

·方药研究·

本文引用:范瑜洁,聂颖,陈安,殷坚,杨奔,李亮.补阳还五汤对移植 BMSCs 在脊髓损伤局部存活、增殖及分化的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(11):1321-1325.

## 补阳还五汤对移植 BMSCs 在脊髓损伤局部存活、增殖及分化的影响

范瑜洁<sup>1</sup>,聂颖<sup>2</sup>,陈安<sup>3</sup>,殷坚<sup>3</sup>,杨奔<sup>3</sup>,李亮<sup>4\*</sup>

(1.湖南省脑科医院中医科,湖南长沙 410007;2.湖南中医药大学第一附属医院脊柱外科,湖南长沙 410007;3.湖南中医药大学人体解剖学教研室,湖南长沙 410208;4.湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室,湖南长沙 410208)

**[摘要]** 目的 探讨补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)对移植骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在脊髓损伤局部存活、增殖及分化的影响。**方法** 将60只雄性SD大鼠随机分为5组:正常组、气虚血瘀组、BYHWD组、BMSCs组、BYHWD+BMSCs组,每组12只。除正常组以外所有大鼠均行脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)气虚血瘀证造模,并予以相应干预,连续28d。通过斜板实验观察前肢运动功能恢复情况,免疫组织化学法检测脊髓局部BrdU、Nestin和GFAP的表达。**结果** 术后14d、28d两个时间点,BYHWD+BMSCs组斜板实验评分及前肢使用率均高于气虚血瘀组( $P<0.05$ ),BYHWD组、BMSCs组相应数据则低于BYHWD+BMSCs组( $P<0.05$ )。免疫组化显示:正常组、气虚血瘀组、BYHWD组未见BrdU阳性细胞表达,BMSCs组仅见少量表达,BYHWD+BMSCs组可见大量表达。正常组可见较少Nestin阳性细胞,气虚血瘀组Nestin阳性细胞应激性增多,BYHWD、BMSCs组及BYHWD+BMSCs组则明显增多,且BYHWD+BMSCs组多于BYHWD、BMSCs组( $P<0.01$ )。BYHWD、BMSCs组及BYHWD+BMSCs组GFAP表达低于气虚血瘀组( $P<0.01$ );BYHWD、BMSCs组GFAP表达高于BYHWD+BMSCs组( $P<0.01$ )。**结论** BYHWD能促进脊髓损伤后移植的BMSCs在脊髓局部存活、增殖并向神经干细胞方向分化。

**[关键词]** 补阳还五汤;骨髓间充质干细胞;脊髓损伤;气虚血瘀证;红核脊髓束

**[中图分类号]**R285.5;R681.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.11.023

### Effect of Buyang Huanwu Decoction on the Survival, Proliferation, and Differentiation of Transplanted Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells After Spinal Cord Injury

FAN Yujie<sup>1</sup>, NIE Ying<sup>2</sup>, CHEN An<sup>3</sup>, YIN Jian<sup>3</sup>, YANG Ben<sup>3</sup>, LI Liang<sup>4\*</sup>

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Brain Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Department of Spine Surgery, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Department of Human Anatomy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostics of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) on the survival, proliferation, and differentiation of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) after spinal cord injury (SCI). **Methods** A total of 60 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, Qi deficiency-blood stasis group, BYHWD group, BMSCs group, and BYHWD+BMSCs group, with 12 rats in each group. All rats except those in the normal group were used to establish a model of SCI with Qi deficiency and blood stasis, and corresponding intervention was given for 28 consecutive days. The inclined plate test was used to observe the recovery of motor function of the forelimb, and immunohistochemistry was used to measure the local expression of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), nestin, and glial fibrillary acidic protein (GFAP). **Results** On days 14 and 28 after surgery, the BYHWD+BMSCs group had significantly higher score of inclined plate test and rate of use of forelimb than the Qi deficiency-blood stasis group ( $P<0.05$ ), while the BYHWD group and the BMSCs group had significantly

**[收稿日期]**2018-01-16

**[基金项目]**国家自然科学基金资助项目(81302899),湖南省科技厅科技计划重点项目(2013SK2023),湖南省中医药科研计划项目(2013111),湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金(2014-37)。

**[作者简介]**范瑜洁,女,硕士,主治医师,从事中医药修复中枢神经系统损伤的研究。

**[通讯作者]**\*李亮,男,博士,副教授,E-mail:liliang@hncetm.edu.cn。

lower data than the BYHWD+BMSCs group ( $P<0.05$ ). Immunohistochemistry showed that there were no BrdU-positive cells in the normal group, the Qi deficiency-blood stasis group, and the BYHWD group; only a small number of BrdU-positive cells were observed in the BMSCs group, and a large number was observed in the BYHWD+BMSCs group. A small number of nestin-positive cells were observed in the normal group; there was a slight increase in the number of nestin-positive cells due to stress in the Qi deficiency-blood stasis group and a significant increase in the BYHWD group, the BMSCs group, and the BYHWD+BMSCs group, and the BYHWD+BMSCs group had a significantly higher number than the BYHWD group and the BMSCs group ( $P<0.01$ ). The BYHWD group, the BMSCs group, and the BYHWD+BMSCs group had significantly lower expression of GFAP than the Qi deficiency-blood stasis group ( $P<0.01$ ), while the BYHWD group and the BMSCs group had significantly higher expression of GFAP than the BYHWD+BMSCs group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** BYHWD can enhance the survival and proliferation of transplanted BMSCs in the spinal cord and promote their differentiation into neural stem cells.

〔**Keywords**〕 Buyang Huanwu Decoction; bone marrow mesenchymal stem cell; spinal cord injury; Qi deficiency and blood stasis; rubrospinal tract

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓中具有多向分化能力的非造血多能干细胞<sup>[1]</sup>。细胞表面目前并没有发现特殊标志物,一般认为 CD29、CD44、CD90、CD105、CD71、SH-2、SH-3 等呈阳性表达,对于造血干细胞标志 CD11b、CD34、CD45 等呈阴性表达<sup>[2]</sup>。此类细胞易于分离、培养和扩增,扩增后仍保留分化潜能,不存在伦理学和免疫排斥问题。因而 BMSCs 移植成为治疗脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的理想选择<sup>[3]</sup>。然而移植的 BMSCs 活力低,在体内不容易存活、增殖和分化,因此如何增强移植 BMSCs 的活力、促进其增殖和分化,成为问题的关键。近年来渐有中医药促进 BMSCs 移植治疗 SCI 的报道,但研究多集中于单味中药及脊髓全横断模型<sup>[4-5]</sup>。我们的前期研究工作发现<sup>[6]</sup>:补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)可减少损伤 SCI 后局部胶质瘢痕的体积,抑制星形胶质细胞的活化和增生,维持其可生长状态,促进前肢功能恢复。故本课题拟以 SCI 气虚血瘀证大鼠为研究对象,旨在深入探讨 BYHWD 对脊髓损伤后移植的 BMSCs 在脊髓局部存活、增殖、分化的影响。

## 1 材料

### 1.1 动物及细胞

成年雄性健康 Sprague-Dawley 大鼠 60 只,体重 200~220 g(合格证编号:43004700014842),由湖南中医药大学实验动物中心提供(许可证编号:SYXK [湘] 2013-0005),饲养环境温度 22~25 °C,相对湿度 50%~70%,自由饮食进水,分笼喂养。BMSCs 购于湖南省长沙市盈润生物技术有限公司(YRbio PC059),细胞浓度为  $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。

### 1.2 BYHWD 制备方法

参照《医林改错·瘫痪论》原方,由黄芪 120 g,

当归尾 9 g,赤芍 4.5 g,川芎 3 g,地龙 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g 组成。上述饮片购于老百姓大药房连锁股份有限公司,符合《中华人民共和国药典》2015 年版质量要求,水煎制成浓度  $1 \text{ g}/\text{mL}$ <sup>[7]</sup>。

### 1.3 主要试剂及仪器

DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司),5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)(美国 SIGMA 公司),兔抗鼠巢蛋白(Nestin)、神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)。KD2258 型手动石蜡切片机(中国浙江金华),BX43 型双目生物摄像显微镜(日本 OLYMPUS)。

## 2 方法

### 2.1 动物造模

除正常组以外所有大鼠均行 SCI 气虚血瘀证造模。气虚造模同文献[7],采用“游泳力竭法”,时间持续 21 d,血瘀造模采用 RST 横断术,通过在脊髓颈椎 C3-C4 之间横断红核脊髓束(rubrospinal tract, RST),建立局部“血瘀”状态<sup>[8]</sup>。气虚指征为游泳动作失调、水淹没鼻尖、身体下沉超过 10 s 不能浮出水面。大鼠游泳后疲惫无力,目微闭,大喘,摇晃甚至后倒,多不动或挪步蹒跚,无力抵抗、一触即倒。血瘀指征为动物苏醒后右侧前肢屈曲,紧贴躯干,运动不协调,右前爪不能张开,表明造模成功。

### 2.2 动物分组及干预

将造模成功的 48 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:气虚血瘀组、BYHWD 组、BMSCs 组、BYHWD+BMSCs 组,每组 12 只,余下 12 只为正常组。BYHWD 组、BYHWD+BMSCs 组以  $25.65 \text{ g}/\text{kg}$ (按照体表面积药物剂量换算公式计算,相当于 70 kg 成人剂量的 2 倍)灌胃<sup>[8]</sup>,1 次/d,连续 28 d,其余各组均以等容量生理盐水灌胃。BMSCs 组和 BYHWD+BMSCs 组在造模后 2 d 予以注射  $10 \mu\text{L}$  被 BrdU 标记的

BMSCs, 其余 3 组在相同的部位注射等容量的生理盐水。药物干预 28 d 处死所有动物。

### 2.3 肢体行为学检测斜板实验<sup>[9]</sup>

造模前、造模后 1、7、14、28 d 作为时间点观察大鼠前肢功能恢复情况。具体方法是将 SD 大鼠身体轴线垂直与斜板纵轴放置,检测停留时间,5 s 后增加斜板角度,每次升高 5°,以大鼠能够停留 5 s 的最大角度为其对应的功能值。每只大鼠测量 3 次,记录分数(即斜度)最高者。

### 2.4 动物取材

各组大鼠麻醉后开胸,经左心室插管至升主动脉,先后用生理盐水、4%多聚甲醛灌注固定,先快后慢,持续约 45 min。取出脊髓,保留以损伤点为中心上下各 2 cm 一段,4 °C 下固定 2 h,进行石蜡包埋及切片,片厚 5 μm。

### 2.5 免疫组化检测脊髓组织 BrdU、Nestin 和 GFAP 表达

脱腊,加入 1%过氧化氢溶液 10 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次,5%正常小牛白蛋白(BSA)+0.3% TritonX-100 室温下封闭 1 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次,滴加兔抗鼠一抗 BrdU、Nestin 和 GFAP(1:100),4 °C 过夜,阴性对照组用 PBS 替代一抗,其余同步骤相同,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次,加入二抗(1:200),37 °C 孵育 1 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次,加入 ABC 复合物,37 °C 孵育 1 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次,DAB 显色试剂盒 37 °C 显色 5 min,复染,二甲苯透明 15 min,中性树脂胶封片。视野内所有选定对象(如:阳性细胞)的平均反应强度,计算光密度值。阳性细胞计算:每只动物取 6 张切片,每张切片取 5 个视野,在 400 倍镜下摄取图像,计算阳性细胞个数。

### 2.6 统计学处理

使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,实验结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用 one-way ANOVA。所有数据均进行正态性、方差齐性检验,方差齐采用 LSD 法,若方差不齐采用 Dunnett T3。不满足正态检验则使用秩和检验。设置  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 动物造模情况

气虚血瘀组、BYHWD 组、BMSCs 组、BYHWD+BMSCs 组大鼠造模后大鼠出现体质量减轻、摄食量减少,毛发暗淡,倦怠嗜睡,口唇、爪甲颜色浅淡,双

目无神,喜欠伸等。伴发右侧前肢屈曲,紧贴躯干,运动不协调,右前爪不能张开,说明 SCI 气虚血瘀证造模成功。

气虚血瘀组中在造模后 12 d 死亡 1 只,BYHWD 组在造模 25 d 死亡 1 只,BMSCs 组在造模 14 d 死亡 1 只。

### 3.2 斜板实验评分

造模前各组斜板实验评分相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。术后 1 d,与正常组相比,其它 4 组评分大幅下降( $P<0.05$ )。术后 14 d、28 d,BYHWD 组、BYHWD+BMSCs 组评分高于气虚血瘀组( $P<0.05$ )。BMSCs 组仅术后 28 d 高于气虚血瘀组( $P<0.05$ )。术后 14 d、28 d,BYHWD 组、BMSCs 组评分低于 BYHWD+BMSCs 组( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠斜板实验评分比较 ( $\bar{x}\pm s, ^\circ$ )

| 组别            | n  | 术前         | 术后 1 d      | 术后 14 d                      | 术后 28 d               |
|---------------|----|------------|-------------|------------------------------|-----------------------|
| 正常组           | 12 | 70.41±5.33 | 70.08±5.32  | 70.11±4.99                   | 70.56±5.30            |
| 气虚血瘀组         | 11 | 71.89±5.30 | 21.03±5.98* | 35.02±6.13*                  | 43.10±5.76*           |
| BYHWD 组       | 11 | 70.54±5.79 | 25.09±4.66* | 44.07±5.21 $\Delta$ *        | 60.88±6.23 $\Delta$ * |
| BMSCs 组       | 11 | 70.14±5.24 | 25.22±5.08* | 42.13±5.70 $\blacklozenge$ * | 59.87±4.08 $\Delta$ * |
| BYHWD+BMSCs 组 | 12 | 71.20±5.66 | 25.27±5.62* | 50.14±5.03 $\Delta$          | 66.31±5.43 $\Delta$   |
| F             |    | 0.43       | 12.86       | 6.87                         | 3.64                  |
| P             |    | 0.92       | 0.00        | 0.00                         | 0.04                  |

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与气虚血瘀组比较, $\Delta$  $P<0.05$ ;与 BYHWD+BMSCs 组比较, $\blacklozenge$  $P<0.05$ 。

### 3.3 各组大鼠脊髓 BrdU、Nestin 和 GFAP 免疫组化结果

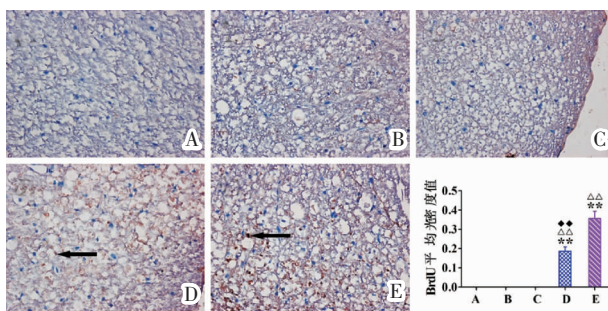
BrdU 细胞核中反应物呈棕褐色阳性表达,正常组、气虚血瘀组、BYHWD 组未见阳性细胞表达,BMSCs 组可见少量表达,与前三组相比有统计学意义( $P<0.01$ );BYHWD+BMSCs 组表达显著上升,高于其他四组。Nestin 细胞核中反应物呈棕褐色强阳性表达,正常组可见少量 Nestin 阳性细胞,气虚血瘀组 Nestin 阳性细胞应激性增多,但与正常组相比无统计学意义( $P>0.05$ );BYHWD 组、BMSCs 组、BYHWD+BMSCs 组明显增多,与前两组相比有统计学意义( $P<0.01$ );且 BYHWD+BMSCs 组多于 BYHWD 组、BMSCs 组( $P<0.01$ )。GFAP 细胞质反应物呈棕褐色阳性表达,正常组仅见少量表达,气虚血瘀组大量表达,明显高于正常组( $P<0.01$ );BYHWD 组、BMSCs 组、BYHWD+BMSCs 组表达减少,与气虚血瘀组相比有统计学意义,但仍高于正常组( $P<0.01$ );BYHWD 组、BMSCs 组表达高于 BYHWD+BMSCs 组( $P<0.01$ )。见表 2、图 1-3。



表 2 各组大鼠脊髓 BrdU、Nestin、GFAP 免疫组化比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

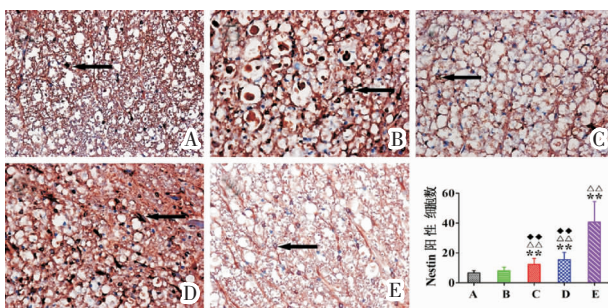
| 组别            | n  | BrdU 光密度值         | Nestin 阳性细胞数     | GFAP 光密度值       |
|---------------|----|-------------------|------------------|-----------------|
| 正常组           | 12 | 0.000±0.000       | 6.56±1.65        | 0.14±0.08       |
| 气虚血瘀组         | 11 | 0.000±0.000       | 8.14±2.43        | 0.74±0.16**     |
| BYHWD 组       | 11 | 0.000±0.000◆◆     | 12.35±3.97**△△◆◆ | 0.38±0.14**△△◆◆ |
| BMSCs 组       | 11 | 0.186±0.023**△△◆◆ | 15.58±4.67**△△◆◆ | 0.40±0.18**△△◆◆ |
| BYHWD+BMSCs 组 | 12 | 0.356±0.038**△△   | 40.66±13.76**△△  | 0.25±0.17**△△   |
| F             |    | 123.2             | 87.06            | 69.86           |
| P             |    | 0.00              | 0.00             | 0.00            |

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与气虚血瘀组比较,△△ $P<0.01$ ;与 BYHWD+BMSCs 组比较,◆◆ $P<0.01$ 。



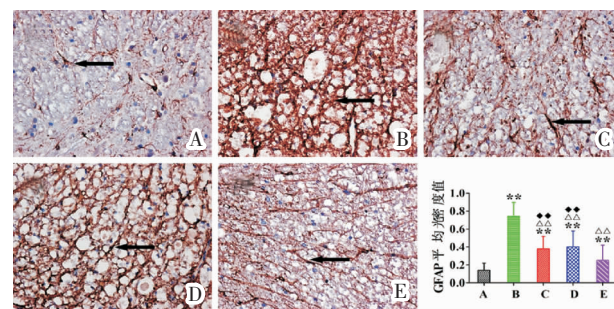
注:A为正常组,B为气虚血瘀组,C为BYHWD组,D为BMSCs组,E为BYHWD+BMSCs组。箭头所指为BrdU在细胞核内表达。

图 1 大鼠脊髓 BrdU 染色( $\times 400$ )



注:A为正常组,B为气虚血瘀组,C为BYHWD组,D为BMSCs组,E为BYHWD+BMSCs组。箭头所指为Nestin阳性细胞。

图 2 大鼠脊髓 Nestin 染色( $\times 400$ )



注:A为正常组,B为气虚血瘀组,C为BYHWD组,D为BMSCs组,E为BYHWD+BMSCs组。箭头所指为GFAP在胞浆内表达。

图 3 大鼠脊髓 GFAP 染色( $\times 400$ )

### 4 讨论

BMSCs 治疗 SCI 的作用机制是多方面的,一方面,在受损中枢神经系统的微环境下,植入宿主的 BMSCs 可以自主地向受损部位迁移,并向神经元样细胞及神经胶质样细胞方向分化<sup>[10]</sup>,进而有助于功能恢复。研究表明,BMSCs 可在体内神经组织中分化为神经元样细胞,诱导后的细胞可表达神经元特异性烯醇化酶、神经丝蛋白、巢蛋白等,阳性表达率近 80%<sup>[11]</sup>;BMSCs 移植到 SCI 局部后可向中枢神经系统内迁移并存活<sup>[12]</sup>;移植的 BMSCs 甚至可以通过血脑屏障,在脑组织内存活,并发生定向迁移、分化和表达<sup>[13-14]</sup>;体外实验中雪旺细胞也能诱导 BMSCs 分化为神经元和少突胶质细胞,并且 BMSCs 的分化能力随年龄上升而下降<sup>[15]</sup>。另一方面,BMSCs 还能通过自分泌或旁分泌途径分泌多种神经营养因子、细胞因子、趋化因子<sup>[16-17]</sup>,包括脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等,进而促进局部微血管再生、神经再生和重构。如向亨延顿(氏)舞蹈病模型大鼠的纹状体内移植 BMSCs 后,其可分化为神经元,同时释放 NGF、BDNF、胶质源性神经营养因子(glial cell line derived factor, GDNF)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factors, CNTF)等神经因子保护纹状体,最终缓解运动功能障碍<sup>[18]</sup>;将脊髓神经元与 BMSCs 共同进行体外培养后,发现 BMSCs 可通过分泌 BDNF 和 GDNF 促进脊髓神经元突起生长的数量和长度<sup>[19]</sup>;Kamei 等<sup>[20]</sup>通过 RT-PCR 的方法从 mRNA 水平也证实了 BMSCs 能够分泌 BDNF 和 VEGF。这部分结果表明,移植的骨髓间充质干细胞可以在体内存活,能够向神经干细胞、神经元或星形胶质细胞分化。

本实验在移植 BMSCs 前使用 BrdU 对其进行了标记。BrdU 是胸腺嘧啶核苷的类似物,在细胞周期的 S 期掺入到增殖或分裂细胞的核内,随着细胞分裂传到子代,只要细胞不消亡,BrdU 将永久地存留在胞核 DNA 中,可以通过免疫组织化学法进行检测。结果显示,正常组、气虚血瘀组、BYHWD 组未见 BrdU 阳性细胞表达,BMSCs 组仅见少量表达,而 BYHWD+BMSCs 组脊髓右后外侧索可见 BrdU 阳性细胞大量表达。这说明 BYHWD 能有效促进移植的 BMSCs 在脊髓局部的存活、增殖。

巢蛋白(Nestin)和神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)

分别为神经干细胞和星形胶质细胞的特异性标志<sup>[21]</sup>, 亦可通过免疫组织化学法进行检测。结果显示, 正常组、气虚血瘀组、BYHWD 组均可见 Nestin 阳性细胞, 这说明体内存在一定数目的内源性神经干细胞; 正常组可见较少 Nestin 阳性细胞, 气虚血瘀组 Nestin 阳性细胞应激性增多, BYHWD 组、BMSCs 组、BYHWD+BMSCs 组则明显增多, 且 BYHWD+BMSCs 组多于 BYHWD 组、BMSCs 组 ( $P<0.01$ ), 这说明 BYHWD 不仅能促进内源性神经干细胞的增殖, 更能有效促进移植的 BMSCs 向神经干细胞方向分化, 使得损伤局部神经干细胞总量增加。气虚血瘀组 GFAP 大量表达, 明显高于正常组, BYHWD 组、BMSCs 组、BYHWD+BMSCs 组表达减少, 这说明 SCI 后脊髓局部星形胶质细胞大量增生, BYHWD、BMSCs 的单独使用以及联合使用都能有效缓解这一增生状况; 与 BYHWD 组、BMSCs 组相比, BYHWD+BMSCs 组表达减少 ( $P<0.01$ ), 这说明 BYHWD 能阻止移植的 BMSCs 向星形胶质细胞方向分化。

以上各指标的检测结果均以 BYHWD+BMSCs 组改变最为明显, 由此可见 BYHWD 能促进移植的 BMSCs 在脊髓局部存活、增殖并向神经干细胞方向分化。

#### 参考文献:

- [1] OJA S, KOMULAINEN P, PENTTILÄ A, et al. Automated image analysis detects aging in clinical-grade mesenchymal stromal cell cultures[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018,9(1):6.
- [2] LEE S, KIM Y, SHIN H S, et al. Comparative characteristics of laryngeal-resident mesenchymal stromal cell populations isolated from distinct sites in the rat larynx [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017,8(1):200.
- [3] MATYAS J J, STEWART A N, GOLDSMITH A, et al. Effects of Bone-Marrow-Derived MSC Transplantation on Functional Recovery in a Rat Model of Spinal Cord Injury: Comparisons of Transplant Locations and Cell Concentrations[J]. *Cell Transplant*, 2017,26(8):1472-1482.
- [4] 王文奇,李一帆,张大威.人参与骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤大鼠功能恢复的影响[J].*中国中西医结合急救杂志*,2014,21(6):401-404.
- [5] 陈东风,黎 晖,杜少辉,等.龟板对植人大鼠损伤脊髓内骨髓间充质干细胞分化为神经元的影响[J].*神经解剖学杂志*,2006,22(2):233-237.
- [6] 陈 安,廖 君,熊艾君,等.补阳还五汤对脊髓损伤后胶质瘢痕及 GFAP 表达的影响[J].*世界中西医结合杂志*,2007,2(10):570-572.
- [7] 扈新刚,张允岭,柳洪胜,等.气虚血瘀大鼠模型表征及血液流变学研究[J].*天津中医药*,2007,24(2):138-141.
- [8] CHEN A, WANG H, ZHANG J, et al. BYHWD rescues axotomized neurons and promotes functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(3): 451-456.
- [9] 李 花,陈 安,李 亮,等.三七总皂苷对大鼠脊髓损伤后 GS 的表达及运动功能恢复的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*,2012,32(11):23-26.
- [10] ZENG R, WANG L W, HU Z B, et al. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(13):997-1005.
- [11] SHAKHBAZAU A V, GONCHAROVA N V, KOSMACHEVA S M, et al. Plasticity of human mesenchymal stem cell phenotype and expression profile under neurogenic conditions[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2009,147(4):513-516.
- [12] CHEN D, ZENG W, FU Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells combined with minocycline improve spinal cord injury in a rat model [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015,8(10):11957-11969.
- [13] WEI Z Z, GU X, FERDINAND A, et al. Intranasal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells improved neurovascular regeneration and rescued neuropsychiatric deficits after neonatal stroke in rats[J]. *Cell Transplant*, 2015,24(3):391-402.
- [14] CUI L L, KERKELÄ E, BAKREEN A, et al. The cerebral embolism evoked by intra-arterial delivery of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in rats is related to cell dose and infusion velocity[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015,6(1):1-9.
- [15] ZHAO F, WU G, WU Y, et al. Effect of Schwann cells on differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells at different ages [J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2011,25(2):160-165.
- [16] WHONE A L, KEMP K, SUN M, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor[J]. *Brain Res*, 2012,1431:86-96.
- [17] TAGHI G M, GHASEM KASHANI MARYAM H, TAGHI L, et al. Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors[J]. *Cell Biol Int*, 2012,36(12):1239-1249.
- [18] JIANG Y, LV H, HUANG S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells can improve the motor function of a Huntington's disease rat model[J]. *Neurol Res*, 2011,33(3):331-337.
- [19] GU W, ZHANG F, XUE Q, et al. Bone mesenchymal stromal cells stimulate neurite outgrowth of spinal neurons by secreting neurotrophic factors[J]. *Neurol Res*, 2012, 34(2):172-180.
- [20] KAMEI N, TANAKA N, OISHI Y, et al. Bone marrow stromal cells promoting corticospinal axon growth through the release of humoral factors in organotypic cocultures in neonatal rats[J]. *J Neurosurg Spine*, 2007,6(5):412-419.
- [21] 韦琛静,周小青,刘旺华,等.丹龙醒脑方对局灶性脑缺血大鼠 CA1 区 Nestin 和 GFAP 表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2014,34(5):9-13.