论著

文章编号:1000-5404(2012)12-1214-04

低频超声治疗对SD大鼠颊囊黏膜溃疡愈合的影响

向学熔[1],季 平[1],范小平[2],杨明聪[1],张华昌[1] (401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院:牙周粘膜科[1],正畸科[2])

[摘要] **目的** 探讨低频超声对大鼠实验性口腔黏膜溃疡愈合时间及溃疡组织中一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(NOS)含量的影响。**方法** 健康Sprague-Dawley(SD)大鼠36只,雌雄各半,完全随机分为6组($n=6$),1组设为正常对照组,其余5组利用氧自由基诱导法+物理烧伤法建立SD大鼠颊囊黏膜口腔溃疡动物模型,分别为溃疡组、药物组和低频超声组(1.1、1.58、2.06 W)。末次治疗24 h后观察溃疡愈合时间,并采用分光光度计测定大鼠口腔颊囊黏膜组织中NO、NOS含量。**结果** 大鼠溃疡病理特点与人类口腔溃疡病理特点基本相似。低频超声组较溃疡组及药物组的溃疡愈合时间短。NO活性测定结果显示,低频超声组1.1、1.58、2.06 W[分别为(9.86±1.69)、(9.42±1.34)、(8.51±1.26)μmol/g]较溃疡组[(23.85±4.81)μmol/g]显著降低($P<0.05$),与正常对照组(10.88±1.68)μmol/g比较无统计学差异($P>0.05$);NOS活性检测结果同样表明,低频超声组1.1、1.58、2.06 W[分别为(3.89±0.72)、(4.35±0.53)、(4.74±0.81)μmol/g]较溃疡组[(6.48±0.77)μmol/g]显著降低($P<0.05$),与正常对照组(3.83±0.99)μmol/g比较无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 适合剂量参数的脉冲低频超声能有效降低溃疡组织中的NO、NOS活性含量,对溃疡的愈合有一定的促进作用。

[关键词] 脉冲低频超声;口腔溃疡;NO;NOS

[中图法分类号] R-332;R454.3;R781.5 [文献标志码] A

Effect of low-frequency ultrasound therapy on oral mucosal ulcer healing in SD rats

Xiang Xuerong[1], Ji Ping[1], Fan Xiaoping[2], Yang Mingcong[1], Zhang Huachang[1] ([1]Department of Periodontal & Oral Medicine, [2]Department of Orthodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 401147, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of low-frequency ultrasound therapy on healing time and the contents of NO and NO synthetase (NOS) in ulcer tissues of rat models with oral mucosal ulcer. **Methods** Thirty-six Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups, including a normal control group, a model group, a 1% iodine glycerin group and three low-frequency ultrasound groups (with different energy levels of 1.1 W, 1.58 W and 2.06 W, respectively). Except for the normal control group, the rats of the other five groups were given oxygen free radicals and physical burn to construct the oral mucosal ulcer models. At 24 h after last treatment, three rats of each group were sacrificed and the cheek pouches were obtained for the detection of NO and NOS contents in the mucosal tissues by spectrophotometry. The ulcer healing was also observed for 8 consecutive days. The efficiency of low-frequency ultrasound therapy with different energy levels was evaluated. **Results** The healing time of the low-frequency ultrasound groups was shorter than that of the model group and 1% iodine glycerin group. The contents of NO and NOS in the low-frequency ultrasound groups (NO: 9.86±1.69, 9.42±1.34 and 8.51±1.26 μmol/g; NOS: 3.89±0.72, 4.35±0.53 and 4.74±0.81 μmol/g) were significantly lower than those in the model group (NO: 23.85±4.81 μmol/g; NOS: 6.48±0.77 μmol/g) ($P<0.05$), but were not significantly different from those in the normal control group (NO: 10.88±1.68 μmol/g; NOS: 3.83±0.99 μmol/g, $P>0.05$). **Conclusion** Low-frequency ultrasound therapy with appropriate energy levels can effectively reduce the contents of NO and NOS in ulcer tissues, and can promote the process of ulcer healing.

[**Key words**] low-frequency ultrasound; oral ulcer; NO; NO synthetase

Supported by the Tackling Project of Sci & Tech Research of Chongqing Committee of Science and Technology (2010GGA156). Corresponding author: Fan Xiaoping, Tel: 86-23-88860058, E-mail: cqzxfxp@sina.com

[基金项目] 重庆市科委科技攻关计划项目(2010GGA156)

[通信作者] 范小平,电话:(023)88860058,E-mail:cqzxfxp@sina.com

口腔溃疡是口腔粘膜病中最常见的黏膜疾病,其患病率(约达 20%)在口腔疾病中仅次于龋病和牙周病,位居第三。因其病因复杂并存在明显的个体差异,由于研究报道的发病因素甚多,可能是多因素综合作用的结果,其治疗一直比较困难,目前局部治疗的方法虽多,但其疗效受口腔特殊环境的影响,其治疗效果存在一定的局限性[1]。因此寻求一条新的途径解决局部治疗口腔溃疡的局限性是十分必要的。近年来,随着超声医学的迅速发展,其中低强度超声由于其设备技术含量低、操作简便、安全性较易控制,已用于促进手术切口、肌腱损伤、神经损伤、骨折及放射性骨坏死的再生或修复及皮肤溃疡等的治疗,并取得了较好的效果[2]。本研究拟通过构建口腔溃疡动物模型,观察低频超声对溃疡愈合时间及组织中一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)活性含量的影响,客观评价低频超声在口腔黏膜溃疡治疗中的效果,探讨低频超声用于口腔黏膜溃疡局部治疗疗效的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级 Sprague-Dawley(SD)大鼠 36 只,雌雄各半,体质量(180 ±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供;NO、NOS 测定试剂盒购自南京建成生物实验材料研究所;甲基紫精溶液(100 mg,Sigma,USA);双目光学显微镜(Olympus);低频超声治疗仪,工作频率 1.00 ~ 1.10 MHz,单路晶片输出声功率 0.11 ~3.5 W,脉冲占空比为 50%,脉冲输出频率为 1 kHz(重庆医科大学超声影像研究所);721 A 型分光光度计(江苏,中国);台式离心机(江苏,中国)。

1.2 方法

1.2.1 口腔溃疡动物模型的建立及分组 36 只大鼠完全随机分笼饲养,每笼 6 只,适应性饲养及光照节律 1 周正常后,随机选取 1 笼作为正常对照组,正常饲养不予任何处理,余下 5 笼随机分为溃疡组,药物组,低频超声输出功率为 1.1、1.58、2.06 W,后 5 组均采用改良文献[3]的方法制得口腔黏膜溃疡模型。用 10% 水合氯醛(3 ml/kg)经腹腔静脉注射麻醉 SD 大鼠,大鼠麻醉后,用橡皮筋将其四肢和头部以后仰卧位固定于手术台上,平齿镊撑开上下颌,暴露颊囊,5 号皮试针头抽取浓度 10 mmol/L 的甲基紫精溶液 0.25 ml,注射于左、右颊囊的黏膜下约 0.8 cm 后用预制的直径 5 mm 的 100 ℃的铁钉烧烫3 s,24 h后黏膜溃疡形成。

1.2.2 不同剂量脉冲低频超声照射 根据分组情况进行不同处理,对正常对照组不做任何处理,对溃疡组既不用药物涂擦,也不用低频超声处理,让其自然愈合,观察其自然愈合时间。对药物组在乙醚麻醉下分开其上下颌后在溃疡位置处用 1% 碘甘油的局部涂擦,每日 1 次,连续 3 d。对低频超声 3 组按照输出功率 1.1、1.58、2.06 W 的实验剂量分别给予脉冲低频超声处理 90 s。每日 1 次,连续 3 d。

1.2.3 口腔溃疡愈合时间观察 所有组别在末次治疗 24 h 后,随机选取 3 只 SD 大鼠进行溃疡愈合时间的观察,持续 8 d,余下 3 只进行其他检测。

1.2.4 大鼠口腔溃疡黏膜组织中 NO、NOS 活性含量的测定 所有组别在末次治疗 24 h 后,除开观察溃疡愈合时间的 SD 大鼠,余下 3 只用 10% 水合氯醛(3 ml/kg)经腹腔静脉注射麻醉大鼠,平齿镊撑开上下颌,暴露左右颊囊,用组织剪取下两侧黏膜溃疡组织,用 4 ℃生理盐水漂洗组织,除去血液,用滤纸拭干后称量后将组织剪碎,置于匀浆器中并加入组织质量 9 倍的生理盐水,将其研磨成 10% 的组织匀浆,随后将匀浆液倒入离心管中,以 3 000 r/min 的速度离心 10 min,吸取上清液。按试剂盒说明采取分光光度法测定样品管的光密度值后按试剂盒说明中的公式计算组织中 NO、NOS 的含量,并分析各组组织中 NO、NOS 的变化。

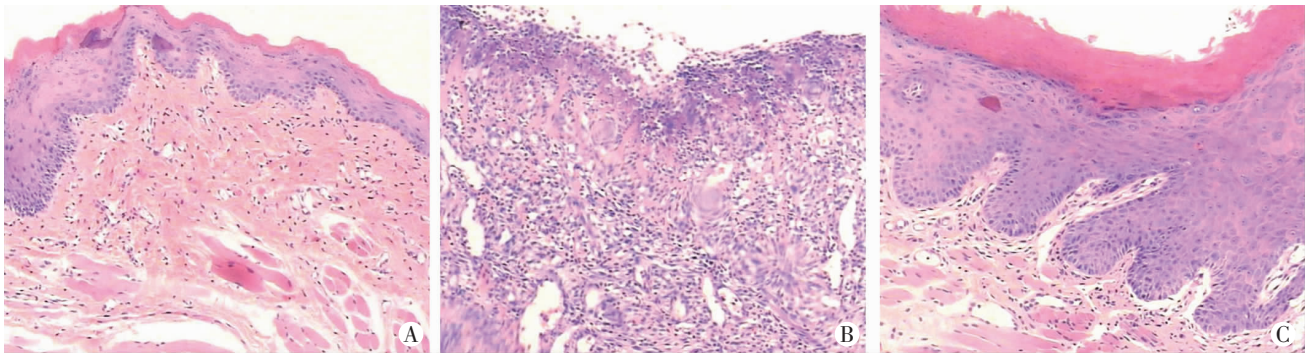
1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,以 SPSS 10.0 统计软件进行完全随机单因素方差分析。

2 结果

2.1 口腔溃疡动物模型病理切片观察结果

组织病理切片光镜下见正常口腔黏膜组织表现为组织结构完整,层次分明,上皮结构完整,细胞质透明,细胞核深染,呈椭圆形,固有层胶原纤维排列稀疏(图 1A);溃疡模型主要表现为非特异性炎症,上皮结构消失,组织破溃溶解、脱落,固有层胶原纤维水肿、变性、坏死,炎性细胞大量浸润,以淋巴细胞和中性粒细胞浸润为主(图 1B);溃疡愈合后可见鳞状上皮结构完整、增厚,黏膜下层恢复为疏松结缔组织结构,炎性浸润细胞数减少(图 1C)。



A:正常组织;B:溃疡模型;C:溃疡愈合后

图 1 口腔溃疡动物模型病理切片观察结果 (HE ×100)

2.2 末次治疗后各组大鼠口腔溃疡愈合时间观察

除去正常组,其余各组别溃疡数总和是6个,药物组(7.00 d)与低频超声组(1.1、1.58、2.06 W)溃疡平均愈合时间(分别为6.83、6.01、4.83 d)均比溃疡组(7.50 d)愈合时间短。

2.3 末次治疗24 h后6组大鼠组织中NO、NOS含量的比较

适合剂量参数的脉冲低频超声处理后,各组组织中NO及NOS含量有一定差异,其中脉冲低频超声组1.1、1.58、2.06 W与溃疡组比较,组织中NO及NOS含量显著降低($P<0.05$),不同功率超声处理组间NO及NOS含量无明显差异($P>0.05$),与正常对照组比较,其组织中NO及NOS含量则无统计学差异($P>0.05$)。见表1。

表1 不同组别溃疡组织中NO、NOS含量比较(μmol/g, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	NO含量	NOS含量
正常对照组	10.88±1.68[a]	3.83±0.99[a]
溃疡组	23.85±4.81	6.48±0.77
药物组	18.71±3.00	4.64±0.91
低频超声组		
1.1 W	9.86±1.69[a]	3.89±0.72[a]
1.58 W	9.42±1.34[a]	4.35±0.53[a]
2.06 W	8.51±1.26[a]	4.74±0.81[a]

a: $P<0.05$,与溃疡组比较

3 讨论

有调查数据显示,我国约60%的人群患有不同程度的口腔溃疡,口腔溃疡可发生于各个阶段年龄的人群,其中以中青年居多,又因其发作时伴有明显疼痛,引起说话、吞咽、进食困难,给人们带来诸多不便[4-5]。因此,为解决这种疾病给人们带来的痛苦,有必要通过建立口腔溃疡动物模型的形式,客观评价某种局部治疗方法对口腔溃疡的疗效。

目前,国内外关于口腔溃疡动物模型制备的方法非常多,综合比较各种方法的优缺点及结合本实验的主要目的[6-8],本实验参照陈谦明等[3]制备口腔溃疡动物模型的方法,选用了氧自由基诱导法,这种方法建立的模型,其病理特点与人类复发性口腔溃疡基本相似,即黏膜组织上皮结构消失,表面覆盖坏死组织,固有层大量炎细胞浸润;从形态学上观察,溃疡面积、大小、形状和深度均相对接近,并且还可以检测组织中NO及NOS的含量,有利于局部治疗方法的比较[9]。基于简便清晰有效地观察溃疡局部治疗疗效的目的,本实验动物模型的溃疡部位均建立在SD大鼠的颊囊黏膜上。同时,为了客观地评价治疗方法的疗效,本实验以溃疡充血水肿的改变和伤口的愈合为主要观测指标。

近年来,随着超声医学的迅速发展,超声作为一种安全、方便、有效的治疗手段,已广泛用于临床疾病的治疗,其中低频超声波具有显著的空化作用,能够破坏角质层的脂质双分子层结构,增加皮肤黏膜的通透性,即低频超声波具有显著增透效应[10]。同时,研究还发现低频超声的机械振荡不仅可对组织产生按摩及松懈作用,使局部血循环和微循环增强,还可刺激成纤维细胞、巨噬细胞及血管的生成,加速创面的愈合作用[11-12]。低频超声用于口腔溃疡治疗的研究较少,1997年国外曾有低频超声用于口腔溃疡局部治疗的报道[13],并且仅是对临床疗效的评价而缺少对其治疗机制的基础研究。本研究通过建立动物模型,检测溃疡治疗前后的NO及NOS含量的变化,对低频超声用于口腔溃疡治疗的机制进行了初步探讨。

本实验选用了1.1、1.58、2.06 W 3种不同强度的低频超声治疗黏膜溃疡,结果表明经低频超声处理后,从第4天开始即出现溃疡愈合,比对照组溃疡愈合时间有所缩短,其中以2.06 W低频超声处理组的愈合时间为最短。由于口腔溃疡的病因较复杂,其中体内氧自由基的生成和清除率不平衡可以诱发口腔溃疡,NO作为细胞信息传递过程中的重要调节因子可与氧自由基作用,延迟溃疡愈合,而NOS是NO合成过程中的关键酶,在溃疡的形成愈合过程中,则呈现出先降后升的趋势[14-15]。本实验结果证实,在溃疡急性期,组织中的NO及NOS的含量均较正常组织有所增高,但在采用适合剂量参数的脉冲低频超声处理实验大鼠溃疡黏膜后,其黏膜组织中NO及NOS的含量均有减少,其中1.1、1.58、2.06 W低频超声组与溃疡组比较,NO、NOS活性显著降低($P<0.05$)。由此可见适合剂量参数的脉冲低频超声处理黏膜溃疡后,可以使黏膜组织中NO及NOS的活性降低,从而减少机体的炎症反应与组织细胞损伤,加速溃疡愈合。

综上所述,脉冲低频超声在治疗口腔溃疡时,对溃疡愈合时间及组织中NO及NOS的活性有一定影响,对口腔溃疡的愈合有一定的促进作用。同时在选择适合剂量参数的脉冲低频超声用于治疗溃疡时,是比较安全、方便、有效的,而其安全剂量范围可选择脉冲能量为1.1~2.06 W的剂量来治疗口腔溃疡,其疗效可能是通过影响组织中NO及NOS含量来起作用。

参考文献:

[1] 李秉琦. 口腔粘膜病学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 2-4.

[2] Becker B M, Helfrich S, Baker E, *et al*. Ultrasound with topical anesthetic rapidly decreases pain of intravenous cannulation[J]. Acad Emerg Med, 2005, 12(4): 289-295.

[3] 陈谦明, 李秉奇, 刘一, 等. 氧自由基对口腔粘膜损伤的动物实验研究: 动物模型的形态和结构变化[J]. 华西口腔医学杂志, 1993, 11(1): 65-67.

[4] 袁侨英, 黄晶, 李学军, 等. 犬缺血心肌注射肝细胞生长因子致血管

新生的效应[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32 (13) : 1452 - 1455.
[5] Li X, Wang Z, Ran H, *et al*. Experimental research on therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor directed by ultrasound-targeted microbubble destruction in rats[J] . J Ultrasound Med, 2008, 27(3): 453 - 460.
[6] 陈谦明, 李秉奇, 萧卓然. 氧自由基对口腔粘膜损伤的动物实验研究: 动物模型的建立[J]. 华西口腔医学杂志, 1993, 11(1): 62 - 64.
[7] Yu Z H, Che J, Ma X, *et al*. Effect of aloe vera polysaccharides on immunity and antioxidant activities in oral ulcer animal models[J]. Carbohydr Polym, 2009, 75(2): 307 - 311.
[8] Carrozzo M. Vitamin B12 for the treatment of recurrent aphthous stomatitis[J]. Evid Based Dent, 2009, 10(4): 114 - 115.
[9] Orbak R, Kara C, Ozbek E, *et al*. Effects of zinc deficiency on oral and periodontal diseases in rats[J]. J Periodontal Res, 2007, 42(2): 138 - 143.
[10] 孔璐, 赵进顺. 低剂量脉冲式超声波的生物学效应研究概况[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(12): 1515 - 1516.
[11] D'Vaz A P, Ostor A J, Speed C A, *et al*. Pulsed low-intensity ultrasound therapy for chronic lateral epicondylitis: a randomized controlled trial[J] . Rheumatology (Oxford), 2006, 45(5): 566 - 570.
[12] Mitragotri S, Coleman M, Kost J, *et al*. Transdermal extraction of analytes using low-frequency ultrasound[J]. Pharm Res, 2008, 17 (4): 466 - 470.
[13] 任常群, 王勤涛. 低强度超声治疗复发性阿弗他口炎的临床评价[J]. 国外医学:口腔医学分册, 1998, 25(2): 112 - 113.
[14] Filippou D, Papadopoulos V P, Triga A, *et al*. Nitric oxide, antioxidant capacity, nitric oxide synthase and xanthine oxidase plasma levels in a cohort of burn patients[J]. Burns, 2007, 33(8): 1001 - 1007.
[15] Liu J, Zeng X, Chen Q, *et al*. An evaluation on the efficacy and safety of amlexanox oral adhesive tablets in the treatment of recurrent minor aphthous ulceration in a Chinese cohort: a randomized, double-blind, vehicle-controlled, unparallel multicenter clinical trial[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 102(4): 475 - 481.

(**收稿**:2011-10-29;**修回**:2012-01-21)
(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2012)12-1217-01

个案与短篇

亚低温联合神经节苷脂治疗96例重型颅脑损伤的疗效

石瑞成 (014010 内蒙古自治区 包头, 包头医学院第一附属医院神经外科)

[**关键词**] 亚低温;神经节苷脂;颅脑损伤
[**中图法分类号**] R651.15 [**文献标志码**] B

重型颅脑损伤是神经外科最常见的急危重症,容易引发神经功能障碍而导致残疾甚至死亡。近年来,在得当应用的情况下,亚低温对重型颅脑损伤的保护作用日益显著,随着神经节苷脂等新型促进神经功能药物的出现,为其提供了更多的治疗手段[1],本研究采用亚低温联合神经节苷脂对重型颅脑损伤,取得了显著疗效。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2010年6月至2011年7月本科收治的重型颅脑损伤患者96例,分为亚低温治疗组、神经节苷脂治疗组、亚低温联合神经节苷脂治疗组(联合组),每组32例,其中亚低温治疗组:男性15例,女性17例,年龄24~56岁,平均36.4岁;神经节苷脂治疗组:男性16例,女性16例,年龄24~53岁,平均35.8岁;联合组:男性18例,女性14例,年龄26~64岁,平均38.5岁。96例患者均经头颅CT扫描确诊,其中脑挫裂伤45例,原发性脑干损伤伴下丘脑损伤30例,颅骨骨折21例。入院时GCS评分4~8分,平均6.1分,其中4~5分29例,6~7分30例,8分37例。3组患者一般资料比较无显著性差异($P>0.05$)。患者均知情同意。

1.2 方法

3组均给予常规治疗,亚低温治疗组在常规治疗的基础上于术后24 h内采用半导体降温毯降温,同时肌肉注射氯丙嗪和异丙嗪50 mg,随后将氯丙嗪和异丙嗪各50 mg加入生理盐水50 ml用微泵维持,必要时于双侧腹股沟和腋区加用冰袋,使肛温在3~6 h降至33~35 ℃,维持2~6 d,一般颅内压正常24 h后逐渐复温,每4小时复温1 ℃至使肛温逐渐升至37 ℃左右。对GCS评分≤5分患者常规行气管切开和呼吸机辅助呼吸;神经节苷脂治疗组在常规治疗的基础上加用神经节苷脂100 mg/d静脉滴注,连用2周后改为维持量20~40 mg/d,连用4~6周;联合组将亚低温和神经节苷脂联合应用。96例患者均采用多功能监护仪监测动态心电图、呼吸、血压、心率和血氧饱和度,开颅患者采用颅脑内压监测,每日监测血糖、电解质和肾功,并作疗效判定。

1.3 统计学处理

计数资料的比较采用χ^2检验,通过SPSS 13.0软件进行统计分析。

2 结果

2.1 疗效评价

根据伤后6个月GCS评分判定疗效分为预后良好,中、重残,植物生存和死亡。总有效率等于预后良好+轻、中、重残。预后良好:能正常生活;轻残:生活基本自理;中、重残:意识清楚,生活不能自理。结果显示:联合组的病死率低于亚低温治疗组和神经节苷脂治疗组($P<0.05$);中重残率亦低于亚低温治疗组和神经节苷脂治疗组($P<0.05$);亚低温治疗组和神经节苷脂治疗组的病死率及中重残率比较无统计学意义($\chi^2=0.10$, $P>0.05$);联合组的总有效率优于亚低温治疗组和神经节苷脂治疗组($P<0.01$)。见表1。

(下转1222页)

[**通信作者**] 石瑞成, E-mail: qxy0826@163.com