

人脐带间充质干细胞移植治疗大鼠创伤性脑损伤*☆

袁源¹, 杨树源², 张建宁²

Human umbilical cord derived mesenchymal stem cell transplantation for rat traumatic brain injury

Yuan Yuan¹, Yang Shu-yuan², Zhang Jian-ning²

¹Department of Neurosurgery, Yantai Yu Huang Ding Hospital, Yantai 264000, Shandong Province, China; ²Department of Neurosurgery, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300040, China

Yuan Yuan☆, Doctor, Attending physician, Department of Neurosurgery, Yantai Yu Huang Ding Hospital, Yantai 264000, Shandong Province, China

Supported by: the Science and Technology Development Program of Yantai City, No. 2007139-4*

Received: 2011-05-02
Accepted: 2011-06-27

¹烟台毓璜顶医院神经外科, 山东省烟台市 264000; ²天津医科大学总医院神经外科, 天津市 300040

袁源☆, 男, 1975年生, 山东省泰安市人, 汉族, 2006年天津医科大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事神经干细胞体内移植的研究。

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)45-08424-05

收稿日期: 2011-05-02
修回日期: 2011-06-27
(20110402001/W·W)

Abstract

BACKGROUND: There are rare reports about umbilical cord derived mesenchymal stem cells (UCMSCs) transplantation in the treatment of brain injury.

OBJECTIVE: To investigate the effects and mechanism of UCMSCs transplantation on the repair of rat brain fluid percussion injury.

METHODS: UCMSCs were separated from new-born umbilical cord and cultured *in vitro*, labeled with BrdU, and transplanted into rat brain 24 hours after fluid percussion injury. There were four groups: UCMSCs transplantation group, *in situ* UCMSCs transplantation; control group, injected with the same volume of DMEN/F12 medium; model group, without treatment; sham-injury group, no fluid percussion injury was made.

RESULTS AND CONCLUSION: Significant recovery of behavior was found in UCMSCs-treated rats at 1-3 weeks after transplantation. Immunohistochemical analysis showed that a small number of transplanted cells expressed neuron-specific enolase and glial fibrillary acidic protein. Compared with the control group, the expression of vascular endothelial growth factors increased in the injured region and the number of apoptotic cells decreased in the UCMSCs transplantation group. These findings show that UCMSCs transplantation can promote the early function recovery following brain fluid percussion injury through stimulating the secretion of vascular endothelial growth factors, increasing the number of microvessels in the injured region, and inhibiting cell apoptosis.

Yuan Y, Yang SY, Zhang JN. Human umbilical cord derived mesenchymal stem cell transplantation for rat traumatic brain injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(45): 8424-8428. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 脐带间充质干细胞体内移植治疗脑损伤的效果目前尚较少见报道。

目的: 观察人脐带间充质干细胞移植对大鼠液压冲击脑损伤的治疗作用。

方法: 从新生儿脐带中分离、培养间充质干细胞。制作中度打击大鼠脑损伤模型。实验分为4组: ①脐带间充质干细胞移植组: 损伤后原位移植脐带间充质干细胞。②对照组: 损伤后原位注射等量 DMEN/F12 培养基。③单纯损伤组: 仅施行损伤。④假损伤组: 仅切开头皮及颅骨, 不实施机械性损伤。

结果与结论: 脐带间充质干细胞移植后 1~3 周, 动物神经功能评分较对照组明显改善; 4 周后, 各组动物神经功能评分均恢复正常。免疫组织化学检测表明少部分移植细胞表达神经元特异性烯醇化酶, 胶质纤维酸性蛋白。与对照组相比, 移植组损伤区血管内皮生长因子表达明显增加, 凋亡细胞减少。提示脐带间充质干细胞脑内移植有助于促进创伤性脑损伤后的早期功能恢复, 这种治疗效果是通过刺激宿主细胞分泌血管内皮生长因子, 增加损伤区微血管密度, 抑制宿主细胞凋亡等实现的。

关键词: 脐带; 间充质干细胞; 大鼠; 细胞移植; 脑损伤

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.45.014

袁源, 杨树源, 张建宁. 人脐带间充质干细胞移植治疗大鼠创伤性脑损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(45):8424-8428. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

新近研究表明, 新生儿脐带组织中可提取到一种具有自我更新和多向分化潜能的干细胞, 在特定培养条件下, 这种干细胞可分化为神经元样细胞, 表达巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶、神经丝蛋白、胶质纤维酸性蛋白, 将这种细胞命名为脐带间充质干细胞(umbilical cord derived mesenchymal stem cell, UCMSC)^[1-3]。实验首次采用大鼠液压冲击脑损伤模型, 观察人UCMSC移植对脑损伤的影响及

其机制。

1 材料和方法

设计: 对比观察。

时间及地点: 实验于2009-10/2011-02天津市神经病学研究所完成, 实验室为天津市重点实验室。

材料: 成年雄性Wistar大鼠40只, 体质量200~250 g, 由解放军军事医学科学院实验动物中心提供。脐带取自天津市中心妇产医院足月新生儿剖宫产脐带, 均经父母授权同意。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胶原酶IV、Fic-Bandeiraea simplicifolia lectin-1	sigma 公司
兔抗人神经元特异性烯醇化酶 (neuron specific enolase, NSE)单克隆抗体、兔抗人胶质纤维酸性蛋白 (glia fibrillary acidic protein, GFAP) 单克隆抗体	Chemicon
兔抗 BrdU 单克隆抗体; SP 试剂盒	北京中山生物技术有限公司
原位细胞凋亡检测试剂盒	德国 Roche 公司
MODEL01-B 型液压颅脑损伤仪	美国 NEW SUN 公司
立体定向仪	美国 Stoelting 公司

实验方法:

UCMSC的培养: UCMSC的培养由本实验室在参考文献的基础上, 结合前期工作, 形成了稳定的培养方法^[1,4-6]。操作如下: 取下脐带, 无菌条件下浸入 DMEM/F12培养基中, 4 °C 保存, 超净台内取出脐带, PBS充分洗, 冲去脐静脉及动脉内的残存血。将脐带剪碎至1 mm×1 mm×1 mm大小组织块, 将组织块转移至1 g/L胶原酶IV中, 37 °C 持续搅拌消化30 min, 随即1 g/L胰酶37 °C继续搅拌消化30min。细胞筛过滤, 含组织细胞的滤液离心, PBS洗2遍。组织细胞以 $1.0 \times 10^6/cm^2$ 的密度接种于含 DMEM/F12培养基(含体积分数10% FBS, 25 mmol/L谷氨酰胺, 100 U/mL青霉素, 100 mg/L链霉素)的T-25塑料培养瓶中。三四天后, 更换培养基, 去掉未贴壁细胞。以后每3 d换液1次, 至细胞融合传代。

UCMSC鉴定: 取第3代UCMSCs经流式检测仪检测细胞表面抗原标志CD13, CD29, CD105, CD44, CD106, CD14, CD34, CD11a, CD31, CD45的表达。取第4, 5代的UCMSC, 于移植前48 h在培养基内加入终浓度为200 μ mol/L的BrdU。移植前, 收集细胞, 调整细胞悬液浓度至 $1 \times 10^{11} L^{-1}$ 待用。

动物分组及液压冲击伤模型的建立: 成年Wistar大鼠40只, 编号后随机抽样分为4组, 每组10只: ①UCMSC组: 损伤后原位移植UCMSC。②对照组: 损伤后原位注射不含干细胞的等量DMEM/F12培养基。③单纯损伤组: 仅施行损伤, 不予移植操作。④假损伤组: 仅切开头皮及颅骨, 但不实施机械性损伤。每组10只动物(不含打击致死者)。将各组实验用大鼠随机编号后称体质量, 用体积分数10%水合氯醛按0.35 g/kg经腹腔内注射麻醉, 头皮正中切口, 暴露冠状缝与人字缝之间的颅骨。用台式牙钻于左顶颅骨钻孔, 开一直径5 mm的圆形骨窗, 保持硬膜完整。将自制打击管通过骨窗安置于硬膜外, 将打击管接到液压冲击颅脑损伤仪打击口, 以202.65 kPa峰值冲击压力, 对大鼠颅脑造成冲击损伤。随后观察动物, 放回复苏。

细胞移植: 伤后24 h, 再次麻醉动物并固定于立体定向架上。每只动物于患侧顶叶皮质接受细胞移植。移植部位位于患侧顶叶皮质, 坐标点为: 前囟后3 mm, 左旁开2 mm, 深3 mm。损伤后皮质苏木精-伊红染色发现, 损伤区域形成一约5 mm×5 mm的水肿坏死区域, 深度约3 mm。该移植部位即由坏死区域的中心进针, 针尖部位坏死区与正常组织的交界处。微量注射泵以1 μ L/min的速度向脑组织内注入10 μ L(1×10^6)UCMSC悬液, 停针10 min后缓慢拔出注射针头。并用骨蜡将骨孔堵塞。对照组同样操作注射不含干细胞的等量培养基。

神经功能评价: 大鼠颅脑损伤后, 由同一位盲于实验分组的评者分别在颅脑损伤前、伤后24, 48 h, 1, 2, 3, 4周对动物进行神经运动功能评价。参照Faden等使用的大鼠实验性颅脑创伤功能行为评分标准^[7], 并结合本研究所的应用经验, 制定评价标准如下: ①30°斜板保持位置能力: 将大鼠置于倾斜30°的斜板上, 观察其保持位置的能力, 包括垂直、左右两侧和水平3个方向。②悬吊尾部前肢屈曲能力: 悬吊大鼠尾部, 观察前肢屈曲能力。③对抗侧向牵拉能力: 患侧对抗牵拉的能力。④前爪抓握牵引能力: 将大鼠前爪悬放在绳子上, 记录鼠的悬挂时间及有无后肢悬挂。⑤行走能力: 行走的方向及稳定性。正常为满分, 22分。

脑组织的处理和观察: 颅脑损伤后4周, 各组动物给予体积分数10%水合氯醛腹腔内注射麻醉, 40 g/L多聚甲醛经左心室灌注固定。脑组织完整取下, 同一固定液室温后固定过夜, 后行石蜡包埋, 于细胞移植位点连续冠状切片, 片厚5 μ m。每隔10张切片抽取1张行BrdU免疫组织化学染色, 镜下确定BrdU 阳性细胞后, 取其相邻切片分别行NSE、GFAP、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)免疫组织化学染色。

免疫组织化学染色观察血管内皮生长因子表达: 取石蜡切片, 常规脱蜡至水, 体积分数3% H_2O_2 -甲醇溶液封闭10 min, 微波炉抗原修复, 山羊血清室温孵育15 min, 一抗(兔抗人NSE单克隆抗体, 兔抗人GFAP单克隆抗体, 兔抗人BrdU和兔抗大鼠VEGF单克隆抗体)4 °C过夜, PBS洗, 加生物素标记的二抗工作液37 °C孵育15 min, 再与辣根酶标记链酶卵白素工作液37 °C作用15 min, DAB或AEC显色10 min。在BrdU染色时, 一抗孵育前切片首先予1 mol/L HCl 65 °C处理30 min。

原位凋亡染色观察脑组织凋亡细胞: 选取损伤临近部位脑组织石蜡切片, 行TUNEL法原位标记凋亡细胞。检测步骤如下: 切片经二甲苯及梯度乙醇脱蜡。蛋白酶K(20 mg/L)15 min消化细胞核蛋白成分, 体积分数3% H_2O_2 -甲醇溶液封闭10 min, 0.1%Triton-X 100 4 °C 2 min。加TUNEL混合液50 μ L/片, 置湿盒内37 °C孵育1 h, 5 μ L Convert-POD 37 °C孵育1 h, DAB显色。光

镜下($\times 400$)于创伤区皮质相同部位计数每高倍视野下阳性细胞数。

主要观察指标: ①UCMSC的分离、纯化及扩增结果。②液压冲击脑损伤后病理学观察结果。③神经功能评价结果。④移植细胞转归。⑤VEGF染色及原位凋亡染色结果。

统计学分析: 由本文作者应用SPSS 13.0统计软件进行分析,进行多因素方差分析,各组间行LSD/*t* 检验,两样本均数*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 实验选用大鼠40只,分为4组,4组大鼠均有死亡,均为损伤后即刻死亡,每组死亡大鼠立即得到补充,最终完成实验大鼠仍为每组10只。

2.2 UCMSC的分离、纯化及扩增结果 细胞滤液接种后第2天即看见有少量形态各异的贴壁细胞,散在分布。1周左右时贴壁细胞形成集落,占优势的是成纤维样细胞。其增殖能力旺盛,至2周左右可达到80%融合,2.5 g/L胰酶消化,传代后可得到纯化的成纤维样细胞,以后每3天传代1次。传代后的细胞形态无明显变化,性质稳定。至少能体外培养4个月,传20代以上。细胞表面抗原标志检测表明不同代数的脐带来源MSC均强烈表达CD13、CD29、CD105、CD44,弱表达CD106,不表达CD14、CD34、CD11a、CD31、CD45^[1]。该结果与骨髓及脐血间充质干细胞相似,表明UCMSCs与骨髓间充质干细胞一样属于间充质干细胞。

2.3 液压冲击脑损伤后病理学观察结果 为观察液压冲击脑损伤大鼠的损伤部位及损伤程度,将部分单纯损伤大鼠分别于伤后2 d及2周处死,取脑组织切片行苏木精-伊红染色,观察其病理学改变。伤后2 d,大体观察见损伤大鼠额顶叶打击部位挫伤坏死,脑实质内明显出血,伴有皮质下蛛网膜下腔出血,并可延及同侧大脑半球。苏木精-伊红染色见神经细胞周围明显水肿,微血管外间隙显著增大。2周后,打击部位已可见胶质瘢痕形成,苏木精-伊红染色白质内可见大量神经元坏死、胶质细胞增生和空洞样结构形成。

2.4 神经功能评价结果 大鼠给予中等压力(202.65 kPa)的液压冲击脑损伤后,大部分立即出现呼吸骤停,四肢抽搐,弓背,毛发竖立。立即经人工按摩辅助呼吸,直至呼吸恢复正常,仍有部分死亡,死亡率约20%,麻醉清醒后,大多精神萎靡,右下肢运动障碍明显,不能直线行走。每组死亡大鼠立即得到补充,最终完成实验大鼠仍为每组10只。损伤后24 h至移植后24 h,与假损伤组相比,损伤组动物评分明显减低($P < 0.05$),且各损伤组之间评分差异无显著性意义($P > 0.05$),说明脑损伤动物模型各组间的神经功能障碍程度比较一

致,证明本液压冲击脑损伤模型稳定可靠。损伤后1~3周,UCMSC移植组神经运动功能评分显著高于对照组、单纯损伤组($P < 0.05$),损伤后4周,各组神经运动功能评分均恢复正常,组间比较差异无显著性意义($F=1.3, P > 0.05$)。见表1。

Group	1 d	2 d	1 wk
UCMSC transplantation	7.1±0.9 ^{ab}	7.1±0.9 ^{ab}	16.4±1.2 ^{ab}
Control	7.3±1.2 ^a	7.3±1.2 ^a	10.7±1.2 ^a
Model	7.3±0.9 ^a	7.3±0.9 ^a	10.8±1.2 ^a
Sham-injury	22	22	22
Group	2 wk	3 wk	4 wk
UCMSC transplantation	19.30±0.67 ^{ab}	20.5±1.0 ^{ab}	21.9±0.3
Control	15.70±1.25 ^a	18.7±0.7 ^a	21.7±0.5
Model	15.20±1.6 ^a	18.9±0.7 ^a	21.8±0.4
Sham-injury	22	22	22

^a $P < 0.05$, vs. sham-injury group; ^b $P < 0.05$, vs. control group and model group; UCMSC: umbilical cord derived mesenchymal stem cells

2.5 移植细胞转归 免疫组织化学检查结果显示,UNMSC移植后4周,穿刺道临近的损伤皮质,海马区均可见大量BrdU阳性细胞,见图1,同侧胼胝体区,室管膜下区也可见散在分布的BrdU阳性细胞,但对侧脑组织未见阳性染色。对相邻切片行兔抗人单克隆抗体免疫组织化学检查显示BrdU阳性细胞的同一部位有部分细胞分别表达NSE、GFAP,见图2。

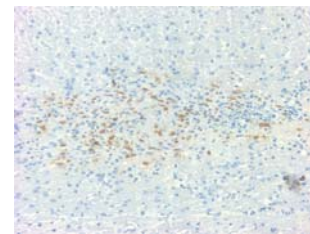
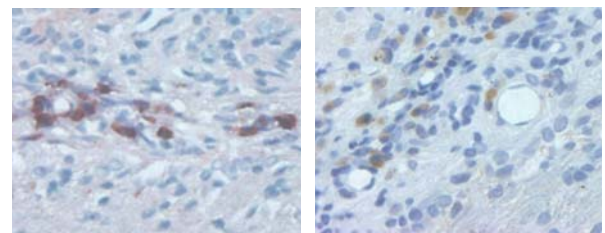


Figure 1 A bound of BrdU positive cells could be seen in the injected side at 4 wk after transplantation (Immunohistochemistry staining, $\times 100$)

图 1 脐带间充质干细胞移植后4周注射部位可见大量BrdU阳性细胞(免疫组织化学染色, $\times 100$)



a: Glial fibrillary acidic protein

b: Neuron-specific enolase

Figure 2 Glial fibrillary acidic protein and neuron-specific enolase were expressed by BrdU positive cells (Immunohistochemistry staining, $\times 400$)

图 2 BrdU 阳性细胞表达胶质纤维酸性蛋白和神经元特异性烯醇化酶(免疫组织化学, $\times 400$)

2.6 VEGF染色及原位凋亡染色结果 VEGF免疫组织化学检查显示UCMSC移植组创伤区VEGF表达较对照组明显增多。经TUNEL法染色检测凋亡细胞, 阳性细胞为高倍视野下细胞核固缩、且呈棕黄色或棕黑色染色者, 细胞核形态正常而呈阳性染色者不计在内。单纯损伤组与UCMSC移植组损伤皮质区均有大量凋亡细胞, 见图3。经两样本均数 t 检验, UCMSC移植组凋亡细胞数明显少于单纯损伤组($P < 0.05$)。见表2。

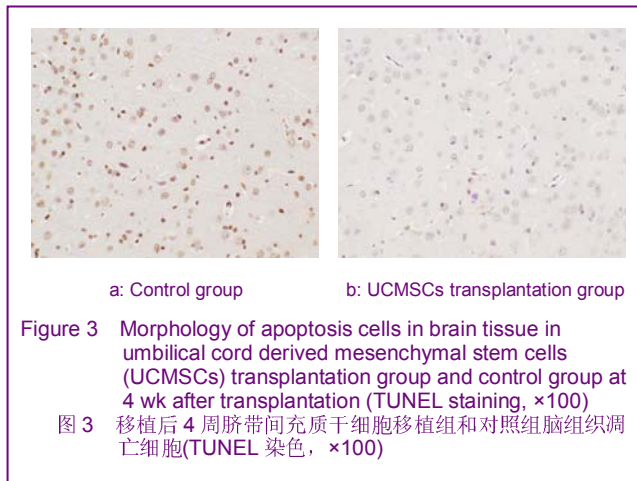


表2 血管内皮生长因子表达及原位凋亡染色结果
Table 2 Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and *in situ* apoptosis staining results in different group
($x \pm s$, $n=10$, positive cells/ High power field)

Group	VEGF expression	<i>In situ</i> apoptosis staining
UCMSC transplantation	37.6 \pm 6.8	14.2 \pm 4.5
Control	12.7 \pm 5.3 ^a	71.7 \pm 13.1 ^a

^a $P < 0.05$, vs. UCMSC transplantation group; UCMSC: umbilical cord derived mesenchymal stem cells

3 讨论

脐带作为母体与胎儿间的营养纽带, 除动脉和静脉管壁外, 还含有脐带的基本连接组织wharton jelly, 也就是脐带胶样组织。脐带在妊娠26 d时出现, 至出生前, 在短短40周内, 脐带已迅速增长为30~50 cm长的螺旋状器官, 推测胎儿脐带胶样组织内肯定含有增殖迅速的间充质前体细胞^[8-9]。这些前体细胞在出生时是否仍然有部分保持未分化状态, 引起本室的关注。利用胶原酶消化法, 从新生儿脐带中分离到了具有自我更新能力和多向分化潜能的干细胞, 证实了作者之前的推测。进一步的研究发现, 脐带干细胞形态及生物学特性与BMSC相似, 表面抗原标志也与BMSC基本相同, 因此将这种存在于wharton jelly中的干细胞命名为脐带充间质干细胞(UCMSC)。

实验发现, 将人UCMSC移植到液压冲击脑损伤模

型大鼠损伤同侧脑组织后1~3周, 动物神经功能评分较对照组明显改善, 至第4周时, 各损伤组动物均恢复正常。免疫组织化学染色证实, UCMSC移植后4周, 穿刺道临近的损伤皮质, 海马区均可见大量BrdU阳性细胞, 表明UNMSC移植后在宿主体内良好存活并促进了脑损伤后神经功能的早期恢复。但由于伤后4周时, 各实验组动物神经功能均已恢复正常, 本实验未能对UCMSC的远期治疗效果进行评价。有报道在创伤性脑损伤和脑梗死后早期移植骨髓间质干细胞, 可迅速改善神经功能, 与本实验结果一致^[10-11]。表明脑损伤后不同来源间质干细胞移植均有利于神经功能的早期恢复。

大量研究报道骨髓间充质干细胞移植用于治疗脑梗死、脑出血、神经元变性性疾病及脊髓损伤, 均取得显著效果^[12-14]。实验进一步证实UCMSC对创伤性脑损伤同样具有显著的修复功能。间充质干细胞对中枢神经系统损伤的治疗效果似乎已经得到证实, 但其对损伤脑组织的治疗机制却众说纷纭。人们利用干细胞移植治疗中枢神经系统损伤的初衷是进行细胞替代治疗, 即利用干细胞的增殖分化能力, 使其在损伤部位分化为成熟的神经元和胶质细胞, 替代受损的神经细胞。

研究表明, UCMSC在神经分化培养基诱导下有部分表达神经元特异性抗原^[15], 甚至定向化为某一特定类型神经元^[16-17]。本室前期亦证实了这一点并进而证实UCMSC异体脑内移植后能长期存活^[18-19]。实验则经单克隆抗体(抗人, 与大鼠无交叉反应)免疫组织化学染色证实, 人UNMSC移植后4周, 部分移植细胞分别表达神经元特异性标志物NSE及胶质细胞特异性蛋白GFAP, 表明确实有部分细胞分化为神经样细胞。同时发现, NSE或GFAP阳性细胞数量很少, 且阳性细胞并无明显的轴突或树突状突起, 不足以重建损伤的神经结构。移植后1周, 治疗组神经功能已经较对照组显著改善了, 在如此短的时间内, 间充质干细胞显然不可能分化为成熟的功能神经元。一小部分移植细胞表达神经细胞蛋白表型, 并不代表间充质干细胞真正分化为神经元或胶质细胞。在这么短的时间内即便是分化成熟的细胞也不可能真正整合到宿主结构中, 参与复杂的神经网络, 从而达到改善功能的效果。因此, 间充质干细胞促进神经功能修复可能不是通过组织替代发挥作用的。更合理的解释是移植的UCMSC与脑组织相互作用, 诱导后者激活内源性修复功能和可能的再生机制。

为证实这一假设, 作者对损伤区域进行VEGF免疫组织化学染色。结果发现, 移植组VEGF表达明显增高。VEGF是一种血管原性蛋白, 它与血管内皮细胞的受体酪氨酸激酶结合促进血管再生。新近研究表明VEGF也可直接对神经元发挥神经营养或神经保护作用。如: VEGF可促进神经轴突再生, 促进背根神经节神经元存活, 保护海马神经元免于谷氨酸神经毒损害^[20]。而抑制

VEGF 信号通路会导致培养的皮质神经元凋亡^[21]。VEGF 具有促进血管再生和神经营养的双重作用^[22]，因此 UCMSC 移植促进损伤皮质 VEGF 表达增加可能是神经功能改善的原因之一。这与本研究的体内实验结果一致。UCMSC 移植促进微血管增生可能是通过 VEGF 表达增加实现的。血管新生对受损神经组织的恢复是非常必要的，组织损伤时处于高代谢状态，新生血管不仅有利于输入更多的营养物质，也可以及时运走各种代谢废物，保持微环境稳定，不仅如此，微血管系统还能发挥信号转运系统的功能，调节神经分化和神经发生。大量证据表明血管内皮细胞和血管新生对于启动和保持损伤后的神经再生发挥重要作用^[23-24]。

实验证实，UCMSC 移植确实可以激活受损脑组织的内源性修复功能，其中部分是通过促进损伤区 VEGF 表达增加和血管新生而实现的。

对损伤区域脑组织切片行 TUNEL 法检测细胞凋亡，结果，移植组损伤区凋亡细胞数量较对照组明显减少。创伤性脑损伤后损伤中心区域细胞死亡，损伤周边及临近脑组织内的细胞代谢反应性增加，易于受到继发的炎症反应，水肿，钙超载，过氧化物的损害而发生凋亡，这个过程将持续数周，进一步加重脑组织损害并破坏损伤后神经组织的修复反应和可塑性^[17]。实验证实 UCMSC 移植后，可以抑制细胞凋亡，这有利于逆转上述继发性损害，使得存活神经元数量增加。UCMSC 抑制细胞凋亡可能与其自身分泌各种营养因子，改善损伤区域微环境有关。

综上，实验利用液压冲击脑损伤模型，证明 UCMSC 脑内移植有助于损伤早期神经功能恢复。外源性 UCMSC 对脑组织的修复机制可能涉及到诱导内源性 VEGF 表达，局部微血管增生，抑制细胞凋亡等。

虽然有部分移植细胞表达神经元标志物，但更多的移植细胞表型未能鉴定，作者只能通过 BrdU 染色知道这些移植细胞存活并且在脑组织内广泛分布着，其最终转归是怎样的，是继续保持间充质干细胞特性还是在损伤脑组织内分化成了其他类型的细胞，目前无法确切知道，还需要大量的研究以确证其安全性及临床应用的可行性。

4 参考文献

[1] Yuan Y, Yang SY, Han ZC. Zhonghua Shiyuan Waikae Zazhi. 2006; 23(1):118.
袁源, 杨树源, 韩忠朝. 人脐带充间质干细胞分离纯化及其生物学特性研究[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(1):118.

[2] Cai J, Li W, Su H, Qin D. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. J Biol Chem. 2010;285(15):11227-11234.

[3] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. Haematologica. 2006; 91:1017-1026.

[4] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells. 2003; 21: 105-110.

[5] McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, et al. Isolation, culture and characterization of fibroblastlike cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. Biochem Soc Trans. 1991; 19: 29S.

[6] Montanucci P, Basta G, Pescara T, et al. New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly. Tissue Eng Part A. 2011 Jun 17. [Epub ahead of print]

[7] McIntosh TK, Vink R, Noble L, et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. Neuroscience. 1989;28: 233-244.

[8] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells. 2004; 22: 1330-1337

[9] Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, et al. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. Stem Cells. 2005;23: 220-229.

[10] Chen J, Li Y, Katakowski M, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. J Neurosci Res. 2003;73: 778-786.

[11] Joyce N, Annett G, Wirthlin L, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. Regen Med. 2010; 5(6):933-946.

[12] Kassir I, Vaknin-Dembinsky A, Karussis D. Bone marrow mesenchymal stem cells: agents of immunomodulation and neuroprotection. Curr Stem Cell Res Ther. 2011;6(1):63-68.

[13] Dezawa M, Hoshino M, Ide C. Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons. Expert Opin Biol Ther. 2005;5: 427-435

[14] Neuhuber B, Timothy Himes B, et al. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. Brain Res. 2005;1035: 73-85.

[15] Nekanti U, Mohanty L, Venugopal P, et al. Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. Stem Cell Res. 2010;5(3):244-254.

[16] Fu YS, Cheng YC, Lin MY, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. Stem Cells. 2006;24:115-124.

[17] Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells. 2003; 21: 50-60.

[18] Yuan Y, Yang SY, Han ZC. Zhonghua Shenjing Yixue Zazhi. 2006; 5(3):230-236.
袁源, 杨树源, 韩忠朝. 人脐带间充质干细胞体外扩增和向神经元样细胞定向诱导分化的研究[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(3): 230-236

[19] Yuan Y, Yang SY, Wang YL. Zhonghua Shenjing Waikae Zazhi. 2007, (7):548-551
袁源, 杨树源, 王媛丽. 人脐带充间质干细胞大鼠脑内移植的实验研究[J]. 中华神经外科杂志, 2007, (7):548-551.

[20] Jin K, Zhu Y, Sun Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99: 11946-11950.

[21] Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, et al. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. J Biol Chem. 2002;277: 11410-11415.

[22] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Embo J. 1999; 18: 3964-3972.

[23] Jones GL, Juszczak MT, Hughes SJ, et al. An improved method of fluorescent dual insulin and endothelial staining allows visualisation of the revascularisation of intraportally transplanted islets. Transplant Proc. 2005;37: 3509-3511.

[24] Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. Cell Transplant. 2000;9: 439-443.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 烟台市科技发展项目资助(2007139-4)。

作者贡献: 设计、实施为第一作者，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: 根据国务院《医疗机构管理条例》规定，取足月新生儿脐带，均经父母授权同意。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》。