

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.12.001

· 基础研究 ·

局部脑缺血再灌注损伤小鼠脑组织 TMEM166 的表达
及其与脑细胞凋亡的关系*王 瑜 周凌雪 王天龙 赵 磊 李 丽[△]

(首都医科大学宣武医院麻醉科 北京 100053)

摘要 目的:观察跨膜蛋白 166 (Transmembrane protein 166, TMEM166)基因在小鼠局部脑缺血再灌注损伤(MCAO)后的表达改变及其对脑细胞凋亡的影响。**方法:**C57/BL6J 雄性小鼠 50 只,体重 22-28 g,采用线栓法制作 MCAO 模型,缺血后动物随机分为再灌注 6、12、24、48 h 组。采用免疫组化染色的方法观察缺血侧大脑 TMEM166、Caspase 3 的阳性细胞数目,TUNEL 标记法检测细胞凋亡情况,Western blot 检测不同再灌注时间点 TMEM166、Caspase 3 蛋白水平的表达。**结果:**缺血侧 TMEM166 的表达随着再灌注时间的延长而增加,24 h 达到高峰,48 h 后逐渐下降;再灌注 6 h 后 Caspase 3 观察到有表达,同样随着再灌注时间而升高,24 h 达到高峰。缺血侧细胞凋亡数量变化趋势与 TMEM166 基本一致,对侧大脑半球上述指标无明显变化。**结论:**小鼠局部脑缺血再灌注损伤时伴有 TMEM166 的表达升高,可能通过激活 Caspase 3 引起脑细胞凋亡。

关键词:TMEM166;脑缺血再灌注;凋亡

中图分类号:R-332;R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)12-2201-04

Effect of TMEM166 on Neuron Apoptosis in Mice after Focal Brain Ischemia
Reperfusion Injury*WANG Yu, ZHOU Ling-xue, WANG Tian-long, ZHAO Lei, LI Li[△]

(Department of Anesthesiology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100053, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of TMEM166(Transmembrane protein 166) and its effect on neuron apoptosis in mice after middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Methods:** Fifty C57/BL6J male mice weighing 22-28 g were randomly divided into five groups according to different reperfusion time points at 6, 12, 24 and 48 h, respectively. TMEM166 and Caspase 3 were measured by immunochemistry staining. TUNEL staining was conducted to observe the neuron apoptosis. Protein levels of TMEM166 and Caspase 3 were detected by Western blot. **Results:** TMEM166 was induced in mice after cerebral ischemia reperfusion injury, and it has peaked at 24 h after injury in the ischemia hemisphere. Cleaved Caspase 3 began to increase at 6 h following MCAO, which then kept going up over time and also reached the highest level at 24 h after ischemia insult. Changing pattern of TMEM166 level in this process was consistent with the changes of TUNEL positive cell numbers. No changes of TMEM166 was found in the contralateral hemisphere. **Conclusion:** TMEM166 was induced after MCAO, and it could lead to cell apoptosis by activating Caspase 3.

Key words: TMEM166; Cerebral ischemia/reperfusion; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-332; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)12-2201-04

前言

TMEM166(transmembrane protein 166, 也称为 FLJ13391)基因定位于人 2 号染色体短臂 12 区(2p12),进化较保守,是最近通过高通量筛选首次证实与程序性细胞死亡相关的人类新基因^[1-3]。TMEM166 蛋白相对分子量约 17450 KDa,表达产物由 152 个氨基酸组成,在人体多种组织广泛表达,与细胞凋亡密切相关^[4-9]。本研究拟观察脑缺血再灌注损伤模型 TMEM166 的

表达变化,探讨其与脑缺血损伤后神经细胞凋亡之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

戊巴比妥钠购自广州莱绿宠商贸有限公司;TMEM166、Cleaved Caspase 3 购自美国 Santa cruz 公司;ABC 过氧化物酶试剂盒、抗兔 ABC 过氧化物酶试剂盒购自上海鲁汶生物科技有限公司;Western blot 相关试剂购自美国 bio-rad 公司;光学

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81500996);北京市 215 高层次卫生技术人才学术带头人资助项目(008-0027);

北京市医院管理局“登峰计划”专项(DFL20150802)

作者简介:王瑜(1980-),博士研究生,主治医师,主要研究方向:脑血管病,电话:13041234428,E-mail: he13041234428@163.com

[△] 通讯作者:李丽,博士后,主要研究方向:脑血管病,E-mail: lili2009kaoyan@163.com

(收稿日期:2017-12-31 接受日期:2018-01-26)

显微镜购自德国 OLMPLUS 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物选择与分组 SPF 级 C57/BL6J 小鼠 50 只, 雄性, 体重 22-28 g, 由首都医科大学实验动物科学部提供。采用随机数字表法分为缺血 90 min 再灌注 6、12、24 及 48 h 组, 每组 12 只。

1.2.2 模型制备 动物用戊巴比妥钠(3 mL/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定后做颈部正中切口, 保持头后仰, 呼吸道通畅, 钝性分离右侧颈总动脉及其上行颈外动脉、颈内动脉及翼腭动脉分支。动脉夹暂时夹闭颈总动脉, 缝线结扎翼腭动脉, 并分别于颈外动脉近心端、远心端底部留置缝线, 将其远心端打结系紧, 近心端系一个松结备用, 随后在颈外动脉的两缝线间用血管剪一个小口, 将一 5.0 自制硅胶线栓送入颈内动脉, 深度约 10 mm, 之后将近心端丝线拉紧以防血液反流渗出, 用湿润的纱布覆盖手术切口, 并注意保暖, 密切观察其变化。栓塞 1.5 h 后拔除线栓, 依次缝合切口。术中监测体温、血压、呼吸等各项生命体征, 用电热毯保持体温在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 左右, 选取手术结束动物苏醒后出现左侧前肢偏瘫评分为 6~11 分的实验动物进入下一步实验。

1.2.3 神经功能评分 采用 Garcia 神经功能评分标准^[10]用双盲法于再灌注后各时间点对实验动物进行评分, 最低评分 3 分, 最高评分 18 分, 得分越低提示神经功能损伤越严重。

1.2.4 免疫组化染色 各组动物按再灌注时间深麻醉后迅速剪开胸骨暴露心脏, 20 mL 注射器针头小心刺入左心室, 并剪开右心耳, 于左心室快速灌注预冷的生理盐直至从右心耳流出的血液颜色变浅, 随后再以冷的 4% 多聚甲醛先快后慢灌注, 待充分固定后取全脑放入 30% 蔗糖, 4°C 直冰箱保存至沉底。OTC 包埋后做连续冠状冰冻切片, 切片厚 $10\ \mu\text{m}$, 风干后 4°C 保存。盐酸抗原修复 30 min, 充分浸洗; 3% 双氧水消除内源性过氧化物酶活性 10 min (避光), 洗涤后置于牛血清封闭 30 min, 吸除血清后添加一抗孵育液 4°C 过夜, 阴性对照组用 PBS 替代, 抗体稀释浓度分别为: 抗 TMEM166(sc-162329) 1:200, 抗 Cleaved Caspase 3 (sc-70498) 1:500。充分浸洗后按照 ABC 过氧化物酶试剂盒、抗兔 ABC 过氧化物酶试剂盒的说明书进行二抗、三抗的孵育, 最后 DAB 显色并封片。Olympus BX51 显微镜观察, 光镜下棕染有细胞形态的为阳性细胞。

1.2.5 Western blot 分析 各时间点根据蛋白浓度测定结果, 取相同总量蛋白, 沸水浴变性 10 min。配分离胶(8%/10%/12%, 根据分子量大小不同选择不同浓度的胶), 及 4% 的浓缩胶, 待其聚合后开始电泳, 设置电压 45V, 当溴酚蓝过上层胶后升高电压至 100V, 根据分子量大小适时停止电泳启动电泳。电泳完毕后, 关闭电源, 取出凝胶, 放入电转液中漂洗, 按顺序正确安装电转槽, 倒入预冷的电转液, 电转结束后, 取下硝酸纤维素膜, 置入 5% 脱脂奶粉封闭液室温 2 h。1× TBST 漂洗后加入一抗 4°C 过夜, 阴性对照组用 PBS 替代, 抗体稀释浓度分别为: 抗 TMEM166(sc-162329) 1:1000, 抗 Cleaved Caspase 3(sc-70498) 1:500。复温 30 min, washing buffer 中洗 3 遍加入二抗, 室温孵育 1 h。按比例配制发光液, 室温下避光孵育 5 min。暗室下曝光显影。X 胶片曝光后经凝胶成像系统分析数据。

1.2.6 细胞凋亡计数 采用 TUNEL 法测定脑组织细胞凋亡情况。随机抽样取切片 5 张, 采用 TUNEL 法标记凋亡细胞, 切

片固定后参照试剂盒操作说明操作。阴性对照用蒸馏水代替荧光素标记的 TdT 酶。荧光显微镜下标记为绿色且与细胞核共定位的为阳性细胞, 即凋亡细胞。计数 5 个高倍视野, 分别计数凋亡细胞数目。

1.3 统计学处理

各组计量资料统计学处理采用 SPSS15.0 软件进行分析。各组采用 One-way ANOVA 方差分析, 缺血侧与对照侧的差异采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 脑组织 TMEM166 及 Caspase 3 的表达

TMEM166 及 Caspase 3 的棕黄色阳性细胞在再灌注 6 h 时已经有表达($60 \pm 2, 60 \pm 2$), 阳性细胞的数目在 12 h 时进一步增加($87 \pm 2, 83 \pm 2$), 24 h 达到高峰($120 \pm 2, 124 \pm 2, P < 0.05$), 48 h 后开始下降($89 \pm 2, 87 \pm 2$), 见(图 1、2)。

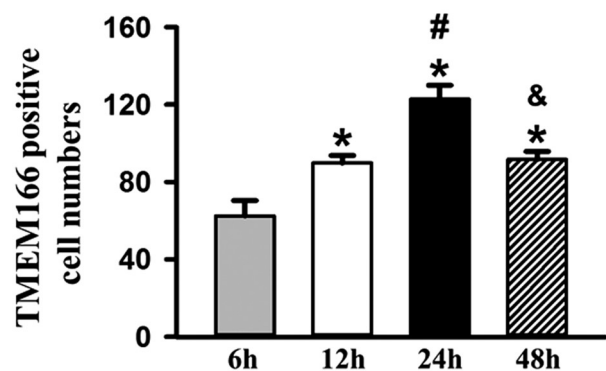


图 1 再灌注后 TMEM166 在不同时间点的阳性细胞数目

Fig.1 TMEM16 positive cell numbers at different reperfusion time points

Note: Data are expressed as. * $P < 0.05$, compared with group 6 h; # $P < 0.05$, compared with group 12 h; & $P < 0.05$, compared with group 24 h.

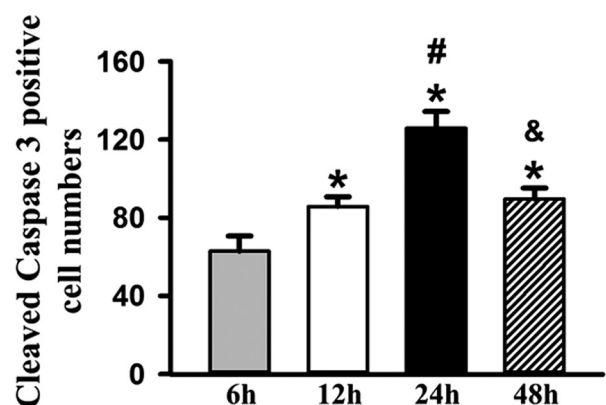


图 2 再灌注后 Cleaved Caspase 3 在不同时间点的阳性细胞数目

Fig.2 Cleaved Caspase 3 positive cell numbers at different reperfusion time points

Note: Data are expressed as. * $P < 0.05$, compared with group 6 h; # $P < 0.05$, compared with group 12 h; & $P < 0.05$, compared with group 24 h.

Western blot 结果显示 TMEM166 及 Cleaved Caspase 3 在再灌注 6 h 时已经表达, 12 h 时表达明显增强, 二者均在 24 h 表达最高, 强度约为 6 h 的 3 倍($P < 0.05$), 48 h 后开始下降, 与 12 h 之间相比无明显统计学差异, 但与 6 h 相比差异具有显著性(图 3、4)。

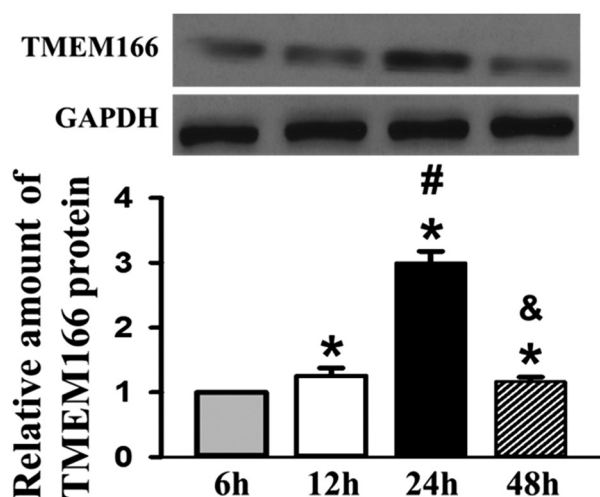


图3 再灌注后 TMEM166 在不同时间点的表达

Fig.3 TMEM166 protein expression at different reperfusion time points
Note: Data are expressed as. * $P < 0.05$, compared with group 6 h; $^{\#}P < 0.05$, compared with group 12 h; $^{\&}P < 0.05$, compared with group 24 h.

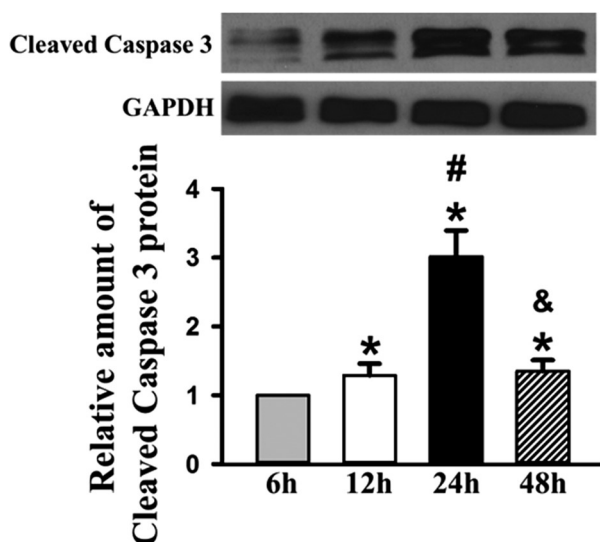


图4 再灌注后 Cleaved Caspase 3 在不同时间点的表达

Fig.4 Cleaved Caspase 3 protein expression at different reperfusion time points

Note: Data are expressed as. * $P < 0.05$, compared with group 6 h; $^{\#}P < 0.05$, compared with group 12 h; $^{\&}P < 0.05$, compared with group 24 h.

2.2 脑组织细胞凋亡情况

与细胞核共定位的 TUNEL 阳性细胞在 6 h 时已经有表达 (52 ± 2), 阳性细胞的数目在 12 h 时进一步增加 (70 ± 2), 24 h 达到高峰 (108 ± 2 , $P < 0.05$), 48 h 后开始下降 (76 ± 2), 见(图 5)。

3 讨论

据我国最新发布的高血压指南: 脑卒中的年发病率为 250/10 万, 是我国高血压人群最主要的心脑血管风险^[11]。脑卒中主要有两种类型: 出血性和缺血性脑卒中, 后者在我国卒中中所占比例高达 80%。患者发生脑卒中后, 如果不能及时干预, 缺血区周围的神经细胞很快就会死亡, 可导致严重并发症。因此, 减轻脑卒中后的神经细胞损伤是改善中风患者预后提高存活率的关键问题之一。虽然人类对缺血性脑血管病的研究从未

停止, 但目前仍无有效的治疗方法。

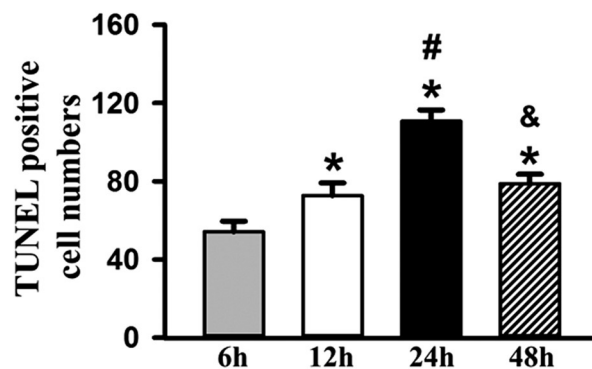


图5 再灌注后不同时间点的 TUNEL 阳性细胞数目

Fig.5 TUNEL positive cell numbers at different reperfusion time points

Note: Data are expressed as. * $P < 0.05$, compared with group 6 h; $^{\#}P < 0.05$, compared with group 12 h; $^{\&}P < 0.05$, compared with group 24 h.

缺血性脑卒中的病理生理过程复杂, 缺血后神经元死亡主要表现为凋亡、坏死和自噬。坏死主要发生缺血灶中心, 凋亡和自噬则主要发生在缺血灶中心周边的半暗带区域^[12]。目前多项研究已证实局部脑缺血再灌注损伤模型中有神经细胞凋亡的存在^[13-16], 凋亡是那缺血再灌注损伤后脑卒中疾病进展的重要机制之一, 如果能够有效抑制细胞凋亡, 则有可能挽救缺血区的神经细胞, 减小脑梗死面积, 有望改善脑卒中患者的预后。细胞凋亡是指细胞由基因调控的主动死亡过程, 特征是细胞膜的完整性和细胞代谢障碍, 是一种不伴炎症反应的能量依赖性细胞死亡程序。研究表明在脑缺血细胞凋亡过程中, 自由基的过度产生、细胞内钙超载、各种炎症因子的高表达、兴奋性氨基酸的毒性、酸中毒及多种分子或蛋白均可能参与其中^[17-21]。

TMEM166 是一个新的溶酶体 - 内质网相关的膜蛋白, 是目前通过高通量功能筛选出的一个明显下调内参活性同时诱导细胞死亡的新基因, 可以相继诱导 HeLa 细胞出现自噬和凋亡的典型特征, 最终细胞呈现 I 型和 II 型程序性细胞死亡的结局^[22,23], 但目前国内外对 TMEM166 的报道主要集中在肿瘤领域^[24-27], 其在脑缺血后神经细胞凋亡过程中的作用研究尚不多见。研究显示 TMEM166 转染的 HeLa 细胞在细胞死亡的初始阶段表现出了凋亡和自噬的典型特征, 而应用小干扰 RNA 下调 TMEM166 的表达, 则可以抑制饥饿诱导的 HeLa 细胞自噬^[9]。Wang 发现 TMEM166 转染的 HeLa 细胞在转染后期更表现出了细胞凋亡的典型特征, 说明 TMEM166 可以同时诱导 HeLa 细胞的自噬和凋亡。在人非小细胞肺癌, TMEM166 可以明显抑制肿瘤细胞的发生^[9]。Chang 等在用腺病毒 Ad5-TMEM166 转染人类肿瘤细胞时发现, TMEM166 可以通过下调 mTOR (哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, 自噬负性调节蛋白) 及其下游 p70s6k 的磷酸化水平, 使肿瘤细胞自噬水平升高, 提示 TMEM166 可能是通过调节 mTOR 的活性来调节细胞自噬^[26]。该研究团队进一步发现 TMEM166 无论是在在体及离体细胞试验中, 均有显著的抗胶质母细胞瘤生物活性的作用。分别在三种胶质母细胞瘤(U251, U87 和 SHG44)中过表达 TMEM166 后, 胶质母细胞瘤的增殖呈剂量及时间依赖性被抑制, 肿瘤细胞的自噬活性增加, 且 mTOR/RPS6KB1 信号通路被抑制^[27]。除

此之外, TMEM166 虽然在人体正常的胰腺细胞表达较弱,但在胰腺炎患者的胰岛 α 细胞中却能检测到强表达,而且在胰腺腺泡细胞癌的细胞膜及胞浆中也有不同程度的表达,令人感兴趣的是 TMEM166 在其它类型的胰腺癌,如胰腺导管癌、导管内乳头状黏液性肿瘤、粘液性囊腺瘤,实性乳头状瘤和胰腺神经内分泌肿瘤中却没有检测到^[29],这可能提示我们 TMEM166 作用的组织特异性。除了肿瘤细胞,在角膜内皮营养不良的小鼠动物模型中,锂治疗可以上调 TMEM166 的表达进而通过诱导角膜细胞自噬而起到视力保护作用^[29]。此外, TMEM166 与神经干细胞的再生与分化也关系密切,研究发现 TMEM166 通过调节自噬参与调控胚胎神经系统的发育^[30]。近来, Zhang 等还在心肌细胞特异性 TMEM166 敲除小鼠中发现 TMEM166 在心肌重塑中有重要作用, TMEM166 敲除鼠心肌细胞自噬被抑制,心肌出现纤维化,心室肥厚显著,最终发展成各种心肌病甚至导致死亡^[31]。

本研究中,我们首次对 TMEM166 在小鼠脑缺血再灌注后脑组织中的表达情况进行研究,结果显示 TMEM166 在脑组织中有表达,在脑缺血后表达升高,缺血再灌注损伤后 6 小时即有显著表达,其阳性细胞的数目及表达强度均随着再灌注时间的延长而增加,在再灌注后 24 小时达到高峰,其强度约为再灌注 6 小时时的 3 倍左右。而这一过程与 TUNEL 及 Caspase 3 的表达趋势基本吻合。Caspase 3 的表达在缺血后 6 小时开始,12 小时继续升高,同样在 24 小时达到高峰,48 小时回落。TUNEL 荧光标记的阳性细胞的数目均随着再灌注时间的延长而增加,24 小时时数目最多,随后逐渐减少。这说明 TMEM166 与脑缺血后神经细胞的凋亡之间可能存在某种关联,这一发现与我们课题组之前发表的在大鼠模型中的研究结果类似^[25]。

综上所述,小鼠局部脑缺血再灌注损伤时伴有 TMEM166 的表达升高,可能通过激活 Caspase 3 引起脑细胞凋亡,其它机制有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] D Xu, F Yang, H He, et al. Expression of TMEM166 Protein in Human Normal and Tumor Tissues [J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2013, 21(6): 543-552
- [2] J Hu, G Li, L Qu, et al. TMEM166/EVA1A interacts with ATG16L1 and induces autophagosome formation and cell death [J]. Cell Death & Disease, 2016, e2323
- [3] Sun Wei, Ma XM, Bai JP, et al. Transmembrane Protein 166 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Xinjiang, China[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012, 13(8): 3713-3716
- [4] Shen X, Shen X, Kan S, et al. EVA1A inhibits GBM cell proliferation by inducing autophagy and apoptosis[J]. Experimental Cell Research, 2017, 352(1): 130-138
- [5] Tao M, Shi XY, Yuan CH, et al. Expression profile and potential roles of EVA1A in normal and neoplastic pancreatic tissues [J]. Asian Pacific journal of cancer prevention, 2015, 16(1): 373-376
- [6] Wang L, Yu C, Lu Y, et al. TMEM166, a novel transmembrane protein, regulates cell autophagy and apoptosis [J]. Apoptosis, 2007, 12(8): 1489-1502
- [7] Y Su, F Li. Endoplasmic reticulum stress in brain ischemia[J]. International Journal of Neuroscience, 2016, 126(8): 681-691
- [8] P He, Z Peng, Y Luo, et al. High-throughput functional screening for autophagy-related genes and identification of TM9SF1 as an autophagosome-inducing gene[J]. Autophagy, 2009, 5(1): 52-60
- [9] H Xie, J Hu, H Pan, et al. Adenovirus vector-mediated FAM176A overexpression induces cell death in human H1299 non-small cell lung cancer cells[J]. BMB reports, 2014, 47(2): 104-109
- [10] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Statistical validation Stroke, 1995, 26(4): 627-34
- [11] 刘力生. 中国高血压防治指南 [J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 701-708
Liu Li-sheng. Guidelines for prevention and treatment of hypertension in China[J]. Chinese Journal of hypertension, 2011, 19(8): 701-708
- [12] 熊建忠, 易飞. 米诺环素对大鼠脑缺血再灌注后细胞凋亡的抑制作用[J]. 上海医学, 2012, 35(2): 129-132
Xiong Jian-zhong, Yi Fei. Inhibitory effect of minocycline against cell apoptosis in rats with cerebral ischemia [J]. Shang Hai Medicine, 2012, 35(2): 129-132
- [13] MP Baar, RMC Brandt, DA Putavet, et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging[J]. Cell, 2017, 169(1): 132-147
- [14] F Dufour, T Rattier, AA Constantinescu, et al. TRAIL receptor gene editing unveils TRAIL-R1 as a master player of apoptosis induced by TRAIL and ER stress[J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 9974-9985
- [15] HD Halicka, J Garcia, J Li, et al. Synergy of 2-deoxy-d-glucose combined with berberine in inducing the lysosome/autophagy and transglutaminase activation-facilitated apoptosis[J]. Apoptosis, 2017, 22(2): 229-238
- [16] P Djadeu, LP Kotra, N Swezey, et al. Surfactant protein D delays Fas-and trail-mediated extrinsic pathway of apoptosis in T cells[J]. Apoptosis, 2017, 22(5): 730-740
- [17] M Mrschik, KM Ryan, et al. Lysosomal proteins in cell death and autophagy[J]. State-of-the-Art Review, 2015, 282(10): 1858-1870
- [18] 李和平, 杨振, 李红霞, 等. 非 Caspase 依赖细胞凋亡因子对脑缺血 / 再灌注损伤的作用研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2013, 16(22): 57-59
Li He-ping, Yang Zhen, Li Hong-xia, et al. Effects of Caspase independent apoptotic factors on brain ischemia/reperfusion injury [J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2013, 16(22): 57-59
- [19] VP Nakka, A Gusain, SL Mehta, et al. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities [J]. Molecular Neurobiology, 2008, 37(1): 7-38
- [20] C Kiewert, J Hartmann, J Stoll, et al. NGP1-01 is a brain-permeable dual blocker of neuronal voltage-and ligand-operated calcium channels[J]. Neurochemical Research, 2006, 31(3): 395-399
- [21] SA Saeed, KF Shad, T Saleem, et al. Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke [J]. Experimental Brain Research, 2007, 182(1): 1-10
- [22] Z Wang, L Tang, H Yan, et al. Effects of huperzine A on memory deficits and neurotrophic factors production after transient cerebral ischemia and reperfusion in mice [J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2006, 83(4): 603-611

- [12] Li T, Xia M, Gao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy [J]. Expert Opin Biol Ther, 2015, 15(9): 1293-1306
- [13] Liu C, Yu J, Yang Y, et al. Effect of 1 mT sinusoidal electromagnetic fields on proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stromal cells[J]. Bioelectromagnetics, 2013, 34(6): 453-464
- [14] Song M Y, Yu J Z, Zhao D M, et al. The time-dependent manner of sinusoidal electromagnetic fields on rat bone marrow mesenchymal stem cells proliferation, differentiation, and mineralization [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 69(1): 47-54
- [15] 崔向荣, 苏伟, 黄钊, 等. 高频脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011(10): 1715-1720
- Cui Xiang-rong, Su Wei, Huang Zhao, et al. Effects of high-frequency pulsed electromagnetic fields on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011 (10): 1715-1720
- [16] Shahbazi-Gahrouei D, Hashemi-Beni B, Ahmadi Z. Effects of RF-EMF Exposure from GSM Mobile Phones on Proliferation Rate of Human Adipose-derived Stem Cells: An In-vitro Study [J]. J Biomed Phys Eng, 2016, 6(4): 243-252
- [17] Wang H, Strange C, Nietert P J, et al. Autologous Mesenchymal Stem Cell and Islet Cotransplantation: Safety and Efficacy [J]. Stem Cells Transl Med, 2017[Epub ahead of print]
- [18] Chelluboina B, Nalamolu K R, Mendez G G, et al. Mesenchymal Stem Cell Treatment Prevents Post-Stroke Dysregulation of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(4): 1360-1369
- [19] Mohr A, Zwacka R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer - From cells to ghosts [J]. Cancer Lett, 2017, 414: 239-249
- [20] Saeed H, Ahsan M, Saleem Z, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics - an update[J]. J Biomed Sci, 2016, 23: 41
- [21] Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015, 9(1): 31-40
- [22] Fu Y C, Lin C C, Chang J K, et al. A novel single pulsed electromagnetic field stimulates osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and bone repair[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91581
- [23] Kang K S, Hong J M, Kang J A, et al. Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions[J]. Exp Mol Med, 2013, 45: e6
- [24] Ongaro A, Pellati A, Bagheri L, et al. Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation in human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells[Z]. Bioelectromagnetics, 2014, 35: 426-436
- [25] 周建, 马小妮, 陈克明, 等. 电磁场不同处理时间对人脐带间充质干细胞增殖与分化的影响[J]. 解放军医药杂志, 2015, (03): 11-15
- Zhou Jian, Ma Xiao-ni, Chen Ke-ming, et al. Effect of Electromagnetic Field in Different Treatment Time on Proliferation and Differentiation of Human Umbilical Cord of Mesenchyme Stem Cells in Vitro [J]. Med & Pharm J Chin PLA, 2015, (03): 11-15

(上接第 2204 页)

- [23] SA Tooze. The role of membrane proteins in mammalian autophagy [J]. Seminars in cell & developmental biology, 2010, 21(7): 677-682
- [24] K Wei, P Wang, CY Miao, et al. A Double-Edged Sword with Therapeutic Potential: An Updated Role of Autophagy in Ischemic Cerebral Injury[J]. CNS neuroscience & therapeutics, 2012, 18(11): 879-886
- [25] Li L, Khatibi NH, Hu Q, et al. Transmembrane protein 166 regulates autophagic and apoptotic activities following focal cerebral ischemic injury in rats[J]. Experimental neurology, 2012, 234(1): 181-190
- [26] Chang Y, Li Y, Hu J, et al. Adenovirus vector-mediated expression of TMEM166 inhibits human cancer cell growth by autophagy and apoptosis in vitro and in vivo[J]. Cancer Lett, 2013, 328(1): 126-134
- [27] Li M, Lu G, Hu J, et al. EVA1A/TMEM166 Regulates Embryonic Neurogenesis by Autophagy[J]. Stem Cell Reports, 2016, 6(3): 396-410
- [28] Tao M, Shi XY, Yuan CH, et al. Expression profile and potential roles of EVA1A in normal and neoplastic pancreatic tissues[J]. Asian Pacific journal of cancer prevention, 2015, 16(1): 373-376
- [29] EC Kim, H Meng, AS Jun, et al. Lithium treatment increases endothelial cell survival and autophagy in a mouse model of Fuchs endothelial corneal dystrophy [J]. British Journal of Ophthalmology, 2013, 97(8): 1068-1073
- [30] Li M, Lu G, Hu J, et al. EVA1A/TMEM166 Regulates Embryonic Neurogenesis by Autophagy [J]. Stem Cell Reports, 2016, 6 (3): 396-410
- [31] S Zhang, X Lin, G Li, et al. Knockout of Eva1a leads to rapid development of heart failure by impairing autophagy[J]. Cell Death & Disease, 2017, 8, e2586