

· 实验研究 ·

慢性不完全性睡眠剥夺对幼鼠生长及学习记忆影响的研究

江帆¹, 沈晓明², 李生慧², 崔茂龙³, 张颖³, 王成³, 余晓刚², 颜崇淮²

(1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心儿童保健科, 上海 200127; 2. 上海交通大学医学院新华医院
上海儿科医学研究所, 上海 200092; 3. 上海交通大学医学院生物医学工程系, 上海 200092)

[摘要] 目的 睡眠不足现象在成人及儿童中普遍存在, 其对人尤其是处于生长发育期儿童的影响尚未得到很好的认识。该研究将探讨慢性不完全性睡眠剥夺对幼年动物体格发育及学习记忆的影响。**方法** 12只出生后3周刚断奶的雄性幼鼠, 随机分为睡眠剥夺组、试验对照组和空白对照组。采用计算机程控睡眠剥夺装置对幼鼠进行每天3 h(8 am~11 am)持续2周的睡眠剥夺, 同时进行体温及体重监测, 睡眠剥夺结束后利用 Morris 水迷宫进行学习记忆测试, 之后处死并对重要脏器进行称量。**结果** 实验结果表明睡眠剥夺组在2周慢性睡眠剥夺后体温显著升高; 睡眠剥夺组幼鼠的体重增长速度较其他两组减慢, 且胸腺重量也明显轻于空白对照组。学习记忆测试结果发现, 三组幼鼠空间学习能力随实验进程均有明显提高, 各组间差异无显著性; 1周的慢性不完全性睡眠剥夺后, 睡眠剥夺组幼鼠空间参照记忆的获得较对照组明显延迟; 2周慢性不完全性睡眠剥夺对幼鼠的空间参照记忆未见明显影响。**结论** 慢性不完全性睡眠剥夺不仅会对幼年动物的体格发育产生影响, 而且可能会影响到空间参考记忆获得的速度。
[中国当代儿科杂志, 2009, 11(2): 128-132]

[关键词] 慢性睡眠剥夺; 学习记忆; 水迷宫; 幼鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)02-0128-05

Effects of chronic partial sleep deprivation on growth and learning/memory in young rats

JIANG Fan, SHEN Xiao-Ming, LI Sheng-Hui, CUI Mao-Long, ZHANG Yin, WANG Cheng, YU Xiao-Gang, YAN Chong-Huai. Department of Child Health Care, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China (Email: riversailer@sina.com)

Abstract: Objective The effects of sleep deprivation on the immature brain remain unknown. Based on a computer controlled chronic sleep deprivation animal model, the effects of chronic partial sleep deprivation on growth, learning and memory in young rats were explored. **Methods** Twelve weaned male Sprague-Dawley rats (3-week-old) were randomly divided into sleep deprivation, test control and blank control groups. Sleep deprivation was performed using computer-controlled "disc-over-water" technique at 8-11 am daily, for 14 days. The temperature and weights were measured every 7 days. Morris water maze was used to test spatial learning and memory abilities before and 7 and 14 days after sleep deprivation. After 14 days of sleep deprivation, the rats were sacrificed for weighting their major organs. **Results** After 14 days of sleep deprivation, the rats' temperature increased significantly. During the sleep deprivation, the rate of weight gain in the sleep deprivation group was much slower than that in the test control and blank control groups. The thymus of the rats subjected to sleep deprivation was much lighter than that of the blank control group. After 7 days of sleep deprivation, the rats showed slower acquisition of reference memory, but were capable of successfully performing the task by repeated exposure to the test. Such impairment of reference memory was not seen 14 days after sleep deprivation. **Conclusions** Chronic sleep deprivation can affect growth of immature rats, as well as their abilities to acquire spatial reference memory.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(2): 128-132]

Key words: Chronic sleep deprivation; Learning and memory; Morris water maze; Young rats

目前随着竞争压力的逐渐增大以及夜间娱乐生活的日益丰富, 各行各业现代人的夜间睡眠时间都明显缩短, 这一趋势也无法避免的波及到处于生长发育关键时期的青少年^[1,2]。尽管目前的研究已经

告诉人们睡眠对于人类的重要性, 但是有关不完全性睡眠剥夺, 尤其是慢性不完全性睡眠剥夺对人类健康的影响一直还不为人们所了解。现有的一些相关睡眠剥夺研究主要集中于成人^[3,4], 但是慢性睡

[收稿日期] 2008-05-09; [修回日期] 2008-06-18

[基金项目] 国家自然科学基金(30500410), 上海市科委重点项目(02DJ14040), 上海市教委“曙光计划”追踪项目(02GG08)。

[作者简介] 江帆, 女, 副主任医师。主攻方向: 儿童睡眠医学。

眠不足对大脑发育不完善的年幼儿童影响是否有别于成人,或者更甚于成人,这些问题很难从成人的研究直接获得。由于儿童本身是受保护群体,不允许对其进行慢性睡眠剥夺的研究,因此尚无法直接回答上述问题。

目前只能借助于幼年动物的实验研究初步探索慢性不完全性睡眠剥夺对未成熟动物的影响。现有的动物模型研究中,很少有涉及慢性不完全性睡眠剥夺的研究^[5,6]。而计算机程控的睡眠剥夺模型由于将睡眠剥夺组与试验对照组放在完全相同的环境中,因此目前为止被认为是最好的控制应激因素在睡眠剥夺研究中干扰影响的方法^[7]。利用这一模型进行关于幼鼠慢性不完全性睡眠剥夺的研究尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 实验动物及设备

1.1.1 实验动物

12只3周龄雄性 Sprague-Dawley 幼鼠,体重 63.08 ± 4.48 g,随机分成3组,分别为睡眠剥夺组(PSD)、试验对照组(TC,即阳性对照组)以及空白对照组(CC,即阴性对照组),在睡眠剥夺期间,PSD与TC组分别置于计算机程控睡眠剥夺装置内的两侧,CC组置于常规饲养笼。单笼饲养于国标清洁级动物房适应1d,实验室室温25℃,12h明暗交替(光照周期8am~8pm),给予幼鼠自由饮食及进水。

1.1.2 计算机程控慢性不完全性睡眠剥夺装置

慢性幼鼠睡眠剥夺计算机程控装置为本研究小组参照国外的计算机程控睡眠剥夺模型^[7]与上海交通大学医学院生物医学工程系联合研制。整套装置由一对有机玻璃箱、转盘、驱动马达、前置放大器、记录及控制电脑组成(图1)。有机玻璃箱60cm×20cm×60cm,有机玻璃转盘的直径为46cm,其中央即两个有机玻璃箱空隙的中央位置,转盘各深入每个笼子15.5cm。在转盘下方的有机玻璃箱子内盛2~3cm深的水。睡眠剥夺期间室温维持在25℃,同时幼鼠可以自由饮食及进水。

信号采集及分析部分的主要组成部分有:模拟信号放大部分;稳压电源部分;信号采集部分以及系统软件分析、控制部分。对采集的信号进行存储、显示、实时分析,并在分析结果的基础上给出触发信号,控制鼠笼转盘的转动和转向。使用NI-DAQ所提供的数据采集平台,对四道生理信号(两道脑电、两道肌电)同时进行采集。



图1 慢性不完全性睡眠剥夺装置实物图

1.2 研究方法

1.2.1 手术过程

采用戊巴比妥(40 mg/kg)进行麻醉。采用特制的不锈钢微型圆头螺丝电极固定在颅骨上以记录脑电,采用银电极分别固定在颈部两侧以记录肌电。脑电电极固定的位置在前额部位是前囟后1mm、中线旁开3mm,在枕部是后囟前1mm、中线旁开4mm,参考电极放置于小脑部位,螺丝电极拧入颅骨深度约1~1.5mm左右,然后用牙科水泥密封各电极。幼鼠手术后立即给予肌注青霉素5万单位,之后同样剂量再连续用2d。手术以后,幼鼠被独立分笼饲养,光线和室温保持恒定(光照强度<150 lx,室温 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$)。

1.2.2 睡眠剥夺过程

幼鼠手术后第1天即开始适应性训练,每天将幼鼠放入睡眠剥夺箱进行训练3h,持续1周。1周后开始正式睡眠剥夺。睡眠剥夺过程从每天早晨8am~11am,睡眠剥夺结束后各幼鼠被分别放回饲养笼单独饲养,睡眠剥夺过程共持续2周时间。在此期间,空白对照组持续置于饲养笼中。

睡眠剥夺过程中将睡眠剥夺组和试验对照组幼鼠分别放置在两个有机玻璃箱的同一个转盘上,并连上电极连线。通过固定在头颅特定位置的脑电电极以及植入皮下的肌电电极,取得实时的幼鼠脑电和肌电信号。该系统将取得的脑电、肌电信号进行放大、模数转换、采集后,进行实时时域、频域的分析,从而判断幼鼠的睡眠状态。

因为幼鼠由清醒转向睡眠时,脑电和肌电的频谱成分会发生明显变化,高频成分减少,而低频成分增加;同时,脑电和肌电的时域幅度也会有明显下

降。当高频成分增加、低频成分减少以及时域幅度降低,这三个因素的改变达到特定域值时,系统将输出一个出发信号,启动鼠笼转盘并给出一个随机旋转方向,转动速度为 2.5 r/min,转动直至上述 3 个因素恢复到设定域值之上,鼠笼转盘停止转动。如果实验过程中睡眠剥夺组清醒,则转盘不转,试验对照组可以睡眠。由于两组幼鼠处于同一转盘上,因此实验过程中 PSD 组与 TC 组的环境完全相同,仅 TC 组允许睡眠而 PSD 组则严格睡眠剥夺。

1.2.3 Morris 水迷宫测试学习记忆能力 Morris 水迷宫测试房间的墙上贴有彩色画报作为线索,测试期间迷宫周围的参照(包括灯光、周围的器物)均保持不变,测试过程中实验者的位置也相对固定。

睡眠剥夺前、睡眠剥夺开始后 1 周及 2 周后的 3 次测试中,分别把站台放在下述 3 个地方:东北象限中央、水池正中、以及西北象限的中央。小站台位置在 1 d 的测试中保持稳定。每天测试时将幼鼠从东、南、西、北 4 个入水点放入水,入水时面向池壁。每只幼鼠在各个入水点进行两个轮次测试。测试时每只幼鼠有 120 s 时间寻找站台。如果找到站台后,允许其在站台上呆 30 s,然后开始同一入水点第 2 轮次测试的实验。如果 120 s 内没有找到站台,那就把幼鼠引到站台上放置 30 s。测试过程中摄像头记录了幼鼠的游泳轨迹,评价参数是找到站台所经过的路程以及所需的潜伏期,同时利用这两个参数计算幼鼠的游泳速度。

1.2.4 慢性睡眠剥夺 2 周后各项生理指标的测定 在睡眠剥夺开始前测定幼鼠体重及肛门温度,之后在部分睡眠剥夺 1 周以及 2 周后同一时间分别测定幼鼠体重及肛门温度。最后将幼鼠处死,取胸腺、双肺、肝脏、脾脏、双肾上腺进行称量,将各器官重量与体重之比作为参数进行统计分析。

1.3 统计方法

采用 Statistic 5.1 统计软件(Statsoft Inc. 1998)对结果进行统计分析。对幼鼠各阶段体重及体温数据采用双因素析因设计的方差分析,分组以及睡眠剥夺时间分别作为两个因素进行统计。水迷宫数据统计利用单因素方差分析对各组幼鼠在每个测试轮次中的游泳速度、各个入水点各个轮次找到平台所需的路程及所需要的潜伏期进行比较分析。各组幼鼠脏器重量间比较采用单因素方差分析。对于上述方差分析结果有统计学差异的,进一步采用 Newman-Keuls 检验对各组差异进行比较。

2 结果

2.1 幼鼠慢性不完全性睡眠剥夺后体温、体重变化

PSD 组、试验 TC 组以及 CC 组体温变化在 PSD 前、PSD 1 周后以及 PSD 2 周后差异有非常显著性意义($F = 10.51, P < 0.01$),但 3 组之间差异无显著性意义,分组因素,时间因素不存在交互影响。进一步统计分析,睡眠剥夺组在不同时间体温变化差异有显著性意义($F = 9.28, P < 0.01$),且不完全性睡眠剥夺 2 周后与睡眠剥夺前比较差异有显著性($P < 0.01$)。TC 组及 CC 组体温在睡眠剥夺前后差异无显著性意义。3 组幼鼠慢性不完全睡眠剥夺不同阶段体温变化见图 2。

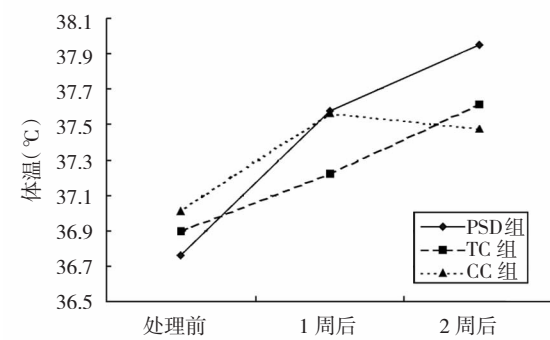


图 2 慢性不完全性睡眠剥夺后 3 组幼鼠体温变化

在睡眠剥夺前,3 组幼鼠体重差异无显著性意义,因此将睡眠剥夺前体重作为基线标准 100%,睡眠剥夺后体重的变化以测得实际体重占睡眠剥夺前体重(基线)的百分比进行统计。不完全性睡眠剥夺后 3 组幼鼠体重变化差异有显著性意义($F = 26.01, P < 0.01$),不同睡眠剥夺阶段体重变化也有显著性意义($F = 130.87, P < 0.01$),分组因素与时间因素存在交互影响($F = 6.77, P < 0.01$),提示在这两周期间各组幼鼠的体重增长速率不同。进一步组间比较发现,PSD 组的增长速率与 CC 组差异有非常显著性意义($P < 0.01$);PSD 组的增长速率与 TC 组差异有显著性意义($P < 0.05$),而试验对照组与空白对照组之间差异无显著性意义。3 组幼鼠不完全性睡眠剥夺过程中体重相对于基础体重变化见图 3。

2.2 幼鼠慢性不完全性睡眠剥夺对学习记忆的影响

在对幼鼠进行水迷宫测试参数进行比较前,首先对游泳速度进行比较。因为游泳速度可以作为代表体力以及运动活力的参数。在统计中发现,3 组

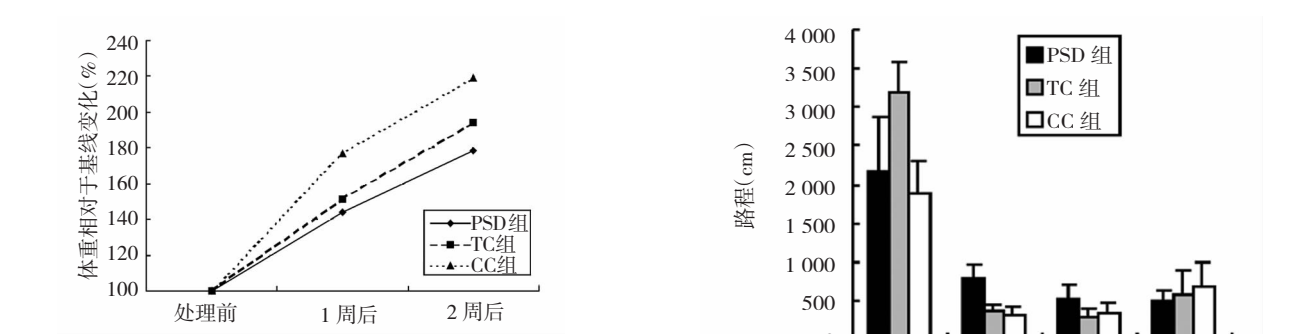


图3 慢性不完全性睡眠剥夺后3组幼鼠体重变化

在 PSD 前、PSD 1 周后以及 2 周后的两个轮次测试中差异均未表现出显著性。

因小站台的位置每天设定在不同位置,所以每天第一轮次第一个入水点的测试幼鼠都需要重新学习找到小站台,因此这一点的测试反映了幼鼠的学习能力。比较了 3 组幼鼠睡眠剥夺前、不完全性睡眠剥夺持续 1 周以及 2 周后测试数据后发现,3 组幼鼠随着时间的推移第一轮次第一个入水点的路程 ($F = 17.73, P < 0.01$) 和潜伏期 ($F = 22.86, P < 0.01$) 都明显缩短,但 3 组幼鼠之间在路程以及潜伏期均未显现出明显差异。

水迷宫第一轮次的测试结果代表了幼鼠的空间参照记忆^[8]。睡眠剥夺 1 周后 PSD 组幼鼠在水迷宫第一轮次测试中找到平台的路程以及潜伏期在第 2 及 3 个入水点均长于两个对照组,且在第二个入水点潜伏期测试中差异存在显著性意义,组间分析发现主要为 PSD 组找到平台的潜伏期明显长于 CC 组 ($P < 0.05$,图 4)。PSD 前以及 PSD 2 周后 3 组幼鼠在水迷宫第一轮次测试中各入水点潜伏期以及路程差异均无显著性意义。

水迷宫第二轮次的测试结果代表了幼鼠的工作记忆^[8]。PSD 前、PSD 1 周及 2 周后,3 组幼鼠水迷宫测试中第二轮次潜伏期以及路程差异均无显著性意义。

2.3 幼鼠慢性不完全性睡眠剥夺后行为表现及各重要脏器的重量变化

幼鼠不完全睡眠剥夺 2 周后与两对照组相比,未见明显的外观皮肤破损、行为表现也未见明显差

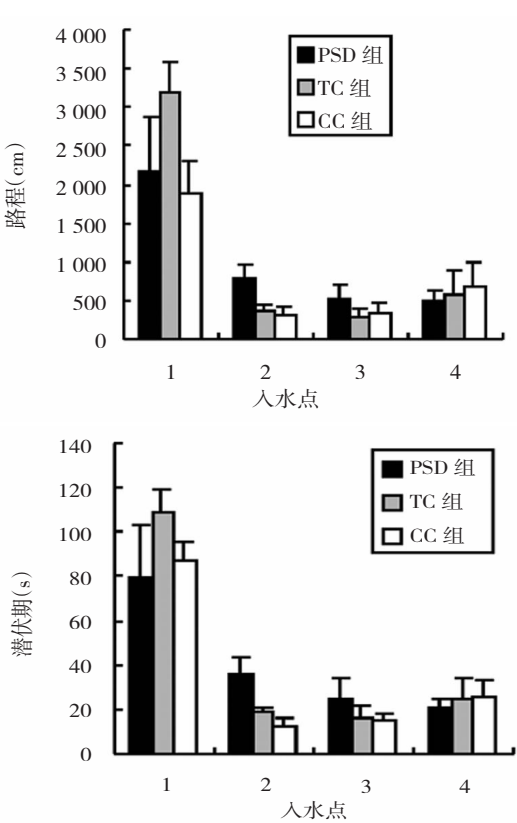


图4 3组幼鼠第一轮次测试路程及潜伏期比较

异,进一步解剖各主要脏器时也未见胃溃疡等肉眼可见脏器损害。各主要脏器重量占比重的比值见表 1。对 3 组间存在显著统计学差异的胸腺占体重比值进一步进行组间比较发现,PSD 组与 CC 组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究采用水平转盘睡眠剥夺方法建立了计算机程控的慢性不完全性睡眠剥夺模型,目前为止该方法被认为是控制刺激因素对睡眠剥夺研究最好的方法^[7],已有的经典研究表明这样的睡眠剥夺装置可以使得实验组睡眠减少 91%,而对照组减少 28%^[7]。由于本研究每天仅对幼鼠进行 3 h 的睡眠剥夺,为了尽可能保证其余时间幼鼠的正常生活,除睡眠剥夺外的其他时间幼鼠均在饲养笼内度过。这就可能会出现睡眠剥夺的幼鼠在其他的时间段出现

表1 不完全睡眠剥夺2周后幼鼠各脏器质量占体重比值的比较 (x̄±s,%)

	胸腺	双肺	脾脏	肝脏	双肾上腺
空白对照组	0.29 ± 0.03	0.60 ± 0.07	0.32 ± 0.04	4.55 ± 0.46	0.020 ± 0.008
试验对照组	0.26 ± 0.02	0.61 ± 0.12	0.41 ± 0.09	3.92 ± 0.42	0.024 ± 0.006
睡眠剥夺组	0.24 ± 0.03	0.81 ± 0.30	0.40 ± 0.02	4.14 ± 0.18	0.024 ± 0.001
F 值	5.19	1.46	2.99	3.08	0.71
P 值	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

睡眠反弹,以补偿被剥夺的睡眠时间。但现有的研究证实,小剂量的睡眠剥夺,尤其是采用轻柔的刺激进行的2~3 h/d睡眠剥夺不会对接着的睡眠结构产生明显影响,并导致出现明显的睡眠反弹^[9]。因此本研究通过缓慢的转盘运动对幼鼠进行每天3 h的睡眠剥夺,也可以达到不影响其之后睡眠结构的效果。

慢性不完全性睡眠剥夺的3组幼鼠均呈现了体重的上升趋势,但是不同的是空白对照组的体重上升最为显著而睡眠剥夺组的体重上升较慢。这一结果提示慢性不完全性睡眠剥夺可能会对处于生长发育阶段个体的体格发育产生影响。另外胸腺组织在幼年动物中是一个重要的免疫器官,胸腺组织的体积缩小提示可能慢性不完全性睡眠剥夺会对幼年动物的免疫系统造成一定的影响。

睡眠对于脑内突触可塑性的调节具有重要的作用,既往的研究大多将睡眠与学习记忆的作用集中与快速眼动睡眠期(rapid eye movement, REM)^[8,10]。在成年大鼠的睡眠剥夺研究中发现,持续3~4 d的选择性快速眼动睡眠剥夺后大鼠的空间记忆受到明显损害^[11]。而在新近的成年大鼠的研究中发现,完全性睡眠剥夺(包括快速眼动和非快速眼动睡眠剥夺)6 h后大鼠即表现出空间记忆的受损^[12]。这就提示无论是快速眼动睡眠还是非快速眼动睡眠对于学习记忆能力的获得和保持都是非常重要的。

在既往的各种类型的睡眠剥夺和学习记忆的研究中,均未发现睡眠剥夺对大鼠学习能力以及工作记忆的影响^[7,12],这一结果在本研究对幼鼠进行的慢性不完全性睡眠剥夺中也得以证实。在成年大鼠的研究中发现,完全性睡眠剥夺可以造成空间参照记忆的获得受损,也可以影响到空间参照记忆的维持^[7,12]。本研究在慢性不完全性睡眠剥夺后1周幼鼠出现空间参照记忆获得的延迟,但是最终记忆的获得水平与对照组未显现差异。而在慢性不完全性睡眠剥夺持续2周后,睡眠剥夺组幼鼠各个入水点的潜伏期和路程上与其他两组相比未显现显著差异。这可能是由于幼鼠在睡眠剥夺过程中逐渐表现出烦躁,自主活动能力增强有关,既往的完全性睡眠剥夺研究实验中也有报道因为睡眠剥夺造成幼鼠自主能力增强而出现一个阶段记忆损害无法检出的情况^[7]。本研究出现的这一现象还有待今后进一步延长睡眠剥夺时间,消除暂时性自主活动能力增强的影响后加以证实。

空间学习记忆能力与大脑多部位的功能密切相关。大多数研究认为完全性睡眠剥夺后的记忆损害

与海马功能受影响密切相关^[11,13]。但也有研究发现,除了海马以外,前额叶皮质、杏仁核、尾状核-壳核记忆系统也与空间记忆能力密切相关^[14,15]。因此不同的睡眠剥夺以及所采用的学习记忆测试工具都可能使得记忆损害涉及的脑区有所不同。

[参 考 文 献]

- [1] Lam LT, Yang L. Short duration of sleep and unintentional injuries among adolescents in China [J]. *Am J Epidemiol*, 2007, 166 (9):1053-1058.
- [2] Smaldone A, Honig JC, Byrne MW. Sleepless in America: inadequate sleep and relationships to health and well-being of our nation's children [J]. *Pediatrics*, 2007, 119 (S1):S29-S37.
- [3] Chee MWL, Chuah YLM. Functional neuroimaging and behavioral correlates of capacity decline in visual short-term memory after sleep deprivation [J]. *PNAS*, 2007, 104 (22):9487-9492.
- [4] Van Dongen HPA, Maislin G, Mullington JM, Dinges DF. The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation [J]. *Sleep*, 2003, 26 (2): 117-126.
- [5] Kim Y, Laposky AD, Bergmann BM, Turek FW. Repeated sleep restriction in rats leads to homeostatic and allostatic responses during recovery sleep [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (25): 10697-10702.
- [6] Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, Antunes IB, Tufik S. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 293 (1):R504-509.
- [7] Feng PF. Neonates [M]. // Kushida CA. Sleep deprivation, clinical issues, pharmacology and sleep loss effect. New York: Marcel Dekker, 2005, 121-150.
- [8] Youngblood BD, Smagin GN, Elkins PD, Ryan DH, Harris RB. The effects of paradoxical sleep deprivation and valine on spatial learning and brain 5-HT metabolism [J]. *Physiol Behav*, 1999, 67 (5):643-649.
- [9] Rampin C, Cespuglio R, Chastrette N, Jouvet M. Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat [J]. *Neurosci Lett*, 1991, 126 (2):113-118.
- [10] Datta S, Mavanji V, Ulloor J, Patterson EH. Activation of phasic pontine-wave generator prevents rapid eye movement sleep deprivation-induced learning impairment in the rat: a mechanism for sleep-dependent plasticity [J]. *J Neurosci*, 2004, 24 (6):1416-1427.
- [11] McDermott CM, LaHoste GJ, Chen C, Musto A, Bazan NG, Maggee JC. Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons [J]. *J Neurosci*, 2003, 23 (29):9687-9695.
- [12] Guan Z, Peng X, Fang J. Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus [J]. *Brain Res*, 2004, 1018 (1):38-47.
- [13] Cantero JL, Atienza M, Stickgold R, Kahana MJ, Madsen JR, Kocsis B. Sleep-dependent theta oscillations in the hippocampus and neocortex [J]. *J Neurosci*, 2003, 23 (34):10897-10903.
- [14] Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation [J]. *Sleep*, 1989, 12 (1): 13-21.
- [15] Packard MG, Teather LA. Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 1998, 69 (2):163-203.

(本文编辑:吉耕中)