

· 基础研究 ·

重复磁刺激对体外培养大鼠神经干细胞增殖作用的影响

柳华 韩肖华 陈红 黄晓琳

【摘要】目的 探讨重复磁刺激(rMS)对体外培养大鼠神经干细胞(NSCs)增殖的作用机制。**方法** 取新生 3 天内的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠乳鼠双侧海马组织培养 NSCs, 通过 cck-8 试剂盒检测第 2 代 NSCs 的 OD 值绘制生长曲线图。再将第 2 代 NSCs 分为空白对照组和 rMS 组, rMS 组刺激参数为频率 10 Hz, 50% 最大输出强度, 每天 200 个脉冲, 连续刺激 3 d。于 rMS 组最后 1 次干预 1 h 后收集 2 组细胞, 采用 cck-8 试剂盒检测其细胞增殖效应, 同时用免疫印迹法检测 c-fos 蛋白和环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(p-CREB)的表达量。**结果** 第 2 代神经球巢蛋白(nestin)免疫荧光染色证实为 NSCs, 生长曲线提示培养第 3 天时 NSCs 活性最佳。rMS 干预后, rMS 组 cck-8 的 OD 值为 (0.309 ± 0.043) , 与空白对照组的 (0.256 ± 0.043) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); rMS 干预后, rMS 组的 c-fos 和 p-CREB 蛋白相对表达量分别与空白对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 频率 10 Hz 的 rMS 可促进 NSCs 的增殖, 其作用机制可能与 p-CREB 和 c-fos 蛋白表达的增加有关。

【关键词】 重复磁刺激; 大鼠; 神经干细胞; 细胞增殖

The proliferation effect of rMS on neural stem cells of rats in vitro Liu Hua, Han Xiaohua, Chen Hong, Huang Xiaolin. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Huang Xiaolin, Email: xiaolin2006@126.com

【Abstract】Objective To study the mechanism of rats' neural stem cells (NSCs) proliferation in vitro after repetitive magnetic stimulation (rMS). **Methods** The bilateral hippocampus of neonatal Sprague-Dawley rats (< 3 d) was taken out to culture NSCs in vitro. The OD value was evaluated with Cell Counting Kit-8 (cck-8) and cell growth curve was generated. The NSCs cultured were divided into a control group and an rMS group. rMS (3 days, once per day) was applied on p2 NSCs at 10 Hz, 50% machine output and 200 pulses per day. One hour after the last rMS, the cck-8 was used to test the cell proliferation, and the western blotting was applied to detect the protein expression of c-fos and p-CREB. **Results** The nestin fluorescent staining of p2 neurospheres was proved to be neural stem cells. The growth curve indicated that their viability reached the peak on the third day. The OD value in the rMS group (0.309 ± 0.043) showed a significant difference ($P < 0.05$) after rMS compared with the control group (0.256 ± 0.043). So did the c-fos and p-CREB protein expression between the two groups ($P < 0.01$). **Conclusion** The rMS at 10 Hz can promote rats' NSCs proliferation in vitro, which may be related to the increased expression of p-CREB and c-fos after rMS.

【Key words】 Repetitive magnetic stimulation; Rats; Neural stem cells; Cell proliferation

重复经颅磁刺激 (repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS) 是一种无创伤性的神经刺激技术, 其原理是通过特定的磁场穿透头骨从而影响大脑皮质的兴奋性。临床实验发现, rTMS 具有减轻抑郁症状^[1]、镇痛^[2]、改善患者运动和认知功能等作用^[3], 但其机制尚不清楚。有研究指出, 这些效应可能与磁场^[4]、长时程增强 (long-term potentiation, LTP)、长时程

抑制 (long-term depression, LTD)^[5-7]、神经递质浓度的改变^[8-10]、细胞活性的提高^[11]、神经细胞凋亡的减少^[12] 以及神经再生^[13] 有关。Gao 等^[14] 的研究发现, 高频 rTMS 刺激 (10 Hz) 可促进中脑动脉栓塞模型 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠室管膜下区 (subventricular zone, SVZ) 神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 的增殖, 但其作用机制还有待进一步的研究来阐明。本研究采用重复磁刺激 (repetitive magnetic stimulation, rMS) 干预体外培养的 NSCs, 并对 NSCs 的增殖情况以及 c-fos 和 p-CREB 蛋白的表达情况进行了检测, 以期解释 rTMS 对 NSCs 的增殖作用, 为 rTMS 的临床应用提供理论依据。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.05.002

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81071601, 81171858)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科

通信作者: 黄晓琳, Email: xiaolin2006@126.com

材料和方法

一、实验材料

(一) 实验动物

选取新生 3 d 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠乳鼠, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

(二) 主要仪器和材料

CCY-I 型依瑞德重复磁刺激仪(武汉依瑞德公司), 酶标仪(瑞士 Tecan 公司), CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo Forma 公司), cck-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司), 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, DMEM/F12)(美国 Gibco 公司), B-27[®] Supplement Minus Vitamin A(美国 Invitrogen 公司), 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)(美国 Peprotech 公司), 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(美国 Peprotech 公司), TrypLE[™] Express Enzyme (1×)(美国 Gibco 公司), 多聚赖氨酸(美国 sigma 公司), 小鼠 nestin 抗体(美国 BD 公司), c-fos 抗体(美国 santa cruz 公司), 磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白抗体(phosphorylation response element-binding protein, p-CREB)(美国 santa cruz 公司), 二抗羊抗小鼠异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)(美国 Jakson Immuno Research 公司), β -actin 抗体(武汉博士德公司)。

(三) 主要试剂的配制

1. 生长因子分装: 使用将前 b-FGF 和 EGF 放入高速离心机中 10 000 转 30 s(离心半径 8 cm), 将 100 μ g 的 EGF 和 50 μ g 的 b-FGF 分别用 0.1% 的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶解, 以 2 μ g 分装。保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

2. 100 ml 增殖培养基配置: 取 DMEM/F12 细胞培养基 98 ml, B27 2 ml, b-FGF 2 μ g, EGF 2 μ g 在超净台内配置, 再经 0.22 μ m 过滤器除菌后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存(如存放超过 1 周, 需加入 L-谷氨酰胺, 浓度为 2 mmol/L)。

二、实验方法

1. NSCs 原代培养方法: 将 SD 大鼠乳鼠浸入 75% 乙醇中消毒 30 s, 用眼科剪和镊子取双侧海马组织, 放入预冷的培养基中, 眼科剪剪碎海马组织, 并用 1 ml 枪头吹打至无明显组织块。200 目滤网过滤, 将细胞液移入 15 mL 离心管, 在 4 $^{\circ}$ C 预冷的离心机离心, 离心半径 8 cm, 1000 r/min 离心 5 min, 然后用 200 μ l 枪头重悬细胞。将细胞移入 25 T 玻璃培养瓶, 调整细胞密度为每毫升 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞。置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 环境静置培养, 每 2~3 d 换新鲜培养液, 每 5 d 传代 1 次。

2. 神经干细胞传代培养: 收集细胞, 用胰酶替代物 TrypLE[™] Express 在 37 $^{\circ}$ C 消化 2 min, 离心半径 8 cm, 600 r/min 离心 5 min 后弃上清。加入 200 μ l 细胞培养基, 用 200 μ l 的枪头打若干次, 制成 NSCs 单细胞悬液, 细胞计数板计数后接种于培养瓶悬浮培养密度为每毫升 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞。每 2~3 d 换新鲜培养液, 5 d 传代 1 次。第 2 代 NSCs 开始进行干预。

3. 生长曲线的测定: 在 96 孔板中将第 2 代 NSCs 细胞悬液连续接种 7 d, 每孔 100 μ l (2000 个细胞), 然后放入培养箱预培养, 向每孔加入 10 μ l 的 cck-8 溶液, 培养箱内孵育 3 h 后, 采用酶标仪测定, 于 450 nm 处测量吸光度(optical density, OD)。

4. 实验分组: 将第 2 代的 NSCs 置于培养瓶和培养皿内培养, 随机分为 rMS 组(给予 rMS 刺激)和空白对照组(不给予 rMS 刺激)。

5. 干预方法: ①放置位置——将 rMS 组的培养瓶和培养皿平置于“8”字形刺激线圈的交叉中心(图 1), 干预前, 用 200 μ l 枪头轻柔吹打神经球若干次, 使神经球吹散及均匀悬浮于培养基中。②刺激参数——频率 10 Hz, 50% 最大输出强度, 每日 1 次, 每次 200 个脉冲(脉冲个数 50, 重复序列 4 次), 序列刺激间隔时间为 10 s。③干预方法——第 2 代 NSCs 培养 12 h 后开始进行磁刺激, 每隔 24 h 1 次, 连续刺激 3 d。



图 1 细胞培养瓶放置位置

6. 细胞免疫荧光染色方法: 取出冻存的细胞爬片, 放置于 24 孔板内, 用 0.01 M 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)摇床洗涤 3 次, 每次 5 min, 再经 0.1% 的 Triton-X100-PBS 透膜洗涤后, 加正常山羊血清常温封闭 1 h, 然后充分洗涤。一抗孵育过夜, 4 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 16 h 后洗涤 3 次, 每次 5~10 min。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。二抗孵育室温避光孵育 1 h 后洗涤 3 次, 每次 5~10 min。DAPI 染色 50% 甘油封片。采用正置荧光显微镜采集并分析图像, 每张片随机取 5 个视野, 每次至少 3 张片, 重复 3 次。

7. cck-8(cell counting kit-8)测定: 将 2 组细胞分别消化吹打成单细胞悬液, 在细胞计数板中调节细胞

密度,于 96 孔板每孔加入 100 μ L 培养基(含 2000 个细胞),再每孔加入 cck-8 溶液 10 μ L,在细胞培养箱内继续孵育 3 h,采用酶标仪测定,于 450 nm 处测量 OD 值,连续测量 7 d,最后将第 2 代 NSCs cck-8 的 OD 值绘制生长曲线。

8. 免疫印迹法(western blotting)分析:分别提取空白对照组和 rMS 组的蛋白总量。各样品取 50 μ g 总蛋白上样电泳。转膜条件:p-CREB 电流为 200 mA,转膜时间 100 min;c-fos 电流为 200 mA,转膜时间 120 min。用含 5% 脱脂奶粉的洗涤液(tris-buffered saline and tween, TBST)浸泡,室温摇床封闭 2 h。聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜浸泡于一抗孵育液中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(16 h)。一抗稀释(c-fos 稀释比例为 1:200, p-CREB 稀释比例为 1:200)。TBST 充分洗涤后用封闭液稀释相应的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗(稀释比例 1:50 000)孵育 2 h。TBST 充分洗涤后用增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)显色曝光。采用 Gene Genius Bio-Imaging system 凝胶成像仪采集图片, BandScan 软件半定量分析吸光度信号条带。

三、统计学方法

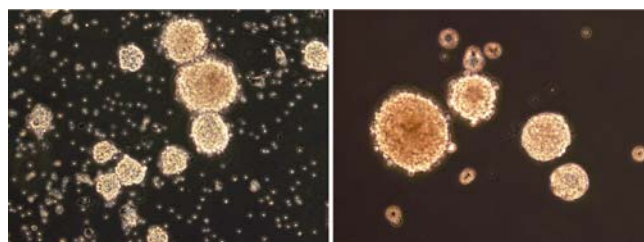
采用 SPSS 17.0 版统计软件包进行统计分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差(analysis of variance,

ANOVA)分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、神经干细胞的培养与鉴定

1. NSCs 的培养:原代培养基于第 2 天即现细胞聚集成球,第 5 天时细胞球体积增大,直径可达到 100 ~ 200 μ m。如图 2 所示,第 2 代神经球培养基背景干净,细胞呈球形,外周细胞折光性好,球体过大的细胞中心则呈现黑色,折光性较差。

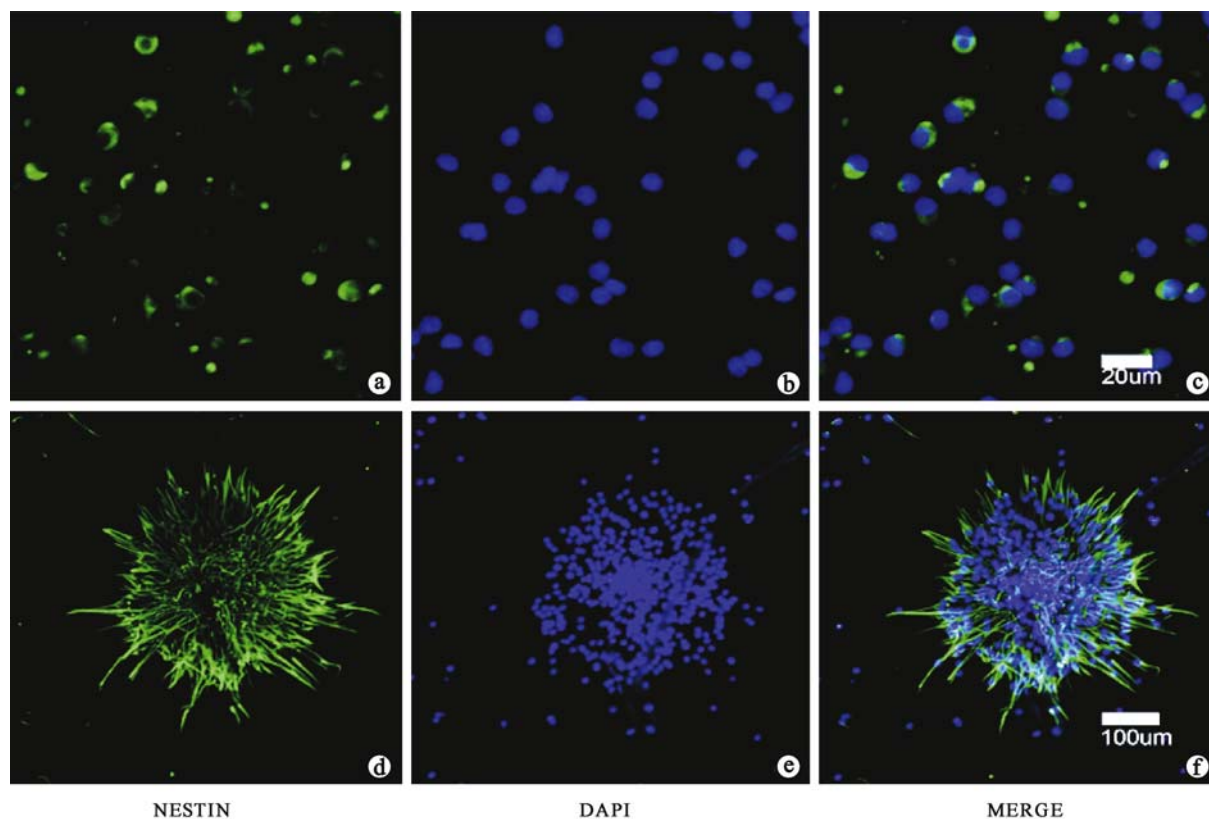


原代第 5 天

第 2 代第 5 天

图 2 光镜下神经干细胞的形态学观察($\times 400$)

2. NSCs 的鉴定:nestin 为神经干细胞的标记物,将第二代神经干细胞单细胞悬液的细胞和神经球爬片进行 nestin 绿色荧光染色和 DAPI 蓝色荧光染色,鉴定结果为该细胞为 NSCs(图 3)。



NESTIN

DAPI

MERGE

注:a、b、c 为神经干细胞单细胞悬液(免疫组化染色, $\times 400$);d、e、f 为神经球(免疫组化染色, $\times 200$),其中绿色荧光代表 nestin,蓝色荧光为 DAPI 染核

图 3 神经干细胞和神经球的 nestin 荧光标记鉴定

二、cck-8 生长曲线

神经干细胞的生长曲线显示培养第 3 天 cck-8 的 OD 值最高,至培养第 5 天和第 7 天呈下降趋势。如图 4 所示。

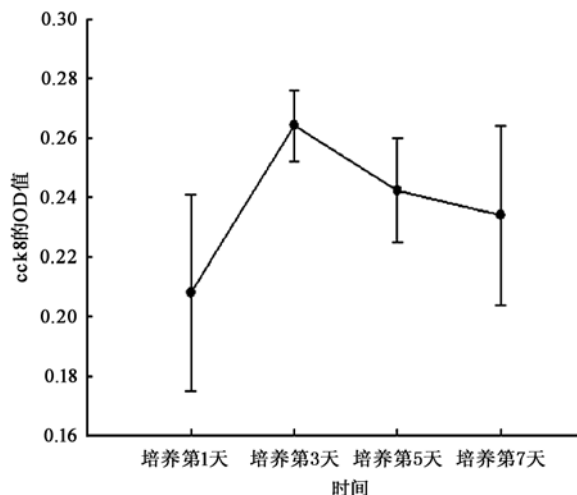


图 4 神经干细胞的生长曲线图

三、cck-8 检测细胞增殖

rMS 干预后, rMS 组 cck-8 的 OD 值为 0.309 ± 0.043 , 与空白对照组的 0.256 ± 0.043 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

四、c-fos 和 p-CREB 的蛋白表达

图 5 所示, rMS 干预后, rMS 组的 c-fos 和 p-CREB 蛋白相对表达量分别为 0.421 ± 0.060 和 0.385 ± 0.089 , 与空白对照组的 0.164 ± 0.044 和 $0.271 \pm$

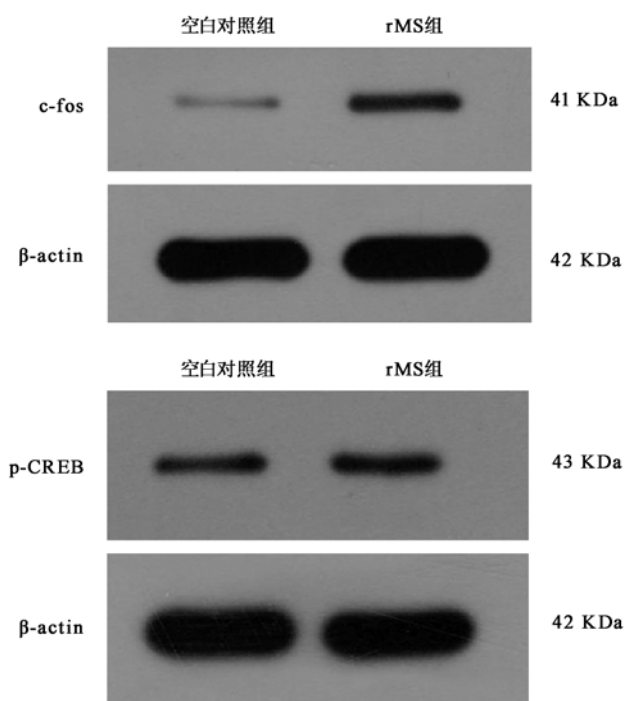


图 5 rMS 组和空白对照组 c-fos 蛋白、p-CREB 蛋白表达情况

0.070 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

讨 论

本研究选取第 2 代第 1 天的单细胞悬液和神经球分别进行 nestin 染色, 证实细胞为神经干细胞 (图 3)。Nestin 作为 NSCs 的标志物可存在于出生前和出生后的 NSCs 中^[15-16]。有研究指出, 悬浮培养下的 NSCs 可形成神经球^[17], 因此本研究采用出生后 < 3 d 的乳鼠大脑双侧海马组织, 用体外悬浮培养的方式培养 NSCs。神经球不仅提供神经源性的环境, 同样也有利于神经元的分化^[15]。传代后的 NSCs 其培养基背景清亮, 可很快聚集或增殖形成新的神经球, 周边可见折光均匀, 边缘明亮锐利的细胞, 还可见细小的棘刺 (图 2), 即表明神经球活跃。

cck-8 为测量细胞活性和增殖的试剂盒, 可间接反映活细胞数量或细胞增殖情况。本研究中, NSCs 生长至第 3 天其 cck-8 的 OD 值最大, 提示细胞活性最好。NSCs cck-8 的 OD 值于生长第 3 天后开始下降, 其原因可能是由于形成的神经球体积的增大影响了 NSCs 生长活性。因此, 本课题组选取连续刺激 3 d 后测定相应指标^[18]。

本研究还发现, 在 10 Hz 高频磁场下 NSCs 的 cck-8 OD 值明显上升, 提示在高频 rMS 磁场可使 NSCs 增殖, 这与本课题组前期在体实验结果一致^[14]。Hellmann 等^[19]的研究发现, 5 Hz 高频的 rMS 体外刺激能促使人骨髓神经母细胞瘤细胞环磷酸腺苷 (cyclic Adenosine monophosphate, cAMP) 的表达, 使其 p-CREB 的表达升高。本研究中也发现, 10 Hz 高频 rMS 可促进体外 NSCs 的 p-CREB 表达。众所周知, 环磷酸腺苷效应元件结合蛋白是一个转录因子, 可磷酸化 serine133 末端, 从而激活 CAMP 反应元件 CRE, 调节成体海马前体细胞的增殖和分化^[20]。有研究指出, p-CREB 还具有促进神经系统的发育和突触可塑性, 保护神经, 改善学习记忆等作用^[21-22]。另外, c-fos 为即早基因, 是 p-CREB 通路靶基因之一, 当外界环境发生变化时, 细胞将快速、短暂表达 c-fos, 然后与 c-Jun、JunB、JunD 蛋白形成转录激活蛋白 AP-1^[23]。在大鼠认知损伤模型中, c-fos 表达量会增高^[24]; rTMS 刺激正常大鼠可使海马组织中 c-fos 蛋白和 mRNA 增加^[25], 且高频刺激的作用优于低频刺激^[26]。本研究结果表明, 10 Hz, 50% 最大输出强度的 rMS 干预, 可促进 c-fos 蛋白的显著表达, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 因此 c-fos 和 CREB 蛋白活化表达的增加可能是 rMS 刺激神经干细胞体外增殖的原因之一。

NSCs 是一类具有分化潜能和自我更新的神经细胞。当发生癫痫、脑外伤、脑缺血以及大脑其他病变

时,静息状态的 NSCs 受到内环境改变会增殖、迁徙并分化成神经细胞来修复受损的组织^[27]。有研究表明,rTMS 可促进脑缺血大鼠颅内 NSCs 增殖^[14]和神经再生^[13]。本实验通过体外刺激 NSCs,进一步排除了 rMS 对其他神经细胞的刺激效应,直接观察了 rMS 对 NSCs 的增殖作用,为 rTMS 治疗神经系统疾病提供了新的思路,并为今后 rTMS 配合药物试验和 NSCs 的移植提供了新的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Pallanti S, Bernardi S, Di Rollo A, et al. Unilateral low frequency versus sequential bilateral repetitive transcranial magnetic stimulation: is simpler better for treatment of resistant depression [J]? *Neuroscience*, 2010, 167(2):323-328.
- [2] Cruccu G, Aziz TZ, Garcia-Larrea L, et al. EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain [J]. *Eur J Neurol*, 2007, 14(9):952-970.
- [3] Bentwich J, Dobronevsky E, Aichenbaum S, et al. Beneficial effect of repetitive transcranial magnetic stimulation combined with cognitive training for the treatment of Alzheimer's disease: a proof of concept study [J]. *J Neural Transm*, 2011, 118(3):463-471.
- [4] Meyer JF, Wolf B, Gross GW. Magnetic stimulation and depression of mammalian networks in primary neuronal cell cultures [J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2009, 56(5):1512-1523.
- [5] Touge T, Gerschlagel W, Brown P, et al. Are the after-effects of low-frequency rTMS on motor cortex excitability due to changes in the efficacy of cortical synapses [J]? *Clin Neurophysiol*, 2001, 112(11):2138-2145.
- [6] Speer AM, Kimbrell TA, Wassermann EM, et al. Opposite effects of high and low frequency rTMS on regional brain activity in depressed patients [J]. *Biol Psychiatry*, 2000, 48(12):1133-1141.
- [7] Gangitano M, Valero-Cabre A, Tormos JM, et al. Modulation of input-output curves by low and high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex [J]. *Clin Neurophysiol*, 2002, 113(8):1249-1257.
- [8] Trippe J, Mix A, Aydin-Abidin S, et al. theta burst and conventional low-frequency rTMS differentially affect GABAergic neurotransmission in the rat cortex [J]. *Exp Brain Res*, 2009, 199(3-4):411-421.
- [9] Poirrier AL, Nyssen Y, Scholtes F, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation improves open field locomotor recovery after low but not high thoracic spinal cord compression-injury in adult rats [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 75(2):253-261.
- [10] Michael N, Gosling M, Reutemann M, et al. Metabolic changes after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) of the left prefrontal cortex: a sham-controlled proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS) study of healthy brain [J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 17(11):2462-2468.
- [11] Post A, Muller MB, Engelmann M, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation in rats: evidence for a neuroprotective effect in vitro and in vivo [J]. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(9):3247-3254.
- [12] Yoon KJ, Lee YT and Han TR. Mechanism of functional recovery after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in the subacute cerebral ischemic rat model: neural plasticity or anti-apoptosis [J]? *Exp Brain Res*, 2011, 214(4):549-556.
- [13] Ueyama E, Ukai S, Ogawa A, et al. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats [J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2011, 65(1):77-81.
- [14] Guo F, Han X, Zhang J, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation via the regulation of MiR-25 in a rat model of focal cerebral ischemia [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e109267.
- [15] Conti L, Cattaneo E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities [J]? *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(3):176-187.
- [16] Mu Y, Lee SW, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2010, 20(4):416-423.
- [17] Doetsch F, Petreanu L, Caille I, et al. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells [J]. *Neuron*, 2002, 36(6):1021-1034.
- [18] Su X, Zheng X, Ni J. Lanthanum citrate induces anoikis of Hela cells [J]. *Cancer Lett*, 2009, 285(2):200-209.
- [19] Hellmann J, Juttner R, Roth C, et al. Repetitive magnetic stimulation of human-derived neuron-like cells activates cAMP-CREB pathway [J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2011, 262(1):87-91.
- [20] Peltier J, O'Neill A, Schaffer DV. PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation [J]. *Dev Neurobiol*, 2007, 67(10):1348-1361.
- [21] Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system [J]. *Neuron*, 2002, 35(4):605-623.
- [22] Dworkin S, Heath JK, deJong-Curtain TA, et al. CREB activity modulates neural cell proliferation, midbrain-hindbrain organization and patterning in zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2007, 307(1):127-141.
- [23] Kubik S, Miyashita T, Guzowski JF. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions [J]. *Learn Mem*, 2007, 14(11):758-770.
- [24] Hausmann A, Weis C, Marksteiner J, et al. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation enhances c-fos in the parietal cortex and hippocampus [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 76(2):355-362.
- [25] Aydin-Abidin S, Trippe J, Funke K, et al. High- and low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation differentially activates c-Fos and zif268 protein expression in the rat brain [J]. *Exp Brain Res*, 2008, 188(2):249-261.
- [26] Sun JJ, Chuang Kung J, Wang CC, et al. Short-term facilitation in the anterior cingulate cortex following stimulation of the medial thalamus in the rat [J]. *Brain Res*, 2006, 1097(1):101-115.
- [27] Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2005, 28:223-250.

(修回日期:2015-02-10)

(本文编辑:阮仕衡)