

论著·实验研究

缺血启动未成熟大鼠脑白质内源性 修复功能的研究

李文娟 陈惠金 钱龙华 毛凤霞

(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,上海 200092)

[摘要] 目的 探讨缺血启动未成熟脑白质的内源性修复机制。方法 5日龄 Sprague-Dawley 新生大鼠随机分为假手术(Sham)组和 PVL 组。分别于建模后 7 d 及 21 d 光镜、电镜下评估脑白质病变及髓鞘形成情况,免疫组化检测脑白质 O4⁺ 少突胶质细胞(OL)前体,观察 SVZ 区祖细胞的激活、增殖、迁移和分化情况。结果 与 Sham 组比较,PVL 组在建模后 7 d 和 21 d 光镜下脑白质病理均呈轻或重度病变;病理评分均明显增高;髓鞘形成数量明显减少,厚度变薄;免疫组化显示 O4⁺ OL 前体明显减少。建模 48 h 后,PVL 组 SVZ 区 BrdU、NG2 共阳性祖细胞明显增殖并向脑室周围迁移,至 7 d 达到高峰;从 72 h 开始,脑室周围出现呈 BrdU、O4 共阳性 OL 前体,至 21 d,新生 OL 前体明显多于同时段 Sham 组。结论 缺血可启动新生大鼠脑白质的内源性修复机制,诱导 SVZ 区胶质源性神经祖细胞激活、增殖、迁移至脑室周围和分化为 OL 前体。 [中国当代儿科杂志,2012,14(7):548-553]

[关键词] 脑室周围白质软化;NG2 神经祖细胞;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)07-0548-06

Endogenous self-repair in immature white matter induced by ischemia in neonatal rats

Li Wen-Juan, CHEN Hui-Jin, QIAN Long-Hua, MAO Feng-Xia. Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China (Chen H-J, Email: hjchenk@163.com)

Abstract: Objective To study *in vivo* the endogenous self-repair mechanism in immature white matter induced by ischemia in neonatal rats with periventricular leukomalacia (PVL). **Methods** Five-day-old neonatal Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham and PVL groups. Rat model of PVL was prepared by ligation of the right common carotid artery following 2 hours of exposure to 8% oxygen. Pathological changes and myelination in the white matter were assessed under light and electron microscopy at 7 and 21 days after PVL. O4-positive OL precursor cells in the white matter were determined with immunofluorescence staining. Activation, proliferation, migration and differentiation of glial progenitor cells in SVZ were observed using immunofluorescent double labeling of either NG2 (marker of progenitor cells) and 5-bromodeoxyuridine (BrdU), or O4 (marker of OL precursor cells) and BrdU. **Results** All rats in the PVL group manifested either mild or severe white matter injury under light microscopy, and had higher pathological scores of white matter compared with the sham group at 7 and 21 days after PVL ($P < 0.05$). Electron microscopy showed that the number and thickness of myelin sheath in the PVL group were significantly reduced compared with the sham group ($P < 0.01$). O4-positive OL precursor cells in the white matter observed under fluorescence microscopy were significantly reduced in the PVL group compared with the sham group ($P < 0.05$). BrdU/NG2-positive cells in the SVZ increased significantly in the PVL group 48 hours after PVL and migrated into the periventricular area, reaching a peak on day 7 after PVL. BrdU/O4-positive newborn cells began to appear in the periventricular area 72 hours after PVL, and the number of BrdU/O4-positive cells in the PVL group was statistically more than in the sham group on day 21 after PVL ($P < 0.05$). **Conclusions** Ischemia may induce brain self-repair in neonatal rats, resulting in activation and proliferation of NG2 glial progenitor cells in the SVZ migration and differentiation into OL precursor cells in periventricular white matter.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(7):548-553]

Key words: Periventricular leukomalacia; NG2 progenitor cell; Neonatal rats

[收稿日期]2011-12-25; [修回日期]2012-03-16
[基金项目]国家自然科学基金(No. 81070989)。
[作者简介]李文娟,女,硕士研究生。
[通信作者]陈惠金,教授。

脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)是脑室周围未成熟白质的缺血性病变,以形成髓鞘的少突胶质细胞(oligodendrocyte, OL)前体的受损和丢失为特征,为早产儿常见脑损伤,是新生儿死亡和其后发生脑瘫、认知及视听障碍的主要原因^[1]。近来研究显示,哺乳动物脑内始终藏匿有一种最原始、具有自我复制能力和多向分化潜能的神经祖细胞。大量研究证实,脑缺血、损伤等刺激后可诱导脑内神经祖细胞激活,从而启动神经再生以修复脑损伤^[2-3]。但目前研究主要局限于成年脑,对未成熟脑神经祖细胞,其增殖分化及参与髓鞘修复的能力则研究甚少,尤其对早产儿PVL的脑内在修复潜能尚未见报道。新生脑内的胶质源性神经祖细胞主要来源于室管膜下区(SVZ区)、海马部位以及脑白质部位^[4-5],NG2为其特异性标记物^[6]。本研究通过单侧颈总动脉结扎伴缺氧2h,建立5日龄新生大鼠PVL动物模型,应用BrdU示踪和光电镜病理评估等方法,从体内探讨缺血启动未成熟脑白质的内源性修复机制,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

5日龄Sprague-Dawley(SD)新生大鼠108只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)2008-0016;动物使用许可证号:SYXK(沪)2008-0052],随机分为假手术(Sham)组和PVL组,每组54只,分别于建模后48h、72h、7d及21d断头取脑进行相关检测,其中建模后7d及21d每组各19只,建模后48h及72h每组各8只。

1.2 PVL动物模型制备

参照本研究组已建立的PVL模型制备方法^[7-8],动物乙醚麻醉后固定于仰卧位,颈部正中切口,分离并结扎右侧颈总动脉,术毕缝合切口,火棉胶涂抹伤口。手术时间短于5min。术后30min将新生大鼠送入恒温缺氧箱内缺氧2h,箱内温度37℃,湿度70%±5%,以1.5L/min的流量恒定输入8%O₂+92%N₂混合气体。Sham组仅予游离右侧颈总动脉,不予结扎和缺氧。术毕各组大鼠送回母鼠身边继续喂养。24h及48h处理组新生大鼠于建模后即刻腹腔注射BrdU(Sigma公司)一次(100mg/kg),7d及21d处理组则于建模后连续3日腹腔注射BrdU,每日两次,每次50mg/kg。

1.3 脑病理评估方法

1.3.1 电镜病理评估 乙醚麻醉下,各组新生大鼠各取3只,分别于建模后7d以及21d用2%戊二醛心脏灌注,选取右侧胼胝体处脑组织1mm³,置于2%戊二醛4℃保存。1%锇酸4℃下固定2h后,用30%~100%浓度丙酮梯度脱水。将脱水后组织置环氧树脂包埋剂中浸泡、包埋,再行加温聚合。超薄切片机切片,片厚约50nm,对切片用蜡酸铀染色。在透射电镜下观察白质髓鞘形成情况。应用ITEM图像分析软件,分别于7400倍和13500倍透射电镜下,每个脑组织随机选取8张切片,对每张切片随机选取4~5个视野,分别测算横断面的髓鞘数目及髓鞘厚度,其中髓鞘厚度均值的测算公式为:髓鞘厚度=(最薄内径+最厚内径)/2。

1.3.2 光镜病理评估 两组新生大鼠各时段各取8只,乙醚麻醉下,分别于建模后7d和21d经生理盐水灌注后快速断头取脑,4%多聚甲醛固定保存。经常规脱水、石蜡包埋后,以脑室周围平面行冠状切片,苏木精-伊红(HE)染色。光镜下观察脑室周围及皮下白质的病理变化。根据Uehara的病理分级标准^[9],各组大鼠的脑白质进行病理分级如下:0级为正常;1级(轻度异常)为白质轻度疏松,神经纤维排列不齐;2级(重度异常)为白质严重疏松,神经纤维排列紊乱,有凝固性坏死和囊腔形成。同时将上述脑白质的病理分级改良为病理评分,即0级、1级和2级分别被评为0分、1分和2分。

1.4 免疫荧光检测

1.4.1 冰冻切片制备 两组新生大鼠于建模后48h、72h、7d及21d各时段各取8只,分别经生理盐水灌注后断头取脑,OCT包埋剂固定右侧脑组织,以侧脑室平面行冠状冰冻切片,片厚10μm。

1.4.2 脑白质OL前体标志物O4免疫荧光检测 两组新生大鼠分别取建模后7d及21d时冰冻切片,经0.3%Triton-100穿膜剂处理后,加入10%山羊血清封闭液封闭30min;甩去多余的血清后分别加入O4单克隆抗体(R&D公司)1:200 4℃过夜;次日PBS漂洗3min×5次;加入TRITC荧光标记的二抗,室温孵育1h;PBS漂洗3min×5次;封片,荧光显微镜下拍照,应用Image J图像处理分析软件分析计数镜下O4阳性细胞数,每只大鼠脑组织随机选3张切片,每张切片随机选3个视野。

1.4.3 SVZ区胶质源性祖细胞及其分化细胞免疫荧光检测 两组新生大鼠分别取建模后各时段冰冻切片,经0.3%Triton-100穿膜剂处理和2M盐酸37℃处理各30min后,加入10%山羊血清封闭液封

闭 30 min;甩去多余的血清,分别加入 NG2 单克隆抗体(Millipore 公司)1:800 和 BrdU 单克隆抗体(ab-com 公司)1:400 混合液,以及 O4 单克隆抗体(R&D 公司)1:200 和 BrdU 单克隆抗体 1:400 混合液,4℃ 过夜;次日 PBS 漂洗 3 min × 5 次;分别加入 TRITC 荧光标记和 FITC 荧光标记的二抗混合液,室温孵育 1 h;PBS 漂洗 3 min × 5 次;封片,荧光显微镜下拍照分析。每只大鼠脑组织随机选 3 张切片,每张切片随机选 3 个视野,应用 Image J 图像处理分析软件镜下计数 BrdU 和 NG2 共阳性细胞数以及 BrdU 和 O4 共阳性细胞数,计算公式为:双标阳性细胞数 = 相关系数(由 Image J 图像分析软件自动计算) × DAPI 核染总细胞数。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件对数据进行处理和统计分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用 *t* 检验;等级资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较

PVL 组大鼠建模后出现皮肤发绀、活动减少、睁眼时间延迟、体重增长缓慢等异常表现。建模前 Sham 组和 PVL 组大鼠的体重差异无统计学意义(13.1 ± 1.0 g vs 12.9 ± 1.6 g, $P > 0.05$),建模后 PVL 组大鼠在 7 d 及 21 d 的体重均明显低于 Sham 组(分别 25.9 ± 1.3 g vs 21.3 ± 3.3 g, $t = 3.691$, $P = 0.002$; 60.7 ± 5.2 g vs 49.1 ± 7.6 g, $t = 3.549$, $P = 0.003$)。提示一侧颈总动脉结扎伴缺氧 2 h 所造成的脑白质损伤可明显影响大鼠的体格生长。

2.2 脑白质病理评估

建模后 7 d 和 21 d, PVL 组大鼠呈现双侧脑萎缩伴大片白色梗死灶,以右侧为甚。光镜下脑病理显示:Sham 组大鼠皮层下脑白质的细胞结构清晰,排列有序,神经纤维致密,走向一致,未发现病理改变。PVL 组大鼠皮层下白质的细胞层次及结构欠清晰,呈疏松模糊状,神经纤维走向紊乱,呈网状或条索状,部分出现囊腔病变。脑白质的病理分级显示, PVL 组在建模后 7 d 和 21 d, 分别有 58% 和 63% 的大鼠脑白质呈轻度病变, 42% 和 38% 的大鼠呈重度病变; Sham 组大鼠则均呈正常脑白质($P < 0.05$)。脑白质的病理评分显示, PVL 组在建模后 7 d 及 21 d 的病理评分(1.42 ± 0.5 ; 1.38 ± 0.5) 均明显高于 Sham 组(0;0)(χ^2 值分别为 96 和 108, 均 $P < 0.01$)。提示一

侧颈总动脉结扎伴缺氧 2 h 所构建的 5 日龄 PVL 新生大鼠模型, 可出现明显的脑白质病变。见图 1。

2.3 髓鞘形成评估

建模后 7 d, 电镜下观察到 Sham 组大鼠的脑白质内可见髓鞘, 至建模后 21 d, 白质内髓鞘基本形成, 有髓神经纤维形态规则, 边界清晰, 髓鞘厚度一致, 密度均匀。PVL 组大鼠在建模后 7 d 和 21 d 均罕见髓鞘形成, 神经纤维形态不规则, 排列松散。在 7400 倍透射电镜下显示 PVL 组在建模后 7 d 和 21 d 的髓鞘数目(0.67 ± 0.5 ; 6.7 ± 3.5) 均明显低于 Sham 组(24 ± 2.8 ; 112 ± 2.8) (t 值分别为 15.013 和 34.968, 均 $P < 0.01$); 在 13500 倍透射电镜下显示 PVL 组在建模后 7 d 和 21 d 的髓鞘厚度(nm) (32 ± 14 ; 58 ± 12) 均明显薄于 Sham 组(84 ± 11 ; 155 ± 20) (t 值分别为 9.801 和 13.91, 均 $P < 0.01$)。提示一侧颈总动脉结扎伴缺氧 2 h 所造成的脑白质损伤可明显减少脑白质髓鞘形成的数量及厚度。见图 2。

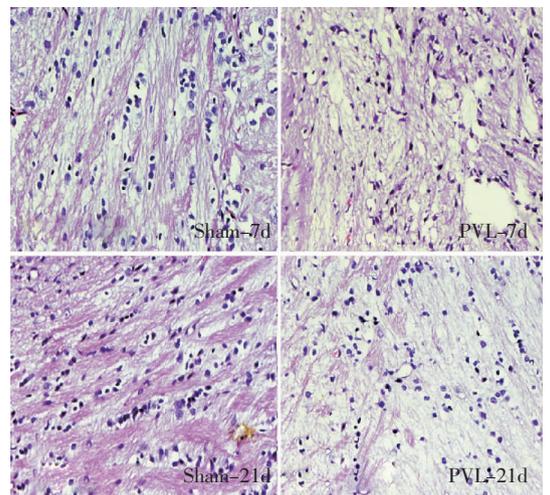


图1 两组大鼠脑白质病理检测(苏木精-伊红染色, ×400) 显示 PVL 组在建模后 7 d 和 21 d, 脑白质呈现结构疏松, 神经纤维走向紊乱, 部分出现囊腔改变。

2.4 OL 前体免疫荧光检测

PVL 组大鼠在建模后 7 d 和 21 d, 其脑室周围 O4 阳性细胞数量均明显少于 Sham 组大鼠(分别 14 ± 4 vs 27 ± 3 , $t = 9.657$, $P < 0.05$; 19 ± 6 vs 50 ± 4 , $t = 10.816$, $P < 0.01$)。提示一侧颈总动脉结扎伴缺氧 2 h 所造成的脑白质损伤可明显引起脑白质内 O4 阳性 OL 前体的大量丢失。见图 3。

2.5 SVZ 区胶质源性祖细胞增殖和分化情况

免疫荧光显微镜下观察到, 建模后 48 h, Sham 组大鼠的 SVZ 区和脑室周围部位, 可见 1 ~ 2 个 NG2 与 BrdU 共阳性的胶质源性祖细胞。在 PVL 组大鼠的 SVZ 区和脑室周围部位, 则可见呈 BrdU 与

NG2 共阳性的胶质源性祖细胞较同时点 Sham 组明显增多,并随着时间的延长呈进一步增加($P < 0.05$ 或 0.01)。此外,从建模后 72 h 开始,两组在脑室周围均可见呈 BrdU 和 O4 共阳性的 OL 前体出现,并随着时间的延长呈进一步增加,其中 PVL 组的 BrdU

和 O4 共阳性 OL 前体细胞数在建模后 72 h、7 d 及 21 d 均较 Sham 组明显增多(均 $P < 0.05$)。提示一侧颈总动脉结扎伴缺氧 2 h 所造成的脑白质损伤可明显诱导 SVZ 区胶质源性神经祖细胞激活并出现明显增殖,并向 OL 系的方向分化。见图 4~5。

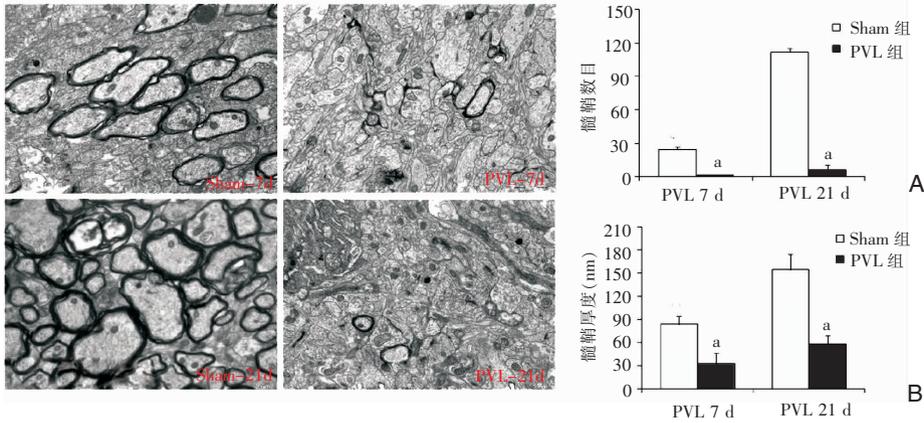


图2 建模后 7 d 和 21 d 脑白质髓鞘形成的电镜检测结果 ($\times 13500$) PVL 组在建模后 7 d 和 21 d 均罕见髓鞘形成; Sham 组髓鞘形成良好,形态规则,边界清晰,髓鞘数目(图 A)及厚度(图 B)均明显优于 PVL 组。a:与同时时间点 Sham 组比较, $P < 0.01$ 。

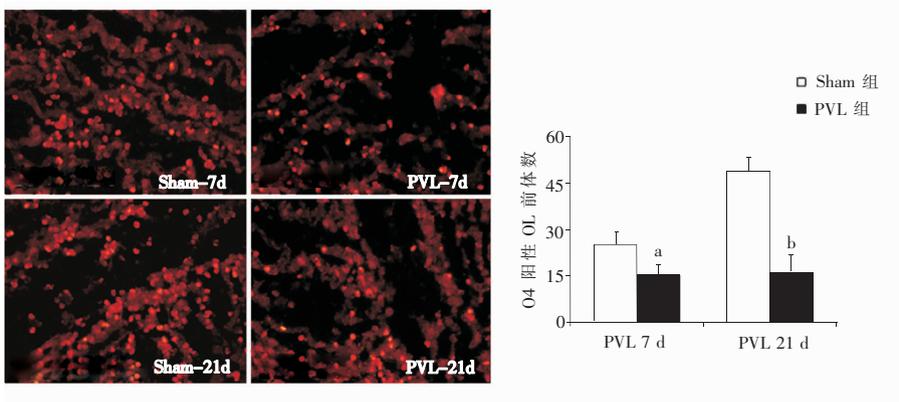


图3 建模后 7 d 和 21 d 大鼠脑白质 OL 前体标志物 O4 表达(免疫荧光, $\times 200$) 显示 PVL 组在建模后 7 d 和 21 d 的脑室周围 O4 阳性标记物(红色)明显少于 Sham 组。a:与同时时间点 Sham 组比较, $P < 0.05$;b:与同时时间点 Sham 组比较, $P < 0.01$ 。

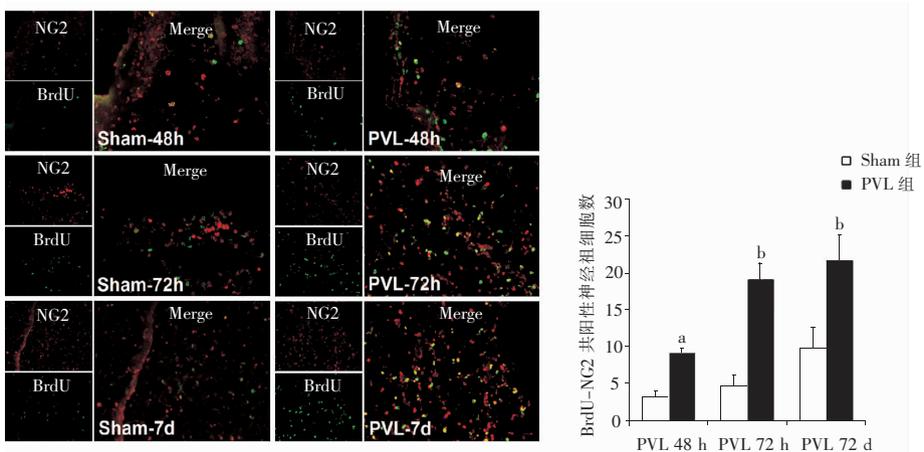


图4 各组 SVZ 区神经祖细胞增殖情况(免疫荧光, $\times 200$) 显示 PVL 组建模后各时段在 SVZ 区和脑室周围呈 BrdU 与 NG2 共阳性的神经祖细胞较同时段 Sham 组明显增多。a:与同时时间点 Sham 组比较, $P < 0.05$;b:与同时时间点 Sham 组比较, $P < 0.01$ 。

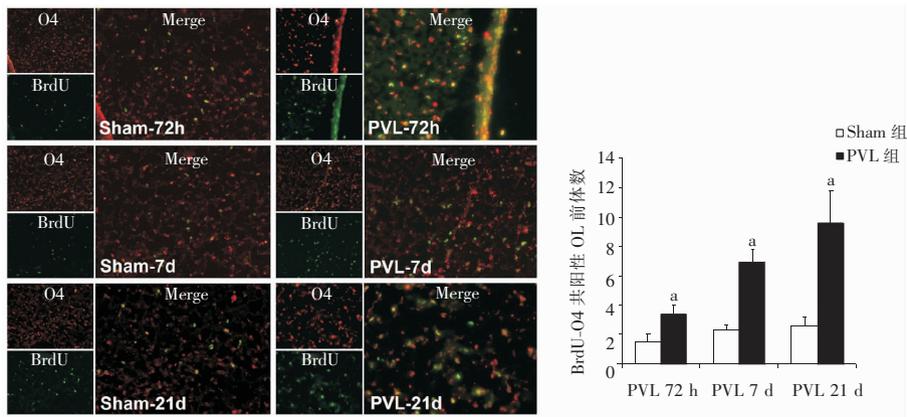


图5 各组SVZ区胶质源性神经祖细胞分化情况(免疫荧光, ×200) 显示PVL组在建模后各时段在脑室周围呈BrdU与O4共阳性的OL前体较同时段Sham组明显增多。a:与同时段Sham组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

PVL为早产儿常见脑损伤,是脑瘫和智力视听障碍的主要原因,迄今尚无有效防治方法。缺血被认为是早产儿好发PVL的主要诱因。早产儿由于脑室周围白质的血管发育不完善、脑血流的自动调节功能尚不成熟,以及主要构成未成熟白质的OL前体被缺血、自由基攻击尤易受损,导致早产儿好发脑白质缺血性损伤^[1]。OL是形成髓鞘的主要细胞,在早产儿PVL的好发期(胎龄23~32周),OL前体在不成熟的脑白质内占了绝大多数,提示OL前体是发生PVL的主要靶细胞^[10]。研究显示,PVL的最终病理改变为脑室周围白质OL前体的受损和丢失,致使脑白质内髓鞘不能形成,在临床上呈现脑瘫、认知及视听障碍等后遗症^[1]。

近年来的研究表明,在哺乳动物脑内的SVZ区、海马齿状回下区(SGZ)以及脑白质等部位,始终存在着具有神经干细胞功能的神经祖细胞,与脑的内在修复机制密切相关^[4-5]。这些神经祖细胞具有自我更新和多向分化潜能,在某些条件及刺激下被诱导激活、出现增殖,分化为神经元、星型胶质细胞和OL,并分别沿其固有的路径迁移到损伤部位进行修复^[11-12]。如何调动神经再生的内在修复潜力,刺激内源性神经干细胞的增殖、分化和迁移,并保证再生细胞的成活和功能,已成为治疗中枢神经系统疾病的重要策略和研究目标。在本课题组以往研究的基础上^[7-8,13],本研究采用对5日龄新生大鼠进行一侧颈总动脉结扎伴缺氧2h的方法,制备PVL动物模型。光镜下病理结果显示,PVL组大鼠在建模后7d和21d,结扎侧脑白质均呈现轻度或重度病变,

在脑室周围和皮层下白质结构模糊疏松,神经纤维走向紊乱,呈网状或条索状,部分出现囊性病变。病理评分显示PVL组在建模后7d及21d的病理评分均明显高于Sham组。电镜下显示PVL组在建模后7d及21d脑白质的髓鞘形成数量明显减少,髓鞘厚度明显变薄。荧光显微镜下显示PVL组的脑室周围OL前体细胞亦明显少于Sham组。由此提示,本研究制备的PVL新生大鼠模型是以脑室周围白质OL前体的损伤和丢失为特征,呈现脑白质病变和髓鞘形成不良,与人类早产儿脑白质病变十分相似。

BrdU是一种脱氧核苷嘧啶的类似物,在细胞增殖周期的S期可代替脱氧核苷尿嘧啶嵌入细胞核的DNA。BrdU阳性细胞被视作是新增殖的细胞^[14-16]。Sypecka等^[17]的研究证实,NG2阳性细胞具有多分化的潜能,激活后可诱导分化为OL、星型胶质细胞和小胶质细胞,因此被称为胶质源性祖细胞。本研究结果显示,PVL组大鼠在建模48h后,在SVZ区出现呈BrdU和NG2共阳性的胶质源性祖细胞增殖和向脑室周围迁移,并随着时间的延长,祖细胞增殖数量呈进一步增加,至建模后7d达到高峰。同时从建模后72h开始,脑室周围开始出现呈BrdU和O4共阳性的新生OL前体细胞,至建模后21d,新生OL前体在PVL组大鼠明显多于同时段Sham组大鼠。由此提示,缺血可诱导激活SVZ区胶质源性神经祖细胞出现明显增殖,沿脑室周围迁移并向OL系的方向分化。

综上所述,通过一侧颈总动脉结扎伴缺氧2h所构建的5日龄新生大鼠PVL模型,可造成脑白质OL前体细胞的受损和丢失以及髓鞘形成不良,并可诱导SVZ区胶质源性祖细胞激活、增殖、向脑室周

围迁移和分化为OL前体细胞。本研究为进一步探讨早产儿脑白质损伤的内源性修复启动机制和神经再生功能奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity[J]. Arch Dis Child Fetal Neonate Ed, 2008, 93(2): F153-F161.

[2] Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buyllan A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment[J]. Cereb Cortex, 2003, 13(6): 580-587.

[3] Fagel DM, Ganat Y, Silbereis J, Ebbitt T, Stewart W, Zhang H, et al. Cortical neurogenesis enhanced by chronic perinatal hypoxia[J]. Exp Neurol, 2006, 199(1): 77-91.

[4] Decressac M, Prestoz L, Veran J, Cantereau A, Jaber M, Gaillard A. Neuropeptide Y stimulates proliferation, migration and differentiation of neural precursors from the subventricular zone in adult mice[J]. Neurobiol Dis, 2009, 34(3): 441-449.

[5] Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension[J]. Science, 2007, 315(5816): 1243-1249.

[6] 李文娟,陈惠金. 脑内在修复潜能机制[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(7): 606-611.

[7] 贺月秋,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. 脑室周围白质软化新生大鼠模型的创建及所伴随的白内障病变[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(3): 220-224.

[8] 贺月秋,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. 不同缺血方式制作脑室周围白质软化大鼠模型的比较[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(3): 153-157.

[9] Uehara H, Yoshioka H, Kawase S, Nagai H, Ohmae T, Hasegawa K, et al. A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion[J]. Brain Res, 1999, 837(1-2): 213-220.

[10] Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury[J]. J Neurosci, 2001, 21(4): 1302-1312.

[11] Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment[J]. Cereb Cortex, 2003, 13(6): 580-587.

[12] Chandran S, Hunt D, Joannides A, Zhao C, Compston A, Franklin RJ. Myelin repair: the role of stem and precursor cells in multiple sclerosis[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008, 363(1489): 117-183.

[13] 贺月秋,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. 不同缺氧时间制作新生大鼠脑室周围白质软化动物模型的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12): 10-13.

[14] Munoz-Elias G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cells and precursor functions[J]. Stem Cells, 2003, 21(4): 437-448.

[15] Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM. Bromodeoxyuridine and the detection of neurogenesis[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2007, 8(3): 127-131.

[16] Foster MT, Bartness TJ. Sympathetic but not sensory denervation stimulates white adipocyte proliferation[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 291(6): R1630-R1637.

[17] Sypecka J, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Crucial role of the local micro-environment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors[J]. Cell Prolif, 2009, 42(5): 661-671.

(本文编辑:王庆红)