

· 基础研究 ·

低强度次声对大鼠海马多聚唾液酸神经细胞黏附因子表达的影响

唐晨 李玲 袁华 牟翔 彭丽岚 张斐 王方聚 赵联伟 陈景藻

【摘要】目的 观察低强度(16 Hz, 90 dB)次声作用不同时间后对大鼠海马多聚唾液酸神经细胞黏附因子(PSA-NCAM)表达的影响。**方法** 将 120 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组及次声作用组,次声作用组又根据次声暴露天数不同进一步划分为次声作用 1 d 组、次声作用 7 d 组、次声作用 14 d 组及次声作用 21 d 组。各次声作用组大鼠分别于相应次声干预结束后即日、7 d、14 d 及 21 d 时灌注取材,采用免疫组化染色法观察各组大鼠海马 PSA-NCAM 表达情况。**结果** 次声作用 7 d 后大鼠海马区 PSA-NCAM 阳性表达明显增强,在次声连续作用 14 d 后达到峰值,在次声作用 21 d 后开始降低,但仍显著高于对照组水平($P < 0.05$)。各次声作用亚组在次声结束后其海马齿状回区 PSA-NCAM 表达均随时间进展呈下降趋势,在次声结束 21 d 时达到最低值,其中以次声作用 14 d 组其 PSA-NCAM 表达降低幅度尤为显著($P < 0.05$)。**结论** 16 Hz, 90 dB 次声作用可引起大鼠海马 PSA-NCAM 表达增强,提示低强度次声在导致中枢神经损伤同时,还能促使机体启动修复机制,增强神经干细胞迁移能力,从而参与次声性脑损伤的修复。

【关键词】 次声; 海马; 神经干细胞; 多聚唾液酸神经细胞黏附因子; 迁移

The effect of exposure to low intensity infrasound on the expression of PSA-NCAM in the rat hippocampus

TANG Chen*, LI Ling, YUAN Hua, MU Xiang, PENG Li-lan, ZHANG Fei, WANG Fang-ju, ZHAO Lian-wei, CHEN Jin-zao. *Department of Physiotherapy, Yantai Sanatorium of the Jinan Military Region of the PLA, Yantai 264001, China

Corresponding author: LI Ling, Email: liling0519@126.com

【Abstract】Objective To observe the expression of the polysialic acid neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in the hippocampus of rats after exposure to low intensity (16 Hz, 90 dB) infrasound for different periods. **Methods** One hundred and twenty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into infrasound exposure and normal groups. The exposure group was further divided into 1 day, 7 days, 14 days and 21 days exposure groups. After exposure, the rats' brains were removed and an immunohistochemical technique was used to observe the expression of PSA-NCAM in the hippocampus after 1, 7, 14 or 21 days of exposure. **Results** The expression of PSA-NCAM had increased significantly after exposure for 7 days. It peaked at 14 days, then had decreased by 21 days, but always remaining higher than in the normal group. After the infrasound exposure had ended, the expression of PSA-NCAM demonstrated a tendency of decrease over time, and the least was on the 21st day. The largest decrease was observed in the 14 days exposure groups. **Conclusion** 16 Hz, 90 dB infrasound can increase the expression of PSA-NCAM in the hippocampus, at least in rats. This suggests that low intensity infrasound might initiate recovery of an injured central nervous system. Migration of neural stem cells may aid in the repair of neural injuries resulted from infrasound exposure.

【Key words】 Infrasound; Hippocampus; Neural stem cells; PSA-NCAM; Migration

频率低于 20 Hz 的声波称为次声,广泛存在于自然界和生活环境中。高强度、长时间次声作用会对脑部产生一系列影响,如脑内 P53 mRNA 表达增高^[1]、谷氨酸转运蛋白 3 (excitatory amino acid transporter 3,

EAAT3) 表达下调等^[2],从而导致脑部神经元受损。

当前研究表明:当中枢神经受到损伤或变性时,会启动一系列再生修复机制,神经干细胞在趋化因子作用下向损伤部位迁移并分化形成新的神经元,这可能是中枢神经修复的重要机制之一。多聚唾液酸神经细胞黏附分子 (polysialic acid-neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM) 是一种在新生成的齿状回颗粒细胞胞体或发育中的树突组织内表达的介导细胞间黏附及识别的糖蛋白,其表达与神经干细胞迁移具有密切联系^[3]。本实验通过观察 16 Hz, 90 dB 次声作用后不同

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.08.001

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:264001 烟台,解放军济南军区烟台疗养院理疗科(唐晨、彭丽岚、张斐、王方聚、赵联伟);解放军总医院第一附属医院康复理疗科(李玲);西安第四军医大学西京医院康复与理疗科(袁华、牟翔、陈景藻)

通信作者:李玲, Email: liling0519@126.com

时间点大鼠海马齿状回区 PSA-NCAM 表达的时序变化,进而探讨次声干预对神经干细胞迁移能力的影响。

材料与方法

一、主要实验仪器

次声源选用本校研制的电激励式次声压力仓系统,包括次声信号源、功率放大器、电动扬声器和次声仓等。此外设有高灵敏度的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声压强度等。

二、实验动物分组与模型制作

共选取成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 120 只,由第四军医大学实验动物中心提供,体重(210 ± 20)g,8~10 周龄,饲养于安静环境下(环境基础噪音不高于 40 dB),大鼠自由饮水,标准饲料喂养。采用随机数字表法将其分为对照组及次声作用组。次声作用组大鼠每天给予 16 Hz,90 dB 次声暴露,每次持续 2 h。该组又根据次声暴露天数不同进一步划分为次声作用 1 d 组、次声作用 7 d 组、次声作用 14 d 组及次声作用 21 d 组共 4 个亚组,每个亚组 24 只大鼠。对照组大鼠每天置于次声仓内 2 h,但期间次声发生器无能量输出。

三、标本制作

各次声亚组大鼠分别于相应次声干预结束后即日、7 d、14 d 及 21 d 时各取 6 只大鼠灌注取材,对照组则分别于假次声作用 1 d、7 d、14 d 及 21 d 时各取 6 只大鼠灌注取材。具体操作步骤如下:实验大鼠经 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后,迅速开胸经左心室至升主动脉插管,用 100 ml 生理盐水洗去血液,再经 400 ml 4% 多聚甲醛灌注固定 2 h。取脑组织置于 20% 蔗糖溶液中(4℃)直至沉底,取前脑置于冰冻切片机上连续连续冠状切片,片厚 30 μ m,然后置于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中待测。

四、免疫组化染色及图像处理

各组大鼠切片隔五取一,采用抗生物蛋白-生物素-过氧化物酶复合物(avidin-biotin-peroxidase complex, ABC)法进行抗 PSA-NCAM 免疫组化染色。将切片放入 0.3% 甲醇双氧水中 15 min,再置入 0.3% Triton X-100 PBS 中浸泡 30 min(室温环境下),依次加入小鼠抗 PSA-NCAM 抗体(1:1000,美国 Sigma 公司出品)4℃ 孵育 48 h,由生物素标记的大鼠抗小鼠 IgG(1:500,美国 Sigma 公司出品)室温下孵育 2 h,生物素-卵白素-辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)复合物(1:500,美国 Sigma 公司出品)室温下孵育 2 h,以上各步骤中间均用 0.01 mol/L PBS 液充分

漂洗 3 次,每次 10 min;经葡萄糖氧化酶-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)-硫酸镍胺法呈色,可见免疫阳性物呈紫蓝色。阴性对照选用一抗稀释液(1% 小牛血清白蛋白 + 0.3% Triton X-100 + 0.01 mol/L PBS 液)替代孵育,其它反应步骤同上。所有阴性对照切片均未见阳性染色。每只大鼠均选取 3 张典型海马切片,通过高倍显微镜($\times 400$ 倍)在海马齿状回区选取 3 个视野进行 PSA-NCAM 阳性细胞计数。采用 Image-pro plus 5.0 版图像处理软件对各组大鼠染色结果进行分析,统计每个高倍镜视野中 PSA-NCAM 阳性产物像素值。

五、统计学分析

选用 SPSS 11.0 版统计学软件包进行数据处理,各组数据组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

PSA-NCAM 主要在新生神经细胞的细胞膜和新生或处于发育状态的轴突及树突周围表达,免疫组化染色呈蓝紫色。经 Image-Pro Plus 5.0 版图像处理软件分析后发现,对照组(图 1a、b)大鼠海马齿状回区颗粒细胞层 PSA-NCAM 表达较弱,PSA-NCAM 阳性细胞较少,阳性树突较短;次声作用组 PSA-NCAM 表达增强,在次声作用 14 d 时达到峰值(图 1c),可见 PSA-NCAM 阳性细胞及阳性树突明显增多,PSA-NCAM 阳性树突逐渐延伸,在次声作用 21 d 时 PSA-NCAM 表达出现下降(图 1d),表现为 PSA-NCAM 阳性树突减少、变短,但仍显著强于对照组水平($P < 0.05$);而对照组经假次声作用 1 d、7 d、14 d 及 21 d 后其 PSA-NCAM 表达均无显著变化($P > 0.05$),具体结果见表 1。

表 1 次声作用不同时间对大鼠海马齿状回区 PSA-NCAM 阳性表达的影响(像素/每高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	次声作用 1 d	次声作用 7 d	次声作用 14 d	次声作用 21 d
次声作用组	24	114 914.7 $\pm$ 28 274.1	202 830.7 $\pm$ 90 628.2 ^a	320 594.7 $\pm$ 41 515.9 ^a	221 582.7 $\pm$ 36 618.2 ^a
对照组	24	86 681.3 $\pm$ 25 919.3	106 185.0 $\pm$ 23 655.2	95 139.3 $\pm$ 33 184.5	93 333.0 $\pm$ 35 335.5

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

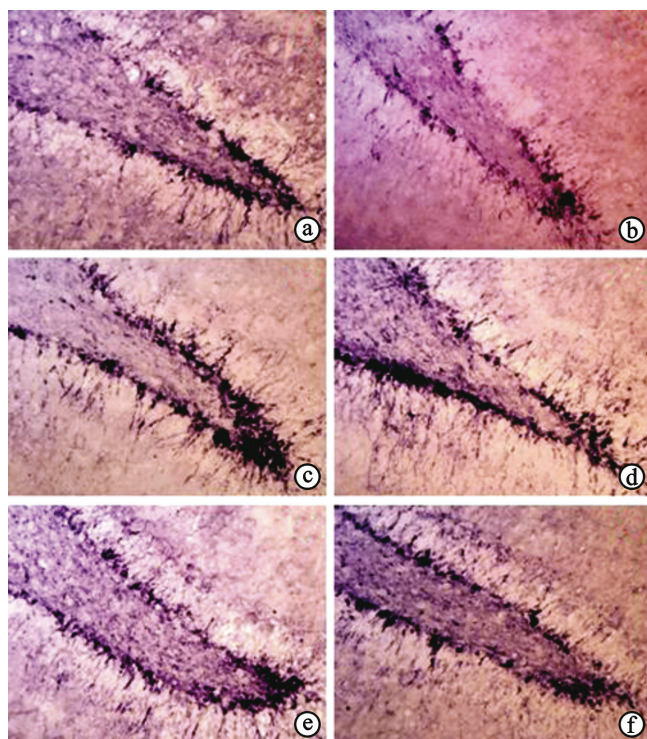
各次声亚组大鼠均以次声停止作用后即日其海马齿状回区 PSA-NCAM 表达强度最高,随后表达开始逐渐下降,表现为 PSA-NCAM 阳性细胞减少,阳性树突变短、变少(图 1e、f),在次声结束 21 d 时达到最低值,其中以次声作用 14 d 组在次声结束 21 d 时其 PSA-NCAM 表达强度降低幅度尤为显著,与次声结束即时差异具有统计学意义($P < 0.01$);另外次声作用 1 d

组大鼠海马齿状回区 PSA-NCAM 表达强度在次声结束后即日、7 d、14 d 及 21 d 时均无显著变化 ($P > 0.05$), 具体结果见表 2。

表 2 次声结束后不同时间点各组大鼠海马齿状回区 PSA-NCAM 阳性表达比较 (像素/每高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	次声结束后 即日	次声结束 7 d 时	次声结束 14 d 时	次声结束 21 d 时
次声作用 1 d 组	24	114 914.7 ± 28 274.1	102 513.3 ± 12 298.4	100 230.0 ± 39 189.1	90 083.3 ± 10 608.8
次声作用 7 d 组	24	202 830.7 ± 90 628.2	188 322.7 ± 17 717.5	161 800.7 ± 22 234.7	139 358.3 ± 15 560.4 ^b
次声作用 14 d 组	24	320 594.7 ± 41 515.9	294 272.3 ± 18 222.8	236 857.3 ± 32 212.2 ^a	196 860.0 ± 30 499.9 ^a
次声作用 21 d 组	24	221 582.7 ± 36 618.2	203 190.3 ± 10 952.3	171 024.7 ± 19 510.2	153 436.7 ± 22 970.8 ^b

注:与次声结束后即日比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$



注:a 对照组经假次声作用 14 d 时;b 对照组经假次声作用 21 d 时;c 次声组经次声作用 14 d 时;d 次声组经次声作用 21 d 时;e 次声作用 14 d 组在次声结束 14 d 时;f 次声作用 21 d 组在次声结束 14 d 时

图 1 各组大鼠海马齿状回区 PSA-NCAM 表达情况比较 (免疫组化染色, $\times 400$)

讨 论

次声是由物质振动产生的频率低于 20 Hz 的机械波,是生产噪声和公共噪声的重要组成部分,频率多集中在 16 Hz 范围,其次是 8 Hz。相关实验证明 16 Hz 次声对脑部的影响较 8 Hz 次声更为显著^[4]。海马是脑内与学习、记忆关系最密切的组织之一,海马部位神经发生对大脑学习、记忆功能具有重要影响作用^[5]。

相关研究表明,次声作用能促进小鼠海马内 B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, bcl-2) mRNA 表达增强^[6], Ca^{2+} 分布减少^[7],并且对海马各区蛋白激酶 A 及环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 磷酸化水平均有不同程度影响^[8],还会导致大鼠海马齿状回区神经细胞数量减少,加速学习、记忆功能衰退^[9]。因此本研究采用 16 Hz 次声对实验大鼠进行干预,并选定海马作为观察部位,以探讨次声作用不同时间后大鼠海马 PSA-NCAM 表达的变化。

神经干细胞是指中枢神经系统中具有自我更新能力、并且能够分化为各种成熟脑细胞 (包括神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞等) 的多潜能细胞,一般处于相对静止状态。当中枢神经系统发生脑缺血或脑损伤时,神经干细胞可被激活,从某一特定部位迁移到另一特定区域并发挥相应功能。目前研究发现,PSA-NCAM 与神经干细胞迁移具有密切相关性^[10-12]。神经细胞黏附分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) 属于细胞黏附分子免疫球蛋白超家族 (immunoglobulin superfamily, IGSF),是细胞黏附因子中的一员,主要在新生的齿状回颗粒细胞胞体或发育中的树突组织内表达。有研究表明多聚唾液酸 (polysialic acid, PSA) 对 NCAM 具有重要影响,由于 PSA 带有大量负电荷,具有亲水性,能在 NCAM 膜外形成 PSA 水化球,在神经生长发育及损伤修复阶段,PSA 复合物表达增高^[13],能增加 NCAM 间的排斥作用,减少细胞黏附性,有利于细胞迁移以及神经向外生长;当 PSA 复合物表达减少时,将增加细胞黏附作用,维持结构功能,可见 PSA-NCAM 表达水平与神经细胞迁移具有密切关联,即 PSA-NCAM 高表达有助于神经干细胞迁移更远距离,从而加速受损神经功能恢复。

本研究结果显示:16 Hz, 90 dB 次声作用会引起大鼠海马齿状回区 PSA-NCAM 表达增强,在次声作用 14 d 时达到峰值,在次声作用 21 d 时开始下降,但仍显著高于对照组水平;其变化趋势与以往研究报道 16 Hz, 90 dB 次声引起大鼠脑皮质损伤过程基本一致^[14]。提示低强度次声在引起中枢神经损伤同时,还能同时促进大鼠海马神经干细胞迁移,并且随着次声作用时间增加,其神经干细胞迁移微环境也在不断改善。至于次声作用 21 d 后脑内 PSA-NCAM 表达下降,可能与实验动物脑组织对次声作用产生适应性有关^[15]。

对本研究结果进一步分析后发现,当次声作用停止后,各组大鼠 PSA-NCAM 表达逐渐下降,于次声结束后 21 d 时达到最低值,其中以次声作用 14 d 组 PSA-NCAM 表达下降幅度尤为显著。谭永霞等^[16]研

究证实,次声作用结束后随着时间延长,次声引起的脑部变性损伤会逐渐恢复,与本实验次声作用结束后 PSA-NCAM 表达时程基本一致。至于次声作用 14 d 组 PSA-NCAM 表达在次声结束 21 d 时较次声结束即日时显著下降,可能是由于该组次声引发的脑部变性损伤较其他各组严重,加速了神经干细胞迁移,其损伤的修复速度也相对加快。随着次声结束后时间延长,大鼠受损脑神经功能逐渐恢复,故神经干细胞的迁移能力也随之减弱,从而出现 PSA-NCAM 表达显著降低,这也提示 PSA-NCAM 可能参与了次声所致脑损伤的修复过程。关于次声促进大鼠海马神经干细胞迁移的具体机制,还需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 牟翔,袁华,李玲,等. 高强度次声作用小鼠后海马内 P53 mRNA 表达的变化. 中国康复医学杂志,2008,23:320-321.
- [2] 赵金安,胡炜,费舟,等. 次声脑损伤后脑组织谷氨酸转运蛋白 3 的改变及意义. 神经损伤与功能重建,2009,1:28-29.
- [3] Iwai M, Hayashi T, Zhang WR, et al. Induction of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in postischemic gerbil hippocampus mainly dissociated with neural stem cell proliferation. Brain Res, 2001, 902:288-293.
- [4] 傅国友,陈景藻,贾克勇. 大鼠次声刺激后脑组织谷氨酸的变化. 第四军医大学学报,1999,20:288-290.
- [5] 钟乐,颜崇淮,陆澄秋,等. 断乳前丰富环境暴露促进大鼠学习记忆及海马神经发生. 中国行为医学科学,2007,16:779-782.
- [6] 牟翔,袁华,李玲,等. 小鼠次声刺激后海马内 bcl-2 mRNA 表达的变化. 中华神经外科疾病研究杂志,2008,7:328-330.
- [7] 赵志刚,唐笑先,王爽,等. 130 dB 次声作用后大鼠下丘脑神经细胞钙离子分布. 中华神经外科疾病研究杂志,2008,7:209-211.
- [8] 刘朝晖,陈景藻,邱建勇,等. 8 Hz-90 dB 次声作用对大鼠海马蛋白激酶 A 表达及 cAMP 反应元件结合蛋白磷酸化水平的影响. 中国康复医学杂志,2008,23:198-201.
- [9] 袁华,龙华,牟翔,等. 8 Hz 次声对大鼠学习记忆能力和神经元再生的影响. 中国康复医学杂志,2008,23:385-387.
- [10] Bruses JL, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. Biochimie, 2001, 83:635-643.
- [11] Ulfing N, Chan WY. Expression patterns of PSA-NCAM in the human ganglionic eminence and its vicinity; role of PSA-NCAM in neuronal migration and axonal growth. Cells Tissues Organs, 2004, 177:229-236.
- [12] Kiss JZ. A role of adhesion molecules in neuroglial plasticity. Mol Cell Endocrinol, 1998, 140:89-94.
- [13] Aubert I, Ridet JL, Schachner M, et al. Expression of L1 and PSA during sprouting and regeneration in the hippocampal formation. J Comp Neuro, 1998, 399:1-19.
- [14] 唐迪,陈景藻,李玲,等. 次声不同时间作用后对大鼠大脑皮质超微结构的影响. 中华物理医学与康复杂志,2006,28:309-311.
- [15] 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,2004,26:148-150.
- [16] 谭永霞,李玲,陈景藻,等. 次声对大鼠海马 5-HT_{1A}、5-HT_{1B} 及 RyR 表达及恢复的研究. 中国神经外科疾病研究杂志,2005,4:324-327.

(修回日期:2012-07-25)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

社区和居家康复指导丛书已出版发行

为了适应我国卫生部、中国残联“十二五”规划对社区康复发展的要求,应华中科技大学出版社的要求,由华中科技大学同济医学院附属协和医院康复医学科王刚教授担任总主编、由国内外康复专家分别主编的社区和居家康复指导丛书已陆续出版发行,前期第一部分包含十四本书,分别是:《脑卒中病人社区和居家康复训练指导手册》、《脊髓损伤病人社区和居家康复训练指导手册》、《脑瘫病人社区和居家康复训练指导手册》、《骨折病人社区和居家康复训练指导手册》、《手外伤术后社区和居家康复训练指导手册》、《人工髋关节置换术后社区和居家康复训练指导手册》、《人工膝关节置换术后社区和居家康复训练指导手册》、《膝骨性关节炎病人社区和居家康复训练指导手册》、《颈肩痛病人社区和居家康复训练指导手册》、《足底痛病人社区和居家康复训练指导手册》、《骨质疏松症病人社区和居家康复训练指导手册》、《腰椎间盘突出症病人社区和居家康复训练指导手册》、《帕金森氏病病人社区和居家康复训练指导手册》、《传统康复治疗的社区和居家康复训练指导手册》。

该书采用问答的形式,图文并茂,操作性强,适宜于社区康复指导员、家属、康复治疗专业在校学生以及初级康复治疗师和康复医师使用。订价:每本 10 - 13 元,邮费 5 元;10 本以上免邮费。订购热线:027 - 85726092,手机:18602746440;邮箱:275419466@qq.com;汇款地址:武汉协和医院康复医学科,邮编 430022,收款人:毛朝琴。