

· 基础研究 ·

小剂量超短波对脑缺血再灌注损伤的保护作用的机制研究

张立新 张志强 梁维娣 李琳 苑秀华

【摘要】目的 通过观测小剂量超短波(USW)对大鼠脑缺血再灌注后脑梗死体积、脑组织中 B 细胞淋巴瘤-x1(Bcl-x1)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响,进一步探讨小剂量 USW 对脑缺血再灌注损伤保护作用的机制。方法 用线栓法制备一侧大脑中动脉栓塞再灌注大鼠模型,造成大鼠右脑缺血 2 h 再灌注 24 h,采用 Longa 5 级评分法评定神经功能缺损程度。大鼠按体重随机分成空白对照组、对照组及超短波治疗组(USW 组),后 2 组选择 Longa 5 级评分法为 2 分的大鼠。所选大鼠均于再灌注 24 h 后断头取脑,分别测定脑梗死灶体积、脑组织中 Bcl-x1 及 TNF- α 的表达。结果 与对照组比较,USW 组梗死体积及梗死体积占全脑体积的百分比均降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,USW 组脑组织中 Bcl-x1 表达增加, TNF- α 水平降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 小剂量超短波可通过增加 Bcl-x1 表达,降低 TNF- α 水平而抑制脑神经细胞凋亡,挽救半暗带,缩小脑梗死灶,减小梗死体积,从而保护脑缺血再灌注后损伤神经,进而提高治疗效果。

【关键词】超短波; 脑缺血再灌注; 作用机制

Mechanism of protective effects of low dosage of ultrashortwave diathermy on cerebral ischemia-reperfusion injury ZHANG Li-xin*, ZHANG Zhi-qiang, LIANG Wei-di, LI Lin, YUAN Xiu-hua. Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】Objective To observe the effect of low dosage of ultrashortwave(USW) on infarction volume, B cell lymphocytoma-x1(Bcl-x1) and tumor necrosis factor alpha(TNF- α) after cerebral ischemia-reperfusion in rats and discuss its acting mechanisms. Methods Focal ischemia-reperfusion model was established in 25 rats by reversible right middle cerebral artery occlusion with filament. The right side cerebral ischemia was lasted for 2 hours and then followed with 24 hours of reperfusion. The content of neurological deficits were evaluated by the Zea-Longa 5-degree scoring system to select rats. After surgery, the rats were divided into 3 groups: blank control group, control group and USW treatment group. The brain of all rats was taken at 24 hours after reperfusion. The cerebral infarction volume, the expression of Bcl-x1 and TNF- α were measured and analyzed. Results Twenty-five rats were used in the analysis of results. When compared with the control group, the infarction volume and rate in total cerebral volume of USW group significantly decreased($t = 2.54, 2.33, P < 0.05$), the expression of Bcl-x1 significantly increased, and the expression of TNF- α decreased($P < 0.05$). Conclusion Low dosage of USW therapy can protect reperfusion injuries after cerebral ischemia and increase the therapeutic effect by increasing the expression of Bcl-x1 and decreasing the level of TNF- α to inhibit neuron apoptosis, save ischemic penumbra and decrease infarction volume.

【Key words】Ultrashortwave; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Mechanism

以往我们的研究表明,小剂量超短波(ultrashort-wave, USW)可通过降低梗死半球脑含水量及自由基产物——丙二醛含量,提高超氧化物歧化酶水平而对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[1]。通过对 USW 治疗的最佳时机的研究,我们发现大鼠在缺血 2 h 再灌注 18 h 时给予 USW 治疗可明显降低梗死侧脑含水量,减轻病理损伤^[2]。为进一步研究 USW 的治疗作用,我们采取了同一动物模型,同样的 USW 治

疗剂量来观测 USW 对大鼠缺血再灌注后脑梗死体积、B 细胞淋巴瘤-x1(B cell lymphocytoma-x1, Bcl-x1)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)表达的影响,以进一步探讨其作用机制。

材料与方法

一、动物模型的制备

参照 Longa 等^[3]报道的方法进行改良建立局灶性脑缺血再灌注模型。室温为 20~25℃,用 10% 的水合氯醛(0.35 mg/kg 体重)麻醉大鼠成功后,使之仰卧固定,取正中切口,钝性分离暴露右侧颈总动脉(common

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院康复医学科(张立新、苑秀华);中国医科大学附属第二医院康复科(张志强、梁维娣);广东省人民医院康复科(李琳)

carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA),在 ICA 及 ECA 分叉处结扎 ECA,并结扎 CCA 近心端。在距颈动脉分叉约 0.5 cm 处 CCA 上刺一小口,将直径为 0.26 mm、长 5 cm 的尼龙鱼线经 CCA 插入 ICA,入颅至大脑前动脉起始部,闭塞大脑中动脉起始部,进线长度为距 CCA 分叉处 17~20 mm,至稍有阻力感停止。然后将栓线结扎固定于 CCA 上,逐层缝合至皮肤。于阻塞动脉 2 h 后将尼龙线拔出,形成再灌注,24 h 后断头取脑。

二、动物分组

选用中国医科大学实验动物中心提供的健康 Wistar 大鼠 30 只,雌雄各半,体重 270~320 g,2.5~3.0 月龄。模型入选标准为 Zea-Longa 5 级评分法评分 2 分,即行走时向病灶对侧转圈。造模后去除死亡及评分不是 2 分的 5 只大鼠,剩余 25 只大鼠按体重分层随机分为空白对照组($n=5$)、对照组($n=10$)、超短波治疗组(USW 组, $n=10$)。

三、治疗方法

1. USW 组:模型制备成功后,在脑缺血再灌注后 18 h 给予小剂量 USW 治疗。采用上海电子仪器厂生产的五官超短波治疗机,频率为 40.68 MHz,最大输出功率为 40 W,调谐后第 1 档输出功率约为 11 W,电极直径为 4 cm,于鼠脑两侧对置,电极表面距鼠头皮约 2 cm,治疗时间为 10 min。

2. 对照组:模型制备成功后,给予 USW 组处理过程但无输出。

3. 空白对照组:处理步骤同模型制备,只是插线深度 < 10 mm,并且不给予上述 2 组的治疗处理。

四、观测指标

空白对照组只检测脑组织 Bcl-xl 及 TNF- α ,对照组及 USW 组分别取 5 只大鼠检测脑梗死体积、脑组织 Bcl-xl 及 TNF- α 的表达。

1. 脑梗死体积的测定:大鼠再灌注后 24 h 处死,迅速断头取脑,自额极向后每 2 mm 作冠状切片至大脑小脑裂,将切片立即置于 2% 红四氮唑(TTC)磷酸缓冲液中,37℃ 避光恒温孵育 30 min 后置于 10% 甲醛溶液中固定,脑梗死区不着色,正常脑组织被染成红色,脑片经实体图像采集后,用 MetaMorph/DPI0/BX41 图像分析系统计算脑梗死体积。

2. 免疫组化染色及结果分析:各组于再灌注后 24 h 以 10% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)麻醉成功后,迅速开胸,剪开右心房,于心尖部插管,注入 100 ml 生理盐水后,再注入 4% 多聚甲醛 100 ml 灌注固定,断头取脑,取视交叉凹处 2 mm 脑片入 4% 多聚甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋,切片厚度为 5 μ m,采

用第二代免疫组化 EfvisionTM pfus 广谱试剂盒(购于福州迈新公司)进行免疫组化染色,一抗[Bcl-xl、TNF- α 滴度 1:100(购于武汉博士德公司)]。400 倍显微镜下,取每张切片梗死灶边缘区域相互不重叠的 4 个视野,用 MetaMorph/DPI0/BX41 图像分析系统分析综合光密度均值(integrated optical density average, IODA)。

五、统计学分析

各组数据用($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异用 student-t 检验。

结 果

一、脑梗死体积测定

对照组和 USW 组脑梗死体积与脑梗死体积占全脑的百分比见表 1。

表 1 对照组和 USW 组梗死体积与梗死体积占全脑的百分比($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	病灶侧脑梗死体积 (mm ³)	梗死体积占全脑体积的 百分比(%)
对照组	5	354.03 $\pm$ 128.01 ^a	17.95 $\pm$ 5.53 ^a
USW 组	5	156.62 $\pm$ 118.45	8.55 $\pm$ 4.50

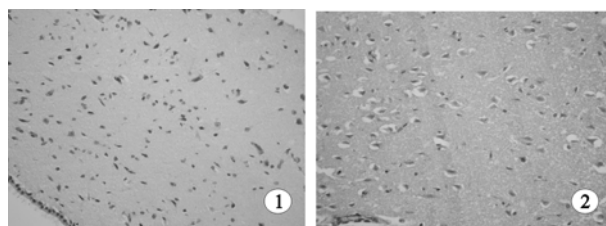
注:与 USW 组比较,^a $P < 0.05$

二、组织学观察

肉眼所见:对照组大体标本检查见病灶侧半球脑水肿明显,颜色苍白,脑沟、脑回模糊不清,组织较脆,呈豆腐渣样;USW 组大脑病灶侧半球水肿轻微,沟回清楚,脑表面无出血。

光镜下(5 μ m HE 染色):对照组病灶侧淡染区广泛,细胞水肿明显,血管周围炎性细胞浸润,神经细胞坏死明显,软化灶明显;USW 组淡染区小且不明显,水肿轻微,神经细胞皱缩变小,未见坏死,小部分切片偶见神经细胞数轻度减少,均为小范围轻度缺血性改变,未见软化灶。

光镜下(5 μ m 免疫组化染色):Bcl-xl、TNF- α 阳性反应定位于胞浆,呈黄色或棕黄色颗粒。对照组病灶侧缺血坏死区与正常区之间(即缺血半暗带区)阳性表达细胞数较多,呈棕黄色表达;USW 组于缺血半暗带区 Bcl-xl 阳性表达细胞数明显增多, TNF- α 阳性表达细胞数明显减少;空白对照组见淡黄色阳性表达细胞散在分布。见图 1~6。



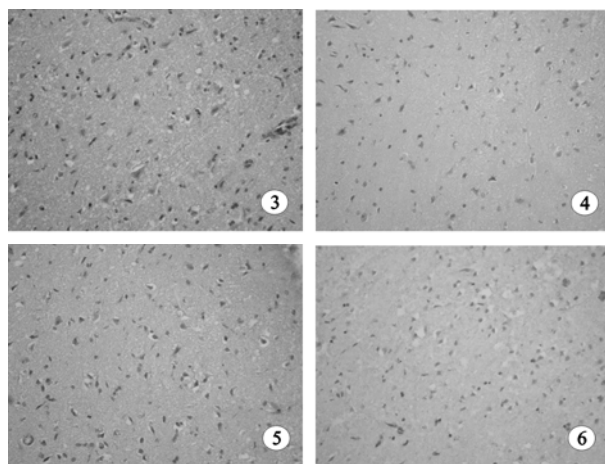


图1 空白对照组鼠脑 Bcl-xl 表达; 图2 对照组病灶侧鼠脑 Bcl-xl 表达; 图3 USW 组病灶侧鼠脑 Bcl-xl 表达; 图4 空白对照组鼠脑 TNF- α 表达; 图5 对照组病灶侧鼠脑 TNF- α 表达; 图6 USW 组病灶侧鼠脑 TNF- α 表达

对照组的 Bcl-xl、TNF- α 阳性表达明显高于空白对照组, USW 组 Bcl-xl 表达明显高于对照组, 而 TNF- α 表达明显低于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 各组脑组织中 Bcl-xl 及 TNF- α 表达的综合光密度均值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-xl	TNF- α
空白对照组	5	4.74 $\pm$ 2.20	3.45 $\pm$ 2.21
对照组	5	8.96 $\pm$ 1.90 ^a	11.11 $\pm$ 1.85 ^a
USW 组	5	12.97 $\pm$ 2.07 ^b	6.97 $\pm$ 2.30 ^b

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与对照组比较, ^b $P < 0.05$

讨 论

缺血性脑卒中后, 部分血管再通或溶栓治疗后血流恢复引起的再灌注损伤是由多种机制共同作用、互相促进的结果。在实验性脑卒中研究中, 常以能否挽救或减少半暗带内的细胞凋亡来判断某一疗法的有效性。Bcl-2、Bcl-xl 能抑制大多数凋亡的过程^[4,5], 因此, 我们选择 Bcl-xl 指标来观察 USW 能否通过增加其表达起到脑保护作用。本研究结果表明, USW 组脑组织 Bcl-xl 表达明显高于对照组, 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

TNF- α 是一种炎性介质, 被认为与急性脑血管病的发生、发展及预后密切相关。正常情况下, 机体内存在较低水平的 TNF- α , 可促进肿瘤细胞的凋亡, 但如在体内大量产生和释放 TNF- α 则会产生多种病理损伤。研究发现, 在短暂性大脑中动脉缺血模型的缺血再灌注早期即可观察到 TNF- α 水平增高^[6]。Yang 等^[7]发现, 应用 TNF- α 单克隆中和抗体能明显减小小鼠缺血再灌注后脑梗死体积。Barone 等^[8]发现, 脑室内注射 TNF- α , 脑梗

死体积增大, 而在缺血前 0.5 h 及缺血后 3~6 h 单独注射单克隆 TNF- α 抗体, 可阻断内源性 TNF- α 活性, 显著降低脑缺血再灌注损伤, 缩小脑梗死体积, 可见在脑缺血早期, TNF- α 参与再灌注损伤, 对脑组织有损害作用。许多国内外学者认为, 抑制 TNF- α 炎性细胞因子增加会起到脑保护作用^[9-11]。本研究发现, USW 组 TNF- α 表达明显低于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

本研究中, 我们发现大鼠在缺血 2 h 再灌注 18 h 时给予 USW 治疗可缩小脑梗死灶、降低梗死体积, 说明小剂量 USW 治疗可抑制半暗带中神经细胞的凋亡。

通过一系列的研究, 我们发现小剂量 USW 不仅可通过降低梗死半球脑含水量及自由基产物——丙二醛含量, 提高超氧化物歧化酶水平而对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 而且可以通过增加 Bcl-xl 表达、降低 TNF- α 水平而抑制脑神经细胞凋亡, 挽救半暗带, 缩小脑梗死灶, 降低梗死体积来保护大鼠缺血再灌注后损伤神经, 从而提高治疗效果。因此, 小剂量 USW 有可能成为缺血性脑卒中新的辅助治疗方法。

参 考 文 献

- [1] 张志强, 张立新, 苑秀华, 等. 超短波对大鼠局灶性脑缺血再灌注后大脑的保护作用. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 322-324.
- [2] 苑秀华, 张立新, 张志强, 等. 脑缺血再灌注损伤后超短波治疗最佳时机的选择. 中国临床康复, 2005, 9: 80-81.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Canson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- [4] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol, 1995, 146: 3-15.
- [5] Rodriguez I, Matsuura K, Khatib K, et al. A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. J Exp Med, 1996, 183: 1031-1036.
- [6] Buttini M, Appel K, Sauter A, et al. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischemia in the rat. Neuroscience, 1996, 71: 1-16.
- [7] Yang GY, Gong C, Qin Z, et al. Inhibition of TNF-alpha attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. Neuroreport, 1998, 9: 2131-2134.
- [8] Barone FC, Arvin B, White RF, et al. Tumor necrosis factor- α . A mediator of focal ischemic brain injury. Stroke, 1997, 28: 1233-1244.
- [9] Zhang M, Ma YF, Gan JX, et al. Basic fibroblast growth factor alleviates brain injury following global ischemia reperfusion in rabbits. J Zhejiang Univ Sci B, 2005, 6: 637-643.
- [10] Williams AJ, Dave JR, Tortella FC. Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappaB (NF-kappaB), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration. Neurochem Int, 2006, 49: 106-112.
- [11] Storini C, Rossi E, Marrella V, et al. C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. Neurobiol Dis, 2005, 19: 10-17.

(修回日期: 2007-06-20)

(本文编辑: 松 明)