

网络出版时间:2016-3-8 8:29:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160308.0829.002.html>

◇基础医学研究◇

光通过自主感光视网膜神经节细胞调节睡眠活动

王媛¹, 吴芳¹, 李晓凤¹, 洪艳¹, 丁正霞¹, 许奇¹, 张瑾¹, 薛天², 鲍进², 王烈成¹

摘要 **目的** 利用不同基因型小鼠,探讨有无自主感光视网膜神经节细胞(ipRGCs)的小鼠在光的调节下对睡眠-觉醒活动的影响。**方法** 四种不同基因型小鼠,分别为野生型(C57BL/6, WT), ipRGCs不感光型(MKO),仅保留ipRGCs型(MO)和视杆、视锥细胞缺失且ipRGCs不感光型(TKO)。记录小鼠在12 h:12 h明暗交替下24 h睡眠量和觉醒量以及在关灯后1 h(即21:00)给予3 h光照,观察其在光照期间(21:00~24:00)睡眠量和觉醒量的变化。**结果** 在12 h:12 h明暗交替下,WT、MKO和MO小鼠的觉醒、快动眼睡眠(REM)、非快动眼睡眠(NREM)有明显的昼夜节律,并且这3种时相的分布时间差异无统计学意义;而TKO小鼠的3种时相无稳定相位,表现为自由运转。与12 h:12 h明暗交替的相应时段比较,在3 h光照期间,WT小鼠觉醒总量减少($P < 0.01$),REM总量增加($P < 0.01$),NREM总量增加($P < 0.01$)以及总睡眠时间(TST)增加($P < 0.01$);MO小鼠觉醒总量减少($P < 0.01$),REM总量增加($P < 0.05$),NREM总量增加($P < 0.05$)以及TST总量增加($P < 0.01$);MKO和TKO小鼠的3种时相均无显著变化。**结论** 表达视黑素的ipRGCs在小鼠光诱导睡眠的过程中起重要作用。

关键词 自主感光视网膜神经节细胞;光照;生物节律;睡眠
中图分类号 R 338.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0463-05

在哺乳动物中,眼睛是唯一具有成像和非成像视觉功能的感光器官,视网膜中负责感光的细胞有3种,分别是视杆细胞、视锥细胞以及自主感光视网膜神经节细胞(intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipRGCs)。ipRGCs能够合成感光蛋白—视黑素,由*Opn4*基因编码,参与调控昼夜节律、瞳

孔对光反射等非成像视觉功能^[1]。众所周知,睡眠受内稳态和生物节律的双重调控,最佳的睡眠状态是内稳态和生物节律的同步化^[2]。光可以影响睡眠,也可以影响觉醒,表明光在睡眠觉醒状态中可能扮演直接角色^[3]。在啮齿类动物中,部分ipRGCs提供形态学证据证明光可能通过视网膜到睡眠中枢腹外侧视前区(ventrolateral preoptic area, VLPO)的这一直接途径调节睡眠^[4-5]。该实验通过构建不同基因型小鼠的睡眠模型,观察并记录在12 h:12 h明暗交替下以及关灯后给予光照对小鼠睡眠觉醒的影响,进一步探讨ipRGCs在睡眠活动中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级雄性8周龄小鼠共34只,25~28 g。均由中国科学技术大学生命科学学院脑功能与脑疾病重点实验室薛天研究组提供,按不同基因类型分为四组:野生型(WT)即C57BL/6小鼠,有视锥、视杆细胞和ipRGCs($n=10$);ipRGCs不感光型(MKO)小鼠有视锥、视杆细胞($n=8$);仅保留ipRGCs型(MO)小鼠无视锥、视杆细胞($n=8$);视杆、视锥细胞缺失且ipRGCs不感光型(TKO)小鼠($n=8$)。实验小鼠置于动物房的独立通风笼盒内饲养,光照8:00~20:00,温度适宜,能够自由摄食饮水。

1.2 主要试剂与仪器 68030型小鼠脑立体定位适配器、高速颅骨钻(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);MP150多导生理信号记录分析系统(美国Biopac公司);Sleepsign睡眠分析软件(日本Kissei Comtec株式会社);PCR相关试剂(日本TaKaRa公司);电极用银丝(美国Cooner Wire公司);造牙粉、义齿基托树脂(上海二医张江生物材料有限公司);记录排线(东莞市耀博电子有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 基因鉴定 取出生两周后小鼠脚趾组织放入EP管中,加入50 mmol/L NaOH 80 μ l,金属浴99 $^{\circ}$ C、35 min后加1 mmol/L Tris-HCl 40 μ l,于4 $^{\circ}$ C保存样品。各基因分别取1 μ l样品进行PCR,反应条

2015-12-25 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071075、81401100、81371066、31322024);中国科学院脑功能与脑疾病重点实验室开放课题(编号:2013-1);安徽省教育厅自然科学基金重点项目(编号:KJ2014A116)

作者单位:¹安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

²中国科学技术大学生命科学学院脑功能与脑疾病重点实验室,合肥 230027

作者简介:王媛,女,硕士研究生;

王烈成,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wangliecheng@ahmu.edu.cn

件:94 ℃、5 min;94 ℃、30 s,58 ℃、30 s,72 ℃、45 s 共 35 个循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。新生小鼠除 WT 外,都需要基因鉴定确定基因型后方可饲养实验。

1.3.2 动物手术 小鼠经 Avertin(30 ml/kg)行腹腔麻醉后固定于小鼠脑立体定位适配器上,将小鼠头顶毛剪去,酒精消毒皮肤并剪开,血管夹夹紧切口两侧皮肤,分离皮下组织,用生理盐水洗净后使颅骨完全暴露,分别位于前囟前 1.0 mm、旁开 1.5 mm 和后囟前 1.0 mm、旁开 1.5 mm 处用颅骨钻钻通颅骨,但不弄破硬脑膜,将脑电电极埋入,两根肌电电极分别插入两侧的颈部肌肉内。用牙科水泥将电极固定于颅骨上,腹腔注射青霉素,缝合伤口,将小鼠侧卧位放入屏蔽箱恢复笼内。

1.3.3 记录方法 小鼠手术后放入恢复笼内恢复 7 d,第 8 天将小鼠头部电极通过所焊的记录排线与多通道万向轮连接,适应 3 d 后,正式记录。屏蔽箱内光照 8:00~20:00,记录从早 8:00(记为 ZT 0)开始,用 Acqknowledge 4.2 软件记录小鼠的脑电肌电活动,记录过程中小鼠能够自由饮食和饮水,活动不

受限制。在正式记录第 1 天和第 2 天,观察 12 h:12 h 明暗交替下小鼠的睡眠觉醒活动。第 3 天和第 4 天在关灯后 1 h(21:00)给予 3 h(21:00~24:00,ZT 13~ZT 15)的光照。以 4 s 为一段段时间,将睡眠觉醒周期分为觉醒,以低幅快波脑电和明显肌电活动为特征;非快速眼睡眠(non-rapid eye movement,NREM),以高幅慢波脑电和肌电活动明显减少为特征;快速眼睡眠(rapid eye movement,REM),以低幅慢波脑电和肌电安静为特征。总睡眠时间(total sleep time,TST)是 REM 和 NREM 时间之和。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数比较采用 t 检验,组间样本比较采用方差分析。

2 结果

2.1 12 h:12 h 明暗交替的光信号对 WT、MKO 以及 MO 小鼠的睡眠觉醒节律的影响 在 12 h:12 h 明暗交替中,WT、MKO 和 MO 小鼠的觉醒、REM 睡眠以及 NREM 睡眠时间呈昼夜节律变化,三者之间差异无统计学意义。见图 1。

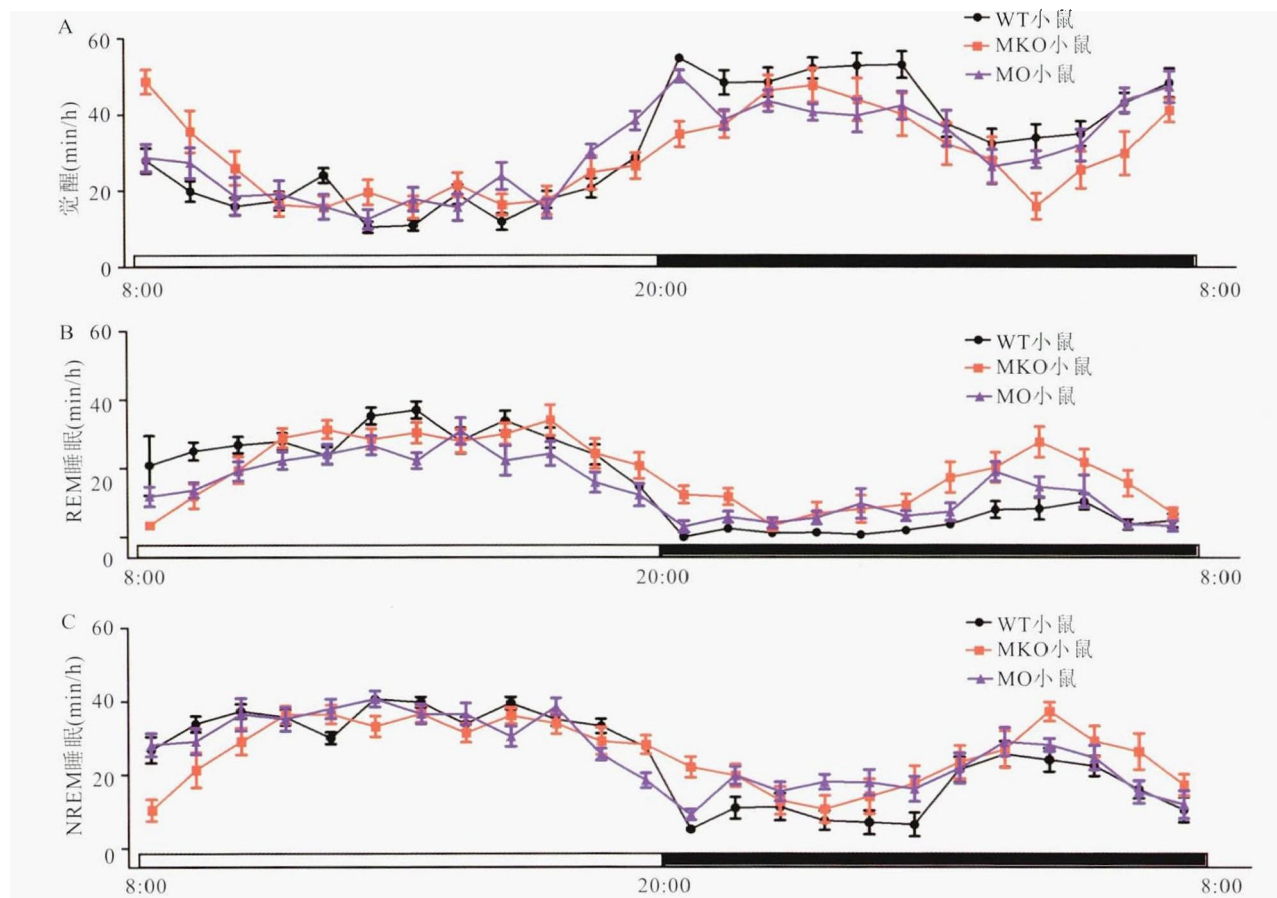


图 1 WT、MKO 及 MO 小鼠在 12 h:12 h 明暗交替 24 h 中各时相的分布

A:觉醒;B:REM 睡眠;C:NREM 睡眠

2.2 WT小鼠在21:00给予3 h光照时睡眠变化

与WT小鼠12 h:12 h明暗交替的相应时段比较,在给予3 h光照(ZT 13~ZT 15)的时段内,WT小鼠觉醒总量减少($t=12.99, P<0.01$),REM睡眠总量增加($t=-11.74, P<0.01$),NREM睡眠总量增加($t=-12.37, P<0.01$)以及TST总量增加($t=-12.99, P<0.01$)。见图2。

2.3 MKO小鼠在21:00给予3 h光照时睡眠变化

与MKO小鼠12 h:12 h明暗交替的相应时段比较,给予3 h的光照,其觉醒总量、REM睡眠、NREM睡眠以及TST总量无明显的改变。见图3。

2.4 MO小鼠在21:00给予3 h光照时睡眠变化

与MO小鼠12 h:12 h明暗交替的相应时段比较,给予3 h光照,MO小鼠觉醒总量减少($t=3.15, P<0.01$),REM睡眠总量增加($t=-2.69, P<0.05$),NREM睡眠总量增加($t=-2.72, P<0.05$)以及TST总量增加($t=-3.15, P<0.01$)。见图4。

2.5 TKO小鼠在12 h:12 h明暗交替以及关灯后给予光照睡眠觉醒的变化 在12 h:12 h明暗交替中,TKO小鼠觉醒、REM睡眠及NREM睡眠周期无法与光照周期相位匹配,给予3 h光照后无改变。

3 讨论

在生物进化过程中,行为活动和生理功能需要适应外部环境的各种环境因素,在这些因素中,光被认为是最为普遍和有效的^[6]。光可诱导生物节律的时相位移,调节日常活动、睡眠-觉醒周期以及激素分泌等。非视觉的光反应被认为主要由感光蛋白视黑素介导^[7]。ipRGCs表达视黑素,与其他类型的视网膜神经节细胞不同,ipRGCs除了能够接受来源于视锥视杆光感受器的信号输入,还能通过自身表达的感光蛋白直接对光产生反应^[8]。视杆细胞、视锥细胞以及以视黑素为感光蛋白的ipRGCs都是调节光作用于睡眠状态所必须的。视杆细胞和视锥细胞通过ipRGCs传递睡眠和觉醒的信号以及缺少视黑素会改变睡眠的内稳态都表明ipRGCs介导了光感受对昼夜节律的影响^[9],ipRGCs加工感光信息在光诱导睡眠中同样扮演重要的角色^[10]。

本研究结果显示,在12 h:12 h明暗交替中,MKO小鼠、MO小鼠与WT小鼠一样,拥有与光照周期同步的睡眠觉醒节律,而TKO小鼠的睡眠-觉醒时间无法与光照周期同步,且无固定相位,表现为自

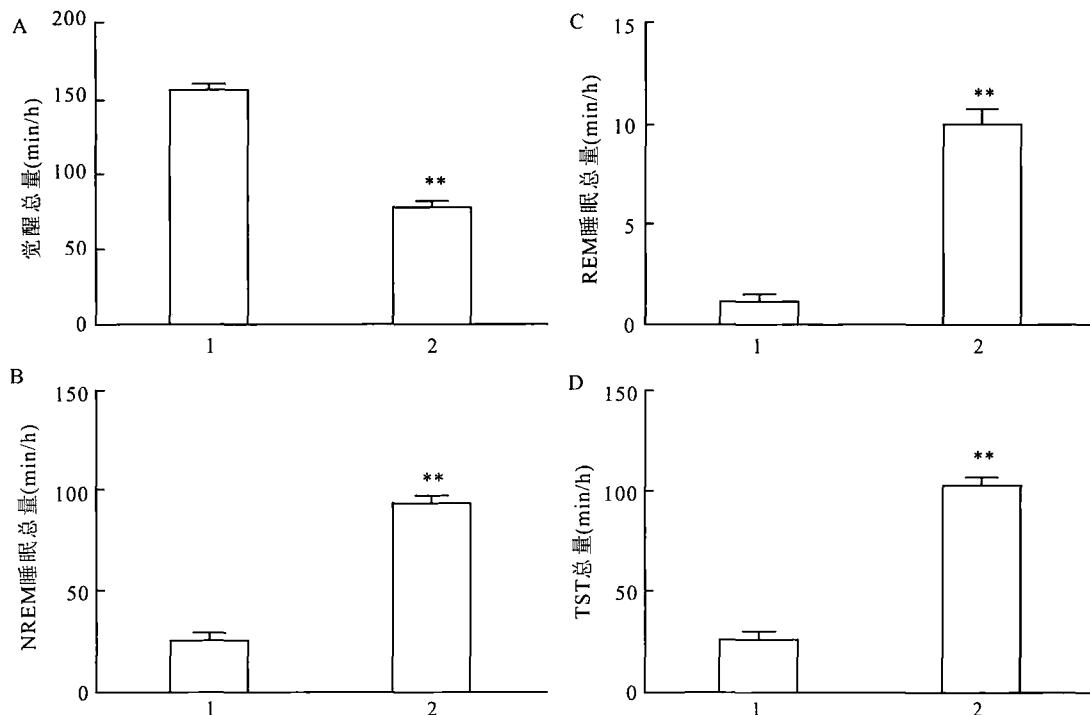


图2 WT小鼠给予3 h光照(ZT 13~ZT 15)睡眠觉醒总量的变化

1:对照组;2:3 h光照组;A:觉醒总量;B:REM睡眠总量;C:NREM睡眠总量;D:TST总量;与对照组比较:** $P<0.01$

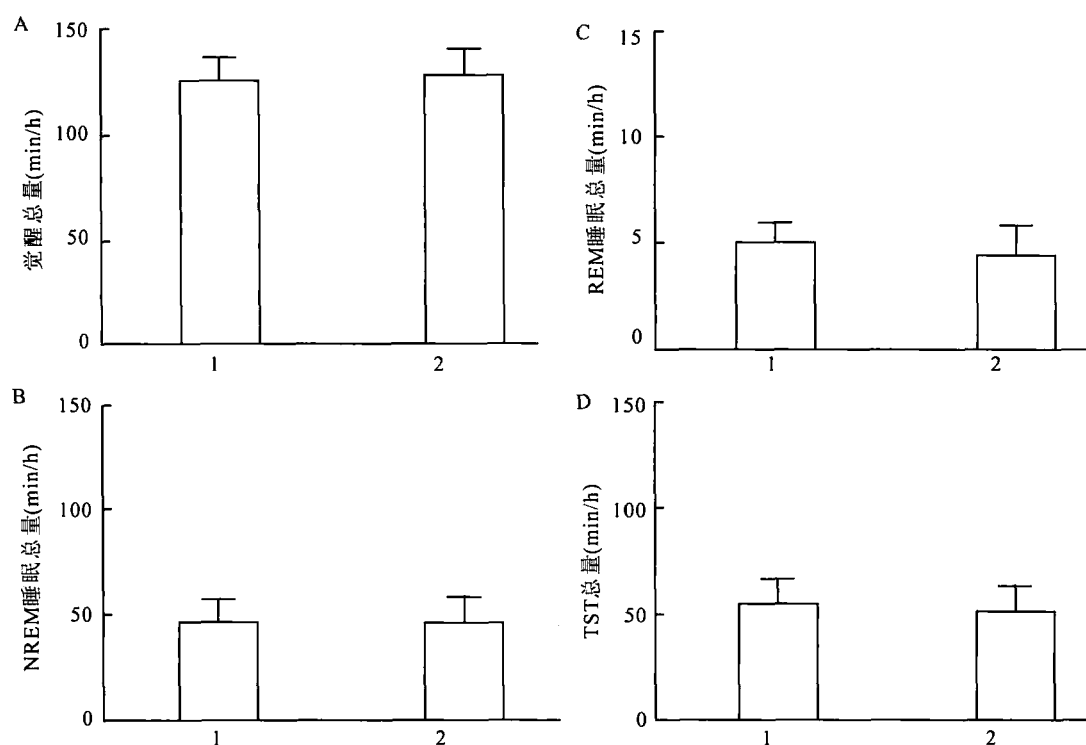


图3 MKO小鼠给予3 h光照(ZT 13~ZT 15)睡眠觉醒总量的变化
1:对照组;2:3 h光照组;A:觉醒总量;B:REM睡眠总量;C:NREM睡眠总量;D:TST总量

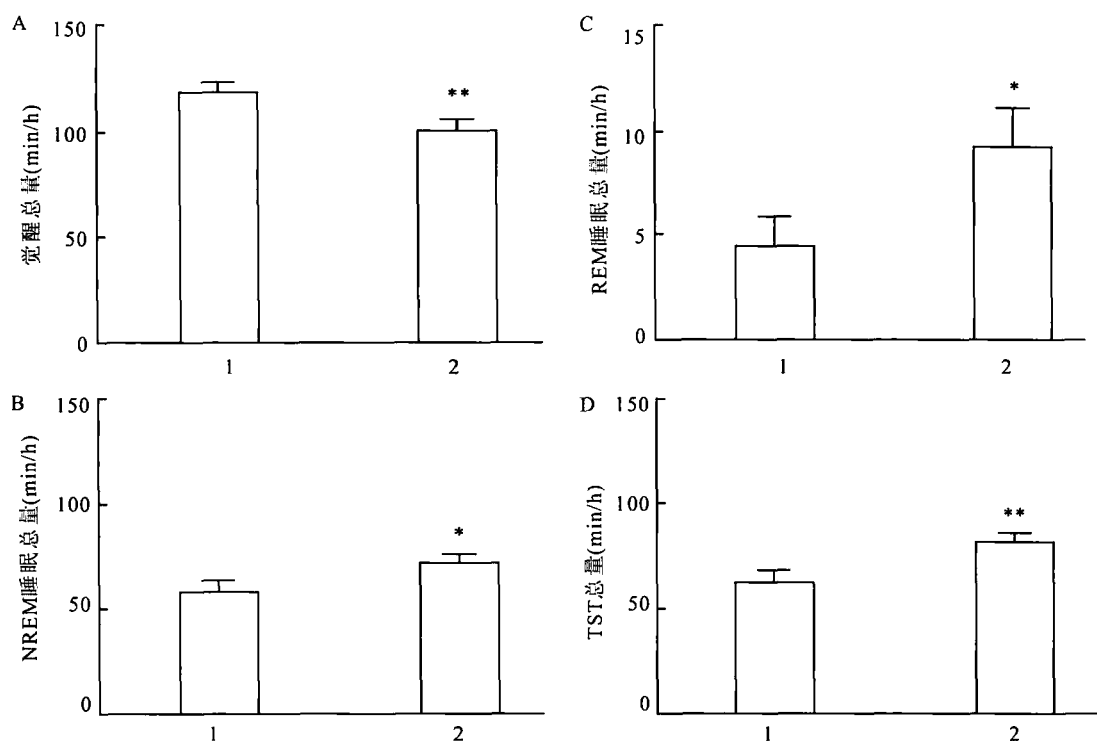


图4 MO小鼠给予3 h光照(ZT 13~ZT 15)睡眠觉醒总量的变化
1:对照组;2:3 h光照组;A:觉醒总量;B:REM睡眠总量;C:NREM睡眠总量;D:TST总量;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

由运转。这说明单一的视杆/视锥细胞或者 ipRGCs 能够提供光的信号使内部节律与外部时间同步,而

视黑素的存在能够补偿视杆细胞和视锥细胞的缺失。夜行性动物的睡眠主要取决于明时相中光的输

入,在暗时相开始 1 h 后给予 3 h 光照,WT 小鼠和 MO 小鼠能够迅速诱导睡眠,降低觉醒,然而 MKO 小鼠在光照期间任何时段都没有应答,没有产生这样的诱导效应,说明表达视黑素的 ipRGCs 在光诱导睡眠中起到至关重要的作用。TKO 小鼠因无法感知外部光照的周期变化,丧失光授时的途径,睡眠和觉醒机制在给予光照时也无响应。

参考文献

- [1] Hattar S, Lucas R J, Mrosovsky N, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice [J]. *Nature*, 2003, 424(6944):76-81.
- [2] Borbély A A. A two process model of sleep regulation [J]. *Hum Neurobiol*, 1982, 1(3):195-204.
- [3] Lockley S W, Evans E E, Scheer F A, et al. Short-wavelength sensitivity for the direct effects of light on alertness, vigilance, and the waking electroencephalogram in humans [J]. *Sleep*, 2006, 29(2):161-8.
- [4] Gooley J J, Lu J, Fischer D, et al. A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(18):7093-106.
- [5] Hattar S, Kumar M, Park A, et al. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 497(3):326-49.
- [6] Kawaguchi C, Isojima Y, Shintani N, et al. PACAP-deficient mice exhibit light parameter-dependent abnormalities on nonvisual photoreception and early activity onset [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):e9286.
- [7] Xue T, Do M T, Riccio A, et al. Melanopsin signalling in mammalian iris and retina [J]. *Nature*, 2011, 479(7371):67-73.
- [8] Hubbard J, Ruppert E, Gropp C M, et al. Non-circadian direct effects of light on sleep and alertness: lessons from transgenic mouse models [J]. *Sleep Med Rev*, 2013, 17(6):445-52.
- [9] Tsai J W, Hannibal J, Hagiwara G, et al. Melanopsin as a sleep modulator: circadian gating of the direct effect of light on sleep and altered sleep homeostasis in *Opn4(-/-)* mice [J]. *PLoS Biol*, 2009, 7(6):e1000125.
- [10] Jagannath A, Hughes S, Abdelgany A, et al. Isoforms of melanopsin mediate different behavioral responses to light [J]. *Curr Biol*, 2015, 25(18):2430-4.

Light induced sleep is mediated by intrinsically photosensitive retinal ganglion cells

Wang Yuan, Wu Fang, Li Xiaofeng, et al

(Dept of Physiology, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate whether the light modulates sleep and wakefulness of rodents through intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs). **Methods** Mice were divided into four groups, including C57BL/6(WT), melanopsin knock out (MKO), melanopsin only (MO) and coneless, rodless and melanopsin knock out (TKO). The normal 12 h : 12 h light dark cycle and 3 h light pulse administered at 1 h after the turning off of light (21:00) were used to detect the variation of sleep activity. **Results** In the normal 12 h : 12 h light dark cycle, WT, MKO and MO mice had a regular day-night rhythm and no significant difference in wakefulness, rapid eye movement (REM) and non-rapid eye movement (NREM). However, TKO mice could not be entrained according to the light-dark cycle and exhibited free-running rhythm. During 3 h light pulse, the amount of wakefulness in WT mice decreased ($P < 0.01$) along with an increase of REM ($P < 0.01$), NREM ($P < 0.01$) and total sleep time (TST) ($P < 0.01$) compared with the corresponding time of the normal 12 h : 12 h light dark cycle. MO mice exhibited a similar effect with a decrease of wakefulness ($P < 0.01$) and an increase of REM, NREM and TST ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). Both MKO and TKO mice had no significant changes for all stages during the light pulse. **Conclusion** Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells play an important role in light induced sleep of mice.

Key words intrinsically photosensitive retinal ganglion cells; light; circadian rhythm; sleep