

神经科学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000077

表皮神经嵴干细胞移植对大鼠损伤脊髓组织中
脑源性神经营养因子表达的影响刘 争¹, 张洁元², 陈魁君², 李兵仓², 段朝霞², 张 路³, 余华荣¹

(1. 重庆医科大学基础医学院生理学教研室、神经科学研究中心, 重庆 400016; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042; 3. 西南大学淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

【摘要】目的:观察表皮神经嵴干细胞(epidermal neural crest stem cells, EPI-NCSCs)移植治疗大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的作用以及 SCI 组织中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophical factor, BDNF)表达的变化,从神经营养因子的角度探讨 EPI-NCSCs 移植修复 SCI 的机制。**方法:**分离培养绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)转基因大鼠的 EPI-NCSCs, 备移植用。60 只 SD 大鼠均暴露 T₁₀ 脊髓并在 NYU-II 撞击机(10 g 25 mm 致伤力)挫伤脊髓制作 SCI 模型,随机分为空白损伤组(A 组)、培养基移植组(B 组)、EPI-NCSCs 移植组(C 组)。SCI 模型大鼠损伤 1 周后将 EPI-NCSCs 细胞悬液移植入 C 组大鼠 SCI 处, B 组用单纯 DMEM/F12 培养基代替,空白损伤组不做处理。伤后每周进行一次运动功能评分,移植后 1、3、6 周取材行酶联免疫分析、免疫组织化学染色、免疫荧光染色以及 Western blot 检测 BDNF 蛋白的表达。**结果:**移植术后第 2 周起 C 组运动功能评分高于同期 A 组(2、3、4、5、6 周, P 值分别为 0.003、0.000、0.000、0.000、0.000)和 B 组(2、3、4、5、6 周, P 值分别为 0.044、0.000、0.006、0.000、0.008)。酶联免疫分析显示 C 组 BDNF 蛋白在移植后 3 周表达高于 A 组($P=0.009$)和 B 组($P=0.013$),移植后 6 周表达量显著高于 A 组($P=0.003$)和 B 组($P=0.003$)。免疫组化和免疫荧光结果显示移植后 3 周和 6 周, C 组 BDNF 表达高于同期 A 组和 B 组。Western blot 结果显示移植后 6 周, C 组 BDNF 表达高于同期 A 组($P=0.000$)和 B 组($P=0.000$)。**结论:**EPI-NCSCs 移植能促进 SCI 内 BDNF 的表达,改善局部微环境,从而有助于大鼠损伤脊髓的修复。

【关键词】脊髓损伤;表皮神经嵴干细胞;细胞移植;脑源性神经营养因子**【中图分类号】**R322.81**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-11-11Effects of epidermal neural crest stem cell transplantation on expression of
brain-derived neurotrophical factor in rats with spinal cord injuryLiu Zheng¹, Zhang Jieyuan², Chen Kuijun², Li Bingcang², Duan Zhaoxia², Zhang Lu³, Yu Huarong¹

(1. Teaching and Research Section of Physiology, College of Basic Medicine, Research Center of Neuroscience, Chongqing Medical University; 2. Daping Hospital Research Institute of Field Surgery, the Third Military Medical University; 3. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development of Ministry of Education, South West University)

【Abstract】Objective: To explore the role of epidermal neural crest stem cells(EPI-NCSCs) in the treatment of spinal cord injury(SCI) of rats and changes in expression of brain-derived neurotrophical factor(BDNF) and to investigate the mechanism of EPI-NCSCs repairing SCI from the perspective of neurotrophic factors. **Methods:** EPI-NCSCs were isolated from green fluorescent protein(GFP) transgenic rats for transplantation. Rat models of SCI were made by NYU-II impactor(10 g 25 mm injuries force) at T₁₀ level. Then 60 SD rats were randomly divided into blank injury group (group A), medium transplantation group(group B), epidermal neural crest stem cell transplantation group(group C). EPI-NCSCs were transplanted into the injured region in group C at 1 week after establishing SCI model. Group B used the DMEM/F12 to take place of EPI-NCSCs. Nothing was done in blank injury group. Then locomotor function score was appraised at every week after the transplantation. Expression of BDNF in

作者介绍: 刘 争, Email: 023liuzheng@163.com,

研究方向: 脊髓损伤及修复。

通信作者: 余华荣, Email: 1370748729@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81371341); 国家重点基础研究发展计划资助项目(编号: 2012CB518106); 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 I 类研究课题资助项目(编号: SKLZZ201003)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000077.html>

three groups was detected by ELISA, immunohistochemistry, immunofluorescence and Western blot respectively at 1, 3, 6 weeks after the transplantation. **Results:** After 2 weeks of transplantation, locomotor function score was higher in group C than in group A (2, 3, 4, 5, 6 weeks; $P=0.003, 0.000, 0.000, 0.000, 0.000$) and group B (2, 3, 4, 5, 6 weeks; $P=0.440, 0.000, 0.006, 0.000, 0.008$). Based on the results of ELISA, expression of BDNF was higher in group C than in group A ($P=0.009$) and group B ($P=0.013$) at 3 weeks after the transplantation; expression of BDNF was higher in group C than in group A ($P=0.003$) and group B ($P=0.003$) at 6 weeks after the transplantation. Expression of BDNF was higher in group C than in group A and group B at 3 weeks and 6 weeks after the transplantation based on the results of immunohistochemistry and immunofluorescence. Expression of BDNF was higher in group C than in group A ($P=0.000$) and group B ($P=0.000$) at 6 weeks after the transplantation based on the results of Western blot. **Conclusions:** EPI-NCSCs transplantation can repair SCI by increasing expression of BDNF to improve local microenvironment.

[Key words] spinal cord injury; epidermal neural crest stem cell; cell transplantation; brain-derived neurotrophical factor

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后的再生修复一直是神经科学研究的热点之一,细胞移植治疗为SCI修复提供了一条新的途径。近年来研究发现表皮神经嵴干细胞(epidermal neural crest stem cells, EPI-NCSCs),具有向神经元分化的能力^[1],在SCI内可减少胶质疤痕形成,促进轴突生长和再生^[2],改善SCI动物的运动功能,引起众多学者的关注。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophical factor, BDNF)是神经营养因子中重要的成员之一,神经营养因子作为神经再生的关键促进因子,EPI-NCSCs移植后能否影响SCI内BDNF的表达从而改善SCI微环境,国内外还未见报道。为此本实验借助大鼠脊髓挫伤模型,观察了EPI-NCSCs移植后,SCI内BDNF的表达情况,从BDNF角度来探讨EPI-NCSCs修复SCI的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康雌性SD大鼠,体质量(220 ± 10) g,清洁级,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。60只大鼠随机分为空白损伤组(A组)、培养基移植组(B组)、EPI-NCSCs移植组(C组),每组各20只。

1.2 EPI-NCSCs的分离、培养与鉴定

按照本实验室已建立的EPI-NCSCs分离和培养方法,由绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)转基因大鼠的触须毛囊分离培养出的EPI-NCSCs,经SOX10和Nestin免疫荧光双染标记鉴定,纯度可达99%以上,详见文献[3]。培养第10天,收集EPI-NCSCs细胞悬液,备移植用。

1.3 SCI动物模型制作

SD雌性大鼠,3%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射麻醉后备皮,固定于手术台,常规消毒铺洞巾,无菌条件下暴露T₁₀

脊髓节段,固定于NYU-II撞击机,以10 g 25 mm致伤力挫伤脊髓,伤后其运动功能评分为0分。术后逐层缝合,包扎伤口,每日膀胱按摩2次。

1.4 EPI-NCSCs细胞移植

SCI后1周,暴露T₁₀损伤区域,固定于立体定位仪,无菌条件下用5 μ l微量注射器(汉密尔顿,美国)在损伤区域中心,以及其首尾各1 mm处缓慢注入EPI-NCSCs(1×10^5 个/ μ l)的细胞悬液,每点注射2 μ l,共计6 μ l,注射深度1 mm,并留针2 min, B组注射方法同C组,但用DMEM/F12培养基(Gibco, 美国)6 μ l代替, A组SCI后未做处理。移植术后1周内腹腔注射青霉素[2.5 万 U/(kg·d)]及环孢菌素 A[10 mg/(kg·d)]^[4],每日膀胱按摩挤尿2次。

1.5 酶联免疫分析 BDNF 的表达

移植术后1、3、6周每组随机取动物3只,取T₁₀节段区脊髓组织约15 mm,抽提组织总蛋白,采用BDNF的酶联免疫(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(博士德,中国),按照使用说明检测各组脊髓组织内BDNF的表达量,每组设立3个重复,于酶标仪450 nm处测定A值,记录数据。

1.6 免疫组化及免疫荧光检测 BDNF 的表达

移植术后3周和6周取每组随机取动物3只,取T₁₀节段区脊髓组织约15 mm,做冰冻切片,切片厚15 μ m,贴附于多聚赖氨酸包被的载玻片上,将切片放入4%多聚甲醛室温固定30 min,用pH 7.4的PBS溶液清洗,弃去切片上液体,0.2% Triton X-100作用5 min, PBS清洗,滴加3% BSA溶液,置于37 $^{\circ}$ C孵箱1 h弃去,滴加兔抗鼠BDNF一抗(Santa Cruz, 美国, 1:100稀释),置于湿盒4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜后于37 $^{\circ}$ C复温30 min, PBS清洗,滴加山羊抗兔二抗(Abcam, 美国, 1:500稀释),于37 $^{\circ}$ C孵箱1 h后清洗, DAB进行显色,苏木素染核,梯度乙醇脱水,透明,封片保存。免疫荧光染色时滴加二抗Cy3(碧云天, 中国, 1:500稀释),于37 $^{\circ}$ C孵箱1 h后清洗,封片保存。免疫荧光染色结果在荧光显微镜(奥林巴斯, 日本)下随机选择5个400倍视野,对阳性细胞计数,进行统计分析。

1.7 Western blot 检测 BDNF 的表达

移植后 6 周每组随机取动物 3 只,取 T₁₀ 为中心脊髓组织 15 mm,提取蛋白,调整蛋白浓度后变性,12% SDS-PAGE 分离蛋白,转膜后 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗 BDNF (Santa Cruz,美国,1:200 稀释)以及 β -actin (Abcam,美国,1:3 000 稀释)4 ℃ 孵育过夜,含 0.05% Tween20 的 PBS 液洗膜,山羊抗兔二抗 (Abcam,美国,1:5 000 稀释)37 ℃ 孵育 1 h,含 0.05% Tween20 的 PBS 液洗膜,ECL 发光剂显影,显影结果用 Quantity One 软件进行图片分析,计算各组 BDNF/ β -actin 的灰度比值。

1.8 运动功能评分

采用 Basso-Beattie-Bresnahan 评分法(以下简称 BBB 评分法),后肢全瘫为 0 分,完全正常为 21 分,两者之间根据功能分别定为 1~20 分。评分由 2 名操作者独立进行,然后将各自所得评分结果平均。测量时间点分别为造模后 1 d,以及移植术后 1、2、3、4、5、6 周。

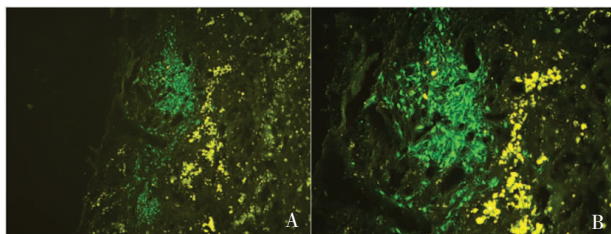
1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行分析,所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。不同时间点各组 BBB 评分总体采用重复测量方差分析,某一时间点不同组别之间采用单因素方差分析;其余资料均采用单因素方差分析;组间两两比较采用 Bonferroni 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 EPI-NCSCs 移植后的存活及分布情况

移植 EPI-NCSCs 后 6 周,可见 C 组脊髓挫伤处有大量呈强绿色荧光的 EPI-NCSCs 存活,SCI 区内变性坏死的细胞和巨噬细胞,呈黄绿色荧光。移植细胞呈团分布,主要分布于移植注射点中心,少部分细胞向损伤区域迁移(图 1)。



绿色荧光为 EPI-NCSCs, B 图为 A 图放大所示

图 1 EPI-NCSCs 移植 6 周后在 SCI 内的存活情况 (100 $\times$)

Fig.1 Survival of EPI-NCSCs in SCI rats at 6 weeks after the transplantation (100 $\times$)

2.2 酶联免疫分析 BDNF 的表达

移植术后 1 周,C 组脊髓的 BDNF 表达水平与 A 组和 B 组相比,差异无统计学意义;移植术后 3 周,C 组 BDNF 表达开始高于 A 组和 B 组 ($P<0.05$);移植术后 6 周,C 组 BDNF 表达持续升高,表达量达到高峰,与同期 A 组和 B 组比较,差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (表 1)。

表 1 移植术后不同时间点大鼠 SCI 内 BDNF 的表达量 (ng/ml)

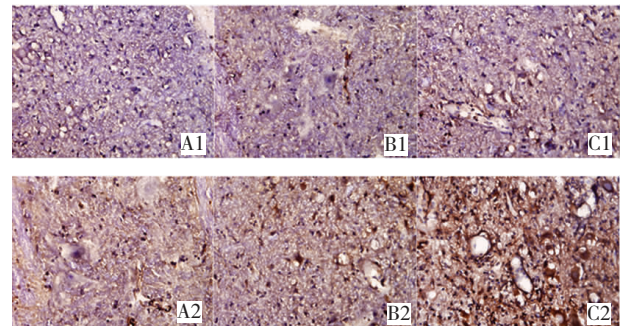
Tab.1 Expression of BDNF in SCI rats in each group at different time points after the transplantation (ng/ml)

组别	例数(n)	移植术后 1 周	移植术后 3 周	移植术后 6 周
A 组	3	3.322 $\pm$ 0.126	4.942 $\pm$ 0.354	6.201 $\pm$ 1.303
B 组	3	3.356 $\pm$ 0.067	5.115 $\pm$ 0.417	6.088 $\pm$ 1.934
C 组	3	3.475 $\pm$ 0.188	7.332 $\pm$ 0.912 ^{ab}	16.672 $\pm$ 2.949 ^{cd}
F 值		1.045	14.135	23.523
P 值		0.408	0.005	0.001

注:a,与 A 组比较 ($P=0.009$);b,与 B 组比较 ($P=0.013$);c,与 A 组比较 ($P=0.003$);d,与 B 组比较 ($P=0.003$)

2.3 BDNF 免疫组化结果

移植术后 3 周,A 组和 B 组有少量细胞胞浆呈现棕黄色染色,分布于脊髓的灰质和白质,而 C 组可见大量细胞胞质呈棕黄色染色,着色也较深;移植术后 6 周,C 组阳性细胞明显增多,染色更深,表达量高于同期 A、B 2 组,阳性表达区域不仅限于移植区,在 SCI 处及周边均可见 BDNF 的广泛高表达(图 2)。



A1、A2. A 组移植后 3、6 周 ($\times 400$); B1、B2. B 组移植后 3、6 周 ($\times 400$); C1、C2. C 组移植后 3、6 周 ($\times 400$)

图 2 移植术后 3 周和 6 周各组大鼠 SCI 内 BDNF 表达情况 (免疫组化)

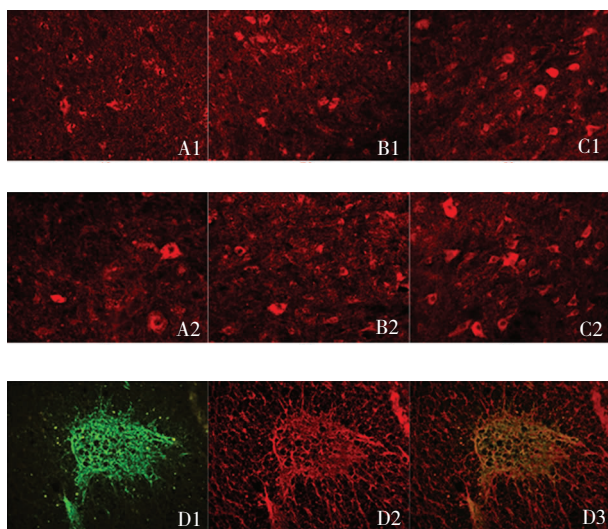
Fig.2 Expression of BDNF in SCI rats in each group at 3 weeks and 6 weeks after the transplantation (immunohistochemistry)

2.4 BDNF 免疫荧光结果

移植术后 3 周,C 组阳性细胞数 [(15.400 $\pm$ 3.435) 个] 高于 A 组 [(6.800 $\pm$ 3.347) 个] ($F=12.667, P=0.002$) 和 B 组 [(7.400 $\pm$ 2.074) 个] ($F=12.667, P=0.004$);移植术后 6 周,C 组 SCI 区和非损伤区域均可见广泛 BDNF 表达,其阳性细胞数 [(19.200 $\pm$ 3.271) 个], 高于 A 组 [(7.600 $\pm$ 3.647) 个] ($F=20.657, P=0.000$) 和 B 组 [(9.400 $\pm$ 2.073) 个] ($F=20.657, P=0.001$)。移植的 EPI-NCSCs,自身也呈现阳性反应,并促进其周围细胞表达 BDNF,以移植细胞为中心,向周围呈放射状分布(图 3)。

2.5 Western blot 检测 BDNF 表达的结果

移植术后 6 周,在各组 16 kD 处检测到 BDNF 目的条带,在 43 kD 处检测到内参 β -actin。其中 C 组 BDNF 的灰度比值最高,同 A、B 两组比较,差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (表 2、图 4)。



A1、A2. A 组移植后 3、6 周 ($\times 400$); B1、B2. B 组移植后 3、6 周 ($\times 400$); C1、C2. C 组移植后 3、6 周 ($\times 400$); D1. 绿色荧光为 C 组移植后 6 周 EPI-NCSCs ($\times 200$); D2. 红色荧光为 BDNF 表达 ($\times 200$); D3. 为 D1、D2 合成图 ($\times 200$)

图 3 移植术后 3 周和 6 周各组大鼠 SCI 内 BDNF 表达情况 (免疫荧光)

Fig.3 Expression of BDNF in SCI rats in each group at 3 weeks and 6 weeks after the transplantation (immunofluorescence)

表 2 移植术后 6 周各组大鼠 SCI 内 BDNF 蛋白的表达及其比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Expression of BDNF in SCI rats in each group at 6 weeks after the transplantation and comparisons ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	BDNF
		BDNF/ β -actin
A 组	3	0.469 ± 0.017
B 组	3	0.452 ± 0.030
C 组	3	0.747 ± 0.044^{ab}
F 值		77.755
P 值		0.000

注: a, 与 A 组比较 ($P=0.000$); b, 与 B 组比较 ($P=0.000$)

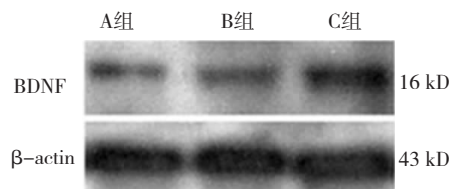


图 4 移植术后 6 周各组大鼠脊髓组织 BDNF 蛋白的表达

Fig.4 Expression of BDNF in the spinal cord of rats in each group at 6 weeks after the transplantation

2.6 BBB 评分

移植术后, 各组大鼠后肢功能有所恢复, 从第 2 周起 C 组大鼠双下肢 2 个关节开始活动; 移植术后 4 周, C 组大鼠常见双下肢 3 个关节大幅活动; 移植术后 6 周 C 组大鼠足底负重步行, A 组和 B 组大鼠拖动后肢前行, 足置于不负重位。经重复测量方差分析表明, 移植术后各组大鼠 BBB 评分差异具有统计学意义 ($F=24.502, P=0.000$), 移植术后第 2 周起 C 组不同时间点的 BBB 评分均高于其余 2 组, 且差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (表 3)。

3 讨论

EPI-NCSCs 是近年来发现的一种多能干细胞, 可通过微创手术获取, 并可在体外培养出高纯度的该细胞^[5-6], 用于自体移植, 避免了排斥反应^[7]。以往研究证明, 移植到 SCI 中的 EPI-NCSCs 在受体中不会形成肿瘤且可分化为幼稚的神经元细胞, 胶质细胞, 少突胶质细胞等^[2,8], 在受体脊髓内还可以通过诱导血管再生等途径减少胶质瘢痕的形成, 上调髓鞘碱性蛋白表达促进髓鞘形成以及轴突再生^[2,9], 重塑神经传导系统, 从而促进 SCI 修复^[8,10]。

SCI 后损伤区微环境的改变, 如神经营养因子的相对缺乏, 阻碍了神经的再生及修复。BDNF 是被研究最为广泛的神经营养因子之一, 能维持和促进多种感觉神经元、胆碱能神经元、多巴胺能神经元的发育、生长和再生, 对损伤后神经元的修复与功

表 3 不同时点各组大鼠 BBB 运动功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of BBB score in each group at different time points ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	移植术后时间					
		1周	2周	3周	4周	5周	6周
A 组	10	1.500 ± 0.527	2.600 ± 0.699	3.900 ± 0.737	5.800 ± 1.032	6.900 ± 0.875	8.400 ± 0.699
B 组	10	1.700 ± 0.483	2.900 ± 0.578	4.300 ± 0.674	6.700 ± 0.948	7.800 ± 0.918	9.400 ± 0.843
C 组	10	2.000 ± 0.667	3.600 ± 0.516^{ab}	6.300 ± 1.059^{cd}	8.300 ± 1.159^{ef}	9.800 ± 1.229^{gh}	10.800 ± 1.229^{ij}
F 值		1.988	7.330	23.372	14.527	21.171	16.082
P 值		0.156	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a, 与 A 组比较 ($P=0.003$); b, 与 B 组比较 ($P=0.044$); c, 与 A 组比较 ($P=0.000$); d, 与 B 组比较 ($P=0.000$); e, 与 A 组比较 ($P=0.000$); f, 与 B 组比较 ($P=0.006$); g, 与 A 组比较 ($P=0.000$); h, 与 B 组比较 ($P=0.000$); i, 与 A 组比较 ($P=0.000$); j, 与 B 组比较 ($P=0.008$)

能重塑具有重要作用^[11];还可以调节突触蛋白的转录和翻译,对突触可塑性起着重要作用^[12]。为此,本文从移植 EPI-NCSCs 后 SCI 内 BDNF 的表达变化,对其 SCI 的修复机制进行初步探讨。

本文将 GFP 大鼠的 EPI-NCSCs 移植到 SCI 后 6 周,可见 EPI-NCSCs 在受体内存活,通过 ELISA 分析、免疫组化以及 Western blot 实验发现,EPI-NCSCs 的移植可增加受体脊髓内 BDNF 的表达,随着细胞移植在受体组织内存活时间延长,脊髓组织内的 BDNF 表达也逐渐增加,C 组大鼠的运动功能逐渐高于 A 组和 B 组,表明 EPI-NCSCs 在移植治疗大鼠 SCI 中,可上调受体组织内 BDNF 的表达,在其修复 SCI 的过程中发挥了重要的作用。

在 Hu 等^[8]的研究中,小鼠来源的 EPI-NCSCs 体外存在 BDNF 的编码基因,本文通过免疫荧光发现,GFP 大鼠来源的 EPI-NCSCs 可以在受体脊髓内自分泌 BDNF,同时还促进细胞移植周围受体脊髓 BDNF 的表达,SCI 内的 BDNF 不仅可以通过 TrkB 受体激活细胞外信号调节激酶信号转导途径,发挥神经保护作用^[13],还能激活 3-磷酸肌醇激酶-蛋白激酶 B 信号通路,引起 ATK 磷酸化,使凋亡抑制蛋白上调,裂解活化的 Caspase-3 使其水平下降,从而减少神经细胞的凋亡^[14],促进了脊髓神经元的存活及 BDNF 的表达。以上 2 个信号转导途径常同时发生,共同发挥了神经保护作用^[15-16],从而启动了内源性修复途径。可见 EPI-NCSCs 一方面在体内表达 BDNF,另一方面细胞也促进了脊髓本身组织表达 BDNF,因此对受体内的 BDNF 表达起到了放大效应。

综上所述,EPI-NCSCs 移植到大鼠 SCI 模型中可以长时间存活,并促进运动功能修复,其机理可能有:一方面作为外源性神经元来弥补损伤破坏丢失的细胞结构,桥接脊髓断端,形成功能性突触,重建神经传导通路;另一方面移植的 EPI-NCSCs 还可自分泌 BDNF 以及促使受体脊髓内 BDNF 表达上调,并随时间的增加而表达增多,对脊髓内的神经细胞起到持续保护,对改善 SCI 微环境和促进损伤修复具有重要作用。据此推断 EPI-NCSCs 通过上调 SCI 内 BDNF 的表达,发挥神经保护作用,是其修复神经损伤的机制之一。

参 考 文 献

- [1] Amoh Y, Li L, Katsuo K, et al. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(12): 1865-1869.
- [2] Sieber-Blum M, Schnell L, Grim M, et al. Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 32(1-2): 67-81.
- [3] 张洁元, 陈立朝, 段朝霞, 等. GFP 标记成年大鼠表皮神经嵴干细胞的分离培养与形态学特征[J]. *重庆医学*, 2012, 41(33): 3471-3472, 3475, 3577, 3460.
- [4] 陈莉发, 段朝霞, 张洁元, 等. 嗅鞘细胞移植到损伤脊髓存活时间的研究[J]. *成都医学院学报*, 2010, 5(3): 190-192.
- [5] Hu YF, Zhang ZJ, Sieber-Blum M. An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(12): 2692-2702.
- [6] Uchugonova A, Duong J, Zhang N, et al. The bulge area is the origin of nestin-expressing pluripotent stem cells of the hair follicle[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(8): 2046-2050.
- [7] Clewes O, Narytnyk A, Gillinder KR, et al. Human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC)-characterization and directed differentiation into osteocytes and melanocytes[J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(4): 799-814.
- [8] Hu YF, Gourab K, Wells C, et al. Epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC)-mediated recovery of sensory function in a mouse model of spinal cord injury[J]. *Stem Cell Rev*, 2010, 6(2): 186-198.
- [9] Amoh Y, Aki R, Hamada Y, et al. Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury[J]. *J Dermatol*, 2012, 39(1): 33-38.
- [10] Liu F, Uchugonova A, Kimura H, et al. The bulge area is the major hair follicle source of nestin-expressing pluripotent stem cells which can repair the spinal cord compared to the dermal papilla[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(5): 830-839.
- [11] Salehi Z, Mashayekhi F. Brain-derived neurotrophic factor concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease [J]. *J Clin Neurosci*, 2009, 16(1): 90-93.
- [12] Santos AR, Comprido D, Duarte CB. Regulation of local translation at the synapse by BDNF[J]. *Prog Neurobiol*, 2010, 92(4): 505-516.
- [13] Liu Y, Tao L, Fu X, et al. BDNF protects retinal neurons from hyperglycemia through the TrkB/ERK/MAPK pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(6): 1773-1778.
- [14] Lu S, Lu C, Han Q, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation[J]. *Toxicology*, 2011, 279(1-3): 189-195.
- [15] Xia Y, Wang CZ, Liu J, et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents phencyclidine-induced apoptosis in developing brain by parallel activation of both the ERK and PI-3K/Akt pathways[J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(2): 330-336.
- [16] Robinet C, Pellerin L. Brain-derived neurotrophic factor enhances the expression of the monocarboxylate transporter 2 through translational activation in mouse cultured cortical neurons[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(2): 286-298.