

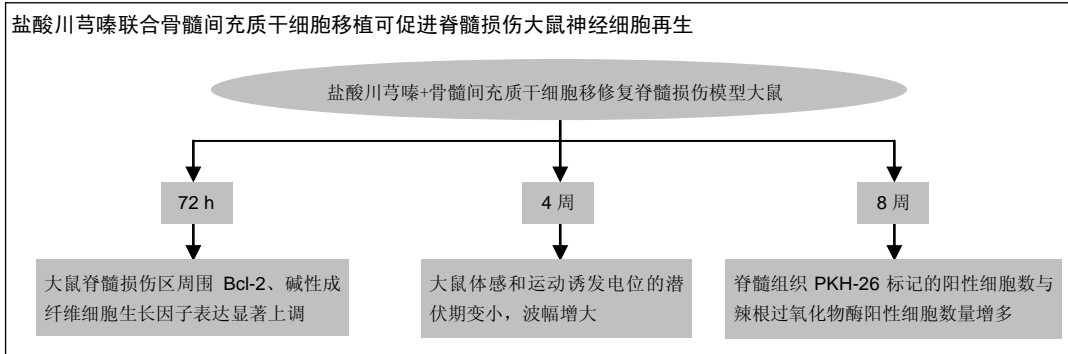
# 盐酸川芎嗪联合骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤模型大鼠的神经保护

吴晓明<sup>1</sup>, 高文山<sup>2</sup>, 王静<sup>1</sup>, 蔡红云<sup>2</sup>(<sup>1</sup>河北大学, 河北省保定市 071000; <sup>2</sup>河北大学附属医院, 河北省保定市 071000)

引用本文: 吴晓明, 高文山, 王静, 蔡红云. 盐酸川芎嗪联合骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤模型大鼠的神经保护[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):95-101.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.017 ORCID: 0000-0003-0928-8330(吴晓明)

文章快速阅读:



吴晓明, 男, 1990年生, 河北省保定市人, 汉族, 河北大学在读硕士。

通讯作者: 高文山, 河北大学附属医院, 河北省保定市 071000

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)01-00095-07

稿件接受: 2015-11-27

http://www.crter.org

文题释义:

**川芎嗪:** 是从伞形科藜本属植物川芎中分离提纯的生物碱单体, 是中药川芎的主要有效成分, 是活血行气祛瘀的一种中药活性生物碱。

**骨髓间充质干细胞分离方法:** ①全骨髓法: 根据干细胞在低血清培养基中有贴壁优势特性, 定期换液除去不贴壁细胞, 从而达到纯化及扩增骨髓间充质干细胞的目的。②密度梯度离心法: 根据骨髓中各细胞成分密度的不同, 分离单核细胞进行贴壁培养。③免疫法: 如流式细胞仪法、免疫磁珠法等对其进行分离纯化。但经过流式或磁珠分选后的细胞出现了增殖缓慢等一些问题, 加之成本较高和技术的难度, 在某种程度上限制了这些方法的广泛应用。

摘要

**背景:** 盐酸川芎嗪具有促进神经修复的作用, 可以应用于神经系统损伤的治疗。

**目的:** 观察盐酸川芎嗪与骨髓间充质干细胞移植联合应用大鼠脊髓损伤后的干预对电生理及后肢功能变化的影响。

**方法:** 采用 Allen 打击法建立 T<sub>9</sub> 脊髓全横断损伤模型大鼠, 建模后随机分为 3 组, 对照组仅尾静脉注射培养液; 骨髓间充质干细胞移植组于尾静脉注射等体积的骨髓间充质干细胞; 联合组尾静脉注射骨髓间充质干细胞 + 尾静脉滴注盐酸川芎嗪, 持续 4 h。造模后 1, 2, 4, 6, 8 周后进行 BBB 评分、改良 Tarlov 评分检测大鼠后肢运动功能恢复情况; 于造模后 72 h 采用 RT-PCR 法检测各组大鼠脊髓损伤区周围 Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子的表达变化; 于造模后 4 周行体感诱发电位和运动诱发电位进行神经电生理恢复程度测定; 造模后 8 周行辣根过氧化物酶示踪评估大鼠脊髓神经纤维的再生状况, 通过 PKH-26 标记观察移植细胞的存活、迁移。

**结果与结论:** 造模后 1, 2, 4, 6, 8 周, 联合组大鼠后肢 BBB 评分、改良 Tarlov 评分联合组明显优于骨髓间充质干细胞移植组, 骨髓间充质干细胞移植组明显优于对照组 ( $P < 0.05$ ), 造模后 72 h, PCR 法检测结果表明联合组中大鼠脊髓损伤区周围 Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子的表达显著高于骨髓间充质干细胞移植组及对照组 ( $P < 0.05$ )。造模后 4 周, 各组体感和运动诱发电位的潜伏期: 联合组 < 骨髓间充质干细胞移植组 < 对照组 ( $P < 0.05$ )。体感和运动诱发电位波幅宽度依次为联合组 > 骨髓间充质干细胞移植组 > 对照组 ( $P < 0.05$ )。造模后 8 周, 骨髓间充质干细胞移植组及联合组有辣根过氧化物酶标记的神经锥体细胞明显的穿越痕迹; 联合组中 PKH-26 标记的阳性细胞数与辣根过氧化物酶阳性细胞数量最多, 骨髓间充质干细胞移植组次之, 对照组相对最少 ( $P < 0.05$ )。研究表明, 盐酸川芎嗪联合骨髓间充质干细胞移植可促进脊髓损伤大鼠神经细胞再生, 促进 Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子基因的表达, 改善肢体运动功能。

**关键词:**

干细胞; 移植; 盐酸川芎嗪; 脊髓损伤; 再生; 骨髓间充质干细胞; 移植; 大鼠; 电生理; Bcl-2; 碱性成纤维细胞生长因子; 功能

**主题词:**

组织工程; 脊髓损伤; 干细胞

**基金资助:**

河北大学医学学科专项基金建设项目(2012B2001)

Wu Xiao-ming<sup>1</sup>, Gao Wen-shan<sup>2</sup>, Wang Jing<sup>1</sup>, Cai Hong-yun<sup>2</sup> (Hebei University, Shijiazhuang 071000, Hebei Province, China; <sup>2</sup>Affiliated Hospital of Hebei University, Shijiazhuang 071000, Hebei Province, China)

Wu Xiao-ming, Studying for master's degree, Hebei University, Shijiazhuang 071000, Hebei Province, China

Corresponding author: Gao Wen-shan, Affiliated Hospital of Hebei University, Shijiazhuang 071000, Hebei Province, China

**Subject headings:** Tissue Engineering; Spinal Cord Injuries; Stem Cells  
**Funding:** the Medical Construction Fund of Hebei University, No. 2012B2001

## Neuroprotection of ligustrazine hydrochloride combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in rats with spinal cord injury

### Abstract

**BACKGROUND:** Ligustrazine hydrochloride which promotes nerve repair can be applied to the treatment of nervous system injury.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of ligustrazine hydrochloride combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on electrophysiological property and hindlimb function of rats with spinal cord injury.

**METHODS:** T<sub>9</sub> spinal cord transection injury models were made in rats using Allen's method, and then rat models were randomized into three groups: rats in control group received tail vein injection of culture solution; rats in cell transplantation group underwent bone marrow mesenchymal stem cell transplantation via the tail vein; rats in combined group were subjected to the tail vein injection of ligustrazine hydrochloride and bone marrow mesenchymal stem cells that lasted for 4 hours. At 1, 2, 4, 6, 8 weeks after modeling, Basso, Beattie and Bresnahan scores and modified Tarlov scores were used to detect the motor function of rats. At 72 hours after modeling, RT-PCR method was used to detect the expression of Bcl-2 and basic fibroblast growth factor around the injured region. At 4 weeks after modeling, somatosensory and motor evoked potentials were measured for evaluation of neurophysiological recovery. At 8 weeks after modeling, horseradish peroxidase tracer was used to assess the regeneration of rat spinal cord nerve fibers; PKH-26 labeling was used to observe the survival and migration of transplanted cells.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 1, 2, 4, 6, 8 weeks after modeling, Basso, Beattie and Bresnahan scores and modified Tarlov scores were significantly higher in the combined group than the cell transplantation followed by the control group ( $P < 0.05$ ). At 72 hours after modeling, the expression of Bcl-2 and basic fibroblast growth factor around the injured region was significantly higher in the combined group than the cell transplantation group and control group ( $P < 0.05$ ). At 4 weeks after modeling, the latencies of somatosensory and motor evoked potentials were ranked as follows: combined group < cell transplantation group < control group ( $P < 0.05$ ); the amplitudes of somatosensory and motor evoked potentials were ranked as follows: combined group > cell transplantation group > control group ( $P < 0.05$ ). At 8 weeks after modeling, horseradish peroxidase-labeled pyramidal cells in the cell transplantation group and combined group showed apparent crossing signs; the number of PKH-26-positive cells and horseradish peroxidase-positive cells was the most in the combined group followed by the cell transplantation group, and was the least in the control group ( $P < 0.05$ ). These findings indicate that ligustrazine hydrochloride combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation can facilitate nerve cell regeneration, promote the expression of Bcl-2 and basic fibroblast growth factor, and improve motor function in rats after spinal cord injury.

**Cite this article:** Wu XM, Gao WS, Wang J, Cai HY. Neuroprotection of ligustrazine hydrochloride combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in rats with spinal cord injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):95-101.

## 0 引言 Introduction

近年来对于脊髓损伤的研究中,较普遍地认为脊髓损伤的原发性损伤以及继发性的水肿、缺血再灌注、氧自由基的形成等导致局部的神经细胞、少突胶质细胞的死亡,是导致病情严重程度的重要因素,目前脊髓损伤的治疗目标主要以减少因原发伤及继发伤导致的神经细胞死亡,最大程度挽救受损的脊髓神经元,最终达到脊髓的神经细胞的修复与重建之目的,具体的临床治疗手段主要以手术减压、药物抗炎消肿及支持为主,以及后期的理疗康复等,但经过上述治疗,仍未明显降低截瘫不良预后的比率<sup>[1]</sup>。

近年来随着干细胞治疗研究的深入及再生医学的不断发展,证实骨髓间充质干细胞兼具强大的增殖潜能与多向分化能力,在体内及体外实验中均能分化为神经细胞<sup>[2-5]</sup>。川芎嗪是从中药川芎中的提取物,其主要有效活性物为一种生物碱,可通过血脑屏障,有抗血小板、扩张小动脉、改善微循环和中枢神经血流之作用,广泛应用于神经科的各种缺血性及创伤性疾病<sup>[3]</sup>,有报道称川芎嗪在体内可增加星形胶质细胞表达胶质纤维酸性蛋白<sup>[4]</sup>,对神经元有保护作用<sup>[5]</sup>,提示其可能对骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤起到促进作用,川芎嗪还可以诱导大鼠骨髓间充质干

细胞向神经样细胞转化<sup>[6]</sup>。

实验旨在观察川芎嗪联合骨髓间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤后电生理及后肢功能变化的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物模型实验。

1.2 时间及地点 2014年2月至2015年3月,于河北医科大学动物实验室完成。

1.3 材料

**实验动物:**健康纯系两三月龄SD大鼠51只,雌雄不限,体质量272-399 g,购自河北医科大学动物实验室,动物质量合格证号:SCXK(冀)20090028,饲养温度20-25℃,正常饮食。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞培养与鉴定 SD大鼠1只麻醉后颈椎脱臼法处死,体积分数75%乙醇浸泡10 min以消毒全身。于无菌条件下行双侧胫骨、股骨取出术,将取出的长骨两端骨端予以剪除,以DMEM-LG培养基(Astarte Biologics公司)冲洗骨髓腔后进行离心分离,用体积分数20%含胎牛血清的DMEM-LG培养基配制单细胞悬液,调

整悬液细胞浓度以 $3 \times 10^7 L^{-1}$ 接种至100 mL培养瓶内, 将培养瓶置于 $37^\circ C$ 、体积分数95%饱和湿度的体积分数5%  $CO_2$ 环境下的孵育箱中进行培养, 24 h后置换培养基, 以清除未贴壁的细胞, 再以每隔两三天置换新鲜的培养液, 然后按1:2比例进行传代。细胞融合达到80%–90%时, 进行下一次传代操作, 下次以1:3比例传代。在多次传代并扩增培养后骨髓间充质干细胞得到不断纯化和扩增。放于倒置相差显微镜下检查及观测培养效果, 应用流式细胞仪鉴定大鼠骨髓间充质干细胞表面抗原表达水平。

**1.4.2 脊髓损伤模型的建立** 大鼠50只, 造模成功45只, 用2.5%氯胺酮经腹腔注射(20 mg/kg)成功麻醉, 俯卧位固定在实验台上, 腰背部去毛备皮, 常规消毒后自背部正中切口, 显露出 $T_{8-11}$ 棘突与椎板, 切除 $T_{9-10}$ 棘突及部分椎板, 将该段脊髓组织显露, 即为损伤区。以改良Allen打击法制模<sup>[7]</sup>, 以10 g重物于4 cm高度自由落体至手术大鼠显露的脊髓组织。

**1.4.3 造模成功标准** 脊髓损伤后鼠尾痉挛性摆动且有后双肢呈迟缓性瘫。确认造模成功者逐层缝合切口。建模后连续3 d进行经腹腔内注射庆大霉素2 000 U/(kg·d), 大鼠制模后常规行促进排便排尿按摩。

**1.4.4 动物分组** 采用随机区组法将造模成功的SD大鼠分为对照组、骨髓间充质干细胞移植组及联合组, 每组15只。造模成功6 h后, 对照组仅尾静脉注射1 mL培养液, 骨髓间充质干细胞移植组尾静脉注射骨髓间充质干细胞( $3 \times 10^6$ 个)悬液1 mL, 联合组注射等体积的骨髓间充质干细胞( $3 \times 10^6$ 个)同时注射盐酸川芎嗪注射液(50 mg/kg)连续用药5 d。

**1.4.5 下肢运动功能评价** 参与实验的大鼠均在术前, 及造模成功后1, 2, 4, 6, 8周进行后肢运动功能评测。

**BBB评分<sup>[8]</sup>:** 将大鼠后肢运动功能分为22个等级, 其中后肢全瘫为0分, 功能完全正常为21分, 主要观察内容包括关节活动数目和范围、负重程度及前后肢协调性、前后爪和尾部活动情况等。

**改良Tarlov评分<sup>[9-10]</sup>:** 0分: 完全瘫痪, 针刺下肢无反应; 1分: 完全瘫痪, 针刺下肢有反应, 但肢体不能活动; 2分: 肢体可活动, 但不能站立或站立不稳; 3分: 可站立, 但无法行走; 4分: 可行走数步, 但不能稳定; 5分: 能缓慢行走, 但不灵活; 6分: 正常行走。

**1.4.6 RT-PCR法检测大鼠脊髓组织Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子mRNA的表达** 于建模后72 h提取大鼠正常及损伤脊髓的总RNA。采用RT-PCR分析Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子在脊髓损伤前后的表达变化。Primer Primer 5.0软件设计引物, 见表1。TRIzol法分别提取5组细胞总RNA, 并反转录为cDNA, 每组细胞设计3个重复孔。PCR引物均由上海生物工程公司合成, 每组均设3个复孔, 实验重复操作3次, RT-PCR的反应条件如下:  $95^\circ C$  预变性5 min,  $95^\circ C$  变性30 s,  $57^\circ C$  退火30 s,  $72^\circ C$  延伸60 s,

共计42个循环。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像仪观测, UVI凝胶成像系统摄像, Image-Pro Plus 7.0软件进行条带灰度值分析, 计算Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子与GAPDH灰度值比值。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)	温度( $^\circ C$ )
GAPDH	上游: 5'-AGT ATG ACT CCA CTC ACG GCA A-3'	100	57
	下游: 5'-TCT CGC TCC TGG AAG ATG GT-3'		
Bcl-2	上游: 5'-CTG GTG GAC AAC ATC GCT CTG-3'	228	57
	下游: 5'-AGC CTC CTC TGC TCT TTC TGC TGG A-3'		
碱性成纤维细胞生长因子	上游: 5'-AGC CTC CTC TGC TCT TTC TGC TGG A-3'	705	57
	下游: 5'-CTT TIG TCT ATG CCC CTG CAG CCT T-3'		

**1.4.7 运动诱发电位与体感诱发电位的检测** 建模后第8周, 于各组取6只大鼠, 依据参考文献<sup>[11]</sup>所示方法采用KEYPOINT 4诱发电位仪进行体感诱发电位和运动诱发电位的测定。以10%水合氯醛经腹腔内注射进行麻醉成功后, 将大鼠置于操作台上, 安装刺激电极于后肢待测。

**体感诱发电位检测:** 于矢状缝和冠状缝交点处头皮下放置记录电极, 记录电极后0.5 cm处头皮下安置参考电极。以直流方波进行电刺激(波宽0.2 ms, 电流5–15 mA, 频率3 Hz), 使其出现后肢轻度抽动, 叠加次数设置为50–60次, 观测并记录体感诱发电位潜伏期与波幅改变, 观测神经电生理的恢复程度。

**运动诱发电位检测:** 安置针状刺激电极于顶冠状缝前2 mm、矢状缝旁2 mm处的头皮下, 刺激强度40 mA, 波宽0.1 ms, 频率1 Hz, 叠加次数300–500次, 扫描速率5 ms/D, 灵敏度5  $\mu V/D$ 。持续观察并记录运动诱发电位潜伏期与波幅改变。

**1.4.8 辣根过氧化物酶神经逆行示踪** 移植后8周, 加入等量生理盐水将辣根过氧化物酶稀释溶解。各组随机选3只大鼠, 水合氯醛腹腔注射后实施脊髓暴露。定位脊髓于 $T_{10}$ 髓背正中静脉外侧1 mm以玻璃微管穿刺进针1.5 mm。于40 min内匀速注射体积分数50%辣根过氧化物酶(Santa Cruz 公司) 1  $\mu L$ , 将微管停留脑内30 min, 封闭切口, 正常饲养3 d。水合氯醛麻醉后, 以温热的40 g/L多聚甲醛+体积分数1.25%戊二醛固定液150 mL进行心脏灌注, 并切取 $T_{3-11}$ 胸髓, 并将其浸泡于 $4^\circ C$ 的体积分数30%葡萄糖溶液中浸泡20 h, 取出脊髓制成30  $\mu m$ 横切面冰冻切片。对切片进行DAB加强染色后以中性树胶封固。光镜下脊髓横切面切片视野中, 记录辣根过氧化物酶阳性的神经锥体细胞数目, 随机抽取各组于不同的时点10张切片, 记录后取其平均值。

**1.4.9 PKH-26标记观察移植细胞的存活与迁移** 移植建模后4周, 每组随机抽取6只大鼠以上述同样方式麻醉后处死, 损伤区脊髓取标本, 对损伤处作组织学检查以观测恢复情况。将损伤区脊髓组织经40 g/L多聚甲醛固定后进行常规制作冰冻切片。将所制作的组织切片苏木精-伊红染色后在荧光显微镜下观察细胞的存活数目以及迁移情况。每张切片在高倍镜(200×)下随机选取10个视野进行观测与计数。对各视野内PKH-26阳性细胞进行计数, 取其均值。

**1.5 主要观察指标** 各组BBB评分、改良Tarlov评分、脊髓损伤区周围Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子基因表达变化, 体感和运动诱发电位变化、脊髓神经纤维的再生状况、移植细胞的存活和迁移情况。

**1.6 统计学分析** 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由第二作者应用SPSS 18.0软件整理分析数据, 组间数据差异的比较采用Student's *t* 检验和重复测量方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 纳入大鼠50只, 均进入结果分析50只, 有死亡和感染5只, 未及时补充, 有脱失值, 最终计入结果分析的数量45只。干预流程图见图1。

**2.2 培养的大鼠骨髓间充质干细胞形态** 骨髓间充质干细胞在培养24 h后, 可见有少许细胞开始贴壁, 多呈成对出现, 多为椭圆形, 折光性强。培养72 h后观测到球形和梭形细胞贴壁生长。培养5 d时, 可见呈梭形、多边形的细胞, 有凸起伸出, 培养瓶骨髓基质细胞数目增多明显, 以形态均一的细胞集落出现。传代至1-3代的细胞可见活跃的增殖状态, 传代第1, 2天可见细胞以单层贴壁生长状态为主, 胞体呈扁平状、梭形及不规则形状, 细胞核及核仁清晰可见, 细胞融合处的生长状态多呈平行或旋涡状。3代的细胞形态比较为均一。流式细胞仪观测结果可见细胞有良好的均一性, 纯度达95%以上。见图2。

**2.3 大鼠后肢运动功能的评价结果** 实验各组大鼠在造模前所进行的BBB评分及改良Tarlov评分均较为相似无显著差异。而在移植后各组间的的BBB评分及改良Tarlov评分差异较为显著, 各组比较大鼠后肢运动功能评价联合组明显优于骨髓间充质干细胞移植组, 骨髓间充质干细胞移植组各项数据均显示优于对照组( $P < 0.05$ ), 见表2。

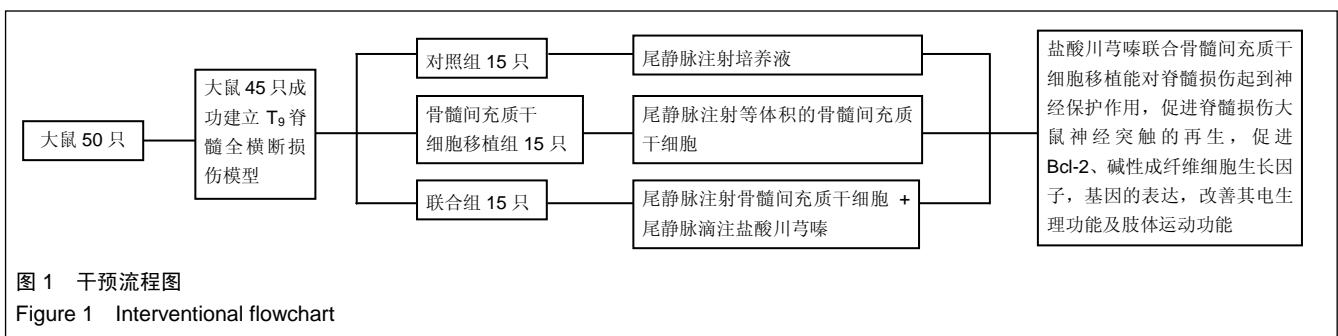
**2.4 大鼠脊髓组织Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子mRNA的表达** RT-PCR结果显示, 大鼠脊髓损伤后, 损伤区周围Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子mRNA的表达水平: 联合组表达水平较骨髓间充质干细胞移植组及对照组明显高( $P < 0.05$ ), 另外, 骨髓间充质干细胞移植组较对照组又显著高 ( $P < 0.05$ ), 见图3。

**2.5 各组体感与运动诱发电位的变化** 大鼠脊髓损伤模型建立成功后, 经随机抽取各组2个实验鼠进行检测, 发现大鼠的体感诱发电位和运动诱发电位的诱发电位波形均显示完全消失。骨髓间充质干细胞移植后4周, 联合组与骨髓间充质干细胞移植组的体感诱发电位和运动诱发电位明显恢复, 波幅可见增高, 而对照组体感诱发电位和运动诱发电位仅稍有恢复迹象, 各组间体感诱发电位和运动诱发电位潜伏期比较: 联合组<骨髓间充质干细胞移植组<对照组 ( $P < 0.05$ ); 波幅比较: 联合组>骨髓间充质干细胞移植组>对照组( $P < 0.05$ ), 见表3。提示电信号从后肢到头皮传导时间联合组较其他两组都短, 传导通路相对顺畅, 可认为有明显的恢复。

**2.6 辣根过氧化物酶神经逆行示踪结果** 辣根过氧化物酶示踪脊髓追踪显示, 骨髓间充质干细胞移植组及联合组有明显的辣根过氧化物酶标记的神经锥体细胞穿越损伤区。对照组注入神经辣根过氧化物酶示踪显色液后2 d, 辣根过氧化物酶示踪显示液被逆行转运, 辣根过氧化物酶阳性标记的神经锥体细胞在T<sub>8</sub>以上节段少有发现, 为(13.15±2.08)个/高倍视野, 见图4A。骨髓间充质干细胞移植组可见有辣根过氧化物酶阳性神经锥体细胞, 其数量较联合组为少, 为(20.63±2.14)个/高倍视野, 但较对照组多, 见图4B。联合组脊髓可见辣根过氧化物酶阳性颗粒标记的神经锥体细胞数目较多, 为(30.75±2.31)个/高倍视野, 见图4C。

脊髓损伤造模后4周, 联合组中辣根过氧化物酶阳性神经细胞数量最多, 骨髓间充质干细胞移植组次之, 对照组相对最少( $P < 0.05$ )。

**2.7 PKH-26标记观察移植细胞的存活状态与迁移情况** 联合组中PKH-26标记的阳性细胞的数量最多: (43.16±2.98)个/高倍视野, 骨髓间充质干细胞移植组次之: (24.37±3.65)个/高倍视野, 而对照组则未有阳性发现, 3组差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图5。



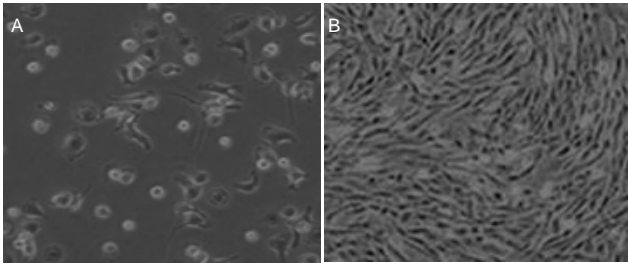


图2 原代与第3代培养的骨髓间充质干细胞形态  
Figure 2 Morphology of primary and passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells  
图注: 图A为原代培养呈椭圆形的骨髓间充质干细胞; B为第3代的细胞骨髓间充质干细胞均一性较好。

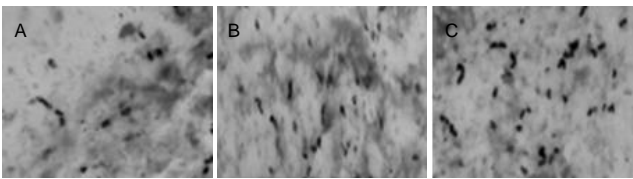


图4 各组辣根过氧化物酶神经逆行示踪结果(x200)  
Figure 4 Horseradish peroxidase retrograde tracing in each group (x200)  
图注: 图A为建模后4周, 对照组辣根过氧化物酶阳性标记的神经锥体细胞在T<sub>8</sub>以上节段少有发现; B为建模后4周, 骨髓间充质干细胞移植组可见有辣根过氧化物酶阳性神经锥体细胞; C为伤后4周联合组辣根过氧化物酶阳性颗粒标记的神经锥体细胞数目较多。

表2 各组各时间点 BBB 评分和改良 Tarlov 评分比较

Table 2 Basso, Beattie and Bresnahan scores and modified Tarlov scores at different time

( $\bar{x} \pm s$ , n=15, 分)

组别	造模前	造模后时间(周)				
		1	2	4	6	8
<b>BBB 评分</b>						
对照组	21.03±0.02	0.00±0.00	1.35±0.07	2.59±0.67	8.54±1.56	11.25±1.37
骨髓间充质干细胞移植组	21.02±0.01	0.00±0.00	1.56±0.05	4.05±1.05	10.45±1.42	12.84±1.44
联合组	21.03±0.03	0.00±0.00	3.58±0.04	6.26±1.07	13.34±1.14	14.89±1.38
<b>改良 Tarlov 评分</b>						
对照组	41.15±1.37	14.50±1.48	15.17±1.25	20.47±2.1	21.77±2.05	24.84±2.16
骨髓间充质干细胞移植组	41.16±1.66	15.45±2.13	17.51±1.26	23.27±2.13	28.96±2.11	33.21±2.03
联合组	41.16±2.24	17.16±1.25	20.32±2.12	24.10±2.24	32.18±2.42	37.14±2.44

表注: 造模前所进行的 BBB 评分及改良 Tarlov 评分无显著差异。移植后各组比较大鼠后肢运动功能评价联合组>骨髓间充质干细胞移植组>对照组(P < 0.05)。

表3 移植后4周各组大鼠体感和运动诱发电位检测 ( $\bar{x} \pm s$ , n=15)  
Table 3 Somatosensory and motor evoked potential measurement at 4 weeks after transplantation

指标	潜伏期(ms)	波幅(μV)
<b>体感诱发电位</b>		
对照组	35.773±1.027	1.422±0.126
骨髓间充质干细胞移植组	26.854±1.015	1.834±0.122
联合组	15.134±0.564	2.134±0.115
<b>运动诱发电位</b>		
对照组	15.827±0.347	1.468±0.131
骨髓间充质干细胞移植组	12.039±0.162	2.230±0.124
联合组	7.837±0.124	4.049±0.155

表注: 各组间体感诱发电位和运动诱发电位潜伏期比较: 联合组<骨髓间充质干细胞移植组<对照组(P < 0.05); 波幅比较: 联合组>骨髓间充质干细胞移植组>对照组(P < 0.05)。

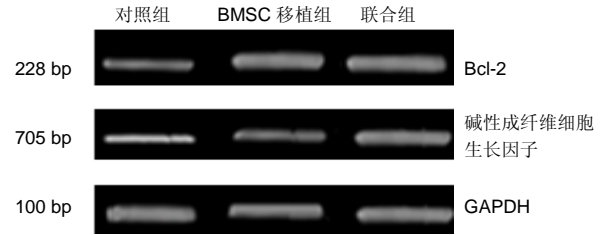


图3 大鼠脊髓组织 Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 的表达  
Figure 3 Expression of Bcl-2 and basic fibroblast growth factor mRNA in the spinal cord of rats

图注: 大鼠脊髓组织 Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 的表达: 联合组>骨髓间充质干细胞移植组>对照组(P < 0.05)。BMSC: 骨髓间充质干细胞。



图5 各组的 PKH26 染色阳性的红色荧光(x200)  
Figure 5 Red fluorescence presents PKH26 positive cells (x200)  
图注: 图中 A 为对照组; B 为骨髓间充质干细胞移植组; C 为联合组。联合组中 PKH-26 标记的阳性细胞的数量最多, 骨髓间充质干细胞移植组次之, 对照组未见。

### 3 讨论 Discussion

骨髓间充质干细胞因其自身取材方便, 体外培养简单, 且排斥反应较弱甚至没有等特点, 成为治疗中枢神经损伤的理想细胞来源<sup>[12-15]</sup>。Friedenstein等<sup>[16]</sup>最早报道由骨髓中分离培养出来骨髓间充质干细胞。骨髓间充质干细胞是来源于骨髓组织中的多能干细胞, 其多向分化的潜能尤为强大, 它可以在相应诱导因素下分化成为多种细胞<sup>[17-18]</sup>。Woodbury等<sup>[19]</sup>首先报道了经化学及生物诱导可以将骨髓间充质干细胞转化为神经元。Tamir等<sup>[20]</sup>发现, 骨髓间充质干细胞可培养出高比例的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞, 说明其具有优异的分化的潜能和较强的增殖力。机体对骨髓间充质干细胞产生的免疫反应很低, 对特异性及非特异性免疫的杀灭作用可以忽略<sup>[21]</sup>。骨髓间充质干细胞以细胞桥的作用刺

激脊髓神经生长, 引导损伤神经再生<sup>[22-23]</sup>。以上骨髓间充质干细胞的这些特点使其成为治疗脊髓损伤的理想供应源<sup>[24-27]</sup>。

川芎嗪有效成分是四甲基吡嗪, 是从中药川芎中提炼分离所得, 具备多种生物和药理活性, 广泛应用于心、脑血管疾病, 并对神经损伤在多个渠道起保护作用<sup>[28]</sup>。川芎嗪在体外可促进血管内皮细胞增殖和再生, 从而改善缺血周围微环境, Kao等研究表明川芎嗪能显著减轻脑缺血再灌注引起的炎症, 考虑川芎嗪的消炎作用可能为神经的保护机制<sup>[29-31]</sup>。

沈正祥等<sup>[32]</sup>经过实验证实川芎嗪可以有效修复脊髓损伤SD大鼠的受损神经元, 并能明显促进大鼠行为功能的恢复。王善金等<sup>[32]</sup>研究发现川芎含有的多种成分对脊髓神经损伤有多重积极影响, 促进了脊髓神经损伤的修复。Sun等<sup>[34]</sup>的研究可以证明川芎嗪能对脊髓损伤有切实的保护作用。

实验结果发现, 对大鼠后肢运动功能的评价联合组明显优于骨髓间充质干细胞移植组, 骨髓间充质干细胞移植组明显优于对照组, 说明骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤的运动功能疗效确切, 而联合川芎嗪治疗后可以使神经功能得到更好地恢复; 联合组中大鼠脊髓损伤区周围Bcl-2、碱性成纤维细胞生长因子的表达显著高于骨髓间充质干细胞移植组及对照组, 证实联合组可产生抑制损伤区的细胞凋亡、促进神经再生的有利微环境; 联合组的神经纤维再生情况及神经电生理恢复情况明显优于其他2组, 表明盐酸川芎嗪联合骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤可以达到相对理想的疗效。其药理作用机制可能为: 修复脊髓微循环损害、抑制细胞凋亡与炎症反应、促进神经营养因子的表达、保护线粒体和纠正细胞内外离子紊乱等<sup>[35]</sup>。考虑到仅依靠干细胞移植治疗脊髓损伤因脊髓损伤后损伤区域神经组织的水肿、缺血、缺氧等引起继发性损伤难以达到预期效果<sup>[36-42]</sup>, 实验联合了盐酸川芎嗪治疗后实验鼠的脊髓损伤恢复程度明显得到提高。

实验结果证实了盐酸川芎嗪联合骨髓间充质干细胞移植治疗对脊髓损伤造模大鼠有促进神经纤维再生、改善局部微环境、抑制炎症反应、促进神经电生理恢复等作用, 较单一骨髓间充质干细胞移植更能促进脊髓神经损伤的修复, 对骨髓间充质干细胞移植有辅助正向推动作用, 可作为有显著确切疗效的方案进一步研究并应用于临床。

综上所述结果说明, 将盐酸川芎嗪与骨髓间充质干细胞移植联合应用可以促进损伤脊髓的功能恢复和神经修复, 为临床治疗脊髓损伤提供新的思路和途径, 有良好的治疗应用前景。

**作者贡献:** 实验设计为吴晓明和高文山。实验实施为王静和蔡红云。实验评估为王静和高文山。资料收集为吴晓明和王静。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**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, 实验方案中有关动物伦理问题已经河北医科大学动物实验室单位实验动物伦理委员会讨论批准。批准号为 SCXK(冀)20090028。

**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:** 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。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] 孙兆忠,李瑞.脐血干细胞移植及电针治疗脊髓损伤大鼠神经生长因子及神经营养因子3的表达[J].中国组织工程研究,2015,19(7):61-66.
- [2] 刘琇,章涛.脊髓损伤治疗研究进展[J].实用医学杂志,2014,30(18):3008-3010.
- [3] 胡国芬,王建平.川芎嗪的药理作用及临床应用进展[J].中国药物与临床,2006,6(10):773-774.
- [4] 王锁良,申小东,王辉,等.川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤后GFAP表达和脑组织水肿的影响[J].神经解剖学杂志,2009,25(4):427-431.
- [5] 马璐,刘文科,张跃康,等.川芎嗪对重型脑损伤组织BDNF, bFGF表达的影响及对神经元的保护作用[J].四川大学学报,2008,9(2):207-210.
- [6] 杜晓鸣,魏会平.川芎嗪对大鼠骨髓间充质干细胞长期诱导效应的研究[J].中国中医药现代远程教育,2012,10(13):157-158.
- [7] Robert M, Trientje B, Mark Jw, et al. Is additional hyperbaric oxygen therapy cost-effective for treating ischemic diabetic ulcers? Study protocol for the Dutch DAMOCLES multicenter randomized clinical trial? J Diabet. 2015;7(1):125-132.
- [8] Nowacki M, Pietkun K, Pokrywczynska M. Filling effects, persistence, and safety of dermal fillers formulated with stem cells in an animal model. Aesthet Surg J. 2014;34(8):1261-1269.
- [9] Lammertse DP. Up date on pharmaceutical trials in acute spinal cord injury. J Spinal Cord Med. 2004;27(4):319-325.
- [10] van Gorp S, Leerink M, Kakinohana O, et al. Amelioration of motor/sensory dysfunction and spasticity in a rat model of acute lumbar spinal cord injury by human neural stem cell transplantation. Stem Cell Res Ther. 2013;4(3):57.
- [11] Albin RL, Mink JW. Recent advances in Tourette syndrome research. Trends Neurosci. 2006;29:175-182.
- [12] 王国玺,王国乾,张树泉.高压氧联合神经干细胞移植脊髓损伤大鼠电生理及后肢功能的变化[J].中国组织工程研究,2015,19(14):2205-2210.
- [13] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review. Mesenchymal stem/multipotent stromal cells. the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. Stem Cells. 2007;25(11):2896-2902.
- [14] Dai G, Liu X, Zhang Z, et al. Comparative analysis of curative effect of CT-guided stem cell transplantation and open surgical transplantation for sequelae of spinal cord injury. J Transl Med. 2013;11:135.



- [15] Lucy J, Norcliffe K, Felicia B, et al. Cyclic vomiting associated with excessive dopamine in Riley-day syndrome. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47(2):136-138.
- [16] Arinze TL. Mesenchymal stem cells for bone repair: preclinical studies and potential orthopedic applications. *Foot Ankle Clin.* 2005;10(4):651-665.
- [17] Zhu H, Yang A, Du J, et al. Basic fibroblast growth factor is a key factor that induces bone marrow mesenchymal stem cells towards cells with Schwann cell phenotype. *Neurosci Lett.* 2014;559:82-87.
- [18] William J, Adams,Guillermo, et al. Novel stem cell-based drug discovery platforms for cardiovascular disease. *J Biomol Screen.* 2012;17(9):1117-11127.
- [19] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bonemarrow stromal cells differentiate into neurons. *Neurosci Res.* 2000;1:57-62.
- [20] Tamir A1, Petrocelli T, Stetler K, et al. Stetler K. Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: a role for p27 in erythroid differentiation coupled G<sub>1</sub> arrest. *Cell Growth Differ.* 2000;5:269-277.
- [21] Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005;1:47-57.
- [22] 李敬花,张红军,卢旻鹏.硫酸软骨素酶ABC联合骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤后神经功能的恢复作用[J].第三军医大学学报,2015,37(2):122-127.
- [23] Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy.* 2005;1:36-45.
- [24] Jung DI, Ha J, Kang BT, et al. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J Neurol Sci.* 2009; 285:67-77.
- [25] 阮智,黄慧.异体骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(36):6729-6732.
- [26] Pal R, Gopinath C. Functional recovery after transplantation of bonemarrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Cytotherapy.* 2010;12:792-806.
- [27] Cizkova D, Novotna I, Slovinska L, et al. Repetitive intrathecal catheter delivery of bone marrow mesenchymal stromal cells improves functional recovery in a rat model of contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2011;28(9):1951-1961.
- [28] Gao HJ, Liu PF, Li PW, et al. Ligustrazine monomer against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res.* 2015; 10 (5): 832-840
- [29] 李虎,万俊,张玲.亚低温、川芎嗪对缺氧缺血性脑病幼鼠脑组织MDA、SOD含量的影响[J].中国医师杂志,2013,15(4):503-504.
- [30] 刘云云,赵兴绪.Ca<sup>2+</sup>信号介导川芎嗪诱导小鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞的定向分化[J].甘肃农业大学学报,2010,45(2): 1-9.
- [31] Tang Q, Han R, Xiao H, et al. Neuroprotective effects of tanshinone IIA and/or tetramethylpyrazine in cerebral ischemic injury in vivo and in vitro. *Brain Res.* 2012;1488: 81-91.
- [32] 沈正祥,吕红斌,李小明,等.川芎嗪对大鼠急性脊髓损伤模型 caspase-3和nf表达的影响[J].中南大学学报(医学版),2008, 33(8):693-699.
- [33] 王善金,夏英鹏,张学利.脊髓损伤的中药治疗研究进展[J].中医正骨,2008,20(2):71-72.
- [34] 孙海燕,贾连顺,陈宣维,等.川芎嗪对大鼠脊髓损伤后神经功能恢复作用的研究[J].颈腰痛杂志,2004,25(6):395-398.
- [35] 肖志满,吕红斌,王华秀,等.川芎嗪促进脊髓损伤修复的研究进展 [J].国际病理科学与临床杂志,2009,29(2):180-184.
- [36] 贾宏伟,李艳英.骨髓间充质干细胞移植联合吡拉西坦修复大鼠脊髓损伤[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(10): 1783-1788.
- [37] Kuyucu E, Bülbül M, Kara A, et al. Is cold therapy really efficient after knee arthroplasty? *Ann Med Surg (Lond).* 2015;4(4):475-478.
- [38] Desteli EE, Imren Y, Aydın N. Effect of both preoperative and postoperative cryochemical treatment on hemostasis and postoperative pain following total knee arthroplasty. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(10):19150-19155.
- [39] Wang F, Zhou Y, Sun J, et al. Influences of continuous femoral nerve block on knee function and quality of life in patients following total knee arthroplasty. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(10):19120-19125.
- [40] Calatayud J, Casaña J, Ezzatvar Y, et al. High-intensity preoperative training improves physical and functional recovery in the early post-operative periods after total knee arthroplasty: a randomized controlled trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016.
- [41] Notte BB, Fazzini C, Mooney RA. Reiki's effect on patients with total knee arthroplasty: A pilot study. *Nursing.* 2016;46(2): 17-23.
- [42] Furu M, Ito H, Nishikawa T, et al. Quadriceps strength affects patient satisfaction after total knee arthroplasty. *J Orthop Sci.* 2016;21(1):38-43.