

·基础研究·

电针对局灶性脑缺血成年大鼠内源性神经干细胞增殖的影响*

刘 喆¹ 赖新生²

摘要 目的: 研究成年大鼠脑缺血后缺血脑区神经干细胞增殖情况及电针干预对其影响, 探讨电针治疗缺血性脑损伤的作用机制。**方法:** 采用开颅热凝闭法制作大鼠中动脉闭阻(MCAO)模型, 随机分为模型组与电针组, 缺血后用溴脱氧尿苷(BrdU)腹腔注射标记增殖的神经细胞, 选用“大椎”、“百会”行电针干预, 采用 BrdU 免疫组化观察脑缺血后第 3d、7d、14d 与 21d 四个不同时相 BrdU 阳性细胞数量的变化情况。**结果:** 脑缺血后不同时相缺血侧皮质、齿状回、纹状体和 SVZ 均有 BrdU 阳性细胞, 其中第 7d 的阳性细胞数量增加最为显著 ($P<0.01$); 而且电针组在不同时相的细胞数量均较同时相模型组有明显的增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:** 缺血可激发相关脑区神经干细胞的增殖, 电针可起到促进作用, 推论这种作用可能是电针治疗脑缺血的重要作用机制之一。

关键词 局灶性脑缺血; 神经干细胞; 溴脱氧尿苷; 电针

中图分类号: R246, R743, R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-03-0218-04

Effects of electro-acupuncture on proliferation of endogenous neural stem cells after focal cerebral ischemia in adult rats/LIU Zhe, LAI Xinsheng//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(3): 218—221

Abstract Objective: To investigate the effects of electro-acupuncture (EA) on the proliferation of neural stem cells (NSCs) and neurogenesis in the regions of ischemic brain injury of rats and to explore the mechanism of EA in treating ischemic brain injury. **Method:** The model of permanent focal ischemia was made by heat-coagulation of the right middle cerebral artery (MCA) after craniotomy, and the rats were randomized into model group and EA group. After middle cerebral artery occlusion (MCAO), proliferating brain cells were labeled with bromodeoxyuridine (BrdU) and EA was applied to "Dazhui" and "Baihui" in EA group. At the 3rd, 7th, 14th and 21st days after cerebral ischemia rats ($n=5$) were killed and the number of proliferating cell was observed by Immunohistochemistry for BrdU. **Result:** BrdU-positive cells were found in cortex, dentate gyrus (DG), striatum and subventricular zone (SVZ) at different time after cerebral ischemia, at the 7th day remarkably increased ($P<0.01$). The number of BrdU-positive cells in EA group was more than that in model group at different time ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** Ischemia can stimulate the proliferation of NSCs and the proliferation can be promoted by EA in interrelated regions after focal cerebral ischemia. It may be one of important mechanisms of EA in treating ischemic brain injury to enhance endogenous neurogenesis after ischemia.

Author's address College of Acupuncture & Massage, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, 310053

Key words focal cerebral ischemia; neural stem cell; bromodeoxyuridine; electro-acupuncture

如何有效促进脑血管病患者神经功能的恢复是目前国际神经科学界研究的重点课题。以往认为成年中枢神经系统在急性损伤和神经退行性疾病中因缺乏神经发生和结构性重建的功能机制而导致脑功能缺陷^[1]。然而近年研究表明, 在成脑海马齿状回 (dentate gyrus, DG) 和室下带 (subventricular zone, SVZ) 仍存在神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 并不断分化为神经元和胶质细胞, 这些新生细胞对脑可塑性起到重要作用^[2]。脑缺血可刺激成脑神经发生, 使用某些干预措施可起到促进作用, 并能改善某些功能缺陷症状, 具有潜在治疗价值^[3-4]。本研究制备大鼠局灶性脑缺血模型并施以电针干预,

采用免疫组织化染色法观察不同脑区 NSCs 增殖的影响情况, 以探讨电针促进 NSCs 在脑缺血损伤神经修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目 (31458), 浙江省自然科学基金项目 (Y205389)

1 浙江中医药大学针灸推拿学院, 杭州, 310053

2 广州中医药大学针灸推拿学院

作者简介: 刘喆, 男, 医学博士, 教授

收稿日期: 2006-05-29

溴脱氧尿苷 (bromodeoxyuridine, BrdU, Sigma 公司), 小鼠抗大鼠 BrdU 单克隆抗体 (Sigma 公司), 免疫组化染色试剂盒 (Sigma 公司), 其中包括: 生物素化抗小鼠抗体 (二抗), 亲和卵白素化过氧化物酶 (三抗); PBS (北京中山生物技术公司); 正常山羊血清 (武汉 BOSTER 公司); DAB (武汉 BOSTER 公司) 及去离子甲酰胺、TritonX-100 等。

1.2 主要仪器

石蜡切片机 (Leica 2025 型, 德国); 生物显微镜 (Olympus BS-50 型, 日本); CCD 数码相机为 Canon 970 型; 图像采集和分析采用图像分析系统 (北京航空航天大学图像分析系统, 3.0 版); G6805-1 电针治疗仪 (青岛华青仪器厂)。

1.3 动物及分组

SPF 级 SD 大鼠 40 只, 雄性, 体质量 250—280g, 鼠龄为 3—4 个月 (广州中医药大学实验动物中心提供)。所有动物随机分为模型组与电针组, 造模后按不同时间第 3d、7d、14d 和 21d 共 8 个亚组, 每组动物 5 只。

1.4 动物造模

各组大鼠称重后, 用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (50mg/kg), 参考 Bederson 等^[9]方法加以改良^[6]进行模型制作, 主要步骤: 将大鼠固定于手术台上, 在右眼外眦距外耳道连线中点处垂直切开皮肤和颞肌, 在颞骨前下紧邻颞弓前份上缘的部位开窗, 用自制开颅钻钻开此处颞骨, 暴露 $\Phi 5\text{mm}$ 的骨窗。在手术显微镜下找到大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA) 并用烧灼的金属针凝闭位于嗅束至大脑下静脉之间的 MCA 主干, 阻断血流。检查无活动性出血后, 用生理盐水和双抗 (青霉素 $1 \times 10^5\text{U/L}$, 庆大霉素 $1 \times 10^4\text{U/L}$) 反复冲洗脑面后缝合伤口。缺血模型的可靠性已经过反复的神经功能缺损评分和 TTC 染色所证明。

1.5 治疗方法

1.5.1 取穴: 穴位选用督脉“大椎”、“百会”2 穴。其定位参照大鼠的常用针灸穴位进行^[7], “百会”位于顶骨正中; “大椎”在第 7 颈椎与第 1 胸椎间, 背部正中。

1.5.2 针刺方法: 电针组: 本组大鼠于造模后当日开始实施电针治疗, 取“百会”和“大椎”穴使用 1 寸毫针刺, 联接 G6805-1 电针治疗仪, 选择 5—10Hz 频率交替的等幅疏密波, 电流强度 1—5mA 以大鼠身体轻微颤动为宜, 持续 30min。模型组: 本组大鼠于造模后当日开始按同等条件抓取, 但不实施电针治疗处理。

1.6 BrdU 标记方法

在大鼠处死的前 3 天开始, 进行 BrdU 腹腔注射 50mg/kg, 每 12h/1 次, 连续注射 4 次, 在最后一次注射后 24h 处死, 进行指标检测。

1.7 切片制备

动物在戊巴比妥钠 (40mg/kg) 腹腔麻醉下开胸, 经左心室、升主动脉插管, 先用生理盐水 150ml 冲去血液, 继而灌注含 40mg/L 多聚甲醛的 0.1mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS, pH7.4) 450ml, 注毕取前脑置于相同的新鲜灌注液后固定至组织块沉底。继之梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋, 石蜡切片, 片厚 $5\mu\text{m}$ 。

1.8 神经功能缺损评分

参照 Bederson 等^[9]的评分方法, 分别观察大鼠行为表现并进行神经功能缺损评分, 评估 MCA 阻断后大鼠的神经损伤和治疗状况: 0 分, 向地面伸展两前肢, 未见行为异常; 1 分, 脑损伤对侧前肢持续屈曲; 2 分, 脑损伤对侧前肢屈曲, 脑损伤对侧肩内收但无扭转, 侧推抵抗力弱; 3 分, 脑损伤对侧前肢屈曲, 脑损伤对侧肩内收、扭转, 侧推无抵抗力。

1.9 BrdU 免疫组化染色方法

参照 BrdU (2351, Sigma) 说明书染色方法加以改进: 切片常规脱蜡至水后, 进行 BrdU 免疫组化染色。首先进行切片细胞核 DNA 解链变性处理, 切片先后入新鲜 3% H_2O_2 (37°C)、50% 甲酰胺/2×SSC (64°C)、2N HCl (37°C) 孵育, 0.1mol/L 硼酸缓冲液 (pH 8.5) 浸洗; 继之滴加 10% 胃蛋白酶、1% BSA (含 0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 配制), 37°C 孵育, 甩脱多余液体, 不洗; 然后分别滴加小鼠抗 BrdU 单克隆抗体 (1:1000, Sigma)、生物素化山羊抗小鼠 IgG (1:150, Sigma)、HRP 标记的卵白素 (1:150, Sigma), 37°C 水浴; 0.05% DAB (含 0.01% H_2O_2) 室温显色, 苏木素复染, 酒精脱水, 干燥, 二甲苯透明, 明胶玻片裱片。以上各步之间除说明者外, 均以 0.01mol/L PBS 洗涤, 5min×3 次。

阴性对照: 用 BSA 或 PBS 代替一抗作孵育, 其余步骤同上, 用以检查 BrdU 免疫反应的特异性。

1.10 细胞计数方法

染色结果采用生物显微镜观察并摄片, 在 10×40 倍光镜下观察大鼠脑切片各区 BrdU 阳性细胞, 并用图像分析系统采集图像, 设置相等的检测窗口面积计数 BrdU 阳性细胞。每只大鼠随机取 3 张非连续切片, 每部位各随机取 3—4 个非重叠视野进行计数, 以此得出每张切片 BrdU 阳性细胞的平均数。

1.11 统计学分析

每组神经功能缺损评分和细胞计数结果均以均值±标准差表示,使用 SPSS 12.0 软件包行方差分析及组间比较, $P<0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 脑缺血后各组大鼠神经功能缺损评分比较及电针对其影响

电针治疗前,两组脑缺血神经病学评分比较差异无显著性意义($P>0.05$)。动物造模后 3d,其神经功能缺损症状最为明显,随着缺血时间的延长,模型组动物症状逐渐减轻;其中,第 3d 分别与第 7d、14d、21d 时相的评分比较,差异有显著性意义($P<0.01$),而第 7d—21d 评分虽呈下降趋势,但第 7d、14d 和 21d 之间评分比较差异无显著性意义($P>0.05$)。电针组评分变化趋势与模型组基本相同,但电针组与模型组在各时相上的评分比较差异均有显著性意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 1。

2.2 脑缺血后各组大鼠缺血侧皮质 BrdU 阳性细胞计数比较及电针对其影响

缺血模型组各时相大鼠皮质 BrdU 阳性细胞数量经统计分析表明存在显著差异,在 7d 时达到峰值,以后开始逐步下降,其中第 7d 时相上第 3、14、21d 的均存在高度显著性差异($P<0.01$),而除第 3d 和 21d 无明显差异($P>0.05$)外,其余各时相的变化亦存在高度显著性差异($P<0.01$);电针组各时相的变化也存在同样趋势。但缺血后电针组 BrdU 阳性细胞数量在各时相均较缺血模型组显著增加($P<0.05$),在第 7d、14d 存在高度显著性差异($P<0.01$)。见表 2。

2.3 脑缺血后各组大鼠缺血侧纹状体 BrdU 阳性细胞计数比较及电针对其影响

在局灶性脑缺血后模型组缺血侧纹状体出现 NSCs 增殖,第 3、7、14 和 21d 不同时相上 BrdU 阳性细胞数比较均存在高度显著性差异($P<0.01$)。电针组在 4 个时相上增殖状态也呈同样趋势,其中第 3d 和 14d 比较差异无显著性($P>0.05$);而阳性细胞计数均较同时相模型组有显著增高趋势($P<0.01$) (表 3)。

2.4 脑缺血后各组大鼠缺血侧海马 BrdU 阳性细胞计数比较及电针对其影响

脑缺血后模型组缺血侧海马 NSCs 增殖,除第 14d 与 3d、21d 比较差异无显著性($P>0.05$)外,余各时相比较差异均存在显著性,其中第 7d 与其他时相的差异具有高度显著性($P<0.01$)。电针组在 4 个时相上增殖状态也呈同样趋势,其中第 3d 和 14d 比较

差异无显著性;而细胞计数均较同时相模型组明显增高(第 21d 时相上 $P<0.05$,其余时相 $P<0.01$)。见表 4。

2.5 脑缺血后各组大鼠缺血侧室下带 BrdU 阳性细胞计数比较及电针对其影响

模型组缺血后各时相缺血侧室下带的阳性细胞计数相互比较均存在显著性差异,其中 7d 时相上的增殖情况与其他各时相比较差异存在高度显著性($P<0.01$)。电针组在不同时相上也呈现出同样的变化趋势,而在同时相上与模型组相比细胞数明显高于模型组,差异存在高度显著性($P<0.01$)。见表 5。

2.6 脑缺血后各组大鼠缺血侧不同脑区 BrdU 阳性细胞计数总体变化趋势

两组大鼠缺血后在缺血侧不同脑区的细胞计数总体变化趋势具有一致性,而海马 DG 神经发生的变化曲线游离于其他脑区的变化趋势。见图 1—2。

表 1 两组大鼠脑缺血后神经功能缺损评分比较 (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	缺血时间			
		3d	7d	14d	21d
模型组	9	2.78±0.44	2.00±0.71 ^③	1.89±0.60 ^③	1.67±0.50 ^③
电针组	9	2.11±0.78 ^①	1.22±0.67 ^{①③}	0.78±0.67 ^{②③}	0.56±0.53 ^{②③}

与模型组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与组内缺血 3d 比较:③ $P<0.01$

表 2 脑缺血后不同时间皮质 BrdU 阳性细胞数量比较 (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	时间			
		3d	7d	14d	21d
模型组	5	12.22±2.23	23.88±3.04 ^③	18.20±2.84	8.78±2.74
电针组	5	16.02±2.76 ^①	33.44±4.45 ^{②③}	26.46±2.81 ^②	13.6±2.58 ^①

与模型组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与组内其他时相比较:③ $P<0.01$

表 3 脑缺血后不同时间纹状体 BrdU 阳性细胞数量比较 (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	时间			
		3d	7d	14d	21d
模型组	5	16.82±1.79	24.94±2.78 ^②	13.14±1.69	8.84±1.23
电针组	5	22.88±2.60 ^①	32.52±3.90 ^{①②}	20.30±2.55 ^①	13.38±1.84 ^①

与模型组比较:① $P<0.05$;与组内其他时相比较:② $P<0.01$

表 4 缺血后不同时间海马 BrdU 阳性细胞数量比较 (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	时间			
		3d	7d	14d	21d
模型组	5	21.18±3.07	27.46±3.24 ^③	19.30±2.94	15.98±2.34
电针组	5	30.90±3.31 ^②	39.64±4.66 ^{②③}	28.44±3.33 ^②	20.06±2.54 ^①

与模型组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与组内其他时相比较:③ $P<0.01$

表 5 缺血后不同时间室下带 BrdU 阳性细胞数量比较 (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	时间			
		3d	7d	14d	21d
模型组	5	15.54±1.42	21.22±2.56 ^②	12.52±1.67	8.58±1.60
电针组	5	21.50±2.64 ^①	28.50±3.22 ^{①②}	17.64±1.88 ^①	14.00±2.60 ^①

与模型组比较:① $P<0.05$;与组内其他时相比较:② $P<0.01$

3 讨论

脑缺血可诱导年轻及老龄动物大脑的室下带和海马颗粒细胞下层(subgranular zone, SGZ)的神经

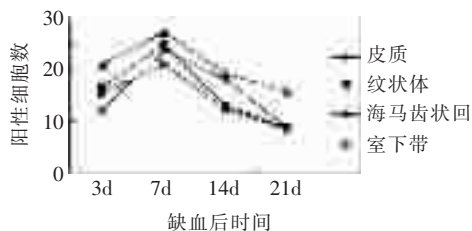


图1 模型组缺血后不同部位 BrdU 阳性细胞数变化趋势

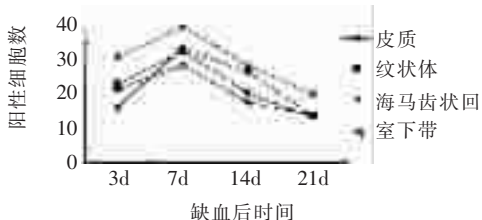


图2 电针缺血后不同部位 BrdU 阳性细胞数变化趋势

发生增强^[8-9],而缺血性损伤可导致纹状体、大脑皮质甚至海马等脑区神经元的丢失,并造成动物运动和认知等功能障碍。BrdU作为一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞处于DNA合成期可掺入新合成的DNA中,只要细胞不消亡,这种BrdU在胞核DNA中将长期存留。故可用免疫组织化学染色法观察BrdU在细胞内的掺入情况,且BrdU标记和检测的准确性高,是反映细胞增殖的理想指标。

本研究发现模型组和电针组大鼠在缺血后各时相缺血侧的皮质、纹状体、海马和室下带等区域均有BrdU阳性细胞分布,表明缺血后上述部位均有增殖的NSCs存在。Iwai等^[10]利用沙鼠全脑缺血/再灌注模型发现,模型动物5d后海马的BrdU阳性细胞开始增加,10d左右达到高峰,20d时降至对照组水平。Kee等^[11]采用两血管闭塞合并低血压法造成大鼠脑缺血模型,缺血再灌注1周后,齿状回NSCs的增殖增加了2—3倍。Jin等^[12]用MCAO模型,发现脑缺血可以促使海马和室下带的NSCs增殖,且未缺血侧大脑半球NSCs的增殖也有增加。Zhang等^[13]发现在大脑皮质缺血灶周围和室下带均有BrdU表达,并在再灌注后第7d达到高峰;再灌注后14d,增殖的NSCs总数达到最大值。上述研究表明,全脑或局灶性脑缺血均可引起海马、室下带及损伤皮质等部位的NSCs增殖,尽管观察结果并不完全一致,但7—14d达到高峰,14d后开始下降的总体趋势是十分明显的。

本研究显示,采用开颅凝闭法制备的大鼠MCAO模型同样可引起大脑内源性NSCs的增殖,尤其以缺血侧的增殖表现最为显著。研究中分别观察了模型组缺血侧皮质、纹状体、海马和室下带四个脑区,BrdU阳性细胞均于3d时明显增加,7d时

达到高峰,14d时出现下降趋势。而电针治疗组各部位的NSCs增殖规律也与模型组表现一致,但与同时相的模型组比较,其增殖数量明显增多($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。我们同期采用NSCs特异性标记物巢蛋白(Nestin)的免疫组化观察也显示了同样的增殖趋势^[14]。证明电针可有效地促进局灶性脑缺血后NSCs的增殖活动。

研究表明^[8-9],室下带的NSCs可迁移到缺血灶附近并分化成投射神经元表型细胞,而纹状体增殖的神经细胞可有效促进缺血损伤的运动功能的恢复。新近研究证实^[15],新生神经元具有突触发生的能力并能够功能性整合到现存神经回路中。在我们同期研究中已经证实^[16]:随着缺血时间的延长,模型组动物神经功能缺损症状和病理损害程度逐渐减轻,梗死体积也有逐步减小的趋势。说明缺血性脑损伤后,脑组织存在自我修复-神经可塑性。推测这与本研究中发现的缺血后NSCs增殖现象之间存在着必然的联系,说明NSCs参与了脑缺血损伤的自我修复,但这种自我修复是有限的,上述三个方面自愈程度均较电针治疗组的治疗效果存在显著的差异^[16]。而本研究中证实,电针治疗组在各时相上,NSCs增殖数量明显多于模型组。结果表明电针对大鼠脑缺血组织的明显保护作用与促进NSCs的增殖密切相关。由此证实我们以往提出的一个假说^[17]:电针促进缺血后脑组织NSCs的增殖与存活是治疗缺血性脑卒中的重要作用机制之一。此外,海马神经增殖活动游离于其他脑区的变化趋势,提示海马神经发生可能具有特殊的病理生理意义。

可以肯定的是,内源性NSCs的增殖与存活并不是脑缺血的直接结果,而是缺血引起了脑内某些因子的变化,通过不同途径作用于脑内处于静止期的NSCs使其增殖、迁徙和分化^[4]。本研究虽然没有涉及电针促进NSCs增殖的作用机制研究,但通过以往针灸对脑缺血临床与实验研究的作用机理研究成果的复习,我们认为电针治疗可能与其调节了脑缺血所引起脑内微环境的变化有关。但其具体的作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

[1] Lowenstein DH, Parent JM. Brain, heal thyself [J]. Science, 1999, 283(5405):1126—1127.
 [2] Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system [J]. Annu Rev Neurosci, 2005,28:223—250.
 [3] Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous