

·基础研究·

头穴丛刺法调控大鼠脑梗死后内源性神经干细胞增殖迁移分化的实验研究

唐 强¹ 白 晶¹ 王 艳¹ 周海纯¹

摘要 目的:本实验通过观察头穴丛刺法对室管膜下区(SVZ)的神经干细胞(NSC)增殖、迁移、分化的调控作用,探讨该疗法促进成年神经再生、修复和重建神经网络的理论机制。**方法:**大鼠注射荧光染料 Dil 以预标记室 SVZ 细胞;栓线法制备大鼠局灶性脑缺血模型。将造模成功的 Wistar 大鼠随机分成 4 组:模型组 12 只,头针组 12 只,头穴丛刺法组 12 只,假手术组 4 只。采用脉冲式的 BrdU 标记方法标记新生细胞;采用激光共聚焦显微镜检测预标记原始 SVZ NSC 后,再检测双重免疫荧光染色所确定的分化的细胞。**结果:**①模型组、头针组、头穴丛刺法组均可见 Dil 标记的 SVZ 细胞迁移至梗死周边的纹状体和皮质,并且分化成神经元或胶质细胞,头穴丛刺法组 Dil/BrdU/NeuN 或 Dil/BrdU/GFAP 标记的细胞明显增多,与其他两组比较有显著性差异 ($P<0.01$);②头穴丛刺法组 BrdU/NeuN 及 BrdU/GFAP 阳性细胞表达均多于其他两组,组间比较有显著性差异 ($P<0.01$)。**结论:**①头穴丛刺法能促进脑梗死后 SVZ 区神经干细胞增殖,并且随时间递增减少其增殖衰减;②此法可促进 Dil 标记的 SVZ 细胞均迁移至梗死周边的纹状体和皮质,并且分化成神经元或胶质细胞;③此法能促进局灶性脑缺血后 SVZ NSC 的迁移和分化。

关键词 脑梗死;头穴丛刺法;室管膜下区;神经干细胞

中图分类号:R743.3,R493 文献表示码:A 文章编号:1001-1242(2009)-08-0676-04

Experimental research on the therapy of scalp clustering acupuncture regulating proliferation, migration and differentiation of endogenous neural stem cells of rats after cerebral infarction/TANG Qiang, BAI Jing, WANG Yan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2009,24(8):676—679

Abstract Objective: To observe the regulation effect of scalp clustering acupuncture therapy on the proliferation, migration and differentiation of neural stem cells(NSC) in subventricular zone(SVZ) and explore the therapeutic effect and mechanism of promoting adult neurogenesis, repair and reconstitution of neural networks. **Method:** Stereotaxic apparatus was used to locate the coordination in rats. Dilstain (Dil) was injected into the lateral cerebrum ventricle for prelabeling the SVZ cells. The cerebral ischemia model of rat was made by blocking middle cerebral artery. Rats were randomly divided into four groups: A—sham operation group (4 rats), R—model group (12 rats), C—scalp acupuncture group(12 rats), D—scalp clustering acupuncture group(12 rats). Pulsed BrdU method was used to label new cells. NSCs in SVZ prelabelled with Dil were observed with laser confocal microscopy, and double immunofluorescent staining was used to identify cells differentiation. **Result:** ①Dil label cells in B, C, D groups all migrated into peri-infarct regions and differentiated into neurons and astrocytes. Dil/BrdU/NeuN or Dil/BrdU/GFAP-positive cells in D group increased significantly, compared with B and C groups ($P<0.01$); ②Expressions of BrdU/NeuN and BrdU/GFAP-positive cells in D group increased significantly compared with B and C groups ($P<0.01$). **Conclusion:** ①The scalp clustering acupuncture therapy can promote NSCs proliferation in neuroproliferation center—SVZ after focal ischemia, to reduce the diminishment of proliferation with the time passing. ②This therapy can promote Dil-label cells in SVZ migrating to striatum and cortex in peri-infarct region and differentiating into neurons and astrocytes. ③This therapy can promote the migration of SVZ NSCs after focal ischemia and the differentiation of endogenous NSCs.

Author's address Department of Rehabilitation Wards, the Second Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Haerbin, 150001

Key words cerebral infarction; scalp clustering acupuncture; subventricular zone; neural stem cell

脑缺血是常见的脑血管疾病,缺血后中心区神经细胞坏死是引起神经功能缺损的根本原因,近年研究发现成年哺乳动物神经系统中,位于侧脑室附近的室管膜下区(subventricular zone,SVZ)和海马结构的齿状回是目前公认的成年个体神经干细胞

(neural stem cell, NSC)最为集中的区域^[1]。因此,这两个部位成为对 NSC 研究的重点^[2-5]。此两区域的

1 黑龙江中医药大学附属第二医院康复医学科,哈尔滨,150001

作者简介:唐强,主任医师,教授

收稿日期:2009-03-17

NSCs都具有自我更新能力和多分化潜能,可以在体外被分离、克隆,都对疾病和损伤具有反应能力,但它们最大的区别在于齿状回的 NSCs 不能长距离迁移,而位于 SVZ 的 NSCs 在分裂增殖后产生的祖细胞可以长距离迁移,这使得 SVZ 的 NSCs 区别于齿状回的 NSCs 成为研究神经细胞增殖、迁移和分化的较佳模型^[6-10]。因此本实验选用 Dil 荧光染料预标记大鼠 SVZ 的原始细胞,观察在局灶性脑缺血后头穴丛刺法对大鼠内源性 NSCs 的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源

Wistar 大鼠体重 250—300g,由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。

1.2 预标记方法

10%水合氯醛 35mg/kg 腹腔麻醉大鼠,于立体定位仪上固定头部,取左侧前囟旁 1.5mm、向后 0.8mm 处钻孔,用 10 μ l 微量加样器由孔内垂直深入 4.0mm,缓慢注入 10 μ l Dil 染料 (Dil 染料配制:Dil 溶于二甲亚砜配成 0.2%溶液),留针 10min 后,缓慢出针。

1.3 局灶性脑缺血模型制备方法

在 Dil 注射 48h 后,大鼠麻醉方法同前,仰卧固定在手术台上,采用大脑中动脉插入线栓造成局灶性脑缺血模型,将圆钝头端的单股尼龙线 (直径 0.235mm)由切口处插入右侧颈内动脉,顺颈内动脉走行轻轻推进尼龙线,进线长度由颈总动脉分叉处向内 16.5—17.5mm。

1.4 动物分组方法

术后 24h 按 4 级神经功能评分法评分,0 级:未见行为缺陷;1 级:前肢屈曲;2 级:侧推抵抗力下降 (即侧向推力实验阳性)伴前肢屈曲,无转圈行为;3 级:同二级行为伴自发性旋转。除假手术组外,其余组别评分低于 2 分者剔除。

将造模后符合标准的大鼠随机分为 4 组:①模型组鼠 12 只,侧脑室注射 Dil 染料,48h 后,行后大脑中动脉梗死术,术后饲养于标准笼中,不予治疗;②头针组鼠 12 只,同上,术后 24h 针刺治疗;③头穴丛刺法组鼠 12 只,同上,术后 24h 针刺治疗;④假手术组鼠 4 只,单纯侧脑室注射 Dil 荧光染料,48h 后,仅分离动脉,不结扎插线,标准笼中饲养,各时间点同。

1.5 针刺方法

头穴丛刺即取大鼠的百会和百会左右旁开 2mm 三个穴位,向眼的方向平刺大约 3mm,捻转

5min,留针 6h;头针组选穴:百会透曲鬓即取大鼠百会向右侧的曲鬓方向针刺,捻转 5min,留针 6h。

1.6 溴脱氧尿嘧啶核苷 (Bromodeoxyuridine, BrdU) 标记方法

①BrdU 配制:BrdU 溶解于生理盐水中配成 1% 的溶液,注射前配制;②BrdU 注射:采用脉冲标记法,大鼠按时相在处死前,按每次 5 mg/ml, 50 mg/kg 的剂量,分 3 次腹腔注射,每 4h 1 次,最后一次注射后 4h 处死动物。

1.7 取材切片

各组大鼠取 6 只用 10%水合氯醛深度麻醉大鼠,用 37 $^{\circ}$ C 100ml 肝素化生理盐水经大鼠左心室向体内注射以便冲洗全身血管,后以 4 $^{\circ}$ C 4%多聚甲醛 200ml 灌注固定,灌注固定完成后,迅速断头并取出大脑,将脑片 (前囟前 1.2mm 至前囟后 0.3mm)放入 4%多聚甲醛溶液 4 $^{\circ}$ C 中固定一夜,以聚乙烯醇包埋,冷藏于 -20 $^{\circ}$ C,行冠状冰冻连续切片,片厚 10 μ m。

1.8 免疫荧光染色方法

组织在 50% 甲酰胺 2Xssc 65 $^{\circ}$ C 中 2h,在 2NHCL 37 $^{\circ}$ C 中培养 30min,使 DNA 变性后,在 0.1mol/L 硼酸 (PH8.5) 中室温下漂洗 10min,组织经一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,经二抗室温下 2h,一抗:大鼠抗 BrdU (Abcam, UK, 1:100),小鼠抗大鼠 NeuN (Chemicon, USA, 1:400),小鼠抗大鼠 GFAP (Sigma-Aldrich, USA, 1:400),二抗: Cy5-conjugated 羊抗大鼠 IgG (blue, Chemicon, USA, 1:400), FITC-conjugated 羊抗小鼠 IgG (green, Chemicon, USA, 1:200), 90% 甘油 PBS 溶液封片,以备激光共聚焦显微镜观察。

1.9 图像处理

每只大鼠取 2 套切片,每张切片选取 5 个视野计算阳性细胞数,取其均值。

1.10 统计学分析

各组最终取 2 套切片纳入统计分析,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,根据方差齐性与否分别采用参数检验和非参数检验,即齐性资料用单因素方差分析 (ANOVA),两两比较应用 LSD 检验;非齐性资料应用秩和检验。

2 结果

预标记 SVZ 细胞的检测:48h 后 Dil 染色的细胞层确定在 SVZ,无明显扩散。

模型组、头针组、头穴丛刺法组 Dil 标记的 SVZ 细胞均迁移至梗死周边的纹状体和皮质,同时在梗死周边区观察到 Dil/BrdU/NeuN 或 Dil/BrdU/GFAP 标记的细胞的共同表达,细胞计数经组间 *t* 检验,有

显著性差异($P<0.01$),见表1。图1—2(见彩色插页),显示了Dil标记的SVZ细胞从神经发生区迁移到损伤区,分化成神经元和星形胶质细胞。

头穴丛刺法组BrdU/NeuN及BrdU/GFAP阳性细胞表达均多于其他两组,有显著性差异($P<0.01$),见表2;图3—4(见彩色插页)。

表1 Dil⁺/BrdU⁺/NeuN⁺细胞及 Dil⁺/BrdU⁺/GFAP⁺细胞计数

($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	动物数	Dil ⁺ /BrdU ⁺ /NeuN ⁺ 细胞计数			Dil ⁺ /BrdU ⁺ /GFAP ⁺ 细胞计数		
		第7天	第14天	第21天	第7天	第14天	第21天
模型组	6	7.63±1.31	3.51±0.78	1.32±0.25	5.90±1.25	3.35±0.61	2.26±0.49
头针组	6	9.62±0.69 ^①	6.08±1.27 ^①	3.96±0.66 ^①	10.11±1.76 ^①	6.01±1.31 ^①	4.07±0.73 ^①
丛刺组	6	13.21±2.48 ^②	10.16±2.23 ^②	7.05±1.05 ^②	13.74±1.75 ^②	9.25±1.52 ^②	6.39±0.74 ^②

注:①与模型组比较 $P<0.01$;②与头针组比较 $P<0.01$

表2 BrdU⁺/NeuN⁺细胞及 BrdU⁺/GFAP⁺细胞计数

($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	动物数	BrdU ⁺ /NeuN ⁺ 细胞计数			BrdU ⁺ /GFAP ⁺ 细胞计数		
		第7天	第14天	第21天	第7天	第14天	第21天
模型组	6	17.21±1.64	8.65±1.44	6.35±0.71	11.35±1.91	8.30±1.14	6.50±0.80
头针组	6	22.21±2.96 ^①	14.75±2.09 ^①	9.70±1.56 ^①	15.74±1.98 ^①	9.72±0.79 ^①	7.18±1.59 ^①
丛刺组	6	28.15±3.62 ^②	21.15±2.75 ^②	16.14±2.58 ^②	22.25±2.77 ^②	17.05±2.59 ^②	12.22±1.55 ^②

注:①与模型组比较 $P<0.01$;②与头针组比较 $P<0.01$;③与模型组比较 $P<0.05$;④与模型组比较 $P>0.05$

3 讨论

虽然成年哺乳动物神经系统中存在着NSCs的集中区域,但是原位NSCs本身数量较少,其增殖不一定能满足补充需要,我们要做的是通过干预使NSCs数量增多以利于补充需要;用一定的方法促使其迁移和分化并最终融入功能缺失区的神经网络。传统的“非药物”治疗方法“针刺”具有“整体良性调整”作用,对机体可发挥多环节、多水平、多途径的调节作用。本研究中我们选用了头穴丛刺疗法,观察此法对脑梗死大鼠内源性NSCs的调控作用。

本研究采取头穴丛刺法治疗实验性脑梗死,预先标记SVZ的细胞,治疗结束后,为了观察细胞的分化情况,我们使用一种在成熟神经元中表达的转录因子(neuronal nuclei, NeuN)和一种在星形胶质细胞中表达的神经胶原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体进行免疫荧光标记。除了NSCs,脑内成熟星形细胞和少突胶质细胞也保持了反应性增殖的能力,因此,需采用BrdU标记结合特有的细胞表面标记,增殖的NSCs可分化成神经元、胶质细胞、保持未分化状态或凋亡,采用不同时期的细胞表面标记(成熟神经元-NeuN;星形胶质细胞-GFAP),可确认NSCs在体内的分化,判断增殖细胞的种类、增殖速度,对研究细胞增殖动力学有重要意义^[11]。

已有实验研究结果显示:缺血性脑损伤后NSC存在由室管膜下区(sub-ependymal zone, SEZ)和海马齿状回向外周脑实质迁移的趋势^[12];另有研究显示针刺处理可能是改变了血清中的某些抑制因子,促进NSCs向神经元的分化^[13-14],加速了脑损伤的康复。本研究中发现模型组、头针组、头穴丛刺组Dil标记的SVZ细胞均迁移至梗死周边的纹状体和皮质,同时在梗死周边区观察到Dil/BrdU/NeuN或Dil/

BrdU/GFAP标记的细胞的共同表达,显示了Dil标记的SVZ细胞从神经发生区迁移到损伤区,分化成神经元和星形胶质细胞,提示SVZ细胞在成熟脑组织缺血性损伤后的自我修复过程中发挥着重要作用;其中头穴丛刺疗法组BrdU/NeuN及BrdU/GFAP阳性细胞表达多于其他两组,提示该疗法能够促进增殖、迁移的NSCs分化;头穴丛刺疗法对SVZ的NSCs神经干细胞增殖、迁移、分化的促进作用明显;同时实验结果显示在梗死后第21天荧光三标及双标的阳性细胞均多于模型组及头针组,差异有显著性意义,提示头穴丛刺疗法能够随时间递增而减少自体干细胞的增殖衰减。

本实验提示头穴丛刺疗法可将脑缺血后自我修复机制扩大,促使SVZ的NSCs活化,促进其增殖、迁移,以补偿和替代缺失的神经元,初步探讨了头穴丛刺疗法对脑缺血后NSCs的作用,工作还远远不够。我们希望本研究能为今后缺血性脑血管病的实验研究和临床治疗提供一定的帮助和借鉴。若通过头穴丛刺疗法这种微针疗法可以促使内源性NSCs增殖、迁移直至分化、网络化的实现,改善神经功能,将更有临床应用价值,采用本法以动态治疗代替体针针刺在留针期间的静态治疗,使本法便于与现代康复技术结合,这种综合疗法也将成为我们接下来的研究方向。虽然研究中还存在许多困难和问题,但是随着各方面研究的不断深入,头穴丛刺法诱导NSCs原位增殖、迁移和分化将对脑缺血等神经系统损伤性疾病的治理有着巨大的应用前景。

参考文献

- [1] Dietrich J, Easterday MC. Developing concepts in neural stem cells[J]. Trends Neurosci, 2002, 25(3):129—31.
- [2] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287(5457):1433—1438.

- [3] Temple S. The development of neural stem cells [J]. Nature, 2001, 414(6859): 112—117.
- [4] Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(8):4710—4715.
- [5] Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus [J]. Stroke, 2001,32(8):1890—1896.
- [6] Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain[J]. Science, 1994,264(5162):1145—1148.
- [7] Zigova T, Pencea V, Betarbet R, et al. Neuronal progenitor cells of the neonatal subventricular zone differentiate and disperse following transplantation into the adult rat striatum[J]. Cell Transplant, 1998,7(2):137—156.
- [8] Zerlin M, Levison SW, Goldman JE. Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain [J]. J Neurosci, 1995,15(11):7238—7249.
- [9] Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone[J]. J Neurosci, 2002, 22(3):629—634.
- [10] Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems[J]. J Neurosci, 2002, 22(3):619—623.
- [11] Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001,98(8): 4710—4715.
- [12] 刘晓帆,冯志博,杨文亮.大鼠脑缺血再灌注诱导自体神经干细胞原位增殖的研究[J].中国微侵袭神经外科杂志, 2007,12(1):31—34.
- [13] 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.
- [14] 王素娥,彭争荣,钟广伟,等. 针刺血清对脑源性神经干细胞分化的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(5):459—461.

国家级继续医学教育项目 神经训导康复治疗体系第三届专项培训班招生通知 [批准号: 2009-16-00-006(国)]

中枢神经(CN)细胞坏死和运动程序破坏是运动功能障碍的根源,恢复的方法需符合 CN 可塑性变化的“技巧性使用-依赖”原理并能重建运动程序方可。赵文汝教授根据上述机理将以调神、调息和调形为基本技术、完全主动运动的我国古老中医导引术改良成六步法以更好开发 CN 潜能,采用信号接收设备实时检测并以曲线形式显示导引出的运动程序信号的强度和比例,然后通过冲着箭靶圆心反复练习射箭才能提高射箭准确度的生物反馈机制,反复调控该信号的强度和比例使之重建。经近 10 年临床应用证明效果良好,不仅适用于急性、尚适用于慢性和经传统康复方法不能进一步改善功能的患者。

培训班采用课堂和实践相结合方式,由著名康复专家孙启良教授、北京中医药大学养生康复系林殷教授、本项目发明人赵文汝和赵海红教授授课。

培训对象:康复医师、体疗师、康复护士、神经内外科及骨科医师等。内容:神经训导康复技术理论和方法,中医导引术现代化发展和在康复医学中的应用,预防和校正异常运动模式的三阶段治疗方法,神经训导虚模实际训练技术,以及运动中枢、吞咽、言语和认知训导、人体潜能开发训练、新型矫形器原理及制作方法和亚健康等治疗技术。

培训时间:2009 年 9 月 12—16 日;培训费 1580 元(含学费、材料费、午餐费),住宿、差旅费自理。经考试合格授予国家级继续医学教育 I 类 10 学分和首都医科大学附属北京同仁医院神经训导康复中心结业证。

咨询电话:010-58266262 或 6344,联系人:张学敏、孙爱萍。传真:010-58266866。

通讯地址:北京市经济技术开发区西环南路 2 号(100176)。E-mail:zhaowenru@hotmail.com & zxmde@yahoo.com.cn