文章编号:1000-5404(2010)06-0511-05

论著

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

富奇志[1],齐志国[1],朱晓峰[2],谢 鹏[3] (400016 重庆,重庆医科大学:第一附属医院神经内科[1],神经科学中心[3];154002 黑龙江 佳木斯,佳木斯大学神经科学中心[2])

[摘要] **目的** 研究血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)与神经干细胞(neuron stem cells, NSCs)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带的神经干细胞增殖、凋亡和血管重建的影响。**方法** 线栓法建大鼠脑缺血再灌注模型;血管内皮祖细胞、层粘连蛋白和神经干细胞构建的移植复合体移入模型鼠脑缺血半暗带;免疫组化观察 Brdu 标记的移入脑内神经干细胞和缺血半暗带血管新生,免疫荧光双标观察神经干细胞的凋亡情况。**结果** 移植后各时间点 Brdu 标记的神经干细胞数 NSCs + EPCs 组明显高于 NSCs 组($P<0.05$);NSCs + EPCs 组在各时间点的凋亡率明显低于 NSCs 组($P<0.05$);各时间点 NSCs + EPCs 组血管新生数量明显多于 EPCs 组、缺血对照组和 NSCs 组($P<0.05$)。**结论** 血管内皮祖细胞可以促进移植入缺血再灌注模型大鼠缺血半暗带的神经干细胞增殖,减少其凋亡;2 种细胞共移植可以促进缺血半暗带的血管新生。

[关键词] 神经干细胞;毛细血管内皮祖细胞;缺血再灌注
[中图法分类号] R322.81;R329.28;R743.31 **[文献标志码]** A

Endothelial progenitor cells combined implantation improves proliferation and suppresses apoptosis of neural stem cells and angiogenesis of MCAO/R rats

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

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of endothelial progenitor cells (EPCs) which complexed with neuron stem cells (NSCs) after transplanted into ischemia and reperfusion (I/R) rat model on the proliferation and apoptosis of the NSCs and vasal construction. **Methods** Totally 150 SD adult male rats were randomly and equally divided into 5 groups, sham-operation group, I/R group, I/R + NSCs group, I/R + EPCs group, and I/R + NSCs + EPCs group. The rats were further divided into 5 subgroups according to the time points of 3, 7, 14, 30 and 60 d after transplantation. I/R rat model was established by reversiblyligating middle cerebral artery occlusion. NSCs were derived from the hippocampus of 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, CD34 and KDR after culture. The complex of NSCs and EPCs was produced with aid of laminin. Then the complex were transplanted into the ischemia penumbra of corresponding model rat brain. The proliferation and apoptosis of NSCs, and the fomation of new vessels were observed through immunohistochemistry and double-labeled immunofluorescence staining. **Results** The proliferation of NSCs was increased, apoptosis cells were decreased and the new vessels were raised in the complex transplantation when compared with single NSCs or EPCs transplantation groups. **Conclusion** The complex of NSCs and EPCs transplantation improves the proliferation of NSCs, suppresses cell apoptosis and promotes the formation of new vessels.

[Key words] neural stem cells; endothelial progenitor cells; ischemic and reperfusion

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2009CB008300). Corresponding author: Xie Peng, Tel: 86-23-68485490, E-mail: xiepeng58@21cn.com

缺血性脑血管病是人类脑血管疾病中高致死致残率的疾病之一。缺血性脑血管病包括两大病理损害,即神经元的缺损和局部血循环结构的破坏。近年来,

[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,电话:(023)68485490,E-mail: xiepeng58@21cn.com

神经再生和神经干细胞(neural stem cells,NSCs)的发现为干细胞移植疗法修复脑梗死病灶提供了依据[1]。但NSCs移植后成活率和神经元转化率低严重制约了NSCs移植在临床上的应用[2]。1997年,血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)分离培养成功,并发现可以移植EPCs可以促进血管重建。研究发现,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,表明神经再生的发生在血管生成的环境中,脑内血管再生和神经再生有紧密联系。本实验研究血管内皮祖细胞和神经干细胞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带,观察神经干细胞的增殖和凋亡情况及缺血半暗区血管形成情况,为二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 动物及分组

成年雄性SD大鼠150只,实验动物包括两组第一组新生24 h内SD大鼠60只和雄性SD大鼠20只(用于NSCs、EPCs原代细胞培养)成年雄性SD大鼠培养,以上动物均(由重庆医科大学实验动物中心提供,符合国家级动物标准),后者体质量250~350 g,随机分为假手术组、缺血对照组、缺血后神经干细胞移植组(NSCs组)、缺血后血管内皮祖细胞移植组(EPCs组)、缺血神经干细胞加血管内皮祖细胞移植组(NSCs+EPCs组),各组又根据移植后不同时间点分为3、7、14、30、60 d 5个亚组,每个时间点6只。

1.2 药品及试剂

M-199培养基、胎牛血清、纤维连接蛋白(FN)、VEGF、bFGF、兔抗大鼠CD31单克隆抗体、兔抗大鼠CD34单克隆抗体、兔抗大鼠KDR单克隆抗体、羊抗兔(二抗)免疫组化染色试剂盒、浓缩型DAB试剂盒(以上购自美国Sigma公司);5-溴脱氧尿苷(BrdU)、小鼠抗巢蛋白(Nestin)单克隆抗体、表皮生长因子(EGF)、兔抗大鼠VEGF单克隆抗体、小鼠抗大鼠caspase IgG、小鼠抗大鼠Brdu IgG单克隆抗体、抗小鼠免疫组化试剂盒(购自晶美生物工程公司);层粘连蛋白(LN)(购自美国Invitrogen公司);DMEM/F12干粉培养基(购自美国Gibico BRL公司)、SABC-CY3试剂盒、B27(购自美国Boster公司)。

1.3 大鼠神经干细胞的培养及鉴定

在无菌条件,取新生24 h内SD大鼠的海马组织,剪碎后反复吹打,200目细胞筛网过滤后,离心5 min,弃上清,加入完全神经干细胞培养液(DMEM/F12,2% B27,20 μg/L, EGF)1 ml,用吸管轻轻吹打成细胞悬液,调整细胞密度为5×10^8/L,加入25 cm培养瓶中,放入适量完全培养液,在37 ℃、体积分数为0.05的CO_2条件静置培养7 d,每隔2天换液1次,7 d后传代,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。

1.4 EPCs的体外分离、培养和鉴定

参照Wang等[3]方法,抽取SD大鼠动脉血10~15 ml,室温下400 r/min离心30 min,吸出第2层的单核细胞层,然后用PBS清洗,细胞吹打成悬液后计数,将单核细胞以$(1\sim3)\times10^5$的密度,分别接种于铺有FN的塑料培养皿中,加入培养液,放入37 ℃,5% CO_2,湿度100%细胞培养箱,每4天换液1次。对培养的第4、7、10、14天的细胞,用甲醇固定2次,每次20 min,胎牛血清工作液封闭非特异性抗原30 min,分别加入鼠抗人CD31、CD34及兔抗人KDR单克隆抗体(1∶50),37 ℃孵育2 h,滴加生物素标记二抗,37 ℃孵育20 min,滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液,DAB显色。封片后上镜观察。

1.5 EPCs和NSCs共移植复合体构建

将传代的EPCs用2.5 g/L胰酶消化20 min,轻轻吹打成单细胞,以3×10^7/L的密度接种在培养瓶中,12 h贴壁后吸出EPCs培养液,涂以一层细胞外基质(层粘连蛋白)后接种经1.25 g/L胰酶消化20 min后吹打成单细胞的NSCs(以Brdu标记),密度为6×10^8/L,加入NSCs完全培养液。培养3~6 h,经镜下观察NSCs完全贴壁后吸出培养液,涂以一薄层细胞外基质,再接种以上相同密度的EPCs,加入神经干细胞完全培养液。70 ml培养瓶分别接种两种细胞4 ml,共培养12~24 h,镜下观察最后接种的EPCs贴壁,并由消化后的圆形变为椭圆或不规形。用细胞刮刀将细胞从瓶壁上依次刮起,适力吹打成1~3个EPCs与5~18个NSCs相互包绕的细胞团,用150目细胞筛网过滤,取滤液再用500目细胞筛网过滤,取筛网上细胞团即为共移植复合体。然后用免疫荧光方法进行鉴定。

1.6 大脑中动脉缺血/再灌注动物模型的制备

除假手术组外,各组均采用Longa等[4]线栓法建立局灶性脑缺血再灌注动物模型。手术结束麻醉清醒后,神经缺损评分标准观察大鼠神经症状,选择行走时身体向偏瘫侧转圈作为移植对象。假手术组只麻醉,颈部皮肤切口,即缝合、不作其他处理。

1.7 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,细胞浓度调整为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,经微量注射器进行移植,移植速度为0.5 μl/min,在缺血侧缺血半暗带区(前囟后0.5 mm,矢状缝右旁开3.5 mm),垂直进针,在进针5.0 min后缓慢推入细胞悬液,留针10 min后缓慢拔针。

1.8 神经干细胞增殖和凋亡的检测

Brdu阳性细胞免疫组化检测:切片常规脱蜡至水,微波修复,加入小鼠抗大鼠Brdu一抗(1∶100)4 ℃过夜,PBS冲洗;生物素化山羊抗小鼠IgG 25 ℃孵育,PBS冲洗,DAB显色,复染,镜下计数Brdu阳性细胞数。

免疫荧光双标染色:石蜡切片,按常规下行入水,加Brdu(1∶100)抗体与Caspase-3(1∶200)的组合抗体,4 ℃过夜,以含0.1% Triton X-100的PBS冲洗3次,加入CY3和FITC的二抗(CY3标记Brdu,FITC标记Caspase-3),37 ℃孵育45 min, 0.05 mol碳酸缓冲液甘油封固。荧光显微镜下拍照,计数阳性细胞数。显微镜高倍视野(×400)下,在缺血侧皮质随机选取5个不重复视野统计阳性细胞的平均数。

凋亡率 = NSCs 双阳性荧光细胞/Brdu 阳性荧光细胞 × 100%

1.9 新生血管的检测

免疫组织化学法检测新生血管:操作方法根据试剂盒说明,一抗(1∶100)Rabbit Anti- VEGF,同时磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照,DAB 室温显色,显微镜观察。

新生血管密度检测:血管内皮生长因子在新生血管内皮细胞质中标记为棕黄色的颗粒,任何被血管内皮生长因子抗体染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇团,只要与临近的微血管、神经细胞或其他结缔组织分开,就视为一个新生血管,其分支结构也作为一个血管。应用 BIM-2000 显微图像分析系统,每个时间点取 6 张切片,在低倍镜下选择缺血区周围新生血管密度最丰富区域,然后在 200 倍视野下,每张切片选择 5 个血管最丰富的区域进行新生血管计数,计算每平方毫米新生血管的数量,即新生血管的密度,求其平均值。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件进行统计处理,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 和共移植复合体镜下所见及鉴定结果

海马 NSCs 原代分离后在 12 h 内单 NSC 相互聚集成云雾状,4 d 时即可见大量细胞球,由几十个到上百个悬浮生长的圆球形细胞组成,相差镜下该细胞球立体感强,周边光滑,但球中央可见细胞碎片掺杂。经传代后杂质减少以至消失,克隆后经 Nestin 免疫荧光鉴定,阳性细胞球呈细胞。新鲜分离的外周血单核细胞呈圆形,体积小浮在培养液中。3 ~ 4 d 可见细胞开始增大贴壁,细胞数增加,细胞呈梭形;7 ~ 10 d 出现多个细胞团并呈典型线样排列。培养第 4、7、10 天时 EPCs CD31、CD34 及 KDR 免疫组化染色细胞呈阳性,10 ~ 14 d 细胞免疫荧光染色 CD31、CD34 及 KDR 表达在 95% 以上。显微镜下可见共移植体细胞团不规则,NSCs 被 EPCs 包绕或相互粘贴,平均每个共移植体复合细胞数 8 ~ 15 个,其中 EPCs 平均 2.8 个。免疫荧光可见红色 EPCs 包被绿色 NSCs,或相互粘贴(图 1)。

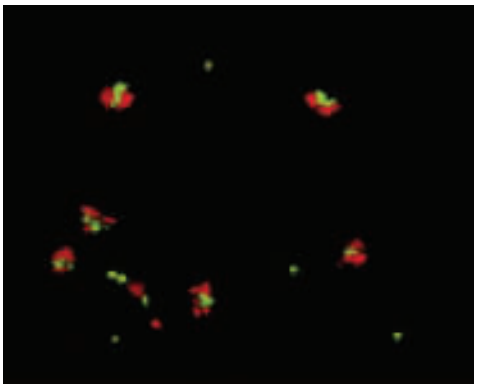


图 1 免疫荧光观察神经干细胞和血管内皮组细胞构建的共移植复合体 (荧光显微镜 ×200)

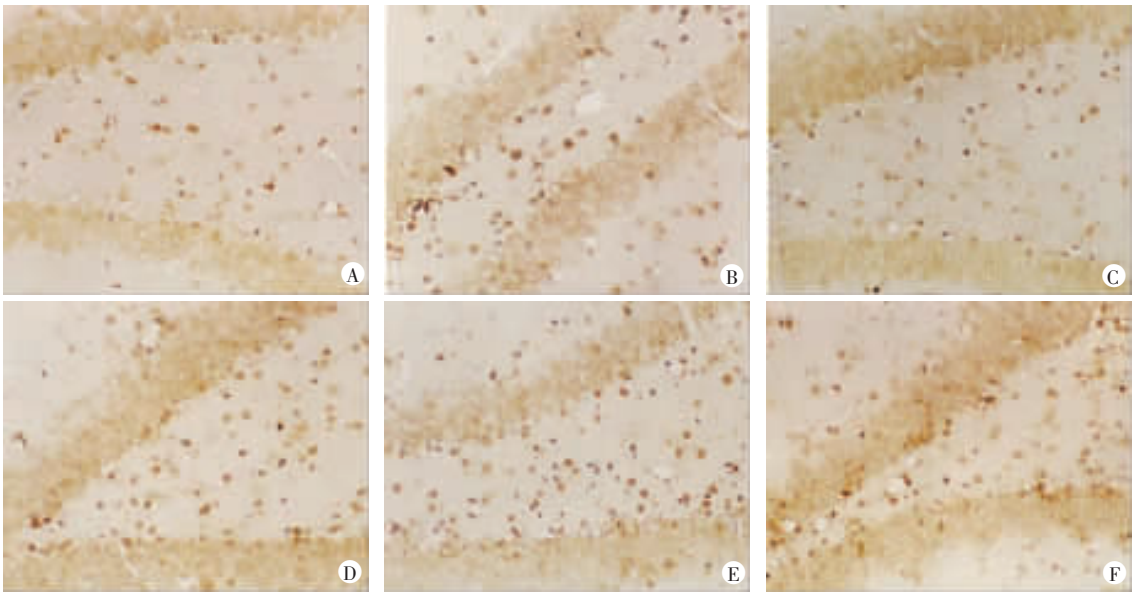
2.2 NSCs 增殖情况

假手术组、缺血对照组和 EPCs 组各时间点未见 Brdu 阳性细胞;NSCs 组和 NSCs + EPCs 组 3、7 d Brdu 阳性细胞主要集中在针迹部位;14 d Brdu 阳性细胞数最多,散在分布,部分与周围组织整合;30、60 d 阳性细胞数有所下降,细胞与周围组织充分整合;各时间点 Brdu 阳性细胞数 NSCs + EPCs 组明显高于 NSCs 组($P < 0.05$)(表 1、图 2)。

表 1 NSCs 组和 NSCs + EPCs 组移植后不同时间点神经干细胞的增殖数比较 (个,$n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

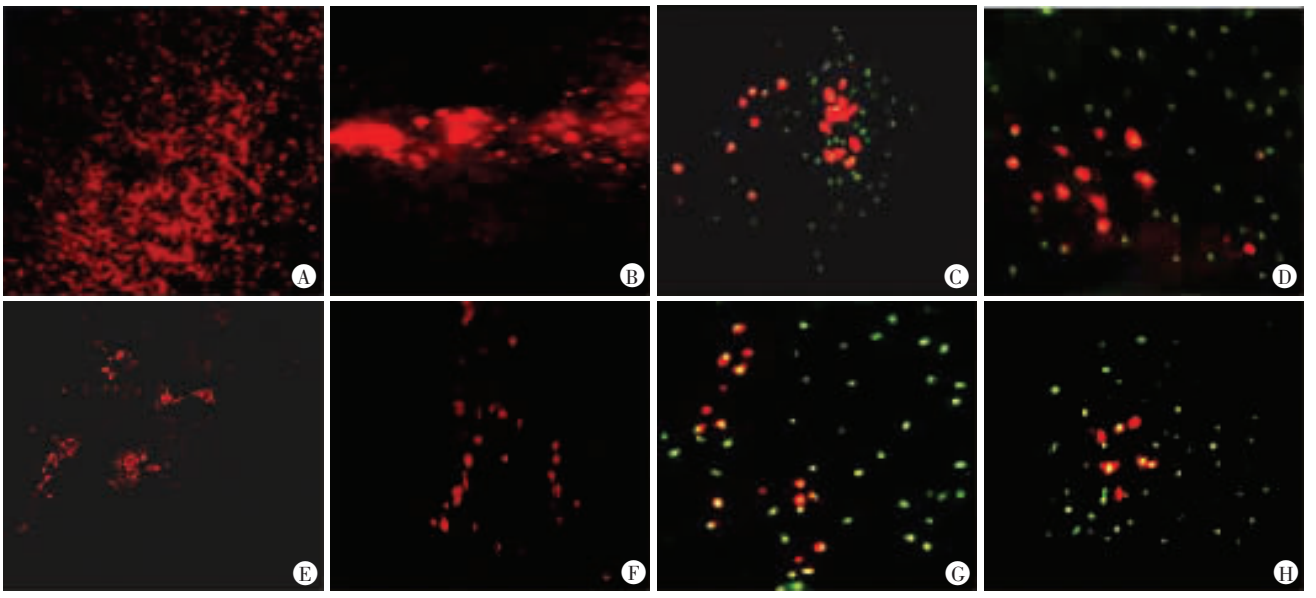
组别	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
NSCs 组	20.96 ± 3.58	28.74 ± 3.25	39.28 ± 5.52	22.65 ± 3.78	10.25 ± 2.63
NSCs + EPCs 组	38.64 ± 4.33[b]	45.38 ± 4.97[a]	58.32 ± 6.04[a]	30.56 ± 5.42[a]	19.35 ± 1.68[b]

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



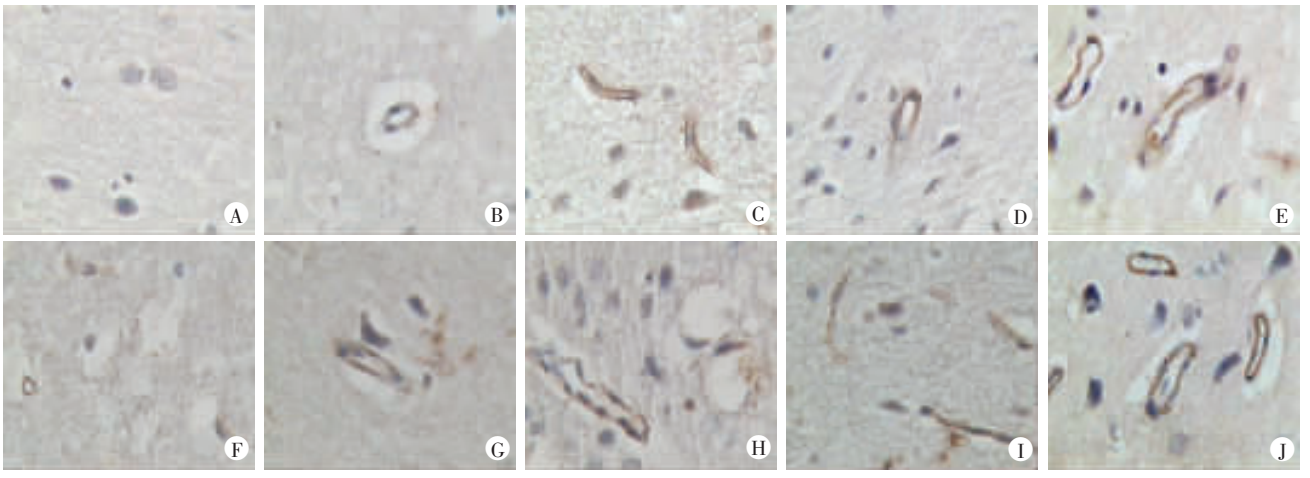
A、B、C:分别为 NSCs 组 3、14、30 d;D、E、F:分别为 NSCs + EPCs 组 3、14、30 d

图 2 NSCs 组和 NSCs + EPCs 组移入缺血半暗带不同时间点神经干细胞增殖情况 (SABC ×200)



A、E:缺血对照组3、7 d;B、F:EPCs组3、7 d;C、G:NSCs组3、7 d;D、H:NSCs+EPCs组3、7d

图3 各组移入缺血半暗带不同时间点神经干细胞凋亡情况 (荧光显微镜 ×200)



↑所示为新生血管 A、F:假手术组7、14 d;B、G:缺血对照组7、14 d;C、H:EPCs组7、14 d;D、I:NSCs组7、14 d;E、J:NSCs+EPCs组7、14 d

图4 免疫组化观察各组移入缺血半暗带不同时间点血管新生情况 (SABC ×100)

2.3 NSCs凋亡情况

Brdu阳性细胞胞核呈绿色荧光,Caspase-3阳性细胞胞质呈红色荧光。胞核呈绿色胞质呈红色为移入缺血半暗带的NSCs凋亡双阳性细胞。假手术组各时间点未见阳性细胞;缺血组对照组和EPCs组各时间点可见较多的Caspase-3单标阳性细胞,随时间延长阳性细胞减少;NSCs组和NSCs+EPCs组在3d时有缺血区有较多的双标阳性细胞,凋亡率较高。随时间的延长凋亡率均下降,且NSCs+EPCs组在各时间点的凋亡率明显低于NSCs组($P<0.05$)(表2、图3)。

表2 NSCs组和NSCs+EPCs组移植后不同时间点NSCs的凋亡率比较 (%, $n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
NSCs组	37.56±2.65	28.69±1.87	18.81±1.64	10.63±1.6	2.03±0.88
NSCs+EPCs组	26.64±3.24[a]	21.35±2.21[a]	9.23±1.04[b]	95.22±1.04[a]	0.56±0.02[a]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与NSCs组比较

2.4 新生血管检测结果

假手术组在各时间点无新生血管形成;EPCs组、缺血对照组和NSCs组3 d开始有新生血管生成,免疫组化DAB显色后,新生的血管是由单层扁平上皮细胞构成的,新生的血管内皮细胞的细胞质呈棕黄色,胞体扁平,呈单层管样排列,有的基底膜完整、有的不完整甚至无基底形成。7 d血管生成数量增加,14 d达高峰,30 d只有少量新生血管,60 d无新生血管;NSCs+EPCs组3 d血管新生明显,7 d达高峰,14 d高峰持续,30 d仍有明显新生血管,60 d可见少许新生血管,且各时间点NSCs+EPCs组血管新生数量明显多于EPCs组、缺血对照组和NSCs组($P<0.05$)(表3、图4)。

表3 各组移植后不同时间点新生血管数目比较 (个, $n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
假手术组	0	0	0	0	0
缺血对照组	4.35±1.34	12.04±2.54	17.68±3.21	2.15±0.62	1.04±0.26
NSCs组	3.87±0.95	13.06±2.65	18.81±2.05	2.05±1.02	1.12±0.38
EPCs组	5.23±1.30	18.56±1.67	22.68±3.55	3.65±0.95	2.33±1.08
NSCs+EPCs组	9.65±1.77[b]	21.47±3.27[a]	28.34±3.29[a]	5.63±1.17[b]	2.67±1.18[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与NSCs组比较

3 讨论

神经干细胞的移植在缺血性脑血管疾病治疗中的作用已经明确,但植入缺血区的神经干细胞分发生依赖于 bax 基因启动的凋亡和"失巢"凋亡。其原因单纯将神经干细胞植入缺血半暗区,神经干细胞不具备足够的神经因子分泌能力使细胞营养供应不足和细胞间微信号调节中断而引发了相关基因表达。这使神经干细胞在缺血性脑血管疾病的应用受到限制的主要因素。Asahara 等[5]首次从人外周血中分离 EPCs,并可分化为成熟内皮细胞的特殊血细胞,具有归巢能力、分泌功能和参与出生后血管再生等特性。Rehman 等[6]研究发现 EPCs 能够分泌多种细胞因子,如血管内皮生长因子、粒细胞克隆刺激因子、粒巨细胞克隆刺激因子等。其分化成熟后也可以分泌一些可溶性细胞因子,如胰岛素样生长因子(insulin-like gowth factor 1, IGF-1)、白细胞干扰素、血小板衍生生长因子、转化生长因子、粒细胞克隆刺激因子等[7]。在 EPCs 及其分化成熟细胞分泌的一些因子中,如胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子等能促进神经干细胞的增殖抑制其凋亡[8,9]。层黏连蛋白是一种神经细胞外基质,其对神经干细胞有保护作用减少其凋亡,还模拟类神经生长因子的营养神经的作用,促进神经干细胞增殖,并通过模拟体内环境解决失巢凋亡的发生[10]。本实验结果显示,在早期将 EPCs、层粘连蛋白和 NSCs 复合体移入大鼠缺血半暗带后,神经干细胞增殖较单纯神经干细胞移植增多且凋亡减少,这与 EPCs 的旁分泌和其与层黏连蛋白共同构成神经干细胞生存的微环境有关。后期由于移入的内皮祖细胞加快了脑缺血区血管重建的发生,进一步改善了移入脑内神经干细胞的生存条件。本实验也发现在复合体移植 1 个月后脑缺血半暗区仍有移入的神经干细胞增生,且凋亡细胞明显少于单纯神经干细胞移植组。

血管新生和神经再生是通过相同的因子进行调控协同和信号的相互联系,这些因子主要括包括碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growthfactor, bFGF)、血管内皮生长因子、IGF-1 和转化生长因子 Q 等,内皮细胞分泌的已知可作用于神经元的有丝分裂原和分化存活的因子有 bFGF、IGF-l、血管内皮生长因子、血小板源性生长因子和脑源性生长因子(brain-derived neurotrophicf -actor, BDNF)。在血管新生中产生的神经因子对神经干细胞保护作用的同时,神经干细胞分泌的因子如 BDNF、胶质源性生长因子和神经因子等[11,12],也可以促进新生血管的形成。本实验发现 EPCs、层黏连蛋白和神经干细胞复合体移入缺血半暗带后血管新生的度明显高于单纯 EPCs 移植。这也说明血管新生和神经发生具有协同作用。

EPCs、层粘连蛋白和神经干细胞复合体移植入脑缺血半暗带后,EPCs 及其成熟体分泌的因子可促进新生血管的形成,同时也促进移入脑内神经干细胞的增殖。其形成的血管为神经干细胞的生存提供了一个持续的良好的生存环境,同时神经干细胞分泌的因子也加速了血管的新生。这样可将神经发生和血管再生有机结合起来,发挥神经替代和神经缺损修复作用,促进神经结构的重建,从而达到神经功能的最大限度的康复。

参考文献:

[1] Taupin P. Stroke-induced neurogenesis: physiopathology and mechanisms[J]. Curr Neurovasc Res, 2006, 3(1): 67-72.

[2] Toda H, Takahashi J, Iwakami N, *et al*. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats[J]. Neurosci Lett, 2001, 316(1): 9-12.

[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] Longa E Z, Weinstein P R, Carilson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[5] Asahara T, Masuda H, *et al*. Bone marrow qrigin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization[J]. Circ Res, 1999, 85: 221-228.

[6] Rehman J, Li J, Orschell C M, *et al*. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors[J]. Circulation, 2003, 107(8): 1164-1169.

[7] Kucknoor A S, Mundodi V, Alderete J F. The proteins secreted by Trichomonas vaginalis and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65[J]. Cell Microbiol, 2007, 9(11): 2586-2597.

[8] Ayuso S A, Moliterno J A, Kratovac S, *et al*. Activated EGFR signaling increases proliferation, survival, and migration and blocks neuronal differentiation in post-natal neural stem cells[J]. J Neurooncol, 2009, 95(24): 2417-2422.

[9] Zhou X M, Yuan H P, Wu D L, *et al*. Study of brain-derived neurotrophic factor gene transgenic neural stem cells in the rat retina[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(14): 1642-1649.

[10] Zhan M, Zhao H, Han Z C. Signalling mechanisms of anoikis[J]. Histol Histopathol, 2004, 19(3): 973-983.

[11] Niles L P, Armstrong K J, Rincon-Castro L M, *et al*. Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers[J]. BMC Neurosci, 2004, 5(1): 41.

[12] 王岩峰, 吕刚, 李雷, 等. 神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后胶质细胞源性神经营养因子与生长相关蛋白 43 基因表达的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2005, 19(6): 416-419.

(**收稿**:2009-09-26;**修回**:2009-10-20)

(编辑 张 维)