文章编号: 1001-0580(2007)11-1360-03 中图分类号: R 131 文献标志码: A 【论 著】

睡眠剥夺对大鼠海马锥体细胞超微结构影响*

王嫄,陈景元,骆文静,张云,王强,胡炜,杨瑞华

摘 要: **目的** 研究异相睡眠剥夺对大鼠海马 CA1 区锥体细胞形态、超微结构及线粒体的损伤作用,以阐明其介导的海马神经元凋亡机制。**方法** 选用成年 SD 大鼠随机分组,采用多平台水环境法制备睡眠剥夺模型,以尼氏(Nissl)染色法光镜下观察神经元形态,并用透射电镜进一步观察海马神经元超微结构的变化,采用免疫组织化学法测定细胞色素 C 的水平。**结果** 睡眠剥夺造成海马 CA1 区细胞数量减少,细胞排列松散,出现大量空泡。透射电镜检测显示,海马 CA1 区,神经元轴突水肿明显,内质网扩张,线粒体肿胀,嵴结构模糊、紊乱,线粒体数量减少,有的呈空泡样变。胞浆内细胞色素 C 水平明显增高。**结论** 睡眠剥夺造成海马 CA1 区线粒体损伤,释放细胞色素 C,从而介导了海马神经元的凋亡。

关键词: 异相睡眠剥夺;线粒体;细胞色素 C

Effect of paradoxical sleep deprivation on ultrastructure of pyramidal cell of hippocampus of rats

WANG Yuan, CHEN Jing-yuan, LUO Wen-jing, et al. Department of Occupational and Environmental Health, Faculty of Military Preventive Medicine, the Fourth Military Medical University (Xi'an 710033, China)

Abstract: **Objective** To illustrate the mechanism of mitochondria-induced neuron apoptosis of hippocampus, the effect of paradoxical sleep deprivation on microstructure of pyramidal neurons and mitochondria of CA1 region of hippocampus was studied. **Methods** Adult SD rats were chosen and random grouping was applied. Sleeping deprivation model was provided by modified multiple platform method. Nissl stain and light microscope were applied to observe the morphological changes of hippocampus, while TEM was used for observing the transformation of ultra-structure of hippocampus. The level of CytC expression was assessed by immunohistochemical method. **Results** The quantity of the cell in hippocampus CA1 region decreased after sleep deprivation, while cell sequence was loosen and a number of vacuoles appeared. Under the TEM observation, endoplasmic reticulum was extended. And there were obvious dropsy of neurite and mitochondria swelling. Cristae structure was getting disordered while the quantity of mitochondria decreased and vacuole sample transform appeared. The level of CytC in endochylema was growing up. **Conclusion** Sleep deprivation mediates the apoptosis of hippocampus neuron by damaging the cell of hippocampus CA1 region, and releasing the CytC.

Key words: paradoxical sleep deprivation; mitochondria; CytC

睡眠和觉醒周期性是人类和大多数哺乳动物生存的必要条件。睡眠剥夺在夜班作业以及多种职业人群中均属于常见的应激原。有文献表明,睡眠剥夺可引起机体免疫力下降,警觉性和判断力下降,记忆力下降等变化[1,2]。为研究睡眠剥夺对海马锥体细胞形态结构的影响,探讨睡眠剥夺后神经元损伤的机制,为睡眠剥夺损伤的防治提供依据,进行了本研究。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 选用成年健康 SD 大鼠 54 只,雌雄不拘,体重(180 + 20) g(第四军医大学实验动物研究中心)。将 54 只大鼠随机分为 6 组,1 组为正常对照组,其余 5 组分别进行睡眠剥夺 1～5 d,每组 9 只大鼠。饲养环境:室内温度和湿度均控制在适宜范围内[3],同时避免噪音,保持 24h 光暗周期。

1.2 制备大鼠异相睡眠剥夺的模型 采用多平台水环境法(Modifield multiple platform method)[4],制作大鼠异相睡眠剥夺模型。睡眠剥夺箱(30 cm ×30 cm ×150 cm)中央放置直径为 4.5 cm,高 8 cm 的平台数个。剥夺箱内注有水,水面低于平台 2 cm,水温保持在(20 ±2) ℃。大鼠可以在平台上活动,自由摄取食物和水,但当进入睡眠时,由于骨骼肌的松弛使大鼠掉入水中而惊醒,造成异相睡眠剥夺。

1.3 海马 CA1 区锥体细胞形态的观察 睡眠剥夺后,各时段大鼠均以 2 %戊巴比妥钠进行腹腔麻醉,迅速开胸暴露心脏,行左心室插管经右心耳放液,先以肝素化生理盐水 50～100 ml 冲去血液,再以 4 %多聚甲醛磷酸缓冲液(0.1 mol/L pH 7.4,4 ℃)200～250 ml 灌注固定 30～40 min 取脑组织。脑组织置于同种固定液中续固定(4 ℃,2 h),再置于 20 %蔗糖溶液(0.1 mol/L pH 7.4,4 ℃)过夜。按 PaXinos 立体定位图谱取海马,恒冷切片机连续冠状切片(Bregrnan 平面后 3.8 mm),片厚 15 μm。采用尼氏(Nissl)染色,光镜下观察海马 CA1 区锥体细胞形态的变化。

1.4 海马 CA1 区锥体细胞超微结构的观察 睡眠剥夺后,将各组大鼠戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉后,断头处死,迅速取出海马,按电镜样品取材要求,3 %戊二醛、1 %锇酸双固定,常规包埋,光镜选区,制备超薄切片,铀、铅双染,100CX-II 型透射电镜观察并照相。

1.5 海马 CA1 区线粒体损伤后细胞色素 C 水平的变化 按常规链霉亲和素免疫组化法(SABC)进行检测,按免疫组化试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)说明书操作。二氨基联苯氨(DAB)显色。

2 结 果

2.1 睡眠剥夺对大鼠海马神经元形态的影响 正常对照组的海马 CA1 区神经元呈梭形紧密排列,细胞轮廓清晰,胞浆透明。随睡眠剥夺时间的延长,神经元数目减少,排列紊乱,细胞轮廓模糊,出现大量空泡。

2.2 睡眠剥夺对海马 CA1 区锥体细胞超微结构的影响(图 1,2) 睡眠剥夺后,海马 CA1 区内质网扩张;轴突水肿明显;

*基金项目: 第四军医大学科研基金资助(4142D68125)
作者单位: 第四军医大学军事预防医学系劳动与环境卫生学教研室,西安 710033
作者简介: 王嫄(1980 -),女,吉林长春人,硕士在读,研究方向:劳动卫生与环境卫生学。
通讯作者: 杨瑞华

线粒体数目明显减少,线粒体肿胀,嵴结构模糊,紊乱,有的呈空泡样变。

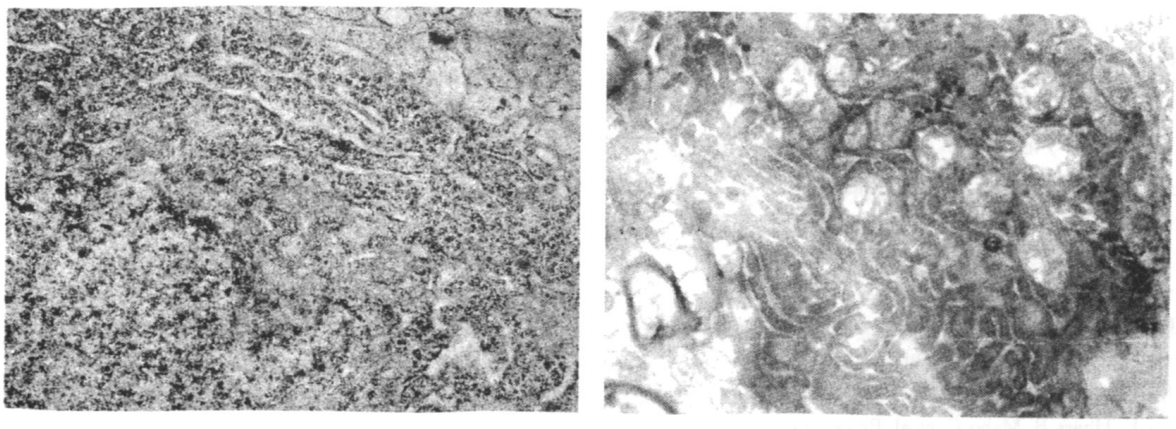

图 1　睡眠剥夺后,电镜观察海马 CA1 区内质网及粒体的超微结构的改变(×1 0000)

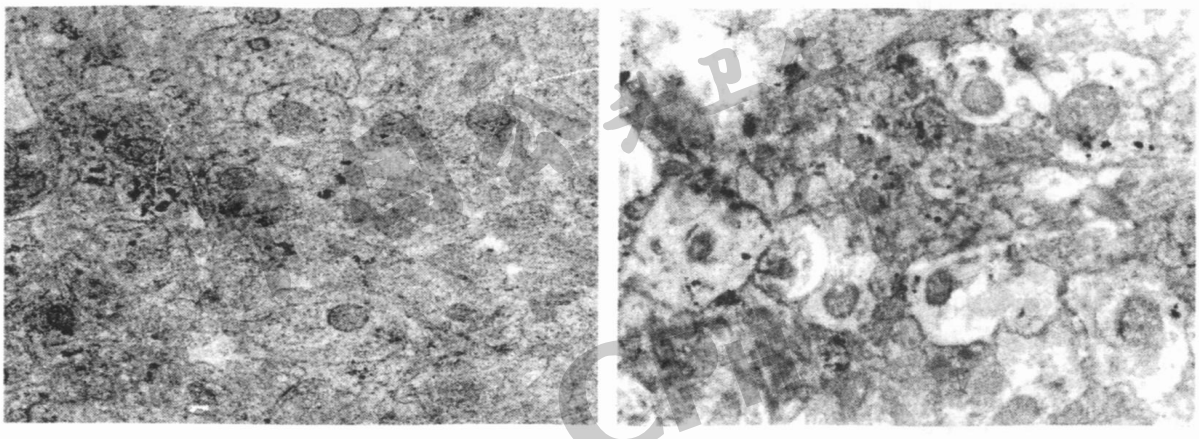

图 2　睡眠剥夺后,电镜观察海马 CA1 区轴突超微结构的改变(×1 000)

2.3　睡眠剥夺对海马 CA1 区锥体神经元内细胞色素 C 的影响(图 3)　应用免疫组织化学法检测各组大鼠海马神经元内细胞色素 C 的变化。结果显示,随着睡眠剥夺时间的延长,细胞色素 C 免疫阳性的神经元较对照组逐渐增多,提示细胞线粒体损伤导致细胞色素 C 释放入胞浆。

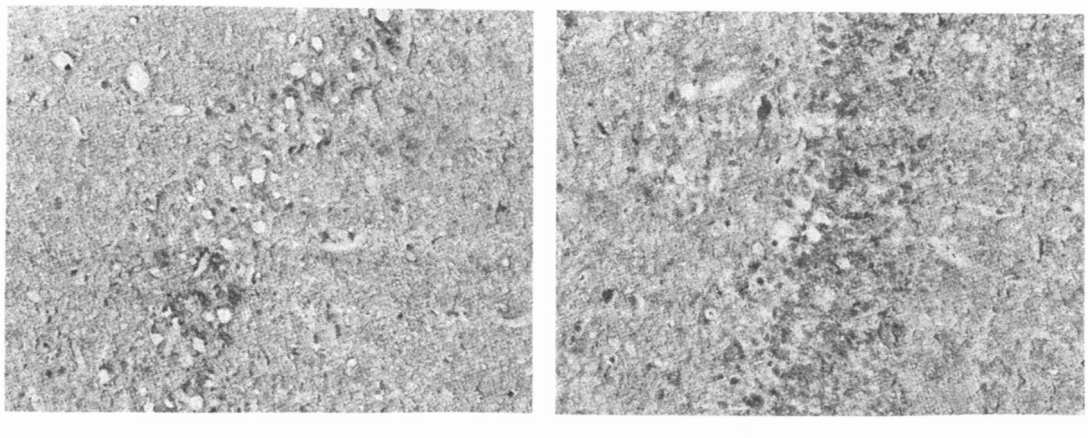

图 3　睡眠剥夺后,海马 CA1 区免疫组化染色(×400)

3　讨　论

在中枢神经系统中,海马是介导应激反应的最重要的脑区之一[5]。海马与学习记忆功能密切相关,对认知性应激反应尤为重要。本研究结果显示,睡眠剥夺组大鼠海马 AC1 区锥体细胞排列松散,尼氏小体减少或者消失。尼氏小体是细胞合成蛋白质的场所,它的结构正常与否能够反映细胞的功能状态[6]。本实验结果证明,睡眠剥夺组的海马 CA1 区锥体细胞形态发生破坏,这可能是睡眠剥夺影响学习记忆功能的机制之一。另外,透射电镜观察结果显示,睡眠剥夺后海马 CA1 区的血管、轴突、线粒体等的超微结构发生异常的改变,而线粒体的损伤较为明显。免疫组织化学方法也证明神经元胞浆内细胞色素 C 免疫阳性增强,表明线粒体损伤后细胞色素 C 释放入胞浆[7]。本实验中睡眠剥夺后,海马神经元形态功能异常变化,线粒体受损,释放细胞色素 C 至胞浆,在某种因素作用下,激活凋亡程序引起海马神经元的凋亡[8],可能与学习记忆功能密切相关,有待进一步研究。细胞色素 C 是线粒体呼吸链中的一个基本成分,位于线粒体膜内并松散地附着于线粒体膜的内表面,被认为是哺乳动物细胞凋亡信号传导过程的关键因素[9]。线粒体损伤后,线粒体膜间隙的细胞色素 C 释放入胞浆,与 Apaf-1 结合,并激活 caspase-9,后者又

激活由 caspase-3 介导的凋亡过程[10]。

研究表明,睡眠剥夺可引起大鼠学习记忆功能的降低,但其作用机制尚不完全清楚。本实验结果表明,睡眠剥夺可引起大鼠海马神经元超微结构的损害,线粒体的损伤更引起细胞色素 C 的释放,影响神经元的存活状态,在一定程度上可解释睡眠剥夺影响学习记忆的机制。另外,线粒体是能量供应的中心,也是神经元维持正常生理功能的重要细胞器[11],改善线粒体功能可望成为睡眠剥夺损伤防治的一条新途径。

参考文献

〔1〕 Bueno OFA, Lobo LL, Olivedra MGM, et al. Dissociated paradoxical sleep deprivation effects on inhibiting avoidance and conditioned fear[J]. Physiol & Behavior, 1994, 56: 775 - 779.

〔2〕 Hennevin E, Hhars B, Maho C, et al. Processing of learned information in paradoxical sleep: relevance for memory[J]. Behavioral Brain Research, 1995, 69: 125 - 135.

〔3〕 施新猷,李六金. 影响动物实验效果的动物饲养环境因素和营养因素[M]// :施新猷. 现代医学实验动物学. 北京:人民军医出版社, 2000.

〔4〕 Deborah Sucheki, Beatyiz Duarte Palma, Sergio Tufik. Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modifield multiple platform method[J]. Brain Research, 2000, 875: 14 - 22.

〔5〕 Robert M, Sapolsky. Why stress is bad for your brain[J]. Science, 1996, 273(5276): 749 - 750.

〔6〕 张艳美,杨权,许崇涛,等. 慢性应激对大树海马锥体细胞形态结构的效应[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(5): 719 - 722.

〔7〕 Kitagawa K, Matsumoto M, Mabuchi T, et al. Deficiency of intercellular adhesion molecular-1 attenuates microcirculatory disturbance and infaction size in focal ischemia[J]. J Cereb Blaood Flow Metab, 1998, 18(12): 1336 - 1345.

〔8〕 Andreyev A, Fiskum G. Calcium induced release of mitochondrial cytochrome C by different mechanisms selective for brain versus liver[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(9): 825 - 832.

〔9〕 王叨,刘玉峰. 细胞色素 C 与细胞凋亡的研究进展[J]. 中国小儿血液, 2004, 9(4): 181 - 184.

〔10〕 Liu X, Kim C N, Yang J, et al. Induction of apoptotic program 1 cell extracts: requirement for dATP and cytochrome c[J]. Cell 1996, 86(1): 147 - 157.

〔11〕 贾栋,高国栋. 细胞器于缺血性神经元凋亡[J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21(3): 286 - 288.

收稿日期: 2007-04-27 (宋艳萍编辑 李贵福校对)

文章编号: 1001-0580(2007)11-1362-01 **中图分类号**: R 181.3 + 2 **文献标志码**: B

【基层公共卫生】

和平区流行性出血热流行病学分析

周雨

近几年来,沈阳市流行性出血热呈高发趋势,为掌握其流行情况,以采取相应的防治措施控制疫情,现对沈阳市和平区 2000～2005 年流行性出血热疫情进行流行病学分析。

材料与方法 运用描述流行病学分析方法,对沈阳市和平区 2000～2005 年流行性出血热疫情资料进行分析。

结 果 (1)流行概况:2000～2005 年,沈阳市和平区累计报告流行性出血热病人 275 例,死亡 2 例,年平均发病率 7.12/10 万,年平均死亡率 0.31/10 万,年平均病死率 0.73 %。2003 年起发病率上升,至 2005 年均发病率 9.04/10 万。(2)人群分布特点:①性别分布:2000～2005 年累计报告流行性出血热 275 例,男性 223 例,占 81.09 %;女性 52 例,占 18.91 %。男女性别之比 4.29∶1。历年性别报告发病率均为男性高于女性。②年龄分布:15 岁以下无流行性出血热病例之外,其他各年龄段均有发病。其中 40～49 岁组、30～39 岁组、20～29 岁组发病率较高。15～19 岁 16 例,占 5.82 %;20～29 岁 62 例,占 22.55 %;30～39 岁 69 例,占 25.09 %;40～49 岁 76 例,占 27.64 %;50～59 岁 36 例,占 13.09 %;60 岁及以上 16 例,占 5.82 %。③时间分布:3～5 月发病 139 例,占全年 50.55 %;10～12 月发病 46 例,占全年 16.73 %。6～9 月发病率较低。④职业分布:患者职业构成以家务待业最高 124 例,占 45.09 %;其次依次为干部 39 例,占 14.18 %;工人 35 例,占 12.73 %;民工 16 例,占 5.82 %;离退人员 14 例,占 5.09 %;学生 13 例,占 4.73 %;其他 13 例,占 4.73 %;农民 8 例,占 2.91 %;餐饮人员 5 例,占 1.82 %;医务人员 4 例,占 1.46 %;商业人员 2 例,占 0.73 %;不详 2 例,占 0.73 %。⑤地区分布:北市、砂山、长白地区的发病率较高。

讨 论 沈阳市和平区 2000～2005 年流行性出血热疫情结果表明:2003 年进入疫情高发期。40～49 岁组、30～39 岁组、20～29 岁组男性发病率较高,因 20～49 岁男性是社会主要劳动力,接触危险因素较多。3～5 月发病率最高,其次为 10～12 月,因沈阳地区出血热疫情以家鼠型为主,少数为野鼠型所致。3～5 月份是家鼠活动高峰。家务待业者发病率最高,因这一群体无稳定工作,经济条件和卫生意识均较差,造成发病较多。北市和砂山地区人口密度较高,居住环境不好,发病率较高。长白地区是城乡结合处,易于发生本病。提示:20～49 岁男性家务待业者为防治出血热的重点人群。应加强防病宣传,提倡注射出血热疫苗。另外,广泛开展灭鼠工作。

作者单位: 沈阳市和平区疾病预防控制中心, 110001
作者简介: 周雨(1973 -),女,辽宁沈阳人,主管医师,本科,主要从事疾病预防控制工作。

收稿日期: 2007-04-19 (蔡天德编辑 李贵福校对)