

研究论文

慢性睡眠剥夺加重APP/PS1/tau小鼠学习记忆能力和病理损伤

王纯¹, 曹旭², 尹静¹, 高文蕊¹, 李蔚然¹, 祁金顺¹, 武美娜^{1,*}

山西医科大学¹生理学系, 细胞生理学教育部重点实验室; ²医学影像学院, 太原 030001

摘要: 睡眠在认知功能和情绪的调节过程中发挥重要作用。近年研究显示, 睡眠障碍是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)重要的危险因素之一, 但慢性睡眠剥夺对于AD模型小鼠认知功能的影响及其机制尚不明确。本研究采用改良多平台法对8月龄雄性APP/PS1/tau三转基因AD模型(3xTg-AD)小鼠和野生型(wild type, WT)小鼠(每组8只)进行连续21天、每天20 h的睡眠剥夺。睡眠剥夺结束后, 采用旷场、高架十字迷宫、糖水偏好、物体识别、Y迷宫和条件恐惧记忆实验等多种行为学手段观察慢性睡眠剥夺对3xTg-AD小鼠的焦虑和抑郁样行为以及多种认知功能的影响, 并通过免疫组织化学染色观察小鼠海马区β淀粉样蛋白(amyloid β protein, Aβ)斑块沉积、神经原纤维缠结和小胶质细胞的活化程度。结果显示: (1)慢性睡眠剥夺未影响3xTg-AD小鼠的焦虑($P = 0.539$)和抑郁样行为($P = 0.874$); (2)慢性睡眠剥夺加重了3xTg-AD小鼠的识别记忆($P < 0.001$)、工作记忆($P = 0.002$)和条件恐惧记忆能力($P = 0.039$)损伤; (3)慢性睡眠剥夺增加了3xTg-AD小鼠海马区Aβ斑块的沉积($P < 0.001$)和小胶质细胞的过度活化($P < 0.001$), 但并未导致tau蛋白异常磷酸化和神经原纤维缠结出现。以上结果表明, 慢性睡眠剥夺加重了3xTg-AD小鼠的识别记忆、工作记忆和条件恐惧记忆能力损伤, 且其损伤作用与3xTg-AD小鼠海马区Aβ斑块沉积增加和小胶质细胞过度活化密切相关。

关键词: APP/PS1/tau转基因小鼠; 慢性睡眠剥夺; 学习记忆; β淀粉样蛋白; 小胶质细胞

中图分类号: R338

Chronic sleep deprivation exacerbates cognitive and pathological impairments in APP/PS1/tau triple transgenic Alzheimer's disease model mice

WANG Chun¹, CAO Xu², YIN Jing¹, GAO Wen-Rui¹, LI Wei-Ran¹, QI Jin-Shun¹, WU Mei-Na^{1,*}

¹Department of Physiology, Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education; ²The School of Imaging Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Sleep exerts important functions in the regulation of cognition and emotion. Recent studies have found that sleep disorder is one of the important risk factors for Alzheimer's disease (AD), but the effects of chronic sleep deprivation on the cognitive functions of AD model mice and its possible mechanism are still unclear. In the present study, 8-month-old male APP/PS1/tau triple transgenic AD model (3xTg-AD) mice and wild type (WT) mice ($n = 8$ for each group) were subjected to chronic sleep deprivation by using the modified multiple platform method, with 20 h of sleep deprivation each day for 21 days. Then, open field test, elevated plus maze test, sugar water preference test, object recognition test, Y maze test and conditioned fear memory test were performed to evaluate anxiety- and depression-like behaviors, and multiple cognitive functions. In addition, the immunohistochemistry technique was used to observe pathological characteristics in the hippocampus of mice. The results showed that: (1) Chronic sleep deprivation did not affect anxiety- ($P = 0.539$) and depression-like behaviors ($P = 0.874$) in 3xTg-AD mice; (2) Chronic sleep deprivation exacerbated the impairments of object recognition memory ($P < 0.001$), working memory ($P = 0.002$) and the conditioned fear memory ($P = 0.039$) in

Received 2020-10-09 Accepted 2021-03-11

This work was supported by Fund Program for "Sanjin Scholars" of Shanxi Province, Shanxi Province Science Foundation for Excellent Young Scholars (No. 201801D211005), Research Project supported by Shanxi Scholarship Council of China (No. 2020-083), the National Natural Science Foundation of China (No. 31700918), Fund for Shanxi "1331 Project" Key Subjects Construction (No. 1331KSC), and Fund for Shanxi Key Subjects Construction (FSKSC).

*Corresponding author. Tel: +86-351-4135117; E-mail: wmna@163.com

3xTg-AD mice; (3) Chronic sleep deprivation increased amyloid β (A β) deposition ($P < 0.001$) and microglial activation ($P < 0.001$) in the hippocampus of 3xTg-AD mice, without inducing abnormal tau phosphorylation and neurofibrillary tangles. These results indicate that chronic sleep deprivation exacerbates the impairments of recognition memory, working memory and conditioned fear memory in 3xTg-AD mice by aggravating A β deposition and the excessive activation of microglia in the hippocampus.

Key words: APP/PS1/tau transgenic model mice; chronic sleep deprivation; learning and memory; β amyloid protein; microglia

睡眠是脑的重要功能活动之一, 在学习记忆^[1]和情绪调节^[2]过程中发挥着重要作用。在现代社会生活中, 由于多种因素的共同作用, 越来越多的人患有睡眠障碍, 经历着不同程度的睡眠剥夺。据调查, 在我国 30~79 岁的人群中, 患有睡眠障碍的人高达 23.1%^[3], 而我国农村有 49.7% 的老年人存在各种睡眠障碍性疾病^[4]。阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与年龄相关的进行性发展的神经退行性疾病, 也是最常见的痴呆症类型。据估计, 在中国 60 岁及以上人群的痴呆症总体患病率为 5.3%, 痴呆症患者约有 1 000 万人, 其中 60% 为 AD 患者^[5]。AD 的主要临床表现为进行性认知功能障碍和记忆减退, 近年研究还发现精神行为异常是 AD 病程中的前驱症状^[6]。除了遗传因素, 还有多种高风险因素参与 AD 的发病和疾病进程, 睡眠障碍是其中重要的危险因素之一^[7]。

有研究显示, 睡眠能够促进记忆的巩固, 而睡眠障碍则会导致认知能力下降^[8]和 AD 的患病风险增加^[9]。同时, 高达 45% 的 AD 患者出现昼夜节律紊乱、碎片化睡眠和夜间睡眠减少而白天过度困倦等睡眠障碍相关表现, 且睡眠障碍通常出现在认知能力下降之前^[10]。基础研究则表明, 急性睡眠剥夺导致 SD 大鼠的长时程空间参考记忆损伤^[11]; 慢性轻度睡眠剥夺可以引起 CD1 小鼠的工作记忆损伤和焦虑样行为^[12], 还会导致 3 月龄 APP/PS1 小鼠脑内出现明显的 β 淀粉样蛋白 (amyloid β protein, A β) 斑块沉积^[13]。也有研究显示, 慢性睡眠剥夺损伤 8 月龄和 14 月龄 APP/PS1/tau 三转基因 AD 模型 (3xTg-AD) 小鼠的恐惧记忆能力^[14, 15], 但并未影响 8 月龄 3xTg-AD 小鼠的短期工作记忆能力^[15]。

虽然目前已有睡眠剥夺对于不同类型小鼠认知功能影响的研究, 但是还缺乏在日常生活中的慢性睡眠剥夺^[16]对 3xTg-AD 小鼠多种不同类型的认知功能影响的系统研究, 特别是对物体识别记忆能力的影响未见报道, 同时也缺乏慢性睡眠剥夺对 AD 模型小鼠情绪异常影响的相关报道。因此, 本研究主要采用多种行为学手段观察慢性睡眠剥夺

能否加重已出现部分认知行为损伤和脑内病理变化的 8~9 月龄 3xTg-AD 小鼠的不同类型认知功能损伤及情绪异常, 并探讨其相关病理特征的变化, 希望为睡眠剥夺在 AD 病程中的作用及机制提供更多的实验证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 为了排除雌激素的影响, 本研究以 8 月龄雄性 3xTg-AD 小鼠^[17]和野生型 (wild type, WT) C57BL/6 小鼠为研究对象。3xTg-AD 小鼠由美国 Jackson 实验室引进并在山西医科大学动物实验中心进行饲养和繁殖, WT 小鼠购买自山西医科大学动物实验中心。本研究的动物实验方案经山西医科大学动物伦理委员会审批。所有动物均在 12 h/12 h 明暗交替的 SPF 级动物房中饲养, 每笼 3~4 只, 小鼠可自由饮水和进食, 室温保持在 24~26 °C, 湿度为 50%~60%。将 WT 小鼠和 3xTg-AD 小鼠随机分为 4 组: WT 大平台对照组 (WT+PC)、WT 小平台睡眠剥夺组 (WT+SD)、3xTg-AD 大平台对照组 (3xTg-AD+PC) 和 3xTg-AD 小平台睡眠剥夺组 (3xTg-AD+SD), 每组 8 只小鼠。

1.2 模型制备 采用经典的改良多平台法 (modified multiple platform method, MMPM) 建立慢性睡眠剥夺模型^[13]。自制 40 cm \times 25 cm \times 15 cm 的实验水箱, 将 12 个圆形小平台 (直径 3 cm, 高 5 cm, 相距 3 cm) 或大平台 (直径 11.5 cm) 放置在水箱中, 箱内水面高度低于平台约 1 cm, 水温 22 °C 左右。在睡眠剥夺的过程中, 每天从中午 12:00 到次日上午 08:00 将睡眠剥夺组小鼠放置于小平台上保证其连续 20 h 的清醒, 对照组小鼠放置于大平台上能够自由活动 and 休息, 每个水箱放 2~3 只小鼠, 所有小鼠均可自由饮水和进食。实验期间保持水箱内温度、湿度、水温适宜一致, 水环境干净。所有小鼠睡眠剥夺 21 天后进行行为学测试, 此时小鼠约为 9 月龄。

1.3 实验试剂及仪器 鼠抗 A β 单克隆抗体 (β -amyloid 1-16, 803015) 购自美国 Biogen 公司, 兔抗 tau (phospho T231) 单克隆抗体 (ab151559) 购自

英国 Abcam 公司, 兔抗 Iba-1 多克隆抗体 (Iba-1, 019-19741) 购自日本 Wako 公司, 小鼠二步法检测试剂盒 (PV-9002) 和兔二步法检测试剂盒 (PV-9001) 购自北京中杉金桥公司, 封闭山羊血清购自北京博奥森公司, DAB 试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.4 旷场实验 旷场实验用于观察小鼠的焦虑样行为, 也可检测小鼠的自主活动能力以排除运动能力对实验结果的影响。将旷场 (40 cm × 40 cm × 40 cm) 等分为 16 个正方形, 中间四个正方形为中心区, 其余为外周区。旷场正上方装有红外摄像装置, 可通过 Smart 3.0 软件 (Harvard Apparatus, 美国) 追踪小鼠的运动轨迹。实验前 24 h 将小鼠放入实验室以适应环境, 实验期间保持安静。正式实验时, 将小鼠放入旷场中央, 让其自由活动 10 min, 记录每只小鼠在旷场中的总运动距离和在中央区域的活动时间, 并计算其在中央区域的活动时间百分比。每只小鼠实验结束后, 清除小鼠排泄物并用 75% 酒精擦拭旷场以消除气味对下一只小鼠的影响^[18]。

1.5 物体识别实验 物体识别实验用于检测小鼠的物体识别记忆能力, 在旷场实验结束后的第 2 天进行。实验分为熟悉和测试两个阶段。熟悉阶段时在旷场中放置两个完全相同的物体, 两物体间距 20 cm, 与两侧壁相距 10 cm。依次将小鼠从同一位置面壁放入旷场, 任其自由探索 10 min, 活动结束后将小鼠放回笼内休息。6 h 后进行测试阶段实验, 此时将旷场中的一个物体换成另一材质相同、但形状和颜色均不同的新物体, 再依次按照相同顺序将小鼠从同一位置放入旷场, 任其自由探索 10 min, 记录每只小鼠探索新旧物体的时间并计算物体识别指数 (recognition index, RI) 和辨别指数 (discrimination index, DI)。RI = 探索新物体时间 / (探索新物体时间 + 探索旧物体时间) × 100%, DI = (探索新物体的时间 - 探索旧物体的时间) / (探索新物体时间 + 探索旧物体时间) × 100%^[19]。

1.6 高架十字迷宫实验 高架十字迷宫实验用于观察小鼠的焦虑样行为。高架十字迷宫距地面高度约 80 cm, 由 2 个开放臂和 2 个闭合臂构成, 每个臂长、宽、高均为 30 cm × 6 cm × 15 cm, 夹角为 90°。实验时依次将每只小鼠面朝开放臂放入中央区域, 让其自由活动 5 min, 记录每只小鼠在迷宫中的总运动距离和在开放臂停留时间, 并计算小鼠在开放臂停留时间百分比 (开放臂停留时间 / 5 min × 100%)^[20]。

1.7 Y 迷宫实验 Y 迷宫用于测定小鼠的短期工作记忆能力。Y 迷宫由三个夹角为 120°, 长、宽、高均为 30 cm × 7 cm × 15 cm 的臂组成, 中间区域为三角形。实验时, 依次将小鼠从同一位置放入中间区域, 让其自由活动 8 min, 记录每只小鼠的总进臂次数和进臂顺序, 并计算正确进臂次数和自发交替正确率。在小鼠自发交替进臂过程中, 当小鼠的四肢完全进入某一臂内时即为一次进臂。前两次进臂不计, 从第三次进臂开始, 每次进臂与前两次均不相同, 则视为正确进臂。自发交替正确率 = 正确进臂次数 / (总进臂次数 - 2) × 100%^[21]。

1.8 糖水偏好实验 糖水偏好实验用于衡量小鼠的抑郁样行为。第一天给予小鼠 2 瓶 1% 蔗糖水自由饮用 24 h; 第二天给予小鼠 1 瓶 1% 蔗糖水、1 瓶清水自由饮用 24 h, 并在 12 h 时交换糖水与清水的位置以避免水瓶位置对实验的干扰; 第三天将小鼠禁水禁食 24 h; 第四天给予 1 瓶 1% 蔗糖水、1 瓶清水自由饮用 12 h, 并在 6 h 末交换糖水和清水位置。通过测量小鼠在 12 h 内饮用糖水和清水的重量, 计算糖水偏好率 [1% 蔗糖水饮用量 / (1% 蔗糖水饮用量 + 清水饮用量) × 100%]^[22]。

1.9 条件恐惧记忆实验 条件恐惧记忆实验用于检测小鼠的条件恐惧学习记忆能力。实验分为训练阶段和测试阶段。在训练阶段, 先让小鼠在训练箱中自由活动 90 s; 然后给予 30 s 的声波刺激 (频率 2 900 Hz、强度 90 dB), 并在声波刺激的最后 2 s 给予直流电刺激 (电流强度 0.3 mA) 联合刺激 5 次, 每次间隔 90 s; 第 5 次联合刺激后再给予 30 s 的声波刺激。记录 90 s 自由探索期内 (Exploration) 和第 5 次联合刺激后的声波刺激期间 (Pre-END) 各组小鼠的僵直比率 (僵直时间占该时期总时间的百分比)。在测试阶段, 将小鼠放入颜色不同的新训练箱中, 让其适应 150 s, 然后给予 150 s 的条件刺激 (conditioning stimulus, CS), 即不加电刺激的声波刺激 (声波频率和强度与训练阶段相同), 记录小鼠在条件刺激前 150 s (Pre-CS) 和 CS 期间 150 s 的僵直比率^[23]。

1.10 免疫组织化学染色实验 在行为学实验结束后, 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠, PBS 和 4% 多聚甲醛灌注后取脑, 4% 多聚甲醛固定过夜, 脱水后包埋成蜡块。常规石蜡切片 (3 μm) 后烤片、脱蜡脱水后加入 0.01 mol/L 柠檬酸钠 (pH 6.0) 进行抗原修复 3 min, 随后在 3% H₂O₂ 中孵育 10 min 以阻

断内源性过氧化物酶，滴加一抗鼠抗 A β 单克隆抗体 (1:1 000)、兔抗 tau (phospho T231) 单克隆抗体 (1:800) 或兔抗 Iba-1 多克隆抗体 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜，PBS 代替抗体作为阴性对照。第二天滴加二抗 (PV-9002, PV-9001 试剂盒) 后 37 °C 孵育 20 min，使用二氨基联苯胺 (DAB) 反应显色，并将切片在苏木素溶液中染色 40 s。脱水、透明、封片后观察并拍照。

1.11 统计学分析 实验结果以 mean \pm SD 表示，采用 SPSS 13.0 和 SigmaPlot 12.3 进行统计分析，Origin 作图。实验数据采用双因素方差分析进行统计学检验，Tukey's *post hoc* 检验进行两两比较， $P < 0.05$ 被认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 慢性睡眠剥夺未影响3xTg-AD小鼠的焦虑样行为

在旷场实验中，WT+PC 组、WT+SD 组、3xTg-

AD+PC 组和 3xTg-AD+SD 组小鼠在中央区域的活动时间百分比分别为 (31.2 \pm 2.1)%、(29.3 \pm 2.4)%、(11.9 \pm 1.7)% 和 (10.4 \pm 1.7)% (图 1A)。与 WT+PC 组小鼠相比，3xTg-AD+PC 组小鼠在中央区域活动时间百分比明显降低 ($P < 0.001$)，但 3xTg-AD+PC 组与 3xTg-AD+SD 组之间无统计学差异 ($P = 0.159$)。在高架十字迷宫实验中，WT+PC 组、WT+SD 组、3xTg-AD+PC 组和 3xTg-AD+SD 组小鼠在开放臂停留时间百分比分别为 (14.3 \pm 2.5)%、(13.0 \pm 1.9)%、(8.6 \pm 2.1)% 和 (7.4 \pm 2.9)% (图 1C)。与 WT+PC 组小鼠相比，3xTg-AD+PC 组小鼠在开放臂停留时间百分比明显降低 ($P = 0.010$)，但 3xTg-AD+PC 组与 3xTg-AD+SD 组之间无统计学差异 ($P = 0.539$)。以上结果表明，3xTg-AD 小鼠出现了焦虑样行为，但慢性睡眠剥夺并未进一步加重 3xTg-AD 小鼠的焦虑样行为。

此外，WT+PC 组和 WT+SD 组小鼠在旷场实

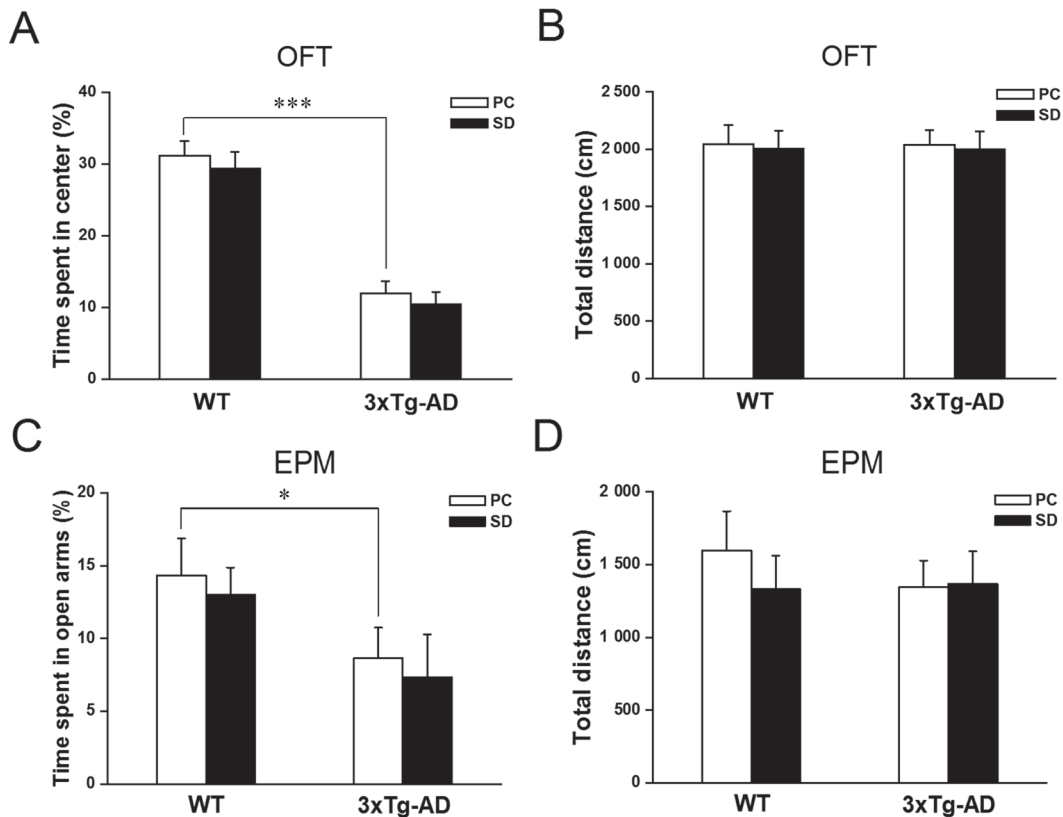


图 1. 慢性睡眠剥夺未影响9月龄3xTg-AD小鼠的焦虑样行为

Fig. 1. Chronic sleep deprivation did not affect anxiety-like behaviors in 9-month-old 3xTg-AD mice. *A*: Histograms showing that the mice in 3xTg-AD+PC group spent less time in the central area than the mice in WT+PC group in the open field test (OFT). *C*: Histograms showing that the mice in 3xTg-AD+PC group spent less time in open arms than the mice in WT+PC group in the elevated plus maze test (EPM). *B* and *D*: Histograms showing no difference in the total running distance among four groups in the OFT and EPM, respectively. SD: sleep deprivation, PC: platform control. Mean \pm SD, $n = 8$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

验中的中央区域活动时间百分比 ($P = 0.093$) 及高架十字迷宫实验中的开放臂停留时间百分比 ($P = 0.512$) 均无统计学差异, 表明慢性睡眠剥夺并未导致 WT 小鼠出现焦虑样行为。同时, 4 组小鼠在旷场实验和高架十字迷宫实验中的总运动距离均无统计学差异 (图 1B、1D), 表明 APP/PS1/tau 基因突变和慢性睡眠剥夺均未影响小鼠的自主活动能力。

2.2 慢性睡眠剥夺未影响3xTg-AD小鼠的抑郁样行为

在 4 组小鼠总饮水量无统计学差异的情况下 (图 2A), 3xTg-AD+PC 组小鼠的糖水偏好率为 ($59.6 \pm 1.9\%$), 明显低于 WT+PC 组的 ($63.4 \pm 2.0\%$) ($P = 0.008$), 但 3xTg-AD+PC 组和 3xTg-AD+SD 组之间

无明显差异 ($P = 0.874$) (图 2B), 表明 3xTg-AD 小鼠出现了抑郁样行为, 但慢性睡眠剥夺并未进一步加重其抑郁样行为。此外, WT+PC 组和 WT+SD 组之间的糖水偏好率也无明显差异 ($P = 0.411$), 表明慢性睡眠剥夺未导致 WT 小鼠出现抑郁样行为。

2.3 慢性睡眠剥夺加重了3xTg-AD小鼠的识别记忆能力损害

在物体识别实验中, 3xTg-AD+PC 组小鼠的 RI 为 ($48.0 \pm 2.6\%$) (图 3A), 明显低于 WT+PC 组的 ($66.4 \pm 2.8\%$) ($P < 0.001$), 慢性睡眠剥夺后 3xTg-AD 小鼠的 RI 进一步降至 ($42.6 \pm 2.7\%$) ($P < 0.001$)。同时, 3xTg-AD+PC 组小鼠的 DI 为 ($-4.0 \pm 5.3\%$) (图

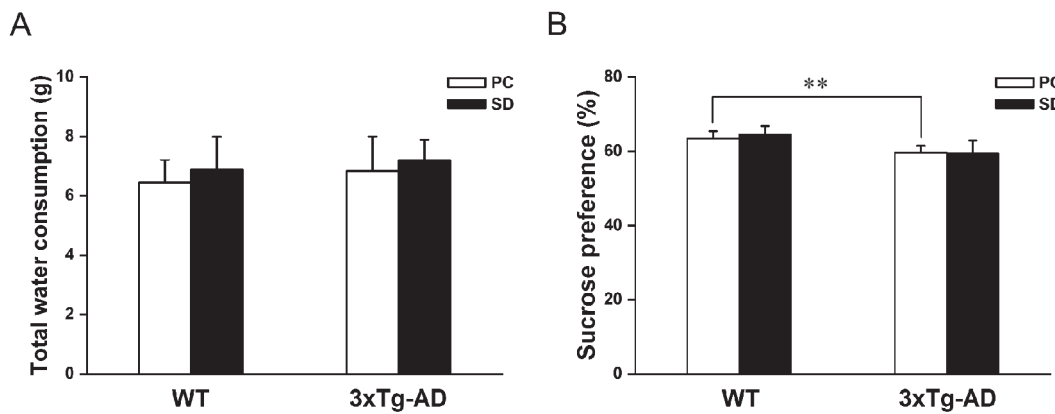


图 2. 慢性睡眠剥夺未影响9月龄3xTg-AD小鼠的抑郁样行为

Fig. 2. Chronic sleep deprivation did not affect depression-like behavior in 9-month-old 3xTg-AD mice. A: Histograms showing no significant difference in the total water consumption of mice among four groups. B: Histograms showing that the mice in 3xTg-AD+PC group had lower sucrose preference percentages than mice in WT+PC group, but chronic sleep deprivation did not further decrease sucrose preference percentage in 3xTg-AD mice. SD: sleep deprivation, PC: platform control. Mean \pm SD, $n = 8$. ** $P < 0.01$.

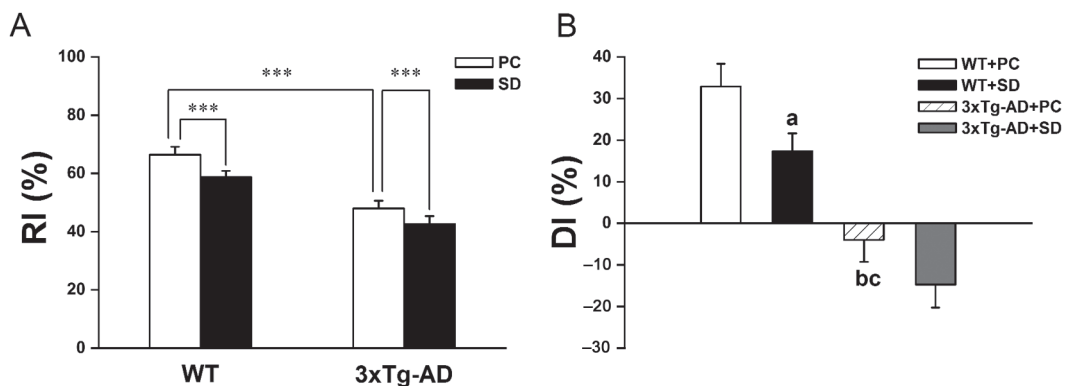


图 3. 慢性睡眠剥夺加重了9月龄3xTg-AD小鼠的识别记忆能力损伤

Fig. 3. Chronic sleep deprivation exacerbated the object recognition memory impairment in 9-month-old 3xTg-AD mice. A, B: The recognition index (RI) and discrimination index (DI) of mice in each group. SD: sleep deprivation, PC: platform control. Mean \pm SD, $n = 8$. *** $P < 0.001$, ^a $P < 0.001$ vs WT+PC group, ^b $P < 0.001$ vs WT+PC group, ^c $P < 0.001$ vs 3xTg-AD+SD group.

3B), 明显低于 WT+PC 组的 $(32.9 \pm 5.5)\%$ ($P < 0.001$), 慢性睡眠剥夺后 3xTg-AD 小鼠的 DI 进一步降低为 $(-14.7 \pm 5.5)\%$ ($P < 0.001$)。以上实验结果表明 3xTg-AD 小鼠的识别记忆能力受损, 慢性睡眠剥夺进一步加重了 3xTg-AD 小鼠的识别记忆能力损害。此外, WT+SD 组小鼠的 RI 和 DI 均明显低于 WT+PC 组 ($P < 0.001$), 表明慢性睡眠剥夺损害了 WT 小鼠的识别记忆能力。

2.4 慢性睡眠剥夺加重了3xTg-AD小鼠的工作记忆能力损伤

在 Y 迷宫实验中, 3xTg-AD+PC 组小鼠的自发交替正确率为 $(43.4 \pm 3.8)\%$, 明显低于 WT+PC 组的 $(63.2 \pm 1.8)\%$ ($P < 0.001$, 图 4A), 慢性睡眠剥夺后 3xTg-AD 小鼠的自发交替正确率进一步降至 $(32.2 \pm 3.7)\%$ ($P = 0.002$)。同时, WT+SD 组小鼠的自发交替正确率也明显低于 WT+PC 组 ($P < 0.001$)。此外, 4 组小鼠的总进臂次数没有统计学差异 (图 4B)。以上结果表明慢性睡眠剥夺加剧了 3xTg-AD 小鼠的工作记忆能力损伤, 并导致了 WT 小鼠的工作记忆能力损伤, 同时 APP/PS1/tau 基因突变和慢性睡眠剥夺均未影响小鼠的运动能力。

2.5 慢性睡眠剥夺加剧了3xTg-AD小鼠的条件恐惧记忆能力损伤

在训练阶段 (图 5A) 的自由探索期 (Exploration), 4 组小鼠的僵直比率没有统计学差异。在第五次联合刺激后的声波刺激期 (Pre-END), WT+SD 组和 3xTg-AD+SD 组小鼠的僵直比率分别为 $(66.0 \pm$

$3.2)\%$ 和 $(58.4 \pm 3.9)\%$, 分别显著低于 WT+PC 组的 $(70.5 \pm 3.1)\%$ ($P = 0.015$) 和 3xTg-AD+PC 组的 $(67.5 \pm 2.7)\%$ ($P < 0.001$), 表明慢性睡眠剥夺损伤了 3xTg-AD 和 WT 小鼠的条件恐惧学习能力。

在第二天测试阶段的条件刺激期 (CS) (图 5B), 3xTg-AD+PC 组小鼠的僵直比率为 $(53.4 \pm 4.0)\%$, 显著低于 WT+PC 组小鼠的 $(66.3 \pm 3.2)\%$ ($P < 0.001$); 慢性睡眠剥夺后, 3xTg-AD 小鼠的僵直比率进一步降至 $(49.8 \pm 2.0)\%$ ($P = 0.039$), 表明慢性睡眠剥夺加重了 3xTg-AD 小鼠的条件恐惧记忆能力损伤。同时, WT+SD 组小鼠的僵直比率为 $(54.9 \pm 3.0)\%$, 显著低于 WT+PC 组 ($P < 0.001$), 表明慢性睡眠剥夺同样损害了 WT 小鼠的条件恐惧记忆能力。

2.6 慢性睡眠剥夺增加了3xTg-AD小鼠海马区A β 沉积

脑内 A β 沉积是 AD 的典型病理特征之一。免疫组织化学染色实验结果显示 (图 6B), 3xTg-AD+PC 组小鼠的 A β 沉积阳性面积为 $(1.7 \pm 0.1)\%$, 明显高于 WT+PC 组的 $(0.2 \pm 0.1)\%$ ($P < 0.001$); 慢性睡眠剥夺后, 3xTg-AD 小鼠的 A β 沉积阳性面积进一步增加至 $(3.1 \pm 0.5)\%$ ($P < 0.001$)。同时, WT+SD 组小鼠的 A β 沉积阳性面积为 $(0.8 \pm 0.1)\%$, 较 WT+PC 组有所增高, 但无统计学差异 ($P = 0.063$)。以上结果表明, 慢性睡眠剥夺导致 3xTg-AD 小鼠海马区 A β 沉积明显增加。

2.7 慢性睡眠剥夺未导致3xTg-AD小鼠海马区出现神经原纤维缠结

Tau 蛋白异常磷酸化形成的神经原纤维缠结是

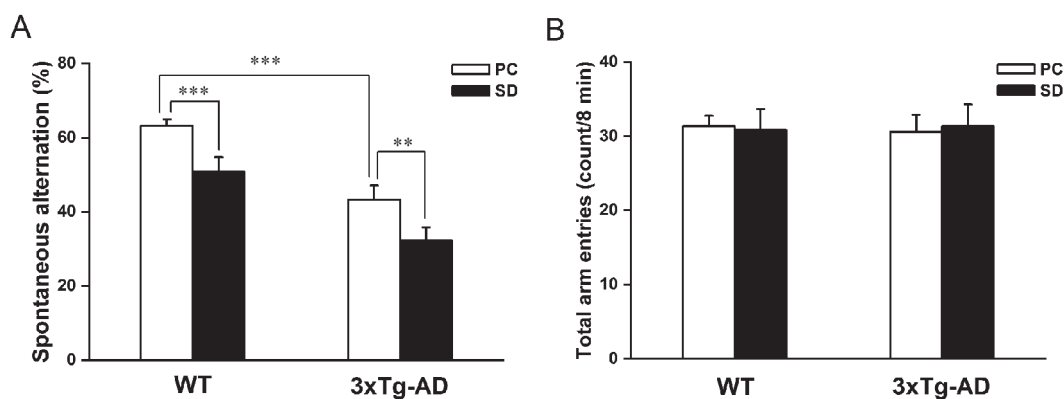


图 4. 慢性睡眠剥夺加重了9月龄3xTg-AD小鼠的工作记忆能力损伤

Fig. 4. Chronic sleep deprivation exacerbated the working memory impairment in 9-month-old 3xTg-AD mice. *A*: Histograms showing the percentage of correct spontaneous alternation of mice among four groups. *B*: Histograms showing no significant difference in the total number of arm entries among the four groups. SD: sleep deprivation, PC: platform control. Mean \pm SD, $n = 8$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

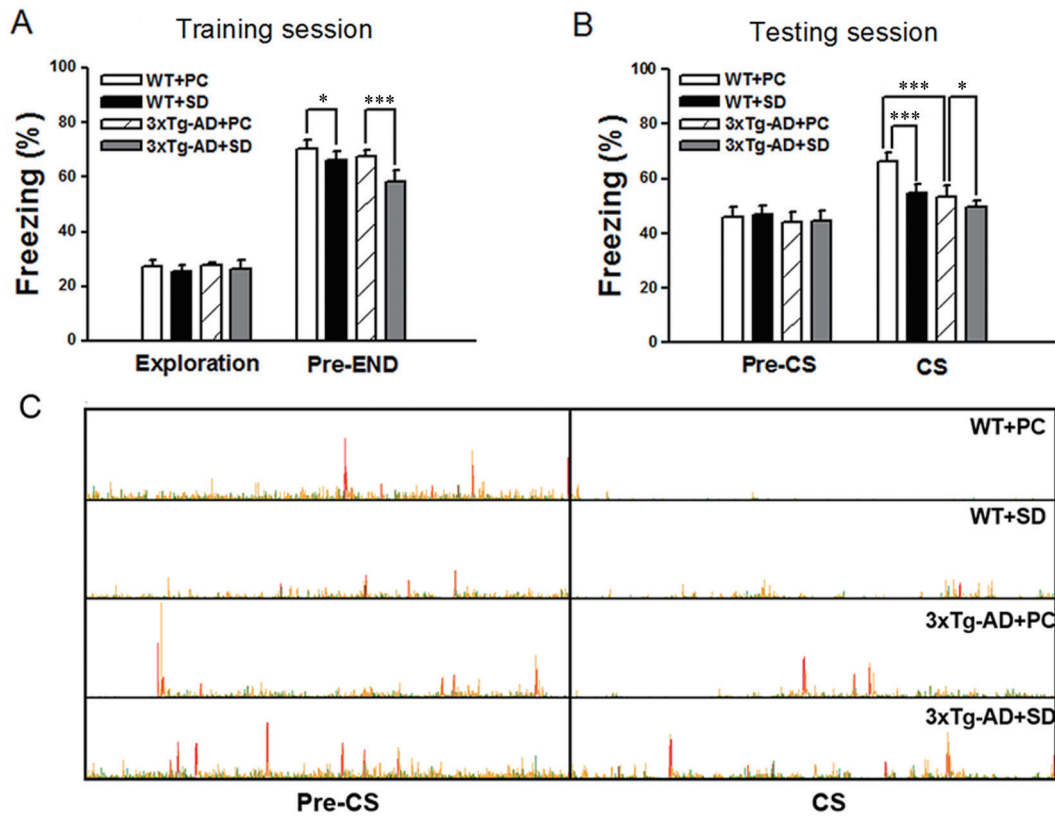


图 5. 慢性睡眠剥夺加剧了9月龄3xTg-AD小鼠的条件恐惧记忆能力损伤

Fig. 5. Chronic sleep deprivation exacerbated the conditioned fear memory impairment in 9-month-old 3xTg-AD mice. *A, B*: Histograms showing the freezing percentages of mice among four groups in training session and testing session, respectively. Mean \pm SD, $n = 8$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. *C*: Representative pressure sensing traces of mice in testing session. SD: sleep deprivation, PC: platform control.

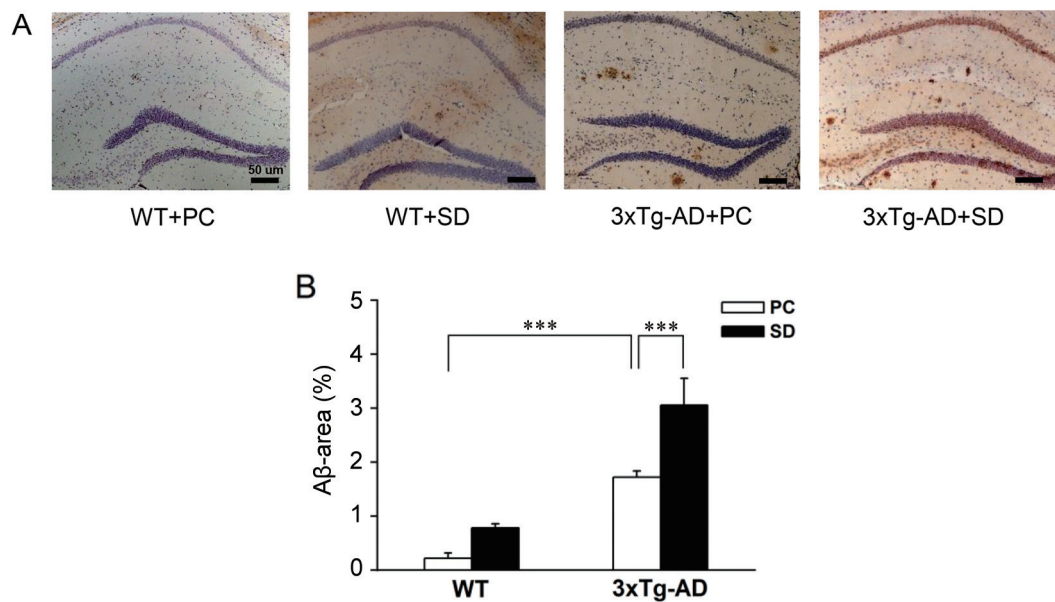


图 6. 慢性睡眠剥夺增加了9月龄3xTg-AD小鼠海马区Aβ沉积

Fig. 6. Chronic sleep deprivation increased A β deposition in the hippocampus of 9-month-old 3xTg-AD mice. *A*: Images showing representative immunohistochemical staining of A β plaques in the hippocampus in the mice of 4 groups. Scale bar, 50 μ m. *B*: Quantification of A β immunoreactivities revealed that chronic sleep deprivation increased A β deposition in the hippocampus. SD: sleep deprivation, PC: platform control. Mean \pm SD, $n = 3$. *** $P < 0.001$.

3xTg-AD 小鼠脑内重要的病理特征之一。免疫组织化学染色实验结果显示 (图 7), 4 组小鼠海马区均未观察到磷酸化 tau 蛋白免疫阳性反应, 表明 9 月龄 3xTg-AD 小鼠脑内尚未出现明显的神经原纤维缠结, 慢性睡眠剥夺也未导致神经原纤维缠结出现。

2.8 慢性睡眠剥夺加重了3xTg-AD小鼠海马区小胶质细胞的过度活化

小胶质细胞过度活化也是 AD 重要的病理表现之一^[24]。免疫组织化学染色结果显示 (图 8B), 3xTg-AD+PC 组小鼠海马区的 Iba-1 阳性面积为 $(1.8 \pm 0.1)\%$, 明显高于 WT+PC 组的 $(0.8 \pm 0.1)\%$

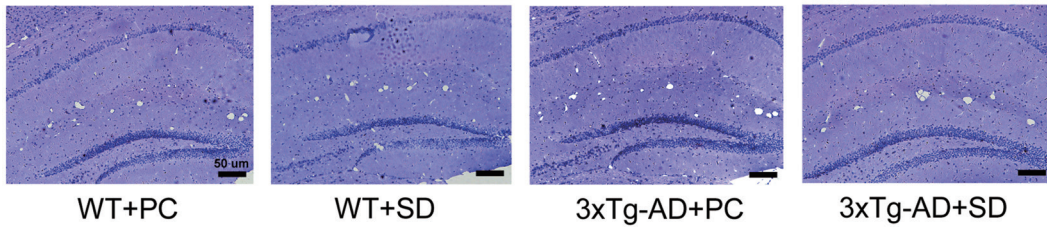


图 7. 慢性睡眠剥夺未导致9月龄3xTg-AD小鼠海马区出现神经原纤维缠结

Fig. 7. Chronic sleep deprivation did not induce neurofibrillary tangles in the hippocampus of 9-month-old 3xTg-AD mice. Images showing representative immunohistochemical staining of phosphorylated tau protein in the hippocampus in the mice of 4 groups. Scale bar, 50 μm . SD: sleep deprivation, PC: platform control.

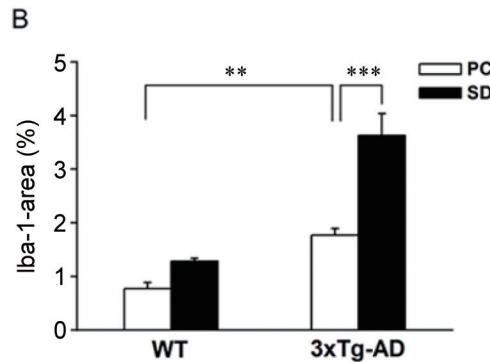
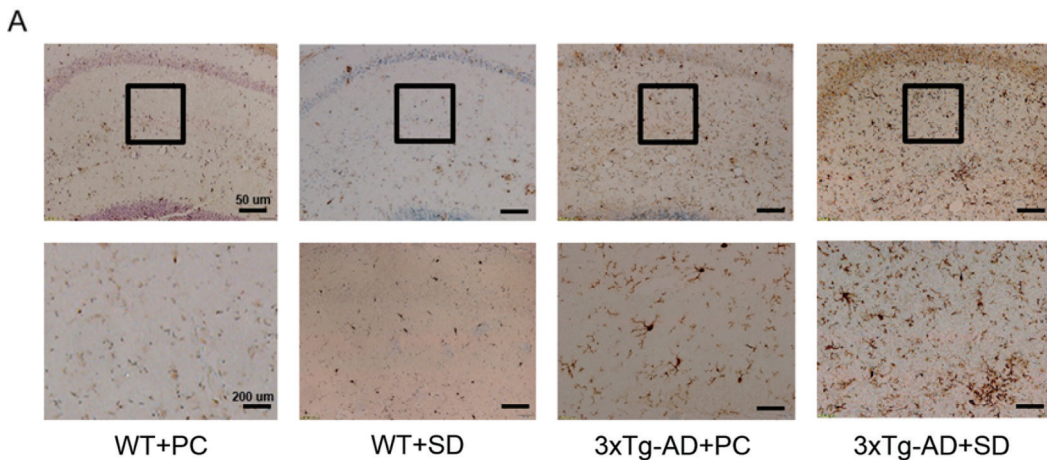


图 8. 慢性睡眠剥夺加重了9月龄3xTg-AD小鼠海马区小胶质细胞的过度活化

Fig. 8. Chronic sleep deprivation increased activation of microglia in the hippocampus of 9-month-old 3xTg-AD mice. A: Images showing representative immunohistochemical staining of microglia in the hippocampus in the mice of 4 groups. Scale bar, 50 or 200 μm . B: Histograms showing that chronic sleep deprivation increased percentages of Iba-1 immunopositive area in the hippocampus of 9-month-old 3xTg-AD mice. SD: sleep deprivation, PC: platform control. Mean \pm SD, $n = 3$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

($P = 0.002$); 慢性睡眠剥夺后, 3xTg-AD 小鼠的 Iba-1 阳性面积增加至 $(3.6 \pm 0.4)\%$ ($P < 0.001$), 表明慢性睡眠剥夺进一步加重了 3xTg-AD 小鼠海马区小胶质细胞的过度活化。同时, WT+SD 组小鼠的 Iba-1 阳性面积为 $(1.3 \pm 0.1)\%$, 与 WT+PC 组相比有所增加, 但无统计学差异 ($P = 0.051$)。

3 讨论

认知功能和学习记忆能力损害是 AD 最主要的临床表现。本研究结果显示, 9 月龄 3xTg-AD 小鼠在物体识别实验中的 RI 和 DI、Y 迷宫中的自发交替正确率和条件恐惧记忆实验中的僵直比率均较 WT 小鼠明显降低, 表明 3xTg-AD 小鼠出现了识别记忆、短期工作记忆和条件恐惧记忆损伤, 该结果与以往报道相一致^[25-27]。近年研究显示, 睡眠障碍是 AD 重要的危险因素之一, 且常常出现在 AD 患者记忆力减退之前^[10]。以往也有研究发现, 慢性睡眠剥夺可以影响不同月龄 3xTg-AD 小鼠不同类型的认知功能。连续 6 周每天 6 h 的睡眠剥夺不影响 14 月龄 3xTg-AD 小鼠的恐惧学习能力, 但损伤其恐惧记忆能力^[14], 连续 8 周每天 4 h 的睡眠剥夺能够导致 8 月龄 3xTg-AD 小鼠的长时程空间学习记忆和条件恐惧记忆能力损伤, 但并未影响其短期工作记忆能力^[15]。本研究采用经典的 MMPM^[13]对 3xTg-AD 小鼠进行为期 21 天每天 20 h 的慢性睡眠剥夺, 结果显示慢性睡眠剥夺加重了 9 月龄 3xTg-AD 小鼠的识别记忆能力、工作记忆和条件恐惧记忆能力损伤。不同报道结果的差异可能与所使用的慢性睡眠剥夺方法、动物所处的病程阶段、以及所观察的学习记忆类型不同密切相关。

近年研究显示精神行为异常是 AD 病程中的前驱症状或者共病。本研究组前期实验也证实 9 月龄 3xTg-AD 小鼠已经表现出焦虑和抑郁样行为^[28]。有报道显示慢性睡眠剥夺并未影响 14 月龄 3xTg-AD 小鼠在旷场中的焦虑情绪^[14], 而关于慢性睡眠剥夺对 AD 模型小鼠抑郁样行为的影响未见报道。在本研究中, 与 WT 对照组小鼠相比, 9 月龄 3xTg-AD 小鼠在旷场中央区域的活动时间百分比、高架十字迷宫开放臂停留时间百分比和糖水偏好实验中的糖水偏好率均明显降低, 表现出焦虑和抑郁样行为。但是, 慢性睡眠剥夺并未进一步加重 3xTg-AD 小鼠的焦虑样行为, 也未影响 3xTg-AD 小鼠的抑郁样行为。以往有研究显示, 连续 3 天每天 20 h 的

睡眠剥夺导致 WT 小鼠出现焦虑样行为^[29], 48 h 的完全睡眠剥夺导致 BALB/c 小鼠出现抑郁样行为^[30], 但连续 11 周每天 4 h 的慢性睡眠剥夺未影响 C57BL/6J 小鼠在高架十字迷宫中的焦虑样行为^[31]。因此我们推测, 慢性睡眠剥夺可能会引起小鼠对应激刺激的适应, 从而不会表现出明显的焦虑和抑郁样行为。

A β 沉积是 AD 的主要病理特征之一, 也是 AD 病程中导致认知损害的重要原因^[32]。以往研究显示, 慢性睡眠剥夺并未导致 3xTg-AD 小鼠脑内可溶性 A β 1-40 和 A β 1-42 水平出现明显差异^[15], 但本研究免疫组织化学染色实验结果显示慢性睡眠剥夺能够进一步增加 9 月龄 3xTg-AD 小鼠海马区 A β 斑块沉积, 且 A β 增加可能是慢性睡眠剥夺加重 3xTg-AD 小鼠多种认知功能损伤的重要原因。同时, 本研究结果还显示, 3xTg-AD 小鼠海马区出现了小胶质细胞的过度活化, 而慢性睡眠剥夺则进一步加重了小胶质细胞的激活。由于脑内 A β 的沉积会刺激小胶质细胞过度激活和神经炎性反应的发生^[33], 我们推测慢性睡眠剥夺会导致海马区 A β 沉积增加, 进而引起小胶质细胞的过度活化及神经炎性反应, 并导致 3xTg-AD 小鼠的物体识别记忆、工作记忆和条件恐惧记忆等不同类型的认知功能损伤进一步加重。此外, 4 组小鼠海马区均未观察到 tau 蛋白异常磷酸化和神经原纤维缠结, 表明慢性睡眠剥夺未导致 9 月龄 3xTg-AD 小鼠脑内出现明显的神经原纤维缠结。综上所述, 本研究结果显示, 慢性睡眠剥夺加重 3xTg-AD 小鼠的识别记忆、工作记忆能力和条件恐惧记忆能力损伤, 且其损伤作用与 3xTg-AD 小鼠海马区 A β 斑块沉积增加和小胶质细胞过度活化密切相关。

参考文献

- 1 Klinzing JG, Niethard N, Born J. Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci* 2019; 22(10): 1598-1610.
- 2 Palmer CA, Alfano CA. Sleep and emotion regulation: An organizing, integrative review. *Sleep Med Rev* 2017; 31: 6-16.
- 3 Zheng B (郑棒), Lin L, Yu C, Lu J, Guo Y, Bian Z, Tan Y, Pei P, Chen J, Chen Z, Li L. Study on the distribution and correlation of sleep duration, nap and insomnia symptoms in Chinese adults. *Chin J Epidemiol* (中华流行病学杂志) 2017; 38(4): 452-456 (in Chinese with English abstract).
- 4 Li J, Yao YS, Dong Q, Dong YH, Liu JJ, Yang LS, Huang F.

- Characterization and factors associated with sleep quality among rural elderly in China. *Arch Gerontol Geriatr* 2013; 56(1): 237–243.
- 5 Jia L, Quan M, Fu Y, Zhao T, Li Y, Wei C, Tang Y, Qin Q, Wang F, Qiao Y, Shi S, Wang YJ, Du Y, Zhang J, Zhang J, Luo B, Qu Q, Zhou C, Gauthier S, Jia J; Group for the Project of Dementia Situation in China. Dementia in China: epidemiology, clinical management, and research advances. *Lancet Neurol* 2020; 19(1): 81–92.
 - 6 Kuring J, Mathias J, Ward L. Prevalence of depression, anxiety and PTSD in people with dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neuropsychol Rev* 2018; 28(4): 393–416.
 - 7 Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Larson EB, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L, Mukadam N. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet* 2017; 390(10113): 2673–2734.
 - 8 Cellini N. Memory consolidation in sleep disorders. *Sleep Med Rev* 2017; 35: 101–112.
 - 9 Shi L, Chen S, Ma M, Bao Y, Han Y, Wang Y, Shi J, Vitiello M, Lu L. Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev* 2018; 40: 4–16.
 - 10 Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. Sleep and Alzheimer's disease: A pivotal role for the suprachiasmatic nucleus. *Sleep Med Rev* 2018; 40: 17–27.
 - 11 Chen L, Huang J, Yang L, Zeng XA, Zhang Y, Wang X, Chen M, Li X, Zhang Y, Zhang M. Sleep deprivation accelerates the progression of Alzheimer's disease by influencing A β -related metabolism. *Neurosci Lett* 2017; 650: 146–152.
 - 12 Yin M, Chen Y, Zheng H, Pu T, Marshall C, Wu T, Xiao M. Assessment of mouse cognitive and anxiety-like behaviors and hippocampal inflammation following a repeated and intermittent paradoxical sleep deprivation procedure. *Behav Brain Res* 2017; 321: 69–78.
 - 13 Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, Fujiki N, Nishino S, Holtzman DM. Amyloid- β dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science* 2009; 326(5955): 1005–1007.
 - 14 Rothman SM, Herdener N, Frankola KA, Mughal MR, Mattson MP. Chronic mild sleep restriction accentuates contextual memory impairments, and accumulations of cortical A β and pTau in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2013; 1529: 200–208.
 - 15 Di Meco A, Joshi YB, Pratico D. Sleep deprivation impairs memory, tau metabolism, and synaptic integrity of a mouse model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Neurobiol Aging* 2014; 35(8): 1813–1820.
 - 16 Zhao ZX (赵忠新). *Clinical Sleep Disorders*. Shanghai: Second Military Medical University Press 2003; 472 (in Chinese).
 - 17 Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Neuron* 2003; 39(3): 409–421.
 - 18 Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 2015; 96(96): e52434.
 - 19 McClean PL, Hölscher C. Lixisenatide, a drug developed to treat type 2 diabetes, shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2014; 86: 241–258.
 - 20 Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2(2): 322–328.
 - 21 Kraeuter A, Guest P, Sarnyai Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Methods Mol Biol* 2019; 1916: 105–111.
 - 22 Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, Chen H, Zhu DY, Zhou QG. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat Protoc* 2018; 13(7): 1686–1698.
 - 23 Hu MM (胡梦明), Yan XD, Zhang XM, Bai Y, Zhao F, Qi JS. The application of wireless neural telemetry technology in the fear learning and memory activities of Alzheimer's disease transgenic mice-observation of hippocampal Theta rhythm. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2018; 70(5): 571–578 (in Chinese with English abstract).
 - 24 Madore C, Yin Z, Leibowitz J, Butovsky O. Microglia, lifestyle stress, and neurodegeneration. *Immunity* 2020; 52(2): 222–240.
 - 25 Chiquita S, Ribeiro M, Castelhana J, Oliveira F, Sereno J, Batista M, Abrunhosa A, Rodrigues-Neves AC, Carecho R, Baptista F, Gomes C, Moreira PI, Ambrósio AF, Castelo-Branco M. A longitudinal multimodal *in vivo* molecular imaging study of the 3xTg-AD mouse model shows progressive early hippocampal and taurine loss. *Hum Mol Genet* 2019; 28(13): 2174–2188.
 - 26 Nakajima A, Aoyama Y, Shin EJ, Nam Y, Kim HC, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Yokoi T, Ohizumi Y, Yamada K. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and reduces soluble A β levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). *Behav Brain Res* 2015; 289: 69–77.
 - 27 España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Alvarez J, LaFerla F, Saura CJBp. Intraneuronal

- beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biol Psychiatry* 2010; 67(6): 513–521.
- 28 Bai Y (白羽), Zhou F, Yan XD, Wang C, Li YY, Wu MN. The molecular mechanism by which adiponectin improves anxiety-depression-like behavior in mice with Alzheimer's disease. *Chin J Behav Med Brain Sci (中华行为医学与脑科学杂志)* 2019; 28: 4 (in Chinese with English abstract).
- 29 Yaoita F, Namura K, Shibata K, Sugawara S, Tsuchiya M, Tadano T, Tan-No K. Involvement of the hippocampal alpha2A-adrenoceptors in anxiety-related behaviors elicited by intermittent REM sleep deprivation-induced stress in mice. *Biol Pharm Bull* 2020; 43(8): 1226–1234.
- 30 Xu X, Zheng P, Zhao H, Song B, Wang F. Effect of electroacupuncture at GV20 on sleep deprivation-induced depression-like behavior in mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020; 2020: 7481813.
- 31 Zielinski MR, Davis JM, Fadel JR, Youngstedt SD. Influence of chronic moderate sleep restriction and exercise training on anxiety, spatial memory, and associated neurobiological measures in mice. *Behav Brain Res* 2013; 250: 74–80.
- 32 Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol* 2020; 140(4): 417–447.
- 33 Ulland TK, Colonna M. TREM2 - a key player in microglial biology and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2018; 14(11): 667–675.

* * * * *

勘误启事

本刊 2021 年第 73 卷第 2 期上刊登的文章《Prostate organoid technology – the new POT of gold in prostate stem cell and cancer research》勘误如下表。

页	行	误	正
181	18~19	¹ 上海交通大学医学院附属仁济医院泌尿外科, 仁济-Med X临床干细胞研究中心, 癌基因与相关基因国家重点实验室, 上海 200127	¹ 癌基因与相关基因国家重点实验室, 仁济-Med X临床干细胞研究中心, 泌尿外科, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127

特此更正!

《生理学报》编辑部
2021 年 6 月