



不同干预方法对局灶性脑缺血大鼠内源性神经干细胞增殖的影响^{*}

陶 静¹ 薛偕华¹ 陈立典^{2,3} 杨珊莉¹

摘要

目的: 观察针刺、康复训练、针刺+康复训练对成年局灶性脑缺血大鼠的神经功能缺损评分及内源性神经干细胞(NSCs)增殖的影响。

方法: 采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,并给予针刺、康复训练、针刺+康复训练干预,在缺血损伤后第4、7、14和21天,对大鼠进行神经功能缺损评分,同时应用BrdU免疫组化法观察再灌注损伤后大鼠NSCs增殖情况。

结果: 康复训练组、针刺组、针刺+康复训练组在术后第4、7、14、21天神经功能缺损评分比较,差异无显著性意义($P>0.05$);与造模组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。脑缺血后,第4、7、14、21天室管膜下区、缺血边缘区BrdU阳性细胞表达,第7天达高峰;第7天室管膜下区康复训练组和针刺组BrdU阳性细胞数显著高于相同时间段模型组($P<0.05$),针刺+康复训练组BrdU阳性细胞数显著高于相同时间段康复训练组和针刺组($P<0.05$);第14天和21天BrdU阳性细胞数在模型组、针刺组、康复训练组和针刺+康复训练组差异未见显著性意义($P>0.05$)。

结论: 缺血性脑损伤后诱发内源性NSCs发生增殖。康复训练和针刺可增加局灶性脑缺血大鼠SVZ区内源性NSCs的增殖。

关键词 康复;大鼠;局灶性脑缺血;神经干细胞

中图分类号: R493, R743.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2010)-02-0099-05

Experimental study on effects of different interferences on proliferation of endogenous nerve stem cells in adult rats after brain ischemic injury/TAO Jing, XUE Xiehua, CHEN Lidian, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(2):99—103

Abstract

Objective: To observe the effects of acupuncture, rehabilitation training and acupuncture combined with rehabilitation training on neurological deficits and differentiation of endogeneous nerve stem cells(NSCs) in adult rats with middle cerebral artery occlusion(MCAO).

Method: A rat model of MCAO was established and interfered with acupuncture, rehabilitation training or acupuncture combined with rehabilitation training. On the 4th, 7th, 14th and 21st d after ischemic injury, neurological deficits of rats were scored, and the effects of acupuncture, rehabilitation training and acupuncture combined with rehabilitation training interference on the proliferation of rat NSCs were detected with BrdU immunohisto chemistry technique.

Result: Significant differences were found in the scores of rat neurological deficits between the treatment groups and model groups at the 4th, 7th, 14th and 21th d after cerebral ischemic injury ($P<0.05$). BrdU positive cells were found in subventricular zone (SVZ) and ischemic marginal zone at different time points after cerebral ischemia. The level of BrdU positive cells proliferation peaked at the 7th d. The BrdU positive cells in SVZ, and those in

^{*} 基金项目:国家自然科学基金(30672731),福建省科技厅重点项目; 1 福建中医学院附属第二人民医院,350003; 2 福建中医学院;
3 通讯作者

作者简介:陶静,女,博士,主治医师; 收稿日期:2009-07-31

acupuncture and rehabilitation training groups were much more than those in model group at the 7th d after injury ($P<0.05$). In acupuncture combined with rehabilitation training group were much more than those in the other treatment groups at the 7th d after injury ($P<0.05$). There was no significant difference ($P>0.05$) in the number of BrdU positive cells in SVZ at the 14th and 21st d after injury in the four groups.

Conclusion: Cerebral ischemic injury induces proliferation and migration of endogenous NSCs. The treatment of rehabilitation training, acupuncture or acupuncture combined with rehabilitation training all can induce proliferation of NSCs, but the treatment of acupuncture combined with rehabilitation training is most optimal than others.

Author's address The Second People's Hospital Affiliated Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian Province, 350003

Key words rehabilitation; rat; focal cerebral ischemia; nerve stem cells

康复治疗可改善脑梗死患者的各种功能障碍,提高其生活自理能力,这已被广大的临床工作者所接受。但康复治疗方法是通过何种机制促进脑梗死后脑实质细胞功能的恢复,进而改善患者的功能,至今尚未清楚。目前,中枢神经系统内的内源性干细胞的增殖、分化、成熟、迁移、突触整合和有关的基因调控和内环境的影响正在引起学者们的广泛关注。本研究通过观察不同康复治疗方法对成年大鼠局灶性脑缺血后神经干细胞(nerve stem cells, NSCs)增殖的影响,探讨其治疗脑梗死的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

所有试验都在遵照国际动物保护和使用指南下实施。选取健康雄性SD大鼠,清洁级,体重(250 ± 30)g(由上海斯莱克公司提供)。将大鼠随机分为假手术组、造模组、康复训练组、针刺组、针刺+康复训练组,共5组,每组各12只。

1.2 模型制作方法

术前所有实验动物均禁食12h。在室温22℃条件下,大鼠称重后,参考Zea Longa方法^[1],行左侧MCAO手术,制备急性脑梗死动物模型。方法如下:

所有大鼠均选择左侧大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)区作为梗死侧,肌肉注射62.5mg/kg氯氨酮腹腔麻醉成功后,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。动物苏醒后观察其体态及行为,以判断大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型成功。假手术组只分离动脉,不结扎、插线。手术结束后,动物放置于室温(24℃)环境下苏醒,正常饮食。

1.3 治疗参数

假手术组:回笼饲养,只予以同等条件抓取,不予任何治疗。

模型组:造模后回笼饲养,只予以同等条件抓取,不予任何治疗。

康复训练组:每天置于自制滚筒式网状训练器内进行转动训练,平衡木上行走训练,转棒上转动训练及网屏抓握训练共40min,1次/d,手术24h后开始治疗,至动物处死。

①采用自制滚筒式网状训练器进行转动训练:自制滚筒式网状训练器为长100cm、直径60cm的圆形网状仪器。中间被分为4个格,可同时训练4只鼠。底座有一固定架,一端有一手摇柄,可手摇按5转/min进行转动训练。该器材可训练鼠的抓握、旋转、行走等运动功能。

②平衡木训练:采用长170cm、宽2cm的方木棒,平放在距地面7cm处,作为一个平衡木让鼠在其上行走,主要训练鼠的平衡功能。

③转棒训练:取长150cm,直径4.5cm的木棒1根,其中点固定在3转/min的转动器上,分别向左右

交替转动,可训练鼠的动态平衡功能。

④网屏训练:网屏为50cm×40cm的网带,网眼为1cm×1cm。网眼的左右和上方都用25cm高的木筐,以防鼠爬出。网屏距地面高度为80cm,下方铺以12cm厚的海绵。先将网屏水平放置,将鼠放置其上,然后缓慢地将其一端抬高,在2s内将此屏变成垂直位,保持5s观察是否会从网屏上掉下来或用前爪握网屏。可训练鼠的抓握等功能。

针刺组:穴位取患侧曲池、足三里(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》^[2]中之定位方法)。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24h后开始治疗,至动物处死。

针刺+康复训练组:在针刺基础上加康复训练。

1.4 Brdu 给药方法

溴脱氧尿嘧啶核苷(Brdu)溶解于生理盐水中,临注射前配制。按50mg/kg/次经腹腔注射,2次/d,每次间隔8h腹腔注射Brdu,最后一次注射后的第2天处死。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 神经功能缺损评估:各组大鼠在术后第4天、7天、14天和21天进行神经功能缺损评估^[3]。评分范围为0—18分,1—6分代表轻度损伤,7—12分代表中度损伤,13—18分代表重度损伤。

1.5.2 NSCs增殖的观察:缺血性脑卒中模型造模后,给予Brdu(50mg/kg)。治疗后第4天、7天、14天和21天,大鼠肌肉注射62.5mg/kg氯氨酮麻醉后取出大脑,分别取出含室管膜下区(subventricular zone, SVZ)部分,切成40μm切片置-20℃冰箱保存(保存液为30%甘油,30%乙二醇和40% 0.1M PBS)。脑组织切片以0.6% H₂O₂ (TBS液,0.15M NaCl, 0.1M Tris-HCl, pH7.5)处理30min,灭活内源性的过氧化酶。为使DNA变性,将切片置50% formamide/2×SSC(0.3M NaCl, 0.03M 枸橼酸钠)中,65℃孵育2h。PBS冲洗3遍后置2M HCl,37℃孵育30min。PBS冲洗3遍,置3%正常羊血清中孵育15min,后置于含大鼠抗Brdu(1:200)的TBS中4℃过夜,次日复温15min, PBS冲洗3遍,去除多余的抗体,随后加入TRITC标记的抗大鼠二抗(1:200),室温下2h, PBS冲洗3遍,清除周围水滴,甘油缓冲

液封片在激光共聚焦显微镜下观察红色荧光细胞。

1.6 图像分析及统计学分析

放大倍数(20×10)下,随机选3个视野,输入图像分析系统,记取SVZ不同时间点阳性细胞数。所得数据用SPSS 13.0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 MCAO 模型 SD 大鼠神经功能缺损评分

本实验结果显示假手术组大鼠未见神经功能缺损,神经功能缺损评分为0。模型组、康复训练组、针刺组、针刺+康复训练组各组SD大鼠出现不同程度神经缺损体征,说明本次实验造模是成功的。模型组和康复训练组、针刺组、针刺+康复训练组神经缺损评分随着时间逐渐好转,康复训练组、针刺组、针刺+康复训练组在术后第4天、7天、14天、21天神经功能缺损评分与造模组比较有显著性差异($P<0.05$),提示康复训练、针刺、针刺+康复训练对脑缺血大鼠的神经缺损症状有明显改善促进作用。康复训练组、针刺组、针刺+康复训练组三组在术后第4天、7天、14天、21天神经功能缺损评分比较,无明显差异($P>0.05$),见图1。

2.2 MCAO 模型 SD 大鼠 SVZ 区 BrdU 标记的阳性细胞表达

Brdu阳性标志物为圆形、卵圆形或椭圆形、呈红色荧光,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缺血侧半球(含SVZ);缺血损伤后4天,Brdu阳性细胞逐渐增多,在缺血侧半球(含SVZ)呈簇状分布;再灌注7天,Brdu阳性细胞数目急剧增多并达高峰,缺血损伤7天后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。缺血损伤后第7天康复训练组和针刺组Brdu阳性细胞数显著高于相同时间段模型组($P<0.05$);针刺+康复训练组Brdu阳性细胞数在第7天显著高于相同时间段康复训练组和针刺组($P<0.05$),提示针刺+康复训练组比康复训练组和针刺组更能促进内源性NSCs的增殖(图1)。缺血损伤后第14和21天Brdu阳性细胞数在模型组、针刺组、康复训练组和针刺+康复训练组的无明显差异($P>0.05$)。

表 1 各组 MCAO 模型 SD 大鼠神经功能缺损评分情况

	第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
模型组	11.67±1.53	9.0±1.0	7.33±0.58	6.33±0.57
针刺组 ^①	10.33±1.52	6.0±1.0	5.0±1.0	4.67±0.58
康复训练组 ^①	10.67±1.53	6.0±1.0	5.33±0.58	4.33±0.58
针刺+康复训练组 ^①	11.33±1.53	5.0±2.0	4.33±1.52	4.0±1.0

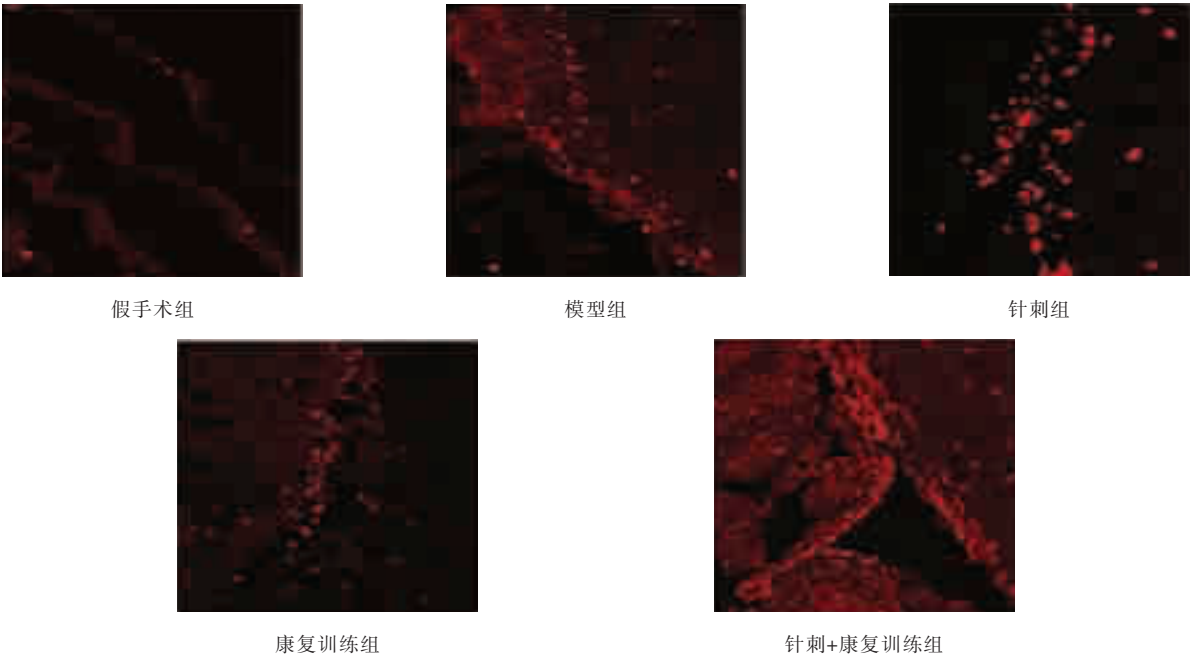
①神经功能缺损评分在模型组、康复训练组、针刺组、针刺+康复训练组随着时间推移逐渐降低,康复训练组、针刺组、针刺+康复训练组在术后第 4 天、7 天、14 天、21 天神经功能缺损评分与造模组比较有显著性差异 $P<0.05$ 。

表 2 不同时间点各组 SVZ 区 Brdu 标记的阳性细胞 (细胞数/mm²)

	第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
模型组	196.67±7.09	293.33±14.43 ^①	210.66±9.07	160.00±10.44
针刺组	203.33±11.24	341.33±18.88	246.33±10.02	168.67±14.84
康复训练组	218.67±15.02	326.0±30.0	255.33±11.93	183.67±16.56
针刺+康复训练组	200.66±21.38	397.0±27.07 ^②	246.33±8.02	186.00±23.64

①在缺血损伤后第 7 天康复训练组和针刺组比模型组 BrdU 阳性细胞数明显增加,差异有显著性 $P<0.05$;②针刺+康复训练组 BrdU 阳性细胞数在第 7 天显著高于相同时间段康复训练组和针刺组 $P<0.05$ 。

图 1 第 7 天各组 SVZ 区 Brdu 标记的阳性细胞情况



3 讨论

临床上,缺血性脑血管疾病多为局灶性,以 MCAO 多见。部分梗死患者由于溶栓治疗或栓子自发向远端推移出现血管再通即再灌注现象。因此,制备大脑中动脉缺血并且可实现再灌注的动物模型更为接近临床实际情况。可供选择的动物有猴、狗、猫、家兔、鼠等。其中大鼠易于饲养,价格低廉;纯种鼠近亲交配,基因型相似,脑血管解剖和生理机能也相似;大鼠脑血管解剖和生理机能接近人类;大鼠脑血管损伤部位恒定,实验重复性好;耐受手术创伤,动物存活时间长,利于脑缺血相关病理改变过程的研究;大鼠脑体积大小适宜,易于病理和生化分析。根据以上优点,本研究选用 SD 大鼠制备急性脑梗死

动物模型。

BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞增殖周期 S 期像 ³H-TdR 一样可整合到细胞核 DNA 中,并可完成长距离的迁移及在目的地分化,且不影响细胞的功能,毒性较小,因此其阳性细胞被看成是有增殖活性的细胞。因 BrdU 抗体不与胸腺嘧啶发生交叉反应,经免疫组织化学染色可观察 BrdU 在细胞内的掺入情况,故应用 BrdU 标记 NSCs 标记率和检测的准确性都较高,且方法简便、迅速、安全,是反映细胞增殖较为理想的指标^[4]。因此,结合以往的研究,我们选择 BrdU 作为标记细胞增殖的药物。

在成年哺乳动物的脑室下区、海马齿状回、纹状体、大脑皮质、脊髓中央管等区域均证实有 NSCs 存



在^[5]。其中,位于侧脑室壁的脑室下区和海马齿状回的颗粒下层是成体大脑内源性神经干细胞的主要分布区。本研究也观察到缺血性脑损伤后,MCAO大鼠细胞增殖主要分布在SVZ、缺血边缘区。缺血损伤后4—7天BrdU阳性细胞逐渐增多,第7天时达到高峰。在SVZ呈簇状分布,缺血边缘区呈散在分布;缺血损伤7天后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。这与国内不少相关报道基本一致^[6-7]。也有报道细胞增殖达到高峰的时间是11d^[8],和我们有所差别,可能与实验条件、模型的选择、动物的种属、缺血时间的不同有关。

本研究观察到缺血损伤后第7天康复训练组和针刺组BrdU阳性细胞数显著高于相同时间段模型组($P<0.05$);针刺+康复训练组BrdU阳性细胞数在第7天显著高于相同时间段康复训练组和针刺组($P<0.05$),提示针刺+康复训练组比康复训练组和针刺组更能促进内源性NSCs的增殖。因为新增殖的内源性NSCs不仅局限在损伤一侧,对侧SVZ区亦可见BrdU阳性细胞。因而我们考虑内源性NSCs的活化机制首先可能建立在某些弥散性的影响因素上,像神经生长因子、细胞因子、神经递质等。针刺、康复训练等外界刺激可能使MCAO模型大鼠缺血脑组织神经营养因子,如胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达增多,从而促进NSCs的增殖^[9-11]。

虽然,在本研究中我们观察到康复训练、针刺、针刺+康复训练可增加局灶性脑缺血大鼠SVZ区内源性NSCs的增殖,其中以针刺+康复训练更明显。

本研究下一步将进行BrdU/NeuN(提示增殖细胞分为成熟的神经元细胞)、BrdU/GFAP(增殖细胞分化为星型胶质细胞)方面的研究,对BrdU阳性的增殖细胞迁移、分化的过程进行深入的跟踪。

参考文献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84—91.
- [2] 邓春雷. 实验针灸学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 7.
- [3] Gould E, Tanapat P, Hastings NB, et al. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning [J]. *Trends Cogn Sci*, 1999, 3(5): 186—192.
- [4] Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication [J]. *Science*, 1982, 218(4571): 474—475.
- [5] Abe K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 1393—1408.
- [6] 刘玲玉, 曾庆杏. 脑缺血再灌注神经干细胞原值激活的研究 [J]. *卒中与神经疾病*, 2003, 10(6): 329—332.
- [7] 刘喆, 赖新生. 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 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(3): 218.
- [8] Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, et al. Impairment of neural precursor proliferation increases survival of cell progeny in the adult rat dentate gyrus [J]. *Mech Ageing Dev*, 2002, 123(10): 1341—1352.
- [9] Gould E, Tanapat P, Hastings NB, et al. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning [J]. *Trends Cogn Sci*, 1999, 3: 186—192.
- [10] van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus [J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2: 266—270.
- [11] 陶静, 陈立典, 薛偕华, 等. 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 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(12): 1061—1063.