

剝奪大白鼠反常睡眠對睡眠型式之影響

李 蘊 香* 吳 京 一**

摘 要

本實驗即以電網法剝奪大白鼠反常睡眠，而比較剝奪前、後之生活型式。生活型式一般分為覺醒期，正常睡眠期及反常睡眠期之三種，而這次以新皮質、古皮質（杏仁核）、舊皮質（海馬核）等之腦波及眼肌肌電圖作為對象。所得之結果如次：

1. 剝奪反常睡眠前，其在一日 24 小時內，覺醒期佔 44%，睡眠期為 56%（44：56），其中正常睡眠為 42%，反常睡眠為 14%。剝奪反常睡眠 6 日後，其覺醒期與睡眠期之比例不變（46：54），但正常睡眠有顯著性的減少為 35%（ $P < 0.05$ ），而反常睡眠有顯著性的增加為 20%（ $P < 0.05$ ），因此可以認為反常睡眠確實為動物所需要者。

2. 動物被剝奪反常睡眠六日後，在海馬核（n-hippocampus）內，出現叢發性腦波（burst wave），但經休息六日後不再出現，而其睡眠型式完全恢復到未剝奪前之型式。

3. 若與其他剝奪反常睡眠之方法，如水池法、踏磨法或喚醒法所得之結果比較時，本電網法所得之數據很接近其他剝奪方法所得之結果，認為用本方法剝奪反常睡眠是相當良好且正確之方法之一。

緒 言

Dement (9) 首先用選擇性斷眠法來探討睡眠的生理後，研究者以人（2, 20），貓（5, 7, 15, 35, 37, 38, 40），兔子（22），大白鼠（26, 27, 30, 39, 43, 44）等為實驗對象，用藥理學（3, 15, 16, 18, 24, 25, 31, 33, 36），腦及腦幹的切除（21, 23, 29），電刺激（1, 6, 32）等方法，探索睡眠機制，而至今其報告亦多。惟這些報告中所採用的選擇性斷眠法不外為：踏磨法（treadmill method）（26, 27）、水池法（water pool method）（5, 7, 13, 30, 35）或傳

統的喚醒法（classical arousal method）（13, 30）等。踏磨法易造成動物的疲憊（21），而且會嚴重的干擾正常睡眠（26, 27, 42）；水池法易使動物潮濕；傳統的喚醒法即所需人力甚多，不易施行。本實驗經設計而改用沒有上述現象的電網刺激法以剝奪大白鼠之反常睡眠，欲比較其他剝奪法之結果，並探討反常睡眠之本質為目的。

材料及方法

(1) 電極的種植

以八隻體重 200～250 公克的大白鼠為實驗動物。以 sodium pentobarbital 麻醉後，雙極針電極

*台灣省立教育學院，科學教育系，生物組

**國立台灣師範大學，生物研究所

種至杏仁核 (A: 5.0, L: 3.5, V: -3.2), 海馬核 (A: 3.0 L: 5.2 V: 2.4) (14) 的位置。兩極間距離 1.0 ~ 1.2 mm。以螺絲電極置於眼眶骨及皮質。不關電極置於鼻骨上。然後所有電極與七孔插座連結並以牙科用固定劑固定於頭骨上。上述手術完畢後, 讓動物送回飼養室, 經過三星期以上的回復期後才供於記錄腦波。

(2) 記錄的方法

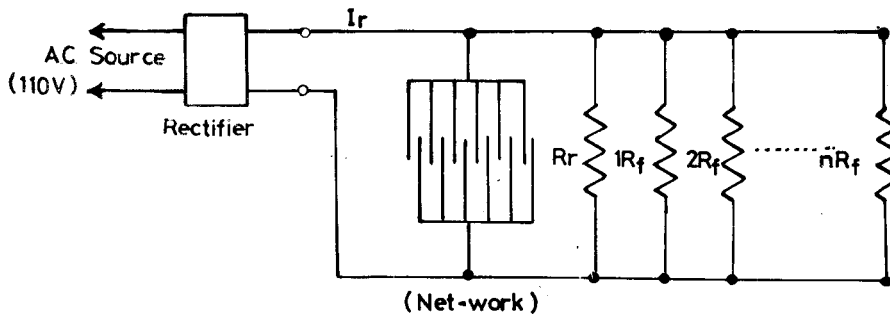
每次之記錄, 皆須使大白鼠適應實驗 (記錄) 環境 1 ~ 2 小時後才開始記錄。每次記錄由上午九點鐘開始至第二日上午九時為止共記錄 24 小時。

記錄使用多用途記錄裝置 (time constant; 0.3 sec, high frequency; cut off)。記錄紙通常以 0.25 mm/sec 的速度移動, 但必要時改用 30 mm/sec 的速度。記錄時之室溫、濕度、光線皆維持自然狀態, 並無特殊處理。惟夜間為了操作儀器及肉眼觀察大白鼠行為起見使用小燈泡, 其光能在離 30 cm 被照物為 $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。

每隻大白鼠至少記錄兩次以上的正常腦波、剝奪反常睡眠後第一恢復日 (first rebound day)、第六恢復日等, 三種情況之腦波。

(3) 剝奪反常睡眠之方法

記錄動物的正常腦波 24 小時兩次後, 每隻動物只容許有覺醒及正常睡眠 (orthodoxal sleep O.S), 而被剝奪反常睡眠 (paradoxical sleep P.S)。剝奪 P.S 的方法為電網刺激法, 此方法極為簡便。即取一小燒杯 (直徑為 5.5 cm. 200.c.c.), 置於通有 0.3 ~ 0.6 mA 的裸銅絲網 (網絲直徑 1.6 mm) 上。電流強度即見體重之大小而有差異。體重大, 所需之 A 即較小。老鼠因逃避電擊, 蹲於燒杯上。大多數的老鼠僅訓練 7 ~ 8 次就可以學習到逃避電擊之方法而蹲在燒杯上。電網上有蓋子, 一方面防止老鼠之逃走, 一方面也可用給水瓶, 充分供給水分。在此狀況下, 大白鼠只能進入 O.S。當其進入 P.S 時, 因全身肌肉緊張性消失, 尤其頸部肌肉鬆弛太甚 (8, 10, 11, 17, 19, 21, 43), 身體會滑落於電網上, 因而觸電醒來並會即時爬回小燒杯上。大白鼠受到電擊後, 因恐懼會有排尿或排便, 因此每日定時給食時 (每日 8:00 a.m 及 4:00 p.m) 掃除電網上的糞便, 並用砂紙把電網磨亮, 不使因而生銹而不觸電。如此可做 6 日之剝奪 P.S (圖一、圖二)。



圖一 R_r : rat resistance (about 150 ~ 200 K Ω)

R_f : rat's feces resistance (about 10 K Ω)

V_r : voltage of net-work terminal

$$\therefore I = \frac{V}{R}$$

$$\therefore I_r = \frac{V_r}{R_r} \quad (\text{with 1 rat})$$

$$I_r = \frac{V_r}{R_r} + 1 \frac{V_r}{R_f} \quad (\text{with 1 rat and 1 feces})$$

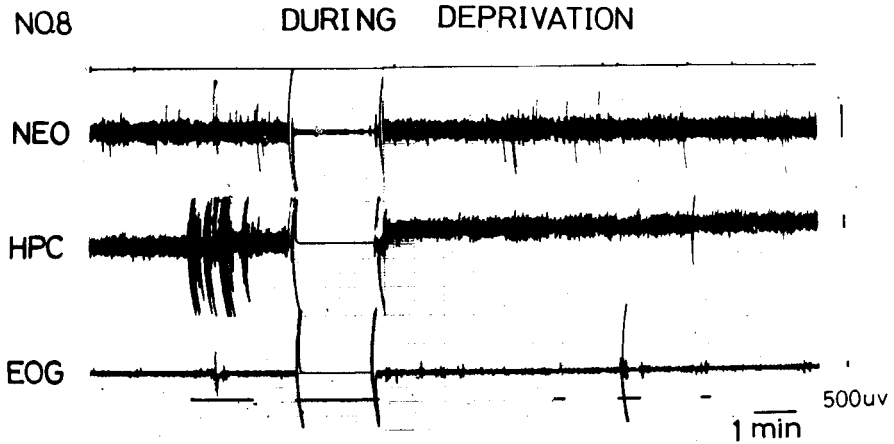
$$I_r = \frac{V_r}{R_r} + n \frac{V_r}{R_f} \quad (\text{with 1 rat and n feces})$$

(4) 電極位置的確認

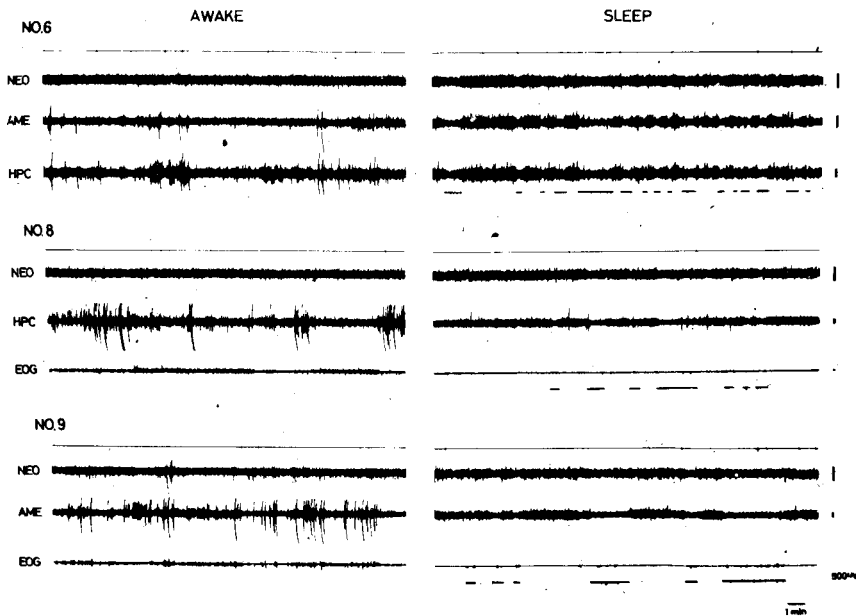
當電極正確插入杏仁核、海馬核的位置時可記錄到 30 ~ 60 c/s, 100 ~ 150 μ V 的損傷電位及嗅覺刺激所引起的誘發電位。待所有實驗結束後, 以 3 mA 的直流電通過該腦組織 15 秒使凝固,

經過福馬林固定取出腦部, 做成 15 μ 的連續切片, 以 Klüver 氏法染色確定電極位置。

腦波的分析是以一分鐘為單位, 以下列特徵為準, 以腦波分為三種, 即覺醒期, O.S 期, P.S 期, 且再加以參考當時的肉眼觀察所得之大白鼠行為特



圖二 正在剝奪反常睡眠時的腦波, NEO : 新皮質, HPC : 海馬核, EOG : 眼肌肌電圖 有黑線部分: 動物因在反常睡眠而滑落在電網上醒來時。無黑線部分: 動物在正常睡眠



圖三 三種皮質在覺醒期, 正常睡眠期及反常睡眠期的腦波及眼肌肌電圖。 NEO : 新皮質, AME : 古皮質 (杏仁核), HPC : 舊皮質 (海馬核), EOG : 眼肌肌電圖。左列: 覺醒期, 右列: 睡眠期。 右列中 無黑線部分: 正常睡眠期 (O.S) 有黑線部分: 反常睡眠期 (P.S)

徵。

(1) 覺醒期：此時動物運動活潑，皮質有25~30 c/s, 100 μ V的速波出現，杏仁核有15~20 c/s, 30 μ V, 海馬核有20~30 c/s, 100 μ V左右的海馬覺醒波 (hippocampul arousal wave) 之出現，眼肌的肌電圖有尖形電位。

(2) O.S期 (正常睡眠期)：此時動物的運動停止，眼瞼下垂，皮質有11~15 c/s, 400 μ V的同步慢波 (synchronized slow wave)；杏仁核、海馬核各為5~8 c/s, 80 μ V及8~10 c/s, 400 μ V波出現，在眼肌電圖上即沒有尖形電位。

(3) P.S期 (反常睡眠期)：此期即經O.S期後才出現。由外表看來，全身肌肉鬆弛，偶有觸鬚或下顎的嚼動。在較長的睡眠時間中，O.S期與P.S期會交替出現。在此期，皮質有25~30 c/s, 100~150 μ V, 杏仁核7 c/s, 50 μ V之慢波出現，但常有14 c/s左右的速波混雜着。海馬核為14~25 c/s, 150 μ V的速波，眼肌電圖上也可看到尖形電位。(圖三)

結 果

1. 未剝奪P.S時之腦波

若以24小時為單位，分析每分鐘的腦波時，覺醒期的平均總時間為635分，佔24小時的44%；O.S期為605分，佔42%，P.S期為199分，佔14%。若以總睡眠時間 (total sleeping time) 為100%，則O.S佔75%，P.S佔25%。

在24小時內O.S出現138次，而P.S即有111次。O.S持續時間有24分鐘者，但也只有1分鐘者，其平均為4.69分。P.S之最長持續時間為10分鐘，最短的也有1分鐘者，平均為1.84分鐘 (表一，圖三)

將一日24小時的腦波依睡眠之深淺的程度為縱軸，時間為橫軸做成連續圖，可看出大白鼠的睡眠為多週期性，圖四示其一例。

2. 剝奪P.S對腦波及睡眠型式的影響

比較剝奪P.S前及剝奪後第一日、第六日的腦波時，剝奪後第一恢復日的睡眠期中海馬核常有叢發性腦波 (burst wave) 出現，但在剝奪後第六日

表一 剝奪反常睡眠前、後的覺醒期(A)，正常睡眠(O.S)及反常睡眠(P.S)的時間百分比，出現頻率及持續時間的比較 (8隻老鼠)

	CONDITION	CONTROL	TEST
A	TAT(min.)	635 \pm 79 Δ	600 \pm 90
	TAT/24 hr (%)	44.08 \pm 2.49	45.86 \pm 3.27
O.S.	TOT(min.)	605 \pm 56	496 \pm 69 *
	TOT/24 hr.	42.08 \pm 2.87	34.47 \pm 2.81 *
	TOT/TST (%)	75.32 \pm 2.62	63.78 \pm 5.69
	Freq./24 hr	138 \pm 8	115 \pm 6
	Mean (min)	4.69 \pm 1.38	4.41 \pm 0.85
P.S.	TPT(min)	199 \pm 34	283 \pm 40 *
	TPT/24 hr	13.86 \pm 1.36	19.67 \pm 2.19 *
	TPT/TST (%)	24.76 \pm 2.72	36.22 \pm 5.69
	Freq./24 hr	111 \pm 16	105 \pm 7
	Mean (min)	1.84 \pm 0.33	2.71 \pm 0.37 *

TAT: Total awaking time

TOT: Total Ortho-sleeping time

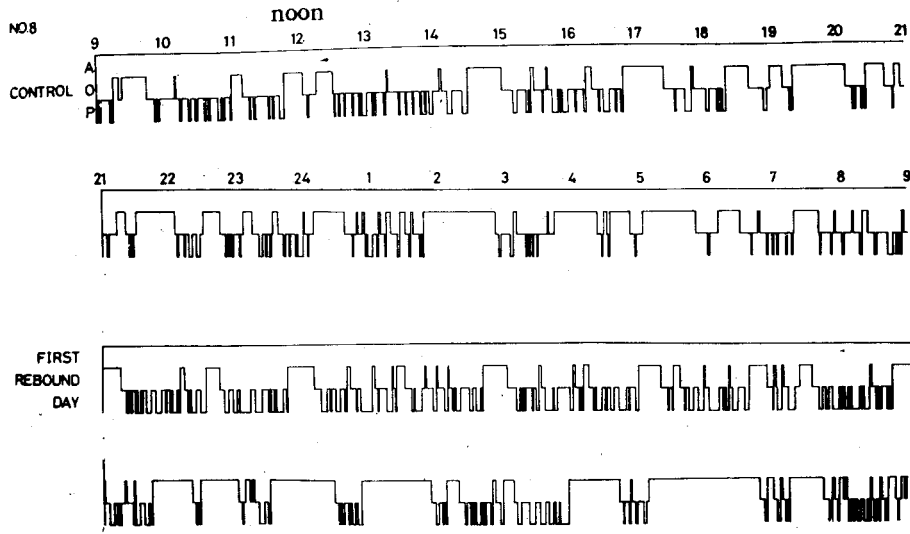
TST: Total sleeping time

TPT: Total Para-sleeping time

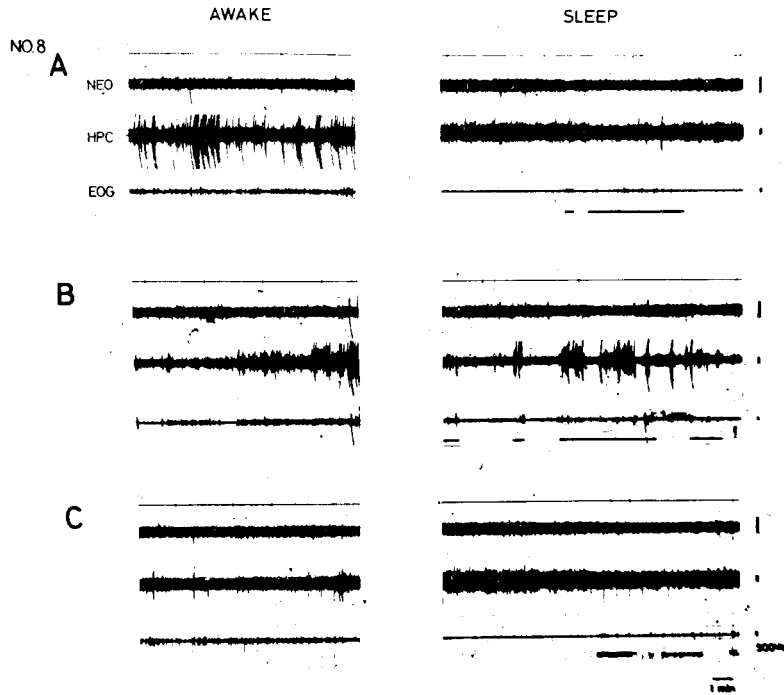
Mean: Mean time of duration of sleeping

* 有顯著性 (P < 0.05)

Δ 平均值 \pm 標準偏差



圖四 同一老鼠在剝奪反常睡眠前、後之24小時連續記錄腦波分布圖。腦波分為A：覺醒期，O：正常睡眠期，P：反常睡眠期。Control：未剝奪前之腦波。FIRST REBOUND DAY：剝奪反常睡眠6日後之第一恢復日。上面數字為小時，睡眠持續時間以振幅之寬度來表示。



圖五 同一老鼠剝奪反常睡眠前、後之腦波及眼肌肌電圖。A行：剝奪前，B行：剝奪反常睡眠6日後第一恢復日，C行：剝奪反常睡眠6日後之第六恢復日，NEO：新皮質，HPC：海馬核，EOG：眼肌肌電圖。
無黑線部分：正常睡眠期
有黑線部分：反常睡眠期

者即不會有此現象(圖五);而其腦波型式,睡眠時間皆與剝奪 P.S 期完全相同,因此本實驗,僅以剝奪 P.S 前與剝奪 P.S 後比較研究。

剝奪 P.S 後第 1 日覺醒期總平均為 660 分鐘, O.S 時間為 496 分, P.S 時間為 283 分鐘。以 24 小時所佔的百分比觀之,則各佔 46%, 34%, 及 20% 之比率。如以總睡眠時間來看, O.S 佔 64%, P.S 為 36%。(表一)

若與剝奪 P.S 前之記錄比較,覺醒期增加 25 分鐘, O.S 期即減少 109 分鐘, P.S 期增加 84 分鐘。以 *t*-test 分析,測知剝奪 P.S 後之覺醒期,其時間並未減少($t = 0.76$, *d.f.* 4, $p > 0.05$)但 O.S 期即顯著地減少($t = 3.66$, *d.f.* 4, $p < 0.05$)而 P.S 期有顯著地增加($t = 3.29$, *d.f.* 4, $p < 0.05$)。

剝奪 P.S 後, O.S 的持續時間最長的有 17 分鐘,平均為 4.41 分鐘,較剝奪 P.S 前短。其平均出現次數為 115 次,亦較剝奪前減少(表一);剝奪 P.S 後第一恢復日,其最長的持續時間為 13 分鐘,平均持續時間為 2.71 分鐘,較剝奪前延長,其出現次數為 105 次(表一)。

討 論

依據演化上及胚胎發生的特徵,杏仁核被認為是古皮質(archicortex),海馬核被認為是舊皮質(paleocortex)(43),而已有學者對一日 24 小時內不同感覺標準之覺醒,睡眠期(O.S 及 P.S 期)時的腦波特徵做詳細的報告(28, 29)。因此本實驗除眼肌電圖及(新)皮質外,杏仁核、海馬核的腦波亦做同時記錄,以為分析睡眠腦波型式的依據。

大白鼠是夜行性動物(12, 17, 26),但依本實驗做 24 小時之連續記錄的結果,可知老鼠之睡眠是多相性,除白天外,夜間亦有較短週期的睡眠。因此僅記錄日間 8 小時的腦波來推測其睡眠時間(30),恐在統計上可能發生偏差。

本次實驗結果,大白鼠的自然睡眠中——未剝奪 P.S 時——的 P.S 出現的總時間較其他報告(17, 27, 30)為多。但其原因可能因實驗室在夜間為了操作方便有小於 $10 \mu W/cm^2$ 光源所致。Fishman 等(12), Borbely 等(4)曾報告,小於 $70 \mu W/cm^2$

的光對大白鼠的 P.S 有促進作用,相反地較強光的照射對 O.S 有抑制作用,因此本實驗之 P.S 總時間較高。但以總睡眠時間來比較,幾乎於其他報告一致(17, 27, 30)因此本實驗所得之數字應該可以信賴的。

本實驗採用電網刺激法剝奪 P.S,可以避免其他剝奪 P.S 之缺點。例如 Levitt (27)採用踏磨法來剝奪 P.S,但對 O.S 亦有嚴重地干擾,故在恢復期總睡眠時間就有顯著地增加(26, 27), Morden 等(30)所做的報告僅做 8 小時的實驗,忽略了恢復第 1 日中的其他 16 小時的影響因素。

限制睡眠時間,其 P.S 的總時間不因睡眠時間的減少而減少(10),因此其 P.S 期在總睡眠時間的百分比增加(11, 40)。本實驗經過六日的剝奪 P.S,實際上亦限制了其睡眠時間。故在恢復期,其 P.S 時間勢必增加,而 O.S 之減少,可能是剝奪 P.S 期,動物進行的 O.S 較平常多所致。

在大白鼠, P.S 與 O.S 的時間有數秒至數分鐘之別,但一般以持續 2 分鐘的較多(30, 34)。本實驗結果即持續時間較短的出現次數多。若比較剝奪 P.S 前後,即 P.S 出現的次數以剝奪 P.S 後較少,但其持續時間以剝奪 P.S 後較長(表一)。

由以上的統計數字,大白鼠被剝奪 P.S 達 6 日後,因 P.S 確實需要補償,因此減少 O.S 增加 P.S 以回復 P.S 的百分比,由此可見 P.S 確實為動物所需要。

參考文獻

1. Akert, K., Koella, W.P., and Hess, R., Sleep produced by electric stimulation of the thalamus, *Amer. J. Physiol.* 168 (1952) 260 - 267.
2. Aserinsky, E. and Kleitman, N., Two types of ocular motility occurring in sleep, *J. Appl. Physiol.*, 8 (1955) 1-10.
3. Autret, A., Minz, M., Bussel, B., Cathala, H.P. and Castaigne, P., Human sleep and 5-HTP effects of repeated high dose and of association with benserazide, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 41

- (1976) 408-413.
4. Borbely, A. A., Huston, J.P. and Wasex, P.G., Control of sleep states in the rat by short lightdark, *Brain Research*, 95(1975) 89-101.
 5. Bowers, M., Hartmann, E., and Freedman, D., Sleep deprivation and brain acetylcholine, *Science*, 153 (1966) 1416-1417.
 6. Brugge, J, F., An electrographic study of the hippocampus and neocortex in unrestrained rats following septal lesions, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 18(1965) 36-44.
 7. Corner, M.A., Van Wingerden, C. and Bakhuis, W., Spontaneous motility bursts during sleep in the chick, as related to phasic "paradoxical" cerebral bioelectric activity, *Brain Research*, 50 (1973) 200-204.
 8. Dement, W., The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavior sleep in the cat, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 10 (1958) 291-296.
 9. Dement, W., The effect of dream deprivation, *Science*, 131 (1960) 1705-1707.
 10. Dement, W., Recent studies on the biological role of rapid eye movement sleep, *Amer. J. Psychi.*, (1965) 377-391.
 11. Ferguson, J. and Dement, W., The effect of variations in total sleep time on the occurrence of rapid eye movement sleep in cats, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 22 (1967) 2-10.
 12. Fishman, R. and Roffwarg, H.P., REM sleep inhibition by light in the albino rat, *Exp. Neurol.* 36 (1972) 166-178.
 13. Foote, S.L., Compensatory changes in REM sleep time of cats during ad libitum sleep and following brief REM sleep deprivation, *Brain Research*, 54 (1973) 261-276.
 14. De Groot, J. The rat forebrain in stereotaxic coordinates, N.V. Noord-Holland-sche Uitgevers 1963.
 15. Hartmann, E. The sleep dream cycle and brain serotonin, *Psychonm. Sci.*, 8 (1967) 295-296.
 16. Hery, F.P., Pujol, J.F., Lepez, M., Macon, J. and Glowinski, J., Increased synthesis and utilization of serotonin in the central nervous system of the rat during paradoxical sleep deprivation, *Brain Research*, 21 (1970) 391-403.
 17. Jo, K.J., Polygraphic study on sleep and wakefulness in normal adult rats, *J. Med. Soc. Toho. Japan*, 16(1969) 27-34.
 18. Jouvet, M., Biogenic amines and the states of sleep, *Science* 163 (1969) 32-41.
 19. Jouvet, M., Paradoxical sleep: A study of its nature and mechanisms. in K. Akert, C. Bally, and J.P. Schade (Eds.). *Sleep Mechanisms, Progress in Brain Research*, Elsevier Amsterdam, 1965, 20-62.
 20. Kales, A., Hoedemaker, F.S., Jacobson, A. and Lichtenstein, E., Dream deprivation: an experimental reappraisal, *Nature (London)*, 204 (1964) 1337-1338.
 21. Kawamura, H., Nakamura, Y., and Tokizane, T., Effect of acute brain stem lesions on the electrical activities of the limbic system and neocortex. *Jap. J. Physiol.*, 11 (1961). 564-575.
 22. Khazan, N., and Sawyer, C.H., Rebound recovery from deprivation of paradoxical

- sleep in the rabbit, *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 114(1963) 536-539.
23. Kim, C., Choi, H., Kim, K.J., Kim, M.S., Huh, M.K. and Moon, Y.B., Sleep pattern of hippocampectomized cat. *Brain Research*, 29(1971) 223-236.
 24. Koella, W.P., and Czicman, J., Mechanism of the EEG-synchronizing action of serotonin. *Amer. J. Physiol.*, 211(1966) 926-934.
 25. Kovacevic, R. and Radulovacki, M., Monoamine changes in the brain of cats during slow wave sleep, *Science*, 193(1976) 1025-1027.
 26. Levitt, R.A., Sleep deprivation in the rat, *Science*, 153(1966) 85-87.
 27. Levitt, R.A. Paradoxical sleep: activation by sleep deprivation, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 63(1967) 505-509.
 28. Matsuzaki, M., and Takagi, H., Sleep induced by sodium butyrate in the cat, *Brain Research*, 4 (1976) 206-222.
 29. Matsuzaki, M., and Takagi, H., Para-sleep induction by sodium butyrate in acute brain stem preparations, *Brain Research*, 4(1967) 223-242.
 30. Morden, B., Mitchell, G., and Dement, W., Selective REM sleep deprivation and compensation phenomena in the rat, *Brain Research*, 5(1967) 339-349.
 31. Morgane, P.J. and Stern, W.C., Effects of serotonin metabolites on sleep-waking activity in cats, *Brain Research*, 50(1973) 205-213.
 32. Mouret, J., Pujol, J.F. and Kiyono, S., Paradoxical sleep rebound in the rats; effects of physical procedures involved in intracisternal injection, *Brain Research*, 15(1969) 501-506.
 33. Pujol, J.F., Mouret, J., Jouvot, M. and Clowinski, Increased turnover of cerebral norepinephrine during rebound of paradoxical sleep in the rat, *Science*, 159(1968) 112-114.
 34. Roldan, E., Weiss, T. and Fifkova, E., Excitability changes during the sleep cycle of the rat, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 15 (1963) 775-785.
 35. Siegel, J. and Gorden, T.P., Paradoxical sleep: Deprivation in the cat, *Science*, 148(1965) 978-979.
 36. Sitaram, N., REM sleep induction by physostigmine infusion during sleep, *Science*, 191 (1976) 1281-1283.
 37. Serman, M.B., Knauss, T., Lehmann, D. and Clemente, D., Circadian sleep and waking patterns in the laboratory cat, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 19(1965) 509-517.
 38. Serman, M.B., Lucas, E.A. and Macdonald, L.R., Periodicity within sleep and operant performance in the cat, *Brain Research*, 38(1972) 327-341.
 39. Swisher, J., Manifestations of "activated" sleep in the rat, *Science*, 138(1962) 1110.
 40. Ursin, R., Sleep stage relations within the sleep cycles of the cat, *Brain Research*, 20(1970) 91-97.
 41. Ursin, R., Cohen, H., Henriksen, S., Mitchell, G. and Dement, W., Effects on sleep of restricted sleep. a cat case study, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 41(1976) 96-101.
 42. Webb, W.B. and Agnew, H.W., Sleep deprivation, age and exhaustion time in the rat, *Science*, 136(1962) 1122.
 43. Wu, C. C., Physiology of "Para-sleep",

- J. Formosan. Med. Asso. 70(1971) 713-724. in the rat during desynchronized sleep, Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 19 (1965)521-523.
44. Wurtz, R.H., Steady potential shifts

Effect of the deprivation of Paradoxical sleep on the diurnal EEG in rats by using electric net-work-shocking method

Uning-Shung Lee and Chin-Yih Wu

Abstract

The diurnal EEG patterns of the pre-and the post-deprivation of the paradoxical sleep (P.S.) on the neo-, paleo- and archicortex of the cerebrum in rats were studied by using an electrical-shocking method.

In a 24 hours period (100%) of *ad libitum sleep*, the occurrence of awake (A), orthodoxical sleep(O.S.) and P.S. can be found as a ratio-44, 42 and 14% respectively. Although there was no significant change of EEG between the time duration of the awake and the total sleep period in the rats after applying the electrical shocking, but there was an evidence indicated that when a decreases of the duration of the O.S., the P.S. was increased significantly in the period of sleep.

The EEG pattern of the rats were recorded again at the 7th day of the onset of the electrical deprivation, and a spindle-burst can be found in the hippocampal EEG of the P.S. period.

It is possible, the diurnal EEG pattern of sleep can be disturbed or modified by the electrical net-work-shocking stimulation.