文章编号:1000-5404(2010)07-0625-05

论著

神经干细胞与血管内皮祖细胞共移植促进移入缺血再灌注模型大鼠脑内神经干细胞向神经元分化和突触的形成

齐志国[1], 朱晓峰[2], 富奇志[1], 谢 鹏[3] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院神经内科[1],神经科学中心[3];154002 黑龙江 佳木斯,佳木斯大学[2])

[摘要] **目的** 研究神经干细胞与血管内皮祖细胞构建的复合移植体对移植入缺血再灌注模型大鼠缺血半暗区的神经干细胞向神经元分化及突触形成的影响。**方法** 300只SD大鼠根据完全随机原则分为假手术组、缺血对照组、缺血神经干细胞移植组、缺血血管内皮祖细胞移植组和缺血共移植复合体移植组。分离培养新生大鼠海马神经干细胞和外周血管内皮祖细胞,利用神经干细胞和血管内皮祖细胞及层粘连蛋白共建共移植复合体;将神经干细胞、血管内皮祖细胞及共移植复合体分别移入缺血再灌注模型大鼠缺血半暗区,在1、3、7、14、30、60 d,利用免疫荧光双标观察神经干细胞向神经元分化情况;免疫组化观察突触素P38在缺血半暗区的表达,RT-PCR检测突触蛋白-Ⅰ和连接蛋白43mRNA在缺血半暗区表达,Western blot法分析突触小泡蛋白在缺血半暗区表达。**结果** 与缺血神经干细胞移植组相比,缺血共移植复合体移植组除1 d外,其余各时间点Brdu-神经元特异性烯醇化酶双阳性细胞数增加($P<0.05$, $P<0.01$);突触蛋白-Ⅰ和连接蛋白43mRNA表达增加($P<0.05$, $P<0.01$);突触蛋白-Ⅰ蛋白表达增加($P<0.01$, $P<0.05$);除1、3 d外,其余各时间点突触素P38免疫阳性反应产物吸光度值增大($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 神经干细胞和血管内皮祖细胞共移植,可促进移入大鼠缺血半暗区神经干细胞向神经元分化,并促进其突触形成和神经网络的重建。

[关键词] 神经干细胞;内皮祖细胞;缺血再灌注;分化;突触
[中图法分类号] R743.31; R329.2; R-33 **[文献标志码]** A

Complex of neural stem cells and endothelial progenitor cells enhances differentiation of neural stem cells to neuron and formation of synapse after implanted in MCAO rats

Qi Zhiguo[1], Zhu Xiaofeng[2], Fu Qizhi[1], Xie Peng[3] ([1]Department of Neurology, First Affilitated Hospital, [3]Neurosciences Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Jamusi University, Jiamusi, Heilongjiang Province, 154002, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of the complex containing neuron stem cells (NSCs) and endothelial progenitor cells (EPCs) after being transplanted to ischemia and reperfusion rat model on the differentiation of neural stem cells to neuron and synapse formation. **Methods** Totally 300 SD adult male rats were randomly divided into sham operation group, middle cerebral artery occlusion (MACO) model group, MACO + NSCs group, MACO + EPCs group, and MACO + complex group, and every group were further divided into 6 subgroups according to time points 1, 3, 7, 14, 30 and 60 d after operation, NSCs were isolated from the hippocampus of neonatal SD rats born in 24 h and identified with Nestin staining. EPCs were obtained from the artery blood of SD rats and verified with immunocytochemical stainings of CD31 and CD34 after culture. NSCs and EPCs were cultured together to produce the complex with aid of laminin. Then normal saline, the NSCs, EPCs, or complex (2×10^{10}/L) were transplanted into the ischemia penumbra of corresponding model rat brain, sham control or MACO rats. The differentiation of NSCs, the expression of P38, synapsin-I, mRNA of connexin 43 were observed with double label immunofluorescence technique, immunohistochemical method, RT-PCR and Western blot analysis in ischemic penumbra. **Results** Compared with other groups, there were more double Brdu and neural special enolase positive cells in MACO + complex group with the increased expression of P38. RT-PCR and Western blot analysis indicated that MACO + complex group had significantly higher expressions of synapsin-I at mRNA and protein levels in ischemic penumbra, and so did the mRNA expression of connexin 43. **Conclusion** The transplantation of the complex of NSCs and EPCs improves the NSCs differentiation to neuron, synapse formation and reconstruction of neural network.

[Key words] neuron stem cells; endothelial progenitor cells; ischemic and reperfusion; differentiation; synapse

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2009CB008300). Corresponding author: Xie Peng, E-mail: xiepeng58@21cn.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2009CB008300)
[通信作者] 谢 鹏,E-mail: xiepeng58@21cn.com

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的迁徙能力和多向分化潜能使其成为理想的神经移植供体细胞,给神经系统损伤的修复带来了新的希望。NSCs 替代疗法可以直接或间接替代已经坏死的神经细胞和组织,重建神经网络,恢复部分已丧失的神经功能。但 NSCs 移植后只有 3% ~9% 的细胞分化为神经元,这严重制约了 NSCs 替代疗法在临床上的应用。通过对神经损伤反应、神经组织移植、离体神经组织或神经元培养以及对低等动物学习与记忆机制传导易化的实验研究等已取得了大量的证据证明神经回路、突触联系到单个神经元的形态、超微结构、生化组成及电活动等都具有一定程度的可塑性,而轴突出芽、突触形成、突触结构和功能是可塑性的基础[1]。提高移植 NSCs 向神经元分化率和与周围细胞建立神经网络联系,是解决 NSCs 移植治疗脑缺血性疾病的关键因素之一。局部微环境是调控 NSCs 的自我更新、增殖、定向分化的一个主要因素。缺血半暗区是指围绕在不可逆性损伤之外的电生理活动消失,但尚能维持自身离子平衡的脑组织,代表缺血中心坏死以外的可逆性损伤的脑组织,是通过干预可以在结构和功能上得以恢复的区域。本实验将血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)和 NSCs 中间填充神经间黏附因子形成微细胞团移入缺血再灌注大鼠缺血半暗区,观察 NSCs 向神经元分化和突触形成情况,将血管新生和神经发生有机结合,使缺血半暗区的结构功能得以一定程度的恢复,为两者联合移植治疗缺血性脑血管病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、分组与试剂

成年雄性 SD 大鼠 300 只(由重庆医科大学实验动物中心提供,符合国家级动物标准),体质量 250 ~350 g。遵循完全随机原则,分为假手术组、缺血对照组、缺血神经干细胞移植组(NSCs 组)、缺血血管内皮祖细胞移植组(EPCs 组)和缺血共移植复合体移植组(NSCs + EPCs 组),各组又根据不同时间点分为 1、3、7、14、30、60 d 6 个亚组,每个时间点 10 只。

M-199 培养基、胎牛血清、VEGF、bFGF、免疫组化试剂盒(Sigma 公司),突触素 P38(武汉博士德公司,货号:BM0125)免疫双标荧光试剂盒(Amresco 公司,货号:AP181F),RNA 提取试剂 Trizol(Omega 公司,货号:B15217),逆转录试剂盒(Fermentas 公司,货号:294-66401),DNA 标准(北京天为时代科技有限公司,货号:LSK10057)。

1.2 NSCs 和 EPCs 的培养及鉴定

参照刘仕勇等[2]的方法,在无菌条件下取新生 24 h 内 SD 大鼠的海马组织,培养 NSCs 传 3 代后备用。采用免疫组织化学法 Nestin 染色鉴定神经干细胞。参照 Wang 等[3]方法,抽取 SD 大鼠动脉血 10 ~15 ml,密度梯度离心,取单个核细胞培养 4、7、10、14 d,分别行 CD31、CD34 免疫组化染色鉴定。

1.3 EPCs 和 NSCs 共移植复合体构建

参照朱晓峰等[4]方法将传代的 EPCs 和 NSCs 以分层方式培养后,经吹打,过滤,形成大小适中的共移植复合体。

1.4 大脑中动脉缺血再灌注动物模型的制备

各组大鼠均采用 Longa 线栓法[5]建立局灶性脑缺血再灌注动物模型。麻醉清醒后,神经缺陷评分 2 级以上者作为移植对象。

1.5 EPCs、NSCs 及共移植复合体的移植

在模型制备 6 h 后,分别将培养的 NSCs、EPCs 及共移植复合体溶解于磷酸盐缓冲液中,细胞数调整为 2×10^{10}/L。EPCs 组、NSCs 组和 NSCs + EPCs 组分别移植 3 种细胞悬液 10 μl。在立体定位仪下经微量注射器移植于造模侧缺血半暗区(前囟后 0.5 mm,前囟右 3.5 mm)。

1.6 神经干细胞分化神经元的检测

免疫荧光双标染色:各组分别于移植后 1、3、7、14、30、60 d,参照免疫荧光双标说明书操作实验,观察神经干细胞移入脑内后分化成神经元的情况。胞核呈绿色、胞质呈红色荧光的为 Brdu-神经元特异性烯醇化酶双阳性细胞,且代表移入脑内的神经干细胞所分化的神经元。计算各组各时间点双阳性细胞占绿色荧光标记的百分率,并进行比较。

1.7 突触素 P38 的检测

免疫组化染色:常规成片,按组化试剂盒标明操作。在光学显微镜下观察免疫组化标记突触素 P38 的阳性细胞,然后应用 BI-2000 医学图像分析系统测定缺血半暗区吸光度值,用 COD 值进行比较。

1.8 RT-PCR 检测突触蛋白-I (synapsin-I) mRNA 的表达

根据文献[6]采用 Prime Premier 5.0 设计,正义链 5′-CAGGGTAAGGCCGCCAGTC-3′,反义链 5′-CACATCCTGGCTGGGTTTTCTG-3′。脑组织缺血半暗区 RNA 提取,按照逆转录试剂盒说明进行逆转录反应,PCR 扩增和电泳;采用 Lab Work 4.0 凝胶成像系统成像,Quantity One 分析系统进行图像分析,分析目的基因与 β-actin 的积分吸光度值,两者的积分吸光度值比值作为目的基因的表达水平。

1.9 Western blot 法分析 synapsin-I 蛋白质的表达

常规组织蛋白质提取,用 BCA 法测定蛋白质浓度,制胶,点样,转膜,用增强化学发光法显色,X 线片曝光显影,凝胶成像分析系统摄像分析。

1.10 RT-PCR 检测连接蛋白 43(Cx43) mRNA 的表达

参考文献[7]并结合基因文库的检索,合成 Cx43 引物序列,正义链 5′-CTCCACTCTCGCCTATGTCT-3′,反义链 5′-ATCGACAGCTCGATGCTCAA-3′,同时设 β-actin 阳性产物作为 PCR 内参,其他操作同 1.8。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 EPCs、NSCs和两者共移植复合体光学和荧光显微镜观察

原代分离的单NSC在12 h内自动聚集成团,4 d后细胞球形成。Nestin免疫荧光染色,细胞球呈阳性。新鲜分离的外周血单核细胞浮在培养液中呈圆形,体积小。3 d时贴壁增殖,细胞呈梭形,培养第4、7、10天时贴附细胞具有内皮细胞表型CD31和CD34,免疫组化染色细胞呈阳性,14 d细胞免疫荧光染色CD31和CD34表达在95%以上。荧光显微镜下可见共移植体细胞团不规则,免疫荧光可见红色CD31 EPCs包被绿色Brdu NSCs或相互黏贴,NSCs与EPCs细胞数比为10∶1。

2.2 NSCs分化为神经元样细胞情况

各时间点假手术组、缺血对照组和EPCs组只有被Cy3标记成红色神经元样细胞,未见双阳性细胞。NSCs组和NSCs+EPCs组在1 d时未见Brdu-神经元特异性烯醇化酶双阳性细胞,只在沿着针迹部位Brdu标记的绿色NSCs,3 d时两组均发现有双阳性细胞,且随着时间的延长,双阳性细胞比率增加,60 d时比率最高,且在各时间点NSCs+EPCs组双阳性细胞多于NSCs组($P<0.05$),在7 d后各时间点差异更明显($P<0.01$)。见表1、图1。随着移植时间的延长,各组Brdu-神经元特异性烯醇化酶双阳性细胞形态均逐渐增大,到移植后60 d时细胞周边可见突起明显。

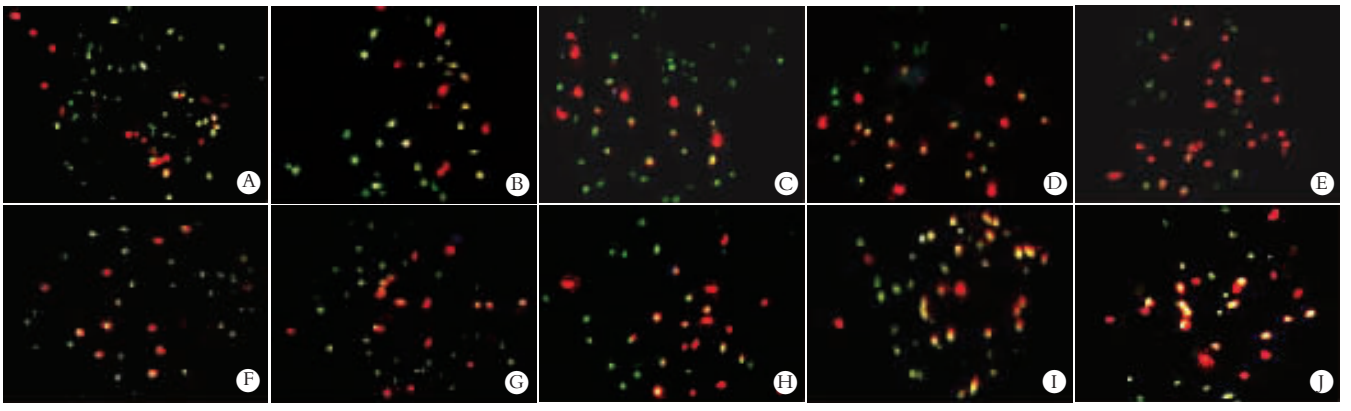
表1 移植后不同时间Brdu-神经元特异性烯醇化酶双阳性细胞百分率(%, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
NSCs组	0	3.12±0.22	3.48±087	7.21±0.95	8.11±0.98	9.27±0.90
NSCs+EPCs组	0	4.03±0.48[a]	6.27±0.6[b]	10.35±1.04[b]	14.24±1.26[b]	19.55±2.17[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与NSCs组比较

2.3 缺血半暗区突触素P38免疫组织化学检测结果

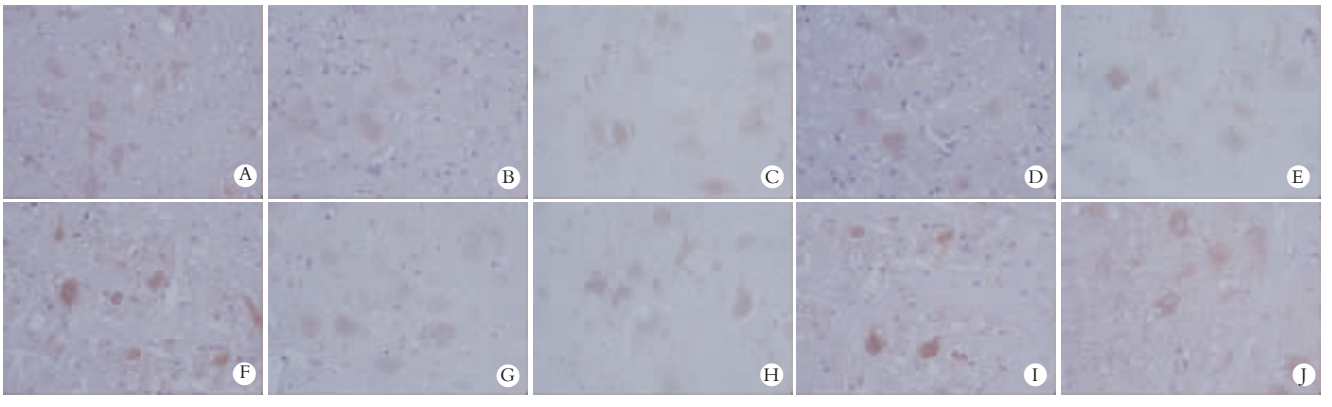
光学显微镜下,突触素P38阳性细胞呈棕黄色点状或颗粒状沉积,分布比较密集,大小较一致,主要分布在神经细胞内,有些围绕在神经元胞体周围,衬托出神经元细胞体的轮廓。移植后假手术组在缺血半暗区相应部分各时间点突触素P38表达率高而稳定;缺血对照组1 d脑缺血半暗区突触素P38有所表达,移植后3、7、14、30、60 d突触素P38的表达逐渐增加。NSCs组、EPCs组与NSCs+EPCs组在1 d时P38有少量表达,随时间延长P38表达增加,60 d达高峰,并在7 d后各时间点NSCs+EPCs组P38表达高于NSCs组和EPCs组($P<0.05$),其中14、30 d和60 d时增高更明显($P<0.01$)。见图2、表2。



A: NSCs组3 d; B: NSCs组7 d; C: NSCs组14 d; D: NSCs组30 d; E: NSCs组60 d; F: NSCs+EPCs组3 d; G: NSCs+EPCs组7 d; H: NSCs+EPCs组14 d; I: NSCs+EPCs组30 d; J: NSCs+EPCs组60 d

免疫荧光, Brdu-FITC呈绿色, NSE-Cy3呈红色, 双标阳性细胞为移入神经干细胞分化的神经元

图1 移植后缺血半暗区各时间点各组神经干细胞向神经元分化情况 (×100)



A、F:假手术组14、30 d; B、G:缺血对照组14、30 d; C、H: EPCs组14、30 d; D、I:NSCs组14、30 d; E、J:NSCs+EPCs组14、30 d

图2 移植后缺血半暗区各时间点各组突触素P38表达情况 (SABC ×200)

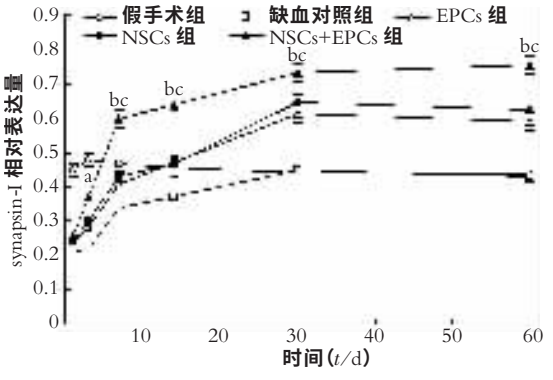
表2 移植后不同时间点各组脑缺血半暗区突触素P38免疫反应产物吸光度值($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
假手术组	75.32±4.32	74.98±2.37	75.24±3.98	76.01±2.64	75.61±3.01	75.39±2.67
缺血对照组	1.34±0.05	2.83±0.35	7.54±3.21	9.34±2.67	10.65±3.18	12.14±1.94
EPCs组	1.32±0.34	5.68±1.33	12.92±2.14	14.68±3.86	18.36±2.97	24.14±6.72
NSCs组	1.42±0.67	5.75±1.64	11.07±2.37	15.37±2.64	20.37±2.68	36.38±3.81
NSCs+EPCs组	1.35±0.31	5.21±1.67	16.21±2.97^{ac}	27.27±4.67^{bd}	46.98±8.97^{bd}	62.54±6.28^{bd}

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与NSCs组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与EPCs组比较

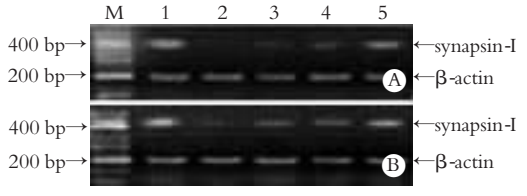
2.4 RT-PCR检测synapsin-I mRNA表达变化

synapsin-I在假手术组缺血半暗区相应部位各时间点均有较高表达,缺血对照组缺血半暗区在1~7 d时呈低表达,14 d后表达增高,30 d达高峰,60 d下降;EPCs组在1 d、3 d时表达较低,7 d表达有所增加,并持续至30 d达高峰,60 d呈下降趋势;NSCs组表达情况和EPCs组相似,30 d时高峰更明显,NSCs+EPCs组与NSCs组相比1 d时呈低表达,3 d表达增高($P<0.05$),14 d表达呈高峰($P<0.01$),直持续到60 d($P<0.01$)。见图3、图4。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与NSCs组比较; c: $P<0.01$, 与EPCs组比较

图3 移植后不同时间各组脑缺血半暗区synapsin-I mRNA表达



A:14 d synapsin-I表达; B:30 d synapsin-I表达

M:标准; 1:假手术组; 2:缺血对照组; 3:NSCs组; 4:EPCs组; 5:NSCs+EPCs组

图4 不同时间synapsin-I mRNA的表达

2.5 Western blot检测synapsin-I蛋白的表达变化

synapsin-I蛋白在假手术组缺血半暗区相应区各时间点均有较高表达;缺血对照组缺血半暗区在1~7 d时呈低表达,14 d后表达增高,30 d达高峰,60 d下降,表达情况与synapsin-I mRNA表达相似;EPCs组1、3、7 d时表达较低,14 d表达有所增加,并持续至30 d达高峰,60 d呈下降趋势;NSCs组表达情况和EPCs组相似,30 d时高峰更明显,60 d下降不明显;NSCs+EPCs组1 d时呈低表达,与NSCs组和EPCs组相比,3 d表达增高($P<0.05$),30 d表达呈高峰($P<0.01$),60 d表达下降不明显($P<0.01$)。见表3。

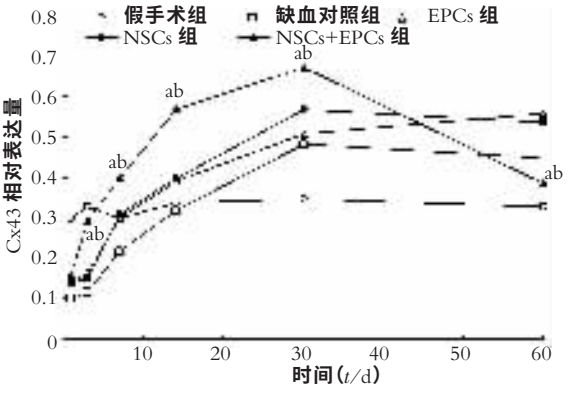
表3 移植后不同时间点各组脑缺血半暗区synapsin-I蛋白表达与β-actin的比值情况($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
假手术组	1.024±0.08	0.957±0.050	1.036±0.002	0.997±0.112	1.165±0.08	1.033±0.105
缺血对照组	0.211±0.002	0.225±0.001	0.195±0.015	0.314±0.024	0.512±0.128	0.417±0.065
EPCs组	0.225±0.068	0.243±0.037	0.247±0.064	0.425±0.107	0.621±0.117	0.609±0.149
NSCs组	0.241±0.024	0.270±0.029	0.286±0.038	0.487±0.130	0.692±0.206	0.628±0.173
NSCs+EPCs组	0.298±0.031	0.335±0.116^{ac}	0.621±0.144^{bd}	0.687±0.143^{bd}	0.941±0.144^{bd}	0.924±0.152^{bd}

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与NSCs组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与EPCs组比较

2.6 RT-PCR检测Cx43 mRNA表达变化

由缺血半暗区提取的总RNA,经紫外分光光度计检测,吸光度值均在1.8以上,能满足逆转录要求。RT-PCR扩增所得产物经琼脂糖凝胶电泳后,片段大小与所设计引物相符。凝胶电泳扫描分析显示,缺血半暗区Cx43在最初呈低表达,在7 d后表达增加,14 d更明显,30 d出现高峰,直到60 d,与缺血对照组相比,EPCs组和NSCs组在各时间点表达稍高,NSCs+EPCs组在各时间点明显高于各组($P<0.01$),但60 d时表达较EPCs组和NSCs组有所下降($P<0.01$)。见图5。



a: $P<0.01$, 与NSCs组比较; b: $P<0.01$, 与EPCs组比较

图5 不同时间Cx43 mRNA的表达变化

3 讨论

中枢神经系统的血管再生和神经发生有紧密联系。成人海马与脉管系统相连的稠密丛中存在正在分裂的细胞,表明神经再生发生在血管生成的环境中。Taguchi等[8]首次证实了在缺血性脑损害的修复中血管生成与神经生成的直接关系。我们前期的研究也显示,在缺血再灌注大鼠移植修复中,血管新生和神经发生具有协同作用[9]。本实验结果显示,血管EPCs和NSCs共移植可促进缺血半暗区神经干细胞向神经元分化。EPCs能产生VEGF、成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF-2)和IGF-1等细胞因子,提供有益于神经生成的环境加速神经生成[10]。同时,血管新生加速这种毒性产物的清除,促进化学活性物与神经营养因子的释放[11]。Monje等[12]研究发现,用X线照射破坏内皮细胞与脑室下层细胞的内在联系后,丧失了神经生成环境,出现小胶质细胞的增生,

甚至将干细胞从非照射的脑移植至照射的宿主脑后，干细胞主要分化成胶质细胞，这说明新血管形成可能有益于NSCs移植后向神经元分化。从而为神经干细胞提供一个相对良好的微环境有关。

Asahara等(1997年)提出了出生后的血管新生过程不仅靠简单的已存在血管的衍生，而是其中有EPCs加入，随后他们(1999年)进行了EPCs的移植追踪实验，进一步证实了从骨髓来源的EPCs也参与出生后生理或病理性血管新生。新生的血管产生毛细血管网状结构，并在局部血液循环作用下，继续分化为动静脉系统，这可以给神经元重塑创造一个良好的微环境，促进了NSCs的分化和成熟。本研究发现血管EPCs和NSCs共同移植入缺血半暗区后，突触素(SYN)在神经细胞表面表达增多，并且synapsin-I mRNA表达上调，Western blot也证明synapsin-I蛋白表达明显高于对照组。突触体素的定位和分布可反映突触的可塑性。SYN通过影响神经递质的释放及通过酪氨酸激酶使其磷酸化，从而调节内源性谷氨酸的释放来影响突触的重建。敲除SYN基因的动物，海马CA1区短时程增强(STP)和长时程增强(LTP)明显减低。黄如训等[13]发现脑缺血后随着SYN表达的下降，出现神经元的细胞器减少、轴突变性、突触解体及突触数目减少。而缺血3周后，随着SYN逐渐上调，突触的数目逐渐恢复。突触结构在第9周末也有改变，如突触间隙变窄、突触活性区延长和突触后膜致密物质增厚等改变，这些改变均有利于神经冲动传导。由此可见，脑梗死后突触重建同SYN表达密切相关。synapsins还对其他与突触发生有关的蛋白起着调节作用，synapsins的表达增高或降低可导致其他囊泡相关蛋白的表达增高或降低。在本实验中用EPCs与NSCs构建的共移植体，通过对神经细胞小生境的模拟，提高了突触素的合成与释放，同时促进了突触的发生和发育，增强其可塑性。EPCs是通过何种机制来提高突触素的表达还不是十分清楚，有待进一步研究。在脑内，存在着大量的缝隙连接，其连接蛋白(Cx43)是组成缝隙连接的通道蛋白。它存在于神经元之间、星形胶质细胞和神经元之间，作为神经元之间的电突触和这些细胞之间交换代谢物和第2信使分子的通道。星形胶质细胞通过缝隙连接方式与神经元相连接，密切地参与神经元功能的调节，神经元也可通过缝隙连接调控星形胶质细胞的功能。缝隙连接被认为参与调节包括NSCs在内许多细胞的增殖，也介导损伤后细胞的繁殖和扩增。缝隙连接的电联系在早期脑发育中细胞与细胞之间信息交通中扮演重要角色，虽然在出生后，脊椎动物的神经元之间主要是化学突触，但电突触依然存在[14]。尤其在损伤后，细胞间的缝隙连接可能介导轴突切断的运动神经元之间的联系，直到与靶目标的突触连接恢复。本实验中显示血管内皮祖细胞与神经干细胞共移植可以提高脑缺血再灌注模型大鼠缺血半暗区的Cx43的mRNA表达，提高缝隙连接数目，强化移植后神经干细胞与微环境细胞的信息联系，从而加快其整合和神经网络重建。

血管内皮祖细胞与神经干细胞共移植可以提高突触蛋白和Cx43的表达，促进神经干细胞分化成神经元，有助突触形成(包括电突触及化学突触)和重塑；通过用这两种细胞构建的共移植体可以解决移植入体内神经细胞的定向分化率低的问题，同时也加强了移入细胞与体内环境的相互作用，从而恢复神经网络，改善脑卒中后神经功能恢复。

参考文献：

[1] 黄谷，李学余，罗振国. 旋转磁场对脑局灶性缺血大鼠神经化学影响的实验研究[J]. 中国现代药物应用，2008，2(10)：23－25.
[2] 刘仕勇，张可成，杨辉，等. 神经干细胞的分离培养及其鉴定[J]. 第三军医大学学报，2000，22(1)：26－28.
[3] 王肃生，冀航，梁刚，等. 鼠外周血内皮祖细胞体外培养鉴定与诱导分化[J]. 中国美容整形外科杂志，2007，3(18)：237－239.
[4] 朱晓峰，齐志国，张晓梅. 神经干细胞共移植体的体外构建[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2007，11(24)：4756－4759.
[5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84－91.
[6] 张晨，李昕，李尧华，等. 制备与鉴定导致家族性帕金森病突变蛋白质的α-突触核蛋白聚合体[J]. 中国临床康复，2005，9(13)：39－41.
[7] Guo R, Liu L, Barajas L. RT-PCR study of the distribution of connexin 43 mRNA in the glomerulus and renal tubular segments[J]. Am J Physiol, 1998, 275(2 Pt 2): R439－R447.
[8] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, *et al*. Administration of $CD34^+$ cells after stroke enhances neurogenesis *via* angiogenesis in a mouse model[J]. J Clin Invest, 2004, 114(3): 330－338.
[9] 富奇志，齐志国，朱晓峰，等. 血管内皮祖细胞对共同植入缺血再灌注模型大鼠脑内的神经干细胞增殖、凋亡和血管形成的调节[J]. 第三军医大学学报，2010，32(6)：511－515.
[10] 赵洪雯，余荣杰，彭侃夫，等. $VEGF_{165}$基因转染EPCs移植对大鼠阿霉素肾病组织学的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(2)：93－97.
[11] Kelly S, Bliss T M, Shah A K, *et al*. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(32): 11839－11844.
[12] Monje M I, Mizumatsu S, Fike J R, *et al*. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction[J]. Nat Med, 2002, 8(9): 955－962.
[13] 黄如训，张艳，方燕南，等. 大鼠脑梗死后运动功能可塑性物质基础及发生机制[J]. 中华医学杂志，2000，80(10)：769－772.
[14] Cai J, Cheng A, Luo Y, *et al*. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells[J]. J Neurochem, 2004, 88(1): 212－226.

(**收稿**：2009-09-25；**修回**：2009-10-25)
(编辑 龙 亮)