

针刺对宫内感染致脑损伤仔鼠脑组织碱性成纤维细胞生长因子表达的影响

李晓捷,迟瑛娇,庞伟

[摘要] 目的 观察针刺对宫内感染致脑损伤仔鼠脑组织碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响。方法 对孕17、18 d的Wistar大鼠腹腔注射脂多糖建立动物模型,以腹腔注射生理盐水为对照组。正常分娩后,仔鼠随机分为针刺组与模型组。针刺组7~21日龄时给予针刺干预。3组分别于生后21 d取幼鼠脑组织应用免疫组化方法检测脑白质bFGF的表达。结果 针刺组bFGF免疫阳性细胞数量多,染色深;对照组bFGF免疫阳性细胞数量少,染色浅;模型组介于两者之间。结论 bFGF表达增加可能是针刺对宫内感染致脑损伤仔鼠的治疗机制之一。

[关键词] 宫内感染;脑白质;针刺;碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)

Effect of Acupuncture on Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in Brain of Neonatal Rats Injured by Intrauterine Infection LI Xiao-jie, CHI Ying-jiao, PANG Wei. College of Rehabilitation Medicine, Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of acupuncture on expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in brain of neonatal rats injured by intrauterine infection. **Methods** 43 pregnant Wistar rats were divided into two groups: lipopolysaccharide (LPS, n=35) and normal saline (n=8, as control), which were consecutively injected intraperitoneally with LPS (450 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or saline on the 17th and 18th day of gestation. LPS group was randomly divided into the acupuncture group and model group. Acupuncture group was given acupuncture 7~21 d after being born. bFGF expression was assayed with immunohistochemistry. **Results** The number of bFGF positive neurons in the cerebral white matter was large in the acupuncture group, medium in the model group and little in the control group. **Conclusion** Acupuncture may be used to treat brain injury caused by intrauterine infection at the early stage, which may result from its up-regulating the expression of bFGF in the cerebral white matter.

Key words: intrauterine infection; white matter; acupuncture; basic fibroblast growth factor (bFGF)

[中图分类号] R742.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)12-1101-02

[本文著录格式] 李晓捷,迟瑛娇,庞伟. 针刺对宫内感染致脑损伤仔鼠脑组织碱性成纤维细胞生长因子表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(12): 1101-1102.

神经胶质细胞是脑白质的主要组成细胞,对脑损伤的发生、发展及儿童期脑功能恢复起着重要作用。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种广谱的神经营养因子和促分裂因子,在脑的多种损伤及疾病中都有增强表达。本研究通过建立新生幼鼠宫内感染致脑损伤动物模型,观察针刺是否可以调节脑损伤后内源性bFGF的表达。

1 材料与方法

1.1 材料 成年Wistar雌性大鼠60只,雄性大鼠30只,体重180~240 g,由佳木斯大学动物中心提供,室温下常规饲养,自由饮食,明暗周期各半。环境适应2周后,于17时以雌雄比2:1合笼,次日8时查阴道涂片,以查得精子为妊娠第0天。孕鼠另笼饲养。

主要试剂:脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 血清型055:B5, Sigma公司, LPS每1 mg溶于10 ml生理盐水中。bFGF 1抗、SABC试剂盒和DAB显色试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 模型制备与分组 选取43只孕鼠随机分为LPS组(n=35)和对照组(n=8)。在受孕第17、18天时, LPS组孕鼠腹腔

注射LPS 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$,连续2 d,对照组孕鼠腹腔注射同剂量生理盐水^[1]。观察记录两组孕鼠的分娩时间及新生鼠出生时体重。孕22 d前分娩的仔鼠为早产鼠,两组均去除早产鼠。仔鼠出生后,将母鼠处死,取子宫和胎盘行HE染色,观察宫内感染情况,判断标准为大量中性粒细胞浸润。

随机选取LPS组仔鼠60只,分为针刺组(n=30)、模型组(n=30)。随机选取对照组孕鼠所产仔鼠为对照组(n=30)。针刺组于生后7 d行针刺干预至第21天,共14 d,模型组与对照组常规饲养。

1.3 针刺方法 取30号1寸毫针,参照《实验针灸学》^[2],结合人与动物骨度类比,并参照王琴玉^[3-4]方法,取百会、曲池、内关、足三里、涌泉。头部穴位平刺,进针后觉针下沉紧即可。百会、曲池、足三里接电针仪,连续波,频率5~10 Hz,以头部轻微抖动为度(约3~5 V),持续10 min;内关、涌泉速刺微出血,不留针。每日针刺1次。

1.4 行为测试^[1] 采用悬吊试验,使大鼠前肢抓住距离桌面45 cm的水平玻璃棒(直径0.5 cm),记录大鼠掉下的时间。评分标准:1分:<10 s;2分:>10~30 s;3分:>30 s~2 min;4分:2~5 min;5分:>5 min。

1.5 bFGF免疫组化检测^[4] 采用链酶亲和素-过氧化物酶复合物(SABC)法, bFGF阳性细胞呈棕黄色;其蛋白表达结果采用半定量分析法,10×40倍光镜下,表达强度按细胞阳性数结合着色深浅分为3级:+:<25%细胞阳性(着色淡);2+:25%~50%细胞阳性(着色中等深);3+:>50%的细胞阳性(着色

作者单位:佳木斯大学康复医学院儿童神经康复实验室,黑龙江佳木斯市154002。作者简介:李晓捷(1951-),女,山东莱芜市人,主任医师,教授,中国残疾人康复协会小儿脑瘫康复专业委员会主任委员,中国康复医学会儿童康复专业委员会主任委员,黑龙江省康复医学会会长,主要从事儿童脑瘫康复。通讯作者:迟瑛娇。

最深)。

1.6 统计学处理 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 10.0 统计软件进行两样本均数 t 检验,等级资料比较采用多个样本比较秩和检验中的 Kruskal-Wallis H 检验。

2 结果

2.1 一般情况 对照组 8 只孕鼠腹腔注射后活动、进食均正常,无死亡及提前分娩,共娩出活产足月仔鼠 75 只,无死产仔鼠;LPS 组 35 只孕鼠腹腔注射后 9 只死亡,8 只提前分娩,其余 18 只顺利生产,共娩出活产足月仔鼠 105 只,死产仔鼠 63 只。与对照组仔鼠相比,LPS 组仔鼠出生后颜色青紫、活动少、体重低。两组一般情况比较见表 1。

表 1 两组孕鼠活产足月仔鼠数及仔鼠出生体重比较

组别	孕鼠数量(只)	活产仔鼠数(只)	仔鼠出生体重(g)
对照组	8	9.38 ± 0.92	5.78 ± 0.38
LPS 组	18	5.83 ± 0.99 ^a	4.88 ± 0.35 ^a

注:a.与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 子宫及胎盘病理检测 LPS 组孕鼠子宫及胎盘病理检测可见炎性改变。对照组子宫及胎盘病理检测未见明显炎症反应。

2.3 行为学测试 模型组仔鼠反应迟钝、稳定性差,悬吊时肢体自主活动明显减少,下肢颤抖,很快掉落到桌上,最长悬吊时间为 2' 10",得分(1.70 ± 0.67);对照组大鼠反应灵活,动作敏捷、准确,在玻璃棒上可灵活运动,甚至翻至玻璃棒上沿玻璃棒爬行,最长悬吊时间为 5' 20",得分(3.60 ± 0.70),优于模型组($P < 0.05$);针刺组介于两者之间,最长悬吊时间为 3' 50",得分(2.40 ± 0.84),与另两组的差异均有显著性意义(均 $P < 0.05$)。

2.4 免疫组化染色 在脑室旁白质区,bFGF 主要位于星形胶质细胞。对照组阳性细胞数目少,染色浅,分布稀疏,胞体小,突起细短;针刺组阳性细胞增生,胞浆明显,突起增多,染色普遍较深;模型组的阳性反应介于针刺和对照组之间,染色中等。PBS 替代 bFGF 1 抗对照结果为阴性(见表 2 及插图 1 图 1.1 ~ 图 1.4)。

表 2 21 日龄仔鼠脑白质 bFGF 免疫组化染色(只)

组别	n	+	2+	3+
针刺组	10	0	2	8
模型组	10	1	8	1
对照组	10	10	0	0

注:经 H 检验, $P < 0.05$ 。

3 讨论

bFGF 是广泛存在于体内多种组织中的一类多肽生长因子,对中胚层和神经外胚层来源的细胞有明显的促增殖和分化作用,在机体的胚胎发育、血管形成、创伤愈合及神经系统生长发育过程中起着十分重要的作用^[5]。正常中枢神经系统(central nervous system,CNS)中的 bFGF 主要来自星形胶质细胞(astrocyte,As),神经元等也有轻度表达^[6]。CNS 损伤后 bFGF 系统活化,bFGF 免疫染色增强最早见于神经元胞浆,并以旁分泌的途径启动反应性星形胶质化过程,突出地表现为 As 肥大、增生,胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)大量表达,形成反应性星形胶质化。随着 As 的活化,这些细胞本身也能持续大量生成 bFGF,以自分泌的方式维持星形胶质

化进程^[7]。激活的 As 能够生成各种细胞因子与细胞外基质物质^[8],这些物质有利于神经元复性及轴突再生。许多研究也证实,外源性 bFGF 可使实验动物脑梗死体积缩小及神经功能恢复^[9-10]。

在脑损伤中,bFGF 的神经保护机制为:①直接营养神经元、神经胶质细胞和血管内皮细胞;②调节血管舒缩状态及局部脑血流量;③拮抗有害物质的毒性;④阻止迟发性细胞死亡和/或促进新的神经元芽生及突触形成,促进神经前体细胞的增殖与分化^[11-13]。

本实验结果显示,模型组较对照组 bFGF 表达增加,表明宫内感染可刺激脑组织自发分泌一定量的 bFGF,起到自我修复的作用;但自我保护能力是有限的,在脑组织遭受损伤时更多神经元需要 bFGF 等神经营养因子的支持。针刺组较模型组 bFGF 表达增加,表明针刺可延长 bFGF 的产生时限,提高 bFGF 的产量,促进脑损伤实验大鼠神经功能的恢复。在神经功能评分上,针刺组与模型组相比差异有显著性意义,说明针刺疗法能改善神经功能。针刺可能通过增加内源性 bFGF 的表达,把反应性星形胶质化调控至一个适当的状态,创造一个有利于神经功能恢复的微环境,从而促进神经功能的恢复。

[参考文献]

[1] 李晓捷,高晶,孙忠人.宫内感染致早产鼠脑瘫动物模型制备及其鉴定的实验研究[J].中国康复医学杂志,2004,19(12):885-889.
[2] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:327.
[3] 王琴玉,王文花,靳瑞.针刺对窒息脑瘫幼鼠脑组织胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J].中国康复医学杂志,2005,20(6):423-425.
[4] 王琴玉,孙砚辉,靳瑞.不同时窗针刺对窒息脑瘫幼鼠脑组织 bFGF 表达的影响[J].中国康复,2005,20(4):195-197.
[5] Baird A, Bottlen P. Fibroblast growth factors[M]// Sporn B, Roberts AB. Peptide Growth Factors and Their Receptors. Berlin: Springer-Verlag,1990:369-418.
[6] Gomez-Pinilla F, Lee WK, Cotman CW. Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection[J]. J Neurosci,1992,12:345-355.
[7] 李立新,叶诸榕,朱建辉.碱性成纤维细胞生长因子的自分泌与反应性星形细胞胶质化[J].中华病理学杂志,1997,26(1):8-11.
[8] Matsunaga M, Hatta K, Nagafuchi A. Guidance of optic nerve fibres by N-adhesion molecules[J]. Nature,1988,334:62.
[9] Fichet M, Meadows ME, Do T, et al. Delayed treatment with intracerebral basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab,1995,15:953.
[10] Jiang N, Finklestein SP, Do T, et al. Delayed intravenous administration of basic fibroblast growth factor reduces volume in a model of focal cerebral ischemia/reperfusion in the rat[J]. J Neurol Sci,1996,139:173.
[11] Chen HH, Chien CH, Liu HM. Correlation between angiogenesis and basic fibroblast growth factor expression in experimental brain infarct[J]. Stroke,1994,25(8):1651-1657.
[12] 杨琴,胡常林.碱性成纤维细胞生长因子对脑缺血后神经元特异性烯醇化酶的影响[J].临床神经病学杂志,1998,4(11):198-200.
[13] 辛颖,韩玉昆,李强. bFGF 对缺血缺氧新生大鼠脑组织中 SOD、MDA 和 NO 的影响[J]. 新生儿科杂志,1999,14(6):262-265.

(收稿日期:2007-07-18)

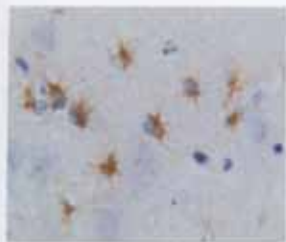


图 1.1 针刺组 bFGF 表达

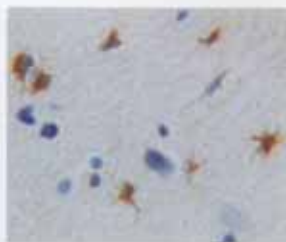


图 1.2 模型组 bFGF 表达

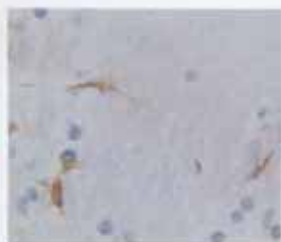


图 1.3 对照组 bFGF 表达

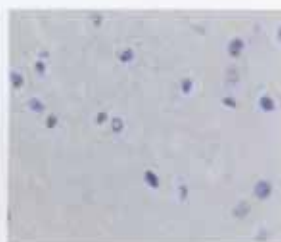


图 1.4 阴性对照