

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00320

## 快速眼球运动睡眠剥夺对大鼠下丘脑背内侧核神经肽 S 表达的影响

赵菲, 赵正卿, 李雁鹏, 庄建华, 赵忠新\*

第二军医大学长征医院神经内科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 探讨快速眼球运动(rapid eye movement, REM)睡眠剥夺后大鼠下丘脑背内侧核神经肽 S (neuropeptide S, NPS)表达的变化。**方法** 24 只大鼠随机均分为正常对照(CC)组、环境对照(TC)组、REM 睡眠剥夺(SD)组,采用改良多平台睡眠剥夺法建立大鼠 REM 睡眠剥夺模型,运用免疫组织化学分析及原位杂交法观察大鼠经 3 d REM 睡眠剥夺后下丘脑内 NPS 蛋白及 mRNA 的表达变化。**结果** NPS 蛋白及 mRNA 的表达在 CC 组和 TC 组没有显著差异。REM 睡眠剥夺后,大鼠下丘脑背内侧核内的 NPS 蛋白及 mRNA 表达上调, SD 组下丘脑背内侧核内 NPS 蛋白及 mRNA 阳性细胞数分别为  $(27.86 \pm 2.47)$  和  $(25.75 \pm 2.12)$ , 较 CC 组  $(16.75 \pm 2.12)$  和  $(19.63 \pm 1.85)$ 、TC 组  $(18.60 \pm 1.60)$  和  $(18.50 \pm 1.69)$  升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** REM 睡眠剥夺后下丘脑内觉醒相关区域 NPS 表达增加,说明当 REM 睡眠减少时机体会主动调节 NPS 的分泌,提示 NPS 与睡眠觉醒的调节机制有关。

**[关键词]** REM 深眠状态;睡眠剥夺;下丘脑背内侧核;神经肽 S

**[中图分类号]** R 741.02; R 338.63

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2015)03-0320-04

### Effect of rapid eye movement sleep deprivation on expression of neuropeptide S in dorsomedial nucleus of rat hypothalamus

ZHAO Fei, ZHAO Zheng-qing, LI Yan-peng, ZHUANG Jian-hua, ZHAO Zhong-xin\*

Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the changes of the neuropeptide S (NPS) expression in dorsomedial nucleus of rat hypothalamus after rapid eye movement (REM) sleep deprivation. **Methods** Totally 24 adult male rats were evenly randomized into 3 groups: normal control group (CC), tank control group (TC) and REM sleep deprivation group (SD). Modified multiple platform method (MMPM) was used to establish REM sleep deprivation model in rats. Immunohistochemistry and hybridization *in situ* were applied to examine the expression of NPS protein and mRNA in the rat hypothalamus. **Results** There was no significant differences in the expression of NPS protein or mRNA in rats hypothalamus between CC group and TC group. After REM sleep deprivation, NPS protein and mRNA positive cells in rats hypothalamus in SD group were  $(27.86 \pm 2.47)$  and  $(25.75 \pm 2.12)$ , respectively, which were significantly more than those in CC group and TC group  $(16.75 \pm 2.12)$  and  $(19.63 \pm 1.85)$  in CC group,  $(18.60 \pm 1.60)$  and  $(18.50 \pm 1.69)$  in TC group;  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of NPS is increased in the awakening region of rat hypothalamus after REM sleep deviation, suggesting that NPS might be related to the sleep awakening mechanism.

**[Key words]** REM sleep parasomnias; sleep deprivation; dorsomedial hypothalamic nucleus; neuropeptide S

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(3): 320-323]

快速眼球运动(rapid eye movement, REM)睡眠与生长发育、学习记忆和认知功能等心理活动有关<sup>[1-2]</sup>。REM 期睡眠障碍或缺失会导致认知障碍等多种疾病。REM 睡眠剥夺是通过模拟睡眠缺失对引发的生理性损害进行研究的常用方法,其作用机

制与神经递质表达变化密切相关<sup>[3]</sup>。研究发现,神经肽 S (neuropeptide S, NPS)在睡眠和觉醒方面有明显调节作用<sup>[4]</sup>。NPS 最早发现于 2002 年,因其氨基端残基在已检定物种中均为丝氨酸(serine, S)而得名,其相应的 G 蛋白偶联受体被称为 NPS 受体

**[收稿日期]** 2015-01-22 **[接受日期]** 2015-03-02

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81100991, 81171252, 81200061)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81100991, 81171252, 81200061).

**[作者简介]** 赵菲, 硕士生, 主治医师。E-mail: babamamahw@163.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885451, E-mail: zhaozx@medmail.com.cn

(neuropeptide S receptor, NPSR), 两者结合形成新的系统, 共同影响生物个体的睡眠觉醒、抑郁焦虑、记忆学习、摄食代谢、内分泌甚至免疫功能等多种生理过程。初步研究证实, 这可能与其主要集中在中枢神经系统并且随其在下丘脑的表达变化高度相关<sup>[5]</sup>。背内侧核是下丘脑内的重要核团, 参与机体的睡眠、觉醒过程。当存在睡眠障碍导致睡眠减少时, 机体是否会通过主动调节背内侧核内 NPS 来参与觉醒过程尚未可知。本研究采用改良多平台水环境睡眠剥夺法(modified multiple platform method, MMPM)<sup>[6]</sup>建立大鼠 REM 期睡眠剥夺模型, 观察 REM 睡眠剥夺后下丘脑背内侧核 NPS 表达的变化情况。

## 1 材料和方法

1.1 动物分组 成年雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量 200~220 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(许可证号 SCXK 沪 2009-0005)。利用随机数字表将其随机均分为 3 组: 正常对照 (cage control, CC) 组、环境对照 (tank control, TC) 组和 REM 睡眠剥夺 (sleep deprivation, SD) 组, 每组 8 只。

1.2 睡眠剥夺模型的建立 采用改良多平台睡眠剥夺法(modified multiple platform method, MMPM) 建立大鼠 REM 期睡眠剥夺模型。SD 组剥夺水槽内放置两排平台, 每排设置 8 个平台, 往水槽内注水, 距离平台表面 1.5 cm 时停止, 放置恒温棒, 将水温保持在 20~25℃。为保证大鼠可在平台间自由活动, 平台间的间隔设定在 15 cm 左右, 同时, 为确保 REM 睡眠被剥夺的效果, 平台设计较小, 这样大鼠进入 REM 期睡眠时, 会因肌肉放松导致身体失衡落水, 从而惊醒。每个水槽内放 8 只大鼠, 每 12 h 对明暗进行切换, 保持实验环境安静。TC 组水槽内同样放置两排平台, 每排 8 个, 平台设置相对较大, 其他设计同上。CC 组大鼠则照常常规隔离笼养。

1.3 取材及切片制备 经睡眠剥夺的 SD 组大鼠, 用 CO<sub>2</sub> 窒息, 先后使用 0.9% NaCl 溶液和灌注固定液进行主动脉灌注, 快速分离脑组织, 置于灌注固定液中浸泡 4 h, 移至含 20% 蔗糖的磷酸缓冲液(PBS) 中。制作下丘脑冠状切片, 20 μm/片, 收集切片置于 0.05 mol/L PBS, 4℃ 冰箱保存。

1.4 免疫组化染色 标本用含 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 35 min, 消除内源性过氧化物酶; 置于含 10% 正常马血清(NHS)、0.2% Triton X-100 的 PBS 中, 预孵育 30 min; 用 0.05 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 3×5 min; 加入一抗(NPS 抗体, 1:500, Santa Cruz), 4℃ 过夜; 用 0.05 mol/L PBS (pH 7.2)漂洗 3×5 min; 加入二抗(Cy3 标记的驴抗兔 IgG, 1:500, Abcam)和 1% NHS/PBS 溶液, 孵育 2 h; 用 0.05 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 3×5 min; 裱片, 用含 50% 甘油的 PBS 封片。荧光显微镜下(E600, Nikon Eclipse, Japan)观察下丘脑背内侧核 NPS 蛋白的表达, 应用 Nikon 公司的 Digital Camera DXM 1200 进行图像采集, 对每组 8 只大鼠、每只大鼠 2 张下丘脑背内侧核切片的 NPS 蛋白阳性神经元进行计数。

1.5 原位杂交 探针的制备详见文献[7]。标本先用 0.1 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 3×5 min, 含 0.1 mol/L 甘氨酸的 PBS(pH 7.2)漂洗 5 min, 含 0.4% Triton X-100 的 PBS(pH 7.2)漂洗 15 min, 然后加入 1 μg/mL 蛋白酶 K 于 37℃ 保温 30 min; 用含 4% 多聚甲醛的 PBS(pH 7.2)固定 5 min, 0.1 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 3×5 min; 用 0.25% 醋酸酐浸泡 10 min; 用 2×SSC 漂洗 10 min。用灭菌吸水纸将切片吸干, 而后放入杂交液(核酸探针浓度为 0.5 μg/mL)于 56℃ 保温 12~16 h; 用 4×SSC 于 37℃ 漂洗 5 min, 2×SSC(含 RNaseA 20 μg/mL)于 37℃ 保温 30 min, 1×SSC 于 37℃ 漂洗 15 min, 0.5×SSC 于 37℃ 漂洗 20 min, 0.05 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 2×6 min; 将碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(Fab)按 1:1 000 稀释, 室温孵育 4 h; 0.05 mol/L PBS (pH 7.2)漂洗 4×5 min; TSM1 和 TSM2 分别漂洗 2×5 min。然后用 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色液避光反应 1~3 h, 以 0.05 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 2×5 min, 终止显色。准备覆涂铬矾明胶载玻片, 将切片贴在上面并放置于阴凉处干燥; 中性树胶封片。荧光显微镜下观察下丘脑背内侧核 NPS mRNA 的表达, 采集图像, 对每组 8 只大鼠、每只大鼠 2 张下丘脑背内侧核切片的 NPS mRNA 阳性神经元进行计数。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 1.0 软件进行数据统计和分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 SNK 检验比较组间差异。

检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 REM 睡眠剥夺后大鼠的一般情况及行为学表现  
REM 睡眠剥夺后,大鼠体重有所减轻,皮毛蓬松杂乱、无光泽,部分大鼠爪子表面皮肤有出血现象;大鼠有狂躁表现,容易被激怒,同时表现出较强的攻击性。

2.2 REM 睡眠剥夺后大鼠下丘脑背内侧核 NPS

蛋白表达变化 在大鼠下丘脑区域,能够观察到中等强度的 NPS 蛋白阳性染色。在下丘脑背内侧核区域,NPS 蛋白阳性染色则较为明显。CC 组和 TC 组的 NPS 阳性蛋白在背内侧核中表达较少,呈散在分布(图 1A、1B),两组间阳性神经元数量差异无统计学意义(表 1);SD 组大鼠经 3 d 睡眠剥夺后,背内侧核 NPS 蛋白阳性细胞数量较多,占背内侧核核团的大部分(图 1C),其阳性神经元数量与 CC 组和 TC 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1)。

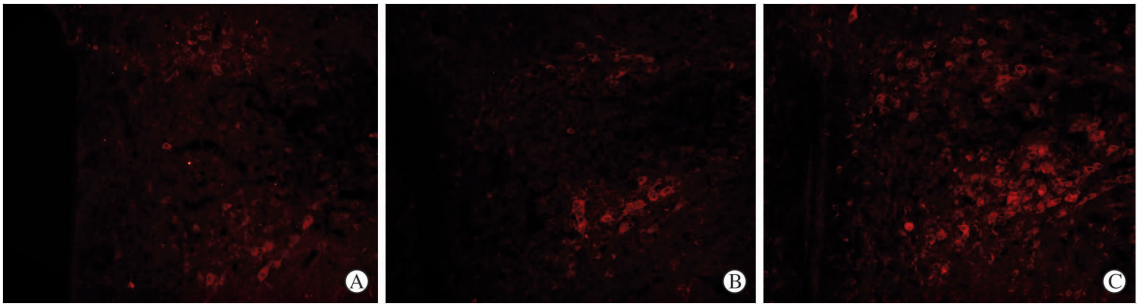


图 1 神经肽 S 蛋白在各组大鼠下丘脑背内侧核内的表达

A:正常对照(CC)组;B:环境对照(TC)组;C:快速眼球运动(REM)睡眠剥夺(SD)组. Original magnification:  $\times 200$

表 1 各组大鼠背内侧核神经肽 S(NPS)蛋白及 mRNA 阳性神经元数

组别	NPS 蛋白	NPS mRNA
CC	16.75 $\pm$ 2.12	19.63 $\pm$ 1.85
TC	18.60 $\pm$ 1.60	18.50 $\pm$ 1.69
SD	27.86 $\pm$ 2.47* $\Delta$	25.75 $\pm$ 2.12* $\Delta$

$n=8, \bar{x} \pm s$

2.3 REM 睡眠剥夺后大鼠下丘脑背内侧核 NPS mRNA 表达变化 在本实验中,下丘脑背内侧核内 NPS mRNA 的表达趋势与 NPS 蛋白一致。大鼠下丘脑背内侧核的 NPS mRNA 在 CC 组和 TC 组阳性表达较少,呈散在分布(图 2A、2B),阳性神经元数量在两组间差异无统计学意义(表 1)。SD 组大鼠经 3 d 睡眠剥夺后,大鼠下丘脑背内侧核 NPS mRNA 阳性表达的细胞数较多,占该核团大部分(图 2C),与 CC 组和 TC 组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1)。

CC:正常对照;TC:环境对照;SD:快速眼球运动(REM)睡眠剥夺. \*  $P < 0.05$  与 CC 组比较;  $\Delta P < 0.05$  与 TC 组比较

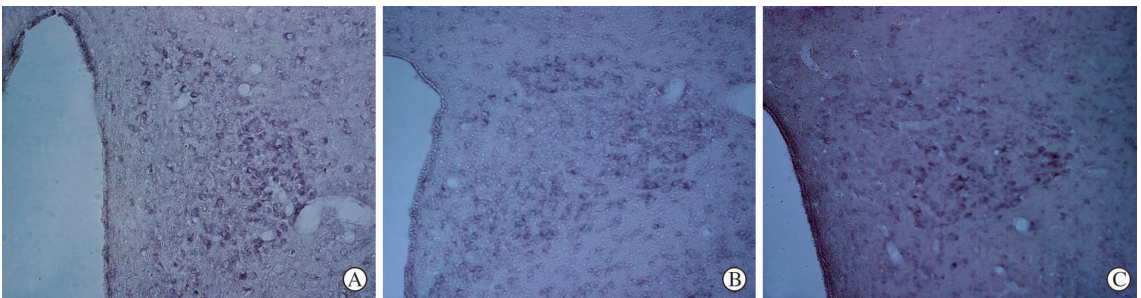


图 2 神经肽 S(NPS) mRNA 在各组大鼠下丘脑背内侧核内的表达

A:正常对照(CC)组;B:环境对照(TC)组;C:快速眼球运动(REM)睡眠剥夺(SD)组. Original magnification:  $\times 200$

## 3 讨论

睡眠和觉醒的调节涉及复杂的神经环路,多

种神经化学成分参与其中,而在参与觉醒系统的多种神经递质中,NPS 是最新被报道的一种。NPS 广泛分布在人、狗、牛、猪等动物组织中,尤



其在脊椎动物的脑组织、唾液腺、甲状腺和乳腺中有较高表达,参与睡眠和觉醒、饮食、体温、代谢等多项生理功能的调节,其中尤其与睡眠及觉醒的关系最为密切<sup>[8]</sup>。

本实验中,我们对大鼠进行 REM 睡眠剥夺处理,试图探讨在 REM 睡眠缺失时机体是否会启动补偿机制。早期研究中,Xu 等<sup>[9]</sup>对实验组和对照组小鼠分别进行侧脑室注射 NPS 和生理盐水,而后分别记录小鼠脑电图变化。结果发现,NPS 注射组小鼠慢波睡眠的 1 期、2 期和 REM 期睡眠时间明显缩短。作者认为,NPS 介导的觉醒产生迅速,可能是通过激活单胺能系统起作用。这表明 NPS 能够促进唤醒,诱导觉醒,抑制睡眠。一项关于咖啡因与 NPS 关系的研究发现,大鼠下丘脑和脑干的 NPS 受体在经过咖啡因处理后均出现较高表达<sup>[5]</sup>,说明 NPS 可能是咖啡因促进觉醒的机制。Oishi 等<sup>[10]</sup>学者也证明 NPS 能有效促进觉醒,并显著缩短睡眠时间。这都提示 NPS 会显著促进或维持觉醒。

下丘脑背内侧核与机体的睡眠觉醒密切相关。本实验中,我们对进行 REM 睡眠剥夺处理的大鼠下丘脑 NPS 表达进行测定,结果显示,CC 组与 TC 组之间大鼠下丘脑背内侧核内 NPS 阳性细胞数无明显差异,说明水环境对 NPS 蛋白和 mRNA 表达无明显影响。但 SD 组大鼠下丘脑背内侧核内 NPS 阳性细胞数比 CC 组、TC 组明显升高,且与两组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 REM 睡眠剥夺可引起下丘脑内背内侧核 NPS 蛋白和 mRNA 的表达上调。上述结果提示当存在外界刺激,导致机体无法正常睡眠时,机体会自动启动保护和调节机制,通过下丘脑分泌 NPS 以维持和促进觉醒,证实 NPS 可能参与机体的促觉醒调节过程。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Alkadhi K, Zagaar M, Alhaider I, Salim S, Aleisa A. Neurobiological consequences of sleep deprivation[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2013, 11:231-249.
- [2] Nishida M, Pearsall J, Buckner R L, Walker M P. REM sleep, prefrontal theta, and the consolidation of human emotional memory[J]. *Cereb Cortex*, 2009, 19: 1158-1166.
- [3] Rakitin B C, Tucker A M, Basner R C, Stern Y. The effects of stimulus degradation after 48 hours of total sleep deprivation[J]. *Sleep*, 2012, 35:113-121.
- [4] Valsalan R, Manoj N. Evolutionary history of the neuropeptide S receptor/neuropeptide S system[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2014, 209:11-20.
- [5] Lage R, Diéguez C, López M. Caffeine treatment regulates neuropeptide S system expression in the rat brain[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 410:47-51.
- [6] Zagaar M, Alhaider I, Dao A, Levine A, Alkarawi A, Alzubaidy M, et al. The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: behavioral, electrophysiological and molecular evidence[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45:1153-1162.
- [7] 刘芳,许家军,龙建纲,向正华,沈慧,张传森,等. 地高辛原位杂交显示锌转运体 3 mRNA 在脑、脊髓和脊神经节中的分布[J]. *解剖学杂志*, 2008, 31:747-750.
- [8] Reinscheid R K. Neuropeptide S: anatomy, pharmacology, genetics and physiological functions[J]. *Results Probl Cell Differ*, 2008, 46:145-158.
- [9] Xu Y L, Gall C M, Jackson V R, Civelli O, Reinscheid R K. Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain[J]. *J Comp Neurol*, 2007, 500:84-102.
- [10] Oishi M, Kushikata T, Niwa H, Yakoshi C, Ogasawara C, Calo G, et al. Endogenous neuropeptide S tone influences sleep-wake rhythm in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 581:94-97.

[本文编辑] 孙岩