

· 基础研究 ·

超短波对大鼠局灶性脑缺血再灌注后大脑的保护作用

张志强 张立新 苑秀华 田丽君 李少忠

【摘要】目的 观察超短波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** 用线栓法制备右侧大脑中动脉栓塞-再灌注(MCA-OR)大鼠模型,将造模后动物分为3组:空白对照组($n=16$)、对照组($n=24$)和治疗组($n=24$),治疗组在再灌注6 h时给予无热量超短波治疗10 min,所有大鼠于24 h后断头取脑,分别观察形态学变化,测量梗死灶体积、脑含水量、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量。**结果** 再灌注6 h时给予超短波治疗能减轻大鼠缺血侧脑含水量,提高抗氧化酶SOD含量,降低自由基产物MDA的含量,病理损伤减轻,而对大鼠梗死灶体积的影响不明显。**结论** 超短波对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用。

【关键词】 超短波; 局灶性脑缺血; 缺血-再灌注; 脑水肿

The neuroprotective effects of ultrashort wave diathermy on brain against focal cerebral ischemia-reperfusion lesion in rats ZHANG Zhi-qiang, ZHANG Li-xin, YUAN Xiu-hua, TIAN Li-jun, LI Shao-zhong. Department of Physiotherapy, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】Objective To study the neuroprotective effects and mechanisms of ultrashort wave on the focal cerebral ischemia-reperfusion lesions in rats. **Methods** Focal cerebral ischemia in rats was produced by 2 hours of occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) followed by 24 hours of reperfusion. The rats were then subject to ultrashort wave diathermy on their head at 6 hours after the end of reperfusion. The cerebral water content was determined by wet/dry weighing method; the infarct volume measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining technique, the neurological deficits evaluated by Zea-Longa Scale. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malonaldehyde (MDA) in ischemia tissue of brain and morphologic changes were tested. **Results** A significant decrease in water content and MDA content and reduced pathologic lesion of the rat brain as well as the increase in the activity of SOD were demonstrated in rats treated by ultrashort wave diathermy as compared with those by placebo diathermy. **Conclusion** Ultrashort wave has a neuroprotective effect against focal cerebral ischemia-reperfusion injuries. This effect may be related to the decrease of cerebral water content and MDA, and an increase of the activity of SOD.

【Key words】 Ultrashort wave; Focal cerebral ischemia; Ischemia-reperfusion; Brain edema

目前,对脑血管病尤其是缺血性脑血管病的治疗仍较棘手,溶栓可尽早地恢复脑血流,改善半暗带区的血液供应,缩小梗死面积,挽救未死的脑组织及其功能,但血管再通不可避免地造成损伤。本研究利用改良的 Longa 法^[1]复制大脑中动脉阻塞模型,观察超短波治疗对大鼠脑缺血再灌注后脑水肿、脑梗死体积、抗氧化酶及自由基的作用,为临床应用提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物和仪器

选用本校动物部提供的健康 Wistar 大鼠 64 只,雌雄不拘,体重 250 ~ 350 g (普通级,合格证号为[2000]

015 号),鼠龄 18 ~ 20 周。

本实验采用上海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 11.32 W (输出功率测定采用光度学测定法^[2])。将大鼠固定于特制的塑料固定器内,直径为 4 cm 的圆形电极对置于大鼠脑两侧,电极与大鼠头部皮肤间隙 4 cm。

二、方法

(一) 一侧大脑中动脉栓塞——再灌注(MCA-OR)模型的制备

通过阻断右侧大脑中动脉造成大鼠局灶性脑缺血:栓线选用直径 0.26 mm 市售尼龙鱼线,剪成 5 cm 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。大鼠用 100 g/L 水合氯醛麻醉(350 mg/kg 体重,腹腔注射),将室温维持在 20 ~ 25℃

基金项目:辽宁省社会发展基金资助项目(No. 99225003)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院理疗科

之间。动物仰卧固定,正中切开颈部皮肤及皮下组织,分离右侧颈总动脉(CCA)及其颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA),电凝 ECA 分支并结扎 ECA。用动脉夹夹闭 CCA 和 ICA,在 CCA 距分叉 3 mm 处,用 4.5 号针头扎一小孔,将已备栓线插入 CCA,穿过 ICA 与 ECA 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 起始部的插入长度达约 2.0 cm 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

64 只大鼠分 3 组进行实验。①空白对照组:16 只,手术操作过程见“(一)”,但插线深度为 1.0 cm,不至于造成脑梗死。其中 8 只鼠作脑含水量的测定,8 只鼠作脑 SOD、MDA 的测定。②超短波治疗组:24 只,手术操作同“(一)”,在再灌 6 h 后,开始用超短波作用大鼠头部,无热量,治疗 10 min 后,各取 8 只鼠分别作脑含水量、SOD 及 MDA、脑梗死体积的测定。③对照组:24 只,手术操作见“(一)”,按超短波治疗组的方法给予处理,但无输出,各取 8 只鼠分别作脑含水量、SOD 及 MDA、脑梗死体积的测定。

(三) 观测指标

1. 神经行为学评分:动物清醒后采用 Zea-Longa 5 级评分法^[1]评估神经功能缺损程度。0 级——正常活动,无神经功能缺损;1 级——不能充分伸展左前肢;2 级——向左侧转圈;3 级——向左侧倾倒;4 级——无自发行走,有意识障碍。

2. 脑梗死体积的测定:处死动物后,立即断头取脑,自额极由前向后作冠状切片,厚 2 mm,脑片以 2% 盐酸 2,3,5-三苯基四氮唑溶液(TTC)染色,37℃ 水浴避光 30 min,然后用 10% 的福尔马林溶液固定 10 min,用图像分析仪采集并分析梗死灶体积。

3. 脑含水量测定:采用干湿重法测量,脑组织含水量(100%) = $(1 - \text{干重}/\text{湿重}) \times 100\%$ 。

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后,以 300 r/min 的速度离心 20 min,取上清液放入 -20℃ 冰箱中,2 周内测定。SOD 采用羟胺法,MDA 采用 TBA 分光光度比色法。

5. 病理组织取材:取对照组及治疗组中作 TTC 染色的鼠脑(脑组织已用 10% 的中性福尔马林液固定),石蜡包埋,切片;行常规 HE 染色,光镜病理观察。

(四) 选模标准

根据神经学行为评分选择动物,评分 1 级和 2 级

及缺血 2 h 再灌注 24 h 后仍存活者入选,并保证各组间 1,2 级动物数相等,其余剔除。分析梗死灶体积时,梗死不完全者(即:皮质区不出现白色梗死灶,仅基底节区出现浅红色或白色者)剔除。

三、统计学分析

结果均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,进行方差分析,并进行均数的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

结 果

一、组织病理学观察

空白对照组大鼠脑组织切片呈均匀红色。对照组病灶侧大脑半球体积明显增大,脑回变平,脑沟变浅,梗死灶颜色明显变浅,组织脆且易碎。镜下可见间质高度水肿,神经元周围间隙明显增宽,神经元呈三角形,核仁减小,浓缩甚至消失,血管腔内中性粒细胞增多明显。治疗组病灶侧可见中度或轻度水肿,血管腔内中性粒细胞增多轻微。

二、脑含水量的变化

由表 1 可见,3 组间健侧脑含水量比较差异无统计学意义($P > 0.05$),患侧脑含水量均明显高于空白对照组,且差异有显著性意义($P < 0.05$),但治疗组患侧脑含水量明显低于对照组,差异有显著性意义($P < 0.05$)。可见对照组和治疗组的大鼠因局灶性脑缺血均有不同程度的脑水肿,而超短波治疗能减轻大鼠患侧脑水肿程度。

三、梗死体积以及 SOD 和 MDA 的变化

由表 2 可见,治疗组脑梗死体积略小于对照组,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。对照组患侧脑与空白对照组比较,SOD 平均降低 10.71 NU/mg,MDA 平均增高 0.49 nmol/mg,差异具有显著性意义($P < 0.05$),说明大鼠局灶性脑缺血再灌注后有自由基损伤和过氧化酶的过量消耗。治疗组 MDA 显然高于空白对照组,但较对照组平均减少 0.21 nmol/mg,差异有显著性意义($P < 0.05$)。治疗组的 SOD 活性较对照组高 6.38 NU/mg,且差异有显著性意义($P < 0.05$),虽然还低于空白对照组,但差异无显著性意义($P > 0.05$),说明超短波治疗能够增加 SOD 活性,降低 MDA 的含量,减轻自由基的损伤。

表 1 各组脑含水量分布情况(%, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	健侧	患侧
空白对照组	16	77.58 ± 0.51	77.59 ± 0.52
对照组	24	77.26 ± 0.67	81.00 ± 0.74 *
治疗组	24	77.13 ± 0.70	79.78 ± 0.70 * △
F 值		0.28	62.94
P 值		> 0.05	< 0.05

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,△ $P < 0.05$

表 2 各组梗死体积以及 SOD 和 MDA 的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	脑梗死体积		SOD(NU/mg)	MDA(nmol/mg)
		梗死体积(mm ³)	占总脑体积%		
空白对照组	16	—	—	52.90 ± 4.62	0.90 ± 0.04
对照组	24	362.03 ± 142.01	17.95 ± 6.53	42.19 ± 5.18 *	1.39 ± 0.03 *
治疗组	24	310.85 ± 126.77	15.52 ± 5.76	48.57 ± 3.78 ^{#△}	1.18 ± 0.03 * △
F 值		2.27	1.45	15.65	517.55
P 值		>0.05	>0.05	<0.05	<0.05

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,[#] $P > 0.05$;与对照组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

目前认为,脑缺血再灌注损伤是多种机制共同作用、互相促进的结果,其中氧自由基在脑缺血再灌注损伤中起着重要作用。缺血再灌注后急剧增加的氧自由基可与细胞膜不饱和脂肪酸发生反应,形成过氧化脂质,损伤细胞膜成分,导致细胞损伤破裂,血脑屏障破坏,脑水肿形成。MDA 作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,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。本研究结果表明,大鼠 MCA 闭塞 2 h 再灌注 24 h 时病灶侧脑组织含水量升高,SOD 活性降低,MDA 水平升高,提示存在自由基损伤。

本研究对 MCA-OR 大鼠在再灌注 6 h 时给予无热量超短波治疗,可以减轻脑水肿,提高 SOD 含量,降低 MDA 水平。由于小剂量超短波对机体有多种作用机制,但其中兴奋迷走神经使血管扩张,血流加速^[3],是很值得关注的问题。缺血再灌注脑血流量时间窗研究表明^[4],在缺血再灌注即刻,患侧脑血流突然增加,形成所谓的高灌注流状态,而在再灌注 6 h 后,血流降低形

成低灌注状态,72 h 后低灌注趋于稳定。故在再灌注 6 h 后给予小剂量超短波治疗有可能缓解低灌注,减轻其缺血缺氧,从而降低 MDA 含量,增加 SOD 水平,减轻细胞源性及血管源性脑水肿,对再灌注损伤起到保护作用。

本实验结果中,超短波治疗组患侧脑梗死体积虽小于对照组,但差异无显著性意义,其原因可能与动物数少、梗死体积变异较大有关。

超短波治疗方法简便、经济、安全,因此具有良好的应用前景,有关其治疗剂量、最佳时机、作用机制及其副作用仍需进一步的研究。

参 考 文 献

- Longa EZ, Weinstein PR, Carson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- 郭万学, 主编. 理疗学. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 219.
- 吴并生. 超短波对家兔肢体再灌注损伤的影响. 中华理疗杂志, 1994, 16: 77.
- 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.

(收稿日期: 2002-10-14)

(本文编辑: 熊芝兰)

· 消息 ·

中华医学会物理医学与康复学分会网站开通

网站建设是学会今年的工作重点之一。去年 11 月在北京召开的学会常委会决定,由广州第一军医大学珠江医院康复科黄国志主任负责学会网站的筹划和建设。在大家的共同努力下,学会网站已于 2003 年 1 月 10 日正式开通。

网站目前设有《新闻动态》、《学会简介》、《继续教育》、《科研动态》、《学术会议》、《康复药械》、《康复论坛》等栏目,分别由学会各位常委或委员负责各栏目的建设和维护。经过近半年的运行,已经有近万人次的本专业人员浏览该网站,许多老专家教授提了极具建设性的意见和建议。

目前,本网站已经成为本专业人员获取专业知识的重要渠道和交流信息的重要平台,网站对本学会的发展正产生越来越重要的影响,对学科的医疗、教学和科研等工作正发挥越来越重要的作用。下一步,本网站将加强康复医学论坛和康复理疗器械数据库的建设和应用。希望大家更多地关注学会网站发展并参与学会网站的建设,共同促进学科的发展。

学会网站网址: <http://www.capmr.org>

学会联系电子邮件: mail@capmr.org; rehab2002@21cn.com

(第一军医大学珠江医院康复科 黄国志供稿)