

脉冲磁场对脑缺血再灌注大鼠胰岛素生长因子表达的影响*

吴红瑛¹ 范建中¹ 罗 仁² 魏 轶¹ 李 川¹

摘要 目的: 观察脉冲磁场对脑缺血再灌注大鼠胰岛素生长因子(IGF-1)表达的影响。方法: SD 大鼠 24 只, 随机分成假手术组、模型组和脉冲磁场组, 每组 8 只。采用线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型, 假手术组仅做右侧颈外动脉和颈总动脉结扎, 不做右侧大脑中动脉线栓栓塞。脉冲磁场组在造模结束后 2h 给脉冲磁场处理, 磁场强度为 0—0.01T, 频率为 50Hz, 20min/次, 1 次/d, 7d 后处死大鼠, 断头取脑, 采用免疫组化方法检测 IGF-1 的表达。结果: 模型组与假手术组相比, IGF-1 的表达增多; 脉冲磁场组与模型组相比, IGF-1 的表达增多($P < 0.05$)。结论: 脉冲磁场能促进脑缺血再灌注大鼠 IGF-1 的表达。

关键词 脉冲磁场; 脑缺血; 再灌注损伤; 胰岛素生长因子

中图分类号: R493, R741 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2009)-08-0699-03

The effect of pulsed magnetic field on expression of IGF-1 in cerebral ischemia reperfusion injured rats/
WU Hongying, FAN Jiangzhong, LUO Ren, et al. // Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(8): 699—701

Abstract Objective: To examine the effect of pulsed magnetic field in inducing insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression in focal cerebral ischemia reperfusion injured model. **Method:** Twenty-four SD rats were randomized into 3 groups, namely, sham-operation group, model group and pulsed magnetic field group with 8 in each group. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was employed to establish focal cerebral ischemia perfusion model in rats of model group and pulsed magnetic field group. In sham-operation group rats' middle cerebral artery were only ligated without occlusion. The treatment of pulse magnetic field was at 50Hz, 0.01T, 20min, once daily, for 7d. The expression of IGF-1 in ischemic brain tissue was detected with immunohistochemical staining. **Result:** The expression of IGF-1 in ischemic brain tissue was the highest in pulsed magnetic field group. **Conclusion:** Pulsed magnetic field might improve the expression of IGF-1 in cerebral ischemia reperfusion injured rats.

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

Key words pulsed magnetic field; brain ischemia; reperfusion injury; insulin-like growth factor-1

磁场是常用的物理治疗方法, 利用磁场对缺血性卒中恢复期患者进行康复治疗, 已取得较好的治疗效果^[1], 动物实验也证实脑梗死急性期的磁场治疗具有明显效果^[2-4]。本研究主要观察脉冲磁场对大鼠脑缺血再灌注损伤后胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 表达的影响, 对脉冲磁场促进脑损伤后神经系统修复的实验室机制进行进一步的探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 24 只, 雌雄不拘, 体重 250—330g, 鼠龄 3—4 个月, 由南方医科大学实验动物研究所提供, 质量合格证号: SCXK(粤)2006A051。实验动物随机分成假手术组、模型组和脉冲磁场组, 每组 8 只。

1.2 主要试剂和材料

尼龙线栓由北京沙东生物技术有限公司提供。GMC-B 型脉冲磁疗仪, 解放军总医院研制。IGF-1 一抗由美国 NeoMarker 公司提供; 二抗、DAB 显色试剂盒由北京中杉生物技术公司提供。

1.3 脑缺血再灌注模型制备

大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型采用颈外动脉插入线栓法制备^[5]。大鼠用 10% 水合氯醛(350mg/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位

* 基金项目: 广东省医学科研基金(WSTJ200612014401111967 06108827)

1 南方医科大学南方医院康复科, 510515

2 南方医科大学南方医院中医科

作者简介: 吴红瑛, 女, 博士, 副主任医师

收稿日期: 2008-10-20

固定于手术台上,颈正中切口,分离右侧颈总动脉、颈外动脉,结扎颈总动脉和颈外动脉,假手术组仅做以上步骤。另二组大鼠在颈总动脉远端上动脉夹,于颈总动脉分叉处剪一切口,将尼龙线栓子插入颈部动脉,松开动脉夹,经颈总动脉和颈内动脉进入到大脑中动脉,阻断右侧大脑中动脉所有血液来源,栓子插入深度距离颈外动脉和颈内动脉分叉处约为 19mm,扎紧颈总动脉远端的备用线。术中和术后维持动物体温在 37℃左右,缺血 2h 后,缓慢拔出栓子至颈内动脉,实现大脑中动脉的再灌注。尼龙线栓直径 0.26mm,头端膨大成球状,经显微操作烧制而成,直径为 0.34 ± 0.22 mm。术后各组大鼠单笼饲养,自由进食饮水。

1.4 造模成功标准

右侧 MCAO 后 2h 大鼠已清醒。参照 Zeal Longa 5 分法进行评分^[4]。0 分:无神经功能缺损症状;1 分:轻度局灶性神经功能缺损,提尾悬空不能伸展左侧前爪;2 分:中度局灶性神经功能缺损,行走向左侧转圈;3 分:中度局灶性神经功能缺损,行走困难,并向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识水平下降。评分为 1—3 分,取脑时无蛛网膜下腔出血者为造模成功。

1.5 磁场处理方法

脉冲磁场组动物于术后 2h 开始用脉冲磁疗仪进行干预,异名磁极对置于大鼠头部,磁距为 7—10cm,磁场强度为 0.01T,频率为 50Hz,20min/次,每天 1 次,7d 后处死动物。

1.6 切片制作

脉冲磁场组末次磁场处理后 2h,与假手术组、造模组用 10%水合氯醛深麻醉动物(800mg/kg),用 16 号钝头穿刺针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,用 10%福尔马林进行心脏灌注,断头取脑,用同一固定液固定 8h,在视交叉前后 1—3mm 之间取脑进行常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片。

1.7 免疫组化

制成的切片置于 65℃烤箱中烤 3h,脱蜡,水洗,高压修复,置于 3% H_2O_2 中加热阻断内源性过氧化物酶,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中洗涤,加兔抗大鼠 IGF-1 多克隆抗体(一抗)孵育盒中 4℃孵育, PBS 缓冲液中洗涤,加兔二抗-HRP 多聚体于室温孵育, PBS 缓冲液中洗涤, DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。结果判定以胞浆近胞膜处呈棕黄色为阳性。免疫组化切片置于摄像显微镜下,放大 1000 倍,随机取 5 个视野,阳性细胞

计数取平均值。

1.8 统计学分析

所有资料经 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,数据用均数 $\pm$ 标准差表示,三组数据的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

IGF-1 在假手术组神经细胞中表达最弱,模型组缺血再灌注 7d 后梗死中心区和半暗带区神经元细胞阳性细胞数均增多,高于假手术组。脉冲磁场组缺血再灌注 7d 后梗死中心区和半暗带区阳性细胞数高于模型组和假手术组(图 1,表 1,见彩色插页)。

表 1 脑 IGF-1 表达阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$, 个/高倍视野)

组别	动物数	阳性细胞数
假手术组	8	8.55 $\pm$ 0.41
模型组	8	10.85 $\pm$ 0.48 ^①
脉冲磁场组	8	32.48 $\pm$ 1.52 ^②

①与假手术组比较 $P < 0.05$; ②与模型组比较 $P < 0.05$

3 讨论

IGF-1 是一种结构上与胰岛素类似,但在中枢神经系统内有其特异性受体的多肽,它有调节代谢的作用,参与调节多种细胞的分化、增殖和多种损伤后的修复。体内几乎所有组织、细胞都能分泌 IGF-1、表达 IGF-1 受体。IGF-1 存在于正常脑组织中,参与脑的发育。有研究发现,若鼠脑 IGF 结合蛋白基因过度表达,IGF-1 或 IGF 受体基因被破坏,其脑的生长速度明显迟缓,脑重量明显下降;如 IGF-1 过度表达,则无论是脑细胞数量还是重量都明显增加^[6]。在脑缺血损伤的研究中发现,脑缺血再灌注发生后 2h 至 1d 梗死中心区和半暗带区 IGF-1 表达渐增多,再灌注 3d 后 IGF-1 的表达达到高峰,7d 后梗死中心区和半暗带区 IGF-1 的表达有所下降^[7]。Beiharz 等^[8-9]发现脑缺血迟发性坏死区神经小胶质细胞分泌 IGF-1 增加,IGF-1 的增加可明显抑制神经元和胶质细胞的损害。可以设想,给予外源性 IGF-1 可以挽救濒死的神经细胞,尤其是半暗带的神经细胞,减轻脑损伤,这一设想已被众多动物实验所证实。Gluckman 等^[10]用 21 日龄 Wistar 大鼠制备单侧大脑中动脉闭塞模型,缺血 1h 后恢复灌注,再灌注 2h 后经侧脑室一次性给予 IGF-1,5d 后处死动物,取其脑组织进行组织学观察,与对照组相比,缺血损伤区神经元缺失明显减少,其中尤以皮质和齿状回明显。说明 IGF-1 具有促进神经发育、神经保护和修复作用^[11]。IGF-1 作为脑缺血缺氧损伤的保护剂,对神经元起营养修复作用已得到越来越多

的关注。因经侧脑室给药创伤较大, 对人体来说难以接受, 故 IGF-1 的神经保护作用目前仍处于动物实验阶段。如能探索出 IGF-1 适宜的给药途径或脑组织在某种干预下 IGF-1 得到更多的表达, 则 IGF-1 对脑缺血性疾病的治疗将会有较大的临床价值。

从 20 世纪 80 年代起, 国内、外许多学者发现磁场对骨折的愈合具有良好的促进作用^[12-15]。磁场对神经细胞的修复和再生是否也有作用, 引起了人们的关注。在采用 0.5Hz、1.9T 的脉冲磁场治疗脊髓损伤大鼠模型的研究中, 治疗组和未经磁场作用的对照组相比, 损伤区脊髓组织水肿明显减轻, Ca^{2+} 含量减低, Mg^{2+} 含量增高, 神经纤维生长情况优于对照组^[16]。李怡等^[17]报道, 采用 5Hz 或 20Hz、8mT 交变磁场对离体新生鼠中脑神经干细胞进行干预, 能明显促进神经干细胞神经元的分化。说明磁场可保护神经组织、促进神经细胞再生、促进神经干细胞分化, 从而对神经损伤起修复作用。但有关磁场对中枢神经系统中 IGF-1 表达的影响未见研究报道。

本研究结果显示, 脑缺血发生后, 模型组大鼠脑组织中 IGF-1 表达明显高于假手术组, 证实缺血状态下脑内 IGF-1 表达增加, 有助于神经组织的自我保护和修复, 与吴红瑛等^[7]的报道一致; 应用脉冲磁场干预后, 脉冲磁场组大鼠脑梗死区表达 IGF-1 神经元细胞数较模型组明显增加, 说明脉冲磁场可以促进更多的 IGF-1 的表达, 增强脑损伤后的内源性保护机制, 从而对脑组织产生保护作用。

参考文献

[1] 李茜, 李新艳, 李敏. 头部脉冲磁疗对脑卒中偏瘫患者康复的影响[J]. 中国康复, 2006, 21(5): 314—315.
[2] 张鸿日, 李伯勤, 彭静华, 等. 低频脉冲磁场对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元保护作用的研究 [J]. 临床神经病学杂志, 2007, 20(2): 125—127.
[3] 刘晓红, 张志强, 张立新. 旋磁场对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(38): 76—78.

[4] 魏轶, 范建中, 吴红瑛, 等. 脉冲磁场对脑缺血大鼠的作用及其 IGF-1 表达的变化[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 24(10): 878—883.
[5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
[6] D'Erecole AJ, Dai Z, Xing Y, et al. Brain growth retardation due to the expression of human insulin like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: an in vivo model for the analysis of IGF function in the brain [J]. Brain Res Dev Brain Res, 1994, 82(2): 213—222.
[7] 吴红瑛, 范建中, 罗仁, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑胰岛素生长因子-1 的动态观察 [J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(4): 598—599.
[8] Beiharz EJ, Russo VC, Butler G, et al. Coordinate and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 59(2): 119—134.
[9] Hwang IK, Yoo KY, Park SK, et al. Expression and changes of endogenous insulin-like growth factor-1 in neurons and glia in the gerbil hippocampus and dentate gyrus after ischemic insult[J]. Neurochem Int, 2004, 45(1): 149—156.
[10] Gluckman P, Klempt N, Mallard EC, et al. A role for IGF-1 in the rescue of the CNS neurons following hypoxic-ischemic injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 182(2): 593—599.
[11] Gluckman PD, Guan J, Williams C, et al. Asphyxial brain injury: the role of the IGF system [J]. Mol Cell Endocrinol, 1998, 140: 95—99.
[12] 孙嘉利, 范建中, 张建宏, 等. 红外线和磁场对兔膝关节炎滑膜损伤的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(11): 971—972.
[13] 何成奇, 肖登, 王维, 等. 不同强度脉冲电磁场对去势大鼠股骨骨钙含量的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(3): 215—217.
[14] 何成奇, 王维, 肖登, 等. 不同频率脉冲电磁场对去势大鼠血清雌二醇及股骨骨钙含量的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(4): 303—305.
[15] 刘林, 董立平, 李鑫鑫. 脉冲电磁场治疗骨质疏松症的临床分析[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(6): 555—555.
[16] 李新志, 郭风劲, 陈安民, 等. 磁刺激对脊髓损伤后神经再生的影响[J]. 中国康复, 2001, 16(3): 129—131.
[17] 李怡, 赵仑, 邢莹, 等. 5Hz 和 20Hz 磁场对中脑神经干细胞分化的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2002, 15(5): 374—376.