

大鼠脑组织固有频率测定

卢新刚,尹露,安云,伍丹丹,杨诣坤,杨斌堂,严隽陶

1.上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院,上海 200437; 2.上海交通大学机械系统与振动国家重点实验室,上海 200240

【摘要】目的:确定正常及常见中枢神经损伤、外周神经损伤后大鼠脑组织的固有频率,为经颅磁刺激、经颅声波刺激等非侵入性脑刺激技术的频率选择及相关动物实验的开展提供依据。**方法:**24只SD大鼠随机分为正常组、坐骨神经损伤(SNI)模型组和脑缺血再灌注(MCAO)模型组,每组8只大鼠。SNI模型组行坐骨神经钳夹伤术;MCAO模型组行脑缺血再灌注损伤术;两模型组造模7d后,3组大鼠逐步小心地打开颅骨、硬脑膜,暴露大鼠脑部。频率源输出频率,激光传感实时频谱观察、时频分析方法,得出特性曲线,确定大鼠脑组织幅值B最大时出现的固有频率。**结果:**每组大鼠脑组织幅值最大时的固有频率峰值较为接近,正常组大鼠为 (27.04 ± 2.12) Hz, SNI模型组大鼠为 (27.57 ± 2.19) Hz, MCAO模型组大鼠为 (26.44 ± 2.27) Hz。SNI模型组与正常组大鼠固有频率差异无统计意义($P>0.05$), MCAO模型组与正常组大鼠固有频率差异无统计意义($P>0.05$), MCAO模型组与SNI模型组大鼠比较固有频率差异无统计意义($P>0.05$)。**结论:**脑组织的固有频率是相对稳定的,在SNI周围损伤刺激时,以及MCAO这一中枢损伤刺激时,脑组织的固有频率不会发生较大差异。

【关键词】大鼠;脑;固有频率;神经损伤

【中图分类号】R318;R-33

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2020)12-1560-06

Measurement of natural frequency in rat brain

LU Xingang, YIN Lu, AN Yun, WU Dandan, YANG Yikun, YANG Bintang, YAN Juntao

1. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. State Key Laboratory of Mechanical System and Vibration, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Objective To identify the natural frequencies of rat brain tissue before and after common central nerve injury and peripheral nerve injury with an aim of providing the basis for the frequency selection of non-invasive brain stimulation techniques such as transcranial magnetic stimulation and transcranial acoustic wave stimulation as well as for the development of relevant animal experiments. **Methods** 24 SD rats were randomly divided into normal group, sciatic nerve injury (SNI) model group and cerebral ischemia reperfusion (MCAO) model group, with 8 rats in each group. SNI model group underwent sciatic nerve clamp injury; MCAO model group underwent cerebral ischemia-reperfusion injury; 7 days after the two model groups were modeled, the skulls and dura maters of three groups' rats were gradually opened, and the rats' brain units were carefully exposed. Frequency source output frequency, laser sensing real-time spectrum observation and time-frequency analysis method were used to obtain characteristic curve and identify the natural frequency that appears when the rat brain tissue amplitude B is maximum. **Results** The peaks of the natural frequency at the maximum amplitude of the brain tissue of each group of rats were relatively close. The normal group was (27.04 ± 2.12) Hz, the SNI model group was (27.57 ± 2.19) Hz, and the MCAO model group was (26.44 ± 2.27) Hz. The natural frequency difference between the SNI model group and the normal group is not statistically significant ($P>0.05$), the difference between the MCAO model group and the normal group is not statistically significant ($P>0.05$), and the MCAO model group and the SNI model group also have no statistically significant difference. ($P>0.05$). **Conclusion** The natural frequency of brain tissue is relatively stable. There will be no big difference in the natural frequency of brain tissue even when stimulation of peripheral injury SNI and central damage MCAO was happened.

Keywords: rat; brain; natural frequency; nerve injury

【收稿日期】2020-07-19

【基金项目】国家自然科学基金(30973806);国家自然科学基金青年科学基金(81603713);岳阳医院院级项目(KY11.30.57)

【作者简介】卢新刚,博士,主要研究方向:传统康复与脑功能的相关性, E-mail: 11082@163.com

【通信作者】严隽陶,主任医师,教授,博士生导师,主要研究方向:传统康复与脑功能的相关性, E-mail: doctoryjt@sohu.com

前言

固有频率也被称为自然频率,是自然系统中固有的物理参数,往往与物体本身质量、材料、形状等内在特性较为密切。外界施加的振动等干预在固有频率附近时,往往会引起能量较大的共振,可能引起破坏性。生物医学领域,生物体的各器官往往也存在着一一定的固有频率,但目前研究较少^[1]。近年来,非侵入性脑刺激技术,包括经颅磁刺激、经颅磁声刺激与经颅超声刺激等技术逐渐成为脑损伤治疗的热点^[2]。动物实验证实非侵入性脑刺激技术也对外周神经损伤、疼痛等感觉异常具有较好的作用^[3]。其优良疗效、无创伤特性受到了患者普遍欢迎,成为康复治疗的新手段。在上述非侵入性脑刺激技术的临床应用中,频率的选择成为了临床应用经颅磁刺激及基础科研时所必需考虑之处^[4]。

目前,在实验动物领域,已有大鼠部分内脏器官、兔的部分内脏器官测得了频率^[5],然而尚缺乏大鼠这种最常见的神经生物学实验动物的大脑固有频率的测试,这导致相关非侵入性脑刺激技术在基础实验中的研究受到限制。探索大鼠的大脑固有频率,是基础科研的急需。因此,本研究开展了大鼠大脑固有频率测定,以期为非侵入性脑刺激技术中频率的选择,相关谐振与生物体共振的基础研究和可能的临床治疗应用,提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 主要器械与试剂

SXP-1C手术显微镜(上海医光仪器有限公司),10%水合氯醛(国药试剂有限公司),成套手术器械(苏州林华医疗器械厂),MCAO线栓(北京西浓科技),固有频率检测平台(上海交通大学机械系统与振动实验室)。

1.2 实验动物及处理

SD大鼠,雌雄各半,购自上海吉辉实验动物有限公司。大鼠饲养于上海中医药大学附属岳阳医院动物房。保持12/12 h日夜节奏,充足饮水饮食。大鼠适应性饲养7 d后,随机分为3组:正常组、坐骨神经损伤(SNI)模型组、脑缺血再灌注(MCAO)模型组。每组8只大鼠。

正常组:正常组大鼠未做任何处理。

SNI模型组:SNI手术方法参考本组前期制备方法^[6],以10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉大鼠,对大鼠右侧下肢及腰部进行剃毛备皮以暴露皮肤区域,碘伏消毒,用剪刀于右下肢后外侧纵行剪开皮肤小口,将剪刀合并深入,并反向打开剪刀以钝性分离

股二头肌,用镊子于距离梨状肌下缘5 mm处坐骨神经主干处,游离出约2 cm长度的坐骨神经,止血钳完全闭合钳夹坐骨神经3次,每次10 s,间隔10 s。

MCAO模型组:参考文献[7]采用线栓法制备MCAO模型。选用合适大小的MCAO线栓,大鼠10%水合氯醛诱导麻醉,用小动物麻醉机1.4%异氟烷吸入维持麻醉,仰卧位固定,小心地剥离大鼠右侧颈总动脉,结扎颈总动脉近心端,远心端采用动脉夹夹闭,用眼科剪于颈总动脉分叉1 cm处剪口,插入线栓并慢慢推进深入颈内动脉,经分叉进入大脑中动脉,总深度约为18 mm。在插入合适深度后,线栓在大鼠颈部留120 min后拔出。

1.3 检测方法

大鼠水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉,将大鼠俯卧位固定,并置于测试台,大鼠脑部剃毛,用颅骨钻小心地在大脑中部区域依次打开大鼠颅骨及脑膜约一个4 mm×4 mm的空间,血管钳将颅骨朝后固定,将锡箔纸剪成2 mm×2 mm大小,小心地黏贴于大鼠脑组织正中区域,注意紧密贴合大鼠脑部不凹凸,将激光接收器对准锡箔纸直至调试信号稳定。

基于课题组前期测定方法^[6]以及物体固有频率测定的原理^[8-9],对本次测试的频率测试系统进行一定的调整,频率测试系统示意图见图1。本测试系统中,频率源的输出能够在测量所需的范围内连续刺激,激光传感器可以连续测出各频率点上的频率特性结果并立即显示特性曲线。使用Labview软件编写上位机界面,对数据进行分析与处理,可对采集的响应时域信号进行快速傅里叶变化,得到频率特性曲线。通过分析频率特性曲线的峰值处频率即为固有频率。单自由度系统在简谐激励力的动力学方程为: $m\ddot{x} + c\dot{x} + kx = F_0 \sin(\omega t)$,其中, F_0 为激励力的幅值, ω 为激励力的圆频率, m 为质量, c 为阻尼系数, k 为刚度, x 为相对平衡位置的位移。有阻尼系统在简谐激励下,运动微分方程的全解: $x = x_1(t) + x_2(t)$,其中, $x_1(t) = Ae^{-\zeta\omega_n t} \sin(\omega_d t + \varphi)$, $x_2(t) = B \sin(\omega_d t - \psi)$ 。 $x_1(t)$ 为阻尼衰减瞬态响应, A 为衰减幅值, ω_n 为无阻尼固有频率, ω_d 为有阻尼固有频率, ζ 为阻尼比, t 为时间, φ 为衰减相位。 $x_2(t)$ 为稳态响应, B 为稳态响应幅值, ψ 为稳态相位。快速傅里叶变化得到的频率特性,曲线中的幅频特性曲线即反映了稳态响应的幅值 B ,当测定频率进入共振区域,系统发生共振时,幅值 B 最大。因此通过分析幅频特性曲线的峰值处的频率即可得到固有频率。

1.4 统计学方法

每组8只大鼠,每只大鼠均进行3次测试,数据

用均数±标准差表示,Origin 2018 软件分析特性曲线,SPSS 19.0 软件单因素方差分析(One-way ANOVA)统计,两两比较采用LSD法,方差不齐时采用非参数检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

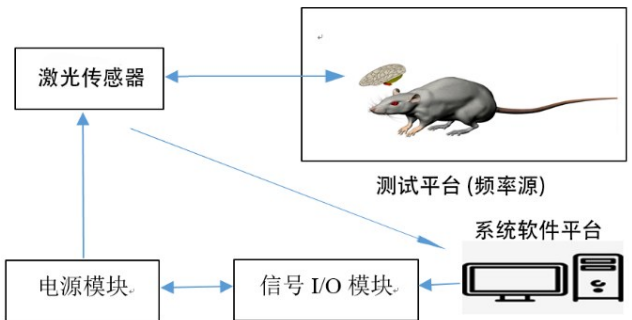


图1 固有频率测定系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of natural frequency measurement system

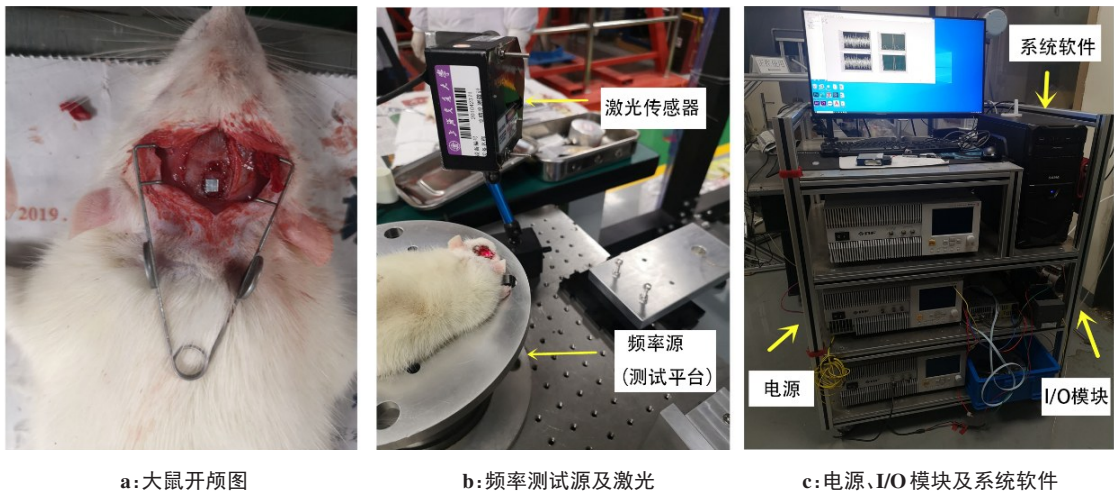
2 结果

2.1 大鼠大体情况

在水合氯醛麻醉(0.3 mL/100 g)及开颅后,大鼠呼吸正常,心跳平稳,证实本检测对大鼠创伤不大,也证实了本检测为活体大鼠的真实大脑固有频率。大鼠测定图片见图2。由图2a可知,大鼠在打开颅骨、脑膜之后,出血量可控,生命体征平稳。图2b可见测试激光照射至铝箔处。在测试结束后,缝合颅骨,各组大鼠均继续生存7 d以上,无死亡。

2.2 固有频率测试区间的选择

首先,频率源对大鼠的脑部组织以定频激发大鼠脑组织某频率振动(0.1、1、5、10、30、40、50 Hz)时,测试软件记录其幅值 B ,以此进行大致的固有频率区间的选择。结果发现,单只大鼠幅值 B 大小不一,但



a:大鼠开颅图

b:频率测试源及激光

c:电源、I/O 模块及系统软件

图2 大鼠实际测试图

Fig.2 The actual picture of rat test

当其脑部频率在20和30 Hz这两个点时,其激发的幅值 B 相比在其他点的幅值 B 较高,3组大鼠均呈现上

述的特性,证实固有频率所在区间可能在此。其中,各组典型大鼠的检测数据如表1所示。

表1 3组大鼠固定频率时的幅值 B

Tab.1 Amplitude B at naturalfrequency of 3 groups of rats

组别	0.1 Hz	1 Hz	5 Hz	10 Hz	20 Hz	30 Hz	40 Hz	50 Hz
正常组	0.9	0.8	0.6	0.7	3.5	3.8	0.8	0.7
SNI组	0.7	0.8	0.6	0.9	3.9	4.1	1.2	0.5
MCAO组	0.8	0.6	0.7	0.8	4.2	3.6	1.1	0.8

2.3 固有频率测定

测定3组大鼠脑组织固有频率,3组大鼠大脑的幅频特性曲线均呈现在一定频率区间内幅值 B 开始上升,达到顶峰,然后逐渐下降的特点,且其幅值最

高峰值基本在26~30 Hz的频率区间出现。正常组大鼠典型特性曲线见图3a,SNI模型组大鼠大鼠典型特性曲线见图3b,MCAO模型组大鼠典型特性曲线见图3c。

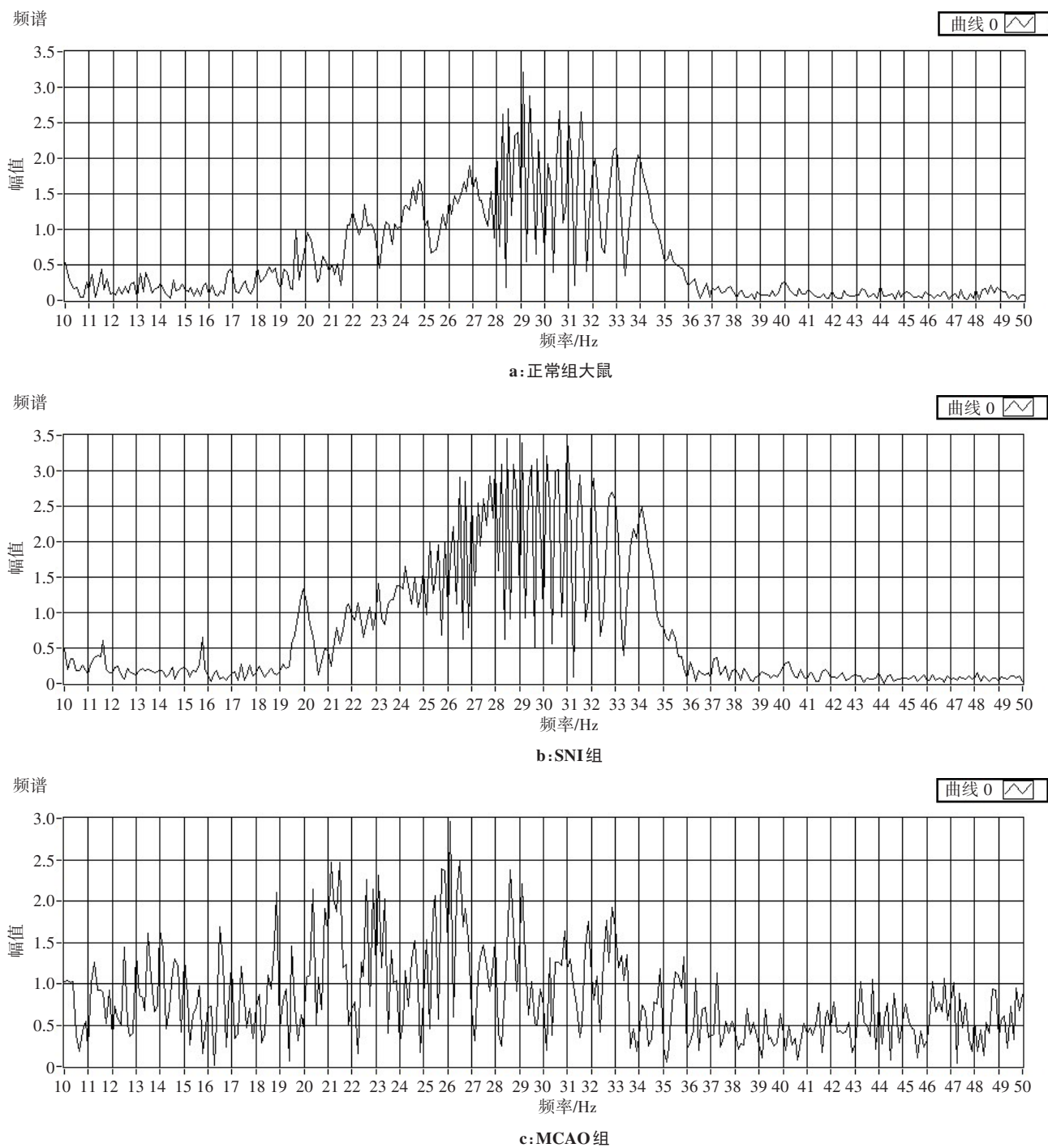


图3 3组大鼠的典型特性曲线
Fig.3 Typical characteristic curve of 3 groups of rats

对各组8只大鼠的幅值最高峰值进行测量并计算,得出该组大鼠固有频率均值与标准差,正常组大鼠8只大鼠固有频率为(27.04±2.12) Hz,SNI组大鼠脑组织固有频率为(27.57±2.19) Hz,MCAO组大鼠脑组织固有频率为(26.44±2.27) Hz。两组间比较证实,SNI模型组大鼠固有频率与正常组大鼠大脑的固有频率无显著性差异($P=0.412>0.05$),MCAO模型组大鼠固有频率与正常组大鼠大脑的固有频率无显著性差异($P=0.342>0.05$),MCAO模型组大鼠固有频率与SNI大鼠大脑的固有频率无显著性差异($P=0.079>0.05$)。

3 讨论

多种含有能量的外界刺激与生物机体内部的固有频率,特别是神经系统接近时,可能诱发能量较大的共振,如振动刺激、磁刺激、超声刺激与音波刺激^[10]。基于固有频率产生的共振,有许多文献认为是具有破坏性的。如人体牙周旁的基于固有频率的振动,可以使牙齿松动,对牙床结构具有破坏性^[11]。汽车的振动频率可能在人体腰背部肌肉固有频率4~6 Hz附近,从而引发腰背部共振,诱发下腰痛^[12]。然而,不是所有的生

物体振动都是有害且无用的,有部分的生物体共振也被认为是有益的。比如,音乐波所引起的生物体内部的振动,就认为是一种和谐振动,可以缓解肌肉酸痛和抑郁等状态^[13]。而基于肌肉固有频率的运动系统谐振,则表现为特定频率的节律性肌肉收缩,可以使肌肉提高收缩功率,提高最大运动能力^[14]。运用基于固有频率的谐振,可以有效提高成人和小儿麻痹患者运动能力^[15]。目前,极低频磁刺激对人体大脑被证实可以产生人体脑电的改变,如低频段的同步现象和高频段的去同步现象^[16]。然而,上述共振或谐振是否具体存在,且属于有益性效应和有害性谐振效应的研究尚未开展。因此,测定大鼠大脑本身的固有频率,为经颅磁刺激等非侵入性脑刺激的动物研究提供了基础,使得相关共振和谐振对动物影响的实验可以开展。

本实验基于上述目的开展了大鼠大脑固有频率的测定工作。实验结果证实,3组大鼠的特性曲线图类似,并在接近固有频率时,出现共振特有的图形,即幅值 B 持续升高到达顶峰后逐渐降低,3组大鼠固定频率比较无统计差异。实验中一些细节和结构是值得讨论的。第一,真实状态下的脑组织的固有频率测定,因其需要开颅等操作,是无法在大鼠清醒的情况下进行的,因此,本测定全部在麻醉下进行,未设置麻醉组和清醒组。前期本组对肌肉的固有频率研究也证实,麻醉和清醒状态下,对大鼠下肢肌肉的固有频率测定影响不大。第二,MCAO是常见的中枢神经损伤^[17],SNI是常见的外周神经系统损伤^[18]。本实验证实,大鼠的脑部组织固有频率相对是固定的,无论是MCAO这种中枢神经损伤,以及SNI这种外周神经损伤,对脑组织自身的固有频率影响不大。第三,大鼠的脑部组织的频率约为27 Hz,相比他人前期研究的大鼠内脏组织频率^[5],以及本组前期研究小腿三头肌等下肢肌肉频率^[6]都是相对高的,这可能有多种原因:一是可能与脑组织质量和密度相关;二是神经组织,特别是中枢神经组织是每分钟都在运转的组织。其中,脑组织是全身耗氧量最大,活动最为活跃的器官,其固有频率较高可能与其内部皮层、海马等神经结构的频繁活动有关。万馨等^[19]通过AMESim的计算,得出人体大脑的固有频率为30~400 Hz,高于人体其余器官的10~200 Hz,脑可能是人体组织中固有频率最高的器官。相应地,大鼠大脑的频率也可能是最高的。

综上所述,本研究首次测定了大鼠脑组织的固有频率,为相关动物实验的开展提供了基础。基于本实验,可以开展高于目前以经颅磁刺激为代表的非侵入性脑刺激技术对大脑的共振、谐振研究,这对

证实磁刺激脑部是否会产生不良效应,对指导频率的选择具有一定意义。本研究得出,大脑的固有频率约为27 Hz。因此,20 Hz以上,特别是固有频率附近的高频刺激,极可能导致大鼠脑部出现谐振,谐振的能量较大,导致刺激部位神经异常兴奋。这与目前研究^[20]普遍认为>10 Hz的高频经颅磁刺激可以扩大神经电位,促进神经冲动,提高兴奋性是吻合的,也为20 Hz以上的经颅磁刺激选择提供科学依据。但是,如果后续研究证实,能量过大的共振对大鼠大脑导致了破坏性结果,那么在今后动物实验中,应当谨慎选择27 Hz附近的高频刺激。

【参考文献】

- [1] 吴莉莉,惠国华,潘敏,等. 生物医学领域中随机共振的理论及应用研究[J]. 国际生物医学工程杂志, 2007, 30(2): 86-90.
WU L L, HUI G H, PAN M, et al. Theoretical and applied research on stochastic resonance in biomedical field[J]. International Journal of Biomedical Engineering, 2007, 30(2): 86-90
- [2] 曲笑霖,董艳,金海,等. 非侵入性脑刺激技术在创伤性脑损伤康复治疗中的应用研究进展[J]. 中华创伤杂志, 2018, 34(8): 759-763.
QU X L, DONG Y, JIN H, et al. The application of noninvasive brain stimulation technology in the rehabilitation of traumatic brain injury[J]. Chinese Journal of Trauma, 2018, 34 (8): 759-763.
- [3] TAİB S, ARBUS C, SAUVAGET A, et al. How does repetitive transcranial magnetic stimulation influence the brain in depressive disorders: a review of neuroimaging magnetic resonance imaging studies[J]. J ECT, 2018, 34(2): 79-86.
- [4] ZHIVOLUPOV S A, ODINAK M M, RASHIDOV N A, et al. Impulse magnetic stimulation facilitates synaptic regeneration in rats following sciatic nerve injury[J]. Neural Regen Res, 2012, 7(17): 1299-1303.
- [5] 杨光瑜,周继红,张岫竹,等. 大鼠与家兔内脏共振频率对比研究[J]. 国际生物医学工程杂志, 2011, 34(5): 275-278.
YANG G Y, ZHOU J H, ZHANG X Z, et al. Comparative study of visceral resonance frequencies in rats and rabbits[J]. International Journal of Biomedical Engineering, 2011, 34(5): 275-278.
- [6] 史智君,严隽陶,杨斌堂,等. 坐骨神经损伤后大鼠臀大肌、小腿三头肌固有频率测定的实验研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2019, 36(6): 721-725.
SHI Z J, YAN J T, YANG B T, et al. Experimental study on the measurement of natural frequency of gluteus maximus and triceps cruris in rats after sciatic nerve injury[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2019, 36(6): 721-725.
- [7] 林军,李艳芳,李冲,等. 线栓法大鼠MCAO模型制作的要点及经验总结[J]. 医学综述, 2018, 24(17): 76-80.
LIN J, LI Y F, LI C, et al. Key points and experience summary of making MCAO model of rats by thread bolt method[J]. Medical Review, 2018, 24(17): 76-80.
- [8] XI W, BINT Y, HU Y. Optimal design and experimental study of a multi-dynamic vibration absorber for multi-frequency excitation[J]. J Vib Acoust, 2017, 139(3): 031011.
- [9] 谢宝莹,杨斌堂,杨诣坤,等. 新型电磁振动台低频振动控制研究[J]. 噪声与振动控制, 2018, 38(3): 198-202.
XIE B Y, YANG B T, YANG Y K, et al. Research on low frequency vibration control of a new electromagnetic vibration table[J]. Noise and Vibration Control, 2018, 38(3): 198-202.

- [10] GUO D, PERC M, ZHANG Y, et al. Frequency-difference-dependent stochastic resonance in neural systems[J]. *Phys Rev E*, 2017, 96(2-1): 022415.
- [11] 辛海涛, 李玉龙, 郭伟国. 后牙牙周附着与牙齿振动频率和动度的有限元分析[J]. *现代口腔医学杂志*, 2009, 23(3): 265-268.
XIN H T, LI Y L, GUO W G. Finite element analysis of posterior periodontal attachment and tooth vibration frequency and mobility[J]. *Journal of Modern Stomatology*, 2009, 23(3): 265-268.
- [12] 赵亮, 黄昌林. 谐振致装甲步兵肌源性下腰痛的调查与分析[J]. *实用医药杂志*, 2015, 32(8): 7-9.
ZHAO L, HUANG C L. Investigation and analysis of myogenic low back pain in armored infantry caused by resonance[J]. *Journal of Practical Medicine*, 2015, 32(8): 7-9.
- [13] 陈勇. 温情的音乐与运动同步共振疗法最适合过劳人群[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(52): 10632-10635.
CHEN Y. Warm music and motion synchronous resonance therapy is most suitable for overworked people[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2007, 11(52): 10632-10635.
- [14] 许光旭, 顾绍钦, 孟殿怀, 等. 健康青年人步行效率分析-肌肉谐振规律的前驱研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2009, 31(4): 253-255.
XU G X, GU S Q, MENG D H, et al. Analysis of walking efficiency of healthy young people: a precursor study of muscle resonance law [J]. *Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2009, 31(4): 253-255.
- [15] 许光旭, 顾绍钦, 孟殿怀, 等. 生物谐振规律对步行效率影响的前驱研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(12): 1092-1094.
XU G X, GU S Q, MENG D H, et al. A pre-research on the influence of biological resonance law on walking efficiency[J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Medicine*, 2008, 23(12): 1092-1094.
- [16] 王学民, 陈芳, 郁洪强, 等. 基于极低频磁刺激的大脑谐振效应[J]. *天津大学学报*, 2011, 44(9): 823-828.
WANG X M, CHEN F, YU H Q, et al. Brain resonance effect based on extremely low frequency magnetic stimulation [J]. *Journal of Tianjin University*, 2011, 44(9): 823-828.
- [17] FLURI F, SCHUHMANN M K, KLEINSCHNITZ C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3445-3454.
- [18] CHALLA S R. Surgical animal models of neuropathic pain: pros and cons[J]. *Int J Neurosci*, 2015, 125(3): 170-174.
- [19] 万馨, 芮延年. 基于AMESim的人体固有频率计算[J]. *南通职业大学学报*, 2014, 28(1): 103-106.
WAN X, RUI Y N. Calculation of natural frequency of human body based on AMESim [J]. *Journal of Nantong Vocational University*, 2014, 28(1): 103-106.
- [20] DAYAN E, CENSOR N, BUCH E R, et al. Noninvasive brain stimulation: from physiology to network dynamics and back[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(7): 838-844.

(编辑:陈丽霞)