

· 基础研究 ·

电针对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞巢蛋白表达的影响

刘喆 赖新生

【摘要】目的 研究电针治疗对成年大鼠脑缺血后缺血侧神经干细胞巢蛋白(nestin)表达的影响,探讨电针治疗缺血性脑损伤的作用机制。**方法** 采用开颅热凝闭法制作大鼠中动脉阻塞(MCAO)模型,随机分为模型组与电针组,针刺“大椎”、“百会”,并行电针干预,采用巢蛋白免疫组化法观察脑缺血后 3, 7, 14 与 21 d 四个不同时相巢蛋白表达阳性细胞的数量。**结果** 脑缺血后不同时相缺血侧皮质、海马齿状回和纹状体均有巢蛋白表达阳性细胞,其中 7 d 时的阳性细胞数量明显增加(皮质: $P < 0.05$,海马: $P < 0.01$,纹状体: $P < 0.01$);而电针组在不同时相的巢蛋白阳性细胞数量均较同时相模型组有明显的增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 电针可促进缺血后相关脑区巢蛋白阳性细胞数量的增加,提示这种作用可能是电针治疗脑缺血的重要作用机制之一。

【关键词】 局灶性脑缺血; 神经干细胞; 巢蛋白; 电针

Effects of electroacupuncture on the expression of Nestin in neural stem cell after focal cerebral ischemia in rats LIU Zhe*, LAI Xin-sheng. *Department of the Acupuncture and Moxibustion, Zhejiang Traditional Chinese Medicine College, Hangzhou 310053, China

【Abstract】 Objective To study the influence of electroacupuncture on the expression of Nestin in neural stem cells after focal cerebral ischemia in rats and to explore the mechanism of electroacupuncture in treating ischemic brain injury. **Methods** The model of middle cerebral artery occlusion was made by using opening cranium hot coagulation in 72 rats, who were divided randomly into a model group and an electroacupuncture group. Electroacupuncture was applied on "Dazhui" and "Baihui" points in rats in electroacupuncture group, and immunohistochemistry method was used to observe the number of Nestin expression positive cells on the 3th, 7th, 14th and 21st days after ischemia. **Results** There were Nestin positive cells in the cortex, hippocampal dentate gyrus (DG) and striatum at different time points after cerebral ischemia, and the number of Nestin positive cells in various brain regions were increased significantly on the 7th day ($P < 0.05$). It was also found that the number of Nestin positive cells in electroacupuncture group was significantly more than that in the model group at different time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture can increase the number of Nestin positive cells in some brain regions after focal cerebral ischemia, which might be one of the important mechanisms of electroacupuncture in treating ischemic brain injury.

【Key words】 Focal cerebral ischemia; Neural stem cell; Nestin; Electroacupuncture

传统观念认为,成年中枢神经系统中的神经元缺乏再生的能力,而且在损伤后通常由胶质瘢痕修复。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]。当发生脑缺血或其他脑损伤时,可诱导其增殖、定向迁移及分化,对受损伤脑组织结构与功能进行修复和重塑^[2]。本研究用凝闭法制作大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,采用免疫组化染色法,观察电针

对脑缺血后 NSC 特异性标记物巢蛋白(nestin)表达的影响,并探讨其与脑缺血后大鼠神经功能恢复之间的关系。

材料与方法

一、实验动物分组及造模

SD 健康雄性大鼠 72 只,体重 250 ~ 280 g,由广州中医药大学实验动物中心提供。随机分为模型组与电针组,每组大鼠 36 只,造模后每组按缺血时间的不同随机分为缺血 3 d、缺血 7 d、缺血 14 d 和缺血 21 d 4 个亚组,每个亚组大鼠 9 只。

所有大鼠均用 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,参考 Bederson 等^[3]的方法加以改良进行

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(No. 31458)

作者单位:310053 杭州,浙江中医学院针灸推拿系(刘喆);广州中医药大学针灸推拿学院(赖新生)

通讯作者:赖新生

模型制作。主要步骤:在右侧眼外眦距外耳道连线中点处垂直切开皮肤和颞肌,在颞骨前下紧邻颞弓前份上缘的部位开窗,钻开此处颞骨暴露 $\phi 0.5\text{ cm}$ 的骨窗。在手术显微镜下用烧灼金属针凝闭位于嗅束至大脑下静脉之间的大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)主干,阻断血流。

二、治疗方法

电针组于造模后当日开始实施电针治疗,采用 1 寸毫针针刺大鼠“百会”和“大椎”,其定位参照《实验针灸学》^[4]书中大鼠的常用穴位进行,联接 G6805-I 型电针治疗仪,选择 5~10 Hz 频率交替的等幅疏密波,刺激强度以大鼠身体轻微颤动为宜,持续 30 min。模型组不实施治疗处理。

三、神经功能缺损评分

参照 Bederson 等^[3]的评分方法,分别观察大鼠行为表现并进行神经功能缺损评分,评估 MCA 阻断后大鼠的神经损伤和治疗状况:0 分——向地面伸展两前肢,未见行为异常;1 分——脑损伤对侧前肢持续屈曲;2 分——脑损伤对侧前肢屈曲,脑损伤对侧肩内收但无扭转,侧推抵抗力弱;3 分——脑损伤对侧前肢屈曲,脑损伤对侧肩内收、扭转,侧推无抵抗力。

四、组织取材与免疫组化染色

在大鼠腹腔麻醉下开胸,经左心室先灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛,注毕立即取脑,置于相同的新鲜灌注液后固定 6 h。洗去表面的固定液,继之梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,石蜡切片,片厚 5 μm 。免疫组化染色主要程序:切片常规脱蜡至水后,入 0.3% H_2O_2 灭活内源性酶;然后 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)中行微波抗原修复,再滴加抗原修复液;0.3% Triton-X100 孵育;滴加正常山羊血清孵育(不洗);滴加小鼠抗大鼠巢蛋白抗体(1:1000, Rrt 401, Pharmingen 公司产),37℃ 孵育 2 h,再 4℃ 下过夜;滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG(1:150, Sigma 公司)孵育;滴加卵白素化过氧化物酶(1:150, Sigma 公司)孵育;二氨基联苯胺(DAB, 武汉博士德公司产)显色;双蒸水多次洗涤;苏木素复染,脱水,透明,中性树脂封片。以上各步之间未作说明者,用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosptat buffer, PBS)洗涤,洗涤 3 次,每次 3 min。同一组切片中,分别用正常山羊血清和 PBS 代替巢蛋白一抗作孵育进行阴性对照。

五、细胞计数与统计学分析

染色结果用生物显微镜观察并摄片,经图像分析系统(北京航空航天大学图像分析系统,3.0 版)分析并计数巢蛋白阳性细胞。每只大鼠缺血侧不同脑区取 3 张非连续切片,每部位各随机取 3~4 个非重叠视野进行计数,以此得出阳性细胞的平均数。各时相的细

胞计数结果表示为($\bar{x} \pm s$),使用 SPSS 12.0 软件包行单因素方差分析及组内、组间的 t 检验。

结 果

一、电针对神经功能缺损的影响

电针治疗前,2 组脑缺血神经病学评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$),随着缺血时间的延长,模型组动物神经缺损症状逐渐减轻,其中,3 d 分别与 7 d、14 d、21 d 时相的评分比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 7 d 至 21 d 评分虽呈下降趋势,但 7 d、14 d 和 21 d 之间评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。电针组评分变化趋势与模型组基本相同,但电针组与模型组在各时相上的评分比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 脑缺血后两组大鼠在不同时间的神经功能缺损评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	缺血 3 d	缺血 7 d	缺血 14 d	缺血 21 d
模型组	9	2.78 $\pm$ 0.44	2.00 $\pm$ 0.71 [△]	1.89 $\pm$ 0.60 [△]	1.67 $\pm$ 0.50 [△]
电针组	9	2.11 $\pm$ 0.78 [*]	1.22 $\pm$ 0.67 [*]	0.78 $\pm$ 0.67 [#]	0.56 $\pm$ 0.53 [#]

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; 与缺血 3 d 比较, $\Delta P < 0.01$

二、脑缺血后各组大鼠缺血侧皮质巢蛋白阳性细胞计数及电针对其影响

在局灶性脑缺血后,模型组缺血侧皮质在 7 d 与 3 d、14 d 和 21 d 时相上的巢蛋白阳性细胞计数比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而在 3 d、14 d 和 21 d 三个时相上,除 3 d 与 14 d 比较差异有统计学意义($P < 0.05$)外,其余两两比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。电针组变化趋势与模型组基本相同,在同时相上,电针组表达增高,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表 2 脑缺血后两组大鼠不同时间皮质巢蛋白阳性细胞计数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	缺血 3 d	缺血 7 d	缺血 14 d	缺血 21 d
模型组	9	5.20 $\pm$ 1.70	14.16 $\pm$ 3.95	9.26 $\pm$ 3.29	6.70 $\pm$ 2.27
电针组	9	11.50 $\pm$ 3.39 [*]	26.40 $\pm$ 4.65 [*]	18.16 $\pm$ 3.03 [*]	12.66 $\pm$ 2.57 [*]

注:与模型组比较, * $P < 0.01$

三、脑缺血后各组大鼠缺血侧海马齿状回巢蛋白阳性细胞计数及电针对其影响

脑缺血后模型组缺血侧海马齿状回在不同的时相上均有巢蛋白表达,其中 7 d 阳性细胞计数与其它时相比较差异有统计学意义($P < 0.01$),3 d 和 14 d 差异无统计学意义($P > 0.05$)。电针组的表达状态也有同样趋势,在与同时相上的模型组比较,其表达差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

四、脑缺血后各组大鼠缺血侧纹状体巢蛋白阳性

细胞计数及电针对其影响

脑缺血后模型组缺血侧纹状体在不同的时相上均有巢蛋白表达,其中 7 d 组与 3 d、14 d 和 21 d 阳性细胞计数比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),而 3 d 与 21 d 之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。电针组的表达状态也有同样趋势,但在同时相上与模型组比较,表达差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 4。

表 3 脑缺血后两组大鼠不同时间齿状回巢蛋白
阳性细胞计数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	缺血 3 d	缺血 7 d	缺血 14 d	缺血 21 d
模型组	9	13.58 ± 2.33	20.34 ± 2.73	13.12 ± 2.25	8.64 ± 1.56
电针组	9	20.04 ± 3.60*	29.26 ± 3.16#	18.78 ± 2.24#	13.52 ± 2.10#

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$

表 4 脑缺血后两组大鼠不同时间纹状体巢蛋白
阳性细胞计数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	缺血 3 d	缺血 7 d	缺血 14 d	缺血 21 d
模型组	9	6.88 ± 1.09	14.28 ± 2.43	10.64 ± 1.90	7.80 ± 1.02
电针组	9	11.48 ± 1.99*	25.94 ± 4.78#	16.68 ± 2.70#	9.76 ± 1.25*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$

讨 论

巢蛋白是近年新发现的第 VI 类中间丝蛋白,被认为是 NSC 的特异性标记物,它被单克隆抗体 rat.401 特异性识别^[5]。巢蛋白的表达始于神经胚形成期,当 NSC 迁移基本完成,巢蛋白的表达逐渐减少,并随细胞的成熟停止表达;巢蛋白与胚胎 NSC 的某些功能有关,如维持原始细胞特殊的形态、参与细胞迁移等^[6]。巢蛋白的表达是暂时的,一旦干细胞分化成终末细胞如神经元或胶质细胞,则被其它中间纤维蛋白所取代;巢蛋白在干细胞增殖旺盛阶段出现并大量表达,提示其在干细胞自我更新并保持多潜能分化方面具有其它中间纤维无法取代的作用^[7]。

大量研究证实成年人及哺乳动物脑存在 NSC,脑缺血可诱导这些 NSC 的增殖、迁移并分化为神经元和胶质细胞^[8-11],并可促进相应脑区表达胚胎期巢蛋白^[5,6,12]。研究发现^[12,13],局灶性脑缺血发生后,在皮质和纹状体等梗死区周围的胶质细胞、神经元和间质细胞的核、胞浆中均有巢蛋白的表达,并且构造出了一个清楚的梗死灶边缘带。对于梗死灶周围出现巢蛋白阳性细胞的现象有两种解释^[6,12]:一种观点认为,星形胶质细胞在脑梗死后改变细胞表型,重演正常发育较早期表达的一过性表型特性;另一种观点认为,损伤可能诱导 NSC 分化为反应性星形胶质细胞。上述研究提示,在特定的条件下,成年脑中静止的 NSC 可恢复其增殖分化能力,而成熟的神经细胞也可逆向返回到

幼稚状态,表达发育期的蛋白并表现出生长发育的性质,这可能在缺血后的修复过程中发挥重要作用^[6,14]。

本研究发现,模型组在未加任何干预的情况下,神经功能缺损有减轻,说明缺血性脑损伤后,脑组织存在可塑性,能进行自我修复。其自我修复的能力,主要表现在 3~7 d 之间,而 7 d~21 d 其恢复趋势基本平稳,表明其自我修复能力是有限的。电针治疗在各时相对改善神经功能损伤均有显著的作用,其突出表现在 14 d 和 21 d 两个时相上。研究观察到脑缺血后缺血侧各部位巢蛋白的表达,随着时间的延长在达到峰值后而逐渐降低,即第 7 天达到高峰,14 d 开始下降,21 d 时基本恢复到 3 d 时的水平。电针组于造模后 3 h 开始给予连续不同时间的电针干预后,其缺血侧相应部位巢蛋白的表达也呈现出与模型组基本一致的变化趋势,但均比同时相的模型组有明显的增高,证实电针具有促进脑缺血后巢蛋白表达的作用。结合神经功能改善情况分析,脑缺血后的自然恢复能力及电针显著的促进作用与巢蛋白的反应模式不无关系。

在神经胚发育过程中,巢蛋白的表达从某种意义上增加了 NSC 的抵抗力和适应性。巢蛋白很可能是一种自我保护性蛋白,当中枢神经系统受损伤时,巢蛋白的重新表达可能增加细胞抗损伤的能力,有利于损伤灶的修复^[6]。含有巢蛋白的细胞骨架在神经发育过程中可能增加神经细胞的弹性和伸缩性,这对于 NSC 的增殖和迁移具有重要作用^[15]。本研究证实,脑缺血后出现巢蛋白表达且电针可明显增强这种趋势,而神经细胞的可塑性与细胞骨架蛋白的弹性和伸缩性有关,因此推断脑缺血后神经功能缺损的改善及电针对其显著的促进作用均与巢蛋白表达细胞参与了神经可塑性和突触重构有关。但电针促进巢蛋白表达的确切机制尚不清楚,还有待于今后的进一步探讨。

本研究结果初步显示,大鼠局灶性脑缺血后,给予电针治疗可以使与神经系统生长发育及神经可塑性有关的巢蛋白的表达保持在较高水平,促进神经细胞的代偿性修复,减轻神经功能缺损程度,提示电针促进脑缺血后巢蛋白的表达可能为针灸治疗缺血性脑卒中的重要作用机制之一。

致谢:感谢广州中医药大学张宏教授,胡年宏、赵永华、李敏、姜桂美博士,广州中医药大学附属第一医院病理科匡忠生副教授、实验技师谢宇辉等在本研究的动物实验、病理形态观察及数据处理中所给予的热情帮助。

参 考 文 献

- Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science, 2000, 287:1433-1438.

- 2 Mackowiak M, Chocyk A, Markowicz-Kula K, et al. Neurogenesis in the adult. *Pol J Pharmacol*, 2004, 56:673-687.
- 3 Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17:472-476.
- 4 李忠仁, 主编. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2003. 327.
- 5 Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, et al. Differential expression of Musashi1 and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res*, 2002, 69: 750-756.
- 6 刘鹏翀, 陆世铎, 黄娅林, 等. 成年鼠缺血性脑损伤诱导 nestin 的表达. *生理学报*, 2002, 54:294-299.
- 7 史冬梅, 周畅, 谢佐平. 神经干细胞有丝分裂过程中 nestin 表达变化. *神经解剖学杂志*, 2003, 19:119-123.
- 8 Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:4710-4715.
- 9 Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*, 2001, 32:1890-1896.
- 10 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.
- 11 Liu PC, Yang ZJ, Qiu MH, et al. Induction of CRMP-4 in striatum of adult rat after transient brain ischemia. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24: 1205-1211.
- 12 Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*, 1999, 830:1-10.
- 13 郑青立, 龚薇薇, 王玲, 等. 脑缺血再灌注损伤后神经细胞巢蛋白和干细胞因子基因表达. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:589-591.
- 14 袁华, 龙华, 李玲. 康复训练对脑梗死大鼠皮质 S-100、GFAP 和 Nestin 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:520-523.
- 15 李东培, 汪华侨, 姚志彬. 巢蛋白的表达模式及其功能. *解剖学研究*, 2004, 26:216-218.

(修回日期:2005-09-11)

(本文编辑:阮仕衡)

· 研究快报 ·

运动训练对小鼠脑局灶缺血后脑源性神经营养因子 mRNA 表达水平的影响

高谦 吴宗耀 姚志彬 袁群芳

脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 在脑内分布广泛, 大脑皮层、海马及基底前脑是其主要分布区, 在基底前脑的胆碱能神经元及其末梢发现了 BDNF 的受体^[1-3]。运动促进脑损伤后胆碱能神经元轴突的出芽再生, 可能与 BDNF 的增多有重要关系。本研究旨在探讨运动训练是否可使小鼠大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 后 BDNF mRNA 表达水平发生改变。

材料与方法

一、材料

选雄性 C57 BL/6J 小鼠 26 只 (由中山大学医学院动物实验中心提供), 体重为 20~30 g, 鼠龄为 3~5 个月。

二、方法

(一) 动物分组和运动训练方法

按 Bederson 等^[4]的方法, 建立小鼠 MCAO 模型, MCAO 术后第 3 天开始运动训练。随机将 26 只小鼠分为运动 I 组 (9 只), 运动 II 组 (9 只) 及对照组 (8 只)。运动 I 组每天于跑笼中训练 1 h, 共训练 90 d; 运动 II 组先于跑笼中运动 15 d, 停止运动 30 d, 再置于跑笼中运动 45 d, 每天训练 1 h, 其它处理与 I 组相同; 对照组每次置于跑笼中, 但跑笼不转动。90 d 后断头取

大脑。

(二) BDNF 基因 mRNA 表达的定量 RT-PCR 测定

1. 脑组织中 RNA 的提取: 小鼠 BDNF 引物是根据鼠神经细胞上 BDNF mRNA 全序列^[5] (gene bank accession no. X55573) 而设计的, 其序列为 F 5'-GGA TGA GGA CCA GAA GGT TCG-3, 其位点为 296~316; R 5'-ACC CTC ATA GAC ATG TTT GCG G-3', 其位点为 460~439, 由上海生工生物工程公司合成, 扩增长度为 164 bp, 使用浓度为 10 nmol/ml。脑组织中 RNA 的提取按 TRIzol Reagent 试剂盒说明书进行, 电泳得到 5S、18S、28S 总 RNA 条带 (图 1)。同时用紫外分光光度计 (Pharmacia Ultrospec 2000) 测 A_{260} 和 A_{280} 的 OD 值 ($1\text{OD} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$), 计算所提取的总 RNA 量, 并使每次 A_{260}/A_{280} 比值保持在 1.8 以上, 置于 -70°C 下保存待测, 于 1 周内测定完毕。

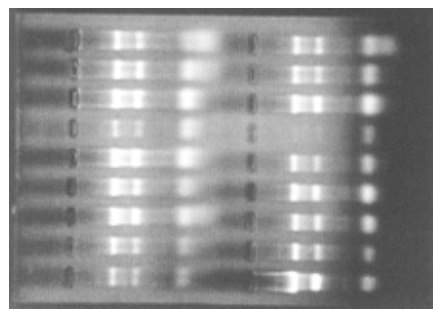


图 1 TRIzol 法提取的神经细胞内总 RNA 见 28S、18S、5S 三条带

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院康复医学科 (高谦); 第三军医大学附属西南医院康复科 (吴宗耀); 中山大学医学院解剖教研室 (姚志彬、袁群芳)