

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00513

α -硫辛酸对睡眠剥夺所致的大鼠脑中 IRE1 表达的影响

冯 晶,赵忠新*

第二军医大学长征医院神经内科,上海 200003

[摘要] **目的:**观察睡眠剥夺及抗氧化药物干预对大鼠皮质、海马中抑制阻抗性酯酶 1(IRE1)表达的影响。**方法:**将 SD 大鼠随机分为对照组和睡眠剥夺组。对照组分为空白对照组(CC, $n=10$)和实验环境对照组(TC, $n=10$)。睡眠剥夺组制作不同时间睡眠剥夺大鼠模型(SD, $n=120$),分为用药组($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ α -硫辛酸)和非用药组,每组按不同睡眠剥夺(SD)及恢复时间(RS)随机分为 6 小组:SD 1 d、SD 3 d、SD 5 d、SD 7 d、SD 7 d/RS 6 h、SD 7 d/RS 12 h($n=10$)。应用 RT-PCR 和免疫组织化学方法检测 IRE1 转录及蛋白表达变化。**结果:**RT-PCR 结果发现大鼠海马、皮质中 IRE1 mRNA 表达量在 CC 组和 TC 组间无统计学差异,SD 组明显升高($P<0.05$),用药后随之减少。将用药组分别与非用药组相应时间点作一一比较,在睡眠剥夺 5、7 d 及恢复睡眠后 6、12 h 各时间点有统计学意义($P<0.05$),其余无统计学意义。经免疫组织化学染色后,有棕黄色阳性细胞表达,各组间的表达水平与 RT-PCR 结果一致。**结论:** α -硫辛酸能够降低睡眠剥夺大鼠脑中 IRE1 的表达,为睡眠剥夺的抗氧化治疗研究提供了依据。

[关键词] 睡眠剥夺;IRE1;内质网;海马; α -硫辛酸;氧化性应激

[中图分类号] R 741 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0513-04

Effects of α -lipoic acid on cerebral IRE1 expression induced by sleep deprivation in rats

FENG Jing, ZHAO Zhong-xin*

Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influences of sleep deprivation and antioxidant agent α -lipoic acid on the expression of IRE1 in the cortex and hippocampus in rats. **Methods:** Rats were randomly divided into control groups and sleep deprivation group. The control groups included blank control group ($n=10$) and environmental control group ($n=10$). Sleep deprivation group included 120 rats, and rats were further divided into α -lipoic acid group ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and sleep deprivation model group. The two were further divided into 6 groups according to the periods of sleep deprivation and sleep restoration (SD 1 d, SD 3 d, SD 5 d, SD 7 d, SD 7 d/RS 6 h, SD 7 d/RS 12 h [$n=10$]). The expression of IRE1 mRNA and protein was examined by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. **Results:** RT-PCR results showed that the expression of IRE1 mRNA in the cortex and hippocampus were significantly higher in sleep deprivation group than in the blank and environmental control groups ($P<0.05$); there was no significant difference between the latter 2 groups. α -lipoic acid decreased the expression of IRE1. Expression of IRE1 between α -lipoic acid groups and sleep deprivation model groups was significantly different on SD 5 d, SD 7 d, SD 7 d/RS 6 h and SD 7 d/RS 12 h ($P<0.05$). The immunohistochemistry results of IRE1 expression were consistent with RT-PCR results. **Conclusion:** α -lipoic acid can reduce the cerebral IRE1 expression in sleep deprivation rats, which provides a basis for antioxidant treatment of sleep deprivation.

[KEY WORDS] sleep deprivation; IRE1; endoplasmic reticulum; hippocampus; α -lipoic acid; oxidative stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5): 513-516]

睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)是指机体因环境需要而部分或全部丧失正常睡眠量的状态,它是睡眠障碍中的常见症状^[1]。氧化应激和内质网应激

(ERS)是睡眠剥夺引起脑损害的病理基础^[2-3],两者之间又存在着共同的信号转导通路,也曾有人推测氧化应激所导致的损害作用可能是通过内质网所启

[收稿日期] 2008-09-22 **[接受日期]** 2009-01-21

[基金项目] 全军医学科学技术研究“十一五”计划保健专项课题(07BJZ06);上海市科技发展基金(08411950700);第二军医大学长征医院“三重三优”学科人才建设基金(2005312)。Supported by grants from the Health Care Special Project of “11 Five-Year Plan” for Chinese Military Medical Science and Technology Research (07BJZ06), the Shanghai Science and Technology Development Foundation (08411950700) and the Key Superior Program of Changzheng Hospital(2005312).

[作者简介] 冯 晶, 硕士, 主治医师, E-mail: medicine_mm@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885451, E-mail: zhaozx@medmail.com.cn

动的凋亡通路实现的^[4]。动物实验^[5]发现睡眠剥夺使能量代谢异常并产生大量的活性氧,活性氧在内质网中聚集,加重了内质网的负担并引起 ERS。

抑制阻抗性酯酶 1(IRE1)是 ERS 通路中的蛋白,在 ERS 反应过程中具有承上启下的作用。因此本研究选择 IRE1 作为评价 ERS 的指标,通过 RT-PCR 和免疫组化方法,观察抗氧化剂 α -硫辛酸对睡眠剥夺后大鼠脑组织中 IRE1 含量的影响,以期进一步了解 α -硫辛酸对睡眠剥夺后脑损害的干预作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 成年雄性 SD 大鼠 140 只,体重(200±20) g,清洁级,由中国科学院上海实验动物中心提供。大鼠均饲养于空调房间(25℃左右),每日 40 W 日光灯光照 12 h,黑暗 12 h。将 SD 大鼠随机分为对照组和睡眠剥夺组。对照组分为空白对照组(CC, $n=10$)和实验环境对照组(TC, $n=10$),分别检测用药前后脑组织中 IRE1 表达的变化。睡眠剥夺组(SD, $n=120$)分为用药组(drug group, DG)和非用药组(non-drug group, NDG),每组按不同睡眠剥夺(SD)及恢复时间(RS)随机分为 6 小组,SD 1 d、SD 3 d、SD 5 d、SD 7 d、SD 7 d/RS 6 h、SD 7 d/RS 12 h($n=10$)。

1.2 动物模型制作 采用改良多平台法(modified multiple platform method, MMPM)建立 REM(快速眼球运动)睡眠剥夺模型。制作长、宽、高分别为 110 cm×60 cm×40 cm 的水槽^[6],内有 8 个直径 6.5 cm、高 8.0 cm 的平台,每个平台间隔 15 cm,其周边注满水,水面距平台面约 1.0 cm,水温保持在约 22℃,大鼠可在平台上自行摄食饮水。实验前 1 周将大鼠放在平台上适应,每天适应 1 h。睡眠剥夺 7 d 后将恢复睡眠(SD 7 d/RS 6 h、SD 7 d/RS 12 h)的大鼠置于正常饲养环境中,停止剥夺。TC 组采用与 SD 组大小一样的水槽,但内置直径 17 cm、高 8 cm 的大平台,其周边注满水,以形成与 SD 组相似的环境。其他条件与 SD 组相同。CC 组为未进行处理的大鼠。

1.3 给药方法 在正常喂养的基础上,CC 组、TC 组和 DG 组大鼠腹腔注射 α -硫辛酸(上海浦东制药厂生产,规格 20 ml : 0.6 g;批号:国药准字 H20056403),剂量 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹。DG 组于睡眠剥夺前 1 d 和剥夺开始后每日上午 9:00 称量、给药,至处死。CC 组和 TC 组同步给药,8 d 后处死。

1.4 实验动物取材 各组动物在相应时点处死。用于 RT-PCR 实验的大鼠麻醉后快速断头取脑,将

双侧皮质、海马分离干净后置入焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的 Eppendorf 离心管中,液氮速冻后置于-80℃保存待用。而用于免疫组化的实验动物开胸经左心室至升主动脉插管,用生理盐水和 4%多聚甲醛(pH 7.4,4℃)250 ml 进行灌注,随后进行脱水,透明,浸蜡,包埋,切片。切片后分别用 H-E 染色进行病理组织学观察及进行免疫组化测定。

1.5 RT-PCR 反应 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,按试剂盒(上海晶美生物工程有限公司)说明提取大鼠脑组织总 RNA,进行反转录反应和 PCR 扩增,上样电泳后半定量分析。

1.6 免疫组织化学反应 采用 S-P 法。IRE1 一抗、二抗购自 Santa Cruz 公司,免疫组化常规试剂购自 Sigma 公司。显微镜观察 IRE1 主要表达在细胞质内,染成棕褐色为阳性。每只大鼠选取 6 张切片,测相同面积的大鼠海马和皮质,每片随机取 3 个视野(×100)输入图像分析仪,利用 KS400 图像分析系统选取灰度阈值对图像进行分析处理,以阳性面积进行统计分析。

1.7 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组比较采用方差分析;用 SPSS 13.0 版本软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果 利用 RT-PCR 方法检测大鼠脑组织海马、皮质中 IRE1 mRNA 表达情况,以 β -actin 作为内参照进行半定量分析,结果(图 1、表 1)发现:CC 组与 TC 组之间表达差异无统计学意义($P > 0.05$),SD 组比 CC 组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。用药干预后大鼠海马、皮质中 IRE1 mRNA 表达量随之减少,在 SD 5 d、SD 7 d 及 SD 7 d/RS 6 h、SD 7 d/RS 12 h 各时间点有统计学差异($P < 0.05$)。

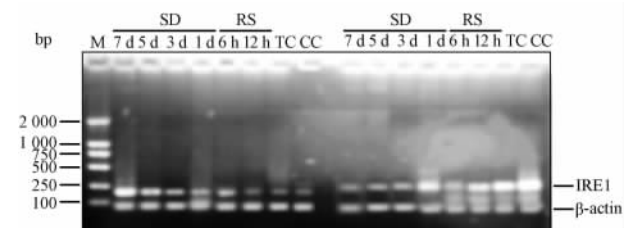


图 1 α -硫辛酸对睡眠剥夺大鼠 IRE1 mRNA 表达的影响
Fig 1 Effect of α -lipoic acid on IRE1 mRNA expression of brain induced by sleep deprivation in rats

CC: Cage control group; TC: Tank control group; SD: Sleep deprivation; RS: Recovery of sleep. M: Marker

表 1 药物干预前后睡眠剥夺 IRE1 mRNA 的相对表达量

Tab 1 Effect of α -lipoic acid(α -LA) on cerebral IRE1 mRNA expression induced by sleep deprivation in rats(n=6, $\bar{x}\pm s$)

Group	Hippocampus		Cortex	
	Non-drug	α -LA	Non-drug	α -LA
CC	0.424 \pm 0.024	0.402 \pm 0.046	0.464 \pm 0.024	0.434 \pm 0.05
TC	0.412 \pm 0.038	0.368 \pm 0.057	0.446 \pm 0.041	0.430 \pm 0.07
SD 1 d	0.474 \pm 0.032*	0.468 \pm 0.052*	0.532 \pm 0.051*	0.492 \pm 0.064*
SD 3 d	0.546 \pm 0.059*	0.492 \pm 0.063*	0.652 \pm 0.056*	0.550 \pm 0.095*
SD 5 d	0.486 \pm 0.040*	0.416 \pm 0.050* Δ	0.518 \pm 0.043*	0.434 \pm 0.058 Δ
SD 7 d	0.434 \pm 0.049	0.410 \pm 0.035 Δ	0.496 \pm 0.058	0.396 \pm 0.047 Δ
SD 7 d/RS 6 h	0.502 \pm 0.066*	0.420 \pm 0.035* Δ	0.526 \pm 0.047*	0.426 \pm 0.065 Δ
SD 7 d/RS 12 h	0.520 \pm 0.095*	0.436 \pm 0.049* Δ	0.546 \pm 0.059*	0.452 \pm 0.045 Δ

CC: Cage control group; TC: Tank control group; SD: Sleep deprivation; RS: Recovery of sleep. * $P < 0.05$ vs CC group; $\Delta P < 0.05$ vs non-drug group

2.2 免疫组织化学染色结果 各组切片经免疫组织化学染色后, IRE1 免疫阳性细胞呈现棕黄色, 其

表达变化趋势与 RT-PCR 结果一致 (图 2、表 2)。

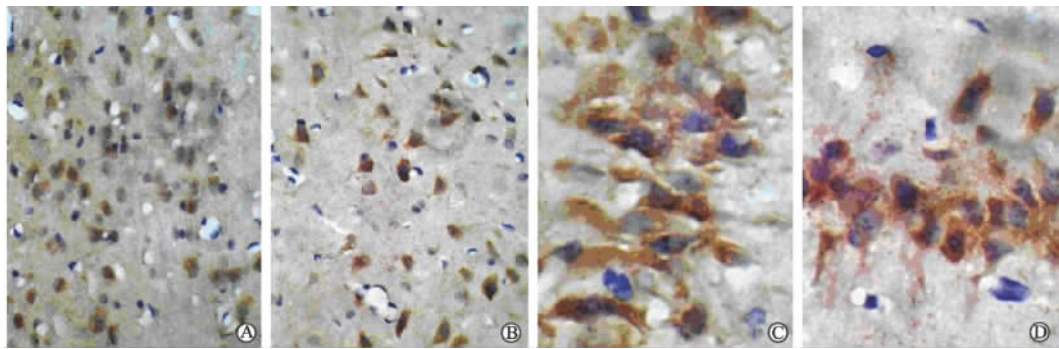


图 2 睡眠剥夺 3 d IRE1 的阳性表达

Fig 2 IRE1 expression 3 d after sleep deprivation(S-P)

A: Cortex in non-drug group; B: Cortex in drug group; C: Hippocampus in non-drug group; D: Hippocampus in drug group. Original magnification: A, B($\times 200$); C, D($\times 400$)

表 2 药物干预前后睡眠剥夺 IRE1 的阳性表达

Tab 2 Effect of α -lipoic acid(α -LA) on cerebral IRE1 protein expression induced by sleep deprivation in rats(n=6, $\bar{x}\pm s, \%$)

Group	Hippocampus		Cortex	
	Non-drug	α -LA	Non-drug	α -LA
CC	15.18 \pm 0.90	13.56 \pm 1.50	10.18 \pm 0.68	8.33 \pm 1.66
TC	15.06 \pm 1.43	13.84 \pm 1.17	10.6 \pm 0.87	8.65 \pm 1.81
SD 1 d	16.64 \pm 0.77	14.20 \pm 1.70*	11.02 \pm 0.38	9.65 \pm 0.91*
SD 3 d	25.52 \pm 3.28	21.69 \pm 0.25*	20.90 \pm 3.76	16.70 \pm 0.32*
SD 5 d	18.10 \pm 1.89	15.74 \pm 0.43*	12.90 \pm 1.92	10.09 \pm 0.18*
SD 7 d	15.62 \pm 1.49	13.02 \pm 0.23*	10.82 \pm 0.92	8.58 \pm 1.42*
SD 7 d/RS 6 h	17.32 \pm 1.48	14.96 \pm 1.07*	11.76 \pm 0.95	9.28 \pm 1.46*
SD 7 d/RS 12 h	16.98 \pm 1.17	14.35 \pm 1.51*	11.64 \pm 0.85	9.03 \pm 1.65*

CC: Cage control group; TC: Tank control group; SD: Sleep deprivation; RS: Recovery of sleep. * $P < 0.05$ vs non-drug group

3 讨论

正常情况下, 细胞内质网膜上存在 IRE1、PERK、ATF-6 三种跨膜蛋白质。在 ERS 反应过程中, 这三种跨膜蛋白质可感知 ERS 信号并通过寡聚

化和自身磷酸化由内质网膜向细胞质和细胞核转导 ERS 信号^[7-8]。IRE1 属 I 型跨膜蛋白, 其 N 末端与内质网伴侣分子 Bip 相连, 以防止跨膜蛋白聚集。然而, 当错误/未折叠蛋白聚集时, Bip 与 IRE1 解聚而释放出来, 同时 IRE1 发生自身磷酸化。IRE1 活

化后,可以特异地剪接 XBP1 mRNA,合成 XBP1 蛋白^[9],且与 ERSE(内质网应激反应元件)结合,导致 Bip 上调,从而引导蛋白质正确折叠。鉴于 IRE1 在 ERS 反应过程中具有承上启下的作用,本研究选择了 IRE1 这个 UPR 通路中的感应蛋白作为评价 ERS 的指标。

氧化应激和 ERS 是睡眠剥夺引起脑损害的病理基础,氧化应激与 ERS 之间又存在着共同的信号转导通路。氧自由基是一类具有高度活性的物质,当作用于中枢神经系统时,其神经毒性可以造成神经细胞和组织的氧化损伤,影响细胞正常功能。正常情况下,体内氧自由基的产生和清除是平衡的。当自由基产生过多或体内抗氧化系统出现故障,体内氧自由基代谢就会出现失衡形成氧化应激。于是通过摄入外源性抗氧化剂,增加细胞内的抗氧化剂水平,可以恢复氧化/抗氧化平衡,减少氧化应激的损伤。因此寻找合适的抗氧化剂,并研究其抗氧化机制就显得十分重要。

本实验选用的 α -硫辛酸具有“万能抗氧化剂”之称,可以有效清除自由基,具有可透过血脑屏障,并且可在水、脂两相发挥抗氧化作用等优点^[10]。其作用机制是通过除去 O_2^- 清除活性氧(ROS)或其前体,抑制 ROS 的生成或清除过多的 ROS,增加其他抗氧化物质的含量及活性等一系列途径来发挥保护神经元作用。 α -硫辛酸已经用来治疗高血压、糖尿病、动脉硬化、多发性神经炎,肝病及其他氧化损伤有关的疾病,还能维持微粒体中的蛋白肌醇,防止溶血和神经系统的疾病^[11-12]。

本实验采用 RT-PCR 和免疫组化方法分别对用药干预之前的大鼠海马、皮质中 IRE1 的 mRNA 和蛋白进行研究,结果显示 mRNA 表达和蛋白表达基本一致,即随着睡眠剥夺时间延长其增高趋势明显,这提示睡眠剥夺对机体是一种有害应激。而对睡眠剥夺大鼠予以 α -硫辛酸腹腔注射干预后,大鼠海马、皮质中 IRE1 mRNA 表达量也随之减少,提示 α -硫辛酸的抗氧化作用明显。在睡眠剥夺最初的第 1、3 天,大鼠海马、皮质中 IRE1 的转录水平与对照组比较后无明显差异,分析原因可能是剥夺睡眠初期,大鼠体内的氧化与抗氧化系统尚能维持平衡,机体尚未处于氧化应激状态。在睡眠剥夺 5、7 d,及恢复睡眠后 6、12 h 各时间点差异均有统计学意义,这说明随着剥夺时间逐渐延长,大鼠的抗氧化能力逐渐减弱,所受氧化损伤逐渐加重,机体便处于氧化应激状态。此时抗氧化剂在大鼠体内也已具有一定的药物浓度,从而起到了神经保护作用。

氧化应激的损伤作用越来越受到人们的重视,寻找高效低毒的天然抗氧化剂及设法调动和激活机体中的内源性抗氧化剂是至关重要的。 α -硫辛酸能透过血脑屏障,是一种高效的能量型天然抗氧化剂,毒副作用较少,可能会在临床上发挥较大的作用。本研究关于睡眠剥夺后脑损害及抗氧化剂 α -硫辛酸干预作用机制的探讨,希望能给临床工作中合理地应用抗氧化剂,减轻慢性失眠患者白天出现的脑功能下降症状提供一定的实验依据。

[参考文献]

- [1] Forest G, Godbout R. Effects of sleep deprivation on performance and EEG spectral analysis in young adults [J]. *Brain Cogn*, 2000, 43(1-3): 195-200.
- [2] Kumar A, Singh A. Possible nitric oxide modulation in protective effect of against sleep deprivation-induced behavioral alterations and oxidative damage in mice [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15: 577-586.
- [3] 唐庆娟,陶凯忠,胡森森,徐胜,徐建平,崔瑞耀,等. 72 小时睡眠剥夺大鼠的氧化应激 [J]. *中国行为医学科学*, 2003, 12: 500-502.
- [4] Cullinan S B, Diehl J A. Coordination of ER and oxidative stress signaling; the PERK/Nrf2 signaling pathway [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38: 317-332.
- [5] Dou W, Zhao Z X, Miao M Y, Wang W Z, Huang L Q. The effect of sleep deprivation on cognition and cerebral mitochondrial respiratory function in rats [J]. *Neuroscience Bulletin*, 2005, 21: 204-209.
- [6] 宋国萍,苗丹民,皇甫恩,陈足怀,冯学文. 睡眠剥夺对大鼠学习和行为的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21: 663.
- [7] Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus the unfolded protein response in yeast and mammals [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 349-355.
- [8] Degracia D J, Kumar R, Owen C R, Krause G S, White B C. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22: 127-141.
- [9] Oikawa D, Tokuda M, Iwawaki T. Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, IRE1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360: 122-127.
- [10] Packer L. Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury [J]. *Drug Metab Rev*, 1998, 30: 245-275.
- [11] Eremera M E, Silverman D J. Effects of the antioxidant alpha-lipoic acid on human umbilical vein endothelial cells infected with *Rickettsia rickettsii* [J]. *Infect Immun*, 1998, 66: 2290-2299.
- [12] Shi D Y, Liu H L, Stern J S, Yu P Z, Liu S L. Alpha-lipoic acid induced apoptosis in hepatoma cells via the PTEN/Akt pathway [J]. *FEBS*, 2008, 582: 1667-1671.