

异氟醚对新生大鼠海马神经干细胞增殖及分化的影响

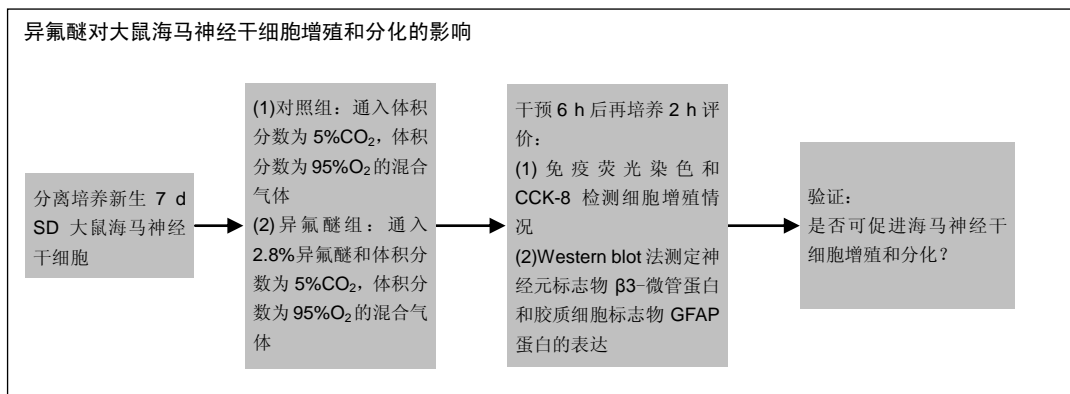
闵娜, 胡强夫, 李晓培, 聂晓红, 杨利利(郑州大学第五附属医院麻醉科, 河南省郑州市 450052)

引用本文: 闵娜, 胡强夫, 李晓培, 聂晓红, 杨利利. 异氟醚对新生大鼠海马神经干细胞增殖及分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):118-122.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.021

ORCID: 0000-0001-8738-9327(闵娜)

文章快速阅读:



闵娜, 女, 1979 年生, 广东省信宜人, 汉族, 2004 年牡丹江医学院毕业, 主治医师, 主要从事心血管麻醉方面的研究。

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2016)01-00118-05
稿件接受: 2015-11-23
<http://www.crter.org>

文题释义:

神经干细胞: 存在于神经发生过程以及成年哺乳类动物中枢神经系统的神经干细胞是一种多能性细胞, 具有自我更新以及分化为神经元、星形胶质细胞以及少突胶质细胞能力。从哺乳动物胚胎及脑组织中可以分离培养出神经干细胞, 呈聚集悬浮生长, 形成典型的神经球形态, 可表达其特异性标志物巢蛋白、CD133。

吸入麻醉: 为挥发性麻醉药或麻醉气体经呼吸系统吸入, 抑制中枢神经系统而产生全身麻醉的麻醉方法。吸入麻醉由于所用麻醉药在药理学性质上存在差别, 其临床麻醉表现如诱导快慢、麻醉强度、苏醒快慢、对循环和呼吸的影响等也不相同, 常用的吸入麻醉药物有乙醚、氟烷及七氟烷等。

摘要

背景: 异氟醚麻醉药物会对神经系统产生一定的影响, 研究表明其可能是通过影响神经干细胞功能或形态而引起神经功能障碍。

目的: 探讨异氟醚对大鼠海马神经干细胞增殖和分化的影响。

方法: 培养新生 7 d SD 大鼠海马神经干细胞并进行诱导分化, 取传至第 3 代细胞, 将其分为 2 组: 异氟醚组通入 2.8% 异氟醚和体积分数为 5%CO₂, 体积分数为 95%O₂ 的混合气体; 对照组仅通入体积分数为 5%CO₂, 体积分数为 95%O₂ 的混合气体。干预 6 h 后, 再常规培养 2 h。抗 BrdU 单克隆抗体进行免疫荧光染色检测细胞增殖情况, Western blot 法测定神经元标志物 β3-微管蛋白和胶质细胞标志物 GFAP 蛋白的表达。

结果与结论: 与对照组相比, 异氟醚组 BrdU 阳性细胞数目明显减少, 说明异氟醚抑制了神经干细胞增殖; 与对照组相比, 异氟醚组 GFAP 表达水平上调, β3-微管蛋白表达水平无明显改变, 说明异氟醚可促进神经干细胞更多地向星形胶质细胞分化。

关键词:

干细胞; 培养; 异氟醚; 吸入麻醉; 大鼠; 新生; 海马; 神经干细胞; 细胞增殖; 神经元分化

主题词:

神经干细胞; 异氟醚; 麻醉, 吸入; 细胞增殖; 组织工程

Isoflurane effects on the proliferation and differentiation of neural stem cells in the hippocampus of neonatal rats

Abstract

BACKGROUND: Isoflurane is an anesthesia drug that has a certain effect on the nervous system. It possibly causes neurologic disorders through impacting nerve stem cell function or morphology.

OBJECTIVE: To investigate the effects of isoflurane on the proliferation and differentiation of neural stem cells in the hippocampus of rats.

METHODS: Neural stem cells from the hippocampus of neonatal Sprague-Dawley rats, aged 7 days, were induced and differentiated. Passage 3 cells were obtained and divided into two groups: isoflurane group (a mixture gas of 2.8% isoflurane, 5% CO₂ and 95% O₂) and control group (a mixture of 5% CO₂ and 95% O₂). After

Min Na, Hu Qiang-fu, Li Xiao-pei, Nie Xiao-hong, Yang Li-li (Department of Anesthesiology, Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China)

Min Na, Attending physician,
Department of
Anesthesiology, Fifth
Affiliated Hospital of
Zhengzhou University,
Zhengzhou 450052, Henan
Province, China

Subject headings: Neural
Stem Cells; Isoflurane;
Anesthesia, Inhalation; Cell
Proliferation; Tissue
Engineering

intervention of 6 hours followed by 2 hours of routine culture, anti-BrdU monoclonal antibody immunofluorescent staining was used to detect cell proliferation, and western blot assay to detect the expression of β 3-tubulin and glial fibrillary acidic protein.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the number of BrdU positive cells in the isoflurane group reduced significantly, indicating that isoflurane inhibits the proliferation of neural stem cells. Compared with the control group, the expression of glial fibrillary acidic protein in the isoflurane group up-regulated, but the expression of β 3-tubulin had no changes, indicating isoflurane promotes the differentiation of neural stem cells into astrocytes.

Cite this article: Min N, Hu QF, Li XP, Nie XH, Yang LL. Isoflurane effects on the proliferation and differentiation of neural stem cells in the hippocampus of neonatal rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2016;20(1):118-122.

0 引言 Introduction

婴幼儿手术常采用吸入麻醉方法进行麻醉, 其具有诱导快、操作简单等优点, 如七氟醚、异氟醚都是常用的全麻药^[1]。吸入麻醉药对胎儿、婴幼儿大脑发育的影响, 仍是目前临床关注的问题。为了保证吸入麻醉的安全性, 有必要深入探讨吸入麻醉药物对神经系统的影响^[2-3]。Stratmann等^[4]研究表明异氟醚能够抑制新生大鼠海马齿状回神经干细胞的增殖, 并影响神经干细胞向神经元的分化。Fredriksson等^[5]也通过研究报道, 异氟醚对人类神经干细胞分化以及神经形成等产生一定的影响。在动物实验研究中, 人们发现达到临床手术要求的麻醉药物浓度将影响脑的学习、记忆、认知功能及行为表现能力^[6-7]。

自从1992年Reynolds等提出神经干细胞的概念, 神经干细胞研究已成为神经科学的一个重要领域。神经干细胞是一类能够不断增殖、具有多向分化潜能的细胞群, 其可以分化为神经组织各类细胞, 如神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞等, 周围外环境可对其分裂增殖以及分化等产生显著影响^[8-9]。实验对新生大鼠神经干细胞予以异氟醚处理, 了解其对神经干细胞增殖以及分化的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年3至4月在郑州大学第五附属医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康7 d龄雄性SD大鼠20只, 体质量15-20 g, 购自郑州大学实验动物中心。

1.3.2 试剂与仪器 异氟醚(百灵威科技有限公司); DMEM/F12培养基(美国Hyclone公司); 碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、B27(Peprotech公司); 巢蛋白、BrdU单克隆抗体(美国Sigma公司); 抗 β 3-微管蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白抗体(Invitrogen公司); 抗 β -actin抗体(武汉博士德生物工程有限公司); CCK-8试剂盒(碧云天生物技术有限公司); 气体检测仪(济南德耐电子有限公司); 荧光显微镜(日本Olympus公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 神经干细胞的分离培养 取出生后第7天SD大鼠, 无菌条件下分离出海马组织, PBS漂洗, 用眼科剪剪碎成

糊状, 放入胰蛋白酶中消化, 根据消化情况加入含体积分数为10%胎牛血清的PBS中止消化, 吸管机械吹打后, 1 200 r/min离心5 min弃上清, 沉淀加入无血清DMEM/F12培养液(含2%B27, 20 ng/L表皮生长因子和20 ng/L碱性成纤维细胞生长因子)混悬, 200目筛网过滤后进行细胞计数, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 置于37 °C, 体积分数为5% CO₂培养箱进行培养, 每隔两三天换液1次。原代培养7 d左右进行传代, 传代后每3 d换液1次, 大约7 d细胞克隆球传代1次, 利用神经干细胞标志蛋白Nestin对神经干细胞进行鉴定, 选择第3代细胞进行后续实验。

1.4.2 神经干细胞的诱导分化 将神经干细胞接种至多聚鸟氨酸和层粘连蛋白包被的培养板, 加入含体积分数为1%胎牛血清、1%青链霉素、2%B27的DMEM/F12培养基进行诱导培养7-9 d。

1.4.3 实验分组与处理 实验分为2组: 对照组和异氟醚组。将6孔培养板细胞置于实验箱, 异氟醚组通入2.8%异氟醚和体积分数为5%CO₂, 体积分数为95%O₂的混合气体^[10]; 对照组仅通入体积分数为5%CO₂, 体积分数为95%O₂的混合气体。干预6 h后, 取出6孔培养板再放入37 °C细胞培养箱中继续培养2 h。

1.4.4 免疫荧光染色和CCK-8检测细胞增殖情况 利用抗BrdU单克隆抗体进行免疫荧光染色检测细胞增殖情况。收集第3代对数生长期的神经干细胞, 轻轻吹打为单细胞悬液, 接种至含盖玻片的24孔板中, 于异氟醚干预前30 min, 各组细胞培养液中掺入10 $\mu\text{mol/L}$ BrdU。待异氟醚干预完成后, 立即更换新鲜培养液, 在37 °C, 体积分数为5%CO₂条件继续培养3 d后进行免疫荧光细胞化学染色检测: ①滴加0.01 mol/L pH 7.4的PBS于盖玻片, 10 min后弃去, 使标本保持一定温度。②滴加一抗BrdU(1 : 100), 37 °C保温30 min。③用0.01 mol/L pH 7.4的PBS洗涤浸泡3次。④加入FITC标记的二抗, 37 °C保温30 min, 用0.01 mol/L pH 7.4的PBS洗涤浸泡3次。⑤用滤纸吸去多余水分, 滴加缓冲甘油封固。⑥荧光显微镜下每组随机选择5个视野, 计数BrdU阳性细胞数和细胞总数, 以BrdU阳性细胞数/细胞总数比值反映神经干细胞增殖能力。

另外随机取6孔细胞, 以酶标法使用CCK-8试剂盒检测细胞增殖能力, 酶标仪测定450 nm波长处吸光度值。

1.4.5 Western blot法测定神经元标志物 β 3-微管蛋白和

胶质细胞标志物GFAP蛋白的表达 异氟醚干预后, 弃去培养液, 用冷PBS洗涤细胞3次, 加入适量的RIPA全细胞裂解液裂解5-10 min, 12 000 r/min离心15 min, 收集上清, BCA法测定蛋白浓度, 提取细胞总蛋白。SDS-PAGE凝胶电泳, 电转法将蛋白转至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 加入β3-微管蛋白、GFAP一抗4 ℃孵育过夜, 洗膜后加入二抗室温孵育2 h, 化学发光法ECL显影, 采用Image Pro Plus 6.0软件分析β3-微管蛋白和GFAP蛋白相对于内参β-actin的表达水平。

1.5 主要观察指标 ①神经干细胞培养形态。②免疫荧光化学染色检测BrdU阳性表达情况。③CCK-8法检测吸光度值。④Western blot法测定神经元标志物β3-微管蛋白和胶质细胞标志物GFAP蛋白表达。

1.6 统计学分析 计算结果利用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较行t检验, 数据处理采用SPSS 19.0软件, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 神经干细胞形态 刚接种时细胞呈圆形亮点状悬浮生长, 边界清楚, 第3天开始形成神经球, 由5-8个细胞组成, 第6-8天细胞数量增多, 神经球体积增大。第3代神经

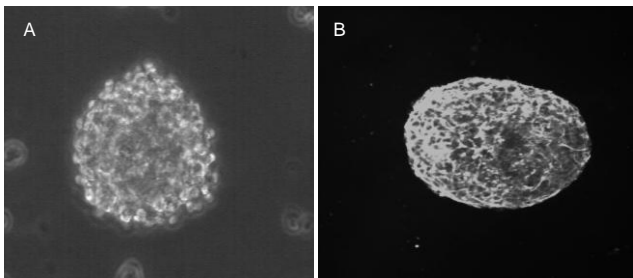


图1 新生SD大鼠神经干细胞形态及鉴定(x400)
Figure 1 Morphology and identification of neural stem cells in neonatal Sprague-Dawley rats (x400)

图注: 图中A为第3代神经干细胞球形态规则, 细胞排列紧密, 立体感强; B为第3代神经干细胞进行Nestin免疫荧光鉴定, 结果呈阳性。

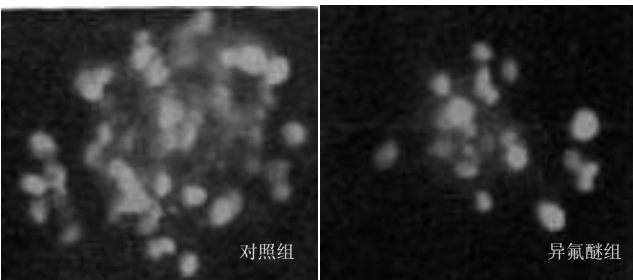


图2 免疫荧光化学染色检测BrdU阳性表达情况(x200)
Figure 2 BrdU positive expression detected by immunofluorescence staining (x200)

图注: 异氟醚组BrdU标记的神经干细胞数目明显少于对照组。

干细胞球形态规则, 细胞排列紧密, 立体感强(图1A)。免疫荧光化学染色检测神经干细胞标志物Nestin表达阳性(图1B)。

2.2 异氟醚抑制神经干细胞的增殖 免疫荧光化学染色检测BrdU阳性表达情况, 结果发现异氟醚组BrdU标记的神经干细胞数目明显少于对照组($P < 0.05$), 见图2, CCK-8法检测异氟醚组的吸光度值显著低于对照组, 即细胞数减少, 见表1。

表1 两组大鼠神经干细胞增殖能力测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 1 The proliferation of neural stem cells in the two groups of rats

组别	免疫荧光化学法(%)	CCK-8法(吸光度值)
对照组	35.04±5.23	0.98±0.12
异氟醚组	16.79±3.67 ^a	0.54±0.09 ^a

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.3 异氟醚促进神经干细胞向胶质细胞分化 待神经干细胞分化完成后, Western blot法检测胶质细胞标志物GFAP和神经元标志物β3-微管蛋白的表达变化。与对照组相比, 异氟醚组GFAP表达升高($P < 0.05$), β3-微管蛋白表达无明显改变($P > 0.05$), 见图3。

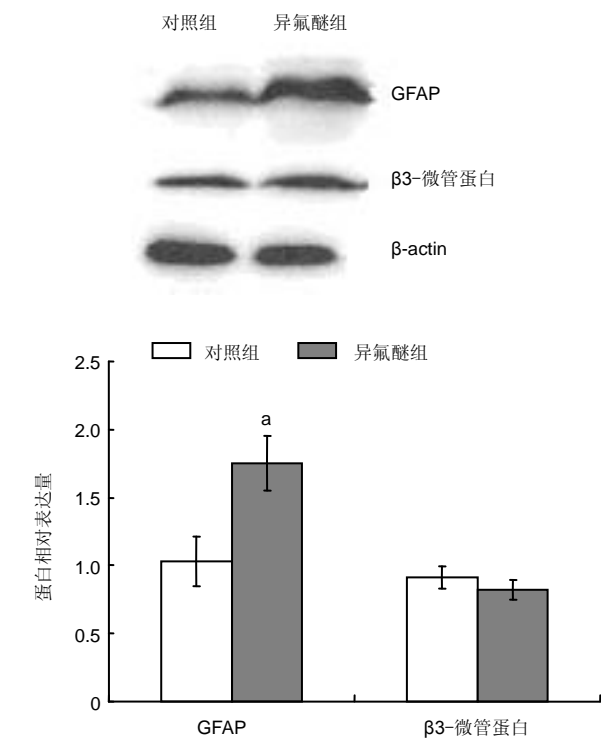


图3 Western blot法测定神经元标志物β3-微管蛋白和胶质细胞标志物GFAP蛋白的表达

Figure 3 The expression of β3-tubulin and glial fibrillary acidic protein detected by western blot assay

图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

在动物大脑海马区存在神经干细胞, 可以发生增殖分化, 形成神经元^[10-13]。对于新生动物而言, 神经干细胞处于生长高峰期, 且取材方便^[14-16]。实验取新生7 d龄大鼠海马培养神经干细胞, 使用无血清DMEM/F12培养液(含2%B27, 20 ng/L表皮生长因子和20 ng/L碱性成纤维细胞生长因子)进行培养, 其中添加的细胞生长因子、B27起促进神经干细胞分裂增殖, 抑制细胞分化的作用。通过以上技术, 可以培养出特征性神经球干细胞。

麻醉药物会对神经系统产生一定的影响, 研究表明其可能是通过影响神经干细胞功能或形态而引起认知功能障碍和行为改变。依据Culley等^[17]和Sall等^[18]实验采用2.8%异氟醚作用6 h干预神经干细胞, 以了解吸入麻醉药异氟醚对神经干细胞增殖以及分化的影响。

实验采用BrdU标记的方式观察神经干细胞的增殖情况^[19]。利用BrdU对细胞进行标记之后, 随着细胞的分裂和增殖, BrdU可以继续存在于细胞中^[20-23], 还可以随着细胞分裂传递到子细胞^[24-27]。因此, 用BrdU对神经干细胞进行标记, 免疫荧光化学染色检测BrdU的表达情况, 可以较为直观的了解神经干细胞的增殖情况^[28-32]。实验结果显示, 异氟醚组BrdU标记的神经干细胞数目明显少于对照组($P < 0.05$), 表明异氟醚可有效抑制神经干细胞的增殖能力。同样, 采用CCK-8法也得到了相同的结果, 异氟醚组的吸光度值显著低于对照组, 即细胞数减少。另外, Jevtovic-Todorovic等^[33]还通过研究指出, 新生大鼠进行异氟醚吸入麻醉之后, 会导致大鼠脑组织神经元凋亡, 相应的效应与异氟醚浓度以及时间之间呈现出一定的依赖性。但是, 此次实验受到时间限制, 并没有研究不同异氟醚浓度对新生大鼠齿状回神经干细胞增殖的影响, 相关问题, 还有待今后予以进一步分析。

$\beta 3$ -微管蛋白是一种微管蛋白, 其作为神经元特有标志物, 被广泛应用于神经生物学研究^[34-35]。GFAP是一种中间丝蛋白, 其主要存在于星形胶质细胞内, 可以作为胶质细胞的标志物^[36-37]。实验采用Western blot法测定神经元标志物 $\beta 3$ -微管蛋白和胶质细胞标志物GFAP蛋白的表达, 与对照组相比, 异氟醚组GFAP表达升高($P < 0.05$), $\beta 3$ -微管蛋白表达无明显改变($P > 0.05$), 说明异氟醚可促进神经干细胞更多地向星形胶质细胞分化, 产生一定的促进作用。Sall等^[38]也通过研究发现, 新生大鼠吸入异氟醚麻醉之后, 海马区神经干细胞增殖会受到一定的抑制, 但吸入麻醉可以促进神经干细胞向早期神经发生分化。Zhu等^[39]采用反复吸入方式对新生大鼠进行异氟醚吸入麻醉, 并检测体内神经干细胞的增殖情况。结果发现, 在接受异氟醚吸入麻醉处理之后, 大鼠齿状回神经干细胞增殖受到显著抑制。Stratmann等^[40]通过研究指出, 异氟醚吸入麻醉处理之后, 新生大鼠齿状回神经干细胞增殖出现抑制现象, 上述学者的研究结果均与此次实验结果一致, 表明了异氟醚可通过

诱导发育期海马神经干细胞增殖能力减弱和分化增加, 最终导致海马神经干细胞数量减少。但是, Stratmann等^[40]实验没有观察到异氟醚吸入麻醉显著影响神经干细胞向神经元分化, 与此次实验结果存在较大的差异, 还有待进一步研究。

综上所述, 新生大鼠海马齿状回神经干细胞经过异氟醚干预之后, 其增殖以及分化能力均受到影响。其中, 异氟醚会明显抑制神经干细胞的增殖能力, 但会促进神经干细胞向星形胶质细胞方向分化。

作者贡献: 实验设计、实施、评估以及资料收集为全部作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 侯冷晨, 林福清, 傅舒昆, 等. 异氟醚抑制 Notch-1通路诱导小鼠神经干细胞凋亡[J]. 中国临床医学, 2015, 22(2): 122-125.
- [2] 陈英圳, 王寿平, 王志, 等. 异氟醚麻醉对新生大鼠齿状回神经干细胞增殖及分化的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2012, 32(7): 839-842.
- [3] 卢成康. 异氟醚麻醉抑制海马齿状回神经干细胞的增殖及分化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(19): 3049-3053.
- [4] Stratmann G, Sall JW, May LD, et al. Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology*. 2009; 110(4): 834-848.
- [5] Fredriksson A, Pontén E, Gordh T, et al. Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology*. 2007; 107(3): 427-436.
- [6] 刘劲, 连庆泉, 林函, 等. 七氟醚和异氟醚急性暴露对神经干细胞增殖和发育调控基因的影响[C]. 第十二届华东六省一市麻醉学术会议暨2013年福建省麻醉学术会议论文集, 2013: 438-439.
- [7] 赵序利, 刘艳华, 罗剑刚, 等. 异氟醚通过激活Ryanodine受体对ReNcell CX人神经干细胞损伤和存活发挥双向调节作用[J]. 中国医药科学, 2012, 2(9): 11-13.
- [8] 赵序利, 刘艳华, 罗剑刚, 等. 异氟醚通过激活InsP3受体对ReNcell CX人神经干细胞损伤和存活的双向调节作用[J]. 中国医学创新, 2012, 9(12): 1-2.
- [9] 刘劲. 七氟醚和异氟醚对神经干细胞增殖和迁移的影响[D]. 温州: 温州医科大学, 2014.
- [10] 林函, 刘劲, 李纯, 等. 七氟醚和异氟醚对大鼠大脑皮质神经干细胞增殖的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(11): 1306-1309.

- [11] 赵序利.异氟醚通过细胞内钙离子稳态对神经干细胞存活、分化和增殖发挥双向调节作用[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2012.
- [12] 周小煦,宋文静,苏畅,等.异氟醚单凭吸入麻醉法用于糖尿病大鼠玻璃体注射的实验研究[J].眼科新进展,2014,34(8):710-712.
- [13] 张建芳,陈欣,王伟,等.异氟烷通过激活Calpain影响大鼠海马神经干细胞的增殖与分化[J].华中科技大学学报:医学版,2015,44(3):263-267.
- [14] Sall JW, Stratmann G, Leong J, et al. Propofol at clinically relevant concentrations increases neuronal differentiation but is not toxic to hippocampal neural precursor cells in vitro. *Anesthesiology*. 2012;117(5):1080-1090.
- [15] 郭玮,徐剑文.NeuroD对细胞分化的影响[J].福建医科大学学报,2008,42(2):191-194.
- [16] Zhu C, Gao J, Karlsson N, et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(5):1017-1030.
- [17] Culley DJ, Boyd JD, Palanisamy A, et al. Isoflurane decreases self-renewal capacity of rat cultured neural stem cells. *Anesthesiology*. 2011;115(4):754-763.
- [18] Sall JW, Stratmann G, Leong J, et al. Isoflurane inhibits growth but does not cause cell death in hippocampal neural precursor cells grown in culture. *Anesthesiology*. 2009;110(4):826-833.
- [19] 许伟,谢兴文,赵永利,等.Brdu 标记的 rBMSCs 在大鼠体内的迁移[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(4):409-414.
- [20] 罗时鹏,余资江,肖朝伦,等.小鼠缺血再灌注损伤后海马齿状回 Wnt1、Wnt3a的表达变化[J].中国老年学杂志,2013,33(11):2578-2581.
- [21] Zhu C, Gao J, Karlsson N, et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(5):1017-1030.
- [22] Eto H, Ishimine H, Kinoshita K, et al. Characterization of human adipose tissue-resident hematopoietic cell populations reveals a novel macrophage subpopulation with CD34 expression and mesenchymal multipotency. *Stem Cells Dev*. 2013;22(6):985-997.
- [23] 崔兆辉,董海涛,姜金,等.成年大鼠脊髓损伤后内源性神经前体细胞的增殖与分化规律的研究[J].世界科技研究与发展,2014,36(5):521-525.
- [24] 张红星,王琼,乐薇,等.头针对急性脑缺血再灌注大鼠 BrdU/nestin表达的实验研究[J].湖北中医药大学学报,2011,13(5):3-6.
- [25] Ravagnani F, Coluccia P, Notti P, et al. Peripheral blood stem cell collection in pediatric patients: feasibility of leukapheresis under anesthesia in uncompliant small children with solid tumors. *J Clin Apher*. 2006;21(2):85-91.
- [26] 张广慧,吴方荣,何明利,等.电刺激嗅球对脑缺血再灌注大鼠内源性神经干细胞增殖、迁移及分化的影响[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2014,21(6):414-418.
- [27] 刘慧华,燕铁斌,李胜活,等.功能性电刺激对急性脑梗死大鼠运动功能及室管膜下区的溴氧尿嘧啶核苷+/神经胶质纤维酸性蛋白+细胞表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2012,34(3):161-165.
- [28] 杜傲男,徐静,何燕,等.神经源性分化因子对小鼠放射性肠损伤的治疗作用[J].中华放射医学与防护杂志,2015,35(1):45-48.
- [29] 郭玮,刘晓艳,柯荔宁,等.RT-PCR法检测神经源性分化因子 mRNA在大鼠脑发育过程中的表达[J].解剖学报,2014,45(1):26-30.
- [30] 崔猛,冯世庆,范宁建,等.酪氨酸激酶2与酪氨酸激酶3对神经干细胞分化及Ngn2、NeuroD基因表达的调控[J].中华实验外科杂志,2013,30(4):670.
- [31] Li YW, Ma L, Sui B, et al. Etomidate with or without flumazenil anesthesia for stem cell transplantation in autistic children. *Drug Metabol Drug Interact*. 2014;29(1):47-51.
- [32] 李玉宇,徐剑文,郭玮,等.神经源性分化因子在新生大鼠短暂脑缺血中的表达[J].解剖学报,2011,42(5):610-613.
- [33] Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*. 2003;23(3):876-882.
- [34] Mine Y, Tatarishvili J, Oki K, et al. Grafted human neural stem cells enhance several steps of endogenous neurogenesis and improve behavioral recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurobiol Dis*. 2013;52:191-203.
- [35] Lucchinetti E, Zeisberger SM, Baruscotti I, et al. Stem cell-like human endothelial progenitors show enhanced colony-forming capacity after brief sevoflurane exposure: preconditioning of angiogenic cells by volatile anesthetics. *Anesth Analg*. 2009;109(4):1117-1126.
- [36] Lucchinetti E, Zeisberger SM, Baruscotti I, et al. Stem cell-like human endothelial progenitors show enhanced colony-forming capacity after brief sevoflurane exposure: preconditioning of angiogenic cells by volatile anesthetics. *Anesth Analg*. 2009;109(4):1117-1126.
- [37] 刘晓艳,徐剑文,王玮,等.短暂性缺氧后海马神经元神经源性分化因子表达增高[J].解剖学报,2011,42(1):27-31.
- [38] Sall JW, Stratmann G, Leong J, et al. Isoflurane inhibits growth but does not cause cell death in hippocampal neural precursor cells grown in culture. *Anesthesiology*. 2009;110(4):826-833.
- [39] Zhu C, Gao J, Karlsson N, et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(5):1017-1030.
- [40] Stratmann G, Sall JW, May LD, et al. Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology*. 2009;110(4):834-848.