

①

## 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后脑组织上清液 诱导骨髓基质细胞神经分化

谢 岷, 杨于嘉, 刘沉涛, 王庆红, 王 霞, 余小河

(中南大学湘雅医院儿科, 长沙 410008)

**[摘要]** 目的:观察缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠不同时间点脑组织上清液对骨髓基质细胞(BMSCs)向神经细胞分化的影响。方法:7日龄新生SD大鼠结扎左颈总动脉制作HIBD模型( $n=15$ ),另设15只正常同日龄新生大鼠。两组分别在HIBD后24h(8日龄)、72h(10日龄)及7d(14日龄)时处死( $n=5$ )。分别制备左、右脑组织上清液。将培养3~5代的SD大鼠BMSCs接种于预先置有盖玻片24孔板中,正常培养至细胞达到60%~70%融合后,分别加入上述时间点的脑组织上清液,另正常换液未加上清液组为未干预组。培养3d后行神经元特异性烯醇酶(NSE)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、少突胶质细胞前体细胞标记 $O_4$ 的免疫荧光检测,计算阳性率。结果:未干预各组细胞仅有少量NSE、GFAP及 $O_4$ 的表达,正常大鼠各时间点左、右脑上清液共培养各组细胞NSE、GFAP及 $O_4$ 阳性率较未干预组增加(均 $P<0.01$ ),但左、右两侧比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。HIBD后24h组、72h组左脑(损伤侧)上清液共培养组细胞NSE、 $O_4$ 的阳性率明显增加,分别与同时间点右侧及正常组同一时间点的左、右侧比较,差异有统计学意义(分别 $P<0.05$ , $P<0.01$ ),HIBD后7d左、右脑上清液共培养组细胞NSE、GFAP及 $O_4$ 的阳性率相近,分别与正常组同一时间点比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。HIBD后24h组左脑上清液共培养组细胞NSE、 $O_4$ 的阳性率较HIBD后72h组及7d组左脑上清液共培养组细胞NSE、 $O_4$ 的阳性率高,差异有统计学意义(均 $P<0.01$ )。结论:正常鼠、HIBD鼠脑上清液均能诱导BMSCs发生神经分化,以HIBD后24h损伤侧脑上清液对BMSCs的神经分化率最高。

**[关键词]** 上清液; 骨髓基质细胞; 细胞分化; 缺氧; 缺血; 脑; 大鼠

**[中图分类号]** R743.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)04-0557-06

## Differentiation of rat bone marrow stromal cells into neural cells induced by hypoxic-ischemic brain tissue extracts in neonate rats

XIE Min, YANG Yu-jia, LIU Chen-tao, WANG Qing-hong, WANG Xia, YU Xiao-he

(Department of Paediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of brain tissue extracts in neonate rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) on the differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) into neural cells. **Methods** Fifteen 7-day-old neonate rats were induced HIBD by left carotid artery ligation and hypoxia exposure, and another 15-day-old neonate rats were served as normal rats. The left and right brain tissue extracts of the normal and HIBD rats were prepared 24 h after the HIBD (8-day old), 72 h after the HIBD (10-day old), and 7 d after the HIBD (14-day old), respectively ( $n=5$ ). The rat BMSCs of passage 3~5 were cultured in the medium with or without

①收稿日期(Date of reception) 2006-06-30

作者简介(Biography) 谢岷(1972-),女,湖南祁阳人,主治医师,博士研究生,主要从事新生儿脑损伤的研究。

通讯作者(Corresponding author) 杨于嘉, E-mail:yyjcjcp@163.com

基金项目(Foundation item) 国家自然科学基金(30672240) This work was supported by National Nature Science Foundation of China (30672240)

previous brain tissue extracts. The expressions of neuron specific encolase (NSE), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and  $O_4$  marked oligodendrocyte were detected after 3 days by immunocytochemistry. **Results** The expressions of NSE, GFAP and  $O_4$  of BMSCs cultured in the medium with left or right brain tissue extracts of different day old normal rats were higher than those of BMSCs cultured without the extracts, respectively ( $P < 0.01$ ), and the expressions of NSE, GFAP and  $O_4$  of BMSCs cultured in the medium with left brain tissue extracts of 8-day-old and 10-day-old HIBD rats were higher than those of BMSCs cultured with right brain tissue extracts of the same day HIBD rats and BMSCs cultured with left or right brain tissue extracts of the same day normal rats ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The expressions of NSE, GFAP and  $O_4$  of BMSCs cultured in the medium with left brain tissue extracts of 8-day-old HIBD rats were higher than those of BMSCs cultured with left brain tissue extracts of 10-day-old and 14-day-old HIBD rats ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The brain tissue extracts of normal and HIBD rats can induce BMSCs into neural cells, and the damaged brain tissue extracts of 8-day-old HIBD rats is the best inductor.

**Key words:** extracts; bone marrow stromal cell; cell differentiation; hypoxia; ischemia; brain; rats

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007, 32(4):0557-06]

干细胞移植治疗中枢神经系统疾病,如帕金森病、创伤性脑外伤、脑血管疾病及缺氧缺血性脑损伤是有效的并相对安全的<sup>[1-4]</sup>,为临床神经系统疾病的治疗带来了曙光,并在部分临床试验中得到了验证<sup>[5-6]</sup>。目前认为骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)治疗脑损伤的机制之一是BMSCs向神经细胞分化后的替代作用。BMSCs具有多向分化潜能,在不同的诱导条件下,能向软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞分化<sup>[7-9]</sup>。而通过抗氧化剂、生长因子以及共培养的方法诱导BMSCs向神经细胞分化的研究中,因所采用的诱导方法不同,神经细胞的分化率以及存活时间有明显差别,提示BMSCs所处的环境对其分化起决定性作用。脑损伤后何时的微环境最有利于BMSCs向神经细胞分化,目前尚不清楚。本研究利用脑组织上清液模拟脑内微环境,与BMSCs共培养,观察新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)后24 h, 72 h及7 d左、右脑组织上清液对BMSCs神经分化的影响,为BMSCs移植治疗HIBD最佳移植时间窗的选择提供依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 7日龄(33只)及4周龄Sprague-Dawley大鼠(6只)(清洁级),由中南大学实验动物学部提供。DMEM低糖培养基系Gibco BRL公

司产品,小牛血清由中南大学细胞中心提供,hoechst33324系美国Sigma公司产品,兔抗神经元特异性烯醇酶(NSE)、兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)均系北京中杉试剂公司产品,小鼠抗少突胶质细胞前体细胞标记 $O_4$ 系Chemicon公司产品。

### 1.2 方 法

**1.2.1 BMSCs 培养** 用全骨髓培养法培养BMSCs。取4周龄SD大鼠,10%水合氯醛0.2~0.3 mL/100 g腹腔注射麻醉后,无菌条件下取出四肢骨,剪开干骺端,用D-Hanks液仔细冲洗骨髓腔,将冲洗下的组织反复通过1 mL注射器制成细胞悬液,1 000 r/min离心10 min,弃上清,用含10%小牛血清的DMEM重悬细胞,1 × 10<sup>7</sup>/mL密度接种于50 mL培养瓶中,24 h后换液,去除未贴壁细胞,以后2~3 d换液,待贴壁细胞达90%融合后,用0.25%胰蛋白酶消化传代。

**1.2.2 HIBD 模型制作方法** 参照文献[10],7日龄SD新生鼠,乙醚吸入麻醉,行颈部正中切口,长1.0~1.5 cm,依次分离皮肤、皮下脂肪及肌肉,分离出左侧颈总动脉并用7-0灭菌丝线双线结扎,中间断开血管,缝合伤口并再次消毒皮肤。整个手术过程在15 min内完成。休息2 h后,将大鼠置于低氧舱内,按一定比例输入氧气和氮气,测氧仪监测氧浓度在7%~9%,舱内温度控制在(36 ± 2) °C,湿度为(70 ± 5)%,缺氧时间持续2 h。实验结束后将大鼠放回鼠笼由母鼠行母乳喂养。实验过程中3只大鼠死亡。

1.2.3 脑组织匀浆上清液制备 HIBD 后 24 h (8 日龄)、72 h (10 日龄) 及 7 d (14 日龄) 时, 每个时间点冰冻麻醉后处死 HIBD 大鼠和同日龄正常大鼠各 5 只, 无菌条件下取出左右大脑, 迅速称重, 加入 DMEM 低糖培养基 (100 mg/mL), 置冰上 10 min, 匀浆器匀浆, 4 °C 以 10 000 r/min, 离心 15 min, 收集上清。

1.2.4 脑组织匀浆上清与 BMSCs 共培养 将培养 3 ~ 5 代的 SD 大鼠 BMSCs 接种于预先置有盖玻片 24 孔板中, 正常培养至细胞达到 60% ~ 70% 融合后, 分别将 8 日龄、10 日龄及 14 日龄正常鼠和 HIBD 鼠左脑上清液、右脑上清液与 DMEM 培养基以 1:1 的比例混合后与 BMSCs 共培养。另正常换液未加上清液组为未干预组, 每组 12 孔, 培养 3 d 后行 NSE, GFAP, O<sub>4</sub> 免疫荧光检测, 计算阳性率。

1.2.5 免疫细胞化学法检测 共培养 3 d 后, 将盖玻片取出, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗 2 次 × 5 min, 0.1% Triton-X-100 15 min, PBS 漂洗 2 次 × 5 min, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 30 min, PBS 漂洗 2 次 × 5 min, 正常山羊血清室温封闭 15 min, 分别加入 NSE (1:100), GFAP (1:100), O<sub>4</sub> (1:100) 置湿盒 4 °C 冰箱过夜。从冰箱拿出后, 置室温复温 1 h, PBS 漂洗 3 次 × 5 min, 加入二抗, 山羊抗小鼠 IgG-Cy3 (1:50), 山羊抗兔 IgG-FITC (1:100) 避光孵育 15 min, PBS 漂洗 3 次 × 5 min, Hoechst33342 (10 ng/mL) 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次 × 5 min, 干后, 50% 缓冲甘油封片, 阴性对照用 PBS 取代一抗。荧光显微镜下计数 (每张切片计数 10 个非重叠视野), 计算阳性率。

1.3 统计学处理 统计学处理采用 SPSS 10.0 软件进行。实验数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 各组间比较用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

刚接种的细胞种类较多, 经 2 ~ 3 次传代后, 形成较为典型的大鼠 BMSCs, 主要为 II 型细胞, 长梭形为主, 并且在局部呈现同向性生长的特点。加入脑组织匀浆上清诱导后 3 d, 部分长梭形细胞体回缩, 突起增多、伸长、变细, 类似神经细胞形态。免疫荧光结果显示未干预各组细胞仅有少量 NSE, GFAP 及 O<sub>4</sub> 的表达, 正常大鼠各时间点 (8 日龄、10 日龄、14 日龄) 左、右脑上清液共培养各组细胞 NSE, GFAP 及 O<sub>4</sub> 阳性率较未干预组增加 (均 P < 0.01), 但左、右两侧比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。8 日龄 HIBD 鼠、10 日龄 HIBD 鼠组左脑 (损伤侧) 上清液共培养组细胞 NSE, O<sub>4</sub> 的阳性率明显增加, 分别与同时时间点右侧 (未结扎侧) 及正常组同一时间点的左、右侧比较, 差异有统计学意义 (分别 P < 0.05, P < 0.01), 14 日龄 HIBD 鼠左、右脑上清液共培养组细胞 NSE, GFAP 及 O<sub>4</sub> 的阳性率相近, 分别与正常组同一时间点比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。8 日龄 HIBD 鼠左脑上清液共培养组细胞 NSE, O<sub>4</sub> 的阳性率较 10 日龄 HIBD 鼠、14 日龄 HIBD 鼠左脑上清液共培养组细胞 NSE, O<sub>4</sub> 的阳性率高, 差异有统计学意义 (P < 0.01) (表 1, 图 1 ~ 9)。

表 1 各组大鼠脑上清液诱导 BMSCs 表达 NSE, GFAP 和 O<sub>4</sub> 阳性率的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Table 1 Comparison of NSE, GFAP, and O<sub>4</sub> expression of BMSCs induced by different brain tissue extracts ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	左脑上清液			右脑上清液		
	NSE	GFAP	O <sub>4</sub>	NSE	GFAP	O <sub>4</sub>
未干预组	4.14 ± 3.10	4.55 ± 1.68	3.86 ± 2.67	—	—	—
8 日龄正常鼠	49.85 ± 4.31 **	26.15 ± 4.60 **	35.05 ± 5.29 **	48.87 ± 4.67 **	26.33 ± 6.17 **	34.81 ± 2.64 **
8 日龄 HIBD 鼠	84.93 ± 8.70 **△△#	33.71 ± 7.01 **△△#	47.68 ± 7.59 **△△#	51.74 ± 7.09 **	28.34 ± 8.18 **	38.26 ± 5.72 **
10 日龄正常鼠	46.71 ± 3.67 **	24.4 ± 6.51 **	31.69 ± 4.47 **	45.87 ± 5.30 **	25.36 ± 4.32 **	31.13 ± 3.05 **
10 日龄 HIBD 鼠	72.45 ± 8.11 **△△#▲▲	30.21 ± 6.33 **△	39.45 ± 6.54 **△△#▲▲	49.57 ± 6.85 **	26.28 ± 6.50 **	34.37 ± 5.63 **
14 日龄正常鼠	44.73 ± 4.69 **	25.5 ± 6.26 **	30.70 ± 4.79 **	43.89 ± 3.68 **	24.09 ± 4.78 **	30.38 ± 3.68 **
14 日龄 HIBD 鼠	49.19 ± 4.52 **▲▲\$	29.98 ± 8.05 **	34.04 ± 5.02 **▲▲\$	46.48 ± 3.89 **	26.73 ± 4.43 **	33.78 ± 3.23 **

与未干预组比较, \*\* P < 0.01; 与同日龄正常左脑比较, △ P < 0.05, △△ P < 0.01; 与同日龄 HIBD 右脑比较, # P < 0.05, ## P < 0.01; 与 8 日龄 HIBD 鼠左脑比较, ▲▲ P < 0.01; 与 10 日龄 HIBD 鼠左脑比较, \$ P < 0.01

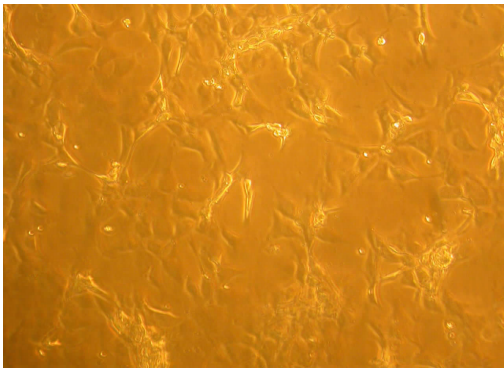


图1 第3代大鼠 BMSCs 主要为 II 型细胞,长梭形为主 (×100)

Fig. 1 Most of BMSCs of passage 3 displayed spindle-shaped (×100)

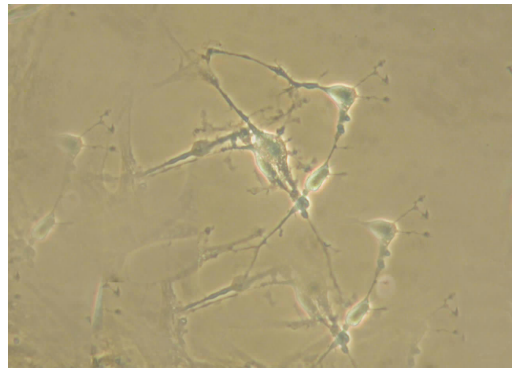


图2 脑组织上清诱导后 3 d,部分长梭形 BMSs 细胞胞体回缩,突起增多、伸长、变细(×100)

Fig. 2 BMSCs induced by brain tissue extracts displayed neural cells morphologies with cell body retracting and elongate (×100)

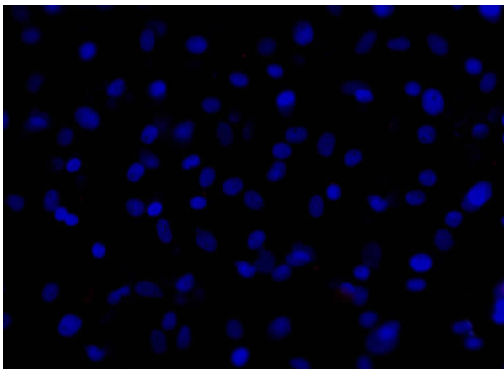


图3 阴性对照组 BMSCs 胞核呈蓝色,胞浆不表达 NSE (×200)

Fig. 3 Nucleus of BMSCs of negative group stained blue with Hoechst 33342(×200)

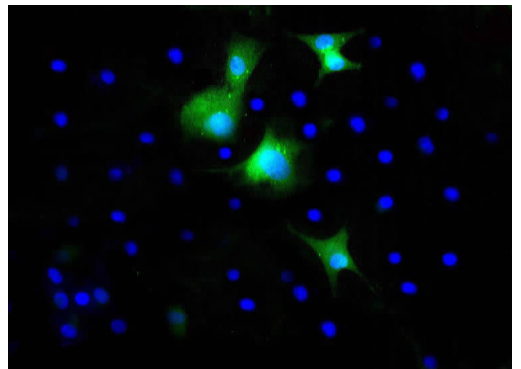


图4 未干预组中仅有少量 BMSCs 胞浆表达 NSE(绿色荧光,×200)

Fig. 4 A few BMSCs cultured without brain tissue extracts expressing NSE (green, ×200)

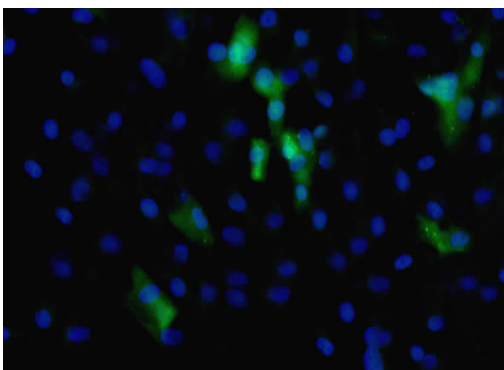


图5 未干预组中仅有少量 BMSCs 胞浆表达 GFAP(绿色荧光,×200)

Fig. 5 A few BMSCs cultured without brain tissue extracts expressing GFAP (green, ×200)

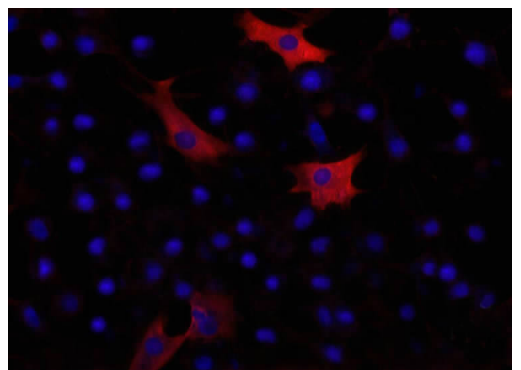


图6 未干预组中仅有少量 BMSCs 胞浆表达 O<sub>4</sub>(红色荧光,×200)

Fig. 6 A few BMSCs cultured without brain tissue extracts expressing O<sub>4</sub>(red, ×200)

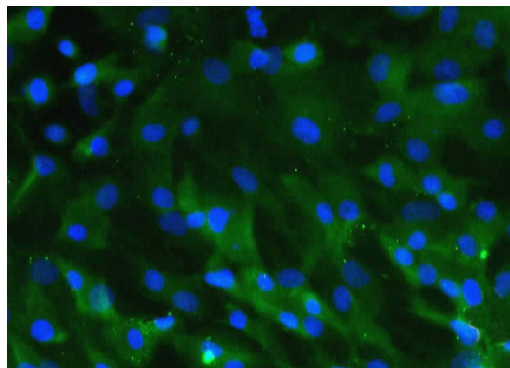


图7 HIBD后24 h左脑(损伤侧)上清诱导后 BMSCs 胞浆表达 NSE 明显增多(绿色荧光, ×200)

Fig. 7 More BMSCs induced by left (damage) brain tissue extracts of 8-day-old HIBD rats expressing NSE (green, ×200)

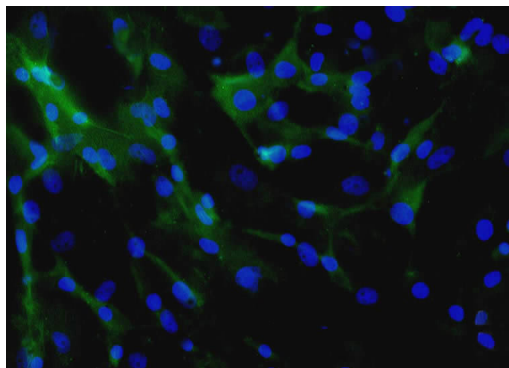


图8 HIBD后24 h左脑(损伤侧)上清诱导后 BMSCs 胞浆表达 GFAP 明显增多(绿色荧光, ×200)

Fig. 8 More BMSCs induced by left (damage) brain tissue extracts of 8-day-old HIBD rats expressing GFAP (green, ×200)

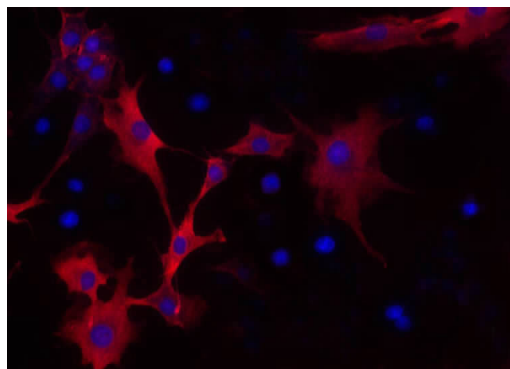


图9 HIBD后24 h左脑(损伤侧)上清诱导后 BMSCs 胞浆表达 O<sub>4</sub> 明显增多(红色荧光, ×200)

Fig. 9 More BMSCs induced by left (damage) brain tissue extracts of 8-day-old HIBD rats expressing O<sub>4</sub> (red, ×200)

### 3 讨 论

目前 BMSCs 的分离培养方法已较为成熟,主要利用其黏附特性以及细胞密度的差别来分离细胞,其中全骨髓培养法和密度梯度离心法是最为常用的2种方法。采用这两种方法培养的 BMSCs 细胞不表达 CD31, CD34, CD45 等造血系统标记物,而表达 CD29, CD45 等干细胞标记物,而且具有多向分化潜能。本研究采用的是全骨髓培养法,经过2~3次传代后, BMSCs 较为纯化。主要为 II 型大鼠 BMSCs 细胞,长梭形为主,并且在局部呈现同向性生长的特点,形态上与腾晓华等<sup>[11]</sup>报道类似。目前认为 BMSCs 移植治疗脑损伤的机制之一是 BMSCs 向神经细胞分化后的替代作用。成

年大鼠大脑中动脉缺血(MCAO)模型体内移植 BMSCs 的研究结果显示大部分 BMSCs 分布在缺血灶中心及其周边,移植到脑内的 BMSCs 神经元分化率低,一般为 1% ~ 2%<sup>[12-13]</sup>,而 Munoz-Elias 等<sup>[14]</sup>将成年大鼠 BMSCs 同种异体移植到胎鼠侧脑室内,嗅球及额叶皮质内 BMSCs 的 NeuN 阳性率达到 70% ~ 100%,提示不同的脑内环境对 BMSCs 的神经分化作用不同。由于 NSE 可以在早期神经前体细胞表达,一直持续至神经元成熟,GFAP 是星形胶质细胞的标记,O<sub>4</sub> 是未成熟少突胶质细胞标记,少突胶质细胞是中枢神经系统的髓鞘形成细胞,包绕神经纤维的轴突形成髓鞘,对轴突正常快速电传导等功能有重要作用。因此本研究参照文献<sup>[15-17]</sup>,利用脑组织上清液体外模拟脑内微环境,比较新生大鼠 HIBD 后 24 h(8 日龄),72 h(10 日龄)及 7 d(14 日龄)的脑内微环境对 BMSCs 的 NSE,GFAP 和 O<sub>4</sub> 表达的影响。结果显示:上述不同日龄正常大鼠左、右脑上清液均可诱导 BMSCs 表达 NSE,GFAP 和 O<sub>4</sub>,但左、右脑无明显差别;HIBD 后 24 h,72 h 左脑(损伤侧)上清液诱导后, BMSCs 表达 NSE,GFAP, O<sub>4</sub> 的阳性率明显增加,分别与同时时间点右脑(未损伤侧)以及同日龄正常鼠左、右脑上清液比较有明显差别,以 HIBD 后 24 h 左脑(损伤侧)上清液诱导后 NSE,GFAP, O<sub>4</sub> 的阳性率最高。HIBD 后 7 d 左脑(损伤侧)上清液诱导与同时时间点右脑(未损伤侧)以及同日龄正常鼠左、右脑上清液诱导比较, BMSCs 的 NSE,GFAP 和 O<sub>4</sub> 表达无明显差别。提示新生大鼠 HIBD 后 24 h 脑内微环境最有利于 BMSCs 的神经分化,而且主

要向神经元及少突胶质细胞方向分化,这对于 HIBD 的修复具有重要意义,因为新生动物 HIBD 属弥漫性脑损伤,不仅有神经元的缺血坏死,还有白质损伤,后者是引起慢性神经功能障碍——脑瘫的主要原因。BMSCs 的神经分化是一复杂过程,HIBD 后不同时间点脑组织上清液对 BMSCs 神经分化的差异,反应了 HIBD 后不同时间脑内微环境的差异。但在脑上清液中对 BMSCs 的神经分化起关键作用的是什么成分,尚需进一步研究。从体外研究的结果中笔者推测 HIBD 后尽早进行 BMSCs 移植,可增加 BMSCs 的神经分化,提高移植效果。本研究选择 HIBD 后 24 h 为起始点,主要考虑到新生动物是一特殊群体,其脑仍处于发育的关键期,比成年脑有更强的可塑性,HIBD 后是否会留下神经系统后遗症以及后遗症的严重程度存在个体差异,移植太早一方面由于新生儿抵抗力差,可能会增加死亡率,而且对某些能通过自身修复基本恢复正常的患儿造成不必要的浪费,加重家庭负担,而对 HIBD 后留下严重后遗症的患儿如果移植太晚,则会错过某些感觉运动的发育。HIBD 后 24 h ~ 7 d 这一阶段,脑损伤的症状会逐渐出现,选择这个阶段研究更有利于进一步的研究。

#### 参考文献:

[1] Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21(1):33-39.

[2] Li Y, Chen J, Zhang C L, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells [J]. *Glia*, 2005, 49(3):407-417.

[3] Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1):102-109.

[4] 王霞,杨于嘉,余小河,等.神经干细胞移植对 HIBD 新生大鼠学习记忆的影响[J].*中国病理生理杂志*, 2005, 14(1):1491-1494.

WANG Xia, YANG Yu-jia, YU Xiao-he, et al. Grafting neural stem cells improve the impaired cognitive deficits and spatial recognition after ischemic-hypoxic brain damage in neonatal rats [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2005, 14(1):1491-1494.

[5] Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease [J]. *Neuroreport*, 1997, 8(14):3-10.

[6] Bang O Y, Lee J S, Lee P H, et al. Autologous mesenchy-

mal stem cell transplantation in stroke patients [J]. *Ann Neurol*, 2005, 57(6):874-882.

[7] Hung S C, Chen N J, Hsieh S L, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow [J]. *Stem Cells*, 2002, 20(3):249-258.

[8] D'Ippolito G, Diabira S, Howard G A, et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 14):2971-2981.

[9] Tropel P, Noel D, Platet N, et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 295(2):395-406.

[10] Rice J E, Vannucci R C, Brierley J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2):131-141.

[11] 滕晓华,邹雨汐,徐如祥,等.神经移植的种子细胞:大鼠骨髓基质细胞部分生物学特性[J].*中国临床康复*, 2005, 9(5):52-54.

TENG Xiao-hua, ZOU Yu-xi, XU Ru-xiang, et al. Seed cells in neural transplantation: some biological characteristics of bone marrow stromal cells in rats [J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2005, 9(5):52-54.

[12] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(4):1005-1011.

[13] Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, et al. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats [J]. *Brain Res*, 2004, 1007(1-2):1-9.

[14] Munoz-Elias G, Marcus A J, Coyne T M, et al. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(19):4585-4595.

[15] Chen X, Katakowski M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69(5):687-691.

[16] 肖庆,张亚卓,王红云,等.损伤脑组织诱导骨髓基质细胞向神经元方向分化[J].*中华神经外科杂志*, 2003, 19(2):132-134.

XIAO Qing, ZHANG Ya-zhuo, WANG Hong-yun, et al. Differentiation of rat bone marrow stromal cells into neuron induced by homogenate of damaged brain [J]. *Chin J Neurosurg*, 2003, 19(2):132-134.

[17] 娄晓辉,张亚卓,王红云,等.大鼠梗死脑组织上清诱导人骨髓基质细胞向神经细胞分化[J].*温州医学院学报*, 2004, 34(1):23-27.

LOU Xiao-hui, ZHANG Ya-zhuo, WANG Hong-yun, et al. Differentiation of human bone marrow stromal cells into neural cells induced by infarcted cerebral constitution of rats [J]. *J Wenzhou Med College*, 2004, 34(1):23-27.