

# 连续及部分睡眠剥夺 96 小时后大鼠脑中 c-Fos 蛋白的表达

宋国萍, 苗丹民, 皇甫恩, 陈足怀

(第四军医大学航空航天医学系心理教研室, 陕西 西安 710032)

**【摘要】** 目的: 探索连续及部分不同睡眠剥夺条件下的脑 c-Fos 蛋白的表达。方法: 采用小平台水环境法建立大鼠睡眠剥夺模型, 用 Fos 蛋白免疫组化的方法分别测量连续睡眠剥夺 96 小时组、部分睡眠剥夺 96 小时组、大平台对照组和正常单独饲养组脑中 Fos 蛋白的表达, 每组 4 只。结果: 同连续睡眠剥夺组相比, 部分睡眠剥夺组表达范围更广, 在脑网状结构及中缝的被盖背侧核、脑桥被盖网状核及脑桥吻侧网状核、脑桥尾侧网状核、丘脑的中线核群、板内核群和网状核均有所表达, 但阳性程度低。结论: 部分睡眠剥夺对脑的影响要小于连续睡眠剥夺。

**【关键词】** 大鼠; c-Fos 蛋白; 免疫组化; 脑干; 睡眠剥夺

中图分类号: B84

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2003)01-0009-03

## c-Fos Protein Expression of the Rats on the Cerebral Stem after Continuing and Partial Sleep Deprivation of 96 Hours

SONG Guo-ping, MIAO Dan-min, HUANGFU En, CHEN Zu-huai

Department of Psychology, Faculty of Aviation Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate the expression of c-Fos protein after total and partial sleep deprivation (SD) of 96 hours.

**Methods:** SD was induced in the male Sprague-Dawley rats by housing them on the small platforms over water. Controls were housed in the normal cage (CC) or on the large platforms over water (TC). The effects of total and partial 96h SD on the expression of c-Fos protein were examined by immunocytochemistry. **Results:** SD made Fos protein express differently in the different fields of the brain. The expression of Fos protein of partial SD was wider and lighter than of total SD. **Conclusion:** Compared with total SD, partial SD has lighter stress.

**【Key words】** Rats; c-Fos Protein; Immunocytochemistry; Cerebral stem; Sleep deprivation

睡眠剥夺 (sleep deprivation, SD) 是指由于各种原因引起的睡眠丢失状态, 并引起情绪、学习记忆、免疫功能等一系列改变<sup>[1]</sup>, 是一种生理和心理应激。SD 在生活节奏日益加快的今天, 发生率明显升高, 并且更为多见的是部分睡眠剥夺 (partial sleep deprivation, PSD), 即 SD 并不是持续存在, 而是时断时续, 但总的睡眠时间少于日常所需。

c-Fos 原癌基因是一类即刻早期基因 (Immediate Early Genes, IEGs), 属核内蛋白类细胞癌基因。其特点是细胞外各种刺激均能诱导包括神经元及神经胶质细胞在内的 c-Fos 原癌基因快速、短暂地表达, 并表达在相应的脑功能区<sup>[2]</sup>。它参与细胞分裂、生长分化<sup>[3]</sup>、信息识别与传递、学习和记忆等生理活动, 也与行为及多种疾病的发生与发展密切相关<sup>[4]</sup>, 并且同动物的清醒水平也有一定的关系<sup>[5]</sup>。已有实验表明 SD 后, 脑中 c-Fos 蛋白表达发生变化<sup>[6]</sup>。

Fos 免疫组化法为我们提供了一种观察在单个细胞水平突触后神经元活动的方法, 为我们研究睡眠的机制提供了比较好的方法。为此, 我们采用“小平台水环境法”<sup>[7]</sup>剥夺大鼠睡眠, 分为连续 96h 组和

部分 96h 组, 用免疫组化的方法了解 SD 后 Fos 蛋白在脑中哪些区域表达, 从而了解连续、部分 SD 及其引起的行为变化的脑基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

成年、雄性、健康上海产 Sprague-Dawley 大鼠 16 只, 体质量  $180.0 \pm 5.0g$  (由第四军医大学实验动物中心提供)。将其随机分为 SD 组、PSD 组 (即每日在下午 12:00~16:00 允许自由活动 4h, 其余时间在 SD 模型中), 共持续 96h、大平台实验对照组 (tank control, TC) 和正常对照组 (cage control, CC)。每组 4 只。SD 组自早 8:00 开始剥夺睡眠。

### 1.2 睡眠剥夺模型的建立

根据文献<sup>[7]</sup>, 采用小平台水环境法 (flower pot) 建立大鼠 SD 模型, 制作  $30.0 \times 30.0 \times 30.0cm$  的鼠箱, 其中有一直径为 6.3cm, 高 8.0cm 的平台, 在平台周边注满水, 水温保持在  $20^\circ C$  左右, 水面距平台面约 1.0cm。鼠在平台上可自行饮食饮水。若其睡眠, 则由于肌肉张力松弛而落入水中。在大鼠活动

空间内持续 40w 日光灯照射,室内温度控制在 18~22℃。实验前,让鼠熟悉适应环境 1 周。大平台组直径为 18.0cm,其余条件同上。正常对照组,单独饲养于笼中,其余条件同上。

### 1.3 脑组织标本采集

SD 组、CC 组和 TC 组大鼠在实验后立即腹腔注射戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉,开胸经升主动脉灌注生理盐水 100ml,以快速冲洗全身组织血液,随后灌注冷的(4℃)4%多聚甲醛(0.1mol/L, PB 配制, PH7.4) 500ml,先快后慢,持续 90min~120min,注毕取全脑置于 20%蔗糖磷酸缓冲液(PH7.4, 4℃)中,放置 12~24h 至其沉底。用 Leitz kryomat 1700 型组织冰冻切片机做连续冠状冰冻切片,片厚 50μm,隔 5 取 1,切片收集于 0.01mol/L PBS 中。

### 1.4 免疫组织化学染色

在温室条件下,切片用 0.2% TritonX-100 液孵育 40min,用羊抗 Fos 抗体血清(1:4000)孵育 48h(37℃),用 0.01mol/L PBS(PH7.4)漂洗 3×10min;用生物素结合兔抗羊 IgG 孵育 2~4h,用 0.01mol/L PBS(PH7.4)漂洗 3×10min;用链霉卵白素-HRP(1:300)孵育 2~4h,用 0.01mol/L PBS(PH7.4)漂洗 3×10min;再用 AB 0.1M PH 6.0 漂洗 2×10min,用 DAB 呈色液染色 15~30min,用 AB 0.1M PH6.0 漂洗 2×10min,用 0.01mol/L PBS(PH7.4)漂洗 3×10min;常

规铬明胶贴片,空气干燥、脱水、透明,DPX 封片。

呈色结束后,Olympus 显微镜观察各脑片 Fos 阳性神经元的标记,摄片。

### 1.5 结果判定

以每个单位视野(200μm)内 Fos 阳性神经元的数目来表示数量,具体判断标准:特高密度、高密度、中等密度、低密度、散在标记。31~40 个为 + + +, 21~30 个为 + + +, 11~20 个为 + +, 2~10 个为 +, 2 个以下为 -。

## 2 结 果

SD 后, Fos 蛋白在大鼠脑干各区均有表达,同 CC 组及 TC 组相比脑桥网状结构(PRF)、孤束核(NTS)、臂旁核(PB)、脑桥被盖核(PPT)、蓝斑下核(SubC)及被盖背外侧核(LDTg)有较强表达。其中以臂旁核与脑桥被核表达呈强阳性反应;中缝苍白核(RP)、蓝斑核(LC)、背侧缝(RD)和内侧缝(RM)表达未见明显增加。PSD 组大鼠同 SD96h 组大鼠相比,Fos 蛋白表达的区域更为广阔,但相对阳性程度较低,为低或中等密度。除上述的各脑区外,在脑干网状结构及中缝的被盖背侧核、被盖腹侧核、脑桥被盖网状核及脑桥吻侧网状核、脑桥尾侧网状核,丘脑的中线核、板内核及网状核均有表达。结果见附表。

附表 连续及部分 SD96h 后大鼠脑干 Fos 蛋白的表达(n=4)

	NTS*	PCR	RP	LC	PB*	PPT*	RD	SubC*	LDTg	RM	PRF*
SD96h	+++	++	++	++	++++	++++	++	++	+++	-	+++
PSD96h	++	++	+	++	+++	+++	++	++	+	-	++
TC	++	++	+	++	+++	+++	++	+	+	+	+
CC	++	++	-	++	+++	++	++	-	+	+	+

注:NTS:孤束核;PCR:小细胞核;RP:中缝苍白核;LC:蓝斑核;PB:臂旁核;PPT:脑桥被盖核;RD:背侧缝;SubC:蓝斑下核;LDTG:被盖背外侧核;RM:内侧缝;PRF:脑桥网状结构

## 3 讨 论

### 3.1 关于动物模型的建立

本研究采用“小平台水环境法”进行 SD,水环境对大鼠有一定的兴奋作用,一定程度的隔离和限制活动也会产生应激。由于 c-Fos 对各种应激的反应不具有特异性,所以为了它们的影响,在实验设计上,我们要求动物进入实验前 1 周充分适应 SD 实验环境。并且除采用 CC 组作为对照外,还采用了 TC 组作为对照。TC 组即平台直径增大,其它条件与小平台相同,大鼠可在平台上有一定的活动,可进入睡眠,排除小平台对大鼠活动限制的应激。已有研究

表明<sup>[7]</sup>,平台面积与大鼠体重之比为 1:1 时不会产生 SD,故本研究中大平台直径为 18.0cm。在前面的研究<sup>[8]</sup>中,TC 组在实验前后体重无明显变化,说明其有一定的应激,但应激水平远远低于 SD 组。已有研究表明,小平台法不会引起血中皮质激素的升高,说明其应激程度不是很高<sup>[9]</sup>。

尽管我们在实验前要求大鼠适应实验环境 1 周,从实验结果可以看到在 CC 组和 TC 组, Fos 蛋白表达水平也有一定程度的升高。CC 组的 Fos 蛋白表达可视为大鼠在正常单独饲养情况下的表达情形,TC 组的 Fos 蛋白表达是水环境及一定程度隔离所造成的。CC 组和 TC 台组的蛋白增高水平反映了

非激状态的清醒大鼠的正常基础水平<sup>[2]</sup>。

### 3.2 SD后 Fos 蛋白的表达

心理应激是机体通过认知评价而觉察到应激源(stressor)的威胁时,引起的心理生理机能改变的过程。SD是心理生理应激的一种。从觉察到应激到出现反应是通过脑机制的中介完成的。因此,SD会影响作为脑细胞活动的标志的 Fos 蛋白的表达。

动物SD后会导一些行为的变化,并且中枢神经系统的某些神经元处于一定的兴奋水平。早期基因在其他组织基因尚未发生变化时便会发生变化,作为“第三信使”起作用。因此有理由认为中枢神经系统神经元的变化与行为及生理变化有关,并且可能在未表现出某些行为之前,中枢神经系统的神经元已表现出某些变化,因此,用 Fos 蛋白免疫组化的方法可以表示SD的影响。本研究中,脑干 Fos 水平表达增高主要集中于REM-ON类细胞,如:臂旁核(PB)、脑桥被盖核(PPT)、脑桥网状结构(PRF)、蓝斑下核(SubC)及背盖外侧核(LDTg),这同以往的研究相一致<sup>[6]</sup>。我们可以看到,这些结构主要集中于背内侧和背中线附近。而主要含REM-OFF类细胞的脑区,如蓝斑、中缝大核等, Fos 蛋白表达无明显变化。因为神经活动水平减低时不可能看到 Fos 蛋白表达的降低,因此 Fos 蛋白表达无变化代表了神经活动水平的降低。

本实验中,部分SD为96h中有24h的睡眠时间。大鼠在SD后的大部分时间内活动性降低,进行睡眠,因此本实验的部分SD中大鼠在自由活动期往往在睡眠。从其他实验<sup>[8]</sup>中,我们知道部分SD兴奋性低于完全SD,激惹程度低于完全SD。我们知道 c-Fos 蛋白表达的程度是动物兴奋性的指标,因此 c-

Fos 蛋白表达程度低于连续SD。另外,部分SD中存在着重复应激和习惯化的问题, c-Fos 表达有反复暴露于同类应激源习惯化的问题,虽然暴露于同一程度的应激中,但表达没有原来程度高<sup>[10]</sup>。部分SD反复暴露于SD的应激中,在其恢复一定睡眠之后又一次剥夺睡眠,剥夺的程度相同,每日18h,大鼠产生一定的习惯化。从结果可以看到,部分SD所涉及的脑区范围较连续SD广,表达程度低。

### 参 考 文 献

- 1 Rymond CA. Shifting work sleep cycles are on the way to becoming another public health issue, *Journal of American Medical Association*, 1988, 359: 2958- 2959
- 2 Morgan JJ, Curran T. Stimulus- transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto- oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*, 1991, 14: 421- 451
- 3 Schonthal A, et al. Requirement for c- fos genes expression in the transcriptional of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell*, 1988, 54:325- 54334
- 4 钱忠明,肖德生,徐 斌. c- fos 表达与心理应激脑机制的研究. *生理科学进展*, 1997, 1: 52- 54
- 5 Novak CM, Nunez AA. Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *Am J Physiol*. 1998, 275: R1620- 1626
- 6 宋国萍,皇甫恩,苗丹民,等. 连续不同时间睡眠剥夺后大鼠脑干中 c- fos 蛋白的表达. *中国行为医学科学*. 2001, 10: 407- 409
- 7 Bradley DY, Zhou Jun, Smagin GN, et al. Sleep deprivation by the "Flower Pot" technique and spatial reference memory. *Physiol Behav*, 1997, 2: 249- 256
- 8 宋国萍,苗丹民,皇甫恩,等. 睡眠剥夺对大鼠学习和行为的影响. *第四军医大学学报*, 2000, 6: 663- 666
- 9 Tobler I, Borbely AA. The effect of 3- h and 6- h sleep deprivation on sleep and EEG, spectra of the rat. *Behav Brain Res*. 1990, 6: 73- 78
- 10 Watambe Y, Stone E, McEwen BS. Induction and habituation of c- fos and Zif/286 by acute and repeated stressor. *Neuro Report*, 1994, 5: 1321- 1324

(收稿日期:2002- 06- 11)

(上接第8页)

- 6 Roid GH, Prifitera A, Ledbetter MF. Confirmatory analysis of the factor structure of the Wechsler Memory Scale- Revised. *The Clinical Neuropsychologist*, 1988, 2(2): 376- 384
- 7 Roth DL, Conboy TJ, Reeder KP, et al. Confirmatory factor analysis of the Wechsler Memory Scale- Revised in a sample of head injured patients. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 1990, 12(4): 834- 842
- 8 Burton DB, Mittenberg W, Burton CA. Confirmatory factor analysis of the Wechsler Memory Scale- Revised standardization sample. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 1993, 8(6): 467- 475
- 9 Woodard JL. Confirmatory factor analysis of the Wechsler Memory Scale- Revised in a mixed clinical population. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 1993, 15

(6): 968- 973

- 10 Wechsler D. WAIS- III and WMS- III Technical Manual. San Antonio, TX: The Psychological Corporation, 1997
- 11 程灶火. 多维记忆评估量表手册. 长沙:中南大学湘雅二医院, 2002
- 12 程灶火,耿铭,郑虹,等. 新编多维记忆评估量表的理论构思. *中国心理卫生杂志*, 2002, 16(4): 234- 236
- 13 程灶火,李欢欢,郑虹,等. 多维记忆评估量表的信效度研究. *中国心理卫生杂志*, 2002, 16(4): 237- 241
- 14 Cole DA. Utility of confirmatory factor analysis in test validation research. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 1987, 55: 584- 594

(收稿日期:2002- 07- 28)