

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001724

慢性睡眠不足诱导小鼠大脑和肝脏氧化应激和炎症反应

甘 丽, 幸 宇, 陈晓丽, 官 琦, 单晓民, 张洪丹, 郑娇娇, 查治凯, 邓世雄
(重庆医科大学基础医学院法医学与生物医学信息研究室, 法医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨慢性睡眠不足对小鼠肝脑功能的影响及作用机制。**方法:**20 只 4 周龄野生雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为正常对照组($n=10$)和睡眠剥夺组($n=10$), 睡眠剥夺组小鼠睡眠剥夺 45 d 后, 观察 2 组小鼠体质量变化; Morris 水迷宫实验分析 2 组小鼠空间学习记忆能力的变化; 测量各组小鼠肝重指数、脾重指数和肾重指数; ELISA 法检测血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的含量; 酶标比色法检测海马和肝脏超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力和还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 含量; Western blot 检测海马和肝脏 TNF- α 、P53、BCL-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, BAX)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白相对表达水平; 免疫组化 SP 法检测海马 Ki-67 的表达水平。**结果:**睡眠剥夺组小鼠体质量较正常对照组增加缓慢, 空间学习记忆能力减退, 肝重指数和肾重指数均增高 ($t=4.274, P=0.000; t=3.629, P=0.002$), 脾重指数明显降低 ($t=2.380, P=0.029$)。与正常对照组相比, 睡眠剥夺组小鼠血清 TNF- α [(24.440 ± 4.468) vs. (53.719 ± 4.128)]、IL-6 [(14.265 ± 3.718) vs. (31.766 ± 4.535)] 和 IL-1 β [(20.383 ± 3.230) vs. (41.916 ± 4.819)] 明显增高 ($t=10.762, P=0.000; t=6.673, P=0.000; t=8.229, P=0.000$), 睡眠剥夺组海马和肝脏 SOD 活力和 GSH 含量明显降低 ($t=4.171, P=0.003; t=8.851, P=0.000; t=7.138, P=0.000; t=5.390, P=0.000$)。Western blot 结果显示, 睡眠剥夺组海马和肝脏 TNF- α [(0.702 ± 0.088) , (0.818 ± 0.074)]、P53 [(0.626 ± 0.103) , (1.225 ± 0.116)] 和 BAX [(0.978 ± 0.078) , (1.120 ± 0.135)] 蛋白相对表达量明显上调 ($t=13.688, P=0.000; t=11.682, P=0.000; t=6.991, P=0.000; t=10.023, P=0.000; t=13.721, P=0.000; t=10.422, P=0.000$), BCL-2 蛋白相对表达量 [(0.365 ± 0.059) , (0.380 ± 0.040)] 明显下降 ($t=15.165, P=0.000; t=12.143, P=0.000$), 海马齿状回和门区 Ki-67 蛋白的表达水平明显下降 ($t=4.171, P=0.003$)。**结论:**慢性睡眠不足可诱导大脑和肝脏的氧化应激, 增加血清中炎症因子的浓度, 并通过细胞凋亡调节 DNA 损伤。

【关键词】慢性睡眠不足; 氧化应激; 炎症反应; DNA 损伤

【中图分类号】R339.3*8

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-07-18

作者简介:甘 丽, Email: ganlilee1991@163.com,

研究方向: 法医病理学。

通信作者:邓世雄, Email: dengshixiong1963@163.com。

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (编号: 81202385);

2016 年重庆医科大学基础医学院“荣耀计划” (编号:

JCY201607)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.0941.012.html>

(2018-05-23)

strogen receptor activity (REA), is a crucial regulator of the timing and magnitude of uterine decidualization [J]. *Endocrinology*, 2013, 154 (3): 1349-1360.

[30] Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, et al. Endometrial decidualization: of mice and men [J]. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2010, 28 (1): 17-26.

[31] Kee BL, Rivera RR, Murre C. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF- β [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2 (3): 242-247.

[32] Lowery JW, Frump AL, Anderson L, et al. ID family protein expression and regulation in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 2010, 299 (6): R1463-R1477.

[33] Wassmann K, Mueller CFH, Becher UM, et al. Interaction of Inhibitor of DNA binding 3 (Id3) with Gut-enriched Krüppel-like factor (GKLF) and p53 regulates proliferation of vascular smooth muscle cells

[J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2010, 333 (1-2): 33-39.

[34] Taylor AM, Hanchett R, Natarajan R, et al. The effects of leukocyte-type 12/15-lipoxygenase on Id3-mediated vascular smooth muscle cell growth [J]. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 2005, 25 (10): 2069-2074.

[35] Kersten C, Dosen G, Myklebust JH, et al. BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis—upregulation of Id1 and Id3 [J]. *Experimental Hematology*, 2006, 34 (1): 72-81.

[36] Li Q, Kannan A, Wang W, et al. Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (43): 31725-31732.

[37] Gao F, Bian F, Ma X, et al. Control of regional decidualization in implantation: role of FoxM1 downstream of Hoxa10 and cyclin D3 [J]. *Scientific Reports*, 2015 (5): 13863.

(责任编辑: 张辉洁)

Chronic sleep restriction induces oxidative stress and inflammation in mice livers and brains

Gan Li, Xing Yu, Chen Xiaoli, Guan Qi, Shan Xiaoming,

Zhang Hongdan, Zheng Jiaojiao, Zha Zhikai, Deng Shixiong

(Laboratory of Forensic Medicine and Biomedical Information, Teaching and Research Section of Forensic
Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of chronic sleep restriction (SR) on the function of livers and brains in mice, and to explore the possible mechanism. **Methods:** Twenty C57BL/6J female mice at the age of 4 weeks were randomly divided into normal control group ($n=10$) and SR group ($n=10$). Then forty-five days after SR, the mice were observed for the changes of body weight, and the percentage of weight gain was detected in each group. Learning and memorizing abilities were measured by Morris Water Maze test. Liver, spleen and kidney wet weight index were detected in each group. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the serum were detected by ELISA. The activities of superoxide dismutase (SOD) and contents of reduced glutathione (GSH) were measured by microplate assay. The protein levels of TNF- α , P53, Bcl-2-associated X protein (BAX) and B-cell lymphoma-2 (BCL-2) were measured by Western blot. The expression of Ki-67 was analyzed by immunohistochemical technique. **Results:** Compared with the normal control group, the mice in SR had a relatively slow body weight gain, a reduced spatial learning and memorizing capacities, an increased liver and kidney wet weight index ($t=4.274, P=0.000; t=3.629, P=0.002$), and a decreased spleen wet weight index ($t=2.380, P=0.029$). The levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β were higher in SR group [$(53.719 \pm 4.128), (31.766 \pm 4.535), (41.916 \pm 4.819)$] than those in the normal control group [$(24.440 \pm 4.468), (14.265 \pm 3.718), (20.383 \pm 3.230)$] ($t=10.762, P=0.000; t=6.673, P=0.000; t=8.229, P=0.000$); the activities of SOD and contents of GSH in hippocampus and livers in SR group lowered significantly, compared with those in the normal control group ($t=4.171, P=0.003; t=8.851, P=0.000; t=7.138, P=0.000; t=5.390, P=0.000$). Compared with that of normal control group, the expression level of TNF- α [$(0.702 \pm 0.088), (0.818 \pm 0.074)$], P53 [$(0.626 \pm 0.103), (1.225 \pm 0.116)$] and BAX [$(0.978 \pm 0.078), (1.120 \pm 0.135)$] in hippocampus and livers increased significantly ($t=13.688, P=0.000; t=11.682, P=0.000; t=6.991, P=0.000; t=10.023, P=0.000; t=13.721, P=0.000; t=10.422, P=0.000$), while the expression level of BCL-2 [$(0.365 \pm 0.059), (0.380 \pm 0.040)$] decreased significantly ($t=15.165, P=0.000; t=12.143, P=0.000$), and the positive expression of Ki-67 in hippocampus decreased significantly ($t=4.171, P=0.003$). **Conclusion:** SR induces the oxidative stress of brains and livers in mice and elevates the concentration of inflammatory cytokines in the brain and serum, and mediates the DNA damage through cell apoptosis.

[Key words] chronic sleep restriction; oxidative stress; inflammation; DNA damage

随着现代社会生活节奏的加快和工作压力的增加,人类每天睡眠时间减少,睡眠质量降低,睡眠不足已发展为一种普遍现象。研究证实正常人睡眠不足会导致学习记忆能力与注意力下降、情感反应迟钝、认知功能下降、焦虑抑郁等情绪障碍,预示神经退行性疾病的发展^[1-2]。流行病学研究表明,长期睡眠不足与 2 型糖尿病、高血压、心血管疾病等密切相关^[3]。睡眠不足引起的机体自由基产生增多,细胞抗氧化能力下降,是导致机体功能缺陷的原因之一,但其作用机制仍不太清楚。大量研究表明,功能疾病的发病机制与氧化应激和炎症反应密切相关,肝脏作为解毒器官,其高代谢率更易受活性氧自由

基(reactive oxygen species, ROS)的攻击,而大脑是耗氧量最大的器官,易发生抗氧化平衡失调^[4],因此本课题采用改良多平台(modified multiple platform, MMP)^[5]建立小鼠慢性睡眠不足模型,研究慢性睡眠不足对小鼠大脑和肝脏功能的影响及机制,旨在为改变不良生活方式和提高生活质量提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康 4 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠 20 只,由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号:SYXK

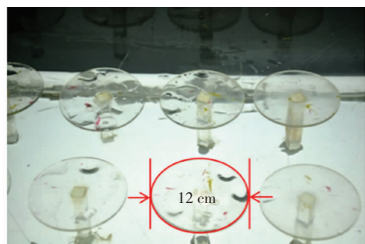
(渝)2012-0001。小鼠饲养在无菌塑料盒中,5 只/盒,环境安静,12 h/12 h 光照/黑暗周期(8:00~20:00),温度控制在 22℃~24℃,湿度保持在 60%~70%,自由摄取水和食物。本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 主要试剂 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测试盒、微量还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)测试盒购自南京建成生物工程研究所;BCA 法蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司;小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒购自欣博盛公司;Anti-P53、Anti-Ki-67 购自万类生物;Anti-TNF- α 、Anti-BAX、Anti-BCL-2 购自博士德生物;Antibody GAPDH、Antibody β -actin 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL 化学发光检测试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术公司。

1.1.3 动物模型的构建 采用 MMP 睡眠剥夺技术建立睡眠不足模型,装置如图 1 所示^[6]。实验前所有小鼠在水环境适应性饲养 1 周后,采用数字随机的方法,将 20 只小鼠随机分为正常对照组和睡眠剥夺组,2 组小鼠的水环境相同。睡眠剥夺组小鼠放置于直径为 2 cm 的小平台,小鼠进入睡眠后,肌张力降低而接触水或掉到水中,突然惊醒;正常对照组小鼠放置于直径为 12 cm 的大平台,小鼠可以正常睡眠。箱中装水使水面低于平台约 1 cm,水温保持在 22℃~24℃,箱顶盖上鼠笼盖,放置饲料和水瓶,小鼠可在平台上自由活动,随意进食饮水。小鼠每天在水箱中活动 20 h(13:00~9:00)后,放回灭菌的塑料盒内饲养 4 h(9:00~13:00)。



A. 小鼠睡眠剥夺装置(平台直径 2 cm)



B. 小鼠正常对照装置(平台直径 12 cm)

图 1 睡眠剥夺装置示意图

Fig.1 Water tank for chronic sleep restriction

1.2 实验方法

1.2.1 Morris 水迷宫实验 慢性睡眠不足模型构建结束后第 2 天进行 Morris 水迷宫实验,检测各组小鼠空间学习记忆

能力,具体方法参考 Long^[7]:可视平台测试,将平台调整至高于水面 1 cm,小鼠分别从 4 个象限放入水中。隐藏平台测试,平台被固定在同一位置,调至低于水面 1 cm,记录其 60 s 内小鼠到达平台的逃避潜伏期和游泳路程。空间探索测试,撤去平台,记录不同象限 60 s 小鼠的游泳速度、穿越原平台的次数、在原平台目标象限停留时间百分比。

1.2.2 肝重指数、脾重指数、肾重指数的测定 小鼠麻醉前称重,采用 3.5%的水合氯醛 1 mL/100 g 腹腔注射麻醉大鼠,眼眶取血后,固定于手术台上,0.9%生理盐水灌注,剖取肝脏、脾脏、肾脏,0.01 mol/L PBS 洗净组织,滤纸吸干,称重,脏器指数=脏器重量(mg)/体质量(g)。

1.2.3 ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量 采血后室温静置 1 h 至血清析出,离心(4℃,2 000 r/min,15 min),分离上清液进行分析。按照试剂盒说明步骤进行加样,设置空白孔,用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长的吸光度值,运用 CurveExpert 1.4 软件计算炎症因子的浓度。

1.2.4 酶标比色法检测海马和肝脏组织 SOD 活力和 GSH 含量 10%匀浆液的制备:新鲜分离的组织,1 g 组织加入 9 mL 生理盐水,冰水浴匀浆,静置 5 min;离心(4℃,3 000 r/min,10 min)。取上清液,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。SOD 活力:按照试剂盒说明步骤进行加样,每个孔设置 3 个复孔,用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长的吸光度值,计算待测样本 SOD 活力;GSH 含量:按照试剂盒说明步骤进行加样,用酶标仪测定各孔在 405 nm 波长的吸光度值,计算待测样本 GSH 含量。

1.2.5 Western blot 检测海马和肝脏组织 P53、TNF- α 、BAX、BCL-2 蛋白表达水平 常规提取海马和肝脏总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,10%(检测 P53)和 12%(检测 TNF- α 、BAX 和 BCL-2)SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉 37℃封闭 1 h,分别加入 P53(1:1 000)、TNF- α (1:200)、BAX(1:400)、BCL-2(1:400)、GAPDH(1:1 000)、 β -Actin(1:1 000)一抗 4℃孵育过夜,TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,二抗 37℃孵育 1 h,TBST 洗膜 30 min $\times$ 3 次,ECL 显影。运用 Image Lab 5.2 软件分析蛋白条带灰度值,计算蛋白相对表达量。

1.2.6 免疫组织化学检测海马 Ki-67 的表达 海马组织经 4%多聚甲醛固定,蔗糖梯度脱水后,于冰冻切片机切片,厚度为 10 μ m。枸橼酸钠盐 95℃抗原修复 30 min,冷却至室温,3% H_2O_2 去离子水室温孵育 10 min,PBS 冲洗后正常山羊血清工作液室温孵育 15 min,一抗工作液(1:200)4℃孵育过夜,用 PBS 代替一抗工作液作阴性对照。二抗室温孵育 30 min,PBS 冲洗后辣根酶标记链霉卵白素工作液室温孵育 30 min,DAB 显色剂显色,复染,分化,返蓝,脱水,透明,封片。随机选取 4 个海马齿状回和门区高倍视野(400 $\times$),计数阳性细胞百分比。

1.3 统计学分析

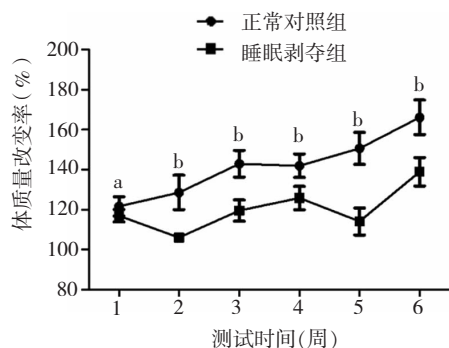
实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间采用 t 检验;体质

量的改变和水迷宫隐蔽平台实验数据为重复测量资料,采用重复测量方差分析进行检测。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 慢性睡眠不足减缓小鼠体质量的生长

睡眠剥夺前 2 组小鼠体质量无明显差异 ($t=1.987, P=0.062$), 从第 1 周到第 6 周, 正常对照组小鼠体质量逐渐增加, 仅在第 4 周略有下降 [$(14.979 \pm 1.413) \text{ g}, (15.775 \pm 1.034) \text{ g}, (17.555 \pm 1.107) \text{ g}, (17.431 \pm 0.958) \text{ g}, (18.481 \pm 0.896) \text{ g}, (20.399 \pm 1.226) \text{ g}$], 睡眠剥夺组小鼠体质量增加缓慢, 且在睡眠剥夺后的第 2 周和第 5 周下降 [$(13.599 \pm 0.759) \text{ g}, (12.320 \pm 0.561) \text{ g}, (13.887 \pm 0.671) \text{ g}, (14.610 \pm 0.672) \text{ g}, (13.248 \pm 0.761) \text{ g}, (16.135 \pm 0.907) \text{ g}$], 睡眠剥夺组小鼠体质量改变率分别为 [$(1.170 \pm 0.030), (1.060 \pm 0.022), (1.196 \pm 0.053), (1.258 \pm 0.059), (1.141 \pm 0.067), (1.389 \pm 0.071)$], 均低于正常对照组, 如图 2 所示。重复测量方差分析结果显示, 2 组小鼠体质量改变率之间的差异有统计学意义 ($F=110.217, P=0.000$), 时间与处理因素之间存在交互作用 ($F=18.724, P=0.000$)。



a: 与正常对照组比较, $P<0.05$; b: 与正常对照组比较, $P<0.001$

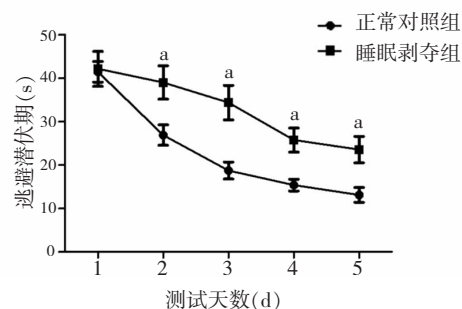
图 2 2 组小鼠体质量改变率的变化

Fig.2 Changes of body weight in the control group and sleep deprivation group

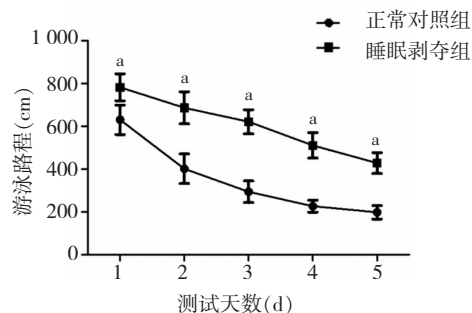
2.2 慢性睡眠不足降低小鼠空间学习记忆能力

Morris 水迷宫结果显示, 隐蔽平台实验的第 1 天, 睡眠剥夺组与正常对照组小鼠逃避潜伏期 (找到隐蔽平台的时间) [$(42.175 \pm 4.031) \text{ s}$ vs. $(41.475 \pm 2.364) \text{ s}$] 无明显差异 ($t=0.474, P=0.641$)。随着训练时间的延长, 2 组小鼠逃避潜伏期和找到平台的游泳路程均逐渐减少, 在第 2、3、4、5 天, 睡眠剥夺组小鼠逃避潜伏期分别为 $(39.025 \pm 3.852), (34.375 \pm 3.960), (25.750 \pm 2.791), (23.575 \pm 3.035) \text{ s}$, 正常对照组小鼠逃避潜伏期分别为 $(26.900 \pm 2.352), (18.725 \pm 1.960), (15.375 \pm 1.350), (13.100 \pm 1.692) \text{ s}$; 隐蔽平台实验第 1~5 天, 睡眠剥夺组小鼠找到目标平台的游泳路程分别为 $(782.586 \pm 63.098), (687.351 \pm 75.064), (621.807 \pm 56.110),$

$(511.457 \pm 59.428), (428.470 \pm 48.667) \text{ cm}$, 正常对照组小鼠找到目标平台的游泳路程分别为 $(631.006 \pm 68.847), (402.460 \pm 69.160), (294.402 \pm 50.657), (227.378 \pm 28.369), (198.755 \pm 31.372) \text{ cm}$ 。睡眠剥夺组小鼠找到平台的平均潜伏期和游泳路程较正常对照组均明显增加 ($F=196.722, P=0.000; F=308.729, P=0.000$), 时间与处理因素之间存在交互作用 ($F=6.759, P=0.004; F=5.361, P=0.007$), 如图 3A、B 所示。空间探索实验中, 2 组小鼠的游泳速度没有明显差异 ($t=0.756, P=0.459$), 睡眠剥夺组穿越原平台的次数明显少于正常对照组 ($t=7.055, P=0.000$), 睡眠剥夺组小鼠在原目标象限活动的时间百分比明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t=7.877, P=0.000$), 见表 1。



A. 小鼠逃避潜伏期



B. 小鼠游泳路程

a: 与正常对照组比较, $P=0.000$

图 3 2 组小鼠逃避潜伏期和游泳路程的比较

Fig.3 Comparison of the escape latency and length between the control group and sleep deprivation group

表 1 2 组小鼠游泳速度、目标象限时间和穿越原平台次数的比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab.1 Comparison of the swimming speed, time spent in the designated target quadrant and number of times the mouse crossed the exact place between the control group and sleep deprivation group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	游泳速度 (cm/s)	目标象限时间 (%)	穿越平台次数 (次/s)
正常对照组	17.095 ± 1.320	47.270 ± 3.560	2.950 ± 0.329
睡眠剥夺组	17.582 ± 1.670	32.923 ± 3.205	1.700 ± 0.453
t 值	0.756	7.877	7.055
P 值	0.459	0.000	0.000

2.3 慢性睡眠不足对脏器指数的影响

与正常对照组比较,睡眠剥夺组小鼠肝重指数和肾重指数明显增高($t=4.247, P=0.000; t=3.629, P=0.002$),脾重指数下降($t=2.380, P=0.029$),见表 2。

表 2 2 组小鼠肝脏指数、脾脏指数和肾脏指数的比较

($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg/g}$)

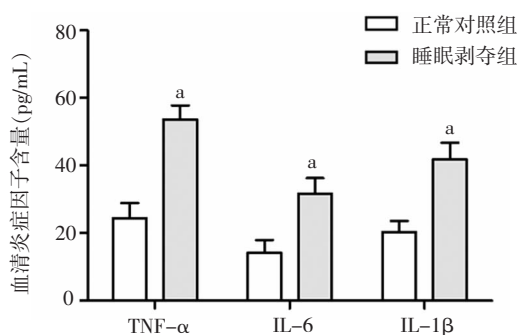
Tab.2 Comparison of the liver, spleen and kidney wet weight index between the control group and sleep deprivation group

($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg/g}$)

分组	肝重指数	脾重指数	肾重指数
正常对照组	48.652 ± 4.540	3.867 ± 0.393	14.258 ± 1.454
睡眠剥夺组	57.084 ± 4.337	3.397 ± 0.485	16.184 ± 0.839
<i>t</i> 值	4.274	2.380	3.629
<i>P</i> 值	0.000	0.029	0.002

2.4 慢性睡眠不足促进 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达

2 组小鼠血清炎症因子的改变如图 4 所示,睡眠剥夺组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量[(53.719 ± 4.128), (31.766 ± 4.535), (41.916 ± 4.819)]较正常对照组[(24.440 ± 4.468), (14.265 ± 3.718), (20.383 ± 3.230)]明显增加($t=10.762, P=0.000; t=6.673, P=0.000; t=8.229, P=0.000$)。



a: 与正常对照组比较, $P < 0.001$

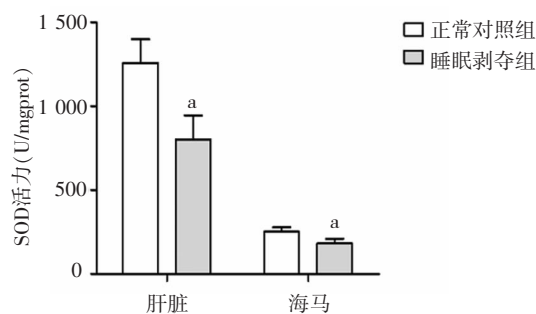
图 4 各组小鼠血清炎症因子的比较

Fig.4 Comparison of the pro-inflammatory cytokines in serum between the control group and sleep deprivation group

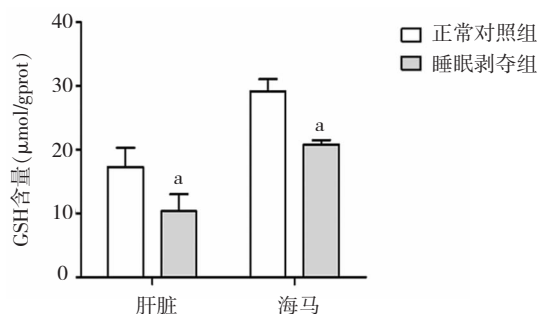
2.5 慢性睡眠不足降低小鼠海马和肝脏组织 SOD 活力和 GSH 含量

小鼠海马和肝脏的抗氧化能力如图 5 所示,睡眠剥夺组小鼠海马 SOD 活力和 GSH 含量较正常对照组明显下降[(181.955 ± 27.232) vs. (251.809 ± 25.706); (20.859 ± 0.658) vs. (29.141 ± 1.986)],差异有统计学意义($t=4.171, P=0.003; t=8.851, P=0.000$);肝脏 SOD 活力和 GSH 含量较正常对照组明显降低[(800.601 ± 143.576) vs. (1256.865 ± 142.282); (10.377 ± 2.659) vs. (17.284 ± 3.058)],差异有统计学意义($t=7.138, P=0.000; t=5.390, P=0.000$)。结果表明,睡眠不足能

降低机体的抗氧化能力。



A. 酶标比色法检测海马和肝脏组织 SOD 活力



B. 酶标比色法检测海马和肝脏组织 GSH 含量

a: 与正常对照组比较, $P < 0.01$

图 5 2 组小鼠海马和肝脏组织 SOD 活力、GSH 含量的比较

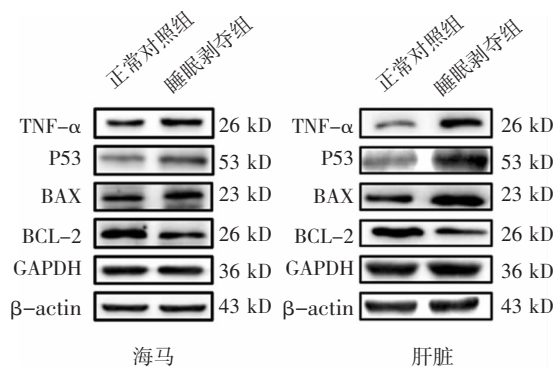
Fig.5 Comparison of the activities of SOD, contents of GSH in hippocampus and livers between the control group and sleep deprivation group

2.6 慢性睡眠不足上调 TNF- α 、P53 和 BAX 蛋白表达,下调 BCL-2 蛋白水平

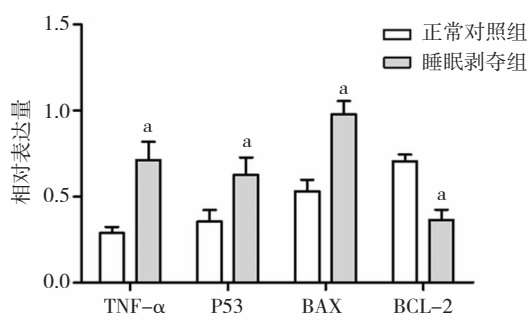
小鼠海马和肝脏的炎症蛋白和凋亡相关蛋白的表达水平如图 6 所示,睡眠剥夺组小鼠海马和肝脏 TNF- α [(0.702 ± 0.088), (0.818 ± 0.074)], P53[(0.626 ± 0.103), (1.225 ± 0.116)]和 BAX[(0.978 ± 0.078), (1.120 ± 0.135)]蛋白相对表达量较正常对照组[(0.280 ± 0.042), (0.364 ± 0.045); (0.354 ± 0.067), (0.587 ± 0.082); (0.530 ± 0.067), (0.398 ± 0.075)]均明显升高($t=13.688, P=0.000; t=11.682, P=0.000; t=6.991, P=0.000; t=10.023, P=0.000; t=13.721, P=0.000; t=10.422, P=0.000$), BCL-2 蛋白相对表达量[(0.365 ± 0.059), (0.380 ± 0.040)]较正常对照组[(0.705 ± 0.039), (0.950 ± 0.097)]明显下降($t=15.165, P=0.000; t=12.143, P=0.000$)。

2.7 慢性睡眠不足下调 Ki-67 蛋白的表达

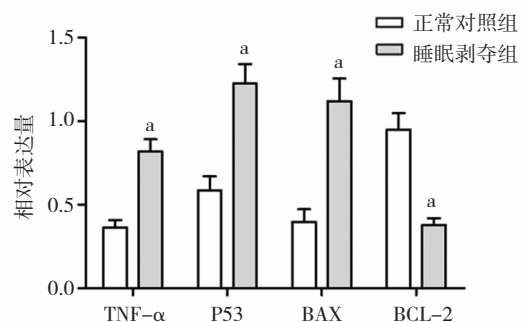
免疫组织化学结果显示,睡眠剥夺组小鼠海马齿状回和门区 Ki-67 的阳性表达率为(9.163 ± 2.087)%,与正常对照组(21.84 ± 4.304)%相比,明显下降($t=4.171, P=0.003$),如图 7 所示。



A. Western blot 检测相关蛋白表达



B. 海马相关蛋白的相对表达量

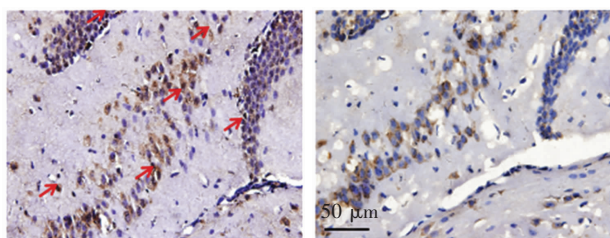


C. 肝脏相关蛋白的相对表达量

a: 与正常对照组比较, $P < 0.001$

图 6 2 组小鼠海马和肝脏 P53、TNF-α、BAX 和 BCL-2 蛋白表达的比较

Fig.6 Comparison of the expression of P53, TNF-α, BAX and BCL-2 between the control group and sleep deprivation group



A. 正常对照组

B. 睡眠剥夺组

图 7 2 组小鼠海马门区 Ki-67 蛋白表达的比较

Fig.7 Comparison of the expression of Ki-67 between the control group and sleep deprivation group

3 讨论

充足和有质量的睡眠是人类认知功能和健康的重要保障,现代社会产生的工作和生活压力正在潜移默化地改变人类睡眠质量和睡眠持续时间。流行病学研究表明,长期睡眠不足可增加老年痴呆等神经退行性病变的发病率和死亡率^[8-9]。大量研究表明,慢性生活和工作压力与精神疾病、心脑血管疾病和某些类型的肿瘤密切相关,导致器官功能损伤^[10]。慢性睡眠不足作为一种压力源,导致机体更高的压力脆弱性和易感性,其对肝脑损伤的机制尚不清楚。

本实验发现,通过 MMP 法建立的小鼠睡眠不足模型,小鼠体质量增加缓慢。Porter 和 Alzoubi 等^[11-12]发现睡眠剥夺通过提高代谢率使机体进入负能量平衡状态,导致小鼠食欲增加而降低体质量, O_2 的消耗量与体质量的下降呈显著正相关。睡眠剥夺导致小鼠能量消耗增加,机体新陈代谢亢进,引起体质量下降。然而, Hakim 等^[13]研究发现睡眠不足通过激活内质网应激降低瘦素水平,导致小鼠代谢功能障碍,饮食和体质量增加。因此,睡眠不足对小鼠体质量的影响还存在争议,这种差异可能与睡眠剥夺的方式和持续时间不同有关。

在本实验中,采用 Morris 水迷宫实验发现慢性睡眠不足能够导致小鼠的空间学习记忆能力下降,提示睡眠在认知功能中起着至关重要的作用,符合相关文献报道^[14]。慢性睡眠不足,通过增加海马氧化应激反应,改变突触结构和功能,降低神经元的可塑性而损害认知功能。研究发现睡眠不足可通过降低脑源性神经营养因子的水平抑制细胞增殖,减少海马神经元的数量,降低认知能力^[15]。Ki-67 是一种与细胞增殖有关的核蛋白,本实验结果显示,慢性睡眠不足降低 Ki-67 的表达,提示海马细胞增殖减少。

大量研究已证实,睡眠不足可以引起氧化应激反应,诱发多器官功能损伤^[16]。本实验发现慢性睡眠不足的小鼠海马和肝脏组织 SOD 活性和 GSH 含量均下降,与 Lima 等^[17]研究结果一致。睡眠不足可激活下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)轴,糖皮质激素的释放增加而促进氧化应激^[18]。SOD 和 GSH 是氧化应激的重要标志物,其活性的改变提示机体对 ROS 清除能力下降。慢性

睡眠不足使机体自由基产生增多而清除能力减弱,积聚的自由基改变 DNA、蛋白质和脂质的结构和功能,导致 DNA 氧化损伤,机体抗氧化能力降低,而充足的睡眠有助于清除清醒期积聚在组织的 ROS 从而发挥抗氧化损伤的作用。

有研究表明,睡眠不足会引起免疫系统的改变,激活炎症反应,大脑及其他器官 IL-1、IL-4、IL-6、IL-10 和 TGF β 1 等细胞因子表达增加,长期炎症反应会导致组织损伤^[9]。本研究进一步表明,睡眠剥夺后小鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达增高,提示睡眠不足通过激活细胞因子的分泌诱导炎症反应的发生,与 Kincheski 等^[20]、Venancio 和 Suchecki^[21]研究结果一致。ROS 通过促进 NF- κ B 从细胞质向细胞核转移,介导炎性细胞因子的形成。另一方面,氧化应激阻止糖皮质激素受体从细胞质向细胞核的移动,通过调节 HPA 轴而增加炎症因子水平。本实验还发现慢性睡眠不足的小鼠肝脑细胞 P53 和促凋亡蛋白 BAX 表达增高,抑凋亡蛋白 BCL-2 表达降低。P53 编码的蛋白与 DNA 氧化损伤和修复密切相关,慢性睡眠不足诱发的 DNA 损伤,可能通过激活 P53-P21 细胞信号通路及下游基因的靶,抑制 Bcl-2 和(或)激活 BAX,诱导细胞周期停滞和促进细胞凋亡,从而加速机体和脏器损伤。

综上所述,慢性睡眠不足可激活大脑和肝脏的氧化应激和炎症反应,加速细胞凋亡,可能会引起肝脑等器官功能的损伤,具体分子机制尚有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] McCoy JG, Strecker RE. The cognitive cost of sleep lost[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2011, 96(4): 564-582.
- [2] Cordi MJ, Hirsiger S, Merillat S, et al. Improving sleep and cognition by hypnotic suggestion in the elderly[J]. *Neuropsychologia*, 2015, 69: 176-182.
- [3] Tobaldini E, Pecis M, Montano N. Effects of acute and chronic sleep deprivation on cardiovascular regulation[J]. *Arch Ital Biol*, 2014, 152(2-3): 103-110.
- [4] Lu Y, Hu D, Ma S, et al. Protective effect of wedelolactone against CCl₄-induced acute liver injury in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016(34): 44-52.
- [5] Rothman SM, Herdener N, Frankola KA, et al. Chronic mild sleep restriction accentuates contextual memory impairments, and accumulations of cortical A β and pTau in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Brain Res*, 2013(1529): 200-208.
- [6] 刘丽君, 何 菲, 郭 珮, 等. 睡眠剥夺上调小鼠腺腺 TNF- α 的表达[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2015, 25(5): 461-464.
- [7] Long ZM, Zhao L, Jiang R, et al. Valproic acid modifies synaptic structure and accelerates neurite outgrowth via the glycogen synthase kinase-3 β signaling pathway in an Alzheimer's disease model[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(11): 887-897.
- [8] Zhao HY, Wu HJ, He JL, et al. Chronic sleep restriction induces Cognitive deficits and cortical Beta-amyloid deposition in mice via BACE1-antisense activation[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2017, 23(3): 233-240.
- [9] Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, et al. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(2): 414-420.
- [10] Eriksson M, Raikonen K, Eriksson JG. Early life stress and later health outcomes—findings from the Helsinki Birth Cohort Study[J]. *Am J Hum Biol*, 2014, 26(2): 111-116.
- [11] Porter NM, Bohannon JH, Curran-Rauhut M, et al. Hippocampal CA1 transcriptional profile of sleep deprivation: relation to aging and stress[J]. *PLoS One*, 2012, (7): e40128.
- [12] Alzoubi KH, Khabour OF, Salah HA, et al. The combined effect of sleep deprivation and Western diet on spatial learning and memory: role of BDNF and oxidative stress[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 50(1): 124-133.
- [13] Hakim F, Wang Y, Carreras A, et al. Chronic sleep fragmentation during the sleep period induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and PTP1b-mediated leptin resistance in male mice[J]. *Sleep*, 2015, 38(1): 31-40.
- [14] Zielinski MR, Davis JM, Fadel JR, et al. Influence of chronic moderate sleep restriction and exercise training on anxiety, spatial memory, and associated neurobiological measures in mice[J]. *Behav Brain Res*, 2013(250): 74-80.
- [15] Sahu S, Kauser H, Ray K, et al. Caffeine and modafinil promote adult neuronal cell proliferation during 48 h of total sleep deprivation in rat dentate gyrus[J]. *Exp Neurol*, 2013, 248: 470-481.
- [16] Periasamy S, Hsu DZ, Fu YH, et al. Sleep deprivation-induced multi-organ injury: role of oxidative stress and inflammation[J]. *EXCLI J*, 2015(14): 672-683.
- [17] Lima AM, de Bruin VM, Rios ER, et al. Differential effects of paradoxical sleep deprivation on memory and oxidative stress[J]. *Naun-Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2014, 387(5): 399-406.
- [18] Schmitt K, Holsboer-Trachsler E, Eckert A. BDNF in sleep, insomnia, and sleep deprivation[J]. *Ann Med*, 2016, 48(1-2): 42-51.
- [19] Ashley NT, Sams DW, Brown AC, et al. Novel environment influences the effect of paradoxical sleep deprivation upon brain and peripheral cytokine gene expression[J]. *Neurosci Lett*, 2016(615): 55-59.
- [20] Kincheski GC, Valentim IS, Clarke JR, et al. Chronic sleep restriction promotes brain inflammation and synapse loss, and potentiates memory impairment induced by amyloid- β oligomers in mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2017(64): 140-151.
- [21] Venancio DP, Suchecki D. Prolonged REM sleep restriction induces metabolic syndrome-related changes: mediation by pro-inflammatory cytokines[J]. *Brain Behav Immun*, 2015(47): 109-117.

(责任编辑:张辉洁)