

胶质细胞源性神经营养因子基因修饰CD34⁺细胞静脉移植治疗 高血压大鼠脑梗死*☆

欧雅莉, 余国龙, 杨天伦, 方立, 胡柯

Intravenous transplantation of glial cell-derived neurotrophic factor gene modified CD34⁺ cells for treating cerebral infarction in spontaneous hypertensive rats

Ou Ya-li, Yu Guo-long, Yang Tian-lun, Fang Li, Hu Ke

Department of
Cardiology, Xiangya
Hospital, Central
South University,
Changsha 410008,
Hunan Province,
China

Ou Ya-li ☆, Doctor,
Physician,
Department of
Cardiology, Xiangya
Hospital, Central
South University,
Changsha 410008,
Hunan Province,
China
ou-yali@hotmail.com

Correspondence to:
Yu Guo-long,
Professor,
Department of
Cardiology, Xiangya
Hospital, Central
South University,
Changsha 410008,
Hunan Province,
China
yugulong123@
yahoo.com.cn

Supported by: the
National Natural
Science Foundation
of China, No.
30572079*

Received: 2010-01-15
Accepted: 2010-05-10

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have confirmed that direct administration of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) or viral vector carrying GDNF gene can significantly reduce cerebral infarction volume, promote outcomes of the recovery of nerve function, but the therapeutic method is invasive and limits in clinic.

OBJECTIVE: To observe the outcomes of intravenous transplantation of human umbilical cord blood (hUCB) CD34⁺ cells transfected with GDNF gene in spontaneous hypertensive rats with cerebral infarction and to explore its mechanism.

METHODS: CD34⁺ cells isolated from hUCB were transfected by the pEGFP-GDNF plasmid and pEGFP blank vector to prepare pEGFP-GDNF-CD34⁺ and pEGFP-CD34⁺ cells. Sixty adult male spontaneous hypertensive rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO) were randomly divided into three groups: pEGFP-GDNF-CD34⁺ cell group, pEGFP-CD34⁺ cell group and saline group. Neurological functional measurements were performed using the modified neurological severity score. Quantitative histological determinations of infarct volume were performed using standard TTC staining and quantitative image analysis. The GDNF level in the cell culture or the cerebral tissue was measured by enzyme linked immunosorbent assay. The survival and migration of green fluorescent protein (GFP)-labeled CD34⁺ cells and the expression of astrocytic marker-gliofibrillary acidic protein (GFAP) and the neuron marker-neuronal nuclei (NeuN) were detected by immunohistochemical and fluorescent staining.

RESULTS AND CONCLUSION: Intravenous transplantation of pEGFP-GDNF-CD34⁺ cells migrated into ischemic-injured cerebral hemisphere, survived and differentiated into neural cells in ischemic region of spontaneous hypertensive rats, and promoted the recovery of nerve function. GDNF gene-transfected CD34⁺ cells survived in the brain tissue and differentiated into neural cells, and its neurological protection effect was superior to CD34⁺ cells. The increased GDNF level in cerebral tissue was one of possible mechanisms responsible for focal cerebral ischemia in spontaneous hypertensive rats after transplantation of between GDNF gene modified CD34⁺ cells and CD34⁺ cells.

Ou YL, Yu GL, Yang TL, Fang L, Hu K. Intravenous transplantation of glial cell-derived neurotrophic factor gene modified CD34⁺ cells for treating cerebral infarction in spontaneous hypertensive rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(27): 5028-5032. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 近年来, 已有实验证实经颅直接给予胶质细胞源性神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)或携带GDNF 基因病毒载体有显著减少脑梗死体积、促进神经功能恢复的疗效, 但其治疗方法有创, 临床应用有限。

目的: 观察 GDNF 基因转染的人脐血 CD34⁺细胞经静脉移植对自发性高血压大鼠脑梗死的疗效, 并探讨其机制。

方法: 分离人脐血 CD34⁺细胞, 脂质体方法转染 pEGFP-GDNF 质粒和 pEGFP 空载体至 CD34⁺细胞制备 pEGFP-GDNF-CD34⁺和 pEGFP-CD34⁺细胞; 制备 60 只雄性自发性高血压大鼠大脑中动脉栓死模型并随机分为 3 组: pEGFP-GDNF-CD34⁺细胞移植组(基因细胞组)、pEGFP-CD34⁺细胞移植组(单纯细胞组)、生理盐水组。改良神经功能损害评分评价神经功能恢复状况; 图像分析法观察 TTC 染色脑梗死体积; 酶联免疫法检测细胞培养液与脑组织匀浆 GDNF 水平, 荧光显微镜及免疫组织化学检测绿色荧光蛋白标记 CD34⁺细胞及其人神经胶质纤维酸性蛋白和人神经元核抗原表达。

结果与结论: 经静脉移植 pEGFP-GDNF-CD34⁺细胞向自发性高血压大鼠脑梗死区域迁移、存活、并向神经细胞定向分化, 促进神经功能恢复。GDNF 基因转染 CD34⁺细胞在脑组织存活、向神经细胞分化及对大脑神经功能保护作用优于 CD34⁺细胞。脑组织 GDNF 水平可能是 GDNF 基因转染 CD34⁺细胞和单纯 CD34⁺细胞移植治疗自发性高血压大鼠局灶性脑缺血疗效差异机制之一。

关键词: 胶质细胞源性神经营养因子; CD34⁺细胞; 神经功能; 移植; 高血压大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.27.020

欧雅莉, 余国龙, 杨天伦, 方立, 胡柯. 胶质细胞源性神经营养因子基因修饰 CD34⁺细胞静脉移植治疗高血压大鼠脑梗死[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(27):5028-5032.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

近年来, 多项实验研究表明人脐血干细胞(human umbilical cord blood cells, HUCBCs)

移植治疗脑缺血有与骨髓间质干细胞相似的疗效^[1-3]; 但上述研究均采用血压正常、缺乏脑血管基础病变的SD或Wistar大鼠制备的脑缺血实验模型。本实验采用有脑血管病变基础的自发性高血压大鼠制备脑缺血实验模型, 观察经

静脉移植胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) 基因转染的人脐血 CD34⁺ 细胞移植对局灶性脑缺血高血压大鼠神经损伤、脑组织梗死面积的影响; 及经静脉移植 HUCBCs 在脑内迁移和存活状况, 以进一步揭示 HUCBCs 静脉移植对脑缺血损伤保护作用, 为脐血细胞在人类缺血性心脑血管疾病治疗中的应用提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于 2007-06/2008-06 在中南大学中心实验室及动物部完成。

材料: 雄性自发性高血压大鼠 60 只, 鼠龄 12~16 周, 体质量 250~300 g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 实验过程中对动物的处置符合中国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

人脐血样本取自湖南省妇幼保健院产科健康妊娠产妇(经产妇同意)。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
Trizol 试剂、cDNA 第 1 链合成试剂盒	上海生物工程公司
RNA 纯化试剂盒	南京建成生物工程公司
质粒 pEGFP-N1 及菌种 <i>E. coli</i> DH5a	湘雅医院心内科方立博士提供
MMLV 反转录酶, T ₄ DNA 连接酶, T ₄ DNA 聚合酶, TaqDNA 聚合酶及 dNTPs, 核酸内切酶 (<i>Xho</i> I、 <i>Kpn</i> I)、DNA Marker, GDNF(ELISA)试剂盒	Promega
Primer5.0 自行设计上下游引物	博尚生物技术有限公司合成
IMDM 培养基, 胎牛血清	GIBCO 公司
电子天平	上海天平仪器厂
冰冻切片机	CM3050S, 德国 Leica 公司
病理图像定量分析系统	北京航天
台式高速离心机	上海安亭
免疫磁珠	德国美天妮
玻璃组织匀浆器	上海恰姆

实验方法:

脐血 CD34⁺ 干细胞的分离培养与鉴定: 取健康妊娠产妇脐带血 60 mL, PBS 对倍稀释混匀, 离心沉淀, 加入到淋巴细胞分离液, 2 000 r/min 离心 15 min。离心后吸取混浊的灰白色层即为单个核细胞层, PBS 洗涤后与免疫磁珠及抗体孵育、过柱, 获取 CD34⁺ 脐血干细胞, 以 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于含体积分数为 10% 胎牛血清、20 $\mu\text{g/L}$

白细胞介素 3, 20 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素 6, 干细胞生长因子 50 $\mu\text{g/L}$, Flt-3-L 30 $\mu\text{g/L}$, 促红细胞生长因子 30 $\mu\text{g/L}$ 的 DMDM 培养基中进行培养, 流式细胞仪鉴定。

pEGFP/GDNF 转染脐血 CD34⁺ 干细胞: 按照 LipofectamineTM 2000 脂质体转染试剂盒说明, 在培养瓶中培养脐血 CD34⁺ 细胞生长至对数生长期, 将 pEGFP-GDNF 质粒与脂质体按 1:1 混合转染细胞, 6 h 后换正常生长培养基培养, 同法转 pEGFP 空载体组作对照。48 h 后抽提细胞总 RNA 并收集细胞培养上清, ELISA 检测 GDNF 水平。

实验动物分组: 雄性自发性高血压大鼠 60 只, Longa 腔内线栓法制作大鼠大脑中动脉栓塞模型^[4], 参照 BEDERSON 评分法进行评分^[5], 评分 1 分以上者定为造模成功。造模后 6 h 随机分为 3 组: pEGFP-GDNF-CD34⁺ 细胞移植组 (基因细胞组): 经尾静脉注射 1×10^6 GDNF-GFP-CD34⁺ 细胞; pEGFP-CD34⁺ 细胞移植组 (单纯细胞组): 经尾静脉注射 1×10^6 GFP-CD34⁺ 细胞; 生理盐水组: 经尾静脉注射等量生理盐水。

移植后神经功能的检测: 于移植当天, 移植后 7, 28 d, 对各组大鼠进行神经损害严重程度评分 (NSS)^[2], 主要观察其运动、感觉功能、平衡能力及生理反射能力; 总分为 18 分, 正常为 0 分, 分值越高其神经损害越严重。

脑梗死体积测定: 于移植后 7, 28 d 每组分别随机选取 5 只大鼠, 快速断头取脑, 于距额极 2 mm 处向后连续等距切取 5 个冠状脑片, 间距为 2 mm, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 避光、1% TTC 磷酸缓冲溶液中染色 30 min^[6], 蒸馏水冲洗、40 g/L 多聚甲醛固定后数码相机照相, 测各层梗死面积, 计算梗死体积。

梗死体积=各层梗死面积之和×层间隔

免疫组织化学与免疫荧光检测: 移植后 7, 28 d 每组分别随机选取 5 只大鼠, 上述方法取大脑, 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸于 40 g/L 多聚甲醛液固定, 随机选取 2 只大鼠脑标本蔗糖梯度脱水后选择含梗死灶部位脑组织连续冠状切片 5 张, 片厚 50 μm 。荧光显微镜对移植后 28 d 每切片中发绿色荧光的 GFP 阳性细胞进行计数, 取其各切片阳性细胞总数的平均值。余下的 3 只大鼠脑标本蔗糖梯度脱水后选择含梗死灶部位脑组织连续冠状切片 10 张, 片厚 5 μm , 按 Promega 试剂盒说明书使

中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008

欧雅莉, 女, 1982 年生, 湖南省资兴市人, 回族, 2009 年中南大学湘雅医院毕业, 博士, 医师, 主要从事干细胞治疗缺血性疾病的研究。ou-yali@hotmail.com

通讯作者: 余国龙, 教授, 中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008 yugulong123@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)27-05028-05

收稿日期: 2010-01-15
修回日期: 2010-05-10
(20091115001/WL.Q)

用, 进行GFAP、NeuN免疫组织化学检测, 显微镜观察GFAP阳性细胞胞浆呈棕黄色丝或颗粒, 荧光显微镜下NeuN阳性细胞发红色荧光, 分别计数移植后28 d每切片中各阳性细胞, 取其各切片阳性细胞总数的平均值。

脑匀浆的制备: 移植28 d后基因细胞组与单纯细胞组各随机选取5只大鼠, 快速断头取脑, 取造模侧半脑, 与生理盐水以1:10比例置于匀浆器中制成匀浆, ELISA检测匀浆GDNF水平。

主要观察指标: NSS评分, 移植细胞在梗死区域的分布、表达, 脑匀浆中GDNF的表达。

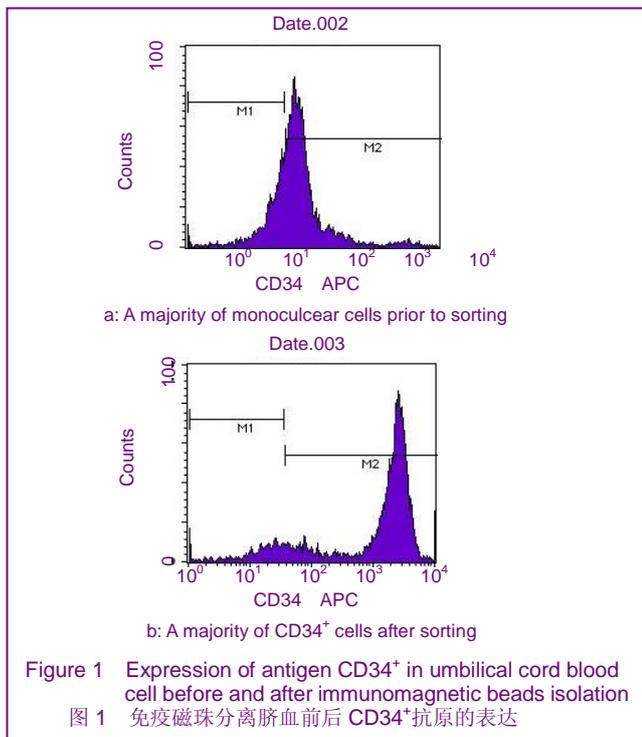
设计、实施、评估者: 实验设计为第一、二作者, 干预实施及评估为第一作者。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.5软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

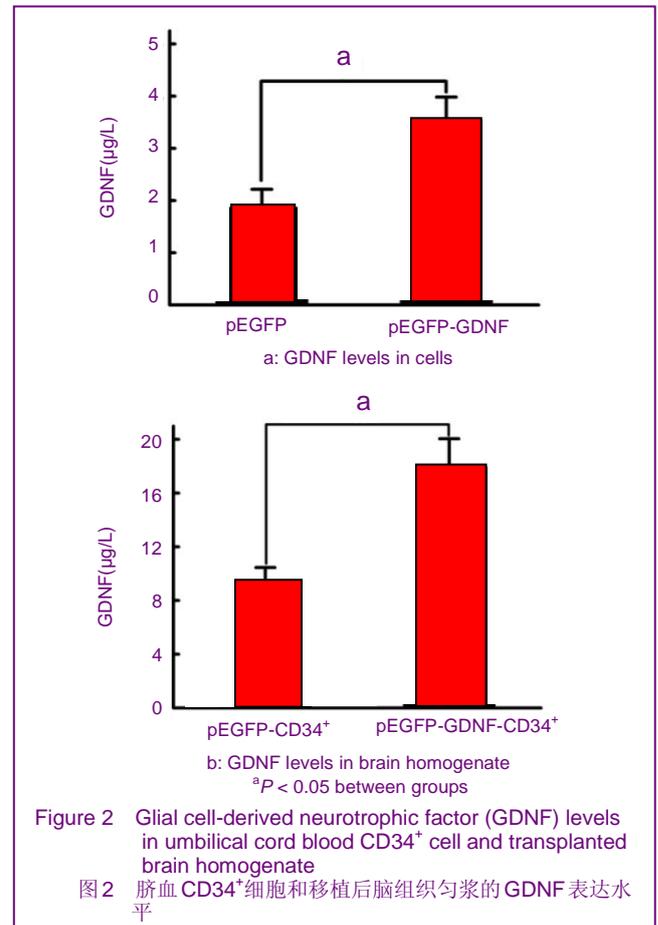
2.1 实验动物数量分析 纳入自发性高血压大鼠60只, 均进入结果分析, 无脱落。

2.2 pEGFP-GDNF-CD34⁺细胞的表面标记 流式细胞仪检测显示pEGFP-GDNF-CD34⁺细胞表面标记显示细胞均一性好, CD34⁺表达阳性, 纯度达90%以上, 见图1。



2.3 脐血CD34⁺细胞和移植后脑组织匀浆的GDNF表达水平 ELISA检测可见GDNF基因转染CD34⁺细胞培养液GDNF水平较转空载体细胞培养液明显升高, 见图

2a, 表明重组GDNF质粒经脂质体转染脐血CD34⁺细胞能有效产生和释放GDNF。移植后28 d基因细胞组脑组织匀浆GDNF水平较单纯细胞组明显增高, 见图2b。



2.4 免疫组织化学检测移植细胞GFAP蛋白和NeuN蛋白的表达 基因细胞组与单纯细胞组移植后7 d均可见少量GFP阳性细胞和个别NeuN、GFAP阳性细胞; 移植后28 d GFP阳性细胞和GFAP阳性细胞、NeuN阳性细胞数增多, 主要分布于缺血侧基底节区、海马以及额顶叶皮质。基因细胞组3类阳性细胞每视野计数均显著多于单纯细胞组($P < 0.05$)。生理盐水组组织切片上未见上述阳性细胞, 见表1, 图3。

表1 移植后28 d高倍镜下各组每视野阳性细胞数值比较
Table 1 Comparison of positive-cells number in each visual field in each group under high power lens at 28 d posttransplantation ($\bar{x}\pm s$, cell/LP)

Group	n	GFP cells	NeuN ⁺ cells	GFAP ⁺ cells
pEGFP-GDNF-CD34 ⁺ cell	18	128.6±16.5 ^b	68.7±10.9 ^a	114.1±12.8 ^a
pEGFP-CD34 ⁺ cell	17	71.9±6.0	38.6±11.4	68.2±4.1
Saline	20	0	0	0

EGFP: enhanced green fluorescent protein; GDNF: glial cell-derived neurotrophic factor; GFAP: glial fibrillary acidic protein; NeuN: neuronal nuclei; n: the number of visual field in each group; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. pEGFP-CD34⁺ cell group

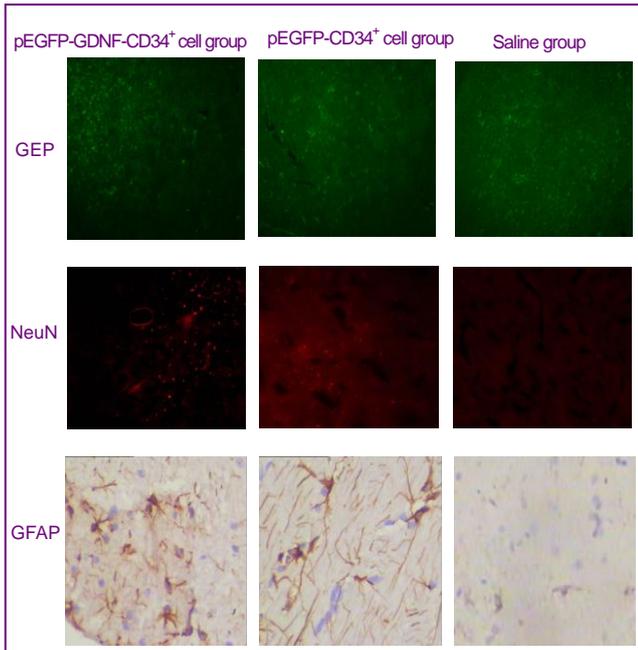


Figure 3 Images of immunohistochemistry and pathology inspection (×100), green fluorescence: GFP-positive cells, red fluorescence: NeuN-positive cells; cytoplasm presented yellow silk or particles: GFAP-positive cells
图 3 免疫组织化学及病理学检测显微镜图像(×100), 发绿色荧光为 GFP 阳性细胞, 发红色荧光为 NeuN 阳性细胞, 细胞胞浆呈棕黄色丝或颗粒为 GFAP 阳性细胞

2.5 移植前后脑梗死面积的变化 显示移植后28 d基因细胞组脑梗死体积(153.51±43.11) mm³显著低于单纯细胞组(186.06±48.50) mm³和生理盐水组(244.2±59.70) mm³, 差异均有显著性意义(P < 0.05), TTC染色结果见图4。

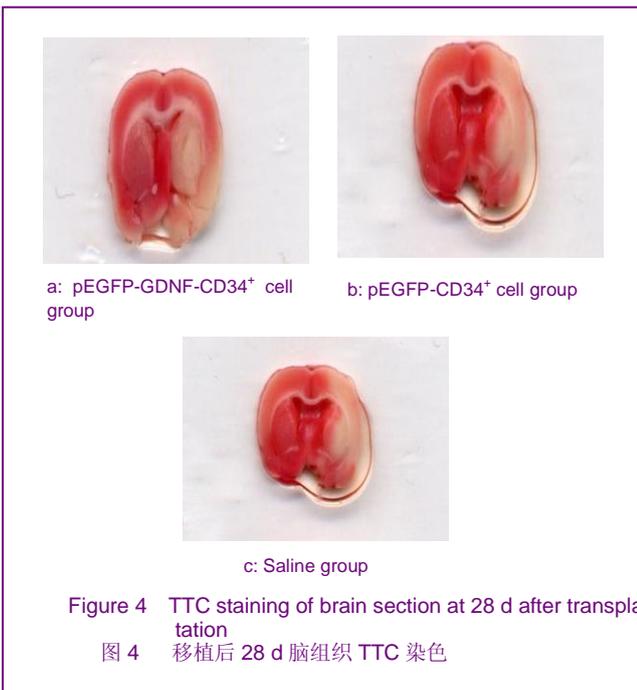


Figure 4 TTC staining of brain section at 28 d after transplantation
图 4 移植后 28 d 脑组织 TTC 染色

2.6 移植后脑梗死模型鼠的行为学与运动功能观察 移植后各组NSS评分结果比较, 见表2。

表 2 各组大鼠移植后不同时间的 NSS 评分情况
Table 2 NSS score of each group at specific time after transplantation (x±s, cell/HP)

Group	0 d	7 d	28 d
pEGFP-GDNF-CD34 ⁺ cell	8.6±1.6 (n=20)	8.2±1.4 (n=20)	4.8±1.1 ^{abc} (n=10)
pEGFP-CD34 ⁺ cell	8.3±1.8 (n=20)	8.0±1.6 (n=20)	6.8±1.1 ^a (n=10)
Saline	8.8±1.6 (n=20)	7.9±1.9 (n=20)	7.5±1.4 (n=10)

^aP < 0.05, vs. saline group; ^bP < 0.05, vs. pEGFP-CD34⁺ cell group; ^cP < 0.05, vs. the same group at 7 d posttransplantation

造模后各组NSS评分无明显差异, 移植后7 d基因细胞组与单纯细胞组和生理盐水组差异无显著性意义(P > 0.05), 但移植后28 d基因细胞组运动功能改善; NSS评分显著低于单纯细胞组和生理盐水组(P < 0.05)。单纯细胞组移植后28 d运动功能有所改善, NSS评分也显著低于生理盐水组, 但与同组第7天相比无明显区别。

3 讨论

本实验采用有脑血管病变基础的自发性高血压大鼠制备脑缺血模型, 以探讨经静脉移植GDNF基因修饰HUCBCs对局灶性脑缺血大鼠的治疗疗效及其GDNF基因修饰HUCBCs迁入脑内的能力和迁入后在脑内成活和分化, 目前国内外均未见类似报道。已有研究显示高血压大鼠脑血管解剖结构与人类相近, 而且具有与人类高血压病相似的脑血管病理变化基础^[7-8]。课题组近期研究表明同样采用线栓法制作的高血压大鼠脑梗死体积显著高于血压正常的SD大鼠^[9], 故用其制备局灶性脑缺血模型, 可能更接近人类脑血栓形成发病或脑缺血及缺血再灌注过程, 其实验结果对临床更有指导意义。

本实验是选择HUCBCs为移植细胞, Ha等^[10]研究证实超过60%的HUCBCs在表达CD133的同时亦有Nestin的表达, 说明HUCBCs可向神经细胞方向分化; Borlongan等^[11]研究显示脐血干细胞移植后鼠中风模型神经功能缺失得以改善。与目前大多数研究采用的骨髓干细胞比较, 选择HUCBCs有采集简单、来源广泛; 对HLA不合抗原易耐受, 宿主抗移植反应和移植抗宿主反应的发生率低和程度轻; 临床应用治疗血液病等已20年, 安全可靠, 利于今后临床推广应用等优势^[3]。

GDNF是近年来发现的一种新的神经营养因子, 实验证明GDNF不仅促进正常运动神经元的存活。降低细胞凋亡中自然发生的神经元死亡。还对受损的运动神经元具有营养保护作用。研究发现GDNF对运动神经元的保护作用比脑源性神经营养因子高75倍, 比睫状神经营养因子高650倍, 是目前发现的活性最强的运动神经元神经营养因子^[6, 11]。本实验将GDNF转染到脐血CD34⁺细胞而后进行移植, 结果证实发现经静脉移植GDNF质

粒转染脐血CD34⁺细胞较pEGFP空载体脐血CD34⁺细胞在脑内产生GDNF水平显著增加, 说明GDNF质粒转染脐血CD34⁺细胞移植脑组织内GDNF水平显著增加可能是有效地改善SD大鼠脑缺血再灌注损伤的神经功能、减低脑梗死范围和移植细胞在脑内分布、向神经细胞分化增加的主要机制之一。结合课题组另一报道中证实脐血分离的CD34⁺细胞经脂质体介导转染pEGFP-GDNF质粒, 转染后12 h即检测到GDNF基因表达, 24~48 h分泌GDNF达高峰^[12], GDNF水平较pEGFP空载体脐血CD34⁺细胞显著增加, 说明在体外GDNF基因转染CD34⁺细胞产生和分泌GDNF作用得以增强。

实验结果证实移植后7 d基因细胞组与单纯细胞组均可见GFP阳性细胞和少量GFAP和NeuN阳性细胞。仅移植后28 d基因细胞组各阳性细胞计数显著高于单纯细胞组, 主要分布于缺血侧基底节、海马以及额顶叶皮质。说明GDNF质粒转染并不增加脐血CD34⁺细胞迁入脑内细胞数量, 但能促进移植细胞在脑内增殖或减少移植细胞死亡; 促进移植细胞在脑内分化为神经细胞。实验结果还证实与生理盐水组比较, 移植后7 d基因细胞组与单纯细胞组神经功能改善无明显疗效, 移植后28 d基因细胞组与单纯细胞组神经功能才均有改善, 且治疗组神经功能较单纯细胞组改善更为明显, 推测脐血细胞在脑内产生保护作用需要一定的时间, GDNF质粒转染脐血细胞对神经功能恢复作用优于单纯的脐血细胞。

目前细胞移植治疗脑梗死的途径有3种: 脑立体定向移植、经颈内动脉注射移植及经静脉注射移植。各种方法均有优缺点。Li等^[13]应用经颈内动脉和脑立体定向注射两种途径治疗脑缺血模型鼠, 前者无明显效果, 而后者虽然使脑缺血大鼠的神经功能得到显著改善, 但其手术创伤、风险大。但多数实验研究证实经静脉或动脉进行细胞移植治疗脑梗死模型实验动物效果明确^[3], 并且经静脉或动脉进行细胞移植创伤小、可反复多次注射、不受细胞移植数量的影响、患者容易接受, 更适用于临床推广应用。

总之, 实验显示GDNF基因转染脐血CD34⁺细胞经静脉移植能进入缺血脑组织, 在脑内成活率、神经细胞定向分化率高于单纯的CD34⁺细胞; 并且有效改善SD大鼠脑缺血再灌注损伤的神经功能、减低脑梗死体积, 也优于单纯的CD34⁺细胞。实验对高血压脑梗死实施基因治疗与干细胞移植联合治疗进行了有效地尝试, 并证实了其治疗方法有效, 且优于单纯性干细胞移植。

4 参考文献

[1] Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, et al. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke*. 2004;35(10): 2385-2389.
 [2] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke

in rats. *Stroke*. 2001;32(11):2682-2688.
 [3] Yu G, Borlongan CV, Stahl CE, et al. Systemic delivery of umbilical cord blood cells for stroke therapy: a review. *Restor Neurol Neurosci*. 2009;27(1):41-54.
 [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989 Jan;20(1):84-91.
 [5] 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.
 [6] Bennett DL, Boucher TJ, Armanini MP, et al. The glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci*. 2000;20(1):427-437.
 [7] Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, et al. GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron*. 1995; 15(4):821-828.
 [8] Guo GQ, Shen WZ, Jiepouxue Zazhi. 2000;23(3):242-244. 郭国庆, 沈伟哉. 自发性卒中高血压大鼠脑中动脉超微结构的病理改变[J]. 解剖学杂志, 2000, 23(3): 242-244.
 [9] Wang JY, Wang AC, Wu M, et al. Xinnao Xueguanbing Fangzhi. 2008;8(1):21-23. 汪俊元, 王安才, 吴明, 等. 血管内皮生长因子与自发性高血压大鼠血管重构的关系[J]. 心脑血管病防治, 2008, 8(1): 21-23.
 [10] Ha Y, Lee JE, Kim KN, et al. Intermediate filament nestin expressions in human cord blood monocytes (HCMNCs). *Acta Neurochir (Wien)*. 2003;145(6):483-487.
 [11] Yu GL, Hu K, Ou YL, et al. *Zhonghua Gaoxueya Zazhi*. 2009; 19(7):633-635. 余国龙, 胡柯, 欧雅莉, 等. 自发性高血压大鼠缺血再灌注性脑损伤实验动物模型制备[J]. 中华高血压杂志, 2009, 19(7): 633-635.
 [12] Ou YL, Yang TL, Yu GL, et al. *Zhongfeng yu Shenjingbingxue Zazhi*. 2008;25(6):651-654. 欧雅莉, 杨天伦, 余国龙, 等. GDNF基因真核表达载体构建及其脐血CD34⁺干细胞表达[J]. 中风与神经病学杂志, 2008, 25(6): 651-654.
 [13] Li Y, Chen J, Wang L, et al. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology*. 2001;56(12):1666-1672.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金项目(30572079)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 实验对高血压脑梗死实施基因治疗与干细胞移植联合治疗进行了有效地尝试, 并证实了其治疗方法有效, 且优于单纯性干细胞移植。

设计或课题的倚倚与不足: 实验仅观察脑组织神经营养因子胶质细胞源性神经营养因子水平, 没有观察其他神经营养因子如神经生长因子和脑衍生性神经营养因子水平的变化, 而此两种营养因子已证实是干细胞移植促进脑梗死神经功能改善的重要因子; 本实验观察时间不长, 尚不能提供移植细胞能否在脑内存活和促进神经功能恢复的远期疗效实验证据; 对脑内移植细胞仅进行鼠抗人神经核抗原和鼠抗人神经胶质纤维酸性蛋白单克隆抗体识别, 不能证实移植细胞分化的细胞是否具有神经细胞功能。

课题评估的“金标准”: 实验观察的脑梗死体积、神经功能恢复指标、神经损害严重程度评分(NSS)和对移植细胞分化的细胞标志物人神经核抗原(NeuN)及抗人神经胶质纤维酸性蛋白检测等主要结果指标评价方法均得到国内外公认。

提供临床借鉴的价值: 实验选择含丰富未成熟干细胞的人脐血干细胞作为供体细胞, 与目前大多数研究采用的骨髓干细胞比较, 人脐血干细胞采集简单、来源广泛, 对孕妇和婴儿无任何风险, 且长期保存后细胞成活率高; 临床应用治疗血液病等已有15年, 安全可靠, 利于今后临床应用与推广。移植途径采用静脉输注, 有别于目前大多数细胞移植治疗脑梗死实验采用经颅直接注射的方法, 本方法简单、无创、无需复杂设备、能大剂量、重复移植, 易被患者接受, 适于今后临床推广应用。