

神经生长因子修饰脂肪干细胞移植促进损伤脊髓的修复

王 勇, 赵 伟, 冯健洲, 陈晓春(沈阳医学院附属中心医院骨外四科, 辽宁省沈阳市 110024)

文章亮点:

- 1 采用贴壁培养法成功培养出大鼠脂肪干细胞并首次将神经生长因子转染到脂肪干细胞中, 转染后的脂肪干细胞可稳定表达神经生长因子 mRNA 和蛋白。
- 2 实验将神经生长因子转染修饰的脂肪干细胞注射到大鼠脊髓损伤部位后, 发现损伤部位的神经生长因子表达量明显升高, 大鼠后肢的运动功能改善程度也明显提高, 证实了神经生长因子修饰的脂肪干细胞可起到修复脊髓损伤的作用。

关键词:

干细胞; 移植; 神经生长因子; 脂肪干细胞; 脊髓损伤; 基因修饰; 修复

主题词:

干细胞; 脂肪组织; 神经生长因子; 脊髓损伤

基金资助:

辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2014418); 沈阳医学院科学研究基金项目(20121008, 20132041); 沈阳市卫生局青年基金项目

摘要

背景: 基因修饰的干细胞能够增加多肽和全长蛋白的分泌而起到保护脊髓损伤和促进神经元功能恢复的作用, 因而成为近年来的研究热点。

目的: 探讨神经生长因子修饰的脂肪干细胞移植对大鼠脊髓损伤的保护作用。

方法: 贴壁培养法原代培养脂肪干细胞, 免疫荧光法行表面标志物鉴定; 脂质体介导神经生长因子质粒转染修饰脂肪干细胞, Real-time PCR 及 Western blot 检测转染后神经生长因子的表达; 改良 Allen 法构建大鼠脊髓损伤模型, 将转染后的脂肪干细胞注射移植入大鼠脊髓损伤部位, BBB 评分评估修复效果; 脂肪干细胞移植后 3 周处死大鼠, Real-time PCR 及 Western blot 检测移植后损伤节段脊髓中神经生长因子的表达。

结果与结论: 原代培养脂肪干细胞获得成功, 免疫荧光显示表面抗原 CD29 和 CD44 呈阳性表达; 转染后脂肪干细胞中神经生长因子 mRNA 及蛋白表达增高; 转染神经生长因子的脂肪干细胞移植后, 大鼠 BBB 评分明显升高, 损伤节段脊髓中神经生长因子 mRNA 及蛋白表达明显升高。结果表明神经生长因子转染修饰的脂肪干细胞可促进大鼠脊髓损伤修复。

王勇, 赵伟, 冯健洲, 陈晓春. 神经生长因子修饰脂肪干细胞移植促进损伤脊髓的修复[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(14):2224-2229.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.14.016

Nerve growth factor-modified adipose derived stem cells for repair of spinal cord injury

Wang Yong, Zhao Wei, Feng Jian-zhou, Chen Xiao-chun (The 4th Department of Orthopedics, the Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Gene-modified stem cells can increase the secretion of peptides and full-length proteins to protect spinal cord injury and promote recovery of neuronal function, which thus become a research hotspot in recent years.

OBJECTIVE: To investigate the effect of nerve growth factor-modified adipose derived stem cells in repairing spinal cord injury in rats.

METHODS: Adipose derived stem cells were primarily cultured by adherent culture method and cell surface markers were detected by immunofluorescence method, while spinal cord injury models were set by modified Allen method. Nerve growth factor plasmid was transfected into adipose derived stem cells with Lipofectamine2000 and the expression of nerve growth factor was detected by real-time PCR and western blot. The modified adipose derived stem cells intervened by nerve growth factor were injected into the injured part of spinal cord injury rat models. Basso-Beattie-Bresnahan score was used to evaluate the repairing effect. Models rats were sacrificed at 3 weeks after cell transplantation. Real-time PCR and western blot were used to testify nerve growth factor expression in the injured spinal segment after cell transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: Adipose derived stem cells were successfully cultured primarily, and positive for CD29 and CD44; the mRNA and protein expression of nerve growth factor was elevated after plasmid

王勇, 男, 1980年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2014年中国医科大学毕业, 博士, 主治医师, 讲师, 主要从事干细胞与脊髓损伤的基础研究。

通讯作者: 陈晓春, 硕士, 主任医师, 教授, 沈阳医学院附属中心医院骨外四科, 辽宁省沈阳市 110024

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2015)14-02224-06

稿件接受: 2015-04-11

http://www.crter.org

Wang Yong, M.D., Attending physician, Lecturer, the 4th Department of Orthopedics, the Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Corresponding author: Chen Xiao-chun, Master, Chief physician, Professor, the 4th Department of Orthopedics, the Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Accepted: 2015-04-11

transfection. The Basso-Beattie-Bresnahan score was elevated after transplantation of adipose derived stem cells intervened by nerve growth factor modification compared to control group; and the expression of nerve growth factor in the injured segment of the spinal cord was up-regulated detected by real-time PCR and western blot. These findings indicate that the nerve growth factor-modified adipose derived stem cells have repairing effects on spinal cord injury in rats.

Subject headings: Stem Cells; Adipose Tissue; Nerve Growth Factor; Spinal Cord Injuries

Funding: the Education Fund Item of Liaoning Province, No. L2014418; General Science Foundation of Shenyang Medical College, No. 20121008, 20132041; the Youth Fund of Shenyang Health Department

Wang Y, Zhao W, Feng JZ, Chen XC. Nerve growth factor modified adipose derived stem cells for repair of spinal cord injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(14):2224-2229.

0 引言 Introduction

脊髓损伤常导致截瘫、四肢瘫等严重的致残性并发症,目前脊髓损伤后的功能重建仍是困扰脊柱外科及临床康复医学领域的一个难题。脂肪干细胞作为一种新兴的种子细胞具有多项分化潜能。研究表明,基因修饰的干细胞能够增加多肽和全长蛋白的分泌而起到保护脊髓损伤和促进神经元功能恢复的作用^[1],因而成为近年来研究的热点并取得了一定的疗效。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)可促进神经元细胞突起的延长并提高受损神经元的存活率从而促进脊髓功能的恢复^[2-3]。本研究拟原代培养脂肪干细胞并应用神经生长因子转染进行基因修饰,然后移植到脊髓损伤大鼠模型中,探讨其对大鼠脊髓损伤的保护作用。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 单因素设计。

时间及地点: 实验于2013年5月至2014年12月在沈阳医学院附属中心医院中心实验室暨沈阳医学院附属中心医院博士后流动工作站实验中心完成。

材料:

实验动物: 雄性SD大鼠50只,体质量约300 g,由沈阳医学院动物实验中心提供,动物许可证号:SYXK(辽)2003-0026,实验动物的操作及处置过程经沈阳医学院学术委员会审查,认为该项目操作遵循国际及国家颁布的有关生物医学及实验动物伦理要求。

实验方法:

脂肪干细胞的原代培养: 参照Zuk等^[4]提取脂肪干细胞的方法并加以改进,取10只大鼠大网膜及肾周脂肪囊处脂肪组织, PBS清洗、剪碎,胰酶消化、胎牛血清中和、离心、弃上清、重悬、红细胞裂解、中和、离心、筛网过滤,离心、加入H-DMEM培养基重悬沉淀并置于37℃、体积分数为5%CO₂饱和湿度的孵箱中培养,定期换液,细胞融合至75%-80%时,常规传代。

脂肪干细胞的表面抗原鉴定: 取第2代生长良好的脂肪干细胞,调整细胞密度为2×10⁴个,常规接种于24孔板中,37℃、体积分数为5%CO₂孵育24-48 h至融合率为70%时进行表面抗原鉴定。取2孔细胞,弃培养基,依次行PBS清洗、多聚甲醛固定、PBS清洗、滤纸吸干,分别加入CD29、胞移植组和转染脂肪干细胞移植组,每组10只。Allen打击

CD44兔抗大鼠多克隆抗体,湿盒4℃孵育过夜,次日弃一抗, PBS清洗,二抗标记并孵育(室温), 2 h后PBS清洗,滤纸吸干,荧光显微镜下观察并照相。

神经生长因子修饰脂肪干细胞修复大鼠脊髓损伤实验所用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
H-DMEM培养基	Gibco公司
标准胎牛血清	Hyclone公司
胎牛血清、胰蛋白酶	Sigma公司
神经生长因子激活质粒(sc-421889-ACT)、神经生长因子单克隆抗体	Santa Cruz公司
RNA提取试剂盒, 反转录试剂盒, PCR试剂盒及Lipofectamine™2000转染试剂盒	Invitrogen公司
CD29、CD44兔抗大鼠多克隆抗体、FITC标记的羊抗兔二抗	武汉博士德生物工程有限公司
兔抗鼠β-actin 单克隆抗体	Cell Signaling公司
引物	生工生物工程(上海)有限公司合成
SYBR Master Mixture	Takara公司
荧光显微镜	日本Olympus公司
SYBR Master Mixture	Takara公司
HF90二氧化碳培养箱	美国Bioterra公司
Biospectrum AC凝胶成像系统、Mini-Protein III垂直板电泳装置	美国BIO-RAD公司
CR21GII 高速低温冷冻离心机	日本Sanyo公司

脂质体介导的神经生长因子转染: 取第3代生长状态佳的脂肪干细胞,调整细胞密度为2×10⁵个,接种于6孔板中,并分为未转染组、对照组和转染神经生长因子组,细胞达70%融合率时同步化24 h。参照Lipofectamine™2000说明书制备神经生长因子激活质粒-脂质体复合物,室温孵育20 min,将制备好的神经生长因子激活质粒-脂质体复合物均匀滴加于转染神经生长因子组细胞中,对照组则滴加等量Lipofectamine™2000,未转染组滴加等量PBS。37℃孵育6 h,添加500 μL H-DMEM完全培养基,培养48 h待细胞铺满后常规消化接种于培养瓶中继续培养。

大鼠脊髓损伤模型制作、分组、脂肪干细胞注射移植: 40只SD大鼠随机分为未手术组、PBS组、未转染脂肪干细胞法行模型制作^[5],依次为水合氯醛腹腔麻醉、固定及备皮、

T₁₀节段脊髓显露、自制打击器击打(未手术组无此步骤)、缝合伤口,大鼠清醒后出现双侧后肢明显迟缓性瘫痪为模型制作成功(未手术组除外)。造模后辅助排尿,1周后沿原切口进入并显露脊髓,以T₁₀为中心上下各0.5 cm处分别注射PBS、未转染神经生长因子的脂肪干细胞和转染神经生长因子的脂肪干细胞悬液各10 μL,蛋白凝胶封闭针孔并缝合切口。

BBB评分: 分别于手术当天、术后第1周、第2周(脂肪干细胞移植后1周)、第3周(脂肪干细胞移植后2周)及第4周(脂肪干细胞移植后3周)行BBB评分^[6-7]。该评分系统将大鼠后肢运动功能分为22个等级,其中后肢全瘫为0分,功能完全正常为21分,主要观察内容包括关节活动数目和范围、负重程度及前后肢协调性、前后爪和尾部活动情况等。

Real time PCR检测脂肪干细胞和移植后3周脊髓组织中神经生长因子mRNA表达: 应用Trizol分别提取各组细胞及各组脊髓组织的总RNA。按照Invitrogen的试剂盒说明书进行反转录反应,反应产物行PCR扩增,PCR过程按Invitrogen的SYBR Green 实时荧光定量PCR 试剂盒说明书在荧光定量仪上进行,以β-actin为内参照,其中神经生长因子引物序列上游为AAT CAA CTC CTG CTT GGC,下游为GTA TTT AGC CCC TCC TCC; β-actin上游引物序列为AGT GTG ACG TGG ACA TCC GCA AAG,下游为ATC CAC ATC TGC TGG A AG GTG GAC。以神经生长因子与β-actin拷贝数的比值为其相对表达量。

Western blot检测脂肪干细胞和移植后3周脊髓组织中神经生长因子蛋白表达: 分别提取各组细胞及各组脊髓组织的总蛋白,BCA法行蛋白浓度测定,上样、电泳、转膜、封闭、一抗孵育过夜,TBST清洗、二抗杂交、TBST清洗,最后行ECL电化学发光检测。

主要观察指标: ①转染前后脂肪干细胞中神经生长因子 mRNA的相对表达量、神经生长因子蛋白表达量。②脂肪干细胞移植后3周脊髓组织中神经生长因子 mRNA的相对表达量、神经生长因子蛋白表达量。③神经生长因子修饰的脂肪干细胞移植后大鼠的BBB评分变化。

统计学分析: 采用SPSS 17.0 for windows统计软件储存和分析数据。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 脂肪干细胞的形态学观察及免疫荧光鉴定 原代培养24 h即可见细胞贴壁,外形为类小圆型,呈团簇状生长,形成集落。3 d左右细胞融合超过80%时传代,传代后细胞生长速度明显加快,形态较均一,呈长梭形,排列紧密,类似成纤维细胞(图1A, B)。免疫荧光法检测细胞表面抗原CD29和CD44呈阳性表达,证实为干细胞来源(见图1C, D)。

2.2 脂质体介导的神经生长因子质粒转染结果 应用Real-time PCR和Western blot分别从mRNA和蛋白水平检测转染后脂肪干细胞中神经生长因子的表达情况,结果显示,相比于未转染组和对照组,转染神经生长因子组的脂肪干细胞中神经生长因子的mRNA和蛋白表达水平明显升高,证实转染获得了成功(图2, 3)。

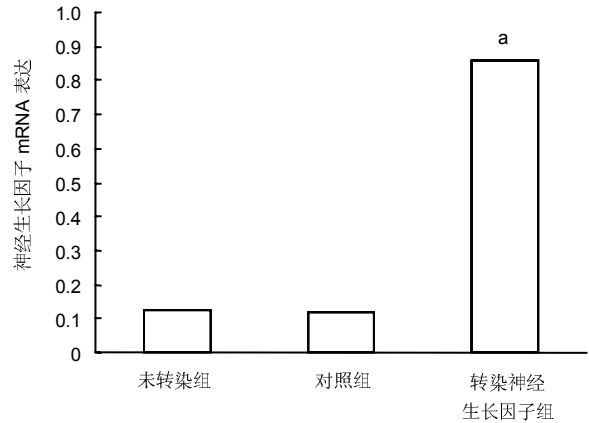


图2 应用 Real-time PCR 检测脂肪干细胞中神经生长因子 mRNA 的表达情况

Figure 2 Real-time PCR detection of mRNA expression of nerve growth factor in adipose derived stem cells

图注: 相比于未转染组及对照组, 转染神经生长因子组中神经生长因子 mRNA 明显增高($P < 0.01$)。

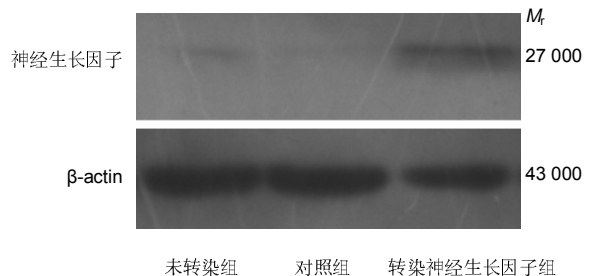


图3 应用 Western blot 检测脂肪干细胞中神经生长因子蛋白的表达情况

Figure 3 Western blot detection of protein expression of nerve growth factor in adipose derived stem cells

图注: 相比于未转染组及对照组, 转染神经生长因子组中神经生长因子蛋白表达增加。

2.3 BBB评分结果 未手术组在各时间点BBB评分无变化,而相比于未手术组,PBS组、未转染脂肪干细胞组及转染脂肪干细胞组大鼠BBB评分在脊髓损伤术后最低,此3组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。

随着时间的延长,大鼠后肢的运动功能逐渐恢复;在移植细胞前及移植细胞后1周,大鼠后肢运动功能恢复差异无显著性意义($P > 0.05$);而在移植后2周及3周,转染脂肪干细胞组大鼠的后肢运动功能恢复显著优于PBS组、未转染脂肪干细胞组,差异有非常显著性意义($P < 0.01$),见图4。

2.4 脂肪干细胞移植3周后损伤节段脊髓中神经生长因子的表达 脂肪干细胞移植后3周, 切取脊髓损伤上下各1 cm区域脊髓组织行Real-time PCR和Western blot检测神经生长因子的表达情况。结果显示, 相比于未手术组、PBS组、未转染脂肪干细胞组, 转染脂肪干细胞组大鼠脊髓中神经生长因子mRNA和蛋白表达水平明显升高。据此可以判断, 移植神经生长因子修饰后的脂肪干细胞可增加相应节段脊髓内神经生长因子的表达, 而这种神经生长因子表达的增加与脊髓功能恢复有关或者说呈正相关(图5和图6)。

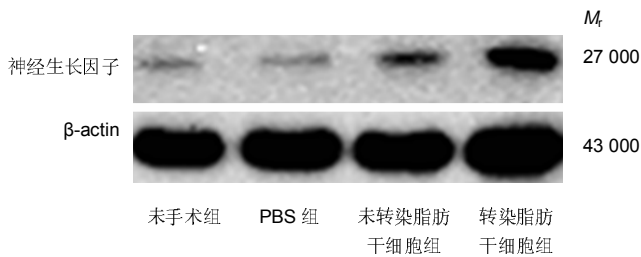


图6 应用Western blot检测脊髓组织中神经生长因子蛋白的表达情况

Figure 6 Western blot detection of protein expression of nerve growth factor in adipose derived stem cells

图注: 相比于未手术组、PBS组、未转染脂肪干细胞组, 转染脂肪干细胞组大鼠脊髓组织中神经生长因子蛋白表达明显增高。

3 讨论 Discussion

高能量损伤导致的脊髓损伤是脊柱外科常见损伤^[8], 此类患者预后相对较差, 致残率极高, 多数患者存在截瘫或四肢瘫而导致终身肢体功能障碍。脊髓损伤后肢体的运动感觉等神经功能重建仍是骨科、神经外科和康复医学科所要共同面对的难题^[9-11]。近年来的研究表明, 包括胚胎干细胞、神经干细胞和诱导多能干细胞在内的多种细胞疗法的开展为脊髓损伤修复提供了新的思路和视野并取得了一定的成果^[12-16]。Wang等^[17]研究发现联合应用种植勿动蛋白受体沉默的神经干细胞和许旺细胞的细胞支架可明显改善脊髓损伤后局部的微环境从而达到促进脊髓损伤修复的效果。

脂肪干细胞是一种来源于脂肪组织的具有多种分化潜能的种子细胞, 其具有取材容易、生长迅速、生物学性状稳定等优点^[4, 18-20]。文献表明, 包括脂肪干细胞在内的多种干细胞到达脊髓损伤部位后可分泌多种细胞因子, 如胰岛素样生长因子、脑源性神经营养因子、血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子2、转化生长因子、粒细胞-巨噬细胞刺激因子等并通过下调凋亡相关因子和上调抗凋亡因子等机制参与脊髓损伤的保护和修复^[21]。神经生长因子是最早发现的神经营养因子, 其与神经元的分化和再生密切相关^[22-23], 神经生长因子可促进胆碱能局部神经元尤其是伤害性感觉轴突和蓝核脊髓束神经轴突的发芽和再生^[24]。

本实验参照Zuk等^[4]的贴壁培养方法从大鼠脂肪组织中分离培养出脂肪干细胞, 并进一步通过免疫荧光鉴定验证了其特异性细胞表面抗原CD29和CD44为阳性表达; 然后通过细胞转染的方式将神经生长因子基因转入到培养的脂肪干细胞中, 实验结果表明, 转染后的脂肪干细胞可稳定表达神经生长因子 mRNA和蛋白, 亦即证实获得了稳定表达神经生长因子基因修饰的脂肪干细胞。

目前应用基因修饰的干细胞治疗脊髓损伤的国内外文献并不少见^[25-27], Kumagai等^[28]证实应用MNTS1和MNTS1/P75修饰的间充质干细胞移植治疗脊髓损伤后可明显促进轴突的生长并预防皮肤过敏反应; Sasaki等^[29]报道基因修饰后过表达脑源性神经营养因子的骨髓间充质干细胞可进一步增加脑源性神经营养因子治疗脊髓损伤的效果。文献报道, 神经生长因子可与原肌球蛋白相关激酶A(tropomyosin-related kinase, TrkA)和p75神经生长蛋白受体(p75 neurotrophin receptor, p75 NTR)相结合, 这种神经生长因子-受体复合物经过细胞内吞作用逆行转移到神经元胞体内并调控其下游基因的表达^[30-31], 从而达到提高神经元存活率并促进轴突生长的效果。

本实验首次将神经生长因子通过脂质体转染入脂肪干细胞中, 相比于其他种子细胞, 脂肪干细胞取材相对更广、生物学性状也相对更为稳定、可长期增殖不易衰老。实验选取生物学性状稳定的第3代脂肪干细胞进行基因修饰, 并通过Realtime PCR和Western blot对修饰后的脂肪干细胞进行检测, 实验结果表明, 转染后的脂肪干细胞中神经生长因子的mRNA和蛋白表达量相比于未转染组和对照组明显增高, 亦即证实成功构建了能够稳定表达目的基因的生物学性状稳定的神经生长因子修饰的脂肪干细胞。实验将神经生长因子转染修饰的脂肪干细胞注射到大鼠脊髓损伤部位后, 损伤部位的神经生长因子表达量明显升高, 大鼠后肢的运动功能改善程度较未转染脂肪干细胞组和PBS组明显提高, 证实神经生长因子修饰的脂肪干细胞可起到修复脊髓损伤的作用。损伤部位的神经生长因子表达增加, 可促进神经细胞的增殖和分化, 并可促进内源性的神经干细胞向损伤部位迁移, 从而起到促进神经功能重建的作用。

另外, 神经生长因子对局部未受损的神经元尚有一定的保护作用, 抑制其凋亡, 从而间接起到损伤后修复的作用。当然, 脊髓损伤及其修复是一个涉及多种因素的复杂过程, 本实验仅初步证实了神经生长因子修饰后的脂肪干细胞对大鼠脊髓损伤的修复作用, 神经生长因子具体通过何种分子机制促进脊髓功能恢复, 移植后局部生长因子的表达浓度及表达量、表达效率等方面对脊髓损伤后功能恢复程度差异等问题仍需进一步研究和探讨。

总之, 研究结果发现, 应用神经生长因子转染修饰的脂肪干细胞可促进大鼠脊髓损伤的修复, 为基因修饰干细胞移植治疗脊髓损伤提供了一定的理论基础。

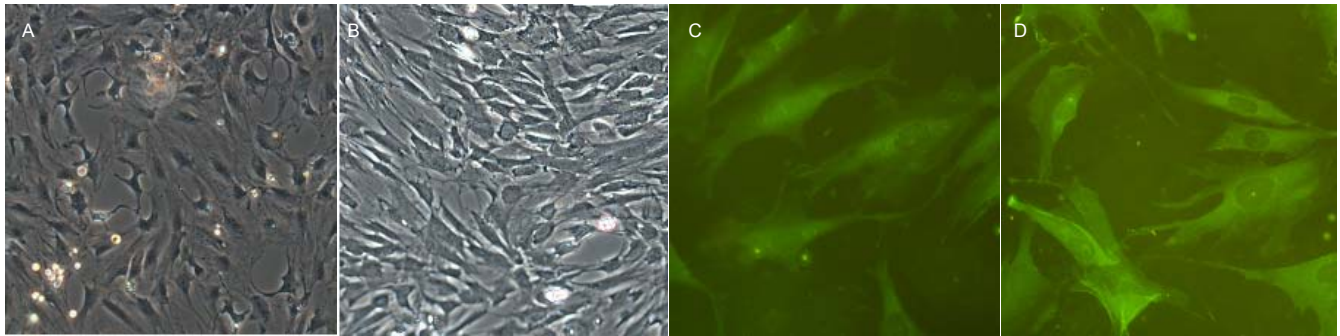


图1 脂肪干细胞的形态学观察及免疫荧光鉴定

Figure 1 The morphological observation and immunofluorescent identification of adipose derived stem cells

图注: 图中 A 为倒置相差显微镜观察显示原代培养的脂肪干细胞呈小圆型, 可见伪足, 生长形成集落($\times 100$); B 为第 2 次传代后细胞形态类似成纤维细胞, 呈长梭形, 生长迅速, 排列紧密($\times 100$); C, D 为免疫荧光鉴定结果显示培养的脂肪干细胞表面抗原 CD29 和 CD44 呈阳性表达, 发出绿色荧光($\times 400$)。

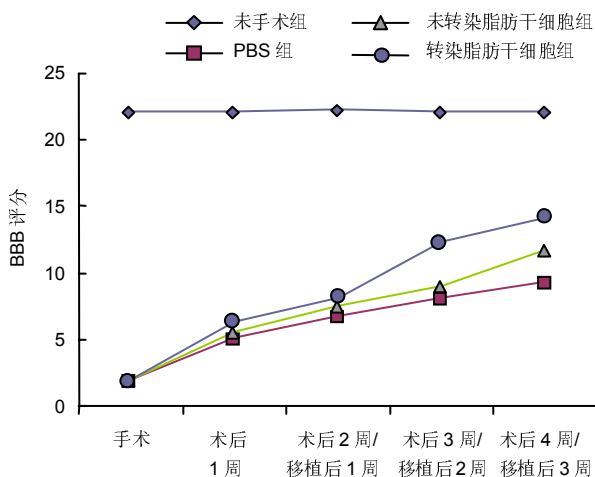


图4 各组大鼠脂肪干细胞移植前后 BBB 评分

Figure 4 Basso-Beattie-Bresnahan scores before and after transplantation of adipose derived stem cells

图注: 各组大鼠的运动功能随时间延长呈逐渐恢复趋势, 细胞移植后转染脂肪干细胞组功能恢复最为显著。

致谢: 感谢沈阳医学院附属中心医院中心实验室各位老师们在实验过程中提供的支持与帮助。

作者贡献: 实验设计为陈晓春教授, 实验实施为王勇、冯健洲, 实验评估为陈晓春教授, 资料收集为冯健洲。王勇成文, 陈晓春、赵伟审校, 王勇、陈晓春对文章负责。

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: 基因修饰-主要指利用生物化学方法修改 DNA 序列, 将目的基因片段导入宿主细胞内, 或将特定基因片段从基因组中删除, 从而达到改变宿主细胞基因型或者使原有基因型得到加强的作用。

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。

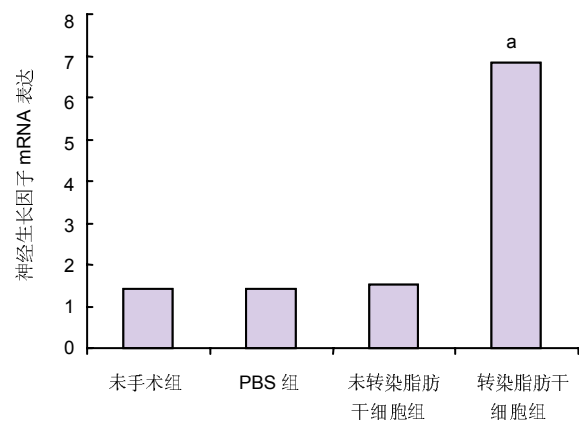


图5 应用 Real-time PCR 检测脊髓组织中神经生长因子 mRNA 的表达情况

Figure 5 Real-time PCR detection of mRNA expression of nerve growth factor in the spinal cord

图注: 相比于未手术组、PBS 组、未转染脂肪干细胞组, 转染脂肪干细胞组大鼠脊髓组织中神经生长因子 mRNA 表达明显增高($P < 0.01$)。

4 参考文献 References

- Cui X, Chen L, Ren Y, et al. Genetic modification of mesenchymal stem cells in spinal cord injury repair strategies. *Biosci Trends*. 2013;7(5):202-208.
- Aloe L, Bianchi P, De Bellis A, et al. Intranasal nerve growth factor bypasses the blood-brain barrier and affects spinal cord neurons in spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2014;9(10):1025-1030.
- Zhang H, Wu F, Kong X, et al. Nerve growth factor improves functional recovery by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury. *J Transl Med*. 2014;12:130.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228.
- 徐帆, 陈建敏, 张晓. 脊髓损伤动物模型的制备及神经功能评价[J]. 创伤外科杂志, 2007, 9(1):91-93.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996; 139(2):244-256.

- [7] 彭忠勇, 陈志斌, 修波, 等. 嗅鞘细胞移植联合督脉电针对脊髓损伤大鼠脊髓诱发电位的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(23):4426-4432.
- [8] Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(8):628-643.
- [9] Ting LH, Chiel HJ, Trumbower RD, et al. Neuromechanical Principles Underlying Movement Modularity and Their Implications for Rehabilitation. *Neuron*. 2015;86(1):38-54.
- [10] Tanhoffer RA, Tanhoffer AI, Raymond J, et al. Energy expenditure in individuals with spinal cord injury quantified by doubly labeled water and a multi-sensor armband. *J Phys Act Health*. 2015;12(2):163-170.
- [11] Cardenas DD, Emir B, Parsons B. Examining the Time to Therapeutic Effect of Pregabalin in Spinal Cord Injury Patients With Neuropathic Pain. *Clin Ther*. 2015. [Epub ahead of print]
- [12] Nicaise C, Mitrecic D, Falnikar A, et al. Transplantation of stem cell-derived astrocytes for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis and spinal cord injury. *World J Stem Cells*. 2015; 7(2):380-398.
- [13] Watanabe S, Uchida K, Nakajima H, et al. Early Transplantation of Mesenchymal Stem Cells after Spinal Cord Injury Relieves Pain Hypersensitivity Through Suppression of Pain-Related Signaling Cascades and Reduced Inflammatory Cell Recruitment. *Stem Cells*. 2015 Mar 24. doi: 10.1002/stem.2006. [Epub ahead of print]
- [14] Garbossa D, Boido M, Fontanella M, et al. Recent therapeutic strategies for spinal cord injury treatment: possible role of stem cells. *Neurosurg Rev*. 2012;35(3):293-311.
- [15] Mothe AJ, Tator CH. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. *J Clin Invest*. 2012;122(11):3824-3834.
- [16] Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(28):12704-12709.
- [17] Wang D, Liang J, Zhang J, et al. Mild hypothermia combined with a scaffold of NgR-silenced neural stem cells/Schwann cells to treat spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2014;9(24):2189-2196.
- [18] Minteer DM, Marra KG, Rubin JP. Adipose Stem Cells: Biology, Safety, Regulation, and Regenerative Potential. *Clin Plast Surg*. 2015;42(2):169-179.
- [19] Kapur SK, Dos-Anjos Vilaboa S, Llull R, et al. Adipose Tissue and Stem/Progenitor Cells: Discovery and Development. *Clin Plast Surg*. 2015;42(2):155-167.
- [20] Kingham PJ, Reid AJ, Wiberg M. Adipose-Derived Stem Cells for Nerve Repair: Hype or Reality. *Cells Tissues Organs*. 2015 Mar 21. [Epub ahead of print]
- [21] Azari MF, Mathias L, Ozturk E, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of CNS injury. *Curr Neuropharmacol*. 2010;8(4):316-323.
- [22] Mufti RE, Sarker K, Jin Y, et al. Thrombin enhances NGF-mediated neurite extension via increased and sustained activation of p44/42 MAPK and p38 MAPK. *PLoS One*. 2014; 9(7):e103530.
- [23] Lin CL, Heron P, Hamann SR, et al. Functional distinction between NGF-mediated plasticity and regeneration of nociceptive axons within the spinal cord. *Neuroscience*. 2014;272:76-87.
- [24] Grill RJ, Blesch A, Tuszynski MH. Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol*. 1997; 148(2):444-452.
- [25] Shi B, Ding J, Liu Y, et al. ERK1/2 pathway-mediated differentiation of IGF-1-transfected spinal cord-derived neural stem cells into oligodendrocytes. *PLoS One*. 2014;9(8): e106038.
- [26] Wang LJ, Zhang RP, Li JD. Transplantation of neurotrophin-3-expressing bone mesenchymal stem cells improves recovery in a rat model of spinal cord injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014;156(7):1409-1418.
- [27] Zhang YJ, Zhang W, Lin CG, et al. Neurotrophin-3 gene modified mesenchymal stem cells promote remyelination and functional recovery in the demyelinated spinal cord of rats. *J Neurol Sci*. 2012;313(1-2):64-74.
- [28] Kumagai G, Tsoulfas P, Toh S, et al. Genetically modified mesenchymal stem cells (MSCs) promote axonal regeneration and prevent hypersensitivity after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2013;248:369-380.
- [29] Sasaki M, Radtke C, Tan AM, et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2009;29(47):14932-14941.
- [30] Schor NF. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol*. 2005;77(3):201-214.
- [31] Ginty DD, Segal RA. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12(3):268-274.