

止精神过度紧张,避免情绪波动,对防止该病的复发或加重也有很大帮助。

综上所述,以针刺为主的综合康复治疗能有效改善儿童抽动秽语综合征的各种症状,提高患儿的学习和生存质量,且副作用少,是目前治疗抽动秽语综合征安全有效的方法,值得进一步深入探讨和研究。

参考文献

- [1] 陈生弟.抽动秽语综合征.见:王维治,主编.神经病学[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2001.222—223.
- [2] 王玉凤.抽动障碍.见:胡亚美,江载芳,主编.诸福棠实用儿科学[M].第7版.北京:人民卫生出版社,2005.1962—1964.
- [3] 吴家骅译.DSM-IV-R 关于抽动障碍的分类与诊断标准[J].中华儿科杂志,1996,36(3):352.
- [4] 徐书珍,解玉梅.抽动-秽语综合征的临床表现及诊断标准[J].实用儿科临床杂志,1997,12:5—7.
- [5] 万国斌.多发性抽动症的治疗[J].中国实用儿科杂志,2002,17:200—202.
- [6] 石学敏,主编.针灸治疗学[M].第1版.上海:上海科学技术出版社,1998.182—183.
- [7] Leckman JF, Burd L, Kerbeshian J, et al. The Yale Global Tic Severity [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.1989,28:566.
- [8] 孙传兴,主编.临床疾病诊断依据治愈好转标准[M].第1版.北京:人民军医出版社,1987.505.
- [9] 杜亚松.儿童青少年精神障碍-抽动障碍.见:陈灏珠,主编.实用内科学[M].第12版.北京:人民卫生出版社,2005.2797.
- [10] 姚凤莉,陈梅,安育林.抽动秽语综合征的治疗研究进展[J].中国优生与遗传杂志,2005,13:128—129.
- [11] 陈辉.针刺配合耳穴贴压治疗抽动秽语综合征 32 例[J].针灸临床杂志,2003,19(1):7.

·传统医学与康复·

针刺血清对脑源性神经干细胞分化的影响*

王素娥¹ 彭争荣² 钟广伟¹ 李 炜¹

摘要 目的:探讨针刺血清对脑源性神经干细胞分化的调控机制。**方法:**将实验大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、模型针刺血清组,制备各组血清培养脑源性神经干细胞,然后用免疫荧光显微镜观察其分化情况,计数各类分化细胞的百分率。**结果:**模型对照组神经元分化率较正常对照组显著下降($P<0.05$),模型针刺血清组神经元分化率较模型对照组显著提高($P<0.05$),与正常对照组比较,差异无显著性意义($P>0.05$)。**结论:**针刺处理可上调脑源性神经干细胞向神经元的分化,促进脑损伤组织的康复。

关键词 针刺血清;脑源性神经干细胞;分化;脑出血大鼠模型

中图分类号: R246,R681 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-1242(2007)-05-0459-03

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一类存在于神经系统中具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞,它们在一定条件下可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞^[1]。针灸血清研究是指从针灸处理后的人或动物内采集到的血清,作为效应物质加入到另一个反应系统中,同在体或离体器官、组织、细胞或分子等靶目标接触,通过它们功能或形态学的改变,直接观察针灸产生的效应^[2]。目前,脑出血性疾病在我国的发病率有上升的趋势,针刺治疗脑出血性疾病的后遗症和急性期神经元保护方面在临床取得了重要进展,但其作用机制的研究不多,尤其是其对神经干细胞分化调控的分子机制所知甚少,本项目采用脑出血模型大鼠针刺血清干预脑源性神经干细胞的分化,为针刺治疗脑血管疾病开辟新的研究领域。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD(Sprague-Dawley)大鼠 30 只,由中南大学实验动物学部提供(雌雄不限)。

1.2 试剂及仪器

DMEM/F12(1:1)、B27、bFGF、EGF(Gibco),胎牛血清(fetal bovine serum; FBS,四季青),胶原酶、胰蛋白酶、多聚赖氨酸(Sigma),兔抗巢蛋白 Nestin 单克隆抗体(CHEMICON 公司产品),微管相关蛋白(MAP₂)单抗(北京晶美公司),兔抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)单抗(Neo Markers 公司产品),GalcC 单抗(Santa Cruz),羊抗鼠异硫氰酸荧光素(fluoresce iniso thiocyanate, FITC)荧光二抗(博士德)及 CO₂ 培养箱(QWJ),倒置显微镜(OLYMPUS),倒置荧光相差显微镜(NIKON)。

1.3 方法

1.3.1 脑出血模型制作:参照 Rosenbergde 等方法建立脑出血模型^[3],大鼠水合氯醛腹腔注射麻醉,固定于鼠脑立体定位

* 基金项目:湖南省卫生厅中医药科研基金资助(24203)

1 中南大学湘雅医院中医科,长沙市湘雅路 87 号,410008

2 中南大学湘雅医院高压氧科

作者简介:王素娥,女,硕士,主治医师

收稿日期:2006-10-25

仪,切开头部正中皮肤,暴露颅骨,根据鼠脑立体定位图谱确定进针部位:以前囟为原点,向后1.4mm,矢状缝右侧旁开3.2mm,在颅骨表面开一2mm×2mm正方形骨窗,向下进针5.6mm,通过微量注射器向右侧苍白球内缓慢注入2μl用无菌生理盐水稀释的Ⅶ胶原酶,留针5min。

1.3.2 针刺血清制备:大鼠自造模之日起,隔日上午9时针刺1次,以0.5寸32号华佗牌毫针针刺双曲池、双阳陵泉4穴^[4],每穴留针20min,每隔5min行针1次(以200r/min的捻转速度捻针20次为行针1次),模型制备的14天中共针刺治疗7次。然后心脏采血,将血液缓慢注入离心试管中,除菌过滤及灭活后,低温保存置4℃冰箱中。

1.3.3 脑源性神经干细胞的分离培养:无菌条件下分离新生鼠脑组织,机械分成小块组织,用胰酶和EDTA消化20min。将单细胞悬液移入培养瓶,培养基DMEM/F12,含谷氨酰胺、B27、bFGF、EGF,37℃,5%CO₂培养箱中培养,神经球形成克隆呈悬浮状,用吸管轻轻吹打球形克隆成为单细胞悬液,将部分细胞接种到新的培养瓶中培养。

1.3.4 脑源性神经干细胞的诱导分化:选取上述部分培养的球形克隆悬液种植于有多聚赖氨酸的盖玻片的培养皿中。取部分盖玻片进行Nestin免疫荧光染色,然后去除生长因子,加入各组制备血清的培养基继续培养5—7d。

1.3.5 神经干细胞特异免疫荧光染色:将培养在盖玻片上的细胞用PBS洗,多聚甲醛固定。分别加入一抗(Nestin,GFAP,MAP₂,GalcC),4℃过夜,再用PBS洗,加入FITC标记的二抗,37℃温育2h,封片后,在免疫荧光显微镜下观察细胞分化情况。

1.3.6 分化细胞计数:统一用带有目镜测微尺的显微镜在200倍视野下进行细胞计数,在盖玻片上观察6个不重复视野,记录6个视野的阳性细胞数总数。按下列公式计算出神经干细胞分化为神经元或胶质细胞的百分率:

神经元(胶质细胞)百分率=MAP₂(或GFAP+GalcC)阳性细胞数/(MAP₂阳性细胞数+GFAP阳性细胞数+GalcC阳性细胞数)×100%

1.3.7 实验组别设计:共分为3组,每组10只大鼠。①正常对照组:采集正常大鼠的血清培养脑源性神经干细胞,观察神经干细胞的分化情况。②模型对照组:采集脑出血模型大鼠的血清培养脑源性神经干细胞,然后观察其分化情况。③模型针刺血清组:针刺脑出血模型大鼠双侧曲池、阳陵泉穴位,制备血清,同时培养脑源性神经干细胞。

1.4 统计学分析

实验数据以均数±标准差表示,全部资料用SPSS11.0软件包及Excel 7.0分析统计软件处理,3组间比较采用完全随机设计资料的方差分析。 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 脑源性神经干细胞的培养与鉴定

原代培养细胞在无血清培养基中生长2—3d后,大部分细胞死亡,少数以单细胞形式悬浮生长,部分细胞分裂形成2—3个细胞组成的细胞团,即原代克隆,这些细胞的胞体较大,胞浆颜色较深,胞核/胞浆比例较大,呈典型的未成熟细胞

形态,细胞形态规则,折光性好,未见到明显的细胞突起,7d时生长为数十个细胞到数百个细胞的克隆(图1),悬浮生长呈球形,传代后出现与原代培养相同的大量次代克隆,5—7天可再次传代,原代神经球(图2,见前置彩色插页9)及传代神经球免疫荧光细胞化学染色(图3,见前置彩色插页9)发现,NSCs标记蛋白Nestin在各级克隆中都有表达。

2.2 脑源性神经干细胞诱导分化

神经球克隆悬液种植于有多聚赖氨酸的盖玻片的培养皿中,去除生长因子,加入各组制备血清的培养基继续培养5—7d后即发现有突起从克隆边缘长出,大部分细胞克隆开始为贴壁生长,24—48h后,可见不同形态的细胞在克隆周围出现,并形成不同的结构。诱导分化3天后各组均出现:MAP₂免疫细胞化学染色可见克隆周边稀疏的阳性细胞,细胞胞体较大圆形、胞浆少,突起为1—2个,较长,此为神经元样细胞(图4,见前置彩色插页9);GFAP免疫细胞化学染色可见克隆团中向外成放射状密集排列的阳性细胞,细胞扁平,突起较短且数量较多,此为星形胶质样细胞(图5,见前置彩色插页9);GalcC免疫细胞化学染色可见克隆周边有相当少的阳性细胞,大小介于上述两种细胞之间,突起细小较多且不断分支,此为少突胶质样细胞(图6,见前置彩色插页9)。

2.3 各组神经干细胞分化结果的分析

取培养7天的各组贴壁分化细胞,分别作MAP₂、GFAP、GalcC免疫荧光染色。计数各类分化细胞,计算出各组神经干细胞分化为神经元、胶质细胞的百分率(见表1),从表1可知3组之间比较差异有显著性意义($P<0.05$),两两比较,模型对照组神经元分化率较正常对照组明显下降,胶质细胞分化率较正常对照组明显增加,差异有显著性意义($P<0.05$);模型针刺血清组神经元分化率较模型组迅速提高,胶质细胞分化率较模型对照组明显下降,两组比较差异有显著性意义($P<0.05$);模型针刺血清组神经元分化率较正常对照组低,胶质细胞分化率较正常对照组组增加,但两组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。

表1 分化细胞百分率比较表 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	神经元	胶质细胞
正常对照组	10	19.77±4.42	80.23±4.42
模型对照组	10	14.88±4.12 ^①	85.12±4.12 ^①
模型针刺血清组	10	19.09±3.97 ^{②③}	80.91±3.97 ^{②③}

三组之间比较, $F=4.031, P<0.05$;①与正常对照组比较 $P<0.05$;②与模型对照组比较 $P<0.05$;③与正常对照组比较 $P>0.05$

3 讨论

神经干细胞是一类存在于神经系统中具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞,在一定条件下可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,并表现有相应的形态和电生理特征。经过十余年的研究,人们发现成年脊椎动物和成人的神经干细胞集中在脑内的三个区:一个是位于脑室区和脑室下区,这两个区域的室管膜细胞是由神经母细胞组成的混合细胞群,可以迁移到嗅球产生前体细胞、星形细胞;另一个在连接侧脑室和嗅球的区域;第三个是海马^[4]。神经干细胞的发现使得人们对中枢神经系统的发育、神经的再生等都有了新的认识,为脑血管疾病的治疗带来了新的希望,本实验通

过对新生鼠脑源性神经干细胞分离、培养及鉴定,用免疫荧光染色观察脑源性神经干细胞的增殖与分化情况,结果充分说明培养的神经干细胞具有高度的分裂增殖能力和多向分化潜能。

80 年代中期日本学者提出了“血清药理学”的概念,并用药物吸收后的血清滤液进行各种药理学实验。我国针灸学者为克服在体实验的局限性进行长期摸索,孕育了“针灸血清”研究的基本内容。针灸血清研究是指从针灸处理后的人或动物内采集到的血清,作为效应物质加入到另一个反应系统中,同在体或离体器官、组织、细胞或分子等靶目标接触,通过它们功能或形态学的改变,直接观察针灸产生的效应^[9]。大量的实验已经证明,针灸治疗后可引起血液中某些活性物质含量的变化,从而产生针灸效应^[9],针灸血清学研究可以排除各种因素的干扰,直接观察针灸在离体环境中对细胞产生的作用,这比仅以症状体征变化评估针灸治疗的作用,在观念或方法上都是一种进步^[10]。

脑出血是急性脑血管疾病中的危重类型,随着人口的老齡化和生活水平的提高,其发病率、病死率、致残率逐年升高^[7]。导致了患者的生存质量的严重下降和社会角色的丧失。对家庭社会均造成沉重的负担。为了探讨针刺治疗对脑出血的治疗作用与机制,我们设计了本实验。结果显示,模型对照组血清使脑源性神经干细胞向神经元分化的百分率较正常对照组显著下降,而胶质细胞的分化率,特别是星形胶质细胞的分化率增加,从而可知脑出血后脑组织及脑功能的恢复时间长且恢复难,可能因为脑出血后血清中存在抑制因子^[8],抑制了神经干细胞向神经元的分化,促进神经干细胞向胶质细胞分化^[9],从而形成瘢痕,导致脑损伤后功能恢复较慢^[10-11]。而模型针刺血清组是在大鼠脑出血造模后,予以针刺治疗,然后才采集其血清诱导神经干细胞的分化,实验显示模型针刺血清组神经元的分化率较模型组迅速上升,胶质细胞分化率显著减少,差异有显著性意义,与正常对照组比较无显著性差异,从中可知针刺处理可能是改变了血清中的某

些抑制因子,促进神经干细胞向神经元的分化^[12],加速了脑损伤的康复。本实验揭示了针刺促进脑损伤的恢复可能是其上调了神经干细胞向神经元的分化。

4 结论

脑出血影响神经干细胞的分化,下调了脑源性神经干细胞向神经元的分化,使脑出血脑损伤后恢复较为困难,针刺治疗改变了血清中的某些成分,促进了神经干细胞向神经元的分化,从而加速脑功能的恢复。

参考文献

- [1] 王廷华,羊惠君,John W.McDonald 主编.干细胞理论与技术[M].第 1 版.北京:科学出版社,2005.138—156.
- [2] 陈汉平,裴建.关于“针灸血清”方法的研究和应用[J].上海针灸杂志,1998,17(1):1.
- [3] Rosenberg CA,Mun-Bryce S,Wesley M,et al.Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats[J].Stroke,1990,21(5):801—807.
- [4] 李忠仁主编.实验针灸学[M].第 1 版.北京:中国中医药出版社,2003.314—320.
- [5] 董玉喜.针刺对脑缺血分子调节机制的研究进展[J].湖北中医杂志,2002,24(1):51.
- [6] 孙德利,陈汉平.“针灸血清”的研究方法及意义[J].浙江中医学院学报,1999,23(3):59.
- [7] 杨期东主编.神经病学[M].第 1 版.北京:人民卫生出版社,2002.41—49.
- [8] Vasthare VS,Heinel LA,Robert MS,et al.Leukocyte Involvement in cerebral ischemia and reperfusion injury[J].Surg Neurol,1990,33:260—165.
- [9] Dunning MD,Lakatos A,Loizou L,et al.Superparamagnetic iron oxide-labeled schwann cells and olfactory ensheathing cells can be traced in vivo by magnetic resonance imaging and retain functional properties after transplantation into the CNS [J].J Neurosci,2004,24:9799—9810.
- [10] Asher RA,Morgenstern DA,Fidler PS,et al.Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes[J].J Neurosci,2000,20:2427—2438.
- [11] Menet V,Gimenez RM,Chauvet N,et al.Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression[J].J Neurosci,2001,21:6147—6158.
- [12] 王彦春,马骏,王华.“双固一通”法对帕金森病模型大鼠神经干细胞增殖及分化的影响[J].中国针灸,2006,26(4):277—282.

·传统医学与康复·

针刺治疗脑卒中后足下垂的临床观察

张千生¹

足下垂即足跖屈和不能背屈或背屈功能减弱,脑卒中后足下垂是脑卒中偏瘫痉挛状态的一种表现。我们曾尝试用头针、耳针、腕踝针和体针等治疗脑卒中后足下垂,经多年反复摸索,发现针刺照海或大都穴可即刻致足背屈,重复性好。为证实针刺照海和大都穴治疗脑卒中后足下垂的效果,对 60 例患者进行了对照观察,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

病例来源于 2001 年 3 月—2006 年 8 月安徽省宣城中心医院内二科收治的住院和家庭病房患者。

纳入标准:①原发病为脑卒中,诊断符合 1995 年中华医学会全国第四届脑血管病学术会议制订的《各类脑血管疾病诊断要点》,经 CT 或 MRI 证实;②偏瘫;③偏瘫侧足下垂,踝足关节不能背屈,有踝阵挛;④意识恢复清醒,能配合治疗。

排除标准:①既往有严重的下肢关节疾病、关节炎和关节损伤;②既往有脊髓型颈椎病;③既往有腰骶椎管狭窄;④既往有下肢神经病变;⑤有脑卒中史;⑥不配合治疗者。

分组:符合选择标准的 60 例脑卒中后足下垂患者陆续

1 安徽省宣城中心医院内二科,242000

作者简介:张千生,男,副主任医师

收稿日期:2006-08-24