DOI:10.16016/j.1000-5404.201601152

上调脑内脑衰反应调节蛋白2的表达促进了脑缺血再灌注大鼠神经再生

幸享凤,王恬竹,王 玉,张融融,秦新月 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨脑衰反应调节蛋白2(collapsin response mediator protein 2,CRMP2)对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经元丢失及神经再生的影响及其可能的机制。**方法** 将60只成年雄性SD大鼠分成4组:假手术组(sham)、脑缺血/再灌注组(MCAO)、脑缺血+质粒对照组(MCAO+GFP)、脑缺血+CRMP2真核表达质粒组(MCAO+CRMP2)。将质粒注射入各组大鼠脑内,1 d后建立大鼠大脑中动脉缺血(middle cerebral artery occlusion,MCAO)/再灌注模型,术后5~7 d腹腔注射5-乙炔基-2′脱氧尿嘧啶核苷(5-ethinyl deoxidization uracil nucleoside-2′,Edu),免疫荧光检测各组大鼠MAP2、GFAP、Edu标记细胞的阳性率及Nestin/Edu双标记阳性细胞的表达;采用Western blot检测CRMP2、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF)及N-甲基-D-天冬氨酸受体2B(N-methyl-D-aspartate receptor 2B,NMDAR2B)的表达;免疫组化检测CRMP2的表达及其神经功能评分。**结果** 与sham组相比,脑缺血再灌损伤使MAP2表达降低($P<0.05$),GFAP表达增高($P<0.05$),同时促进了Edu标记阳性细胞[(62.00±7.65)、(62.60±7.06)]及Nestin/Edu标记阳性细胞[(31.60±5.50)、(31.60±5.40)]的表达($P<0.05$)。而CRMP2真核质粒干预之后降低了GFAP的表达($P<0.05$),且升高了MAP2的表达($P<0.05$),还进一步促进了Edu标记阳性细胞(100.20±11.52)及Nestin/Edu标记阳性细胞(57.20±4.80)的表达($P<0.05$)。与sham组相比,MCAO及MCAO+GFP组BDNF及NMDAR2B的表达明显升高($P<0.05$);经CRMP2真核质粒干预后,BDNF表达进一步增高($P<0.05$),NMDAR2B的表达被部分削弱($P<0.05$)。CRMP2真核质粒干预后神经功能评分较MCAO及MCAO+GFP组明显改善($P<0.05$)。**结论** CRMP2减少了大鼠脑缺血再灌注损伤后神经元的丢失;促进了大鼠脑缺血再灌注损伤后内源性神经干细胞的增殖,而其对BDNF及NMDAR2B的调节可能是其作用机制的一部分。

[关键词] 脑衰反应调节蛋白2;脑缺血再灌注;神经再生;BDNF;NMDAR2B
[中图法分类号] R341;R364.3;R743.31 [文献标志码] A

Up-regulation of collapsin response mediator protein 2 promotes neurogenesis in rats after cerebral ischemia/reperfusion injury

Xing Xiangfeng, Wang Tianzhu, Wang Yu, Zhang Rongrong, Qin Xinyue (Department of Neurology, Chongqing Key Laboratory of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) on the neuronal loss and neurogenesis in the rats after cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury and investigate its possible mechanisms. **Methods** A total of 60 adult male SD rats were divided into 4 groups, that is, sham operation group, cerebral I/R group (middle cerebral artery occlusion, MCAO), cerebral ischemia with blank plasmid control group (MCAO+GFP group), and cerebral ischemia with CRMP2 eukaryotic plasmid group (MCAO+CRMP2 group). In 1 d after the injection of corresponding plasmids, the cerebral I/R model was established. In 5 to 7 d after the operation, 5-ethinyl deoxidization uracil nucleoside-2′ (Edu) was injected intraperitoneally into these rats. Then the expression of MAP2, GFAP, Edu and Nestin/Edu was tested by immunofluorescence assay. The expression levels of CRMP2, brain derived

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81200900)
[通信作者] 王恬竹,E-mail:dolphin820916@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.r.20160407.0836.018.html(2016-04-07)

neurotrophic factor (BDNF) and N-methyl-D-aspartate receptor 2B (NMDAR2B) were detected by Western blotting. The location of CRMP2 was tested by immunohistochemical staining. Neurological function was also evaluated. **Results** Compared with the sham group, cerebral I/R injury decreased the expression level of MAP2 ($P<0.05$), while increased that of GFAP ($P<0.05$), as well as the numbers of Edu (62.00 ± 7.65, 62.60 ± 7.06) and Edu/Nestin (31.6 ± 5.50, 31.6 ± 5.40) positive cells in the MCAO and MCAO + GFP groups ($P<0.05$). Intervention of CRMP2 eukaryotic plasmid increased the expression of MAP2 ($P<0.05$), inhibited the expression of GFAP ($P<0.05$), and boosted the amounts of Edu (100.20 ± 11.52) and Nestin/Edu (57.20 ± 4.80) positive cells ($P<0.05$). Compared with the sham group, the expression levels of BDNF and NMDAR2B were obviously increased in the MCAO and MCAO + GFP groups ($P<0.05$). After the intervention of CRMP2 eukaryotic plasmid, the expression of BDNF was further enhanced ($P<0.05$), and NMDAR2B was partly alleviated ($P<0.05$). The neurological scores were improved significantly in the MCAO + CRMP2 groups than the other groups ($P<0.05$). **Conclusion** CRMP2 may attenuate neuronal loss and promote the proliferation of the neural stem cells in rats after I/R injury, which might be due to the regulation of BDNF and NMDAR2B.

[**Key words**] collapsin response mediator protein 2; cerebral ischemia/reperfusion; neurogenesis; brain derived neurotrophic factor; N-methyl-D-aspartate receptor 2B

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81200900). Corresponding author: Wang Tianzhu, E-mail: dolphin820916@163.com

内源性神经干细胞(neural stem cell,NSC)具有改善卒中后神经功能缺损的潜能[1-2]。脑缺血损伤可促进脑室下区(sub ventricular zone,SVZ)成神经干细胞增殖迁移到损伤区域分化为成熟的神经细胞补充缺血区神经细胞的丢失[3]。而在成人甚至是年老的卒中患者中也已经证实脑卒中可以诱发神经再生。但是NSC的增殖非常有限,患者的神经功能恢复欠佳,所以找到一个有效的外源性干预手段来促进内源性神经细胞再生至关重要。课题组前期的研究已证实,缺血性脑损伤使缺血侧皮质内脑衰反应调节蛋白2(collapsin response mediator protein 2,CRMP2)表达下降,并不利于轴突修复;而阻断CRMP2的磷酸化有利于轴突再生[4]。其他研究发现,在大鼠大脑中动脉缺血(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型中病灶侧缺血半暗带及纹状体内的CRMP2的表达水平升高,可能与缺血后的神经再生有关[5];在人类免疫缺陷病毒相关性认知障碍研究中发现病毒相关蛋白Tat通过激活细胞周期依赖性蛋白激酶5(cyclin dependent kinase,CDK5)调节其下游因子CRMP2、Tau及神经元迁移蛋白(doublecortin,DCX),从而影响细胞的再生、迁移分化、血管新生及轴突重塑[6]。因此,我们推测CRMP2可能是一个能够调节内源性神经干细胞增殖的蛋白,但其具体的作用机制尚不明确。本实验采用立体定位注射CRMP2真核表达质粒的方式,使大鼠脑内CRMP2表达升高,探索CRMP2对大鼠缺血再灌注损伤后神经元及神经干细胞的影响及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及器材

CRMP2真核表达质粒pCDNA3.1+(上海生工),兔抗CRMP2(美国CST公司),兔抗β-actin(Proteintech),山羊抗兔二抗(碧云天公司),兔抗脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF,美国Abcam),兔抗DCX(Proteintech),兔抗微管相关蛋白2(microtubule associated protein 2,MAP2,Proteintech),兔抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP,Proteintech),Edu试剂盒(广州锐博)。大鼠脑立体定位仪(深圳瑞沃德)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物及分组 健康成年雄性SD大鼠60只,体质量200~250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,分为假手术组(sham)、缺血再灌注组(MCAO)、缺血再灌注加空白质粒组(MCAO+GFP)、缺血再灌注加CRMP2真核质粒干预组(MCAO+CRMP2,$n=15$),其中用于Western blot检测、荧光及组化检测、神经功能评分各5只大鼠。

1.2.2 脑立体定位注射 以前囟为坐标原点,右侧侧脑室注射的坐标点为1.2、-1.5、-4.5 mm。大鼠缺血再灌注模型手术前1 d进行立体定向手术,CRMP2真核表达质粒(160 ng/μL)或者空载体质粒(160 ng/μL)分别注射到对应组别的对应靶点,每个点注射质粒4 μL,注射速度为0.3 μL/min,注射完毕

后留针 5 min。

1.2.3 大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型制备 参照本课题组前期的实验操作方法[5]:大鼠经腹腔注射浓度为 10% 的水合氯醛(3.5 mL/kg),固定在操作台上,脑正中切口,分离出颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,游离颈外动脉,夹闭颈总和颈内动脉,将直径 0.20 mm、头端 0.40 mm 的栓从颈外缓慢逆行插入颈内动脉,在 17 ~ 19 mm 处感阻力,结扎固定线栓,2 h 后再灌注。结合 Longa 评分,1 ~ 3 分纳入实验,0、4 分以及取材有蛛网膜下腔出血者剔除,从同批次模型中随机补充。

1.2.4 Edu 标记神经细胞再生 建立缺血再灌注模型成功后,根据 Edu 染色试剂盒说明书提示,第 5、6 天注射浓度为 1 mg/mL 的 Edu 溶液(5 mg/kg),每天注射 2 次,第 7 天注射 1 次,4 h 后灌注取脑。

1.2.5 Western blot 检测 缺血再灌注 7 d 后将大鼠断头取脑,取右侧缺血区皮质液氮速冻后 -80 ℃保存。按照蛋白提取说明书提取总蛋白,计算蛋白浓度,配至 5 μg/μL。蛋白样品在浓度为 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中分离后,转移至 PVDF 膜上,浓度为 5 g/L 的脱脂牛奶封闭 90 min,CRMP2(55 ~ 65) × 10^3 一抗(1∶1 000)、BDNF(28 × 10^3)一抗(1∶400)及 N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B(N-methyl-D-aspartate receptor 2B,NMDAR2B)(166 × 10^3)一抗(1∶800)4 ℃ 孵育 18 h,山羊抗兔二抗(1∶1 000)37 ℃ 孵育 1 h 后,Fusion 软件扫描分析。

1.2.6 免疫荧光及免疫组化 为行免疫荧光双标记,Edu 标记后的大鼠在 7 d 灌注取脑,多聚甲醛固定,冰冻切片成厚 10 μm 的贴片,-80 ℃ 保存。切片,晾干,修复后,Nestin(1∶50)、MAP2(1∶50)及 GFAP(1∶100)一抗孵育,4 ℃过夜,山羊抗兔 FITC(1∶50)避光孵育 2 h,甘油封片或者加 Edu 染色试剂盒染色后甘油封片,而 Edu 单标则仅需 Edu 染色,甘油封片,共聚焦显微镜扫描并拍照。进行免疫组化染色的冰冻切片,-80 ℃ 拿出,晾干修复后,37 ℃,加 3% H_2O_2 孵育 20 min,封闭后加 CRMP2(1∶50)一抗孵育 4 ℃过夜,山羊抗兔二抗孵育 30 min,辣根过氧化物酶反应 30 min,DAB 染色加苏木精复染,最后中性树胶封片,拍照。

1.2.7 神经功能评分 采用 Shen 等[7]的评估方法,最低分为 3 分,最高分为 18 分,得分越低表示神经功能缺损越严重。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析,方差齐是两两比较行 LSD 检验,方差不齐时行 Tamhane 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 各组大鼠脑缺血侧皮质 MAP2 及 GFAP 的表达

与 sham 组相比,再灌注后 7 d,MCAO 组大鼠可见明显的神经元丢失及大量胶质细胞的激活。MCAO + GFP 组大鼠皮质 MAP2 及 GFAP 的表达与 MCAO 组无明显差异($P > 0.05$)。而 CRMP2 真核质粒干预后,MAP2 表达增多($P < 0.05$),GFAP 的表达明显减少($P < 0.05$)。结果见图 1,表 1。

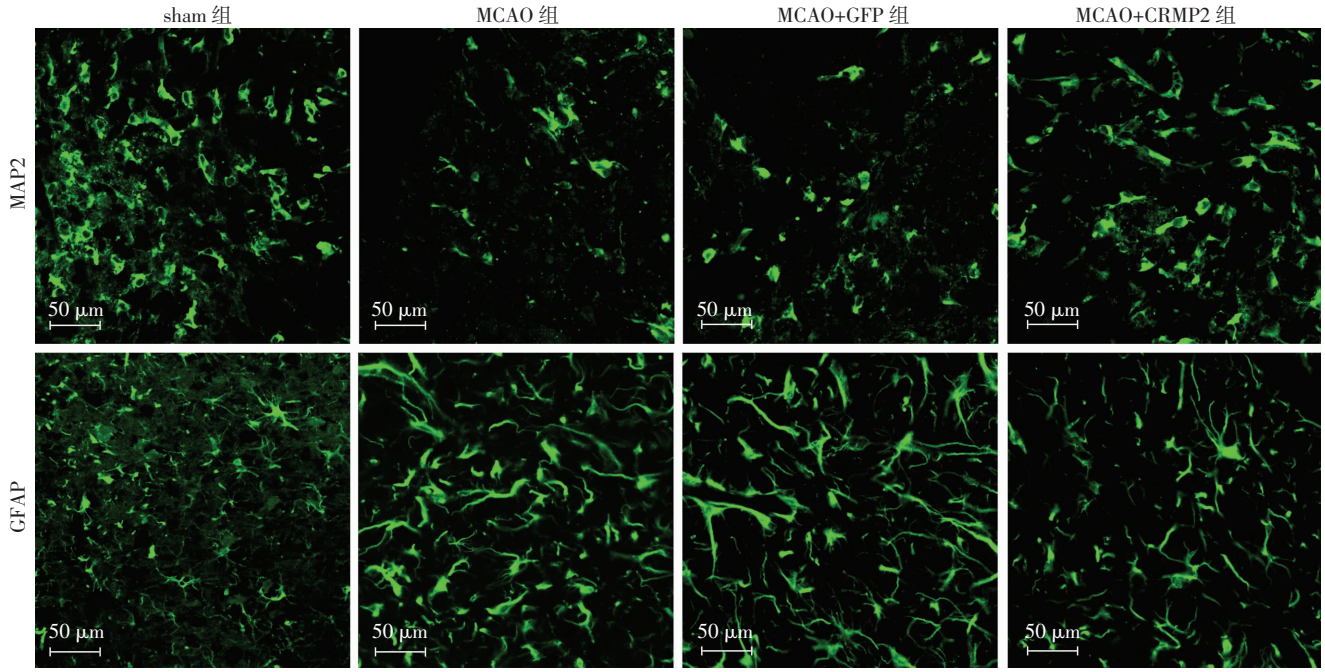


图 1 脑缺血再灌注 7 d 各组大鼠缺血皮质 MAP2 及 GFAP 的表达情况 (免疫荧光)

表 1　脑缺血再灌注 7 d 各组大鼠 MAP2 及 GFAP 的相对表达量($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	MAP2	GFAP
sham 组	118.20±13.00	12.20±5.63
MCAO 组	47.00±8.69[a]	80.00±7.90[a]
MCAO+GFP 组	48.40±8.44[ab]	80.60±7.91[ab]
MCAO+CRMP2 组	76.20±6.76[ac]	59.40±3.65[ac]

a:$P<0.05$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 MCAO+CRMP2 组比较;c:$P<0.05$,与 MCAO 组比较

2.2　各组大鼠 SVZ 及缺血侧皮质 Edu 标记的阳性细胞数

共聚焦结果显示,与假手术比较,脑缺血再灌注损伤促进了 SVZ 及缺血侧皮质 Edu 标记阳性细胞的表达($P<0.05$);而 CRMP2 真核质粒干预之后 Edu 标记阳性细胞在这两个部位的表达量较其余 3 组均明显增多($P<0.05$),提示过表达的 CRMP2 可促进神经细胞增殖(表 2,图 2)。

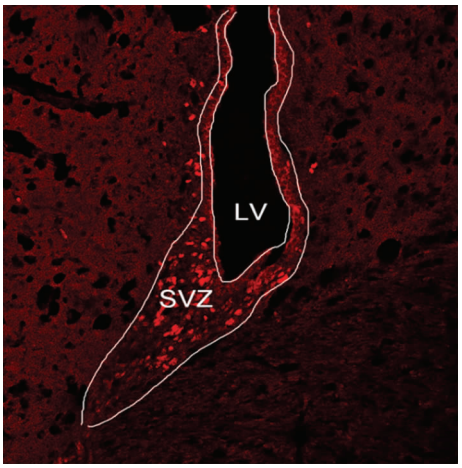
表 2　脑缺血再灌注 7 d 各组大鼠 SVZ 及缺血侧皮质 Edu 标记阳性细胞的相对表达量($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	SVZ	缺血侧皮质
sham 组	5.60±2.07	3.00±2.23
MCAO 组	62.00±7.65[a]	39.60±7.92[a]
MCAO+GFP 组	62.60±7.06[ab]	39.60±8.44[ab]
MCAO+CRMP2 组	100.20±11.52[ac]	96.80±6.30[ac]

a:$P<0.05$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 MCAO+CRMP2 组比较;c:$P<0.05$,与 MCAO 组比较

2.3　各组大鼠 SVZ Nestin/Edu 双标细胞观察

免疫荧光双标结果显示,缺血再灌注后 7 d,MCAO 组及 MCAO+GFP 组 Nestin[(31.60±5.50) *vs* (0.80±0.84)]与 Edu[(31.60±5.40) *vs* (0.80±0.84)]的双标数量较 sham 组明显增多($P<0.05$),而两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。过表达 CRMP2 之后 Nestin 与 Edu 的双标数量(57.20±4.80)较其余 3 组明显增多($P<0.05$),提示 CRMP2 促进了内源性神经干细胞的增殖(图 3~5)。



LV:侧脑室;SVZ:脑室下区

图 4　脑缺血再灌注 7 d 后 MCAO 组大鼠 Edu 标记的侧脑室形态观察　(激光共聚焦显微镜 ×100)

2.4　各组大鼠缺血侧皮质 CRMP2、BDNF 及 NMDAR2B 蛋白表达

与 sham 组相比,MCAO 及 MCAO+GFP 组 CRMP2 表达明显降低($P<0.05$),而 BDNF 及 NMDAR2B 的表达明显升高($P<0.05$)。与其余 3 组比较,CRMP2 真核质粒干预后上调了 CRMP2 的表达,且使 BDNF 表达进一步增高($P<0.05$);同时降低了 NMDAR2B 的表达($P<0.05$,图 6,表 3)。

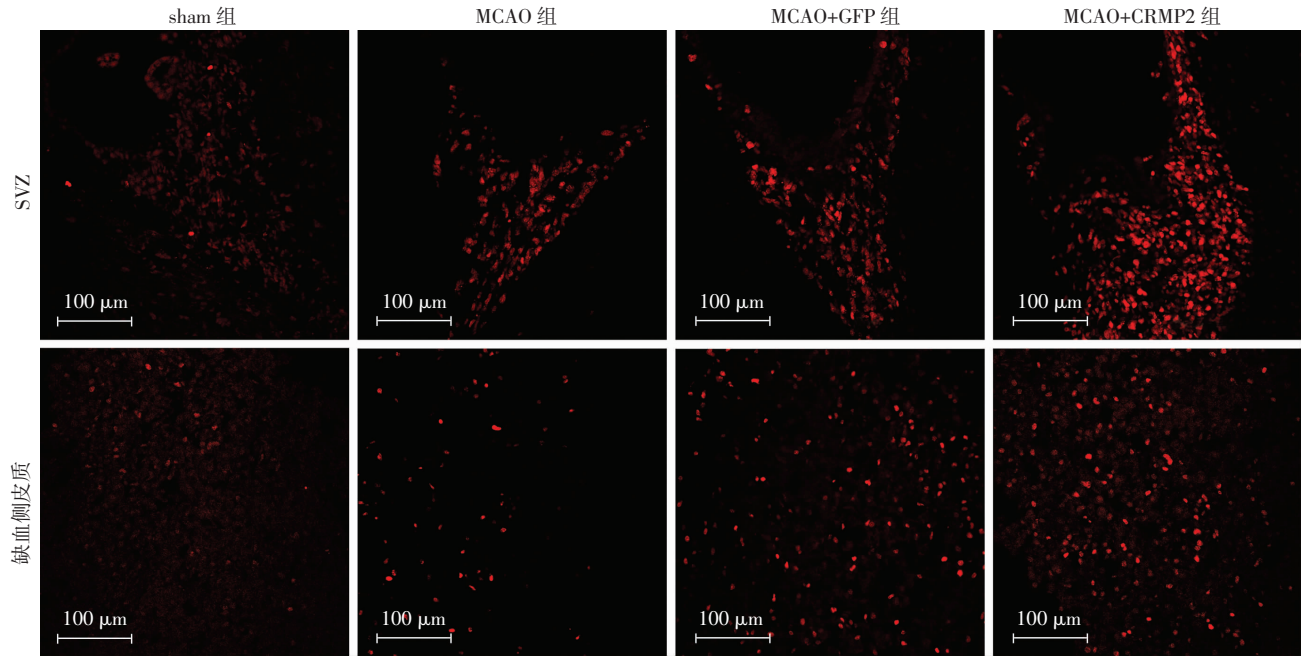


图 2　脑缺血再灌注 7 d 各组大鼠 SVZ 及缺血侧皮质 Edu 标记阳性细胞的表达　(免疫荧光)

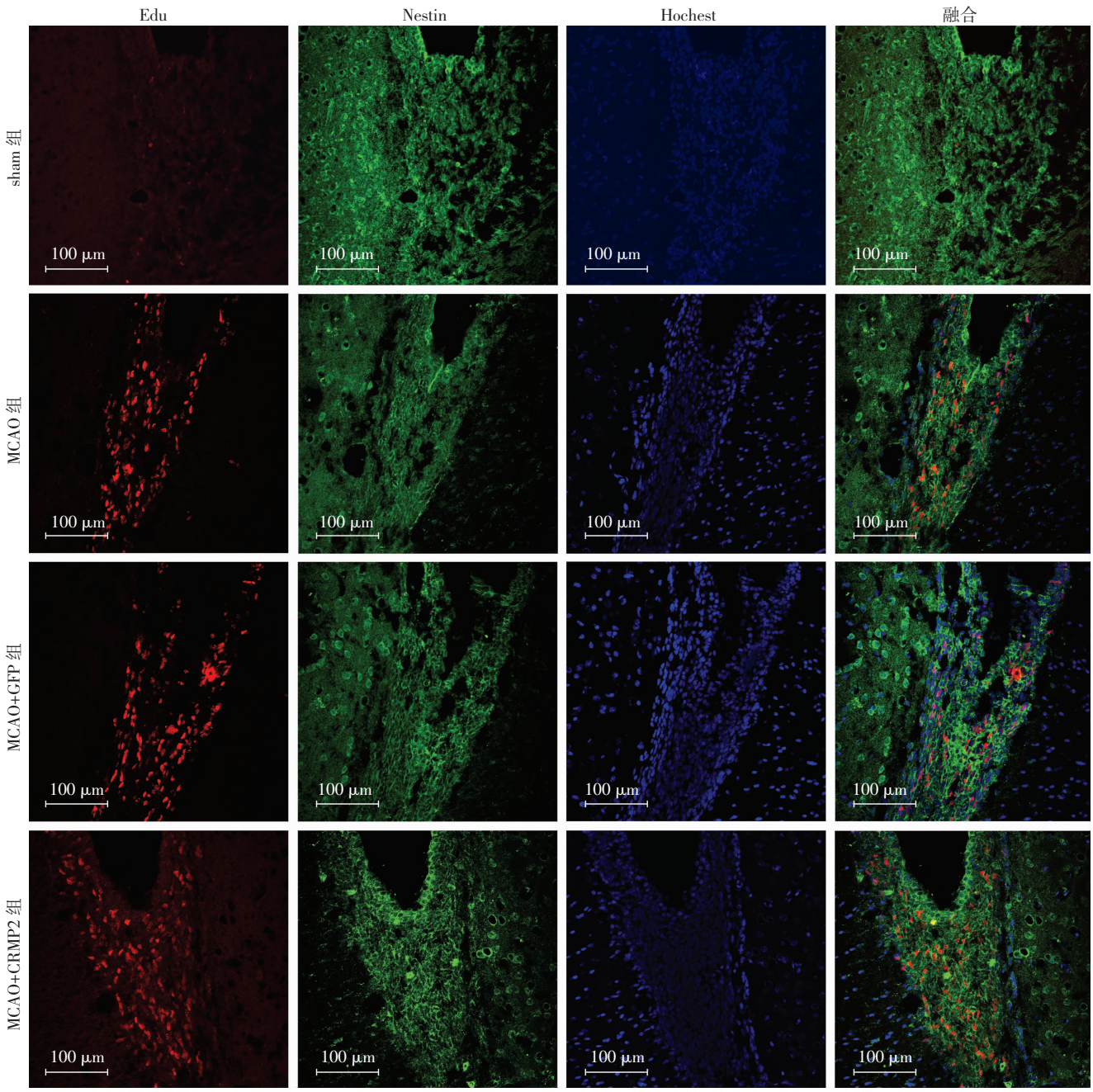
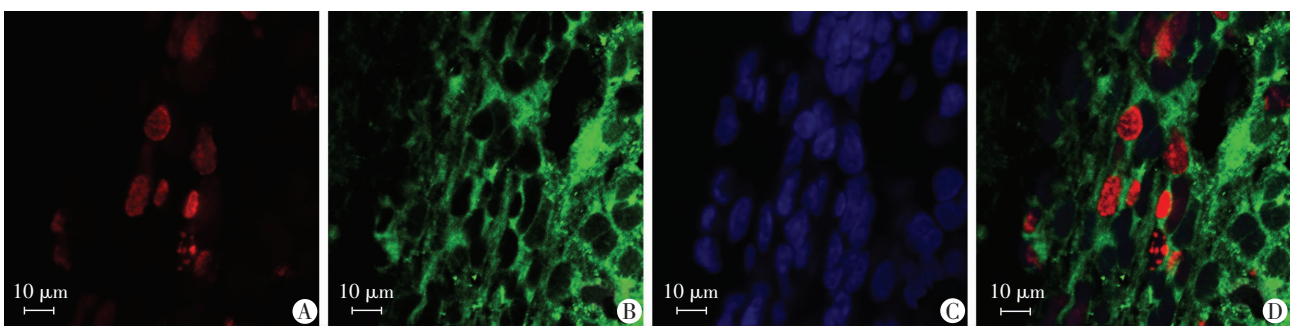
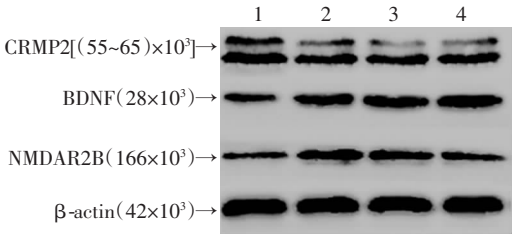


图 3　脑缺血再灌注后 7 d 各组大鼠 Nestin 与 Edu 双标记细胞形态观察　（免疫荧光）



A：Edu；B：Nestin；C：Hochest；D：融合

图 5　脑缺血再灌注 7 d 后 Nestin 与 Edu 双标记细胞形态观察　（免疫荧光）



1:sham 组;2:MCAO 组;3:MCAO + GFP 组;4:MCAO + CRMP2 组

图 6 脑缺血再灌注 7 d 各组大鼠脑组织 CRMP2、BDNF 及 NMDAR2B 的表达

表 3 脑缺血再灌注 7 d 各组大鼠脑组织 CRMP2、BDNF 及 NMDAR2B 的蛋白水平($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	CRMP2 蛋白灰度比值	BDNF 蛋白灰度比值	NMDAR2B 蛋白灰度比值
sham 组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
MCAO 组	0.52 ± 0.14[a]	2.16 ± 0.22[a]	1.52 ± 0.07[a]
MCAO + GFP 组	0.52 ± 0.14[ab]	2.18 ± 0.21[ab]	1.53 ± 0.07[ab]
MCAO + CRMP2 组	0.85 ± 0.08[ac]	3.28 ± 0.19[ac]	1.27 ± 0.05[ac]

a:$P<0.05$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 MCAO + CRMP2 组比较;c:$P<0.05$,与 MCAO 组比较

2.5 免疫组化观察 CRMP2 的表达部位

再灌注后 7 d,通过免疫组化染色观察到 CRMP2 表达部位,结果显示 CRMP2 主要在细胞质表达(图 7)。

2.6 神经功能评估

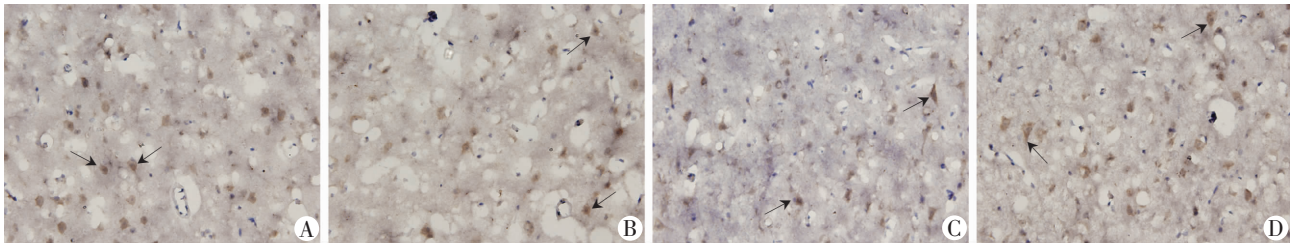
MCAO 组(8.98 ± 0.92)和 MCAO + GFP 组(8.86 ± 1.11)脑缺血再灌注后 7 d,与 sham 组(17.23 ± 0.31)相比,显示出严重的神经功能缺损($P<0.05$);而给予 CRMP2 真核质粒干预后,大鼠神经功能评分较 MCAO 组、MCAO + GFP 组有明显改善[(11.96 ± 1.23),$P<0.05$]。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤的病理过程极为复杂,包括兴奋性氨基酸毒性、离子不平衡、氧化应激、炎症反应、自噬、凋亡和细胞坏死等[8],导致大量的神经细胞丢失;同时使星形胶质细胞活化并增生形成反应性星形胶质细胞,部分形成胶质瘢痕,作为一个物理屏障阻碍轴突再生,同时释放大量的炎症介质进一步损伤神经细胞[9]。在对大鼠缺血性脑损伤的研究中发现 CRMP2 可能具有多重的神经保护作用[4,10]。NSC 在卒中后的神经修复潜能已经得到肯定[1-3],而 CRMP2 可能对其增殖有一定的影响[6-7]。

类似前期研究结果[4,10],本实验结果证实缺血损伤后大鼠皮质 CRMP2 的表达较 sham 组明显降低。而 CRMP2 真核质粒干预后,CRMP2 的表达量较 MCAO 组明显升高,证实真核质粒干预后,能使大鼠缺血侧脑组织 CRMP2 表达上调。脑缺血损伤可使 CRMP2 在体内磷酸化,致使 pCRMP2 表达增加,而 CRMP2 表达下调,该变化不利于轴突再生[4]。同时缺血后的兴奋性毒性反应及 NMDA 受体表达的上调将激活钙调蛋白酶(calpain),从而裂解全长 CRMP2(64×10^3),生成 55×10^3 的短 CRMP2[11];大部分神经系统疾病损伤均将导致轴突退化,而轴突退化研究中发现 CRMP2 可被 calpain 酶解生成 58×10^3 的片段[12]。CRMP2 具有多个 calpain 酶解位点[12],被酶解后的片段还可发生核异位,而脑缺血损伤所诱发的酶解发生于哪些位点,是否有更小的降解片段目前尚不清楚。由此,我们推测,脑缺血损伤后 CRMP2 表达降低可能与其被磷酸化及酶解等有关。

本实验将 CRMP2 真核表达质粒转染到大鼠颅内后,观察了缺血后神经元及胶质细胞的数量以及其对 SVZ 内神经干细胞增殖的影响。结果表明,缺血再灌注后 7 d,过表达 CRMP2 使神经元丢失减少,同时抑制了胶质细胞的过度活化,提示 CRMP2 可改善缺血性脑损伤对神经细胞结构及分布的破坏,为神经修复提供良好的内环境。本研究发现,CRMP2 促进了 SVZ 及缺血皮质 Edu 标记阳性细胞的表达,提示 CRMP2 可促



A: sham 组; B: MCAO 组; C: MCAO + GFP 组; D: MCAO + CRMP2 组 ↑:示阳性细胞

图 7 免疫组化观察脑缺血再灌注 7 d 各组大鼠 CRMP2 的表达 (SABC ×400)

进脑缺血再灌注后神经细胞的增殖,调动了神经修复的启动。同时,过表达 CRMP2 促进了 SVZ Nestin/Edu 标记阳性细胞的表达,提示 CRMP2 促进了内源性神经干细胞的增殖。此外,过表达 CRMP2 还减轻了神经功能缺损。

为了对 CRMP2 的作用机制有进一步的认识,本实验还检测了 BDNF 在各组大鼠脑组织中的表达,发现脑缺血再灌注后 BDNF 表达升高,而过表达 CRMP2 使 BDNF 进一步升高。BDNF 已经被证实可通过其受体 TrkB 介导内源性神经干细胞的再生[13];还可通过依赖细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)方式激活转录因子 NF-κB[14],后者是神经细胞再生的重要调节因子[15]。有研究证实 CRMP2 可调节 BDNF 受体 TrkB 向轴突终端的传送[16],实现 BDNF 的信号传导,从而我们推测,CRMP2 促进神经再生可能是通过上调 BDNF 的表达来实现的,其具体调节方式可能是通过 CRMP2/BDNF/ERK/NF-κB 信号通路来完成。

有研究表明,采用 NMDAR 抑制剂 MK801 抑制其表达之后可促进成年大鼠神经细胞的增殖[17];同时发现用甲基苯丙胺上调 NMDAR2B 的表达抑制了神经细胞的增殖[18-19]。这些均证明 NMDA 受体对神经再生的抑制效应。前期研究发现 CRMP2 酶解后可降低细胞表面 NMDAR2B 的表达[11]。本实验证实,脑缺血再灌注损伤之后 NMDAR2B 表达升高,而上调 CRMP2 抑制了其表达,同时促进了神经再生。由此,我们推测 CRMP2 还可能通过抑制 NMDAR2B 的表达促进神经细胞的再生。而有研究发现,NMDA 受体的过度激活可通过转录激活 NF-κB[20],抑制 NMDA 受体的表达能够上调 BDNF 及其受体 TrkB 及 P75 的表达,而这种效应能被 ERK 抑制剂所抑制[21]。结合前面的结果,我们进一步推测 CRMP2 可能是通过调节 NMDA 受体及 BDNF 的表达促进神经细胞再生。

综上所述,上调 CRMP2 的表达可改善神经细胞的病理损伤,为神经修复提供良好的内环境,同时还可促进神经细胞的再生,说明 CRMP2 具有多重的神经调节作用,可能是一个具有巨大神经保护潜能的蛋白分子。这些作用可能与 CRMP2 调节了 BDNF 及 NMDAR2B 的信号传递有关,我们将在以后的研究中对其进行更深入地探讨。

参考文献:

[1] Peron S, Berninger B. Imported Stem Cells Strike against Stroke[J]. Cell Stem Cell, 2015, 17(5): 501-502. DOI: 10.1016/j.stem.2015.10.006

[2] Lindvall O, Kokaia Z. Neurogenesis following stroke affecting the adult brain[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(11). pii: a019034. DOI: 10.1101/cshperspect.a019034

[3] Luo J, Hu X, Zhang L, *et al*. Physical exercise regulates neural stem cells proliferation and migration *via* SDF-1α/CXCR4 pathway in rats after ischemic stroke[J]. Neurosci Lett, 2014, 578: 203-208. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.06.059

[4] Wang T, Wu X, Yin C, *et al*. CRMP-2 is involved in axon growth inhibition induced by RGMa *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(3): 903-913. DOI: 10.1007/s12035-012-8385-3

[5] Indraswari F, Wong P T, Yap E, *et al*. Upregulation of Dpysl2 and Spna2 gene expression in the rat brain after ischemic stroke[J]. Neurochem Int, 2009, 55(4): 235-242. DOI: 10.1016/j.neuint.2009.03.005

[6] Fields J A, Dumaop W, Crews L, *et al*. Mechanisms of HIV-1 Tat neurotoxicity *via* CDK5 translocation and hyper-activation: role in HIV-associated neurocognitive disorders[J]. Curr HIV Res, 2015, 13(1): 43-54.

[7] Shen L, Miao J, Yuan F, *et al*. Overexpression of adiponectin promotes focal angiogenesis in the mouse brain following middle cerebral artery occlusion[J]. Gene Ther, 2013, 20(1): 93-101. DOI: 10.1038/gt.2012.7

[8] Li H, Liu X, Zhu Y, *et al*. Magnolol derivative 002C-3 protects brain against ischemia-reperfusion injury *via* inhibiting apoptosis and autophagy[J]. Neurosci Lett, 2015, 588: 178-183. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.01.007

[9] Yuan J, Zou M, Xiang X, *et al*. Curcumin improves neural function after spinal cord injury by the joint inhibition of the intracellular and extracellular components of glial scar[J]. J Surg Res, 2015, 195(1): 235-245. DOI: 10.1016/j.jss.2014.12.055

[10] Nada S E, Tulsulkar J, Shah Z A. Heme oxygenase 1-mediated neurogenesis is enhanced by Ginkgo biloba (EGb 761) after permanent ischemic stroke in mice[J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(2): 945-956. DOI: 10.1007/s12035-013-8572-x

[11] Bu X, Zhang N, Yang X, *et al*. Proteomic analysis of cPKCβⅡ-interacting proteins involved in HPC-induced neuroprotection against cerebral ischemia of mice[J]. J Neurochem, 2011, 17(2): 346-356. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07209.x

[12] Touma E, Kato S, Fukui K, *et al*. Calpain-mediated cleav-

age of collapsin response mediator protein(CRMP)-2 during neurite degeneration in mice[J]. Eur J Neurosci, 2007, 26(12): 3368-3381.

[13] Vilar M, Mira H. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles[J]. Front Neurosci, 2016, 10: 26. DOI: 10.3389/fnins.2016.00026

[14] Ortega F, Perez-Sen R, Morente V, *et al*. P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(10): 1723-1733. DOI: 10.1007/s00018-010-0278-x

[15] Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain[J]. Front Mol Neurosci, 2015, 8: 69. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00069

[16] Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, *et al*. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with SlP1 and Rab27[J]. Dev Cell, 2009, 16(5): 675-686. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.03.005

[17] Gao Z Y, Yang P, Huang Q J, *et al*. The influence of dizocilpine on the reserpine-induced behavioral and neurobiological changes in rats[J]. Neurosci Lett, 2016, 614: 89-94. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.006

[18] Singhakumar R, Boontem P, Ekthuwapranee K, *et al*. Melatonin attenuates methamphetamine-induced inhibition of neurogenesis in the adult mouse hippocampus: An *in vivo* study[J]. Neurosci Lett, 2015, 606: 209-214. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.09.011

[19] Ekthuwapranee K, Sotthibundhu A, Govitrapong P. Melatonin attenuates methamphetamine-induced inhibition of proliferation of adult rat hippocampal progenitor cells *in vitro*[J]. J Pineal Res, 2015, 58(0): 418-428. DOI: 10.1111/jpi.12225

[20] Delavallee L, Cabon L, Galan-Malo P, *et al*. AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics[J]. IUBMB Life, 2011, 63(4): 221-232. DOI: 10.1002/iub.432

[21] Yu W, Zhu H, Wang Y, *et al*. Reactive Transformation and Increased BDNF Signaling by Hippocampal Astrocytes in Response to MK-801[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0145651. DOI: 10.1371/journal.pone.0145651

(**收稿**:2016-01-27;**修回**:2016-03-22)

(编辑 栾 嘉)