

任脉电针对脑缺血大鼠侧脑室下区神经干细胞增殖与分化的影响

杨卓欣¹ 于海波¹ 饶晓丹² 刘远声¹ 皮敏¹

摘要 目的:观察任脉电针对脑缺血大鼠侧脑室下区神经干细胞增殖与分化的影响。方法:制备大脑中动脉闭塞模型(MCAO),两小时后再灌注。实验大鼠随机分为手术对照组和任脉电针组,分别于造模成功7天、14天和28天后观察侧脑室下区神经干细胞增殖与分化的变化。结果:与手术对照7天组(C-7d)相比,任脉电针7天组(R-7d)的5-溴脱氧尿苷(BrdU)阳性细胞、5-溴脱氧尿苷/胶质纤维酸性蛋白双标细胞(BrdU/GFAP)、5-溴脱氧尿苷/巢蛋白双标细胞(BrdU/Nestin)、5-溴脱氧尿苷/神经元特异性烯醇化酶双标细胞(BrdU/Nse)数量差异无显著性($P>0.05$);而在14天组及28天组中,任脉电针14天组(R-14d)、任脉电针28天组(R-28d)BrdU阳性细胞及BrdU/Nestin、BrdU/Nse双标细胞数量分别较手术对照14天组(C-14d)、手术对照28天组(C-28d)差异有显著性($P<0.05$)。在28天组,R-28d的BrdU/GFAP双标细胞明显多于C-28d($P<0.01$)。结论:任脉电针能促进脑缺血大鼠侧脑室下区神经干细胞的增殖与分化,适当促进增殖的神经干细胞向星形胶质细胞方向分化。

主题词 脑缺血/针灸疗法 细胞增殖/针灸效应

Effects of Electroacupuncture at the Conception Vessel on Proliferation and Differentiation of Nerve Stem Cells in Subventricular Zone of the Lateral Ventricle of Cerebral Ischemia Rats

Yang Zhuoxin¹, Yu Haibo¹, Rao Xiaodan², et al.

(1. Shenzhen Municipal TCM Hospital, Guangdong 518033; 2. Guangzhou University of TCM)

Objective: To observe effects of electroacupuncture (EA) at The Conception Vessel on proliferation and differentiation of nerve stem cells in the subventricular zone of the lateral ventricle of cerebral ischemia rats. **Methods:** The middle cerebral artery was blocked for 2 hours and then reperused. Model rats were randomly divided into two groups: control group and EA group. Changes of differentiation and proliferation of nerve stem cells were observed at 7, 14, 28 days after successfully modeling. **Results:** Compared with the control group, there was no significant difference ($P>0.05$) in the number of 5-bromodeoxyuridine (BrdU) positive cells, BrdU/GFAP, BrdU/Nestin and BrdU/Nse double-labeled cells in the subventricular zone in EA group 7 days after modeling. However, in the 14-day group and the 28-day group, the number of BrdU positive cells and BrdU/GFAP, BrdU/Nestin, BrdU/Nse double-labeled cells significantly increased as compared with the control group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** EA at The Conception Vessel promotes differentiation and proliferation of nerve stem cells in the subventricular zone of the lateral ventricle of cerebral ischemia rats, and may promote proliferation of the nerve stem cell towards astrocytes.

Key Words Cerebral ischemia/Acup-mox therapy; Cellular proliferation/acup-mox effect

脑血管疾病是目前人类三大死因之一,而缺血性脑病约占80%^[1]。有效地促进脑缺血后神经的恢复是目前研究的热点。过去认为,中枢神经系统神经元不可再生,但是近年来,神经干细胞(NSC)的发现与应用,为神经损伤的修复带来了新的希望^[2]。针刺是治疗脑缺血的主要方法之一,任脉有不少治疗中风的验穴,而任脉又有调节胚胎发育的作用,这两种功能主治之间的内在联系是否与NSC的增殖分化相关,为此我们进行了如下研究。

1 实验方法

1.1 造模:实验动物为Wistar雄性大鼠36只,体重(250 ± 20)g,由中山大学中山医学院实验动物中心提供。用10%水合氯醛腹腔麻醉($35\text{mg}/100\text{g}$ 体重)大鼠,仰卧手术台上,颈正中切开,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA),电热烧灼器烧断ECA的分支,结扎并游离ECA主干一段,沿ICA向下分离翼颌动脉,穿线沿起点结扎。将制备好的尼龙线(直径 0.205mm)插入ECA,经CCA分叉处通过ICA入颅,若尼龙线插入深度大约为(18.5 ± 0.5)mm,且术者感觉到有阻力,说明尼龙线已至大脑前动脉(ACA),从而阻断该侧大脑中动脉的血流。缺血2小时后再灌注,再灌注时拉出尼龙线即可恢复大

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371808)

1 深圳市中医院针灸科,广东省深圳市福田区福华路(518033)

2 广州中医药大学2003级硕士研究生

收稿日期:2005-09-01;修回日期:2005-11-10

脑中动脉(MCA)血供^[3]。神经病学评分参考 Longa EZ^[4]评定神经功能缺损程度的五级4分法标准:0分,无神经功能缺损症状;1分,轻微神经功能缺损,不能完全伸展左侧前爪;2分,中度局灶性神经功能缺损,向左侧转圈;3分,重度局灶性神经功能缺损,向左侧倾倒;4分,不能自发行走,意识水平下降。再灌注后大鼠神经病学评分为1~4分则为造模成功。

1.2 分组和处理:36只实验动物随机分为任脉电针组和手术对照组,而每组又随机分为3个组:7天组、14天组、28天组。共计6个小组,每小组6只。任脉电针7天组、14天组、28天组分别简称为R-7d、R-14d、R-28d;手术对照7天组、14天组、28天组分别简称为C-7d、C-14d、C-28d。电针组大鼠于手术后第2天针刺,依据《实验针灸学》(上海科学技术出版社,1999年9月)取穴关元、气海、承浆,针刺后加电,用G6805电针仪,疏密波,以出现局部肌肉跳动为准,10分钟后出针。对照组大鼠于手术后第2天将其如电针组大鼠般固定于木板上10分钟,但并不针刺。实验动物分别于7天、14天、28天后处死。

1.3 给药:5-溴脱氧尿苷(BrdU,博士德公司)溶解于含0.28g/L氢氧化钠的生理盐水中,临注射前配制。按每次50mg/kg剂量经腹腔注射,每只大鼠于处死前两天,每天3次,每次间隔8小时腹腔注射BrdU,最后1次注射后的第2天处死动物。

1.4 取材与切片:上述BrdU给药后的大鼠用10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,经左心室-升主动脉用120ml生理盐水快速灌注,再用含4%多聚甲醛的0.1mol/L磷酸缓冲液(PB, pH7.2~7.4)300~400ml内固定,30分钟内灌完。将已灌注固定的动物置于动物脑立体定位仪上,按大鼠脑图谱,于Interaural 7.7mm和Interaural 15.7mm处行大鼠脑冠状切面并取脑,将上述断面之间的脑组织块置于相同固定液,4℃,4~6小时,再将组织块放于含30%蔗糖的0.1mol/L磷酸缓冲液,4℃,待脑组织块沉底后行冰冻切片,片厚30μm,隔2取1,分4组收集切片,第1组切片用于BrdU免疫荧光标记,第2组用于BrdU/胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫荧光双标,第3组用于BrdU/巢蛋白(Nestin)免疫荧光双标,第4组用于BrdU/神经元特异性烯醇化酶(Nse)免疫荧光双标。

1.5 免疫荧光双标组化染色

1.5.1 BrdU免疫荧光标记:切片入0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗3次,每次5分钟;切片入3%过氧化氢,37℃,30分钟,以灭活内源性过氧化物酶;0.01mol/L PBS洗4次,每次5分钟;切片入50%

甲酰胺(formamide)/2倍枸橼酸钠杂交液(SSC),65℃温箱处理2小时;2倍SSC洗2次,每次5分钟;0.01mol/L PBS洗2次,每次5分钟;73g/L HCl 37℃处理1小时;0.1mol/L硼酸缓冲液(pH8.0)洗2次,每次5分钟;0.01mol/L PBS洗2次,每次5分钟;1%牛血清蛋白(BSA,用含0.3%TritonX-100的0.01mol/L PBS配),37℃,30分钟,封闭非特异性抗原;小鼠抗BrdU单克隆抗体(Sigma公司,1:1000,用1%牛血清蛋白配)37℃孵育2小时后置于4℃冰箱过夜;第2天,切片入0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗4次,每次5分钟;羊抗小鼠IgG-Cy3红色荧光二抗(Sigma公司,1:400)37℃孵育1小时;PBS洗4次,每次5分钟;贴片后置于37℃,1小时后甘油封片,马上进行荧光观察及摄片。

1.5.2 BrdU/GFAP免疫荧光双标:第一步BrdU免疫荧光标记步骤同上,接下来把切片置于4%多聚甲醛,室温1小时,使得第一重染色中二抗的抗原结合部位失活;切片用0.01mol/L PBS洗5次,每次5分钟;切片加小鼠抗GFAP单克隆抗体(Sigma公司,1:1500),37℃孵育2小时后置于4℃冰箱过夜;第2天,切片入0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗4次,每次5分钟;羊抗小鼠IgG-FITC绿色荧光二抗(Sigma公司,1:400)37℃孵育1小时;PBS洗4次,每次5分钟;贴片后置于37℃,1小时后甘油封片,马上在激光共聚焦显微镜(Olympus FV 500)下进行荧光观察及摄片。

1.5.3 BrdU/Nestin、BrdU/Nse免疫荧光双标:步骤同BrdU/GFAP免疫荧光双标,经过BrdU荧光标记的切片经4%多聚甲醛处理后,分别加入小鼠抗Nestin单克隆抗体(Chemicon公司,1:1000)和小鼠抗Nse单克隆抗体(Lab Vision公司,1:800),但第一重染色加羊抗小鼠IgG-FITC绿色荧光二抗,第二重染色加羊抗小鼠IgG-Cy3红色荧光二抗。

本实验用1%牛血清蛋白(BSA,用含0.3%TritonX-100的0.01mol/L PBS配)代替第一抗体作为阴性对照。

进行荧光观察的同时对BrdU阳性细胞和BrdU/GFAP、BrdU/Nestin及BrdU/Nse荧光双标细胞计数。以每平方毫米所含阳性细胞(个/mm²)进行统计分析。

1.6 统计学方法:利用SPSS10.0进行统计分析,检测数据用均数±标准差表示,行单因素方差分析。

2 结果

2.1 7天组(R-7d、C-7d):C-7d及R-7d损伤侧侧脑室下区均出现大量红色BrdU阳性细胞,主要集中在

附表 各组 Brdu/GFAP、Brdu/Nestin、Brdu/Nse 双标细胞及 Brdu 阳性细胞计数比较(个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	亚组	大鼠数	Brdu/GFAP	Brdu/Nestin	Brdu/Nse	Brdu
手术对照组	C-7d	6	176.2±17.5	108.2±12.6	1.83±1.9	299.3±17.0
	C-14d	6	88.3±11.0	47.5±9.3	8.0±2.1	169.8±18.0
	C-28d	6	41.8±6.9	23.3±5.4	10.3±5.1	76.0±8.1
任脉电针组	R-7d	6	182.0±18.4	108.0±19.1	4.7±3.3	290.7±24.8
	R-14d	6	81.8±10.5	70.8±14.5**	23.8±5.5**	200.5±13.5**
	R-28d	6	62.5±9.8**	31.8±7.4*	35.3±5.5**	101.8±15.7**

与手术对照组同时段亚组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

外侧壁上部和上角,卵圆形或圆形,着色深,成簇分布,在侧脑室外上角形成迁移流;C-7d 及 R-7d 侧脑室外上角均可见 Brdu/GFAP 双标细胞,树突状,胞核呈橙黄色,胞体较肿胀,突触较粗、较多,多为绿色;Brdu/Nestin 双标细胞形态、分布与 Brdu/GFAP 双标细胞大致相同。由于 Brdu/Nestin 双标染色的 Brdu 阳性细胞用绿色荧光标记,而 Nestin 阳性细胞用红色荧光标记,故胞核仍呈橙黄色,而突触则多为红色。与 C-7d 相比, R-7d 的 Brdu 阳性细胞及 Brdu/GFAP、Brdu/Nestin、Brdu/Nse 双标细胞数量差异无显著性($P = 0.08611 \sim 0.9832, P > 0.05$)。

2.2 14 天组(R-14d、C-14d):C-14d 损伤侧侧脑室下区 Brdu 阳性细胞及 Brdu/Nestin 双标细胞较 C-7d 明显减少,出现了 Brdu/Nse 双标细胞,梭形或卵圆形,胞核呈橙黄色,胞浆及突触红色,突触粗短量少,主要靠近纹状体分布,数量较少;R-14d 的 Brdu 阳性细胞及 Brdu/Nestin 双标细胞虽然较 R-7d 有所减少,但明显较 C-14d 多($P = 0.000159 \sim 0.005133, P < 0.01$)。两组 Brdu/Nse 双标细胞亦靠近纹状体分布,但 R-14d 的数量明显较 C-14d 多($P < 0.01$)。Brdu/GFAP 双标细胞两组相比差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 28 天组(R-28d、C-28d):附表示,与 C-28d 相比, R-28d 的 Brdu 阳性细胞及 Brdu/GFAP、Brdu/Nse 双标细胞数量差异有显著性($P = 0.000001 \sim 0.003062, P < 0.01$), Brdu/Nestin 双标细胞数量两组相比差异亦有显著性($P = 0.039324, P < 0.05$)。

3 讨论

神经干细胞能自我更新,并具有分化为神经元、神经胶质细胞的潜能,可参与修复缺损的神经功能^[2]。成体大脑内源性的神经干细胞主要存在于海马齿状回(DG)和侧脑室下区(SVZ)两个主要脑区,正常情况下处于静息状态^[2,5],在遇到异常情况时或与胚胎时期相同因子的影响也会被诱导分裂、分化,如脑缺血、各种生长因子等都可成为诱发因素^[6~9]。Brdu 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞 S 期可以标记 DNA 合

成,因而 Brdu 阳性细胞可被看作是具有增殖活性的细胞。对增殖细胞进行双标染色,以确定增殖细胞是神经元还是胶质细胞^[10]。Nestin 在神经细胞中的表达始于胚胎期,当神经细胞迁移基本完成后,其表达开始下降,并随细胞的成熟停止表达。Nse 是成熟神经元的标志物之一,GFAP 是星形胶质细胞活化及增殖的标志物之一。本研究显示,脑缺血及电针任脉大鼠均可见 Brdu 及 Brdu/GFAP、Brdu/Nestin、Brdu/Nse 双标阳性细胞,表明神经干细胞在脑缺血损伤的病理条件下会发生增殖,细胞数量差异并无显著性($P > 0.05$);而在 14 天及 28 天组中,R-14d 及 R-28d 的 Brdu 阳性细胞及 Brdu/Nestin、Brdu/Nse 双标细胞数量均较对照组差异有显著性($P < 0.05$)。R-28d 的 Brdu/GFAP 双标细胞明显多于对照组。由结果可知,与手术对照组相比,任脉电针组能显著促进神经干细胞的增殖,同时,任脉电针组对于促使神经干细胞向神经元及星形胶质细胞方向分化的作用亦较对照组强,这些作用主要表现在再灌注后的 14~28 天。另外,我们发现神经干细胞较多地向胶质细胞方向分化,而在 28 天组中,R-28d 的这一作用要强于 C-28d。

几乎所有中枢神经系统的病变过程中都能观察到星形胶质细胞形态和功能的改变^[11]。传统上认为星形胶质细胞的功能是扶持、营养与保护,通过快速重摄取使释放的神经递质失活,形成血脑屏障以及维持水和离子平衡来维持生理状态下局部微环境的稳定^[12]。随着研究的深入,发现其有维持突触周围环境自我稳态、参与神经信息传递等功能,在神经再生中对神经元之间的突触建立与传递机能的维持起关键作用。星形胶质细胞具有针对所有神经递质的受体及电压敏感性的离子通道,使它能够对神经元的信号作出反应;星形胶质细胞还在神经可塑性上起重要作用,可支持突触发芽,形成新的多突触连接,维持现存的神元回路等^[13]。近年研究表明,神经系统损伤后的反应性星形胶质细胞可合成和释放多种神经营养因子,如神经生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等,这类因子有促进

神经再生功能,能提高在成年侧脑室下区及海马齿状回神经干细胞的增殖和迁移能力^[14]。近年来,对于pim激酶的研究越来越受到重视,pim家族包括pim-1、pim-2和pim-3,pim蛋白可作为单生长因子或协同信号通道的激活剂,对生长因子的调控具有重要作用^[15]。最新研究提示,pim激酶在细胞分化中有重要作用,有研究证明正在分化的神经祖细胞中pim激酶的短期表达导致GFAP表达细胞增多,而且pim激酶的表达导致外向生长的过程加速,最终导致星形细胞表现出更显著的生长过程^[16]。

电针任脉为何有此效应?从中医理论理解,任脉不但主管胚胎妊娠,也与脑的生理病理密切相关。从任脉的循行来看,《灵枢·五音五味》指出:“冲脉、任脉皆起于胞中。”;从任脉的功能上看,《素问·上古天真论》曰:“女子七岁,肾气盛,齿更发长;二七而天癸至,任脉通,太冲脉盛,月事以时下,故有子……七七任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也。”另一方面,虽无古籍记载任脉直通于脑,但也达于头。任督二脉阴阳相衔,任脉为“阴脉之海”,督脉为“阳脉之海”,一行身之前,一行身之后,一主阴,一主阳,循环往复,维持着阴阳脉气的平衡。脑位于颅内,由精髓汇集而成,其功能的发挥有赖于任脉的气血津液濡养。结合现代研究我们推测,针刺任脉能产生一些与发育有关的生长因子,而这些生长因子能促进神经干细胞的增殖;电针任脉促进增殖的神经干细胞向星形胶质细胞方向分化,这可能与pim激酶相关,这些都是我们进一步研究的目标。

参考文献

- 王维治,罗祖明,丁新生,等.神经病学.第4版.北京:人民卫生出版社,2001:122~130.
- Mckay R. Stem cells in the central nervous system. Science, 1997, 276(5309):66~71.

- Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, et al. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke, 1995, 26(9):1665~1657.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20(1):84~91.
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science, 2000, 287(5457):1433~1438.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, et al. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. J Neurosci, 1996, 16(8):2649~2658.
- Gould E, Reeves AJ, Graxiano MS, et al. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. Science, 1999, 286(5439):548~552.
- Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. Brain Res, 1999, 8, 14, 838(1~2):1~10.
- Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, et al. Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. Brain Res, 1999, 831(1~2):283~287.
- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. J Neurosci, 2002, 22(3):619~623.
- Meeker RB, Azuma Y, Bragg DC, et al. Microglial proliferation in cortical neural cultures exposed to feline immunodeficiency virus. J Neuroimmunol, 1999, 101(1):15~26.
- Kato H, Kogure K, Araki T, et al. Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. Brain Res, 1994, 664(1~2):69~76.
- 熊晖,梁卫兰,吴希如.围产期缺血缺氧性脑损伤中星形胶质细胞的病理生理改变.生理科学进展,2000,31(3):217~221.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature, 2002, 417(6884):39~44.
- Mikkers H, Nawijn M, Allen J, et al. Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. Mol Cell Biol, 2004, 24(13):6104~6115.
- 罗伟,赵匡彦,王廷华,等.神经干细胞诱导分化调控新进展.云南医药,2004,25(1):65~67.

(上接第424页)

2001年初因肝硬化先后3次上消化道出血,同年10月17日行“脾切除、门奇静脉断流”术,术后半年出现贫血、黑便,胃镜提示:“食管内糜烂渗血,胃底静脉曲张处有出血点”。2005年4月,因饮食不慎引起恶心、呕吐咖啡色胃内容物前来就诊。检查:血红蛋白106g/L,白蛋白30g/L,胆汁酸238μmol/L,大便潜血阳性。刻诊:形体消瘦,神情倦怠,头晕,面黑无泽,大便不畅,呈柏油样,舌紫、苔黄厚腻,脉数大无力。证属瘀热内结,拟用化瘀通腑法,处方:水牛角30g,生栀子15g,白及15g,三七粉2包(冲服),当归15g,炒白术15g,生大黄3g,制大黄10g,生槐花15g,郁金15g,清甘草6g。

服20剂后精神好转,舌质由瘀紫转暗,苔薄白。上方加白芍18g以养血柔肝。半月后患者病情好转,面色渐有光泽,血浆白蛋白升至正常,胆汁酸74μmol/L,大便潜血实验阴性,舌淡红、苔薄白。出院后继服原方,门诊定期复诊。

按:本案以出血为主要表现,魏教授在治血之余合用通腑则有别于常法。患者瘀热内蕴,血不循经,溢于脉外,故有呕血、黑便。瘀血不去,新血不生,日久则气血亏虚,无力鼓动脉道,则脉数大无力。通腑可因势利导,使瘀热从下而走,瘀血去,则新血生,与水牛角、生栀子、生槐花、白及等相伍又可增强其凉血止血作用。