黄红,姜宁,吕静薇,等. 不同时间睡眠干扰致小鼠体力疲劳模型的建立［J］. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 16-20.
Huang H, Jiang N, Lyu JW, et al. Physical fatigue induced by sleep interruption in mice［J］. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 16-20.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.003

不同时间睡眠干扰致小鼠体力疲劳模型的建立

黄　红[1,2],姜　宁[2],吕静薇[2],杨玉洁[3],陈碧清[1],王　琼[3],刘新民[2*],吕光华[1,4*]

(1. 成都中医药大学药学院,成都　611137;2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所,北京　100193;
3. 西南医科大学药学院药理教研室,四川 泸州　646000; 4. 成都中医药大学民族医药学院,成都　611137)

【摘要】　目的　研究不同时间睡眠干扰(sleep interruption,SI)后所致小鼠体力疲劳,为缓解体力疲劳产品研发提供稳定可靠的动物模型。**方法**　使用滚筒睡眠干扰仪对小鼠进行不同时间(5, 10, 15 d)睡眠干扰后,对各组动物进行转轮实验和负重游泳实验,并测定小鼠肝糖原和血清尿素氮的含量。**结果**　转轮实验中,睡眠干扰 5 d、10 d、15 d 组与对照组比较时间有减少的趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。睡眠干扰 10 d、15 d 组与空白对照组比较,负重游泳力竭时间明显缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$),下沉次数和下沉总时间显著减少($P < 0.01$, $P < 0.01$)。干扰 5 d、10 d、15 d 组与对照组比较,肝糖原含量明显降低($P < 0.05$);干扰 10 d、15 d 组与对照组比较,血清尿素氮含量显著升高($P < 0.05$)。**结论**　滚筒法睡眠干扰(滚动参数 3 r/min,每转 1 min,间隔 1 min)10, 15 d 均可引起小鼠的体力疲劳行为学表现。

【关键词】　睡眠干扰;疲劳;转轮;负重游泳;肝糖原;血清尿素氮;小鼠
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2019) 01-0016-05

Physical fatigue induced by sleep interruption in mice

HUANG Hong[1,2], JIANG Ning[2], LYU Jingwei[2], YANG Yujie[3], CHEN Biqing[1],
WANG Qiong[3], LIU Xinmin[2*], LYU Guanghua[1,4*]

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China.
2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100193.
3. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000.
4. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137)

【Abstract】　Objective　To study the physical fatigue behavioral manifestation of mice after sleep interruption (SI) at different timepoints, to provide a stable and reliable animal model for the research and development of general health products. **Methods**　Mice were placed into a rotating drum sleep interferometer for different periods of time (5, 10, and 15 days). Then, the rotating wheel and loaded swimming tests were used to assess the behavioral activities of mice after SI. The hepatic glycogen and serum urea nitrogen levels were used to assess the biochemical index after SI. **Results**　In the rotating wheel exhausted test, the exhausted time of SI in the 5 d, 10 d and 15 d groups were decreased compared with the control group, but with a non-significant difference ($P > 0.05$). In the loaded swimming test, compared with the control

[基金项目]四川省教育厅科研创新团队项目(18TD0017);四川省科技计划项目(19ZDYF0603);人类疾病动物模型平台(2016-I2M-2-006)中国医学科学院创新工程。
[作者简介]黄红(1993—),女,在读硕士研究生,主要研究方向:中药品种、质量及资源利用。E-mail: 455951769@qq.com
[通信作者]刘新民(1962—),男,研究员,博士生导师,研究方向:中药神经药理及实验方法研究。E-mail: liuxinmin@hotmail.com
吕光华(1965—),男,教授,博士生导师,研究方向:中药/民族药鉴定及资源利用。E-mail: lughcd@aliyun.com　*共同通信作者

group, the mice after SI for 10 and 15 days showed significantly decreased exhaustive time ($P< 0.05$, $P < 0.01$), sink frequency and total sink time ($P < 0.01$, $P < 0.01$). In addition, our study demonstrated that the content of hepatic glycogen was significantly reduced in mice after SI for 5, 10, and 15 days ($P < 0.05$) compared with the control group, and that the serum urea nitrogen level of mice after SI for 10 and 15 days was increased ($P < 0.05$). **Conclusions** A mouse model of physical fatigue behavior can be established by sleep interruption using a sleep interruption apparatus set at rotation speed, 20 s per revolution; and rotation frequency, rotating 1 min after 1 min pause for 10 days and 15 days.

【Keywords】 sleep interruption(SI); fatigue; rotating wheel; loaded swimming test; hepatic glycogen; serum urea nitrogen; mice

疲劳是一种渐进性主观感受,造成疲劳的原因可分为生理性(即运动性)和心理性。生理(运动)疲劳是肌肉暂时无法保持最佳的身体机能,并且会随着剧烈的运动而越发严重的状态[1-3]。根据 1982 年第五届国际运动生化会议,运动性疲劳是指,机体生理过程不能持续其机能在一特定水平或各器官不能维持预定的运动强度。在我国,40 岁以上的白领阶层中,75%属于亚健康人群,40%主诉慢性疲劳[4]。因此,筛选具有抗疲劳或改善疲劳的保健食品/药物,是当今科学研究的一大热点。目前,动物研究中常见的疲劳模型主要有跑台[5]、游泳[6]、束缚[7]、睡眠剥夺(水平台法)[8]等。本实验室前期研究结果表明滚筒法睡眠干扰(sleep interruption, SI)可导致小鼠学习记忆障碍[9-10]和抑郁等脑力疲劳[11-12]。本实验采用滚筒法对动物进行不同时间的睡眠干扰,研究造成小鼠体力疲劳的干扰强度,为体力疲劳慢性模型的建立和防护产品研发提供一种稳定可靠的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

ICR 雄性小鼠 48 只,SPF 级,体重 21~23 g,5~6 周龄,来源于北京维通利华实验动物公司[SCXK(京) 2016-0006]。实验在中国医学科学院药用植物研究所动物实验设施内进行[SYXK (京) 2018-0020],伦理委员会审批号:SLXD-201803170028,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。动物实验遵守国际实验动物伦理学要求。动物适应性喂养 3 d 后,按体重分为睡眠干扰 5 d 组、10 d 组、15 d 组和空白对照组,每组 12 只,自由饮食饮水。实验室安静,温度 24℃,12 h 照明/12 h 黑暗环境(8:00 a.m.开灯)。

1.2 主要试剂与仪器

血清尿素氮和肝糖原试剂盒,均购于南京建成生物工程研究所。大小鼠睡眠干扰仪、小鼠自主活动实时测试分析处理系统、小鼠转轮式疲劳仪、小鼠负重游泳测试分析系统均由北京康森益友公司、仪康科技(北京)有限公司联合研制;变温紫外-可见分光光度仪(Agilent Cary100,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 睡眠干扰实验

大小鼠睡眠干扰仪由滚筒和控制机箱两部分组成。自行设定控制参数,使干扰仪以不同模式转动对滚筒内饲养动物进行不同时长睡眠干扰。睡眠干扰组:先将睡眠干扰 15 d 组放入滚筒内,5 d 后将睡眠干扰 10 d 组放入滚筒内,10 d 后将睡眠干扰 5 d 组放入。滚筒直径 40 cm、长 22 cm,每个滚筒放一组动物(12 只),滚动参数为:3 r/min,每转 1 min,间隔 1 min;在干扰造模时间点取出测试组进行行为学检测,测试完毕后继续放入滚筒进行睡眠干扰,直至行为学检测完全结束。对照组常规饲养。

1.3.2 转轮实验

于滚筒法睡眠干扰第 16 天,采用转轮式疲劳仪进行测试,条件:转速 25 r/min、刺激电流 0.2 mA[13]。转轮底端有刺激电流,为避免电击,小鼠必须保持跑动状态。当小鼠力竭时,会跟不上转轮速度,滑到转轮底端,小鼠身体触碰到整个电路造成短路,转轮停止转动,仪器自动记录力竭时间。

1.3.3 负重游泳实验

于滚筒法睡眠干扰第 17 天将小鼠置于独立自动检测的游泳箱中游泳,水温(25 ± 0.5)℃[14],鼠尾根部负荷 10%体重的铅皮[15],水深≥ 25 cm。自动记录小鼠自游泳开始至力竭时间段内的行为。力竭时间从小鼠头部沉入水中,经 7 s 仍不能返回水面为止。游泳结束后,立即捞出小鼠,擦干小鼠身上的水分,放回原来的笼中。

1.3.4 生化指标的测定

于负重游泳实验前半个小时对各组小鼠禁食,负重游泳实验结束半小时后,取血,4℃静置 4 h,低温离心后,分取血清。小鼠脱臼处死,取肝组织以

冷生理盐水冲洗,滤纸吸干,于-80℃贮藏。血清尿素氮和肝糖原的含量按试剂盒说明书测定。

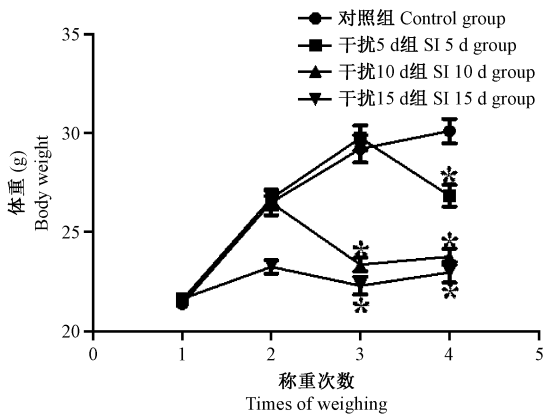
1.4 统计学方法

应用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析,结果用平均数±标准误差($\bar{x}\pm s\bar{x}$)的方式表示,用单因素方差分析和 t 检验分析组间差异。分析结果用 GraphPad Prism Software 5.0 绘制。$P < 0.05$ 表示数据差异有显著性。

2 结果

2.1 不同睡眠干扰时间对小鼠体重的影响

图 1 显示,经过 5, 10, 15 d 睡眠干扰后,与对照组比较,睡眠干扰组体重均明显降低($P < 0.05$)。



注:SI,睡眠干扰;下图同。小鼠每 5 d 称重一次。各干扰组与对照组比较,* $P < 0.05$。

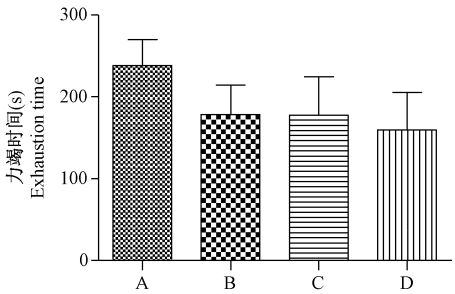
图 1 不同睡眠干扰时间对小鼠体重的影响

Note. SI, sleep interruption; the same in the following figures. Mice were weighed every 5 days. SI groups compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Effect of different sleep interruption time on the body weight of mice

2.2 不同睡眠干扰时间对小鼠转轮力竭时间的影响

由图 2 可见,各睡眠干扰组与对照组比较,转轮力竭时间差异无显著性($P > 0.05$),但呈现出干扰时间越长,小鼠力竭时间减少的趋势。



注:A:对照组;B:干扰 5 d 组;C:干扰 10 d 组;D:干扰 15 d 组。

图 2 不同睡眠干扰时间对小鼠转轮力竭时间的影响

Note. A: Control group; B: SI 5 d group; C: SI 10 d group; D: SI 15 d group.

Figure 2 Effects of different sleep interruption times on the rotating wheel exhausted test time

2.3 不同睡眠干扰时间对小鼠负重游泳力竭时间的影响

游泳实验结果如表 1 所示。表 1 中,睡眠干扰 10 d、15 d 组与空白对照组比较,负重游泳力竭时间明显缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$);睡眠干扰 5 d 组与对照组差异无显著性($P > 0.05$)。下沉次数和下沉总时间反映了小鼠在负重游泳过程中的耐力,耐力程度与下沉次数和下沉总时间成正比。睡眠干扰 10 d、15 d 组与正常对照组比较,下沉次数和下沉总时间显著减少($P < 0.01$);睡眠干扰 5 d 组与对照组差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 不同睡眠干扰时间对小鼠负重游泳的影响($\bar{x}\pm s\bar{x}$, $n = 12$)

Table 1 Effect of different sleep interruption times on loaded swimming

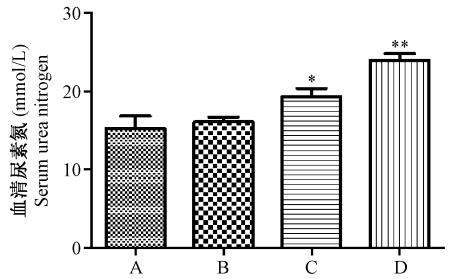
组别 Groups	力竭时间(s) Exhaustive time (ET)	下沉次数 Sink frequency (SF)	下沉总时间(s) Total sink time (TST)	首次下沉时间(s) First sink time (FST)	首次连续下沉时间(s) Continuous sink time (CST)
空白对照组 Control group	261.26 ± 33.39	40.13 ± 7.38	72.75 ± 11.51	69.06 ± 21.12	103.81 ± 26.65
干扰 5 d 组 SI 5 d group	258.90 ± 57.22	26.38 ± 9.20	47.66 ± 13.10	90.42 ± 26.57	150.32 ± 27.05
干扰 10 d 组 SI 10 d group	125.57 ± 26.66 *	14.63 ± 3.70 **	31.38 ± 7.42 **	37.19 ± 5.40	50.12 ± 6.98
15 d 干扰组 SI 15 d group	105.87 ± 21.06 **	9.75 ± 1.58 **	25.48 ± 3.22 **	39.55 ± 16.09	66.20 ± 14.18

注:SI,睡眠干扰。与对照组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$。

Note. SI, sleep interruption. SI groups compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4　慢性疲劳模型对小鼠血清尿素氮的影响

如图 3 所示，睡眠干扰 10 d 和 15 d 组的血清尿素氮含量较空白对照组显著升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。而干扰 5 d 组仅有上升趋势，差异无显著性。



注：A：对照组；B：干扰 5 d 组；C：干扰 10 d 组；D：干扰 15 d 组。与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

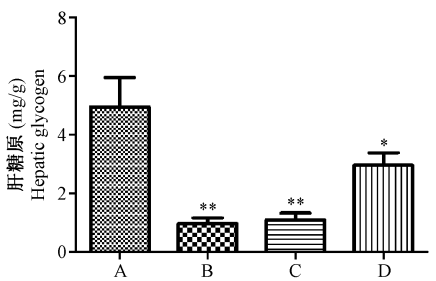
图 3　不同睡眠干扰时间对小鼠血清尿素氮的影响

Note. A: Control group; B: SI 5 d group; C: SI 10 d group; D: SI 15 d group. SI groups compared with the control group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 3　Effects of different sleep interruption times on serum urea nitrogen in the mice

2.5　慢性疲劳模型对小鼠肝糖原的影响

如图 4 所示，睡眠干扰 5 d 和 10 d 组的肝糖原含量较空白对照组显著降低（$P < 0.01$），睡眠干扰 15 d 组的肝糖原含量较空白对照组显著降低（$P < 0.05$）。



注：A：对照组；B：干扰 5 d 组；C：干扰 10 d 组；D：干扰 15 d 组。与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图 4　不同睡眠干扰时间对小鼠肝糖原的影响

Note. A: Control group; B: SI 5 d group; C: SI 10 d group; D: SI 15 d group. SI groups compared with the control group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 4　Effects of different sleep interruption times on hepatic glycogen in the mice

3　讨论

负重游泳时间的长短可以直接反映动物运动疲劳的程度，本实验采用自主研发的小鼠负重游泳实验系统，能采集除力竭时间外的其他评价小鼠耐力的指标[14]。负重游泳力竭实验中，睡眠干扰 10 d、15 d 组与空白对照组比较，首次下沉时间和首次连续下沉时间明显缩短，但是差异无显著性，主要是由于小鼠间存在个体差异；负重游泳力竭时间、下沉次数、下沉总时间等耐力性指标显著缩短，这说明睡眠干扰 10，15 d 均可造成小鼠运动耐力显著下降。转轮实验中各睡眠干扰组与对照组比，呈现出干扰时间越长，小鼠力竭时间越短的趋势，但是差异无显著性。推测本模型造模原理与转轮相似，因此在转轮评价小鼠耐力上不敏感。

糖原的含量能说明疲劳发生的快慢或程度。肌糖原消耗的同时，为维持血糖水平，肝糖原储备量减少[16]。尿素氮含量是蛋白质和氨基酸代谢的重要产物之一，运动负荷增加，机体能量代谢平衡被破坏时，蛋白质分解供能，血中尿素氮的含量增加。其与机体机能、疲劳程度呈正相关[17]。本研究结果显示睡眠干扰各组与空白对照组比较，睡眠干扰各组肝糖原含量均出现显著降低；睡眠干扰 10 d、15 d 组较空白对照组的血清尿素氮含量显著升高。说明由于游泳力竭，小鼠机体代谢糖供应不足，蛋白质开始分解供能。睡眠干扰 5 d 组仅造成了肝糖原与对照组相比降低，负重游泳和血清尿素氮检测结果均为阴性，说明睡眠干扰 5 d 不能造成小鼠的体力疲劳。

综合上述行为学和生化指标检测结果，ICR 小鼠在滚筒式睡眠干扰所致慢性疲劳的行为学表现中，干扰 10 d 和 15 d 均可致小鼠表现出体力疲劳行为，进一步完善后，将为睡眠障碍所致慢性疲劳的发病机制、筛选改善睡眠运动障碍所致体力疲劳药物和保健品的研发提供一种稳定可靠的动物模型。

参考文献：

[1] Gandevia SC. Some central and peripheral factors affecting human motoneuronal output in neuromuscular fatigue [J]. Sports Med, 1992, 13(2): 93-98.

[2] Hagberg M. Muscular endurance and surface electromyogram in isometric and dynamic exercise [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1981, 51(1): 1-7.

[3] Hawley JA, Reilly T. Fatigue revisited [J]. J Sports Sci, 1997, 15(3): 245-246.

[4] 杨菊贤，杜勤. 慢性疲劳与失眠是亚健康的重要表现 [J]. 上海预防医学，2003，15(1)：48-49.

[5] Claghorn GC, Fonseca IA, Thompson Z, et al. Serotonin-mediated central fatigue underlies increased endurance capacity in mice from lines selectively bred for high voluntary wheel running [J]. Physiol Behav, 2016, 161: 145-154.

[6] Ikeuchi M, Koyama T, Takahashi J, et al. Effects of astaxanthin supplementation on exercise-induced fatigue in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(10): 2106-2110.
[7] 王天芳, 陈易新, 季绍良, 等. 慢性束缚致慢性疲劳动物模型的研制及其行为学观察 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(5): 25-29.
[8] Verret L, Fort P, Gervasoni D, et al. Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat [J]. J Comp Neurol, 2010, 495(5): 573-586.
[9] 卜兰兰, 石哲, 武宏伟, 等. 达玛烷苷元对睡眠干扰所致小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(10): 48-53.
[10] Lu C, Shi Z, Dong L, et al. Exploring the effect of ginsenoside Rh1 in a sleep deprivation-induced mouse memory impairment model [J]. Phytother Res, 2017, 31(5): 763-770.
[11] 高江晖, 卜兰兰, 石哲, 等. 不同时间睡眠干扰所致小鼠的类抑郁样行为 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 405-409.
[12] 张北月, 石晋丽, 郑志全, 等. DS-1226 对慢性睡眠干扰所致小鼠抑郁行为的改善作用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 85-89.
[13] 苏成虎, 陈晓农, 杨新波, 等. 水芹提取物抗运动性疲劳作用及初步机制分析 [J]. 解放军药学学报, 2011, 27(2): 103-106.
[14] 谢磊, 李由, 刘新民, 等. 小鼠游泳耐力实验系统的建立与红景天抗疲劳作用的验证 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(5): 71-76.
[15] Takeda K, Takemasa T. Expression of ammonia transporters Rhbg and Rhcg in mouse skeletal muscle and the effect of 6-week training on these proteins [J]. Physiol Rep, 2015, 3(10): e12596.
[16] 何来英, 严卫星, 楼密密, 等. 抗疲劳试验中肝糖原测定的意义探讨 [J]. 中国食品卫生杂志, 1998, 10(6): 1-5.
[17] Dolny DG, Lemon PW. Effect of ambient temperature on protein breakdown during prolonged exercise [J]. J Appl Physiol (1985), 1988, 64(2): 550-555.

〔收稿日期〕2018-08-28

专题计划

2019 年《中国实验动物学报》专题计划

《中国实验动物学报》2019 年第 2 期 **专题:"斑马鱼发育和遗传"**
主持人:王强
E-mail: qiangwang@ioz.ac.cn

《中国实验动物学报》2019 年第 3 期 **专题:非人灵长类动物(树鼩)模型研究及其应用**
主持人:代解杰
E-mail: djj@imbcams.com.cn

《中国实验动物学报》2019 年第 5 期 **专题:感染动物模型与生物安全**
主持人:周晓辉
E-mail: zhouxiaohui@shphc.org.cn

《中国实验动物学报》2019 年第 6 期 **专题:大动物猴和猪的疾病模型研制,评价与应用**
主持人:黄韧
E-mail: 1649405216@qq.com

有相关研究内容请与主持人联系!