

睡眠剥夺对大鼠一氧化氮和一氧化氮合酶的影响

吴兴曲, 杨来启, 王晓峰, 杨喜民, 张宏斌, 马文涛, 刘光雄, 张彦, 王蓉蓉

(宝鸡市解放军第三医院精神科, 陕西 宝鸡 721004)

【摘要】 目的: 探讨睡眠剥夺对大鼠脑组织一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)影响。方法: 采用小平台水环境法(Flower Pot)制作大鼠睡眠剥夺模型, 采用化学法和酶法观察不同时间睡眠剥夺后大鼠额叶、海马、中脑和下丘脑NO含量及NOS活性变化。结果: 与正常对照组及大平台组比较, 大鼠在SD后额叶和海马的NO含量及NOS活性增高, 有显著性差异($P < 0.01 \sim 0.05$), 其余脑区无显著性差异($P > 0.05$)。随着剥夺时间的延长, 额叶和海马NO含量及NOS活性增高更加明显。结论: 睡眠剥夺可致NO及NOS升高, 可能与其学习障碍有关, NO可能参与大鼠的睡眠调节。

【关键词】 睡眠剥夺; 大鼠; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

中图分类号: B845.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-3611(2002)02-0106-02

The Effects of Sleep Deprivation on Brain Levels of Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide in Rat

WU Xing-qu, YANG Lai-qi, WANG Xiao-feng et al.

Lanzhou Military Command Institute of Mental Health, The Third Hospital of PLA, Baoji 721004, China

【Abstract】 Objective: To explore the brain levels of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in rats after sleep deprivation. **Methods:** NO levels and NOS activity were assayed in different brain regions of Sprague-Dawley rats after sleep deprivation by flower pot compare with normal group (CC) and tank control groups (TC). **Results:** NO levels and NOS activity were increased in front cortex and hippocampus after SD compared with CC and TC ($P < 0.01 \sim 0.05$). **Conclusion:** The NO levels and activity of NOS are increased after sleep deprivation, NOS/NO may play an important role in learning and memory and modulating sleep

【Key words】 Sleep deprivation; Rat; Nitric oxide; Nitric oxide synthase

睡眠剥夺作为一种强烈的应激原, 可对机体造成多方面的影响, 如免疫力降低, 行为改变等。睡眠剥夺可导致学习记忆减退^[1], 但其机制尚不清楚。一氧化氮(NO)作为中枢神经系统(CNS)细胞间信使分子, 在学习记忆机制中具有重要作用。一氧化氮合酶(NOS)是催化产生内源性NO的唯一酶类, 并因NO的非囊泡释放、高度弥散和半衰期极短等特征而在很大程度上决定着NO的生物学效应。研究表明, 动物学习记忆过程中, 不同脑区的NO水平及NOS活性增高^[2,3]。本文观察了大鼠睡眠剥夺后不同脑区NO及NOS含量变化, 探讨NO/NOS在睡眠剥夺后的有关作用。

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大鼠共30只, 体重200~250g(由第四军医大学实验动物研究中心提供), 随机分为五组, 每组6只: 正常对照组(CC), 大平台对照组(TC)和睡眠剥夺组(SD), SD组又分为24h、72h、120h三个时点。实验前, 让鼠熟悉适应环境1周。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的制备 采用小平台水环境法^[4], 剥夺实验箱为30cm×30cm×40cm大小的玻璃水箱, 正中一直径6cm圆形平台, 箱中注满水, 水面距平台约1.0cm。大鼠在平台上可自由进食进水, 如果睡眠, 会因为肌张力松弛而落入水中。为排除隔离、限制活动和水环境造成的应激影响, 我们设立了大平台对照组, 其平台直径为18.0cm, 鼠在平台上可以睡眠, 其他环境与实验组相同。睡眠剥夺期间持续灯光照射, 室内温度控制在18.0~22.0℃。每天更换箱中的水, 水温保持在20℃左右。对照组单独笼养, 自然昼夜光照, 其余饲养条件同SD组。

1.2.2 样本采集与处理 实验后立即予5%戊巴比妥腹腔注射麻醉(50mg/kg), 开胸暴露心脏, 经左心室快速灌注生理盐水500ml以除去脑组织残血, 然后快速断头取脑, 分离额叶、海马、中脑和下丘脑, 分析天平称其质量, 按质量加入生理盐水稀释至10%, 并以玻璃匀浆器匀浆, 5400转/分低温离心10分钟后沉淀, 取上清液置于-20℃冰箱中保存待测。采用化学法(Griess法)检测NO, 酶法检测NOS, 由专人一次检测, 所有试剂盒均购自南京建成生物工程

研究所。

1.2.3 统计结果 实验数据采用 SPSS 软件包进行统计分析。

2 结 果

2.1 睡眠剥夺后脑组织 NO 含量变化

与正常对照组及大平台组比较,睡眠剥夺组大鼠脑组织 NO 含量升高,其中额叶及海马 NO 含量升高更明显。随着剥夺时间的延长,脑组织 NO 含量有升高幅度增大,见表 1。

表 1 睡眠剥夺组与大平台组脑组织 NO 含量比较($\bar{x} \pm s$, mg/mgprot)

组别	额叶	海马	中脑	下丘脑
CC	3.623±0.877	2.405±1.597	3.642±3.281	5.364±3.111
TC	4.464±2.355	4.843±2.086 *	5.092±3.895	6.928±2.093
SD24h	4.629±2.491	5.266±2.119 *	5.865±2.261	5.024±2.940
SD72h	7.772±2.724 * #	7.988±2.362 * #	7.728±2.813	5.848±3.262
SD120h	11.693±3.514 * #	10.040±3.908 * #	11.340±3.083 * #	8.960±3.669

注:与 CC 组比较, * $P<0.05$;与 TC 组比较, # $P<0.05$

2.2 睡眠剥夺后脑组织 NOS 含量变化

与正常对照组及大平台组比较,SD 组大鼠脑组织 NOS 活性增强,同 NO 的变化一样,额叶及海马 NOS 活性增强更明显,同时,随着剥夺时间的延长,脑组织 NOS 活性增加的幅度增大,见表 2。

表 2 睡眠剥夺组与大平台组脑组织 NOS 活性比较($\bar{x} \pm s$, U/mgprot)

组别	额叶	海马	中脑	下丘脑
CC	1.181±0.586	1.032±0.737	1.305±0.865	1.989±1.326
TC	1.736±0.412	1.574±0.605	1.600±0.888	2.068±0.952
SD24h	2.666±0.585 * #	2.001±0.597 *	1.834±0.666	2.565±0.809
SD72h	2.362±0.468 * #	2.579±0.699 * #	2.047±0.884	2.853±1.458
SD120h	3.597±1.089 * #	3.308±0.802 * #	2.783±0.794 * #	3.179±1.065

注:同表 1

3 讨 论

有研究发现^[1],较短时间的睡眠剥夺(24h 和 48h)组可增强大鼠的 Y 迷宫学习成绩,但随着 SD 时间的延长,剥夺程度加深,可使大鼠的学习成绩下降。海马长时程增强效应(LTP)及 NMDA/NO/cGMP 通路被认为是学习记忆的主要机制^[5],NO 作为逆行信使促进谷氨酸从神经末梢释放影响海马 LTP^[6];突触后 NMDA 受体及非 NMDA 受体激活,Ca²⁺内流,与调钙蛋白(CaM)一起活化 NOS,催化 L-Arg 产生 NO;NO 可自由而迅速地透过细胞膜,进入突触前

成份,激活鸟氨酸环化酶,cGMP 增加,进一步促进谷氨酸合成及递质释放;谷氨酸再作用于突触后 NMDA 及非 NMDA 受体而实现 LTP 诱导,大鼠隔一海马通路损伤可使大鼠海马 NO 含量明显降低并导致大鼠学习能力严重下降^[7],NOS 的活性也与学习过程密切相关:学习过程中海马 NOS 活性物增加^[2],学习训练后大鼠海马 nNOS 神经元数量及染色强度增加^[3](生理状态下,脑内主要来源于神经元的 nNOS),大鼠海马内注射 NOS 抑制剂 NNLA 可使大鼠海马 NO 含量明显降低并导致大鼠学习能力严重下降^[7],本研究发现大鼠睡眠剥夺 24h 后海马 NO 含量及 NOS 活性升高,可能是导致其学习能力增强的原因之一。本研究还发现,SD 后额叶的 NO 含量及 NOS 活性也有升高,表明额叶也可能参与了大鼠的学习调节,但其确切机制有待进一步研究。

本研究发现,经较长时间的 SD(72h 及 120h),大鼠脑组织 NO 含量增加,NOS 活性增强,而且随着 SD 时间的延长,NO 含量及 NOS 活性升高越明显,这与文献报导的长时间 SD 抑制学习能力^[1]相矛盾,我们推测可能与 NO 神经毒性作用有关。高浓度的 NO 能抑制多种与线粒体电荷传递系统及柠檬酸循环有关的酶,NO 还能抑制 DNA 复制的限速酶,并可与超氧化阴离子(O₂⁻)相互作用形成过氧化亚硝基阴离子(ONOO⁻),后者分解成具有强毒性作用的^oOH 及二氧化氮自由基^[9]。还有研究发现 NOS 抑制剂具有延缓神经元变性和改善学习记忆的能力^[10],因此过高的 NO 及 NOS 可能会对机体有害,但 NO 及 NOS 与学习记忆的量效关系尚不清楚,有待深入研究。

还有研究发现 NO 参与了机体睡眠-觉醒的调节^[11]。侧脑室微量注射 NOS 抑制剂 L-NAME 可使大鼠觉醒(W)明显增加,慢波睡眠(SWS)明显减少,用同样方法注射 NO 前体 L-Arg 后 W 明显减少而 SWS 显著增加;L-NAME 通过抑制 NOS 使大鼠 W 增加,SWS 减少,这一作用可被 NO 前体 L-Arg 所拮抗。本研究发现 SD 后 NO 及 NOS 变化,也支持这一观点。大鼠因被迫剥夺睡眠,机体分泌 NO 等递质产生睡意,但因环境限制而不得不保持清醒,致使 NO 等含量进一步升高。NO 对睡眠的调节机制尚未明了,也有待深入研究。由于 NO 能促进多巴胺、5-羟色胺等递质的释放^[12],而这些递质也都参与了睡眠的调节,因此推测这可能是 NOS/NO 参与睡眠调节的机制之一。

3 讨 论

关于中学生心理问题发生率,由于调查对象和调查工具的不同,结果不完全一致。于守臣等以 Achenbach's 儿童行为量表发现心理问题发生率为 26.17%。卢世臣等对普通中学随机抽取 800 名学生,以流调用抑郁自评量表测查,有抑郁情绪者 186 名,占 23.5%。本文主要对常见的心理问题焦虑状态、抑郁状态进行测查,结果发现初三毕业生的焦虑状态和抑郁状态发生率分别为 26.59%、31.42%。关于焦虑、抑郁的性别差异,有研究认为女生高于男生^[9],本文也发现女生得分高于男生。

影响中学生心理卫生状况的因素很多,梁巍等用生活事件调查表对中学生进行调查,结果发现,中学生心理问题的发生主要与家庭和学校管教过严、担心升学失败、失恋等,本文使用了主要用于针对青少年生理心理特点的青少年生活事件量表,对各因子与 SAS、SDS 的相关性进行了分析,结果发现各因子与 SAS、SDS 有不同程度的相关。提示初三毕业生焦虑状态、抑郁状态的发生主要与人际关系不协调学习和升学压力过大、学校与父母批评和惩罚有关,与梁巍等调查结果相近^[10]。

关于应对方式对心理健康况的影响,姜乾金等研究发现大学生的消极应对方式与 SCL-90、SAS、SDS 密切相关^[6]。本调查也发现消极应对方式与 SAS、SDS 得分呈正相关。消极应对项目主要集中在“喜欢将情绪压在心底但又忘不掉、烦恼事一多情绪

和态度就沉闷、有时想悄悄痛哭、喜欢一个人独处”。

本文结果提示初三毕业生的焦虑、抑郁状态发生率较高,减轻学习和升学压力,学校和家庭不要过分批评和惩罚,教育学生正确处理人际关系及对应激采取正确应对方式是减少焦虑、抑郁发生的重点。

(感谢怀远三中初三老师的支持)

参 考 文 献

- 1 刘贤臣,孙良明,唐茂芹,等. 2 464 名青少年焦虑自评量表测查结果分析. 中国心理卫生杂志, 1997, 11(2): 75-77
- 2 王 玲,郑 雪,宇 斌. 1 758 名城镇中小学生的焦虑的测查与分析. 中国心理卫生杂志, 2000, 14(4): 271
- 3 张明园主编. 精神科评定量表手册. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993. 38-41
- 4 张明园主编. 精神科评定量表手册. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993. 34-37
- 5 汪向东主编. 心理卫生评定量表手册(增订版). 北京: 中国心理卫生杂志社, 1999. 106-107
- 6 姜乾金,黄 丽,卢抗生,等. 心理应激: 应对的分类与身心健康. 中国心理卫生杂志, 1993, 7(4): 145-147
- 7 于守臣,宋 彦. 1 414 名中学生心理健康状况调查. 中国心理卫生杂志, 1994, 8(1): 7-8
- 8 卢世臣,翟金国. 中学生抑郁情绪及其相关因素的调查. 四川精神卫生 1999, 12(3): 184
- 9 Angelopoulos N Ecomou M. Prevalence of anxiety and depressive symptoms in a high-school students population. European Psychiatry, 1994, 9(1): 19-26
- 10 梁 巍,赵靖平,郑延平. 中学生心理卫生调查. 中国心理卫生杂志, 1992, 6(3): 100-102

(收稿日期: 2001-08-06)

(上接第 107)

参 考 文 献

- 1 宋国萍,皇甫恩,苗丹民,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, 21(6): 663-666
- 2 Chen J, Zhang S, Zuo P, et al. Memory-related changes of nitric oxide synthase activity and nitrite level in rat brain. Neuroreport, 1997, 8(7): 1771-1774
- 3 刘辉,陈俊抛,田时雨,等. 神经元型一氧化氮合酶在学习记忆过程中的变化和作用. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2000, 17: 116-122
- 4 Bradley DY, Zhou J, Smagin GN, et al. Sleep deprivation by the "Flower Pot" technique and spatial reference memory. Physiol-Behav, 1997, 61: 249-256
- 5 Yamada K. Role of nitric oxide in learning and memory processes. Nippon Yakunigaku zasshi, 1998, 111: 87-96
- 6 Holscher C. Nitric oxide the enigmatic neuronal messenger; its role in synaptic plasticity. Trends Neurosci, 1997, 20(7): 298-

303

- 7 王景华,杨贵贞. 一氧化氮对大鼠学习功能的影响. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 1997, 4(1): 11-15
- 8 Ward L, Mason SE, Abraham WC. Effects of the NMDA antagonists CPP and MK-801 on radial arm maze performance in rat. Pharmacol Biochem Behav, 1990, 35(4): 785-790
- 9 田恒力,张镛. 一氧化氮生物作用的研究进展. 国外医学神经病学神经外科学分册, 1995, 22(2): 87-90
- 10 Molina JA, Jimenez JF, Orti PM, et al. The role of nitric oxide in neurodegeneration Potential for pharmacological intervention. Drugs Aging, 1998, 12(4): 251-259
- 11 张文慧,孙碧英,林殷利. NO 对大鼠睡眠-觉醒的调节. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(4): 339-342
- 12 Kuriyama K, Ohkuma S. Role of nitric oxide in central synaptic transmitter release. J Pharmacol(Japan), 1995, 69: 1

(收稿日期: 2001-09-05)