

· 基础研究 ·

针刺对新生鼠缺血缺氧性脑损伤皮质 Nestin 表达的影响

刘明发 庄明华 骆健明 白晔

【摘要】目的 观察针刺对新生鼠缺血缺氧性损伤后皮质神经干细胞的影响。**方法** 新生 7 d 龄 SD 大鼠 72 只,随机分为正常组(24 只)、新生鼠缺血缺氧性脑病(HIE)模型组(24 只)和 HIE + 针刺组(24 只),3 组均于建模后第 3,7,14,28 天处死取脑,行免疫组化染色,巢蛋白(Nestin)标记神经干细胞。**结果** 正常 SD 大鼠生后早期的皮质存在一定数量的 Nestin 阳性细胞,随年龄增加而减少;缺血缺氧后,新生 SD 大鼠皮质损伤区及其周围、对侧镜区出现 Nestin 阳性细胞增多,并以病灶边缘更加突出,伤后 3 d 达高峰,HIE + 针刺组阳性细胞明显增多($P < 0.01$),并使高峰时间延长,高峰期推迟,至伤后 28 d 各组无差异。**结论** 针刺可促使新生 SD 大鼠缺血缺氧性损伤后皮质神经干细胞增多,高峰期延长。

【关键词】 干细胞; 针刺; 缺血缺氧性脑病; 大鼠; 巢蛋白

The influence of acupuncture on Nestin expression in the cortex of hypoxia-ischemic neonatal rats LIU Ming-fa*, ZHUANG Ming-hua, LUO Jian-ming, BAI Ye. * Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

【Abstract】Objective To investigate the influence of acupuncture on Nestin expression in the cerebral cortex of hypoxia-ischemic neonatal rats. **Methods** A total of 72 Sprague-Dawley (SD) rats aged 7 days were randomly divided into three groups: A normal group ($n = 24$), the hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) group ($n = 24$), and an acupuncture + HIE group ($n = 24$). The rats were sacrificed at time points including 3d, 7d, 14d and 28d after insult, their brains were removed and sections were made. Any nerve stem cells (NSCs) in the cerebral cortex were detected using immunohistochemical staining of Nestin. **Results** Nestin-positive cells were found in the cerebral cortex in the normal neonatal SD rats early after birth. After HI insult, the Nestin-positive cells had increased in the injured areas of the cortex and in contralateral mirror areas, especially around the injured areas. Peak Nestin expression was 3 days after insult. In the acupuncture + HIE group, Nestin positive cells were significantly increased when compared with that in the HIE group, the peak was postponed, and the peak was longer than in the HIE group. The Nestin positive cells decreased, were seldom seen, and were not different among three groups 28 days after the HI insult. **Conclusions** Endogenous neural stem cells in the cerebral cortex were increased by acupuncture in hypoxia-ischemic in neonatal rats, and acupuncture made the peak of Nestin expression longer.

【Key words】 Stem cells; Acupuncture; Hypoxia-induced ischemia of the brain; Nestin

新生儿缺血缺氧性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期危害最大的常见病之一,常引起新生儿的死亡或严重的神经功能损害,传统的中医针刺疗法治疗 HIE 具有确切的临床疗效。本课题组近年来采用针刺治疗此类患者,取得满意临床疗效,并经 CT 和 MRI 证实发育不良的大脑皮质经治疗后重新发育,皮质厚度增加,外部性脑积水消失^[1]。针刺治疗具有多靶点、多效应的特点,其对 HIE 的治疗机制尚不清楚。目前的研究大多着眼于阻止神经变性和减少凋亡。实验证明,新生鼠缺血缺氧性损伤后

出现内源性神经干细胞的增殖^[2],本实验通过针刺新生 SD 大鼠 HIE 模型,用巢蛋白(Nestin)免疫组化染色对神经干细胞进行标记,观察针刺对缺血缺氧性脑损伤后新生鼠皮质神经干细胞的影响,为进一步探讨针刺的作用机制提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物与分组

7 d 龄新生 SD 大鼠(购于上海西普尔-必凯实验动物中心)72 只,雌雄不拘,体重约 12 ~ 14 g,随机分为正常组、HIE 模型组和 HIE + 针刺组,每组 24 只。HIE 模型组和针刺 + HIE 组于建模后再随机分为术后 3,7,14 和 28 d 4 个小组,每组 6 只,分别于术后第 3 天、第 7 天、第 14 天和第 28 天进行取材。正常组同样

基金项目:广东省第三批科技计划项目(No. 2003c33902)

作者单位:515041 汕头,汕头大学医学院第二附属医院神经外科(刘明发、庄明华、骆健明),针灸科(白晔)

通讯作者:庄明华

分相同时间段 4 小组, 每小组 6 只, 于各观察点与 HIE 模型组和 HIE + 针刺组同时取材。正常组不作任何处理, HIE 组建模后不作处理, HIE + 针刺组在建模后给予针刺治疗, 3 组的喂养条件相同。

二、HIE 模型建立

采用改良的 HIE 建模方法^[3], 将已经编号的 7 d 龄新生 SD 大鼠在清醒状态下, 取颈前正中切口, 解剖并用 0 号丝线双重结扎左侧颈总动脉, 从两结扎线中间剪断血管, 缝合皮肤切口, 随后立即置于 37℃ 水溶闭缺氧箱 (上海市儿科医学研究所研制), 以 1.0 L/min 的速度通入 8% 氧气 + 92% 氮气混合气, 维持缺氧 2 h 后取出, 返由母鼠喂养, 每只模型鼠的缺氧过程都独立计时。

三、取穴与针刺

参照《实验针灸学》^[4]取穴, 督脉穴为百会、天门、大椎和脊中, 任脉穴为关元、中脘、膻中和承浆。以上诸穴毫针浅刺, 不留针, 每天 1 次, 直至取材。

四、取材与切片

各观察点的大鼠, 采用乙醚麻醉后开胸, 经心脏先后灌注 PBS 和 4% 多聚甲醛, 然后断头取脑, 取前囟后厚 2 mm 的冠状位组织块置于 4% 多聚甲醛中固定, 24 h 内进行常规脱水、石蜡包埋。切片, 片厚为 2 μm, 连切两张, 分别行常规 HE 染色和 Nestin 免疫组化染色。

五、Nestin 免疫组化染色

切片常规脱蜡至水, 室温下 3% H₂O₂ 孵育 20 min, 蒸馏水洗 3 次; 将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0), 微波修复抗原; 滴加 5% 牛血清白蛋白, 置室温下 20 min, 甩去多余液体, 不洗; 滴加小鼠抗大鼠单克隆抗体 Nestin (1:100), 4℃ 过夜, PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 37℃ 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液, 37℃ 30 min, PBS 洗 4 次, 每次 5 min; DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水、透明和封片 (Nestin 购于 CHEMICON 公司, 其余免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司)。

六、结果判定与分析

切片置于 Olympus 显微镜下观察皮质梗死区及对侧镜区, 以胞浆内呈黄色或棕黄色为 Nestin 阳性细胞, 在相同的光亮程度下, 计数高倍镜下 (×400) 每个观察点各连续 3 个不重叠视野的阳性细胞数, 取总和为该张切片的阳性细胞数, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 并用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统完成图像采集。

七、统计学分析

多个均数间比较用方差分析, 两均数间比较用 S-N-K 法。

结 果

一、正常组

大鼠出生后早期皮质有 Nestin 阳性细胞, 但随增龄而减少, 在 3 d 组可见较多数量的 Nestin 阳性细胞, 7 d 组明显减少, 14 d 组皮质偶见阳性细胞 (未行计数), 见表 1、图 1、图 2, 而 28 d 组皮质未发现 Nestin 阳性细胞。

表 1 缺血缺氧性脑损伤后皮质 Nestin 阳性细胞数 (个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	皮质 Nestin 阳性细胞数目	
		损伤侧	镜侧 (正常)
正常组	24		
3 d 组	6	—	29.75 ± 3.86
7 d 组	6	—	9.50 ± 3.00
14 d 组	6	—	未计数
28 d 组	6	—	未计数
HIE 模型组	24		
3 d 组	6	77.25 ± 5.91 * #	58.50 ± 16.11 *
7 d 组	6	67.00 ± 2.45 * △	21.50 ± 6.76 ▲
14 d 组	6	35.60 ± 6.84 * #	6.40 ± 1.18 ▲
28 d 组	6	未计数	未计数
HIE + 针刺组	24		
3 d 组	6	125.00 ± 15.25 * △ ☆	54.50 ± 5.97 * ★
7 d 组	6	152.50 ± 24.43 * △ ☆	26.80 ± 5.25 ▲ ★
14 d 组	6	134.20 ± 20.85 * △ ☆	21.40 ± 9.34 ▲ ★
28 d 组	6	未计数	未计数

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$, ▲ $P > 0.05$; HIE 模型组和 HIE + 针刺组各自的伤侧与对侧比较, # $P < 0.05$, △ $P < 0.01$; HIE 模型组伤侧与 HIE + 针刺组伤侧比较, ☆ $P < 0.01$; 两组的对侧比较, ★ $P > 0.05$

二、HIE 模型组

在皮质损伤灶及其周围出现大量 Nestin 阳性细胞, 病灶中央散在, 周边 Nestin 阳性表达密集且从内向外呈梯度递减, 在伤后 3 d 达高峰, 至伤后 14 d 仍然有较多的阳性细胞; 对侧镜区也出现 Nestin 阳性细胞增多, 但在 7 d 组已经出现明显减少; 3 d 组、7 d 组和 14 d 组损伤灶及其周围的计数与对侧和正常组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 而对侧除了 3 d 组与正常组的差异有统计学意义 ($P < 0.01$) 外, 7 d 组和 14 d 组与正常组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1、图 3、图 5、图 7。HIE 模型的 28 d 组罕见阳性细胞 (未行计数)。

三、HIE + 针刺组

在皮质缺血缺氧性损伤灶及其周围出现 Nestin 阳性细胞明显增多, 周边 Nestin 阳性表达同样密集且从内向外呈梯度递减, 与 HIE 模型组比较, 除 28 d 组外, 余各观察点差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 高峰期在治疗后第 7 天, 高峰持续时间更长, 在 14 d 组, 其阳性细胞数约是 HIE 组的 3.8 倍; 在对侧镜区虽然也出现阳性细胞增多, 但其变化规律与 HIE 模型组相同, 两者比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1、图 4、图 6、图 8。在 28 d 组罕见阳性细胞 (未行计数)。

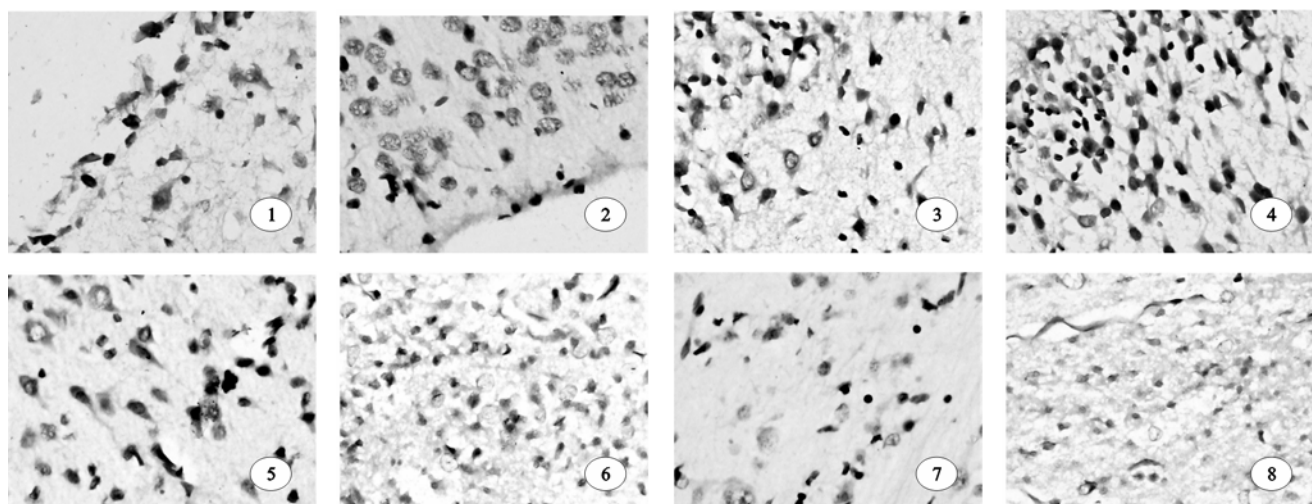


图 1 正常 3 d 组皮质 Nestin 表达 ($\times 400$); 图 2 正常 7 d 组皮质 Nestin 表达 ($\times 400$); 图 3 HIE 3 d 组皮质 Nestin 表达 ($\times 400$); 图 4 HIE + 针刺 3 d 组皮质 Nestin 表达 ($\times 400$); 图 5 HIE 7 d 组皮质 Nestin 表达 ($\times 400$); 图 6 HIE + 针刺 3 d 组皮质 Nestin 表达 ($\times 400$); 图 7 HIE 14 d 组皮质 Nestin 表达 ($\times 400$); 图 8 HIE + 针刺 14 d 组皮质 Nestin 表达 ($\times 400$)

讨 论

新生儿缺血缺氧性脑损伤是新生儿常见的危害严重的疾病之一,常常导致新生儿死亡或幸存者遗留智力低下、脑瘫和癫痫等严重神经功能残损,至今西医缺乏有效疗法,而中医的针刺疗法取得肯定的临床效果。研究表明,针刺对脑缺血的干预作用有清除自由基、调节钙稳态、纠正中枢单胺类神经递质紊乱、降低兴奋性氨基酸含量、调节脑内 NO 含量及 NOS 活性等^[5]。针刺通过多种途径,作用于多个靶点,起到缩小梗死面积、减少神经元变性与坏死、抑制神经细胞凋亡等多种效应,而有关针刺对损伤后内源性神经干细胞影响的研究目前尚较少。

近年来研究表明,脑缺血能激活脑内“静息”的神经干细胞,并促进其增殖、迁移和分化,分化的神经元能部分替代和修复损伤的神经元,从而在一定程度上改善缺损的神经功能^[6]。本实验结果显示,缺血缺氧性损伤后,在新生 SD 大鼠皮质损伤区及其周围、对侧镜区都出现 Nestin 阳性细胞增多,并以病灶边缘更加突出,在伤后 3 d 达高峰,至伤后 28 d 恢复至正常水平。Nestin 是神经干细胞的特异性标记蛋白,在神经干细胞中短暂表达,随干细胞的分化、发育而消失,利用 Nestin 免疫反应可鉴定神经干细胞。骆健明等^[2]的研究表明,缺血缺氧性损伤激活并促使 HIE 大鼠皮质内源性神经干细胞增多。增多的 Nestin 阳性细胞可能是脑的自我修复的物质基础,从而使损伤后部分患者的部分神经功能得以改善,但这种自我修复能力有限。

缺血缺氧性损伤能激活并促使 HIE 大鼠皮质内源性神经干细胞增多,在临床治疗 HIE 患者中观察到经针刺治疗后大脑皮质重新发育、皮质厚度增加及脑积

水消失^[1],据此推测患儿针刺治疗有效的原因不仅是减少损伤,更重要的可能是针刺促进内源性神经干细胞的增殖、迁移和分化,神经再生而功能重建,本实验的结果初步证实了针刺促使损伤后皮质神经干细胞增多的设想。经针刺治疗 3 d,皮质损伤灶及边缘出现 Nestin 阳性细胞显著增多,在第 7 天达高峰,延至 14 d 仍然有大量表达,但这种作用在本实验中仅仅见于损伤区域,而对侧镜区的变化情况与 HIE 模型组的非损伤侧类似,这可能由于损伤区是最需要立即修复的部位,符合针灸治疗的“气至病所”现象。针刺在导致皮质损伤灶 Nestin 阳性细胞增多的同时也使高峰持续时间延长,证明了针刺通过促进内源性神经干细胞修复损伤的中枢神经系统功能的临床现象。结合目前针刺及干细胞的研究结果,针刺促使 Nestin 阳性增多的机制可能是通过作用于调节由缺血缺氧作为始动因素引起局部的环境变化,对伤后脑内各种营养和生长因子在不同时间和空间的表达有调节作用。正常中枢神经的发育是由决定细胞命运和局部神经元数目的各种营养因子和生长因子所支配,在病理情况下,同样需要适当的营养因子和生长因子在时间和空间上的准确表达,从而促使神经前体细胞产生并指引其迁移、分化和生存^[7]。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导致神经干细胞的增殖和分化^[8,9],而针刺能使多种神经营养因子(如脑源性神经营养因子、碱性成纤维生长因子等)的分泌增多,持续针刺能促进脑源性神经营养因子较长时间的增高^[10,11]。但这些因素在复杂的脑内究竟如何协调,目前仍在继续研究中。

本实验结果还显示,在损伤后 28 d, HIE 模型组和 HIE + 针刺组的皮质都未见 Nestin 阳性细胞,与正常组一致,表明针刺治疗促进 Nestin 阳性细胞增多的效应

存在时间窗, Nestin 阳性细胞可能只在伤后早期参与神经修复, Nestin 阳性细胞的参与是早期针刺疗效较佳的原因。

总之, 新生 SD 大鼠缺血缺氧性损伤后在皮质病灶及其边缘出现 Nestin 阳性细胞增多, 伤后早期针刺治疗显著增强 Nestin 阳性表达的数量, 但针刺治疗的作用机制有待进一步研究。从针刺对神经干细胞的影响着手研究针刺治疗脑出血的作用机制也有助于进一步了解内源性神经干细胞, 从而更好地利用内源性神经干细胞的治疗作用。

参 考 文 献

- 1 庄明华, 白晔, 郑文斌. 以针灸为主综合治疗儿童交通性脑积水 26 例观察. 中国康复理论与实践, 2004, 10: 379-380.
- 2 骆健明, 庄明华, 刘明发, 等. 缺血缺氧能促进新生鼠神经干细胞的增殖. 中国神经精神疾病杂志, 2005, 31: 379-380.
- 3 骆健明, 庄明华, 刘明发, 等. 两种新生儿缺血缺氧性脑病模型建模方法的比较. 中国康复理论与实践, 2005, 11: 548-549.
- 4 李忠仁. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2003. 327-329.
- 5 许能贵, 易玮, 赖新生, 等. 缺血性脑损伤机制及其针刺干预作用的研究进展. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7: 71-73.

- 6 Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell, 2002, 110: 429-441.
- 7 Hallbergson AF, Gnatenco C, Peterson DA. Neurogenesis and brain injury: managing a renewable resource for repair. J Clin Invest, 2003, 112: 1128-1133.
- 8 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 striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. J Neurosci, 2001, 21: 6706-6717.
- 9 Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, et al. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 5874-5879.
- 10 陈英辉, 黄显奋. 累加电针对脑缺血大鼠皮层脑源性神经营养因子表达及脑梗塞体积的影响. 针刺研究, 2000, 25: 165-169.
- 11 Ou YW, Han L, Da CD, et al. Influence of acupuncture upon expressing 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.

(修回日期: 2005-11-04)

(本文编辑: 松 明)

· 短篇论著 ·

不同强度运动对老年人心肺机能的影响

林伟 蒋小毛 姚波 陈仁清 杨其刚

据相关统计表明, 多种老年人疾病的发生、发展与其体力活动减少或运动训练强度不够有关, 本研究通过亚极量运动试验及肺功能测试, 试图分析不同强度运动对老年人心肺机能的影响, 并进一步探讨适合老年人的最佳运动强度。现将结果报道如下。

一、资料与方法

共选取 2004 年 4 月至 2004 年 11 月间入住本院疗养院 119 例老干部作为研究对象, 其中男 101 例, 女 18 例; 年龄 67 ~ 81 岁, 平均 (76.1 ± 6.3) 岁。根据研究对象在进行日常锻炼时的主观劳累程度分级^[1] (rating of perceived exertion, RPE), 将其分为大 (RPE > 15 级)、中 (RPE > 12 级)、小 (RPE > 9 级) 运动强度组及无运动锻炼组 (RPE < 9 级)。4 组对象的家庭日常生活活动间差异无统计学意义, 其活动方式主要包括步行、慢跑、交谊舞及各种体操等, 每周运动 3 ~ 5 次, 每周累计运动时间不少于 3 h, 平均运动年限为 2 ~ 20 年, 平均 (14.0 ± 3.2) 年。大、中、小运动强度组及无运动锻炼组分别有 36 例、32 例、27 例及 24 例研究对象, 各组性别、年龄及疾病构成比、病程等差异均无统计学意义, 具有可比性。

各组研究对象均给予亚极量运动试验及肺功能测试。亚极量运动试验采用 Space Labs Medical 90217 型心电图活动平板运动测试仪, 受试者运动量采用运动当量 (metabolic equivalent,

MET) 表示, 1 MET 相当于每千克体重每分钟需耗氧 3.5 ml。研究对象在运动试验前 3 d 停用 β 受体阻滞剂, 前 14 d 内停用洋地黄制剂; 运动试验终点为受试对象在试验中的心率次数达 $(195 - \text{年龄})$ 或出现以下情况之一, 包括心电图出现 ST 段下移 ≥ 0.2 mV、心绞痛等循环不良表现、或因其它因素而不能坚持运动等。肺功能测试采用 MIR Spirolab II 型肺活量测定仪测试各组对象肺功能。

本研究所得数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

二、结果

各组研究对象在亚极量运动试验终点时, 发现中、小运动强度组对象的收缩压、脉压均显著低于无运动锻炼组及大运动强度组 ($P < 0.01$), 各运动强度组对象的峰值代谢当量、运动时间均高于无运动锻炼组 ($P < 0.01$), 各组对象心率、舒张压间差异均无统计学意义, 具体数据详见表 1。

各运动强度组对象的第一秒用力呼气量 (the first second of forced expiration, FEV1)、每分自主最大通气量 (maximum voluntary ventilation, MVV)、最高呼气流量 (peak expiratory flow, PEF)、中段呼气流速 (forced expiratory flow 25% to 75%, FEF 25 ~ 75) 均显著高于无运动锻炼组 ($P < 0.01$), 各运动强度组对象的肺活量 (vital capacity, VC)、用力肺活量 (forced vital capacity, FVC) 较无运动锻炼组均有显著增加, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义。具体数据详见表 2。