

针刺联合康复训练对 MCAO 大鼠内源性神经干细胞增殖的影响

胡科, 任应国, 徐明超, 张保朝, 贾东佩*

(南阳市中心医院神经康复科, 河南 南阳 473009)

摘要:目的 探讨针刺联合康复治疗对成年局灶性脑缺血大鼠的神经功能缺损评分及内源性神经干细胞增殖的影响。方法 制备大鼠中动脉阻塞(MCAO)模型,并将其分为模型组、康复训练组及针康组,分别于造模后 24 h、7 d、14 d、21 d 进行神经功能评定和行为功能评估,同时应用 Brdu 免疫组化法观察再灌注损伤后大鼠神经干细胞增殖情况。结果 3 组大鼠治疗后 24 h 神经功能评定及行为功能评估比较差异无统计学意义;随着时间的推移,第 7、14、21 天针康组和康复组神经功能评定及行为功能评估与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且与治疗前比较,各组内治疗后第 7 天、第 14 天、第 21 天差异有统计学意义($P < 0.05$)。第 7 天针康组和康复组 Brdu 阳性细胞数与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后第 7 天与第 14 天、第 21 天 Brdu 阳性细胞数比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 针刺加康复训练均能增加成年局灶性脑缺血大鼠的神经功能及内源性神经干细胞的增殖。

关键词: 针刺; 大鼠; 内源性神经干细胞; 脑缺血

中图分类号: R245 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2016)01-0050-04

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0050

Effects of Acupuncture Combined with Rehabilitation Training on Neurological Deficits and Endogeneous Nerve Stem Cells in Adult Rats with Brain Ischemic Injury

HU Ke, REN Ying-guo, XU Ming-chao, ZHANG Bao-chao, JIA Dong-pei*

(Department of Neurological Rehabilitation, Nanyang Center Hospital, Nanyang, 473009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study of the effect of acupuncture combined rehabilitation training on neurological deficits and endogeneous nerve stem cells in adult rats with brain ischemic injury. **METHODS** Rats model of middle cerebral on occlusion were established and were divided into model group, rehabilitation training group and acupuncture combined rehabilitation training group. Neurological scores, behavior function and the proliferation of rats nerve stem cells were detected after 24 h, 7 d, 14 d, 21 d. **RESULTS** There were no significant differences in three groups in Neurological scores, behavior function after 24 h. Significant differences were found in Neurological scores, behavior function after 7 d, 14 d, 21 d ($P < 0.05$). Brdu positive cells proliferation were at the highest peak in 7 d, and there were significant increase in rehabilitation training group and acupuncture combined rehabilitation training group than model group ($P < 0.05$). **CONCLUSION** The treatment of acupuncture combined rehabilitation training can improve Neurological scores and behavior function and can induce proliferation of nerve stem cells.

KEY WORDS: acupuncture; rats; nerve stem cells; cerebral ischemia

脑血管病具有发病率高、死亡率高、复发率高、致残率高的特点,它与心脏病、恶性肿瘤构成许多国家的三大致死性疾病。缺血性脑血管病在脑血管病中最常见,占脑血管病的 70%~80%,给人类的健康造成极大的威胁。因此,如何防治缺血性脑血管

病具有重要的临床意义。针刺在缺血性脑血管病及其后遗症的防治中备受青睐^[1],同时,康复治疗也广泛用于改善脑梗死患者的各种功能障碍,提高患者生活自理能力^[2]。临床上常将针刺联合康复治疗用于缺血性脑血管病。然而目前其联合治疗缺血性脑

收稿日期: 2015-09-18; 修稿日期: 2015-12-09

基金项目: 河南省自然科学基金(051041900)

作者简介: 胡科(1978-),男,河南南阳人,南阳市中心医院主治医师。* 通信作者: 515238612@qq.com

血管病的机制尚不清楚,本研究通过观察针刺联合康复治疗对成年局灶性脑缺血大鼠的神经功能缺损评分及内源性神经干细胞增殖的影响,探讨其治疗缺血性脑血管病的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用 Wistar 大鼠 200~300 g,由上海斯莱克公司提供。将大鼠随机分为模型组、康复训练组、针刺加康复训练组,共 3 组,每组各 14 只。

1.2 大脑中动脉阻塞(MCAO)模型制备^[3]

室温条件下,采用 10% 水合氯醛溶液,按 400 mg/kg 的量进行腹腔麻醉。麻醉后的大鼠仰卧固定在手术台上,颈部备皮,常规消毒后行正中切口,钝性分离,结扎右颈总动脉和颈外动脉,钝性分离颈内动脉,备线并打一活结,在颈内动脉远端用微动脉夹夹闭,在颈总动脉分叉处切一小口,将与体重相应直径的栓线插入,收紧备线,打开动脉夹,栓线进入颈内动脉,轻柔推进,当线端进入 18~22 mm 感觉有阻力时停止推送。此即在颈内动脉颅内分叉处阻断量流入大脑中动脉的所有血液。扎紧备线,固定缝合。手术结束后,放置于室温下苏醒,正常饮食。

1.3 治疗方法

模型组:造模后置于普通笼中饲养,不予以任何治疗。康复训练组:造模清醒后予以转笼,网屏,转棒等综合康复疗法。术后 24 h 开始到 21 d,10 min/d,5 次/周。可训练大鼠的动态平衡功能。针刺加康复训练组(针康组):在康复训练基础上加针刺治疗。针具选用 0.35 mm×25 mm 华佗牌无菌针灸针,取百会穴及百会左、右侧各旁开 4 mm 处沿皮分别刺入 10 mm,快速捻转 1 min 后留针 30 min,每 5 min 快速捻转 1 次,每日 1 次,共治疗 3 周。

1.4 溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)给药方法

BrdU 溶于 0.007 mol/L NaOH 生理盐水中,配成 1% 的溶液,于注射前配制。采用脉冲标记法,大鼠按每次 50 mg/kg 的剂量,分 3 次腹腔注射,每 8 h 1 次,最后 1 次注射后 4 h 处死大鼠。

1.5 指标测定

神经功能评定:按 Bederson 等^[4]制定的标准评分分为 4 级。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 2 级行为伴自发性旋转。分别于造模后 24 h、7 d、14 d、21 d 进行评估。

行为功能评估:在安静的环境中进行,观察大鼠在行为学方面的差异。分别于造模后 24 h、7 d、14 d、21 d 进行评估。每项实验进行 2 次,取较高的分值作为大鼠的该项得分,评分标准见表 1。

表 1 行为功能评分标准

分数	网屏	平衡木	抓握-牵引
0	0~5 s	不能维持平衡	0~2 s
1	6~10 s	10 s 一下	3~5 s
2	11~14 s	11~20 s	≥5,无第三肢上绳
3	≥15 s	21~30 s	≥5,有第三肢上绳

注:3 项行为学测定的分数相加为最终得分,总分 9 分。

神经干细胞增殖的观察:大鼠造模后,给予 Brdu。治疗后第 24 h、第 7、14、21 天给予肌肉注射 62.5 mg/kg 氯氨酮麻醉后取出大脑,分别取出含室管膜下区(Subventricular zone, SVZ)部分,切成 40 μm 切片置于-20℃冰箱保存(保存液为 30% 甘油,30% 乙烯甘油醇,40% 0.1 mol/L PBS)。脑组织切片以 0.6% H₂O₂ (TBS 液,0.15 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5)处理 30 min,灭活内源性的过氧化酶。使 DNA 变性,将切片置于 50% formamide/2×SSC(0.3 mol/L NaCl,0.03 mol/L 枸橼酸钠)中,65℃孵育 2 h,PBS 冲洗 3 遍,去除多余抗体,加入 TRITC 标记的抗大鼠二抗(1:200),室温下 2 h,PBS 冲洗 3 遍,甘油缓冲液封片在激光共聚焦显微镜(ZEISS LSM 700)观察。

1.6 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据的录入及统计分析,定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布方差齐性的重复测量资料均数比较,采用重复测量的方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评定

大鼠制备 MCAO 模型后均出现程度不同的神经功能缺损,说明本次造模成功。3 组大鼠治疗后 24 h 神经功能评定组间比较差异无统计学意义;3 组大鼠神经功能评定与治疗前组内比较,治疗后 24 h、第 7 天、第 14 天、第 21 天差异均有统计学意义($P<0.05\sim0.01$);随着时间的推移,第 7、14、21 天针康组和康复组神经功能评定与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 神经功能评定($\bar{x} \pm s$)

组别	n	治疗前	24 h	第 7 天	第 14 天	第 21 天
模型组	14	3.51±0.82	3.04±0.43*	2.74±0.58**	1.95±0.64**	1.71±0.46**
康复组	14	3.48±0.47	3.23±0.52*	1.78±0.93***#	1.21±0.82***#	1.02±0.47***#
针康组	14	3.49±0.63	3.26±0.51*	1.24±0.78***#	0.43±0.56***#	0.24±0.56***#

注:与治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.2 行为学功能评定

3 组大鼠治疗前及治疗后 24 h 行为学功能评分组间比较差异无统计学意义;三组大鼠与治疗前组内比较,治疗后 24 h、第 7 天、第 14 天、第 21 天差异

有统计学意义($P<0.01$),随着时间的推移,第 7、14、21 天针康组和康复组行为学功能评分与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05\sim 0.01$),见表 3。

表 3 行为学功能评定($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	24 h	第 7 天	第 14 天	第 21 天
模型组	14	1.18±0.74	4.26±1.21**	5.48±1.53**	6.84±1.32**	7.28±1.03**
康复组	14	1.24±0.35	4.37±1.42**	6.48±1.58**	7.93±0.91***#	8.48±0.89***#
针康组	14	1.20±0.68	4.53±1.52**	7.59±1.83***#	8.47±1.38***#	8.91±0.58***#

注:与治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.3 各组 SVZ 区 Brdu 标记的阳性细胞

3 组大鼠造模后 24 h Brdu 阳性细胞数组间比较差异无统计学意义;第 14 天和第 21 天 Brdu 阳性细胞数组间比较差异无统计学意义。治疗后第 7 天与第 14 天、第 21 天 Brdu 阳性细胞数与治疗前组内

比较差异有统计学意义($P<0.05\sim 0.01$),随着时间的推移,第 7 天各组 Brdu 阳性细胞数达到峰值,且针康组和康复组 Brdu 阳性细胞数与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 4。

表 4 各组 SVZ 区 Brdu 标记的阳性细胞(mm^{-2})

组别	n	24 h	第 7 天	第 14 天	第 21 天
模型组	14	198.32±8.43	221.34±12.35**	214.73±9.03*	167.45±10.34**
康复组	14	202±12.48	345.35±10.36***#	248.34±10.26**	187.49±13.51*
针康组	14	219.46±13.54	364.74±17.36***#	247.58±9.38**	182.46±16.36**

注:与治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3 讨论

脑缺血是影响人类健康的重大疾病之一,临床上脑缺血多为局灶性,以 MCAO 多见^[5]。为系统研究脑缺血的生理病理变化,必须建立成功率高,重复性好的动物模型。大鼠作为动物模型具有一下优点^[6-7]:易于饲养,价格低廉;纯种鼠近亲交配,基因相似,脑血管解剖和生理机能相似;大鼠脑血管损伤部位恒定,重复性好;大鼠耐受手术创伤,存活时间长,利于相关病理改变过程的研究;大鼠脑血管解剖及生理机能接近人类;大鼠脑体积大小适宜,易于病理、生化分析。本研究选用成年 Wistar 大鼠制备的局灶性脑缺血动物模型。该模型避免了开颅对颅内环境的影响,造模成功率高,重复性好,是目前运用最多、最成熟的一种模型。

神经干细胞是指那些可以自我复制、能在一定的微环境中分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞的一类多能干细胞。其具有以下特点^[8-9]:①

能增殖分裂产生大量后代,包括自我复制更新和分化;②以指数增长速度进行增殖、分裂;③具有多向分化潜能;④损伤性信号可刺激其迁移、分化。大量研究结果显示,成年哺乳动物的大脑皮质、海马、脑室下区等区域都存在神经干细胞。侧脑室下区及海马齿状回颗粒下层是成年大脑内源性神经干细胞存在的主要区域。这两个区域起源的神经干细胞在哺乳动物中终生存在。BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞增殖周期可被整合到细胞核 DNA 中,并可经过长距离迁移及在目的地分化,且具有不影响细胞功能,毒性小的特点^[10]。因 Brdu 抗体不与胸腺嘧啶发生交叉反应,经免疫组化染色可观察 Brdu 在细胞内的渗入情况,因此,采用 Brdu 标记神经干细胞标记率和检测准确性都较高,是反应神经干细胞增殖的理想指标。

本研究结果显示,局灶性脑缺血后,针康组和康复组神经功能评定及行为学功能评分均优于模型

组,提示针刺和康复训练能够促进成年大鼠局灶性脑缺血后神经组织的重建,促使神经功能缺损体征得到修复。3 组大鼠 Brdu 阳性细胞在第 7 天达到高峰,第 7 天后增殖细胞增长幅度降低,这与相关报道的相一致^[11]。这可能由于脑的神经细胞在缺血性损伤后,能量代谢发生障碍,由于神经干细胞参与糖代谢过程中的催化反应,所以神经干细胞的表达增多,可以改善细胞的能量代谢,促进受损细胞的恢复。第 7 天针康组和康复组 Brdu 阳性细胞数均高于模型组,且针康组 Brdu 阳性细胞数显著高于康复组和模型组,提示康复训练加针刺比单纯康复训练更能刺激内源性神经干细胞的增殖,原因可能为针刺能促进脑损伤后原位诱导内源性神经干细胞增殖、分化,同时还具有改善脑血管循环、减轻脑细胞缺氧、抑制损伤局灶炎症反应、改善大脑电生理活动等功能,这些改变也进一步影响了神经干细胞的增殖分化。

综上所述,本研究结果显示康复训练、针刺加康复训练均能增加成年局灶性脑缺血大鼠的神经功能及内源性神经干细胞的增殖,且以针刺加康复训练效果更明显,且针刺加康复训练的方法不同于外源性药物,其具有作用广泛、无不良反应的特点,故对于诱导内源性神经干细胞增殖分化具有药物疗法不可比拟的优越性,是一种安全有效的针对脑缺血的方法,值得临床推广应用。

参考文献:

- [1] 李梦,李佩芳,罗春梅,等.刺督调神针法对大鼠脑缺血性损伤神经修复的细胞外信号调节激酶(ERK)通路的影响[J].浙江中医药大学学报,2013,37(4):455-459.
Li M, Li PF, Luo CM, et al. The influence of needling the du meridian and regulating the spirit acupuncture therapy on the extracellular signal regulated kinase pathway in rat cerebral ischemic injury of neural repair[J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med, 2013, 37(4): 455-459.
- [2] Zhang DS, Liu YL, Zhu DQ, et al. Point application with Angong Niuhuang sticker protects hippocampal and cortical neurons in rats with cerebral ischemia[J]. Neur Regen Res, 2015, 10(2): 286-291.
- [3] 于培兰,隋累鸣,韩松,等.小鼠大脑中动脉栓塞脑局部缺血模型及其评价方法[J].首都医科大学学报,2010,31(5):587-590.
Yu PL, Sui LM, Han S, et al. Evaluation of middle cerebral ar-

- tery occlusion induced focal cerebral ischemia model in mice[J]. J Capit Med Univ, 2010, 31(5): 587-590.
- [4] 曹云燕,蔡圣朝,崔倩倩,等.行气调神针刺疗法对缺血性脑卒中后抑郁模型大鼠脑左前皮质及海马 cAMP 含量、PKA 和 PKC 活性的影响[J].甘肃中医学院学报,2013,30(4):1-4.
Cao YY, Cai SC, Cui QQ, et al. Effects of Xingqi Tiaoshen acupuncture therapy on cAMP content, PKA and PKC activity of left anterior cortex and hippocampus in ischemic PSD rats[J]. J Gansu Coll Tradit Chin Med, 2013, 30(4): 1-4.
- [5] Yan Q, Ruan JW, Ding Y, et al. Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury[J]. Exp Toxicol Pathol, 2011, 63(1/2): 151-156.
- [6] Shi HF, Song J, Yang XM. Zhichan decoction induces differentiation of dopaminergic neurons in Parkinson's disease rats after neural stem cell transplantation[J]. Neur Regen Res, 2014, 9(9): 931-936.
- [7] 任秀君,马惠芳,图娅,等.电针对高脂血症合并脑缺血大鼠侧脑室室管膜下区神经干细胞增殖的影响[J].针刺研究,2010,35(3):175-181.
Ren XJ, Ma HF, Tu Y, et al. Effect of electroacupuncture on the proliferation of stem cells in the subependymal zone of the lateral ventricle of the brain in rats with hyperlipemia and cerebral ischemia[J]. Acupunc Res, 2010, 35(3): 175-181.
- [8] Zhang K, Liu Z, Li G, et al. Electro-acupuncture promotes the survival and differentiation of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells pre-induced with neurotrophin-3 and retinoic acid in gelatin sponge scaffold after rat spinal cord transection[J]. Stem Cell Rev, 2014, 10(4): 612-625.
- [9] 刘玉丽,李野,任路,等.深刺“环跳”穴对大鼠损伤坐骨神经的修复作用[J].针刺研究,2014,39(2):93-99.
Liu YL, Li Y, Ren L, et al. Effect of deepelectroacupuncture stimulation of "Huantiao" (GB 30) on changes of function and nerve growth factor expression of the injured sciatic nerve in rats[J]. Acupunc Res, 2014, 39(2): 93-99.
- [10] 卓缘圆,杨卓欣,吴家满,等.电针对脾虚证幼鼠海马区神经干细胞增殖和分化的影响[J].针刺研究,2011,36(5):327-334.
Zhuo YY, Yang ZX, Wu JM. Effect of electroacupuncture on differentiation and proliferation of hippocampal nerve stem cells in splenic asthenia pedo-rats[J]. Acupunc Res, 2011, 36(5): 327-334.
- [11] Liu Z, Ding Y, Zeng YS. A new combined therapeutic strategy of governor vessel electro-acupuncture and adult stem cell transplantation promotes the recovery of injured spinal cord[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(33): 5165-5171.

(编辑:董宇)