

GM1 和 NGF 对神经干细胞体外增殖的影响

王倩¹, 王治平¹, 许勤², 鲍南¹

(1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心, 上海 200127; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院, 上海 200092)

[摘要] **目的** 探讨单唾液酸神经节苷脂(GM1)、鼠神经生长因子(NGF)对神经干细胞(NSCs)体外增殖的影响。**方法** ①体外分离培养 NSCs;②将含有表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的 NSCs 完全培养基及不含 bFGF、EGF 的 DMEM/F12 培养基作为两种不同的培养介质,分别加入不同浓度的 GM1 和 NGF,进行 NSCs 体外增殖研究;③以 MTT 法和细胞球计数观察 NSCs 增殖情况;以免疫组化法观察分化条件下药物对 NSCs 增殖的影响。**结果** ①在含有 bFGF、EGF 的 NSCs 完全培养基中,较高浓度 GM1 条件下,NSCs 增殖明显($P < 0.05$);②含血清的分化培养液中,随 GM1 浓度增加,NSCs 增殖明显;随 NGF 浓度增加,神经元及胶质细胞比例增高。**结论** 高浓度 GM1 能促进 NSCs 增殖,NGF 能促进 NSCs 分化。

[中国当代儿科杂志,2009,11(10):841-845]

[关键词] GM1;NGF;增殖;神经干细胞

[中图分类号] R329.2⁺8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)10-0841-05

Effects of ganglioside 1 and nerve growth factor on the proliferation of neural stem cells *in vitro*

WANG Qian, WANG Zhi-Ping, XU Qin, BAO Nan. Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China (Wang Z-P, Email:wangzhp2@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effects of ganglioside 1 (GM1) and nerve growth factor (NGF) on neural stem cells (NSCs) proliferation *in vitro*. **Methods** NSCs were isolated and cultured *in vitro*. NSCs were cultured in the medium containing epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) or without the two agents. Different concentrations of GM1 and NGF were added into the two different medium. MTT and cell ball counting methods were used to ascertain the proliferation of NSCs. Immunohistochemical technology was used to observe the effect of GM1 and NGF on the proliferation of NSCs. **Results** High concentrations of GM1 (100 ng/L and 200 ng/L) promoted significantly the proliferation of NSCs in the medium containing EGF and bFGF ($P < 0.05$). In the differentiation medium containing serum but no EGF and bFGF, NSCs proliferation increased with increasing concentration of GM1; the proportion of neurons and gliocytes increased with increasing concentration of NGF. **Conclusions** High concentration of GM1 can promote NSCs proliferation and NGF can promote NSCs differentiation. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (10):841-845]

Key words: Ganglioside 1; Nerve growth factor; Proliferation; Neural stem cell

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的发现和培养成功,是神经科学的重大发展。NSCs在体外进行分离扩增并进行诱导可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞^[1]。NSCs的增殖分化受到内因和外因的调控^[2,3],内因方面主要是基因的调控,外因方面主要是微环境的调控。单唾液酸神经节苷脂(GM1,商品名为施捷因)和鼠神经生长因子(NGF,商品名为恩经复)作为神经科常用的营养药物,目前普遍应用于临床。动物实验表明,GM1和NGF在活体组织上对神经元的增殖分化可能有协

同作用^[4,5],但这两种神经科常用药物在NSCs体外分离培养和扩增中是否起作用尚未得到证实,这两种药物在体外培养NSCs实验中的量效关系及是否有协同作用尚无明确报道。本研究目的在于:观察上述两种神经营养药物对体外培养的NSCs增殖的影响,并探讨药物的有效剂量;为今后临床NSCs移植后续药物治疗奠定基础,为临床应用干细胞治疗神经系统疾病的综合治疗提出科学依据。

[收稿日期]2009-01-01;[修回日期]2009-03-04

[作者简介]王倩,女,硕士。主攻方向:小儿神经系统疾病。

[通讯作者]王治平,女,教授,上海儿童医学中心神经内科,邮编:200127。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物 Sprague-Dawley (SD) 成年大鼠由中科院上海实验动物中心提供。DMEM/F12 培养基、B27 液、N2 培养液、0.125% 胰蛋白酶液及胎牛血清由 Gibco 公司提供;人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、人表皮生长因子 (EGF) 由 Sigma 公司提供;NGF 由 Introgen 公司提供;GM1 由 TRB 药厂提供;小鼠抗巢蛋白 (nestin) 抗体由 Genetix 公司提供,小鼠抗神经元特异性烯醇酶 (NSE) 抗体、小鼠抗胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 抗体、多聚赖氨酸由 GIBCO 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 实验动物饲养及取材 成年 SD 大鼠,体重 220~240 g。雌雄合笼,次日(第2天)早上对雌鼠阴道涂片检查,有精子者为孕 0 (E0) 天,并将其分开喂养,至孕第 13 天(E13)。取孕 13 d SD 大鼠,颈椎脱臼处死,严格无菌条件下取出胚胎,在解剖显微镜下取出脊髓,放入盛有 DMEM 的离心管中备用。

1.2.2 胎鼠脊髓 NSCs 分离培养、离心和计数

在含有脊髓的离心管中,加入 0.125% 胰蛋白酶溶液,置 37℃ 水浴中消化后用吸管吹打分离,然后用含 10% 小牛血清的 PBS-G 液中和。细胞悬液离心,吸除上清液,获得细胞悬液,用 PBS-G 液重悬细胞,再离心,最后取细胞沉淀,用 N2 培养液(配方:DMEM/F12 培养液、B27、谷氨酰胺、EGF、bFGF、青霉素及链霉素)重悬细胞,滤网过滤,取少量细胞悬液加于血球计数板上,在显微镜下计数,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。

1.2.3 原代培养 将细胞悬液分装于 6 cm 培养皿中,置 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。培养 7 d,每隔 2~3 d 半量换液一次。

1.2.4 NSCs 球的分离及传代培养 将原代培养 7 d 后的贴壁细胞及在贴壁细胞上形成的细胞球,轻匀吹打收集于离心管中,离心后弃上清,将胰酶和透明质酸酶混合后加入 N₂ 培养液并移入上述离心管中,放入 37℃,5% CO₂ 温箱中静置培养后以 PBS 稀释以终止消化。接着再次离心,弃去上清后加入 N₂ 培养液制成单细胞悬液,传代接种于 6 cm 培养板上,培养 7 d,每 2~3 d 半量换液一次,约每隔 7 d 分离传代一次。

1.3 免疫细胞化学检查

悬浮生长的细胞球行 nestin 单抗免疫细胞染色。

1.4 培养条件下药物对 NSCs 增殖影响的观察

将以上 NSCs 球经分离后得到的单细胞悬液,取少量进行镜下计数,以 1×10^5 个/mL 密度接种于 6 个 96 孔培养板中,每孔 100 μ L,设置实验组、阳性对照组(含有 EGF、bFGF 的 NSCs 培养液)、阴性对照组(不含有 EGF、bFGF 的 DMEM/F12 培养液),每组 4 个孔,放入 37℃,5% CO₂ 温箱中静置培养,于第 4,7,10 天分别用相差显微镜观察结果并对培养板中的悬浮细胞进行细胞球计数及 MTT 检测。

1.4.1 观察在含有 bFGF、EGF 的 NSCs 培养基中

药物对干细胞增殖的影响 实验随机分为以下 4 组:①阳性对照组:将单细胞悬液放在含有 bFGF、EGF 的 NSCs 培养液培养。②NGF 组:将单细胞悬液放在含有 bFGF 和 EGF 的 NSCs 培养液培养,并加入 NGF(终浓度分别为 25,50,100,200 ng/mL)。③GM1 组:将单细胞悬液放在含有 bFGF、EGF 的 NSCs 培养液培养,并加入 GM1(终浓度分别为 10,25,100,200 ng/mL)。④NGF + GM1 组:将单细胞悬液放在含有 bFGF、EGF 的 NSCs 培养液培养,并加入 NGF(终浓度 100 ng/mL)和 GM1(终浓度 100 ng/mL)。

1.4.2 观察在不含有 bFGF 和 EGF 的 DMEM/F12

培养基中药物对干细胞增殖的影响 实验分组:分为 5 组,与上述相比,添加阴性对照组(将单细胞悬液放在不含有 bFGF 和 EGF 的 DMEM/F12 培养液培养),各实验组培养液换为不含有 bFGF 和 EGF 的 DMEM/F12 培养液。

1.5 分化条件下药物对 NSCs 增殖影响的观察

将以上原代培养 7 d 形成的 NSCs 克隆球,取少量加于血球计数板上,显微镜下计数,接种于预先置有 0.025 多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔培养板,每孔加入细胞悬液 1 mL,在不同的实验条件下作用 7 d 后将盖玻片取出,分别行 nestin、GFAP、NSE 免疫细胞化学检测并计数观察药物对 NSCs 分化比率的影响。于接种首日随机分为以下 4 大组:①NGF 组:上述培养板中加入含血清的分化培养基并分别加入以下 4 种浓度的 NGF(终浓度分别为 25,50,100,200 ng/mL);②GM1 组:上述培养板中加入含血清的分化培养基并分别加入以下 4 种浓度的 GM1(终浓度分别为 10,25,100,200 ng/mL);③NGF + GM1 组:上述培养板中加入含血清的分化培养基并加入 GM1(终浓度 100 ng/mL)和 NGF(终浓度 100 ng/mL);④对照组:上述培养板中加入含血清的分化培养基。接种 7 d 后免疫组化鉴定诱导后 nestin、NSE、GFAP 的表达。

免疫组化鉴定:采用抗 nestin (抗体稀释度 1:100)、抗 NSE(抗体稀释度 1:150)、抗 GFAP (抗体稀释度 1:900),分别标记 NSCs、神经元、星形胶质细胞。取出盖玻片用4%的多聚甲醛固定 20 min,内源性过氧化物酶用 3% H₂O₂ 灭活,非特异性结合用 3% BSA 阻断,加抗 nestin 单抗、抗 NSE 单抗、抗 GFAP 单抗后湿盒置于 4℃ 冰箱过夜,0.1 mol/L PBS 液漂洗 3 次后加入二抗(二步法,Antibody 公司提供),湿盒,37℃ 孵育 30 min,0.1 mol/L PBS 液漂洗盖玻片 3 次,DAB(二氨基联苯胺)显色 10 min,苏木素复染,80%、95%、100% 乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封闭,立即在显微镜下观察并摄像记录。

1.6 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SAS

6.12 统计软件包行方差齐性检验和 Dunnet 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 含有 bFGF 和 EGF 的 NSCs 培养基中,药物作用下 NSCs 球计数及细胞活力测定

随培养天数增加,各孔细胞球数及 MTT 值均增高。和阳性对照组相比,GM1 (100 ng/mL、200 ng/mL) 组细胞球数及 MTT 值在 4 d,7 d 和 10 d 时增高,差异有显著性 ($P < 0.05$);GM1 (25 ng/mL) 组细胞球数及 MTT 值在 7 d 和 10 d 时增高,差异有显著性 ($P < 0.05$)。余实验组和阳性对照组相比差异无显著性。见表 1。

表 1 含有 bFGF 和 EGF 的培养基中细胞球计数及细胞活力测定 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	4 d		7 d		10 d	
	细胞球数	MTT 值	细胞球数	MTT 值	细胞球数	MTT 值
阳性对照	31.50 ± 1.29	0.118 ± 0.006	50.00 ± 1.93	0.131 ± 0.002	63.75 ± 3.40	0.162 ± 0.003
GM1 (10 ng/mL)	30.75 ± 0.50	0.117 ± 0.005	53.50 ± 3.11	0.136 ± 0.001	66.00 ± 1.15	0.167 ± 0.004
GM1 (25 ng/mL)	34.25 ± 1.25	0.123 ± 0.002	63.75 ± 2.22 ^a	0.141 ± 0.003 ^a	76.60 ± 2.16 ^a	0.219 ± 0.004 ^a
GM1 (100 ng/mL)	42.00 ± 2.58 ^a	0.127 ± 0.003 ^a	71.00 ± 1.41 ^a	0.156 ± 0.004 ^a	78.25 ± 0.96 ^a	0.225 ± 0.001 ^a
GM1 (200 ng/mL)	43.50 ± 3.51 ^a	0.128 ± 0.005 ^a	72.25 ± 0.50 ^a	0.159 ± 0.001 ^a	79.25 ± 1.71 ^a	0.236 ± 0.001 ^a
NGF (25 ng/mL)	28.50 ± 1.29	0.113 ± 0.002	47.50 ± 1.29	0.128 ± 0.001	61.25 ± 1.26	0.158 ± 0.010
NGF (100 ng/mL)	29.00 ± 1.46	0.114 ± 0.010	51.00 ± 1.63	0.128 ± 0.003	60.75 ± 1.71	0.158 ± 0.002
NGF (200 ng/mL)	28.75 ± 2.99	0.112 ± 0.003	50.75 ± 1.26	0.124 ± 0.004	63.75 ± 2.22	0.160 ± 0.003
GM1 + NGF	32.00 ± 1.83	0.118 ± 0.001	53.06 ± 4.83	0.136 ± 0.005	63.50 ± 1.29	0.164 ± 0.003

a: 与阳性对照组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 在不含有 bFGF 和 EGF 的 DMEM/F12 培养基中,药物作用下神经球计数及细胞活力测定

GM1 (25 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL) 组细胞球数及 MTT 值在 4 d,7 d,10 d 时,和阳性对照组

相比无明显减少 ($P > 0.05$),和阴性对照组相比增高 ($P < 0.05$);余实验组和阳性对照组相比,细胞球计数及 MTT 值减少 ($P < 0.05$),和阴性对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 不含有 bFGF 和 EGF 的培养基中细胞球计数及细胞活力测定 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	4 d		7 d		10 d	
	细胞球数	MTT 值	细胞球数	MTT 值	细胞球数	MTT 值
阳性对照	53.50 ± 2.08	0.135 ± 0.002	66.25 ± 2.50	0.169 ± 0.002	73.75 ± 4.03	0.178 ± 0.003
GM1 (10 ng/mL)	32.25 ± 1.50 ^a	0.122 ± 0.002 ^a	49.50 ± 6.45 ^a	0.161 ± 0.003 ^a	44.25 ± 2.22 ^a	0.158 ± 0.007 ^a
GM1 (25 ng/mL)	51.50 ± 2.08 ^b	0.132 ± 0.001 ^b	62.00 ± 2.45 ^b	0.166 ± 0.001 ^b	70.00 ± 0.82 ^b	0.175 ± 0.006 ^b
GM1 (100 ng/mL)	54.50 ± 1.29 ^b	0.135 ± 0.001 ^b	64.25 ± 1.71 ^b	0.168 ± 0.001 ^b	71.50 ± 3.51 ^b	0.182 ± 0.001 ^b
GM1 (200 ng/mL)	54.50 ± 2.38 ^b	0.135 ± 0.002 ^b	61.50 ± 1.29 ^b	0.164 ± 0.001 ^b	69.00 ± 2.94 ^b	0.181 ± 0.009 ^b
NGF (25 ng/mL)	32.50 ± 1.29 ^a	0.123 ± 0.001 ^a	34.00 ± 1.83 ^a	0.123 ± 0.005 ^a	34.25 ± 0.96 ^a	0.119 ± 0.003 ^a
NGF (50 ng/mL)	31.00 ± 1.14 ^a	0.122 ± 0.006 ^a	31.75 ± 4.99 ^a	0.117 ± 0.001 ^a	33.75 ± 1.50 ^a	0.115 ± 0.001 ^a
NGF (100 ng/mL)	31.50 ± 2.08 ^a	0.122 ± 0.005 ^a	34.50 ± 3.87 ^a	0.117 ± 0.004 ^a	38.75 ± 1.71 ^a	0.115 ± 0.001 ^a
NGF (200 ng/mL)	30.25 ± 2.22 ^a	0.121 ± 0.002 ^a	35.50 ± 1.91 ^a	0.117 ± 0.003 ^a	32.50 ± 2.65 ^a	0.117 ± 0.004 ^a
GM1 + NGF	31.00 ± 1.63 ^a	0.128 ± 0.002 ^a	47.50 ± 1.29 ^a	0.133 ± 0.003 ^a	49.50 ± 1.29 ^a	0.161 ± 0.002 ^a
阴性对照	29.50 ± 1.29	0.122 ± 0.002	36.50 ± 2.08	0.118 ± 0.001	32.25 ± 2.27	0.117 ± 0.001

a: 与阳性对照组相比, $P < 0.05$; b: 与阴性对照组相比, $P < 0.05$ 。

2.3 神经球细胞 nestin 单抗免疫细胞染色鉴定及分化条件下细胞免疫组化染色结果

实验结果显示,40倍显微镜下观察,随GM1浓度增加,表达nestin神经细胞球体积呈增大趋势,说

明高浓度GM1促进NSCs增殖(图1);随NGF浓度增加,神经球分化为NSE阳性及GFAP阳性细胞的比例增加(表3)。

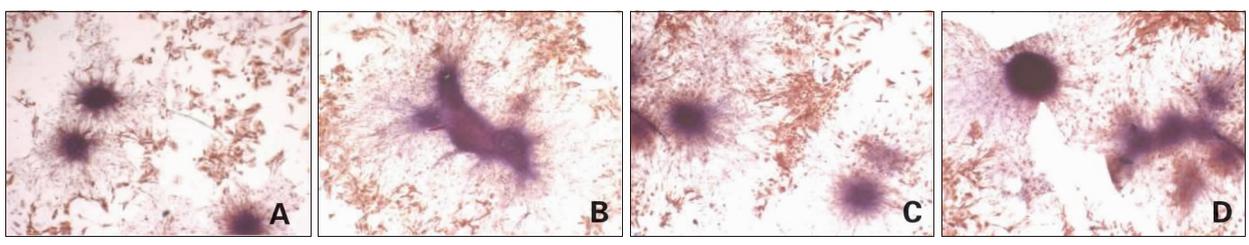


图1 不同浓度GM1对NSCs增殖的影响(×40)
A,B,C和D分别代表10,25,100和200 ng/mL GM1组。随GM1浓度增加,表达nestin神经细胞球体积呈增大趋势。

A,B,C和D分别代表10,25,100和200 ng/mL GM1组。随GM1

表3 各组分化为NSE(+)细胞和GFAP(+)细胞比例 (n=5, x±s, %)

组别	NSE(+)细胞比例	GFAP(+)细胞比例
对照组	15.3 ± 1.5	21.6 ± 5.4
NGF(25 ng/mL)	19.1 ± 3.4	27.1 ± 3.1
NGF(100 ng/mL)	21.2 ± 3.4 ^a	33.9 ± 5.6 ^a
NGF(200 ng/mL)	30.9 ± 3.5 ^a	41.2 ± 2.7 ^a
F值	24.51	18.44
P值	<0.05	<0.05

a:与对照组比较,P<0.05

分裂增殖的子代NSCs维持在干细胞的状态;EGF对NSCs增殖后期的增殖刺激能力明显增强^[8,9]。

神经营养因子在神经细胞的增殖、分化和存活过程中也起着重要作用。NGF作为第一个被发现的神经营养因子,是神经系统最重要的生物活性分子之一,是神经系统维持正常发育和功能的必要因素^[10]。NGF能促进发育中的感觉神经元和交感神经元的存活及分化,参与损伤神经再生和功能修复,刘怀军等^[11]探讨NGF对脑出血血肿灶的神经元和神经胶质细胞的保护作用时发现,立体定向注射NGF入血肿灶,发现NGF早期能够保护神经元,晚期通过促进神经胶质细胞适度增生、神经纤维生长促进神经功能的修复。苏刚等^[12]研究自体去神经带血管移植肌神经的再生中发现NGF对移植肌神经再生有较明显促进作用,对失神经肌肉有保护作用。神经节苷酯类物质是构成神经细胞膜双酯层的最主要酯质成分,GM1对反映中枢神经系统功能恢复的各种生化、组织化学及行为参数的改善有良好影响^[13-15]。有实验研究,GM1和NGF在活体组织上对神经细胞的保护可能有协同作用。神经节苷酯GM1能增加神经营养因子NGF的营养作用,减少病损细胞的死亡^[16,17]。如果实验能够证明在NSCs的体外扩增中GM1及NGF也能发挥促进作用或两者间存在协同作用,势必会对GM1和NGF两种药物作为今后临床NSCs移植的后续治疗药物奠定基础,为临床应用干细胞治疗神经系统疾病的综合治疗提出科学依据。

3 讨论

干细胞的研究是当前生命科学的热点。《Science》在近两年将干细胞的研究评为21世纪最重要的研究领域之首,为世人瞩目。NSCs是其中最有发展前景的重要分支,NSCs具备未分化特性、增殖和自我更新能力以及分化产生中枢神经系统主要类型细胞(神经元和胶质细胞)多向分化潜能和修复损伤组织的能力^[6]。NSCs最直接的应用是干细胞移植,利用NSCs的多向分化潜能以恢复中枢神经系统的正常结构和功能。NSCs移植技术的实现,干细胞体外分离扩增和分化技术的建立及干细胞在不同的胚层之间横向分化的实现,为中枢神经系统损伤、神经系统变性病或遗传性代谢疾病、神经退行性疾病等的治疗提供了新的策略^[7]。

众多研究表明NSCs的增殖、迁移和分化受到内因和外因的调控。胞外基质的各种成分通过调节粘着性和迁移能力及其与细胞因子的相互作用影响NSCs的增殖与分化,而NSCs对外源性因子的反应具有多样性。NSCs分裂能力的维持需要有丝分裂因子,常用的有丝分裂因子有bFGF和EGF。bFGF在NSCs增殖的早期阶段发挥促有丝分裂作用,使

本实验采用无血清培养技术,目的是去除血清中可能诱导NSCs分化的生长因子等干扰因素。本研究结果显示,在含有bFGF和EGF的NSCs完全培养基培养条件下,和在不含bFGF和EGF的DMEM/F12基础培养基培养条件下,高浓度GM1均

有促进 NSCs 增殖的作用。有丝分裂因子 bFGF 和 EGF 对 NSCs 体外扩增的促进作用已经得到证实^[8,9],本研究证实 GM1 和细胞因子 bFGF、EGF 作用相似且具有协同作用。GM1 的作用机制可能是药物维持了干细胞结构的完整性,细胞处于良好结构状态下增殖明显^[18]。虽然 NGF 在 NSCs 的增殖阶段没有显现出促增殖作用,但本研究发现,在含血清而不含 bFGF 和 EGF 的分化培养液条件下,NGF 促进 NSCs 向神经元和胶质细胞分化。这和乌优图等^[19]的研究一致。

根据上述结果,设想在今后临床进行 NSCs 移植术的综合治疗中,后续药物治疗可以分阶段进行,第一阶段进行 NSCs 的体外扩增,GM1 可作为此阶段的合适药物,药物推荐浓度为 25 ~ 200 ng/mL。第二阶段进行 NSCs 的定向分化,得到神经元和胶质细胞,NGF 可作为合适药物参与此阶段的治疗,药物推荐浓度为 10 ~ 200 ng/mL。bFGF、EGF 和 GM1 虽然存在协同作用,但机制尚不清楚,此外 bFGF、EGF 和 NGF 之间的作用也不清楚,尚有待进一步研究。本研究使用的细胞因子,由于价格昂贵,不能普遍用于临床。GM1 和 NGF 作为神经科常用营养药物,使用安全,且存在价格优势,作为 NSCs 移植后的后续治疗药物势必成为一种趋势。

[参 考 文 献]

[1] Ishibashi S, Sakaguchi M, Hiroiwa T, Yamasaki M, Kanemura Y, Shizuko I, et al. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 78 (2):215-223.

[2] Nishino H, Hida H, Takei N, Kumazaki M, Nakajima K, Baba H. Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum [J]. *Exp Neurol*, 2000, 164(1):209-214.

[3] Doering LC, Snyder EY. Cholinergic expression by a neural stem cell line grafted to the adult medial septum/diagonal band complex [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(6):597-604.

[4] Schwartz M, Spirman N. Sprouting from chicken embryo dorsal root ganglia induced by nerve growth factor is specifically inhibited by affinity purified antianglioside antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79 (19):6080-6083.

[5] Cuello AC, Garofalo L, Kenigsberg RL, Maysinger D. Ganglio-

sides potentiate in vivo and in vitro effects of nerve growth factor on central cholinergic neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86 (6):2056-2060.

[6] Mckay R. Stem cells in the central nervous system [J]. *Science*, 1997, 276(5309):66-71.

[7] Freed CR, Breeze BE, Rosenberg NL, Schneck SA. Embryonic dopamine cell implants as treatment for the second phase of Parkinson's disease. Replacing failed nerve terminals [J]. *Adv Neurol*, 1993, 60(8):721-728.

[8] Fiorio Pla A, Maric D, Brazer SC, Giacobini P, Liu X, Chang YH, et al. Canonical transient receptor potential 1 plays a role in basic fibroblast growth factor (bFGF)/FGF receptor-1-induced Ca²⁺ entry and embryonic rat neural stem cell proliferation [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(10):2687-2701.

[9] Türeyen K, Vemuganti R, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain [J]. *Neurosurgery*, 2005, 57(6):1254-1263.

[10] Petruska JC, Mendell LM. The many functions of nerve growth factor: multiple actions on nociceptors [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 361(1-3):168-171.

[11] 刘怀军,贺丹,冯平勇,杨桦,武柏林,王勇,等.神经生长因子对脑出血血肿灶周神经元和神经胶质细胞的影响 [J]. *中国急救医学*, 2005, 25(9):651-653.

[12] 苏刚,刘贵麟,王燕.神经生长因子促进自体去神经带血管移植肌神经的再生 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2005, 20(4):373-374.

[13] 邓小明,朱诚,张光霁.单唾液酸神经节苷脂与缺血性脑损伤 [J]. *国外医学脑血管疾病分册*, 1994, 2(2):68-69.

[14] Neto JC, Vasconcelos BC, Sobral AP, da Silva VA Jr, Noqueira RV. Clinical and histopathologic study of the use of gangliosides for nerve regeneration in rats after axonotmesis [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2007, 65(5):870-874.

[15] 李建军,孙琦,曹辉,王小娜.神经节苷脂对大鼠脑缺血再灌注损伤的脑保护作用 [J]. *临床神经病学杂志*, 2006, 19(2):124-126.

[16] Duchemin AM, Neff NH, Hadjiconstantinou M. GM1 increases the content and mRNA of NGF in the brain aged rats [J]. *Neuroreport*, 1997, 8(17):3823-3827.

[17] Baumgartner WA, Redmond JM, Zehr KJ, Brock MV, Tseng EE, Blue ME, et al. The role of the monosialoganglioside, GM1 as a neuroprotectant in an experimental model of cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 845:382-390.

[18] 赵新利,杨波,李宏伟,宋来君,许予明,杜英等. GM1 对培养的人胚 NSCs 增殖和分化的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2003, 38(1):20-22.

[19] 乌优图,王运杰.神经生长因子对 NSCs 分化及神经元轴突形成的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(29):5631-5635.

(本文编辑:吉耕中)