

## 骨髓基质细胞与 *bcl-2* 基因对脑缺血大鼠疗效以及 IGF-1 表达影响的研究

付霞,何志义<sup>△</sup>,张晓天,石磊,李艳玲

(中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的:探讨联合应用骨髓基质细胞与 *bcl-2* 基因治疗大鼠脑缺血的疗效,以及对 IGF-1 表达的影响。方法:40 只 Wistar 大鼠采用改良栓线法制成大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)再灌注模型,随机分成空白对照组、*bcl-2* 组、MSC 组和 MSC+*bcl-2* 组,每组 10 只。各组于再灌注后 1、3、7 及 14 d 进行神经功能评分;于 3 d 及 14 d 分别处死 5 只大鼠,采用免疫组化法检测 BrdU、IGF-1 及 *bcl-2* 蛋白的表达;通过 TUNEL 法检测细胞凋亡情况。结果:再灌注 7、14 d 后各治疗组神经功能评分明显低于空白对照组( $P < 0.05$ ),而 14 d 时 MSC+*bcl-2* 组神经功能评分明显低于 *bcl-2* 组及 MSC 组( $P < 0.05$ );MSC+*bcl-2* 组梗死半球 BrdU 阳性细胞明显多于 MSC 组 ( $P < 0.05$ );MSC+*bcl-2* 组梗死灶侧皮层表达 IGF-1 和 *bcl-2* 的阳性细胞明显多于 *bcl-2* 组及 MSC 组( $P < 0.05$ );MSC+*bcl-2* 组凋亡细胞明显少于 *bcl-2* 组及 MSCs 组( $P < 0.05$ )。结论:*bcl-2* 基因可抑制 MSCs 移植后的凋亡,增加其治疗脑缺血的疗效,二者联合应用可产生叠加效应;增加 IGF-1 的表达可能是 MSC 治疗脑缺血的机制之一。

[关键词] 骨髓基质细胞;*bcl-2* 基因;脑缺血;胰岛素样生长因子 1

[中图分类号] R743.32 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)04-0369-05

### Effect of combination of marrow stromal cell and *bcl-2* gene on neurological deficit and IGF-1 expression in rats with cerebral ischemia

FU Xia, HE Zhi-yi<sup>△</sup>, ZHANG Xiao-tian, SHI Lei, LI Yan-ling

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of the combination of marrow stromal cell (MSC) and *bcl-2* gene on neurological deficit and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression in rats with cerebral ischemia. **Methods:** The models of middle cerebral artery occlusion were established in 40 Wistar rats by occluding the middle cerebral artery for 2 hours and then performing reperfusion. The rats were randomly and equally divided into 4 groups: control group, *bcl-2* group, MSC group, and MSC+*bcl-2* group. The neurological scores were assessed 1, 3, 7, and 14 days after the reperfusion, and the expressions of bromodeoxyuridine (BrdU), IGF-1, and *bcl-2* protein were detected by immunohistochemical method. The apoptosis of neural cells were detected by TUNEL method. **Results:** Compared with control group, the neurological scores were significantly lower in other 3 groups after 7 and 14 days of the reperfusion. The neurological scores in MSC+*bcl-2* group were significantly lower than those in *bcl-2* and MSC groups after 14 days of the reperfusion. The number of BrdU-positive cells in the infarct hemisphere in MSC+*bcl-2* group was significantly higher than that in MSC group. Compared with the MSC and *bcl-2* groups, the expression of IGF-1 and *bcl-2* protein in the infarct hemisphere significantly increased and the apoptosis of neural cells significantly decreased in MSC+*bcl-2* group. **Conclusion:** *bcl-2* gene could inhibit MSC apoptosis and enhance the therapeutic effect of MSC on cerebral ischemia. The combination of MSC and *bcl-2* has a synergistic effect in treating cerebral ischemia. Enhancing IGF-1 expression might be one of the mechanisms of MSC in treating rats with cerebral ischemia.

[Key words] marrow stromal cell; *bcl-2* gene; cerebral ischemia; insulin-like growth factor-1

骨髓基质细胞(marrow stromal cell, MSC)移植和 *bcl-2* 基因 (B-cell lymphoma/leukemia-2 gene, *bcl-2* gene) 转染都是已知的治疗大鼠局灶性脑缺血的有效方法。为了进一步提高疗效,我们现将以上两种方法结合起来,联合应用 *bcl-2* 基因与 MSC 治疗大鼠局灶性脑缺血,观察二者是否能够产生叠加效应,取得更好的治疗效果,同时检测具有神经保护作用的胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1,

IGF-1) 的表达是否增加,从而为脑梗死的治疗开辟一条新途径。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物及分组

实验动物均购自中国医科大学实验动物部,选用 270~300 g Wistar 大鼠 40 只,雌雄不限。采用改良线栓法<sup>[1]</sup>建立大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,闭塞 2 h 后再灌注。大鼠苏醒后表现为提尾时右侧肢体内收屈曲、爬行时向右侧划圈者入选。模型建立后,40 只大鼠随机分成空白对照组、*bcl-2* 组、MSC 组和 MSC+*bcl-2*

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(20032054)

[作者简介] 付霞(1979-)女,硕士研究生

<sup>△</sup>Corresponding Author's E-mail:hezhiyi0301@sina.com

组,每组又分 3 d 和 14 d 2 个时间点,每一时间点均为 5 只大鼠。*bcl-2* 组及 MSC+*bcl-2* 组在大鼠脑缺血再灌注 3 h 后,经颈动脉注射 pLXSN-*bcl-2* 质粒 200  $\mu$ l (总量 10  $\mu$ g),注射完毕后从根部结扎颈总动脉。MSC 组及 MSC+*bcl-2* 组在大鼠脑缺血再灌注 24 h 后,经鼠尾静脉注入骨髓基质细胞悬液 1 ml (总量  $3 \times 10^6$  个)注射后局部按压止血。

## 1.2 MSCs 培养与标记

无菌条件下取 120 ~ 150 g Wistar 大鼠胫骨和股骨,去除干骺端。用含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液将骨髓冲出,离心后重悬为单细胞悬液,分装入 25  $\text{cm}^2$  培养瓶内,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的培养箱中培养。待原代培养的细胞生长到 80% 铺满瓶底时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1 : 2 传代,传代细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养,3~4 d 即可再传一代。本实验用第 3~5 代细胞静脉注射。

体外标记 MSC:5-溴脱氧尿苷(bromodeoxyuridine, BrdU) 在细胞有丝分裂 S 期掺入到细胞核中,故可用来标记细胞。静脉注射前在培养基中加入 BrdU 使其浓度达到 3  $\mu$ g/ml,培养 24 h 即可标记。标记后的 MSC 用 0.25% 胰蛋白酶消化,调整细胞浓度为  $3 \times 10^6$  个/ml 待用。

## 1.3 质粒的提取、鉴定及扩增

pLXSN-*bcl-2* 质粒由第二军医大学钱其军博士惠赠。将含有 pLXSN-*bcl-2* 质粒的大肠杆菌从 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出,室温解冻,划于含有氨苄青霉素的琼脂糖固体培养基平板上,37  $^{\circ}\text{C}$  温箱培养过夜。收集阳性菌落分别接种于同样氨苄青霉素浓度的 3 ml 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴震荡培养 16 ~ 18 h 后,按小量质粒提取试剂盒(Watson)说明书操作,小量提取 pLXSN-*bcl-2* 质粒。应用酶 EcoR I、Xho I 酶切质粒,酶切产物与 Marker 分别经 1% 琼脂糖凝胶电泳,依碱基对大小鉴定质粒 pLXSN-*bcl-2*。将已确认的阳性菌落常规大量扩增,严格依照大量质粒提取试剂盒(Watson)说明书操作,大量提取质粒,紫外分光光度法测定浓度,-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

## 1.4 观测指标及方法

1.4.1 神经功能缺损评分:采用 CHEN 等<sup>[2]</sup>制定的神经功能评分标准(modified neurological severity scores, mNSS) 分别于术后 1、3、7 及 14 d 对大鼠进行神经功能评分。

1.4.2 免疫组化法检测 BrdU、IGF-1 及 *bcl-2* 蛋白的表达:各组于术后 3、14 d 分别取 5 只大鼠,用

10% 水合氯醛麻醉,先后用肝素化生理盐水及 4% 多聚甲醛心内灌注,迅速断头取脑,以前囟为中心、冠状面  $\pm 1$  mm 切取脑片,置于 4% 多聚甲醛中后固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,每隔 100  $\mu$ m 连续作 6  $\mu$ m 厚脑冠状面石蜡切片。石蜡切片进行免疫组化染色,具体步骤按照即用型 SABC 免疫组化试剂盒(博士德)说明书操作。

1.4.3 通过脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的切口末端标记技术(terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling, TUNEL) 检测细胞凋亡情况:石蜡切片按照 TUNEL 试剂盒(Roche)说明书操作,进行细胞凋亡染色。

## 1.5 图像分析及统计学处理

每个标本取 2 张切片,分别在高倍镜( $\times 400$ )下随机观察额顶叶及纹状体区不重叠的 8 个视野,显微图像分析系统采集图像。BrdU:细胞核中呈棕黄色颗粒者为阳性细胞,计数阳性细胞数;IGF-1、*bcl-2*:细胞浆中呈棕黄色颗粒者为阳性细胞,分析阳性细胞面积百分比。TUNEL:细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,计数凋亡细胞数。各组数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析及 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 质粒 pLXSN-*bcl-2* 的鉴定

经 EcoR I、Xho I 双酶切的 pLXSN-*bcl-2* 有两条带,一条是 850 bp 的 *bcl-2* 片断,另一条是 5 863 bp 的 pLXSN 开环片断,见图 1。

1 2

1: pLXSN-*bcl-2*/ 双酶切(EcoR I, Xho I); 2: marker

图 1 pLXSN-*bcl-2* 电泳结果

Fig.1 Electrophoresis result of pLXSN-*bcl-2*

### 2.2 神经功能评分结果

再灌注 1、3 d 后各组神经功能评分无显著差异;再灌注 7、14 d 后各治疗组神经功能评分明显低于空白对照组( $P < 0.05$ ),而 14 d 时 MSC+*bcl-2* 组神

经功能评分明显低于 *bcl-2* 组及 MSC 组 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

### 2.3 BrdU 免疫组化染色结果

空白对照组和 *bcl-2* 组未见 BrdU 阳性细胞, MSC 组和 MSC+*bcl-2* 组在梗死半球有大量 BrdU 阳性细胞, 主要分布在梗死灶周围、大脑皮质、海马等处, 对侧半球也可见少量 BrdU 阳性细胞, 其中 MSC+*bcl-2* 组 BrdU 阳性细胞明显多于 MSC 组

( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 MSC 组和 MSC+*bcl-2* 组 BrdU 阳性细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.2 Number of BrdU-positive cell in MSC group and MSC+*bcl-2* group ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	BrdU 阳性细胞数	
	3 d	14 d
MSC 组	16 ± 2.55	10.6 ± 3.05
MSC+ <i>bcl-2</i> 组	23 ± 2.24 <sup>1)</sup>	20.4 ± 2.07 <sup>1)</sup>

注: 1) 与 MSCs 组比较  $P < 0.05$

表 1 各组神经功能评分 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.1 Neurological score in every group ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	神经功能评分			
	1 d	3 d	7 d	14 d
空白对照组	7.6 ± 0.55	7.2 ± 0.45	6.6 ± 0.55	6.4 ± 0.55
<i>bcl-2</i> 组	7.6 ± 0.89	6.8 ± 0.84	4.2 ± 0.84 <sup>1)</sup>	2.4 ± 0.89 <sup>1)</sup>
MSC 组	7.8 ± 0.84	6.4 ± 0.55	4.6 ± 0.55 <sup>1)</sup>	3.2 ± 0.84 <sup>1)</sup>
MSC+ <i>bcl-2</i> 组	7.8 ± 1.30	6.2 ± 1.1	3.8 ± 0.84 <sup>1)</sup>	1.4 ± 0.55 <sup>1)2)3)</sup>

注: 1) 与空白对照组比较  $P < 0.05$ ; 2) 与 *bcl-2* 组比较  $P < 0.05$ ; 3) 与 MSCs 组比较  $P < 0.05$

### 2.4 IGF-1 与 *bcl-2* 免疫组化染色结果

治疗组的梗死灶侧皮层表达 IGF-1 和 *bcl-2* 的阳性细胞较空白对照组明显增多 ( $P < 0.05$ ),

MSC+*bcl-2* 组 IGF-1 和 *bcl-2* 阳性细胞较 *bcl-2* 组及 MSC 组明显增多 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 各组 IGF-1 与 *bcl-2* 蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.3 Expressions of IGF-1 and *bcl-2* protein in every group ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	IGF-1 阳性面积百分比%		<i>bcl-2</i> 阳性面积百分比%	
	3 d	14 d	3 d	14 d
空白对照组	4.6226 ± 0.64	2.9730 ± 0.78	1.7831 ± 0.63	0.7916 ± 0.13
<i>bcl-2</i> 组	7.1037 ± 0.62 <sup>1)</sup>	6.2038 ± 0.98 <sup>1)</sup>	3.9694 ± 0.39 <sup>1)</sup>	3.6055 ± 0.22 <sup>1)</sup>
MSC 组	5.9884 ± 0.50 <sup>1)</sup>	5.5765 ± 1.04 <sup>1)</sup>	2.8382 ± 0.78 <sup>1)</sup>	2.0319 ± 0.57 <sup>1)</sup>
MSC+ <i>bcl-2</i> 组	11.2331 ± 0.74 <sup>1)2)3)</sup>	8.1201 ± 1.05 <sup>1)2)3)</sup>	5.2069 ± 0.99 <sup>1)2)3)</sup>	4.5150 ± 0.91 <sup>1)2)3)</sup>

注: 1) 与空白对照组比较  $P < 0.05$ ; 2) 与 *bcl-2* 组比较  $P < 0.05$ ; 3) 与 MSC 组比较  $P < 0.05$

### 2.5 TUNEL 细胞凋亡染色结果

空白对照组大鼠缺血侧可见许多凋亡细胞, 集中分布在缺血灶周围区域, 明显多于治疗组 ( $P < 0.05$ ), 而 MSC+*bcl-2* 组凋亡细胞明显少于 *bcl-2* 组及 MSC 组 ( $P < 0.05$ ), 见表 4 及图 2 ~ 5。

表 4 TUNEL 法检测各组凋亡细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.4 Number of apoptotic cells in every group ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	凋亡细胞数	
	3 d	14 d
空白对照组	93.6 ± 4.39	118.2 ± 3.70
<i>bcl-2</i> 组	65.2 ± 4.32 <sup>1)</sup>	88.6 ± 2.97 <sup>1)</sup>
MSC 组	76.2 ± 3.96 <sup>1)</sup>	91.6 ± 2.41 <sup>1)</sup>
MSC+ <i>bcl-2</i> 组	55.6 ± 2.41 <sup>1)2)3)</sup>	74.2 ± 3.03 <sup>1)2)3)</sup>

注: 1) 与空白对照组比较  $P < 0.05$ ; 2) 与 *bcl-2* 组比较  $P < 0.05$ ; 3) 与 MSC 组比较  $P < 0.05$

## 3 讨论

MSC 是目前研究最广泛的成体干细胞, 近年来在中枢神经系统疾病治疗中的应用越来越被重视。许多动物实验研究证明 MSC 移植是促进脑梗死后神经功能恢复的有效方法之一。研究表明静脉注射的 MSC 能游走、迁移至大鼠缺血脑组织并存活<sup>[2]</sup>, 存活的 MSC 可在脑缺血的微环境中向神经细胞分化, 并和宿主脑组织相互作用促进各种生长因子的分泌<sup>[3-5]</sup>。虽然 MSC 在体内、外均可向神经细胞转化, 但细胞转化率有很大差别。实验表明 MSC 神经细胞转化率在体外可高达 80%<sup>[6]</sup>, 在体内仅约为 3% ~ 10%<sup>[2]</sup>, 其原因复杂, 但主要是 MSC 移植入脑后其自身发生凋亡所致<sup>[7]</sup>。因此, 如何抑制 MSC 移植后的凋亡, 提高 MSC 在体内的存活率及向神经细

图 2 空白对照组 TUNEL 细胞凋亡染色 × 400

Fig.2 TUNEL staining of apoptotic cells in control group × 400

图 3 *bcl-2* 组 TUNEL 细胞凋亡染色 × 400Fig.3 TUNEL staining of apoptotic cells in *bcl-2* group × 400

图 4 MSC 组 TUNEL 细胞凋亡染色 × 400

Fig.4 TUNEL staining of apoptotic cells in MSC group × 400

图 5 MSC+*bcl-2* 组 TUNEL 细胞凋亡染色 × 400Fig.5 TUNEL staining of apoptotic cells in MSC+*bcl-2* group × 400

胞的转化率是目前 MSC 移植治疗脑缺血中亟待解决的重要问题。

HANABUSA 等<sup>[8]</sup>联合应用具有抗凋亡作用的肾上腺髓质素与 MSC 来治疗大鼠局灶性脑缺血,结果联合治疗组 MSC 的存活率以及大鼠神经功能恢复都明显优于单纯应用 MSC 组。说明联合应用其他具有抗凋亡作用的药物是提高 MSC 疗效的可行途径。大量实验<sup>[9,10]</sup>已证实 *bcl-2* 基因具有抗凋亡作用,应用 *bcl-2* 基因治疗大鼠局灶性脑缺血可以抑制神经细胞的凋亡,减少梗死灶体积,改善大鼠神经功能。因此本实验选择联合应用 *bcl-2* 基因和 MSC 来治疗大鼠局灶性脑缺血,结果取得了理想的治疗效果,观察到与单纯 MSC 或 *bcl-2* 基因治疗组相比,联合治疗组 MSC 的存活数量明显增多,大鼠神经功能评分明显降低,*bcl-2* 蛋白的表达明显增加,神经细胞的凋亡明显减少,证实 *bcl-2* 基因能够抑制移植后 MSCs 的凋亡,增加 MSC 治疗脑缺血的疗效。

本实验还检测了 IGF-1 表达的变化。IGF-1 是由 70 个氨基酸组成的多肽,结构与胰岛素类似。作为神经营养因子之一的 IGF-1,因其在神经组织的生长、分化、修复、再生中具有重要的作用,近年来倍受关注。IGF-1 及其受体在正常脑组织有少量表达,脑缺血发生后,脑组织 IGF-1 含量明显增加,其中

枢神经系统的分布也发生相应改变。HWANG 等<sup>[11]</sup>在沙鼠脑缺血后 12~24 h 检测到海马及齿状回神经细胞可表达 IGF-1,4 d 后星形胶质细胞和小胶质细胞大量表达 IGF-1。LIN 等<sup>[12]</sup>在实验中应用侧脑室注射 IGF-1 治疗新生脑缺血缺氧大鼠,结果显著改善了大鼠神经功能,并证明 IGF-1 的神经保护作用与其抗凋亡和促进有丝分裂效应有关。

本试验的结果显示,分别应用 *bcl-2* 基因和 MSC 均可增加脑缺血大鼠脑内 IGF-1 的表达,而将二者联合应用可使 IGF-1 的表达明显高于单独治疗组。因此我们认为,增加 IGF-1 的表达可能是 MSC 治疗脑梗死的机制之一;而 *bcl-2* 基因增加 IGF-1 表达的原因可能是由于抑制了大鼠脑内神经细胞的凋亡,使其存活增多,所表达的神经营养因子自然也就增多了。二者联合应用时 IGF-1 的表达量明显高于单独治疗组,说明二者联合可以产生叠加效应,起到更好的治疗效果。

将 *bcl-2* 基因和 MSC 联合起来治疗大鼠脑缺血其实可以有两种具体的联合方式:第一就是把 *bcl-2* 基因与 MSC 分别注射到同一脑缺血大鼠中,正如本实验所做;第二是先把 *bcl-2* 基因转染至 MSC,再把转染后高效表达 *bcl-2* 蛋白的 MSC 移植到脑缺血大鼠中。WANG 等<sup>[13]</sup>发现,将 *bcl-2* 基因制成转基因

动物后,其高效表达 *bcl-2* 蛋白的 MSC 经无血清培养基处理后自身的凋亡数量少于正常 MSC。因此认为,高效表达 *bcl-2* 蛋白可减少 MSC 的凋亡,推测 *bcl-2* 转基因预处理后的个体 MSC 作为移植供体能提高 MSC 移植后的成活率。WEI 等<sup>[14]</sup>证实,在体外将 *bcl-2* 基因转染到小鼠胚胎干细胞中,可以增加其在脑缺血大鼠脑内的存活与分化,并促进脑缺血大鼠的神经功能恢复。如果将该实验中的胚胎干细胞换成更易于获得的 MSC,相信也应该可以得到类似的结果。

由于实验条件的限制,本实验采用的是前一种较为简单的方法,已证明将 *bcl-2* 基因和 MSC 分别注射到同一脑缺血大鼠中,可以提高 MSC 的存活率,增强其疗效,二者联合可以产生叠加效应。在今后的实验中我们将进一步应用后一种方法,即将具有抗凋亡作用的 *bcl-2* 基因转染至 MSC 来治疗缺血性脑损伤,探讨后一种方法能否取得更好的疗效,为缺血性脑血管病的治疗开辟一条新途径。

#### 参考文献:

- [1] ZEALE, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rat [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [2] CHEN J, LI Y, WANG L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [3] LI Y, CHEN J, CHEN XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery [J]. *Neurology*, 2002, 59(4): 514-523.
- [4] GATCIA R, AGUIAR J, ALBERTI E, et al. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(3): 753-754.
- [5] CHEN J, ZHANG ZG, LI Y, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats [J]. *Circ Res*, 2003, 92(6): 692-699.
- [6] SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro [J]. *Exp Neurol*, 2000, 164(2): 247-256.
- [7] CHEN J, LI Y, KATAKOWSKI M, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 73(6): 778-786.
- [8] HANABUSA K, NAGAYA N, IWASE T, et al. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats [J]. *Stroke*, 2005, 36(4): 853-858.
- [9] 何志义, 陈晏, 孟祥亚, 等. 质粒 pLXSN 介导人 *bcl-2* cDNA 抑制局灶性脑缺血大鼠神经细胞凋亡 [J]. *中华神经科杂志*, 2003, 36(5): 374-378.
- [10] 何志义, 赵晶, 邹巧治, 等. 脑室注射 pLXSN-*bcl-2* 对局灶性脑缺血大鼠脑梗死体积 Bcl-2/Bax 蛋白表达及神经元凋亡的影响 [J]. *中华神经科杂志*, 2005, 38(4): 269-270.
- [11] HWANG IK, YOO KY, PARK SK, et al. Expression and changes of endogenous insulin-like growth factor-1 in neurons and glia in the gerbil hippocampus and dentate gyrus after ischemic insult [J]. *Neurochem Int*, 2004, 45(1): 149-56.
- [12] LIN S, FAN LW, PANG Y, et al. IGF-1 protects oligodendrocyte progenitor cells and improves neurological functions following cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat [J]. *Brain Res*, 2005, 1063(1): 15-26.
- [13] WANG L, LI Y, CHEN J, et al. Bone marrow stromal cells of *bcl-2* transgenic mice express widespread *bcl-2* protein and reduce apoptosis in a serum-free medium [J]. *Abstr Int Stroke Conf*, 2001, 32(1): 380.
- [14] WEI L, CUI L, SNIDER BJ, et al. Transplantation of embryonic stem cells overexpressing *bcl-2* promotes functional recovery after transient cerebral ischemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 19(1-2): 183-193.

[收稿日期] 2006-12-26