

神经干细胞移植联合 PEP-1-SOD1 对颅脑损伤大鼠神经功能恢复的影响

贾进明¹, 陈菲菲¹, 吴云飞², 赵卫忠^{1*}

(¹常州市第三人民医院急诊科, ²病理科, 江苏 常州 213001)

[摘要] **目的:**探讨神经干细胞(neural stem cells, NSCs)移植联合 PEP-1-SOD1 对颅脑损伤后大鼠神经功能恢复的影响。**方法:**SD 雄性大鼠 80 只, 建立颅脑损伤模型后随机分为 4 组: 对照组(损伤处注入生理盐水)、NSCs 移植组(损伤处注入 NSCs 悬液)、SOD1 组(损伤处注入 PEP-1-SOD1 蛋白)及 NSCs+SOD1 组(损伤处注入 NSCs 悬液+PEP-1-SOD1 蛋白)。4 d 后采用定量 PCR 及 Western blot 法分别检测小鼠脑组织中 AQP4 基因表达及蛋白合成变化; 分别于损伤后 1、3 d 和 1、2、3、4 周行 Bederson 评分, 损伤后 23~28 d 行 Morris 水迷宫试验对大鼠运动神经功能进行评价; 伤后第 4 周取材行病理切片 BrdU 免疫组织化学染色。**结果:**脑损伤后 4 d, 对照组脑损伤周围组织 AQP4 及其 mRNA 的表达高于 NSCs 移植组及 SOD1 组, NSCs 移植组及 SOD1 组均高于 NSCs+SOD1 组($P < 0.05$)。分别于损伤后 1、3 d 及 1、2、3、4 周行 Bederson 评分显示 4 周时各组大鼠 Bederson 评分均低于 24 h, 并且 4 周时 Bederson 评分 NSCs+SOD1 组低于对照组($P < 0.05$)。Morris 水迷宫试验结果显示 NSCs+SOD1 组神经功能改善较对照组明显($P < 0.05$)。免疫组化染色结果显示 NSCs+SOD1 组大鼠损伤灶脑组织中的 BrdU 阳性细胞数高于 NSCs 移植组、SOD1 组和对对照组($P < 0.05$)。**结论:**神经干细胞移植可明显改善重型颅脑损伤后大鼠的神经学功能, 联合应用 PEP-1-SOD1 有协同效果。

[关键词] 颅脑损伤; 神经干细胞; PEP-1-SOD1; 神经功能恢复; 大鼠

[中图分类号] R651.15

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1511-06

doi:10.7655/NYDXBNS20151103

Effects of PEP-1-SOD1 combined with neural stem cells transplantation on the neurologic function of rats with traumatic brain injury

Jia Jinming¹, Chen Feifei¹, Wu Yunfei², Zhao Weizhong^{1*}

(¹Department of Emergence, ²Department of Pathology, the Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of neural stem cell(NSC)transplantation combined with PEP-1-SOD1 on recovery of neurologic function of rats with traumatic brain injury. **Methods:** A total of 80 healthy SD rats were randomly divided into four groups including the control group(with injection of physiological saline into injury region), the NSCs transplantation group(suspension of NSCs), the SOD1 group(PEP-1-SOD1 protein), and the NSCs transplantation + SOD1 group(suspension of NSCs + PEP-1-SOD1 protein). AQP4 mRNA and AQP4 expressions were determined by quantitative polymerase chain reaction(QPCR)and Western blot assay at the 4th day after traumatic brain injury. Bederson neurobehavioral assessment was performed 24 hours, 3 days, 1, 2, 3 and 4 weeks after traumatic brain injury. Morris water maze test was performed to determine neurologic function of rats from day 23 to 28 after traumatic brain injury. Immunohistochemistry and pathology changes were determined at 4 weeks after injury. **Results:** The expressions of AQP4 mRNA and AQP4 in the control group were higher than those in the NSCs transplantation group and SOD1 group, and the expressions in the NSCs transplantation group and SOD1 group were higher than those in the NSCs transplantation+SOD1 group($P < 0.05$). Bederson scores at 4 weeks after traumatic brain injury were lower than those at 24 hours in all groups. At 4 weeks after traumatic brain injury, the scores in the NSCs transplantation+SOD1 group were lower than those in the control group($P < 0.05$). Morris water maze test showed that neurologic function in the NSCs+SOD1 group was significantly more improved than that in the control group ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining showed that the number of BrdU positive cells in the NSCs transplantation+SOD1 group was higher than that in the control group, NSCs transplantation group, and SOD1 group ($P < 0.05$).

[基金项目] 常州市卫生局重大科技项目(ZD201212)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xibei-js@163.com

Conclusion: PEP-1-SOD1 combined with transplantation of neural stem cells can significantly improve the neurological function in rats with traumatic brain injury.

[Key words] traumatic brain injury; neural stem cells; PEP-1-SOD1; neural functional recovery; rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1511-1516]

颅脑损伤由于其高致残率、致死率及医疗资源投入比例大的特点,目前已不单是一个医学问题,更是一个重要的社会问题^[1]。各国学者一直不断寻找安全有效、可直接促进患者神经功能康复的药物,但没有取得突破性进展^[2]。研究发现颅脑损伤后,内源性的神经前体细胞无法再形成神经元,只能分化为未成熟的星形胶质细胞和少突胶质细胞,因此目前公认的观点是神经系统一旦损伤,依靠自身很难完成修复重建,细胞移植成为研究颅脑损伤治疗的热点。而神经干细胞(neural stem cells, NSCs)因其具有自我更新和多向分化的潜能成为首选的种子细胞。一些前期实验表明铜锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn-superoxide dismutase, SOD1)对 NSCs 的增殖分化具有促进作用。鉴于 SOD1 及 NSCs 的生理特性,将两者联合应用于颅脑损伤的治疗,将会给 NSCs 移植治疗神经损伤带来更大的成效,给神经损伤修复治疗带来新的希望。本研究将通过 NSCs 移植联合细胞转导肽 PEP-1 介导 SOD1 形成的融合蛋白 PEP-1-SOD1 治疗,探讨对大鼠颅脑损伤后神经功能恢复的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 雄性大鼠 80 只(北京华阜康生物科技股份有限公司),无畸形,无外伤,皮肤无感染,体重(250 ± 10)g。

DMEM/ F12 培养基、胎牛血清(FBS)(Gibco 公司,美国),B27、bFGF、EGF(PeproTech 公司,美国),胰蛋白酶(Hyclone 公司,美国),PBS(北京中山生物技术公司),青霉素、链霉素(石家庄华北制药厂);荧光定量 PCR 试剂盒、Sybr green I、引物(Western Biotechnology 公司,美国),EDTA (Sigma 公司,美国);兔抗 AQP4 单克隆抗体(Abcam 公司,美国),兔抗 β -actin 鼠多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(GenScript 公司,美国);考马斯亮蓝 G250(Amersham Pharmacia Biotech 公司,美国),蛋白质相对分子量标记物(Bio-Rad 公司,美国);液压颅脑创伤仪(New Sun 公司,美国),Morris 水迷宫

DMS-2 系统(中国科学院药物研究所),Morris 水迷宫分析软件(Noldus 公司,荷兰)。PEP-1-SOD1 融合蛋白为本课题组前期纯化制备^[3]。

1.2 方法

1.2.1 NSCs 的培养和鉴定

孕 14 d 的 SD 大鼠用 75%酒精消毒,取出胎鼠脑组织。用剪刀反复剪切至 1~3 mm 大小组织块,加入 DMEM/F12 基础培养基 2~3 mL,用吸管反复吹打,制成细胞悬液。将细胞悬液过滤,离心 10 min。吸除上清液体,将沉淀的细胞重悬于 2 mL DMEM/F12 培养基中,置 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养。培养 4~5 d 后,将含细胞的培养液离心 10 min,收集细胞。吸除上清液体,用相同培养液重悬细胞后,接种于更换的培养瓶中,继续培养。每 5~7 d 换液 1 次。以后用机械法分散神经球方法进行传代培养。对形成的神经球用 Nestin 抗体染色鉴定。

1.2.2 动物模型制备及分组

SD 雄性大鼠 80 只,随机分为 4 组,每组 20 只。大鼠采用 7%水合氯醛以每 100 g 体重 0.5 mL 标准进行深度麻醉,头部手术部位备皮,于正中线由前向后切开头皮,切口后端再以 45°角向前下延伸,形成三角形皮瓣。剥离软组织和骨膜,充分暴露左侧颅骨。在人字缝前方 2 mm,颅骨中线旁 2 mm,采用高速颅骨钻直径 5 mm 的圆形骨窗,采用自由落体打击装置,以 30 g 砝码从 15 cm 高处下落打击致颅脑损伤,骨蜡封闭,缝合头皮。放入笼中精心饲养。手术后 24 h,将大鼠再次麻醉,打开损伤颅骨骨窗,根据实验要求分别注射。对照组:注射 1 mL 生理盐水;NSCs 移植组:同法注射等量 NSCs 悬液(1 × 10¹⁰ 个/L);SOD1 组:腹腔注射 2.5 μ mol/L PEP-1-SOD1 蛋白 200 μ g 1 次/d,连续 3 d;NSCs +SOD1 组:注射等量 NSCs 悬液(1 × 10¹⁰ 个/L),腹腔注射 2.5 μ mol/L PEP-1-SOD1 蛋白 200 μ g 1 次/d,连续 3 d。另外术后腹腔注射庆大霉素 2 000 U 预防感染。

1.2.3 定量 PCR 检测 AQP4-mRNA 表达情况

脑损伤后 4 d 各组随机处死 6 只大鼠,取损伤处脑组织,迅速剪碎新鲜脑组织标本,制成脑组织匀浆,采用 TRIzol 提取脑组织总 RNA。检测总 RNA

的纯度和完整性。采用试剂盒中说明将 RNA 反转录成 cDNA,再将 cDNA 进行定量 PCR。

引物设计:AQP4 (114 bp) 上游:5'-TCGC-CAAGTCCGCTCTTCTACA-3', 下游:5'-CCGTGGT-GACTCCCAATCC-3'; β -actin (150 bp) 上游:5'-CC-CATCTATGAGGTTACGC-3', 下游:5'-TTTAATGT-CACGCACGATTTTC-3'。

定量 PCR 反应条件为:94℃ 4 min 预变性;94℃ 20 s 变性,60℃ 30 s 退火,72℃ 30 s 延伸,72℃检测信号,独立实验重复 3 次,得到 Ct 值后根据 $\Delta\Delta Ct$ 法计算 mRNA 相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测 AQP4 蛋白表达情况

脑损伤后 4 d 各组随机处死 6 只大鼠,取损伤处脑组织,迅速剪碎新鲜脑组织标本,按每 100 mg 组织加入 1 mL RIPA 裂解液将标本制成匀浆。将匀浆物离心 5 min,取上清即为全蛋白提取物。采用 Bradford 方法测蛋白浓度。配置 4%浓缩胶及 10%分离胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳至溴酚蓝染料前沿下至凝胶末端处,即停止电泳。恒流 200 mA 进行转膜,电转移 1 h。用封闭液将一抗(AQP4 单克隆抗体)1:500 稀释,内参一抗 1:3 000 稀释,然后温育 1.5 h。TBST 洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:3 000),温育 1.5 h,再次用 TBST 洗膜,使用 ECL 法显色,UVP 凝胶图像分析系统照相并分析处理。上述反应以 β -actin 作为内参照,用 UVP 凝胶图像处理系统 Labworks4.6 软件分析目的条带的灰度值,通过目的条带与 β -actin 条带灰度值的比值评定蛋白表达水平。

1.2.5 神经功能评价

大鼠运动神经功能评价在颅脑损伤后 1、3 d 及 1、2、3、4 周进行,采用 Bederson 评分标准^[4]:0 分为无明显的神经功能缺失;1 分为对侧前肢屈曲;2 分为提尾时对侧前肢抓力下降;3 分为各方向自主运动,但提尾时向左侧旋转;4 分为行走时自发性向左侧旋转。

1.2.6 Morris 水迷宫实验

在脑损伤后 23~28 d 通过 Morris 水迷宫装置检测学习记忆能力^[5]。空间定航能力:历时 5.5 d,记录每只大鼠从入水到找到并爬上平台所需的时间,即逃避潜伏期(escaping latency);空间探索实验:第 5 天下午撤掉平台,让大鼠在迷宫内自由活动 2 min,记录其经过平台原址的次数(times of passing platform)。

1.2.7 BrdU 免疫组织化学染色

脑损伤后 4 周每组随机各取 5 只大鼠行损伤

处组织学检测。脑组织常规石蜡切片、脱蜡,对组织切片进行 HE 染色和抗 BrdU 免疫组织化学染色。每张切片在高倍镜($\times 200$)下任取 10 个视野,计算每个视野的 BrdU 阳性细胞数,取其均值作为每组的 BrdU 阳性细胞数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据的处理及分析,实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组之间比较用 t 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

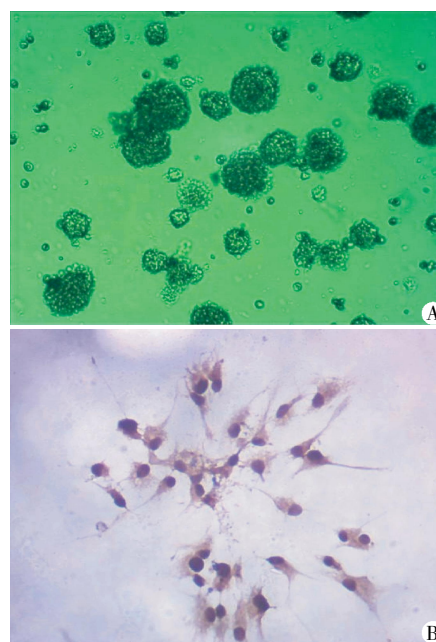
2 结果

2.1 NSCs 形态学观察

培养第 1 天,NSCs 细胞呈单个透亮悬浮生长,圆形,胞体较小。第 2 天后,单个细胞大量减少,培养板底部见许多细胞碎片,部分胞体较大。可见两两正在分裂的细胞,似哑铃形。第 4 天,有 3~5 个细胞集落形成,集落中的细胞呈圆形(图 1A)。以后细胞集落不断增多、增大。培养至 7~10 d 时,已形成由数十甚至数百个细胞不等典型的神经球生长。细胞集落呈球形或卵圆形及桑葚状。传代培养的活细胞形态基本表现与原代细胞相似。NSCs Nestin 免疫细胞化学染色结果为阳性(图 1B)。

2.2 RT-PCR 结果

各组大鼠脑损伤后,对照组 AQP4 mRNA 表达

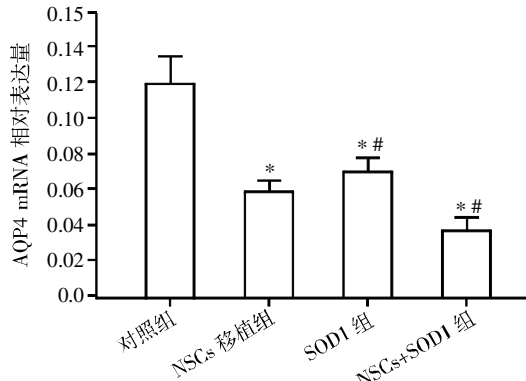


A:倒置显微镜下原代 NSCs 形态($\times 40$);B:NSCs 的 Nestin 染色结果($\times 400$)。

图 1 NSCs 镜下观察

Figure 1 Observation of neural stem cells by microscope

量高于 SOD1 组 ($P < 0.05$), SOD1 组高于 NSCs 移植组 ($P < 0.05$), NSCs 移植组高于 NSCs+SOD1 组 ($P < 0.05$, 图 2)。



与对照组相比, * $P < 0.05, n=6$; 与 NSCs 移植组相比, # $P < 0.05, n=6$ 。

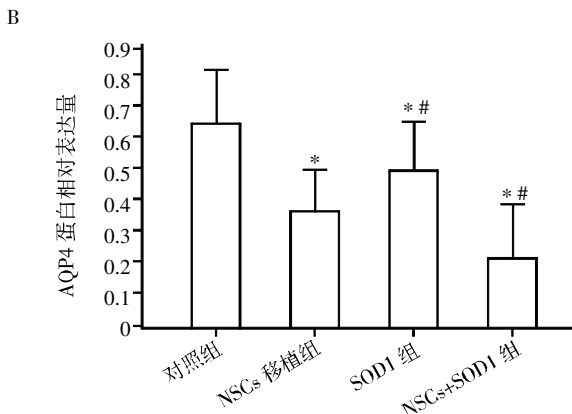
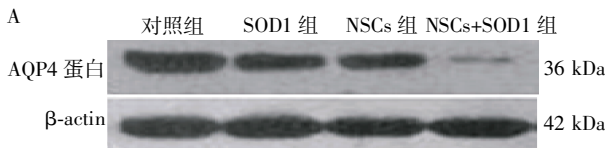
图 2 各组大鼠脑损伤后脑组织 AQP4 mRNA 表达量
Figure 2 AQP4-mRNA expression after traumatic brain injury

2.3 Western blot 结果

各组大鼠脑损伤后, 对照组 AQP4 蛋白的表达高于 SOD1 组 ($P < 0.05$), SOD1 组高于 NSCs 移植组 ($P < 0.05$), NSCs 移植组高于 NSCs+SOD1 组 ($P < 0.05$, 图 3)。

2.4 神经功能评价

损伤后 4 周各组大鼠神经学缺损评分均低于损伤后 1 d 时, 且 NSCs+SOD1 组大鼠神经学缺损评分低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。



A: 各组大鼠脑损伤后脑组织 AQP4 蛋白电泳图; B: 各组大鼠脑损伤后脑组织 AQP4 蛋白表达量。与对照组相比, * $P < 0.05, n=6$; 与 NSCs 移植组相比, # $P < 0.05, n=6$ 。

图 3 各组大鼠脑损伤后脑组织 AQP4 蛋白表达
Figure 3 AQP4 expression of each group after traumatic brain injury

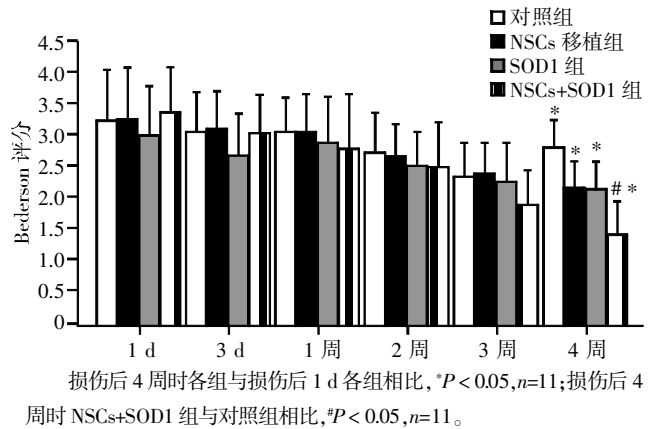


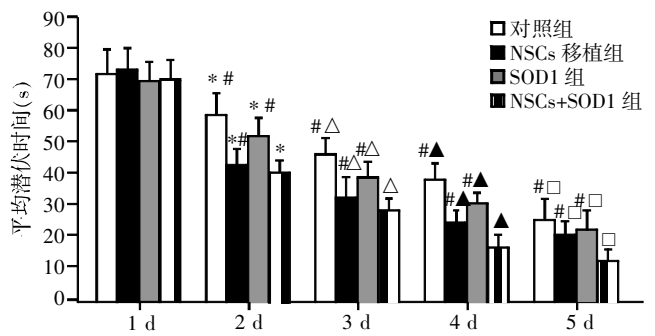
图 4 4 组大鼠损伤后不同时间 Bederson 评分
Figure 4 Bederson scores of rats at different time after injury

2.5 Morris 水迷宫行为学检测

各组平均潜伏时间均逐渐缩短, 损伤后 1 d 各组之间无明显差异, 损伤后 2 d NSCs+SOD1 组逃避潜伏期均较对照组、NSCs 移植组及 SOD1 组明显缩短 ($P < 0.05$)。损伤 3~5 d NSCs+SOD1 组逃避潜伏期缩短更明显 ($P < 0.01$, 图 5)。空间探索试验穿越平台次数: 与 NSCs+SOD1 组相比, 对照组、NSCs 移植组及 SOD1 组穿越原平台次数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 6)。目标象限游泳时间占总时间的百分比: 与 NSCs+SOD1 组相比, 对照组、NSCs 移植组及 SOD1 组明显减少 ($P < 0.05$), NSCs 移植组、SOD1 组较对照组增多 ($P < 0.05$), 而 NSCs 移植组及 SOD1 组之间无明显差异 (图 7)。

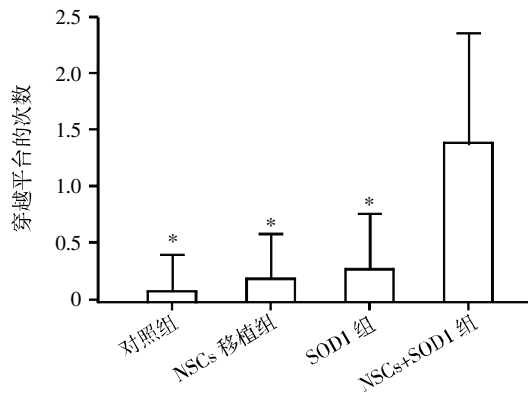
2.6 免疫组化 BrdU 标记

4 组标本脑组织切片免疫组化 BrdU 标记, 在显微镜下细胞核呈棕色颗粒状为阳性表达, 随机取 10 个无重叠高倍视野进行细胞总数及 BrdU 阳性细胞计



损伤后 2 d 时各组分别与损伤后 1 d 相比, * $P < 0.05, n=11$; 损伤后 3 d 时各组分别与损伤后 2 d 相比, # $P < 0.05, n=11$; 损伤后 4 d 时各组分别与损伤后 3 d 相比, # $P < 0.05, n=11$; 损伤后 5 d 时各组分别与损伤后 4 d 相比, # $P < 0.05, n=11$; 与 NSCs+SOD1 组比较, # $P < 0.05, n=11$ 。

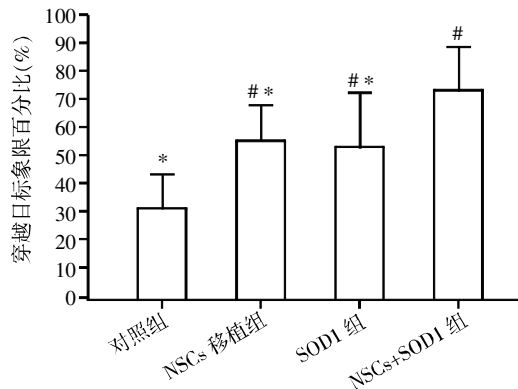
图 5 各组平均潜伏时间比较
Figure 5 The average latency of each group



与 NSCs+SOD1 组比较, * $P < 0.05$ ($n=11$)。

图 6 各组穿越平台的次数

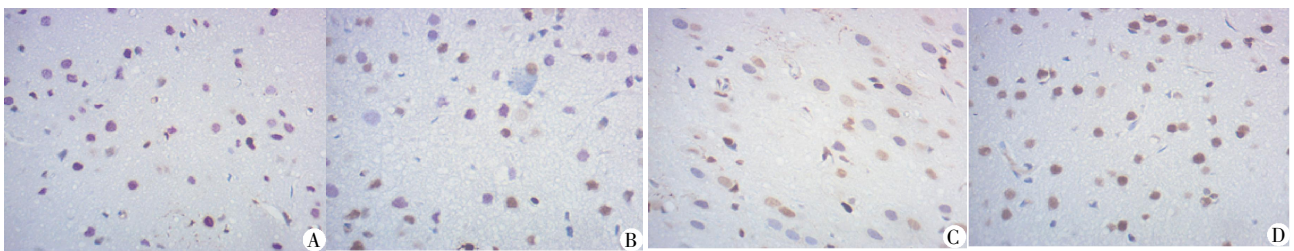
Figure 6 The number of crossing the former platform



与 NSCs+SOD1 组比较, * $P < 0.05$ ($n=11$); 与对照组比较, * $P < 0.05$ ($n=11$)。

图 7 各组穿越目标象限的百分比

Figure 7 The percentage through the target quadrant in each group



A: 等渗盐水对照组, 未见 BrdU 阳性细胞; B: NSCs 移植组, BrdU 阳性细胞较对照组明显增多; C: SOD1 组, BrdU 阳性细胞较对照组明显增多; D: NSCs+SOD1 组, BrdU 阳性细胞弥漫分布, 较前 3 组明显增多。

图 8 各组免疫组化 BrdU 标记结果 ($\times 200$)

Figure 8 The numbers of BrdU positive cells in each group ($\times 200$)

我调节,使得更多的神经元与轴突结合,达到对神经系统的修复功能。NSCs 移植细胞存活率及向神经元分化率低,中枢神经系统缺氧及损伤后的炎症反应对移植细胞造成严重损伤,阻碍了 NSCs 向神经元分化,这是细胞替代性治疗的一个障碍^[9-10]。

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,广泛存在于各种生物体内,包括 Cu/ZnSOD(SOD1)、MnSOD 以

数,计算标记指数。4 组标本的 BrdU 标记指数分别为 0、 $(45.13 \pm 8.01)\%$ 、 $(43.78 \pm 7.13)\%$ 、 $(75.33 \pm 11.53)\%$,4 组之间经统计学分析显示 NSCs 移植组及 SOD1 组 BrdU 阳性细胞均较对照组增多 ($P < 0.05$),NSCs+SOD1 组 BrdU 阳性细胞较其他 3 组增多 ($P < 0.05$,图 8)。

3 讨论

神经损伤修复和功能重建一直是临床医学研究的热点和难点。成熟中枢神经系统基本不能再生形成神经元或者有功能的突触。众多研究显示,损伤后细胞增生多不分化或形成未成熟的星形胶质细胞和激活的少突胶质细胞,很少形成神经元^[6-7]。同时,在大部分脑区,无明显的神经元再生,因而仅依靠内源性神经再生功能修复脑损伤,不能完全实现修复目的。因此,细胞移植成为中枢神经系统变性疾病和损伤最有希望的治疗方法。NSCs 是指神经系统中终生保持增殖能力和分化潜能的细胞,可以通过对称或不对称分裂生成新的干细胞和分化潜能逐渐降低的子细胞,最终生成中枢神经系统的 3 种主要细胞:神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞^[8]。NSCs 来源广泛并能够在体外长期保持其多能性及分化增殖能力,这一特性使其在细胞移植中具有重要作用。NSCs 具有自我更新和多向分化的潜能,NSCs 移植治疗神经损伤能增加机体神经元的数量,NSCs 本身又能分泌各种神经营养因子,从而实现自

及 FeSOD,其中 90%是 SOD1,其是生物体内清除自由基的首要物质,能清除需氧代谢中产生的过氧化物,具有保护神经细胞的功能。但是由于其分子量过大,不能自由通过细胞膜或者血脑屏障;并且 $T_{1/2}$ 短,容易受酶水解而失活,因此外源性 SOD1 的应用受到限制^[11-12]。脑组织损伤、缺血时会在短时间内产生大量氧自由基,对神经元产生毒性作用,此时体

内的 SOD1 由于数量有限而不能有效发挥保护作用。曾有部分研究探索利用诸如基因工程技术等手段以增加中枢神经系统内 SOD1 的含量。但由于这些技术本身存在诸多缺陷,使进一步研究受到限制^[13]。有前期研究已经证实细胞穿透肽 PEP-1 可以携带天然活性的 SOD1 转导进入中枢神经系统^[14],为提高脑组织内 SOD1 含量提供了新途径。有研究者应用 SOD1 转基因鼠作为实验对象,发现 NSCs 的分化率提高,神经元存活率提高^[15-16]。SOD1 对所有神经前体细胞的早期阶段以及限于神经祖细胞谱细胞的更多分化阶段有重要作用,作为 NSCs 中特定基因表达模式的基本组成部分,它与神经细胞的死亡有密切关系^[17]。本课题组前期采用基因工程技术成功制备 PEP-1-SOD1 融合蛋白^[3]。研究表明,用 NSCs 移植联合 PEP-1-SOD1 融合蛋白治疗大鼠颅脑损伤,能够使移植的 NSCs 更好地在损伤部位存活、增殖、分化与迁移,促进损伤后大鼠神经功能的恢复,可以为临床治疗颅脑损伤提供新的治疗手段和方法。

[参考文献]

- [1] 费舟,屈延. 颅脑创伤的循证医学思考[J]. 中华神经医学杂志,2014,5(13):436
- [2] 肖国民. 黄体酮对颅脑损伤神经保护研究现状[J]. 中华神经外科杂志,2014,30(5):530
- [3] 贾进明,濮翔科. PEP-1-SOD1 融合蛋白的制备、表达及纯化[J]. 徐州医学院学报,2015,35(2):105-108
- [4] Mothe AJ, Kulbatski I, Parr A, et al. Adult spinal cord stem/progenitor cells transplanted as neurospheres preferentially differentiate into oligodendrocytes in the adult rat spinal cord[J]. *Cell Transplant*,2008,17(7):735-751
- [5] Barthel A, Ostrakhovitch EA, et al. Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling by copper and zinc ions; mechanisms and consequences[J]. *Arch Biochem Biophys*,2007,463(2):175-182
- [6] Kernie SG, Erwin TM, Parada LF. Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice[J]. *J Neurosci Res*,2001,66(3):317-326
- [7] Maldonado-Soto AR, Oakley DH, Wichterle H, et al. Stem cells in the nervous system[J]. *Am J Phys Med Rehabil*,2014,93(11 Suppl 3):132-144
- [8] De Feo D, Merlini A, Laterza C, et al. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders:from cell replacement to neuroprotection[J]. *Curr Opin Neurol*,2012,25(3):322-333
- [9] López-Bendito G, Arlotta P. Cell replacement therapeutics for nervous system regeneration[J]. *Dev Neurobiol*,2012,72(2):145-152.
- [10] Matsui T, Akamatsu W, Nakamura M, et al. Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology:basic concepts and potential application for cell replacement therapy[J]. *Exp Neurol*,2014,260(10):12-18
- [11] Kunze A, Lengacher S, Dirren E, et al. Astrocyte-neuron co-culture on microchips based on the model of SOD mutation to mimic ALS[J]. *Integr Biol(Camb)*,2013,5(7):964-975
- [12] 周畅,张晨,姚倩倩,等. 骨髓基质细胞对 SOD1 转基因小鼠的作用及机制探讨[J]. 中华医学杂志,2013,93(29):2324-2328
- [13] Davis AS, Zhao H, Sun GH, et al. Gene therapy using SOD1 protects striatal neurons from experimental stroke[J]. *Neurosci Lett*,2007,411(1):32-36
- [14] 董敏,席刚明,张正洪,等. PEP-1-SOD1 融合蛋白转入小鼠海马组织的能力及时间关系[J]. 第四军医大学学报,2009,30(13):1184-1187
- [15] Xu L, Shen P, Hazel T, et al. Dual transplantation of human neural stem cells into cervical and lumbar cord ameliorates motor neuron disease in SOD1 transgenic rats[J]. *Neurosci Lett*,2011,494(3):222-226
- [16] Takemura S, Kayama T, Kuge A, et al. Correlation between copper/zinc superoxide dismutase and the proliferation of neural stem cells in aging following focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosurg*,2006,104(1):129-136
- [17] Sakata H, Niizuma K, Wakai T, et al. Neural stem cells genetically modified to overexpress Cu/Zn-superoxide dismutase enhance amelioration of ischemic stroke in mice[J]. *Stroke*,2012,43(9):2423-2429

[收稿日期] 2015-03-25