

# 神经节苷脂联合骨髓间充质干细胞移植治疗颅脑创伤

黄永辉(天津市津南区咸水沽医院神经外科, 天津市 300040)

## 文章亮点:

- 1 骨髓间充质干细胞在一定诱导条件下能定向分化成神经元细胞, 同时能分泌多种神经营养因子, 从而起到对创伤脑组织的恢复作用, 但骨髓间充质干细胞又具有生存周期短的问题而影响其发挥对损伤脑组织的保护作用。因此, 选择神经节苷脂与骨髓间充质干细胞联合应用, 以促进其更好的发挥优势作用。
- 2 将骨髓间充质干细胞与神经节苷脂联合应用, 能够使骨髓间充质干细胞更好的在损伤部位存活、增殖分化与迁移, 促进颅脑创伤后大鼠神经功能恢复, 联合应用的治疗效果优于单独应用骨髓间充质干细胞。

## 关键词:

干细胞; 移植; 颅脑创伤; 神经节苷脂; 骨髓间充质干细胞; 大鼠

## 主题词:

大脑出血, 创伤性; 神经节苷脂类; 骨髓; 间质干细胞移植

## 摘要

**背景:** 骨髓间充质干细胞可以在体内外诱导下分泌神经营养因子, 还可向神经元方向转化, 从而促进创伤脑组织再生修复, 但骨髓间充质干细胞又存在生存周期短的问题而影响其发挥对损伤脑组织的保护作用。

**目的:** 观察骨髓间充质干细胞移植联合神经节苷脂治疗大鼠颅脑创伤的效果。

**方法:** 60只Wistar大鼠采用液压颅脑损伤仪制备大鼠重型颅脑创伤模型, 建模24h后按照随机表法随机分为3组: 模型组经尾静脉注入1mL DMEM培养液, 移植组经尾静脉注入1mL( $1 \times 10^{10} L^{-1}$ )骨髓间充质干细胞悬液, 联合组经尾静脉注入1mL( $1 \times 10^{10} L^{-1}$ )骨髓间充质干细胞悬液以及经腹腔注射神经节苷脂水溶液(30mg/kg), 1次/d, 共3d。伤后24h, 细胞移植后3d及1, 2, 3, 4周依据Longa 5分法进行神经功能行为学评分; 移植后3d应用RT-PCR、Western blot检测创伤脑组织中水通道蛋白4基因和蛋白的表达; 移植后1周, 行苏木精-伊红染色观察创伤脑组织病理变化。

**结果与结论:** 移植后3d及1, 2, 3, 4周, 联合组神经行为学功能评分低于移植组( $P < 0.05$ ), 移植组低于模型组( $P < 0.05$ ); 移植后3d, 模型组创伤脑周围组织水通道蛋白4蛋白及mRNA的表达高于移植组( $P < 0.05$ ), 移植组高于联合组( $P < 0.05$ ); 苏木精-伊红染色观察到联合组脑组织恢复明显优于模型组和移植组( $P < 0.05$ )。结果提示骨髓间充质干细胞移植联合神经节苷脂可以明显改善颅脑创伤大鼠的神经行为学功能。

黄永辉. 神经节苷脂联合骨髓间充质干细胞移植治疗颅脑创伤[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(36): 5811-5815.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.36.013

## Ganglioside combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for treatment of traumatic brain injury

Huang Yong-hui (Department of Neurosurgery, Xianshuigu Hospital of Jinnan District, Tianjin 300040, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Bone marrow mesenchymal stem cells can secrete neurotrophic factors *in vitro*, and can also be differentiated into neurons, thereby contributing to the repair of traumatic brain injury. However, the short life cycle of bone marrow mesenchymal stem cells influences their protective effects on the damaged brain tissues.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation combined with ganglioside in rats with traumatic brain injury.

**METHODS:** Sixty Wistar rats were used to make severe traumatic brain injury models using a hydraulic head injury instrument, and then randomized into three groups: 1 mL DMEM, 1 mL bone marrow mesenchymal stem cell suspension ( $1 \times 10^{10}/L$ ), 1 mL bone marrow mesenchymal stem cell suspension ( $1 \times 10^{10}/L$ ) combined with ganglioside solution (30 mg/kg) were injected respectively in model group, transplantation group and combined group, once a day, totally for 3 days. Neurological behavior scores were observed according to Longa method at 24 hours after modeling and at 3 days, 1, 2, 3, 4 weeks after cell transplantation. At 3 days after cell transplantation, RT-PCR and western blot assay were employed to detect aquaporin 4 mRNA and protein expressions. At 1 week after transplantation, hematoxylin-eosin staining was performed for pathological observation of the damaged brain tissues.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 3 days, 1, 2, 3, 4 weeks after cell transplantation, the neurological behavior scores were ranked as follows: combined group < transplantation group < model group ( $P < 0.05$ ). At 3 days after

黄永辉, 男, 1973年生, 天津市人, 1998年河北医科大学毕业, 主治医师, 主要从事神经外科方面的研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)36-05811-05

稿件接受: 2015-07-26

http://www.crter.org

Huang Yong-hui, Attending physician, Department of Neurosurgery, Xianshuigu Hospital of Jinnan District, Tianjin 300040, China

Accepted: 2015-07-26

cell transplantation, the mRNA and protein expression of aquaporin 4 was ranked as follows: model group > transplantation group > combined group ( $P < 0.05$ ). Hematoxylin-eosin staining showed that the recovery of brain tissue was better in the combined group than the model and transplantation groups ( $P < 0.05$ ). These findings indicate that bone marrow mesenchymal stem cells combined with ganglioside can significantly improve the neurological behavior function of rats with traumatic brain injury.

**Subject headings:** Cerebral Hemorrhage, Traumatic; Gangliosides; Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cell Transplantation

Huang YH. Ganglioside combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for treatment of traumatic brain injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(36):5811-5815.

## 0 引言 Introduction

颅脑创伤是神经外科较为常见的一种多发病,其死亡率和伤残率居严重创伤之首,救治亦尤为困难,给患者的生命健康带来极大的威胁,现已成为全球较严重的公共卫生问题<sup>[1-3]</sup>。降低颅脑创伤死亡率、致残率以及提高患者的生活质量一直是创伤医学领域需攻克的难题,也是目前神经外科领域研究的重点和难点<sup>[4-6]</sup>。近年来,干细胞在损伤修复方面所发挥的作用越来越受关注<sup>[7-9]</sup>。骨髓间充质干细胞是一种较为容易分离培养的具有多项分化潜能的干细胞,且免疫排斥反应低,易于外源基因转染和表达,可诱导内源性干细胞增殖等<sup>[10-12]</sup>,其可以促进脑组织再生以及神经功能恢复。神经节苷脂是哺乳类动物细胞膜的组成部分,亦是一种营养神经的药物,现已被广泛应用于临床,其能通过多种作用机制减轻脑损害,改善脑损伤后患者预后,促进神经功能恢复<sup>[13-14]</sup>。本研究将神经节苷脂与骨髓间充质干细胞联合应用,探讨其对大鼠颅脑创伤的治疗作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2013年12月至2014年11月在天津医科大学中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 1月龄健康清洁级Wistar大鼠67只,雌雄不限,体质量210-230 g,购自中国医学科学院动物实验室,动物质量合格证号:SCXK(津)20050002。所有大鼠于恒温下饲养,自由饮水和进食,实验前1 d禁食不禁水。实验中对动物处置方法符合动物伦理学要求。

1.3.2 主要试剂和仪器 神经节苷脂(山东齐鲁制药厂,批号H20046213),DMEM培养基(Hyclone公司),胎牛血清(北京天根生化有限公司),胰蛋白酶(Sigma公司),mRNA提取试剂盒、PCR反应试剂盒(美国Santa cruz公司),RT-PCR两步法试剂盒(福州迈新生物技术开发公司),AMV反转录试剂盒(北京赛百盛基因技术有限公司),MMLV试剂盒(美国Coulter公司),水通道蛋白4单克隆抗体(SANTA公司), $\beta$ -actin兔抗鼠多克隆抗体和辣根酶标记山羊抗兔IgG抗体(美国Hyclone公司),液压颅脑创伤仪(美国NEW SUN公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞的培养 将1月龄健康

Wistar大鼠2只于麻醉状态下处死,浸入体积分数为75%乙醇中消毒约10 min,游离双侧胫骨和股骨,剪除骨髓端,暴露骨髓腔,采用10号注射器吸取1 mL DMEM完全培养基,自一端反复冲洗骨髓腔,吸管反复吹打骨髓液成细胞悬液,接种至100 mL培养瓶中,放置于37 °C,体积分数为5% CO<sub>2</sub>饱和湿度孵育箱中孵育,第3天半量换液,以后每隔3 d换液1次,并按1:2比例传代。倒置显微镜下观察细胞生长情况及形态变化,待细胞融合达到80%-90%时,进行下一次传代,再次传代时按1:3比例进行。经多次传代后细胞逐渐得到纯化和扩增,移植前调整细胞浓度为 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 。

1.4.2 动物模型的建立 取65只清洁级Wistar大鼠,经腹腔注射20%乌拉坦(1.2 g/kg)麻醉,采用液压颅脑损伤仪,按国际通用标准,给予253.312 5-303.975 kPa峰值的冲击压力,建立大鼠重型颅脑创伤模型<sup>[15]</sup>。建模后大鼠自主呼吸出现暂停者,立刻采用小动物呼吸面罩给予吸氧。缝合头皮后,于腹腔注射庆大霉素 $2 \times 10^3 \text{ U}$ 行抗菌治疗,回笼饲养。

1.4.3 动物分组及干预 建模24 h后按照随机表法将建模成功的60只大鼠随机分为3组:模型组、移植组及联合组,每组20只。模型组:经尾静脉注入1 mL DMEM培养液;移植组:经尾静脉注入1 mL( $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ )骨髓间充质干细胞悬液;联合组:经尾静脉注入1 mL( $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ )骨髓间充质干细胞悬液以及经腹腔注射神经节苷脂水溶液(30 mg/kg),1次/d,共3 d。

1.4.4 大鼠Longa神经行为学功能评分 各组大鼠于伤后24 h,细胞移植后3 d及1, 2, 3, 4周依据Longa神经行为学5分法进行评分<sup>[16]</sup>,观察颅脑创伤大鼠的神经行为学功能变化。Longa评分标准:0分:无神经缺损症状;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向左旋转;3分:向左侧倾倒;4分:不能自发行走或昏迷;5分:意识丧失。分数越高,提示神经功能障碍越严重。

1.4.5 RT-PCR检测水通道蛋白4 mRNA的表达 细胞移植后3 d,各组取5只实验动物的创伤脑组织50 mg制备匀浆,加入Trizol核酸提取液,提取脑组织总RNA<sup>[17]</sup>,利用紫外分光光度仪测定RNA含量,根据MMLV试剂盒中步骤将RNA反转录成cDNA,再将DNA进行PCR,水通道蛋白4(305 bp)引物序列为:上游5'-CCA GCT GTG ATT CCA AAA CGG AC-3',下游5'-TCT AGT CAT ACT GAA GAC AAT ACC TC-3'; $\beta$ -actin(175 bp)上游5'-CCA TCA TGA

AGT GTG ACG TTG-3', 下游5'-ACA GAG TAC TTG CGC TCA GGA -3'。取PCR扩增产物进行电泳,用凝胶图像分析系统对电泳结果进行吸光度分析,计算水通道蛋白4产物与 $\beta$ -actin产物的积分吸光度比值,作为水通道蛋白4 mRNA的相对表达量。

**1.4.6 Western blot检测水通道蛋白4蛋白的表达** 将上述RT-PCR提取物离心30 min,取上清为粗提蛋白质,Bradford法测定蛋白浓度。5%浓缩胶40 V恒压1 h,10%分离胶60 V恒压3.5 h,湿转14 V恒压14 h,37 °C摇床封闭2 h,行3次10 min的洗膜,将水通道蛋白4单克隆抗体以1:200比例稀释溶于TBST中,室温孵育60 min;TBST洗膜10 min×3次,加入1:500稀释的辣根酶标记的兔抗鼠抗体。于室温下孵育60 min;TBST洗膜10 min×3次,DAB显色,使用Bio-Rad凝胶成像系统扫描吸光度值,Quantity one软件分析,通过目的条带与 $\beta$ -actin条带吸光面积的比值评定蛋白表达水平。

**1.4.7 苏木精-伊红染色** 分别于移植后当天及移植后1周,各组随机取5只大鼠处死,取脑创伤组织行常规冰冻切片,对组织切片进行苏木精-伊红染色,观察脑创伤局部的病理变化。

**1.5 主要观察指标** ①大鼠Longa神经行为学功能评分。②脑组织水通道蛋白4 mRNA和蛋白的表达。③脑创伤局部的病理变化。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 13.0软件包进行处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间连续变量比较用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 骨髓间充质干细胞形态** 原代培养的骨髓间充质干细胞呈克隆样分布(图1A);培养第5天时,少量集落形成,细胞可贴壁生长;培养第7天时细胞呈长梭形、多角形或纤维状,有明显集落形成,胞体饱满。细胞长满后即可进行传代,随着传代次数的增加,贴壁细胞均匀分布,形态趋于一致,以梭形为主,呈漩涡状分布,胞体饱满,均一性较好(图1B)。

**2.2 实验动物数量分析** 实验共选取67只Wistar大鼠,其中2只大鼠用于骨髓间充质干细胞培养,其余65只大鼠进行造模,造模过程中死亡5只,最终进入结果分析60只大鼠。

**2.3 大鼠神经行为学功能评分** 细胞移植后3 d及1, 2, 3, 4周,各组大鼠神经行为学功能评分比较,模型组>移植组>联合组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),可见联合组的神经行为学功能恢复优于模型组及移植组,见表1、图2。

**2.4 水通道蛋白4 mRNA的表达** 移植后3 d创伤周围组织水通道蛋白4 mRNA的表达模型组高于移植组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ );移植组高于联合组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见图3。

表1 大鼠神经行为学功能评分 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=20$ )

Table 1 Neurological behavior scores of rats in different groups

时间	模型组	移植组	联合组
伤后 24 h	2.48±0.20	2.25±0.32	2.10±0.31
细胞移植后时间			
3 d	1.69±0.10 <sup>a</sup>	1.45±0.11 <sup>a</sup>	1.13±0.12 <sup>a</sup>
1 周	1.60±0.20 <sup>a</sup>	1.16±0.18 <sup>ac</sup>	0.85±0.16 <sup>ab</sup>
2 周	1.45±0.12 <sup>a</sup>	1.07±0.13 <sup>ac</sup>	0.76±0.09 <sup>abd</sup>
3 周	1.32±0.23 <sup>a</sup>	0.92±0.20 <sup>ac</sup>	0.52±0.18 <sup>abd</sup>
4 周	1.29±0.10 <sup>a</sup>	0.71±0.13 <sup>ac</sup>	0.41±0.11 <sup>abd</sup>

表注:与伤后 24 h 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与移植组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

**2.5 水通道蛋白4蛋白的表达** 移植后3 d创伤周围组织水通道蛋白4蛋白的表达模型组高于移植组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ );移植组高于联合组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见图4。

**2.6 苏木精-伊红染色结果** 移植后立即观察大鼠颅脑创伤部位的病理切片,镜下显示大脑皮质出血,创伤较为严重。移植后1周,模型组可见脑组织出血、局部组织松散,组织间空隙增多,脑组织细胞肿胀,并有大量空泡出现;移植组可见组织空隙有所减小,细胞核趋于正常;联合组可见组织空隙减小,细胞增多,组织生长恢复明显,已少见固缩核,表明联合组脑组织恢复明显优于对照组和移植组(图5)。

## 3 讨论 Discussion

降低颅脑创伤后的致死率、致残率是目前神经外科较难攻克的一个问题<sup>[18-20]</sup>。骨髓间充质干细胞是目前治疗颅脑创伤的一个新策略,为颅脑创伤后的神经功能恢复带来新曙光<sup>[21-23]</sup>。骨髓间充质干细胞可以在体内外诱导下分泌神经生长因子、脑源性神经生长因子等,还可向神经元方向转化,从而起到对创伤脑组织的恢复作用,但骨髓间充质干细胞又具有生存周期短的问题而影响其发挥对损伤脑组织的保护作用<sup>[24-26]</sup>。因此,选择神经节苷脂与骨髓间充质干细胞联合应用,以促进其更好的发挥优势作用。

神经节苷脂对神经元细胞的生长、分化、成熟、再生及轴浆转运发挥着重要作用<sup>[27-29]</sup>。神经节苷脂可通过血脑屏障进入神经细胞浆膜中,通过多种途径对创伤脑组织起到保护作用,神经节苷脂能够与神经生长因子协同作用促进神经再生,抑制神经细胞凋亡,进而促进创伤后的神经功能恢复<sup>[30-31]</sup>。目前神经节苷脂的脑保护作用越来越受到学者们的关注。

水通道蛋白4是近年来发现的与水通透有关的细胞膜转运蛋白,是影响水跨膜转运和细胞内外环境平衡调节的主要膜蛋白,研究发现水通道蛋白4在中枢神经系统内参与脑水肿的形成和消除,具有维持体液及渗透压平衡的作用,此外还参与胶质细胞的迁移和神经信号转导等重要的神经生理功能。

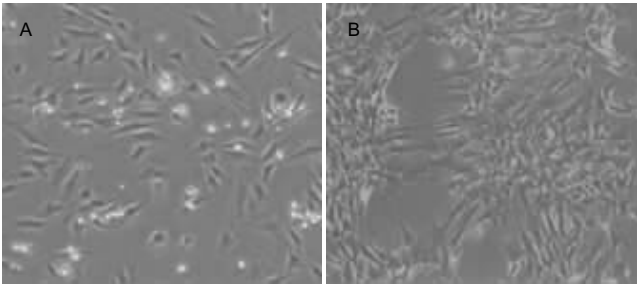


图 1 Wistar 大鼠骨髓间充质干细胞形态( $\times 200$ )

Figure 1 Morphology of Wistar rat bone marrow mesenchymal stem cells ( $\times 200$ )

图注: 图中 A 为原代培养的骨髓间充质干细胞呈克隆样分布; B 为第 3 代骨髓间充质干细胞以梭形为主, 呈漩涡状分布, 胞体饱满。

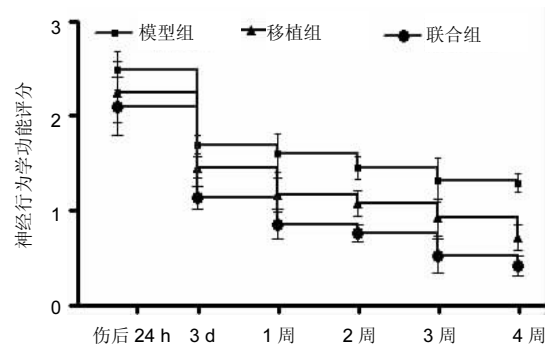


图 2 各组大鼠神经行为学功能评分

Figure 2 Neurological behavior scores in different groups

图注: 移植后 1-4 周, 联合组与模型组比较,  $P < 0.01$ , 联合组与移植组比较,  $P < 0.05$ , 模型组与移植组比较,  $P < 0.05$ 。

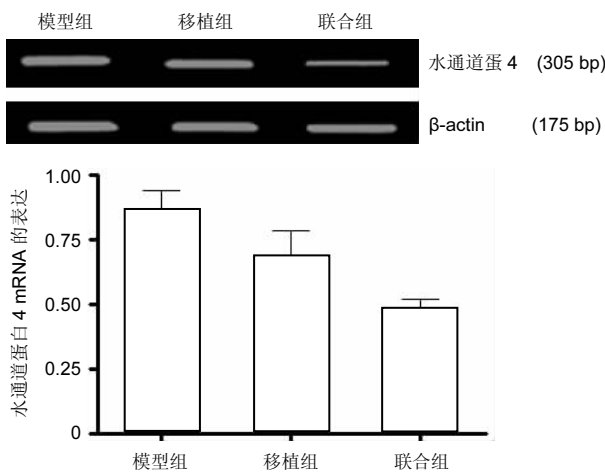


图 3 各组大鼠创伤脑组织水通道蛋白 4 mRNA 的表达

Figure 3 Expression of aquaporin 4 mRNA in the damaged brain tissue of rats

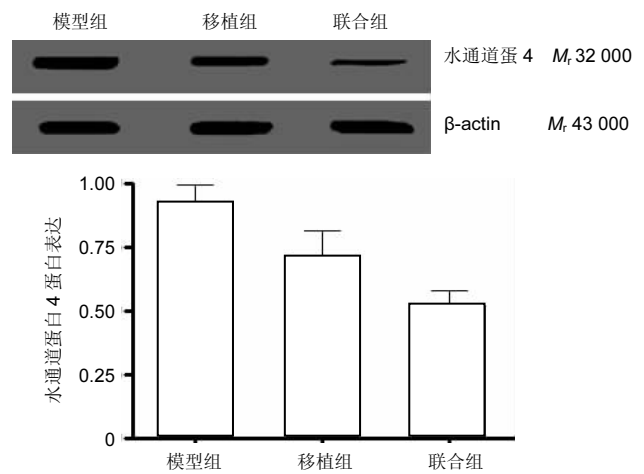


图 4 各组大鼠创伤脑组织水通道蛋白 4 蛋白的表达

Figure 4 Expression of aquaporin 4 protein in the damaged brain tissue of rats

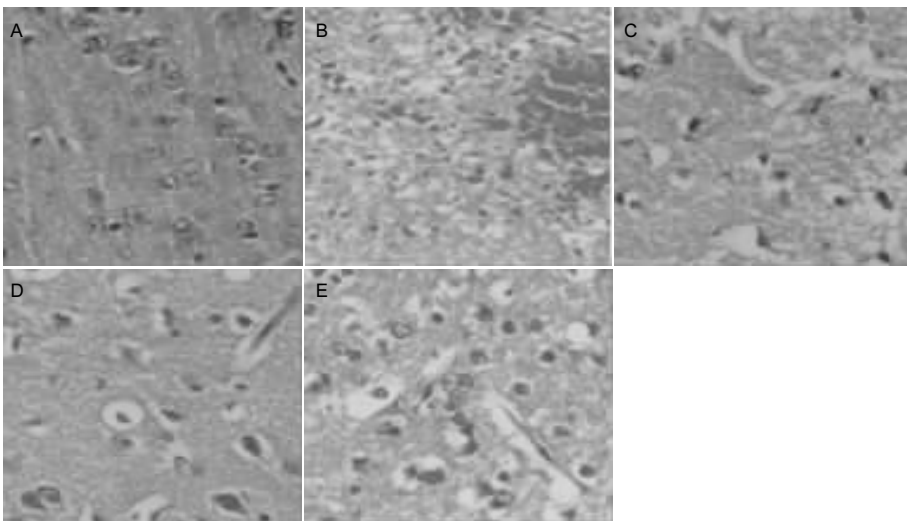


图 5 大鼠颅脑创伤部位的病理切片(苏木精-伊红染色,  $\times 200$ )

Figure 5 Biopsy of rats with traumatic brain injury (hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )

图注: 图中 A 为大鼠正常脑组织紧密, 细胞核圆而大; B 为颅脑创伤后脑组织局部立即可见组织松散, 空隙增多; C 为颅脑创伤 1 周后模型组局部组织松散, 并有大量空泡出现; D 为细胞移植 1 周后移植组可见组织空隙有所减小, 细胞核趋于正常; E 为联合治疗 1 周后联合组组织空隙减小, 细胞增多, 组织生长恢复明显, 已少见固缩核。

实验采用神经节苷脂联合骨髓间充质干细胞移植的方法治疗大鼠颅脑创伤。通过 Longa 行为学评分法观察到联合组的神经行为学功能恢复优于模型组及移植组, 提示神经节苷脂与骨髓间充质干细胞移植联合应用效果优于单独应用骨髓间充质干细胞; 通过 RT-PCR、Western blot 检测创伤脑组织水通道蛋白 4 mRNA 及其蛋白的表达, 联合组

明显低于对照组及移植组, 可见神经节苷脂与骨髓间充质干细胞移植对创伤脑组织具有重要的保护作用; 通过苏木精-伊红染色下的病理切片观察到, 联合组脑组织恢复明显优于模型组和移植组, 进一步证明了骨髓间充质干细胞移植与神经节苷脂联合应用比单独骨髓间充质干细胞移植效果更明显些。

综上所述, 将骨髓间充质干细胞与神经节苷脂联合应用, 能够使移植的骨髓间充质干细胞更好的在损伤部位存活、增殖分化与迁移, 促进颅脑创伤后大鼠神经功能恢复, 二者联合应用能够获得更佳的治疗效果。随着干细胞移植技术的不断发展, 相信在不久的将来, 二者联合作用修复脑创伤将会有良好的临床应用前景。

**作者贡献:** 实验设计、实施、评估均为黄永辉。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验方案经天津医科大学动物实验伦理委员会批准。实验动物在麻醉下完成所有手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**学术术语:** 神经节苷脂对脑组织的保护作用? 神经节苷脂对神经元细胞的生长、分化、成熟、再生及轴浆转运发挥着重要作用。神经节苷脂可通过血脑屏障进入神经细胞浆膜中, 通过多种途径对创伤脑组织起到保护作用, 神经节苷脂能够与神经生长因子协同作用促进神经再生, 抑制神经细胞凋亡, 进而促进创伤后的神经功能恢复。

**作者声明:** 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

#### 4 参考文献 References

- [1] Xu J, Liao W, Gu D, et al. Neural ganglioside GD2 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells in umbilical cord. *Cell Physiol Biochem*. 2009;23(4-6):415-424.
- [2] 武俏丽,李庆国,刘暎.干细胞移植治疗脊髓损伤研究进展[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(12):2343-2346.
- [3] Drayna PC, Abramo TJ, Estrada C. Near-infrared spectroscopy in the critical setting. *Pediatr Emerg Care*. 2011;27(5):432-439.
- [4] She JQ, Wang M, Zhu DM, et al. Monosialoanglioside (GM1) prevents lead-induced neurotoxicity on long-term potentiation, SOD activity, MDA levels, and intracellular calcium levels of hippocampus in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009;379(5):517-524.
- [5] 蒋红梅,龚燕梅.神经节苷脂对急性脑出血患者神经元特异性烯醇化酶的影响[J].医学综述,2011,17(14):2227-2228.
- [6] Lim ST, Esfahani K, Avdoshina V, et al. Exogenous gangliosides increase the release of brain-derived neurotrophic factor. *Neuropharmacology*. 2011;60(7-8):1160-1167.
- [7] Cummings DM, Belluscio L. Continuous neural plasticity in the olfactory intrabulbar circuitry. *J Neurosci*. 2010;30(27):9172-9180.
- [8] Liu YJ, Wang Q, Li B. Neuronal responses to looming objects in the superior colliculus of the cat. *Brain Behav Evol*. 2011;77(3):193-205.
- [9] Galvin KA, Jones DG. Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system. *Med J Aust*. 2002;177(6):316-318.
- [10] Huang F, Dong X, Zhang L, et al. The neuroprotective effects of NGF combined with GM1 on injured spinal cord neurons in vitro. *Brain Res Bull*. 2009;79(1):85-88.
- [11] Hydén LC. The importance of providing scaffolding to support patient narratives when brain damage impairs storytelling ability. *Top Stroke Rehabil*. 2011;18(1):52-54.
- [12] Agrawal A, Garg LN. Split calvarial bone graft for the reconstruction of skull defects. *J Surg Tech Case Rep*. 2011;3(1):13-16.
- [13] 穆晓红,赵子义,徐林,等.密度梯度离心法体外培养骨髓间充质干细胞的分化能力[J].中国组织工程研究与临床康复,2011, 15(27):4955-4958.
- [14] Wang J, Zhang R, Shen Y, et al. Recent advances in cell sheet technology for periodontal regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(3):162-173.
- [15] Lu Y, Hui G, Liu F, et al. Survival and regeneration of deep-freeze preserved autologous cranial bones after cranioplasty. *Br J Neurosurg*. 2012;26(2):216-221.
- [16] Linden MA, McClure J. The causal attributions of nursing students toward adolescent survivors of brain injury. *Nurs Res*. 2012;61(1):58-65.
- [17] Seyed Jafari SS, Ali Aghaei A, Asadi-Shekaari M, et al. Investigating the effects of adult neural stem cell transplantation by lumbar puncture in transient cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 2011;495(1):1-5.
- [18] Hassanein AH, Arany PR, Couto RA, et al. Cranial particulate bone graft ossifies calvarial defects by osteogenesis. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(5):796e-802e.
- [19] Thompson HJ, Weir S, Rivara FP, et al. Utilization and costs of health care after geriatric traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2012;29(10):1864-1871.
- [20] Su J, Haner CV, Imbery TE, et al. Reelin is required for class-specific retinogeniculate targeting. *J Neurosci*. 2011;31(2):575-586.
- [21] 刘爱民.临床各种体液标本中神经节苷脂变化意义的研究进展[J].中国现代医药杂志,2007,9(2):152-154.
- [22] Haider M, Cappello J, Ghandehari H, et al. In vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells in recombinant silk-elastinlike hydrogels. *J Pharm Res*. 2008;25(3):692-699.
- [23] 张供,谷兴华,宋毅,等.单唾液酸神经节苷脂对大鼠缺血再灌注脑损伤的保护作用[J].山东大学学报:医学版,2006,44(3):252-255.
- [24] Polak SJ, Levensgood SK, Wheeler MB, et al. Analysis of the roles of microporosity and BMP-2 on multiple measures of bone regeneration and healing in calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1760-1771.
- [25] 张赛.颅脑创伤后神经行为障碍的认识和药物治疗[J].中华神经外科杂志,2007,23(7):481-482.
- [26] Becker C. Nursing care of the brain injury patient on a locked neurobehavioral unit. *Rehabil Nurs*. 2012;37(4):171-175.
- [27] 张荣洁.脑损伤高危儿早期干预与护理[J].护理实践与研究,2012, 9(1):56-57.
- [28] Li J, Li Y, Ma S, et al. Enhancement of bone formation by BMP-7 transduced MSCs on biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds in repair of mandibular defects. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(4):973-981.
- [29] Liu Y, Ming L, Luo H, et al. Integration of a calcined bovine bone and BMSC-sheet 3D scaffold and the promotion of bone regeneration in large defects. *Biomaterials*. 2013;34(38):9998-10006.
- [30] 钟池,钟春玖,罗玉敏,等.骨髓基质细胞静脉移植治疗大鼠短暂性局灶性脑缺血[J].中华神经医学杂志,2004,3(2):89-92.
- [31] Kim S, Honmou O, Kato K, et al. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain Res*. 2006;1123(1):27-33.