

低声压级次声对小鼠海马胶质纤维酸性蛋白表达的影响*

彭丽岚¹ 牟翔^{2,4} 袁华² 李玲³ 唐晨¹ 张斐¹ 王方聚¹ 赵联伟¹ 陈雷¹

摘要

目的:研究低声压级次声作用不同时间对小鼠海马胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响。

方法:将60只雄性BALB/c小鼠随机分为对照组和次声作用组,次声作用组以Infrasonic9次声治疗仪产生的次声(频率为8—12Hz,声强为60—80dB)作用,1h/d,分别作用1d、7d、14d、21d、28d,对照组小鼠除无次声作用,其余处理皆与次声作用组相同。各组小鼠实验结束后取脑,采用免疫荧光化学染色方法观察次声作用不同次数(1d、7d、14d、21d、28d)小鼠海马中GFAP的表达情况。

结果:次声作用1d后小鼠海马中GFAP阳性表达无明显变化(62.9 ± 3.0),7d后GFAP阳性细胞数开始减少(60.5 ± 8.0),连续作用21d达到最低值(56.3 ± 5.3)($P < 0.05$),28d回升至正常水平(59.2 ± 9.7)($P > 0.05$)。

结论:次声治疗仪产生的低声压级次声作用能抑制小鼠海马星形胶质细胞的活化,这为次声的临床治疗提供了理论依据。

关键词 次声;小鼠;海马;胶质纤维酸性蛋白

中图分类号:R454,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-10-899-04

The effect of infrasound of low sound pressure level on the expression of glial fibrillary acidic protein in hippocampus of mice/PENG Lilan, MU Xiang, YUAN Hua, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(10): 899—902

Abstract

Objective: To study the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hippocampus of mice after exposure to infrasound of low sound pressure level for different times.

Method: Sixty BALB/C male mice were randomized into control group and infrasound exposure group. Mice of the infrasound exposure group were exposed to infrasound of low sound pressure level (8—12Hz, 60—80dB) generated by infrasonic 9 instrument, 1h/d for 1, 7, 14, 21 and 28 days. Mice of control group were treated as the infrasound group except for the infrasound exposure. Brains of mice were removed and immunofluorescent staining method was used to detect the expression of GFAP in hippocampus right after the treatment.

Result: The expression of GFAP-positive cells in hippocampus showed after once exposure there was no significant change (62.9 ± 3.0), after exposure for 7 days decreased (60.5 ± 8.0), after exposure for 21 days reached to the least (56.3 ± 5.3) ($P < 0.05$), after exposure for 28 days increased to normal level (59.2 ± 9.7) ($P > 0.05$).

Conclusion: Infrasound of low sound pressure level generated by infrasound instrument could inhibit the activation of GFAP-positive astrocytes in hippocampus of mice, which might provide the theory basis for the clinical therapy of infrasound.

Author's address Department of Physiotherapy, Yantai sanatorium of PLA Ji'nan military region, Yantai, 264001

Key word infrasound; mouse; hippocampus; glial fibrillary acidic protein

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.10.002

*基金项目:国家自然科学基金项目(30970674)

1 解放军济南军区烟台疗养院理疗科,烟台,264001; 2 第四军医大学西京医院康复与理疗科; 3 解放军总医院第一附属医院康复理疗科; 4 通讯作者

作者简介:彭丽岚,女,主任医师; 收稿日期:2012-02-07

频率低于20Hz范围内的弹性波称为次声波,在人们的工作和生活环境中广泛存在。我们以往研究表明,一定强度的次声会使体内自由基产生过多、引起脑组织谷氨酸浓度及代谢型谷氨酸受体(mGluR) mRNA表达水平的变化^[1]、导致细胞内钙离子浓度增高^[2]、还可引起 GFAP^[3]、HSP70^[4]、c-fos^[5]表达增高等一系列应激改变,从而引起一定程度的脑损伤。

随着对次声的进一步研究,有学者认为,低强度小剂量次声可对人体的精神和情绪产生振奋作用。临床研究也发现低声压级水平次声具有改善循环、扩张血管、减轻瘢痕纤维化、加速伤口愈合、加速炎症消退等功能^[6],所以我们应该在以往研究的基础上,进一步发掘低强度、短时间次声对人体可能产生的有益、积极的作用。

本实验观察次声治疗仪产生的低声压级次声(8—12Hz, 60—80dB)作用不同时间对小鼠海马GFAP表达的影响,分析低声压级次声对脑部的作用机制。

1 材料与方法

1.1 低声压级次声的产生和检测

次声治疗仪 Infrasonic 9由美国 Infrasonic Solutions CHI学会研制,主机面板上的输出档位分为3种次声频率(balance、acute、deep calm)及时间组合档,采用第四军医大学等单位研制的便携式野外低频信号实时测试智能分析系统对实验中的次声信号测试结果显示,该仪器在acute档时,输出次声频谱主要集中在8—12Hz,声强为60—80dB。

1.2 动物分组与模型制作

健康雄性BALB/C小鼠60只,体质量18—20g,由第四军医大学实验动物中心提供,分笼饲养于安静舒适的环境下(基础噪音不高于40dB),标准饲料喂养,自由饮水。随机分为对照组和次声作用组,次声作用组动物,每天暴露于次声治疗仪下1h,按暴露天数分为1d、7d、14d、21d和28d共5亚组(n=6),各对照组动物每天无次声作用放置于次声治疗仪下1h(n=6),余处理同次声作用组。

1.3 材料制备

次声作用组及对照组小鼠按不同时间点分别灌注取材,1%戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉,迅速开胸经

左心室至升主动脉插管,40ml生理盐水洗去血液,100ml 4%多聚甲醛灌流固定1h,取脑后经4%多聚甲醛后固定2h,置于20%蔗糖中(4℃)直至沉底。取含海马部分的全脑,冰冻切片机连续冠状切片,片厚30μm,置于0.01mol/L PBS中,隔5取1,进行免疫荧光染色。

1.4 免疫荧光染色

切片放入0.3%的甲醇双氧水15min,入含0.3% Triton X-100的KPBS中室温浸泡30min,依次入小鼠抗GFAP抗体(1:1500, Sigma) 4℃孵育48h,驴抗鼠IgG(FITC标记, 1:500, Invitrogen)的荧光二抗稀释液中,室温环境下避光放置2—4h,以上每步骤中间均用0.01mol/L KPBS液充分漂洗3次,每次10min。阴性对照选用一抗稀释液(1%小牛血清白蛋白+0.3% Triton X-100+0.01mol/L KPBS, pH=7.4)替代孵育,其他反应步骤同上,随后标本切片经漂洗裱片、晾干、封固处理后置于荧光显微镜下观察并采集图像数据。所有阴性对照切片均未见阳性染色。

1.5 图像分析和统计学分析

每只小鼠取3张呈GFAP典型反应的海马切片,每张切片在高倍镜下(×200倍)于海马齿状回区选取3个视野进行计数,采用Image-pro plus5.0图像处理软件对结果进行图像分析处理,计数每个视野中GFAP免疫阳性产物,以光密度值表示,结果记为均数±标准差,数据用SPSS 17.0版统计软件进行双因素方差分析,结果差异显著水平设为 $P<0.05$ 。

2 结果

GFAP阳性染色呈绿色纤维状荧光(图1),对照组小鼠海马区可见大量呈细纤维状排列的GFAP染色阳性的星形胶质细胞;次声作用1d组,GFAP阳性染色纤维与对照组无明显差异($P>0.05$);经次声作用7d后,星形胶质细胞GFAP阳性染色纤维开始减少,次声作用14d、21d后GFAP阳性染色减少最为明显($P<0.05$),随后逐渐回升,次声作用28d后,GFAP阳性染色与对照组相比无明显差异($P>0.05$),见表1。

3 讨论

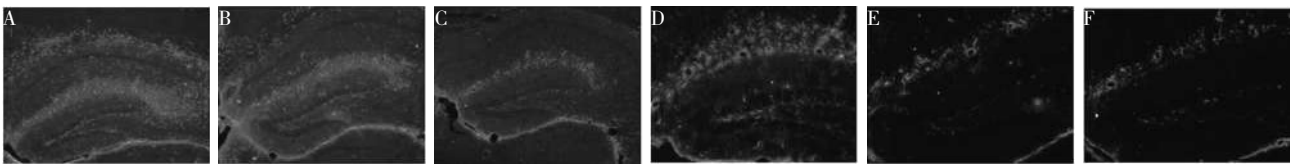
星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的细

表1 低声压级次声作用不同时间点小鼠海马齿状回区 GFAP 的阳性表达情况 (x±s, 光密度值)

组别	1d	7d	14d	21d	28d
对照组	68.8 ± 5.1	70.7 ± 4.2	69.5 ± 5.2	69.0 ± 6.5	67.3 ± 4.2
次声组	62.9 ± 3.0	60.5 ± 8.0	57.6 ± 5.8 ^①	56.3 ± 5.3 ^①	59.2 ± 9.7

与对照组比较:①P<0.05

图1 次声作用后大鼠海马 GFAP 的表达 (荧光染色)



A:对照(×100倍);B:作用7d组(×100倍);C:作用21d组(×100倍);D:对照(×200倍);E:作用7d组(×200倍);F:作用21d组(×200倍)

胞之一,受损后大量激活的星形胶质细胞可帮助清除邻近神经元受损后的代谢产物,同时星形胶质细胞有突起与脑脊液接触,并参与血脑屏障的形成及维持,星形胶质细胞可从脑脊液和血液中吸取营养物质并带走有害产物,因而对神经元具有支持、营养和保护的重要作用^[3,7]。GFAP 是星形胶质细胞的细胞骨架的中间丝蛋白,是星形胶质细胞的标志物,在星形胶质细胞中有丰富的、唯一的表达。当神经系统损伤时,如缺血、缺氧、中毒等,均引起星形胶质细胞反应,细胞数增加,细胞体肥大,细胞分支变粗等,GFAP 的表达增强。脑部内环境的变化也可引起星形胶质细胞表达的变化,最新的研究证明,星形胶质细胞对周围环境渗透压的变化极为敏感,能迅速地做出反应^[8]。本实验通过免疫荧光化学染色法观察低声压级次声作用不同时间后小鼠海马区 GFAP 的表达情况,研究低声压级次声对海马星形胶质细胞的影响。

次声对机体的各个系统都有影响,以神经系统最为明显,研究表明次声可使大鼠下丘脑室旁核 c-fosmRNA^[5]激活,脑皮质内 I 组 mGluR 的 mRNA 阳性神经元数量增加^[1]。8Hz、130dB 次声可使大鼠海马细胞内钙离子浓度升高^[2],进而激活 Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶,受其调节的磷脂酶、蛋白酶、核酸内切酶等被激活,导致磷脂分解,细胞骨架破坏,造成神经细胞迟发性损伤或触发细胞凋亡。刘卫^[9]在研究发现,8Hz 和 16Hz 不同声压级水平的次声作用兔 20min,可使兔脑电活动处于抑制状态,且抑制程度与声压强相关。谭永霞等^[10]证实 8Hz、130dB 次声作用不同时间会引起大鼠海马 5-羟色胺、5-羟色胺

受体和兰尼定受体表达降低,在作用停止后随着时间延长可逐渐恢复。说明次声造成的损伤是可逆的,可能与次声作用后大脑内环境的改变有关。

同时实验中还观察到次声可以激发中枢神经系统的自我保护机制,例如促进 IL-6^[3]、NOS^[11]等的表达,尤其是低强度次声此效应更明显,这一自我保护机制为神经元再生创造了良好的条件,因此我们推测低强度次声对中枢神经系统神经元的再生可能存在着某些刺激效应。

我们以往广泛而全面地研究了高强度、长时间次声对机体的损伤机制及防护方法。对于低强度、短时间的次声对机体的作用却少有关关注。次声对人体的精神和情绪可产生振奋作用,如海浪拍击海岸时可以产生 10Hz 左右的次声,使人精神振奋^[12]。低声压级水平的次声可以促进血液循环、扩张血管、减少纤维性瘢痕增生、消退炎症及加速伤口的愈合,已经证实适当频率和声压的次声可辅助治疗角膜炎、胆囊炎,利用次声治疗仪对初产妇盆底损伤的治疗有效^[6]。范建中等^[13]应用次声治疗仪(主频范围:4—20Hz,声强<90dB)直接作用于体外培养的 B 淋巴瘤 RAJI 细胞,结果发现次声治疗 90min 可能对 RAJI 细胞增殖有抑制作用,但其差异无显著性意义,治疗 120min 则有明显抑制作用。提示低频率、低强度的次声对细胞的影响呈时间依赖性。

本实验所采用 infrasonic 9 产生的次声波频率为 2—16Hz,以随机的频率产生低声压级水平次声(在 40—80dB 之间),缓慢而轻柔,随频率的变化对人体的不同组织器官可产生不同的共振效应,以这种能量形式治疗可以达到组织和细胞深部,对生物组织

具有较明显治疗作用。该仪器在 acute 档时,输出次声频谱主要集中在 8—12Hz,声强 60—80dB,与头部的振动频率一致,因此选用此档。

实验结果显示低强度次声作用一定时间后,小鼠大脑海马中 GFAP 表达降低,作用 21d 后达最低值,作用 28d 后表达增高,提示低强度次声短时间作用对 GFAP 表达没有明显影响,但随着时间的延长可抑制小鼠海马星形胶质细胞的增殖。一般认为星形胶质细胞与神经元功能密切相关。反应性星形胶质细胞增多,可以促进兴奋毒谷氨酸的清除,并可低水平合成和分泌多种神经营养因子^[14],有营养和维持神经元生存并促进神经突起生长的作用。但是星形胶质细胞过度增生和功能增强也有不利影响,研究表明,星形胶质细胞成熟之后,早期具有的多种有益功能逐渐消失,反而分泌有害因子,形成化学性胶质屏障,从而影响神经生长^[15]。而且反应性星形胶质细胞后期过度增生以及胶质瘢痕形成,会导致机械性障碍,影响轴突的再生、延长和融合^[16],胶质瘢痕可以形成微血管套,压迫微血管,影响局部的血液供应^[17]。此外,反应性星形胶质细胞还能产生大量的一氧化氮,通过对大分子特别是 DNA 的修饰产生毒性作用,可导致神经元发生迟发性坏死^[18]。所以低强度次声作用对小鼠海马星形胶质细胞的抑制可能会为大脑神经的生长和发育创造有利环境。李川等^[19]研究发现低声压级次声对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,可能与低强度次声作用对小鼠海马 GFAP 的抑制有关。

我们在以往的研究基础上观察了 16Hz、90dB 次声作用后海马神经干细胞的增殖情况,预实验发现该参数次声作用后海马齿状回 BrdU 免疫组化阳性细胞数量增加,处于增殖期的神经干细胞数目增加,提示低强度次声可能会有效地刺激海马区神经元再生。所以我们认为低强度次声作用一定时间后小鼠海马 GFAP 表达减少,可能与次声作用后小鼠大脑内环境的改变有关,神经干细胞的增殖可能是其中原因之一。

次声治疗的研究在我国还处于起步,虽然不晚,但发展较慢,目前主要的研究结果集中于较高声压级的次声生物学效应和防护的研究,对低声压级次声的效应及机制了解很少。由于次声具有频率低、

传播远、作用深、穿透力强的特点,研究其对机体的作用将为进一步探讨和利用次声的有益作用治病和保健开辟新的途径,具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 刘恩渝, 费舟, 章翔, 等. 次声作用下大鼠脑皮质内谷氨酸及其代谢型受体 I 亚型 mRNA 的变化[J]. 第四军医大学学报, 2001,22(23): 2137—2140.
- [2] 刘朝晖, 陈景藻, 王志鹏, 等. 8Hz/130dB 次声对大鼠海马细胞内钙离子浓度的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004,25(4):304—306.
- [3] 牟翔, 袁华, 江山, 等. 16Hz,90dB 和 16Hz,130dB 次声对小鼠海马区 IL-6 及星形胶质细胞 GFAP 表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2008,30(7):452—455.
- [4] 黄文晋, 贾克勇, 张萍, 等. 次声作用后大鼠下丘脑 HSP70 的表达[J]. 第四军医大学学报, 2000,21(2):162—163.
- [5] Naoko N, Masanobu M, Yasukiyo Y, et al. Process and emergence on the effects of infrasonic and low frequency noise on inhabitants[J]. J Low Freq Noise Vib, 1989,8:87—99.
- [6] 蒋雪清, 邓芳, 李瑞满. 低声压级水平次声对初产妇盆底损伤治疗的研究[J]. 中国医药导报, 2011,8(14):52—54.
- [7] 梁彦涛, 张敬军. 胶质纤维酸性蛋白基础与临床研究发展[J]. 医学综述, 2009,15(16):2407—2409.
- [8] Hussy N, Deleuse C, Desarmeniem MG, et al. Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure[J]. Porg Neurobiol, 2000,62(1):113—134.
- [9] 刘卫, 陈景藻, 李玲, 等. 次声对兔脑电活动的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(5):269—271.
- [10] 谭永霞, 李玲, 陈景藻, 等. 次声对大鼠海马 5-HT、5-HTR、RyR 表达及恢复的研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2005, 4(4):324—327.
- [11] 魏智钧, 李玲, 陈景藻, 等. 130dB 次声对大鼠纹状体 NOS 阳性神经元及 ChAT 免疫阳性神经元表达的影响[J]. 第四军医大学学报, 2003,24(4): 289—292.
- [12] Arabadzhi VI. Infrasonic and biorhythms of the human brain [J]. Brofizika, 1992,37(1):150—151.
- [13] 范建中, 张积安, 李克, 等. 次声治疗对 B 淋巴瘤 Raji 细胞的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2008,3:145—149.
- [14] 武亮, 李建军, 陈亮, 等. 抑制脊髓损伤后星形胶质细胞增殖和胶质瘢痕形成的研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2010,16 (3):201—204.
- [15] Hobohm C, Günther A, Grosche J, et al. Decomposition and long-lasting down regulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats[J]. J Neurosci Res, 2005,80(4):539—548.
- [16] Alonso G. NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound[J]. Glia, 2005,49(3):318—338.
- [17] West H, Richardson WD, Fruttiger M. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes[J]. Development, 2005,132(8): 1855—1862.
- [18] Kozuka N, Itofusa R, Kudo Y, et al. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines require different astrocytes states to induce nitric oxide production[J]. J Neurosci Res, 2005,82 (5):717—728.
- [19] 李川, 范建中, 吴红瑛. 低声压级次声对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2009,24(5):419—422.