

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.36.016 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

李肖云, 兰希发, 王玉琳, 刘晶. 粒细胞集落刺激因子与血管性痴呆大鼠海马凋亡相关蛋白[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(36):6741-6747.

粒细胞集落刺激因子与血管性痴呆大鼠海马凋亡相关蛋白

李肖云¹, 兰希发², 王玉琳², 刘晶²

文章亮点: 实验发现: ①粒细胞集落刺激因子可缩短血管性痴呆大鼠逃避潜伏期, 提高血管性痴呆大鼠的学习记忆能力。②粒细胞集落刺激因子可减少血管性痴呆大鼠海马神经元细胞凋亡。③粒细胞集落刺激因子可增强血管性痴呆大鼠海马抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 减少海马促凋亡蛋白 Bax 的表达。

关键词: 粒细胞集落刺激因子; 血管性痴呆; 海马; 神经细胞; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax; 认知; 神经退行性疾病; 神经再生

摘要

背景: 研究表明粒细胞集落刺激因子在保护神经元免受各种因素所致的神经元变性和死亡中发挥重要作用。

目的: 观察粒细胞集落刺激因子对血管性痴呆大鼠海马组织神经细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响。

方法: 采用永久性双侧颈总动脉结扎法建立 SD 大鼠血管性痴呆模型, 以未进行血管结扎的大鼠作为假手术组。造模成功后, 治疗组大鼠每日皮下注射粒细胞集落刺激因子 50 μg/kg, 假手术组和模型组注射等量的生理盐水。分别于造模后 7, 14, 28 d 取大鼠海马组织用于检测。

结果与结论: Morris 水迷宫结果显示, 模型组大鼠逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$), 而治疗组各时间点大鼠逃避潜伏期较模型组缩短 ($P < 0.01$); TUNEL 及免疫组织化学结果显示, 与模型组比较, 治疗组各时间点大鼠海马 TUNEL 及 Bax 阳性细胞吸光度值明显减小 ($P < 0.01$), Bcl-2 阳性细胞吸光度值明显增加 ($P < 0.01$)。说明粒细胞集落刺激因子可提高血管性痴呆大鼠海马 Bcl-2 蛋白的表达, 抑制 Bax 蛋白的表达, 减少神经细胞凋亡, 改善大鼠的学习记忆功能。

Effect of granulocyte colony-stimulating factor on the expression of hippocampal apoptosis-related protein in rats with vascular dementia

Li Xiao-yun¹, Lan Xi-fa², Wang Yu-lin², Liu Jing²

Abstract

BACKGROUND: Studies have demonstrated that granulocyte colony-stimulating factor plays an important role in protecting neurons from neuronal degeneration and death caused by a variety of factors.

OBJECTIVE: To investigate the effect of granulocyte colony-stimulating factor on hippocampal neuronal cell apoptosis and Bcl-2 and Bax protein expression in rats with vascular dementia.

METHODS: The permanent bilateral common carotid artery ligation method was used to establish the Sprague-Dawley rat vascular dementia models. Rats with no vascular ligation were included in the sham-operation group. Rats in the treatment group were subcutaneously injected with 50 μg/kg granulocyte colony-stimulating factor daily, rats in the sham-operation group and model group were injected with normal saline. At 7, 14 and 28 days after modeling, rat hippocampus was used for detection.

RESULTS AND CONCLUSION: Morris water maze results showed that the escape latency of the rats in the model group was significantly prolonged ($P < 0.01$), and the escape latency at different time points in the treatment group was shorter than that in the model group ($P < 0.01$). TUNEL and immunohistochemistry results showed that, compared with the control group, rat hippocampal TUNEL and Bax positive cell number in the treatment group were significantly reduced ($P < 0.01$), and the number of Bcl-2 positive cells was significantly increased ($P < 0.01$). Granulocyte colony-stimulating factor can up-regulate Bcl-2 protein expression in the hippocampus of vascular dementia rats, down-regulate Bax protein expression, reduce neuronal apoptosis and improve the learning and memory abilities of rats.

Li XY, Lan XF, Wang YL, Liu J. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on the expression of hippocampal apoptosis-related protein in rats with vascular dementia. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(36): 6741-6747.

¹ 秦皇岛市第三医院康复科, 河北省秦皇岛市 066000; ² 河北医科大学附属秦皇岛市第一医院神经内科, 河北省秦皇岛市 066000

李肖云, 女, 1970年生, 副主任医师, 主要从事脑血管病的康复研究。happyxiaoyunli@sohu.com

通讯作者: 兰希发, 博士, 主任医师, 教授, 河北医科大学附属秦皇岛市第一医院神经内科, 河北省秦皇岛市 066000 lanxifa2000@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)36-06741-07

收稿日期: 2012-07-19
修回日期: 2012-08-10 (20120608003/
WLM · C)

¹Department of Rehabilitation, the Third Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, Hebei Province, China; ²Department of Neurology, First Hospital of Qinhuangdao, Hebei Medical University, Qinhuangdao 066000, Hebei Province, China

Li Xiao-yun, Associate chief physician, Department of Rehabilitation, the Third Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, Hebei Province, China happyxiaoyunli@sohu.com

Corresponding author: Lan Xi-fa, Doctor, Chief physician, Professor, Department of Neurology, the First Hospital of Qinhuangdao, Hebei Medical University, Qinhuangdao 066000, Hebei Province, China lanxifa2000@126.com

Received: 2012-07-19
Accepted: 2012-08-10

0 引言

血管性痴呆是最常见的老年性痴呆之一, 主要是由脑血管因素引起的脑组织血液循环障碍, 脑部功能减退而致的一种认知功能缺损综合征。近年研究表明神经细胞凋亡是血管性痴呆重要的病理环节之一。粒细胞集落刺激因子是一种干细胞动员剂, 在保护神经元免受各种因素所致的变性和死亡中发挥重要作用^[1-2]。实验通过Morris水迷宫实验观察血管性痴呆大鼠学习记忆能力的改变, 免疫组织化学染色检测血管性痴呆大鼠海马神经细胞凋亡及Bcl-2、Bax蛋白表达的变化, 探讨粒细胞集落刺激因子对血管性痴呆大鼠的保护作用及相关机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009-09/2010-01在中国医科大学实验动物中心完成。

材料:

实验动物: 健康清洁级24月龄老年雄性SD大鼠54只, 体质量300-400 g, 由中国医科大学实验动物中心提供。Morris水迷宫实验筛选证实实验用大鼠学习记忆良好。

粒细胞集落刺激因子与血管性痴呆大鼠海马凋亡相关蛋白实验所用试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
Tunel 凋亡检测试剂盒, Bcl-2、Bax 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Morris 水迷宫	中国医科大学提供
粒细胞集落刺激因子	协和发酵麒麟株式会社
光学显微镜	日本 Olympus 公司
Motic Images Advanced 3.0 系统	厦门麦克奥迪实业集团有限公司

实验方法:

实验分组与模型制备: 将54只大鼠随机分为假手术组、模型组和治疗组, 每组18只。参照Ohta等^[3]方法永久性结扎大鼠双侧颈总动脉制作血管性痴呆动物模型。模型组和治疗组大鼠麻醉后取颈正中切口, 分离结扎双侧颈总动脉; 假手术组仅分离血管, 不结扎。造模后采用

Morris水迷宫定向航行实验评估大鼠的认知功能^[4], 观察大鼠平均逃避潜伏期。以假手术大鼠逃避潜伏期的均值为参考值, 计算模型大鼠平均逃避潜伏期与参考值之差占该大鼠平均逃避潜伏期的比值, 大于20%作为模型成功的标准^[5]。

粒细胞集落刺激因子的干预: 血管性痴呆模型制作成功后, 将粒细胞集落刺激因子用生理盐水稀释至20 mg/L, 治疗组每日皮下注射粒细胞集落刺激因子50 μg/kg, 假手术组和模型组注射等量的生理盐水。

Morris水迷宫检测大鼠的学习记忆能力: 实验前将大鼠置于站台上适应10 s, 随后将大鼠随机从不同象限面壁置入池内, 大鼠登上站台5 s后终止记录, 最长记录时间为120 s, 若大鼠在120 s内不能上台, 引导其登上站台适应10 s, 最后将大鼠擦干放入鼠笼。如此将大鼠置入游泳池, 4次/d, 每次间隔1 h, 测量平台逃避潜伏期。

大鼠海马组织标本的制备: 分别于造模后7, 14, 28 d行为检测完后, 各组随机取6只大鼠, 用体积分数10%水合氯醛(4 μL/g)腹腔麻醉动物, 先后用肝素化生理盐水及40 g/L多聚甲醛心内灌注, 迅速断头取脑, 取含海马结构的脑组织, 固定于中性甲醛中, 置4 °C冰箱过夜, 脱水、透明、常规石蜡包埋, 冠状连续切片, 片厚4 μm, 海马组织每5张取1张进行TUNEL染色及免疫化学染色。

TUNEL染色检测大鼠海马组织细胞凋亡: 石蜡切片常规脱蜡至水。放入新鲜配制的体积分数3%的H₂O₂中室温处理10 min, 蒸馏水洗2 min×3次。标本加入Tris缓冲液稀释的蛋白酶K(1:200)中37 °C消化5 min, Tris缓冲液洗2 min×3次。甩去切片上多余液体后, 加入TUNEL反应混合液50 μL/片(其中酶溶液5 μL、标记溶液45 μL), 置于湿盒中, 37 °C避光标记1 h。Tris缓冲液洗2 min×3次。周围擦干, 加入Convert-POD溶液50 μL/片, 置于湿盒中, 室温反应30 min。Tris缓冲液洗2 min×3次。滴加50-100 μL DAB反应液, 15-25 °C显色约10 min, 镜下控制反应时间, 流水终止。苏木精轻度复染, Tris缓冲液洗, 蒸馏水洗, 脱水、透明、封固。

免疫组织化学染色: 染色步骤按试剂盒说明

书进行, 光学显微镜下阳性细胞表现为细胞核或细胞浆呈棕色或棕褐色着色。步骤如下: 取各组梗死中心区切片(前凶前后各1 mm), 40 g/L多聚甲醛室温固定30 min。PBS洗涤5 min×3次。体积分数0.3% H_2O_2 -甲醇溶液室温孵育20 min, 以消除内源性过氧化物酶活性。PBS洗涤5 min×3次。体积分数0.1%Triton X-100室温作用20 min。PBS洗涤5 min×3次。加封闭血清室温下封闭30 min。吸去多余液体后, 分别滴加Bcl-2、Bax单克隆抗体4 °C过夜。PBS洗涤5 min×3次。滴加生物素标记羊抗兔IgG(1:100), 室温孵育60 min。PBS洗涤5 min×3次。DAB显色, 苏木精轻度复染。

图像分析: 用Motic Images Advanced 3.0系统对大鼠海马区吸光度进行分析。所有测量在相同光学条件下进行。

主要观察指标: 各组大鼠的平均逃避潜伏期; 大鼠海马TUNEL阳性细胞及Bcl-2, Bax蛋白的表达。

统计学分析: 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析, 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入54只大鼠, 均进入结果分析。

2.2 粒细胞集落刺激因子对血管性痴呆大鼠行为学的影响

影响 Morris水迷宫结果显示, 与假手术组比较, 模型组和治疗组各时间点大鼠逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$), 以模型组大鼠逃避潜伏期延长更为显著; 与模型组比较, 治疗组各时间点大鼠逃避潜伏期明显缩短($P < 0.01$), 见表1。

Group	Time after model establishment (d)		
	7	14	28
Sham-operation	17.02±1.32	16.83±1.46	15.67±1.57
Model	67.72±5.43 ^a	86.31±7.52 ^a	114.67±10.35 ^a
Treatment	43.67±4.39 ^{ab}	35.24±3.65 ^{ab}	28.2±2.61 ^{ab}

^a $P < 0.01$, vs. sham-operation group; ^b $P < 0.01$, vs. model group

2.3 粒细胞集落刺激因子干预后血管性痴呆大鼠海马组织神经细胞凋亡情况 TUNEL染色见血管性痴呆模型大鼠缺血周边区有TUNEL免疫阳性凋亡细胞的存在, 见图1。凋亡细胞表现为细胞核呈棕色或棕褐色着色, 细胞核形态呈碎点状, 不规则, 大小不一致。图像分析结果表明, 与假手术组比较, 模型组和治疗组各时间点大鼠海马组织TUNEL阳性细胞吸光度值明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较, 治疗组各时间点大鼠海马组织TUNEL阳性细胞吸光度值明显减少($P < 0.01$), 见表2。

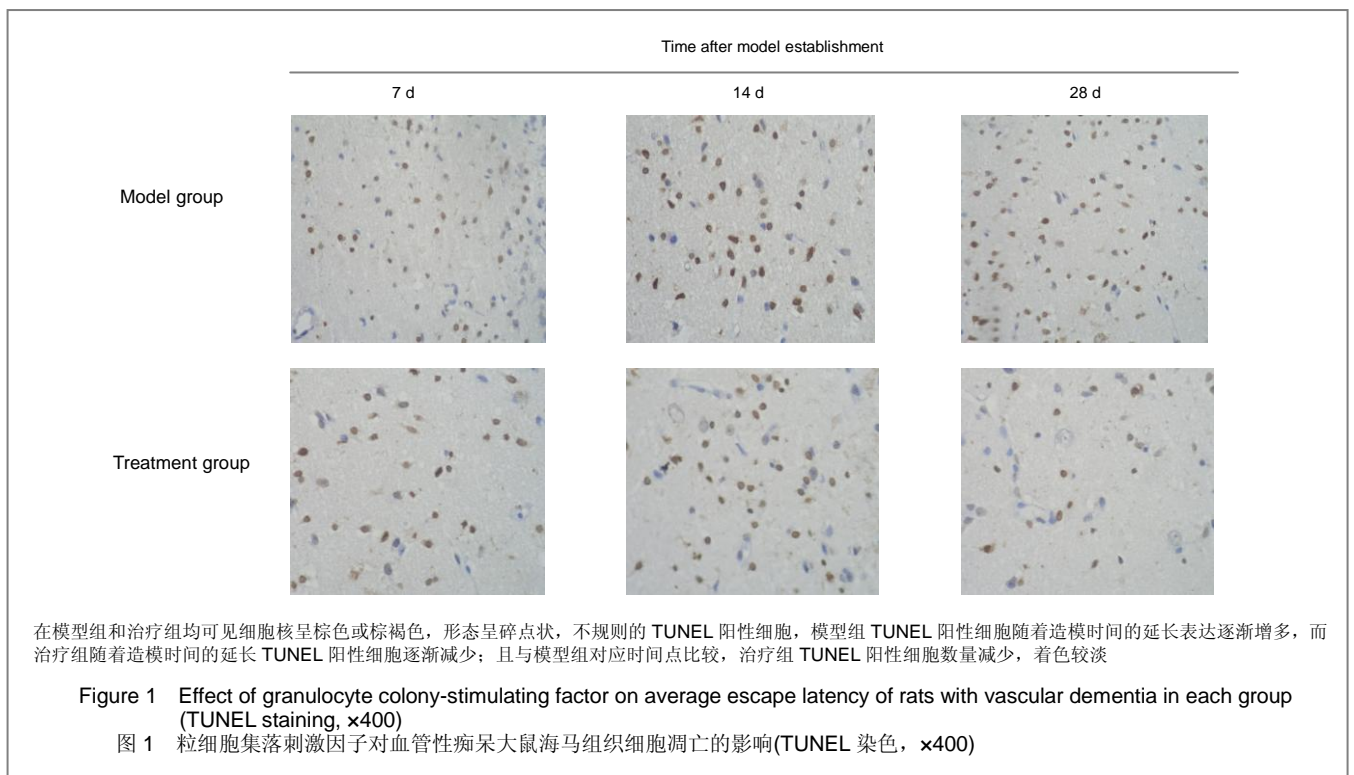


表2 粒细胞集落刺激因子干预后血管性痴呆大鼠海马组织TUNEL阳性细胞吸光度值的改变
Table 2 Absorbance value of TUNEL positive cells in the rats hippocampus after induced by granulocyte colony-stimulating factor ($\bar{x}\pm s, n=6, A$)

Group	Time after model establishment (d)		
	7	14	28
Sham-operation	43.82±3.40	36.53±5.23	38.24±4.07
Model	194.61±10.96 ^a	259.32±18.12 ^a	267.15±12.57 ^a
Treatment	135.67±7.59 ^{ab}	94.83±5.75 ^{ab}	53.00±4.63 ^{ab}

^a $P < 0.01$, vs. sham-operation group; ^b $P < 0.01$, vs. model group

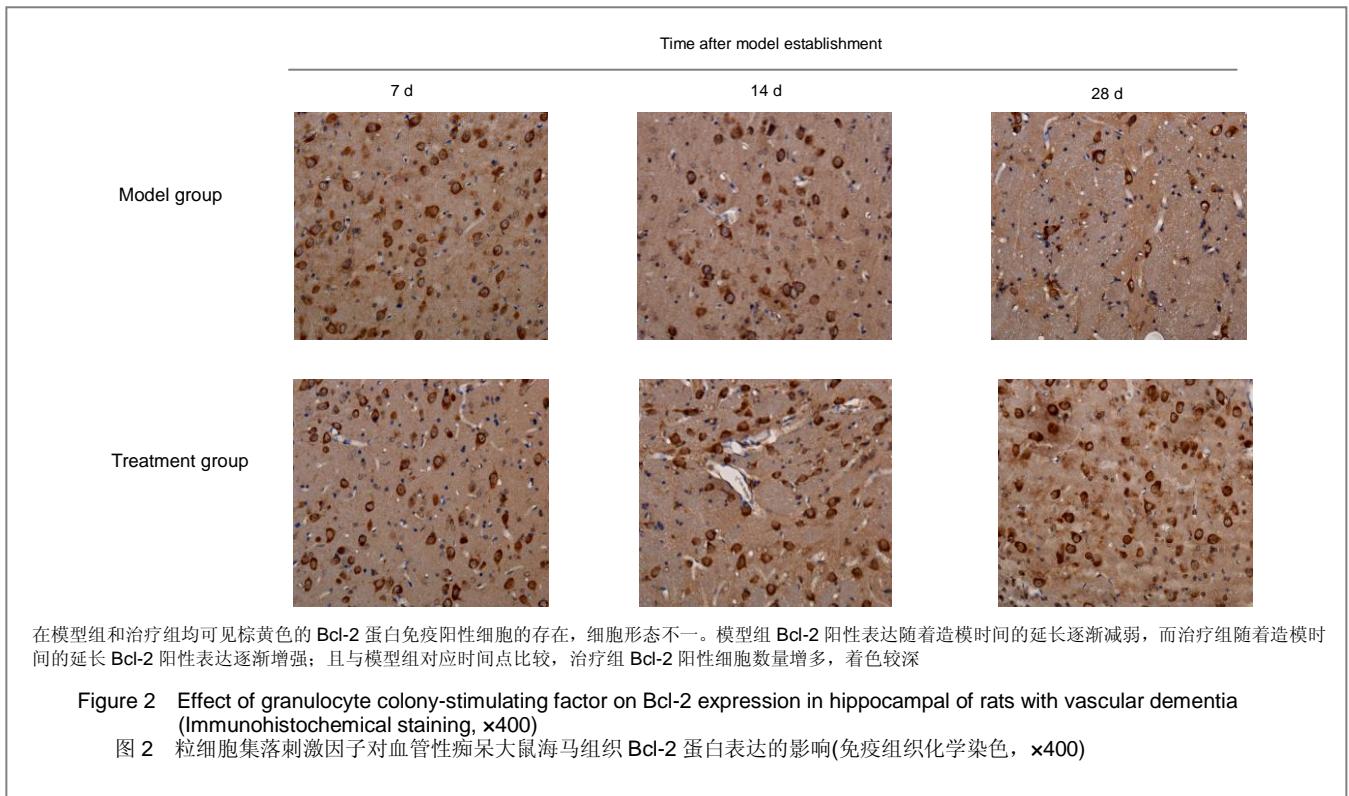
2.4 粒细胞集落刺激因子对血管性痴呆大鼠海马组织Bcl-2表达的影响 免疫组织化学染色结果显示, 各组大鼠海马区均有棕黄色的Bcl-2蛋白免疫阳性细胞的存在, 细胞形态不一, 见图2。统计结果显示, 与假

手术组比较, 模型组对应时间点海马组织Bcl-2蛋白表达明显减少($P < 0.01$); 与模型组比较, 治疗组对应时间点海马组织Bcl-2蛋白表达明显增高($P < 0.01$), 见表3。

表3 粒细胞集落刺激因子干预后血管性痴呆大鼠海马组织Bcl-2阳性细胞吸光度值的改变
Table 3 Absorbance value of Bcl-2 positive cells in the rats hippocampus after induced by granulocyte colony-stimulating factor ($\bar{x}\pm s, n=6, A$)

Group	Time after model establishment (d)		
	7	14	28
Sham-operation	79.22±4.25	76.67±5.56	84.34±5.11
Model	68.71±4.35 ^a	52.04±4.24 ^a	36.04±5.20 ^a
Treatment	88.87±5.17 ^{ab}	109.52±10.57 ^{ab}	162.47±11.09 ^{ab}

^a $P < 0.01$, vs. sham-operation group; ^b $P < 0.01$, vs. model group

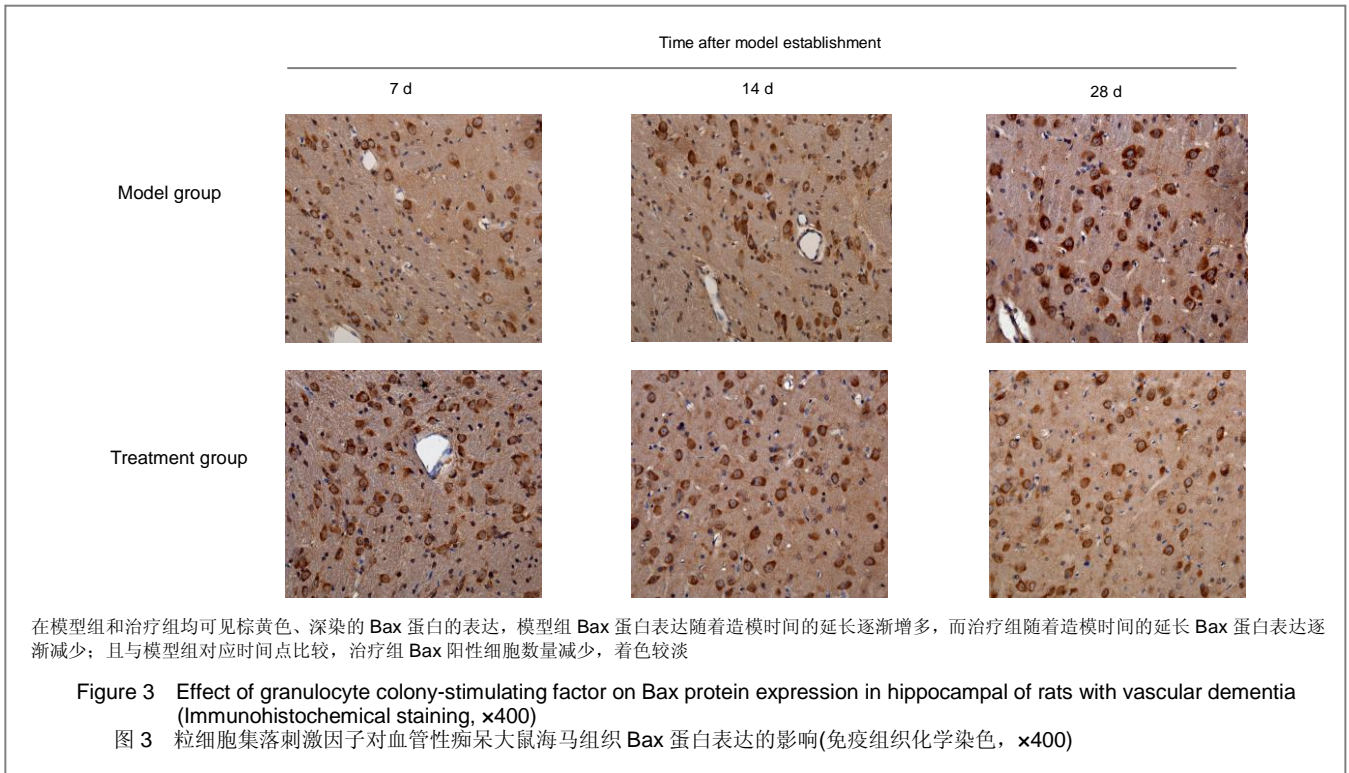


2.5 粒细胞集落刺激因子对血管性痴呆大鼠海马组织Bax表达的影响 免疫组织化学染色结果显示, 各组大鼠海马区均有棕黄色的Bax蛋白免疫阳性细胞的存在, 其中模型组Bax阳性表达最强烈, 染色最深, 见图3。统计结果显示, 与假手术组比较, 模型组对应时间点海马组织Bax蛋白表达明显增多, 且随造模时间的延长增多更明显($P < 0.01$); 与模型组比较, 治疗组对应时间点海马组织Bax蛋白表达明显减少($P < 0.01$), 见表4。

表4 粒细胞集落刺激因子干预后血管性痴呆大鼠海马组织Bax阳性细胞吸光度值的改变
Table 4 Absorbance value of Bax positive cells in the rats hippocampus after induced by granulocyte colony-stimulating factor ($\bar{x}\pm s, n=6, A$)

Group	Time after model establishment (d)		
	7	14	28
Sham-operation	70.65±4.29	75.09±5.12	81.34±5.54
Model	97.68±3.33 ^a	119.16±2.47 ^a	156.07±12.04 ^a
Treatment	83.03±6.87 ^{ab}	66.93±5.50 ^{ab}	44.23±3.76 ^{ab}

^a $P < 0.01$, vs. sham-operation group; ^b $P < 0.01$, vs. model group



3 讨论

血管性痴呆是痴呆的主要临床类型, 随着人口老龄化、生活习惯和饮食结构的变化, 卒中的发病率逐渐增加, 血管性痴呆的发生有上升的趋势, 越来越受到人们的关注, 不仅影响患者的生活质量, 也给家庭、社会和国家带来了沉重的负担, 已成为严重影响人类健康和生活的社会公共卫生问题。建立可靠的动物模型是研究血管性痴呆发生机制、防治措施和疗效评价的关键。范文辉等^[5]证实持久性双侧颈总动脉结扎可造成稳定的脑缺血模型, 更接近血管性痴呆的脑组织病理生理演变过程。实验采用持久性双侧颈总动脉结扎的方法建立血管性痴呆大鼠模型, 造模 7 d 后, Morris 水迷宫发现大鼠逃避潜伏期均较假手术组明显延长, 出现了明显的空间定位、识别能力下降, 学习记忆功能障碍, 且随着造模时间的延长, 大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期延长, 说明实验建立的血管性痴呆的动物模型是成功的。

血管性痴呆的发生是复杂的, 并由多因素造成, 神经细胞凋亡被认为是缺血性脑损伤级联反应的重要病理环节之一, 与血管性痴呆关系密切, 是血管性痴呆的基本病理损害。脑缺血后神经细胞凋亡发生的机制目前尚不完全清楚, 可能与氧自由基产生, 损伤膜线粒体和 DNA, 继而引起 Caspase 介导的细胞凋亡有关。海马组织

是参与学习和记忆功能的重要部位, 其神经细胞内 Ca^{2+} 、钙调蛋白和钙调素依赖蛋白激酶 II 与学习、记忆有确切关系。海马组织的缺血性损伤及其引起的神经细胞的凋亡势必会造成学习、记忆能力下降, 乃至痴呆^[6-9], 如何减轻海马区脑组织损伤, 减少神经细胞凋亡, 降低血管性痴呆的发生是值得探讨的重要课题。

粒细胞集落刺激因子是一种干细胞动员剂, 具有较强的动员骨髓干细胞的能力。研究发现在中枢神经系统一些脑区的神经元中表达粒细胞集落刺激因子及其受体, 且在实验性卒中时表达上调。在神经元中, 粒细胞集落刺激因子通过激活多个保护途径发挥抗凋亡作用^[10-12]。可同时动员造血干细胞和间充质干细胞向缺血性脑梗死动物模型的梗死部位迁移, 促进干细胞向神经细胞分化, 形成新的神经突触, 以修复梗死的脑组织^[13-15]。可激活脑内成体神经干细胞, 刺激其增殖和分化^[16], 还能促进脑内多种神经营养因子的分泌^[17-20], 减小脑缺血动物模型的缺血性损害, 促进慢性缺血模型神经功能的长期恢复^[21-26]。实验发现, 模型组大鼠脑缺血后 7 d 平均逃避潜伏期即比假手术组明显延长, 有了明显的学习记忆功能障碍, 海马组织 TUNEL 阳性凋亡细胞比假手术组显著增高, 随着缺血时间的延长, 14, 28 d 时大鼠的学习记忆功能障碍逐渐加重, 相应的海马组织 TUNEL 阳性凋亡细胞逐渐增加, 提示脑组织的慢性缺血诱发了海马组织神经细胞的凋亡, 引起大鼠发生了血管性痴呆。模型组和治疗组

造模后7, 14, 28 d时大鼠平均逃避潜伏期均比假手术组明显延长, 海马组织TUNEL阳性凋亡细胞也比假手术组显著增高, 说明了缺血性损害的存在。但和模型组比较, 治疗组各时间点大鼠平均逃避潜伏期比明显缩短, 海马组织TUNEL阳性凋亡细胞也显著减少。说明脑缺血后早期给予外源性粒细胞集落刺激因子有助于减少海马组织神经细胞的凋亡, 改善大鼠的学习记忆能力, 减轻血管性痴呆的严重程度。

研究证实**bcl-2**是具有抗凋亡作用基因之一, 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^[27]。已知**Bax**是**Bcl-2**的同性蛋白, 二者之间的比例决定了细胞的命运是生存还是凋亡。当**Bax**高表达时, 则其形成同源二聚体, 使细胞趋于凋亡; 当**Bcl-2**在细胞内表达很高时, 则**Bax**与**Bcl-2**形成异源二聚体**Bax-Bcl-2**, 后者对细胞凋亡则起抑制作用, **Bcl-2**能否阻止细胞凋亡取决于**Bax-Bcl-2**异源二聚体的数量。实验结果显示粒细胞集落刺激因子的应用能明显增加缺血海马区**Bcl-2**蛋白的表达, 脑缺血7, 14, 28 d海马区**Bcl-2**蛋白免疫阳性细胞吸光度值均明显高于模型组; 同时粒细胞集落刺激因子的应用能明显减少**Bax**蛋白的表达, 脑缺血7, 14, 28 d海马区**Bax**蛋白免疫阳性细胞数均明显低于模型组; 相应地海马区神经细胞的凋亡明显减少, 说明粒细胞集落刺激因子可以调节凋亡蛋白**Bcl-2**和**Bax**的表达, 促进**Bax-Bcl-2**异源二聚体的形成, 发挥了抗凋亡作用。因此粒细胞集落刺激因子改善血管性痴呆后大鼠的认知功能缺损与增加缺血海马区**Bcl-2**蛋白的表达, 减少**Bax**蛋白的表达, 从而减少缺血脑组织细胞凋亡有关^[28-29]。

综上所述, 血管性痴呆大鼠早期应用粒细胞集落刺激因子干预治疗, 对血管性痴呆海马脑组织的缺血性损伤有保护性作用^[30]。其可通过调控凋亡基因的表达, 抑制海马神经细胞凋亡, 促进大鼠学习、记忆等认知功能障碍的恢复, 其保护作用的其他机制尚待进一步的研究。

4 参考文献

- [1] Pan C, Gupta A, Prentice H, et al. Protection of taurine and granulocyte colony-stimulating factor against excitotoxicity induced by glutamate in primary cortical neurons. *Biomed Sci.* 2010;17 Suppl 1:S18.
- [2] Yung MC, Hsu CC, Kang CY, et al. A potential for granulocyte-colony stimulating factor for use as a prophylactic agent for heatstroke in rats. *Eur J Pharmacol.* 2011;661(1-3):109-117.
- [3] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res.* 1994;653(1-2):231-236.
- [4] Zhao XZ, Wang W, Kang ZH, et al. Xiandai Kangfu. 2001;6(5):54-55.
赵小贞, 王玮, 康仲涵, 等. 血管性痴呆大鼠学习记忆障碍与海马突触界面结构参数改变的相关性研究[J]. 现代康复, 2001, 6(5):54-55.
- [5] Fan WH, Liu ZR, Li LS. Disan Junyi Daxue Xuebao. 2000;22(4):314-317.
范文辉, 刘之荣, 李露斯. 血管性痴呆的动物模型及其胆碱能机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(4):314-317.
- [6] Kim SH, Kang HS, Kim HJ, et al. The effect of ischemic cholinergic damage on cognition in patients with subcortical vascular cognitive impairment. *Geriatr Psychiatry Neurol.* 2012;25(2):122-127.
- [7] Liu R, Yuan H, Yuan F, et al. Neuroprotection targeting ischemic penumbra and beyond for the treatment of ischemic stroke. *Neurol Res.* 2012;34(4):331-337.
- [8] Dolek N, Saylisoy S, Ozbabalik D, et al. Comparison of hippocampal volume measured using magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease, vascular dementia, mild cognitive impairment and pseudodementia. *Int Med Res.* 2012;40(2):717-725.
- [9] Li W, Zhou Y, Zhao N, et al. Pharmacokinetic behavior and efficiency of acetylcholinesterase inhibition in rat brain after intranasal administration of galanthamine hydrobromide loaded flexible liposomes. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012;34(2):272-279.
- [10] Choi JK, Kim KH, Park H, et al. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor shows anti-apoptotic activity in neural progenitor cells via JAK/STAT5-Bcl-2 pathway. *Apoptosis.* 2011;16(2):127-134.
- [11] Solaroglu I, Tsubokawa T, Cahill J, et al. Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience.* 2006;143(4):965-974.
- [12] Kong T, Choi JK, Park H, et al. Reduction in programmed cell death and improvement in functional outcome of transient focal cerebral ischemia after administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rats. Laboratory investigation. *Neurosurg.* 2009;111(1):155-163.
- [13] Schäbitz WR, Kollmar R, Schwanager M, et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2003;34(3):745-751.
- [14] Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, et al. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation.* 2004;110(13):1847-1854.
- [15] Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, et al. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation.* 2006;113(5):701-710.
- [16] Buschmann IR, Hossmann KA. Letter regarding article by Shyu et al. "functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells". *Circulation.* 2005;111(19):e297-298.

- [17] Tzaan WC, Chen HC. Investigating the possibility of intervertebral disc regeneration induced by granulocyte colony stimulating factor-stimulated stem cells in rats. *Adv Orthop*. 2011;2011:602089.
- [18] Sahota P, Savitz SI. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. *Neurotherapeutics*. 2011;8(3):434-451.
- [19] Diederich K, Quennet V, Bauer H, et al. Successful regeneration after experimental stroke by granulocyte-colony stimulating factor is not further enhanced by constraint-induced movement therapy either in concurrent or in sequential combination therapy. *Stroke*. 2012;43(1):185-192.
- [20] Ohmori Y, Morioka M, Kaku Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the angiogenetic effect of indirect bypass surgery for chronic cerebral hypoperfusion in a rat model. *Neurosurgery*. 2011;68(5):1372-1379.
- [21] Lan X, Qu H, Yao W, et al. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits neuronal apoptosis in a rat model of diabetic cerebral ischemia. *Tohoku J Exp Med*. 2008;216(2):117-126.
- [22] Khara S, Tiwari A, Srinivasan R, et al. Expression of granulocyte colony stimulating factor and its receptor by retinal pigment epithelial cells: a role in maintaining differentiation-competent state. *Curr Eye Res*. 2011;36(5):469-480.
- [23] Li ZX, Li QY, Qiao J, et al. Granulocyte-colony stimulating factor is involved in low-dose LPS-induced neuroprotection. *Neurosci Lett*. 2009;465(2):128-132.
- [24] Diederich K, Schäbitz WR, Kuhnert K, et al. Synergetic effects of granulocyte-colony stimulating factor and cognitive training on spatial learning and survival of newborn hippocampal neurons. *PLoS One*. 2009;4(4):e5303.
- [25] Yu SC, Kuo CL, Huang CS, et al. Endogenous granulocyte colony-stimulating factor: a biomarker in acute ischemic stroke. *Biomarkers*. 2012;17(4):319-324.
- [26] England TJ, Abaei M, Auer DP, et al. Granulocyte-colony stimulating factor for mobilizing bone marrow stem cells in subacute stroke: the stem cell trial of recovery enhancement after stroke 2 randomized controlled trial. *Stroke*. 2012;43(2):405-411.
- [27] He ZY, Zhao J, Zou QZ, et al. *Zhonghua Shenjingke Zazhi*. 2005;38(4):269-270.
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.
- [28] Yamashita T, Deguchi K, Sehara Y, et al. Therapeutic strategy for ischemic stroke. *Neurochem Res*. 2009;34(4):707-710.
- [29] Bordet R, Ouk T, Onténiente B, et al. Cerebral ischaemia: tomorrow's therapeutic tracks. *Med Sci (Paris)*. 2009;25(10):847-854.
- [30] Li XY, Lan XF. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(27):5044-5047.
李肖云, 兰希发. 粒细胞集落刺激因子对血管性痴呆大鼠海马神经细胞凋亡的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(27):5044-5047.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 兰希发进行实验设计, 实验实施为王玉琳, 实验评估为刘晶, 资料收集为李肖云, 李肖云成文, 兰希发审校, 李肖云对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 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。

文章概要: 观察粒细胞集落刺激因子治疗对血管性痴呆大鼠认知功能的影响, 并从分子生物学角度探讨其对认知功能影响的发生机制。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。