

# 神经营养素-3基因修饰骨髓间充质干细胞的明胶海绵圆柱体支架移植促进大鼠全横断脊髓损伤部分结构和功能修复的研究\*

卢丽雅<sup>1</sup> 张巍<sup>1</sup> 曾园山<sup>1,2</sup> 曾湘<sup>1</sup> 何兵<sup>1</sup> 黄斯凡<sup>1</sup> 李燕<sup>1</sup>

## 摘要

**目的:**探讨神经营养素-3(NT-3)基因修饰骨髓间充质干细胞(MSCs)的明胶海绵圆柱体支架移植对大鼠全横断脊髓损伤部分结构和功能修复的影响。

**方法:**选取15只SD大鼠,随机分成3组:①NT-3基因修饰MSCs联合明胶海绵圆柱体支架移植组(NT-3-MSCs组);②MSCs联合明胶海绵圆柱体支架移植组(MSCs组);③单纯明胶海绵圆柱体支架移植组(control组)。在脊髓全横断后施行上述支架移植,在一定时间点比较3组动物功能恢复情况及其脊髓损伤区的结构变化。

**结果:**NT-3-MSCs组BBB功能评分、移植的MSCs存活数、神经丝蛋白-200(NF-200)阳性纤维计数和平均空洞面积均优于其余组别( $P<0.05$ )。

**结论:**NT-3基因修饰MSCs联合明胶海绵圆柱体支架移植能够促进大鼠脊髓损伤部分结构和功能的修复,为临床治疗脊髓损伤提供实验依据。

**关键词** 神经营养素-3;骨髓间充质干细胞;明胶海绵圆柱体支架;移植;脊髓损伤;神经纤维再生

**中图分类号:**R338.21,R651.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-07-0603-06

Effects of transplantation of gelatin sponge cylinder scaffold containing neurotrophin-3 NT-3 gene modified bone marrow mesenchymal stem cells on promoting the recovery of partial structure and function of rats with spinal cord complete transection injury/LU Liya, ZHANG Wei, ZENG Yuanshan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(7): 603—608

## Abstract

**Objective:** To explore the effects of transplantation of gelatin sponge cylinder scaffold containing neurotrophin-3 (NT-3) gene modified bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on the recovery of partial structure and function of rats with spinal cord complete transection injury.

**Method:** Fifty SD rats were randomly divided into 3 groups: NT-3-MSCs group, MSCs group and control group. After complete transection of spinal cord, function recovery and morphological changes in each group were recorded and analyzed at certain time points in 8 weeks postoperation.

**Result:** NT-3-MSCs group displayed remarkably better outcomes in BBB scores, number of survival grafted MSCs, and NF-200 positive nerve fibers as well as average cavity area than those in other groups.

**Conclusion:** Transplantation of gelatin sponge cylinder scaffold containing NT-3 gene modified bone marrow MSCs may promote the recovery of partial structure and function of rats with spinal cord complete transection injury. It may provide a strategy for clinical spinal cord injury therapy.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.07.002

\*基金项目:国家自然科学基金(30771143);国家教育部博士点基金(200805581102)

1 中山大学中山医学院组织胚胎学教研室神经科学教研室,广州,510080; 2 通讯作者

作者简介:卢丽雅,女,硕士研究生; 收稿日期:2011-03-09

**Author's address** Division of Neuroscience, Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080

**Key word** neurotrophin-3; bone marrow mesenchymal stem cell; gelatin sponge cylinder scaffold; transplantation; spinal cord injury; nerve fiber regeneration

急性脊髓损伤的主要表现为截瘫或四肢瘫,在目前还没有行之有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。脊髓损伤后存在许多影响功能修复的不利因素,比如损伤区胶质瘢痕、神经元死亡、神经纤维断裂、神经营养因子分泌不足等,因此制定联合治疗策略可能更有利于脊髓损伤后的功能修复<sup>[2]</sup>。我们前期的研究表明,神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)修饰的雪旺细胞在体外能够诱导骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向神经元分化<sup>[3]</sup>。而将NT-3修饰的MSCs移植到脊髓损伤,有助于其功能修复<sup>[4]</sup>。另外,组织工程材料的应用为干细胞分化成神经元及建立突触联系提供了良好的人工神经网络支架<sup>[5]</sup>。近年研究表明<sup>[6-10]</sup>,多孔隙明胶海绵作为细胞移植的支架材料具有较好的组织相容性。因此,本研究应用NT-3基因修饰MSCs联合明胶海绵圆柱体支架一同移植到全横断脊髓损伤处,探讨在这种治疗策略对移植的MSCs存活、神经纤维再生、空洞形成和瘫痪后肢自主活动的影响,为将来临床治疗脊髓损伤提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

本研究选取健康雌性成年SD大鼠15只,220—250g,由中山大学动物实验中心提供。随机分成3组,每组5只,分别为:①NT-3基因修饰MSCs联合明胶海绵圆柱体支架移植组(NT-3-MSCs组);②MSCs联合明胶海绵支架移植组(MSCs组);③单纯明胶海绵圆柱体支架移植组(control组)。所有动物饲养于室温(24±2)℃,饮水不限,自由摄食。

### 1.2 移植物的准备

**1.2.1 MSCs的分离、培养与纯化。**参照我们前期研究<sup>[11]</sup>,无菌条件下取1—2周龄绿色荧光SD大鼠(green rat CZ20042SD, Osaka University)股骨收集骨髓细胞悬浮液,接种至预先涂有多聚赖氨酸的培养瓶中,于37℃,5% CO<sub>2</sub>中培养。第2天半量换液,以后每隔2—3d全量换液。大约4—6d MSCs长至

接近融合时(70%—80%),弃培养液,D-Hank液清洗3次,加入0.25%胰酶(0.02% EDTA)消化2min,用含10% FBS的L-DMEM培养液终止消化。用吸管轻轻吹打细胞收集细胞悬液,40转/min离心5min,弃上清。用含10% FBS的L-DMEM培养液重新悬浮细胞,混匀,按1:2接种传代(P<sub>1</sub>代)后继续培养。当MSCs再长至接近融合时,同样按照上述方法1:2进行传代纯化MSCs至第4代(P<sub>4</sub>代)。

**1.2.2 NT-3基因修饰MSCs。**具体方法参照Zhang YQ等的方法<sup>[3]</sup>,稍作改良。用一定剂量(按测定感染复数,MOI)NT-3基因重组腺病毒在含5% FBS的L-DMEM培养液中感染MSCs 3h,补充含5% FBS的L-DMEM培养液继续培养24h,弃病毒残液,加入正常培养液继续培养24h。

**1.2.3 PLGA包裹的明胶海绵圆柱体支架材料。**0.02mm厚PLGA薄膜购自山东济南岱罡生物技术公司,无菌明胶海绵购自金陵药业公司。将PLGA薄膜包绕在直径为3mm的不锈钢圆柱磨具上一圈,边缘用丙酮粘贴,形成直径为3mm的圆筒状PLGA外壳。使用时将PLGA外壳剪成2mm长度,酒精浸泡15min,随后用无菌D-Hank液清洗3次,每次10min。超净工作台中将无菌明胶海绵剪成直径3mm,厚度2mm大小(约1.0mg)。将明胶海绵用尖嘴镊小心塞入消毒好的PLGA外壳中。材料无菌干燥保存待用。

**1.2.4 NT-3-MSCs联合支架材料制备。**将上述NT-3基因修饰的MSCs用0.25%胰酶+0.02% EDTA消化,1000转/min离心5min(4℃),弃去上清液后重悬,制备成细胞悬液。并按每个支架1×10<sup>6</sup>个细胞种植于上述支架上,将吸附MSCs的材料置于无菌孔板中。每孔1个材料,采用10% FBS的L-DMEM培养液。取相同数量的MSCs,按上述的方法作MSCs组。

### 1.3 脊髓损伤修复模型的建立

参照我们前期方法<sup>[12]</sup>,SD大鼠经腹腔内注射1%戊巴比妥钠(40mg/kg体重)麻醉后,切除T<sub>9</sub>椎板,

行T<sub>10</sub>脊髓节段全横断。并切除该节段2mm脊髓组织块,清除损伤腔内残留的神经纤维。充分止血后,NT-3-MSCs组在脊髓切断处置入约2mm长含有NT-3-MSCs明胶海绵圆柱体支架;MSCs组置入含MSCs的明胶海绵圆柱体支架;control组置入含有5μl无血清的L-DMEM培养液的明胶海绵圆柱体支架。依次缝合肌肉、皮下组织与皮肤。手术后1周肌肉内注射青霉素16万单位1ml/d。人工排尿2—3次/d。术后各组动物被饲养67d。

1.4 功能BBB评分

参照Basso等<sup>[13]</sup>提出的大鼠脊髓损伤后功能评判标准(Basso-Beattie-Bresnahan, BBB评分法)对各实验动物后肢的运动功能进行评分。脊髓全横断前,大鼠后肢为正常的运动功能(21分)。T<sub>10</sub>全横断后,双后肢随即完全瘫痪(0分)。术后每周测评,记录并分析结果。

1.5 灌注、固定、取材及切片

术后8周,各组动物施行1%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉,经升主动脉插管。先快速输注血管灌注液,随后滴注预冷固定液。取出脊髓置入新鲜固定液中做后固定(4℃过夜)。固定后将脊髓依次放入20%和30%蔗糖溶液中,浸泡至组织块下沉到瓶底(4℃)。T<sub>7</sub>—T<sub>12</sub>脊髓段行连续纵向冰冻切片,片厚25μm,并依顺序贴片。

1.6 免疫荧光组织化学染色和HE染色

将各组大鼠T<sub>7</sub>—T<sub>12</sub>脊髓纵切片行绿色荧光蛋白和神经丝蛋白-200(NF-200)免疫荧光染色<sup>[14]</sup>,分别确定移植的MSCs存活及神经纤维再生情况。切片用0.01mol/L PBS漂洗后,10%正常山羊血清在37℃孵育30min,甩去血清,一抗4℃过夜。弃一抗,PBS漂洗后再分别加入相应的二抗,37℃孵育1h。弃二抗,PBS充分漂洗后80%甘油封片。以PBS代替一抗作为阴性对照。荧光显微镜下拍照和分析。

此外,对脊髓纵切片行HE染色,光镜下拍照和分析,运用Photoshop和IPP软件计算脊髓损伤区的空洞面积<sup>[4]</sup>。

1.7 统计学分析

所得数据应用SPSS 13.0软件经两个样本均数t检验或单因素方差(one-way ANOVA)分析处理。

2 结果

2.1 BBB评分

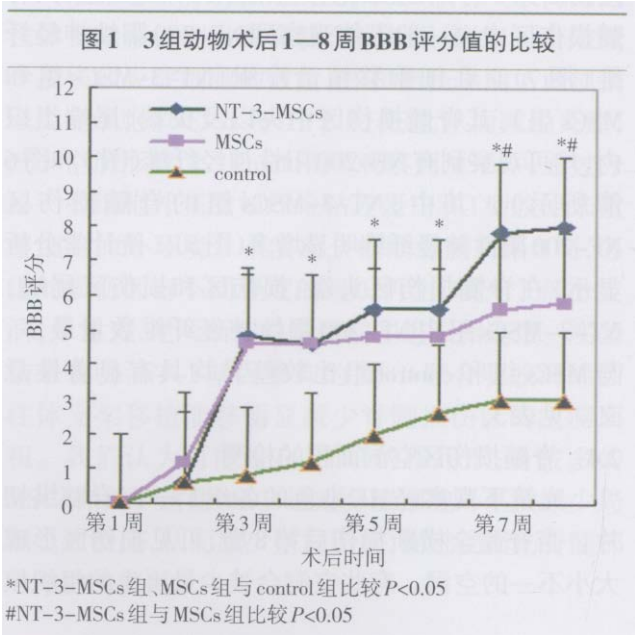
术后第8周,各组动物均表现出不同程度的后肢功能恢复,NT-3-MSCs组BBB评分平均分数最高,与其他移植组比较差异有显著性意义(P<0.05)。见表1。

| 表1 术后第8周3组脊髓全横断大鼠后肢运动功能BBB评分值比较 (x±s) |    |                          |
|---------------------------------------|----|--------------------------|
| 组别                                    | 例数 | BBB评分值                   |
| NT-3-MSCs组                            | 5  | 8.00 ± 1.22 <sup>①</sup> |
| MSCs组                                 | 5  | 5.80 ± 1.10 <sup>①</sup> |
| Control组                              | 5  | 3.00 ± 0.71 <sup>①</sup> |

单因素方差分析:组间两两比较:①P<0.05

术后第3周起,各细胞移植组(NT-3-MSCs组和MSCs组)与control组相比,有更好的功能恢复。前者表现为3个后肢关节的轻微或者1—2个关节大幅度运动,后者不能观察到后肢运动或仅有1—2个关节轻度运动。与control组相比,术后第7周和第8周各细胞移植组表现出不同程度的后肢关节和肌肉的运动。在MSCs组,大鼠可发生后肢所有3个关节轻微或大幅度运动,尤其是在NT-3-MSCs组中,大鼠后肢出现3个关节轻微或大幅的活动,且在地面上爬行的过程中,有不负重拖动或静止时足底位于负重位,偶见负重步行,但前后肢运动不协调,与MSCs组比较差异有显著性意义(P<0.05)。见图1。

2.2 移植的MSCs存活情况



在荧光显微镜下观察各细胞移植组的T<sub>7</sub>—T<sub>12</sub>脊髓纵切片,于脊髓损伤处及其邻近区域可见被绿色荧光蛋白(GFP,绿色)及被细胞核荧光(Hoechst33342, Ho)双重标记的MSCs。在NT-3-MSCs组,可见损伤后第8周,移植的NT-3修饰的MSCs仍可被NT-3免疫荧光组织化学染色(红色)标记(图2箭头示)。

结果显示:无论在NT-3-MSCs组或MSCs组,大部分移植的MSCs分布在脊髓损伤处,头、尾两端逐渐减少。有的MSCs往头侧和尾侧脊髓白质和灰质迁移;存活的MSCs形态呈圆形、卵圆形、多边形、三角形或不规则形,其胞浆(绿色)围绕蓝色的细胞核(图3和图4箭头示)。统计学分析表明,与MSCs组比较,NT-3-MSCs组存活的MSCs数量较多,差异具有显著性意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 术后第8周两组脊髓损伤处及其邻近区域移植的MSCs存活数比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别         | 例数 | MSCs存活数        |
|------------|----|----------------|
| NT-3-MSCs组 | 5  | 1194.60±180.49 |
| MSCs组      | 5  | 807.60±109.59  |

两组间比较( $t$ 检验): $P<0.05$

### 2.3 NF-200阳性的再生神经纤维情况

在荧光显微镜下观察各组脊髓损伤区及其邻近组织内NF-200阳性神经纤维。NF-200阳性神经纤维的形态呈现为长短不一,分布亦不均一。在脊髓损伤后第8周,未经细胞移植治疗的control组,其脊髓损伤区中央一般不能观察到NF-200阳性神经纤维(图7)。在细胞移植治疗组(NT-3-MSCs组和MSCs组),其脊髓损伤区中央以及头端、尾端组织内,均可观察到有NF-200阳性神经纤维(图5和图6箭头示)。其中,NT-3-MSCs组的脊髓损伤区NF-200阳性神经纤维明显增多(图5)。统计学分析显示:在脊髓损伤区头端、损伤区和损伤区尾端,NT-3-MSCs组中NF-200阳性神经纤维数量最多,与MSCs组和control组比较差异均具有显著性意义。见表3。

### 2.4 脊髓损伤区空洞面积的检测

光镜下观察经HE染色的各组T<sub>7</sub>—T<sub>12</sub>脊髓纵切片。当脊髓全横断损伤后第8周,可见损伤区形成大小不一的空洞。有些空洞会被少量再生的组织填

充,并与头、尾两断端的脊髓宿主组织相连接。经Photoshop和IPP软件分析计算显示:与control组比较,NT-3-MSCs组和MSCs组的脊髓损伤区平均空洞面积较小。尤其是NT-3-MSCs组的平均空洞面积最小,与MSCs组和control组比较,有显著性差异( $P<0.05$ )。见表4。

表3 术后第8周脊髓损伤区及其头端、尾端的NF-200阳性神经纤维数比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别         | 例数 | 损伤区头端                    | 损伤区                      | 损伤区尾端                    |
|------------|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| NT-3-MSCs组 | 5  | 50.80±2.17 <sup>①②</sup> | 18.60±1.67 <sup>①②</sup> | 48.60±2.51 <sup>①②</sup> |
| MSCs组      | 5  | 43.40±2.60 <sup>①</sup>  | 13.20±2.17 <sup>①</sup>  | 39.00±2.24 <sup>①</sup>  |
| control组   | 5  | 6.20±0.84                | 1.60±0.55                | 6.00±0.71                |

单因素方差分析:NT-3-MSCs组和MSCs组分别与Control组比较:① $P<0.05$ ;NT-3-MSCs组与MSCs组比较:② $P<0.05$

表4 术后第8周3组脊髓损伤区空洞面积的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别         | 例数 | 空洞面积(mm <sup>2</sup> )  |
|------------|----|-------------------------|
| NT-3-MSCs组 | 5  | 0.74±0.06 <sup>①②</sup> |
| MSCs组      | 5  | 1.12±0.09 <sup>①</sup>  |
| control组   | 5  | 2.10±0.57               |

NT-3-MSCs组和MSCs组分别与Control组比较(单因素方差分析):① $P<0.05$ ;NT-3-MSCs组与MSCs组比较:② $P<0.05$

## 3 讨论

临床上,明胶海绵主要用于手术止血;而骨基质明胶作为骨替代材料可用于修复骨缺损。最新的研究资料表明<sup>[6-10]</sup>,多孔隙明胶海绵可作为细胞移植的支架材料。它具有较好的组织相容性及较少引起炎症反应,且降解产物不会对组织产生有害作用,但是存在难以塑形的缺点<sup>[15]</sup>。高分子生物材料——聚乳酸-羟基乙酸(poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA)共聚物,虽然组织相容性不如明胶海绵,但易塑形并可降解<sup>[16]</sup>。本研究利用PLGA薄膜包裹明胶海绵共同构建新型生物支架(2011年2月已获得国家专利局授予的发明专利权通知),正好可以相互弥补,为移植细胞提供了良好的用于修复神经损伤的明胶海绵圆柱体支架。

MSCs来源丰富、取材简便、易于分离和纯化培养,给予一定的条件可在体外迅速扩增,并具有多向分化潜能,用于自体移植可克服伦理和免疫排斥等问题,因而被用于多种疾病的细胞治疗和基因治疗的载体<sup>[17]</sup>。因此,MSCs已成为治疗神经损伤的重要的成体干细胞来源。我们的研究也发现,MSCs移植

图2 NT-3-MSCs组脊髓损伤区NF3和GFP双标免疫荧光组织化学染色

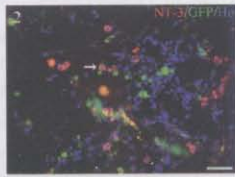


图3 NT-3-MSCs组脊髓损伤区GFP免疫荧光组织化学染色

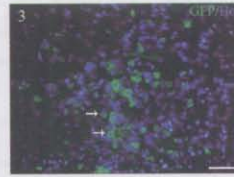


图4 MSCs组脊髓损伤区GFP免疫荧光组织化学染色

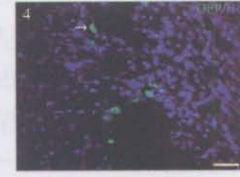


图5 NT-3-MSCs组脊髓损伤区NF-200免疫荧光组织化学染色



图6 MSCs组脊髓损伤区NF-200免疫荧光组织化学染色

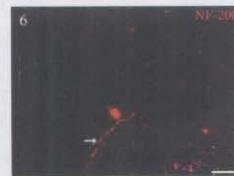


图7 Control组脊髓损伤区NF-200免疫荧光组织化学染色



图2—7标尺=40 μm

治疗能够下调抑制神经生长的因子活性,从而促进脊髓损伤区的神经纤维再生<sup>[18]</sup>。

NT-3作为一种神经营养因子,本身对神经元的发育和分化及对损伤的中枢神经元存活及其轴突再生都有重要作用<sup>[19]</sup>。我们有理由推测,经NT-3基因修饰的MSCs联合明胶海绵圆柱体支架移植可能更有利于脊髓损伤修复。本文结果显示,无论是MSCs组,还是NT-3-MSCs移植组的大鼠瘫痪后肢的自主活动功能都有明显恢复,这与前期报道一致<sup>[4]</sup>。有研究报道<sup>[20]</sup>,NT-3能够促进大鼠全横断脊髓损伤区神经纤维再生。在实施本实验脊髓全横断损伤时,将损伤区组织完全切除2mm,不存在任何残存的神经纤维。因而我们有理由认为,术后第8周脊髓损伤区中的组织应为再生的组织。在损伤区观察到的NF-200阳性染色的神经纤维,应为再生的神经纤维。实验结果表明,NT-3基因修饰的MSCs联合明胶海绵圆柱体支架移植能够促进脊髓损伤区的神经纤维再生,这可能与NT-3基因修饰的MSCs联合明胶海绵圆柱体支架移植有利于脊髓全横断大鼠瘫痪后肢的自主活动功能恢复有一定联系。

研究表明,移植细胞存活数量是影响脊髓损伤后功能恢复的主要因素之一<sup>[21]</sup>。Yan-Wu等<sup>[22]</sup>在研究NT-3联合类雪旺细胞移植治疗脊髓损伤中发现,NT-3可以提高脊髓损伤区移植细胞的存

活率。本研究也显示了类似的实验结果,可能是因为过表达的NT-3能作用于移植的MSCs,使之表达NT-3受体(TrkC)。我们前期的研究<sup>[11]</sup>发现用维甲酸预处理的NT-3基因修饰的MSCs可促使TrkC mRNA的转录,并能促进宿主神经元存活。而Hechler报道<sup>[23]</sup>,NT-3能够明显促进神经纤维再生。本研究中的NT-3基因修饰MSCs能过表达NT-3,可能有利于损伤区局部微环境的改善,利于其移植细胞的存活,同时利于神经纤维再生。

本课题组前期研究发现,MSCs联合明胶海绵圆柱体支架移植到大鼠脊髓全横断损伤处,可有效减少损伤区炎症细胞的数量,并在损伤早期下调损伤区炎症细胞TNF- $\alpha$ 与IL1 $\beta$ 的表达,从而减轻炎症,减少空洞形成<sup>[24]</sup>。Kundu等<sup>[25]</sup>观察到MSCs可通过分泌一些细胞外基质如纤维粘连蛋白和I型胶原来重塑细胞的外环境。本实验全横断脊髓后第8周,各组的损伤区有不同程度的组织再生,填充了部分空洞,并与头、尾两断端的脊髓宿主组织相连接。实验结果表明,NT-3基因修饰的MSCs联合明胶海绵圆柱体支架移植能够明显减少脊髓损伤区的空洞面积。我们认为可能是在NT-3的作用下,有较多的MSCs存活。这些MSCs通过分泌细胞外基质减少局部炎症反应,从而减少空洞形成,促进受损伤脊髓部分结构的修复。

综上所述,本研究过表达的外源性 NT-3 能够促进明胶海绵圆柱体支架内移植的 MSCs 存活和脊髓损伤区的神经纤维再生,从而减少空洞形成,结果有利于脊髓全横断大鼠瘫痪后肢的自主活动功能部分恢复。但是 NT-3 促进 MSCs 存活的具体分子机制目前尚不明确,需进一步探索。

## 参考文献

- [1] Sahni V, Kessler JA. Stem cell therapies for spinal cord injury[J]. Nat Rev Neurol, 2010, 6(7):363—372.
- [2] Xu CJ, Xu L, Huang LD, et al. Combined NgR vaccination and neural stem cell transplantation promote functional recovery after spinal cord injury in adult rats[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2011, 37(2):135—155.
- [3] Zhang YQ, Zeng X, He LM, et al. NT-3 gene modified Schwann cells promote TrkC gene modified mesenchymal stem cells to differentiate into neuron-like cells in vitro[J]. Anat Sci Int, 2010, 85(2):61—67.
- [4] Zhang W, Yan Q, Zeng YS, et al. Implantation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells transfected with the neurotrophin-3 gene and pretreated with retinoic acid in completely transected spinal cord[J]. Brain Res, 2010, 1359:256—271.
- [5] Xiong Y, Zeng YS, Zeng CG, et al. Synaptic transmission of neural stem cells seeded in 3-dimensional PLGA scaffolds[J]. Biomaterials, 2009, 30(22):3711—3722.
- [6] Hong SR, Lee YM, Akaike T. Evaluation of a galactose-carrying gelatin sponge for hepatocytes culture and transplantation[J]. J Biomed Mater Res, 2003, 67(3):733—741.
- [7] Lazzeri L, Cascone MG, Danti S, et al. Gelatine/PLLA sponge-like scaffolds: morphological and biological characterization[J]. J Mater Sci Mater Med, 2007, 18(7):1399—1405.
- [8] Deng QY, Li SR, Cai WQ, et al. Poly-lactic acid and agarose gelatin play an active role in the recovery of spinal cord injury[J]. Neurosci Bull, 2006, 22(2):73—78.
- [9] Li F, Wang TY, Xia RY, et al. The clinical application of human bone matrix gelatin[J]. J Tongji Med Univ, 1995, 15(2):90—94.
- [10] Yi HZ, Wei J. In vitro proliferation of mesenchymal stem cells on 3-dimensional macroporous scaffolds of chitosan-gelatin-basic fibroblast growth factor composite[J]. Journal of Clinical Rehabilitative and Tissue Engineering Research, 2008, 12(10):1943—1949.
- [11] Zhang W, Zeng YS, Zhang XB, et al. Combination of adenoviral vector-mediated neurotrophin-3 gene transfer and retinoic acid promotes adult bone marrow cells to differentiate into neuronal phenotypes[J]. Neurosci Lett, 2006, 408(2):98—103.
- [12] 张燕青,曾园山,曾湘,等.神经营养素-3 基因修饰雪旺细胞和神经营养素-3 受体基因修饰脊髓间充质干细胞联合移植促进脊髓损伤大鼠神经元存活的研究[J].中国康复医学杂志,2009,(7):577—581.
- [13] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1):1—21.
- [14] Yan Q, Ruan JW, Ding Y, et al. Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury[J]. Exp Toxicol Pathol, 2011, 63(1—2):151—156.
- [15] Neuss S, Stainforth R, Salber J, et al. Long-term survival and bipotent terminal differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) in combination with a commercially available three-dimensional collagen scaffold[J]. Cell Transplant, 2008, 17(8):977—986.
- [16] Chen G, Hu YR, Wan H, et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells and Schwann cells[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(17):2424—2431.
- [17] Kan EM, Ling EA, Lu J. Stem cell therapy for spinal cord injury[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(36):4492—4510.
- [18] Ding Y, Yan Q, Ruan JW, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells and electro-acupuncture downregulate the inhibitor molecules and promote the axonal regeneration in the transected spinal cord of rats[J]. Cell Transplant, 2010, [Epub ahead of print].
- [19] Zhang W, Li Y, Wang ZJ, et al. Functional roles of intrinsic neurotrophin-3 in spinal neuroplasticity of cats following partial ganglionectomy[J]. Growth Factors, 2010, 28(5):351—358.
- [20] Fan J, Xiao Z, Zhang H, et al. Linear ordered collagen scaffolds loaded with collagen-binding neurotrophin-3 promote axonal regeneration and partial functional recovery after complete spinal cord transection[J]. J Neurotrauma, 2010, 27(9):1671—1683.
- [21] Lee JH, Chung WH, Kang EH, et al. Schwann cell-like remyelination following transplantation of human umbilical cord blood (hUCB)-derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury[J]. J Neurol Sci, 2011, 300(1—2):86—96.
- [22] Yan-Wu G, Yi-Quan K, Ming L, et al. Human umbilical cord-derived schwann-like cell transplantation combined with neurotrophin-3 administration in dyskinesia of rats with spinal cord injury[J]. Neurochem Res, 2011, 36(5):783—792.
- [23] Hechler D, Boato F, Nitsch R, et al. Differential regulation of axon outgrowth and reinnervation by neurotrophin-3 and neurotrophin-4 in the hippocampal formation[J]. Exp Brain Res, 2010, 205(2):215—221.
- [24] Zeng X, Zeng YS, Ma YH, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells in a three dimensional gelatin sponge scaffold attenuate inflammation, promote angiogenesis and reduce cavity formation in experimental spinal cord injury[J]. Cell Transplant, 2010, [Epub ahead of print].
- [25] Kundu AK, Khatriwala CB, Putnam AJ. Extracellular matrix remodeling, integrin expression, and downstream signaling pathways influence the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on poly (lactide-co-glycolide) substrates[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(2):273—283.