

· 基础研究 ·

8 Hz/130 dB 次声对大鼠心肌细胞的损伤作用研究

裴兆辉 陈景藻 朱妙章 李玲 庄志强

【摘要】目的 观察次声对大鼠心肌的影响并探讨其相关机制。**方法** 用 8 Hz/130 dB 的次声分别作用大鼠 1, 7, 14, 21 和 28 d, 每日 2 h, 观察大鼠心肌细胞超微结构的变化和心肌的凋亡情况以及次声引起的心肌氧化损伤。**结果** 与对照组比较, 次声暴露组大鼠心肌超微结构出现损伤; 心肌细胞凋亡增加 ($P < 0.01$); 心肌组织 MDA 含量增加 ($P < 0.01$), SOD 含量降低 ($P < 0.01$), 心肌出现氧化损伤。这些损伤性变化随着时间的延长而逐渐加重。**结论** 次声可引起大鼠心肌损伤, 损伤程度与次声暴露时间有关。

【关键词】 次声; 心肌损伤; 大鼠

Effects of infrasound on rat myocardial cell and its underlying mechanism PEI Zhao-hui*, CHEN Jing-zao, ZHU Miao-zhang, LI Ling, ZHUANG Zhi-qiang. * Department of Physical Therapy & Rehabilitation, Xijing Hospital, Xi'an 710033, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of infrasound on rat myocardial cells and to study its underlying mechanism. **Methods** One hundred Sprague-Dawley rats were divided into a normal control group and a infrasound exposure group, composed of various subgroups subject to exposure to infrasound for 2 hours daily for 1 d, 7 d, 14 d, 21 d, and 28 d, respectively. The ultra-microstructure and apoptosis of the rat myocardial cells were observed, and SOD and MDA were measured. **Results** After exposure to infrasound, significant ultra-microstructural impairment and increased apoptosis of the myocardial cells were observed in the infrasound exposure group as compared to those of the normal control group, ($P < 0.01$), there also observed significant time-dependent increase of MDA and significant time-dependent decrease of SOD in the rat myocardial cells ($P < 0.01$). **Conclusion** Infrasound can induce damage to the rat cardiac muscle cells dependent on the exposure time to infrasound.

【Key words】 Infrasound; Cardiac muscle damage; Rats

自然环境是人类生存的物质基础,保护和改善自然环境,是人类维护自身生存和发展的前提。如何处理好人类与自然的关系是目前面临的重要课题。随着经济的快速发展,环境污染日益严重,探索生活中各环境的影响因素尤为必要。次声在环境中比较广泛地存在,是环境污染的因素之一^[1]。人体和其它生物体均可以产生次声,当次声振荡频率与人体内脏器官的振荡节律相同或相近时,会发生共振或叠加等声学效应,可能影响心肌功能,甚至出现心肌损伤^[2]。本实验研究 8 Hz/130 dB 次声暴露对心肌的影响,为次声防护提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物及试剂

实验动物为本校实验动物中心引进的健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体质量 180 ~ 220 g。采用完全随机法将 100 只动物分为正常对照组和次声暴露

组,每组 50 只大鼠。将 2 组大鼠分别置于次声舱中,正常对照组大鼠不施以次声作用,次声暴露组大鼠施以次声作用,每天 1 次,每次 2 h。根据两组在次声舱中的时间 1, 7, 14, 21 和 28 d,又将两组各分成 5 小组,每小组各 10 只大鼠。通过微机系统调制并传送次声。透射电镜为 Olympus 公司产品。Tunnel 试剂盒为美国 DAKO 公司产品。丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒均购于北京军事医学科学院。

二、透射电镜观察

动物采用 29 g/L 苯巴比妥钠腹腔注射麻醉,开胸经左心室至主动脉插管,剪破右心耳,先用 200 mL 的生理盐水冲洗,再灌注含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 500 mL,持续 1 h,取出左心室,在解剖显微镜下小心切取左心室浸入 2.5% 戊二醛溶液中,放于 4℃ 冰箱内保存待用。观察时将标本用丙酮系列脱水,常规脱水,包埋,超薄切片,铀-铅双染色,透射电镜 (JEM-2000EX) 下观察。

三、次声作用后大鼠心肌细胞凋亡测定 (TUNEL 法)
取标本方法同上,将心肌组织置于盛有 95% 酒精

基金项目:国家自然科学基金资助 (No. 30400091)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院理疗与康复医学科 (裴兆辉),基础部生理教研室 (朱妙章);北京 304 医院康复医学科 (李玲)

的青霉素小瓶中固定,不少于 1 h。常规进行石蜡包埋,制成 10 μm 厚的切片。切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化;再浸于 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K 中,室温消化 15 min,尔后用去离子水洗 2 min $\times$ 4;于 30 ml/L H_2O_2 中室温下封闭 23 min,以 0.05 M PBS(含 0.2 M NaCl)洗 5 min $\times$ 2;向组织片滴加平衡缓冲液,室温下作用 15~30 s;滴加 TdT 酶,盖塑料盖片,于温箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 65 min;于 37 $^{\circ}\text{C}$ STOP/WASH 缓冲液中振荡孵育 10 min,尔后 PBS 洗 5 min $\times$ 3;滴加过氧化物酶,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 湿箱中孵育 30 min;PBS 洗 5 min $\times$ 4;DAB 显色 10 min,1% 甲基绿复染 8 min,脱水透明、封片。以 PBS 替代 TdT 酶作为阴性对照。

四、次声作用后大鼠心肌细胞氧化损伤测定

采用 30 g/L 巴比妥钠腹腔麻醉大鼠后,剪下左心室心肌组织,用 pH6.4 的磷酸缓冲液制成 1:10 匀浆,12 000 $\times g$ 离心,取上清液准备测定 MDA 和 SOD 用。心肌组织匀浆中 MDA 含量、SOD 活性按试剂盒说明测定。

五、统计学分析

实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 11.0 进行数据分析。组间比较采用析因设计的方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、次声作用后心肌超微结构观察

在次声暴露期间,与对照组(图 1A)比较,随着时间的增加,心肌组织损伤逐渐加重:1 d 组无明显变化,细胞形态完整,细胞核清晰,核仁明显,闰盘、横小管、肌浆网、线粒体、肌丝等超微结构清晰可见(图 1B);7 d 组心肌细胞出现少数线粒体轻度肿胀,偶见内质网扩张及细胞内水肿(图 1C);14 d 组心肌细胞出现较多线粒体肿胀,偶见内质网扩张、肌丝溶解、线粒体嵴模糊(图 1D);21 d 组心肌细胞出现较多线粒体肿胀,内质网扩张、肌丝溶解、线粒体嵴模糊,闰盘间隙扩大,髓样结构出现,心肌细胞间质有血小板聚集(图 1E);28 d 组心肌细胞出现较多线粒体肿胀、内质网扩张、肌丝溶解、线粒体嵴模糊、闰盘间隙扩大、溶酶体、肌浆网扩张,心肌细胞间质有毛细血管壁破裂,明显出血灶(图 1F)。详见图 1。

表 1 8 Hz/130 dB 次声对大鼠照射不同时间后心肌细胞凋亡率、MDA 含量、SOD 含量的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	心肌细胞凋亡率(%)				
		1 d 组($n_1=10$)	7 d 组($n_2=10$)	14 d 组($n_3=10$)	21 d 组($n_4=10$)	28 d 组($n_5=10$)
对照组	50	1.9 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.5
次声暴露组	50	2.8 $\pm$ 0.5 *	4.8 $\pm$ 0.7 [#] Δ	7.9 $\pm$ 0.7 [#] Δ	10.6 $\pm$ 1.1 [#] Δ	15.5 $\pm$ 1.4 [#] Δ
组 别	n	MDA 含量(nmol/g)				
		1 d 组($n_1=10$)	7 d 组($n_2=10$)	14 d 组($n_3=10$)	21 d 组($n_4=10$)	28 d 组($n_5=10$)
对照组	50	28 $\pm$ 2	27 $\pm$ 3	27 $\pm$ 3	27 $\pm$ 3	27 $\pm$ 3
次声暴露组	50	48 $\pm$ 2 [#]	54 $\pm$ 4 [#] Δ	65 $\pm$ 5 [#] Δ	74 $\pm$ 4 [#] Δ	85 $\pm$ 5 [#] Δ

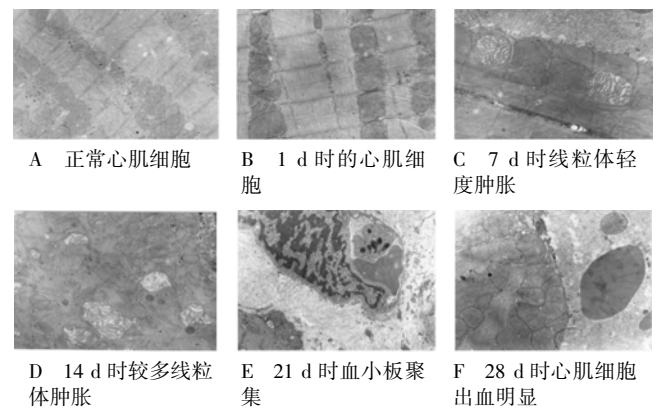


图 1 8 Hz/130 dB 次声作用后心肌细胞超微结构的变化($\times 8\ 000$)

二、次声作用后大鼠心肌细胞凋亡(TUNEL 法)情况和 MDA、SOD 含量的变化

1. 心肌细胞凋亡:正常心肌细胞不显色或呈浅棕色,凋亡的心肌细胞染色质呈深棕色。在次声暴露期间,与对照组比较,随时间延长,1,7,14,21,28 d 组心肌细胞发生凋亡的细胞数逐渐增多。见图 2,A 为对照组。

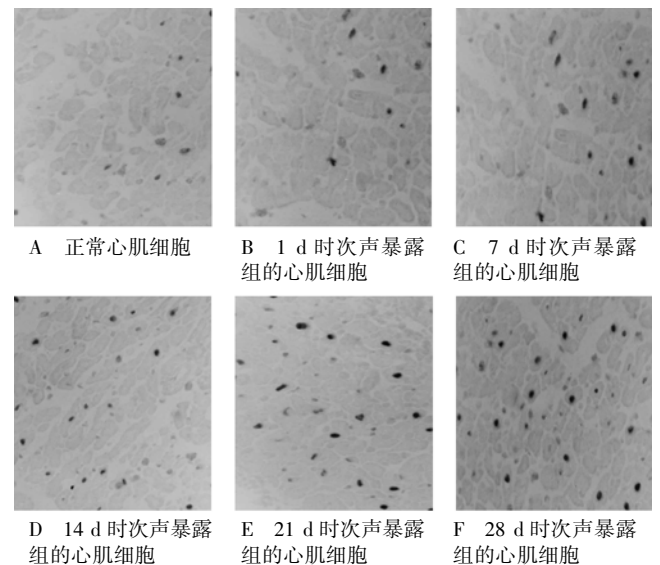


图 2 8 Hz/130 dB 次声作用后大鼠心肌细胞凋亡变化($\times 200$)

2. 8 Hz/130 dB 次声对心肌 MDA 含量的影响:在次声暴露期间,随时间延长,心肌组织 MDA 含量逐渐增多($P < 0.01$)。

3. 130 dB 次声对心肌 SOD 含量的影响:在 130 dB 次声暴露期间,1 d 组心肌 SOD 含量降低($P < 0.05$),7,14,21,28 d 组 SOD 含量显著降低($P < 0.01$)。

组 别	n	SOD 含量(U/g)				
		1 d 组($n_1=10$)	7 d 组($n_2=10$)	14 d 组($n_3=10$)	21 d 组($n_4=10$)	28 d 组($n_5=10$)
对照组	50	9.0 ± 0.9	9.1 ± 0.9	9.1 ± 0.8	9.2 ± 0.7	9.0 ± 0.8
次声暴露组	50	5.2 ± 0.6 [#]	4.2 ± 0.6 ^{*#}	3.10 ± 0.9 ^{*#}	2.3 ± 0.7 ^{*#}	1.7 ± 0.7 ^{*#}

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$;与次声暴露组前一时间组比较, $\Delta P < 0.01$

讨 论

次声对心血管系统有损害作用。人体暴露于次声环境会出现胸闷、心悸等症状,甚至死亡,轻重程度与次声暴露时间、频率及声压级有关,因而明确次声性心血管损害的机制非常重要^[2,3]。

生物体不同部位和器官发出低频声,生物体心脏发出的低频声频率一般为 5 Hz,在次声频率范围内。当次声作用生物体时其频率与生物体组织器官的固有频率相同时,会发生共振或叠加效应,引起生理反应,甚至造成病理改变,导致组织器官的损伤^[4]。我们实验所用的次声频率为 8 Hz 的次声,与心脏自身产生的 5 Hz 次声是两个频率相近波,当它们相遇时发生叠加,会产生振幅和频率的改变,从而影响生物体的正常生理活动。

大鼠在 8 Hz/130 dB 次声暴露后,心肌于 1, 7, 14 和 28 d 时出现心肌细胞的超微结构的变化以及 MDA 和 SOD 的改变。

造成这些损伤的原因可能是:次声对物质超微结构的损伤首先是直接的物理损伤。细胞受到次声作用后,细胞膜结构的稳定性遭到破坏,从而导致一系列不良变化。次声在传播过程中会引起物质性质和状态的变化,导致力学、热学、光学、电学等物理效应的出现,这些物理效应可以直接损伤心肌组织超微结构,影响到心肌组织的功能,如能量代谢、离子电流、心肌收缩等。因而有人指出,次声导致的损伤作用机制中,细胞膜结构的功能原发性损伤最早出现^[5,6]。

另外,次声可以引起化学损伤。如次声可引起生物体自由基增多,造成生物体损伤^[7,8],本实验结果也可以证实。在次声的作用下,随时间延长自由基产生增加,抗氧化损伤能力降低,心肌超微结构损伤加重。自由基具有很强的生物活性,很容易与生物大分子反应,直接损害或者通过一系列过氧化链式反应而引起广泛的生物结构的破坏^[9]。为了减少有氧代谢过程中自由基对细胞的损害,细胞内发生着一系列有效的抗氧化防御机制,包括 SOD、过氧化氢酶(CAT)等。通常细胞处于氧化与抗氧化平衡中而维持着正常的功能。次声作用后生物体氧化与抗氧化作用失衡,心肌出现氧化损伤^[10]。

次声引起心肌细胞发生凋亡,据报道^[11]与次声能引起心肌细胞内钙超载有关,而且随时间的延长心肌细胞内钙超载增加。因此,可以推测 Ca^{2+} 在次声性心肌凋亡中起着重要作用。在 X 线诱发胸腺细胞和脾细胞凋亡中有 Ca^{2+} 和核酸内切酶活化的作用。由于细胞

凋亡与 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸酶和细胞核内某些不稳定性结合有关,如抑制 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶的活性,则可抑制凋亡的发生^[12]。研究还发现凋亡中 DNA 降解片段现象与内源性 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶活性增高相一致,这种酶可被 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 激活,而被生理浓度的 Zn^{2+} 所抑制^[13]。

上述研究结果表明:次声可引起心肌损伤,次声性心肌损伤与次声作用时间密切相关,随次声暴露时间延长,次声性心脏损伤逐渐加重。

参 考 文 献

- 1 裴兆辉,陈景藻,朱妙章,等. 次声对人类的影响. 中国自然医学杂志, 2004, 6: 125-127.
- 2 裴兆辉. 次声对心血管系统的影响. 见:朱妙章,等,主编. 心血管生理学与临床. 北京:高等教育出版社, 2004. 611-614.
- 3 丘萍,温宁,姜勇,陈景藻. 次声的物理存在及研究意义. 中华预防医学杂志, 2003, 37: 56-58.
- 4 赵志刚,陈景藻,张李燕. 次声作用后大鼠血浆中血管紧张素 II 含量的改变. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 83-85.
- 5 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层 Ryanodine 受体的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 272-275.
- 6 裴兆辉,陈景藻,朱妙章,等. 次声诱导的大鼠心肌细胞凋亡和血管内皮损伤. 第四军医大学学报, 2004, 25: 97-99.
- 7 Schlüter T, Struy H, Schönfeld P. Protection of mitochondrial integrity from oxidative stress by the triaminopyridine derivative flupirtine. FEBS Letter, 2000, 481: 42-46.
- 8 Wang JM, Silva JP, Gustafsson CM, et al. Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 4038-4043.
- 9 He L, Perkins GA, Poblentz AT, et al. Overexpression blocks Bax-mediated mitochondrial contact site formation and apoptosis in rod photoreceptors of lead-exposed mice. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 1022-1027.
- 10 Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y, et al. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. Life Sci, 2000, 67: 101-112.
- 11 Kayanoki Y, Fujii J, Islam KM. The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. J Biochem (Tokyo), 1996, 119: 817-822.
- 12 Conradt B, Horvitz HR. The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the bcl-2-like protein CED-9. Cell, 1998, 93: 519-529.
- 13 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.

(修回日期:2005-10-10)

(本文编辑:熊芝兰)