

## 刺五加体外诱导骨髓基质细胞分化为神经元样细胞的实验研究

杨琴<sup>1</sup>, 杨军<sup>1</sup>, 谢鹏<sup>1</sup>, 曾志磊<sup>1</sup>, 李傲<sup>2</sup>, 张小东<sup>1</sup>, 李咏梅<sup>3</sup>, 吕发金<sup>3</sup>(重庆医科大学<sup>1</sup>附属第一医院神经内科/重庆市神经病学重点实验室,<sup>2</sup>药学院,<sup>3</sup>附属第一医院影像科, 重庆 400016)

**提要:**目的 研究刺五加体外诱导骨髓基质细胞(MSCs)分化为神经元样细胞。方法 采用全骨髓贴壁筛选法分离培养 MSCs。含刺五加的无血清 DMEM/F12 诱导 MSCs 的分化。间接免疫荧光法、Western blot 及 RT-PCR 检测巢蛋白(nestin)、 $\beta$ -Tubulin III 及 GFAP 蛋白和 mRNA 的表达。结果 MSCs 在体外传代扩增至第 3 代, CD44、CD54 表达阳性已达 90%以上, 而 CD14 表达阳性下降至 2.37%。刺五加诱导后, MSCs 胞体收缩, 突起伸出, 类似神经元; 免疫荧光、Western blot 及 RT-PCR 均显示刺五加诱导后的细胞 nestin、 $\beta$ -Tubulin III 蛋白和 mRNA 表达阳性, 而 GFAP 表达阴性。结论 刺五加可以在体外诱导 MSCs 分化为神经元样细胞。

**关键词:**骨髓基质细胞; 神经元; 刺五加; 细胞分化

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2009)03-0487-04

## Effects of *Ciwujia* in inducing marrow stromal cell differentiation into neuron-like cells *in vitro*

YANG Qin<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>1</sup>, XIE Peng<sup>1</sup>, ZENG Zhi-lei<sup>1</sup>, LI Ao<sup>2</sup>, YANG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-dong<sup>1</sup>, LI Yong-mei<sup>3</sup>, LÜ Fa-jin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Key Laboratory of Neurology of Chongqing, <sup>2</sup>College of Pharmacy, <sup>3</sup>Department of Radiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**Abstract:** **Objective** To study the effect of the traditional Chinese herbal drug *Ciwujia* in inducing the differentiation of marrow stromal cells (MSCs) into neuron-like cells. **Methods** Rat MSCs isolated from the whole bone marrow were amplified by adherent culture *in vitro* and induced to differentiate into neuron-like cells using serum-free DMEM/F12 containing *Ciwujia*. The protein and mRNA expressions of nestin,  $\beta$ -Tubulin III and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the differentiated cells were detected by indirect immunofluorescence method, Western blotting and RT-PCR. **Results** The third-passage MSCs showed positive expression rates for CD44 and CD54 beyond 90% with decreased CD14 expression rate to 2.37%. Induction by *Ciwujia* of the MSCs resulted in cell body shrinkage and protrusion of the cell processes resembling those of neurons. The differentiated cells were positive for nestin and  $\beta$ -Tubulin III expression and negative for GFAP as shown by immunofluorescence assay, Western blotting and RT-PCR. **Conclusion** *Ciwujia* can induce the differentiation of rat MSCs into neuron-like cells *in vitro*.

**Key words:** bone marrow stromal cells; neurons; *Ciwujia*; differentiation

中药刺五加为五加科植物刺五加的根和根茎, 含多种苷类, 属滋补性中药, 对神经系统功能具有双向调节作用, 已广泛应用于神经系统疾病的临床治疗<sup>[1]</sup>。骨髓基质细胞(MSCs)是成体干细胞之一, 具有多项分化潜能, 在一定的诱导条件下可分化为神经元样细胞<sup>[2-8]</sup>。目前国内外研究对诱导剂的筛选多集中于具有抗氧化作用的化学制剂, 如维甲类化合物、 $\beta$ -巯基乙醇、硫代甘油、二甲基亚砷、异丁基甲基黄嘌呤和双丁酰环磷腺苷等<sup>[8]</sup>, 但此类物质尚不能用于人体。我们拟选用已用于临床且具有抗氧化作用的中药刺五加作为诱导剂, 观察能否诱导 MSCs 分化为神经元样细胞, 为中药在干细胞移植领域的应用提供依据。

收稿日期: 2008-10-21

基金项目: 重庆市卫生局科学基金(04-2-143); 重庆市科委自然科学基金(2005BB5315)

作者简介: 杨琴(1970-), 女, 博士, 副教授, 电话: 13508332327, E-mail: xyqh200@126.com

通讯作者: 谢鹏, 电话: 023-68485490, Fax: 023-68485111, E-mail: xiepeng58@21cn.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 4 周龄 Wistar 大鼠, 雌雄不限, 由重庆医科大学实验动物中心提供。动物合格证号: SCXK(渝)20020001。

1.1.2 药物与主要试剂 刺五加注射液购自黑龙江完达山制药厂(规格: 20 ml 含总黄酮 100 mg, 批准文号: 国药准字 Z23020810); DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司; 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(Pepro Tech, Inc, 美国); 抗体: 神经干细胞标志物小鼠抗大鼠巢蛋白(nestin)单抗, 星形胶质细胞标志物小鼠抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP)单抗(Santa Cruz, 美国); 神经细胞标志物小鼠抗大鼠  $\beta$ -Tubulin III 单抗(Chemicon, 美国), Cy3 标记的羊抗小鼠二抗(Chemicon, 美国), 兔抗大鼠 CD54、CD44、CD14 一抗及羊抗小鼠二抗-FITC(FITC 标记兔抗大鼠 IgG, 辣根酶标记兔抗大鼠 IgG)(武汉博士德公司), 胎牛血清购自杭州四季清公司, 0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA

购自 Hycolne 公司,总 RNA 提取试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品;RT-PCR 试剂盒为大连宝生物工程有限公司产品;RIPA 蛋白裂解液为上海申能博彩生物科技有限公司产品,蛋白定量试剂盒为 TIANGEN 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

## 1.2 方法

1.2.1 大鼠 MSCs 培养 参照文献[9]的方法,将大鼠脱颈椎处死,浸入 75%酒精中 5 min,无菌条件下取出双侧股骨、胫骨、肱骨,剔除肌肉和脂肪组织,露出骨骺端,用 5 ml DMEM/F12 完全培养液(含 10%胎牛血清,100 U/ml 青、链霉素)冲出骨髓,吸管充分吹打混匀,制成单细胞悬液,稀释后,调整接种密度为  $2 \times 10^6/\text{ml}$  接种于  $25 \text{ cm}^2$  塑料培养瓶内,置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  饱和湿度的细胞培养箱中培养。24 h 后弃去未贴壁细胞,更换培养液,以后每 3 d 换液 1 次。贴壁细胞接近 80%~90%融合后,用 0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA 消化,传代接种,每隔 72 h 换液,传 3 代后接种于预先置有盖玻片的 6 孔培养板培养 3 d,达到 80%~90%融合后,进行诱导实验。原代,第 3 代的 MSCs 接种于预先置有盖玻片的 24 孔板,培养 3 d,PBS 缓冲液冲洗 3 次,4%多聚甲醛固定 30 min,行细胞表型鉴定。

1.2.2 MSCs 诱导分化实验 参考文献的方法<sup>[5,6]</sup>。诱导分化的细胞选用 3 代后的细胞,MSCs 达到 80%~90%融合后,除去 DMEM/F12 完全培养基,PBS 液清洗 3 次。刺五加诱导组加入预诱导液(DMEM/F12 培养基,10%胎牛血清,10 ng/ml bFGF)培养 24 h,换用诱导液(DMEM/F12 培养基,100  $\mu\text{l}/\text{ml}$  刺五加)诱导 5 h,再换用维持液(DMEM/F12 培养基,bFGF10 ng/ml,2%B27)继续维持 7 d;空白对照组预诱导同刺五加组,诱导时仅加入 DMEM/F12 培养基诱导 5 h,换用维持液(DMEM/F12 培养基,bFGF10 ng/ml,2%B27)继续维持 7 d。各组分别于诱导前、诱导后 5 h、7 d 收集细胞以备用。

1.2.3 免疫细胞化学染色 采用间接免疫细胞荧光法。将制备好的载玻片用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,0.3% Triton-X-100 破膜 30 min,PBS 缓冲液洗涤 3 次,正常血清封闭 20 min,吸去血清,不洗,分别加入兔抗大鼠 CD54、CD44、CD14、NSE (1:100)、小鼠抗大鼠 nestin、GFAP、 $\beta$ -Tubulin III (1:200)一抗,对照组用 PBS 液代替一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,PBS 缓冲液洗涤 3 次,加入羊抗大鼠二抗-FITC(1:50)或羊抗大鼠二抗-CY3 (1:200),室温孵育 2 h,50%甘油封片,激光共聚焦显微镜观察拍照。每张玻片采用双人双盲随机记数 200 个细胞,计算阳性细胞百分比,其中阳性细胞  $\geq 61\%$  为强阳性(+++),30%~60%为阳性(++),6%~30%为弱阳性(+),1%~5%为可疑( $\pm$ ), $<1\%$ 为阴性(-)。

## 1.2.4 Western blotting 法测细胞 nestin、 $\beta$ -Tubulin III

及 GFP 蛋白的表达 各组按分组时间以 PBS 冲洗细胞 3 次,然后加入 RIPA 细胞裂解液 200  $\mu\text{l}$  及 100 mmol/L PMSF 2  $\mu\text{l}$  冰上裂解 30 min,12000 $\times g$  离心 30 min。收集上清蛋白质样本,Bradford 法检测蛋白浓度,加入 5 $\times$ 上样缓冲液,在沸水中变性 5 min,取 50  $\mu\text{g}$  蛋白用 SDS-PAGE 分离后电转移至 PVDF 膜上。取出膜用脱脂奶粉封闭 1 h,然后置于杂交袋中,加入 nestin、 $\beta$ -Tubulin III 及 GFAP 抗体(均按 1:200 稀释), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。TBST 漂洗 10 min $\times 3$  次,HRP 标记兔抗大鼠 IgG (1:1000), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,TBST 漂洗 10 min $\times 4$  次。PVDF 膜上覆盖足量 ECL 发光试剂,化学发光显色,照相。试验重复 3 次,结果经 Bio-Rad 公司图像分析软件 Quantity One-4.4.0 分析目的条带和内参的平均光密度值,以目的条带与内参比值为衡量参数,分析各组蛋白的表达。

1.2.5 RT-PCR 法测细胞 nestin、 $\beta$ -Tubulin III 及 GFAP mRNA 的表达 细胞分组及处理如 1.2.2 所述。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,紫外可见分光光度计对 RNA 样品定量。以 5  $\mu\text{l}$  RNA 作为模板进行逆转录,PCR 扩增,以  $\beta$ -actin 为内参照。根据大鼠 nestin、 $\beta$ -Tubulin III 及 GFAP mRNA 基因全序列,Primer 5.0 软件设计引物序列,引物由上海英骏生物技术有限公司合成。Nestin 引物序列:上游 5'-CACAGAAAGTGAGACCCAG-3',下游 5'-ACATCTGCTCATTCCCTACA3'(产物大小:381 bp); $\beta$ -Tubulin III 引物序列:上游 5'-CCAAGTTCTGGGAGGTCA3',下游 5'-AATTGCCAGCACCCTCT-3'(产物大小:246 bp);GFAP 引物序列:上游 5'-GGCAGAAGCTCCAAGATG3',下游 5'-CTCAAGGTCGCAGGTCAA3'(产物大小:437 bp); $\beta$ -actin 引物序列:上游 5'-TAGGGAAATCGTGCCTGAC3',下游 5'-TTCTGGAAGGTGGACGTGAG3'(产物大小:445 bp)。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后进行光密度扫描,将目的扩增条带的光密度值与  $\beta$ -actin 的光密度值之比作为衡量参数,分析各组 mRNA 的表达。

1.2.6 统计学处理 实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 MSCs 生长形态学观察

大鼠全骨髓细胞悬液接种于塑料培养瓶后,4 h 倒置显微镜观察,少数细胞贴壁,呈圆形、短梭形或三角形,核位于中央。12 h 时短梭形或三角形贴壁细胞增多。24 h 更换培养液后,2~3 d 出现长梭形贴壁细胞,圆形细胞减少,并可见细胞集落形成。初期的细胞集落由几个或几十个细胞组成;5~6 d 圆形细胞进一步减少,而梭形细胞集落增多。集落中心细胞密度增大,外周细胞逐渐稀疏,呈放射状分布,细胞集落大小

不等;1周左右,细胞密度进一步增加,细胞接近80%~90%融合时原代培养结束。原代培养消化后细胞数达 $(5\sim6)\times 10^5$ 。刚传代的细胞呈圆形,散在均匀分布于瓶底,8h后形态重新变为长梭形纤维细胞样,生长潜伏期较短,为1~2d,2~4d是细胞快速增殖期,5~6d达到大部分融合。传至3代后,细胞形态很均匀,呈单层漩涡状排列的长梭形纤维样细胞,细胞仍然保持良好的增殖能力(图略)。

## 2.2 MSCs 细胞表型鉴定

原代、第3代细胞表面抗原CD54表达阳性依次为: $(73.38\pm 1.46)\%$ 、 $(95.18\pm 3.66)\%$ ;CD44表达阳性依次为 $(76.56\pm 6.20)\%$ 、 $(94.36\pm 3.47)\%$ ;CD14表达阳性

依次为 $(23.19\pm 3.53)\%$ 、 $(2.37\pm 0.61)\%$ :这表明我们培养的MSCs传到第3代后纯度已达到90%以上。

## 2.3 MSCs 诱导后形态学观察

两组预诱导24h,细胞形态无明显变化。刺五加诱导组诱导1h,部分细胞体积减小,立体感增强,胞体收缩成锥形或球形;随时间推移,锥形或球形细胞增多;诱导5h,较多细胞成三角形或球形,细胞微丝收缩,伪足形成细长突起,局部交织成网,有些细胞周围有光晕,类似神经细胞,部分细胞脱落、死亡(图1,2);维持培养7d,多数细胞成锥形、三角形、球形,交织成网,形成较典型的神经样细胞,并见部分细胞伸出长突起(图3)。空白对照组偶见锥形细胞(图4)。

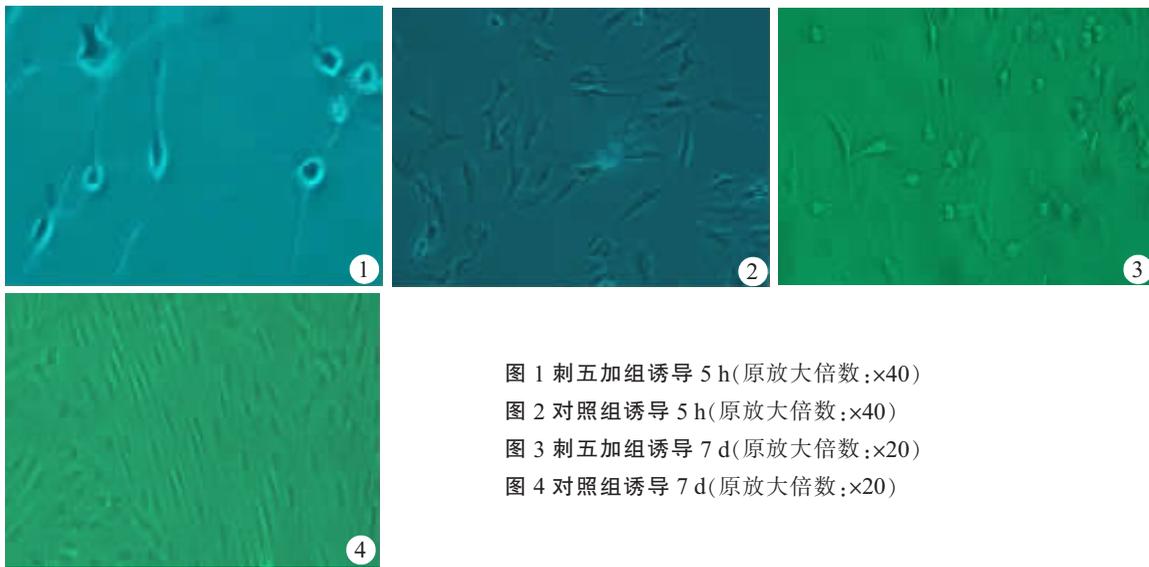


图1 刺五加组诱导5h(原放大倍数:×40)

图2 对照组诱导5h(原放大倍数:×40)

图3 刺五加组诱导7d(原放大倍数:×20)

图4 对照组诱导7d(原放大倍数:×20)

## 2.4 MSCs 诱导后细胞鉴定

间接免疫细胞荧光染色提示,诱导前和诱导对照组偶有细胞表达nestin、 $\beta$ -Tubulin III,并且阳性表达细胞形态与神经细胞极为相似。刺五加诱导5h时nestin表达为强阳性,到第7d仍为强阳性,而 $\beta$ -Tubulin III在第5h为阳性,持续到7d为强阳性,未见胶质细胞标记蛋白GFAP的表达(图5~10)。

## 2.5 刺五加诱导 MSCs 前后神经元前体细胞、神经元及神经胶质细胞标志物蛋白的表达变化

诱导对照组在0h、5h、7d时,神经干细胞标志物(nestin)及早期神经元的标记物( $\beta$ -tubulin III)蛋白表达极微弱;诱导及对照各组均未见星型胶质细胞标志物(GFAP)蛋白的表达。刺五加诱导5h后nestin蛋白的表达最强 $0.841\pm 0.030$ ,强于诱导7d组 $0.302\pm 0.109$ ,差异有极显著性( $P<0.01$ )。诱导5h后的 $\beta$ -tubulin III表达较低 $1.059\pm 0.102$ ,低于诱导7d组 $1.694\pm 0.079$ ,差异有极显著性( $P<0.01$ )。各对照组在诱导前后各时间点nestin和 $\beta$ -tubulin III的蛋白均为弱阳性表达(图11)。

## 2.6 刺五加诱导 MSCs 前后神经元前体细胞、神经元及神经胶质细胞标志物 mRNA 的表达变化

诱导对照组在0h、5h、7d时,可见神经干细胞的标志物(nestin)、早期神经元的标记物( $\beta$ -tubulin III)mRNA的表达,但极微弱。而在诱导前后的各组中均未见星型胶质细胞标志物(GFAP)蛋白的表达。刺五加诱导5h后,可见nestin的mRNA表达增强 $0.683\pm 0.074$ ,而7d时的表达明显减弱 $0.367\pm 0.106$ ,差异有显著性( $P<0.05$ )。刺五加诱导5h后,可见较强的 $\beta$ -tubulin III的mRNA表达 $0.676\pm 0.097$ ,维持至7d仍维持高表达 $0.367\pm 0.135$ ,差异有显著性( $P<0.05$ )。各对照组在诱导前后nestin和 $\beta$ -tubulin III的mRNA均为弱阳性表达。

## 3 讨论

MSCs具有多向分化潜能,不仅可分化为多种中胚层来源的间质细胞,如软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞等,还可在特定条件下跨越胚层横向分化为神经细胞<sup>[2-8]</sup>。Woodbury等采用抗氧化剂 $\beta$ -ME、

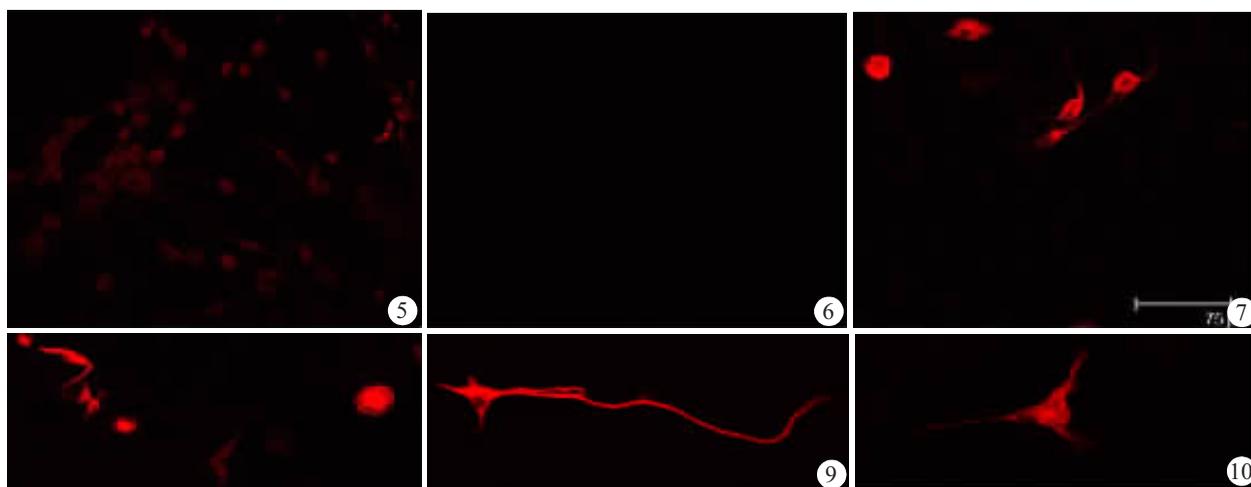


图 5 刺五加组诱导 5 h  $\beta$ -Tubulin III 表达阳性(原放大倍数:×20)  
 图 6 刺五加组诱导 5 h GFAP 表达阴性(原放大倍数:×20)  
 图 7 刺五加组诱导 7 d  $\beta$ -Tubulin III 表达强阳性(原放大倍数:×40)  
 图 8 刺五加组诱导 5 h nestin 表达强阳性(原放大倍数:×40)  
 图 9 刺五加组诱导 7 d  $\beta$ -Tubulin III 表达阳性,伸出长突起(原放大倍数:×40)  
 图 10 刺五加组诱导 7 d nestin 表达阳性,伸出长突起(原放大倍数:×40)

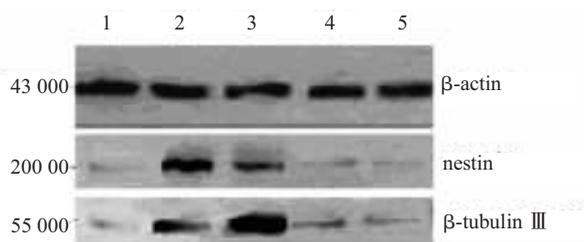


图 11 刺五加诱导前后 MSCs nestin 和  $\beta$ -tubulin III 蛋白的表达  
 1: 0 h 对照组; 2: 5 h 诱导组; 3: 7 d 诱导组; 4: 5 h 诱导对照组; 5: 7 d 诱导对照组

DMSO+BHA 等在体外诱导 MSCs 成为神经细胞<sup>[8]</sup>。我们采用抗氧化剂  $\beta$ -ME 及中药黄芩甙诱导成年大鼠 MSCs 表达 NSE, 这些资料提示, MSCs 可以定向诱导分化为神经细胞或神经元样细胞<sup>[5,6]</sup>。

本研究采用简单易行的全骨髓贴壁培养方法, 多次换液和传代以纯化、扩增 MSCs, 获得的 MSCs 在体外有较强的扩增能力。传至第 3 代时 MSCs 的重要表面标记 CD44、CD54 的表达已达 90% 以上, 而造血干细胞的表面标记 CD14 则下降至 2.37%。表明本研究所采用的细胞培养条件适于 MSCs 的纯化和扩增。第 3 代以后的 MSCs 已可用于细胞的诱导分化和细胞治疗。

免疫组化显示在诱导前及诱导对照组均见极少数细胞表达 nestin 和  $\beta$ -Tubulin III, 并且细胞形态与神经细胞相似, Western blot 及 RT-PCR 也见 nestin 和  $\beta$ -Tubulin III 有极微弱的表达。表明 MSCs 中有极少部分细胞属神经前体细胞, 这是文献未曾报道的, 需进一步详细研究 MSCs 的特性。

刺五加是临床上常用的治疗心脑血管疾病的常用药物, 能够平补肝肾, 益精壮骨<sup>[1]</sup>。本研究采用免疫荧光、Western blot 及 RT-PCR 三种方法均证实经刺五加诱导后神经前体细胞和神经元样细胞标志物的表达明显增强, 表明刺五加能够定向诱导 MSCs 转变为神经元样细胞。

本研究结果显示, 刺五加诱导 5 h 的细胞 nestin 表达强阳性,  $\beta$ -Tubulin III 表达阳性, GFAP 表达阴性, 证明该细胞属于分化早期神经元。随时间推移, nestin 表达阳性渐减弱,  $\beta$ -Tubulin III 表达阳性渐增强, GFAP 表达仍为阴性, 表明诱导分化的细胞是神经元样细胞而不是胶质细胞。

刺五加是一复合成分, 含多种苷类, 是其中哪一种或几种成分起作用, 目前不清楚, 需要进一步研究。刺五加又是如何诱导 MSCs 分化为神经元样细胞的, 可能通过哪些机制, 尚待阐明。我们在诱导 MSCs 分化为神经元样细胞的其他研究中, 观察到核因子- $\kappa$ B 和 Notch-1 参与了分化过程<sup>[5-7]</sup>。核因子- $\kappa$ B 和 Notch-1 是否也参与刺五加诱导 MSCs 分化为神经元样细胞的过程中, 是否还有其他机制参与, 需要进一步研究。

参考文献:

[1] 张 祎, 刘宝珠, 裴月湖. 刺五加药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(2): 143-6.  
 [2] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.

离子紧贴椎板腹侧自上而下分离粘连,必要时锐性剪断粘连带,以便使椎板掀开顺利完成。(4)如掀开椎板时门轴侧完全断裂,应将此椎板完全切除,以免术后断裂的椎板陷入椎管内,造成对脊髓的压迫损伤。

一旦椎板被打开、脊髓压迫被解除,防止椎管再狭窄成为研究的热点<sup>[2]</sup>。临床上常用的办法是将棘突根部缝线固定于门轴侧的椎旁肌或小关节囊上,由于缝合点有一定的弹性或缝合线撕裂关节囊致缝合处松动以及门轴侧的周围肌肉等组织收缩挤压掀开的椎板可造成再关门<sup>[2]</sup>;丝线缝合于关节囊易医源性损伤颈神经背支分布于关节囊的中间分支,致日后颈后部牵拉性疼痛<sup>[6]</sup>;随着颈部肌肉收缩和颈部活动磨擦可引起丝线断裂造成再关门。那么理想的维持单开门椎管扩大成形术后开门状态的方法应该是技术简单、提供安全的椎板固定、最大限度的减少医源性损伤及手术时间,术后能防止椎管的再狭窄,且费用适中。

应用 OsteoMed M3 钉板系统内固定理论上可以避免术后再关门等并发症,可提供即刻稳定性,可早期行颈部功能锻炼。研究表明术后早期活动颈部,适当的颈肌肉功能锻炼是一种重建颈椎生理弧度和阻止颈椎后凸畸形的有效方法<sup>[7]</sup>。

目前我们已经对此固定系统内固定颈椎单开门进行了生物力学实验,研究表明稳定性及力学强度高(文章待发表)。OsteoMed M3 钉板系统所用为钛质材料,易于塑形,应用于开门侧内固定手术操作简单,可以避免传统单开门手术时在棘突根部打孔穿线缝上硬膜囊,在掀开门时撕裂硬膜囊致脑脊液漏,甚至损伤脊髓致瘫痪、危及生命的风险;螺钉的长度适中且呈角度拧入抬起的椎板及侧块内,无损伤脊髓神经及椎动脉等危险。我们已初步将此固定系统应用于临

床,术后随访未见钛板及钛钉脱落移位,门轴侧骨折处骨质渐融合,椎板获得了永久稳定,可不需在其他地方再进行植骨融合,仅行单纯钛板钛钉固定即可。本组病人术后早期行功能锻炼,术后定期复查 X 光片、CT 及 MRI 检查提示椎管的容积扩大,脊髓后方的压迫解除,无 1 例患者术后出现再关门的现像;术后患者的颈痛、腹部束带感、麻木和下肢踩棉花样等症状均有明显恢复,术后 JOA 评分较术前增加,差异有统计学意义,手术效果满意。

#### 参考文献:

- [1] Park AE, Heller JG. Cervical laminoplasty: use of a novel titanium plate to maintain canal expansion--surgical technique [J]. J Spinal Disord Tech, 2004, 17(4): 265-71.
- [2] Yang SC, Yu SW, Tu YK, et al. Open-door laminoplasty with suture anchor fixation for cervical myelopathy in ossification of the posterior longitudinal ligament [J]. J Spinal Disord Tech, 2007, 20(7): 492-8.
- [3] Sakaura H, Hosono N, Mukai Y, et al. Preservation of the nuchal ligament plays an important role in preventing unfavorable radiologic changes after laminoplasty [J]. J Spinal Disord Tech, 2008, 21(5): 338-43.
- [4] Mayr MT, Subach BR, Comey CH, et al. Cervical spinal stenosis: outcome after anterior corpectomy, allograft reconstruction, and instrumentation [J]. J Neurosurg, 2002, 96(1 Suppl): 10-6.
- [5] 王 健,梁芳果,瞿东滨,等.脊髓型颈椎病前路手术早期并发症相关因素分析(附 258 例报告)[J].第一军医大学学报, 2005, 25(4): 450-3.
- [6] Zhang J, Tsuzuki N, Hirabayashi S, et al. Surgical anatomy of the nerves and muscles in the posterior cervical spine: a guide for avoiding inadvertent nerve injuries during the posterior approach [J]. Spine, 2003, 28(13): 1379-84.
- [7] Liu J, Ebraheim NA, Sanford CG, et al. Preservation of the spinous process-ligament-muscle complex to prevent kyphotic deformity following laminoplasty [J]. Spine J, 2007, 7(2): 159-64.

(上接 490 页)

- [3] Dawn B, Bolli R. Adult bone marrow-derived cells: Regenerative potential, plasticity, and tissue commitment [J]. Basic Res Cardiol, 2005, 100(6): 494-503.
- [4] Wang Y, Deng Z, Lai X. et al. Differentiation of human bone marrow stromal cells into neural-like cells induced by sodium ferulate *in vitro* [J]. Cell Mol Immunol, 2005, 2(3): 225-9.
- [5] 杨 琴,贾延劫,杨 军,等.核因子- $\kappa$ B 在黄芩甙诱导大鼠骨髓基质细胞分化为神经细胞中的作用 [J].中国中西医结合杂志, 2005, 25(3): 248-51.

- [6] 杨 军,董为伟,贾延劫.体外诱导大鼠骨髓基质细胞分化为神经元样细胞中 NF- $\kappa$ B 的表达改变 [J].重庆医学, 2003, 32(11): 1502-4.
- [7] 杨 军,贾延劫,杨 琴,等. Notch-1 在骨髓间质干细胞分化为神经细胞中的作用 [J].重庆医科大学学报, 2005, 30(6): 781-6.
- [8] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. J Neur Sci Res, 2000, 61(4): 364-70.
- [9] 杨 琴,曾志磊,谢 鹏,等.体外培养大鼠骨髓基质细胞生物学特性研究 [J].重庆医科大学学报, 2007, 32(9): 926-9.