

臭氧大自血法对睡眠剥夺大鼠褪黑素及氧化应激指标的影响

税云华, 张 兰, 雷光磊, 诸源江, 李培玉

(四川省骨科医院麻醉科, 成都 610041)

[摘要] 目的 观察臭氧大自血法对睡眠剥夺大鼠褪黑素及氧化应激指标的影响。方法 选取40只成年雄性Wistar大鼠,采用“改良多平台睡眠剥夺法”制作快速眼球运动(rapid eye movement sleep, REM)睡眠剥夺模型。根据随机数字表原则,将大鼠分为对照组和观察组,每组各20只。观察组大鼠给予臭氧自体血回输,对照组大鼠以空气进行对照。分别在干预0 h、24 h、48 h和72 h时,采尾静脉血检测血清褪黑素水平,在干预0 h、72 h时,检测静脉血氧化应激指标超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)和丙二醛(MDA)水平。结果 干预0 h时,两组大鼠觉醒期(wake, W)、慢波睡眠(slow-wave sleep, SWS)、快波睡眠(fast-wave sleep, FWS)比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);干预72 h时,观察组大鼠W低于对照组, SWS、FWS高于对照组($P<0.05$)。干预48 h、72 h时,观察组大鼠血清褪黑素水平均高于对照组($P<0.05$)。干预72 h时,观察组大鼠SOD水平、MDA水平低于对照组, GSH-px水平高于对照组($P<0.05$)。结论 臭氧大自血法可促进睡眠剥夺大鼠褪黑素释放,降低大鼠血清SOD水平、MDA水平,提高大鼠血清GSH-px水平。

[关键词] 臭氧; 臭氧大自血法; 睡眠剥夺; 大鼠; 褪黑素; 氧化应激

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)02-0110-06

失眠症是以睡眠障碍为主要表现的一种疾病。随着社会的发展和各方面压力的增大,失眠症已经普遍存在于成年人群中^[1]。最新的一项流行病学调查显示,全世界范围内,有接近30%的人群受失眠症的困扰,严重影响了人类的身心健康^[2]。尽管睡眠对人类的意义重大,但关于睡眠和失眠的机制研究却不甚清楚。对于失眠症的治疗方法也在逐渐探索中。目前治疗失眠症的药物主要以镇静、催眠类药物为主,但长期大量服用容易引起药物成瘾,且不良反应较大^[3-5]。臭氧(O_3)具有极强的氧化作用和较高的能量,是构

成自然界大气的成分之一。既往研究证实,臭氧治疗局部感染有着良好的效果^[6];也有学者采用臭氧自体血回输技术治疗急性期脑梗死并取得了显著的疗效^[7]。随着对臭氧研究的深入,国内已有报道,臭氧大自血法对于失眠症的治疗也具有益处^[8],但其机制却在探索中。为了深入探讨臭氧大自血法治疗失眠症的可能机制,本研究通过构建睡眠剥夺大鼠模型,并用臭氧大自血法进行干预,观察大鼠血清褪黑素和氧化应激指标的变化。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性Wistar大鼠40只,9周龄,体重(300±30)g,购自成都达硕实验动物有限公司[SCXK(川)2015-030]。所有大鼠均于实验前

[收稿日期] 2019-09-12

[基金项目] 四川省医学科研青年创新课题(Q17069)

[作者简介] 税云华(1989-),男,住院医师,研究方向:骨科麻醉/疼痛。E-mail: yxzzs10001@163.com

[通信作者] 李培玉, E-mail: 99058940@qq.com

在昼夜明暗 12 h : 12 h (07 : 00 开灯, 19 : 00 关灯)、通风良好、正常饮食条件下适应性饲养观察 7 d, 并于成都中医药大学中医内科脏腑病症实验室[SYXK(川)2017-179]完成实验。

1.2 实验材料

Hyper-Medozon comfort 医用臭氧发生器(德国赫尔曼公司)发生的臭氧, 回输专用真空注射器(上海康德莱企业发展集团股份有限公司, 批号 20190200); 大鼠血清褪黑素检测试剂盒(上海信裕生物工程有限公司, 批号 XY-E30014-18192), 大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(上海泽叶生物科技有限公司, 批号 ZY-SOD-Ra18057), 大鼠血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)检测试剂盒(上海抚生实业有限公司, 批号 fs-E5809-18133), 大鼠血清丙二醛(MDA)检测试剂盒(上海信裕生物工程有限公司, 批号 XY-E30266-181072)。

1.3 实验仪器

按文献^[9]自制睡眠剥夺箱(127 cm × 44 cm × 45 cm, 材质为有机玻璃)(图 1), 在箱内底部装有 14 个直径为 6.5 cm 的平台。实验开始前, 向箱内加水至距离平台 1 cm 处。

1.4 造模方法

造模时, 每次将 10 只大鼠分别置于平台上(图 2), 大鼠可在平台自由活动、饮食。待大鼠进入快速眼球运动睡眠(rapid eye movement sleep, REM)相时, 大鼠肌张力下降, 头部触水惊醒, 强制进行睡眠剥夺。所有大鼠睡眠剥夺 72 h。

1.5 分组方法

根据随机数字表, 将所有大鼠随机分成 2 组, 每组 20 只, 分别设置为对照组和观察组。

1.6 干预方法

使用回输专用真空注射器于造模后抽取观察

组大鼠尾静脉血 2 mL, 与臭氧(40 μg/mL)按 1 : 1 体积比混合 3~5 min, 随后从尾静脉回输体内, 1 次 / 12 h, 共 3d。

对照组大鼠使用空气代替臭氧, 其余同观察组。

1.7 观察指标

1.7.1 睡眠时相 分别在干预前及干预结束后, 于 9 : 00~17 : 00, 检测各组大鼠觉醒期(wake, W)、慢波睡眠(slow-wave sleep, SWS)、快波睡眠(fast-wave sleep, FWS), 作为失眠客观评价指标, 以评价干预效果。

1.7.2 血清褪黑素水平 分别在干预 0 h、24 h、48 h、72 h 时, 于凌晨 01 : 00~02 : 00, 抽取大鼠尾静脉血 1 mL 进行检查。血液样本保存于 4 °C 冰箱, 2 500 r/min 下离心 10 min, 用试剂盒进行检测。

1.7.3 血清氧化应激指标 分别在干预 0 h、72 h 时, 于凌晨 01 : 00~02 : 00, 抽取大鼠尾静脉血 1 mL, 其余同血清褪黑素水平检测方法。检测试剂购自上海信裕生物工程有限公司

1.8 统计学方法

应用统计软件 SPSS 20.0 进行统计分析。血清褪黑素、SOD、GSH-px、MDA 水平均为正态分布计量资料, 采用均值 ± 标准差表示。上述指标组间比较采用独立样本 *t* 检验, 组内血清褪黑素水平比较采用双因素方差分析, 组内 SOD、GSH-px、MDA 水平比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠睡眠时相比较

干预 0 h 时, 两组大鼠 W、SWS、FWS 比较, 差异均无统计学意义(*P* > 0.05); 干预 72 h 时, 观察组大鼠 W 时间短于对照组, SWS、FWS 时



图 1 自制睡眠剥夺箱



图 2 睡眠剥夺实验

间长高于对照组($P<0.05$)(表 1)。

2.2 两组大鼠血清褪黑素水平比较

干预 0 h、24 h 时, 两组大鼠血清褪黑素水平比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$); 干预 48 h、72 h 时, 观察组大鼠血清褪黑素水平平均高于对照组($P<0.05$)(表 2)。

2.3 两组大鼠血清氧化应激指标比较

干预 0 h 时, 两组大鼠 SOD 水平、GSH-px 水平、MDA 水平比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$); 干预 72 h 时, 观察组大鼠 SOD 水平、MDA 水平低于对照组, GSH-px 水平高于对照组($P<0.05$)(表 3)。

表 1 两组大鼠睡眠时相比较

(min)

指标	时间	观察组($n=20$)	对照组($n=20$)	t	P 值
W	干预前	306.25 $\pm$ 56.25	323.00 $\pm$ 75.50	0.796	0.431
	干预后	205.75 $\pm$ 48.45	307.65 $\pm$ 42.45	7.075	<0.001
	t	5.812	0.862	—	—
	P 值	<0.001	0.399	—	—
SWS	干预前	100.95 $\pm$ 19.28	94.00 $\pm$ 14.13	1.300	0.201
	干预后	158.75 $\pm$ 37.23	116.55 $\pm$ 31.77	3.797	0.001
	t	6.280	3.338	—	—
	P 值	<0.001	0.003	—	—
FWS	干预前	4.77 $\pm$ 1.05	4.79 $\pm$ 1.14	0.072	0.943
	干预后	8.79 $\pm$ 1.81	7.00 $\pm$ 2.06	2.918	0.006
	t	7.283	3.649	—	—
	P 值	<0.001	0.002	—	—

表 2 两组大鼠血清褪黑素水平比较

(ng/L)

组别	例数	0 h	24 h	48 h	72 h	F	P 值
观察组	20	64.21 $\pm$ 5.90	74.70 $\pm$ 8.33	91.04 $\pm$ 9.47	107.85 $\pm$ 9.00	717.48	<0.001
对照组	20	67.01 $\pm$ 7.20	73.63 $\pm$ 6.55	75.95 $\pm$ 5.68	77.27 $\pm$ 5.21	103.89	<0.001
t	—	1.347	0.453	6.111	13.154	—	—
P 值	—	0.186	0.653	0.000	0.000	—	—

表 3 两组大鼠血清氧化应激指标比较

指 标	时间	观察组($n=20$)	对照组($n=20$)	t	P 值
SOD/(ng $\cdot$ mL $^{-1}$)	0 h	439.25 $\pm$ 31.18	430.18 $\pm$ 32.52	0.900	0.374
	72 h	388.76 $\pm$ 31.67	425.47 $\pm$ 33.31	3.571	0.001
	t	4.620	0.493	—	—
	P 值	<0.001	0.628	—	—
GSH-px/(U $\cdot$ mL $^{-1}$)	0 h	54.17 $\pm$ 7.16	57.60 $\pm$ 7.03	1.530	0.134
	72 h	76.30 $\pm$ 11.32	57.08 $\pm$ 7.22	6.398	<0.001
	t	8.921	0.288	—	—
	P 值	<0.001	0.776	—	—
MDA/(mmol $\cdot$ mg $^{-1}$)	0 h	25.19 $\pm$ 5.41	27.34 $\pm$ 6.34	1.151	0.257
	72 h	15.05 $\pm$ 5.81	25.95 $\pm$ 5.41	6.139	<0.001
	t	7.229	0.845	—	—
	P 值	<0.001	0.409	—	—

3 讨论

失眠症是影响人们身心健康的常见疾病之一。镇静、催眠类药物是治疗失眠症的主要药物,但受副作用和成瘾性影响,临床应用受到限制。臭氧大自血法最早被用于治疗脑梗死,随着研究的深入,其逐渐被应用于治疗包括失眠在内的多种疾病。国内学者王晓平等^[10]指出,臭氧大自血法治疗失眠效果优于阿普唑仑,且安全性较好;郭明远等^[11]利用臭氧大自血法联合电项针治疗高血压伴失眠症,可有效改善患者睡眠质量,无明显不良反应。然而,目前关于失眠症治疗的研究主要集中在心理水平改变^[12]、神经行为学水平改变^[13]等方面,对于其机制的研究尚处在起步阶段。近年来,关于失眠机制的可能学说主要集中在下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)轴功能失调^[14]、迷走神经张力改变^[15]以及褪黑素水平改变^[16]等方面。

本研究选取睡眠时相作为观察指标,结果发现,采用臭氧大自血法干预 72 h 的观察组大鼠 W 期短于对照组, SWS、FWS 时间长于对照组。这一结果提示,臭氧大自血法对于调节睡眠剥夺大鼠睡眠时相具有积极的意义。这与贺丹等^[8]、王晓平等^[10]的临床研究结果相一致。本研究从动物实验上进一步证实了臭氧大自血法治疗失眠的效果。

由于褪黑素具有镇静催眠和调节睡眠周期的作用,正常情况下,褪黑素受光照调节,光照通过视网膜和视神经将信号转导至松果体,松果体内的色氨酸转变为 5-羟色氨酸,5-羟色氨酸逐步转化合成为褪黑素。失眠患者体内褪黑素水平降低,试验性睡眠剥夺模型也具有相似的改变。由此可见,褪黑素不仅是失眠的分子标志物,同时也是失眠的重要诱因之一。由于褪黑素是内源性神经调节剂,其调控受众多因素影响,其在失眠中的具体机制还尚未阐明。有研究证实,褪黑素除了与失眠关系密切外,也在神经功能受损^[17]、焦虑抑郁^[18]、肝硬化^[19]等疾病中发挥着重要的作用,在这些疾病中,褪黑素又与氧化应激反应关系密切。基于以上结果,本研究选取褪黑素和氧化应激指标(SOD、GSH-px、MDA)作为观察指标,探讨臭氧大自血法对睡眠剥夺大鼠血清中上述指标的影响。

本研究结果显示,干预早期(0 h、24 h 时),两组大鼠血清褪黑素水平差异不显著;而在干预 48 h、72 h 时,观察组大鼠血清褪黑素水平平均高于对照组。如前所述,机体褪黑素水平的高低可在一定程度上反映失眠的程度,也是诱发失眠发生的使动因素。因此,有理由认为,臭氧大自血法可阻断失眠发展的诱因,从而对失眠起到治疗作用。随后,本研究观察了两组大鼠 SOD、GSH-px、MDA 水平的变化,结果显示,干预 0 h 时,两组大鼠 SOD、GSH-px、MDA 水平比较,差异不显著;在干预 72 h 时,观察组大鼠 SOD、MDA 水平明显低于对照组, GSH-px 水平明显高于对照组。既往研究认为,机体氧化应激水平的改变参与了失眠的发生发展^[20],针灸及部分药物均可在改善睡眠质量的同时减轻机体氧化应激反应^[21-22]。由此可见,氧化应激水平也可能是失眠发展的重要影响因素。

综上所述,臭氧大自血法可促进睡眠剥夺大鼠褪黑素释放,降低大鼠血清 SOD 水平、MDA 水平,提高大鼠血清 GSH-px 水平。但在臭氧干预下的褪黑素与氧化应激水平之间的关系还需进一步探索。

参考文献:

- [1] Qaseem A, Kansagara D, Forciea MA, et al. Management of chronic insomnia disorder in adults: a clinical practice guideline from the American College of Physicians[J]. *Ann Intern Med*, 2016, 165(2):125-133.
- [2] Chung KF, Yeung WF, Ho FYY, et al. Cross-cultural and comparative epidemiology of insomnia: the diagnostic and statistical manual (DSM), international classification of diseases (ICD) and international classification of sleep disorders (ICSD)[J]. *Sleep Med*, 2015, 16(4):477-482.
- [3] Trauer JM, Qian MY, Doyle JS, et al. Cognitive behavioral therapy for chronic insomnia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Intern Med*, 2015, 163(3):191-204.
- [4] Kay DB, Buysse DJ, Germain A, et al. Subjective-objective sleep discrepancy among older adults: associations with insomnia diagnosis and insomnia treatment[J]. *J Sleep Res*, 2015, 24(1):32-39.
- [5] Blom K, Jernelöv S, Kraepelien M, et al. Internet treatment addressing either insomnia or depression, for patients with both diagnoses: a randomized trial[J]. *Sleep*, 2015, 38(2):

- 267-277.
- [6] Song M, Zeng Q, Xiang Y, et al. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2):2449-2455.
- [7] Wu X, Zhang T, Wang J, et al. Magnetic resonance diffusion tensor imaging following major ozonated autohemotherapy for treatment of acute cerebral infarction[J]. *NRR*, 2016, 11(7):1115.
- [8] 贺丹, 彭颜晖. 医用臭氧治疗高血压伴失眠症的疗效观察[J]. *中国医师进修杂志*, 2013, 36(33):67-68.
- [9] 何玉宏, 王培欢, 吴高义, 等. 改良多平台法建立大鼠部分睡眠剥夺模型及其效果评价[J]. *实用医药杂志*, 2015, 32(12):1107-1111.
- [10] 王晓平, 麻梅菊, 吴秀荣. 大自血臭氧治疗失眠症的疗效观察[J]. *实用医技杂志*, 2016(2):183-184.
- [11] 郭明远, 陈建平, 林杰文. 电项针联合臭氧治疗心脾两虚型老年高血压伴失眠症疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(34):3800-3802.
- [12] Prather AA, Vogelzangs N, Penninx BW. Sleep duration, insomnia, and markers of systemic inflammation: results from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA)[J]. *J Psychiatr Res*, 2015, 60:95-102.
- [13] Kyle SD, Hurry MED, Emsley R, et al. Effects of digital cognitive behavioural therapy for insomnia on cognitive function: study protocol for a randomised controlled trial [J]. *Trials*, 2017, 18(1):281.
- [14] Vgontzas AN, Fernandez-Mendoza J, Bixler EO, et al. Impaired negative feedback of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in chronic insomnia: a corticotrophin releasing hormone (CRH) challenge test[J]. *Sleep*, 2018, 41:A131.
- [15] Zhao B, Li L, Jiao Y, et al. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation in treating post-stroke insomnia monitored by resting-state fMRI: The first case report[J]. *Brain Stimul*, 2019, 12(3):824-826.
- [16] Quera-Salva MA, Claustat B. Melatonin: physiological and pharmacological aspects related to sleep: the interest of a prolonged-release formulation (Circadin®) in insomnia [J]. *Encephale*, 2018, 44(6):548-557.
- [17] Yang L, Wang J, Deng Y, et al. Melatonin improves neurological outcomes and preserves hippocampal mitochondrial function in a rat model of cardiac arrest[J]. *PLoS One*, 2018, 13(11):e0207098.
- [18] Nie L, Wei G, Peng S, et al. Melatonin ameliorates anxiety and depression - like behaviors and modulates proteomic changes in triple transgenic mice of Alzheimer's disease[J]. *Biofactors*, 2017, 43(4):593-611.
- [19] Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM, et al. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(40): 8918.
- [20] Gulec M, Ozkol H, Selvi Y, et al. Oxidative stress in patients with primary insomnia[J]. *Prog Neuro-Psychoph*, 2012, 37(2):247-251.
- [21] 王红, 吴建丽, 王晓磊, 等. 针灸治疗对氯苯丙氨酸(PCPA)失眠模型大鼠基础研究进展[J]. *针灸临床杂志*, 2017, 33(2):76-79.
- [22] 邵红利, 涂星, 卢映, 等. 土家苗药夜关门对小鼠实验性失眠的疗效观察与机制初探[J]. *中成药*, 2014, 36(2):383-385.

Effects of Ozonated Autohemotherapy on Melatonin and Oxidative Stress in Rats with Sleep Deprivation

SHUI Yunhua, ZHANG Lan, LEI Guanglei, ZHU Yuanjiang, LI Peiyu

(Department of Anesthesiology, Sichuan Orthopaedic Hospital, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of ozone major autohemotherapy on melatonin and oxidative stress in rats with sleep deprivation, and to provide theoretical basis for the treatment of ozone major autohemotherapy. **Methods** Forty adult male Wistar rats were selected as the study subjects. A rapid eye movement (REM) sleep deprivation model was subsequently developed using the “modified multi-platform sleep deprivation method”. Rats were randomly divided into the control group and the observation group according to the principle of random number table, with 20 rats in each group. The rats in the observation group were given autologous blood transfusion after ozone treatment, and the control rats were given air instead of ozone. Serum melatonin levels were measured at tail vein blood at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h after intervention. The venous blood oxidative stress index [superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px) and malondialdehyde (MDA)] levels were measured at 0 h and 72 h after intervention. **Results** There was no significant difference in wake (W), slow-wave sleep (SWS), and fast-wave sleep (FWS) time between the two groups of rats at the 0 h intervention ($P>0.05$). At 72 hours of intervention, W time in the observation group was shorter than that in the control group, and SWS and FWS time were longer than those in the control group. The differences were statistically significant ($P<0.05$). At 48 h and 72 h after intervention, the serum melatonin levels in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$). At 72 h after intervention, the levels of SOD and MDA in the observation group were lower than those in the control group, and the GSH-px level was higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Ozone major autohemotherapy can promote melatonin release in rats with sleep deprivation, decrease serum SOD level and MDA level, and increase serum GSH-px level in rats. **[Key words]** Ozone; Autohemotherapy; Sleep deprivation; Rats; Melatonin; Oxidative stress