

· 基础研究 ·

次声对骨髓间充质干细胞生长情况的影响

毕迎立 陈银海 范建中

【摘要】目的 观察次声对骨髓间充质干细胞(BMSCs)生长情况的影响,探讨次声合理应用的时间参数。**方法** 采用全骨髓培养法获取 SD 大鼠的原代 BMSCs,经传代纯化后,取 P3 代细胞分为次声作用组和空气暴露组。次声作用组分为次声作用 10 min 组、30 min 组和 60 min 组;空气暴露组分为空气暴露 10 min 组、30 min 组和 60 min 组。采用 CCK8 法检测细胞的增殖活性,流式细胞术进行细胞凋亡和细胞周期分析。**结果** 经次声作用 10 min、30 min 和 60 min 的 BMSCs,在培养 72 h 后,光密度(OD)值分别为 (1.480 ± 0.030) 、 (1.348 ± 0.030) 、 (1.493 ± 0.030) ,培养 96 h 后,OD 值分别为 (1.774 ± 0.030) 、 (1.731 ± 0.030) 、 (1.833 ± 0.030) ;而空气暴露 10 min、30 min 和 60 min 的 BMSCs,在培养 72 h 后,OD 值分别为 (1.479 ± 0.030) 、 (1.267 ± 0.030) 、 (1.227 ± 0.030) ,培养 96 h 后,OD 值分别为 (1.567 ± 0.030) 、 (1.563 ± 0.030) 、 (1.632 ± 0.030) 。经次声作用的 BMSCs 培养 72 h 后,其 OD 值均大于空气暴露的 BMSCs,且随着作用或暴露时间的增加,细胞 OD 值呈递增或先减后增的趋势,以作用或暴露时间为 60 min 的 BMSCs 的 OD 值最高,2 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。次声作用 10 min 和 60 min 时, BMSCs 的早期凋亡率分别为 $(1.07 \pm 0.12)\%$ 和 $(0.97 \pm 0.21)\%$,相应暴露时间的空气暴露组的早期凋亡率分别为 $(1.43 \pm 0.06)\%$ 和 $(3.33 \pm 0.15)\%$,差异有统计学意义($P < 0.01$)。60 min 的次声作用还可降低 BMSCs 的中晚期凋亡率、提高其正常细胞的百分率($P < 0.01$);次声作用 30 min 时,对 BMSCs 的细胞凋亡没有显著影响。次声作用 10 min 与次声作用 30 min 相比,可对 BMSCs 的细胞周期产生相反的影响;次声作用 10 min 组的 DNA 合成前期的(G1 期)细胞多于空气暴露 10 min 组($P < 0.05$);次声作用 30 min 组 G1 期的细胞少于空气暴露 30 min 组($P < 0.01$),而次声作用 60 min 组的 BMSCs 的细胞周期无显著改变($P > 0.05$)。**结论** ①次声可以促进 BMSCs 的增殖,且未发现次声引起 BMSCs 的凋亡;经次声作用的 BMSCs 培养 72 h 后大多数停留在静止期,但其周期分布被干扰;②次声作用 60 min 后,可以稳定地促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,且不改变细胞的正常周期分布,比较适合应用于 BMSCs 的培养。

【关键词】 次声; 骨髓; 间充质干细胞; 增殖; 凋亡; 细胞周期

The effect of infrasound on the growth of bone marrow mesenchymal stem cells BI Ying-li*, CHEN Yin-hai, FAN Jian-zhong. *Department of Rehabilitation Medicine, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: FAN Jian-zhong, Email: fjz@fimmu.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of infrasound on the growth of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and seek the most reasonable duration for using infrasound. **Methods** The primary BMSCs were obtained from Sprague-Dawley rats through whole bone marrow adherent cultivation. The cells of passage 3 were divided into trial groups treated with infrasound for 10 min, 30 min or 60 min, and control groups which were not treated with infrasound but exposed to air for the same durations. The vitality of cell proliferation was measured using the CCK8 method. Apoptosis and the cell cycle were analysed with flow cytometry (FACS). **Results** After cultivation for 72 h, the optical density (OD) values for BMSCs treated with infrasound for 10 min, 30 min and 60 min were 1.480 ± 0.030 , 1.348 ± 0.030 , 1.493 ± 0.030 respectively and after 96 h they were 1.774 ± 0.030 , 1.731 ± 0.030 and 1.833 ± 0.030 . All of which were significantly greater than in the control groups (1.479 ± 0.030 , 1.267 ± 0.030 and 1.227 ± 0.030 after 72 h and 1.567 ± 0.030 , 1.563 ± 0.030 and 1.632 ± 0.030 after 96 h). With the extension of the treatment duration, the OD values of the BMSCs increased or increased after decreasing, and the OD value for BMSCs treated with infrasound for 60 min was the highest. The FACS results indicated no effect of infra-

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.03.002

基金项目:广东省自然科学基金项目(8451051501000460);广州市海珠区科技计划项目(2009-Y-018)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院康复医学科(毕迎立、范建中);南方医科大学珠江医院门诊部(陈银海)

通信作者:范建中,Email:fjz@fimmu.com

sound on apoptosis of BMSCs when the treatment duration was 30 min, but that cell apoptosis could be inhibited when the treatment duration was 10 min or 60 min. The early phase apoptosis rates were $1.07\% \pm 0.12\%$ and $0.97\% \pm 0.21\%$ in the trial groups treated for 10 min and 60 min respectively, and $1.43\% \pm 0.06\%$ and $3.33\% \pm 0.15\%$ in the respective control groups, a highly significant difference. The results of cell cycle analysis showed infrasound could disturb the cell division of BMSCs significantly when the treatment duration was less than 30 min, but there was no significant effect when the treatment duration was 60 min. **Conclusions** Infrasound can promote cell proliferation and disturb cell division, but it did not cause apoptosis of BMSCs. When the treatment duration was 60 min, cell proliferation improved steadily, the apoptosis rate decreased, and the cell cycle did not change. So 60 min is the most reasonable treatment duration for infrasound.

【Key words】 Infrasound; Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Proliferation; Apoptosis; Cell cycle

次声波是频率低于 20 Hz 的机械振动波^[1]。次声的生物学效应表现在次声作用后,机体、器官、组织、及细胞的结构和功能的变化上。研究发现,次声可以对多种细胞产生影响,但对骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs)的影响还鲜有报道。本研究观察不同时间次声作用对 BMSCs 的增殖、凋亡和周期分布的影响,旨在为进一步探讨次声对 BMSCs 生物学特点的影响提供实验依据。

材料与方法

一、材料

动物: Sprague-Dawley (SD) 大鼠 1 只, 雌性, 体重约 120 g, 由南方医科大学实验动物中心提供。

试剂及耗材: DMEM/F12 培养基 (Hyclone, 美国), 优级胎牛血清 (Gibco, 美国), 青霉素、链霉素双抗 (吉诺, 中国), DNA 含量检测试剂盒 (凯基, 中国), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (凯基, 中国), CCK8 试剂盒 (同仁, 日本), 抗大鼠 CD29-PE/CY5、CD45-FITC、CD90-APC/CY7 单克隆抗体 (Biolegend, 美国), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) (Boster, 中国), 胰酶 (Hyclone, 美国), 25 cm² 培养瓶 (Corning, 美国), 96 孔板 (Corning, 美国)。

仪器: 美国 Chi 公司生产的 Infrasound 8 TM 次声治疗仪, 酶标仪, 流式细胞仪, 超净操作台, 离心机, 孵箱。

Infrasound 8 TM 次声治疗仪主要有次声声头和主机两部分组成, 输出档位为 1、2、3。本实验采用 3 档作用。经第四军医大学“便携式低频信号实时测试智能分析系统”测试显示, 该治疗仪 3 档位输出次声频率 4 ~ 20 Hz, 声强 79.75 ~ 86.11 dB^[2]。

二、大鼠 BMSCs 培养

1. 原代大鼠 BMSCs 的分离培养: ①用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠, 放入 70% 酒精的消毒缸中, 使体毛完全浸透。②将大鼠放在超净台的消毒托盘中, 取一套消毒过的止血钳和剪刀, 剪开大鼠背侧的皮肤并充分分

离, 暴露两侧后腿的皮下组织, 另取一套止血钳和剪刀剪开并分离干净股骨和胫骨周围的肌肉, 在关节处剪断股骨和胫骨, 放入消毒的玻璃培养皿中。③取第三套止血钳和剪刀剪开股骨和胫骨的骨髓腔, 用注射器吸取 5 ml DMEM/F12 培养基反复冲洗骨髓腔, 将冲洗后的骨髓悬液离心 ($2200 \times g$, 离心 5 min)。④离心结束后, 倒掉上清液, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 10 ml 重悬细胞, 将吹打混匀的细胞悬液平均移入 2 个 25 cm² 培养瓶中, 在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。

2. 大鼠 BMSCs 的传代和纯化: 利用差异贴壁培养法纯化细胞, 接种后的细胞, 每 2 天换液 1 次, 以除去不贴壁的细胞, 细胞长到 80% ~ 90% 融合时, 按 1:3 的比例进行细胞传代。倒掉细胞培养液, 用 PBS 缓冲液清洗 3 遍, 以去除细胞表面的培养液, 向培养瓶中加入 1 ml 磷酸盐缓冲液和 1 ml 0.25% 胰酶进行细胞消化, 倒置显微镜下控制消化时间, 在细胞变圆并开始脱落时, 加入 300 μ l 的胎牛血清终止消化, 用玻璃吸管轻轻吹打瓶底, 把细胞吹打下来, 将悬液转移到离心管中, 离心 ($2200 \times g$, 离心 5 min)。去上清, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞, 平均分配到 3 个培养瓶中, 分别标记为 P1、P2 等, 移入孵箱中培养。本实验所用的细胞为处于对数生长期第 3 代细胞。

三、BMSCs 的表型鉴定

BMSCs 的表型鉴定^[3]: 取第 3 代 BMSCs 细胞, 0.125% 胰酶 (PBS 缓冲液与 0.25% 的胰酶体积比为 1:1) 消化离心后, PBS 缓冲液重悬细胞, 调整细胞浓度约为 5×10^5 /ml, 取 1 ml 细胞悬液移入 1.5 ml EP 管中, 加入抗大鼠 CD29-PE/CY5、CD45-FITC、CD90-APC/CY7 单克隆抗体各 1 μ g, 另取一管等量细胞悬液不加抗体作为空白对照, 30 min 内用流式细胞仪检测。

四、实验分组及处理方法

将处于相同培养条件下的同一代 BMSCs 消化、培养基重悬后, 分为次声作用组和空气暴露组, 次声作用组按次声作用的时间再分为次声作用 10 min 组、次声作用 30 min 组、次声作用 60 min 组, 次声探头距细胞

悬液液面 2 cm 左右。空气暴露组为次声仪处于关闭状态,按空气暴露的时间再分为空气暴露 10 min 组、空气暴露 30 min 组、空气暴露 60 min 组。增殖实验在 96 孔板进行,每亚组 1 板,共 6 板。6 亚组细胞数均调整每孔为 4000/100 μ l,每组 4 孔。细胞铺板后放于孵箱中培养 3 h 基本贴壁后,对细胞进行对应的次声和空气暴露的处理,之后在每天的相同时间点处理细胞 1 次,连续处理 3 d,处理结束后,迅速将细胞转入孵箱中培养。细胞铺板后 48 h 进行 CCK8 检测,每日 1 次,共观察 3 d,每天每培养板取 4 个复孔。凋亡实验和周期分析实验时,将细胞用培养基重悬后,移至 5 ml 冻存管中进行次声和对照组的处理,处理结束后将细胞吹打重悬、转入 25 cm^2 培养瓶中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基在孵箱中培养 3 d。

五、测定细胞增殖活性

细胞增殖活性的测定采用 CCK8 法^[4]:在每孔要检测的 BMSCs 中加 10 μ l 的 CCK8 试剂液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h,细胞液面变为橙色后,用酶标仪检测细胞光密度(optical density, OD)值,采用双波长检测,测定波长为 630 nm,参比波长为 450 nm。

六、细胞凋亡检测

细胞凋亡检测^[5]:各组的 BMSCs 培养 3 d 后,达到 80%~90% 的融合状态。用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化后离心(2200 $\times g$,离心 5 min),弃去上清,PBS 重悬并调整细胞数大约 5×10^5 个/管,6 个亚组均制作 3 管细胞标本,每管细胞用 PBS 清洗一遍后,加 500 μ l Buffer 重悬细胞,再加入 5 μ l 的异硫氰酸荧光素和 5 μ l 碘化丙啶染液,室温避光孵育 10 min 后,用流式细胞仪检测。

七、细胞周期分析

细胞周期分析^[6]:取各组培养 3 d 后的 BMSCs,消化离心,清洗后调整细胞数为大约 1×10^6 个/管,6 个亚组均制作 3 管标本,用 70% 的酒精固定细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后洗去固定液,加 100 μ l RNase A 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,再加入 400 μ l PI 染色混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后,用流式细胞仪检测。

八、统计学分析

所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 版软件处理。对 OD 值的处理用析因设计资料的方差分析,对凋亡率和细胞周期分布率用 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、细胞形态及表型鉴定

光学显微镜下观察:原代细胞培养 7 d 左右达 90% 融合,成涡旋状,传代后细胞 2~3 d 即达融合状

态,纯度增高,呈纤维状贴壁生长。经不同作用时间的次声作用后,细胞形态不发生改变。

表型鉴定结果可见 CD90、CD29 表达阳性,而作为造血干细胞标志的 CD45 表达阴性,符合 BMSCs 的表型特点^[7]。

二、次声对 BMSCs 增殖活性的影响

经次声作用 10 min、30 min 和 60 min 的 BMSCs,在培养 72 h 后,OD 值分别为(1.480 ± 0.030)、(1.348 ± 0.030)、(1.493 ± 0.030),培养 96 h 后,OD 值分别为(1.774 ± 0.030)、(1.731 ± 0.030)、(1.833 ± 0.030);而空气暴露 10 min、30 min 和 60 min 的 BMSCs,在培养 72 h 后,OD 值分别为(1.479 ± 0.030)、(1.267 ± 0.030)、(1.227 ± 0.030),培养 96 h 后,OD 值分别为(1.567 ± 0.030)、(1.563 ± 0.030)、(1.632 ± 0.030)。结果可见经次声作用的 BMSCs,培养 72 h 后,其 OD 值均大于空气暴露的 BMSCs,且随着作用或暴露时间的增加,细胞 OD 值呈递增或先减后增的趋势,以作用或暴露时间为 60 min 的 BMSCs OD 值都最高,2 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 6 组 BMSCs 不同培养时间其 OD 值的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	培养 48 h 后	培养 72 h 后	培养 96 h 后
次声作用 10 min 组	4	0.929 ± 0.030	1.480 ± 0.030	1.774 ± 0.030
次声作用 30 min 组	4	1.094 ± 0.030	1.348 ± 0.030	1.731 ± 0.030
次声作用 60 min 组	4	1.410 ± 0.030	1.493 ± 0.030	1.833 ± 0.030
空气暴露 10 min 组	4	1.148 ± 0.030^a	1.479 ± 0.030	1.567 ± 0.030^a
空气暴露 30 min 组	4	1.147 ± 0.030^a	1.267 ± 0.030^a	1.563 ± 0.030^a
空气暴露 60 min 组	4	1.112 ± 0.030^a	1.227 ± 0.030^a	1.632 ± 0.030^a

注:与次声作用对应时间组相同时间点比较,^a $P < 0.05$

三、次声对 BMSCs 凋亡的影响

次声作用 10 和 60 min 时, BMSCs 的早期凋亡率分别为(1.07 ± 0.12)% 和(0.97 ± 0.21)%,相应暴露时间的空气暴露组的早期凋亡率分别为(1.43 ± 0.06)% 和(3.33 ± 0.15)%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。60 min 的次声作用还可降低 BMSCs 的中晚期凋亡率,提高其正常细胞的百分率($P < 0.01$);次声作用 30 min 时,对 BMSCs 的细胞凋亡没有显著影响。详见表 2。

四、次声对 BMSCs 周期分布的影响

6 亚组处于静止期的 BMSCs $> 80\%$,次声作用 10 min 组 BMSCs 的 DNA 合成前期(G1 期)和 DNA 合成后期-细胞分裂期(G2-M 期)的分布率与空气暴露 10 min 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);次声作用 30 min 组的 G1 期、DNA 合成期(S 期)和 G2-M 期的分布率与空气暴露 30 min 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);次声作用 60 min 组的 BMSCs 的细胞

周期无明显变化($P>0.05$)。详见表 3。

表 2 6 组 BMSCs 凋亡率的变化($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	管数	Q1	Q2	Q3	Q4
次声作用 10 min 组	3	2.47 ± 1.37	5.07 ± 0.35	91.40 ± 1.11	1.07 ± 0.12 ^a
次声作用 30 min 组	3	3.17 ± 0.87	3.87 ± 0.29	92.37 ± 1.26	0.57 ± 0.15
次声作用 60 min 组	3	2.50 ± 0.56	1.57 ± 0.29 ^a	94.97 ± 0.47 ^a	0.97 ± 0.21 ^a
空气暴露 10 min 组	3	4.50 ± 1.78	5.37 ± 0.67	88.73 ± 1.72	1.43 ± 0.06
空气暴露 30 min 组	3	4.13 ± 0.61	3.90 ± 0.10	91.57 ± 0.67	0.40 ± 0.20
空气暴露 60 min 组	3	2.50 ± 0.82	6.17 ± 0.71	88.00 ± 1.04	3.33 ± 0.15

注:Q1 为坏死率,Q2 为中晚期凋亡率,Q3 为正常活细胞率,Q4 为早期凋亡率;与空气暴露 60 min 组比较,^a $P<0.01$

表 3 6 亚组 BMSCs 周期分布情况($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	管数	G1 期	S 期	G2-M 期
次声作用 10 min 组	3	88.51 ± 0.42	2.46 ± 0.41	9.03 ± 0.49
次声作用 30 min 组	3	79.89 ± 1.77	8.98 ± 0.97	11.14 ± 0.83
次声作用 60 min 组	3	88.56 ± 1.27	3.66 ± 0.74	7.77 ± 0.68
空气暴露 10 min 组	3	86.21 ± 1.04 ^a	2.82 ± 0.82	10.97 ± 0.22 ^a
空气暴露 30 min 组	3	90.39 ± 2.11 ^a	1.65 ± 1.43 ^a	7.96 ± 0.96 ^a
空气暴露 60 min 组	3	88.92 ± 0.62	3.90 ± 0.78	7.18 ± 0.47

注:与次声作用对应时间组比较,^a $P<0.05$

讨 论

次声作为一种机械振动波,可能通过共振效应影响机体状况。目前,关于次声的研究除了对机体的损害和防护外,对离体细胞的影响研究也在逐渐增加,但次声对 BMSCs 的生物学效应研究还鲜有报道。本研究通过不同时间的次声作用后,观察 BMSCs 的增殖、凋亡和周期分布情况,揭示次声对 BMSCs 的影响。

次声对细胞增殖的影响机制,目前还不清楚,但已有研究报道,不同参数(频率、强度、时间等)的次声对细胞增殖所产生的影响不同,不同的细胞对次声的反应也不同。据文献报道,100 dB 的次声每天 30 min 作用 5 d 后,可以促进小鼠成骨样细胞增殖^[9];16 Hz、130 dB 的次声作用每天 2 h,可以抑制大鼠海马^[10]和脑室下区^[11]神经前体细胞的增殖。国外有学者发现,次声联合氨基嘧啶可以显著降低神经胶质瘤细胞的集落形成^[12],从而推断次声可以增加化疗药物的效能,抑制细胞增殖。国内有学者采用 Infrasound 8 TM 次声治疗仪的最高档位作用后,发现不同时间对人外周血淋巴细胞和肿瘤细胞的增殖无影响^[8,13]。本研究采用 CCK8 法测定细胞增殖活性,研究结果显示,次声作用时间对 BMSCs 有影响,次声作用不同时间产生的效应不同,次声作用 60 min 后,可以稳定地促进细胞增殖。

次声可以诱导多种细胞凋亡,机制可能与细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高或改变凋亡相关蛋白的表达有关。研究发现,8 Hz、90 dB 或 130 dB 的次声可能通过提高细胞内 Ca^{2+} 浓度引起大鼠海马神经前体细胞的凋亡^[14];5 Hz、130 dB 的次声可以提高细胞内的 Ca^{2+} 浓度^[15],还可以提高促凋亡相关蛋白 Bax,降低抑制凋亡相关蛋白 Bcl-x 的表达^[16],从而引起心肌细胞的凋亡。但是次声对 BMSCs 的凋亡影响如何还未见文献报道。本研究通过流式细胞术检测次声作用后 3 d 的细胞凋亡率,探查次声能否对 BMSCs 产生负面效应。结果显示,作用时间在 30 min 内时次声对 BMSCs 的凋亡影响不明显,作用 60 min 时次声不但不会引起 BMSCs 凋亡,还可抑制 BMSCs 凋亡。有研究发现,将 MML-1 细胞阻滞在 G1 期可以抑制 Fas 诱导的细胞凋亡,可能与凋亡抑制分子 Bcl-2 在 G1 期的表达上调有关^[17];还有研究发现,经次声作用后,小鼠海马内的 Bcl-2mRNA 表达上调^[18]。至于次声抑制 BMSCs 凋亡的机制是否与之相似,还需进一步研究证实。

有研究报道,次声可以干扰骨髓细胞的分裂周期^[19]。本实验结果验证了这一观点,同时提示次声干扰细胞分裂周期可能与作用时间有关。经不同时间次声作用的 BMSCs 培养 72 h 后有 >80% 的细胞处于静止期(G0-G1 期),其中次声作用 30 min 的 BMSCs 在培养 72 h 后,处于增殖期(S 期和 G2-M 期)的细胞最多,提示 72 h 内细胞增殖速度较慢,未出现生长抑制的现象,这也解释了次声作用 30 min 对 BMSCs 增殖实验的结果。但由于细胞过于融合后可能会使细胞周期停滞,而本研究中各组细胞增殖速度不一致,检测时细胞融合程度不同,可能会对结果产生一定影响。

综上所述,次声可以促进 BMSCs 的增殖,不会引起细胞凋亡,可能对细胞的分裂周期产生影响,且与作用时间有关。研究结果提示,60 min 的次声作用,可以稳定地促进 BMSCs 增殖,抑制细胞凋亡,对细胞的分裂周期无影响,比较适合应用于 BMSCs 的培养。

参 考 文 献

- [1] Leventhall G. What is infrasound? Prog Biophys Mol Biol, 2007, 93: 130-137.
- [2] 范建中,鲍勇,易南,等. 治疗用次声发生装置的声场特征研究. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29: 213-214.
- [3] Poliseti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. Neurol India, 2010, 58: 201-208.
- [4] Fu X, He Y, Xie C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. Cytotherapy, 2008, 10: 353-363.
- [5] Sui X, Yin J, Ren X. Antiviral effect of diammonium glycyrrhizinate and lithium chloride on cell infection by pseudorabies herpes virus.

- Antiviral Res, 2010, 85:346-353.
- [6] Zhang H, Wang Y, Gao P, et al. Silencing stathmin gene expression by survivin promoter-driven siRNA vector to reverse malignant phenotype of tumor cells. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5:1457-1461.
- [7] Li L, Bai X, Gong X, et al. Differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells in duck. *J Genet Genomics*, 2009, 36: 133-140.
- [8] 范建中, 张积仁, 鲍勇, 等. 次声对人外周血淋巴细胞的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29:724-727.
- [9] 王斌, 陈景藻, 刘静, 等. 次声波对成骨样细胞生物学特性的影响. *中国临床康复*, 2006, 10:83-85.
- [10] Liu J, Lin T, Yan X, et al. Effects of infrasound on cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroreport*, 2010, 21:585-589.
- [11] 林甜, 赵钢, 江文, 等. 次声对成年大鼠脑室下区神经前体细胞增殖的影响. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2009, 6:424-427.
- [12] Yount G, Taft R, West J, et al. Possible influence of infrasound on glioma cell response to chemotherapy: a pilot study. *J Altern Complement Med*, 2004, 10:247-250.
- [13] 鲍勇, 范建中, 李克, 等. 次声治疗对 Raji 细胞的影响. *南方医科大学学报*, 2008, 28:1093-1095.
- [14] Liu Z, Gong L, Li X, et al. Infrasound increases intracellular calcium concentration and induces apoptosis in hippocampi of adult rats. *Mol Med Report*, 2011, 5:73-77.
- [15] Pei Z, Sang H, Li R, et al. Infrasound-induced hemodynamics, ultra-structure, and molecular changes in the rat myocardium. *Environ Toxicol*, 2007, 22:169-175.
- [16] Pei ZH, Chen BY, Tie R, et al. Infrasound exposure induces apoptosis of rat cardiac myocytes by regulating the expression of apoptosis-related proteins. *Cardiovasc Toxicol*, 2011, 11:341-346.
- [17] 李玉峰, 沈加, 吴伟岚, 等. MML-1 细胞 G₁ 期阻断对 Fas 诱导细胞凋亡的抑制作用. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2011, 31:417-420.
- [18] 牟翔, 袁华, 李玲, 等. 小鼠次声刺激后海马内 bcl-2 mRNA 表达的变化. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2008, 7:328-330.
- [19] Svidovy VI, Kitaeva LV. Evaluation of cytogenetic activity in bone marrow cells exposed to infrasound (experimental data). *Med Tr Prom Ekol*, 1998, 6:42-44.

(修回日期:2012-01-17)

(本文编辑:阮仕衡)

· 短篇论著 ·

作业疗法结合肌电生物反馈疗法对脑卒中偏瘫患者上肢功能及日常生活活动能力的影响

张英 何世铭 李臣 廖维靖

随着经济和医疗水平的不断发展,脑卒中患者的存活率逐年提高。据统计存活的脑卒中患者中有 80% 以上留有不同程度的功能障碍^[1]。在进入康复期后,脑卒中偏瘫患者的上肢功能往往比下肢功能恢复慢,需要的时间长。因此,有效而具有针对性的上肢功能训练对脑卒中患者尤为重要,本研究旨在探讨通过作业疗法结合肌电生物反馈疗法对脑卒中偏瘫患者上肢功能及日常生活活动能力的影响。

一、资料与方法

(一) 临床资料

选取 2010 年 9 月至 2011 年 6 月在本院康复医学科住院的脑卒中偏瘫患者 30 例,均符合第四届脑血管病学术会议制订的脑卒中的诊断标准^[2],并均经 CT 或 MRI 检查证实;病程均 < 3 个月,无严重心、肝、肾等脏器疾病,无严重的意识障碍、完全性失语及明显智力障碍。将 30 例患者按照住院治疗的先后顺序分为观察组和对照组,每组 15 例。观察组 15 例中,男 11 例,女 4 例;平均年龄(54.6 ± 11.5)岁;脑出血 5 例,脑梗死 10 例。对照组 15 例中,男 10 例,女 5 例;平均年龄(58.2 ± 12.7)岁;脑出血 6 例,脑梗死 9 例。2 组患者的年龄、性别、病变性质及康复介入的时间等差异无统计学意义($P > 0.05$)。

(二) 治疗方法

对照组予以常规康复治疗(包括良肢位摆放、关节被动活动、Bobath 或 PNF 方法、肌力训练、平衡训练、针灸)及肌电生物反馈疗法。观察组在与对照组相同的常规康复治疗基础上予以作业疗法。

1. 肌电生物反馈疗法:采用广州产 WOND2000F 多功能生物反馈系统进行治疗。患者取坐位,先用 95% 的酒精脱脂,然后将 2 个刺激电极置于前臂背侧、腕背伸肌群起止点,2 个记录电极紧挨刺激电极和一个接地电极。电流强度 8 mA,电流脉冲宽度 200 s,电流刺激频率 35 Hz,刺激持续时间 5 s,休息时间 15 s,每天治疗 1 次,每次 20 min,每周 5 次。30 d 为 1 个疗程,共治疗 2 个疗程。

2. 作业治疗:① 维持正常的关节活动度,患者利用健手支撑偏瘫侧上肢,使肘关节屈曲,健手托偏瘫侧肘关节,用前臂控制偏瘫侧前臂,完成肩关节屈曲触及患者前额的动作;健手扶偏瘫侧肘关节,用前臂控制偏瘫侧前臂,完成肩关节内收运动;在偏瘫侧肩内收的状态下,用健手使偏瘫侧上肢肘关节屈曲,完成肩关节外展运动;偏瘫侧的上臂与躯干接触,用健手握偏瘫侧腕关节完成肘关节屈曲运动;② 肌力和耐力训练,治疗过程中逐渐增加肌力和耐力训练,早期按照从主动运动到轻微抗阻力运动再到中度和重度抗阻力运动、从等长运动训练到等张运动训练的顺序进行。当患者肌力 > 3 级时,开始由治疗师通过徒手施加阻力或选用橡皮筋、弹簧、滑轮及手训练器等设备进行抗阻训练;③ 上肢控制能力训练,初时做肩、肘、腕 3 个