

张士滨,王璐,王储,等. 不同时间急性睡眠剥夺对大鼠行为学及突触生物标志物表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 55-64.

Zhang SB, Wang L, Wang C, et al. Effects of acute sleep deprivation on behavior and synaptic biomarker expression in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 55-64.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.006

不同时间急性睡眠剥夺对大鼠行为学及突触生物标志物表达的影响

张士滨¹, 王璐¹, 王储¹, 郭鹏程¹, 闫旭升², 霍东升², 杨占君²,
王艳国^{2*}, 贾建新^{2*}

(1. 内蒙古科技大学包头医学院研究生学院, 内蒙古 包头 014040;
2. 内蒙古科技大学包头医学院人体解剖学教研室, 内蒙古 包头 014040)

【摘要】 目的 探究不同时间急性睡眠剥夺对大鼠行为学及突触蛋白表达的影响。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠 70 只随机分为 7 组, 即空白对照组 (Control)、睡眠剥夺 24 h 组、48 h 组、72 h 组、96 h 组、120 h 组、144 h 组, 采用改良多平台水环境睡眠剥夺法建立大鼠睡眠剥夺模型, 通过 Morris 水迷宫检测空间学习记忆能力, 旷场实验检测大鼠焦虑状况, Nissl 染色观察大鼠海马神经元形态、数量的改变, Western blot、Real-time PCR 实验分别测定大鼠突触相关分子标志物突触素 (synaptophysin, SYN)、突触后膜致密物质 95 (post-synaptic density protein-95, PSD-95)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的表达。**结果** 与 Control 组比较, 随着睡眠剥夺时间的延长, 大鼠的站立次数和修饰行为次数均显著增加 ($P < 0.05$); 120 h、144 h 组大鼠的逃避潜伏期与上台前路程均显著增加 ($P < 0.05$), 而穿越平台次数和目标象限时间百分比均显著下降 ($P < 0.01$), 且与睡眠剥夺时间呈负相关; BDNF、SYN 及 PSD-95 蛋白/基因的表达式均随睡眠剥夺时间的延长呈明显下降趋势 ($P < 0.01$), 且与睡眠剥夺时间呈负相关。**结论** 随着睡眠剥夺时间的增加, 模型大鼠空间学习记忆损害与焦虑情绪逐渐加重, 其可能与突触相关分子标志物表达减少有关。

【关键词】 大鼠; 睡眠剥夺; 学习认知; 海马; 突触可塑性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0055-10

Effects of acute sleep deprivation on behavior and synaptic biomarker expression in rats

ZHANG Shibin¹, WANG Lu¹, WANG Chu¹, GUO Pengcheng¹, YAN Xusheng², HUO Dongsheng², YANG Zhanjun²,
WANG Yanguo^{2*}, JIA Jianxin^{2*}

(1. Graduate School of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China.

2. Department of Human Anatomy, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of acute sleep deprivation on the behavior and synaptic protein expression of rats. **Methods** Seventy healthy male Wistar rats were randomly divided into seven groups, a Control group

【基金项目】 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持计划” (NJYT-20-A08); 内蒙古自治区高等学校创新团队发展计划 (NMGIRT2328); 内蒙古自然科学基金 (2021LHMS08018); 国家自然科学基金 (81860215)。

【作者简介】 张士滨 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中枢神经系统退行性疾病的防治研究。E-mail: 17865587009@163.com

【通信作者】 王艳国 (1977—), 男, 副教授, 研究方向: 神经系统病理生理学。E-mail: wanyanguo7975@163.com

贾建新 (1981—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中枢神经系统退行性疾病的防治研究。E-mail: jiajianxindx@163.com

* 共同通信作者

and sleep deprivation groups (24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours). The sleep deprivation rat model was established by the modified multiplatform water environment sleep deprivation method. Spatial learning and memory were assessed by the Morris water maze. Anxiety was assessed by the open field test. The morphology and quantity of hippocampal neurons were observed by Nissl staining. Western blot and Real-time PCR were used to determine the expression of synaptophysin (SYN), post-synaptic density protein-95 (PSD-95), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rats. **Results** Compared with the Control group, the numbers of standing and modification were significantly increased by prolongation of the sleep deprivation time ($P<0.05$). The escape latency and path length were significantly increased in 120 and 144 h groups ($P<0.05$), whereas the number of platform crossings and the percentage of the target quadrant time were significantly decreased ($P<0.01$) and negatively correlated to the sleep deprivation time. The expression levels of BDNF, SYN, and PSD-95 were significantly decreased with the prolongation of sleep deprivation time ($P<0.01$). **Conclusions** With the increase in sleep deprivation time, cognitive dysfunction and anxiety gradually deteriorated, which may be related to decreases in the expression of synaptic biomarkers.

【Keywords】 rat; sleep deprivation; learning cognition; hippocampus; synaptic plasticity

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

睡眠是大脑清除代谢废物的一种特殊方式,对于大脑功能的维持、运行以及神经元的生长至关重要^[1-2]。《中国睡眠研究报告 2023》显示,2023 年我国居民睡眠指数得分为 67.77 分,较 2021 年(64.78 分)增加了 2.99 分,《报告》显示我国居民总体睡眠时间延长了,但仍有 16.7% 的成年人睡眠时长不足 7 h,睡眠问题仍是各国共同面临的健康问题^[3]。睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)是指各种原因导致的严重睡眠不足,普遍存在于各行各业,其主要的临床症状包括入睡困难、早醒、多梦、易惊醒等^[4-5]。长期睡眠不足可引起记忆力减退、学习能力降低、注意力不集中、情绪和行为异常、激素水平变化、免疫力降低等现象^[6-7]。

相关研究表明,睡眠剥夺与学习认知功能密切相关^[8-9]。睡眠是支持学习和记忆功能的重要生理状态,正常的睡眠-觉醒周期能够提高学习能力、巩固记忆^[10],而睡眠不足会产生记忆巩固缺陷。突触可塑性(synaptic plasticity)是指神经元间随着活动的增强或减弱,突触形态、结构及功能可以发生相应改变的能力,是哺乳动物中枢神经系统储存信息的主要机制,被认为是学习记忆活动的生物学基础^[11-14]。突触相关蛋白的表达在突触可塑性中发挥了重要的生理功能,突触后膜致密物质 95(post-synaptic density protein-95, PSD-95)是维持突触间连接、促进突触传递效能的重要支架蛋白,对突触可塑性产生重要影响^[15]。突触素(synaptophysin, SYN)是突触囊泡膜的一种特殊糖蛋白,能促进突触囊泡前移和神经递质的释放,被认为是突触前膜发育和活性的标志性蛋白^[16],脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是具有神

经营养作用的蛋白质,能够促进神经环路的发育和成熟,在突触的正常生长发育和可塑性中发挥重要作用^[17-19]。睡眠剥夺导致的学习认知功能障碍机制复杂,至今尚未阐明其确切机制,既往研究表明,学习认知功能减退与突触可塑性密切相关^[20],但不同时间急性睡眠剥夺是否通过调控突触可塑性进而影响学习认知功能鲜有报道。因此本实验通过探究不同时间急性睡眠剥夺后大鼠行为学及突触相关蛋白表达的变化,进而研究大鼠急性睡眠剥夺与学习认知功能之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 6~8 周龄 Wistar 大鼠 70 只,体重 300~320 g,购自北京斯贝福生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],所有实验动物均饲养于内蒙古科技大学包头医学院动物实验中心 SPF 级动物房[SYXK(蒙)2018-0001],温度(24.0 ± 1.0)℃,光照条件为每 12 h 昼夜交替 1 次,自由进食进水。本实验经内蒙古科技大学包头医学院伦理审查委员会批准(包医伦审 2022 第(63)号),饲养和实验过程中严格遵循 3R 原则,并给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

高效 RIPA 裂解液(R0010)、ECL Plus 超敏发光液(PE0010)、电泳缓冲液(T1070)、转膜液(D1060)、蛋白上样缓冲液(P1015)等均购自购自北京索莱宝;免疫组化试剂盒(PV-9000)购自北京中杉金桥;BCA 蛋白检测试剂盒(23227)购自美国 Thermo Scientific; PSD-95 (AB192757)、SYN (ab32127)抗体购自美国 Abcam;BDNF(48503-2)、

β -actin (52901) 购自美国 SAB; 羊抗兔二抗 (SA00001-2) 购自美国 Proteintech。

石蜡切片机(德国 Leica 公司);光学显微镜(德国 Leica 公司);旷场实验箱(上海欣软);-80℃超低温冰箱(美国 Thermo Fisher 公司);电泳仪(北京六一生物科技有限公司);脱色摇床(北京六一生物科技有限公司);蛋白凝胶成像分析系统(上海 Tanon 科技);酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及模型制备

将 70 只大鼠随机分为 7 组,即空白对照组(Control)、睡眠剥夺 24 h 组、48 h 组、72 h 组、96 h 组、120 h 组、144 h 组。采用改良多平台水环境法制备睡眠剥夺模型^[21],实验设备为长 130 cm×宽 50 cm×高 45 cm 的长方体聚乙烯树脂水箱。水箱内放置直径为 5 cm,高 20 cm 的小平台,水箱注水深度约为 18 cm,维持水温(20±1)℃。实验开始前 1 周每天将大鼠放入水箱平台上适应环境 1 h,除 Control 组外,其余各组均放置在小平台上进行睡眠剥夺。自由摄食和水,每天 12 h/12 h 明/暗交替。

1.3.2 体重变化

所有大鼠于行为学实验开始的前一天上午 8:00 统一称量体重并记录,睡眠剥夺实验开始后每天同一时间称量体重并记录。

1.3.3 Morris 水迷宫

定位航行实验:水迷宫划分为 4 个象限,平台置于第四象限内,水面高出平台约 2 cm,水温保持在(25±1)℃。记录 60 s 内大鼠找到平台时游泳的距离、时间以及游泳轨迹,未找到平台的大鼠将其引导至平台上并停留 20 s,连续训练 5 d。

空间探索实验:第 6 天把平台撤掉,记录 120 s 内穿越平台次数和目标象限停留时间百分比。

各组大鼠均在睡眠剥夺最后 1 d 结束后进行空间探索实验,24 h 组在水迷宫第 5 天进行睡眠剥夺实验;48 h 组在水迷宫第 4 天进行睡眠剥夺实验;72 h 组在水迷宫第 3 天进行睡眠剥夺实验;96 h 组在水迷宫第 2 天进行睡眠剥夺实验;120 h 组在水迷宫第 1 天进行睡眠剥夺实验;144 h 组在水迷宫实验开始前 24 h 进行睡眠剥夺实验。

1.3.4 旷场实验

实验开始时将测试大鼠依次放入旷场实验箱固定角落,使用行为分析软件记录 5 min 内大鼠的站立次数、修饰行为及次数、粪便数量等指标。实

验过程中要求环境安静,并且两次实验之间用清水和 75%乙醇酒精分别擦拭实验装置,以免上次实验动物残留信息影响下次实验结果。

1.3.5 尼氏染色

将脑组织用 4%多聚甲醛固定,脱水、包埋、切片、脱蜡至水,切片厚度为 5 μ m,尼氏染液染色、分化,无水乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,显微镜下观察神经细胞形态、数量的变化。

1.3.6 免疫组织化学染色

常规脑组织脱水、包埋、切片、脱蜡至水,高压微波抗原热修复,PBS 洗 5 min×3 次,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min,PBS 洗 5 min×3 次。一抗孵育,4℃过夜,室温复温 30 min,PBS 洗 5 min×3 次,滴加反应增强液,37℃孵育 25 min,PBS 洗 5 min×3 次,滴加增强酶标山羊抗兔 IgG 聚合物,37℃孵育 25 min,PBS 洗 5 min×3 次,DAB 显色 2 min,自来水洗,苏木精复染,上行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片。

1.3.7 蛋白免疫印迹(Western blot)

取海马组织加入蛋白 RIPA 裂解液,冰浴环境下超声匀浆,低温超速离心机离心 12 000 r/min,15 min,取上清并采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定其蛋白浓度,取 20 μ g 蛋白加蛋白上样缓冲液置于 100℃金属浴变性 5 min 制备蛋白样品并-20℃保存。提前配制浓缩胶和分离胶并安装在电泳槽内进行电泳,电泳结束后恒流转膜 2 h,取出 PVDF 膜用 5%脱脂奶粉常温封闭 2 h;将 PVDF 膜置于一抗(1:1000)中于脱色摇床 4℃过夜,1×TBST 中进行漂洗后,二抗常温孵育 2 h;利用成像分析系统扫描拍照并分析各组条带灰度值进行定量分析。

1.3.8 RT-PCR

使用 TRIzol 法提取海马组织总 RNA 并进行浓度测定。使用反转录试剂盒进行逆转录,反转录条件为 42℃ 15 min,95℃ 3 min,完成后置于-20℃保存,使用荧光定量试剂盒进行荧光定量扩增反应,反应体系为 20 μ L,反应条件为 95℃ 3 min,1 个循环,95℃ 5 s,59℃ 10 s,72℃ 15 s,40 个循环,结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 进行数据分析。引物序列见表 1,引物序列由上海生物工程有限公司合成。

1.4 统计学方法

所有实验结果均采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并用 Graphpad Prism 9.5 软件进行数据统计分析和绘图。两两比较采用 SNK-*q* 检验,多样本比较

采用单因素方差分析 (one-way ANONA), 以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间睡眠剥夺对大鼠体重的影响

急性期各组睡眠剥夺大鼠体重变化结果显示, Control 组大鼠在 0~144 h 体重未见明显变化。与 Control 组比较, 急性睡眠剥夺 24 h 后, 大鼠体重明显下降 ($P<0.05$), 48~96 h 大鼠体重维持在相对恒定的水平且呈下降趋势, 120 h 和 144 h 组大鼠体重较前下降更显著 ($P<0.05$, 图 1)。说明急性睡眠剥夺可以引起大鼠体重下降。

2.2 不同时间睡眠剥夺对大鼠空间学习记忆的影响

2.2.1 定位航行实验结果

随着定位航行实验天数的增加, 各组大鼠上台前路程和逃避潜伏期均逐渐减小。与 Control 组比较, 24 h、48 h、72 h、96 h 组上台前路程和逃避潜伏期均无显著性差异, 120 h 和 144 h 组模型大鼠上台前路程和逃避潜伏期仅在第 5 天均显著增加 ($P<0.05$, 图 2)。

2.2.2 空间探索实验结果

与 Control 组比较, 随着睡眠剥夺时间的增加, 大鼠穿越平台次数呈现逐渐减少的趋势 ($P<0.05$, 图 3A), 且与睡眠剥夺时间呈负相关 (图 3C); 与 Control 组比较, 24 h、48 h、72 h 组目标象限停留时间所占百分比无显著性差异, 但 96 h、120 h、144 h 组目标象限停留时间所占百分比呈明显下降趋势 ($P<0.01$, 图 3B), 且与睡眠剥夺时间呈负相关 (图 3D)。大鼠游泳轨迹热图显示, 随着睡眠剥夺时间的延长大鼠的游泳轨迹逐渐紊乱, 在目标象限停留的时间逐渐减少 (图 4)。上述结果表明, 睡眠剥夺

对大鼠记忆功能影响更为显著。

2.3 不同时间睡眠剥夺对大鼠焦虑行为的影响

旷场实验结果显示, 睡眠剥夺前各组大鼠站立次数、修饰次数无显著性差异。随着睡眠剥夺时间的增加, 24 h、48 h、72 h 组模型大鼠站立次数显著增多 ($P<0.05$), 而 96 h、120 h、144 h 组大鼠站立次数显著减少 ($P<0.01$)。睡眠剥夺后各组大鼠修饰次数显著增加, 其中 72 h 组尤为显著 ($P<0.01$); 至此之后, 随着睡眠剥夺时间的增加, 大鼠修饰次数逐渐减少, 但仍高于睡眠剥夺前 ($P<0.05$, 图 5)。上述结果表明, 随着睡眠剥夺时间的延长, 各组大鼠出现了焦虑情绪。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
β-actin	F: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	R: TGCTGAAGACGCCAGTGA
BDNF	F: AGGTCTGACGACGACATCACT
	R: CTTGCTTGGGCCGAACCTT
SYN	F: AGTGCCCTCAACATCGAAGTC
	R: CGAGGAGGACTAGTCACCAAC
PSD-95	F: ACCAGAAGAGTATAGCCGATTCC
	R: GGTCTTGTCGTAGTCAAACAGG

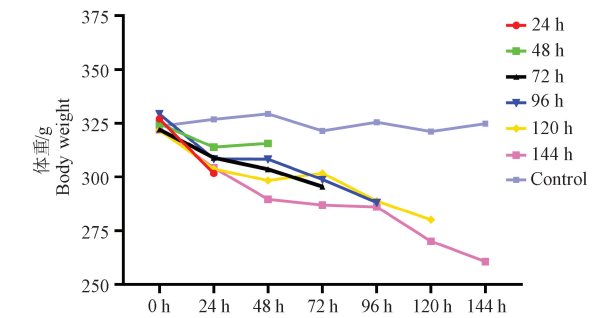


图 1 不同时间睡眠剥夺模型大鼠体重变化
Figure 1 Weight changes in rats at different times after sleep deprivation

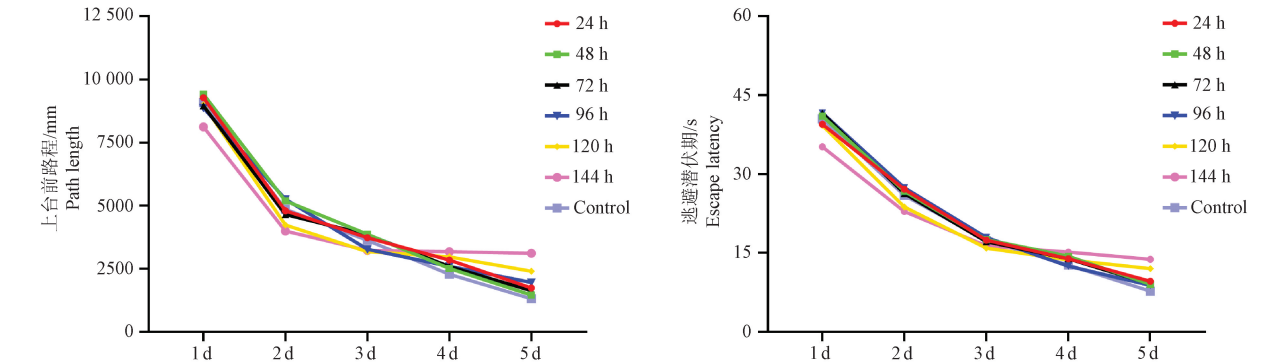
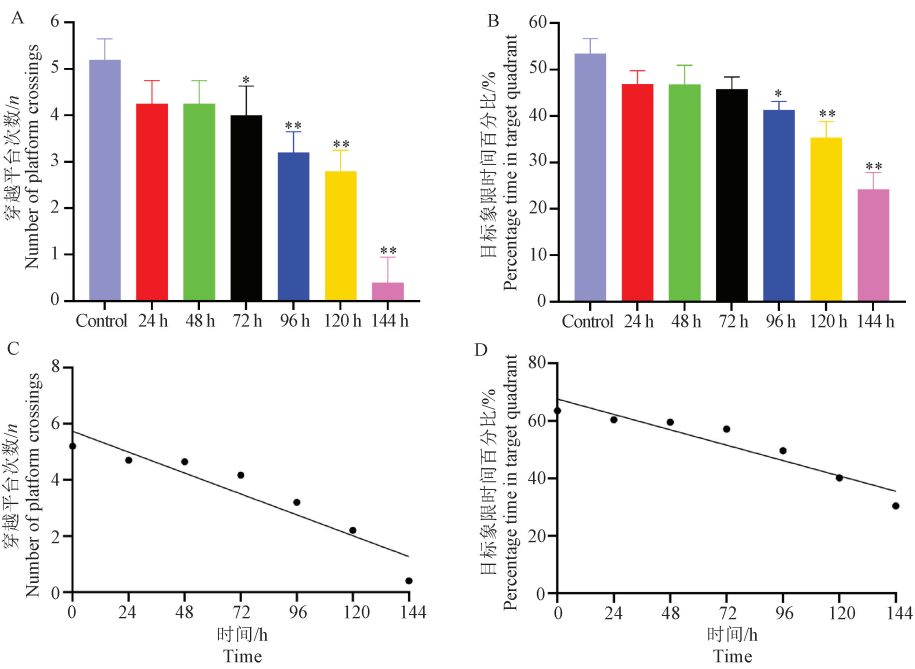


图 2 Morris 水迷宫定位航行实验结果
Figure 2 Results of Morris water maze navigation test



注:A:空间探索实验穿越平台次数;B:空间探索实验目标象限时间百分比;C:睡眠剥夺时间与穿越平台次数相关性分析;D:睡眠剥夺时间与目标象限时间百分比相关性分析。与 Control 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 Morris 水迷宫空间探索实验结果

Note. A, Number of platform crossing. B, Percentage time in target quadrant. C, Correlation analysis between sleep deprivation time and number of platform crossings. D, Correlation analysis between sleep deprivation time and target quadrant time percentage. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Results of Morris water maze space exploration test

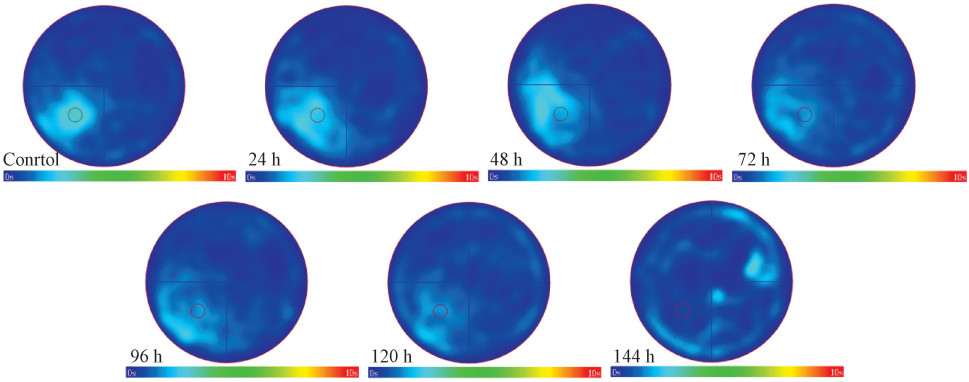


图 4 空间探索实验各组大鼠游泳轨迹热图

Figure 4 Swimming trajectory heat map of rats in each group of space exploration test

2.4 不同时间睡眠剥夺对大鼠海马 CA1 区细胞形态的影响

尼氏染色结果显示,与 Control 组比较,急性睡眠剥夺后 24 h、48 h、72 h、96 h 组大鼠海马 CA1 区神经细胞数量未见明显减少,排列整齐,轮廓清晰,尼氏体核仁深染、清晰、居中,细胞形态结构基本正常;120 h、144 h 组海马 CA1 区细胞数目较前减少,形态不规则,排列疏松紊乱,间隙增大(图 6)。

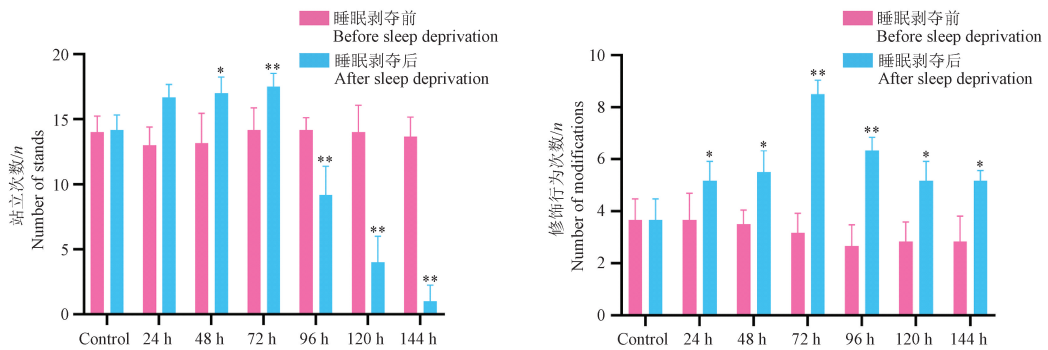
2.5 不同时间睡眠剥夺对大鼠突触相关分子标志物表达的影响

如图 7 免疫组织化学染色结果显示,与 Control

组比较,睡眠剥夺 24 h、48 h、72 h、96 h 组模型大鼠海马 CA1 区 BDNF、SYN、PSD-95 阳性细胞数未见明显减少,而 120 h、144 h 组阳性细胞表达减少($P<0.05$),且 CA1 区神经细胞排列疏松,着色浅。

图 8 所示,Western blot 检测各组大鼠海马 BDNF、SYN、PSD-95 蛋白表达量结果显示,与 Control 组比较,随着睡眠剥夺时间的增加,各组大鼠海马组织中 BDNF、SYN、PSD-95 蛋白表达量均呈下降趋势($P<0.01$),且与睡眠剥夺时间呈负相关。

如图 9 的 RT-PCR 结果显示,与 Control 组比较,随着睡眠剥夺时间的延长,各组大鼠海马组织中



注:与 Control 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 旷场实验结果

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Open field test results

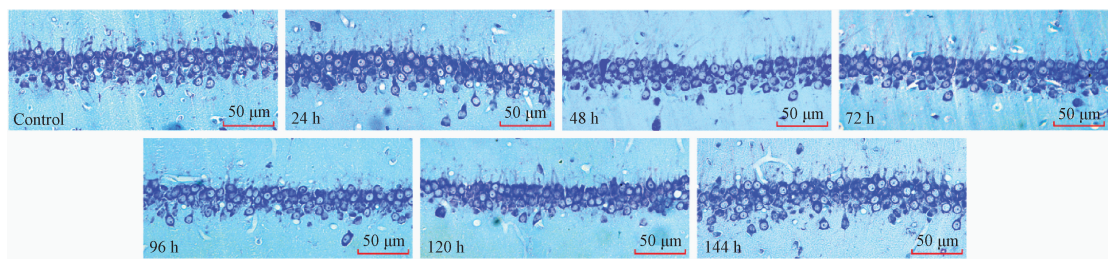


图 6 Nissl 染色观察不同时间睡眠剥夺对大鼠海马 CA1 区神经元形态、数量的影响

Figure 6 Effects of sleep deprivation at different times on the morphology and number of neurons in the CA1 region of the hippocampus in rats observed by Nissl staining

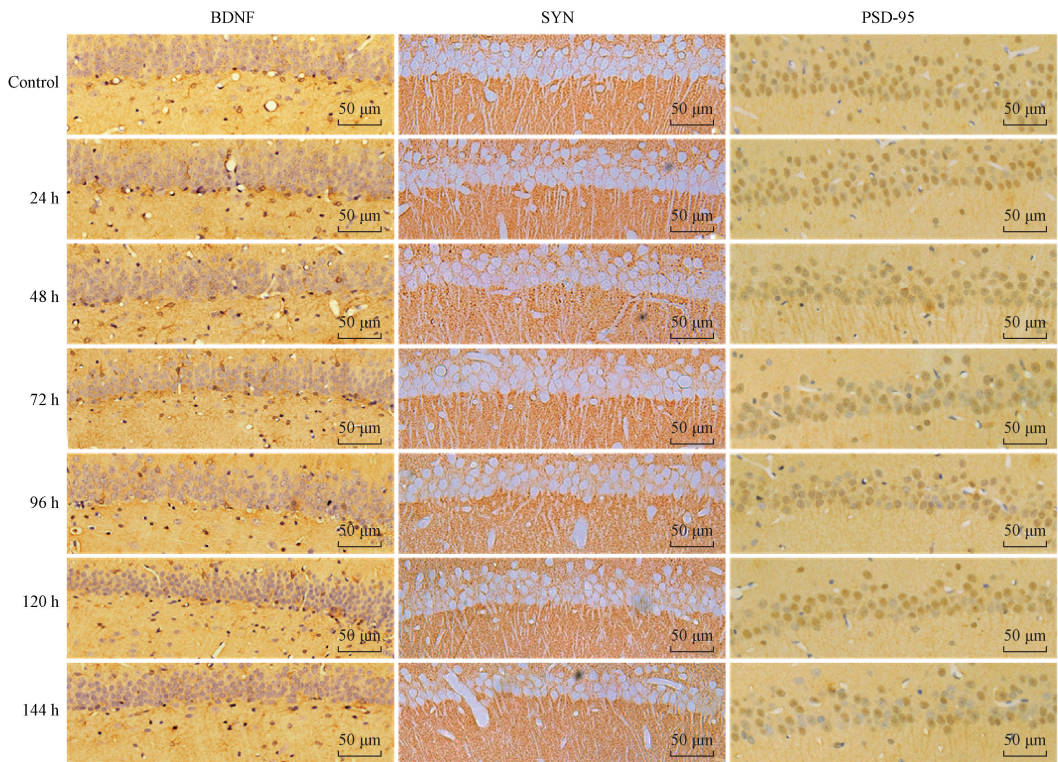
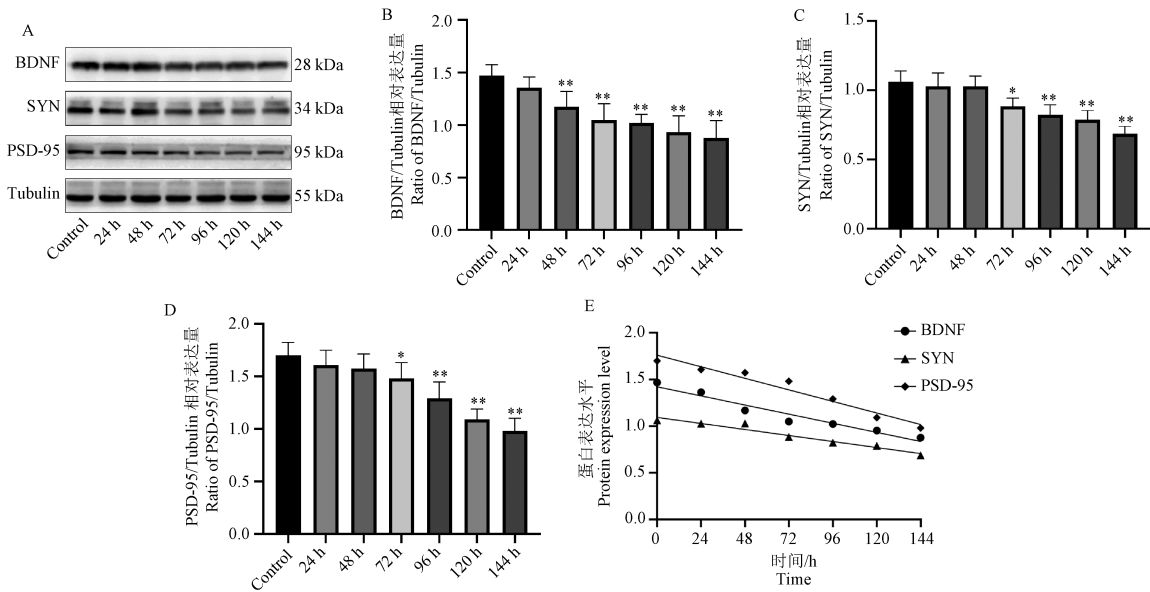


图 7 免疫组织化学染色观察不同时间睡眠剥夺对大鼠海马 CA1 区突触相关蛋白 BDNF、SYN 和 PSD-95 阳性细胞表达的影响

Figure 7 Effects of sleep deprivation at different times on the expression of synaptic related proteins BDNF, SYN and PSD-95 positive cells in the CA1 region of the hippocampus in rats observed by immunohistochemical staining

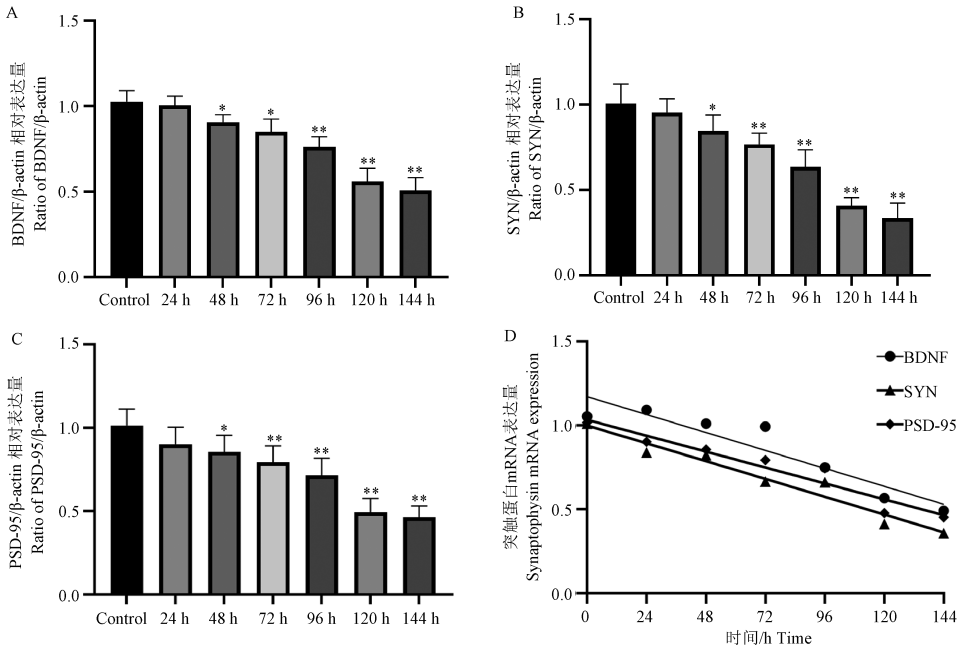


注:A:条带图片;B:BDNF 蛋白表达;C:SYN 蛋白表达;D:PSD-95 蛋白表达;E:睡眠剥夺时间与突触相关蛋白表达量的相关性分析。与 Control 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 8 Western blot 检测不同时间睡眠剥夺模型大鼠海马组织突触相关蛋白的表达

Note. A, Strip picture. B, Expression of BDNF. C, Expression of SYN. D, Expression of PSD-95. E, Correlation analysis between sleep deprivation time and synaptic related protein expression. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 8 Western blot detects the expression of synaptic related proteins of hippocampus with sleep deprivation models at different times in rats



注:A:BDNF mRNA 的表达水平;B:SYN mRNA 的表达水平;C:PSD-95 mRNA 的表达水平;D:突触蛋白 mRNA 的表达水平。与 Control 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 9 RT-PCR 检测不同时间睡眠剥夺模型大鼠海马组织突触相关蛋白基因的表达

Note. A, Expression level of BDNF mRNA. B, Expression level of SYN mRNA. C, Expression level of PSD-95 mRNA. D, Expression level of synaptophysin mRNA. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 9 RT-PCR detects the expression of synaptic related protein genes of hippocampus with sleep deprivation models at different times in rats

BDNF、SYN、PSD-95 的 mRNA 表达水平均显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)且与睡眠剥夺时间呈负相关。上述结果表明,睡眠剥夺可以导致大鼠海马组织突触相关分子标志物表达异常。

3 讨论

睡眠在中枢神经系统的正常运行中起着至关重要的作用,良好睡眠有利于学习记忆的形成与巩固^[22],而睡眠剥夺则会导致记忆功能紊乱以及认知功能下降^[8,23]。既往研究报道,睡眠剥夺可以导致学习认知功能减退,但具体机制错综复杂,至今尚未明确。突触可塑性是突触的形态和功能发生较为持久改变的特性,长期以来一直被认为是学习和记忆的重要组成部分^[12]。突触相关蛋白的表达在增强突触传递效能中发挥了重要作用,是构成突触可塑性重要的生物学基础^[24]。

最近的相关研究报道主要集中在药物干预对急、慢性睡眠剥夺诱导的学习认知功能障碍,但睡眠剥夺导致学习认知功能障碍的确切机制研究鲜有报道,本实验通过改良多平台水环境法制备大鼠睡眠剥夺模型,探究不同时间睡眠剥夺是否通过调控突触相关标志物的表达影响突触可塑性,进而导致睡眠剥夺模型大鼠学习认知功能减退。结果显示,睡眠剥夺后大鼠站立次数和修饰次数逐渐增加,出现易激惹、互相撕咬等焦虑样行为,随着睡眠剥夺时间的延长,大鼠站立次数和修饰次数均呈升高的趋势且在 72 h 达高峰,96 h、120 h、144 h 呈逐渐下降趋势,表明大鼠对新鲜事物探索的好奇心减弱,兴奋性降低,焦虑情绪增加。Liu 等^[25]研究发现改良多平台法诱导的急性反常睡眠剥夺持续 6 h 可导致小鼠焦虑样行为,与本研究结果一致。Morris 水迷宫定位航行实验中,120 h、144 h 组逃避潜伏期和上台前路程增加,可能是由于随着睡眠剥夺时间的延长,大鼠体力不支、耐力下降导致的;在空间探索实验中,大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间百分比随睡眠剥夺时间的延长呈明显下降趋势且呈负相关。此外,本研究结果发现随着睡眠剥夺时间的增加,动物的学习能力(大鼠逃避潜伏期和上台前路程)没有明显改变,但记忆功能(大鼠目标象限停留时间百分比和穿越平台次数)呈明显下降趋势,且与睡眠剥夺时间呈负相关,由此表明,睡眠剥夺可能对大鼠记忆功能的影响更为显著。

Zhou 等^[26]研究结果显示,睡眠剥夺可以导致

海马神经元数量减少,诱导海马神经元损伤,异槲皮素通过抑制 NLRP3 诱导的焦亡来减轻睡眠剥夺依赖性海马神经元损伤改善学习认知功能。本研究结果中各组大鼠海马神经元形态和结构未发生明显改变,但结合 Morris 水迷宫、Western blot 和 RT-PCR 结果推测,急性睡眠剥夺短期内对海马神经细胞形态和结构不会产生明显改变,但其功能发生了变化,主要表现为大鼠记忆能力明显减退。

突触与学习认知功能密不可分,突触可塑性是学习记忆形成的神经基础^[27],研究表明,蒙药珍宝丸通过促进 PSD-95 的合成,修复 PSD 结构来维持长时程增强的功能,进而改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆能力^[28]。相关文献报道,SAMP8 小鼠大脑内 BDNF 的表达下降,突触传递效能减低,上调 BDNF 的表达可以有效增强突触可塑性,改善学习认知功能^[29]。研究发现,SYN 表达的增加能够增强大鼠的学习记忆能力^[30-31]。Pei 等^[32]研究认为,睡眠剥夺大鼠空间记忆缺陷与海马神经元突触可塑性有关。本实验 Western blot 和 RT-PCR 结果均显示突触可塑性相关蛋白 BDNF、SYN、PSD-95 的表达随着睡眠剥夺时间的增加呈逐渐下降的趋势且呈负相关,本研究发现,睡眠剥夺主要通过影响突触相关蛋白的表达进而影响动物的空间学习记忆功能。

随着睡眠剥夺时间的增加,当达到 120 h、144 h 时大鼠进食量减少、体重减轻、情绪暴躁、出现攻击行为,部分大鼠出现血尿、血便,并且落水频率增加,不能稳定站立于平台上,出现溺水而亡。故推测大鼠死亡原因可能与睡眠剥夺时间过长食欲素分泌紊乱、体力不支、消化系统功能紊乱等有关。后期仍需进行相关实验进行验证。

综上所述,急性睡眠剥夺可增加大鼠焦虑样情绪,导致学习认知功能下降,其可能与突触生物标志物表达降低有关。

参考文献:

- [1] XIE L, KANG H, XU Q, et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain [J]. Science, 2013, 342 (6156): 373-377.
- [2] EIDE P K, VINJE V, PRIPE A H, et al. Sleep deprivation impairs molecular clearance from the human brain [J]. Brain, 2021, 144 (3): 863-874.
- [3] 何静文, 苏彤, 唐云翔. 关注睡眠, 关爱健康:《中国睡眠研究报告 2023》解读 [J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(11): 1261-1267.

- HE J W, SU T, TANG Y X. Care for sleep, care for health; interpretation of Annual Sleep Report of China 2023 [J]. Acad J Nav Med Univ, 2023, 44(11): 1261-1267.
- [4] HÄRMÄ M, TENKANEN L, SJÖBLOM T, et al. Combined effects of shift work and life-style on the prevalence of insomnia, sleep deprivation and daytime sleepiness [J]. Scand J Work Environ Health, 1998, 24(4): 300-307.
- [5] SALEHPOUR F, FARAJDOKHT F, ERFANI M, et al. Transcranial near-infrared photobiomodulation attenuates memory impairment and hippocampal oxidative stress in sleep-deprived mice [J]. Brain Res, 2018, 1682: 36-43.
- [6] LEWIS L D. The interconnected causes and consequences of sleep in the brain [J]. Science, 2021, 374(6567): 564-568.
- [7] LO J C, CHONG P L, GANESAN S, et al. Sleep deprivation increases formation of false memory [J]. J Sleep Res, 2016, 25(6): 673-682.
- [8] KILLGORE W D. Effects of sleep deprivation on cognition [J]. Prog Brain Res, 2010, 185: 105-129.
- [9] ZHU Y, GONG S. Research progress in the effect of sleep deprivation on working memory and its mechanisms [J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2023, 54(2): 240-245.
- [10] 李运, 王海云. Homer1a 在睡眠剥夺损伤学习和记忆功能中的研究进展 [J]. 临床麻醉学杂志, 2021, 37(8): 891-894. LI Y, WANG H Y. Research progress of Homer1a in learning and memory impairment induced by sleep deprivation [J]. J Clin Anesthesiol, 2021, 37(8): 891-894.
- [11] 左昕, 潘奇波, 林春辉. 学习记忆中长时记忆形成的分子机制 [J]. 海军医学杂志, 2008, 29(4): 364-366. ZUO X, PAN Q B, LIN C H. Molecular mechanism of long-term memory formation in learning and memory [J]. J Navy Med, 2008, 29(4): 364-366.
- [12] MAGEE J C, GRIENBERGER C. Synaptic plasticity forms and functions [J]. Annu Rev Neurosci, 2020, 43: 95-117.
- [13] MANSVELDER H D, VERHOOG M B, GORIUNOVA N A. Synaptic plasticity in human cortical circuits: cellular mechanisms of learning and memory in the human brain? [J]. Curr Opin Neurobiol, 2019, 54: 186-193.
- [14] BIN IBRAHIM M Z, BENOY A, SAJIKUMAR S. Long-term plasticity in the hippocampus: maintaining within and ‘tagging’ between synapses [J]. FEBS J, 2022, 289(8): 2176-2201.
- [15] COMPANS B, CAMUS C, KALLERGI E, et al. NMDAR-dependent long-term depression is associated with increased short term plasticity through autophagy mediated loss of PSD-95 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2849.
- [16] WANG X, HUANG X, YANG M, et al. Tongxinluo promotes axonal plasticity and functional recovery after stroke [J]. Transl Neurosci, 2020, 11(1): 428-438.
- [17] VON BOHLEN UND HALBACH O, VON BOHLEN UND HALBACH V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function [J]. Cell Tissue Res, 2018, 373(3): 729-741.
- [18] KOWIANSKI P, LIETZAU G, CZUBA E, et al. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity [J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(3): 579-593.
- [19] KEIFER J. Regulation of AMPAR trafficking in synaptic plasticity by BDNF and the impact of neurodegenerative disease [J]. J Neurosci Res, 2022, 100(4): 979-991.
- [20] 刘心朗, 周丽丽, 杨占君, 等. 肉苁蓉总苷对 SAMP8 小鼠学习记忆能力及突触可塑性的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 110-115, 276-277. LIU X L, ZHOU LL, YANG Z J, et al. Effects of glycosides of *Cistanche* on cognitive function and synaptic plasticity in SAMP8 mice [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(1): 110-115, 276-277.
- [21] 王若冲, 戴宁, 李儒婷, 等. 平台水环境法构建人类疾病动物模型的应用与思考 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(22): 205-213. WANG R C, DAI N, LI R T, et al. Application and thinking of platform method in construction of animal model of human disease [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(22): 205-213.
- [22] REYES-RESINA I, SAMER S, KREUTZ M R, et al. Molecular mechanisms of memory consolidation that operate during sleep [J]. Front Mol Neurosci, 2021, 14: 767384.
- [23] NABAE E, KESMATI M, SHAHRIARI A, et al. Cognitive and hippocampus biochemical changes following sleep deprivation in the adult male rat [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 69-76.
- [24] HENLEY J M, SEAGER R, NAKAMURA Y, et al. SUMOylation of synaptic and synapse-associated proteins: an update [J]. J Neurochem, 2021, 156(2): 145-161.
- [25] LIU H, HUANG X, Li Y, et al. TNF signaling pathway-mediated microglial activation in the PFC underlies acute paradoxical sleep deprivation-induced anxiety-like behaviors in mice [J]. Brain Behav Immun, 2022, 100: 254-266.
- [26] ZHOU H, WU J, GONG Y, et al. Isoquercetin alleviates sleep deprivation dependent hippocampal neurons damage by suppressing NLRP3-induced pyroptosis [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44(5): 766-772.
- [27] FENG Y, SHI R, HU J, et al. Effects of neural-derived estradiol on actin polymerization and synaptic plasticity-related proteins in prefrontal and hippocampal cells of mice [J]. Steroids, 2022, 177: 108935.
- [28] 周芮. 蒙药珍宝丸改善大鼠睡眠剥夺所致海马氧化应激及突触可塑性的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021. ZHOU R. Improvement of Mongolian Zhenbao Pills on Hippocampus Oxidative Stress and Synaptic Plasticity in Sleep Deprivationinduced Rats [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2021.
- [29] LIAN W W, ZHOU W, ZHANG B Y, et al. DL0410 ameliorates cognitive disorder in SAMP8 mice by promoting mitochondrial dynamics and the NMDAR-CREB-BDNF pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(7): 1055-1068.
- [30] YAO Y, WANG F, YANG X, et al. Bombesin attenuated

ischemia-induced spatial cognitive and synaptic plasticity impairment associated with oxidative damage [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 87-93.

[31] DANDI E, KALAMARI A, TOULOUMI O, et al. Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress [J]. Int J Dev Neurosci, 2018, 67: 19-32.

[32] 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.

[收稿日期] 2023-10-15



《中国比较医学杂志》不接受重复投稿说明

本刊严格执行国家有关科研诚信建设的相关规定及标准,包括但不限于《CY/T 174-2019:学术出版规范 期刊学术不端行为界定》、《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》(国务院公报 2018 年第 17 号)、《发表学术论文“五不准”》(科协发组字〔2015〕98 号)等,严肃对待各种学术不端行为。

本刊不接受重复发表(包括不同语种),也不允许作者一稿多投。具体表现形式包括:
重复发表:

- a) 不加引注或说明,在论文中使用自己(或自己作为作者之一)已发表文献中的内容。
- b) 在不做任何说明的情况下,摘取多篇自己(或自己作为作者之一)已发表文献中的部分内容,拼接成一篇新论文后再次发表。
- c) 被允许的二次发表不说明首次发表出处。
- d) 不加引注或说明地在多篇论文中重复使用一次调查、一个实验的数据等。
- e) 将实质上基于同一实验或研究的论文,每次补充少量数据或资料后,多次发表方法、结论等相似或雷同的论文。

f) 合作者就同一调查、实验、结果等,发表数据、方法、结论等明显相似或雷同的论文。
一稿多投:

- a) 将同一篇论文同时投给多个期刊。
- b) 在首次投稿的约定回复期内,将论文再次投给其他期刊。
- c) 在未接到期刊确认撤稿的正式通知前,将稿件投给其他期刊。
- d) 将只有微小差别的多篇论文,同时投给多个期刊。
- e) 在收到首次投稿期刊回复之前或在约定期内,对论文进行稍微修改后,投给其他期刊。
- f) 在不做任何说明的情况下,将自己(或自己作为作者之一)已经发表论文,原封不动或做些微修改后再次投稿。

若存在以上问题,一经查实,编辑部有责任揭露,给予书面警告,拒绝发表有其署名的文稿,通知其所在单位,并在我刊公开曝光。

《中国比较医学杂志》编辑部