基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0048-03

高强度聚焦超声建立骨骼肌失神经萎缩动物模型的研究

徐 鹏,王 涛,冯 露,王 茜,胡文煦
(重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,重庆 400015)

【摘 要】目的:利用高强度聚焦超声(High intensity focused ultrasound,HIFU)设计及建立骨骼肌失神经萎缩动物模型。方法:实验兔共计 12 只,利用 HIFU 损伤实验动物一侧坐骨神经,与另一侧比较。1 周,2 周和 4 周后观察坐骨神经组织病理学改变及腓肠肌和比目鱼肌萎缩变化,并综合评价。结果:所有实验动物辐照侧均发生神经损伤症状,各辐照侧坐骨神经发生变性,腓肠肌和比目鱼肌与对照侧比较均萎缩。结论:利用 HIFU 建立骨骼肌失神经萎缩动物模型的方法可行、有效。

【关键词】高强度聚焦超声;失神经萎缩;动物模型;神经损伤
【中国图书分类法分类号】R454.3;Q95-33 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-25

Experimental study on the establishment of skeletal muscle denervated atrophy models by high intensity focused ultrasound

XU Peng, et al
(*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: The aim of this study was to evaluate the possibility and the safety to make use of image -guided high-intensity focused ultrasound (HIFU) to establish the skeletal muscle denervated atrophy models. *Methods*: One of sciatic nerves of 12 rabbits was treated by HIFU, under the guidance of ultrasound imaging. The other side was control group. The observation time was 1 week, 2 weeks and 4 weeks after HIFU treatment. The thickness?of soleus muscle was measured by B-mode ultrasonography. The weight of gastrocnemius muscles and soleus muscle was measured. Histological analysis of gastrocnemius muscles and nerve sections at the HIFU site were performed. *Results*: All the rabbits had taken place in the obvious symptoms of claudication. The soleus muscle and gastrocnemius muscle from the treated group were atrophy. The

作者介绍:徐 鹏(1982-),男,硕士,
研究方向:口腔颌面部整形。
通讯作者:王 涛,男,教授,E-mail:dtaosan@sina.com。

要结构蛋白,其存在与 HBV DNA 含量有明显的关系,是病毒复制的重要标志。因此将二者作为观察 HBV 表达复制的重要观察指标。

本实验将构建成功的重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 通过脂质体法转染入 HepG2.2.15 中,RT-PCR 法测定 HepG2.2.15 中 MxA mRNA 水平以及 ELISA 法测定其对 HBsAg、HBeAg 抑制效率。结果显示:MxA 基因在转染后细胞内表达升高并且明显抑制了 HBV DNA 复制及表达,提示 MxA 蛋白具有明显的抗 HBV 作用,为进一步研究 MxA 蛋白体内抗 HBV 作用奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 黄 琴,赵瑞秋,刘爱平,等. 人 MxA 基因重组真核载体的构建及鉴定[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(2):152-154.

[2] Haller O, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity [J]. Traffic, 2002, 3(10): 710-714.

[3] Hefti HP, Frese M, Landis H, et al. Human MxA protein protects mice lacking a *functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral* infections [J]. J Virol, 1999, 73(8): 6984-6991.

[4] Reichelt M, Stertz S, Spiegel M, et al. Missorting of La Crosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes [J]. Traffic, 2004, 5(10): 772-784.

[5] Turan K, Mibayashi M, Sugiyama K, et al. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered *influenza virus genome* [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(2): 643-652.

[6] Haller O, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity [J]. Traffic, 2002, 3(10): 710-714.

[7] Ogata S, Ogata A, Schneider-Schaulies S, et al. Expression of the interferon-alpha/beta-inducible MxA protein in brain lesions of subacute sclerosing panencephalitis [J]. J Neurol Sci, 2004, 223(2): 113-119.

[8] Chieux V, Chehadeh W, Hautecoeur P, et al. Inhibition of coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein [J]. Virology, 2001, 283(1): 84-92.

[9] Gordien E, Rosmorduc O, Peltekian C, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein[J]. J Virol, 2001, 75(6): 2684-2691.

[10] Peltekian C, Gordien E, Garreau F, et al. Human MxA protein participates to the interferon-related inhibition of hepatitis B virus replication in female transgenic mice [J]. J Hepatol, 2005, 43(6): 965-972.

[11] Fernandez M, Quiroga JA, CarrenoV. Hepatitis B virus downregulates the human interferon-inducible MxA promoter through direct interaction of precore/core proteins [J]. J Gen Virol, 2003, 84(8): 2073-2082.

(责任编辑:关蕴良)

sciatic nerves at the HIFU site showed degeneration by histologic. *Conclusion*: It is safe and realistic to use HIFU to establish the skeletal muscle denervated atrophy models.

【Key words】High intensity focused ultrasound(HIFU); Muscle denervated atrophy; Animal model; Nerve injury

骨骼肌失神经萎缩动物模型涉及到神经修复、肌肉失神经萎缩、神经性疼痛等许多方面,应用范围非常广泛。目前建立该模型主要方法为手术切断实验动物相关神经,给动物带来痛苦和死亡的危险,也给实验者带来手术操作的麻烦[1-3]。我们利用 HIFU 能对深部组织进行精确定位损伤的特点,达到非侵入性的损伤动物骨骼肌神经,从而建立骨骼肌失神经萎缩动物模型。探讨建立一种新型骨骼肌失神经萎缩动物模型的可能。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

采用 12 只健康成年雄性新西兰兔为实验动物,体重 2.5 kg 到 3.2 kg,实验前未发现有任何疾病症状。采用区组随机排列方法分为 1 周,2 周和 4 周组,每组 4 只实验动物。每只实验动物随机一侧坐骨神经为实验侧,另一侧为对照侧。

1.2 实验设备

重庆海扶技术有限公司提供的 JC 型聚焦超声治疗系统。治疗头频率 1.6 MHz,声功率 230 W,辐照时间共 20 s(辐照 5 s,间隔 5 s,单点 4 次)。焦距 13.0 cm,焦域大小 0.4 cm × 0.4 cm × 0.7 cm,声强 1 400 W/cm^2。

1.3 模型建立

通过肌肉注射地西泮(0.1 ml/kg)和速眠新注射液(0.2 ml/kg)麻醉实验动物。麻醉显效后用 8%硫化钠脱毛剂脱去实验动物实验侧大腿及小腿毛发。将其固定于超声工作台上。实验侧动物腿部全部浸泡入蓄水池中并固定。调整超声治疗头,使其对准实验动物膝关节平面以上 1.5 cm 处大腿横截面。利用频率 8.5 MHz 的 B 型超声显示定位坐骨神经,JC 型聚焦超声治疗系统进行辐照。辐照完成后用苏醒 3 号(2 mg/kg)肌肉注射,解除实验动物麻醉状态。预防性使用抗生素软膏涂擦辐照处皮肤。术后每只实验动物分笼饲养。

1.4 实验综合评价

1.4.1 后腿运动情况和比目鱼肌厚度变化 实验后每天观察其后腿运动情况和溃疡情况。分别在实验后 1 周、2 周和 4 周用 B 型超声测量实验动物比目鱼肌最厚处厚度(超声探头垂直于小腿长轴)。

1.4.2 坐骨神经组织病理变化 处死实验动物,切取两侧坐骨神经,行横截面组织病理学观察(HE 染色),比较其差别。

1.4.3 腓肠肌和比目鱼肌湿重变化 解剖暴露其双侧腓肠肌和比目鱼肌,比较其萎缩情况,并整体切取腓肠肌和比目鱼肌,称量其湿重,比较其差别。

1.4.4 腓肠肌肌细胞直径、截面积变化 对辐照侧和对照侧的腓肠肌中部肌肉组织进行组织病理学观察(HE 染色)。用 YC.YX-2050 型实验动物病理图文系统测定肌细胞直径、截面积(每个标本取 6 个切面,每个切面随机不重叠测定 6 个低倍镜视野,测量视野中每个肌细胞的直径、截面积,取其均值)。

1.5 统计学处理

各计量资料(比目鱼肌厚度、腓肠肌和比目鱼肌湿重、腓肠肌肌细胞直径和截面积)以均数 ± 标准差表示,统计学处理采用单侧单因素 t 检验,显著性差异的界值为 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 后腿运动情况和比目鱼肌厚度变化结果

所有实验动物在 HIFU 辐照后能在 B 超图像上立即显示出灰度增加变化。所有实验动物均出现跛行。所有实验动物术后进食良好,没有观察到抓咬辐照侧皮肤的情况,没有观察到皮肤损伤等并发症。实验后 1 周、2 周和 4 周用 B 型超声测量实验动物比目鱼肌最厚处厚度,除 1 周组外,2 周组和 4 周组辐照侧与对照侧间差异均有统计学意义(表 1)。

2.2 坐骨神经组织病理变化结果

处死实验动物,解剖暴露其两侧坐骨神经,见辐照侧坐骨神经色泽发白,与周边肌肉组织有一定粘连(图 1)。组织病理学检查示:1 周组辐照侧坐骨神经发生黏液样变性;2 周组辐照侧坐骨神经发生黏液样变性及空泡变性;4 周辐照侧坐骨神经发生大量空泡变性(图 2)。

2.3 腓肠肌和比目鱼肌湿重变化结果

完整切取腓肠肌和比目鱼肌(自股骨内外髁起点至跟骨结节止点),观察其大小,称量其湿重。经统计学处理,除 1 周组外,2 周组和 4 周组中辐照侧与对照侧间差异均有统计学意义(表 2)。

2.4 腓肠肌肌细胞直径、截面积变化结果

测定各组肌细胞直径、截面积,经统计学处理,除 1 周组外,2 周组和 4 周组中辐照侧与对照侧间差异均有统计学意义(表 3)。

3 讨 论

本实验结果显示,在辐照 1 周后,辐照侧实验动物坐骨神经发生变性,但腓肠肌和比目鱼肌变化不明显;2 周后,辐照侧比目鱼肌厚度与对照侧比较平均下降 9%,腓肠肌和比目鱼肌湿重平均下降 4%,腓肠肌肌细胞直径平均下降 6%,截面积平均下降 12%;4 周后,辐照侧比目鱼肌最厚处厚度与对照侧比较平均下降 11%,腓肠肌和比目鱼肌湿重平均下降 6%,腓肠肌肌细胞直径平均下降 8%,截面积平均下降 15%。说明肌肉发生有进行性萎缩趋势,成功证实辐照侧坐骨神经受到损伤,但其萎缩程度较其它文献低[4,5]。原因可能为辐照后,神经传导未完全阻断所致。2006 年,曾令全等在

表 1 辐照侧与对照侧比目鱼肌最厚处厚度比较(n=4,$\bar{x}\pm s$)

组别	辐照侧(cm)	对照侧(cm)
1 周	0.840 0±0.040 8	0.860 0±0.067 8
2 周	0.795 0±0.043 6*	0.875 0±0.026 5*
4 周	0.675 0±0.045 1*	0.750 0±0.049 7*

注：1 周组辐照侧与对照侧比较 t=1.4142，P>0.05，2 周组辐照侧与对照侧比较 *t=8.7636，P<0.05，4 周组辐照侧与对照侧比较 *t=11.6190，P<0.05

表 2 辐照侧与对照侧腓肠肌和比目鱼肌湿重比较(n=4,$\bar{x}\pm s$)

组别	辐照侧(g)	对照侧(g)
1 周	16.400 0±0.748 3	16.550 0±0.838 6
2 周	15.150 0±1.135 8*	15.700 0±1.311 5*
4 周	14.300 0±0.621 8*	15.250 0±0.806 2*

注：1 周组辐照侧与对照侧比较 t=1.5667，P>0.05，2 周组辐照侧与对照侧比较 *t=5.7446，P<0.05，4 周组辐照侧与对照侧比较 *t=6.3333，P<0.05

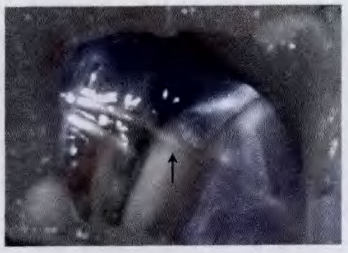


图 1 辐照点坐骨神经色泽变白（箭头所指为坐骨神经）

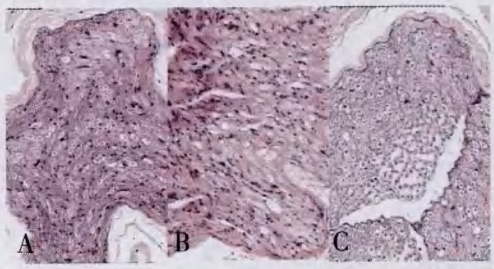


图 2 A、B、C 分别为 1 周、2 周和 4 周时 HIFU 辐照点坐骨神经切片图像（HE ×200）

表 3 各组腓肠肌肌细胞直径、截面积(n=6,$\bar{x}\pm s$)

组别	指标	辐照侧	对照侧
1 周	直径(μm)	18.161 7±0.944 0	18.191 7±0.949 0
	截面积(μm²)	259.420 0±26.477 6	260.373 3±26.498 0
2 周	直径(μm)	16.913 3±0.809 9*	17.985 0±0.778 1*
	截面积(μm²)	224.535 0±21.689 3*	254.313 3±21.965 3*
4 周	直径(μm)	15.775 0±0.707 5*	16.993 3±0.746 2*
	截面积(μm²)	195.673 3±17.785 2*	230.050 0±18.851 8*

注：1 周组辐照侧与对照侧腓肠肌肌细胞直径比较 t=0.5759，P>0.05，截面积比较 t=0.6201，P>0.05；2 周组辐照侧与对照侧腓肠肌肌细胞直径比较 *t=6.4550，P<0.05，截面积比较 *t=6.3866，P<0.05；4 周组辐照侧与对照侧比较腓肠肌肌细胞直径比较 *t= 17.3060，P<0.05，截面积比较 *t=9.5337，P<0.05

动物实验中证实 HIFU 可以完善地阻断交感神经和内脏感觉神经的传导[6]。但加大 HIFU 强度或增加辐照时间都会增加皮肤损伤等并发症的发生机会，其相关参数及辐照时间的确定还需大量实验研究。

目前在设计建立失神经骨骼肌萎缩动物模型时，主要使用大鼠作为实验动物，因本实验需用 B 型超声对辐照神经进行定位，而大鼠坐骨神经显像较困难，故选用新西兰兔。选择 B 型超声测量实验动物比目鱼肌，是因为比目鱼肌位于小腿中部后方皮下，较其余肌肉便于测量。

使用手术切断实验动物相关神经的方法建立骨骼肌失神经萎缩动物模型后，实验动物常常出现肢体溃疡、撕咬掉实验侧肢体等情况[4]，而在本实验中未观察到上述情况。2007 年，Jessica LF 等利用声强为 1 930 W/cm² 的 HIFU 经皮肤辐照活体新西兰兔坐骨神经，证明其能使所辐照的所有坐骨神经轴突发生退化坏死，其中 4 只新西兰兔出现轻度皮肤损伤，并在 1 周内愈合，没有观察到其余并发症[7]。以上实验为本实验提供了可靠的实验参数，同时显示了使用 HIFU 建立骨骼肌失神经萎缩动物模型在控制并发症方面的优越性。

总之，通过本项研究，证明了使用 HIFU 建立骨骼肌失神经萎缩动物模型的可能性和可行性。与传统方法相比，有创伤小、操作简便等特点。但要使本方法逐步成熟，还需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] 徐建广，顾玉东. 大鼠失神经支配骨骼肌萎缩的实验研究[J]. 中华实验外科杂志，2004，21(1)：57-58.

[2] Isabelle D，Clifford J，Woolf. Spared nerve injury：an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. Pain，2000，87(2)：149-158.

[3] 杜本军，苏 冰，朱灼新，等. 咬肌去神经动物模型的建立及其动态观察[J]. 第三军医大学学报，2007，29(2)：147-150.

[4] 徐建广，顾玉东. 大鼠坐骨神经显微解剖及其意义[J]. 上海医学，1999，22(3)：154-156.

[5] 银 欢，赵建文. 建立大鼠失神经支配骨骼肌萎缩模型适宜方法的研究[J]. 沈阳医学院学报，2008，10(2)：81-85.

[6] 曾令全，魏安宁，傅 洪，等. 高强度聚焦超声和乙醇阻滞腹腔神经节对内脏大神经放电的影响[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(2)：141-144.

[7] Jessica L F，James W L，Shahram V. Image-guided high-intensity focused ultrasound for conduction block of peripheral nerves[J]. Ann Biomed Eng，2007；35(1)：109-119.

（责任编辑：冉明会）