DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.004
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)17-1521-03

论著

皮质酮大鼠神经干细胞增殖分化的变化

高 唱,王景周 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 观察皮质酮(corticosterone, CORT)大鼠神经干细胞增殖分化的变化,探讨肾阳虚证与CORT大鼠神经干细胞增殖分化的联系。方法 成年雄性SD大鼠连续14 d皮下注射CORT(10 mg·kg^{-1}·d^{-1}),采用免疫单标和双标方法检测成体大鼠神经干细胞及分化的功能细胞。给予CORT大鼠右归饮水煎剂灌胃,观察CORT大鼠神经干细胞增殖分化的变化。结果 与正常对照组相比,CORT大鼠大脑皮层、海马及下丘脑区BrdU阳性细胞数明显减少,BrdU+NF200,BrdU+NeuroD,BrdU+GFAP免疫荧光双标细胞数也显著减少($P<0.01$)。给予右归饮后CORT大鼠BrdU阳性细胞以及免疫荧光双标细胞数明显增加($P<0.01$)。结论 CORT大鼠神经干细胞增殖分化能力显著下降,右归饮可显著增加CORT大鼠神经干细胞增殖分化能力。

关键词:右归饮;肾阳虚证;神经干细胞;增殖分化
中图法分类号:R256.59;R322.8;R329.28 文献标识码:A

Changes of differentiation and proliferation of neural stem cells in rats treated with corticosterone

GAO Chang, WANG Jing-zhou (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the changes of differentiation and proliferation of neural stem cells in rats treated with corticosterone (CORT). **Methods** Adult SD rats were administered with CORT (10 mg·kg^{-1}·d^{-1}) by consecutive subcutaneous injection for 14 days. Single and double immunohistochemical stainings were used to identify the neural stem cells and differentiated neural cells in adult rats. **Results** Compared with that in the normal control group, the number of BrdU immunohistofluorescence positive cells and BrdU+NF200, BrdU+NeuroD, BrdU+GFAP double-immunostaining positive cells in the cerebral cortex, hippocampus, and hypothalamus were markedly decreased ($P<0.01$). After treatment of adult CORT-rats with *Yougui Yin*, the number of BrdU and double-immunostaining positive cells increased significantly ($P<0.01$). **Conclusion** The differentiation and proliferation of neural stem cells in CORT-treated rats were decreased significantly and *Yougui Yin* can reverse the abnormality of the differentiation and proliferation of neural stem cells in CORT-treated rats.

Key words: *Yougui Yin*; kidney *Yang* insufficiency syndrome; neural stem cell; differentiation; proliferation

中医基础理论认为阴乃物质基础,阳乃脏腑功能。《内经》认为"阴精所奉其人寿,阳精所降其人夭",说明阴精与阳气的重要性。但中医理论阴精与阳气的物质基础是什么?如何用现代科技研究精气神理论和阴阳五行学说的内在本质,是中医基础理论研究的关键所在。干细胞增殖和分化的研究为中医基础理论研究提供了有益的启示。本研究用皮质酮(corticosterone, CORT)造成大鼠HPS轴功能低下模型以模拟肾阳虚证型,通过观察神经干细胞增殖和分化的变化,探讨肾阳虚证的病理生理机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

皮质酮(CORT)购自Sigma公司,巢蛋白(Nestin)小鼠单克隆抗体(Chemicon产品)、BrdU小鼠单克隆抗体(Sigma产品)、胶原纤维酸性蛋白(GFAP)兔源性单克隆抗体(Sigma产品)、神经纤维丝(NF200)小鼠源性单克隆抗体(Sigma产品)、NeuroD山羊源性单克隆抗体(Santa Cruz产品)、SABC-Cy3和SABC-FITC试剂盒(博士德产品)、SABC-DS试剂盒(博士德产品)、兔抗羊IgG-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271652)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271652)
作者简介:高 唱(1965-),男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事脑血管病方面的研究,发表论文46篇。电话:(023)68757363
收稿日期:2003-10-16;修回日期:2004-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Cy3（Sigma 产品），羊抗兔 IgG-Cy3（Sigma 产品），羊抗小鼠 IgG-FITC（Sigma 产品）。

1.2 右归饮制备

参照文献[1]方法制备。右归饮组成为附子、肉桂、熟地、山茱萸、山药、枸杞子、仙灵脾、甘草，依次按 2，1，3，2，3，3，3，1 比例称量。10 倍体积饮用水煎 1 h，滤取上清，如此重复 3 次。合并 3 次所得药汁，微火浓缩成 100%浓度，冷却后置磁力搅拌器上边搅拌边加入无水乙醇，至乙醇浓度为 75%，继续搅拌过夜。2 000×g 离心 20 min，上清液经 100 ℃电恒温水浴锅蒸发尽乙醇，用蒸馏水调节药物浓度至 100%，100 kPa 灭菌 15 min，4 ℃保存备用。

1.3 动物分组

成年雄性 SD 大鼠 18 只（第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供），体质量（200±20）g，每天皮下注射 CORT，每次 10 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$，对照组注射等体积生理盐水，连续 14 d。分笼饲养，光照时间为 12 h（8:00～20:00），温度（22±1）℃。将大鼠随机分成 3 组，即正常对照组、CORT 组以及右归饮组，每组各 6 只。右归饮组以 10 g/kg 的右归饮灌胃，对照组与 CORT 组以等体积的生理盐水灌胃，连续 30 d。观察造模后 30 d 各组 NSC 增殖分化的变化。

1.4 BrdU 标记及免疫荧光双标

参照文献[2]方法改进。皮下注射 BrdU（Sigma）100 mg/kg，每 8 小时给药 1 次，连续 2 d 后处死动物、放入 4%多聚甲醛（4 ℃），固定 8 d。在手术显微镜下取脑组织，入 10%蔗糖磷酸缓冲液 2 h，再入 30%蔗糖磷酸缓冲液至沉底。恒冷箱切片机（－20 ℃）切片，片厚 18 μm，所有切片均为脑组织冠状切面。先用抗 BrdU 单克隆抗体（Sigma）分别进行 SABC-NBT 或免疫荧光（SABC-FITC）染色，然后用 NF200、NeuroD、GFAP 抗体进行 SABC-ACE 或免疫荧光（SABC-Cy3）染色；以上各步骤前后均用 0.01 mol/L PBS（pH 7.35）漂洗 3×10 min；常规脱水、透明、封片。染色结果用 Olympus BH-2 显微镜和 Leica 倒置荧光显微镜观察并摄片。本实验用 0.01 mol/L PBS 或正常羊血清替代第一抗体作为阴性对照。组织切片行免疫荧光单标染色以及 NF200、NeuroD、GFAP 免疫荧光双标染色，并在镜下分别对 NF200、NeuroD、GFAP 和 BrdU 抗体免疫阳性细胞计数。

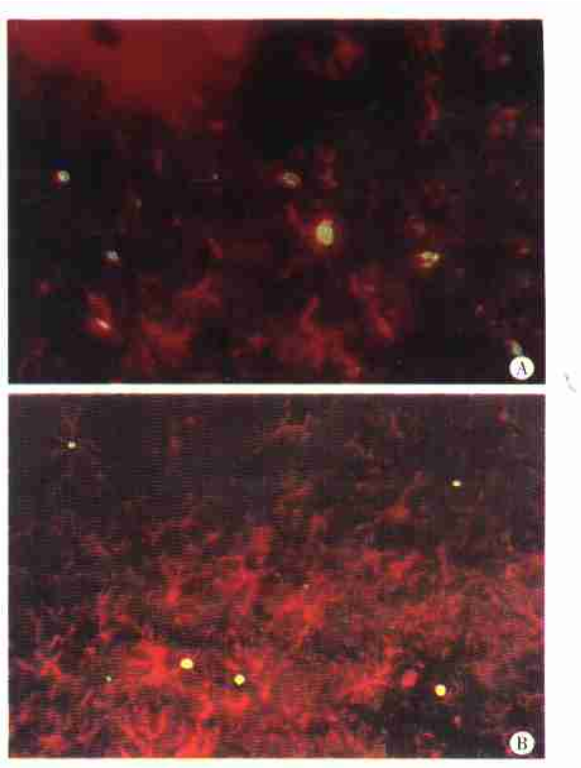
1.5 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件分析。检测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，作方差分析和均数间多重比较 q 检验。

2 结果

2.1 CORT 模拟肾阳虚证型大鼠 NSC 增殖分化的变化

成年 CORT 大鼠活动减少，体质量减轻，反应迟钝，弓背蜷缩，喜扎堆，畏寒喜暖；体毛枯疏，失去光泽，竖毛，采食量、饮水量减少；肾上腺、胸腺、垂体体积较正常组减小。免疫组化双标显示正常组和 CORT 组 BrdU 阳性细胞主要分布在皮层、海马、室管膜上皮细胞、室官膜下区、脉络丛上皮细胞等（图 1）。部分 BrdU 标记的细胞中同时呈 NF200、NeuroD、GFAP 染色阳性，CORT 组大脑皮层、海马和下丘脑区 BrdU 免疫阳性细胞数、BrdU＋NF200、BrdU＋NeuroD、BrdU＋GFAP 明显较正常组减少（P＜0.01）（表 1）。



A：In hippocampus；B：In cerebral cortex

图 1 免疫组化双标记显示 **BrdU** 阳性细胞（蓝色）与 **Neuro D** 阳性细胞（红色）（SABC-FIFC×400）

Fig 1 Immunohistochemical double staining for BrdU positive cells (blue) and Neuro D positive cells (red) (SABC-FIFC×400)

表 1 各组 **BrdU** 免疫阳性细胞计数（n=6，$\bar{x} \pm s$，cells/0.15 mm^2）

Tab 1 BrdU immunohistofluorescence positive cell count in each group (n=6, $\bar{x} \pm s$, cells/0.15 mm^2)

	Control	CORT group	CORT＋ *Yougui Yin* group
Cerebral cortex	43.7±10.4	27.6±5.2**	40.8±13.5**##
Hippocampus	28.2±3.9	21.5±2.6**	25.1±3.4**##
Ventricular zone	33.6±4.8	33.1±2.0	35.6±4.2
Subventricular zone	35.8±5.4	33.4±1.1	36.2±3.5
Hypothalamus	10.5±3.6	6.2±17**	9.2±2.3**##

**：P＜0.01，*vs* control；##：P＜0.01，*vs* CORT group

各组免疫荧光单标和双标阳性细胞计数见表 2。给与右归饮水合煎剂灌胃后 30 d，BrdU 阳性细胞计数明显增多（P＜0.01，P＜0.05）。

2.2 右归饮对 CORT 模拟肾阳虚证型大鼠 NSC 增殖分化的影响

给与右归饮水煎合剂灌胃后 30 d，大脑皮层、海马和下丘脑区 BrdU 阳性细胞和 BrdU＋NeuroD、BrdU＋NF200、BrdU＋GFAP 阳性细胞计数明显增多。各组免疫荧光单标和双标阳性细胞计数见表 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　各组免疫荧光双标阳性细胞计数（$n=6$, $\bar{x}\pm s$, cells/0.15 mm²）

Tab 2　Double immunohistochemical staining positive cell count in each group（$n=6$, $\bar{x}\pm s$, cells/0.15 mm²）

		Control	CORT group	CORT+ *Yougui Yin* group
Cerebral cortex	NeuroD+BrdU	17.6±2.2	6.6±1.8 *	12.7±2.4 *#
	NF200+BrdU	15.0±3.4	9.3±1.5 *	15.6±1.6
	GFAP+ BrdU	11.8±6.7	12.3±3.4	12.6±4.2
Hippocampus	NeuroD+BrdU	8.6±4.2	6.3±1.7 *	7.9±2.1 *#
	NF200+BrdU	6.0±3.4	4.9±1.8 *	5.9±1.2 *#
	GFAP+ BrdU	12.8±6.7	10.1±4.5 *	12.2±4.8 *#
Subventricular zone	NeuroD+BrdU	7.6±2.2	7.8±1.7	8.1±2.1
	NF200+BrdU	7.0±3.4	7.4±1.4	7.6±1.7
	GFAP+ BrdU	17.8±6.7	17.3±3.2	18.1±4.4
Hypothalamus	NeuroD+BrdU	3.6±0.2	2.1±1.1 *	3.0±1.0 *#
	NF200+BrdU	3.0±1.4	2.3±1.2 *	2.9±1.1 *#
	GFAP+ BrdU	3.9±0.7	2.7±1.0 *	3.3±1.2 *#

*: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, *vs* CORT group

3　讨论

越来越多的证据表明, 成体脑内也存在着具有自身分化增殖能力的神经干细胞[3]。成体脑内 NSC 主要位于海马齿状回(DG)、侧脑室下区(SVZ)、室管膜下区等。自我更新和分化潜能是神经干细胞的两大特性。由于干细胞增殖分化的特性, 参照中医理论比类取象方法, 我们提出以下工作假设: 阴精的物质基础之一是干细胞增殖以及功能细胞的数量和功能状态, 阳气的物质基础之一是干细胞分化和功能细胞所处的功能状态。本研究以 CORT 模拟肾阳虚证为切入点, 对此假设作初步的探讨。

以往研究表明, 肾阳虚证具有下丘脑-垂体-肾上腺功能紊乱, 主要发病环节在下丘脑, 温补肾阳中药能够直接作用于下丘脑, 改善肾阳虚大鼠或老年大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRF)神经元和神经纤维免疫活性[4]、CRFmRNA 表达水平[5], 下丘脑双氢睾酮(DHT)受体的亲和力[6], 改善下丘脑正中隆起室管膜细胞超微结构的损伤[7], 进而提高 HPA 轴功能。这些研究实践上都从功能上探讨了肾阳虚证的病生机制。由于 CORT 可抑制葡萄糖的转运和利用, 导致脑组织能量水平下降和谷氨酸含量明显生高, 从而对神经细胞有直接毒性作用, 尤其对海马和大脑皮层神经细胞更明显, 这可能与海马组织高表达糖皮质激素受体有关[8]。但 CORT 是否影响神经干细胞增殖分化凋亡尚不清楚。我们从发育生物学角度考虑肾阳虚证 HPA 轴功能与神经细胞发育有何联系。本研究初步结果提示皮质酮模型大鼠神经干细胞增殖和分化与正常组有明显差异。皮质酮模型大鼠大脑皮层、海马和下丘脑区 BrdU 阳性细胞数以及 BrdU+NF200、BrdU+NeuroD 阳性细胞数较正常对照组明显减少, 提示 CORT 可抑制大鼠神经干细胞增殖分化能力, 但与左旋单钠谷氨酸(MSG)大鼠不同的是 CORT 并不影响室管模区和室管模下区 NSC 增殖分化, 并且 CORT 影响 BrdU 阳性细胞数不如 MSG 严重。提示 CORT 主要影响 NSC 的分化能力。由于 NSC 增殖和分化能力减退, 可能导致功能细胞的数量相对不足, 推测这可能与 HPA 轴的功能抑制的发生有关。NSC 增殖分化能力可能随年龄增加而逐渐减退。这与中医肾藏精、主骨的理论认识一致。中医理论认为肾精是肾主生长发育的物质基础。我们的实验结果初步提示肾阳虚证可能存在 NSC 增殖分化能力减退。但是, 由于肾虚证是一个大范畴, 所涉及的机体器官组织较多, 内源性 NSC 可能仅仅与神经细胞(包括部份神经内分泌细胞)发育有关, 其它与中医肾本质有关的造血干细胞, 骨髓间质干细胞、表皮干细胞以及体内一些专能性干细胞, 如肝干细胞、免疫系统的前体细胞等也可能广泛参与了肾虚证的病生机制。有关肝肾同源、肾主水(髓), 脑为髓海, 肾主骨等中医理论提示机体内不同类型的专能性干细胞之间可能存在相互关系, 在一定条件下可相互转化, 这可能与目前现代医学发现的干细胞横向分化有关[3]。因此, 从不同成体干细胞角度深入研究中医证的本质不仅可对中医基础理论提供科学根据, 也可对现代医学成体干细胞研究提供有益线索。值得注意的是, 本研究发现 CORT 大鼠存在 NSC 分化能力的减退, 但目前尚无证据表明 NSC 分化能力的减退与 HPA 轴功能减退的直接联系。因此, 应进一步深入研究 NSC 分化能力的减退在肾阳虚证的病生机制中的作用及与 HPA 轴功能减退的内在关系。

参考文献:

[1] 蔡定芳, 沈自平, 张玲娟, 等. 右归饮对大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴抑制模型的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1994, 10(4): 236—239.

[2] Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, *et al*. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus[J]. Stroke, 2001, 32(8): 1890—1896.

[3] Gage F H. Mammalian neural stem cells[J]. Science, 2000, 287(5457): 1433—1438.

[4] 蔡定芳, 沈自尹, 张玲娟, 等. 右归饮对皮质酮大鼠细胞免疫及细胞因子的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(4): 248—252.

[5] 钟历勇, 沈自尹, 蔡定芳, 等. 补肾健脾活血三类复方对下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴及 CRF 基因表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(1): 39—41.

[6] 王文健, 沈自尹, 张新民, 等. 补肾法对老年男性下丘脑-垂体-性腺轴作用的临床和实验研究[J]. 中医杂志, 1986, 27(4): 32—36.

[7] 宋春风, 尹桂山, 李　恩, 等. 右归饮对肾阳虚大鼠下丘脑正中隆起室管膜细胞的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(1): 19—22.

[8] 周建政, 张永祥. 皮质酮对大鼠原代海马神经细胞的毒性作用[J]. 中国神经科学杂志, 1998, 14(1): 11—15.

（编辑　汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net