

刁华琼,张婧,王敏,等. 改良的多平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 120-128.

Diao HQ, Zhang J, Wang M, et al. Application and evaluation of the modified multi-platform method in animal model of sleep deprivation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 120-128.

Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2023. 01. 015

改良的多平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用与评价

刁华琼¹, 张婧¹, 王敏¹, 陈雨菲¹, 朱庆生^{2*}, 李小黎^{1*}

(1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029; 2. 北京市朝阳区第三医院, 北京 100121)

【摘要】 改良的多平台水环境法(modified multi-platform method, MMPM)由单平台及多平台水环境法发展而来,目前多用于制备睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)动物模型。与单平台和早期的多平台水环境相比, MMPM 可扩大动物的活动范围,减少群体分离和社会孤立带来的应激,具有易行性和适用性高及造模死亡率低的优点,是国内外较常用的一种 SD 造模方法。不过,影响 SD 模型制备的实验因素较多, MMPM 在不同研究中的造模效果参差不齐。为提高模型的稳定性和实验的可重复性,本文梳理了 MMPM 在 SD 动物模型中的具体应用和评价方法,以供后期相关研究参考。

【关键词】 改良的多平台水环境法;睡眠剥夺;动物模型;综述

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0120-09

Application and evaluation of the modified multi-platform method in animal model of sleep deprivation

DIAO Huaqiong¹, ZHANG Jing¹, WANG Min¹, CHEN Yufei¹, ZHU Qingsheng^{2*}, LI Xiaoli^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China. 2. Third Hospital of Beijing Chaoyang District, Beijing 100121)

Corresponding author: LI Xiaoli. E-mail: tigerxl2002@163.com; ZHU Qingsheng. E-mail: zhuqingsheng32@sina.com

【Abstract】 The modified multi-platform method (MMPM) is developed from single-platform and multi-platform method and is mostly used to prepare sleep deprivation (SD) animal models. Compared with single-platform and early multi-platform method, MMPM expands the range of activities that animals partake in and decreases the stress caused by group separation and social isolation. Thus, MMPM can increase the social stability of SD animals. The advantages of MMPM, high simplicity and applicability and low mortality, contribute to the popularity in preparing the animal model of SD in China and other countries. However, many experimental factors affect the modeling effects of MMPM, resulting in uneven modeling effects in different SD studies. In this article, to improve the stability and reproductivity of the experimental SD and provide a reference for further, the specific application and evaluation method of MMPM in SD animal models are reviewed.

【Keywords】 modified multi-platform method, MMPM; sleep deprivation; animal models; review

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 北京市朝阳区科技计划项目(CYSF2205)。
Funded by Chaoyang District Science and Technology Program of Beijing(CYSF2205)。
[作者简介] 刁华琼(1994—),女,博士研究生,研究方向:中医药防治脑病的研究。Email:m18989120996@163.com
[通信作者] 李小黎,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治脑病和神志病的临床和基础研究。
Email:tigerxl2002@163.com;
朱庆生,男,主任医师,研究方向:精神疾病的防治研究。Email:zhuqingsheng32@sina.com
* 共同通信作者

睡眠是维护机体健康及中枢神经系统正常功能必不可少的生理过程,睡眠剥夺对机体的精力、注意力、认知功能等均有消极影响,是多种神经系统疾病的常见危险因素,亟需建立与人类睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)相似的动物模型来探索其发病机制及防治途径。依据睡眠时脑电图表现、眼球运动和睡眠深度等情况,人类正常睡眠可分为非快速眼动(non-rapid eye movement sleep, NREM)和快速眼动(rapid eye movement, REM)两种时相^[1],其中 REM 睡眠又称异相睡眠,与人和动物的学习记忆、智力发育、情感等有密切联系,是动物实验中常被剥夺的睡眠时相。改良的多平台水环境法(modified multiple water method, MMPM)便是剥夺 REM 睡眠的一种常用方法,与温和刺激、强迫运动、药物干预等造模方法相比, MMPM 不仅简便易行,而且动物的死亡率低,具有较高的可控性和适用性。不过,不同研究在动物品系、睡眠剥夺时间、平台直径、对照组及模型评价等方面的选择存在差异, MMPM 的造模效果参差不齐。为提高 MMPM 制备 SD 模型的可靠性和可重复性, 本文将从以上角度,梳理 MMPM 在国内外睡眠剥夺研究中的应用现状,为后期相关实验提供参考。

1 平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用历程

单平台水环境法, 又称倒置花盆法(inverted flowerpot method), 是 SD 动物模型中最早使用的平台水环境。1965 年, Dement 等^[2]初次将成年猫放置在圆形水箱中的石块上, 发现该方法确能剥夺猫的睡眠; 同年 Cohen 等^[3]将水箱中的石块更换为倒置花盆, 当盆底上的动物进入 REM 睡眠时, 会因全身肌张力下降, 鼻尖触水甚至落水而觉醒, 动物因畏水又重新上台进入睡眠, 如此循环往复, 可达到剥夺 REM 睡眠的效果。不过, 水环境中的单平台不仅限制了动物的活动范围, 而且增加了群体分离带来的应激, 不易判断指标变化与 SD 间的关系, 降低了实验对科学问题的说明性。1981 年, van Hulzen 等^[4]围绕水箱中心平台增加了 4 个平台, 在保证睡眠剥夺效果的前提下, 扩大了动物的活动范围。但动物此时仍为孤立状态, 同组大鼠被置于不同水箱或不同时段进行睡眠剥夺, 均可增加组内的造模效果差异, 因此研究者对平台水环境法进行再次改进, 即本文探讨的改良的多平台水环境法(MMPM)。MMPM 是指在增添水箱中平台的同时,

增加动物的数量, 使同组动物有机会被放入同一水箱剥夺睡眠, 不仅能减小组内的造模效果差异, 而且能降低群体分离带来的应激, 为睡眠剥夺研究提供相对稳定的动物模型。

2 MMPM 在睡眠剥夺动物模型中的具体应用

2.1 实验动物的选择

选择合适的实验动物是睡眠剥夺实验中的重要环节, 应尽量选用与人类有相似睡眠结构的动物为研究对象。SD 动物模型可用的品系较多, 如猫、鼠、犬、猴、果蝇、斑马鱼等, 但在 MMPM 建立的 SD 模型中, 大鼠和小鼠更为常用, 其中 Sprague-Dawley 大鼠^[5-7]、Wistar 大鼠^[8-10]、ICR 小鼠^[11-13]和 C57BL/6J 小鼠^[14-16]的供应充足, 且与人类有着相近的睡眠结构, 其使用频率更高^[17](见表 1)。动物的年龄和性别是 MMPM 中需要考虑的另外两个重要因素^[18]。有研究同时纳入雄性和雌性鼠进行睡眠剥夺, 发现雌性鼠对 SD 的反应性更高^[19], 这与女性失眠患者居多的特点相符, 但目前国内外的 SD 相关实验多以雄性鼠为研究对象, 其目的是减少激素波动对睡眠和实验结果的影响。事实上, 雄性鼠也存在激素波动, 其个体差异甚至比雌性个体更明显^[20], 缺乏对雌性个体的睡眠剥夺研究, 可能会降低女性服用治失眠药物的疗效或增加药物的不良反应发生率, 应平衡雌性与雄性个体在睡眠剥夺研究中的占比^[21]。此外, MMPM 中多以成年鼠为研究对象, 其中大鼠的周龄多为 8 ~ 12 周, 小鼠多为 6 ~ 8 周, 计划慢性睡眠剥夺或实验周期较长者, 可适当减小动物的基线周龄。另有研究选用孕鼠^[22]、青年鼠^[23]、退役种鼠^[24]分别构建妊娠期失眠、青少年失眠及老年失眠动物模型, 进而观察母代失眠对子代的影响^[25]以及青少年和老年群体中失眠的病理变化, 对研究特殊人群失眠的产生机制及治疗途径有重要价值。

2.2 睡眠剥夺环境的设置

睡眠与觉醒具有明显的昼夜节律, 光照周期是睡眠研究中需要关注的重要因素。多数实验在选用 MMPM 制备 SD 模型时, 会依据实验室原本的光照周期, 选择 12 h 光照 12 h 黑暗或 14 h 光照 10 h 黑暗^[13, 26], 也有研究为排除光暗节律对动物睡眠的影响, 将进行睡眠剥夺的动物暴露在 24 h 的荧光灯下^[27]。结果表明, 在不同光照周期中进行的 MMPM 均可减少动物的总睡眠时间, 但尚不清楚哪一光照

周期下的睡眠剥夺效果更好。其次,温度亦可影响动物的睡眠,在 MMPM 实验中,需着重关注睡眠剥夺水箱中的水温,而早期发表的相关文献多未提及对水温的控制,可能是水温这一因素未引起重视。随着睡眠研究的广泛开展及实验方法的完善,有关 MMPM 中水温控制的阐述越发详细,研究报道其一般设置在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,总体而言,与所处实验室的温度差异较小。再者,动物有随时采食水的习惯,无论正常饲养期还是睡眠剥夺期,都应保证动物有充足的饲料和饮水^[26]。MMPM 中的食水一般悬挂于睡眠剥夺水箱的顶部,动物站上平台则可自由进食饮水,也为连续观察动物的进食量提供了条件。此外,MPPM 常持续数小时甚至数天,应定时更换睡眠剥夺箱中的水,为动物提供相对清洁的实验环境。

2.3 平台相关参数的确定

MPPM 需用到的实验设备包括睡眠剥夺水箱、圆形窄平台、恒温仪、水箱网格盖、饲料挂篮及水瓶。首先,窄平台是 MMPM 剥夺动物睡眠的主要工具,平台数与动物数的比例、平台的直径、平台间的纵横间距以及平台与水面的距离均可影响造模效果。考虑到动物的社会群居性,越来越多的研究将来自同组的大鼠放入同一水箱进行睡眠剥夺,水箱中的平台数通常为动物数的 2 倍^[28],该比例既能为动物提供足够的活动范围,也不会占用过多的实验空间。其次,平台的直径由大鼠重量与平台面积的比值决定,大鼠体重与平台面积的比值越大,REM 睡眠减少越明显。当比值为 1:1 时,仅部分慢波睡眠受到影响;当比值为 10:1 时(如大鼠体重约 330 g,平台直径为 6.5 cm,平台表面积为 33 cm²),可完全剥夺 REM 睡眠^[29]。再者睡眠剥夺实验中大鼠常用的平台直径为 5.0 ~ 6.5 cm^[10,23],小鼠常用的平台直径为 3.0 ~ 3.5 cm^[30,11];平台间距以动物能在平台间自由跳越,但不能倚靠两个平台或水箱边缘入睡为宜,大鼠所在睡眠剥夺箱中的平台纵横间距一般设置为 7.0 ~ 10 cm^[19,31],小鼠则多设置为 5.0 cm^[12]。另一需要注意的是,平台通常高出水面 1 ~ 2 cm^[29]。若平台超出水面过多,动物在进入 REM 睡眠时不能第一时间触水而觉醒,且不利于动物入水后再次上台;若平台高出水面不足,则会增加动物与水环境的接触时间,造成更大的应激。

2.4 正常对照的实施

采用 MMPM 制备睡眠剥夺动物模型时,常用 3 种方法作为正常对照。第一种是宽平台对照,是指

将对照组动物放置在与模型组相似水环境中的宽平台上(大鼠:直径约 15 cm^[28],小鼠:直径约 12 cm^[16]),该平台可供动物蜷缩入睡而不触水,保证动物的睡眠,而且每个宽平台仅能容下 1 只动物,与窄平台制备的睡眠剥夺模型形成了严格的对照。第二种是密集铁丝网对照,是指将对照组动物放置在与模型组相似水环境中的密集铁丝网上(高出水面 2 cm),该方法允许同一水箱中动物蜷缩在一起入睡,与宽平台对照相比,更符合动物的社会群体性。第三种是家笼对照,是指将对照组动物置于平日饲养的笼中,由于对照组动物不用接触新异的水环境,且有充足的睡眠条件,故能与模型组形成更大程度的对照。3 种对照方法各有优势,可依据研究目的及实验条件选择其中 1 种或 2 种方法作为对照。从目前文献来看,家笼对照最为常用,其次是宽平台对照;当设置 2 个对照组时,多为家笼对照与宽平台对照组合。不过,在最初剥夺睡眠的 24 h 内,12.5 cm 的宽平台仍可以剥夺动物 50% 的 REM^[32];在剥夺睡眠的第 4 个 24 h,宽平台组与家笼对照组大鼠有同样长的 REM 睡眠时间,而窄平台组大鼠的 REM 急剧下降,提示造模时间过短不利于观察宽平台组与模型组动物间的睡眠差异,宽平台对照可能更适用于 24 h 以上的睡眠剥夺方案。此外,观察动物从平台取下后 24 h 内的睡眠情况,发现窄平台组大鼠的 REM 睡眠时间增加 280%,而宽平台组大鼠的 REM 时间没有显著增加^[33],提示宽平台对大鼠 REM 睡眠的影响较小,可用作 SD 模型的正常对照。

2.5 睡眠剥夺时长的选择

大鼠与小鼠均为夜行性动物,其睡眠多发生在白天,故国内外的睡眠剥夺实验多在白天进行。但动物的睡眠并非全在白天,有研究在夜间采用 MMPM 制备模型(14 h/d, 21 d),发现动物的自主活动距离增加,且出现明显的焦虑样行为^[8],这与人类长期失眠易引起不良情绪的特点相符。但目前尚无研究比较白天与夜间制备睡眠剥夺模型的效果差异,不清楚是否必要将 MMPM 集中在白天或夜间进行。此外,MPPM 有较高的可操作性,不仅适合制备急性 SD 模型,在慢性 SD 模型的制备中也有明显优势。如前所述,造模时间过短不易观察到模型组与对照组动物间的睡眠差异^[34],持续时间过长又会增加动物死亡的风险,因此急性 SD 模型中的动物通常暴露于 24 h 的 MMPM,持续时间多为 2 ~

4 d (见表 1)。慢性 SD 模型中,动物常接受 8 ~ 18 h/d 的睡眠剥夺,剥夺时长短于 12 h/d 者,常于上午开始,当日白天结束;剥夺长于 12 h/d 者,多从下午开始,次日白天结束,这在扰乱动物的睡眠节律的同时,也减小了造模实验对研究者睡眠的影响。更重要的是慢性 SD 模型的制备至少需要持续21 d,如此可形成生物周期,这是 MMPM 在制备 SD 动物模型中的优势。

3 MMPM 在睡眠剥夺动物模型中的评价方法

3.1 一般体征

动物的一般体征包括体重、饮食饮水量、二便、精神状态、背毛色泽等。由于 SD 可显著增加动物的活动时间,增强能量代谢^[60],体重成为了睡眠剥夺研究常观察的体征之一。Youngblood 等^[29] 比较

表 1 MMPM 在 SD 动物模型中的应用
Table 1 Application of MMPM in the animal models of SD

类型 Type	常用的睡眠剥夺参数 Frequently-used parameters of MMPM		较少用的睡眠剥夺参数 Less-used parameters of MMPM	
	大鼠 Rats	小鼠 Mice	大鼠 Rats	小鼠 Mice
品系 Strains	Sprague-Dawley ^[5-7] 、 Wistar ^[8-10]	ICR ^[11-13] 、 C57BL/6J ^[14-16]	Swiss Albino ^[35] 、 Wistar Albino ^[36]	BALB/c ^[37] 、 Swiss EPM-M1 ^[38]
周龄 Age	8 ~ 12 周 ^[7,19,39] 8 ~ 12 weeks ^[7,19,39]	6 ~ 8 周 ^[12-13,40] 6 ~ 8 weeks ^[12,13,40]	3 ~ 4 周 ^[23,41] 、 退役种鼠 ^[24] 3 ~ 4 weeks ^[23,41] 、 retired breeders ^[24]	4 周 ^[11] 、12 周 ^[38] 4 weeks ^[11] 、12 weeks ^[38]
性别 Gender		雄性 Male	雌性 ^[10,28] 、雌雄并用 ^[19] Female ^[10,28] 、Male and female ^[19]	
光照周期(光:暗) Photoperiod (light:dark)		12:12	14:10 ^[13,26] 、24:0 ^[27]	
水温(℃) Water temperature(℃)	22 ~ 24 ^[27,41-42]	23 ~ 25 ^[11-12]	19 ^[33]	26 ~ 28 ^[14]
平台直径(cm) Diameter of platform (cm)	5.0 ^[10,31,43] 、5.5 ^[5] 、 6.0 ^[41] 、6.5 ^[23,27,44]	3.0 ^[14,16,30,38,45-46] 、 3.5 ^[11,12,37]	7.0 ^[19] 、 8.0 ^[47]	1.5 ^[40] 、 2.5 ^[15]
平台间距(cm) Distance between platforms (cm)	10 ^[19,23,28] 、 7.0 ^[27,31,48]	5.0 ^[12,15]	4.5 ^[39] 、 15.0 ^[49]	7.0 ^[46]
平台与动物数量之比 Ratio of platform to animals	10:4 ^[23,28] 、11:7 ^[41] 、 20:8 ^[24] 、12:5 ^[40] 、 12:8 ^[44] 、20:12 ^[9]	12:6 ^[38,45]	5:2 ^[10] 、6:5 ^[49]	24:5 ^[14]
正常对照的方法 Method of normal control	宽平台 ^[9,43] 、家笼 ^[50] 、 密集铁丝网 ^[27,47,49] Large platform ^[9,43] 、Cage ^[50] 、 Dense wire mesh ^[27,47,49]		无水环境的多平台 ^[39] MMPM was not filled with water ^[39]	
急性睡眠剥夺时长 Duration of acute SD	24 h/d(2 d ^[35,41,45] 、3 d ^[19,28,36,38] 、 4 d ^[28,44])		24 h/d(1 d ^[24] 、5 d ^[11] 、7 d ^[27,51])、 20 h/d(5 d ^[46] 、7 d ^[52])、 18 h/d(3 d ^[12])	
慢性睡眠剥夺时长 Duration of chronic SD	8 h/d(28 d ^[53] 、42 d ^[9,43])、 12 h/d(21 d ^[54] 、30 d ^[55])、 18 h/d(21 d ^[5,56] 、28 d ^[57-58])		20 h/d(14 d ^[49] 、28 d ^[47] 、56 d ^[14])、 24 h/d(42 d ^[59])	
REM 睡眠剥夺时间 Time of REM SD	8 h/d(8:30 ~ 16:30 ^[53])、 12 h/d(8:00 ~ 20:00 ^[54] 、9:00 ~ 21:00 ^[55])、 18 h/d(14:00 ~ 次日 8:00 ^[5] 、16:00 ~ 次日 10:00 ^[58] 、18:00 ~ 次日 12:00 ^[7,12]) 18 h/d(from 14:00 to the next day 8:00 ^[5] 、 from 16:00 to the next day 10:00 ^[58] 、 from 18:00 to the next day 12:00 ^[7,12])		19 h/d(20:00 ~ 次日 15:00 ^[6])、 20 h/d(0:00 ~ 20:00 ^[26] 、12:00 ~ 次日 8:00 ^[14,47]) 19 h/d(from 20:00 to the next day 15:00 ^[6])、 20 h/d(from 0:00 to 20:00 ^[26] 、from 12:00 to the next day 8:00 ^[14,47])	

窄平台与宽平台组大鼠的体重变化,发现窄平台能更明显地减轻动物的体重,提示平台水环境法对动物体质量的消极影响。闫德祺等^[59]运用 MMPM 制备慢性 SD 模型(24 h/d,每周 6 d,连续 7 周),从第 3 周开始,便观察到模型组大鼠的体重明显低于家笼对照组;Turan 等^[36]运用 MMPM 建立急性 SD 模型后(24 h/d,3 d),发现模型组动物的体重明显低于对照组和宽平台组。无论是在急性或慢性 SD 动物模型中,MMPM 均可减小动物的体重增长率,这与过度觉醒相关失眠人群体重下降的特点相符^[61]。此外,魏丹丹等^[54]通过 MMPM 建立睡眠剥夺模型(12 h/d,21 d)后,发现模型组小鼠毛发干枯、形体消瘦、对外界刺激反应减弱及严重的疲劳状态;谭云霞等^[49]通过 MMPM 制备 SD 模型(20 h/d,14 d),观察到大鼠进食和饮水量显著增多,本该睡眠的白天也活动不停,提示大鼠的睡眠节律紊乱;唐淑洁等^[57]建立慢性 SD(18 h/d,28 d),发现模型组大鼠精神亢奋,易激惹,毛硬粗糙无光泽,饮食减少、饮水增多等。由此可见,MMPM 模型对动物的一般体征影响较广,而且动物的进食量在不同睡眠剥夺期的变化趋势不完全一致,可能的原因是睡眠剥夺初期的能量代谢较高,促使动物进食,随着睡眠剥夺时长的累积,动物身体逐渐虚弱,进食日渐减少。总之,动态观察动物的一般体征,可丰富对 SD 模型的评价依据。

3.2 自主活动

老鼠有昼伏夜出的习性,睡眠剥夺会增加动物总的自主活动距离,可通过观测动物的自主活动情况,初步评估 MMPM 剥夺睡眠的效果。谢光璟等^[47]利用 MMPM 制备慢性睡眠剥夺模型(20 h/d,28 d),发现模型组大鼠的中心点移动距离增长,平均活动速度增加,活动频率更高,且活动面积更大,提示大鼠的兴奋性增加。刘鑫等^[56]通过 MMPM 进行慢性睡眠剥夺(18 h/d,21 d),于造模结束后第 7 天记录大鼠的自主活动情况,发现模型组大鼠的光照和黑暗环境活动路程以及总活动路程均显著增加,动物的白昼睡眠节律出现紊乱;谭云霞等^[49]进行的睡眠剥夺研究也发现类似结果。以上研究均提示 MMPM 可通过剥夺睡眠来增加动物的自主活动,该结果可作为成功建立 SD 模型的间接依据。

3.3 戊巴比妥钠睡眠协同实验

戊巴比妥钠对中枢神经系统有抑制作用,实验一般通过腹腔注射戊巴比妥钠,并结合动物的翻正

反射来评价 SD 模型的制备效果^[62]。翻正反射消失提示动物入睡,翻正反射恢复则提示动物从睡眠中觉醒,通常将腹腔注射至翻正反射消失的时长记为睡眠潜伏期,翻正反射消失到反射恢复的时长记为睡眠持续时间。课题组前期采用 MMPM 剥夺大鼠睡眠(12 h/d,21 d),通过戊巴比妥钠睡眠协同实验发现睡眠剥夺大鼠的睡眠潜伏时间较对照组长,睡眠持续时间较对照组短^[63]。Bergmann 等^[60]间断运用 MMPM 建立慢性 SD 模型,通过戊巴比妥钠睡眠协同实验发现模型组大鼠的睡眠潜伏期显著长于正常组,而睡眠时间显著短于正常组,这与失眠人群入睡困难,总睡眠时间不足的特点相符,提示 MMPM 制备 SD 模型的相似性。

3.4 脑电监测

脑电图是脑生物电活动的检查技术,通过手术在动物脑部安装电极,可持续监测动物的总睡眠时间及睡眠结构,是评估睡眠剥夺动物模型制备效果的重要工具。根据眼球运动,睡眠脑电图可分为 NREM 和 REM 波相,脑电观察的睡眠结构主要包括觉醒(WAKE)、慢波睡眠 I 期(SWS1)、慢波睡眠 II 期(SWS2)、快速眼动睡眠(REM)及其占总睡眠时间的比例。有研究通过 MMPM 制备 24 h 的急性 SD 模型,脑电监测发现模型组动物的睡眠潜伏期延长,并伴随皮层快速的低波幅脑电波,睡眠恢复期则观察到 REM 睡眠的反弹^[48],提示 REM 是 MMPM 剥夺的主要睡眠时相。课题组前期运用 MMPM(12 h/d,21 d)制备慢性睡眠剥夺大鼠,脑电监测发现模型组大鼠的 Wake 期时间显著增加,NREM 期、REM 期和总睡眠时间均明显短于正常对照组^[64]。闫德祺等^[59]间断使用 MMPM 42 d 建立慢性 SD,脑电结果提示模型组大鼠的总睡眠时间不短于家笼对照组,但 SWS2、REM 及其所占比例显著低于家笼对照组。张曼等^[51]利用 MMPM(24 h/d,7 d)制备 SD 模型,发现大鼠的总睡眠时间和 NREM 占比均低于正常组,睡眠潜伏期和觉醒比例均高于正常组;王琦^[34]与唐淑洁等^[57]的研究也得出类似结论,为 MMPM 成功制备 SD 动物模型提供了有力证据。

4 结语

动物品系、睡眠剥夺环境、平台相关参数、睡眠剥夺时长和正常对照方法是 MMPM 模型制备和评价的重要影响因素,虽然不同研究在以上方面存在差异,但也有规律可循。模型制备方面,睡眠剥夺

动物实验多以成年的雄性大鼠或小鼠为研究对象,以水环境中的宽平台或家笼饲养为正常对照,实验常依据动物的体重估算合适的窄平台和宽平台直径。此外,MMPM 中的睡眠剥夺多在白天进行,其中急性 SD 的剥夺时长通常为 24 h/d,连续 2 ~ 4 d,慢性 SD 的剥夺时长多为 8 ~ 18 h/d,至少持续 3 周,具体剥夺时长需依据研究目的而定。模型评价方面,MMPM 制备的 SD 模型可表现出动物毛发粗糙、易激惹、体质量下降、自主活动增加等体征,以及睡眠潜伏期延长、总睡眠时间缩短、REM 睡眠及其占比降低等睡眠变化,符合人类失眠的临床特征,提示 MMPM 制备 SD 模型的相似性。

虽然 MMPM 是一种可靠的睡眠剥夺方法,但其在模型的制备和评价方面仍有不足。首先,水环境是 MMPM 剥夺动物睡眠的一个重要因素,但动物对水环境的适应程度存在差异,不同程度的应激可增加除 SD 以外其他因素对实验指标的影响,因此,有必要将动物提前放入睡眠剥夺箱适应环境。其次,温度过低是动物失眠的一个重要因素,若不能合理且均衡地控制每个睡眠剥夺箱的水温,将会增加实验误差,故需加用恒温设备来控制各睡眠剥夺箱中的水温。再者,睡眠剥夺动物模型中的客观评价方法较少,其中脑电监测需经手术安装电极,而 MMPM 中的水环境会增加切口感染的风险,且大鼠头部电极易在睡眠剥夺期脱落,对 24 h/d 的睡眠剥夺实验而言,不易监测动物在模型制备期的睡眠变化情况。随着实验设备的日益完善及睡眠研究的逐步深入,MMPM 在睡眠剥夺动物模型中的应用和评价方法有望得到改进。

参 考 文 献(References)

- [1] 王洛萱,李劲草,张有志. 常用失眠动物模型及其睡眠结构特征研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34 (5): 389-394.
Wang LX, Li JC, Zhang YZ. Research progress in sleep structure characteristics of commonly used animal insomnia models [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2020, 34 (5): 389-394.
- [2] Dement WC. Recent studies on the biological role of rapid eye movement sleep [J]. Am J Psychiatry, 1965, 122 (4): 404-408.
- [3] Cohen HB, Dement WC. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of paradoxical phase [J]. Science, 1965, 150(3701): 1318-1319.
- [4] van Hulzen ZJ, Coenen AM. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats [J]. Physiol Behav, 1981, 27 (4): 741-744.
- [5] Konakanchi S, Raavi V, MI HK, et al. Effect of chronic sleep deprivation and sleep recovery on hippocampal CA3 neurons, spatial memory and anxiety-like behavior in rats [J]. Neurobiol Learn Mem, 2022, 187: 107559.
- [6] Wang T, Niu K, Fan A, et al. Dietary intake of polyunsaturated fatty acids alleviates cognition deficits and depression-like behaviour via cannabinoid system in sleep deprivation rats [J]. Behav Brain Res, 2020, 384: 112545.
- [7] Noorafshan A, Karimi F, Kamali AM, et al. Restorative effects of curcumin on sleep-deprivation induced memory impairments and structural changes of the hippocampus in a rat model [J]. Life Sci, 2017, 189: 63-70.
- [8] Han C, Li F, Tian S, et al. Beneficial effect of compound essential oil inhalation on central fatigue [J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1): 309.
- [9] Massadeh AM, Alzoubi KH, Milhem AM, et al. Evaluating the effect of selenium on spatial memory impairment induced by sleep deprivation [J]. Physiol Behav, 2022, 244: 113669.
- [10] de Oliveira RA, Cunha GMA, Borges KDM, et al. The effect of venlafaxine on behaviour, body weight and striatal monoamine levels on sleep-deprived female rats [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2004, 79(3): 499-506.
- [11] Zhou HR, Wu JR, Bei L, et al. Hydroalcoholic extract from *Abelmoschus manihot* (Linn.) Medicus flower reverses sleep deprivation-evoked learning and memory deficit [J]. Food Funct, 2020, 11(10): 8978-8986.
- [12] Li H, Yu F, Sun X, et al. Dihydropyridine ameliorates memory impairment induced by acute sleep deprivation [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 853: 220-228.
- [13] Wang X, Wang Z, Cao J, et al. Melatonin alleviates acute sleep deprivation-induced memory loss in mice by suppressing hippocampal ferroptosis [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 708645.
- [14] Tai F, Wang C, Deng X, et al. Treadmill exercise ameliorates chronic REM sleep deprivation-induced anxiety-like behavior and cognitive impairment in C57BL/6J mice [J]. Brain Res Bull, 2020, 164: 198-207.
- [15] Wang W, Yang L, Liu T, et al. Corilagin ameliorates sleep deprivation-induced memory impairments by inhibiting NOX2 and activating Nrf2 [J]. Brain Res Bull, 2020, 160: 141-149.
- [16] Jiao Q, Dong X, Guo C, et al. Effects of sleep deprivation of various durations on novelty-related object recognition memory and object location memory in mice [J]. Behav Brain Res, 2022, 418: 113621.
- [17] 谢晨,杨文佳,于心同,等. 睡眠研究中相关动物选择的进展 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 87-92.
Xie C, Yang WJ, Yu XT, et al. Progress in the animal selection for sleep research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20(2): 87-92.
- [18] 齐凤琴. 具有改善睡眠作用药物的药效评价方法的建立 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2005.
Qi FQ. The establishment of pharmacological evaluating methods

- on improving sleep effect [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2005.
- [19] Hajali V, Sheibani V, Esmaili-Mahani S, et al. Female rats are more susceptible to the deleterious effects of paradoxical sleep deprivation on cognitive performance [J]. Behav Brain Res, 2012, 228(2): 311–318.
 - [20] Dayton A, Exner EC, Bukowy JD, et al. Breaking the cycle; estrous variation does not require increased sample size in the study of female rats [J]. Hypertension, 2016, 68(5): 1139–1144.
 - [21] Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies [J]. Nature, 2014, 509(7500): 282–283.
 - [22] Khodaverdilo A, Farhadi M, Jameie M, et al. Neurogenesis in the rat neonate's hippocampus with maternal short-term REM sleep deprivation restores by royal jelly treatment [J]. Brain Behav, 2021, 11(12): e2423.
 - [23] Ghaheri S, Panahpour H, Abdollahzadeh M, et al. Adolescent enriched environment exposure alleviates cognitive impairments in sleep-deprived male rats; role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor [J]. Int J Dev Neurosci, 2022, 82(2): 133–145.
 - [24] Solanki N, Atrooz F, Asghar S, et al. Tempol protects sleep-deprivation induced behavioral deficits in aggressive male Long-Evans rats [J]. Neurosci Lett, 2016, 612: 245–250.
 - [25] Han Y, Wang J, Zhao Q, et al. Pioglitazone alleviates maternal sleep deprivation-induced cognitive deficits in male rat offspring by enhancing microglia-mediated neurogenesis [J]. Brain Behav Immun, 2020, 87: 568–578.
 - [26] Xie G, Huang X, Li H, et al. Caffeine-related effects on cognitive performance; roles of apoptosis in rat hippocampus following sleep deprivation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 534: 632–638.
 - [27] Zhao FY, Guo SN, Xu Y, et al. Investigation of acupuncture in improving sleep, cognitive and emotion based on attenuation of oxidative stress in prefrontal cortex in sleep-deprived rats [J]. J Acupunct Tuina Sci, 2021, 19(3): 157–166.
 - [28] Rajizadeh MA, Esmailpour K, Masoumi-Ardakani Y, et al. Voluntary exercise impact on cognitive impairments in sleep-deprived intact female rats [J]. Physiol Behav, 2018, 188: 58–66.
 - [29] Youngblood BD, Zhou J, Smagin GN, et al. Sleep deprivation by the “flower pot” technique and spatial reference memory [J]. Physiol Behav, 1997, 61(2): 249–256.
 - [30] Zhang Q, Su G, Yang Q, et al. Round scad-derived octapeptide WCPFSRSF confers neuroprotection by regulating Akt/Nrf2/NFκB signaling [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(36): 10606–10616.
 - [31] Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, et al. Sleep deprivation prevents stimulation-induced increases of levels of P-CREB and BDNF; protection by caffeine [J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 46(4): 742–751.
 - [32] Pujol JF, Mouret J, Jouvet M, et al. Increased turnover of cerebral norepinephrine during rebound of paradoxical sleep in the rat [J]. Science, 1968, 159(3810): 112–114.
 - [33] Mendelson WB, Guthrie RD, Frederick G, et al. The flower pot technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1974, 2(4): 553–556.
 - [34] 王琦. 刺五加总苷对水平所致大鼠睡眠剥夺的睡眠周期的影响 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2014.
 - [35] Wang Q. *Acanthopanax* aggregation glycosides on levels of rats caused by sleep deprivation sleep cycle [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2014.
 - [36] Lima AMA, de Bruin VMS, Rios ERV, et al. Differential effects of paradoxical sleep deprivation on memory and oxidative stress [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2014, 387(5): 399–406.
 - [37] Turan I, Sayan Ozacmak H, Ozacmak VH, et al. The effects of glucagon-like peptide 1 receptor agonist (exenatide) on memory impairment, and anxiety- and depression-like behavior induced by REM sleep deprivation [J]. Brain Res Bull, 2021, 174: 194–202.
 - [38] Xu X, Zheng P, Zhao H, et al. Effect of electroacupuncture at GV20 on sleep deprivation-induced depression-like behavior in mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 7481813.
 - [39] Silva RH, Chehin AB, Kameda SR, et al. Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice [J]. Neurobiol Learn Mem, 2004, 82(2): 90–98.
 - [40] Pei W, Meng F, Deng Q, et al. Electroacupuncture promotes the survival and synaptic plasticity of hippocampal neurons and improvement of sleep deprivation-induced spatial memory impairment [J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27(12): 1472–1482.
 - [41] Farajdokht F, Vatandoust SM, Hosseini L, et al. Sericin protects against acute sleep deprivation-induced memory impairment via enhancement of hippocampal synaptic protein levels and inhibition of oxidative stress and neuroinflammation in mice [J]. Brain Res Bull, 2021, 174: 203–211.
 - [42] Sahin L, Cevik OS, Cevik K, et al. Mild regular treadmill exercise ameliorated the detrimental effects of acute sleep deprivation on spatial memory [J]. Brain Res, 2021, 1759: 147367.
 - [43] 孟玲欣, 范贵民, 王景涛. 改良多平台水环境法制作大鼠 REM 睡眠剥夺模型的研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(2): 99–100.
 - [44] Meng LX, Fan GM, Wang JT. Study on REM sleep deprivation model of rats made by improved multi-platform water environment law [J]. Heilongjiang Med Pharm, 2013, 36(2): 99–100.
 - [45] Alzoubi KH, Khabour OF, Rashid BA, et al. The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment; the role of oxidative stress [J]. Behav Brain Res, 2012, 226(1): 205–210.
 - [46] Rossi VC, Tiba PA, Moreira KDM, et al. Effects of sleep

- deprivation on different phases of memory in the rat: dissociation between contextual and tone fear conditioning tasks [J]. *Front Behav Neurosci*, 2014, 8: 389.
- [45] Cao Y, Li Q, Liu L, et al. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(9): 1282–1297.
- [46] Wan Y, Gao W, Zhou K, et al. Role of IGF-1 in neuroinflammation and cognition deficits induced by sleep deprivation [J]. *Neurosci Lett*, 2022, 776: 136575.
- [47] 谢光璟, 徐波, 夏婧, 等. 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马 CA1 区细胞结构及神经元损伤的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 26–32.
- Xie GJ, Xu B, Xia J, et al. Protective effects of anmeidan on cell structure against neuronal damage in hippocampal CA1 region of sleep-deprived rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(7): 26–32.
- [48] Xie JF, Shao YF, Wang HL, et al. Neuropeptide S counteracts paradoxical sleep deprivation-induced anxiety-like behavior and sleep disturbances [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 64.
- [49] 谭云霞, 纪可, 刘福贵, 等. 安寐丹通过调控星形胶质细胞活性改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆能力 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 18–25.
- Tan YX, Ji K, Liu FG, et al. Anmeidan improves learning and memory ability of sleep-deprived rats by regulating astrocyte activity [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(7): 18–25.
- [50] Karabulut S, Korkmaz Bayramov K, Bayramov R, et al. Effects of post-learning REM sleep deprivation on hippocampal plasticity-related genes and microRNA in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 361: 7–13.
- [51] 张曼, 戴建业, 唐乾利. 白背桐黄钻方调控失眠剥夺大鼠脑电活动、神经递质、炎症因子和氧化应激的促眠机制研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(11): 2432–2435.
- Zhang M, Dai JY, Tang QL. Hypnogenetic mechanism underlying regulation of electrical activity, neurotransmitter, inflammatory factors and oxidative stress of brain in insomnia model rats by baibeitong Huangzhuang formula [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2019, 46(11): 2432–2435.
- [52] 黄晓宇, 谢光璟, 黄攀攀. 天王补心丹加减干预睡眠剥夺大鼠能量代谢机制的生物信息学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(22): 172–180.
- Huang XY, Xie GJ, Huang PP. Bioinformatics analysis on mechanism of modified Tianwang buxin dan intervention on energy metabolism in sleep deprived rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, 26(22): 172–180.
- [53] Alzoubi KH, Mayyas FA, Khabour OF, et al. Chronic melatonin treatment prevents memory impairment induced by chronic sleep deprivation [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 3439–3447.
- [54] 魏丹丹, 李玉洁, 王永杰, 等. 圣愈汤通过调节海马区单胺类神经递质水平改善睡眠剥夺小鼠学习、记忆能力 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(7): 1–8.
- Wei DD, Li YJ, Wang YJ, et al. Shengyutang improves learning and memory ability of sleep deprived mice by regulating levels of monoamine neurotransmitters in *Hippocampus* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2021, 27(7): 1–8.
- [55] 郭帆, 吴东南, 刘玲, 等. 酸枣仁汤防治睡眠剥夺性大鼠学习记忆功能变化及其对 NLRP3 通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(2): 22–27.
- Guo F, Wu DN, Liu L, et al. Effect of Suanzaoren Tang on learning-memory function and NLRP3 pathway in sleep-deprived rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2021, 27(2): 22–27.
- [56] 刘鑫, 王平, 丁莉, 等. 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠节律基因与钟控基因表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(4): 1890–1894.
- Liu X, Wang P, Ding L, et al. Effects of Suanzaoren Decoction on the expression of rhythm gene and clock control gene in elderly chronic sleep deprivation rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(4): 1890–1894.
- [57] 唐淑洁, 赵旭伟, 王梓丞, 等. 佐匹克隆对慢性睡眠剥夺老年大鼠神经递质及脑电的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(15): 1472–1474.
- Tang SJ, Zhao XW, Wang ZC, et al. Effects of zopiclone on neurotransmitter and electroencephalogram in aged rats with chronic sleep deprivation [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2017, 37(15): 1472–1474.
- [58] Lai WD, Tung TH, Teng CY, et al. Fish oil ameliorates neuropsychiatric behaviors and gut dysbiosis by elevating selected microbiota-derived metabolites and tissue tight junctions in rats under chronic sleep deprivation [J]. *Food Funct*, 2022, 13(5): 2662–2680.
- [59] 闫德祺, 张星平, 邓宁, 等. 魄不安于肺不寐大鼠褪黑素及其相关受体的变化 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(5): 2924–2928.
- Yan DQ, Zhang XP, Deng N, et al. Changes of melatonin and G-protein-coupled receptor 50 in insomnia rats with corporeal soul unrest in the lung [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(5): 2924–2928.
- [60] Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, et al. Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation [J]. *Sleep*, 1989, 12(1): 31–41.
- [61] Ren R, Zhang Y, Yang L, et al. Insomnia with physiological hyperarousal is associated with lower weight: a novel finding and its clinical implications [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11(1): 604.
- [62] 夏天吉, 闫明珠, 王智, 等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3): 428–435.
- Xia TJ, Yan MZ, Wang Z, et al. Research progress on animal models of insomnia and evaluation methods [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(3): 428–435.
- [63] 陈弘婧. 柴胡加龙骨牡蛎汤加减对 REM 睡眠剥夺大鼠肠道菌群的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- Chen HJ. Effect of Chaihu plus Longgu Muli decoction on

intestinal flora of REM sleep deprivation rats [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2020.

- [64] 张乃文, 李梦媛, 李小黎, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对睡眠剥夺大鼠行为学、脑电活动和炎性因子的影响 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2022, 19(2): 36-41.

Zhang NW, Li MY, Li XL, et al. Effects of Caihujialonggumuli

Decoction on behavior, brain electrical activity mapping and inflammatory response of rats in sleep deprivation [J]. J Hunan Normal Univ (Med Sci), 2022, 19(2): 36-41.

[收稿日期] 2022-09-21

《中国实验动物学报》2023 年征订启事

《中国实验动物学报》由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

开设栏目:研究论著和研究快报。

读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,140 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,合计 600 元。邮发代号:2-748。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。