

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.36.014

[http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

董锋, 林建华, 吴朝阳. 骨髓间充质干细胞静脉移植脊髓损伤大鼠肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 的表达[J].

中国组织工程研究, 2012, 16(36):6730-6735.

骨髓间充质干细胞静脉移植脊髓损伤大鼠肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 的表达****

董 锋, 林建华, 吴朝阳

福建医科大学附属第一医院骨科, 福建省福州市 350005

董锋★, 男, 1979年, 福州市连江县人, 2006年福建医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事脊髓损伤康复研究。
dongfengok555@sina.com中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)36-06730-06收稿日期: 2011-09-06
修回日期: 2011-11-08
(20110906006/W·C)

Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Dong Feng★, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China
dongfengok555@sina.com

Supported by: Key Project of Chinese Ministry of Education, No.01058*; Key Project of Fujian Provincial Science and Technology Agency, No.2002Y014*; Project of Fuzhou Science and Technology Bureau, No.2002-14*

Received: 2011-09-06
Accepted: 2011-11-08**文章亮点:** 大鼠骨髓间充质干细胞静脉移植后能改变脊髓损伤区的微环境, 使损伤脊髓局部的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 表达程度降低。这可能是减少脊髓继发性损伤, 促进损伤大鼠运动功能恢复的机制之一。**关键词:** 脊髓损伤; 骨髓间充质干细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1β ; 细胞移植

摘要

背景: 研究认为间充质细胞的营养支持在脊髓损伤治疗中起了主要作用, 其同损伤宿主神经组织间的相互作用可导致一些不利于损伤修复的炎症因子表达减少。**目的:** 观察大鼠骨髓间充质干细胞静脉注射移植对脊髓损伤后肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 表达的影响。**方法:** 运用改良 Allen 法制备大鼠 T₁₀ 脊髓外伤性截瘫模型, 随机分为对照组和骨髓间充质干细胞移植组, 设未损伤脊髓的假手术组做对照。骨髓间充质干细胞移植组、假手术组均接受大鼠骨髓间充质干细胞静脉注射移植, 对照组静脉注射等量 PBS。**结果与结论:** 对照组和骨髓间充质干细胞移植组损伤脊髓肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白表达较假手术组有明显增加($P < 0.05$); 骨髓间充质干细胞移植组与对照组比较, 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白表达受到明显抑制($P < 0.05$)。提示大鼠骨髓间充质干细胞静脉移植后能使损伤脊髓局部的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 表达程度降低。这可能是改变脊髓损伤区的微环境, 减少脊髓继发性损伤, 促进损伤大鼠运动功能恢复的机制之一。

Expression of tumor necrosis factor- α and interleukin 1 beta in spinal cord injury rats undergoing intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells

Dong Feng, Li Jian-hua, Wu Zhao-yang

Abstract

BACKGROUND: Evidence exists that nutrition of bone marrow mesenchymal stem cells plays an important role in the treatment of spinal cord injury. The interaction between bone marrow mesenchymal stem cells and damaged host nerve tissue can reduce the expression of inflammatory cytokines which is conducive to injury recovery.**OBJECTIVE:** To explore the effect of intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on the expression of tumor necrosis factor- α and interleukin 1β after spinal cord injury in rats.**METHODS:** The T₁₀ paraplegia model of rat spinal cord injury was prepared using modified Allen. The experiment was divided into control group and transplantation group. The sham operation group with no spinal cord injury was designated. The transplantation group and sham operation group were given intravenous administration of bone marrow mesenchymal stem cells, the same concentration of PBS was intravenously injected into the control group.**RESULTS AND CONCLUSION:** Expression of tumor necrosis factor- α and interleukin 1β protein in the transplantation group and control group was higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of tumor necrosis factor- α and interleukin 1β protein in the transplantation group was significantly inhibited ($P < 0.05$). Intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells could reduce the expression of tumor necrosis factor- α and interleukin 1β in the injured area of spinal cord. Maybe it was one of the mechanisms to change the microenvironment of the injured area, decrease the secondary spinal cord injury and promote the recovery of motor function in spinal cord injury rats.Dong F, Li JH, Wu ZY. Expression of tumor necrosis factor- α and interleukin 1 beta in spinal cord injury rats undergoing intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells intravenous. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(36): 6730-6735.

0 引言

骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤的实验研究国内外均有报道^[1-3],并取得了较好的实验效果,但其作用机制尚不完全清楚。急性脊髓损伤后可引发一系列的病理生理过程,导致继发性损伤,脊髓损伤早期微循环障碍所致的免疫炎症反应可能在继发性损伤中起着重要的作用^[4-6]。已有证据表明,肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 在中枢神经系统损伤过程中起着重要的作用^[7-10]。有研究认为间充质细胞的营养支持在脊髓损伤治疗中起了主要作用^[11-14],间充质干细胞同损伤宿主神经组织间的相互作用可导致一些不利于损伤修复的炎症因子表达减少。这些细胞因子的减少对神经功能的恢复发挥积极的作用。实验应用免疫组织化学方法观察大鼠脊髓损伤后大鼠骨髓间充质干细胞移植对的肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 蛋白表达的影响,探讨大鼠骨髓间充质干细胞促进脊髓修复的作用机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 2004-07/2006-03在福建医科大学动物中心、福建医科大学附属第一医院骨科研究所及中心实验室完成。

材料:

实验动物: 两三个月龄清洁级健康雄性SD大鼠35只,由解放军第二〇八医院动物实验中心提供,动物质量合格证号:吉动合证字113号,实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[15]。

主要试剂:

试剂	来源
兔抗大鼠肿瘤坏死因子 α 、 兔抗大鼠白细胞介素 1β	厦门泰京生物技术有限公司
免疫组织化学 SABC 试剂盒、 乙基咪唑(AEC)显色剂试剂盒	福州迈新生物技术公司

实验方法:

大鼠骨髓间充质干细胞的培养及鉴定^[16-17]: 取2月龄清洁级SD雄性大鼠5只,麻醉、消毒,取双侧四肢骨,剪除干骺端,冲洗骨髓腔,所获骨髓加入分离液,离心,弃上清,加入培养基,反复吹打成单细胞悬液,调节细胞浓

度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$,接种于培养基中孵育。细胞传3代,移植时PBS洗涤细胞3次,调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 备用。另取100 μL 细胞悬液与小鼠抗人单抗(CD34-ECD、CD45-PE、CD29-FITC、CD90-FITC)室温避光孵育30 min后,采用流式细胞仪检测大鼠骨髓间充质干细胞的鉴定。

脊髓损伤动物模型制作、分组及治疗方法: 随机选取24只大鼠,采用改良Allen重物打击法制作脊髓损伤模型^[18-19],脊髓损伤模型成功的标志:在Allen装置撞击脊髓的瞬间,动物身体抖动,双下肢迅速发生回缩及弹动动作,尾巴翘起并迅速倒下,打击局部脊髓表面迅速呈瘀紫色,术后双下肢出现完全瘫痪说明造模成功。另取6只大鼠为假手术组,同法暴露 T_{10} 段脊髓,而不造成脊髓冲击伤。将造模成功的24只大鼠随机分为对照组和骨髓间充质干细胞移植组。动物模型建立后10 min,骨髓间充质干细胞移植组、假手术组接受大鼠骨髓间充质干细胞单细胞悬液1 mL(1×10^6 个大鼠骨髓间充质干细胞)自大鼠尾静脉缓慢注射移植,空白对照组静脉注射PBS 1 mL。

肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白的表达变化的免疫组织化学检测: 分别于移植后3, 7 d,对照组、骨髓间充质干细胞移植组各时间点随机抽取大鼠6只,氯胺酮(60 mg/kg)腹腔注射麻醉后开胸,以40 g/L多聚甲醛500 mL经心脏灌注固定,完整地切取伤区脊髓1.5 cm,置于40 g/L多聚甲醛固定3 d,脱水、石蜡包埋。经常规脱蜡水化后分别进行免疫组织化学检测移植细胞及脊髓组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白表达情况。细胞中含有红色颗粒者为阳性,用摄像机将切片组织图像输入计算机,每个标本取3张不同层面的切片,每张切片随机选取5个不重叠视野,采用JD801形态分析软件系统,测定免疫组织化学阳性染色的平均灰度值和累积吸光度值。

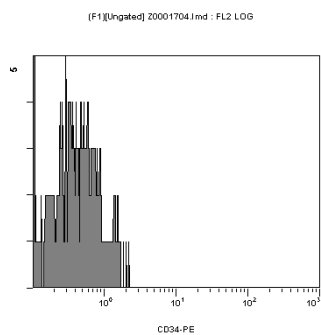
主要观察指标: 损伤大鼠脊髓局部肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白表达情况。

统计学分析: 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,由第一作者用SPSS 10.0统计软件进行 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

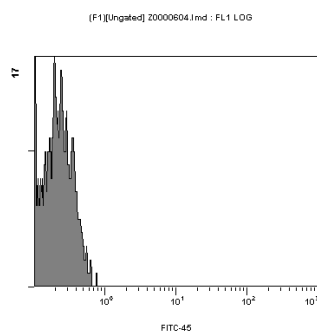
2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入动物数量30只,分为3组,无脱失,全部进入结果分析。

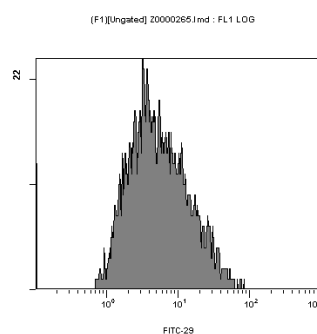
2.2 大鼠骨髓间充质干细胞表面抗原的鉴定 流式细胞仪检测10份第2代细胞样本,结果显示:CD34、CD45基本表达阴性,证实这些细胞是非造血干细胞,CD29、CD90表达阳性。见图1。



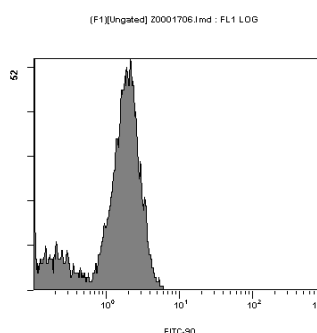
a: 0.81% of CD34



b: 0.09% of CD45



c: 95.9% of CD29



d: 67% of CD90

Figure 1 Identification of surface antigen of bone marrow mesenchymal stem cells

图1 大鼠骨髓间充质干细胞表面抗原的鉴定

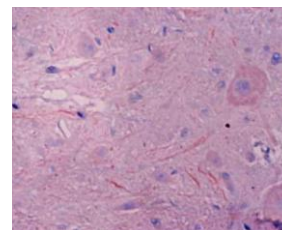
2.3 各组大鼠脊髓组织肿瘤坏死因子 α 蛋白的表达
移植后3, 7 d, 在每组大鼠脊髓组织内可见胞浆表达肿瘤坏死因子 α 免疫组织化学染色阳性的神经细胞, 见图2。可见胞浆呈红色染色, 但染色强度不一。



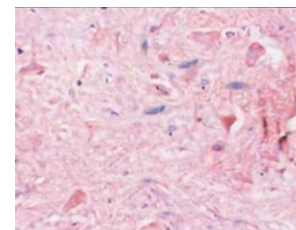
a: Sham operation group ($\times 100$)

b: After 3 d in control group ($\times 100$)

c: After 7 d in control group ($\times 100$)



d: After 3 d in transplantation group ($\times 200$)



e: After 7 d in transplantation group ($\times 200$)

Figure 2 Expression of tumor necrosis factor- α in spinal cord tissue of each group (inverted microscope)

图2 各组大鼠脊髓组织肿瘤坏死因子 α 蛋白的表达(倒置显微镜)

应用JD801形态分析软件检测各组大鼠脊髓组织肿瘤坏死因子 α 蛋白表达, 测得平均灰度和积分吸光度见表1。

表1 各组大鼠脊髓肿瘤坏死因子 α 表达情况比较
Table 1 Expression of tumor necrosis factor- α in rat spinal cord in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

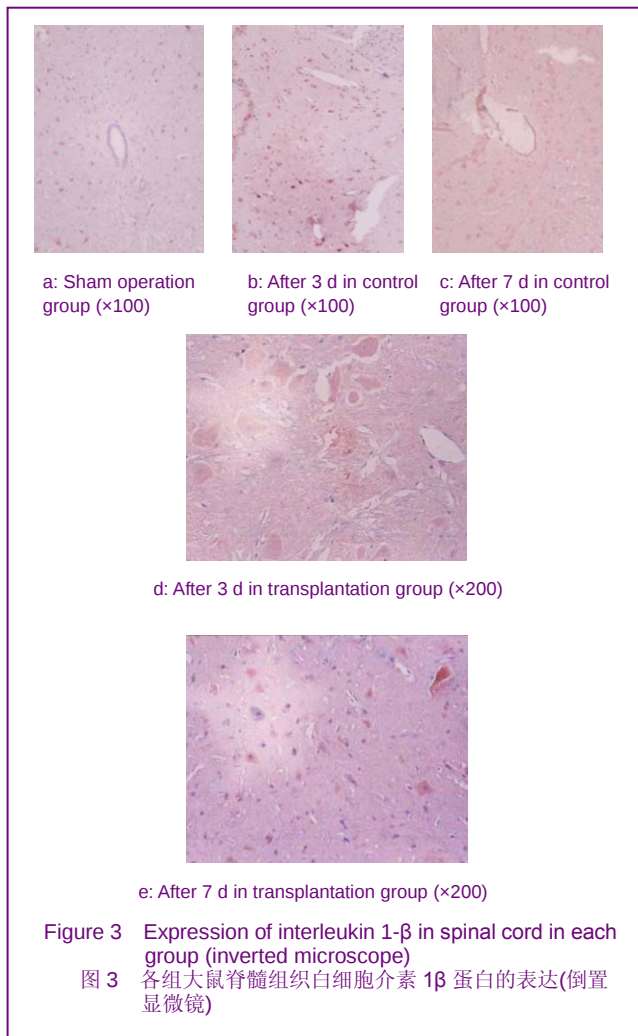
Item	Time after transplantation	
	3 d	7 d
Gray value		
Control group	158.61 $\pm$ 11.89 ^c	164.39 $\pm$ 13.52 ^{ac}
BMSCs transplantation group	185.76 $\pm$ 13.28 ^{cd}	198.55 $\pm$ 13.70 ^{bcd}
Integrated absorbance		
Control group	1 247.17 $\pm$ 104.89 ^c	1 015.02 $\pm$ 109.58 ^{ac}
BMSCs transplantation group	980.21 $\pm$ 71.91 ^{cd}	838.63 $\pm$ 60.58 ^{bcd}

The mean gray scale and integrated absorbance of the sham operation group were 206.61 $\pm$ 17.02 and 726.17 $\pm$ 90.29 respectively; ^a $P < 0.05$, vs. 3 d in the control group; ^b $P < 0.05$, vs. 3 d in the BMSCs transplantation group; ^c $P < 0.05$, vs. sham operation group; ^d $P < 0.05$, vs. control group; BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

表1结果表明假手术组脊髓组织中肿瘤坏死因子 α 蛋白仅微弱表达, 平均灰度值为206.61 $\pm$ 17.02, 积分吸光度值为726.17 $\pm$ 90.29。对照组和骨髓间充质干细胞移植组在移植后3 d 肿瘤坏死因子 α 平均灰度较假手术组有明显降低($P < 0.05$), 而积分吸光度较假手术组明显增加($P < 0.05$), 说明肿瘤坏死因子 α 蛋白表达有明显增加。对照组和骨髓间充质干细胞移植组移植后7 d 平均灰度虽有升高但仍低于假手术组($P < 0.05$), 而积分吸光度虽有降低但仍高于假手术组($P < 0.05$), 说明肿瘤

坏死因子 α 蛋白表达仍高于正常水平;而骨髓间充质干细胞移植组与对照组比较,移植后3, 7 d肿瘤坏死因子 α 平均灰度较高,而积分吸光度较低,说明肿瘤坏死因子 α 蛋白表达受到明显抑制($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠脊髓组织白细胞介素 1β 蛋白的表达 移植后3, 7 d白细胞介素 1β 在各组脊髓组织内可见胞浆表达白细胞介素 1β 免疫组化染色阳性的神经细胞,见图3,可见胞浆呈红色染色,但染色强度不一。



各组大鼠脊髓组织白细胞介素 1β 蛋白表达应用JD801形态分析软件测得平均灰度和积分吸光度见表2。表2表明假手术组脊髓组织中白细胞介素 1β 蛋白仅微弱表达,平均灰度值为 233.92 ± 16.54 ,积分吸光度值为 648.68 ± 66.30 。对照组和骨髓间充质干细胞移植组移植后3 d白细胞介素 1β 平均灰度较假手术组明显降低($P < 0.05$),而积分吸光度较假手术组明显增加($P < 0.05$),说明白细胞介素 1β 蛋白表达有明显增加。对照组和骨髓间充质干细胞移植组移植后7 d平均灰度虽有升高但仍低于假手术组($P < 0.05$),而积分吸光度虽有降低但仍高于假手术组($P < 0.05$),说明白细胞介

素 1β 蛋白表达仍高于正常水平;而骨髓间充质干细胞移植组与对照组比较,移植后3, 7 d白细胞介素 1β 平均灰度较高,而积分吸光度较低,说明白细胞介素 1β 蛋白表达受到明显抑制($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠脊髓白细胞介素 1β 表达情况比较
Table 2 Expression of interleukin 1β in rat spinal cord in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Item	Time after transplantation	
	3 d	7 d
Grey value		
Control group	115.21 ± 6.72^c	168.75 ± 11.32^{ac}
BMSCs transplantation group	133.43 ± 8.85^c	199.10 ± 20.70^{bcd}
Integral absorbance		
Control group	$1\,490.83 \pm 117.32^c$	993.22 ± 116.17^{ac}
BMSCs transplantation group	$1\,358.60 \pm 59.57^{cd}$	742.03 ± 52.57^{bcd}

The mean gray scale and integrated absorbance of the sham operation group were 206.61 ± 17.02 and 726.17 ± 90.29 respectively; ^a $P < 0.05$, vs. 3 d in the control group; ^b $P < 0.05$, vs. 3 d in the BMSCs transplantation group; ^c $P < 0.05$, vs. sham operation group; ^d $P < 0.05$, vs. control group; BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

3 讨论

脊髓损伤是一种比较严重的中枢神经创伤。脊髓损伤的急性期和继发损伤期均有多种不同的细胞因子表达^[20-21],这些细胞因子大多都不利于神经元新生和轴突再生修复,其中炎症因子白细胞介素 1β 、肿瘤坏死因子 α 在促进脊髓继发性损伤中起着重要作用。它们作为其中极其重要的损伤因子在脊髓损伤后高表达,其高表达会导致小胶质细胞和星形胶质细胞的活化、增殖及向损伤部位的迁徙,引起瘢痕形成和继发细胞毒性,不利于神经元新生和轴突再生^[22-23]。如果消除这些因子的影响将更有利于脊髓损伤修复。

肿瘤坏死因子 α 是在中枢神经系统损伤的早期最早出现增高的细胞因子,可上调其他细胞因子的产生,可能是众多细胞因子的重要启动因子^[24]。在脊髓损伤后,肿瘤坏死因子 α 可诱导神经毒性分子花生四烯酸及代谢产物的释放,损害神经细胞,引起脊髓组织坏死。所以,严格控制神经组织的炎症反应十分重要。

本实验发现,肿瘤坏死因子 α 蛋白在脊髓损伤后3 d表达迅速上调,损伤后7 d表达虽然有所减弱但仍高于正常水平^[25-27]。Wang等^[28-29]研究也发现,脊髓损伤后3 d脊髓损伤区肿瘤坏死因子 α 蛋白表达明显上调,与本实验结果相吻合。Wang等还进一步证明肿瘤坏死因子 α 的表达水平与创伤程度相关。本实验结果还显示,骨髓间充质干细胞移植组在脊髓损伤早期(3 d)肿瘤坏死因子 α 蛋白

表达虽然比正常脊髓有增高,但明显低于相应时间点的对照组($P < 0.05$),移植后7 d虽然仍高于正常水平,但较损伤后3 d已有下降趋势且逐渐降至正常水平,可见将大鼠骨髓间充质干细胞移植可显著降低损伤脊髓肿瘤坏死因子 α 表达,从而减轻损伤局部的炎症程度,将有助于损伤后神经功能的恢复^[30]。

白细胞介素 1β 也是一种具有多种生物学功能的炎性细胞因子,以往研究发现在脊髓损伤后的继发性损伤过程中^[31],白细胞介素 1β 参与刺激其他细胞因子和损伤介质的合成,导致脊髓损伤局部炎症和水肿反应,同时还参与启动凋亡基因的表达过程,诱导神经细胞凋亡,是造成神经功能永久性丧失的一个重要因素。Nesic等^[32-33]研究发现,脊髓损伤后脊髓损伤区白细胞介素 1β 蛋白表达明显上调。

本实验也表明了,白细胞介素 1β 蛋白在正常脊髓组织中仅有微弱的表达;而在脊髓损伤后3 d表达迅速上调;随后其表达逐渐减弱。可见脊髓损伤后白细胞介素 1β 的过度表达以损伤性因素参与了脊髓继发性损伤的过程。同时,本实验结果还显示,骨髓间充质干细胞移植组不同时间点的白细胞介素 1β 蛋白表达虽然高于正常脊髓,但均低于相应时间点的对照组,骨髓间充质干细胞移植组3, 7 d后白细胞介素 1β 蛋白表达虽均高于正常水平,而大鼠骨髓间充质干细胞移植后7 d已逐渐降至正常水平,表明大鼠骨髓间充质干细胞移植可通过降低白细胞介素 1β 表达,从而减轻损伤脊髓局部炎症,进而减少脊髓神经元细胞的损伤。

移植大鼠骨髓间充质干细胞在宿主体内可向损伤区脊髓迁移、存活并聚集,但其机制尚不清楚,可能与损伤部位趋化因子的产生和释放有关。大鼠骨髓间充质干细胞移植治疗的可能作用有:①大鼠骨髓间充质干细胞向神经元和胶质细胞分化起到细胞替代作用,通过与神经通路建立广泛的传入传出联系甚至重建神经环路和髓鞘再生等机制诱导神经保护作用。②迁移至局部大鼠骨髓间充质干细胞及其分化的神经细胞反应性分泌各种各样的生长因子,产生神经保护作用 and 促进局部微血管再生,促进神经再生和重构,抑制炎症因子表达,减轻损伤局部的继发性炎症反应,从而起到治疗脊髓损伤的作用。

4 参考文献

- [1] Liu KJ, Li YD, Wang HP, et al. Zhonghua Sunshang yu Xiufu Zazhi. 2008;3(4):11.
刘开俊,李永灯,王海平,等.骨髓间质干细胞对大鼠脊髓损伤修复实验研究[J].中华损伤与修复杂志,2008,3(4):11.
- [2] Cho SR, Kim YR, Kang HS, et al. Functional recovery after the transplantati-on of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone barrow in a rat model of spinal cord injury. Cell Transplant.2009;18(12):1359.
- [3] Liu Y, Zhang BA, Song Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of spinal cord injury: an in vivo magnetic resonance imaging tracking study. Neural Regen Res. 2011;6(13):978-982.
- [4] Kang J, Jiang MH, Min HJ, et al. IKK- β -mediated myeloid cell activation exacerbates inflammation and inhibits recovery after spinal cord injury. Eur J Immunol. 2011;41(5):1266-1277.
- [5] Pineau I, Sun L, Bastien D, et al. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. Brain Behav Immun. 2010;24(4):540-553.
- [6] Alexander JK, Popovich PG. Neuroinflammation in spinal cord injury: therapeutic targets for neuroprotection and regeneration. Prog Brain Res. 2009;175:125-137.
- [7] Yan CH, Jiang Y, Liu HX. Guangdong Yixue. 2011;32(9):1127-1128.
晏长红,江英,刘红霞.新生儿缺氧缺血性脑病血清TNF- α 水平与脑损伤的相关性[J].广东医学,2011,32(9):1127-1128.
- [8] Carmen J, Rothstein JD, Kerr DA. Tumor necrosis factor- α modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. Brain Research. 2009;1263(31): 143-154.
- [9] Kato K, Kikuchi S, Shubayev VI, et al. Distribution and tumor necrosis factor- α isoform binding specificity of locally administered etanercept into injured and uninjured rat sciatic nerve. Neuroscience. 2009 ;160(2):492-500.
- [10] Zong SH, Wei B, Zeng GF, et al. Guangdong Yixue. 2011;32(10):1245-1247.
宗少晖,韦波,曾高峰,等.白介素-1受体拮抗剂对大鼠急性脊髓损伤后神经元功能修复的影响[J].广东医学,2011,32(10):1245-1247.
- [11] Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. Circ Res. 2004;94(5):573-574.
- [12] Ronsyn MW, Daans J, Spaepen G, et al. Plasmid-based genetic modification of human bone marrow-derived stromal cells: analysis of cell survival and transgene expression after transplantation in rat spinal cord. BMC Biotechnol. 2007;14(7): 90-92.
- [13] Keating A. Mesenchymal stromal cells. Curr Opin Hematol. 2006;13(6):419-425.
- [14] Li L, Lü G, Wang YF, et al. Glial cell-derived neurotrophic factor mRNA expression in a rat model of spinal cord injury following bone marrow stromal cell transplantation. Neural Regen Res 2008;3(10):1056-1059.
- [15] 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.
- [16] Kang DZ, Lin JH, Yu LH, et al. Zhonghua Shenjing Yixue Zazhi. 2006;5(11):1117-1121.
康德智,林建华,余良宏,等.大鼠骨髓间充质干细胞静脉移植对脊髓损伤的修复作用[J].中华神经医学杂志,2006,5(11):1117- 1121.

- [17] Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, et al. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol*.2008, 36(9):1176-85.
- [18] Khan T,Havey RM,Sayers ST,et al.Animal models of spinal cord contusion injuries.*Lab Anim Sic*.1999;49(2):161-172.
- [19] Chen SQ,Lin JH.Jiepouxue Zazhi. 2009;32(2):190-194.
陈少强,林建华.不同移植时间窗对静脉移植骨髓间充质干细胞在大鼠损伤脊髓内存活和迁移的影响[J].解剖学杂志,2009, 32(2):190-194.
- [20] Nakamura M,Houghtling RA,MacArthur L,et al. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord.*Exp Neurol*.2003; 84:313-325.
- [21] Lü ZG,Sun XL,Xu Y,et al.Linchuang Jianyan Zazhi. 2008; 26(5): 349-350.
吕志刚,孙湘兰,许燕,等.炎症因子在脊髓损伤SD大鼠脑脊液和血液中表达的比较研究[J].临床检验杂志,2008,26(5):349-350.
- [22] Bartholdi D,Schwab M.Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse an in situ hybridization study.*Eur J Neurosci*.1997;9:1422-1438
- [23] Chi LY,Yu J,Zhu H,et al.The dual role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiology of spinal cord injury. *Neurosci Lett*.2008;438(2):174-179.
- [24] Mc Coy MX,Tansey MG.TNF signaling inhibition in the CNS:implications for normal brain function and neurodegenerative disease.*J Neuroinflam*.2008;5(1):45-57.
- [25] Liu JB,Tang TS,Yang HL,et al.Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi. 2004;12(18):1404-1406.
刘锦波,唐天骊,杨惠林,等.大鼠脊髓损伤后神经营养素及受体表达的比较[J].中国矫形外科杂志,2004,12(18):1404-1406.
- [26] Yang L,Jones NR,Blumbergs PC,et al.Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat.*Clin Neurosci*.2005;12(3):276-284.
- [27] Lee yb,Yune TY,Baik SY,et al.Role of tumor necrosis factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury.*Exp Neurol*.2000;166(1):190-195.
- [28] Wang CX,Reece C,Wraithall JR,et al .Expression of tumor necrosis factor alpha and its mRNA in the spinal cord following a weight-drop injury.*Neuroreport*.2002;13(11):1391
- [29] Zhao YP.Shandong Yiyao. 2010,50(44):62-64.
赵彦平.脊髓损伤急性期内源性NGF和TNF- α 的表达与分布[J].山东医药,2010,50(44):62-64.
- [30] Tator CH, Fehlings MG.Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasison vascular mechanisms.*Neurosurg*.1991;75:15
- [31] Whalley K, O'Neill P, Ferretti P. changes in response to spinal cord injury with development vascularization,temorrhage and apoptosis.*Neuroscience*. 2006;137(3):821-832.
- [32] Yang XY,Zhu QS,Sun Q,et al.Zhonghua Chuangshang Zazhi. 2004;20(5):295-299.
杨小玉,朱庆三,孙庆,等.细胞间粘附分子-1及白细胞介素- 1β 在脊髓缺血-再灌注损伤中的表达及其作用[J].中华创伤杂志,2004, 20(5):295-299.
- [33] Nesic O, Xu GY, McAdoo D, et al. IL-1 receptor antagonist prevents apoptosis and caspase-3 activation after spinal cord injury. *Neurotrauma*.2001;18(9):947-956.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 教育部科学技术研究重点项目(01058); 福建省科技厅重点项目(2002Y014); 福州市科技局项目(2002-14)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第一、三作者进行实施, 第二作者进行实验评估, 资料收集为第一、三作者, 第一作者成文, 第二作者审校。均经过正规培训, 未采用盲法评估。

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。

伦理要求: 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》标准。

本文创新性: ①在移植方法上拟用静脉注射法, 若有效, 将为临床应用带来大的便利。②对骨髓间充质干细胞移植后脊髓功能改善的机制进行探讨。国内外有研究报道, 用取自于成年大鼠骨髓进行培养的骨髓间充质干细胞, 直接移植于大鼠损伤的脊髓中, 结果显示移植的骨髓间充质干细胞可迁移并表达神经蛋白标志物, 同时大鼠脊髓功能得到显著的改善。这表明骨髓基质细胞移植对脊髓损伤有治疗作用。但未对其作用机制进行探讨。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。