

高压氧联合神经干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤

石瑞成, 冯士军, 王志刚

Hyperbaric oxygen combined with neural stem cells transplantation for rat spinal cord injury

Shi Rui-cheng, Feng Shi-jun, Wang Zhi-gang

Abstract

BACKGROUND: Neural stem cells (NSCs) transplantation is widely used in the repair of spinal cord injury (SCI).
OBJECTIVE: To investigate the effect of NSCs transplantation plus hyperbaric oxygen (HBO) on repair of rat SCI.
METHODS: Sixty female rats were divided randomly into three groups: SCI group; NSCs transplantation group; NSCs transplantation+HBO group. Four weeks post-transplantation, histopathology examination and BrdU staining were performed. Eight weeks post-transplantation, horseradish peroxidase (HRP) nerve trace and transmission electron microscope testing and somatosensory evoked potential (SEP) testing were performed. At 1, 2, 4, 6, 8 weeks post-injury, all animals were evaluated for the hind limb behavior with Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score and inclined plane test.
RESULTS AND CONCLUSION: HRP-labeled neurofibrils and BrdU positive cells were found in the spinal cord of the NSCs transplantation+HBO group, some in NSCs transplantation group but few in the SCI group spinal cord injury. SEP testing in the SCI group surpassed that in the NSCs transplantation group ($P < 0.05$). There was significant difference between spinal cord injury group and NSCs transplantation+HBO group ($P < 0.01$). By transmission electron microscope, nerve fibers and myelinated nerve fibers were found in the central transverse plane in the NSCs transplantation group and NSCs transplantation+HBO group. The outcome of functional recovery in the NSCs transplantation+HBO group surpassed that in the NSCs transplantation group. There was significant difference between the NSCs transplantation and NSCs transplantation+HBO groups ($P < 0.05$). The outcome of the SCI group was worse than that of the other groups. There was significant difference between the NSCs transplantation group, NSCs transplantation+HBO group and SCI group ($P < 0.05$). NSCs transplantation can promote the functional recovery of rat hind limbs after SCI, and its combination with HBO has a synergistic effect.

Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Baotou Medical University, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Shi Rui-cheng, Chief physician, Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Baotou Medical University, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China
625024883@qq.com

Received: 2010-11-19
Accepted: 2011-01-25

Shi RC, Feng SJ, Wang ZG. Hyperbaric oxygen combined with neural stem cells transplantation for rat spinal cord injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(19): 3507-3512. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 单纯神经干细胞移植已应用于对受损脊髓组织的修复。

目的: 以神经干细胞移植同时应用高压氧治疗大鼠脊髓损伤, 观察联合作用对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响。

方法: 雌性 SD 大鼠 60 只, 以半切法制成胸段脊髓半横断大鼠模型。随机分成单纯损伤组、神经干细胞移植组及高压氧治疗组, 每组 20 只。伤后第 4 周取材行病理切片苏木精-伊红染色及 BrdU 免疫组织化学染色, 第 8 周取材行辣根过氧化物酶示踪, 透射电镜观察轴突的再生情况, 通过体感诱发电位观察神经电生理恢复情况。造模后 1, 2, 4, 6, 8 周进行 BBB 评分和斜坡实验等运动功能检测。

结果与结论: 观察伤后 4 周病理切片, 单纯损伤组未见神经轴索通过, 神经干细胞移植组可见少量神经轴索样结构, 高压氧治疗组可见较多神经轴索样结构。BrdU 的阳性细胞数及辣根过氧化物酶阳性神经纤维数, 高压氧治疗组最多, 神经干细胞移植组次之, 单纯损伤组最少, 且各组之间差异有显著性意义($P < 0.05$)。透射电镜下神经干细胞移植组、高压氧治疗组正中横断面可见新生的无髓及有髓神经纤维。高压氧治疗组大鼠体感诱发电位的潜伏期短于神经干细胞移植组, 波幅高于神经干细胞移植组($P < 0.05$), 明显优于单纯损伤组($P < 0.01$)。伤后 4 周神经干细胞移植组、高压氧治疗组大鼠后肢运动功能均有较明显恢复, 高压氧治疗组较神经干细胞移植组恢复快($P < 0.05$); 单纯损伤组亦有所恢复, 但程度较轻。提示神经干细胞移植对于脊髓损伤大鼠后肢功能的恢复有促进作用, 联合应用高压氧有协同效果。

关键词: 脊髓损伤; 神经干细胞; 移植; 高压氧; 运动功能

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.19.020

石瑞成, 冯士军, 王志刚. 高压氧联合神经干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(19):3507-3512. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

包头医学院第一附属医院神经外科, 内蒙古自治区包头市 014010

石瑞成, 男, 1967 年生, 山西省榆社县人, 汉族, 1992 年内蒙古医学院毕业, 主任医师, 主要从事立体定向研究。
625024883@qq.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:1673-8225 (2011)19-03507-06

收稿日期:2010-11-19
修回日期:2011-01-25
(20101024001/G·W)

0 引言

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)在一定条件下可以分化成神经系统的各种细胞, 在神经损伤修复方面有着良好的应用前景^[1-10]。高压氧是治疗颅脑损伤及其所致的脑功能障碍的一种有效的无创疗法, 实验将NSCs移植于大鼠脊髓损伤区同时应用高压氧治疗, 观察联合

作用对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009-09/2010-09在包头医学院第一附属医院动物实验室完成。

材料: 取孕14~16 d的SD大鼠1只, 体质量250~300 g; 健康清洁级雌性成年SD大鼠60只,

体质量200~250 g, 均由中国医学科学院动物实验室提供, 实验动物机构许可证号: SCXK20060023。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》^[11]。

主要试剂及仪器:

主要试剂及仪器	来源
L-DMEM 培养基、胰蛋白酶	GIBCO 公司, 美国
FBS	HyClone 公司, 美国
PBS	福州迈新生物技术开发公司
谷氨酰胺	Sigma 公司, 美国
碱性成纤维细胞生长因子	Peptotech 公司, 美国
EDTA	天津市化学试剂一厂
辣根过氧化物酶	Santa Cruz 公司, 美国
BrdU 免疫组织化学试剂盒	大连宝生物工程有限公司

方法:

NSCs的培养和鉴定: 取孕14~16 d的SD大鼠1只, 麻醉后引颈处死, 体积分数75%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EGF 10 mg/L、碱性成纤维细胞生长因子10 mg/L、N2添加剂, 37 °C, 体积分数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。

急性脊髓损伤动物模型的建立: 取雌性SD大鼠60只, 用25 g/L氯胺酮(20 mg/kg)腹腔注射麻醉, 取俯卧位。选择T₉棘突, 沿后正中中线切开背部皮肤及皮下组织, 长2.0~3.0 cm, 剥离椎旁肌并向两侧牵开, 显露T₈₋₉棘突及椎板, 用大鼠椎板钳咬除T₈棘突、T₉棘突及椎板, 显露硬膜。剪开硬膜, 用针头制成的刀口切除右半侧脊髓。以损伤后右侧后肢瘫痪为成功标准。用青霉素盐水冲洗伤口, 逐层缝合组织。术后挤尿早晚各1次, 直至恢复排尿反射。

动物分组和高压氧治疗: 将急性脊髓损伤动物模型60只按随机数字表法分成3组, 即单纯损伤组、NSCs移植组、高压氧治疗组, 每组20只。NSCs移植组造模后6 h显露出脊髓损伤区域, 微量注射器自损伤处头尾两端向损伤处刺入, 分别缓慢注入10 μL(1×10¹⁰ L⁻¹)细胞悬液, 3 min内注射完后留针5 min并用医用生物胶封闭针孔以防止细胞悬液顺针道外溢, 逐层缝合伤口。高压氧治疗组大鼠建模1 h后, 将大鼠置于高压氧舱内, 用纯氧洗舱10 min, 以0.01 MPa/min的速率匀速加压至0.2 MPa, 稳压30 min, 期间间断通纯氧以维持氧体积分数在70%以上, 随后匀速减压10 min至常压, 造模6 h后按上述方法移植NSCs。每日治疗4次, 连续7 d。

苏木精-伊红染色和免疫组化染色: 3组各于伤后4周随机取2只大鼠取材行伤处组织学检查以证实损伤程度。对组织切片进行苏木精-伊红染色和抗BrdU免疫组化染色。每张切片在高倍镜(×200)下任取10个视野, 计算每个视野的BrdU阳性细胞数, 取其均值作为每组的BrdU阳性细胞数。

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)示踪: 造模后8周, 以生理盐水溶解HRP。每组随机取2只大鼠, 用25 g/L氯胺酮(20 mg/kg)麻醉后手术暴露脊髓。于T₁₂髓背正中静脉左、右侧1 mm处进针, 进针深度1.5 mm。以0.01 μL/min的速度注射50%HRP 1 μL, 注射完毕后留针15 min。饲养3 d后, 水合氯醛(1 mL/kg)麻醉下, 40 g/L多聚甲醛心脏灌注, 取出T₃₋₁₂脊髓节段浸入300 g/L蔗糖溶液, 4 °C、18 h 后制作5 μm厚冰冻切片, 行HRP的DAB显色。各组各时间点随机抽取10张切片, 光镜下计数脊髓横切面上HRP阳性神经纤维束数目。

透射电镜观察: 造模后8周, 每组随机取2只大鼠, 25 g/L戊二醛经心灌注处死大鼠, 取材后用25 g/L戊二醛固定过夜; 在左半侧脊髓以损伤处为起点分别向近心端、远心端连续取2段1 cm长、1 mm宽的脊髓, 置于4 °C 锇酸固定2 h, 漂洗后丙酮梯度脱水, 醋酸铀4 °C染色4 h, 环氧树脂618包埋, 透射电镜观察。

体感诱发电位(Somatosensory evoked potentials, SEP)的检测: 造模后第8周, 3组各取7只大鼠, 参考文献[12]的方法进行体感诱发电位的测定, 并记录潜伏期和波幅, 观察神经电生理恢复情况。体感诱发电位检测: 用KEYPOINT 4诱发电位仪进行测定。100 g/L水合氯醛腹腔注射麻醉, 将其平放在水平面上, 后肢固定刺激电极。记录电极安放于冠状缝和矢状缝愈合线的相交处头皮下(即后肢皮质感觉区), 参考电极置于其后方0.5 cm处。给予直流方波电脉冲刺激, 以后肢轻微抽动为宜, 电流强度为5~15 mA, 波宽0.2 ms, 频率3 Hz, 叠加次数50~60次。观察记录感觉诱发电位潜伏期及波幅的变化。

下肢运动功能评价: ①Basso-Beattie-Bresnahan (BBB)运动功能评分测定^[13]: 采取双盲法对3组大鼠进行评分, 分别于造模后1, 2, 4, 6, 8周对3组大鼠进行BBB运动功能评分测定, 共检测6次, 取均值。②斜板实验: 斜板实验是将斜板表面垫以6 mm厚的橡胶垫, 按大鼠身体轴线与斜板纵轴垂直的方向放置大鼠, 逐渐增加斜板倾斜角度, 在斜板上至少停留5 s, 记录这一最大角度, 每只大鼠测3次斜板倾斜角度, 取平均值。测量时间: 3组分别在造模后1, 2, 4, 6, 8周进行, 所得数据采用Student's t 检验进行统计学处理。

主要观察指标: 病理切片苏木精-伊红染色及BrdU免疫组织化学染色及HRP示踪, 透射电镜观察轴突的再生情况, 通过体感诱发电位观察神经电生理恢复情况。

于造模后1, 2, 4, 6, 8周进行BBB评分和斜板实验等运动功能检测。

统计学分析: 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 由第一作者采用SPSS 15.0统计软件进行完全随机设计的方差分析。两组之间的两样本 t 检验比较用Dunnett t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入雌性成年SD大鼠60只, 分为3组, 全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 NSCs形态 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, NSCs团增多, 较小, 形状不规则。小部分细胞团贴壁。5 d后, NSCs球增多, 较大, 形状规则, 成球形, 见图1, 2。

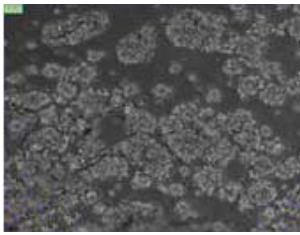


Figure 1 Morphology of primary cultured neural stem cells under phase-contrast microscope ($\times 40$)
图1 相差显微镜下观察培养的原代神经干细胞形态($\times 40$)

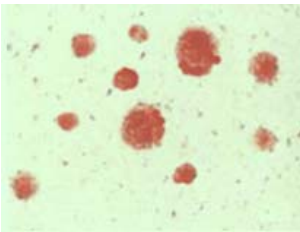


Figure 2 Nestin staining of neural stem cells ($\times 40$)
图2 神经干细胞 Nestin 免疫组织化学染色($\times 40$)

2.3 苏木精-伊红染色和免疫组化染色结果 伤后4周单纯损伤组可见损伤处脊髓组织断裂, 为瘢痕连接, 结构紊乱, 有明显空洞形成, 见图3。NSCs移植组见星形胶质细胞在损伤的边缘聚集在完整的脊髓与受损脊髓的交界处形成瘢痕, 组织空洞小于单纯损伤组, 而大于高压氧治疗组, 见图4。高压氧治疗组见星形胶质细胞反应性肥大, 在损伤的边缘聚集, 并在脊髓受损伤的边缘形成瘢痕, 部分细胞呈长梭形, 突起与突起之间构成致密的网络, 空洞消失, 见图5。免疫组化染色结果显

示, 大鼠脊髓损伤灶组织中的BrdU阳性细胞数见表1及图6~8。3组经过方差分析后两组之间的比较用Dunnett t 检验, 各组之间差异具有显著性意义($P < 0.01$)。

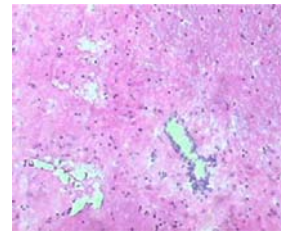


Figure 3 Hematoxylin-eosin staining of spinal cord tissues at 4 wk following spinal cord injury ($\times 40$)
图3 伤后4周单纯损伤组苏木精-伊红染色结果($\times 40$)

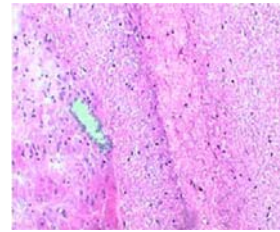


Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of spinal cord tissues at 4 wk following neural stem cells transplantation ($\times 40$)
图4 伤后4周神经干细胞移植组苏木精-伊红染色结果($\times 40$)

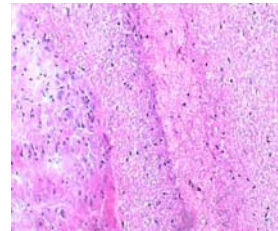


Figure 5 Hematoxylin-eosin staining of spinal cord tissues at 4 wk following hyperbaric oxygen combined with neural stem cells transplantation ($\times 40$)
图5 伤后4周高压氧治疗组苏木精-伊红染色结果($\times 40$)

表1 伤后各组大鼠 BrdU 阳性细胞数及 HRP 阳性神经纤维数比较

Table 1 The number of horseradish peroxidase (HRP)-positive nerve fibers and the number of BrdU positive neurons ($\bar{x}\pm s, n=2, n$)

Group	BrdU positive cells	HRP-positive fibers
Spinal cord injury	0.00 \pm 0.00	11.46 \pm 1.84
Neural stem cells transplantation	82.53 \pm 5.19	43.95 \pm 2.98
Neural stem cells transplantation +hyperbaric oxygen	107.23 \pm 7.54	86.37 \pm 4.42
P	< 0.01	< 0.01



Figure 6 BrdU-labeled cells at 4 wk following spinal cord injury (x40)
图 6 伤后 4 周单纯损伤组 BrdU 免疫组化结果(x40)

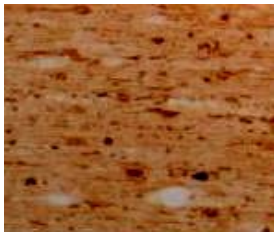


Figure 7 BrdU-labeled cells at 4 wk following neural stem cells transplantation (x40)
图 7 伤后 4 周神经干细胞移植组 BrdU 免疫组化结果(x40)

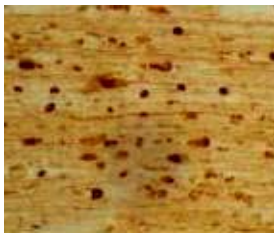


Figure 8 BrdU-labeled cells at 4 wk following hyperbaric oxygen combined with neural stem cells transplantation (x40)
图 8 伤后 4 周高压氧治疗组 BrdU 免疫组化结果(x40)

2.4 HRP逆行神经示踪结果 HRP经DAB呈色反应后, 在注射部位出现一中心部位深染其周围逐渐变浅的区域。单纯损伤组大鼠经腰膨大处注入HRP后2 d, HRP逆行运输, 至T₈以上节段可见较少的HRP阳性颗粒标记的神经纤维, 见图9。



Figure 9 Horseradish peroxidase-positive fibers at 8 wk following spinal cord injury (x40)
图 9 伤后 8 周单纯损伤组 HRP 逆行神经示踪结果(x40)

NSCs移植组可见有HRP阳性神经纤维, 但数目较高压氧治疗组少, 较单纯损伤组多, 见图10。高压氧治疗组脊髓可见到较多HRP阳性颗粒标记的神经纤维, 见图11。伤后8周大鼠脊髓损伤灶组织中HRP阳性神经纤维束数目见表1, 各组之间差异具有显著性意义($P < 0.01$)。



Figure 10 Horseradish peroxidase-positive fibers at 8 wk following neural stem cells transplantation (x40)
图 10 伤后 8 周神经干细胞移植组 HRP 逆行神经示踪结果(x40)

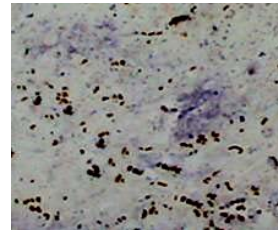


Figure 11 Horseradish peroxidase-positive fibers at 8 wk following hyperbaric oxygen combined with neural stem cells transplantation (x40)
图 11 伤后 8 周高压氧治疗组 HRP 逆行神经示踪结果(x40)

2.5 透射电镜观察 造模后8周透射电镜观察示, 单纯损伤组损伤区可见胶质瘢痕和少量有髓神经纤维, 巨噬细胞吞噬变性、坏死的有髓神经纤维, 见图12。NSCs移植组损伤区可见较多有髓神经纤维及无髓神经纤维, 数目多于单纯损伤组, 见图13; 高压氧治疗组损伤区可见大量有髓神经纤维及无髓神经纤维, 轴突数量较多, 再生轴突髓鞘完整, 见图14。

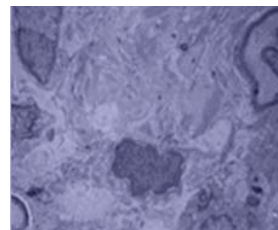


Figure 12 Eight weeks after injury, the changes of spinal cord injury group under transmission electron microscopy (x8 000)
图 12 伤后 8 周单纯损伤组透射电镜观察结果(x8 000)

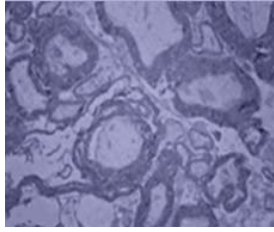


Figure 13 Eight weeks after injury, the changes of neural stem cells transplantation group under transmission electron microscopy ($\times 8\ 000$)
图 13 伤后 8 周神经干细胞移植组透射电镜观察结果 ($\times 8\ 000$)

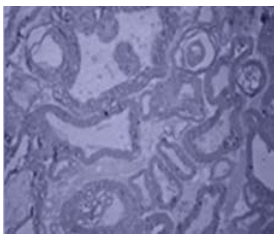


Figure 14 Eight weeks after injury, the changes of hyperbaric oxygen combined with neural stem cells transplantation group under transmission electron microscopy ($\times 8\ 000$)
图 14 伤后 8 周高压氧治疗组透射电镜观察结果 ($\times 8\ 000$)

2.6 SEP检测结果 建立脊髓半横断损伤模型后, 同时进行SEP检测发现各组大鼠的诱发电位波形完全消失。移植后8周, 单纯损伤组体感诱发电位少量恢复, 高压氧治疗组体感诱发电位明显恢复, 波幅增高, 见表2。NSCs移植组与单纯损伤组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 高压氧治疗组与单纯损伤组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。表明高压氧治疗组电信号从后肢到头皮传导时间比其他两组短, 传导通路已经畅通, 恢复较好。

表 2 伤后 8 周各组大鼠 SEP 检测结果比较
Table 2 Somatosensory evoked potential (SEP) testing in each group 8 wk after spinal cord injury ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Group	Latency (ms)	Amplitude (mV)
Spinal cord injury	15.543 \pm 0.257	0.755 \pm 0.434
Neural stem cells transplantation	13.917 \pm 0.567 ^a	1.264 \pm 0.423 ^a
Neural stem cells transplantation + hyperbaric oxygen	12.354 \pm 0.438 ^b	1.925 \pm 0.539 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. spinal cord injury group

2.7 BBB评分和斜坡实验结果

BBB评分: 伤前各组BBB评分均为21分。伤后大鼠均表现为完全截瘫, 后肢及尾无活动, 排尿障碍, 排便未见明显障碍。伤后4 d时开始出现对针刺的回缩反应;

伤后2周开始出现后肢运动; 伤后4周时可见明显后肢活动; 伤后6周后肢可出现协调活动, 排尿功能部分恢复, 但仍有膀胱残余尿。伤后3组变化过程相同, NSCs移植组、高压氧治疗组两组评分高于单纯损伤组, 伤后4周高压氧治疗组与单纯损伤组差异具有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 高压氧治疗组与NSCs移植组差异具有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图15。

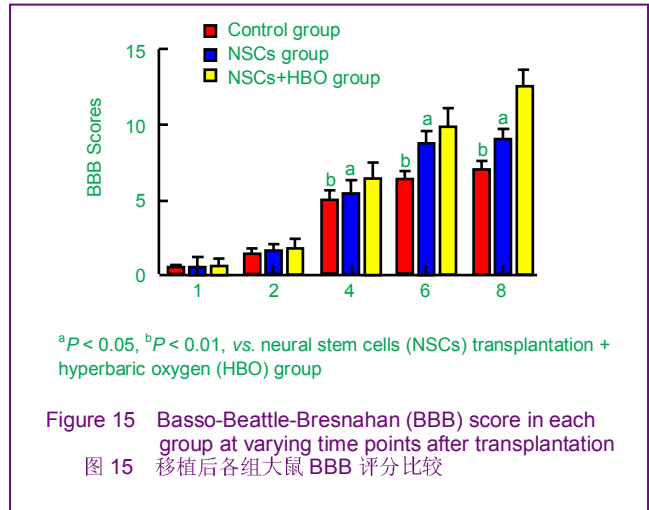


Figure 15 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score in each group at varying time points after transplantation
图 15 移植后各组大鼠 BBB 评分比较

斜坡实验: 高压氧治疗组与单纯损伤组比较差异具有显著性意义 ($P < 0.05$), 高压氧治疗组与NSCs移植组比较差异具有显著性意义 ($P < 0.05$), NSCs移植组与单纯损伤组比较差异具有显著性意义 ($P < 0.05$)。伤后6周, 高压氧治疗组与对单纯损伤组差异具有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 高压氧治疗组与NSCs移植组差异具有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图16。

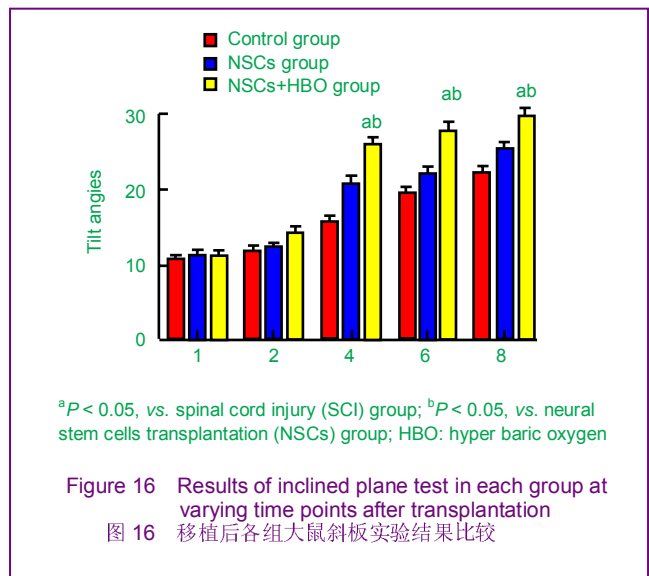


Figure 16 Results of inclined plane test in each group at varying time points after transplantation
图 16 移植后各组大鼠斜坡实验结果比较

3 讨论

中枢神经系统再生问题一直是在理论研究和临床

实践上困扰神经科学界和医学界的重大难题。脊髓损伤后引起的一系列“瀑布”式反应,由此带来对脊髓组织的“二次打击”,导致大量神经元变性甚至坏死,使得正常神经传导通路中断,最终导致机体功能严重障碍^[14-23]。因此,有学者据此提出以下治疗脊髓损伤的策略:①保护变性神经元,减少坏死范围。②诱导内源性NSCs增殖或NSCs移植替代坏死神经元。NSCs是中枢神经系统中保持分裂和分化潜能的细胞,其在研究神经系统的发育、分化以及治疗神经系统疾病中具有重要的作用,NSCs移植已成为人们探索治疗神经系统损伤的新途径。但是单纯NSCs移植对受损脊髓组织的修复作用并不理想,需要结合药物及生物工程材料等手段进行综合治疗。

脊髓损伤后出现一系列的氧化反应,产生大量自由基,最终可导致神经组织损伤,从而出现临床多种神经功能缺失的症状和体征。脊髓损伤后应尽早开始高压氧治疗,有利于减轻残疾程度,能预防和阻止患者病情恶化,有明显的远期效果,其具有疗效良好,安全可靠,并发症少的优点。故本实验将高压氧和NSCs移植联合用于大鼠脊髓损伤的治疗。实验结果表明高压氧联合NSCs移植与单纯的NSCs移植相比无论从组织学上还是功能学上疗效都有明显的提高。分析联合后的协同作用可能是高压氧通过以下途径改善了脊髓损伤后的微环境:①神经细胞对氧有特殊的依赖性和敏感性,而高压氧能显著提高血氧浓度,增加氧弥散距离。②高压氧能提高红细胞变形能力,降低毛细血管通透性。③高压氧能促进血流速度,减少血小板聚集,从而降低血液黏滞度。④高压氧纠正酸中毒,改善脊髓损伤部位的微循环及血流灌注,维持神经细胞能量代谢,并恢复可逆性损伤的神经元功能。

总之,用高压氧联合NSCs治疗大鼠缺氧缺血性脑损伤,移植的NSCs可以更好的在损伤部位存活、增殖分化与迁移,促进脊髓损伤后大鼠神经功能的恢复,这可以为临床治疗脊髓损伤提供新的思路和方法。

4 参考文献

[1] Fukuda S, Nakamura T, Kishigami Y, et al. New canine spinal cord injury model free from laminectomy. *Brain Res Protoc.* 2005;14: 171-180.

[2] Lepore AC, Bakshi A, Swanger SA. Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the lumbar cord. *Brain Res.* 2005;1045:206-216.

[3] Kang SK, Shin MJ, Jung JS, et al. Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev.* 2006;15:583-594.

[4] Nishio Y, Koda M, Kamada T, et al. The use of hematopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hind limb function in adult rats. *J Neurosurg Spine.* 2006;5:424-433.

[5] Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, et al. Transplantation of canine umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J Vet Sci.* 2007;8: 275-282.

[6] Fehlings MG, Sekhon LH. Acute interventions in spinal cord injury: what do we know, what should we do? *Clin Neurosurg.* 2001;48: 226-242.

[7] Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M. Steroid - mediated differentiation of neural/neuronal cells from epithelial ovarian precursors in vitro. *Cell Cycle.* 2008;7(22):3577-3583.

[8] Bethea CL, Reddy AP, Pedersen D, et al. Expansion of differentiating serotonin neurons derived from rhesus embryonic stem cells and comparison to adult serotonin neurons. *Gene Expr Patterns.* 2009;9(2):94-108.

[9] Maletić-Savatić M, Vingara LK, Manganas LN, et al. Metabolomics of neural progenitor cells: A novel approach to biomarker discovery. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008; 73:389-401.

[10] Chigr F, Rachidi F, Segura S, et al. Neurogenesis inhibition in the dorsal vagal complex by chronic immobilization stress in the adult rat. *Neuroscience.* 2008;34(9):503-509.

[11] 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.

[12] Albin RL, Mink JW. Recent advances in Tourette syndrome research. *Trends Neurosci.* 2006;29:175-182.

[13] Pallini R, Vitiani LR, Bez A, et al. Homologous transplantation of neural stem cells to the injured spinal cord of mice. *Neurosurgery.* 2005;57(5): 1014-1025.

[14] Engelmann CM, Sierl L. Cognitive disturbances following severe traumatic brain injury. *Ugeskr Laeger.* 2007;169(3):217-219.

[15] Nordenbo AM, Jakobsen JK. Rehabilitation of severe traumatic brain injury. *Ugeskr Laeger.* 2007;169(3):197-198.

[16] Aberi H, Moshayedi P, Aghayan HR, et al. Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: An interim report on safety considerations and possible outcomes. *Neurosci Lett.* 2008;443(1):46-50.

[17] Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlen M, et al. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol.* 2008;6(7):e182.

[18] Carvalho KA, Vialle EN, Moreira GH, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45(+)/CD34(-)) after cell therapy in chronic spinal cord injury in Wistar rats. *Transplant Proc.* 2008; 40(3): 845-846.

[19] Xiao Q, Du Y, Wu W, et al. Bone morphogenetic proteins mediate cellular response and, together with Noggin, regulate astrocyte differentiation after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2010;221(2): 353-366.

[20] Wang D, Zhang JJ, Yang ZX. Treatment of spinal cord injury by transplanting neural stem cells with NgR gene silencing. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2010;22(1): 28-31.

[21] Foret A, Quertainmont R, Botman O, et al. Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise. *J Neurochem.* 2010;112(3):762-772.

[22] Lü HZ, Hu JG. Expression of bone morphogenetic proteins-2/4 in neural stem cells and their lineages. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2009;69(4):441-447.

[23] Lee SH, Chung YN, Kim YH, et al. Effects of human neural stem cell transplantation in canine spinal cord hemisection. *Neurol Res.* 2009;31(9):996-1002.

来自本文课题的更多信息一

作者贡献: 实验设计、实施者为第一作者石瑞成, 评估者为第二作者冯士军, 经过正规培训, 采用盲法评估。

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》^[11]。

本文创新性: 以“NSCs, transplantation, hyperbaric oxygen”为关键词, 检索 ScienceDirect 数据库(<http://www.sciencedirect.com>), 发现单纯 NSCs 移植对受损脊髓组织的修复作用并不理想, 需要结合药物及生物工程材料等手段进行综合治疗。文章创新性地将神经干细胞移植于大鼠脊髓损伤区同时应用高压氧治疗, 观察联合作用对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响, 结果提示神经干细胞移植对于脊髓损伤大鼠后肢功能的恢复有促进作用, 联合应用高压氧有协同效果。实验结果为神经系统损伤提供了有效的治疗方法, 使神经系统损伤后在结构和功能上尽可能达到生理性修复。