

# 8Hz 次声对大鼠学习记忆能力和神经元再生的影响\*

袁 华<sup>1</sup> 龙 华<sup>2</sup> 牟 翔<sup>1</sup> 李 玲<sup>3</sup> 张美霞<sup>1</sup> 葛雪松<sup>1</sup> 刘 静<sup>1</sup> 瞿丽莉<sup>1</sup> 陈景藻<sup>1</sup>

**摘要 目的:**观察次声作用对大鼠学习记忆能力和脑内神经元再生的影响。**方法:**将 36 只 SD 大鼠随机分为对照组和 8Hz 130dB 次声作用组。次声作用组大鼠暴露于 8Hz 130dB 次声, 分别作用 1、2 和 4 周; 对照组大鼠除无次声作用外, 余处理均同于次声作用组。各组大鼠实验结束后进行水迷宫测评后取脑, 抗 Ki-67 免疫组化显示脑内脑室下带 (subventricular zone, SVZ) 和海马齿状回颗粒层下增生带 (subgranular proliferative zone, SGZ) 中神经细胞再生情况的变化。**结果:**8Hz 130dB 次声作用从第 2 周开始增生的神经细胞数目开始减少, 到第 4 周时增生期的神经细胞数目比对照组大鼠减少, 同时大鼠表现出水迷宫测评中找到站台的潜伏期延长。**结论:**8Hz 130dB 次声慢性作用后大鼠引起脑内尤其海马 SGZ 中增生的神经细胞数目减少, 这可能是次声作用引起学习记忆功能障碍的原因之一。

**关键词** 次声; 脑室下带; 海马齿状回颗粒层下增生带; 学习记忆能力; 增生

中图分类号: R594.9, R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2008)-05-0385-03

**The effect of 8Hz infrasound on the learning and memory ability and proliferation in rats' brain/YUAN Hua, LONG Hua, MOU Xiang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(5): 385—387**

**Abstract Objective:** To study the effect of 8Hz infrasound with different duration (1, 2 and 4 weeks) on the proliferation in rats' brain. **Method:** Thirty-six SD rats were randomly divided into 1, 2 and 4 weeks infrasound exposure groups and control group (n=12). Infrasound exposure groups were exposed to 8Hz 130dB infrasound, 2h/d for 1, 2 and 4 weeks respectively. The control rats were treated as well as the infrasound exposure group except for the infrasound exposure. At the last 3 days of the treatment duration, rats were applied for Morris water maze test. After then their brains were removed and anti-Ki67 immunohistochemical staining was used to check the proliferation in rats' brain. **Result:** After 2 weeks exposure to 8Hz 130dB infrasound, the performance in water maze began to be impaired. The Ki-67 positive cells in SGZ decreased the top decrease occurred in 4th week. **Conclusion:** 8Hz 130dB infrasound could down regulate the proliferation in the SGZ, which may be involved in the impairment of learning and memory.

**Author's address** Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, 710032

**Key words** infrasound; subventricular zone; subgranular proliferative zone; learning and memory ability; proliferation

次声在自然和人工环境中广泛存在, 次声的生物学效应日渐受到关注。近十年来对次声的生物学效应研究表明次声作用引起学习、记忆的明显下降。在学习和记忆中发挥中心作用的海马受到关注。

本研究采用 Morris 水迷宫测评大鼠的空间学习记忆能力, 并用抗 Ki-67 免疫组化染色方法标记增生的神经细胞, 观察 8Hz 130dB 次声作用不同时间引起大鼠脑中神经细胞增生的变化。

## 1 材料与方 法

### 1.1 次声的产生与检测

采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。此外, 设有次声声频和声压检测系统, 灵敏度高, 能同步完成记录时域波形、频谱分析及检测不同次声

成分的声压强度。

### 1.2 动物分组与模型制作

成年雄性 SD 大鼠 36 只, 由第四军医大学实验动物中心提供, 平均体重 220±20g, 8—10 周龄, 饲养于安静环境下, 自由饮水, 标准饲料喂养, 避免各种刺激。随机分为次声作用组 1、2 和 4 周及对照组 (n=6), 实验组每天暴露于 8Hz 130dB 次声下 2h, 对照组动物则每天在次声仓内无次声作用放置 2h, 余处理同次声作用组。

\* 基金项目: 全军医学科学技术研究“十五”计划指令性课题(OIL071)

1 第四军医大学西京医院康复与理疗科, 西安, 710032

2 第四军医大学唐都医院骨科

3 北京中国人民解放军总医院第一附属医院康复理疗科

作者简介: 袁华, 女, 主治医师

收稿日期: 2007-11-02

### 1.3 Morris 水迷宫

每个作用组在次声作用的最后 3d 进行水迷宫训练。每日每只鼠训练 6 次, 每两次训练间隔 15min, 训练其在水迷宫寻找隐匿在水下的站台, 180s 内未找到站台者, 将其放置于站台 20s。记录大鼠每次找到站台的时间, 并将 6 次成绩平均作为其当天的成绩。

### 1.4 抗 Ki-67 免疫组织化学染色

次声作用组及对照组大鼠分别于作用不同时间常规 4%多聚甲醛灌注取全脑。全脑进行冰冻切片 (Cryostal; Leitz, Wetzal, Germany), 片厚 50 $\mu$ m。切片经 50%甲酰胺/2 $\times$ SSC, 65 $^{\circ}$ C, 2h 处理后, 分别经 2N 的 HCl 37 $^{\circ}$ C, 30min, 0.1M 硼酸, 10min 后, 入含 0.03% Triton, 5%羊血清的 PBS 稀释的兔抗 Ki-67 抗体 (1:1000, Novacastra), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 而后入依次入含 0.03% Triton, 5%羊血清的 PBS 稀释的羊抗兔二抗 (1:500; vector) 和 AB 液混合物室温分别孵育 4h 和 3h 后, DAB 棕色法显色后, 脱水、透明, 树脂封

片, 光学显微镜观察结果, 数码相机采图。各作用组分别取 3 张相应位置的切片, 同时进行抗 Ki-67 免疫组化染色。由第三者计数阳性染色细胞的数量。

### 1.5 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 并用 SPSS 软件进行方差分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 次声作用对水迷宫成绩的影响

见表 1。将各组大鼠水迷宫测评中找到隐匿平台的时间进行统计学分析, 8Hz 130dB 次声作用 1 周, 水迷宫的找到隐匿平台的潜伏期虽然比对照组延长, 但差异没有显著性意义; 在 2 周和 4 周作用组, 第 1—3 天的训练成绩均显著低于对照组, 找到隐匿平台的潜伏期明显比对照组延长。分别比较 3d 的训练成绩, 随着次声作用次数增加, 大鼠找到平台的潜伏期均逐渐延长。

表 1 次声作用后大鼠水迷宫测定结果

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	1 周			2 周			4 周		
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天
对照组	85.83 $\pm$ 11.50	29.50 $\pm$ 4.97	20.67 $\pm$ 4.41	81.16 $\pm$ 13.76	30.33 $\pm$ 4.84	20.50 $\pm$ 1.76	83.40 $\pm$ 11.67	30.67 $\pm$ 3.93	21.67 $\pm$ 2.34
次声组	96.67 $\pm$ 10.50	35.17 $\pm$ 8.40	24.67 $\pm$ 5.16	101.16 $\pm$ 13.92 <sup>①</sup>	64.33 $\pm$ 6.38 <sup>②</sup>	33.51 $\pm$ 4.76 <sup>②</sup>	133.80 $\pm$ 6.38 <sup>②</sup>	67.50 $\pm$ 7.23 <sup>②</sup>	36.33 $\pm$ 6.06 <sup>①</sup>

与各时间点对照组比较: ① $P < 0.05$ , ② $P < 0.01$

### 2.2 次声作用对大鼠脑室下带 Ki-67 阳性染色细胞的影响

如图 1 所示 (见前置彩色插页 5), 在对照组和 8Hz, 130dB 次声作用组大鼠脑内脑室下带 (subventricular zone, SVZ), SVZ 中均有 Ki-67 阳性染色, 阳性染色为细胞核, 呈棕色圆形或椭圆形。在 400 倍视野下计数 Ki-67 阳性细胞个数结果显示次声作用各组与对照组相比较有减少的趋势, 但差异不具有显著性意义 (表 2)。

表 2 次声作用后大鼠 SVZ 中 Ki-67 阳性

染色细胞数目 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	1 周	2 周	4 周
对照组	110.67 $\pm$ 11.59	108.17 $\pm$ 7.08	107.67 $\pm$ 6.68
次声组	107.17 $\pm$ 12.09	107.51 $\pm$ 10.59	105.83 $\pm$ 7.47

### 2.3 次声作用对大鼠海马齿状回颗粒细胞下层 Ki-67 阳性染色细胞的影响

见图 2 (见前置彩色插页 5), 在对照组和次声各作用组海马中颗粒层内侧 (subgranular proliferative zone, SGZ) 可见 Ki-67 阳性染色颗粒, 呈圆形或椭圆形细胞核。在高倍视野 (400 $\times$ ) 下计数各组 Ki-67 阳性细胞数目, 并进行统计学分析结果显示从 8Hz, 130dB 次声连续作用 14 天后, 海马 SGZ 中 Ki-67 阳性细胞数量开始减少, 但差异无显著性。次声持续作用 4 周组大鼠海马 SGZ 中 Ki-67 阳性细胞数量

与对照组比较显著减少 ( $P < 0.05$ , 表 3)。

表 3 次声作用后大鼠 SGZ 中 Ki-67 阳性染色细胞数目 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	1 周	2 周	4 周
对照组	9.83 $\pm$ 1.94	10.17 $\pm$ 2.14	9.02 $\pm$ 1.78
次声组	9.50 $\pm$ 1.64	9.83 $\pm$ 2.11	7.01 $\pm$ 1.89 <sup>①</sup>

与对照组相同时间点比较: ① $P < 0.05$ , ② $P < 0.01$

## 3 讨论

次声是频率低于 20Hz 的声波, 虽然不能为人耳所听见, 但是其对机体功能具有广泛的影响。由于脑的固有振动频率为 8—12Hz, 刚好处于次声的振动频率范围之内。当机体暴露于次声时, 脑可能与次声产生共振反应并吸收能量, 从而引起细胞分子的结构改变并影响其功能<sup>[1]</sup>。

我们实验室以往的研究发现, 8Hz 120dB 的次声作用可以引起实验动物的学习记忆能力下降, 表现为 Morris 水迷宫训练中找到隐匿站台的时间延长<sup>[2]</sup>; 明暗箱回避实验中潜伏期缩短<sup>[3-4]</sup>; 兔脑电活动处于抑制状态<sup>[5]</sup>等。

在水迷宫测评实验中, 大鼠学会通过空间线索记忆寻找水面下隐匿的平台而逃离水中<sup>[6]</sup>。这个实验被证实非常敏感地反映海马的损伤, 海马部分损伤也足以影响水迷宫成绩<sup>[7]</sup>。在本实验中, 8Hz 130dB

次声较长期作用后,大鼠水迷宫测评中寻找到隐匿站台的时间延长,提示该参数次声作用后大鼠空间学习记忆能力下降,这一结果基本与我们以往的结果一致<sup>[2]</sup>。

本实验着重观察了在脑中神经元再生的变化。神经元的再生给很多神经元变性性疾病和神经损伤的治疗带来新的希望,同时大量研究结果显示,神经元的再生本身与学习与记忆、情绪等很多神经功能有非常密切的关系<sup>[8]</sup>。

Ki-67是一种与细胞周期相关的增生细胞核抗原,在G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub>,S期和有丝分裂期表达,而在G<sub>0</sub>期的细胞不表达,因此能灵敏地反映细胞增生的情况<sup>[9]</sup>。抗Ki-67免疫组织化学染色已用作观察神经再生的指标之一。

研究证实很多成年动物包括人类脑中神经元能够再生,但是神经元的再生是局限在脑中的特定区域的,包括SVZ和SGZ。在SVZ中新生的神经元将沿着吻侧迁移束而迁移到嗅球分化成中间神经元<sup>[10]</sup>。在海马中,新的颗粒细胞产生于位于齿状回中的前体细胞,在成熟和分化过程中渐将进入颗粒细胞层,逐渐迁移进入海马循环<sup>[11]</sup>。在本实验中,抗Ki-67免疫组织化学染色结果显示,8Hz 130dB次声作用4周后,海马SGZ的新生的神经元数量与对照组相比显著减少。

5-HT是脑内一种重要的神经递质,参与神经再生,凋亡等重要生理功能<sup>[12]</sup>。在海马DG中的神经前体细胞上有5-HT纤维的支配,5-HT含量的减少可以减少海马神经元的增生<sup>[13-14]</sup>。我们以往实验也观察到次声较长时间作用后,脑中5-HT含量的减少,这可能是海马中神经元增生减少的原因之一。研究显示单胺系统本身在空间学习记忆中并不发挥主要作用<sup>[15]</sup>,我们认为本实验中水迷宫成绩的下降并不是5-HT减少的直接结果,而可能与神经元再生的抑制有关。本实验中神经元增生的减少迟滞于水迷宫成绩的下降;我们认为可能有两个原因:第一,水迷宫作为敏感的海马功能的行为学检测,可能早于形态学可见的改变;第二,在次声作用后的适应性反应可能部分弥补了次声对神经元再生的抑制效应,而次声抑制神经元再生的作用机制正在研究之中。

工业化发展过程中,由于各种劳动保护措施的实施,在噪声中可听声的比例下降,次声的比例逐渐

上升,已成为生产噪声和公共噪声的重要组成部分。关于次声较长期作用降低学习记忆功能机制及其防治手段值得进一步研究。

## 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[J].中华物理医学与康复杂志,1999,21(3):131.
- [2] 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[J].中华物理医学与康复杂志,2004,26(1):272.
- [3] 魏智钧,李玲,陈景藻,等.长时间次声作用对大鼠学习记忆功能的影响[J].中国临床康复,2004,8(10):1844.
- [4] 王斌,陈景藻,易南.不同声强8Hz次声对小鼠学习能力的影响[J].第四军医大学学报,1997,18(5):442.
- [5] 刘卫,陈景藻,李玲,等.次声对兔脑电活动的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2002,24(5):269.
- [6] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat [J]. J Neurosci Methods, 1984, 11(1): 47.
- [7] Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(40): 14515.
- [8] Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses[J]. Rev Neurosci. 2007, 18(2): 93.
- [9] Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, et al. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis [J]. J Neurosci Methods, 2002, 115(1): 97.
- [10] Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2006, 7(3):179.
- [11] Paizanis E, Hamon M, Lanfumey L. Hippocampal neurogenesis, depressive disorders, and antidepressant therapy[J]. Neural Plast, 2007, 2007: 73754.
- [12] Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics[J]. Neural Plast, 2003, 4(12):1002.
- [13] Nishimura A, Ueda S, Takeuchi Y, et al. Age-related decrease of serotonergic fibres and S-100β immunoreactivity in the rat dentate gyrus[J]. NeuroReport, 1995, 6(10): 1445.
- [14] Jha S, Rajendran R, Davda J, et al. Selective serotonin depletion does not regulate hippocampal neurogenesis in the adult rat brain: differential effects of p-chlorophenylalanine and 5, 7-dihydroxytryptamine [J]. Brain Res, 2006, 1075(1): 48.
- [15] McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze[J]. Brain Res Rev, 18(1): 33.