

· 论 著 ·

EPO 基因修饰 MSCs 对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的治疗作用*

王文益¹, 赵聪敏^{1△}, 廖伟¹, 张红²

(1. 第三军医大学新桥医院儿科, 重庆 400037; 2. 解放军第三二四医院儿科, 重庆 400020)

摘要:目的 移植促红细胞生成素(EPO)修饰的骨髓间充质干细胞(MSCs)至新生儿缺氧缺血性脑损伤(HIBD)大鼠, 观察移植细胞 EPO 的表达及向神经元分化情况, 为治疗缺氧缺血性脑病提供实验基础。方法 构建大鼠 EPO 的真核表达质粒 pEGFP-N1/EPO, 用脂质体 2000 转染大鼠骨髓间充质干细胞, 免疫组化和 RT-PCR 检测 EPO 表达, 然后移植 7d HIBD 大鼠, 免疫组化检测体内 EPO 表达及 MSCs 向神经元分化情况。结果 酶切和测序鉴定证实重组表达质粒正确, 该质粒体外转染大鼠 MSCs 后可表达 EPO, 移植 EPO 修饰的 MSCs 体内能表达 EPO, 部分表达神经元特异标记神经特异性烯醇化酶(NSE)。结论 EPO 修饰的大鼠 MSCs 能在新生 HIBD 大鼠中存活并表达 EPO, 部分移植细胞呈现向神经元分化的趋势, 对新生 HIBD 大鼠有治疗作用。

关键词:促红细胞生成素; 真核表达载体; 骨髓间充质干细胞; 缺氧缺血性脑病; 神经元

中图分类号: R365.741

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2787-03

Therapeutic effect of EPO gene modified MSCs on HIBD rat

WANG Wei-yi¹, ZHAO Cong-min^{1△}, LIAO Wei¹, et al.

(Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

2. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

Abstract: Objective To transplant EPO modified MSCs to newborn hypoxic-ischemic brain damage(HIBD) rat, and to observe the EPO expression and differentiation to neuron of transplantation cell for providing the basis to further study on the treatment of HIBD. **Methods** We constructed eukaryotic expression plasmid vector pEGFP-N1/EPO, MSCs cells were transfected with the plasmid using Lipofectamine 2000. Then the expression of EPO protein was detected by immunohistochemistry techniques and RT-PCR. Then we transplanted MSCs to HIBD rat aged 7d, detected the expression of EPO protein and differentiation to neuron of transplantation cell of MSCs by immunohistochemistry techniques. **Results** The constructed recombinant plasmid contained the sequence of rat's EPO gene. After transfection with the plasmid, EPO protein could be expressed in MSCs cells in vivo and in vitro, partition MSCs could express specificity marker NSE of neuron. **Conclusion** EPO modified MSCs of rat can survive in newborn HIBD rat and express EPO; partition MSCs present the tendency of differentiation to neuron.

Key words: erythropoietin; eukaryotic expression plasmid; MSCs; hypoxic-ischemic brain damage; neurons

促红细胞生成素(EPO)是一种耐热的酸性糖蛋白, 能促进造血祖细胞增殖分化。近年来发现其具有阻断兴奋性氨基酸的毒性、抗神经细胞凋亡、抑制炎症反应、促进新生血管形成等效应, 在脑损伤的神经保护中起重要作用。因此, 作者构建真核表达载体 pEGFP-N1/EPO 并转染骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 检测其 EPO 的体内外表达, 并移植 MSCs 至新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)大鼠, 检测 MSCs 分化为神经元情况及大鼠行为学改善情况, 为进一步探讨治疗缺氧缺血性脑病提供实验基础。

1 材料与方

1.1 主要材料及试剂 克隆宿主菌 E. coli Competent Cells JM109 和克隆载体质粒 pEGFP-N1 购自 Invitrogen 公司, RNA reagent 反转录酶、琼脂糖、引物、High Fidelity PrimeScriptTMRT-PCR Kit、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC buffer、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit、TaKaRa DNA A-Tailing Kit、TaKaRa DNA Fragment Purification Kit、TaKaRa DNA Ligation Kit、pMD19-T Simple Vector、Hind III、Kpn I 内切酶及标准胎牛血清均购自天津 TBD 公司, DMEM/F12 培养基购

自美国 Hyclone 公司。Lipofect2000 购自 Invitrogen 公司, 质粒小量提取试剂盒及去内毒素质粒小量提取试剂盒购自北京博大泰克公司, 抗大鼠 CD44、CD45、CD90 抗体购自美国 santa 公司, 抗大鼠 EPO 单克隆抗体购于美国 R&D 公司, 神经特异性烯醇化酶(NSE)抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, G418 购自美国 Gibco 公司, 实验动物购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获取及 RT-PCR 从大鼠肾脏组织中提取 EPO 的 Total RNA, 由大连宝生物技术有限公司设计合成 4 条引物: 上游引物 F: 5'-CAG CAG CCA GGC GCG GA GAT-3', 下游引物 R: 5'-TGG AGG GTT GGC GTG ACA CAG T-3'。在引物中加入 Hind III /Kpn I 酶切位点。使用 High Fidelity PrimeScriptTMRT-PCR Kit, 取 1 μ L 大鼠肾脏组织提取的 EPO 的 Total RNA 为模板, 以 R 引物进行反转录, 反应程序: 65 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 冰上放置 2min 后, 加入 Prime Script RTase, 30 $^{\circ}$ C 反转录 10min, 42 $^{\circ}$ C 延伸 30min, 95 $^{\circ}$ C 灭活反转录酶 5min, 然后以上述的反转录液为模板, F/R 为引物, 加入 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 进行 PCR 扩增, 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10s, 60 $^{\circ}$ C 退火 5s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,

* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(CSCT, 2007BB5057)及重庆市 2009 计划生育自然科学基金资助项目(2009C175)。

△ 通讯作者, 电话: 68774602; E-mail: zhao_54@163.com。

30 个循环,末轮循环 72°C 聚合 10min。

1.2.2 PCR 产物纯化 (1)使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 切胶回收上述的 PCR 产物;(2)使用 TaKaRa DNA A-Tailing Kit 上 A 处理;(3)使用 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver. 2.0 精制,命名为 RPO-RT-PCR。

1.2.3 测序分析 克隆测序:使用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的连接酶,将 RPO-RT-PCR 与 pMD19-T Simple Vector 连接后,热转化至 E. coli Competent Cells JM109 中,涂布平板,37°C 过夜培养。挑选阳性菌落植菌,提取质粒并命名为 RPO-RT-PCR-T-1、RPO-RT-PCR-T-2。送大连宝生物公司,对 RPO-RT-PCR-T-1、RPO-RT-PCR-T-2 质粒测序。测序结果表明,RPO-RT-PCR-T-2 质粒符合预期要求。

1.2.4 目的基因亚克隆

1.2.4.1 用 Hind III 和 Kpn I 双酶切 RPO-RT-PCR-T-2 质粒及载体 pEGFP-N1(-)。 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 切胶回收目的片段,并取 1 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4.2 克隆及酶切验证 (1)克隆:使用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的连接酶,将目的片段与 pEGFP-N1 Vector 连接后,热转化至 E. coli Competent Cells JM109 中,涂布平板,37°C 过夜培养。挑选阳性菌落植菌,提取质粒并命名为 pEGFP-N1/EPO 质粒。(2)酶切验证:使用 Hind III/Kpn I 对 pEGFP-N1/EPO 质粒进行双酶切鉴定,全量电泳;重组子插入片段的序列测定由上海生工公司协助完成。

1.2.5 pEGFP-N1/EPO 体外表达 将细胞数对数生长期的 MSCs 细胞流式细胞仪鉴定纯度,以 1×10^5 /孔浓度接种于 6 孔板,待细胞融合达 90% 以上时,按脂质体 2000 转染常规步骤进行基因转染。转染后 24~48h 将贴壁生长细胞行 EPO 免疫组化染色,观察 pEGFP-N1/EPO 质粒转染后在细胞内 EPO 的表达情况。收集细胞行 RT-PCR,检测细胞中的 EPO mRNA 表达情况。

1.2.6 HIBD 大鼠模型的建立 参照 Rice 法,选择 P7 SD 大鼠,乙醚吸入麻醉后,置仰卧位,四肢头部固定,75%酒精消毒,做颈部正中切口,分离并结扎左侧颈总动脉,缝合皮肤后置于自制 1L 容积缺氧仓内,以氧氮混合气(氧浓度为 8%)1~2L/min 持续灌注 2.5h,制成 HIBD 模型。缺氧仓置于恒温水浴箱中,维持环境温度在 37~37.5°C。缺氧后将新生鼠放回母鼠身边常规喂养。缺氧缺血后出现自发左旋或夹尾左旋者纳入实验。

1.2.7 移植 MSCs 至 HIBD 大鼠模型并检测体内 EPO 表达, NSE 表达 G418(浓度 300 μ g/mL)筛选转染 EPO 基因的 MSCs,移植至 7d 龄 HIBD 大鼠脑组织,7d 后冰冻切片行 EPO 及 NSE 免疫组化染色,观察移植 MSCs 细胞 EPO 表达及分化为神经元情况。

1.2.8 移植大鼠远期学习记忆功能检测 各组新生鼠饲养至 1 月龄时用 Morris 水迷宫测试学习记忆功能。Morris 水迷宫组成:由圆形水池和自动录像记录系统两部分组成。水池为直径 120cm,高 50cm,水深 30cm 的圆形,水温保持(23 \pm 1) $^{\circ}$ C,池壁上标记 4 个等距离点 N、E、S、W,分水池为 4 个象限(NW、WS、SE、EN),任选一象限在中央放置平台(平台与池壁圆心距离相等),平台无色透明,直径 12cm,高 29cm,没于水下 1cm。测定前将鼠头用染发剂染黑,向泳池内加入奶粉(浓度为 0.5%~1.5%),使水呈白色不透明,平台不可见。迷宫外视觉线索相对固定(包括工作台、椅子、门、窗、书架及电灯等)。自动录像记录系统以电脑为核心,以图像采集卡、摄像机、图像监视器

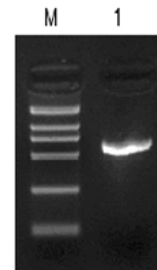
等为主要扩展硬件,同步纪录大鼠运动轨迹。利用图像软件包可完成数据采集和统计处理。

测试分为三部分:(1)定位航行实验(place navigation)。训练前 24h 将大鼠放入水迷宫中自由游泳 3min 以熟悉迷宫环境。实验历时 4d,每天在固定时间分上午、下午两个时间段,每个时间段训练 4 次。将平台置于 SE 象限,分别从池壁 4 个象限的中点放入水池,记录大鼠从入水至爬上平台的时间,即隐匿平台逃避潜伏期(escape latency, EL),至 90s 找不到平台,即将引其上平台,EL 记为 90s,让大鼠在平台上休息 30s,取 4 次训练 EL 平均值。取实验第 4 天 EL,计算各组均数。隐匿平台 EL 反映动物获得经验的能力,即学习能力。(2)空间探索实验(spatial probe)。第 5 天进行空间探索实验,撤除平台,将大鼠随机从某一象限池壁中点头朝池壁放入水中,记录 2min 穿越平台的次数。空间探索实验反映动物保持经验的能力,即记忆能力。(3)可见平台实验。为排除大鼠运动和感觉功能不同对实验的影响,第 6 天行可见平台实验,使平台露出水面,观察大鼠 EL。

1.3 统计学方法 所有数据以 SPSS10.0 统计软件分析处理。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因扩增结果 以大鼠 EPO 的 cDNA 为模板,以 F/R 为引物进行 2 次 PCR,扩增得到约 750 bp 的片段(图 1)。DNA 序列测定表明扩增片段的核苷酸序列与 GenBank 上的 EPO 编码区基因完全一致。



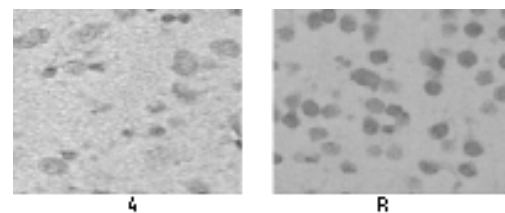
M:DL2,000 DNA Marker;1: RT-PCR 产物。

图 1 大鼠 EPO cDNA 琼脂糖电泳

2.2 重组质粒 pEGFPN1-EPO 的鉴定

2.2.1 双酶切验证 使用 Hind III/Kpn I 对重组质粒 pEGFPN1-EPO 进行双酶切鉴定,全量电泳,产生与 pEGFPN1、EPOcDNA 大小一致的片段。

2.2.2 测序鉴定 重组质粒 pEGFP-N1/EPO 送上海生工公司测序,测序结果显示重组质粒 pEGFP-N1/EPO 中插入的 EPO 序列与 GenBank 上的 EPO 编码区基因完全一致。



A:MSCs 胞核染成淡蓝色,胞浆染成红色,为表达 EPO 所致(免疫组化和 HE 复染 $\times 400$);B:部分 MSCs 分化,胞核染成淡蓝色,胞浆及胞膜染成赭色,为表达 nestin 所致(免疫组化和 HE 复染 $\times 400$)。

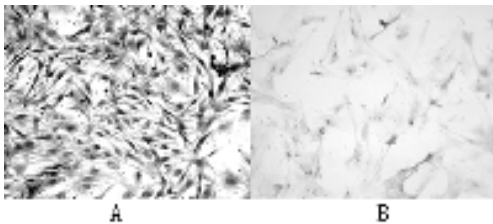
图 2 EPO 及 Nestin 在 HIBD 新生大鼠脑组织中的表达

2.3 大鼠 MSCs 流式细胞仪鉴定 大鼠 P5 MSCs 流式细胞

鉴定,CD44、CD90 表达阳性;CD45 表达阴性。

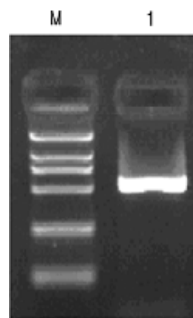
2.4 EPO 及 Nestin 在 HIBD 新生大鼠脑组织移植 MSCs 冰冻切片中的表达 脑组织冰冻切片示移植细胞胞质内 EPO 呈阳性反应,部分细胞 nestin 呈阳性反应(图 2)。

2.5 EPO 在 MSCs 细胞中的表达 重组质粒 pEGFP-N1/EPO 在脂质体 Lipofectamine 2000 介导下转染 MSCs 细胞,将转染后的细胞爬片行 EPO 免疫组化染色,结果显示,胞质内呈阳性反应(图 3)。提取转染后的细胞行 RT-PCR 检测细胞中的 EPO mRNA 表达情况,能扩增出和目的片段大小一致的片段(图 4)。表明 pEGFP-N1/EPO 质粒转染 MSCs 细胞后可表达 EPO 蛋白。



分泌 EPO 胞浆染成红色 A, MSCs 胞核染成淡蓝色(B),为含所致(免疫组化和 HE 复染×200)

图 3 转染重组质粒 pEGFP-N1/EPO 的大鼠 MSCs EPO 的体外表达



M:DL2,000 DNA Marker; 1:RT-PCR 产物。

图 4 转染重组质粒 pEGFP-N1/EPO 的大鼠 MSCs EPO mRNA RT-PCR

2.6 移植大鼠远期学习记忆功能检测结果(表 1)。

表 1 Morris 水迷宫实验结果

组别	n	EL 隐匿平台(s)	空间探索(次)	EL 可见平台(s)
假手术组	10	22.30±3.46 ^{△△}	4.9±1.91 [△]	12.47±3.75 [△]
缺氧缺血组	10	39.96±4.37	2.0±1.63	17.93±3.94
干预组	10	31.48±3.28 ^{△△*}	4.2±1.48 ^{△***}	16.67±3.19 ^{△△△*}

与缺氧缺血组比较,△: P<0.01,△△: P<0.001,△△△: P>0.05; 与假手术组比较,*: P<0.05,**: P<0.001,***: P>0.05。

3 讨论

新生儿 HIBD 发病率高,是造成新生儿死亡和儿童永久性神经功能障碍的重要原因。其发病机制尚不完全清楚,目前仍缺乏有效的防治手段。

EPO 是一种酸性糖蛋白,能刺激红系祖细胞增殖、分化与成熟,1985 年人类 cDNA 被成功克隆,并利用基因重组技术制成重组人促红细胞生成素(recombinant humanerythropoietin, rHuEpo)用于临床贫血治疗。目前发现 EPO 不仅影响造血系统,而且在应激时对机体发挥重要的保护作用,有利于生物体保持各系统稳态。

在动物实验中, Kim 等^[1]亦发现,对于缺氧缺血 7 日龄大鼠, EPO 治疗保护了损伤侧大脑体积,降低了损伤侧大脑血管

膜下区(SVZ)的扩展,显著改善了大鼠受损前肢的活动情况。 Mizuno 等^[2]研究发现,对于新生 3d 大鼠缺氧缺血所致的脑室周围白质损伤,低剂量的 EPO 预处理,可能经靶向作用于少突胶质细胞祖细胞而发挥减轻白质损伤的作用。而 Chen 等^[3]比较在造血系统存在 EPO-R 而中枢神经系统不存在 EPO-R 的大鼠和正常的大鼠,发现 EPO 能刺激神经祖细胞的增殖,影响神经元发育;并且能促进卒中后大鼠神经集落向受损伤区域的迁移。 Spandou 等^[4]在围产期窒息引起的 HIBD 模型中证实, EPO 通过抗凋亡机制来减少脑损伤程度并提高脑恢复功能。 Kumral 等^[5]在 HIBD 新生大鼠模型中也发现, EPO 可以下调凋亡基因 bax 和 DP5 的表达来保护神经细胞的活性。最近 Gunnarson 等^[6]研究表明,大脑的神经胶质细胞上存在 4 型水通道蛋白(AQP-4), EPO 可以对抗谷氨酸引起的神经胶质细胞 AQP-4 的通透性增加,从而减轻由此所导致的脑水肿。此外, EPO 治疗降低了 IL-6、TNF-α 水平^[7],降低了单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)的浓度,显著降低了星形细胞的活性并阻止白细胞、小胶质细胞进入梗死区,提高了大鼠血循环 IL-10 的水平^[8]。

MSCs 是来源于骨髓的具有多种分化潜能的干细胞,具有取材方便、免疫原性低、成本低等诸多优点。目前许多动物实验和临床研究表明, MSCs 对于脑损伤有较好的治疗疗效。 Bang 等^[9]将 30 例大脑中动脉脑梗死的患者随机分为 MSCs 移植组和对照组, 1 年后观察神经缺损的改变和功能的改善,并对每组中的 5 例进行连续的神经影像观察,结果表明,移植组神经功能的改善与对照组相比差异有统计学意义,没有发现明显的不良反应。 Liu 等^[10]移植大鼠 MSCs 至生后 7d HIBD 大鼠侧脑室, BrdU 示踪移植的细胞,发现移植的 MSCs 能到达受损脑区并存活,同时 HIBD 大鼠学习记忆能力较对照组改善,差异有统计学意义,该研究同时提示该效应可能是移植的 MSCs 调节大脑的 IL-6、Fas 及 BDNF,使之处于一合适的水平所引起的。吴永超等^[11]报道 MSCs 能表达脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF),并且随 MSCs 细胞培养时间的延长,培养液中 BDNF 和 NGF 的含量相应增加。 Mendonca 等^[12]将自体骨髓间充质单核细胞经动脉移植治疗急性缺血性脑卒中患者,发现也是安全有效的。综上所述,在脑损伤发生后, MSCs 可能在损伤区域局部细胞因子的趋化作用下到达受损区域,并分泌多种神经营养因子,促进神经前体细胞的增殖、分化和迁移,从而上调脑的局部可塑性,以利于损伤修复;同时,作为多能干细胞,其自身亦可能部分分化为神经细胞,发挥替代部分神经元的效果。

基于此,作者把 EPO 和 MSCs 结合起来,利用 EPO 抗神经元凋亡、神经营养保护和对神经干细胞的促迁移、增殖、分化等作用; MSCs 分化为神经元的功能,及分泌促进神经前体细胞增殖、分化和迁移的细胞因子的作用;协同治疗 HIBD;构建了 pEGFPN1-EPO 真核表达质粒,并将其转染大鼠 MSCs,移植至新生 HIBD 大鼠模型;验证其体内 EPO 的表达,移植的部分 MSCs 分化为神经元的情况,结果表明 EPO 修饰的大鼠 MSCs 能减轻 HIBD 大鼠的脑损伤,改善学习记忆功能,取得了令人鼓舞的阶段性结果,从而完成了重组 EPO 基因 MSCs 移植治疗 HIBD 的第一步工作,为下一步临床治疗提供了实验室基础和新的治疗方法。

参考文献:

[1] Kim SS, Lee KH, Sung DK, et al. Erythropoietin attenuates brain injury, subventricular zone (下转第 2792 页)

MAP-2 的表达对于树突的分化是必需的,其磷酸化状态对神经元突起生长是非常重要的。本实验对 MAP-2 免疫组化定量结果表明,非干预组患侧海马 CA1 区表达较假手术组明显减少,提示缺血缺氧后神经元受到损伤,MAP-2 磷酸化障碍,微管的不稳定性增强,微管聚合作用下降,这样必然会导致细胞骨架完整性遭到破坏,树突崩溃,发育停止,突触连接中断,突触结构和功能受到影响。给予 EE 干预后早期干预组和晚期干预组海马 CA1 区 MAP-2 的表达均增高,提示 EE 对大鼠海马 CA1 区有保护作用,可以使树突生长和受损细胞结构恢复,在一定程度上能阻止 HIBD 的病理过程。实验发现早期干预组 MAP-2 的表达高于晚期干预组,说明早期应用 EE 干预对阻止神经元损伤,促进已受损细胞的修复作用优于晚期应用。MAP-2 在海马表达的变化可能参与了脑发育不同阶段 EE 对 HIBD 神经可塑性的影响机制,而这种表达变化的原因尚不清楚,可能与不同发育阶段脑中 MAP-2 磷酸化状态不一致有关。

参考文献:

- [1] Robert C, Vannucci B, Jeffrey M. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Pediatrics*, 1997, 100(6):1004.
 - [2] Brenes Saenz JC, Villagra OR, Fornaguera Trias J. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats[J]. *Behav Brain Res*, 2006, 169(1):57.
 - [3] 郭亚乐,袁宝莉,李瑞林,等. 丰富环境干预对早产儿预后的影响 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2003, 18:378.
 - [4] Wish G. High-Mr microtubule-associated proteins: properties and functions [J]. *Biochemistry*, 1989, 259(1):1.
 - [5] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2):131.
 - [6] Puurunen K, Sivenius J. Influence of enriched environment on spatial learning following cerebral insult[J]. *Rev Neurosci*, 2002, 13(3):347.
 - [7] Sale A, Putignano E, Cancedda L, et al. Enriched environment and acceleration of visual system development [J]. *Neuropharmacology*, 2004, 47(5):649.
 - [8] Pilar Zamora-Leon S, Lee G, Peter Davies. Binding of Fv α to MAP-2c through an SH3 Binding Domain [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(43):39950.
 - [9] Cristofanilli M, Thanas S, Brosius J, et al. Neuronal MAP2 Mrna: species-dependent differential dendritic targeting competence [J]. *J Mol Biol*, 2004, 341(4):927.
 - [10] Li Y, Jiang N, Powers C. Neurodamage and plasticity identified by MAP2, GAP43, Cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1998, 29(9):1972.
 - [11] Brazel CY, Romanko MJ, Rothstein RP, et al. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development [J]. *Prog Neurobiol*, 2003, 69(1):49.
- (收稿日期:2009-06-05)
-
- (上接第 2789 页)
- expansion, and sensorimotor deficits in hypoxic-ischemic neonatal rats [J]. *Korean Med Sci*, 2008(23):484.
 - [2] Mizuno K, Hida H, Masuda T, et al. Pretreatment with low doses of erythropoietin ameliorates brain damage in periventricular leukomalacia by targeting late oligodendrocyte progenitors: a rat model [J]. *Neonatology*, 2008, 94(4):255.
 - [3] Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT, et al. Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation [J]. *Biol Chem*, 2007, 282(35):25875.
 - [4] Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia induced DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 366(1):24.
 - [5] Kumral A, Genc S, Ozer E, et al. Erythropoietin downregulate bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Biol Neonate*, 2006, 89(3):205.
 - [6] Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, et al. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(5):1602.
 - [7] Agnello D, Bigini P, Villa P, et al. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Brain Res*, 2002, 952(1):128.
 - [8] Lu XM, Xie WY, Liu PC, et al. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion [J]. *Life Sci*, 2005, 9(1):53.
 - [9] Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients [J]. *Ann Neurol*, 2005, 57(6):874.
 - [10] Liu Y, Zhang X, Dai Y, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on learning and memory functional recovery in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage [J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(9):648.
 - [11] 吴永超,郑启新,胡东,等. 骨髓间充质干细胞神经营养因子的表达及对脊髓神经元的保护作用 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(10):867.
 - [12] Mendonca ML, Freitas GR, Silva SA, et al. Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2006, 86(1):52.
- (收稿日期:2009-06-05)