

# 睡眠剥夺对抑郁模型大鼠海马 CREB 表达的影响

赵小赋<sup>1</sup>, 王玉锋<sup>2</sup>, 朱金富<sup>2</sup>

(1.解放军第91中心医院全军精神疾病防治中心,河南 焦作 454003;

2.新乡医学院心理学系,河南 新乡 453003)

**【摘要】** 目的:探讨睡眠剥夺通过影响海马区 CREB 含量及活性而产生的快速抗抑郁机制。方法:将 40 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、抑郁模型组、睡眠剥夺组和水环境对照组。用改良多平台睡眠剥夺法(MMPM)对慢性不可预见性应激抑郁模型方法建立的抑郁大鼠模型进行睡眠剥夺。用旷场实验和强迫游泳实验测试其行为变化,以及用免疫组化法测试海马 CREB、P-CREB 的含量。结果:①睡眠剥夺组大鼠与抑郁模型组相比旷场实验的水平得分与垂直得分均明显升高,潜伏期明显缩短。②海马 CA1、CA3、DG 区的 CREB 及 p-CREB 平均光密度值比较中,抑郁模型组均显著低于正常对照组,睡眠剥夺组均显著高于抑郁模型组。结论:睡眠剥夺可明显改善抑郁大鼠的抑郁样行为;海马部位 CREB 含量及活性的增高可能参与了睡眠剥夺的快速抗抑郁作用。

**【关键词】** 睡眠剥夺;慢性不可预见性应激抑郁模型;海马;CREB

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2012)04-0461-04

## Effects of Sleep Deprivation on Depressive Behaviors and Hippocampus CREB in Rats Depression Model

ZHAO Xiao-fu, WANG Yu-feng, ZHU Jin-fu

Mental Diseases Prevention and Treatment Center of the Chinese PLA,

the Chinese PLA 91st Center Hospital, Jizuo 454003, China

**【Abstract】 Objective:** To explore the changes of CREB levels and activities in hippocampus resulting from sleep deprivation, and then to reveal the mechanism for rapid antidepressant aroused by sleep deprivation. **Methods:** 40 SD rats were randomly divided into normal control group, chronic stress group, sleep deprivation group and tank control group. 10 rats in each group. The depression animal model was established by chronic mild unpredictable stress methods. Sleep deprivation was performed by the modified multiple platform method (MMPM). The animal model and the effect of antidepressant were evaluated by the Open Field test and Forced Swimming test. The expression levels of CREB and P-CREB were separately observed by immunohistochemical technology in hippocampus CA1, CA3 and DG. **Results:** ①In the CUMS depressant animal model, compared with the normal control rats, following 72-hour sleep deprivation, ambulation and rearing increased, and the latent period in the center decreased. ②CREB and P-CREB: The average values of optical density(OD) in hippocampus CA1, CA3, DG of the model group was lower than that of the normal control group significantly, and that of the sleep deprivation group was higher than that of the model group. **Conclusion:** Rats showed depressive behaviors after 21 days stresses, while 72 hours sleep deprivation could reverse this effect. The up regulation of the expression and phosphorylation of CREB by sleep deprivation may participate in the antidepressant-like effect of sleep deprivation.

**【Key words】** Chronic unpredicted mild stress(CUMS); Sleep deprivation; Hippocampus; CREB

抑郁症是最常见的精神障碍之一,具有反复发作和自杀的倾向。目前,抗抑郁药物治疗只能缓解60%的患者的症状,并且抗抑郁药需2~6周临床才能达到充分的时间起效。睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)具有快速的抗抑郁效应,其特点是在睡眠剥夺后的第二天即迅速起效,且副作用较一般抗抑郁药物治疗少。1次睡眠剥夺后抑郁缓解有效率约为40%~60%,因此得到广泛的应用<sup>[1]</sup>。且与抗抑郁药

物、锂盐等联用可巩固其抗抑郁效果<sup>[2]</sup>。对动物模型及抑郁症患者尸检的研究显示,抑郁症时大脑海马 CREB (cAMP-response element binding protein, CREB)的表达和活性降低<sup>[3,4]</sup>。许多证据表明抗抑郁药的作用机制与 cAMP-CREB 信号通路有关,所有主要类型的抗抑郁药都导致包括海马在内的不同脑区 CREB 的功能和表达增强<sup>[5]</sup>。睡眠剥夺可通过上调可塑性相关基因如转录因子环磷酸腺苷反应原件结合蛋白 CREB 发挥抗抑郁作用的<sup>[6]</sup>。本研究拟通过对慢性应激抑郁模型大鼠进行连续 72 小时快眼动睡眠剥夺 (Rapid eye movement sleep deprivation,

**【基金项目】** 河南省科技发展计划项目(102102310069);新乡医学院重点领域项目(ZD2011-29)

通讯作者:朱金富

REMSD),,观察大鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区 CREB 的变化,以探讨睡眠剥夺抗抑郁作用的可能机制。

### 1 对象与方法

#### 1.1 动物及分组

健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 40 只,清洁级,体重 200-250 克,由河南师范大学实验动物中心提供。大鼠适应环境一周后进行旷场实验,选择旷场实验得分相近的随机分为 4 组:正常对照组(A 组),抑郁模型组(B 组),睡眠剥夺组(C 组)和水环境对照组(D 组),各组旷场实验得分无显著差异性,每组 10 只。睡眠剥夺组和水环境对照组都是在抑郁模型基础上进行旷场行为测试和睡眠剥夺。

#### 1.2 主要仪器及试剂

LEICA 石蜡切片机(德国产),OLYMPUS 光学显微镜(日本产),LEICA 显微摄影系统(德国产)。小鼠抗大鼠 CREB 多克隆抗体,兔抗大鼠 p-CREB(磷酸化 CREB)多克隆抗体;与 CREB 抗体配套的小鼠 SP 免疫组化试剂盒,均购自北京博奥森公司。DAB 染色试剂盒、PBS 粉、枸橼酸盐缓冲液购自北京中杉公司。

#### 1.3 动物模型制备

采用慢性不可预见性应激抑郁模型<sup>[7]</sup>,每日给予 1 种刺激,每种刺激随机使用 2-3 次,使动物不能预料刺激的发生。正常对照组除行为学实验和定期换垫料外,不给予其他刺激。

#### 1.4 行为学评分

旷场实验:将大鼠置于正方形旷场箱中央,记录大鼠 5 分钟内的行为表现,包括潜伏期、水平穿越格数(水平运动得分)、直立次数(垂直运动得分)。强迫游泳实验:用秒表记录 5 分钟游泳中大鼠不动的时间(不动即大鼠在水中停止挣扎、呈漂浮状态,或仅

有细小肢体运动以保持头部浮在水面)。

#### 1.5 睡眠剥夺的实行

睡眠剥夺组采用改良多平台睡眠剥夺法(modified multiple platform method,MMPM)<sup>[8]</sup>,具体操作如下:在睡眠剥夺箱内放置 10 个小平台,水面低于平台面约 1.0cm,大鼠在平台上自行摄食饮水,并可在平台间活动。水环境对照组采用与睡眠剥夺组大小一样的鼠箱,把大鼠放在铁丝网上,网距水面约 1cm,以形成与睡眠剥夺组相似的环境。

#### 1.6 组织取材

将动物大脑切片后进行免疫组化并记录分析海马 CA1、CA3 区和齿状回(DG)内阳性细胞的平均光密度值(所测阳性细胞的平均光密度值,OD),取每只大鼠所有切片的平均值作为其平均光密度值。

#### 1.7 统计处理

采用 SPSS13.0 统计学软件对数据进行分析。

## 2 结 果

### 2.1 旷场实验及强迫游泳实验得分

2.1.1 造模前后比较 造模前各组大鼠旷场实验得分及强迫游泳实验得分均无差异(P>0.05)。应激后抑郁模型组、睡眠剥夺组、水环境对照组与正常对照组相比,旷场实验水平与垂直得分均明显下降,潜伏期明显延长,强迫游泳实验不动时间明显增加。抑郁模型组、睡眠剥夺组、水环境对照组三组间各项得分均无差异。详见表 1 和表 2。

2.1.2 睡眠剥夺前后比较 经过 72 小时睡眠剥夺,抑郁模型大鼠旷场实验的水平得分与垂直得分均明显升高,潜伏期明显缩短,强迫游泳实验不动时间明显减少。睡眠剥夺组与抑郁模型组和水环境对照组相比,各项行为学实验得分均有显著差异性。详见表 3。

表 1 造模刺激前旷场实验评分结果及强迫游泳实验不动时间比较(分,  $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	A	B	C	D	F	P
水平得分	69.20 ± 14.89	65.60 ± 10.48	66.30 ± 11.54	73.40 ± 11.74	0.834	0.484
垂直得分	26.00 ± 4.40	27.80 ± 4.66	25.80 ± 4.32	26.50 ± 3.57	0.447	0.721
潜伏期	1.90 ± 0.74	2.00 ± 0.82	2.10 ± 0.88	2.10 ± 0.78	0.145	0.932
强迫游泳	102.30 ± 12.58	107.50 ± 11.57	100.70 ± 9.29	99.70 ± 9.41	1.032	0.390

注: P>0.05

表 2 造模刺激后旷场实验评分结果及强迫游泳实验不动时间比较(分,  $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	A	B	C	D	F	P
水平得分	66.70 ± 24.61	39.40 ± 16.51*	35.70 ± 13.13*	32.60 ± 15.26*	7.431	0.000
垂直得分	26.00 ± 7.59	17.70 ± 4.00*	19.00 ± 4.88*	18.40 ± 4.53*	5.041	0.005
潜伏期	2.10 ± 1.52	4.10 ± 2.53**	4.20 ± 2.15**	5.20 ± 2.30*	4.130	0.013
强迫游泳	108.50 ± 21.17	151.40 ± 28.20*	145.20 ± 15.93*	136.80 ± 31.10**	5.830	0.002

注:与正常对照组相比 \*P<0.01, \*\*P<0.05

表3 第三次旷场实验评分结果和强迫游泳实验不动时间比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	A	B	C	D	F	P
水平得分	74.30±24.91	41.20±18.47*	81.30±18.41 <sup>△△</sup>	35.30±18.77*	12.810	0.000
垂直得分	27.90±10.37	19.20±3.62**	27.70±8.19 <sup>△△△</sup>	20.50±4.84**	4.048	0.014
潜伏期	2.20±1.23	4.50±2.07*	2.20±1.55 <sup>△△</sup>	4.60±1.35*	7.362	0.001
强迫游泳	105.80±12.24	139.60±50.11**	100.40±20.73 <sup>△△△</sup>	133.60±15.23**	4.394	0.010

注:与正常对照组相比 \* $P<0.01$ , \*\* $P<0.05$ ;与抑郁模型组相比  $\Delta P<0.01$ ,  $\Delta\Delta P<0.05$ ;与水环境对照组相比  $\Delta P<0.01$ ,  $\Delta\Delta P<0.05$ ;下同。

表4 各组海马 CREB 平均光密度值比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	A	B	C	D	F	P
CA1	0.1154±0.0215	0.0816±0.0183*	0.1080±0.0350 <sup>△△△</sup>	0.0857±0.0146*	4.934	0.006
CA3	0.1209±0.0500	0.0799±0.0152*	0.1222±0.0405 <sup>△△△</sup>	0.0851±0.0146**	4.608	0.008
DG	0.1510±0.0572	0.0983±0.0191*	0.1430±0.0540 <sup>△△△</sup>	0.0966±0.0181*	4.827	0.006

表5 各组海马 p-CREB 平均光密度值比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	A	B	C	D	F	P
CA1	0.1058±0.0207	0.0779±0.1086**	0.1161±0.0371 <sup>△△</sup>	0.0816±0.0225**	5.188	0.004
CA3	0.1116±0.0242	0.0767±0.0283*	0.1127±0.0277 <sup>△△△</sup>	0.0787±0.0322**	4.982	0.005
DG	0.1239±0.0350	0.0924±0.0220**	0.1188±0.0368 <sup>△△△</sup>	0.0863±0.0163*	4.212	0.012

## 2.2 免疫组化 CREB 及 p-CREB 光密度值比较

各组大鼠海马 CA1、CA3、DG 区 CREB 及 p-CREB 平均光密度值结果表现为:抑郁模型组大鼠海马各区 CREB 及 p-CREB 平均光密度值均显著低于正常对照组,睡眠剥夺组 CREB 及 p-CREB 平均光密度值显著高于抑郁模型组,睡眠剥夺组 CREB 及 p-CREB 平均光密度值与水环境对照组相比差异显著,见表4、表5。

## 3 讨论

本实验采用慢性应激因子加孤养制模方法,造成了动物的抑郁状态,运动和探索行为能力下降,在规定时间内水平运动和垂直运动次数均减少等,说明大鼠抑郁模型的制作是成功的<sup>[9-12]</sup>。而连续72小时的睡眠剥夺后,抑郁模型大鼠旷场实验的水平得分与垂直得分均明显升高,潜伏期明显缩短,强迫游泳实验不动时间明显减少,提示睡眠剥夺具有改善抑郁模型大鼠抑郁样行为的效应,这与杨国愉等人的研究结果一致<sup>[13]</sup>。

Xu 等<sup>[14]</sup>在慢性应激大鼠模型中的前侧额叶和海马部位都检测到下降的 p-CREB。Li 等<sup>[15]</sup>在慢性不可预知应激大鼠模型检测到海马齿状回部位的 p-CREB 水平明显下降。郑晖等<sup>[16]</sup>也发现,慢性应激可以降低大鼠海马 p-CREB 蛋白的表达水平。海马作为边缘系统的重要组成部分,对情绪、学习、记忆、行为等有着重要的调节作用;无论是抑郁症患者,还是行为性抑郁模型动物,均有海马形态结构和分子生物学改变的报道<sup>[17]</sup>。研究表明慢性应激减少或

抑制 CA1-PCL、CA3-PCL 和 DG-GCL 细胞的生长,减少 DG 的神经发生和海马体积<sup>[18]</sup>。本实验采用免疫组化方法检测各组大鼠海马区 CREB 及 p-CREB 的变化,与其他三组相比,睡眠剥夺组海马 CA1、CA3、DG 区 CREB 及 p-CREB 的平均光密度值明显提高( $P<0.01$ ),这说明睡眠剥夺可以在一定程度上延缓细胞凋亡,从而改善抑郁模型大鼠抑郁样行为。

## 参 考 文 献

- Bunney JN, Potkin SG. Circadian abnormalities, molecular Clock genes and chronobiological treatments in depression. *British Medical Bulletin*, 2008, 86(1): 23-32
- Benedetti F, Barbini B, Colombo C, Smeraldi E. Chronotherapeutics in a psychiatric ward. *Sleep Medicine Reviews*, 2007, 11: 509-522
- Yamada S, Yamamoto M, Ozawa H, et al. Reduced phosphorylation of cyclin cAMP-responsive element-binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *Journal of Neural Transmission*, 2003, 110(6): 671-680
- Yuan P, Zhou R, Wang Y, et al. Altered levels of extracellular signal regulated kinase signaling proteins in postmortem frontal cortex of individuals with mood disorders schizophrenia. *Journal of Affective Disorders*, 2010, 124(1-2): 164-169
- Tanya LW, Kathryn ES, Rachael LN, et al. Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety. *Society of Biological Psychiatry*, 2004, 56(3): 151-160
- Berger M, Vollmann J, Hohagen F, et al. Sleep deprivation

- combined with consecutive sleep phase advance as a fast-acting therapy in depression: An open pilot trial in medicated and unmedicated patients. *The American Journal of Psychiatry*, 1997, 154 (6): 870-872
- 7 Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 1997, 134: 319-329
- 8 黄建欧, 赵忠新. 大鼠睡眠剥夺方法的研究进展. *中华神经医学杂志*, 2004, 3(3): 229-231
- 9 朱宇章, 彭淼, 丁宝坤, 等. 慢性应激对大鼠外显行为及海马亚区脑源性神经营养因子表达差异性的影响. *中国行为医学科学*, 2004, 13: 481-483
- 10 李晶晶, 袁勇贵, 侯钢, 等. 不同剂量文拉法辛对抑郁模型大鼠海马区 pCREB 和 BDNF 表达的影响. *中国神经精神疾病杂志*, 2008, 34(11): 645-649
- 11 许志强, 高长越, 方传勤, 等. 睡眠剥夺对小鼠学习记忆和海马 pCREB 水平的影响. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2010, 15(5): 392-393
- 12 宋炜熙, 胡随瑜, 王哲, 等. 白松片对抑郁模型大鼠海马 DAT mRNA 表达的影响. *中国临床心理学杂志*, 2006, 14 (5): 547-549, 541
- 13 杨国愉, 皇甫恩, 张大均, 等. 人参皂甙对睡眠剥夺大鼠学习记忆和活动性的影响. *中国临床心理学杂志*, 2007, 15 (1): 81-84
- 14 Xu Y, Ku B, Tie L, et al. Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. *Brain Research*, 2006, 1122 (1): 56-64
- 15 Li H, Zhang L, Huang Q. Differential expression of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the hippocampus of rats exposed to chronic unpredictable stress. *Behavioural Brain Research*, 2009, 205(1): 32-37
- 16 郑晖, 马光瑜, 徐小虎. 应激对大鼠海马 CREB, ERK 活性的影响. *中国行为医学科学*, 2007, 16: 103-105
- 17 Jayatissa MN, Bisgaard CF, West MJ, et al. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. *Neuropharmacology*, 2008, 54(3): 530-541
- 18 McLaughlin KJ, Gomez JLB, et al. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Research*, 2007, 1161: 556-564

(收稿日期: 2012-02-22)

(上接第 468 页)

- 4 Wilson TD, Houston CE, Etling KM, Brekke N. A new look at anchoring effects: Basic anchoring and its antecedents. *Journal of Experimental Psychology: General*, 1996, 125: 387-402
- 5 Mussweiler T. The malleability of anchoring effects. *Experimental Psychology*, 2002, 49(1): 67-72
- 6 LeBoeuf RA, Eldar S. Anchoring on the "Here" and "Now" in time and distance judgments. *Journal of Experimental Psychology*, 2009, 35(1): 81-93
- 7 唐海波, 徐慧. 时间管理倾向研究回顾与展望. *中国临床心理学杂志*, 2010, 18(2): 262-263
- 8 Epley N, Gilovich T. Putting adjustment back in the anchoring and adjustment heuristic: Differential processing of self-generated and experimenter-provided anchors. *Psychological Science*, 2001, 12: 391-396
- 9 Wu CS, Cheng FF, Lin HH. Exploring anchoring effect and the moderating role of repeated anchor in electronic commerce. *Behaviour and Information Technology*, 2008, 27(1): 31-42
- 10 Nicholas E, Thomas G. Anchoring and adjustment heuristic: A differential processing of self-generated and experimenter-provided anchors. *American Psychological Society*, 2001, 12(5): 391-397
- 11 Oppenheimer DM, LeBoeuf RA, Brewer NT. Anchors weigh: A demonstration of cross-modality anchoring and magnitude priming. *Cognition*, 2008, 106(1): 13-26
- 12 Epley N, Gilovich T. The anchoring-and-adjustment heuristic: Why the adjustments are insufficient. *Psychological Science*, 2006, 19: 311-320
- 13 Hartmut B, Steffen N. Cognitive process models of hindsight bias. *Social Cognition*, 2007, 25(1): 132-146
- 14 Chris J, Dan U. Precision of the anchor influences the amount of adjustment. *Psychological Science*, 2008, 19: 121-127
- 15 Rüdiger FP, Eisenhauer M. SARA: A cognitive Process model to simulate the anchoring effect and hindsight bias. *Memory*, 2003, 11(4/5): 337-356

(收稿日期: 2012-01-11)