

· 论 著 ·

HIF-1 α 基因转导的神经干细胞移植对大鼠红核神经元逆行性损伤的保护作用*

孔令胜¹, 苗建美², 靳峰¹, 郭强¹, 张浩¹

(1. 济宁医学院附属医院神经外科, 山东济宁 272029; 2. 山东省济宁市肿瘤医院 272029)

摘要:目的 研究低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)基因转导的神经干细胞(NSCs)移植对大鼠脊髓损伤(SCI)后红核神经元损伤的影响。方法 采用电控 SCI 打击装置制作大鼠 SCI 模型。将 80 只 SD 大鼠随机分为 4 组:对照组、SCI 组、NSCs 组、基因修饰移植组(HIF-NSC 组)。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)法标记处于对数生长期的 NSCs,SCI 后即刻进行 NSCs 及 HIF-1 α 基因转导的 NSCs 移植。应用免疫组化法观察 BrdU 标记的移植细胞的存活、迁移情况以及 HIF-1 α 的表达,用辣根过氧化物酶(HRP)逆行示踪技术标记红核神经元,用四甲基联苯胺(TMB)呈色反应显示红核脊髓束神经元的存活情况,采用斜板试验(改良 Rivlin 法)观察大鼠后肢运动功能的恢复情况。结果 NSCs 组与 HIF-NSC 组在损伤脊髓区域均可检测到 BrdU 标记的阳性 NSCs; HIF-NSC 组中 HIF-1 α 免疫阳性细胞平均光密度(OD)值比其他各组各时间点均高($P < 0.01$),且表达高峰延迟至移植后 14 d;中脑 HRP 标记红核神经元数目明显多于 NSCs 组、SCI 组($P < 0.01$);移植后第 7、14、28 天,HIF-NSC 组后肢运动功能评分比 NSCs 组、SCI 组明显升高($P < 0.01$)。结论 HIF-1 α 基因体外转导的胚鼠 NSCs 移植到 SCI 区域后可以存活、迁移,且能明显的上调 HIF-1 α 的表达、减轻红核神经元的逆行性损伤,从而促进大鼠后肢运动功能的恢复。

关键词:脊髓损伤;转染;干细胞移植;低氧诱导因子;红核神经元

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.27.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)27-2793-03

Protective effect of HIF-1 α genetically modified neural stem cells transplantation on retrograde trauma of rat red nucleus neurons after spinal cord injury*

Kong Lingsheng¹, Miao Jianmei², Jin Feng¹, Guo Qiang¹, Zhang Hao¹

(1. Department of Neurosurgery, Afiliated Hospital, Jining Medical College, Jining, Shandong 272029, China;

2. Jining Municipal Tumor Hospital, Jining, Shandong 272029, China)

Abstract: Objective To study the effects of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) genetically modified neural stem cells transplantation on trauma of red nucleus neurons in the rats with spinal cord injury(SCI). **Methods** SCI model of Sprague Dawley rats was induced with electrocircuit control spinal cord injuring device. 80 SD rats were divided into four groups randomly: normal group, SCI group, NSC group and HIF-NSC group. The NSCs labeled with BrdU were transplanted into the injured site on 3 d after SCI. HIF-1 α and BrdU were detected by immunohistochemistry, rubrospinal tract(RST) neurons were labeled by retrograde transport of the horseradish peroxidase(HRP) from the lesion site, which were taken by damaged axons and remained in the neurons, then the labeled red nucleus(RN) neurons were counted. The improved Rivlin method(slope test) was used to assess the motor function following spinal cord injury in rats. **Results** NSCs can be detected in the spinal cord after transplantation. The mean OD of HIF-1 α in HIF-NSC group was prominently higher than that of the other experimental groups at each time point($P < 0.01$). The expression peak was postponed to 14 d after transplantation. The number of RST neurons labeled by HRP in HIF-NSC group was more than that in SCI and NSC group($P < 0.01$). On 7, 14, 28 d after transplantation, the scores of hindlimb motor function were obviously increased compared with the NSCs and SCI groups($P < 0.01$). **Conclusion** HIF-1 α genetically modified NSCs can survive in the injured site of spinal cord, upregulate more obviously the expression of HIF-1 α and protect RN, then promote more remarkably functional recovery of hind limb in rat after SCI.

Key words: spinal cord injuries; transfection; stem cell transplantation; hypoxia inducible factor; red nucleus neurons

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)对机体造成灾难性的后果,如何治愈截瘫,一直是医学界一大难题^[1]。低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)作为低氧应答时基因表达和维持细胞内氧环境稳定的调节中心^[2],是一种具有转录活性的核蛋白,它与增强脊髓组织细胞的缺氧耐受,促进脊髓新生血管的形成密切相关。神经干细胞(NSCs)可作为转基因载体携带多个外源基因并可高表达目的基因^[3],NSCs 移植成为治疗 SCI 新的研究热点^[4-6]。本课题的前期工作已从人脑胶质瘤中克隆出 HIF-1 α cDNA,并成功地将其与腺病毒连接构建了重组腺病毒载

体^[7]。本研究将已构建的 HIF-1 α 腺病毒载体体外转染 NSCs,再移植入损伤大鼠脊髓,研究其对大鼠 SCI 后红核神经元损伤的影响,探讨基因修饰 NSCs 移植修复 SCI 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性 SD 大鼠 80 只,体质量(250.0 \pm 20.0)g,由徐州医学院实验动物中心提供;HIF-1 α 腺病毒载体由济宁医学院附属医院实验室构建,HIF-1 α 单克隆抗体购自武汉博士德公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)(RZ>3.0,

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071779);山东省自然科学基金资助项目(ZR2010HM040)。

VI 型)、四甲基联苯胺(TMB)、焦油紫、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)抗体、多聚赖氨酸、巢蛋白(nestin)抗体、神经原特异烯醇化酶(NSE)抗体、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)抗体均购自 Sigma 公司,DMEM/F12(1:1)培养基购自 Hyclone 公司,B27 复合物购自 Gibco 公司,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮细胞生长因子(EGF)购自 Invitrogen 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,DAB 液体购自 Boster 公司,二步法免疫组化试剂盒购自 Zymed 公司,其他试剂均为国产分析纯或化学纯。采用自行研制的电控 SCI 自动打击装置制备大鼠 SCI 模型。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将成年健康雄性 SD 大鼠 80 只,按随机数字表法分为 4 组:对照组,仅做椎板切开术;SCI 组,脊髓(T₁₀ 水平)内微量注射生理盐水 5 μL;NSCs 组,脊髓内微量注射细胞密度为 2×10⁵/μL 的 NSCs 悬液 5 μL;基因修饰移植组(HIF-NSC 组),脊髓内微量注射细胞密度为 2×10⁵/μL 的 HIF-1α 基因修饰 NSCs 悬液 5 μL。每组 20 只大鼠,又分 1、3、7、14、28 d 5 个时间点,每组各时间点 4 只大鼠。

1.2.2 大鼠 SCI 模型的制备 2%戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉(30 mg/kg),以 T₁₀ 棘突为中心作背部正中切口,长约 2 cm,依次切开皮肤、皮下组织,剥离椎旁肌肉,轻轻咬除 T₁₀ 棘突和椎板,打开椎管至椎弓根部,暴露损伤脊髓约 5 mm,注意保护硬脊膜完整。用两把文氏钳分别钳住 T₉ 和 T₁₁ 棘突并向两侧牵拉以固定脊髓。以 T₁₀ 相对区域为损伤区,脊髓后正中血管为中心,用电磁程控铁棒下落打击装置(10 g 铁棒从 5 cm 高处自由落下)致伤脊髓,打击强度为 50(5.0 cm×10 g)势能克厘米(gram-cm force, gcf)。撞击成功标准为:撞击的脊髓组织水肿、出血,大鼠尾巴出现痉挛性摆动,双后肢体回缩样扑动,双后肢呈现弛缓性瘫痪。然后逐层关闭手术切口,记录手术时间。

1.2.3 HIF-1α 基因修饰 NSCs 悬液的制备及 BrdU 标记细胞核 大鼠胚胎 NSCs 的分离培养鉴定及 HIF-1α 基因重组腺病毒体外转染 NSCs 分别参照既往文献[7-8]进行。参考 Miura 等[9]的方法进行 NSCs 移植。

1.2.4 BrdU、HIF-1α 免疫组化染色 在 SCI 后各时间点麻醉后取材,开胸经左心室一主动脉插管,先灌注生理盐水约 200 mL 冲洗(至流出液澄清),再用 4%多聚甲醛约 200 mL 灌注固定,解剖椎管,切断神经根,取出距打击区 0.5 cm 上、下段脊髓,再置于 4%多聚甲醛液进行固定,石蜡包埋固定,连续切片,片厚 5 μm,每个标本随机取连续切片多张,采用 SABC 法进行 BrdU、HIF-1α 的免疫组化染色,阴性对照用 PBS 代替一抗。

1.2.5 HRP 逆行示踪及 TMB 法呈色反应 移植后 28 d,大鼠原伤灶下方脊膜约 5 mm 处用汉密尔顿微量注射器缓慢注射 20%的 HRP 生理盐水溶液 2 μL,48 h 后深麻醉状态下灌注、取材剥取中脑,进行中脑红核的冷冻连续切片,按 Mesulam^[10] TMB 法进行呈色反应。

1.2.6 大鼠后肢运动功能恢复的评价 分别于移植后 1、3、7、14、28 d 采用斜板试验(改良 Rivlin 法)对大鼠进行功能评

定,斜板表面垫以 6 mm 厚的橡胶垫,板可绕下边旋转,按大鼠身体轴线与斜板纵轴垂直的方向放置大鼠,从水平位置(0°)起逐渐增大斜板与水平面之间的角度,以大鼠能够在板上停留 5 s 而不跌落的最大角度作为评分标准,双后肢分别评分,重复 3 次,取平均值^[11]。斜板试验主要观察大鼠后肢的静态肌张力,正常大鼠斜板实验评分平均值为 75°~80°。观察者为熟悉评分标准但非本组的实验人员。

1.3 统计学处理 采用 LEICA QWin 图像处理与分析系统进行图像分析。实验数据采用 SPSS11.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析法(ANOVA)进行统计学分析,相关分析采用 Spearman 等级分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 移植 NSCs 在宿主脊髓内的存活及迁移 SCI 组及对照组均未观察到 BrdU 阳性细胞。NSCs 组第 7 天可检测到。HIF-NSC 组 BrdU 阳性细胞在移植术后第 1 天未检测到,第 3 天即可检测到,为棕黄色核标记的小圆形细胞,散在排列,第 7 天阳性细胞增多,沿穿刺针道呈串珠状排列,平均每高倍镜视野阳性细胞数为(9.3±1.2)个;第 14 天 BrdU 阳性细胞数在临近损伤区继续增多,较移植术后第 7 天明显增多,平均每高倍镜视野阳性细胞数为(22.4±2.8)个($P < 0.01$),且向移植针道周围迁移达 1.4 cm(封 2 图 1);移植后 7、14 d BrdU 阳性细胞数及向移植针道周围迁移距离与 NSCs 组同一时间点比较,均明显增多($P < 0.05$)。

2.2 HIF-1α 免疫组化结果分析 对照组大鼠脊髓前角、背角 HIF-1α 免疫细胞为阴性。SCI 组第 3 天细胞质着色明显加深,与第 1 天比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),从第 7 天开始,平均光密度(OD)值开始下降,细胞质着色变浅。NSCs 组 HIF-1α 免疫反应蛋白平均 OD 值变化与 SCI 组相似。HIF-NSC 组移植后第 3、7 天,HIF-1α 染色的平均 OD 值增加明显,第 14 天平均 OD 值增加达到高峰(封 2 图 2),以后开始下降,但仍保持较高水平,HIF-1α 的平均 OD 值在各时间点均较其他各组各时间点增高,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.3 HRP 逆行示踪标记中脑红核神经元数目 移植后第 28 天,对照组大鼠中脑 HRP 标记红核神经元数目为(1 327.7±64.2)个;SCI 组为(487.1±38.8)个,较对照组显著减少($P < 0.01$,封 2 图 3a);NSCs 组为(761.2±24.4)个,较 SCI 组明显增加($P < 0.01$,封 2 图 3b)。HIF-NSC 组 HRP 标记红核神经元胞体饱满,树突明显,排列紧密,无核萎缩,数目为(1 024.5±42.4)个,比 NSCs 组显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$,封 2 图 3c),但与对照组比较仍有差异($P < 0.05$)。HRP 标记中脑红核神经元数目越多,大鼠后肢运动功能评分越高($r = 0.957, P < 0.01$),表明两者有高度相关性。

2.4 行为学变化 移植后第 7、14、28 天,NSCs 组斜板试验评分比 SCI 组明显升高($P < 0.01$),HIF-NSC 组比 NSCs 组、SCI 组明显升高($P < 0.01$),但与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表 1 移植后各组 HIF-1α 免疫阳性细胞 OD 值比较($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
SCI 组	39.1±2.2	63.6±2.9 [#]	42.7±3.7	41.2±2.8	30.8±2.5
NSCs 组	44.7±4.2 [○]	69.9±3.3 [○]	64.1±4.1 [○]	54.8±3.6 [○]	43.7±3.4 [○]
HIF-NSC 组	58.9±4.3*▲	84.6±3.5*▲	91.5±4.4*▲	110.4±6.2*▲	91.1±3.1*▲

[#]: $P < 0.05$, 与同组第 1 天比较; [○]: $P < 0.05$; *: $P < 0.01$, 与 SCI 组相应值比较; ▲: $P < 0.01$, 与 NSCs 组相应值比较。

表 2 各组术后斜板试验评分($\bar{x} \pm s, n=4$, 分)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
对照组	76.0 \pm 3.5*	75.8 \pm 2.8*	76.1 \pm 3.5*	75.9 \pm 5.1*	76.2 \pm 3.2*
SCI 组	21.6 \pm 3.2	22.9 \pm 3.6	30.1 \pm 3.8	33.6 \pm 2.7	36.1 \pm 3.4
NSCs 组	22.7 \pm 3.5	23.5 \pm 2.9	39.2 \pm 2.2#	44.6 \pm 3.4#	49.5 \pm 3.6#
HIF-NSC 组	22.8 \pm 3.6	24.6 \pm 2.8	48.5 \pm 3.7 Δ	55.8 \pm 2.9 Δ	65.9 \pm 3.9 Δ

Δ : $P < 0.01$, 与 NSCs 组、SCI 组相应时间点比较; #: $P < 0.01$, 与 SCI 组相应时间点比较; *: $P < 0.01$, 与其他 3 组相应时间点比较。

3 讨 论

HIF-1 是由 Semenza 等^[12]发现的一种转录因子,低氧诱导其表达,由 α 、 β 两个亚基组成, α 亚基是其活性单位。低氧时 HIF-1 α 蛋白水平和 HIF-1 DNA 的结合活性增加,在组织细胞中广泛表达,和低氧反应相关基因中的低氧反应元件(HRE)中的 HIF-1 α 结合位点结合,介导低氧反应。HIF-1 α 是低氧时基因表达和恢复细胞内环境的调节中心,诱导大量与低氧有关的基因的表达,包括促红细胞生成素(EPO)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、II 型 NO 合酶、血红素氧化酶-1、糖酵解基因和酪氨酸羟化酶等,这些酶参与机体对低氧的细胞性和全身性适应性反应,包括无氧代谢、离子代谢、红细胞生成、血管增生和呼吸增强、儿茶酚胺类物质的代谢等低氧应答反应,使细胞在低氧环境存活并帮助其恢复至常氧水平^[13]。其中,HIF-1 α 可以刺激 EPO、VEGF 的分泌,EPO 可以促进红细胞增生,提高机体的输氧能力;而 VEGF 是机体局部低氧诱导的,在许多组织细胞类型中广泛表达,促进新生血管形成及微循环的重建,从而增加缺血局部的血流量,利于氧和能量物质运输^[14]。本研究将腺病毒介导的 HIF-1 α 基因体外转导 NSCs,后者再移植受损脊髓后,HIF-1 α 基因有持续较高水平的表达,提示 HIF-1 α 基因修饰 NSCs 能使受损脊髓更好地耐受缺血、缺氧,促进新生血管形成,重建微循环,为损伤脊髓的恢复创造条件。

NSCs 是一类存在于中枢神经系统的具有多向分化能力的细胞,能分化成少突胶质细胞、神经元、星形胶质细胞。大量的繁殖和自我更新是 NSCs 的基本属性,再加之 NSCs 具有极低的免疫原性,所以 NSCs 是基因治疗的理想载体。应用转基因技术将携带治疗基因的 NSCs 移植入 SCI 区,早期利用其分泌的治疗基因产物阻止神经细胞的凋亡和坏死,然后利用 NSCs 固有的增殖、迁移、分化特性来达到功能修复和功能整合的目的。已有研究表明,对于脱髓鞘疾病动物模型通过不同途径移植的 NSCs 可到达受损伤的组织区域,从而改善临床症状^[15-17]。BrdU 是胸腺苷类似物,可通过碱基互补配对的原则整合到处于 S 期的原始干细胞双链 DNA 中,在半保留复制过程中逐渐消减。BrdU 标记简单、方便,检测手段与常规免疫组化反应类似。本研究将 BrdU 标记的 NSCs 和基因工程化 NSCs 移植到大鼠 SCI 区,均于移植后检测到 BrdU 阳性细胞,而 HIF-NSC 组较 NSCs 组更能提前检测到阳性细胞,且移植后 7、14 d BrdU 阳性细胞数及向移植针道周围迁移距离与 NSCs 组同一时间点比较均明显增多($P < 0.05$),提示 HIF-1 α 基因修饰 NSCs 移植较单纯的 NSCs 移植更易存活于 SCI 区,并向 SCI 区域有较大范围的迁移,这可能与 HIF-1 α 基因修饰的 NSCs 移植入损伤脊髓后,HIF-1 α 高效稳定的表达发挥了它的生物学作用有关,但其具体的调控机制尚待进一步深入研究。

神经细胞具有摄取、双向转运 HRP 的特性,HRP 逆行示踪技术就是利用轴浆运输现象追踪神经元之间联系的一种方

法。既往研究表明,SCI 以后,由于轴突脱髓鞘发生变性以及失去纤维末梢靶源性神经营养因子的逆向支持,红核脊髓束可以产生不同程度的延迟性的变性坏死,进而红核神经元发生萎缩变性,这种延迟性的逆行性中枢神经元损伤直接影响着脊髓神经功能的恢复^[18]。HRP 是被通过损伤区域的纤维逆行摄取而到达红核细胞的,因而呈色反应所显示的细胞数反映了仍能与脊髓建立联系的红核细胞群。本研究结果表明,HIF-NSC 组标记红核神经元数目较 NSCs 组及 SCI 组均明显增加,提示 HIF-1 α 基因修饰的 NSCs 移植较单纯的 NSCs 移植更能明显减轻 SCI 后红核神经元的逆行性损伤;同时相关分析表明,中脑红核神经元的数目与大鼠后肢运动功能的评分呈密切正相关,即 HRP 逆行示踪标记中脑红核神经元数目越多,大鼠后肢运动功能斜板试验评分越高,可能的机制是移植存活的 NSCs 分化出神经元,在损伤局部形成一些神经元回路,使损伤脊髓远端和近端形成神经纤维之间的联系,从而促进脊髓神经纤维传导的恢复;同时 HIF-1 α 有效的高表达亦为损伤脊髓的恢复创造了良好的微环境。

综上所述,HIF-1 α 基因修饰 NSCs 移植到损伤脊髓后可以存活、迁移,且能明显上调 HIF-1 α 的表达,并能明显减轻红核神经元的逆行性损伤,进而促进大鼠后肢运动功能的恢复。但外源基因在体内长期有效的表达必须接受机体生理信号的调控,因此,必须对基因结构以及表达和调控的分子机制进行深入的研究,从而为构建理想的治疗基因提供依据。

参考文献:

- [1] 卢凤飞,陈强,仲淑玉,等.慢性脊髓损伤胶质瘢痕边界定位的实验研究[J].中华神经医学杂志,2009,8(5):488-492.
- [2] Le QT, Giaccia AJ. HIF- α , a gender independent transcription factor [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2391-2393.
- [3] Galli R, Gritti A, Bonfanti L, et al. Neural stem cells; an overview [J]. Circ Res, 2003, 92(6): 598-608.
- [4] Saberi H, Moshayedi P, Aghayan HR, et al. Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: an interim report on safety considerations and possible outcomes [J]. Neurosci Lett, 2008, 443(1): 46-50.
- [5] Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, et al. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells [J]. PLoS Biol, 2008, 6(7): 182.
- [6] Carvalho KA, Vialle EN, Moreira GH, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells(CD45(+)/CD34(-)) after cell therapy in chronic spinal cord injury in Wistar rats [J]. Transplant Proc, 2008, 40(3): 845-846.
- [7] 孔令胜,于如同,赵万巨.低氧诱导因子-1 α 基因重组腺病毒体外转染胚鼠神经干细胞研究[J].中华实验外科杂志,2010,27(5):399.
- [8] 孔令胜,张军臣,张冉,等.胚胎大鼠神经干细胞的分离培养及鉴定研究[J].济宁医学院学报,2009,32(2):96-99.
- [9] Miura T, Tanaka S, Seichi A, et al. Partial functional recovery of paraplegic rat by adenovirus-mediated gene delivery of constitutively active MEK1 [J]. Exp Neurol, 2000, 16(6): 115-126.

- peptide in vascular physiology and disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 105(2):85-93.
- [4] Hobbs AJ, Foster P, Prescott C, et al. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial is chemia/reperfusion injury: a novel cardio-protective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide[J]. *Circulation*, 2004, 110(11):1231-1235.
- [5] Potter LR, Yoder AR, Flora DR, et al. Natriuretic peptides: their structures receptors, physiologic, functions and therapeutic applications[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009 (191):341-366.
- [6] Vlachopoulos C, Ioakeimidis N, Terentes-Printzios D, et al. Amino-terminal pro-C-type natriuretic peptide is associated with arterial stiffness, endothelial function and early atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(2):649-655.
- [7] Nakao K, Ogawa Y, Suga S, et al. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides[J]. *J Hypertens*, 1992, 10(9):907-912.
- [8] Miyoshi M, Kitaqawa Y, Imoto T, et al. Effect of natriuretic peptide receptor antagonist on lipopolysaccharide-induced fever in rats: is natriuretic peptide an endogenous antipyretic[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(3):1163-1170.
- [9] Pagel-Langenickel I, Buttgerit J, Bader M, et al. Natriuretic peptide receptor B signaling in the cardiovascular system; protection from cardiac hypertrophy[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2007, 85(8):797-810.
- [10] Garbers DL, Chrisman TD, Wiegand P, et al. Membrane guanylyl cyclase receptors: an update[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(6):251-258.
- [11] Kelsall CJ, Chester AH, Sarathchandra P, et al. Expression and localization of C-type natriuretic peptide in human vascular smooth muscle cells[J]. *Vascular Pharmacol*, 2006, 45(6):368-373.
- [12] Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions [J]. *Endocr Rev*, 2006, 27(1):47-72.
- [13] Ono K, Mannami T, Baba S, et al. A single-nucleotide polymorphism in C-type natriuretic peptide gene may be associated with hypertension[J]. *Hypertens Res*, 2002, 25(5):727-730.
- [14] Palmer SC, Prickett TC, Espiner EA, et al. Regional release and clearance of C-type natriuretic peptides in the human circulation and relation to cardiac function[J]. *Hypertension*, 2009, 54(3):612-618.
- [15] Walther T, Stepan H. C-type natriuretic peptide in reproduction, pregnancy and fetal development[J]. *J Endocrinol*, 2004, 180(1):17-22.
- [16] Hutchinson H, Trinlade P, Cunanan D, et al. Mechanisms of natriuretic-peptide-induced growth inhibition of vascular smooth muscle cells[J]. *Cardiovascular Res*, 1997, 35(1):158-167.
- [17] Sandow SL, Tare M. C-type natriuretic peptide: a new endothelium-derived hyperpolarizing factor[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(2):61-67.
- [18] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, 2002:78-90.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)

(上接第 2795 页)

- [10] Mesulam MM. Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a noncarcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents[J]. *J Histochem Cytochem*, 1978, 26(2):106-117.
- [11] He C, Chen JY, Ao SZ, et al. Preparation and a structure-function analysis of human ciliary neurotrophic factor[J]. *Neurosci Res*, 1995, 23(2):327-333.
- [12] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(12):5447-5454.
- [13] Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(5-6):993-998.
- [14] Iyer NV, Ko tch LE, A gani F, et al. Cellular and developmental control of oxygen homeostasis by hypoxia inducible factor -1 α [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(1):149-162.
- [15] Copray S, Balasubramaniyan V, Levenga J, et al. Olig2 overexpression induces the in vitro differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4):1001-1010.
- [16] Cayre M, Bancila M, Virard I, et al. Migrating and myelinating potential of subventricular zone neural progenitor cells in white matter tracts of the adult rodent brain[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 31(4):748-758.
- [17] Walczak P, Kedziorek DA, Gilad AA, et al. Applicability and limitations of MR tracking of neural stem cells with asymmetric cell division and rapid turnover: the case of the shiverer dysmyelinated mouse brain[J]. *Magn Reson Med*, 2007, 58(2):261-269.
- [18] 孔令胜, 于如同, 聂冬丽, 等. 大鼠脊髓损伤后对红核神经元逆行性损伤的实验研究[J]. *济宁医学院学报*, 2009, 32(1):12-14.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-05-22)