

· 实验研究 ·

经脑室神经干细胞移植对脑室周围白质软化 新生大鼠的脑病理评估

贺月秋, 陈惠金, 钱龙华, 陈冠仪

(上海交通大学医学院附属新华医院, 上海市儿科医学研究所 200092)

[摘要] **目的** 对经脑室植入神经干细胞(NSCs)的脑室周围白质软化(Periventricular leukomalacia, PVL)新生大鼠进行光镜下脑病理评估,探讨 NSCs 移植对治疗早产儿 PVL 的可行性。**方法** 采用 E14 胎鼠大脑皮层制备 NSCs。2 日龄新生大鼠随机分为 PVL 对照组(PVL 组),PVL + DMEM/F12 培养基对照组(PVL + DMEM/F12 组),PVL + 神经干细胞(NSCs)移植组(PVL + NSCs 组),假手术对照组(Sham 组),Sham + DMEM/F12 培养基对照组(Sham + DMEM/F12 组),Sham + NSCs 移植组(Sham + NSCs 组),每组 18~21 只。对 2 日龄 PVL 新生大鼠在建模后 72 h 进行经脑室 NSCs 移植,分别于移植后 7,14,21 d 进行光镜下脑病理评估。**结果** 随着移植后时间的增加,脑白质病变呈进一步改善。移植后 21 d 光镜下病理证实,未移植组脑白质呈轻度和重度病变各占 50%,神经元病理评分为 1.28 ± 0.86 。移植组则有 30% 白质完全正常,轻度和重度病变各占 40% 和 30%,神经元病理评分为 0.32 ± 0.16 ,两组在脑白质病变程度以及神经元病理评分之间的差异均呈非常显著性意义($\chi^2 = 10.7, P < 0.01; F = 29.664, P < 0.01$)。**结论** 经脑室外源性 NSCs 移植可明显改善脑白质的病理损伤。经脑室 NSCs 移植对早产儿 PVL 具有很大的治疗潜力,为今后成功防治早产儿这一最常见的脑损伤顽症提供了新的可行性途径。

[中国当代儿科杂志,2008,10(3):362-366]

[关键词] 脑室周围白质软化;神经干细胞;细胞移植;病理;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)03-0362-05

Cerebral pathological evaluation following neural stem cells intraventricular transplantation in neonatal rats with periventricular leukomalacia

HE Yue-Qiu, CHEN Hui-Jin, QIAN Long-Hua, CHEN Guan-Yi. Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China (Chen H-J, Email: hjchenk@online.sh.cn)

Abstract: Objective To evaluate the brain pathological changes following exogenous neural stem cells (NSCs) intraventricular transplantation in neonatal rats with periventricular leukomalacia (PVL), and to explore the feasibility of NSCs transplantation for the treatment of PVL in premature infants. **Methods** NSCs were prepared from E14 embryonic rat brain. Two-day-old neonatal rats were randomly divided into six groups: PVL, PVL + culture medium, PVL + NSCs, sham operation, sham operation + culture medium, and sham operation + NSCs (18-21 rats each group). Intraventricular transplantation of exogenous NSCs was performed 72 hrs after PVL induction or sham operation. The cerebral pathological evaluation was undertaken by light microscopy 7, 14 and 21 days after transplantation. **Results** The pathological changes in the cerebral white matter were gradually improved with the prolonged time after transplantation. After 21 days of transplantation, 50% of the cerebral white matter showed mild pathological changes and 50% of that showed severe pathological changes, with neuronal pathological scores of 1.28 ± 0.86 , in the untreated PVL group. In the PVL + NSCs group, 30% of normal white matter, 40% of mild and 30% of severe pathological changes in the white matter were observed, with neuronal pathological scores of 0.32 ± 0.16 , 21 days after transplantation. There were very significant differences in both of pathological changes in the cerebral white matter and neuronal pathological scores between the PVL and PVL + NSCs groups ($\chi^2 = 10.7, P < 0.01; F = 29.664, P < 0.01$). **Conclusions** Intraventricular transplantation of exogenous NSCs can apparently improve cerebral white matter damage. It is suggested that intraventricular transplantation of NSCs is of a great potential feasibility for the treatment of PVL in premature infants.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (3):362-366]

Key words: Periventricular leukomalacia; Neural stem cell; Cell transplantation; Pathology; Neonatal rats

[收稿日期]2007-10-18;[修回日期]2007-11-22

[作者简介]贺月秋,女,博士。主攻方向:新生儿脑损伤。

[通讯作者]陈惠金,女,主任医师,教授。上海交通大学医学院附属新华医院,上海市儿科医学研究所,邮编 200092。

脑室周围白质软化(periventricular leukolamacia, PVL)是早产儿脑损伤的主要类型,为早产儿死亡和存活儿脑瘫和智力落后的主要原因。迄今对早产儿PVL尚无防治方法。近来对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的系列研究,为早产儿PVL的治疗提供了新思路。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,能分化为少突胶质细胞、神经元及其星形胶质细胞等神经细胞,且NSCs具有极低的免疫原性,从而使外源性细胞的修复治疗成为一种可能的理想治疗途径^[1-6]。本研究在成功创建了2日龄PVL新生大鼠模型的基础上^[7-9],对建模后72h的PVL新生大鼠进行经脑室NSCs移植治疗。本文对经脑室NSCs移植的PVL新生大鼠进行光镜下脑病理评估,报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

2日龄Sprague-Dawley清洁级新生大鼠和E14孕鼠(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2003-0002)。其中E14孕鼠用于制备神经干细胞。2日龄新生大鼠随机分为6组,每组18~21只,分别为:PVL对照组(PVL组),PVL+DMEM/F12培养基对照组(PVL+DMEM/F12组),PVL+神经干细胞(NSCs)移植组(PVL+NSCs组),假手术对照组(Sham组),Sham+DMEM/F12培养基对照组(Sham+DMEM/F12组),Sham+NSCs移植组(Sham+NSCs组)。

1.2 主要实验材料

1.2.1 主要试剂 DMEM/F12无血清专用培养基(Gibco),小牛血清(杭州四季青公司),碱性成纤维细胞生长因子bFGF(Protech),表皮生长因子EGF(Protech),青霉素/链霉素(Gibco),B27无血清添加剂(Gibco),L-谷氨酰胺(L-Glutamine)(Sigma)。

1.2.2 主要实验器材 瑞沃德脑立体定位仪MP8000(深圳瑞沃德生命科技有限公司),KdScientific 310微量注射泵(KdScientific),CO₂孵箱(Thermoforma),一次性培养器材(25 mL培养瓶,6,24,96孔板,Corning)。

1.3 PVL模型制备

新生大鼠仰卧位固定,颈部正中切口,分离并结扎双侧颈总动脉。休息1.5~3h后,送入缺氧箱,箱温37℃,湿度(70±5)%,8%O₂和92%N₂混合气体输入流量为1~2.5 mL/min。缺氧0.5h后,返回母鼠身边继续喂养。假手术组游离双侧颈总动

脉,不予结扎和缺氧。

1.4 胚鼠神经干细胞的制备和培养

将E14孕鼠乙醚麻醉后打开腹腔切取子宫,剪开子宫角后取出胎鼠,夹取胎鼠双侧大脑皮层组织,用D-Hanks液冲洗。小心剥除脑膜和血管后,将脑组织剪成1.0 mm³小块,吸管吹打成单细胞悬液。1 000 r/min下离心5 min,弃上清,1×10⁶/4 mL密度置条件培养基(DMEM/F12 6 mL, bFGF 20 ng/mL, EGF 20 ng/mL, B27 20 μL/mL, pen 100 U/mL, strep 100 μg/mL)中培养。每2~3 d半量换液1次。每6~7 d传代一次。

1.5 对新生大鼠经脑室移植 NSCs

将已标记PKH26的NSCs浓度调整为5×10⁴/μL,置冰上备用。2日龄PVL新生大鼠于术后第3天(5日龄),对照组为相应5日龄新生大鼠,经乙醚麻醉后固定于脑立体定位仪下,脑室穿刺部位定位于:前-后(AP)=1.5 mm;中线-外侧(ML)=-2 mm;深度(DV)=1.5 mm。用5 μL微量注射器通过微量注射泵,将2 μL移植液缓缓注入新生大鼠的一侧脑室内,注速为0.5 μL/min。其中PVL+NSCs组和Sham+NSCs组分别注入NSCs移植液2 μL;PVL+DMEM/F12组和Sham+DMEM/F12组分别注入DMEM/F12培养液2 μL;PVL组和Sham组则不注射任何液体。注射完毕后留针2 min后取出,火棉胶封闭注射针口。待新生大鼠苏醒后送返母鼠旁继续喂哺。

1.6 光镜病理标本的制备和检测

1.6.1 病理标本的制备 乙醚麻醉下,分别对各组新生大鼠于移植后7 d(每组n=5)、14 d(每组n=5)及21 d(每组n=8~11)用生理盐水进行心脏灌注,直至流出液清亮为止,取出脑组织置10%中性福尔马林固定24 h,选择立体定位仪进针位置处前0.5 mm至后2.5 mm共3 mm厚度冠状位脑组织。经脱水石蜡包埋后切片,每间隔20张切片(片厚25 μm)取1张切片(片厚5 μm),共取4张切片进行光镜下病理评估。

1.6.2 光镜下病理评估方法

①神经元损伤病理评估方法:参照Towfighi等^[10]所描述方法进行适当改良简化,高倍视野下(40×10)每1/10病变面积记一个单位,一个单位的变性评为0.2分,一个单位的坏死评为2分。其中“变性”指组织切片为嗜伊红染色增强或呈细网状改变;“坏死”指组织切片见小圆形空泡密集或小圆形空泡呈相互融合,组织结构模糊或消失,细胞核形态改变,浓缩或破裂。若同时出现变性和坏死灶,

则变性不另评分,忽略不计。

②白质损伤病理评估方法:参照 Hisakazhu 等^[8,11]方法,对胼胝体和脑室周围白质区域进行评分,其中正常为0度;白质轻度稀疏,神经纤维排列不整齐为Ⅰ度,提示为轻度病变;白质严重稀疏,神经纤维排列不整齐,有凝固性坏死和囊腔形成Ⅱ度,提示为重度病变。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件对数据进行分析处理,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用方差分析,计数资料使用卡方检验。 $P < 0.05$ 示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 脑室 NSCs 移植术

5 日龄各组新生大鼠乙醚麻醉后,在脑立体定位仪下进行经脑室 NSCs 移植术。术中进针顺利,在微量注射泵的控制下,移植液通过微量注射器以 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注速缓缓注入新生大鼠的脑室内。注射过程平稳,没有 1 例动物在移植过程中出现呼

吸急促、皮肤苍白及抽搐等不良反应。注射完毕后留针 2 min,拔针后针道未见液体渗漏或出血现象。新生大鼠麻醉苏醒后活动如常。

2.2 光镜下脑病理评估

各组新生大鼠于移植后 7,14,21 d 的光镜下脑病理评估结果如下(图 1A~L)。

2.2.1 Sham 各组的脑病理改变 Sham 组、Sham + DMEM/F12 组以及 Sham + NSCs 组(各组 $n = 8$)大鼠的脑皮层和皮层下细胞结构清晰,排列有序,细胞形态正常;皮层下神经纤维致密,走向整齐,未发现病理改变。

2.2.2 未移植 PVL 各组的脑病理改变 PVL 组($n = 9$)和 PVL + DMEM/F12 组($n = 8$)大鼠的脑皮质部位可见少量神经元损伤。脑皮层下细胞层次、结构则欠清晰,呈疏松状,神经纤维走向紊乱,呈网状、条索状,部分出现排列紊乱,可见囊性空洞形成。所有未移植 PVL 大鼠在移植后 21 d 均出现脑白质病变,其中 PVL 组轻度病变和重度病变各占 50%,PVL + DMEM/F12 组则各占 81.2% 和 18.8%。两组神经元病理评分分别为 1.28 ± 0.86 和 1.01 ± 0.88 (表 1)。

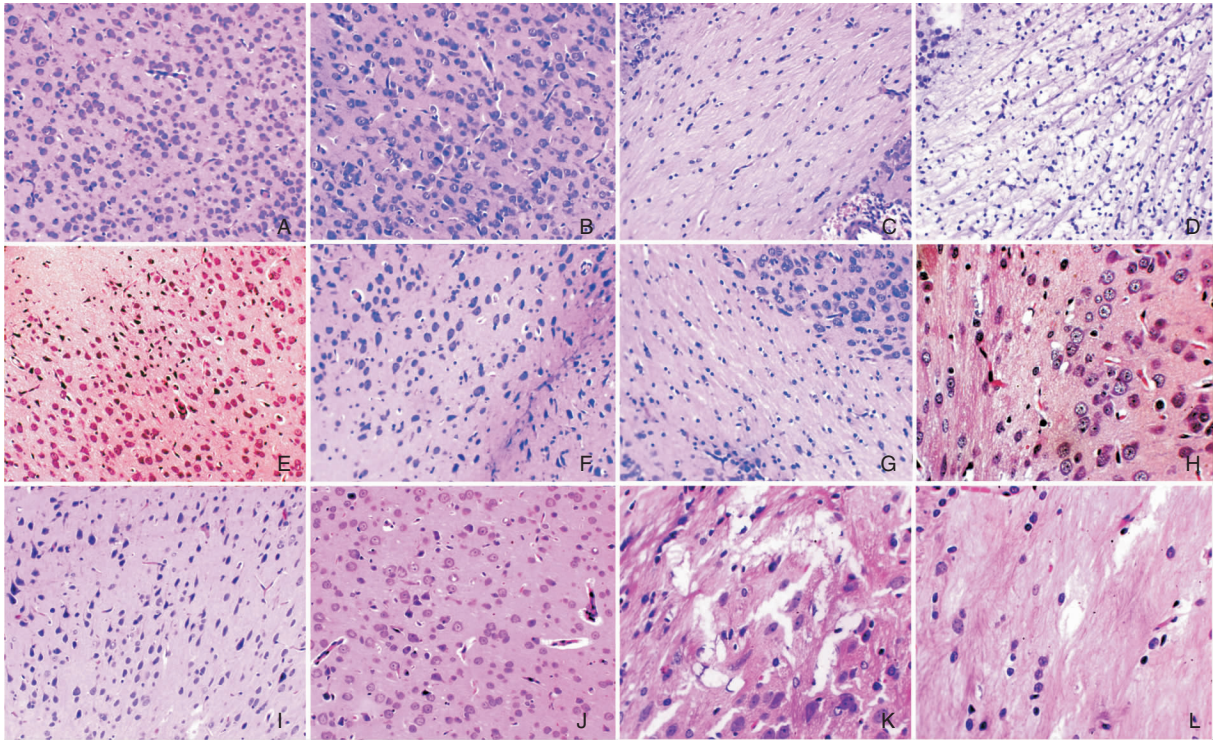


图 1 各组新生大鼠移植后 7,14,21 d 光镜下脑病理照片(×200) A~D 为移植后 7 d。A: Sham 组,显示正常皮层神经元。B: PVL + NSCs 组,显示皮层部分神经元水肿,数量减少。C: Sham 组,显示白质神经纤维排列齐整。D: PVL + NSCs 组,显示白质疏松,神经纤维排列紊乱。E~H 为移植后 14 d。E: PVL 组,显示皮层部分神经元变性、坏死。F: PVL + NSCs 组,显示部分神经元变性,数量减少。G: Sham 组,显示正常白质。H: PVL + NSCs 组(×400),显示白质有部分改善,但排列仍紊乱疏松。I~L 为移植后 21 d。I: PVL 组,显示皮层细胞变性、坏死。J: PVL + NSCs 组,皮层神经元接近正常。K: PVL 组(×400),显示白质紊乱伴囊性坏死。L: PVL + NSCs 组(×400),显示白质紊乱呈明显好转。

表 1 各组大鼠 NSCs 移植后 21 d 光镜下脑病理评分比较

组别	切片	光镜下脑白质病变评分 ^a			光镜下神经元病变评分 ^b ($\bar{x} \pm s$)
		0 度(%)	I 度(%)	II 度(%)	
PVL 组	36	0(0)	18(50)	18(50)	1.28 ± 0.86
PVL + DMEM/F12 组	32	0(0)	26(81.3)	6(18.7)	1.01 ± 0.88
PVL + NSCs 组	40	12(30)	16(40)	12(30)	0.32 ± 0.16
Sham 组	32	32(100)	0(0)	0(0)	0
Sham + DMEM/F12 组	32	32(100)	0(0)	0(0)	0
Sham + NSCs 组	32	32(100)	0(0)	0(0)	0

a: 采用 Kruskal-Wallis Test 秩和检验方法, $\chi^2 = 10.7, P < 0.01$; b 采用 One-Way ANOVA 的 tamhane's t^2 检验方法, $F = 29.664, P < 0.01$; PVL 组与 PVL + NSCs 组比较, $P < 0.01$; PVL + DMEM 组与 PVL + NSCs 比较, $P < 0.01$. Sham 各组光镜下无病理改变, 未纳入统计。

2.2.3 PVL 移植各组的脑病理改变 PVL + NSCs 组 ($n = 10$) 大鼠的脑损伤情况较未移植 PVL 各组呈明显改善, 脑皮层细胞排列整齐, 细胞轮廓清晰, 结构完整。皮层下结构清晰, 神经纤维排列致密, 走向整齐, 未观察到有异形性细胞以及成瘤样胶质细胞增生等异常改变。比较 7 d、14 d 及 21 d 组, 可见随着移植后时间的增加, 脑白质病理改变呈进一步改善。移植后 21 d 的病理评分示, PVL + NSCs 组有 30% 脑白质正常, 轻度和重度异常在 PVL + NSCs 组各为 40% 和 30%, 提示经脑室 NSCs 移植可明显改善脑白质的病理改变。

3 讨论

PVL 是早产儿最常见的脑损伤类型, 主要引起脑室周围白质的少突胶质细胞受损, 纤维束损伤, 导致去髓鞘病变, 是造成脑瘫等神经系统后遗症的主要原因^[12,13]。迄今对早产儿 PVL 尚无防治良策。外源性 NSCs 的移植研究进展, 为早产儿 PVL 的治疗提供了新的思路。

NSCs 移植的成功与否, 很大程度上取决于合宜的动物模型、移植物的来源、移植时间窗及移植部位的选择。本研究在成功建立了 2 日龄 PVL 模型^[9]、并成功制备了取自于胚胎、具有良好分化能力的 NSCs 的基础上, 对 PVL 新生大鼠在建模后 72 h 进行了经脑室 NSCs 移植的对照研究。

移植时间窗选择在 PVL 建模后 72 h、即新生大鼠 5 日龄时进行, 主要基于下列考虑: ①从脑缺血原发损伤到继发损伤的间隔时间通常为 0.5 ~ 72 h 左右。原发损伤主要是神经细胞坏死, 继发损伤主要是神经细胞凋亡, 而凋亡的高峰时间至少在缺血 3 d 后发生。本研究移植时间窗选择在建模后 72 h, 即选择在缺血后发生凋亡的高峰之前进行移植。②建模后 72 h 也是损伤炎症水肿明显的阶段, 损伤区域可以分泌多种细胞因子, 有可能促使植入 NSCs 的

迁移并诱导其分化。本研究对植入 NSCs 在脑内的迁移分化过程的观察显示 (另文总结), 植入的 NSCs 主要迁移聚集在 PVL 病变最明显的部位即脑室周围和皮层下白质等区域, 并主要分化为少突胶质细胞, 提示病变部位可能对植入 NSCs 有一定的趋化诱导作用, 可能通过释放一些细胞因子来诱导外源性 NSCs 的迁移和分化^[14]。

移植部位的合宜选择也是移植成功与否的重要因素。对成年动物最常用的移植部位, 是将 NSCs 直接注射于脑损伤区, 如植入皮层、SVZ、海马或纹状体等部位。但通常脑内 NSCs 移植的成功率较低, 这是因为脑损伤部位是一处不良的局部微环境区域, 植入的 NSCs 有可能被激活的小胶质细胞和巨噬细胞所清除。经脑内移植尚有容积占位效应, 致使 NSCs 移植量有限, 也是导致移植成功率降低的因素之一。此外, 经脑内移植还可导致局部 NSCs 过度聚集, 将不利于 NSCs 的分化, 甚至有成瘤倾向。也有经静脉注入 NSCs 进行移植。如 Jeong 等^[15]经大鼠尾静脉植入 NSCs, 证实进入脑内的 NSCs 有 10% 成功分化为神经元, 并与周围正常神经元建立了突触联系。但经静脉进行 NSCs 移植的不利因素在于, 从外周静脉进入脑内需经长时迁移, 最后进入脑内的细胞数量十分有限, 从而导致移植成功率不高。

由于新生动物的血脑屏障呈开放状态, 较成年动物具有得天独厚的优势, 因此新生动物可选择脑室作为独有的有效移植途径。经脑室移植的长处在于: ①植入细胞可远离损伤环境, 避免损伤区的不良微环境影响移植细胞的成活, 从而提高植入细胞的存活率; ②避免经脑内移植时的容积占位效应, 增加植入细胞的数量; ③SVZ 存在大量内源性 NSCs, 经脑室移植可以避免损伤 SVZ 区, 保护和促进内源性 NSCs; ④脑室内环境也为植入的 NSCs 提供了一个良好的迁移发育和定向分化的场所, 更有利于宿主对 NSCs 的生理性调控; ⑤经脑室植入的细胞在内

源性 NSCs 的迁移途径引导下,可广泛快速地到达脑内损伤区。报道对脑缺氧缺血新生动物进行非损伤侧脑室内 NSCs 移植,植入细胞以 1~2 mm/d 的速度,3 d 内不仅在同侧脑内迁移、分化,并且广泛迁移至对侧脑半球损伤区,进一步分化为神经元和胶质细胞,其分化成功率高达 80% 以上,远高于成年鼠神经元的分化程度,因此损伤修复效果十分显著^[16]。本研究亦发现,在脑立体定位仪下经侧脑室植入的 NSCs,主要分布在脑室周围胼胝体下方的区域中,大部分分化为少突胶质细胞,少部分分化为星形胶质细胞和神经元,提示经脑室内进行 NSCs 移植是研究 PVL 治疗方法的合宜途径。

通过光镜下病理评估,本研究显示,经 NSCs 移植治疗后,对照未移植组,PVL 移植组幼鼠的脑病理得到明显改善,且随着移植后时间的增加,脑白质病变呈进一步改善,在脑白质部位的神经纤维排列较整齐,走向一致,未见出现囊性坏死,移植后 21 d 光镜下病理证实,未移植组脑白质呈轻度和重度病变各占 50%,神经元病理评分为 1.28 ± 0.86 。移植组则有 30% 白质完全正常,轻度和重度病变各占 40% 和 30%,神经元病理评分为 0.32 ± 0.16 。提示随着植入的外源性 NSCs 分化为少突胶质细胞系数量的逐渐增多,脑白质病变亦逐步获得明显改善,证实经脑室外源性 NSCs 移植可明显改善脑白质的病理损伤。

通过上述研究,证实经脑室 NSCs 移植植入的 NSCs 具有较强的迁移能力,可以迁移到主要病变受累的脑室周围部位,植入 NSCs 在脑室周围主要分化为少突胶质细胞,从而替补受损的少突胶质细胞,修复白质病变,使 PVL 新生大鼠的脑白质病变获得明显改善,髓鞘形成明显增加,提示经脑室 NSCs 移植对早产儿 PVL 具有很大的治疗潜力,为今后成功防治早产儿这一最常见的脑损伤顽症提供了新的可行性途径。

对 NSCs 移植治疗早产儿脑室周围白质软化尚有不少环节有待进一步探索,如对植入 NSCs 在脑内的迁移、增殖、分化及与组织结构融合的细胞内环境的调控机制尚不完全明了;对植入的外源性 NSCs 与宿主细胞所建立的有效突触联系及参与的宿主神经网络的形成,尚有待提供更翔实的证据;以及对植入 NSCs 的迁徙速度和分化方向尚缺乏有效的调控手段等。上述环节均为本研究组在今后需要进一步

努力实践的方向。

[参 考 文 献]

- [1] McKay R. Stem cells in the central nervous system[J]. *Science*, 1997, 276(5309):66-71.
- [2] Davis AA, Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex[J]. *Nature*, 1994, 372(6503):263-266.
- [3] Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo[J]. *Nature*, 1996, 383(6601):624-627.
- [4] Lios C, Buyua A. Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain[J]. *Science*, 1994, 264(5162):1145.
- [5] Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus[J]. *Nat Med*, 1998, 4(11):1313-1317.
- [6] Doetsch F, Gaille L, Lim DA. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain[J]. *Cell*, 1999, 97(6):703-716.
- [7] Cai ZW, Pang Y, Xiao F, Rhods PG. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain [J]. *Brain Res*, 2001, 898(1):126-135.
- [8] Uehara H, Yoshioka H, Kawase S, Nagai H. A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion[J]. *Brain Res*, 1999, 837(1-2):213-220.
- [9] 贺月秋,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. 构建以少突胶质细胞前体为主与人类早产儿脑室周围白质软化病理相似的动物模型[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(19):3742-3747.
- [10] Towfighi J, Mauger D, Vannucci RC, Vannucci SJ. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 1997, 100(2):149-160.
- [11] Lin S, Rhodes PG, Lei M, Zhang F, Cai Z. alpha-Phenyl-n-tert-butyl-nitron attenuates hypoxic-ischemic white matter injury in the neonatal rat brain[J]. *Brain Res*, 2004, 1007(1-2):132-141.
- [12] Volpe JJ. Cerebral white matter injury of the premature infant—more common than you think[J]. *Pediatrics*, 2003, 112(1 Pt 1):176-180.
- [13] Back SA. Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms[J]. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2006, 12(2):129-140.
- [14] Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat [J]. *Neuroscience*, 1993, 56(2):337-344.
- [15] Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim SU, Kim M, Roh JK. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2003, 34(9):2258-2263.
- [16] 栾佐,屈素清,尹国才,阎凤清,胡晓红,吴南海. 新生鼠缺氧缺血性脑损伤后不同途经神经干细胞移植的实验研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2006, 27(9):497-500.

(本文编辑:吉耕中)