

· 基础研究 ·

运动训练结合电针治疗对脑缺血再灌注大鼠海马齿状回区巢蛋白表达的影响

陆敏 张苏明 常立英 王义辉 陈晨 朱舟

【摘要】目的 探讨运动训练结合电针治疗对脑缺血再灌注大鼠海马齿状回区巢蛋白表达的影响。**方法** 54 只 Wistar 大鼠随机分为造模对照组(A 组)、运动训练组(B 组)和运动训练结合电针治疗组(C 组),采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,大脑中动脉阻塞 1 h,再灌注 7、14 和 21 d,应用免疫组织化学方法分别检测各组大鼠缺血侧和对侧海马齿状回区巢蛋白的表达情况。**结果** 3 组大鼠均表现为 7 d 时的海马区阳性细胞最多,而且在各时间点的缺血侧海马 DG 区的巢蛋白阳性细胞数均明显多于对侧 DG 区($P < 0.01$)。7、14 和 21 d 时,C 组和 B 组大鼠缺血侧海马区巢蛋白阳性细胞较 A 组明显增多,差异有统计学意义($P < 0.01$),7 d 和 14 d 时,C 组大鼠缺血侧海马区巢蛋白阳性细胞较 B 组亦明显增多($P < 0.01$)。**结论** 脑缺血再灌注大鼠海马区巢蛋白阳性细胞的增多存在时间规律及原位增殖特性,运动训练和电针治疗可显著增加巢蛋白阳性表达的数量。

【关键词】 脑缺血再灌注; 运动训练; 电针; 巢蛋白

Effects of movement exercise combined with electroacupuncture on expression of Nestin in hippocampus dentate gyrus after cerebral ischemia-reperfusion LU Min*, ZHANG Su-ming, CHANG Li-ying, WANG Yi-hui, CHEN Chen, ZHU Zhou.

* Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: ZHANG Su-ming, Email: summing_zhang@163.com

【Abstract】Objective To observe the effect of movement exercise combined with electroacupuncture on the expression of Nestin in the hippocampus dentate gyrus (DG) after cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** Fifty-four Wistar rats were used and randomly divided into a control group (Group A), an exercise training group (Group B), and an exercise training combined with electroacupuncture group (Group C). The middle cerebral arteries (MCA) of all the rats were occluded for 1 h, followed by reperfusion for 7, 14 and 21 days. Immunohistochemistry method was used to detect the expression of Nestin in the hippocampus dentate gyrus. **Results** The number of Nestin-positive cells peaked in DG in all groups on the 7th day after cerebral ischemia-reperfusion. The number of Nestin-positive cells in DG ipsilateral to the ischemia-reperfusion lesion were significantly more than those in the opposite side at various time points ($P < 0.01$). Significant increase of Nestin expression were detected in rats of Group B and Group C at various time points after cerebral ischemia-reperfusion when compared with that of Group A ($P < 0.01$). It was also found that the number of Nestin-positive cells of Group C were significantly more than those of Group B on the 7th and 14th days after cerebral ischemia-reperfusion ($P < 0.01$). **Conclusion** The increase of Nestin-positive cells in the DG was time-dependent and characterized by in situ proliferation after cerebral ischemia-reperfusion. Exercise training and electroacupuncture can significantly promote the expression of Nestin.

【Key words】 Cerebral ischemia-reperfusion; Movement exercise; Electroacupuncture; Nestin

神经组织是高度分化的组织,传统观念认为成年哺乳动物中枢神经组织不再具有再生的能力。但近年研究证实,成年哺乳动物包括人的中枢神经系统中均存在神经干细胞(neural stem cell, NSC),只是绝大多数处于静止状态^[1]。自体神经干细胞在缺血、损伤等病理条件下可以增殖、迁移及分化,显示出在中枢神经

系统损伤后自我修复的潜在作用^[2],为脑梗死后神经组织结构修复及功能康复带来了新的希望。虽然有研究表明运动训练和电针治疗可明显改善和提高脑梗死患者的运动功能和日常生活活动能力,但其功能恢复的神经生物学基础研究还相当不充分。在相关康复机制的研究中对神经再生的探讨较少,由于巢蛋白(Nestin)是识别神经干细胞的重要的标志性蛋白,本实验通过观察运动训练结合电针治疗对成年脑缺血再灌注大鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)区巢蛋白表达的影响,以探讨运动训练和电针治疗作用的神经发生机

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(陆敏),神经内科(张苏明、王义辉、陈晨、朱舟);湖北省襄樊市中心医院神经内科(常立英)

通讯作者:张苏明,Email: summing_zhang@163.com

制,为脑卒中治疗提供一种新的思路。

材料和方法

一、实验动物与分组

成年雄性 Wistar 大鼠 54 只,由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供,体重 200~250 g,随机分为造模对照组(A组)、运动训练组(B组)和运动训练结合电针治疗组(C组),每组各 18 只。各组大鼠在组内又随机分为 7、14 和 21 d 共 3 个小组,每小组 6 只,分别于术后第 7 天、第 14 天和第 21 天取材。A 组造模后不做任何处理,B 组和 C 组大鼠均从造模后 24 h 开始接受运动训练,C 组大鼠还从造模当天开始同时接受电针治疗,3 组大鼠饲养条件相同。

二、脑缺血再灌注实验动物模型制作

参照 Longa 线栓法^[3]制作大脑中动脉梗阻(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注实验动物模型,大鼠用 6% 水合氯醛(0.5 ml/100 g 体重)行腹腔注射麻醉,仰卧位固定,常规备皮消毒,取颈正中切口,游离右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉,结扎颈外动脉、颈总动脉近心端,血管夹夹闭颈内动脉远端,在颈总动脉的分叉处下方剪一小口,插入直径为 0.23 mm、末端涂以硅酮的尼龙鱼线,顺颈内动脉走行轻轻推进尼龙线,直到遇到轻微阻力为止,由分叉处计算平均插入深度约 (18.0 ± 0.5) mm,以阻断右大脑中动脉入口,造成右侧大脑中动脉供血区的缺血;1 h 后拔出线栓恢复再灌注,并缝扎切口。模型成功的标志是动物苏醒后左侧前肢屈曲、行走左转或左侧跌倒,不合格的动物剔除。

三、运动训练

B 组和 C 组运动训练项目相同,包括平衡木上行走训练、转棒上转动训练及网屏抓握训练,每日训练 1 次,每次 1 h,每周训练 6 d。

1. 平衡木上行走训练:采用长 170 cm、宽 2 cm 的方木棒,置于距地面 50 cm 处,用食物诱导大鼠在方木棒上行走,下方置海绵垫保护,训练其平衡能力。

2. 转棒上转动训练:将大鼠置于长 150 cm、直径 4.5 cm、距离地面 50 cm 高的圆木棒上,圆木棒中点固定在 5 转/min 的转动器上,以 5 转/min 的速度转动,棒下方置海绵垫保护,训练大鼠的抓握和动态平衡能力。

3. 网屏训练:网屏为 50 cm × 40 cm 网带,网眼为 1 cm × 1 cm,网屏距地面高度为 80 cm,下方铺海绵垫保护,先将网屏水平放置,将老鼠放在其上,再缓缓将网屏竖直,然后在网屏竖直位状态下用手转动网屏,训练大鼠的抓握能力。

四、电针治疗

C 组大鼠于脑缺血 1 h 再灌注 30 min 时(大鼠此时尚未完全清醒)进行首次电针治疗。穴位选取督脉

经穴“百会”、“大椎”,其定位的选取参照大鼠的常用针灸穴位^[4]。“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。选用苏州产直径为 0.40 mm,长 25 mm 的华佗牌不锈钢毫针,“百会”斜向前刺入 10 mm,“大椎”直刺入 4 mm,接通上海产 ZYZ-20GZ1 型高性能针灸治疗仪,“百会”接负极,“大椎”接正极,选用连续波,频率为 40 Hz,刺激强度为 1~2 mA,以大鼠肢体轻微抖动为度,每天治疗 1 次,每次 20 min,每周治疗 6 d。

五、取材切片

造模后第 7、14 和 21 天,分别将各组大鼠用生理盐水 150 ml 行心脏灌注,然后用 4% 多聚甲醛 200 ml 心脏灌注固定,30 min 后断头取脑。根据大鼠脑图谱在距前囟 4 mm 处(相当于大鼠海马区)冠状切取 2 mm 厚包含左、右半球的组织块,浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定,24 h 内进行常规脱水,石蜡包埋,切片(片厚 5 μ m)。

六、巢蛋白免疫组化染色

切片常规脱蜡至水后,加入 3% H_2O_2 ,室温下孵育 20 min 以灭活内源性过氧化物酶;然后放入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中进行微波抗原修复;滴加 5% 牛血清白蛋白封闭液,室温下放置 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加小鼠抗大鼠巢蛋白抗体(1:400, Chemicon 公司),4℃ 下过夜;滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG(1:150, 北京中山公司),37℃ 孵育 30 min;滴加辣根酶标记酶联卵白素工作液(1:150, 北京中山公司),37℃ 孵育 30 min;二氨基联苯胺(DAB)显色,双蒸水多次洗涤;苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片。以上各步间除特殊说明外,均用磷酸盐缓冲液振洗 5 min,洗 3 次。

七、图像分析

切片置于 Olympus 显微镜下,观察脑梗死同侧和对侧海马 DC 区,以胞浆内呈黄色或棕黄色为巢蛋白阳性细胞。每只大鼠取 3 张非连续切片,在相同的光亮程度下,每部位各随机在高倍镜下($\times 400$)取 3 个非重叠视野进行计数,以此得到脑梗死同侧和对侧海马 DG 区的巢蛋白阳性细胞的平均数,结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。采用 Olympus Micro Image 4.0 图像处理系统进行图像分析。

八、统计学分析

采用 SPSS 10.0 版统计软件对数据进行统计分析,实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两样本均数比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

各组大鼠局灶性脑缺血后 7、14 和 21 d 时缺血侧和对侧海马 DG 区巢蛋白阳性细胞数结果见表 1。3 组大鼠巢蛋白阳性细胞的时间分布规律相同,都表现

为局灶性脑缺血后 7 d 海马区阳性细胞最多,缺血后 14 d 和 21 d 阳性细胞逐渐减少,分布稀疏,而且 3 组大鼠在各时间点的缺血侧海马 DG 区的巢蛋白阳性细胞数均显著多于对侧 DG 区。局灶性脑缺血后 7 d 和 14 d, C 组和 B 组大鼠缺血侧海马区巢蛋白阳性细胞较 A 组明显增多,差异有统计学意义,而且 C 组大鼠缺血侧海马区巢蛋白阳性细胞较 B 组亦明显增多,而缺血后 21 d, C 组和 B 组大鼠缺血侧海马区巢蛋白阳性细胞仍明显多于 A 组,但 C 组和 B 组间差异无统计学意义,见图 1。但 3 组大鼠间在同一时间点缺血对侧海马 DG 区的巢蛋白阳性细胞表达无明显差异。

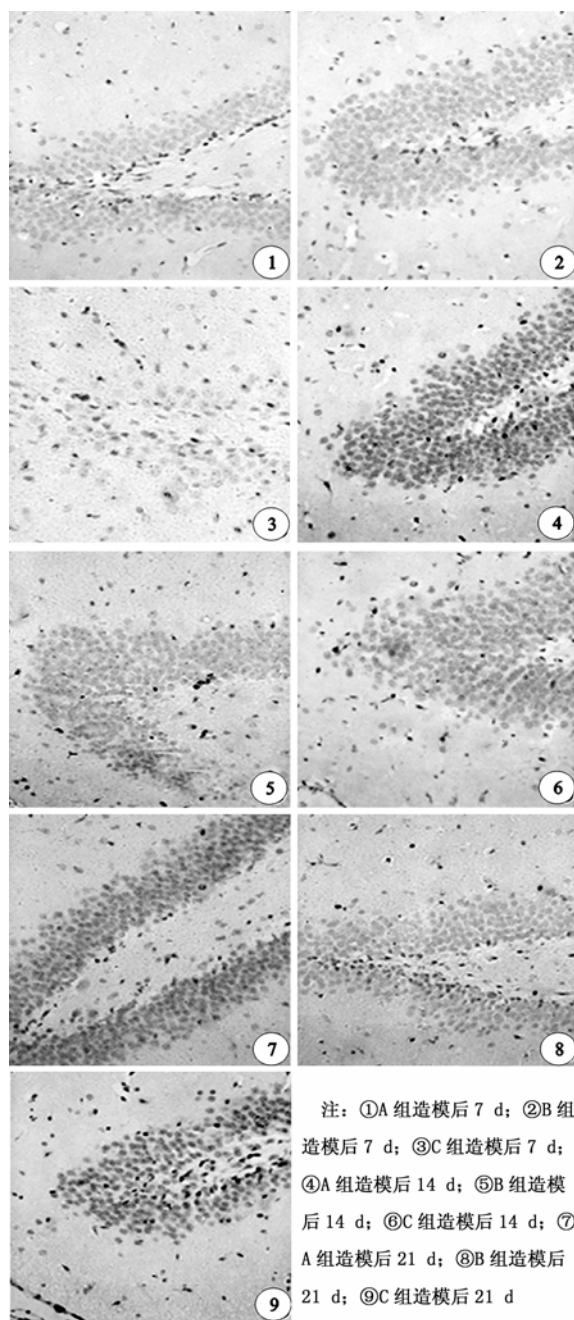


图 1 3 组大鼠缺血侧海马 DG 区巢蛋白的表达情况(S-P, ×400)

表 1 各组大鼠局灶性脑缺血后 7, 14 和 21 d 时 DG 区巢蛋白阳性细胞数(个/400 倍视野)

组别	缺血侧 DG 区		
	7 d($n_1=6$)	14 d($n_2=6$)	21 d($n_3=6$)
A 组	18.54 ± 2.42	11.28 ± 2.73	5.36 ± 2.55
B 组	24.70 ± 3.94 ^a	18.70 ± 2.37 ^a	12.50 ± 3.06 ^a
C 组	31.10 ± 2.97 ^{ab}	23.60 ± 1.87 ^{ab}	12.40 ± 2.83 ^a
组别	对侧 DG 区		
	7 d($n_1=6$)	14 d($n_2=6$)	21 d($n_3=6$)
A 组	8.09 ± 1.33 ^c	5.63 ± 2.08 ^c	2.86 ± 1.77 ^c
B 组	9.10 ± 1.02 ^c	6.26 ± 1.23 ^c	3.17 ± 1.44 ^c
C 组	8.97 ± 1.26 ^c	5.73 ± 1.38 ^c	3.36 ± 2.05 ^c

注:与 A 组相同时间点比较,^a $P < 0.01$;与 B 组相同时间点比较,^b $P < 0.01$;与同组相同时间点缺血侧比较,^c $P < 0.01$

讨 论

运动训练和电针治疗都是临床较为常用的康复治疗手段,虽有研究表明它们可通过多种途径干预脑缺血过程,包括对神经营养因子、神经元、神经胶质细胞的影响以及抑制神经细胞凋亡等方面的作用^[5-7],但将这两种临床常用康复方法结合起来着眼于对脑缺血后内源性神经干细胞影响的研究较少。

研究发现成年哺乳动物主要在海马 DG 和侧脑室室下区(SVZ)存在终生具有增殖能力的神经干细胞^[8],而缺血作为内源性增殖的强烈诱导因素可促使神经干细胞增殖、移行及分化^[9]。巢蛋白是目前识别神经干细胞的重要标志蛋白^[10],其属于类中间丝,是最大的中间丝,氨基酸序列与其他已知的任何中间丝都不一样,巢蛋白的功能可能与维持原始细胞特殊的形态、参与细胞迁移等有关,巢蛋白在干细胞增殖旺盛阶段出现并大量表达的现象,提示其在干细胞自我更新并保持多潜能增加细胞抗损伤的能力方面具有其它中间纤维无法取代的作用。巢蛋白阳性细胞具有干细胞特征,由成年大鼠中枢神经系统中分离出的巢蛋白阳性细胞在体外培养中呈集落性生长,并分化出神经元与胶质细胞的前体细胞。

本实验结果显示,局灶性脑缺血损伤后,两侧海马 DG 区的巢蛋白阳性细胞数在梗死后 7 d 最多,14 d 时有所下降,21 d 时数目最少,而且 3 组大鼠在各时间点的缺血侧海马 DG 区的巢蛋白阳性细胞数均多于对侧 DG 区,此结果与其他学者的实验结果相似^[11]。巢蛋白阳性细胞数分布的时间规律提示出神经干细胞的增殖可在缺血后较短时间内发生,且很快达到增殖高峰,对照组也具有相同的时间分布规律,说明缺血性脑损伤后,脑组织存在自我修复的神经可塑性,而且其自我修复的能力主要表现在缺血早期,因而自我修复能力有限,因此在脑缺血损伤后神经干细胞增殖的有效时间段内给予适应的干预手段可能促进其进一步增殖、迁移和分化,从这个意义上来说,干预的介入时间显得

极为重要。

缺血侧海马 DG 区的巢蛋白阳性细胞数均多于对侧 DG 区,提示出局灶性缺血性脑损伤可以刺激神经干细胞原位增殖,其可能的机制是脑梗死后局部存在可以促进神经干细胞原位增殖的信号物质或存在诱导神经干细胞迁移、趋向的因子,并且损伤侧局部的病理生理环境适宜新生细胞的生长增殖。有学者认为脑损伤可以引起一些神经生长因子释放增加,进而激发神经干细胞原位增殖,Nakatomi 等^[12]报道,大鼠脑梗死后向侧脑室注入 FGF2 和 EGF 后,靠近海马后部侧脑室周围的神经干细胞反应性增殖并部分分化成神经细胞,迁移至 CA1 区进一步分化为锥体细胞,接受突触输入并投射至海马,神经电生理研究证实这些新生的神经元参与构成神经环路并与脑梗死后大鼠学习记忆能力的提高有关^[9]。据此推测,内源性神经干细胞可能参与了脑梗死后的病理生理过程,进而帮助修复缺损的神经组织。当然,这些增殖的神经干细胞的发展方向、增殖分化机制以及在脑梗死中的作用还有待于进一步深入研究。

运动训练组在脑梗死后第 7、14 和 21 天各时间点海马区巢蛋白阳性细胞数量均高于相同时间点的对照组,说明局灶性脑缺血损伤后,运动训练可以提高内源性神经干细胞增殖水平,但其中的机制还不十分清楚。有研究表明运动训练可以使损伤局部的神经营养因子水平增高^[13],而神经营养因子水平的增高则可促进内源性神经干细胞的增殖。另有报道运动训练可以改变海马 NMDA 受体通道特性,使兴奋性谷氨酸通过 NMDA 受体而使细胞去极化,引起细胞内与增殖有关的基因转录和蛋白表达增强,最终导致细胞增殖水平上调^[14]。电针作为一种传统的非药物治疗手段,多年来在我国得到广泛应用,而且在临床脑卒中治疗中有肯定的价值。本实验证实,运动训练结合电针治疗组的巢蛋白阳性细胞的增殖情况在缺血后 7 d 和 14 d 均明显好于单纯运动训练组,表明电针治疗对神经干细胞的增殖具有正性推动作用。既往已有研究表明,脑源性神经生长因子和碱性成纤维生长因子等能促进神经干细胞的增殖和分化^[12,15],而电针能使包括脑源性神经生长因子和碱性成纤维生长因子等在内的多种神经营养因子的分泌增多^[16,17]。因此,推测电针促使巢蛋白阳性细胞增多的可能机制之一是通过脑缺血后对多种神经营养因子在不同时间和空间表达的调节来影响内源性神经干细胞的增殖,但这些因素在复杂的脑内究竟如何协调以及其他因素的参与情况如何尚不十分清楚。另外,本实验结果还显示,在缺血后 21 d,运动训练结合电针治疗组的巢蛋白阳性细胞的增殖情况与单纯运动训练组差异无统计学意义,表明电针治疗促进巢蛋白阳性细胞增多的效应存在时间窗,因此早

期治疗的重要性也可据此体现出来。

综上所述,脑缺血再灌注大鼠海马区巢蛋白阳性细胞的增多存在时间规律及原位增殖特性,运动训练和电针治疗可显著增强巢蛋白阳性表达的数量,这为临床应用研究提供了初步的有关神经再生方面的神经康复基础,但其具体作用机制以及对神经干细胞进一步迁移、分化的影响尚需进行进一步深入的探讨。

参 考 文 献

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287:1433-1438.
- [2] Goulsd E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci*, 2002, 22: 619-623.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [4] 李忠仁,主编. 实验针灸学. 北京:中国中医药出版社,2003:327, 1205-1211.
- [5] 张松涛,李玲,邱建勇,等. 康复训练对大鼠脑梗死灶周围 BDNF 表达的影响. *中国康复理论与实践*, 2003, 9:130-141.
- [6] 张京钟,施静,刘晓春,等. 电针对大鼠局灶性脑缺血后脑内 Bax, Bcl-2 表达的影响. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2001, 10:27-32.
- [7] Teresita, LB, Julie W, Magdalena W, et al. Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training. *Behav Brain Res*, 2006, 171: 17-25.
- [8] Rossella G, Angela G, Luca B, et al. Neural stem cells. *Circ Res*, 2003, 92:598-608.
- [9] Iwai M, Sato K, Omori N, et al. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22: 411-419.
- [10] Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, et al. Differential expression of Musashi 1 and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res*, 2002, 69: 750-756.
- [11] 周晓琳,赵永波,段淑荣,等. 脑梗死后康复训练对成年大鼠海马结构中神经干细胞的影响. *神经疾病与精神卫生*, 2004, 4: 430-434.
- [12] Nakatomi H, Okabe S, Yamaoto S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*, 2002, 110:429-441.
- [13] 唐强,秦颖,倪金霞,等. 脑梗死大鼠康复训练后脑功能恢复及免疫组织化学改变. *中国康复理论与实践*, 2003, 9:136-138.
- [14] 余茜,李晓红,刘羲,等. 康复训练对脑梗死大鼠学习记忆与健侧海马神经元 NMDA 受体通道的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24:683-686.
- [15] Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, et al. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the atriatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci*, 2001, 21:6706-6717.
- [16] Ou YW, Han L, Da CD, et al. Influence of acupuncture upon expression levels of basic fibroblast growth factor in rat brain following focal cerebral ischemia-evaluated by time resolved fluorescence immunoassay. *Neurol Res*, 2001, 23:47-50.
- [17] 郭宗君,王鲁民. 电针刺激神经干对脑缺血再灌注后不同时期皮层 BDNF mRNA 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 585-588.

(收稿日期:2006-11-20)

(本文编辑:熊芝兰)