

· 基础研究 ·

骨髓间充质干细胞移植治疗合并高血压缺血性脑卒中大鼠的疗效及机制探讨

刘玉林¹ 赵颖² 郭凯锋¹ 龙程² 黄臻¹

¹广州市番禺区中心医院康复医学科, 广州 511400; ²华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

通信作者: 黄臻, Email: Mishz@126.com

【摘要】 目的 观察骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植治疗合并高血压缺血性脑卒中大鼠的疗效并探讨相关作用机制。**方法** 采用随机数字表法将 72 只雄性自发性高血压大鼠(SHR)分为空白组、模型组及 BMSCs 组, 每组 24 只大鼠。将模型组及 BMSCs 组大鼠制成大脑中动脉闭塞(MCAO)脑梗死模型, 空白组不给予任何特殊处理。于造模 24 h 后 BMSCs 组大鼠经尾静脉注射 1 ml BMSCs 溶液(细胞浓度为 1×10^6 个/ml), 同期模型组及空白组则分别注射 1 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)。在术后 3 d、7 d 及 14 d 时分别对各组大鼠进行改良神经功能缺损评分(mNSS)及 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色, 并采用 RT-PCR 和 Western blot 技术分别检测各组大鼠梗死侧脑组织血管内皮生长因子(VEGF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)mRNA 及蛋白表达。**结果** 在术后 3 d、7 d 及 14 d 时, BMSCs 组神经功能缺损评分[(7.4±1.34)分 vs (9.2±0.84)分, (6.2±0.84)分 vs (8.8±0.84)分, (5.0±1.00)分 vs (7.8±0.84)分]、脑梗死面积占比[(39.09±1.66)% vs (45.78±1.26)%, (26.20±1.47)% vs (43.11±1.06)%, (22.45±1.45)% vs (38.16±0.87)%]均较模型组明显降低($P < 0.01$); 随着术后时间延长, BMSCs 组脑梗死面积逐渐减小。在术后 3 d、7 d 及 14 d 时, 空白组、模型组 VEGF 及 GDNF mRNA 表达组间差异均无统计学意义($P > 0.05$); 与空白组及模型组比较, BMSCs 组缺血脑组织中 VEGF、GDNF 蛋白表达及 mRNA 表达均明显增强, 组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** BMSCs 移植对合并高血压的缺血性脑卒中大鼠具有神经保护作用, 其治疗机制可能与上调缺血脑组织中 VEGF、GDNF 含量有关。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 高血压大鼠; 缺血性脑卒中

基金项目: 广东省广州市番禺区科技计划项目资助(2018-Z04-07)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.04.002

Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treating ischemic stroke

Liu Yulin¹, Zhao Yin¹, Guo Kaifeng¹, Long Cheng², Huang Zhen¹

¹Department of Rehabilitation Medicine, Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China; ²School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Corresponding author: Zhen Huang, Email: Mishz@126.com

【Abstract】 Objective To observe any effect of transplanting bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) after ischemic stroke, and explore its mechanism. **Methods** Seventy-two spontaneous hypertensive male rats were randomly divided into a sham group, a model group and a BMSCs group, each of 24. A model of middle cerebral artery occlusion was induced in the rats of the model and BMSCs groups but not in the sham group. The BMSCs rats had 106 BMSCs injected into their tail veins 24 hours after the modeling, while the other 2 groups were injected with the same amount of phosphate buffer. Modified neurological deficit scoring and 2,3,5-triphenyltetrazole chloride staining were performed on the 3rd, 7th and 14th days after the operation. The mRNA and protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) in the rats' brain tissues were detected by RT-PCR and western blotting. **Results** On the 3rd, 7th and 14th days after the operation, the average neurological deficit score of the BMSCs group was significantly lower and the area of cerebral infarction was significantly smaller than among the model group. Moreover, the infarcted volume in the BMSCs group continued to decrease gradually as time went on. There was no significant difference between the sham and model group in the expression of VEGF or GDNF mRNA or protein 3, 7 or 14 days after the operation. They were, however, significantly higher in the ischemic brain tissue of the BMSCs group compared with the other two groups. **Conclusions** BMSC transplantation has a neuroprotective effect on rats with hypertension modeling ischemic

stroke. The mechanism may be that BMSCs can up-regulate the expression of VEGF and GDNF in ischemic brain tissue.

【Key words】 Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Hypertension; Ischemic stroke

Funding: A Panyu District Science and Technology Planning Project (2018-Z04-07)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.04.002

相关研究表明,脑卒中是导致人类死亡及功能残疾的最常见病因之一,其中约 69.6%~70.8% 的患者为缺血性脑卒中^[1]。尽管溶栓、介入等治疗能降低缺血性脑卒中患者死亡率,但超过 60% 的脑卒中患者常遗留有不同程度的运动、认知、语言及吞咽功能等障碍,对患者自理能力及生活质量均造成严重影响。近年来骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植治疗已成为研究热点,大量实验研究发现, BMSCs 移植治疗可减轻脑组织损伤,促进缺血性脑卒中动物模型神经功能恢复^[2-3],但实验对象多为健康动物。而实际临床工作发现,缺血性脑卒中患者常合并有多种基础疾病,如高血压、糖尿病等,如有研究调查指出,缺血性脑卒中患者中合并有高血压的比例高达 70%^[4],且患者预后不良发生率及病死率均较无高血压患者明显升高^[5]。尽管 BMSCs 移植在治疗无基础疾病脑梗死动物中取得显著疗效,但关于 BMSCs 移植治疗合并高血压缺血性脑卒中动物的疗效鲜见报道。受损神经元的存活及修复多依赖于半暗带区新生血管形成、多种营养因子生物学效应等,其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在新生血管形成中发挥重要作用,而胶质细胞源性神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)在促进受损神经元生长、修复及再生等方面具有重要影响。基于此,本研究主要观察 BMSCs 移植对合并高血压缺血性脑卒中大鼠的治疗作用及对缺血脑组织中 VEGF、GDNF 的影响,并探讨其可能的作用机制。

材料与方法

一、实验材料与仪器

选取健康雄性自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rats, SHR) 72 只,鼠龄 12 周,体重约 250 g,由北京维通利华实验动物中心提供,在无特殊病原体级(specific pathogen free animals, SPF)环境中适应性饲养 1 周,所有动物操作均符合相关实验动物伦理学要求;Wistar 大鼠骨髓间充质干细胞购于赛业生物有限公司(标号:190320I31)。本研究主要试剂及仪器包括胎牛血清(美国 Gibco 公司)、蛋白裂解缓冲液(radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA lysis buffer)(中国赛维尔生物科技有限公司)、2,3,5-氯化

三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色液(中国索莱宝科技有限公司)、荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司)、酶标仪(中国雷杜生命科学股份有限公司)、台式高速冷冻离心机(中国大龙兴创实验仪器有限公司)、石蜡切片机(德国 Leica 公司)及光学显微镜(日本 Nikon 公司)等。

二、细胞培养及传代

取来源于 Wistar 大鼠的 BMSCs 进行流式细胞学鉴定,发现 BMSCs 抗原 CD90、CD44、CD29 呈阳性表达,而抗原 CD45、CD34 呈阴性表达,确认该细胞为 BMSCs。将冻储备用的 BMSCs 进行复苏并接种于培养瓶中,加入适量完全培养基后置于 37 ℃、5% 的 CO₂ 孵箱中培养,以后每 48 h 换液 1 次,当细胞贴壁融合至 80% 左右时按 1:2 传代,取第 3 代处于对数生长期的 BMSCs 用于后续细胞移植操作。

三、分组与造模

采用随机数字表法将 72 只健康 SHR 大鼠分为空白组、模型组及 BMSCs 组,每组 24 只大鼠。空白组不给予任何特殊干预,模型组及 BMSCs 组大鼠则分别制成大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)脑梗死模型,制模方法参照改良 Zea Longa 线栓法^[6],采用 3% 异氟烷麻醉大鼠,将大鼠固定于实验台上,行颈部正中切口,小心分离出颈动脉鞘(注意勿伤及迷走神经),暴露出颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA),在 CCA 近心端用缝线结扎,在 ECA 与 ICA 分叉处将 ECA 结扎后,采用动脉夹夹闭 ICA 远心端,在 CCA 远心端用眼科剪剪一小口并插入栓线,待缝合固定好后松开动脉夹,将栓线沿 ICA 缓慢插入至稍有阻力处,阻断大脑中动脉血流 2 h 后将线栓拔出。选取神经功能评分为 1~3 分的大鼠进行后续实验。

四、造模后干预

于造模 24 h 后 BMSCs 组经尾静脉注射 1 ml BMSCs 溶液(细胞浓度为 1×10^6 个/ml),而模型组及空白组则同期注射 1 ml 浓度为 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)。

五、神经功能缺损评分

于大鼠造模苏醒后、造模后 3 d、7 d 及 14 d 时分别采用改良神经功能缺损评分(modified neurological

severity score, mNSS) 对各组大鼠进行神经功能评定, 该量表主要评定项目包括运动功能检测、平衡木试验、感觉试验、反射丧失及不正常运动等方面, 分值范围 0~18 分, 得分越高表示大鼠神经功能缺损程度越严重, 如得分 1~6 分为轻度损伤, 7~12 分为中度损伤, 13~18 分为重度损伤^[6]。

六、脑梗死情况观察

于造模后 3 d、7 d 及 14 d 时每组各随机取 5 只大鼠, 按 4 ml/kg 体重标准给予水合氯醛 (10%) 腹腔注射, 待麻醉剂生效后断头处死, 分离大鼠脑组织, 切除小脑及低位脑干, 置于 -20 ℃ 冰箱中冷冻 20 min, 再将脑组织连续切成 2 mm 厚冠状切片 (共 5 片), 并立即置于 2% TTC 溶液中 (37 ℃) 避光染色 30 min, 期间数次翻转切片使其染色均匀。将染色好的脑组织切片置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后取出拍照, 采用 Image-Pro Plus 软件计算脑梗死面积占脑片面积百分比。

七、Western blot 检测

于造模后 3 d、7 d 及 14 d 时分别取各组大鼠脑组织, 用预冷 PBS 液洗涤 2~3 次去除血污, 剪成小块后置于匀浆管中, 加入 10 倍组织体积的裂解液并制备组织匀浆, 在 4 ℃ 环境下离心 (12 000 rpm) 10 min, 收集上清即为总蛋白溶液。取 50 μg 蛋白样品, 加入 6 μl 5×还原型蛋白上样缓冲液, 沸水浴变性 15 min, 经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶电泳分离蛋白, 并转移至聚偏氟乙烯 (poly vinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 经 5% 脱脂奶粉室温封闭 30 min, 加入稀释的一抗, 4 ℃ 孵育摇床过夜, 经三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液 (tris-buffered saline with tween-20, TBST) 快速洗膜 3 次后, 将二抗按 1:5000 比例用 TBST 进行稀释, 室温孵育 30 min, 最后进行显影、定影处理, 采用 Alpha 软件计算 VEGF 及 GDNF 蛋白条带光密度值。

八、RT-PCR 检测

采用 Trizol 法提取各组大鼠脑组织 RNA, 然后经逆转录获取其 cDNA, 再通过 qPCR 仪检测各组大鼠脑组织标本 VEGF、GDNF 表达。共设置 3 个复孔, 各组大鼠样本经 95 ℃ 预变性 10 min, 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 30 s, 65 ℃ 延伸 15 s, 共进行 30 个循环, 所有样本均重复检测 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目标因子 mRNA 水平。具体引物序列如下: VEGF 上游 5'-GCACTG-GACCCTGGCTTTACT-3', 下游 5'-AACTTCACCACT-TCATGGGCTTT-3'; GDNF 上游 5'-CAGTGACTC-CAATATGCCCGA-3', 下游 5'-CGCTTGTTTATCTGCT-GACCTTTT-3'; β-actin 上游 5'-CTGGAGAAACCTGC-CAAGTATG-3', 下游 5'-GGTGGAAGAATGGGAGTT-GCT-3'。

九、统计学分析

本研究所得计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 20.0 版统计学软件包进行数据分析, 计量资料组间两两比较采用最小显著差异法 (least-significant difference, LSD), 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、术后不同时间点各组大鼠 mNSS 评分比较

本研究空白组大鼠 mNSS 评分为 0 分, 提示其无神经功能损伤; 与空白组比较, 在术后 3 d、7 d 及 14 d 时模型组、BMSCs 组 mNSS 评分均明显增高 ($P < 0.05$); 并且上述时间点模型组 mNSS 评分亦显著高于 BMSCs 组 [(9.2±0.8) 分对 (7.4±1.3) 分, (8.8±0.8) 分对 (6.2±0.8) 分, (7.8±0.8) 分对 (5.0±1.00) 分], 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

二、术后不同时间点各组大鼠 TTC 染色结果比较

空白组大鼠脑切片 TTC 染色呈红色, 未见梗死区域。造模后大鼠脑缺血区域呈白色, BMSCs 组、模型组脑梗死面积与空白组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 在术后 3 d、7 d 及 14 d 时 BMSCs 组脑梗死面积占比均显著降低 [(39.09±1.66)% 对 (45.78±1.26)%, (26.20±1.47)% 对 (43.11±1.06)%, (22.45±1.45)% 对 (38.16±0.87)%], 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。具体情况见图 1。

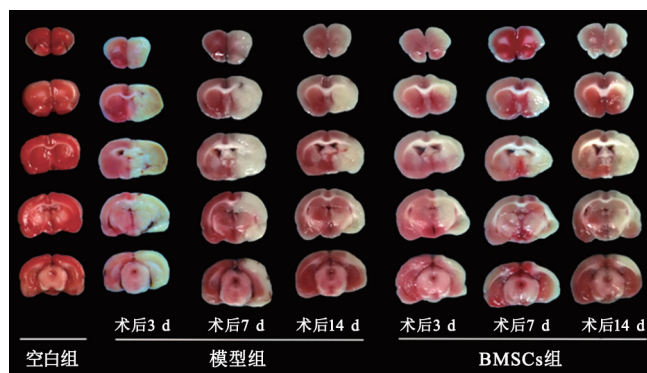


图 1 术后不同时间点 3 组 SHR 大鼠脑梗死面积比较 (TTC 染色)

三、术后不同时间点各组大鼠 VEGF 及 GDNF 蛋白表达比较

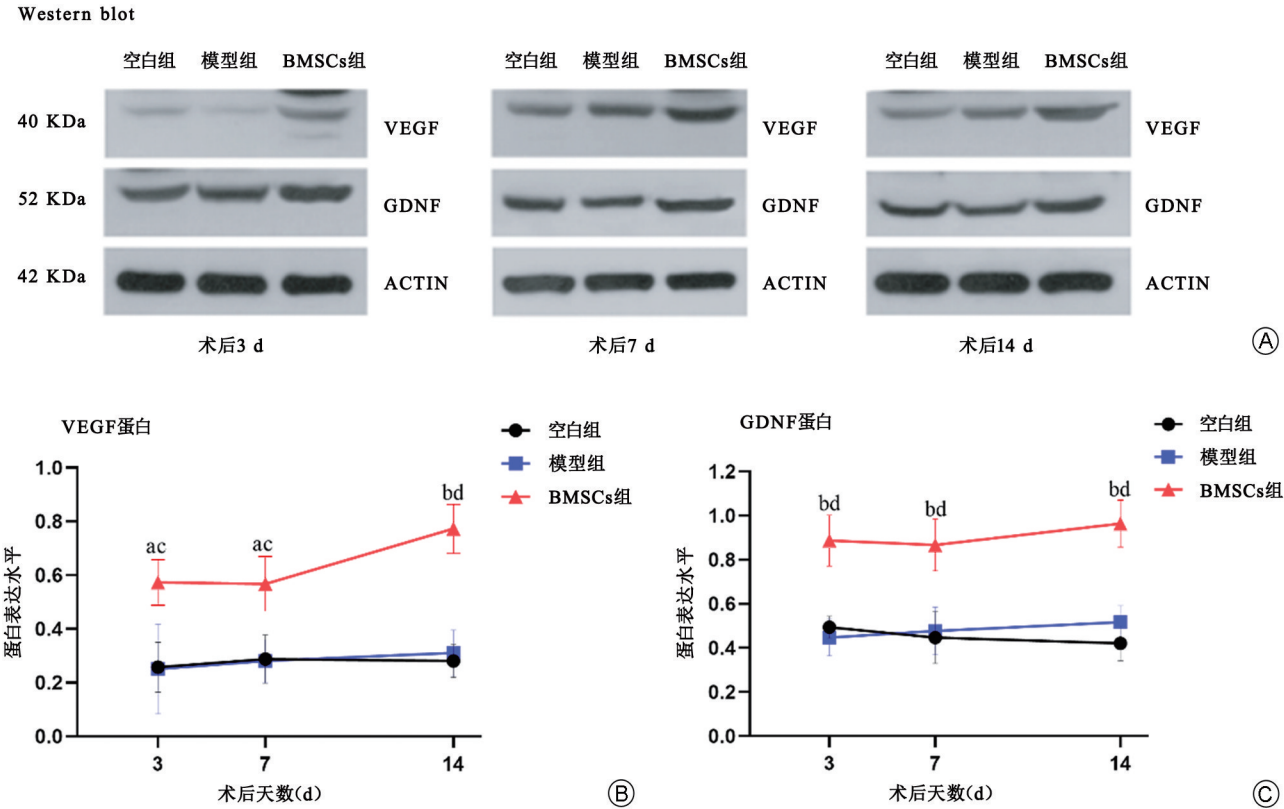
通过 Western blot 检测发现, 空白组、模型组在术后 3 d、7 d 及 14 d 时均可见 VEGF、GDNF 蛋白微量表达, 且 2 组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组 VEGF 蛋白表达随时间延长呈逐渐增加趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); BMSCs 组 VEGF、GDNF 蛋白表达在术后 3 d、7 d 及 14 d 时均较模型组和空白组明

显增加,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$),具体情况见图 2A-C。

四、术后不同时间点各组大鼠 VEGF 及 GDNF mRNA 表达比较

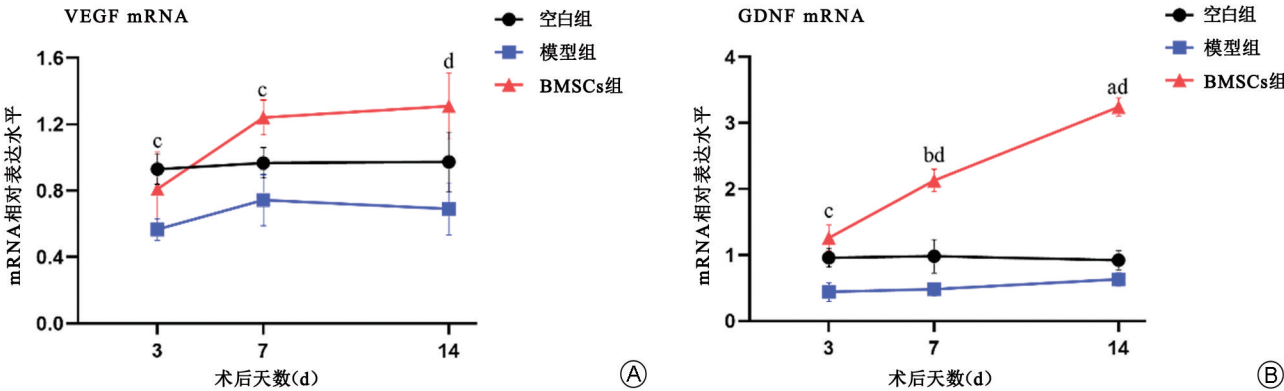
通过 RT-PCR 检测发现,在术后 3 d、7 d 及 14 d 时空白组和模型组 VEGF、GDNF mRNA 表达组间差异

均无统计学意义($P>0.05$),上述时间点 BMSCs 组 VEGF 及 GDNF mRNA 表达均较模型组明显增加,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$);在术后 7 d、14 d 时 BMSCs 组 GDNF mRNA 表达亦较空白组明显增加,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。具体情况见图 3A-B。



注:与空白组相同时间点比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组相同时间点比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

图 2 术后不同时间点 3 组 SHR 大鼠 VEGF 及 GDNF 蛋白表达比较



注:与空白组相同时间点比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组相同时间点比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

图 3 术后不同时间点 3 组 SHR 大鼠 VEGF 及 GDNF mRNA 表达比较

讨 论

本研究结果显示,与模型组比较,BMSCs 组大鼠神经功能恢复情况明显改善,且脑梗死面积显著减少,表明 BMSCs 移植对合并高血压的缺血性脑卒中大鼠具有保护作用;本研究同时还发现,高血压缺血性脑卒中大鼠经移植 BMSCs 后,其 VEGF、GDNF 蛋白及 mRNA 表达均明显增强,考虑其治疗机制可能包括促进新生血管形成,在缺血病灶周围建立良好的微循环,并促使神经营养因子分泌,从而加速受损神经功能恢复。

BMSCs 是一种多能成体干细胞,具有易分离增殖、免疫原性低、旁分泌和免疫调节等潜力,被认为是治疗缺血性脑卒中的理想种子细胞^[7]。目前有大量动物实验针对 BMSCs 保护缺血性脑卒中的相关机制进行了深入研究,发现 BMSCs 在特定环境中可向神经细胞分化^[8],还可通过调节受损脑组织微环境而减轻炎症反应,促进血管生成、神经发生、神经血管修复等^[9-10],由此减小脑梗死面积、减轻血脑屏障被破坏程度。本研究发现,SHR 大鼠经移植 BMSCs 后,其脑梗死面积较模型组明显缩小,且神经功能缺损评分也明显下降,表明 BMSCs 移植对高血压缺血性脑卒中大鼠具有神经保护作用,与之前报道结果基本一致^[11]。同时有大量临床研究指出,BMSCs 移植对缺血性脑卒中患者也具有一定疗效。Zheng 等^[12]通过临床荟萃分析发现,干细胞治疗组患者在肢体感觉功能、运动功能及日常生活活动能力方面的改善情况均明显优于对照组,脑梗死面积也显著缩小,且治疗过程中无严重不良反应。由于目前大部分研究并未考虑伴发疾病对 BMSCs 移植治疗脑卒中患者疗效的影响,本研究重点关注了合并高血压的缺血性脑卒中对象,为将来临床应用 BMSCs 移植治疗此类疾病患者提供了实验依据。

大量研究报道,采取积极手段促进缺血性脑卒中后半暗带区新生血管形成及生长,对减小脑梗死体积、改善受损神经功能极为重要^[13-14]。新生血管的生成与多种细胞因子有关,如 VEGF、转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)等^[15]。当脑组织发生缺血后,能诱导 BMSC 向病灶内迁移,分泌并输送 VEGF,能促进血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 表达,有助于缺血脑组织中新毛血管形成及侧支循环建立,从而减少神经元凋亡及脑梗死面积,加速神经功能恢复。有学者向缺血性脑卒中大鼠脑内注射 BMSCs,经治疗 7 d 后发现脑梗死灶周围 VEGF 表达明显增加,能促进脑梗死区血管重塑^[16]。本研究通过 RT-PCR 及 Western blot 检测发现,BMSCs 组 VEGF 蛋白及 mRNA

表达均显著高于模型组水平,表明 BMSCs 能通过促进高血压大鼠脑损伤组织周围微血管生长,改善梗死灶周边血流灌注,发挥神经保护作用。GDNF 是 TGF- β 超家族中的一种蛋白,在正常成年大鼠脑内表达较低。GDNF 作为一种有效的神经营养因子,对神经元损伤后的修复、再生及营养支持等方面均具有重要作用。许多研究指出,GDNF 不仅可维持多种神经细胞生长、分化及成熟,而且对脑缺血组织也具有显著保护作用^[17]。Shen 等^[18]发现在脑梗死后第 8 天移植 BMSCs 能显著增加患者 GDNF 表达,促进侧脑室脑室下区神经母细胞增殖及迁移,还可抑制缺血半暗带区神经细胞凋亡。本研究发现,模型组大鼠 GDNF 表达可见少量一过性升高,但与空白组比较无显著差异,考虑脑梗死后大鼠脑组织会反应性上调梗死灶周围 GDNF 合成及分泌,但这种能力非常有限,尚无法达到完全自我修复的目的。经 BMSCs 移植治疗 7 d 后,SHR 大鼠脑缺血区 GDNF 蛋白及 mRNA 表达均较模型组、空白组明显增强,考虑为 BMSCs 激活了缺血半暗带区局部星形胶质细胞,后者能释放大量 GDNF,从而促进受损神经元修复、减少细胞凋亡,加速神经功能恢复。

综上所述,本研究结果表明 BMSCs 移植治疗对合并高血压的缺血性脑卒中大鼠具有治疗作用,其干预机制可能包括上调脑内 VEGF、GDNF 表达,促进新生血管形成,减少神经元凋亡,从而促进神经功能恢复,为临床治疗合并高血压的缺血性脑卒中患者提供了新的治疗方案。需要指出的是,尽管目前对 BMSCs 移植进行了大量研究,但在临床上仍未得到广泛应用,还需更多的研究支持、促其向临床转化;本实验仅观察了部分细胞因子变化,是否还有其它神经通路或细胞因子等参与,还需后续研究进行更深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480687 adults [J]. *Circulation*, 2017, 135 (8): 759-771. DOI: 10.1161/circulationaha.116.025250.
- [2] Zhang J, Li Z, Liu W, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on the recovery of neurological functions and the expression of Nogo-A, NgR, RhoA, and ROCK in rats with experimentally-induced convalescent cerebral ischemia [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (6): 390. DOI: 10.21037/atm.2020.03.144.
- [3] Vahidy FS, Rahbar MH, Zhu H, et al. Systematic review and meta-analysis of bone marrow-derived mononuclear cells in animal models of ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2016, 47 (6): 1632-1639. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.012701.
- [4] 王拥军, 王春雪, 缪中荣. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南 2014 [J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48 (4): 258-273. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2015.04.003.
- [5] Bejan AT, Saadatian EM, Wright JM, et al. Treatment of hypertension

- in patients 80 years and older; the lower the better? A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Hypertens*, 2010, 28 (7): 1366-1372. DOI: 10.1097/HJH.0b013e328339f9e5.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- [7] Chabord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21 (9): 1045-1056. DOI: 10.1089/hum.2010.115.
- [8] Nezhadi A, Ghazi F, Rassoli H, et al. BMSC and CoQ10 improve behavioural recovery and histological outcome in rat model of Parkinson's disease [J]. *Pathophysiology*, 2011, 18 (4): 317-324. DOI: 10.1016/j.pathophys.2011.05.004.
- [9] Wu X, Jiang J, Gu Z, et al. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11 (1): 345. DOI: 10.1186/s13287-020-01855-9.
- [10] Xin H, Katakowski M, Wang F, et al. MicroRNA cluster miR-17-92 cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats [J]. *Stroke*, 2017, 48 (3): 747-753. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.015204.
- [11] Liu Z, Li Y, Zhang RL, et al. Bone marrow stromal cells promote skilled motor recovery and enhance contralesional axonal connections after ischemic stroke in adult mice [J]. *Stroke*, 2011, 42 (3): 740-744. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.607226.
- [12] Zheng H, Zhang B, Chhatbar PY, et al. Mesenchymal stem cell therapy in stroke: a systematic review of literature in pre-clinical and clinical research [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27 (12): 1723-1730. DOI: 10.1177/0963689718806846.
- [13] 于秋红, 刘亚玲, 王丛, 等. 高压氧对大鼠中动脉阻塞大鼠细胞凋亡的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2019, 41 (8): 561-564. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.08.001.
- [14] Sun Y, Jin K, Lin X, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111 (12): 1843-1851. DOI: 10.1172/JCI17977.
- [15] Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15 (1): 16-19. DOI: 10.4103/1673-5374.264442.
- [16] Xin H, Wang F, Li Y, et al. Secondary release of exosomes from astrocytes contributes to the increase in neural plasticity and improvement of functional recovery after stroke in rats treated with exosomes harvested from microRNA 133b-overexpressing multipotent mesenchymal stromal cell [J]. *Cell Transplant*, 2017, 26 (2): 243. DOI: 10.3727/096368916X693031.
- [17] Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, et al. Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 2005, 29 (7): 1417. DOI: 10.1161/01.STR.29.7.1417.
- [18] Shen LH, Li Y, Chopp M. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats [J]. *Glia*, 2010, 58 (9): 1074-1081. DOI: 10.1002/glia.20988.

(修回日期: 2021-12-27)

(本文编辑: 易 浩)

• 外刊撷英 •

Effect of total number of pulses of radial extracorporeal shock wave therapy (rESWT) on hamstring muscle spasticity in children with spastic type cerebral palsy: A randomized clinical trial

Purpose To evaluate the efficacy and safety of radial extracorporeal shock wave therapy (rESWT) according to total number of pulses on hamstring muscle spasticity in children with spastic type cerebral palsy (CP).

Methods This study is a randomized controlled trial consisting of thirteen patients with spastic CP, 9 males and 4 females, aged 5 to 14 years (mean age 9.2). Twenty-five spastic hamstring muscles were divided in four groups. Group I: 500 pulses, Group II: 1,000 pulses, Group III: 1,500 pulses, and Group IV: 2,000 pulses. Australian Spasticity Assessment Scale (ASAS) was measured at four different time points (pre-ESWT, post-ESWT, 2 weeks post-ESWT, and 4 weeks post-ESWT).

Results All four groups showed improvement in ASAS relative to pre-treatment, although only significant in Group III (1,500 pulses). There were no statistically significant differences in ASAS between all four groups in pre-ESWT [$t(2) = 3.907$, $P = 0.272$], immediately post-ESWT [$t(2) = 1.250$, $P = 0.741$], 2 weeks post-ESWT vs pre-ESWT [$t(2) = 3.367$, $P = 0.338$], and 4 weeks post-ESWT vs pre-ESWT [$t(2) = 1.566$, $P = 0.667$].

Conclusion The effect of rESWT on spastic hamstring in children with spastic CP is not dependent on the number of pulses.

Keywords Cerebral palsy; ESWT; children; hamstring; pulses; spasticity.

【摘自: Wardhani RK, Wahyuni LK, Laksmiastari B, et al. Effect of total number of pulses of radial extracorporeal shock wave therapy (rESWT) on hamstring muscle spasticity in children with spastic type cerebral palsy: A randomized clinical trial. *J Pediatr Rehabil Med*, 2022, 15 (1): 159-164. DOI: 10.3233/PRM-200796.】