

骨髓单个核细胞移植治疗脑出血

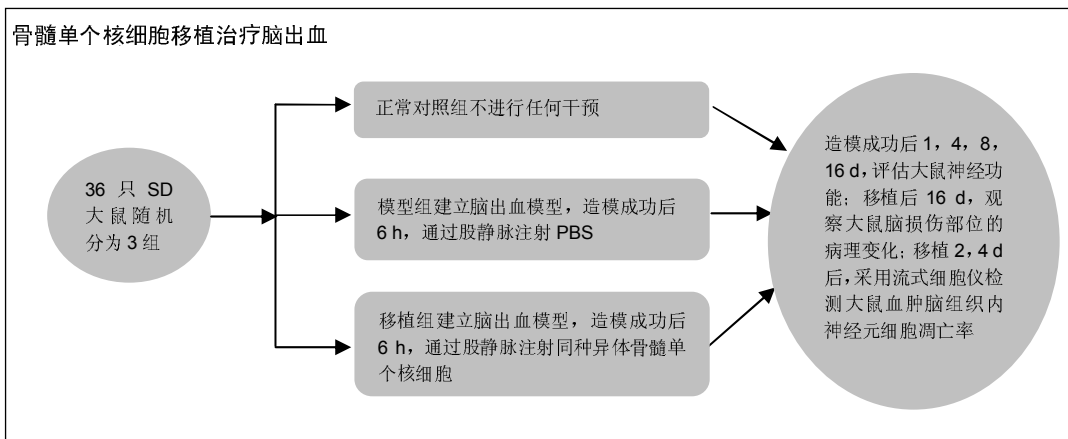
杨郁野¹, 王景丰¹, 张宏义¹, 王跃伍¹, 杨树全²(¹唐山工人医院神经外科, 河北省唐山市 063000; ²河北大学附属医院神经外科, 河北省保定市 071000)

引用本文: 杨郁野, 王景丰, 张宏义, 王跃伍, 杨树全. 骨髓单个核细胞移植治疗脑出血[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19):2831-2837.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.19.014

ORCID: 0000-0003-3222-5282(杨郁野)

文章快速阅读:



杨郁野,男,1974年生,汉族,河北省唐山市人,主治医师,主要从事脑血管病研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)19-02831-07

稿件接受:2016-03-18

http://www.crter.org

文题释义:

骨髓单个核细胞:是骨髓中原始的多潜能细胞的总称,主要包括两种类型:造血干细胞和间充质干细胞,这两种干细胞均能在心肌修复中起很大的作用,前者除了维持造血功能以外,同时也是多种细胞的祖细胞,其中有些成分还可分化为心肌细胞;而间充质干细胞具有极强的分化潜能,在适当的条件下,可向肌细胞、骨细胞、脂肪细胞、肝脏细胞、神经细胞等方向转化。

骨髓单个核细胞移植治疗脑出血:骨髓单个核细胞用于移植治疗疾病有许多其他干细胞不可比拟的优势,如获取方便、数量充足、价格低廉、成活率高、可自体异体移植、无需培养、无道德伦理学争议。近年来,骨髓单个核细胞用于治疗脑出血后神经系统损伤的研究越来越多,其可能的作用机制:一方面,是可形成具有特殊功能的神经元,取代受损细胞;另一方面是,可通过减少血肿脑组织周围细胞凋亡,改善神经功能。

摘要

背景:研究证实,骨髓单个核细胞移植能够明显改善脑出血大鼠的神经功能。

目的:观察骨髓单个核细胞移植对大鼠脑出血后神经功能损伤及血肿脑组织细胞凋亡的影响。

方法:将36只SD大鼠随机分为3组,每组12只,正常对照组不进行任何干预;采用立体定向仪向模型组、移植组大鼠尾状核注射IV型胶原酶,建立脑出血模型,造模成功后6h,移植组通过股静脉注射同种异体骨髓单个核细胞 $3 \times 10^{10} L^{-1}$,模型组注射等量PBS。造模成功后1,4,8,16d,评估大鼠神经功能;移植后16d,观察大鼠脑损伤部位的病理变化;移植2,4d后,采用流式细胞仪检测大鼠血肿脑组织内神经元细胞凋亡率。

结果与结论:①神经功能:移植组8,16d的神经功能缺损评分低于模型组($P < 0.05$)。②脑组织病理变化:正常对照组脑组织各层细胞排列紧密、结构完整,神经细胞和胶质细胞形态正常;模型组大鼠脑组织血肿周围组织疏松,细胞间出现间隙,出血部位神经细胞、胶质细胞大部分坏死;移植组大鼠脑组织细胞各层排列较紧密,较整齐,可见增生胶质细胞。③神经元细胞凋亡率:移植组血肿脑组织内细胞凋亡率低于模型组($P < 0.05$)。④结果表明,骨髓单个核细胞可明显促进脑出血后大鼠神经功能的恢复,降低大鼠脑组织内神经细胞凋亡。

关键词:

干细胞;移植;骨髓单个核细胞;脑出血;细胞凋亡;神经功能

Yang Yu-ye, Attending physician, Department of Neurosurgery, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China

主题词:
干细胞; 移植; 脑出血; 细胞凋亡; 组织工程
基金资助:
河北省医学科学研究重点课题(20130617)

Bone marrow mononuclear cell transplantation for cerebral hemorrhage

Yang Yu-ye¹, Wang Jing-feng¹, Zhang Hong-yi¹, Wang Yue-wu¹, Yang Shu-quan² (¹Department of Neurosurgery, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China; ²Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: It has been proved that bone marrow mononuclear cell transplantation can obviously improve neurological function of rats with cerebral hemorrhage.

OBJECTIVE: To investigate the effects of transplanted bone marrow mononuclear cells on the neurological function and apoptosis in perihematoma brain tissues following cerebral hemorrhage in a rat model.

METHODS: Twenty-four Sprague-Dawley rats were given stereotaxical injection of collagenase IV into the caudate nucleus to establish cerebral hemorrhage models in transplantation group ($n=12$) and model group ($n=12$), and then at 6 hours after cerebral hemorrhage, rats in these two groups were administrated 3×10^{10} /L allograft bone marrow mononuclear cells and the same amount of PBS, respectively. Another 12 rats were given no interventions as control group. Neurological functions of rats were assessed at 1, 4, 8, 16 days after cerebral hemorrhage; pathological changes of the injury sites were observed at 16 days after transplantation; neuronal apoptosis rates in the perihematoma brain tissue were detected by flow cytometry at 2 and 4 days after transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: The modified neurologic severity scores in the transplantation group were significantly lower than those in the model group at 8 and 16 days after cerebral hemorrhage ($P < 0.05$). In the control group, cells in each layer arranged closely with complete structure, and neurons and glial cells were in good shape; in the model group, perihematoma brain tissues were loose with intercellular gap, in which most neurons and glial cells became necrotic; in the transplantation group, cells in each layer arranged closely and regularly, and glial cell proliferation occurred. Besides, compared with the model group, the neuronal apoptosis rate in the transplantation group was significantly lower ($P < 0.05$). To conclude, bone marrow mononuclear cells can significantly enhance the neurological function recovery and reduce neuronal apoptosis in the brain of cerebral hemorrhage rats.

Subject headings: Stem Cells; Transplantation; Cerebral Hemorrhage; Apoptosis; Tissue Engineering

Funding: the Medical Science Research Project of Hebei Province, No. 20130617

Cite this article: Yang YY, Wang JF, Zhang HY, Wang YW, Yang SQ. Bone marrow mononuclear cell transplantation for cerebral hemorrhage. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(19):2831-2837.

0 引言 Introduction

脑出血是指非外伤性脑实质内血管破裂引起的出血。脑出血对脑组织造成的原发性和继发性损伤,是造成脑组织神经功能损伤的主要原因^[1]。目前临床对于脑出血,主要是采取手术治疗和保守治疗,外科手术治疗脑出血,可有效挽救脑出血急症重症患者的生命,但对于老年人来说并不太适用,会因为手术时间长给患者造成较大的创伤^[2]。而西药保守治疗只能用于较小的血肿患者^[3]。目前,随着人口老龄化社会的来临及社会生活及工作压力的增加,中国脑出血的发病率占到脑卒中的17.1%~55.4%,明显高于国外6.5%~19.6%的发病率^[4-5]。

干细胞是形成哺乳动物各组织器官的原始细胞,是

一类具有自我更新能力和分化潜能的细胞^[6]。依据干细胞分化潜能,目前可以分为全能干细胞、多能干细胞和单能干细胞。由于干细胞可定向分化为神经细胞、心肌细胞、内皮细胞等多种功能细胞,从而替代受损的细胞,并且还能够激活细胞的再生修复能力,以促进损伤组织恢复^[7-8],因此近年来干细胞移植已成为各种疾病的研究热点,也给患者带来了一种新的治疗方法。骨髓单个核细胞用于移植治疗疾病有许多其他干细胞不可比拟的优势,如获取方便、数量充足、价格低廉、成活率高、可自体异体移植、无需培养、无道德伦理学争议^[9-10]。

近年来,骨髓单个核细胞用于治疗脑出血后神经系

统损伤的研究越来越多, 其可能的作用机制: 一方面, 是可形成具有特殊功能的神经元, 取代受损细胞; 另一方面是, 可通过减少血肿脑组织周围细胞凋亡, 改善神经功能^[11-13]。因此, 实验通过运用立体定位技术将胶原酶注入大鼠尾状核纹状体内, 制作实验性脑出血模型, 旨在探讨骨髓单个核细胞对大鼠脑出血后神经功能损伤及血肿脑组织细胞凋亡的影响。

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7月至2014年9月在唐山工人医院实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠, SPF级, 选取5只4周龄SD大鼠, 体质量120-180 g, 用作提取骨髓单个核细胞; 选取36只7周龄SD大鼠, 体质量180-220 g, 用作实验用。所有大鼠均购于河北省医学实验动物中心, 大鼠饲养环境为标准级, 自由饮水。将36只SD大鼠随机分为3组, 正常对照组、模型组与移植组, 每组12只。

骨髓单个核细胞移植治疗脑出血实验用主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
IV型胶原酶	美国Millipore公司
BrdU、二甲基亚砜	美国Sigma公司
胎牛血清、L-DMEM培养基、青霉素/链霉素、胰酶	Gibco 公司
水合氯醛	江苏永华精细化学品有限公司
凋亡检测试剂盒	武汉博士德生物工程有限公司
立体定位仪	淮北正华生物仪器ZH-蓝星C
CytoFLEX流式细胞仪	贝克曼库尔特公司
Milli-Q labconco 纯水仪	美国Millipore公司
普通光学显微镜	日本OLYMPUS公司
细胞培养箱	日本SANYO三洋MCO-15AC
微型漩涡混合仪	上海沪西分析仪器厂
低温离心机	安徽中科中佳科学仪器有限公司
Leica EG1140 石蜡包埋机、LEICA-RM2025 组织切片机	德国Leica公司
冻存管、培养瓶、培养板	美国Corning公司
电热恒温水浴槽	上海医疗器械七厂
血球计数板	浙江玉环县求精医用仪器厂
微量加样器	德国GILSON公司

1.4 实验方法

主要试剂的配制: ①10%水合氯醛溶液: 将4.0 g水合氯醛放入烧杯中, 加入70-80 mL的去离子水, 搅拌使其完全溶解后于量筒中定容至100 mL, 常温下避光保存。② 40 g/L多聚甲醛溶液: 将10 g多聚甲醛溶于250 mL PBS中, 先在恒温磁力搅拌器上搅拌1 h后, 于45 °C恒温水浴箱中水浴, 并直至多聚甲醛完全溶解, 在常温下冷却后过滤, 4 °C冰箱保存。③0.25 U/ μ L IV型胶原酶溶液: 将0.3 mg IV型胶原酶溶于200 μ L生理盐水中, 于振荡器上摇匀及至完全溶解后, 将其分装成每小管50 μ L, -20 °C保存备用。④盐酸乙醇: 将1 mL浓盐酸加入到99 mL体积分数75%乙醇中。

骨髓单个核细胞的标记: BrdU是一种胸腺嘧啶的类似物, 能够与内源性存在的胸腺嘧啶竞争性抑制结合到细胞增殖周期S期DNA链中, 可在DNA中长期稳定保存, 所以可用于对细胞的长期标记, 也可用于研究细胞移植后在体内的存活、迁移及增殖情况^[14]。参照王建平等^[14]的方法, 选取4周龄雄性SD大鼠, 对这些大鼠腹腔注射BrdU(50 mg/kg), 1次/d, 连续注射14 d后处死, 提取骨髓单个核细胞。

骨髓单个核细胞的制备: 参照文献^[15]的方法, 取标记过BrdU的SD大鼠, 10%水合氯醛(350 mg/Kg)腹腔注射麻醉, 脱臼处死大鼠, 用体积分数75%乙醇浸泡10 min, 在无菌环境下收集股骨和胫骨, 剔净附着组织(皮肤及肌肉), 用手术剪分离双侧股骨及胫骨, 保留大鼠股骨干骺端, 将分离的双侧股骨及胫骨置于体积分数75%乙醇中, 浸泡5 min左右, 移入超净工作台中。用PBS把股骨和胫骨洗3遍, 剪开骨两端暴露骨髓腔, 用肝素生理盐水冲出骨髓, 用离心管收集, 加5 mL低糖培养基于离心管中, 反复吹打制成细胞悬液。

用Fi-coll密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞, 按1:1体积用淋巴细胞分离液分离细胞悬液, 即避光条件下在离心管底部先加入淋巴细胞分离液, 然后按照1:1体积的比例, 将骨髓单个核细胞悬液缓慢加在离心管内淋巴分离液表面上, 并避免破坏分离层界面, 以2 000 r/min离心30 min; 离心后可见溶液分3层, 小心缓慢吸取中间白色界面层, 按1:2体积加入L-DMEM重悬浮细胞1 200 r/min离心10 min, 弃去上清, 取细胞沉淀; 再将10 mL L-DMEM液加入细胞沉淀中, 吹打混匀制成骨髓单个核细胞悬液, 1 200 r/min离心10 min, 弃去上清, 最后用含体积分数15%胎牛血清的L-DMEM培养基重悬浮细胞, 并接种于培养瓶。采用2%锥虫蓝染色法检查细

胞活力, 将2%锥虫蓝溶液与细胞悬浮液1:1混合, 用移液枪吸取10 μL 细胞悬液滴入细胞计数板, 开始计数。3 min后观察, 活性细胞> 95%。最后将接种细胞的培养瓶放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 饱和湿度的 CO_2 培养箱中孵育备用。

脑出血模型的制作与分组干预: 参考文献[16-17]的方法, 腹腔注射麻醉后, 将3组大鼠固定于立体定向仪上, 立体定向于尾状核, 用直径1 mm的牙钻钻开颅骨, 穿透颅骨, 但不伤及脑组织, 用微量注射器向模型组与移植组大鼠尾状核注射2 μL IV型胶原酶溶液(每1 μL 生理盐水含IV型胶原酶0.25 U), 建立大鼠脑出血模型; 正常对照组注射等量无菌生理盐水, 缓慢退针, 骨蜡封闭颅骨。

造模成功6 h后, 无菌打开大鼠腹股沟, 移植组通过股静脉移植注射含骨髓单个核细胞 $3 \times 10^{10} \text{L}^{-1}$ 的PBS 1 mL, 模型组大鼠体内则注入等量的PBS, 缝合, 消毒, 常规饲养。

1.5 主要观察指标

神经功能评价: 采用Narantuya等报道的mNSS评分系统, 于脑出血后1, 4, 8, 16 d, 从运动、感觉、反射、平衡4方面对各组大鼠的神经功能进行综合评估, 0分代表神经功能正常; 2分代表神经功能损害; 20分代表神经功能损害最严重^[17]。

大鼠脑组织苏木精-伊红染色: 于移植16 d后常规石蜡包埋切片, 先冰冻切片, 经4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的丙酮固定10 min, 然后流水冲洗1.0-2.0 s, 用苏木精染色5 min, 再用流水冲洗5-10 s, 用盐酸乙醇返色1-3 s, 再经流水蓝化10-15 s, 伊红溶液染色5 min, 流水冲洗1.0-2.0 s, 切片经体积分数60%、75%、80%、90%、100%乙醇梯度脱水, 每级30 s, 再用二甲苯I、II透明各5 min, 中性树胶封固, 显微镜下观察^[11]。

检测大鼠血肿脑组织内神经元细胞凋亡率: 于移植2, 4 d后, 取大鼠血肿周围5 mm以内的脑组织, 用PBS固定后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。冰上操作剪碎、吹打、过滤、离心, 混悬制备脑组织单细胞悬浮液; 取 1×10^5 细胞悬液离心后, 进行凋亡检测试剂盒双染色, 室温下避光反应15 min, 反应后直接进行流式细胞仪检测。使用未经凋亡检测试剂盒染色的细胞悬液作为对照, 进行荧光补偿调节。

1.6 统计学分析 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用t检验或方差分析, 取 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 36只SD大鼠均进入结果分析。

2.2 各组大鼠mNSS评分结果比较 正常对照组大鼠mNSS评分为0; 模型组大鼠mNSS评分结果比较稳定, 一直处于较高水平; 移植组大鼠脑出血第8, 16天的mNSS评分显著低于模型组($P < 0.05$), 表明骨髓单个核细胞可以促进脑出血大鼠神经功能的恢复, 见表1。

表1 各组造模后不同时间点的神经功能损害评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

Table 1 Modified neurologic severity scores in the two groups at different time after cerebral hemorrhage

组别	第1天	第4天	第8天	第16天
模型组	16.2 \pm 1.3	14.5 \pm 2.2	12.9 \pm 1.2	11.9 \pm 0.9
移植组	16.1 \pm 1.9	13.0 \pm 1.2	11.5 \pm 1.1	9.2 \pm 1.3
P	> 0.05	> 0.05	< 0.05	< 0.05

2.3 各组大鼠脑组织苏木精-伊红染色结果 光镜下发现, 正常对照组大鼠脑组织各层细胞排列紧密, 结构完整, 神经细胞和胶质细胞形态正常; 模型组大鼠脑组织血肿周围组织疏松, 细胞间出现间隙, 出血部位神经细胞、胶质细胞大部分坏死; 移植组大鼠脑组织细胞各层排列较紧密, 较整齐, 可见增生胶质细胞, 见图1。

2.4 各组大鼠血肿脑组织内神经元细胞凋亡率的比较 流式细胞仪检测结果显示, 模型组大鼠在移植2 d和4 d时血肿周围组织中的细胞凋亡率较高; 移植组大鼠在2 d和4 d时血肿周围组织中的细胞凋亡率显著低于模型组($P < 0.05$), 见表2。

表2 各组移植不同时间点血肿脑组织内细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

Table 2 Neuronal apoptosis rates in the perihematoma brain tissues of the model group and transplantation group at different time points after cell transplantation

组别	2 d	4 d
模型组	22.12 \pm 2.12	28.21 \pm 3.12
移植组	20.11 \pm 2.01	21.33 \pm 2.67
P	< 0.05	< 0.05

3 讨论 Discussion

脑出血的发病率、死亡率呈逐年上升趋势, 发病初始年龄较以往提前, 具有死亡率高、致残率高、并发症多等特点^[18-24]。在意大利每年脑卒中新发病例15万人, 其中15%为脑出血患者, 超过1/3的患者发病内1个月

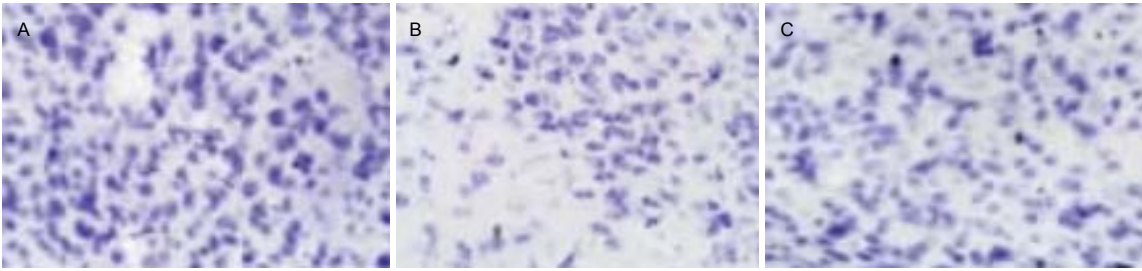


图 1 各组大鼠脑组织苏木精-伊红染色(×100)

Figure 1 Histological observation of brain tissues in each group (hematoxylin-eosin staining, ×100)

图注: 图中 A 为正常对照组大鼠脑组织, 各层细胞排列紧密, 结构完整, 神经细胞和胶质细胞形态正常; B 为模型组大鼠脑组织, 血肿周围组织疏松, 细胞间出现间隙, 出血部位神经细胞、胶质细胞大部分坏死; C 为移植组大鼠脑组织, 细胞各层排列较紧密, 较整齐, 可见增生胶质细胞。

内死亡^[25]。流行病学资料表明, 各年龄段女性发病率均低于男性^[25], 男性的发病率比女性高约 25%。一项研究显示, 青年和老年脑出血患者的发病率和病死率也很大差异, 青年组患者的住院病死率和 1 年病死率(3.55%, 0.97%)明显低于老年组患者(7.6%, 3.2%)^[26]。

积极探索脑出血发病的危险因素至关重要, 其中最常见吸烟、喝酒是否成为脑出血的危险因素至今争论不休。多数学者认为饮酒是脑出血的危险因素, 而吸烟与脑出血关系不确切。Thrift 等^[27]研究认为, 如果患者之前有高血压病史, 那么吸烟将显著加重脑出血的风险。而 Monforte 等^[28]研究认为, 吸烟与饮酒均是脑出血的危险因素。高血压也是脑出血的一个危险因素, 并且与其他患者相比, 患有高血压病史的脑出血患者预后较差, 危险性更大^[29]。Willmot 等^[30]的一项随访研究发现, 当收缩压和舒张压增高时, 患者随访末期病死率分别是正常者的 2.69 倍和 4.68 倍。此外刘运海等^[31]认为平均动脉压是提示近期愈后不良的标志, 平均动脉压代表性优于收缩压和舒张压。目前关于脑出血与血脂关系的研究也较多^[32-34], Sturgeon 等^[32]研究显示, 血脂水平与脑出血呈反比, 其水平越低脑出血发病风险越高; 但 Iribarren 等^[33]的研究发现, 低胆固醇血症仅对于年龄大于 65 岁的脑出血患者有意义。另外糖尿病也被归为脑出血的危险因素, 国内外文献也有证实, 有糖尿病者是无糖尿病者脑出血发病率的 2.40 倍^[35-36]。

随着科技的发展, 目前干细胞移植是治疗脑出血的一种新兴且有良好应用前景的治疗措施^[37], 移植方式包括动脉注射、静脉注射、蛛网膜下腔注射和局部注射等^[38]。大量实验研究表明, 应用干细胞移植治疗脑出血, 可起到较好的治疗作用^[39]。但关于干细胞移植治疗脑出血的确切机制尚不明确, 目前研究认为有以下几种可能机制: Liao 等^[40]应用脐带源性间充质干细胞移植治疗脑梗死

大鼠, 结果发现间充质干细胞可分化为血管内皮细胞, 并促进血管新生。

有研究应用骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血大鼠, 结果显示骨髓间充质干细胞在脑内可分化神经元和星形胶质细胞, 即能表达神经元特异性核蛋白(NeuN)及星形胶质细胞特异性胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的神经细胞^[41]。Lee 等^[42]用过度表达 F3.BDNF 因子、F3.GDNF 因子、Akt1 的神经干细胞治疗脑梗死动物模型, 发现移植的神经干细胞能够存活、分化, 还可激活脑内存在的内源性干细胞的再生修复能力, 即分化为神经元、神经胶质细胞、血管内皮细胞等, 修复损伤神经组织。Mimura 等^[43]研究认为, 脑组织分泌的碱性成纤维细胞生长因子等神经营养因子能促进干细胞增殖, 并且能作用于干细胞的神经营养因子受体, 促进其向神经细胞分化。Mahmood 等^[44]研究表明, 干细胞移植后会明显增加脑内生长因子的表达, 如脑源性神经生长因子、神经生长因子和碱性成纤维细胞生长因子等, 这些神经营养因子可通过不同信号传导途径抑制神经细胞凋亡, 发挥神经保护作用, 还能为神经组织和功能的修复提供适宜的微环境。Ma 等^[45]发现缺血性脑卒大鼠模型中海马区的 α 微管蛋白表达水平显著降低, 而将人骨髓单个核细胞移植到该缺血性脑卒中大鼠模型体内, 可使海马区 α 微管蛋白表达水平明显上调, 同时也可以使血管生成素 1 和 2 表达水平显著上调, 促进缺血区域的血管再生。干细胞在体内发挥作用存在很多可能机制, 但哪种机制占主导作用, 是否还存在其他未知的机制, 仍不明确。因此为了能更好地深入了解干细胞特性, 还尚待进一步研究。

实验结果显示, 模型组大鼠在各个时间点的 mNSS 评分均明显高于正常对照组, 且移植组大鼠在 8, 16 d 的 mNSS 评分均明显低于模型组($P < 0.05$), 提示骨髓

单个核细胞能够显著提高脑出血大鼠神经功能的恢复。移植组大鼠在 4, 8 d 时的血肿脑组织内细胞凋亡率显著低于模型组($P < 0.05$)。苏木精-伊红染色结果显示,模型组大鼠脑组织出现变性坏死,且逐渐增生、变大;移植组大鼠可见少量脑组织坏死,且脑组织坏死面积明显低于模型组。以上提示骨髓单个核细胞移植可有效治疗脑出血,明显促进大鼠脑出血后神经功能的恢复,具有良好的临床应用前景。

作者贡献: 杨郁野进行实验设计,实验实施为王景丰、张宏义、王跃伍、杨树全,杨郁野成文。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 严格按照《实验动物管理条例》和《实验动物许可管理办法》规定执行。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。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。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*. 2001; 344(19):1450-1460.
- [2] 刘太平. 自拟方治疗高血压性脑出血 120 例疗效观察[J]. *中医学报*, 2001, 16(6):30-31.
- [3] Schellinger PD, Fiebich JB, Hoffmann K, et al. Stroke MRI in intracerebral hemorrhage: is there a perihemorrhagic penumbra. *Stroke*. 2003;34(7):1674-1679.
- [4] Jiang B, Wang WZ, Chen H, et al. Incidence and trends of stroke and its subtypes in China: Results from three large cities. *Stroke*. 2006;37(1):63-68.
- [5] Elliott J, Smith M. The acute management of intracerebral hemorrhage: a clinical review. *Anesth Analg*. 2010;110(5):1419-14271.
- [6] Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;4(11):1313-1317.
- [7] Curtis MA, Kam M, Nannmark U, et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*. 2007;315(5816):1243-1249.
- [8] Wang SP, Wang ZH, Peng DY, et al. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection. *Mol Med Report*. 2012;6(4):848-854.
- [9] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
- [10] Woodburg D, Schwarz EJ, Prockp DJ, et al. Adult rat human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61(4):364-370.
- [11] 何远宏, 李魁, 王建平, 等. 骨髓单个核细胞移植对脑出血大鼠的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2014, 49(2):264-268.
- [12] Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 2007;61:219-227.
- [13] 张雪莹, 卢宏, 王建平, 等. 骨髓单个核细胞移植对脑出血大鼠神经元样细胞分化和 GDNF 的影响[J]. *中华神经医学杂志*, 2014, 13(1):22-25.
- [14] 王建平, 余列, 蒋超, 等. 正常与脑梗死后大鼠来源的骨髓单个核细胞治疗缺血性脑卒中的效果对比[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2013, 22(2):103.
- [15] 陈君. 骨髓单个核细胞移植治疗大鼠脑出血后脑损伤的实验研究[D]. 郑州大学, 2014.
- [16] Peeling J, Yan HJ, Corbett D, et al. Effect of FK-506 on inflammation and behavioral outcome following intracerebral hemorrhage in rat. *Exp Neurol*. 2001; 167(2):341-347.
- [17] Zhang H, Huang A, Xu Y, et al. Differentiation and neurological benefit of the mesenchymal stem cells transplanted into the rat brain following intracerebral hemorrhage. *Neurol Res*. 2006;28(1):10.
- [18] Lee SH, Kim BJ, Ryu WS, et al. White matter lesions and poor outcome after intracerebral hemorrhage: a nationwide co-hort study. *Neurology*. 2010; 74(19):1502-15101.
- [19] Steiner T, Vincent C, Morris S, et al. Neurosurgical outcomes after intracerebral hemorrhage: results of the factor seven for acute hemorrhagic stroke trial (FAST). *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2011;20(4):287-294.
- [20] Sakamoto S, Shibukawa M, Tani I, et al. Open-cell Stent Deployment across the Wide Neck of a Large Middle Cerebral Aneurysm Using the Stent Anchor Technique. *J Cerebrovasc Endovasc Neurosurg*. 2016;18(1):38-41.

- [21] Jiang H, Qin Y, Liu T, et al. Nao-Xue-Shu Oral Liquid Protects and Improves Secondary Brain Insults of Hypertensive Cerebral Hemorrhage. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:9121843.
- [22] Zijlstra IA, Gathier CS, Boers AM, et al. Association of Automatically Quantified Total Blood Volume after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage with Delayed Cerebral Ischemia. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016. [Epub ahead of print]
- [23] Mutoh T, Mutoh T, Sasaki K, et al. Isoflurane postconditioning with cardiac support promotes recovery from early brain injury in mice after severe subarachnoid hemorrhage. *Life Sci*. 2016. pii: S0024-3205(16)30241-30247.
- [24] Tsvigoulis G, Zand R, Katsanos AH, et al. Risk of Symptomatic Intracerebral Hemorrhage After Intravenous Thrombolysis in Patients With Acute Ischemic Stroke and High Cerebral Microbleed Burden: A Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2016. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.0292. [Epub ahead of print]
- [25] Ciccone A, Pozzi M, Motto C, et al. Epidemiological, clinical, and therapeutic aspects of primary intracerebral hemorrhage. *Neurol Sci*. 2008;29(Suppl 2):S256-S2571.
- [26] 呼铁民, 孙璩贤, 王维兴, 等. 青年与中老年急性脑出血的危险因素及预后比较[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(14): 1537-1540.
- [27] Thrift AG, McNeil JJ, Donnan GA. The risk of intracerebral hemorrhage with smoking. The Melbourne Risk Factor Study Group. *Cerebrovasc Dis*. 2004;99(10):34-39.
- [28] Monforte R, Estruch R, Graus F, et al. High ethanol consumption as risk factor for intracerebral hemorrhage in young and middle-aged people. *Stroke*. 1990;21(11):1529-1532.
- [29] Ruiz-Sandoval JL, Cantu C, Barinagarrementeria F. Intracerebral Hemorrhage in Young people. *Stroke*. 1999;30:537-541.
- [30] Willmot M, Leonardi Bee J, Bath PMW. High blood pressure in acute stroke and subsequent outcome: a systematic review. *Hypertension*. 2004;43(1):18-24.
- [31] 刘运海, 奉俊敏, 杨期东, 等. 高血压性脑出血住院患者的近期预后影响因素回顾性分析[J]. *卒中与神经疾病*, 2004, 11(6):364-367.
- [32] Sturgeon JD, Folsom AR, Longstreth WT Jr, et al. Risk factors for intracerebral hemorrhage in a pooled prospective study. *Stroke*. 2007;8(10):2718-2725.
- [33] Iribarren C, Jacobs DR, Sadler M, et al. Low total serum cholesterol and intracerebral hemorrhagic stroke: is the association confined to the elderly men? the Kaiser permanent medical care program. *Stroke*. 1996; 27:1993-1998.
- [34] SSegal AZ, Chiu RI, Eggleston-Sexton PM, et al. Low cholesterol as a risk factor for primary intracerebral hemorrhage: A case-control study. *Neuroepidemiology*. 2003;18(4):185-193.
- [35] 罗晶, 王永红, 钟小妮, 等. 158例青年脑出血病因、危险因素及预后分析[J]. *现代预防医学*, 2008, 8(35):1587-1589.
- [36] Andersen KK, Olsen TS, Dehlendorff C, et al. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke*. 2009;40: 2068-2072.
- [37] Wang Z, Cui C, Li Q, et al. Intracerebral transplantation of foetal neural stem cells improves brain dysfunction induced by intracerebral haemorrhage stroke in mice. *J Cell Mol Med*. 2011;15(12):2624-2633.
- [38] Wang SP, Wang ZH, Peng DY, et al. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection. *Mol Med Report*. 2012;6(4):848-854.
- [39] 李秀云, 张国华. 脐血干细胞移植治疗脑出血的疗效分析[J]. *中华全科医学*, 2011, 9(11):1724-1725.
- [40] Liao W, Xie J, Zhong J, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke. *Transplantation*. 2009; 87(3): 350-359.
- [41] 张化彪, 许予明, 张苏明. 丁新生骨髓间质干细胞移植治疗大鼠脑出血的实验研究[J]. *中华神经科杂志*, 2003, 36(6): 432.
- [42] Lee HJ, Lim IJ, Lee MC, et al. Human neural stem cells genetically modified to over-express brain-derived neurotrophic factor promote functional recovery and neuro-protection in a mouse stroke model. *Neurosci Res*. 2010;88(15):3282-3294.
- [43] Mimra T, Dezawa M, Kamo H, et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg*. 2004;101:806-812.
- [44] Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2004; 21:33-39.
- [45] Ma XL, Liu KD, Li FC, et al. Human mesenchymal stem cells increases expression of α -tubulin and angiopoietin1 and 2 in focal cerebral ischemia and reperfusion. *Curr Neurovasc Res*. 2013;10(2):103-111.