

· 基础研究 ·

超声-中频电经颅刺激小脑区对大鼠局灶性脑缺血再灌注的保护作用

杜宝琮 董继超 杜宝民 金妍 刘烁

【摘要】目的 观察超声-中频电经颅刺激小脑区对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用,并探讨其作用机制。**方法** 将实验大鼠随机分为假手术组、对照组及治疗组。用线栓法制备一侧大脑中动脉闭塞再灌注(MCA-OR)模型,造成大鼠左脑缺血 2 h 再灌注 24 h,采用 5 级评分法评定神经功能缺损程度并筛选大鼠。采用干湿重法测定脑含水量,用 TTC 染色-图像分析仪测定梗死灶体积,并分析缺血侧脑组织超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量的变化。**结果** 与对照组相比,治疗组大鼠(即刻组除外)的脑水肿程度明显减轻($P < 0.05$);治疗组脑梗死体积缩小($P < 0.05$),脑组织中 SOD 含量增加,而 MDA 值下降($P < 0.05$)。**结论** 超声-中频电经颅刺激小脑区对脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用,其作用可能与减轻脑水肿、提高 SOD 活性、降低 MDA 含量及缩小梗死体积有关。

【关键词】 超声-中频电经颅刺激小脑区; 局灶性脑缺血; 缺血-再灌注; 脑水肿; 自由基

The protective effects of cerebellar ultrasound-medium frequency electric stimulation on focal cerebral ischemia reperfusion in rats DU Bao-zong*, DONG Ji-chao, DU Bao-min, JIN Yan, LIU Shuo. * Department of Rehabilitation, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】Objective To study the protective effects of cerebellar ultrasound-medium frequency electric stimulation on the focal cerebral ischemia reperfusion damages in rats. **Methods** After the focal cerebral ischemia in rats was produced by 2 hours of occlusion of the middle cerebral artery(MCAO) followed by 24 hours of reperfusion, all the animals were divided into a sham-operation group, a control group and an experimental group. To select rats, the neurological deficits were evaluated in 0-4 scales. The cerebral water content was determined by wet/dry weighing method. The infarct volume was measured by 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride(TTC) staining technique and image analysis equipment. The activity of super-oxide dismutase(SOD) and the content of malondialdehyde(MDA) in ischemic tissue of brain were analyzed. **Results** The severity of cerebral edema in the treatment group, as compared with the control group, was lessened($P < 0.05$), the volume of cerebral infarction of the treatment group was reduced($P < 0.05$), the content of SOD was increased, and the MDA was reduced($P < 0.05$). **Conclusion** Cerebellar ultrasound-medium frequency electric stimulation has a neuroprotective effect against focal cerebral ischemia-reperfusion injuries. The effect may be related to decrease in cerebral water content and MDA, increase in the activity of SOD and decrease in the cerebral infarct volume.

【Key words】 Cerebellar ultrasound-medium frequency electric stimulation; Focal cerebral ischemia; Ischemia-reperfusion; Brain edema; Free radical

应用经颅电刺激小脑区治疗缺血性脑血管病有一定疗效,但鲜见应用超声-中频电经颅刺激小脑区对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用方面的报道。本实验采用改良的 Zea-Longa 法^[1]制备大脑中动脉闭塞再灌注模型,观察超声-中频电经颅刺激小脑区对急性局灶性脑缺血再灌注大鼠的脑水肿情况、脑梗死体积及自由基代谢的影响,以研究超声-中频电经颅刺激小脑区对急性局灶性脑缺血再灌注有否治疗作用,为临床应用超声-中频电经颅刺激小脑区治疗缺血再灌注损伤

提供依据。

材料与方法

一、实验动物、仪器及刺激方法

选用健康 Wistar 大鼠 100 只,雌雄各半,体重为 280 ~ 350 g,平均(316.5 ± 18.8)g,鼠龄为 19 ~ 20 周。

采用超声-中频电同步治疗仪(沈阳产),治疗组为间脉+全波间调,超声工作频率为 0.8 MHz,包络脉冲频率为 50 Hz,包络脉冲工作比为 1:1;中频电的载波频率为 2 kHz,包络脉冲频率亦为 50 Hz,包络脉冲工作比亦为 1:1。因超声与中频电受同一调制(调幅调制)信号所调制,故二者同位相,即二者同步。

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院理疗康复科(杜宝琮、董继超);辽宁省朝阳市第三人民医院(杜宝民);沈阳市儿童医院(金妍);北京大学医学院三院(刘烁)

刺激治疗前,先将大鼠耳后(相当于人体乳突部)剃毛,刺激治疗时局部涂抹导电的耦合剂,将辅极(直径为 5 mm 的圆形电极)固定于大鼠的一侧耳后,另一侧置超声头(直径为 5 mm),于小脑部左右对置,声强为 0.75 W/cm^2 ,中频电流强度为 1 mA,刺激治疗 15 min 后,声头与辅极对调,再刺激治疗 15 min,共刺激治疗 30 min。

二、实验方法

(一) 大脑中动脉闭塞-再灌注模型的制备

采用改良 Zea-Longa 线栓法^[1]制备大鼠大脑中动脉闭塞再灌注(occlusion and reperfusion of the middle cerebral artery, MCA-OR)模型。将直径 0.26 mm 的市售尼龙鱼线剪成 6 cm 长的线段,一端用细砂纸打磨光滑,酒精消毒后浸入生理盐水中备用。用 10% 水合氯醛溶液(0.35 g/kg 体重)腹腔注射麻醉大鼠,大鼠仰卧固定,于颈前正中切开皮肤,钝性分离皮下组织,游离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)及其颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA),电凝 ECA 分支并结扎 ECA。动脉夹夹闭 CCA 和 ICA,在距 CCA 分叉处 3 mm 的 CCA 上用 4.5 号针头扎一小孔,将已备栓线插入 CCA,穿过分叉处进入 ICA,松开夹 ICA 的动脉夹,继续将尼龙线插入到 ICA 颅内段,当尼龙线自 ICA 起始部插入约 20 mm 左右时遇有阻力感,表明线的头端已穿过大脑中动脉起始部,然后结扎 ICA 起始段,固定栓线,以防栓线脱落,缺血 2 h 后拔出栓线退至 CCA 内,行大脑中动脉再灌注,24 h 后断头取脑。

(二) 实验分组

将造模成功的 54 只大鼠随机分为 3 组。

1. 假手术组($n = 12$):手术操作过程同(一),但插线深度为 1.0 cm,不至于造成脑梗死。分别取 6 只做脑含水量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定。

2. 对照组($n = 18$):手术操作同(一),经颅超声-中频电同步刺激小脑区,刺激方法见一、但不给输出,6 只做脑含水量测定,6 只做 SOD 及 MDA 测定,6 只做脑梗死体积测定。

3. 治疗组($n = 24$):又分为 2 个亚组,即①即刻治疗组($n = 6$),做脑含水量测定;②6 h 治疗组($n = 18$),取 6 只做脑含水量测定,6 只做 SOD 及 MDA 测定,6 只做脑梗死体积测定。刺激方法见一。

(三) 观测指标

1. 神经行为学评分:大鼠清醒后,采用 Zea-Longa 5 级评分法^[3]评定神经功能缺损程度,0 级——正常活动,无神经功能缺损;1 级——不能充分伸展右前爪;2 级——向右侧转圈;3 级——向右侧倾倒;4

级——无自发行走,有意识障碍。

2. 脑梗死体积测定:处死大鼠后,立即断头取脑,将所取脑组织置于 -20°C 冰箱中冷冻 20 min 后,自额极从前至后作冠状切片,片厚 2 mm,然后放入 2% 盐酸 2,3,5-三苯基四氮唑溶液(TTC)磷酸盐缓冲液($\text{pH} 7.4$)中, 37°C 水浴避光染色 30 min,再用 10% 福尔马林溶液固定 10 min,用图像分析仪采集并分析梗死灶体积。脑梗死体积计算公式: $V = t(A_1 + \dots + A_n) - (A_1 + A_n)t/2$,其中 V 为梗死体积, t 为切片厚度, A 为梗死面积。

3. 脑含水量测定:采用干重湿重法测定脑含水量。分别取左右大脑,于万分之一精度天平上称其湿重,然后将脑组织放入 95°C 电烤箱中烘干至恒重,称取干重。脑含水量计算公式为:脑组织水份含量 = (湿重 - 干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

4. SOD、MDA 测定:大鼠在冰台上断头处死,快速取脑,用冰生理盐水冲洗,去掉软脑膜,取约 200 mg 的额顶叶皮质,剪碎,加入 2 ml 生理盐水,在冰水浴中进行组织匀浆及超声破碎,3 000 转/min 离心 20 min。取上清液放入 -20°C 冰箱中保存,2 周内测定。用亚硝酸盐还原比色法测 SOD,用硫巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)分光光度比色法测 MDA。

(四) 选模标准

根据神经行为学评分筛选动物,评分为 1 级或 2 级,且缺血 2 h 再灌注 24 h 后仍存活的大鼠入选,其余剔除。分析梗死灶体积时,梗死不完全者亦剔除。

三、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析采用成组 t 检验。

结 果

一、梗死灶体积

TTC 染色后,假手术组大鼠脑组织切片呈均匀红色,对照组和治疗组病灶侧脑组织呈苍白色。若皮质区不出现白色梗死灶,仅基底核区出现白色者为部分梗死,表明梗死不完全,此类剔除。实验结果显示:治疗组与对照组比较,绝对脑梗死体积和相对脑梗死体积(梗死体积占全脑体积的百分比)均明显缩小,2 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 超声-中频电经颅刺激小脑区对 MCA-OR 大鼠脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	绝对梗死体积 (mm^3)	相对梗死体积 (%)
对照组	6	379.02 ± 101.35	26.68 ± 4.02
治疗组	6	$262.26 \pm 51.35^*$	$17.38 \pm 1.65^*$

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

二、脑含水量的变化

与对照组相比,6 h 治疗组大鼠的脑水肿程度明显减轻,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组脑含水量的变化($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	脑含水量		
		右	左	左-右 (脑水肿)
假手术组	6	78.23 $\pm$ 0.20	78.25 $\pm$ 0.17	0.02 $\pm$ 0.15
对照组	6	78.30 $\pm$ 0.17	81.50 $\pm$ 0.29	3.20 $\pm$ 0.30*
即刻治疗组	6	78.40 $\pm$ 0.16	81.41 $\pm$ 0.30	3.01 $\pm$ 0.24*#
6 h 治疗组	6	78.39 $\pm$ 0.15	80.99 $\pm$ 0.25	2.60 $\pm$ 0.20* Δ

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

三、SOD、MDA 的变化

治疗组大鼠脑组织中 SOD 含量增加,而 MDA 含量下降,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 超声-中频电经颅刺激小脑区对 MCA-OR 大鼠 SOD、MDA 的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	SOD(NU/mg)	MDA(nmol/mg)
假手术组	6	52.01 $\pm$ 4.12	0.97 $\pm$ 0.05
对照组	6	31.32 $\pm$ 2.85*	0.41 $\pm$ 0.07*
治疗组	6	38.86 $\pm$ 2.88*#	1.08 $\pm$ 0.06**

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$

讨 论

临床上以大脑中动脉阻塞为主的脑梗死患者较为多见,本研究采用线栓法制成可逆的一侧大脑中动脉脑梗死动物模型,以更好地模拟临床,探讨治疗效果。

众所周知,脑缺血再灌注是脑梗死研究中的一个重要课题。局部脑组织缺血后,由于溶栓措施或侧枝循环建立等因素,使血流得以恢复,但血流恢复后却使原有的缺血性损伤反而加重,我们把它称为再灌注损伤。迄今已有大量研究证明,脑缺血再灌注损伤是由多种致病机制共同作用互相促进的结果,主要包括氧自由基增多、神经细胞内钙超载、炎症和免疫反应、兴奋性氨基酸的毒性作用及细胞凋亡^[2,3],其中氧自由基在脑缺血再灌注损伤中起重要作用。缺血再灌注后,氧自由基急剧增加,与细胞膜不饱和脂肪酸发生反应,形成过氧化脂质,损伤膜成分,导致细胞损伤破裂、血脑屏障破坏及脑水肿形成。MDA 作为氧自由基与细胞膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的最终代谢产物之一,其含量变化间接反映了组织中氧自由基的变化。此外,氧自由基的大量产生,可导致脑组织中抗氧化反应的物质(如 SOD)的过量消耗。本实验结果显示,大鼠大脑

中动脉闭塞 2 h 再灌注 24 h 时病灶侧脑含水量升高,SOD 活性降低,MDA 水平升高,提示存在自由基损伤。

目前,已有研究证明,超声-中频电治疗脑梗死有肯定的治疗效果^[4]。本实验中,治疗组与对照组相比,病灶侧 SOD 含量增加($P < 0.05$),而 MDA 含量却明显降低($P < 0.05$),证明超声-中频电经颅刺激小脑区能增强缺血再灌注后脑组织中 SOD 活性,增强抗氧化防御能力,减少自由基含量,从而减轻自由基诱导的组织超微结构损伤,防治再灌注损伤。

超声-中频电同步治疗作为一种新的物理治疗方法^[5],具有诸多生物学作用。一些实验研究^[4-6]均证实,超声-中频电同步治疗可使血管扩张、血液循环改善,血流速度加快等。若经颅超声-中频电刺激小脑区同样可使局部血管扩张、血流加快,局部脑血流增加,改善微循环,而微循环的改善,则促进了渗出物的吸收与消散,从而减轻脑水肿,缩小脑梗死体积。本实验中超声-中频电经颅刺激小脑区 6 h 治疗组大鼠的病灶侧脑含水量降低($P < 0.05$),脑水肿程度明显减轻,也证实了上述观点。

本实验之所以采用超声与中频电联合应用并同步刺激是由于:(1)调制中频电与经颅电刺激小脑区疗法所使用的电流参数相类似^[7,8];(2)国内大量临床实践证明,经颅超声治疗脑血管病颇有疗效;(3)超声与中频电二者联合并同步刺激治疗,二者可相辅相成,产生交互作用与协同作用^[6]。

研究中我们发现,在再灌注即刻给予治疗不仅不能减轻脑水肿,而且大鼠死亡率较高(8/14),分析其原因可能是:超声-中频电经颅刺激小脑区使血管扩张、血流加速,而在再灌注初期,脑血流量也是突然增加,形成所谓的“高灌注状态”,此时若给予超声-中频电经颅刺激小脑区治疗则进一步增加血流量,不但会加重损害,而且易导致出血,使死亡率增加;而在再灌注 6 h 时,血流量已减少,形成低灌注状态^[9],此时给予超声-中频电经颅刺激小脑区治疗可使血流加速,脑血流量增加,缓解低灌注状态,减轻其缺血缺氧,从而促进了渗出物的吸收与消散,使脑水肿减轻,死亡率亦明显降低。本实验结果显示,6 h 治疗组脑水肿程度明显减轻,与对照组比较,差异有统计学意义。可见,在再灌注 6 h 给予超声-中频电经颅刺激小脑区治疗是安全的,也是有效的。

本实验中治疗组脑梗死体积减小,除以上几个方面作用机制外,可能与超声-中频电经颅刺激小脑区影响了细胞内钙超载和细胞凋亡等亦有关系。

综上所述,超声-中频电经颅刺激小脑区治疗方法简便,安全可靠,但该疗法如何更有效地应用于临

床,以及具体应用途径、作用参数等尚须进一步加以探讨。

参 考 文 献

- 1 Zea-Longa EL, Weinstein PR, Canson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- 2 朴春花. 脑缺血再灌注损伤的机制和对策. *中国康复理论与实践*, 2002, 8: 428-431.
- 3 刘煜敏, 徐仁佃, 黄怀钧, 等. 兴奋性氨基酸氧自由基与缺血再灌注脑损伤关系的实验观察. *卒中与神经疾病*, 2000, 7: 98-100.
- 4 杜宝琮, 赵国祥. 超声-中频电治疗脑梗塞的临床观察. *中华理疗杂志*, 1996, 19: 223.
- 5 杜宝琮. 超声-中频电同步治疗仪的临床应用. *中国超声医学杂志*, 1995, 11: 254.
- 6 杜宝琮, 刘景祥, 孟凤霖. 超声-调制中频电叠加疗法治疗作用的研究. *中华理疗杂志*, 1984, 7: 18-19.
- 7 Nakai M, Ladecold C, Reis DJ, et al. Global cerebral vasodilation by stimulation of rat fastigial cerebellar nucleus. *Am J Physiol*, 1982, 24: 226-235.
- 8 Golanov EV, Feis DJ. Contribution of cerebral edema to the neuronal salvage elicited by stimulation of cerebellar fastigial nucleus after occlusion of the middle cerebral artery in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995, 15: 172-174.
- 9 陈春富, 李劲松. 栓线法大鼠局灶性脑缺血模型的研究. *中风与神经疾病杂志*, 1996, 13: 18-19.

(修回日期: 2005-03-22)

(本文编辑: 松 明)

· 短篇论著 ·

弹力手套加气囊外展垫预防虎口烧伤植皮后早期皮片挛缩

林海涛 龚黎明 邱春梅 秦巍 罗军复 石团员 杨光喜 杨艳清
廖发翠 高余凤

我科于 2001 年 3 月至 2002 年 12 月间对虎口深度烧伤后行大张中厚皮片移植愈合后的 28 例患者, 在早期应用弹力手套加压的同时, 通过缝接于手套虎口处的气囊外展垫将患者拇指固定于外展对掌位以预防其虎口皮片挛缩, 临床实践证明疗效满意。现报道如下。

一、资料与方法

治疗组共有 28 例手深度烧伤患者, 其中男 19 例, 女 9 例; 年龄 18 ~ 49 岁, 平均 26.5 岁; 共有 38 只手 (11 只左手, 27 只右手) 烧伤, 其虎口均为深度烧伤, 其中双手烧伤 10 例, 单手烧伤 18 例。另回顾性将 2001 年 3 月前接受治疗的另外 26 例患者作为对照组, 其虎口也为深度烧伤, 男 18 例, 女 8 例; 年龄 20 ~ 45 岁, 平均 24.5 岁; 共有 35 只手 (12 只左手, 23 只右手) 烧伤, 其中双手烧伤 9 例, 单手烧伤 17 例。2 组患者一般资料及病情经统计学分析, 差异均无统计学意义, 具有可比性。

气囊垫主要由两部分组成: ① 30 ml 圆柱型扩张器 1 只; ② 自制弹力布外套 (布料为弹力手套用料, 容积为 20 ml) 1 只。将弹力布外套底面横行缝接于弹力手套的虎口相应凹陷处, 然后再将被压瘪的扩张器置入其内, 导管与注水壶则外置于手套表面并用丝线妥善固定。当患者戴上该手套后, 用 4 $\frac{1}{2}$ 号针头插入注水壶内并向气囊充气, 充气量可酌情而定, 但一般不能超过 40 ml, 充气后的气囊扩张变形呈橄榄状, 其产生的压力可将虎口固定于外展对掌位 (图 1), 放气时只需将 4 $\frac{1}{2}$ 号针头插入注水壶内挤压气囊即可。2 组患者均在烧伤后 3 ~ 7 d 内行手背削痂移植大张中厚皮片 (以大腿皮肤为供区) 治疗, 术毕

则将患手虎口包扎固定于功能位 (拇指呈 45° 对掌外展)^[1]; 治疗组患者于皮片愈合拆线后即开始佩戴弹力手套及应用气囊外展垫, 每天佩戴时间达 23 h (清洗、换药时可取下), 连续佩戴 6 个月以上; 对照组患者于皮片愈合拆线后未给予特殊处理。

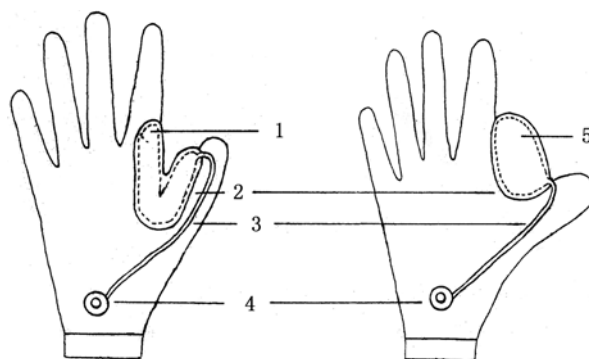


图 1 弹力手套加气囊外展垫应用示意图

注: 1——未充气扩张气囊; 2——气囊垫外套; 3——导管
4——扩张器注水壶; 5——已充气扩张气囊

临床上一般以拇指呈 45° 对掌外展时, 将被检者拇指指间关节掌侧横纹尺侧端到掌心横纹桡侧端的距离用来表示虎口外展宽度, 正常值男性为 5.0 cm, 女性为 4.5 cm^[1]。2 组患者均在皮片愈合拆线前及术后 0.5 ~ 1 年内分 2 次测量虎口外展宽度, 由于患者拆线前的虎口外展宽度一般接近正常值, 故将后者占前者的百分比作为疗效评定指标, 按优、良、差共 3 个等级统计各组相应例数, 其中以百分比大于 90% 为优, 70% ~ 90% 为良, 小于 70% 为差。

2 组患者疗效优良率比较采用 χ^2 检验, 组内虎口外展宽度治疗前、后比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学