

· 基础研究 ·

低声压级次声对缺血再灌注损伤大鼠脑组织胰岛素样生长因子-1 的影响

李川 范建中 吴红瑛 魏轶

【摘要】目的 观察低声压级次声对局灶性脑缺血再灌注损伤的影响及其作用机制。**方法** 用线栓法制备右侧大脑中动脉栓塞-再灌注大鼠模型,以 Infrasound 8TM 次声治疗仪产生的次声作为处理因素。将 32 只大鼠随机假手术组 ($n=8$)、造模组 ($n=8$)、次声组 ($n=16$),次声组按每天作用时间分为 20 min 组及 120 min 组,每组 8 只。动态观察(2 h、1 d、3 d 和 7 d)各组神经功能状态。7 d 后大鼠断头取脑,采用免疫组化技术观察缺血侧大脑皮质胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 变化。**结果** 与模型组相比,次声 120 min 组神经症状改善明显 ($P<0.05$)。次声 120 min 组缺血侧大脑皮质 IGF-1 表达明显增加,与模型组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。**结论** 低声压级次声(120 min/d, 7 d)对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制与增加 IGF-1 表达有关。

【关键词】 次声; 局灶性脑缺血; 缺血-再灌注; 胰岛素样生长因子-1

Effects of infrasound with low sound pressure level on the content of IGF-1 in brain of rats with focal cerebral ischemia-refusion injury LI Chuan, FAN Jian-zhong, WU Hong-ying, WEI Yi. Department of Rehabilitation medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China
Corresponding author: FAN Jian-zhong, Email: fjz@flmmu.com

【Abstract】 Objective To study the effects and mechanisms of infrasound with low sound pressure level on focal cerebral ischemia-refusion injury. **Methods** Focal cerebral ischemia was produced by 2 hours of occlusion of the middle cerebral artery in rats. Infrasound generated by infrasound 8TM device was used as treatment factor. Thirty-two Sprague-Dawley rats were divided into three groups: sham group ($n=8$), model group ($n=8$) and infrasound group ($n=16$), and the infrasound group was subdivided into 20- and 120-min infrasound groups, with 8 rats in each group. Neurological symptoms was assessed at 2 h, 1 d, 3 d and 7 d, respectively. These rats were sacrificed after 7 days of infrasound treatment and their brains were harvested. The number of IGF-1 positive cells of ischemia cortex was counted by using immunohistochemical technique. **Results** Compared with model group, neurological symptoms of rats in 120-min infrasound group was significantly improved ($P<0.05$); the number of IGF-1 positive cells of ischemia cortex in 120-min infrasound group increased significantly as compared with that in model group ($P<0.01$). **Conclusion** Infrasound with low sound pressure level (120 min/d, 7 d) could exert neuroprotective effect in focal cerebral ischemia injury by increasing expression of IGF-1 in brain.

【Key words】 Infrasound; Focal cerebral ischemia; Ischemia-reperfusion; IGF-1

胰岛素样生长因子-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是一种重要神经营养因子,内源性和外源性的 IGF-1 均有重要的神经保护作用。次声波是频率低于 20 Hz 的弹性波,它是由物质的机械振动产生,与声波和超声同属机械波。有报道证实,低声压级次声可通过轻柔的共振作用,改善局部循环,增加细胞活力,对生物体产生有利的作用^[1],课题组前期研究表明,低强度次声可显著缩小脑缺血大鼠脑梗死体积,减轻病理损伤。为了进一步阐明其作用机理,本研究观察了低强度次声对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 IGF-1 表达的影响,现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

1. 动物:健康 SD 大鼠 32 只,雌雄各半,体重 250 ~ 330 g,南方医科大学实验动物中心提供,室温、常湿饲养,普通饲料,自由饮水。质量合格证号:SCXK (粤)2006A051。

2. 试剂和仪器:IGF-1 一抗由美国 NeoMarker 公司提供;IGF-1 二抗、DAB 显色试剂盒由北京中杉生物技术公司提供;尼龙线直径 0.26 mm,经显微操作烧制而成,头端膨大成球状,直径为 (0.34 ± 0.22) mm,由北京沙东生物技术有限公司提供;Infra-sound 8TM 次声治疗仪由美国 CHI 公司研制;日产 Olympus 光学显微镜;日

产 Olympus 数码相机。

二、实验方法

1. 动物分组:将 32 只大鼠随机分为 3 组,假手术组($n=8$)、造模组($n=8$)、次声组($n=16$),次声组按每天作用时间又分为次声 20 min 组和次声 120 min 组,每组 8 只。

2. 动物模型制作:造模组和次声组参照廖维靖等^[2]报道的在大脑中动脉线栓方法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。大鼠用 10% 水合氯醛麻醉(0.35 ml/100 g 体重,腹腔注射),动物仰卧位固定于手术台上,颈部正中切口,长 1.6 ~ 1.9 cm,暴露右侧颈总动脉和颈外动脉 5/0 丝线结扎颈外动脉,分离与颈总动脉伴行的迷走神经,在距颈总动脉分叉处近端 0.5 ~ 0.6 cm 处结扎颈总动脉,在结扎线的远端,置丝线备用。用微小动脉夹夹闭备用线远端的颈总动脉,在备用线的近端用眼科剪剪一小切口,将尼龙线栓送入切口,向上推至动脉夹处,将备用线扎紧,随即松开动脉夹,将线栓沿颈总动脉,颈内动脉顺行向上插入至 MCA 起始部,遇阻力时停止。从颈总动脉分叉处计算插入深度 18 ~ 20 mm,造成大脑中动脉血供阻断,缺血 2 h 后,用乙醚再次麻醉,将栓线后拔退至颈总动脉,恢复大脑中动脉的血供。造模时室温保持在 20 ~ 30℃,肛温维持在(37.0 ± 0.5)℃,术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒,自由饮水,进食必要时用滴管给动物喂水,湿润鼻部和眼部。假手术组除不插入尼龙线,其他造模步骤同造模组和次声组。

3. 纳入及剔除标准:在规定缺血时限内(术后 2 ~ 3 h)按 Longa^[3]5 分制评分标准评分——0 分为无神经损伤症状;1 分为不能伸展对侧前爪;2 分为向外侧划圈;3 分为向对侧倾倒;4 分为不能自发行走,意识丧失。1 分以上视为成功。如未出现肢体瘫痪(0 分)或已死亡的动物被剔除。采用差额补充的方法以保证每组的实验例数。

4. 次声信号参数和处理方法:次声治疗仪 Infra-sound 8™主要由次声声头和主机两部分组成,主机面板上的输出档位分为 3 种次声频率及强度组合档,本实验用 3 档进行处理。采用第四军医大学等单位研制的“便携式野外低频信号实时测试智能分析系统”对实验中的次声信号测试结果显示,该仪器在 3 档时,输出次声频谱主要集中在 4 Hz ~ 20 Hz,次声主频信号的频谱是随机变化的,声强 79.75 dB ~ 86.11 dB^[4]。

采用质地较硬的塑料瓶固定大鼠,固定架固定次声声头,使之垂直于大鼠头部,次声发射头与大鼠头部的距离 3 ~ 4 cm。

次声 20 min 组和次声 120 min 组均于术 6 h 后开始次声处理,每日作用 1 次,每次时间分别为 20 min

和 120 min,连续作用 7 d。模型组与假手术组均不进行次声处理。

5. 神经功能评分标准:各组大鼠均于术后 2 h、1 d、3 d 和 7 d 进行神经功能评分,评分标准采用 Longa 5 分制^[3],7 d 后断头取脑,行 IGF-1 免疫组化检测。

6. 标本制作:各组动物到达预定时间后,用水合氯醛深麻醉动物(0.8 ml/100 g 体重,腹腔注射),用经处理后头端较钝的 16 号针头穿刺入左心室至主动脉起始部,眼科剪剪开右心耳,先用 100 ml 生理盐水快速冲洗体内血液,续用 10% 中性福尔马林 400 ml 进行灌注固定,断头取脑,在视交叉前后 1 ~ 3 mm 之间取脑片,用同一固定液后固定 6 ~ 8 h。进行常规脱水、透明、石蜡包埋,冠状切片,片厚 5 μm,备用。

7. 免疫组化检测:由北京中杉金侨提供的通用型二步法(SP 法)免疫组化检测试剂。制成的石蜡切片于 65℃烤箱中烤 2 ~ 3 h,自动脱蜡机脱蜡,蒸馏水洗 3 min。用枸橼酸盐修复液(pH 值 = 6.0)于 1.2 个大气压下高压修复 3.5 min,水浴冷却,蒸馏水洗 3 min。置于 3% H₂O₂ 中微波炉 350 W 加热 3 min,阻断内源性过氧化物酶,PBS 5 min × 3 次。加兔抗大鼠胰岛素样生长因子-1 多克隆抗体(一抗稀释浓度 1:35)孵育盒中 4℃孵育 72 h,PBS 5 min × 3 次。加兔二抗-HRP 多聚体于室温孵育 30 min,PBS 5 min × 3 次。DAB 显色,在显微镜下控制反应时间,苏木素复染,脱水,透明,封片。胞浆和(或)胞膜处呈棕黄色为阳性。

8. 脑组织 IGF-1 阳性细胞计数:每只鼠取切片 2 张,在高倍镜(1000 油镜)视野下,在缺血侧皮层取非重叠区域 5 个不同视野分别计数,所得阳性细胞数取平均值。

三、统计方法

资料采用 SPSS 11.5 软件处理。神经功能评分、脑组织 IGF-1 实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示。神经功能评分按重复测量方差分析方法比较多组间差异,经球形检验齐性后行 LSD 组间比较。脑组织 IGF-1 计数按单因素方差分析比较多组间差异,经方差齐性检验后行 LSD 组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、神经功能评分

各时间点神经功能评分假手术组大鼠均为 0 分,模型组和次声组评分情况见表 1。

二、缺血侧大脑皮质 IGF-1 免疫反应阳性细胞计数

各组缺血侧大脑皮质 IGF-1 免疫阳性细胞计数情况见表 2 和图 1。

表 1 各时间点低声压级次声对神经功能的影响
(分, $\bar{x} \pm s$)

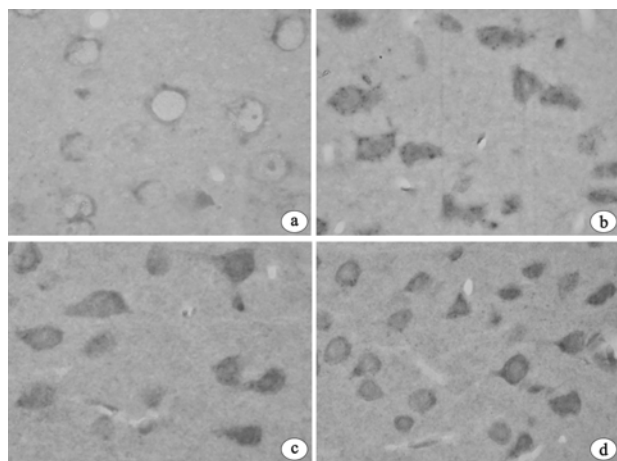
组 别	n	术后 2 h	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d
模型组	8	2.50 ± 0.93	2.50 ± 0.93	2.21 ± 0.99 ^a	1.13 ± 0.83 ^a
次声 20 min 组	8	2.75 ± 0.46	2.62 ± 0.74	1.88 ± 0.64 ^a	1.13 ± 0.83 ^{ab}
次声 120 min 组	8	2.63 ± 0.52	2.38 ± 0.52	0.75 ± 0.71 ^a	0.83 ± 0.82 ^{ac}

注:与本组术后 2 h 和术后 1 d 比较, ^a $P < 0.05$;与模型组同时点比较, ^b $P > 0.05$, ^c $P < 0.05$

表 2 各组缺血侧大脑皮质 IGF-1 免疫阳性细胞计数情况(个/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	IGF-1 表达
假手术组	8	8.56 ± 0.41 ^a
模型组	8	10.85 ± 0.47
次声 20 min 组	8	10.38 ± 0.77 ^b
次声 120 min 组	8	25.63 ± 2.07 ^a

注:与模型组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P > 0.05$



注:a 为假手术组, b 为造模组, c 为次声 20 min 组, d 为次声 120 min 组

图 1 各组缺血侧大脑皮质 IGF-1 免疫阳性细胞图(SP 法染色, ×1000)

讨 论

脑缺血损伤发生后,神经元损伤的严重程度取决于缺血面积大小、持续时间及内源性保护因素及时启动情况,内源性保护机制的启动主要包括:诱导神经营养因子,释放抑制神经递质,降低大脑温度,增加血流量。近年来,IGF-1 作为重要的神经营养因子已备受人们关注。在生理状态下,中枢神经系统有广泛的 IGF-1 免疫反应性和 IGF-1mRNA 的表达,并发现 IGF-1 受体在蛋白、mRNA 和 DNA 等不同水平广泛存在于中枢神经系统。在脑缺血部位,IGF-1 表达明显增加并与损伤程度呈正相关。损伤较轻时,IGF-1 表达增加仅局限于大脑皮质;严重损伤时,则弥漫于整个受损半球^[5]。局灶性脑缺血后,IGF 系统被激活上调,已由众多实验所证实。徐忠信等^[6]

应用免疫组化染色、原位杂交技术检测 IGF-1 蛋白及 mRNA 表达,发现正常脑组织有极低水平的 IGF-1 表达,脑缺血后表达主要位于半影区,随着缺血及缺血再灌注时间延长,半影区表达逐渐增强,IGF-1 蛋白 mRNA 表达在再灌注 48 h 达高峰。缺血中心区及半暗带区脑组织中的 IGF-1 高浓度表达可以延缓神经细胞的凋亡或死亡。外源性和内源性的 IGF-1 作用类似。刁尧等^[7]从脑室注入 IGF-1,发现 IGF-1 可明显减小脑梗死体积,减少凋亡细胞数,促进 Bcl-2 蛋白表达。王丹等^[8]从尾静脉注入 IGF-1,发现用药组细胞坏死凋亡减少,Caspase-3 阳性细胞数明显下降。提示 IGF-1 对局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用,在脑缺血损伤时 IGF-1 能通过血脑屏障,IGF-1 可通过抑制神经细胞凋亡发挥作用。Guan 等^[9]发现,经侧脑室给予 IGF-1 的降解产物 GPE,亦能减轻局灶性脑缺血引起的皮质损害和海马区神经细胞缺失,说明 IGF-1 对脑缺血的神经元可产生多种保护机制。

脑缺血发生后,脑组织 IGF-1 表达增强。此外,血脑屏障的通透性增强,IGF-1 在体内的重新分布,血液中的 IGF-1 进入脑内,两者共同导致脑组织 IGF-1 含量升高^[10]。在本实验中,随着时间的延长,模型组和次声组神经功能症状逐渐减轻,另外发现 IGF-1 在假手术组中亦有少量表达,脑缺血发生后缺血侧脑皮质 IGF-1 表达增加,推测脑缺血后 IGF-1 内源性表达增加,发挥神经保护作用。

次声的作用原理是生物共振,已证实高强度的次声会产生共振效应,可对各系统产生不利影响,尤其中枢神经系统较为敏感^[11]。低声压级(通常 90 dB 以下)次声与生物体可产生轻微共振,其产生的力学、热学、光学、电学等物理效应作用缓慢而轻柔,不仅对生物体不产生损伤,还可以对生物产生深部按摩作用,这种能量形式可以达到任何组织和细胞,对生物组织有益。由于次声的频率低,不容易被吸收;波段长,不易被阻挡,传播中几乎无衰减,因此能在人体内很好的传播,穿透病态组织(细胞)内,使病态组织内闭塞的血管重新开放,并推动其血液流动,改善病态组织内的血液循环,为氧气、吞噬细胞、免疫球蛋白等物质向病变组织输送创造了有利条件^[12]。本实验发现次声 120 min 组 IGF-1 的表达较模型组明显增加。低强度次声引起 IGF-1 分泌增加可能机制是:通过轻微共振作用,改善脑缺血局部的低灌注状态,增加脑血流量,增强神经元细胞活力和合成代谢。

参 考 文 献

- [1] Batanov GV. Characteristics of etiology immediate hypersensitivity in

- condition of exposure to infrasound. Radiats Biol Radioecol, 1995, 35: 78-82.
- [2] 廖维靖, 刘淑红, 范明, 等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良的改良. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24: 6345-6348.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- [4] 范建中, 鲍勇, 易南, 等. 治疗用次声发生装置声场特征研究. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29: 213-214.
- [5] Beilharz E J, Russo V C, Butler, et al. Coordinated and cellular specific induction of the component soft the IGF-1/IGF-1BP axis in the rat brain following hypoxic is chemic injury. Brain Res Mol Brain Res, 1988, 59: 119, 134-138.
- [6] 徐忠信, 何金婷, 莽靖, 等. 局灶性脑缺血及再灌注损伤 IGF-1 表达的动态变化. 吉林大学学报(医学版), 2005, 31: 401-403.
- [7] 刁尧, 陈春梅, 高杰, 等. 胰岛素样生长因子-1 对局灶性脑缺血/再灌注脑损伤保护机制的研究. 中国现代医学杂志, 2006, 16: 679-682.
- [8] 王丹, 王建平, 王金兰. 胰岛素样生长因子-1 对大鼠脑缺血再灌注损伤的作用机制研究. 实用神经疾病杂志, 2005, 8: 38-39.
- [10] Guan J, Waldvogel HJ, Faull RL, et al. The effect soft the N-terminal tripe p tide of insulin like growth factor-1, glycine-pro-line-glutamate in different regions following hypoxic ischemic brain injury in adult rats. Neuro Sci, 1999, 89: 649-659.
- [11] 刘宗超, 王慕一. 胰岛素样生长因子 1 与脑缺血. 国外医学脑血管疾病分册, 2001, 9: 162-164.
- [12] 庞春红, 李澎涛. 脑缺血再灌注损伤后血脑屏障通透性研究进展. 中日友好医院学报, 2007, 21: 238-240.
- [13] 程浩然, 赵钢. 次声对脑的影响. 神经损伤与功能重建, 2007, 2: 120-122.
- [14] 张永元, 吴胜举. 次声的研究与应用进展. 宝鸡文理学院学报. 2004, 24: 216-217.

(修回日期: 2008-10-11)

(本文编辑: 阮仕衡)

· 短篇论著 ·

头穴埋磁对脑卒中患者运动功能的影响

丁洪越 修志红 张伟

近 30 年来, 国内外学者对磁场生物效应及其治疗作用进行了广泛的研究, 磁场对急性脑缺血缺氧反应的影响也有新报道^[1]。本研究探讨头穴埋磁对脑卒中患者运动功能的影响, 报道如下。

一、资料与方法

(一) 一般资料

选择 2003 年 10 月至 2005 年 10 月住院的脑卒中患者 60 例, 入选标准: ①符合 1995 年全国第四届脑血管病会议制定的诊断标准^[2]; ②存在肢体运动功能障碍; ③年龄 35 ~ 75 岁; ④神志恢复, 生命体征稳定; ⑤无严重的心、肝、肾等脏器疾病; ⑥无痴呆。将患者随机分为头穴埋磁治疗组(观察组)和对照组, 每组 30 例。观察组中, 男 17 例, 女 13 例; 年龄 38 ~ 75 岁, 平均(60.7 ± 3.4)岁; 病程 28 ~ 80 d, 平均 46 d; 脑出血 12 例, 脑梗死 18 例; 左侧偏瘫 13 例, 右侧偏瘫 17 例。对照组中, 男 16 例, 女 14 例; 年龄 35 ~ 75 岁, 平均(58.0 ± 2.5)岁; 病程 28 ~ 76 d, 平均 45 d; 脑出血 11 例, 脑梗死 19 例; 左侧偏瘫 14 例, 右侧偏瘫 16 例。2 组性别、年龄、病程、病变性质、偏瘫部位等比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。

(二) 治疗方法

2 组患者均接受常规药物及康复治疗, 包括电针治疗和康复运动训练, 失语和言语不流畅者加语言训练。患者在治疗过程中给予心理治疗, 以增加患者对康复的信心。治疗时间为 30 d。

观察组同时给予头穴埋磁治疗。头穴埋磁术前, 告知患者及其家属头穴埋磁的作用及目的并签署知情同意书。操作方法: 剃去患者头顶部毛发, 常规消毒、局部麻醉后, 在前顶穴处切开 1 个 1.5 cm 长小口, 用直止血钳分别将磁场强度为 0.25 T 的(直径 7 mm, 厚度 3.5 mm, 消毒后用硅胶包裹处理, 再消毒)磁体, 经头皮下送至百会、囟会和双侧通天穴处, 各 1 块, 均按 N 极朝下(同名极磁力线可穿透较深组织)固定埋置。缝皮包扎后 7 d 拆线, 磁体可在穴位永久埋置, 有持续促进颅内微循环的作用。

(三) 疗效评定

于患者入组时(治疗前)和治疗 30 d 后, 采用简式 Fugl-Meyer 运动功能积分法(Fugl-Meyer Assessment, FMA)评定患者的肢体运动功能; 采用修订 Barthel 指数(Modified Barthel Index, MBI)评定患者日常生活活动能力; 采用 1995 年全国第四届脑血管病会议修订的脑卒中患者临床神经功能缺损程度评分标准评定患者神经功能, 比较 2 组患者疗效。

(四) 统计学分析

应用 SPSS 10.0 版统计软件, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 进行组间和组内 t 检验, 计数资料进行 χ^2 检验。

二、结果

治疗前, 2 组患者各项功能评分比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 治疗 30 d 后, 2 组患者的 FMA 评分、MBI 评分和神经功能缺损程度评分均有明显改善($P < 0.01$), 且观察组疗效明显优于对照组($P < 0.05$)。见表 1。