

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.051

成年哺乳动物皮质区神经发生的研究进展*

冯莹 李志远[△]

(中南大学湘雅医学院 人体解剖与神经生物学系 湖南 长沙 410013)

摘要:神经发生是神经干细胞在适当的条件下分化成功能性整合神经元的过程,主要包括细胞的增殖、迁移、分化和存活。成年神经发生区以前脑室管膜下区(Subventricular zones, SVZ)和海马齿状回颗粒层下区(Subgranular zones, SGZ)为主,但皮质作为神经元和神经胶质细胞数量最多、分布最广,同时也是哺乳动物高度发展的脑区,是否有成年神经元新生,已成为近年来神经科学领域的研究热点^[1,2]。现本文就未成熟神经元在皮质区的研究方法、分布、来源与转归、病理生理功能影响等方面探讨成年哺乳动物皮质神经发生现象。

关键词:皮质;神经发生;神经干细胞

中图分类号:Q42;Q95-3;R322.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)29-5797-04

Advancement in Research on Neurogenesis Occurs in Adult Mammal Cerebral Cortex*

FENG Ying, LI Zhi-yuan[△]

(Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan, 410013, China)

ABSTRACT: Neurogenesis is a process which neural stem cells differentiate into functional neurons, including cell proliferation, migration, differentiation and survival. Neurogenesis occurs in the adult brain in a constitutive manner under physiological circumstances within two regions: the dentate gyrus of the hippocampus and the subventricular zone of the lateral ventricles. As cerebral cortex is well developed area with numerous neurons and astrocytes in mammals, whether there is adult neurogenesis is controversial^[1,2]. Here research on neurogenesis occurs in adult mammal cerebral cortex will be reviewed.

Key words: cortex; neurogenesis; neural stem cells

Chinese Library Classification(CLC): Q42; Q95-3; R322.8 **Document code:** A

Article ID :1673-6273(2014)29-5797-04

长期以来,中枢神经系统被认为无自我更新能力。Ramon Cajal 指出一旦发育完成,轴突和树突停止生长,神经网络将固定不变,成年中枢神经系统内只有神经元的死亡,没有再生。然而随着观察方法的改进,越来越多的研究结果否定了传统的观念,除前脑室管膜下区和海马齿状回颗粒层下区外,中枢神经系统的其他区域,如杏仁核、纹状体、小脑、下丘脑、脊髓、大脑皮质等也被报道存在成年神经细胞新生^[3-5]。由于大脑皮质是动物进化过程中晚期出现的最高级神经中枢,是满足和调控高级神经功能活动的主要结构基础,所以用合适的技术手段探讨这一部位内的成年神经元新生具有广泛的神经生物学意义及临床科学价值。

1 成年皮质神经发生的观察方法

1.1 放射自显影与核苷示踪标记法

上个世纪 60-80 年代,有学者通过将一定量的 ³H 胸腺嘧啶注入成年猫和大鼠的体内,观察到皮质区可能存在潜在性的新生神经元^[6,7]。³H 胸腺嘧啶能在细胞周期的 S 期特异性地整

合到细胞的 DNA 中,通过放射自显影观察结合免疫细胞化学技术,可以明确增殖细胞与前体细胞的表型,因此是测定细胞分裂的经典方法。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromodeoxyuridine, BrdU)也能整合入 S 期的细胞,但 BrdU 为非放射性标记法,可判断细胞增殖速度,是反映细胞动力学的重要指标。目前,Br-dU 及其类似物氯去氧腺苷(chlorodeoxyuridine, CldU)、碘苷(iododeoxyuridine, IdU)已替代 ³H 胸腺嘧啶成为研究成年神经发生的重要手段^[8]。但是随着细胞分裂,注入体内的 BrdU 不排除由于被稀释,或因较长的细胞周期导致摄入不足,从而被免疫组化方法漏检的可能性^[9]。此外, BrdU 的毒性作用也有可能影响未分化状态神经前体细胞的存在^[10]。

1.2 放射性 C¹⁴ 标记法

和 BrdU 类似,放射性 C¹⁴ 也能够整合入 DNA 中。相比之下, BrdU 标记法为注射外源性物质整合入细胞,而 C¹⁴ 整合过程比较自然,不需要医学干预。但 C¹⁴ 标记法只能检测出一个时间点的部分新生神经元,检测率低。由于 C¹⁴ 不能检测低水平产生的神经元,并且不能持续^[11]的整合入细胞中,所以有学者认为

* 基金项目:中国博士点基金项目(32800014)

作者简介:冯莹(1986-),女,硕士,主要研究方向:神经发育,电话:15116478640, E-mail: wafq111111@163.com

[△] 通讯作者:李志远,教授,博士生导师, E-mail: lizhiyuan2000@yahoo.com

(收稿日期:2013-11-23 接受日期:2013-12-18)

人脑新皮质在出生后不存在神经发生^[1]。

1.3 逆转录病毒免疫荧光蛋白标记法

鉴于逆转录病毒的功能整合作用以及转基因的持续表达需要借助细胞的分裂,因此可将表达绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)的逆转录病毒立体定向注入脑区。由于GFP的报告基因仅于干细胞未分化时被激活,一旦细胞分化则关闭。所以可根据荧光的位置来判断成年神经干细胞分裂产生的GFP阳性神经元的存在、位移及发展过程^[11]。

1.4 神经发生特异性标记物的免疫化学染色

Nestin为巢蛋白,存在于神经元中间丝上。表达Nestin的细胞具有多潜能性、高增殖性、限制性自我更新能力等,通过检测Nestin的表达以确定中枢神经系统多潜能干细胞的存在,是目前普遍采用的方法,具有高选择性^[12]。DCX(Doublecortin),是一种微管相关蛋白,其主要表达在迁移中的神经元胞体和前导突起,以及分化中的神经元轴突上。在成年哺乳动物的脑内,DCX短暂表达在新生神经元中,这些神经元迁移并最终分化成熟^[13]。PSA-NCAM(Polysialic Acid NCAM)介导细胞的粘附和识别,其表达水平与神经干细胞/祖细胞迁移、轴突生长及对功能活动诱导的可塑性有关,成年后,除此之外,RNA结合蛋白Mussashi、增殖细胞核抗原PCNA、Ki67、早期神经元命运决定因子PAX6、微管相关蛋白MAP-2(随着年龄的增长MAP-2被组织蛋白酶D降解)、早期神经元标志物 β -III Tubulin、成熟中间神经元标记物Parvalbumin、钙结合蛋白Calbindin、钙视网膜蛋白Calretinin等都在研究成年未成熟神经元增殖和分化中起重要作用的表达仅限制在保留可塑性的区域。除此之外, RNA结合蛋白Mussashi、增殖细胞核抗原PCNA、Ki67、早期神经元命运决定因子PAX6、微管相关蛋白MAP-2(随着年龄的增长MAP-2被组织蛋白酶D降解)、早期神经元标志物 β -I-II Tubulin、成熟中间神经元标记物Parvalbumin、钙结合蛋白Calbindin、钙视网膜蛋白Calretinin等都在研究成年未成熟神经元增殖和分化中起作用^[12-14]。

2 成年神经发生在不同皮质区的分布

大脑皮质按进化序列可分古皮质、旧皮质、新皮质。新皮质在人类占大脑皮质96%以上,古皮质包括海马和齿状回,属于进化上古老的边缘系统的一部分。旧皮质为古、新皮质的过渡区,发生上与嗅觉关系密切,分梨状皮质和内嗅皮质等。关于成年哺乳动物皮质内神经元的发生,已有报道在啮齿类、豚鼠、猫、兔、刺猬、獭及包括人类在内的灵长类的大脑皮质内均有相当数量的未成熟神经元存在^[15-21]。

2.1 古皮质

海马齿状回是目前公认的成年神经元新生区域,神经科学界普遍认为这些新生的神经元可能与海马的学习记忆功能有关^[22]。学习、记忆和其他刺激如环境强化等都能增强此处神经元的分化和存活^[24]。但也有研究发现,在不同种类的热带蝙蝠海马齿状回中,仅有少数存在低水平的神经发生,鉴于蝙蝠是唯一飞行类的哺乳动物,并且具有很好的3-D导航能力,因此,认为海马齿状回的神经发生与记忆功能有关的观点应被重新考虑^[25,26]。相对于成年啮齿类动物而言,灵长类动物海马的神经发生率仅为啮齿类动物的极低,提示不同种属古皮质区的神经

发生强度可能有所不同^[27]。目前,海马齿状回神经发生的研究已基本明确。此区域血管富集,潜在的神经干胚样细胞共表达GFAP和Nestin,经过短暂增殖后,分化成未成熟神经元,开始表达DCX和PSA-NCAM,此时细胞呈高度增殖状态,并开始向颗粒层迁移。新生神经元进入有丝分裂后期,并表达钙视网膜蛋白Calretinin和NeuN。有丝分裂后,细胞的树突伸向分子层,接受信号输入。轴突伸向海马的CA3区,建立突触联系。此时的神经元不再表达Calretinin,而表达成熟中间神经元标记物Calbindin,分化成有功能的颗粒细胞,整合入神经环路中^[12]。

2.2 旧皮质

梨状皮质是嗅神经可塑性的主要输出结构,接受嗅球神经元通过外侧嗅束发出的信号,有感觉和记忆加工作用^[28]。强化嗅觉刺激,可使梨状皮质新生神经元的存活和分化加强,嗅球神经发生加强,这对气味的识别有重要意义^[29]。在成年啮齿类动物梨状皮质和内嗅皮质中DCX阳性细胞主要分布在II/III层^[20,27]。这些细胞表达PSA-NCAM、DCX、TUC-4,不表达细胞活性因子C-fos和Arc,镜下观察发现它们大多缺乏突触连接,具有未成熟神经元的超微结构,认为这些细胞是早期未成熟神经元,保持未分化状态,并且随着年龄的增长而逐渐减少^[30]。在灵长类、猫的梨状皮质和嗅球中也发现了类似神经元^[16]。在兔和豚鼠的梨状皮质及内嗅皮质中也有DCX/PSA-NCAM双标细胞富集,它们可能与非空间学习记忆网络有关^[20,31]。

2.3 新皮质

从上个世纪起,成年哺乳动物大脑新皮质区是否存在神经发生现象就是一个很有趣的话题。早在1912年就有报道称,在成年新皮质区域存在细胞增生。采用³H胸腺嘧啶示踪技术,Altman及其同事在成年大鼠新皮质内发现未成熟神经元的增加^[6]。Michael S. Kaplan结合放射自显影和连续切片电子显微镜技术,在暴露于复杂环境中的3月龄大鼠的视皮质中也发现了³H胸腺嘧啶标记的细胞。但当时学术界对成年哺乳动物新皮质内是否存在神经发生持怀疑态度^[7,32]。Rakic用BrdU逆行示踪法在啮齿类动物新皮质区域未能发现新生神经元,却发现了被标记的星形胶质细胞。Bhardwaj等通过放射性C¹⁴标记法未能在人脑新皮质中发现C₁₄标记的新生神经元。因此认为某些成年哺乳动物的新皮质区缺乏成年神经发生^[33]。Rasic等认为人脑新皮质中缺乏神经再生与人类进化过程有关^[34,35]。而Gould则认为未能找到成年神经发生的证据可能与当时的技术有关^[1]。另外,成年哺乳动物新皮质神经发生现象之所以存在一系列争论,可能也与动物个体条件有关:如饲养条件、遗传因素等^[36,37]。

通过计算在成年灵长类动物颞叶深部BrdU细胞中成熟神经元、未成熟神经元、星形胶质细胞的比例,发现,约1/4的新生神经元能够分化为成熟神经元^[38]。在成年豚鼠、猫以及灵长类动物新皮质的区域均有DCX阳性细胞的存在。在不同的皮层位置,这些细胞的大小、形态、染色密度、突起数量及长度也各不相同。DCX阳性细胞主要分布在第II层,形态相似的小胞体细胞紧密结合,成簇出现。而中大胞体神经元则分布在较深的皮层。这些被标记的细胞随动物年龄逐渐增长而减少,

并且没有出现明显的凋亡(TUNEL),但是该群细胞共表达未成熟神经元标记物 PSA-NCAM, Tuj-1, 暗示这些细胞可能与皮质的可塑性有关^[18,20]。有学者还发现 DCX 和 NeuN 共表达,并且表达的相对强度与胞体形态大小有相关性,暗示了新皮质 DCX 神经元具有分化成熟趋势^[15,16,39]。在正常的成年哺乳动物新皮质中有低水平的神经发生,并且,在不同的种属,神经发生程度明显不同,例如在成年灵长类动物明显,大鼠次之,而成年小鼠大脑新皮质中神经发生则相对罕见,因此,关于成年哺乳动物大脑新皮质新生神经元的种属差异仍需进一步研究。

3 成年哺乳动物皮质区未成熟神经元的来源及转归

目前已基本公认在成年哺乳动物皮质区有未成熟神经元的广泛分布,但学术界对于这些神经元的起源和分化成熟去向等问题仍存在很大争议。Gomez-Climent 通过对胚胎期大鼠注射 BrdU 示踪发现,皮质 II 层 PSA-NCAM 阳性细胞在胚胎发育期产生,这些细胞在个体成年后仍未分化,一直保持未成熟状态,在老年大鼠皮质 II 层也没有发现明显皱缩的细胞核,因此推测 II 层 PSA-NCAM 阳性细胞所在区域是成年期未成熟细胞的储蓄池,这些未分化的细胞可能会在不同的条件刺激下被激活,并进一步分化成熟^[27]。Luzzati 随后在兔的新皮质 II/III 层,也发现了 DCX/PSA-NCAM 共表达的未成熟神经元,认为这些细胞在出生前已经产生,是不同皮质衍生物中相对保守的细胞^[29]。

但是有其他学者则认为这些未成熟神经元在出生后一直到成年期均有产生。由于梨状皮质直接接受嗅觉信号输入, Bernier 认为该区域的神经发生可能与嗅球新生神经元的植入类似,即从经典的成年神经发生区前脑室管膜下区(SVZ)迁移而来,并认为这些未成熟神经元有很大一部分是少突胶质细胞,这与 SVZ 成年神经发生在髓鞘形成中的作用一致^[38]。Shapiro 等通过比较海马齿状回和梨状皮质中的未成熟神经元后也倾向于这种观点,并指出相较于 RMS 连续的迁移链,梨状皮质中“迁移链”的不连续是由不同路径神经发生的迁移率不同造成的^[19]。

我们课题组发现在新皮质区域,未成熟神经元主要在皮质 II 层,并且主要是小胞体神经元,而大胞体神经元则有向皮质深部转移的趋势。这些大胞体神经元具有复杂的突起,DCX 表达水平下降,并共表达成熟神经元标记物 GABA、NeuN 等。这些形态和染色差异揭示了神经元分化成熟的趋势。根据 DCX 细胞在不同皮层由浅入深的形态学成熟的趋势,结合皮质中间神经元大多是从皮质下结构迁移而来的实验证据,推测皮质区的 DCX 阳性细胞可能是由缘层 I 层通过切线迁移而来,并且继续向皮层深部迁移,分化成熟为中间神经元^[16,39]。由此进一步推测出,皮质 I 层可能是哺乳动物出生后 GABA 能中间神经元的成年神经发生巢^[15]。并认为这将与成年哺乳动物中间神经元的可塑性有一定联系。Kutsuna N 对急性压力暴露下大鼠皮质的研究发现,皮质 DCX 阳性细胞减少,但 DCX/NeuN, DCX/Parvalbumin 共表达的细胞数变化不大,而且并没有检测到明显的细胞死亡,这也为皮质 DCX 阳性神经元能够发育成

GABA 能中间神经元的假说提供了实验证据^[22]。然而关于皮质区 DCX 阳性神经元最终演变成皮质中间神经元的假说,另一些学者持不同意见,他们认为这些神经元分化为兴奋性锥体神经元,并对损伤后的功能修复有重大意义^[20,40]。

4 功能改变对成年皮质神经发生的影响

成年哺乳动物皮质神经发生是一个动态过程,各种内源性和外源性因子在不同阶段发挥着不同作用。生理活动如新环境刺激能够促进皮质神经发生^[15]。饲养环境的改变作为一种应激方式也对皮质内新生神经元也有一定影响。慢性应激在减少神经增殖的同时,也减少了神经元的存活,但对神经元的分化并没有明显的影响。然而,急性应激可能仅是暂时抑制神经细胞的增殖,对最终生成的细胞数目并没有影响^[41,42]。最近一系列报道中也提示,在不同的病理学条件下如局部缺血或全脑广泛缺血、神经退行性病变、热损伤、化学物质引起的扩散性抑制和电损伤等,成年哺乳动物大脑皮质区域大多有新生神经元的产生。Tonchev, A.B. 研究发现缺血导致皮质区神经元受损的同时也刺激了该区的神经发生^[34]。Ohira, K 等认为大鼠大脑皮质 I 层的祖细胞在正常状态下是静止的,但脑组织缺血后被激活,并产生新生的皮质神经元,特别是中间神经元^[43]。虽然脑组织缺血后,内源性的神经发生作用能够部分代替损伤的神经元的功能,但是,对于新生神经元整合入相应脑区神经环路的角度以及是否能够真正建立起有效的功能联系,仍需要进一步证实。局部损伤如辐射能刺激皮质神经干/祖细胞的增殖分化^[44]。低剂量 X 线持续照射会减少新皮质 DCX 阳性细胞数量从而减少神经发生^[15]。另外衰老、癫痫等也会导致成年哺乳动物皮质神经发生受损^[22,45]。

这些生理、病理功能的改变可能通过细胞因子激活不同的信号转导通路如受体酪氨酸蛋白激酶途径、Notch1 信号途径等调节神经干/祖细胞增殖、分化,从而影响了成年皮质的神经发生。

5 展望

近年神经科学领域关于成年大脑皮质神经发生的研究已取得了显著的进展,但仍有许多问题存在争议,如皮质区未成熟神经元是否为成年期新生,未成熟神经元的功能意义、调控机制等仍需要大量的实验研究证据。这些研究的深入将对生理情况下皮质的可塑性以及皮质相关疾患的病理机制和治疗提供思路。

参考文献(References)

- [1] Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals?[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(6): 481-488
- [2] Jang M H, Bonaguidi M A, Kitabatake Y, et al. Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(2): 215-223
- [3] Pierce A A, Xu A W. De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance[J]. J Neurosci, 2010, 30(2): 723-730

- [4] Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 53(1): 198-214
- [5] Yuan T F, Arias-Carrion O. Adult neurogenesis in the hypothalamus: evidence, functions, and implications [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011, 10(4): 433-439
- [6] Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats[J]. *Anat Rec*, 1963, 145: 573-591
- [7] Kaplan M S. Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex [J]. *J Comp Neurol*, 1981, 195(2): 323-338
- [8] Frum R A, Deb S, Deb S P. Use of the DNA fiber spreading technique to detect the effects of mutant p53 on DNA replication [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 962: 147-155
- [9] Eisch A J, Mandyam C D. Adult neurogenesis: can analysis of cell cycle proteins move us “Beyond BrdU”?[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2007, 8(3): 147-165
- [10] Lehner B, Sandner B, Marschallinger J, et al. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival[J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 345(3): 313-328
- [11] Hansen D V, Lui J H, Parker P R, et al. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex[J]. *Nature*. 2010, 464(7288): 554-561
- [12] Von Bohlen U H O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus[J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 329(3): 409-420
- [13] Campos A C, Ortega Z, Palazuelos J, et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013: 1-13
- [14] Kumazawa-Manita N, Hama H, Miyawaki A, et al. Tool use specific adult neurogenesis and synaptogenesis in rodent (*Octodon degus*) hippocampus[J]. *PLoS One*. 2013, 8(3): e58649
- [15] Xiong K, Cai Y, Zhang X M, et al. Layer I as a putative neurogenic niche in young adult guinea pig cerebrum [J]. *Mol Cell Neurosci*. 2010, 45(2): 180-191
- [16] Cai Y, Xiong K, Chu Y, et al. Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups[J]. *Exp Neurol*, 2009, 216(2): 342-356
- [17] Bartkowska K, Turlejski K, Grabiec M, et al. Adult neurogenesis in the hedgehog (*Erinaceus concolor*) and mole (*Talpa europaea*)[J]. *Brain Behav Evol*, 2010, 76(2): 128-143
- [18] Bloch J, Kaeser M, Sadeghi Y, et al. Doublecortin-positive cells in the adult primate cerebral cortex and possible role in brain plasticity and development[J]. *J Comp Neurol*, 2011, 519(4): 775-789
- [19] Shapiro L A, Ng K L, Kinyamu R, et al. Origin, migration and fate of newly generated neurons in the adult rodent piriform cortex[J]. *Brain Struct Funct*, 2007, 212(2): 133-148
- [20] Luzzati F, Bonfanti L, Fasolo A, et al. DCX and PSA-NCAM expression identifies a population of neurons preferentially distributed in associative areas of different pallial derivatives and vertebrate species[J]. *Cereb Cortex*, 2009, 19(5): 1028-1041
- [21] Srikandarajah N, Martinian L, Sisodiya S M, et al. Doublecortin expression in focal cortical dysplasia in epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2009, 50(12): 2619-2628
- [22] Kutsuna N, Suma T, Takada Y, et al. Decrease in doublecortin expression without neuronal cell death in rat retrosplenial cortex after stress exposure[J]. *Neuroreport*, 2012, 23(4): 211-215
- [23] Deng W, Aimone J B, Gage F H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(5): 339-350
- [24] Glasper E R, Schoenfeld T J, Gould E. Adult neurogenesis: optimizing hippocampal function to suit the environment [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 227(2): 380-383
- [25] Amrein I, Slomianka L. A morphologically distinct granule cell type in the dentate gyrus of the red fox correlates with adult hippocampal neurogenesis[J]. *Brain Res*, 2010, 1328: 12-24
- [26] Amrein I, Dechmann D K, Winter Y, et al. Absent or low rate of adult neurogenesis in the hippocampus of bats (*Chiroptera*)[J]. *PLoS One*, 2007, 2(5): e455.
- [27] Gomez-Climent M A, Castillo-Gomez E, Varea E, et al. A population of prenatally generated cells in the rat paleocortex maintains an immature neuronal phenotype into adulthood[J]. *Cereb Cortex*, 2008, 18(10): 2229-2240
- [28] Lazarini F, Lledo P M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? [J]. *Trends Neurosci*, 2011, 34(1): 20-30
- [29] Pekcec A, Loscher W, Potschka H. Neurogenesis in the adult rat piriform cortex[J]. *Neuroreport*, 2006, 17(6): 571-574
- [30] Varea E, Castillo-Gomez E, Gomez-Climent M A, et al. Differential evolution of PSA-NCAM expression during aging of the rat telencephalon[J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(5): 808-818
- [31] Hargreaves E L, Rao G, Lee I, et al. Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus[J]. *Science*, 2005, 308(5729): 1792-1794
- [32] Kaplan M S. Environment complexity stimulates visual cortex neurogenesis: death of a dogma and a research career [J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24(10): 617-620
- [33] Rakic P. Neuroscience. No more cortical neurons for you[J]. *Science*, 2006, 313(5789): 928-929
- [34] Tonchev A B, Yamashima T, Sawamoto K, et al. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 81(6): 776-788
- [35] Bonfanti L, Ponti G. Adult mammalian neurogenesis and the New Zealand white rabbit[J]. *Vet J*, 2008, 175(3): 310-331
- [36] Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? [J]. *Science*, 1962, 135(3509): 1127-1128
- [37] Abrous D N, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(2): 523-569

- [14] Haldar S, Sharma N, Gupta VK, et al. Efficient diagnosis of tuberculous meningitis by detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in cerebrospinal fluid filtrates using PCR [J]. J Med Microbiol, 2009, 58(Pt 5): 616-624
- [15] Gao Y, Ou Q, Huang F, et al. Improved diagnostic power by combined interferon-gamma release assay and nested-PCR in tuberculous pleurisy in high tuberculosis prevalence area [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 66(3): 393-398
- [16] Kibiki GS, Mulder B, van der Ven AJ, et al. Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for M. tuberculosis in bronchoalveolar lavage fluid[J]. Trop Med Int Health, 2007, 12(10): 1210-1217
- [17] Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment of Mycobacterium tuberculosis and its possible use in diagnosis[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(10): 2163-2168
- [18] 孟祥红, 匡铁吉, 董梅. 应用多重 PCR 方法快速鉴定结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32: 1177-1178
Meng Xiang-hong, Kuang Tie-ji, Dong Mei. Application of multiplex PCR in rapid identification of Mycobacterium tuberculosis and non-tuberculosis Mycobacteria [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2007, 32: 1177-1178
- [19] Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis[J]. J Infect Dis, 1990, 161(5): 977-981
- [20] Linton CJ, Smart AD, Leeming JP, et al. Comparison of random amplified polymorphic DNA with restriction fragment length polymorphism as epidemiological typing methods for Mycobacterium tuberculosis[J]. Clin Mol Pathol, 1995, 48(3): 133-135
- [21] Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, et al. Insertion element IS986 from Mycobacterium tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(9): 2051-2058
- [22] Hashemi A, Shojaei H, Heidarieh P, et al. Genetic diversity of Iranian clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis [J]. New Microbiol, 2012, 35(1): 61-65
- [23] Englund S, Ballaqi-Pordá ny A, Bölske G, et al. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999, 33(3): 163-171
- [24] Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterbacteria [J]. Mol Microbiol, 1991, 5(4): 825-834
- [25] Sechi LA, Zanetti S, Dupré I, et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of Mycobacterium tuberculosis strains[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(1): 128-132

(上接第 5800 页)

- [38] Bernier P J, Bedard A, Vinet J, et al. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(17): 11464-11469
- [39] Xiong K, Luo D W, Patrylo P R, et al. Doublecortin-expressing cells are present in layer II across the adult guinea pig cerebral cortex: partial colocalization with mature interneuron markers [J]. Exp Neurol, 2008, 211(1): 271-282
- [40] Guo F, Maeda Y, Ma J, et al. Pyramidal neurons are generated from oligodendroglial progenitor cells in adult piriform cortex [J]. J Neurosci, 2010, 30(36): 12036-12049
- [41] Schoenfeld T J, Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis[J]. Exp Neurol, 2012, 233(1): 12-21
- [42] Wentz C T, Magavi S S. Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus[J]. Neuropharmacology, 2009, 56(6-7): 994-1000
- [43] Ohira K, Furuta T, Hioki H, et al. Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer I progenitor cells[J]. Nat Neurosci, 2010, 13(2): 173-179
- [44] Sirko S, Neitz A, Mittmann T, et al. Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex[J]. Brain, 2009, 132(Pt 8): 2252-2264
- [45] Zhang X M, Cai Y, Chu Y, et al. Doublecortin-expressing cells persist in the associative cerebral cortex and amygdala in aged nonhuman primates[J]. Front Neuroanat, 2009, 3: 17