

快速动眼睡眠剥夺对大鼠学习、记忆能力及海马组织自噬的影响

孙文静 兰丹梅 杨洋 贺斌

【摘要】 目的 探讨快速动眼(rapid eye movement, REM)睡眠剥夺后与大鼠认知相关的行为学变化及脑内海马组织中自噬相关蛋白的表达水平。**方法** 健康成年雄性大鼠经过筛选后分为空白对照组(CC组)、环境对照组(TC组)、睡眠剥夺组(SD组),每组各6只;采用改良多平台睡眠剥夺法(modified multiple platform method, MMPM)建立睡眠剥夺模型,连续剥夺5 d后利用Morris水迷宫检测大鼠认知功能;用蛋白质印记法(Western Blot, WB)检测自噬相关微管蛋白(LC3)及SQSTM1/P62的表达水平变化。**结果** 与CC组和TC组比较,SD组大鼠毛色无光泽、易激惹、体重下降($P < 0.05$)。SD组与其他2组比较,逃逸潜伏期延长、目标象限时间减少($P < 0.05$)。WB显示SD组与其他2组比较,大鼠脑内海马组织自噬相关蛋白LC3-II表达水平上升,P62水平下降($P < 0.05$)。CC组与TC组大鼠比较,体重、学习记忆能力、海马组织自噬蛋白表达水平均无明显差异($P > 0.05$)。**结论** 睡眠剥夺后可损害大鼠学习及记忆功能,海马组织中自噬水平上调提示自噬活动可能参与睡眠剥夺介导的认知功能障碍过程。

【关键词】 睡眠剥夺 自噬 海马 认知功能

【中图分类号】 R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)04-0328-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.04.012

Effects of rapid eye movement sleep deprivation on cognitive and autophagy in rat hippocampus Sun Wen-jing, Lan Danmei, Yang Yang, et al. Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003

【Abstract】 Objective To investigate the effects of rapid eye movement(REM) sleep deprivation(SD) on the learning and memory abilities, and the changes of autophagy in the rat hippocampus. **Methods** Healthy adult male Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into sleep deprivation(SD) group, Treatment control(TC) group and circumstance control(CC) group, and each group included 6 rats. The sleep deprivation model was established by the modified multiple platform method(MMPM). After 5 days of measure, morris water maze was used to test the cognitive function of rats, and the hippocampal LC3-II and P62 protein levels were detected by western blot method. **Results** Compared with CC and TC groups, SD rats were exhausted and irritated. The weight of SD rats was considerably decreased from the third day of sleep deprivation($P < 0.05$). The escape latencies of SD group were obviously increased and rates of SD group spent significantly less time in the target quadrant than those of control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the protein expression of LC3-II was significantly increased as P62 significantly decreased in the SD group($P < 0.05$). At the same time, there were no significant differences between the CC group and TC group. **Conclusion** SD could be the reason which led to the decrease of learning and memory abilities, increased the expression of LC3-II and P62, elevated the formation of autophagosome, and suggested that autophagy might be involved in the cognitive impair induced by sleep deprivation.

【Key words】 Sleep deprivation Autophagy Hippocampus Cognitive function

基金项目:长征医院青年启动基金(海藻糖通过诱导自噬抑制慢性睡眠剥夺所致A β 沉积及机制研究)(2015CZQN03)

作者单位:200003 上海,解放军第二军医大学附属长征医院神经内科[孙文静 兰丹梅 杨洋 贺斌(通信作者)]

睡眠剥夺是指由于各种原因引起的睡眠时间或质量的下降,并导致学习记忆、认知心理等机体功能异常的状态^[1]。睡眠不足已经被公认为阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病的重要危险因素^[2-3],两者互为因果,恶性循环,但其中机制尚不明

确^[4-5]。

自噬即自我吞噬,是一种普遍存在的由溶酶体介导的降解过程,在维持细胞内物质的合成、降解平衡以及参与细胞成分的有序再利用,在营养匮乏或疾病状态下自噬可被激活,出现特征性的具有双层膜结构的自噬小体。已有文献报道 AD 脑内特征性病理改变的主要成分— β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β) 在自噬-溶酶体系统中产生并降解^[6],且多数 AD 患者发病早期即存在自噬溶酶体功能障碍^[7-8]。但自噬活动是否参与睡眠剥夺所致的认知功能障碍这一过程,目前少有相关报道。本研究主要通过建立快速动眼睡眠剥夺大鼠模型,通过观察大鼠学习记忆功能、脑内海马组织自噬活动的改变,以探讨自噬在睡眠剥夺介导认知障碍中可能发挥的作用,为认知障碍提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 成年雄性 SD 大鼠(由第二军医大学动物中心提供),体质量 220~250 g($n=18$)。标准实验环境中饲养(光照 12 h、温度 21~22℃、湿度 50%),并随机分为 3 组:空白对照组(CC 组)($n=6$)、环境对照组(TC 组)($n=6$)、睡眠剥夺组(SD 组)($n=6$)。

1.2 实验试剂 10%水合氯醛(中国武汉协和医院)、RIPA 裂解液(碧云天生物科技研究所)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(碧云天生物科技研究所)、Anti-LC3B antibody(Abcam, UK)、P62 抗体(Proteintech Group, USA)、 β -actin(Abcam, UK)、蛋白 Marker (Therm Fermentas)、TBS 缓冲液(武汉谷歌生物科技)。

1.3 模型制备 采用改良多平台 REM 睡眠剥夺法(modified multiple platform method, MMPM)建立 REM 睡眠剥夺模型^[9];SD 组剥夺水槽放置两排平台,每排 8 个平台,在水槽内注水,水温保持在 22℃左右,水面距平台约 1.0 cm,大鼠在平台上可自行摄食饮水,并可在平台间活动;当大鼠进入 REM 睡眠时,由于全身肌肉张力降低,节律性地垂头触水而觉醒,从而使大鼠始终不能进入 REM 睡眠期,造成 REM 睡眠剥夺;TC 组装置与睡眠剥夺组类似,但平台直径较大,大鼠睡眠时不会落入水中;实验前将各组大鼠放在同一笼中饲养,并将大鼠放在平台上适应 3 d,每天适应 1 h,水槽中的水每天更换;CC 组常规标准饲养。

1.4 大鼠状态观察 观察各组大鼠毛发整齐度及色泽变化,有无脚趾、鼠尾的出血破溃,是否存在激惹好斗等现象,并记录大鼠进食水量及体重变化。

1.5 行为学观察 实验前 3 d 及睡眠剥夺 5 d、大鼠熟悉环境 3 d 后采用 Morris 水迷宫(上海吉量科技公司)测试系统测量大鼠定位及空间探索能力,由监视探头记录实验过程,每只大鼠在同一平台上游泳,记录大鼠找到平台逃逸的潜伏期、游泳总路程及总速度,记录 3 次并计算平均值。允许其在 120 s 内找到平台,找到后继续保持 20 s;若在 120 s 内找不到平台,则将大鼠引导至平台上保持 20 s,记录潜伏期为 120 s。

1.6 大鼠脑内自噬水平的测定 每组 6 只大鼠在相应时间点经 10%水合氯醛(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉后快速断头取脑,在冰上分离出海马组织,迅速以液氮处理后-80℃冻存;采用蛋白质印迹法检测大鼠脑内 LC3 及 P62 蛋白表达水平;将海马组织解冻后超声震碎,用试剂盒提取蛋白,加入蛋白裂解液并手动匀浆,4℃13000 r/min 离心 15 min,取上清液,BCA 蛋白定量检测试剂盒定量;样本经过电泳、转膜、封闭后加入自噬相关抗体 LC3B(工作浓度为 1:1000)、P62(工作浓度为 1:2000)以及 β -actin(工作浓度为 1:1000)4℃过夜, TBST 清洗后加入 HRP 标记抗大鼠二抗或抗兔二抗(工作浓度均为 1:3000),室温下孵育 30 min 后用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次(每次 5 min),用显影、定影试剂进行显影和定影后根据不同的光强度调整曝光条件后观察。以 LC3II、P62 目的条带与内参 β -actin 条带光密度值代表各产物的相对表达水平。

1.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。其中质量、潜伏期及逃逸时间采用 two-way ANOVA 进行多组间差异比较,蛋白表达水平采用 one-way ANOVA 进行多组间差异比较。 $P < 0.05$ 为有显著差异。

2 结果

2.1 一般状态变化 随 REM 睡眠剥夺后大鼠的行为和生理变化日益明显,大鼠能量消耗增加、疲惫、皮毛蓬乱无光泽、体重下降,且攻击性增强,对声音等环境刺激的警觉性、反应性也增强,因易激惹扒搔后爪子也有损伤,表现为脚趾粘膜破损出血,而 TC 组及 CC 组大鼠行为正常,体重较实验前增加(图 1)。

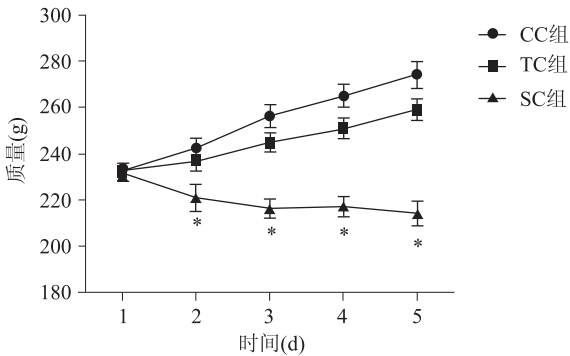


图1 睡眠剥夺后大鼠体重变化 与SD组比较,* $P<0.05$

2.2 行为学观察 REM剥夺后SD组与TC、CC组比较,逃逸潜伏期延长,目标象限时间缩短($P<0.05$),但TC组与CC组比较,逃逸潜伏期及目标象限时间变化均不大($p>0.05$)(图2)。

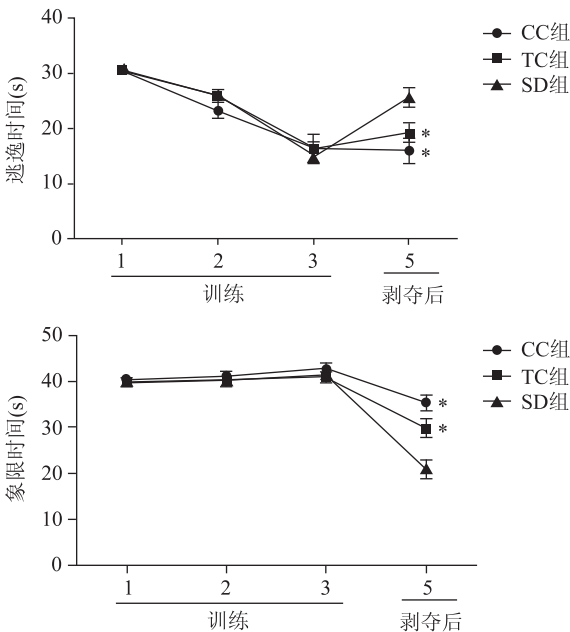


图2 睡眠剥夺后大鼠行为学改变与SD组比较* $P<0.05$

2.3 大鼠海马组织自噬活动变化 REM剥夺后SD组大鼠TC、CC组比较,脑内海马组织自噬微管相关蛋白LC3-II表达水平上升,而P62蛋白表达水平下降($P<0.05$)。TC组与CC组比较,大鼠海马组织中两种蛋白的表达水平变化不明显($P>0.05$)(图3)。

3 讨论

AD是最常见的神经退行性疾病,主要表现为智力与认知功能减退以及行为和人格改变。近年来研究发现睡眠剥夺是AD的重要发病因素,著名的

AD病专家Pan在2014年度发文称睡眠障碍可导致AD,呼吁控制睡眠障碍,以减少AD的发生^[10]。A β 沉积形成的老年斑、神经纤维缠结是AD脑内特征性的病理改变^[11]。A β 的生成增多或降解减少是脑内A β 沉积的基本原因。由于A β 在自噬-溶酶体系统中产生并降解,所以自噬溶酶体功能障碍均可导致A β 降解减少、A β 沉积^[12],多数AD患者发病早期即存在自噬溶酶体功能障碍^[13]。自噬与溶酶体功能的平衡可能是AD的关键机制^[14],在AD发病机制中自噬泡形成障碍^[15]、自噬泡的转运障碍^[16]、自噬泡与溶酶体融合障碍^[17]、溶酶体功能障碍^[17]等任一环节障碍均可导致A β 的降解减少,导致A β 异常沉积及认知障碍。

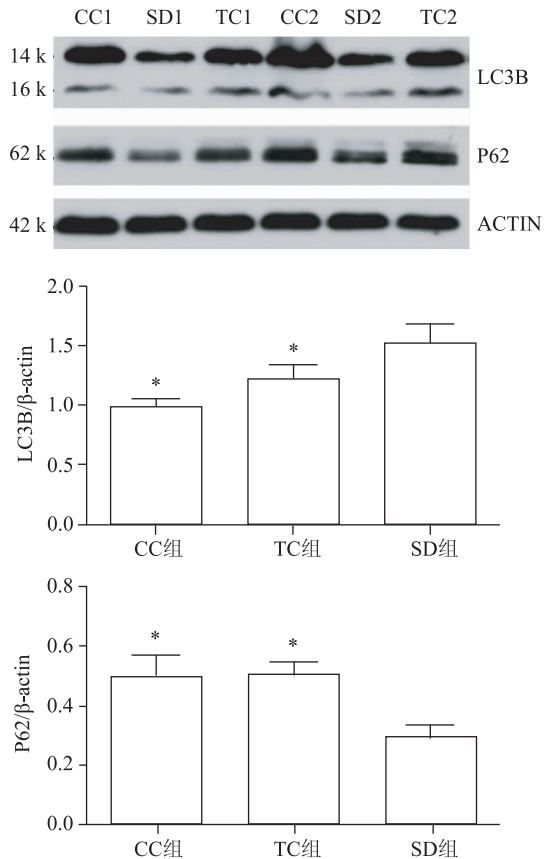


图3 睡眠剥夺后大鼠海马组织自噬水平的变化 与SD组比较* $P<0.05$

自噬过程由一系列自噬相关基因(Atg)编码的对应蛋白参与完成,LC3是酵母Atg8在哺乳动物中的同源物,分为I型和II型,被认为是自噬发生的标志,自噬激活时LC3I转换为LC3-II^[18]。p62为一种多结构域的支架蛋白,结合泛素化修饰的蛋白,并将其运送至自噬泡中降解。自噬发生时p62蛋白

被不断降解。自噬功能缺陷或活性减弱时 p62 蛋白在细胞质中不断积累。因此, p62 水平可作为反映自噬活性的指标^[19]。

本实验研究结果进一步验证了睡眠剥夺可以导致认知行为能力下降。随着剥夺时间的延长, 大鼠的空间学习能力受到了明显的损害。同时, 海马作为脑内边缘系统中调控学习记忆的中枢, 睡眠剥夺后对其组织中自噬水平进行检测后发现, SD 组大鼠海马区 LC3-II 蛋白水平上升, p62 水平下降, 且与其他 2 组相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明快速动眼期睡眠剥夺可引起大鼠脑内海马区自噬水平上调。与邱红艳等人发表的慢性睡眠剥夺对小鼠脑内自噬水平的影响结果一致^[20]。提示自噬活动参与睡眠剥夺后认知功能损伤这一过程。但就其具体机制, 需进一步研究, 从而寻求包括 AD 在内的神经疾病治疗的新方案。

参 考 文 献

- [1] Davies SK, Ang JE, Revell VL, et al. Effect of sleep deprivation on the human metabolome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(29):10761-10766.
- [2] Lim MM, Gerstner JR, Holtzman DM. The sleep-wake cycle and Alzheimer's disease; what do we know? [J]. *Neurodegener Dis Manag*, 2014, 4(5):351-362.
- [3] Walker MP, Stickgold R. Sleep-dependent learning and memory consolidation[J]. *Neuron*, 2004, 44(1):121-133.
- [4] Ju YB. Alzheimer Disease Pathology—a Bidirectional Relationship[J]. *Nat Rev neurol*, 2013, 10(2):115-119.
- [5] Lim AS, Yu L, Kowgier M, et al. Modification of the relationship of the apolipoprotein E epsilon 4 allele to the risk of Alzheimer disease and neurofibrillary tangle density by sleep[J]. *JAMA Neurol*, 2013, 70(12):1544-1551.
- [6] Pasternak SH, Bagshaw RD, Guiral M, et al. Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29):26687-26694.
- [7] Zhou X, Yang C, Liu Y, et al. Lipid rafts participate in aberrant degradative autophagic-lysosomal pathway of amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(1):92-100.
- [8] Li L, Zhang XJ, Le WD. Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *Neurodegener Dis*, 2010, 7(4):265-271.
- [9] Zagaar M, Alhaider I, Dao A, et al. The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: Behavioral, electrophysiological and molecular evidence[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(3):1153-1162.
- [10] Pan W, Kastin AJ. Can sleep apnea cause Alzheimer's disease? [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014, 47(4):656-669.
- [11] Querfurth HW, Laferla FM. Alzheimer's disease[J]. *Inpharma Weekly*, 1998, 1154(1):7-7.
- [12] Nilsson P, Loganathan K, Sekiguchi MA, et al. A beta Secretion and Plaque Formation Depend on Autophagy [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(1):61-69.
- [13] Zare SA, Masliah E, Johnson GV, et al. Autophagy in Alzheimer's disease[J]. *Rev Neurosci*, 2015, 26(4):385-395.
- [14] Peric A, Annaert W. Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction? [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(3):363-381.
- [15] Pickford F, Masliah E, Britschgi M, et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6):2190-2199.
- [16] Matej R, Rohan Z, Holada K, et al. The contribution of Proteinase-Activated receptors to intracellular signaling, transcellular transport and autophagy in Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2015, 12(1):2-12.
- [17] Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: A review[J]. *Neurochem Res*, 2000, 25(9/10):1161-1172.
- [18] Dong Y, Undyala VV, Gottlieb RA. Autophagy: definition, molecular machinery, and potential role in myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2010, 15(3):220-230.
- [19] Bordini M, Berg MJ, Mohan PS, et al. Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy [Z]. 2016:1-17.
- [20] 邱红艳, 李崧, 乐卫东, 等. 慢性睡眠剥夺对小鼠自噬和凋亡的影响[J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48(7):564-569. 引文 7, 13 重复。

(2016-12-01 收稿)