

电针对 MCAO 模型大鼠海马区内源性神经干细胞表达的影响

谭峰¹ 王健¹ 陈晶¹ 顾勇² 詹杰¹
顾民华² 谭玖清¹ 梁艳桂¹ 刘效仿¹

摘要 目的 观察电针对大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)不同时间点大鼠海马区内源性神经干细胞(endogenous neural stem cells, eNSCs)表达的影响,探讨电针对急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI)远隔损害的可能机制。**方法** 雄性 SPF 级 SD 大鼠用线栓法制作 MCAO 模型,采用随机数字表法分为假手术组、脑梗死组、电针组,每组 30 只;假手术组仅做手术创伤,脑梗死组仅作 MCAO 缺血再灌注处理;电针组选取“百会”和“大椎”行电针治疗,每天 1 次,每次 30 min;治疗后第 1、7、14 天分别评定神经功能缺损程度,同时在各组随机选取 6 只大鼠处死,分离出缺血侧海马组织,采用免疫荧光法检测海马组织 eNSCs 增殖与分化表达。**结果** (1)大鼠神经功能缺损评分方面:与假手术组比较,脑梗死组在第 1、7、14 天神经功能缺损评分增高($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组在第 1、7、14 天神经功能缺损评分降低($P < 0.05$)。(2)BrdU 阳性细胞表达:与假手术比较,脑梗死组缺血侧海马 CA1、CA3、DG 处 BrdU 阳性细胞数在第 1、7、14 天均增多($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组 BrdU 阳性细胞数均增多($P < 0.05$)。(3)Nestin 阳性细胞表达:与假手术组比较,脑梗死组海马齿状回 Nestin 阳性细胞数在第 1、7、14 天均增多($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组 Nestin 阳性表达增加,但仅第 7 天差异明显($P < 0.05$)。(4)DCX 阳性细胞表达:与假手术组比较,脑梗死组第 1、7 天 DCX 阳性细胞增多($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组第 7、14 天 DCX 阳性细胞增多($P < 0.05$)。(5)NeuN 阳性细胞表达:与假手术组比较,脑梗死组海马齿状回 NeuN 阳性细胞表达在第 1、7、14 天均增加,但仅第 14 天时差异明显($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组 NeuN 阳性细胞表达增多,但仅第 1、14 天时差异明显($P < 0.05$)。(6)GFAP 阳性细胞表达:与假手术组比较,脑梗死组缺血侧海马齿状回 GFAP 阳性细胞表达在第 1、7、14 天均明显增多($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组 GFAP 阳性细胞表达增多不显著,仅第 14 天时差异明显($P < 0.05$)。**结论** 大鼠脑梗死后海马区存在 eNSCs 增殖与分化,电针治疗可促进脑梗死后神经缺损功能恢复,其机制可能与电针促进脑梗死海马区 eNSCs 增殖与分化,抑制 eNSCs 过度分化为星形胶质细胞,及早长时程促进 eNSCs 分化为神经元,促进神经再生等机制密切相关。

关键词 脑梗死;内源性神经干细胞;神经再生;电针

Effect of Electroacupuncture on the Expression of Hippocampal eNSCs in MCAO Model Rats
TAN Feng¹, WANG Jian¹, CHEN Jing¹, GU Yong², ZHAN Jie¹, GU Min-hua², TAN Jiu-qing¹, LIANG Yang-gui¹, and LIU Xiao-fang¹ 1 Department of Neurology, Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (528000); 2 Department of Neurology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou (510000)

ABSTRACT Objective To observe the effects of electroacupuncture (EA) on hippocampal endogenous neural stem cells (eNSCs) expression of middle cerebral artery occlusion (MCAO) model rats after cerebral ischemia-reperfusion (I/R) at different time points, and to observe possible mechanisms of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81473470, 81072947);广东省自然科学基金重点项目(No.8152800007000001, 2014A030311033);佛山市市合作项目(No.2014HT10004)

作者单位:1.广东省佛山市中医院神经内科(广东 528000);2.南方医科大学南方医院神经内科(广州 510000)

通讯作者:刘效仿, Tel:0757-83068600, E-mail: drliuxf@aliyun.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.02.0198

EA for keeping away from damage in acute cerebral infarction (ACI). **Methods** MCAO model was prepared in male SPF grade SD rats by suture method. Totally 90 rats were divided into the sham-operated group, the model group, and the EA group according to random number table, 30 in each group. Rats in the sham-operated group only received surgical trauma. Rats in the model group only received MCAO I/R injury. Rats in the EA group received EA at Baihui (DU20) and Dazhui (DU14), once per day, 30 min each time. Nerve defects of rats were tested by neural function defect scale at day 1, 7, 14 of treatment, respectively. Meanwhile, 6 rats were executed randomly from each group. Their hippocampus tissues were isolated. Then the proliferation and differentiation expression of eNSCs in the hippocampus area were detected by immunofluorescence method. **Results** (1) The scores of nerve function defect scale: The scores of the model group increased at day 1, 7, 14 of treatment, being higher as compared with those of the sham-operated group ($P < 0.05$). The scores of the EA group were lower than those of the model group at day 1, 7, 14 of treatment ($P < 0.05$). (2) The expression of BrdU positive cells: Compared with the sham-operated group, the expression of BrdU positive cells in the model group were increased at day 1, 7, 14 of treatment ($P < 0.05$). Compared with the model group at each time points, the expression of BrdU positive cells in the EA group were increased more at day 1, 7, 14 of treatment ($P < 0.05$). (3) The expression of Nestin positive cells: The expression of Nestin positive cells were increased more in the model group than in the sham-operated group at day 1, 7, 14 of treatment ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of Nestin positive cells increased more in the EA group, but only with statistical difference at day 7 of treatment ($P < 0.05$). (4) the expression of DCX positive cells: the expression of DCX positive cells were increased more in the model group than in the sham-operated group at day 1 and 7 of treatment ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of DCX positive cells were increased more in the EA group at day 7 and 14 of treatment ($P < 0.05$). (5) the expression of NeuN positive cells: The expression NeuN of positive cells were increased more in the model group than in the sham-operated group at day 1, 7, and 14 of treatment, but only with statistical difference at day 14 of treatment ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of NeuN positive cells were increased more obviously, but only with statistical difference at day 1 and 14 of treatment ($P < 0.05$). (6) the expression of GFAP positive cells: The expression of GFAP positive cells increased more obviously in the model group than in the sham-operated group at day 1, 7, and 14 of treatment ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of GFAP positive cells were not obviously increased in the EA group, but only with statistical difference at day 14 of treatment ($P < 0.05$). **Conclusions** The proliferation and differentiation of eNSCs exist in the hippocampus area after cerebral I/R in MCAO model rats. EA could improve the recovery of damaged nerve function. Its possible mechanism might lie in that EA could promote the proliferation and differentiation of eNSCs in hippocampus area, inhibit excessive differentiation of eNSCs into astrocytes, promote differentiation of eNSCs into neurons, and improve regeneration of nerve cells.

KEYWORDS cerebral infarction; endogenous neural stem cell; nerve regeneration; electroacupuncture

急性脑梗死 (acute cerebral infarction, ACI) 是一种病损严重、致残率高、神经功能恢复困难的疾病^[1]。脑梗死部位及其相关神经纤维发生轴突断裂、神经元丢失、破坏等与中枢神经髓鞘相关轴突再生抑制信号传导引起的轴突损伤、神经再生障碍、内源性神经干细胞 (endogenous neural stem cells, eNSCs) 分化抑制等密切相关^[2]。如不及时解除抑制因素作用, 则会阻碍 eNSCs 增殖和神经功能恢

复, 引发偏瘫、失语等神经功能缺损症状^[3], 严重影响患者生活质量, 给家庭与社会带来沉重负担, 这是临床神经病学亟待解决的重要难题。

研究表明, 成年哺乳动物脑内存在神经干细胞, 主要位于侧脑室下区 (subventricular zone, SVZ) 和海马齿状回颗粒下区 (subgranular zone, SGZ)^[4]。当脑内出现某些病理变化或外在因素刺激下, 这些神经干细胞就会发生迁移、增殖与分化。课题组前期研

究显示 RhoA 中枢神经抑制信号通路参与 ACI 病变过程并阻遏 eNSCs 增殖与分化,电针百会、大椎穴可抑制 RhoA 信号跨膜传导,减轻海马等部位继发性损害。但电针减轻 ACI 损害是否与其调控 RhoA 抑制信号跨膜传导、促进 eNSCs 再生有关,目前还不清楚。本研究从神经再生抑制信号通路新角度,动态观察电针对 MCAO 大鼠神经功能缺损评分、eNSCs 增殖与分化表达的影响,探讨电针治疗 ACI 的潜在机制。

材料与方法

1 动物 成年健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 90 只,10~12 周龄,体重 220~250 g,购自南方医科大学动物实验中心。安静环境 5 只 1 笼饲养,室温 20~25℃,湿度 50%~70%,12 h 昼夜循环照明(08:00—20:00),颗粒型普通大鼠饲料喂养,饮用凉开水,造模前适应性喂养 7 天。

2 主要试剂 10%水合氯醛;10%福尔马林;BrdU(博士德公司);Anti-BrdU、Anti-NeuN、Anti-GFAP(均购自 Abcam 公司)等。

3 主要仪器 包埋机(武汉俊杰电子有限公司);病理切片机(上海莱卡仪器有限公司);G68051 型电针仪(青岛鑫升公司);倒置荧光显微镜、成像系统(日本尼康公司);摇床(其林贝尔仪器制造有限公司)等。

4 方法

4.1 分组 按随机数字表法将 90 只 SD 大鼠随机分成假手术组、脑梗死组、电针组,每组按第 1、7、14 天细分亚组,各亚组 10 只。

4.2 MCAO 模型制备 参照 Zea Longa EL 方法^[5]制备 MCAO 模型。具体步骤如下:术前 6 h 禁食不禁水,10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔麻醉后,常规酒精消毒,取颈正中切口,切开皮肤皮下组织,暴露切断二腹肌肌腹,分离右侧颈总动脉(CCA),结扎右侧 CCA 近心端,向上分离右侧颈内动脉(ICA)与颈外动脉(ECA),在近右侧 CCA 分叉处结扎 ECA,用血管夹夹住 CCA 远心端,CCA 结扎处与上血管夹处保持 5 mm 左右距离,在此处放置一打好结的丝线,勿收紧线结,在此线下端剪一小口,插入已制备好的栓线头端,收紧线结,松去血管夹,顺 CCA 经 ICA 将栓线送至颅内,遇阻力而止,栓线插入深度为(23±0.5)mm,此时栓线头端正好位于大脑中动脉(MCA)起始部,阻断了 MCA 的血流。缝合切口,留置线头于体外,实现再灌注时,抽提栓线至 CCA 内即

可。术后连续 3 天腹腔注射青霉素抗炎(0.9%NaCl 注射液 2 mL 配 8 万 U 青霉素,腹腔注射 0.2 mL/只)。单笼饲养观察。假手术组只做手术暴露颈部动脉,结扎颈总动脉,但不予线栓。

模型成功的标准:参考 Zea Longa EL^[5]的 5 分制法,即 0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:向对侧转圈;3 分:向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。动物麻醉清醒后评分为 1~3 分为模型制备成功。

4.3 治疗方法 将大鼠固定于实验架上,参照《实验针灸学》^[6]选取百会、大椎穴;常规消毒,选用 30 号 1 寸不锈钢毫针,快速刺入皮下,进针深度 2~3 mm,针刺后针柄接至 G68051 型电针仪电极上,强度为 3 V,频率为 3 Hz,连续波,以肌肉轻微抽动、动物不挣扎嘶叫为度,时间持续 30 min。电针组于造模当天动物清醒后开始针刺治疗,每天 1 次,每次留针 30 min;假手术组不进行任何处理;脑梗死组只固定于实验木板上 30 min,但不针刺。

4.4 Brdu 给药方法 将保存于 -20℃的 Brdu 粉末从冰箱取出后溶解于生理盐水,溶液需在避光环境中配置并使其充分溶解,且需现用现配。每只大鼠于处死前 1 天,按每次 50 mg/kg 经腹腔注射,每天 3 次,每次间隔 8 h,最后 1 次注射后的次日处死。

4.5 取材 各组大鼠在 MCAO 术后第 1、7、14 天进行神经功能评分后,随机抽取每个时间点大鼠 6 只,用 10%水合氯醛腹腔注射(0.4 mL/kg),深度麻醉后自剑突水平剪开胸腔,暴露跳动的的心脏,将大号注射针头自左心室插入,剪开右心耳,经左心室-升主动灌注生理盐水 10 min 后用 4%多聚甲醛灌注至大鼠四肢发白,全身僵硬抽搐 15 min,取出脑组织用 4%多聚甲醛固定 24 h,0.01 mol/L PBS 清洗 3 次,再将组织块放于含 10%、20%、30%梯度蔗糖脱水,4℃过夜至组织块下沉,0.01 mol/L PBS 清洗 3 次,选取每只大鼠大脑半球海马组织,OCT 包埋,进行冠状连续切片,片厚 6 μm,硅烷化防脱玻片捞片,60℃烤片 30 min,4℃保存备用。

4.6 检测指标及方法

4.6.1 大鼠神经功能缺损评分 参考 Zea Longa EL^[5]的 5 分制法,于 MCAO 术后动物清醒时及术后第 1、7、14 天分别评定大鼠神经功能缺损情况。

4.6.2 免疫荧光法检测大鼠海马组织 eNSCs 增殖与分化表达 取冰冻切片,空气干燥 30 min 进行复温,0.01 mol/L PBS 清洗 5 min×3 次,冲洗去多余 OCT,0.2%Triton 常温透膜 5 min,0.01 mol/L

PBS 清洗 5 min × 3 次,每张切片上滴加抗原修复液 50 μL,常温修复 5 min,0.01 mol/L PBS 清洗 5 min × 3 次,用 10% BSA 血清 37 ℃ 封闭 60 min,用一抗稀释液配置大鼠抗 Brdu 单克隆抗体(1:200 稀释),倾去血清,滴加配置好的一抗 4 ℃ 孵育过夜,0.01 mol/L PBS 清洗 5 min × 3 次,分别滴加小鼠抗巢蛋白(Nestin)单克隆抗体(1:500 稀释),小鼠抗 NeuN 单克隆抗体(1:500 稀释),小鼠抗星形胶质细胞(GFAP)单克隆抗体(1:100 稀释),小鼠抗 doublecortin(DCX)单克隆抗体(1:1 000 稀释) 4 ℃ 孵育 16h,分别滴加 0.01 mol/L PBS 配制的 1:500 Alexa Fluor 488 驴抗小鼠抗体,Alexa 488 标记的驴抗兔绿色荧光二抗(1:400),37 ℃ 避光孵育 1 h,0.01 mol/L PBS 摇床 15 min × 3 次,抗荧光淬灭剂封片,显微镜下观察梗死灶海马区域 eNSCs 增殖与分化表达情况。

采用计算机图像分析系统软件(Image-pro plus 6.0)计数脑梗死后不同时间段海马区域 Brdu 阳性细胞。在整个颗粒细胞层及颗粒下层,新生及未成熟的神经干细胞在海马齿状回中被标记为 Brdu/Nestin(确定内源性 eNSCs 标记)、Brdu/DCX(确定 eNSCs 增殖)、Brdu/NeuN 和 GFAP(确定 eNSCs 分化),所有阳性细胞计数均在 FV-1000 激光扫描共聚焦显微镜下获得。

4.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件包进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,计数资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠神经功能缺损评分比较(表 1) 与假手术组比较,脑梗死组神经功能缺损评分第 1 天达到高峰,随后开始降低,各时间点(第 1、7、14 天)差异有统计学意义($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组神经功能缺损评分第 1 天最高,随时间延长渐降低,各时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	神经功能缺损评分		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
假手术	6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
脑梗死	6	2.20 ± 0.29*	1.78 ± 0.121*	1.10 ± 0.21*
电针	6	1.75 ± 0.17 [△]	1.25 ± 0.12 [△]	0.53 ± 0.10 [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与脑梗死组比较,[△] $P < 0.05$

2 各组海马区 Brdu 免疫荧光阳性细胞的表达比较(表 2) 与假手术比较,脑梗死组缺血侧海马 CA1、CA3、海马齿状回(DG)处 Brdu 阳性细胞数均增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组缺血侧海马区 Brdu 阳性细胞数均增多,且各时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组海马区 Brdu 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Brdu 阳性细胞数(个)		
		CA1	CA3	DG
假手术	6	10.00 ± 0.65	9.00 ± 0.67	10.20 ± 0.69
脑梗死	6	15.20 ± 0.97*	12.78 ± 0.17*	19.70 ± 1.17*
电针	6	20.75 ± 1.05 [△]	17.25 ± 0.85 [△]	25.21 ± 1.28 [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与脑梗死组比较,[△] $P < 0.05$

3 各组不同时段 Nestin 免疫荧光阳性细胞的表达比较(表 3) 与假手术组比较,脑梗死组海马齿状回 Nestin 阳性细胞数在各个时间点(第 1、7、14 天)均增多,且差异有统计学意义($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组海马齿状回 Nestin 阳性表达增加,但仅第 7 天差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠不同时段缺血侧海马齿状回 Nestin 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Nestin 阳性细胞数(个)		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
假手术	6	32.70 ± 1.68	41.90 ± 2.03	41.90 ± 2.3
脑梗死	6	85.20 ± 3.12*	107.60 ± 4.57*	85.50 ± 3.72*
电针	6	102.21 ± 4.90	135.00 ± 5.01 [△]	95.70 ± 3.74

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与脑梗死组比较,[△] $P < 0.05$

4 各组不同时段 DCX 免疫荧光阳性细胞的表达比较(表 4) DCX 免疫组化阳性细胞主要位于缺血侧海马齿状回,在脑缺血第 1 天少量增加,第 7 天明显增加,第 14 天达到高峰,之后细胞数逐渐减少;与假手术组比较,脑梗死组第 1、7 天 DCX 阳性细胞增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组第 7、14 天 DCX 免疫组化阳性细胞增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠不同时段缺血侧海马齿状回 DCX 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	DCX 阳性细胞数(个)		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
假手术	6	27.83 ± 3.19	39.00 ± 4.38	15.33 ± 1.63
脑梗死	6	52.00 ± 4.60*	23.17 ± 1.47*	12.17 ± 2.31
电针	6	71.17 ± 3.76	93.17 ± 4.83 [△]	82.33 ± 3.39 [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与脑梗死组比较,[△] $P < 0.05$

5 各组大鼠不同时段 NeuN 免疫荧光阳性细胞的表达比较(表 5) 与假手术组比较,脑梗死组海马齿状回 NeuN 阳性细胞表达在各时间点(第 1、7、14 天)均增加,但仅第 14 天时差异有统计学意义($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组海马齿状回 NeuN 阳性细胞表达在各时间点增加,但仅第 1、14 天时差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 5 各组大鼠不同时段缺血侧海马齿状回 NeuN 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NeuN 阳性细胞数(个)		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
假手术	6	1.22 ± 0.21	1.70 ± 0.33	1.67 ± 0.20
脑梗死	6	1.33 ± 0.23	1.94 ± 0.17	4.89 ± 0.33 *
电针	6	0.56 ± 0.26 [△]	2.17 ± 0.27	7.56 ± 0.65 [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与脑梗死组比较,[△] $P < 0.05$

6 各组大鼠不同时段 GFAP 免疫荧光阳性细胞的表达比较(表 6) 与假手术组比较,脑梗死组缺血侧海马齿状回 GFAP 阳性细胞表达在各时间点(第 1、7、14 天)均明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组缺血侧海马齿状回 GFAP 阳性细胞表达在各时间点均无明显增多,仅第 14 天时差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 6 各组大鼠不同时段缺血侧海马齿状回 GFAP 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GFAP 阳性细胞数(个)		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
假手术	6	10.21 ± 0.85	30.70 ± 1.07	21.27 ± 0.92
脑梗死	6	40.11 ± 1.24 *	55.91 ± 1.33 *	35.22 ± 0.99 *
电针	6	30.26 ± 0.71	45.15 ± 1.38	21.16 ± 1.13 [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与脑梗死组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

eNSCs 是一类存在于中枢神经系统内能够分化出神经元、神经胶质细胞等多种神经细胞的特殊细胞。当疾病或某些刺激下 eNSCs 可被活化,以代替疾病中缺失的神经细胞。传统观点认为以神经细胞增殖、分化和迁移为主要过程的神经发生仅可见于动物胚胎期或发育早期,然而,新近实验证实中枢神经系统的神经发生在成年乃至终生均可观察到。成年哺乳动物 eNSCs 的发现彻底打破了中枢神经元缺乏再生能力的观点。

Brdu 是一种胸腺脱氧核苷类似物,胸腺嘧啶的衍生物,在细胞的增殖周期 S 期即 DNA 合成期整合入细胞核 DNA 中,是反映新生细胞和细胞增殖状态的

理想标志物。Brdu 染色阳性细胞代表了脑缺血后的新生细胞,Brdu 阳性数目越多,增殖越明显。Nestin 存在于神经上皮干细胞,其表达与神经干细胞的发育、分化有关。Nestin 在发育期表达渐增强,当神经干细胞终末分化后,Nestin 表达减少,它是目前鉴定神经干细胞存在的常用标志物。DCX 阳性细胞被认为是循环中前体神经元谱系以及未成熟的颗粒细胞,其阳性细胞表达增多代表细胞增殖明显,是反映细胞增殖状态常用的标志物^[7]。

目前研究 eNSCs 增殖分化较多的部位是嗅球、SVz、DG。DG 是神经干细胞增殖分化最多的区域。eNSCs 主要分化为:NeuN、GFAP 和少突胶质细胞。NeuN 是构成神经系统结构和功能的基本单位,其功能是传递和整合信息。GFAP 是数量最多的神经胶质细胞,以往认为其功能是营养、支持与保护,新近研究发现其有维持突触周围环境自我稳态、参与神经信息传递等功能,可支持突触发芽、形成新的多突触连接、维持现存的神元回路。但过度增殖的胶质细胞及胶质疤痕的形成不仅影响到正常的局部神经回路,还影响神经发生。

百会和大椎是针灸治疗中风选取频率最高的穴位之一,临床上应用广泛,但其机制尚不十分明晰。多项研究表明电针百会、大椎可减轻缺血缺氧新生大鼠损伤侧海马区神经元尼氏体脱水现象^[8],可直接刺激双侧皮层脑干束,进而反射性刺激延髓麻痹部位,促进 bFGF 表达^[9],改善脑血流量,促进中风后遗症恢复^[10]。课题组前期研究亦发现,电针百会、大椎可发挥脑保护作用,其潜在机制可能与下调 RhoA 表达^[11]、Nogo-A 表达^[12]、neurocan-mRNA 表达^[13],调节皮层超微结构、加速血管新生^[14],促进梗死灶皮质与脊髓神经元再生、减轻细胞损伤^[15]等有关。然而,电针百会、大椎对 MCAO 模型大鼠海马区 eNSCs 增殖分化有何影响,电针治疗中风有效是否与调控 eNSCs 增殖分化相关,目前国内外相关报道尚少见。

本研究发现电针百会、大椎可改善 MCAO 模型大鼠神经功能缺损评分。Brdu、Nestin、DCX、NeuN、GFAP 在 MCAO 模型大鼠缺血侧海马齿状回区各时间点(第 1、7、14 天)均有共表达,Brdu/Nestin 阳性细胞在第 7 天表达最显著,在 14 天渐减弱;Brdu/DCX、Brdu/NeuN、Brdu/GFAP 阳性细胞在第 1 天开始增加,第 7 天后渐减弱,提示各组缺血侧海马区均存在 eNSCs 增殖与分化,且 eNSCs 可分化为 NeuN 与 GFAP。Brdu、Nestin 阳性细胞表达提示海马区均存

在神经细胞增殖,且电针干预后 eNSCs 增殖明显,第 7 天增殖达到顶峰。DCX 阳性细胞表达数目提示电针干预后可延长 MCAO 模型大鼠海马区 eNSCs 增殖周期,于第 14 天达到顶峰。NeuN 阳性细胞表达数则显示电针干预后 eNSCs 可在缺血损害早期(术后第 1 天)即可开始分化为神经元,而减少神经功能缺损,及早促进神经功能恢复。GFAP 阳性细胞表达提示短时程(14 天以内)电针干预可抑制 MCAO 模型大鼠海马区 eNSCs 过度分化为 GFAP,抑制胶质细胞过表达及胶质疤痕形成,而维持现存神经元回路,促进神经再生。

以上研究结果表明大鼠脑梗死后海马区存在神经发生,eNSCs 增殖与分化。电针治疗可促进脑梗死后神经缺损功能恢复,其机制可能与电针促进脑梗死海马区 eNSCs 增殖与分化,抑制 eNSCs 过度分化为星形胶质细胞,及早长时程促进 eNSCs 分化为神经元,促进神经再生等机制密切相关。

参 考 文 献

- [1] Viscomi MT, Molinari M. Remote neurodegeneration: multiple factors for one play[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(2): 368–389.
- [2] Garbuzova-Davis S, Rodrigues MC, Hernandez-Ontiveros DG, et al. Blood-brain barrier alterations provide evidence of subacute diaschisis in an ischemic stroke rat model[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63553.
- [3] Kittappa R, Bornstein SR, Androutsellis-Theotokis A. The role of eNSCs in neurodegenerative disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2012, 46(3): 555–562.
- [4] Mckya R. Stem cells in the central nervous system[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 66–71.
- [5] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without

craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–87.

- [6] 李忠仁.实验针灸学[M].中国中医药出版社, 2007: 100–158.
- [7] Friedman MJ, Shah AG, Fang ZH, et al. Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIB interaction: implications for its normal function and neurodegeneration[J]. *Nature Neurosci*, 2007, 10(12): 1519–1528.
- [8] 李宛青,吴爱群,刘伟,等.电针治疗缺血缺氧新生大鼠对海马神经元尼氏体的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2005, 40(2): 271–273.
- [9] 易玮,许能贵,靳瑞.针刺对局灶性脑缺血大鼠脑血流量的影响[J]. *新中医*, 2001, 30(10): 75–76.
- [10] 许能贵,周逸平,冠荪,等.电针大椎、百会穴对局灶性脑缺血大鼠脑血流量和自发脑电的影响[J]. *中国中医药科技*, 2001, 8(1): 3–4.
- [11] 谭峰,陈杰,梁艳桂,等.电针对肾性高血压大鼠脑梗死 Rho-A 表达的影响[J]. *新中医*, 2014, 46(1): 160–164.
- [12] 梁艳桂,谭峰,陈杰,等.电针对脑缺血再灌注大鼠脑皮层超微结构及 Nogo-A 表达影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(2): 209–213.
- [13] Tan F, Wan SY, Wu HK, et al. Expression of neurocan mRNA and ultrastructure of brain tissue after cerebral ischemia and reperfusion in stroke-prone renovascular hypertensive rats treated by electroacupuncture[J]. *Neural Regener Res*, 2011, 6(36): 2834–2838.
- [14] 万赛英,谭峰,吴海科,等.电针干预高血压脑缺血再灌注大鼠血管新生及细胞损伤的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(2): 350–353.
- [15] 谭峰,陈杰,梁艳桂,等.电针对高血压大鼠脑梗死灶皮层与脊髓神经元数目的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21(1): 1–5.

(收稿:2016-09-16 修回:2016-12-01)