

· 基础研究 ·

16 Hz, 90 dB 和 16 Hz, 130 dB 次声对小鼠海马区 IL-6 及星形胶质细胞 GFAP 表达的影响

牟翔 袁华 江山 瞿丽莉

【摘要】目的 观察 16 Hz, 90 dB 和 16 Hz, 130 dB 次声对小鼠海马区白介素-6 (IL-6) 表达及星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白含量 (GFAP) 的影响, 从而探讨次声作用对中枢神经系统自我保护功能的影响。**方法** 共选取 BALB/C 小鼠 60 只, 将其随机分为 90 dB 次声作用组 (20 只)、130 dB 次声作用组 (20 只) 及对照组 (20 只)。将 90 dB 次声作用组、130 dB 次声作用组小鼠分别置于次声压力舱内 2 h, 期间分别给予 90 dB 或 130 dB 的次声刺激, 对照组小鼠也于同期置入次声压力舱内, 但期间不给予次声刺激。于次声作用 1, 7, 14, 21 及 28 d 时观察各组小鼠海马区 IL-6 及星形胶质细胞 GFAP 的表达情况。**结果** 对照组小鼠海马区有一定强度 IL-6 表达; 各次声作用组小鼠海马区 IL-6 在次声作用 7, 14 及 21 d 时均较对照组明显增高 ($P < 0.05$), 并于次声作用 14 d 时达到峰值; 进一步分析后发现, 90 dB 次声作用组 IL-6 表达水平明显高于 130 dB 次声作用组 ($P < 0.05$)。各次声作用组小鼠海马区 GFAP 表达水平在次声作用 7, 14 及 21 d 时均较对照组明显增高 ($P < 0.05$), 并于次声作用 14 d 时达到峰值; 90 dB 次声作用组小鼠海马区 GFAP 表达水平明显低于 130 dB 次声作用组 ($P < 0.05$)。**结论** 次声刺激能显著促进小鼠海马区神经元 IL-6 表达, 提高海马区星形胶质细胞 GFAP 含量。

【关键词】 小鼠; 海马; 白介素-6; 星形胶质细胞; GFAP

The effect of infrasound on the expression of IL-6 and astrocyte formation in the hippocampus MOU Xiang, YUAN Hua, JIANG Shan, QU Li-li. Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, The 4th Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】Objective To study the effects of infrasound on the expression of interleukin-6 (IL-6) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampus of mice. **Methods** Sixty BALB/C mice were randomized into a 90 dB infrasound exposure group, a 130 dB infrasound exposure group and a control group. The mice of the 2 infrasound exposure groups were exposed to infrasound of 16 Hz at an intensity of 90 dB or 130 dB two hours per day for 1, 7, 14, 21 or 28 days. Immunofluorescence was used to detect the expression of IL-6 and GFAP in the hippocampus at different time points. **Results** At 7, 14 and 21 days, IL-6 and GFAP expression in the 2 infrasound exposure groups was significantly increased compared with the control group. At the 14th day of infrasound exposure, the expression of IL-6 and GFAP reached a peak. Moreover, the expression of IL-6 was significantly stronger in the 90 dB infrasound exposure group than that in the 130 dB group, while that of GFAP was significantly lower. **Conclusion** Infrasound can promote the expression of IL-6 and GFAP in the hippocampus of mice.

【Key words】 Mouse; Hippocampus; IL-6; Astrocyte; GFAP

随着当前工业化进程的快速发展, 次声已成为生产噪声和公共噪声的重要组成部分之一, 对人类健康产生较大影响^[1]。大量研究表明, 次声对机体中枢神经系统具有明显生物学效应, 一方面次声刺激能诱导神经元产生缺血、缺氧性改变, 促进神经元凋亡^[2]; 另一方面次声作用可激活中枢神经系统自我保护机制^[3-7], 从而加速受损神经功能恢复。白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 是迄今发现功能较为广泛的细胞因子之一。IL-6 被认为对中枢神经系统具有

神经保护和神经营养功能, 是一种与脑损伤及损伤后修复过程密切相关的重要炎性因子^[8]。此外相关研究同时发现, 在中枢神经系统受损后, 星形胶质细胞可出现增殖或返祖现象 (即重新返祖为神经干细胞), 提示星形胶质细胞是一种重要的损伤修复细胞。本研究采用 16 Hz, 90 dB 及 16 Hz, 130 dB 次声作用实验小鼠, 选用免疫组织化学法观察小鼠经次声作用后其海马 IL-6 和星形胶质细胞特异性标志物-胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的变化情况, 以及二者间的相关性, 从而探讨次声作用激发中枢神经系统自我保护功能的相关机制。现报道如下。

基金项目: 全军医学科学技术研究“十五”计划指令性课题 (01L071)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院康复医学理疗科

材料与方法

一、实验材料

采用本校研制的电激励式次声压力舱系统,包括次声信号源、功率放大器、电动扬声器和次声舱等设备;此外还设有高灵敏度次声声频和声压检测系统,能同步记录时域波形、频谱分析及检测不同次声成分的声压强度值;实验动物为 60 只健康 BALB/C 小鼠,平均体重(19 ± 3)g,雄性,由本校实验动物中心提供;主要实验试剂包括兔抗 IL-6 抗体(美国 Santa Cruz 公司产品)、小鼠抗 GFAP 抗体(美国 Sigma 公司产品)、Texas red 标记的羊抗兔 IgG(美国 Sigma 公司产品)和 FITC 标记的驴抗鼠 IgG(美国 Sigma 公司产品)。

二、动物分组及处理

将上述 60 只 BALB/C 小鼠分笼饲养于安静舒适环境中(环境基础噪音不高于 40 dB),期间给予标准饲料喂养、自由饮水,将其随机分为 90 dB 次声作用组(20 只)、130 dB 次声作用组(20 只)及对照组(20 只)。将 90 dB 次声作用组及 130 dB 次声作用组小鼠每天置于次声压力舱内 2 h,期间分别给予 16 Hz, 90 dB 或 16 Hz, 130 dB 的次声干预;对照组小鼠也于相同时间点置于次声压力舱内持续 2 h,但期间不给予次声干预。

三、取材及标本处理

1. 标本取材:于次声作用 1, 7, 14, 21 及 28 d 时,各实验组小鼠分别取 5 只处死后取材,采用 1% 戊巴比妥钠按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重常规麻醉,打开胸腔,拨开心包膜,暴露心脏,剪开右心房放出血液,再剪开左心室将灌注头插入主动脉内并用动脉夹固定,先输入 10 ml 生理盐水将血管内血液冲洗干净,再注入 10% 福尔马林液 40 ml 灌流固定 2 h。待灌注完毕后用咬骨钳咬开颅骨,小心取出脑组织,取材时注意保持脑组织结构完整性,标本组织经 10% 福尔马林液后固定 2 h,再置入 20% 蔗糖溶液中直至标本沉底,于 4℃ 冰箱内保存过夜,最后将标本进行连续冠状冰冻切片(片厚 $30 \mu\text{m}$),隔五取一。

2. 免疫荧光双重染色:标本切片经 0.01 mol/L PBS 液漂洗后,置入含 0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 液中浸泡 30 min(室温环境下),然后进行免疫荧光染色,具体操作步骤如下:①将标本置入含有兔抗 IL-6 的抗体稀释液(1:1000,美国 Santa Cruz 公司产品)和小鼠抗 GFAP 的抗体稀释液(1:1500,美国 Sigma 公司产品)中,在室温环境下孵育 24 h;②将标本置入含有羊抗兔 IgG(Texas-red 标记,1:500,美国

Sigma 公司产品)和驴抗鼠 IgG(FITC 标记,1:500,美国 Molecular Probes 公司产品)的荧光二抗稀释液中,避光放置 2~4 h(室温环境下)。以上每一步骤结束后均用 0.01 mol/L PBS 液充分漂洗 3 次,每次 10 min,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。

四、图象分析与统计学处理

采用 IX270 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司产品)对各实验组小鼠标本切片进行图像采集;从每只小鼠脑片中选择有典型反应的 3 张切片进行检测,将其置于 200 倍显微镜下用肉眼计数海马区 IL-6 阳性细胞数量总和,GFAP 免疫反应产物的标记强度以光密度值(optical density, OD)表示。在检测过程中,各组小鼠测量区域位置均相同,每一解剖结构均检测 3 个视野,每个视野测量面积保持一致。所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 版统计学软件进行数据分析,统计学方法包括方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、90 dB 次声作用对小鼠海马 IL-6 及 GFAP 表达的影响

对照组小鼠海马内可见少许神经元细胞呈 IL-6 阳性表达,未见神经胶质细胞表达 IL-6。90 dB 次声作用组经次声作用 1 d 时,可见其海马组织有 IL-6 免疫阳性神经元细胞出现,但与对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$);经次声作用 7 d 后,可见海马组织锥体细胞内有大量 IL-6 表达,星形胶质细胞内也可见 IL-6 表达(呈金黄色标记),与对照组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);经次声作用 14 d 后,发现海马区神经元 IL-6 表达较次声作用 7 d 时无显著改变($P > 0.05$),但 IL-6 阳性表达星形胶质细胞数量显著增多,较次声作用 7 d 时差异有统计学意义($P < 0.05$);经次声作用 28 d 后,发现小鼠海马区 IL-6 阳性表达神经元数量逐渐恢复至正常水平,但仍可见大量胶质细胞呈 IL-6 阳性反应,具体情况详见表 1。对照组小鼠海马区可见大量呈细纤维状排列的 GFAP 阳性表达星形胶质细胞;90 dB 次声作用组经次声作用 1 d 后,其星形胶质细胞 GFAP 表达情况与对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$);经次声作用 7 d 后,发现星形胶质细胞 GFAP 表达情况明显增强,于次声作用 14 d 时 GFAP 阳性表达星形胶质细胞密度、数量及 OD 值均达到峰值,此后随时间延长开始逐渐下降,于次声作用 28 d 后基本恢复至正常水平,具体情况详见表 2、图 1。

表 1 经次声作用不同时间后各组小鼠海马 IL-6 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

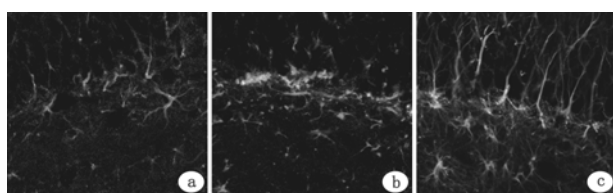
组 别	只数	IL-6 阳性表达细胞数量(个/每低倍镜视野)				
		次声作用 1 d	次声作用 7 d	次声作用 14 d	次声作用 21 d	次声作用 28 d
90 dB 次声作用组	20	16.21 $\pm$ 3.28	24.18 $\pm$ 6.77 ^{bc}	28.75 $\pm$ 7.78 ^{bd}	22.12 $\pm$ 7.89 ^{bd}	15.77 $\pm$ 4.18
130 dB 次声作用组	20	16.09 $\pm$ 4.11	21.23 $\pm$ 4.71 ^b	24.83 $\pm$ 5.33 ^b	17.13 $\pm$ 1.89 ^a	14.96 $\pm$ 5.81
对照组	20	15.73 $\pm$ 4.71	15.39 $\pm$ 5.06	16.13 $\pm$ 3.95	15.99 $\pm$ 3.80	15.60 $\pm$ 5.11

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 130 dB 次声作用组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

表 2 经次声作用不同时间后各组小鼠海马 GFAP 表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	GFAP 表达(OD 值)				
		次声作用 1 d	次声作用 7 d	次声作用 14 d	次声作用 21 d	次声作用 28 d
90 dB 次声作用组	20	47.80 $\pm$ 4.58	66.32 $\pm$ 5.97 ^{bd}	73.38 $\pm$ 7.28 ^{bd}	69.12 $\pm$ 10.74 ^{bd}	50.47 $\pm$ 4.28 ^c
130 dB 次声作用组	20	48.02 $\pm$ 3.81	70.21 $\pm$ 4.56 ^b	78.65 $\pm$ 9.33 ^b	75.93 $\pm$ 8.89 ^b	52.26 $\pm$ 3.81 ^a
对照组	20	47.96 $\pm$ 4.11	47.39 $\pm$ 5.86 [?]	49.33 $\pm$ 8.95	49.79 $\pm$ 6.80	50.16 $\pm$ 7.11

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 130 dB 组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$



注:a 为对照组;b 为 90 dB 次声作用组;c 为 130 dB 次声作用组

图 1 次声作用 14 d 后各组实验小鼠 IL-6 与星形胶质细胞 GFAP 表达情况比较(免疫组化染色, $\times 200$)

二、130 dB 次声作用对小鼠海马 IL-6 及 GFAP 表达的影响

130 dB 次声作用组小鼠海马 IL-6 的变化规律基本与 90 dB 次声作用组相似,但实验小鼠经 130 dB 次声作用 7 d、14 d 及 21 d 后,其海马 IL-6 表达强度明显低于 90 dB 次声作用组($P < 0.05$),具体数据详见表 1。130 dB 次声作用组小鼠星形胶质细胞 GFAP 变化规律也与 90 dB 次声作用组基本相似,但 130 dB 次声作用组星形胶质细胞密度、数量及 OD 值均明显高于 90 dB 次声作用组($P < 0.05$),具体数据详见表 2、图 1。

讨 论

次声是指频率为 0.0001 ~ 20 Hz 的声波,其广泛存在于自然界中,如地震、火山、风暴等自然现象均可产生次声;随着人类科技的高速发展,在交通及工业领域中也都存在一定强度的次声污染。次声对机体具有显著的多系统生物学效应,其原发性作用机制是生物共振效应^[9]。既往研究已证实,次声作用对中枢神经系统、消化系统、心血管系统及泌尿系统等均具有显著影响^[10-13],对中枢神经系统的影响作用尤为突出。通过实验动物行为学研究发现,次声作用可明显抑制大鼠学习记忆能力^[14],故本研究选取机体学习记忆中枢-海马作为重要观察器官。

大量研究表明,次声对中枢神经系统生物学效应具有两面性,一方面能诱导神经元产生缺血、缺氧性改

变,促进神经元凋亡,这也是次声刺激引起实验大鼠学习记忆能力下降的重要机制之一^[2];另一方面次声刺激也可激活中枢神经系统的自我保护功能。我们在前阶段研究中发现,次声刺激可促进一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、C-fos 以及热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)表达^[3-7],这些细胞因子或蛋白均可促进血管扩张、增加神经元营养供给、加快受损神经元功能修复。

近年来随着分子生物学技术的迅速发展,人们愈来愈认识到 IL-6 与中枢神经系统损伤修复过程具有密切联系。IL-6 水平异常增高在许多神经变性疾病、病毒性、细菌性、自身免疫性疾病和癌症病因学研究中均得到证实;当机体发生创伤性脑损伤后,不同实验动物或患者脑组织、脑脊液以及血清中均可检测到 IL-6 和 IL-6 受体水平升高^[15]。目前在临床、动物模型及细胞培养研究中发现,外伤性脑损伤能诱导炎症因子 IL-6 表达。Taupin 等^[16]通过免疫组化法检测到脑受损大鼠脑皮质 IL-6 表达迅速增高,于伤后 8 h 达到高峰,于伤后 18 h 开始逐步下降。有学者对脑损伤动物模型研究后发现,脑组织受伤后 4 ~ 5 d 可在损伤区周围单核细胞内检测到大量 IL-6 mRNA 表达,并发现单核巨噬细胞和星形胶质细胞均呈现 IL-6 阳性表达。以上结果均提示 IL-6 在中枢神经系统损伤过程中具有重要作用。通过分子药理学、细胞免疫分子生物学以及形态学研究后发现,当机体发生脑损伤后,IL-6 可抑制 IL-1 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)合成,并刺激机体产生相应循环拮抗剂,如可溶性肿瘤坏死因子- α 受体和 IL-1 受体拮抗剂等,从而对抗 IL-1 和 TNF- α 所致的炎症损伤;IL-6 还可诱导机体产生肾上腺皮质激素,从而控制机体炎症反应。最近研究还发现,IL-6 作为脑缺血-再灌注损伤时神经元死亡的拮抗因子,具有神经营养、保护作用,并可对交感神经系统功能进行有效调节,它还能促进体外培养的基底前脑胆碱能神经元存活,因此 IL-6 对脑损伤所致学习记

忆能力下降以及突触数量减少等具有抑制作用^[17-19],可见 IL-6 也是一种重要的脑保护因子。故本研究重点探讨次声作用对小鼠海马区 IL-6 表达的影响,以进一步了解次声刺激与中枢神经系统自我保护功能间的相关性。

星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的细胞之一,既往人们认为其作用主要包括支持和营养功能,但目前研究发现,星形胶质细胞在脑损伤修复过程中也具有重要作用,一方面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,另一方面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,因而具有维持神经元微环境稳定、保护神经元的作用;此外脑损伤后星形胶质细胞还可出现返祖现象,即重新逆分化为神经干细胞,参与损伤神经元的修复重建。因此本研究也同时观察了次声刺激对海马区星形胶质细胞的影响。由于 GFAP 是目前公认的星形胶质细胞反应产物之一,因此本研究将 GFAP 作为星形胶质细胞的标记物。

本研究结果表明,次声作用能明显促进海马区 IL-6 以及 GFAP 表达,由于 IL-6 以及 GFAP 是重要的脑保护因子,因此推测次声刺激能激活中枢神经系统自我保护功能,这也为次声防治提供了新的思路。通过本研究结果发现,无论是 90 dB、还是 130 dB 次声(频率均为 16 Hz)作用,它们对 IL-6 的促进效应均于次声作用 14 d 时达到峰值,由于次声刺激引发的神经元损伤大都出现在次声作用 7 d 左右,故本研究推测次声刺激能诱发神经元释放大量损伤因子或细胞毒性物质(如谷氨酸等),而这些损伤因子或细胞毒性物质又反过来激活中枢神经系统的自我保护功能,引起 IL-6 表达水平增加。此外本研究还发现,实验小鼠经次声作用后其脑组织 GFAP 表达水平明显增强,表明次声刺激能促进星形胶质细胞增殖。由于星形胶质细胞可返祖分化为神经干细胞,故本研究推测次声刺激促进星形胶质细胞增殖,可能会增加返祖星形胶质细胞的比例,进而参与损伤神经元的修复。同时本研究结果还显示,130 dB 次声对 IL-6 表达的促进效应弱于 90 dB 次声,提示 130 dB 次声对神经元的损伤作用较严重;另外 130 dB 次声对脑组织 GFAP 表达的促进作用要显著高于 90 dB 次声,提示星形胶质细胞对次声刺激引发的内环境紊乱具有重要调节作用。

综上所述,本研究结果表明次声作用能显著提高实验小鼠 IL-6 表达水平,促进受损脑组织星形胶质细胞增殖,至于次声作用激活中枢自我保护功能的确切

机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈景藻. 次声的产生及生物学效应. 北京:军事医学科学出版社, 1997:194-197.
- [2] 叶琳,龚书明,黄晓峰,等. 次声作用对鼠大脑皮层超微结构的影响. 第四军医大学学报, 2002, 23:856-858.
- [3] 袁华,陈景藻,李玲,等. 次声作用后大鼠脑热休克蛋白 70 的表达与分布. 第四军医大学学报, 1998, 19:606-609.
- [4] Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 2002, 417:39-44.
- [5] 韩良辅,肖华胜,陈景藻. 次声作用引起大鼠下丘脑 c-fos mRNA 与 CRF mRNA 的表达. 第四军医大学学报, 1999, 20:1-3.
- [6] 牟翔,李玲,袁华,等. 慢性次声作用后对小鼠海马内 IL-6 的影响. 中国康复医学杂志, 2005, 20:739-740.
- [7] 牟翔,李玲,袁华,等. 不同声压级次声作用后小鼠海马内白细胞介素-6 mRNA 的变化. 中华神经外科疾病研究杂志, 2006, 5:28-30.
- [8] Schobitz B, Voorhuis DA, Dekloet ER. Localization of interleukin-6 mRNA and interleukin-6 receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett*, 1992, 136:189.
- [9] Backteman O, Kohler J, Sjöberg L. Infrasound-tutorial and review: part 4. *J Low Freq Noise Vib*, 1984, 3:28-67.
- [10] 王冰水,陈景藻,郭国祯,等. 次声暴露对血管内皮细胞骨架微丝 F-actin 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28:28-31.
- [11] 韩风华,黄晓峰,陈景藻,等. 大鼠肾脏经 90 dB 或 130 dB 次声作用后其超微结构的改变. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26:143-146.
- [12] 谭永霞,李玲,陈景藻,等. 8 Hz 次声对大鼠体重及胃十二指肠 5-HT 表达的影响. 中国康复理论与实践, 2004, 10:31-33.
- [13] 韩风华,武毅军,陈景藻,等. 次声作用下大鼠肝细胞损伤作用的超微结构变化. 西南国防医药, 2003, 13:465-467.
- [14] 王斌,陈景藻,易南. 次声对小鼠学习能力的影响及防护. 航空医学, 1997, 25:142-143.
- [15] Morganti MC, Otto VI, Stahel PF, et al. The role of inflammation in neurologic disease. *Curr Opin Crit Care*, 2000, 26:98.
- [16] Taupin V, Toulmond S, Serrano A, et al. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. *J Neuroimmunol*, 1993, 42:177.
- [17] Dziedzic T, Slowik A, Szczudlik A. Interleukin-6 and stroke: cerebral ischemia versus nonspecific factors influencing interleukin-6. *Stroke*, 2003, 34:1864-1869.
- [18] Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18:176-179.
- [19] Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, et al. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured forebrain neurons from postnatal rat. *Neurosci Lett*, 1989, 104:340.

(收稿日期:2008-05-29)

(本文编辑:易 浩)