

弱激光对兔失神经肌肉萎缩的防治作用

周晓兰¹ 张志强¹

摘要

目的:观察弱激光对失神经肌萎缩的防治作用。

方法:取健康雄性家兔30只,随机分为对照组(CON组),失神经肌萎缩组(DM组)和弱激光治疗+失神经肌萎缩组(LDM组),DM和LDM组采用家兔胫神经切断后制作失神经腓肠肌肌萎缩模型,进行HE染色及免疫组化研究,检测肌湿重,肌肉横断面面积及Bcl-2表达强度的差异。

结果:与DM组比较,LDM组腓肠肌湿重、肌肉横截面积和Bcl-2表达均有明显差异($P<0.05$)。

结论:弱激光治疗可防治失神经引起的肌肉萎缩。

关键词 弱激光;失神经肌萎缩;腓肠肌;B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-08-0725-04

The influence of low-power laser irradiation on denervated myoatrophy in rabbits/ZHOU Xiaolan,ZHANG Zhiqiang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(8): 725—728

Abstract

Objective: To investigate the influence of low-power laser irradiation on denervated myoatrophy.

Method: Thirty rabbits were randomly divided into 3 groups, normal group (CON group), denervated myoatrophy group (DM group), and low-power laser irradiation plus denervated myoatrophy group (LDM group). The right tibia nerves of rabbits in DM and LDM groups were cut off under aseptic conditions and were researched by HE staining and immunohistochemical techniques. The muscles were taken for measuring wet weight, investigating cross sectional area, as well as observing the expression of Bcl-2.

Result: There were statistical significances in all the data between the muscles in LDM group and DM group ($P<0.05$).

Conclusion: Low-power laser irradiation was a valuable treatment for preventing denervated muscle atrophy.

Author's address Department of Rehabilitation, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110021

Key words low-power laser; denervated muscle atrophy; musculus gastrocnemius; B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2)

周围神经损伤后再生修复是一个极其复杂的生物化学和细胞化学过程。显微外科技术的应用,提高了修复水平,然而术后功能恢复并不理想^[1]。因为周围神经损伤功能恢复涉及神经元胞体、轴突和靶器官,目前关于周围神经损伤的研究主要着眼于三个环节,即保护神经元、提高神经再生速度和防治失神经骨骼肌萎缩,其中任何一个环节延缓或发生了不

可逆性损害,均将影响肢体功能的康复,从而最终影响疗效^[2]。弱激光是指不会使生物组织产生不可逆损伤、不会引起局部温度明显升高的激光,它对细胞和组织具有一系列的生物调节作用,近年来很多基础或临床实验均发现弱激光治疗能有效促进周围神经再生修复^[3-4],但弱激光是否能防止或延缓失神经肌肉萎缩的发生则少见研究报道。本研究采用切断兔

DOI10.3969/j.issn.1001-1242.2010.08.002

¹ 中国医科大学附属盛京医院康复科,沈阳,110021

作者简介:周晓兰,女,住院医师;收稿日期:2009-07-30

胫神经制造失神经骨骼肌萎缩模型,研究弱激光防治失神经肌肉萎缩的作用,为下一步临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 分组

新西兰纯种成年雄性健康家兔 30 只,体重 (2.57 ± 0.23) kg,干式标准笼喂养。随机分为 A 组、B 组和 C 组,每组各 10 只;A 组为正常对照组(CON 组),B 组为失神经肌萎缩组(DM 组),C 组为激光治疗+失神经肌萎缩组(LDM 组)。

1.2 动物模型建立

以 3%戊巴比妥钠按 30mg/kg 体重剂量,经耳缘静脉麻醉(B 组和 C 组),俯卧位固定,消毒,铺无菌巾单,在右侧腘窝处纵向切开皮肤,切口长约 5cm,拨开脂肪沿腓肠肌向近端寻找暴露胫神经,适当延长胫神经长度,距其入肌点 2cm 处切断,近端反折缝合至附近肌肉中,远断端 10—0 显微缝线结扎,以防止近端再生轴突通过,关闭切口。术中注意无菌操作,室温保持在 20—25℃。术后常规注射青霉素(4 万 U/kg)。

1.3 建模后处理

A 组(CON):笼内自由活动,不做任何处理。B 组(DM):术后伤口每日换药 1 次,7d 后伤口拆线,每日笼内自由活动。C 组(LDM):除了与 DM 组每日相同的处理外,还采用 MDC-500I 半导体激光治疗仪治疗(功率 30mW,波长 810nm,光斑直径 50mm),方法是直接将半导体激光治疗仪探头照射右侧腓肠肌中段,探头离皮面约 2cm,光斑直径 0.5mm,照射面积 2cm×1cm,每次照射 3min,第 1 周每日 1 次,第 2 周隔日 1 次,共计 10 次。

1.4 标本采集

各兔均于治疗第 2 周末时行耳缘静脉空气栓塞处死。迅速取双侧腓肠肌,剔除多余结缔组织并称量其湿重。于右侧腓肠肌中段切取部分肌肉组织(约 2cm×1cm×1cm 大小),制作石蜡切片,HE 染色后,置光镜下观察股直肌纤维化程度及肌纤维排列顺序、形态的改变,用自动图像分析仪测定肌细胞直径及截面积,每个标本至少测量 50 个肌细胞,取其均值。

1.5 免疫组化检测

用 4%的多聚甲醛固定标本,8h 后石蜡包埋,每例标本于石蜡切片机上切取同一部位切片 4 张,片厚 5μm。室温下 3g/L 过氧化氢浸泡 15min 灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 3 遍;室温下复合消化液处理 5min,PBS 洗 3 遍;20%的山羊血清室温封闭 20min,甩干不洗;湿盒中 1:60 的羊多克隆 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2,Bcl-2) 抗体(一抗,武汉博士德公司生产)于 4℃孵育 18h,PBS 洗 2min×3;生物素化羊抗兔 IgG(二抗,武汉博士德公司生产)于 25℃孵育 20min,PBS 洗 2min×3;辣根过氧化物酶标记的链卵白素工作液 SABC(武汉博士德公司生产)室温孵育 20min,PBS 洗 5min×4;二氨基联苯胺(DAB)染色,镜下控制显色时间;苏木素轻度复染,脱水,透明中性树脂封片。阴性对照则用 PBS 代替一抗。

1.6 免疫组化判断指标

Bcl-2 免疫组化染色以细胞胞浆内出现棕黄色颗粒者为阳性,切片在高倍镜($\times 400$)视野下观察,随机计数 5 个视野中视野内 Bcl-2 阳性细胞数和细胞总数,计算阳性细胞表达率,IPP(image pro plus)图像分析软件对每一张切片在高倍镜($\times 400$)下分别随机选 10 个阳性细胞,测定其胞浆平均灰度值,染色越深灰度值越小,表示阳性越强,输出数据为细胞平均灰度值大小。

1.7 统计学分析

各组均数比较用单因素方差分析,各组间比较用 SNK-*q* 检验。统计软件应用 SPSS10.0 统计软件包,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 家兔体重及腓肠肌湿重

表 1 显示,实验前各组家兔体重无明显差异。激光治疗期间,各组家兔体重均增长,实验后 2 周组间体重无明显差异。DM 组腓肠肌湿重显著低于 LDM 和 CON 组($P<0.05$),而 LDM 组腓肠肌湿重又显著低于 CON 组($P<0.05$)。

2.2 各组家兔肌细胞直径及肌纤维截面积的比较

HE 染色镜下可见 DM 组肌纤维排列紊乱,胞浆淡染呈网状,间质及肌核相对增多,细胞核体积变

小,染色加深,细胞核固缩,肌纤维周边出现较多的成纤维细胞和脂肪细胞及增生的胶原纤维。表 2 显示,DM 组腓肠肌肌细胞直径及肌纤维截面积显著低于 CON 组和 LDM 组($P<0.05$),而 LDM 组腓肠肌肌细胞直径及肌纤维截面积又显著低于 CON 组($P<0.05$)。

2.3 免疫组化研究

显微镜下观察 Bcl-2 主要分布于细胞胞浆。与 Bcl-2 多克隆抗体结合后,DAB 显色使细胞胞浆呈棕黄色。阴性对照细胞胞浆中未见棕黄色颗粒。对各组之间的 Bcl-2 表达阳性率及胞浆平均灰度值进行比较,见图 1 及表 3。

3 讨论

骨骼肌功能和结构的维持都受到运动神经的支

表 1 各组家兔体重和腓肠肌湿重的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	体重		右侧腓肠肌湿重 (mg)
	实验前(kg)	实验后(kg)	
CON 组	2.56±0.09	3.63±0.13	410±0.07
DM 组	2.61±0.13 ^①	3.72±0.14 ^①	112±0.05 ^②
LDM 组	2.59±0.06 ^①	3.74±0.20 ^①	298±0.06 ^②

①与 CON 组比较: $P>0.05$;②与 CON 组比较: $P<0.05$

表 2 各组家兔肌细胞直径及肌纤维截面积的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	肌细胞直径(μm)	肌纤维截面积(μm^2)
CON 组	33.50±5.24	1090.50±5.24
DM 组	23.30±4.46 ^①	601.68±12.00 ^①
LDM 组	28.68±4.21 ^②	810.50±13.68 ^②

①与 CON 组、LDM 组比较 $P<0.05$;②与 CON 组比较 $P<0.05$

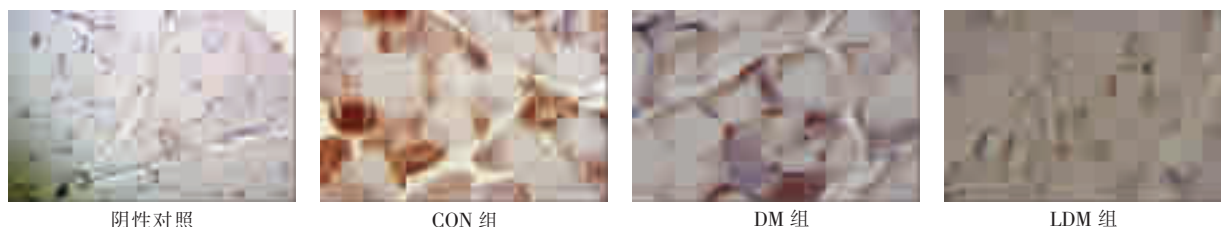
表 3 Bcl-2 表达阳性率及胞浆平均灰度值 ($\bar{x}\pm s$)

组别	阳性率(%)	平均灰度值
CON 组	39.6±2.8	134.5±6.5
DM 组	16.6±3.3 ^①	173.2±7.6 ^①
LDM 组	29.6±3.4 ^②	150.6±5.8 ^②

与 CON 组、LDM 组比较:① $P<0.05$;与 CON 组比较:② $P<0.05$

图 1 各组 Bcl-2 表达情况

(免疫组化染色,×400)



配和调节,失去神经支配后,骨骼肌肌肉体积减小,肌纤维萎缩,逐渐被脂肪细胞和结缔组织所替代,最终完全丧失收缩功能^[5]。失神经支配骨骼肌的萎缩既是失营养性萎缩,又是废用性萎缩,只有重新获得神经再支配才是防止肌萎缩的最佳方案。由于神经再生的速度极为缓慢,周围神经损伤虽经修复,但轴突往往需要相当长的时间才能到达周围靶器官,某些失神经支配骨骼肌在神经再生轴突到达运动终板前已发生了不可逆的萎缩和变性^[6],这必然造成神经修复手术的疗效欠佳。有研究表明,周围神经损伤后 6 个月内外科修复成功率最高,若能在这个时间内采用干预手段延缓骨骼肌的萎缩,则能大大改善功能恢复^[7]。在新近研究报告中^[8],采用弱激光治疗失神经肌萎缩模型大鼠的腓肠肌,检测到了肌酸激酶和乙酰胆碱受体的水平升高,肌酸激酶可为骨骼肌细胞提供能量,而乙酰胆碱受体则在神经肌肉接头传递过程中发挥重要作用。因此,弱激光有可能对失神

经骨骼肌的细胞生化产生影响,失神经后骨骼肌萎缩的原因主要是细胞内蛋白降解加快,肌肉萎缩和退化,若能减少或暂时防止蛋白降解,为神经移植重建或吻合术后轴突的生长提供时间,则术后功能很有可能在很大程度上恢复。也有研究表明^[9],弱激光照射可增加线粒体内 ATP 的合成,从而增加肌酸激酶的合成,弱激光可在肌肉降解的早期阶段,暂时保持失神经的肌肉处于受伤前的生理状态。本实验显示,弱激光治疗家兔失神经腓肠肌的肌肉湿重及横截面面积均明显高于单纯失神经腓肠肌组,说明弱激光可有效防治失神经引起的肌肉萎缩。

为了初步探讨弱激光照射对失神经骨骼肌萎缩的保护作用机制,我们检测了各组腓肠肌细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达强度的差异。研究结果显示,与单纯失神经组相比,弱激光治疗组家兔骨骼肌组织 Bcl-2 表达水平显著升高,而胞浆灰度值明显降低,提示弱激光治疗可抗骨骼肌细胞凋亡,这与 Shefer

等的研究结果一致^[10],他们用低强度 He-Ne 激光照射无血清培养基(无血清培养基会诱导骨骼肌细胞的凋亡)中的骨骼肌细胞和骨骼肌卫星细胞,照射时间为 3s,结果发现,与非照射组相比,照射组的细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达显著增强,细胞在无血清培养基中的存活率得以提高。

弱激光疗法具有简单、安全、作用广等特点,在临床医学许多领域得到了应用,但其作用机制复杂,可能参与细胞的生理或能量代谢,不同的照射剂量及波长有不同的生物作用^[11]。在本研究中,弱激光治疗组肌肉湿重及肌纤维截面积明显高于单纯失神经组,同时肌肉组织 Bcl-2 表达水平显著升高,而胞浆灰度值明显降低,说明弱激光治疗可干预失神经骨骼肌细胞的凋亡代谢,从而减轻肌肉萎缩的程度。弱激光组腓肠肌湿重及横截面积和 Bcl-2 表达明显高于失神经组,但仍明显低于正常对照组,故还应探讨弱激光与其他防治措施,如运动疗法、中药、物理因子治疗等的联合作用^[12-13],以共同防治失神经肌肉萎缩。此外,目前尚未见到用弱激光照射进行失神经肌肉萎缩治疗的临床报告,弱激光能否在人体上具有同样的保护作用有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Wang H, Gu Y, Xu J, et al. Comparative study of different surgical procedures using sensory nerves or neurons for delaying atrophy of denervated skeletal muscle [J]. J Hand Surg Am, 2001,26 (2) :326—331.
- [2] 田德虎.周围神经损伤与康复[J].中国康复医学杂志,2007,22(2): 99.
- [3] Chen YS, Hsu SF, Chiu CW, et al. Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats [J]. Microsurgery, 2005,25(1):83—89.
- [4] Gigo-Benato D, Geuna S, de Castro Rodrigues A, et al. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy:a double blind randomized study in the rat median nerve model[J]. Lasers Med Sci,2004,19(1):57—65.
- [5] Dupont-Versteegden EE,Murphy RJ,Houle JD,et al. Mechanisms leading to restoration of muscle size with exercise and transplantation after spinal cord injury [J].Am J Physiol Cell Physiol,2000,279(6): 1677—1684.
- [6] Day CS,Buranapanitkit B,Riano FA,et al, Insulin growth factor-1 decreases muscle atrophy following denervation [J]. Microsurgery, 2002, 22(4):144—151.
- [7] Wong BJ ,Crumley RL. Nerve wound healing. An overview [J]. Otolaryngol Clin North Am,1995, 28(5):881—895.
- [8] Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. The role of phototherapy in peripheral nerve regeneration and muscle preservation[J]. Int Rev Neurobiol, 2009, 87: 445—464.
- [9] Bolognani L,Volpi N. Low power laser enzymology:reactivation of myosin ATPase by GaAs an HeNe lasers. In:Passarella S, Quagliariello E. (eds.) Basic and Applied Research in Photobiology and Photomedicine [M]. Bari, Italy:Trani, 1991. 315—338.
- [10] Shefer G, Partridge TA, Heslop L,et al. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells [J]. J Cell Sci, 2002,115 (7): 1461—1469.
- [11] Amat A,Rigau J,Waynant RW,et al.The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy:a hypothesis of mechanism[J].J Photochem Photobiol B, 2006,82(2):152—160.
- [12] 李熙明,田德虎,张宏,等. 分米波对失神经肌肉形态改变的影响 [J].中国康复医学杂志,2008,23(11):1035—1036.
- [13] 李志宏,周振华,谢菊英,等.坐骨神经和股神经离断、后肢固定对大鼠降钙素基因相关肽水平及骨密度的影响[J].中国康复医学杂志,2009,25(12):1112—1114.