

# 细胞质膜微囊蛋白1敲除小鼠神经干细胞培养与生物学特性

刘柏炎<sup>1,2</sup>, 俞悦<sup>1</sup>, 易健<sup>1</sup>, 陈雪梅<sup>1</sup>, 蔡光先<sup>1</sup>(<sup>1</sup>湖南中医药大学, 湖南省长沙市 410007; <sup>2</sup>益阳医学高等专科学校, 湖南省益阳市 413000)

## 文章亮点:

- 1 细胞质膜微囊及其结构蛋白微囊蛋白在肿瘤和内皮细胞中有许多报道,但在神经干细胞研究报道不多。
- 2 实验在体外从两种小鼠胚胎脑中成功获得了神经干细胞,且来源于细胞质膜微囊蛋白1敲除胎鼠的神经干细胞及其分化细胞均呈细胞质膜微囊蛋白1阴性,结果显示可从细胞质膜微囊蛋白1敲除鼠内获取细胞质膜微囊蛋白1缺失神经干细胞;并发现细胞质膜微囊蛋白1缺失可促进神经球的形成速度和数量。说明细胞质膜微囊蛋白1可促进神经干细胞的增殖,并抑制其分化。

## 关键词:

干细胞; 培养; 神经干细胞; 细胞质膜微囊蛋白1; 生物学特性; C57BL/6 胎鼠; 国家自然科学基金

## 主题词:

干细胞; 神经干细胞; 细胞质膜微囊蛋白

## 基金资助:

国家自然科学基金(30873355, 81273989), 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2010CB530400), 2012年度湖南省高校创新平台开放基金项目(12K089)

## 摘要

**背景:** 研究发现细胞质膜微囊蛋白1在哺乳动物脑内表达,参与脑的正常发育,能影响脑内神经干细胞的增殖。

**目的:** 从细胞质膜微囊蛋白1敲除小鼠脑内获取神经干细胞并观察其生物学特性。

**方法:** 分别取 E14-E16 正常 C57BL/6 胚胎小鼠和细胞质膜微囊蛋白1敲除 C57BL/6 胚胎小鼠全脑,采用酶消化法获得单细胞悬液,置神经干细胞条件培养基中培养,原代培养 7 d 后,加入含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基诱导 7 d。

**结果与结论:** 从两种胎鼠脑内获取的细胞悬液培养 1 d 后较多细胞发生死亡,可见单个细胞漂浮于培养基中,透光度较好,3 d 后逐渐形成悬浮生长的多细胞团。传代后培养板底部可见少量细胞发生贴壁,7 d 后可见大量细胞团出现,且细胞质膜微囊蛋白1敲除胎鼠源细胞增殖速度更明显。免疫细胞化学检测显示,两种胎鼠来源细胞团均为巢蛋白阳性,分化细胞可见神经丝蛋白 200、胶质纤维酸性蛋白或 O4 阳性表达;正常 C57BL/6 胎鼠来源细胞团呈细胞质膜微囊蛋白1阳性表达,而细胞质膜微囊蛋白1敲除 C57BL/6 胎鼠来源细胞团呈细胞质膜微囊蛋白1表达阴性,且神经干细胞成球速度和成球数量优于正常胎鼠神经干细胞。说明实验成功从细胞质膜微囊蛋白1敲除胎鼠脑内培养出细胞质膜微囊蛋白1缺失神经干细胞,细胞质膜微囊蛋白1可促进神经干细胞的增殖,并抑制其分化。

刘柏炎, 俞悦, 易健, 陈雪梅, 蔡光先. 细胞质膜微囊蛋白1敲除小鼠神经干细胞培养与生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(23):3739-3744.

## Culture and biological characteristics of neural stem cells from caveolin-1 knockout embryonic mice

Liu Bai-yan<sup>1,2</sup>, Yu Yue<sup>1</sup>, Yi Jian<sup>1</sup>, Chen Xue-mei<sup>1</sup>, Cai Guang-xian<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China; <sup>2</sup>Yiyang Medical College, Yiyang 413000, Hunan Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Caveolin-1 is expressed in mammalian brain and involved in the normal development of the brain, which can affect the proliferation of neural stem cells in the brain.

**OBJECTIVE:** To acquire neural stem cells from caveolin-1 knockout embryonic mice *in vitro* and study their biological characteristics.

**METHODS:** The whole brain was separated from C57BL/6 mice and caveolin-1 knockout C57BL/6 mice respectively at encyesis 14-16 days. Single cell suspension was obtained by enzyme digestion, and cultured in the conditioned medium of neural stem cells. Following 7 days of primary culture, the cells were induced in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's nutrient mixture F-12 containing 10% fetal bovine serum for 7 days.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The major cells of the cell suspensions from the fetal mouse brain were dead at 1 day after culture, and some single cells floated in the medium and their transmittance were better, and then they gradually formed multicellular balls after 3 days. A small amount of cells were adhered at the bottom of culture

刘柏炎, 男, 1970年生, 湖南省隆回县人, 汉族; 2002年中南大学毕业; 博士, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合防治脑血管疾病及神经干细胞研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.23.022  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2  
文献标识码:B  
文章编号:2095-4344  
(2014)23-03739-06  
稿件接受:2014-03-07

Liu Bai-yan, M.D., Professor, Doctoral supervisor, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China; Yiyang Medical College, Yiyang 413000, Hunan Province, China

Accepted: 2014-03-07

plate after passage, and a great amount of cell balls appeared after 7 days. The proliferation rate of neural stem cells from caveolin-1 knockout mice was higher than that from normal mice. The cell balls were nestin-positive and their differentiated cells was positive for neurofilament 200, glial fibrillary acidic protein or O4, respectively. All of the cells from normal mouse brain were positive for caveolin-1, but the cells from caveolin-1 knockout mice were negative for caveolin-1 by immunocytochemistry. Moreover, the speed of cell ball formation and the number of cell balls in neural stem cells from caveolin-1 knockout mice were better than those from normal mice. Caveolin-1 negative neural stem cells were cultured successfully from caveolin-1 knockout mouse brain, and the results show that caveolin-1 can promote the proliferation of neural stem cells and inhibit their differentiation *in vitro*.

**Subject headings:** stem cells; neural stem cells; caveolins

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No.30873355, 81273989; the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No.2010CB530400; the Open Innovation Platform Project for Universities in Hunan Province, No.12K089

Liu BY, Yu Y, Yi J, Chen XM, Cai GX. Culture and biological characteristics of neural stem cells from caveolin-1 knockout embryonic mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(23):3739-3744.

## 0 引言 Introduction

随着老龄社会到来, 神经损伤和退行性疾病发病率不断增加, 据新近统计, 中国国民死亡原因之首为脑血管病, 高达22.45%<sup>[1]</sup>, 而由此造成的认知、运动功能减退给社会、家庭带来了严重的负担。

传统观点认为, 成年哺乳动物大脑是终末器官, 一旦受到损伤就无法修复。但自20世纪90年起大量实验发现, 成体脑内多个部位如前脑、皮质、海马存在神经干细胞, 一类具有自我增殖和多向分化能力的细胞群, 主要以沉默静止的状态分布于海马颗粒层和侧脑室旁区, 并受细胞内外因素的调控<sup>[2-3]</sup>。神经生长因子如表皮生长因子、脑源性生长因子等参与了神经干细胞增殖、分化的全过程。碱性成纤维生长因子作为神经干细胞的主要有丝分裂因子, 通常与表皮生长因子联用, 在体外维持细胞的生长于增殖<sup>[4]</sup>。

脑缺血后由于血流的中断、能量匮乏导致细胞缺氧、坏死, 氧自由基大量蓄积, 钙超载, 释放白细胞介素、肿瘤坏死因子而引起炎症级联反应, 另一方面, 机体内在保护机制可调节脑源性神经营养因子等水平。这些病理生理变化改变了神经干细胞所处的微环境, 进而影响其生物学特性。

传统观念认为炎症等细胞因子由胶质细胞分泌, 诱导免疫细胞吸附至组织损伤部位以减轻损伤。近来研究发现其中枢神经系统中有着广泛的非免疫作用, 包括调节神经干细胞的增殖、移行、分化与突触形成<sup>[5-6]</sup>。如肿瘤坏死因子是一种重要的前炎症因子, 在脑缺血损伤后表达明显增高, 升高的肿瘤坏死因子抑制海马神经前体细胞的向神经元分化, 促进向胶质细胞分化<sup>[7-8]</sup>; 脑源性神经营养因子与表皮生长因子合用能显著提高神经干细胞的增殖与移行, 促进神经干细胞元血管迁移至缺血损伤部位<sup>[9-10]</sup>, 激发的神经干细胞增殖并移行至损伤区分化为成熟神经元<sup>[11-12]</sup>, 脑缺血后2 d啮齿动物室旁区分裂细胞达24%, 7 d达高峰期, 14 d分裂水平与缺血后2 d相近<sup>[13]</sup>, 这种现象不仅在成体动物脑内, 在老年大鼠也得到证实, 也存在与人类缺血损伤的脑中<sup>[14]</sup>。这些研究为中枢神经系统再生和功能重建提供了新的可能途径, 但除移行至海马的neuroblasts存活外, 其他部位的神经没有存活, 且有

内源性神经干细胞分化的神经元不及死亡细胞的0.2%<sup>[15-16]</sup>。因此, 如何调控神经干细胞的增殖分化及新生神经细胞的存活对脑卒中治疗十分重要。

细胞质膜微囊蛋白1是新近发现的一种膜蛋白, 广泛表达于多种组织细胞表面, 最先发现在内皮细胞上, 随后发现在平滑肌细胞和肿瘤细胞上均有表达<sup>[17-18]</sup>, 能与具有“细胞质膜微囊蛋白结合域”的多种信号蛋白质分子如酪氨酸激酶类膜受体、类固醇激素受体、生长因子受体等结合, 对许多关键性信号分子的活性状态起直接调控作用, 从而参与细胞分化、增殖等多种病理、生理过程<sup>[19]</sup>。

目前细胞质膜微囊蛋白1主要研究集中于脂质转运、血管重建和肿瘤研究等方面, 它能促进内皮祖细胞增殖、移行、分化与血管形成, 与肿瘤细胞的侵袭、迁移有关, 并促进锚地独立的增长<sup>[20-22]</sup>, 在神经生物学研究尚处于开始阶段。研究发现, 细胞质膜微囊蛋白1在哺乳动物脑内表达, 参与脑的正常发育<sup>[23]</sup>, 能影响脑内神经干细胞的增殖<sup>[24]</sup>。实验从细胞质膜微囊蛋白1敲除小鼠获取神经干细胞以及细胞质膜微囊蛋白1对神经干细胞的影响, 以期明确神经干细胞的调控机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 体外细胞学实验。

**时间与地点:** 2011年3月至2012年6月湖南中医药大学内科实验室完成。

**材料:** 妊娠14-16 d C57BL/6小鼠由湖南斯莱克景达实验动物公司提供, 许可证号SCXK(湘)2009-0004; 细胞质膜微囊蛋白1基因敲除C57BL/6小鼠购自美国Jackson Laboratory, 授权号2909619。实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定<sup>[25]</sup>。

**实验方法:**

**神经干细胞条件培养基配置:** DMEM/F12(1:1)加2%B27、20 μg/L表皮生长因子、20 μg/L碱性成纤维细胞生长因子和10 mL/L非必须氨基酸。

## 细胞质膜微囊蛋白1敲除小鼠神经干细胞培养实验用主要试剂:

试剂	来源
DMEM/F12(1:1)培养基、胎牛血清、PBS缓冲液	HyClone公司
非必需氨基酸、B27	Invitrogen Gibco公司
表皮生长因子、Poly-L-Lysine、Accutase	Sigma公司
碱性成纤维细胞生长因子	Millipore公司
巢蛋白、神经丝蛋白200、胶质纤维酸性蛋白与O4单克隆抗体	Abcam公司
细胞质膜微囊蛋白1单克隆抗体	Santa Cruz公司
SABC试剂盒、AEC显色剂	北京中杉金桥生物公司

**神经干细胞的分离与培养:** 取妊娠14-16 d(阴栓出现日作为0 d)C57BL/6或细胞质膜微囊蛋白1敲除小鼠断颈处死, 浸泡于体积分数为75%的乙醇中消毒, 无菌条件下剪开腹部组织, 取出胎鼠置于装有75%乙醇的30 mL小烧杯中, 漂洗羊水及血液后, 无菌操作依次剪开皮肤、颅骨, 完整取出脑组织, 移至培养皿中, 用预冷的PBS冲洗3次以去除血污, 转置盛有神经干细胞培养基的培养皿中, 去视束、小脑, 以眼科镊小心剥离脑膜和血管。收集脑组织于离心管中, 采用机械吹打的方法, 反复吹打将组织制备成细胞悬液, 800 r/min离心5 min, 弃上清得到细胞沉淀<sup>[26]</sup>。加入神经干细胞条件培养基重新悬浮细胞沉淀, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ , 接种于6孔板中, 置37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境的恒温培养箱中。待神经干细胞球形成后, 收集至离心管, 加入accutase液, 同时反复轻柔均匀吹打, 尽量消化细胞, 细胞悬液按原培养密度接种到新的培养瓶, 置培养箱中继续培养。

**神经干细胞鉴定:** 对原代和传代神经干细胞进行巢蛋白免疫细胞化学检测。取悬浮生长的克隆球, 接种于培养皿中, 其中预置经多聚赖氨酸包被过的盖玻片, 于培养基中添加体积分数10%胎牛血清以促进神经球贴壁。37 °C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>培养2 h后取出盖玻片。吸去培养基, PBS漂洗3次, 5 min/次。40 g/L多聚甲醛固定15 min, PBS漂洗后进行免疫组织化学检测, 具体步骤参考文献<sup>[27]</sup>, 观察染色情况, 待标本显色后倒掉染液, 用蒸馏水充分冲洗以终止染色, 干燥后封固, 显微镜观察结果并拍照。

**神经干细胞增殖能力鉴定:** 采用克隆球计数检测<sup>[28]</sup>。收集生长期的神经干细胞, 采用accutase消化液37 °C消化3 min, 将神经球机械吹打散开, 制成单细胞悬液, 调节细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ , 接种于12孔板中, 每孔1 mL细胞悬液。培养3 d在低倍镜下进行神经球计数, 纳入计数的神经球需包含5个以上细胞。实验重复3次。

**神经干细胞的诱导分化:** 取第2代培养3 d的神经干细胞, 加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12进行诱导分化, 7 d后细胞贴壁分化后行免疫细胞化学检测, 步骤

同神经干细胞巢蛋白检测, 分别用1:500稀释的神经丝蛋白200、胶质纤维酸性蛋白和O4抗体代替巢蛋白抗体。同时用正常山羊血清和PBS代替一抗作空白对照以检查免疫反应的特异性。

**细胞质膜微囊蛋白表达检测:** 取原代和传代神经干细胞进行免疫细胞化学法检测, 方法同前, 用1:500稀释的细胞质膜微囊蛋白1抗体代替巢蛋白抗体。

**主要观察指标:** 神经干细胞的生物学特性, 神经干细胞的鉴定、增殖与分化结果, 细胞质膜微囊蛋白1表达结果及对细胞增殖的影响。

**统计学分析:** 细胞增殖能力所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由第2作者应用SPSS 11.0统计软件包对数据进行统计分析, 组间比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$ 被认为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 神经干细胞生长情况观察结果** 两种来源细胞悬液接种1 d后, 镜下可见较多细胞发生死亡, 表现为透光度较差的小点, 其间可见单个细胞漂浮于培养基中, 部分为数个细胞的聚集, 和周围悬浮细胞碎片相比, 呈透光度较好的亮点。原代培养两三天后, 悬浮细胞碎片间可见一定数量的细胞聚集, 形态较为规则, 多为类圆形或近圆形, 胞体通透, 呈悬浮生长, 第1次换液后, 悬浮细胞碎片较之前明显减少, 神经干细胞生长迅速, 可见有较多细胞团聚集, 大小不一, 形态各异, 呈球型、长椭圆型或桑葚型悬浮生长。采用accutase消化加机械吹打的方式传代后, 可见呈悬浮生长的单细胞逐渐形成球形克隆, 成球速度快于原代培养, 同时可见培养板底部细胞部分发生分化(图1)。

**2.2 神经干细胞的鉴定结果** 免疫细胞化学检测显示, 附着于多聚赖氨酸包埋盖玻片上的细胞球均呈巢蛋白抗原强阳性(图2)。

**2.3 诱导分化细胞鉴定结果** 加入血清诱导2 d后, 两组可见细胞球贴壁, 细胞团周围长出长短不一的突起, 7 d中小细胞球基本铺展开, 部分细胞移行至一定距离, 细胞呈胞体形态不一带突起的细胞。免疫细胞化学检测显示, 两组细胞可分别呈神经丝蛋白200、胶质纤维酸性蛋白和O4抗原阳性(图2)。

**2.4 细胞质膜微囊蛋白1表达鉴定** 来源于正常胎鼠的神经干细胞和分化细胞均呈细胞质膜微囊蛋白1阳性表达, 而来源于细胞质膜微囊蛋白1敲除胎鼠的神经干细胞和分化细胞细胞质膜微囊蛋白1表达均呈阴性(图3)。

**2.5 细胞质膜微囊蛋白1对神经干细胞增殖的影响** 采用克隆球计数的方法对两种来源胚胎神经干细胞进行计数发现, 细胞质膜微囊蛋白1敲除胎鼠神经干细胞成球速度和成球数量优于正常胎鼠神经干细胞, 两组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 图3, 表1)。

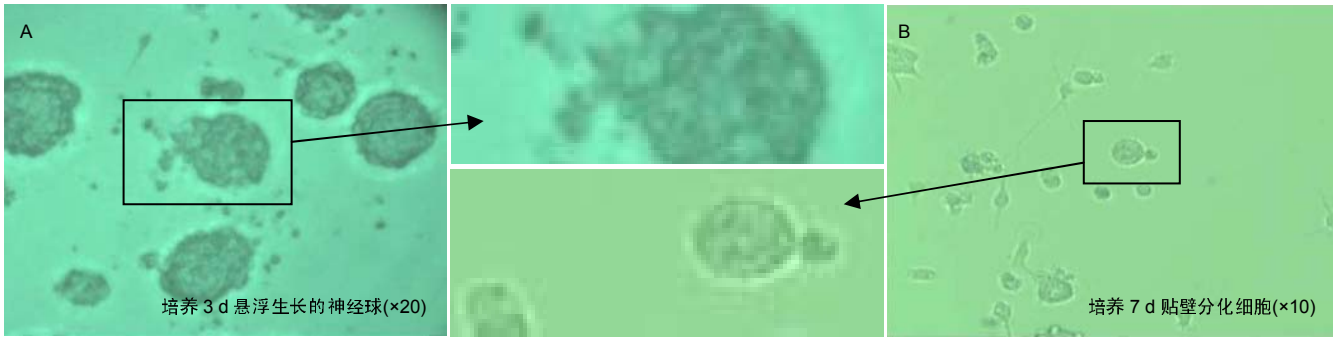


图 1 正常组原代培养小鼠神经干细胞形态

Figure 1 Morphology of neural stem cells from normal mice after primary culture

图注: 可见有较多细胞团聚集, 大小不一, 形态各异, 呈球型、长椭圆型或桑葚型悬浮生长。

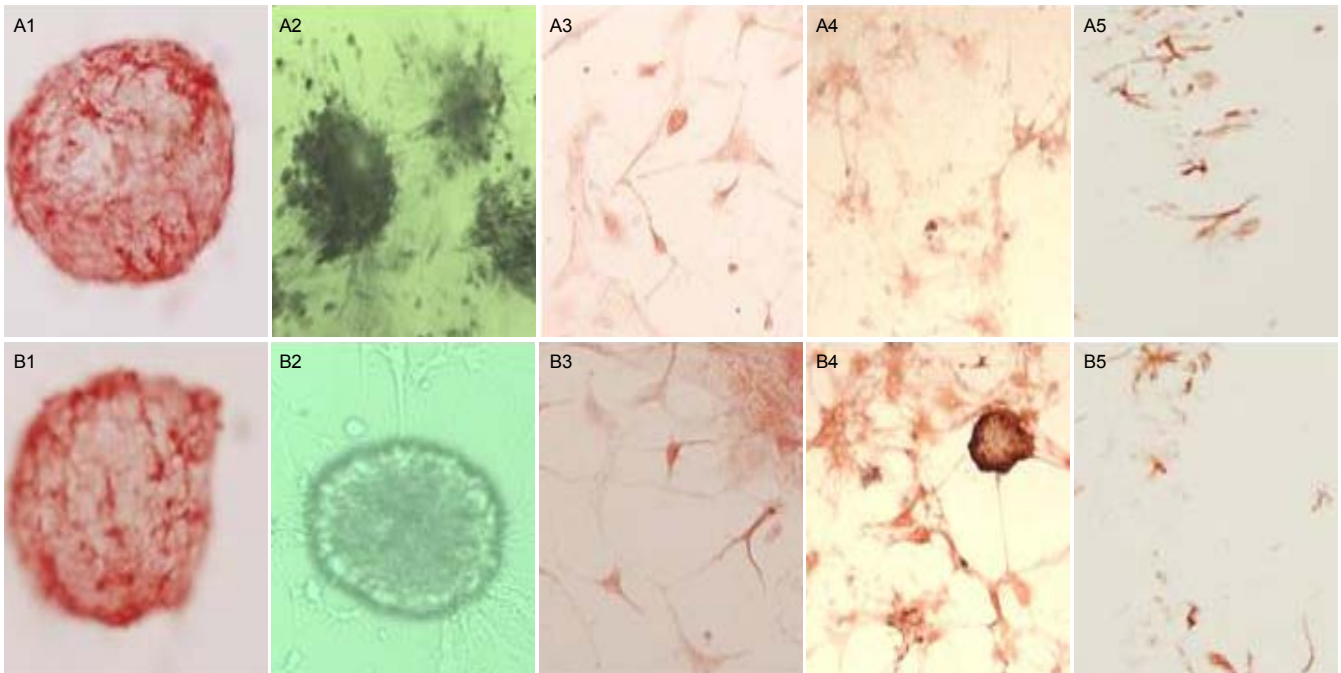


图 2 正常组和敲除组神经干细胞的鉴定及诱导分化细胞鉴定结果(×20)

Figure 2 Identification of neural stem cells and differentiated cells in the two groups (×20)

图注: 图中 A 为正常组 1, 2, 3, 4, 5 图片分别为 nestin 阳性神经球、分化细胞(未进行免疫细胞化学检测), 神经丝蛋白 200 阳性细胞、胶质纤维酸性蛋白阳性细胞和 O4 阳性细胞; B 敲除组 1, 2, 3, 4, 5 图片为分别为 nestin 阳性神经球、分化细胞(未进行免疫细胞化学检测), 神经丝蛋白 200 阳性细胞、胶质纤维酸性蛋白阳性细胞和 O4 阳性细胞。

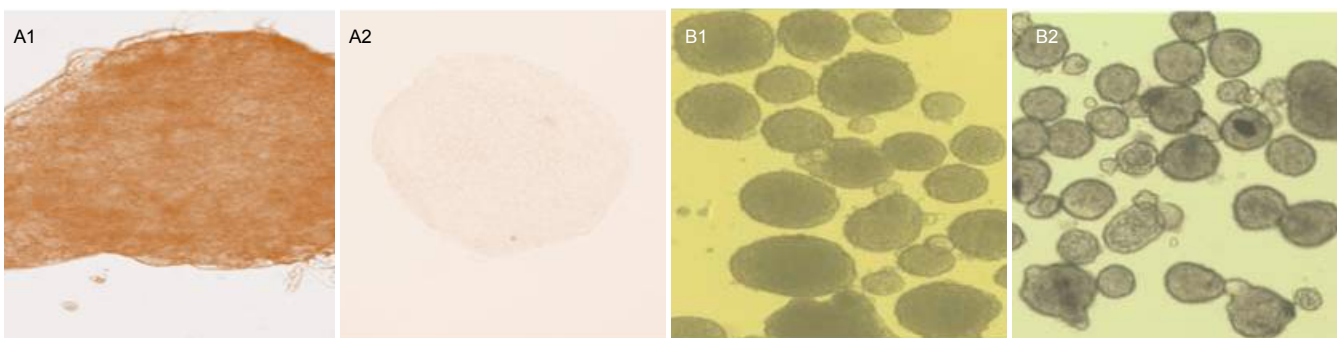


图 3 细胞质膜微囊蛋白 1 对神经干细胞增殖的影响(×10)

Figure 3 Caveolin-1 effects on proliferation of neural stem cells (×10)

图注: ①A1 为正常组细胞质膜微囊蛋白 1 免疫细胞化学检测; A2 为敲除组细胞质膜微囊蛋白 1 免疫细胞化学检测; B1 为正常第 3 代神经球; B2 为敲除组第 3 代神经球。②A 图提示正常胎鼠神经干细胞和分化细胞的细胞质膜微囊蛋白 1 均呈阳性表达, 敲除胎鼠神经干细胞和分化细胞的细胞质膜微囊蛋白 1 均呈阴性表达; B 图提示细胞质膜微囊蛋白 1 敲除胎鼠神经干细胞成球速度和成球数量优于正常胎鼠神经干细胞。

表 1 培养 3 d, 5 d 的小鼠胚胎神经干细胞克隆球计数

Table 1 Number of clone balls of mouse embryonic neural stem cells at 3 and 5 days after culture ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ )

细胞来源	3 d	5 d
正常胎鼠	61.33±7.66	68.15±9.37
基因敲除鼠	77.22±5.40 <sup>a</sup>	86.34±5.78 <sup>a</sup>

表注: 细胞质膜微囊蛋白1敲除胎鼠神经干细胞克隆球数量优于正常胎鼠神经干细胞, 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论 Discussion

自1992年Reynolds首次在成年小鼠脑内分离培养出神经干细胞以来, 作为一类具有多向分化潜能的细胞, 目前绝大多数哺乳动物脑内均被证实存在, 它们在生理状态下以静止未增殖状态存在, 当机体或脑组织受到损伤时被激活<sup>[29]</sup>, 激活后的神经干细胞如何分化是目前研究的重点。如研究发现, 当脑缺血损伤或退化性改变时, 神经干细胞被激活, 但只有极少数移行并分化为成熟的神经元, 其数量不足以补偿损伤细胞<sup>[30]</sup>。细胞分化受细胞内外信号的精确定调控, 如神经生长因子、碱性成纤维生长因子细胞外信号和neuroD等细胞内信号均证实有助于神经干细胞增殖与存活<sup>[31]</sup>, 但内外信号的转导上欠明确。

Caveolae是细胞质膜表面特异性的内陷微区结构, 主要由脂类和蛋白质组成, 参与分子转运、细胞脂质代谢和信号转导等多种生理过程<sup>[32]</sup>。细胞质膜微囊蛋白是相对分子质量为22 000的结构蛋白, 是细胞质膜结构小窝(caveolae)的标志蛋白。目前在哺乳动物细胞已确定的细胞质膜微囊蛋白家族成员有细胞质膜微囊蛋白1、细胞质膜微囊蛋白2和细胞质膜微囊蛋白3三种分子, 细胞质膜微囊蛋白1作为Caveolae主要蛋白, 广泛表达于内皮细胞、脂肪细胞和心肌细胞等细胞类型中, 对维持Caveolae的结构功能具有重要作用<sup>[33]</sup>。细胞质膜微囊蛋白1通过其绞手架结构域能寡聚Ha-RAS、c-Src、eNOS、PKC等多种信号分子, 调节信号转导过程<sup>[34]</sup>, 参与了许多生理与病理过程。

细胞质膜微囊蛋白1在神经系统中分布广泛, 在大脑皮层、小脑、海马、黑质等多个部位都有表达, 能影响胚胎发育中侧线神经丘和脊索发育, 调控血脑屏障的功能<sup>[35-36]</sup>, 通过作用于notch信号而调节骨髓间充质细胞向神经元分化<sup>[37]</sup>。新近发现, 细胞质膜微囊蛋白1可表达于胚胎干细胞源性神经干细胞和培养的神神经球<sup>[38]</sup>, 细胞质膜微囊蛋白1敲除能增强成年小鼠脑内室旁区神经干细胞的增殖<sup>[24]</sup>, 促进神经干细胞向胶质细胞分化, 抑制向神经元分化<sup>[39-40]</sup>, 但尚未见体外缺失神经干细胞的报道。

实验在体外从两种小鼠胚胎脑中成功获得了神经干细胞, 且来源于细胞质膜微囊蛋白1敲除胎鼠的神经干细胞及其分化细胞均呈细胞质膜微囊蛋白1阴性, 结果显示可从细胞质膜微囊蛋白1敲除鼠内获取细胞质膜微囊蛋白1缺失神经干细胞; 同时实验还发现, 细胞质膜微囊蛋白1缺失可

促进神经球的形成速度和数量, 提示细胞质膜微囊蛋白1能促进神经干细胞的增殖, 与体内实验结果相似<sup>[24]</sup>。实验结果一方面为体外研究细胞质膜微囊蛋白1在神经干细胞的作用机制提供平台, 另一方面也为神经干细胞调控研究提供了平台。

**作者贡献:** 设计与评估者为第一、五作者, 实施者为第二、三、四作者, 评估采用盲法评估。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**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。

**学术术语:** 细胞质膜微囊-是指细胞膜上特异性内陷性囊性结构, 直径在50-100 nm之间, 有胆固醇、磷脂和微囊蛋白组成, 参与细胞信号转导。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

### 4 参考文献 References

- [1] 陈竺. 全国第三次死因回顾抽样调查报告[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008.
- [2] Gage FH, Kempermann G, Song H. Adult Neurogenesis. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2008.
- [3] Ihrle RA, Alvarez-Buylla A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*. 2011;70(4):674-686.
- [4] Christie KJ, Turnley AM. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain. *Front Cell Neurosci*. 2013;6:70.
- [5] Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, et al. Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem*. 2002;82(6):1311-1329.
- [6] Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, et al. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;48(1):16-42.
- [7] Lan X, Chen Q, Wang Y, et al. TNF- $\alpha$  Affects Human Cortical neural progenitor cell differentiation through the autocrine secretion of leukemia inhibitory factor. *PLoS One*. 2012; 7(12): e50783.
- [8] Vukovic J, Colditz MJ, Blackmore DG, et al. Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J Neurosci*. 2012;32(19):6435-6443.
- [9] Grade S, Weng YC, Snapyan M. Brain-derived neurotrophic factor promotes vasculature-associated migration of neuronal precursors toward the ischemic striatum. *PLoS One*. 2013; 8(1):e55039.
- [10] Zhang Q, Liu G, Wu Y. BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the PI3K/Akt pathway. *Molecules*. 2011; 16(12):10146-10156.
- [11] Thored P, Arvidsson A, Cacci E, et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*. 2006; 24(3):739-747.

- [12] Wang C,Zhang M,Sun C,et al. Sustained increase in adult neurogenesis in the rat hippocampal dentate gyrus after transient brain ischemia. *Neurosci Lett.* 2011; 488(1):70-75.
- [13] Zhang RL,Zhang ZG,Chopp M.Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular Zone. *Neuropharmacology.* 2008;55(3):345-352.
- [14] Jin K, Wang X, Xie L, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(35):13198-13202.
- [15] Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, et al. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2005;81(16):776-788.
- [16] Arvidsson A, Collin T, Kirik D,et al.Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.*2002;8(9):963-970.
- [17] Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, et al. Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem Cell Biol.* 2002; 117(2): 105-112.
- [18] Jin Y, Lee SJ, Minshall RD, et al.Caveolin-1: a critical regulator of lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300(2):L151-60.
- [19] Cohen AW,Hnasko R,Schube W,et al. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004; 84(4): 1341-1379.
- [20] Liao WX, Feng L, Zheng J, et al. Deciphering mechanisms controlling placental artery endothelial cell migration stimulated by vascular endothelial growth factor. *Endocrinology.* 2010;151(7):3432-3444.
- [21] Tahir SA,Yang G,Ebara S,et al.Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen insensitive prostate cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(10): 3882-3885.
- [22] Chanvorachote P, Chunhacha P. Caveolin-1 regulates endothelial adhesion of lung cancer cells via reactive oxygen species-dependent mechanism. *PLoS One.* 2013;8(2): e57466.
- [23] 王璐,嵇志红,陈冬冬,等. Cav-1与脑功能关系的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*,2007;34(5):449-453.
- [24] Jasmin JF, Yang M, Iacovitti L,et al. Genetic ablation of caveolin-1 increases neural stem cell proliferation in the subventricular zone (SVZ) of the adult mouse brain. *Cell Cycle.* 2009;8:3978-3983.
- [25] 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见,2006,09.30.
- [26] Massirer KB,Carromeu C,Griesi-Oliveira K,et al. Maintenance and differentiation of neural stem cells. *Wiley Interdiscip Rev SystBiol Med.*2011;3(1):107-114.
- [27] 佟雷,季丽莉,解大龙,等.碱性成纤维生长因子和神经生长因子联合应用培养成年大鼠海马神经干细胞向神经元样细胞的分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2011;15(1):74-77.
- [28] Kim JS, Chang MY, Yu IT. Lithium selectively increases neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells both in vitro and in vivo. *J Neurochem.* 2004 ; 89(2):324-336.
- [29] Aimone JB, Deng W, Gage FH.Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends Cogn Sci.* 2010;14(7):325-337.
- [30] Aimone JB, Weick JP.Perspectives for computational modeling of cell replacement for neurological disorders. *Front Comput Neurosci.*2013;7:150.
- [31] De Filippis L, Binda E. Concise review: self-renewal in the central nervous system: neural stem cells from embryo to adult. *Stem Cells Transl Med.*2012; 1(4):298-308.
- [32] 沈林霞,项美香. Caveolae/Caveolin在心血管疾病中的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*,2006,26(6):865-867.
- [33] Razani B,Woodman SE,Lisanti MP.Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev.* 2002;54(3): 431-467.
- [34] Williams TM,Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol.*2004;5(3):214-217.
- [35] Nixon SJ, Carter A, Wegner J,et al. Caveolin-1 is required for lateral line neuromast and notochord development. *J Cell Sci.*2007;120(pt3):2151-2161.
- [36] Deng J, Huang Q, Wang F, et al.The role of caveolin-1 in barrier disruption induced by focused ultrasound combined. *J Mol Neurosci.* 2012;46(3):67-87.
- [37] Wang S, Kan Q, Sun Y, et al.Caveolin-1 regulates neural differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neurons by modulating Notch signaling. *Int J Dev Neurosci.* 2013;31(1):30-35.
- [38] Campos LS, Decker L, Taylor V, et al. Notch, epidermal growth factor receptor, and beta1-integrin pathways are coordinated in neural stem cells. *J Biol Chem.*2006; 281(8): 5300-5309.
- [39] Li Y, Luo J, Lau WM, et al.Caveolin-1 plays a crucial role in inhibiting neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells via VEGF signaling-dependent pathway. *PLoS One.* 2011; 6(8):e22901.
- [40] Li Y, Lau WM, So KF, et al.Caveolin-1 promote astroglial differentiation of neural stem/progenitor cells through modulating Notch1/NICD and Hes1 expressions. *Biochem Biophys Res Commun.*2011; 407(3):517-524.