

基因修饰神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后神经营养素-3 表达及神经细胞凋亡的影响*

孔令胜¹ 姚维成² 栗世方² 贺昭忠² 成 磊²

(¹ 济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272029; ² 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266003)

摘 要 **目的** 探讨基因修饰神经干细胞(NSCs)移植大鼠损伤脊髓后对神经营养素-3(NT-3)表达及神经细胞凋亡的影响。**方法** SD 大鼠 80 只随机分为假手术组(Normal 组)、单纯损伤组(SCI 组)、NSCs 移植组(NSC 组)、NT-3 基因修饰 NSCs 移植组(NT-NSC 组)。采用电控脊髓损伤打击装置致大鼠 SCI 模型, 25g/cm (10g×2.5cm)力致伤 T13 脊髓。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)法标记处于对数生长期的 NSCs, SCI 后即刻进行 NSCs 及基因修饰 NSCs 移植, 分 1、3、7、14、28d 5 个时间点运用免疫组织化学的方法检测 NT-3、BrdU 的表达, 采用原位末端脱氧核苷转移酶介导的脱氧核苷三磷酸生物素缺口末端标记技术(TUNEL 法)标记凋亡细胞, 改良 Rivlin 法(斜坡试验)观察大鼠后肢运动功能的恢复情况。**结果** NT-NSC 组与 NSC 组在脊髓损伤区域内均可检测到 Brdu 阳性细胞, 移植后 7、14、28d BrdU 阳性 NSCs 数与 NSC 组相比明显增多, 差异有统计学意义($t=9.439, 8.918, 4.185, P_{均}<0.05$)。NT-NSC 组 NT-3 表达高峰延迟, 在 14d 达到最高值, 其平均 OD 值与其他实验组各时间点相比均增高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 移植后 7、14、28d 凋亡细胞数比 NSC 组明显减少($P<0.05$), 斜坡试验评分比 NSC 组明显提高($P<0.05$)。**结论** NT-3 基因修饰 NSCs 移植较单纯 NSCs 移植更容易在脊髓损伤区域存活, 并能通过增强 NT-3 的表达来抑制神经细胞的凋亡, 从而促进大鼠损伤脊髓的功能恢复。

关键词 基因修饰神经干细胞; 脊髓损伤; 神经营养素-3; 细胞凋亡

中图分类号: R651.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2014)120-393-07

Effect of genetically modified neural stem cells transplantation on neurotrophin-3 expression and neuronal apoptosis after spinal cord injury in rats

KONG Lingsheng, YAO Weicheng, LI Shifang, HE Zhaozhong, CHENG Lei

(The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To explore the effect of genetically modified neural stem cells transplantation on neurotrophin-3 expression and neuronal apoptosis after spinal cord injury in rats. **Methods** 80 SD rats were divided into four groups randomly: Normal group, SCI group, NSC group, NT-NSC group. SCI model of Sprague Dawley rats was induced with electrocircuit control spinal cord injuring device method by a 10g×2.5 cm impact on the posterior T13 spinal cord. The NSCs were labeled with BrdU. NSCs and NT-3 genetically modified NSCs transplantation were performed immediately after SCI. 5 time points of 1d, 3d, 7d, 14d, and 28d were observed. The expression of NT-3 and BrdU were detected by immuno-histochemical stain (immunohistochemistry and immunofluorescence). The improved Rivlin method (namely, slope test) was used to assess the motor function following spinal cord injury in rats. **Results** NSCs in NT-NSC group and NSC group can be detected in the spinal cord after transplantation. After transplantation for 7d, 14d, 28d, the BrdU positive cells increased obviously than that of NSC group ($t=9.439, 8.918, 4.185, P<0.05$). In NT-NSC group, the expression peak of NT-3 was postponed and reached the peak at 14thd, and their mean OD was prominently higher than that of the other experimental groups ($P<0.05$). After transplantation for 7d, 14d, 28d, TUNEL-positive cells (immunohistochemistry and immunofluorescence) were significantly decreased that in NT-NSC group than in NSC group ($P<0.05$), and inclined plane test were obviously

* [基金项目] 山东省自然科学基金资助项目 (编号: ZR2010HM040)

higher than those of NSC group ($P < 0.05$). **Conclusion** NT-3 genetically modified NSCs can survive more easily than pure NSCs in the injured site of spinal cord, and inhibits neuronal apoptosis by enhancing NT-3 expression after SCI, which promote remarkably functional recovery after SCI.

Key words: Genetically modified neural stem cells; Spinal cord injury; Neurotrophin-3; Apoptosis

脊髓损伤(SCI)对机体造成灾难性的后果,表现为损伤节段平面以下感觉、运动功能的完全丧失和大小便失禁,如何治愈截瘫仍是医学界的难题。目前神经干细胞(NSCs)移植被认为是一种很有前途的治疗中枢神经系统疾患的新策略,相对于其他干细胞如胚胎干细胞、间充质干细胞而言,NSCs具有更好的神经源性、更少的致瘤性及免疫源性^[1-2];同时 NSCs 易于进行转基因操作并可携带多个外源基因且有高水平的表达,是进行基因治疗的良好载体^[3]。神经营养素-3(NT-3)是在脊髓中作用最强的神经营养因子,在 NSCs 的分化和迁移、神经递质的调节合成中发挥着重要的作用,并且能促进神经元的存活和神经轴突的再生,对周围神经元和非神经元细胞也具有明显地保护作用^[4-7]。本文旨在动态观察基因修饰 NSCs 移植大鼠损伤脊髓后对 NT-3 表达及神经细胞凋亡影响,从而为基因修饰 NSCs 移植治疗 SCI 提供理论依据和物质基础。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

成年健康雄性 SD 大鼠 80 只,体重(245 ± 15)g(徐州医学院实验动物中心提供)。NT-3 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),TUNEL 试剂盒(Roche Diagnostics GmbH 公司),PowerVision T-MTwo-Step Histostaining Reagent(美国 Zymed 公司),5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)抗体(Sigma 公司),DMEM/F12(1:1)培养基(Hyclone 公司),B27 复合物(Gibco 公司),bFGF(Invitrogen 公司),EGF(Invitrogen 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),多聚赖氨酸(Sigma 公司),DAB 显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司),其他试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.2 实验动物分组及脊髓损伤模型的建立

成年健康雄性 SD 大鼠 80 只随机分为 4 组:1)假手术组(Normal 组);2)单纯损伤组(SCI 组);3)神经干细胞组(NSC 组);4)NT-3 基因修饰 NSCs 组(NT-NSC 组)。每组 20 只动物,在 1、3、7、14、28d 5 个时间点。采用本实验室研制的电磁

程控脊髓损伤自动打击装置制备脊髓损伤模型:以 T13 棘突相对应的脊髓后正中血管为中心,用电磁程控铁棒下落打击装置损伤脊髓,力量为 10×2.5 g/cm,撞击成功标准为:撞击的脊髓组织水肿、出血,大鼠尾巴出现痉挛性摆动,双后肢躯体回缩样扑动,双后肢呈现弛缓性瘫痪。

1.3 NSCs 及 NT-3 基因修饰 NSCs 悬液的制备

移植前 2 天取处于对数生长期的胎鼠 NSCs 离心后加入无血清培养液,轻柔吹打混匀成单细胞悬液,计数后调整种植密度为 1×10^6 /ml。按感染复数(MOI)为 200PFU/细胞将含 NT-3 的腺病毒颗粒储存液加入培养瓶中,放入培养箱中孵育 48h,离心弃上清,用少量无血清培养液重悬成单细胞,计数后调整细胞浓度为 2×10^5 /μl,置于冰上待移植用。同时制备细胞浓度为 2×10^5 /μl 的单纯 NSCs 悬液置于冰上待移植用。将移植后剩余细胞悬液进行台盼蓝染色,NSCs 活性在 90%~95%。

1.4 NSCs 及 NT-3 基因修饰 NSCs 移植

大鼠脊髓损伤后将动物麻醉,固定于立体定位仪上,原切口进入,在平 T13 棘突处硬脊膜背侧正中血管旁 1mm 处轻轻挑开硬脊膜成一纵行小口,用汉密尔顿微量注射器,向头侧呈 45°进针,深度 1.5mm,将细胞浓度为 2×10^5 /μl 基因修饰 NSCs 悬液 5μl、细胞浓度为 2×10^5 /μl 的 NSCs 悬液 5μl、生理盐水 5μl 分别注入基因修饰 NSCs 组、NSCs 移植组、SCI 组。10min 内推入,保留 5min 后退出。关闭伤口,分笼喂养。

1.5 大鼠灌注、固定、取材、切片及染色

取材后石蜡包埋切片,片厚 30μm,分别作 NT-3、BrdU 免疫组织化学染色;采用原位末端标记法(TUNEL 法)标记凋亡细胞;切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温 10min;0.01M CB 缓冲液(pH6.0) 200ml 中,750W 微波修复 1min,取出后迅速加入 80ml 双蒸水;加动物血清封阻,室温 30min;TUNEL 反应液,避光 37℃ 1h,0.01 M PBS 液洗 5min×3 次,避光;荧光显微镜观察并用数码相机同时拍摄照片留用;加过氧化物酶 37℃,30min,0.01 M PBS 洗 5min×3 次;DAB 显色,流水冲洗

10min,脱水、透明、封固。

1.6 大鼠损伤脊髓功能恢复的评价

分别于移植后第 1、3、7、14、28 天采用斜板试验(改良 Rivlin 法)对大鼠后肢运动功能评定,斜板表面垫以 6mm 厚的橡胶垫,板可绕下边旋转,按大鼠身体轴线与斜板纵轴垂直的方向放置大鼠,从水平位置(0°)起逐渐增大斜板与水平面之间的角度,以大鼠能够在板上停留 5s 而不跌落的最大角度作为评分标准,双后肢分别评分,重复 3 次取平均值。斜板试验主要观察大鼠后肢的静态肌张力,正常大鼠斜板实验评分平均值在 75°~80°之间。观察者为熟悉评分标准但非本组的实验人员。

1.7 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析。

2 结果

2.1 基因修饰 NSCs 在大鼠损伤脊髓内存活情况

表 1 NSCs 与基因修饰 NSCs 移植后在损伤大鼠脊髓内存活情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	1d	3d	7d	14d	28d	F 值	P
NSC 组	20	—	—	5.33±0.82	10.83±1.47	14.83±2.63	41.786	0.000
NT-NSC 组	20	—	4.39±0.72	10.01±0.89	19.54±1.87	20.62±2.31	64.983	0.000
<i>t</i>				9.439	8.918	4.185		
<i>P</i>				0.000	0.000	0.002		

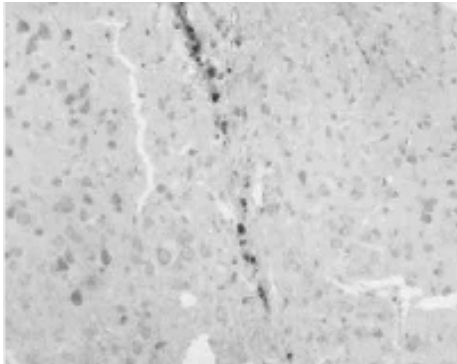


图 1 NT-NSC 组脊髓损伤 14d 后 BrdU 免疫阳性 NSCs(DAB 染色,×100)

2.2 基因修饰神经干细胞移植后 NT-3 的表达

SCI 组 NT-3 表达主要位于脊髓前区的前角神经元,胞浆染色,胞核不着色;第 3 天到达峰值,直到第 7 天开始降低,第 28 天达最低点。NSC 组

SCI 组及 Normal 组均未观察到 BrdU 阳性细胞。NSC 组第 7 天可检测到,14、28d BrdU 阳性细胞逐渐增多,差异有统计学意义($F=41.786, P=0.000$);NT-NSC 组 BrdU 阳性细胞在移植后第 1 天亦未检测到,第 3 天即可检测到,为棕黄色核标记的小圆形细胞,散在排列(见图 1),第 7 天阳性细胞增多,沿穿刺针道呈串珠状排列,平均每高倍镜视野阳性细胞数为(10.01 ± 0.89);第 14 天 BrdU 阳性细胞数在临近损伤区继续增多,较移植后第 7 天明显增多,平均每高倍镜视野阳性细胞数为(19.54 ± 1.87),第 28 天 BrdU 阳性细胞仍有增多,差异有统计学意义($F=64.983, P=0.000$)。移植后 7、14、28d BrdU 阳性细胞数与 NSC 组相比明显增多,差异有统计学意义($t=9.439、8.918、4.185, P_{均}<0.05$)。见表 1。

在移植后第 1 天,脊髓后角、前角可检测到 NT-3 免疫阳性细胞,着色部位位于神经元胞浆及突起,棕黄色(见图 2~图 4);移植后第 7 天,NT-3 染色的平均 OD 值达到最高值,至第 14 天平均 OD 值开始下降,至第 28 天达到最低值,NT-3 平均 OD 值与 SCI 组各时间点相比,除第 1 天外差异均有统计学意义($P<0.05$)。NT-NSC 组 NT-3 平均 OD 值在移植后第 1 天就高于 SCI 组,且表达高峰延迟,在第 14 天达到最高值,以后渐低,但仍保持较高水平,NT-3 平均 OD 值与其他实验组相应各时间点相比均增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。SCI 组、NSC 组、NT-NSC 组 NT-3 平均 OD 值各时间点组内比较,差异有统计学意义(F 值 = 9.208、15.617、19.872, $P_{均}<0.05$);组间比较,差异有统计学意义(F 值 = 6.248、18.951、21.687、28.321、17.354, $P_{均}<0.05$)。见表 2。

表 2 大鼠损伤脊髓后各时间点各组 NT-3 免疫阳性 OD 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	1d	3d	7d	14d	28d	F	P
Normal 组	20	28.12±1.34	29.24±1.21	28.34±2.84	28.91±1.56	28.31±2.63	0.000	1.000
SCI 组	20	35.21±2.51	49.23±3.52	45.21±1.98	36.28±3.24	36.85±3.16	9.208	0.027
NSC 组	20	36.84±2.36	60.28±3.61 [#]	78.39±3.08 [#]	68.31±3.54 [#]	54.61±4.06 [#]	15.617	0.018
NT-NSC 组	20	45.21±2.73 [*]	65.01±2.94 [*]	89.32±2.83 [*]	95.28±2.67 [*]	62.24±2.94 [*]	19.872	0.005
F 值		6.248	18.951	21.687	28.321	17.354		
P		0.038	0.004	0.002	0.001	0.004		

注:与 SCI 组比较, [#] $P<0.05$;与其他各组比较, ^{*} $P<0.05$

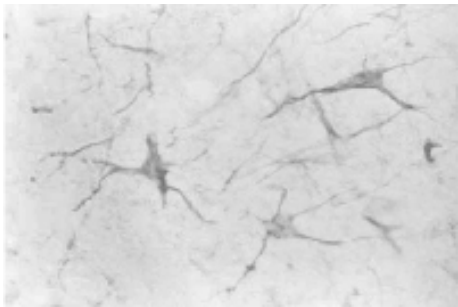


图 2 SCI 组脊髓损伤 3d 后 NT-3 免疫阳性表达(DAB 染色, ×400)

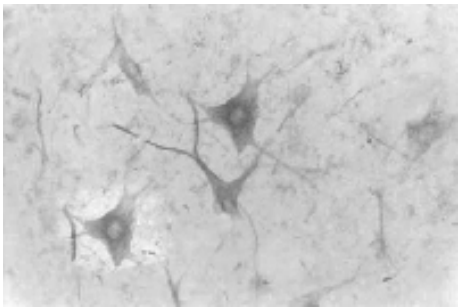


图 3 NSC 组脊髓损伤 7d 后 NT-3 免疫阳性表达(DAB 染色, ×400)

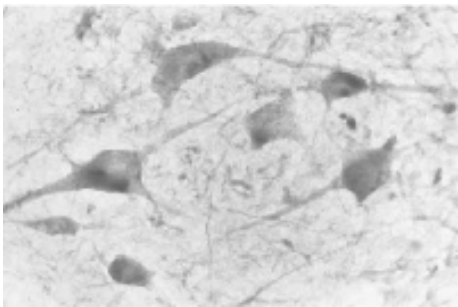


图 4 NT-NSC 组脊髓损伤 14d 后 NT-3 免疫阳性表达(DAB 染色, ×400)

2.3 TUNEL 法标记凋亡细胞结果

凋亡细胞主要出现于脱髓鞘区域,细胞核染成

棕黄色。SCI 组大鼠脊髓损伤后 1d 可见较多标记凋亡细胞,3d 达高峰,28d 时仍有较多凋亡细胞(见图 5~图 8)。NSC 组凋亡细胞高峰出现在伤后 7d,但各时间点凋亡细胞数均较 SCI 组明显减少($P<0.05$)。NT-NSC 组在移植后 7、14、28d 凋亡细胞数均比 NSC 组减少($P<0.05$)。SCI 组、NSC 组、NT-NSC 组凋亡阳性细胞数各时间点组内比较,差异有统计学意义(F 值 = 20.125、16.542、14.651, $P_{\text{均}}<0.05$);组间比较,差异有统计学意义(F 值 = 8.982、22.318、18.397、16.584、14.259, $P_{\text{均}}<0.05$)。免疫荧光染色结果同免疫组化染色结果。见表 3。

表 3 大鼠损伤脊髓后各时间点各组 TUNEL 标记凋亡细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	1d	3d	7d	14d	28d	F 值	P
Normal 组	20	10.87±0.65	10.24±0.95	10.34±1.73	10.95±0.45	10.21±1.53	0.000	1.000
SCI 组	20	34.31±1.61	98.97±4.63	80.27±4.15	71.38±3.28	66.65±3.27	20.125	0.001
NSC 组	20	28.75±1.95 [#]	62.28±7.32 [#]	78.24±4.62 [#]	58.42±2.65 [#]	45.39±3.24 [#]	16.542	0.029
NT-NSC 组	20	27.65±2.64	61.33±3.86	70.54±3.72 [*]	51.37±1.78 [*]	40.28±2.87 [*]	14.651	0.016
F 值		8.982	22.318	18.397	16.584	14.259		
P		0.041	0.001	0.015	0.023	0.035		

注:与 SCI 组比较, [#] $P<0.05$;与 NSC 组比较, ^{*} $P<0.05$

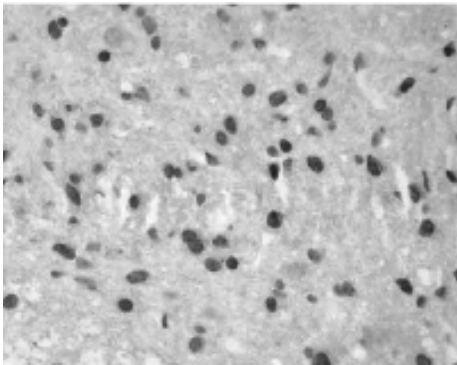


图 5 SCI 组脊髓损伤 3d 后 TUNEL 标记
免疫组化阳性细胞(DAB 染,×100)

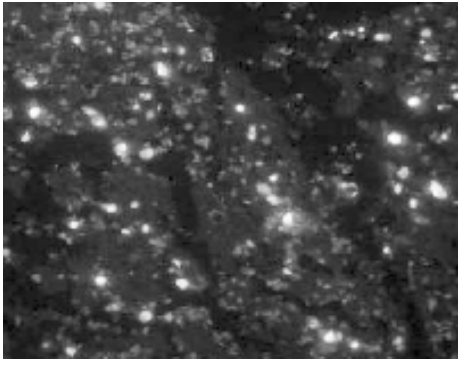


图 6 SCI 组脊髓损伤 3d 后 TUNEL 标记
免疫荧光细胞(×100)

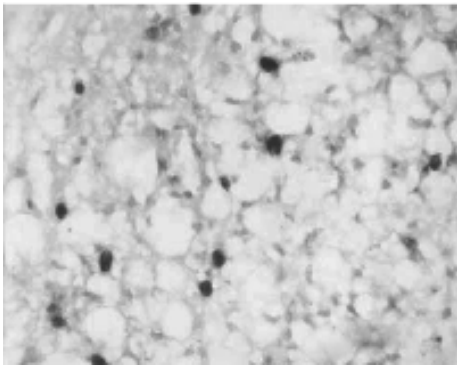


图 7 NT-NSC 组脊髓损伤 14d 后 TUNEL 标记
免疫组化阳性细胞(×100, DAB 染色)

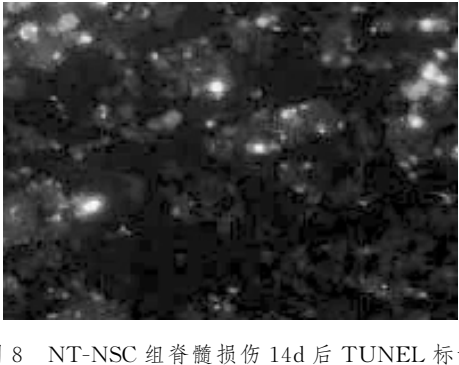


图 8 NT-NSC 组脊髓损伤 14d 后 TUNEL 标记
免疫荧光细胞(×100)

2.4 大鼠后肢运动功能恢复

移植后第 7 天、第 14 天、第 28 天,NSC 组斜板试验评分比 SCI 组提高($P<0.05$),NT-NSC 组比 NSC 组明显提高($P<0.05$)。SCI 组、NSC 组、NT-NSC 组各时间点斜板试验评分组内比较,差

异有统计学意义(F 值=5.618、9.651、13.684, $P_{\text{均}}<0.05$);组间比较,差异有统计学意义(F 值=23.548、22.579、16.254、15.621、11.289, $P_{\text{均}}<0.05$)。见表 4。

表 4 各组各时间点大鼠后肢运动功能恢复情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	1d	3d	7d	14d	28d	F 值	P
Normal 组	20	76.2±2.3 [△]	75.6±3.1 [△]	76.4±1.3 [△]	77.5±2.5 [△]	76.8±2.9 [△]	0.000	1.000
SCI 组	20	20.5±1.3	23.6±4.2	30.5±4.3	33.5±2.8	36.7±3.9	5.618	0.042
NSC 组	20	21.3±1.6	24.3±3.6	36.5±3.2 [#]	40.7±2.8 [#]	46.2±3.4 [#]	9.651	0.034
NT-NSC 组	20	21.6±2.5	24.9±3.7	41.6±2.4 [*]	46.5±3.5 [*]	50.6±4.7 [*]	13.684	0.006
F 值		23.548	22.579	16.254	15.621	11.289		
P		0.001	0.001	0.004	0.014	0.023		

注:与 SCI 组比较,[#] $P<0.05$;与 NSC 组比较,^{*} $P<0.05$;与其他各组比较,[△] $P<0.05$

3 讨论

目前神经干细胞移植已被接受为一种很有前途的治疗中枢神经系统疾患的新策略,Nemati 等

将源自猴脑的 NSCs 移植到猕猴损伤脊髓内,6 个月观察到移植细胞的存活并能改善猕猴后肢运动功能^[8];Lee 等^[9]将人胚胎 NSCs 移植到完全横断的大鼠脊髓损伤处,观察到了移植细胞可以分

化为神经元和神经胶质细胞,生长相关蛋白-43 免疫组化结果显示了损伤脊髓的轴突再生,Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分显示了脊髓功能的恢复。但由于受伤局部不利的微环境如炎症、缺氧、脂质过氧化、神经胶质疤痕形成等原因使得神经干细胞促进神经功能恢复的作用有限^[10]。越来越多的证据表明,神经营养因子在脊髓损伤后促进神经功能恢复方面发挥着重要作用^[11-12],神经营养因子家族(NFs)包括神经生长因子、脑源性神经营养因子、神经营养因子等,他们在各种神经代谢活动中发挥着重要的调节作用^[13-14],NFs 可以减少细胞死亡、促进神经元的存活及神经轴突的再生^[15-16],NT-3 是在脊髓中作用最强的 NFs,在 NSCs 的分化和迁移、神经递质的调节合成中发挥着重要的作用,并且能促进神经元的存活和神经轴突的再生,对周围神经元和非神经元细胞也具有明显地保护作用^[4-7]。

BrdU 是胸腺苷类似物,可通过碱基互补配对的原则整合到处于 S 期的原始干细胞双链 DNA 中,在半保留复制过程中逐渐消减。为动态观察单纯 NSCs 与基因修饰 NSCs 移植大鼠损伤脊髓后对 NT-3 表达及神经细胞凋亡影响,本实验将胚胎大鼠 NSCs 及 NT-3 基因修饰 NSCs 体外 BrdU 标记后移植入损伤脊髓,结果显示基因修饰 NSC 组较 NSC 组较早观察到 BrdU 阳性细胞,且在移植后 7、14、28d BrdU 阳性细胞数较 NSC 组明显增多,结果表明 NT-3 基因修饰 NSCs 移植较单纯 NSCs 移植更易在损伤脊髓内存活,这可能与 NT-3 基因的神经保护作用有关,但其具体的调控机制尚待进一步深入研究。本实验还观察到,SCI 组在第 1 天就有 NT-3 免疫反应蛋白的表达,在第 3 天达到高峰,以后逐渐降低,提示 NT-3 参与了脊髓损伤后的修复过程,是脊髓感伤害性反应的内分泌性保护剂,但这种内分泌性的保护作用是有有限度的;NSCs 移植组 NT-3 的表达除移植后第 1 天外其他各时间点均强于 SCI 组($P<0.05$),并在移植后第 7 天达到高峰,这可能与 NSCs 分化后产生的神经元和胶质细胞可以分泌多种神经营养因子包括 NT-3 有关;而 NT-3 基因修饰 NSCs 组 NT-3 免疫反应蛋白的表达高峰延迟至移植后第 14 天,并且在各时间点上 NT-3 免疫反应蛋白的表达均明显高于其他治疗组($P<0.05$),结果提示腺病毒介导的 NT-3 基因能够整合入宿主脊髓并获得持续稳定表达,从而发挥它的生物学作用。

脊髓损伤主要包括原发性和继发性损伤,原发性损伤是脊髓受伤当时即刻发生的组织机械性损伤,继发性损伤是细胞微粒介导的复杂病理生理过程。研究证实,继发性脊髓损伤中出现的神经元和神经胶质细胞死亡一定程度上都是继发细胞凋亡的结果;如何抑制细胞凋亡,是保护神经元、修复脊髓损伤的一大难题^[17-19]。NSCs 移植到损伤脊髓后对神经细胞凋亡的影响是我们关注的重点。本实验采用原位末端脱氧核苷转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸生物素缺口末端标记技术标记凋亡细胞,NT-NSC 组在移植后 7d、14d、28d 凋亡细胞数均比 NSC 组明显减少($P<0.05$),斜板试验评分亦比 NSC 组明显提高($P<0.05$),结果表明 NT-3 基因修饰 NSCs 移植入损伤脊髓后比单纯 NSCs 移植更能明显减少脊髓神经细胞的凋亡、促进大鼠损伤脊髓功能的恢复,这与 NT-3 基因在损伤脊髓内持续稳定的表达是分不开的。

综上所述,NT-3 基因修饰 NSCs 移植后较单纯 NSCs 更容易在脊髓损伤区域存活,并能通过上调 NT-3 的表达来抑制神经细胞的凋亡,从而促进大鼠损伤脊髓的功能恢复。但以上结果与 Normal 组相比仍有一定差距($P<0.05$),为了更好地协同、高效发挥基因修饰 NSCs 的抗凋亡作用,我们设想,可以在体外将凋亡抑制基因和 NT-3 基因共同转染入 NSCs,然后将凋亡抑制基因、NT-3 基因修饰 NSCs 移植入损伤脊髓,这将是我们的继续研究的课题和努力方向。

参考文献:

- [1] Albertu E, Los M, Garcia R, et al. Prolonged survival and expression of neural markers by bone marrow-derived stem cells transplanted into brain lesions[J]. Med Sci Monit, 2009, 15(2): 47-54.
- [2] 刘冰, 管英俊. 神经干细胞治疗进行性神经系统疾病研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(5): 376-378.
- [3] Galli R, Gritti A, Bonfanti L, et al. Neural stem cells: an overview[J]. Circ Res, 2003, 92(6): 598-608.
- [4] Wang T H, Meng Q S, Qi J G, et al. NT-3 expression in spared DRG and the associated spinal laminae as well as its anterograde transport in sensory neurons following removal of adjacent DRG in cats[J]. Neurochem Res, 2008, 33(1): 1-7.
- [5] Lin S, Wang Y, Zhang C, et al. Modification of the neurotrophin-3 gene promotes cholinergic neuronal differentiation and survival of neural stem cells derived from rat embryonic spinal cord in vitro and in vivo[J]. J Int Med Res, 2012, 40: 1449-1458.

(下转第 402 页)

质量。因此,治疗癌症的同时可以提高患者生活质量的药物受到越来越多的重视^[8]。本实验将两种植物类抗癌及免疫保护药物的联合,结果表明槐耳颗粒对人参皂甙 Rg3 有良好的辅助、协同作用,可弥补人参皂甙 Rg3 单独应用的不足。一方面联合应用效果更好,另一方面也进一步克服了传统化疗药物的毒副作用,抗肿瘤的同时也能保护机体免疫功能,提高了患者的生存质量,为进一步的临床联合应用提供理论基础和依据。另外,我国人参、槐耳菌质资源丰富,可人工栽培,若能作为抗肿瘤药物和免疫保护药物进一步加以开发,将具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 陈明伟,陈健,姚煜,等. 人参皂甙 20(R)-Rg3 治疗肺癌的临床疗效观察[J]. 西安交通大学学报(医学版),2003,24(3): 288-289.
 - [2] Iishi H, Tatsuta M, Baba M, et al. Inhibition by ginsenoside Rg3 of bombesin-enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane in Wistar rats [J]. Clin Exp Metastasis, 1997, 15(6): 603-611.
 - [3] 徐华祥,朱小东,孔令群,等. 槐耳清膏抑制肝癌切除术后复发瘤的生长及机制[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(10): 1445-1447.
 - [4] 李德林,麦大海. 槐耳颗粒对胃癌术后同步放化疗患者生存质量和免疫功能的影响[J]. 中国肿瘤, 2010, 19(1): 73-76.
 - [5] 施丽飞,薛大方,郝爱国,等. 3 种抗肿瘤中成药中 10 种人体必需微量元素的含量分析[J]. 中国中医药科技, 2007, 14(3): 181-182.
 - [6] 杨宪勇. 应用环磷酸腺苷构建 C57BL/6J 小鼠免疫抑制模型[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(40): 7486-7490.
 - [7] Di I M, Del P B, De I M, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells[J]. Exp Hematol, 2008, 36: 309-318.
 - [8] O'Shaughnessy J A, Wittes R E, Burke G, et al. Commentary concerning demonstration of safety and efficacy of investigational anticancer agents in clinical trials[J]. J Clin Oncol, 1991, 9(12): 2225-2232.
- (收稿日期 2014-7-29)
- +++++
- (上接第 398 页)
- [6] Li X, Yang Z, Zhang A. The effect of neurotrophin-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells[J]. Biomaterials 2009, 30(28): 4978-4985.
 - [7] 张建,顾茵,罗学胜,等. 氯化锂通过激活 Wnt 信号通路促进神经干细胞增殖[J]. 济宁医学院学报, 2013, 36(6): 387-392.
 - [8] Nemati S N, Jabbari R, Hajinasrollah M, et al. Transplantation of adult monkey neural stem cells into a contusion spinal cord injury model in rhesus macaque monkeys[J]. Cell J, 2014, 16(2): 117-130.
 - [9] Lee K B, Choi J H, Byun K, et al. Recovery of CNS pathway innervating the sciatic nerve following transplantation of human neural stem cells in rat spinal cord injury[J]. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32(1): 149-157.
 - [10] Wright K T, El Masri W, Osman A, et al. Concise review: bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications[J]. Stem Cells, 2011, 29(2): 169-178.
 - [11] Hollis E R, Tuszynski M H. Neurotrophins: potential therapeutic tools for the treatment of spinal cord injury[J]. Neurotherapeutics, 2011, 8: 694-703.
 - [12] McCall J, Weidner N, Blesch A. Neurotrophic factors in combinatorial approaches for spinal cord regeneration[J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(1): 327-337.
 - [13] Cohen-Cory S, Kidane A H, Shirkey N J, et al. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity[J]. Dev Neurobiol, 2010, 70(5): 271-288.
 - [14] Dicou E. Neurotrophins and neuronal migration in the developing rodent brain[J]. Brain Res Rev, 2009, 60(2): 408-417.
 - [15] Gu S, Huang H, Bi J, et al. Combined treatment of neurotrophin-3 gene and neural stem cells is ameliorative to behavior recovery of Parkinson's disease rat model[J]. Brain Res, 2009, 1257: 1-9.
 - [16] Lee S T, Chu K, Jung K H, et al. Slowed progression in models of huntington disease by adipose stem cell transplantation[J]. Ann Neurol, 2009, 66(5): 671-681.
 - [17] Hwang L, Choi I Y, Kim S E, et al. Dexmedetomidine ameliorates intracerebral hemorrhage-induced memory impairment by inhibiting apoptosis and enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the rat hippocampus[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5): 1047-1056.
 - [18] Kim D H, Ko I G, Kim B K, et al. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis[J]. Physiol Behav, 2010, 101(5): 660-665.
 - [19] Sung Y H, Kim S C, Hong H P, et al. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice[J]. Life Sci, 2012, 91(25/26): 1309-1316.
- (收稿日期 2014-04-30)