

甲基强的松龙影响脊髓损伤后内源性神经干细胞的迁移

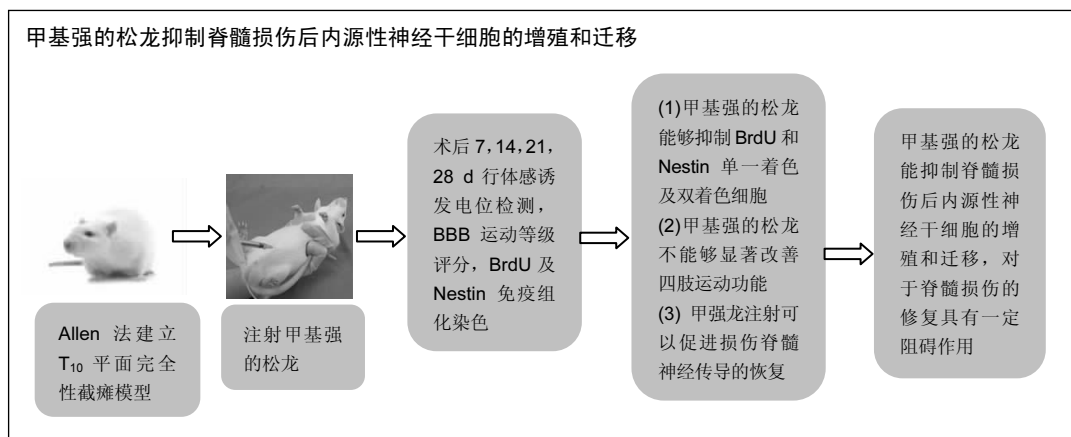
屈一鸣, 李波, 王群波, 邵高海, 卢昱鹏, 余雨, 刘佐忠, 曹春风(重庆医科大学附属永川医院脊柱外科, 重庆市 402160)

引用本文: 屈一鸣, 李波, 王群波, 邵高海, 卢昱鹏, 余雨, 刘佐忠, 曹春风. 甲基强的松龙影响脊髓损伤后内源性神经干细胞的迁移[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(36):5419-5425.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.36.015

ORCID: 0000-0002-1593-9913(李波)

文章快速阅读:



屈一鸣, 男, 1979 年生, 四川省巴中市人, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事脊柱外科方面的研究。

通讯作者: 李波, 副教授, 硕士, 硕士生导师, 重庆医科大学附属永川医院脊柱外科, 重庆市 402160

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)36-05419-07

稿件接受: 2016-07-06

文题释义:

内源性神经干细胞: 主要来源于神经系统, 形成神经组织, 具有自我更新能力和多向分化潜能。在神经损伤后, 脑室下区和海马齿状回颗粒下层的神经干细胞能够增殖, 在细胞因子和其他蛋白质的作用下, 增殖的干细胞可能会靶向性迁移到损伤区, 分化成神经元或神经胶质细胞修复和替代坏死或凋亡的神经元。

细胞迁移: 也称为细胞爬行、细胞移动或细胞运动, 是指细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的梯度而产生的移动。胚胎发育、血管生成、伤口愈合、免疫反应、炎症反应、动脉粥样硬化、癌症转移等过程中都涉及细胞迁移。损伤会造成机体部分细胞和组织的丧失, 机体需要对损伤进行修复。修复有两种不同的形式: 再生和纤维性修复, 这两个过程都涉及细胞迁移。

摘要

背景: 脊髓损伤后, 内源性神经干细胞发生增殖及迁移, 修复受损组织。甲基强的松龙作为临床用药, 其对于内源性神经干细胞的作用是未知的。

目的: 探讨甲基强的松龙对大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞增殖和迁移的影响。

方法: 75 只 SD 大鼠采用 Allen 法建立 T₁₀ 平面完全性截瘫模型, 随机均分成 3 组: 甲基强的松龙组、生理盐水组和模型组。甲基强的松龙组将 1 g/L 甲基强的松龙溶液 10 min 内按 30 mg/kg 的剂量腹腔注射, 随后 23 h 按 5.4 mg/(kg·h) 的剂量注射, 生理盐水组以相同的剂量注射生理盐水, 模型组不注射任何溶剂。脊髓损伤后 7, 14, 21, 28 d 行体感诱发电位检测神经功能恢复情况, BBB 运动等级评分测定下肢运动功能。取损伤节段脊髓, 进行免疫组化 BrdU 及 Nestin 染色。

结果与结论: ①各组均有大量的 BrdU 和 Nestin 着色细胞, 均在 14 d 达到高峰; ②甲基强的松龙组能够抑制 BrdU 和 Nestin 单一着色及双着色细胞, 抑制内源性神经干细胞的增殖和迁移; ③BBB 评分显示甲基强的松龙不能够显著改善四肢运动功能; ④甲基强的松龙对于运动诱发电位潜伏期没有显著作用, 但是可以促进损伤脊髓神经传导的恢复; ⑤结果表明, 甲基强的松龙能抑制脊髓损伤后内源性神经干细胞的增殖和迁移, 对于脊髓损伤的修复具有一定阻碍作用。

关键词:

干细胞; 神经干细胞; 内源性神经干细胞; 甲基强的松龙; 脊髓损伤; 细胞增殖; 细胞迁移

主题词:

脊髓损伤; 神经干细胞; 甲泼尼龙; 组织工程

Qu Yi-ming, Master,
Attending physician,
Department of Spinal
Surgery, Yongchuan
Hospital of Chongqing
Medical University,
Chongqing 402160, China

Corresponding author:
Li Bo, Master, Associate
professor, Master's
supervisor, Department of
Spinal Surgery, Yongchuan
Hospital of Chongqing
Medical University,
Chongqing 402160, China

基金资助:

重庆市卫生局面上项目资助(2012-2-170); 重庆市永川区科委资助(YCSTC,2012BE5013)

Methylprednisolone effects on the migration of endogenous neural stem cells after spinal cord injury

Qu Yi-ming, Li Bo, Wang Qun-bo, Shao Gao-hai, Lu Min-peng, Yu Yu, Liu Zuo-zhong, Cao Chun-feng
(Department of Spinal Surgery, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract

BACKGROUND: After spinal cord injury, endogenous neural stem cells are activated to proliferate and migrate to repair damaged tissue. As a clinical medicine, methylprednisolone shows a lot of functions, but its effects on endogenous neural stem cells are still unknown.

OBJECTIVE: To explore the effects of methylprednisolone on the proliferation and migration of endogenous neural stem cells after spinal cord injury.

METHODS: Seventy-five Sprague-Dawley rats were used to make animal models of T₁₀ complete paraplegia using Allen's method, and randomized into methylprednisolone, normal saline and model groups. Rats in these three groups were given intraperitoneal injection of 1 g/L methylprednisolone solution at a dose of 30 mg/kg for 10 minutes and at a dose of 5.4 mg/kg/h for 23 hours, given intraperitoneal injection of normal saline at the same dose and given no treatment, respectively. Neurological and motor functions were assessed by somatosensory evoked potential and Basso Beattie Bresnahan scores at 7, 14, 21, 28 days after spinal cord injury. BrdU and Nestin staining of the injured spinal cord segment was conducted.

RESULTS AND CONCLUSION: A large amount of BrdU- and Nestin-positive cells were visible in all the groups, and the number of these cells reached the peak at 14 days after spinal cord injury. Methylprednisolone was found to inhibit BrdU-, Nestin- or double-positive cells, indicating methylprednisolone can inhibit the proliferation and migration of endogenous neural stem cells. The results of Basso Beattie Bresnahan scores showed no notable improvement in the motor function of the limbs. Methylprednisolone also showed no significant effects on the motor evoked potential latency, but promoted nerve conduction recovery. All these findings indicate that methylprednisolone has some hindering effects on spinal cord repair by inhibiting the proliferation and migration of endogenous neural stem cells after spinal cord injury.

Subject headings: Spinal Cord Injuries; Neural Stem Cells; Methylprednisolone; Tissue Engineering

Funding: a grant from Chongqing Health Department, No. 2012-2-170; a grant from the Science and Technology Committee of Yongchuan District of Chongqing, China, No. 2012BE5013

Cite this article: Qu YM, Li B, Wang QB, Shao GH, Lu MP, Yu Y, Liu ZZ, Cao CF. Methylprednisolone effects on the migration of endogenous neural stem cells after spinal cord injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(36):5419-5425.

0 引言 Introduction

随着世界各国经济水平的发展,脊髓损伤发生率呈逐年增高的趋势。脊髓损伤是脊柱损伤最严重的并发症,常导致损伤平面以下感觉、运动功能部分或完全丧失和泌尿功能障碍等^[1],脊髓损伤的高发生率、高致残率、高耗费不仅会给患者本人带来身体和心理的严重伤害,还会对整个社会造成巨大的经济负担^[2]。脊髓损伤病理过程一般分为原发性损伤和继发性损伤^[3]。原发性损伤是机械力直接作用于脊髓局部,引起局部功能障碍,一般发生在损伤的早期^[4]。继发性损伤是一个可控的病理过程,却可扩大损伤范围,加重原发性损伤^[4-6]。脊髓损伤引起神经元的破坏,轴突的断裂,后期会在脊

髓中央形成空洞^[7]。损伤部位神经元数量的减少和传导束的断裂、华勒氏变形导致损伤脊髓功能永久性丧失^[8]。近年研究发现脊髓内部本身有干细胞,其对于脊髓修复具有重要作用。目前研究较多的有神经干细胞、胚胎干细胞、间充质干细胞和许旺细胞等^[9-11],存在诸如取材不便、免疫排斥及医学伦理学等问题的限制,制约了其在急性脊髓损伤治疗中的应用,目前的研究多聚集在内源性神经干细胞上^[11]。甲基强的松龙在临床上应用广泛,能够抑制脊髓损伤后炎症反应,减轻继发损伤等^[12-13]。国外研究者在大鼠实验中发现甲基强的松龙对于脊髓恢复不具有促进作用^[14-16]。关于甲基强的松龙对脊髓内源性神经干细胞的影响,目前很少见报道。为揭开甲基强的

松龙的作用实质, 实验旨在研究甲基强的松龙对于脊髓损伤后神经干细胞增殖和迁移的影响。

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4月至2015年3月在重庆医科大学附属永川医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康SD成年大鼠75只, 雌性, 体重200–250 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.3.2 实验主要试剂 甲基强的松龙(辉瑞公司); 生理盐水(太极西南药业股份有限公司); 无菌PBS(Hyclone公司); 小鼠抗大鼠BrdU(1:100)抗体、免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); 巢蛋白(Nestin)抗体(1:200) (Abcam公司); 40 g/L多聚甲醛(加拿大BioBasic公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 急性脊髓损伤动物模型制备 以T₁₀棘突为中心, 无菌下行背部正中切口, 显露T₈₋₁₂棘突及椎板, 切除T₁₀棘突及椎板, 暴露脊髓。应用改良Allen打击法, 将15 g重物从10 cm高度垂直落下, 造成T₁₀节段急性脊髓损伤。如脊髓组织出现水肿、出血, 大鼠出现摆尾反射, 双下肢及躯体回缩扑动, 双后肢迟缓性瘫痪, 表明撞击成功。

1.4.2 实验分组及试剂注射 将制作成功的完全瘫痪大鼠随机平均分成3组: 模型组、生理盐水对照组、甲基强的松龙组。甲基强的松龙以生理盐水配置成质量浓度为1 g/L的溶液, 甲基强的松龙组动物在脊髓损伤后30 min内按30 mg/kg的剂量经腹腔内注射, 随后23 h内按5.4 mg/(kg·h)的剂量注射, 分3次注射(8 h/次)。生理盐水对照组动物注射同剂量生理盐水。模型组不注射任何溶剂。BrdU在脊髓损伤后2 h内按50 mg/kg的剂量腹腔注射, 连续7 d。

1.4.3 运动诱发电位检测及运动功能评分 在模型制作后7, 14, 21, 28 d每组各取5只动物, 采用SC-II型电生理刺激仪(蚌埠实用技术研究所研制)和EJD-IV型生物信号处理系统(第二军医大学研制)记录运动诱发电位, 评定神经功能恢复情况。刺激电极阴极置于T₉、T₁₀间隙, 阳极置于T₁₀、T₁₁间隙; 接收电极刺入后肢股二头肌, 正负极距离1 cm; 参考电极夹住大鼠腹部。刺激参数: 刺激强度2 mA, 频率3 Hz, 延时1 ms, 间隔33 ms, 波宽0.200 ms、叠加60次, 分析时程60 ms, 连续观察5 h。

上述指标检测完毕后采用BBB运动等级评分测评5只大鼠下肢运动功能。然后对所有大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉, 灌注取材, 取出损伤节段及损伤节段以上2 mm左右脊髓组织, 进行石蜡包埋及切片。

1.4.4 免疫组织化学染色 按如下步骤行免疫组织化学染色: ①梯度乙醇中脱蜡至水; ②微波抗原修复20 min(柠檬酸抗原修复液); ③冷却至室温, 并用双蒸水清洗2遍; ④体积分数为3% H₂O₂室温消除内源性过氧化物酶10 min; ⑤0.01 mol/L PBS清洗3次, 每次10 min; ⑥体积分数为5%山羊血清封闭37 °C 30 min; ⑦滴加一抗体工作液(Nestin抗体1:200稀释, BrdU抗体1:100稀释), 4 °C过夜; ⑧0.01 mol/L PBS清洗3次, 每次10 min; ⑨滴加二抗-辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG, 37 °C孵育30 min; ⑩0.01 mol/L PBS清洗3次, 每次10 min; ⑪滴加生物素-卵白素-辣根过氧化物酶复合物, 37 °C孵育30 min; ⑫0.01 mol/L PBS清洗3次, 每次10 min; ⑬DAB显色, 镜下控制染色深度; ⑭自来水清洗; ⑮苏木精复染; ⑯梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。阴性对照用PBS代替一抗。取完整的横切片, 每隔5张取1张, 每个标本取5张。在同一倍数的镜下统计BrdU阳性细胞和Nestin阳性细胞数量。BrdU标记新增殖的细胞, 碱性磷酸酶染色显示为暗紫色; Nestin标记神经干细胞, 过氧化物酶染色为猩红色。

1.5 主要观察指标 ①各组不同时间点BrdU和Nestin阳性细胞数量; ②BrdU⁺和Nestin⁺双阳性的细胞数量; ③各组大鼠下肢运动评分; ④脊髓损伤后脊髓运动诱发电位。

1.6 统计学分析 所有结果以SPSS 13.0软件统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 75只SD大鼠均进入结果分析。

2.2 甲基强的松龙抑制损伤脊髓内BrdU染色的细胞数量 BrdU染色的细胞数量及位置可以用于检测内源神经干细胞的增殖及迁移。在同一倍数的镜下统计BrdU阳性细胞数目(图1)。在正常的大鼠脊髓切片中, 大小均匀、圆形或椭圆形的细胞, 即表明内源神经干细胞存在。各组BrdU细胞阳性数目见表1。统计分析显示, 生理盐水组与模型组差异无显著性意义, 甲基强的松龙组各时间点BrdU阳性细胞数均低于生理盐水组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表 1 各组脊髓组织 BrdU 阳性细胞数目 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 1 Number of BrdU-positive cells in rat spinal cord tissue

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
生理盐水组	41.34±0.57	52.34±0.93	36.32±0.56	18.85±0.43
甲基强的松龙组	32.46±0.43 ^a	40.24±0.93 ^a	22.43±0.62 ^a	10.23±0.92 ^a
模型组	42.52±0.73	52.52±0.79	35.99±0.82	18.55±0.73

表注: 与生理盐水组比较, ^a $P < 0.05$ 。

表 3 各组脊髓组织 BrdU⁺和 Nestin⁺双阳性细胞数目 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 3 Number of BrdU- and nestin-positive cells in rat spinal cord tissue

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
生理盐水组	8.34±0.25	14.34±0.46	10.71±0.63	6.26±0.36
甲基强的松龙组	6.42±0.15 ^a	12.01±0.72 ^a	8.50±0.32 ^a	4.65±0.72 ^a
模型组	8.52±0.43	13.92±0.38	10.50±0.72	6.57±0.37

表注: 与生理盐水组比较, ^a $P < 0.05$ 。

表 5 脊髓损伤后运动诱发电位潜伏期的检测($\bar{x} \pm s$, $n=5$, ms)
Table 5 The motor evoked potential latency after spinal cord injury in rats

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
生理盐水组	3.22±0.24	2.54±0.19	1.90±0.37	0.91±0.29
甲基强的松龙组	3.12±0.31	2.43±0.50	1.89±0.36	0.93±0.18
模型组	3.34±0.26	2.49±0.38	1.72±0.21	0.82±0.25

2.3 甲基强的松龙抑制损伤脊髓内 Nestin 染色的细胞数量 3组各个时间段的 Nestin 标记的细胞数量与 BrdU 的变化相同(图2, 表2), 均在脊髓损伤后第14天达到最峰, 随后降低。Nestin 标记的神经干细胞主要集中在脊髓损伤的部位。统计分析显示, 在各个时间点甲基强的松龙组 Nestin 表达阳性细胞明显低于生理盐水组, 模型组与生理盐水组差异无显著性意义, 提示甲基强的松龙能够明显抑制脊髓损伤大鼠的神经干细胞的扩增及迁移。

2.4 甲基强的松龙抑制 BrdU⁺和 Nestin⁺双阳性的细胞数量 脊髓损伤后 BrdU⁺和 Nestin⁺双阳性细胞在14 d 达到最高, 随后降低, 该细胞趋向于损伤部位, 并且聚集于损伤部位周围(图3)。甲基强的松龙组与生理盐水组相比差异有显著性意义, 模型组与生理盐水组差异无显著

表 2 各组脊髓组织 Nestin 阳性细胞数目 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 2 Number of Nestin-positive cells in rat spinal cord tissue

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
生理盐水组	24.50±0.09	39.24±0.78	34.52±0.31	12.67±0.24
甲基强的松龙组	17.45±0.13 ^a	31.24±0.62 ^a	22.72±0.34 ^a	8.65±0.62 ^a
模型组	25.37±0.48	40.53±0.73	35.47±0.83	13.57±0.58

表注: 与生理盐水组比较, ^a $P < 0.05$ 。

表 4 大鼠脊髓损伤后各时间点 BBB 评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 4 Basso Beattie Bresnahan score at each time point after spinal cord injury in rats

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
生理盐水组	2.21±0.43	3.54±0.32	4.34±0.45	8.01±0.93
甲基强的松龙组	2.12±0.56	3.63±0.43	4.64±0.53	7.93±0.71
模型组	2.34±0.35	3.39±0.61	4.53±0.61	8.12±0.57

表 6 脊髓损伤后运动诱发电位波幅的检测 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, %)
Table 6 The motor evoked potential amplitude after spinal cord injury in rats

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
生理盐水组	40.56±3.24	50.00±4.19	63.56±1.37	84.00±2.29
甲基强的松龙组	45.57±0.31 ^a	56.35±0.50 ^a	71.32±0.36 ^a	93.56±0.18 ^a
模型组	39.72±2.21	51.32±5.89	65.56±8.32	83.93±4.34

表注: 与生理盐水组比较, ^a $P < 0.05$ 。

性意义, 见表3。

2.5 甲基强的松龙对于后肢运动无显著性作用 利用 BBB 评分鉴定甲基强的松龙对于脊髓损伤后下肢活动的影响, 各组之间比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 可见注射甲基强的松龙对于损伤脊髓大鼠后肢运动没有显著作用, 见表4。

2.6 脊髓损伤后脊髓运动诱发电位潜伏期和波幅的改变 表5显示在各时间点各组大鼠运动诱发电位潜伏期, 分析可见各组大鼠运动诱发电位潜伏期比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 甲基强的松龙对于诱发电位潜伏期没有显著作用。表6显示在各时间点各组大鼠运动诱发电位波幅, 可见甲基强的松龙组波幅显著比生理盐水组有所改善, 即甲基强的松龙注射可以促进损伤脊髓神经传导的恢复。

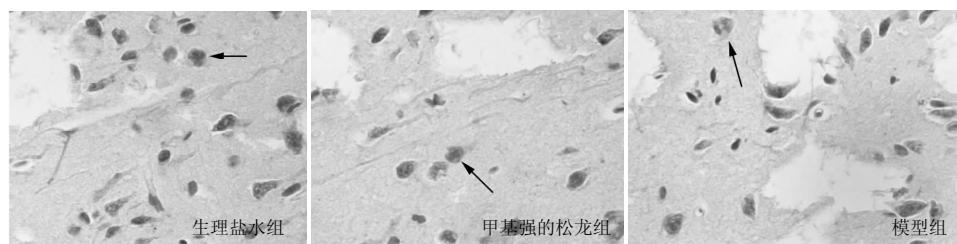


图1 各组大鼠脊髓组织 BrdU 表达(免疫组化检测, ×200)

Figure 1 Detection of BrdU in the rat spinal cord in three groups (immunohistochemical staining, ×200)

图注: 箭头所示为 BrdU 阳性细胞。

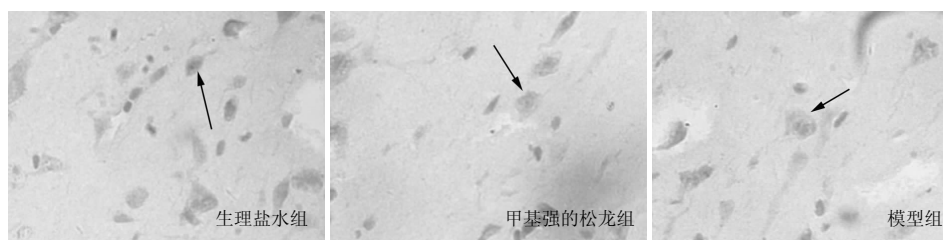


图2 各组大鼠脊髓组织 Nestin 表达(免疫组化检测, ×200)

Figure 2 Detection of Nestin expression in the rat spinal cord in three groups (immunohistochemical staining, ×200)

图注: 箭头所示为 Nestin 阳性细胞。

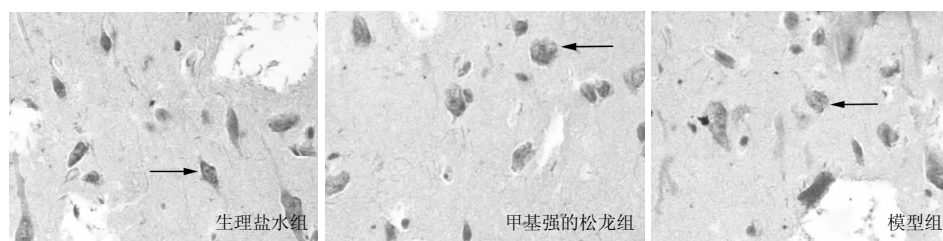


图3 各组大鼠脊髓组织 BrdU 和 Nestin 表达(免疫组化检测, ×200)

Figure 3 Detection of BrdU and Nestin expression in the rat spinal cord in three groups (immunohistochemical staining, ×200)

图注: 箭头所示为 BrdU⁺和 Nestin⁺ 双阳性细胞。

3 讨论 Discussion

脊髓损伤按发生机制可以分为原发性损伤与继发性损伤^[3], 大量研究表明, 脊髓损伤引起的炎症反应具有神经损伤与神经保护的双重效果^[17]。炎症趋化因子和细胞因子能够补充、激活免疫细胞和中枢神经细胞, 在促进和维持炎症反应的过程中起关键作用^[18]。大量的炎症因子和炎症细胞介导了脊髓损伤后炎症反应发生发展过程, 比较重要的有如下几种^[19-20]: 淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 及趋化因子等。脊髓损伤可以导致脱髓鞘反应, 产生的髓鞘碱性蛋白可激活 T 细胞。活化后的 T 细胞表面出现大量细胞黏附分子, 易与血管内皮细胞黏附使 T 细胞进入中枢神经系统, 抑制轴突的枯死并发挥神经保护作用^[21]。脊髓损伤早期中性粒细胞迅速进入损伤区域, 并在 24 h 内达到峰值, 活化的中性粒细胞和巨噬细胞通过释放细胞因子、自由基、类花生四烯酸和蛋白酶产生神经细胞毒性^[22]。脊髓损伤后 15 min 检测到肿瘤坏死因子 α mRNA 的表达, 至损伤后 1 h, 其表达水平达到最大值。脊髓损伤后期, 肿瘤坏死因子 α 可诱导神经元和少突胶质细胞的死亡, 导致运动和感觉功能的丧失^[23-24]。白细胞介素 1β 可以协同 NF- κ B、肿瘤坏死因子 α 、INF- γ

上调黏附分子的表达, 介导损伤后的炎症反应, 引起继发性损伤^[19-20]。脊髓损伤后 30 min, 白细胞介素 1β 在神经元和轴突中表达; 损伤后 5 h, 在小胶质细胞中检测到白细胞介素 1β 的表达^[25]。趋化因子是细胞因子的一个亚家族, 具有促炎和迁移的作用, 在脊髓损伤引发的炎症反应中作为免疫细胞的化学诱导物^[26]。

神经干细胞是一种具有自我更新能力的多潜能分化细胞, 在神经损伤后, 脑室下区和海马齿状回颗粒下层的神经干细胞能够增殖, 在细胞因子和其他蛋白质的作用下, 增殖的干细胞可能会靶向性迁移到损伤区, 分化成神经元或神经胶质细胞修复和替代坏死或凋亡的神经元^[27-28]。在迁移过程中, 炎症因子、生长因子、趋化因子等通过一系列信号转导途径引导干细胞的迁移^[29]。在脊髓损伤后, 由炎症因子及趋化因子介导的内源性神经干细胞激活增殖。炎症因子及趋化因子的强弱既是促进炎症对于损伤的不利因素, 也是促进神经干细胞分化, 恢复细胞学基础的可利因素^[30]。因此炎症因子的平衡, 对于脊髓损伤是关键。

BrdU 可以结合到正在复制的 DNA 中, 染色的细胞数量及位置可以用于检测内源神经干细胞的增殖及迁移。BrdU 阳性细胞数越多, 提示内源性神经干细胞增

殖快。研究结果显示, 生理盐水组 BrdU 阳性细胞数与模型组差异无显著性意义, 可见生理盐水对于脊髓损伤不具有任何作用。脊髓损伤 14 d 后, BrdU 阳性的细胞数达到高峰, 并且向损伤的部位集中。甲基强的松龙组各时间点 BrdU 阳性细胞数均显著低于生理盐水组。研究结果还显示, 生理盐水组 Nestin 标记的细胞数量与模型组差异无显著性意义, 而甲基强的松龙组各时间点 Nestin 标记的细胞数量均显著低于生理盐水组。可见甲基强的松龙能抑制内源性神经干细胞的增殖和迁移。而在 BrdU⁺和 Nestin⁺双阳性细胞方面, 甲基强的松龙组与生理盐水组相比差异有显著性意义。关于后肢运动 BBB 评分, 3 组组间比较差异无显著性意义, 可见甲基强的松龙对于损伤脊髓大鼠后肢运动没有显著作用。研究结果显示, 关于运动诱发电位潜伏期, 各组间比较差异无显著性意义, 而在运动诱发电位波幅方面, 甲基强的松龙组比生理盐水组有所改善, 差异有显著性意义, 可见甲基强的松龙对于诱发电位潜伏期没有显著作用, 而甲基强的松龙注射可以促进损伤脊髓神经传导的恢复。

Hall 等^[31]研究则发现甲基强的松龙能够抑制血栓素合成酶的活性, 减缓前列腺素的生成, 减轻损伤脊髓组织中微小血管的痉挛, 从而改善损伤脊髓组织的微循环, 提高对于脊髓损伤的修复作用。另外, 甲基强的松龙还能够维持细胞膜 Na-K-ATP 酶的活性, 保证钙离子的外流, 确保神经冲动的正常。Wang 等^[32]研究也发现, 在体外诱导培养低氧环境中, 能够抑制脊髓神经干细胞的分化。Jing 等^[33]研究也发现甲基强的松龙能够提高大鼠缺氧后神经元的存活率。

综上所述, 甲基强的松龙对于脊髓损伤的修复具有一定阻碍作用。但是鉴于甲基强的松龙对于抑制炎症的作用, 其在脊髓修复中的作用还需要进一步平衡的研究。

作者贡献: 实验设计为屈一鸣、李波, 实验实施为卢昱鹏、余雨, 资料收集为刘佐忠、曹春风, 王群波进行质量控制及审校。

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: 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。

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] Cirillo G, Colangelo AM, De Luca C, et al. Modulation of Matrix Metalloproteinases Activity in the Ventral Horn of the Spinal Cord Re-stores Neuroglial Synaptic Homeostasis and Neurotrophic Support following Peripheral Nerve Injury. PLoS One. 2016;11(3):e0152750.
- [2] Trofimenko V, Hotaling JM. Fertility treatment in spinal cord injury and other neurologic disease. Transl Androl Urol. 2016;5(1):102-116.
- [3] Lemmon VP, Abeyruwan S, Visser U, Jet al. Facilitating transparency in spinal cord injury studies using data standards and ontologies. Neural Regen Res. 2014; 9(1): 6-7.
- [4] Güzelkürk Ü, Demir Y, Kesikburun S, et al. Spinal cord injury resulting from gunshot wounds: a comparative study with non-gunshot causes. Spinal Cord. 2016 Mar 1. [Epub ahead of print]
- [5] Schwab JM, Chiang N, Arita M, et al. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. Nature. 2007;447(7146):869-874.
- [6] Forner S, Martini AC, de Andrade EL, et al. Neuropathic pain induced by spinal cord injury: Role of endothelin ETA and ETB receptors. Neurosci Lett. 2016;617:14-21.
- [7] Yeng CH, Chen PJ, Chang HK, et al. Attenuating spinal cord injury by conditioned medium from human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells in rats. Taiwan J Obstet Gynecol. 2016;55(1):85-93.
- [8] Dong Y, Miao L, Hei L, et al. Neuroprotective effects and impact on caspase-12 expression of tauroursodeoxycholic acid after acute spinal cord injury in rats. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(12): 15871-15878.
- [9] Knoller N, Auerbach G, Fulga V, et al. Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results. J Neurosurg Spine. 2005;3(3):173-181.
- [10] Dong YZ, Yang LB, Yang L, et al. Transplantation of neurotrophin-3-transfected bone marrow mesenchymal stem cells for the repair of spinal cord injury. Neural Regen Res. 2014;9(16): 1520-1524.

- [11] Erlandsson A, Lin CH, Yu F, et al. Immunosuppression promotes endogenous neural stem and progenitor cell migration and tissue regeneration after ischemic injury. *Exp Neurol*. 2011;230(1):48-57.
- [12] Bartholdi D, Schwab ME. 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(7):1422-1438.
- [13] Mao D, Yao X, Feng G, et al. Skin-derived precursor cells promote angiogenesis and stimulate proliferation of endogenous neural stem cells after cerebral infarction. *Biomed Res Int*. 2015;2015:945846.
- [14] Thored P, Arvidsson A, Cacci E, et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*. 2006;24(3):739-747.
- [15] Horky LL, Galimi F, Gage FH, et al. Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J Comp Neurol*. 2006;498(4):525-538.
- [16] Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotechnol*. 2005;23(7):862-871.
- [17] Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Meinl E. Dual role of inflammation in CNS disease. *Neurology*. 2007;68 (22 Suppl 3):S58-63.
- [18] Yacoubian S, Serhan CN. New endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators: implications for rheumatic diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007;3(10):570-579.
- [19] de Araújo RF Jr, Reinaldo MP, Brito GA, et al. Olmesartan decreased levels of IL-1 β and TNF- α , down-regulated MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and up-regulated SOCs-1 in an intestinal mucositis model. *PLoS One*. 2014;9(12):e114923.
- [20] Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. Acacia ferruginea inhibits tumor progression by regulating inflammatory mediators-(TNF- α , iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-2, GM-CSF) and pro-angiogenic growth factor- VEGF. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(6):3909-3919.
- [21] Aharoni R, Saada R, Eilam R, et al. Oral treatment with laquinimod augments regulatory T-cells and brain-derived neurotrophic factor expression and reduces injury in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2012;251(1-2):14-24.
- [22] Stirling DP, Liu S, Kubes P, et al. Depletion of Ly6G/Gr-1 leukocytes after spinal cord injury in mice alters wound healing and worsens neurological outcome. *J Neurosci*. 2009;29(3):753-764.
- [23] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci*. 2008;28(20):5189-5194.
- [24] He X, Shu J, Xu L, et al. Inhibitory effect of Astragalus polysaccharides on lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production in THP-1 cells. *Molecules*. 2012; 17(3):3155-3164.
- [25] Boato F, Rosenberger K, Nelissen S, et al. Absence of IL-1 β positively affects neurological outcome, lesion development and axonal plasticity after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2013;10:6.
- [26] Hassanshahi G, Amin M, Shunmugavel A, et al. Temporal expression profile of CXC chemokines in serum of patients with spinal cord injury. *Neurochem Int*. 2013;63(5):363-367.
- [27] De Filippis L, Südhof TC, Pang ZP. Harness the power of endogenous neural stem cells by biomaterials to treat spinal cord injury. *Sci China Life Sci*. 2015;58(11): 1167-1168.
- [28] Lytle JM, Wrathall JR. Glial cell loss, proliferation and replacement in the contused murine spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2007;25(6):1711-1724.
- [29] Mladinic M, Nistri A. Dynamic expression of ATF3 as a novel tool to study activation and migration of endogenous spinal stem cells and their role in neural repair. *Neural Regen Res*. 2015;10(5):713-714.
- [30] Durak H, Atmaca S, Karayığit MÖ, et al. Effect of Mitomycin C on bFGF, TGF- β 1, KGF-1 Expressions after Myringotomy: An Animal Study. *J Int Adv Otol*. 2015;11(3):188-191.
- [31] Hall ED. Methylprednisolone for the Treatment of Patients with Acute Spinal Cord Injuries: A Propensity Score-Matched Cohort Study from a Canadian Multi-Center Spinal Cord Injury Registry. *J Neurotrauma*. 2016;33(10):972-974.
- [32] Wang W, Wang P, Li S, et al. Methylprednisolone inhibits the proliferation and affects the differentiation of rat spinal cord-derived neural progenitor cells cultured in low oxygen conditions by inhibiting HIF-1 α and Hes1 in vitro. *Int J Mol Med*. 2014;34(3):788-795.
- [33] Jing YH, Hou YP, Song YF, et al. Methylprednisolone improves the survival of new neurons following transient cerebral ischemia in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2012;72(3):240-252.