

肾脑复元汤联合人脐带间充质干细胞移植对脑缺血再灌注大鼠神经营养因子表达的影响

李映辰^{1,2}, 王瑾茜¹, 刘侃¹, 胡国恒^{2*}

1. 湖南中医药大学研究生院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学第一附属医院 神经内科, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 探究肾脑复元汤(SFD)联合人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)移植对缺血性脑卒中的神经保护作用及机制。**方法** 采用大脑中动脉栓塞(MCAO)法制备脑缺血再灌注大鼠模型,大鼠随机分为假手术组、模型组、SFD组(11.6 g/kg)、hUC-MSCs组、联合组(SFD+hUC-MSCs),各组根据处死时间随机分为造模4、8、15 d 3个时相组;采用神经功能缺损评分量表评估各组大鼠神经功能改变,HE染色观察海马区脑组织病理改变,免疫组化和Western blotting分别检测脑源性神经营养因子(BDNF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达。**结果** 与模型组比较,SFD组、hUC-MSCs组和联合组海马区神经细胞坏死均明显减轻,SFD组(第8、15天)、hUC-MSCs组及联合组(第4、8、15天)神经功能缺损评分显著降低、BDNF和bFGF表达显著升高($P<0.01$ 、 0.05)。与SFD组和hUC-MSCs组比较,联合组第8、15天时神经功能缺损评分显著降低、BDNF和bFGF表达显著升高($P<0.05$)。**结论** SFD联合hUC-MSCs移植能显著改善脑缺血后大鼠神经功能恢复,其作用机制可能与促进脑缺血后神经营养因子BDNF和bFGF表达有关。

关键词: 肾脑复元汤;人脐带间充质干细胞;缺血性脑卒中;脑源性神经营养因子;碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)05-0781-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.016

Effects of Shennao Fuyuan Decoction combined with implantation of hUC-MSCs on expression of neurotrophic factors in cerebral ischemia-reperfusion rats

LI Ying-chen^{1,2}, WANG Jin-xi¹, LIU Kan¹, HU Guo-heng²

1. Post-Graduate School, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: **Objective** To investigate the neuroprotective effects and mechanisms of Shennao Fuyuan Decoction (SFD) combined with implantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs). **Methods** Rats were randomly divided into Sham operation group, model group [cerebral ischemia-reperfusion (I/R) model of rats prepared by middle cerebral artery occlusion, MCAO], SFD group (11.6 g/kg), hUC-MSCs group, combination group (SFD + hUC-MSCs), and these groups were separately divided into other three groups by execution time (days 4, 8, and 15). The neurological function of rats was evaluated by neurological severity scores (NSS), the pathological changes of hippocampus were observed by HE staining, and the expression of BDNF and bFGF was detected by immunohistochemical and Western blotting method. **Results** After cerebral ischemia, the neural necrocytosis of hippocampus in SFD group, hUC-MSCs group, and combination group was alleviated compared with model group; Compared with model group, the NSS was much lower and the expression of BDNF and bFGF was higher in SFD group (days 8 and 15), hUC-MSCs group, and combination group (days 4, 8, and 15) ($P<0.01$ and 0.05); Compared with SFD group and hUC-MSCs group, the NSS was lower and the expression of BDNF and bFGF was higher in combination group (days 8 and 15) ($P<0.05$). **Conclusion** The combination of SFD and hUC-MSCs implantation could significantly improve the restoration of neurological defects after cerebral ischemia of rats, and this neuroprotective effect is probably due to the promotion of BDNF and bFGF expression.

Key words: Shennao Fuyuan Decoction; human umbilical cord mesenchymal stem cells; ischemia stroke; brain-derived neurotrophic factor; basic fibroblast growth factor

收稿日期: 2015-06-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273751, 81573941); 中西医结合心脑血管病防治湖南省重点实验室项目(2014XNFZ01); 湖南省研究生科研创新项目(CX2014B348); 湖南省中医药科研计划项目基金(201235)

作者简介: 李映辰(1989—),男,博士生,从事脑血管疾病的基础研究。E-mail: 494104178@qq.com

*通信作者 胡国恒,男,教授,博士生导师,从事心脑血管疾病的防治研究。Tel: (0731)85670760 E-mail: hugh9198@163.com

缺血性脑卒中具有高发病率、高致残率、高致死率及高复发率等特点,严重威胁中老年人的生命健康,目前仍然缺乏安全、高效的治疗措施,因此,研究本病的防治具有重大的医学和社会意义。一方面,近年来,通过移植具有自我增殖、多向分化特点的间充质干细胞治疗缺血性脑卒中在实验研究中取得了一定进展,而来源广泛、含量丰富、低免疫原性的人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)更是引起了广泛关注^[1];另一方面,长期临床实践和研究观察证明,传统中医药可显著改善脑卒中后遗症、提高患者生活质量,有望为本病的脑保护治疗开辟新的途径^[2]。因此,本研究通过建立大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,采用中药肾脑复元汤(SFD)联合hUC-MSCs移植,从神经营养因子表达等方面探究其对缺血性脑卒中的神经保护作用及机制,以寻求一种可靠有效的治疗方式。

1 材料

1.1 动物

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量(280±20)g,购自斯莱克景达实验动物公司,许可证号 SYXK(湘)2011-0003,饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心。

1.2 hUC-MSCs

足月平产健康胎儿脐带从湖南中医药大学第一附属医院妇产科获得,实验经过医院伦理委员会批准,并与产妇及配偶签署脐带捐赠知情同意书。

1.3 药物及主要试剂

SFD 药材组成:熟地黄 10 g、山茱萸 10 g、山药 15 g、黄芪 30 g、红景天 20 g、牡丹皮 10 g、当归尾 10 g、赤芍 10 g、地龙 10 g、丹参 10 g、川芎 10 g,以上药材均购自湖南中医药大学第一附属医院,并经该院药剂科刘红宇副主任药师鉴定,分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根、山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果实、薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 干燥根茎、豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根、景天科植物红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba 的干燥全草、毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、毛茛科植物川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch. 的干燥根、巨蚓科动

物通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen. 的干燥体、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。

DMEM/F12、青/链霉素、胰蛋白酶、PBS(美国 Hyclone 公司);胎牛血清、干细胞成骨、成脂分化培养基(美国 Gibico 公司);FITC、PerCP、AlexaFluor、Qdot 标记的 CD90、CD34、CD73、CD105 抗体(美国 BD 公司);茜素红、油红 O(美国 Sigma 公司);兔抗大鼠脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)试剂盒(武汉博士德生物公司)。

1.4 主要仪器

细胞培养箱(美国 Thermo 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 SFD 的制备

SFD 复方由湖南中医药大学第一附属医院药剂科按比例水煎浓缩后制成口服液 100 mL,并建立“一测多评”的质量控制方法^[3],其主要药效成分为黄芪甲苷≥0.12 mg/mL、丹皮酚≥0.3 mg/mL、芍药苷≥0.21 mg/mL、丹参酮 II_A≥0.02 mg/mL、川芎嗪≥0.4 mg/mL。

2.2 hUC-MSCs 的培养和鉴定^[4]

2.2.1 hUC-MSCs 原代培养 无菌采集脐带,用装有 DMEM/F12 的 50 mL 离心管运输,在超净台内将脐带的羊膜及血管分离,剩下的华通胶组织剪碎至 2~3 mm³ 大小,平铺在 T25 培养瓶内;向培养瓶中滴加少量完全培养液(15%胎牛血清、84% DMEM/F12、1%青/链霉素)至浸润组织块即可;每天观察组织块,隔 3~4 d 半量换液 1 次,7~10 d 可以观察到细胞从组织块边缘游离出来,细胞达到 80%~90%融合度即可进行传代。

2.2.2 表面分子鉴定 取一瓶 90%融合度的第 3 代细胞,弃去培养液, PBS 清洗 2 次,加入 0.25%胰酶进行消化,2 min 后加入 2 mL 完全培养基终止消化,1 000 r/min 离心 4 min;弃上清,加入 100 μL PBS 及 5 μL 抗体(CD90、CD34、CD73、CD105 抗体),重悬细胞,避光室温孵育 25 min;1 mL PBS 洗 2 遍,100 μL PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测分析。

2.2.3 分化鉴定 取第 4 代细胞,弃培养基, PBS 洗 2 次,0.25%胰酶消化 2 min 后吹打、重悬,按每孔 5×10⁴ 个细胞的浓度接种到 24 孔板中,37℃、5%

CO₂、饱和湿度培养过夜；将培养液更换成成骨、成脂诱导培养基，每隔 3 d 全量换液 1 次，共诱导培养 21 d；诱导结束后，弃培养液，PBS 洗 2 次，每孔加入 4%多聚甲醛 1 mL 固定 30 min；弃固定液，PBS 洗 2 次，分别采用茜素红和油红 O 对诱导分化的细胞进行染色，倒置显微镜下观察染色情况并拍照。

2.3 大鼠 MCAO 模型的制备

采用改良 Zea Longa 法制备大鼠 MCAO 模型^[5]，2 h 后拔除线栓，造成脑缺血后再灌注，假手术组只分离血管而不插入线栓；造模后采用 Zea Longa 5 分制神经功能评分初步评价造模情况^[5]，分值在 1~3 分者入组。

2.4 hUC-MSCs 移植

取第 3~7 代细胞，胰酶消化 2 min 后以 PBS 重悬，调整密度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ，以 1 mL EP 管分装细胞悬液，每管 0.5 mL；大鼠尾部用酒精擦拭后，以 1 mL 注射器穿刺尾静脉，回抽见血后将细胞悬液缓慢注入尾静脉，完成后再缓慢补推 0.5 mL PBS。

2.5 大鼠分组及给药

将所有大鼠随机分为假手术组、模型组、SFD 组、hUC-MSCs 组、联合组（SFD+hUC-MSCs）。根据处死时间点随机分为造模后 4、8、15 d 3 个时相组，每组 6 只。造模 24 h 后，hUC-MSCs 组及联合组大鼠尾 iv 移植 1×10^6 个 hUC-MSCs，其余各组分别尾 iv 1 mL PBS。造模后 24 h 开始给药，SFD 组及联合组 ig SFD，给药体积 10 mL/kg，每天 1 次，直至处死。假手术组、模型组、hUC-MSCs 组 ig 等体积的蒸馏水。前期研究证明，SFD 剂量因素对 MCAO 大鼠疗效的影响差异不显著^[6-7]，故本实验中选用临床使用中药剂量换算大鼠给药剂量，即根据 70 kg 成人每天服 145 g 生药进行换算，换算后 ig SFD 的生药量为 11.6 g/kg，使用时蒸馏水稀释 SFD 口服液至给药体积。

2.6 指标检测

2.6.1 神经功能缺损评分 各组大鼠在造模前 24 h、造模后 2 h、处死前采用改良大鼠神经功能缺损评分量表（modified-neurological severity scores, m-NSS）^[8]进行评分：从肢体运动、感觉功能、平衡能力及生理反射对大鼠各项神经功能进行等级评分测定，正常记 0 分，异常者根据量表及严重程度记 1~6 分，总分为 18 分，分值越高表示神经功能损害越严重。

2.6.2 脑组织样本取材及处理 10%水合氯醛 ip 麻醉大鼠，生理盐水灌注，冰块上断头取脑，在端脑的正中做冠状切开，前端置于 4%多聚甲醛内固定，

常规脱水、透明、浸蜡、包埋；后端取缺血侧海马及顶叶皮质，用锡箔纸包裹置于液氮中冻存，备用。

2.6.3 HE 染色 取脑组织蜡块，在前囟后 1.0~1.5 mm 区域做冠状切片，厚 5 μm 。二甲苯和无水乙醇脱蜡，苏木精染色 10 min 后自来水浸洗，1%伊红复染 3 min，梯度乙醇脱水，二甲苯透明后封片。光镜下，观察各组大鼠缺血侧海马区神经细胞组织形态学特征。

2.6.4 免疫组化 脑组织切片常规脱蜡、水化，3% H₂O₂ 孵育 10 min，PBS 冲洗 3 次，每次 2 min，湿盒中滴加 1:100 稀释的一抗（BDNF、bFGF），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后，分别滴加聚合物辅助剂和辣根酶标记二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，DAB 显色，常规脱水、透明及封片。每组每个指标检测 6 张切片，分别选取缺血侧海马区 5 个互不重叠的视野，采用 IPP 6.0 软件进行图像分析，测定阳性细胞的平均吸光度（A）值，取 5 个视野平均值纳入。A 值高，则细胞阳性染色（胞浆内见棕黄色颗粒）强度高。

2.6.5 Western blotting 检测 取出冻存的脑组织，加入细胞裂解液，超声匀浆 10 min，13 000 r/min 离心 5 min，取上清，BCA 法蛋白定量。95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min，取上清制备 50 μg 蛋白样品。电泳后转 NC 膜，加入一抗（BDNF、bFGF、GAPDH），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h；TBST 洗膜 3 次，分别加入辣根酶标记二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，TBST 洗膜，ECL 显色。使用凝胶成像仪拍照，采用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

2.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 *t* 检验进行两组间比较，多组比较采用单因素方差分析。

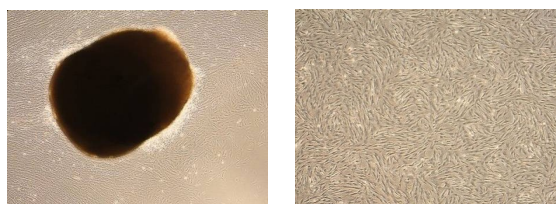
3 结果

3.1 hUC-MSCs 的培养和鉴定

组织块法培养 hUC-MSCs 至第 10 天后，镜下可见大量梭形纤维样细胞从组织块边缘游出，贴壁生长，大小均一，传代后呈漩涡样或簇状生长，结果见图 1。流式细胞仪鉴定细胞表面分子，可见 hUC-MSCs 高表达间充质干细胞抗原 CD90、CD105、CD73，不表达造血干细胞标志性抗原 CD34，结果见图 2。经过诱导培养后，可向成骨、成脂分化，结果见图 3。细胞培养及鉴定结果符合国际细胞疗法协会关于间充质干细胞的鉴定标准^[9]。

3.2 对大鼠神经功能缺损评分的影响

大鼠脑缺血再灌注后，SFD 组（第 8、15 天）、



原代培养

第 2 代

图 1 hUC-MSCs 细胞形态

Fig. 1 Cell morphology of hUC-MSCs

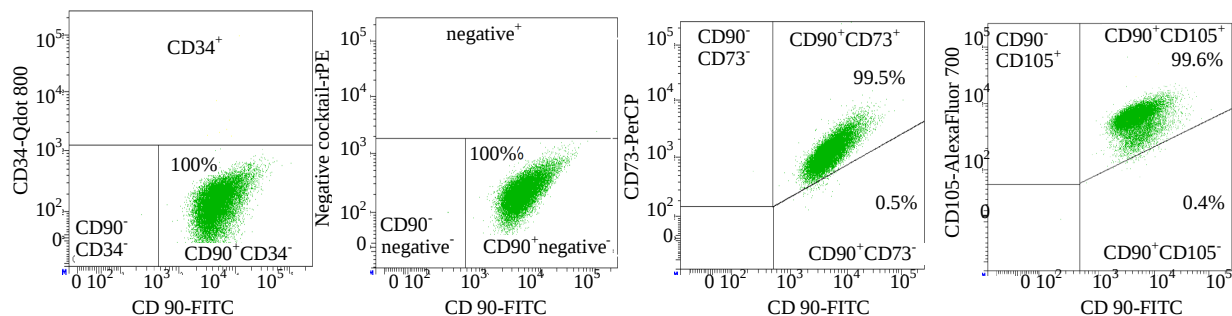
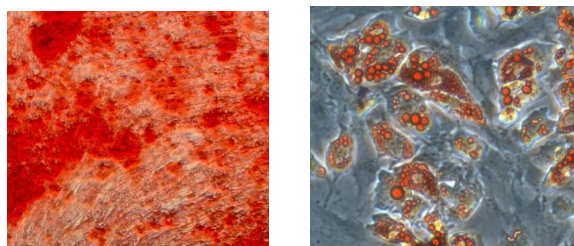


图 2 hUC-MSCs 的表面分子鉴定

Fig. 2 Surface molecule identification of hUC-MSCs

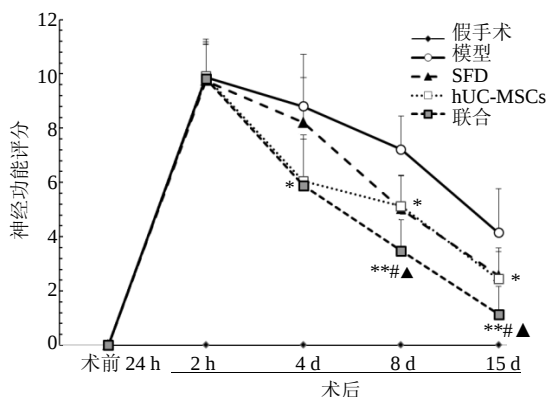


成骨分化

成脂分化

图 3 hUC-MSCs 的分化鉴定

Fig. 3 Differentiation identification of hUC-MSCs



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 SFD 组比较: # $P < 0.05$;
与 hUC-MSCs 组比较: ▲ $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs SFD group;
▲ $P < 0.05$ vs hUC-MSCs group, same as below

图 4 各组神经功能缺损分值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 4 Comparison on NSS in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

hUC-MSCs 组和联合组 (第 4、8、15 天) 神经功能评分均明显低于模型组 ($P < 0.01$ 、 0.05); 联合组在第 8、15 天评分较 SFD 组及 hUC-MSCs 组显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 4。

3.3 HE 染色

光镜下对缺血海马区脑组织进行形态学观察, 各时间点假手术组细胞轮廓正常, 排列紧密, 胞核居中; 脑缺血后 4、8 d, 造模各组可见梗死区或者

钙化病灶, 胞核固缩或出现空泡, 细胞结构散乱、部分细胞轮廓不清; 但 SFD 组、hUC-MSCs 组和联合组细胞坏死较模型组减轻; 第 15 天时, 各组细胞排列有序、轮廓较清晰, 但模型组仍可见少量坏死细胞。第 8 天 HE 染色结果见图 5。

3.4 对 BDNF、bFGF 表达的影响

假手术组 BDNF 及 bFGF A 值在各时间点差异不显著; 与模型组比较, SFD 组 (第 8 天)、hUC-MSCs 组及联合组 (第 8、15 天) BDNF A 值明显升高 ($P < 0.01$), SFD 组 (第 8、15 天)、hUC-MSCs 组及联合组 (第 4、8、15 天) bFGF A 值明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 联合组在第 8 天 BDNF A 值较 SFD 组及 hUC-MSCs 组明显升高 ($P < 0.05$), 第 8、15 天 bFGF A 值较 SFD 组及 hUC-MSCs 组明显升高 ($P < 0.05$)。BDNF、bFGF 第 8 天免疫组化结果见图 5, 第 4、8、15 天 A 值结果见图 6。

3.5 对 BDNF、bFGF 蛋白水平的影响

假手术组 BDNF、bFGF 蛋白表达在各时间点无明显变化; 与模型组比较, SFD 组 (第 8、15 天)、hUC-MSCs 组及联合组 (第 4、8、15 天) BDNF 及 bFGF 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 联合组在第 8、15 天 BDNF 及 bFGF 蛋白表达较 SFD 组及 hUC-MSCs 组升高 ($P < 0.05$)。结果见图 7。

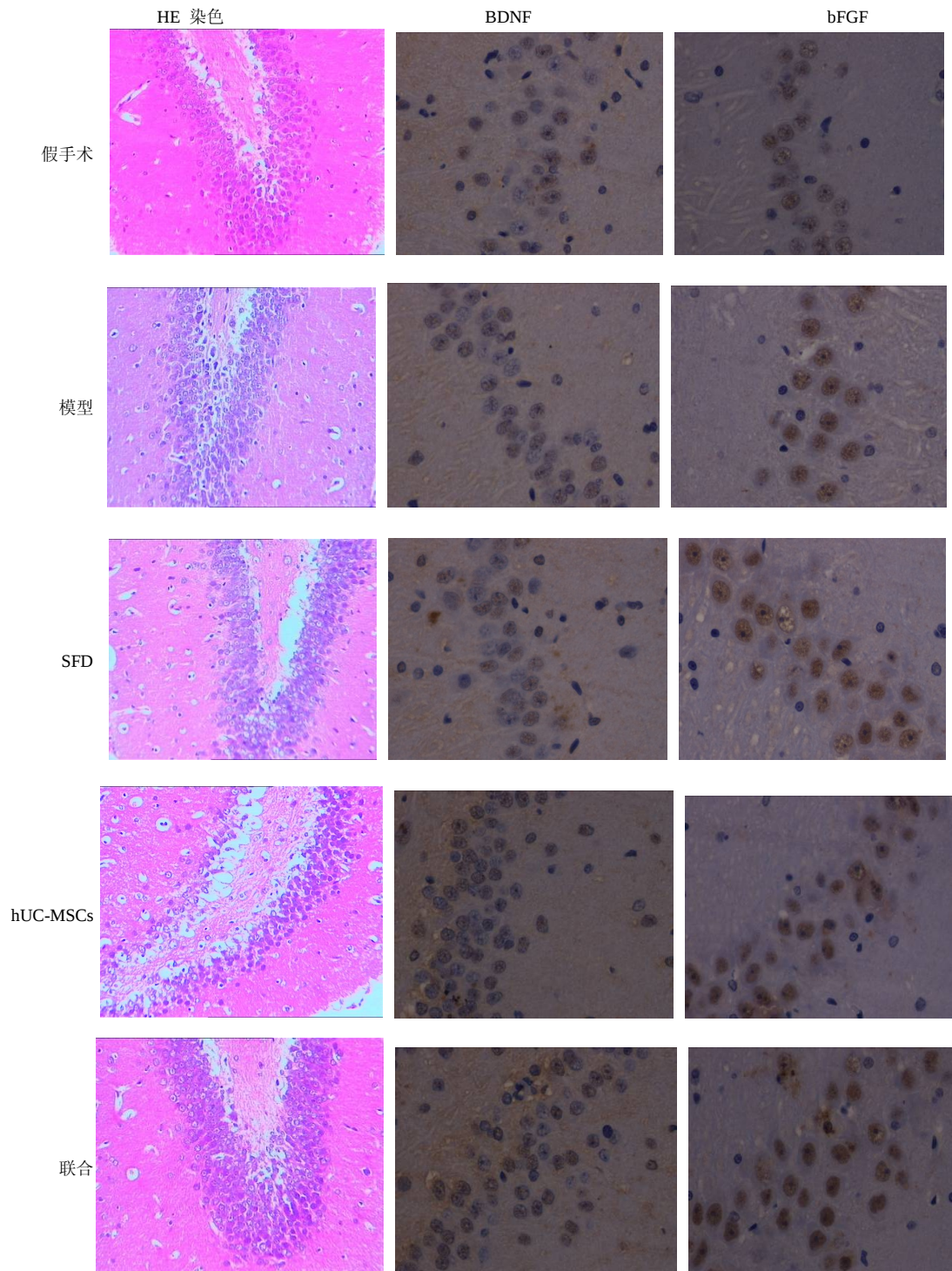


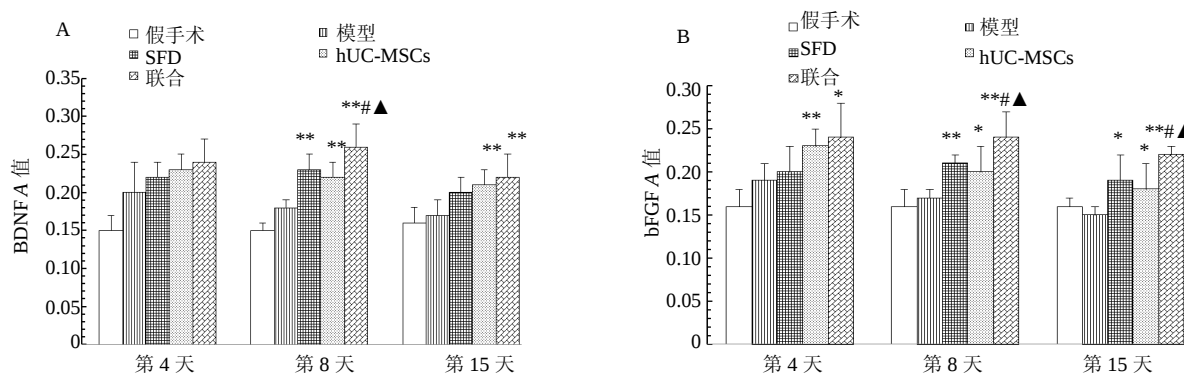
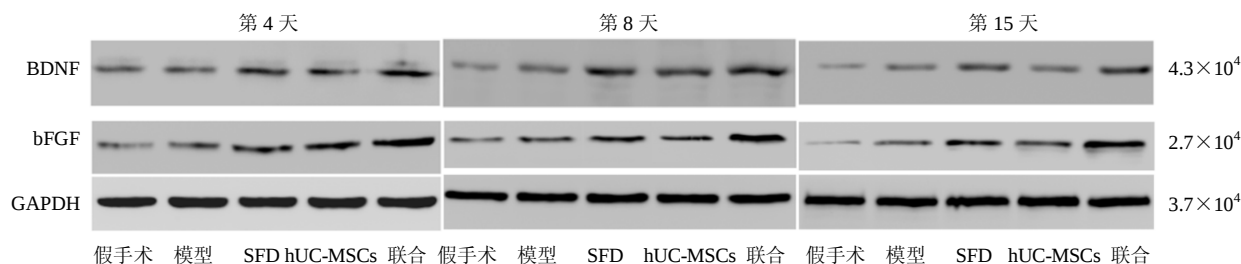
图 5 第 8 天时海马区细胞病理染色

Fig. 5 Pathological staining of hippocampus on day 8

4 讨论

自成人脑中存在神经元再生现象被发现以来，具有移植后再生、增殖、分化修复脑组织潜能的干细胞迅速引起了科研工作者的广泛关注。人脐带间充质干细胞来源于脐带羊膜与脐带血管之间的华氏胶

(Wharton's Jelly)，其来源丰富、取材方便、且不存在伦理道德争议，体外培养可向软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、内皮细胞等多方向分化，其免疫原性低，异体移植不会发生明显免疫排斥反应^[1]。Zhang 等^[8]采用尾 iv 移植 hUC-MSCs 治疗脑缺血损伤大鼠，

图 6 各组 BDNF (A)、bFGF (B) A 值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 6 Comparison on A values of BDNF (A) and bFGF (B) in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)图 7 各组 BDNF (A) 及 bFGF (B) 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 7 Comparison on BDNF (A) and bFGF (B) protein expression in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

发现移植细胞可以存活、归巢到脑梗死区域,并能促进新血管生成,明显改善大鼠神经功能恢复。Lin 等^[9]通过皮层下移植 hUC-MSCs,移植组脑内缺血区血管密度、神经营养因子表达都有显著提高,神经细胞凋亡减少,脑内炎症水肿也能得到明显缓解。更多的研究表明, hUC-MSCs 修复缺血性脑损伤的根本原因在于其可通过旁分泌途径促进内源性神经营养因子、抗炎因子、抗凋亡细胞因子的合成和分泌,从而抑制缺血再灌注后炎症反应和细胞凋亡、促进血管新生和神经再生,改善脑缺血后神经功能恢复^[1]。

中医理论认为,肾精化生脑髓,髓海有病,其本在肾。肾虚则脑髓失充、脉络失养、血行不畅,发为脑卒中。因此,肾虚血瘀也是本病的重要病理

机制之一,治疗时,应“从肾治脑、肾脑同治”,化瘀行血同时填精补髓,精髓得充、气血冲旺则血瘀自去,如此则精盛、髓满、瘀散、络畅、窍通、肢便。根据“从肾治脑、肾脑同治”理论组方的 SFD 是湖南省名中医胡国恒教授经验方,临床上治疗缺血性脑卒中可明显改善患者各项神经功能,降低致残率^[10],实验研究证明其可抑制脑缺血再灌注大鼠缺血区炎症反应并促进神经营养因子 NGF 及 GDNF 表达,显著改善神经功能恢复^[11]。本方君药黄芪、熟地,健脾益气、补血养阴、填精益髓;臣药山药、山茱萸,益气养阴、补益肝肾、兼能涩精;佐以化瘀通络之品,牡丹皮、赤芍、红景天、当归尾,补血通络、活血祛瘀;使以地龙,引药入经、

通经祛瘀，全方共奏益肾补气活血通络之功。

BDNF、bFGF 同属神经营养因子家族，在脑缺血损伤修复过程中起着重要的作用。BDNF 在大脑皮层及海马区水平较高，脑缺血再灌注损伤可以诱导其表达，从多个方面减少炎症损伤和细胞凋亡。BDNF 可促进细胞内 Ca^{2+} 结合蛋白表达、稳定 Ca^{2+} 浓度，抑制 NO 合酶的产生、减少自由基生成，下调 Bax/Bcl 表达、抑制 β -淀粉样蛋白介导的细胞凋亡^[12]；脑缺血后，BDNF 还可以通过与其特异性 trkB 受体相结合，增加神经突触可塑性，促进轴突生长，改善脑组织修复^[13]。bFGF 属于 FGF 家族，是一种广谱的促神经生长因子和促神经细胞分裂因子，但正常情况下脑组织内水平较低^[14]。脑缺血发生后，bFGF 表达明显增加，其可以通过特异性提高 caspase-3 基因、降低 Bcl-2 基因的表达，促进细胞分裂、增殖和血管新生，并抑制神经元凋亡，减少再灌注损伤；另外，bFGF 还能通过结合其特异性受体，激活酪氨酸激酶，增加 NO 释放，扩张局部血管，改善微循环和细胞代谢，拮抗脑组织缺血缺氧损伤^[15]。

本实验结果显示，脑缺血发生后，BDNF、bFGF 的表达均明显增高，而随着组织修复进程逐渐呈降低趋势，这与之前的文献报道相符合^[13]。实验中，BDNF、bFGF 表达的免疫组化和 Western blotting 检测结果不完全相同，但表达的总体趋势一致；与模型组比较，SFD 与 hUC-MSCs 均可明显改善脑梗死后大鼠各项神经功能，减少细胞坏死，促进 BDNF、bFGF 的表达；但在缺血早期（第 4 天）hUC-MSCs 的疗效更加显著，在第 8、15 天，二者疗效相当，说明 SFD 的治疗效应主要发生在恢复期，这与前期对 SFD 的临床观察相符合^[10]；与 SFD 组及 hUC-MSCs 组比较，联合组更加显著地促进神经营养因子的表达，改善大鼠脑缺血后神经功能恢复，说明 SFD 与 hUC-MSCs 联用后，治疗效应有更加显著的提高。实验中，未出现由药物引起的不良反应，也未出现任何免疫排斥反应，因此，本研究证实，SFD 联合 hUC-MSCs 移植治疗缺血性卒中安全且有良好的疗效，其作用机制可能与促进脑缺血再灌注后神经营养因子 BDNF 及 bFGF 表达有关。

参考文献

[1] Li Y, Hu G, Cheng Q. Implantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells for ischemic stroke:

perspectives and challenges [J]. *Front Med*, 2015, 9(1): 20-29.

[2] 陈 薇, 胡玉英. 中医药治疗缺血性中风研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(4): 474-475.

[3] 王 丹. 银杏健脑片质量研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.

[4] Latifpour M, Shakiba Y, Amidi F, et al. Differentiation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells [J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2014, 6(4): 218-227.

[5] 陈韵羽. 肾脑复元汤对局灶性脑缺血大鼠 GDNF 和 NGF 蛋白表达水平的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.

[6] 范金花. 肾脑复元汤对缺血性脑损伤大鼠 Brdu、Nestin 及相关细胞因子的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.

[7] Kuptsova K, Kvist E, Nitzsche F, et al. Combined enriched environment atipamezole treatment transiently improves sensory functions in stroke rats independent from neurogenesis and angiogenesis [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2015, 56(1): 41-47.

[8] Zhang L, Li Y, Zhang C, et al. Delayed administration of human umbilical tissue-derived cells improved neurological functional recovery in a rodent model of focal ischemia [J]. *Stroke*, 2011, 42(5): 1437-1444.

[9] Lin Y C, Ko T L, Shih Y H, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2011, 42(7): 2045-2053.

[10] 张忠伟, 胡国恒. 肾脑复原汤治疗脑梗死恢复期肾虚血瘀证 30 例疗效观察 [J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(4): 11-13.

[11] 胡国恒, 李映辰, 邹 婷, 等. 肾脑复元汤对 MCAO 大鼠炎症因子及神经营养因子表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 81-85.

[12] 黄 文, 莫雪安, 张 成, 等. BDNF 体外诱导骨髓间充质干细胞对脑缺血大鼠神经缺失功能的作用 [J]. 广西医科大学学报, 2012, 29(6): 821-824.

[13] Zhang Y, Pardridge W M. Blood-brain barrier targeting of BDNF improves motor function in rats with middle cerebral artery occlusion [J]. *Brain Res*, 2006, 11(11): 227-229.

[14] Sonmez A B, Castelnovo J. Applications of basic fibroblastic growth factor (FGF-2, bFGF) in dentistry [J]. *Dent Traumatol*, 2014, 30(2): 107-111.

[15] Cai H, Xu X, Liu Z, et al. The effects of calcitonin gene-related peptide on bFGF and AQP4 expression after focal cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. *Pharmazie*, 2010, 65(4): 274-278.