

· 基础研究 ·

次声作用后大鼠颞叶皮层 5-HT、5-HTR、RyR 表达及恢复时间

李玲 谭永霞 陈景藻 邱建勇 刘朝晖

【摘要】目的 研究 8 Hz、130 dB 的次声作用后大鼠颞叶皮层 5-羟色胺(5-HT)、5-羟色胺受体(5-HTR)、兰尼定受体(RyR)表达的改变及恢复时间。方法 大鼠暴露于 8 Hz、130 dB 次声仓 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 d 后置安静环境恢复 1~2 周,取脑组织并进行免疫组织化学染色,光学显微镜下观察颞叶皮层 5-HT、5-HTR、RyR 表达的变化。结果 次声作用各组大鼠脑组织颞叶皮层 5-HT、5-HTR、RyR 表达均较对照组减少,最低值分别出现于 21 d、28 d 和 42 d ($P < 0.01$)。各恢复组大鼠颞叶皮层 5-HT、5-HTR、RyR 表达均较其相应次声作用组增多,并随恢复时间的延长而增加。结论 8 Hz、130 dB 次声可引起大鼠颞叶皮质 5-HT、5-HTR、RyR 表达减少,其变化规律与次声作用参数有关;次声引起的 5-HT、5-HTR、RyR 表达减少在停止次声作用后可逐渐恢复正常。

【关键词】次声; 大鼠; 颞叶皮层; 5-羟色胺; 5-羟色胺受体; 兰尼定受体; 恢复

The recovery of 5-HT, 5-HTR and RyR in rats temporal cortex after infrasound exposure of 8 Hz 130 dB

LI Ling*, TAN Yong-xia, CHEN Jing-zao, QIU Jian-yong, LIU Zhao-hui. * Department of Rehabilitation and Physiotherapy, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】Objective To study the recovery of 5-HT, 5-HTR and RyR expression in rats temporal cortex after different time of exposure to 8 Hz, 130 dB infrasound. Methods A total of 140 Sprague-Dawley rats were used in this study. The animals were divided into a control group and various infrasound exposure groups subject to infrasound exposure of 8 Hz and 130 dB for 1, 7, 14, 21, 28, 35 or 42 days, respectively. A half of the animals (exposure subgroups) in the infrasound exposure groups were sacrificed immediately at the end of the last exposure and another half (recovery subgroups) were placed in quiet environment for recovery for 1 or 2 weeks before being sacrificed at due time. All the animals' brains were sampled and stained immunohistochemically for the observation of 5-HT, 5-HTR and RyR expression. Results The expression of 5-HT, 5-HTR and RyR in temporal cortex were decreased in rats exposed to infrasound as compared with that in the control rats, the least expression was observed at the 21st, the 28th and the 42nd days ($P < 0.01$). There observed more positive expression of 5-HT, 5-HTR and RyR in temporal cortex in the recovery subgroups than that in the corresponding exposure subgroups, and the longer the recovery time, the more expression of 5-HT, 5-HTR and RyR. Conclusion The decreased expression of 5-HT, 5-HTR and RyR in temporal cortex of rats could result from exposure to infrasound of 8 Hz, 130 dB, which could recover gradually after cessation of infrasonic exposure.

【Key words】Infrasound; Rats; Temporal cortex; 5-HT; 5-HTR; RyR; Recovery

次声是频率为 0.000 1~20 Hz 的机械震动波,它通过共振效应引起动物和人体的反应。次声作为交通、工业及住宅环境等污染因素已逐渐引起人们的关注,长时间次声作用可导致工作人员注意力减退、情绪波动、一些反映工作效能的指标(精神测验、智力测验)降低、记忆力下降^[1]。研究表明中枢神经系统对次声敏感。一定参数的次声作用后大鼠下丘脑、边缘系统、听觉中枢、皮质、海马等脑区 24 个核团出现热休克蛋白(heat shock protein, HSP70)的表达,其中颞叶皮质在 8 Hz、90 dB、120 dB 作用 7 d 出现 HSP70 的表

达^[2,3]。本试验拟通过动物试验探讨 8 Hz、130 dB 次声对大鼠颞叶皮层 5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)、5-羟色胺受体(5-hydroxy tryptamine receptor, 5-HTR)、兰尼定受体(Ryanodine receptor, RyR)表达的影响及恢复时间的情况。

材料与方法**一、材料**

1. 动物:一级雄性 SD 大鼠 140 只,由第四军医大学实验动物中心提供,6~7 周龄,体重 190~210 g,实验前一周领回,分笼饲养于安静环境中。动物室温度控制在 20℃~24℃,湿度控制在 50% 左右,动物自由进食、饮水,正常日光周期。

2. 仪器及设备:次声声源及检测系统采用本校在中国科学院声学研究所和航空工业总公司第 41 所的

基金项目:全军医学科学技术研究“十五”计划指令性课题(No. 011071)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院康复理疗科(李玲、谭永霞、陈景藻、邱建勇),第四军医大学军事预防医学系(刘朝晖)

指导和协作下建成的、声源为电动扬声器的次声压力仓系统及检测系统。

二、方法

1. 试验方法:将 140 只 SD 大鼠随机分为对照组, 8 Hz、130 dB 的 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 d 组, 8 Hz、130 dB 及上述各组次声作用结束恢复 1 周组与 2 周组, 即对照组、130 dB 组、恢复 1 周组及恢复 2 周组, 每组 35 只, 每组再分为 7 小组, 每小组 5 只。实验动物每天暴露于 8 Hz、130 dB 的次声仓中 2 h, 至试验天数, 对照组动物每天置次声仓中 2 h, 但不予次声作用, 恢复组大鼠在每次声组作用结束后置安静环境中恢复 1~2 周。

2. 取材方法:所有动物于最后一次实验结束后或恢复时间满 1 周或 2 周后立即取材, 常规灌注固定。

3. 试剂及免疫组织化学染色方法:兔抗 5-HT 抗体(本校组织胚胎学教研室生产)(1:1 000), 兔抗 5-HTR 抗体(本校组织胚胎学教研室生产)(1:100), 兔抗 RyR 抗体(Santa Cruze 公司生产)(1:200), 生物素化羊抗兔 IgG(Sigma 公司产品)(1:500), ABC 复合物(Sigma 公司产品)(1:500)。

4. 染色及计数方法:大鼠脑组织在 Leica 恒冷冰冻切片机制取冠状切面连续切片, 片厚 35 μm , 隔 5 取 1。采用抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合法(ABC 法)染色, DAB 显色(蓝色反应)。每例动物随机取经结节、乳头体交界平面切片 3 张。在光镜下采图颞叶皮质, 用 MIAS-2000 图文分析系统进行图像分析。取灰度值代表其阳性结果。

三、统计学分析

所得数据用 SPSS 10.0 软件计算均数及标准差, 并进行 ANOVA 方差分析, 组间差异采用 Dunnett-t 检验。

结 果

一、5-HT

表 1 8 Hz、130 dB 次声作用后大鼠颞叶皮质 5-HT 表达的恢复(个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	作用时间						
		1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
对照组	35	116.64 $\pm$ 19.38	112.09 $\pm$ 14.86	111.90 $\pm$ 13.67	116.98 $\pm$ 18.97	115.14 $\pm$ 18.33	117.68 $\pm$ 19.57	114.33 $\pm$ 21.56
130 dB 组	35	97.21 $\pm$ 11.26	81.09 $\pm$ 9.64	72.31 $\pm$ 8.91 [*]	52.09 $\pm$ 7.68 [#]	63.48 $\pm$ 7.86 [#]	75.20 $\pm$ 9.21 [*]	86.43 $\pm$ 9.64
恢复 1 周组	35	114.29 $\pm$ 13.01	104.73 $\pm$ 10.24	91.13 $\pm$ 10.11	73.67 $\pm$ 9.46 [*]	77.05 $\pm$ 9.13 [*]	95.67 $\pm$ 11.09	102.97 $\pm$ 10.98
恢复 2 周组	35	113.67 $\pm$ 12.59	117.34 $\pm$ 11.51	109.48 $\pm$ 11.45	97.57 $\pm$ 9.67	107.39 $\pm$ 11.90	109.99 $\pm$ 11.82	118.21 $\pm$ 12.09

注:与对照组相比, ^{*} $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

表 2 8 Hz、130 dB 次声作用后大鼠颞叶皮质 5-HTR 表达的恢复(个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	作用时间						
		1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
对照组	35	45.38 $\pm$ 6.01	42.68 $\pm$ 5.20	41.55 $\pm$ 5.49	44.29 $\pm$ 5.12	43.82 $\pm$ 4.19	45.08 $\pm$ 5.94	44.94 $\pm$ 5.64
130 dB 组	35	35.94 $\pm$ 4.72	31.90 $\pm$ 4.21 [*]	23.48 $\pm$ 3.65 [#]	17.96 $\pm$ 2.11 [#]	13.76 $\pm$ 2.01 [#]	22.46 $\pm$ 3.67 [#]	31.26 $\pm$ 4.20 [*]
恢复 1 周组	35	42.33 $\pm$ 5.12	38.65 $\pm$ 4.05	31.49 $\pm$ 4.31 [*]	25.17 $\pm$ 2.61 [*]	23.61 $\pm$ 3.21 [#]	31.25 $\pm$ 4.52 [*]	40.12 $\pm$ 4.16
恢复 2 周组	35	45.08 $\pm$ 5.11	43.64 $\pm$ 4.35	39.01 $\pm$ 4.22	34.62 $\pm$ 4.25	35.00 $\pm$ 4.22	39.45 $\pm$ 4.34	45.35 $\pm$ 5.04

注:与对照组相比, ^{*} $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

对照组颞叶皮质全层均可见阳性神经纤维表达, 其中浅层较深层为多, 阳性纤维呈深蓝色串珠样, 长短不等, 130 dB 次声作用各组阳性纤维减少, 颜色变淡, 以 21 d 为最少($P < 0.01$)。130 dB 恢复组各组大鼠脱离次声环境后阳性表达均有不同程度的恢复, 其中恢复 1 周时, 14, 35 d 组阳性表达与对照组相比差异无统计学意义, 恢复 2 周时, 各时间点与对照相比, 差异均无统计学意义(表 1 及图 1)。

二、5-HTR

对照组皮质可见呈胞浆染色的阳性胶质细胞和神经元, 其中浅层可见阳性胶质细胞表达, 胶质细胞胞体小, 有较多细而长的突起, 而锥体层有较多阳性神经元表达, 神经元胞体较大, 核仁较明显, 有 1~2 个较长的突起。130 dB 次声作用各组阳性胶质细胞及神经元数目均减少, 颜色变淡, 以 28 d 为最少($P < 0.01$), 此后阳性表达有回升。恢复组大鼠脱离次声环境后颞叶皮质阳性表达均有不同程度的恢复, 其中恢复 1 周时, 7, 42 d 组阳性表达与对照组相比, 差异无统计学意义, 恢复 2 周时, 各时间点与对照组相比, 差异均无统计学意义(表 2 及图 2)。

三、RyR

各组大鼠在颞叶皮质均见呈胞浆染色的阳性神经元表达, 皮质全层均可见, 但皮质浅层较深层多见, 阳性物质于高倍镜下呈颗粒状。对照组阳性神经元多, 染色深, 胞核不清晰, 130 dB 次声作用各组的阳性神经元数量少, 染色淡, 胞核清晰可见, 有两个峰值, 即 14 d 及 42 d($P < 0.01$), 且 42 d 时阳性神经元较 14 d 时少。恢复组各组大鼠脱离次声环境后阳性表达均有不同程度的恢复, 其中恢复 1 周时, 21, 35 d 组阳性表达与对照组相比, 差异无统计学意义, 恢复 2 周时, 各时间点与对照组相比, 差异均无统计学意义(表 3 及图 3)。

表 3 8 Hz、130 dB 次声作用后大鼠颞叶皮层 RyR 表达的恢复(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	作用时间						
		1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
对照组	35	136.86 ± 16.57	142.58 ± 16.31	133.25 ± 13.08	140.74 ± 17.20	144.69 ± 18.38	139.07 ± 15.21	135.97 ± 14.06
130 dB 组	35	106.28 ± 17.57	86.65 ± 10.85	68.47 ± 8.06 [#]	80.66 ± 8.57 [*]	90.85 ± 9.67	78.28 ± 7.64 [*]	56.67 ± 5.20 [#]
恢复 1 周组	35	130.26 ± 14.07	102.23 ± 13.24	82.96 ± 9.25 [*]	103.74 ± 12.44	113.68 ± 14.26	102.09 ± 11.43	75.39 ± 8.21 [*]
恢复 2 周组	35	140.82 ± 15.61	129.31 ± 14.20	109.56 ± 11.06	130.00 ± 14.23	136.57 ± 13.46	129.50 ± 12.34	96.44 ± 10.32

注:与对照组相比, * $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$

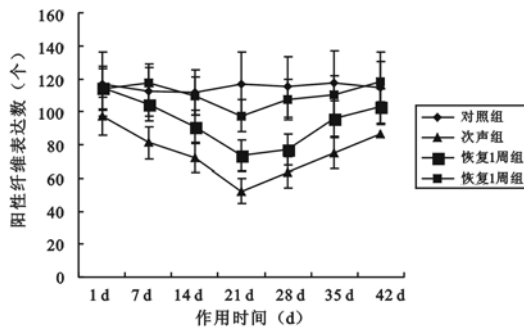


图 1 8 Hz、130 dB 次声作用后大鼠颞叶皮层 5-HT 表达的恢复

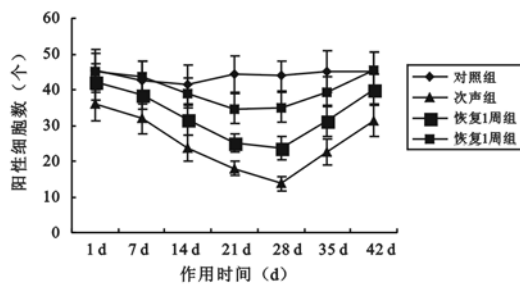


图 2 8 Hz、130 dB 次声作用后大鼠颞叶皮层 5-HTR 表达的恢复

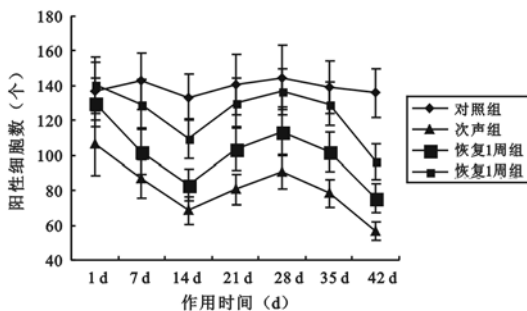


图 3 8 Hz、130 dB 次声作用后大鼠颞叶皮层 RyR 表达的恢复

讨 论

学习和记忆是脑的高级功能,对动物和人是非常重要的,其定位尽管在中枢神经系统是十分弥漫的,但颞叶皮层和海马对人类记忆具有特殊的重要性^[4]。

为确定空间学习记忆的中枢, Morris^[5] 曾将大鼠的海马损伤后观察其在水迷宫训练中的成绩,结果显示在定向航行中海马损伤组的潜伏期明显长于对照组。Becker 等^[6] 用损毁的方法观察不同脑区在空间学习记忆中的作用,发现只要海马系统完好,大鼠就可以精确

地完成空间迷宫任务。Miller 等^[7] 用电生理学方法证实猴的空间学习记忆的中枢定位在下颞叶皮层。关于人类海马记忆功能的认识,关键资料来自对海马损伤患者的观察和测试,其中最著名的是对 HM 的观察。HM 从 1942 年开始患癫痫,1953 年行切除内侧颞叶手术,术后出现了持久而严重的遗忘症状。主要表现为保留短时记忆的能力,但如果不有意复述则很快忘记;伴有逆行性遗忘;可以学得新的认知技巧(如从镜中阅读),但又宣称从未学过^[7]。因此可以认为海马和颞叶皮层在空间学习记忆中起重要作用。

中枢神经系统的 5-HT、5-HTR、RyR 与学习记忆有关。在学习记忆的敏感化过程中,中间神经元可释放 5-HT,使中间神经元内的 cAMP 增加,cAMP 是细胞信息传递的重要第二信使,进一步可引起运动神经元的兴奋性突触后电位,从而促进学习记忆^[8]。5-HT 通过分布在各处的 5-HTR 起作用。5-HTR 有 7 型,每一型中又有不同的亚型,它们在学习记忆中所起的作用是不同的而且是非常复杂的,如 5-HTR(1A)激动剂瑞匹诺坦 HCI 可改善脑损伤后空间学习记忆,使大鼠大脑局部缺血和硬膜下血肿引起的症状得以改善,使大鼠在水迷宫中的成绩提高,并且伴有海马神经元的增加^[9]。

RyR 是存在于内质网和肌浆网上的钙通道蛋白,由于这种通道对植物碱 Ryanodine 敏感,所以称其为 Ryanodine 受体钙通道,简称为 Ryanodine 受体,即 RyR。体内的 RyR 有 3 个亚型,RyR2、RyR3 在脑内有表达,并与学习记忆有关。RyR 通过影响胞浆内的 Ca^{2+} 浓度而在学习记忆过程发挥作用。这种钙通道引起的细胞内钙释放,参与神经系统的可塑性,对联想学习记忆及经典条件反射是必需的。细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,通过 3 条途径调节 K^+ 电流,进而可以引起兴奋性突触后电位长时程增强,后者是学习记忆的神经基础^[8]。空间学习——水迷宫训练后,可观察到大鼠海马 CA1 区 RyR2mRNA 及 RyR2 明显增多^[10],提示 RyR2 调节的钙信号在空间学习记忆中起重要作用。在缺乏 RyR3 受体即 RyR3(-) 的变异大鼠模型,可观察到海马突触可塑性改变,空间学习能力降低,在水迷宫实验中找到平台时间延长^[11]。但亦有资料显示 RyR3(-) 大鼠在水迷宫实验中成绩提高,并能记录到海马 CA1 区易化了的长时程增强^[12]。可见,脑组织

RyR 与大鼠空间学习记忆关系密切。

王斌等^[13,14]报道次声作用可引起动物学习记忆功能下降,胆碱能神经元数目减少。袁华等^[3]报道 8 Hz、90 dB、120 dB 次声作用后可引起颞叶皮层及海马神经元 HSP70 大量表达。本实验表明,8 Hz、130 dB 的次声实验组大鼠颞叶皮层 5-HT、5-HTR、RyR 表达均较对照组减少,其中 5-HT、5-HTR 在 21、28 d 最低 ($P < 0.01$),提示次声作用后引起的学习记忆功能降低可能与皮质中 5-HT、5-HTR、RyR 的减少有关。RyR 的变化较复杂,出现两个峰值,在次声作用 14 d 时出现一低值,之后有所回升,35 d、42 d 时又降低,42 d 阳性表达达最低。提示大鼠对次声存在适应现象,但是如果持续接受次声作用,某些功能的这种适应将消失而出现损害,RyR 的这种时间序列特点提示其对长期次声的作用可能具有二次受损的易感性,其下游机制尚在进一步研究之中。我们既往也曾观察到 8 Hz、90 dB、130 dB 次声对大鼠海马超微结构的变化以变性为主,次声作用后期其形态学指标有所恢复^[15]。一定参数的次声不仅可以引起受试者出现乏力、淡漠、抑郁、耳受压感、注意力降低、困倦、内脏震动感,并可伴有颅腔静脉血流减少^[1],但长期从事长途运输的卡车司机暴露于 115 dB 的次声环境中,并未有明显的疲劳、嗜睡、无力、耳鸣、头痛、感觉减退、听力受损等变化^[16],说明动物机体对一定参数的次声可产生适应性。

本实验表明,8 Hz、130 dB 恢复组的大鼠,颞叶皮层 5-HT、5-HTR、RyR 阳性表达均较相应组次声作用恢复结束时增多,至恢复 1 周时,颞叶皮层的 5-HT 表达在 14、21 d 组,5-HTR 表达在 7、42 d 组,RyR 表达在 21、35 d 组与对照组相比差异无统计学意义;至恢复 2 周时,颞叶皮层 5-HT、5-HTR、RyR 阳性表达在各组与对照组相比差异均无统计学意义。提示 8 Hz、130 dB 引起的大鼠海马和颞叶皮层的损伤是可逆的。有作者观察到,8 Hz 或 16 Hz、120 ~ 140 dB 的次声作用 40 d 可引起心肌氧化还原酶活性降低、血流紊乱、心肌纤维断裂及 RNA、DNA 的变化,但次声作用停止后这些变化都逐渐恢复正常^[17]。一组豚鼠受 8 Hz 或 16 Hz、90 ~ 120 dB 次声作用 25 d、每天 3 h 的试验发现半规管感受器细胞和毛细胞的内质网和线粒体出现肿胀、脊缩短等变化,但次声作用停止后这些变化逐渐恢复^[18]。同样,这些恢复现象也可以通过次声作用引起的超微结构来解释——即一定参数的次声引起的变性性损伤具有可逆性。

由于次声难以防护,适应性的存在可以为次声的防护提供新的思路,即可以先予以较弱的声压级的次

声作用一段时间,促使机体的适应机制产生。对于非坏死性的次声损伤在还未找到特效防护治疗药物之前可等待时间让其自然恢复。

参 考 文 献

- 1 陈景藻. 次声的产生及生物学效应. 见: 中国人民解放军总后勤部, 主编. 医药卫生科学技术进展. 北京: 北京军事医学科学出版社, 1997. 194-197.
- 2 袁华, 陈景藻, 李玲, 等. 次声作用后大鼠脑中热休克蛋白 70 的表达和分布. 第四军医大学学报, 1998, 19: 606-609.
- 3 袁华, 陈景藻, 李玲. 次声作用后大鼠皮质和海马 HSP70 表达的实验. 解放军医学杂志, 1998, 23: 472-473.
- 4 韩济生, 主编. 神经科学原理. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 933-934.
- 5 Morris RGM. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rats. J Neurosci Methods, 1984, 11: 47-60.
- 6 Becker JT, Walker JA, Olton DS. Neuroanatomical base of special memory. Brain Res, 1980, 2000: 307-320.
- 7 Miller EK, Li L, Desimone R. A neural mechanism of working and recognition memory in inferior temporal cortex. Science, 1991, 254: 1377-1379.
- 8 韩太真, 吴馥梅, 主编. 学习记忆的神经生物学. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 237-258.
- 9 Kline AE, Yu J, Horvath E, et al. The selective 5-HT(1A) receptor agonist repinotan HCl attenuates histopathology and spatial learning deficits following traumatic brain injury in rats. Neuroscience, 2001, 106: 547-555.
- 10 Zhao W, Meiri N, Xu H, et al. Spatial learning induced changes in the expression of the ryanodine type II receptor in the rat hippocampus. FASEB J, 2000, 14: 290-300.
- 11 Balschun D, Wolfer DP, Bertocchini F, et al. Deletion of the ryanodine receptor type 3 impairs forms of synaptic plasticity and spatial learning. EMBO J, 1999, 18: 5264-5273.
- 12 Futatsugi A, Kato K, Ogura H, et al. Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. Neuron, 1999, 24: 701-713.
- 13 王斌, 陈景藻, 易南. 不同声强 8 Hz 次声对小鼠学习能力的影响. 第四军医大学学报, 1997, 18: 442-444.
- 14 魏智钧, 李玲, 陈景藻, 等. 次声作用对大鼠记忆功能及隔内侧核和斜角带核胆碱能神经元表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 79-82.
- 15 谭永霞, 李玲, 陈景藻, 等. 次声对大鼠海马超微结构的影响. 中国康复理论与实践, 2003, 9: 645-647.
- 16 Yamaguchi H, Funasaka S. Effects of infrasound on humans: A questionnaire survey of 145 drivers of long distance transport trucks. Pract Otol Kyoto, 1991, 84: 1315-1324.
- 17 Nekhoroshev AS, Glinchikov VV. Morphofunctional changes in the myocardium under exposure to infrasound. Gig Sanit, 1991: 56-58.
- 18 Nekhoroshev AS, Glinchikov VV. Mechanism of the effect of infrasound on labyrinthine receptors. Kosm Biol Aviakosm Med, 1990, 24: 39-42.

(修回日期: 2005-04-25)

(本文编辑: 松 明)