

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.28.002

## 结肠癌 HCT-116 细胞增殖及细胞周期的影响

张 剑, 吴 敏, 张自森, 王利娟, 张红巧, 师广勇, 巴 楠, 闫 琳, 郑晓珂, 邢 鑫  
(郑州大学第五附属医院肿瘤科 450052)

**摘要:**目的 探讨结肠癌组织中 SLP-2 基因的表达情况, 及 SLP-2 蛋白对结肠癌 HCT-116 细胞增殖和细胞周期的影响。方法 采用免疫组织化学法检测 50 例结肠癌及对应癌旁正常结肠组织中 SLP-2 蛋白的表达, 分析结肠癌病例临床病理特征与 SLP-2 蛋白表达的关系, 将 SLP-2 小干扰 RNA (siRNA) 转染 HCT-116 细胞, 采用逆转录 (RT)-PCR 及 Western blot 检测转染 SLP-2 siRNA 后 HCT-116 细胞中基因及蛋白的表达情况, MTT 法和流式细胞术分别检测转染 SLP-2 siRNA 后 HCT-116 细胞生长状况及细胞周期。结果 癌旁正常结肠组织及结肠癌组织中 SLP-2 的高表达率分别为 22% 和 70%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); SLP-2 表达情况与结肠癌分期及淋巴结转移情况相关 ( $P < 0.05$ )。转染 SLP-2 siRNA 后, HCT-116 细胞中 SLP-2 mRNA 和蛋白的表达均下降 ( $P < 0.05$ ), HCT-116 细胞 G1 期增高, S 期减少, 细胞生长变慢 ( $P < 0.05$ )。结论 SLP-2 在结肠癌中高表达, 并参与结肠癌的发生发展。

**关键词:** 结肠肿瘤; SLP-2; 小干扰 RNA; 细胞增殖; 细胞周期

中图分类号: R735.9

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)28-3700-04

### The Effects of SLP-2 on proliferation and cell cycle of HCT-116 cell line

Zhang Jian, Wu Min, Zhang Zisen, Wang Lijuan, Zhang Hongqiao, Shi Guangyong, Ba Nan, Yan Lin, Zheng Xiaoke, Xing Xin  
(Department of Oncology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

**Abstract:** Objective To investigate SLP-2 expression in colorectal cancer and its influence on proliferation and cell cycle of HCT-116 cells. Methods Immunohistochemical method was used to detect the expression of SLP-2 in 50 normal colorectal tissues and colorectal cancer tissue specimens. Then, analysis the relationship between the expression of SLP-2 and the clinical pathological characteristics of the 50 colorectal cancer cases was made. SLP-2 siRNA was transfected into colorectal cancer cell line HCT-116. RT-PCR and Western blot were used to detect the SLP-2 gene expression in HCT-116 after the transfection. The cell proliferation was detected by MTT, the cell cycles was analyzed by flow cytometry. Results SLP-2 expression in colonic tissue and colorectal cancer tissue were 20% and 70% respectively, which showed statistical significance ( $P < 0.05$ ). The expression of SLP-2 in colorectal cancer tissues was associated with TNM stage and lymph nodes metastasis (both  $P < 0.05$ ). After SLP-2 siRNA was interfered, the HCT-116 cells showed slower growth, the number of cells in G1 phase was increased and S phase was declined (both  $P < 0.05$ ). And the expression of SLP-2 in HCT-116 cell was decreased ( $P < 0.05$ ). Conclusion SLP-2 protein shows up-regulation in colorectal cancer, and it may have some relationship with carcinogenesis and development of colorectal cancer.

**Key words:** colonic neoplasms; SLP-2; siRNA; cell proliferation; cell cycles

结肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤, 其在欧美国家发病率较高, 在发展中国家发病率较低, 但近年来, 随着生活水平及饮食习惯的改变, 我国结肠癌的发病率和病死率明显升高。SLP-2 基因属于 stomatin 基因家族成员, 是 2001 年新发现的一个基因<sup>[1]</sup>, 近年来的研究显示, SLP-2 在多种恶性肿瘤中过表达, 可能是一个新的肿瘤相关基因<sup>[2-6]</sup>。本研究采用免疫组织化学法检测 SLP-2 在人结肠癌配对组织中的表达, 并通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 下调结肠癌细胞 HCT-116 中 SLP-2 的表达, 检测转染后 HCT-116 细胞中 SLP-2 的表达情况, 并检测转染后 HCT-116 细胞增殖及周期的变化, 旨在探讨结肠癌中 SLP-2 的表达特点及 SLP-2 对结肠癌细胞的影响。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 结肠癌组织及距离癌组织边缘大于 5 cm 的癌旁正常结肠组织为郑州大学第五附属医院 2010 年 1 月至 2011 年 1 月手术切除结肠癌标本, 共 50 例, 其中男 27 例, 女 23 例, 年龄 40~72 岁, 中位年龄 63 岁。所有标本均经病理学检查确诊为结肠癌, 术前未接受过放、化疗。临床分期按

TNM 分期标准 (AJCC) 2010 年第 7 版, 其中早期结肠癌 (I + II 期) 13 例, 晚期结肠癌 (III + IV 期) 37 例。

**1.2 细胞培养** 结肠癌细胞系 HCT-116 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。用含抗菌药物和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 3~5 d 传代 1 次。

**1.3 siRNA 转染** 构建的 SLP-2 siRNA 序列正向引物: 5'-UGC UGC CUG AUU UAU CUG UUC AGC C-3', 反向引物: 5'-GGC UGA ACA GAU AAA UCA GGC AGC A-3' 由上海吉玛公司设计合成。细胞按 5 × 10<sup>4</sup> / 孔接种于 24 孔板上, 参考 Lipofectamine™ 2000 说明书, 50 μL 的 RPMI-1640 无血清培养液中加入 20 pmol SLP-2 siRNA 混匀, Lipofectamin 试剂, 用 50 μL 无血清的 RPMI-1640 培养液稀释 1 μL Lipofectamin 试剂, 混匀。将稀释好的 SLP-2 siRNA 和 Lipofectamin 试剂混合, 轻柔混匀, 室温放置 20 min, 以形成 SLP-2 siRNA/Lipofectamin 复合物; 将以上混合液加到含有细胞和培养基的培养板孔中, 在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 孵育 24 h 后更换完全培养基继续培养, 设为实验组。实验设阴性对照组 (转染阴性对照

siRNA)和空白对照组(不转染 siRNA)。

**1.4 RNAi 有效时间点的筛选** 分别于转染后 24、48 和 72 h 收集细胞,进行 RT-PCR 及 Wester blot 检测,比较上述 3 个时间点的 siRNA 干扰效果的差异,从中找到最为有效的时间点。SLP-2 扩增片段长度:500 bp,上游引物 5'- CTG GAG CCT GGT TTG AAC AT-3';下游引物 5'- AGG ATC TGG GCC TGT TTC TT-3'。内参  $\beta$ -actin 扩增片段长度 242 bp,上游引物 5'- ACA CTG TGC CCA TCT ACG ACC-3';下游引物 5'- AGG GGC CGG ACT CGT CAT AGA-3'。引物由上海生工公司合成。PCR 反应体系:2 $\times$ Taq PCR MasterMix 12.5  $\mu$ L, SLP-2 及内参上、下游引物各 1  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu$ L。PCR 反应条件,预变性 94  $^{\circ}$ C,5 min;变性 94  $^{\circ}$ C,30 s,退火 55  $^{\circ}$ C,30 s,延伸 72  $^{\circ}$ C,50 s,30 循环;延伸 72  $^{\circ}$ C,7 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电泳条带图像凝胶成像仪扫描,以 SLP-2 与  $\beta$ -actin 的灰度值的比值表示 SLP-2 mRNA 的相对表达水平。SLP-2 单克隆抗体和抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。提取 HCT-116 细胞总蛋白,经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳,稳流冰浴电转膜,分别与抗辣根过氧化物酶连接的二抗(美国 Santa Cruz 公司)孵育,DAB 显色拍照。

**1.2 免疫组织化学** 鼠抗人 SLP-2 单克隆抗体稀释度为 1:200,购自美国 Proteintech 公司。免疫组织化学试剂盒购自迈新公司。用已知阳性片(子宫内膜癌切片,为公司提供)作阳性对照用 PBS 代替一抗作阴性对照。操作步骤按试剂盒说明书进行。结果判定标准参照文献[7],由两位高年资病理医师在双盲条件下进行评分,每张切片根据阳性细胞百分数及阳性细胞染色程度进行评分。细胞膜及细胞质染色程度评分由每张切片的大多数细胞染色情况决定,0 分:无着色,1 分:浅黄色为,2 分:黄色,3 分:棕黄色。阳性细胞百分数评分,0 分:没有阳性细胞,1 分:1%~25% 阳性,2 分:26%~50% 阳性,3 分:51%~75% 阳性,4 分:>75% 阳性。二者分数相乘为总分, $\geq 8$  分为高表达,<8 分为阴性或低表达。

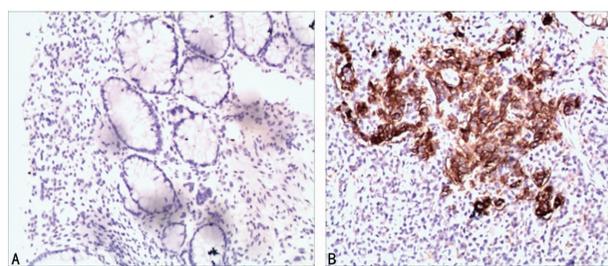
**1.5 噻唑蓝(MTT)试验** 取转染后 24、48、72、96 h 转染组、阴性对照组及空白对照组的 HCT-116 细胞,每孔加入 200  $\mu$ L 5 mg/mL MTT,置于 37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h。弃 MTT,每孔加入 200  $\mu$ L 二甲基亚砷(DMSO),酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(OD)值。

**1.6 流式细胞术检测细胞周期** 收集转染 SLP-2 siRNA 48 h 后转染组、阴性对照组和空白对照组 HCT-116 细胞,参考文献[8]处理后,采用流式细胞仪检测细胞周期。实验中每组各设 3 个平行对照。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料采用率表示,结肠癌配对组织中 SLP-2 蛋白表达的比较采用配对  $\chi^2$  检验,转染 SLP siRNA 后各组 HCT-116 细胞中 SLP-2 mRNA 和蛋白的表达量以及转染 SLP siRNA 后各组 HCT-116 细胞周期和增殖能力的比较采用方差分析,组间比较用 LSD-t 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 SLP-2 蛋白在结肠癌及癌旁正常结肠组织的表达** SLP-2 在癌旁正常结肠组织中多为阴性或低表达,高表达例数为 11 例(22.0%),在结肠癌组织中则多呈高表达,高表达例数分别为 35 例(70.0%)。二者的高表达率差异有统计学意义( $\chi^2=23.188,P=0.000$ ),见图 1。



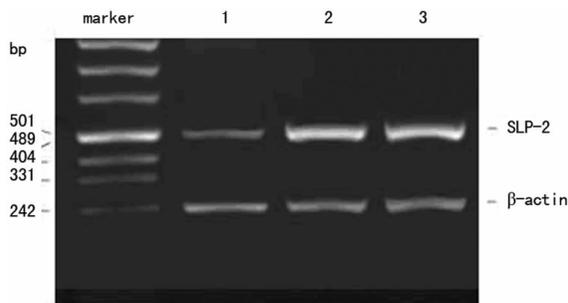
A:癌旁正常结肠组织 SLP-2 蛋白阴性表达;B:结肠癌组织 SLP-2 蛋白阳性表达。

图 1 正常结肠黏膜及结肠癌组织中 SLP-2 蛋白的表达( $\times 100$ )

**2.2 SLP-2 蛋白表达与结肠癌临床病理特征之间的关系** 见表 1。

表 1 SLP-2 的表达与结肠癌临床病理参数的关系(n)

组别	n	SLP-2 蛋白表达		$\chi^2$	P
		高	低		
性别				0.004	0.951
男	27	19	8		
女	23	16	7		
年龄(岁)				0.192	0.662
$\leq 50$	21	14	7		
$> 50$	29	21	8		
肿瘤大小(cm)				0.066	0.797
$\leq 5$	32	22	10		
$> 5$	18	13	5		
分化程度				0.000	1.000
高-中分化	35	24	11		
低分化	15	11	4		
淋巴结转移				19.647	0.000
有	34	31	3		
无	16	4	12		
临床分期				10.474	0.001
I + II	13	4	9		
III + IV	37	31	6		

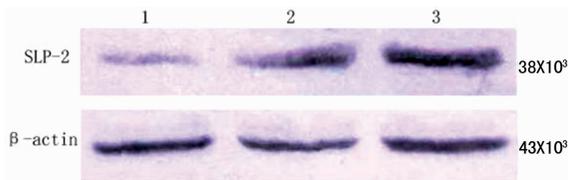


marker: DNA 分子标记物;1:实验组;2:阴性对照组;3:空白对照组。

图 2 转染 48 h 后各组 HCT-116 细胞中 SLP-2 mRNA 的表达

**2.3 siRNA 的转染及有效时间点的确定** 结果显示,转染 SLP-2 siRNA 序列后,HCT-116 目的基因 SLP-2 的表达呈现出明显降低的趋势。从转染后 24 h 开始,SLP-2 基因的表达就有所下降,转染后 48 h 表达量最低。72 h SLP-2 基因表达量有所回升,但仍维持在较低水平。因转染后 48 h 后表达抑制率最高,表达降低幅度最大,因此该时间点被选做转染有效

时间点。转染 48 h 后, 实验组 SLP-2 mRNA 表达水平为  $0.55 \pm 0.26$ , 空白对照组为  $1.42 \pm 0.31$ , 阴性对照组为  $1.35 \pm 0.38$ , 3 者比较差异有统计学意义 ( $F=6.764, P=0.029$ ), 见图 2。转染 48 h 后, 实验组 SLP-2 蛋白表达水平为  $0.61 \pm 0.30$ , 空白对照组为  $1.38 \pm 0.42$ , 阴性对照组为  $1.47 \pm 0.35$ , 3 者比较差异有统计学意义 ( $F=5.171, P<0.05$ ), 见图 3。

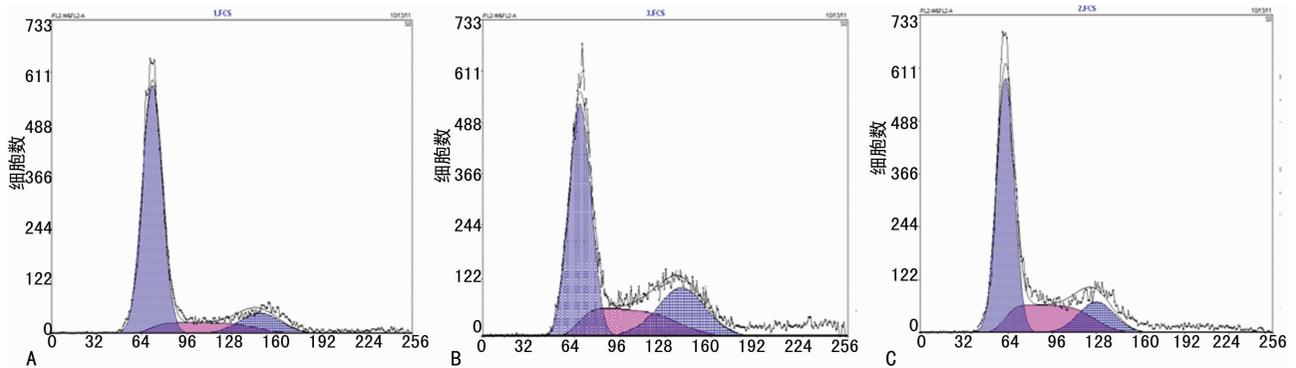


1: 实验组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组。

图 3 转染 48 h 后各组 HCT-116 细胞中 SLP-2 蛋白的表达

2.4 转染 SLP-2 siRNA 后 HCT-116 细胞增殖力的变化 MTT 法检测结果显示, 实验组细胞与阴性对照组和空白对照组比较, 增殖力下降 ( $P<0.05$ ), 见表 2。

2.5 转染 SLP-2 siRNA 后 HCT-116 细胞周期的变化 流式



A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组。

图 4 SLP-2 siRNA 对 HCT-116 细胞周期的影响

### 3 讨论

SLP-2 是 2000 年由美国耶鲁大学病理科首次发现并命名的一个新基因, 属于 *stomatin* 基因超家族。人 SLP-2 基因定位于 9p13.1, 编码长约 1 500 bp 的 mRNA, 其编码的蛋白含 357 个氨基酸, 相对分子质量为  $3.9 \times 10^3$ 。SLP-2 蛋白是一种细胞膜相关蛋白, 可能作为外周膜蛋白起作用, 调控离子通道和脂筏结构<sup>[1,8]</sup>。SLP-2 蛋白还存在于细胞线粒体中, 是一种线粒体相关蛋白, 可能参与调节与其结合的线粒体膜相关蛋白的稳定性, 影响 ATP 的合成<sup>[7,9]</sup>。

近年来的研究显示, SLP-2 基因在食管鳞癌<sup>[7,10]</sup>、肺癌<sup>[2]</sup>、子宫内膜癌<sup>[4]</sup>、乳腺癌<sup>[5,11]</sup>、胃癌<sup>[3,6]</sup>等恶性肿瘤中高表达。且 SLP-2 反义基因可抑制某些恶性肿瘤细胞的增殖及转移, 促进其凋亡, 推测 SLP-2 可能促进癌细胞的生长、增殖, 抑制癌细胞凋亡, 并参与癌细胞的转移<sup>[4,7,10]</sup>。这些研究表明, SLP-2 可能是一个新的恶性肿瘤相关基因。但目前有关 SLP-2 在结肠癌中的表达情况及作用机制的研究较少。

本研究采用免疫组织化学染色发现 SLP-2 在结肠癌组织中表达升高, 通过分析结肠癌患者的临床病理资料, 发现在较晚期、有淋巴结转移的患者中 SLP-2 表达升高更为明显。为进一步研究 SLP-2 在结肠癌发生发展中的作用, 本课题组设计合成 SLP-2 siRNA, 将其转染结肠癌 HCT-116 细胞, 采用

细胞仪检测结果显示, 与阴性对照组和空白对照组相比, 实验组 G1 期细胞比例增加, S 期细胞比例下降, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见表 3, 图 4。

表 2 SLP-2 siRNA 对 HCT-116 细胞增殖的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	转染后 24 h	转染后 48 h	转染后 72 h	转染后 96 h
实验组	$0.331 \pm 0.028$	$0.438 \pm 0.039$	$0.636 \pm 0.115$	$0.857 \pm 0.045$
阴性对照组	$0.353 \pm 0.047$	$0.604 \pm 0.035^a$	$1.010 \pm 0.097^a$	$1.459 \pm 0.400^a$
空白对照组	$0.341 \pm 0.029$	$0.663 \pm 0.067^a$	$1.061 \pm 0.185^a$	$1.747 \pm 0.101^a$
F	0.279	17.005	8.525	10.825
P	0.766	0.003	0.018	0.010

<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与实验组比较。

表 3 3 组 HCT-116 细胞的细胞周期变化 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	G1 期	S 期	G2/M 期
SLP-2 siRNA 转染组	$69.8 \pm 2.4$	$18.3 \pm 2.7$	$12.0 \pm 1.6$
阴性对照组	$53.6 \pm 4.1^a$	$30.9 \pm 3.6^a$	$15.3 \pm 2.1$
空白对照组	$57.5 \pm 3.7^a$	$28.7 \pm 5.3^a$	$13.5 \pm 3.3$

<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与实验组比较。

MTT 及流式细胞仪检测 HCT-116 细胞增殖及细胞周期的变化。结果发现, 转染 SLP-2 siRNA 后, HCT-116 细胞的增殖活性下降, G1 期细胞数增多, S 期细胞数减少。提示 SLP-2 可能通过调节细胞周期促进结肠癌细胞的增殖。

SLP-2 在恶性肿瘤发生发展中的作用机制尚未明确, 推测可能与调节细胞信号传导通路及线粒体能量代谢有关。SLP-2 蛋白作为一种膜相关蛋白, 与细胞信号通路密切相关, 可能通过对信号通路的调节参与恶性肿瘤的发生发展。有文献报道, SLP-2 蛋白可能通过与 Rho 家族蛋白的相互作用, 参与细胞信号传导通路来调节肿瘤细胞的侵袭转移能力<sup>[12]</sup>。祁代华等<sup>[13]</sup>的研究也显示, 结直肠癌组织中 SLP-2 与 Rho 家族 CDC42 蛋白表达呈正相关, 且与结直肠癌的 Dukes 分期、淋巴结转移相关。此外, 转染 SLP-2 siRNA 降低 HeLa 细胞中 SLP-2 的表达, 可引起线粒体膜电势的降低<sup>[9]</sup>; 转染 SLP-2 siRNA 降低食管癌 KYSE150 细胞中 SLP-2 表达后, 细胞线粒体膜电势和 ATP 水平均降低, 同时伴细胞运动能力和增殖能力减弱<sup>[7]</sup>; 推测 SLP-2 可能通过影响细胞的能量代谢参与肿瘤细胞的增殖和转移。目前对 SLP-2 的研究不多, 对 SLP-2 在恶性肿瘤中作用机制的研究仍处于起步阶段, 有待进一步深入探索。

本研究发现 SLP-2 在结肠癌中表达升高, SLP-2 基因沉默可使 HCT-116 细胞被阻滞在 G1 期, 增殖活性降低。该研究

结果对阐明结肠癌的发病机制及寻找新的结肠癌治疗分子靶点具有一定意义。

#### 参考文献:

- [1] Wang Y, Morrow JS. Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin(band 7. 2b) present in erythrocytes and other tissues[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(11):8062-8071.
- [2] Chang D, Ma K, Gong M, et al. SLP-2 overexpression is associated with tumour distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma[J]. *Biomarkers*, 2010, 15(2):104-110.
- [3] 张剑, 李建生, 吴敏, 等. SLP-2 在胃癌组织中的表达及对胃腺癌细胞 SGC7901 运动侵袭的影响[J]. *中华消化杂志*, 2013, 33(1):37-41.
- [4] Cui Z, Zhang L, Hua Z, et al. Stomatin-like protein 2 is overexpressed and related to cell growth in human endometrial adenocarcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(4):829-833.
- [5] Cao WF, Zhang B, Li J, et al. SLP-2 overexpression could serve as a prognostic factor in node positive and HER2 negative breast cancer[J]. *Pathology*, 2011, 43(7):713-718.
- [6] Liu DN, Zhang L, Shen ZY, et al. Increased levels of SLP-2 correlate with poor prognosis in gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2013, 16(4):498-504.
- [7] Wang Y, Cao W, Yu Z, et al. Downregulation of a mitochondria associated protein SLP-2 inhibits tumor cell motility, proliferation and enhances cell sensitivity to chemotherapeutic reagents[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(17):1651-1658.
- [8] Sprenger RR, Speijer D, Back JW, et al. Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(1):156-172.
- [9] Hájek P, Chomyn A, Attardi G. Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(8):5670-5681.
- [10] Zhang L, Ding F, Cao W, et al. Stomatin-like protein 2 is overexpressed in cancer and involved in regulating cell growth and cell adhesion in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(5):1639-1646.
- [11] Cao W, Zhang B, Liu Y, et al. High-level SLP-2 expression and HER-2/neu protein expression are associated with decreased breast cancer patient survival[J]. *Am J Clin Pathol*, 2007, 128(3):430-436.
- [12] Horiuchi A, Imai T, Wang C, et al. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma[J]. *Lab Invest*, 2003, 83(6):861-870.
- [13] 祁代华, 李建生, 王康康. SLP-2 和 CDC42 蛋白在结直肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *中华消化杂志*, 2009, 29(3):191-192.

(收稿日期:2014-05-26 修回日期:2014-06-17)

(上接第 3699 页)

- [5] Ostrowski RP, Graupner G, Titova E, et al. The hyperbaric Oxygen preconditioning-induced brain protection is mediated by a reduction of early apoptosis after transient global cerebral ischemia[J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 29(1):1-13.
- [6] Aoki Y, Huang Z, Thomas SS, et al. Increased susceptibility to ischemia-induced brain damage in transgenic mice overexpressing a dominant negative form of SHP2[J]. *FASEB J*, 2000, 14(13):1965-1973.
- [7] Acka G, Sen A, Canakci Z, et al. Effect of combined therapy with hyperbaric Oxygen and antioxidant on infarct volume after permanent focal cerebral ischemia[J]. *Physiol Res*, 2007, 56(3):369-373.
- [8] Gao-Yu C, Cong-Yina D, Li-Jun Z, et al. Effects of hyperbaric Oxygen preconditioning on energy metabolism and glutamate level in the peri-infarct area following permanent MCAO[J]. *Undersea Hyperb Med*, 2011, 38(2):91-99.
- [9] Günther A, Küppers-Tiedt L, Schneider PM, et al. Reduced infarct volume and differential effects on glial cell activation after hyperbaric Oxygen treatment in rat permanent focal cerebral ischaemia[J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(11):3189-3194.
- [10] Lou M, Zhang H, Wang J, et al. Hyperbaric Oxygen treatment attenuated the decrease in regional glucose metabolism of rats subjected to focal cerebral ischemia; a high resolution positron emission tomography study[J]. *Neuroscience*, 2007, 146(2):555-561.
- [11] Veltkamp R, Sun L, Herrmann O, et al. Oxygen therapy in permanent brain ischemia: potential and limitations[J]. *Brain Res*, 2006, 1107(1):185-191.
- [12] Xue L, Yu Q, Zhang H, et al. Effect of large dose hyperbaric oxygenation therapy on prognosis and oxidative stress of acute permanent cerebral ischemic stroke in rats[J]. *Neurol Res*, 2008, 30(4):389-393.
- [13] Liu L, Wang Z, Wang X, et al. Comparison of two rat models of cerebral ischemia under hyperglycemic conditions[J]. *Microsurgery*, 2007, 27(4):258-262.
- [14] Li S, Sun G, Murai K, et al. Characterization of TLX expression in neural stem cells and progenitor cells in adult brains[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e43324.
- [15] Magavi SS, Macklis JD. Identification of newborn cells by BrdU labeling and immunocytochemistry in vivo[J]. *Methods Mol Biol*, 2002, 198:283-290.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-06-11)