

# 艾灸对快速老化模型小鼠海马神经干细胞分化的影响<sup>\*</sup>

唐 勇<sup>1</sup> 卢圣锋<sup>1</sup> 乔秀兰<sup>2</sup> 尹海燕<sup>1</sup> 曾 芳<sup>1</sup> 魏焦禄<sup>1</sup> 余曙光<sup>1</sup> 黄 梅<sup>1</sup>

## 摘要

**目的:**研究艾灸疗法对快速老化模型(SAMP8)小鼠海马神经干细胞(NSCs)分化的影响。

**方法:**24只SAMP8小鼠随机分为模型组与艾灸组,12只抗快速老化型(SAMR1)小鼠作为正常对照组,艾灸组选用“百会”穴进行艾灸治疗。每天治疗1次,7d为1个疗程,共治疗3个疗程。处死前1周开始给予小鼠50mg/kg的溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)腹腔注射,治疗结束后,取海马组织,用免疫荧光双标方法检测NSCs分化。

**结果:**①各组小鼠海马均有新生神经元免疫荧光双标阳性细胞表达。与模型组比较,艾灸组有促进或诱导NSCs向成熟神经元及未成熟神经元分化的倾向( $P>0.05$ )。②模型组成熟星形胶质细胞神经胶质纤维酸性蛋白表达增多,艾灸能使其表达下降( $P>0.05$ );模型组未成熟星形胶质细胞表达减少,艾灸能促进其表达( $P<0.05$ )。③与对照组比较,模型组少突胶质细胞增多( $P<0.05$ );艾灸能减少其表达( $P<0.05$ )。

**结论:**经过3个疗程的艾灸治疗,能抑制小鼠海马NSCs向少突胶质细胞分化,促进其向未成熟星形胶质分化,同时其也有向神经元分化倾向。

**关键词** 艾灸;快速老化型小鼠;神经干细胞;海马;分化

**中图分类号:**R245.82 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-04-0301-04

**Influence of moxibustion on neural stem cell differentiation in SAMP8 mice hippocampus/TANG Yong, LU Shengfeng, Qiao Xiulan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(4):301—304**

## Abstract

**Objective:** To investigate the influence of moxibustion therapy on hippocampal neural stem cells(NSCs) differentiation of senescence-accelerated mouse prone 8(SAMP8) mice.

**Method:** Twenty-four SAMP8 mice were randomized equally into model group and moxibustion treatment group, with 12 senescence-accelerated mouse/resistance (SAMR1) mice as control group. Moxibustion on Baihui (Du20) was administered once daily for 21 consecutive days in mice in moxibustion group. After i.p bromodeoxyuridine(BrdU) 50mg/kg, mice were sacrificed 1 week later, then the proliferation and differentiation of NSCs in hippocampus were detected by immunohistochemistry, double-labeled immunofluorescent.

**Result:** ① New neurons appeared in both SAMP8 and SAMR1 groups. Compared to SAMP8 group, the expression of BrdU/MAP-2(microtubule associated protein-2) and BrdU/ $\beta$ -tubulin III in moxibustion group had no obvious change and only showed increasing tendency ( $P>0.05$ ). ② Compared to SAMR1 group, the expression of BrdU/GFAP (glialfibrillary acidic protein) increased in SAMP8 group, and decreased in moxibustion group ( $P>0.05$ ). The positive cells of BrdU/ S-100  $\beta$  decreased in SAMP8 group, and increased in moxibustion group ( $P<0.05$ ). ③ Compared to SAMR1 group, the positive cells of BrdU/GalC increased significantly ( $P<0.05$ ) in SAMP8 group; after treatment of

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.04.002

<sup>\*</sup> 基金项目:国家自然科学基金(90709032);四川省青年科技基金(09ZQ026-025);国家重点基础研究发展计划(2009CB522903,2006CB504501);四川省教育厅课题(2002ZD004)

1 成都中医药大学针灸推拿学院,四川 成都,610075; 2 重庆中医院针灸科

作者简介:唐勇,男,博士,副研究员,硕士生导师;收稿日期:2009-07-14

moxibustion, the expression decreased( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** After moxibustion treatment for 21d, it can inhibit the hippocampal NSCs' differentiating into oligodendrocyte and promote differentiating into immaturity astrocytes, but it also has the tendency of differentiating into neurons.

**Author's address** College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075

**Key words** moxibustion; senescence-accelerated mouse prone 8; neural stem cell; hippocampus; differentiation

针灸疗法是中国传统医药疗法的重要组成部分,在近年来的机制研究中发现,针灸刺激可以促进室管膜下层、中枢病灶周围及海马的神经干细胞(neural stem cells, NSCs)增殖<sup>[1-8]</sup>。我们的前期研究也表明,艾灸改善衰老动物模型学习记忆的同时,促进海马神经干细胞的增殖<sup>[7-8]</sup>。而 NSCs 只有分化成相应神经细胞,才能产生相应的效应,那么其在促进增殖的基础上,进一步促进或诱导其分化的具体情况是怎么样的呢?为此,本实验进行相应的研究探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与分组

快速老化模型小鼠(senescence-accelerated mouse prone 8, SAMP8)24只,雄性,8月龄,体重20—24g;抗快速老化模型小鼠(senescence-accelerated mouse/resistance, SAMR1)12只,雄性,8月龄,体重20—24g,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驯养 1 周后,将 SAMP8 小鼠随机分为模型组、艾灸组,每组各 12 只;SAMR1 小鼠 12 只作为正常对照组(简称对照组)。

### 1.2 主要仪器与试剂

荧光显微装置及数码相机输出系统(德国 Leica 公司),Leica Qwin v3 图像采集及分析系统,溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)(Sigma, USA),羊抗鼠 BrdU 多克隆抗体、兔抗鼠  $\beta$  III 微管蛋白(Tubulin)抗体(abcam, USA),兔抗鼠神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体、兔抗鼠 s-100 $\beta$  抗体、兔抗鼠半乳糖脑苷脂(GalC)抗体、兔抗鼠微管相关蛋白(MAP)-2 抗体(Santa Cruz, USA)

### 1.3 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。艾灸操作:采用“麦粒灸”,剪去穴位区毛发,左手固定小鼠后,穴区涂抹凡士林,右手用镊子持麦粒大小艾炷放在穴位上,用线香点燃,勿吹,待其自然熄灭后,再燃一炷,共燃三炷,每日 1 次,7 次为 1 疗程,共治疗 3 个疗程,疗程间休息 2d。对照组和模型组除不予艾灸治疗外,其他处理方式与艾灸组相同。

### 1.4 BrdU 注射标记

在动物处死前一周,给予小鼠腹腔注射 BrdU, 50mg/kg,每天 1 次,连续注射 7d。

### 1.5 指标检测

**1.5.1 取材:**第 7 次 BrdU 腹腔注射后的第二天,动物麻醉、开胸、灌注后,取海马组织后固定、蔗糖液沉淀、冰冻切片置于-20℃冰箱保存、待测。

**1.5.2 NSCs 分化检测:**采用免疫荧光双标进行 NSCs 分化检测。其中 BrdU/MAP-2 鉴定成熟神经元、BrdU/ $\beta$ -Tubulin III 鉴定未成熟神经元;BrdU/GFAP 鉴定成熟星形胶质细胞、BrdU/S-100  $\beta$  鉴定未成熟星形胶质细胞;BrdU/GalC 鉴定少突胶质细胞。检测步骤参照试剂盒说明书操作。

### 1.6 统计学分析

数据用均数 $\pm$ 标准差表示,运用 SPSS12.0 统计软件处理,组间比较数据方差齐时进行单因素方差分析,方差不齐时用 Games Howell 分析。

## 2 结果

### 2.1 海马 NSCs 向神经元分化结果

表 1 显示,3 组小鼠海马组织都有 BrdU/MAP-2 与 BrdU/ $\beta$ -Tubulin III 免疫荧光双标阳性细胞表达,提示 SAMR1 小鼠和 SAMP8 小鼠海马增殖细胞可以分化为成熟神经元与未成熟神经元。与对照组比较,模型组小鼠 BrdU/MAP-2 与 BrdU/ $\beta$ -Tubulin

Ⅲ共表达阳性细胞数都较少,分别为  $P<0.05$  与  $P>0.05$ ;与模型组比较,艾灸组小鼠荧光双标阳性细胞数虽有增多倾向,但无显著性差异( $P>0.05$ )。

## 2.2 海马 NSCs 向星形胶质细胞分化结果

表 2 显示,3 组小鼠海马组织都有 BrdU/GFAP 与 BrdU/S-100  $\beta$  免疫荧光双标阳性细胞表达,提示 SAMR1 小鼠和 SAMP8 小鼠海马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。与对照组比较,模型组小鼠 BrdU/GFAP 荧光双标阳性细胞数偏多,但无显著性差异( $P>0.05$ );艾灸治疗后,其表达有下降倾向,但  $P>0.05$ 。与对照组比较,模型组 BrdU/S-100  $\beta$  荧光双标阳性细胞表达下降,且有显著性差异( $P<0.05$ ),艾灸治疗后,其表达上升, ( $P<0.05$ ),与对照组相接近,差异无显著性( $P>0.05$ )。

## 2.3 海马 NSCs 向少突胶质细胞分化结果

表 3 显示,3 组小鼠海马组织都有 BrdU/GalC 免疫荧光双标阳性细胞表达,提示 SAMR1 小鼠和 SAMP8 小鼠海马增殖细胞可以分化为少突胶质细胞。与对照组比较,模型组小鼠荧光双标阳性细胞数较多( $P<0.05$ );与模型组比较,艾灸组小鼠共表达阳性细胞数较少( $P<0.05$ ),而与对照组相接近,无差异( $P>0.05$ )。

表 1 BrdU/MAP-2 与 BrdU/ $\beta$ -tubulin Ⅲ 荧光双标阳性细胞数比较 ( $\bar{x}\pm s$ )(个)

| 组别  | 例数 | BrdU/MAP-2                    | BrdU/ $\beta$ -tubulin Ⅲ |
|-----|----|-------------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 6  | 39.90 $\pm$ 8.54              | 11.65 $\pm$ 2.68         |
| 模型组 | 6  | 28.37 $\pm$ 7.56 <sup>①</sup> | 9.33 $\pm$ 2.38          |
| 艾灸组 | 6  | 34.91 $\pm$ 4.74              | 12.21 $\pm$ 3.11         |

与对照组比较:① $P<0.05$

表 2 BrdU/S-100  $\beta$  免疫荧光双标阳性细胞数比较 ( $\bar{x}\pm s$ , 个)

| 组别  | 例数 | BrdU/GFAP         | BrdU/S-100 $\beta$            |
|-----|----|-------------------|-------------------------------|
| 对照组 | 6  | 39.45 $\pm$ 13.01 | 16.35 $\pm$ 2.79              |
| 模型组 | 6  | 51.38 $\pm$ 11.30 | 12.83 $\pm$ 2.26 <sup>①</sup> |
| 艾灸组 | 6  | 40.58 $\pm$ 9.99  | 16.12 $\pm$ 1.74 <sup>②</sup> |

与正常组比较:① $P<0.05$ ;与模型组比较:② $P<0.05$

表 3 BrdU/GalC 免疫荧光双标阳性细胞数比较 ( $\bar{x}\pm s$ , 个)

| 组别  | 例数 | BrdU/GalC                     |
|-----|----|-------------------------------|
| 对照组 | 6  | 20.05 $\pm$ 3.74              |
| 模型组 | 6  | 25.03 $\pm$ 3.04 <sup>①</sup> |
| 艾灸组 | 6  | 18.98 $\pm$ 4.21 <sup>②</sup> |

与正常组比较:① $P<0.05$ ;与模型组比较:② $P<0.05$

## 3 讨论

目前国内外大量文献表明成年哺乳动物脑中不连续的脑区存在神经干细胞,如侧脑室室下区(SVZ)、海马齿状回颗粒下层(SGZ)、嗅球(OB)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<sup>[9-11]</sup>。

我们的前期研究显示<sup>[7-8]</sup>,老年期生理或病理状态下,神经细胞增殖都持续存在,给予艾灸治疗后,老年学习记忆减退动物模型海马 BrdU 和巢蛋白(Nestin)阳性细胞的表达明显增强,提示艾灸在一定程度上可以促进或诱导海马神经干细胞增殖。神经干细胞在增殖后,只有分化成相应的神经元和胶质细胞才能最终产生作用。神经元的标志物有许多,我们选用微管相关蛋白 2 (MAP-2) 和  $\beta$  微管蛋白 Ⅲ ( $\beta$ -tubulin Ⅲ protein)进行标志。其中 MAP-2 是神经元树突标志物,特异性的存在于神经元树突中,是组成神经元细胞骨架的重要组成成分,随着年龄的增长,MAP-2 被组织蛋白酶 D 所降解,在不同类型的神经元中表达量存在差异,常被用作成熟神经元标志之一; $\beta$ -Tubulin Ⅲ 又名 tubulin  $\beta$ -4,属微管蛋白,是神经元的重要结构蛋白,是原始神经上皮中所表达的最早的神经元标志物之一,常被作为未成熟神经元标志。神经胶质细胞的数量约为神经元的几倍或几十倍,主要为星形胶质细胞,少突胶质细胞及小胶质细胞,其中前者又包括成熟和不成熟两种。胶质细胞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。但不同的胶质细胞起到的作用存在差异,为此我们分别选取神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、s-100  $\beta$ 、半乳糖脑苷脂 (GalC)进行标志。

本研究结果初步表明,无论是 SAMR1, 还是 SAMP8,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。提示在老年期,无论是生理状态还是病理状态,都持续存在着 NSCs 的分化,这和众多的相关报道一致<sup>[12-14]</sup>。虽然与模型组比较,艾灸组在促进或诱导 NSCs 向成熟神经元及未成熟神经元分化方面没有显著性差异 ( $P>0.05$ ),但其有增多的倾向。此外,与对照组相比,模

型组成熟星形胶质细胞表达增多, 艾灸治疗后, 其表达下降 ( $P>0.05$ ); 模型组未成熟星形胶质细胞表达减少, 艾灸能促进其表达 ( $P<0.05$ )。但有文献报道<sup>[15]</sup>, 针刺可以促进或诱导 NSC 分化为成熟神经元及成熟胶质细胞, 且和模型组比较有显著性差异, 我们认为这可能和针刺与艾灸的作用效应途径存在差异性, 以及和模型的选择、穴位和治疗时间长短的选择有关。另外, 我们也观察到, 与对照组相比, 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的代偿机制有关, 而艾灸能使其向相反方向发展, 体现了针灸调节的双向性原则。当然, 同时也提出疑问: 机体的这种代偿是有益还是有害的? 如果是有益的, 那么针灸的双向调节是不是也存在良性和非良性之分? 研究表明, 少突胶质细胞与老年性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 关系密切, 转基因 tau 蛋白表达在少突胶质细胞较神经元中要高许多, 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 AD 有诊断意义<sup>[16]</sup>。而 SAMP8 常作为 AD 模型进行研究<sup>[17]</sup>。本实验结果表明, 与对照组比较, 模型组少突胶质细胞增多 ( $P<0.05$ ); 艾灸能减少其表达 ( $P<0.05$ )。这说明, 艾灸在促进或诱导 NSCs 向神经元及星形胶质细胞分化的同时, 还抑制其向少突胶质细胞分化, 其作用机制还需要进一步进行研究。

在本实验中, 经过 3 个疗程的艾灸治疗, 能抑制海马 NSCs 向少突胶质细胞分化, 促进其向未成熟星形胶质分化, 同时其也有向神经元分化倾向, 在今后的研究中, 我们将通过延长其治疗时间, 调整刺激方式及穴位选择, 以证实艾灸是否能诱导海马 NSCs 向成熟神经元和成熟星形胶质细胞分化。

## 参考文献

- [1] Kim EH, Chung JH, Kim CJ. Auricular acupuncture increases cell proliferation in the dentate gyrus of Sprague-Dawley rats [J]. Acupunct Electrother Res, 2001, 26(3): 187—194.
- [2] Park HJ, Lim S, Lee HS, et al. Acupuncture enhances cell proliferation in dentate gyrus of maternally-separated rats [J]. Neurosci Lett, 2002, 319(3): 153—156.
- [3] Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, et al. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils [J]. Neurosci Lett, 2001, 97(1): 21—24.
- [4] Kim EH, Jang MH, Shin MC, et al. Acupuncture increases cell proliferation and neuropeptide Y expression in dentate gyrus of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Neurosci Lett, 2002, 327(1): 33—36.
- [5] 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 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(5): 441—444.
- [6] Cheng H, Yu J, Jiang Z, et al. Acupuncture improves cognitive deficits and regulates the brain cell proliferation of SAMP8 mice [J]. Neurosci Lett, 2008, 432(2): 111—116.
- [7] Tang Y, Yin HY, Wu QF, et al. Moxibustion enhanced hippocampus neurogenesis to improve learning and memory ability in aged memory decline mouse [J]. Alternative and Complementary Medicine, 2007, 13(8): 912.
- [8] 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 [J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(11): 2081—2083.
- [9] Loseva E, Yuan TF, Karnup S. Neurogenesis in the mature olfactory system: A possible protective role against infection and toxic dust [J]. Brain Res Rev, 2009, 59(2): 374—387.
- [10] Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice [J]. Nature, 2000, 405(6789): 951—955.
- [11] Curtis MA, Connor B, Faulk RL. Neurogenesis in the diseased adult human brain—new therapeutic strategies for neurodegenerative diseases [J]. Cell Cycle, 2003, 2(5): 428—430.
- [12] Greenberg DA, Jin K. Neurodegeneration and neurogenesis: focus on Alzheimer's disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(1): 25—28.
- [13] 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 [J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(1): 11—17.
- [14] Jin K, Peel AL, Mao XO, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(1): 343—347.
- [15] 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 [J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(12): 1061—1065.
- [16] 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 [J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2005, 25(3): 193—196.
- [17] 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 [J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(12): 1057—1060.