

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00130

# 大脑皮质细胞低氧条件液对神经干细胞增殖的影响及其信号转导通路的分析

蔡 明, 陆耀飞, 娄淑杰\*

上海体育学院运动科学学院运动生化与营养学教研室, 上海体育学院运动健身科技教育部重点实验室, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 观察和分析大脑皮质细胞低氧条件液对神经干细胞增殖的影响, 并探讨磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3-K)和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)两条信号通路在此过程中的作用。**方法** 原代培养出生后 24 h 内 SD 大鼠大脑皮质细胞 5 d 后, 全量换液并在 4% O<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub> 和常氧环境下继续培养细胞 6 h 以制备低氧条件液和常氧条件液。分别用 3 种条件液及结合使用 PI3-K、JNK 信号通路抑制剂 LY294002 和 SP600125 悬浮培养神经干细胞, 并用免疫荧光染色鉴定神经干细胞, 使用增殖效率(神经球数量)和增殖速度(神经球直径)分析神经干细胞的增殖情况。**结果** (1) 4% 低氧条件液组和常氧条件液组神经干细胞的增殖效率高于 1% 低氧条件液组( $P < 0.01$ ), 但前两者之间差异无统计学意义; (2) 与常氧条件液相比, 两个低氧条件液均提高了神经干细胞的增殖速度( $P < 0.01$ ), 且 4% 低氧条件液组神经干细胞的增殖速度较 1% 低氧条件液组快( $P < 0.01$ ); (3) 在 4% 低氧条件液中使用 LY294002 和 SP600125 同时抑制了神经干细胞的增殖效率和增殖速度, 且 LY294002 抑制作用在 24 h 之后尤为明显。**结论** 4% 大脑皮质细胞低氧条件液能提高神经干细胞的增殖速度, PI3-K 信号通路在此过程中发挥主要作用。

[关键词] 大脑皮质; 神经干细胞; 细胞低氧; 细胞增殖; 磷脂酰肌醇 3-激酶; c-Jun 氨基末端激酶

[中图分类号] R 338.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)02-0130-07

## Effects of hypoxic conditioned medium of cerebral cortex cells on proliferation of neural stem cells and related signal pathways

CAI Ming, LU Yao-fei, LOU Shu-jie\*

Department of Exercise Biochemistry and Nutrition, Key Laboratory of Exercise and Health Sciences, Ministry of Education, School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of hypoxic conditioned medium (HCM) of cerebral cortex cells on the proliferation of neural stem cells (NSCs) and to discuss the role of phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal pathways in the process. **Methods** The cerebral cortex cells of newborn SD rats (within 24 h after birth) were primarily cultured for 5 days, the cells were then cultured under 4% O<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub> or normal oxygen for 6 h, and the cultured media were collected as the HCM and normoxic conditioned medium (NCM). The specific inhibitors of PI3-K and JNK (LY294002 and SP600125) were added into the conditioned medium to culture NSCs. And then immunofluorescence staining was performed to identify NSCs in the neurospheres. The proliferation efficiency (number of neurospheres) and speed (diameter of neurospheres) were used to analyze the effects of hypoxic conditioned media on the proliferation of NSCs. **Results** The proliferation efficiencies of 4% HCM and NCM groups were significantly higher than that of 1% HCM group ( $P < 0.01$ ), and there was no significant difference between former two groups. The proliferation speed of two HCM groups was significantly faster than that of the NCM group ( $P < 0.01$ ), with the speed of 4% HCM group being the fastest one. The two inhibitors inhibited both the proliferation efficiency and speed of NSCs in the 4% HCM group ( $P < 0.01$ ), and the inhibitory effect of LY294002 was more prominent after 24 h. **Conclusion** 4% HCM of cerebral cortex cells can promote the proliferation speed of NSCs, and PI3-K pathway may play an important role in it.

[收稿日期] 2012-11-26

[接受日期] 2012-12-31

[基金项目] 国家自然科学基金(30870349). Supported by National Natural Science Foundation of China (30870349).

[作者简介] 蔡 明, 硕士生. E-mail: ethan321@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-51253243, E-mail: shujielou319@yahoo.com.cn

[Key words] cerebral cortex; neural stem cells; cell hypoxia; cell proliferation; phosphatidylinositol 3-kinase; c-Jun N-terminal kinase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2): 130-136]

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是具有自我更新、增殖及多向分化潜能的神经前体细胞<sup>[1]</sup>,现已证实在成年哺乳动物大脑内它主要存在于两个区域:侧脑室下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回颗粒细胞下区(subgranular zone, SGZ)<sup>[2]</sup>。NSCs目前被广泛用于细胞移植和基因载体治疗的研究,干细胞移植成为修复脑组织损伤和治疗神经系统退行性疾病的理想方法,其应用途径主要有两种:体外扩增干细胞移植入体内和诱导内源性干细胞增殖<sup>[3]</sup>。动物研究发现,由于机体的免疫排斥反应、急性炎症、氧化应激等原因,外源性 NSCs 移植后大部分会很快死亡,难以发挥其功能<sup>[4]</sup>。因此,诱导内源性 NSCs 大量增殖对发挥干细胞潜能便具有重要的意义。

氧气是地球上绝大多数生物生存所必需的物质,它影响生命活动的各个方面,包括生长和发育<sup>[5]</sup>。研究发现,人体内部正常的生理氧浓度低于大气中的 20.96%,这种身体内部的氧浓度被称为“生理性低氧”<sup>[6-7]</sup>。利用适宜的低氧刺激能促进干细胞的增殖和分化,改善学习和认知等功能<sup>[8-9]</sup>。离体实验证实,用 3% O<sub>2</sub> 能促进人的 NSCs 增殖<sup>[10]</sup>,5% O<sub>2</sub> 能诱导小鼠胚胎 NSCs 增殖<sup>[11]</sup>。在体实验发现,成年大鼠在海拔 3 000~5 000 m 间歇低氧(16%~12% O<sub>2</sub>)暴露 2 周后,在 SVZ 和海马齿状回(dentate gyrus, DG)区域 BrdU 标记的阳性细胞大量增加,表明间歇低氧促进了 NSCs 的增殖<sup>[5]</sup>。

在体和离体实验表明,低氧对 NSCs 的增殖具有重要的影响。而低氧诱导 NSCs 增殖的机制,可能是低氧直接刺激 NSCs,也可能是其作用于 NSCs 的周围细胞,如通过刺激神经元、胶质细胞等使其大量分泌各种生物活性因子,这些因子通过旁分泌作用激活信号转导通路来促进 NSCs 的增殖<sup>[12-13]</sup>。为了探讨低氧间接调节 NSCs 增殖的可能机制,我们用低氧刺激大鼠大脑皮质细胞,用含有细胞分泌物的低氧条件液(HCM)培养来源于大脑皮质的 NSCs,观察 NSCs 的增殖情况。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3-K)和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)是介导 NSCs 增殖、分化的两条主要信号通路<sup>[14-15]</sup>,但 HCM 主要通过哪条信号通路影响 NSCs 的增殖目前还不清楚。为此,本实验通过使用不同含氧量的 HCM 及

结合使用 PI3-K 信号通路抑制剂 LY294002 和 JNK 信号通路抑制剂 SP600125 培养 NSCs,观察不同条件下 NSCs 的增殖情况,并探讨 PI3-K 和 JNK 信号通路在此过程中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 实验对象 新生 24 h 内的 SD 大鼠,雌雄不限,购自第二军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 0.25%胰蛋白酶、兔抗大鼠 Nestin 抗体、LY294002、SP600125 均为美国 Sigma 公司产品,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 为美国 Invitrogen 公司产品,Neurobasal 培养液和 B27 添加剂为美国 Gibco 公司产品,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为杭州四季青生物工程材料有限公司产品。

1.3 主要仪器 低氧细胞工作站(英国 Don Whitley Scientific 公司),CO<sub>2</sub>细胞培养箱和移液器(美国 Thermo 公司),倒置荧光显微镜和倒置解剖显微镜(德国 Leica 公司),超净工作台(上海圣欣科学仪器有限公司),台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.4 大脑皮质细胞的分离培养和 HCM 的制备 取出生后 24 h 的 SD 大鼠大脑皮质,在解剖显微镜下去除脑膜和血管,用眼科剪将其充分剪碎;用 0.25%胰蛋白酶 37℃消化 10~15 min。用含 FBS 的种植液终止消化,用火焰抛光的巴氏管吹打成单细胞悬液,200 目网筛过滤,将滤液 157×g 离心 5 min,弃上清液;用添加 2% B27 的 Neurobasal 培养液调整细胞密度为 6×10<sup>5</sup>个/mL,接种于 0.01%多聚赖氨酸包被的 24 孔板中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%空气的细胞培养箱中培养,5 d 后全量换液。设定低氧工作站温度为 37℃,CO<sub>2</sub>浓度为 5%,O<sub>2</sub>浓度分别设为 4%和 1%,通过释放 N<sub>2</sub>自动调整 CO<sub>2</sub>和 O<sub>2</sub>至设定浓度。低氧工作站达到设定的条件后,放入细胞培养 6 h,取出培养板并收集培养液,979×g 离心 5 min,上清液即为皮质细胞 HCM。常氧条件液的制备是在全量换液后将细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%空气的细胞培养箱内培养 6 h,收集培养液并离心,上清液即为常氧条件液。

1.5 NSCs 的分离培养和实验分组 NSCs 分离于出生后 24 h 内 SD 大鼠大脑皮质,经 0.25%胰蛋白

酶消化和 200 目网筛过滤后吹打获得单细胞悬液,以  $6.5 \times 10^5$  个/mL 细胞密度接种于 48 孔板中,使用不同的培养条件悬浮增殖培养。为分析不同条件液对 NSCs 增殖的影响,实验分为 3 组:常氧条件液对照组(NCM 组);4% HCM 组;1% HCM 组。为分析 HCM 中不同信号通路抑制剂对 NSCs 增殖的影响,实验分为 4 组: HCM 组;DMSO 组(向 HCM 中添加 DMSO,其终浓度为 0.5%);LY294002 组;SP600125 组。两种抑制剂使用前均用 DMSO 溶解,以  $10 \mu\text{mol/L}$  终浓度加入 HCM 中,DMSO 终浓度为 0.5%。每组设 3 个复孔,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、95% 空气的细胞培养箱内培养 72 h,实验重复 3 次。

**1.6 神经球计数和直径测量方法及免疫荧光染色鉴定** 细胞接种 24 h 后,在 100 倍倒置显微镜下计数神经球以分析 NSCs 的增殖效率;在 24、48、72 h 于 200 倍显微镜下测量神经球的直径以分析 NSCs 的增殖速度。每个培养孔按时钟的 3 点、6 点、9 点、12 点和圆心 5 个方位拍摄照片,分别统计神经球的数量和直径,并计算各自的平均数。细胞培养 72 h 后进行 Nestin 免疫荧光染色鉴定,步骤如下:多聚甲醛固定 30 min;磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次,5 min/次;加入 0.3% Triton X-100,通透细胞膜 30 min;PBS 漂洗 3 次,5 min/次;加入山羊血清(覆盖

板底即可), $37^\circ\text{C}$  避光封闭 30 min;加入兔抗大鼠 Nestin 抗体(1:200), $4^\circ\text{C}$  避光过夜;PBS 漂洗 3 次,5 min/次;加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1:400), $37^\circ\text{C}$  避光温育 1 h;400 倍倒置荧光显微镜下观察并拍摄照片。

**1.7 统计学处理** 神经球数量和直径的结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,经 SPSS 18.0 统计软件进行分析。采用单因素方差分析检验各组之间的差异。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

**2.1 神经球形态特征和免疫荧光染色鉴定** 大脑皮质细胞培养 5 d 后,倒置相差显微镜下可见立体感较强的神经元,神经元胞体饱满且突起细长,相互交织成网状,细胞生长状态良好(图 1A)。用不同条件液培养 NSCs 6 h 后发现,2 个 HCM 组的细胞开始分裂增殖,产生由 2~3 个细胞组成的小细胞团,常氧条件液组仍为单细胞分散在培养液中悬浮生长;培养 24 h 后,3 个组均出现由数十个细胞聚集的神经球。随培养时间的延长,各组神经球的直径逐渐增大,球体边界清晰且有光晕(图 1B~1D)。72 h 后对各组神经球进行 Nestin 免疫荧光染色,结果为阳性(图 1E)。

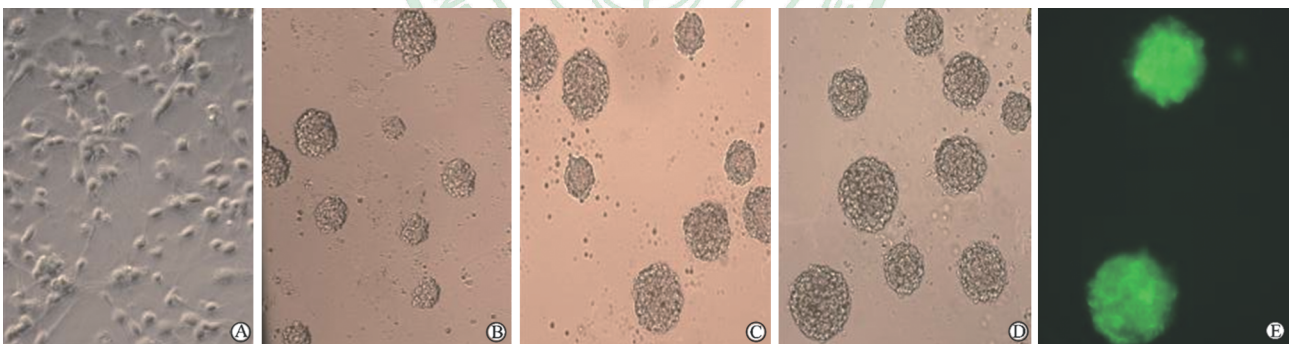


图 1 原代培养大脑皮质细胞和 72 h 后不同培养条件下的神经球及免疫荧光染色鉴定

Fig 1 Cerebral cortex cells were primary cultured and neurospheres were produced after 72 h in different culture conditions identified by Nestin immunofluorescence staining

A: The cerebral cortex cells were cultured with Neurobasal and 2% B27 for 5 d; B: The neurospheres in normoxia condition medium; C: The neurospheres in 1% hypoxia condition medium; D: The neurospheres in 4% hypoxia condition medium; E: Nestin positive expression in the neurospheres through immunofluorescence staining. Original magnification:  $\times 400$  (A,E);  $\times 200$  (B-D)

**2.2 HCM 对 NSCs 增殖效率和增殖速度的影响** 在 24 h 和 48 h 通过计数各组神经球发现,两个时间点内神经球的数量差异没有统计学意义,故以 24 h 神经球的数量代表 NSCs 的增殖效率。1% HCM 组神经球的数量低于常氧条件液组和 4%

HCM 组( $P < 0.01$ ),但后两组之间差异没有统计学意义( $P > 0.05$ ,图 2)。结果表明,1% HCM 能抑制 NSCs 的增殖效率,4% HCM 对 NSCs 的增殖效率没有影响。

在 24、48、72 h 通过测量神经球的直径发现,随



培养时间的延长,3个组神经球的直径均逐渐增大,且2个HCM组神经球的直径始终大于常氧条件液组( $P<0.01$ ),其中4% HCM组神经球直径在3个时间点内均大于其他两组( $P<0.01$ ,图3)。结果表明,4% HCM和1% HCM均能提高NSCs的增殖速度,且4% HCM促进作用更明显。

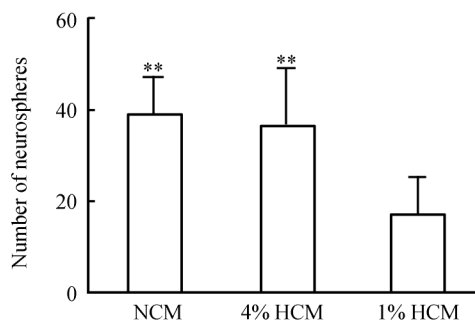


图2 24 h时 HCM对 NSCs增殖效率的影响

Fig 2 Effects of different HCM on the proliferation efficiency of NSCs

NSCs; Neural stem cells; HCM; Hypoxia condition medium; NCM; Normoxia condition medium. \*\*  $P<0.01$  vs 1% HCM group.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

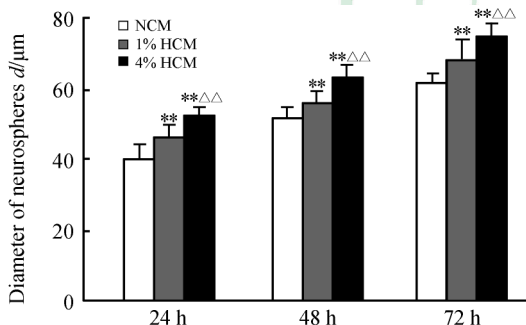


图3 HCM对 NSCs增殖速度的影响

Fig 3 Effects of different HCM on the proliferation speed of NSCs

NSCs; Neural stem cells; HCM; Hypoxia condition medium; NCM; Normoxia condition medium. \*\*  $P<0.01$  vs NCM group;  $\Delta\Delta P<0.01$  vs 1% HCM group.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

2.3 LY294002和SP600125对NSCs增殖效率和增殖速度的影响 在24 h时通过计数各组神经球发现,4% HCM组和DMSO组神经球数量差异无统计学意义,2个抑制剂组神经球的数量少于前两组,且LY294002组数量最少( $P<0.01$ ,图4)。结果表明,0.5% DMSO对NSCs的增殖效率没有影响,而SP600125组和LY294002组抑制了NSCs的增殖效率,且LY294002的抑制效果更明显。

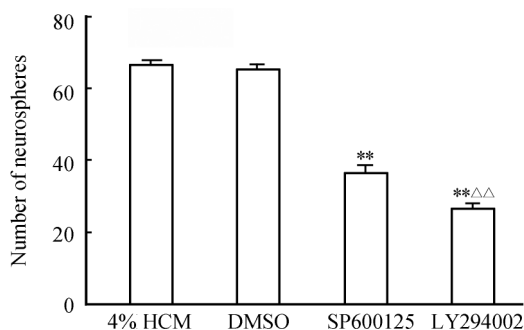


图4 LY294002和SP600125对NSCs增殖效率的影响

Fig 4 Effects of LY294002 and SP600125 on the proliferation efficiency of NSCs

NSCs; Neural stem cells; HCM; Hypoxia condition medium; DMSO; Dimethyl sulfoxide. \*\*  $P<0.01$  vs DMSO and 4% HCM group;  $\Delta\Delta P<0.01$  vs SP600125 group.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

在24、48、72 h通过测量各组神经球的直径发现,DMSO组和4% HCM组神经球直径差异无统计学意义。2个抑制剂组神经球直径均小于DMSO组( $P<0.01$ ,图5),且LY294002组神经球中的细胞出现空泡状(图6),球的直径随时间延长而逐渐变小,NSCs的增殖速度受到抑制(图5)。结果提示,4% HCM诱导能提高NSCs的增殖速度与PI3-K和JNK信号通路有关,且PI3-K信号通路在此过程中可能发挥主要作用。

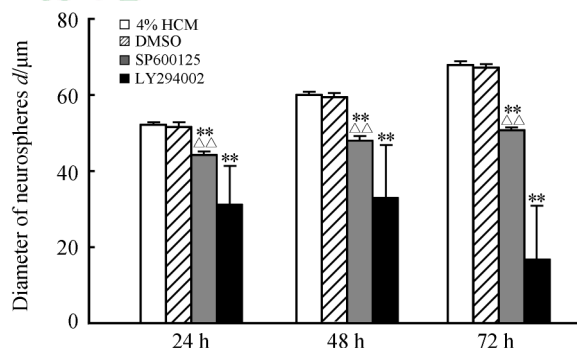


图5 LY294002和SP600125对NSCs增殖速度的影响

Fig 5 Effects of LY294002 and SP600125 on the proliferation speed of NSCs

NSCs; Neural stem cells; HCM; Hypoxia condition medium; DMSO; Dimethyl sulfoxide. \*\*  $P<0.01$  vs DMSO group;  $\Delta\Delta P<0.01$  vs SP600125 group.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

### 3 讨论

本研究用4%  $O_2$ (适度低氧)和1%  $O_2$ (重度低氧)分别刺激大脑皮质细胞6 h以制备HCM,用其

悬浮增殖培养 NSCs,发现不同的条件液对 NSCs 的增殖效率(相同时间内形成神经球的个数)和增殖速度(相同时间内 NSCs 的分裂速度,分裂速度越快则神经球体积越大)有不同的影响。统计结果显示,与常氧条件液相比,2种 HCM 均能提高 NSCs 的增殖速度,且4% HCM 的促进作用更明显;4% HCM 没有提高 NSCs 的增殖效率,1% HCM 对 NSCs 的增殖效率有抑制作用。HCM 能提高增殖速度,可能是皮质细胞受低氧刺激后分泌了较多的生物活性因子,在各种活性因子的协同作用下促进了 NSCs 的分裂。

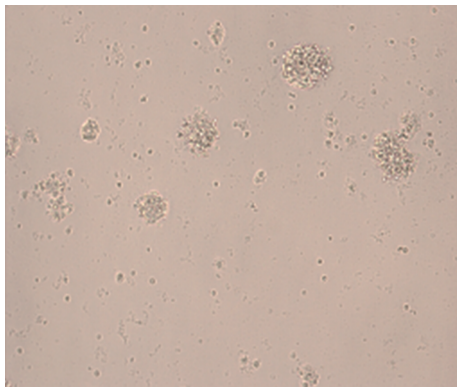


图6 LY294002对NSCs增殖的影响

Fig 6 Effect of LY294002 on the proliferation of NSCs

The neurospheres produced in the hypoxic cultured medium containing LY294002 present air bubbles, and their diameters become shorter as time goes by. Original magnification:  $\times 200$

有研究报道,低氧引起的神经发生是各种生物活性因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、促红细胞生成素(EPO)等协同作用的结果<sup>[16-18]</sup>。经适度低氧刺激后,通过低氧诱导因子 $1\alpha$ (HIF- $1\alpha$ )的调控,细胞会大量地分泌这些生物活性因子<sup>[8]</sup>。例如,5%  $O_2$  刺激会上调星形胶质细胞内 BDNF 和 EPO 的蛋白表达水平,使其大量分泌到细胞外液中,并促进了大鼠胚胎干细胞的增殖<sup>[19-20]</sup>; Nakamura 等<sup>[21]</sup> 研究发现,适度低氧刺激上调了大鼠颗粒细胞中 HIF- $1\alpha$  的表达,同时 HIF- $1\alpha$  又能诱导神经生长因子(NGF)和 VEGF 的大量分泌,促进了小鼠 NSCs 的增殖。同时本课题组研究发现,SD 大鼠大脑皮质细胞分别经 4%  $O_2$  和 1%  $O_2$  刺激 6 h 后,细胞培养液中 VEGF 和 BDNF 的含量均高于常氧培养组,且 1%  $O_2$  组的含量高于 4%  $O_2$  组(待发表资料)。提示可能是在 VEGF、BDNF 等生物活性因子共同作用下提高了 NSCs 的增殖速

度。但本研究发现 1% HCM 抑制了 NSCs 的增殖效率,且 NSCs 的增殖速度低于 4% HCM。提示可能是细胞在含氧量 1% 的环境下主要进行无氧代谢,导致乳酸产生过多、谷氨酸释放增加<sup>[22-23]</sup>,这些物质的积累在一定程度上影响了 VEGF 和 BDNF 等促进 NSCs 增殖作用的发挥。此外,4% HCM 和常氧条件液对 NSCs 的增殖效率有相同的影响,提示启动 NSCs 增殖(即提高增殖效率)和延续 NSCs 增殖(即提高增殖速度)可能是由不同的生物活性因子和信号转导机制控制,其具体原因还有待进一步研究。

研究表明,PI3-K 和 JNK 信号通路对 NSCs 的迁移、增殖、分化等有重要的调控作用。PI3-K 是一种与细胞信号转导有关的胞内蛋白激酶,是由一个 p85 调节亚基和一个 p110 催化亚基组成的异源二聚体<sup>[24]</sup>。PI3-K 信号转导通路对中枢神经系统的神经发生起重要作用<sup>[25]</sup>,它可被多种生物活性因子(如 NGF、VEGF、EPO)激活<sup>[26]</sup>,活化的 PI3-K 可使其下游信号分子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)发生磷酸化,通过 Akt 的活化引起下游靶基因的变化,从而调节细胞的存活、迁移、增殖和分化<sup>[27]</sup>。LY294002 是 PI3-K 的特异性抑制剂,可竞争性地抑制 PI3-K 亚基中的 ATP 结合位点,抑制 PI3-K 信号途径。Fournier 等<sup>[28]</sup> 发现在海马 NSCs 培养液中加入 PI3-K 抑制剂 LY294002,细胞内 Akt 的磷酸化受到明显抑制,同时导致 BrdU 免疫阳性细胞减少,说明 PI3K/Akt 信号通路与海马 NSCs 的增殖有关。JNK 是促分裂原活化蛋白激酶(MAPKs)中的一种,可有效磷酸化 c-Jun 氨基末端<sup>[29]</sup>。以 JNK 为中心的 JNK 信号通路对细胞的存活、增殖、分化及多种人类疾病的发生发展起重要作用<sup>[30-31]</sup>,该信号通路可被生长因子、细胞因子及某些 G 蛋白耦联受体等激活<sup>[15]</sup>,上述信号分子可以激活 MEKK1,继而导致后续的 MKK1/4 磷酸化,并最终激活 JNK 信号通路。SP600125 是 JNK 的特异性抑制剂,对 JNK 的选择性抑制比对 ERK1 和 p38-MAPK 的抑制高 300 倍以上,可抑制 JNK 介导的 c-Jun 磷酸化。Go 等<sup>[32]</sup> 向神经前体细胞培养液中加入 SP600125,然后检测细胞增殖情况,结果显示神经前体细胞中 BrdU 免疫阳性细胞减少,提示 JNK 信号通路参与了神经前体细胞的增殖。

研究发现,LY294002 和 SP600125 对相应信号通路的抑制作用呈现剂量依赖关系,低浓度的抑制

剂对信号转导的影响较小,中等浓度(10  $\mu\text{mol/L}$ 、15  $\mu\text{mol/L}$ )能起到抑制作用,但提高浓度在促进抑制作用的同时,还会影响细胞的存活,并可能引起细胞死亡<sup>[33]</sup>。同时,各种抑制剂最适宜的抑制浓度会因细胞种属及存在部位的不同而不同。本研究中LY294002和SP600125选用10  $\mu\text{mol/L}$ 的中等浓度,以分析PI3-K和JNK信号通路在4% HCM中对NSCs增殖的影响。结果显示,2种抑制剂均阻断了各自的信号通路,抑制了NSCs的增殖效率和增殖速度,且LY294002的抑制作用在24 h之后尤为明显,神经球中的细胞出现空泡状,细胞数量减少导致直径逐渐变小,说明PI3-K信号通路受到抑制后,NSCs的增殖能力受到明显影响。提示在4% HCM中PI3-K和JNK信号通路均参与调控了NSCs的增殖过程,且PI3-K信号通路在此过程中起到重要的作用。

综上所述,不同含氧量的HCM对NSCs的增殖有不同的影响,1% HCM能抑制NSCs的增殖效率;而4% HCM能提高NSCs的增殖速度,且其过程可能主要受PI3-K信号转导通路的调控,提示低氧刺激可通过调节脑内成熟神经元和胶质细胞的分泌功能进而通过信号转导实现对NSCs增殖过程的调控。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Santilli G, Lamorte G, Carlessi L, Ferrari D, Rota Nodari L, Binda E, et al. Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e8575.
- [2] Borrell V, Reillo I. Emerging roles of neural stem cells in cerebral cortex development and evolution [J]. *Dev Neurobiol*, 2012, 72: 955-971.
- [3] Palm T, Bahnassawy L, Schwamborn J. MiRNAs and neural stem cells: a team to treat Parkinson's disease? [J]. *RNA Biol*, 2012, 9: 720-730.
- [4] Ronaghi M, Erceg S, Moreno-Manzano V, Stojkovic M. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? [J]. *Stem Cells*, 2010, 28: 93-99.
- [5] Zhang K, Zhu L, Fan M. Oxygen, a key factor regulating cell behavior during neurogenesis and cerebral diseases [J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4: 5.
- [6] Chen H L, Pistollato F, Hoepfner D J, Ni H T, McKay R D, Panchision D M. Oxygen tension regulates survival and fate of mouse central nervous system precursors at multiple levels [J]. *Stem Cells*, 2007, 25: 2291-2301.
- [7] Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219: 271-275.
- [8] De Filippis L, Delia D. Hypoxia in the regulation of neural stem cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 2831-2844.
- [9] Zhang J X, Lu X J, Wang X C, Li W, Du J Z. Intermittent hypoxia impairs performance of adult mice in the two-way shuttle box but not in the morris water maze [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84: 228-235.
- [10] Milosevic J, Schwarz S C, Krohn K, Poppe M, Storch A, Schwarz J. Low atmospheric oxygen avoids maturation, senescence and cell death of murine mesencephalic neural precursors [J]. *J Neurochem*, 2005, 92: 718-729.
- [11] Rodrigues C A, Diogo M M, da Silva C L, Cabral J M. Hypoxia enhances proliferation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106: 260-270.
- [12] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, Hurukawa S, Araie M, Sakuragawa N. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 62: 585-590.
- [13] Dahl A, Eriksson P S, Persson A I, Karlsson G, Davidsson P, Ekman R, et al. Proteome analysis of conditioned medium from cultured adult hippocampal progenitors [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 2195-2202.
- [14] Bouchard V, Demers M J, Thibodeau S, Laquerre V, Fujita N, Tsuruo T, et al. Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212: 717-728.
- [15] Tiwari V K, Stadler M B, Wirbelauer C, Paro R, Schübeler D, Beisel C. A chromatin-modifying function of JNK during stem cell differentiation [J]. *Nat Genet*, 2011, 44: 94-100.
- [16] Li Y, Luo J, Lau W M, Zheng G, Fu S, Wang T T, et al. Caveolin-1 plays a crucial role in inhibiting neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells via VEGF signaling-dependent pathway [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e22901.

- [17] Lameu C, Trujillo C A, Schwindt T T, Negraes P D, Pillat M M, Morais K L, et al. Interactions between the NO-citrulline cycle and brain-derived neurotrophic factor in differentiation of neural stem cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287:29690-29701.
- [18] Alcalá-Barraza S R, Lee M S, Hanson L R, McDonald A A, Frey W H 2nd, McLoon L K. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS[J]. J Drug Target, 2010, 18:179-190.
- [19] Zhu L L, Wu L Y, Yew D T, Fan M. Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs[J]. Mol Neurobiol, 2005, 31(1-3):231-242.
- [20] Vermehren-Schmaedick A, Jenkins V K, Knopp S J, Balkowiec A, Bissonnette J M. Acute intermittent hypoxia-induced expression brain-derived neurotrophic factor is disrupted the brainstem of methyl-CpG-binding protein 2 null mice[J]. Neuroscience, 2012, 206:1-6.
- [21] Nakamura K, Tan F, Li Z, Thiele C J. NGF activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  [J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 46:498-506.
- [22] Schurr A, Rigor B M. The mechanism of cerebral hypoxic-ischemic damage[J]. Hippocampus, 1992, 2:221-228.
- [23] Korf J. Intracerebral trafficking of lactate *in vivo* during stress, exercise, electroconvulsive shock and ischemia as studied with microdialysis [J]. Dev Neurosci, 1996, 18(5-6):405-414.
- [24] Cully M, You H, Levine A J, Mak T W. Beyond PTEN mutations: the PI3-K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6:184-192.
- [25] Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung Y D, Ellis L M, Semenza G L. Insulin-like growth factor induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277:38205-38211.
- [26] Chan C B, Ye K. Phosphoinositide 3-kinase enhancer (PIKE) in the brain: is it simply a phosphoinositide 3-kinase/Akt enhancer? [J]. Rev Neurosci, 2012, 23:153-161.
- [27] Heffron T P, Salphati L, Alicke B, Cheong J, Dotson J, Edgar K, et al. The design and identification of brain penetrant inhibitors of phosphoinositide 3-kinase  $\alpha$  [J]. J Med Chem, 2012, 55:8007-8020.
- [28] Fournier N M, Lee B, Banasr M, Elsayed M, Duman R S. Vascular endothelial growth factor regulates adult hippocampal cell proliferation through MEK/ERK and PI3K/Akt dependent signaling [J]. Neuropharmacology, 2012, 63:642-652.
- [29] Kanzawa T, Iwado E, Aoki H, Iwamaru A, Hollingsworth E F, Sawaya R, et al. Ionizing radiation induces apoptosis and inhibits neuronal differentiation in rat neural stem cells via the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) pathway [J]. Oncogene, 2006, 25:3638-3648.
- [30] Zhang Q G, Wang R, Han D, Dong Y, Brann D W. Role of Rac1 GTPase in JNK signaling and delayed neuronal cell death following global cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2009, 1265:138-147.
- [31] Kim S J, Son T G, Kim K, Park H R, Mattson M P, Lee J. Interferon-gamma promotes differentiation of neural progenitor cells via the JNK pathway [J]. Neurochem Res, 2007, 32:1399-1406.
- [32] Go H S, Shin C Y, Lee S H, Jeon S J, Kim K C, Choi C S, et al. Increased proliferation and gliogenesis of cultured rat neural progenitor cells by lipopolysaccharide-stimulated astrocytes [J]. Neuroimmunomodulation, 2009, 16:365-376.
- [33] 佟雷, 佟晓杰. JNK 信号转导通路对神经干细胞增殖的影响 [J]. 解剖学研究, 2011, 33:85-88.