

· 基础研究 ·

骨髓间充质干细胞移植对急性脊髓损伤大鼠神经功能恢复及 Nogo-A 表达的影响*

黄洁萍¹ 翁金森² 王 锋³ 刘 楠^{1,4} 贾小力³ 张逸仙¹ 王杰华¹

摘要 目的:探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)静脉注射移植对急性脊髓损伤(SCI)大鼠神经功能恢复及 Nogo-A 表达的影响。方法:采用全贴壁法分离培养大鼠 BMSCs, 雌性 SD 大鼠 96 只,随机分成 4 组,假手术组(sham 组)、损伤对照组(SCI 组)、溶剂对照组(vehicle 组)和 BMSCs 治疗组(BMSCs 组),24 只/组。采用改良 Allen 法制作大鼠急性 SCI 模型,BMSCs 移植前用羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记,BMSCs 组于造模成功 10min 后自大鼠尾静脉注射 BMSCs 悬液 1ml(5×10^6 个 BMSCs);vehicle 组则注射 1ml 0.01m 的磷酸盐缓冲液(PBS)。术后第 1 天、第 3 天、第 7 天和第 14 天通过进行 BBB 神经行为学评分对神经功能进行评估,观察其恢复状况,免疫组化及 RT-PCR 法检测 Nogo-A 表达。结果:BMSCs 组损伤周边区脊髓组织中观察到 CFSE 染色的阳性细胞;BMSCs 组术后第 7 天和第 14 天神经功能评估明显优于 SCI 组、vehicle 组;BMSCs 组术后第 3 天、第 7 天和第 14 天脊髓损伤区周边组织中 Nogo-A 表达较 SCI 组和 Vehicle 组明显降低($P < 0.01$)。结论:BMSCs 移植可以通过下调 SCI 中 Nogo-A 的生成来促进脊髓损伤后大鼠神经功能的恢复。

关键词 骨髓间充质干细胞;脊髓损伤;神经功能;Nogo-A

中图分类号:R651.2, R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-07-0582-05

Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation on the recovery of neurological functions and the expressions of Nogo-A after acute spinal cord injury in rats/HUANG Jieping, WENG Jinsen, WANG Feng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(7):582-586

Abstract Objective: To investigate the effects of intravenous administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) on the recovery of neurological functions and the expressions of Nogo-A after acute spinal cord injury (SCI) in rats. **Method:** BMSCs were harvested and purified following adherence technique. Briefly 96 female adult Sprague-Dawley rats were randomized into 4 groups (24 in each group): sham-operated group, SCI group, vehicle group, BMSCs-treated group. Rat's acute SCI model was established with modified Allen's method. Soon after SCI, 5×10^6 BMSCs (1ml) were injected into tail vein at 10 min after SCI and 1ml 0.01m (PBS) were given to the vehicle group. BMSCs were labeled by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) before transplantation. Before sacrifice and at the 1st d, 3rd d, 7th d and 14th d after SCI, neurological functions were evaluated by Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale; The expressions of Nogo-A were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and immunohistochemical method at the 1st d, 3rd d, 7th d and 14th d after SCI. **Result:** CFSE staining positive cells were observed around the SCI area in BMSCs-treated group. Compared with SCI group and vehicle group, neurological functions were better in BMSCs-treated group at the 7th d, 14th d after SCI, and the expressions of Nogo-A around the injury area down-regulated significantly at the 3rd d, 7th d, 14th d after SCI. (all $P < 0.01$). **Conclusion:** BMSCs transplantation after acute SCI in rats can significantly improve the neurological functions, and its mechanism is related to down-regulation of Nogo-A expressions.

Author's address Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, 350001

Key words bone marrow-derived mesenchymal stem cells; spinal cord injury; neurological functions; Nogo-A

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)常导致损伤平面以下感觉、运动功能不可逆丧失,给患者造成极大伤害,给家庭及社会造成极大负担。Nogo-A 是神经轴突生长抑制因子,对轴突再生具有极强抑制作用。既往研究证实抑制 Nogo-A 蛋白的表达有助于脊髓损伤的修复和再生^[1]。近年来,骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells,

BMSCs)已被证明移植后可替代丢失的神经细胞,其

* 基金项目:福建医科大学教授基金项目(JS06077)

1 福建医科大学附属协和医院,福建省福州市新权路 29 号,350001

2 福建省肿瘤医院 ICU

3 福建医科大学基础医学院

4 通讯作者

作者简介:黄洁萍,女,住院医师

收稿日期:2008-09-24

分泌的各种神经生长因子可促进轴突再生, 桥接神经缺损后遗留的空隙^[2-4], 但其促进中枢神经系统的轴突再生的作用是否与下调 Nogo-A 表达有关, 尚未清楚。本实验通过建立大鼠急性 SCI 模型来探讨 BMSCs 移植后促进急性脊髓损伤大鼠神经功能恢复的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级成年雌性 SD 大鼠 96 只 (制备模型), 体重 250—280g/只; 清洁级雄性 SD 大鼠 20 只 (分离培养 BMSCs), 体重 80—100g/只 (上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号 SCXK 沪 2007-0003)。DMEM-LG 培养基、0.25% 胰酶 (GIBCO 公司); 胎牛血清 (FBS) (Hyclone 公司); CD90、CD45 FITC 抗体 (ABD 公司); CD34、CD29PE (Biolegend 公司); CFSE (瑞士 Fluka 公司); 细胞培养瓶 (Corning 公司); 羊抗大鼠 Nogo-A 多克隆抗体 (北京中山生物技术公司); SP 试剂盒及 AEC 染色试剂盒 (福州迈新生物技术有限公司)。CO₂ 培养箱 (Thermo 公司); 倒置相差显微镜 (Olympus 公司); 引物由上海生物工程技术公司合成, Trizol (Invitrogen 公司); PCR 试剂盒及逆转录试剂 (MBI Fermentas 公司); 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica); 凝胶成像分析系统 (Syngene Genius 公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的分离、培养、鉴定及标记。

1.2.1.1 BMSCs 的分离、培养: 采用全骨髓贴壁法分离培养骨髓间充质干细胞, 具体如下: 2% 戊巴比妥 (35mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉大鼠, 75% 酒精消毒皮肤, 无菌操作下取出股骨、胫骨。75% 的酒精浸泡 10min, 移入超净工作台, 无菌培养皿内晾干。剪掉骨头两端, 露出骨髓腔, 用无血清的 DMEM 培养液冲洗骨髓腔, 反复 2—3 次, 以 1000r/min, 离心 5min。离心后弃上清液, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬沉淀的细胞, 将骨髓悬液接种于 25cm² 培养瓶中。5% CO₂ 湿饱和条件下, 37℃ 恒温孵箱培养 24h 后全量换液, 后每 3 天全量换液 1 次, 细胞基本铺满瓶壁后, 以 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.1.2 流式细胞术检测: 调整第 3 代 BMSCs 细胞浓度为 (1—3) × 10⁶/ml, 分装, 分别加入 CD90、CD45 FITC 抗体及 CD34、CD29PE 抗体, 于 37℃ 避光孵育 30min 后检测。

1.2.1.3 移植前细胞标记: 取长满瓶底的第 3 代细胞, 每瓶加入 5mM 的 CFSE 2.5μl 置 37℃ 孵育 10min, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered

solution, PBS) 漂洗 3 次以洗掉未结合的 CFSE, 再加胰酶消化后离心收集细胞, PBS 重悬, 配成 5 × 10⁶/ml 的细胞悬液置于冰浴中 1h 内进行细胞移植。3d 后取部分脑组织用于冰冻切片, 厚度 10μm, 予激光共聚焦显微镜检。

1.2.2 实验动物分组: 雌性 SD 大鼠 96 只, 随机分成假手术组 (Sham 组)、损伤对照组 (SCI 组)、溶剂对照组 (Vehicle 组) 和 BMSCs 治疗组 (BMSCs 组), 共 4 组, 4 组均按造模后时间点不同分为造模成功后 1d、3d、7d、14d 4 个亚组, 每个亚组 6 只。大鼠喂养条件: 22—25℃, 12h 昼夜循环, 可自由进食饲料和饮水的动物房。

1.2.3 手术步骤: 参考 Allen 法制作大鼠急性 SCI 模型^[5], 无菌条件下以 T10 棘突为中心做正中切口, 显露 T9、T10、T11 三个椎节的椎板, 咬除 T10 棘突及椎板, 显露其下方的硬脊膜, 将自制的塑料薄垫片平放于硬脊膜上用自制的 12.5g 重的钢棒在钢管的引导下进行打击, 打击能量为 12.5 × 8gcf (gram × centimeter × force, gcf) 冲量, 以打击后立即出现一过性鼠尾痉挛性摆动和双下肢抽动为造模成功标准。Sham 组大鼠仅单纯咬除椎板, 而不损伤脊髓。BMSCs 组于造模成功后 10min 自大鼠尾静脉缓慢注射 1ml 的骨髓间充质干细胞悬液, 内含 5 × 10⁶ 细胞数 (所用细胞为 3 代细胞), Vehicle 组则注射 0.01M PBS 1ml 为对照, 术中大鼠用小加热毯保持肛温 37℃。

1.2.4 神经行为学评分: 评分观察者为非本试验组人员。在损伤后不同时间点参照 BBB 行为评分法^[6]综合评定 SCI 组、Vehicle 组、BMSCs 组三组大鼠 SCI 后功能, 最小值为 0 分, 表示神经行为功能完全丧失; 最大值为 21 分, 表示行为功能完全正常。

1.2.5 RT-PCR 法检测 Nogo-A 的表达: 分别取各组大鼠脊髓损伤周边区组织 (液氮冻存) 20mg 置玻璃匀浆器中, Trizol 法提取总 mRNA, 严格按照说明书进行。以逆转录 (RT 法) 合成 cDNA, 再进行 PCR 扩增: 参照 GenBank 公布的 Nogo-A 和 GAPDH cDNA 序列, 设计 Nogo-A 上游引物为: 5' - GCCTATTCCTGCTGCTTTCATT-3', 下游引物为: 5' - TGCCTGATGCCGTTTCATAAATA-3' (扩增产物 410bp); GAPDH 上游引物为: 5' - TTCTTGTGCACTGCCAGCCTCGTC-3', 下游引物为: 5' - TAGGAACACGGAAGGCCATGCCAG-3' (扩增产物 738bp)。由上海生物工程技术公司合成目的基因 Nogo-A 和 GAPDH 的引物, 反应条件为: 变性 94℃ 30s, 退火 54℃ 45s, 延伸 72℃ 45s, 反应循环数为

30。以 GAPDH 为内参照同时进行 PCR。扩增产物用 20g/L 琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶成像分析系统半定量分析电泳条带的吸光度,结果以目的基因与 GAPDH 吸光度的比值表示。

1.2.6 Nogo-A 免疫组织化学检测:切取损伤节段相邻头尾节段长约 0.8cm 的脊髓,立即置 4%多聚甲醛固定;脱水、石蜡包埋,冠状面连续切片,切片厚度为 5 μ m;切片经脱蜡至水,30ml/L H₂O₂ 室温孵育 5—10min,高压修复 2—5min;加入一抗羊抗大鼠 Nogo-A 多克隆抗体(工作浓度约为 1:100),4℃湿盒孵育过夜;再加入滴加生物素化兔抗羊的二抗,室温 30min,AEC 显色 10—20min(显微镜下控制显色程度);自来水充分冲洗,终止反应,苏木素复染;滴加水性封片剂,干燥后中性树胶封片。各步骤间用 0.01mol/L PBS(pH7.2)冲洗 5min $\times$ 3 次。对照试验用 PBS 代替一抗。图像分析:每张切片随机选取 10 个高倍视野,各组所选部位相同,分别计数免疫反应阳性的细胞数。

1.3 统计分析

所有数据经过方差齐性检验和正态性检验,实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析,组间两两比较采用 Lsd-*t* 检验, $P<0.05$ 表示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的分离、培养、鉴定

2.1.1 BMSCs 的分离、培养:原代接种 1—2d,细胞

增殖较慢;3d 后观察,细胞呈散在多个集落分布,细胞形态主要为长梭形、成纤维样;4—5d 左右细胞数量明显增加,集落渐扩大;8—9d 基本铺满瓶壁形态为较均一长梭形。原代培养过程中可见部分悬浮造血细胞,经数次换液后其基本消失。传代细胞呈均匀分布,生长迅速,3—4d 可铺满瓶壁,细胞多呈梭形(图 1—2)。

2.1.2 流式细胞仪鉴定结果:所培养的细胞高表达 BMSCs 表面标志分子 CD90 及 CD29 分别为 100% 和 99.7%,而极低表达造血细胞表面分子:CD45、CD34 分别为 0.8%、0.3%(图 3)。



图 1 第三代细胞培养 3d 后分布均匀,细胞多呈梭形 (×100)



图 2 原代培养第 4 天细胞呈散在多个集落分布,形态主要为长梭形

(×100)

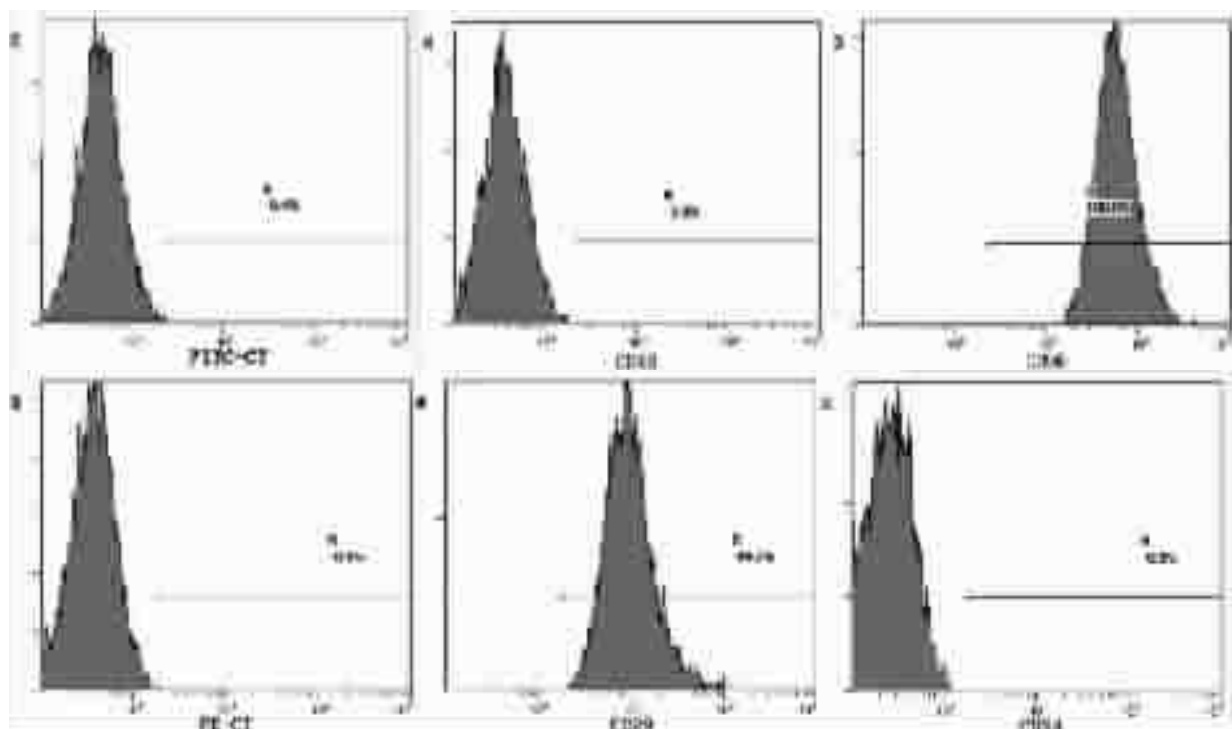


图 3 细胞表面分子 CD90、CD29、CD45 及 CD34 的检测结果

2.1.3 CFSE 标记的荧光观察:激光共聚焦显微镜下 BMSCs 组 3d 在损伤周边部位, 可见散在的聚集成团状的细胞, 部分细胞开始向周围扩散, 可见荧光细胞呈小圆形(图 4, 见彩色插页)。

2.2 大鼠行为学评分结果

BMSCs 组在第 7、14 天 BBB 神经行为学评分优于 SCI 组和 Vehicle 组(第 7 天分别为 $P<0.05$, $P<0.01$; 第 14 天均 $P<0.01$)(表 1)。

2.3 RT-PCR 法检测 Nogo-A mRNA 的表达

Sham 组 Nogo-A mRNA 在各个时间点均呈低水平表达; SCI 组、Vehicle 组及 BMSCs 组于造模成功后第 1 天, Nogo-A mRNA 表达处于较低水平, 之后开始升高, 第 7 天达到高峰, 第 14 天有所下降。SCI 组和 Vehicle 组在各个时间点的 Nogo-A mRNA 表达均高于 Sham 组, 差异具有显著性 ($P<0.01$)。BMSCs 组 Nogo-A mRNA 表达亦高于 Sham 组, 差异具有显著性(除 1d $P<0.05$, 其余各时间点 P 均 <0.01)。BMSCs 组 Nogo-A mRNA 的表达在第 3 天, 第 7 天, 第 14 天均低于 SCI 组和 Vehicle 组, 差异具有显著性($P<0.01$)(表 2, 图 5, 见彩色插页)。

2.4 免疫组化法检测 Nogo-A 的表达

Nogo-A 阳性染色在少突胶质细胞表面排列成环状或半弧形, 阴性对照切片未见 Nogo-A 阳性染色。Sham 组脊髓损伤区周边白质中可见少量散在的 Nogo-A 阳性细胞。SCI 组和 Vehicle 组于造模成功后第 1 天, 在脊髓损伤区周边白质中可见少量 Nogo-A 阳性细胞, 多于 Sham 组, 差异具有显著性 ($P<0.01$); 之后开始逐渐升高, 第 7 天达到高峰, 损伤区周边白质中可见多量的 Nogo-A 阳性细胞, 第 14 天有所下降, 高于 Sham 组, 差异具有显著性 ($P<0.01$)。BMSCs 组 Nogo-A 在损伤区周边白质中阳性细胞数在第 3 天, 第 7 天, 第 14 天均少于 SCI 组和 Vehicle 组, 差异具有显著性 ($P<0.01$); BMSCs 组内 Nogo-A 阳性染色细胞在各个时间点的对比, 第 7 天明显高于第 14 天的表达 ($P<0.01$), 第 14 天高于第 3 天和第 1 天的表达 ($P<0.01$), 见表 3, 图 5(见彩色插页)。

表 1 各组神经行为学评分结果 ($\bar{x}\pm s$, 分, $n=6$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
SCI 组	0.83±0.75	3.50±0.84	6.17±1.17	8.67±1.03
Vehicle 组	1.00±0.89	3.67±0.82	6.00±1.26	8.50±0.55
BMSCs 组	0.83±0.41	3.83±0.41	7.50±0.55 ^{①②}	10.33±1.21 ^③

①与同时时间点 SCI 组比较 $P<0.05$, ②与同时时间点 Vehicle 组比较 $P<0.01$, ③与同时时间点 Vehicle 组及 BMSCs 组比较 $P<0.01$

表 2 各组脊髓损伤区周边不同时间点 Nogo-A mRNA 表达的比较

($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	损伤后第 1 天	损伤后第 3 天	损伤后第 7 天	损伤后第 14 天
Sham 组	0.2144±0.0256	0.2027±0.0197	0.2037±0.0261	0.1991±0.0264
SCI 组	0.2837±0.0336 ^①	0.4576±0.0438 ^{①③}	0.6501±0.0419 ^{①③}	0.5627±0.0293 ^{①③}
Vehicle 组	0.2803±0.0309 ^①	0.4595±0.0421 ^{①③}	0.6227±0.0481 ^{①③}	0.5511±0.0349 ^{①③}
BMSCs 组	0.2661±0.0369 ^②	0.3896±0.0321 ^①	0.5101±0.0466 ^①	0.4287±0.0423 ^①

①与 Sham 组比较 $P<0.01$; ②与 Sham 组比较 $P<0.05$; ③与同时时间点 BMSCs 组比较 $P<0.01$

表 3 各组脊髓损伤区周边不同时间点

Nogo-A 表达的比较

($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	损伤后第 1 天	损伤后第 3 天	损伤后第 7 天	损伤后第 14 天
Sham 组	9.67±2.16	9.17±1.83	9.33±1.86	9.27±2.04
SCI 组	18.17±2.93 ^①	48.84±4.54 ^{①②}	76.33±5.50 ^{①②}	61.83±4.53 ^{①②}
Vehicle 组	19.83±3.97 ^①	48.63±5.34 ^{①②}	73.83±5.23 ^{①②}	59.17±5.21 ^{①②}
BMSCs 治疗组	19.17±3.66 ^①	39.33±4.46 ^①	60.67±3.93 ^①	50.33±3.83 ^①

①与假手术组比较 $P<0.01$; ②与同时时间点 BMSCs 治疗组比较 $P<0.01$

3 讨论

SCI 是一种严重的中枢神经系统损伤。虽然 SCI 后存在轴突再生潜能, 但是中枢神经系统损伤后继发一系列病理变化导致大量轴突再生抑制蛋白释放, 不利于神经功能恢复^[7-8]。Nogo-A 是已知的最主要的髓鞘源性轴突再生抑制蛋白, 由少突胶质细胞产生, 参与 SCI 发生发展的全过程^[9-10]。有学者发现中和性 Nogo-A 抗体(IN-1)能有效地抑制 Nogo-A, 从而诱导长距离轴突再生, 增加结构可塑性, 促进功能恢复^[11-12]。既往研究表明: 移植后的 BMSCs 可增

加神经营养因子、血管内皮生长因子等的表达, 减少缺血半暗带的细胞凋亡, 改善局部血液循环, 从而促进轴突再生和突触重建^[13-16], 进而有利于脊髓损伤后的神经功能恢复。但迄今为止极少见到 BMSCs 与 Nogo-A 在 SCI 相关性研究。

本研究采用全骨髓贴壁法分离培养 BMSCs, 经流式细胞仪鉴定得出高纯度 BMSCs, 经尾静脉进行 SCI 后 BMSCs 移植。于 SCI 后第 3 天在损伤周边区脊髓组织中观察到 CFSE 染色的绿色阳性细胞, 表明移植的 BMSCs 能向脊髓受损部位迁移、募集、存活。并发现大鼠急性 SCI 组织中, 无论是 SCI 组还是 BMSCs 组, 在各个时期 Nogo-A 蛋白的表达量都明显增加; 其趋势为急性 SCI 后第 1 天 Nogo-A 的表达开始增加, 第 7 天达到高峰, 第 14 天较前有所下降, 但仍高于第 3 天的表达。而 BMSCs 组脊髓损伤周边白质中 Nogo-A 阳性细胞数及其 mRNA 水平在第 3 天、第 7 天和第 14 天时均较 SCI 组明显降低; 表明 BMSCs 移植对于 SCI 大鼠脊髓中 Nogo-A

的表达有一定的抑制作用。有学者发现 BMSCs 可表达基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1), 而前者的酶活性高低与髓鞘相关抑制因子的表达量有明显关联, 认为 BMSCs 移植可能通过调节 MMP-1 的表达来抑制髓鞘相关抑制因子如 Nogo-A 的生成, 从而发挥脊髓保护作用^[17-19]。此外骨髓间充质干细胞还可促进突触素的表达, 突触素表达的增加亦可反馈抑制 Nogo-A 的生成^[13,20]。

本实验还发现 SCI 大鼠神经功能缺损受损后第 1 天达到高峰, 尽管随着时间延长有所恢复, 但仍比正常差; 而 BMSCs 组 BBB 神经行为学评分, 在第 7 天和第 14 天优于 SCI 组, 表明 SCI 早期 BMSCs 可在自然恢复基础上有效地促进神经功能恢复。故我们认为 BMSCs 移植可通过下调 SCI 周边白质 Nogo-A 表达, 促进受损的神经功能恢复。值得一提的是, 虽然 BMSCs 组第 1 天和第 3 天时神经功能与 SCI 组均有不同程度的恢复, 但二者 BBB 评分相比无显著性差异, 其原因可能是移植时间短, 其脊髓保护作用尚未在神经功能上体现。另外, 为了避免假阳性结果, 本研究还以 Vehicle 组作为实验对照之一, 该组神经功能变化及 Nogo-A 表达与 SCI 组一致, 进一步证实 BMSCs 移植对脊髓损伤后神经功能恢复的影响与下调 Nogo-A 表达有关。

参考文献

- [1] Huber AB, Weinmann O, Bramble C, et al. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions[J]. J Neurosci, 2002, 22: 3553—3567.
- [2] Chen X, Li Y, Wang L, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production [J]. Neuropathology, 2002; 22(4): 275—279.
- [3] Zhang YH, Grant D. Nicol NGF-mediated sensitization of the excitability of rat sensory neurons is prevented by a blocking antibody to the p75 neurotrophin receptor [J]. Neurosci Lett, 2004, 366(2): 187—192.
- [4] Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2005, 191(2): 344—360.
- [5] Allen AR. Surgery of experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation[J]. Preliminary Report, HANA, 1911, 57: 878—880.
- [6] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection[J]. Exp Neurol, 1996, 139(2): 244—256.
- [7] Olson L. Regeneration in the adult central nervous system: experimental repair strategies[J]. Nat Med, 1997, 3: 1329—1335.
- [8] Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord [J]. Physiol Rev, 1996, 76: 319—370.
- [9] Huber AB, Weinmann O, Bramble C et al. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions[J]. Neurosci, 2002, 22: 3553—3567.
- [10] Qiang Guo, Shu-Rong Li, Bing-Yin Su. Nogo-A immunoreactivity in injured spinal cord of adult rat[J]. Neuroscience Bulletin, 2005, 21(4): 33—35.
- [11] Brosamle C, Huber AB, Fiedler M, et al. Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment [J]. J Neurosci, 2000, 20: 8061—8068.
- [12] Fiedler M, Horn C, Bandtlow C, et al. An engineered IN-1 Fab fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity [J]. Protein Eng, 2002, 15 (11): 931—941.
- [13] 翁金森, 刘楠, 杜厚伟, 等. 骨髓间充质干细胞移植对脑梗塞大鼠神经功能恢复及突触素表达的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(1): 34—37.
- [14] Chen CG, Li Y, Wang L, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production [J]. Neuropathology, 2002, 22(4): 275—279.
- [15] Genoud C, Knott GW, Sakata K, et al. Altered synapse formation in the adult somatosensory cortex of brain-derived neurotrophic factor heterozygote mice [J]. Neurosci, 2004, 24 (10): 2394—2400.
- [16] LI Y, Chen J, Chen XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery [J]. Neurology, 2002, 59(4): 514—523.
- [17] Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases[J]. Stem Cells, 2006, 24 : 1254—1264.
- [18] Belien AT, Paganetti PA, Schwab ME. Membrane type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter[J]. Cell Biol, 1999, 144: 373—384.
- [19] Wright KT, El Masri W, Osman A, et al. Bone marrow stromal cells stimulate neurite outgrowth over neural proteoglycans (CSPG), myelin associated glycoprotein and Nogo-A [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 354: 559—566.
- [20] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke[J]. Stroke, 2007, 38(7): 2150—2156.