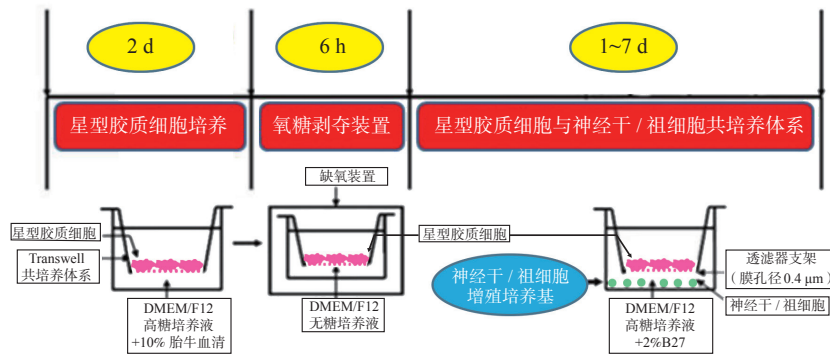


· 实验研究 ·

氧糖剥夺-再灌注星型胶质细胞内皮素-1过表达对神经干/祖细胞增殖的影响

程晓 杨家杰 钟金淑子

结构式摘要



【摘要】 目的 探讨氧糖剥夺-再灌注(OGD-R)星型胶质细胞内皮素(ET)-1过表达对神经干/祖细胞(NSPCs)增殖的影响。方法 构建阴性对照星型胶质细胞(C6-Mock)和ET-1过表达的星型胶质细胞(C6-ET-1) OGD-R模型,并构建星型胶质细胞与NSPCs Transwell共培养体系。对星型胶质细胞及原代NSPCs进行形态观察及鉴定;将细胞分为以下4组进行共培养:C6-Mock+NSPCs组,OGD-R+C6-Mock+NSPCs组,C6-ET-1+NSPCs组,OGD-R+C6-ET-1+NSPCs组,共培养0、24、48、72 h,分析各组NSPCs神经球直径。结果 C6-Mock及C6-ET-1均呈现I型星型胶质细胞的纤维状形态,神经胶质酸性纤维蛋白(GFAP)表达于这两种细胞的胞质中。原代NSPCs的巢蛋白(nestin)染色阳性。共培养后的48 h及72 h,OGD-R+C6-Mock+NSPCs组神经球的直径明显大于C6-Mock+NSPCs组的直径,OGD-R+C6-ET-1+NSPCs组神经球的直径明显大于C6-ET-1+NSPCs组的直径,同时OGD-R+C6-ET-1+NSPCs组神经球的直径明显大于OGD-R+C6-Mock+NSPCs组的直径,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。结论 OGD-R星型胶质细胞促进NSPCs的增殖,且ET-1过表达进一步促进了NSPCs的增殖。

【关键词】 星型胶质细胞;神经干/祖细胞(NSPCs);内皮素(ET)-1;氧糖剥夺-再灌注(OGD-R);巢蛋白;增殖;Transwell共培养;神经球直径

【中图分类号】 R742 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2018)02-0005-06

Effect of oxygen glucose deprivation-reperfusion in astrocytes overexpressing endothelin-1 on the proliferation of neural stem/progenitor cells Cheng Xiao*, Yang Jiajie, Sookjia Kim Chung. *Department of Neurology, Guangdong Province Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.02.005

基金项目: 国家自然科学基金(81303115、81774042、81771353); 广东省自然科学基金(S2013040016915); 广州市科技计划(201604020003); 中国博士后项目(BBK42913K09、201003345、BBH429151701); 香江学者计划

作者单位: 510120 广州, 广东省中医院神经科(程晓); 香港大学李嘉诚医学院(杨家杰、钟金淑子)

作者简介: 程晓, 女, 1983年生, 博士, 副教授, 研究方向为中西医结合脑血管病临床及基础, Email: chengxiaolucky@126.com

通讯作者: 钟金淑子, 女, 1956年生, 博士, 教授, 研究方向为干细胞与脑血管病, Email: 28868599@qq.com

Corresponding author: Sookjia Kim Chung, Email:28868599@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of oxygen glucose deprivation-reperfusion (OGD-R) in astrocytes overexpressing endothelin (ET)-1 on the proliferation of neural stem/progenitor cells (NSPCs). **Methods** OGD-R models of negative control astrocytes (C6-Mock) and astrocytes over-expressing ET-1 (C6-ET-1) were constructed. Transwell co-culture system of astrocytes and NSPCs was established. Morphologic observation and identification of the astrocytes and primary NSPCs were performed. The cells were divided into four groups: C6-Mock+NSPCs, OGD-R+C6-Mock+NSPCs, C6-ET-1+NSPCs and OGD-R+C6-ET-1+NSPCs groups and co-cultured for 0, 24, 48 and 72 h respectively. The diameter of neurosphere was measured in each group. **Results** In the C6-Mock and C6-ET-1 cells, type I astrocytes in fibrous morphology were observed. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) was expressed in the cytoplasm of these two types of cells. Primary NSPCs were positive for nestin staining. After co-culture for 48 and 72 h, the neurosphere diameter in the OGD-R+C6-Mock+NSPCs group was significantly greater than that in the C6-Mock+NSPCs group. The neurosphere diameter in the OGD-R+C6-ET-1+NSPCs group was considerably greater than that in the C6-ET-1+NSPCs group. The neurosphere diameter in the OGD-R+C6-ET-1+NSPCs group was significantly greater compared with that in the OGD-R+C6-Mock+NSPCs group (all $P < 0.05$). **Conclusions** OGD-R astrocytes can promote the proliferation of NSPCs. ET-1 over-expression further accelerates the proliferation of NSPCs.

【Key words】 Astrocyte; Neural stem/progenitor cells (NSPCs); Endothelin (ET)-1; Oxygen glucose deprivation-reperfusion (OGD-R); Nestin; Proliferation; Transwell co-culture; Neurosphere diameter

神经干/祖细胞 (neural stem/progenitor cells, NSPCs) 的发现为神经细胞移植治疗神经系统损伤和退行性变提供了有效的移植体^[1]。NSPCs 是中枢神经中具有分裂潜能和自我更新能力的一类细胞, 它可增殖及分化成神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞。近年来的研究发现, 在成人的中枢系统中, 例如侧脑室壁、海马齿状回、室管膜下区、嗅球和脊髓等处, 存在 NSPCs 并且观察到神经细胞再生^[2]。同时有研究证明了 NSPCs 的生理分化具有定向性, 可以分化成神经元以维持正常的神经细胞代谢。在神经系统病理性损伤如脑缺血、脊髓损伤、帕金森病等神经退行性疾病情况下, 会伴随内源性神经干细胞的激活, 但内源性干细胞修复能力不足^[3]。因此, 通过外源性干细胞的移植促进神经系统病理损伤后神经功能恢复的研究成为焦点。神经再生的微环境是脑内 NSPCs 增殖和分化的重要场所, 所以 NSPCs 增殖和分化的调控因素已成为 NSPCs 移植研究的核心问题。

大量研究发现, 脑缺血-再灌注损伤 (IRI) 后损伤的局部会出现 NSPCs 的自发增殖^[4-5], 但其原因尚未明确。研究表明脑缺血损伤的局部常常伴随星形胶质细胞的反应性增殖, 而作为神经再生环境的重要组成部分的星形胶质细胞, 对 NSPCs 再生的调控发挥重要作用^[6-9]。星形胶质细胞在正常生理条件下不表达内皮素 (endothelin, ET)-1, 但是在脑缺血

损伤时星形胶质细胞中 ET-1 表达增多^[10], ET-1 作为血管收缩剂及有丝分裂因子^[11-12], 在我们的前期研究已证实脑缺血损伤后 ET-1 过表达可以引起神经发生区 NSPCs 的增殖, 因此本研究在体外细胞水平构建氧糖剥夺-再灌注 (oxygen glucose deprivation-reperfusion, OGD-R) 模型模拟在体脑 IRI 模型, 进一步探讨在体外 OGD-R 环境下星形胶质细胞过表达 ET-1 对 NSPCs 增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

DI TNCI 星形胶质细胞株购自美国 ATCC 公司。无特定病原体 (SPF) 级成年昆明小鼠 30 只, 周龄 6~8 周, 由香港大学李嘉诚医学院实验动物中心提供。星形胶质细胞培养采用的 DMEM/F12 高糖培养液及 DMEM 无糖培养液均购自美国 Gibco 公司。原代 NSPCs 培养采用的 DMEM/F12 培养液另添加的 B27、N2、双抗、L-谷氨酰胺、D-葡萄糖、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 及表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 均购自美国 Gibco 公司。兔抗神经胶质酸性纤维蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体及兔抗巢蛋白 (nestin) 抗体均购自英国 Abcam 公司, Transwell 共培养体系购自美国 Millipore 公司。

1.2 ET-1 过表达及阴性对照星型胶质细胞株的构建及培养

本课题组前期已成功构建阴性对照星型胶质细胞 (C6-Mock) 和 ET-1 过表达的星形胶质细胞 (C6-ET-1)^[13]。C6-ET-1 细胞是通过共转染 ET-1 表达质粒 (pGET) 和含有嘌呤霉素抗性基因质粒 (pPUR) 构建, 该种细胞 ET-1 的表达是 DI TNCI 细胞的 21 倍。星形胶质细胞的嘌呤霉素抗性克隆采用 pGET 稳定整合的基因组 DNA 通过聚合酶链反应 (PCR) 来筛选。两种细胞置于 DMEM 高糖完全培养液中 (含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 g/L 链霉素), 在 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养, 每隔 2 d 换液 1 次, 待单层培养细胞生长至 80% 汇合后以 0.25% 胰蛋白酶消化传代培养。传代比例依据细胞生长的密度来定, 一般以 1:4~1:2 为宜, 传代期间 2~3 d 更换培养液, 用吸管小心吸出培养液, D-Hanks' 液清洗 2~3 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶置于 37 °C 培养箱中消化数秒, 待显微镜下观察细胞突起回缩, 细胞形态变圆, 细胞间隙变大, 在细胞尚未漂起时立即加入适量 DMEM 高糖完全培养液中和胰蛋白酶中止消化, 用吸管轻轻吹打使细胞脱落并与消化液混匀, 500×g 离心 3 min 收集细胞沉淀, 按传代比例稀释后置于新的培养瓶中继续培养。待细胞稳定贴壁培养 24 h 后进行星形胶质细胞标志物 GFAP 鉴定。

1.3 原代 NSPCs 的培养

出生 6~8 周的成年小鼠, 消毒后在 D-Hanks' 液的平皿中取出侧脑室下区的脑组织, 反复洗涤, 剪成碎组织块后移至离心管中, 用抛光的直头细滴管轻轻吹打后使之成为细胞悬液, 并通过尼龙网过滤, 以除去粘连的纤维组织, 将收集的细胞悬液离心后, 重悬于生长液中, 用滴管再次吹打, 经计数和活力观察, 将密度调至 1×10⁶/mL, 并以 1×10⁵/mL 的密度接种于培养瓶中。在 37 °C、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养, 直到 7~9 d NSPCs 分裂、增殖形成较大的神经细胞球后再作传代处理, 每隔 3 d 换液 1 次, 待细胞稳定贴壁培养 24 h 后进行 NSPCs 标志物 nestin 鉴定。

1.4 免疫荧光组织化学鉴定星型胶质细胞及 NSPCs

按 2×10⁴/mL 的细胞密度将星形胶质细胞和 NSPCs 接种于 96 孔培养板中, 过夜贴壁后进行免疫荧光组织化学染色鉴定, 简要步骤如下: 4% 多聚甲醛固定 15 min, 然后用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 0.3% TritonX-100, 0.1% 牛血清白蛋白

(PBS 配制) 室温孵育 30 min。分别滴加兔抗 GFAP 的一抗 (1:5 000) 及兔抗 nestin 的一抗 (1:200), 4 °C 过夜, 阴性对照组用 PBS 来代替一抗。清洗后滴加抗兔四甲基异硫氰酸罗丹明 (tetramethyl rhodamin isothiocyanate, TRITC) 标记的二抗 (1:500) 或抗兔异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的荧光二抗 (1:500), 室温避光孵育 2 h。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。荧光显微镜下观察并摄片。

1.5 氧糖剥夺 - 再灌注星型胶质细胞培养模型的建立

将 C6-Mock 细胞和 C6-ET-1 细胞的培养液更换为不含糖 DMEM 于 95%N₂、5%CO₂ 混合气中预平衡 1 h。置入密闭恒温缺氧培养装置 6 h 后, 以常规培养液替换不含糖培养液, 置回入含 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.6 星型胶质细胞与 NSPCs 的 Transwell 共培养体系的建立

将 C6-Mock 细胞和 C6-ET-1 细胞培养按 1×10⁵/mL 的密度培养在 Transwell 体系的上室 2 d, 后置于缺氧装置 6 h, 将原代 NSPCs 接种于共培养 Transwell 体系的下室, 膜孔径为 0.4 μm 上下室的培养液能相互通融。第 3 日换液 1 次。

1.7 实验分组与神经球直径测量

将细胞分为以下 4 组进行共培养: C6-Mock+NSPCs 组 (C6-Mock 细胞与 NSPCs 共培养), OGD-R+C6-Mock+NSPCs 组 (C6-Mock 细胞 OGD-R 后与 NSPCs 共培养), C6-ET-1+NSPCs 组 (C6-ET-1 细胞与 NSPCs 共培养), OGD-R+C6-ET-1+NSPCs 组 (C6-ET-1 细胞 OGD-R 后与 NSPCs 共培养)。在倒置显微镜下观察 NSPCs 的形态变化, 共培养 0、24、48、72 h 拍摄神经球图片, 各组同一显微倍数下随机选取 20 个视野, Image J 软件计算神经球直径, 数据用于神经球直径分析。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差表示, 多组比较采用 ANOVA 方差分析, 两组间比较采用 *t*' 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 星型胶质细胞的形态及鉴定

相差显微镜下, C6-Mock 和 C6-ET-1 的形态无明显差异, 均显示 I 型星型胶质细胞的纤维状形态,

大部分细胞有完整的胞质，突触不多呈扁平状，有些细胞呈现多边形结构（图 1）。免疫荧光组织化学检测发现 GFAP 恒定表达于 C6-Mock 和 C6-ET-1 的细胞胞质中，几乎全部的细胞胞浆都表达 GFAP（图 2）。

2.2 原代 NSPCs 的形态及鉴定

相差显微镜下观察体外培养的神神经球，可见神经球悬浮生长，呈桑葚状，细胞透光性良好，立体感强，中心细胞密度较大，边缘有分裂的细胞突起于神经球表面（图 3），结果显示离体培养神经球显示 nestin 阳性表达（绿光），结合我们取材部位为成年小鼠的侧脑室下区，培养条件为 NSPCs 培养及神经球的形态，表明我们所培养的细胞球为神经球。

2.3 星型胶质细胞与 NSPCs 共培养不同时间神经球直径的比较

通过检测神经球的直径来观察 NSPCs 的增殖，

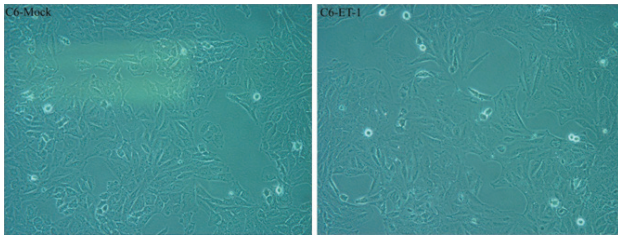
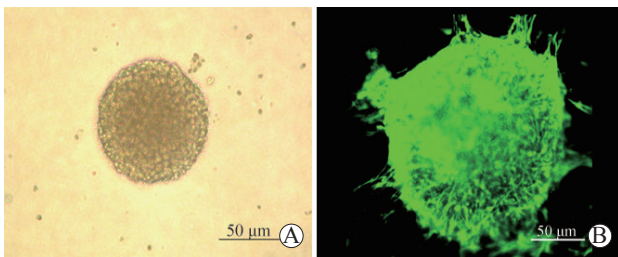


图 1 相差显微镜下 C6-Mock 和 C6-ET-1 细胞的形态（ $\times 200$ ）

Figure 1 Morphology of C6-Mock and C6-ET-1 under phase contrast microscope



A 图为相差显微镜下的 NSPCs 神经球；B 图为荧光显微镜下的 NSPCs 神经球

图 3 相差显微镜和荧光显微镜下原代培养神经球的形态及 nestin 表达

Figure 3 Nestin expression and morphology of primary culture neurosphere under phase contrast microscope and fluorescence microscope

结果显示，C6-Mock+NSPCs 组、OGD-R+C6-Mock+NSPCs 组、C6-ET-1+NSPCs 组、OGD-R+C6-ET-1+NSPCs 组共培养后随着培养时间的延长，NSPCs 均有增殖，在共培养后的 0、24 h 各组 NSPCs 神经球的直径差异均无统计学意义（均为 $P>0.05$ ），但是在共培养后的 48、72 h，OGD-R+C6-Mock+NSPCs 组 NSPCs 神经球的直径明显大于 C6-Mock+NSPCs 组，OGD-R+C6-ET-1+NSPCs 组神经球的直径明显大于 C6-ET-1+NSPCs 组，差异均有统计学意义（均为 $P<0.05$ ），同时 OGD-R+C6-ET-1+NSPCs 组 NSPCs 神经球的直径亦明显大于 OGD-R+C6-Mock+NSPCs 组，差异均有统计学意义（均为 $P<0.05$ ），详见图 4。

结果说明星型胶质细胞在缺糖缺氧状态下能促进 NSPCs 的增殖，而且星型胶质细胞在缺糖、缺氧状态下对 NSPCs 增殖的影响与 ET-1 有关。

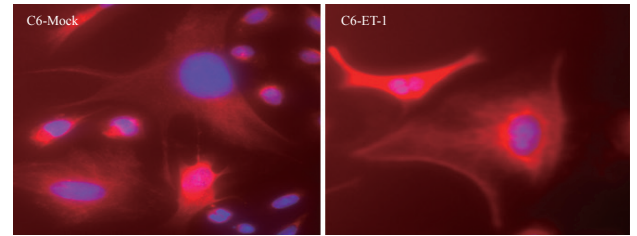
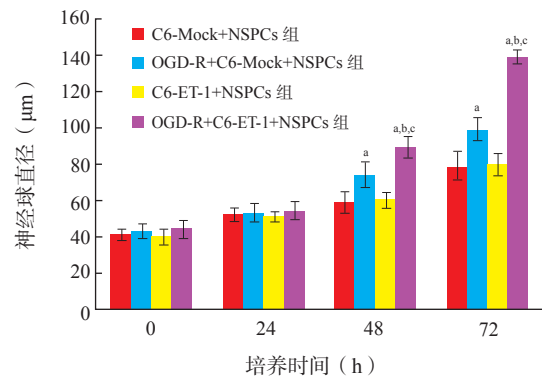


图 2 荧光显微镜下 C6-Mock 和 C6-ET-1 的 GFAP 表达（免疫荧光， $\times 400$ ）

Figure 2 GFAP expression of C6-Mock and C6-ET-1 under fluorescence microscope



与 C6-Mock+NSPCs 组比较，^a $P<0.05$ ；与 OGD-R+C6-Mock+NSPCs 组比较，^b $P<0.05$ ；与 C6-ET-1+NSPCs 组比较，^c $P<0.05$

图 4 各组细胞共培养不同时间神经球直径的比较

Figure 4 Comparison of the diameter of neurospheres among each group of cells at different time after co-culture

3 讨 论

NSPCs 的发现为神经细胞移植治疗神经系统损伤和退行性变提供了有效的移植物,可移植神经细胞株的培育,为神经细胞损伤或变性的修复提供了新的手段,但其修复也面临许多问题。主要是移植后的环境不利于修复的发生和发展,包括:(1)可移植神经细胞株的衰老和死亡。(2)促进修复的因素,如神经营养因子的缺乏。(3)存在抑制修复的分子。

(4)胶质瘢痕阻碍移植细胞的迁移和血管的重新生长。修复损伤或变性的神经细胞主要策略就是针对上述因素加以干预^[14-16],其中研究 NSPCs 增殖和分化的调控因素已成为 NSPCs 研究的核心问题。目前用 NSPCs 治疗中枢神经系统损伤主要通过两个途径:一是诱导病变局部 NSPCs 自身的增殖和分化;二是体外分离、培养诱导 NSPCs 并移植入病变局部区域^[17]。我们前期动物研究证实星型胶质细胞本身并不表达 ET-1,但是在脑缺血损伤后星型胶质细胞 ET-1 表达明显上调^[13]。我们体外构建星型胶质细胞 ET-1 过表达基因调控脑缺血损伤模型,发现星型胶质细胞 ET-1 过表达脑缺血损伤鼠出现更严重的神经功能缺损及脑梗死面积^[18],同时该鼠脑缺血损伤后脑内干细胞发生区 NSPCs 增殖明显增多,因此我们认为星型胶质细胞 ET-1 过表达刺激了脑缺血损伤后 NSPCs 的增殖,在此研究的基础上,本实验的体外共培养研究再次证实了这一结论。

促进 NSPCs 增殖的因素很多种,而且各因素之间也是相辅相成、相互协调,同时这也是研究干细胞的核心问题。近年来,大量研究证实脑内存在 NSPCs 增殖和分化的重要场所,即神经再生微环境分化的重要场所,其中星型胶质细胞作为神经再生微环境的重要组成部分对调控 NSPCs 的增殖和分化起着重要作用^[6-9]。研究表明,脑 IRI 后新生的 NSPCs 可被诱导迁移到星型胶质细胞活化的损伤区,并在星型胶质细胞作用下进一步增殖、分化,参与脑组织的修复。目前星型胶质细胞如何影响 NSPCs 的增殖尚不清楚,研究证实脑 IRI 后星型胶质细胞可以通过释放高迁移率族蛋白 B1 促进 NSPCs 的增殖和脑的发育^[19]。有研究报道星型胶质细胞可以通过分泌细胞生长及营养因子促进 NSPCs 的增殖和分化^[20],星型胶质细胞也可以在梗塞灶局部增殖活化,并形成胶质瘢痕及释放多种炎症因子,参与炎症反应^[9,21]。临床研究证实脑

卒中患者血浆、脑脊液、脑组织及星型胶质细胞内 ET-1 表达都升高^[22]。

综上所述,本研究发现星型胶质细胞内 ET-1 表达升高促进了 NSPCs 的增殖,为脑 IRI 后星型胶质细胞促进 NSPCs 增殖过程的机制提供了实验依据,也为星型胶质细胞内 ET-1 过表达对脑 IRI 的影响机制提供了体外实验依据。

参考文献:

- [1] DOOLEY D, VIDAL P, HENDRIX S. Immunopharmacological intervention for successful neural stem cell therapy: new perspectives in CNS neurogenesis and repair[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141(1): 21-31. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.08.001.
- [2] BUTTI E, CUSIMANO M, BACIGALUPPI M, et al. Neurogenic and non-neurogenic functions of endogenous neural stem cells[J]. *Front Neurosci*, 2014, 8:92. DOI: 10.3389/fnins.2014.00092.
- [3] YONEYAMA M, SHIBA T, HASEBE S, et al. Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration[J]. *J Pharmacol Sci*, 2011, 115(4): 425-432.
- [4] SIMS JR, LEE SW, TOPALKARA K, et al. Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation[J]. *Stroke*, 2009, 40(11): 3618-3626. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.561951.
- [5] NAKAGOMI T, TAGUCHI A, FUJIMORI Y, et al. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice[J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29(9): 1842-1852. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.06732.x.
- [6] GO HS, SHIN CY, LEE SH, et al. Increased proliferation and gliogenesis of cultured rat neural progenitor cells by lipopolysaccharide-stimulated astrocytes[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2009, 16(6): 365-376. DOI: 10.1159/000228911.
- [7] LEE C, HU J, RALLS S, et al. The molecular profiles of neural stem cell niche in the adult subventricular zone[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50501. DOI: 10.1371/journal.pone.0050501.
- [8] CAO X, LI LP, QIN XH, et al. Astrocytic adenosine 5'-triphosphate release regulates the proliferation of neural stem cells in the adult hippocampus[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(8): 1633-1643. DOI: 10.1002/stem.1408.
- [9] GUO Y, WEI Q, HUANG Y, et al. The effects of astrocytes on differentiation of neural stem cells are influenced by knock-down of the glutamate transporter,

- GLT-1[J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(5): 498-506. DOI: 10.1016/j.neuint.2013.08.003.
- [10] TSANG MC, LO AC, CHEUNG PT, et al. Perinatal hypoxia-/ischemia-induced endothelin-1 mRNA in astrocyte-like and endothelial cells[J]. *Neuroreport*, 2001, 12(10): 2265-2270.
- [11] YE H, WOLF RA, KURZ T, et al. Phosphatidic acid increases in response to noradrenaline and endothelin-1 in adult rabbit ventricular myocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 1994, 28(12): 1828-1834.
- [12] SAH SK, KIM BH, PARK GT, et al. Novel isonahocol E(3) exhibits anti-inflammatory and anti-angiogenic effects in endothelin-1-stimulated human keratinocytes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 720(1/2/3): 205-211.
- [13] HO MC, LO AC, KURIHARA H, et al. Endothelin-1 protects astrocytes from hypoxic/ischemic injury[J]. *FASEB J*, 2001, 15(3): 618-626.
- [14] RODRIGUEZ AL, BRUGGEMAN KF, WANG Y, et al. Using minimalist self-assembling peptides as hierarchical scaffolds to stabilise growth factors and promote stem cell integration in the injured brain[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(3): e1571-e1579. DOI: 10.1002/term.2582.
- [15] NGUYEN HX, HOOSHMAND MJ, SAIWAI H, et al. Systemic neutrophil depletion modulates the migration and fate of transplanted human neural stem cells to rescue functional repair[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(38): 9269-9287. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2785-16.2017.
- [16] PILTTI KM, FUNES GM, AVAKIAN SN, et al. Increasing human neural stem cell transplantation dose alters oligodendroglial and neuronal differentiation after spinal cord injury[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(6): 1534-1548. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.04.009.
- [17] 李明军, 张琦玮, 王维峰, 等. 神经干细胞的应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(29): 5709-5714.
- LI MJ, ZHANG QW, WANG WF, et al. Application of neural stem cells[J]. *Chin J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2008, 12(29): 5709-5714.
- [18] LO AC, CHEN AY, HUNG VK, et al. Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin 4 expression in astrocytic end-feet[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(8): 998-1011.
- [19] LI M, SUN L, LI Y, et al. Oxygen glucose deprivation/reperfusion astrocytes promotes primary neural stem/progenitor cell proliferation by releasing high-mobility group box 1[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(8): 1440-1450. DOI: 10.1007/s11064-014-1333-z.
- [20] ZHAO X, KUJA-PANULA J, ROUHIAINEN A, et al. High mobility group box-1 (HMGB1; amphoterin) is required for zebrafish brain development[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(26): 23200-23213. DOI: 10.1074/jbc.M111.223834.
- [21] 黄红云, 毛更生, 陈琳, 等. 神经修复临床细胞治疗现状与展望[J/CD]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2017, 7(3): 162-167. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2017.03.008.
- HUANG HY, MAO GS, CHEN L, et al. Current status and prospect of cell therapy in neurorestoration[J/CD]. *Chin J Cell Stem Cell(Electr Edit)*, 2017, 7(3): 162-167. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2017.03.008.
- [22] BARONE FC, GLOBUS MY, PRICE WJ, et al. Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, 14(2): 337-342.

(收稿日期: 2018-02-15)

(本文编辑: 邬加佳 朱佩玲)