

神经干细胞NgR基因沉默立体定向移植治疗大鼠脑损伤*

王东, 张建军, 马景鑑

Stereotaxic intracerebral transplantation of neural stem cells with Nogo-66 receptor gene silencing for treating traumatic brain injury in rats

Wang Dong, Zhang Jian-jun, Ma Jing-jian

Abstract

BACKGROUND: Neural stem cells (NSCs) have the potential of self-proliferation and multiple directional differentiation, and can differentiate into various cells in the neural system under a certain condition. Therefore, NSCs have good prospect in repair of nerve injury. However, RNA interference avoids the abuse of permanent gene silencing, and is hopeful to combine with NSC transplantation for treating craniocerebral injury.

OBJECTIVE: To determine whether the Nogo-66 receptor (NgR) gene silencing in NSCs can enhance curative effects of stereotaxic intracerebral transplantation of NSCs on traumatic brain injury (TBI) in rats.

METHODS: A total of 60 male Wistar rats following TBI establishment were randomly assigned to 3 groups ($n = 20$). In the experimental group, NgR gene silencing NSC suspension (6 μ L) was injected into rat brain tissue following 24 hours of model induction. In the control group, an equal volume of NSC suspension was infused by the same method. In the blank group, an equal volume of medium without stem cells was infused by the same method. At 24 hours, 3 days, 1 and 2 weeks following injury, neurological deficits were scored. Two weeks later, animals were sacrificed and subjected to immunohistochemistry and hematoxylin-eosin staining.

RESULTS AND CONCLUSION: Following transfection of small interfering RNA, compared with control group, NgR gene protein expression was significantly reduced in the experimental group. At 1 and 2 weeks following transplantation, neurological deficit score was significantly less in animals undergoing NSC transplantation in the experimental group compared with the control group ($P < 0.05$). Moreover, neuron number in the brain tissue sections of experimental group was significantly more than in the control group ($P < 0.01$). At 2 weeks following injury, hematoxylin-eosin staining showed that brain tissue breakage at damaged site as scar connection, remarkable porosis in the blank group; typical morphological changes as neural cells at the transplanted site in the control group; typical morphological changes as neural cells without cavity in the experimental group. Immunohistochemistry showed (37.92 \pm 16.02) BrdU-labeled positive cells/high-power field in the blank group, (89.68 \pm 15.34) cells/high-power field in the control group, and (102.67 \pm 13.52) cells/high-power field in the experimental group. Significant differences were detected between groups ($P < 0.01$). The above-mentioned results indicated that the NSCs of NgR gene silencing transplanted into the injured cerebral tissues can significantly improve the neurological function in rats with TBI.

General Hospital,
Tianjin Medical
University, Tianjin
300052, China

Wang Dong★,
Studying for master's
degree, Associate
chief physician,
General Hospital,
Tianjin Medical
University, Tianjin
300052, China
5609@hotmail.com

Correspondence to:
Ma Jing-jian, Doctoral
supervisor, General
Hospital, Tianjin
Medical University,
Tianjin 300052,
China

Received: 2009-10-14
Accepted: 2009-12-14

Wang D, Zhang JJ, Ma JJ. Stereotaxic intracerebral transplantation of neural stem cells with Nogo-66 receptor gene silencing for treating traumatic brain injury in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(14): 2539-2544. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 神经干细胞具有自我增殖能力和多向分化潜能, 一定条件下可以分化成神经系统的各种细胞, 因此在神经损伤修复方面有着良好的应用前景。而 RNA 干扰避免了永久基因沉默的弊病, 最有希望与神经干细胞移植相结合治疗颅脑损伤。

目的: 检测是否可以通过沉默 NgR 基因的方法提高神经干细胞立体定向移植对重型颅脑损伤大鼠的治疗效果。

方法: 60 只雄性 Wistar 大鼠制成重型液性脑挫伤模型后随机区组法分为 3 组, 每组 20 只。实验组: 造模 24 h 后向损伤的大鼠脑组织内注射 NgR 基因沉默的神经干细胞悬液 6 μ L; 对照组: 同法注射等量的神经干细胞悬液; 空白组: 同法注射等量的不含干细胞的培养液。伤后 24 h, 3 d, 1, 2 周行动物神经学缺损评分。2 周后处死行免疫组织化学和苏木精-伊红染色。

结果与结论: 转染小分子干扰 RNA 后, 与对照组相比, 实验组 NgR 基因蛋白表达量明显降低, 移植后 1 周和 2 周, 接受神经干细胞移植的大鼠神经学缺损评分明显低于对照组($P < 0.05$); 且其脑组织切片中的神经元数量较对照组明显增多($P < 0.01$)。伤后 2 周苏木精-伊红染色空白组可见损伤处脑组织断裂, 为瘢痕连接, 有明显空洞形成; 对照组在移植部位出现典型的神经细胞样形态学改变; 实验组出现典型的神经细胞样形态学改变且空洞消失。免疫组织化学染色观察空白组 BrdU 标记的阳性细胞为(37.92 \pm 16.02)个/高倍视野, 对照组为(89.68 \pm 15.34)个/高倍视野, 实验组为(102.67 \pm 13.52)个/高倍视野, 各组间两两比较, 差异均有显著性意义($P < 0.01$)。提示神经干细胞 NgR 基因沉默后立体定向移植治疗大鼠脑损伤可明显改善重型颅脑损伤后大鼠的神经学功能。

关键词: 神经干细胞; NgR; RNA 干扰; 脑内移植; 颅脑损伤

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.14.014

天津医科大学总医院, 天津市
300052

王东★, 男,
1971 年生, 河北省乐亭县人, 汉族, 天津医科大学在读硕士, 副主任医师, 主要从事脑外伤、脊髓损伤的研究。
5609@hotmail.com

通讯作者: 马景鑑, 博士生导师, 天津医科大学总医院, 天津市 300052

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2010)14-02539-06

收稿日期:2009-10-14
修回日期:2009-12-14
(20090914032/
WL-Q)

王东, 张建军, 马景鑑. 神经干细胞 NgR 基因沉默立体定向移植治疗大鼠脑损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(14):2539-2544. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脑损伤是头部受到暴力所造成的损伤^[1],多年来一直是致残致死的重要因素,重型颅脑损伤严重的情况会导致重度残疾和持续性植物状态^[2-3]。神经干细胞具有自我增殖能力和多向分化潜能,一定条件下可以分化成神经系统的各种细胞,因此在神经损伤修复方面有着良好的应用前景^[4-8]。

Nogo-66受体(Nogo-66 receptor, NgR)介导的神经突生长抑制作用,是影响神经干细胞移植后修复效果的重要原因^[9-12]。本实验用RNA干扰(RNA interference, RNAi)的方法沉默神经干细胞NgR基因表达,旨在为改良神经干细胞立体定向移植治疗重型颅脑损伤开辟新的思路。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2008-10/2009-06在天津医科大学总医院神经病学研究所完成。

材料: 胎龄为14~16 d的Wistar胎鼠12只,体质量10~15 g;健康雄性Wistar大鼠60只,体质量250~300 g,购自中国医学科学院动物实验室,实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[13]。

主要试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|---------------------------------------|-----------|
| DMEM/F12、胎牛血清、兔抗鼠NgR基因抗体、山羊抗兔抗体 | 武汉博士德公司 |
| 体积分数为95%乙醇 | 天津润泰公司 |
| 碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、N ₂ 添加剂 | Peptotech |
| Western blot蛋白检测试剂盒 | KPL公司,美国 |

实验过程:

神经干细胞的培养和鉴定: 取孕14~16 d的Wistar大鼠1只,引颈处死,体积分数为75%(由95%的稀释而成)的乙醇浸泡消毒。打开鼠腹取出胎鼠,取出胎鼠大脑,浸泡在DMEM/F12液中,去除脑膜和血管。将去除脑膜和血管的胎脑浸泡于DMEM/F12液中,用吸管反复吹打成悬液,过100目孔筛网,过滤的悬液接种于培养瓶中,加表皮生长因子10 mg/L,碱性成纤维细胞生长因子10 mg/L, N₂添加剂(5 mg/L胰岛素, 100 μg/L铁蛋白, 100 μmol/L腐胺, 30 nmol/L亚硒酸钠, 100 U/mL青霉素, 100 U/mL链霉素, 2 mmol/L谷氨酰胺), 于37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱中培养。3 d后换液, 加入含

BrdU的培养基进行标记, 并对形成的神经球行nestin免疫组织化学染色。

小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)转染沉默NgR基因: siRNA的设计和合成: 针对大鼠NgR mRNA设计2条靶序列, 5' -UGC AGU ACC UCU ACC UAC AAG ACA A-3', 5' -UUG UCU UGU AGG UAG AGG UAC UGC A-3', 参照文献[14]。siRNA模板由上海生物工程公司合成, 根据Ambion公司体外转录试剂盒(Silencer™ siRNA Construction Kit)说明书操作。取1 mL含神经干细胞的培养液加入离心管, 离心半径16 cm, 800 r/min离心5 min, 弃上清, 加入900 μL不含抗生素的培养基, 机械吹打分散细胞。将50 pmol siRNA用50 μL Opti-MEM稀释, 混匀; 另将1 μL Lipofectamine™2000加入50 μL Opti-MEM稀释, 混匀, 室温孵育15 min; 两液体轻柔混合, 室温孵育15 min。将混合物加入神经干细胞悬液中, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂、饱和湿度的培养箱中孵育, 于72 h后检测NgR基因表达。

Western blot检测: 将未分化的神经干细胞悬液和经siRNA转染72 h后的神经干细胞悬液分别经离心半径16 cm, 800 r/min离心5 min, 收集细胞, 弃去上清, 加400 μL蛋白裂解液, 提取蛋白, Bradford法测定蛋白浓度。5%浓缩胶40 V恒压1 h, 10%分离胶恒压60 V 3.5 h, 湿转14 V恒压14 h, 37 °C摇床封闭2 h, 兔抗鼠NgR基因抗体1:800, 37 °C摇床孵育2 h, TBST洗膜5 min×4次, 山羊抗兔抗体1:700, 37 °C摇床孵育1.5 h, TBST洗膜5 min×4次。二甲基联苯胺(DAB)显色, 重复3次, Quantity one图像分析。目的条带与β-actin条带吸光面积积分比值评定蛋白表达水平。

颅脑损伤模型的制备: 20%乌拉坦经腹腔内注射(1.2 g/kg)麻醉后, 采用液压颅脑损伤仪, 按国际通用标准, 对全部大鼠给予253.312 5~303.975 0 kPa峰值的冲击压力, 制成重度大鼠液压颅脑损伤模型^[15]。损伤后出现自主呼吸暂停者, 立即用小动物呼吸机给予面罩吸氧。伤后24 h将大鼠再次麻醉, 打开原先骨窗, 立体定向注射。

干预分组: 60只雄性Wistar大鼠随机区组法分为3组, 每组20只。实验组: 向损伤的大鼠脑组织内注射NgR基因沉默的神经干细胞悬液6 μL; 对照组: 同法注射等量的神经干细胞悬液; 空白组: 同法注射等量的不含干细胞的培养液。于骨窗边缘分3点注入, 每点2 μL, 深度为硬膜下3.0 mm, 留针10 min, 缓慢退针, 缝合头皮。腹腔注射庆大霉素2 000 U抗菌治疗, 回笼饲养。

神经功能评估: 大鼠运动神经功能评价采用Bederson等^[16]的神经学缺损评分法, 在脑损伤后24 h及伤后3 d, 1, 2周进行。

评分标准:

| 分数 | 标准 |
|----|--------------------|
| 0分 | 无明显的神经功能缺失 |
| 1分 | 对侧前肢屈曲 |
| 2分 | 提尾时对侧前肢抓力下降 |
| 3分 | 各方向自主运动, 但提尾时向左侧旋转 |
| 4分 | 自发性向左侧旋转 |

评分越低表示神经运动功能恢复越好。

苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色: 3组于伤后2周随机各取3只大鼠行伤处组织学检查以证实损伤程度。取脑组织行常规石蜡切片, 对组织切片进行苏木精-伊红染色、抗NF, 抗BrdU免疫组织化学染色。每张切片在高倍镜($\times 200$)下任取10个视野, 计算每个视野的NF阳性纤维, BrdU阳性细胞数, 取其均值作为每组的NF阳性纤维, BrdU阳性细胞数。

主要观察指标: 动物神经学缺损评分; 苏木精-伊红染色观察伤处脑组织变化; 免疫组织化学染色观察NF阳性纤维, BrdU阳性细胞数。

设计、实施、评估者: 实验设计、干预实施为第一作者, 评估为第二作者, 经过正规培训, 采用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 15.0软件进行完全随机设计的方差分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间样本比较用Dunnett *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 神经干细胞形态观察 脑组织单细胞悬液接种于培养瓶后1 h, 大部分细胞沉积瓶底, 圆形, 无突起; 同时可以观察到小的细胞团, 团的细胞数量较少。1 d后, 神经干细胞团增多, 较小, 形状不规则; 小部分细胞团贴壁。5 d后, 神经干细胞球增多, 较大, 形状规则, 呈球形, 见图1。

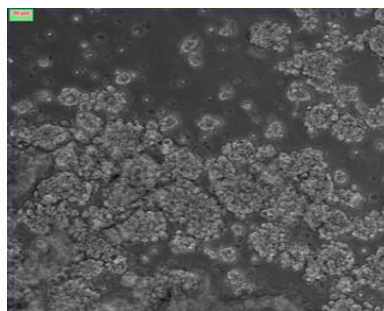


Figure 1 Morphology of primary cultured neural stem cells under phase-contrast microscope ($\times 40$)
图1 相差显微镜下观察培养的原代神经干细胞形态($\times 40$)

2.2 神经干细胞球染色 神经球经Nestin免疫组织化学染色, 呈强阳性, 见图2。

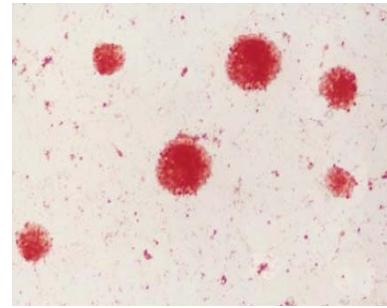


Figure 2 Immunohistochemistry for Nestin of neural stem cells ($\times 40$)
图2 神经干细胞 Nestin 免疫组织化学染色($\times 40$)

2.3 Western blot检测结果 对照组NgR基因表达量与 β -actin内参的比值为 1.88 ± 0.15 。经siRNA转染后24 h的神经干细胞NgR基因表达量与 β -actin内参的比值为 1.03 ± 0.08 。经siRNA转染后24 h的神经干细胞NgR基因表达较对照组NgR基因显著降低($P=0.002$), 见图3。

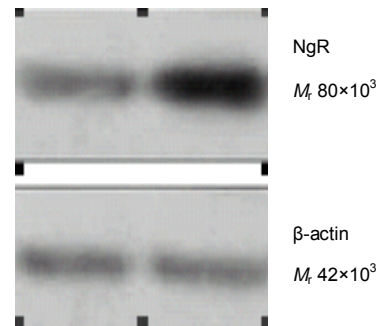


Figure 3 Western blot detection of NgR protein in the expression levels before and after transfection
图3 Western blot 检测 NgR 蛋白在转染前后的表达水平

2.4 神经功能评价各组大鼠不同时间神经学缺损评分见表1。

表1 各组大鼠不同时间神经学缺损评分
Table 1 Neurological deficit score at various time points in rats of each group ($\bar{x} \pm s$, point)

| Group | Time posttrauma | | | |
|--------------|-----------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| | 24 h | 3 d | 1 wk | 2 wk |
| Experimental | 3.46 ± 1.14 | 3.15 ± 1.02 | 1.72 ± 1.06^b | 1.21 ± 0.58^b |
| Control | 3.48 ± 1.02 | 3.24 ± 0.75 | 2.04 ± 0.98 | 1.51 ± 0.62 |
| Blank | 3.52 ± 1.17 | 3.39 ± 0.84 | 2.90 ± 1.51^{ab} | 2.72 ± 1.16^b |

^a $P < 0.01$, experimental group; ^b $P < 0.05$, control group

2.5 苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色结果

伤后2周苏木精-伊红染色:

空白组:

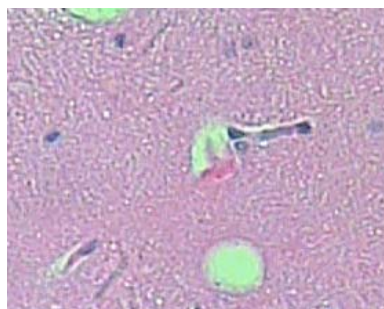
可见损伤处脑组织断裂, 为瘢痕连接, 结构紊乱, 有明显空洞形成, 见图4a。

对照组:

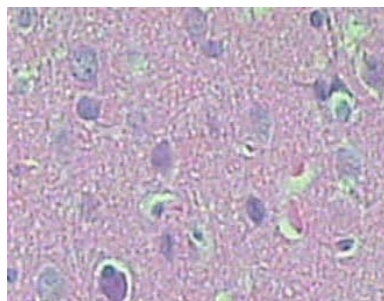
在移植部位出现典型的神经细胞样形态学改变, 组织空洞小于空白组, 而大于实验组, 见图4b。

实验组:

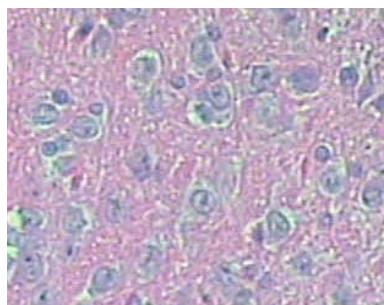
出现典型的神经细胞样形态学改变且空洞消失, 见图4c。



a: Blank group



b: Control group

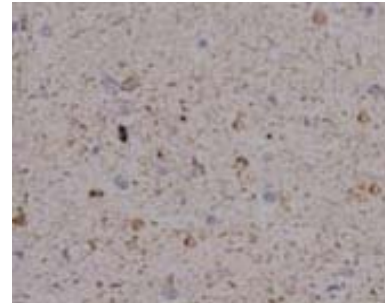


c: Experimental group

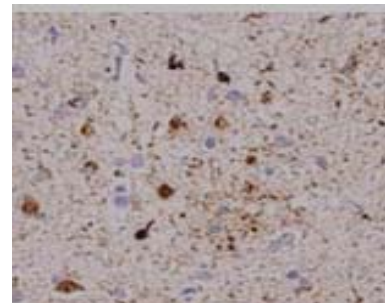
Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of brain tissue changes at 2 wk following transplantation in rats of each group ($\times 200$)

图4 苏木精-伊红染色观察各组大鼠细胞移植后2周脑组织变化($\times 200$)

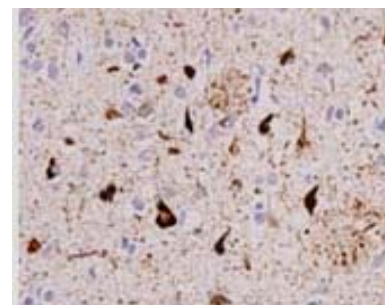
伤后2周免疫组织化学染色观察NF阳性纤维数量: 实验组为(58.00 \pm 11.32)个/高倍视野, 见图5a。对照组为(39.61 \pm 10.21)个/高倍视野, 见图5b。空白组为(15.13 \pm 9.13)个/高倍视野, 见图5c。



a: Blank group



b: Control group



c: Experimental group

Figure 5 Neurofilament-positive fiber at damage site at 2 wk following cell transplantation in each group under a microscope ($\times 200$)

图5 显微镜下观察各组细胞移植后2周损伤处NF阳性纤维($\times 200$)

伤后2周免疫组织化学染色:

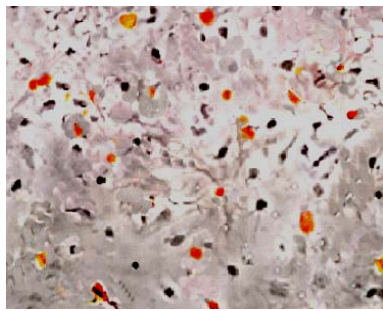
观察BrdU标记阳性细胞:

空白组石蜡切片显微镜下观察可见仍有散在的BrdU标记的细胞, 为(37.92 \pm 16.02)个/高倍视野, 见图6a。

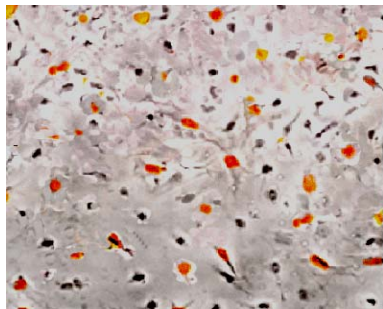
对照组BrdU标记阳性细胞数少于实验组而多于空白组, 为(89.68 \pm 15.34)个/高倍视野, 见图6b。

实验组显微镜下可见有大量散在的BrdU标记的阳性细胞, 为(102.67 \pm 13.52)个/高倍视野, 见图6c。

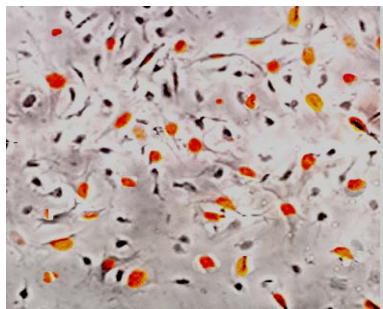
各组间两两比较, 差异均有显著性意义($P < 0.01$)。



a: Blank group



b: Control group



c: Experimental group

Figure 6 Immunohistochemistry of positive expression of BrdU-labeled cells of brain tissues at 2 wk following cell transplantation in rats of each group ($\times 200$)

图6 免疫组织化学染色观察各组大鼠细胞移植后2周脑组织 BrdU 标记细胞阳性表达($\times 200$)

3 讨论

成年哺乳动物中枢神经系统再生困难的主要因素之一就是中枢神经系统内环境限制了轴突再生,这种限制作用与髓鞘产生的神经生长抑制因子有关。目前,人们已经在中枢神经系统髓磷脂中分离出了多种抑制神经再生的因子,其中Nogo蛋白(勿动蛋白)是最重要的因子之一。Guo等^[17]研究表明大鼠中枢神经系统损伤后Nogo蛋白基因表达升高。Jiang等^[18]研究表明大鼠局灶性脑梗死脑组织中Nogo蛋白,NgR和RhoA的表达6 h时开始升高,24 h时达到高峰,96 h后降低到接近正常

水平。Nogo蛋白激活Rho激酶通过NgR可促进C-反应蛋白合成和分泌,导致C-反应蛋白增高,又可反馈地激活Rho激酶,参与组织损伤,从而形成恶性循环^[19]。Nogo蛋白通过此过程导致生长锥塌陷并抑制神经元突起的延伸,用Nogo蛋白的抗体能中和Nogo蛋白,体外培养少突胶质细胞轴突延伸的抑制作用,同样Zhan等^[20-22]动物实验研究表明,在脊髓损伤大鼠应用Nogo蛋白中和抗体能促进神经损伤的恢复。Nogo蛋白(勿动蛋白)的抑制作用通过NgR基因介导,实验采用基因沉默的方法封闭神经干细胞的NgR基因,以达到解除抑制,促进神经干细胞分化后神经元神经突生长的作用,提高神经干细胞移植修复中枢神经损伤的疗效和成功率。NgR基因敲除能够永久地使NgR基因沉默,但NgR基因的生理功能还未彻底清楚,永久使NgR基因沉默可能会带来意想不到的后果。只有RNAi的方法简便易行,有效基因沉默的时间通常可以维持在3~5 d,与颅脑损伤后Nogo蛋白,NgR的高表达期一致^[23-24]。避免了永久基因沉默的弊病,最有希望与神经干细胞移植相结合治疗颅脑损伤。故本实验用RNAi的方法沉默神经干细胞的NgR基因。

神经干细胞疗法近年来已成为治疗多种疾病的新策略,首先细胞移植对于修复受损脑组织是一种有效的治疗方法,神经干细胞在移植部位分裂增殖,并在局部微环境的作用下分化成相应的细胞而替代受损细胞^[25-28]。但也有人认为,将神经干细胞在体外培养成神经前体细胞再进行移植入相应的脑部区域有利于其成活及形成相应功能的细胞^[29],本实验结果显示神经干细胞在移植前经NgR基因沉默,可以更好的发挥对受损脑组织的修复作用,能够促进神经干细胞在伤后移植区的增殖和分化。

实验结果表明:神经干细胞经NgR基因沉默后立体定向移植治疗大鼠脑损伤与单纯的神经干细胞立体定向移植治疗大鼠脑损伤相比,无论从组织学上还是功能学上疗效都有明显的提高。组织学苏木精-伊红染色方面实验组于伤后2周出现典型的神经细胞样形态学改变且空洞消失,组织修复程度优于对照组,空白组。免疫组织化学染色方面也显示大鼠损伤灶脑组织中BrdU的阳性细胞数:实验组>对照组>空白组,且各组之间差异具有显著性意义($P < 0.01$)。在神经学缺损评分中1周后实验组<对照组<空白组,各组之间差异具有显著性意义($P < 0.05$)。

总之,用RNAi的方法使神经干细胞的NgR基因沉默,再通过立体定向的方法准确移植到大鼠颅脑损伤区。移植的神经干细胞可以更好的在损伤部位存活,增殖分化与迁移,促进脑外伤后大鼠神经功能的恢复,这可以为临床治疗重型颅脑损伤提供新的思路和方法。

4 参考文献

- [1] Klose MC, Juul A, Poulsen L, et al. Pituitary insufficiency following head trauma. *Ugeskr Laeger*. 2007;169(3):211-213.
- [2] Engelmann CM, Siert L. Cognitive disturbances following severe traumatic brain injury. *Ugeskr Laeger*. 2007;169(3):217-219.
- [3] Nordenbo AM, Jakobsen JK. Rehabilitation of severe traumatic brain injury. *Ugeskr Laeger*. 2007;169(3):197.
- [4] Li GX, Wang CM, Gong LP, et al. Zhongguo Linchuang Shenjing Waike Zazhi. 2009;14(5):288-290.
黎国雄, 王传涓, 龚利平, 等. 神经干细胞立体定向移植治疗大鼠重型颅脑损伤[J]. 中国临床神经外科杂志, 2009, 14(5): 288-290.
- [5] Mothe AJ, Tator CH. Transplanted neural stem/progenitor cells generate myelinating oligodendrocytes and Schwann cells in spinal cord demyelination and dysmyelination. *Exp Neurol*. 2008; 213(1):176-190.
- [6] Gao J, Prough DS, McAdoo DJ, et al. Transplantation of primed human fetal neural stem cells improves cognitive function in rats after traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2006;201(2):281-292.
- [7] Gu S, Huang H, Bi J, et al. Combined treatment of neurotrophin-3 gene and neural stem cells is ameliorative to behavior recovery of Parkinson's disease rat model. *Brain Res*. 2009;1257:1-9.
- [8] Parr AM, Kulbatski I, Wang XH, et al. Fate of transplanted adult neural stem/progenitor cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the injured adult rat spinal cord and impact on functional recovery. *Surg Neurol*. 2008;70(6):600-607.
- [9] Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*. 2001;409(6818):341-346.
- [10] Yu P, Huang L, Zou J, et al. Immunization with recombinant Nogo-66 receptor (NgR) promotes axonal regeneration and recovery of function after spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis*. 2008;32(3):535-542.
- [11] Lenzlinger PM, Shimizu S, Marklund N, et al. Delayed inhibition of Nogo-A does not alter injury-induced axonal sprouting but enhances recovery of cognitive function following experimental traumatic brain injury in rats. *Neuroscience*. 2005;134(3): 1047-1056.
- [12] Wang X, Chun SJ, Treloar H, et al. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci*. 2002;22(13):5505-5515.
- [13] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [14] Wang F, Zhu Y. Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi. 2007; 21(6):642-647.
王丰, 朱悦. RNA干扰沉默神经干细胞Nogo-66受体基因阻断Nogo-66抑制神经突生长作用的研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(6): 642-647.
- [15] Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2001;108(3):399-405.
- [16] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17(3):472-476.
- [17] Guo X, Guo Y. Expression of Nogo-A mRNA after injury of the rat central nervous system. *Neural Regen Res*. 2008;3(12): 1368-1371.
- [18] Jiang W, Xia F, Han J, et al. Patterns of Nogo-A, NgR, and RhoA expression in the brain tissues of rats with focal cerebral infarction. *Transl Res*. 2009;154(1):40-48.
- [19] Winbeck K, Poppert H, Etgen T, et al. Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke. *Stroke*. 2002;33(10):2459-2464.
- [20] Zhan R, Chen SJ. Effects of Nogo-neutralizing antibody and neurotrophin-3 on axonal regeneration following spinal cord injury in rat. *Neural Regen Res*. 2008;3(12):1319-1323.
- [21] Wannier-Morino P, Schmidlin E, Freund P, et al. Fate of rubrospinal neurons after unilateral section of the cervical spinal cord in adult macaque monkeys: effects of an antibody treatment neutralizing Nogo-A. *Brain Res*. 2008;1217:96-109.
- [22] Brenneman MM, Wagner SJ, Cheatwood JL, et al. Nogo-A inhibition induces recovery from neglect in rats. *Behav Brain Res*. 2008;187(2):262-272.
- [23] Ahmed Z, Dent RG, Suggate EL, et al. Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knockdown of NgR, p75NTR and Rho-A. *Mol Cell Neurosci*. 2005;28(3):509-523.
- [24] Wang F, Zhu Y. The interaction of Nogo-66 receptor with Nogo-p4 inhibits the neuronal differentiation of neural stem cells. *Neuroscience*. 2008;151(1):74-81.
- [25] Miller RH. The promise of stem cells for neural repair. *Brain Res*. 2006;1091(1):258-264.
- [26] Nie X, Zhang YJ, Tian WD, et al. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 36(1): 32-38.
- [27] Lowry N, Goderie SK, Adamo M, et al. Multipotent embryonic spinal cord stem cells expanded by endothelial factors and Shh/RA promote functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008;209(2):510-522.
- [28] etter CP, Holmström NA, Lilja JA, et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci*. 2005;8(3): 346-353.
- [29] Lepore AC, Neuhuber B, Connors TM, et al. Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS. *Neuroscience*. 2006;139(2):513-530.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 无其他利益冲突。

课题的创新点: 本实验在近年神经干细胞移植治疗神经损伤研究的基础上, 用 RNA 干扰的方法沉默神经干细胞 NgR 基因表达后, 再采用立体定向的移植方法进行移植, 提高神经干细胞对神经损伤修复方面的治疗效果, 较传统的神经干细胞移植治疗神经损伤更为有效, RNA 干扰技术是近年来才发展和应用的新技术, 在颅脑创伤中的应用具有一定的创新性。

课题评估的“金标准”: 实验各观察指标无“金标准”。

设计或课题的偏倚与不足: 实验在神经干细胞移植后缺乏有力证据显示 RNA 干扰沉默发挥了作用, 仅有神经行为学评分和 NF 免疫组织化学方面的研究, 而缺少相关分子生物学的实验支持。限于经费和实验条件限制对 NgR 沉默后体外培养神经干细胞是否也出现神经元增多没有进行深入研究, 且实验动物的样本量不够大, 神经干细胞移植方式及颅脑损伤动物模型的制作有待进一步完善。

提供临床借鉴的价值: 颅脑损伤后神经不能再生、修复不但是导致患者死亡率、致残率增高的根本原因, 而且也是使患者预后不良和生活质量低下的直接因素。神经干细胞移植为临床治疗颅脑损伤提供了新的希望, 本实验应用 RNA 干扰和立体定向移植的技术优化神经干细胞移植的疗效, 为临床治疗重型颅脑损伤开辟新的思路。