

· 基础研究 ·

不同声压级次声对大鼠海马细胞凋亡的影响

刘朝晖 陈景藻 李康樗 曹云新

【摘要】目的 探讨 8 Hz, 90 dB/130 dB 次声作用对海马细胞凋亡的影响。**方法** 将雄性 SD 大鼠 88 只随机分为 11 个组, 即对照组、90 dB 次声作用 1 d 组、7 d 组、14 d 组、21 d 组及 28 d 组, 130 dB 次声作用 1 d 组、7 d 组、14 d 组、21 d 组及 28 d 组, 每组 8 只。采用细胞分离技术、荧光染色和流式细胞仪观察大鼠脑海马细胞凋亡率。**结果** 与对照组比较, 90 dB/1 d 组、130 dB/1 d 组、130 dB/7 d 组次声作用后, 海马细胞未显示凋亡率增高 ($P > 0.05$); 90 dB/7 d 组、90 dB/14 d 组、90 dB/21 d 组、130 dB/14 d 组、130 dB/21 d 组次声作用后, 海马细胞凋亡率显著增高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 90 dB/21 d 组比 90 dB/14 d 组明显回落 ($P < 0.01$), 但仍高于对照组 ($P < 0.05$), 90 dB/14 d 组海马细胞凋亡率达到高峰 ($P < 0.01$), 90 dB/28 d 组及 130 dB/28 d 组与对照组相比, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。**结论** 8 Hz, 90 dB/130 dB 次声作用一定时间后, 均可导致海马细胞凋亡数量显著增高, 尤以 90 dB/14 d 组效应最强; 8 Hz, 90 dB/130 dB 次声作用对大鼠海马细胞具有损伤效应。随作用时间延长, 海马细胞对 8 Hz, 90 dB/130 dB 次声作用均可产生适应性。

【关键词】 次声; 细胞凋亡; 海马; 大鼠

Effects of different sound pressure levels of infrasound on apoptosis of hippocampal cells in rat brain LIU Zhao-hui*, CHEN Jing-zao, LI Kang-chu, CAO Yun-xin. * Department of Radiation Medicine, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】Objective To study the effect of infrasound on apoptosis of hippocampal cells. **Methods** Eighty-eight male SD rats were randomized into eleven groups: control group, 90dB/1d, 7d, 14d, 21d and 28d infrasound exposure groups; 130dB/1d, 7d, 14d, 21d and 28d infrasound exposure groups. Infrasonic exposure groups were put into an infrasound field with 8Hz, 90dB or 130dB, each day for 2h. Acute cell separation and flow cytometer (FCM) techniques were used for measurement of apoptosis ratio in hippocampal cells. **Results** Compared with the control group, no increase of apoptosis ratio was recorded in 90dB/1d, 130dB/1d and 130dB/7d infrasound exposure groups ($P > 0.05$), but there are increases of that in 90dB/7d ($P < 0.01$), 90dB/14d ($P < 0.01$), 90dB/21d ($P < 0.05$), 130dB/14d ($P < 0.01$) and 130dB/21d ($P < 0.05$) infrasound exposure groups, reaching the peak level in 90dB/14d group ($P < 0.01$ vs all the others), restoring in 90dB/28d and 130dB/28d infrasound exposure groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The results showed that 8Hz, 90dB/130dB infrasound definitely induced increases of apoptosis ratio in the hippocampus cells after certain time of exposure, suggesting that there are damages occurred by infrasound field with 90dB or 130dB and some adaptation of the hippocampal cells ensued after a certain period of time.

【Key words】 Infrasound; Apoptosis; Hippocampus; Rat

在多细胞生物中, 细胞数量的生物稳态是通过细胞增殖和细胞死亡之间的平衡来维持的, 其中细胞凋亡是神经生长发育和衰老及维护其正常结构与功能的重要机制之一^[1-3]。不同参数的次声作用能够引起中枢神经系统功能紊乱甚至结构损害^[4-8]。次声作用能否引起海马细胞凋亡, 对于研究次声性脑损害效应及其机制乃至次声卫生防护都具有重要意义。因此, 我们应用流式细胞仪观察 8 Hz, 90 dB/130 dB 次声作用不同时间后大鼠

海马细胞凋亡率的变化, 探讨 8 Hz, 90 dB/130 dB 次声对海马细胞凋亡的影响及其作用规律。

材料与方法

一、仪器与试剂

采用本校研制的次声压力舱及次声信号检测系统; 美国 BIO-RAD 公司生产的 MRC-1024 型激光共聚焦显微镜; Fluo-3/AM, Annexin V-FITC 和 PI 荧光染料均购自美国 Sigma 公司; DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。

二、动物分组与处理

雄性成年 SD 大鼠 88 只 (由本校二级实验动物中

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, 第四军医大学放射医学教研室 (刘朝晖、陈景藻、李康樗), 免疫学教研室 (曹云新)

心提供), 体重 190 ~ 210 g, 随机分为对照组、8 Hz/90 dB 次声作用 1 d、7 d、14 d、21 d 及 28 d 组, 8 Hz/130 dB 次声作用 1 d、7 d、14 d、21 d 及 28 d 组, 每组各 8 只。各实验组每天行次声暴露 2 h, 对照组每天只在次声舱内停留 2 h 而无次声作用。

三、大鼠海马细胞急性分离

于不同时间次声作用后 1 h 内, 将大鼠断头处死, 碘酒、酒精消毒及 0.9% 生理盐水清洗后, 无菌条件下 5 min 内剥出双侧海马组织。置于 4℃ 预冷的 Hank's 液中, 剪成 1 mm³ 大小的碎块, 用 0.125% 胰酶消化 10 min (37℃), 吸出组织团块入离心管。加入完全 DMEM 培养液终止消化。800 r/min × 5 min 离心后弃上清液, 加入 Hank's 液, 并用火焰刨光的吸管轻柔吹打, 使细胞充分分散, 静止后吸取上层细胞悬液, 反复 3 次。合并各次收集的细胞, 800 r/min × 5 min 离心后弃上清液, 用 20% DMEM 液将细胞轻柔吹散、混匀并将细胞密度调至每毫升细胞悬液含 2×10^6 个细胞 (经 4% 台盼蓝染色证实收集到的细胞存活率达 90% 以上)。然后将此细胞悬液置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中待测。

四、荧光染色

将对照组和各实验组的细胞采用 Annexin V-FITC/PI 双标记染色, 利用流式细胞仪进行双参数分析, 测定坏死、凋亡和正常细胞的百分率。具体步骤是每份取 100 ml 单细胞悬液, 每组做 3 份复管, 然后各加入 490 ml 工作浓度的结合缓冲液、5 ml Annexin V-FITC 和 5 ml PI 染料轻轻振荡、混匀。置 4℃ 冷藏室中染色 10 min, 待用。

五、流式细胞术分析

将 Annexin V-FITC/PI 荧光标记染色成功的细胞样品, 用流式细胞仪检测, 经 488 nm 的激发光激发, 被激发的细胞发射 525 nm 绿色荧光和 610 nm 红色荧光。分别用不同的荧光通道接收, 然后用 LMD 软件对所测数据进行分析, 可获得任意一群细胞的细胞凋亡率。Annexin V/PI 法是目前检测细胞凋亡和

区分坏死细胞特异性较强的方法, 其原理是正常活细胞带负电的磷脂酰丝氨酸定位于细胞膜的内侧。在细胞凋亡的早期, 由于细胞膜失去对称性, 磷脂酰丝氨酸从胞膜内侧暴露于胞膜外, 成为巨噬细胞清除凋亡细胞识别的标志。Annexin V-FITC 是一种标记有荧光素的钙依赖磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有很高的亲和力, 可特异性地与磷脂酰丝氨酸结合。凋亡早期细胞仍保持膜的完整性, 碘化丙啶不能进入细胞内, 而凋亡晚期和发生继发坏死的细胞可同时被 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色。利用流式细胞仪进行双参数分析, 即可将凋亡细胞 (Annexin V+) 与继发坏死的细胞 (Annexin V+PI+) 区分开来, 并能计算出染色阳性细胞的百分率。

六、统计学分析

采用 SPSS 软件的单因素方差分析进行统计学分析, 各组结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组与组之间的差异采用 *t* 检验进行配对比较检验。

结 果

频率 8 Hz、90 dB 的次声对海马细胞的作用与对照组 ($2.45\% \pm 0.61\%$) 相比, 1 d 组未显示凋亡率增高 ($2.47\% \pm 0.72\%$, $P > 0.05$), 7 d 组凋亡率显著增高 ($5.38\% \pm 1.4\%$, $P < 0.01$), 14 d 组继续升高并达到高峰 ($15.84\% \pm 5.00\%$, $P < 0.01$, 图 1), 21 d 组比 14 d 组明显回落 ($P < 0.01$), 但仍高于对照组 ($4.77\% \pm 1.1\%$, $P < 0.05$), 至 28 d 组已有较大程度的恢复 ($2.72\% \pm 1.28\%$, 与对照组比较, $P > 0.05$, 图 2); 频率 8 Hz、130 dB 次声对海马细胞作用后与对照组相比, 1 d 组 ($4.23\% \pm 1.62\%$, $P > 0.05$), 7 d 组 ($3.74\% \pm 1.98\%$, $P > 0.05$) 均未发现凋亡率增高, 14 d 组则显著升高 ($6.80\% \pm 2.14\%$, $P < 0.01$, 图 1), 21 d 组凋亡率有所回落但仍比对照组高 ($5.07\% \pm 2.15\%$, $P < 0.05$), 28 d 组恢复正常水平 ($3.16\% \pm 1.63\%$, 与对照组比较, $P > 0.05$, 图 2)。

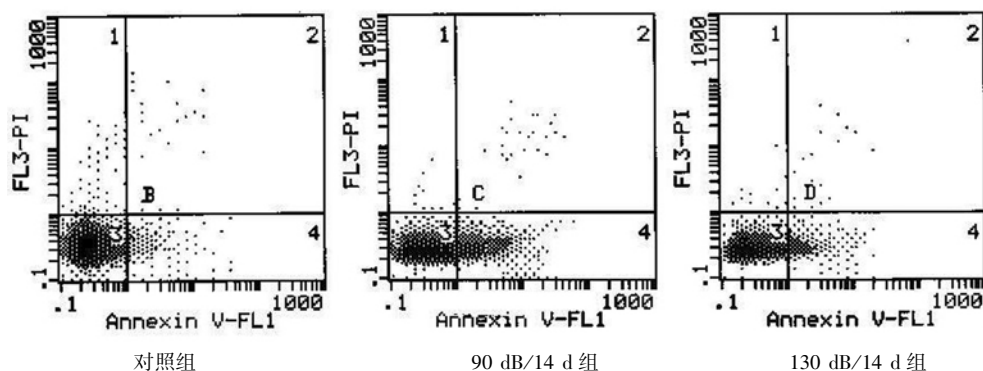


图 1 对照组、90 dB/14 d 组和 130 dB/14 d 组的海马细胞凋亡散点图

注: 每幅图的第 4 象限为凋亡细胞分布区

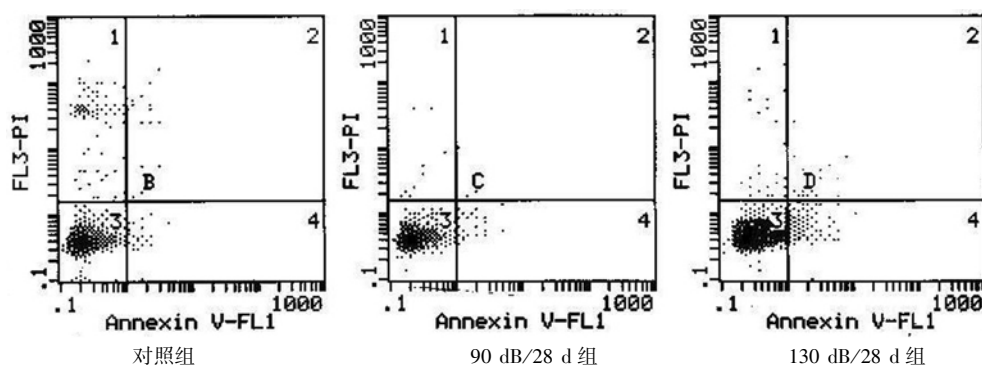


图 2 对照组、90 dB/28 d 组和 130 dB/28 d 组的海马凋亡细胞散点图

注:每幅图的第 4 象限为凋亡细胞分布区

讨 论

细胞凋亡在整个生命过程中不间断地进行。正常情况下,机体借助这一机制维持器官形状,完成组织退化,消灭各种受伤、老化和突变的细胞。这些过程一旦失控就会导致疾病。研究发现,细胞凋亡与中枢神经系统变性疾病、自身免疫性疾病及肿瘤等多种疾病有着密切关系^[2,3]。次声一方面可以造成中枢神经系统功能及结构损害,还可导致海马胶质细胞损伤^[7],另一方面在安全范围内已应用于临床治疗^[9],其应用前景不可限量。次声作用是否涉及细胞凋亡的改变,对于研究次声作用机制及其在临床应用中的安全性问题具有重要意义。

本研究结果表明,频率 8 Hz、声压级水平 90 dB 或 130 dB 次声经一定时间作用后均可诱发细胞凋亡,但在程度上存在差异。本实验所观察的各时间点次声作用效应,由强到弱依次为 90 dB/14 d 组、130 dB/14 d 组、90 dB/7 d 组、130 dB/21 d 组和 90 dB/21 d 组。其意义在于,8 Hz、90 dB/130 dB 较长时间的次声暴露可以造成神经系统损害作用,应该加以防护;有机体在一定时间的次声暴露后能够产生适应性。

细胞凋亡是一种十分独特的细胞死亡类型,其形态学、生物化学、分子生物学等方面的改变都与经典的细胞坏死有本质区别。从基因水平看,细胞凋亡是在基因控制下的细胞自我消亡过程。研究表明,细胞凋亡涉及一系列基因表达的级联反应,研究较多的主要有 bcl-2、c-myc、P53、ice、fas/apo-1 等^[1];从生物化学水平来看,特异性酶学作用具有重要意义,如内源性内切核酸酶、DNA 拓扑异构酶 I、II (Topo I、Topo II)、转谷氨酰胺酶和 ICE/CED-3 蛋白酶家族;从应答反应看,涉及信号传递系统的调节,如 Ca^{2+} 介导的细胞凋亡及 FAS、TNFR1 等死亡受体介导等机制。频率为 8 Hz 或 16 Hz 次声作用可致红细胞膜通透性改变、膜上某些酶活性改变^[4]和血浆儿茶酚胺类物质含量的变化^[10];

16 Hz、90 dB/130 dB 次声作用致小鼠海马 P53mRNA 表达增高^[11],提示次声作用导致细胞凋亡的机制可能涉及不同水平。诱导细胞凋亡的因素很多,有些呈普遍性,如:放射线导致 DNA 损伤诱导多种细胞凋亡;有些则呈组织特异性。次声作用的物理学基础主要是引发生物体与次声波共振,但其物理能量如何转化为生物化学能量的机制尚不清楚。次声所诱导的细胞凋亡是普遍性的还是组织特异性的,尚需进一步的实验研究确定。

本实验结果表明,次声作用效应与作用时间和声压级水平存在明显的量效和时效规律性,即在 7 d 组和 14 d 组的较低声压级水平 90 dB 次声比较高声压级水平 130 dB 次声诱导细胞凋亡作用更显著。说明 90 dB 次声对促凋亡基因具有显著上调作用或对抑凋亡基因具有显著下调作用,而 130 dB 次声诱导细胞凋亡作用较 90 dB 次声相对弱一些。但这一结果并不能说明 130 dB 次声总体损伤作用弱于 90 dB 次声作用,因为评价细胞损伤程度不仅限于细胞凋亡,8 Hz 的 130 dB/7 d、130 dB/14 d 和 130 dB/21 d 次声作用引起脑细胞的坏死性细胞死亡倾向更明显^[6,8]。

脑海马及其相关区域是学习记忆功能的重要脑区。海马组织是次声作用的敏感靶组织^[7,11,12],次声作用能够造成动物学习记忆功能障碍^[12]。海马细胞凋亡增加可能是次声所致人和动物学习记忆功能障碍的原因之一。因此,应用细胞凋亡抑制剂可能有助于次声引起的脑功能损害的康复。

参 考 文 献

- 1 温进坤,韩梅,主编. 医学分子生物学理论与研究技术. 第 2 版. 北京:科学出版社,2002. 246-258.
- 2 Oppenheim RW. Naturally occurring cell death during neural development. Trends Neurosci, 1985, 17: 487.
- 3 Linda JM, Jean M. Apoptosis. Science, 1998, 281: 1301-1302.
- 4 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: 131-133.

- 5 Нехорошев АС. Реакция гематоцитов на воздействие инфразвука, Гиг и Сан, 1991, 2 :45-47.
- 6 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: 847-849.
- 7 牟翔,陈景藻,李玲,等. 次声作用对小鼠脑中胶质纤维酸性蛋白表达和分布的影响. 中华物理医学与康复杂志,2001,23: 76-78.
- 8 费舟,章翔,王晓峰,等. 次声作用后鼠脑超微结构与血脑屏障的改变. 中华物理医学与康复杂志,1999,134-135.
- 9 Sidorenko EI, Obtubov SA,Tumasian AR. Experience of clinical use of infrasound pneumomassage in the treatment of progressive myopia in school children. Vestn Oftalmol,1997,113:18-20.
- 10 赵志刚,陈景藻,张李燕. 90dB 次声作用后大鼠血浆儿茶酚胺类物质含量的改变. 中华物理医学与康复杂志, 2003,25: 27-29.
- 11 牟翔. 环境次声测量及次声对小鼠海马部分生物效应实验研究. 第四军医大学博士学位论文. 西安: 第四军医大学出版社, 2001. 41.
- 12 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.

(收稿日期:2003-10-29)
(本文编辑:熊芝兰)

· 短篇论著 ·

半导体激光联合消炎痛治疗颞下颌关节紊乱症的临床疗效观察

汤琳 秦建勇 徐静 赵玉梅 强艳丽 邱宏亮 常文

颞下颌关节紊乱症是口腔颌面部的常见疾病之一,我科自 1999 年应用半导体激光联合药物治疗颞下颌关节紊乱症以来,取得了满意的临床效果。现报道如下。

一、资料与方法

共选取 98 例颞下颌关节紊乱症患者,其中男 58 例,女 40 例;年龄 16~35 岁,平均 24.5 岁;患者主要临床表现为张口困难、咀嚼时关节区或关节周围肌群疼痛等。将上述患者随机分为 2 组,即治疗组和对照组,每组各 49 例患者,2 组患者构成、一般情况及病情等的差异均无显著性意义,具有可比性。

治疗组患者采用 LHH-500 型铈镱半导体激光机进行治疗,激光波长 810 nm,输出功率 0~310 mW 且连续可调,采用激光照射患者颞下颌关节区,根据患者疼痛部位及程度选取 1~2 个照射点,每点照射 3 min,每天 1 次,连续照射 1~8 d;同时口服消炎痛治疗,每次口服 25 mg,每天 3 次,8 d 为 1 疗程。对照组仅口服消炎痛治疗,用法、用量同治疗组。

疗效评价以患者张口困难程度及咀嚼时关节区或关节周围肌群的疼痛变化为参考指标,具体标准为:治愈——患者治疗结束时无张口困难及关节疼痛症状;显效——患者症状和体征基本消失;好转——患者病情好转,遗留有部分症状和体征;无效——患者治疗前、后症状和体征无明显改善。

二、结果

上述患者经 8~16 d(平均 12 d)治疗后,2 组患者症状、体征均有一定程度的改善。其中治疗组患者在改善张口困难、咀嚼时关节区或关节周围肌群的疼痛方面明显优于对照组,且治疗组患者在治疗 8 d 左右时已基本治愈,而对照组患者于治疗 15 d 时才基本治愈。2 组患者疗效对比见表 1,经统计学分析,2 组疗效间差异有极显著性意义($P < 0.01$),治疗组疗效优于对照组。在治疗过程中,治疗组有 1 例患者照射部位出现小水疱,直径 2 mm,未经任何特殊处理,1 周后自愈。

表 1 2 组患者经治疗后的疗效比较(例)

组别	治愈	显效	好转	无效
治疗组	39	6	3	1
对照组	20	15	12	2

注:2 组患者疗效经 χ^2 检验, $P < 0.01$,差异具有显著性意义

三、讨论

激光具有热、光压及光化学等效应,其能量被组织吸收后可转化为生物能,改善机体局部的血液循环,促进炎症、水肿吸收消散,减轻疼痛,还可调节机体免疫力,加快组织修复过程等等。本研究所用的半导体激光波长为 810 nm,该型激光易透过被照射皮肤进入机体,使机体深层组织亦能获得较高的激光能量,但其能量未超过激光致伤阈值,故不会造成机体损伤。激光对生物体的主要作用是热效应,瞬间的热刺激可激惹患者而产生疼痛,由于每个患者对热和疼痛的阈值不完全相同,故反应也不尽一致^[1]。杨桂虹等^[2]通过家兔动物试验证实,适量激光照射所致的牙髓组织刺激性反应是一种短暂、可逆性反应,当去除激光刺激后,被照射组织完全可以恢复正常功能。消炎痛为非甾体类抗炎药,具有解热、镇痛及抗炎等功效,短期口服无明显副作用。

通过消炎痛与半导体激光的联合应用,治疗组疗效明显优于对照组,主要表现在改善患者张口困难、咀嚼时关节区或关节周围肌群疼痛等方面。该联合疗法具有治疗时间短、操作简单、灵活、安全性高、止痛迅速及无明显副作用等优点,值得临床推广、应用。

参 考 文 献

- 1 朱天岭. 激光的牙髓效应. 国外医学口腔医学分册,1991,18:34.
- 2 杨桂虹,陈菲,张春华. 半导体激光治疗牙本质过敏症牙髓刺激性反应临床及动物实验研究. 口腔医学,2001,21:138-139.

(收稿日期:2003-11-27)
(本文编辑:易 浩)

作者单位:257034 东营,山东东营胜利油田中心医院口腔科