

长期睡眠期噪声暴露对小鼠认知功能的影响及生物钟相关机制

付一鸣^{1,2}, 张鑫垚¹, 余晓俊¹, 朱英文¹, 杨红莲¹, 杲修杰¹, 付波¹, 崔博¹

1. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050
2. 中国人民解放军 92619 部队 42 分队, 海南 三亚 572001



DOI 10.11836/JEOM23198

摘要:

[背景] 环境噪声污染严重, 目前关于长期睡眠期噪声暴露对认知功能影响及可能的生物钟机制相关研究较少。

[目的] 探讨睡眠期噪声暴露诱导小鼠认知功能损伤及可能的生物钟机制, 为噪声暴露防护提供理论依据。

[方法] 20 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组和噪声暴露组, 每组 10 只。噪声暴露组采用噪声发生器进行每天 12 h(08:00–20:00), 共 30 d 的睡眠期噪声暴露, 校准标定噪声强度为 90 dB。对照组不施加任何干预措施。噪声暴露结束后, 采用新物体识别实验和旷场实验检测小鼠认知功能, 对小鼠海马组织进行尼氏染色, 对离子钙结合适配器分子 1 蛋白(Iba-1)进行免疫荧光化学染色, 采用实时荧光定量 PCR 检测炎症因子、生物钟基因表达, 并采用试剂盒检测小鼠海马组织氧化应激指标变化。

[结果] 睡眠期噪声暴露后, 新物体识别实验结果显示: 与对照组相比, 噪声暴露组小鼠辨别指数为 0.06 ± 0.04 , 低于对照组的 0.65 ± 0.13 ($P < 0.05$)。旷场实验结果显示: 噪声暴露组中心活动距离为 (242.20 ± 176.10) mm, 低于对照组的 (1548.00 ± 790.30) mm ($P < 0.05$); 噪声暴露组中心活动时间为 (0.87 ± 0.64) s, 低于对照组的 (6.00 ± 2.86) s ($P < 0.05$)。尼氏染色结果显示: 与对照组相比, 噪声暴露组小鼠海马组织神经元固缩, 染色加深, 排列紊乱, 连接松散。免疫荧光结果显示: 与对照组相比, 噪声暴露组小鼠海马组织小胶质细胞活化, Iba-1 表达增加 ($P < 0.05$)。实时荧光定量 PCR 结果显示: 与对照组相比, 噪声暴露组小鼠生物钟基因 *Clock*、*Per2*、*Rev-erba* mRNA 水平增加 ($P < 0.05$), *Per1* mRNA 水平降低 ($P < 0.05$), 海马组织 *IL-18*、*IL-6*、*iNOS*、*NLRP3* mRNA 水平增加 ($P < 0.05$)。氧化应激指标检测结果显示: 与对照组相比, 噪声暴露组还原型谷胱甘肽含量降低 ($P < 0.001$)。

[结论] 睡眠期噪声暴露可导致海马组织生物钟基因失稳态并引发海马神经炎症, 促使小胶质细胞激活, 引起小鼠的认知功能损伤。

关键词: 睡眠期噪声暴露; 神经炎症; 认知损伤; 生物钟

Effects of long-term noise exposure during sleep on cognitive function and biological clock-related mechanisms in mice FU Yiming^{1,2}, ZHANG Xinyao¹, SHE Xiaojun¹, ZHU Yingwen¹, YANG Honglian¹, GAO Xiujie¹, FU Bo¹, CUI Bo¹ (1. Institute of Environmental and Occupational Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050, China; 2. Division 42, Unit 92619 of the People's Liberation Army, Sanya, Hainan 572001, China)

Abstract:

[Background] Environmental noise pollution is serious, and there are few studies on the effects of long-term noise exposure during sleep on cognitive function and possible biological clock mechanism.

[Objective] To explore the cognitive impairment induced by noise exposure during sleep in mice and possible biological clock mechanism, and to provide a theoretical basis for the protection against noise exposure.

[Methods] Twenty male C57BL/6J mice were randomly divided into a control group and a noise-exposed group, 10 mice in each group. The noise-exposed group was exposed to sleep-period noise using a noise generator for 12 h (08:00–20:00) per day for a total of 30 d. The calibrated

基金项目

国家自然科学基金面上项目(81673136)

作者简介

付一鸣(1993–), 男, 硕士, 医师;
E-mail: 739541572@qq.com

通信作者

崔博, E-mail: iamcuib@sina.com

作者中包含编委会成员 无

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2023-06-13

录用日期 2023-12-13

文章编号 2095-9982(2024)02-0119-07

中图分类号 R13

文献标志码 A

引用

付一鸣, 张鑫垚, 余晓俊, 等. 长期睡眠期噪声暴露对小鼠认知功能的影响及生物钟相关机制 [J]. 环境与职业医学, 2024, 41(2): 119-124, 132.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM23198

Funding

This study was funded.

Correspondence to

CUI Bo, E-mail: iamcuib@sina.com

Editorial Board Members' authorship No

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2023-06-13

Accepted 2023-12-13

To cite

FU Yiming, ZHANG Xinyao, SHE Xiaojun, et al. Effects of long-term noise exposure during sleep on cognitive function and biological clock-related mechanisms in mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2024, 41(2): 119-124, 132.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM23198

noise intensity was set at 90 dB. No intervention was imposed on the control group. At the end of the noise exposure, cognitive function of mice was examined using the new object recognition experiment and the open field test, and the hippocampal tissue damage of mice were evaluated by Nissl staining, ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) immunofluorescence staining, and real-time fluorescence quantitative PCR for inflammatory factors and biological clock genes. Oxidative stress indicators in the hippocampus of mice were also detected by assay kit.

[Results] After noise exposure during sleep period, the results of new object recognition experiment showed that the discrimination index of mice in the noise-exposed group was 0.06 ± 0.04 , which was significantly lower than that of the control group (0.65 ± 0.13) ($P < 0.05$). The results of open field test showed that the central activity distance of the noise-exposed group was (242.20 ± 176.10) mm, which was significantly lower than that of the control group, (1548.00 ± 790.30) mm ($P < 0.05$), and the central activity time of the noise-exposed group was (0.87 ± 0.64) s, which was significantly lower than that of the control group, (6.00 ± 2.86) s ($P < 0.05$). The Nissl staining results showed that compared with the control group, neurons in the hippocampus of the noise-exposed mice were shrunken, deeply stained, disorganized, and loosely connected. The immunofluorescence results showed that microglia in the hippocampus of the noise-exposed mice were activated and the expression of Iba1 was significantly increased compared with those of the control group ($P < 0.05$). The real-time PCR results showed that the mRNA levels of the biological clock genes *Clock*, *Per2*, and *Rev-erba* were significantly increased compared with those of the control group ($P < 0.05$), and the mRNA level of *Per1* was significantly decreased compared with that of the control group ($P < 0.05$); and the mRNA levels of *IL-18*, *IL-6*, *iNOS*, and *NLRP3* in the hippocampal tissues of mice were significantly increased compared with those of the control group ($P < 0.05$). The results of oxidative stress evaluation showed that compared with the control group, reduced glutathione content was significantly reduced in the noise-exposed group ($P < 0.001$).

[Conclusion] Noise exposure during sleep period can lead to the destabilization of biological clock genes in hippocampal tissues and trigger hippocampal neuroinflammation, which can lead to the activation of microglia and cause cognitive impairment in mice.

Keywords: sleep phase noise exposure; neuroinflammation; cognitive impairment; biological clock

噪声是指使人感到厌烦、不需要或有损健康的声音^[1]。随着我国城镇化水平的急速发展,环境噪声已成为城市环境的最主要污染源之一。噪声主要存在于交通运输、城市工业、建筑施工、居民社会生活、军事作业及其他多种职业环境中^[2],不仅会对听觉系统造成特异性损伤,还能通过听觉器官作用于听觉外的神经、内分泌、心血管等系统,引发睡眠功能紊乱、认知障碍、内分泌失调、高血压等健康风险^[3]。由于新型装备武器的快速发展以及夜间执勤的需要,军事噪声所致的噪声性耳聋发生概率大幅提升,军人这一特殊群体因噪声造成的神经、心血管系统健康问题引发关注^[4]。因此,睡眠期噪声污染及其健康风险亟待重视。

海马作为大脑中神经连接环路十分丰富的区域之一,其功能与记忆、信息存储、情绪情感、认知活动密切相关。相关研究表明,24 h 非间断噪声暴露可通过抑制海马与前额叶皮层自噬降解过程造成阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)样改变^[5],噪声暴露可引起肠道菌群紊乱并促发肠-脑轴异常进而引发神经炎症^[6]。生物钟稳态是指生物钟系统的正常运行状态,能够在 24 h 的周期内调节身体的生理和行为功能,对认知功能有着重要的影响。保持规律的作息、充足的睡眠,优化生活环境有助于维持生物钟稳态^[7]。任何对生物钟的干扰,例如夜间噪声、轮班工作、长时间的飞行时差等,都可能对认知功能产生不利影响。

睡眠期噪声暴露是否会通过影响生物钟稳态,进

而导致小鼠产生认知功能紊乱、学习记忆能力减退尚不明确。本研究对睡眠期噪声暴露的病理生理改变进行更深层的探索,探究噪声环境对小鼠认知功能损伤的影响以及发生病理改变可能的生物钟紊乱机制,旨在为夜间噪声暴露人员的健康防护提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 实验动物

本研究选用 8 周龄无特定病原体(SPF)级健康雄性 C57BL/6J 小鼠,耳廓反应灵敏,营养良好,小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2021-0006],体重 (21.0 ± 2.0) g,饲养于军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所清洁级动物房。动物实验室温度、湿度、光照可控,昼夜时间为 12 h: 12 h(昼, 8:00—20:00; 夜, 20:00—次日 8:00),小鼠自由摄入标准食物和水。实验前,小鼠进行 1 周的适应。本实验中动物的使用已获得军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所实验动物福利伦理委员会批准(IACUC of AMMS-04-2022-013)。本次实验所有的动物实验操作过程严格按照实验动物使用的“3R 原则”和伦理的相关规定进行。

1.2 主要试剂与仪器设备

超氧化物歧化酶测定试剂盒、微量还原型谷胱甘肽测定试剂盒(南京建成),离子钙结合适配器分子 1 蛋白(Ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba-1)

抗体(美国 Santa Cruz), RimeScript RT Master Mix 试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ 试剂盒(大连 TaKaRa), 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、精氨酸酶(arginase 1, Arg-1)、脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1(brain and muscle arnt-like protein 1, Bmal1)、昼夜节律运动输出周期故障基因(circadian locomotor output cycles kaput, *Clock*)、周期 1 基因(period1, *Per1*)、周期 2 基因(period2, *Per2*)、孤儿核受体(orphan nuclear receptor, *Rev-erba*)引物序列(上海 Sangon), 4%多聚甲醛/通用型组织固定液(北京兰杰柯), 无水乙醇、二甲苯、甲苯胺蓝、丙酮(中国国药), 中性树胶、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)(北京索莱宝), 抗荧光淬灭封片剂(上海碧云天), TRIzol™ 试剂(美国 Thermo Scientific)。

实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Scientific), 包埋框(武汉赛维尔), 组化笔(北京兰杰柯), 荧光显微镜(上海普赫光电), 噪声发生器(丹麦 Nærum), 新物体识别/旷场实验箱组件、动物行为学软件检测系统(上海欣软), 组织匀浆器(上海净信), Epoch2 型酶标仪(美国 BioTek), 全自动切片机(德国 Leica)。

1.3 分组和噪声暴露

20 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组和噪声暴露组, 每组 10 只。对照组不施加任何干预, 其所在饲养环境背景噪声不高于 40 dB。噪声暴露组使用噪声发生器进行模拟舱室环境的噪声强度和暴露模式, 条件设置为白天 12 h·d⁻¹(8:00—20:00), 90 dB, 持续 30 d。噪声暴露时每只小鼠分别放入容纳单只小鼠的小型铁丝笼内, 扬声器位于鼠笼正上方 5 cm 处, 噪声暴露的声强范围为(90±1) dB, 饲养笼里的声级每小时测量 1 次。不同饲养笼之间的噪声水平差异小于 2 dB。

1.4 实验方法

1.4.1 新物体识别实验 噪声暴露结束后的第 2 天, 进行新物体识别实验^[8]($n=5$), 以评价小鼠的短期记忆功能。新物体识别实验箱为长 50 cm、宽 50 cm、高 30 cm 的区域, 四周均不透明。实验室保持安静, 室内温度保持恒定, 光线保持均匀。每次每只小鼠实验前后均用 75%乙醇喷洒、擦拭实验箱和实验用积木, 防止每只动物之间气味串扰。新物体识别实验过程共 2 d: 第 1 天

为适应期, 动物对行为箱适应 5 min; 第 2 天为熟悉期和测试期, 熟悉期将两块相同的红色圆柱体积木(直径 3 cm)分别放在盒子内左右两侧, 距离箱体侧壁 8 cm, 小鼠自由嗅探积木 5 min, 1 h 后为测试期, 将箱内一个物体换成蓝色正方体积木(边长 3 cm), 位置不变, 将小鼠放入箱内同一位置, 记录小鼠在 5 min 内对新旧两个不同实验积木的探索时间, 即探索新物体时间(time of new object, TN)和探索旧物体时间(time of familiar object, TF)。实验结果以辨别指数(discrimination index, DI)表示, $DI = TN / (TN + TF)$ 。实验进行时, 排除不对旧物体和新物体进行探索的小鼠。每次每只小鼠实验前后清除可能出现的粪便, 以免影响实验结果。

1.4.2 旷场实验 进行旷场实验评价新异环境中自主行为和对新事物的探索能力($n=10$)。旷场实验箱为长 50 cm、宽 50 cm、高 30 cm 的区域, 四周均不透明。实验室保持安静, 室内温度保持恒定, 光线保持均匀。记录动物的编号、日期、状态等信息; 将实验动物从饲养笼中轻轻取出, 注意背向实验者; 迅速放置于实验箱的中央区域, 并立即离开; 打开动物行为学分析软件, 自动记录动物在箱体内的活动, 记录时间为 5 min; 实验结束后, 将实验动物放入事先准备好的其他饲养笼内。用酒精喷洒仪器装置除味, 并用纸巾擦干。记录中央区域滞留时间、中央区域活动距离。

1.4.3 尼氏染色 为进一步研究噪声暴露导致小鼠认知受损的机制, 对各组小鼠海马组织进行尼氏染色($n=3$)。行为学实验结束后, 按 40 mg·kg⁻¹ 戊巴比妥钠腹腔注射给药麻醉, 待小鼠失去知觉后打开胸腔, 暴露心脏, 使用生理盐水和多聚甲醛进行灌注, 待小鼠出现四肢及鼠尾僵直停止灌注。将小鼠全脑小心分离取出, 4%多聚甲醛溶液浸泡固定 24 h, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 于石蜡包埋盒包埋, 全自动切片机切片, 厚度为 10 μ m, 切好后的脑片(海马组织所在的脑片)进行脱蜡、脱水处理后, 于 45 °C 的甲苯胺蓝溶液中染色 30 min, 蒸馏水冲洗 3 次后, 梯度乙醇脱水, 特殊分色液中分色, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜随机选取 5 个视野观察海马 CA1、CA3、DG 区尼氏体形态及染色阳性细胞数。

1.4.4 免疫荧光染色 为进一步研究噪声暴露导致小鼠认知受损的机制, 对各组小胶质细胞的激活状态进行 Iba-1 免疫荧光化学染色($n=3$)。行为学实验结束后, 40 mg·kg⁻¹ 戊巴比妥钠腹腔注射给药麻醉, 小鼠灌注方法同上。将小鼠全脑小心分离取出, 石蜡包埋及抗原修复后, 组化笔画圈血清封闭 30 min, 滴加浓度为 1:

200 的 Iba-1 一抗, 放于湿盒内 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 加入二抗, 避光孵育 50 min, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 复染细胞核, 抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜采集图像。

1.4.5 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 实验 为进一步研究噪声暴露是否影响生物钟稳态表达, 对小鼠海马组织生物钟基因 *Bmal1*、*Clock*、*Per1*、*Per2*、*Rev-erba* mRNA 表达进行检测($n=6$)。为确认各组小鼠进行噪声暴露后是否出现炎症反应, 对海马组织进行炎症因子检测, 采用实时荧光定量 PCR, 测定海马组织样品的炎症因子 RNA 表达水平($n=5$)。检测完生物钟基因后再进行炎症因子表达检测时, 剩余 RNA 量不足, 故采取每组 5 个样本以完成炎症因子检测和重复。行为学实验结束后即断头取脑, 取出小鼠脑组织分离海马, 放入装有 Trizol RNA 裂解液的研磨管, 置于组织匀浆器中采用 70 Hz 频率震荡 2 次, 每次 30 s; 采用酚氯仿抽提法提取总 RNA, 分光光度计测定小鼠海马组织总 RNA 浓度及质量。RNA 提取时在超净工作台进行实验操作, 每个样品提取 RNA 后进行浓度测定, 样品的浓度均在 300~500 ng· μL^{-1} , 纯度在 1.9~2.1 之间。按 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒说明进行反转录为 cDNA, 按 TB Green® Premix Ex Taq™ 试剂盒进行定量分析。20 μL 反应体系: TB Green 10 μL , 反应酶 0.4 μL , 引物正义链(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 引物反义链(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 无 RNAase 水 6.8 μL , cDNA 溶液 2 μL 。实时荧光定量 PCR 仪上进行两步法扩增, 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s, 40 个循环反应; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 每个样本设 3 个复孔。按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据相对定量分析。相关引物设计由上海生物工程有限公司设计。具体见表 1。

表 1 小鼠引物序列

Table 1 Mouse primer sequences

基因(Gene)	正向(Forward), 5'-3'	反向(Reverse), 5'-3'
<i>IL-1β</i>	AATGCCACCTTTTGACAGTGATG	AGCTTCTCCACAGCCACAAT
<i>IL-18</i>	TCAAAGTGCCAGTGAACCCC	GGTCACAGCCAGTCTCTTAC
<i>IL-6</i>	ATCCAGTTGCCTTCTGGGACTGA	TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
<i>TNF-α</i>	AGCAAACCAAGTGGAGGA	GCTGGCACCAGTGTGGTTGT
<i>NLRP3</i>	ATTACCCGCCGAGAAAGG	TCGCAGCAAAGATCCACACAG
<i>Arg-1</i>	TGCTCACACTGACATCAACTCC	TCTACGTCTCGAAGCCAATGTAC
<i>iNOS</i>	GGCAAACCAAGGTCTAGGTT	TCGCTCAAGTTCAGCTTGGT
<i>Bmal1</i>	ACAGTCAGATTGAAAAGAGGCG	GCCATCCTTAGCACGGTGAG
<i>Clock</i>	ATGGTGTTTACCGTAAGCTGTAG	CTCGCTTACCAGGAAGCAT
<i>Rev-erba</i>	CAGGAGGTGTATTGCTTACA	GGACGAGGACTGGAAGCTATT
<i>Per1</i>	GAATTGGAGCATATCATCCGA	CCCGAAACATCCCGTTTG
<i>Per2</i>	CTCCAGCGGAAACGAGAAGCTG	TTGGCAGACTGCTCACTACTG
<i>β-Actin</i>	GCCTCACTGTCCACCTTCCA	AGCCATGCCAATGTTGTCTCTT

1.4.6 氧化应激指标检测 为进一步研究噪声暴露是否通过增加氧化应激水平扰乱海马功能, 对小鼠海马组织超氧化物歧化酶活性、还原型谷胱甘肽含量进行检测, 采用超氧化物歧化酶测定试剂盒和微量还原型谷胱甘肽测定试剂盒, 按照说明书要求将小鼠海马组织匀浆、离心并取上清液, 配制标准溶液和样本稀释液, 使用 Epoch2 型酶标仪进行浓度测定。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 所有计量资料经正态性检验和方差齐性检验, 采用独立样本 t 检验分析两组数据之间的差异, 数据均表示为 $\bar{x}\pm s$ 。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 短期记忆能力

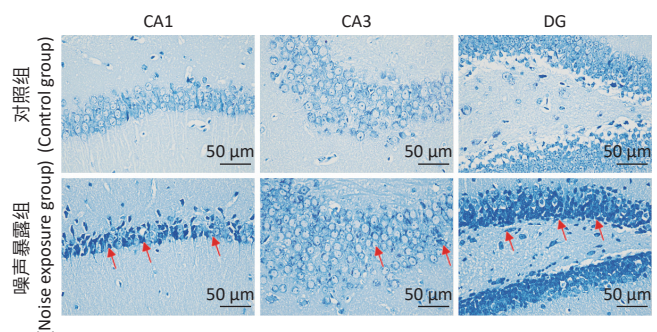
在新物体识别实验中, 噪声暴露组小鼠的 DI 为 0.06 ± 0.04 , 低于对照组的 0.65 ± 0.13 , 差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 新事物学习能力

在旷场实验中, 噪声暴露组小鼠中心活动距离为 (242.20 ± 176.10) mm, 低于对照组的 (1548.00 ± 790.30) mm, 差异有统计学意义($P<0.05$); 中心活动时间为 (0.87 ± 0.64) s, 也低于对照组的 (6.00 ± 2.86) s, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 海马组织神经元形态

与对照组相比, 噪声暴露组小鼠海马神经元数目减少, 细胞固缩, 染色加深, 排列紊乱, 连接松散。见图 1。



[注] 红色箭头所指为海马 CA1、CA3、DG 区中固缩神经元。出现神经元固缩, 染色加深, 排列紊乱, 连接松散。

[Note] Red arrows indicate sequestered neurons in the CA1, CA3, and DG regions of the hippocampus. Neurons are shrunken, deeply stained, disorganized, and loosely connected.

图 1 30 d 睡眠期噪声暴露对小鼠海马组织神经元的影响 ($\times 400$)

Figure 1 Effects of 30 d noise exposure during sleep on neurons in mouse hippocampal tissue ($\times 400$)

2.4 海马组织小胶质细胞激活状态

对各组小鼠海马的 Iba-1 表达进行统计分析,结果显示,与对照组相比,噪声暴露组小鼠海马 DG 区 Iba-1 的表达增加($P < 0.05$),提示噪声暴露后小鼠海马组织小胶质细胞的过度激活。见图 2。

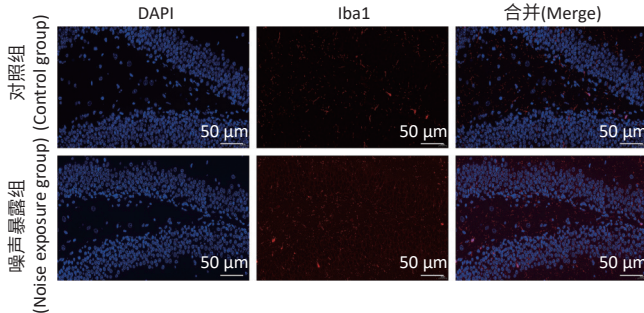


图 2 30 d 睡眠期噪声暴露对小鼠海马组织小胶质细胞的影响 ($\times 400$)

Figure 2 Effects of 30 d noise exposure during sleep on microglia in mouse hippocampal tissue ($\times 400$)

2.5 海马组织炎症因子含量

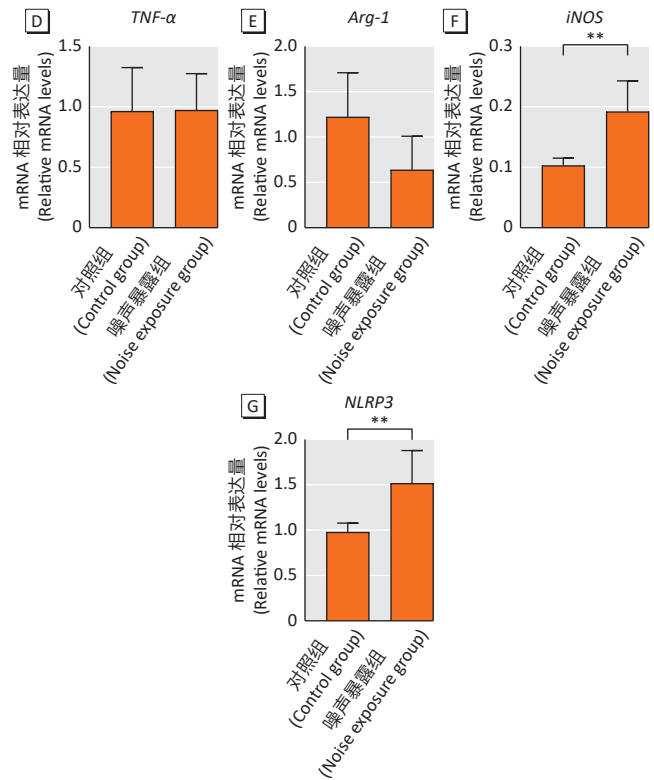
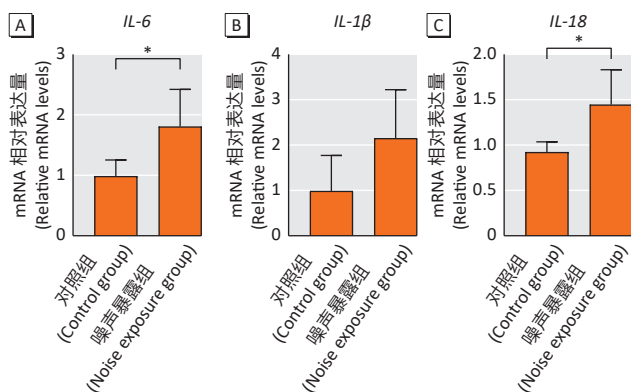
结果表明,噪声暴露组小鼠海马组织出现炎症因子 *IL-6/IL-18*、炎症小体复合物 *NLRP3*、M1 型小胶质细胞标志物 *iNOS* mRNA 表达增加($P < 0.05$), M2 型小胶质细胞标记物 *Arg-1* mRNA 表达呈下调趋势。见图 3。

2.6 海马组织氧化应激水平

与对照组相比,噪声暴露组超氧化物歧化酶活性呈增加趋势,但差异尚无统计学意义($P > 0.05$),还原型谷胱甘肽含量降低($P < 0.001$)。见图 4。

2.7 海马组织生物钟基因表达

与对照组相比,噪声暴露组生物钟基因 *Clock*、*Per2*、*Rev-erba* mRNA 水平增加($P < 0.05$), *Per1* mRNA 水平降低($P < 0.05$), *Bmal1* mRNA 表达无明显变化($P > 0.05$)。见图 5。

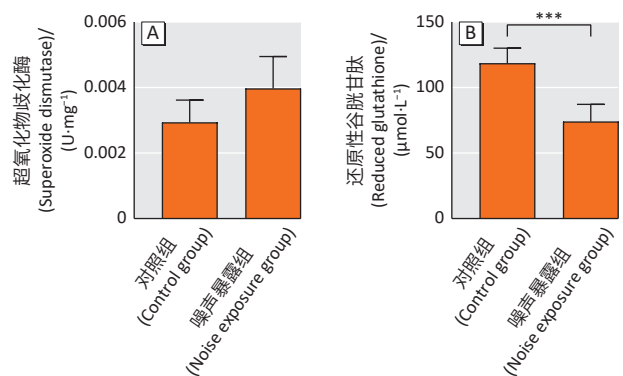


[注] A~D: 小鼠海马组织炎症因子; E~F: 小鼠海马组织 M1 型和 M2 型小胶质细胞标志物; G: 小鼠海马组织炎症小体。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

[Note] A-D: Inflammatory factors in mouse hippocampal tissue; E-F: M1-type and M2-type microglia markers in mouse hippocampal tissue; G: Inflammatory vesicle complexes in mouse hippocampal tissue. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

图 3 30 d 睡眠期噪声暴露对小鼠海马组织炎症因子的影响 ($n=5$)

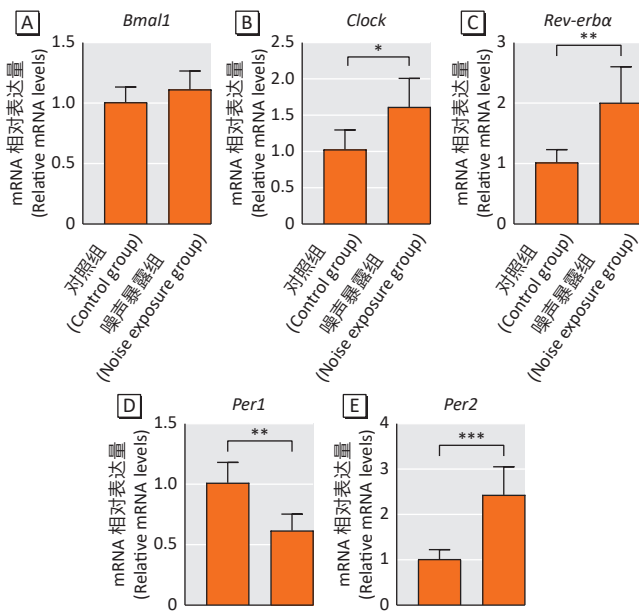
Figure 3 Effects of 30 d noise exposure during sleep on inflammatory factors in mouse hippocampal tissue ($n=5$)



[注] A: 超氧化物歧化酶活性; B: 还原性谷胱甘肽含量。***: $P < 0.001$ 。
[Note] A: Superoxide dismutase activity; B: Reduced glutathione content. ***: $P < 0.001$ 。

图 4 30 d 睡眠期噪声暴露对小鼠海马组织中氧化应激标志物含量的影响 ($n=5$)

Figure 4 Effects of 30 d noise exposure during sleep on the content of oxidative stress markers in mouse hippocampal tissue ($n=5$)



[注 (Note)] A: *Bmal1*; B: *Clock*; C: *Rev-erba*; D: *Per1*; E: *Per2*。

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

图5 30 d 睡眠期噪声暴露对小鼠海马组织中生物钟基因 mRNA 表达的影响 ($n=6$)

Figure 5 Effect of 30 d noise exposure during sleep on mRNA expression of biological clock genes in mouse hippocampal tissue ($n=6$)

3 讨论

噪声对神经系统等非听觉效应的影响越来越受到关注,目前已有多项研究证实,噪声暴露与认知功能呈负相关关系^[9]。目前对于认知功能的发病机制研究主要涉及氧化应激、神经递质、钙离子超载等方面,其中一个共同核心通路为中枢神经系统炎症损伤^[10]。但该核心通路是否与生物节律改变及生物钟基因有关联尚未明确。相关文献表明,约十分之一的哺乳动物基因处于昼夜节律转录控制之下。昼夜节律在睡眠、代谢及免疫等过程中均发挥着显著的作用。这些行为过程不仅受昼夜节律的调节,反过来也调节着昼夜节律^[11]。同样的机制也存在于炎症性疾病中,生物钟紊乱可诱导或加重炎症反应,同时炎症反应也可引起生物钟紊乱^[12]。

本研究首先对长期睡眠期噪声暴露小鼠进行新物体识别实验及旷场实验,结果显示,噪声暴露后小鼠学习、记忆、探索能力均下降,小鼠认知功能出现减退;随后通过病理切片证实噪声暴露组小鼠神经元损伤及小胶质细胞活化的标志物表达增加,提示小胶质细胞出现活化,数量增多,并通过炎症因子(如 IL-18、IL-6)显著增加共同佐证神经炎症反应;再次,通过对氧化应激指标进行检测发现噪声暴露组小鼠还原型谷胱甘肽含量显著降低,提示小鼠神经元出现氧化损伤;最后,对小鼠海马生物钟基因进行检测,在噪声暴

露后小鼠出现神经炎症,同时核心生物钟基因 *Clock*、*Per2* 表达上调,*Per1* 表达下调,一定程度上证实神经炎症与生物钟基因之间的相关性。Chen 等^[13]研究表明,在过敏性哮喘模型中,*Clock* 高表达的动物中表现出肺内嗜酸性粒细胞浸润增加和哮喘相关趋化因子的高表达;Wang 等^[14]分别利用 *Per1* 和 *Per2* 缺陷小鼠研究了 Per 蛋白在免疫系统中的作用,证实 *Per1* 的抗炎作用和 *Per2* 的促炎作用。同时王保泞等^[15]研究表明 *Bmal1* 对炎症影响可能通过其他时钟分子来实现,*Clock* 具有促炎作用,*Per1* 主要与抗炎作用有关,而 *Per2* 主要与促炎作用有关,这与本研究结果基本一致。

通过深入研究噪声暴露对大脑的损伤效应,可以为改善认知健康和生活方式提供有益的指导。但仍有相关问题尚未进一步探讨:一是噪声类型和频谱。不同类型的噪声可能对认知功能产生不同的影响。目前大多数研究主要关注交通噪声和工业噪声,但其他类型的噪声,如社会噪声、低频噪声和电子噪声等,也可能对认知功能产生潜在的影响。二是器官差异和个体差异。不同的器官和个体可能对噪声暴露产生不同的响应。例如,年龄、性别、遗传背景、先天条件等因素可能影响个体对噪声的敏感性和易感性^[16]。三是环境因素的交互作用。噪声暴露往往伴随着其他环境因素的存在,例如空气污染、化学物质暴露和社会压力等。这些环境因素可能相互作用,增加对认知功能的损伤影响。因此在未来的噪声暴露研究中,应对以上三个方面加强研究,提高对噪声暴露对认知功能损伤效应的全面理解。

本实验采用啮齿动物全睡眠期噪声暴露,比较 30 d 单一时长睡眠期噪声暴露的损伤效应,未考虑可能存在的短期急性噪声暴露及可能出现的声学环境短期耐受等实际作业环境现状,这一不足之处将在后续实验中优化和继续深入研究。

综上,本研究以 C57BL/6J 小鼠为研究对象,探讨长期睡眠期噪声暴露对中枢神经系统的非听觉效应,初步揭示了长期睡眠期噪声暴露会导致小鼠认知功能下降、海马组织神经炎症的发生,以及生物钟基因表达失稳态,为进一步研究噪声促发的昼夜节律紊乱,影响中枢神经系统功能的分子机制,并寻找改善海马生物钟基因振荡紊乱的相应治疗措施提供依据。

参考文献

[1] JAFARI Z, MEHLA J, KOLB BE, et al. Prenatal noise stress impairs HPA axis and cognitive performance in mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10560.

(下转第 132 页)

- 2019.
- [14] YANG Y, CHANG Y, WU Y, et al. A homogeneous polysaccharide from *Lycium barbarum*: Structural characterizations, anti-obesity effects and impacts on gut microbiota [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 2074-2087.
- [15] WANG W, ZHOU J, CHEN M, et al. Exposure to concentrated ambient PM_{2.5} alters the composition of gut microbiota in a murine model [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2018, 15(1): 17.
- [16] BURNS M B, LYNCH J, STARR T K, et al. Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment [J]. *Genome Med*, 2015, 7(1): 55.
- [17] SHIMA A, HINENOYA A, ASAKURA M, et al. Molecular characterizations of cytolethal distending toxin produced by *Providencia alcalifaciens* strains isolated from patients with diarrhea [J]. *Infect Immun*, 2012, 80(4): 1323-1332.
- [18] MANRESA M C, TAYLOR C T. Hypoxia inducible factor (HIF) hydroxylases as regulators of intestinal epithelial barrier function [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 3(3): 303-315.
- [19] 韩柳, 刘威. 微生态制剂联合莫西沙星序贯疗法对老年慢性阻塞性肺疾病合并下呼吸道感染患者肠道菌群及免疫功能的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 2020, 32(11): 1309-1313.
- HAN L, LIU W. Effect of microecologies combined with Moxifloxacin sequential therapy on intestinal microecology and immune function in elderly patients with COPD combined with lower respiratory tract infection [J]. *Chin J Microecol*, 2020, 32(11): 1309-1313.
- [20] LIU W, ZHOU Y, QIN Y, et al. Sex-dependent effects of PM_{2.5} maternal exposure and quercetin intervention on offspring's short chain fatty acids [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(22): 4371.
- [21] MARSLAND B J, GOLLWITZER E S. Host-microorganism interactions in lung diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(12): 827-835.
- [22] WANG L, CAI Y, GARSEN J, et al. The bidirectional gut-lung axis in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2023, 207(9): 1145-1160.
- [23] 沈俊希, 朱星, 陈云志, 等. 肺部、肠道菌群及其相互作用与慢性阻塞性肺疾病发生发展的研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2023, 26(20): 2548-2554.
- SHEN J X, ZHU X, CHEN Y Z, et al. Novel developments in lung and gut Microbiota and their cross-talk with the development of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin Gen Pract*, 2023, 26(20): 2548-2554.
- [24] LIU X, CHENG Y, ZANG D, et al. The role of gut Microbiota in lung cancer: from carcinogenesis to immunotherapy [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 720842.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣)

(上接第 124 页)

- [2] 张翔, 石菲. 军事噪声特点及其防治研究进展 [J]. *武警医学*, 2020, 31(9): 815-819.
- ZHANG X, SHI F. Military noise characteristics and its prevention and control research progress [J]. *Med J Chin People's Armed Police Forces*, 2020, 31(9): 815-819.
- [3] World Health Organization (WHO). Night noise guidelines for Europe [EB/OL]. [2024-01-01]. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0017/43316/E92845.pdf.
- [4] 崔博, 朱英文, 余晓俊, 等. 军事作业医学视域下战场声学研究理念及保障策略 [J]. *军事医学*, 2022, 46(10): 721-725.
- CUI B, ZHU Y W, SHE X J, et al. Research concepts and medical support strategies of battlefield acoustics based on military operational medicine [J]. *Mil Med Sci*, 2022, 46(10): 721-725.
- [5] ZHENG P, SHE X, WANG C, et al. Around-the-clock noise induces ad-like neuropathology by disrupting autophagy flux homeostasis [J]. *Cells*, 2022, 11(17): 2742.
- [6] 吴芷丹, 吴珊, 罗心越, 等. 噪声对小鼠血糖、炎症因子及肠道菌群的影响 [J]. *现代预防医学*, 2022, 49(6): 1016-1021, 1065.
- WU Z D, WU S, LUO X Y, et al. Effects of noise on blood glucose, inflammatory factors and intestinal flora of mice [J]. *Mod Prev Med*, 2022, 49(6): 1016-1021, 1065.
- [7] ALBRECHT U, RIPPERGER J A. Circadian clocks and sleep: impact of rhythmic metabolism and waste clearance on the brain [J]. *Trends Neurosci*, 2018, 41(10): 677-688.
- [8] 付信靖, 张钰, 郭建国, 等. PM_{2.5}通过增加海马神经炎症引起小鼠的认知障碍 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 9-14.
- FU X J, ZHANG Y, GUO J G, et al. Particulate matter 2.5 aggravates cognitive impairment in mice via hippocampal neuroinflammation [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 9-14.
- [9] SU D, LI W, SHE X, et al. Chronic noise exposure exacerbates AD-like neuropathology in SAMP8 mice in relation to Wnt signaling in the PFC and hippocampus [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14622.
- [10] YANG T, XU G, NEWTON P T, et al. Maresin 1 attenuates neuroinflammation in a mouse model of perioperative neurocognitive disorders [J]. *Br J Anaesth*, 2019, 122(3): 350-360.
- [11] HERGENHAN S, HOLTkamp S, SCHEIERMANN C. Molecular interactions between components of the circadian clock and the immune system [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(12): 3700-3713.
- [12] PEARSON J A, WONG F S, WEN L. Crosstalk between circadian rhythms and the microbiota [J]. *Immunology*, 2020, 161(4): 278-290.
- [13] CHEN H C, CHEN Y C, WANG T N, et al. Disrupted expression of circadian clock genes in patients with bronchial asthma [J]. *J Asthma Allergy*, 2021, 2021: 371-380.
- [14] WANG T, WANG Z, YANG P, et al. PER1 prevents excessive innate immune response during endotoxin-induced liver injury through regulation of macrophage recruitment in mice [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(4): e2176.
- [15] 王保泞, 姜一弘, 曹青林, 等. 节律基因在炎性反应中的研究进展 [J]. *心脏杂志*, 2021, 33(6): 650-654.
- WANG B N, JIANG Y H, CAO Q L, et al. Research progress of rhythm genes in inflammatory response [J]. *Chin Heart J*, 2021, 33(6): 650-654.
- [16] SUTER A H. Construction noise: exposure, effects, and the potential for remediation; a review and analysis [J]. *AIHA J*, 2002, 63(6): 768-789.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)