

睡眠剥夺对大鼠凝血功能及血红蛋白的影响*

张琼霞¹ 夏中元¹ 苏娃婷¹ 赵博¹ 王雅枫¹ 张元¹ 雷少青¹

[摘要] 目的:探讨睡眠剥夺(SD)对大鼠凝血功能及血红蛋白的影响。方法:将 32 只健康成年雄性 SD 大鼠(220±10)g 采用随机数字表法分为正常笼饲养组(CN 组)、大平台饲养组(TC 组)、睡眠剥夺组(SD 组)及睡眠剥夺恢复组(SR 组),每组各 8 只。采用改良多平台睡眠剥夺法(MMPM)建立睡眠剥夺模型,连续剥夺 5 d,颈内静脉采血,置于抗凝管内,采用全自动血液分析仪进行血细胞计数,包括白细胞总数(WBC)、红细胞总数(RBC)、血红蛋白(Hb)含量及血小板(PLT)计数;采用自动分析仪检测止血参数,包括活化的部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)及纤维蛋白原(FIB)。结果:与 CN 组和 TC 组比较,SD 组大鼠毛色暗淡,易激惹,体重减轻($P<0.05$);WBC 明显增加($P<0.05$),RBC 及 Hb 含量明显减少($P<0.05$),PLT 差异无统计学意义($P>0.05$);APTT、PT 及 TT 值明显延长($P<0.05$),FIB 值明显降低($P<0.05$)。与 SD 组比较,SR 组大鼠 WBC 明显下降($P<0.05$),RBC 及 Hb 含量明显增加($P<0.05$),PLT 及体重差异无统计学意义($P>0.05$);APTT、PT 及 TT 值明显缩短($P<0.05$),FIB 值明显升高($P<0.05$)。SR 组与 CN 组及 TC 组比较,体重明显减轻($P<0.05$),其余值差异无统计学意义($P>0.05$)。CN 组与 TC 组比较,体重、WBC、RBC、Hb、PLT、APTT、PT、TT 及 FIB 值均差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。结论:持续长时间 SD 可能导致大鼠凝血功能障碍及贫血倾向,睡眠剥夺后可通过延长合适的睡眠时间来改善机体的凝血功能障碍及贫血倾向。

[关键词] 睡眠剥夺;凝血功能;血红蛋白

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.08.004

[中图分类号] R554 **[文献标志码]** A

Effects of sleep deprivation on coagulation function and hemoglobin in rats

ZHANG Qiongxia XIA Zhongyuan SU Wating ZHAO Bo

WANG Yafeng ZHANG Yuan LEI Shaoqing

(Department of Anaesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430060, China)

Corresponding author: LEI Shaoqing, E-mail: leishaoqing@163.com

Abstract Objective: To investigate the effects of sleep deprivation on coagulation function and hemoglobin in rats. **Method:** Pathogen-free male Sprague-Dawley rats, weighing (220±10)g, were used in this study. 32 rats were randomly divided into four groups ($n=8$) using a random number table: normal group (group CN), large platform group (group TC), sleep deprivation group (group SD) and sleep recovery group (group SR). The sleep deprivation model was established by a modified multi-platform method (MMPM). Five days after continuous deprivation, the jugular vein was collected and placed in the anticoagulant tube. The blood cell count, including white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb) and platelet (PLT) were measured by automatic blood analyzer. The coagulation was measured by automatic blood analyze, including activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and fiber proteins (FIB). **Result:** Compared with group CN and group TC, group SD had dark coat, irritable and weight loss ($P<0.05$); white blood cell count (WBC) increased significantly ($P<0.05$), red blood cell count (RBC) and hemoglobin (Hb) decreased significantly ($P<0.05$), PLT had no significant change; APTT, PT and TT values were significantly prolonged ($P<0.05$), FIB value was significantly lower ($P<0.05$). Compared with group SD, body weight of rats in group SR had no significant change ($P>0.05$), WBC decreased significantly ($P<0.05$), RBC and Hb content increased significantly ($P<0.05$), and PLT had no significant change ($P>0.05$); APTT, PT and TT values were significantly shorter ($P<0.05$), FIB values

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No:81671891)

¹ 武汉大学人民医院麻醉科(武汉,430060)

通信作者:雷少青, E-mail: leishaoqing@163.com

- [6] 蒋丽江,黄春容,李浩贤,等.妊娠合并特发性血小板减少性紫癜 56 例临床分析[J].现代妇产科进展,2012,21(2):153-154.
- [7] 朱永亮,朱雯雯,周小玉.血栓弹力图在妊娠伴血小板减少症产妇产后出血中的应用探讨[J].临床血液学杂

志(输血与检验),2018,32(2):96-99.

- [8] 马莉,李明,蒋荣珍,等.妊娠合并重度血小板减少 29 例临床分析[J].实用妇产科杂志,2018,30(5):361-365.

(收稿日期:2018-04-26)

were significantly higher($P<0.05$). Compared with group CN and group TC, the body weight of group SR was significantly reduced($P<0.05$), and the rest values did not change significantly. There were no significant differences in body weight, WBC, RBC, Hb, PLT, APTT, PT, TT and FIB between group CN and group TC($P>0.05$).

Conclusion: Sleep deprivation may lead to coagulopathy and anemia. After sleep deprivation, coagulation dysfunction and anemia tendency can be improved by prolonging appropriate sleep time.

Key words sleep deprivation; coagulation; hemoglobin

睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)是指睡眠不足或睡眠质量低下造成的睡眠紊乱及其带来的一系列不良后果^[1]。由于噪声、人工照明、工作压力和疾病等诸多因素,SD已成为当代社会的普遍现象。SD能够引起机体损伤,如学习记忆能力下降、警觉性降低、免疫力下降、胃肠疾病、心血管疾病等,甚至引发猝死^[2-3]。SD对机体的影响极其复杂,然而其对机体造成损伤的原因和机制尚不清楚。

正常状态下,机体凝血及抗凝系统处于动态平衡状态,当凝血功能亢进时,会导致血栓形成,引发各种缺血性疾病,如心肌梗死^[4]。反之抗凝系统活化时,会导致各种出血性疾病。因此,维持两者的动态平衡至关重要。凝血功能障碍及血红蛋白(Hb)减少会对机体产生直接危害,是心脑血管疾病发生和发展的重要机制之一^[5]。然而,长时间持续睡眠剥夺对机体凝血功能及Hb的影响以及通过补充睡眠是否能恢复其正常状态,目前尚不明确。本实验主要通过建立大鼠持续SD模型,检测大鼠血细胞计数及凝血功能,以探讨持续睡眠剥夺对大鼠凝血功能及血红蛋白含量的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF级成年健康雄性大鼠32只,购自辽宁长生生物技术有限公司[SCXK(辽)2015-0001],体重(220 ± 10)g。标准实验环境中饲养(光照12h,温度 $24\pm2^{\circ}\text{C}$,相对湿度45%~50%)。大鼠分笼饲养,5只/笼,整个实验过程中自由摄食饮水。适应性喂养7d后按照随机数字表法分为4组:正常笼饲养组(CN组)、大平台饲养组(TC组)、睡眠剥夺组(SD组)及睡眠剥夺恢复组(SR组),每组各8只。

1.2 实验试剂及仪器

2%戊巴比妥钠(武汉赛维尔生物科技有限公司)、日本Sysmex SF-3000自动化血液分析仪、日本Sysmex-CA7000全自动血凝分析仪及西门子公司生产的试剂。

1.3 模型制备

采用改良多平台睡眠剥夺法(modified multiple platform method, MMPM)建立持续睡眠剥夺模型^[6]。睡眠剥夺箱大小为 $130\text{ cm}\times50\text{ cm}\times50\text{ cm}$,剥夺箱中央放置4个直径为6.5 cm,高

10.0 cm的圆柱形平台,各平台之间的间距为16.0 cm,箱内注水,水面低于平台1.0 cm,水温与室温保持一致,于平台之上15.0 cm处放笼罩,笼罩以平行的不锈钢丝制成,上面放水和食物,大鼠可自由摄食饮水及活动。当大鼠进入快速动眼睡眠时相时,伴随全身肌张力降低,肌肉松弛和节律性垂头,大鼠落入平台下面的水中而惊醒,由于大鼠恐水,将重新爬上站台,并继续以原有姿势维持清醒状态站立,造成持续睡眠剥夺。TC组装置与SD组相似,平台直径为15.0 cm,大鼠在大平台上可以保持完整的睡眠周期,不会落入水中。SR组大鼠在睡眠剥夺5d后,置于大平台上恢复睡眠2d。睡眠剥夺期间,维持12h日光灯照,持续剥夺5d,每日更换睡眠剥夺箱内的水及打扫平台。

1.4 观察大鼠状态

观察各组大鼠毛发光泽程度,有无皮肤、脚趾及鼠尾出血破溃;情绪变化情况,是否易激惹好斗;并记录大鼠每日进食进水量及体重变化。

1.5 采血及血样分析

于第5d禁食,采用2%戊巴比妥钠按照45 mg/kg剂量行腹腔注射将大鼠麻醉,颈内静脉置管。取3.0 ml静脉血于EDTA抗凝管内,采用日本Sysmex SF-3000自动化血液分析仪进行血细胞计数分析,主要检测白细胞总数(WBC)、红细胞总数(RBC)、血红蛋白(Hb)含量及血小板(PLT)。取1.8 ml静脉血与0.2 ml枸橼酸钠抗凝剂充分混合后,3 000 r/min,离心10 min后,采用日本Sysmex-CA7000全自动血凝分析仪进行凝血功能检测,主要检测活化的部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)及纤维蛋白原(FIB)。

1.6 统计学处理

采用GraphPad Prism 6.0软件对所有实验数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态变化

随着睡眠剥夺时间的延长,大鼠生理变化逐渐明显,主要变现为摄食饮水量减少,体重下降;疲乏,打盹间隔时间逐渐缩短;皮毛暗淡、杂乱无光泽;对声音等环境刺激警觉性增强,易激惹,攻击性

强,主要表现为相互撕咬,皮肤黏膜破损出血。而 CN 组及 TC 组大鼠与试验前比较,体重增加,行为正常。SR 组表现为睡眠时间明显延长,与试验前 SD 组和 SR 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1、2。

2.2 各组大鼠血细胞计数及 Hb 的变化

与 CN 组及 TC 组比较,SD 组 WBC 明显增加($P<0.05$),RBC 及 Hb 含量明显减少($P<0.05$),PLT 差异无统计学意义($P>0.05$);与 SD 组比较,SR 组 WBC 明显下降($P<0.05$),RBC 及 Hb 含量明显增加($P<0.05$),PLT 差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 各组大鼠凝血功能变化情况

与 CN 组和 TC 组比较,SD 组大鼠 APTT、PT 及 TT 值明显延长($P<0.05$),FIB 值明显降低($P<0.05$)。SR 组与 SD 组比较,APTT、PT 及 TT 值明显缩短($P<0.05$),FIB 值明显增加($P<$

0.05)。SR 组与 CN 组及 TC 组比较,各值差异无统计学意义($P>0.05$)。CN 组与 TC 组比较,APTT、PT、TT 及 FIB 值差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

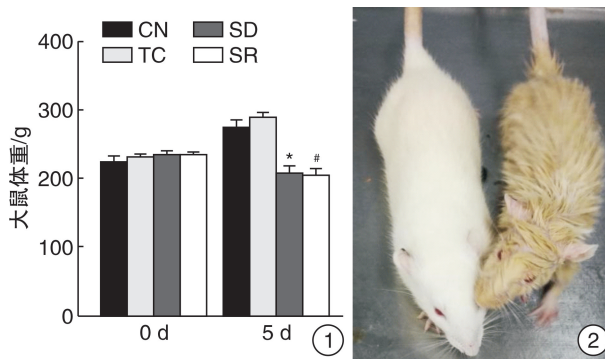


图 1 4 组试验前后比较; 图 2 2 组大鼠比较(左边为 CN 组大鼠,右边为 SD 组大鼠)

表 1 睡眠剥夺后大鼠血细胞计数及 Hb 含量的变化

$\bar{x} \pm s$

指标	CN 组	TC 组	SD 组	SR 组
WBC/ $(\times 10^9 \cdot L^{-1})$	9.37 ± 0.56	9.22 ± 0.48	$10.50 \pm 0.72^{1)2)}$	$9.36 \pm 0.27^{3)}$
RBC/ $(\times 10^{12} \cdot L^{-1})$	7.31 ± 0.56	7.26 ± 0.27	$6.59 \pm 0.48^{1)2)}$	$7.31 \pm 0.28^{3)}$
Hb/ $(g \cdot L^{-1})$	160.49 ± 5.86	161.84 ± 4.67	$146.95 \pm 6.91^{1)2)}$	$161.51 \pm 3.52^{3)}$
PLT/ $(\times 10^9 \cdot L^{-1})$	683.92 ± 9.03	682.19 ± 12.09	683.13 ± 9.09	686.43 ± 7.46

与 CN 组比较,¹⁾ $P<0.05$;与 TC 组比较,²⁾ $P<0.05$;与 SD 组比较,³⁾ $P<0.05$ 。

表 2 睡眠剥夺后大鼠凝血功能的变化

$\bar{x} \pm s$

指标	CN 组	TC 组	SD 组	SR 组
APTT/s	17.91 ± 0.62	17.95 ± 0.80	$20.05 \pm 1.28^{1)2)}$	$18.77 \pm 0.87^{3)}$
PT/s	8.11 ± 0.26	8.12 ± 0.68	$9.52 \pm 0.79^{1)2)}$	$8.50 \pm 0.67^{3)}$
TT/s	15.73 ± 0.66	16.03 ± 0.82	$18.92 \pm 1.06^{1)2)}$	$16.04 \pm 1.45^{3)}$
FIB/ $(g \cdot L^{-1})$	3.66 ± 0.49	3.60 ± 0.48	$2.69 \pm 0.51^{1)2)}$	$3.50 \pm 0.57^{3)}$

与 CN 组比较,¹⁾ $P<0.05$;与 TC 组比较,²⁾ $P<0.05$;与 SD 组比较,³⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

良好的睡眠对于保持机体健康及提高生活质量至关重要。然而,随着生活节奏的加快及工作压力的增加,睡眠时间逐渐缩短。调查发现^[7],在过去的 25 年间,美国成年人的睡眠时间由 8~9 h 缩减到 5~6 h。同时,以医护群体为代表的轮班制工作也是导致睡眠时间缩短,睡眠质量下降的重要原因。研究发现^[8],睡眠剥夺可导致肥胖、高血压、2 型糖尿病及心血管疾病等多种疾病。然而,其对凝血功能及 Hb 含量的影响并不明确。

本实验采用 MMPM 建立睡眠剥夺模型,该法是研究睡眠剥夺最常见的方法。睡眠剥夺 5 d 后,大鼠血细胞计数异常,表现为 WBC 明显增加,RBC 及 Hb 含量明显减少。WBC 增加是全身炎症反应的指标之一,说明 SD 可能造成全身炎症反

应,而炎症反应又是多种疾病发生发展的重要机制之一。RBC 及 Hb 含量明显减少,说明长时间持续 SD 可能导致机体出现贫血倾向;RBC 及 Hb 减少,会导致机体携氧能力减弱,更不易耐受各种缺血性疾病,如心肌梗死等。而贫血本身也会导致心率加快、房颤、室颤、晕厥,甚至休克猝死等疾病^[9]。SR 组大鼠表现为 WBC 回落,RBC 及 Hb 升高,说明睡眠剥夺后延长合适的睡眠时间可以减轻机体炎症反应及改善贫血倾向。

APTT、PT、TT 及 FIB 是反映机体凝血功能的重要指标,升高或降低都具有重要的临床意义。APTT 和 PT 分别反映内、外源性凝血系统状况。APTT 和 PT 延常见于凝血因子或纤维蛋白原缺乏,缩短见于血液高凝状态。TT 主要反映纤维蛋白原转化为纤维蛋白的时间,增高见于 DIC 纤溶

亢进期或低纤维蛋白原血症,降低无临床意义。FIB反映纤维蛋白原的含量。本实验中发现长时间持续SD可引起APTT、PT及TT延长,FIB值降低,说明长时间持续SD可导致机体出现出血倾向。而恢复睡眠,可以改善机体凝血功能障碍。由于大部分凝血因子及纤维蛋白原均由肝脏合成,因此,长时间持续SD可能造成肝功能障碍。肝功能损伤后引起凝血因子及纤维蛋白原合成受阻,引发凝血功能障碍。因此,需要进一步进行肝功能检测加以明确。Pinotti等^[10]研究发现,慢性睡眠剥夺会导致凝血因子VII缺乏,恢复睡眠,凝血因子VII表达增加,与我们的实验结果一致。然而,Liu等^[11]及Tosur等^[12]研究发现,成年人睡眠剥夺后,APTT、PT及TT缩短,凝血因子表达增加,与上述实验结果矛盾,这可能与睡眠剥夺的时间长短及方式有关。因此,连续动态的监测睡眠剥夺过程中的凝血状态的变化可以更真实的反映SD对机体凝血功能的影响。SR组大鼠APTT、PT及TT缩短,FIB值升高,表明睡眠剥夺对凝血功能的影响具有可逆性,通过延长合适的睡眠时间可以改善凝血功能障碍。

综上所述,良好的睡眠对于维持机体正常功能至关重要,SD可导致机体出现炎症反应、贫血倾向及凝血功能障碍,恢复睡眠后可使影响减轻。然而,SD对于凝血功能及血红蛋白影响的具体机制及深层原因还需要进一步研究,为SD损伤机体凝血功能及血红蛋白减少的治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Abrams RM. Sleep Deprivation[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2015, 42: 493—506.
- [2] Sá-Nunes A, Bizzarro B, Egydio F, et al. The dual effect of paradoxical sleep deprivation on murine immune functions[J]. J of Neuroimmunol, 2016, 290: 9—14.
- [3] Cakici M, Dogan A, Cetin M, et al. Negative Effects of Acute Sleep Deprivation on Left Ventricular Functions and Cardiac Repolarization in Healthy Young Adults[J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2015, 38: 713—722.
- [4] Deng CJ, Jin LP, Cheng W, et al. The Effect of Thrombus Aspiration in the Elderly Patients with Acute ST-segment Elevation Myocardial Infarction During the Direct Percutaneous Coronary Intervention[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2015, 37: 464—471.
- [5] Wu AHB, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases[J]. Am J Cardiol, 2001, 87: 1361—1366.
- [6] Han C, Feng L, Jie M, et al. Distinct behavioral and brain changes after different durations of the modified multiple platform method on rats: An animal model of central fatigue[J]. PLoS One, 2017, 12: e0176850.
- [7] Fang J, Wheaton AG, Keenan NL, et al. Association of Sleep Duration and Hypertension Among US Adults Varies by Age and Sex[J]. Am J Hypertens, 2012, 25: 335—341.
- [8] Velasco E, Koban M, Hoffman G. The Role of Sleep Time in Weight Status, Cardiovascular Disease and Diabetes Mellitus[J]. Ann Epidemiol, 2010, 20: 702—702.
- [9] Westenbrink BD, Alings M, Granger CB, et al. Anemia is associated with bleeding and mortality, but not stroke, in patients with atrial fibrillation: Insights from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) trial[J]. Am Heart J, 2017, 185: 140—149.
- [10] Pinotti M, Bertolucci C, Frigato E, et al. Chronic sleep deprivation markedly reduces coagulation factor VII expression[J]. Haematologica, 2010, 95: 1429—1432.
- [11] Liu H, Wang G, Luan G, et al. Effects of sleep and sleep deprivation on blood cell count and hemostasis parameters in healthy humans[J]. J Thromb Thrombolysis, 2009, 28: 46—49.
- [12] Tosur Z, Green D, De Chavez PJ, et al. The association between sleep characteristics and prothrombotic markers in a population-based sample: Chicago Area Sleep Study[J]. Sleep Medicine, 2014, 15: 973—978.

(收稿日期: 2018-01-19)