

·基础研究·

# 不同物理因子对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用的研究\*

汪 薇<sup>1</sup> 张立新<sup>2,4</sup> 张志强<sup>3</sup> 苑秀华<sup>2</sup>

**摘要 目的:**通过观察不同物理因子对大鼠脑缺血再灌注后脑梗死体积,脑组织中B细胞淋巴瘤-x1及肿瘤坏死因子- $\alpha$ 表达的影响,比较不同物理因子对脑缺血再灌注损伤后的保护作用并初步探讨其作用机制。**方法:**用线栓法制备一侧大脑中动脉栓塞再灌注大鼠模型,造成大鼠右脑缺血2h再灌注24h,采用Zea-Longa 5级评分法评定神经功能缺损程度来筛选实验用鼠。大鼠按体重随机分成假手术组、对照组及超短波组,电刺激组,旋磁组。所选大鼠均于再灌注24h后断头取脑,分别测定脑梗死灶体积、脑组织中Bcl-x1及TNF- $\alpha$ 的表达。**结果:**与对照组比较,超短波组及电刺激组的梗死体积均缩小,差异有显著性意义( $P<0.05$ ),而旋磁组未见梗死体积的显著缩小。与对照组比较,各治疗组脑组织中Bcl-x1表达增加,TNF- $\alpha$ 水平降低,均具有显著性意义( $P<0.05$ )。**结论:**超短波及电刺激治疗均可通过增加Bcl-x1表达降低TNF- $\alpha$ 水平而抑制脑神经细胞凋亡,挽救半暗带,缩小脑梗死灶体积,从而保护脑缺血再灌注后神经损伤,而旋磁治疗抑制凋亡的作用明显,而缩小梗死体积的作用不明显可能与实验动物数量少有关。

**关键词** 超短波;电刺激;旋磁;脑缺血再灌注损伤;作用机制

中图分类号:R454.1,R454.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-08-0694-03

**Study of comparing the protective effects of different physical modalities on cerebral ischemia-reperfusion injury of rats/WANG Wei,ZHANG Lixin,ZHANG Zhiqiang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(8):694-696**

**Abstract Objective:** To observe the effects of different physical modalities on infarction volume,the expressions of B cell lymphocytoma-x1(Bcl-x1) and tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ ) after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and to compare their protective effects and discuss their action mechanisms. **Method:** Focal ischemia-reperfusion model was established in rats with reversible right middle cerebral artery occlusion with filament. Right cerebral ischemia was for 2 hours and then with 24 hours reperfusion. The severity of neurological deficits were evaluated by Zea-Longa 5-grade scoring to select experimental rats. After surgery,the rats were divided into 5 groups:sham operation group, control group,ultrashortwave treatment group, electrical stimulation treatment group and rotated magnetic field treatment group. **Result:** Forty-five rats were involved in the analysis of results: ①Compared with control group, in ultrashortwave treatment group and electrical stimulation treatment group the infarction volume reduced, the differences were significant ( $P<0.05$ ), but in rotated magnetic field treatment group that was not. ② Compared with control group, the expressions of Bcl-x1 in all treatment groups elevated, but the expressions of TNF- $\alpha$  reduced, the differences were significant ( $P<0.05$ ).**Conclusion:**Ultrashortwave and electrical stimulation therapy can protect cerebrum from ischemia-reperfusion injuries and enhance the therapeutic effects by elevating the expression of Bcl-x1 and reducing the level of TNF- $\alpha$  to inhibit neuron apoptosis, saving ischemic penumbra and reducing infarction volume. The rotated magnetic field therapy has significant effect on inhibiting neuron apoptosis.

**Author's address** Experimental Technology Center, China Medical University, Shenyang, 110001

**Key words** ultrashortwave;electrical stimulation;rotated magnetic field;cerebral ischemia-reperfusion injury;action mechanism

脑血管病是老年人常见病、多发病、病死率较高,病后约3/4的存活者留有残疾,致残率极高<sup>[1]</sup>,其中又以急性脑梗死为多见,虽然治疗方法多样,但都有其局限性。近年来,物理因子辅助治疗急性脑梗死已逐渐引起人们的关注。

以往研究显示,许多物理因子对大鼠脑缺血再灌注损伤均有脑保护作用。但由于各实验条件(动物模型及物理治疗时机)的不同,物理因子中哪种疗效优、作用强、副作用小等多因素比较的研究较少,因

此本实验的目的是为比较在同一实验条件下不同物理因子的疗效并初步探讨其作用机制,为临床应用提供理论基础。

\* 基金项目:辽宁省教育厅科学技术研究项目(20061007)

1 中国医科大学实验技术中心,沈阳,110001

2 中国医科大学附属第一医院康复医学科

3 中国医科大学附属第二医院康复科

4 通讯作者

作者简介:汪薇,女,副主任技师

收稿日期:2008-01-18

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型的制备

参照 Zea-Longa 等<sup>[2]</sup>报道的方法进行改良建立局灶性脑缺血再灌注模型。室温 20—25℃下, 用 10%的水合氯醛(350mg/kg 体重, ip)麻醉大鼠成功后, 使之仰卧固定, 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 ICA 及 ECA 分叉处结扎 ECA, 并结扎 CCA 近心端。在距颈动脉分叉约 0.5cm 处 CCA 上刺一小口, 将直径 0.26mm、长 5cm 的尼龙鱼线经 CCA 插入 ICA, 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 CCA 分叉处 17—20mm, 致稍有阻力感, 动脉出血停止。然后将栓线结扎固定于 CCA 上, 逐层缝合至皮肤。于阻塞动脉 2h 后将尼龙线拔出, 形成再灌注, 24h 后断头取脑。

### 1.2 动物分组

选用中国医科大学实验动物中心提供的健康 Wistar 大鼠 85 只, 雌雄不拘, 体重 270—320g, 2.5—3 月龄。模型入选标准为 Zea-Longa 5 级评分法评分 2 分, 即行走时向病灶对侧转圈。造模后去除死亡及评分不足 2 分的 40 只大鼠, 剩余 45 只大鼠按体重分层随机分为: ①空白对照组(n=5): 一切步骤处理同模型制备, 只是插线深度小于 10mm。②对照组(n=10): 模型制备成功后, 不给予任何治疗。③超短波组(n=10); ④电刺激组(n=10); ⑤旋磁组(n=10)。后 3 组为模型制备成功后, 于脑缺血再灌注 18h 后分别给予小剂量超短波治疗 10min、经皮电刺激治疗 10min 及旋磁场治疗 10min。其中空白对照组只检测脑组织 B 细胞淋巴瘤-x1(B cell lymphocytoma-x1, Bcl-x1) 及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 表达, 其余各组分别取 5 只大鼠检测脑梗死体积、脑组织 Bcl-x1 及 TNF- $\alpha$  表达。

### 1.3 治疗方法

超短波组: 用上海电子仪器厂生产的五官超短波治疗机, 频率为 40.68MHz, 最大输出功率为 40W, 调谐后第 1 档输出功率约为 11W。电极直径 4cm, 对置于鼠脑两侧, 电极表面距鼠头皮约 2cm。于脑缺血再灌注后 18h 治疗 10min。

电刺激组, 用电流频率 100Hz, 强度 1.0mA, 时程 0.5ms 的直角方波脉冲电流, 直径 0.5cm 的圆形电极, 脑缺血再灌注后 18h 放于大鼠两侧耳后(通过小脑所在位置)治疗 10min。

旋磁组采用旋磁治疗器, 磁头直径 6cm, 磁头含两枚直径为 1.5cm 的磁柱, 异名极并置, 两极中心距

离 2.7cm, 表面磁场强度 0.09T, 旋转速度 2500r/min, 磁头距鼠头皮约 0.6cm, 磁头对准病灶侧脑。于脑缺血再灌注后 18h 治疗 10min。

### 1.4 观测指标

1.4.1 脑梗死体积的测定: 大鼠再灌注后 24h 处死, 断头取脑, 自额极向后每 2mm 作冠状切片至大脑小脑裂, 将切片立即置于 2%红四氮唑缓冲液中 37℃避光恒温孵育 30min, 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(生产厂: UZC/OLYMPUS, US/JP) 图像分析系统计算脑梗死体积。

1.4.2 免疫组化染色及结果分析: 各组于再灌注后 24h 以 10%水合氯醛(350mg/kg 体重, ip)麻醉成功后, 迅速开胸, 剪开右心房, 于心尖部插管, 注入 100ml 生理盐水后, 再注入 4%多聚甲醛 100ml 灌注固定, 断头取脑, 取视交叉凹处 2mm 脑片入 4%多聚甲醛固定 24h, 常规石蜡包埋, 切片厚 5 $\mu$ m, 采用第二代免疫组化 EfvisionTMpfus 广谱试剂盒(购于福州迈新公司)进行免疫组化染色, 一抗(Bcl-x1, TNF- $\alpha$  滴度 1:100(购于武汉博士德公司)。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 图像分析系统分析综合光密度均值(integrated optical density average, IODA)。

### 1.5 统计学分析

使用 SPSS10.0 统计分析软件, 各组数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 数据处理用方差分析, 组间差异比较用 Student-t 检验分析。

## 2 结果

### 2.1 脑梗死体积测定及分析

超短波组与电刺激组脑梗死体积百分比小于对照组, 差异具有显著性( $P < 0.05$ ), 旋磁组梗死体积百分比虽小于对照组, 但差异无显著性( $P > 0.05$ ), 假手术组未发现梗死灶。4 组的脑梗死体积百分比从大到小的顺序为对照组 > 旋磁组 > 超短波组 > 电刺激组, 显示出电刺激治疗优于超短波组及旋磁组, 见表 1。

### 2.2 组织学观察

2.2.1 肉眼观察: 对照组大体标本检查见病灶侧半球脑水肿明显, 颜色苍白, 脑沟、脑回模糊不清, 组织较脆, 呈豆腐渣样; 治疗组大脑病灶侧半球水肿轻微, 沟回清楚, 脑表面无出血。

2.2.2 光镜下观察: 5 $\mu$ m 苏木精和伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色, 对照组病灶侧淡染区广泛, 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; 治疗组淡染区小且不明显, 水肿轻

表1 各组脑梗死体积占全脑体积的百分比、患侧脑 TNF- $\alpha$  及 BCL-XL 表达的积分光密度值 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别   | 动物数 | 脑梗死体积百分比(%)                   | TNF- $\alpha$ 表达             | Bcl-xl 表达                     |
|------|-----|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 对照组  | 10  | 14.98 $\pm$ 5.92              | 11.11 $\pm$ 1.85             | 8.96 $\pm$ 1.90               |
| 超短波组 | 10  | 7.97 $\pm$ 3.21 <sup>①</sup>  | 6.97 $\pm$ 2.30 <sup>①</sup> | 12.97 $\pm$ 2.67 <sup>①</sup> |
| 电刺激组 | 10  | 4.95 $\pm$ 3.11 <sup>①</sup>  | 7.13 $\pm$ 2.40 <sup>①</sup> | 12.65 $\pm$ 2.11 <sup>①</sup> |
| 旋磁组  | 10  | 10.33 $\pm$ 4.73 <sup>②</sup> | 6.77 $\pm$ 2.31 <sup>①</sup> | 13.55 $\pm$ 2.84 <sup>①</sup> |
| 假手术组 | 5   | -                             | 3.45 $\pm$ 2.21              | 4.74 $\pm$ 2.20               |

与对照组相比:① $P<0.05$ ,② $P>0.05$

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 $\mu$ m 免疫组化染色,Bcl-xl、TNF- $\alpha$  阳性反应定位于胞浆,呈黄色或棕黄色颗粒。对照组病灶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;治疗组于缺血半暗带区见 Bcl-xl 阳性表达细胞数明显增多,TNF- $\alpha$  阳性表达细胞数明显减少。假手术组切片可见淡黄色阳性表达细胞散在分布(图 1—10,见前置彩色插页 6)。对照组的 Bcl-xl、TNF- $\alpha$  阳性表达明显高于假手术组。

### 3 讨论

缺血性脑卒中后,部分血管再通或溶栓治疗后血流恢复引起再灌注损伤是由多种致病机制共同作用、互相促进的结果。在实验性卒中研究中,常以能否挽救或减少半暗带内的细胞凋亡来判断某一疗法的有效性。Bcl-xl 是抑制细胞凋亡的主要基因,能抑制大多数凋亡的过程<sup>[3,4]</sup>,因此,本研究选择 Bcl-xl 指标来观察超短波能否通过增加其表达起到脑保护作用。实验结果表明,各治疗组脑组织 Bcl-xl 表达均明显高于对照组,差异具有显著性( $P<0.05$ )。说明超短波、电刺激及旋磁治疗均可通过提高抑制细胞凋亡的基因表达,来对脑缺血再灌注损伤起到脑保护作用,这与以往的研究一致<sup>[5]</sup>。

TNF- $\alpha$  是一种炎性介质,其被认为与急性脑血管病的发生、发展及预后密切相关。正常情况下,机体内存在较低水平的 TNF- $\alpha$ ,可促进肿瘤细胞的凋亡,如在体内大量产生和释放 TNF- $\alpha$  则会产生多种病理损伤。有研究发现<sup>[6]</sup>,在短暂性大脑中动脉缺血模型的缺血再灌注早期即可观察到 TNF- $\alpha$  水平增高。Yang 等<sup>[7]</sup>应用 TNF- $\alpha$  单克隆中和抗体者能明显缩小小鼠缺血再灌注后脑梗死体积。Barone 等<sup>[8]</sup>发现,脑室内注射 TNF- $\alpha$ ,梗死体积增大,而在缺血前 0.5h 及缺血后 3—6h 单独注射单克隆 TNF- $\alpha$  抗体,可阻断内源性 TNF- $\alpha$  活性,显著减轻脑缺血再灌注损伤,缩小梗死体积,可见在脑缺血早期,TNF- $\alpha$  参与再灌注损伤,对脑组织有损害作用。许多国内

外学者<sup>[9—10]</sup>认为抑制 TNF- $\alpha$  炎性细胞因子增加会起到脑保护作用。本研究发现 3 个治疗组 TNF- $\alpha$  表达明显低于对照组,差异具有显著性( $P<0.05$ ),而 3 个治疗组间比较差异不显著( $P>0.05$ ),说明超短波、电刺激及旋磁治疗均可通过降低炎性细胞因子表达,来对脑缺血再灌注损伤起到脑保护作用。

本研究发现大鼠在缺血 2h 再灌注 18h 时给予三种物理因子治疗均能缩小脑梗死灶体积,电刺激治疗最显著,而旋磁治疗虽有数值上的减小,但在统计学上无显著性差异,提示在缩小脑梗死体积上电刺激疗效最佳,其次是超短波治疗,而旋磁治疗效果最差,这也许与治疗剂量或实验动物的数目较少有关,有待进一步研究。

经皮电刺激小脑、小剂量超短波、旋磁治疗不仅可通过减少梗死半球脑含水量及自由基产物-丙二醛含量,提高超氧化物歧化酶水平而对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用<sup>[9]</sup>,而且可以通过增加 Bcl-xl 表达降低 TNF- $\alpha$  水平而抑制脑神经细胞凋亡,挽救半暗带,缩小脑梗死灶体积来保护大鼠缺血再灌注后神经损伤,从而提高治疗效果,其中以经皮电刺激治疗效果最显著。

### 参考文献

- [1] 朱铺连. 急性脑血管病早期康复机不可失 [J]. 中华内科杂志, 1997,36(12):840—842.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Canson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989;20(1):84—91.
- [3] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death [J]. Am J Pathol, 1995,146(1):3—15.
- [4] Rodriguez I, Matsuura K, Khatib K, et al. A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection [J]. Exp Med, 1996,183(3):1031—1035.
- [5] 梁维娣, 张志强. 超短波和旋磁对局灶性脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(4):225—228.
- [6] Buttini M, Appel K, Sauter A, et al. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischemia in the rat [J]. Neuroscience, 1996,7(1):1—16.
- [7] Yang GY, Gong C, Qin Z, et al. Inhibition of TNF- $\alpha$  attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain [J]. Neuro-report, 1998,9(9):2131—2144.
- [8] Barone FC, Arvin B, White RF, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ . A mediator of focal ischemic brain injury [J]. Stroke, 1997,28(6):1233—1244.
- [9] Zhang M, Ma YF, Gan JX, et al. Basic fibroblast growth factor alleviates brain injury following global ischemia reperfusion in rabbits [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2005,6(7):637—643.
- [10] Williams AJ, Dave JR, Tortella FC. Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration [J]. Neurochem Int, 2006,49(2):106—112.