基础研究 文章编号：0253-3626（2011）04-0408-04

高强度聚焦超声对新生鼠缺血缺氧性脑损伤 SYP 的影响

胡文静[1]，周江堡[1]，廖 丛[1]，李 东[2]，司 维[2]，王志彪[2]
（1. 重庆医科大学附属儿童医院神经康复科，重庆 400014；2. 国家超声重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：研究国家超声重点实验室研制的高强度聚焦超声（High intensity focused ultrasound，HIFU）对新生鼠缺血缺氧性脑损伤（Hypoxic-ischemic brain damage，HIBD）的突触素（Synaptophysin，SYP）的影响。方法：选取 7 d 龄 SD 大鼠 192 只，随机分成 4 组：（1）假手术组（n=48，A）；（2）模型组（n=48，B）；（3）电针组（n=48，C）；（4）超声组（n=48，D）。每组又分为治疗 1、2、3 周 3 个亚组，每亚组 8 只，免疫组织化学染色和 RT-PCR 方法检测脑组织中海马区域 SYP 表达水平。结果：各时间点电针组和超声组 SYP 表达明显高于假手术组和模型组（P<0.05）。结论：HIFU 穴位治疗可以上调 SYP 的表达，对 HIBD 后的脑组织具有神经保护效应。其机制可能是聚焦超声穴位治疗时其物理效应能起到类似针灸时经络传导增加缺血缺氧性脑损伤大鼠脑区突触的作用。

【关键词】新生大鼠；缺血缺氧性脑损伤；高强度聚焦超声；电针；突触素
【中国图书分类法分类号】R748 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-08

High intensity focused ultrasound in SYP of neonatal rat with hypoxic-ischemic brain damage

HU Weng-jing, et al
(*Department of Neurological Rehabilitation, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the treatment of high intensity focused ultrasound (HIFU) in synaptophysin (SYP) of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). *Methods*: One hundred and ninety-two 7-day-old SD rats were randomly divided into four groups: 1 sham group (n=48, A), 2 HIBD model group (n=48, B), 3 acupuncture group (n=48, C), 4 high intensity focused ultrasound group (n=48, D), every group respectively divided into 1w, 2w, 3w sub-groups (n=8). The expressions of synaptophysin (SYP) in Hippocampus were examined with immunohistochemical staining and RT-PCR. *Results*: In high intensity focused ultrasound group and acupuncture group, SYP expression levels were significantly higher than those in sham group and HIBD model group (P<0.05), which had distinct differences compared with the HIBD model group. The expressions of SYP in high intensity focused ultrasound group had no difference compared with acupuncture group. *Conclusion*: High-intensity focused ultrasound therapy can enhance the expression of SYP level, which has neuroprotective function. Its possible mechanism is that when HIFU is focused on the point, it can play a similar role like acupuncture which can increase the synaptic of HIBD.

【Key words】neonatal rat; hypoxic-ischemic; high-intensity focused ultrasound; acupuncture; synaptophysin (SYP)

新生儿缺血缺氧性脑损伤（Hypoxic-ischemic brain damage，HIBD）是儿科常见的临床并发症，主要由围产期窒息引起，可引起新生儿一系列病理生理改变，是造成中枢神经系统损害最常见的原因。早期干预康复治疗可促进 HIBD 的神经功能恢复，预防神经系统严重损害后造成的脑瘫、智力低下、癫痫等后遗症。目前临床上治疗 HIBD 的主要方法有：①物理治疗法如运动疗法、水疗、高压氧等；②营养神经的药物如神经节甘酯、神经生长因子；③传统的针灸治疗[1]。针灸历史悠久，其治疗 HIBD 疗效已得到大部分学者及临床医师的认可，但患者尤其是小年龄患儿对针灸有恐惧感，不可避免会出现晕针、滞针、弯针、断针等异常情况。高强度聚焦超声（High intensity focused ultrasound，HIFU）是重庆医科大学国家超声治疗中心经过数十年研究的精华成果，是以超声波为治疗源，利用超声波具有的组织穿透性和可聚焦性等物理特征，将体外低能量超声波聚焦成一点，具有无创伤、无感染、安全可靠的优点。通过长期的基础和临床研究，HIFU 已在肿瘤治疗区域有了重大的突破[2]，在促进胃肠道功能、镇痛等其他方面也有大量研究报道，其作用原理主要有机械作用、热效应及空化作用。HIFU 能否对 HIBD 有治疗作用，国内外尚无报道。我们通过制作 HIBD 新生鼠模型，观察脑组织病理变化，检测突触素（Synaptophysin，SYP）的表达情况来探讨 HIFU

作者介绍：胡文静（1985-），女，硕士，
研究方向：神经康复。
通信作者：周江堡，男，教授，Email：zhoujb1115@yahoo.com.cn。

对新生鼠 HIBD 的治疗作用及可能机制。

1 材料及方法

1.1 材料

SYP 抗体购自博奥森公司，二抗试剂盒和 DBA 显色剂购自北京中杉金桥公司，SYBR 试剂购自百泰克试剂公司，逆转录试剂盒购自 takara 试剂公司，realtime-PCR 仪器是 ABI 公司 steponePCR 仪，引物由北京三博远志生物技术有限责任公司设计，Invitrogen 公司合成，7 d 龄新生 SD 大鼠由重庆医科大学动物中心提供，海扶超声聚焦型号 CZF 治疗机由国家超声重点实验室提供，电针仪购自青岛鑫升实业有限公司，型号为 G6805-IB 型，针灸针型号为华佗 0.18 mm × 10 mm，8% O_2、92% N_2 混合气由重庆医科大学附属儿童医院提供。本实验在重庆医科大学附属儿童医院儿研所及重庆国家超声重点实验室完成。

1.2 动物模型制作及标本收集

选取 192 只新生 7 d 龄 SD 大鼠，随机分成 4 组：(1)假手术组(n=48，A)；(2)模型组(n=48，B)；(3)电针组(n=48，C)；(4)超声组(n=48，D)。按照 Rice-Vannucci 法[3]制作新生大鼠 HIBD 模型：7 d 龄新生 SD 大鼠(12~16 g)乙醚吸入麻醉后取仰卧位，分离颈总动脉并结扎，手术完成后置于 37℃恒温的密闭缺氧箱，通入体积分数为 8% O_2、92% N_2 的混合气体，放置约 120 min，缺氧完毕后存活者继续保温 1 h 后做行为测定，不能翻身、平衡异常或左旋者视为成功模型，送回母鼠笼中。假手术组动物麻醉后分离颈总动脉，不予结扎，缝合皮肤；模型组，HIBD 模型完成后不予任何干预；电针组，在 HIBD 模型完成后次日开始电针治疗：针刺大鼠“百会”穴，其定位参照《实验针灸学》。方法：以直径 0.18 mm，长 10 mm 的华佗牌针灸针，针刺百会穴，接 G6805-IB 电针仪，大鼠右后腿用湿生理盐水浸泡的纱布包裹接电针仪另一电极，连续波，频率 5~10 Hz，强度以引起穴位周围组织轻微颤抖为度，持续 10 min[4]。针刺均为每日上午 1 次。超声组，HIBD 模型完成后次日开始 HIFU 治疗：型号为 CZF，频率 10.20 MHz，脉冲 1 000 Hz，功率 0.5 W，涂抹超声耦合剂后探头对准百会穴，时间为 1 min，HIFU 治疗的各种参数由国家超声重点实验室设定[5,6]，超声治疗均在每日上午进行。在分别治疗 7、14、21 d 后每组随机取 8 只幼鼠，10% 水合氯醛麻醉动物后，打开胸腔暴露心脏，经左心室插管至主动脉起始处，剪开右心耳，用生理盐水 250 ml 先快后慢冲洗，流出清亮液体后，4% 多聚甲醛原位灌注固定，迅速取脑，放入 4%多聚甲醛中固定。另取相同时间点的各组 8 只幼鼠冰上迅速断头取脑，分离海马称重，置于 -70℃冰箱中保存。

1.3 免疫组织化学检测

标本固定后，常规脱水、包埋、切片，德国莱卡切片机切 5 μm 厚的标本，每隔 5 张切片选 1 张，用 SP 法进行免疫组化染色，光镜下观察海马区域的突触素表达情况。LEICA QWIN’q 2.3 图像分析处理系统测量光密度值及面积，每张切片随机取 5 个测量区测定，每次光学条件一致，每个测量区像素量一致，光密度值 除以图片的整个面积，即平均光密度值。

1.4 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

取脑海马组织，严格按照试剂盒说明常规提取 RNA，RNA 用分光光度计测量浓度，根据不同的 RNA 浓度，根据 10 μl 体系需要 500 ng RNA 来计算，按照说明书要求制备逆转录反应体系。反应条件是 37℃，15 min，85℃，5 s。反应产物 cDNA 放置于 -20℃ 冰箱保存。

1.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

PCR 反应体系：SYP 引物：5’-TCGCTTTCATG TGGC-TAGTTAGTTC-3’，5’-CCTTGAACACGAACCATAAGTTGC-3’，产物长度 228 bp；内参 GAPDH 引物：5’-TCGTGGAGTCTACT-GGCGTCTTC-3’，5’-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCTC-3’，产物长度 489 bp。反应体系为 2 × Taq MasterMix 12.5 μl，上下游引物（10 mmol/L）各 0.5 μl，cDNA 模板 2 μl，根据体系成分补充 dd H_2O 至 25 μl。反应条件：94 ℃变性 2 min，94℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72℃延伸 60 s，35 个循环，72℃终延伸 5 min。扩增产物经 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳后，在凝胶成像仪上成像，分析条带的亮度。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较均采用析因设计方差分析，以 P<0.05，差异具有统计学意义。

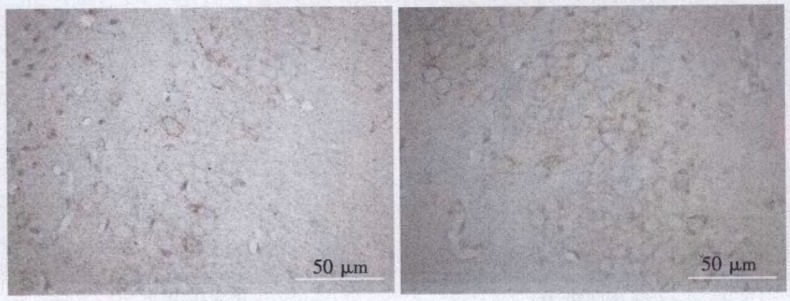
2 结 果

2.1 免疫组化结果

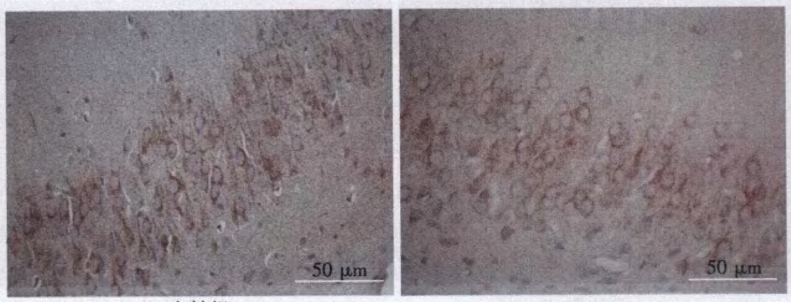
SYP 免疫反应产物为褐黄色颗粒状沉积，光镜下 SYP 均匀分布于海马辐射层内树突的周围及多形层锥体细胞层内胞体的周围，以 CA3 区尤为明显。模型组海马 CA3 区锥体细胞排列疏松，锥体细胞层次减少，相应各层 SYP 染色较浅；电针组和超声组海马 CA3 区锥体细胞排列较模型组整齐，SYP 染色较深。免疫组织化学分析海马 CA3 区的 SYP 在各组不同时间点的表达情况（见图 1），从图像可看出 SYP 在同一时间点的不同组之间表达水平以电针组和超声组术后 3 周时最高，以假手术组的水平最低。对实验图像进行 Ipp 软件分析结果显示各时间点上电针组和超声组 SYP 明显高于假手术组和模型组，其中 F=8.64，P<0.05，有统计学意义，术后 3 周时电针组和超声组 SYP 表达高于前 2 周，F=12.54，P<0.01，有统计学意义（见表 1）。

2.2 RT-PCR 结果分析

运用RT-PCR（图2）检测SYP时我们发现电针组和超声组各时间点表达量高于假手术组和模型组，在治疗 2 周 和 3 周的时候具有显著性差异性（见表2），其中 F = 10.52，P < 0.05。



A. 假手术组　　B. 模型组



C. 电针组　　D. 超声组

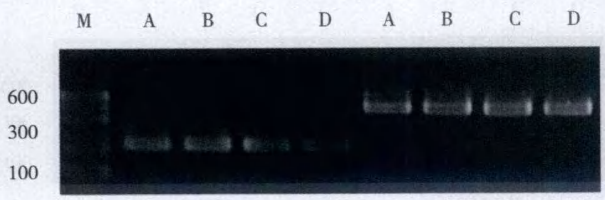
图上可以看出 SYP 在超声治疗组和电针治疗组中大鼠海马的表达高于假手术组和模型组

图 1　各组术后 3 周时海马 SYP 的表达情况（×400）

表 1　SYP 在海马表达情况（n=8，$\bar{x}\pm s$）

组别	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	F值	P值
假手术组	0.578 ± 0.088	0.621 ± 0.064	0.651 ± 0.094	2.45	0.280 3
模型组	0.706 ± 0.138[a]	0.739 ± 0.078	0.782 ± 0.066	7.98	0.034 6
电针组	0.901 ± 0.107[bc]	0.999 ± 0.155[bd]	1.543 ± 0.081[bdef]	8.64	0.020 4
超声组	0.904 ± 0.134[bc]	0.998 ± 0.252[bd]	1.630 ± 0.096[bdef]	12.54	0.000 1

注：a:P <0.05，b:P <0.01 与假手术组相比；c:P<0.05，d:P<0.01 与模型组相比；e:P<0.01 与术后 1 周相比；f:P<0.01 与术后 2 周相比



注：内参为 GAPDH，Marker 单位为 bp

图 2　RT-PCR 检测 SYP 的表达水平

表 2　SYP 在脑组织表达情况（n=8，$\bar{x}\pm s$）

组别	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	F值	P值
假手术组	0.719 ± 0.063	0.807 ± 0.185	0.838 ± 0.154	0.64	0.623 0
模型组	0.943 ± 0.079[a]	0.882 ± 0.206	0.911 ± 0.172[b]	16.9	0.000 2
电针组	0.958 ± 0.147[b]	1.262 ± 0.260[bd]	1.343 ± 0.238[bde]	10.52	0.000 4
超声组	0.952 ± 0.158[a]	1.162 ± 0.316[bc]	1.221 ± 0.266[bde]	20.89	0.000 1

注：a:P <0.05，b:P <0.01 与假手术组相比；c:P<0.05，d:P<0.01 与模型组相比；e:P<0.01 与术后 1 周相比

3　讨　论

突触连接是神经元之间信息和物质传递的重要结构[7]。近年来，大量的研究表明，当神经系统受到损伤时，可以通过突触和轴突再生，使得受损伤的神经元之间的联系重新建立而得以代偿和恢复功能，这就是突触重塑[8]。SYP（p38）是位于突触囊泡上与突触结构和功能密切相关的钙结合蛋白，在神经元胞体合成后主要转运至轴突终末，参与突触小泡膜与突触前膜的融合和神经递质的释放，还参与了神经元间信息传递，对突触传递效能的变化有明显影响，所以 SYP 既是突触连接的标志，又是突触传递效能水平的反应。大量研究证

明，其定量和定性分布能够准确反映突触的发生和分布，且与学习记忆能力关系密切[9]。本实验发现，假手术组中突触素有表达，在免疫组织化学染色中，胞浆里分布有弥散的棕黄色颗粒；模型组 SYP 表达高于假手术组，这主要是因为脑组织对缺血、缺氧等损伤非常敏感，自身有一定的修复作用。当阻断大鼠脑血流后，脑组织发生一系列级联式反应，而神经系统通过神经体液调节作用、神经-内分泌-免疫作用等途径促进突触和轴突再生。电针组和超声组在 HIBD 模型制作后各时间点 SYP 的表达均高于假手术组和模型组，电针组与超声组 SYP 表达在术后 3 周时最高；从基因水平上看，电针组与超声组各个时间点表达均高于模型组，这说明针灸与超声治疗能使脑组织发生突触重塑，能够从蛋白和基因水平上调 SYP 的表达，改善与恢复神经功能，而且治疗的时间相对越长，突触重塑与神经功能恢复越完善。而 HIFU 治疗 HIBD 能够达到和传统针灸一样的效果。

近年来，有关针灸治疗缺血性脑损伤的机制研究取得了一定进展，其内容主要包括：改善血液流变学特性；改善微循环，增加脑血流量；调节神经肽、递质与调质的水平；抗氧化自由基损伤，抑制脂质过氧化反应；减轻兴奋性氨基酸的毒性，抑制钙超载；抑制神经细胞凋亡[10]。大多数研究者认为针灸通过穴位刺激能够增加海马内突触素的表达，减轻兴奋性氨基酸的毒性，抑制钙超载，在一定程度上能够促进学习记忆能力的恢复。余曙光等[11]研究了电针对老年性痴呆大鼠及阿尔茨海默病模型大鼠海马神经元突触形态可塑性的影响，认为电针能有效修复大鼠海马神经元突触的形态，促进突触可塑性，阻止受损神经元突触的退变。本实验结果支持以上观点。

高强度聚焦超声作用原理主要有机械作用、热效应及空化作用。机械作用是超声波对人体的基本作用，能对细胞产生细微的按摩，增加细胞膜的渗透性，促进细胞内外的物质交换，改善组织代谢功能，使渗出吸收，有利于正常恢复；超声在体内能转换为热能，使局部组织温度升高、分子运动速度加快，这就是超声的热效应；超声空化效应是一种聚焦能量的有效方法，把超声场中低能量密度变换为气泡内部及其周围高能量密度特性[12]。廖维靖[13]、Mourad[14]等认为超声促进神经再生的主要机制是机械效应。一般认为高强度短时间辐照范围内的超声产生的空化效应是损伤机体的主要机制，美国医用超声学会 1985 年认为负声压峰值大于 2 MPa 即对人体产生有害效应，声强 <100 mW/cm² 认为一般不会对人体产生空化效应。1~4 W/cm² 超声会产生瞬态空化，这正是大多数诊断超声仪的输出强度[15]。HIFU 对组织的不同作用取决于组织类型及物理参数，但目前为止，HIFU 的生物学效应和相关的剂量学还处于一个探索阶段，尚无一个最佳频率、声强、时间参数组合的报道，这就限制了 HIFU 的全面临床应用。我们的研究证明 HIFU 和电针一样能够上调 SYP 的表达，从而降低兴奋性氨基酸对大脑的损害，促进突触重塑和大脑恢复。

综上所述，高强度聚焦超声通过其物理效应作用于穴位能够促进神经突触重塑，其机制可能类似于针灸，促进穴位组织兴奋，沿着经络传导至脑组织，改善脑部血液循环及脑部供养需求，促进神经元的能量代谢。它将传统针灸技术与现代物理康复技术结合起来，既能达到传统针灸的治疗目的，又能发挥超声的优势。HIFU 治疗过程中安全可靠、能防止医源性感染、解除患者对针灸的恐惧感，具有很高的临床应用价值。它有可能为 HIBD 及脑瘫等疾病的康复提供一种新的有效疗法。今后我们将在电子显微镜、电生理、行为学等方面更进一步研究高聚焦超声对脑损伤的影响。

参 考 文 献

[1] Perlman J M.Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury[J].Clin Ther,2006,28(9):1353-1365.

[2] Williams A K,Mart ínez C H,Chalasani V,et al.High-intensity focused ultrasound: where are we and where to from here[J].Expert Rev Anticancer Ther,2010,10(1):33-40.

[3] Rice J E,Vannucci R C,Brierley J B.The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J].Ann Neurol,1981,9(1):131-141.

[4] 张红星，王 琼，周 利，等.头针抗大鼠急性脑缺血再灌注炎症损伤的作用机制[J].中西医结合学报，2009，8(7)：769-774.

[5] Hong C Z,Lau H H,Yu J.Ultrasound thermotherapy effect on the recovery of nerve conduction in experimental compression neuropathy[J].Arch phys Med Rehail,1988,69(6):410-414.

[6] 白 晋，李发琪，杜永洪，等.高强度聚焦超声形成生物学焦域的剂量学研究[J].第三军医大学学报，2004，26(15)：1378-1380.

[7] Valtorta F,Pennuto M,Bonanomi D,et al.Synaptophysin:leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis[J].Bioessays,2004,26(4):445-453.

[8] Lu B,Chow A.Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity[J].Neurosci Res,1999,58(1):76-87.

[9] Haley G E,Kohama S G,Urbanski H F.Age-related decreases in SYN levels associated with increases in MAP-2,apoE,and GFAP levels in the rhesus macaque prefrontal cortex and hippocampuss[J].Age(Dordr),2010,32(3):283-296.

[10] 董锦丽，倪光夏.针刺治疗缺血性脑损伤的机制研究进展[J].江苏中医药，2009，41(9)：81-82.

[11] 余曙光，罗 松，韩 婷，等.电针对老年性痴呆大鼠海马神经元突触形态可塑性的影响研究[J].中华神经医学杂志，2006，5(4)：369-370.

[12] O'Neill B E,Vo H,Angstadt M,et al.Pulsed high intensity focused ultrasound mediated nanoparticle delivery:Mechanisms and efficacy in murine muscle[J].Ultrasound Med Biol,2009,35(3):416-424.

[13] 廖维靖，南登昆，黄彬鉴.超声对鼠周围神经损伤后肌肉神经再支配作用的研究[J].中华理疗学杂志，1995，18(3)：207.

[14] Mourad P D,Lasar D,Curra F P,et al.Ultrasound accelerates functional recovery after peripheral nerve damage[J].Nevrosurg,2001,48(5):1136-1140.

[15] 马 芳，李发琪，王志彪.超声空化效应的研究进展[J].临床超声医学杂志，2003，5(5)：292-294.

（责任编辑：关蕴良）