论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201407181

硫酸软骨素酶ABC联合骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤后神经功能的恢复作用

李敬花,张 涛,张红军,余 雨,卢旻鹏,邵高海 (402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院骨科)

[摘要] **目的** 探讨骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)移植联合硫酸软骨素酶ABC(chondro-itinrase ABC,ChABC)降解对脊髓损伤后神经功能修复作用。**方法** 成年雄性SD大鼠60只,制作脊髓损伤模型并按随机数字表法分成4组($n=15$):假手术组(A组)、ChABC降解组(B组)、BMSCs移植组(C组)、ChABC联合BMSCs移植组(D组)。4组分别在术后7、14 d观察记录动物情况并处死动物进行标本检测。伤后7、14 d,BBB评分评价大鼠后肢运动感觉功能;伤后7 d TUNEL法检测神经细胞凋亡情况;伤后14 d,HE染色测损伤区总面积;免疫组化法观察胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)、神经丝蛋白-200(NF-200)和勿动蛋白A(Nogo-A)的表达。**结果** 伤后7 d各组BBB评分比较差异无统计学意义($P>0.05$);伤后14 d,4组BBB评分分别为(6.33±1.00)、(7.25±0.96)、(7.33±0.58)、(9.75±0.96)分。D组BBB评分明显高于其他3组($P<0.05$);伤后14 d,HE染色结果显示,4组损伤区均形成空洞,4组空洞相对面积分别为(4.44±0.18)、(3.70±0.21)、(3.23±0.22)、(2.33±0.31)mm^2,D组空洞面积显著小于其他3组($P<0.05$);伤后14 d GFAP/Nogo-A免疫组化染色结果显示D组GFAP/Nogo-A表达低于他3组($P<0.05$);NF-200免疫组化染色结果显示D组阳性表达显著高于其他3组($P<0.05$);伤后7 d TUNEL法检测结果显示D组阳性细胞数显著低于其他3组($P<0.05$)。**结论** ChABC联合BMSCs移植可以溶解胶质瘢痕,减少神经元细胞凋亡,促进神经纤维再生并越过脊髓损伤区域,对脊髓损伤后有明显的修复作用。

[关键词] 脊髓损伤;ChABC;BMSCs;GFAP;NF-200;细胞凋亡
[中图法分类号] R345;R617;R651.2 [文献标志码] A

Effect of bone mesenchymal stem cell transplantation combined with chondroitinase ABC on nerve function recovery in rats after spinal cord injury

Li Jinghua, Zhang Tao, Zhang Hongjun, Yu Yu, Lu Minpeng, Shao Gaohai (Department of Orthopedics, the Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing, 402160, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation combined with chondro-itinrase ABC (ChABC) on the recovery of nerve function after spinal cord injury in rats. **Methods** A total of 60 adult male SD rats were selected, and the spinal cord injury model was established. The rats were randomly divided into 4 groups (15 rats per group): a control group (group A), a BMSCs transplantation group (group B), a ChABC injection group (group C), and a ChABC + BMSCs transplantation group (group D). The rat conditions on the 7th and 14th days after injury were recorded, and the rats were executed to detect specimens. Basso-beattie-bresnahan (BBB) score was used to evaluate the rat hind leg movement functions. On the 7th day after injury, the level of neuron apoptosis was detected with TUNEL assay, and on the 14th day after injury, HE staining was used to calculate the total area of the injured zones. Immunohistochemical assay was employed to examine the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), neurofilament-200 (NF-200) and Nogo-A protein in the injured spinal cord. **Results**

[基金项目] 重庆市卫生局医学重点研究项目(2012-1-060)
[通信作者] 邵高海,E-mail:shaogaohai567@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1530.067.html(2014-12-05)

On the 7th day after injury, no significant differences in the BBB scores wre found among the 4 groups (P = 0.892). On the 14th day after injury, the BBB scores of groups A to D were 6.33 ± 1.00, 7.25 ± 0.96, 7.33 ± 0.58, and 9.75 ± 0.96, respectively, and the BBB score of group D was obviously higher than that of the other three groups (P < 0.05). On the 14th day after injury, HE staining showed that the cavities were formed in the injured zones, and the cavity areas of groups A to D were: 4.44 ± 0.18, 3.70 ± 0.21, 3.23 ± 0.22, and 2.33 ± 0.31, respectively. The injured area of group D was significantly smaller than that of the other three groups (P < 0.05). On the 14th day after injury, the immunohistochemical assay showed that the expression of GFAP/Nogo-A in group D was obviously lower than that of the other three groups (P < 0.05), while the expression of NF-200 in group D was obviously higher (P < 0.05). On the 7th day after injury, the TUNEL result showed that the apoptosis cells in group D were significantly less than those in the other three groups (P < 0.05). **Conclusion** BMSCs transplantation combined with ChABC can dissolve glial scar, reduce neuron apoptosis, and promote the regeneration of nerve fibers to cross the injured spinal cord zones, having significant repair effect on spinal cord injury.

[**Key words**] spinal cord injury; ChABC; BMSCs; GFAP; NF-200; cell apoptosis

Supported by the Key Project of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-1-060). Corresponding author: Shao Gaohai, E-mail: shaogaohai567@163.com

脊髓损伤属于严重的中枢神经系统损伤,其修复难点在于如何使损伤后的神经元再生及轴突生长并形成有效连接。胶质瘢痕形成的机械屏障及众多的神经生长抑制因子形成的化学屏障是造成其功能难以修复的重要原因[1]。脊髓损伤后再生困难与损伤后神经细胞的缺失和神经生长的微环境改变密切相关。微环境改变包括胶质瘢痕的形成、神经生长抑制因子、神经生长的导向因子和轴突再生所需基质缺失等多方面因素。随着细胞生物技术的飞速发展,移植干细胞治疗脊髓损伤越来越受到重视[2]。研究表明干细胞替代受损神经元,改善局部微环境促进轴突再生作用良好[3]。研究表明骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)可以在脊髓损伤区存活分化[4-5],并具有取材方便、易于培养、可多向分化、无免疫源性等优点,所以我们选择 BMSCs 作为移植细胞。另一方面,研究表明大量硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGS)存在于损伤后的中枢神经内并以化学屏障的形式阻碍轴突再生[6],星形胶质细胞产生的硫酸软骨素酶 ABC(chondro-itinrase ABC, ChABC)可以降解化学屏障 CSPGS,从而促进中枢神经系统损伤后轴突再长与功能恢复[7],但此机制是否与降解后微环境中神经生长导向因子和抑制因子浓度改变有关,有待进一步研究。本研究通过构建大鼠脊髓损伤模型,应用 BMSCs 移植、ChABC 降解胶质瘢痕等方法,探讨 ChABC 联合 BMSCs 移植对脊髓损伤后功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 250 ~ 300 g(重庆医科大学实验动物中心提供)。BMSCs、BMSCs 完全培养基(Cyagen 公司),ChABC、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP)多克隆抗体、小鼠抗大鼠神经丝蛋白-200(NF-200)单克隆抗体(Sigma 公司,美国),勿动蛋白 A(Nogo-A)一抗(中国),凋亡试剂盒(Roche 公司,德国),重庆医科大学生命科学院提供各种大型检测仪器,脊髓损伤器(自制)。

1.2 细胞复苏与传代

紫外消毒超净台,培养基复温;从液氮中取出 BMSCs,37 ℃水浴锅 1 ~ 2 min 内解冻;取 6 mL 培养基于离心管中,加入解冻的 BMSCs 并混匀;1 000 r/min 离心 5 min;弃上清,再加 5 mL 培养基并混匀;分装入瓶培养,待细胞长到 70% 即可传代,弃去旧培养液;PBS 液漂 2 次,0.25% 胰蛋白酶消化,若显微镜观察见到细胞回缩变圆,细胞漂浮离散,表明消化完成,加 3 mL 培养基终止消化,将细胞悬液转移到离心管内,800 r/min 离心 10 min,弃上清;添加新培养基;吹打混匀,分装培养。

1.3 脊髓损伤动物模型制备及分组

大鼠用 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,剃毛消毒,以 T_{10} 棘突为中心,行背部正中切开,暴露 T_9 ~ T_{11} 棘突及椎板,切除 T_{10} 棘突及椎板,暴露脊髓。用自制脊髓损伤器以改良 Allen 打击法造成 T_{10} 节段急性脊髓损伤。发现被撞脊髓段组织有血肿、出血,大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动,双后肢迟

缓性瘫痪,表明撞击成功。术后以生理盐水冲洗并缝合伤口,术后单独饲养,每日早晚各按摩膀胱1次以促进排尿。术后从第3天起每天用温开水清洗后肢及下腹部,避免发生感染及坏死。

将60只造模后大鼠按随机数字表法分成4组($n=15$):假手术组(A组)、ChABC降解组(B组)、BMSCs移植组(C组)及ChABC联合BMSCs移植组(D组)。B组和D组术后即刻应用微量注射器注入ChABC 5 μL(1 U/mL)。C组和D组在伤后2 d用微量注射器局部注射5 μL BMSCs悬液于损伤部位上下[8]。以后每3天注射1次,每次注射5 μL。4组动物分别在手术后响应时间观察记录动物情况,处死动物取标本检测,每次1只。

1.4 观测指标

1.4.1 运动功能评定 观察伤后4组大鼠后肢运动功能恢复情况,并于伤后7、14 d采用BBB(basso-beattie-bresnahan)评分法进行下肢运动功能评定[9]。

1.4.2 组织学观察(HE染色) 大鼠麻醉后,4%多聚甲醛心内灌注固定,取损伤区上下段脊髓组织5 mm。标本用10%甲醛固定,脱水后石蜡包埋并切片,厚度5 μm。显微镜下观察空洞大小,测量空洞直径距离,记录显微镜游标尺数字,并以脊髓中央管为中心采集图像,利用IPP图像处理软件,代入空洞直径(游标尺两点数据差值的绝对值),分析获得所选区面积数据。

1.4.3 免疫组化染色观察 取各组切片行GFAP/NF-200/Nogo-A免疫组化染色。具体方法:切片室温放置,常规脱蜡,抗原修复,按说明书完成全过程,其中GFAP/NF-200/Nogo-A一抗(阴性对照组将一抗改为PBS液)于4 ℃冰箱中过夜,显微镜下DAB染色5~10 s后自来水冲洗终止,苏木精复染10~15 s,脱水、透明、封片,Olympus DP70白光显微镜200倍镜下采图,淡黄色染色提示弱阳性表达;棕黄色染色提示中度阳性表达;棕黑色染色提示强阳性表达。人工计数法计算NF-200阳性表达的细胞百分比,IPP软件分析GFAP/Nogo-A阳性表达产物光密度值,其中软件设置时H设为30,I设为225,S设为230。

1.4.4 TUNEL法检测细胞凋亡 将石蜡切片脱蜡入水;洗涤后加入蛋白酶K溶液(40 μg/mL),于21~37 ℃水解20 min;PBS清洗搽去多余液体,滴加TdT酶缓冲液,置室温5 min;滴加50 μL TdT酶反应液(阴性对照组不加TdT,改为三蒸水),置湿盒中37 ℃反应1 h,PBS洗涤终止反应;每张切片滴加50 μL converter-POD于标本上,37 ℃湿润避光反应30 min,PBS漂洗,DAB染色5~10 s;苏木精复染10~15 s,常规脱水透明干燥后封片,在光学显微镜下观察,凋亡细胞的染色质浓缩、边缘化,核膜裂解,染色质分割成块状形成凋亡小体,细胞核染色呈深浅不一的棕黄色或棕褐色,非凋亡细胞核呈蓝色,亦不可见凋亡小体。每组随机选取3张图片,计算其阳性细胞占总细胞的百分率即为凋亡指数(apoptotic index,AI)。

1.5 统计学处理

采用SPSS 14.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较行单因素方差分析和χ^2检验。

2 结果

2.1 运动功能评定

损伤当天4组大鼠均完全丧失运动功能,伤后3 d部分大鼠后肢运动功能开始出现恢复迹象,7 d时多数后肢关节运动功能已基本恢复,可见明显节律性运动,但A、B、C组BBB评分与D组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。而在14 d,可见4组大鼠足底位于负重位,偶尔足底步行,D组BBB评分均高于其余3组,提示ChABC联合BMSCs移植组对脊髓损伤后神经功能恢复作用优于其余3组。同一组内14 d比7 d BBB评分明显增高($P<0.05$,表1)。

表1 伤后7、14 d各组大鼠BBB评分比较($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	7 d	14 d
假手术组	3.60±0.55	6.33±1.00[ab]
ChABC降解组	3.80±0.84	7.25±0.96[ab]
BMSCs移植组	3.80±0.84	7.33±0.58[ab]
ChABC联合BMSCs移植组	4.00±0.82	9.75±0.96[a]

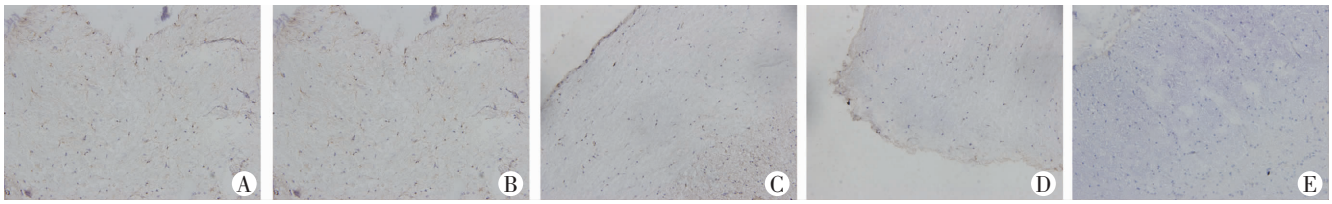
a:$P<0.05$,与7 d比较;b:$P<0.01$,与ChABC联合BMSCs移植组比较

2.2 组织学观察脊髓空洞面积

伤后14 d,4组损伤区可见空洞形成,其周围被瘢痕组织包裹,与周边组织存在明显界限。A、B、C、D组损伤区面积分别为(4.44±0.18)、(3.70±0.21)、(3.23±0.22)、(2.33±0.31) mm^2。D组损伤区面积显著低于其他3组($P<0.05$)。

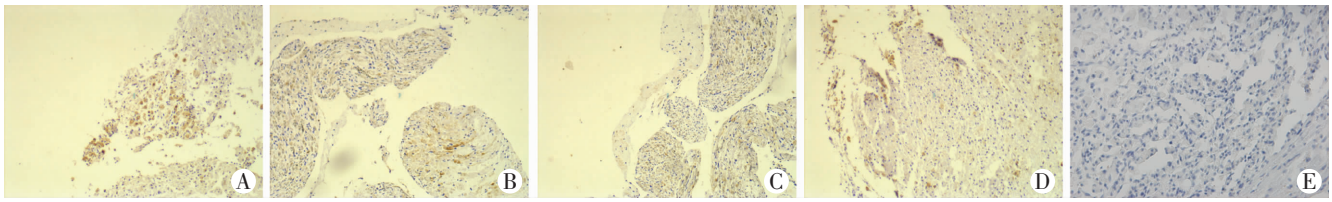
2.3 GFAP、NF-200、Nogo-A免疫组化染色观察

2.3.1 GFAP 脊髓损伤后GFAP阳性表达为星形胶质细胞棕黄色着色,伤后14 d在脊髓损伤区边缘星形胶质细胞内可见明显GFAP阳性表达,形态上表现为星形胶质细胞胞体增生肥大,周围树突变粗、变长,并可在边缘区形成星形胶质细胞瘢痕和界膜。D组在伤后14 d GFAP阳性表达(0.055±0.016)显著低于A、B、C组[分别为(0.147±0.007)、(0.108±0.018)、(0.099±0.013),$P<0.05$,图1],提示ChABC联合BMSCs移植组较其他3组可以更明显地抑制脊髓损伤后GFAP的表达。



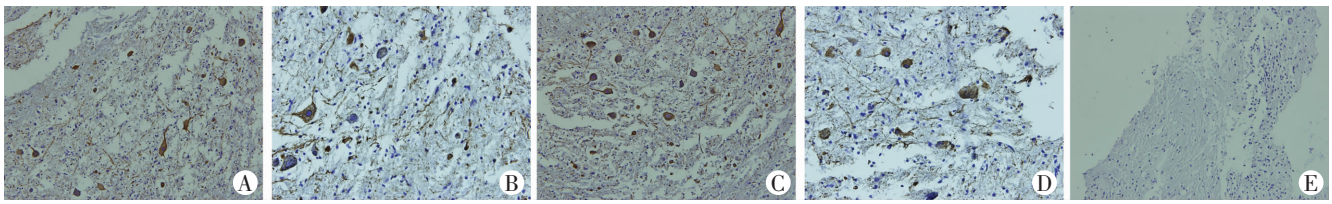
A:假手术组;B:ChABC 降解组;C:BMSCs 移植组;D:ChABC 联合 BMSCs 移植组;E:阴性对照组

图 1　白光显微镜下观察脊髓损伤后 4 组大鼠同一时间点 GFAP 的表达　(S-P ×200)



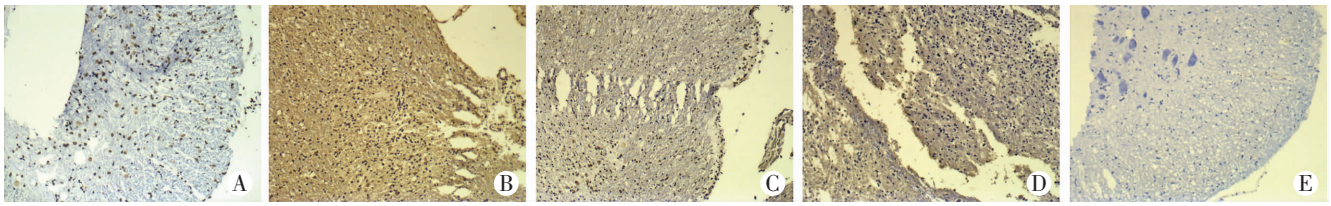
A:假手术组;B:ChABC 降解组;C:BMSCs 移植组;D:ChABC 联合 BMSCs 移植组;E:阴性对照组

图 2　白光显微镜下观察脊髓损伤后 4 组大鼠同一时间点 Nogo-A 的表达　(S-P ×200)



A:假手术组;B:ChABC 降解组;C:BMSCs 移植组;D:ChABC 联合 BMSCs 移植组;E:阴性对照组

图 3　白光显微镜下观察脊髓损伤后 4 组大鼠同一时间点 NF-200 的表达　(S-P ×400)



A:假手术组;B:ChABC 降解组;C:BMSCs 移植组;D:ChABC 联合 BMSCs 移植组;E:阴性对照组

图 4　白光显微镜下观察脊髓损伤后 4 组大鼠脊髓神经细胞凋亡　(TUNEL ×200)

2.3.2　Nogo-A　伤后 14 d,4 组大鼠脊髓损伤后 Nogo-A 大量表达于细胞外基质,D 组 Nogo-A 阳性表达(0.017 ± 0.008)较 A、B、C 组显著减少[分别为(0.059 ± 0.008)、(0.031 ± 0.004)、(0.029 ± 0.001),P < 0.05,图 2],提示 ChABC 联合 BMSCs 移植组较其他 3 组可以明显减少脊髓损伤后 Nogo-A 的释放。

2.3.3　NF-200　从损伤后 3 d 开始,各组损伤区神经元细胞体和轴突即可出现少量棕褐色着色点(NF-200)。从第 7 天开始,NF-200 在各组大鼠脊髓损伤内均有表达,伤后 14 d 达高峰,NF-200 呈点状表达于损伤区内神经元细胞体和轴突,神经元细胞体增大,细胞质呈棕褐色染色,神经轴突也增多、变长,并可见 NF-200 阳性染色纤维呈纵向排列分布于损伤区内部。D 组免疫组化阳性表达(阳性率为 7.1%)较 A、B、C 组明显增高[阳性率分别为1.9%(χ^2 = 12.272,P < 0.01),2.7%(χ^2 = 7.53,P < 0.01)、2.5%(χ^2 = 6.584,P < 0.05),图 3],提示 ChABC 联合 BMSCs 移植组较其他 3 组可以明显增加脊髓损伤后 NF-200 的表达。

2.4　TUNEL 法检测神经细胞凋亡

伤后 14 d 检测细胞凋亡,可以见到大量凋亡细胞,凋亡细胞形态表现为细胞核消失、染色质固缩或出现凋亡小体,DAB 染色呈黄褐色,每组选取 3 张图片计数阳性细胞个数,取平均值计算 AI。D 组 AI(12.87 ± 1.05)显著小于 A、B、C 组[分别为(40.50 ± 3.83)、(22.53 ± 4.25)、(20.83 ± 2.28),F = 41.775,P < 0.05,图 4]。

3 讨论

脊髓损伤的再生修复效果与伤时机械性因素及伤后神经元、轴突生长并形成有效连接所需的微环境密切相关。Li 等[10]研究认为,脊髓损伤后损伤区微环境中含有的大量抑制因子在抑制轴突生长方面起了重要作用,是再生修复失败的重要原因。机械性损伤为原发性损伤,其病理过程无法控制,且不能完全阻碍神经纤维再生[11],所以研究的重点放在微环境上,积极干预微环境及治疗,对脊髓损伤后神经功能的恢复有重大意义。

脊髓损伤后大鼠后肢功能逐渐恢复,2 周时 D 组 BBB 评分明显高于与其余 3 组,且 D 组脊髓损伤后形成脊髓空洞面积明显低于其他 3 组,提示 ChABC 联合 BMSCs 处理较其他 3 组对脊髓损伤后功能恢复和抑制急性创伤效果较好。这可能是脊髓损伤早期活跃合成 NF-200,幼稚期星形胶质细胞保护神经元胞体,促进神经元的生长和轴突再生,进而在促进大鼠后肢功能恢复方面起到了积极作用。

GFAP 具有维持星形细胞形态、功能并参与细胞内细胞骨架重组、细胞粘附、维持神经元结构及作为细胞信号转导通路等作用[12]。脊髓损伤后,星形胶质细胞出现明显的功能活跃及胶质化,表现为增生、肥大、突起增多,并能分泌基膜素等多种诱导因子促进神经再生[13],星形细胞胶质化具有双重性,即幼稚期的诱导作用和成熟期的抑制作用。幼稚期合成活跃,构成网格框架,诱导神经纤维再生;成熟期变为结构型胶质细胞,增生的瘢痕组织在损伤区和正常脊髓组织之间形成屏障,对神经再生起到机械阻挡作用,抑制功能的进一步恢复[14-15]。本研究表明,D 组较其他 3 组在同一时间点 GPAP 阳性表达明显减低($P<0.05$)。这提示 ChABC 联合 BMSCs 移植可以抑制成熟胶质细胞的负性作用,维持脊髓损伤后神经生长抑制因子与促进因子间的平衡状态,对脊髓损伤后功能恢复有明显的作用。

研究发现,Nogo-A 为中枢神经系统内的一种神经生长抑制因子,主要存在于小脑和脊髓组织的少突胶质细胞的细胞质内,在细胞膜上几乎不表达[16-17]。Nogo-A 神经生长抑制作用必须在特定条件下才能发挥,如某些神经生长营养因子缺乏,中枢神经系统发生缺血、缺氧,外伤等使神经生长抑制因子与促进因子平衡状态遭到破坏,Nogo-A 的抑制作用才能发挥出来,才能抑制神经元的再生修复。研究证实,Nogo-A 可能通过细胞方式、细胞膜方式、完全溶解的少突胶质细胞等方式与神经元 Nogo 受体结合抑制神经元轴突再生。在脊髓损伤后 3 种抑制方式共存,抑制作用更强。本研究表明,Nogo-A 在损伤后主要表达于细胞质,破损的细胞在细胞外基质也可见到弱阳性表达,成团块聚集分布于损伤区。本研究发现伤后同一时间点,D 组较其他 3 组在同一时间点 Nogo-A 阳性表达显著减少($P<0.05$)。这提示 ChABC 联合 BMSCs 移植组较其他 3 组可以更好地维持脊髓损伤后神经生长抑制因子与促进因子间的平衡状态,抑制少突胶质细胞的破坏,减少 Nogo-A 抑制因子的流出,间接促进大鼠后肢功能恢复。

NF 是神经元特有的结构蛋白,特异性地分布于神经元的胞体及突起内,包括 NF-68、NF-160 和 NF-200。正常情况下神经元胞体 NF-200 染色为阴性。研究证明,脊髓损伤后大量成熟的神经元并没有死亡,而是在不断合成新的蛋白质及其他产物质,如 NF-200 等,并输向轴突,促进轴突再生[18]。NF-200 是缺血损伤后神经轴突出芽和再生的重要标志,脊髓损伤后 NF-200 的阳性表达率与脊髓损伤后功能恢复有着密切的联系。因此,NF-200 是指示轴突再生状况的一个间接指标[19-21]。本研究通过观察神经丝蛋白 NF-200 的表达来分析 ChABC 联合 BMSCs 移植对脊髓损伤后神经功能恢复的影响。免疫组化检测结果显示,伤后 2 周 NF-200 表达达高峰,NF-200 呈点状表达于损伤区内神经元胞体和轴突,神经元胞体增大,神经轴突也增多、变长,并可见大量 NF-200 阳性染色纤维分布于损伤区内部。同一时间点,D 组免疫组化阳性表达较其他 3 组明显增高($P<0.05$),提示 ChABC 联合 BMSCs 移植组较其他 3 组可以更明显地提高损伤后神经元胞体的功能,增加保护性蛋白 NF-200 的表达,从而促进神经轴突的再生和脊髓功能的恢复。

凋亡是组织为了清除受伤细胞而产生的一种程序性死亡。脊髓损伤 8 h 后,损伤区受伤细胞出现核染色质固缩,DNA 发生断裂,7 d 达到凋亡高峰,持续约 15 d[22],TUNEL 法检测凋亡细胞染色为黄褐色,损伤程度与 AI 呈正相关。本研究表明,伤后同一时间 D 组 AI 较其他 3 组明显减低。由此推测 ChABC 联合 BMSCs 移植组较其他 3 组可以明显改善脊髓损伤后的微环境,抑制损伤区细胞的凋亡,减少损伤交界区胶质瘢痕,促进保护性蛋白的合成,从而减低脊髓损伤后的继发性损害,促进脊髓损伤后的功能恢复。

本研究表明,在伤后 14 d ChABC 联合 BMSCs 移植组脊髓空洞面积最小,AI 最低,BBB 评分最高,GFAP 和 Nogo-A 的表达量最低,NF-200 表达最高。这提示 ChABC 注射联合 BMSCs 移植能够促进神经生长营养因子、基质等的合成、维持神经生长抑制因子与促

进因子动态平衡,能够明显降低 CSPG 免疫反应强度,使损伤交界区胶质瘢痕抑制被 ChABC 降解,从而更好地促进脊髓损伤后神经结构修复和功能恢复。

促进轴突再生并形成有效连接仍然是脊髓损伤后功能修复重建的一大难题,ChABC 注射联合 BMSCs 移植在本研究中取得了明显的效果。但脊髓损伤后的病理过程复杂,修复过程受多种因素调控,其修复重建机制还有待进一步研究,ChABC 注射联合多种细胞移植应该是治疗脊髓损伤的一个方向。

参考文献:

[1] Molinari M, Scivoletto G. The present special issue on Gait recovery after spinal cord injury. Editorial[J]. Brain Res Bull, 2009, 78(1): 1.

[2] National Spinal Cord Injury Statistical Center. Factsheet#2: Spinal Cord Injury Statistics[R]. Birmingham: National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2006.

[3] Olson H E, Rooney G E, Gross L, *et al*. Neural stem cell- and Schwann cell-loaded biodegradable polymer scaffolds support axonal regeneration in the transected spinal cord[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(7): 1797 - 1805.

[4] Novikova L N, Brohlin M, Kingham P J, *et al*. Neuroprotective and growth-promoting effects of bone marrow stromal cells after cervical spinal cord injury in adult rats[J]. Cytotherapy, 2011, 13(7): 873 - 887.

[5] Pal R. Gopinath C, Rao N M, *et al*. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury[J]. Cytotherapy, 2010, 12(6): 792 - 806.

[6] Minor K, Tang X, Kahrilas G, *et al*. Decorin promotes robust axon growth on inhibitory CSPGs and myelin *via* a direct effect on neurons[J]. Neuroboil Dis, 2008, 32(1): 88 - 95.

[7] Cafferty W B, Yang S H, Duffy P J, *et al*. Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans[J]. J Neurosci, 2007, 27(9): 2176 - 2185.

[8] 景文莉, 闫凤霞, 左彦珍. 骨髓间充质干细胞不同移植途径治疗大鼠脊髓损伤的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复杂志, 2008, 12(51): 10045 - 10049.

[9] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1 - 21.

[10] Li S, Liu B P, Budel S, *et al*. Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury[J]. J Neurosci, 2004, 24(46): 10511 - 10520.

[11] Tang X, Davies J E, Davies S J. Changes in distribution, cell associations and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue[J]. J Neurosci Res, 2003, 71(3): 427 - 444.

[12] Perng M D, Wen S F, Gibbon T, *et al*. Glial fibrillary acidic protein filaments can tolerate the incorporation of assembly-compromised GFAP-delta, but with consequences for filament organization and alphaB-crystallin association[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(10): 4521 - 4533.

[13] Alexanian A R, Svendsen C N, Crowe M J, *et al*. Transplantation of human glial-restricted neural precursors into injured spinal cord promotes functional and sensory recovery without causing allodynia[J]. Cytotherapy, 2011, 13(1): 61 - 68.

[14] Ekmark-Lewen S, Lewen A, Israelsson C, *et al*. Vimentin and GFAP responses in astrocytes after contusion trauma to the murine brain[J]. Restor Neurol Neurosci, 2010, 28(3): 311 - 321.

[15] Vos P E, Jacobs B, Andriessen T M, *et al*. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study[J]. Neurology, 2010, 75(20): 1786 - 1793.

[16] 王志力, 陈善飞, 方哲翔, 等. 鲍鱼壳蛋白组分研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(24): 4778 - 4781.

[17] Qiao D, Ke C, Hu B, *et al*. Antioxidant activities of polysaccharides from Hyriopsis cumingii[J]. Carbohydr Polym, 2009, 78(2): 199 - 204.

[18] Perrot R, Berges R, Bocquet A, *et al*. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration[J]. Mol Neurobiol, 2008, 38(1): 27 - 65.

[19] Lever I J, Robinson M, Cibelli M, *et al*. Localization of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase in rat dorsal root ganglion cells and its regulation after peripheral nerve injury[J]. J Neurosci, 2009, 29(12): 3766 - 3780.

[20] 段艳萍, 王金德, 黄佑庆, 等. GAP-43 治疗大鼠脊髓横断后神经中丝 NF200 表达的变化[J]. 神经解剖学杂志, 2008, 24(4): 406 - 410.

[21] Naghdi M, Tiraihi T, Mesbah-Namin S A, *et al*. Induction of bone marrow stromal cells into cholinergic-like cells by nerve growth factor[J]. Iran Biomed J, 2009, 13(2): 117 - 123.

[22] Lossi L, Tamagno I, Merighi A. Molecular morphology of neuronal apoptosis: analysis of caspase 3 activation during postnatal development of mouse cerebellar cortex[J]. J Mol Histol, 2004, 35(6): 621 - 629.

(**收稿**:2014-07-28;**修回**:2014-08-25)

(编辑 龙 亮)