

· 论 著 ·

快速眼球转动期睡眠剥夺对大鼠学习、记忆能力及其海马组织脑源性神经营养因子表达的影响

叶晨静, 赵忠新* (第二军医大学长征医院神经内科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 观察快速眼球转动期睡眠剥夺(RSD)及恢复睡眠(RS)对大鼠海马脑源性神经营养因子(BDNF)表达及学习、记忆能力的影响。**方法:** 大鼠分为空白对照组、环境对照组、RSD 1 d组、RSD 3 d组、RSD 5 d组、RSD 7 d组以及RSD 7 d后RS 6 h、RS 12 h组, 每组12只; RSD大鼠模型采用改良多平台法建立。Y-型迷宫试验评定各组大鼠学习、记忆能力; 实时定量RT-PCR及免疫组化方法检测各组大鼠海马区BDNF mRNA及蛋白表达水平。**结果:** Y-型迷宫评定结果表明RSD各组以及RS 6 h、12 h组错误反应次数明显高于空白对照组和环境对照组($P < 0.05$); 与空白对照组相比, RSD 1 d、3 d大鼠总反应时间降低($P < 0.05$), RSD 7 d组明显增加($P < 0.05$)。与空白对照组相比, RSD 1 d组大鼠海马BDNF mRNA表达明显上升($P < 0.05$), RSD 3 d组达到高峰($P < 0.01$)。RSD 1 d、3 d组海马CA1、CA3、齿状回区以及RSD 5 d、RS 6 h组齿状回区BDNF蛋白表达显著高于空白对照组($P < 0.05$)。**结论:** 睡眠剥夺会导致机体学习、记忆能力下降, RS后可部分改善; 机体可能会通过促进BDNF表达来代偿相对较短时间的睡眠剥夺, 保护自身的认知能力, 然而随着剥夺时间的延长, 这种代偿机制也会被打破。

[关键词] 睡眠剥夺; 脑源性神经营养因子; 海马; 学习; 记忆

[中图分类号] R 395.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0082-05

Effects of rapid eye movement sleep deprivation on cognitive function and expression of brain-derived neurotrophic factor in rat hippocampus

YE Chen-jing, ZHAO Zhong-xin* (Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of various degrees of rapid eye movement (REM) sleep deprivation (RSD) and sleep recovery on cognitive function (learning and memory) and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat hippocampus. **Methods:** Male SD rats were divided into 8 groups ($n=12$): blank control group (with normal sleep), environmental control, RSD 1 d, RSD 3 d, RSD 5 d, RSD 7 d, recover sleep 6 h after 7 d RSD (RS 6 h), and recover sleep 12 h after 7 d RSD (RS 12 h). The modified multiple platform method (MMPM) was used to establish sleep deprivation model in rats. The cognitive functions of rats were tested by Y-type maze. The hippocampal BDNF mRNA and protein levels were detected by real-time PCR and immunohistochemical method. **Results:** The failure reaction times of all RSD groups and the 2 RS groups were significantly more than those in control group and environmental control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the total reaction time in RSD 1 d, 3 d groups was significantly lower ($P < 0.05$), but that of RSD 7 d group was significantly higher ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, expression of BDNF mRNA was significantly increased in RSD 1 d group ($P < 0.05$), and reached the peak in RSD 3 d group. The protein expression of BDNF in CA1, CA3, and dentate gyrus areas of RSD 1 d, 3 d groups and in the dentate gyrus area of RSD 5 d and RS 6 h groups was significantly higher than that of blank control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Short-time RSD can lead to decrease of learning and memory ability, and recovery of sleep can partially improve their ability. The increase of BDNF expression may compensate the result of sleep deprivation and protect the cognitive function. However, as the prolongation of deprivation time, the compensation may become invalid.

[KEY WORDS] sleep deprivation; hippocampus; brain-derived neurotrophic factor; learning; memory

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 82-86]

睡眠是机体的正常生理需要, 能增强机体的学习能力, 强化和巩固对复杂事物的记忆。长期的睡眠剥夺会对机体产生不良的生理和心理影响, 不同程度的损害机体的认知功能, 但目前睡眠剥夺导致认知功能障碍的具体机制尚不清楚。以往研究^[1-3]表明在整个睡眠阶段中, 快速眼球转动期睡眠对学

[基金项目] 国家自然科学基金(30270487); 第二军医大学长征医院“三重三优”学科人才建设基金。Supported by National Natural Science Foundation of China(30270487) and the Key Superior Program of Changzheng Hospital.

[作者简介] 叶晨静, 硕士。现在上海交通大学医学院附属瑞金医院特需科, 上海 200025。E-mail: karycyj@126.com

* Corresponding author. E-mail: zhaozx@medmail.com.cn

习和记忆的影响更大。本研究通过建立快速眼球转动期睡眠剥夺快速眼球转动模型,观察快速眼球转动期睡眠剥夺(RSD)不同时间及恢复睡眠(RS)后对大鼠学习、记忆能力及其海马组织脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响,探讨快速眼球转动期睡眠剥夺引起认知功能障碍的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验大鼠的选择及分组 选取健康雄性SD大鼠(复旦大学实验动物中心),体质量200~250 g。将大鼠放在平台上每天适应1 h,适应1周后对大鼠进行认知功能测定,筛选出活跃、对电击反应敏感、逃避反应迅速的大鼠,淘汰反应迟钝或特别敏感的大鼠。筛选出的96只大鼠随机分为8组:空白对照组(正常睡眠)、环境对照组、RSD 1 d、RSD 3 d、RSD 5 d、RSD 7 d组以及RSD 7 d后RS 6 h、RS 12 h组,每组12只。RSD 1 d~7 d组大鼠在人工光照下饲养7 d后,采用改良多平台法^[4]剥夺大鼠睡眠,剥夺期间给予大鼠正常进食和饮水,每天光照时间12 h(8:00~20:00);RS 6 h、12 h组采用改良多平台法剥夺睡眠7 d后分别进行睡眠恢复6 h、12 h;空白对照组大鼠正常睡眠;环境对照组采用与睡眠剥夺组大小一样的鼠箱,但在其底部并不放置平台,而是放置一面细密铁丝网,把大鼠放在网上,网下置水至离网格1 cm,以形成与睡眠剥夺组类似的环境,其他条件均与睡眠剥夺组相同。

1.2 Y型迷宫试验评价大鼠学习、记忆能力 对各组大鼠进行Y型迷宫试验^[5],记录大鼠1个实验日内所有的错误次数总和即错误反应次数和所有反应时间总和即总反应时间。比较各组大鼠的错误反应次数和总反应时间指标评价大鼠空间辨别的学习记忆能力。

1.3 实时定量 RT-PCR 法测定海马组织 BDNF mRNA 表达 各组6只大鼠在相应时间点断头取出海马组织,液氮冷冻,-80℃深低温保存备用。

1.3.1 总 RNA 的提取 采用 TRIzol 法抽提总 RNA。取海马组织 5 mg,加入 100 μ l 的 TRIzol 试剂(Invitrogen Life Technologies),用电动匀浆器进行匀浆。匀浆后于 15~30℃ 孵育 5 min,再加入 20 μ l 的氯仿,盖紧管盖,手动剧烈振荡管体 15 s 后,15~30℃ 孵育 3 min,4℃ 下 12 000 \times g 离心 15 min。

离心后混合液体分为下层的红色酚氯仿相、中间层和上层的无色水相。将水相转移到新离心管中,加 50 μ l 的异丙醇,混匀后 15~30℃ 孵育 10 min 后,于 4℃ 12 000 \times g 离心 10 min,移去上清液,加入至少 100 μ l 的 75% 乙醇,振荡后,4℃ 7 500 \times g 离心 5 min,去除乙醇溶液,空气中干燥 RNA 沉淀 5~10 min,加入无 RNA 酶的水溶解 RNA,然后 55~60℃ 孵育 10 min,保存于-70℃。RNA 在紫外线分光光度仪下检测光密度值 D_{260} 和 D_{280} 以计算提取的 RNA 浓度,判断纯度。

1.3.2 引物的设计 根据 GenBank 序列资料,由 Primer Premier 5.0 软件设计了相应引物,交上海康成生物工程公司合成。BDNF 上游引物:5'-TTA GCG AGT GGG TCA CAG CG-3';下游引物:5'-ATT GGG TAG TTC GGC ATT GC-3',扩增产物长度为 207 bp。 β -actin 上游引物:5'-CCT GTA CGC CAA CAC AGT GC-3';下游引物:5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3',扩增产物长度为 211 bp。

1.3.3 cDNA 合成 取 RNA 5 μ g 加入 3.5 μ mol/L Oligo^{dt} 引物 1 μ l,再加入无 RNA 酶的 H₂O 至总体积 10 μ l,混合液在 70℃ 水浴 3 min,37℃ 放置 10 min;配制 RT 反应液,5 \times RT 缓冲液 4 μ l、2.5 mmol/L dNTP 混合液 4 μ l、RNA 酶抑制剂(Promega)1 μ l、MMLV 反转录酶(Promega)1 μ l,混合后 37℃ 恒温 1 min;加 10 μ l 的 RT 反应液到 10 μ l 退火混合物中,37℃ 水浴 60 min,加热到 95℃ 维持 5 min。得 RT 终溶液即为 cDNA 溶液,置冰浴待用。

1.3.4 实时定量 PCR 取 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l,加入 MgCl₂ 溶液 3 μ l,dNTP 混合液 3 μ l,Taq 聚合酶(Promega)3 U,Sybergreen 终浓度 6.25 μ l,加入 BDNF 特异性引物 1 μ l,cDNA 1 μ l,加水至总体积为 25 μ l,轻弹管底将溶液混合,5 000 r/min($r=8.5$ cm)短暂离心,然后将配制好的 PCR 反应溶液置于实时 PCR 仪(Rotor-Gene 3000 Realtime PCR 仪,Corbett Research 公司)上进行 PCR 反应,得出实时定量测定值。PCR 反应条件:94℃ 预变性 1 min,94℃ 变性 40 s,57℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 个 PCR 循环,反应终末 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物与 100 bp DNA Ladder(华美生物工程公司)在 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,检测 PCR 产物是否为单一特异性扩增条带。

1.4 免疫组织化学染色检测海马组织 BDNF 的表达 每组 6 只大鼠麻醉后,经 4%多聚甲醛灌注 2 h,断头取脑,后固定 48 h。脱水透明,浸蜡,包埋,切片,片厚 4 μm。免疫组化:SP 法(浓缩型 SP 试剂,华美生物工程公司),羊抗鼠(C-19, Santa Cruz Biotechnology)。常规脱蜡至水, PBS 洗 3 min×3 次,加 0.3% H₂O₂ 20 min, PBS 洗 3 min×3 次, 98℃ 20 min 进行抗原修复,室温冷却, PBS 洗 3 min×3 次,加 BDNF 一抗(1:100)羊抗鼠, 4℃ 过夜。 PBS 洗 3 min×3 次,加 b-兔抗羊(1:200) 37℃ 30 min, PBS 洗 3 min×3 次,加 Streptavidin-HRP(1:200) 37℃ 30 min, PBS 洗 3 min×3 次。0.04% 二氨基联苯胺镍法(DAB)+0.03% 过氧化氢(H₂O₂)显色 8~12 min,水洗。苏木精衬染 1 min,水洗。常规树脂封片,观察。定量分析:每张切片中海马区至少分析 3 个视野,采用 IMS 细胞图像分析系统测量免疫组化

图像中阳性区域面积、阳性比率以及光密度值(D)。 1.5 统计学处理 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$,所有结果均用 SAS 6.12 统计软件进行完全随机方差分析和最小显著差法比较。

2 结果

2.1 Y 型迷宫试验结果 RSD 1 d~7 d 组随着睡眠剥夺时间的延长,大鼠错误反应次数逐渐增加,在 RSD 7 d 组达到最高值,各组均明显高于空白对照组($P < 0.05$);而在恢复 6 h 及 12 h 的睡眠后(RS 6 h, 12 h 组),错误反应次数逐渐下降,但仍高于空白对照组($P < 0.05$);环境对照组和空白对照组之间无显著差异。

与空白对照组相比, RSD 1 d、RSD 3 d 组大鼠总反应时间明显降低($P < 0.05$), RSD 7 d 组明显增加($P < 0.05$),其余各组无明显变化。详见表 1。

表 1 各组大鼠学习、记忆能力的测定结果及其海马区 BDNF mRNA 及蛋白的表达水平
Tab 1 Measurements of cognitive function and hippocampal BDNF expression in different groups

Group	EN (n=12)	TRT (n=12, t/s)	BDNF mRNA (n=6, ×10 ⁻⁴)	BDNF protein(n=6, %)		
				CA1	CA3	Gyrus dentatus
Blank control	4.50±1.73	47.58±6.63	4.91±0.19	9.83±1.17	10.00±2.00	9.67±1.51
Tank control	4.58±1.78	47.67±7.23	4.88±0.11	10.00±1.41	9.67±1.86	9.83±1.60
RSD 1 d	8.08±1.08*	43.00±5.77*	6.88±0.14*	13.50±1.52*	13.83±1.33*	13.83±1.33*
RSD 3 d	13.83±2.25*	42.75±5.80*	7.32±0.53**	16.83±1.32*	16.67±2.16*	17.00±0.89*
RSD 5 d	14.17±2.48*	48.42±7.22	5.22±0.20	11.67±2.25	12.17±2.48	12.00±2.61*
RSD 7 d	18.25±1.86*▲	58.25±5.61*	4.99±0.24	10.00±1.79	10.17±2.23	10.33±1.51
RS 6 h	9.00±1.60*▲	45.25±4.90	5.26±0.64	11.67±1.51	12.00±2.37	11.83±1.60*
RS 12 h	7.83±2.76*	47.17±5.15	4.94±0.53	11.00±1.55	11.17±1.47	11.50±1.37

BDNF protein was indicated by positive signal density of BDNF expression in rat hippocampal tissue in different groups. EN: Error number; TRT: Total reaction time. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank control group

2.2 大鼠海马组织 BDNF mRNA 的表达 各组大鼠海马组织在 207 bp 处均可见一特异性条带,与预期结果一致(图 1)。与空白对照组相比, RSD 1 d 组海马组织 BDNF mRNA 表达明显升高($P < 0.05$), RSD 3 d 组达高峰($P < 0.01$); RSD 5 d 组 BDNF 表达下降, RSD 7 d 组降至基线水平,二者与空白对照组均无显著差异; RS 6 h 组和 RS 12 h 组表达虽有所上升,但与空白对照组无显著差异;环境对照组和空白对照组之间无显著差异。详见表 1。

2.3 大鼠海马组织 BDNF 蛋白的表达

2.3.1 一般染色结果 BDNF 免疫反应阳性产物

为神经元胞质内褐色沉淀物,见于海马 CA1 的锥体细胞层、辐射层, CA3 的透明层及齿状回的颗粒细胞层、分子层,阳性细胞呈锥形或椭圆形。空白对照组阳性染色细胞较少,染色较浅,而 RSD 3 d 组阳性染色细胞较多,染色较深。详见图 2。

2.3.2 定量检测结果 与空白对照组相比, RSD 1 d、3 d 组海马组织 CA1、CA3 和齿状回区 BDNF 表达显著升高($P < 0.05$), RSD 7 d 组以及 RS 12 h 组无显著变化, RSD 5 d 及 RS 6 h 组海马齿状回区稍升高($P < 0.05$), CA1、CA3 区无显著差异;空白对照组和环境对照组之间相比无明显差异。详见表 1。

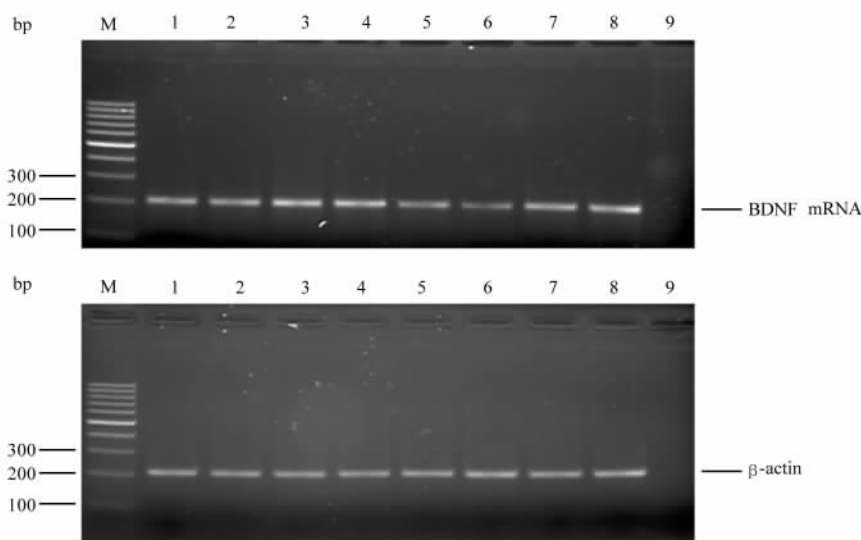


图 1 各组大鼠海马组织 BDNF mRNA 实时定量 PCR 凝胶电泳图

Fig 1 Real-time PCR electrophoresis of BDNF mRNA in different groups

M: Marker; 1: Blank control; 2: Tank control; 3: RSD 1 d; 4: RSD 3 d; 5: RSD 5 d; 6: RSD 6 d; 7: RS 6 h; 8: RS 12 h; 9: Negative

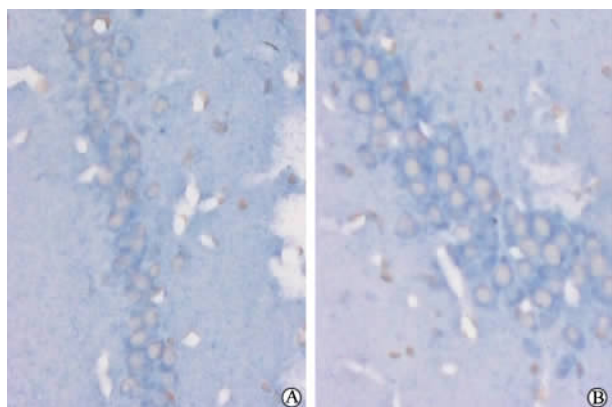


图 2 空白对照组(A)和 RSD 3 d 组(B)
大鼠海马组织 BDNF 染色阳性结果

Fig 2 Hippocampal BDNF immunopositive neurons in blank control group(A) and RSD 3 d group(B)(SP, ×200)

3 讨论

睡眠剥夺会导致机体中枢神经系统发生广泛的病理生理变化,主要表现为脑细胞能量代谢异常、细胞形态结构的改变、神经元内多种基因表达的变化以及神经元可塑性降低,而神经元可塑性降低直接表现为机体学习、记忆能力的减退^[6-7],但具体的损伤机制还不很明确。

3.1 BDNF 调节突触功能的机制 以往学者认为神经生长因子对发育成熟的神经元不产生作用,但近年来研究^[8]发现,神经生长因子不仅在成熟后的神经系统广泛存在,而且能够修复损伤后神经元,延

缓甚至阻止其死亡,也可调节许多神经系统功能,包括突触可塑性和神经递质传递等。BDNF 是 1982 年从猪脑的提取物中分离得到的一种细胞外因子,由 120 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 12 000。研究发现其能介导突起生长,改变神经系统递质表型,改变树突形态,参与突触可塑性的调节,从而调节突触功能;其表达严格受神经元活动调节,对突触的传递和神经元信号的转导可产生确切的效果。

NMDA 受体是突触可塑性的关键分子开关^[9],它的早期活化对于各种记忆来说都是必需的。Kovalchuk 等^[10]发现外源性 BDNF 可激活突触后 BDNF 特异性受体 TrkB,进而激活谷氨酸 NMDA 受体,加强机体记忆能力。长时程增强电位(LTP)目前被认为是学习记忆的重要物质基础,能诱导形成新的突触联系或促进原有突触连接和生长,是突触可塑性的客观指标之一。BDNF 既能作用于突触前膜产生 LTP,也可与突触后膜 TrkB 结合诱导产生 LTP,而当外源性的 BDNF 被清除后 LTP 可被阻断^[11-12]。Kiprianova 等^[13]报道脑缺血后脑室内注射 BDNF 可以明显改善工作记忆和对照记忆。这证实 BDNF 对突触传递和认知功能具有确切的保护效应,也提示可以应用外源性 BDNF 来加强记忆能力。

3.2 睡眠剥夺对大鼠学习、记忆能力及 BDNF 表达的影响 Cirelli 等^[14]发现大鼠完全睡眠剥夺 8 h 后 BDNF 表达高于正常睡眠组;Hairston 等^[15]发现

幼年大鼠部分睡眠剥夺 12 h 后,其皮质、海马组织 BDNF 表达升高。本研究结果表明 RSD 1 d~7 d 组随着睡眠剥夺时间的延长,大鼠错误反应次数逐渐增加,在 RSD 7 d 组达到最高值,均明显高于空白对照组($P < 0.05$);而在恢复 6 h 及 12 h 的睡眠后错误反应次数逐渐下降,但仍高于空白对照组($P < 0.05$);与空白对照组相比,RSD 1 d、3 d 组大鼠总反应时间明显降低,RSD 7 d 组明显增加($P < 0.05$)。研究还发现 RSD 1 d 组大鼠海马组织 BDNF 表达升高,RSD 3 d 组达到高峰,RSD 5 d、7 d 组逐渐趋于基线水平,RS 后表达又有上调趋势。提示相对较短时间的睡眠剥夺会导致 BDNF 表达的增加,这反映了机体的某种代偿保护机制。然而随着睡眠剥夺时间的延长,这种代偿机制也被打破了,最终导致认知功能的损害加重。

本研究结果表明,睡眠剥夺会导致机体学习、记忆能力下降,机体可能会通过促进 BDNF 表达来代偿相对较短时间的睡眠剥夺,保护自身的认知能力,睡眠剥夺引起的记忆损害在 RS 之后可以改善,然而随着剥夺时间的延长,这种代偿机制也会被打破,严重的睡眠剥夺引起的记忆损害能否全面恢复还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Maquet P. The role of sleep in learning and memory[J]. *Science*, 2001, 294: 1048-1052.
- [2] Stickgold R, Hobson J A, Fosse R, et al. Sleep, learning, and dreams: off-line memory reprocessing[J]. *Science*, 2001, 294: 1052-1057.
- [3] Walker M P, Stickgold R. Sleep-dependent learning and memory consolidation[J]. *Neuron*, 2004, 44: 121-133.
- [4] Suchecki D, Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat[J]. *Physiol Behav*, 2000, 68: 309-316.
- [5] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats[J]. *Brain Res*, 1994, 653(1-2): 231-236.
- [6] Durmer J S, Dinges D F. Neurocognitive consequences of sleep deprivations[J]. *Semin Neurol*, 2005, 25: 117-129.
- [7] Cirelli C, Tononi G. Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle[J]. *Brain Res*, 2000, 885: 303-321.
- [8] 何成. 神经营养因子的神经修复作用及其机制[J]. *中国神经科学杂志*, 2002, 18: 466-471.
- [9] Cohen-Cory S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits[J]. *Science*, 2002, 298: 770-776.
- [10] Kovalchuk Y, Hanse E, Kafitz K W, et al. Post-synaptic induction of BDNF-mediated long-term potentiation[J]. *Science*, 2002, 295: 1729-1734.
- [11] Pozzo-Miller L D, Gottschalk W, Zhang L, et al. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice[J]. *J Neurosci*, 1999, 19: 4972-4983.
- [12] Manabe T. Does BDNF have pre- or post-synaptic targets[J]? *Science*, 2002, 295: 1651-1653.
- [13] Kiprianova I, Sandkuhler J, Schwab S, et al. Brain-derived neurotrophic factor improves long-term potentiation and cognitive functions after transient forebrain ischemia in the rat[J]. *Exp Neurol*, 1999, 159: 511-519.
- [14] Cirelli C. How sleep deprivation affects gene expression in the brain: a review of recent findings[J]. *J Appl Physiol*, 2002, 92: 394-400.
- [15] Hairston I S, Peyron C, Denning D P, et al. Sleep deprivation effects on growth factor expression in neonatal rats: a potential role for BDNF in the mediation of delta power[J]. *J Neurophysiol*, 2004, 91: 1586-1595.

[收稿日期] 2006-10-20

[修回日期] 2006-12-20

[本文编辑] 贾泽军

祝贺吴孟超院士从事肝胆外科事业 50 周年

2006年12月22日,来自军内外肝胆外科学科的5位院士和几十名专家齐聚第二军医大学东方肝胆外科医院,以学术交流的形式祝贺吴孟超院士从事肝胆外科事业50周年和东方肝胆外科医院建院10周年。全国人大常委会副委员长、中国科学院院长路甬祥,国务委员陈至立发来贺信,全国人大常委会副委员长韩启德题词祝贺。第二军医大学校长张雁灵少将、政委曹国庆少将等出席了庆祝大会。

学术报告会上,中国科学院上海生命科学院生化与细胞所刘新垣院士、复旦大学肝癌研究所汤钊猷院士、上海肿瘤医院顾健人院士、东方肝胆外科医院吴孟超院士和王红阳院士等分别作了专题演讲。