

## 口服肉苁蓉联合骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤

兰 静, 闫金玉, 夏润福, 李剑锋(内蒙古医科大学第二附属医院康复科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030)

### 文章亮点:

口服肉苁蓉联合骨髓间充质干细胞移植可以明显改善脊髓损伤大鼠的运动功能及神经电生理功能, 其治疗效果优于单纯骨髓间充质干细胞移植及单纯口服肉苁蓉, 可能机制为肉苁蓉可以改善宿主微环境, 从而有效促进移植的骨髓间充质干细胞在宿主体内存活。

### 关键词:

干细胞; 移植; 肉苁蓉; 骨髓间充质干细胞; 脊髓损伤; Wistar 大鼠

### 主题词:

骨髓; 间质干细胞; 肉苁蓉属; 脊髓损伤; 大鼠, Wistar

### 摘要

**背景:** 研究表明骨髓间充质干细胞在特定的条件下可分化成为神经细胞, 移植后可重建神经系统功能, 改善患者功能障碍, 肉苁蓉总苷也对损伤的神经细胞有保护作用, 将二者联合应用的报道较少。

**目的:** 探讨口服肉苁蓉联合骨髓间充质干细胞移植修复大鼠脊髓损伤的效果。

**方法:** 55 只成年 Wistar 大鼠制备脊髓损伤模型, 随机分为 4 组, 对照组每天 20 mL/kg 生理盐水灌胃; 口服肉苁蓉组每天 20 mL/kg 肉苁蓉条件浓缩液灌胃; 骨髓间充质干细胞移植组造模后即刻移植骨髓间充质干细胞悬液( $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ )10  $\mu\text{L}$ , 每天 20 mL/kg 生理盐水灌胃; 口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组造模后即刻移植骨髓间充质干细胞悬液( $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ )10  $\mu\text{L}$ , 每天 20 mL/kg 肉苁蓉条件浓缩液灌胃, 各组连续灌胃 30 d。

**结果与结论:** 治疗 30 d 后免疫组化法检测口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组脊髓组织中 Nestin 阳性表达明显多于其他组; 治疗 12 周后, 口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组 BBB 评分明显高于其他组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 感觉诱发电位和运动诱发电位潜伏期较其他组有明显改善( $P < 0.05$ )。结果表明口服肉苁蓉联合骨髓间充质干细胞移植可以明显改善脊髓损伤大鼠的运动功能及神经电生理功能; 口服肉苁蓉可以有效促进移植的骨髓间充质干细胞在宿主内存活。

兰静, 闫金玉, 夏润福, 李剑锋. 口服肉苁蓉联合骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(41): 6639-6644.

## *Cistanche deserticola* plus bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treating spinal cord injury in rats

Lan Jing, Yan Jin-yu, Xia Run-fu, Li Jian-feng (Rehabilitation Department, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies have shown that bone marrow mesenchymal stem cells under certain conditions can differentiate into nerve cells. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation can rebuild nervous system function and improve functional disorders in patients. Glycosides of *Cistanche* also have a protective effect against nerve cell injury. Their combination has been less reported.

**OBJECTIVE:** To observe the effectiveness of *Cistanche deserticola* and bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on spinal cord injury in rats.

**METHODS:** Fifty adult Wistar rats with spinal cord injury were randomly divided into four groups: a *Cistanche deserticola* group (intra-gastric administration of 20 mL/kg *Cistanche deserticola* concentrated solution per day), a cell transplantation group (10  $\mu\text{L}$  of  $1 \times 10^8/\text{L}$  bone marrow mesenchymal stem cell suspension), a combination group (10  $\mu\text{L}$  of  $1 \times 10^8/\text{L}$  bone marrow mesenchymal stem cell suspension+ intra-gastric administration of 20 mL/kg *Cistanche deserticola* concentrated solution per day) and a control group (intra-gastric administration of 20 mL/kg normal saline per day). The intra-gastric administration lasted for 30 days in each group.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After 30 days of treatment, the expression of Nestin was significantly higher in the combination group than the other groups. After 12 weeks, Basso, Beattie, and Bresnahan scores was significantly higher in the combination group than the other groups ( $P < 0.05$ ); somatosensory and motor evoked potential latencies were also improve significantly in the combination group compared with the other groups ( $P < 0.05$ ). These findings indicate that oral administration of *Cistanche deserticola* combined with bone marrow mesenchymal stem cells can significantly improve the motor and neurophysiological function of spinal cord injury rats. *Cistanche deserticola* can improve the survival of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells in rats with spinal cord injury.

兰静, 女, 1973 年生, 内蒙古自治区呼和浩特市人, 汉族, 2013 年内蒙古医科大学毕业, 主管护师。

通讯作者: 李剑锋, 博士, 主治医师, 内蒙古医科大学第二附属医院康复科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.41.014

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)41-06639-06

稿件接受: 2014-09-11

Lan Jing, Nurse in charge, Rehabilitation Department, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: Li Jian-feng, M.D., Attending physician, Rehabilitation Department, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Accepted: 2014-09-11

**Subject headings:** bone marrow; mesenchymal stem cells; cistanche; spinal cord injuries; rats, Wistar

Lan J, Yan JY, Xia RF, Li JF. Cistanche deserticola plus bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treating spinal cord injury in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(41): 6639-6644.

## 0 引言 Introduction

脊髓损伤是中枢神经系统的一种严重损伤, 多因车祸、坠落伤等造成脊柱骨折、脱位所致。随着人类社会现代化的进程, 脊髓损伤的发病率在全球呈现出上升的趋势, 由其引起的损伤段以下感觉、运动和括约肌功能全部或部分丧失, 使患者出现截瘫或四肢瘫, 导致日常生活困难, 给家庭和社会造成极大负担。目前研究发现间充质干细胞存在于人体的各个组织, 作为再生医学中较为理想的种子细胞, 包括骨髓、脂肪、松质骨、骨膜、滑膜、骨骼肌、牙组织<sup>[1-7]</sup>, 其中骨髓及脂肪组织中分离的骨髓间充质干细胞应用相对广泛。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种易于从骨髓分离的成体干细胞, 在一定条件下具有向神经元和神经胶质分化的潜能。骨髓间充质干细胞用于治疗脊髓损伤已进行了相当广泛的研究, 而且研究证实其可促进脊髓损伤后的功能恢复<sup>[8-15]</sup>。肉苁蓉素有“沙漠人参”之美誉, 具有极高的药用价值, 是中国传统的名贵中药材。肉苁蓉的化学成分主要包括苯乙醇苷类、环烯醚萜类、挥发性成分、木脂素类、多糖以及生物碱等。研究表明, 肉苁蓉可以减轻神经系统缺血再灌注等各种损害, 对神经元凋亡有显著抑制作用。因此, 本研究拟探讨口服肉苁蓉联合骨髓间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2013年1月至2014年1月在内蒙古医科大学分子生物学实验室完成。

**材料:**

口服肉苁蓉联合骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤实验药物、试剂和仪器:

药物、试剂和仪器	来源
肉苁蓉	内蒙古王谷地苁蓉生物有限公司
DMEM/F12培养基, 胎牛血清, D-Hank's溶液	Gibco公司
$\beta$ -巯基乙醇	Amresco公司
Nestin、NSE抗体	Santa Cruz公司
DAB显色试剂盒	武汉博士德公司
HEPA Class 100细胞培养箱	美国Thermo公司
CKX41倒置相差显微镜	日本Olympus公司
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司, SW-CJ-2FD
酶标分析仪	芬兰Labsystems公司
流式细胞仪	美国Beckman Coulter公司

**实验动物:** 成年Wistar大鼠60只, 雌雄不限, 体质量200–220 g, 其中用于制备骨髓间充质干细胞大鼠5只, 用于造模的大鼠55只, 由内蒙古大学动物中心提供。

**实验方法:**

**骨髓间充质干细胞的分离培养:** 5只成年Wistar大鼠麻醉后处死, 体积分数为75%乙醇浸泡10 min, 无菌条件下取出股骨和胫骨, 除去骨表面附着的软组织, D-Hank's液清洗干净。用咬骨钳将两端干骺端切除, 显露骨髓腔, 用注射器吸取含体积分数为20%胎牛血清的DMEM/F12培养液, 从另一端插入注射器冲洗3次, 冲洗后的细胞置于试管中, 然后反复吹打骨髓细胞, 使骨髓细胞充分分散, 制成单细胞悬液。将骨髓细胞悬液沿管壁缓慢注入预先加有等体积淋巴细胞分离液的离心管中, 1 000 r/min离心15 min。小心吸取界面层细胞, 用DMEM洗2次。血细胞计数板计数, 调整细胞浓度。按照 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于含体积分数为20%胎牛血清的DMEM/F12培养液中, 置于37 °C, 体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱内孵育。3 d后全量换液, 去除未贴壁细胞。10–12 d细胞达融合, 0.25%胰酶消化传代, 三四天传代1次。

**动物分组:** 55只成年Wistar大鼠随机分为对照组10只、口服肉苁蓉组15只、骨髓间充质干细胞移植组15只、口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组15只。

**Wistar大鼠脊髓损伤模型制备:** 采用改良Allen重物打击法制作T<sub>10</sub>节段脊髓损伤模型。2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉、固定(包括头部)。备皮消毒后, 在无菌条件下切开皮肤、浅筋膜, 用器械沿T<sub>8</sub>–T<sub>10</sub>两侧棘突顺竖棘肌群走向钝性分离肌肉和韧带, 清晰暴露T<sub>9</sub>棘突和椎弓, 有齿镊轻提T<sub>9</sub>棘突, 用眼科剪沿T<sub>9</sub>、T<sub>10</sub>椎弓间隙轻轻咬开椎弓根部, 并逐渐咬除T<sub>9</sub>椎弓, 暴露T<sub>10</sub>节段脊髓, 采用改良的Allen装置, 打击装置整合于立体定位仪上, 将一打击面直径为3 mm圆形薄铜垫片(面积7.075 mm<sup>2</sup>, 质量0.1 g)置于T<sub>10</sub>节段脊髓表面, 以质量为10 g的砝码自5 cm高处自由坠落打击该垫片, 致伤量为50 g•cm, 造成T<sub>10</sub>节段脊髓的冲击伤。充分止血后, 进行相关实验。术后损伤区以消毒温盐水冲洗完毕, 逐层缝合。各组大鼠均发生了不同程度的后肢肌力减退、行走缓慢、步态异常等运动功能障碍及括约肌功能障碍等脊髓损伤表现即认为造模成功。

**术后处理:** 控制室温在18–22 °C, 清洁笼具, 单笼喂养; 术后腹腔注射青霉素3 d; 注意保暖, 皮下注射生理盐水或葡萄糖液, 预防失血性休克; 每日定时挤压膀胱两三次, 直至膀胱功能恢复, 肛内注开塞露, 1次/d; 每天定时翻身, 预防压疮发生。

**细胞移植和药物干预:** 造模成功后, 随即进行细胞移植, 术后24 h进行给药。

**对照组:** 造模后每天20 mL/kg生理盐水灌胃, 连续灌胃30 d。

**口服肉苁蓉组:** 造模后将制备好的肉苁蓉条件浓缩液(20 mg/L), 按照20 mL/kg灌胃, 连续灌胃30 d。

**骨髓间充质干细胞移植组:** 造模后分别在距离脊髓损伤部位上下1 mm处注入骨髓间充质干细胞悬液(细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ) 3  $\mu\text{L}$ , 损伤部位注入4  $\mu\text{L}$ 细胞悬液, 共10  $\mu\text{L}$ , 每天20 mL/kg生理盐水灌胃, 连续灌胃30 d。

**口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组:** 造模后分别在距离脊髓损伤部位上下1 mm处注入骨髓间充质干细胞悬液(细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ) 3  $\mu\text{L}$ , 损伤部位注入4  $\mu\text{L}$ 细胞悬液, 共10  $\mu\text{L}$ , 将制备好的肉苁蓉条件浓缩液(20 mg/L), 按照20 mL/kg灌胃, 连续灌胃30 d。

**免疫组化检测Nestin的表达:** 治疗30 d时每组随机选取3只取材, 10 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内麻醉, 经左心室插管至升主动脉, 并剪开右心耳, 用微量泵灌入4  $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水约200 mL, 待流出液清亮后再灌注4  $^{\circ}\text{C}$ 的40 g/L多聚甲醛250 mL, 取损伤部位脊髓组织, 常规石蜡包埋切片, 行Nestin免疫组化染色。DAB显色试剂盒显色, 以PBS代替一抗作为阴性对照。

**行为学评定:** 治疗24 h, 4周, 8周, 12周, 采用BBB评分对大鼠运动功能进行评价。评分时采用双人、双盲独立评分, 最后取均值, 以减少主观因素对实验结果的影响。

**神经电生理信号测定:** 利用MD3000型生物信号采集处理系统分别于造模后治疗前及治疗后12周运动功能评分的同时进行神经电生理信号测定, 记录感觉诱发电位和运动诱发电位潜伏期。

**主要观察指标:** BBB总分、感觉诱发电位和运动诱发电位。

**统计学分析:** 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 15.0统计软件分析进行One-way ANOVA检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 55只脊髓损伤模型Wistar大鼠均进入结果分析, 中途无脱落。

**2.2 免疫组化检测结果** 骨髓间充质干细胞移植组和口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组的脊髓损伤部位以及相邻的组织内均有Nestin阳性细胞(图1), 且口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组阳性表达明显较骨髓间充质干细胞移植组多。对照组、口服肉苁蓉组无Nestin阳性细胞表达。

**2.3 BBB评分结果** BBB评分结果显示, 治疗24 h、4周和8周各组评分差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。12周时各组

与对照组比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组与其他各组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 表1)。

**2.4 电生理测定结果** 口服肉苁蓉组和口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组各有1只大鼠感觉诱发电位和运动诱发电位均检测不到。治疗12周后, 各实验组感觉诱发电位和运动诱发电位潜伏期与治疗前比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 治疗后口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组感觉诱发电位潜伏期与其他各组比较改善较为明显, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 治疗后口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组运动诱发电位潜伏期与其他各组比较差异也有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见表2, 图2。

## 3 讨论 Discussion

脊髓损伤的治疗是研究了近百年的世界性难题, 到目前尚未取得突破性进展。胚胎神经干细胞、嗅鞘细胞、许旺细胞及各种骨髓来源细胞等种子细胞移植治疗脊髓损伤已成为目前研究热点<sup>[16-19]</sup>。脊髓损伤后神经功能之所以恢复困难, 主要原因有中枢神经系统轴突再生能力极其有限, 成年人脊髓的少突胶质细胞不能像神经膜细胞那样在轴突断裂后引导轴突生长并形成髓鞘, 神经营养因子分泌不足、轴突生长的微环境中存在抑制因素, 以及脊髓损伤后胶质瘢痕和空洞的形成阻止了轴突进入远端等。寻求治疗脊髓损伤更为有效的方法一直是学者们不断探索的目标。研究表明, 骨髓间充质干细胞在特定的条件下可分化成为神经细胞<sup>[20]</sup>, 移植后可重建神经系统功能, 改善患者功能障碍<sup>[21]</sup>。

骨髓间充质干细胞是广泛存在于骨髓内的一类干细胞, 是骨髓造血微环境的重要组成部分, 可在体外培养条件下大量增殖, 又能保持高度未分化状态, 动物实验证明, 骨髓间充质干细胞可促进脊髓损伤及脑出血的神经修复<sup>[22]</sup>。近年来研究发现骨髓间充质干细胞具有向神经元和神经胶质分化的潜能<sup>[23-24]</sup>, 通过一定的诱导条件, 骨髓间充质干细胞可显示神经系统细胞的一些形态特征并表达一些标志性蛋白。目前的研究热点主要集中于神经营养因子和细胞因子诱导以及化学试剂诱导, 包括脑源性神经生长因子、碱性成纤维生长因子、神经生长因子、表皮生长因子以及全反式维甲酸、二甲基亚砷、2-巯基乙醇、丁羟茴醚等<sup>[25-34]</sup>。关于骨髓间充质干细胞用于治疗脊髓损伤已进行了相当广泛的研究, 而且各种研究证实其可促进脊髓损伤后各方面功能的恢复, 包括炎症、坏死、轴突再生、血管发生、胶质瘢痕及运动功能恢复等方面<sup>[35-40]</sup>。

肉苁蓉为列当科植物沙苁蓉(*Cistanche Sinensis* G. Beck), 肉苁蓉(*Cistanche deserticola*. Y.C. Ma), 盐生肉苁蓉(*Cistanche Salsa* < C.A.Mey > G.Beck)的干燥带鳞状皮的肉质茎<sup>[41]</sup>, 主产于中国的内蒙古、新疆、甘肃和宁夏一带,

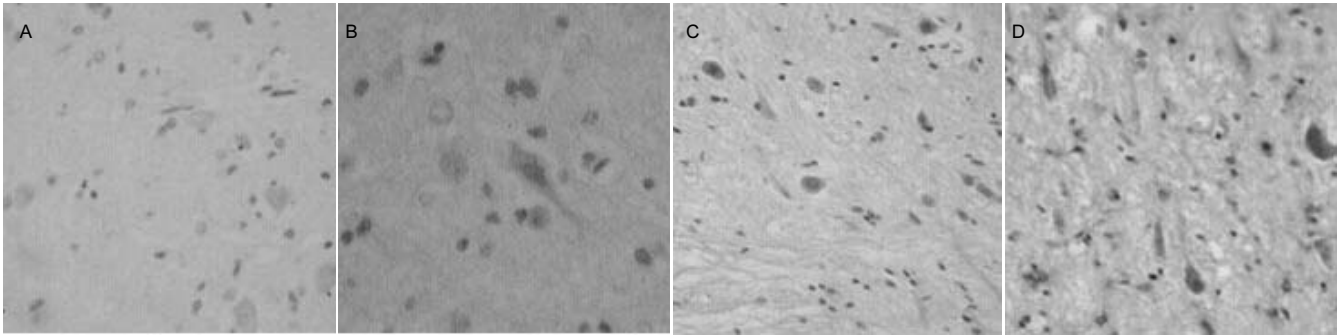


图 1 各组 Wistar 大鼠脊髓组织 Nestin 免疫组化染色(×200)

Figure 1 Nestin immunohistochemical staining result of the spinal cord of Wistar rats (×200)

图注: A 为对照组; B 为口服肉苁蓉组; C 为骨髓间充质干细胞移植组; D 为口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组。免疫组化结果显示口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组 Nestin 阳性表达明显多于其他各组。

表 1 各组 Wistar 大鼠造模后不同时间点 BBB 评分比较

Table 1 Comparison of Basso, Beattie, and Bresnahan scores at different time after modeling

( $\bar{x}\pm s$ )

组别	24 h	4 周	8 周	12 周
对照组	21.00±0.00(n=10)	21.0±0.00(n=10)	21.0±0.00(n=7)	21.0±0.00 <sup>a</sup> (n=7)
口服肉苁蓉组	1.39±2.66(n=15)	1.72±3.03(n=15)	2.84±3.47(n=12)	5.63±3.41(n=12)
骨髓间充质干细胞移植组	1.28±2.34(n=15)	4.62±3.25(n=15)	5.78±3.69(n=12)	7.48±3.90(n=12)
口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组	1.44±2.51(n=15)	7.18±4.26(n=15)	10.05±3.76(n=12)	12.11±3.69 <sup>b</sup> (n=12)

表注: 与其他组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 各组 Wistar 大鼠感觉诱发电位和运动诱发电位潜伏期的比较

Table 2 Comparison of somatosensory and motor evoked potential latencies

( $\bar{x}\pm s$ , ms)

组别	感觉诱发电位		运动诱发电位	
	治疗前	治疗后 12 周	治疗前	治疗后 12 周
对照组	4.23±0.16(n=10)	4.26±0.19 <sup>a</sup> (n=7)	3.72±0.18(n=10)	3.80±0.27 <sup>ab</sup> (n=7)
口服肉苁蓉组	5.60±0.17(n=15)	5.13±0.24 <sup>a</sup> (n=12)	5.82±0.23(n=15)	5.10±0.29 <sup>a</sup> (n=12)
骨髓间充质干细胞移植组	5.46±0.20(n=15)	4.85±0.22 <sup>a</sup> (n=12)	5.79±0.14(n=15)	4.90±0.35 <sup>a</sup> (n=12)
口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组	5.53±0.18(n=15)	4.55±0.24 <sup>ab</sup> (n=12)	5.81±0.16(n=15)	4.49±0.31 <sup>ab</sup> (n=12)

表注: 与治疗前比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与其他各组比较 <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

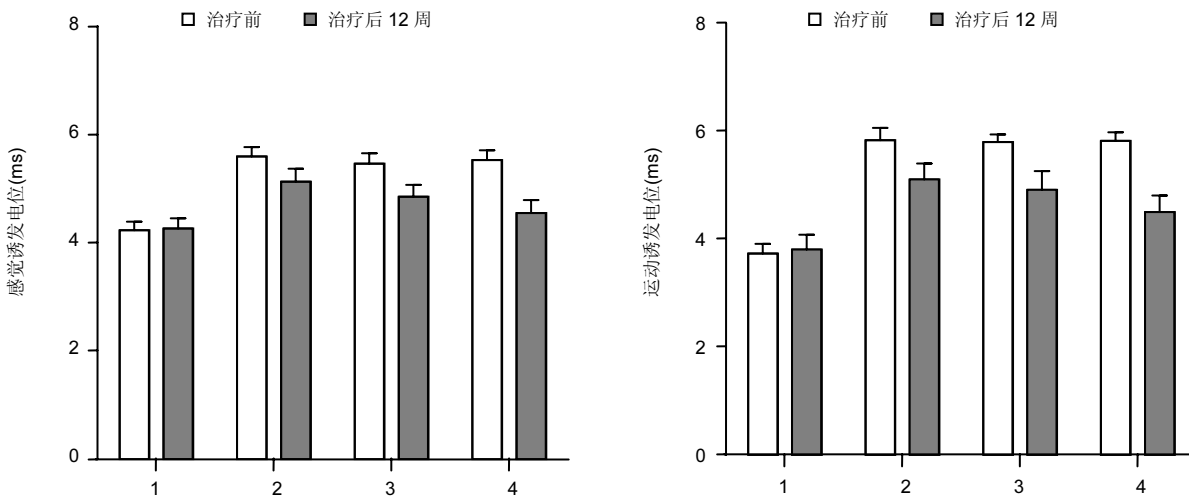


图 2 治疗前后各组 Wistar 大鼠感觉诱发电位和运动诱发电位潜伏期曲线

Figure 2 Latency curves of somatosensory and motor evoked potentials

图注: 1: 对照组; 2: 口服肉苁蓉组; 3: 骨髓间充质干细胞移植组; 4: 口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组。治疗 12 周后, 各组感觉诱发电位和运动诱发电位潜伏期与治疗前比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 治疗后口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组感觉诱发电位和运动诱发电位潜伏期与其他各组比较改善较为明显, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

素有“沙漠人参”之美誉。肉苁蓉的化学成分主要包括苯乙醇苷类、环烯醚萜类、挥发性成分、木脂素类、多糖以及生物碱等。研究表明,苯乙醇苷类可通过抑制caspase-3和caspase-8而抑制大鼠小脑颗粒细胞的凋亡<sup>[42]</sup>,并对MPTP所致的C57小鼠黑质多巴胺能神经元损伤具有保护作用<sup>[43]</sup>。不仅如此,肉苁蓉还可以减轻神经系统缺血再灌注等各种损害,对神经元凋亡有显著抑制作用<sup>[44]</sup>。

研究发现,肉苁蓉总苷对损伤的神经细胞有保护作用<sup>[45]</sup>,在本研究中,骨髓间充质干细胞移植组及口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组均有Nestin阳性表达,而且口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组Nestin阳性表达明显较其他各组多,其机制可能为肉苁蓉可以改善宿主微环境,从而促进移植骨髓间充质干细胞在宿主内存活。骨髓间充质干细胞能够促进脊髓损伤动物模型的运动功能恢复,并且能够调节宿主的免疫环境,分泌神经营养因子,并在微环境的作用下分化成为神经元细胞。与其他来源种子细胞相比,有其特有优点:可以大量获得并且取材方法简便易行,不存在免疫排斥的问题,而且不涉及伦理学问题<sup>[46]</sup>。目前已证实,骨髓间充质干细胞移植是治疗大鼠脊髓损伤有效的方法<sup>[47-51]</sup>。本研究中口服肉苁蓉+骨髓间充质干细胞移植组与单纯口服肉苁蓉组及单纯骨髓间充质干细胞移植组比较BBB评分及感觉诱发电位和运动诱发电位潜伏期恢复明显较好,证明二者联用对大鼠脊髓损伤功能的恢复有协同作用,从而为治疗脊髓损伤提供新的思路。但本研究中相关机制研究尚不够深入,将在今后的工作中进一步深入分析。

**作者贡献:** 实验设计为兰静、闫金玉,实验实施为夏润福、李剑锋,实验评估为李剑锋,资料收集为兰静、夏润福。兰静、李剑锋成文,闫金玉审校,兰静对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 运动诱发电位-刺激运动皮质在对侧靶肌记录到的肌肉运动复合电位,检查运动神经从皮质到肌肉的传递、传导通路的整体同步性和完整性。运动诱发电位是继体感诱发电位后,为检查运动神经系统功能而设计的一项神经电生理学检查方法。

**作者声明:** 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Zeddou M, Relic B, Malaise MG. Umbilical cord fibroblasts: Could they be considered as mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(3):367-370.
- [2] Tuli R, Tuli S, Nandi S, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*. 2003;21(6):681-693.
- [3] Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11(1):55-64.
- [4] Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, et al. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;412:196-212.
- [5] Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther*. 2002;9(10):642-647.
- [6] Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*. 2011;56(7):709-721.
- [7] Parker AM, Katz AJ. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6(6):567-578.
- [8] Urdziková LM, Růžicka J, LaBagnara M, et al. Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *Int J Mol Sci*. 2014;15(7):11275-11293.
- [9] Urdziková L, Jendelová P, Glogarová K, et al. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006;23(9):1379-1391.
- [10] Coutts M, Keirstead HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008;209(2):368-377.
- [11] Garbuzova-Davis S, Willing AE, Saporta S, et al. Novel cell therapy approaches for brain repair. *Prog Brain Res*. 2006;157:207-222.
- [12] Joyce N, Annett G, Wirthlin L, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*. 2010;5(6):933-946.
- [13] Hardy SA, Maltman DJ, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells as mediators of neural differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008;3(1):43-52.
- [14] Nishio Y, Koda M, Kamada T, et al. The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats. *J Neurosurg Spine*. 2006;5(5):424-433.
- [15] Zhang C, He XJ, Li HP, et al. Chondroitinase ABC plus bone marrow mesenchymal stem cells for repair of spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2013;8(11):965-974.
- [16] Iwashita Y, Kawaguchi S, Murata M. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature*. 1994;367(6459):167-170.
- [17] Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science*. 1997;277(5334):2000-2002.
- [18] Martin D, Robe P, Franzen R, et al. Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J Neurosci Res*. 1996;45(5):588-597.
- [19] Ohta M, Suzuki Y, Noda T, et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol*. 2004;187(2):266-278.

- [20] Lee H, Kang JE, Lee JK, et al. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells promote proliferation and neuronal differentiation of Niemann-Pick type C mouse neural stem cells by upregulation and secretion of CCL2. *Hum Gene Ther*. 2013;24(7):655-669.
- [21] Park DY, Mayle RE, Smith RL, et al. Combined Transplantation of Human Neuronal and Mesenchymal Stem Cells following Spinal Cord Injury. *Global Spine J*. 2013;3(1):1-6.
- [22] Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res*. 2002;24(7):634-638.
- [23] Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology*. 2003;23(3):169-180.
- [24] Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000;290(5497):1779-1782.
- [25] 顾加祥, 尚修超, 刘宏君, 等. GDNF基因诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的实验研究[J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(3): 354-357.
- [26] 黄建锋, 黄继锋, 张伟才. 两种细胞因子联合诱导骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(6): 829-834.
- [27] 李娟, 吴建军, 刘凯, 等. 肉苁蓉含药血清对BMSC分化为神经细胞的诱导作用研究[J]. *中国中医药科技*, 2013, 20(5): 486-487, 570.
- [28] 徐丽丽, 匡弢, 张佳. 体外诱导骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化: 两种方法的比较[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(45): 7821-7826.
- [29] 陈增生, 褚强, 刘艳凤, 等. 诱导剂共培养: 谁更适宜骨髓间充质干细胞向神经细胞的分化[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(32): 5757-5764.
- [30] 何丁文, 殷嫦娥, 殷明, 等. 不同血清浓度对bFGF联合EGF诱导BMSCs向神经细胞分化的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29(1): 18-24.
- [31] 孙惠敏, 刘婷, 马丽君, 等. 人骨髓干细胞分离及其向神经细胞诱导分化的实验研究[J]. *宁夏医科大学学报*, 2013, 35(5): 502-505.
- [32] 杜晓鸣, 魏会平, 张爱兰, 等. 川芎嗪对大鼠骨髓间充质干细胞长期诱导效应的研究[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2012, 10(13): 157-158.
- [33] 杜红阳, 付海燕, 包翠芬, 等. 地黄多糖对大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞诱导分化作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(6): 133-137.
- [34] 陈再丰, 许信龙, 魏晓捷, 等. 鼠神经生长因子诱导骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化的实验研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(2): 137-140.
- [35] Quertainmont R, Cantinieaux D, Botman O, et al. Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions. *PLoS One*. 2012;7(6):e39500.
- [36] Boido M, Garbossa D, Fontanella M, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reduces glial cyst and improves functional outcome after spinal cord compression. *World Neurosurg*. 2014;81(1):183-190.
- [37] Karaoz E, Kabatas S, Duruksu G, et al. Reduction of lesion in injured rat spinal cord and partial functional recovery of motility after bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation. *Turk Neurosurg*. 2012;22(2):207-217.
- [38] Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2012;29(8):1614-1625.
- [39] Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, et al. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(1):59-64.
- [40] Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res*. 2010;1343:226-235.
- [41] 白清云. 中国医学百科全书·蒙医学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 188.
- [42] Tian XF, Pu XP. Phenylethanoid glycosides from *Cistanches salsa* inhibit apoptosis induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in neurons. *J Ethnopharmacol*. 2005;97(1):59-63.
- [43] Geng X, Song L, Pu X, et al. Neuroprotective effects of phenylethanoid glycosides from *Cistanches salsa* against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic toxicity in C57 mice. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(6):797-801.
- [44] 王晓雯, 孟新珍, 蒋晓燕, 等. 肉苁蓉总苷对清醒小鼠脑缺血再灌注致海马CA1区脑组织损伤的保护作用[J]. *卒中与神经疾病*, 2003, 10(6): 325-328.
- [45] 罗兰, 阿尔孜古丽·吐尔逊, 王晓雯. 肉苁蓉总苷对 $\beta$ 淀粉样蛋白25-35诱导PC12细胞凋亡的保护作用[J]. *中国新药与临床杂志*. 2010, 29(2): 115-118.
- [46] Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2012;29(8):1614-1625.
- [47] Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res*. 2010;1343:226-235.
- [48] Mohammadian M, Shamsasenjan K, Lotfi Nezhad P, et al. Mesenchymal stem cells: new aspect in cell-based regenerative therapy. *Adv Pharm Bull*. 2013;3(2):433-437.
- [49] Cantinieaux D, Quertainmont R, Blacher S, et al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One*. 2013;8(8):e69515.
- [50] Quertainmont R, Cantinieaux D, Botman O, et al. Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions. *PLoS One*. 2012;7(6):e39500.
- [51] Chen L, Cui X, Wu Z, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells pretreated with valproic acid in rats with an acute spinal cord injury. *Biosci Trends*. 2014;8(2):111-119.