

He-Ne 激光对脑细胞损伤影响的实验研究

王彤 王红星 厉苏苏 陆晓 王蓓蓓 侯红 宋凡

【摘要】 目的 采用 He-Ne 激光直接照射大鼠颅骨缺损部位的脑组织, 观察 He-Ne 激光对脑损伤早期组织形态学、代谢、功能的影响。**方法** 66 只 Wistar 大鼠随机分为 A、B、C、D、E、F 六组, 均在麻醉下去除部分颅骨制作脑损伤模型。采用波长为 632.8 nm, 输出功率 25 mW 的 He-Ne 激光照射脑组织, 光斑直径 2 cm, 照射距离 70 cm。A、B、C 为即刻观察组; E、F 为 1 周观察组。取损伤侧脑组织和血浆分别测定损伤侧脑组织及血浆中丙二醛(MDA)的含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性; 光镜观察脑组织形态学变化; 评定 1 周观察组大鼠处理前后平衡及支撑时间的改变。**结果** 即刻观察组中各激光照射组与对照组形态观察未见明显差异; 经组间配对 *t* 检验发现, A、B、C 组与 D 组之间进行比较血浆中 MDA 值明显降低 ($P=0.000$), 血浆中 SOD 值无显著性差异; 1 周观察组中治疗组血浆 MDA 值较对照组明显减少 ($P=0.001$), SOD 值较对照组明显增高 ($P=0.001$), 治疗组损伤侧脑组织中 MDA 值也明显低于对照组 ($P=0.001$), 大鼠平衡时间 ($P=0.02$) 和支撑时间 ($P=0.0016$) 较对照组有明显提高。**结论** 不同剂量 He-Ne 激光的即刻照射对大鼠脑组织的形态学改变、脑组织中的 MDA/SOD 和血浆中的 SOD 改变影响不大; 1 周 He-Ne 激光直接照射可降低脑损伤大鼠血浆和脑组织 MDA 含量, 增强血浆中 SOD 的活性, 改善肢体平衡和支撑功能。

【关键词】 脑损伤; He-Ne 激光; 运动功能

Experimental study of the effect of He-Ne laser irradiation on injured brain injuries in rats WANG Tong, WANG Hongxing, LI Susu, LU Xiao, WANG Peipei, HOU Hong, SONG Fan. Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of low-energy He-Ne laser irradiation on the injured brain tissues in rats. **Methods** Models of brain injury were made with sixty-six Wistar rats which were randomly allocated into 6 groups (A-F). The brain tissues of the rats in groups A to C received the He-Ne laser irradiation for 1, 3 and 5 min, respectively, and were observed immediately after the irradiation, while the rats in groups E and F observed one week later, the rats in group D served as control. **Results** There was no significant difference with morphological changes and plasma level of SOD among the rats in groups A to C and those in groups D, but the plasma level of MDA in groups A to C was significantly lower than that in group D ($P<0.001$). After laser treatment, the plasma level of MDA was obviously lower than that of group D ($P=0.001$), while the level of plasma SOD was significantly increased ($P=0.001$). The MDA level in the laser irradiated brain tissues was also lower than that in the control group ($P=0.001$). **Conclusion** He-Ne laser irradiation can reduce the MDA level both in the plasma and injured brain tissues, and increase the activity of SOD in plasma.

【Key words】 Brain injury; He-Ne laser; Motor function

颅脑损伤是导致严重残疾的重要原因之一。损伤早期由于病理变化复杂, 病情危重, 限制了康复治疗手段的介入。

近年来, 有不少报道采用低能量 He-Ne 激光、半导体激光等直接照射脊髓和外周神经治疗外周神经损伤^[1-3], 发现有促进神经生长和修复损伤部位的作用; 另有报道采用 He-Ne 激光血管内照射间接治疗脑外伤^[4-9], 对患者意识改变及肢体功能改善有明显疗效。但到目前为止, 用低能量激光直接照射脑损伤部位促进功能改善的报道甚少^[10-12]。本实验首次尝试用 He-

Ne 激光经颅骨缺损区直接照射动物脑损伤区域, 观察其对脑损伤的即刻效应和阶段效应, 探索 He-Ne 激光照射剂量的安全性和有效性; 同时通过观察脑组织一般形态学和生化指标以及运动功能的改变, 探讨 He-Ne 激光直接照射脑组织治疗脑损伤的可行性和有效性, 为脑损伤早期康复治疗提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物与分组

选择雄性 Wistar 大鼠共 66 只, 体重 200 ± 30 g, 随机分成以下几组: 即刻观察组, 共 32 只, 包括照射 1 min (A 组)、3 min (B 组)、5 min (C 组)、不照射 (D

组)几个亚组,每组均为 8 只;1 周观察组,共 34 只,包括 He-Ne 激光治疗组(E 组)和自然恢复组(F 组)两个亚组,每组均为 17 只。

二、动物脑损伤模型的制作

所有大鼠均接受脑外伤模型的制作^[13]。腹腔注射每公斤体重 2% 氯胺酮 100 mg 麻醉,麻醉后将大鼠固定于操作台上。在无菌条件下,于颅顶中线偏左切开头皮约 2 cm,剥离骨膜后用牙钻(转速 1 万/min)行颅骨钻孔,形成一个 0.6 cm × 0.6 cm 的骨窗,暴露左顶部硬脑膜;然后采用电磁触发的重 20 g 的钢珠于 30 cm 高处自由落下,通过一个圆柱形中介物(直径 0.5 cm)撞击暴露的硬脑膜,造成左顶叶脑挫伤,致伤面积为 0.5 cm × 0.5 cm。即刻观察组在不缝合皮肤的状态下直接进行激光照射,1 周观察组缝合皮肤和局部包扎后按时间接受治疗。

三、激光照射及取材

1. 即刻观察组:在脑损伤模型制作完成 3 h 后,用 He-Ne 激光直接照射颅骨缺损处的脑组织,激光的波长为 632.8 nm,输出功率 25 mW,光斑直径 2 cm,照射距离 70 cm^[14]。照射组分成 A、B、C 三组,分别接受 1、3、5 min 的照射;对照组(D 组)不接受任何治疗。各组动物于同一时间取静脉血 1 ml 后断头处死。在每组前 4 只大鼠脑组织受撞击的中心部位取一块约 2 mm³ 的脑组织作病理切片标本,并分别将每只大鼠的患侧脑进行组织匀浆处理。将每只大鼠所取的静脉血和脑组织匀浆进行丙二醛/超氧化物歧化酶(MDA/SOD)测定。

2. 1 周观察组:在脑损伤模型制作完成后,将大鼠受损部位皮肤进行缝合,局部包扎。激光照射组(E 组)于损伤 24 h 后开始接受 He-Ne 激光治疗,照射功率、直径、距离同上,照射时间为 5 min/次,1 次/d,一共治疗 7 d。治疗前、后进行一般运动功能评定,第 7 天治疗结束后与自然恢复组(F 组)同时处死。标本的采集及测定同前。自然恢复组(F 组)则不接受照射治疗,并与治疗组在同一环境下喂养和监护。E 组中 1 例鼠在手术中因麻醉意外死亡,1 例在治疗的第 2 天死亡;F 组有 2 例鼠在手术中因麻醉意外死亡。

四、检测方法

1. 形态学检查:取即刻照射组大鼠受伤脑组织作 KB 染色(髓鞘染色)和常规 HE 染色。光镜下观察受损部位脑组织的水肿、瘀血、出血、炎性细胞浸润、神经元变性、坏死等情况。

2. MDA/SOD 测定:采用硫代巴比妥酸比色法分别测定损伤侧脑组织、血浆中脂质过氧化(LPO)的最终产物 MDA 的含量,以此作为了解自由基反应的指标;另外用 NBA 还原法测定 SOD 的活性。

3. 运动功能评定:对 1 周观察组中的激光照射组 and 自然恢复组在损伤后第 1 天和第 7 天处死前进行一般运动功能评定,包括①瘫痪肢体数目:以大鼠爬行时肢体在地上拖曳为肢体瘫痪指征;②平衡功能测定:将大鼠置于一直径为 2 cm、长度为 60 cm 的长杆上,观察大鼠停留在长杆上的时间;③支撑功能评定:将洗衣板倾斜 70°固定放置,将大鼠放在洗衣板的凹槽面,观察其停留在板上的时间。

五、数据处理

采用秩和检验和配对 *t* 检验。

结 果

一、形态学变化

1. 即刻观察组:接受激光照射和未接受照射的大鼠脑损伤部位的形态学改变观察结果见表 1。经秩和检验,得 $P > 0.5$,故认为四种处理没有差异。

2. 1 周观察组:激光照射组的 15 只大鼠肉眼观察的结果为:2/3 大鼠的颅骨缺损部位有大量新鲜肉芽组织充填,其中 5 只大鼠与其下方的硬脑膜有粘连;有 4 只鼠的脑组织表面残留瘀血痕迹(最大 10 mm × 10 mm),有 4 只鼠的脑表面不光整,有散在小凹陷。自然恢复组中肉芽组织的形成不如照射组明显,有 7 只鼠的脑组织与其下方的硬脑膜有粘连;有 3 只鼠的脑组织表面残留瘀血痕迹(最大 8 mm × 5 mm),有 8 只鼠的脑表面不光整,有散在小凹陷。

二、He-Ne 激光对 MDA/SOD 的影响

1. 不同剂量 He-Ne 激光直接照射脑组织对 MDA/SOD 的影响见表 2。

表 1 即刻观察组各组形态学改变

分组	肉眼观察(每组 8 只)				光镜观察(每组 4 只)				
	组织饱满	瘀血	出血	水肿	瘀血	出血	炎性细胞浸润	神经元变性	坏死
A 组	8(++)	7(+)	8(+)	4(++)	4(+)	4(+)	-	1(+)	1(+)
B 组	8(++)	8(+)	8(+++)	4(++)	4(+++)	2(+++)	3(+++)	1(+)	-
C 组	8(++)	8(+)	8(+++)	4(++)	4(+)	2(+++)	-	1(+)	-
D 组	8(++)	7(+)	8(+)	4(+++)	4(+)	4(+)	-	1(+)	-

注: + 轻微改变, ++ 明显改变, +++ 明显而广泛的改变

表 2 不同照射时间对大鼠 MDA/SOD 的影响

分组	n	血 浆		损伤侧脑组织	
		MDA	SOD	MDA	SOD
		(nmol/ml)	(nu/ml)	(nmol/ml)	(nu/ml)
非恒定磁场		恒定磁场			
细胞增殖	组别	细胞凋亡	细胞增殖	细胞凋亡	
(×105 个)		(%)	(10 ⁵ 个)	(%)	
A 组	8	10.09 ± 2.42	109.46 ± 13.46	3.23 ± 0.84	92.93 ± 21.84
B 组	8	9.23 ± 3.12	94.21 ± 36.37	5.88 ± 2.81	209.43 ± 184.04
C 组	8	10.04 ± 1.79	91.78 ± 35.48	12.32 ± 7.23	170.06 ± 101.74
D 组	8	17.14 ± 2.35	87.01 ± 33.33	5.05 ± 1.64	151.60 ± 111.50

注:经组间配对 *t* 检验发现,1、3、5 min 照射组(A、B、C 组)与未照射组(D 组)之间进行比较时血浆中的 MDA 值较低且具有高度统计学显著性($P=0.0001$),血浆中 SOD 值差异无显著性意义;5 min 照射组(C 组)与其它各组进行比较,脑组织中 MDA 含量明显增高($P<0.05$);各组之间损伤侧脑组织中 SOD 差异值无显著性意义($P>0.05$)

2. 1 周观察组中 MDA/SOD 的变化

表 3 1 周观察组血浆和脑组织中 MDA/SOD 值的变化

分组	n	血 浆		损伤侧脑组织	
		MDA (nmol/ml)	SOD (nu/ml)	MDA (nmol/ml)	SOD (nu/ml)
E 组	15	6.68 ± 4.13	166.98 ± 29.86	6.68 ± 1.51	130.5 ± 28.77
F 组	15	11.21 ± 2.47	107.38 ± 57.02	9.53 ± 2.47	140.14 ± 32.85
P 值		0.001	0.001	0.001	0.40

表 3 结果显示,1 周观察组中的激光治疗组(E 组)血浆 MDA 值较对照组(F 组)明显降低($P=0.001$),而 SOD 值明显增高($P=0.001$);治疗组损伤侧脑组织中 MDA 值也明显低于对照组($P=0.001$)。

三、He-Ne 激光治疗对运动功能的影响

表 4 1 周观察组达到大鼠肢体运动功能的变化

分组(s)	n	死亡例数	瘫痪肢体	平衡时间(s)	支撑时间
E 组	17	2	20	6.17 ± 2.50	6.20 ± 1.82
F 组	17	2	25	5.00 ± 1.45	4.43 ± 3.77
P 值				0.02	0.0016

He-Ne 激光治疗对大鼠运动功能的影响见表 4。从表中可以看出,1 周照射组大鼠的平衡时间和支撑时间等运动功能指标较对照组有明显提高。

讨 论

近十年来,低能量 He-Ne 激光作为一种物理因子已广泛应用于各种脑血管疾病的治疗,但关于其对脑损伤早期效应的研究甚少。临床和实验研究认为,低能量激光经血管内照射,通过传递光子能量直接作用,可对远隔部位产生影响而导致系统效应^[4]。但光子能量经过血液循环,在传递途中不断衰减,血脑屏障亦会削弱激光照射对脑组织受损部位的作用,加上治疗中多次血管穿刺造成的损伤和交叉感染等问题,因此其疗效尚不确定。国外已有学者直接用 He-Ne 激光

照射颅部。Shen-Zheng 等^[12]在立体定向下,将激光束耦合的光导纤维通过大鼠颅骨上已埋好的两个尼龙套管插入预先选定的脑结构中,籍此将激光束直接导入脑表面,用输出功率 20 mW 的 He-Ne 激光照射大鼠的额叶皮层和尾状核头部,首次尝试了低能量激光直接照射脑组织的实验方法。Cassone 等^[11]研究了 He-Ne 激光直接照射大鼠颅骨对脑组织内单胺类递质的作用。而国内还一直停留在 He-Ne 激光血管内照射。低能量激光血管内照射可改善血液流变学,主要表现在膜的稳定性提高,红细胞变能力增强,血粘度降低;使血浆 SOD 含量增高,MDA 含量降低,脑缺血再灌注时自由基的产生和释放减少;还可阻断脑缺血再给氧引起脑细胞内的钙积聚^[5,6,16-18]。

本实验首次尝试采用与以往 He-Ne 激光血管内照射完全不同的途径,经大鼠颅骨缺损窗口直接照射受损脑组织。结果显示,1 周激光照射能使血浆和脑组织 MDA 含量明显降低,血浆中 SOD 含量明显增加,与血管内激光照射实验研究结果一致^[6]。通过降低 MDA 和增加 SOD,可加速自由基的清除,减弱脂质过氧化过程中产生的醛类化合物的毒性^[19-21],减轻对血管内皮细胞、神经细胞的结构损伤,减轻血脑屏障的破坏,降低血脑屏障的通透性,减轻脑水肿,降低血粘度,预防和减少损伤早期脑组织微血栓的形成;同时还可使脑血管扩张,改善微循环和血液流变学,减轻脑组织缺血缺氧状态,促进损伤脑组织的恢复。这可以解释为什么实验中治疗组 Wistar 大鼠平衡、支撑运动功能的改善较对照组明显($P<0.05$)。至于 He-Ne 激光照射时间的选择,根据即刻观察组所见,可知不同照射时间对鼠脑损伤组织形态学改变、MDA/SOD 的影响不明显。这说明短期照射对脑损伤早期的作用意义不大,而连续性治疗对脑损伤的改善有意义。

由于受到动物模型、设备条件和经费限制,未能增加激光血管内照射组进行比较,这将作为我们下阶段研究的课题。同时,必须指出的是,要将该治疗用于康复临床,还有待于进一步从细胞超微结构变化、细胞生理及生化功能改变等方面进一步探讨 He-Ne 激光照射的作用机理,为临床应用提供更可靠的理论依据。

结 论

不同剂量 He-Ne 激光的即刻照射对鼠脑组织的形态学改变、脑组织中 MDA/SOD 和血浆中的 SOD 改变影响不大;而 1 周 He-Ne 激光治疗可降低脑损伤大鼠血浆和脑组织中 MDA 含量,增强血浆中 SOD 的活性,促进鼠平衡与支撑功能的改善。

参 考 文 献

- 1 刘珊林,施冬云,王如瑶,等. 半导体激光光针对大鼠神经递质和血浆丙二醛的影响. 中国激光医学杂志,1998,7:134-137.
- 2 王冰水,李玲,易南,等. 氦-氖激光照射对大鼠神经损伤后脊髓内生长相关蛋白表达的影响. 中华物理医学与康复杂志,2000;22:89-90.
- 3 王冰水,易南,李玲,等. 低功率半导体激光照射对大鼠神经损伤后脊髓降钙素基因相关肽表达的影响. 中国康复医学杂志,2000;15:68-71.
- 4 戚少华. 低能量氦-氖激光血管内照射对脑梗死患者血液流变学及血脂的影响. 中华物理医学与康复杂志,1999,21:189.
- 5 董为人,王铁人,王东海,等. 低能量 He-Ne 激光血管内照射对血液流变学性质影响的实验研究. 激光杂志,1992,13:100-101.
- 6 夏绪刚,郑华,邢永前,等. 氦-氖激光血管内照射对急性脑血栓患者血浆 GMP-140、MDA、SOD 含量的影响及康复. 中华物理医学与康复杂志,1999,21:160-161.
- 7 董为人,肖应庆,程洁奎,等. 血管内激光照射血液综合治疗脑血管病. 激光杂志. 1997,18:56-58.
- 8 陈健东. 急性颅脑损伤早期血管内激光照射治疗 37 例. 广州医学院学报,1999,27:43-46.
- 9 黄东健,李文斌,郭宝平. 低能量血管内激光照射治疗脑损伤的免疫功能变化与研究. 广州医学院学报,1997,25:46-50.
- 10 高惠珍,伍期专,石福明,等. 低强度激光照射对小鼠脑组织单胺类递质含量的影响. 中国激光医学杂志,1999,8:36-38.
- 11 Cassone MC, Lombard A, Rossetti V, et al. Effect of in vivo He-Ne laser irradiation on biogenic amine levels in rat brain. J Photochem Photobiol, 1993,18:291-294.
- 12 Shen-Zheng, Xiao-Jian, Lin-Shu-Zhi, et al. Effects of a low power laser beam guided by optic fiber on rat brain striatal monoamines and amino acids. Neurosci Lett, 1982,32:203-208.
- 13 刘卫平,易声禹,章翔,等. 大鼠急性颅脑损伤后早期脑微血管改变的形态学研究. 中华神经外科杂志,1996,12:46-49.
- 14 杨杰,夏家骝,聂培力,等. 氦-氖激光对真皮下血管网皮瓣的影响. 中华理疗杂志,1997,20:134-136.
- 15 于新. 脑损伤和脑水肿的氧自由基作用和超氧化物歧化酶的治疗作用. 国外医学神经病学神经外科学杂志分册,1994,21:128-131.
- 16 冯加纯,饶明俐,张淑琴,等. 大鼠全脑缺血再灌后几个脑区在不同时间的 LPO、SOD、GSH-Px 含量变化. 中风与神经疾病杂志,1994,11:129-132.
- 17 王强,吴翠娇,金丽英,等. 低强度氦-氖激光辐照血液对实验性家兔微循环障碍影响的形态学研究. 临床神经病学杂志,1998,11:201-203.
- 18 易声禹,只达石,主编. 颅脑损伤诊治. 北京:人民卫生出版社,2000.295.
- 19 田有勇,叶飞,章军建,等. 氦-氖激光血液照射对急性脑梗死患者白细胞变性能力及粘附功能的影响. 中华物理医学与康复杂志,2000,22:217-219.
- 20 Vertisnow VA, Sopromadze MA. Laser irradiation of blood in surgery. KHIR, 1991,1:12-14.
- 21 Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. IEEE J Quantum Electronics, 1987,23:703.

(收稿日期:2001-08-14)

· 读者·作者·编者·

您的论著摘要符合本刊要求吗?

本刊论著须附中英文摘要,摘要必须包括目的、方法、结果、结论四个部分,并标引 2~5 个关键词。此外,一个合乎本刊要求的导读性强的摘要尚须注意以下问题。

1. 中文摘要 250 左右,英文摘要 400 个实词左右。
2. 采用第三人称撰写,不用“本文”等主语。
3. 结果部分只进行描述性陈述是远远不够的,还应该给出主要的数据资料。
4. 英文摘要题录部分应包括文题(仅第一个单词首写字母大写)、所有作者的姓名(汉语拼音,姓每个字母均大写,名字仅首字母大写)、第一作者工作单位名称;所在城市名、邮政编码及国名。例如: **The effects of Piper Futokadsura Neoligans on ICAM-1 and mRNA expression in brain following focal cerebral ischemia in rats** WANG Wei*, WANG Xuesong, RUAN Xuzhong, LIAO Weijing. * Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
5. 关键词标引请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版《Index Medicus》中医学主题词表(MeSH)内所列的词。如其中尚无相应的词,则可根据树状结构表选用最直接的上位词,必要时采用惯用的自由词并排列于最后。各词间用“;”分隔,英文关键词首字母大写。

《中华物理医学与康复杂志》编辑部