

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

針灸促進幼鼠海馬結構在 Dexamethasone 傷害後神經細胞增  
生的研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-039-035-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中國醫藥大學中西醫結合研究所

計畫主持人：張永賢

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 26 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 針灸促進幼鼠海馬結構在 Dexamethasone 傷害後神經細胞增生的研究

計畫編號：NSC93-2320-B-039-035-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

主持人：張永賢 教授 中國醫藥大學中西醫結合研究所

共同主持人：簡基憲 教授 國立成功大學細胞生物暨解剖學研究所

### 中文摘要

合成的糖皮質類固醇(Dexamethasone, Dex)在新生兒臨床上常被用來促進早產兒肺部的成熟以降低呼吸器的使用時間、抑制肺部的炎症反應，並降低合併症的發生率，以提高存活率。Dex 的副作用除了造成高血壓、腸穿孔、心室肥大、代謝異常等外，最近的研究指出接受類固醇治療的早產兒會造成大腦灰質及大腦容量的減少，身高較矮、體重較輕、頭圍較小，並出現神經功能的異常。在動物實驗方面，接受高劑量類固醇治療之老鼠或猴子的海馬結構有明顯細胞數目減少及傷害的現象。本實驗室證實 Dex 給藥傷害新生兒神經系統的發育，給予產後一日齡的老鼠單一高劑量的 Dex 即可造成海馬迴及齒狀迴細胞的傷害。針灸是傳統醫學中的一種治療方式，近年來在動物實驗或臨床上證實針灸的療效。有更多的研究證實針灸足三里可以促進腦部缺血及糖尿病鼠海馬區細胞的增生。足三里是足陽明胃經的第 36 個腧穴(ST-36)，位於膝下三寸，長總趾伸肌與前脛骨肌間，距脛骨一橫指處。本實驗的目的在於探討針刺足三里能否改善糖皮質類固醇對早產兒所造成的神經傷害。於產後一日齡幼鼠腹腔注射單一高劑量的 Dex，第 7 日齡起針刺足三里以探討海馬迴細胞再生的能力。

5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)作為細胞增生的指標，結果顯示產後 7 日齡起針刺治療

的幼鼠其細胞增生的數目明顯的比未針刺組多。以 Neuronal nuclei (NeuN)和 Glial fibrillary acidic protein (GFAP)區別增生的前驅細胞是否分化成神經細胞或神經膠細胞，結果顯示各組前驅細胞分化成神經細胞或神經膠細胞星狀細胞的比率並無統計上明顯的差異。顯示針刺治療的確可以改善 Dex 造成海馬迴神經細胞的傷害，促進前驅細胞的增生。但無法決定新增的前驅細胞分化成神經細胞或神經膠細胞的機制。

### Abstract

Synthetic glucocorticoid-dexamethasone, have been widely used to accelerate pulmonary maturation and inhibit lung inflammation of preterm infants. However, follow-up studies showed that preterm infants received steroid therapy result in neurologic dysfunction, less cortical gray tissue and total brain volume. In our pilot studies, dexamethasone injected postnatal day one rat pups either with high (0.5 mg/kg) or low dose (0.2 mg/kg) result in the cellular irregularity, dendritic atrophy, increased number of pyknotic cells and vascularity in the hippocampus. The pathological changes can be observed predominantly in the CA1 subregion and the granular cell layer of dentate gyrus. Acupuncture has been applied in clinical treatment of various diseases in

Oriental medicine. Growing evidence shows acupuncture enhance cell proliferation in dentate gyrus either in the global ischemic gerbil, in maternally separates stressed rats, or in the diabetic rat. Zusanli (ST-36), an acupoint located 3 mm lateral and distal to the anterior tubercle of the tibia, has been examined in various studies and has been proved to have various effects, including efficacy in the treatment of cerebrovascular diseases in humans and animals. Therefore, purpose of the study is to evaluate the effect of acupuncture at ST-36 enhanced the cell proliferation of dexamethasone damaged neonatal hippocampal formation. Through the 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) immunocytochemic staining, our data show that dexamethasone inhibited cell proliferation and an increased number in the dentate gyrus of rats after acupuncture has been observed. The phenotype of BrdU positive cells were examined by double-labeling with the neuronal marker-NeuN, and astrocyte marker-GFAP. The percentages of cells colocalized with BrdU and NeuN in each group shows no virtually difference. The results will provide solid evidence to support that acupuncture treatment can improve the glucocorticoid damaged neuronal tissue. However the differentiation of precursor cells into neuron or glia cell needs further investigation.

**Key words:** Dexamethasone, Acupuncture, ST-36

## 前言

糖皮質類固醇(glucocorticoids)是緊迫(stress)狀態或炎症反應時由腎上腺皮質部分分泌的內分泌激素，在妊娠末期有促進肺泡發育成熟的功能(Munck et al., 1984)。美國 National Institute of Health (1944)建議出現早產症狀的妊娠婦女可使用合成的糖皮質類固醇來降低早產兒出生時所發生的呼吸

窘迫症候群。產後，合成的糖皮質類固醇 Dexamethasone (Dex)也常被用來促進早產兒的肺部成熟及抑制肺部的炎症反應 (Avery et al., 1985; Benini et al., 1990; Kothadia et al., 1999)，以減低呼吸窘迫症候群的發生率並降低呼吸器的使用時間 (Cummings et al., 1989; Kazzi et al., 1989)。Dex 的副作用除了造成高血壓、腸穿孔、心室肥大、代謝異常等等(Ferrara et al., 1990; Bensky et al., 1996)，最近的研究指出 Dex 治療的早產兒在兩歲時，其腦性麻痺的比率約為對照組的兩倍(Yeh et al., 1998)。前項研究繼續追蹤這群早產兒到達學齡期，結果接受 Dex 治療組相對於對照組其身高較矮、體重較輕、頭圍較小，動作發展及認知功能的評估都較差(Yeh et al., 2004)。Murphy et al. (2001)指出體重過低的早產兒接受類固醇治療，其大腦皮質灰質組織低於對照組 35%。大腦的海馬結構富含皮質類固醇受體，神經化學及電生理學的證據均指出內源性或外因性糖皮質類固醇濃度的上升會損傷海馬結構的神經細胞(Packan and Sapolsky, 1990)。慢性的緊迫狀態或長期的使用類固醇也可造成海馬迴神經細胞數目的減少 (Reagan et al., 1997)。

## 研究目的

為探討 Dex 的給藥對新生兒神經系統發育的影響，本實驗室在產後一日齡的幼鼠分別給予單一低劑量(0.2 mg/kg)或單一高劑量(0.5 mg/kg)的合成糖皮質類固醇 Dexamethasone。於第 7、21、35 日齡分別犧牲幼鼠並觀察海馬結構神經細胞的變化。結果發現齒狀迴神經細胞的排列出現去規則化、細胞間隙增加、血管增生，及濃染細胞出現的現象，神經細胞的數目與對照組相比有顯著的減少(Liu et al., 2002)。一日齡鼠腦的成熟度相當於 22-24 週齡的早產兒，七日齡的鼠腦成熟度相當於足日齡的胎兒 (Hagberg et al., 1997)。因此本實驗以新生幼鼠作為實驗動物探討 Dex 對新生兒神經系統的影響。

針灸是傳統醫學的治療方式之一，針灸

對於止痛，改善新陳代謝及腦部循環等都有顯著的療效(Cho et al., 1998; Shi et al., 1998; Zhang X et al., 1999; Kim et al., 2000)。足三里是十二經脈中足陽明胃經的第 36 個腧穴(ST-36)，位於膝下三寸，長總趾伸肌與前脛骨肌間，距脛骨一橫指處。足三里常被用來治療腸胃疾病，如針灸歌訣「四總穴」中最有名的「肚腹三里留」就是指腸胃問題、急慢性症狀，可由針刺足三里而獲得改善。但近年來不論是在動物實驗上或者是人類醫學臨床上都得到證實，刺激足三里穴可以用來治療、改善腦血管疾病。Cho et al. (2004)以針造成老鼠腦部的出血，再刺激足三里後證實，出血的區域會縮小。Kim et al. (2001, 2002) 及 Park et al. (2002) 證實齧齒類在短暫的大腦缺血，糖尿病及緊迫狀況下會造成齒狀迴顆粒細胞的傷害，但在手針足三里後可以促進齒狀迴顆粒細胞前驅細胞 (precursor granule cell) 的增生。因此，本實驗的目的在於探討針刺能否改善 Dex 對幼鼠齒狀迴神經細胞造成的傷害。本實驗的結果提供臨床上糖皮質類固醇對發育中神經傷害機制的探討。

#### 文獻探討

早產兒給與合成的糖皮質類固醇 (Dexamethasone, Dex) 可以改善肺功能，增加存活率 (Collaborative Dexamethasone Trial Group, 1991; Halliday, 1999)，相對的也傷害了神經組織 (Murphy et al., 2001; Yeh et al., 2004) 尤其是海馬結構 (Haynes, 2001)。Eriksson (1998); Kempermann (2000) 指出人海馬結構的齒狀迴在正常情況下會有新的神經細胞增生。Kuhn (1996); Gould (1999) 指出老鼠的海馬結構齒狀迴特別是在齒狀迴下區 subgranular zone (SGZ)，從幼鼠時期到 11 月大的成鼠都會有新的神經細胞增生。

針灸醫學是中國傳統醫學中重要的一環，在臨床上也有顯著的療效，如 Cho et al. (1998) 在人體腳底的穴位點刺激，再利用核磁共振顯影，經過穴位點刺激後在大腦皮質相對的位置有活化的現象，另外不在穴位點上刺激，核磁共振顯影則無活化的現象。Shi

et al. (1998) 在 Zusanli (ST-36) 以電針灸及手捻針的方式進行針灸，利用 Doppler 偵測發現兩種方式均會使腦脊髓膜的血流量增加，證實針灸會促進腦血液循環。上述的研究證明針灸可以改善血液循環、增加新陳代謝和止痛的效果。Kim et al. (2001) 結紮老鼠總頸動脈以造成腦部缺血，針刺足三里可使腦部缺血鼠海馬結構的齒狀迴細胞增生。Kim et al. (2002) 利用藥物誘發老鼠的糖尿病，針刺足三里也可使糖尿病鼠海馬結構的齒狀迴細胞增生。上述的研究皆發現針刺足三里可促使海馬結構的齒狀迴細胞增生，因此本實驗利用針刺探討 Dex 損傷的神經細胞是否具有再生的能力。

#### 研究方法

##### 一、實驗材料：

人類妊娠足月(38-40 週)時，胎兒的腦部發育到達尖峰(Dobbing, 1974)。但齧齒動物腦部發育的成長尖峰期是在出生後，剛出生一日齡的幼鼠腦部發育相當於人類妊娠 22-24 週齡的胎兒(Whitelaw, 2000)，產後 7 日齡(postnatal day 7)的幼鼠其腦部發育情形不論是腦部神經生長速率、神經化學傳遞物質的表現、腦電波圖形或者是突觸的形式都相當於人類妊娠足月齡(38-40 週) 胎兒的腦部發育情形(Hagberg et al., 1997)。因此本實驗以剛出生的大鼠(Wistar) 做為實驗動物，模擬人類早產兒的腦部發育。

##### 二、實驗步驟：

###### 1. 動物分組

實驗動物為大白鼠(Wistar)，懷孕母鼠來自成大醫學院動物中心，母鼠在 10-12 週齡體重為 250-280 公克時配種。在配種之後，觀察墊料中是否出現陰道白色塊狀物(vaginal plug)以判定是否配種成功。懷孕期約為  $21 \pm 1$  天，所以預產期為配種日期往後推算  $21 \pm 1$  天，達預產期時固定於早上 9 點觀察幼鼠是否出生。幼鼠於出生後的 24 小時內定義為產後第 1 天(postnatal day 1)，每胎幼鼠於產後第 1 天隨機分成以下四組：

	組別	處理方式
1	N/S 生理鹽水 對照組	P1: 腹腔注射等量生理鹽水
2	Dex 注射組	P1: 腹腔注射 Dex , 未給予針刺治療
3	Dex 注射 + 針刺治療	P1: 腹腔注射 Dex , 足三里穴針刺治療
4	Dex 注射 + 埋線治療	P1: 腹腔注射 Dex , 足三里穴埋線治療

## 2. 藥物處理

幼鼠於產後第 1 天，分別經腹腔給予合成的糖皮質類固醇 Dexamethasone (Oradexon, 4 mg/ml, Organon, Netherlands) 劑量為 0.5 mg/kg，亦即模擬早產兒接受 Dex 治療的劑量，對照組則給予等量生理鹽水。

## 3. 針刺處理

針刺治療的設計於產後第 7 天開始給予針刺。產後 7 日為模擬早產兒腦成熟度相當於足齡胎兒期(38-40 週)再給予針刺治療。針刺過程是以穴位探測器(Pointer-PAL, Taiwan)定出幼鼠足三里穴。針刺組(Dex+針刺組)以毫針(直徑 0.3mm)針刺。每隻幼鼠於早上 10 點針刺一次，每次留針 20 分鐘，針刺足三里入針約 2-3mm 深(Park et al., 2002)。埋線組(Dex+埋線)則在穴位點深層約 2-3mm 深處理入羊腸線，並於早上 10 點在埋線處刺激 20 分鐘。兩組皆連續治療 3 天。於治療後第 4 天，於產後 10 日齡(P7+3)時犧牲動物。

## 4. 動物犧牲

腹腔注射麻醉劑(pentobarbital, 1 mg/10g BW)麻醉，再由腹腔注射抗凝血劑-肝素(heparin, 1000unit/kg, LEO)。開胸將灌流針插入左心室，並剪開右心耳引流血液，以氧合的 37°C 生理鹽水(oxygenated, warm saline)經心灌流，沖淨動物體內血液，再以 4 %paraformaldehyde phosphate buffer pH7.4, 0.1M 灌流固定約二十分鐘，取出鼠腦置於濃度漸增(10、20 及 30%)

的蔗糖磷酸緩衝溶液(sucrose phosphate buffer)中做組織脫水、冷凍保護。取腦組織作連續的冷凍切片，腦組織以 O.C.T (Anatomical Pathology U.S.A)包埋，以冷凍切片機(Cryostat; Bright -5040)進行切片，每片厚度 40µm。切片進行以下的免疫組織化學反應。

## 5. 免疫組織化學反應法

### 5-1. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

#### 免疫化學反應

所有 Dex 注射組及對照組幼鼠於針刺治療後每天定時以腹腔注射方式給予 5- Bromo - 2'-deoxyuridine(BrdU ; 50 mg/kg in saline, Sigma)連續 3 天。BrdU 是細胞有絲分裂的主要指標，細胞分裂的過程中 BrdU 取代 DNA 的 thymidine 而標示出分裂中的細胞(Nowakowski, 1989)。故以 BrdU 陽性反應神經細胞作為細胞增生(cell proliferation)的指標。

### 5-2. Neuronal nuclei ( NeuN)免疫化學反應

Neuronal nuclei (NeuN)是 Mullen et al.於 1990 發展出來的一種單株抗體它會辨識神經細胞的蛋白，主要以神經細胞核為主，神經細胞質也會被標示出。NeuN 是神經細胞的指標，以它來探討 Dex 造成海馬迴神經細胞的傷害，以及針刺之後對神經細胞數目的影響。

### 5-3. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)免疫化學反應

Glial fibrillary acidic protein (GFAP)是屬於第三型中間絲維(class-III intermediate filament)，而神經膠細胞中的星狀細胞(astrocyte)主要由第三型中間絲維所構成，所以 GFAP 具有專一性來辨識神經膠細胞中的星狀細胞。以 GFAP 來探討 Dex 造成海馬迴神經膠細胞的影響，以及

針刺之後對神經膠細胞數目的影響。

#### 5-4. Double labeling 雙重免疫染色反應

首先以 BrdU 來探討前驅細胞 (precursor cell) 的差異，再以雙重免疫染色反應 (Double labeling) 探討前驅細胞轉變成神經元或者是神經膠細胞。第一個步驟 BrdU 免疫化學反應，將前驅細胞標示出來。第二個步驟以 NeuN 免疫化學反應來標示神經元細胞或 GFAP 免疫化學反應來標示神經膠星狀細胞，由不同的呈色劑可判別前驅細胞與神經細胞及神經膠細胞星狀細胞的區別，或者在同一細胞看到雙重呈色便可顯示出前驅細胞分化成神經細胞以及神經膠細胞星狀細胞。NeuN & BrdU 與 GFAP & BrdU double immunostaining 採用間接免疫組織化學法，參考 Lewellyn-Smith (1993) 所提的呈色方法。經過以上免疫組織化學反應的步驟，最後將組織切片貼在載玻片上自然陰乾，經酒精脫水，二甲苯 (xylene) 透明化，以封片膠蓋片。

#### 三、顯微技術及統計分析：

在 10 倍物鏡下攝影存檔，以 Image-pro plus (Media Cybernetics, USA) 分析 BrdU 陽性反應神經細胞數目佔齒狀迴區域面積的密度。每組取 6-8 隻，每隻幼鼠的腦組織切片是依據圖譜 (The Rat Brain compact third edition, Paxinos and Watson 1997) 位於 Bregma anatomical plate 31-35，相對於 Bregma -3.30~-4.30 的位置來篩選。將組織切片算出來的密度平均，進行統計分析。Gould, (1991) 提出在幼鼠的中隔海馬迴測量齒狀迴和 hilus 區的神經元密度最為穩定。統計分析利用 SPSS10.0 以 one-way ANOVA 統計分析注射 Dex 後給予針刺治療和未給予針刺治療神經細胞增生的變化，以 Post Hoc 檢定。

#### 實驗結果

本實驗以 BrdU 作為細胞增生的指標探

討針灸能否改善合成的醣皮質類固醇 Dex 對幼鼠海馬迴神經細胞造成的傷害。齒狀迴 BrdU 陽性反應的細胞佔海馬迴的大部份 (69 ± 2%)，故本實驗針對齒狀迴增生細胞的數目及其屬性來探討各組間的差異。

#### 一、5- Bromo - 2'-deoxyuridine (BrdU) 免疫化學反應

在 Dex 注射組，BrdU 陽性反應細胞的數目與注射生理食鹽水的對照組比較也有顯著的減少 (圖一)。注射 Dex 之後，再施以針刺的組與注射 Dex 未經針刺處理組相比則有增加的現象 (圖一)。注射 Dex 後穴位埋線組與注射 Dex 組相比，其 BrdU 陽性反應細胞的數目也有增加 (圖一)。統計分析後，注射 Dex 組 BrdU 陽性反應細胞的數目比對照組注射生理食鹽水組少 (表一)，且有顯著差異 ( $P < 0.05$ ) (圖二)。經注射 Dex 再給予穴位針刺或者是穴位埋線治療與注射 Dex 但未予任何治療比較，BrdU 陽性反應的細胞都較多 (表一)，且有顯著差異 ( $P < 0.05$ ) (圖二)。

#### 二、Neuronal nuclei (NeuN) 免疫化學反應

以 NeuN 的免疫組織化學反應作為神經細胞的指標。注射生理食鹽水的對照組，在齒狀迴上錐狀葉 (supra-pyramidal blade of dentate gyrus) 或齒狀迴下錐狀葉 (infra-pyramidal blade of dentate gyrus) 顆粒細胞的排列均相當規則、緻密；在顆粒層下區 (subgranular zone)，也有許多呈 NeuN 陽性反應的神經細胞，而且具有突起 (圖三)。注射 Dex 組，齒狀迴上錐狀葉與齒狀迴下錐狀葉的顆粒細胞的排列均失去規則，且其數目有顯著的減少。在顆粒層下區呈 NeuN 陽性反應的神經細胞也較少，且不具突起 (圖三)。注射 Dex 再給予針刺治療組，其齒狀迴上錐狀葉或者齒狀迴下錐狀葉顆粒細胞的數目比注射 Dex 組多且排列的也較具規則性。顆粒層下區呈 NeuN 陽性反應的神經細胞也有突起的出現 (圖三)。注射 Dex 再給予穴位埋線組與注射 Dex 組相比，型態上則沒有明顯的差異 (圖三)。以 one-way ANOVA 統計分析各組 NeuN 陽性反應細胞的數目；

注射 Dex 組與注射生理食鹽水組相比，數目有明顯減少(表二)，且有顯著差異 ( $P<0.05$ )(圖四)。注射 Dex 再給予針刺治療組與注射 Dex 組相比，有明顯的增加(表二)，且有顯著差異( $P<0.05$ )(圖四)。而經過注射 Dex 予以穴位埋線組與注射 Dex 組比較，NeuN 陽性反應的細胞數目雖有增加(表二)，但沒有統計上的差異(圖四)。

### 三、Glial fibrillary acidic protein (GFAP)免疫化學反應

以 GFAP 免疫組織化學反應作為神經膠細胞-星狀細胞的指標，在注射 Dex 組 GFAP 陽性反應的細胞數目與注射生理食鹽水對照組相比，數目明顯的減少(圖五)。注射 Dex 再給予針刺治療組與注射 Dex 組相比，GFAP 陽性反應的細胞數目有增加的現象(圖五)。統計分析，注射 Dex 組與注射生理食鹽水組，其 GFAP 陽性反應的細胞數目較少(表三)，具有顯著差異( $P<0.05$ )(圖六)。注射 Dex 再給予穴位針刺治療或者是在穴位埋線治療組分別與注射 Dex 組比較，GFAP 陽性反應的細胞數目較多(表三)，但不具統計上的差異(圖六)。

### 四、雙重免疫染色反應：

#### 1. NeuN 與 BrdU 雙重免疫組織化學反應

注射 Dex 組其 NeuN 與 BrdU 雙重染色的(圖七)陽性反應細胞數目比注射生理食鹽水對照組少(表四)。Dex 注射後再施以針刺組及穴位埋線組與注射 Dex 但未經任何處理組相比，NeuN 與 BrdU 的雙重染色陽性反應細胞數目有增加的現象(表四)。統計分析之後，具統計上的意義 ( $P<0.05$ )(圖八)。但 NeuN 與 BrdU 的雙重染色陽性反應細胞佔各自 BrdU 陽性反應細胞的比率(表五)，則無統計上的差異(圖九)。即各組前驅細胞分化成神經細胞的比率沒有統計上的差異。

#### 2. GFAP 與 BrdU 雙重免疫組織化學反應

注射 Dex 組其 GFAP 與 BrdU 雙重染色(圖十)陽性反應的細胞數目比注射生理

食鹽水對照組少(表六)。Dex 注射後，再施以針刺的組別及穴位埋線組與注射 Dex 未經任何處理組相比，GFAP 與 BrdU 的雙重染色陽性反應細胞數目也有增加的現象(表六)。統計分析之後，具統計上的意義 ( $P<0.05$ )(圖十一)。但 GFAP 與 BrdU 的雙重染色陽性反應細胞佔各自 BrdU 陽性反應細胞的比率(表七)，則沒統計上的差異(圖十二)。即各組的前驅細胞分化成神經膠細胞的星狀細胞的比率無統計上的差異。

### 討論

#### 1. 高劑量的 Dex—抑制海馬迴細胞的增生

產後 1 日齡的幼鼠注射高劑量(0.5 mg/kg)的 Dex，在產後 7 日齡，海馬迴細胞增生的數目都有明顯的減少，BrdU 陽性反應細胞每平方毫米的數目：生理鹽水對照組  $10539.78\pm 824.93$  注射 Dex 組  $4921.88\pm 510.70$ 。顯示出高劑量的 Dex 會抑制幼鼠海馬迴細胞的增生。Ambrogini (2002) 將兩個月齡的公鼠分別植入 100mg 的 corticosterone pellets 一或兩顆。結果持續高劑量皮質類固醇造成其齒狀迴錐狀葉以及 hilus 細胞增生的數目減少。Coe et al. (2003) 分別對妊娠早期及晚期的恆河猴 Rhesus monkey 進行為期六週的驚嚇刺激。這些受驚嚇刺激懷孕恆河猴與不受刺激懷孕恆河猴的子代比較，受驚嚇刺激恆河猴的子代血清的 cortisol 值比不受刺激恆河猴的子代高，且海馬結構齒狀迴細胞增生的數目有明顯的減少，其海馬迴的體積也明顯的減少。Kim et al. (2004) 將兩個月的成鼠由腹腔注射 Dex (0.1 mg/kg/day) 連續 9 天。結果 Dex 抑制成鼠海馬迴神經前趨細胞的增生。King (2004) 將產後 7 日齡的幼鼠與母鼠分離並放置於低溫處，及產後 30 日齡的幼鼠置於一個狹窄的空間(4x3x2 in.) 給予幼鼠一個緊迫(stress)的情境。結果跟不與母鼠分離且不放置於低溫處及置於狹窄空間的對照組相比，海馬結構齒狀迴細胞增生的數目都有明顯的減少。Kim et al. (2005) 將成鼠置於一個狹窄的空間(7cmx18cm)造成它們的緊迫

(stress), 結果成鼠血清的 cortisol 值升高, 而且海馬結構齒狀迴細胞增生的數目明顯的減少。本實驗以產後 1 日齡的幼鼠注射高劑量的 Dex, 跟上述研究持續給予皮質類固醇或以緊迫(stress)來誘發 cortisol 值都會抑制海馬迴細胞的增生。

## 2. 針刺足三里增進齒狀迴細胞增生的能力

Dex 造成海馬迴神經細胞的傷害, 再經由針刺足三里探討海馬迴區域細胞增生的能力。BrdU 陽性反應細胞每平方毫米的數目: 注射 Dex 組  $4921.88 \pm 510.70$ , 注射 Dex+針刺組  $9569.79 \pm 575.52$ 。亦即針刺足三里, 使海馬結構的齒狀迴因 Dex 的傷害後細胞增生的數目有增加的趨勢。Kim et al. (2001) 結紮老鼠總頸動脈以造成腦部缺血, 結果針刺足三里可使腦部缺血鼠海馬結構的齒狀迴細胞增生, 相對的在非足三里穴位刺激, 則得不到相同的效果。Kim et al. (2002) 利用藥物誘發老鼠的糖尿病, 得到針刺足三里可使糖尿病鼠海馬結構的齒狀迴細胞增生, 而在非足三里穴位刺激, 則得不到相同的效果。Jang et al. (2003) 將老鼠總頸動脈結紮造成腦部的缺血, 或利用藥物誘發老鼠的糖尿病, 以模擬人類各種不同的病態, 因這兩種疾病都會使腦中的一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase)減少。得到針刺足三里可使得海馬結構中的一氧化氮合成酶增加。Cho et al. (2004) 把針插入老鼠的腦中, 造成 striatum 的出血, 他們觀察到針刺足三里可使得 striatum 的出血區域縮小, 相對的刺非足三里穴則得不到相同的效果。本實驗以 Dex 造成海馬迴神經細胞的傷害, 再針刺足三里得到齒狀迴的細胞增生的結果, 跟上述以老鼠模擬各種不同的病態然後針刺足三里, 都能達到治療與促使海馬迴的細胞增生的結果是一致的。

## 3. 針刺足三里增進齒狀迴神經細胞的數目

Dex 造成海馬迴神經細胞的傷害, 結果注射 Dex 組 NeuN 陽性反應的細胞數目, 與注射生理食鹽水組相比, 數目明顯減少, NeuN 陽性反應細胞每平方毫米的數目: 生理鹽水對照組  $2954.22 \pm 102.91$ , 注射 Dex 組

$2051.98 \pm 143.08$ 。而注射 Dex 再給予針刺治療組 NeuN 陽性反應的細胞數目與 Dex 組相比, 有明顯的增加, 注射 Dex+針刺組  $2720.19 \pm 84.79$ 。顯示針刺足三里刺激齒狀迴神經細胞數目的增加。Jang et al. (2003) 將老鼠總頸動脈結紮造成腦部的缺血, 利用 TUNEL 免疫組織化學(細胞凋亡的指標) 反應, 結果針刺足三里可使腦部缺血鼠海馬結構的 CA1 齒狀迴細胞凋亡的數目減少。Cho et al. (2004) 把針插入老鼠的腦中造成 striatum 的出血, 亦利用 TUNEL 免疫組織化學反應, 他們得到針刺足三里可使得 striatum 細胞凋亡的數目減少, 相對的刺非足三里穴, 則得不到相同的效果。Kim et al. (2005) 將 6-hydroxydopamine (6-OHD) 注入老鼠腦中, 而 6-OHD 是一種神經毒素, 它會選擇性的傷害 nigral dopaminergic neuron 導致 dopamine 的分泌減少。再利用 Tyrosine hydroxylase (TH) 免疫組織化學反應-以偵測 dopaminergic neuron 的死亡, 得知經 6-OHD 的毒害, 再針刺足三里可使 dopaminergic neuron 細胞死亡的數目減少。相對的沒有刺激到足三里穴位, 則得不到相同的效果。經上述的實驗證實針刺足三里可以抑制細胞的死亡, 本實驗顯示針刺足三里使齒狀迴神經細胞的數目增加, 我們推論跟上述的實驗一樣針刺足三里可以抑制細胞的死亡, 而使得齒狀迴神經細胞數目增加, 但本實驗無法直接證明神經細胞的數目增加是因神經元細胞死亡的減少或增生較多所造成的結果。

## 4. 高劑量的 Dex 造成海馬迴神經細胞的傷害, 但 CA3 區神經細胞僅有限的傷害

本實驗以 Dex 造成海馬迴神經細胞的傷害。結果注射 Dex 組, NeuN 陽性反應的細胞數目, 與注射生理食鹽水組相比, 其數目有明顯減少, NeuN 陽性反應細胞每平方毫米的數目: 生理鹽水對照組  $2954.22 \pm 102.91$ , 注射 Dex 組  $2051.98 \pm 143.08$ 。Hassan (1996) 在不同月齡的老鼠注射  $60 \mu\text{g}/\text{kg}$  Dex, 結果顯示注射 Dex 與對照組比較, 海馬結構神經細胞的凋亡數目明顯增加。

Haynes et al. (2001)從老鼠腹腔注射不同劑量的 Dex，結果顯示海馬結構的神經元細胞凋亡數目會隨著 Dex 的劑量增加而增加。上述研究與本實驗 Dex 造成海馬迴神經細胞的傷害的結果是一致的。在 NeuN 的免疫組織化學反應中，海馬結構 CA3 區域的神經細胞，在給予 Dex 後的傷害有限。Reul (1985)指出老鼠海馬結構富含兩種皮質類固醇接受器(receptor)，包括了礦物質類固醇接受器(mineralocorticoid receptor)和糖皮質類固醇接受器(glucocorticoid receptor)。而且糖皮質類固醇(glucocorticoid) 主要會跟糖皮質類固醇接受器結合。Packan and Sapolsky (1990)指出糖皮質類固醇經由糖皮質類固醇接受器直接結合造成的傷害遠大於間接的傷害。Yu et al. (2004)培養老鼠 16.5 胚齡的海馬迴細胞，再給予濃度  $5 \mu\text{M}$  Dex，並給予 RU38486-糖皮質類固醇接受器的拮抗劑，證明加入 RU38486 可以提高海馬迴細胞因 Dex 造成細胞增生能力的減少。Kim et al. (2004) 將兩個月的成鼠從腹腔注射 Dex (0.1 mg/kg/day)連續 9 天，並給予 RU38486。證明加入 RU38486 可以提高海馬迴神經性前趨細胞因 Dex 造成細胞增生能力的減少。Patel and Bulloch (2003)，利用免疫螢光反應標定出位於老鼠海馬迴的糖皮質類固醇第二型接受器(Type II glucocorticoid receptor)。指出老鼠海馬迴中 CA1 區域糖皮質類固醇第二型接受器最多，其次是齒狀迴的顆粒細胞層(granule cell layer)，CA3 區域的糖皮質類固醇第二類型的接受器。而 Dex 是糖皮質類固醇第二型接受器的催動劑，因此高劑量的 Dex 無法直接藉由糖皮質類固醇第二型接受器來傷害 CA3 區域的神經細胞，故 CA3 區域的神經細胞受損較為有限，這跟本實驗的結果是吻合的。

#### 5. 足三里埋線治療對齒狀迴細胞增生沒有明顯的效果

穴位埋線治療是結合針灸療法及現代醫學的工具，而衍生出一種中西整合的新方法，將可被人體吸收的羊腸線，透過針具將其埋入腧穴中。埋入的線體可在人體內被

軟化、分解、液化及吸收，此一過程對腧穴產生的生理、物理及生化刺激，在線還沒被吸收前持續在體內對腧穴產生刺激。由於腧穴埋線是改良於傳統的針灸方式，其原理和針灸相同，埋線針及羊腸線也都需經過特殊處理。臨床上腧穴埋線有減肥、美白效果。但有關腧穴埋線用於動物實驗及臨床報告都相當有限。在本實驗中注射 Dex 之後再以腧穴埋線治療，對齒狀迴細胞增生並沒有顯著的結果，可能因腧穴埋線沒有得氣的效果，也就是說針刺之後的痠、麻、腫、脹感。而腧穴埋線我們是在穴位埋線之後再以手指按摩，相對針刺來說，得氣沒那麼明顯。Kim et al. (2000)利用電針及手捻針來探討老鼠對於痛覺的差別，他們指出利用手捻針加上電針的老鼠比只有電針老鼠對於痛覺閾值更為提高，證實手捻針更有達到針灸的效果。這跟我們的實驗結果-以手捻針治療有較好的效果是一致的。

#### 6. 高劑量的 Dex 抑制神經膠星狀細胞的增生

在本實驗中發現注射 Dex 後 GFAP 陽性反應的細胞明顯減少，GFAP 陽性反應細胞每平方毫米的數目：生理鹽水對照組  $3100.44 \pm 255.29$ ，注射 Dex 組  $2219.24 \pm 193.60$ 。Grossin (1997) 以產後 3-4 日齡幼鼠前腦的星狀細胞作細胞培養，加入不同劑量的 Dex，結果顯示星狀細胞增生的數量會依 Dex 劑量增加而減少。Pousset (1999)以產後 2 日齡幼鼠腦的星狀細胞作細胞培養，以 ELISA 檢測 Dex 是否抑制星狀細胞 IL-6 mRNA 合成及分泌，IL-6 是藉由星狀細胞活化發炎 inflammatory cytokine 的產物，亦即糖皮質類固醇會抑制星狀細胞的活性。本實驗顯示 Dex 抑制星狀細胞的增生跟上述實驗的結果是一樣的。Seri et al. (2001)利用轉植基因 Gtva 的成鼠，這種轉植基因 Gtva 的老鼠於海馬迴呈 GFAP 陽性反應細胞會有 RCAS-AP 鳥類病毒接受器，當老鼠被注射 RCAS-AP 鳥類病毒後，結果在齒狀迴神經細胞呈 RCAS-AP 陽性反應細胞。顯示齒狀迴顆粒層下的前驅細胞當在呈現 GFAP 陽

性反應時，在正常情況下也會分化成神經細胞。他們認為此區的星狀細胞可能是海馬迴區域顆粒層神經細胞的前驅細胞。與本實驗觀察到高劑量的 Dex 會抑制幼鼠海馬迴細胞的增生相吻合。

### 7. 針刺治療 Dex 造成的神經傷害只能影響前驅細胞的數目，無法決定前驅細胞分化成神經細胞或神經膠細胞

進一步探討增生的前驅細胞可分化成神經細胞或是神經膠細胞，由 NeuN 與 BrdU 雙重免疫化學反應以及 GFAP 與 BrdU 雙重免疫化學反應的實驗結果。各組前驅細胞分化成神經細胞或神經膠細胞的星狀細胞的比率無統計上的差異。顯示注射單一劑量的 Dex 和短期針刺治療只能影響到前驅細胞數目的多寡，但卻無法決定這些新增的前驅細胞分化成神經細胞或神經膠細胞的星狀細胞。Yu et al. (2004) 以 16.5 胚齡老鼠的海馬迴細胞來培養並給予不同濃度的皮質類固醇(corticosterone)，結果細胞增生 BrdU 陽性反應的數目隨著皮質類固醇的濃度增加而減少。TUNEL(細胞凋亡的指標)陽性反應的細胞數目亦隨著皮質類固醇的濃度增加而增加。海馬迴細胞的培養給予濃度  $5 \mu\text{M}$  Dex 跟對照組比較。結果細胞增生 BrdU 陽性反應的數目明顯的減少。但 Dex 的給予跟對照組比較。前驅細胞分化成神經細胞的比率是沒統計上的差異，顯示出 Dex 無法影響前驅細胞分化的能力。Kim et al. (2004) 將兩月齡的成鼠由腹腔注射 Dex(0.1 mg/kg/day)連續 9 天。結果 BrdU 陽性反應的細胞數目明顯的減少，顯示 Dex 會抑制成鼠海馬迴神經性前趨細胞的增生。而在 NeuN 與 BrdU 雙重免疫化學反應上，雙重染色細胞佔 BrdU 陽性反應細胞的比率無統計上的差異，顯示 Dex 無法影響前驅細胞分化成神經細胞的能力。上述兩個實驗不論是在細胞培養或動物實驗均顯示 Dex 無法影響前驅細胞分化的能力，跟本實驗的結果是吻合的。

### 結論

臨床上對皮質類固醇所造成的副作用

如 Cushing's syndrome、憂鬱症及其他精神症狀等(Brown et al., 1999)尚無有效的、積極的治療方式。經由本實驗可以證實針刺可以減少合成的醣皮質類固醇造成海馬迴神經細胞的傷害，促進神經細胞的增生。其結果可供臨床上治療皮質類固醇導致神經傷害的參考。

### 附表及附圖

表一、BrdU 陽性反應細胞每平方毫米的數目

組別	BrdU(+) cells/mm <sup>2</sup>
生理鹽水對照組	10539.78±824.93
注射 Dex 組	4921.88±510.70
注射 Dex+針刺組	9569.79±575.52
注射 Dex+埋線組	7744.96±523.23

表二、NeuN 陽性反應細胞每平方毫米的數目

組別	NeuN(+) cells/mm <sup>2</sup>
生理鹽水對照組	2954.22±102.91
注射 Dex 組	2051.98±143.08
注射 Dex+針刺組	2720.19±84.79
注射 Dex+埋線組	2053.99±143.61

表三、GFAP 陽性反應細胞每平方毫米的數目

組別	GFAP(+) cells/mm <sup>2</sup>
生理鹽水對照組	3100.44±255.29
注射 Dex 組	2219.24±193.60
注射 Dex+針刺組	2687.77±250.84
注射 Dex+埋線組	2289.79±221.59

表四、NeuN 與 BrdU 雙重染色反應的細胞數目每平方毫米的數目

組別	NeuN(+)&BrdU(+) cells/mm <sup>2</sup>
生理鹽水對照組	2734.25±172.89
注射 Dex 組	1066.22±102.99
注射 Dex+針刺組	2304.24±252.74
注射 Dex+埋線組	1868.24±213.45

表五、 NeuN 與 BrdU 雙重染色反應的細胞  
數目佔 BrdU 陽性反應的細胞的比率

組別	NeuN(+)&BrdU(+) cells/BrdU(+)
生理鹽水對照組	25.89%±1.24%
注射 Dex 組	22.23%±1.35%
注射 Dex+針刺組	23.86%±1.31%
注射 Dex+埋線組	24.33%±1.98%

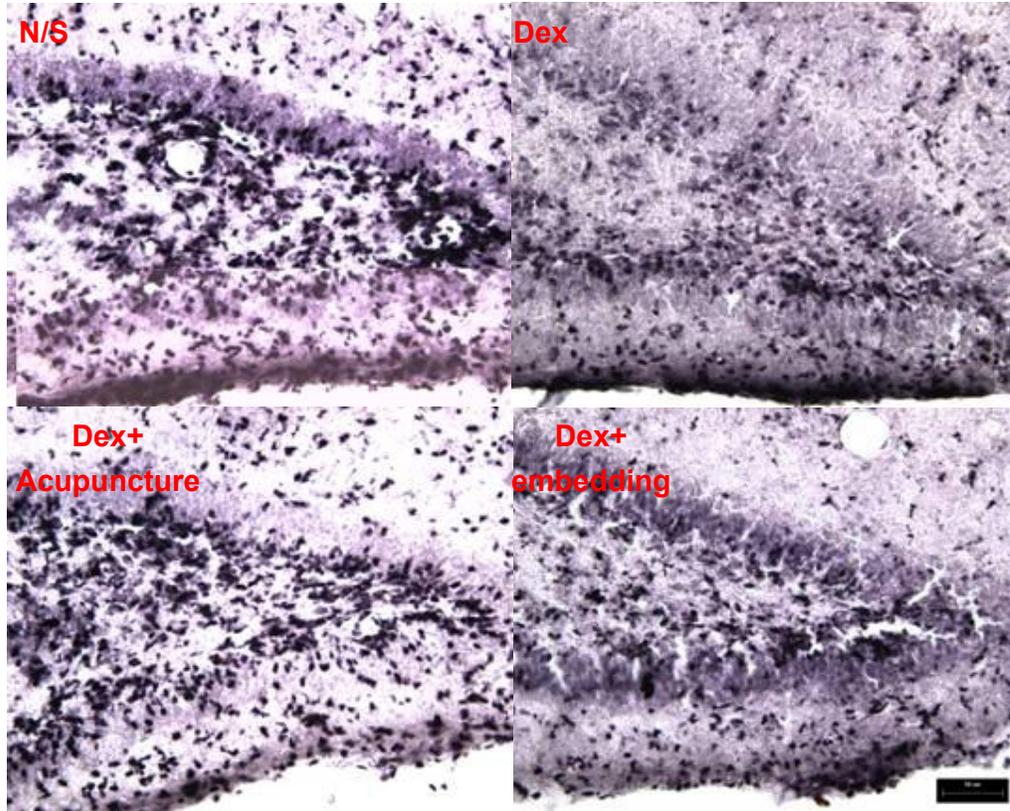
表六、 GFAP 與 BrdU 雙重染色反應的細胞  
數目每平方毫米的數目

組別	GFAP(+)&BrdU(+) cells/mm <sup>2</sup>
生理鹽水對照組	2142.96±164.89
注射 Dex 組	881.39±107.23
注射 Dex+針刺組	1985.01±189.81
注射 Dex+埋線組	1593.33±142.89

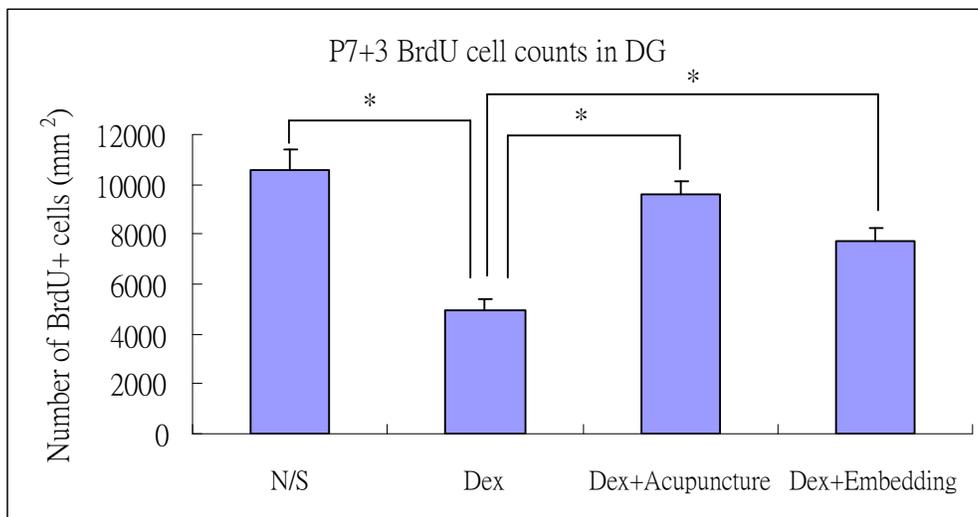
表七、 GFAP 與 BrdU 雙重染色反應的細胞  
數目

佔 BrdU 陽性反應的細胞的比率

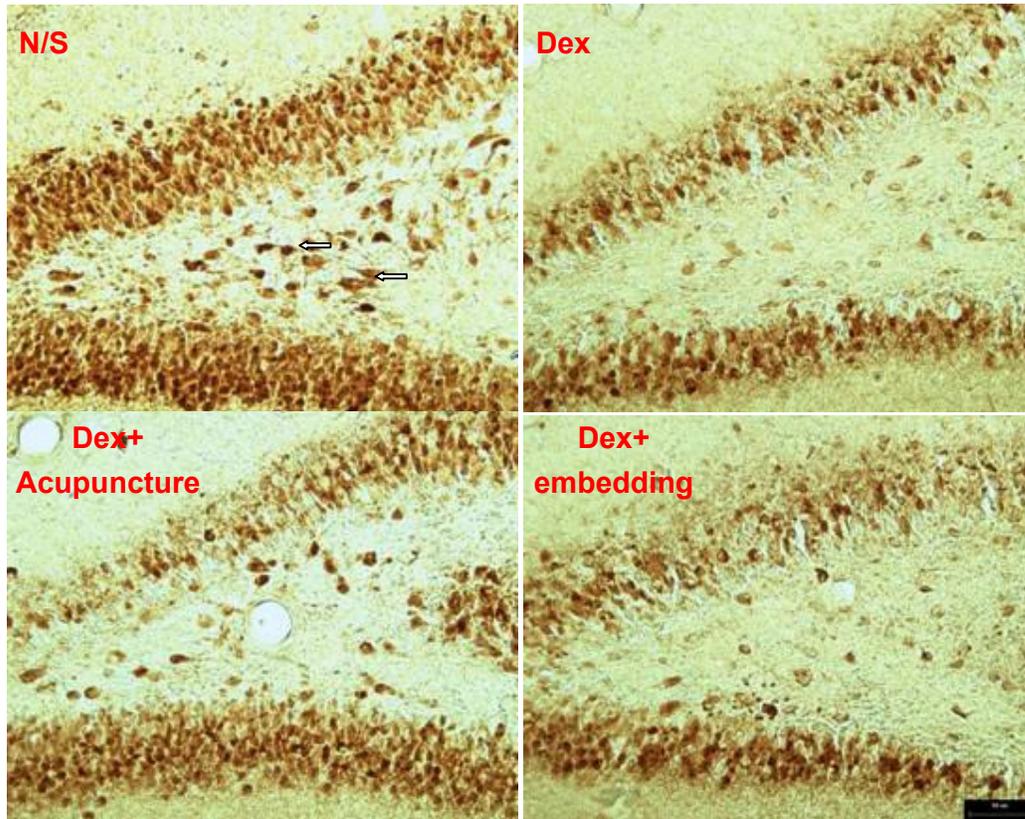
組別	GFAP(+)&BrdU(+) cells/BrdU(+)
生理鹽水對照組	19.19%±0.58%
注射 Dex 組	18.38%±0.78%
注射 Dex+針刺組	20.86%±0.73%
注射 Dex+埋線組	21.01%±1.06%



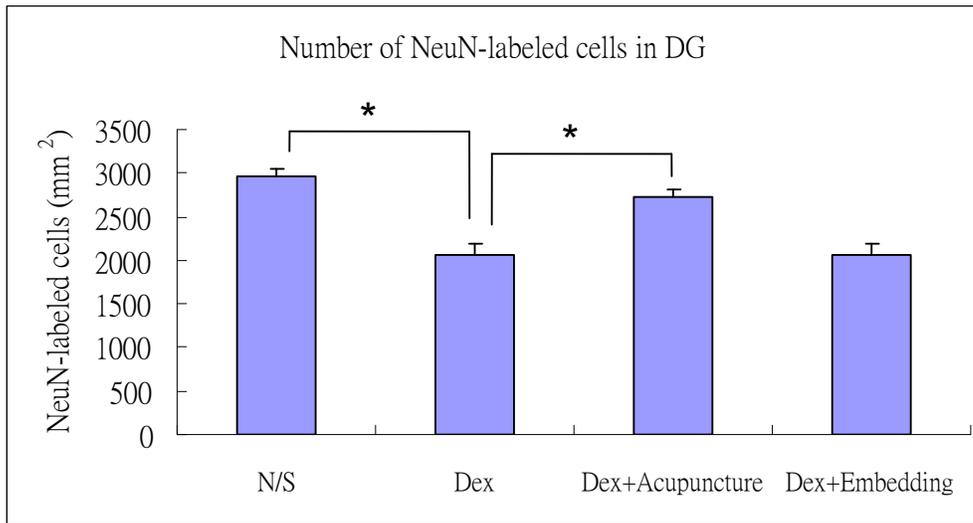
圖一、各組 BrdU 陽性反應細胞（黑點）分佈圖。注射 Dex 之後，跟對照組比較其數目明顯的減少。Dex 注射後再針刺治療和穴位埋線治療的組別，BrdU 陽性反應的細胞數目與注射 Dex 之後未經任何處理的組別比較，數目有明顯的增加。（N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex+embedding 為注射 Dex+埋線組）（游標尺：50  $\mu$ m）



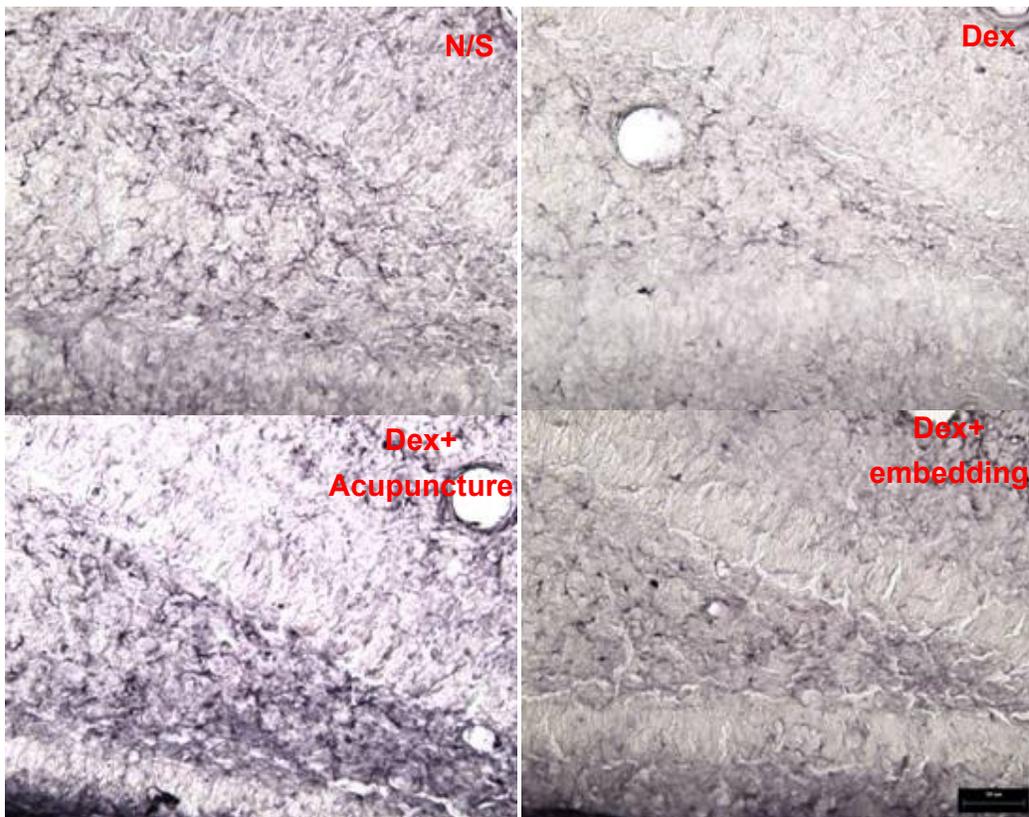
圖二、各組 BrdU 陽性反應細胞每平方毫米的數目。注射 Dex 組別的 BrdU 陽性反應的細胞數目少於對照組，有顯著差異 (\*  $P < 0.05$ ) 注射 Dex 再給予針刺治療組的 BrdU 陽性反應的細胞數目比注射 Dex 組多且有顯著差異 (\*  $P < 0.05$ ) 穴位埋線組與注射 Dex 組別比較，BrdU 陽性反應的細胞數目也有增加，有顯著差異 (\*  $P < 0.05$ ) (N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex+embedding 為注射 Dex+埋線組)圖中顯示之值為平均值±標準誤差。



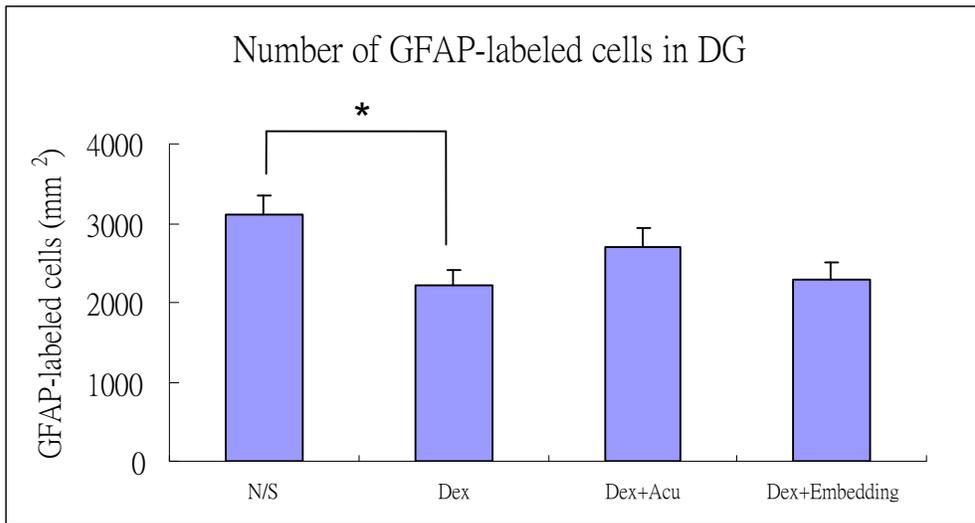
圖三、各組 NeuN 陽性反應細胞分佈圖。在注射生理食鹽水組，在齒狀迴上葉或者下葉的顆粒細胞均排列的相當整齊、緻密；另外在顆粒層下區域，也有許多神經細胞被染出，而且具有突起（箭號）。注射 Dex 組，齒狀迴上葉、下葉的顆粒細胞均排列的很不規則，而且數目明顯的減少，在顆粒層下區域的神經細胞也較少，且不具突起。針刺治療組齒狀迴上下葉的顆粒細胞數目比注射 Dex 組多且排列較規則，在顆粒層下區域的神經細胞也有突起的出現。穴位埋線組與注射 Dex 組比較，型態上則較沒有明顯的差異。(N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex+embedding 為注射 Dex+埋線組) (游標尺:  $50 \mu\text{m}$ )



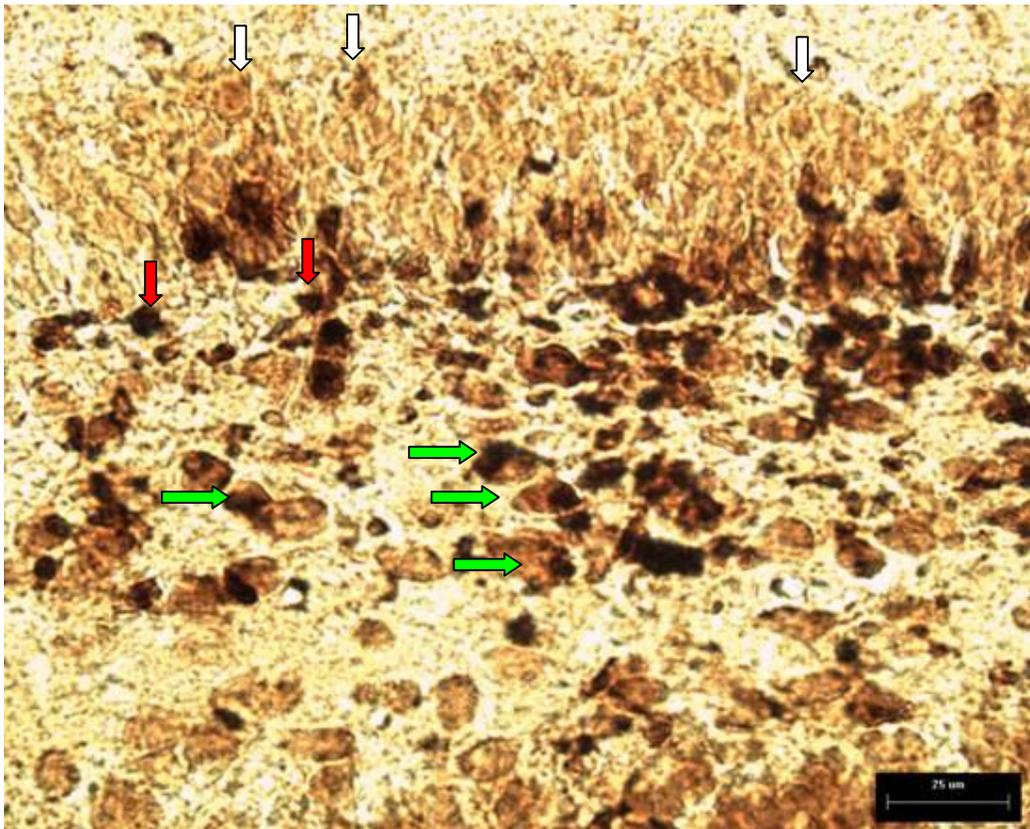
圖四、各組 NeuN 陽性反應細胞每平方毫米的數目。注射 Dex 後，跟對照組比較其數目明顯的減少且有顯著差異 (\*  $P < 0.05$ )。Dex 注射後再針刺治療組，NeuN 陽性反應的細胞數目與有注射 Dex 後未經任何處理組比較其數目有明顯的增加且有顯著差異 (\*  $P < 0.05$ )。膻穴位埋線組與注射 Dex 組別比較，NeuN 陽性反應的細胞數目雖有增加但沒有統計上的差異。(N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex+embedding 為注射 Dex+埋線組)圖中顯示之值為平均值±標準誤差。



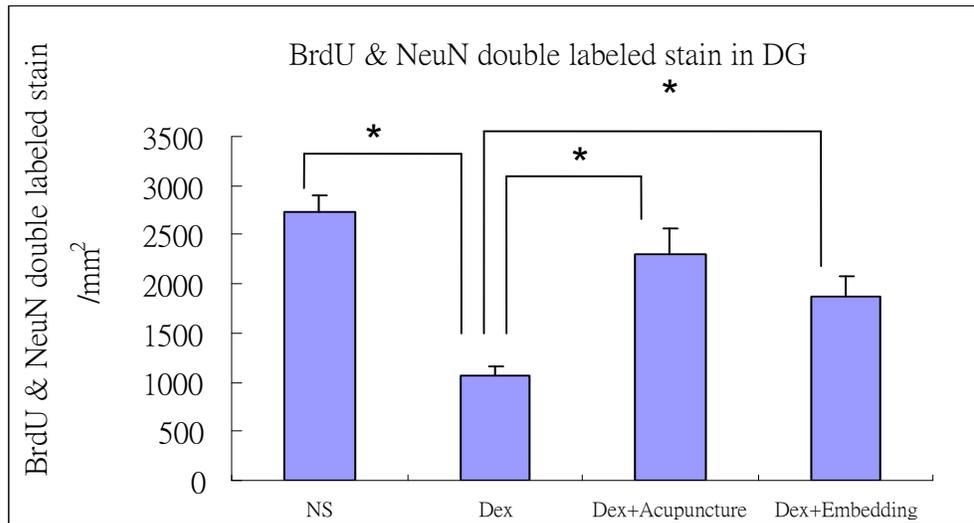
圖五、各組 GFAP 陽性反應細胞分佈圖。注射 Dex 之後，與對照組比較，GFAP 陽性反應的細胞數目明顯的減少。Dex 注射後再針刺治療組，GFAP 陽性反應的細胞數目與注射 Dex 後未經任何處理組比較，數目有明顯的增加。(N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex+embedding 為注射 Dex+埋線組)。(游標尺:  $50 \mu\text{m}$ )



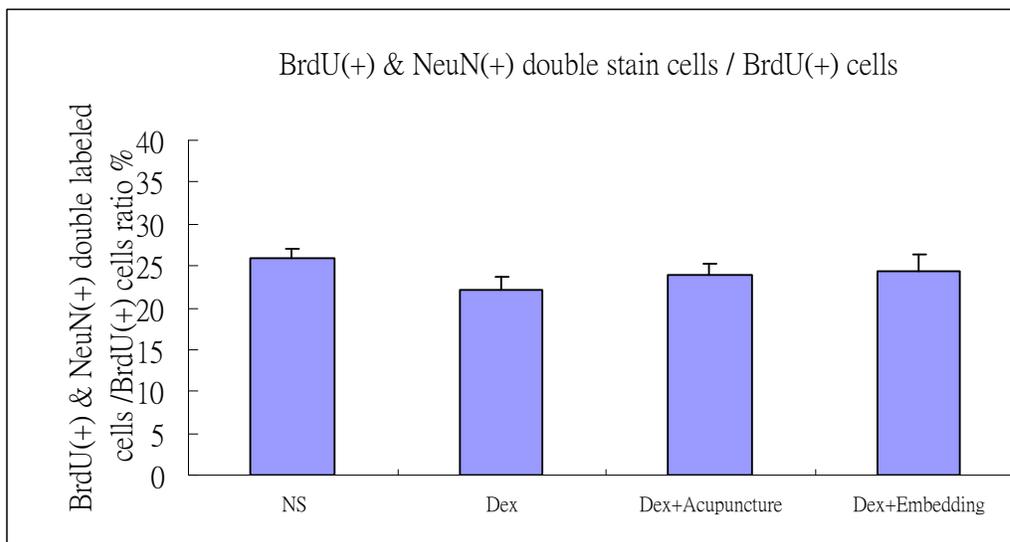
圖六、各組 GFAP 陽性反應細胞每平方毫米的數目。注射 Dex 組與對照組比較其數目明顯的減少，有顯著差異 (\* $P < 0.05$ )。Dex 注射後再針刺治療組，GFAP 陽性反應的細胞數目跟注射 Dex 後未經任何處理組比較，數目雖有增加但沒有統計上的差異。(N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex+embedding 為注射 Dex+埋線組)圖中顯示之值為平均值±標準誤差。



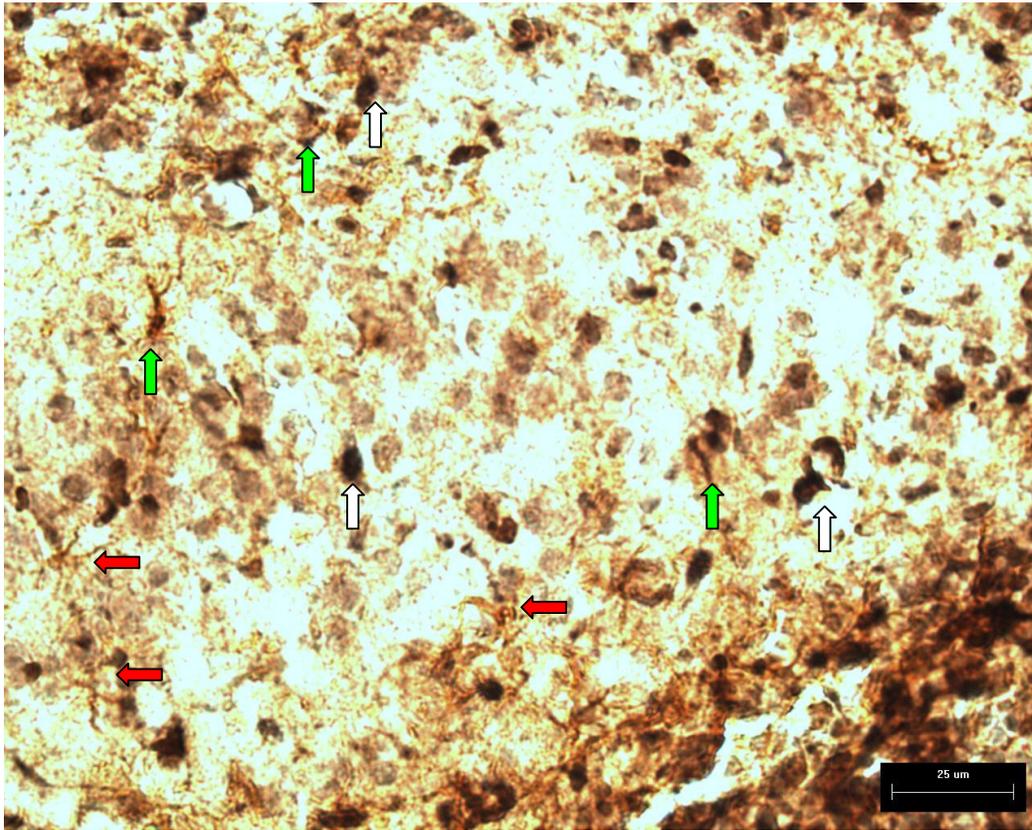
圖七、白色箭頭為 NeuN 陽性反應的細胞，紅色箭頭為 BrdU 陽性反應的細胞，綠色箭頭為 NeuN 與 BrdU 雙重染色反應的細胞。(游標尺: 25  $\mu\text{m}$ )



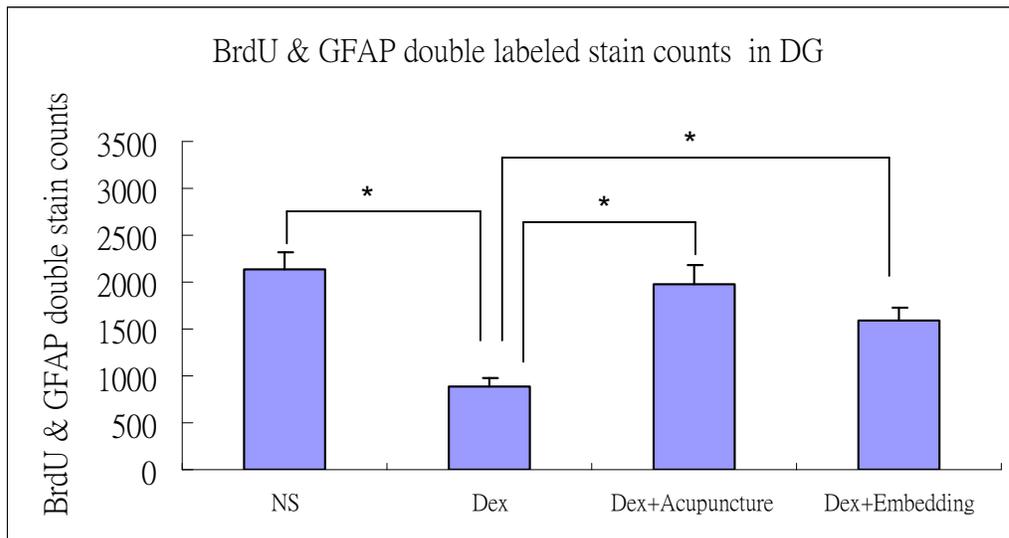
圖八、各組 NeuN 與 BrdU 雙重染色反應每平方毫米的數目。Dex 注射組與對照組比較其數目明顯的減少且有顯著差異 (\*  $P < 0.05$ )。注射 Dex 再給予針刺治療組的 NeuN 與 BrdU 雙重染色反應的細胞數目比 Dex 注射組多，也有顯著差異 (\*  $P < 0.05$ )，而穴位埋線組與 Dex 注射組別比較，NeuN 與 BrdU 雙重染色反應的細胞數目也有增加，有顯著差異 (\*  $P < 0.05$ ) (N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex+embedding 為注射 Dex+埋線組)圖中顯示之值為平均值±標準誤差。



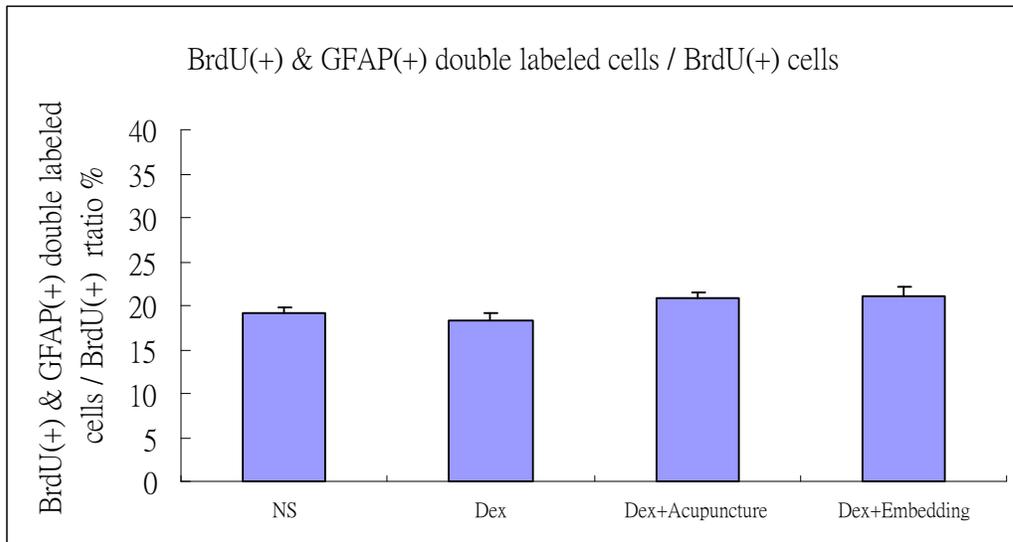
圖九、各組 NeuN 與 BrdU 雙重染色反應的細胞數目分別佔 BrdU 陽性反應的細胞的比率。雙重染色細胞佔各自 BrdU 陽性反應細胞的比率，則是沒統計上的差異。(N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex+embedding 為注射 Dex+埋線組)



圖十、齒狀迴區域 GFAP 與 BrdU 雙重染色: 白色箭頭為 BrdU 陽性反應的細胞, 紅色箭頭為 GFAP 陽性反應的細胞, 綠色箭頭為 GFAP 與 BrdU 雙重染色反應的細胞。(游標尺:  $25\ \mu\text{m}$ )



圖十一、各組 GFAP 與 BrdU 雙重染色反應每平方毫米的數目。Dex 注射組與對照組比較其數目明顯的減少且有顯著差異 ( $*P < 0.05$ )。注射 Dex 再給予針刺治療組的 GFAP 與 BrdU 雙重染色反應的細胞數目比 Dex 注射組多, 也有顯著差異 ( $*P < 0.05$ ) 而穴位埋線組與 Dex 注射組別比較, NeuN 與 BrdU 雙重染色反應的細胞數目也有增加, 有顯著差異 ( $*P < 0.05$ )。(N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex + embedding 為注射 Dex+埋線組)圖中顯示之值為平均值 $\pm$ 標準誤差。



圖十二、各組 GFAP 與 BrdU 雙重染色反應的細胞數目分別佔 BrdU 陽性反應的細胞的比率。雙重染色細胞佔各自 BrdU 陽性反應細胞的比率，則是沒統計上的差異。(N/S 為生理鹽水對照組、Dex 為注射 Dex 組、Dex+Acupuncture 為注射 Dex+針刺組、Dex+embedding 為注射 Dex+埋線組)