

新生鼠缺氧缺血性脑病时骨髓基质干细胞的生长特性*

张 谊¹, 姚 笠²

Growth characteristics of bone marrow stromal stem cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy

Zhang Yi¹, Yao Li²

¹Department of Pediatrics, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China;
²Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Zhang Yi★, Master, Attending physician, Department of Pediatrics, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Received: 2010-11-20
Accepted: 2010-12-29

Abstract

BACKGROUND: The growth features of bone marrow stromal stem cells (BMSCs) for hypoxia ischemic encephalopathy is unclear.

OBJECTIVE: To observe growth characteristics and physical and chemical characters of BMSCs in treatment of acute anoxic-ischemia newborn rats.

METHODS: Seven-day-old rats were selected to ligate the bilateral carotid arteries to prepare ischemic models. After 2 hours, the neonatal rats deeply suffered from hypoxia (8% O₂ and 92% N₂) for 1–2.5 hours. The rats were divided into mild group (ischemia for 1 hour), moderate group (ischemia for 1.5 hours), severe group (ischemia for 2.5 hours), anoxia-ischemia group and sham operation group (only ligation of the left carotid artery). The growth condition of BMSCs was observed.

RESULTS: After 3-hour culture, BMSCs grew adherently in the sham operation and anoxia-ischemia groups, superior to those in the moderate and severe groups. The morphology of BMSCs recovered in the sham operation, mild and moderate groups. The apoptotic rates were similar in the sham operation and mild groups, and obviously increased in the moderate and severe groups. The activity of supernatant lactate dehydrogenase was increased in the mild and severe groups to different extent. The findings demonstrate that the effect of mild and moderate anoxia-ischemia on BMSCs is reversible, and BMSCs grow vigorously and benefit to injury repair.

Zhang Y, Yao L. Growth characteristics of bone marrow stromal stem cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(19): 3438-3442. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 骨髓基质干细胞用于缺氧缺血性脑病治疗, 其生长特性是否稳定尚需观察。

目的: 探讨急性脑缺氧缺血新生大鼠骨髓基质干细胞移植后的生长状态及理化性质的改变。

方法: 结扎新生 7 d Wistar 大鼠双侧颈总动脉制成缺血模型, 恢复 2 h 后, 吸入体积分数 8%O₂、92%N₂ 的混合气体制成缺氧缺血性脑病模型。分为轻度(缺氧 1 h)、中度(缺氧 1.5 h)、重度(缺氧 2.5 h)缺氧缺血性脑病组及假手术组(仅结扎左侧颈总动脉)。观察各组骨髓基质干细胞的生长状态。

结果与结论: 假手术组及轻度缺氧缺血性脑病组骨髓基质干细胞在提取培养 3 h 即可贴壁生长, 而中、重度组骨髓基质干细胞贴壁较晚且生长状态较差, 假手术组、轻、中度组细胞形态可逐渐恢复。假手术组及轻度组细胞凋亡率基本相同, 中、重度组细胞凋亡率明显增高。轻度及中度组培养上清液乳酸脱氢酶有不同程度的增高。提示轻、中度缺氧缺血对骨髓基质干细胞的影响是可逆的, 骨髓基质干细胞生长旺盛, 对于损伤恢复功能较强。

关键词: 缺氧缺血性脑病; 骨髓基质干细胞; 大鼠; 乳酸脱氢酶; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.19.004

张 谊, 姚 笠. 新生鼠缺氧缺血性脑病时骨髓基质干细胞的生长特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(19):3438-3442. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

* 首都医科大学附属北京同仁医院儿科, 北京市 100730, ²哈尔滨医科大学附属第二医学院儿科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

张 谊★, 女, 1976 年生, 北京市人, 汉族, 2004 年哈尔滨医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事新生儿、儿童血液肿瘤研究。
Yichang-1@163.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:1673-8225 (2011)19-03438-05

收稿日期: 2010-11-20
修回日期: 2010-12-29
(20100820010/W ·W)

0 引言

缺氧缺血性脑病 (hypoxic ischemic encephalopathy, HIE) 是由于围生期因素引起的缺氧和脑血流减少或暂停而导致胎儿和新生儿的损伤, 是新生儿死亡和婴儿神经系统功能障碍的主要原因^[1]。骨髓基质干细胞 (bone marrow stromal stem cells, BMSCs) 是一类具有多项分化潜能的干细胞, 可分化为脂肪、骨、软骨、骨骼肌、平滑肌以及神经元等^[2-3]。因为该类细胞具有取材方便且对机体无害、可进行自体移植、所分化组织类型广泛等优点, 对它的

分化特性及机制的研究一直没有间断过^[4-6]。实验旨在研究新生大鼠受到不同程度脑缺氧及缺血损伤时其 BMSCs 生物学特性的影响以及在体外培养条件下的生存活力, 从而了解进行 BMSCs 移植治疗新生儿 HIE 的基本生物学价值。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于 2007-06/2009-01 哈尔滨医科大学组织胚胎实验室进行。

材料: 健康新生 7 d Wistar 大鼠 48 只, 体质

量8~11 g,由哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供,随机分组成4组,假手术组、轻度HIE组、中度HIE组、重度HIE组,每组12只。

主要制剂及材料:

主要制剂及材料	来源
低糖 DMEM 培养液, 体积分数 10%PBS, 体积分数 10%胎牛血清	美国 Hyclone 公司
骨碱性磷酸酶试剂盒	北京中生北控高科技股份有限公司
双抗: 100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素	上海中西药业有限公司
胰蛋白酶	Sigma
含体积分数 8%O ₂ 、92%N ₂ 的混合气体	由哈尔滨气体公司提供
常压低氧箱(20 cm×30 cm×45 cm)	自制

实验方法:

动物模型制作: 轻、中、重HIE组大鼠采用线栓法结扎大鼠大脑双侧颈总动脉制成缺血模型,恢复1 h后放入含有体积分数8%氧气、92%氮气混合气体的密闭低氧舱内,分别为轻度HIE组1 h、中度HIE组1.5 h、重度HIE组2.5 h。假手术组仅结扎左侧颈总动脉。

实验方法: 急性处死新生鼠,无菌条件下分离双股骨及胫骨,体积分数10%PBS缓冲液冲洗双股骨及胫骨,用1 mL注射器抽取培养液(低糖DMEM+双抗+谷氨酰胺+体积分数10%胎牛血清)冲洗骨髓腔,反复几次,至冲出液清,将冲出物直接接种于六孔板中。用含体积分数10%胎牛血清的LG-DMEM吹打细胞成单个细胞。分离提取的细胞接种于六孔板中,用全培养液(低糖DMEM+双抗+谷氨酰胺+体积分数10%胎牛血清)培养,37 ℃、体积分数5%CO₂、饱和湿度常规培养。24 h换液,除去未贴壁细胞。此后,每72 h换液1次。未贴壁细胞经反复换液清除,待细胞集落形成,细胞长到80%~90%融合后传代。传代培养时加入2.5 g/L胰蛋白酶消化,相差显微镜下观察纤维形BMSCS变圆,倾去消化液,加入培养液,并吹打分散细胞,细胞计数板计数,以(2.5~3.5)×10⁷ L⁻¹浓度接种于六孔板中。此时细胞记作P₁,重复以上操作,获得P₁~P₂细胞。每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况^[7]。利用细胞计数法计算细胞生长状态及描记生长曲线。并通过流式细胞仪测定各组BMSCs凋亡比例。并测定乳酸脱氢酶评价细胞损伤程度。

取第2代形态均一的BMSCs,胰酶消化,以3.5×10⁷ L⁻¹浓度接种于加盖玻片的12孔板中,待细胞至70%融合,分两组进行诱导。诱导组用全培养液(10%胎牛血清+DMEM+青霉素100 U+链霉素100 U+谷氨酰胺2 mmol/L)、10⁻⁸ mmol/L地塞米松、50 mg/L维生素C、β-甘油磷酸钠10 mmol/L诱导,每3 d换液1次,又到14~21 d,每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况。利用细胞计数法计算细胞生长状态及描记生长曲线。通过

苏木精-伊红染色观察生长状态,骨碱性磷酸酶测定BMSCs分化为成骨细胞的量化指标。

主要观察指标: ①细胞形态及生长曲线。②乳酸脱氢酶定量。③细胞早期凋亡情况。

统计学分析: 应用SPSS11.0统计软件处理,各组内采取t检验,轻度、中度、重度HIE组间比较采用方差分析,如方差不齐,采用非参数检验分析。

2 结果

2.1 各组细胞形态及苏木精-伊红染色结果

假手术组: 细胞形态最好,均呈克隆样生长,形态均一。苏木精-伊红染色细胞呈成纤维样生长,细胞大多成梭形,有多个突起,有一两个核仁,位于胞体一侧,细胞成团簇状生长,分布不均,显示明显的集落生长。见图1。

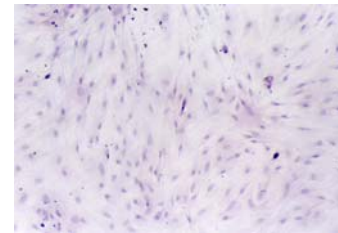


Figure 1 Normal bone marrow stromal stem cells (BMSCs) grew in a stratification manner in the sham operation after 5-d culture (Hematoxylin-eosin staining, ×100)
图1 假手术组培养5 d正常BMSCs成层生长(苏木精-伊红染色, ×100)

轻度HIE组: 接种14 d左右即可见集落形成,但细胞大多呈三角形、成纤维样增长,有突起,少数细胞形态不规则,但在高倍镜下细胞胞质中仍可见细颗粒物质。苏木精-伊红染色仅见细胞核深染,细胞形态基本正常。见图2。

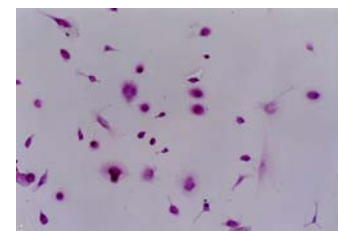


Figure 2 Nuclei of Normal bone marrow stromal stem cells (BMSCs) laid in lateral, the nucleolus was unclear and cytoplasm was deeply dyed in the mild group cultured for 1 wk (Hematoxylin-eosin staining, ×100)
图2 轻度HIE组培养1周骨髓基质干细胞胞核位于一侧,核仁不清,胞浆浓染(苏木精-伊红染色, ×100)

中度HIE组: 细胞生长较缓慢,分散生长,细胞之间空隙变大,21 d左右细胞形态大致恢复正常,但在高倍

镜下可见胞质中出现空泡及颗粒样物质。苏木精-伊红染色后可见凋亡细胞, 主要表现为细胞浓缩, 细胞核深染, 胞浆浓缩。见图3。

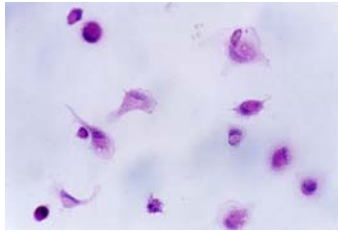
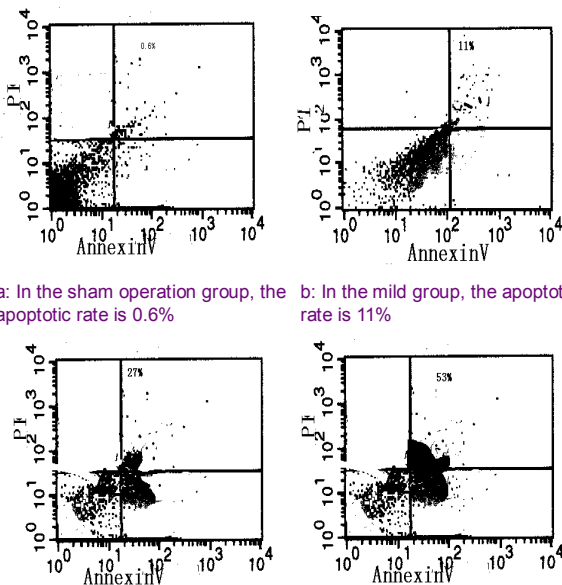


Figure 3 Cytoplasm of Normal bone marrow stromal stem cells (BMSCs) was condensed, the nucleus was deeply dyed and the nucleolus was unclear in the moderate group after 21 d culture (Hematoxylin-eosin staining, $\times 400$)

图3 中度HIE组培养21 d骨髓基质细胞胞质浓缩, 胞核深染, 形态不规则, 胞仁不清(苏木精-伊红染色, $\times 400$)

重度HIE组: 细胞贴壁率极低, 达不到增殖水平细胞损伤为不可逆未能做苏木精-伊红染色。

2.2 流式细胞仪测定细胞凋亡 各组细胞贴壁培养72 h后经胰酶消化制成细胞悬液后立即进行流式细胞仪检测细胞凋亡情况。假手术组、轻度HIE组凋亡率基本相同, 分别为0.6%及11%, 而中度及重度HIE组凋亡率明显增高, 分别为27%及53%。说明不同程度的HIE大鼠BMSCs在轻度缺氧缺血时其生长特性变化不大; 而中、重度损伤其细胞受损严重即使在体外培养条件仍大部分凋亡, 其增殖能力减低, 见图4。



a: In the sham operation group, the apoptotic rate is 0.6%
 b: In the mild group, the apoptotic rate is 11%
 c: In the moderate group, the apoptotic rate is 27%
 d: In the severe group, the apoptotic rate is 53%

Figure 4 Apoptotic rate of bone marrow stromal stem cells detected by using flow cytometry
 图4 流式细胞仪检测不同程度缺氧缺血的骨髓基质干细胞凋亡率

2.3 各组细胞的生长曲线 经体外培养, 假手术组、轻度、中度HIE组BMSCs形态逐渐恢复, 当细胞增殖到85%时, 传代培养, 研究显示, 原代轻度HIE组细胞经过2周左右形态大致恢复, 大约3周达到传代水平, 中度HIE组细胞经21 d左右恢复大致形态, 25~28 d可以传代。假手术组、轻度、中度HIE组BMSCs传代后生长状态及特性无差别, 见图5, 重度HIE组未能传代。

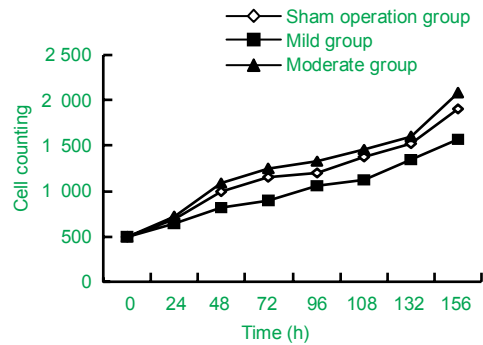


Figure 5 Growth curve of Normal bone marrow stromal stem cells (BMSCs) of the second passage in the sham operation, mild and moderate groups
 图5 假手术组、轻度、中度HIE组骨髓基质干细胞P2代生长曲线

2.4 各组细胞乳酸脱氢酶活性比较 提取BMSCs 24 h后, 轻度HIE组较假手术组乳酸脱氢酶值略有升高, 但差异无显著性意义($P > 0.05$), 中度HIE组乳酸脱氢酶升高明显与假手术组、轻度HIE组($P < 0.05$)。培养24 h于186 h的乳酸脱氢酶活性比较, 中度HIE组组内比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。重度HIE组与其他3组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 但因大部细胞死亡, 9 d的上清液未测, 见表1。

表1 各组于不同时间上清液中乳酸脱氢酶活性测定
 Table 1 Activity of supernatant lactate dehydrogenase at different time ($\bar{x} \pm s$, nkat/L)

Group	1 d	9 d
Sham operation	791.825 \pm 8.135	790.158 \pm 24.538
Mild	875.175 \pm 39.091	833.500 \pm 27.205
Moderate	1 053.544 \pm 83.967	846.836 \pm 31.190
Severe	1 511.969 \pm 5.801	

3 讨论

新生儿HIE是围生期婴儿死亡及婴儿神经系统损伤的主要疾病之一, 可引起智力低下、运动及语言发育障碍、脑瘫、耳聋、失明等严重后遗症, 因此, 自体移植BMSCs治疗HIE患儿目前已成为研究热点。但BMSCs移植的存活时间周期及是否能够稳定的向神经元定向分化就成为了移植成功的重要因素, 因此, 本实验主要

通过脑损伤后大鼠的BMSCs的增殖能力及稳定性的研究探讨移植的时间窗及BMSC的生物特性。骨髓存在两种干细胞,一种是造血干细胞,一种是BMSCs, BMSCs具备干细胞的性质^[8-9]。骨髓基质系统中不同的终末分化细胞的细胞表型可以相互转化,即所谓的反分化和跨化。已确定BMSCs可向成骨细胞、成纤维细胞、软骨细胞、脂肪细胞等分化的具有干细胞功能的一类细胞^[9]。本实验了解了在新生大鼠缺氧缺血脑病时, BMSCs的生长特性虽然受到了一定的影响,但经过一定条件的体外培养轻度缺氧仍可迅速恢复其增殖、分化能力。BMSCs是中胚层来源的干细胞,目前报道最多的是成人骨髓的BMSCs,在骨髓中含量很少,占骨髓单个核细胞的1/10⁶~1/10⁵^[10-11]。Zvaifler等^[12-13]研究发现,外周血脐血脂肪组织可能存在MSCs。传统认为成体内神经细胞数目恒定,不可再生,因而神经损伤性疾病或退行性疾病均不可治愈。Azizi等^[14]将人的BMSC分离培养,并用荧光素标记后植入SD大鼠纹状体,5~72 d后发现20%的BMSC植入细胞成活,且未发现有炎症反应和排斥反应,并发现细胞沿注入部位在脑内逐层迁移。1999年Kopen等^[15]将BMSC注入新生小鼠侧脑室,12 d后,可在脑内检测到BMSC来源的神经胶质细胞和神经元中间丝蛋白的表达。

假手术组BMSCs形态正常,为成纤维细胞样细胞,而单纯结扎一侧颈总动脉并不能对骨髓造血微环境造成影响,只有在缺氧缺血同时发生时才会对BMSCs的理化性质造成影响。而轻度、中度、重度HIE组说明BMSCs易受理化因素例如缺氧缺血的影响,但受影响程度与缺氧缺血程度密切相关,轻度缺氧缺血时,机体能够代偿时,刺激骨髓造血,表现为增生性表现,例如轻度HIE组结果显示BMSCs有生长速度加快趋势,而当损伤进一步加剧时,机体的病理改变为全身性,表现为BMSCs生长状态不同程度的降低,例如:中度HIE组BMSCs。但当重度缺氧缺血时, BMSCs大部死亡。脱离体内环境经过体外培养,轻、中度HIE两组BMSCs形态及生长状态恢复说明BMSCs的损伤时可逆的,细胞损伤已凋亡为主,而重度HIE组细胞损伤为不可逆,细胞死亡。经传代后,生长曲线提示轻度HIE组可以促进BMSCs的生长,轻度HIE组BMSCs虽然在形态上有所改变,有少数细胞胞浆中有细小颗粒,但生长较假手术组旺盛进一步说明轻度缺氧缺血可以促进BMSCs增殖;而中度HIE组(缺氧1.5~2.5 h)BMSCs在倒置显微镜下观察则在接种8h以上才见贴壁细胞,且形态不规则,核浓缩,胞浆内可见空泡颗粒,苏木精-伊红染色核深染,说明BMSCs受全身缺氧缺血环境的影响,形态上有很大变化,生长状态差,大约经21 d恢复正常形态。经过传代后,细胞虽然生长较假手术、轻度HIE组稍慢,但3组BMSCs经传代后生长曲线无统计学意义,倍增时

间无差别($P > 0.05$),说明体内乏氧的缺氧缺血性大鼠的BMSCs虽然受缺氧缺血的影响,但是对BMSCs的损害是可逆的,经过一段时间的体外培养,细胞的形态是可以恢复的。说明BMSCs在形态学上稳定性较好。形态上观察及经过染色后直观上发现轻、中度HIE组显示经缺氧缺血后细胞出现核浓缩、深染提示有细胞凋亡。但在客观上可以通过流式细胞仪检测细胞凋亡。众所周知,细胞凋亡是细胞的基本特征之一,他在机体的胚胎发育,组织修复、内环境的稳定等方面起着十分重要的作用。细胞凋亡有别于细胞死亡,它有一系列的细胞形态学和生化的改变,包括出现染色质浓缩, DNA降解,凋亡小体形成等。

流式细胞仪进行Annexin-V与PI检测后发现假手术组与轻度HIE组的细胞的凋亡细胞所占比例极少,而中度HIE组的凋亡细胞却明显增加占22%,说明当大鼠急性缺氧缺血时,脑、心、肾甚至骨髓不能及时得到血流重分布的血液供应,出现不同程度的缺氧缺血表现,而首先出现的是形态上的改变,即上述所表述的BMSCs形态。在正常的活细胞,磷脂酰丝氨酸(PS)位于细胞膜的内侧,但在凋亡的细胞,PS从细胞膜内侧移至细胞膜表面,暴露在细胞外环境中, Annexin-V与PI配比使用,主要监测早期的BMSCs凋亡细胞。早期凋亡细胞是细胞损伤的一种可逆性改变,经过体外培养,给予BMSCs的所需的生长环境, BMSCs从形态上及生化变化上可以达到正常水平或接近正常水平。说明BMSCs作为种子细胞的理化性质稳定。

乳酸脱氢酶广泛存在于全身各个组织器官中,是细胞损伤的较敏感指标,在细胞损伤早期即可增高,其机制是当细胞损伤时细胞膜受损,乳酸脱氢酶外泄至细胞间隙,使细胞外液的乳酸脱氢酶增高^[16]。细胞膜受损伤,使细胞内乳酸脱氢酶释放,故损伤灶局部酶活性下降,本实验通过检测培养上清液中乳酸脱氢酶的活性反映BMSCs的损伤。结果显示,新生大鼠缺氧缺血后出现BMSCs培养上清液乳酸脱氢酶活性测定值增高提示细胞损伤,但在体外培养环境下细胞损伤可以逐渐修复。其结果显示BMSCs作为种子细胞进行疾病的基因治疗时会受疾病的影响,但这种影响是可逆的。因此,本实验对BMSCs在体外培养扩增后作为种子细胞对疾病进行基因治疗提供了有可靠的基础理论依据。

4 参考文献

- [1] Zhu FT, Hu YM, Jiang ZF. Beijing: People's Medical Publishing House. 2005:450.
诸福荣, 胡亚美, 江载芳. 实用儿科学 [M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2005:450.
- [2] Chen HY, Niu P, Zhao S, et al. Linchuang Shenjingbingxue Zazhi. 2007;20(4):274-277.
陈欢意, 牛平, 赵帅, 等. 碱性成纤维细胞生长因子预诱导对骨髓基质干细胞向多巴胺能神经元分化的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2007, 20(4):274-277.

- [3] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000; 28: 875-884.
- [4] Jiang YH, Balkrishna N, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418:41-49.
- [5] Wang QY, Xu YC, Cai DZ. In vitro chondrocyte differentiation of canine bone marrow stromal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009; 13(46):9037-9040.
- [6] Feng Y, Xie FK, Huang JT. *Shenjing Jiepouxue Zazhi*. 2009; 25(5): 506-510.
冯英, 谢富康, 黄锦桃. 成年大鼠和恒河猴骨髓基质干细胞的体外培养及鉴定[J]. *神经解剖学杂志*, 2009, 25(5): 506-510.
- [7] Li X, Liu JS, Wu SF, et al. *Kunming Yixueyuan Xuebao*. 2007; 28(5): 22-25.
李溪, 刘劲松, 吴仕峰, 等. 探索大鼠骨髓基质干细胞体外培养的方法[J]. *昆明医学院学报*, 2007, 28(5): 22-25.
- [8] Li XS, Guo ZK. *Jiefangjun Yixue Zazhi*. 2000; 25(5): 346-348.
李秀森, 郭子宽. 骨髓间充质干细胞的生物学特性[J]. *解放军医学杂志*, 2000, 25(5): 346-348.
- [9] Jing CT, Yang QH, Liu YJ, et al. *Shenjing Jiepouxue Zazhi*. 2003; 13(19): 56-60.
姜传涛, 杨秋慧, 刘玉军, 等. 成年大鼠及猴骨髓基质干细胞的体外培养及向神经元的分化诱导[J]. *神经解剖学杂志*, 2003, 13(19): 56-60.
- [10] Zhao CH. *Beijing Huaxue Gongye Chubanshe*. 2006: 51-52.
赵春华. *干细胞原理、技术与临床*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 51-52.
- [11] Xue F, Li GL, Zhao YW. *Zhongxixi Jiehe Xinnao Xueguanbing Zazhi*. 2009; 7(8): 913-915.
薛芳, 李光来, 赵永旺. 叶酸诱导骨髓基质干细胞分化为神经细胞的浓度探索[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2009, 7(8): 913-915.
- [12] Zvaifler NJ, Marinova ML, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000; 2(6): 477.
- [13] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000; 109(1): 235.
- [14] Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(7): 3908-3913.
- [15] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(19): 10711-10716.
- [16] Zhao XW. *Zhongguo weizhongbing Jijiu yixue*. 1996; 8(7): 440.
赵祥文. 危重病与机体的应急反应[J]. *中国危重病急救医学*, 1996, 8(7): 440.
- [17] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of 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.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 设计与实施均为第一作者, 评估者为第二作者。

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。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[17]。

本文创新性: 应用骨髓基质细胞治疗中枢神经系统疾病其生理特性是否稳定, 在受损环境下是否可以自主修复且保持较为旺盛的生长能力及分化能力等方面的研究, 目前国内报道较少。本文针对骨髓基质细胞的修复能力, 生长能力以及在体外培养条件下的生长规律及特性进行初步观察, 发现骨髓基质细胞即使在受损环境中依然具有一定的生长能力, 在一定程度上损伤可逆。

如何向 SCI 收录的优秀期刊投稿: 成功发表 SCI 经验谈(本刊发展部)

到目前为止, 我共发表 50 多篇 SCI 论文。其中审稿时间最短的一篇仅用了 3 天时间就被接受了。要想投中 SCI 期刊论文, 我最大的体会是:

1. **选题, 一定要新颖。** 重复研究内容发表十分困难, 除非有充分理由说明与既往研究相比较你的研究方法是先进性的和结果是可信的, 或者是样本数显著大于既往研究。并且你的研究结果具有重要意义等。必须要意识到, 你的研究的目的是为了形成并证实假说, 从一些测试中得出结论, 并把结论传授给别人。你的研究目的不是简单的收集数据。

2. **语言一定要写好。** 如果没有经验和足够的语言水平, 投稿前最好请语言好的专家进行修改。语法、用词错误连篇的文章是很难被审稿专家接受的。

3. **数据的统计学处理要严谨。** 这是最致命的要点, 必须特别强调:

(1) 实验性和分析性的医学论文, 均必须明确地交代统计学方法, 以使有专业知识的读者能够通过原始数据检验所报告的结果。如果可能, 应定量描述结果, 并给出测量误差的适当指标或不确定性(如可信区间)。避免仅依靠统计学假设检验, 如仅有 P 值, 因为其不能代表重要的定量信息。

(2) 讨论实验对象的选择是否合适, 详述随机化方法。描述盲法观察的可靠性, 报告治疗并发症、观察例数以及观察中对象丢失的情况

(如临床实验中退出观察的病例)。

(3) 有不少论文没有交代统计学方法, 大多是那些含有实验室研究内容的文章, 由于花了大量的篇幅介绍实验室的流程, 使“材料与与方法”部分显得“充实”, 因此遗漏或省略了统计学方法的描述, 使文章不完整和欠缺科学性。有些文章在“统计学方法”一栏中, 只用了 5 个字: “采用 t 检验”。也有些只写“全部数据均由 SPSS8.0 软件进行统计学处理”。没有交代具体的统计学方法。让人感觉到, 这是在应付式的填补“缺项”, 写了等于没写。

(4) 虽然 t 检验和 χ^2 检验是基本的统计学方法, 但并非“放之四海而皆准”。目前国内发表的研究论文, 常由于盲目运用 t 检验和 χ^2 检验, 导致质量不高。

并非所有资料的统计分析均可以用 t 检验和 χ^2 检验, 病例数少和非正态分布的资料就必须用非参数检验方法, 如秩和检验和精确概率法等。

(5) 多组间的比较可能需要采用方差分析; 随访资料(如随机临床试验、队列研究等)用生存分析方法可能更佳; 存在多因素的因果关系分析(如预后因素分析、病因学研究等)则需要多元回归分析等。

(6) 不少论文在交代统计学方法时, 笼统地说采用多元回归的方法, 究竟是哪一种回归方法没有说明, 从“结果”中也看不出其资料是

否采用了回归方法。

(7) 滥用相关分析和直线回归的现象也很普遍。实际上, 相关分析是一种低层次的统计学分析方法, 主要用在描述性研究(如横断面研究)的资料分析, 而一般不用于实验性和分析性研究的资料分析。因为相关分析有统计学意义并非代表两组资料存在相关关系。由于在回归分析的统计学教学中, 一般是从直线回归到 Logistic 回归, 再到 cox 回归, 因此回归分析的原理和精神, 多在直线回归中进行交代, 使学习统计学的医学研究生们普遍对直线回归的印象较深。其实直线回归分析很少被运用于医学研究, 医学研究中运用的最广的回归分析是 Logistic 回归和 COX 回归。

(8) 控制混杂和偏倚的措施: 如果研究因素和研究结局之间有可能存在混杂因素, 就必须有措施去校正混杂因素所导致的偏倚。对于多因素的因果关系推导, 必须采用多元回归的方法校正各因素之间的相互混杂。

(9) 样本量的推算主要是使研究的结果避免犯统计学 II 类错误。II 类错误是指由于样本量不足, 使得本来有差异的两组, 运算出无差异的结果。样本量的推算是根据研究者期望的差异值、检出意义的水平(α 值)和研究的功效(1- β 值)。 β 值是允许犯 II 类错误的概率。一般要求 α 值=0.05, 研究功效在 0.8 或 0.9。当你的研究结果中存在 P 值 > 0.05 时, 则要求文章有样本量的推算, 或提供研究功效

作者: 北京协和整形医院薛富善教授
(文献来源: www.dxyer.cn)