

基础研究

人胚胎神经干细胞延迟移植对脊髓损伤大鼠运动功能的影响及其机制

王 鹏¹, 吴燕峰², 孟庆奇¹, 黄 霖¹, 王文豪¹, 高梁斌¹, 唐 勇¹, 沈慧勇¹

(1 中山大学孙逸仙纪念医院骨科; 2 生物治疗中心 510120 广州市)

【摘要】目的:初步探讨人胚胎神经干细胞(human fetal neural stem cells, hfNSCs)延迟移植对脊髓损伤大鼠运动功能的影响及其机制。**方法:**体外分离、培养和鉴定 hfNSCs, 选取 200~250g 的 Wistar 大鼠 28 只建立 T9~T11 节段脊髓挫伤模型, 损伤后第 9 天取 20 只 BBB 评分为 4~5 分的大鼠随机分为对照组及移植组(每组 10 只), 同时在 T10 水平脊髓中线两侧 1.5mm 处分别给予 2 μ l 不含 hfNSCs 的杜氏磷酸缓冲液(DPBS)及 2 μ l 含有 10⁵ 个体外培养第 2 代 hfNSCs 的 DPBS, 细胞移植后第 7、14、28、42、56 天用 BBB 评分评价两组后肢运动功能, 移植后第 28 天及第 56 天用免疫组织化学法检测移植组大鼠损伤脊髓局部神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、微管相关蛋白 2(MAP2)和 2', 3'-环腺苷酸-3'-磷酸二酯酶(CNPase)的表达情况, 以评价大鼠损伤脊髓局部 hfNSCs 的存活及分化情况。移植后第 56 天髓磷脂碱性蛋白(MBP)染色及透射电子显微镜扫描观察移植组与对照组损伤局部髓鞘形成情况。**结果:**体外培养的 hfNSCs 表达 Nestin, 并可分化为星形胶质细胞[(61.2 $\pm$ 1.6)%]、神经元[(27.6 $\pm$ 3.4)%]及少突胶质细胞[(6.0 $\pm$ 5.5)%]。移植前及移植后第 7、14 天两组 BBB 评分比较无统计学差异($P>0.05$), 移植组在移植后第 28、42、56 天评分(分别为 8.30 $\pm$ 1.07 分, 11.30 $\pm$ 1.05 分, 15.10 $\pm$ 1.12 分)较对照组(分别为 7.00 $\pm$ 0.98 分, 8.30 $\pm$ 1.02 分, 9.10 $\pm$ 0.96 分)明显提高($P<0.05$)。在移植后第 28 天 hfNSCs 可分化为 GFAP 阳性的星形胶质细胞、MAP2 阳性的神经元和 CNPase 阳性的少突胶质细胞, 在移植后第 56 天 hfNSCs 仍在损伤局部存活并可分化为星形胶质细胞和少突胶质细胞, 但未见神经元分化; 移植后第 56 天星形胶质细胞的积分光密度(OD)值(1502.31 $\pm$ 131.92)大于移植后第 28 天(628.98 $\pm$ 119.31) ($P<0.05$), 而少突胶质细胞在移植后第 28 天及第 56 天的变化无统计学差异。移植后第 56 天 MBP 染色证实人源性少突胶质细胞参与损伤区髓鞘的形成, 透射电子显微镜扫描结果显示移植组有完整和连续的髓鞘形成, 对照组髓鞘呈断裂及畸形表现。**结论:** hfNSCs 延迟移植可促进脊髓损伤大鼠运动功能的恢复, 其机制可能与促进损伤局部髓鞘的形成有关。

【关键词】 脊髓损伤; 神经干细胞; 移植; 功能恢复; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.11.12

中图分类号: R683.2, Q813.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-11-0934-07

The influence and mechanism of delayed transplantation of human fetal neural stem cells on locomotor recovery after experimental spinal cord injury in rats/WANG Peng, WU Yanfeng, MENG Qingqi, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(11): 934-940

【Abstract】 Objective: To discuss the effect and mechanism of delayed transplantation of human fetal neural stem cells(hfNSCs) on the locomotor recovery of spinal cord injury. **Method:** The hfNSCs were separated, cultured and identified from abortive fetus in vitro. Then rat spinal cord injury (SCI) models (200-250g, $n=28$) were established. At the 9th day after injury, twenty rats with BBB scores between 4 and 5 were divided randomly into two groups with each group of 10 rats. 2 μ l Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) with or without 10⁵ 2nd generation hfNSCs was transplanted into the experimental and control groups (injection site: 1.5mm lateral of central T10 spinal cord). BBB score was used to evaluate the locomotor improvement between control and experimental group at the 7th, 14th, 28th, 42th, 56th day after transplantation. The expressions of glial fibrillary acidic protein(GFAP), microtubule-associated protein 2(MAP2) and CNPase were evaluated by

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30973033、81000529), 广东省自然科学基金(编号: 9151008002000015)

第一作者简介: 男(1979-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 脊髓损伤

电话: (020)81332523 E-mail: sunfox809@yahoo.com.cn

通讯作者: 沈慧勇

immunohistochemistry to observe the survival and differentiation of hfNSCs in the injured area. At the 56th day after transplantation, the remyelination of two groups was evaluated by myelin basic protein (MBP) immunohistochemistry and transmission electron microscope. **Result:** The hfNSCs cultured in vitro expressed Nestin and differentiated into astrocytes [(61.2±1.6)%], neurons [(27.6±3.4)%] and oligodendrocytes [(6.0±5.5)%] respectively. Experimental group (BBB scores: 8.3±1.07 at 28th day and 15.1±1.12 at 56th day) had a better locomotor recovery than control group (BBB scores: 7.0±0.98 at 28th day and 9.1±0.96 at 56th day) ($P<0.05$). Immunohistochemistry showed presence of hfNSCs and differentiation of them into astrocytes and oligocytes on the 56th day after transplantation, yet no hfNSCs-derived neurons were found at that time. There were more astrocytes in the experimental group at the 56th day (1502.31±131.92) than 28th days (628.98±119.31). The numbers of oligocytes between the 28th day and the 56th day had no significant difference. The MBP stain at 56th day showed that hfNSCs-derived oligodendrocytes might take part in the remyelination in injured area. According to the results of transmission electron microscope, compared with the control group which had broken and deformed myelin sheath, the experimental group displayed formation of more integrate and continuous myelin sheath. **Conclusion:** Delayed hfNSCs transplantation may improve locomotor recovery by remyelination after SCI in experimental rat.

[Key words] Spinal cord injury; Neural stem cells; Implantation; Functional recovery; Rat

[Author's address] Department of Orthopedics, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510120, China

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 可破坏神经通路导致截瘫或四肢瘫痪, 同时可以造成持续的细胞损伤、炎症和脱髓鞘^[1]。近十年来, 大量实验研究证实神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 移植治疗 SCI 是一种十分有前景的方法^[2]。由于急性 SCI 后的炎症性微环境并不适合 NSCs 的存活和分化^[3], 因此 NSCs 移植时间点的选择尤为重要。有研究者认为移植的最佳时期在 SCI 后 1~2 周^[3,4], 对此国内外尚无统一的标准。本研究旨在观察 SCI 后第 9 天应用人胚胎神经干细胞 (human fetal neural stem cells, hfNSCs) 移植对 SCI 大鼠后肢运动功能的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 hfNSCs 的分离、培养和鉴定

无菌分离孕 4~5 个月流产胎儿侧脑室下区脑组织, 机械吹打为单个细胞后种植于含达尔伯克 (氏) 改良伊格尔 (氏) 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Media; Nutrient Mixture F-12, DMEM/F-12) (Invitrogen)、B27 无血清培养添加因子 (B27) (R&D)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) (R&D)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) (R&D) 等的 NSCs 培养液中, 置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 每 5d 胰蛋白酶 (Chemicon) 消化传代 1 次。

将第 3~5 代 hfNSCs 消化成为单个细胞, 然后转移至经多聚-L-鸟氨酸和纤维连接蛋白预处理的 12 孔板中, 使其贴壁生长 3d 后用于 Nestin 检测。撤除 bFGF 和 EGF, 自然分化 10d 后用于神经胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2) 及 2', 3'-环腺苷酸-3'-磷酸二酯酶 (CNPase) 检测: 4% 多聚甲醛固定后使用 0.25% Triton X-100 (Serva) 穿透, 然后用含 3% 普通山羊血清的 PBS 浸泡 45min 封闭, 最后加入 0.25% Triton X-100 稀释的下列浓度的一抗 4℃ 孵育过夜: 单克隆小鼠抗人 Nestin 抗体 (1:400, Abcam), 多克隆兔抗 GFAP 抗体 (1:300, Millipore), 单克隆小鼠抗人 MAP2 抗体 (1:200, Millipore), 多克隆鸡抗 CNPase 抗体 (1:200, Millipore), 过夜后清洗掉未结合的一抗后, 相应加入 0.25% Triton X-100 稀释的山羊抗小鼠、鸡和兔的 Cy3 (吖啶类菁染料 Cy3) 及异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 的二抗 (1:400, Jackson) 在室温下孵育 1~2h 后, 用 Hoechst (Sigma) 复染细胞核。用奥林巴斯荧光倒置显微镜 (BX51, Olympus, Japan) 观察及计数特异荧光染色的细胞。

1.2 大鼠脊髓挫伤模型的建立、分组及运动功能评价

选取 200~250g 的 Wistar 雄性大鼠 28 只用

于建立脊髓挫伤模型,用 0.5ml 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,剃毛及常规消毒后,行椎板切除术暴露 T9~T11 对应节段脊髓,利用 NYU 脊髓打击器制备 T9~T11 节段脊髓挫伤模型^[5],给予脊髓 25mm×10g 强度的重力打击,术中及术后维持室温于 27℃,术后连续 3d 青霉素(10000U/100g 体重)肌肉内注射防止感染,术后 1 个月内每日 1 次膀胱按摩助排尿。

用 BBB 评分法评价脊髓挫伤后第 7、14、28、42、56 天大鼠后肢运动功能的恢复情况,为了避免膀胱过度扩张对后肢运动功能的影响,在评分前按摩膀胱使其排空。将造模后第 9 天记录的 BBB 评分数值在 4.0~5.0 分的大鼠随机分配到移植组($n=10$)和对照组($n=10$)中。

1.3 荧光活性染料 CM-DiI 标记 hfNSCs 及细胞移植

将第 2 代 hfNSCs 行亲脂性免疫荧光探针氯甲基-苯甲酰胺二烷基羧花菁(CM-DiI, Molecular Probes, USA)标记,标记后用 0.1M 杜氏磷酸缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)冲洗 3 次并重悬以备移植使用。脊髓挫伤后第 9 天进行移植,分别在 T10 水平脊髓中线两侧各 1.5mm 处给予 2 μ l 含有 10⁵ 个 hfNSCs 的 DPBS,对照组在相同部位给予 2 μ l 不含 hfNSCs 的 DPBS。所有实验大鼠从移植后第 1 天开始每天腹腔内注射环孢素 A(10mg/kg)以减少免疫排斥。

1.4 hfNSCs 在体内存活及分化情况的评价

移植组大鼠于 hfNSCs 移植术后第 28 天及第 56 天时各处死 5 只。先行心脏灌注 0℃ PBS 及 4%多聚甲醛缓冲液^[6],取 T9~T11 段脊髓长约 1cm,4%多聚甲醛缓冲液固定 2h 后放入 30%蔗糖溶液中过夜,冰冻包埋剂包埋置于恒冷箱切片机(Leica, CM1900)内制作 20 μ m 厚的脊髓纵切面连续切片。每个标本以中央管作为参照,在其两侧每隔 400 μ m 选取 2 张(共 10 张)切片进行荧光免疫组织化学染色。用单克隆小鼠抗人 Nestin 抗体(1:800, Abcam)、多克隆兔抗 GFAP 抗体(1:500, Millipore)分别标记活性 NSCs 和星形胶质细胞,单克隆小鼠抗人 MAP2 抗体(1:400, Millipore)、多克隆鸡抗 CNPase 抗体(1:400, Millipore)分别标记活性神经元和少突胶质细胞,单克隆鼠抗人髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)抗体(1:400, Millipore)标记髓鞘。激

光共聚焦显微镜(LSM5 PASCAL, Carl Zeiss, Germany)观察切片并采集图像,每只大鼠随机取切片 5 张。用 Image Pro-Plus 5.1 处理图片,并分析比较两组图片荧光染色的积分光密度(IOD)值。

1.5 损伤脊髓局部髓鞘再生情况的观察

移植组从方法 1.4 中所取 hfNSCs 移植后第 56 天的 T9~T11 节段脊髓标本中取 1mm³ 的小组织块,对照组取相应时间点、相应部位的脊髓标本 1mm³,先用 4%的多聚甲醛过夜固定,再用四氧化锇 4℃ 孵育 2h,接着用 2%液态醋酸双氧铀 4℃ 暗室孵育 2h,之后用乙醇脱水,树脂包埋处理后经 LKB-V(LKB, Sweden)超薄切片机制备厚度为 50nm 的切片,用透射电子显微镜观察损伤脊髓局部髓鞘再生情况。

1.6 数据分析和统计

数据由本实验组专人进行计数和统计,数据表示为均数 $\pm$ 标准差。各组每种染色取切片 5 张,用 SPSS 11.0 进行统计学分析,两组 BBB 评分及移植术后第 28 天与第 56 天 IOD 值比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

hfNSCs 在体外呈神经球样生长(图 1a1),超过 30%的神经球贴壁生长(图 1a2)。免疫细胞化学染色法证实(65 $\pm$ 2.4)%的 hfNSCs 表达 Nestin(图 1b),撤除神经生长因子后可自然分化为 GFAP 阳性的星形胶质细胞[(61.2 $\pm$ 1.6)%]、MAP2 阳性的神经元[(27.6 $\pm$ 3.4)%]及 CNPase 阳性的少突胶质细胞[(6.0 $\pm$ 5.5)%](图 1c~e)。在标记了 10 μ M CM-DiI 30min 后,绝大多数 NSCs 被完全或者部分染成红色,红色免疫荧光在所有被染色的细胞中均非常强烈(图 1f1~f2)。

在 SCI 模型制备之前所有大鼠 BBB 评分均为 21 分。在 SCI 后第 1 天,所有大鼠均出现了后肢瘫痪和以小便失禁为表现的膀胱功能丧失。移植后第 7、14 天两组 BBB 评分无统计学差异,在移植后第 28、42、56 天移植组 BBB 评分与对照组比较显著提高($P<0.05$)(表 1)。

在移植后第 28 天发现大量的 CM-DiI 标记的 hfNSCs(由于红色荧光太强而无法清除计数)由注射部位向四周迁移(图 2a),在移植后第 56 天 CM-DiI 标记的 hfNSCs 数量明显下降(图 2b)。

免疫组织化学染色证实, 在移植后第 28 天 hfNSCs 可分化为 GFAP 阳性的星形胶质细胞、MAP2 阳性的神经元和 CNPase 阳性的少突胶质细胞(图 3a~c);但在移植后第 56 天人源性星形胶质细胞的数量迅速下降(图 3d),未发现人源性神经元的存在(图 3e),而人源性少突胶质细胞的数量未见明显变化(图 3f)。移植后第 56 天与第 28 天比较星形胶质细胞荧光免疫组织化学染色 IOD 值明显减少($P<0.05$),少突胶质细胞 IOD 值两个时间点比较无统计学差异($P>0.05$),移植后第 56 天神经元 IOD 值为 0 (表 2)。移植后第 56

天 MBP 免疫组织化学染色显示损伤区存在大量人源性少突胶质细胞来源的髓鞘形成(图 4a)。透射电子显微镜观察证实对照组脊髓损伤区髓鞘组织畸形且不连续,而在移植组脊髓损伤区则有完整和连续的髓鞘形成(图 4b)。

3 讨论

在过去的 10 年中,大量的动物实验研究评估了 NSCs 移植治疗 SCI 的效果,发现其移植可促进损伤脊髓功能的恢复^[2]。最近研究指出 NSCs 微环境对于 NSCs 的自我更新和分化方向具有重要

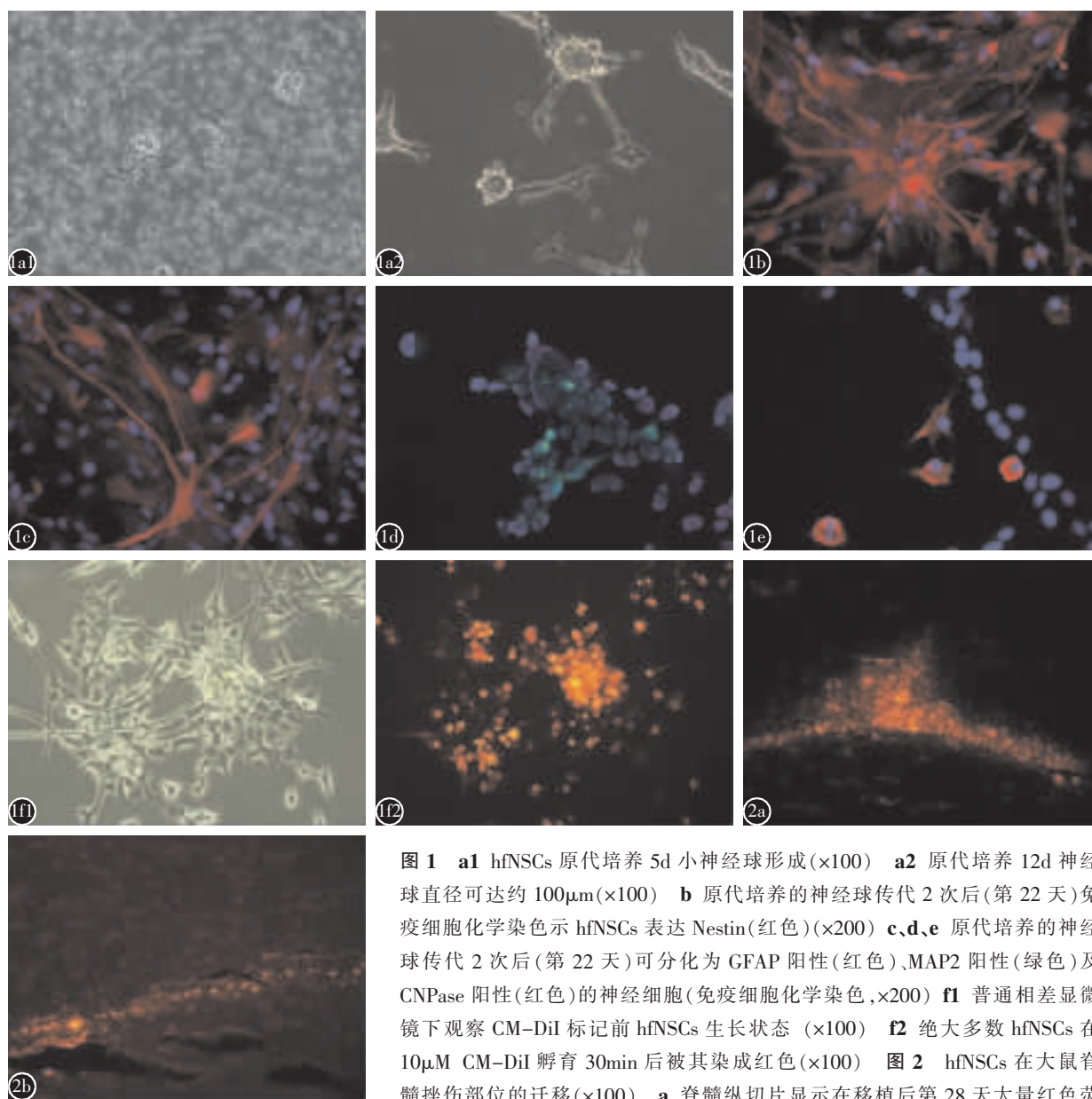


图 1 a1 hfNSCs 原代培养 5d 小神经球形成($\times 100$) a2 原代培养 12d 神经球直径可达约 $100\mu\text{m}$ ($\times 100$) b 原代培养的神经球传代 2 次后(第 22 天)免疫细胞化学染色示 hfNSCs 表达 Nestin(红色)($\times 200$) c、d、e 原代培养的神经球传代 2 次后(第 22 天)可分化为 GFAP 阳性(红色)、MAP2 阳性(绿色)及 CNPase 阳性(红色)的神经细胞(免疫细胞化学染色, $\times 200$) f1 普通相差显微镜下观察 CM-DiI 标记前 hfNSCs 生长状态 ($\times 100$) f2 绝大多数 hfNSCs 在 $10\mu\text{M}$ CM-DiI 孵育 30min 后被其染成红色($\times 100$) 图 2 hfNSCs 在大鼠脊髓挫伤部位的迁移($\times 100$) a 脊髓纵切片显示在移植后第 28 天大量红色荧光标记的 hfNSCs 向移植注射部位的头端和尾端迁移(CM-DiI 标记) b 在移植后第 56 天红色荧光标记的 hfNSCs 细胞数量与移植后第 28 天比较有所下降

与移植后第 28 天比较有所下降

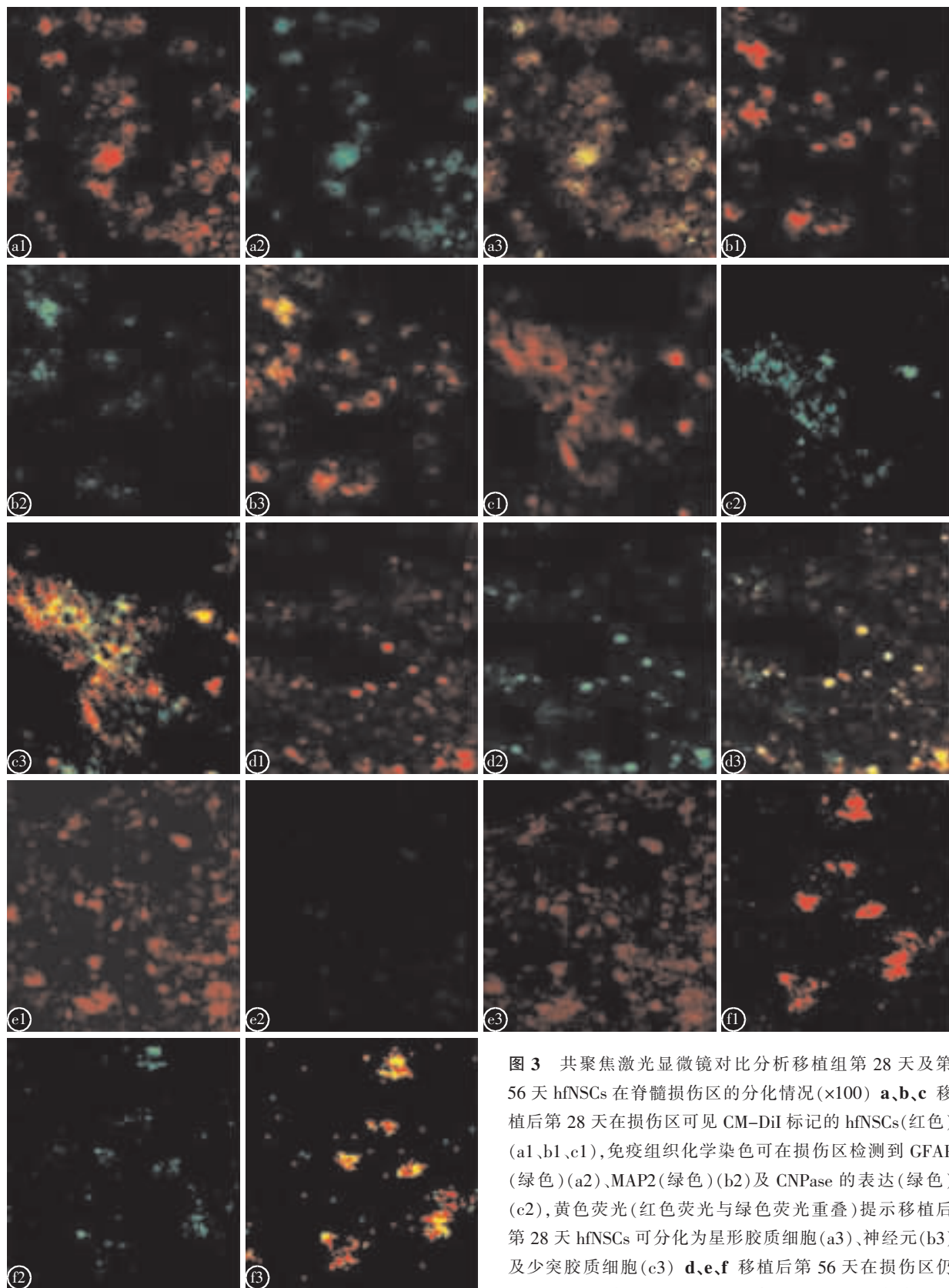


图3 共聚焦激光显微镜对比分析移植组第28天及第56天hfNSCs在脊髓损伤区的分化情况($\times 100$) a、b、c 移植后第28天在损伤区可见CM-DiI标记的hfNSCs(红色)(a1、b1、c1),免疫组织化学染色可在损伤区检测到GFAP(绿色)(a2)、MAP2(绿色)(b2)及CNPase的表达(绿色)(c2),黄色荧光(红色荧光与绿色荧光重叠)提示移植后第28天hfNSCs可分化为星形胶质细胞(a3)、神经元(b3)及少突胶质细胞(c3) d、e、f 移植后第56天在损伤区仍可见CM-DiI标记的hfNSCs(红色)(d1、e1、f1),免疫组织

化学染色示损伤区有GFAP(绿色)(d2)及CNPase(绿色)(f2)的表达,但未见MAP2表达(e2),黄色荧光(红色荧光与绿色荧光重叠)提示与移植后第28天比较,移植后第56天人源性星形胶质细胞的数量明显减少(d3)、未见人源性神经元(e3),而人源性少突胶质细胞的数量未见明显变化(f3)

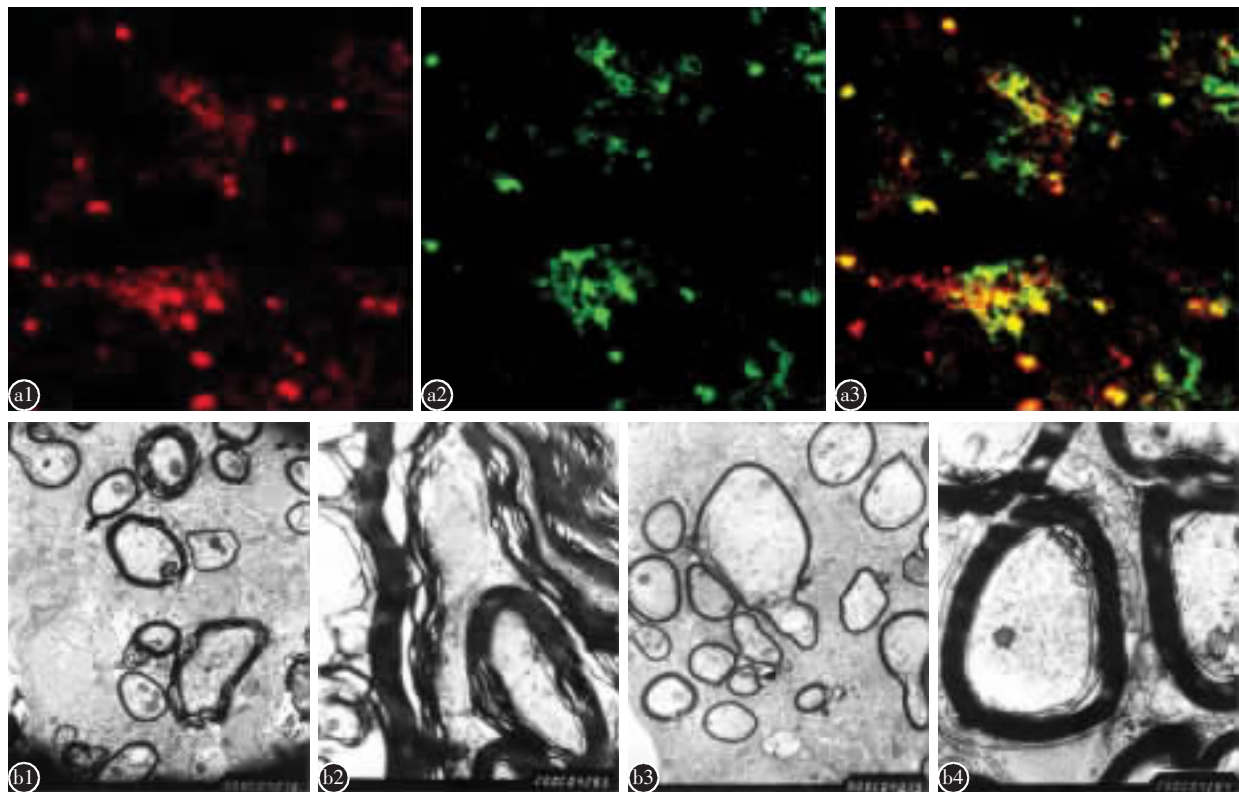


图 4 移植组和对照组损伤部位髓鞘免疫组织化学和结构分析 **a1** 移植后第 56 天在损伤区可见 CM-DiI 标记的 hNSCs (红色)($\times 100$) **a2** 移植后第 56 天移植组免疫组织化学染色在损伤区检测到 MBP 表达(绿色)($\times 100$) **a3** 黄色荧光(红色荧光与绿色荧光重叠)提示移植后第 56 天移植组脊髓损伤部位周围有大量人源性髓鞘形成 **b1**、**b2** 透射电子显微镜观察证实在移植后第 56 天移植组髓鞘组织完整且连续 (**b1** $\times 8000$, **b2** $\times 20000$) **b3**、**b4** 对照组髓鞘组织不完整且畸形 (**b3** $\times 8000$, **b4** $\times 20000$)

表 1 对照组和移植组移植前后 BBB 评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)

	<i>n</i>	移植组	对照组
移植前	10	4.0 $\pm$ 0.89	4.3 $\pm$ 0.91
移植后第 7 天	10	4.4 $\pm$ 0.96	4.8 $\pm$ 0.97
移植后第 14 天	10	6.4 $\pm$ 0.99	6.3 $\pm$ 0.93
移植后第 28 天	10	8.3 $\pm$ 1.07 ^①	7.0 $\pm$ 0.98
移植后第 42 天	5	11.3 $\pm$ 1.05 ^①	8.3 $\pm$ 1.02
移植后第 56 天	5	15.1 $\pm$ 1.12 ^①	9.1 $\pm$ 0.96

注:①与对照组比较 $P < 0.01$

表 2 移植组移植后第 28 天与第 56 天 3 种细胞 IOD ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

	移植后第 28 天	移植后第 56 天
星形胶质细胞	1502.31 $\pm$ 131.92 ^①	628.98 $\pm$ 119.31
神经元	840.25 $\pm$ 170.24	0
少突胶质细胞	524.54 $\pm$ 102.42	493.57 $\pm$ 90.23

注:①与移植后第 56 天比较 $P < 0.05$

的调节作用,但是相关的研究同时表明 NSCs 移植后主要分化为星形胶质细胞,而向神经元和少

突胶质细胞分化有限^[7]。Booth 等^[8]的研究证实移植入哺乳动物上皮隐窝的 NSCs 可以适应性分化成为上皮细胞。相似研究也指出损伤脊髓的微环境在 NSCs 移植后调节其分化方面起到了重要作用^[9]。在 SCI 的急性期,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、干扰素- γ (IFN- γ) 等因子在损伤区域高表达,这种环境足以诱导 NSCs 向星形胶质细胞分化^[9]。同时,有研究表明 SCI 早期的微环境并不支持移植的 NSCs 的存活^[3],在 SCI 慢性期(伤后 60d 以后),损伤部位形成的胶质瘢痕又可抑制移植的 NSCs 的迁移和整合^[10]。因此 NSCs 移植治疗 SCI 的时机非常重要。已有研究证实 NSCs 移植治疗 SCI 的最佳时间为 SCI 后 1~2 周^[3,4]。因此,我们选择在脊髓挫伤模型制备后第 9 天进行 hNSCs 的移植以试图达到最佳效果。我们发现移植的 CM-DiI 标记的 hNSCs 可以存活达 2 个月之久,特异性抗体免疫组织化学染色显示移植后第 28 天可检测到 GFAP 阳性的星形胶质细

胞、MAP2 阳性的神经元及 CNPase 阳性的少突胶质细胞的分化,即使到移植后第 56 天仍可检测到对损伤脊髓功能修复有重要作用的 hfNSCs 源性的少突胶质细胞,与相关的文献报道^[3,4]一致。本研究结果不但证实了亚急性期(损伤后第 9 天) NSCs 移植有助于其在损伤局部的存活及分化,同时还提示亚急性期移植可有效抑制 SCI 慢性期(伤后 60d 之后) NSCs 向星形胶质细胞的分化,从而使胶质瘢痕的形成减少。

NSCs 移植正在从实验室向临床应用过渡,人源性 NSCs 无疑是未来 SCI 细胞治疗的最佳选择。深入探讨 hfNSCs 移植治疗 SCI 的确切机制非常重要。本研究发现从人胚胎侧脑室下区分离、培养的 NSCs 在体外具有自我更新及多向分化能力,且移植到大鼠 SCI 部位后,其分化形成的少突胶质细胞可以存活 2 个月之久。值得注意的是 hfNSCs 虽然在移植后第 28 天出现向神经元分化,但在移植后第 56 天未检测到 hfNSCs 源性的神经元,说明 hfNSCs 源性的神经元不能在损伤脊髓局部长期存活,而与移植后第 28 天相比 hfNSCs 源性的少突胶质细胞的数量在移植后第 56 天未见明显下降,且免疫组织化学染色显示在移植后第 56 天损伤区可见大量 MBP 阳性的人源性髓鞘再生。扫描电子显微镜观察证实在移植后第 56 天移植组损伤局部有完整和连续的髓鞘形成,而对照组损伤局部髓鞘则呈断裂及畸形表现。本研究中, hfNSCs 移植后第 28 天 SCI 大鼠后肢运动功能较对照组有所改善,这一趋势至移植后第 42 及 56 天时更加明显。据此,我们推断损伤区脊髓髓鞘再生是 hfNSCs 延迟移植促进 SCI 大鼠运动功能恢复的基础。

4 参考文献

1. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury[J]. Spine, 2001, 26(24 Suppl):2-12.
2. Kabatas S, Teng YD. Potential roles of the neural stem cell in the restoration of the injured spinal cord: review of the literature[J]. Turk Neurosurg, 2010, 20(2):103-110.
3. Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, et al. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury [J]. Semin Cell Dev Biol, 2003, 14(3):191-198.
4. Li Y, Zhang WM, Wang TH. Optimal location and time for neural stem cell transplantation into transected rat spinal cord [J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(3):407-414.
5. 黄霖, 唐勇, 沈慧勇, 等. 通用型脊髓打击器的研制与脊髓损伤动物模型的建立[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(9):688-693.
6. Iwatsuki K, Yoshimine T, Kishima H, et al. Transplantation of olfactory mucosa following spinal cord injury promotes recovery in rats[J]. Neuroreport, 2008, 19(13):1249-1252.
7. Lathia JD, Rao MS, Mattson MP, et al. The microenvironment of the embryonic neural stem cell: lessons from adult niches [J]? Dev Dyn, 2007, 236(12):3267-3282.
8. Booth BW, Mack DL, Androutsellis TA, et al. The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(39):14891-14896.
9. Ricci VL, Casalbore P, Petrucci G, et al. Influence of local environment on the differentiation of neural stem cells engrafted onto the injured spinal cord[J]. Neurol Res, 2006, 28(5):488-492.
10. Tom VJ, Sandrow HR, Miller K, et al. Combining peripheral nerve grafts and chondroitinase promotes functional axonal regeneration in the chronically injured spinal cord [J]. J Neurosci, 2009, 29(47):14881-14890.

(收稿日期:2011-07-05 修回日期:2011-09-26)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)