

研究论文

低氧预适应大鼠脑脊液减轻氧糖剥夺对培养新生鼠海马神经元的损伤及可能的机制

牛敬忠^{1*}, 张颜波¹, 李美艺², 刘莉莉²

¹泰山医学院附属医院神经内科, 泰安 271000; ²山东泰山慢性病医院神经内科, 泰安 271000

摘要: 本文旨在观察低氧预适应(hypoxic preconditioning, HPC) Wistar大鼠脑脊液对新生鼠海马神经元氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)损伤的影响及机制。原代培养大鼠新生鼠(出生12 h)海马神经元, 随机分为正常对照组、OGD组(OGD培养1.5 h)、正常脑脊液组(正常大鼠脑脊液培养1 d + OGD培养1.5 h)和HPC脑脊液组(HPC大鼠脑脊液培养1 d + OGD培养1.5 h), 各组 $n = 6$ 。用含1 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的无糖Earle's液培养大鼠新生鼠海马神经元1.5 h建立OGD模型。应用激光共聚焦显微镜和流式细胞术检测各组神经元凋亡情况, 用免疫荧光染色法检测各组神经元Bcl-2/Bax表达水平。结果显示, 正常对照组偶见凋亡早期细胞, OGD组见大量中晚期凋亡细胞; 与OGD组和正常脑脊液组相比, HPC脑脊液组细胞凋亡显著减少($P < 0.01$), 细胞生存率提高($P < 0.01$)。OGD组和正常脑脊液组细胞Bcl-2蛋白荧光强度分别为 0.040 ± 0.003 , 0.457 ± 0.044 , 而HPC脑脊液组细胞Bcl-2表达荧光强度增至 1.923 ± 0.078 ($P < 0.01$), 且阳性细胞数量亦明显增加($P < 0.01$); Bax表达则呈相反趋势, 相对OGD组(1.548 ± 0.068)和正常脑脊液组(1.072 ± 0.219), HPC脑脊液组荧光强度(0.411 ± 0.039)明显降低($P < 0.01$), 且阳性细胞数量亦明显减少($P < 0.01$)。以上结果提示, HPC脑脊液能减轻OGD损伤诱导的神经元凋亡, 该神经保护效应与上调Bcl-2表达、下调Bax表达, 提高Bcl-2/Bax有关。

关键词: 低氧预适应; 脑脊液; 海马神经元; Bcl-2/Bax

中图分类号: R363.2

Lessening effect of hypoxia-preconditioned rat cerebrospinal fluid on oxygen-glucose deprivation-induced injury of cultured hippocampal neurons in neonate rats and possible mechanism

NIU Jing-Zhong^{1*}, ZHANG Yan-Bo¹, LI Mei-Yi², LIU Li-Li²

¹Department of Neurology, Affiliated Hospital of Taishan Medical College, Taian 271000, China; ²Department of Neurology, Taishan Chronic Disease Hospital, Taian 271000, China

Abstract: The present study was to investigate the effect of cerebrospinal fluid (CSF) from the rats with hypoxic preconditioning (HPC) on apoptosis of cultured hippocampal neurons in neonate rats under oxygen glucose deprivation (OGD). Adult Wistar rats were exposed to 3 h of hypoxia for HPC, and then their CSF was taken out. Cultured hippocampal neurons from the neonate rats were randomly divided into four groups ($n = 6$): normal control group, OGD group, normal CSF group and HPC CSF group. OGD group received 1.5 h of incubation in glucose-free Earle's solution containing 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, and normal and HPC CSF groups were subjected to 1 d of corresponding CSF treatments followed by 1.5 h OGD. The apoptosis of neurons was analyzed by confocal laser

Received 2011-04-23 Accepted 2011-07-06

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province, China (No. ZR2010HM029), Medical Science Technology Development Program of Shandong Province, China (No. 2009HZ096), Scientific Research Development Program of the Department of Education, Shandong Province, China (No. J08LG71) and Technology Development Program of Taian Municipality, China (No. 2007t037).

*Corresponding author. Tel: +86-538-6237428; E-mail: niujingzhong@tom.com

scanning microscope and flow cytometry using Annexin V/PI double staining. Moreover, protein expressions of Bcl-2 and Bax were detected by immunofluorescence. The results showed that few apoptotic cells were observed in normal control group, whereas the number of apoptotic cells was greatly increased in OGD group. Both normal and HPC CSF could decrease the apoptosis of cultured hippocampal neurons injured by OGD ($P < 0.01$). Notably, the protective effect of HPC CSF was stronger than that of normal one ($P < 0.01$). Compared to OGD group, normal and HPC CSF groups both showed significantly higher levels of Bcl-2 ($P < 0.01$), and Bcl-2 expression level in HPC CSF group was even higher than that in normal CSF group ($P < 0.01$). Whereas the expressions of Bax in normal and HPC CSF groups were significantly lower than that in OGD group ($P < 0.01$), and the Bax expression in HPC CSF group was even lower than that in normal CSF group ($P < 0.01$). These results suggest that CSF from hypoxic-preconditioned rats could degrade apoptotic rate of OGD-injured hippocampal neurons by up-regulating expression of Bcl-2 and down-regulating expression of Bax.

Key words: hypoxia-preconditioning; cerebrospinal fluid; hippocampal neurons; oxygen glucose deprivation; Bcl-2/Bax

低氧预适应 (hypoxic preconditioning, HPC) 是一种机体内源性保护机制, 其通过一系列复杂环节调动机体潜能减轻缺氧损伤, 对机体起保护作用。如何将 HPC 保护理论应用于临床疾病的治疗是目前国内外转化医学研究的热点和难点, 在此方面已有一些初步研究结果: 在体研究显示 HPC 可减轻急性脑梗死所致的神经元损伤^[1-4]; 而离体实验同样证明 HPC 能减少缺氧/复氧后神经元凋亡^[5]。既往研究也显示, HPC 大鼠脑匀浆提取液及其去蛋白液对培养的神经元均有保护作用^[6], 但上述研究结果面临着临床可操作性差和脑匀浆提纯困难等问题, 但脑脊液具有易通过血脑屏障和便于提纯等优点。脑脊液由侧脑室脉络丛分泌, 含多种电解质、蛋白质、糖及生长因子, 研究证实它能诱导神经干细胞分化为神经元和星形胶质细胞; 脑脊液药理学研究显示, 溶有多种药物的脑脊液对诱导剂所致的神经元损伤和 PC12 细胞损伤有减轻作用^[7-10]。故本研究以 HPC 理论为基础, 结合脑脊液药理学方法, 观察 HPC 动物脑脊液对细胞缺氧耐受性的影响并探讨其作用机制, 力图寻找出预适应机制中的关键作用物质, 促进预适应理论转化医学进程, 提高其临床可操作性。本研究采用 HPC 大鼠脑脊液孵育氧糖剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 损伤的大鼠新生鼠海马神经元, 并运用激光共聚焦显微镜和流式细胞术检测神经元凋亡, 用免疫荧光检测凋亡相关蛋白表达, 藉此研究 HPC 大鼠脑脊液对海马神经元 OGD 损伤的作用并探讨相关机制。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器 CO₂ 培养箱 (Precision Scientific 公司, USA), 激光扫描共聚焦显微镜 (Radiance 2100

型, Bio-Rad 公司, USA), 流式细胞仪 (FACSCalibur 型, Bio-Rad 公司, USA), 高糖 DMEM 干粉培养基、胎牛血清、马血清和胰蛋白酶 (GIBCO-BRL 公司, USA), *L*-glutamine、左旋多聚赖氨酸 (Poly-*L*-lysine, Sigma 公司, USA)、小鼠抗人神经特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) 一抗、羊抗小鼠二抗 (Dako 公司), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (凯基生物), 兔抗小鼠 Bax 单克隆抗体、兔抗小鼠 Bcl-2 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司), SABC-FITC 免疫荧光检测试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 实验动物 体重 200~250 g 健康成年 Wistar 大鼠, 雌雄不拘; 出生 12 h 内的 Wistar 大鼠新生鼠 48 只 (由鲁抗实验动物中心提供, 动物批号 scxk20080002)。

1.3 HPC 大鼠脑脊液制备 采用 Vannucci 等^[11]方法, 将大鼠放入自制的简易低氧舱 (8% O₂、92% N₂、37 °C) 3 h 复制 HPC 模型。HPC 处理后 12 h, 以 10% 水合氯醛腹腔注射 (3~4 mg/kg) 麻醉大鼠并固定, 依次暴露大鼠颈部背侧皮肤、皮下筋膜及肌肉, 到达环枕膜, 刺破该膜入枕大池抽取脑脊液, 约 200 μL/只, 脑脊液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后, 储存于 -80 °C 冰箱备用。

1.4 神经元培养、鉴定及分组 采用我室既往方法^[5], 无菌条件下提取出生 12 h 内 Wistar 乳鼠海马组织, 冷 *D*-Hank's 缓冲液中剪成 1 mm³ 组织块, 37 °C、5% CO₂ 条件下以 0.125% 胰酶消化约 10 min, 200 目滤网过滤, 调整细胞浓度为 0.5×10^6 /mL, 接种于预铺 Poly-*L*-lysine (0.01%) 的细胞培养板上, 24 h 后全量更换培养液, 以后每 3 d 半量换液一次, 培养至第 8 天进行海马神经元原代培养及鉴定。取

培养的神经元,吸出培养基,以 PBS (0.1 mol/L) 轻洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,再以 PBS 冲洗 2 遍并风干,根据 NSE 试剂盒 (Dako 公司) 说明书进行染色,于荧光显微镜上观察。NSE 免疫荧光染色显示,绝大多数细胞胞浆绿染,呈梭形或椭圆形,细胞连接成网,细胞边缘清晰,有明显突起 (图 1),细胞计数结果显示神经元纯度超过 95%。取原代培养 8 d 的神经元,随机分为以下 4 组:正常对照组:正常高糖培养基培养;OGD 组:OGD 培养 1.5 h;正常脑脊液组:正常大鼠脑脊液以 1:9 浓度加入高糖 DMEM 培养液培养神经元 1 d 后,OGD 培养 1.5 h;HPC 脑脊液组:HPC 大鼠脑脊液以 10% 浓度培养神经元 1 d,OGD 培养 1.5 h。各组 $n = 6$ 。OGD 培养方法:无糖 Earle's 液洗 3 次后,加入含连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 1 mmol/L) 的无糖 Earle's 液,37 °C、5% CO_2 、饱和湿度下培养。

1.5 Annexin V/propidium iodide (PI) 双染检测

1.5.1 激光共聚焦显微镜观察 取干预后各组神经元,弃培养基,PBS 洗 2 遍。在 500 μL Binding buffer 中加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,混匀,将溶液均匀滴加于培养细胞的盖玻片上,避光,室温反应 5 min,封片,立即于荧光显微镜下观察。凋亡早期细胞膜呈绿色荧光,胞核不着色;凋亡中晚期胞膜呈绿色荧光,细胞核红染;死亡崩解细胞仅见胞核红染。荧光图片经 Laserssharp 2000 软件

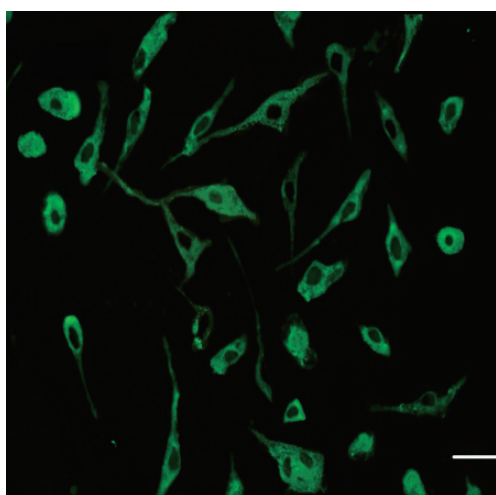


图 1. 原代大鼠海马神经元的免疫荧光染色鉴定

Fig. 1. Identification of primary culture of rat hippocampal neurons with immunofluorescence staining of neuron-specific enolase (NSE). Scale bar, 50 μm .

(4.5.3) 摄像,每组随机选取 20 张图片进行荧光强度检测。

1.5.2 流式细胞仪检测 取干预后各组神经元,用 0.125% 胰酶消化约 4 min,收集细胞于离心管中制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL。取 1 mL 细胞,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 冷 PBS,制成细胞悬液并重复操作 2 次,细胞悬浮于 200 μL Binding buffer 中,加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,混匀,阴性对照以 PBS 代替染料,避光室温反应 20 min 后加入 400 μL PBS,200 μm 筛网过滤,立即流式细胞仪检测。

1.6 Bcl-2/Bax 免疫荧光检测 取干预后各组神经元,吸出培养液,用 37 °C、0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 轻洗两遍,风干;滴加 0.01 mol/L PBS 按 1:10 稀释的正常血清封闭液,室温封闭 20 min,甩去多余液体;加用 0.01 mol/L PBS 按 1:100 稀释的兔抗小鼠 Bcl-2 或 Bax 多克隆抗体 (阴性对照用 PBS 代替一抗溶液),4 °C 过夜,PBS 浸洗后,加入 PBS 稀释的羊抗兔 IgG-FITC,37 °C 孵育 30 min,冲洗后用 0.01 mol/L PBS 按 1:1 稀释的甘油封片,激光共聚焦显微镜观察。扫描选用参数为:激发光波长为 554 nm,观测光波长为 575 nm,物镜为 40 倍,扫描方式为点扫描,Zoom 为 (1.0)。扫描图片用 Laserssharp 2000 软件摄像、分析。

1.7 数据处理与统计学分析 所有数据以 means $\pm$ SD 表示,采用 Sigma Stat 3.5 统计软件包中的单因素方差分析 (ANOVA) 与 Dunnett t (2-tailed) 进行统计学处理,当 $P < 0.05$ 时认为差异具有显著性。

2 结果

2.1 Annexin V/PI双染检测细胞凋亡

2.1.1 HPC脑脊液孵育减轻OGD神经元凋亡

荧光强度检测结果显示,正常对照组红、绿两种荧光均微弱,着色细胞少见,偶见早期凋亡神经元;OGD 组可见大量强绿色和红色荧光,红染裸核多见,为中晚期凋亡和死亡神经元;正常脑脊液组可见较多胞膜绿染、核红染细胞及单纯胞膜绿染细胞,为中晚期凋亡神经元和少量凋亡早期神经元,绿色和红色荧光强度均较 OGD 组减弱 ($P < 0.01$);HPC 脑脊液组神经元荧光着色细胞少,以胞膜绿染为主,是细胞凋亡早期的特征性表现,绿色及红色荧光强度较 OGD 组和正常脑脊液组均有明显减弱

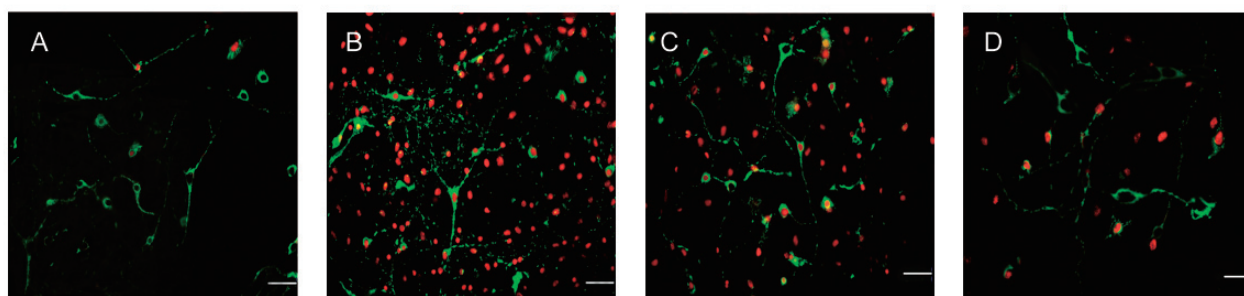


图 2. 神经元凋亡检测的激光共聚焦显微图片(Annexin V/PI双染)

Fig. 2. Confocal laser scanning micrographs showing apoptosis in neurons stained with Annexin V (green)/PI (red). *A*: Normal group. *B*: OGD group. *C*: Normal CSF group. *D*: HPC CSF group. Scale bar, 50 μm . OGD: oxygen glucose deprivation; CSF: cerebrospinal fluid; HPC: hypoxic preconditioning.

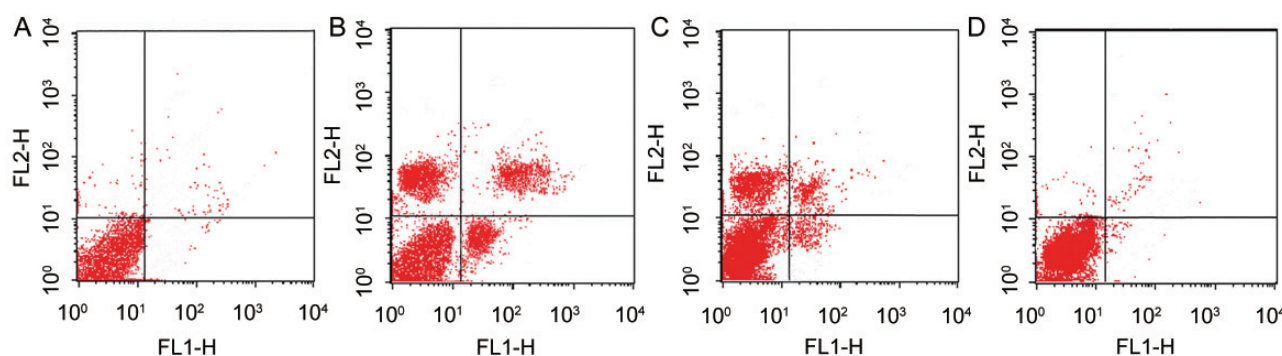


图 3. 神经元凋亡检测的流式细胞术图(Annexin V/PI双染)

Fig. 3. Dot plots of FCM showing survival rates of neurons (Annexin V/PI double staining). *A*: Normal group. *B*: OGD group. *C*: Normal CSF group. *D*: HPC CSF group. OGD: oxygen glucose deprivation; CSF: cerebrospinal fluid; HPC: hypoxic preconditioning.

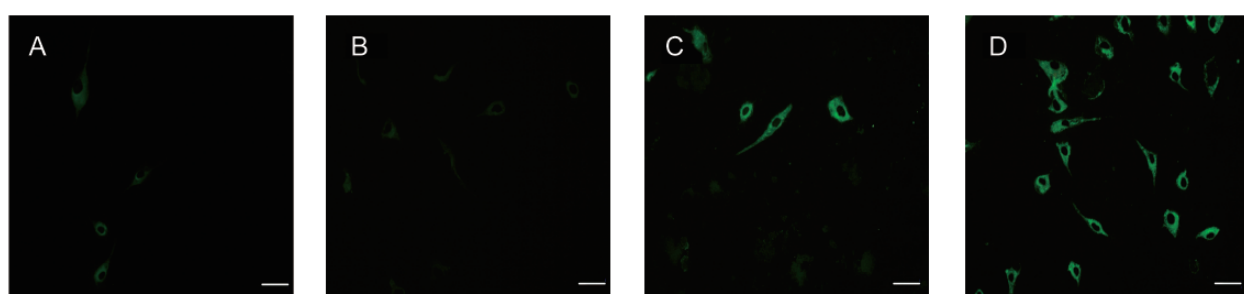


图 4. 各组神经元Bcl-2蛋白表达情况

Fig. 4. Expressions of Bcl-2 protein in neurons from different groups detected with FITC-conjugated antibody. *A*: Normal group. *B*: OGD group. *C*: Normal CSF group. *D*: HPC CSF group. Scale bar, 50 μm . OGD: oxygen glucose deprivation; CSF: cerebrospinal fluid; HPC: hypoxic preconditioning.

($P < 0.01$, 表 1, 图 2)。

2.1.2 HPC脑脊液孵育提高OGD神经元存活率

流式细胞术检测结果显示, 正常对照组细胞存活率 ($73.445\% \pm 3.319\%$) 最高, OGD 组细胞存活率

($45.245\% \pm 2.251\%$) 最低; 与 OGD 组相比, 正常脑脊液组细胞存活率显著提高 ($P < 0.01$), 而 HPC 脑脊液组神经元存活率较 OGD 组和正常脑脊液组均有显著升高 ($P < 0.01$)(表 1, 图 3)。

表1. 各组神经元细胞凋亡和生存率比较

Table 1. Comparisons of apoptosis and survival rate of neurons from different groups

Group	Annexin V-FITC (green)	PI (red)	Survival rate (%)
Control	0.050 ± 0.010	0.020 ± 0.010	73.445 ± 3.319
OGD	2.470 ± 0.145	2.748 ± 0.110	45.245 ± 2.251
Normal CSF	1.625 ± 0.171**	2.016 ± 0.023**	51.828 ± 1.606**
HPC CSF	0.605 ± 0.082***	0.117 ± 0.028***	65.275 ± 2.615***

Means ± SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs OGD group; *** $P < 0.01$ vs normal CSF group. OGD: oxygen glucose deprivation; CSF: cerebrospinal fluid; HPC: hypoxic preconditioning.

表2. 各组神经元Bcl-2和Bax蛋白表达的比较

Table 2. Comparison of protein expressions of Bcl-2 and Bax in neurons from different groups

Group	Fluorescence intensity		Number of positive cells		Bcl-2/Bax
	Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax	
Control	0.040 ± 0.012	0.401 ± 0.010	4.000 ± 0.330	3.800 ± 0.930	1.06 ± 0.45
OGD	0.040 ± 0.003	1.548 ± 0.068	8.800 ± 2.610	16.100 ± 3.520	0.59 ± 0.32
Normal CSF	0.457 ± 0.044*	1.072 ± 0.219*	11.900 ± 2.190	12.300 ± 1.090**	0.98 ± 0.17**
HPC CSF	1.923 ± 0.078***	0.411 ± 0.039***	17.500 ± 4.390**	8.400 ± 0.760***	1.84 ± 0.24***

Means ± SD, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs OGD group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs normal CSF group. OGD: oxygen glucose deprivation; CSF: cerebrospinal fluid; HPC: hypoxic preconditioning. Bcl-2/Bax: Ratio of Bcl-2 positive cells to Bax positive ones.

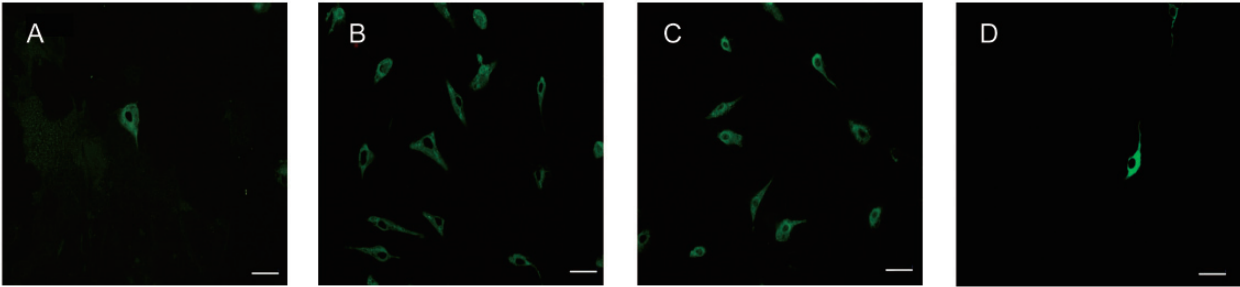


图 5. 各组神经元Bax蛋白表达情况

Fig. 5. Expressions of Bax protein in neurons from different groups detected with FITC-conjugated antibody. A: Normal group. B: OGD group. C: Normal CSF group. D: HPC CSF group. Scale bar, 50 μm . OGD: oxygen glucose deprivation; CSF: cerebrospinal fluid; HPC: hypoxic preconditioning.

2.3 HPC脑脊液孵育提高OGD神经元Bcl-2表达, 降低Bax表达

Bcl-2 蛋白主要位于神经细胞胞浆、核膜及突起中, 在本实验中标记为绿色荧光。正常对照组和 OGD 组偶见细胞表达 Bcl-2, 荧光强度较低, 阳性细胞数量少; 与正常对照组和 OGD 组相比, 正常脑脊液组 Bcl-2 荧光强度显著增加 ($P < 0.05$), 不过阳性细胞数量与 OGD 组相比无显著差异; 相对 OGD 组及正常脑脊液组, HPC 脑脊液组 Bcl-2 蛋白荧光强度显著增加 ($P < 0.01$), 阳性细胞亦明显增多 ($P < 0.05$), 表明 Bcl-2 蛋白表达显著升高 (表 2, 图 4)。

Bax 蛋白主要表达于神经细胞胞浆、核膜及突

起中, 在本实验中标记为绿色荧光。正常对照组仅见少量星点状荧光, 荧光强度极弱, 阳性细胞少; 相对 OGD 组, 正常脑脊液、HPC 脑脊液组的 Bax 表达荧光强度和阳性细胞数均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 相对于正常脑脊液组, HPC 脑脊液组的 Bax 表达荧光强度和阳性细胞数均显著降低 (均 $P < 0.01$) (表 2, 图 5)。

正常对照、OGD 组 Bcl-2/Bax (阳性细胞数比值) 分别为 1.06 ± 0.45 和 0.59 ± 0.32 , 正常脑脊液、HPC 脑脊液组 Bcl-2/Bax 较 OGD 组均显著升高 ($P < 0.01$), 而 HPC 脑脊液组 Bcl-2/Bax 又较正常脑脊液组显著升高 ($P < 0.01$) (表 2)。

3 讨论

我们在既往实验中发现 OGD 1.5 h 时神经元出现明显的凋亡特征: Annexin V/PI 染色荧光显微镜观察可见大量细胞呈单纯细胞膜绿染, 为凋亡早期细胞; 部分细胞呈细胞膜绿染伴细胞核红染, 为凋亡中晚期细胞; 少量细胞呈红色裸细胞核, 为坏死细胞, 故本实验选择 1.5 h 作为凋亡诱导时长。在本实验中, 我们应用流式细胞仪和激光共聚焦显微镜检测获得一致结果: 正常和 HPC 大鼠脑脊液对 OGD 神经元损伤均具有保护作用, 正常脑脊液、HPC 脑脊液组的凋亡情况较 OGD 组明显减轻; 与正常脑脊液组相比, HPC 大鼠脑脊液能使 OGD 处理的神经元凋亡进一步减轻, 表现出更好的神经保护效应。

探讨 HPC 大鼠脑脊液的神经保护效应, 我们推测 HPC 大鼠脑脊液可以减少 OGD 后神经元凋亡的启动, 抑制凋亡进程发展, 从而提高 OGD 后细胞存活率。在众多凋亡调节基因中, Bcl-2 家族中的 Bcl-2 和 Bax 的作用已得到广泛证实, 被认为是细胞凋亡最后共同通路之一。Bcl-2 基因编码的跨膜蛋白可通过调控凋亡执行蛋白 caspase 激活因子、减少细胞内氧化应激、抑制细胞内高钙激活的 DNA 裂解、阻断促凋亡基因作用通路以及维持线粒体结构和功能稳定等途径, 抑制线粒体通透性转换孔开放和细胞凋亡程序启动。Bax 基因是 p53 的下游基因, 它编码的蛋白受到凋亡信号刺激后激活, 与线粒体膜上的 Bcl-2 结合为异源二聚体, 拮抗 Bcl-2 的抗凋亡作用或本身形成同源二聚体直接启动凋亡连锁反应, Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达比决定细胞的最终命运, Bax 蛋白占优势时细胞凋亡, Bcl-2 蛋白占优势时细胞能够存活^[12-16]。本实验结果显示, HPC 脑脊液组的 Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 阳性细胞数比值均显著高于 OGD 组, 亦高于正常脑脊液组; 而 Bax 蛋白表达明显低于 OGD 组和正常脑脊液组, 说明 OGD 能诱导 Bax 蛋白高表达, 抑制 Bcl-2 蛋白表达, 促进细胞凋亡; 而 HPC 大鼠脑脊液可通过上调 Bcl-2 表达, 下调 Bax 表达, 维持线粒体结构和功能稳定性, 提高神经元缺氧耐受性, 抑制细胞凋亡的启动和凋亡进程的发展。这为我们之前 HPC 研究中观察到的 HPC 能减少缺氧后细胞凋亡和坏死形态学改变^[5,6,17]、减轻动物整体缺氧缺血后神经功能损伤^[1-4,18] 提供了证据。

在本实验中, 正常大鼠脑脊液也表现出一定的神经保护作用。这可能与脑脊液本身含有的神经生长因子等有益于神经元生存微环境的介质和分子有关^[7-10]。脑脊液较之脑匀浆提取物蛋白含量低, 更易通过血脑屏障, 较少引起不良反应, 能在保留较多低氧保护性成分的状态下作用于颅内缺血灶, 发挥特异高效治疗作用, 如能制成新型抗缺血药物, 将提高临床缺血性脑损伤的治疗效果。

参考文献

- 1 Zhang YB (张颜波), Lu GW, Yang MF, Niu JZ, Sun BL. Changes in Bcl-2 and Caspase-3 expression in cortex of hypoxic preconditioning mice. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2008; 60(2): 249–253 (Chinese, English abstract).
- 2 Zhang YB (张颜波), Lu GW, Yang MF, Wang X, Niu JZ, Sun BL. Changes in the bcl-2 expression and caspase-3 activity in mouse ependyma during hypoxic preconditioning. *Chin J Neuromed* (中华神经医学杂志) 2007; 6(10): 986–988 (Chinese, English abstract).
- 3 Niu JZ (牛敬忠), Zhang YB, Yang MF, Liu LL, Sun BL. Protective effect of hypoxic preconditioning against cerebral ischemic injury induced by acute cerebral infarction in mice. *Chin J Neuromed* (中华神经医学杂志) 2009; 8(8): 777–780 (Chinese, English abstract).
- 4 Zhang YB (张颜波), Lu GW, Yang MF, Wang X, Sun BL, Niu JZ. Changes in the Bcl-2 expression and Caspase-3 activity in hippocampus of hypoxic preconditioning mice. *Chin J Neurol* (中华神经科杂志) 2007; 40(8): 553–555 (Chinese, English abstract).
- 5 Yang MF (杨明峰), Zhang YB, Sun BL, Niu JZ, Lu GW. Effect of homogenate from hypoxia-preconditioned mice on rat embryonic hippocampal neurons with hypoxic/reoxygenation injury. *Chin J Neuromed* (中华神经医学杂志) 2009; 8(11): 1094–1097 (Chinese, English abstract).
- 6 Liu L (刘亮), Lu GW. Protective effect of protein-free supernatant of brain homogenate taken from hypoxia preconditioned mice on synaptosome membrane exposed to hypoxia. *Chin J Neurosci* (中国神经科学杂志) 2001; 17(4): 373–375 (Chinese, English abstract).
- 7 Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischemic tolerance. *Nature Rev Neurosci* 2006; 7(6): 437–448.
- 8 Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, Maynard T, Gonzalez D, Kim S, Ye P, D'Ercole AJ, Wong ET, LaMantia AS, Walsh CA. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* 2011; 69(5): 893–905.
- 9 Cui XY, Li L, An YY, Lu GW. Changes in the contents of

- glycogen and lactate in the brain and blood during hypoxic preconditioning. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2002; 4(5): 548–549.
- 10 Johanson C, Stopa E, Baird A, Sharma H. Traumatic brain injury and recovery mechanisms: peptide modulation of periventricular neurogenic regions by the choroid plexus-CSF nexus. *J Neural Transm* 2011; 118(1): 115–133.
- 11 Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ. Hypoxic preconditioning and hypoxic- ischemic brain damage in the immature rat: pathologic and metabolic correlates. *J Neurochem* 1998; 71: 1215–1220.
- 12 Romei MJ, Espina V, Lowenthal M, Espina BH, Petricoin EF 3rd, Liotta LA. CSF proteome: a protein repository for potential biomarker identification. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2(1): 57–70.
- 13 Epstein MH, Feldman AM, Brusilow SW. Cerebrospinal fluid production: stimulation by cholera toxin. *Science* 1977; 196: 1012–1013.
- 14 Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 17: 260–263.
- 15 Rybnikova E, Sitnik N, Gluschenko T, Tjulkova E, Samoilov MO. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats. *Brain Res* 2006; 1089(1): 195–202.
- 16 Groc L, Bezin L, Jiang H, Jackson TS, Levine RA. Bax, Bcl-2, and cyclin expression and apoptosis in rat substantia nigra during development. *Neurosci Lett* 2001; 306: 198–202.
- 17 Li YX (李育娴), Xia ZL, Chen LB, Ye WJ, Yang MF, Sun QL. The changes of bcl-2, bax expression and neuron apoptosis in the hippocampus. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2005; 57(1): 54–58 (Chinese, English abstract).
- 18 Chen Y, Ginis I, Hallenbeck JM. The protective effect of ceramide in immature rat brain hypoxia-ischemia involves up-regulation of bcl-2 and reduction of TUNEL-positive cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(1): 34–40.