

右美托咪定对脐血间充质干细胞向神经细胞分化的影响

樊志刚, 乔蕾(河南医学高等专科学校, 河南省郑州市 451191)

文章亮点:

右美托咪定是一种高选择性、强效 α_2 肾上腺素能受体激动剂, 对人的中枢神经系统具有多种治疗作用。实验以脐血间充质干细胞为研究对象, 观察到低浓度的右美托咪定可以提高脐血间充质干细胞活性及增殖能力, 而高浓度的右美托咪定则抑制脐血间充质干细胞活性及增殖能力, 且对脐血间充质干细胞增殖的影响与 ERK1/2 磷酸化密切相关。高、低浓度的右美托咪定均可诱导脐血间充质干细胞向神经细胞分化。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 右美托咪定; 增殖; 分化

主题词:

胎血; 间质干细胞; 右美托咪定; 细胞增殖

摘要

背景: 大量研究证实右美托咪定在缺血再灌注损伤中具有显著的神经保护作用, 但是其对神经系统的作用机制以及影响神经细胞功能的途径和方式鲜见报道。

目的: 探讨右美托咪定对脐血间充质干细胞增殖及向神经细胞分化的影响。

方法: 取第3代脐血间充质干细胞分为对照组、低浓度右美托咪定组(1 $\mu\text{g/L}$)和高浓度右美托咪定组(10 $\mu\text{g/L}$), MTT 法检测脐血间充质干细胞活性, Western blot 法检测增殖期脐血间充质干细胞中 ERK1/2 磷酸化水平, 免疫荧光法检测 NeuN/DAPI、GFAP/DAPI 和 Nestin/DAPI 双染细胞比例, 观察细胞分化能力。

结果与结论: 低浓度右美托咪定组干细胞活性及 ERK1/2 磷酸化水平较对照组明显增加($P < 0.05$); 高浓度右美托咪定组干细胞活性及 ERK1/2 磷酸化水平较对照组及低浓度右美托咪定组明显降低($P < 0.05$); 高、低浓度右美托咪定组中 NeuN、GFAP 阳性细胞数较对照组明显增加($P < 0.05$), 而 Nestin 阳性细胞则显著降低($P < 0.05$)。结果表明低浓度右美托咪定诱导脐血间充质干细胞增殖而高浓度右美托咪定抑制其增殖, 其机制可能通过调节 ERK1/2 磷酸化而实现的; 高、低浓度右美托咪定均诱导脐血间充质干细胞向神经细胞的分化。

樊志刚, 乔蕾. 右美托咪定对脐血间充质干细胞向神经细胞分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(50):8088-8092.

樊志刚, 男, 1978年生, 河南省安阳市人, 硕士, 主要从事干细胞增殖和分化方面的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.50.009

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)50-08088-05

稿件接受:2014-11-14

Effect of dexmedetomidine on neuronal differentiation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells

Fan Zhi-gang, Qiao Lei (Henan Medical College, Zhengzhou 451191, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Increasing evidence has shown that dexmedetomidine has a significant neuroprotection against ischemia-reperfusion injury, but its mechanism of action on the nervous system and its pathways to affect nerve cell function are rarely reported.

OBJECTIVE: To study the effect of dexmedetomidine on proliferation and neuronal differentiation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells.

METHODS: Umbilical cord blood mesenchymal stem cells at passage 3 were divided into control, low-concentration (1 $\mu\text{g/L}$) and high-concentration (10 $\mu\text{g/L}$) dexmedetomidine groups. MTT was used to detect the viability of umbilical cord blood mesenchymal stem cells; western blot assay was used to determine the ERK1/2 phosphorylation in the cells; immunofluorescence staining was used to detect the percentage of NeuN/DAPI, GFAP/DAPI and Nestin/DAPI positive cells. Cell differentiation and proliferation abilities were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: Cell viability and ERK1/2 phosphorylation level were significantly increased in the low-concentration group compared to the control group ($P < 0.05$); while these two indicators in the high-concentration group were significantly lower than those in the other two groups ($P < 0.05$). The number of NeuN and GFAP positive cells was increased significantly in the two dexmedetomidine groups compared with the control group ($P < 0.05$), while the number of Nestin positive cells was significantly decreased in the two dexmedetomidine groups ($P < 0.05$). These findings indicate that low-concentration dexmedetomidine can induce the proliferation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells that is however inhibited by the high-concentration dexmedetomidine, which can be realized by regulating ERK1/2 phosphorylation level. In addition, low- and high-concentration dexmedetomidine can both induce the neuronal differentiation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells.

Fan Zhi-gang, Master, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, Henan Province, China

Subject headings: fetal blood; mesenchymal stem cells; dexmedetomidine; cell proliferation

Accepted: 2014-11-14

Fan ZG, Qiao L. Effect of dexmedetomidine on neuronal differentiation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(50):8088-8092.

0 引言 Introduction

α_2 肾上腺素能受体激动剂在重症监护和麻醉治疗中的疗效日益受到关注, 右美托咪定(dexmedetomidine, DEX)是一种高选择性、强效 α_2 肾上腺素能受体激动剂, 对人的中枢神经系统具有多种治疗作用, 在镇静、镇痛、抗焦虑作用以及无呼吸抑制、血流动力学稳定等方面被广泛应用^[1-2], 大量研究证实右美托咪定在缺血再灌注损伤中具有显著的保护作用^[3-4], 也有实验证实右美托咪定可以影响海马造成学习记忆能力的下降^[5-6], 但是其对神经系统的作用机制以及影响神经系统发育和神经细胞功能的途径鲜见报道。

脐血又称胎盘血或脐带血, 是胎儿出生时脐带内和胎盘近胎儿一侧血管内的血液。脐血中含有丰富的造血干细胞和间充质干细胞^[7], 与其他来源干细胞相比, 脐血来源广泛, 脐血中淋巴细胞的免疫功能不够成熟, 免疫原性较弱, 移植物抗宿主病发生率较低^[8-13], 尤其是脐血来源间充质干细胞在适当条件下具有向神经细胞、成骨细胞、肝细胞方向分化的潜能^[14-18], 所以脐血间充质干细胞作为一类新型的种子细胞成为各项研究的热点。

本实验观察右美托咪定对脐血间充质干细胞增殖和向神经细胞分化的影响, 进而探讨和推测右美托咪定对神经发育的可能影响机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 体外细胞学观察实验。

时间及地点: 实验于2013年7至10月在郑州大学干细胞研究中心完成。

材料: 淋巴细胞分离液(1.077 g/cm³)(天津TBD公司); DMEM/F12培养基(Gibco公司, 美国); BrdU、鼠BrdU抗体、神经上皮干细胞蛋白抗体、胶质原纤维酸性蛋白、抗ERK1/2抗体和p-ERK1/2抗体(Sigma, 美国)。

实验方法:

脐血间充质干细胞的分离培养: 选择郑州市妇幼保健院产科产妇自愿捐献的足月妊娠顺产的婴儿脐血80 mL, 参照文献^[19]采用密度梯度离心法获取脐血间充质干细胞, 将分离的细胞以 5×10^9 L⁻¹细胞浓度接种于含体积分数为20%胎牛血清的DMEM/F12培养液中, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。培养1 d后弃去全部液体, 然后每2 d全量换液1次, 取第3代细胞冻存备用。

细胞的鉴定: 参照文献^[20]复苏细胞, 细胞悬液浓度调整为 1×10^8 L⁻¹, 分别与鼠抗人的FITC-CD90、PE-CD86、FITC-CD45、PE-CD19、FITC-CD105、PE-HLA-DR、FITC-HLA-ABC和PE-CD34抗体反应, 在4 °C的暗室中放置30 min, 用流式细胞仪测定细胞表面标志表达。以鼠抗人PE/FITC-IgG1为平行对照, 数据用Cell Quest软件处理。

实验分组: 实验将细胞分为对照组、低浓度右美托咪定组、高浓度右美托咪定组。参照文献^[19]复苏细胞, 以细胞浓度 5×10^9 L⁻¹接种于含体积分数为20%胎牛血清的DMEM/F12培养液中, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中孵育24 h, 然后加入PBS、1 μ g/L及10 μ g/L右美托咪定再培养12 h后进行检测。

脐血间充质干细胞活性检测: 细胞活性采用MTT法检测。每组脐血间充质干细胞以 1×10^5 /孔接种于96孔培养板中, 24 h贴壁之后, 每孔加入质量浓度为5 g/L的MTT溶液50 μ L, 于37 °C孵育箱中孵育4 h, 弃上清, 加150 μ L二甲基亚砜, 充分振摇10 min, 在酶联免疫检测仪490 nm波长处测定各孔吸光度(A)值。每组细胞分别重复4次。

脐血间充质干细胞增殖期ERK1/2磷酸化: 每组脐血间充质干细胞以 1×10^5 /孔接种于48孔板中, 加入细胞裂解液4 °C裂解30 min, 12 000 r/min离心10 min取上清液, 用BCA法测蛋白浓度。配制12%分离胶和5%积层胶进行SDS-PAGE电泳, 每孔上样量50 μ g, 以GAPDH作为内参照。电泳结束后转膜, 将蛋白转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭, 分别加入兔抗ERK抗体、P-ERK抗体于4 °C孵育过夜。洗膜, 加入HRP标记的相应的羊抗兔IgG抗体于室温孵育1 h。洗膜, ECL显影曝光, 得到胶片, 比较各条带的灰度值, 分析所检测蛋白的磷酸化水平。每组细胞分别重复4次。

脐血间充质干细胞向神经细胞分化检测: 每组脐血间充质干细胞以 1×10^5 /孔接种于预先用0.1%多聚赖氨酸包被过的48孔板中, 培养24 h后换成神经细胞培养液(DMEM/F12+2%B27添加剂+1%N2添加剂+20 μ g/L表皮生长因子+20 μ g/L碱性成纤维细胞生长因子+200 U/L青霉素钠+100 U/L链霉素)培养。分别以NeuN/DAPI、GFAP/DAPI和Nestin/DAPI双染标记神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经干细胞, 观察计数百分比。每组细胞分别重复4次。

主要观察指标: ①MTT法检测脐血间充质干细胞活性。②Western blot法检测增殖期脐血间充质干细胞中ERK1/2磷酸化水平。③免疫荧光法检测NeuN/DAPI、GFAP/DAPI和Nestin/DAPI双染细胞比例, 观察细胞分化能力。

统计学分析: 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 应用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析, 多样本均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 脐血间充质干细胞分离培养 倒置显微镜下可见, 培养初期胞体小且呈圆形(图1A), 2 d以后逐渐变为椭圆、胞体变大(图1B), 7 d(第3代)后向两级伸出凸起为长梭形(图1C)。

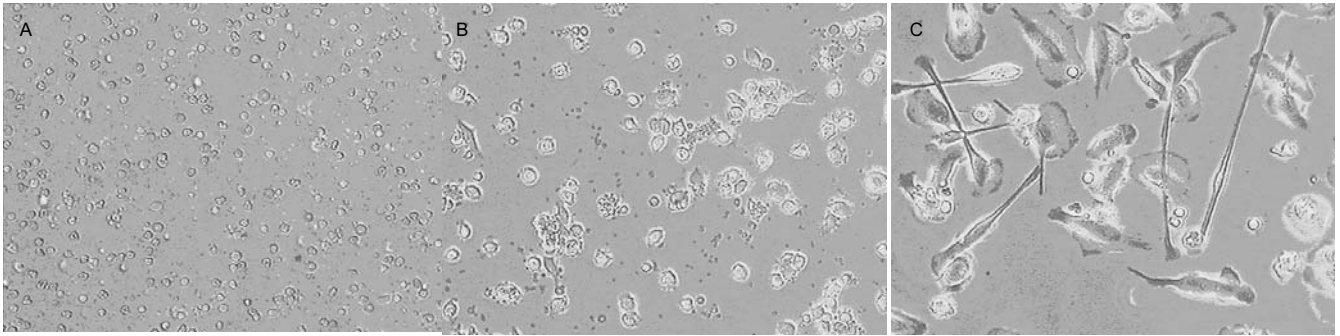


图1 培养不同时期脐血干细胞形态(x100)

Figure 1 Morphology of umbilical cord blood stem cells at different periods (x100)

图注: 图中A为培养1h, 脐血干细胞胞体小且呈圆形; B为培养2d, 脐血干细胞逐渐变为椭圆形, 胞体变大; C为培养7d, 脐血干细胞向两级伸出凸起为长梭形。

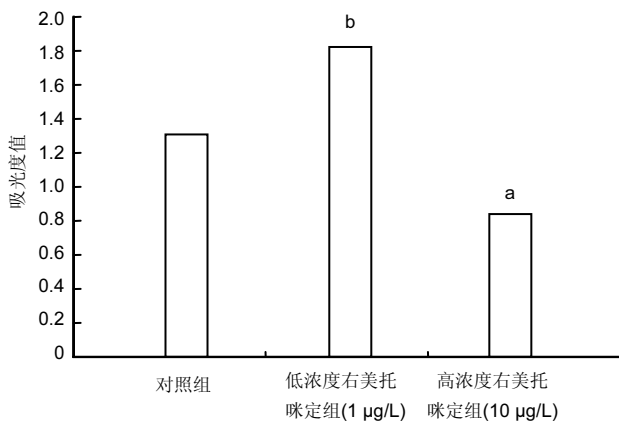


图2 右美托咪定对脐血间充质干细胞活力的影响

Figure 2 Effect of dexmedetomidine on viability of umbilical cord blood mesenchymal stem cells

图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, 与高浓度右美托咪定组比较, ^b $P < 0.05$, 由图可见低浓度右美托咪定可以促进干细胞增殖, 而高浓度右美托咪定则抑制其增殖。

2.2 流式细胞仪检测结果 CD34、CD45的阳性率不足10%, CD19和CD86阳性率少于10%, CD90、CD105阳性率高于70%, 主要组织相容性复合体HLA-ABC的阳性率为90%以上, HLA-DR阳性率低于5%, 结果显示所培养细胞符合间充质干细胞表面分子标记特征。

2.3 右美托咪定对脐血间充质干细胞活力的影响 MTT法检测结果表明, 低浓度右美托咪定组吸光值较对照组显著增高($P < 0.05$), 高浓度右美托咪定组吸光值则较对照组明显降低($P < 0.05$), 高浓度右美托咪定组吸光值较低浓度右美托咪定组也明显降低($P < 0.05$), 说明低浓度右美托咪定可以促进干细胞增殖, 而高浓度右美托咪定则抑制其增殖, 见图2。

2.4 右美托咪定对脐血间充质干细胞增殖期ERK1/2磷酸化的影响 与对照组相比, 低浓度右美托咪定组脐血间充质干细胞ERK1/2磷酸化水平明显增加($P < 0.05$), 而高浓度右美托咪定组脐血间充质干细胞ERK1/2磷酸化水平则较明显下降($P < 0.05$), 高浓度右美托咪定组较低浓度右美托咪定组也明显下降($P < 0.05$), 说明低浓度右美托咪定促进干细胞增殖可能是通过提高ERK1/2磷酸化水平实现的,

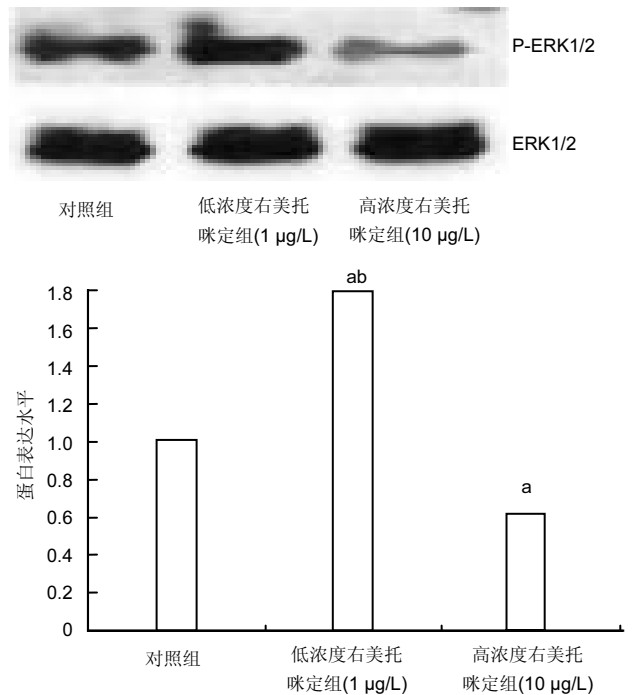


图3 右美托咪定对脐血间充质干细胞增殖期 ERK1/2 磷酸化的影响
Figure 3 Effect of dexmedetomidine on ERK1/2 phosphorylation during the proliferation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells

图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, 与高浓度右美托咪定组比较, ^b $P < 0.05$ 。

而高浓度右美托咪定抑制其增殖是降低了ERK1/2磷酸化水平, 见图3。

2.5 右美托咪定对脐血间充质干细胞向神经细胞分化的影响 通过免疫荧光计数可见, 对于NeuN阳性(神经元细胞)、GFAP阳性(胶质细胞)比例, 低浓度右美托咪定组和高浓度右美托咪定组均较对照组明显增加($P < 0.05$), 见图4A, B; 低、高浓度右美托咪定组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。对于Nestin阳性(神经干细胞)比例, 低浓度右美托咪定组和高浓度右美托咪定组均较对照组明显降低($P < 0.05$), 见图4C, D; 低、高浓度右美托咪定组间差异无显著性意义($P > 0.05$), 说明高、低浓度右美托咪定都可促进脐血干细胞向神经细胞的分化, 且差异无显著性意义, 见图4E。

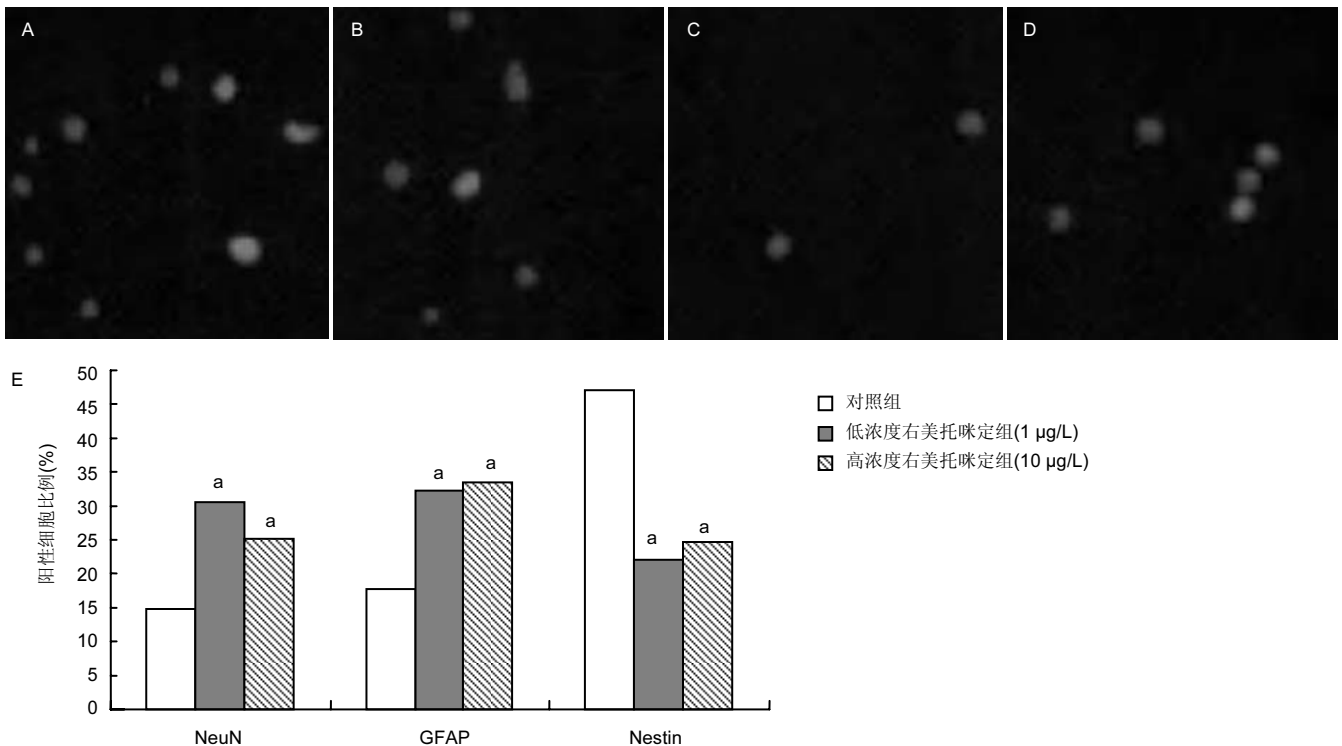


图4 右美托咪定对脐血间充质干细胞向神经细胞分化的影响

Figure 4 Effect of dexmedetomidine on neuronal differentiation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为低浓度右美托咪定组 NeuN/DAPI、GFAP/DAPI 双染细胞($\times 100$), GFAP 阳性(蓝色)、NeuN 阳性(红色); B 为对照组 NeuN/DAPI、GFAP/DAPI 双染细胞($\times 100$), GFAP 阳性(蓝色)、NeuN 阳性(红色); C 为低浓度右美托咪定组 Nestin/DAPI 双染细胞($\times 100$), Nestin 阳性(蓝色); D 为对照组 Nestin/DAPI 双染细胞($\times 100$), Nestin 阳性(蓝色); E 为 NeuN/DAPI、GFAP/DAPI 和 Nestin/DAPI 双染细胞比例, 与对照组比较, $^aP < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

右美托咪定是一种新型高选择性 α_2 受体激动剂, 与 α_2 、 α_1 受体结合的比例为1:620:1^[21], 其与脑干蓝斑核(负责调解觉醒与睡眠)的 α_2 受体结合可产生剂量依赖性镇静、催眠、抗焦虑作用; 与脊髓后角 α_2 受体结合, 可抑制疼痛信号向脑的传导或抑制感觉神经递质的释放而产生镇痛效应^[22]。动物研究还表明右美托咪定可以减少海马的长时程增强^[23], 鞘内注射右美托咪定改变学习和认知能力。另有研究还证实右美托咪定能抑制发育期大鼠神经细胞凋亡^[24]。因此本实验观察右美托咪定对脐血干细胞增殖和分化能力的影响。

MTT法检测右美托咪定对脐血间充质干细胞活力的影响, 实验结果显示低浓度右美托咪定组(1 $\mu\text{g/L}$)可以提高脐血间充质干细胞活力而高浓度右美托咪定组(10 $\mu\text{g/L}$)则抑制脐血间充质干细胞活性, 从而为获得大量稳定的间充质干细胞提高依据和参考。

ERK-CREB信号调节在神经干细胞存活方面具有重要作用^[25-26], 在神经发育初期可影响神经细胞增殖。杜婷^[27]证实, 肾上腺能受体激动剂可引起星形胶质细胞和小鼠脑内ERK1/2磷酸化。另有研究证实右美托咪定可以通过调节ERK通路减轻短暂局灶性脑缺血再灌注损伤^[28-30]。那么作为肾上腺素受体激动剂的右美托咪定是否通过ERK-草药CREB信号调节影响间充质干细胞增殖未见报道。本实验通过蛋白免疫印迹法检测增殖期脐血间充质干细胞

中ERK1/2磷酸化水平, 结果显示低浓度右美托咪定组(1 $\mu\text{g/L}$)中ERK1/2磷酸化较对照组显著增加, 而高浓度右美托咪定组(10 $\mu\text{g/L}$)ERK1/2磷酸化较对照组显著下降, 提示右美托咪定对间充质干细胞增殖影响与ERK1/2磷酸化密切相关。

为检测右美托咪定对脐血间充质干细胞分化的影响, 通过免疫荧光法以NeuN、GFAP分别标记成熟的神经元和星形胶质细胞, 研究结果显示低浓度右美托咪定组(1 $\mu\text{g/L}$)和高浓度右美托咪定组(10 $\mu\text{g/L}$)中神经元、星形胶质细胞比例均较对照组明显提高, Nestin标记的脐血间充质干细胞比例则显著降低, 而低浓度右美托咪定组(1 $\mu\text{g/L}$)和高浓度右美托咪定组(10 $\mu\text{g/L}$)间则无显著差异, 提示低、高浓度右美托咪定均可诱导脐血间充质干细胞分化, 且这种分化是非选择性的。

致谢: 感谢郑州大学干细胞研究中心工作人员的帮助。

作者贡献: 实验设计、实验成文和实验审核为第一作者, 实验实施、实验评估和资料收集为第二作者, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 研究方案经郑州市妇幼保健院伦理委员会批准, 脐血采集均经产妇或家属授权同意, 并签订知情同意书。

学术术语: 右美托咪定-由奥利安 Orion 公司(芬兰)研发, 1999年12月27日首次在美国上市, 2004年1月在日本上市。主要

通过激动 α_2 肾上腺素能受体抑制交感神经的兴奋而发挥作用, $\alpha_2 : \alpha_1 = 1600 : 1$, 亲和力为可乐定的 8 倍, 其半衰期也较可乐定短, 药代动力学的可预测性更强。FDA 于 1999 年批准, 将其应用于成人重症监护病房(ICU)短时间(< 24 h)的镇静与镇痛。

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] Sun L, Guo R, Sun L. Dexmedetomidine for preventing sevoflurane-related emergence agitation in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2014;58(6):642-650.
- [2] Kachalia A, Kachalia K, Nagalli S, et al. Analysis of safety and efficacy of dexmedetomidine as adjunctive therapy for alcohol with drawal in ICU. *Chest.* 2014;145(3 Supp1):207A.
- [3] Engelhard K, Werner C, Eberspächer E, et al. The effect of the alpha 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg.* 2003;96(2):524-531.
- [4] Wang X, Ji J, Fen L, et al. Effects of dexmedetomidine on cerebral blood flow in critically ill patients with or without traumatic brain injury: a prospective controlled trial. *Brain Inj.* 2013;27(13-14):1617-1622.
- [5] 韩缪, 张晴晴, 费远晖, 等. 鞘内注射右美托咪定对小鼠催眠和学习记忆的影响[J]. 徐州医学院学报, 2013, 33(9):577-579.
- [6] 柏平, 吴修建, 闫东. 右美托咪啉与咪达唑仑对幼鼠神经细胞损伤及学习记忆功能的影响[J]. 重庆医学, 2013, 42(25):2966-2968.
- [7] 赵俊暎, 陈乃耀, 石峻, 等. 人脐血间充质干细胞移植对创伤性脑损伤大鼠 VEGF 分泌及血管新生的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2013, 20(4):267-273.
- [8] 郑志娟, 庄文欣, 付文玉. 人脐带间充质干细胞的研究进展[J]. 解剖科学进展, 2008, 14(1):100-104.
- [9] 田晓宁. 脐血干细胞的特性及其临床应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(36):7197-7200.
- [10] Bjugstad KB, Teng YD, Redmond DE Jr, et al. Human neural stem cells migrate along the nigrostriatal pathway in a primate model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2008;211(2):362-369.
- [11] Sanders RD, Xu J, Shu Y, et al. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats. *Anesthesiology.* 2009;110(5):1077-1085.
- [12] Sanders RD, Sun P, Patel S, et al. Dexmedetomidine provides cortical neuroprotection: impact on anaesthetic-induced neuroapoptosis in the rat developing brain. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2010;54(6):710-716.
- [13] Pucilowska J, Puzerey PA, Karlo JC, et al. Disrupted ERK signaling during cortical development leads to abnormal progenitor proliferation, neuronal and network excitability and behavior, modeling human neuro-cardio-facial-cutaneous and related syndromes. *J Neurosci.* 2012;32(25):8663-8677.
- [14] Bjugstad KB, Teng YD, Redmond DE Jr, et al. Human neural stem cells migrate along the nigrostriatal pathway in a primate model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2008;211(2):362-369.
- [15] Sung MA, Jung HJ, Lee JW, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote regeneration of crush-injured rat sciatic nerves. *Neural Regen Res.* 2012;7(26):2018-2027.
- [16] 王蒙, 杨媛, 史春梦, 等. 人脐血源性 MSCs 成骨诱导分化后对 DCs 的免疫抑制研究[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(11):959-963.
- [17] 孙艳, 段芳龄, 陈香宇, 等. 体外诱导人脐血间充质干细胞向肝细胞样细胞分化的研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2004, 13(3):239-243.
- [18] 李恒, 李晓红, 毕建芬, 等. 全反式维甲酸促人脐血多能干细胞向多巴胺能神经元分化[J]. 山东大学学报:医学版, 2012, 50(6):92-96.
- [19] Pucilowska J, Puzerey PA, Karlo JC, et al. Disrupted ERK signaling during cortical development leads to abnormal progenitor proliferation, neuronal and network excitability and behavior, modeling human neuro-cardio-facial-cutaneous and related syndromes. *J Neurosci.* 2012;32(25):8663-8677.
- [20] Herold S, Jagasia R, Merz K, et al. CREB signalling regulates early survival, neuronal gene expression and morphological development in adult subventricular zone neurogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 2011;46(1):79-88.
- [21] Bhana N, Goa KL, McClellan KJ. Dexmedetomidine. *Drugs.* 2000;59(2):263-268.
- [22] Bekker A, Sturaitis M, Bloom M, et al. The effect of dexmedetomidine on perioperative hemodynamics in patients undergoing craniotomy. *Anesth Analg.* 2008;107(4):1340-1347.
- [23] Takamatsu I, Iwase A, Ozaki M, et al. Dexmedetomidine reduces long-term potentiation in mouse hippocampus. *Anesthesiology.* 2008;108(1):94-102.
- [24] Sanders RD, Sun P, Patel S, et al. Dexmedetomidine provides cortical neuroprotection: impact on anaesthetic-induced neuroapoptosis in the rat developing brain. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2010;54(6):710-716.
- [25] Herold S, Jagasia R, Merz K, et al. CREB signalling regulates early survival, neuronal gene expression and morphological development in adult subventricular zone neurogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 2011;46(1):79-88.
- [26] Wang X, Ji J, Fen L, et al. Effects of dexmedetomidine on cerebral blood flow in critically ill patients with or without traumatic brain injury: a prospective controlled trial. *Brain Inj.* 2013;27(13-14):1617-1622.
- [27] 杜婷. 肾上腺素能受体激动剂引起星形胶质细胞和小鼠脑内 ERK1/2 磷酸化的信号传导途径[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2011.
- [28] Diaz NL, Waters CH. Current strategies in the treatment of Parkinson's disease and a personalized approach to management. *Expert Rev Neurother.* 2009;9(12):1781-1789.
- [29] Pucilowska J, Puzerey PA, Karlo JC, et al. Disrupted ERK signaling during cortical development leads to abnormal progenitor proliferation, neuronal and network excitability and behavior, modeling human neuro-cardio-facial-cutaneous and related syndromes. *J Neurosci.* 2012;32(25):8663-8677.
- [30] Kögler G, Callejas J, Sorg RV, et al. The effect of different thawing methods, growth factor combinations and media on the ex vivo expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21(3):233-241.