



急性睡眠剥夺对小鼠血浆褪黑激素水平和下丘脑钟基因表达的影响

杨悦, 郭泽明, 韩昊书, 李伟天, 高婷, 王心彤, 陈耀星*

(中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要: 旨在探究睡眠剥夺后小鼠血浆褪黑激素(MT)水平和下丘脑钟基因表达的变化。将72只小鼠随机分为对照组与睡眠剥夺试验组($n=36$), 试验组小鼠接受水平平台法连续72 h睡眠剥夺。在试验结束后当日每隔4 h(CT4、8、12、16、20和24时)采血测定血浆MT含量, 并取下丘脑以RT-PCR方法测定钟基因 *mClock*、*mBmal1*、*mCry1/2*、*mPer1~3*、*mRor β* 和 *mReverba* 表达量。结果显示, 相较于对照组, 试验组小鼠血浆MT水平昼夜节律紊乱。在下丘脑钟基因的表达量上, *mClock*、*mRor β* 和 *mReverba* 的中值显著下降($P<0.05$), 而 *mPer1* 和 *mPer2* 中值显著增加($P<0.01$); 对于昼夜节律, *mCry1* 和 *mCry2* 的昼夜节律消失; 对于钟基因的相位, *mBmal1* 和 *mClock* 相位提前, 而 *mRor β* 和 *mPer1~3* 相位延后。结果提示, 小鼠睡眠剥夺3 d可致MT分泌和下丘脑钟基因表达节律紊乱。

关键词: 睡眠剥夺; 褪黑激素; 钟基因; 下丘脑; 昼夜节律

中图分类号: S856.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2020)10-2609-04

Effect of Acute Sleep Deprivation on Melatonin Level of Plasma and Clock Gene Expression of Hypothalamus in Mice

YANG Yue, GUO Zeming, HAN Haoshu, LI Weitian, GAO Ting,
WANG Xintong, CHEN Yaoxing*

(Laboratory of Anatomy of Domestic Animals, College of Animal Medicine,
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the changes in plasma Melatonin (MT) level and hypothalamic clock gene expression in mice after sleep deprivation (SD). Seventy-two mice were randomly divided into SD group and non-sleep-deprived control group ($n=36$). The SD mice were subjected to a modified multiple platform water path for 72 h sleep deprivation. After that, blood samples were taken every four hours (CT4, 8, 12, 16, 20 and 24) for the detection of plasma MT content, and hypothalamus samples were collected for the detection of the expressions of clock genes including *mClock*, *mBmal1*, *mCry1/2*, *mPer1-3*, *mRor β* and *mReverba*. The results showed that compared with control group, circadian rhythm of plasma MT was disordered in SD group. The median values of *mClock*, *mRor β* and *mReverba* in the hypothalamus decreased significantly ($P<0.05$), but *mPer1* and *mPer2* increased significantly ($P<0.01$); the circadian rhythms of *mCry1* and *mCry2* disappeared; the expression rhythms of *mBmal1*, and *mClock* were advanced in phase, while *mRor β* and *mPer1-3*'s were delayed. These

收稿日期: 2020-04-05

基金项目: 国家级大学生创新计划(201810019098); 北京市自然科学基金(6182018)

作者简介: 杨悦(1997-), 男, 湖北武汉人, 本科生, 主要从事动物医学研究, E-mail: 2621313293@qq.com

* 通信作者: 陈耀星, 主要从事神经生物学研究, E-mail: yxchen@cau.edu.cn

results suggested that acute sleep deprivation of 3 d could cause disorders of MT secretion and hypothalamic clock gene expression in mice.

Key words: sleep deprivation; melatonin; clock gene; hypothalamus; circadian rhythm

* **Corresponding author:** CHEN Yaoxing, E-mail: yxchen@cau.edu.cn

褪黑激素(MT)是由松果体分泌,周期变化为24 h 并且介导睡眠的激素,它的减少可能与失眠机制有关^[1-2]。此外,位于下丘脑 SCN 的中枢生物钟也调控睡眠这一节律活动,其中正调节钟基因有 *Clock*、*Bmal1*、*Bmal2*,负调节钟基因有 *Per1*、*Per2*、*Cry1*、*Cry2*,其他钟基因有 *Per3*、*Reverba/β* 和 *Rora/β*^[3]。哺乳动物 MT 的分泌也受 SCN 的调控,SCN 中的钟基因环路通过交感神经控制松果体 MT 的分泌^[4]。本研究旨在探究睡眠剥夺情况下,对血浆 MT 与下丘脑钟基因表达变化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物处理

72 只 8 周龄的雄性 ICR-CD1 小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),人为提供 LD:DD=14:10(7:00-21:00)光照,并随机等分为睡眠剥夺试验组(SD)和对照组(CON)。SD 组利用水平台试验装置(水箱中加水至距离平台 4 cm)进行睡眠剥夺 72 h,CON 组不进行睡眠剥夺。在睡眠剥夺 72 h 后的当日 CT4、8、12、16、20 和 24 时 6 个时间点,两组各取 6 只小鼠进行眼球采血并取其下丘脑组织。

1.2 qRT-PCR 法测定小鼠钟基因的表达水平

使用 TRIzol 试剂(CW0580A,康为世纪,中国)提取小鼠下丘脑总 RNA,进行反转录后-20℃保存。以 *GAPDH* 作为内参,PCR 引物序列参考文献^[5]。20 μL 反应体系: cDNA 模板 2 μL、上下游引物均 0.4 μL、2 × Es Taq Master Mix 10 μL、ddH₂O 7.2 μL。反应程序:95℃ 5 min、95℃ 变性 30 s,55~60℃ 30 s,72℃ 20 s,40 个循环,采用公式 $2^{-(\Delta\text{CT}_{\text{目的}}-\Delta\text{CT}_{\text{内参}})}$ 得到结果。

1.3 ELISA 测定血浆 MT 含量

使用 ELISA 试剂盒检测血浆样本的 MT 浓度(CEA908Ge,Cloud-Clone,美国)。所有的检测按照说明书指示进行。

1.4 数据拟合

使用 MATLAB R2016a 软件根据余弦公式 $f(x)=a+b\times\cos(x\times\pi/12-c\times\pi/12)$ 得到钟基因节律曲线并判断是否有昼夜节律性,具体方法见参考

文献^[6]。MT 分析方法与之相同。

2 结果

2.1 下丘脑正调控钟基因 mRNA 水平的变化

对照组与试验组小鼠下丘脑的正调控钟基因(*mBmal1*、*mClock*)都出现了昼夜节律性变化(图 1A、B)。根据余弦曲线参数 *T* 检验,试验组两个钟基因转录的每日变化在睡眠剥夺后出现与对照组不同的震荡(图 1A、B)。对于 *mBmal1* 的转录,睡眠剥夺后其振幅增高 57.3%($P<0.05$),且相位提前(4.75 ± 1.52) h($P<0.05$);对于 *mClock* 的转录,睡眠剥夺后中值降低 34.9%($P<0.01$),而振幅降低 25.3%($P<0.05$),并且相位提前(2.39 ± 0.29) h($P<0.01$)。

2.2 下丘脑负调控钟基因 mRNA 水平的变化

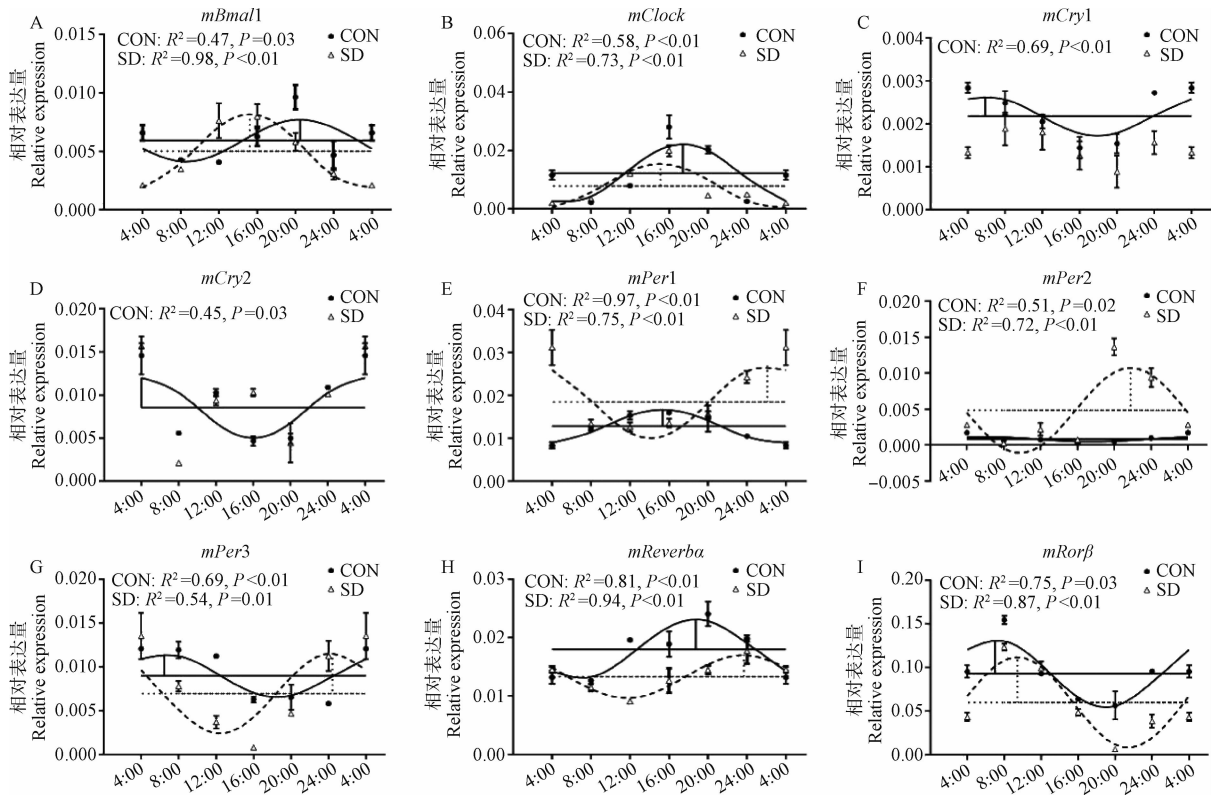
小鼠下丘脑核心负调控钟基因中,对照组 *mCry1* 和 *mCry2* 的转录表现有节律性,而试验组失去了 24 h 昼夜节律性(图 1C、D)。而对于 *mPer1*~3 对照组与试验组都具有昼夜节律性(图 1E~G)。在余弦曲线参数分析中,试验组的 *mPer1* 的中值增加了 44.1%($P<0.01$),相位延后(10.84 ± 1.21) h($P<0.01$); *mPer2* 的中值增加了 500%($P<0.01$),振幅增加了 15 倍($P<0.01$),相位延后(19.34 ± 1.57) h($P<0.01$); *mPer3* 的振幅增加了 283%($P<0.01$),相位延后了(17.31 ± 1.98) h($P<0.05$)。

2.3 下丘脑其他钟基因 mRNA 水平的变化

对照组与试验组小鼠下丘脑中的 *mReverba* 与 *mRorβ* 表达量都有昼夜节律(图 1H、I)。在余弦参数的分析中, *mReverba* 表达量的中值减少了 26.2%($P<0.01$); *mRorβ* 中值减少了 35.5%($P<0.01$),相位延后(2.92 ± 0.81) h($P<0.05$)。

2.4 血浆中 MT 含量的变化

小鼠的血浆 MT 对照组有 24 h 的昼夜节律性,但试验组丧失了昼夜节律性。*T* 检验进行分析发现,试验组相比于对照组小鼠血浆 MT 在 CT4、20 和 24 时降低($P<0.05$),但在 CT12 时显著增高($P<0.05$)(图 2)。



实线代表对照组,虚线代表睡眠剥夺组。水平横线代表中值,竖线代表相位和振幅。 R^2 值表示实际表达与曲线相符合程度, P 值代表回归分析的差异显著性, $P < 0.05$ 说明符合余弦曲线

The solid line represents the control group and the dotted line represents the sleep deprivation group. Horizontal lines represent the median value and vertical lines represent phase and amplitude. The R^2 value indicates the degree of fitting. The P value represents the significance of regression analysis, with significance defined as $P < 0.05$

图1 睡眠剥夺组(SD)与对照组(CON)小鼠下丘脑钟基因 mRNA 水平的昼夜节律

Fig. 1 Circadian expressions of clock genes in the hypothalamus of mice from CON and SD groups

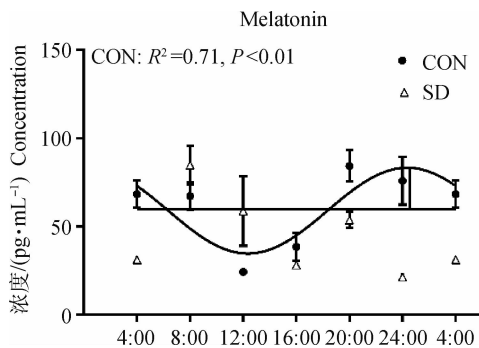


图2 CON组与SD组中小鼠血浆中MT的昼夜节律

Fig. 2 The circadian rhythm of MT in the plasma of mice from CON group and SD group

3 讨论

本实验室前期已经发现3 d睡眠剥夺后小鼠血浆MT显著减少^[7],本试验进一步探究了3 d睡眠剥夺对于小鼠MT的影响。对24 h血浆中的MT

含量进行曲线拟合后发现,试验组小鼠血浆MT水平的昼夜节律消失,并且与对照组相比,在CT4、20和24各时间点含量均显著下降,但在CT12时出现了含量的显著上升,而MT应该在白天/光照阶段受到抑制^[8]。有试验发现,在野生型小鼠中,ZT22处的急性光脉冲可显著抑制MT的浓度,而在Cry1^{-/-}/Cry2^{-/-}小鼠中则没有出现^[9]。所以下丘脑中MT升高可能与钟基因的紊乱有关。

睡眠剥夺对于钟基因 mRNA 的影响已有报道。Wisor等^[10]发现,对AKR/J小鼠进行不同程度的睡眠剥夺后在CT6时处死,结果显示,大脑皮层钟基因表达量增加,但是这些现象并没有在下丘脑中被明显观察到。本研究对钟基因的mRNA进行曲线拟合,发现睡眠剥夺后下丘脑中的mBmal1和mPer3中值与对照组无显著差异,mClock、mRorb和mReverba中值显著下降($P < 0.05$),而mPer1和mPer2中值显著增加($P < 0.01$),mCry1和

mCry2 则失去昼夜节律。与前人结果不同,可能是因为他们试验中睡眠剥夺的时间少于本试验(72 h),并且只取某一时间点小鼠的组织测定 mRNA,而本试验是采用测定 6 个时间点下丘脑组织并进行曲线拟合来比较中值的方法。本试验关于睡眠剥夺后钟基因 mRNA 时相方面的变化如下:*mBmal1* 和 *mClock* 相位都有不同程度的提前,而 *mRorβ* 和 *mPer1~3* 相位延后。而在大鼠衰老时,SCN 的钟基因 mRNA 时相会出现不同程度的改变^[11]。

在 3 d 睡眠剥夺后,小鼠血浆的 MT 昼夜节律消失,9 个钟基因中的 *mCry1*、*mCry2* 昼夜节律也消失。有试验发现,在 *Cry1^{-/-}/Cry2^{-/-}* 的 C3H 小鼠松果体的乙酰基转移酶(AANAT)的表达减少,并且认为和从 SCN 输入到松果体的昼夜节律性去甲肾上腺素信号缺失有关^[12]。而 AANAT 是 MT 合成过程中的关键酶^[13]。因此,3 d 睡眠剥夺后下丘脑中的 *mCry1*、*mCry2* 的昼夜节律紊乱可能也会影响到松果体的信号,最终导致松果体释放入血的 MT 节律也出现了紊乱。

4 结 论

3 d 睡眠剥夺后造成小鼠的 MT 分泌紊乱,钟基因 *mCry1* 与 *mCry2* 的节律丧失,提示睡眠不足诱导 MT 的昼夜节律分泌紊乱可能与下丘脑钟基因 *mCry1* 与 *mCry2* 的节律性表达丧失有关。

参考文献(References):

[1] KUN X, HONG H C, SUBRAMANIAN P. Melatonin and sleep[J]. *Biol Rhythm Res*, 2019, 50(3): 490-493.

[2] TAKAESU Y, FUTENMA K, KOBAYASHI M, et al. A preliminary study on the relationships between diurnal melatonin secretion profile and sleep variables in patients emergently admitted to the coronary care unit[J]. *Chronobiol Int*, 2015, 32(6): 875-879.

[3] HASTINGS M H, MAYWOOD E S, BRANCACCIO M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19(8): 453-469.

[4] MATTAM U, JAGOTA A. Differential role of melatonin in restoration of age-induced alterations in

daily rhythms of expression of various clock genes in suprachiasmatic nucleus of male Wistar rats [J]. *Biogerontology*, 2014, 15(3): 257-268.

- [5] DKHISSI-BENYAHYA O, COUTANSON C, KNOBLAUCH K, et al. The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(18): 3435-3447.
- [6] SINGH D, RANI S, KUMAR V. Daily expression of six clock genes in central and peripheral tissues of a night-migratory songbird: evidence for tissue-specific circadian timing [J]. *Chronobiol Int*, 2013, 30(10): 1208-1217.
- [7] GAO T, WANG Z X, DONG Y L, et al. Role of melatonin in sleep deprivation-induced intestinal barrier dysfunction in mice [J]. *J Pineal Res*, 2019, 67(1): e12574.
- [8] SAHA S, SINGH K M, GUPTA B B P. Melatonin synthesis and clock gene regulation in the pineal organ of teleost fish compared to mammals: Similarities and differences [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2019, 279: 27-34.
- [9] YAMANAKA Y, SUZUKI Y, TODO T, et al. Loss of circadian rhythm and light-induced suppression of pineal melatonin levels in *Cry1* and *Cry2* double-deficient mice [J]. *Genes Cells*, 2010, 15(10): 1063-1071.
- [10] WISOR J P, PASUMARTHI R K, GERASHCHENKO D, et al. Sleep deprivation effects on circadian clock gene expression in the cerebral cortex parallel electroencephalographic differences among mouse strains [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(28): 7193-7201.
- [11] DEBOER T, DÉTÁRI L, MEIJER J H. Long term effects of sleep deprivation on the mammalian circadian pacemaker [J]. *Sleep*, 2007, 30(3): 257-262.
- [12] YAMANAKA Y, YAMADA Y, HONMA K I, et al. Cryptochrome deficiency enhances transcription but reduces protein levels of pineal Aanat [J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 61(4): 219-229.
- [13] BINKLEY S. Pineal gland biorhythms: N-acetyltransferase in chickens and rats [J]. *Fed Proc*, 1976, 35(12): 2347-2352.

(编辑 范子娟)