

· 基础研究 ·

针刺对快速老化小鼠海马神经干细胞增殖、分化的影响

李小宏 卢圣锋 乔秀兰 尹海燕 曾芳 黄梅 余曙光 唐勇

【摘要】目的 研究针刺疗法对快速老化小鼠(SAMP8)海马神经干细胞(NSCs)增殖、分化的影响。**方法** 将 24 只 SAMP8 小鼠随机分为模型组与针刺组,12 只抗快速老化模型小鼠(SAMR1)作为正常对照组(正常组),针刺组选百会穴进行针刺治疗,每天治疗 1 次,7 d 为 1 个疗程,共治疗 3 个疗程。处死前 1 周开始给予小鼠腹腔注射 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU),50 mg/kg 体重,每日 1 次。动物处死后取海马组织,用免疫荧光双标方法检测 NSCs 的增殖、分化。**结果** 各组小鼠海马区都存在 BrdU/nestin 阳性细胞表达,与正常组比较,模型组小鼠阳性细胞数减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组小鼠阳性细胞数增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠海马区都存在 NSCs 分化的新生神经细胞阳性表达,与模型组比较,针刺组 NSCs 向成熟神经元及未成熟神经元的分化不明显($P > 0.05$)。针刺能使 SAMP8 增多的成熟星形胶质细胞表达下降,减少的未成熟星形胶质细胞表达增多,但针刺组与模型组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与正常组比较,模型组少突胶质细胞明显增多($P < 0.05$);针刺能抑制少突胶质细胞的表达,针刺组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 针刺治疗能促进 SAMP8 海马 NSCs 增殖,抑制其向少突胶质细胞分化,但对向神经元、未成熟星形胶质细胞分化的影响不明显。

【关键词】 针刺; 快速老化小鼠; 海马; 增殖; 分化

The influence of acupuncture on neural stem cell proliferation and differentiation in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse prone-8 LI Xiao-hong*, LU Sheng-feng, QIAO Xiu-lan, YIN Hai-yan, ZENG Fang, HUANG Mei, YU Shu-guang, TANG Yong. * Department of Rehabilitation Medicine, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

Corresponding author: TANG Yong, Email: tangyongcn@126.com

【Abstract】Objective To investigate the influence of acupuncture therapy on neural stem cell (NCS) proliferation and differentiation in the hippocampus of the senescence-accelerated prone-8 (SAP8) mouse. **Methods** Twenty-four SAP8 mice were randomly and equally divided into a model group and an acupuncture group. Twelve senescence-accelerated resistant (SAR1) mice served as the control group. Acupuncture was administered at the Baihui (DU20) point to mice in the acupuncture group once daily for 21 consecutive days. Bromodeoxyuridine (BrdU) was used to detect the proliferation and differentiation of NCSs in the hippocampus through double-labeled immunofluorescence. **Results** ①In both the SAP8 group and the SAR1 group BrdU/nestin positive cells appeared. Compared to SAR1 group, the positive cells in the SAP8 group were significantly fewer. Compared to the SAP8 group, positive cells were significantly more numerous in the acupuncture group. ②In both the SAP8 group and the SAR1 group, BrdU markers of neuron or glia cell positive cells appeared. Compared to the SAR1 group, the expression of BrdU/GFAP increased in the SAP8 group, and decreased after acupuncture but not significantly. BrdU/S-100 β cells decreased significantly in the SAP8 group, and increased after acupuncture, but again not significantly. Compared to the SAR1 group BrdU/GalC positive cells increased significantly in the SAP8 group and decreased significantly after acupuncture. **Conclusions** After acupuncture treatment for 21 days, the differentiation of hippocampal NSCs into oligodendrocytes was inhibited, but there was little effect on their differentiating into neurons and immature astrocytes.

【Key words】 Acupuncture; Senescence-accelerated mouse prone-8; Hippocampus; Proliferation; Differentiation

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.09.008

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划(90709032),四川省青年科技基金(09ZQ026-025)

作者单位:400014 重庆,重庆医科大学附属第一医院康复医学科(李小宏);成都中医药大学针灸推拿学院(卢圣锋、尹海燕、曾芳、黄梅、余曙光、唐勇);重庆中医院针灸科(乔秀兰)

通信作者:唐勇,Email:tangyongcn@126.com

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)具有自我更新和多种分化潜能特性,其在海马、侧脑室下区等脑区被发现,对脑损伤的修复具有重要意义。NSCs 的修复方法主要有外源性移植与内源性原位诱导。但前者存在免疫排斥、伦理道德以及胚胎来源有限等问题;而后者不仅有望成为补偿或替代丢失海马神经元的新策

略,还可以完全避免外源性 NSCs 移植所带来的一系列问题。目前公认,针灸疗法具有综合性、整体性、双向性等的特点和优势,可以从多环节、多途径进行调整。在近年来的机制研究中发现,针刺、艾灸都可以促进室管膜下层、中枢病灶周围及海马的 NSCs 增殖^[1-3]。还有研究显示,神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)及其多聚唾液酸化复合物、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)与 NSCs 关系密切^[4-6]。我们的前期研究初步表明,电针可通过促进快速老化模型小鼠(senescence-accelerated mouse / prone 8, SAMP8)海马 NCAM、NF- κ B 的表达,介导神经元突触可塑性,进而改善其学习记忆能力^[6-8]。那么,针刺在促进小鼠学习记忆能力的过程中,是否涉及到 NSCs 的增殖、分化呢,为此,本课题继续采用 SAMP8 为模型,进行相关研究,报道如下。

材料与方法

一、动物与分组

选择 SAMP8 24 只,雄性,8 月龄,体重 20 ~ 24 g; 抗快速老化模型小鼠(senescence-accelerated mouse / resistant 1, SAMR1) 12 只,雄性,8 月龄,体重 20 ~ 24 g,均由天津中医药大学第一附属医院老年脑病研究室动物中心提供,合格证号:W-J 津实动质 M 准字第 006 号。小鼠在实验前适应性喂养 1 周后,将 SAMP8 分为模型组和针刺组,每组 12 只;12 只 SAMR1 作为正常对照组(正常组)。

二、主要仪器与试剂

德国 Leica 公司产荧光显微装置及数码相机输出系统,Leica Qwin V3 图像采集及分析系统,美国 Sigma 公司提供的 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU),英国 Abcam 公司提供的羊抗鼠 BrdU 多克隆抗体、兔抗鼠巢蛋白(nestin)多克隆抗体、兔抗鼠 β 微管蛋白 III(β -tublin III)抗体,美国 Santa Cruz 公司提供的兔抗鼠神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、兔抗鼠 s-100 β 抗体、兔抗鼠半乳糖脑苷脂(galactocerebroside, GalC)抗体、兔抗鼠微管相关蛋白-2(microtubule associated protein-2, MAP-2)抗体。

三、治疗方法

于小鼠头顶两耳根连线中点(顶骨正中)取督脉

之百会穴。针刺操作:小鼠固定后,取百会穴,持针灸针向前平刺约 2 mm,进针之后,行捻转手法操作约 10 s,频率约 150 次/min,每隔 5 min 行针 1 次,每次治疗 20 min,每日 1 次,7 次为 1 个疗程,共治疗 3 个疗程,疗程间休息 2 d。正常组和模型组:除不予针刺治疗外,其他处理方式与针刺组相同。

四、BrdU 注射标记

在动物处死前 1 周,给予小鼠腹腔注射 BrdU,剂量为 50 mg/kg 体重,每天 1 次,连续注射 7 d。

五、指标检测

1. 取材: BrdU 腹腔注射结束后第 2 天,动物麻醉、开胸、灌注后,取海马组织行后固定、蔗糖液沉淀、冰冻切片,置于 -20℃ 冰箱中保存待测。每组采用随机数字表随机选取 6 只动物样本进行 NSCs 增殖、分化的检测。

2. NSCs 增殖的检测:采用 BrdU/nestin 免疫荧光双标法进行 NSCs 增殖检测。具体步骤参照试剂盒说明书进行。

3. NSCs 分化的检测:采用免疫荧光双标法进行 NSCs 分化检测。用 BrdU/MAP-2、BrdU/ β -tublin III、BrdU/GFAP、BrdU/s-100 β 、BrdU/GalC 荧光双染分别检测 NSCs 分化成熟神经元、未成熟神经元、成熟星形胶质细胞、未成熟星形胶质细胞、少突胶质细胞的分化情况。具体检测步骤参照试剂盒说明书操作。

六、统计学分析

数据用($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 12.0 版统计软件处理,组间数据比较方差齐时进行单因素方差分析(one way ANOVA),方差不齐时用 Games Howell 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组小鼠海马组织中 NSCs 增殖结果

3 组小鼠海马组织均有 BrdU/nestin 免疫荧光双标阳性细胞表达,提示 SAMR1、SAMP8 海马组织中都存在 NSCs 增殖。与正常组比较,模型组小鼠阳性细胞数减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组小鼠阳性细胞数增多,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是与正常组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠海马组织中 NSCs 增殖及分化结果比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	BrdU/nestin	BrdU/MAP-2	BrdU/ β -tublin III	BrdU/GFAP	BrdU/s-100 β	BrdU/GalC
正常组	6	140.25 $\pm$ 32.53	39.90 $\pm$ 8.54	11.65 $\pm$ 2.68	39.45 $\pm$ 13.01	16.35 $\pm$ 2.79	20.05 $\pm$ 3.74
模型组	6	107.75 $\pm$ 13.12 ^a	28.37 $\pm$ 7.56 ^b	9.33 $\pm$ 2.38	51.38 $\pm$ 11.30	12.83 $\pm$ 2.26 ^b	25.03 $\pm$ 3.04 ^b
针刺组	6	131.08 $\pm$ 20.82 ^c	35.13 $\pm$ 6.10	11.81 $\pm$ 2.85	40.13 $\pm$ 11.72	16.04 $\pm$ 2.88	19.87 $\pm$ 3.56 ^c

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与模型组比较,^c $P < 0.05$

二、各组小鼠海马组织中 NSCs 向神经元分化结果

3 组小鼠海马组织均有 BrdU/MAP-2 与 BrdU/ β -tublin III 免疫荧光双标阳性细胞表达,提示 SAMR1、SAMP8 海马区增殖细胞可分化为成熟神经元与未成熟神经元。与正常组比较,模型组小鼠 BrdU/MAP-2 与 BrdU/ β -tublin III 阳性细胞数较少,前者差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组小鼠 BrdU/MAP-2 和 BrdU/ β -tublin III 荧光双标阳性细胞数增多,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

三、各组小鼠海马组织中 NSCs 向星形胶质细胞分化结果

3 组小鼠海马组织均有 BrdU/GFAP 与 BrdU/s-100 β 免疫荧光双标阳性细胞表达,提示 SAMR1、SAMP8 小鼠海马区增殖细胞可以分化为成熟星形胶质细胞和未成熟星形胶质细胞。与正常组比较,模型组小鼠 BrdU/GFAP 阳性细胞数稍多,但差异无统计学意义($P > 0.05$);针刺治疗后,其表达有下降倾向,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常组比较,模型组 BrdU/s-100 β 阳性细胞表达下降,且差异有统计学意义($P < 0.05$),针刺治疗后,其表达有上升趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

四、各组小鼠海马组织中 NSCs 向少突胶质细胞分化结果

3 组小鼠海马组织均有 BrdU/GalC 免疫荧光双标阳性细胞表达,提示 SAMR1、SAMP8 小鼠海马区 NSCs 可分化为少突胶质细胞。与正常组比较,模型组小鼠阳性细胞数较多,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组小鼠阳性细胞数较少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

讨 论

目前,不少文献报道,成年哺乳动物脑中不连续的脑区存在 NSCs,如侧脑室室下区、海马齿状回颗粒下层、嗅球等,正常情况下 NSCs 处于静止或动态平衡状态,在疾病或某些生长因子的刺激下能被诱导、活化,以替代疾病中缺乏或受损的神经细胞^[9-11]。

BrdU 标记法是目前国际公认的检测脑内增殖细胞数目的方法,可以在细胞周期的复制期(S 期)渗入到细胞 DNA 内,BrdU 阳性细胞数目越多,增殖越明显。神经丝 nestin 主要存在于神经上皮干细胞,在发育期,nestin 表达逐渐增强,而 NSCs 终末分化后,nestin 表达减少。在本研究中,我们采用 BrdU/nestin 免疫荧光双标法鉴定了增殖细胞是由 NSCs 所产生。研究结果初步显示,SAMP8 海马区存在 BrdU/nestin 阳性细胞表达,但是与 SAMR1(正常组)相比,阳性细胞数较少,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示其 NSCs 增殖能力

下降;经过针刺治疗后,针刺组阳性细胞数目表达增多,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示经过针刺治疗后,SAMP8 海马 NSCs 增殖能力增强,这和针刺治疗癫痫、脊髓损伤、脑梗死和帕金森病的机制研究结果相类似^[2,12-14]。

神经细胞和神经胶质细胞共同构建了脑的结构和功能。NSCs 在增殖之后,只有分化成相应的神经元和神经胶质细胞才能最终产生作用。神经元的标志物有许多,我们选用 MAP-2 和 β -tublin III 进行标记。神经胶质细胞的数量约为神经元的几倍或几十倍,对神经元具有支持和营养、分离和绝缘的作用,还对整个神经系统的发育、细胞构筑、信息传递和神经系统内环境的稳定和可塑性有重要的作用。为此,我们分别选取 GFAP、s-100 β 、GalC 进行标记。本研究结果初步表明,无论是 SAMR1,还是 SAMP8,其海马 NSCs 都有分化能力,可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。这提示在老年期,无论是生理状态还是病理状态,都持续存在 NSCs 的分化,这和众多的相关报道结果一致^[15-17]。

本研究结果显示,与模型组比较,针刺组在诱导或促进 NSCs 向成熟神经元和未成熟神经元分化方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但有使其增多的倾向。此外,与正常组相比,模型组成熟星形胶质细胞表达增多($P < 0.05$),针刺治疗后,其表达稍有下降($P > 0.05$);模型组未成熟星形胶质细胞表达有所减少($P > 0.05$),针刺治疗后,其表达稍有增加($P > 0.05$)。有文献报道,针刺可以促进或诱导 NSCs 分化为成熟神经元及成熟胶质细胞,且和模型组比较差异有统计学意义^[18],我们认为这可能与模型的选择、穴位的选取和治疗时间长短有关。

另外,我们观察到,与正常组相比,模型组成熟胶质细胞增多,未成熟星形胶质细胞表达减少,这种现象的出现可能与机体自身代偿机制有关,而针刺可使其向对立面发展,体现了针刺调节的双向性。当然,这也使我们提出质疑:机体的这种代偿是否存在时间段,即是暂时还是持续;这种代偿是有益还是有害的;如果是暂时的,则可能和取材时间有关;如果是有益的,则针灸的双向调节作用应该存在良性和非良性之分。

有研究表明,少突胶质细胞与老年性痴呆关系密切,转基因 tau 蛋白在少突胶质细胞中的表达较在神经元中的表达高许多,少突胶质细胞 G272V tau 蛋白形成纤维丝,在 tau 蛋白磷酸激酶 AT8 作用下磷酸化,对老年性痴呆有诊断意义^[19]。而 SAMP8 常作为老年性痴呆模型进行研究^[6]。本实验结果初步表明,与正常组比较,模型组少突胶质细胞增多($P < 0.05$);而针刺

能减少其表达($P < 0.05$)。这说明,针刺在促进或诱导 NSCs 向神经元及星形胶质细胞分化的同时,还可抑制其向少突胶质细胞分化,其作用机制还需要进一步研究。

综上可知,针刺能诱导或促进 SAMP8 海马 NSCs 增殖、分化,且以分化为成熟神经元和成熟胶质细胞为主。另外,电针可以通过促进 SAMP8 海马 NCAM、NF- κ B 的表达,介导神经元突触可塑性,进而改善其学习记忆能力^[4-6]。因此,我们推测,针刺对老年模型小鼠学习记忆能力的改善作用与其诱导海马 NSCs 增殖、分化密切相关。

参 考 文 献

- [1] Cheng HY, Yu JC, Jiang ZG, et al. Acupuncture improves cognitive deficits and regulates the brain cell proliferation of SAMP8 mice. *Neurosci Lett*, 2008, 432: 111-116.
- [2] 王津存, 黄远桂, 温晓妮, 等. 电针穴位刺激对致病大鼠海马齿状回神经发生及行为学变化影响的实验研究. *第四军医大学学报*, 2006, 27: 441-444.
- [3] 吴巧凤, 尹海燕, 曾芳, 等. 艾灸补髓促进老年学习记忆减退大鼠海马神经发生. *中国老年学杂志*, 2008, 28: 2081-2083.
- [4] 卢圣锋, 尹海燕, 乔秀兰, 等. 神经细胞粘附分子、多聚唾液酸及其复合体与成年神经发生. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009, 36: 156-160.
- [5] 刘玉霞, 汪泱, 邓志锋. 核因子- κ B 在神经干细胞增殖和分化中的作用. *中华脑血管杂志(电子版)*, 2008, 2: 205-209.
- [6] 卢圣锋, 唐勇, 尹海燕, 等. 电针对 SAMP8 小鼠海马 NCAM、NF- κ B 表达的影响. *中华神经医学杂志*, 2009, 8: 266-269.
- [7] 邵欣, 余曙光, 卢圣锋, 等. 电针对快速老化小鼠海马神经元突触超微结构的影响. *中国老年学杂志*, 2009, 29: 780-782.
- [8] 卢圣锋, 邵欣, 唐勇, 等. 电针促进阿尔茨海默病模型小鼠(SAMP8)海马神经元突触可塑性的神经细胞黏附机制. *中国康复医学杂志*, 2008, 23: 1057-1060.
- [9] Loseva E, Yuan TF, Karnup S. Neurogliogenesis in the mature olfactory system: a possible protective role against infection and toxic dust. *Brain Res Rev*, 2009, 59: 374-387.
- [10] Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 2000, 405: 951-956.
- [11] Curtis MA, Connor B, Faull RL. Neurogenesis in the diseased adult human brain: new therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Cell Cycle*, 2003, 2: 428-430.
- [12] 崔晓军, 李伊为, 陈东风, 等. 督脉电针对脊髓损伤大鼠神经干细胞的作用. *解剖学研究*, 2002, 24: 180-184.
- [13] 李常新, 黄如训, 陈立云, 等. 大鼠脑梗死后神经前体细胞的增殖及电针作用的实验研究. *中国神经精神疾病杂志*, 2004, 30: 190-193.
- [14] 唐勇, 余曙光, 陈瑾. 电针对帕金森小鼠黑质致密部脑源性神经营养因子表达的影响. *针刺研究*, 2006, 31: 38-42.
- [15] Greenberg DA, Jin K. Neurodegeneration and neurogenesis: focus on Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 2006, 3: 25-28.
- [16] Brinton RD, Wang JM. Preclinical analyses of the therapeutic potential of allopregnanolone to promote neurogenesis in vitro and in vivo in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 2006, 3: 11-17.
- [17] Jin K, Peel AL, Mao XO, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *PNAS*, 2004, 101: 343-347.
- [18] 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. *中国康复医学杂志*, 2008, 23: 1061-1065.
- [19] 陈应柱, 包仕尧, 田野. 少突胶质细胞生物学特性与中枢神经系统疾病. *国外医学生理病理科学与临床分册*, 2005, 25: 193-196.

(修回日期: 2010-04-15)

(本文编辑: 吴 倩)

· 短篇论著 ·

面肌按摩并协调性训练辅助治疗周围性面瘫的疗效观察

许梦雅

周围性面瘫是一种临床常见病和多发病,亦称为面神经炎或贝尔麻痹(Bell's palsy),是因茎乳孔内面神经非特异性炎症所致周围性面肌瘫痪,任何年龄均可发病,以成年人多见。该病给患者生活和工作带来极大不便和巨大身心压力。康复治疗的目的尽快并最大限度地恢复患者面神经功能,解除其心理压力,提高生活质量^[1]。笔者近年来根据面部表情肌的解剖学走向,对周围性面瘫患者进行面肌按摩和协调性训练,取得了良好效果,现报道如下。

一、资料与方法

我科 2005 年 8 月至 2009 年 8 月,共收治周围性面瘫患者 80 例,其中男 39 例,女 41 例,年龄 7~69 岁。病例纳入标准:符合面神经麻痹诊断标准,单侧发病,起病在 1 周内,House-Brackmann(H-B)面神经功能评价分级系统^[2]评为 V 级或 VI 级,静止状态时面部明显不对称,查体示抬眉、皱眉、闭眼、耸鼻、鼓腮、示齿、努嘴动作均不能完成,患侧额纹完全消失,眼睑不能闭合,眼裂宽 3 mm 以上,鼻唇沟平坦,口角下垂明显,进食时食物残留于齿颊之间。排除外伤、肿瘤等引起的继发性面神经麻痹,格林-巴利综合征等引起的面神经病变,中枢性面神经麻痹。所有患者均签署知情同意书。按患者就诊顺序编号,单号为对照组,双号为治疗组,2 组患者性别、年龄、病程、H-B 分级等比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表 1。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.09.009

基金项目:河南省郑州市二七区科技局科技攻关项目(2008-27)

作者单位:450014 郑州,郑州大学第二附属医院神经康复科