

电针对局灶性脑缺血成年大鼠神经干细胞增殖、分化的影响*

陶 静¹ 陈立典^{2,3} 薛偕华² 杨珊莉²

摘要 **目的:**观察电针对成年大鼠局灶性脑缺血后神经干细胞增殖、分化的影响,探讨其治疗脑梗死的可能机制。**方法:**采用线栓法制备大鼠 MCAO 模型,应用 BrdU/NeuN、BrdU/GFAP 免疫荧光双标法观察再灌注损伤后第 4、7、14 天大鼠神经干细胞增殖、分化情况。**结果:**脑缺血后第 4、7、14 天 3 个时间点室管膜下区、缺血边缘区均有 BrdU 阳性细胞表达,BrdU 阳性细胞数在第 7 天达高峰;电针组第 7 天 BrdU 阳性细胞数高于相同时间段模型组($P<0.05$);电针组 BrdU/GFAP 双标阳性细胞数在 7 天高于相同时间段模型组($P<0.05$);电针组和模型组 BrdU/NeuN 双标阳性细胞数在缺血后第 4、7 和 14 天差异无显著性($P>0.05$)。**结论:**缺血损伤可诱发室管膜下区、缺血边缘区神经干细胞的增殖,少量的新增殖细胞可以向神经元和星型胶质细胞分化;电针可以促进脑缺血后细胞增殖作用并可激发新增殖细胞向星型胶质细胞分化,而对向神经元细胞分化则影响不明显。

关键词 大鼠;局灶性脑缺血;电针;神经干细胞

中图分类号:R245.9, R743.3, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2008)-12-1061-03

Effects of electroacupuncture on proliferation and differentiation of nerve stem cells in the adult rats after brain ischemic injury/TAO Jing,CHEN Lidian,XUE Xiehua,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008,23(12): 1061—1063

Abstract **Objective:** To study the effects of electroacupuncture on proliferation and differentiation of neural stem cells (NSC), and to explore the possible mechanism of electroacupuncture in treatment of ischemic stroke. **Method:** The model of acute cerebral ischemia reperfusion injury in rat was made by means of middle cerebral artery occlusion. All animals were sacrificed after different durations of reperfusion (4, 7, 14d). The double-label immunofluorescence histochemistry method with BrdU/NeuN or BrdU/GFAP was used to observe the changes of cell proliferation and differentiation in adult rat brains. **Result:** BrdU+ cells were found in subependymal region and ischemic marginal zone at different time points after cerebral ischemia. The level of BrdU+ cells proliferation peaked at the 7thd. The number of BrdU-positive cells in electro-acupuncture group was more than that in model group at same time ($P<0.05$). Compared with model group, the number of BrdU/GFAP positive cells in electro-acupuncture group increased significantly on the 7th d ($P<0.05$). There was no significant difference on the number of BrdU/NeuN positive cells between electro-acupuncture group and model group ($P>0.05$). **Conclusion:** Ischemic injury can induce the proliferation of NSC in subependymal region and ischemic marginal zone. Electro-acupuncture can promote proliferation of NSC and stimulate it differentiate further into astrocytes. It may be one of the important mechanisms of electro acupuncture in treating ischemic stroke.

Author's address Fujian University of TCM, 350003

Key words rat; focal cerebral ischemic injury; electroacupuncture; neural stem cell

脑血管疾病是目前危害人类健康的主要疾病之一,给家庭、社会带来沉重的负担。其中缺血性脑血管疾病的发病率约占脑血管病 75%^[1]。因此,积极寻找其有效的防治手段一直是现阶段医学界亟待解决的课题。有研究表明,针灸在缺血性脑血管疾病的治疗中占有重要的地位,以往这方面的研究主要集中在针灸对神经的保护机制上^[2-3]。文献表明,局灶性脑缺血诱发内源性神经干细胞的增殖、分化,具有修复损伤组织的作用^[4-8]。有研究显示针灸在局灶性脑缺血后内源性神经干细胞的增殖、分化、修复方面

有一定的调节作用^[9],近几年逐渐成为研究的热点。本研究通过观察电针对成年大鼠局灶性脑缺血后神经干细胞增殖、分化的影响,探讨其治疗脑梗死的可能机制。

* 基金项目:国家自然科学基金(30672731)

1 福建中医学院 2006 级博士,350003

2 福建中医学院附属第二人民医院

3 通讯作者:陈立典(福建中医学院附属第二人民医院,350003)

作者简介:陶静,女,在读博士,主治医师

收稿日期:2008-05-26

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

溴脱氧尿嘧啶(BrdU, Sigma 公司), 兔抗 GFAP 抗体(北京中衫生物有限公司), 小鼠抗 NeuN 抗体(Chemicon 公司)、大鼠抗 BrdU 抗体(Abcam 公司), FITC 和 TRITC 标记的二抗(北京中衫生物有限公司)、共聚焦显微镜(Leica 公司)。

1.2 实验动物分组及处理

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 清洁级, 体重(250±30)g(由上海斯莱克公司提供)。27 只大鼠随机分为 3 组: 假手术组、模型组、电针组, 每组各 9 只。动物在造模成功第 2、3、4、5、6、7、8 天腹腔注射 BrdU(50mg/kg), 每天 2 次, 间隔 8h, 最后一次注射 24h 后处死动物; 各组动物于再灌注第 4 天、7 天和 14 天 3 个时间点心脏灌注取脑。电针组穴位取患侧曲池、足三里(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》^[7]中之定位方法), 在局部消毒后, 针具用华佗牌 30 号 0.5 寸毫针, 斜刺 0.2—0.3cm, 应用 G6805 电针仪, 电压峰值为 6V, 以肢体轻轻抖动为度, 疏密波, 频率 1—20Hz, 每次电针 30min, 1 次/d, 手术后第 2 天开始治疗, 至动物处死。

1.3 模型制作方法

在室温 22℃ 条件下, 大鼠称重后, 参考 Zea Longa 方法^[8], 行左侧 MCAO 手术, 制备急性脑缺血动物模型。具体方法为所有大鼠均选择左侧大脑中动脉(MCA)区作为梗死侧, 10%水合氯醛(3ml/kg)腹腔麻醉成功后, 正中切开颈部皮肤, 暴露颈总动脉并向上分离出颈内动脉和颈外动脉主干及其分支, 用双极射频电凝器电凝并剪断颈外动脉分出的枕动脉和甲状腺上动脉, 在舌动脉和颌动脉分叉处结扎颈外动脉, 用动脉夹夹闭颈外动脉和颈内动脉的分叉处; 然后在颈外动脉远端结扎处附近剪一小口, 插入预先烧成圆头的尼龙线并疏松结扎; 剪断颈外动脉并将其拉直, 使之与颈内动脉成一直线; 缓慢推动尼龙线使之进入颈内动脉, 直至感觉有少许阻力为止(从颈外动脉与颈内动脉分叉处起约插入约 18—22mm), 松开颈总动脉。2h 后缓慢退出尼龙线。试验过程和动物苏醒期间注意保温。假手术组只分离动脉, 不结扎、插线。动物苏醒后观察其体态及行为, 按 Zea Longa 评分标准评价动物的行为变化, 以判断 MCAO 模型是否成功。具体评分标准为 0 分: 正常; 1 分: 对侧肢体屈曲; 2 分: 拖住尾巴后拉时, 对侧肢体无力; 3 分: 拉住鼠尾, 向病侧转圈; 4 分: 自发向病侧转圈; 5 分: 不能自发运动。将 0、5 分的动物剔除。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 神经干细胞增殖的观察: 采用 BrdU 标记的办法。MCAO 模型合格的大鼠, 给予 BrdU(50mg/kg), 每日 2 次, 在 4 天、7 天和 14 天 3 个时间点, 相继以 0.01M PBS 200ml、4%多聚甲醛 100ml 心脏灌注, 取出大脑, 4%多聚甲醛固定 4℃ 4h, 置于 4℃ 25%蔗糖溶液直至下沉, 冰冻切片机切成 10μm 切片。

脑组织切片以 0.01M PBS 清洗, 3% H_2O_2 室温 15min, 去除内源性过氧化物酶。为使 DNA 变性, 将切片置 50%甲酰胺/2×SSC(0.3MNaCl, 0.03M 枸橼酸钠)中, 65℃孵育 2h。洗涤后置 2N HCl, 37℃孵育 30 min。以 0.01M PBS 洗涤后, 置 3%正常血清中孵育 15min, 抗 BrdU 抗体 4℃过夜。随后加入 TRITC 标记的二抗, 室温孵育 2h, 0.01M PBS 洗涤后甘油缓冲液封片以共聚焦显微镜观察、拍照。

1.4.2 神经干细胞分化的观察: 采用免疫双标荧光技术。将经 DNA 变性的组织切片, 0.01M PBS 洗涤, 0.01M 枸橼酸钠(pH6.0)热修复 10min, 然后正常羊血清封闭 15min, 加入 BrdU/NeuN(1:200)或 BrdU/GFAP(1:200), 4℃孵育 24h, 0.01M PBS 洗涤后加入 FITC 和 TRITC 标记的二抗, 室温孵育 2h, 0.01M PBS 洗涤后甘油缓冲液封片以共聚焦显微镜观察、拍照。

1.5 图像分析及统计学分析

切片在放大倍数 (20×10) 下, 于室管膜下区(subventricular zone, SVZ)、梗死区周围随机选 3 个视野, 输入图像分析系统, 记取不同时间点阳性细胞数。所得数据用 SPSS 软件进行方差分析和组间比较统计学处理, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 电针引起 MCAO 模型大鼠 SVZ 区发生明显的细胞增殖现象

BrdU 阳性标记物为圆形、卵圆形或椭圆形、呈深褐色、境界清晰。假手术组 BrdU 阳性细胞主要分布在 SVZ, 且数目少、分散。模型组 BrdU 阳性细胞主要分布在 SVZ、缺血边缘区; 缺血损伤后 4 天, BrdU 阳性细胞逐渐增多, 在 SVZ 呈簇状分布, 缺血边缘区呈散在分布; 再灌注 7d BrdU 阳性细胞数目急剧增多并达高峰, 同时可见到梗死灶对侧 SVZ 区 BrdU 阳性细胞。电针组 BrdU 阳性细胞数在第 7 天显著高于相同时间段模型组($P<0.05$), 见图 1(见前置彩色插页), 表 1。

2.2 电针对 MCAO 模型大鼠的内源性神经前体细胞的分化影响

表 1 BrdU 免疫荧光标记阳性细胞计数结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 4 天	第 7 天	第 14 天
电针组	9	77.2±6.26	137.0±6.96 ^①	112.0±9.88
模型组	9	71.8±5.17	125.0±5.0	111±4.42
假手术组	9	54.2±8.49	52.4±9.10	49±6.52

①与其他两组比较 $P < 0.05$

在本实验中我们观察到局灶性脑缺血后, 出现大量的新增殖细胞。缺血灶周围发生增殖的细胞绝大多数是星形胶质细胞反应性增生 (BrdU/GFAP 双

标阳性)(图 2—4, 见前置彩色插页); SVZ 区发现少量的新增殖神经干细胞分化为成熟神经元细胞 (BrdU/NeuN 双标阳性)(图 5—7, 见前置彩色插页)。电针组 BrdU/GFAP 双标阳性细胞数在第 7 天高于相同时间段模型组 ($P < 0.05$); 电针组和模型组的 BrdU/NeuN 双标阳性细胞数在第 4、7 和 14 天差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 各组不同时间 BrdU/NeuN、BrdU/GFAP 阳性细胞计数结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 4 天		第 7 天		第 14 天	
	BrdU/NeuN	BrdU/GFAP	BrdU/NeuN	BrdU/GFAP	BrdU/NeuN	BrdU/GFAP
电针组	3.2±1.30	14±2.45	5.6±2.07	35.2±3.27 ^①	6.6±2.07	32.6±1.15
模型组	2.6±1.14	11.4±2.07	4.8±1.30	25.8±1.92	4.6±1.14	28.6±1.33
假手术组	0	1.2±0.4	0.6±0.2	1.8±0.21	0.4±0.13	1.0±0.32

①与其它两组比较 $P < 0.05$

3 讨论

目前国内外大量的文献表明哺乳动物脑内侧脑室的 SVZ、海马齿状回(dentate gyrus, DG)存在神经干细胞, 这些干细胞在生理状态下保持低水平增殖并不断更新; 在局部和全脑缺血损伤中, 这些神经干细胞能增殖并分化成各种类型的神经元和胶质细胞, 这对脑损伤后的修复和神经可塑性中起着重要作用^[10-11]。脑缺血在引起神经元损伤的同时, 脑的内环境也出现了促使内源性神经干细胞增殖、分化和修复神经元损伤的因素。Arvidsson 和 Abe 等^[12-13]研究发现脑缺血后诱导内源性生长因子 (IGF-1、GDNF、BDNF、TGF 和 bFGF 等) 表达增加, 这些生长因子正是神经干细胞增殖、分化所必需; 在分子水平, Liu 等研究发现脑缺血诱导控制 SVZ 区神经干细胞增殖、分化的基因表达增加, 如 TGF- β 超家族基因、Notch 家族受体基因、转录因子基因等, 从而促进内源性神经前体细胞和血管内皮细胞增殖^[14]。在我们的研究中也证实脑缺血后能够诱发内源性神经细胞增殖, 其中少量的新增殖细胞可以分化为神经元细胞和(或)星形胶质细胞。

Ciaroni 等^[15]研究表明成年沙土鼠短暂全脑缺血后齿状回神经元再生水平升高, 且于缺血后 11d 达到最高峰。在本研究中发现 MCAO 大鼠细胞增殖主要分布在 SVZ、缺血边缘区, 齿状回细胞增殖较少见; 缺血损伤后第 4—7 天 BrdU 阳性细胞逐渐增多, 在 SVZ 呈簇状分布, 缺血边缘区呈散在分布; 缺血损伤后 14d 增殖细胞增长幅度有所下降; 同时梗死灶对侧 SVZ 区亦可见 BrdU 阳性细胞。在对 MCAO 模型 SD 大鼠进行电针干预后发现在第 7 天时 BrdU 阳性细胞数明显高于相同时间段模型组, 其机制可能与电针、功能训练等外界刺激使 MCAO 模型大鼠缺血脑组织神经营养因子表达增多^[16-17], 从而促进神经前体细胞的增殖^[18-20]。

在新增殖的神经干细胞分化的方面, 我们观察到局灶性脑缺血后诱生大量的新增殖细胞。缺血灶周围发生增殖的细胞绝大多数是星形胶质细胞反应性增生 (BrdU/GFAP 双标阳性), 胞体变大, 以缺血损伤后第 7 天最为明显, 其中电针进行干预后 BrdU/GFAP 双标阳性细胞较模型组明显增加; 在 SVZ 区见少量的新增殖神经干细胞分化为神经元细胞 (BrdU/NeuN 双标阳性), 但在电针组和模型组无显著性差异。近来有研究表明在脑损伤后星形胶质细胞不仅起着修复损伤的作用, 还可以在局部分泌神经营养因子作用, 支持和营养局部神经细胞的作用。因此, 本课题组认为电针可以促进新增殖的内源性神经细胞向星形胶质细胞分化, 并通过星形胶质细胞分泌神经营养因子等作用发挥对脑损伤的保护作用, 这可能是电针治疗脑缺血损伤的重要机制之一。

本研究中发现缺血灶周围区见部分 BrdU 阳性细胞未标记上 GFAP 和 NeuN, 这些细胞可能是巨噬/炎症细胞或血管内皮细胞增殖所致。由于本研究未进行 BrdU/DCX (提示增殖细胞为迁移的尚未成熟的神经元细胞)、BrdU/ED-1 (增殖细胞分化为小胶质细胞或吞噬细胞) 方面的研究, 对 BrdU 阳性的增殖细胞迁移、分化的过程不能进行深入的跟踪, 所以相关问题尚待研究。

参考文献

- [1] 孙怡, 杨任民主编. 实用中西医结合神经病学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 197.
- [2] 刘玉珍, 蒋戈利, 韩景献, 等. 电针对局灶性脑缺血大鼠细胞间黏附分子-1 表达和白细胞浸润的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(2): 122.
- [3] 张慧敏. 头穴针刺对局灶性脑缺血大鼠脑微血管内皮第八因子相关抗原影响的动态观察[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(4): 289.
- [4] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke[J]. Nat Med, 2002, 8(9): 963—970.

(下转 1073 页)