

S100A4促进脑源性神经营养因子表达影响神经干细胞的分化

杜晓文¹, 林大鹏², 屠冠军¹ (¹中国医科大学附属第一医院骨科, 辽宁省沈阳市 110001; ²锦州医科大学附属第一医院骨科, 辽宁省锦州市 121001)

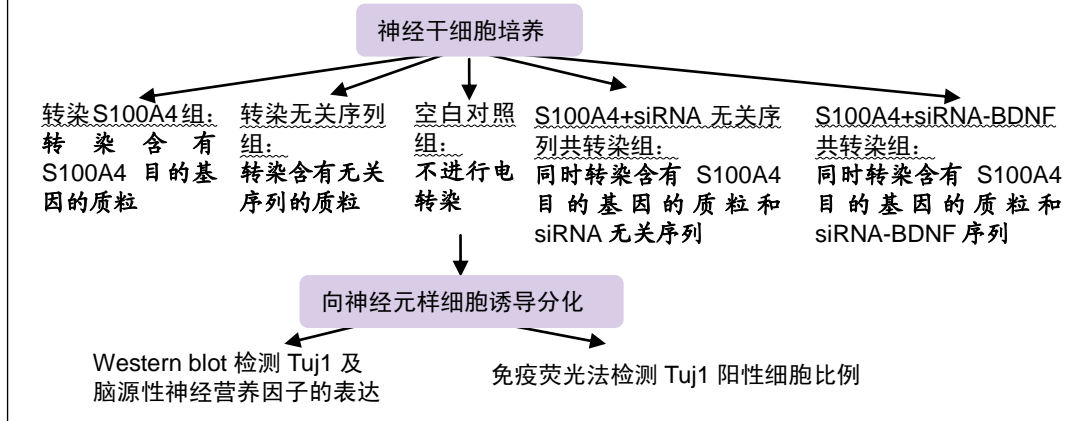
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2076

ORCID: 0000-0002-1131-3497(杜晓文)

文章快速阅读:

文章特点一

- (1) 实验将钙离子结合蛋白 S100A4 转染于神经干细胞中, 进而增加神经干细胞向神经元样细胞分化的比例, 以此探究神经干细胞治疗脊髓损伤的新方法;
- (2) 由于神经干细胞悬浮生长, 常规转染方法往往存在转染效率不高或是价格昂贵的缺点, 实验采用电穿孔法为神经干细胞转染质粒, 探导最佳转染条件并将此结果应用于后续实验之中。



杜晓文, 男, 1992年生, 山东省莱州市人, 汉族, 中国医科大学在读硕士, 主要从事神经干细胞治疗脊髓损伤的研究。

通讯作者: 屠冠军, 博士, 教授, 主任医师, 中国医科大学附属第一医院骨科, 辽宁省沈阳市 110001

文献标识码: B

投稿日期: 2019-09-16

送审日期: 2019-09-18

采用日期: 2019-10-19

在线日期: 2020-03-10



文题释义:

神经干细胞电穿孔: 即通过高强度的电场作用, 瞬时提高细胞膜的通透性, 从而吸收周围介质中外源分子的方法进行转染, 通过研究发现在 230 V、350 μF 条件进行电转染效率较高, 可以在后续实验中采用。

神经干细胞成神经诱导分化: 神经干细胞是一类多能干细胞, 可以向神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞分化。脊髓损伤部位常常表现为瘢痕愈合, 难以恢复脊髓的正常生理功能, 通过提高神经干细胞向神经元分化的比例, 尽可能减少其向胶质细胞分化, 进而减少损伤部位瘢痕的形成, 对于治疗脊髓损伤、恢复脊髓生理功能具有重要的临床意义。

摘要

背景: 如何促进神经干细胞大量向神经元分化是研究的难点。研究发现, S100A4 蛋白可能通过多种途径在中枢神经系统修复中发挥作用。

目的: 研究 S100A4 是否通过上调脑源性神经营养因子表达进而影响神经干细胞向神经元样细胞的分化。

方法: 购买鉴定合格的小鼠胚胎大脑海马和室管膜下区来源的神经干细胞, 体外培养传代, 电穿孔法向神经干细胞中转染 S100A4 表达载体和/或脑源性神经营养因子 siRNA, 转染 48 h 后向神经元方向诱导分化, 诱导分化 3 d 后采用 Western blot 检测细胞中脑源性神经营养因子及 Tuj1 蛋白表达, 免疫荧光检测 Tuj1 阳性神经元比例。

结果与结论: ①与转染无关序列质粒组比较, 转染 S100A4 组神经干细胞中 Tuj1 阳性细胞比例及相应的 Tuj1、脑源性神经营养因子的表达量显著增高($P < 0.01$); ②与 S100A4+siRNA 无关序列共转染组比较, S100A4+脑源性神经营养因子 siRNA 共转染组神经干细胞中 Tuj1 阳性细胞比例及相应的 Tuj1、脑源性神经生长因子的表达量显著降低($P < 0.01$); ③结果表明, S100A4 的过表达可促进神经干细胞向神经元样细胞分化, 其可能通过脑源性神经营养因子发挥作用。

关键词:

脊髓损伤; S100A4; 神经干细胞; 电穿孔; 神经元; 细胞分化; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R459.9; R394.2; R683.2

基金资助:

辽宁省自然科学基金指导计划项目(201602857), 项目负责人: 屠冠军

缩略语:

脑源性神经营养因子: brain-derived neurotrophic factor, BDNF

Du Xiaowen, Master candidate, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Corresponding author: Tu Guanjun, MD, Professor, Chief physician, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

S100A4 promotes differentiation of neural stem cells through up-regulation of brain-derived neurotrophic factor

Du Xiaowen¹, Lin Dapeng², Tu Guanjun¹ (¹Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; ²Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: How to promote neural stem cells differentiate into neurons is a difficulty. S100A4 has been found to play a role in the nervous system repair by various pathways.

OBJECTIVE: To investigate whether S100A4 affects the differentiation of neural stem cells into neurons through up-regulating the expression of brain-derived neurotrophic factor.

METHODS: The neural stem cells from brain hippocampus and subependymal region of embryonic mice were cultured *in vitro* and passaged. The S100A4 expression vector and/or brain-derived neurotrophic factor + siRNA were transfected into neural stem cells by electroporation, and the cells were induced to differentiate into neurons at 48 hours after transfection. Three days later, the expression levels of brain-derived neurotrophic factor and Tuj1 in cells were detected by western blot assay. Proportion of Tuj1 positive neurons was tested by immunofluorescence.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the unrelated sequence plasmid group, the proportion of Tuj1 positive neurons and the expression levels of Tuj1 and brain-derived neurotrophic factor in the S100A4 transfection group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the S100A4+siRNA unrelated sequence plasmid group, the proportion of Tuj1 positive neurons and the expression levels of Tuj1 and brain-derived neurotrophic factor in the co-transfection group were significantly decreased ($P < 0.01$). These results indicate that S100A4 overexpression can promote the differentiation of neural stem cells into neurons, which may be mediated by brain-derived neurotrophic factor.

Key words: spinal cord injury; S100A4; neural stem cells; electroporation; neurons; cell differentiation; brain-derived neurotrophic factor

Funding: the Guidance Program of the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 201602857 (to TGJ)

0 引言 Introduction

脊髓损伤是一类中枢神经系统严重的致残性疾病, 常由创伤引起, 导致损伤平面以下出现运动、感觉等功能障碍, 外科治疗和康复对于减轻症状作用有限, 并不能实质性诱导神经再生及功能恢复。大量研究证实: 成人中枢神经系统中存在神经干细胞^[1], 它是一类多能细胞, 常见于海马区和侧脑室室下区, 具有分化成神经元、少突胶质细胞和星形细胞的潜能, 利用神经干细胞治疗脊髓损伤将是一个重要的研究方向; 然而, 神经干细胞移植后存在神经元分化比例较低、无法修复受损组织等情况, 如何促进神经干细胞大量的向神经元样细胞分化是研究的难点。

S100A4是一种小分子的钙离子结合蛋白^[2], 可参与细胞增殖、分化、转移与凋亡。S100A4最初是作为肿瘤转移促进因子用来研究其与肿瘤发生的关系, 近来, 人们发现细胞内和细胞外S100A4蛋白共同作用可能通过多种途径在中枢神经系统修复中发挥作用——S100A4的过表达可以显著促进螺旋神经节神经元中生长相关蛋白GAP43的表达^[3], 沉默S100A4可下调小鼠视网膜中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达^[4]。既然S100A4可以促进神经元生长蛋白的表达, 也可以影响BDNF的表达, 而BDNF是促进神经元分化的重要因子^[5], 作者推测S100A4促进BDNF的表达进而促进神经干细胞向神经元样细胞分化。该实验应用电穿孔法转染S100A4表达载体, 观察S100A4对神经干细胞向神经元样细胞分化的影响及初步机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 完全随机体外细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年3月至2019年5月在中国医科大学科学实验中心完成。

1.3 材料 神经干细胞购买于广州赛业生物科技有限公

司(货号: MUBNF -90011), 取自孕龄12.5 d的C57BL/6小鼠胚胎大脑海马和室管膜下区。

实验试剂及仪器: DMEM/F12(1:1)培养液(Hyclone公司); Neurobasal™ Medium(Gibco公司); B27(Gibco公司); 碱性成纤维细胞生长因子/表皮生长因子(Invitrogen公司); L-谷氨酰胺(Sigma公司); Matrigel基质胶(康宁); 过表达质粒(上海吉凯基因化学技术有限公司); siRNA(GAACTA CCC AAT CGT ATG T^[6])(苏州吉玛基因股份有限公司); Gene Pulser 电穿孔缓冲液(Bio-Rad公司); S100A4/BDNF/Tuj1/ β -actin抗体(Proteintech公司); Gene Pulser Xcell™电穿孔系统/Western-blot系统(Bio-Rad公司); 荧光显微镜(Olympus公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 神经干细胞培养基的配制 ①神经干细胞增殖培养基: DMEM/F12(1:1)培养液、20 μ g/L碱性成纤维细胞生长因子、20 μ g/L表皮生长因子、2% B27和2 mmol/L谷氨酰胺; ②神经干细胞分化培养基: Neurobasal™ Medium、2%B27和2 mmol/L谷氨酰胺。

1.4.2 神经干细胞培养 从液氮中取出冻存细胞, 立即将冻存管放入37 °C温水中快速晃动, 待冻存管内含物完全融化后取出, 将细胞悬液加入装有9 mL预热至37 °C的神经干细胞完全培养基的离心管中, 250 \times g离心5 min, 弃上清液, 向细胞沉淀物中加入1 mL神经干细胞完全培养基, 轻轻吹打, 随后按照 $(1.0-2.0)\times 10^8 L^{-1}$ 的细胞浓度接种于细胞培养瓶中, 加入足量的培养基, 放置于37 °C、体积分数为5%CO₂、饱和湿度的培养箱中进行培养, 复苏第2天后换液; 当神经干细胞形成较大神经球、神经球中央透光性较差, 且部分神经球出现贴壁生长时进行传代。收集细胞悬液, 140 \times g离心4 min, 弃上清液, 向细胞沉淀物中加入1 mL神经干细胞完全培养基, 轻轻吹打, 按照 $(1.0-2.0)\times 10^8 L^{-1}$ 的细胞浓度接种于细胞培养瓶继续培养。

神经干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	小鼠胎鼠大脑海马和室管膜下区
原代培养方法:	悬浮培养方法
基础培养基:	DMEM/F12 培养基
添加材料:	20 µg/L 碱性成纤维细胞生长因子、20 µg/L 表皮生长因子、2%B27 和 2 mmol/L 谷氨酰胺
原代培养时间:	原代细胞培养第 2 天换液 1 次, 培养第 3 天可以传代
细胞传代:	当神经干细胞出现神经球较大或部分神经球出现贴壁分化时需立即传代, 实验使用 8 代以内的神经干细胞
细胞鉴定:	实验所用细胞购自于广州赛业生物科技有限公司, 公司已提供鉴定合格证明

1.4.3 神经干细胞电转染 收集3-8代神经干细胞, 140×g离心4 min, 弃上清液, 加入1 mL电穿孔缓冲液, 轻轻吹打, 调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 转染质粒时, 每毫升加入20 µg质粒; 转染siRNA时, 每毫升加入1 µg siRNA, 轻轻混匀; 吸取500 µL混合液, 加入到0.4 cm电击杯中, 将电击杯放入Gene Pulser Xcell™电穿孔系统, 按照230 V、350 µF条件进行电转染。S100A4表达载体转染效率验证的分组: ①转染S100A4组: 转染含有S100A4基因的质粒; ②转染无关序列质粒组: 转染相对应的无关序列质粒。siRNA-BDNF干扰效率验证的分组: ①转染siRNA-BDNF组: 转染抑制BDNF表达的小干扰RNA序列; ②转染siRNA无关序列组: 转染相对应的无关siRNA序列。转染后48 h检测相关指标, 实验重复3次。

1.4.4 神经干细胞向神经元诱导分化 实验分为5组: ①转染S100A4组: 转染含有S100A4基因的质粒; ②转染无关序列组: 转染含有无关序列的质粒; ③空白对照组: 不进行电转染; ④S100A4+siRNA无关序列共转染组: 同时转染含有S100A4基因的质粒和siRNA无关序列; ⑤S100A4+siRNA-BDNF共转染组: 同时转染含有S100A4基因的质粒和siRNA-BDNF序列。电转染后将5组细胞按照 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于预先用Matrigel基质胶包被好的3.5 cm细胞培养皿中(内含2 mL神经干细胞增殖培养基), 接种后第2天将培养基更换为神经干细胞分化培养基, 第3天进行换液, 第5天(即分化后第3天)进行相关指标检测, 实验重复3次。

1.5 主要观察指标

1.5.1 S100A4表达载体转染效率、siRNA-BDNF干扰效率 转染后48 h利用荧光显微镜观察细胞内绿色荧光的表达, 了解S100A4表达载体转染情况。采用Western blot实验检测S100A4和BDNF的表达。各组细胞于不同的离心管内做好对应标记, 加入蛋白裂解液, 冰上裂解30 min后, 4 °C、12 000×g离心20 min收集上清液, 测算蛋白浓度, 然后进行电泳、转膜、封闭以及抗体孵育实验, 最后对PVDF膜利用ECL发光法进行发光成像。采用ImageJ及GraphPad prism软件进行定量分析, 蛋白表达水平的参考值为目的蛋白条带灰度与GAPDH条带灰度的比值。

1.5.2 Western blot实验BDNF、Tuj1蛋白表达 诱导分化

后3 d, 按上述方法采用Western blot实验检测BDNF、Tuj1蛋白表达。

1.5.3 免疫荧光检测Tuj1的表达 诱导分化后3 d, 采用免疫荧光检测神经元特异性标志物Tuj1的表达, 收集各组培养皿内带有细胞的盖玻片于6孔板不同孔中并做好对应标记, 然后进行细胞固定、细胞透化、封闭、抗体孵育、DAPI染色以及封固, 最后于荧光显微镜下观察计数Tuj1阳性细胞比例。

1.6 统计学分析 利用GraphPad prism7.0软件进行相关数据分析, 组间比较采用t 检验、方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, 每组实验重复3次。

2 结果 Results

2.1 电转染相关结果

2.1.1 电转染质粒结果 通过荧光显微镜观察, 转染S100A4组大部分细胞球带绿色荧光, 通过Western blot法检测转染S100A4组S100A4的蛋白表达量明显高于转染无关序列组($P < 0.01$), 见图1; 证明质粒在该电转条件下转染成功, 且可使细胞过表达S100A4。

2.1.2 电转染siRNA结果 通过Western blot检测转染siRNA-BDNF组BDNF表达量显著低于转染siRNA无关序列组($P < 0.01$), 见图2; 证明siRNA在该电转条件下转染成功, 且可使细胞中BDNF表达降低。

2.2 转染S100A4表达载体对神经干细胞向神经元样细胞分化的影响 转染S100A4组Tuj1、BDNF蛋白的表达量显著高于转染无关序列组及空白对照组($P < 0.01$), 转染无关序列组及空白对照组Tuj1、BDNF蛋白的表达量基本相同, 见图3; 免疫荧光法检测Tuj1阳性神经元所占比例, 结果显示转染S100A4组Tuj1阳性神经元所占比例显著大于转染无关序列组及空白对照组($P < 0.01$), 见图4, 说明S100A4过表达可促进神经干细胞向神经元样细胞分化, 在分化过程中BDNF表达显著增高。

2.3 BDNF对S100A4诱导神经干细胞分化的影响 S100A4+siRNA-BDNF共转染组Tuj1、BDNF的表达量较S100A4+siRNA无关序列共转染组显著降低($P < 0.01$), 见图5; 免疫荧光检测结果显示, S100A4+siRNA-BDNF共转染组Tuj1阳性细胞比例显著低于S100A4+siRNA无关序列共转染组($P < 0.01$), 见图6, 说明BDNF表达降低可使S100A4诱导的神经干细胞分化能力降低。

3 讨论 Discussion

脊髓损伤的病因大致可分为创伤性及非创伤性损伤, 原发性及继发性损伤是脊髓损伤的重要病理生理过程; 脊髓损伤后炎症因子的释放、局部缺血等微环境改变, 轻则导致神经元的增殖受到抑制, 重则导致神经元的凋亡^[7-13]。脊髓损伤的治疗也因此成为研究的热点与难点, 外科治疗和康复疗法对于减轻症状作用有限, 并不能实质性诱导神经再生及功能恢复, 以细胞为基础促进神经再生的治疗方法已成为脊髓损伤治疗有前景的策略。在干细胞治疗脊髓损伤中常用的细胞有神经干细胞、骨髓间充质干细胞等。

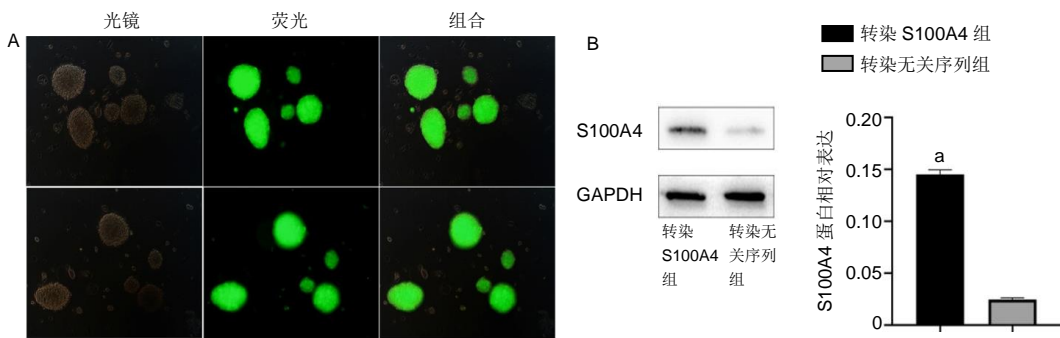
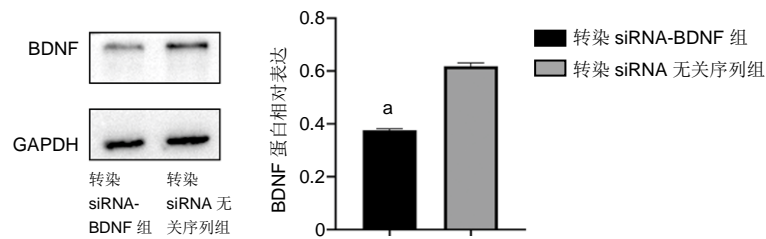


图1 S100A4 表达载体转染效率的验证

Figure 1 Identification of transfection efficiency of S100A4 expression vector



图注: 转染抑制 BDNF 表达的小干扰 RNA 序列 48 h 后, 进行 Western blot 实验验证 BDNF 干扰效率, 转染 siRNA-BDNF 组 BDNF 表达量低于转染 siRNA 无关序列组 ($P < 0.01$), 可以进行下一步实验。BDNF: 脑源性神经营养因子

图2 siRNA-BDNF 干扰效率的验证

Figure 2 Identification of interference efficiency of siRNA-BDNF

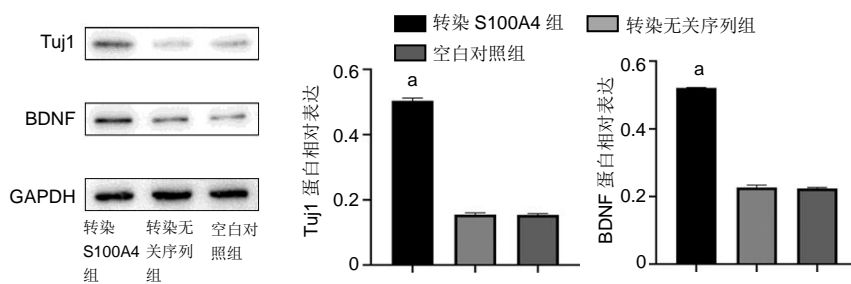
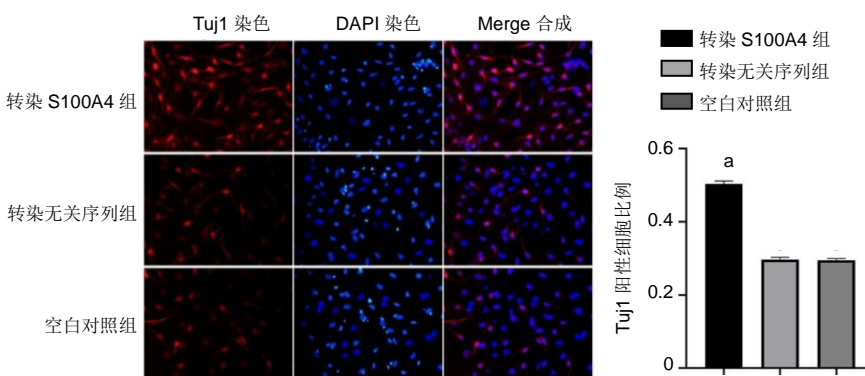


图3 Western blot 检测神经干细胞转染 S100A4 表达载体后 Tuj1、BDNF 蛋白的表达

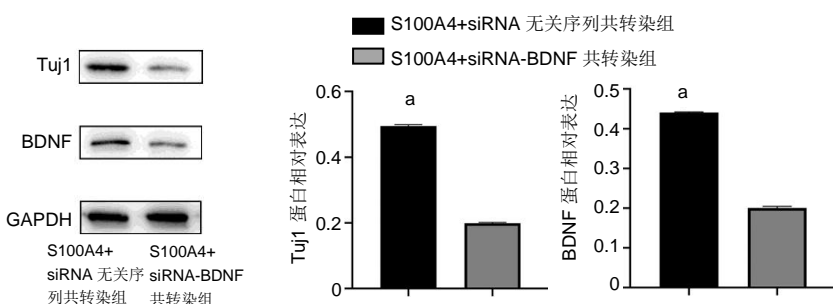
Figure 3 Expression of Tuj1 and BDNF after S100A4 expression vector transfected into neural stem cells detected by western blot assay



图注: 3 组进行成神经诱导分化第 3 天收集细胞进行免疫荧光实验($\times 400$), 转染 S100A4 组神经元特异性标志物 Tuj1 阳性细胞比例明显高于转染无关序列组及空白对照组 ($P < 0.01$)

图4 免疫荧光检测神经干细胞转染 S100A4 表达载体后 Tuj1 蛋白的表达

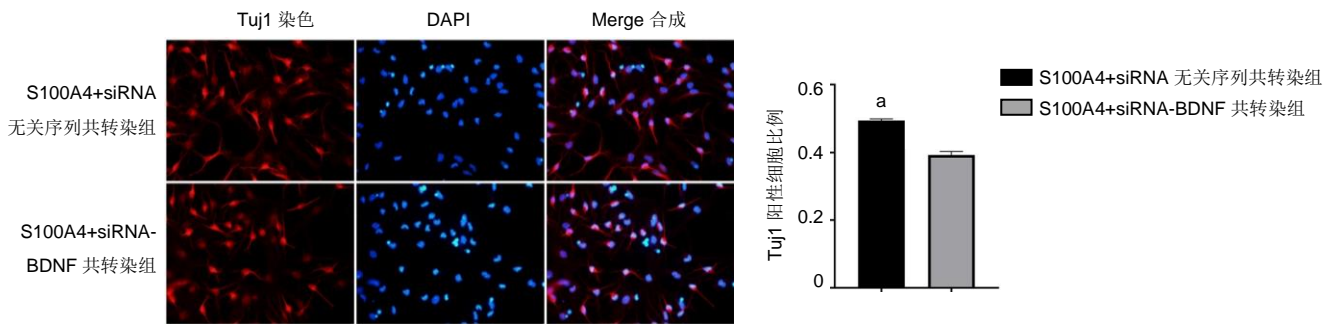
Figure 4 Expression of Tuj1 in neural stem cells after transfected with S100A4 expression vector detected by immunofluorescence



图注: 成神经诱导分化第 3 天收集细胞进行 Western blot 实验, S100A4+siRNA 无关序列共转染组 BDNF、Tuj1 的表达明显高于 S100A4+siRNA-BDNF 共转染组 ($P < 0.01$)。BDNF: 脑源性神经营养因子

图5 Western blot 检测神经干细胞转染 S100A4 表达载体及 siRNA-BDNF 后 Tuj1、BDNF 蛋白的表达

Figure 5 Expression of Tuj1 and BDNF after S100A4 expression vector and siRNA-BDNF transfected into neural stem cells detected by western blot assay



图注：成神经诱导分化第3天收集细胞进行免疫荧光实验(x400)，S100A4+siRNA 无关序列共转染组神经元特异性标志物 Tuj1 阳性细胞比例高于 S100A4+siRNA-BDNF 共转染组($P < 0.01$)。BDNF：脑源性神经营养因子

图6 免疫荧光检测神经干细胞转染 S100A4 表达载体及 siRNA-BDNF 后 Tuj1 蛋白的表达

Figure 6 Expression of Tuj1 in neural stem cells after transfected with S100A4 expression vector and siRNA-BDNF detected by immunofluorescence

神经干细胞因具有增殖快、自我更新能力较强并且可以迁移到病损部位的特点，已被广泛应用于对阿尔茨海默病、帕金森病、缺血性脑卒中等中枢神经系统疾病的研究中^[14-17]。也有数据显示，脊髓损伤之后神经干细胞增殖能力明显增强，从损伤的脊髓中分离培养得到神经球数量明显增加^[18]。脊髓损伤后1-3 d神经干细胞分裂增殖达峰值，在小鼠脊髓半切模型的中央管周围发现大量BrdU阳性细胞，并迁移到损伤部位^[19]；在外伤性脊髓损伤的脊髓中发现Nestin阳性室管膜细胞显著增加^[20]。同时，国内外众多学者进行大量动物实验发现移植到脊髓损伤部位的神经干细胞可以通过分化作用替代损伤细胞、促进轴突再生，通过神经保护作用减少受损部位组织的坏死，进而促进神经功能的恢复^[21-26]。这些都说明利用神经干细胞治疗脊髓损伤具有美好的前景，然而神经干细胞具有向神经元、星形胶质细胞等细胞分化的潜能，如何诱导神经干细胞在脊髓损伤之后大量向神经元分化，减少其向星形胶质细胞分化的比例，对于减少脊髓损伤后瘢痕的形成，促进损伤后的神经修复具有重大意义。神经干细胞的来源主要分为脊髓源性神经干细胞及脑源性(大脑海马区及侧脑室室下区)神经干细胞^[27]。研究表明，脑源性神经干细胞的增殖能力以及诱导分化向神经元分化的比例明显高于脊髓源性神经干细胞^[28]。因此，该实验选择来源于胚胎小鼠大脑海马区及侧脑室室下区的神经干细胞开展体外细胞实验。

S100A4是钙离子结合蛋白S100家族的一员，可以与相应的靶蛋白结合，进而对肿瘤细胞、多能干细胞的增殖与转移产生重要的影响^[29-32]。在细胞内，S100A4可与细胞骨架蛋白相互作用调节细胞骨架动力学影响细胞运动等，如与转录因子等相互作用或通过其他机制调控下游基因表达，影响细胞增殖等多种生物学特性^[2]；同时，对于S100A4的研究大多数是其与肿瘤发生、发展及转移的联系，细胞内的S100A4浓度可以直接影响乳腺癌细胞的迁移能力^[33]；研究证实，S100A4的相关转录产物可以作为卵巢癌的活检标志物^[34]。近年来人们发现了S100A4在神经系统中的作用：在大鼠完整中枢神经系统白质的星形细胞和髓鞘中有大量S100A4表达^[35]；啮齿类外伤性脑损伤可使白质星形细胞中S100A4表达显著增加^[36-37]；S100A4寡聚体刺激培养

的海马神经元，可促进轴突生长^[38]；S100A4过表达的许旺细胞与螺旋神经节神经元共培养，可以显著增加螺旋神经节神经元中生长相关蛋白GAP43的表达^[3]，后者是一种可促进轴突再生的生长锥蛋白；也有报道显示沉默S100A4可下调小鼠视网膜中BDNF表达^[4]。

BDNF作为体内重要的营养因子，可以在日常学习、运动、记忆等活动中发挥重要作用^[39-40]；同时BDNF可以在中枢神经系统、内分泌系统发挥重要作用，如促进神经元的存活、分化以及突触的生长^[5]，预防控制2型糖尿病的发生与发展^[41-42]。

该实验利用小鼠胚胎大脑海马区来源的神经干细胞进行体外培养，电转染含有目的基因S100A4的质粒，随后进行诱导分化，结果发现S100A4的过表达能够促进神经干细胞向神经元样细胞分化；在分化增强的同时，BDNF的表达量也随之增加；于是，细胞在过表达S100A4的同时转染siRNA-BDNF质粒抑制BDNF的表达，结果发现神经元所占比例显著降低。实验结果提示S100A4的过表达可促进神经干细胞向神经元样细胞分化，其可能通过BDNF发挥作用。

该实验发现了S100A4在神经干细胞向神经元样细胞分化过程中的作用及其发挥作用的关键蛋白，后期计划将S100A4表达载体注入小鼠脊髓损伤部位，观察神经干细胞、神经元的数量以及轴突生长、胶质瘢痕形成等情况，最后观察小鼠神经功能恢复情况，另外还计划研究S100A4在体外保护神经元免受脊髓损伤后不利微环境的影响，充分认识S100A4在脊髓损伤治疗中的作用，进而发现治疗脊髓损伤新的、重要的靶点。

致谢：感谢中国医科大学附属第一医院骨科屠冠军教授提供的支持与帮助。

作者贡献：实验设计由通讯作者及第一作者完成，实验实施由第一、二作者完成，均接受正规培训。

经费支持：该文章接受了“辽宁省自然科学基金指导计划项目(201602857)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：神经干细胞购于广州赛业生物科技有限公司(货号：MUBNF-90011)，研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计声明: 文章统计分析由Graphpad Prism 7 软件完成, 并经过通讯作者审核。

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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容进行编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] ZHENG W, ZHUGE Q, ZHONG M, et al. Neurogenesis in adult human brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2013;30(22):1872-1880.
- [2] BOYE K, MAELANDSMO GM. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am J Pathol*. 2010;176(2):528-535.
- [3] LEI L, TANG L. Schwann cells genetically modified to express S100A4 increases GAP43 expression in spinal ganglion neurons in vitro. *Bioengineered*. 2017;8(4):404-410.
- [4] CHENG G, HE T, XING Y. Silencing of S100A4, a metastasis-associated protein, inhibits retinal neovascularization via the downregulation of BDNF in oxygen-induced ischaemic retinopathy. *Eye (Lond)*. 2016;30(6):877-887.
- [5] CHMIELNICKI E, BENRAISS A, ECONOMIDES AN, et al. Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci*. 2004;24(9):2133-2142.
- [6] COULL JA, BEGGS S, BOUDREAU D, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005;438(7070):1017-1021.
- [7] 方康权, 曾宪辉. 脊髓损伤的生物化学研究概况[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(18):2723-2724, 2727.
- [8] 黄辉. 继发性脊髓损伤发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(7):1162-1165.
- [9] 张盼, 赵红卫, 卢斌, 等. 继发性脊髓损伤微环境的研究进展[J]. 海南医学, 2018, 29(19):2774-2777.
- [10] ECKERT MJ, MARTIN MJ. Trauma: Spinal Cord Injury. *Surg Clin North Am*. 2017;97(5):1031-1045.
- [11] BADHIWALA JH, WILSON JR, FEHLINGS MG. Global burden of traumatic brain and spinal cord injury. *Lancet Neurol*. 2019;18(1):24-25.
- [12] SABAPATHY V, THARION G, KUMAR S. Cell Therapy Augments Functional Recovery Subsequent to Spinal Cord Injury under Experimental Conditions. *Stem Cells Int*. 2015;2015:132172.
- [13] WITIW CD, FEHLINGS MG. Acute Spinal Cord Injury. *J Spinal Disord Tech*. 2015;28(6):202-210.
- [14] DOOLEY D, VIDAL P, HENDRIX S. Immunopharmacological intervention for successful neural stem cell therapy: New perspectives in CNS neurogenesis and repair. *Pharmacol Ther*. 2014;141(1):21-31.
- [15] TUSZYNSKI MH, WANG Y, GRAHAM L, et al. Neural stem cell dissemination after grafting to CNS injury sites. *Cell*. 2014;156(3):388-389.
- [16] LUDWIG PE, THANKAM FG, PATIL AA, et al. Brain injury and neural stem cells. *Neural Regen Res*. 2018;13(1):7-18.
- [17] ORMOND DR, SHANNON C, OPPENHEIM J, et al. Stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury. *PLoS One*. 2014;9(2):e88916.
- [18] MARIANO ED, BATISTA CM, BARBOSA BJ, et al. Current perspectives in stem cell therapy for spinal cord repair in humans: a review of work from the past 10 years. *Arq Neuropsiquiatr*. 2014;72(6):451-456.
- [19] HORKY LL, GALIMI F, GAGE FH, et al. Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J Comp Neurol*. 2006;498(4):525-538.
- [20] CAWSEY T, DUFLOU J, WEICKERT CS, et al. Nestin-Positive Ependymal Cells Are Increased in the Human Spinal Cord after Traumatic Central Nervous System Injury. *J Neurotrauma*. 2015;32(18):1393-1402.
- [21] KADROYA K, LU P, NGUYEN K, et al. Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. *Nat Med*. 2016;22(5):479-487.
- [22] GARBOSSA D, BOIDO M, FONTANELLA M, et al. Recent therapeutic strategies for spinal cord injury treatment: possible role of stem cells. *Neurosurg Rev*. 2012;35(3):293-311.
- [23] VAWDA R, WILCOX J, FEHLINGS M. Current stem cell treatments for spinal cord injury. *Indian J Orthop*. 2012;46(1):10-18.
- [24] ZHANG SQ, WU MF, PENG CG, et al. Improvements in neuroelectrophysiological and rear limb functions in rats with spinal cord injury after Schwann cell transplantation in combination with a C5a receptor antagonist. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):15158-15168.
- [25] WANG D, ZHANG J. Effects of hypothermia combined with neural stem cell transplantation on recovery of neurological function in rats with spinal cord injury. *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1759-1767.
- [26] DU XJ, CHEN YX, ZHENG ZC, et al. Neural stem cell transplantation inhibits glial cell proliferation and P2X receptor-mediated neuropathic pain in spinal cord injury rats. *Neural Regen Res*. 2019;14(5):876-885.
- [27] LEONG C, ZHAI D, KIM B, et al. Neural stem cell isolation from the whole mouse brain using the novel FABP7-binding fluorescent dye, CDr3. *Stem Cell Res*. 2013;11(3):1314-1322.
- [28] 陈刚, 秦尚振, 马康亭, 等. 人胚胎与脊髓神经干细胞体外生物学特性的差异[J]. 脑与神经疾病杂志, 2006, 14(3):183-186.
- [29] HUANG H, ZHENG HY, LIU ZL, et al. Prognostic significance of relaxin-2 and S100A4 expression in osteosarcoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(19):2828-2834.
- [30] LI HJ, CHEN YX, WANG Q, et al. S100A4 mRNA as a prognostic marker and therapeutic target in Wilms tumor (WT). *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(6):817-827.
- [31] TARABYKINA S, GRIFFITHS TR, TULCHINSKY E, et al. Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7(3):217-228.
- [32] XU X, SU B, XIE C, et al. Sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway regulates the epithelial mesenchymal transition (EMT) by mediating a new target gene, S100A4, in pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(7):e96441.
- [33] KHAN MI, YUAN T, CHOU RH, et al. S100A4 inhibits cell proliferation by interfering with the S100A1-RAGE V domain. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212299.
- [34] LINK T, KUHLMANN JD, KOBELT D, et al. Clinical relevance of circulating MACC1 and S100A4 transcripts for ovarian cancer. *Mol Oncol*. 2019;13(5):1268-1279.
- [35] ABERG F, KOZLOVA EN. Metastasis-associated mts1 (S100A4) protein in the developing and adult central nervous system. *J Comp Neurol*. 2000;424(2):269-282.
- [36] KOBORI N, CLIFTON GL, DASH P. Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002;104(2):148-158.
- [37] KOZLOVA EN, LUKANIDIN E. Mts1 protein expression in the central nervous system after injury. *Glia*. 2002;37(4):337-348.
- [38] NOVITSKAYA V, GRIGORIAN M, KRIAJEVSKA M, et al. Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 2000;275(52):41278-41286.
- [39] EYILETEN C, KAPLON-CIESLICKA A, MIROWSKA-GUZEL D, et al. Antidiabetic Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Association with Inflammation in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2017;2017:2823671.
- [40] WURZELMANN M, ROMEIKA J, SUN D. Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural Regen Res*. 2017;12(1):7-12.
- [41] 李小花, 冷锦红. 脑源性神经营养因子对糖尿病能量代谢及神经病变的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2019, 27(8):629-631.
- [42] MAROSI K, MATTSON MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(2):89-98.