

# 低声压级次声对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响

李 川<sup>1</sup> 范建中<sup>1</sup> 吴红瑛<sup>1</sup> 魏 轶<sup>1</sup>

**摘要 目的:**研究低声压级次声对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响。**方法:**用线栓法制备右侧大脑中动脉脑缺血模型。以 Infrasonic 8<sup>TM</sup> 次声治疗仪产出的次声作为处理因素。将 64 只大鼠随机分为 3 组,分别为假手术组(n=16)、模型组(n=16)、次声组(n=32),次声组按每天作用时间分为 20min 组及 120min 组,每组 16 只大鼠。动态观察(第 2 小时、1 天、3 天和 7 天)各组神经功能状态,7d 后大鼠断头取脑,每组中的 8 只用于 HE 染色,另外 8 只用于 TTC 染色以测定脑梗死相对体积。**结果:**与模型组相比,次声 120min 组神经症状改善明显 ( $P<0.05$ ),脑梗死体积缩小 ( $P<0.05$ ),病理损伤减轻。**结论:**低声压级次声(120min/d,7d)对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

**关键词** 次声;局灶性脑缺血;缺血再灌注损伤;大鼠

中图分类号:R454,R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-05-0419-04

**Effects of infrasound with low sound pressure level on rats with cerebral ischemia-reperfusion injury/LI Chuan, FAN Jianzhong, WU Hongying, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(5):419-422**

**Abstract Objective:**To study the effects of infrasound with low sound pressure level on rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. **Method:** Focal cerebral ischemia model in rats was produced by 2h occlusion of middle cerebral artery. Infrasound generated by infrasonic 8<sup>TM</sup> device was treated as treatment factor. Sixty-four SD rats were divided into three groups: sham group (n=16), model group (n=16) and infrasound group (n=32); the latter group was subdivided into 20- and 120-min infrasound group, with 16 rats in each group. Neurological symptoms were assessed at the 2nd h, 1st d, 3rd d and 7th d respectively. These rats were sacrificed at the 7th d and rats' brains were taken out. Half of each group was used in HE stain, another half was used in calculating cerebral ischemia relative volume by TTC stain. **Result:** Compared with model group, in 120-min infrasound group neurological symptoms improved significantly ( $P<0.05$ ), the cerebral ischemia volume was significantly smaller ( $P<0.01$ ), and pathological damages were also lessen. **Conclusion:** Infrasound with low sound pressure level (120min/d, 7d) played neuroprotective role in cerebral ischemia-reperfusion injury.

**Author's address** Department of Rehabilitation Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510515

**Key words** infrasound; focal cerebral ischemia; ischemia-refusion; rat

次声波是频率为低于 20Hz 的弹性波,它是由物质的机械振动产生,本质上与声波、超声一样同为机械波。从以往的研究来看,长时间、高声压级的次声对生物体的损伤作用是比较明确和肯定的,各系统中以中枢神经系统对次声最为敏感<sup>[1]</sup>。有报道低声压级次声可通过轻柔的共振作用,改善局部循环,增加细胞活力,对生物体产生有利作用<sup>[2]</sup>。本实验采用大脑中动脉阻塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)制备脑缺血再灌注模型,观察低声压级次声对大鼠缺血性脑损伤的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 动物:**健康 SD 大鼠 64 只,雌雄各半,体重 250—330g,南方医科大学实验动物中心提供,室温、

常湿饲养,普通饲料,自由饮水。质量合格证号:SCXK(粤)2006A051。

**1.1.2 试剂和仪器:**TTC 试剂由美国 MBCHEM 公司提供;次声治疗仪 Infrasonic 8<sup>TM</sup> 由美国 CHI 公司研制;日产 Olympus 光学显微镜;Olympus 数码相机;病理图文软件系统由技易软件科技有限公司研制。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物分组:**将 64 只大鼠随机分为 3 组,为假手术组(n=16)、造模组(n=16)、次声组(n=32),次声组按每天作用时间又分 20min 和 120min 组,每组 16 只。次声处理组于再灌注损伤 6h 后始干预,每天作用 1 次,时间 20min 或 120min,观察 7d。期间动态

1 南方医科大学南方医院康复医学科,广东,广州,510515

作者简介:李川,男,在读硕士,住院医师

收稿日期:2008-09-16

观察(第2小时、第1天、3天和7天)各组神经功能状态,7d后各组大鼠全部处死,每组中的8只用于HE染色,另外8只用于脑梗死面积测定。

**1.2.2 次声信号参数和处理方法:**次声治疗仪 Infrasonic 8™ 主要由次声声头和主机两部分组成,主机面板上的输出档位分为3种次声频率及强度组合档,本实验用3档进行处理。采用第四军医大学等单位研制的“便携式野外低频信号实时测试智能分析系统”对实验中的次声信号测试结果显示,该仪器在3档时,输出次声频谱主要集中在4—20Hz,次声主频信号的频谱是随机变化的,声强79.75—86.11dB<sup>[3]</sup>。

采用质地较硬的塑料瓶固定大鼠,固定架固定次声声头,使之垂直于大鼠头部,次声发射头与大鼠头部的距离3—4cm。

### 1.3 动物模型制作

参照廖维靖等<sup>[4]</sup>报道的在大脑中动脉线栓方法制备大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型。大鼠用10%水合氯醛(0.35ml/100g体重)腹腔注射麻醉,动物仰卧位固定于手术台上,颈部正中切口,长1.6—1.9cm,暴露右侧颈总动脉和颈外动脉,5/0丝线结扎颈外动脉,分离与颈总动脉伴行的迷走神经,在距颈总动脉分叉处近端0.5—0.6cm处结扎颈总动脉,在结扎线的远端,置丝线备用。用微小动脉夹夹闭备用线远端的颈总动脉,在备用线的近端用眼科剪剪一小切口,将尼龙线栓送入切口,向上推至动脉夹处,将备用线扎紧,随即松开动脉夹,将线栓沿颈总动脉,颈内动脉顺行向上插入至大脑中动脉起始部,遇阻力时停止。从颈总动脉分叉处计算插入深度(18—20)mm,造成大脑中动脉血供阻断,缺血2h后,用乙醚再次麻醉,将线栓后拔退至颈总动脉,即恢复大脑中动脉的血供。造模时室温保持在20—30℃,肛温维持在(37±0.5)℃,术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒,自由饮水、进食,必要时用滴管给动物喂水,湿润鼻部和眼部。

假手术组:不插入尼龙线,余过程同前。

纳入及剔除标准:在规定缺血时限内(术后2—3h)按 Zeal Longa<sup>[5]</sup> 5分制评分标准评分:0分,无神经损伤症状;1分,不能伸展对侧前爪;2分,向外侧划圈;3分,向对侧倾倒;4分,不能自发行走,意识丧失。1分以上视为成功。如未出肢体瘫痪(0分)或已死亡的动物被剔除。采用差额补充的方法以保证每组的实验例数。

### 1.4 神经功能评分标准

按 Zeal Longa 5分制评分标准评分。

### 1.5 标本制作

各组动物到达预定时间后,用水合氯醛深麻醉动物(0.8ml/100g体重),用经处理后头端较钝的16号针头穿刺入左心室至主动脉起始部,眼科剪剪开右心耳,先用100ml生理盐水快速冲洗体内血液,续用10%中性福尔马林400ml进行灌注固定,断头取脑,在视交叉前后1—3mm之间取脑片,用同一固定液后固定6—8h。进行常规脱水、透明、石蜡包埋,冠状切片,片厚5μm,备用。

### 1.6 HE染色

石蜡切片常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗,入苏木素染色5min,自来水冲洗,70%的盐酸乙醇分色30s,水洗后酸化伊红复染2min,水洗,脱水、透明、中性树胶封片。

### 1.7 脑梗死相对面积

各组到预定的时间后断头取脑,在-20℃冰箱冰冻20min,从额极开始间隔约2mm冠状切片,切成约7片。去掉嗅球、小脑和低位脑干,迅速将脑片置于2%TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑,triphenyltetrazoliumchloride)染液中,室温避光温孵30min再取出,置于10%甲醛液中过液。经染色后非缺血区为玫瑰红色,梗死区为白色。

对经TTC染色的脑组织切片数码摄像后,用病理图文分析软件测量照片上缺血部分面积占整个脑组织总面积的百分比(%)。

### 1.8 统计学分析

资料由SPSS11.5软件处理。神经功能评分、脑梗死相对面积实验数据采用均数±标准差表示。神经功能评分按重复测量方差分析方法比较多组间差异,即先经球形检验齐性后行LSD多组比较。脑梗死相对面积按单因素方差析比较多组间差异,即先行方差齐性检验齐性LSD多组比较。 $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 神经功能评分

假手术组均为0分,模型组与次声组大鼠麻醉清醒时均出现不同程度的左侧肢体活动障碍。组别和时间之间存在交互效应( $F=8.258, P<0.05$ )。从单独效应分析,各时间组存在显著性差异( $P<0.001$ ),3d后症状逐渐减轻( $P<0.01$ );各组间比较有显著差异( $P<0.05$ ),次声120min组明显改善神经功能症状,与模型组比较有显著性意义( $P<0.05$ ),次声20min组改善神经功能症状不明显,与模型组比较无显著性意义( $P>0.05$ )(表1)。

## 2.2 脑梗死相对面积

见表2。假手术组未出现梗死灶,其他三组均出现不同程度的梗死灶。与模型组比较,次声120min

组梗死灶明显缩小( $P<0.05$ ),而次声20min组梗死灶无明显差异( $P>0.05$ )。见图1(见彩色插页)。

## 2.3 HE染色

表1 低声压级次声对神经功能的影响

( $\bar{x}\pm s, n=16$ )

组别	各时间点				合计	P
	第2小时	第1天	第3天	第7天		
模型组	2.06±0.68	2.13±0.81	1.94±0.85	0.88±0.81	1.75±0.95	
次声20min组	2.38±0.62	2.50±0.73	1.81±0.83	0.93±0.77	1.91±0.95	1.000
次声120min组	2.19±0.66	2.19±0.54	1.25±0.68	0.25±0.45	1.45±1.00	0.0372 <sup>①</sup>
合计	2.21±0.65	2.27±0.71	1.67±0.83	0.68±0.79	1.67±1.15	( $F=2.556, P=0.042$ ) <sup>*</sup>
P		0.235	0.000 <sup>②</sup>	0.000 <sup>②</sup>	( $F=52.471, P=0.000$ ) <sup>*</sup>	( $F=8.258, P=0.001$ ) <sup>#</sup>

\* 主效应的F统计量和P值;# 交互效应的F统计量和P值。与模型组比较:① $P<0.05$ ;与2h比较:② $P<0.01$

表2 低声压级次声对脑梗死面积的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	脑梗面积*	P值
模型组	26.33±2.39	
次声20min组	25.59±5.96	0.783
次声120min组	19.91±6.99	0.026 <sup>①</sup>

与模型组比较:① $P<0.05$ ; \* 缺血部分面积占整个脑组织总面积的百分比

分别在低倍镜(200)和高倍镜(1000油镜)下观察各组缺血半暗带区域,低倍镜重点观察组织结构和细胞的变化,高倍镜重点观察残存神经元胞质尼氏体的变化。

假手术组可见形态结构清楚,神经元细胞数目多,细胞排列规整,核深染,核膜清晰,核仁明显。高倍镜下可见神经元胞浆丰富,呈灰蓝色斑块状,表明尼氏体丰富(图2a、2A见彩色插页)。

模型组半暗带缺血区可见组织结构紊乱、疏松,胶质细丝稀疏,胶质细胞稍增生,数量增多,神经元细胞正常形态消失、部分神经元细胞核固缩,胞体缩小变形,残留的神经元细胞周围间隙增宽,胞质红染、均匀,可见鬼影细胞。边缘区在低倍镜下可见较多形态大致正常的神经元细胞,胶质细胞无明显增生,胶质细丝丰富。在高倍镜下可见边缘区神经元胞浆染色淡染或消失(尼氏小体减少或消失)(图2b、2B见彩色插页)。

次声20min组与模型组差异不大,缺血区组织结构紊乱,胶质细胞增生,神经元细胞正常形态消失,可见残留萎缩的红色神经元细胞。泡沫细胞增多,可见噬神经现象。边缘区神经元细胞较多形态无明显异常,胶质细胞无明显增生。在高倍镜下可见边缘区神经元胞浆蓝染颗粒状物质基本消失(图2c、2C见彩色插页)。次声120min组半暗带缺血区胶质细胞增生更加明显,可见泡沫细胞和噬神经现象。边缘区:在高倍镜下可见边缘区神经元胞浆蓝染明显,颗粒物质明显增多,表明尼氏体丰富(图2d、2D,见彩色插页)。

## 3 讨论

次声的生物效应与其参数(声压、频率等)有关,

一定声压级的次声对机体多个系统产生损伤作用,我们课题组前期研究发现:8Hz、130dB次声暴露14d(2/h)可引发小鼠大脑皮质的脂质过氧化,给小鼠造成一定的损伤<sup>[9]</sup>。低声压级次声在一定的环境中不会产生明显的损伤效应甚至出现正性的作用,次声治疗仪Infrasound 8<sup>TM</sup>产生的次声强度均低于90dB且频率在次声频谱内随机波动,在国外它已广泛运用于临床,其功效主要见于临床报道,基础研究并不多见。国内早期曾报道某型次声治疗仪对小儿厌食症有较好的疗效,但未提及的次声具体参数<sup>[10]</sup>。有人利用次声治疗仪动态观察对HL-60人白血病细胞株生长的影响,发现次声治疗对离体肿瘤细胞的凋亡影响不明显<sup>[11]</sup>。国外报道利用频率8~12Hz,强度72—79dB的次声治疗仪作用神经胶质瘤细胞,发现次声本身对神经胶质瘤细胞无明显作用,但与5-氟尿嘧啶联用后,可以改变肿瘤细胞的通透性,说明次声可增强5-氟尿嘧啶对神经胶质瘤细胞的杀伤力<sup>[12]</sup>。目前尚无低声压级次声对脑缺血再灌注损伤影响的报道。

临床上大多数脑梗死以大脑中动脉阻塞为主,局部脑缺血发生后,由于溶栓治疗或侧支循环的建立,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。采用线栓法制成可逆的一侧大脑中动脉脑梗死动物模型,较好地模拟临床,为研究低声压级次声对脑缺血再灌注损伤作用提供较理想的实验模型。我们在实验中发现模型组与次声组大鼠在3d后神经功能症状均有改善趋势,次声120min组较为明显,提示脑缺血后内源性保护机制发挥作用,同时低声压级次声亦存在神经保护作用。

次声的作用原理是生物共振,低声压级(通常90dB以下)次声与生物体可产生轻微共振,其产生的力学、热学、光学、电学等物理效应作用缓慢而轻柔,不仅对生物体不产生损伤,还可以对生物产生深部按摩作用,这种能量形式可以达到任何组织和细胞,对生物组织有益。由于次声的频率低,不容易被吸

收;波段长,不易被阻挡,传播中几乎无衰减,因此,能在人体内很好的传播,穿透病态组织(细胞)内,使病态组织内闭塞的血管重新开放,并推动其血液流动,改善病态组织内的血液循环,为氧气、吞噬细胞、免疫球蛋白等物质向病变组织输送创造了有利条件<sup>[3]</sup>。这为研究低声压级次声在脑缺血疾病方面的研究提供理论依据。

半暗带指在梗死中心和正常脑组织之间存在一个缺血区域,如何挽救缺血半暗带的神经元细胞一直是脑缺血损伤的研究热点。我们在 HE 染色中,利用高倍的油镜重点观察了观察半暗带神经元尼氏小体的变化。尼氏小体是神经细胞功能活性的形态指标。尼氏小体分散在神经元胞质的内部,它由发达的粗面内质网和游离的核糖体构成,与神经元蛋白质合成功能有密切的关系,主要合成更新细胞器所需的结构蛋白、合成神经递质所需的酶类以及肽类的神经调质。它是对缺血、缺氧损害敏感的细胞器,神经元受损伤时,神经细胞内的尼氏小体趋向溶解或消失。尼氏小体在细胞质内重新出现时,首先是从核的附近开始,然后再向细胞边缘发展。在实验中次声 120min 组中半暗带尼氏小体在胞浆一定程度恢复,数量较模型组增多,表明细胞活力增强(图 2D)。

袁华<sup>[14-15]</sup>在实验中发现,8Hz 90dB 和 130dB 次声不仅激活海马星形胶质细胞,还能激活延髓中神经元-星形胶质细胞复合体,星形胶质细胞发挥支持、营养和保护神经元的作用。从低倍 HE 结果看,次声组激活半暗带胶质细胞,细胞数目增多(图 2c、2C),这不仅有利于局部损伤的修复,还有利于半暗带残存神经元可逆性恢复。

在以往的研究中,已证实高声压级次声(大于或等于 90dB)对中枢神经系统产生损伤作用,我们在研究中发现低声压级次声在一定条件下(120min/d, 7d)对脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用,验证次声的生物学效应与其参数存在密切的关系。次声在我国临床应用较少,积极探索次声(特别是低声级次

声)的生物学效应及作用机制,为次声将来在我国临床广泛运用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 程浩然,赵钢.次声对脑的影响[J].神经损伤与功能重建,2007,2(2):120—122.
- [2] Batanov GV. Characteristics of etiology immediate hypersensitivity in condition of exposure to infrasound [J]. Radiats Biol Radioecol,1995,35(3): 78—82.
- [3] 范建中,鲍勇,易南,等.治疗用次声发生装置声场特征研究[J].中华物理医学与康复杂志,2007,29(3):213—214.
- [4] 廖维靖,刘淑红,范明线,等.线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良的改良 [J]. 中华物理医学与康复杂志,2002,24(6):6345—6348.
- [5] Longa FZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989, 20(5):84.
- [6] 杨俊峰,范建中,陈景藻,等.加味补阳还五汤对次声暴露下小鼠脑组织过氧化指标的影响 [J]. 中国临床康复,2005,9(10):162—163.
- [7] 唐迪,陈景藻,刘静.次声作用对大鼠脑谷氨酸及超微结构影响的量效特征[J].中国临床康复,2006,10(22):95—97.
- [8] 唐迪,陈景藻,李玲.次声不同时间作用后对大鼠大脑皮质超微结构的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志,2006,28(05):309—311.
- [9] 范建中,杨俊峰,陈景藻,等.加味补阳还五汤对 8Hz、130dB 次声暴露下小鼠大脑过氧化水平及超微结构的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(4):296—298.
- [10] 余继林,孙艳萍.次声治疗仪治疗厌食症临床疗效分析[J]. 中国中医药信息杂志,1995,2(11):22.
- [11] 李克,范建中,鲍勇.次声对 HL-60 白血病细胞株生长的影响 [J]. 中国康复医学杂志,2007,22(3):212—214.
- [12] Yount G, Taft R, West J, et al. Possible influence of infrasound on glioma cell response to chemotherapy: a pilot study [J]. J Altern Complement Med, 2004,10(2):247—250.
- [13] 张永元,吴胜举.次声的研究与应用进展[J].宝鸡文理学院学报,2004,24(3):216—217.
- [14] 袁华,龙华,李玲,等.次声作用后大鼠延髓胶质细胞和神经元反应的关系[J].中国康复理论与实践,2002,8(11):661—663.
- [15] 袁华,龙华,李玲,等.次声作用后大鼠海马星形胶质细胞的变化 [J]. 中国临床康复,2002,6(23):3500—3501.