

· 基础研究 ·

超短波和旋磁对局灶性脑缺血再灌注损伤的影响

梁维娣 张志强

【摘要】 目的 探讨超短波、旋磁治疗对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响。**方法** 应用线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。将 52 只健康 Wistar 大鼠随机分为假手术组、对照组、超短波治疗组(超短波组)及旋磁治疗组(旋磁组)。脑缺血再灌注后 18 h 给予治疗,24 h 取脑,观察各组大鼠脑组织含水量、脑梗死体积及 Bcl-2、Bax 蛋白表达,进行组间比较。**结果** 脑缺血再灌注后 18 h,超短波治疗能减少脑含水量,减小梗死体积;超短波组与旋磁组 Bcl-2 的表达均提高,Bax 蛋白表达降低,Bcl-2/Bax 提高,超短波组与旋磁组间差异无统计学意义($P > 0.05$);在减少脑含水量和减小脑梗死体积方面,旋磁组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 脑缺血再灌注后 18 h,应用超短波治疗对局灶性脑缺血再灌注损伤有显著疗效;本实验条件下旋磁治疗对改善脑水肿、减小脑梗死体积未见显著疗效,在改善凋亡方面有显著疗效。

【关键词】 脑缺血再灌注; 超短波; 旋磁; 脑梗死; 凋亡

The effect of ultrashortwave diathermy and rotating magnetic therapy on cerebral ischemia and reperfusion

LIANG Wei-di, ZHANG Zhi-qiang. Department of Physiotherapy, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of ultrashortwave(USW) diathermy and rotating magnetic(RM) field therapy on the brain following transient focal cerebral ischemia and reperfusion in rats.

Methods Fifty-two Wistar rats were randomly divided into a sham operation group, an ischemia and a reperfusion control group, a USW treatment group and a RM treatment group. Focal cerebral ischemia and reperfusion were induced by intraluminal filament occlusion of the middle cerebral artery. Each brain was removed at 24 h after the reperfusion and water content, cerebral infarct volume and histological expression of Bcl-2 and Bax proteins were observed. **Results** When USW treatment was started at 18 h after reperfusion, decreased infarct volume and water content were observed, but RM treatment did not show this relationship. Both USW and RM were associated with increased expression of Bcl-2 protein and decreased the expression of Bax protein. **Conclusions** USW treatment is beneficial in focal cerebral ischemia. RM's effect is uncertain. Any effect is through reducing apoptosis.

【Key words】 Cerebral ischemia; Reperfusion; Ultrashortwave diathermy; Rotating magnetic field therapy; Cerebral infarct; Apoptosis

随着人口老龄化及生活方式的改变,脑血管疾病已成为致命、致残及严重影响生活质量的三大疾病之一。目前除药物治疗、运动疗法外,各种物理因子治疗脑血管病的研究越来越多,但有关超短波对脑缺血再灌注损伤的影响的研究尚少见,而旋磁的研究虽然很多,但疗效仍不确定^[1,2],尤其对这两种方法的治疗机制尚不十分明确。

近年有关药物对脑梗死的影响的研究报道较多,而物理疗法多用于恢复期的治疗。我们将超短波、旋磁用于脑梗死的早期治疗,以促进脑水肿吸收和神经修复,从而达到神经功能部分恢复的目的。

本实验应用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,观察

超短波、旋磁对缺血脑组织含水量、脑梗死灶体积、Bcl-2 及 Bax 凋亡基因蛋白表达的影响,探讨超短波、旋磁对局灶性脑缺血再灌注损伤的影响及其作用机制。

材料与方法

一、动物模型制备

参照 Longa 等^[3]报道的方法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。用 10% 水合氯醛(0.35 mg/kg 体重)将大鼠麻醉成功后,仰卧固定,取正中切口,钝性分离暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA),在颈内、颈外动脉分叉处结扎颈外动脉,并结扎颈总动脉近心端。在距颈动脉分叉约 0.5 cm 处颈总动脉上刺一小口,将直径 0.26 mm、长

基金项目:辽宁省社会发展基金资助项目(No. 99225003)

作者单位:110004 沈阳,中国医科大学第二临床医院康复科

5 cm 的尼龙线经由颈总动脉插入颈内动脉,入颅至大脑前动脉起始部,闭塞大脑中动脉起始部,进线长度为距颈总动脉分叉处 17~20 mm,至稍有阻力感,动脉出血停止。然后将栓线结扎固定于颈总动脉上,逐层缝合至皮肤。于阻塞动脉 2 h 后将尼龙线头端退回至颈外动脉,形成再灌注。假手术组一切处理步骤同上,只是插线深度小于 10 mm。

二、实验动物与分组

健康 Wistar 大鼠 52 只,雌雄各半,体重为 270~320 g,2.5~3.0 个月龄(购于中国医科大学实验动物部),室温(22 ± 2)℃。模型入选标准:Longa 5 级评分法^[3]为 2 分,即行走时向病灶对侧转圈。造模成功入选的动物模型按体重分层随机分为:①假手术组(9 只),手术处置同对照组,但不阻断动脉血流,其中 5 只作脑含水量测定,4 只作 Bcl-2、Bax 检测;②对照组(15 只),5 只检测脑含水量,5 只检测脑梗死体积,5 只检测 Bcl-2、Bax 含量;③超短波治疗组(超短波组,14 只),在脑缺血再灌注后 18 h,给予无热量超短波治疗 10 min,其中 4 只检测脑含水量,5 只检测脑梗死体积,5 只检测 Bcl-2、Bax 含量;④旋磁治疗组(旋磁组,14 只),于脑缺血再灌注后 18 h,给予 0.09 T (2 500 r/min)旋磁场治疗 10 min,5 只检测脑含水量,5 只检测脑梗死体积,4 只检测 Bcl-2、Bax 含量。以上大鼠均于脑缺血再灌注后 24 h 处死取脑。

三、治疗方法

1. 超短波组:应用 DC-C II 五官超短波电疗机(广东省汕头市医用设备厂产)进行治疗,电极直径为 4 cm,对置法,电极表面距大鼠头皮约 2 cm,无热量,输出功率为 8.21 W(光度学测量法)。于脑缺血再灌注后 18 h 治疗 10 min。对照组处置同上,只是仪器没有能量输出。

2. 旋磁组:采用旋磁治疗器,磁头直径为 6 cm,磁头含两枚直径为 1.5 cm 的磁柱,异名极并置,两极中心距离为 2.7 cm,表面磁场强度为 0.09 T,旋转速度为 2 500 r/min,磁头距大鼠头皮约 0.6 cm,磁头对准病灶侧脑。于脑缺血再灌注后 18 h 治疗 10 min。对照组用去除磁头内磁片的旋磁机治疗,转速及治疗时间同旋磁组。

四、脑含水量测定

脑缺血再灌注后 24 h 断头处死大鼠,开颅取出完整脑组织,滤纸吸去表面残血,置于万分之一精度的分析天平上准确称取湿重,置于玻璃皿中,于 120℃干燥箱内达到恒重,用 Eliot 公式计算脑含水量,含水量 = [(湿重 - 干重)/湿重] × 100%。

五、TTC 染色

脑缺血再灌注后 24 h 处死大鼠,迅速断头取全

脑,自额极向后每 2 mm 做冠状切片至大脑小脑裂,将切片立即置于 2% 红四氮唑(2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride, 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/DP10/BX41 图像分析系统计算脑梗死体积。

六、免疫组化染色及结果分析

各组大鼠于脑缺血再灌注后 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,放入 4% 多聚甲醛固定 24 h。常规石蜡包埋,切片厚度为 5 μm,切片常规脱蜡,PBS(pH = 7.4)冲洗 3 次,每次 3 min。0.01 mol/L 的柠檬酸缓冲液微波炉中抗原修复,PBS 冲洗;滴加 50 μl 3% 过氧化氢溶液,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次;滴加 50 μl 一抗(Bcl-2、Bax 单克隆抗体,滴度 1:100,购于武汉博士德公司),4℃ 冰箱孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加 5 μl 聚合物增强液(试剂 A),室温下孵育 20 min,PBS 冲洗 3 次;滴加 5 μl 酶标抗鼠聚合物(试剂 B),室温下孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次(试剂 A、B 为第二代免疫组化 Efavision™ pfus 广谱试剂盒,购于福州迈新公司);滴加新配的 DAB 显色剂 50 μl(一滴),显微镜下观察 3~10 min 至显色满意。苏木素复染,梯度酒精脱水干燥,透明,封片。

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/DP10/BX41 图像分析系统分析灰度值,取均值。

七、统计学分析

各组数据以($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理用方差分析,组间比较用 t 检验。

结 果

一、脑含水量

超短波组与对照组大鼠病损侧脑组织含水量分别为(79.390 ± 1.055)% 和(81.390 ± 0.825)%,2 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而旋磁组脑含水量为(80.873 ± 1.966)%,与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);假手术组脑含水量为(78.528 ± 0.271)%,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

二、脑梗死体积

超短波组与对照组脑梗死体积分别为(7.97 ± 3.21)% 和(14.98 ± 5.92)%,2 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);旋磁组梗死体积为($10.33 \pm$

4.73)%,与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。假手术组未发现梗死灶。

表 1 各组大鼠病损侧脑含水量(% , $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	脑含水量	
		健侧	患侧
对照组	5	78.328 $\pm$ 1.067 *	81.393 $\pm$ 0.825
超短波组	4	78.504 $\pm$ 0.828 *	79.390 $\pm$ 1.055 #
旋磁组	5	79.080 $\pm$ 0.525 *	80.873 $\pm$ 1.966 Δ
假手术组	5	78.604 $\pm$ 0.318	78.528 $\pm$ 0.271 $\star$

注:与假手术组比较,* $P > 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$, $\Delta P > 0.05$, $\star P < 0.01$

表 2 各组大鼠脑梗死体积(% , $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	脑梗死体积
对照组	5	14.98 $\pm$ 5.92
超短波组	5	7.97 $\pm$ 3.21 *
旋磁组	5	10.33 $\pm$ 4.73 #

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,# $P > 0.05$

三、组织学及免疫组化观察

肉眼所见:对照组大体标本检查可见病损侧半球脑水肿明显,颜色苍白,脑沟、脑回模糊不清,组织较脆,呈豆腐渣样;超短波组及旋磁组病损侧半球脑水肿轻微,沟回清楚,脑表面无出血。

光镜下:5 μ m 厚的脑组织切片经 HE 染色,对照组病侧淡染区广泛,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;超短波组和旋磁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。5 μ m 厚的脑组织切片经免疫组化染色,Bcl-2,Bax 阳性反应定位于胞浆,呈黄色或棕黄色颗粒。对照组病侧缺血坏死区与正常区之间(即缺血半暗带区)见阳性表达细胞数较多,呈棕黄色表达;超短波组和旋磁组于缺血半暗带区见阳性表达细胞数较少,染色强度低;假手术组见淡黄色阳性表达细胞散在分布。

超短波组及旋磁组 Bcl-2 表达灰度值明显高于对照组($P < 0.01$),超短波组和旋磁组 Bax 表达灰度值均明显低于对照组($P < 0.01$),但超短波组和旋磁组间 Bcl-2、Bax 表达比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 3 各组脑组织中 Bcl-2、Bax 表达的平均灰度值($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
对照组	5	131.434 $\pm$ 1.578	119.452 $\pm$ 4.360	1.101 3 $\pm$ 0.036 9
超短波组	5	136.112 $\pm$ 2.654 *	112.974 $\pm$ 2.225 *	1.205 2 $\pm$ 0.040 7 *
旋磁组	4	134.715 $\pm$ 2.028 **	112.862 $\pm$ 4.170 **	1.194 2 $\pm$ 0.026 7 **
假手术组	4	126.483 $\pm$ 4.334 *	105.661 $\pm$ 5.196 *	-

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与超短波组比较,# $P > 0.05$

讨 论

脑组织缺血后导致氧供应不足乃至中断。当局部脑血流量下降至每分钟 20 ml/100 g 以下时,出现能量代谢紊乱;局部脑血流量下降至每分钟 15 ml/100 g 时,出现神经元电活动衰竭,维持神经元内环境能量依赖的离子泵进行性耗竭,即组织出现电静息;当血流量下降为每分钟 10 ml/100 g 以下时,出现细胞膜去极化,细胞膜离子梯度丧失,进而引起细胞死亡^[4]。而物理因子在治疗中的改善血流供应是改善微循环状态,这种作用比较和缓且持久,对于挽救部分脑组织有重要作用。

超短波对改善血流、血液状态等方面的作用已有报道^[5-8]。本实验中超短波对脑缺血再灌注损伤的治疗作用机制是否为改善局部脑供血状态,需进一步进行相关实验加以验证。无热量超短波的另一重要作用为非热效应,这种效应是高频振荡的结果,它使组织中的离子、偶极子、微粒之间的摩擦增加,促使组织的各种成分的交换,改变了组织的理化过程。在此作用下出现生长发育迅速、神经纤维再生加速、白血球吞噬作用加强等效果^[9]。研究发现,脑组织缺血后不同脑区神经元对缺血耐受程度不同(如海马区 CA1 对缺血的耐受性差),在同一时间内即便完全恢复脑供血,仍然存在组织损害,这些损害即是那些不易耐受缺血的组织形成的。因此对脑缺血再灌注损伤的治疗不仅要针对恢复脑血流、改善局部脑循环,同时还要针对对缺血不耐受而形成的继发性损害(如神经元细胞凋亡、自由基生成增多、钙超载、兴奋性氨基酸堆积、炎性细胞浸润等)。本实验发现,超短波对脑缺血再灌注损伤能减少凋亡中 Bax 的表达,增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,从而减少损害神经细胞的凋亡发生,有助于脑功能的恢复。超短波的这一作用机制是否与非热效应有关,有待进一步研究。

目前对旋磁的研究文献很多,且结论也有不同,归因于研究方法不一,使用剂量不统一,对磁场强度概念混乱,以致对其结果的可靠性难以作出正确的评价。现在旋磁对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响的研究,所采用的模型多为四血管阻断法,在全脑缺血 30 min 时即给予旋磁治疗,治疗的同时再灌注,30 min 时即采血作生化指标分析,这种研究所反映的结果均为血液中生化指标的即刻量变,虽然各值都有明显的改变,并且这些物质在某些环节上可以改善脑损伤状态,但这些物质浓度上的改变能否引起脑组织功能质上的改善(包括像脑含水量改变、脑梗死体积的变化、脑功能行为评分改善),尚少见报道及研究。本实验结果显示,旋磁未能引起脑含水量、脑梗死体积的改善。大多文

献报道的旋磁作用部位为双侧颈动脉区,该部位血中物质(顺磁性物质)受磁场作用发生理化性质改变,从而引起各种相关指标的改变。本实验是将旋磁场作用于脑缺血局部,这个部位因发生缺血,局部血流中断,且再灌注后持续低灌注,即使半暗带区等有血流的部位也仅为弱流,可能不足以产生血流急速通过磁场作用下的双颈动脉区的作用。

本实验发现,旋磁作用于缺血再灌注脑组织后,凋亡有所改善,说明旋磁对脑缺血再灌注损伤的治疗与改善凋亡有关。而有的研究发现,在半暗带恶化过程中,细胞死亡及由此导致的不可逆性损伤病灶的扩大,可能主要是通过细胞凋亡机制实现的^[10]。因而改善凋亡对于挽救濒死神经元、改善脑组织功能有重要意义。尽管本研究发现旋磁对于脑含水量、脑梗死体积没有明显改善,但其可以改善凋亡是有意义的。旋磁不能改善脑含水量与脑梗死体积,可能与本实验设计中只在脑缺血再灌注后 18 h 给予 1 次治疗,且维持时间仅 10 min,治疗后 6 h 即处死,这与短时间内其疗效尚未充分发挥显著相关。曾有人用不同物种(人、兔、鼠)测定不同指标(β -内啡肽、5-HT、NO、NPY)在磁场作用下所发生的变化,发现各指标含量或表达出现增加或减少,但若离开磁场数小时,这些变化将全部恢复到原来水平,说明如果要获得良好的效应,应有一个较长的疗程,绝不是一两次磁疗就能解决的^[11]。以后研究可以在其治疗时间及剂量上给予调整,使其发挥最大效应。旋磁对凋亡有作用的机制有待进一步研究。目前推测可能为多种因素的复杂变化引起体内产生综合效应的结果。旋磁场在组织内产生涡流电场,使电子自旋和循轨道运动所产生的磁矩能级降低,导致细胞电生理改变,引起细胞内环境代谢的一系列变化(如 Bcl-2 表达的增加、Bax 表达的减少等)而显示治

疗作用。

本实验在采用相同的模型、作用于相同的时间点(缺血再灌注后 18 h)、维持相同治疗时间(10 min)的同等条件下处死大鼠并取样分析,超短波组在改善细胞凋亡疗效方面与旋磁组相比,虽然优于旋磁组,但差异无统计学意义。可能与样本量小有关,但也不排除超短波对脑缺血再灌注损伤的疗效比旋磁场强的可能,这有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 韩丽莎,王维,王芳,等.旋磁场对脑缺血再灌注损伤大鼠血液流变学的影响.中华理疗杂志,2000,23:155-157.
- 2 夏绪刚,黄兆民,周红霞,等.旋磁场并高压氧对脑卒中患者自由基代谢的影响.中华理疗杂志,1995,18:140-142.
- 3 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20:84-91.
- 4 朱明德.现代临床生物化学.上海:上海医科大学出版社,1996. 184.
- 5 潘兴旺,徐福生,梁艳军,等.超短波治疗脑动脉硬化症时对血脂、脑血流图、血流变的影响.宁夏医学杂志,1994,16:220-222.
- 6 李天栋,陈竞贤,彭玉平.超短波对实验性外伤性脑水肿的影响.广东医学,1996,17:254-256.
- 7 吴并生,李光来,裴庆生,等.超短波对家兔肢体缺血再灌注损伤的影响.中华理疗杂志,1994,17:77-78.
- 8 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.
- 9 缪鸿石.电疗与光疗.上海:上海科学技术出版社,1990. 237.
- 10 章建军,阮旭中,张苏明,等.大鼠局灶性脑缺血再灌注半暗带神经细胞坏死与凋亡的动态变化.中华老年医学杂志,1999,18:170-173.
- 11 张小云,罗振国,何晓阳,等.从分子水平探索旋转恒定磁场对机体作用之机理.中国科学(C辑),2001,31:275-282.

(修回日期:2005-09-02)

(本文编辑:松 明)

· 短篇论著 ·

高压氧治疗对多种患者肝脏功能的影响

胡慧军 李璋 潘晓雯

对患有重型颅脑损伤、各种原因导致的脑功能障碍、股骨头坏死等疾病的患者来说,一般都需要较长疗程的高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗^[1-3]。长期 HBO 治疗是否会对患者正常的脏器功能造成不利的影响,目前报道较少。本研究通过对 17 例长期进行 HBO 治疗,且肝功能正常患者的肝功能指标变化情况进行分析,旨在讨论 HBO 治疗对患者肝功能的影响

及其可能的机制。

一、资料与方法

17 例患者均为 HBO 科长期住院治疗的,男 9 例,女 8 例;年龄 11~76 岁,平均年龄(41.9±3.7)岁;17 例患者中重型颅脑损伤 9 例,心肺复苏后缺血缺氧性脑病 4 例,一氧化碳中毒性脑病 3 例, SARS 后股骨头坏死 1 例;总计 HBO 治疗 100~170 次,平均(125.5±5.1)次。排除: HBO 治疗 < 100 次;既往有急、慢性肝脏、胆囊疾患;既往有急、慢性溶血性疾病;治疗期间曾使用人血白蛋白;治疗期间曾使用严重损害肝脏功能的药

作者单位:100037 北京,中国人民解放军海军总医院全军高压氧中心(胡慧军、潘晓雯);昆明医学院第二附属医院高压氧科(李璋)