

· 基础研究 ·

较低强度两种频率次声波预防雄性去势大鼠骨质疏松的实验研究

王斌 陈景藻 牟翔 吕荣 李晓娟 刘静

【摘要】 目的 观察较低强度的两种频率次声波作用于雄性去势大鼠后的股骨骨质变化情况。**方法** 将32只3月龄SD雄性大鼠随机分为正常组(A组)、去势组(B组)、去势后4 Hz次声波作用组(C组)和去势后20 Hz次声波作用组(D组),大鼠行双侧睾丸切除术(A组行假手术)。各组大鼠术后用次声波作用,其中A、B组无次声波输出,C、D组次声波参数分别为4 Hz、100 dB和20 Hz、100 dB,每组每天作用30 min,每周5 d,连续作用12周后处死。用放射免疫法测定血清骨钙素(OCN)浓度;用DPX-IQ型骨密度仪测定左股骨远端骨密度(BMD);取右侧股骨远端制作脱钙石蜡切片,测定骨小梁面积百分比(Tb·Ar)、骨小梁宽度(Tb·Th)、骨小梁间隙(Tb·Sp)以及骨小梁数目(Tb·N);取右股骨近端制备硬骨切片,计算骨膜矿化沉积率(MAR)。采用SPSS 10.0统计软件进行Multivariate ANOVA test分析。**结果** 雄性去势大鼠的血清BGP降低,MAR减少,骨小梁宽度和条数、骨小梁百分比减少,骨小梁间隙增加($P < 0.05$);4 Hz低强度的次声波作用,显著增加了MAR和骨小梁宽度、条数等形态学指标($P < 0.05$),血清BGP也有增加趋势;20 Hz作用组仅骨小梁宽度和骨小梁数目较去势组改善($P < 0.05$),余各项指标无显著变化;各组股骨远端BMD无显著变化。**结论** 4 Hz、100 dB的次声波每天作用30 min,可改善雄性去势大鼠的骨质疏松程度。

【关键词】 次声波; 骨质疏松; 雄性去势

100 dB infrasound for the prevention of osteoporosis WANG Bin, CHEN Jin-zhao, MU Xiang, LU Rong, LI Xiao-juan, LIU Jing. Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital of the Fourth University of Military Medicine, 710032 Xi'an, China

【Abstract】 Objective To observe the preventive effects of low intensity infrasound on bone loss in orchietomized rats. **Methods** Thirty-two male Sprague Dawley rats were divided into 4 groups (group A-the control group, group B-the osteoporosis group, group C-the 4 Hz infrasound group and group D-the 20 Hz infrasound group). The rats in groups B, C and D were orchietomized. Groups C and D were exposed to 4 Hz and 20 Hz infrasound at 100 db, respectively, for 30 min daily, 5 days a week, while groups A and B were not subjected to infrasound exposure. After 12 weeks of infrasound exposure, any changes in serum osteocalcin (OCN), bone mineral density (BMD), and such histomorphometric parameters as trabecular area and trabecular thickness, space and number were measured. The mineralization rate (MAR) of the distal femur was measured using image analysis. **Results** In group B the MAR was obviously decreased, and the histomorphometric dimensions of the distal femur were less than in group A. There was significantly increased MAR, trabecular area, trabecular thickness, and trabecular number in group C compared with group B. In group C, serum osteocalcin was also increased, but there was no significant difference from group B. In group D, only increases in trabecular thickness and trabecular number were observed; the other measurements had no significant differences from those of group B. There were no significant changes in BMD in groups B, C and D. **Conclusion** Exposure to 4 Hz/100 dB infrasound for 30 min a day can prevent bone loss in orchietomized rats, as demonstrated by significantly increased MAR and trabecular area, thickness and number.

【Key words】 Infrasound; Osteoporosis; Orchietomy

骨质生成和骨质疏松的发生与骨质受到的应力大小、振动频率有关^[1-3]。次声波作为一种纵向传播的机械压缩波,作用机体后,在机体上可以产生振动,对骨质的生成应具有一定的作用,但目前鲜见有关次声波改善骨质生成的研究报道。低频振动与次声波的物理

特性相近。有研究报道认为,低频振动对骨质疏松有一定的改善作用^[4,5]。暴露于高强度次声波后所造成的中枢神经系统和内脏损伤效应已引起关注^[6,7]。Svidovyi等^[8]报道,高强度次声波可以损害骨髓细胞的线粒体,使有丝分裂的变异率明显增加。但是低强度的次声波是否具有有益的生物刺激作用报道较少。Yount等^[9]报道,次声波与5-氟尿嘧啶协同作用,明显降低了人神经胶质细胞瘤细胞集落形成率。本研究旨

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院康复理疗科(王斌、陈景藻、牟翔、刘静),骨科(吕荣、李晓娟)

在观察较低强度两种频率的次声波作用于雄性去势大鼠后的股骨骨质变化情况。

材料与方法

一、主要试剂和仪器

钙黄绿素(沈阳化学试剂厂);盐酸四环素胶囊(西安制药厂);骨钙素放射免疫试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免所);甲基丙烯酸甲酯、过氧化苯甲酰、邻苯二甲酸二丁酯(北京化学试剂厂);次声波压力舱及其监测系统(第四军医大学西京医院与航天工业总公司第四研究院合作研制),DPX-IQ 型骨密度测定仪(美国 Lunar 公司);Leitz-1516 组织切片机、Leica SP1600 硬组织切片机、Leica DM LA 显微镜和 Leica Q-Win 3.0 图像分析系统(德国 Leica 公司)。

二、动物分组和处理

32 只 3 月龄的 SD 雄性大鼠(第四军医大学实验动物中心提供),体重约 250 g。随机分为 4 组:正常组(A 组)、去势组(B 组)、去势后 4 Hz 次声波作用组(C 组)和去势后 20 Hz 次声波作用组(D 组),每组 8 只。每组大鼠采用速眠新合剂(1.0 ml/kg 体重,解放军农牧大学军事兽医研究所提供)肌肉注射麻醉后,A 组行假手术,仅仅切开阴囊鞘膜后缝合,B、C、D 组行双侧睾丸切除术。

各组动物饲养于大鼠饲养笼中,每笼 4 只,标准大鼠饲料,可自由活动、进水、进食。手术后 1 周,进入次声舱,其中 A 组、B 组次声波无输出,C 组 4 Hz、100 dB,D 组 20 Hz、100 dB,每组每天作用 30 min,每周 5 d,连续作用 12 周后处死。

三、荧光标记

5 g/L 钙黄绿素配制:2 g 碳酸氢钠溶于 100 ml 生理盐水中,加入 0.5 g 的钙黄绿素,暗房内磁力搅拌器搅拌 3 h,针头过滤器过滤后备用。25 g/L 盐酸四环素配制:将 250 mg 的盐酸四环素胶囊溶于 10 ml 生理盐水中,混匀备用。分别在处死大鼠前的第 11 天和第 3 天给予钙黄绿素(5 mg/kg 体重)和盐酸四环素(25 mg/kg 体重)皮下注射,进行活体荧光标记。

四、血清骨钙素测定

用速眠新(1.0 ml/kg 体重)肌肉注射麻醉后,从心脏抽取血液 2 ml,离心后保留血清于 -20℃ 保存。用放免法测定血清骨钙素(osteocalcin, OCN),取解冻血清 100 μ l,每管加入 100 μ l I^{125} 标记的 BGP 和 100 μ l BGP 抗体,混匀后 4℃ 放置 24 h。每管加入分离剂 0.5 ml 混匀后室温放置 20 min,4℃ 离心 35 000 r/min $\times$ 25 min,弃上清,自动 γ 计数器检测沉淀物放射剂量。根据标准曲线得出 OCN 浓度。

五、骨密度测定

分离完整的左股骨,剔尽表面软组织后于 -20℃ 冰箱内保存,测定前解冻,将离体骨放入盛有蒸馏水的有机玻璃盒中,用 DPX-IQ 型骨密度仪以及所附的小动物骨密度(bone mineral density, BMD)测定软件进行股骨远端局部 BMD 扫描测量。

六、骨小梁形态计量学测定

取右侧股骨远端,100 g/L 中性甲醛溶液固定 24 h,90 ml/L 甲酸脱钙 21 d,常规石蜡包埋,矢状面切片,切片厚度为 4 μ m,HE 染色。采用 Leica DM LA 显微镜及 Leica Q-Win3.0 图像分析系统观察形态学变化。随机取 3 个点,每组 8 只动物,共 24 个点。每点均为股骨干骺端内与骺软骨相距 1 mm 的松质骨部位,在 10 倍视野下,按照陈东等^[10]报道的方法测量并计算骨小梁面积百分比(trabecular area, Tb · Ar)、骨小梁宽度(trabecular thickness, Tb · Th)、骨小梁间隙(trabecular space, Tb · Sp)以及骨小梁数目(trabecular number, Tb · N)。

七、硬骨切片制备

取右股骨近端 80% 酒精固定脱水 24 h,依次浸入 90% 酒精,无水酒精 I、II,二甲苯 I、II 各 2 h。再依次浸入 1 号、2 号、3 号试剂内各 7 d。再将标本置于小玻璃瓶中,倒入 4 号试剂并放入真空泵内抽 3 h,37℃ 水浴 6 h,完全凝固后,将玻璃瓶置于 -20℃ 冰箱 15 min,再敲碎玻璃瓶取出包埋块。其中 1 号试剂为:甲基丙烯酸甲酯 400 ml,邻苯二甲酸二丁酯 100 ml,二甲苯 500 ml。2 号试剂为:甲基丙烯酸甲酯 800 ml,邻苯二甲酸二丁酯 200 ml。3 号试剂为:甲基丙烯酸甲酯 800 ml,过氧化苯甲酰 20 g,邻苯二甲酸二丁酯 200 ml。4 号试剂为:甲基丙烯酸甲酯 800 ml,过氧化苯甲酰 60 g,邻苯二甲酸二丁酯 200 ml。

在 Leica SP1600 硬组织切片机切片,切片取平大转子的水平面,片厚为 6 μ m。荧光显微镜下观察钙黄绿素和四环素标记的双标线,10 倍视野下随机取 3 个点,测量双标线间距,计为骨膜矿化沉积率(mineralization rate, MAR),单位为 μ m。

八、统计学分析

所有数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行 Multivariate ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、显微镜下观察

A 组大鼠股骨远端骨骺板下骨小梁结构排列紧密、有规则,小梁间连接成网状,骨小梁厚度一致(图 1);B 组骨小梁结构排列疏松,小梁间连接差,骨小梁变细(图 2);C 组骨小梁结构、小梁间连接形态、骨小

梁厚度均较 B 组明显改善(图 3);D 组改善不如 C 组明显(图 4)。

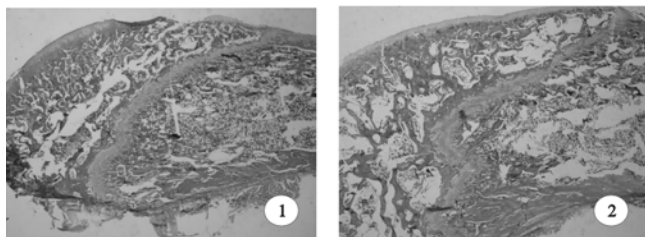


图 1 A 组股骨远端矢状面切片(HE 染色, ×2)

图 2 B 组股骨远端矢状面切片(HE 染色, ×2)

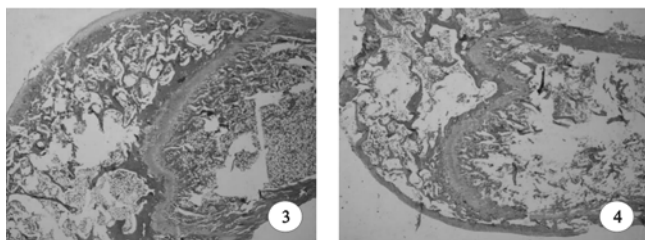
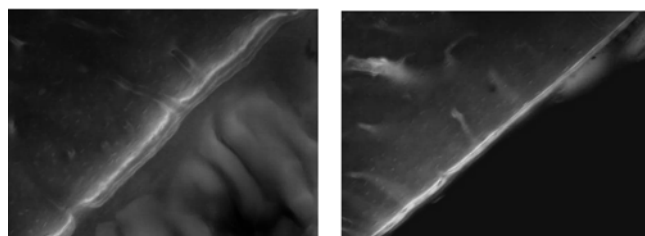


图 3 C 组股骨远端矢状面切片(HE 染色, ×2)

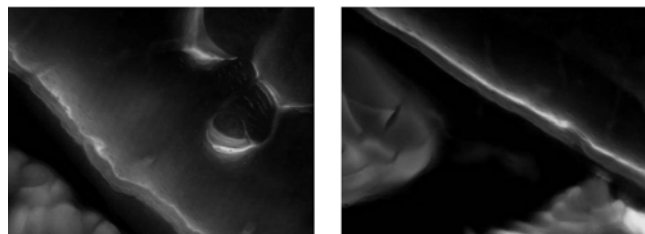
图 4 D 组股骨远端矢状面切片(HE 染色, ×2)

荧光显微镜下骨内膜表面出现钙黄绿素(绿色线)、四环素(桔黄色线)双标记线。可见 B 组标记线间距较 A 组明显缩窄, C 组、D 组标记线间距较 B 组改善(图 5)。



A 组

B 组



C 组

D 组

图 5 各组硬骨切片显示骨膜下钙黄绿素和四环素荧光双标记线(×20)

二、各组股骨骨小梁形态计量学测定

B 组骨质疏松模型大鼠的各项骨小梁形态计量指标与 A 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。C 组大鼠经过 4Hz 的低强度次声波作用后, 骨小梁面积百

分比(Tb · Ar)、骨小梁宽度(Tb · Th)、骨小梁间隙(Tb · Sp)以及骨小梁数目(Tb · N)均较 B 组明显改善($P < 0.05$), 但未达到正常组的指标。D 组大鼠的骨小梁宽度(Tb · Th)和骨小梁数目(Tb · N)指标较 B 组改善($P < 0.05$); 其余指标改善不显著。见表 1。

表 1 各组骨小梁形态学参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Tb · Ar (%)	Tb · Th (μm)	Tb · Sp (μm)	Tb · N (#/mm)
A 组	24	40.2 ± 2.9	74.6 ± 6.2	103.6 ± 13.3	6.5 ± 0.6
B 组	24	28.7 ± 3.2 ^a	53.1 ± 5.7 ^a	167.8 ± 14.9 ^a	4.4 ± 0.5 ^a
C 组	24	34.6 ± 3.4 ^{ab}	66.9 ± 6.7 ^{ab}	121.7 ± 12.5 ^{ab}	5.5 ± 0.4 ^{ab}
D 组	24	30.4 ± 2.7 ^a	58.2 ± 6.9 ^{ab}	158.8 ± 16.2 ^a	4.8 ± 0.6 ^{ab}

注: 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$

三、各组大鼠血清 BGP 浓度、股骨远端 BMD、MAR 测量

各组间股骨远端 BMD 变化均不显著。B 组大鼠的 BGP 浓度和 MAR 均较 A 组降低($P < 0.05$)。C 组大鼠的 BGP 浓度较 B 组增高, 但差异无统计学意义(增加约 7.1%, $P = 0.28$); 该组 MAR 仍较 A 组低($P < 0.05$), 但较 B 组显著升高($P < 0.05$)。D 组大鼠的 BGP 浓度和 B 组一样较 A 组显著减低($P < 0.05$); 该组 MAR 也较 A 组降低($P < 0.05$); 该组与 B 组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组血清 BGP 浓度、股骨远端 BMD 和 MAR 参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	BGP (μg/L)	BMD (g/cm ²)	MAR (μm)
A 组	8	1.46 ± 0.11	0.1770 ± 0.024	11.4 ± 1.4
B 组	8	1.27 ± 0.14 ^a	0.1878 ± 0.030	5.2 ± 0.5 ^a
C 组	8	1.36 ± 0.17	0.1915 ± 0.044	9.8 ± 1.3 ^{ab}
D 组	8	1.23 ± 0.21 ^a	0.1717 ± 0.054	6.4 ± 1.5 ^a

注: 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$

讨 论

雌性大鼠卵巢切除骨质疏松的去势模型为高转换型骨质疏松模型, 类似绝经后妇女的临床表现, 即骨转换速率加快, 骨形成和骨吸收均增加, 但骨吸收大于骨形成, 表现为 MAR 和血清 BGP 浓度均较正常升高^[11,12]。雄性去势大鼠的骨质疏松模型近年来也得到研究者重视^[13,14]。研究认为, 雄性去势骨质疏松的特点表现为松质骨的骨量已明显减少, 而皮质骨面积没有明显变化, 但骨外膜骨形成参数降低, 内膜骨转换有增加趋势^[15]。骨形成减少, 骨吸收增加相对较不明显, 骨转换速率较雌性模型低的特点主要是由于雄激素水平的变化所致。雄激素与雌激素一样, 维持着不同骨骼的骨量和质量, 这两种激素的丢失都会造成骨形成和骨吸收失衡, 最终造成骨量的丢失^[16]。雌、雄激素分别是通过雄激素受体和雌激素受体起作用的。

在啮齿类动物,雄激素对松质骨的作用能直接通过雄激素受体激活,但影响皮质骨的受体还有雌激素受体。雄激素通过直接刺激雄激素受体使骨长长和长粗,增加皮质骨量,另外,它还通过芳香化作用转变为雌激素作用于雌激素受体使骨长粗,这些对维持皮质骨的厚度、体积和生物力学强度有着重要的作用^[17]。

本研究中,雄性去势大鼠较正常组大鼠血清 BGP 浓度降低,骨皮质 MAR 减少,骨小梁宽度、条数、小梁百分比减少,小梁间隙增加($P < 0.05$),但股骨远端的 BMD 变化差异无统计学意义,符合雄性去势大鼠骨质疏松的特点。而 4 Hz 低强度的次声波作用后,血清 BGP 浓度存在增高趋势(但 $P > 0.05$)、骨皮质 MAR 较去势组显著增加($P < 0.05$),小梁宽度、条数等形态学指标也较去势组显著增加($P < 0.05$),但均未达到正常大鼠的指标。表明 4 Hz 低强度的次声波作用能够通过增加骨的形成,一定程度上改善雄性去势所造成的骨质疏松(特别是松质骨的骨量减少)。20 Hz 低强度次声波作用仅仅在骨小梁宽度(Tb·Th)和骨小梁数目(Tb·N)两项指标较去势组改善($P < 0.05$),其余指标改善均不显著,提示 4 Hz、100 dB 次声波每天作用 30 min 较 20 Hz、100 dB 次声波每天作用 30 min 的效果更明显。

机械振动对骨质形成有促进作用,该作用可能与频率、强度、作用时间和频度等有关,但目前的研究存在差异较大。Ryder 等^[1]认为,250 ~ 2500 μE 的机械张力使骨生成大于骨的吸收,过低或过高的机械张力均使骨吸收大于骨生成。申华等^[2]探讨了振动应力促进骨重建的最佳频率,采用 30 N 的纵向应力每日 30 min 作用 4 周,认为 10 ~ 50 Hz 低频应力刺激下骨扭转承受力、抗变形能力和承载能力等较 60 ~ 100 Hz 的高频刺激的结果明显增强。Chao 等^[3]认为,30 ~ 300 Hz 的刺激可以引起骨质疏松,而 0.5 ~ 3 Hz 之间的较低频率的应力可以促进新骨形成,认为 3 Hz 接近动物慢跑的频率。以上研究,虽然具体的强度、频率有出入,但均认为合适强度、较低频率的应力能够促进骨的生成。次声波作为一种低频机械波,可以影响骨质形成。本研究显示,4 Hz、100 dB 次声波每日作用 30 min 可以改善雄性大鼠去势后的骨质疏松,同样声压级水平的 20 Hz 次声波的作用则不显著。其他频率的次声波容易引起中枢神经系统或内脏共振,本研究没有采用。Chao 等^[3]报道,振动应力改善骨代谢存在较低频率的“频率窗”效应。Svidovyi 等^[8]在比较 2, 4, 8, 16 Hz 不同频率的高强度次声波(110 dB, 每天作用 180 min, 30 d)对骨髓细胞有丝分裂的可靠性的影响时,发现 4 Hz、110 dB 导致细胞有丝分裂的变异率增加($P < 0.01$),除 2 Hz、110 dB 导致细胞有丝分裂变异率

也增加外($P < 0.05$),其它频率未见细胞有丝分裂变异率有显著改变。该结果从与本研究相反的损伤的角度揭示了可能存在“频率窗”的现象。不过 Rubin 等^[4]与 Verschuere 等^[5]在低频振动的研究报告中频率并不一致,分别为 15 ~ 35 Hz 和 35 ~ 40 Hz。低强度次声波促进骨质形成的作用是否存在“频率窗”尚不能肯定。

Ryder 等^[1]认为,250 ~ 2 500 μE 的机械张力使得骨生成大于骨的吸收,转换成声压级大约在 60 ~ 90 dB 之间。考虑到体外次声波作用经皮肤、肌肉等软组织传导至骨质的损耗,本研究采用 100 dB 是比较合理的。与申华等^[2]采用 30 N 的纵向振动应力作用于兔尺骨干上比较,100 dB 的声压级,相当 2 N/m² 的声压强,也就是 $2.04 \times 10^{-2} \text{g/cm}^2$,申华等采用的 30 N 应力,考虑骨干截面积尺寸,至少相当于 $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^3 \text{g/cm}^2$,远远大于本试验采用的声压强。原因可能在于骨骼的哈弗管等机械结构承受了大部分振动应力,体内骨骼中的成骨细胞所承受的应力可能远远小于所施加的力;而次声波在软组织中的传播衰减较小,容易通过骨的滋养管孔使得声压力可以在局部形成液体间隙流动力,直接作用到骨细胞缝隙连接而成细胞网络上,虽然远小于 30 N 的机械力,仍然可以取得促进骨质形成的作用。

每次次声波暴露作用的时间和作用天数也是重要的参数,本研究仅仅讨论了每天作用 30 min,不能够排除更高声压级更短时间,或者更低声压级更长作用时间也有类似效应的可能。取 12 周的作用天数是基于骨重建所需要的周期^[18],也与大多数骨质疏松模型的干预时间吻合,而且 12 周的增龄对于成年大鼠的各项骨质指标影响不大^[17]。

本研究结果表明,4 Hz、100 dB 的次声波每天作用 30 min 显著增加了雄性骨质疏松大鼠的骨皮质 MAR 和小梁宽度、条数等形态学指标,从而改善雄性去势所造成的骨质疏松程度。鉴于血清 BGP 浓度有增加趋势,推测次声波改善骨形成主要通过影响成骨细胞的途径。

参 考 文 献

- [1] Ryder KD, Duncan RL. Parathyroid hormone modulates the response of osteoblast-like cells to mechanical stimulation. *Calcif Tissue Int*, 2000, 67:241-246.
- [2] 申华,陈国振,王建国,等. 振动应力促进骨重建最佳频率的生物力学实验研究. *中华医学杂志*, 2000, 80:795-796.
- [3] Chao Eys, Inoue N. Enhancement of fracture healing by mechanical and surgical intervention. *Clin Orthop*, 1998, 355:163-178.
- [4] Rubin C, Turner AS, Bain S, et al. Anabolism: Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature*, 2001, 412:603-604.

- [5] Verschueren SMP, Roelants M, Delecluse C, et al. Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. *J Bone Miner Res*, 2004, 19:352-359.
- [6] Liu ZH, Chen JZ, Tang Y, et al. Effects of infrasound on changes of intercellular Calcium ion concentration and on expression of RyRs in hippocampus of rat brain. *J Low Freq Noise Vib*, 2005, 23: 159-165.
- [7] Kanelo S, Okumura K, Numaguchi Y. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life Sci*, 2000, 67:101-102.
- [8] Svidovyi VI, Kitaeva LV. Evaluation of cytogenetic activity in bone marrow cells exposed to infrasound (experimental data). *Med Tr Prom Ekol*, 1998, 5:42-44.
- [9] Yount G, Taft R, West J. Possible influence of infrasound on glioma cell response to chemotherapy: a pilot study. *J Altern Compl Med*, 2004, 10:247-250.
- [10] 陈东, 王连唐, 陈国栋, 等. 去卵巢后大鼠不同部位的骨组织计量学与骨密度研究. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8:208-210.
- [11] 韩利华, 候的门, 王全平, 等. 卵巢切除大鼠皮质骨骨密度与生物力学特性. *第四军医大学学报*, 2001, 22:1023-1035.
- [12] 李青南, 主编. 骨质疏松实验动物研究—骨组织形态计量学. 成都: 四川大学出版社, 2001:41-43.
- [13] Adler RA. Epidemiology and pathophysiology of osteoporosis in men. *Curr Osteoporos Rep*, 2006, 4:110-115.
- [14] Vandenput L, Ederveen AG, Erben RG, et al. Testosterone prevents orchidectomy induced bone loss in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285:70-76.
- [15] 陈艳, 吴铁崔, 燎胡彬. 骨形态计量学观察睾酮对雄性去势大鼠皮质骨的影响. *解剖学研究*, 2004, 26:277-278.
- [16] 金世鑫. 男性骨质疏松概况. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6:67-73.
- [17] 梁晓萍, 董少红, 肖学吕, 等. 增龄及去睾丸大鼠骨密度和性激素因子的实验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8: 211-213.
- [18] Frost HM. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *J Bone Miner Metab*, 2000, 18:305-316.

(修回日期:2006-11-27)

(本文编辑:松 明)

· 研究简报 ·

高压氧疗法对颅脑损伤大鼠神经元凋亡的影响及其机制研究

陈大庆 朱烈烈

颅脑损伤严重危害人类健康, 如何减轻原发性损伤所造成的神经组织损害, 延缓颅脑损伤后各种继发性损伤的发生和发展, 进一步改善预后, 一直是临床和基础研究的课题。大量研究发现, 颅脑损伤后因脑缺血缺氧而引起的神经细胞凋亡在神经组织损伤过程中起着重要作用^[1-3]。高压氧治疗可以延缓神经细胞凋亡, 但其具体机制尚不明确^[4]。本实验采用免疫组织化学方法研究高压氧治疗对颅脑损伤大鼠神经元凋亡以及胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthetase, NOS) 水平的影响并探讨其机制, 现报道如下。

材料与方法

一、实验动物分组

Sprague-Dawley 雄性大鼠 60 只, 由温州医学院动物实验中心提供, 体重 260 ~ 300 g。大鼠随机分为假手术组、损伤对照组和高压氧治疗组, 每组 20 只, 中途死亡动物即退出该实验研究。

二、动物模型的制作

戊巴比妥钠 (50 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉大鼠后, 用牙科钻于大鼠右侧颅顶部开一直径为 5 mm 的骨窗, 注意保持硬脑膜完整。参照 Feeney 自由落体法^[5]造模, 用 50 g 砝码于 13 cm 高度自由落下, 造成右顶叶较为一致的脑挫裂伤。假手

术组只开放骨窗, 不给予打击。所有动物于术后 48 h 处死。

三、高压氧治疗

高压氧治疗组大鼠于造模后 0.5 h 置于动物氧舱内, 用纯氧洗舱 10 min 后, 匀速加压 10 min 至压力为 0.2 MPa, 稳压 40 min, 按 6 L/min 速率通入医用纯氧, 随后匀速减压 20 min 至常压, 大鼠在常压下呼吸空气 10 min 后重复上述过程 1 次, 此为 1 次治疗。每日治疗 2 次, 每次间隔 40 min, 连续治疗 2 d。损伤对照组不进行高压氧治疗。

四、神经元细胞凋亡的检测

取损伤周边部位的脑组织, 浸入 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 (4℃, pH 值 7.4) 中固定 24 h, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 冠状连续切片, 片厚 6 μm。采用 TUNEL 染色法检测神经元细胞的凋亡情况, 参照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Sigma 公司提供) 说明进行操作: Tris-HCl 缓冲液漂洗 3 次, 每次 3 min; 加入蛋白酶 K, 于 37℃ 水浴箱中消化 15 min; Tris-HCl 缓冲液漂洗 3 次, 每次 3 min; 加入 TdT 酶和标记液 (按 1:9 稀释) 或空白标记液, 于 37℃ 下孵育 60 min; Tris-HCl 缓冲液漂洗 3 次, 每次 3 min; 加入碱性磷酸酶, 37℃ 下水浴 30 min; 加入新鲜配制的 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色液, 室温下反应 3 min; 蒸馏水漂洗, 烘箱中充分干燥后, 用二甲苯透明, 中性树脂胶封片。

应用 Canon 光学显微镜观察切片 (×400), TJY-4000 真彩色细胞图像分析仪的图像分析系统计数阳性细胞, 并计算随机选取 5 个视野的平均细胞凋亡百分率。

五、GDNF 和 NOS 的检测