

· 基础研究 ·

磁疗对大鼠创伤性脑组织损伤局部淋巴细胞浸润及神经细胞凋亡的影响

王玉革 宋秀豹 洪其生 李卫

【摘要】目的 研究磁疗对大鼠创伤性脑组织损伤后神经功能的保护作用及其可能机制。**方法** 制作 20 只大鼠创伤性脑组织损伤模型,随机分为磁疗组和非磁疗组。磁疗组头部创面区接受磁疗,磁场强度为表面强度 0.15 T,旋转时强度 0.1 T,转速为 3000 转/min,每天治疗 2 次,每次 20 min,共 10 d。非磁疗组不接受磁疗。伤后第 11 天测定大鼠左后肢腓肠肌的收缩力,随后取脑组织标本,免疫组化方法观察损伤灶周边分化抗原簇 4 阳性(CD4+)、分化抗原簇 8 阳性(CD8+)细胞浸润及细胞凋亡情况,分析各指标间的关系。**结果** 伤后第 11 天,磁疗组大鼠损伤灶周围的 CD4+、CD8+ 细胞浸润及细胞凋亡数量明显少于非磁疗组,而磁疗组左后肢腓肠肌的收缩力却明显强于非磁疗组。**结论** 磁疗可能通过抑制脑组织损伤灶局部的淋巴细胞浸润及神经细胞凋亡,减轻脑组织的进一步损伤,保护了神经功能。

【关键词】 脑损伤; 磁疗; 凋亡

The effects of magnetotherapy on local lymphocyte infiltration and neurocytes apoptosis after traumatic brain injury of rats WANG Yu-ping*, SONG Xiu-bao, HONG Qi-sheng, LI Wei. *Department of Rehabilitation, The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China
Corresponding author: LI Wei, Email: tliwei@jnu.edu.cn

【Abstract】Objective To study the neuro-protective effects of magnetotherapy after traumatic brain injury of rats. **Methods** Traumatic brain injury models were created in 20 rats and divided randomly into magnetotherapy and non-magnetotherapy groups. The rats in magnetotherapy group received magnetotherapy on the cranial surface of traumatized region twice daily, each for 20 min, over 10 d. The intensity of magnetic field was 0.15 T at the surface, and 0.1 T during spinning at 3000 rpm. The contraction strength of gastrocnemius of each rat's left hind limb was measured on the 11th d after trauma. The rats were then sacrificed and brain tissue samples were taken. The infiltrations of CD4+ and CD8+ cells and apoptosis in the area around the injury lesion were observed with immunohistochemical methods. The relationship among the indexes was analyzed. **Results** At the 11th d after brain injury, the quantities of CD4+ and CD8+ cells and apoptotic cells in magnetotherapy group were all obviously less than those in non-magnetotherapy group. Average contraction strength of gastrocnemius in magnetotherapy group was significantly stronger than that in non-magnetotherapy group. **Conclusions** Magnetotherapy can relieve the secondary effects of brain injury and induce neuro-protection effects. This may involve decreasing the local infiltrations of CD4+ and CD8+ and apoptotic cells in the area around the injury lesion.

【Key words】 Brain injury; Magnetotherapy; Apoptosis

创伤性脑组织损伤后,由于多种因素的作用导致脑组织进一步继发性损伤,表现为脑水肿、脑肿胀等,不仅加重神经功能障碍,严重时可直接导致患者死亡。有关脑组织继发性损伤的治疗多种多样,如自由基清除剂、钙离子拮抗剂等药物的使用,亚低温

治疗,高压氧治疗等,但临床效果不佳。目前国内的磁疗技术和设备已有了长足的进步,治疗的疾病种类已涵盖了外科、内科、妇科等各种疾病,并且均取得了不同程度的治疗效果,但磁疗用于创伤性脑组织损伤的治疗少见报道。本实验通过大鼠创伤性脑组织损伤模型,研究磁疗在创伤性脑组织损伤治疗中的效果。

材料与方法

一、动物分组

SD 大鼠 20 只,体重为(250±50)g,雌雄不限,随机分成磁疗组和非磁疗组,每组 10 只。磁疗组于模型

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.08.005

基金项目:广东省自然科学基金(8451063201000363);广东省医学科研基金(A2008353);广东省中医药局建设中医药强省科研课题基金(2008101)

作者单位:510630 广州,暨南大学附属第一医院康复理疗科(王玉革、宋秀豹、洪其生),神经外科(李卫)

通信作者:李卫,Email:tliwei@jnu.edu.cn

制作后次日开始进行磁疗,非磁疗组模型制作后不予磁疗。2 组均于伤后第 11 天检测腓肠肌的收缩力后处死,收集脑组织标本。

二、主要试剂及仪器

小鼠抗大鼠分化抗原簇 4 阳性(cluster of differentiation 4 +, CD4 +)、分化抗原簇 8 阳性(cluster of differentiation 8 +, CD8 +)单克隆抗体(德国 BD Biosciences 公司);羊抗小鼠 IgG 荧光二抗(美国 Jackson Immunoresearch 公司);恒冷切片机 Leica 1850(德国);荧光显微镜(德国 NiKon TE300、多功能倒置显微镜、Leica DC200 数码相机、Leica Qwin 分析软件系统);PCLab-UE 型生物信号采集处理系统(北京微信斯达科技发展有限公司)。

三、创伤性脑组织损伤模型制作

参照 Feeney 方法^[1]制作创伤性脑组织损伤模型。以 10% 水合氯醛(4 ml/kg 体重)行腹腔注射麻醉大鼠,麻醉诱导期约 10 min,3% 碘酒消毒头皮,于头部中线稍偏右矢状切开头皮,长约 2 cm,剥离骨膜,在右顶骨正中(冠状缝后约 5 mm,中线旁约 3 mm 处),用牙科钻钻开颅骨后,咬骨钳咬除周边颅骨,形成一大小约 6 mm × 6 mm 的骨窗,保持硬脑膜完整。用一个 30 g 的环形金属重物,套在一光滑的金属杆上,自 25 cm 高处垂直坠落,撞击置于硬脑膜上的圆锥体(底面为 2 mm × 2 mm),冲击力为 750 g·cm/s²,致右顶叶脑挫裂伤(面积约为 4 mm × 4 mm),稍压迫止血,撒入少许磺胺异噁唑粉,缝合头皮。术后大鼠昏迷时间为 2 ~ 6 h(平均 3.5 h)。

四、磁疗方法

采用旋转磁疗机(河北产),磁场强度为磁片表面强度 0.15 T,旋转时磁头表面磁场强度 0.1 T,转速为 3000 r/min。将磁头面置于大鼠头部创面区进行磁疗,每天 2 次,每次 20 min,连续治疗 10 d。

五、腓肠肌肌力测定

预先运行 PCLab-UE 型生物信号采集处理系统,将大鼠固定于手术台上。切开左后肢下段背侧皮肤,分离出腓肠肌,近端分离出坐骨神经,远端从肌腱止点处剪断,用丝线结扎后连接于机械-电换能器,用铂金丝电极刺激坐骨神经使肌肉收缩,电流强度为 3 V,波宽为 1 ms。电脑记录测量的腓肠肌肌力。

六、脑标本处理

麻醉同前,皮肤消毒后剪开胸腔,暴露心脏,自左心室快速滴注生理盐水,同时剪开右心房,让灌注液流出,待流出液清亮时,换用 4% 多聚甲醛灌注,约 2 h 左右,大鼠四肢僵硬,停止灌注,断头,正中切开头皮,打开颅骨,小心取出脑组织,冠状切开。取包括损伤灶在内的脑组织块,约 10 mm × 8 mm × 5 mm 大小,置入

4% 多聚甲醛中浸泡 6 h。

七、免疫组化检测

取包含损伤灶的脑组织块,置入 30% 蔗糖溶液浸泡 48 h。恒温冷冻切片机内切片,片厚 10 μm,选取 2 片损伤灶中心的切片,裱于多聚赖氨酸包被的清洁载玻片,晾干。1 mol/L pH7.4 Tris 缓冲盐溶液(tris buffered saline, TBS)洗 5 min,0.1% Tween-20 Tris-HCl 缓冲盐溶液(tris buffered saline with tween, TBST)洗 10 min,滴加 5% 封闭用正常羊血清室温孵育 1 h。倾去血清,滴加稀释一抗。第 1 片加小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体,第 2 片加小鼠抗大鼠 CD8 单克隆抗体,浓度均为 1:40。4℃ 冰箱过夜。PBS 洗 5 min × 3 次,滴加羊抗小鼠 IgG 荧光二抗(1:400),室温孵育 30 min,PBS 洗 5 min × 3 次。梯度脱水,二甲苯透明。荧光显微镜下观察,可见淋巴细胞呈环形金黄色颗粒荧光。随机记录病灶周边不同方位的 4 个高倍视野内(×200)CD4 +、CD8 + 淋巴细胞的总数,取其平均值。因病灶中央坏死液化,无细胞结构,不予细胞计数。

八、Hoechst 染色

取经过损伤灶的脑组织块,置入 30% 蔗糖溶液浸泡 48 h。恒温冷冻切片机内切片,片厚 10 μm,裱于多聚赖氨酸包被的清洁载玻片,晾干。TBS 洗 5 min, TBST 洗 10 min,滴加 5% 封闭用正常羊血清室温孵育 1 h。倾去血清,滴加 5 mg/L Hoechst 33258 染色液染色 10 min。PBS 洗 5 min × 3 次。梯度脱水,二甲苯透明。荧光显微镜下观察,可见正常细胞核出现弥漫均匀的低强度蓝色荧光,凋亡的细胞核则呈浓染致密的固缩形态或碎片状颗粒荧光。随机记录病灶周边不同方位的 4 个高倍视野内(×200)凋亡细胞的总数,取其平均值。

九、统计学分析

数据用($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS10.0 版软件对数据进行统计分析,非参数的两样本间差异采用 Mann-Whitney 检验法,各指标间的相关分析选择 Kendall 相关系数的非参数方法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

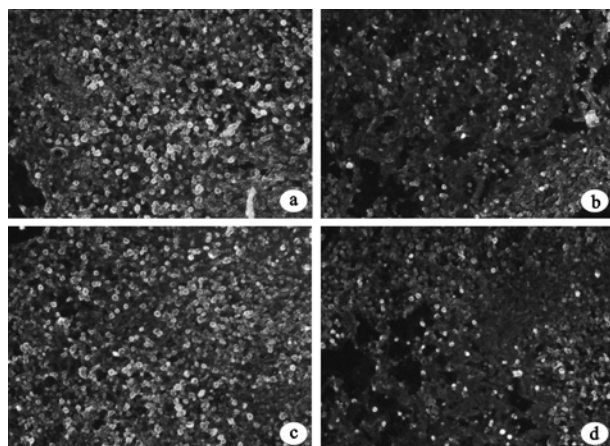
一、2 组左下肢腓肠肌肌力比较

损伤后第 11 天测定 2 组大鼠的左下肢腓肠肌的肌力,磁疗组的肌力约为非磁疗组的 1.7 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。说明磁疗可明显提高实验大鼠左下肢肌力恢复的程度。

二、2 组损伤灶周边 CD4 +、CD8 + 细胞浸润比较

荧光显微镜下观察淋巴细胞主要分布在损伤灶周

边脑组织,中央为液化的坏死组织。损伤后第 11 天,非磁疗组大鼠损伤灶周边可见大量的 CD4 +、CD8 + 细胞浸润,每高倍视野分别约为 270 个和 300 个,而磁疗组的 CD4 +、CD8 + 细胞数仅为 157 个和 85 个。2 组 CD4 +、CD8 + 细胞数的比值分别约为 1.7 和 3.5,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1 和图 1。

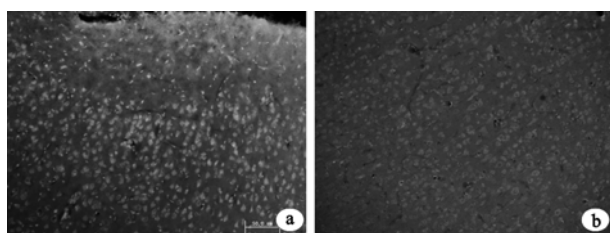


注:a. 非磁疗组大鼠损伤灶周边大量 CD8 + 细胞浸润;b. 磁疗组大鼠损伤灶周边 CD8 + 细胞浸润量明显减少;c. 非磁疗组大鼠损伤灶周边大量 CD4 + 细胞浸润;d. 磁疗组大鼠损伤灶周边 CD4 + 细胞浸润量明显减少

图 1 2 组大鼠脑损伤病灶周边细胞浸润(免疫组化染色, $\times 200$)

三、2 组凋亡细胞比较

荧光显微镜下观察凋亡细胞与淋巴细胞分布基本一致。损伤后第 11 天,非磁疗组大鼠损伤灶周边可见大量的凋亡细胞,每高倍视野分别约 360 个,而磁疗组的凋亡细胞数仅为 84 个,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1 和图 2。



注:a. 非磁疗组大鼠损伤灶周边可见较多凋亡细胞;b. 磁疗组大鼠损伤灶周边少见凋亡细胞

图 2 2 组大鼠脑损伤灶周边凋亡细胞(免疫组化染色, $\times 200$)

四、损伤灶周边凋亡细胞与左下肢腓肠肌肌力、淋巴细胞的相关性

非磁疗组大鼠损伤灶周边凋亡细胞数与左下肢腓肠肌的肌力之间呈负相关关系, Kendall 相关系数为 -0.947 , $P < 0.05$; 而损伤灶周边凋亡细胞与淋巴细胞之间呈正相关关系, 与 CD4 + 之间的 Kendall 相关系数为 0.684 , 与 CD8 + 之间的 Kendall 相关系数为 0.895 , $P < 0.05$ 。见表 1。

表 1 2 组大鼠损伤后第 11 天损伤灶周边 CD4 +、CD8 + 细胞浸润数, 凋亡细胞数及左下肢腓肠肌肌力的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	CD4 + 数	CD8 + 数	凋亡数	肌力(g)
磁疗组	10	156.70 $\pm$ 25.97 ^a	84.50 $\pm$ 26.21 ^a	82.80 $\pm$ 22.66 ^a	50.80 $\pm$ 5.01 ^a
非磁疗组	10	270.70 $\pm$ 31.27	308.30 $\pm$ 27.45	362.40 $\pm$ 34.36	29.70 $\pm$ 4.27

注:与非磁疗组比较, ^a $P < 0.05$

讨 论

大鼠脑组织损伤后,损伤灶局部均有炎症反应发生。多数学者认为,局部的炎症反应可加重脑组织的继发性损伤和神经功能障碍,如白介素-1(interleukin-1, IL-1)^[2]、白介素-8(interleukin-8, IL-8)^[3]、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)^[4]等非特异性的促炎因子和特异性的免疫细胞及抗体均可促进脑组织的坏死和凋亡^[5,6]。也有少数学者认为,损伤灶局部的炎症反应有利于受损脑组织的修复。

本研究中,磁疗组和非磁疗组大鼠损伤后第 11 天的脑组织切片均可见损伤灶周边组织内有大量 CD4 +、CD8 + 淋巴细胞浸润及神经细胞凋亡,且浸润的 2 种淋巴细胞与凋亡的神经细胞在数量上均呈现正相关关系,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示损伤灶周边的淋巴细胞浸润与神经细胞凋亡之间可能相互影响。另外,磁疗组损伤灶周边组织内淋巴细胞及凋亡细胞的数量明显少于非磁疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明磁疗可以减少损伤灶周边的淋巴细胞浸润与神经细胞凋亡数量。

神经细胞凋亡常导致相应的神经功能障碍。本研究中,2 组大鼠损伤后均出现不同程度的左后肢腓肠肌肌力下降,但磁疗组的肌力明显强于非磁疗组。相关分析显示,损伤灶周边神经细胞凋亡的数量与大鼠左下肢腓肠肌的肌力呈负相关关系,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示通过磁疗改善大鼠左下肢腓肠肌的肌力,可能与其减少损伤灶周边神经细胞凋亡数量有关。研究中还发现,虽然大鼠脑组织损伤灶周边组织内 CD4 +、CD8 + 细胞浸润的数量与神经细胞凋亡的数量均有正相关关系,但两两之间关系的密切程度不同。损伤灶周边神经细胞凋亡数与 CD8 + 细胞浸润数之间的 Kendall 相关系数为 0.873 ;而与 CD4 + 细胞之间的 Kendall 相关系数仅为 0.660 。提示损伤灶周边神经细胞凋亡与 CD8 + 细胞浸润的关系更密切。

综上所述,磁疗可以减少损伤灶周边的淋巴细胞浸润及神经细胞凋亡,与其神经功能保护作用有关。损伤灶周边的炎症反应可能加重神经细胞的凋亡,其中 CD8 + 细胞直接的杀伤作用可能是神经细胞凋亡的一个重要因素。

参 考 文 献

- [1] 江基尧,朱诚,主编.现代颅脑损伤学.上海:第二军医大学出版社,1999:509.
- [2] Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1 beta and induction of inflammation, apoptosis and vasogenic edema. J Neurosurg, 2000, 92:108-120.
- [3] Whalen MJ, Carlos TM, Kochanek PM, et al. Interleukin-8 is increased in cerebrospinal fluid of children with severe head injury. Crit Care Med, 2000, 28:929-934.
- [4] 孔雷,韩天权,于颖彦,等.大鼠侧脑室注射细胞因子等对脑损伤的形态学研究.外科理论与实践,2006,11:39-43.
- [5] 李卫,徐如祥,张建,等.颅脑损伤患者血液及脑脊液中 IgG 含量的变化与病情之间的关系.南方医科大学学报,2006,26:703-

704.

- [6] 李卫,徐如祥,陈善成,等.大鼠脑组织损伤后局部及血液中细胞免疫状况的改变.中华神经医学杂志,2006,5:566-568.
- [7] 赵仑,赵德明,魏金河,等.5 Hz 和 20 Hz 磁场刺激对大鼠脑缺血影响的比较研究.航天医学与医学工程,2001,14:41-44.
- [8] 文峻,屈学民,巨宏博,等.脉冲电场和磁场对血液流变学特性的影响.中国临床康复,2003,7:3290-3291.
- [9] 黄乃艳,张效莲,李小瑛,等.脉冲磁场抑制缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡与 Ca^{2+} 分布的关系.中国临床康复,2004,8:1268-1270.
- [10] 马志成.脑脉冲磁场法对脑血流动力学影响研究.生物医学,2003,4:20-22.

(修回日期:2009-04-08)

(本文编辑:松 明)

· 研究简报 ·

高压氧治疗对鼠实验性高眼压视网膜电图的影响

王珊梅 吴双桂 易军晖

高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)治疗能成倍提高缺血组织的氧分压,缓解组织缺氧状况^[1]。开角性青光眼患者经 HBO 治疗后可获得稳定的视功能^[2],视敏度明显提高^[3]。近年来临床试验消除了“HBO 治疗会使眼压增高”的顾虑^[4],但是 HBO 治疗青光眼的作用机制尚不清楚。急性眼压升高造成视网膜缺血缺氧时,视网膜电图(electroretinogram, ERG)的 b 波明显降低,可以敏感地反映其组织损伤。我们应用 HBO 治疗急性高眼压模型大鼠,观察 ERG 的改变,探讨 HBO 治疗是否能促进 ERG 恢复。

对象与方法

一、实验动物

成年健康 Wistar 大鼠 18 只,雌雄不分,体重为 150 ~ 250 g,角膜透明,无眼部疾病,由中南大学医学动物室提供。

二、主要试剂及设备

YLCO. 5/I A 型婴儿高压氧舱;医用氧气;LMS-2A 型二道生理记录仪;BG-1 型视网膜曝光器;江湾 I 型 C 脑立体定位仪。

三、高眼压动物模型制备

对所有大鼠的双眼采用生理盐水灌注加压制备高眼压状态模型^[5,6]。在制模前 3 d,予以 0.25% 氯霉素滴大鼠双眼,每日 2 次。先将大鼠暗适应 2 h,暗红光下腹腔注射 25% 乌拉坦(2 ml/kg 体重)麻醉后,将大鼠固定在脑立体定位仪上,用 0.25% 氯霉素眼药水冲洗结膜囊,于角膜缘前 1 mm 处用 5 号

头皮针穿刺刺入前房,穿刺针尾连接视网膜电图记录仪器,记录加压前的 ERG。调节与头皮针相连的无菌生理盐水瓶的高度进行灌注加压,同时观察记录的 ERG,直至 ERG b 波消失,然后维持此压力 90 min,最后缓慢降低压力至正常,拔出穿刺针,用氯霉素眼药水滴眼。

四、动物分组

高眼压模型制备成功后随机分成对照组和 HBO 治疗组,每组 9 只,18 只眼,对照组造模后不予任何处理,HBO 治疗组予以 HBO 处理。

五、HBO 处理

急性高眼压模型制备成功后当天,将 HBO 治疗组的大鼠置入实验用婴儿高压氧舱内,用纯氧(氧浓度 $\geq 99.5\%$)加压,治疗压力为 0.2 MPa,吸高浓度氧 80 min,舱内氧浓度保持在 85% 左右,HBO 治疗每日 1 次,共 7 d。

六、ERG 描记

在大鼠高眼压模型制备加压前、加压中和加压后 7 d 记录 ERG。动物暗适应 2 h,25% 乌拉坦(2 ml/kg 体重)腹腔麻醉后,将记录电极(5 号头皮针)刺入前房中,参考电极刺入双耳连线中点的尖端达两眼 midpoint 皮下,接地电极刺入鼠尾皮下。单闪白光为刺激,连续测 3 次,测量 ERG b 波波幅,取 3 次记录平均值。

七、统计学分析

所有数据资料均采用 SPSS 13.0 版统计软件处理。指标测定结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,2 组之间比较用成组设计两样本均数 t 检验。

结 果

一、高眼压状态下鼠眼部表现

当眼压升高至视网膜电图 b 波消失时,可见大鼠双眼角膜混浊、瞳孔散大、虹膜颜色苍白、眼球变硬。本研究中,大鼠平

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.08.006

作者单位:417000 娄底,湖南省娄底市卫生学校教科科(王珊梅);湖南省冷水江市人民医院高压氧科(吴双桂);中南大学湘雅三医院眼科(易军晖)

通信作者:易军晖,Email: yijunhui@sohu.com