

· 基础研究 ·

高强度次声作用小鼠后海马内 P53 mRNA 表达的变化*

牟翔¹ 袁华¹ 李玲² 刘静¹ 葛雪松¹ 瞿丽莉¹ 陈景藻¹

摘要 目的: 研究高强度次声作用小鼠后海马内 P53mRNA 表达的变化。**方法:** BALB/C 小鼠暴露于 16Hz 声压 130dB 次声。每天作用 2h, 分别作用 1、7、14、21 和 28d 后, 采用原位杂交的方法观察小鼠海马内 P53mRNA 表达的改变。**结果:** 130dB 次声作用后, 海马区域内 P53mRNA 表达明显增多; 在相同声压级强度的次声作用下, 随着作用次数的增加, 海马内 P53mRNA 的杂交阳性反应产物增多。**结论:** 一定参数次声作用后, 脑内 P53mRNA 表达的增高, 提示脑组织的结构和功能发生变化, 导致 DNA 损伤, 神经元受到损害。这一效应与次声的声强和暴露时间有关。P53mRNA 在次声导致脑组织损伤过程中亦起着非常重要的作用。

关键词 次声; 脑损伤; P53mRNA

中图分类号: R332, R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2008)-04-0320-02

P53 mRNA expression in hippocampus of mice exposed to high intensity infrasound/MOU Xiang, YUAN Hua, LI Ling, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(4):320—321

Abstract Objective: To explore the change of P53mRNA in the hippocampus of mice exposed to infrasound of high sound pressure. **Method:** BALB/C mice were exposed to infrasound of 16Hz 130dB for 2h everyday and lasted for 1, 7, 14, 21 and 28d respectively. In situ hybridization was used to study the expression of P53mRNA in hippocampus. **Result:** P53mRNA in hippocampus increased after exposed to 130 dB infrasound. Under the same sound pressure level, P53mRNA in hippocampus increased along with the increase of exposure time. **Conclusion:** Hippocampus is sensitive to infrasound. By effects on P53 mRNA, infrasound may damage the brain. In the meantime, P53 mRNA is an important factor for the brain injury caused by infrasound. The effects related to the sound pressure level and exposure time of infrasound.

Author's address Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an, 710032

Key words infrasound; brain injury; P53 mRNA

近年来,随着工业化的发展,次声已是生产噪音与公共噪音的重要组成部分^[1]。作为一种环境污染因子,次声的生物学效应受到进一步关注。关于这方面的基础研究也引起人们的日益重视。自从 1979 年 Lane 等在 SV40 感染的小鼠细胞中发现 P53 基因以来,人们对 P53 基因的结构、功能和突变等有了越来越多的了解^[2]。我们采用原位杂交方法观察了在 16Hz, 130dB 次声作用下小鼠海马内 P53 mRNA 的动态表达与分布。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 BALB/C 小鼠 44 只(体重 18—20g), 由我校实验动物中心提供, 分笼饲养于安静舒适的环境下(基础噪音不高于 40dB), 标准饲料喂养, 自由饮水。随机分为次声作用 1、7、14、21d 和 28d 共 10 组, 每组 4 只。小鼠每天置于我校研制的电激励

式次声压力仓系统, 暴露于 16Hz, 130dB 次声作用下 2h; 对照组 4 只, 按上述 5 个时间点每天在次声仓内无次声作用放置 2h。

1.2 动物处理方法

于第 1、7、14、21 和 28d, 动物断头处死, 取全脑, 干冰速冻后置于 -80℃ 保存, 冰冻连续冠状切开, 片厚 15μm。

1.3 P53mRNA 原位杂交

P53 cDNA 购自军事医学科学院, 质粒 DNA 酶切和酶切片段的回收按常规方法进行, 其中质粒酶切片段的回收用低熔点琼脂糖凝胶电泳法, P53 cDNA 用随机引物法进行地高辛 (digoxin, Dig)-d-5'-三磷酸尿苷(uridine triphosphate, UTP) 标记, 地

* 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物理医学与康复科, 西安, 710032

2 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: 牟翔, 男, 博士, 副主任医师, 副教授

收稿日期: 2007-11-14

高辛核酸探针浓度 40ng/ μl , 标记探针的回收按常规方法进行; 原位杂交步骤见文献^[9]。脱水、二甲苯透明、树脂封片。用不含探针的杂交液作为阴性对照。

1.4 阳性判定及统计学分析

杂交阳性信号判定: 原发杂交阳性信号为蓝紫色, 呈细颗粒状。利用图像分析系统分析 P53mRNA 阳性反应的面积。每张切片在相同结构部位随机选取 4 个视野进行测量(观察窗面积 $2 \times 1\ 500\ \mu\text{m}^2$), 取平均值, 以均数 \pm 标准差表示。应用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析, 组间比较采用 SNK 检验。

2 结果

16Hz 130dB 次声作用后, 小鼠海马区 P53 mRNA 的表达随着各时间点而有所不同。130dB 次声作用 1d 后, 在海马 CA1-CA3 区和齿状回锥体细胞内轻度表达(阳性反应产物面积: $534 \pm 63.4\ \mu\text{m}^2$), 海马内血管轻度扩张, 与对照组(阳性反应产物面积: $376 \pm 83.21\ \mu\text{m}^2$) 比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 7d 后(阳性反应产物面积: $1572 \pm 103.2\ \mu\text{m}^2$), 上述区域的表达较第 1d 增多, 微血管和小血管扩张较显, 血管内皮细胞内可见呈强阳性表达的 P53mRNA, 与对照组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$); 14d 后(阳性反应产物面积: $1872 \pm 105.27\ \mu\text{m}^2$), 海马锥体细胞和齿状回颗粒细胞分布明显增多, 部分血管内皮细胞两者强阳性表达, 微小血管扩张状态较第 7d 减轻, 与对照组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$); 21d 后(阳性反应产物面积: $983 \pm 106.3\ \mu\text{m}^2$), 锥体细胞胞浆内 P53 mRNA 表达开始减弱, 与对照组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$); 28d 后(阳性反应产物面积: $426 \pm 70.1\ \mu\text{m}^2$), 上述表达及分布与对照组接近无明显改变, 海马周围颞叶皮质和扣带回区域可见大量散在分布的 P53mRNA 表达, 血管扩张状态已明显减轻。

3 讨论

国内外研究表明: 一定参数的次声作用于机体和小鼠后, 可以损害脑的边缘系统和下丘脑等皮质下结构, 出现间脑-下丘脑综合征^[4]; 小鼠学习记忆能力下降, 声压级越高, 小鼠学习成绩越差^[5-7]。我们在实验中发现: 随着次声作用天数延长, 小鼠脑内神经元 P53mRNA 表达逐渐增多、增强; 而且表达的阳性细胞多集中在海马的 CA1-CA4 区, 齿状回, 扣带回和皮质, 尤其是在次声作用后 14d 左右呈强阳性表达。

P53 基因分野生型和突变型, 野生型 P53 基因具有抑癌作用, 一些细胞自杀要有它的参加, 野生型 P53 蛋白有特殊的 DNA 亲和性, 调节基因转录, 这说明 P53 基因能调节细胞相关基因表达^[8]。突变型 P53 基因是一种癌基因, 可促进癌瘤的发生发展^[9]。

国外报道: 在培养细胞或肿瘤退变过程中, P53 基因过度表达可能伴随细胞凋亡发生, 显示了基因产物的附加功能, 故细胞死亡的促进基因的调节与 P53 基因可能有关^[10]。在人及鼠癫痫发作机理研究中发现: 人及鼠癫痫灶中 P53 mRNA 及 P53 蛋白的免疫反应性均增高, KA 诱导的癫痫发作可在海马细胞内有 P53 基因表达, 造成不可逆损害。这些均提示 P53 基因表达增高可能与选择性神经元易损性有关, 并与中枢神经系统中细胞死亡有某种联系^[11-12]。

因此, 我们认为一定参数次声作用后, 脑内 P53mRNA 表达的增高, 提示脑组织的结构和功能发生变化, 导致 DNA 损伤, 神经元受到损害。说明在一定参数的次声作用后, P53mRNA 在脑组织损害过程中亦起着非常重要的作用。但是关于 P53mRNA 在次声作用后神经元凋亡中的具体机制仍未清楚。

参考文献

- [1] 牟翔, 李玲, 袁华, 等. 不同声压级次声作用后小鼠海马内白细胞介素-6 mRNA 的变化 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2006, 5(1): 28-30.
- [2] Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction [J]. Cell, 1992, 70(4): 523-526.
- [3] 戴大英, 翟为容, 朱腾方, 等. 肝细胞癌中端粒酶逆转录酶表达及其与肿瘤抑制基因 P53 相关性研究 [J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(Supple): 79-81.
- [4] Izmerov Nf, Suvorov GA, Kuralesin NA, et al. Infrasound: body's effects on humans [J]. J Low Freq Noise Vib, 1987, 6: 29-34.
- [5] 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 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23(2): 79-82.
- [6] 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): 442-445.
- [7] 王斌, 陈景藻, 易南. 次声对小鼠学习能力的影响及防护 [J]. 航空医学, 1997, 25(3): 142-143.
- [8] Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, et al. Regulation of the specific DNA binding function of P53 [J]. Cell, 1992, 27, 71(5): 875-886.
- [9] Lan DP. Cancer P53, guardian of the genome [news comment] [J]. Nature, 1992, 358: 15-16.
- [10] Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, et al. Wild-type P53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6 [J]. Nature, 1991, 25, 352(6333): 354-357.
- [11] Campagne VL. Increased expression of cyclin G1 and P21 in neurons following transient forebrain ischemia comparison with early DNA damage [J]. J Neurosci Res, 1988, 53(3): 279-296.
- [12] Schreiber SS, Sakhi S, Dugich-Djordjevic MM, et al. Tumor suppressor P53 induction and DNA damage in hippocampal granule cells after adrenalectomy. Exp [J]. Neurol, 1994, 130(2): 368-376.