网络出版时间:2022 - 05 - 28 17:34 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220526.1018.020.html

持续光照建立斑马鱼失眠模型及评价

冉思邈,夏 婧,夏乐旋,王 平

摘要 **目的** 利用斑马鱼建立睡眠剥夺模型,为失眠的基础研究提供更多可靠的实用建模参考方案。**方法** 选取4月龄同一批次野生型AB系雄性斑马鱼160尾作为实验对象,随机分为对照组(CK组)和睡眠剥夺1~7 d组(SD1~SD7组)。对照组置于正常14 h/10 h明/暗交替环境,睡眠剥夺组分别利用模拟日光对其进行不同时间的持续光照达到剥夺斑马鱼睡眠的效果。造模结束后,比较各组斑马鱼运动形式、学习记忆能力、生物钟基因表达、脑部超微结构的改变。**结果** 运动形式结果显示:与CK组斑马鱼相比,SD1、SD2、SD3组斑马鱼静息时间均增多($P<0.05$),SD3组斑马鱼大运动时间及大运动计数较CK组减少($P<0.05$);学习记忆能力结果显示:CK组斑马鱼学习记忆能力较SD1、SD2、SD3组强,($P<0.05$、0.01),SD1组斑马鱼学习记忆能力较SD2、SD3组斑马鱼强(均$P<0.01$),SD2组斑马鱼学习记忆能力较SD3组斑马鱼强($P<0.01$);qRT-PCR结果显示:与CK组相比,SD3组斑马鱼脑部周期蛋白1a(Per1a)、周期蛋白2(Per2)、脑和肌肉组织芳香烃受体核转运蛋白的类似蛋白1(Bmal1)、隐色素1b(Cry1b) mRNA表达差异有统计学意义($P<0.05$);电镜结果显示:SD2及SD3组斑马鱼大脑神经元出现神经元坏死现象,镜下可见细胞核塌陷,边界破裂甚至溶解,核染色质固缩,线粒体出现肿胀,甚至大量空泡。**结论** 持续光照3 d可改变斑马鱼运动形式,使其学习记忆能力下降,改变了与睡眠相关的时钟基因表达,诱发了脑部神经元凋亡,可以用来建立斑马鱼失眠模型。

关键词 睡眠剥夺;斑马鱼;光照;失眠动物模型

中图分类号 R 256.23

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2022)06 - 0948 - 05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.06.019

失眠是以频繁而持续的入睡困难和睡眠维持困难并导致睡眠感不满意为特征的一种睡眠障碍。各种原因导致的睡眠不足均对健康有着负面影响[1]。严重的睡眠障碍不仅影响患者的身心健康,也影响了患者的生活和工作质量,长期失眠对个人和社会造成了严重的负担[2]。

斑马鱼与人类基因高度同源,可以通过光照、咖啡因、持续流动水流、感官刺激、电刺激、物理摇晃等方式对斑马鱼进行睡眠剥夺[3-7],但目前尚未见斑马鱼成鱼失眠模型的报道。该研究探索建立一种斑马鱼成鱼失眠模型,并通过比较睡眠剥夺后斑马鱼

2022 - 03 - 22 接收

基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项项目(编号:2018YFC1705600)

作者单位:湖北中医药大学老年医学研究所,武汉 430000

作者简介:冉思邈,女,医学博士;

王 平,男,二级教授,主任医师,博士生导师,博士后合作导师,责任作者,E-mail:pwang54@aliyun.com

the proliferation and apoptosis of human keloid fibroblasts and its mechanism *in vitro*. ***Methods*** The lentiviral vector carrying SPARC shRNA (LV2N-shRNA-SPARC, sh-SPARC group) and empty plasmid (LV2-NC, sh-NC group) were transfected into human keloid fibroblasts (HKF) respectively. Real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were performed to examine the expression of SPARC mRNA and protein in HKF. MTT assay was used to estimate the cell proliferation. The cell cycle and apoptosis of HKF were detected by flow cytometry. The expression of TGF-β1 and TβR Ⅰ proteins in HKF were detected by Western blot. ***Results*** ① After transfection of SPARC shRNA lentiviral vector, the expression of SPARC mRNA and protein in HKF were significantly down-regulated compared with those in the control groups ($P<0.05$). ② MTT assay showed that the proliferation of sh-SPARC groups decreased compared with the control groups ($P<0.05$). ③ Flow cytometry results showed that the S phase cell ratios of sh-SPARC groups were reduced while the apoptosis rates increased compared with the control groups ($P<0.05$). ④ Western blot showed that the protein expression levels of TGF-β1 and TβR Ⅰ significantly decreased in sh-SPARC groups. ***Conclusion*** SPARC gene silencing inhibits the proliferation blocks cell cycle progression and promotes cell apoptosis in HKF, which may be related to the down-regulation of the TGF-β signaling pathway.

Key words lentivirus; secreted protien acidic and rich in cysteine; keloid; fibroblasts; transforming growth factor-β

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的运动行为、学习记忆能力、生物钟基因表达和脑部超微结构的改变进行评价,以期为失眠的机制和动物模型研究提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 4月龄同批次野生型AB系雄性斑马鱼160尾,购自国家斑马鱼资源中心,饲养在湖北中医药大学老年医学研究所斑马鱼实验室,房间内温度为(28.5±1)℃,光照条件为14 h光照,10 h黑暗,用自动计时器设置每天8:00开灯,22:00关灯,养鱼水pH值在7.0~8.0之间,导电率在450~500 μs/cm之间。每天早晚饲喂孵化好的丰年虾各1次。

1.2 主要试剂与仪器 荧光定量试剂盒、逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司),集中式斑马鱼养殖系统(青岛金水海洋生物设备有限公司),净水供水单元(上海海圣生物实验设备有限公司),斑马鱼行为分析系统、T迷宫行为学追踪系统(法国View Point Life Sciences公司),PCR仪器(美国Bio-Rad公司)。

1.3 方法

1.3.1 *造模方法* 将160尾雄性斑马鱼随机分为对照组($n=20$,记为CK组)和睡眠剥夺组($n=140$,记为SD组),睡眠剥夺组分别设置不同剥夺时长(1~7 d)的亚组,即SD1、SD2、SD3、SD4、SD5、SD6和SD7组。CK组斑马鱼保持正常的14 h/10 h光暗周期,SD组的斑马鱼根据组别给予相应时长的持续光照。

1.3.2 *斑马鱼行为学检测* 光照结束后,每组随机选取6尾斑马鱼进行运动及学习记忆能力的检测。利用斑马鱼行为分析系统追踪斑马鱼的运动,设置追踪参数Movement Threshold,Small/Large:25,Inact/Small:5。将4月龄斑马鱼放入直径为15 cm的养鱼缸中,缸中加入养鱼水至鱼缸的1/3,斑马鱼可以在缸中自由活动,行为学分析系统会自动追踪斑马鱼的运动并给出运动轨迹和数据分析,追踪时间为24 h。利用改良后的T迷宫测试各组斑马鱼的学习记忆能力,测试前一天,让斑马鱼在迷宫内自由活动20 min以适应环境,减少新环境对斑马鱼的干扰。测试当天,在甬道起点放入测试鱼,让其在T迷宫中自由活动,测试时间为6 min,观察并记录鱼从起点到找到TA区(当鱼找到并停留30 s后才算进入了TA区)的潜伏时间,测试结束后给予食物奖励。未找到TA区的鱼,在6 min后引导其进入TA区并停留30 s,同样给予食物奖励。每条测试鱼都有一个对应编号的独立容器,测试结束后放回各自容器中。每天测试4次,分别于8:00、12:00、16:00、20:00准时测试,记录每次潜伏时间,以次日第5次潜伏时间作为考察其学习记忆能力的主要指标。

1.3.3 *qRT-PCR检测相关基因的表达* 光照结束后,每组随机取3尾斑马鱼,在4 ℃冰水混合物中处死斑马鱼,随即在冰上操作取脑,TRIzol法提取脑组织总RNA,利用M-MLV反转录酶反转录为cDNA,以cDNA为模板进行qRT-PCR实验。以Gapdh为内对照,以对照组为外对照,利用Light Cycler 480荧光实时定量PCR仪进行扩增,以$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算基因相对表达量。所用引物序列如表1所示。

表1 基因引物序列表

基因名称	引物序列(5′-3′)	引物长度(bp)
Per1a	F:AGGGCAGCTTAGAAGCACTG	282
	R:GAGTCTCTGCTTGGGTTGCT	
Per2	F:CTCCCAGAAATCCCACAAGG	307
	R:CTTGATGTCGATGGCTTTAGGC	
Bmal1	F:GGCGTCGTTAGTTCCCACAT	180
	R:GCAGCCCTTAAAATCAAGTGTT	
Cry1b	F:GCTAATTTTGAACGCCCCAGAAT	224
	R:AAATGTGGGTTGTTAGTCGCAG	
Gapdh	F:TCGTTGAAGGTCTTATGAGCACTG	124
	R:GTGGAGGCTGGGATGATGTTCT	

1.3.4 *透射电镜观察斑马鱼大脑超微结构* 实验结束后,每组各取1尾斑马鱼,在4 ℃冰水混合物中处死斑马鱼,随即在冰上断头并剥离出完整的大脑,置于电镜固定液中固定。室温下固定2 h,再转移至4 ℃保存备用,制作切片。利用透射电子显微镜观察各组斑马鱼大脑神经元,比较不同组斑马鱼脑组织神经元细胞器和超微结构的改变。

1.4 统计学处理 运用统计软件SPSS 23.0及绘图软件GraphPad Prism 8.0对实验数据进行处理,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐时,组间比较采用LSD-t法,方差不齐时,组间比较采用Tamhane′s T2法,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组斑马鱼运动情况 与CK组斑马鱼对比,SD1、SD2、SD3组静息时间均增多($P<0.05$),SD4~SD7组斑马鱼静息时间未见明显变化($P>0.05$),可能当睡眠剥夺时长超过3 d时,斑马鱼在持续光照条件下逐渐耐受,故该实验选取了SD1~SD3各组斑马鱼进行进一步的探索。见图1、2。图

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 为各组斑马鱼大、小运动时间，大、小运动距离，大、小运动计数汇总，其中 SD3 组大运动时间及大运动计数较 CK 组减少，差异有统计学意义（$P<0.05$），而各组间大运动距离、小运动时间、小运动距离、小运动计数对比则无明显差异（$P>0.05$）。

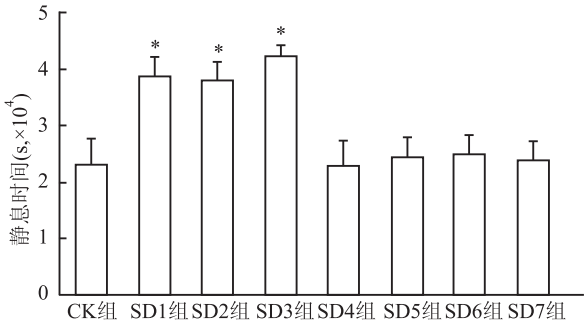

图 1 各组斑马鱼静息时间

与 CK 组比较：* $P<0.05$

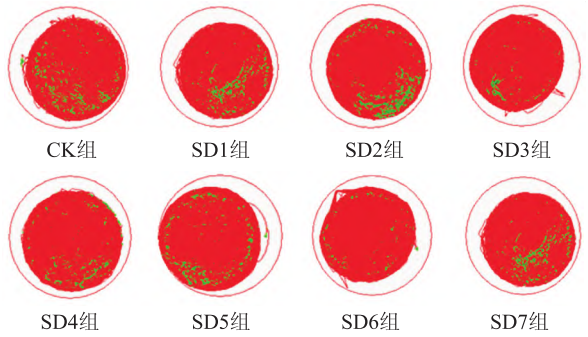

图 2 各组斑马鱼运动轨迹

2.2 各组斑马鱼学习记忆能力情况 图 4 为各组斑马鱼 T 迷宫 5 次测试结果，第 5 次测试结果显示，CK 组与 SD 各组间比较，CK 组斑马鱼学习记忆能力较 SD1 组强（$P<0.05$），CK 组斑马鱼学习记忆能力比 SD2、SD3 组强（$P<0.01$）；SD 各组间对比，SD1 组斑马鱼学习记忆能力较 SD2、SD3 组斑马鱼强（$P<0.01$），SD2 组斑马鱼学习记忆能力较 SD3 斑马鱼强（$P<0.01$），见图 4、5。

2.3 各组斑马鱼生物钟基因变化情况 各组斑马鱼脑组织 qRT-PCR 检测结果显示，SD3 组斑马鱼脑部 Per1a、Per2、Bmal1、Cry1b mRNA 水平表达与 CK 组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$），而其余各组之间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 2。

表 2 各组斑马鱼各指标 mRNA 水平表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Per1a	Per2	Bmal1	Cry1b
CK	3	1.27±0.04	1.28±0.03	0.91±0.03	1.34±0.03
SD1	3	1.02±0.06	1.15±0.09	0.99±0.01	1.11±0.05
SD2	3	0.93±0.04	1.01±0.03	1.02±0.05	1.00±0.03
SD3	3	0.90±0.04*	0.92±0.04*	1.11±0.03*	0.91±0.10*

与 CK 组比较：* $P<0.05$

2.4 各组斑马鱼大脑病理变化情况 透射电子显微镜下可见 CK 组斑马鱼大脑神经元细胞结构完整，细胞核（N）结构完整，染色质颜色稍浅，团聚在核内，线粒体（M）丰富且结构完整，可见散在分布的粗面内质网（rER）。SD2 及 SD3 组斑马鱼大脑神经

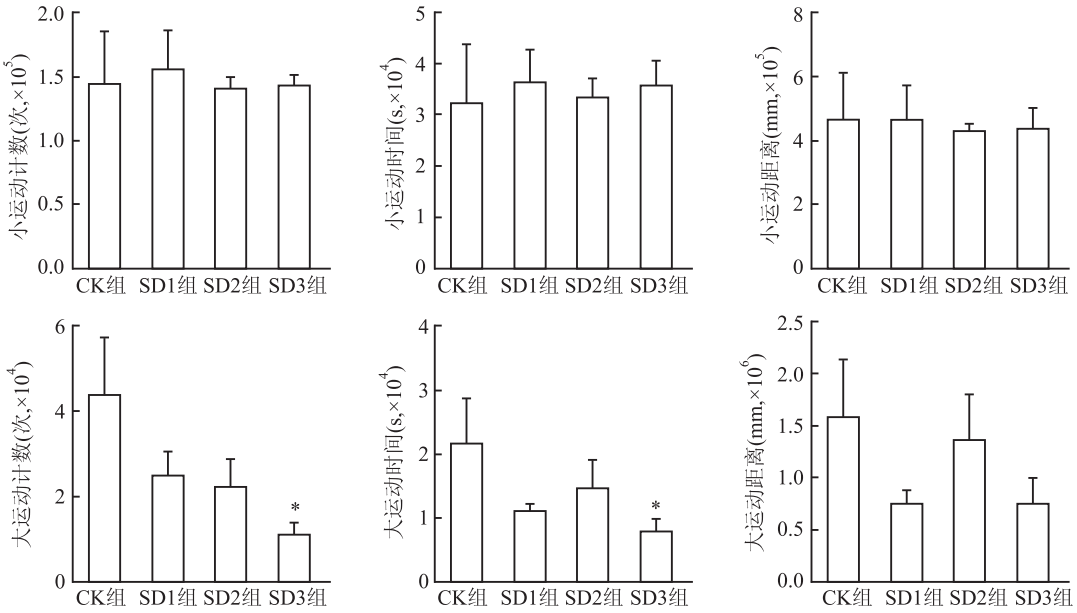

图 3 各组斑马鱼大小运动计数、时间及距离

与 CK 组比较：* $P<0.05$

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

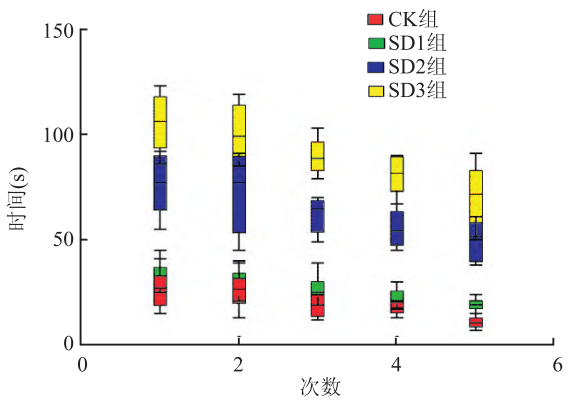

图 4　各组斑马鱼学习记忆能力统计图

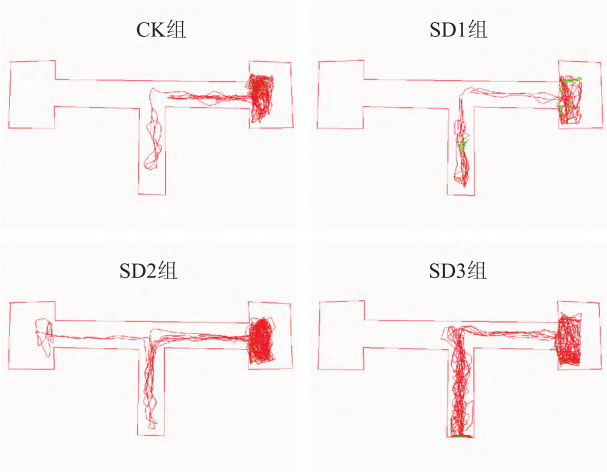

图 5　各组斑马鱼 T 迷宫轨迹图

元出现坏死现象,镜下可见细胞核塌陷,边界破解甚至溶解,染色质固缩,线粒体出现肿胀,甚至大量空泡。见图 6。

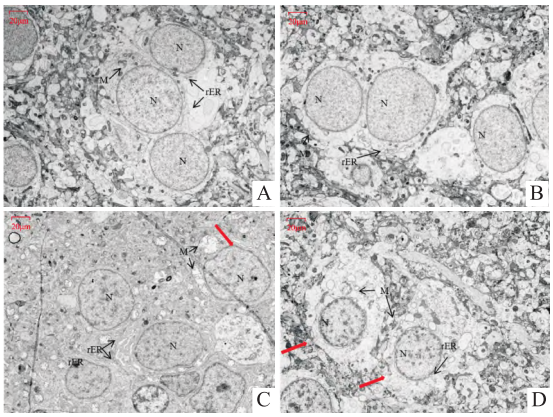

图 6　各组斑马鱼大脑神经元病理改变　×1 200

A ~ D:CK 组、SD1 组、SD2 组、SD3 组

3　讨论

斑马鱼和人类一样,白天活跃,夜间因褪黑激素达到顶峰,进入睡眠阶段,具有明显的昼夜节律,研究[8]显示了其与人类慢波睡眠和快速眼动睡眠相似的慢爆发睡眠和传播波睡眠,因此,选择斑马鱼作为失眠动物模型具有良好的优势。

光照可以明显抑制斑马鱼的睡眠,当斑马鱼在生物夜晚的最后 6 h 暴露在 150 lux 的光线下,睡眠时间减少 90% 以上,但长时间在恒定 150 lux 光照条件下,1 ~ 2 周内睡眠逐渐恢复[9]。正如光照影响小鼠的睡眠一样[10]。该研究观察到光照 4 ~ 7 d 的斑马鱼静息时间与空白组未见差异,这可能是斑马鱼耐受光照开始恢复睡眠,因此,未选择此阶段的斑马鱼进行失眠状态的模拟。完全睡眠剥夺 24 h 后斑马鱼出现认知损害[11],该研究观察到进行光照后的斑马鱼学习记忆能力下降。这与人类失眠后出现的健忘、记忆力下降的表现具有相似性,因此,运用斑马鱼模拟失眠是切实可行的。

光照时间太短可能不能模拟失眠,时间过长斑马鱼可能出现光照耐受,形成光照条件下的睡眠节律而恢复睡眠。该研究在行为学结果的基础上设置了 1、2、3 d 的不同光照时间,比较不同光照时间下斑马鱼的运动行为、学习记忆能力、时钟基因以及脑部超微结构。结果显示,随着光照时间的延长,斑马鱼的学习记忆能力持续下降。而运动形式和生物钟基因均在光照 3 d 时才出现改变,SD3 组斑马鱼大运动时间、计数均较 CK 组减少,大运动指的是斑马鱼在运动中整个身体的运动幅度超过了设置值的上限,为过度行为,此行为可间接说明其活动过度,与人类失眠后焦虑、易激惹、活动过度行为相吻合。昼夜节律的产生和维持与生物钟基因的周期性表达有关,生物节律是由一组生物钟基因如 Bmal1、Clock、Cry 和 Per 等调控的,目前人类在哺乳动物中发现的时钟基因 Per、Cry、Clock、Bmal 对生物体内的生物钟都起着重要的调控作用[12]。Perl 和 Per2 基因可能是光信号转导过程中的靶基因,因为这两个基因对光的反应非常强烈,Per 基因可以通过自身节律表达的变化,实现对中枢节律的调控,从而对生物的昼夜节律产生影响。Bmal1 是调节生物节律的重要转录因子,在时钟体系中发挥着重要的作用。在对 Cry 的研究中表明,持续黑暗的条件下 Cry1 突变会使生物体内的生物钟节律加快,光照条件对其有较大的影响。该研究选用常见的生物钟基因 Per1a、Per2、Bmal1、Cry1b 观察其 mRNA 表达水平来反映光照对其影响,结果显示这些指标均在连续光照 3 d 时出现改变。电镜下观察到光照 2 d 后的斑马鱼出

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

现神经元损伤和细胞凋亡,当光照时间延长到 3 d 时,神经元损伤情况则加重。因斑马鱼脑部体积较小,该次脑部取材为完整大脑,未能单独取到与失眠、生物钟关系最为密切的相关脑区,需要进一步研究。

参考文献

[1] Thompson J B, Su O O, Yang N, et al. Sleep-length differences are associated with altered longevity in the fruit fly Drosophila melanogaster[J]. Biol Open, 2020, 9(9): bio054361.

[2] 韩 芳,唐向东,张 斌. 中国失眠症诊断和治疗指南[J]. 中华医学杂志,2017,97(24):1844 - 56.

[3] Lee Y, Park J, Kim S M, et al. Sleep deprivation impairs learning and memory by decreasing protein O-GlcNAcylation in the brain of adult zebrafish[J]. FASEB J, 2020, 34(1): 853 - 64.

[4] Aho V, Vainikka M, Puttonen H A J, et al. Homeostatic response to sleep/rest deprivation by constant water flow in larval zebrafish in both dark and light conditions[J]. J Sleep Res, 2017, 26(3): 394 - 400.

[5] Hall J C. Cryptochromes: sensory reception, transduction and clock functions subserving circadian systems[J]. Curr Opin Neurobiol, 2000, 10(4): 456 - 66.

[6] Bringmann H. Genetic sleep deprivation: using sleep mutants to study sleep functions[J]. EMBO Rep, 2019, 20(3): e46807.

[7] Pinheiro-da-Silva J, Silva P F, Nogueira M B, et al. Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (Danio rerio)[J]. Anim Cogn, 2017, 20(2): 159 - 69.

[8] Leung L C, Wang G X, Madelaine R, et al. Neural signatures of sleep in zebrafish[J]. Nature, 2019, 571(7764): 198 - 204.

[9] Yokogawa T, Marin W, Faraco J, et al. Characterization of sleep in zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants[J]. PLoS Biol, 2007, 5(10): e277.

[10] 李晓凤,王 媛,李 磊,等. 光信号对 Fmr1 KO 小鼠睡眠 - 觉醒的调控作用[J]. 安徽医科大学学报,2018,53(6):823 - 7.

[11] Pinheiro-da-Silva J, Tran S, Luchiari A C. Sleep deprivation impairs cognitive performance in zebrafish: a matter of fact[J]. Behav Processes, 2018, 157: 656 - 63.

[12] Ehlen J C, Brager A J, Baggs J, et al. Bmal1 function in skeletal muscle regulates sleep[J]. Elife, 2017, 6: e26557.

Modeling and evaluation of zebrafish insomnia by continuous illumination

Ran Simiao, Xia Jing, Xia Lexuan, Wang Ping

(*Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan* 430000)

Abstract ***Objective*** To establish a sleep deprivation model using zebrafish, and to provide more reliable practical modeling schemes for basic research on insomnia. ***Methods*** A total of 160 male 4-month-old wild type AB zebrafish were randomly divided into control group (CK) and sleep deprivation group (SD1 - SD7). The control group was placed in a normal 14 h/10 h alternating light/dark environment, and the sleep deprived group was subjected to different days of continuous light with simulated sunlight to achieve the effect of sleep deprivation. After modeling, the changes of movement form, learning and memory ability, biological clock gene expression and brain ultrastructure of zebrafish in each group were compared. ***Results*** The results of movement form showed that compared with CK group, the resting time of zebrafish in SD1, SD2 and SD3 groups increased ($P < 0.05$), and the movement time and movement count of zebrafish in SD3 group decreased ($P < 0.05$). The results of learning and memory ability showed that zebrafish in CK group had better learning and memory ability than SD1, SD2 and SD3 groups ($P < 0.05, 0.01$), and zebrafish in SD1 group had better learning and memory ability than SD2 and SD3 (all $P < 0.01$), and zebrafish in SD2 group had better learning and memory ability than SD3 ($P < 0.01$). qRT-PCR results showed that compared with CK group, the mRNA expressions of Per1a, Per2, Bmal1 and Cry1b in the brain of zebrafish in SD3 group were significantly different ($P < 0.05$). The results of electron microscopy showed that the neurons of zebrafish brain in SD2 and SD3 groups showed neuronal necrosis. Under the microscope, there were nuclear collapse, boundary cracking and even dissolution, chromatin shrinkage, mitochondrial swelling and even a large number of vacuoles. ***Conclusion*** Light exposure for 3 days can change the movement pattern of zebrafish, reduce its learning and memory ability, change the expression of clock genes related to sleep maintenance, and induce the apoptosis of brain neurons, which can be used to establish the model of zebrafish insomnia.

Key words sleep deprivation; zebrafish; light; animal model of insomnia

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net