

经血干细胞移植联合运动训练促进大鼠脊髓损伤康复的转录组学分析

戚龙菊¹, 陈世园^{1,3}, 廖泽华^{1,3}, 石袁虎^{1,3}, 孙郁雨¹, 王庆华²

(1. 南通大学附属南通第三医院, 南通市第三人民医院, 南通 226000; 2. 南通大学实验动物中心, 南通 226001; 3. 南通大学医学院, 南通 226001)

[摘要] **目的** 通过转录组测序分析探讨经血干细胞 (menstrual blood-derived stem cells, MenSCs) 移植联合运动训练治疗脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 大鼠的潜在干预靶点和分子机制。**方法** 选用 SPF 级 2 月龄雌性 SD 大鼠, 采用第十胸椎 (T10) 处半切方式构建 SCI 模型后, 分为 SCI 后 MenSCs 移植联合运动训练组 [简称细胞与跑步机训练 (cell and treadmill training, CTMT) 组] 和 SCI 组 (作为对照), 每组 12 只大鼠。其中, CTMT 组大鼠在建模后 1 周于损伤局部显微注射 MenSCs 1×10^5 个, 随后进行为期 2 周的减重有氧运动训练。选取损伤处的脊髓组织进行转录组测序分析, 获得 SCI 组和 CTMT 组大鼠的脊髓组织中 mRNA 表达数据, 进行基因表达差异分析、GO 功能富集分析、KEGG 通路富集分析和蛋白质互作网络分析。同时, 采用 BBB 评分评估两组大鼠的运动功能康复情况, 苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色评估两组大鼠损伤局部的组织病理学改善程度, 采用实时荧光定量 PCR 法和蛋白质印迹法对差异基因表达进行验证。**结果** 转录组测序分析差异基因的表达数据显示, 与 SCI 组相比, CTMT 组有 247 个上调基因及 174 个下调基因, 其中 *Bdnf*、*Hmox1*、*Sd4*、*Mmp3* 和 *Cd163* 等基因显著上调 [$|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 0.66$, $P < 0.05$]。KEGG 通路富集分析与 GO 功能富集分析提示, 这些差异基因主要参与了生长发育、代谢反应及免疫炎症过程, 例如轴突生长、电子传递链等。其中, *Bdnf* 基因富集在 PI3K-Akt 信号通路。BBB 评分显示, MenSCs 移植联合运动训练显著提高 SCI 大鼠的运动能力。HE 染色提示治疗组大鼠的损伤局部病理变化程度显著减轻。实时荧光定量 PCR 法和蛋白质印迹法证明, CTMT 组脊髓组织中脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA 和蛋白表达水平均显著高于 SCI 组 ($P < 0.001$)。**结论** MenSCs 移植联合运动训练治疗可能通过上调 BDNF 表达促进 SCI 大鼠运动功能的恢复, 这为 SCI 的临床康复治疗提供了一个新思路。

[关键词] 脊髓损伤; 转录组测序; 经血干细胞; 运动训练; 脑源性神经生长因子; 大鼠

[中图分类号] R744; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0531-12



Transcriptomic Analysis of Menstrual Blood-Derived Stem Cells Transplantation Combined with Exercise Training in Promoting Spinal Cord Injury Recovery in Rats

QI Longju¹, CHEN Shiyuan^{1,3}, LIAO Zehua^{1,3}, SHI Yuanhu^{1,3}, SUN Yuyu¹, WANG Qinghua²

(1. Affiliated Nantong Third Hospital of Nantong University, Nantong Third People's Hospital, Nantong 226000, China; 2. Laboratory Animal Center of Nantong University, Nantong 226001, China; 3. Medical School of Nantong University, Nantong 226001, China)

Correspondence to: WANG Qinghua (ORCID: 0000-0003-3661-6408), E-mail: wangqh@ntu.edu.cn

[ABSTRACT] **Objective** To explore the potential therapeutic targets and molecular mechanisms of menstrual blood-derived stem cells (MenSCs) transplantation combined with exercise training in

[基金项目] 南通市科技计划项目“GelMA 水凝胶负载 MenSCs-Exo 调控 miR-421 / MAGED1 / PI3K-Akt 分子轴改善脊髓损伤后功能恢复的机制研究” (JC2023040)、“MenSCs 外泌体调控 miR-421/MAGED1/PPAR γ 轴改善脊髓损伤后轴突再生机制及其临床诊疗技术攻关” (MS20220212); 南通市卫生健康委员会科研课题面上项目“有氧运动调控 GDNF 减轻脊髓损伤后疼痛的机制及临床应用研究” (MS2022062)

[第一作者] 戚龙菊 (1985—), 女, 硕士, 副主任护师, 研究方向为脊髓损伤后功能康复。E-mail: qilongjunt@163.com

[通信作者] 王庆华 (1978—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为脊髓损伤后功能康复。E-mail: wangqh@ntu.edu.cn。ORCID: 0000-0003-3661-6408

promoting recovery in rats with spinal cord injury (SCI) through transcriptome sequencing analysis.

Methods Female SD rats aged two months were selected and a SCI model was established by a hemisection at the tenth thoracic vertebra (T10). The rats were then divided into two groups: the Cell and Treadmill Training (CTMT) group, which received MenSCs transplantation and treadmill training after SCI, and the SCI group (control), with 12 rats in each group. One week after modeling, the CTMT group received a microinjection of 1×10^5 MenSCs at the injury site, followed by two weeks of weight-supported aerobic exercise training. Spinal cord tissue from the injury site was selected for transcriptome sequencing, and mRNA expression data from both the SCI and CTMT groups were analyzed. Differential gene expression, GO (Gene Ontology) functional enrichment, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway enrichment, and protein-protein interaction (PPI) network analyses were performed. Motor function recovery was assessed using the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) score, while histopathological changes at the injury site were evaluated through hematoxylin-eosin (HE) staining. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blotting were used to verify the expression of differentially expressed genes.

Results Transcriptome sequencing analysis showed 247 upregulated genes and 174 downregulated genes in the CTMT group compared to the SCI group. Notably, genes such as *Bdnf*, *Hmox1*, *Sd4*, *Mmp3*, and *Cd163* were significantly upregulated [$|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 0.66$, $P < 0.05$]. KEGG pathway enrichment analysis and GO functional enrichment analysis indicated that these differentially expressed genes were mainly involved in growth and development, metabolic reactions, and immune-inflammatory processes, such as axon growth and the electron transport chain. The *Bdnf* gene was notably enriched in the PI3K-Akt signaling pathway. The BBB score showed that MenSCs transplantation combined with exercise training significantly improved the motor function of SCI rats. HE staining revealed that pathological changes at the injury site were significantly reduced in the treatment group. Furthermore, real-time quantitative PCR and Western blotting confirmed that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein expression levels in the CTMT group were significantly higher than those in the SCI group ($P < 0.001$). **Conclusion** The combined exercise training with MenSCs effectively promotes the recovery of motor function in SCI rats by upregulating BDNF expression, providing a novel strategy for SCI treatment.

[Key words] Spinal cord injury; Transcriptome sequencing; Menstrual blood-derived stem cells; Exercise training; Brain-derived neurotrophic factor; Rats

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种严重致残的疾病, 伴随诸多并发症, 包括感觉和运动功能障碍、排尿失禁、自主功能失调等, 其受损功能恢复是康复领域内的一个世界级难题^[1]。目前, 临床上主要通过外科手术治疗缓解损伤脊髓内压力, 用皮质类固醇药物治疗减轻脊髓组织的肿胀程度, 通过康复训练降低疼痛、瘙痒和溃疡等并发症^[2]。然而, 由于中枢神经系统的自我修复能力有限^[3], 传统的治疗方法并不能重建损伤后脊髓的神经传导功能。

近年来, 多种干细胞已经被报告可应用于SCI的治疗, 并取得了一定效果^[4-6]。经血干细胞 (menstrual blood-derived stem cells, MenSCs) 于2007年被首次从女性月经期间脱落的子宫内膜中分离出来。它具有来源丰富、无创采集、安全性高等特性, 且拥有极强的多向分化能力^[7]和稳定的遗传性能^[8]; 同

时, 因其自体移植伦理风险低, 定向分化为神经元的能力较强^[9], 免疫调节和神经营养因子分泌能力也强^[10], 正逐步成为中枢神经系统疾病治疗的新材料。本课题组前期研究证实, MenSCs移植能降低大鼠SCI后的胶质瘢痕面积, 抑制神经元凋亡, 促进轴突再生和功能恢复^[11]。然而, 细胞移植后, 由于缺血、缺氧和水肿的微环境, 大部分细胞可能会死亡^[12]。因此, 如何保留移植的MenSCs并使其保持活力, 进而发挥相应功能, 需要进一步探索。

近年来, 运动康复锻炼在预防和治疗各种疾病方面变得越来越重要^[13-14]。诸多临床研究表明: 运动训练有利于SCI患者的运动诱发电位和体感诱发电位改善, 促进神经肌肉运动功能的恢复^[15-16]; 这种广泛接触特定任务的重复性训练有助于促进初级运动皮层的重组^[17]; 运动训练明显改善了不完全SCI患者的神经

功能恢复和神经可塑性^[18]；与对照组相比，运动训练明显增加了腰部运动神经元中一种脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）的表达^[19]。另有研究证实，运动训练叠加重复经颅磁刺激（repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS）可显著提升不完全性SCI大鼠后肢的运动功能，通过促进BDNF和突触素 I（synapsin I, SYN1）表达，改善中枢运动控制及运动神经元的可塑性^[20]。

SCI疾病的治疗和康复是一个复杂过程，治疗靶点的缺失限制了机制研究和临床诊疗的成效。开展高通量转录组分析，可从多角度探讨MenSCs联合运动锻炼治疗SCI的分子机制，帮助挖掘潜在的治疗靶点。本研究采用第十胸椎（T10）半切法构建大鼠SCI模型，通过转录组测序筛选出MenSCs移植联合运动训练治疗SCI大鼠模型组和对照组大鼠脊髓组织中差异表达基因和信号通路，并在大鼠体内验证该治疗效果和关键基因表达情况，以期挖掘针对SCI的临床康复治疗潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养环境

SPF级2月龄雌性SD大鼠（220~250 g）购自南通大学实验动物中心[SCXK（苏）2019-0001]，饲养于屏障设施[SYXK（苏）2020-0029]。大鼠自由采食高压灭菌水和⁶⁰Co辐照灭菌的鼠饲料（购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司），使用高压灭菌的玉米芯垫料（购自苏州双狮实验动物饲料科技有限公司），环境温度20~26℃，12 h/12 h明暗周期循环，相对湿度为40%~70%。此动物实验设计方案获得了南通大学实验动物中心实验动物伦理福利审查委员会的审核批准（批号S20201230-332），充分遵照动物的“5大自由”和“3R”原则，以保障实验动物和科研人员福利，维护动物实验伦理准则。

1.2 细胞制备及鉴定

MenSCs的获取、培养及鉴定根据本课题组既定实验方案进行，并获得南通市妇幼保健院伦理委员会批准（No.2016-023）。简要步骤：征集健康成年育龄女性志愿者，在经期第2天，无菌操作条件下，将月经血采集杯置入阴道深处，采集月经血；在实验室中进行MenSCs的分离、培养、扩增及传代等过程；同时对MenSCs进行鉴定，主要通过流式细胞仪检测细胞表面标志物如CD146-APC、CD73-PerCP、CD105-PE和CD73-FITC以鉴定MenSCs的特性，并通过成脂诱导分

化、成骨诱导分化、成软骨诱导分化实验鉴定MenSCs的多向分化潜能^[11,21]。本实验中使用的细胞主要处于第6~7代。

1.3 大鼠模型制备

所购SD大鼠在性别确认和健康观察后适应性饲养1周，采用3%的异氟烷和氧气混合气体诱导麻醉大鼠，术中维持异氟烷体积分数为2%。大鼠经补液和护眼后行备皮操作，于第十胸椎处作2 cm切口，分离黏膜和肌肉，剔除椎板和两侧椎弓根，以暴露脊髓，用11号手术刀片于垂直中央血管处切断右侧一半脊髓组织。大鼠在缝合后置于37℃热台直至苏醒，经补液（皮下注射2 mL温热生理盐水）、镇痛（皮下注射缓释型buprenex, 0.05 mg/kg）和抗炎（肌肉注射青霉素，200 000 U/d）处理后返回笼盒中。每日定时人工按摩大鼠的膀胱区辅助排尿。同时，剔除术后第一天损伤侧完全自主运动、自主排尿以及术后1周出现严重尿血、尿路感染、严重腹胀、过度虚弱等不符合SCI模型标准的大鼠。符合SCI模型标准的大鼠随机分为脊髓损伤组（SCI组）和SCI建模后MenSCs移植联合运动训练[简称细胞与跑步机训练（cell and treadmill training, CTMT）]组，每组12只。

一次手术后1周，再次麻醉大鼠，并暴露脊髓，于损伤正中处向头侧和尾侧各旁开2 mm，CTMT组采用微量进样器注射 1×10^5 个MenSCs（约5 μ L）^[22]，SCI组注射5 μ L PBS，术后护理过程同上。二次手术次日开始，采用ZH-PT大鼠实验跑台（购自安徽正华生物仪器设备有限公司），CTMT组大鼠开始减重运动训练。运动训练策略：每次训练前排空大鼠膀胱，然后用夹子（中间隔层纱布）夹住大鼠尾巴，使其下半身悬吊起来，前肢接触跑台；跑台速度设定为6 m/min，大鼠每次运动20 min，2次/d，5 d/周，总共2周；训练周期内，可根据大鼠的后肢运动能力恢复情况，逐渐降低悬吊高度，调整后肢承受体重的范围在20%~40%。每天2次的运动在早晚固定时间点进行，并保持动物笼盒位置固定，以减少混杂因素。

1.4 大鼠运动功能评估

采用评价SCI模型大鼠运动能力的BBB评分体系（Basso, Beattie, and Bresnahan locomotor rating scale），分别于造模前（即造模当天）及首次造模后1、3、5、7、10、14、21 d评估SCI组及CTMT组大鼠（每组随机抽取7只大鼠）右后肢的运动能力恢复情况。实验人员需事先进行统一培训，然后在双盲情况下依据BBB评分表对各组大鼠的运动能力进行评分。

1.5 大鼠组织取材

二次手术后2周,将大鼠置于安乐死箱内引入二氧化碳处死,通过捏压脚趾反射等方法确认其生命迹象彻底消失。在确定大鼠无呼吸、无心跳后,沿着大鼠背部造模处的创口,打开背部皮肤及肌肉,暴露脊柱。再沿已摘除椎板的创口处,拆除剩余椎板,暴露完整脊髓。从尾部剪断脊髓,剪断脊髓与周围神经的连接。取出脊髓,去掉脊髓外膜,洗涤干净,取损伤处(T10)上下共5 mm长度的脊髓组织。每组12只大鼠,随机取每组3只大鼠的脊髓组织样本,置于组织RNA保存液即RNA Keeper Tissue Stabilizer(R501,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司)中,冻存于 -80°C ,以便后续测序分析;再随机取每组3只大鼠的脊髓组织样本,保存于4%甲醛固定液中,用于后续冰冻切片和苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色;再随机取每组5只大鼠的脊髓组织样本,冻存于 -80°C ,用于后续的实时荧光定量PCR和蛋白质免疫印迹法检测;每组各剩余1只大鼠,取材后备用。

1.6 转录组测序及生物信息学分析

将各组大鼠手术损伤处脊髓组织(总长5 mm,每组3份样本,来源于3只大鼠)从保存液中取出,液氮冷冻后用TRIzol试剂(购自美国Invitrogen公司)提取RNA。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离长度为18~30 nt的RNA,随后用Illumina测序平台(来自广州基迪奥生物科技有限公司)进行测序分析,结果用统计分析软件R(4.1.0)中的edgeR(3.36.0)软件包(<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>)来鉴定两组间差异表达基因。进一步利用分析软件R中的limma包(3.50.3)、heatmap包(1.0.12)、ggplot2包(3.5.0)和clusterProfiler包(4.10.0)开展差异表达基因的生物信息学相关分析,按照“高通量的测序→数据的质控→参考基因组的比对→基因表达水平的分析→聚类分析→GO/KEGG富集分析→蛋白互作网络分析”的技术路线进行。

1.6.1 样品之间的相关性检验与主成分分析

实验与样品的选择是否可靠,可以通过分析样品之间的基因表达水平来实现。样品之间表达模式的相似程度通常用相关系数表示。而样品之间基因表达量的主成分分析,可以评估样本的重复性、处理因素间的整体差异、样本分组情况和实验设计的科学性。

1.6.2 基因差异表达分析

差异基因的分布情况用火山图直观呈现。将阈值

设定为 $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 0.66$ 并且 $P < 0.05$,筛选两组中的差异基因。依据差异基因的 $\log_2(\text{FoldChange})$ 大小,呈现上调和下调最显著的各15个基因,将功能相同或相近的基因行分层聚类法(hierarchical clustering)分析,以热图形式呈现结果。

1.6.3 差异表达基因的功能分析

采用基因本体(Gene Ontology, GO; <http://www.geneontology.org>)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG; <http://www.kegg.jp>)这两个数据库,分别对差异表达基因(上调和下调的基因)进行分子功能、细胞组分、生物学过程与KEGG通路的富集分析,以气泡图形式呈现结果。

1.6.4 蛋白互作网络分析

依据 $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 0.66$ 且 $P < 0.05$ 的筛选标准,共获得421个显著差异基因。从STRING蛋白质互作数据库(<http://string-db.org>)内提取出目标基因集的互作关系,构建网络,进行蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析。用Cytoscape软件呈现差异基因表达的蛋白互作网络示意图,然后用Cytoscape软件的cytoHubba插件来判定核心节点基因。

1.7 组织冰冻切片和HE染色

对多聚甲醛溶液灌注固定后各组大鼠的脊髓组织(每组3份样本,分别来源于3只大鼠)进行修剪,经10%、20%、30%蔗糖溶液脱水,平放于包埋盒(购自北京索莱宝生物科技有限公司)内。将装有组织的包埋盒进行最佳切割温度化合物(optimal cutting temperature compound)包埋。等待30 min后,安装样品托,组织修块后,使用冷冻低温切片机(德国Leica公司产品)进行连续性切片,对脊髓进行冠状面切片(厚10 μm)。切片置于 -20°C 冰箱保存,用于HE染色(试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司):苏木精染色5 min,双蒸水(ddH_2O)洗2次,1% HCl分化25 s, ddH_2O 洗2次后伊红染色1.5 min。梯度脱水封固后使用Olympus DP71软件采集图像,用于后续的数据分析。

1.8 实时荧光定量PCR和蛋白质印迹法检测

取各组大鼠损伤处脊髓组织(每组5份样本,来源于5只大鼠),用TRIzol提取总RNA,用通用型逆转录试剂盒HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit R211-01(购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司)获得cDNA,用通用型高灵敏度染料法定量PCR检测

试剂盒 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix Q711-02 (购自南京诺维赞生物科技股份有限公司) 以及 StepOne™ 实时荧光定量 PCR 系统 (购自美国 Applied Biosystems 公司) 进行目标基因的 PCR 检测。引物序列如下: *Bdnf* 基因的正向引物为 5'-TGATGCTCAGC-AGTCAA-3', 反向引物为 5'-CACTCGCTAATACT-GTCAC-3'; 内参基因 *GAPDH* 的正向引物为 5'-CCT-CCTGCACCACCAACTGCTT-3', 反向引物为 5'-GAG-GGGCCATCCACAGTCTTCT-3'。PCR 反应过程: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 40 个循环。*Bdnf* 基因的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算, 每份样本设置 3 个复孔。

取各组大鼠损伤处脊髓组织 (每组 5 份样本, 来源于 5 只大鼠), 组织研磨后加入 RIPA 裂解液, 匀浆, 离心后吸取上清液, 测定蛋白质浓度后沸水中变性。使用 BDNF 抗体 (以 GAPDH 抗体作内参, 均购自英国 Abcam 公司, 工作液稀释比例为 1:1 000) 检测 BDNF 蛋白表达。采用 ECL 法显影胶片, 试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司。最后利用 Image J 软件进行目的条带的灰度值分析。

1.9 数据处理及统计方法

用 SPSS 23.0 软件及 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据的统计和分析。首先对各实验结果数据进行 K-S 单样本检验, 确认数据是否符合正态分布; 正态数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 通过两独立样本 *t* 检验进行两组间比较; 偏态分布的计量资料用中位数 (四分位间距) [M (P25, P75)] 表示, 通过 Mann-Whitney U 秩和检验进行两组间比较。计数资料用频数和构成比进行描述, 通过非参数 χ^2 检验进行两组间比较。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠的脊髓组织转录组测序数据可靠

Illumina 测序后相关性检验结果显示, 各样本之间表达量分布均一性高, 中位数、四分位数范围和极值均较为接近, 表明测序数据质量较好 (图 1A)。在主成分分析结果 (图 1B) 中, 一个样本用一个点表示, 共 6 个样本; 横坐标是 PC1 (0.409), 为第一主成分; 纵坐标是 PC2 (0.317), 为第二主成分。主成分分析结果显示, 同一组内的样本聚集在一起, 表明本实验操作具有良好的可重复性; 而不同组间的样本则呈现较大的空间距离, 说明主要样本间的差异来自组间差异。

2.2 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因情况

与 SCI 组 (对照组) 相比, CTMT 组大鼠脊髓组织中有 174 个基因表达下调, 有 247 个基因表达上调 ($|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 0.66$, $P<0.05$)。表 1 中列出了在差异表达基因中下调或上调最显著的 15 个 mRNA, 其中显著上调的基因主要有 *Rabepk*、*Pkig*、*Cthrc1* 和 *Bdnf* 等。依据样本的每千个碱基的转录每百万映射读取的片段 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, fpkm), 使用 R 包中 pheatmap 工具、ggplot 工具, 绘制差异基因火山图 (图 2A) 及聚类热图 (图 2B), 以此呈现 SCI 组和 CTMT 组大鼠脊髓组织中的 mRNA 表达差异情况。

2.3 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因相关通路

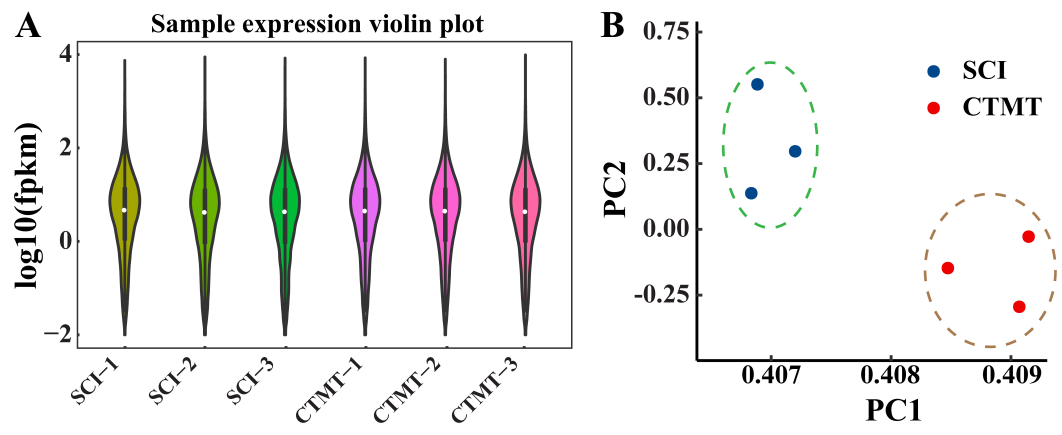
图 3A~C 是两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的 GO 功能富集分析气泡图。图 3D 是差异表达基因的 KEGG 通路富集气泡图。GO 富集分析中, 3 个本体 (ontology) 分别表示 “分子功能 (molecular function, MF)” “细胞组分 (cellular component, CC)” “生物学过程 (biological processes, BP)”。进一步的功能富集分析显示, 差异基因同分子功能的相同蛋白结合呈显著相关性, 与细胞组分的细胞质和细胞外间隙显著相关, 与生物学过程的免疫反应和神经发育显著相关。最后, KEGG 通路富集分析结果表明, 差异基因主要集中在代谢通路 (metabolic pathway)、癌症相关通路 (pathways in cancer) 和细胞内信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway) 等; 其中, *Bdnf* 基因可调控细胞内信号转导通路 (表 2)。

2.4 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的互作关系

针对 421 个差异表达基因, 从 STRING 数据库内提取出目的基因集的互作关系, 构建 PPI 网络图 (图 4)。相比于 SCI 组, CTMT 组大鼠脊髓组织中 *Bdnf*、*Hmox1*、*Sd4*、*Mmp3*、*Cd163*、*Cat* 和 *Traf3* 等基因表达显著上调, 且有较多的节点连接数量。其中, *Bdnf* 在差异基因互作结果中形成了较大的节点, 提示该基因在相关病理生理过程中发挥着重要的调控作用。

2.5 MenSCs 移植联合运动训练能够改善 SCI 大鼠的运动功能

采用 HE 染色法检测 SCI 大鼠脊髓损伤局部的组织病理学改变程度, 结果见图 5。SCI 组损伤局部脊髓组织较疏松, 形成大片空洞, 伴有大量炎症细胞浸润, 组织明显充血、水肿, 甚至有部分区域伴有微血管的



注：A为样本表达量分布情况（FPKM，每千个碱基的转录每百万映射读取的片段），可见SCI组（即单纯脊髓损伤手术组，作为对照， $n=3$ ）和CTMT组（即SCI手术后经血干细胞移植联合运动训练组， $n=3$ ）各样本的中位数、四分位数范围和极值均较为接近，表明测序结果在组内均一性较好，测序数据质量可靠。B为主成分分析（PC1，第一主成分；PC2，第二主成分），可见同组样品聚类在比较接近的空间内，而样本间差异主要来源于组间差异。

Note: A showed the distribution of sample expression levels (FPKM, fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments); in the figure, the median, interquartile range and extreme values of the samples in SCI (spinal cord injury, as the control, $n=3$) group and the CTMT (the transplantation of menstrual blood-derived stem cells combined with treadmill training after SCI surgery, $n=3$) group were relatively close, which indicated that the sequencing results were more homogeneous within the group and the sequencing data quality was high. B showed the principal components analysis (PC1, principal component 1; PC2, principal component 2), and the samples from the same group were clustered together with close proximity, and the differences between samples mainly arose from intergroup differences.

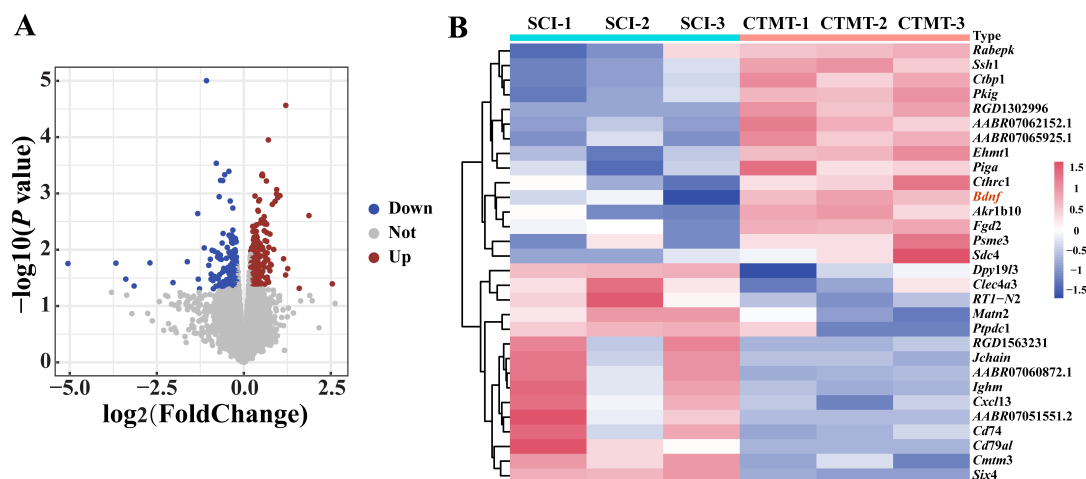
图1 两组大鼠的脊髓组织样本间基因表达量分布情况和主成分分析

Figure 1 Distribution of gene expression and principal component analysis of spinal cord tissue samples in the two groups of rats

表1 经血干细胞移植联合运动训练治疗脊髓损伤大鼠的脊髓组织中显著上调和下调基因

Table 1 Significantly up-regulated and down-regulated genes in spinal cord tissues of spinal cord injury rats after transplantation of menstrual blood-derived stem cells combined with exercise training

表达上调基因 Up-regulated gene	log2(差异倍数) log2 (FoldChange)	t值 t value	P值 P value	表达下调基因 Down-regulated gene	log2(差异倍数) log2 (FoldChange)	t值 t value	P值 P value
<i>Psme3</i>	2.542 363 895	2.672 366 157	0.040 381 267	<i>Ptpdc1</i>	-0.941 169 616	-2.823 151 331	0.033 418 310
<i>Fgd2</i>	1.870 409 798	5.277 683 881	0.002 476 179	<i>RT1-N2</i>	-0.961 937 408	-3.508 946 559	0.014 746 432
<i>Sdc4</i>	1.591 559 898	2.530 079 050	0.048 412 378	<i>Cd79a1</i>	-1.007 349 648	-3.292 831 274	0.018 934 378
<i>Cthrc1</i>	1.259 963 833	3.177 793 692	0.021 693 595	<i>Six4</i>	-1.071 889 332	-15.482 205 520	0.000 009 930
<i>RGD1302996</i>	1.205 943 515	12.811 980 370	0.000 027 300	<i>Matn2</i>	-1.137 472 728	-3.927 529 073	0.009 277 287
<i>Rabepk</i>	1.201 118 420	2.962 815 910	0.028 125 989	<i>Clec4a3</i>	-1.273 541 156	-2.512 270 495	0.049 532 946
<i>Bdnf</i>	1.141 863 432	3.525 110 815	0.001 447 754	<i>AABR07051551.2</i>	-1.308 692 094	-2.825 531 707	0.033 319 465
<i>Pkig</i>	1.036 827 364	6.255 767 217	0.001 095 780	<i>Cmtm3</i>	-1.324 596 882	-5.371 453 966	0.002 279 345
<i>AABR07065925.1</i>	0.970 924 295	6.151 591 228	0.001 189 396	<i>Dpy19B</i>	-1.623 739 520	-3.419 084 313	0.016 347 174
<i>Ehmt1</i>	0.944 670 184	6.578 534 619	0.000 855 702	<i>Cd74</i>	-2.034 312 055	-2.712 776 259	0.038 372 308
<i>AABR07062152.1</i>	0.939 321 669	6.344 499 009	0.001 022 741	<i>Cxcl13</i>	-2.697 259 120	-3.378 916 162	0.017 124 825
<i>Ctbp1</i>	0.898 198 041	5.961 511 123	0.001 385 227	<i>RGD1563231</i>	-3.151 695 504	-2.603 665 774	0.044 063 014
<i>Akr1b10</i>	0.859 136 478	3.868 507 287	0.009 887 528	<i>Jchain</i>	-3.390 915 739	-2.827 200 269	0.033 250 368
<i>Ssh1</i>	0.818 982 469	5.813 203 431	0.001 564 263	<i>Ighm</i>	-3.673 986 054	-3.369 414 954	0.017 314 754
<i>Piga</i>	0.785 438 853	3.303 450 635	0.018 700 031	<i>AABR07060872.1</i>	-5.052 108 514	-3.355 872 330	0.017 589 546



注：A，火山图中，横坐标为基因表达变化倍数，纵坐标表示差异基因表达量的统计显著性，上调和下调的基因分别用红色和蓝色实心圆点表示，灰色圆点表示表达无差异的基因。B，聚类热图中，横坐标为样品名称，纵坐标为基因名称，粉色表示高表达基因，蓝色表示低表达基因。SCI为对照组（即单纯脊髓损伤手术组，作为对照， $n=3$ ），CTMT为联合治疗组（即SCI手术后经干细胞移植联合运动训练组， $n=3$ ）。Note: A, in volcano plot, horizontal axis indicated the fold change in the gene expression, the vertical axis indicated the statistical significance of differential gene expression profile, the red and blue dots indicated the upregulated and downregulated genes, respectively, and the gray dots indicated the non-DEGs; B, in clustered heatmap, the horizontal axis indicated the sample names, the vertical axis indicated gene names, the pink indicated highly expressed genes, and the blue indicated low expressed genes. SCI was the control group (spinal cord injury, as the control, $n=3$), and CTMT was the cell and treadmill training group (the transplantation of menstrual blood-derived stem cells combined with treadmill training after SCI surgery, $n=3$).

图2 两组大鼠的脊髓组织间差异表达基因火山图和聚类热图

Figure 2 Volcano plot and clustered heatmap of differentially expressed genes in spinal cord tissues between the two groups of rats

破裂出血变化，纤维束排列层次不够清晰；CTMT组局部脊髓组织排列整齐且紧密，但仍存在轻微空洞，没有炎性细胞浸润和组织充血水肿，纤维束的排列层次比较清晰（图5A）。对比结果表明，MenSCs移植联合运动训练干预后显著改善了SCI大鼠的脊髓损伤程度。进一步用Image J软件分析表明，与SCI组相比，联合治疗显著降低了脊髓损伤区域面积（图5B， $P < 0.001$ ）。

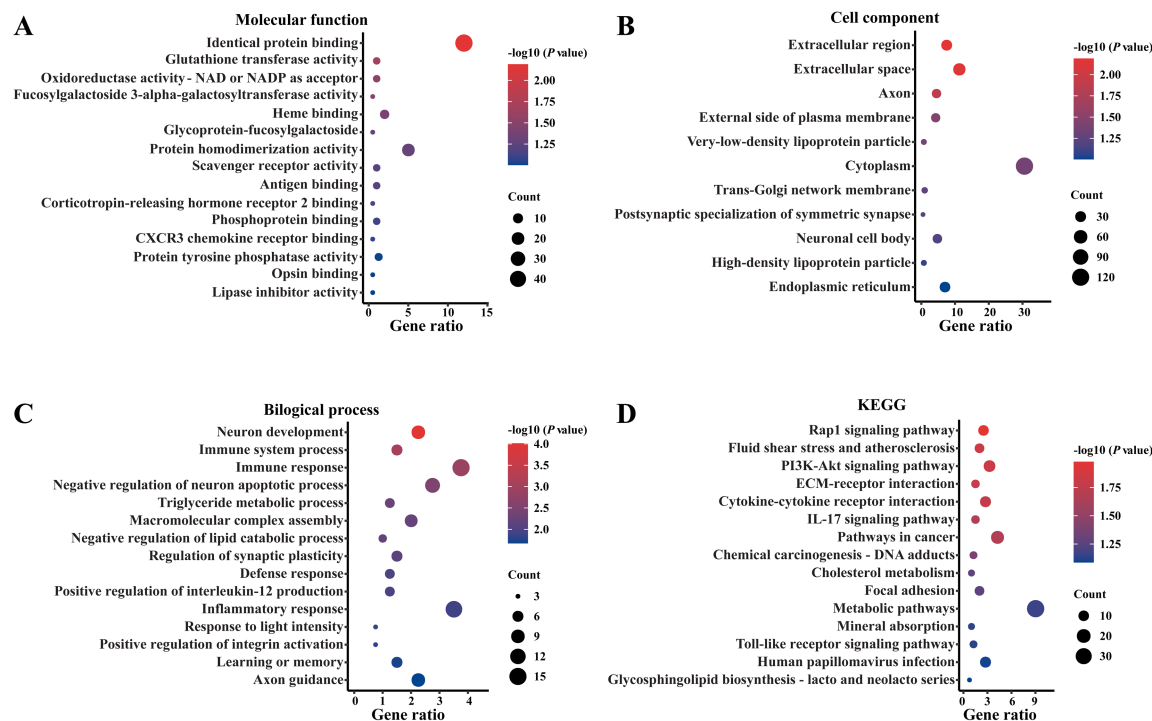
术后14 d开始，BBB评分表明，联合治疗组大鼠的后肢运动功能显著高于SCI组大鼠（图5C， $P < 0.05$ ， $P < 0.001$ ）。实时荧光定量PCR法检测损伤局部脊髓组织中*Bdnf*基因表达情况，结果表明联合治疗组的*Bdnf* mRNA表达量显著高于SCI组（图5D， $P < 0.001$ ）。蛋白质印迹法分析表明，联合治疗组大鼠脊髓组织中BDNF蛋白含量显著高于SCI组（图5E， $P < 0.001$ ）。

综上所述，MenSCs移植联合运动训练治疗能有效改善SCI大鼠损伤局部脊髓组织的病变结构，促进后肢运动功能恢复，上调BDNF表达。

3 讨论

SCI后会触发包括急性期和慢性期在内的完整病理过程，并且会导致一系列与疾病相关联的破坏性事件的发生，如炎症反应、氧化应激、缺血、凋亡，以及感觉、运动功能障碍等^[23]。近年来，随着再生医学的发展，干细胞已经成为SCI治疗的热点材料。移植的干细胞可以分泌多种营养因子，进而促进血管再生、细胞分化、抵抗炎症和凋亡等。然而，干细胞移植后的细胞易流失、定植率低、定向分化能力差，而且其作用的分子机制尚不明确，这些均对其未来的临床推广应用提出了新的挑战。

运动康复锻炼是目前在SCI恢复期被广泛应用的手段之一，能够有效减缓损伤平面的扩展，改善损伤局部微环境，降低诸如疼痛、痉挛等并发症，促进运动功能恢复。迄今为止，尽管许多措施在治疗SCI方面显示出了良好的应用前景，但是单一策略并不能完全恢复SCI患者的神经功能。组合疗法已被证明能更有效地促进神经回路重建和功能恢复。



注：A ~ C 分别为 GO 富集分析中的 3 个本体，即分子功能（A）、细胞组分（B）与生物过程（C）；D 为 KEGG 通路富集分析。富集系数列在 X 轴，富集条目列在 Y 轴，气泡大小表示富集在各条目上的基因数量，面积愈大表示富集基因数量愈多，而颜色呈现的是反映差异显著性的 P 值大小，红色愈深代表其差异性愈显著。

Note: A-C indicated the 3 analysis ontologies for Gene Ontology (GO) enrichment analysis, including molecular function (A), cellular components (B) and biological processes (C), respectively. D represented the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. The X-axis represented the fold enrichment, the Y-axis represented the enrichment items, and the bubble size indicated the number of genes enriched on each item. The larger the bubble, the greater the number of enriched genes. The color corresponded to P-value. The darker the red color, the more significant the difference.

图3 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析
Figure 3 GO enrichment and KEGG pathway enrichment analyses of differentially expressed genes in spinal cord tissues of the two groups of rats

本研究主要通过转录组测序分析探讨了 MenSCs 联合运动训练这一组合疗法治疗 SCI 大鼠的潜在干预靶点和分子机制。全基因组层面的综合分析能够为从分子生物学角度深入探讨 SCI 的病理进程提供新的视角^[24]。本研究采用转录组测序方法，首次探讨了 SCI 大鼠和运动训练联合 MenSCs 治疗大鼠后的脊髓组织中基因表达谱差异。通过转录组测序发现，联合治疗组中共有 247 个基因表达上调，174 个基因表达下调。为了探索差异基因的潜在功能，采用 GO 和 KEGG 富集分析来预测两组间差异基因的生物学功能，包括生物学过程、分子功能、细胞成分和信号通路等情况。本研究中 GO 富集分析结果显示：分子功能以代谢和免疫功能为主，如 NAD 或 NADP 活性、抗原结合、趋化因子受体结合，这与 Wu 等^[11] 和 Li 等^[25] 的研究结果相吻

合；同时显示，联合治疗调节了免疫过程，与唐丹等^[26] 报告的跑台运动训练可调节 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路，抑制 SCI 后大鼠肺组织炎症反应并改善其肺损伤的研究结果相吻合。细胞成分中，胞外区域、神经轴突和神经元胞体占了主要地位。生物学过程显示神经调控及免疫调节为主，如神经元发育、凋亡、突触可塑性及轴突引导。KEGG 富集分析结果则提示，差异基因多与神经系统、免疫系统活动有关。GO 和 KEGG 分析结果均提示差异基因主要通过调控 PI3K-Akt、Rap1 和 IL-17 等信号通路，促进脊髓损伤后的修复。

本研究进一步通过 PPI 网络分析，在上调基因集中筛选出节点基因，包括 *Bdnf*、*Hmox1*、*Sd4*、*Mmp3*、*Cd163*、*Cat* 和 *Traf3* 等。其中，*Bdnf* 基因形成最大的节

表2 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的KEGG信号通路富集分析结果

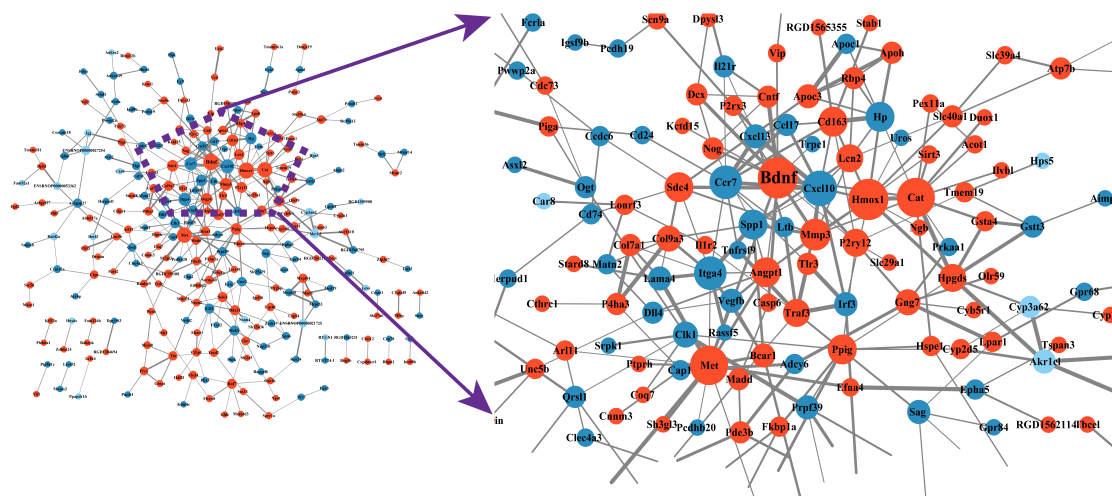
Table 2 Results of KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in spinal cord tissues of the two groups of rats

信号通路名 Term of signal pathway	计数 Count	富集系数 Gene ratio	P值 P value	基因名 Genes
Rap1 signaling pathway	10	2.506 265 664	0.010 546 665	<i>Angpt1, Rassf5, Vegfb, Lpar1, Rapgef6, Efna4, Met, Bcar1, Rap1gap, Adcy6</i>
Fluid shear stress and atherosclerosis	8	2.005 012 531	0.014 625 259	<i>Prkaa1, Mef2c, Sdc4, Gsta4, Il1r2, Gstt3, Hmox1</i>
PI3K-Akt signaling pathway	13	3.258 145 363	0.014 714 234	<i>Prkaa1, Itga4, Angpt1, Bdnf, Lama4, Lpar1, Vegfb, Ppp2r3b, Efna4, Gng7, Spp1, Col9a3, Met</i>
ECM-receptor interaction	6	1.503 759 398	0.016 252 600	<i>Sdc4, Itga4, Rgd1565355, Lama4, Spp1, Col9a3</i>
Cytokine-cytokine receptor interaction	11	2.756 892 231	0.016 582 561	<i>Cxcl10, Cntf, Il25, Tnfsf15, Tnfrsf9, Il1r2, Il21r, Ccr7, Ltb, Cxcl13, Ccl17</i>
IL-17 signaling pathway	6	1.503 759 398	0.020 227 194	<i>Cxcl10, Il25, Traf3, Mmp3, Lcn2, Ccl17</i>
Pathways in cancer	17	4.260 651 629	0.020 758 687	<i>Ctbp1, Lama4, Lpar1, Vegfb, Gstt3, Adcy6, Dlla, Gsta4, Peg12, Traf3, Gng7, Rassf5, Ccdc6, Hmox1, E2f3, Met</i>
Chemical carcinogenesis-DNA adducts	5	1.253 132 832	0.040 451 734	<i>Cyp3a9, Hpgds, Gsta4, Gstt3</i>
Cholesterol metabolism	4	1.002 506 266	0.053 168 933	<i>Rgd1565355, Apoh, Apoc1, Apoc3</i>
Focal adhesion	8	2.005 012 531	0.054 767 437	<i>Itga4, Lama4, Vegfb, Spp1, Col9a3, Pip5k1c, Met, Bcar1</i>
Metabolic pathway	36	9.022 556 391	0.068 256 357	<i>Mtmt2, Glc, Mtmr14, Pde3b, Gstt3, Hexd, Ehmt1, Adcy6, Abo, Selenbp1, Cyp3a9, Hpgds, Neu4, Spp1, Hmox1, St3gal6, Ca8, Pip5k1c, Csgalnact1, Car1, Uros, Qrsf1, Coq7, Sirt3, Nt5c3b, Akrlb10, Cyp2u1, Gsta4, Akrlc15, P4ha3, Piga, Cat, Acot1, Idnk</i>
Mineral absorption	4	1.002 506 266	0.072 932 376	<i>Atp7b, Slc40a1, Hmox1, Slc39a4</i>
Toll-like receptor signaling pathway	5	1.253 132 832	0.074 076 217	<i>Cxcl10, Irf3, Traf3, Spp1, Tlr3</i>
Human papillomavirus infection	11	2.756 892 231	0.079 092 324	<i>Irf3, Itga4, Traf3, Rt1-N2, Lama4, Spp1, Col9a3, Ppp2r3b, Rt1-T24-1, Tlr3, Llgf1</i>
Glycosphingolipid biosynthesis	3	0.751 879 699	0.081 761 102	<i>St3gal6, Abo</i>

点，提示其在脊髓损伤修复过程中发挥重要作用。BDNF（即*Bdnf*基因表达的蛋白）是一种典型的神经营养因子，广泛参与神经元分化及发育，可以通过激活特定的受体（如TrkB、TrkC等），促进损伤脊髓的修复^[27-29]。本课题组的前期研究结果表明，运动训练能够促进BDNF和TrkB在损伤远端脊髓组织中的表达，并且促进了SCI大鼠后肢运动功能的康复^[11]；同时，前期研究结果显示，MenSCs治疗可以促进BDNF表达。另有研究证实，BDNF能够在损伤局部发挥保护神经元、促进轴突再生，以及调节中枢神经突触可塑性的作用^[30-31]。因此，本课题组推测MenSCs治疗联合运动训练可通过调节BDNF表达，促进SCI大鼠的康复。

干细胞及运动训练均已被证明能够有效改善SCI

后损伤局部的免疫微环境，抑制神经元凋亡，促进轴突再生，进而增强运动功能的恢复^[4-6,11]。然而，MenSCs移植和运动锻炼组合疗法在治疗SCI中的疗效及机制尚未见报道。本课题组以往工作发现，MenSCs移植能促进SCI大鼠的轴突再生，但SCI后的病理微环境导致移植后干细胞活力被抑制^[11]。有研究报告提示，运动训练能够显著提高损伤局部神经干细胞的活化及向神经元的定向分化^[32]。另有临床研究显示，运动训练联合脂肪来源的间充质干细胞移植能够显著促进血管生成，改善严重SCI患者的运动功能^[33]。亦有研究表明，运动训练可以提高移植干细胞的定植、存活及分化^[34]。因此，笔者推测在SCI中，运动锻炼亦可对MenSCs的存活发挥相似的作用。

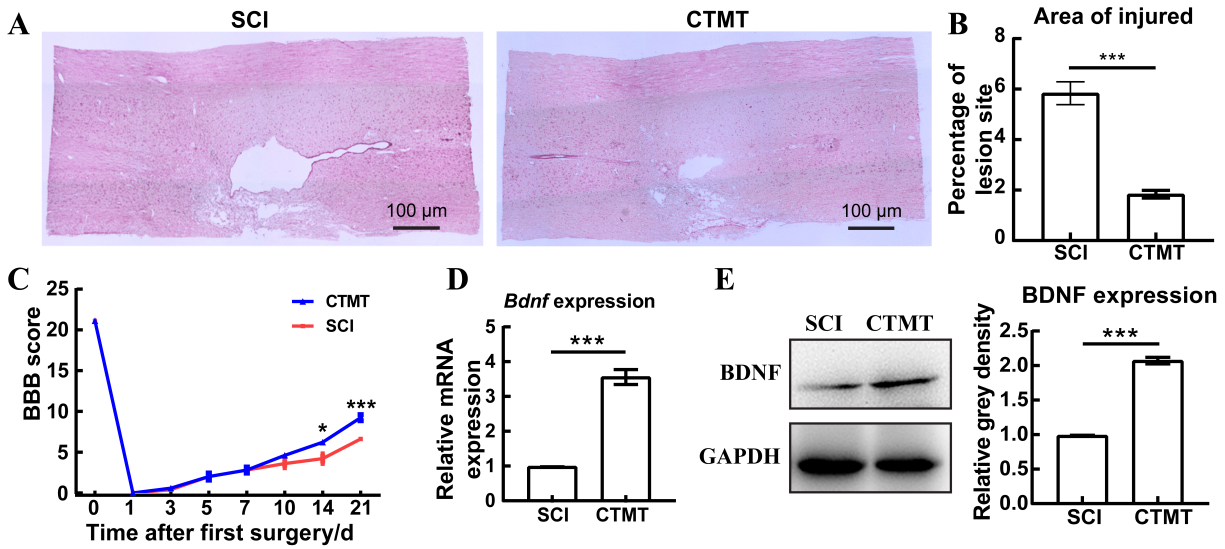


注：圆点及其大小分别代表节点（node）和度（degree），与此节点连接的基因数目越多，节点越大；点内填充红色代表该节点的基因表达量上调，蓝色代表该节点的基因表达量下调。

Note: The size of the dots represented the node and degree, the node with more connections had a larger size; the red color in the dots represented the up-regulation of gene expression in this node, and the blue color represented the down-regulation of gene expression.

图4 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的蛋白互作网络图

Figure 4 Protein-protein interaction network of differentially expressed genes in spinal cord tissues of the two groups of rats



注：A为苏木精-伊红染色观察SCI组（即单纯脊髓损伤手术组，作为对照， $n=3$ ）和CTMT组（即SCI手术后经血干细胞移植联合运动训练组， $n=3$ ）大鼠的脊髓损伤局部结构病理变化情况（放大40倍）。B，A图中损伤区域面积的统计结果（*** $P<0.001$ ， $n=3$ ）。C，2组大鼠的BBB运动评分比较，分数越高说明运动功能恢复越好。D，实时荧光定量PCR检测两组大鼠损伤脊髓组织中*Bdnf*的转录水平差异（*** $P<0.001$ ， $n=5$ ）。E，蛋白质印迹法检测两组大鼠损伤脊髓组织中BDNF蛋白水平差异（*** $P<0.001$ ， $n=5$ ）。

Note: A showed the local structural pathological changes of the spinal cord injury in the SCI group (spinal cord injury, as the control, $n=3$) and the CTMT group (the transplantation of menstrual blood-derived stem cells combined with treadmill training after SCI surgery, $n=3$), observed by hematoxylin-eosin staining (magnified 40 times). B, statistical results of the lesion area in Figure A (*** $P<0.001$, $n=3$). C, BBB motor score, a higher score indicated a better recovery of motor function. D, Real-time fluorescence quantitative PCR was performed to detect the changes in the transcriptional level of *Bdnf* gene in the injured spinal cord in rats of SCI and CTMT groups (*** $P<0.001$, $n=5$). E, Western blotting analysis was performed to detect the changes in the protein level of BDNF in SCI and CTMT groups (*** $P<0.001$, $n=5$).

图5 经血干细胞移植联合运动训练治疗可促进脊髓损伤大鼠的运动功能恢复及BDNF表达

Figure 5 Menstrual blood-derived stem cells transplantation combined with treadmill training promotes motor function recovery and BDNF expression in spinal cord injury rats

本研究实验进一步证明,运动训练联合MenSCs治疗的方式可以有效促进BDNF的表达或分泌。分析原因可能是运动锻炼促进了移植MenSCs的定植、存活及分化,同时改善了SCI大鼠损伤局部的组织结构,促进了其后肢运动功能的恢复。这与Sun等^[35]研究的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)和运动训练可通过激活PI3K/AKT/mTOR通路恢复SCI后运动功能的结果相吻合。本研究揭示了运动训练联合MenSCs移植在SCI大鼠康复过程中的作用,并初步探讨了BDNF在此过程中发挥的重要作用。本研究结果提示BDNF有望成为治疗SCI患者的潜在靶点,为以后干细胞联合运动康复锻炼在SCI患者中的应用提供了临床前实验基础和理论依据。

当然,此研究亦存在不足,比如,在动物实验时应同时设立更严谨的实验对照,如空白对照组和单因素处理组(包括运动训练组和MenSCs移植治疗组)。本研究仅将MenSCs移植联合运动康复作为一个整体组合治疗方法,与模型对照组进行比较,针对性探讨这种复合疗法对SCI大鼠的作用。在后续研究中,本课题组将纳入更多的处理因素,并在不同维度上观察运动康复和MenSCs治疗对SCI动物脊髓损伤的修复作用。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

所有动物实验方案通过南通大学实验动物中心实验动物福利伦理审查委员会审查批准(No. S20201230-332),实验过程均遵循中国实验动物相关法律、法规和条例的要求进行。

All animal experiments involved in this study were approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Nantong University (No. S20201230-332). All experimental procedures were conducted in compliance with the requirements of Chinese laws and regulations related to laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

戚龙菊负责获得项目资助,以及实验设计、数据处理、初稿写作和文稿修改;

陈世园负责测序数据的生物信息学分析;

廖泽华、石袁虎负责动物模型构建及分子生物学实验;

孙郁雨参与初稿写作;

王庆华负责获得项目资助,课题设计和参与文稿修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] COURTINE G, SOFRONIEW M V. Spinal cord repair: advances in biology and technology[J]. *Nat Med*, 2019, 25(6): 898-908. DOI: 10.1038/s41591-019-0475-6.
- [2] O'SHEA T M, BURDA J E, SOFRONIEW M V. Cell biology of spinal cord injury and repair[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(9):3259-3270. DOI: 10.1172/JCI90608.
- [3] ZHOU X, WAHANE S, FRIEDL M S, et al. Microglia and macrophages promote corraling, wound compaction and recovery after spinal cord injury via Plexin-B2[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(3): 337-350. DOI: 10.1038/s41593-020-0597-7.
- [4] ASSINCK P, DUNCAN G J, HILTON B J, et al. Cell transplantation therapy for spinal cord injury[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(5):637-647. DOI: 10.1038/nn.4541.
- [5] JONES I, NOVIKOVA L N, NOVIKOV L N, et al. Regenerative effects of human embryonic stem cell-derived neural crest cells for treatment of peripheral nerve injury[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(4): e2099-e2109. DOI: 10.1002/term.2642.
- [6] CAO S X, MA J, ZHANG J Y, et al. Reprogramming of one human induced pluripotent stem cell line from healthy donor [J]. *Stem Cell Res*, 2021, 57: 102613. DOI: 10.1016/j.scr.2021.102613.
- [7] FENG P H, LI P P, TAN J C. Human menstrual blood-derived stromal cells promote recovery of premature ovarian insufficiency via regulating the ECM-dependent FAK/AKT signaling[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2019, 15(2): 241-255. DOI: 10.1007/s12015-018-9867-0.
- [8] LI Y, LI X N, ZHAO H X, et al. Efficient induction of pluripotent stem cells from menstrual blood[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(7):1147-1158. DOI: 10.1089/scd.2012.0428.
- [9] SHIRIAN S, EBRAHIMI-BAROUGH S, SABERI H, et al. Comparison of capability of human bone marrow mesenchymal stem cells and endometrial stem cells to differentiate into motor neurons on electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffold[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(8): 5278-5287. DOI: 10.1007/s12035-015-9442-5.
- [10] ZEMEL'KO V I, KOZHUKHAROVA I V, KOVALEVA Z V, et al. [BDNF secretion in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, endometrium and adipose tissue]. [J]. *Tsitologiya*, 2014, 56(3): 204-211. DOI: 10.1134/S1990519X14040129.
- [11] WU Q F, WANG Q H, LI Z J, et al. Human menstrual blood-derived stem cells promote functional recovery in a rat spinal cord hemisection model[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 882. DOI: 10.1038/s41419-018-0847-8.
- [12] RONG Y L, LIU W, WANG J X, et al. Neural stem cell-derived small extracellular vesicles attenuate apoptosis and neuroinflammation after traumatic spinal cord injury by activating autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5):340. DOI: 10.1038/s41419-019-1571-8.
- [13] SHARIF K, WATAD A, BRAGAZZI N L, et al. Physical activity and autoimmune diseases: get moving and manage the disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(1): 53-72. DOI: 10.1016/j.autrev.2017.11.010.
- [14] BOOTH F W, ROBERTS C K, LAYE M J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases[J]. *Compr Physiol*, 2012, 2(2): 1143-1211. DOI: 10.1002/cphy.c110025.

- [15] ZBOGAR D, ENG J J, MILLER W C, et al. Physical activity outside of structured therapy during inpatient spinal cord injury rehabilitation[J]. *J Neuroeng Rehabil*, 2016, 13(1): 99. DOI: 10.1186/s12984-016-0208-8.
- [16] BEHRMAN A L, ARDOLINO E M, HARKEMA S J. Activity-based therapy: from basic science to clinical application for recovery after spinal cord injury[J]. *J Neurol Phys Ther*, 2017, 41 Suppl 3(Suppl 3 IV STEP Spec Iss): S39-S45. DOI: 10.1097/NPT.0000000000000184.
- [17] UNGERLEIDER L G, DOYON J, KARNI A. Imaging brain plasticity during motor skill learning[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2002, 78(3):553-564. DOI: 10.1006/nlme.2002.4091.
- [18] SUN T S, YE C Q, WU J, et al. Treadmill step training promotes spinal cord neural plasticity after incomplete spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(27): 2540-2547. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.27.005.
- [19] WANG H X, LIU N K, ZHANG Y P, et al. Treadmill training induced lumbar motoneuron dendritic plasticity and behavior recovery in adult rats after a thoracic contusive spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2015, 271: 368-378. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.07.004.
- [20] 殷睿安, 王双燕, 王培, 等. 重复经颅磁刺激叠加运动训练对脊髓损伤大鼠运动功能和神经元可塑性的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2021, 36(7):774-778, 792. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2021.07.002.
- YIN R A, WANG S Y, WANG P, et al. Effects of combined rTMS and exercise training on locomotor function and neuronal plasticity in rats with spinal cord injury[J]. *Chin J Rehabil Med*, 2021, 36(7): 774-778, 792. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2021.07.002.
- [21] HE W H, ZHANG X X, LI X Z, et al. A decellularized spinal cord extracellular matrix-gel/GelMA hydrogel three-dimensional composite scaffold promotes recovery from spinal cord injury via synergism with human menstrual blood-derived stem cells[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(30):5753-5764. DOI: 10.1039/d2tb00792d.
- [22] HWANG D H, SHIN H Y, KWON M J, et al. Survival of neural stem cell grafts in the lesioned spinal cord is enhanced by a combination of treadmill locomotor training via insulin-like growth factor-I signaling[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(38): 12788-12800. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5359-13.2014.
- [23] DE MIRANDA L, LEVI R, DIVANOGLU A. Tapping into the impossible: Philosophical health in lives with spinal cord injury[J]. *J Eval Clin Pract*, 2023, 29(7):1203-1210. DOI: 10.1111/jep.13874.
- [24] WANG M H, CORDELL H J, VAN STEEN K. Statistical methods for genome-wide association studies[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 55: 53-60. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.04.008.
- [25] LI Y, CHEN Y, LI X, et al. RNA sequencing screening of differentially expressed genes after spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(9): 1583-1593. DOI: 10.4103/1673-5374.255994.
- [26] 唐丹, 王先斌, 杨香莲, 等. 跑台运动训练对脊髓损伤后大鼠肺损伤及HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2023, 38(2):159-166. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2023.02.004.
- TANG D, WANG X B, YANG X L, et al. Effects of treadmill training on lung injury and HMGB1/TLR-4/NF- κ B signaling pathway after spinal cord injury in rats[J]. *Chin J Rehabil Med*, 2023, 38(2):159-166. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2023.02.004.
- [27] MITRE M, MARIGA A, CHAO M V. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(1):13-23. DOI: 10.1042/CS20160044.
- [28] WEISHAUP T, BLESCH A, FOUAD K. BDNF: the career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2012, 238(2):254-264. DOI: 10.1016/j.expneurol.2012.09.001.
- [29] KEEFE K M, SHEIKH I S, SMITH G M. Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):548. DOI: 10.3390/ijms18030548.
- [30] WU Q F, CAO Y N, DONG C M, et al. Neuromuscular interaction is required for neurotrophins-mediated locomotor recovery following treadmill training in rat spinal cord injury[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2025. DOI: 10.7717/peerj.2025.
- [31] HERNANDEZ-TORRES V, GRANSEE H M, MANTILLA C B, et al. BDNF effects on functional recovery across motor behaviors after cervical spinal cord injury[J]. *J Neurophysiol*, 2017, 117(2):537-544. DOI: 10.1152/jn.00654.2016.
- [32] SAHELI M, KHORAMIPOUR K, VOSOUGH M, et al. Athletes' mesenchymal stem cells could be the best choice for cell therapy in *Omicron*-infected patients[J]. *Cells*, 2022, 11(12): 1926. DOI: 10.3390/cells11121926.
- [33] TAKAHASHI A, NAKAJIMA H, KUBOTA A, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cell transplantation for severe spinal cord injury: functional improvement supported by angiogenesis and neuroprotection[J]. *Cells*, 2023, 12(11):1470. DOI: 10.3390/cells12111470.
- [34] WU R, GUO Y P, ZHANG L Y, et al. Physical exercise promotes integration of grafted cells and functional recovery in an acute stroke rat model[J]. *Stem Cell Reports*, 2022, 17(2):276-288. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.12.006.
- [35] SUN X, HUANG L Y, PAN H X, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells and exercise restore motor function following spinal cord injury by activating PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(5): 1067-1075. DOI: 10.4103/1673-5374.355762.

(收稿日期: 2024-02-27 修回日期: 2024-08-06)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周培)

[引用本文]

戚龙菊, 陈世园, 廖泽华, 等. 经血干细胞移植联合运动训练促进大鼠脊髓损伤康复的转录组学分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(5): 531-542. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.031.

QI L J, CHEN S Y, LIAO Z H, et al. Transcriptomic analysis of menstrual blood-derived stem cells transplantation combined with exercise training in promoting spinal cord injury recovery in rats[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(5): 531-542. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.031.