相符。但是从结果看,除 SCN 外,其他的大脑区域也有所表达。这些大脑区域本身引起的还是 SCN 有神经纤维通往这些结构引起的继发性变化,有待我们进一步研究。

参考文献

- 1 Novak CM, Nunez AA. Daily rhythms in fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *Am J Physiol* 1998; 275: 1620—1626
- 2 宋国萍,皇甫恩,苗丹民,等.连续不同时间睡眠剥夺后大鼠脑中 c-fos 蛋白的表达. *中国行为医学科学*, 2001; 10: 407—409
- 3 Bradley DY, Zhou J, Smagin GN, et al. Sleep deprivation by the "Flower Pot" technique and spatial reference memory. *Physiol Behav*, 1997, 2: 249—256
- 4 O' Hara BF, Young KA, Watson FL, et al. Immediate early gene expression in brain during sleep deprivation: Preliminary observations. *Sleep*, 1993, 1: 1—7
- 5 宋国萍,苗丹民,皇甫恩,等.睡眠剥夺对大鼠学习和行为的影响. *第四军医大学学报*, 2000 6: 663—666
- 6 Tobler I, Borbely AA. The effect of 3-h and 6-h sleep deprivation on sleep and EEG spectra of rat. *Behav Brain Res* 1990, 6: 73—78
- 7 Watanabe Y, Stone E, McEwen BS. Induction and habituation of c-fos and Zif/286 by acute and repeated stressor. *Neuro Report* 1994, 5: 1321—1324
- 8 Tononi G, Pompeiano M, Cirelli C. The locus coeruleus and immediate-early genes in spontaneous and forced wakefulness. *Brain Res Bull*, 1994, 5—6: 589—596
- 9 Lydie R, Baghdoyan HA, Hibbard EV, et al. Regional brain glucose metabolism is altered during rapid eye movement sleep in the cat; a preliminary study. *J Comp Neurol*, 1991, 2: 517—529
- 10 Hugo MN, Jacqueline V, Fabio C et al. Brain distribution of c-fos expression as a result of prolonged rapid eye movement (REM) sleep period duration. *Brain Res* 1995, 1: 15—22
- 11 Pompeiano M, Cirelli C, Tononi G. Effects of sleep-deprivation on fos-like immunoreactivity in the rat brain. *Arch Ital Biol* 1992, 3: 325—335
- 12 Daan S, Beersma DGM, Borbely AA. The timing of human sleep; recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am J Physiol* 1984, 2: R161—178
- 13 Merchant NH, Vazquez J, Garcia F, et al. Brain distribution of c-fos expression as a result of prolonged rapid eye movement (REM) sleep period duration. *Brain Res* 1995, 68: 15—22
- 14 Margarita M, Ignacio M. Improvement of shuttle-box avoidance following post-training treatment in paradoxical sleep-deprivation platforms in rats. *Physiol&Behavior*, 1988, 43: 93—98

(收稿日期: 2001—10—17)