

· 基础研究 ·

8 Hz 次声作用对大鼠海马脑源性神经 营养因子表达的影响

袁华 龙华 牟翔 李玲 唐晨 张美霞 葛雪松 刘静 瞿丽莉 陈景藻

【摘要】目的 研究频率为 8 Hz, 声压级分别为 90, 100 和 130 dB 的次声作用对大鼠海马脑源性神经营养因子(BDNF)表达水平的影响。**方法** 将 48 只 SD 大鼠随机分为对照组和 90, 100 和 130 dB 次声作用组(次声频率均为 8 Hz), 每组 12 只。将各次声作用组大鼠暴露于 8 Hz、不同声压级次声环境中, 次声每天作用 2 h; 对照组大鼠同期也置于次声舱内, 但期间不给予次声干预。于实验进行 4 周后, 将各组大鼠处死取脑, 采用免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马中 BDNF 蛋白含量变化情况; 采用原位杂交法检测 BDNF mRNA 在海马分布中的变化。**结果** 各次声作用组大鼠海马中 BDNF 含量均有不同程度减少, 随着次声声压级提高, BDNF 水平下降幅度逐渐加重。原位杂交结果显示 BDNF mRNA 在大鼠海马各区域中均有分布, 各次声作用组大鼠海马 BDNF mRNA 水平均较对照组下降, 其中以齿状回部位的下降幅度最为显著。**结论** 实验大鼠经频率为 8 Hz, 声压级为 90, 100 或 130 dB 的次声作用后, 其海马(尤其是齿状回区)BDNF 含量减少, BDNF mRNA 表达水平下降, 这可能是次声作用引起机体学习记忆障碍的重要原因之一。

【关键词】 次声; 海马; 脑源性神经营养因子

The effect of 8 Hz infrasound on the expression of brain derived neurotrophic factor in the rat hippocampus
YUAN Hua*, LONG Hua, MU Xiang, LI Ling, TANG Chen, ZHANG Mei-xia, GE Xue-song, LIU Jing, QU Li-li, CHEN Jing-zao. * Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of 8 Hz infrasound on the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat hippocampus. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into groups to be exposed to 90, 100 and 130 dB infrasound, and a control group ($n = 12$). All the animals in the infrasound exposure groups were exposed to 8 Hz infrasound at the planned intensity for 2 hours daily for 4 weeks. The rats of the control group were treated identically except that the infrasound amplitude was 0 dB. The animals were sacrificed and their brains were examined at the end of the 4-week infrasound exposure. Western blotting was used to detect the expression of BDNF protein, and in situ hybridization (ISH) was used to observe the distribution of BDNF mRNA in the hippocampus. **Results** Eight Hz infrasound induced down-regulation of BDNF protein in the hippocampus, with volume-dependent characteristics. ISH showed that BDNF mRNA was distributed widely in the hippocampus. After exposed to infrasound, BDNF mRNA in the hippocampus decreased, especially in the dental gyrus. **Conclusion** Eight Hz infrasound can down-regulate the expression of BDNF in the hippocampus, especially in the dental gyrus.

【Key words】 Infrasound; Hippocampus; Brain derived neurotrophic factor

次声是频率为 $10^{-4} \sim 20$ Hz 的弹性波, 广泛存在于自然界、工业生产、交通环境及军事环境中^[1]。相关研究表明, 一定参数的次声作用可引发人体工效学下降, 我科以往研究观察到小鼠经次声作用后出现学习、记忆功能下降, 并发现大鼠脑组织中胆碱能神经元、5-羟色胺能神经元以及胶质细胞等均出现损伤反

应, 表明一定参数的次声作用对脑组织具有确切损伤效应^[2-4]。

海马组织在机体学习记忆功能中具有核心作用, 脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 对于海马长时增强效应 (long term potentiation, LTP) 的产生和维持以及突触可塑性等具有重要意义, 因而被认为在机体学习记忆中发挥重要作用。本研究通过观察频率为 8 Hz, 声压级分别为 90, 100 和 130 dB 的次声作用对大鼠海马内 BDNF 含量及分布的影响, 从而探讨次声作用影响机体学习记忆功能的相关机制。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与理疗科 (袁华、牟翔、唐晨、张美霞、葛雪松、刘静、瞿丽莉、陈景藻); 第四军医大学唐都医院骨科 (龙华); 北京中国人民解放军总医院第一附属医院康复理疗科 (李玲)

材料与方法

一、主要实验仪器

采用由我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;此外还设有高灵敏度次声声频和声压检测系统,能同步完成记录时域波形、频谱分析及检测不同次声成分声压强度等参数。

二、动物分组与模型制作

共选取成年雄性 SD 大鼠 48 只,由第四军医大学实验动物中心提供,平均体重 (220 ± 20) g, 8 ~ 10 周龄,饲养于安静环境中,自由饮水,标准饲料喂养,避免各种刺激。将其随机分为 90, 100 和 130 dB 次声作用组(次声频率均为 8 Hz)及对照组,每组 12 只。各次声作用组实验大鼠每天暴露于次声环境下 2 h,对照组实验大鼠每天也置于次声舱内 2 h,但期间无次声作用。

三、材料制备

各次声作用组及对照组大鼠分别于实验进行 4 周后取材,各组均随机选取 6 只大鼠断头取脑,剥离并提取海马组织,将其置于 -80°C 冻存管内冻存,用于免疫印迹(Western blot)检验。各组余下的 6 只大鼠亦断头处死,取全脑组织置于 -80°C 冰箱中保存待用,将全脑进行冰冻切片,片厚 15 μm 。

四、Western blot 操作

将实验大鼠海马样品标本加入裂解液中,用超声粉碎仪匀浆,提取总蛋白。制备 15% 分离胶以及 5% 积层胶,各组样品分别取 50 μg 蛋白上样,室温条件下经 50 mA 电流电泳后,于 100 mA 电流条件下通过湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜经 5% 脱脂牛奶封闭 30 min 后加入经 PBST(含 0.05% Tween-20)稀释的 BDNF 多克隆抗体(1:300, Santa Cruz)或 β -actin 单克隆抗体(1:500, Sigma 公司产品),于 4°C 环境下孵育 18 h,用 PBST 漂洗后加入用 PBST 稀释的 goat anti-rabbit IgG-HRP(1:10000, Sigma 公司产品),室温下孵育 1 h。经 PBST 漂洗后,用 ECL 化学发光法显影。以 β -actin 为内参,采用图像分析系统(Bio-RAD Gel Doc-1000)对蛋白条带进行分析,用目的条带与 β -actin 条带的灰度值之比表示 BDNF 蛋白表达强度。

五、BDNF mRNA 原位杂交

采用 PCR 技术扩增含 BDNF 编码区(224-734)的 510 bp 核酸片段,构建 pBluescript-BDNF 重组质粒。重组质粒分别经 EcoRI 和 HindIII 酶切后,获得线性化含有 BDNF 的片段,以 1.0 μg 此片段为模板,在绝对无 RNA 酶的条件下,按照试剂盒说明书用地高辛

(DIG)-cRNA 标记试剂盒(Boehringer Mannheim, Germany)进行反转录标记反应。标记探针置于 -80°C 环境下备用。

将标本贴片经 4% 多聚甲醛、蛋白酶 K(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 消化,甘氨酸(2 mg/ml)处理,PBST 漂洗后,入预杂交液, 80°C 孵育 1 h;加入含 200 ~ 500 mg/L 探针的杂交液 50 μl , 70°C 杂交 12 h 后用 $5 \times \text{SSC}$ 液(70°C)和 $2 \times \text{SSC}$ 液(65°C)洗脱 3 次;随后每张切片加 500 μl Anti-DIG 抗体(1:2000,Boehringer Mannheim) 4°C 过夜,经 NTMT 洗脱 3 次后进行地高辛-碱性磷酸酶显色反应。阳性杂交信号为蓝紫色,阴性对照(杂交液中不含探针)无色。采用 Quantimet 570 图象分析系统分别测定海马 CA1 ~ CA3 区和 DG 区阳性杂交信号积分光密度(integral optical density, IOD)。

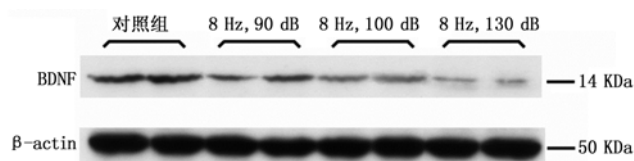
六、统计学分析

研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 版统计学软件进行方差分析,多个样本均数间比较采用最小显著差值法(Least-significant Difference, LSD), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、次声对大鼠海马 BDNF 蛋白含量的影响

Western blot 结果如图 1 所示,各次声作用组和对照组大鼠海马中均有 BDNF 蛋白表达。与对照组 BDNF 阳性条带比较,频率为 8 Hz,声压级分别为 90, 100 和 130 dB 的次声作用组的 BDNF 阳性条带均变浅,以 β -actin 为内参,计算各次声作用组大鼠海马 BDNF 蛋白表达强度结果如表 1 所示。与对照组比较,经 8 Hz, 90 dB 次声作用 4 周后,大鼠海马中 BDNF 蛋白含量开始减少,但两者间差异无统计学意义($P > 0.05$);经 8 Hz, 100 dB 次声作用 4 周后,大鼠海马 BDNF 蛋白含量明显少于对照组大鼠,差异具有统计学意义($P < 0.05$);经 8 Hz, 130 dB 次声作用 4 周后,大鼠海马 BDNF 含量减少更加显著(与对照组比较, $P < 0.01$);表明 8 Hz 次声作用对海马 BDNF 蛋白表达的影响呈现声压级效应,即次声声压级水平越高,则 BDNF 蛋白含量越低。



注:与对照组比较,90,100 和 130 dB 次声(8 Hz)作用组 BDNF 条带染色变浅

图 1 经 8 Hz, 90, 100, 130 dB 次声作用后大鼠海马 BDNF 蛋白含量变化

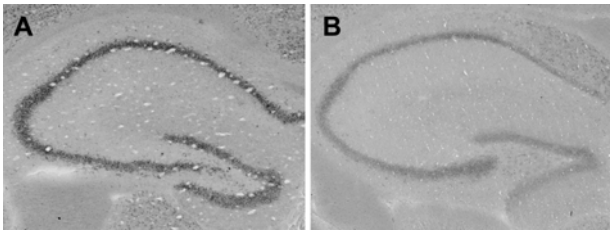
表 1 大鼠经不同声压级次声作用后海马 BDNF 蛋白表达变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	海马 BDNF 蛋白表达
对照组	12	0.40 ± 0.05
90 dB 次声作用组	12	0.37 ± 0.01
100 dB 次声作用组	12	0.36 ± 0.02 ^a
130 dB 次声作用组	12	0.26 ± 0.01 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

二、次声对大鼠海马 BDNF mRNA 的影响

如图 2 所示,对照组大鼠海马 CA1 ~ CA3 区及齿状回区均可见 BDNF mRNA 杂交阳性信号,为蓝色颗粒状物质,主要分布于 CA1 ~ CA3 区锥体细胞和 DG 颗粒细胞的核周胞浆中。各次声作用组大鼠海马中仍可见 BDNF mRNA 信号,形态基本与对照组相同。



注:图 A 示对照组海马 CA1 ~ CA3 及 DG 区均有 BDNF mRNA 表达;图 B 示经 8 Hz, 130 dB 次声作用 4 周后,大鼠海马 CA1 ~ CA3 和 DG 区 BDNF mRNA 阳性信号明显减弱

图 2 次声作用对大鼠海马 BDNF mRNA 的影响(DIG 标记非放射性原位杂交, × 200)

采用图像分析软件计算对照组和各次声作用组原位杂交阳性信号强度值(积分光密度值),结果如表 2 所示,90 dB 次声作用组 CA2 和 DG 区 BDNF mRNA 表达水平降低,与对照组差异具有统计学意义($P < 0.05$);CA1 和 CA3 区 BDNF mRNA 表达也有一定程度降低,但与对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$);100 dB 次声作用组 CA2 区和 DG 区 BDNF mRNA 表达继续降低,CA1 和 CA3 区也出现 BDNF mRNA 表达下降,与对照组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);130 dB 次声作用组 CA1 ~ CA3 区和 DG 区 BDNF mRNA 均继续降低,CA1 ~ CA3 区 BDNF mRNA 阳性信号强度值分别减少至对照组的 84.7%、88.8% 和 76.5%,齿状回区 BDNF mRNA 阳性信号减少最显著,其强度仅为对照组的 66.9%。

表 2 经不同声压级次声作用后大鼠海马 BDNF mRNA 原位杂交阳性信号积分光密度值变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	CA1 区	CA2 区	CA3 区	DG 区
对照组	12	208.81 ± 10.34	197.07 ± 8.66	214.01 ± 6.72	212.87 ± 7.05
90 dB 次声作用组	12	201.33 ± 6.57	176.53 ± 7.57 ^a	179.37 ± 3.38	202.63 ± 5.22 ^b
100 dB 次声作用组	12	190.73 ± 8.60 ^a	175.63 ± 6.57 ^a	173.97 ± 7.76 ^b	187.20 ± 4.52 ^b
130 dB 次声作用组	12	176.83 ± 3.62 ^b	174.93 ± 12.02 ^a	163.67 ± 7.96 ^b	142.52 ± 10.92 ^b

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

讨 论

在当前工业化高速发展过程中,由于各种劳动保护措施的实施,噪声中可听声的比重下降,次声的比重逐渐上升,已成为生产噪声和公共噪声的重要组成部分。Pawlaczyk^[5]在对 124 种工业机械产生的次声调查中发现,约有 96% 的工人暴露在高于标准的次声工作环境中。由于人体各器官都有一个相对固有的振动频率,如脑的固有振动频率为 8 ~ 12 Hz,刚好处于次声振动频率范围内。当机体暴露于次声环境中时,脑可能与次声产生共振反应并吸收能量,从而引起脑细胞分子结构改变并影响其功能^[1]。有研究发现,实验动物经 8 Hz、大于 90 dB 的次声作用后,首先发生神经系统功能障碍,动物定向反应潜伏期延长,拮抗肌时值比降低,主动性抑制改变^[6]。用 15 Hz 以下频率、115 dB 次声作用于人体时,受试者难以完成简单数学运算,并出现头晕、目眩、疲倦、无力、恶心、呕吐、焦躁不安、工效显著下降等症状,并产生精神-情绪变化;经 90 dB 次声作用 3 h 后,发现受试者指针跟踪实验精确性下降^[1]。

次声作用能引起学习记忆能力下降,但其分子机制尚不清楚。张元菊等观察到 16 Hz,130 dB 次声作用于 BALB/C 小鼠 2 h/d,14 d 后小鼠出现记忆能力下降,脑超微结构呈现脂质过氧化性改变^[2]。谭永霞等报道,8 Hz,90,100 和 130 dB 次声作用能引起大鼠 Morris 水迷宫成绩下降,提示次声作用影响了大鼠空间学习记忆能力^[3]。

本研究 Western blot 结果显示,实验大鼠经 8 Hz,90,100 和 130 dB 次声作用后,其海马区 BDNF 蛋白含量减少,提示该参数次声作用能降低 BDNF 蛋白表达水平;且进一步分析后发现,次声减少 BDNF 蛋白表达的效应与次声声压级有关,次声声压级越高,则 BDNF 蛋白含量降低越明显,该结果与我们以往研究观察到 8 Hz 次声作用的声压级效应基本一致。

BDNF 作为神经生长因子家族中的重要成员,在大脑皮质、海马等部位含量丰富。BDNF 不仅能促进神经元分化、生长和存活,而且还能调节突触传递和神经元可塑性^[7]。海马 BDNF 系统功能不全可引起海马萎缩及神经传递效能减弱^[7, 8]。学习过程中海马神经

元棘的改变需要 BDNF 及其受体 TrkB 参与^[8], BDNF 可以调节锚定于海马突触的突触素和突触小泡蛋白的数量^[9], 控制 LTP 的产生和稳定性, 因而在学习过程和海马依赖的认知过程中发挥关键作用^[10]; 同时 BDNF 也参与记忆的形成和保留^[11]。

本实验原位杂交结果显示, 经 8 Hz, 90, 100 和 130 dB 次声作用 4 周后, 实验大鼠海马 CA1 ~ CA3 和 DG 区 BDNF mRNA 含量均不同程度减少, 提示海马中 BDNF 基因转录水平降低。8 Hz 次声的这一效应也与声压级有关, 如大鼠经 90 dB 次声作用 4 周后, 海马 CA2 和 DG 区最先出现 BDNF mRNA 转录水平降低, 随着次声声压级增强, 海马 CA1、CA3 区 BDNF mRNA 转录水平也开始降低; 经 130 dB 次声作用 4 周后, 海马各区 BDNF mRNA 转录水平均降至最低。另外本研究结果还显示, 海马 DG 区 BDNF mRNA 含量从 90 dB 次声作用时即开始降低, 并与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在 130 dB 次声作用下, 其下降幅度尤为显著, 提示大鼠 DG 区 BDNF mRNA 受次声作用影响最明显。

齿状回是成体脑中神经再生的主要集中区之一, 齿状回区新生的神经元将迁移至颗粒层。相关研究发现, 机体学习、记忆功能和情绪调节需要齿状回区新生神经元参与^[12, 13]。刘朝晖等报道, 实验大鼠经 8 Hz, 90 和 130 dB 次声作用 14 d 后, 其海马细胞凋亡率较对照组明显增高^[14]。BDNF 对齿状回神经细胞的增生、分化及存活均具有独特作用^[15], 同时 BDNF 也控制着海马神经元的再生^[16], 注射外源性 BDNF 可以增加海马颗粒细胞数量。因此本研究使用 8 Hz, 90 dB 以上的次声进行干预, 发现能降低大鼠 BDNF 表达, 从而影响齿状回区神经细胞再生, 这也可能是次声作用引起机体学习、记忆功能降低的重要原因之一。

参 考 文 献

- [1] 陈景藻. 次声的存在及其基本生物效应和研究意义. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21: 131-132.

- [2] 张元菊, 陈景藻, 杨俊峰, 等. 16 Hz, 130 dB 次声对小鼠记忆功能和脑超微结构的影响及姜黄素的治疗作用研究. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 152-155.
- [3] 谭永霞, 李玲, 陈景藻. 次声对大鼠学习记忆行为及海马和颞叶皮质 Ryanodine 受体的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 272-276.
- [4] 牟翔, 陈景藻, 李玲, 等. 次声作用对小鼠海马胶质纤维酸性蛋白阳性胶质细胞表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 343-344.
- [5] Pawlaczek LM. Evaluation of occupational exposure to infrasonic in Poland. Int J Occup Med Environ Health, 1999, 12: 159-176.
- [6] 李志刚, 费舟, 贺晓生. 次声对生物中枢神经系统的影响. 中华劳动卫生职业病杂志, 2000, 18: 186-188.
- [7] Manji HK, Quiroz JA, Sporn J, et al. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. Biol Psychiatry, 2003; 707-742.
- [8] Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, et al. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. Learn Mem, 2002, 9: 224-237.
- [9] Vaynman SS, Ying Z, Yin D, et al. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. Brain Res, 2006, 1070: 124-130.
- [10] Allen SJ, Dawbarn D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. Clin Sci (Lond), 2006, 110: 175-191.
- [11] Bekinschtein P, Cammarota M, Izag LM, et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis-and BDNF-dependent phase in the hippocampus. Neuron, 2007, 53: 261-277.
- [12] Raber J, Rola R, LeFevour A, et al. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. Radiat Res, 2004, 82: 39-47.
- [13] Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, et al. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. Neuroscience, 2005, 130: 843-852.
- [14] 刘朝晖, 陈景藻, 李康樗, 等. 不同声压级次声对大鼠海马细胞凋亡的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 148-151.
- [15] Rossi C, Angelucci A, Costantin L, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. Eur J Neurosci, 2006, 24: 1850-1856.
- [16] Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, et al. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. J Neurosci, 2005, 25: 1089-1094.

(修回日期: 2008-02-25)

(本文编辑: 易 浩)

《中华物理医学与康复杂志》2008 年第 5 期 “继续教育园地”测试题

读杂志、获学分, 本刊继续教育园地栏目每期推出, 只要您每期阅读该栏目文章, 正确填写答题卡寄回本刊编辑部, 您就可获得国家 II 类继续教育学分, 全年可获得 5 分。

测试题 (文章见本期 353-355 页, 答题卡见本期 352 页):

- 1、我国对脑性瘫痪的最新定义是如何描述的?
- 2、我国脑性瘫痪的最新分型分为哪 6 型 (按临床神经病学表现) 及哪 5 型 (按瘫痪部位)?

- 3、诊断脑瘫的主要依据及要素有哪些?
- 4、我国小儿脑瘫康复的主要途径有哪三种?
- 5、我国主要采用哪些康复治疗方法对脑瘫患儿进行康复治疗?