

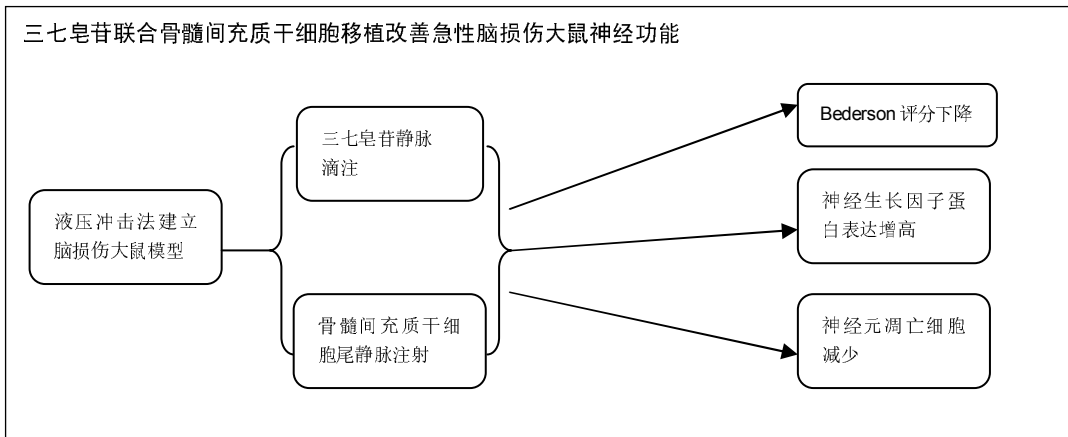
三七皂苷联合骨髓间充质干细胞移植促进急性脑损伤的恢复

李雷兵, 王皎月, 孙彩虹(日照市人民医院重症医学科, 山东省日照市 276800)

引用本文: 李雷兵, 王皎月, 孙彩虹. 三七皂苷联合骨髓间充质干细胞移植促进急性脑损伤的恢复[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(41):6138-6144.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.41.009 ORCID: 0000-0001-7639-0453(李雷兵)

文章快速阅读:



李雷兵, 男, 1979 年生, 山东省日照市人, 汉族, 2003 年河北医科大学毕业, 主治医师, 主要从事重症医学研究。

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2016)41-06138-07
稿件接受: 2016-08-04

文题释义:

三七皂苷: 对治疗脑缺血损伤有着广泛的药理基础, 其作用机制多数与它能够抑制神经细胞凋亡、减轻神经元损伤、影响相关信号通路的蛋白表达有关。研究发现其脂溶性成分中存在的某些单体也对脑缺血损伤具有保护作用。三七中含有少量人参炔醇, 对神经细胞具有营养和保护作用, 可能是治疗缺血性脑损伤的活性物质之一。

神经生长因子: 是神经营养因子中最早被发现, 目前研究最为透彻的, 具有神经元营养和促突起生长双重生物学功能的一种神经细胞生长调节因子, 它对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用。

摘要

背景: 研究证明, 三七皂苷治疗脑缺血损伤有着广泛的药理基础, 骨髓间充质干细胞移植治疗脑损伤动物模型的实验研究也已广泛开展, 但二者联用鲜有报道。

目的: 观察三七皂苷联合骨髓间充质干细胞移植促进大鼠急性脑损伤的恢复作用。

方法: 采用液击冲击法建立 SD 大鼠脑损伤模型, 将 60 只 SD 大鼠随机分为脑损伤组、骨髓间充质干细胞移植组及骨髓间充质干细胞+三七皂苷联合治疗组。治疗后采用 Bederson 神经缺损评分评估神经功能恢复情况, Western blot 法检测脑组织中神经生长因子蛋白表达变化, 苏木精-伊红染色观察脑组织形态学变化, TUNEL 法检测皮质神经元凋亡情况。

结果与结论: ①Bederson 评分: 脑损伤组>骨髓间充质干细胞移植组>联合治疗组, 各组间比较差异有显著性意义($P < 0.05$); ②神经生长因子蛋白表达: 联合治疗组>骨髓间充质干细胞移植组>脑损伤组, 各组间比较差异有显著性意义($P < 0.05$); ③与脑损伤组及骨髓间充质干细胞移植组比较, 联合治疗组脑组织炎症浸润细胞明显减少, 水肿程度明显减轻; ④与脑损伤组及骨髓间充质干细胞移植组比较, 联合治疗组神经元凋亡细胞显著减少; ⑤结果表明, 三七皂苷联合骨髓间充质干细胞移植能够促进大鼠急性脑损伤后的神经功能恢复, 其可能与促进神经生长因子表达及减少神经元细胞凋亡有关。

关键词:

干细胞; 移植; 三七皂苷; 脑损伤; 骨髓间充质干细胞移植; 神经生长因子; 大鼠

主题词:

脑损伤; 三七; 皂苷类; 骨髓; 间充质干细胞移植; 组织工程

Li Lei-bing, Attending physician, Department of Intensive Care, Rizhao People's Hospital, Rizhao 276800, Shandong Province, China

Treatment of traumatic brain injury by Panax notoginseng saponins combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation

Li Lei-bing, Wang Jiao-yue, Sun Cai-hong (Department of Intensive Care, Rizhao People's Hospital, Rizhao 276800, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that Panax notoginseng saponins (PNS) has extensive pharmacological basis for the treatment of cerebral ischemic injury, and animal experiments for treatment of brain injury by bone marrow mesenchymal stem cell transplantation are ongoing. However, little is reported about the combined use of PNS and bone marrow mesenchymal stem cell transplantation.

OBJECTIVE: To investigate the effect of PNS combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on traumatic brain injury in rats.

METHODS: Traumatic brain injury models were made in 60 Sprague-Dawley rats by hydraulic shock method. Then, model rats were randomized into model group, cell transplantation group receiving bone marrow mesenchymal stem cell transplantation and combined treatment group undergoing PNS combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation. Nerve function recovery of the rats and protein expression of nerve growth factor in the brain tissue were evaluated and detected by Bederson scoring and western blot methods, respectively. Morphological changes of the brain tissue and apoptosis in cortical neurons were observed and detected by hematoxylin-eosin staining and TUNEL, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Highest Bederson score was found in the model group, followed by the cell transplantation group and combined treatment group ($P < 0.05$), while the protein expression of nerve growth factor was ranked as follows: the combined treatment group $>$ the cell transplantation group $>$ the model group ($P < 0.05$). Inflammatory infiltration and brain edema in the brain were relieved markedly in the combined treatment group compared with the other two groups, and the number of apoptotic neurons was significantly reduced as well. Our findings suggest that PNS combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation can promote neurological recovery from traumatic brain injury by increasing the expression of nerve growth factor and reducing neuronal apoptosis.

Subject headings: Brain Injuries; Panax notoginseng; Saponins; Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Tissue Engineering

Cite this article: Li LB, Wang JY, Sun CH. Treatment of traumatic brain injury by Panax notoginseng saponins combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(41):6138-6144.

0 引言 Introduction

创伤性颅脑损伤是指头部受到外界暴力侵害后所形成的脑组织损害^[1-2],其发病机制比较复杂,包括细胞损伤、凋亡以及星形胶质细胞形成胶质瘢痕等^[3-6]。严重的脑损伤所导致的运动、记忆及情感等后遗症极大地影响患者的生活质量,给患者家庭与社会造成巨大的经济和精神负担。如何解决这个问题已经成为困扰医学界的重大难题^[7-8]。

临床主要采用清创止血、手术减压、药物脱水降颅压、营养神经、高压氧及对症支持等多种方法来促进中枢神经系统恢复,但其临床疗效不够理想。随着基础医学的不断进步,通过干细胞移植来修复脑组织损伤已成为临床研究重点^[9-10]。骨髓间充质干细胞是从骨髓中分离培养出来的具有自我更新、高度增殖、跨胚层分化、低免疫原性等优势的非造血干细胞,易于向病变部位趋化,可塑性良好,因此骨髓间充质细胞可作为创伤性脑

损伤细胞治疗的理想靶细胞。

骨髓间充质干细胞移植治疗脑损伤动物模型的实验研究已广泛开展,但植入损伤大脑中的骨髓间充质干细胞神经向分化效率比较低^[11-13]。因此需要寻找一种能够在临床上广泛应用且能促进骨髓间充质细胞神经向分化的药物,来更加有效治疗颅脑损伤。

中医药理论认为,创伤性脑损伤的基本病理机制多为气虚血滞、脉络瘀阻,因此,常采用益气活血法治疗^[14-16]。三七总皂苷(total saponins of panax notoginseng, PNS)来源于中药材三七根茎^[17-18],主要用于治疗心脑血管疾病和跌打损伤^[19-21]。现代研究表明,三七总皂苷的作用机制多与抑制神经细胞凋亡、减轻神经元损伤、影响相关信号通路的蛋白表达有关^[22]。三七总皂苷还能够高效诱导骨髓间充质细胞分化成神经元样细胞^[23]。

实验拟对急性创伤性颅脑损伤模型大鼠侧脑室移

植骨髓间充质干细胞, 并给予三七总皂苷干预, 观察二者联用对受损脑组织的恢复作用, 为三七皂苷联合骨髓间充质干细胞移植共同治疗急性颅脑损伤提供理论基础。

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2012年5月至2015年9月在山东大学研究生院动物实验室完成。

1.3 材料 骨髓间充质干细胞由山东大学研究生院动物实验室冻存培养。

1.3.1 实验动物 选取健康成年SPF级雄性SD大鼠60只, 由山东大学研究生院动物实验室提供, 合格证号DK0504(鲁)0001, 体质量250–300 g。实验过程中室温保持在(23±2) °C, 相对湿度40%–60%, 对大鼠的处置符合《关于善待实验动物的指导性意见》中的动物伦理学要求。

1.3.2 主要药品和仪器 三七皂苷(昆明同德众源生物科技有限公司); 胎牛血清(Hyclone公司); L-DMEM培养基(美国Gibco公司); 胰蛋白酶(Gibco BRL公司); EDTA(天津市化学试剂一厂); Western blot 蛋白检测试剂盒、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(美国KPL公司); 倒置相差显微镜(T2000U, Nikon); 三气培养箱(Forma Scientific); 液压颅脑创伤仪(美国 NEW SUN 公司); 切片仪(Thermo Saentific Rotary Microtome HM325); 超低温离心机(Eppendorf 5810R); 5 μL微量注射器(上海医用激光仪器厂); 万分之一电子天平(Sartorius公司); -80 °C低温冰箱(Sany, Japan); 电热恒温水浴锅(北京北方照明电器公司); 手术器械(苏州医疗器械厂)。

1.4 实验方法

1.4.1 脑损伤模型的建立和分组 成年雄性SD大鼠随机分为脑损伤组、骨髓间充质干细胞移植组和联合治疗组, 每组20只。10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于手术板上。按照国际通用标准, 使用液压冲击脑损伤仪给予大鼠253.312 5–303.975 kPa峰值的冲击压力, 造成液压脑损伤模型。

保持大鼠饲养环境的干燥和卫生, 造模后前3 d每天更换垫料, 3 d之后每隔两三天更换1次即可。术前以及术后24 h腹腔注射50 mg/kg的头孢唑林钠以避免伤口和尿路感染。

1.4.2 骨髓间充质干细胞的培养 从液氮罐中取出事先冻存好的骨髓间充质干细胞, 放入37 °C恒温水浴箱

中充分摇晃使其尽快融化, 用移液枪吸出, 缓缓加入适量DMEM完全培养基, 制成细胞悬液, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂及饱和湿度孵箱中, 24 h后全量换液, 之后每3 d换液1次。每日观察细胞的生长状况, 待细胞融合达到80%–90%时, 倒掉DMEM完全培养液, 用无菌PBS冲洗培养瓶3遍, 加入0.25%胰酶消化约30 min, 加入体积分数为10%小牛血清终止消化, 利用移液枪轻轻吹打细胞, 以便将尽量多的细胞吹散下来, 然后1 500 r/min离心5 min, 弃上清, 加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基继续培养, 每隔两三天换液。

1.4.3 三七总皂苷给药和骨髓间充质干细胞移植 三七总皂苷用注射用水稀释配入5%葡萄糖溶液。联合治疗组在造模30 min及造模12 h分别给予三七总皂苷100 mg/kg配于5%葡萄糖液25 mL/kg静滴, 脑损伤组和细胞移植组同时给予相同剂量的5%葡萄糖溶液。观察24 h后, 给予移植组和联合治疗组尾静脉注射1 mL骨髓间充质干细胞悬液(细胞浓度为2.5×10⁹ L⁻¹)。

1.4.4 采用Bederson神经缺损法评估各组大鼠的神经功能 在治疗前及治疗后3, 7, 14, 21 d进行了Bederson神经缺损评分。Bederson分为4个功能等级: 0分: 无神经损伤症状; 1分: 悬尾实验不能完全伸展对侧前爪; 2分: 前肢抵抗对侧的推力能力下降; 3分: 向对侧转圈。Bederson得分越低神经运动功能恢复越好。

1.4.5 苏木精-伊红染色观察病理学形态和TUNEL染色观察皮质细胞凋亡情况 于移植后4周, 每组各处死4只大鼠, 以10%水合氯醛腹腔注射麻醉后, 开胸暴露并游离出心脏, 经左心室插入灌注针并固定, 切开右心耳, 先快速灌注冰冻无菌生理盐水(4 °C)100 mL, 直到肝和肺脏颜色转白及右心房流出液澄清, 然后再灌注冰冻(4 °C)40 g/L多聚甲醛100 mL, 断头取脑, 40 g/L多聚甲醛后固定约2 h, 移入30%的蔗糖溶液4 °C过夜, 恒冷箱式冰冻切片行冠状连续切片(厚20 μm), 常规进行苏木精-伊红染色。

按TUNEL细胞凋亡试剂盒说明进行: ①石蜡切片常规脱蜡至水; ②体积分数为3%H₂O₂室温10 min, 蒸馏水洗涤2 min×3次; ③Proteinase K 37 °C消化10 min, 0.01 mol/L TBS洗涤2 min×3次; ④按每张切片取TdT和DIG-d-UTP各1 μL, 加入18 μL标记缓冲液中, 混匀, 甩去切片上多余液体, 加标记液20 μL, 置于湿盒中, 37 °C标记2 h; ⑤0.01 mol/L TBS洗涤2 min×3次; ⑥加封闭液50 μL, 室温30 min, 甩掉封闭液, 不洗; ⑦

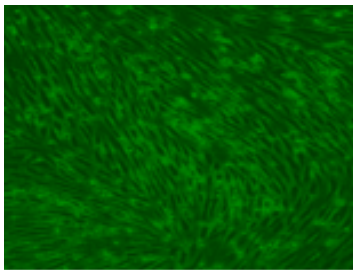


图1 第3代SD大鼠骨髓间充质干细胞($\times 200$)
Figure 1 Rat bone marrow mesenchymal stem cells at passage 3 ($\times 200$)

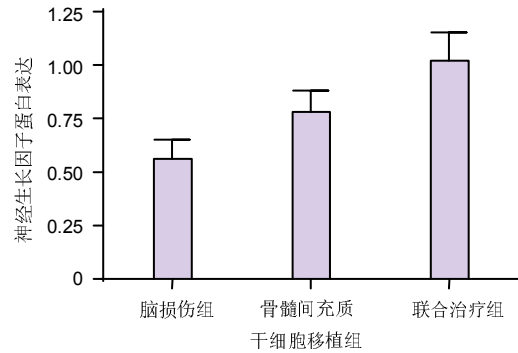
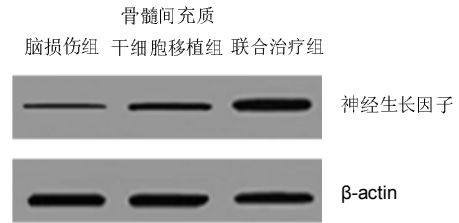


图3 Western blot 检测各组大鼠脑组织中神经生长因子蛋白的表达

Figure 3 The protein expression of nerve growth factor in the rat brain in each group by western blot

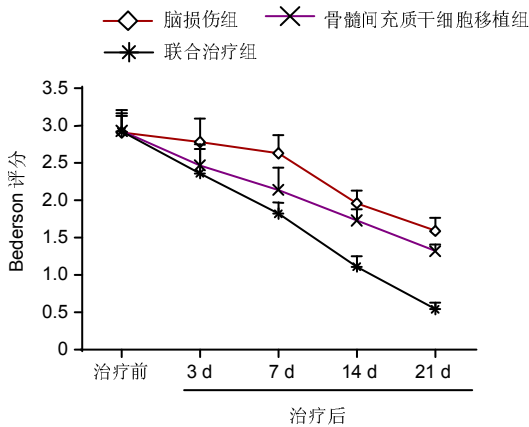


图2 各组大鼠不同时间点的Bederson评分
Figure 2 The Bederson scores of rats at different points in each group

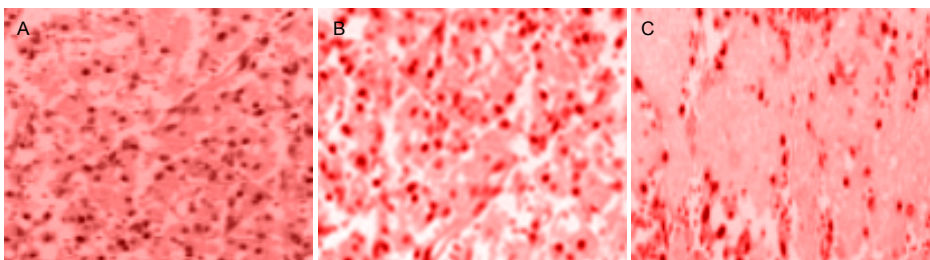


图4 各组大鼠脑组织损伤情况(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Figure 4 Brain injury in rats in each group (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图注: 图中A为脑损伤组, 炎症细胞大量浸润, 细胞结构异常; B为骨髓间充质干细胞移植组, 炎症细胞数目减少, 水肿减轻; C为联合治疗组脑组织水肿几乎消失, 细胞形态趋于正常。

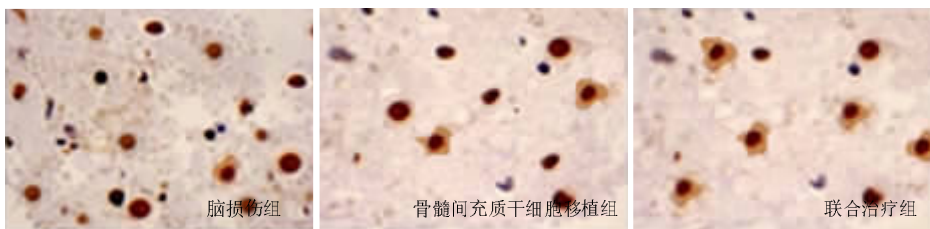


图5 各组大鼠神经元细胞凋亡情况($\times 200$)

Figure 5 The neuronal apoptosis of rats in each group ($\times 200$)

图注: 脑损伤组神经元凋亡细胞明显, 骨髓间充质干细胞移植组次之, 联合治疗组最少。

用抗体稀释液1:100稀释生物素化抗地高辛抗体, 混匀后取50 μ L加于切片, 置于湿盒, 37 $^{\circ}$ C反应30 min, 0.01 mol/L TBS洗涤2 min \times 3次; ⑧取1 mL抗体稀释液加

SABC 10 μ L, 混匀后取50 μ L加于切片, 置于湿盒, 37 $^{\circ}$ C反应30 min, 0.01 mol/L TBS洗5 min \times 4次; ⑨DAB显色; ⑩苏木精轻度复染、脱水、透明、封固, 显微镜观察;

①结果判定: 细胞核固缩有的呈碎片状, 不规则, 大小不一致, 呈棕黄色颗粒者为阳性细胞。

1.4.6 采用Western blot法检测脑组织中神经生长因子蛋白表达变化 于移植后4周, 每组各处死4只大鼠, 取出脑组织, 在液氮中冷冻。根据总蛋白提取试剂盒进行蛋白定量, 经过灌胶、上样、凝胶电泳、转膜等步骤后, 加入一抗4℃孵育过夜, 加入二抗室温孵育2h, 然后经显影、定影、图像采集等, 用Quantity-one分析蛋白条带。

1.5 主要观察指标 ①Bederson神经缺损法评估各组大鼠的神经功能; ②苏木精-伊红染色观察病理学形态和TUNEL染色观察皮质细胞凋亡情况; ③采用Western blot法检测脑组织中神经生长因子蛋白表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 16.0统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析及 q 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 体外培养的骨髓间充质干细胞呈梭形, 体积较小, 核浆比较大, 接种4d后开始贴壁生长, 接种七八天时可见细胞分裂相, 增殖活跃, 细胞融合可达80%-90%。传代之后骨髓间充质干细胞形态均匀一致, 呈漩涡状生长, 生长速度进一步加快, 第10代骨髓间充质干细胞仍具有较好的增殖活性。实验选用生长旺盛第3代骨髓间充质干细胞, 见图1。

2.2 实验动物数量分析 参加实验60只SD大鼠, 均进入结果分析, 中途无脱落。

2.3 Bederson评分结果 治疗前各组大鼠Bederson评分比较非常接近, 差异无显著性意义($P > 0.05$); 治疗后1周各组大鼠神经功能均有不同程度的恢复, 与脑损伤组比较, 骨髓间充质干细胞移植组和联合治疗组的Bederson评分显著降低, 与骨髓间充质干细胞移植组比较, 联合治疗组Bederson评分进一步降低, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。各组Bederson评分比较见表1, 图2。

2.4 脑组织中神经生长因子蛋白表达变化 Western blot检测结果显示, 移植后4周, 与脑损伤组及骨髓间充质干细胞移植组比较, 联合治疗组神经生长因子蛋白表达明显上调, 与脑损伤组比较, 骨髓间充质干细胞移植组神经生长因子蛋白表达明显上调, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图3。

2.5 各组大鼠脑组织形态学变化 移植后4周, 与脑损伤组及骨髓间充质干细胞移植组比较, 联合治疗组受脑组织炎症浸润细胞明显减少, 水肿程度明显减轻。各组大鼠脑组织形态学变化, 见图4。

2.6 各组大鼠脑组织皮质神经元凋亡情况 移植后4周, 与脑损伤组及骨髓间充质干细胞移植组比较, 联合治疗组凋亡细胞显著减少, 骨髓间充质干细胞移植组凋亡细胞明显少于脑损伤组, 见图5。

表1 各组大鼠不同时间点的Bederson评分 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)
Table 1 The Bederson scores of rats at different points

时间	脑损伤组	骨髓间充质干细胞移植组	联合治疗组
治疗前	2.91±0.26	2.93±0.28	2.92±0.21
治疗后3d	2.78±0.32	2.47±0.28	2.36±0.33
治疗后7d	2.63±0.24	2.14±0.30	1.94±0.28 ^a
治疗后14d	1.86±0.17	1.96±0.15	1.11±0.14 ^a
治疗后21d	1.59±0.18	1.32±0.09	0.54±0.06 ^a

表注: 联合治疗组的Bederson评分明显低于其余各组, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

创伤性颅脑损伤主要包括早期损伤和创伤后所引发的继发性损伤(如缺血缺氧、钙离子通道异常和脂质过氧化), 脑损伤初期出现弥漫性细胞死亡, 接着出现细胞凋亡, 最后激活的星形胶质细胞形成胶质瘢痕, 同时发生的炎症反应加剧了神经元细胞变性, 促使半胱氨酸蛋白酶激活, 裂解蛋白底物而导致细胞死亡, 进一步导致神经变性和功能缺损等变化^[23-25]。通常认为神经细胞损伤具有不可逆性, 因此颅脑损伤后的中枢神经再生一直是医学界研究的重点^[26-27]。

骨髓间充质干细胞具有很强的自我更新和跨胚层分化能力, 在一定条件下可以分化为神经元细胞, 对治疗帕金森病、脑卒中、脑损伤、脊髓损伤等神经系统疾病有着重要价值^[28-31]。骨髓间充质干细胞移植治疗神经系统损伤的作用机制包括细胞间渗透融合、分泌相关营养因子、形成突触联系等^[32], 但是单独使用这一技术修复效果并不理想, 仍然需要结合其他手段进行综合治疗^[33]。

三七总皂苷是著名活血中药三七的重要活性成分, 对心脑血管疾病的治疗具有良好的疗效, 对神经细胞具有强大的保护和修复作用^[34-37]。神经生长因子是一种最为人所熟知的神经营养因子, 在脑缺血性损伤中, 神经生长因子对减轻神经元损伤具有重要作用^[38-39]。李花等^[40]实验结果表明脑缺血时给予三七总皂苷可以增加

内源性神经生长因子水平, 增加的神经生长因子可能通过抗自由基、兴奋性氨基酸损伤, 降低细胞内过高的钙离子浓度, 保护损伤的神经元。邓昌^[41]用实验进一步证明了三七皂苷通过升高大鼠脑缺血再灌注损伤时海马部位神经生长因子水平而达到修复受损神经元的效果。

实验采用液压冲击法建立 SD 大鼠脑损伤模型, 移植后不同时间点联合治疗组 Bederson 评分显著低于骨髓间充质干细胞移植组和脑损伤组, 进一步分析发现, 联合治疗组大鼠损伤部位脑组织神经生长因子蛋白表达变化、脑组织形态学变化以及皮质神经元凋亡等指标均优于脑损伤组及骨髓间充质干细胞移植组, 且各组间结果差异有显著性意义, 说明三七皂苷可能通过上调损伤脑组织中神经生长因子水平从而减轻神经元损伤, 避免皮质神经元的凋亡^[42]。

综上所述, 三七皂苷联合骨髓间充质干细胞移植能够在一定程度上促进大鼠急性颅脑损伤的恢复, 与单独移植骨髓间充质干细胞治疗相比表现出更好的治疗效果, 其作用机制可能与三七皂苷促进神经生长因子表达及减少神经元细胞凋亡有关。

作者贡献: 实验设计为李雷兵, 实验实施为李雷兵、王皎月、孙彩虹, 实验评估为李雷兵、王皎月, 资料收集为李雷兵、王皎月、孙彩虹。

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] Klose MC, Juul A, Poulsgaard L, et al. Pituitary insufficiency following head trauma. Ugeskr Laeger. 2007;169(3):211-213.

[2] Lingsma HF, Roozenbeek B, Steyerberg EW, et al. Early prognosis in traumatic brain injury: from prophecies to predictions. Lancet Neurol. 2010;9(5):543-554.

[3] 先德海, 余崇林. 骨髓间充质干细胞治疗创伤性脑损伤的研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2012, 35(3): 337-339.

[4] Arabi YM, Haddad S, Tamim HM, et al. Mortality reduction after implementing a clinical practice guidelines-based management protocol for severe traumatic brain injury. J Crit Care. 2010;25(2):190-195.

[5] Lee HC, Chuang HC, Cho DY, et al. Applying cerebral hypothermia and brain oxygen monitoring in treating severe traumatic brain injury. World Neurosurg. 2010;74(6):654-660.

[6] Engelmann CM, Siert L. Cognitive disturbances following severe traumatic brain injury. Ugeskr Laeger. 2007;169(3):217-219.

[7] Liliang PC, Liang CL, Weng HC, et al. Tau proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. J Surg Res. 2010;160(2):302-307.

[8] Sekhon MS, Dhingra VK, Sekhon IS, et al. The safety of synthetic colloid in critically ill patients with severe traumatic brain injuries. J Crit Care. 2011;26(4):357-362.

[9] Paxinos G, Watson C. The rat brain stereotaxic coordinates[M]. 2nd ed. New York: Academic Press Inc, 2010: 145-152.

[10] Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(7):3908-3913.

[11] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. Expert Opin Emerg Drugs. 2009;14(1):67-84.

[12] 黄小平, 王蓓, 邱咏园, 等. 黄芪甲苷、人参皂苷Rg1、Rb1和三七皂苷R1抗小鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤和促进能量代谢的配伍研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(7):5-11.

[13] 罗欢, 夏伦祝, 段贤春, 等. 三七皂苷对缺血性脑损伤保护作用的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(10): 107-109.

[14] 江刘平, 焦林如. 三七总皂苷的药用生物学活性研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(3):17-21.

[15] 钟森, 陈文超, 徐永强, 等. 三七总皂苷对脑缺血再灌注损伤大鼠神经干细胞相关调节因子及脑细胞凋亡的影响[J]. 中国中医急症, 2010, 19(2):279-281.

[16] 潘敏, 李玛琳. 中药及其提取纯化物对骨髓间充质干细胞诱导分化的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1892-1895.

- [17] 詹合琴, 张文熙, 闫福林, 等. 三七皂苷Rg1对脑缺血损伤后大鼠脑组织凋亡因子表达的影响[J]. 广东医学, 2014, 35(10):1478-1482.
- [18] 冯士军, 韩建国. RhoA基因沉默联合脐带间充质干细胞移植脑损伤大鼠功能的恢复[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1):23-30.
- [19] 何志旭, 严虎, 刘俊峰, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗缺血再灌注脑损伤[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(6): 435-439.
- [20] 王飞, 潘庆刚, 邓东风, 等. 胶质细胞源性神经营养因子基因修饰的神经干细胞移植治疗大鼠脑损伤[J]. 中华创伤杂志, 2007, 23(12):894-897.
- [21] 程发峰, 宋文婷, 郭少英, 等. 三种神经功能评分在鼠类局灶性脑缺血模型评价中的比较[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(4):337-341.
- [22] 李红星, 苑国富, 金耀东, 等. 神经干细胞移植联用神经节苷脂对脑损伤大鼠神经学功能恢复的影响[J]. 中国组织工程与临床康复, 2011, 15(40):7505-7510.
- [23] 安雅臣, 王玉浔, 赵晓晶. 静脉注射人脐血间充质干细胞对大鼠脑损伤细胞凋亡的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013, 15(11):1204-1207.
- [24] 黄兴锐, 朱云霞, 赵爱琴, 等. bFGF与骨髓间充质干细胞联合移植对脑损伤后神经再生的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(2):129-134.
- [25] 张翠香, 刘建勋, 董小霞, 等. 对凋亡细胞 TUNEL 染色操作中的体会[J]. 实验动物科学, 2014, 31(4):46-48.
- [26] Zhang J, Li Y, Zhang ZG, et al. Bone marrow stromal cells increase oligodendrogenesis after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(6):1166-1174.
- [27] Nordenbo AM, Jakobsen JK. Rehabilitation of severe traumatic brain injury. *Ugeskr Laeger.* 2007;169(3): 197.
- [28] Nadri S, Soleimani M, Mobarra Z, et al. Expression of dopamine-associated genes on conjunctiva stromal-derived human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377(2):423-428.
- [29] Zhang J, Li Y, Zhang ZG, et al. Bone marrow stromal cells increase oligodendrogenesis after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(6):1166-1174.
- [30] Cho JS, Park HW, Park SK, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells enhances axonal outgrowth and cell survival in an organotypic spinal cord slice culture. *Neurosci Lett.* 2009;454(1):43-48.
- [31] Li LY, Li JT, Wu QY, et al. Transplantation of NGF-gene-modified bone marrow stromal cells into a rat model of Alzheimer' disease. *J Mol Neurosci.* 2008; 34(2):157-163.
- [32] 冯士军. NGF 联合骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脑损伤[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(8):924-928.
- [33] Mothe AJ, Kulbatski I, Parr A, et al. Adult spinal cord stem/progenitor cells transplanted as neurospheres preferentially differentiate into oligodendrocytes in the adult rat spinal cord. *Cell Transplant.* 2008;17(7): 735-751.
- [34] 谢平安, 廖辉. 三七对脑神经细胞作用机制的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33(2):68-69.
- [35] 严永兴, 梁丽贞, 周智林, 等. 三七三醇皂苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注后不同恢复时期脑梗死体积和Nogo-A表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(5):407-408.
- [36] 陈俊萍, 马祁生. 三七三醇皂苷对脑缺血大鼠脑室下区细胞增殖及星形胶质细胞的影响[J]. 中国药房, 2010, 21(43): 4061-4063.
- [37] Li HP, Qiang L, Zhang CY, et al. Publication trends in studies examining radix notoginseng as a treatment for ischemic brain injury. *ural Regen Res.* 2014; 9(17): 1635-1642.
- [38] 乔春玲, 丁艳芬, 杨崇仁. 三七总皂苷药理研究进展[J]. 中国现代中药, 2012, 14(11):25-30.
- [39] He X, Deng fj, gE jw, et al. Effects of total saponins of Panax notoginseng on immature neuroblasts in the adult olfactory bulb following global cerebral ischemia/reperfusion. *Neural Regen Res.* 2015;10(9): 1450-1456.
- [40] 李花, 邓常青, 熊艾君, 等. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注后脑内NGF 和bFGF 表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(2):219-221.
- [41] 邓昌. 三七总皂苷对局灶性脑缺血再灌注海马中NGF及TrkA的影响[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(2):26-28.
- [42] 涂献坤, 杨卫忠, 石松生, 等. 黄芩苷抑制缺血性脑损伤大鼠脑组织TN- α 和AQP-4表达及减轻脑损伤的研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 39(9):1222-1225.