

研究生论文集

(第二集)

河南医学院

目 录

自然杀伤细胞活性作为实验小鼠癌免疫指标的初步观察·····杜献堂	(1)
家兔睡眠——觉醒的昼夜节律——电生理学与行为之研究·····和喜梅	(8)
电针对家兔血小板细胞化学的影响·····史学义	(26)
恶性细胞 (BEL—7402, Eca—109), 正常细胞 (CHO) 及其杂交细胞 (109×CHO) 体外浸润能力的研究·····祁岩超	(35)
PEG诱导融合细胞的细胞学和细胞化学观察 ·····白经修	(50)
冬凌草甲素对小鼠白血病L ₁₂₁₀ 细胞动力学的影响·····王绵英	(60)
乙双吗啉对L ₁₂₁₀ , S ₁₈₀ 细胞动力学影响的研究·····于 刚	(78)
冬凌草甲素的HPLC测定及其静注, 静滴后的药物动力学研究·· 韩正铸	(94)
缺血性完全性卒中局部脑血流的临床研究·····柴中民	(113)
眼内铜异物存留的生化和生理观察·····付丙南	(137)
小儿急性淋巴细胞性白血病免疫分型及临床意义·····刘正国	(156)
以全血活化凝固时间 (ACT) 确定体外循环中的足够抗凝·····皮开端	(178)
心肌保护——充氧和不充氧晶体停跳液的作用对比·····李歌丰	(190)
骨内压研究的历史和现状 (文献综述) ·····苑 壮	(204)
家兔胫骨上端骨内高压模型研制与丹参对其降压作用的研究·····苑 壮	(219)
小动脉端侧吻合的血液动力学及组织学实验研究·····孔抗美	(236)
骨内压的动物实验和临床研究——家兔正常骨内压与其影响因素及跟骨骨 内压与顽固性跟痛症的关系·····王义生	(248)
急性淋巴细胞白血病的免疫分型 (文献综述) ·····蔡则玲	(263)
成人急性淋巴细胞白血病的免疫分型和预后·····蔡则玲	(276)
乳酸酸中毒与糖尿病 (文献综述) ·····付亚敏	(298)
糖尿病和服用降糖灵者血浆乳酸测定的临床意义探讨·····付亚敏	(312)
骨髓粒系祖细胞 (GM—CFUc) 体外双层软琼脂培养对20例	

再生障碍性贫血发病机制的研究.....梅瑞莲 (321)

1983

迷走神经切除后的大白鼠胃酸分泌机制

——交感神经系统调节胃酸分泌的可塑性的探讨.....余志武 (339)

文献综述

论文部分

迷走传入冲动的诱发睡眠作用.....高 波 (370)

文献综述

试验研究

姐妹染色单体互换技术的研究现状与应用.....金 霁 (389)

(文献综述)

食管癌病人姐妹染色单体互换频率和染色体断裂频率变化的初步研究 (397)

(论文)

心肌梗塞急性期代谢测定的研究概况

(文献综述).....黄振文 (416)

心肌梗塞急性期血清游离脂肪酸测定的临床价值(论文)黄振文 (422)

自然杀伤细胞活性作为实验小鼠

癌免疫指标的初步观察

导师 杨永年

免疫学专业

研究生 杜献堂

免疫作用在癌的发生、发展和治疗中都起着重要作用^{〔1-4〕}。近年来对癌免疫的研究,发现一群不粘附玻璃和尼龙、无吞噬功能,不具备通常的T细胞和B细胞标志的淋巴细胞。这群细胞不需要预先致敏,就能杀伤靶细胞。故名其为自然杀伤(NK)细胞^{〔1〕}。

根据许多体外实验、动物实验和临床观察证明: NK细胞在发癌早期有防癌作用,而且其活性和癌的进展及转移有相关性^{〔5-10〕}。河南医学院微生物学教研室分离的厌氧棒菌制成的菌苗,经该室和国内许多单位临床和实验观察,和国外报导的C. Parvum类似,是一种良好的佐剂。^{〔11,12〕}2]它能增强机体的癌免疫功能,改善病情,延长存活时间或有助于癌的治愈。^{〔11-13〕}那么C.P(厌氧棒菌菌苗),和NK细胞活性有什么关系呢?因此,我们设想通过观察实验小鼠移植瘤的病情进展和NK细胞活性的关系,以及应用厌氧棒菌苗后,病情进展和NK活性的关系,以确立检测NK细胞活性能否作为癌免疫的一个指标,并可能对癌生物学的深入研究有参考价值。

本实验用¹²⁵I尿嘧啶氧核苷(¹²⁵IUdR)标记的YAC-1细胞作为靶细胞,用小鼠脾细胞制备的细胞作NK细胞,对正常、带移植瘤和用厌氧棒菌苗处理的带瘤小鼠的NK细胞活性作了比较观察。

材料和方法

一、动物及处理

纯系C573BL/6小鼠。上海生物制品研究所动物室供给。体重13—16克,鼠龄6~8周。

恶性网状内皮细胞瘤株(ARS),中国科学院上海药物所引进,小鼠体内传代保种。转引自中国科学院上海细胞生物研究所。

厌氧棒菌苗,河南医学院微生物学教研室分离,上海生物制品研究所制(批号:8105和8115)。

每批实验小鼠按体重分配为4组、每组5只,共20只。两组不接种肿瘤,作为对照。两组接种同系小鼠腹腔传代的ARS腹水0.2毫升,三日后即可见小鼠腹部膨大(ARS在腹腔增殖致)。从接种ARS后三日起,开始给一组正常和一组带瘤小鼠腹腔内注射厌氧棒菌苗,每周二次,每次每只0.5毫克/0.25毫升,一组正常和一组带瘤小鼠腹腔内各注生理盐水0.25毫升作为对照。菌苗接种直到实验时为止。

二、效应细胞的制备^[14]:拉顶处死小鼠,无菌下取脾脏,用不含牛血清组织培养液RPMI1640' L-含氨基酸2 mM HEPES 20mM、青霉素100IU/毫升、链霉素100微克/毫升)洗涤后,剔去结缔组织、剪碎、加适量培养液、轻轻吹打、使细胞分散。经6层湿润纱布过滤,每分钟2000转离心3分钟、弃上清、沉积细胞管内加3—5毫升蒸馏水,吹打混匀,使红细胞溶解,10秒钟后,立即加入等量2张(1.7%)的盐水,混匀,蒸馏以终止低张溶解。再离心使有核细胞沉积。用不含牛血清的培养液再悬浮,经6层湿润纱布过滤,洗涤两次后,用含10%初生牛血清的RPMI1640培养液调成 2×10^7 细胞/毫升。每个小鼠脾脏用该程序可制得 5×10^7 以上的细胞。

过尼龙棉柱:尼龙棉柱如文献(15)所述方法制备,经8P蒸气灭菌。尼龙棉柱用培养液浸湿,和准备过柱的细胞,洗脱培养液,一道于37℃温育30分钟后,用 2×10^7 细胞/毫升的细胞悬液2毫升上柱,温育1小时后,用培养液10毫升洗脱(于37℃),过柱细胞以锥兰染色计数,活细胞数>95%。用培养液调成所需浓度[15]。细胞回收率为40—44%。

三、靶细胞:YAC-1细胞(Moloney病毒诱发的A/Sn小鼠淋巴瘤细胞系,日本东北大学石用教授赠于),悬浮培养于含10%初生牛血清的RPMI1640培养液中。

四、NK细胞活性的检测:

^{125}I UdR:系用北京原子能研究所生产的 ^{125}I 钠盐(比放射性强度140 mci/mg),按文献[16]法合成。

当天传代的YAC-1细胞,每毫升50万细胞,共4毫升。加FUdR(美国Aldrichemico Ltd产)到 10^{-5}M ,加 ^{125}I UdR到终浓度为1~2 uci/ml,在37℃温育3~6小时,用不含牛血清的培养液洗涤三次(水平离心 $200 \times g$,10分钟)再用含10%初生牛血清的RPMI1640培养液调成每毫升 1×10^5 活细胞。

制备好的效应细胞和靶细胞按200:1,100:1,50:1,25:1等不同比例,一式三分加于I号塑料小管(径1厘米容量约为3毫升)中,最后补充培养液到终体积0.6毫升。水平离心 $200 \times g$ 、3分钟,促进效应细胞和靶细胞接触,轻轻振荡后置5%二氧化碳湿孵育器内,于37℃温育20小时。然后水平离心 $800 \times g$,10分钟。每管吸取上清0.3毫升,于r计数器测每分钟脉冲(CPM,同时检测原管内剩下的0.3毫升培养液和沉积的细胞的CPM。按如下公式计算:

$$\text{NK细胞活性}\% = \frac{\text{上清CPM}}{\text{上清CPM} + \text{细胞CPM}} \times 100$$

净NK细胞活性% = NK细胞活性% - 自发释放%

自发释放管内仅含标记的YAC-1靶细胞和培养液、和实验管同时同条件培养, 计算公式如NK细胞活性%^[17]。

结 果

纯系 C57BL/6 小鼠腹腔内接种同系小鼠的ARS腹水0.2毫升后,到第三天均可查出有腹水产生。表明ARS已在小鼠腹腔内增殖。第一周末即可出现大量腹水。第一、二周内腹水可呈现白色混浊。以后渐变为血性。带瘤小鼠于3周内全部死亡。如果从接种ARS后第三日起,开始给带瘤小鼠腹腔内注射厌氧棒菌苗其腹水量中等,第一、二周内呈白色混浊,以后也变为血性。虽然该组动物仍于第四周内全部死亡,但存活时间比未用菌苗的带瘤小鼠普遍延长。给正常小鼠腹腔内注射生理盐水,不引起腹水,也不影响存活时间。给正常小鼠腹腔内注射厌氧棒菌苗,仅于打开腹腔取脾脏时,可见少量浅黄透明腹水,小鼠存活时间未受影响。(见表1、2,表2中,腹水在4毫升以上为大量。2—4毫升为中等量,1毫升上下为少量)

自然杀伤细胞活性是我们在检测的主要免疫指标,在该实验条件下,用¹²⁵IUdR20小时释放法,检测正常的C57BL/6小鼠脾NK细胞活性为25%(22~26.3%)。

在予试验中观察到,带瘤一周的小鼠和正常小鼠的Nk细胞活性没有显著性差异。带瘤两周内的小鼠,净NK细胞活性为22.1%(20~24.5%),较正常对照组无明显差异(P>0.1)。

带瘤三周的小鼠,有大量腹水。小鼠萎靡不振,奄奄一息。较正常组小鼠明显瘦小。净NK细胞活性为5.8%(4~8%)。

加厌氧棒菌苗腹腔注射的带瘤小鼠,虽有中等量腹水,但一般情况较带瘤组小鼠为佳,净NK细胞活性为22%(19~26%)。

正常小鼠腹腔内注射菌苗组,净NK细胞活性为21.5%(19~24%)。

各组之间的T值检验结果显示,正常、正常加菌苗,带瘤加菌苗组之间P>0.1(前三周内),而这三组和带瘤组之间P<0.001。故认为,加厌氧棒菌苗的带瘤小鼠,在三周内,净NK细胞活性可维持正常。而未应用菌苗的带瘤小鼠,第三周净NP细胞活性明显降低到5.8%(表3)。表明厌氧棒菌苗可增强NK细胞活性。

从整个实验结果可以看出,NK细胞活性和实验小鼠瘤的病程进展及动物的存活时间有正相关性。

表1 小鼠存活时间(从带瘤组接种ARS算起,表2、3也是)

	时 间 (周)			
	1	2	3	4
正常小鼠	5/5	5/5	5/5	5/5
正常+菌苗	5/5	5/5	5/5	5/5
带瘤小鼠	5/5	4/5	0/5	—
带瘤+菌苗	5/5	4/5	4/5	1/5

注: 表中所列,分母为该组小鼠只数,分子为该周末存活的小鼠只数

表2 各组小鼠的腹水量和质的比较

	时 间 (周)			
	1	2	3	4
正常小鼠	无	无	无	无
正常+菌苗	无	少	少淡黄青	少
带瘤小鼠	大量	大量白色混浊	大量血性混浊	—
带瘤+菌苗	中等	中等量白色混浊	中等量血性	中等血性

表3 各组小鼠的净NK细胞活性(效应细胞:靶细胞=100:1时)

	时 间 (周)		
	2	3	4
正常小鼠	• 25%(24~63%)	• 24.5%(22~26.2%)	20%
正常+菌苗	未测	• 21.5%(19~24%)	
带瘤小鼠	• 22.1%(20~24.5%)	× 5.8%(4~8%)	
带瘤+菌苗	未测	• 22.0%(19~26%)	2%

注: • • $P > 0.1$ • × $P < 0.001$

第4周为观察动物存活时间所剩动物的量值。

效应细胞:靶细胞=100:1时,数值高而整齐,故选用。

讨 论

目前公认,癌的防御、缓解和治愈的主要机制是细胞免疫。随着对癌免疫研究的深入,认识到自然杀伤(NK)细胞是癌免疫中特异的效应细胞。

首先,NK细胞参于免疫监视。如裸鼠或新生即切除胸腺的小鼠,虽缺如T淋巴细胞,但NK细胞未受影响,其自发或诱生肿瘤的发病率并不增高〔18〕〔19〕。NK细胞活

性低的动物移植瘤的成活率高于NK细胞活性高的动物〔20〕〔21〕。过继NK细胞或NK细胞前体,能增高动物对癌的免疫力〔22〕〔23〕。NK细胞选择性缺乏的beige小鼠,很容易发生淋巴瘤〔24〕。实验也证实,某些转化中的细胞或肿瘤细胞缺乏或仅有极微弱的抗原结构,因而不能触发T细胞。但这些细胞能被NK细胞杀伤。

其次,癌的生长和转移也与NK细胞的活性有关。如:Yamada报导,鸡的羊水能诱生抑制NK细胞活性的细胞,若将鸡羊水注射给日本鹌鹑,则能缩短Rous肉瘤病毒诱生鹌鹑发生Rous肉瘤的潜伏期,降低诱生发瘤所需病毒剂量,加快肉瘤的主长〔25〕。

Gorelik 实验证明,对NK细胞选择性抵抗的3LL细胞系对其敏感的亲代株有更强的转移力〔26〕。

秋亢等报导,一组乳癌病人,术前NK细胞活性明显低下。当彻底摘除肿瘤后,病情好转,NK细胞活性也随之回升。提示,癌瘤的病情进展和NK细胞活性呈正相关关系。〔27〕我们在实验中,给带瘤动物注射厌氧棒菌苗登情缓解,NK细胞活性也维持正常,也提示,癌瘤病情和NK细胞活性呈正相关。这表明,NK细胞作为癌免疫指标可能对鼠类和人都适合。

由上述可见,MK细胞活性和癌瘤的发生、发展、转移及治疗反应均相关。因此,选择NK细胞活性作为癌免疫的指标是适宜的。

需要提出的是,NK细胞虽然是淋巴细胞,但除对癌变细胞有特异的细胞毒性外,没有象T或B淋巴细胞那样的特异性表面标志。据报导LY-5, Qa-1为NK细胞特异性表面标志,但我们未得到这种特异性血清,故未能从实验直接检定NK细胞。就文献报导,小鼠脾脏淋巴细胞中,NuU细胞占27%,其中5—10%为NK细胞〔28〕。就以下几方面说明,我们实验中主要检测的为NK细胞活性。

实验中,把脾细胞悬过尼龙棉柱,除去了粘附细胞(包括多形核白细胞,巨噬细胞和B细胞)。

就特异性细胞免疫过样而言,细胞毒T细胞的产生,需要淋巴细胞首先和抗原接触,经过一定的时间的感应和反应阶段。而我们的实验,效应细胞和靶细胞是首次接触,就表现出细胞毒性,故不可能是细胞毒T细胞的作用。

巨噬细胞的细胞毒作用,一般是在其和靶细胞接触后48~72小时〔7〕才能用同位素释放法检测出来,而本实验是¹²⁵I20小时释放法测出的结果。

因无特异性抗体参予,故也不可能是K细胞的作用。

检测细胞免疫通用的玫瑰花结试验,巨噬细胞移动抑制试验,白细胞贴壁抑制试验以及Tarasaki的细胞毒性试验等方法都不直接反映癌所特有的细胞免疫。由于NK细胞是针对癌免疫的效应细胞,从我们的实验结果及文献都说明,NK细胞活性和癌发生、发展、治愈都相关,故检测NK细胞活性就直接了解了各阶段癌免疫的强弱。同位素释放法检测较其它方法客观、速迅简便。故该法可作为实验动物癌免疫的一个理想指标。对人癌是否也适用,需要更进一步地实验证实。

我们实验中,应用腹水型ARS,效应细胞用脾脏制备。在带瘤的第二周检测NK细胞活性,对照和实验组尚未显出差异,而到第三周才显出显著差异。这可能与肿瘤侵犯的范围及全身的状况有关。Gerson等指出,脾脏NK细胞活性的降低不是带移植瘤

动物的普遍伴随现象,但在癌肿原位NK细胞活性均有明显降低〔29·30〕。这和我们的实验结果是一致的。可认为,在腹水型ARS早期,脾脏NK细胞活性未受影响。晚期下降,可能是由于癌侵入脾脏,或癌的进展,使机体免疫处于抑制状态,或癌侵及骨髓使NK细胞产生减少,或由于癌所致的营养不良影响了NK细胞活性的结果。在以后的实验中,从癌侵及的组织,更好从癌肿原位分离效应细胞,所得的结果可能会更理想。

厌氧棒菌苗是免疫佐剂,已证明其可诱生干扰素,而后者又可增强NK细胞活性适当的剂量或合适的途径应用菌苗可使带瘤机体病情缓解或使肿瘤消退〔31-33〕。其机制可能是厌氧棒菌苗诱生干扰素,可增强NK细胞活性,而活化的NK细胞也可产生干扰素,如此生产一个生物放大效应;另一方面厌氧棒菌苗也可激活巨噬细胞或其它免疫因素。活化的NK细胞、巨噬细胞,干扰素及其它抗癌免疫因素,共同作用带瘤机体,遏抑肿瘤增殖并最终使之消退。

癌的发生是多种因素酿成的,是多种生理功能紊乱的结果。反过来癌的增殖又可造成多种生理性功能紊乱。这也包括NK细胞功能的紊乱。如癌可产生各种抑制因素(各种抑制细胞,可溶性抑制因子,阻塞抗体等)癌可致机体的营养障碍,引起神经内分泌功能紊乱,侵及骨髓、阻遏各种免疫细胞的增殖成熟…。因而在评价癌免疫中,目前还应结合其它癌免疫指标综合判定。虽然这些方法是非特异的,但对判定预后是有帮助的。

摘 要

以国产 ^{125}I 钠盐合成的 ^{125}I udR标记的YAC-1细胞为靶细胞,以小鼠脾细胞的过继细胞作为效应细胞,用 ^{125}I udR 20小时释故法检测正常动物,带瘤动物和带瘤用厌氧棒菌苗处理的动物的NK细胞活性。结果提示: NK细胞活性和实验动物的癌进展及动物的存活时间有相关性。厌氧菌苗增强癌免疫能力可能主要通过活化NK细胞和诱生干扰素。从该实验结果看, NK细胞活性可充作实验动物癌免疫的指标之一。对实验动物NK细胞活性变化的原因、意义作了简单讨论。

参考文献

1. Mathe G. Progress in Immunology I ed by Amos B. 959 1971
2. Mathe G. Progress in Immunology III 959 1976
3. Woodruff Progress in Immunology III 579 1976
4. Klein G. Clinical Immunology Vo. I ed by Bach F.H. 219 1972
5. Herberman R.B. et al Adv. Cancer Res. 27 305 1978
6. Haller O. et al Nature 270 609 1977
7. Herberman R. B. Clinical Immunobiol 4 73 1980
8. Kiessling R. & Wigzell H. in Haller O. ed Current Topics in Microbiology and Immunology 92 107 1981
9. Durdik et al in Terry/Yamamura eds Immunology and Immunotherapy 105 1979
10. Warner N. L. ib (9) 119

11. 袁昕 等 1980年上海厌氧棒菌苗鉴定会材料
12. Milas L. et al Adv. Cancer Res. 26 257 1978
13. Brunda M. J. et al Cancer Res. 40 3211 1980
14. 张宗梁 实验生物学报 12/1 13 1979
15. 李绍康 沈瑞珍 上海免疫学杂志 1/1 10 1981
16. 王球达 上海免疫学通讯 4 63 1980
17. Chang K. S. S. et al Int. J. Cancer 25 405 1980
18. Stutman O. J. Natl Cancer Inst 62 353 1979
19. Newborg M. F. et al J. Immunol 124 571 1980
20. Kiessling R. et al Int. J. Cancer 15 933 1975
21. Habu S. et al J. Immunol 127 34 1980
22. Haller O. et al J. Exp. Med 145 1411 1977
23. Riccardi C. et al J. Immunol 126/4 1284 1981
24. Roder J. C. & Duwe A. K. Nature(London) 278 451 1979
25. Yamada A. et al Japan J. Med. Sci. Biol 161 1981
26. Gorelik E. et al Cancer Immunol Immunother 12 105 1982
27. 秋亢富 临床免疫 13/7 593 1981
28. Reynolds C. W. et al J. Immunol 127 282 1981
30. Eremin O. et al Br J. Cancer 44 166 1981
31. Brunda M. J. Cancer Res 40 3211 1981
32. Flexman J. P. et al Br. J. Cancer 42 41 1980
33. Gatenby D. et al Cancer Immunol Immunother 9 245 1980

家兔睡眠—觉醒的昼夜节律

——电生理学与行为之研究

导 师 徐云五 王雨若

生理学专业

研究生 和喜梅

文献综述

脑电图与睡眠

睡眠和觉醒的周期性交替,是人和高等动物的普遍生理现象。但关于睡眠的机制及其生理意义至今却了解甚少。回顾睡眠研究的历史,最早可追溯到十八世纪,用科学的方法研究睡眠,大约是从一百多年前开始的。

1860——1935年,睡眠研究逐步采用了各种客观的研究方法而成为一门科学。在这段时间发展起来的睡眠研究方法,归纳起来有以下几点: 1、觉醒阈值的测定; 2、睡眠期的机体活动; 3、睡眠的持续时间; 4、心率、呼吸、血压、体温、代谢率、皮肤电反射和肌电图等〔1〕。在脑电图出现以前的这一阶段的发展,比较缓慢,方法学也不太可靠。尽管如此,也为脑电图时代的研究奠定了基础。

1875年,Caton〔2〕首先以电流计从兔及猴的大脑皮层描记出电位波动。1924年,Berger〔3〕第一次用电极在头皮上记录了人脑的电活动,并于1929年发表了他的第一篇论文,但由于历史条件的限制,人们没有重视他的工作。1934年,著名的生理学家Adrian等人〔4〕证实了Berger的观察,从此Berger的工作才得到普遍的承认。1953年以后,脑电图用于睡眠研究,有力地促进了这个领域的研究。1935—1938年,Loomis等人〔5—8〕通过大量的观察把正常人睡眠分为五个阶段,第一次分析了人类自然睡眠的时程与深度:

第一阶段(A)为疲倦或临睡期。此时 α 节律已不那么持续,常间以短暂、逐渐的 α 波减少或消失,额部及前中央区导联且有 θ 活动。

第二阶段(B)为入睡期。此时 α 波逐渐消失,代之以不规则低幅活动以及每秒4—5周的活动。

第三阶段(C)为轻度睡眠期。脑电图前额部和前中央导联爆发短程每秒12—14周的节律(称为睡眠梭状波),每几秒钟出现一次。随着睡眠的加深,波率可增至每秒13—15周,且常间以 θ 必 δ 波。

第四阶段(D)为中度睡眠期。此时脑电图出现每秒1—3周慢波,夹以单个尖波,不规则慢波与单个细小的每秒12—14周睡眠梭状波。额区睡眠梭状波的波率略低,常为每秒13周波节律。

第五阶段(E)为深睡期。大脑前部导联出现不规则的高波幅(300—600 μ v)、每秒0.5—2周 δ 波,两侧虽不同步但对称。慢波上常附添有快活动,深睡眠期有时 δ 波会再次减少。

在睡眠过程中第一、二、三阶段常反复移动。入睡似在第二阶段之末期,作梦主要出现于第二、第三阶段。从睡眠到觉醒大抵经过这几个阶段,但过程变异较多。在睡眠时,身体活动或有内、外因素刺激时脑电图常回到第一阶段的式样。

Gibbs夫妇^[9]在研究睡眠现象时,发现不同年龄的人在睡眠时有不同的式样,而且在不同的脑区域产生独特的式样。他们把睡眠细分为七个阶段:

第一阶段为瞌睡期。新生婴儿至生后一个月,清醒时的脑电图差异较小。其特点为各区有持续,不规则和不对称的慢活动。出生一个多月,在瞌睡期各区出现高波幅慢活动。出生后六个月期间,其波率多为每秒2—4周。一岁时的瞌睡阶段的表现为长程、每秒4—6周高幅慢波。两岁时它转变为短程或爆发性、每秒4—6周高幅慢波,有时夹以尖波,容易被误认为搐搦放电。儿童在瞌睡阶段出现的爆发性高幅慢活动在15岁以后极其少见。在青春期直至20岁时,此期额部导联可见有短程每秒5—7周慢活动。成年人(30—40)在此期则可见到脑波平扁趋势和若干每秒4—7周慢波(十岁前少见)。50—60岁时额区导联可见每秒0.5—2周慢波,易于被误认为慢波灶。

第二阶段为极轻度睡眠期。婴儿的极轻度睡眠期与清醒和深睡时的脑电图不易区别,但生后六个月可见有双顶部驼峰,这就是高幅、两相、棘样波或尖波,其时间为125—333毫秒。3—9岁时驼峰最为明显,在20—30岁时在极轻度睡眠时仍甚显著。但随年龄的增长波幅降低,且仅见于顶区。但在50岁时成人中20%无驼峰。出生后六个月至六岁极轻度睡眠阶段且有每秒20—30周低幅快波并间以驼峰。随着年龄的增长,快活动逐渐消失,它不见于成人。从3—4岁以至成年人极轻度睡眠还可有枕部棘样波或正性棘波。这也可见于其它睡眠阶段,但以极轻度睡眠和轻度睡眠最为显著。

第三阶段为轻度睡眠期。新生婴儿顶区出现低波幅,每秒14周睡眠梭状波。出生后两个月以此为特点。15—20岁时睡眠梭状波幅最高。但30岁以后波幅又逐渐降低。60岁时20%没有这种快活动。略深一点的轻度睡眠可有每秒12—14周梭状波。每秒12周的睡眠梭状波同时出现于两侧大脑半球中央区(14岁以前甚为少见)。但每秒12周的睡眠梭状波以额区波幅为最高,且并不同时出现于大脑两半球(独立性)。老年人每秒12—14周睡眠梭状波的波幅降低,数量减少。

第四阶段为中度深睡期,婴儿在此期睡眠梭状波常不显著或消失。两岁后睡眠梭状波完全消失,出现每秒0.5—3周不规则慢活动,且混有每秒4—8周慢波。三岁之后10—14%正常人在这个阶段有每秒10周睡眠梭状波,它同时出现于两侧大脑半球。

第五阶段为高度深睡期。此期以每秒0.5—2周慢波为主,附有快波。除了颞区外,两侧同步对称。此期老年人则只出现低幅慢波。由于这个原因,老年人的睡眠水平向婴儿一样有时很难确定。

第六阶段为早晨睡眠期。脑电图特点为高幅慢波消失,出现每秒8—9周低幅快波及若干低幅不规则慢波,常持续几分钟或更长时间。

第七阶段为唤醒期。婴儿被唤醒时,脑电图只有轻度改变,所以只依据脑波很难判断

是否真正被唤醒。两岁婴儿50%被唤醒时出现每秒2—4周高幅慢波,并持续几分钟之久。随着年龄的增长而波率增高,波幅下降,5—6岁儿童被唤醒时脑电图出现每秒4—8周慢波。在若干儿童被唤醒时,脑电图可转变为爆发性慢波。容易被误认为是搐搦放电,而成人没有这种爆发性活动。成人的唤醒反应为迅速回到清醒时的脑电图,不须经过高幅慢波阶段。

一般来说,人们接受并一直沿用Loomis等人所描述的五种睡眠形式。然而在研究中,人们观察到一种奇异的现象,但并没有认清其本质。

很早以前,研究者已注意到睡眠期,实验狗突然出现活动(尾巴和唇部活动,发出叫声)。Lucretius很早就把这一部份归属于梦活动。Fontana把伴有“痉挛”的睡眠称为“Sonno Profondo”(深睡)^[10]。当脑电图开始应用于慢性实验时,Derbyshire等人^[11]报告了猫在睡眠过程中,有时行为不安静如触须弹动,并伴有低幅快波的脑电图,很类似觉醒状态。Rheinberger等人^[12]也发现了这种现象。Klaue则详细地描述了慢性猫的两种睡眠状态,并第一次发表了伴有低幅快波的“Tiefen Schlaf”(深睡)的脑电图一文,但遗憾的是这项工作被人们忽略了^[10]。尽管在睡眠期脑电图去同步化或海马电为 θ 节律也有记载,但仍没有详细的资料^[13,14]。Hess等人谈到睡眠猫有时慢波明显的消失,但认为是由于实验者未注意到的刺激所引起的唤醒。Aserinsky等人^[15]发现了睡眠受试者显示出典型的两种眼运动(快和慢)。1955年,他们观察到婴儿睡眠中有两种状态相互交替:一为伴有快速眼运动及肢体活动的睡眠;另一为安静睡眠^[16]。Dement等人^[17]观察到同样情况于成年人的睡眠中。相继又报告了睡眠期间脑电图的周期性变化,机体活动和作梦之间的关系。作梦主要是在低幅快波脑电图、快速眼运动期^[18]。Dement^[19]证实猫的睡眠中存在两种状态,睡眠脑电图周期性地出现低幅快波的变化。1958年以后,人们才清楚地认识到,睡眠是由两种状态组成的,一种是慢波睡眠。另一种是异相睡眠。脑电图类似于觉醒状态,和作梦相关。睡眠二元性的发现,推翻了以前的概念,导致了大量的临床和实验研究。Dement等人^[19]重新把睡眠分为四个阶段:

第一阶段:脑电图的特点是没有睡眠梭状波,即梭状波出现之前的阶段。它包括Loomis等人的A及B阶段和Gibbs等人的瞌睡阶段。

第二阶段:a节律消失,脑电图出现每秒14周睡眠梭状波。在低幅快波背景上,也有若干每秒3—6周慢波及双顶部驼峰(成年人不太显著),每十秒钟出现两个100 μ V以上,每秒1—2周慢波。

第三阶段:脑电图出现每秒3—5周高幅慢波。仍有若干睡眠梭状波以及每十秒出现100 μ V以上,每秒1—2周慢波。

第四阶段:脑电图缓慢地出现长程、每秒0.5—2周的高幅慢波。

第四阶段后的睡眠过程中,出现快速眼运动和肢体活动,此时脑电图为低幅快波,类似第一阶段,但与入睡后的第一个第一阶段睡眠不同,后者不伴随快速眼运动和肢体活动通宵睡眠有次序地进行。例如入睡后脑电图的改变很快地从第一阶段依次转入第四阶段,后者持续约30分钟后睡眠突然变浅,伴有肢体活动,接连很短的第二及第三阶段,继而

又转入第一阶段睡眠,此时脑电图表现为低幅快波。枕部导联有每秒7—10周波爆发,额部导联为每秒18—25周快波,并伴有快速眼运动。当第一眼动周期停止后,脑电图又依次显示第二、三、四阶段的睡眠。约30分钟后又突然出现肢体活动,脑电图随之显示出第三、二和第一阶段睡眠的改变与第二个眼动周期。按睡眠时间长短,这种周期性的改变,每晚可达4—6次。每次持续从第一周期约10分钟至第六周期的约40分钟。其时间约占正常人整夜睡眠的25%(约100分钟),而慢波睡眠则占约75%(青壮年第二阶段占50%;第三、四阶段占20%,第一阶段占5—10%;老年人几乎没有第四阶段睡眠)。且深慢波睡眠主要出现在夜间最初几小时。两种状态交替进行,但有时例外,并不进入到1状态,而进入3或4状态。因此,第一周期是从睡眠发生到第一次眼运动结束;第二周期则从第一次眼运动结束到第二次眼运动结束。以后的周期同第二。

为了更明确地了解睡眠与觉醒,人们又在以前的基础上,详细地划分为下列几相:一、觉醒,二、慢波睡眠(又称同步化睡眠、非快动眼睡眠、普通睡眠),包括瞌睡期(第1状态)、浅慢波睡眠期(第2状态)、中慢波睡眠期(第3状态)、深慢波睡眠期(第4状态),三、异相睡眠(又称去同步化睡眠、快动眼睡眠、主动睡眠)(5,20,21)

Touvet^[10]把异相睡眠中所出现的特殊现象归纳为周期性和紧张性两种。紧张性现象包括:脑电图、海马 θ 节律、肌肉弛缓;周期性现象包括:快速眼运动、脑桥一膝状体—枕叶丛状活动和肌肉抽动。任意剥夺慢波慢波睡眠中的3、4状态或异相睡眠,在恢复期被剥夺相出现补偿的现象,直到恢复正常水平。因此两种状态的睡眠在生理状态下都是必需的。

关于睡眠的功能,目前并不太清楚。根据大量的实验结果,推测睡眠可促进生长、恢复健康,恢复和生长两者都需要新细胞的合成。促进合成过程的某些激素,在慢波睡眠的第3、4期释放量相对增加,如生长激素能促进核糖核酸和蛋白质的合成。而异相睡眠占据了未成年和新生动物睡眠的大部分时间,这与脑的迅速生长有关,也与成年突触联系的维持有关。异相睡眠是大脑合成活动的特殊时间,与每天各种事件的持久记忆所需蛋白质合成密切联系^[22,23]。

睡眠与觉醒交替进行,使得人和动物在觉醒时从事各种活动,睡眠时恢复疲劳,大脑经历一个重新整顿的过程。定时的睡眠和觉醒,这种典型的周期性现象已引起很多学者的注意,推测在中枢神经系统中,存在有生物钟,准确地触发觉醒与睡眠。特别是人类表现出典型的昼夜规律,这是靠“内生昼夜节奏”而取得,一般称为“昼夜”节奏或生物钟。内生昼夜节奏首先是在研究植物叶子近似昼夜运动时发现的,对动物所能表现的这种节律研究的较晚,如节肢动物中色素迁移的起伏,这种起伏甚止在没有光暗变化时候也继续下去。以后脊椎动物和人的体温日进程相续得到研究,人体中最典型的昼夜生理震荡便是睡眠和觉醒,还有排尿、脉搏频率等。对于生物钟的本质,目前处于探索阶段^[24,25]。

随着科学技术的发展,计算机引入了睡眠研究,睡眠脑电图通过频谱分析、相关处理等一系列措施,使得过去目测不能检出的有效信号,大大地得到利用,并逐步建立了一套定量参数,为睡眠研究开辟了新的前景^[26,28]。

家兔睡眠—觉醒的昼夜节律

—电生理学与行为之研究

前 言

睡眠和觉醒是两个对立的生理状态。觉醒时,机体与周期环境进行复杂的感觉运动联系,以适应各种变化;睡眠时,机体对环境刺激的整合反应能力发生了改变,使得个体得到恢复以利于觉醒时进行活动。因此两者都是生理活动所必须的过程。

在各种哺乳动物中睡眠和觉醒的昼夜节律,即有共性,也有种系差异。就我们所见到的文献而言,沙土鼠〔²⁹〕、大白鼠〔³⁰〕、猫〔³¹⁻³²〕、狗〔³³⁻³⁵〕、狒狒〔³⁶〕和人〔³⁷〕的睡眠—觉醒昼夜节律已有详细的研究。但兔睡眠实验资料却比较小,直到1962年,Bonamini等人〔³⁸〕还不承认兔有异相睡眠,Albrecht〔³⁹〕和Faure〔⁴⁰〕则认为存在。1965年,终于得到证实〔⁴¹〕。且与大白鼠、猫、猴的异相睡眠类似〔^{19, 42, 43}〕。异相睡眠期脑温度、脑直流电位的变化以及条件诱导也先后得到研究〔⁴⁴⁻⁴⁶〕。上述异相睡眠和Sawyer等人〔⁴⁷〕所发现的雌兔交配后出现的脑电图后反应即海马高度活动相是一致的。并提出雌兔异相睡眠与其本身的激素状态密切相关。卵巢切除的兔用雌激素处理后,可降低低频率电刺激丘脑或边缘系统所诱发的异相睡眠的阈值。Kauarami等人〔⁴⁸〕认为激素能促进异相睡眠的出现。总之这些研究主要限于异相睡眠方面。关于家兔昼夜睡眠—觉醒的系统资料则迄未见到。为此我们设计了本实验,其目的在于1、确定家兔多周期睡眠—觉醒的基本昼夜节律,为利用家兔作睡眠研究提供根据;2、了解海马电图在不同行为状态下的变化,以便探讨脑与行为之间的关系;3、绒毛膜促性腺激素对异相睡眠的影响,从而证实激素与家兔异相睡眠之间的关系。在研究睡眠—觉醒的昼夜节律时,涉及到后两个问题。

方 法

实验动物为11只健康的未交配繁殖的成年家兔(5雌、6雄),体重3.0—3.5kg。动情素为苯甲酸雌二醇注射液;促性腺激素为注射用绒毛激素(HcG)。动物用氨基甲酸乙酯静脉麻醉(1g/kg),硫化钠脱掉头、颈部的毛。然后固定在立体定位仪上,露颅骨。在左、右顶枕部钻洞,钉入不锈钢螺丝,同心圆电极植入海马背侧,眼眶骨和颈部肌肉埋入电极,分别用于记录脑电图(EEG)、海马电图(HIP)、眼动电图(EOG)和肌电图(EMG)〔⁴⁹〕。最后将引导线连在半微型插座上,牙托粉固定在颅骨上。肌肉注射青霉素,预防感染,整个实验是在半无菌的条件下完成的。一般两天后动物恢复,即可放入隔音箱内饲养,适应新环境。7—19点光照,19—7点黑暗,一周后

进行实验,室内温度保持在19—25℃。

描记时,动物处于自由活动状态,装上插头,引导线通过一组滑轮连接在ND—82 B8道脑电图机上。进行昼夜观察时,8点加入足够的饲料和饮水,为了避免干扰因素,弃去第一小时的描记,从第二小时开始。记录室中除了脑电图机的指示灯外,全部是黑暗的。箱内顶部装一手电灯泡并屏蔽,供夜间观察时用,同时通过玻璃窗观察动物的行为。

六只雌兔用雌二醇预先处理,皮下注射0.1mg,每日一次,使动物发情,第二次处理后几小时,静脉注射HCG(100—300IU),用药前后做对照记录。实验若重复利用一只家兔,则两次间隔需3—5天。全部实验结束后,为了验证电极部位,首先通一直电流,游离铁离子,再用1%亚铁氰化钾福尔马林溶液灌流大脑,福尔马林溶液浸泡,然后组织切片,观察兰点部位是否正确。

结 果

一、家兔睡眠—觉醒各状态的分类

此结果来自10只家兔的实验资料,根据脑电图、海马电图和不同的行为变化特点,将家兔睡眠—觉醒行为分为下列六种,每种状态最短时间不低于20秒。

1.活动期(W)

此期动物进行各种各样的活动,如饮水、进食、“洗脸”、抓痒、舔吃、走动、爬高、两前肢上举、偶尔奔跑,对某种声刺激表现为注意力集中,脑电图特点为每秒11—14周低幅快波,振幅50—100 μ v,脑电图曲线中附有肌电的干扰。海马电图为规则的 θ 节律,随活动强度的不同,其频率和振幅发生变化。肌电活动幅度很大。

2.安静期(Q)

动物卧位或半卧位,安静、但清醒、睁眼,脑电图仍为低幅快波,但无肌电干扰,海马为每秒6—8周 θ 节律,肌电减弱。

3.瞌睡期(D)

动物卧位或半卧位,闭眼或半闭眼,脑电图特点是各导开始出现睡眠梭状波,每秒10—16周,振幅较低120—250 μ v,约20秒出现2—4次。背景波仍为低幅快波。 θ 节律在出现梭状波时消失,代之以不规则慢波。有时出现嘴嚼运动。

4.浅慢波睡眠期(LS—S)

动物卧位、闭眼、偶尔嘴嚼或换位。脑电图为每秒4—6周,振幅逐渐变大为100—300 μ v,睡眠梭状波加大。海马电图为中度不规则慢波。

5.深慢波睡眠期(DS—S)

动物卧位、安静、仍维持一定的肌张力。脑电图为每秒1—3周高幅慢波,振幅200—600 μ v,睡眠梭状波更明显。海马电图为高度不规则慢波。

6.异相睡眠(PS)

此期动物在行为上不安静,头突然低下,贴在地板上,两耳下垂、触须弹动、全身动局部肌肉抽动,眼球发生快速运动,每20秒约2—4次,呈周期性,有时和肌肉抽动

一起发生。有时则单独发生。偶尔有下颌运动。脑电图类似清醒状态。海马电图为每秒7—8周θ节律。肌电消失或微弱，有时与深慢波睡眠时无差异。个别兔子此期眼半闭，则能看到眼球的快速运动。

二、昼夜中各状态所占百分比及分布特点

根据上述分类，各状态计算以分为单位，在24小时记录中，以三小时作为间隔绘图可清楚地看出昼夜睡度—觉醒在不同时间的分布，然后把各状态所占时间累加起来，除以总时间1440分，求出各状态在24小时中百分比分布。每只动物各状态的百分比分布见表1，动物个体差异比较小。只有二只家兔(RSH—15、RSH—16)觉醒时间较短，慢波睡眠延长。在12小时光照、12小时黑暗的昼夜观察中，出现两次睡眠高峰（12—15点和0—3点，个别动物是在15—18点和3—6点），在其它时间内，大部分为活动。活动时其“洗脸”动作总是在进食之后开始。活动最长时间为155分，夜间较白天为多。安静和瞌睡期甚短。浅慢波睡眠时间最短为20秒，最长为13分20秒，平均6分50秒。深慢波睡眠时间最短为20秒，最长为12分，平均6分10秒（个别情况下，出现几秒钟则不计算）。睡眠周期平均为20分。异相睡眠期在昼夜中出现20—38次。昼夜中各状态平均百分比（平均值±标准差）为：活动期 $59.4 \pm 2.9\%$ ，安静清醒期 $4.4 \pm 0.3\%$ ，瞌睡期 $4.2 \pm 0.1\%$ ，浅慢波睡眠期 $12.7 \pm 1.4\%$ ，深慢波睡眠期 $13.8 \pm 1.7\%$ ，异相睡眠期 $5.6 \pm 0.3\%$ ，总睡眠期时间为36.3%。曾观察到一次睡眠时间长达58分钟。

表1. 不同家兔睡眠—觉醒各种状态昼夜中百分比总表

分类 编号	各 种 状 态 百 分 比 分 布					
	活动期	安静期	瞌睡期	浅慢波睡眠期	深慢波睡眠期	异相睡眠
RSH—4♂	61.2	4.9	4.0	11.7	12.5	5.7
RSH—5♂	60.9	4.2	4.1	11.9	13.2	5.7
RSH—6♂	55.3	4.7	4.1	15.4	14.9	5.6
RSH—9♀	60.8	4.2	4.1	12.0	13.5	5.4
RSH—11♀	59.7	4.6	4.3	12.4	13.4	5.6
RSH—13♀	60.2	4.4	4.2	12.4	13.3	5.5
RSH—14♀	61.4	4.2	4.1	11.8	13.5	5.0
RSH—15♂	53.0	3.9	4.3	15.1	18.3	5.4
RSH—16♀	60.1	4.3	4.0	12.4	13.4	5.8
RSH—19♂	60.1	4.5	4.4	11.9	12.0	6.1