

光疗对睡眠剥夺小鼠学习记忆以及 BDNF-TrkB 信号通路的影响

陈洪丽^{1,2}, 高静静², 姜忠迪², 王仲朋^{1*}, 陈龙¹, 明东¹

¹天津大学医学工程与转化医学研究院, 天津 300072;

²天津工业大学生命科学学院, 天津 300387

摘要 睡眠障碍是临床中的常见多发病, 睡眠障碍易诱发和加重认知障碍疾病, 损害海马依赖的学习记忆功能。光疗是一种改善睡眠的有效方法, 鉴于此, 本课题组研究了光疗对睡眠剥夺小鼠炎症反应、氧化应激反应及 BDNF-TrkB 信号通路的影响, 探索光疗对睡眠剥夺小鼠学习记忆的影响。通过旋转圆筒法建立睡眠剥夺模型, 小鼠随机被分为对照组、睡眠剥夺组、光疗组(468 nm, 光照强度分别为 100, 300, 900 lx)。光疗组边剥夺边治疗, 每天早晚进行光照 30 min, 于剥夺 3 d 后对各组小鼠进行水迷宫实验和旷场实验, 采用 ELISA 法检测小鼠血浆和海马组织中 TNF- α 、SOD、5-HT 因子的表达量, 采用 RT-PCR 法检测小鼠 BDNF、TrkB 和 Akt 中的 mRNA 表达量。结果显示: 与对照组相比, 睡眠剥夺导致小鼠体重下降, 游泳潜伏期增长, 促进了炎性因子 TNF- α 的表达, 降低了 SOD 活性和 5-HT 的表达, 并降低了 BDNF、TrkB 和 Akt 中的 mRNA 表达; 与睡眠剥夺组相比, 光疗组小鼠的游泳潜伏期缩短, 平台交叉次数增多, TNF- α 表达下降, SOD 和 5-HT 表达呈上升趋势, 焦虑样行为减轻, BDNF、TrkB 与 Akt 中的 mRNA 表达升高; 300 lx 光照剂量的效果较为显著。光疗可以修复睡眠剥夺引起的氧化应激损伤, 调节炎症反应, 促进 BDNF 表达, 代偿相对较短时间的睡眠剥夺, 保护自身的认知能力, 缓解睡眠剥夺引起的学习记忆缺陷。

关键词 医用光学; 光疗; 睡眠剥夺; 氧化应激; 学习记忆; 突触可塑性

中图分类号 R454.2; R256.23; R318.51

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202249.0507011

1 引言

睡眠障碍是目前社会上普遍存在的问题。睡眠障碍会导致认知功能障碍, 尤以学习和记忆能力下降最为突出^[1-2]。长期睡眠剥夺不仅易引起不良情绪, 使抵抗力下降、生理节律紊乱, 还会损伤记忆力, 导致精神失常。大脑海马区在记忆编码、巩固和识别任务中可以起到关键作用^[3]。海马区神经元是储存记忆、学习和定位的重要神经核团, 海马神经元紊乱会引发抑郁症、阿尔茨海默病等多种神经性疾病^[4]。睡眠剥夺与海马区的氧化还原、炎症稳态的失衡以及神经营养信号的调节有关^[5]。目前对睡眠剥夺的治疗多以使用甜梦口服液、加味不忘散、酸枣

仁汤等镇静催眠类药物与中医针灸治疗为主^[6], 其作用机制与减轻海马区氧化应激(即炎症因子释放)有关。目前, 光疗法作为一种无创、安全、有效的物理治疗方法, 已成为昼夜节律失调性睡眠障碍的主要治疗方式之一^[7]。光具有一定的生物学效应^[8-9]。视网膜神经节细胞的发现奠定了非视觉效应的生理基础^[10], 光不仅能给予生物视觉能力, 而且能通过非视觉效应调节人体生物节律。研究表明, 在峰值波长为 468 nm 的蓝光照射下, 人体光生物节律所受影响最大^[11]。视网膜是眼球后部非常薄的细胞层, 它可将光信号转化为神经生物电信号^[12]。光通过视网膜产生非视觉通路, 影响海马介导的记忆水平, 因此, 本课题组旨在通过构建睡眠剥夺小鼠模型

收稿日期: 2021-11-02; 修回日期: 2021-12-03; 录用日期: 2021-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(61705164, 81630051)、天津市“项目+团队”重点培养专项(XB202007)、天津市自然科学基金(19JCQNJC01600)

通信作者: *tunerl_wzp1@tju.edu.cn

来研究睡眠剥夺对小鼠学习记忆、炎症指标、氧化应激反应的影响机制,并从海马神经营养因子及其受体动态变化等方面对睡眠剥夺影响认知记忆功能的机制进行探讨,同时探索光疗的干预模式及治疗机制,为光疗调节睡眠记忆障碍提供临床依据。

2 材料和方法

2.1 实验动物和实验分组

2.1.1 实验动物

实验小鼠选择 SPF 级 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 30 只(体重 18~23 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司),所有小鼠饲养条件一致:笼养,每天接受光照 12 h,黑暗 12 h,光照周期为 8:00—20:00,环境温度为(22±2)℃,相对湿度为 50%~60%,小鼠喂以标准饲料和清洁饮用水,小鼠可自由摄食、饮水。实验开始前饲养 7 d,使小鼠充分适应饲养条件。所有动物实验均符合并且严格遵守中国动物保护协会的相关准则,伦理审核号为 SYXK(津)2019-0002。

2.1.2 实验分组

将小鼠分为正常组(control 组)、睡眠剥夺组(s-dep 组)、光疗组(s-dep+PT 组)。光疗组根据光照强度分为 s-dep+100 lx 组、s-dep+300 lx 组、s-dep+900 lx 组。

2.2 实验方法

2.2.1 睡眠剥夺模型

睡眠剥夺造模采用的是旋转圆筒剥夺法,即通过圆筒的转动带动小鼠不停地运动,从而达到睡眠剥夺的目的。实验时圆筒匀速转动,剥夺前期为正转,转速为 6 r/min,间歇时间为 5 s;随着剥夺时间的延长,逐渐改变旋转模式,加快剥夺速度,减少间歇时间,从而达到进一步睡眠剥夺的目的。

2.2.2 水迷宫实验

Morris 水迷宫实验分为定位航行实验和空间搜索实验,前者用于获取各组小鼠提取空间信息和学习的能力,后者用于测试记忆储存情况,水温控制在(22±1)℃。在定位航行实验中,选择每个象限

标记的下方为入水点,象限的选择随机且概率相同,小鼠航行轨迹由智能视频跟踪系统跟踪记录;第 6 天进行空间搜索实验,将隐藏的平台撤移,选择平台相对象限为入水点,测试 1 次,时间 90 s,记录小鼠有效潜伏期和穿越原平台位置的次数。

2.2.3 旷场实验(OFT)

睡眠剥夺结束后,对每组小鼠进行旷场实验,观察小鼠的焦虑样行为。旷场实验在一个规格为 50 cm×50 cm×40 cm 的箱子中进行。实验开始前先让小鼠充分熟悉旷场环境,实验正式开始后使小鼠在旷场自由活动 5 min,检测小鼠自发活动行为和探索行为,然后将小鼠迅速放置于实验箱的中央区域,并立即离开,记录小鼠的活动轨迹。

2.2.4 ELISA 法检测 5-羟色胺(5-HT)、肿瘤坏死

因子(TNF- α)、超氧化物歧化酶(SOD)因子
采用眼球取血法采集血浆,取血后断头分离海马组织。用 ELISA 法检测小鼠血浆和海马区 5-HT、TNF- α 和 SOD 含量。根据海马组织的质量加入适量 PBS 缓冲液,用匀浆器将标本匀浆充分,接着低温离心处理 15 min,离心速度为 3000 r/min,离心结束后收集上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书严格操作,每孔分别加入待测样品 10 μ L,于 450 nm 下检测 5-HT、TNF- α 和 SOD 的光密度值。

2.2.5 Real-time PCR 检测脑源性神经营养因子(BDNF)、酪氨酸激酶 B 受体(TrkB)、蛋白激酶(Akt)mRNA 的表达

使用 Trizol 试剂盒获取小鼠海马组织中的总 RNA,离心后用分光光度计测定 RNA 浓度(A_{260}/A_{280} ,应在 1.8~2.0 范围内)。根据 RNA 浓度计算上样量。以海马总 mRNA 为模板逆转录得到 cDNA,取 3 μ L cDNA 为模板进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,每个样品重复检测 3 次得到 C_t 值。使用 β -actin 作为内参,目的基因在不同组中的相对表达量的计算曲线公式为 $R_Q = 2^{-\Delta\Delta C_t}$,其中 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t,exp} - \Delta C_{t,con}$, $\Delta C_{t,exp}$ 表示实验组目的基因与内参的 C_t 值之差, $\Delta C_{t,con}$ 表示空白对照组目的基因与内参的 C_t 值之差。引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Gene name	Upstream primer sequence(5'-3')	Downstream primer sequence(5'-3')
BDNF	TCATACTTCGGTTGCATGAAGG	ACACCTGGGTAGCCAAGTT
TrkB	CTGGGGCTTATGCCTGCTG	AGGCTCAGTACACCAAATCCTA
Akt	ATGAACGACGTAGCCATTGTG	TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT
GAPDH	TGGCACCCAGCACAAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA

2.3 实验过程

实验流程时间图如图 1 所示。

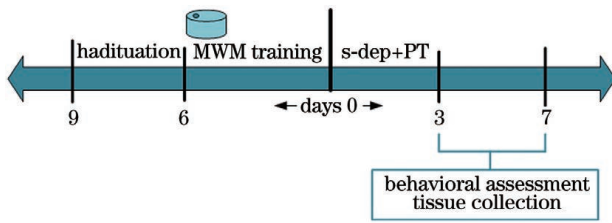


图 1 实验流程时间图

Fig. 1 Time chart of experimental flow

2.4 统计分析

上述实验均重复三次,计算结果采用均值±标准差($X \pm S$)表示。使用 SPSS v22.0 软件采用单因素方差分析(ANOVA)来检验均值之间的差异,显著性水平设为 $P < 0.05$ 。

3 实验结果

3.1 光疗对睡眠剥夺小鼠体重的影响

睡眠剥夺后,小鼠体重明显降低($P < 0.001$),差异具有统计学意义;光疗干预后,与 s-dep 组比较,s-dep+300 lx 组小鼠体重明显较高($P < 0.05$),如图 2 所示。

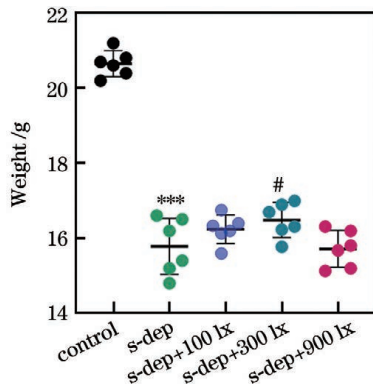


图 2 光疗对睡眠剥夺小鼠体重的影响(与 control 组比较,***表示 $P < 0.001$;与 s-dep 组比较,#表示 $P < 0.05$)

Fig. 2 Effect of phototherapy on body weight in sleep-deprived mice (compared with the control group, *** represents $P < 0.001$; compared with s-dep group, # represents $P < 0.05$)

3.2 光疗对游泳潜伏时间及穿越平台交叉次数的影响

由表 2 可以看出:睡眠剥夺 3 d 后,与 control 组比较,s-dep 组小鼠游泳潜伏期明显升高($P < 0.05$);与 s-dep 组相比,s-dep+300 lx 组小鼠的游泳潜伏期明显缩短($P < 0.05$);与 control 组相比,

s-dep 组小鼠穿越平台次数明显减少($P < 0.05$),光照干预小鼠穿越平台的次数出现上升趋势,s-dep+300 lx 组小鼠差异更显著。

表 2 光疗对睡眠剥夺小鼠游泳潜伏期及穿越平台交叉次数的影响

Table 2 Effect of phototherapy on swimming latency and platform crossing times in sleep-deprived mice

Group	Swimming latency time /s	Platform crossing times (n)
Control	10.67±1.53	4.33±1.53
s-dep	44.33±7.64*	1.33±0.58*
s-dep+100 lx	31.67±21.36	2.67±1.15
s-dep+300 lx	17.33±6.81#	3.00±1.00#
s-dep+900 lx	43.667±3.51	1.67±0.58

Notes: compared with the control group, * represents $P < 0.05$; compared with the s-dep group, # represents $P < 0.05$.

3.3 目标象限时间占总区域时间的百分比

与 control 组相比,s-dep 组小鼠在目标象限的时间显著缩短($P < 0.01$);与 s-dep 组小鼠相比,光疗小鼠的目标象限时间占总区域时间的百分比均有不同程度的提高,s-dep+300 lx 组小鼠的目标象限时间占总区域时间的百分比上升得较为显著($P < 0.01$),s-dep+900 lx 组与 s-dep 组则无显著差异,如图 3 所示。

3.4 光疗对睡眠剥夺小鼠焦虑程度的影响

与 control 组相比,s-dep 组小鼠在旷场中央区域的时间占总区域的时间显著减少($P < 0.001$),如图 4 所示,小鼠的自发活动减少。这表明睡眠剥夺加重了小鼠的焦虑样行为。此外,与 s-dep 组相比,光疗组小鼠 5 min 内在中央区的时间显著延长($P < 0.05$),且 300 lx 光照剂量时的延长更为显著($P < 0.001$),说明小鼠的自发活动增多。

3.5 光疗对睡眠剥夺小鼠 5-HT 的影响

与 control 组相比,s-dep 组小鼠血浆和海马中的 5-HT 含量显著降低($P < 0.01$),如图 5 所示;与 s-dep 组相比,光疗组小鼠血浆和海马中的 5-HT 表达量都明显上升($P < 0.05$),s-dep+300 lx 组小鼠血浆和海马中的 5-HT 含量上升显著($P < 0.01$),s-dep+900 lx 组与 s-dep 组相比无显著差异。

3.6 光疗对睡眠剥夺小鼠 TNF- α 和 SOD 的影响

由图 6(a)、(b)可以看出:与 control 组比较,s-dep 组小鼠血浆和海马中 TNF- α 表达水平显著升高($P < 0.01$);与 s-dep 组比较,光疗组小鼠血浆和

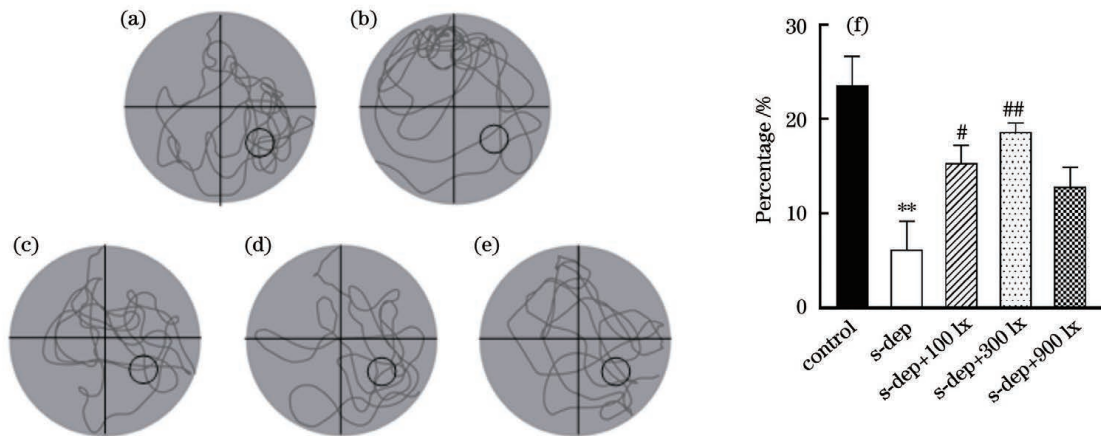


图 3 光疗对睡眠剥夺小鼠的目标象限时间占总区域时间百分比的影响及各组小鼠的轨迹图(与 control 组相比,**表示 $P < 0.01$;与 s-dep 组相比,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$)。(a)control 组小鼠的轨迹图;(b)s-dep 组小鼠的轨迹图;(c)s-dep+100 lx 组小鼠的轨迹图;(d)s-dep+300 lx 组小鼠的轨迹图;(e)s-dep+900 lx 组小鼠的轨迹图;(f)光疗对睡眠剥夺小鼠的目标象限时间占总区域时间百分比的影响

Fig. 3 Effect of phototherapy on the percentage of target quadrant time in total area time for sleep-deprived mice and trajectory diagrams of each group of mice (compared with the control group, ** represents $P < 0.01$; compared with the s-dep group, # represents $P < 0.05$ and ## represents $P < 0.01$). (a) Trajectory diagram of control group mice; (b) trajectory diagram of s-dep group mice; (c) trajectory diagram of s-dep + 100 lx group mice; (d) trajectory diagram of s-dep + 300 lx group mice; (e) trajectory diagram of s-dep + 900 lx group mice; (f) effect of phototherapy on the percentage of target quadrant time in total area time for sleep-deprived mice

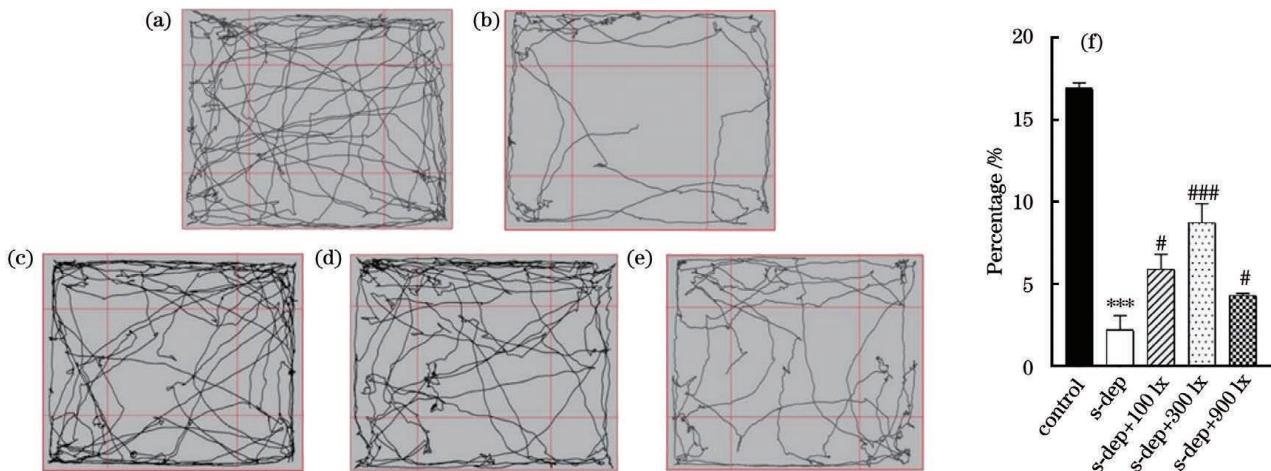


图 4 光疗对睡眠剥夺小鼠焦虑程度的影响以及各组小鼠的轨迹图(与 control 组比较,***表示 $P < 0.001$;与 s-dep 组相比,#表示 $P < 0.05$,###表示 $P < 0.001$)。(a)control 组小鼠的轨迹图;(b)s-dep 组小鼠的轨迹图;(c)s-dep+100 lx 组小鼠的轨迹图;(d)s-dep+300 lx 组小鼠的轨迹图;(e)s-dep+900 lx 组小鼠的轨迹图;(f)光疗对睡眠剥夺小鼠焦虑程度的影响

Fig. 4 Effect of phototherapy on anxiety of sleep-deprived mice and trajectory diagrams of each group of mice (compared with the control group, *** represents $P < 0.001$; compared with s-dep group, # represents $P < 0.05$ and ### represents $P < 0.001$). (a) Trajectory diagram of control group mice; (b) trajectory diagram of s-dep group mice; (c) trajectory diagram of s-dep + 100 lx group mice; (d) trajectory diagram of s-dep + 300 lx group mice; (e) trajectory diagram of s-dep + 900 lx group mice; (f) effect of phototherapy on anxiety of sleep-deprived mice

海马中 TNF- α 表达量明显下降($P < 0.05$),s-dep+300 lx 组 TNF- α 表达量显著降低($P < 0.01$),对缓解小鼠的炎症反应效果最好。由图 6(c)、(d)可以

看出:与 control 组比较,s-dep 组小鼠血浆和海马中 SOD 表达水平明显降低($P < 0.01$);与 s-dep 组相比,光疗组小鼠血浆和海马中 SOD 表达水平均有不

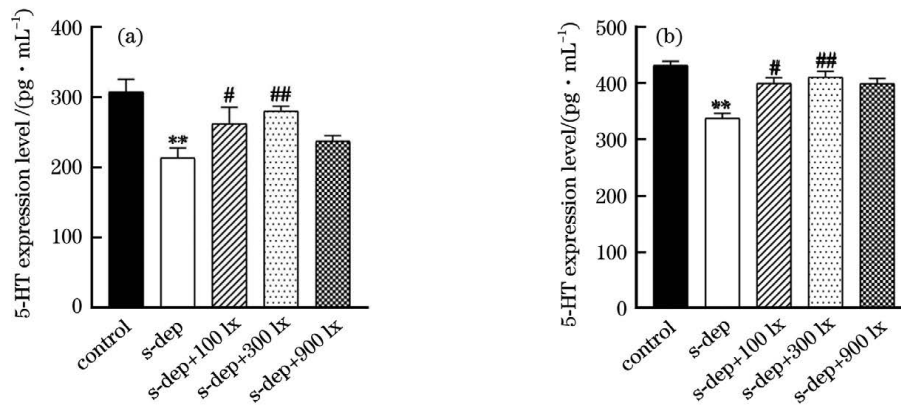


图 5 光疗对睡眠剥夺小鼠血浆和海马区 5-HT 表达量的影响(与 control 组相比,**表示 $P < 0.01$;与 s-dep 组相比, # 表示 $P < 0.05$,## 表示 $P < 0.01$)。(a)血浆;(b)海马区

Fig. 5 Effects of phototherapy on 5-HT expression level in plasma and hippocampus of sleep-deprived mice (compared with the control group, ** represents $P < 0.01$; compared with s-dep group, # represents $P < 0.05$ and ## represents $P < 0.01$). (a) Plasma; (b) hippocampus

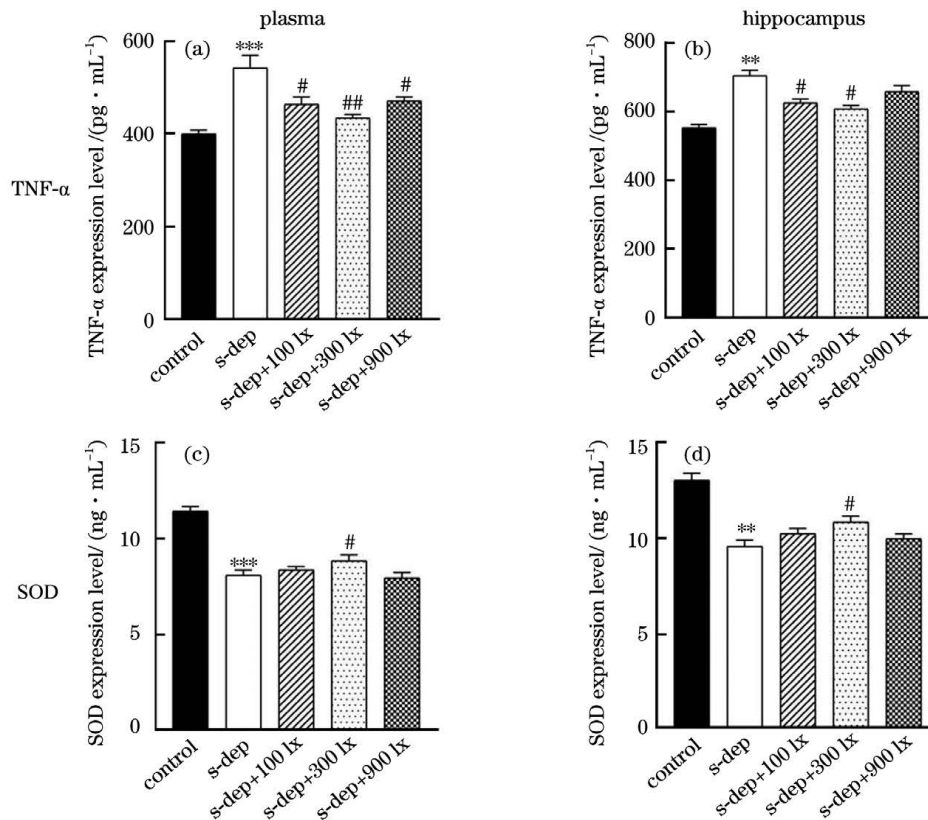


图 6 光疗对睡眠剥夺小鼠血浆和海马区 TNF- α 和 SOD 表达量的影响(与 control 组相比,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$;与 s-dep 组相比,# 表示 $P < 0.05$,## 表示 $P < 0.01$)

Fig. 6 Effects of phototherapy on TNF- α and SOD expression levels in plasma and hippocampus of sleep-deprived mice (compared with the control group, ** represents $P < 0.01$ and *** represents $P < 0.001$; compared with s-dep group, # represents $P < 0.05$ and ## represents $P < 0.01$)

同程度的上调($P < 0.05$), s-dep+300 lx 组小鼠血浆和海马中 SOD 表达量的上调较为显著($P < 0.05$), s-dep+100 lx 组、s-dep+900 lx 组与 s-dep 组比较无显著差异。

3.7 光疗对睡眠剥夺小鼠 BDNF-TrkB 通路的影响

由图 7 可以看出:与 control 组比较,s-dep 组小鼠海马内 BDNF、TrkB 和 Akt 的 mRNA 水平均显著降低($P < 0.05$);与 s-dep 组相比,光疗组小鼠

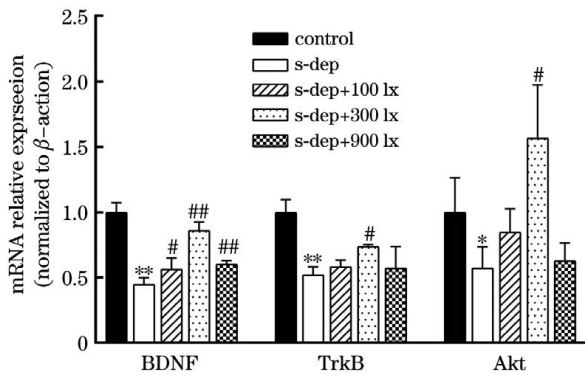


图 7 光疗对睡眠剥夺小鼠 BDNF、TrkB 与 Akt 中 mRNA 表达量的影响(与 control 组相比,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$;与 s-dep 组相比,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$)

Fig. 7 Effects of phototherapy on mRNA expression levels of BDNF, TrkB, and Akt in sleep-deprived mice (compared with the control group, * represents $P < 0.05$ and ** represents $P < 0.01$; compared with s-dep group, # represents $P < 0.05$ and ## represents $P < 0.01$)

BDNF、TrkB 和 Akt 的 mRNA 表达量均呈现不同程度的上升趋势($P < 0.05$)。

4 讨 论

睡眠是人类生命活动的一个重要方面,在中枢神经功能的恢复方面起着重要作用^[13]。良好的睡眠有助于包括学习和记忆在内的认知功能的长期巩固^[14]。视网膜传输的光信号是情绪相关行为的强大调节器,光通过刺激视网膜神经节细胞的神经环路来有效缓解情绪障碍^[15]。Berson 等^[16]研究后发现,自主感光神经节细胞可将光信号通过视网膜下丘脑束传递到视交叉上核、上丘等脑区,参与昼夜节律、睡眠与抑郁等多种非成像视觉功能。本课题组采用边剥夺边干预的方式对小鼠进行 468 nm 蓝光干预,结果发现,睡眠剥夺小鼠的体重明显下降。这可能是睡眠不足造成的,另外旋转圆筒的体力消耗也可能导致小鼠体力消耗而导致其体重下降。与 s-dep 组相比,光照治疗后小鼠体重稍有上升。在本实验中,旋转圆筒剥夺法间歇时间的设置虽然使小鼠有放松时间,但仍有可能使小鼠疲劳。之前使用较多的是多平台水环境法,该方法易导致小鼠频繁落水,体力消耗极大,无法进行长期睡眠剥夺实验,而旋转圆筒法能够模拟人类长期睡眠不足的状态,且不需要实验人员长期看守,是睡眠剥夺造模的一种较为有效的方法^[17]。研究发现,与 control 组

比较,s-dep 组小鼠在水迷宫实验中的游泳潜伏期明显延长,平台交叉次数和目标象限活动时间减少,而光疗干预可以有效缓解这种趋势,特别是当光照剂量为 300 lx 时,游泳潜伏期显著减少,目标象限活动时间延长。旷场实验结果表明:与 s-dep 组相比,光疗组小鼠在中间区域活动的时间明显增加,自发活动时间延长,焦虑样行为减轻。这一实验结果与相关文献报道吻合。Xie 等^[18]通过水迷宫实验和旷场实验发现,慢性睡眠碎片模型小鼠的空间学习记忆障碍和焦虑样行为加重。Zhang 等^[5]评估睡眠剥夺对大鼠学习和空间记忆的影响后发现,睡眠剥夺 5 d 后,大鼠的游泳潜伏期和总游泳距离比正常组显著增加 2.3 倍和 3.2 倍($P < 0.01$)。Xing 等^[19]发现,小鼠白天暴露于蓝光(40 Hz 闪烁频率)1 h 可以显著改善昼夜节律相移,降低睡眠剥夺引起的记忆缺陷的程度。连雨铮等^[20]的研究也表明 300 lx 蓝光照射对大鼠有抗抑郁及促进睡眠的作用。任超然课题组^[21]实时记录了接受光疗的小鼠在进行空间记忆任务时海马 CA1 区场电位的变化,并发现光疗可特异性增强海马神经元的 Gamma 振荡。因此,由记忆损伤导致的认知障碍可能是由睡眠障碍导致的,而采用 468 nm 蓝光照射对由海马调控的小鼠睡眠记忆损伤具有修复调控作用。

睡眠在调节大脑功能与各种神经递质(如多巴胺、5-HT 和 γ -氨基丁酸)之间的复杂相互作用中起着重要作用^[22]。长期睡眠剥夺和睡眠异常是导致严重抑郁障碍的重要危险因素,但其潜在机制目前尚不清楚^[23]。Wang 等^[24]研究后发现,5-HT 缺乏可能与长期抑郁、焦虑样行为相关。睡眠剥夺组小鼠血浆中的 5-HT 浓度较对照组低,焦虑样行为更严重。Grass 等^[25]的研究表明光照能通过白蛋白与胆红素结合物传导直接激活 5-HT 合成的关键酶——色氨酸脱羧酶,从而提高 5-HT 的合成效率,发挥抗抑郁的作用,这与本研究结果一致。睡眠剥夺导致小鼠血浆和海马中的 5-HT 表达量减少,中央区域的自发活动减少,焦虑样行为严重,而光疗组小鼠血浆和海马中的 5-HT 表达量增加,缓解了小鼠的焦虑样行为。因此,光疗可以通过有效缓解小鼠的焦虑及抑郁状态来改善睡眠剥夺引起的记忆缺损。在睡眠剥夺应激刺激过程中,机体在氧化应激反应中会产生炎症反应,并释放一系列炎性因子^[2]。TNF- α 是炎症反应中的重要促炎因子,TNF- α 表达量过高可能会加重炎症反应,引起细胞凋亡,导致功能失调。在本研究中,睡眠剥夺小鼠血浆和海马中

TNF- α 炎症因子的表达水平升高,符合应激模型的特征,说明睡眠剥夺可能介导炎症机制,进而损害认知功能。光疗干预可以抑制促炎因子的表达,光照强度为 300 lx 时,TNF- α 表达量明显下降,抑制效果最好;但当光照强度达到 900 lx 时,TNF- α 表达量又出现上升,这可能是由于光照会产生双相剂量反应,其中低水平的光比高水平的光对刺激和修复组织有更好的效果^[26]。黄晓宇等^[27]研究发现,天王补心丹改善睡眠剥夺大鼠学习记忆可能是通过升高抗炎因子表达、抑制促炎因子(TNF- α 、IL-1 β 和 MCP-1)分泌实现的。因此,光疗可能是通过抑制炎症因子的表达来缓解睡眠剥夺造成的记忆损伤的。睡眠剥夺会影响免疫和氧化还原系统,导致活性氧增多,产生强烈的氧化应激反应。此外,清除能力下降也是活性氧增多的一个原因^[28]。SOD 是机体中具有重要抗氧化作用的酶,是目前广泛应用的氧化应激指标,其水平直接反映机体清除活性氧簇的能力,对维持机体氧化和抗氧化平衡具有至关重要的作用^[29-30]。在本研究中,s-dep 组小鼠的 SOD 活性下降,而采用不同剂量的光照干预后,SOD 活性均有不同程度的升高。这说明光疗干预可以增强小鼠的抗氧化酶活性,清除体内的活性氧,减轻氧化应激反应。这与国内外的研究结果一致。Salehpour 等^[31]将 810 nm 近红外激光经颅送到小鼠头部进行光疗(每天 1 次,持续 3 天),结果显示:近红外光生物调节可预防睡眠剥夺所致的认知障碍,近红外生物治疗增强了睡眠剥夺小鼠海马组织的抗氧化状态和线粒体活性。可见,光疗可以通过调节海马区的氧化应激平衡和炎症反应来缓解小鼠由睡眠剥夺导致的记忆缺失以及情绪障碍。

BDNF 可以介导与睡眠期间记忆处理功能相关的突触可塑性变化,在认知和情绪等方面发挥着重要作用^[32],BDNF 可以促进人脑的神经可塑性、神经元分化、突触的生长与传递以及神经递质的调节^[33]。有研究表明,完全睡眠剥夺可以降低大鼠海马区的 BDNF 表达并使其空间记忆形成受损,促进 BDNF 表达被认为是一种有效缓解睡眠障碍的途径^[34]。通过药物治疗或非药理学策略,可以恢复中枢神经系统中受损的神经传递和神经营养状态。伏立诺他可以改善睡眠剥夺小鼠海马区 BDNF 水平的降低趋势,其通过上调组蛋白乙酰化来阻止睡眠剥夺介导的表观遗传变化,保留海马体中神经营养因子通路,防止或逆转长期可塑性和记忆中的损害^[35]。Cassilhas 等^[36]研究发现,阻力和有氧运动

通过 BDNF-TrkB-CaMKII 通路改善了空间学习和记忆能力。在本研究中,睡眠剥夺降低了海马区 BDNF-TrkB 信号通路中 mRNA 的表达量,海马体的神经营养水平下降,可能导致神经受损和突触可塑性,进而导致情绪障碍和认知障碍;光照干预提高了基因的表达量,BDNF 可能通过结合 TrkB 受体来激活 Akt 通路,促进了海马突触后 NMDA 受体磷酸化,增强了 NMDA 受体的活性,导致突触前后的长时程增强,从而增强学习记忆功能^[37]。长时程增强可以提高 BDNF 中的 mRNA 水平^[38],在一定程度上减缓小鼠学习记忆水平的下降趋势。因此,光疗可能通过影响 BDNF-TrkB 信号通路的基因表达来促进与海马记忆相关的突触可塑性。

5 结 论

本课题组首先建立小鼠睡眠剥夺模型,然后选用蓝光作为干预手段,从动物行为学、细胞因子、与脑内学习记忆有关的神经递质以及突触可塑性等方面探讨了改善睡眠剥夺小鼠学习记忆的机制。光照治疗具有以下作用:1)明显缩短小鼠游泳潜伏期,增加睡眠剥夺小鼠的探索行为;2)上调 5-HT 的表达量,缓解小鼠的焦虑抑郁行为;3)减轻小鼠血浆和海马区炎症因子 TNF- α 的表达,促进抗氧化酶表达,调节氧化还原平衡;4)上调 BDNF-TrkB 通路中的 BDNF、TrkB 和 Akt 基因表达。光疗有可能是通过减轻海马区神经炎症因子的表达、调节氧化还原平衡和突触可塑性来改善睡眠剥夺小鼠学习记忆能力的,因此,探索睡眠障碍患者体内多种氧化应激指标的变化以及 BDNF 信号通路,有助于了解睡眠障碍的发生机制,发现新的治疗靶点。光疗作用后,小鼠海马区电生理特性的变化、光疗如何通过照射视网膜通路对小鼠学习记忆进行精确调控,以及海马参与的神经环路机制等需要进一步研究探讨。

参 考 文 献

- [1] Chai Y, Fang Z, Yang F N, et al. Two nights of recovery sleep restores hippocampal connectivity but not episodic memory after total sleep deprivation[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 8774.
- [2] Yin C, You Q Y, Zhang M Y, et al. Effect of Shenghuitang on learning memory, levels of IL-6, TNF- α and COX-2 in hippocampus of chronic sleep deprivation mice[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2019, 25 (1): 96-100.

- 尹超, 游秋云, 张美娅, 等. 生慧汤对慢性睡眠剥夺小鼠学习记忆及海马 IL-6, TNF- α , COX-2 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 96-100.
- [3] Baratta A M, Buck S A, Buchla A D, et al. Sex differences in hippocampal memory and kynurenic acid formation following acute sleep deprivation in rats[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 6963.
- [4] Zhang X X, He M X, Zhao J W, et al. Effect of 0.1 THz radiation on excitability of hippocampal neurons in sprague dawley rats[J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207023.
张欣欣, 何明霞, 赵晋武, 等. 0.1 THz 辐射对大鼠海马神经元兴奋性的影响[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207023.
- [5] Zhang Q, Su G W, Zhao T T, et al. The memory improving effects of round scad (*Decapterus maruadsi*) hydrolysates on sleep deprivation-induced memory deficits in rats via antioxidant and neurotrophic pathways[J]. Food & Function, 2019, 10(12): 7733-7744.
- [6] Liu Y B, Wang W Z, Jiang Y T, et al. Regulating sleep clinical research based on terahertz needle irradiation acupoints [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2013, 50(10): 101701.
刘玉波, 王万智, 姜永涛, 等. 基于太赫兹针照射穴位的睡眠调节临床研究[J]. 激光与光电子学进展, 2013, 50(10): 101701.
- [7] American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders[M]. 3rd ed. Gao H, Transl. Beijing: People's Medical Publishing House, 2017: 128-133.
美国睡眠医学会. 睡眠障碍国际分类[M]. 3 版. 高和, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 128-133.
- [8] Chen H L, Wang Y H, Tu W J, et al. Effects of photobiomodulation combined with MSCs transplantation on the repair of spinal cord injury in rat[J]. Journal of Cellular Physiology, 2021, 236(2): 921-930.
- [9] Wu H J, Zang Z Y, Pan Z H, et al. Combined effects of low level laser therapy and inducers on the neural differentiation of mesenchymal stem cells[J]. IEEE Access, 2021, 9: 28946-28953.
- [10] Zhou X Y, Li J F, Zhou X M. Research on LED temperature spectral compensation based on visual and non-visual effects[J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(19): 1933001.
周湘艳, 李剑飞, 周晓明. 基于视觉与非视觉效应的 LED 温度光谱补偿研究[J]. 光学学报, 2021, 41(19): 1933001.
- [11] Lu Y H, Wang Y R, Jin S Z, et al. Influence of different wavelength blue LED on human optical biorhythm effect[J]. Chinese Journal of Luminescence, 2013, 34(8): 1061-1065.
鲁玉红, 王毓蓉, 金尚忠, 等. 不同波长蓝光 LED 对人体光生物节律效应的影响[J]. 发光学报, 2013, 34(8): 1061-1065.
- [12] Zhang P F, Zhang T W, Song W Y, et al. Review of advances in ophthalmic optical imaging technologies from several mouse retinal imaging methods [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207003.
张鹏飞, 张廷玮, 宋维业, 等. 从小鼠视网膜多种成像方式探讨眼科光学成像技术进展[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207003.
- [13] Cordeira J, Kolluru S S, Rosenblatt H, et al. Learning and memory are impaired in the object recognition task during metestrus/diestrus and after sleep deprivation [J]. Behavioural Brain Research, 2018, 339: 124-129.
- [14] Ma Z, Wang P, You Q Y. Discussion on the relevance of sleep, sleep deprivation and learning and memory [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2014, 29(4): 995-997.
马哲, 王平, 游秋云. 睡眠及睡眠剥夺与学习记忆的相关性探讨[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(4): 995-997.
- [15] Huang L, Xi Y, Peng Y F, et al. A visual circuit related to habenula underlies the antidepressive effects of light therapy[J]. Neuron, 2019, 102(1): 128-142.e8.
- [16] Berson D M, Dunn F A, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock [J]. Science, 2002, 295(5557): 1070-1073.
- [17] Liu T, Yu J, Qian Z Q, et al. Effect of two sleep deprivation methods on mood, learning and memory of mice [J]. Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition), 2018, 46(5): 77-82.
刘陶, 郁婧, 钱召强, 等. 两种睡眠剥夺模型对小鼠情绪和学习记忆的影响[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2018, 46(5): 77-82.
- [18] Xie Y, Ba L, Wang M, et al. Chronic sleep fragmentation shares similar pathogenesis with neurodegenerative diseases: endosome-autophagosome-lysosome pathway dysfunction and microglia-mediated neuroinflammation [J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2020, 26(2): 215-227.
- [19] Xing F, Fang X, Gong X D, et al. Photoacoustic treatment mitigates cognitive dysfunction in a model of sleep-wake rhythm disturbance [J]. Neural Regeneration Research, 2020, 15(6): 1094-1101.
- [20] Lian Y Z, Meng Q H, Jiang J J, et al. The influence

- of blue light on anxiety, depression, and sleep of rats [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2016, 43(18): 3398-3401, 3405.
- 连雨峥, 孟庆贺, 蒋建军, 等. 蓝光对大鼠焦虑、抑郁及睡眠的影响[J]. *现代预防医学*, 2016, 43(18): 3398-3401, 3405.
- [21] Huang X D, Huang P C, Huang L, et al. A visual circuit related to the nucleus reuniens for the spatial-memory-promoting effects of light treatment [J]. *Neuron*, 2021, 109(2): 347-362.
- [22] Stenberg D. Neuroanatomy and neurochemistry of sleep [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2007, 64(10): 1187-1204.
- [23] Xia M S, Li Z X, Li S, et al. Sleep deprivation selectively down-regulates astrocytic 5-HT_{2B} receptors and triggers depressive-like behaviors via stimulating P₂X₇ receptors in mice[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2020, 36(11): 1259-1270.
- [24] Wang Y, Liu Y, Xiong J W, et al. Reduced serotonin impairs long-term depression in basolateral amygdala complex and causes anxiety-like behaviors in a mouse model of perimenopause[J]. *Experimental Neurology*, 2019, 321: 113030.
- [25] Grass F, Kasper S. Humoral phototransduction: light transportation in the blood, and possible biological effects[J]. *Medical Hypotheses*, 2008, 71(2): 314-317.
- [26] Courtois E, Boulefour W, Guy J B, et al. Mechanisms of PhotoBioModulation (PBM) focused on oral mucositis prevention and treatment: a scoping review[J]. *BMC Oral Health*, 2021, 21(1): 220.
- [27] Huang X Y, Xie G J, Li H, et al. Effect of modified Tianwang buxidan on learning and memory function and expression of inflammatory factors in sleep-deprived rats [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2020, 26(23): 56-62. 黄晓宇, 谢光璟, 李浩, 等. 天王补心丹加减对睡眠剥夺大鼠学习记忆及炎症因子表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(23): 56-62.
- [28] Li T, Cao R N, Xia R, et al. Effects of 72 hours sleep deprivation on liver circadian clock gene expression and oxidative stress in rats[J]. *Yangtze Medicine*, 2017, 1(4): 194-201.
- [29] Liu Y Q, Liu H, Han P L, et al. Protective effect of bilobalide on myocardial ischemia/reperfusion injury of rats via anti-inflammation and anti-oxidation [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2019, 33(4): 241-249.
- 刘永强, 刘辉, 韩培立, 等. 银杏内酯通过抗炎和抗氧化保护缺血再灌注导致的大鼠心肌损伤[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(4): 241-249.
- [30] Han G, Gao J J, Tu M R, et al. Effect of photobiomodulation mediated by 808 nm laser on active oxygen steady-state in CCC-ESFs under high glucose environment [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(9): 0917001. 韩广, 高静静, 屠梦茹, 等. 808 nm 激光介导的光生物调节对高糖环境下成纤维细胞活性氧稳态的影响[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(9): 0917001.
- [31] Salehpour F, Farajdokht F, Erfani M, et al. Transcranial near-infrared photobiomodulation attenuates memory impairment and hippocampal oxidative stress in sleep-deprived mice [J]. *Brain Research*, 2018, 1682: 36-43.
- [32] Rahmani M, Rahmani F, Rezaei N. The brain-derived neurotrophic factor: missing link between sleep deprivation, insomnia, and depression [J]. *Neurochemical Research*, 2020, 45(2): 221-231.
- [33] Monteiro B C, Monteiro S, Candida M, et al. Relationship between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and sleep on depression: a critical review [J]. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health: CP & EMH*, 2017, 13: 213-219.
- [34] Duan R F, Liu X H, Wang T H, et al. Histone acetylation regulation in sleep deprivation-induced spatial memory impairment [J]. *Neurochemical Research*, 2016, 41(9): 2223-2232.
- [35] Wong L W, Chong Y S, Wong W L E, et al. Inhibition of histone deacetylase reinstates hippocampus-dependent long-term synaptic plasticity and associative memory in sleep-deprived mice [J]. *Cerebral Cortex*, 2020, 30(7): 4169-4182.
- [36] Cassilhas R C, Lee K S, Fernandes J, et al. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms[J]. *Neuroscience*, 2012, 202: 309-317.
- [37] Leal G, Bramham C R, Duarte C B. BDNF and hippocampal synaptic plasticity [J]. *Vitamins and Hormones*, 2017, 104: 153-195.
- [38] Song Z. The changes of BDNF and IL-4 in mice hippocampal tissue of different periods of sleep deprivation and their possible correlation [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2018. 宋赞. 不同时长睡眠剥夺小鼠海马组织 BDNF、IL-4 表达变化及相关性研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2018.

Effects of Phototherapy on Learning Memory and BDNF-TrkB Signaling Pathway in Sleep-Deprived Mice

Chen Hongli^{1,2}, Gao Jingjing², Jiang Zhongdi², Wang Zhongpeng^{1*}, Chen Long¹,
Ming Dong¹

¹Academy of Medical Engineering and Translational Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

²School of Life Sciences, Tiangong University, Tianjin 300387, China

Abstract

Objective With the accelerating pace of life, the pressure is getting bigger and bigger, and people are threatened by sleep deprivation because of lack of sleep. Hippocampus is closely related to memory function. Prolonged sleep deprivation tends to damage the hippocampus, leading to reduced learning and memory capacity, depressed mood, reduced immune function, and a range of mental illnesses. Presently, the main treatments for sleep deprivation are sedative drugs and acupuncture in Chinese medicine. Recently, phototherapy has been widely studied for its advantages of non-invasive, safe, and fewer side effects, and it can regulate the biological rhythm. Therefore, this study investigated the effects of light therapy on the inflammatory response, oxidative stress, and BDNF-TrkB signaling pathway in sleep-deprived mice and discussed the effects of phototherapy on learning and memory of sleep-deprived mice, providing a clinical basis for the regulation of sleep disorders using light therapy.

Methods In this study, mice were trained in a water maze for six days for learning and memory skills, which was mainly divided into navigation experiment and space search experiment. Finally, the swimming latency and the times of crossing the original platform were recorded. Then the sleep deprivation model was established by rotating the cylinder, and the mice were randomly divided into the control group, sleep deprivation group, and phototherapy group (468 nm, 100 lx, 300 lx, and 900 lx). The phototherapy group was treated during deprivation. Every morning and evening, the mice in each group were illuminated for 30 min. After deprivation for three days, the mice in each group were weighed and recorded. Then, behavioral experiments were conducted: water maze experiment and open field experiment. The learning and memory degree of mice was tested using water maze test, and the anxiety and depression degree of mice was tested using the open field test. After that, the brain tissue of mice was sampled, and the expression levels of TNF- α , SOD, and 5-HT factors in plasma and hippocampus of mice were detected using ELISA. RT-PCR was used to detect the gene expression of BDNF, TrkB, and Akt in mice.

Results and Discussions The results showed that compared with the control group, sleep deprivation resulted in the weight loss of mice (Fig. 2). The water maze test showed that the swimming latency of sleep-deprived mice increased, the number of platform crossings decreased (Table 2), and the activity of the mice in the target quadrant reduced (Fig. 3), suggesting that memory was impaired in mice. Open field experiments showed that the percentage of time in the central area of sleep-deprived mice in the total area decreased (Fig. 4), the spontaneous activity of mice decreased, and anxiety was obvious. At the same time, sleep deprivation resulted in reduced 5-HT expression in plasma and hippocampus (Fig. 5), increased TNF- α expression, and reduced SOD expression (Fig. 6), also, it reduced the gene expressions of BDNF, TrkB, and Akt (Fig. 7). After the phototherapy intervention, the phototherapy group mice had a slight increase in body weight, and the swimming latency of the phototherapy group was shorter, the number of platform crossings was higher (Table 2), and the percentage of time spent active in the target quadrant increased (Fig. 3). The time percentage of the central area in the total area of mice was increased (Fig. 4), and the anxiety-like behavior of mice was alleviated. The expression of 5-HT showed an upward trend (Fig. 5), which played an antidepressant role and relieved the anxiety state of mice. The expression of the inflammatory factor TNF- α decreased, which reduced the occurrence of inflammatory reaction, and the expression of antioxidant enzyme activity in mice increased (Fig. 6), which might mitigate the oxidative stress damage caused by sleep deprivation. The mRNA expression of BDNF, TrkB, and Akt increased (Fig. 7). BDNF enhanced synaptic plasticity, possibly by activating the Akt pathway after binding to TrkB receptors, enhancing learning, and memory functions. Overall, the effect of the 300 lx light dose was significant.

Conclusions In this study, we investigated the effects of phototherapy on the learning and memory abilities of

sleep-deprived mice by establishing a sleep deprivation model. We discovered that sleep deprivation significantly decreased the learning and memory abilities of mice and produced anxiety-like behaviors, while the combination of 468 nm blue light treatment prevented the increase of inflammatory response, improved the antioxidant capacity of hippocampal tissue, regulated the expression of BDNF-TrkB signaling pathway genes, enhanced inter-synaptic transmission, and effectively improved the learning and memory abilities of mice.

Key words medical optics; phototherapy; sleep deprivation; oxidative stress; learning and memory; synaptic plasticity