· 论著 ·

补阳还五汤对脑缺血大鼠经侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响

刘柏炎，赖鼎元，谢 勇，陈雪梅，蔡光先
（湖南中医药大学，湖南 长沙 410007）

【摘要】 **目的** 探讨补阳还五汤对大鼠脑内移植神经干细胞（NSCs）治疗局灶性脑缺血的影响。**方法** 分离培养新生大鼠海马 NSCs，用 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷（BrdU）进行标记。采用大脑中动脉线栓法复制脑缺血模型；将实验大鼠随机分为模型组、空白移植组、单纯移植组和移植加中药组，移植组大鼠术后 3 d 向脑室注射 10 μl NSCs 细胞悬液，空白移植组则注射等量生理盐水。于移植前及移植后 7、14、28 d 观察神经功能评分，相应时间点处死大鼠后用免疫组化法检测移植细胞存活情况，用荧光双标记免疫组化法检测 BrdU 和神经丝蛋白 200（NF200）双阳性细胞数。**结果** 单纯移植组大鼠神经功能明显得到恢复，在 14 d 和 28 d 与模型组比较差异有统计学意义（P 均 <0.05）；移植加中药组则提前到 7 d（P 均 <0.05）；模型组与空白移植组比较神经功能评分差异无统计学意义。镜下观察 NSCs 能移行至缺血部位并存活，移植加中药组存活和新生细胞在 14 d 和 28 d 与单纯移植组比较差异有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。**结论** 联合使用补阳还五汤能促进脑缺血后移植 NSCs 的存活，提高新生神经元数量，促进神经功能的恢复。

【关键词】 脑缺血；神经干细胞；移植；补阳还五汤；细胞分化
中图分类号：R285.5；Q254 文献标识码：A DOI：10.3969/j.issn.1008-9691.2009.01.009

Effects of Buyang Huanwu decoction（补阳还五汤）on survival and differentiation of neural stem cells transplanted into lateral ventricle in rats with focal cerebral ischemia

LIU Bai-yan, LAI Ding-yuan, XIE Yong, CHEN Xue-mei, CAI Guang-xian. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China
Corresponding author: CAI Guang-xian, Email: lby1203@sina.com

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects of Buyang Huanwu decoction（补阳还五汤）on transplantation of neural stem cells (NSCs) into brain for treatment of focal cerebral ischemia in rats. **Methods** Hippocampus NSCs were isolated and cultured in vitro, then labeled with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU). The model of brain ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion. The animals were randomly divided into four groups: model group, sham transplantation group, simple transplantation group and transplantation with traditional Chinese medicine (TCM) group. Three days after the middle cerebral artery occlusion, 10 μl suspension of BrdU-labeled NSCs was injected into a lateral ventricle in rats in the simple transplantation group, while a similar amount of normal saline was injected into the same brain location in rats in the sham transplantation group. At post-operative 7, 14 and 28 days, the rats were sacrificed respectively. The neurological deficit scores were determined, and the survival situation of the transplanted NSCs was detected by immunohistochemical staining. **Results** The simple transplantation of NSCs could improve the neurological behavior performance obviously, the differences being significant at 14 and 28 days between the simple transplantation group and model group and between the former group and sham transplantation group (all $P<0.05$). Under microscope, the NSCs could be found to migrate into the ischemic zone and survive. The numbers of living cells and regenerating cells in Buyang Huanwu decoction (TCM) + transplantation group were significantly higher than those in simple transplantation group at 14 and 28 days ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The transplantation of neural stem cells combined with Buyang Huanwu decoction can promote the survival of transplanted neural stem cells and increase the number of regenerating neurons in ischemia brain, thus, enhance the recovery of neurological function in rat models with focal cerebral ischemia.

【**Key words**】 cerebral ischemia; neural stem cell; transplantation; Buyang Huanwu decoction; cell differentiation

基金项目：国家自然科学基金项目（30300470，30472217，30873355）；湖南省自然科学基金项目（06JJ2052）；湖南省教育厅科研基金项目（03A034，04B046）

通信作者：蔡光先，Email：lby1203@sina.com 作者简介：刘柏炎（1970-），男（汉族），湖南省人，医学博士，教授，博士生导师。

万方数据

从 1992 年 Reynolds 等[1]成功的分离、培养出神经干细胞(NSCs)后，利用 NSCs 移植治疗神经系统疾病已成为神经科学研究的热点。NSCs 移植能促进局灶性脑缺血大鼠神经功能的恢复[2-3]，但移植 NSCs 在宿主脑内存活、定向分化是细胞移植治疗的关键。我们前期的研究证实补阳还五汤能促进缺血损伤后脑内 NSCs 增殖与分化[4]，本研究中观察补阳还五汤对局灶性脑缺血移植后的影响，探讨其是否也能影响移植 NSCs 的存活与分化。

1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂：补阳还五汤处方来源《医林改错》，组成：黄芪 120 g，赤芍 10 g，川芎 10 g，归尾 10 g，干地龙 10 g，红花 10 g，桃仁 10 g，药材购自湖南省中医研究院，经鉴定符合 2005 年版《中国药典》标准，按标准方法煎煮熬膏，每毫升含生药2 g，冷藏备用。Dubecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)/F12 (1∶1)粉为美国 Hyclone 公司产品，B27 添加剂、5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、胰酶为美国 Sigma 公司产品，碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)为美国 R&D 公司产品；小鼠抗大鼠 BrdU 单克隆抗体购自美国Neumarker公司，抗神经丝蛋白 200(NF200)抗体购自美国 Chemico 公司，罗丹明、荧光素(FITC)标记二抗均购自北京鼎国生物公司。

1.2 NSCs 的分离、培养与标记：参照文献[5]方法进行细胞分离、培养与标记，将第 3 代细胞用作实验。细胞于移植前用 10 mg/L 的 BrdU 孵育 24 h，磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤，用 Trypsin 将 NSCs 球消化为单细胞(达 95%以上)，收集细胞，用无菌生理盐水调整密度至 1×10^4个/L 的细胞悬液备用。

1.3 动物分组、模型制备与给药：雄性 Wistar 大鼠，体重 280～300 g，由湖南中医药大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为模型组、空白移植组、单纯移植组、移植加中药组，各组再分为术后 7、14、28 d 3 个亚组，每组 8 只，另设正常对照组 8 只。采用大脑中动脉线栓法[6]复制局灶性脑缺血大鼠模型。移植加中药组于术后 2 h 起以 14.2 g/kg 灌服补阳还五汤药液(按体表面积 60 kg 成人用量的 3 倍)，每日 1 次，分别给予 7、14、28 d；其他各组动物给予等量无菌蒸馏水。

1.4 NSCs 移植方法：参考文献[7]方法，单纯移植组和移植加中药组术后 3 d 以右侧侧脑室(前囟右侧旁开 1.5 mm、后 1.0 mm、深 5.6 mm)为移植点，缓慢注射 10 μl 细胞悬液，留针 5 min，拔针，缝合皮肤。空白移植组同法注射等量生理盐水。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 神经功能评分：参照文献[8]方法，于移植前前及移植后 1、7、14、28 d 对大鼠进行评分。神经功能检查包括提尾实验、爬板实验、感觉实验、平衡和协调实验 4 个部分，总计 15 分，分值越高，表明神经功能缺损越严重，正常动物分值为 0。

1.5.2 组织处理：用水合氯醛(4 ml/kg)麻醉大鼠，一半大鼠沿胸骨左侧剪开胸腔，从左心室插管至主动脉，采用多聚甲醛灌注法取脑，去额极、小脑，其余脑组织用多聚甲醛水溶液后固定制备切片；另一半大鼠迅速断头取脑，PBS 冲洗，液氮中保存。

1.5.3 存活细胞检测：采用免疫组化法检测。用 H_2O_2-甲醇灭活内源性过氧化物酶，2NHCl 断裂 DNA，马血清封闭，加入 BrdU 抗体(1∶100)反应，PBS 冲洗，加生物素标记的二抗反应，PBS 冲洗。随机计数 5 张脑片，每张切片选 3 个视野，100 倍物镜观察，用图像处理系统自动计数免疫阳性细胞数。

1.5.4 新生神经元检测：采用荧光双标记免疫组化法检测 BrdU 和 NF200 双阳性细胞，即同一细胞胞核紫色、突起和胞质紫红色代表新生神经元。抗大鼠 BrdU 抗体(1∶200)用 BCIP/NBT 标记，抗 NF200 抗体(1∶300)用 AEC 标记。随机计数 5 张脑片，每张切片随机选 3 个视野，100 倍物镜下观察，用图像处理系统自动计数免疫阳性细胞数。

1.6 统计学方法：应用 SPSS 11.0 统计软件包，数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 补阳还五汤对脑缺血大鼠 NSCs 移植后神经功能评分的影响(表 1)：局灶性脑缺血后存活动物均有不同程度的神经功能缺损，随存活时间延长，神经功能有不同程度恢复，尤以单纯移植组和移植加中药组最为明显。经统计学分析，空白移植组和模型组比较差异无统计学意义(P 均>0.05)；单纯移植组在移植后 14 d 时神经功能评分较模型组明显降低(P 均<0.05)，移植加中药组则提前到移植后 7 d (P 均<0.05)。

2.2 补阳还五汤对移植 NSCs 存活、分化的影响：移植后可在缺血脑内检测到 BrdU 表达，阳性细胞主要分布在缺血周围区，随着移植后时间的延长，BrdU 阳性细胞从室旁区向缺血周围区移行(彩色插页图 1)，表达逐渐增强，但 28 d 比 14 d 有所减少。NSCs 移植后 7 d 仅见少量 BrdU/NF200 双阳性细胞分布在缺血周围处，多呈簇状分布(彩色插页

万方数据

表 1 补阳还五汤对脑缺血动物神经功能评分及移植 NSCs 成活和分化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	神经功能评分(分)				BrdU 阳性细胞数(个/mm²)			BrdU/NF200 双阳性细胞数(个/mm²)		
	移植前	移植 7 d	移植 14 d	移植 28 d	移植 7 d	移植 14 d	移植 28 d	移植 7 d	移植 14 d	移植 28 d
模型组	8.9±1.1	7.5±1.0	6.4±1.1	5.9±1.1	0	0	0	0	0	0
空白移植组	8.9±1.0	7.5±1.0	6.5±1.1	5.8±1.1	0	0	0	0	0	0
单纯移植组	9.0±1.1	6.8±1.1	4.5±1.2[a]	3.6±1.0[a]	20.3±1.2	25.4±0.8	26.7±1.0	5.3±0.8	7.3±0.6	8.2±0.9
移植加中药组	8.9±1.1	6.2±1.1[a]	3.5±1.0[ab]	3.1±1.1[a]	20.4±0.8	28.8±1.3[c]	30.1±1.6[c]	5.8±0.6[c]	9.1±1.0[c]	10.9±0.8[b]

注：与模型组比较，[a]$P<0.05$；与单纯移植组比较，[b]$P<0.05$，[c]$P<0.01$

图 2)，14 d 明显增多，28 d 有所增加，但不如 14 d 明显。联合补阳还五汤治疗后，BrdU 阳性和 BrdU/NF200 双阳性细胞数明显增多(彩色插页图 2)。在 14 d 和 28 d 与单纯移植组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$，表 1)。

3 讨 论

传统观点认为，中枢神经系统是终末器官，出生后即停止发育，损伤亦不可再生。因此，人们尝试性使用胚胎脑细胞移植对脑损伤或退行性疾病进行治疗，获得较理想的效果，但由于供体细胞来源或伦理问题未能在临床上广泛使用。自 Reynolds 等[1]首次证实并从脑内分离、鉴定出 NSCs 以来，给脑内细胞移植治疗带来了新的机遇。

大量实验研究表明，NSCs 移植有助于脑缺血后神经功能的恢复，如 Veizovic 等[3]证实用短暂性大脑中动脉闭塞(MCAO)方法造成脑缺血损伤后 2～3 周，将 MHP36 NSCs 植入损伤对侧组织，平衡实验表明 MHP36 移植大鼠无明显的功能缺陷，且缺血损伤体积较模型动物明显减轻。Kelly 等[9]采用 MCAO 脑缺血大鼠模型，1 周后将人源性 NSCs 移植于该区，这些细胞移行至损伤区出现了不成熟神经元和胶质细胞的表型，并促进了认知功能的恢复；同时也发现，在病理状态的脑内，移植细胞和新生神经元的存活是影响移植疗效的关键。脑缺血损伤诱导炎症级联反应、自由基和兴奋性氨基酸的蓄积[10]，缺血脑内的微环境直接威胁移植细胞的生存，细胞微环境对移植物存活、分化及与宿主细胞整合起了重要作用。优化移植细胞所处的微环境有助于细胞的存活。研究表明，可以通过基因修饰 NSCs，如转染血管内皮生长因子(VEGF)[11]，或联合脑内定位注射细胞因子[12]来提高细胞成活率，但存在安全性和高费用的问题。因此，如何高效诱导 NSCs 分化为治疗部位的功能细胞及促进其与宿主神经网络的形成是干细胞移植的研究重点[13]。

补阳还五汤是中医治疗脑缺血的传统方剂，研究表明补阳还五汤能促进脑缺血损伤后的内源性神经再生[4]，同时能上调神经再生因子水平，如增强脑缺血后大鼠脑内 VEGF 及受体 1 的表达增强[14]，上调脑缺血后 bFGF 表达[15]，而 bFGF 是体外神经干细胞生长的重要因子，能促进神经再生，VEGF 则有直接的神经保护和促神经再生作用。还有研究表明，补阳还五汤能强化血肿周围血管紧张素 I (Ang-1)和受体 Tie-2 表达，促进损伤区血管新生，改善血运情况[16]，可见补阳还五汤能优化脑缺血后脑内微环境，可能促进移植干细胞存活。

综上所述，本研究证实联合使用补阳还五汤能促进移植 NSCs 的存活，提高新生神经元数量，促进神经功能的恢复；联合中药治疗对移植疗法是一种安全、有效的辅助方法。

参考文献

[1] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255(5052): 1707-1710.

[2] 蔡光先，刘柏炎，赖鼎元，等. 神经干细胞移植对局灶性脑缺血大鼠神经功能的影响[J]. 中国现代医学杂志，2007，17(24)：2971-2973.

[3] Veizovic T, Beech JS, Stroemer RP, et al. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells[J]. Stroke, 2001, 32(4): 1012-1019.

[4] 刘柏炎，蔡光先，陈雪梅，等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经元再生的影响[J]. 中华神经医学杂志，2007，6(8)：762-765.

[5] 刘柏炎，黎杏群，张花先，等. 海马神经干细胞的分离、培养与鉴定[J]. 中国现代医学杂志，2002，12(19)：21-23.

[6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[7] 彭岚，张苏明，唐洲平，等. 大鼠神经干细胞移植治疗大鼠脑梗死的实验研究[J]. 中国现代医学杂志，2004，14(4)：82-84.

[8] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. Stroke, 2001, 32(11): 2682-2688.

[9] Kelly S, Bliss TM, Shah AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(32): 11839-11844.

[10] 李建生，高剑峰，周友龙，等. 老年脑缺血/再灌注大鼠炎症级联反应变化及其意义[J]. 中国危重病急救医学，2006，18(5)：278-281.

[11] 朱巍，毛颖，周良辅，等. 转染血管内皮生长因子基因神经干细胞移植对大鼠脑缺血损伤的修复作用[J]. 中华器官移植杂志，2006，27(5)：305-308.

万方数据

[12] Aguirre A, Rizvi TA, Ratner N, et al. Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors[J]. J Neurosci, 2005, 25(48): 11092-11106.
[13] 张志明，赵菁，祝兆林. 神经干细胞治疗神经系统疾病研究进展[J]. 中国危重病急救医学，2004，16(9)：574-576.
[14] 刘柏炎，蔡光先，刘维，等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子及其受体 Flk1 的影响[J]. 中草药，2007，38(3)：394-397.
[15] 刘芳，白雪松，刘柏炎，等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志，2008，15(1)：9-12.
[16] 虢灿杰，唐涛，罗杰坤，等. 益气活血法对脑出血大鼠脑组织促血管生成素-1 及其受体表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志，2007，14(3)：138-141.

（收稿日期：2008-08-26 修回日期：2008-11-12）
（本文编辑：李银平）

·治则·方剂·针灸·

慢性心力衰竭中医证治刍议

李雅琴
（浙江省象山县中医医院，浙江 象山 315700）

【关键词】 心力衰竭；中医治疗学；证型
中图分类号：R242 文献标识码：B DOI：10.3969/j.issn.1008-9691.2009.01.010

慢性心力衰竭（心衰）归属中医“心悸”、“喘证”、“水肿”等范畴，中医一直把此病分散在几种疾病中，因此也没有统一的辨证分型，笔者查阅有关文献，又据心衰病因病机、临床症状及多数专家共识，并结合自己临床治疗经验，进行辨证分型治疗如下，供临床参考。

1 痰浊壅肺型

此型多见于慢性肺源性心脏病并心衰。主证：心悸气短，伴咳嗽，咯痰，胸膈痞满，喘咳不能平卧，动则更剧，尿少水肿。偏热：咯痰色黄，舌质红，苔黄，脉滑数或兼促、涩。偏寒：咯痰色白而稀，舌质淡，或胖紫暗，苔厚腻，脉细滑。

病因病机：发于肺胀，肺主治节而朝百脉，肺络于心，久病则肺心同病，或肺脏感受外在六淫之邪，或湿热之邪损伤肺络，引起肺失肃降，治节之功失调，不能通调水道，水津内蓄于上焦，停留于肺，水气内结，血行不畅而瘀阻于心，心气（阴）受累，可影响心脏功能而致心衰。

治则：化痰降气平喘。方药：偏热用泻白散合葶苈大枣泻肺汤加减；偏寒用小青龙汤合葶苈大枣泻肺汤加减。

2 心血瘀阻型

此型多见于风湿性心脏病及老年瓣膜病并心衰。主证：心悸气短，动则加剧，伴两颧黯红，面部下肢水肿，舌质紫暗，或有瘀点，脉涩或结代。

病因病机：久患心痹，日久不愈，则血脉不通，血行不畅。引起肺气不宣，气不宣则气暴上逆，心体鼓满肿胀，继则心气（阳）内虚，心乏开阖之能，血行无力，瘀阻于心，迫使血中水液外渗，而致功减力竭之疾。

治则：益气通脉，活血化瘀。方药：补阳还五汤加减。

3 气虚血瘀型

此型多见于冠状动脉粥样硬化性心脏病并心衰。主证：心悸气短，疲乏无力，伴胸闷，有时为胸膺部疼痛，遇劳、情绪偏激、饱餐或寒冷而诱发，夜间憋醒，尿少水肿，舌质淡、青紫，苔薄白而腻，脉沉细或沉而涩。

病因病机：素有胸痹，胸阳不振，气机不畅，遇劳使心气更虚，遇情志不遂，气机郁滞，遇寒则寒凝气滞。均使心血运行不畅，心脉瘀阻或夹痰浊阻络而发生胸痹心痛，日久损耗气血，阳气受损，水津不化，水饮上凌心脉而致心衰。

治则：益气养心，活血通络。方药：举元煎合血府逐瘀汤加减。

4 心肺两虚型

此型多见于肺源性心脏病后期并心衰。主证：心悸气短，乏力自汗，咳嗽喘促，动则加剧，尿少水肿，舌质黯淡，或有瘀点瘀斑，脉沉无力或兼促、涩、结代。

病因病机：久咳伤肺损心，肺主气，心主血，气血之间相辅相成，互相影响，咳喘日久，肺气受损，以致心气不足，气虚无力行血，则血脉瘀阻；肺气不宣，则水道不通，蓄积为水饮，波及于心，发为心衰。

治则：补肺益气。方药：补肺汤加减。

5 气阴两虚型

此型多见于高血压心脏病并心衰。主证：心悸气短，头晕乏力，尿少水肿，伴心烦失眠，舌质红，或红绛，苔少，脉弦数或结代。

病因病机：久患眩晕，肝肾阴虚，损及阴津，或心悸反复发作，心气匮乏，无力鼓动血脉，心脉瘀阻。形成气阴两虚或阴阳并损，心脉受损而致心衰。

治则：益气养阴。方药：生脉饮加减。

6 气阳两虚型

此型多见于心衰中后期，正气损耗较重。主证：心悸气短，乏力恶寒，尿少水肿，甚至端坐呼吸，动则更甚，舌质淡，或黯淡，脉沉弱或沉缓。

病因病机：久患心疾，心病则阳气营阴受损，心气心阳虚衰，无力鼓动心脉，血行失畅，血脉瘀阻。心之阳气亏虚，不仅使心主血脉的功能受损，亦致肺、肝对血液调节作用失调，进而加重气滞血瘀，心之阳气虚衰，不能下达于肾，以温肾阳，肾阳无资，主水无权，水湿泛滥，上凌心肺而成心衰。

治则：益气温阳。方药：参附汤加减。

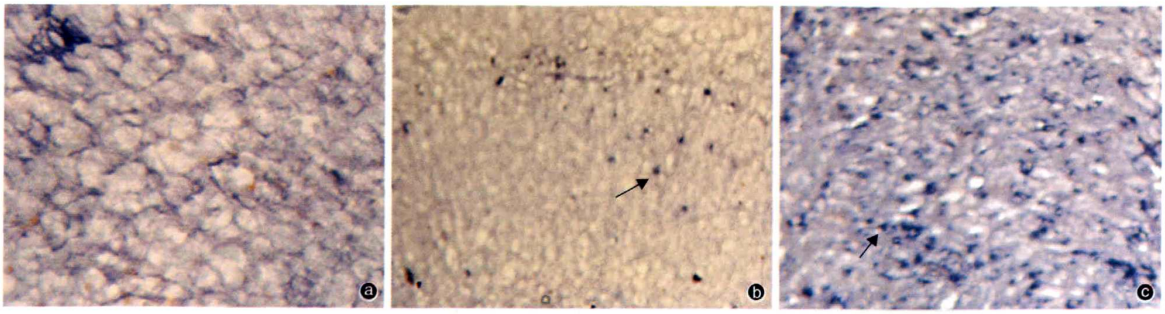
作者简介：李雅琴（1955-），女（汉族），浙江省人，主任中医师。

（收稿日期：2008-12-01
修回日期：2008-12-26）
（本文编辑：李银平）

万方数据

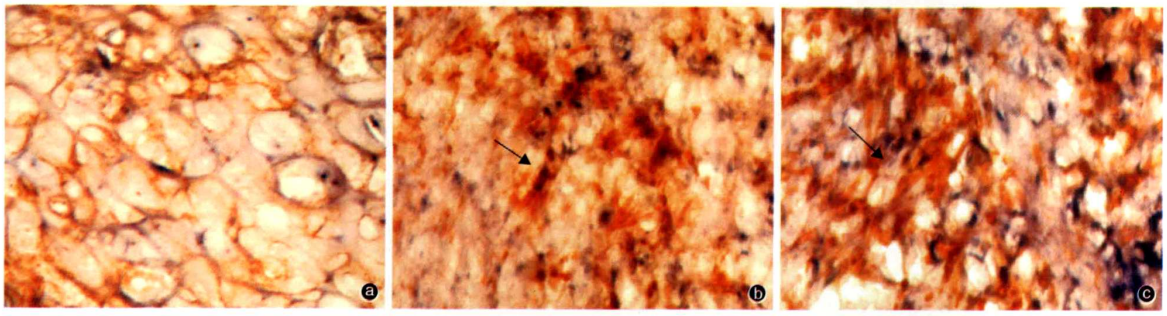
补阳还五汤对脑缺血大鼠经侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响

（正文见22页）



ⓐ:空白移植组；ⓑ:单纯移植组；ⓒ:移植加中药组；箭头示BrdU阳性细胞

图1　物镜下观察补阳还五汤对脑缺血大鼠移植NSCs后7 d时细胞存活的影响(免疫组化，×100)



ⓐ:空白移植组；ⓑ:单纯移植组；ⓒ:移植加中药组；箭头示BrdU/NF200双阳性细胞

图2　物镜下观察补阳还五汤对脑缺血大鼠移植NSCs后7 d时细胞分化的影响(荧光双标记免疫组化，×100)

大鼠骨髓间质干细胞修复缺氧/缺血性脑损伤的研究

（正文见34页）

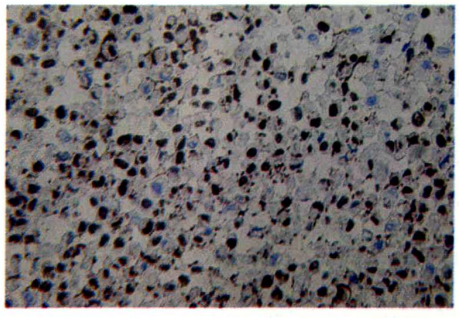


图1 培养至第3代的rMSCs体外标记BrdU阳性(免疫组化，×400)

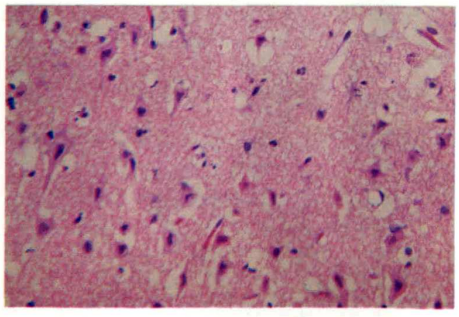


图2 模型组术后1 d脑组织和浓染，和固缩，神经元纤维疏松、水肿(HE，×400)

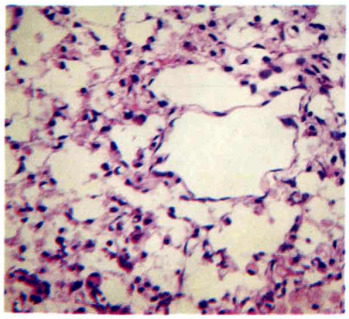


图3 模型组术后6 d脑组织病灶周围胶质细胞增生，间质呈空网状，软化灶形成(HE，×400)

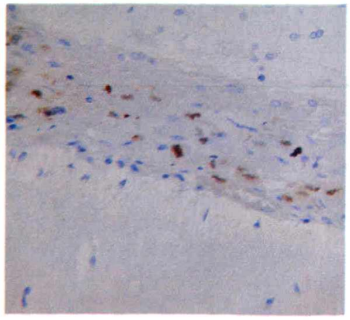


图4 rMSCs移植组移植后1 d脑皮质、海马交界部有BrdU阳性细胞(免疫组化，×400)

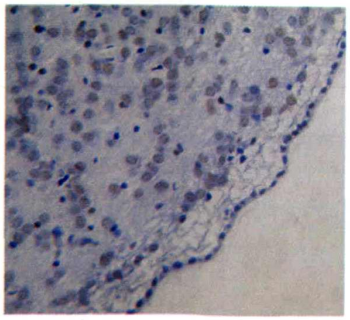


图5 rMSCs移植组移植后3 d BrdU阳性细胞向脑室迁移(免疫组化，×400)

万方数据

补阳还五汤对脑缺血大鼠经侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响

作者： 刘柏炎， 赖鼎元， 谢一勇， 陈雪梅， 蔡光先， LIU Bai-yan， LAI Ding-yuan， XIE Yong， CHEN Xue-mei， CAI Guang-xian

作者单位： 湖南中医药大学,湖南,长沙,410007

刊名： 中国中西医结合急救杂志

英文刊名： CHINESE JOURNAL OF INTEGRATED TRADITIONAL AND WESTERN MEDICINE IN INTENSIVE AND CRITICAL CARE

年，卷(期)： 2009，16(1)

被引用次数： 2次

参考文献(16条)

1. 蔡光先;刘柏炎;赖鼎元 神经干细胞移植对局灶性脑缺血大鼠神经功能的影响[期刊论文]-中国现代医学杂志 2007(24)

2. 虢灿杰;唐涛;罗杰坤 益气活血法对脑出血大鼠脑组织促血管生成素-1及其受体表达的影响[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2007(03)

3. 刘芳;白雪松;刘柏炎 补阳还五汤对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子的影响[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2008(01)

4. 刘柏炎;蔡光先;刘维 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子及其受体Flk1的影响[期刊论文]-中草药 2007(03)

5. 张志明;赵菁;祝兆林 神经干细胞治疗神经系统疾病研究进展[期刊论文]-中国危重病急救医学 2004(09)

6. Aguirre A;Rizvi TA;Ratner N Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors 2005(48)

7. 彭岚;张苏明;唐洲平 大鼠神经干细胞移植治疗大鼠脑梗死的实验研究[期刊论文]-中国现代医学杂志 2004(04)

8. Longa EZ;Weinstein PR;Carlson S Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats 1989(01)

9. 刘柏炎;黎杏群;张花先 海马神经干细胞的分离、培养与鉴定[期刊论文]-中国现代医学杂志 2002(19)

10. 刘柏炎;蔡光先;陈雪梅 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经元再生的影响[期刊论文]-中华神经医学杂志 2007(08)

11. Veizovic T;Beech JS;Stroemer RP Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells 2001(04)

12. Kelly S;Bliss TM;Shah AK Transplanted human fetal neural stem cells survive,migrate,and differentiate in ischemic rat cerebral cortex 2004(32)

13. Chen J;Sanberg PR;Li Y Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats 2001(11)

14. 朱巍;毛颖;周良辅 转染血管内皮生长因子基因神经干细胞移植对大鼠脑缺血损伤的修复作用[期刊论文]-中华器官移植杂志 2006(05)

15. 李建生;高剑峰;周友龙 老年脑缺血/再灌注大鼠炎症级联反应变化及其意义[期刊论文]-中国危重病急救医学 2006(05)

16. Reynolds BA;Weiss S Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system 1992(5052)

相似文献(10条)

1.期刊论文 白润涛.葛朝莉.韩漫夫.高明勇.BAI Runtao.GE Zhaoli.HAN Manfu.GAO Mingyong 转化生长因子-β1基因修饰神经干细胞在大鼠脑缺血模型中的试验研究 -临床医学2008,28(5)

目的 通过向大鼠脑缺血损伤区的靶向移植转化生长因子-β1(TGF-β1)基因修饰的神经干细胞,观察、TGF-β1基因修饰的神经干细胞对大鼠脑缺血损伤的治疗作用.方法 建立大鼠的局灶性脑缺血再灌注模型,并随机分为假手术组(A组)、磷酸盐缓冲液PBS组(B组)、神经干细胞治疗组(C组)、TGF-β1基因修饰神经干细胞组(D组),根据取样时间点的不同每组又分为3、7及14 d共三组(每组5只),手术后3、7、14 d进行神经功能评分(NSS),采用5-溴-2,-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记处于增殖状态的细胞,应用免疫组化法检测BrdU阳性细胞.结果 术后3、7、14 d C组和D组NSS评分明显低于A组和B组,统计学分析差异有统计学意义(P<0.05),其中D组NSS评分较C组低,两组比较差异有统计学意义(P<0.05);C组和D组大鼠在脑缺血/再灌注后3、7、14 d均可检测到BrdU阳性细胞,BrdU阳性细胞计数显示各个时间点C组和D组阳性细胞数明显多于对照组(P<0.05).结论 在局灶性脑缺血再灌注模型大鼠损伤区注入TGF-β1基因修饰的神经干细胞,对脑缺血所致的损伤具有一定的修复作用.

2.学位论文 任秀君 针刺对高血脂合并脑缺血大鼠神经干细胞和神经营养因子的影响 2007

研究目的:

高脂血症(hyperlipidemia，HLP)由血中脂蛋白合成与清除紊乱所致，表现为血浆脂蛋白异常、血脂增高等，属于祖国医学的“痰浊”“瘀血”范畴。它是动脉粥样硬化等心脑血管疾病发生的重要危险因素，有效地防治HLP是防治心脑血管疾病的重要途径。

为了减少和延缓中风的发生，减轻中风后机体状态，从高血脂阶段早期进行针刺干预，是针刺防治中风的新视角，具有重要流行病学研究意义。

高血脂与中风，神经干细胞与神经营养因子之间的关系是目前研究尚未进行探讨的部分，本研究试图通过建立高血脂合并脑缺血动物模型，并观察针刺的影响，探讨在高血脂阶段积极早期进行针刺干预，是否可通过升高神经营养因子的合成与分泌，从而促进神经干细胞的增殖、迁移和分化，促进脑损伤的修复和再生。

研究方法:

应用大鼠喂养经典高脂饲料，化学诱导大脑中动脉血栓闭塞制造高血脂合并脑缺血模型。将动物随机分为八组：正常对照组、高血脂模型组、高血脂治疗组、脑缺血模型组、脑缺血治疗组、高血脂合并脑缺血模型组、高血脂合并脑缺血治疗Ⅰ、Ⅱ组。高血脂治疗组用电针三阴交、丰隆穴治疗10天。脑缺血治疗组用针刺人中、百会穴治疗7天。高血脂合并脑缺血治疗Ⅰ、Ⅱ组，先给大鼠喂养高脂饲料造成高血脂模型，治疗Ⅰ组电针三阴交、丰隆穴10天后，两组同时电针三阴交、丰隆穴，针刺人中、百会穴，7天后处死。正常对照组和模型组均不针刺。用生化方法检测各组治疗前后血脂四项。应用神经行为学指标观察治疗前后神经症状的改善情况。实验结束用免疫组化方法检测海马区和额叶皮层脑缺血病理改变、室管膜下区和大脑额叶皮层nestin、PCNA、vimentin、Tuj—1表达情况。用酶联免疫法(ELISA)检测右侧大脑匀浆中神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)浓度。

实验结论:

1.高血脂合并脑缺血模型的建立是成功的。

2.高血脂本身并不能影响实验性高血脂大鼠右侧室管膜下区和右侧额叶皮层神经干细胞的增殖、迁移与分化，和右侧脑匀浆中NSE的表达，但能降低右侧大脑匀浆中神经营养因子，如NGF、BDNF、bFGF的分泌。

3.脑缺血能增强实验性脑缺血大鼠缺血侧室管膜下区和额叶皮层神经干细胞的增殖、迁移与分化，促进缺血侧脑组织中NSE的分泌，促进缺血侧脑组织中NGF、BDNF、bFGF的分泌与合成。

4.高血脂合并脑缺血，可减弱脑缺血后室管膜下区和右侧额叶皮层神经干细胞的增殖、迁移与分化，促进缺血侧脑组织NSE的分泌，降低缺血侧脑组织NGF、BDNF、bFGF的分泌，减弱大脑的自我保护作用。

5.针刺“丰隆”、“三阴交”，可降低实验性高血脂大鼠CHO、TG、LDL-C，升高HDL-C水平。针刺不能影响实验性高血脂大鼠高血脂后大脑右侧室管膜下区和额叶皮层神经干细胞的增殖、迁移与分化，和右侧脑组织中NSE的分泌，但能促进右侧脑组织中BDNF的分泌与合成。

6.针刺“百会”“人中”可改善实验性脑缺血大鼠神经行为症状评分，改善脑缺血状态，降低缺血侧NSE的分泌，增强实验性脑缺血大鼠缺血侧大脑室管膜下区和额叶皮层神经干细胞的增殖、迁移与分化，促进大脑缺血侧脑组织NGF、bFGF的分泌与合成。

7.针刺可降低高血脂合并脑缺血大鼠CHO、TG、LDL-C水平，升高HDL-C水平，改善高血脂合并脑缺血模型大鼠神经行为症状评分，改善脑缺血状态，可提高高血脂合并脑缺血后缺血侧室管膜下区和缺血区神经干细胞的增殖、迁移与分化，降低缺血侧脑组织中NSE的分泌，促进缺血侧脑组织中神经营养因子NGF、BDNF、bFGF的分泌与合成。

8.从高血脂阶段积极介入针刺治疗，可更好、更有效地调节血脂水平，改善脑缺血状态，明显提高高血脂合并脑缺血后缺血侧室管膜下区和缺血区神经干细胞的增殖、迁移与分化，降低缺血侧大脑NSE的分泌，促进缺血侧大脑匀浆中神经营养因子NGF、BDNF、bFGF的分泌与合成。

9.针刺能通过促进缺血侧脑组织NGF、BDNF、bFGF的分泌，降低NSE分泌，促进神经干细胞的增殖、迁移和分化，从而促进神经元的修复和再生。

综上所述本实验结果显示，神经营养因子和神经干细胞增殖、迁移、分化之间存在必然联系。

在实验性脑缺血和实验性高血脂合并脑缺血大鼠脑缺血造模后，神经营养因子含量的升高，往往同神经干细胞的增殖同时出现，所以猜测本实验脑缺血后是神经营养因子的升高促进了神经干细胞的增殖、迁移和分化。

实验结果表明，针刺作为一种治疗手段在一定程度上促进了神经营养因子的分泌，从而最终促进了脑缺血后神经干细胞增殖、迁移、分化，尤其在高血脂阶段针刺治疗可减轻脑缺血后损伤，促进神经元的修复与再生。

3.期刊论文 陈虎.蔡定芳 内源性神经干细胞与脑缺血后的神经再生 -国外医学(脑血管疾病分册)2002,10(5)

神经干细胞具有分化潜能并可自我更新.近年来的研究发现,成人脑内也有神经干细胞,并且脑缺血后内源性的神经干细胞可以增殖分化,具有再生潜能.文章介绍了神经干细胞在成人脑内的分布和脑缺血后神经干细胞的自身激活及其可能机制,阐明内源性神经干细胞在脑缺血中的作用和可能的应用价值.

4.学位论文 包大鹏 电针对脑缺血损伤大鼠内源性神经干细胞影响的机理研究 2007

目的：观察针刺和电针对成年大鼠脑缺血损伤后神经干细胞增殖、分化的影响，并比较针刺与电针之间的作用差别。从干细胞角度，探讨针灸治疗缺血性中风的可能机制。

方法：大脑中动脉线栓法建立大鼠局灶性脑缺血模型(MCAO)，针灸治疗28天后，运用神经功能缺损评分和HE染色观察动物的神经功能症状与脑梗死病理改变；免疫组化观察大鼠缺血侧海马齿状回(DG)、室管膜下区(SVZ)的5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)，巢蛋白(Nestin)的改变，检测脑缺血后神经干细胞的数量及其增殖；酶联免疫吸附实验观测神经生长因子(NGF)的含量，检测针灸对脑内NGF的影响；逆转录聚合酶链反应测定胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、Nestin、神经元特异烯醇化酶(NSE)的改变，检测脑缺血后神经干细胞的数量及其增殖、分化，从而评价针刺和电针对脑缺血损伤后神经干细胞的作用。

结果：

(1)神经功能评分显示：与模型组比较，针刺组、电针组恢复快。

(2)HE染色显示：与模型组比较，针刺组、电针组组织细胞损伤轻。

(3)免疫组化显示：与模型组比较，针刺组、电针组的BrdU和Nestin光密度比值更高。

(4)ELISA结果显示：与模型组比较，针刺组、电针组脑组织含更多的NGF。

(5)RT-PCR结果显示：与模型组比较，针刺组、电针组GFAP mRNA表达下降；Nestin mRNA、NSE mRNA表达升高。

结论：

(1)针刺和电针能促进MCAO大鼠肢体功能康复。

(2)针刺和电针能促进MCAO大鼠脑内NGF产生。

(3)针刺和电针能促进MCAO大鼠DG区和SVZ区神经干细胞的增殖和分化。

(4)电针对MCAO大鼠神经干细胞的影响优于针刺。

(5)针灸能促进脑缺血后神经干细胞的激活、增殖、分化，促进神经细胞的代偿性修复，这可能是针灸治疗缺血性脑中风的重要作用机制之一。

5.期刊论文 饶晓丹.于海波.皮敏.杨卓欣.RAO Xiao-dan.YU Hai-bo.PI Min.YANG Zhuo-xin 针刺任督脉对脑缺血神经干细胞影响的理论初探 -中医药学刊2006,24(4)

目的:从理论上探讨针刺任督脉对脑缺血神经干细胞增殖与分化的影响.方法:本文通过综合近年来国内外神经干细胞的研究进展,从神经干细胞的功能,神经干细胞的增殖与分化和脑缺血的关系,各种调控因素对神经干细胞的增殖与分化的作用等方面,结合中医对任督脉的认识,探讨针刺任督脉对于脑缺血后神经干细胞增殖与分化的影响.结论:从神经干细胞角度,深入对任督脉实质的认识,对于针刺治疗脑缺血的疗效的探讨,具有临床和理论双重意义.

6.期刊论文 王立新.蔡业峰.孙景波.WANG Li-xin.CAI Ye-feng.SUN Jing-bo 从中医学角度认识脑缺血损伤后内源性神经干细胞的增殖分化 -南京中医药大学学报（自然科学版）2008,24(4)

通过对脑缺血损伤后内源性神经干细胞增殖分化研究的回顾与分析,从中医学角度对此现象进行了思考,认为肝肾精血盛衰是神经干细胞(NSCs)增殖分化的物质基础,先天之精、肾精、督脉、脑髓、神经干细胞增殖分化有密切联系;提出了毒邪害络损髓是抑制脑缺血后内源性神经干细胞增殖分化的病理机制,脑缺血急性期,痰瘀热毒混杂脑内,损伤脑髓、督脉、督络,是抑制NSCs分化增殖主要因素,清热化痰、祛瘀解毒通络是治疗大法;恢复期肝肾精血亏虚,毒邪留恋,NSCs增殖乏源是主要病理因素,治疗当以补益肝肾为主,解毒通络为辅.

7.学位论文 王咏龙 电刺激小脑顶核对大鼠局灶脑缺血/再灌注后脑内成体神经干细胞增殖分化的影响及其作用机制的研究 2009

缺血性脑卒中是神经系统的常见病和多发病，在脑卒中约占75%。大多数患者中遗留有瘫痪、失语等严重后遗症，给患者带来极大的痛苦，同时也给社会和家庭带来沉重的负担。脑缺血/再灌注损伤使脑组织的功能障碍和结构损伤更加严重，使治疗效果大大降低。因此如何采取合理的措施预防和治疗缺血性脑血管病，恢复受损神经细胞功能，降低致残率和病死率，近年来已成为医学界关注的热点课题。脑缺血/再灌注损伤是一复杂的病理生理过程，神经元结构破坏和缺失可能是引起功能障碍的病理关键。目前还没有理想的治疗脑缺血/再灌注损伤的方法。研究发现电刺激小脑顶核对神经系统疾病有神经保护作用，可以抗炎症、抑制细胞凋亡、促进神经组织的结构重建等作用。目前，采用仿生物电，模拟实验性小脑顶核电刺激而研制的小脑电刺激仪已广泛应用于许多神经系统疾病的临床治疗，对多种中枢神经系统疾病都产生了比较肯定的临床效果。Notch1是控制细胞命运的信号传导途径。当Notch1被激活后，神经干细胞进行增殖，而当Notch1活性被抑制时，干细胞则进入分化程序。bHLH基因转录调控因子（包括Hes5和Mash1）是指由一个碱性螺旋-环-螺旋结构及其上游富含碱性氨基酸序列的核酸顺序组成的一类基因，可以调控许多基因的转录。研究表明，Hes5信号通路能抑制神经干细胞向神经元方向分化，促进神经干细胞增殖。Mash1的高表达可促进干细胞的分化，相反低表达则抑制干细胞的分化，使干细胞处于持续的增殖状态。核转录因子-κB对神经干细胞增殖分化作用机制十分复杂，通过对众多涉及炎症和免疫反应等方面的基因调控来影响神经干细胞增殖分化。基于以往实验研究与临床的成果，本实验从电刺激小脑顶核干预局灶脑缺血/再灌注损伤内源性神经干细胞的研究入手，进一步探讨电刺激小脑顶核对大鼠局灶脑缺血/再灌注损伤脑组织神经干细胞的增殖分化的影响及其作用机制，为缺血性脑血管病的治疗提供实验基础。

目的:

1.观察电刺激小脑顶核对大鼠局灶脑缺血/再灌注神经行为学、神经功能缺损的影响以及脑组织的含水量、脑梗死体积的变化。

2.观察局灶脑缺血/再灌注各时间点大鼠成体神经干细胞的增殖分化及电刺激小脑顶核对局灶脑缺血/再灌注大鼠成体神经干细胞的增殖分化的影响，探讨电刺激小脑顶对局灶脑缺血/再灌注后神经重建的作用。

3.观察电刺激小脑顶核对大鼠局灶脑缺血/再灌注大鼠大脑缺血侧皮质Notch1、Hes5、Mash1和NF-κB p65 mRNA和蛋白表达的变化，进一步探讨电刺激小脑顶核对大鼠局灶脑缺血/再灌注后脑内成体神经干细胞增殖分化影响的作用机制。

方法:

1.改良线栓法制备大鼠大脑中动脉局灶脑缺血1.5h再灌注模型。成年SD大鼠随机分为正常对照组（N组），假手术组（S组），缺血/再灌注组（I/R组），缺血/再灌注后小脑顶核假刺激组（SF组），缺血/再灌注后小脑顶核刺激（F）组。根据再灌注时间的不同又分为1d、3d、7d3个亚组。对大鼠进行神经功能缺损评分以及测量脑组织的含水量、脑梗死体积的变化。

2.制备大脑中动脉局灶脑缺血1.5h再灌注模型。成年SD大鼠随机分为正常对照组（N组），假手术组（S组），缺血/再灌注组（I/R组），缺血/再灌注后小脑顶核刺激（F）组。根据再灌注时间的不同又分为3d、7d、14d、28d4个亚组，每个亚组动物数n=7只。免疫荧光单标和双标法检测研究局灶脑缺血/再灌注及电刺激小脑顶核对缺血/再灌注大鼠神经干细胞的增殖的动态变化和分化的结果。

3.改良线栓法制备大脑中动脉局灶脑缺血1.5h再灌注模型。成年SD大鼠随机分为假手术组（S组），缺血/再灌注组（I/R组），缺血/再灌注后小脑顶核刺激（F）组。根据再灌注时间的不同又分为14d、28d2个亚组，每个亚组动物数n=7只。采用RT-PCR和Western blotting检测局灶脑缺血/再灌注及电刺激小脑顶核对大鼠局灶脑缺血/再灌注后Notch1、Hes5和Mash1 mRNA及蛋白的表达，采用RT-PCR和免疫组化技术检测NF-κB p65 mRNA及蛋白的表达。

结果:

1.电刺激小脑顶核能提高局灶脑缺血/再灌注大鼠的神经功能缺损评分，降低缺血侧脑组织中脑含水量，缩小脑梗死体积。

2.正常对照组和假手术组侧脑室区和缺血周围皮质只存在少量Brdu阳性细胞，局灶脑缺血/再灌注脑损伤后3d大鼠侧脑室下区Brdu阳性细胞显著增加（P<0.01），7d时增加达到顶锋（P<0.01），14d和28d时后Brdu阳性细胞仍增加（P<0.01）；局灶脑缺血/再灌注脑损伤后3d大鼠缺血周围皮质Brdu阳性细胞也显著增加（P<0.001），7d时增加达到顶峰（P<0.001），14d和28d时后Brdu阳性细胞仍显著增加（P<0.001）；电刺激小脑顶核后大鼠侧脑室下区和缺血周围皮质Brdu阳性细胞增加更明显，与缺血/再灌注组比较，在3d、7d、14d和28d四个时间点Brdu阳性细胞增加更多，均有显著性差异（P<0.05）。免疫荧光双标法显示在正常组、假手术组仅见极少量Brdu/GFAP和Brdu/DCX双阳性细胞，缺血/再灌注组可见少量Brdu/GFAP和Brdu/DCX双阳性细胞，小脑顶核刺激组可见大量Brdu/GFAP和Brdu/DCX双阳性细胞，Brdu/GFAP和Brdu/DCX双阳性细胞明显增多，主要分化为神经元和神经胶质细胞。

3.与假手术组比较，脑缺血/再灌注组和脑缺血/再灌注后小脑顶核刺激组Notch1、Hes5、Mash1 mRNA和蛋白的表达量均增加（P<0.01）；与脑缺血/再灌注组比较，小脑顶核刺激组Notch1、Hes5、Mash1 mRNA和蛋白的表达量增加更明显（P<0.05）。与假手术组比较，脑缺血/再灌注组和脑缺血/再灌注后小脑顶核刺激组NF-κB p65 mRNA和蛋白的表达量均增加（P<0.01）；与脑缺血/再灌注组比较，小脑顶核刺激组NF-κBp65 mRNA和蛋白的表达量明显降低（P<0.05）。

结论:

1.成功建立改良线栓法大鼠局灶脑缺血/再灌注模型。电刺激小脑顶核可以降低脑缺血/再灌注损伤后急性期死亡率，促进肢体功能恢复。电刺激小脑顶核能提高大脑中动脉局灶脑缺血/再灌注模型大鼠的神经功能缺损评分，降低缺血侧脑组织中脑含水量，缩小脑梗死体积，从而达到脑保护作用

2.脑缺血后自身的神经干细胞也存在增殖。在正常对照组和假手术组大鼠SVZ和缺血侧皮质有少量神经干细胞，未见神经干细胞增殖。内源性神经干细胞增殖在脑缺血再灌注后逐渐升高，在脑梗死后7d达到高峰，以后增殖逐渐下降，28d神经干细胞仍有增殖。电刺激小脑顶核后神经干细胞增殖更明显，在7d达到高峰，28d后在SVZ和缺血周围皮质神经干细胞均还有明显增殖。电刺激小脑顶核能促进脑缺血后大鼠内源性神经干细胞的增殖。在正常组、假手术组仅见极少量神经干细胞分化，缺血/再灌注组可见少量神经干细胞分化，小脑顶核刺激组可见大量神经干细胞分化，分化明显增多，分化为神经胶质细胞和神经元。电刺激小脑顶核促进神经干细胞分化为神经胶质样细胞和神经元样细胞。电刺激小脑顶核通过促进内源性神经干细胞增殖和分化发挥脑组织神经重建作用。

3.正常成年大鼠脑组织Notch1、Hes5、Mash1和NF-κB p65表达较少。局灶脑缺血/再灌注后，大鼠缺血侧脑皮质Notch1、Hes5、Mash1和NF-κB p65 mRNA及蛋白表达明显增强，电刺激小脑顶核后Notch1、Mash1和Hes5 mRNA及蛋白表达增强更明显，NF-κB p65 mRNA及蛋白表达增强则减弱。电刺激小脑顶核通过促进Notch1、Hes5和Mash1mRNA及蛋白表达和抑制NF-κB p65 mRNA及蛋白表达来影响神经干细胞增殖和分化。

8.期刊论文 陈小娱.白波 脑缺血损伤与神经干细胞 -泰山医学院学报2006,27(2)

传统观点认为中枢神经系统的神经元是一种终末细胞,缺乏再生修复能力.但近年来的研究发现,成年哺乳动物的脑组织仍然可以不断产生新的神经元

,从而证实了神经干细胞的存在.尽管新生神经元的数量较少,然而在病理情况下,这些神经元可能对脑功能的恢复起极其重要的作用.已有大量研究表明脑缺血损伤后,内源性神经干细胞大量增殖、迁移和分化,参与神经再生和脑组织功能的恢复.因此研究神经干细胞在脑缺血后的作用机制,为脑缺血的治疗提供了新的思路.

9.学位论文 唐巍 益气活血法和补肾生髓法对体外培养和脑缺血大鼠神经干细胞增殖分化的影响 2006

目的依据中医脑髓学说、气血相关理论和缺血性脑卒中“气虚血瘀”病机学说，借助益气活血法代表方脑络欣通和补肾生髓法代表方左归丸，比较观察两种不同中医治法对诱导神经干细胞增殖、分化，以及神经营养因子表达水平的影响，从神经干细胞增殖、分化和调控角度探讨不同中医治法在修复缺血性脑损伤中的作用及其机制。

方法1分离E14胎鼠大脑皮质及皮质下组织，通过原代细胞培养、传代、单细胞克隆和免疫细胞荧光化学方法，用神经干细胞的特异性巢蛋白单克隆抗体(神经上皮干细胞蛋白Nestin)、增殖细胞单克隆抗体(5-溴脱氧尿苷嘧啶BrdU)、神经细胞的特异性抗体(神经元特异性烯醇化酶NSE、胶质纤维酸性蛋白GFAP、半乳糖脑苷脂Gal-C)鉴定神经干细胞的自我更新增殖能力和多向分化潜能。

2分别采用脑络欣通药物血清和左归丸药物血清培养大鼠胚胎神经干细胞，观察其促增殖效应和诱导分化效应，应用相差显微镜和免疫荧光染色对其进行比较观察。

3线栓法制作急性局灶性脑缺血再灌注损伤动物模型，动物随机分为假手术组、模型组、脑络欣通组及左归丸组4组。在相应时间点进行脑缺血范围测定和神经缺损体征评分。在脑缺血再灌注1d、3d、7d后的3个不同时间点，应用免疫组织化学或免疫荧光化学技术，进行Nestin、BrdU单标染色及BrdU/GFAP、BrdU/NSE双标染色，分析比较各组大鼠脑组织中阳性细胞的表达情况。

4线栓法制作急性局灶性脑缺血再灌注损伤动物模型，动物随机分为假手术组、模型组、脑络欣通组及左归丸组4组。在脑缺血再灌注1d、3d、7d后的3个不同时间点，应用免疫组织化学技术，进行脑源性神经营养因子(BDNF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)免疫组化显色，在大鼠脑缺血后脑内有神经干细胞增生的相关区域，分析比较脑缺血后以及应用脑络欣通和左归丸后BDNF、bFGF的表达情况。

结果1从胎鼠大脑皮质及皮质下分离的组织，经原代和传代培养均可形成细胞克隆，并具有增殖的能力，表达巢蛋白抗原和增殖细胞抗原；在血清诱导下，分化后的细胞表达3种神经细胞(神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞)的特异性抗原。

2脑络欣通药物血清和左归丸药物血清均可诱导绝大多数神经干细胞分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞；前者诱导干细胞分化的进程虽比后者要慢，但其分化的神经元在细胞形态学上与发育成熟的神经元更为接近。此外，两者还能一定程度上促进培养的神经干细胞增殖，以后者促进神经干细胞增殖的效应较为显著。

3脑络欣通组和左归丸组均能缩小大鼠脑缺血范围，改善神经功能缺损体征，脑络欣通组作用强于左归丸组。脑缺血再灌注损伤后，Nestin、BrdU在不同时间点、在缺血侧的不同脑区出现程度不等的表达。与模型组比较，两治疗组Nestin、BrdU免疫阳性表达明显增强，3d时左归丸组促进Nestin、BrdU表达的作用较脑络欣通组显著，1d、7d时两组作用无明显差异。两治疗组在3d时可见少量BrdU/GFAP双标阳性细胞，在7d时可见少量BrdU/NSE双标阳性细胞，双标阳性细胞率以脑络欣通组为高。

4脑缺血再灌注损伤后，在脑内有神经干细胞增殖的相关区域，BDNF表达范围较广泛，表达强度较强，表达峰值出现较晚；bFGF表达范围较局限，表达强度较弱，表达峰值出现较早。与模型组比较，在给予脑络欣通和左归丸后，上述脑区内不同时间点BDNF、bFGF的表达数量明显增多、反应明显增强；两治疗组相比，前者促进BDNF表达上调的效应更为明显，表达峰值出现较晚；后者以促进bFGF表达上调的效应显著，其峰值出现较早。

结论脑络欣通和左归丸均能够促进神经干细胞增殖、分化。前者改善局部缺血病灶和神经功能缺损的作用以及促进神经干细胞分化的效应较强，后者促进神经干细胞增殖的效应较为显著。脑络欣通和左归丸促进神经干细胞增殖、分化的效应可能与促进相关神经营养因子的表达有关。前者以BDNF表达上调为主，后者以bFGF表达上调为著。

10.期刊论文 金玉玲.张晓梅.朱晓峰 移植神经干细胞在脑缺血大鼠损伤脑区的定向分化及其对运动功能的影响 -黑龙江医药科学2005,28(1)

目的:研究神经干细胞(NSCs)移植对大鼠脑缺血模型损伤脑区结构和功能的影响.方法:从新生的Wistar大鼠脑组织中分离、培养NSCs.制作大鼠脑缺血再灌注模型,24h后移植BrdU标记的NSC于梗死灶同侧的侧脑室.记录损伤和移植后的大鼠运动功能评分,研究移植后的NSC迁徙、定向分化的情况及其与宿主细胞间的关系.结果:大鼠NSCs移植后部分可在体内存活并迁徙至脑缺血病灶区,在缺血区内能分化成为神经元细胞并与宿主神经细胞形态一致,运动神经功能评分与对照组相比有统计学差异(P＜0.05).结论:移植的NSCs对缺血损伤脑区结构有修复作用,可改善脑缺血模型动物运动功能.

引证文献(3条)

1.高晓论 补阳还五汤联合清开灵注射液治疗急性高血压性脑出血30例临床观察[期刊论文]-河北中医 2010(12)

2.贾小庆.刘军明.王新芳.范志勇.田宁 补阳还五汤对脑梗死患者天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3影响的研究[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2010(4)

3.李国菁.严浩成.王行宽.孙桂香 补阳还五汤合六味地黄汤对局灶性脑缺血大鼠脑组织bFGF表达的影响[期刊论文]-中西医结合心脑血管病杂志 2010(9)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgzxyjhjjzz200901007.aspx
授权使用：qkzgz16(qkzgz16)，授权号：4b63f5e6-ad60-4be6-a3cb-9eec010b57eb
下载时间：2011年5月23日