

• 论 著 •

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01009

人骨髓间充质干细胞脑内移植对大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

樊建玲¹, 来晓瑜¹, 黄黎², 王艳³, 曹军丽¹, 黄河^{1*}

1. 浙江大学医学院附属第一医院骨髓移植中心, 杭州 310003

2. 金华市人民医院血液科, 金华 321000

3. 浙江中医药大学附属第一医院儿科, 杭州 310053

[摘要] 目的: 观察人骨髓间充质干细胞(hMSCs)移植对缺氧缺血性脑损伤幼年大鼠脑功能影响及其在脑组织中的迁移、分化过程, 探讨hMSCs移植对缺氧缺血性脑损伤的保护作用, 为后续研究奠定基础。方法: 大鼠随机分为hMSCs移植组($n=18$)、移植对照组($n=18$)、模型组($n=6$)和假手术组($n=6$)。前3组均建立幼年Wistar大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)模型, 3 d后hMSCs移植组缓慢注射约 5×10^5 个hMSCs至大鼠的左背侧海马, 移植对照组注射等体积的磷酸盐缓冲液, 假手术组和模型组未移植。其中hMSCs移植组和移植对照组又随机分为5组, 分别于移植后0 d、3 d、1周、2周(均 $n=3$)和4周($n=6$)处死。模型组与假手术组均于造模后31 d(即移植后4周)处死。大鼠处死前均行交替电刺激Y迷官行为学实验, 处死后取脑组织行H-E染色观察病理变化; hMSCs移植组和移植对照组大鼠同时还行免疫组化染色检测hMSCs在脑内的分布。结果: 免疫组化结果显示hMSCs移植后1周主要沿脑室系统迁移, 部分沿胼胝体向对侧迁移, 移植后4周细胞沿脑室向周围实质迁移, 广泛分布于脑组织。Y迷官实验显示hMSCs移植组总错误次数(TE)明显少于移植对照组(5.00 ± 2.82 vs 12.67 ± 3.72), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示hMSCs移植组大鼠空间记忆能力显著优于移植对照组。H-E染色结果显示hMSCs移植组大鼠脑组织损伤较移植对照组及模型组轻。结论: hMSCs脑内移植后可在大鼠中枢神经系统内存活并迁移, 且hMSCs移植能在一定程度上促进损伤脑组织和脑功能的恢复, 值得进一步研究。

[关键词] 人骨髓间充质干细胞; 细胞移植; 缺氧缺血; 脑

[中图分类号] R 743 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1009-06

Protective effect of intracerebral transplantation of human mesenchymal stem cells on hypoxic-ischemic brain damage in rats

FAN Jian-ling¹, LAI Xiao-yu¹, HUANG Li², WANG Yan³, CAO Jun-li¹, HUANG He^{1*}

1. Bone Marrow Transplantation Center, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University, School of Medicine, Hangzhou 310003, China

2. Department of Hematology, The People's Hospital of Jinhua, Jinhua 321000

3. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, Zhejiang Traditional Chinese Medicine University, Hangzhou 310053

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the migration, differentiation and the therapeutic effect of intracerebral transplantation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) after hypoxic-ischemic brain damage in rats, and to test whether three anti-hMSCs monoclonal antibodies prepared by our group can detect hMSCs in rat brains. **Methods:** hMSCs were isolated and purified by density gradient centrifugation and adherence to culture flask. Cells of passage 3-5 were prelabeled with bromodeoxyuridine (BrdU) for 72 h before transplantation. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) were built with 1 month old Wistar rats. Three days after hypoxia-ischemia, HIBD rats in hMSCs-treated group ($n=18$) received intracerebral transplantation of 5×10^5 hMSCs. In control group ($n=18$) HIBD rats received phosphate buffered saline of the same volume. In sham-operated group ($n=6$) and HIBD group ($n=6$), rats did not receive any transplantation. Rats in hMSCs-treated group and control group were allowed to survive for 0 day, 3 days, 1 weeks, 2 weeks (all $n=3$) and 4 weeks ($n=6$, after transplantation).

[收稿日期] 2008-04-17 **[接受日期]** 2008-07-20

[基金项目] 浙江省医学重点学科“组织工程学”, 浙江科技厅重大科技攻关项目(2006C13022). Supported by Medical Key Discipline of Zhejiang Province “Tissue Engineering” and Science and Technology Key Project of the Science and Technology Committee of Zhejiang Province (2006C13022).

[作者简介] 樊建玲, 硕士, 住院医师, 现在第二军医大学长征医院血液科工作, 邮编: 200003. E-mail: jlfan2005@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0571-87236706, E-mail: hehuangyu@126.com

Rats in sham-operated group and HIBD group were allowed to survive for 31 days (4 weeks after transplantation). Rats of all the 4 groups received behavior test (alternative electro-stimulus Y-maze) 4 weeks after transplantation before sacrificed; their brains were sectioned for H-E staining. The brains from all rats were also prepared for immunohistochemistry analysis to detect the distribution of hMSCs. **Results:** Immunohistochemistry results showed that hMSCs migrated mainly along the ventricular system 1 week later, and a few hMSCs migrated along the corpus callosum to the opposite side. Four weeks after transplantation, hMSCs migrated to the parenchyma and distributed throughout the cerebrum. Behavior test showed that the total errors (TE) in hMSCs-treated group ($TE = 5.00 \pm 2.82$) were significantly less than those in the control group ($TE = 12.67 \pm 3.72, P < 0.05$). H-E staining showed that the brain damage in the hMSCs-treated group was slighter than that of the control group and HIBD group. **Conclusion:** After transplanted in the brain of rats, hMSCs can survive and migrate in the central nervous system (CNS). hMSCs can promote tissue repair and functional recovery of rat brain, suggesting that hMSCs might be a possible treatment for hypoxic-ischemic brain damage.

[KEY WORDS] human mesenchymal stem cells; cell transplantation; hypoxia-ischemia; brain

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9): 1009-1014]

成体骨髓中除造血干细胞外还存在另一种多向分化潜能的干细胞,即骨髓间充质干细胞,又称骨髓基质细胞(MSCs)^[1-2],被认为主要是一种造血支持细胞,能不断更新非造血组织^[2]。近年来研究^[3-4]发现,成年大鼠和人源性 MSCs 在体外能分化为神经元。进一步研究^[5-7]发现,将 MSCs 移植到局灶性脑损伤大鼠的脑内能存活、迁移,部分细胞分化为神经元和神经胶质细胞,并能在一定程度上促进脑功能恢复。上述结果提示 MSCs 可用于治疗神经退行性疾病、脑外伤、脑缺血等神经系统疾病。且其具有取材方便、体外培养易扩增、生物学特性稳定、免疫原性低及不受伦理道德的限制等优点,应用优势显著高于胚胎干细胞和神经干细胞,成为目前组织工程和再生医学研究的一个新热点。

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是围产期窒息中常见的中枢神经系统疾病,缺血时间较长者易导致严重并发症,甚至死亡,存活患儿往往遗留脑瘫、智力受损等严重后遗症,临床缺乏较好的治疗手段^[8]。缺氧缺血(HI)诱导的脑损伤是一种弥漫性、进行性的神经元坏死和神经元程序性死亡,短期的缺氧缺血可导致神经功能受损,而长期的损伤则可能导致永久性神经功能缺陷^[9-10]。目前仍缺乏针对性的有效治疗手段,主要采取以支持治疗为主的综合疗法,效果往往欠佳。为进一步探寻缺氧缺血性脑病的有效治疗方法,本研究以缺氧缺血性脑损伤幼年大鼠为模型,尝试将成人骨髓间充质干细胞(hMSCs)定位注射到损伤大鼠脑内,初步观察多向分化潜能的hMSCs在幼年大鼠弥漫性脑损伤微环境下的存活情况及其对缺氧缺血相关脑损伤修复的影响。

1 材料和方法

1.1 hMSCs 的分离培养与标记 hMSCs 的分离培

养与鉴定参照文献^[11]。hMSCs(3~5代)约60%融合时加BrdU(5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷, Sigma公司)至终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$ ^[6],继续培养72h后,胰酶消化收集细胞。取约 1×10^6 个细胞制备细胞团,石蜡包埋、连续切片,行免疫细胞化学染色检测BrdU的标记率,以同一批未掺入BrdU的hMSCs细胞团作阴性对照。其余细胞调整密度为 $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ 备用。

1.2 动物来源及分组 幼年Wistar大鼠(浙江中医学院动物实验中心提供)52只,雄性,体质量90~110g(相当于1个月龄)。术中因麻醉死亡2只,混合性气体中缺氧死亡2只。余48只随机分成4组:hMSCs移植组($n=18$)、移植对照组($n=18$)、模型组($n=6$)和假手术组($n=6$)。其中hMSCs移植组和移植对照组又随机分为5组分别于移植后0d、3d、1周、2周(均 $n=3$)和4周($n=6$)处死。模型组与假手术组均于造模后31d(即移植后4周)处死。

1.3 缺氧缺血性脑损伤(HIBD)大鼠模型的制备及鉴定 幼年大鼠HIBD模型的建立参照新生大鼠HIE模型制备方法^[12]。hMSCs移植组、移植对照组和模型组3组大鼠制备HIBD模型。以 0.4 mg/kg 腹腔注射水合氯醛麻醉,游离并结扎左侧颈总动脉,缝合切口,放回笼中休息2h,再放入2500L密闭容器中通入混合性气体($8\% \text{ O}_2 + 92\% \text{ N}_2$)2.5h,放回笼中继续喂养,3d后行细胞移植。假手术组大鼠麻醉后只分离左颈总动脉不结扎,休息2h后在同一容器中放置2.5h不予缺氧。随机取3只制备好的HIBD模型大鼠,1d后取模型大鼠脑组织,行H-E染色,光学显微镜下观察病理学变化,与健康大鼠脑组织($n=3$)进行对比。造模结束后,大鼠固定向结扎血管侧旋转和结扎对侧瘫痪是模型成功的标志。

1.4 hMSCs 脑内移植 参照 Paxinos 等^[13]的大鼠脑立体定位图谱,选 hMSCs 移植组大鼠前囟后 3.8

mm、左2 mm、硬膜下2.5 mm和前囟后3.8 mm、左3 mm、硬膜下2.5 mm为注射点(背侧海马)。将麻醉大鼠固定至立体定向仪上,切开头正中皮肤,暴露颅骨,定位后用微型牙科钻打一小孔,每个位点移植 $5\ \mu\text{l}$,细胞数约为 5×10^5 个,以 $1\ \mu\text{l}/\text{min}$ 缓慢注入,留针5 min,缓慢退出针头,术毕用骨蜡封住小孔,缝合皮肤。移植后剩余的细胞锥虫蓝染色检测存活细胞的比例。移植对照组大鼠在相应的位点注射等体积磷酸盐缓冲液(PBS);模型组和假手术组大鼠不移植。术毕各组大鼠均未使用免疫抑制剂。

1.5 移植后大鼠行为学的观察 Y迷宫实验是较常用的一种评价大鼠空间记忆能力的行为学试验,能初步评估大鼠海马的损伤情况。hMSCs移植组、移植对照组、模型组和假手术组大鼠于移植后4周(造模后31 d)处死前参考文献^[14]采用单盲法进行交替电刺激Y迷宫实验(Y迷宫为张家港市生物医学仪器厂产品)。实验分两天进行,第1天为训练阶段,第2天为记忆阶段,每天进行40次尝试,以第2天动物选择错误次数(total errors, TE)作为评价大鼠记忆能力的指标。

1.6 移植后大鼠脑组织病理学观察

1.6.1 标本获取及H-E染色 各组大鼠分别于相应时间点灌流处死,立即取脑,浸入4%多聚甲醛固定过夜。冠状切取注射点前后1 mm脑组织,常规脱水,透明,浸蜡,包埋, $4\ \mu\text{m}$ 连续冠状切片,保存备用。移植后4周,4组大鼠每只标本每隔10张切片取1张共5张行H-E染色,光学显微镜下观察病理学改变。

1.6.2 免疫组化染色 将收集的脑组织连续切片,采用Evision二步法进行免疫组化染色。二甲苯脱蜡,乙醇水化,3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶10 min,抗原修复,山羊血清封闭 37°C 10 min,一抗(抗BrdU单克隆抗体,福州迈新生物技术有限公司) 4°C 过夜或 37°C 2 h,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG二抗(北京中山生物技术有限公司), 37°C 1 h。二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。免疫组化以PBS替代一抗作为空白对照,以未注射hMSCs大鼠脑组织作为阴性对照,胞核呈棕黄色的为阳性细胞。

1.7 统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件进行分析,常规进行方差齐性检验、正态性检验,计量资料实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多个样本均数的两两比较采用单因素方差分析及Bonferroni *t*检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hMSCs的分离培养 原代细胞经72 h首次换液,hMSCs梭形贴壁,呈散在的多个集落分布,7~10 d细胞迅速增生,贴壁细胞呈漩涡状、网状、辐射状排列生长,培养至2~3周时贴壁细胞接近80%~90%融合。细胞传代后生长迅速,增生快,大约7~10 d达到完全融合,形态为均一的梭形。掺入BrdU 3 d后移植前hMSCs仍呈梭形。

2.2 大鼠HIBD模型的制备及鉴定结果 Wistar大鼠缺氧后3 min呈洗脸状,5 min后开始登高,10 min后出现发绀,呼吸加深加快,20 min活动明显减少,出现嗜睡现象。HIBD后1 d脑组织切片行H-E染色,光学显微镜下见弥漫性神经元坏死,以结扎同侧(左侧)皮质和海马损伤最为严重,大量神经元坏死(胞体缩小、尼氏小体消失、胞质呈嗜酸性、核固缩浓染),神经毡疏松、空泡形成(图1)。

2.3 移植细胞成活率的检测结果 移植后对剩余细胞进行锥虫蓝染色,结果显示hMSCs细胞存活率在90%以上。

2.4 移植后大鼠行为学检测结果 移植后4周,Y迷宫实验结果显示:hMSCs移植组和假手术组总错误次数(TE)分别为 5.00 ± 2.82 和 4.17 ± 1.17 ,显著少于移植对照组和模型组(12.67 ± 3.72 和 11.83 ± 3.31),差异有统计学意义($P<0.05$)。结果表明hMSCs移植组大鼠的空间记忆能力显著优于移植对照组,提示hMSCs移植组大鼠海马损伤修复程度显著优于移植对照组。

2.5 移植后大鼠病理学观察结果

2.5.1 大体观察 移植后4周,大体上肉眼可见移植对照组和模型组大鼠左侧脑萎缩或部分皮质缺如(图2A,2B),hMSCs移植组和假手术组大鼠脑组织均未见明显异常(图2C,2D)。

2.5.2 H-E染色 光学显微镜下可见,移植对照组与模型组大鼠脑皮质破坏严重,大量神经元坏死,毛细血管扩张充血、渗血,神经毡疏松、空泡形成,海马CA1区甚至整个海马结构紊乱,空洞形成,大量胶质细胞增生(图3A~3D);hMSCs移植组(图3E,3F)大鼠皮质和海马也有部分坏死神经元,且多于假手术组(图3G,3H),但结构正常,无空泡。

2.6 免疫细胞化学和免疫组织化学染色

2.6.1 免疫细胞化学染色 BrdU染色,胞核呈棕黄色的为阳性细胞。随机从3个标本中各取1张切片,每张切片随机选取5个高倍视野,Image J 1.34图像分析软件计算掺入率为50.94%(图4)。

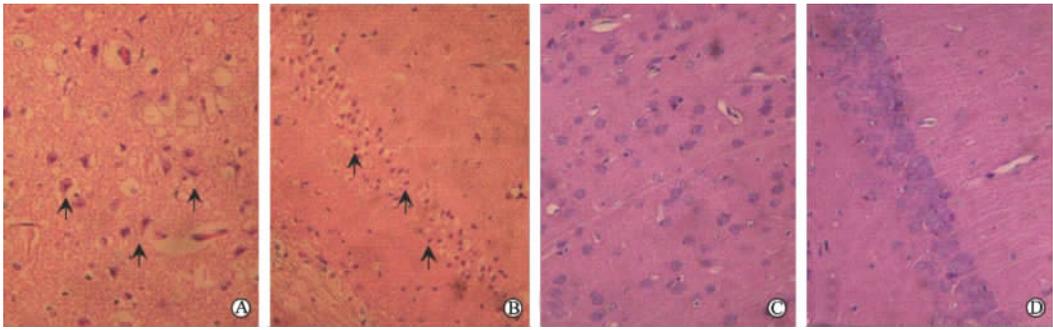


图1 大鼠 HIBD 模型 H-E 染色鉴定结果

Fig 1 H-E staining of HIBD rat brain slices

A: 1 d after HIBD, bulks of neuron necrosis is seen in the cortex; there were Nissl's body disappearance, karyopycnosis, kytoplasm acidophily, neuropil raritas and vacuolization. B: 1 d after HIBD, much neuron necrosis is seen in the CA1 area of hippocampus. C: The cortex of normal rats. D: The CA1 area of hippocampus of normal rats. Arrows in A and B indicate the necrotic neurons. Original magnification: ×400

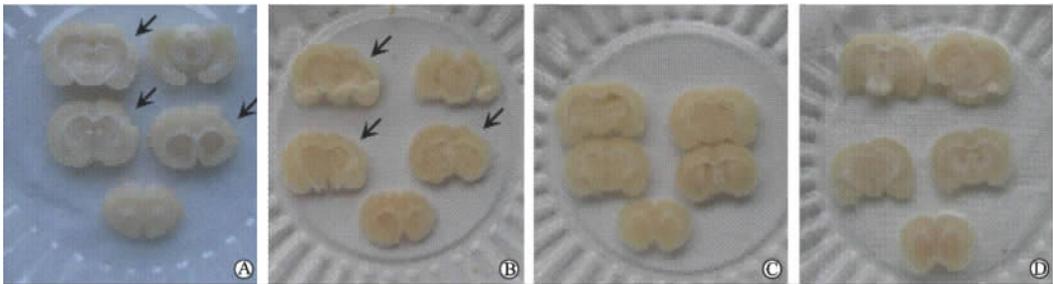


图2 移植后4周大鼠脑组织大体切片观察

Fig 2 Brain sheets of rats 4 weeks after transplantation

A: HIBD group, a part of cortex absent in the ligature side; B: Control group, cerebral atrophy in the ligature side; C: hMSCs-treated group, the injection trace on the hippocampus can be seen, and brain structure is normal; D: Sham-operated group, the brain structure is normal. Arrows in A and B indicate the areas of cortex absence or atrophy. HIBD: Hypoxic-ischemic brain damage

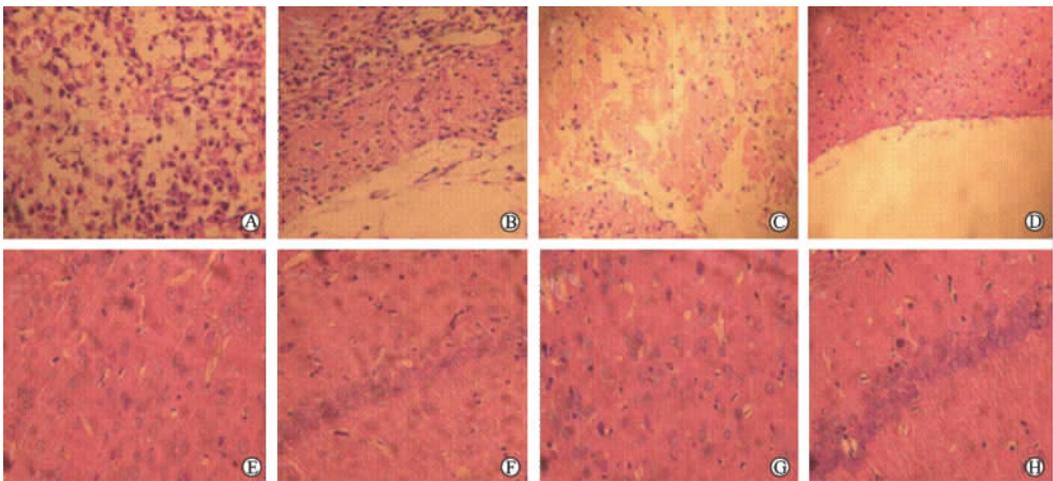


图3 移植后4周大鼠脑皮质和海马组织 H-E 染色结果

Fig 3 H-E staining of rat brain cortex and hippocampus 4 weeks after transplantation

A, B: HIBD group; C, D: Control group; E, F: hMSCs-treated group; G, H: Sham-operated group. A, C, E, G: The cortex of rats; B, D, F, H: The CA1 area of hippocampus. A-D: A bulk of neuron necrosis is seen; there was Nissl's body disappearance, karyopycnosis, neuropil raritas and vacuolization; E-H: A little neuron necrosis, but the constitution is normal. Original magnification: ×400

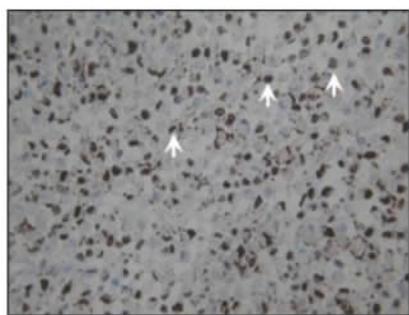


图4 细胞团 BrdU 免疫组化染色

Fig 4 Immunohistochemical staining of BrdU (DAB)

Arrows indicate positive cells. Original magnification: $\times 400$

2.6.2 免疫组织化学染色 BrdU 染色结果示 hMSCs 移植后 0 d, BrdU 阳性细胞集中于注射局部(图 5A); 移植后 3 d, 仍有部分阳性细胞位于局部, 但较分散(图 5B)。hMSCs 移植 1 周后开始出现在侧脑室, 第三脑室内, 室管膜上、下区, 脉络膜上。hMSCs 移植 2 周后, 上述部位阳性细胞增多, 同时皮质、海马颗粒下层出现阳性细胞。hMSCs 移植 4 周后, BrdU 阳性细胞弥漫分布于整个大脑, 以脑室周围、皮质、海马、丘脑、纹状体较多。

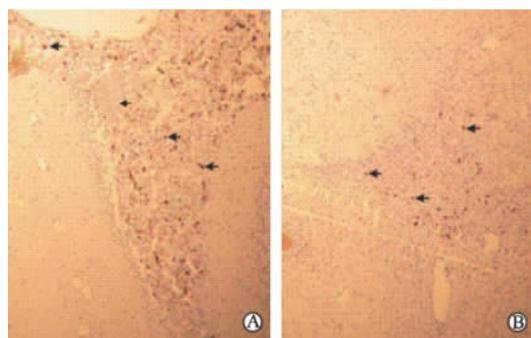


图5 移植后 0 d(A)、3 d(B) BrdU 免疫组化染色

Fig 5 IHC staining of BrdU in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections, 0 day(A) and 3 days(B) after transplantation (DAB)

Arrows indicate positive cells. Original magnification: $\times 100$

3 讨论

MSCs 是一种干细胞, 在微环境作用下能向各个胚层的细胞分化, 具有取材方便、免疫原性低等特点, 近年来成为细胞、基因工程和再生医学研究的热点。Azizi 等^[15]将 hMSCs 直接注射至健康大鼠一侧纹状体内, 发现移植后 5~30 d hMSCs 逐渐增多、迁移途径类似大鼠神经干细胞。Irons 等^[5]将绿色荧光蛋白(GFP)标记的小鼠来源的 MSCs 注射至正

常或局灶性脑梗死大鼠脑内的纹状体, 用或不用免疫抑制剂, MSCs 在大鼠脑内免疫反应性均较弱, 均能存活、迁移、突起形成, 但 MSCs 在局灶性脑梗死大鼠脑内迁移能力较在正常大鼠脑内强。本研究将 hMSCs 移植入免疫功能健全的 Wistar 大鼠脑内, 未使用免疫抑制剂, 同样未发生由于免疫排斥而引起的大鼠死亡, 也未引起肿瘤发生, hMSCs 在大鼠脑内至少能存活 4 周以上。这一方面与 hMSCs 天然无免疫原性, 不表达 HLA II 类分子、FAS 配体和共刺激分子如 B7-1、B7-2、CD40L 等有关; 另一方面, 可能也与脑组织免疫反应性较低有关。

Onodera 等^[16]发现, 海马 CA1 区对缺氧缺血损伤较敏感。本研究结果表明, 缺氧缺血性脑损伤大鼠主要以结扎一侧(左侧)皮质、海马损伤为主的弥漫性损伤。hMSCs 移植后 0 d~4 周细胞分布逐渐弥散, 但以结扎一侧的皮质、海马、室管膜为主。结果提示移植细胞不仅能在大鼠脑内长期存活, 且至少有部分细胞能不断复制、增殖, 迁移至损伤部位。

移植后 1 周, hMSCs 首先出现在脑室系统而后在整个大脑弥漫性分布。由于本研究选择左背侧海马为注射点, 针道途经胼胝体与海马交界的脑室间隙, 可能部分细胞进入脑室, 随脑脊液循环分布于各脑室。另外本研究制备的缺氧缺血性脑损伤模型主要以左侧皮质、海马为主的弥漫性损伤, 因而部分解释了实验中所观察到移植后 4 周细胞沿脑室向周围实质广泛迁移。同时本研究还发现, 少量 hMSCs 位于血管内皮及周围, hMSCs 可能直接分化为血管内皮细胞参与脑内微循环的修复或 hMSCs 中包含部分内皮干细胞。

目前 MSCs 移植用于各种神经退行性疾病动物模型, 包括帕金森病、缺血性脑损伤等, 均证实有改善脑功能缺陷上有显著疗效。Koh 等^[17]将人脐血来源的 MSCs 移植至缺血性脑卒中的大鼠脑内, 能显著提高运动神经的功能, 减少梗死灶。海马 CA1 区被认为是与空间学习记忆有关的重要脑区之一^[18]。本研究通过改良的 Y 迷宫实验发现, hMSCs 移植后 4 周大鼠的空间记忆能力显著改善。MSCs 作用首先可能是 hMSCs 分化为神经元后的替代治疗^[6]; 其次, 可能由于 hMSC 移植后, 脑内多种营养因子, 如神经生长因子(NGF)、脑源性生长因子(BDNF)、胰岛素样生长因子(IGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胎盘生长因子(PLGF)等分泌增加^[19-21]。因此, hMSCs 可能在宿主脑内分泌这些因子保护脑神经元, 改善微循环, 诱导内源性神经细胞增殖, 促进损伤部位神经纤维

再生^[7,22-25]。此外,hMSCs 还可能通过促进内源性神经干细胞的动员,进行自我修复。

综上所述,hMSCs 是一种治疗缺氧缺血性脑损伤极具潜力的替代细胞,为神经系统疾病的治疗开辟了广阔前景,但植入的 hMSCs 是否能长期存活并与宿主脑组织整合以及其确切的作用机制还有待深入研究。

(志谢 本研究中免疫组化实验得到浙江大学医学院附属第一医院病理科丁伟老师的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢!)

[参考文献]

- [1] Friedenstein A J, Petrakova K V, Kurolesova A I, Frolova G P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues[J]. Transplantation, 1968, 6:230-247.
- [2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284:143-147.
- [3] Black I B, Woodbury D. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons[J]. Blood Cells Mol Dis, 2001, 27:632-636.
- [4] Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo J M, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells; switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype [J]. Stem Cells, 2005, 23:392-402.
- [5] Irons H, Lind J G, Wakade C G, Yu G, Hadman M, Carroll J, et al. Intracerebral xenotransplantation of GFP mouse bone marrow stromal cells in intact and stroke rat brain: graft survival and immunologic response[J]. Cell Transplant, 2004, 13:283-294.
- [6] Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. J Neurol Sci, 2001, 189(1-2):49-57.
- [7] Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain[J]. Neurosurgery, 2004, 55:1185-1193.
- [8] Abend N S, Licht D J. Predicting outcome in children with hypoxic ischemic encephalopathy [J]. Pediatr Crit Care Med, 2008, 9:32-33.
- [9] Guan J, Miller O T, Waugh K M, McCarthy D C, Gluckman P D, Gunn A J. TGF beta-1 and neurological function after hypoxia-ischemia in adult rats [J]. Neuroreport, 2004, 15:961-964.
- [10] Mishima K, Ikeda T, Aoo N, Takai N, Takahashi S, Egashira N, et al. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment[J]. Neurosci Lett, 2005, 376:194-199.
- [11] 罗依, 梁彬, 余勤. 成人骨髓间充质干细胞体外培养扩增及其生物学特性研究[J]. 浙江医学, 2003, 25:468-469, 473.
- [12] Jansen E M, Low W C. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats[J]. Behav Brain Res, 1996, 78:189-194.
- [13] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. 2nd ed. New York: Academic Press, Inc., 1997: C X X VIII-CLX.
- [14] 余建, 黄育文, 陈忠. 经过改良的评价大鼠空间记忆能力的交替电刺激 Y 型迷宫 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2003, 32:121-125, 140.
- [15] Azizi S A, Stokes D, Augelli B J, DiGirolamo C, Prockop D J. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:3908-3913.
- [16] Onodera H, Sato G, Kogure K. Lesions to Schaffer collaterals prevent ischemic death of CA1 pyramidal cells [J]. Neurosci Lett, 1986, 68:169-174.
- [17] Koh S H, Kim K S, Choi M R, Jung K H, Park K S, Chai Y G, et al. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats[J]. Brain Res, 2008, 1229:233-248.
- [18] Hartman R E, Lee J M, Zipfel G J, Wozniak D F. Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats [J]. Brain Res, 2005, 1043(1-2):48-56.
- [19] 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]. J Neurotrauma, 2004, 21:33-39.
- [20] Zhang J, Li Y, Chen J, Yang M, Katakowski M, Lu M, et al. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells [J]. Brain Res, 2004, 1030:19-27.
- [21] Liu H, Honmou O, Harada K, Nakamura K, Houkin K, Hamada H, et al. Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia [J]. Brain, 2006, 129(Pt 10):2734-2745.
- [22] Li Y, Chen J, Chen X G, Wang L, Gautam S C, Xu Y X, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat; neurotrophins and functional recovery [J]. Neurology, 2002, 59:514-523.
- [23] Zhao C P, Zhang C, Wang Y H, Zhou S N, Zhou C, Li W Y, et al. Signals in pathological CNS extracts of ALS mice promote hMSCs neurogenic differentiation *in vitro* [J]. Cell Biol Int, 2007, 31:1428-1435.
- [24] Onda T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis J D. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28:329-340.
- [25] Horita Y, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis J D. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat [J]. J Neurosci Res, 2006, 84:1495-1504.

[本文编辑] 贾泽军