

低频电刺激对中国树鼩死亡后脏器中激素水平影响

俞发荣¹, 张璟^{2*}, 郭丽蓉¹, 俞文¹, 连秀珍¹, 谢明仁¹, 李登楼¹, 张诗爽¹

(1. 甘肃政法学院 甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室, 兰州 730070;

2. 甘肃省疾病预防控制中心, 兰州 730000)

【摘要】 目的 探索低频电刺激对中国树鼩死亡后脏器中激素水平的影响。**方法** 给予中国树鼩低频电刺激, 分别于死亡后 0、3、6、12、18、24、36 h 和 72 h 取甲状腺、肝、脾, 用放射免疫法测定内皮素 (endothelin, ET)、心钠素 (atrial natriuretic factor, ANF)、血栓素 (thromboxane, TX) 水平; 剥取死后 0 h 中国树鼩中脑腹侧背盖区 (ventral tegmental area, VTA) 检测 c-fos 表达。**结果** 电刺激后, 中国树鼩尸体脏器中内皮素、心钠素、血栓素水平比对照组显著升高, 其水平随死亡后时间的延长而降低; VTA c-fos 表达明显增强。**结论** 低频电刺激能引起中国树鼩脏器中激素的合成、释放和脑组织 c-fos 表达。

【关键词】 中国树鼩; 尸体; 脏器; 激素; c-fos 表达

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0578-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.006

Effect of low frequency electrical stimulation on hormone levels in the organs of Chinese tree shrew cadavers

YU Fa-rong¹, ZHANG Jing^{2*}, GUO Li-rong¹, YU Wen¹, LIAN Xiu-zhen¹, XIE Ming-ren¹,
LI Deng-lou¹, ZHANG Shi-shuang¹

(1. Key Laboratory of Evidence of Science and Technology Research and Application, Gansu Province (Gansu Institute of Political Science and Law), Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Province Disease Control and Prevention Center, Lanzhou 730000, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of low frequency electrical stimulation on hormone levels in organs of Chinese tree shrews after death. **Methods** Giving Chinese tree shrews low frequency electrical stimulation. At 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h and 72 h after death, the thyroid, liver, spleen were taken, and the levels of endothelin (ET), atrial natriuretic factor (ANF), thromboxane (TX) were determined by RIA method. At 0 h after death, midbrain ventral tegmental area (VTA) of Chinese tree shrews was taken to detect the c-fos expression. **Results** After electrical stimulation, ET, ANF, TX levels in the cadaver organs and VTA c-fos expression of Chinese tree shrews were significantly increased than in the control group. The contents were decreasing with the time after death. **Conclusions** Low frequency electrical stimulation can induce the synthesis and release of hormones in organs and c-fos expression in brain tissue of Chinese tree shrews.

【Key words】 Chinese tree shrews; Cadaver; Visceral organs; Hormone; C-fos expression; Electrical stimulation

中国树鼩个体小, 进化程度高, 新陈代谢比犬、鼠等动物更接近于人, 属低等灵长类动物。中国树鼩对外界环境刺激较其他动物敏感, 是研究外界环

境因素与生物体间相互作用及其机制较理想的动物^[1]。社会环境压力能引起机体激素水平的变化^[2], 甚至导致组织器官损伤。猝死或暴力致死、

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (编号: 31060283); 国家社会科学基金项目 (编号: 07BSH054); 甘肃省基础研究创新群体项目 (编号: 145RJJA333); 甘肃省科技支撑计划 - 社会发展类项目 (编号: 1304FKCA082); 甘肃政法学院重点项目 (编号: GZF2014XZDLW18)。

【作者简介】 俞发荣 (1959 -), 男, 博士, 研究员。研究方向: 法医学、社会环境压力对人类健康的影响、药理学和毒理学实验及实验动物学。E-mail: tim9898@163.com.

【通讯作者】 张璟 (1980 -), 女, 主管技师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: zjlxmr@126.com.

或其他原因死亡的法医病理学死亡时间的推断是法医病理鉴定实践中的难点^[3]。给予中国树鼩低频电刺激后,检测脏器中激素含量和脑组织 c-fos 表达的变化,为进一步研究外界环境因素与人们的社会行为和方式以及疾病(如不育症、心、脑血管病猝发、抑郁症、精神神经病等)的产生与发展的关系以及法医病理学推断死亡时间提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

中国树鼩(滇西亚种, *Tupaia belangeri chinensis*) 20 只,雄性,体重 120 ~ 125 g,购于中国科学院昆明动物研究所【SCXK(滇)K2013-0003】。饲养于甘肃政法学院 SPF 级动物实验室【SYXK(甘)2010-0002】。

1.1.2 试剂与仪器

放免诊断药盒购于北京北方生物技术研究所;c-fos 免疫组化检测试剂盒,购于武汉博士德生物有限公司。GC-1200 γ 计数放免仪(美国 Picker 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物处理

选取中国树鼩 20 只(雄性),饲养适应 7 d,随机分为 2 组,每组 10 只,在饲养笼(250 cm $\times$ 150 cm $\times$ 150 cm 连接 50 cm $\times$ 30 cm $\times$ 20 cm 休息室内)饲养,每笼 5 只。电刺激组:给予脉冲直流电刺激,电压 8 V,电流强度 5 mA,频率 20 Hz,脉冲宽度 0.3 ms,3 次,每次 3 s,刺激间隔时间 1/3 s,连续刺激 7 d。对照组:正常饲养。第 8 天,全部动物用乙醚吸入麻醉,死亡后置于室外露天环境下。

1.2.2 取样

在中国树鼩死亡后 0、3、6、12、18、24、36 h 和 72 h 取各组动物的甲状腺、肝、脾各 5 mg,分别放入研磨器,加 0.5 mL 生理盐水研磨成匀浆,倒入离心管,再加 0.5 mL 生理盐水冲洗研磨器,合并入离心管,用低速冷冻离心机 3500 r/min,离心 10 min,取上清液冷冻(-70℃)备用;剥取死后 0 h 中国树鼩脑干,用 4% 多聚甲醛-1.25% 戊二醛磷酸缓冲液(pH 7.4)固定,参考中缅树鼩广西猕猴脑立体定位图谱,切取中脑腹侧背盖区(ventral tegmental area, VTA),常规酒精梯度脱水,石蜡包埋、切片,片厚为 5 μ m。将切片贴于经粘附剂(铬矾-明胶)处理过的干净载玻片上,烤干后室温保存备用。

1.2.3 激素含量检测

分别取上述冻存液,按放免诊断药盒说明操作,用放射免疫 γ -计数器测定。

1.2.4 c-fos 表达检测

将处理好的石蜡切片常规脱蜡,按 c-fos 检测说明书操作,光镜观察,显微拍照并进行图像分析。

1.2.5 图像分析

用 YA-G5000 系列医学细胞影像分析软件进行图像拍照及其分析。从每组切片中各选 5 张形态典型对应切面,测量积分吸光度(integral optical density, IOD)、平均吸光度(average optical density, AOD)。

1.2.6 统计学分析

动物死亡后不同时间激素含量变化的数据采用 SPSS 17.0 软件单因素方差分析进行统计学处理,死亡后不同时间与激素水平之间的依存关系用多项式回归方程表示。

2 结果

2.1 低频电刺激对中国树鼩甲状腺中激素含量的影响

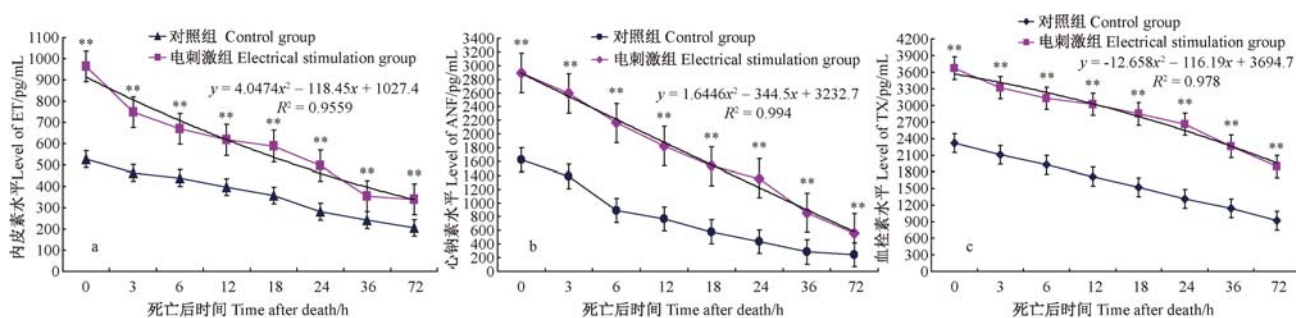
低频电刺激后 0 ~ 72 h,中国树鼩甲状腺中内皮素、心钠素、血栓素水平比对照组显著升高,差异有显著性($P < 0.01$);致死后 0 h,电刺激组甲状腺中内皮素、心钠素、血栓素水平比对照组增加了 82.76%、78.01%、58.78%;多项式回归方程统计结果表明,甲状腺组织中内皮素、心钠素、血栓素水平随死亡后时间的延长而降低。见图 1。

2.2 低频电刺激对中国树鼩肝中激素水平的影响

低频电刺激后 0 ~ 72 h,中国树鼩肝中内皮素、心钠素、血栓素水平比对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);致死后 0 h,电刺激组肝脏中内皮素、心钠素、血栓素含量比对照组增加了 87.05%、87.31%、80.38%;多项式回归方程统计结果表明,肝组织中内皮素、心钠素、血栓素水平随死亡后时间的延长而降低。见图 2。

2.3 低频电刺激对中国树鼩脾中激素水平的影响

低频电刺激后 0 ~ 72 h,中国树鼩脾中内皮素、心钠素、血栓素水平比对照组显著升高,差异有显著性($P < 0.01$);致死后 0 h,电刺激组脾中内皮素、心钠素、血栓素水平比对照组增加了 73.86%、62.32%、45.11%;多项式回归方程统计结果表明,脾组织中内皮素、心钠素、血栓素水平随死亡后时间的延长而降低。见图 3。

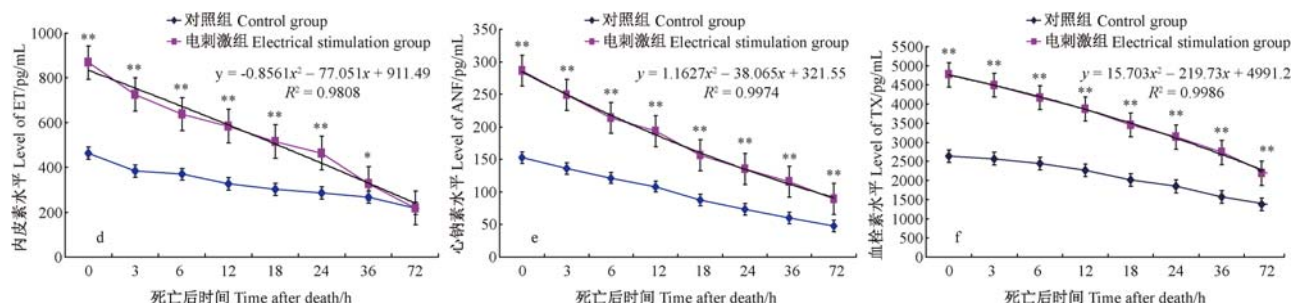


注: a. 内皮素水平; b. 心钠素水平; c. 血栓素水平。

图1 低频电刺激对中国树鼩甲状腺中激素水平的影响(与对照组比: $**P < 0.01$)

Note. a. Level of ET, b. Level of ANF, c. Level of TX.

Fig.1 Effect of low frequency electrical stimulation on hormone levels in the thyroid of Chinese tree shrews ($**P < 0.01$ vs. the control group)

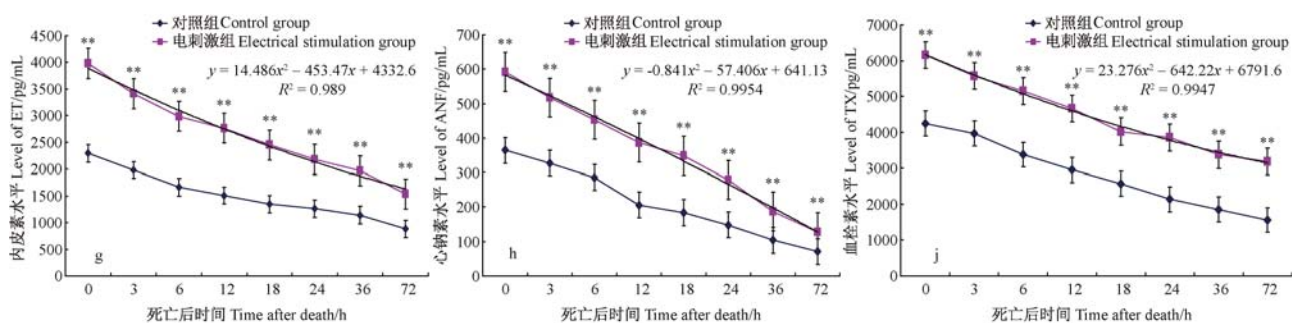


注: d. 内皮素水平; e. 心钠素水平; f. 血栓素水平。

图2 低频电刺激对中国树鼩肝中激素水平的影响(与对照组比: $**P < 0.01$)

Note. d. Level of ET; e. Level of ANF; f. Level of TX.

Fig.2 Effect of low frequency electrical stimulation on hormone levels in the liver of Chinese tree shrews ($**P < 0.01$ vs. the control group)



注: g. 内皮素水平; h. 心钠素水平; j. 血栓素水平。

图3 低频电刺激对中国树鼩脾中激素水平的影响(与对照组比: $**P < 0.01$)

Note. g. Level of ET; h. Level of ANF; j. Level of TX.

Fig.3 Effect of low frequency electrical stimulation on hormone levels in the spleen of Chinese tree shrews ($**P < 0.01$ vs. the control group)

2.4 低频电刺激对中脑腹侧背盖区 c-fos 表达的影响

光镜发现: 低频电刺激后, 中脑腹侧背盖区

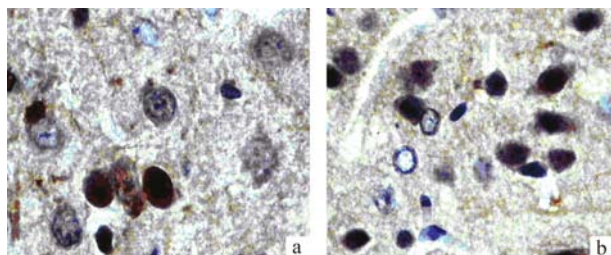
(VTA) 细胞中 c-fos 表达阳性细胞吸光度比对照组显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1, 图 4。

表 1 低频电刺激对中脑腹侧背盖区 c-fos 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Effect of low-frequency electrical stimulation on c-fos expression in the ventral tegmental area of Chinese tree shrew

指标 Index	低频电刺激组 Low-frequency stimulation group	对照组 Control group
积分吸光度	12.31 $\pm$ 1.4 **	7.54 $\pm$ 1.1
平均吸光度	0.21 $\pm$ 0.01 *	0.17 $\pm$ 0.02

注:与对照组比;* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the control group.



注:a. 对照组;b. 电刺激组。

图 4 低频电刺激对中国树鼩中脑腹侧背盖区 c-fos 表达的影响 ($\times 400$)

Note. a: Control group; b: Electrical stimulation group.

Fig. 4 Effect of low frequency electrical stimulation on c-fos expression in the ventral tegmental area of Chinese tree shrew ($\times 400$)

3 讨论

外界环境刺激能引起中国树鼩血象^[4]和激素水平^[5]的变化,较高浓度的去甲肾上腺素促进内皮细胞合成并释放内皮素(ET),ET 不仅本身有强烈的缩血管作用,而且增强去甲肾上腺素的缩血管作用^[6],同时加剧血小板的激活并释放血栓素(TX),引起心、脑血管痉挛和血栓形成,造成机体损伤、发病甚至猝死。心钠素(atrial natriuretic factor, ANF)具有强大的利钠、利尿、舒张血管、降低血压和对抗肾素-血管紧张素系统和抗利尿激素作用^[7]。心钠素能对抗去甲肾上腺素、血管紧张素、5-羟色胺、组织胺和钾离子所引起的血管收缩反应,激活 Ca^{2+} - K^{+} 离子通道^[8],增强内皮细胞通透性^[9],使组织和血浆中的 cGMP 含量增加。运动可以促进心钠素颗粒的形成和分泌^[10],对于心血管的稳态调节起着至关重要的作用^[11]。在急性脑梗死患者中,血清中的心钠素和血管紧张素 II 均显著升高^[12],说明去甲肾上腺素、内皮素、血栓素和心钠素均参与组织器官损伤或猝死过程。社会环境压力在引起缩血管激素释放的同时又促进心钠素的形成和分泌,以对抗

或减弱缩血管激素作用,起到保护机体的作用。实验结果显示,给予中国树鼩电刺激后,脏器中 ET、ANF、TX 水平均显著升高($P < 0.01$),中脑腹侧背盖区 c-fos 表达显著增强,脏器中激素含量变化与动物死亡后时间具有明显的时效关系,其含量随死亡后时间的延长而降低。甲状腺、肝、脾受外界环境影响较少,便于采样,适应于法医病理学检测,其激素含量变化趋势可作为法医病理学推断死亡时间的参考依据。

参 考 文 献

- [1] Yu FR, Lian XZ, Xie MR, et al. Effects of immediate stimulation on single nucleotide and catecholamine level in Chinese tree shrews [J]. Adv Mat Res, 2014, 998-999: 233-237.
- [2] 俞发荣, 常青云, 连秀珍, 等. 生活环境条件对中国树鼩血激素水平和心理行为的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 62-66.
- [3] 于晓军, 王海鹏, 赖小平, 等. 法医学死因分析及其参与度划分规范的探讨 [J]. 法医学杂志, 2010, 26(5): 383-386.
- [4] 连秀珍, 张红梅, 谢明仁, 等. 慢性环境刺激对中国树鼩行为方式的影响 [J]. 生态科学, 2012, 31(6): 666-670.
- [5] 俞发荣, 连秀珍, 张振南, 等. 即刻刺激对中国树鼩体内 DA, cMAP, cMGP 水平的影响 [J]. 中国法医学杂志, 2014, 29(6): 548-550.
- [6] 俞发荣, 宁晓希, 俞文, 等. 低频电刺激对不同动物血内激素水平的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3): 245-249.
- [7] Rubattu S, Sciarretta S, Volpe M. Atrial natriuretic peptide gene variants and circulating levels: implications in cardiovascular diseases [J]. Clin Sci (Lond), 2014, 127(1): 1-13.
- [8] de Bold AJ. Thirty years of research on atrial natriuretic factor: historical background and emerging concepts [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2011, 89(8): 527-531.
- [9] Cannone V, Huntley BK, Olson TM, et al. Atrial natriuretic peptide genetic variant rs5065 and risk for cardiovascular disease in the general community: a 9-year follow-up study [J]. Hypertension, 2013, 62(5): 860-865.
- [10] 韦晓英, 马彬, 吴洪海, 等. 不同运动量游泳运动对大鼠心房肌细胞心钠素颗粒的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2012, 27(2): 107-110.
- [11] 沈一岚. 不同强度运动对心钠素的影响 [J]. 牡丹江师范学院学报(自然科学版), 2011, 3: 40-42.
- [12] 邓勇, 杜艳华, 李连, 等. 心钠素、血管紧张素 II 与急性脑梗死的关系 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2011, 28(8): 715-717.

[收稿日期] 2015-08-24