

次声对大鼠神经元细胞凋亡与Tau蛋白表达的影响*

蔡丽¹ 王晋² 张鸽² 巩丽³ 张文东¹ 刘朝晖^{1,4}

摘要

目的:探索声压级水平是8Hz、90dB的次声连续7d和14d暴露对大鼠海马区神经元细胞凋亡与Tau蛋白表达的影响。

方法:建立次声暴露模型。将24只SD大鼠平均分为对照组、1d组、7d组和14d组等四组。1d组次声暴露2h,7d组次声暴露7d每天2h,14d组次声暴露14d每天2h。对照组放置于无次声暴露仓内2h。运用TUNEL染色、Western Blot、ELISA等实验方法探索次声对大鼠海马区神经元细胞凋亡与Tau蛋白的影响。

结果:连续7d和14d的次声暴露组大鼠海马区神经元细胞凋亡增多,与对照组和1d组相比差异均有显著性意义且Tau蛋白表达也增多,与对照组和1d组相比差异也具有显著性意义,呈现随暴露时间的延长而增多的趋势。

结论:连续7d和14d次声暴露可能会导致大鼠神经功能损害。

关键词 次声暴露;凋亡;Tau蛋白;大鼠;海马区

中图分类号:R741,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-11-1453-04

Effects of infrasound on neuronal apoptosis and Tau protein expression in rats/CAI Li, WANG Jin, ZHANG Ge, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(11): 1453—1456

Abstract

Objective: To study the effects of 7 day and 14 day infrasound exposure on neuronal apoptosis and Tau protein's expression in rats.

Method: Twenty-four male SD rats were randomly divided into control group, one-day infrasound exposure group, seven-day infrasound exposure group and fourteen-day infrasound exposure group, there were six rats in each group. The test groups were put in 8 Hz, 90dB infrasound environment two hours per day, and the control group rats were put in the instrument without 8Hz, 90dB infrasound exposure two hours. Neuronal apoptosis was detected with TUNEL staining, the expression of tau protein in hippocampus was detected with Western blotting and Elisa.

Result: The number of neuronal apoptosis was more than the control group and the 1-day group in 7-day group and 14-day group. The differences were statistically significant. Compared with the control group and the 1-day group, the expression of Tau protein was also increased significantly, which showed a trend of increasing with the extension of exposure time.

Conclusion: Seven day and fourteen day 8Hz, 90dB infrasound exposure may cause nerve function damage in rats.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Tangdu Hospital, the Air Force Military Medical University, Xi'an, Shanxi, 710038

Key word infrasound exposure; apoptosis; Tau protein; rats; hippocampus

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.11.003

*基金项目:国家自然科学基金项目(31470825)

1 空军军医大学第二附属医院唐都医院康复医学科,陕西省西安市,710038; 2 空军军医大学放射医学教研室; 3 空军军医大学第二附属医院唐都医院病理科; 4 通讯作者

第一作者简介:蔡丽,女,硕士,主管治疗师; 收稿日期:2020-10-22

次声波是小于20Hz的一种声波。已知人耳可听到的声波频率在20Hz至20kHz之间,次声波人耳不能听到,但我们却常暴露在次声环境中^[1]。自然界(地震、海啸、火山喷发等)和人类的社会生产活动(风力发电、火箭发射、船舶发动、载人航天飞船等)产生大量的次声波,随着工业、交通、能源等的飞速发展,其在环境水平中的比重不断增加。对于可听声范围内的噪声我们可以进行有效的防护和降低,而对于次声却难于防护。次声对生物体的影响很早便引发了人们的关注,为此人们已经做过大量的追踪调查研究^[2]。现今可以肯定130dB左右的次声长时间暴露,会对生物体造成一定的影响尤其是对中枢神经系统^[3]。Tau蛋白是一种微管相关蛋白,对神经元的稳定性起着关键作用。中枢神经系统中Tau蛋白病是指由于Tau蛋白的过度磷酸化和聚集引起的一种神经退行性疾病^[4]。前期实验中我们已经证实8Hz、130dB的次声暴露,大鼠海马区内Tau蛋白和p-Tau蛋白增多,尤其是p-Tau蛋白的增多可能会导致大鼠中枢神经系统退行性改变^[5]。为了进一步探索不同声压级水平的次声暴露对大鼠神经功能的影响,我们将声压降至90dB,设计实施本次实验。

1 材料与方法

1.1 实验设备与试剂

实验次声声源由空军军医大学的次声发射及监测系统提供。实验组织包埋机、脱水机、烤片机、显微镜、组织研磨仪、低温高速离心机、酶标仪、电子天平等:朗普医疗器械有限公司。蛋白定量试剂盒、TUNEL试剂盒:江苏碧云天公司。鼠抗 β -actin单克隆抗体、鼠抗Tau单克隆抗体:Abcam公司。蛋白凝胶试剂盒:晶彩生物公司。Western Blot一抗稀释液、辣根过氧化标记的鼠二抗:武汉博士德公司。P-Tau蛋白Elisa试剂盒:Elabscience公司。

1.2 动物分组及模型建立

成年雄性、健康、清洁级SD大鼠24只,体重180—220g,环境安静、标准饲料条件进行饲养。对大鼠进行编号,运用随机表法对其随机分组。除对照组外将其余各组暴露在8Hz、90dB次声仓中每天2h。依据在次声仓内暴露时间分为1天组、7天组、14天组。对照组动物于次声仓内无次声暴露放置

2h,各组6只($n=6$)。

1.3 检测方法

1.3.1 TUNEL染色法:次声暴露后,各组随机选取3只大鼠,10%水合氯醛以0.4ml/100g的量经腹腔麻醉,用生理盐水进行心内灌注,剥离大鼠脑组织在固定液中固定。脑组织经冠状面切成30 μ m左右的切块,放入包埋盒,流动水下冲洗2h,转入全自动脱水机中脱水,再进行包埋,形成蜡块。切割成3 μ m的切片置于载玻片上。切片于二甲苯中脱蜡、梯度酒精中脱蜡水化、切片上滴加蛋白酶K、放置保温箱内20min、切片PBS洗涤5次,每次3min、余下按剩余操作步骤进行。

1.3.2 Western Blot:将剩余3只大鼠断头活杀,小心取出脑组织。生理盐水清洗干净后,快速在无菌条件下剥离出海马组织,迅速放入液氮罐内冻存。使用蛋白定量法来测定蛋白浓度:用3 μ l Marker蛋白和30 μ g蛋白对应体积上样,进行凝胶电泳,待目的蛋白成功转移到PVDF膜上。室温环境中用含0.05g/ml牛奶TBST封闭液中封闭膜1.5h左右, TBST反复冲洗,加入一抗后将膜置于4℃冰箱一夜。次日从冰箱中取出条带,使用TBST液进行多次冲洗后,加入相对应的二抗,室温环境中静置2h左右,化学发光法显色。

1.3.3 ELISA法:从液氮中取出冻存组织,提前预冷PBS液中将其冲洗干净,按1:9的比例提取上清液。加入100 μ l的标准品和待测样品,酶标板进行覆膜,37℃静置90min。倒出液体,甩干,加入100 μ l抗体工作液,再次对酶标板进行覆膜、37℃静置1h。倒出液体,甩干,进行3次洗板。加入酶结合工作液100 μ l,加上覆膜,37℃静置30min。倒出液体,甩干,进行5次洗板。加入底物溶液90 μ l,再次酶标板覆膜,37℃避光静置15min左右。加入终止液50 μ l,终止反应。当蓝色立转为黄色时,运用酶标仪测量各孔在450nm波长处的OD值。

1.4 统计学分析

各组结果均以均数 $\pm$ 标准差表示。采用Graph-Pad.Prism.v5.0统计绘图法和SPSS 22.0软件中单因素方差分析法进行多重比较,以组间最小差异(LSDt)完成组间差异性比较。 $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 TUNEL 染色法

8Hz、90dB 次声连续 7d 和 14d 暴露会促进海马 CA1 区神经元细胞的凋亡。7d、14d 组凋亡细胞数目与对照组相比有显著性差异 ($P<0.05$), 14d 组与 7d 组相比也有显著性差异 ($P<0.05$)。见图 1。

2.2 Western Blot

7d、14d 组大鼠海马区内的 Tau 蛋白表达增多。7d 组、14d 组与对照组和 1d 组比较, 均有显著性差异 ($P<0.05$), 7d 组和 14d 组之间同样具有显著性差异 ($P<0.05$)。见图 2。

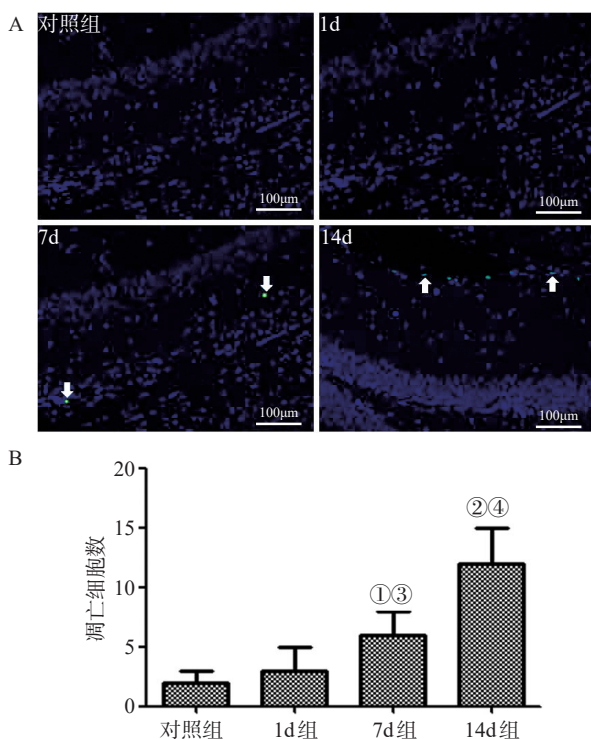
2.3 ELISA 法

大鼠海马区 p-Tau 蛋白在 7d 组和 14d 组的表达明显高于对照组和 1d 组, 二者相比较均有显著性差异 ($P<0.05$), 7d 组与 14d 组比较也具有显著性差异 ($P<0.05$), 1d 组与对照组相比无差异。见图 3。

3 讨论

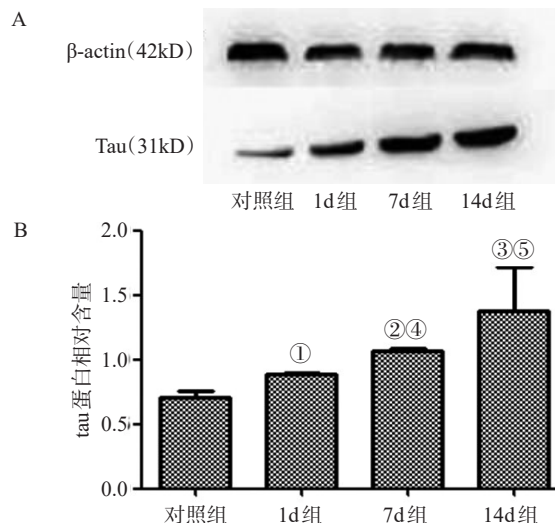
次声波的固有频率与生物体主要器官的固有频

图1 大鼠海马CA1区神经元细胞TUNEL染色及结果



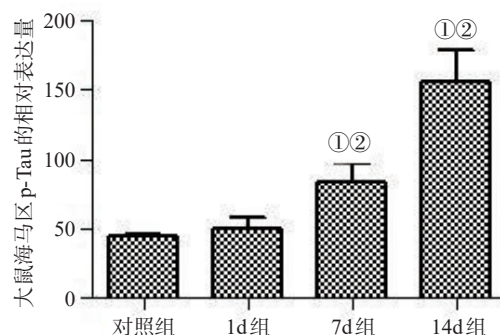
注: ①7d组与对照组相比, $P=0.032$; ②14d组与对照组相比, $P<0.001$; ③7d组与1d组相比, $P=0.043$; ④14d组与7d组相比, $P=0.027$

图2 Western Blot条带及结果分析



注: ①1d与对照组相比, $P=0.040$; ②7d组与对照组相比, $P<0.001$; ③14d组与对照组相比, $P<0.001$; ④7d组与1d组相比, $P=0.043$; ⑤14d组与7d组相比, $P=0.001$ 。

图3 ELISA 结果分析



注: ①各组 vs 对照组, $P<0.001$; ②7d、14d vs 1d, $P<0.001$

率十分接近, 可以通过共振作用对生物体产生损害甚至杀伤作用。次声因其宽波长、强穿透力等原因造成防护困难, 这会对人类及其他生物的健康和生存造成更为严重的威胁。低强度的次声暴露会使人眩晕、头痛、无法集中注意力、恐惧不安等; 高强度次声长时间暴露会使人癫狂、精神错乱、休克、惊厥、思维能力丧失, 甚至死亡^[6]。但是次声波是如何对生物体产生作用的, 这些仍是人们研究的热点和难点。

Tau蛋白是一种广泛存在于神经元胞体及轴突中的微管相关蛋白(microtubule associated protein, MAP)。正常情况下Tau蛋白呈可溶性, 对微管的结构和功能稳定起到重要的作用^[7-8]。在对大鼠脑缺

血性疾病的研究过程中,研究人员发现过度磷酸化的Tau蛋白会影响神经元内物质的转运、减缓树突的生长速度。并且还发现过度磷酸化的Tau蛋白致使神经细胞的凋亡增加^[9-10]。先前研究已发现将大鼠长时间(7d和14d)暴露于8Hz、130dB次声中,均可致海马神经元凋亡细胞数目增多^[11]。此次我们在8Hz、90dB次声暴露模型中也发现连续7d和14d每天2h次声暴露可使大鼠海马神经元凋亡增加,同时海马区内Tau蛋白和P-Tau蛋白的表达也增多,与我们先前在130dB次声暴露模型中发现的结果一致^[5]。过度磷酸化的Tau蛋白会导致其变得不可溶,会降低其对微管的亲和力,并且正常Tau蛋白和微管相关蛋白被消耗。这使得微管的稳定遭受影响,致使微管结构的改变,进而发生病理性聚集,转变为成对螺旋丝(paired helical filaments, PHFs),堆积在神经元内,形成神经纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)^[12]。从而使轴浆运输紊乱,神经递质的释放、运输以及摄取异常,致使神经元之间信息传递受阻,并可使神经元发生退行性改变和大脑的认知功能障碍,终致神经细胞功能丧失、甚至死亡^[13]。在神经系统中,Tau蛋白的异常过度磷酸化和聚集引起的各种神经退行性疾病被称之为Tau蛋白病^[14-15]。最为常见的Tau蛋白病是AD,现已知AD患者的临床表现则多为神经退行性改变及学习记忆等高级认知功能障碍^[16]。高强度次声长时间暴露会导致大鼠的学习记忆功能受损,这已经被之前的研究报道过^[17-18]。本次实验我们虽然将次声降至90dB的水平,但是仍发现连续7d或14d次声暴露后大鼠海马区神经元细胞凋亡增多,同时Tau蛋白及P-Tau蛋白的表达也增多。目前已知P-Tau蛋白的增多和聚集会产生一定的神经毒性,那么次声长时间暴露所导致的大鼠学习记忆等认知功能的改变,是否会像AD等神经退行性疾病一样是因为P-Tau蛋白的过度表达所致,值得我们进一步探索和研究。

综上所述,次声波长时间暴露对生物体产生危害的作用机理可能是通过干涉Tau蛋白及P-Tau蛋白的表达,进而干扰正常的细胞凋亡,进一步对神经系统产生损害甚至造成神经退行性改变。

参考文献

- [1] 杨亦春, 郭泉, 吕君, 等. 大地震前出现的异常次声波观测研究[J]. 物理学报, 2014, 63(13):216—229.
- [2] Weichenberger M, Kühler R, Bauer M, et al. Brief bursts of infrasound may improve cognitive function: An fMRI study[J]. Hear Res, 2015, 328:87—93.
- [3] 张津铭, 庞钧儒, 李春燕. 次声波的物理性质及其应用[J]. 物理通报, 2018, 000(001):123—126.
- [4] Williams DR. Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau[J]. Internal Medicine Journal, 2010, 36(10):652—660.
- [5] 蔡丽, 王晋, 崔尧, 等. 次声对大鼠海马区钙调依赖性蛋白激酶II及Tau蛋白表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(3):298—303.
- [6] Arabadzhi VI. Infrasound and biorhythms of the human brain[J]. Biofizika, 1992, 37(1):150—154.
- [7] 夏兆云, 赵虹, 潘露茜, 等. Tau蛋白在阿尔茨海默病中的作用研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(9):450—453.
- [8] Olsson B, Lautner R, Andreasson U, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Neurol, 2016, 15:673—684.
- [9] Johnson GV, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 24):5721.
- [10] Spires-Jones TL, Stoothoff WH, de Calignon AD, et al. Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue[J]. Trends in Neurosciences, 2009, 32(3):150—159.
- [11] Liu Z, Gong L, Li X, et al. Infrasound increases intracellular calcium concentration and induces apoptosis in hippocampi of adult rats[J]. Molecular Medicine Reports, 2012, 5(1):73—77.
- [12] 赵俊一, 钟伟聪, 邓云松, 等. 阿尔茨海默病中Tau蛋白与线粒体损伤[J]. 生命科学研究, 2020, 112(1):59—65.
- [13] Martin L, Latypova X, Terro F. Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease[J]. Neurochemistry International, 2011, 58(4):458—471.
- [14] 刘彦超, 王建枝. 小胶质细胞在阿尔茨海默病中的研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11(2):149—152.
- [15] 李思苹, 李文惠, 孙安阳. 阿尔茨海默病的tau蛋白病理传播机制与调节[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(3):571—576.
- [16] Garca-Escudero V, Gargini R, Martin-Maestro P, et al. Tau mRNA 3'UTR-to-CDS ratio is increased in Alzheimer disease[J]. Neurosci Lett, 2017, 655:101—108.
- [17] Scholl M, Lockhart SN, Schonhaut DR, et al. PET Imaging of tau deposition in the aging human brain[J]. Neuron, 2016, 89(5):971—982.
- [18] Liu ZH, Chen JZ, Ye L, et al. Effects of 8Hz 90dB/130dB infrasound on expression of NMDAR1 and changes of intracellular calcium ion concentration in hippocampus of rat brain[J]. Molecular Medicine Reports, 2010, 3:917—921.