

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.010

## 羟乙基淀粉沉淀(HES)法分离脐血造血干细胞的临床优势分析

何学鹏 杨凯 陈鹏 刘兵 张媛 王芳 郭智 刘晓东 楼金星 陈惠仁

(北京军区总医院血液科 北京 100700)

**摘要 目的:**探讨羟乙基淀粉沉淀(HES)法分离脐血单个核细胞(MNCs)的效果。**方法:**采集脐血 31 份,应用羟乙基淀粉(HES)沉淀法和密度离心(Ficoll)法分离脐血 MNCs,、纯化 CD3<sup>+</sup>细胞、CD14<sup>+</sup>细胞、CD34<sup>+</sup>细胞,以台盼蓝拒染法检测细胞活力。**结果:**HES 法 MNCs 回收率、CFU-GM 计数高于 Ficoll 法 ( $85.29 \pm 3.79$  VS  $47.06 \pm 4.61$ ,  $t=35.67$ ,  $P<0.05$ ;  $67.31 \pm 11.57/1 \times 10^5$  MNCs VS  $28.54 \pm 6.39/1 \times 10^5$  MNCs,  $t=16.33$ ,  $P<0.05$ ); HES 法分离的 MNCs 中 CD3<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> 细胞数均高于 Ficoll 法 ( $t=5.76$ ,  $t=2.51$ ,  $t=6.67$ ,  $P<0.05$ )。**结论:** HES 法分离 MNCs 可获得较好的回收率,是人脐血干细胞理想的分离方法。

**关键词:**羟乙基淀粉沉淀法;脐血造血干细胞;核细胞数

**中图分类号:** Q592.1; Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)29-5640-04

## Clinical Advantage of Hydroxyethyl Starch Precipitation for Separation of Cord Blood Stem Cell

HE Xue-peng, YANG Kai, CHEN Peng, LIU Bing, ZHANG Yuan,

WANG Fang, GUO Zhi, LIU Xiao-dong, LOU Jin-xing, CHEN Hui-ren

(Department of Hematology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing, 100700, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the separation effect of hydroxyethyl starch (HES) precipitation for nucleated cells(MNCs). **Methods:** 31 copies of cord blood were collected and separated by HES separation and density centrifugation (Ficoll) for MNCs, the CD3<sup>+</sup> cells, CD14<sup>+</sup> cells, and CD34<sup>+</sup> cells, purified by immunomagnetic technique, and cell viability were detected by trypan blue staining. **Results:** The rate of recollection for MNCs and CFU-GM counts using HES method were higher than that using of Ficoll method ( $85.29 \pm 3.79$  VS  $47.06 \pm 4.61$ ,  $t=35.67$ ,  $P<0.05$ ;  $67.31 \pm 11.57/1 \times 10^5$  MNCs VS  $28.54 \pm 6.39/1 \times 10^5$  MNCs,  $t=16.33$ ,  $P<0.05$ ); CD3<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> cells, using HES method were higher than that of Ficoll method ( $t=5.76$ ,  $t=2.51$ ,  $t=6.67$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion:** HES method is an appropriate method for separating HSCs.

**Key words:** Hydroxyethyl starch precipitation; Cord blood stem cells; Nucleated cells

**Chinese Library Classification:** Q592.1; Q813 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)29-5640-04

### 前言

脐血造血干细胞(Cord blood haematopoietic stem cell, CBHSC)作为造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)的一种方式,因其具有良好的扩增能力和免疫反应性,已被广泛地应用于血液系统肿瘤性疾病、先天性免疫缺陷和遗传性代谢病等的治疗中<sup>[1-3]</sup>。但是,单份脐血所含单个核细胞(MNCs)的数量不足影响了体外分离效果,限制了移植应用<sup>[4]</sup>。因此,基于脐血干细胞具有的高增殖和体外扩增的潜能,应用分离技术最大限度地分离出脐血中的 HSCs 将有助于临床治疗和研究。本研究比较了羟乙基淀粉沉淀(HES)法和密度离心法(Ficoll 法)对单个核细胞的分离效果,以期为临床应用提供参考依据。

### 1 资料与方法

#### 1.1 标本来源

作者简介:何学鹏(1964-),男,医学博士,主任医师,主要研究方向:白血、淋巴瘤和贫血诊疗以及造血干细胞移植,

E-mail: hexuepeng0720@sohu.com

(收稿日期:2014-02-18 接受日期:2014-03-17)

2012 年 1 月至 2013 年 6 月期间,在无菌状态下收集本院妇产科足月正常产或足月剖宫产产妇脐血 31 份,所有患者产前检查无乙肝、梅毒及艾滋病,产妇及其家属对实验知情同意。

#### 1.2 试剂与仪器

超净工作台(上海智成);高速离心机(湖南长沙湘智);精密密度比密计、电子天平(DeltaRange 公司);光学显微镜(奥林帕斯);Millipore 超纯水制造系统(美国 Millipore 公司);Mini-MACS 磁性吸附性分离装置(Mihenyi Biotec 公司);RPMI 1640 培养液(GibcoUSA);6%羟乙基淀粉(哈尔滨三联药业有限公司);D-Hank's 液(北京华迈科生物技术有限责任公司);抗 CD3、抗 CD14、抗 CD34 单克隆抗体及 FITC、PE 等标记的特异性荧光直标单抗(美国 BD 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

#### 1.3 脐血收集及分离方法

采集脐带血 60 mL 置入 CPDA1 复合抗凝剂采血带中,4℃ 保存,与采集后 12 h 内进行分离,血样一式两份,分别采用 6%羟乙基淀粉(HES)自然沉降法和密度离心法(Ficoll 法)进行分离,所有血样分离前用 1:1 生理盐水进行稀释。

(1) 6%羟乙基淀粉(HES)自然沉降法:按 1:5 的比例混合 6% HES 和稀释的脐血,树脂海绵筛过滤,室温下自然沉降 60 min,收集上层富含核细胞的血浆层,将收集的细胞同法洗涤,

悬于 10 mL RPMI 1640 培养液中;

(2) Ficoll 密度梯度离心法:将稀释的脐血以 1:1 比例沿管壁缓慢加入到相对密度为 1.0779/L 的 Ficoll Hypaque 淋巴细胞分离液中,2300 r/min× 25 min 梯度离心,吸取中间白膜状 MNCsc 层获得单个核细胞悬液,PBS 缓冲液洗涤 2 次,再悬于 10 mL 1640 培养液中,计数 MNCs 数<sup>[5,9]</sup>。

#### 1.4 细胞计数活力检测

用台盼蓝拒染法检测 MNCs 活力,10  $\mu$ L 稀释后的细胞悬液加入 90  $\mu$ L 5 g/l 台盼蓝染色液,混匀,染色 3 min,镜检计数;对分离前后 MNCs 进行计数,两者相除为 MNCs 产率。

#### 1.5 体外集落培养粒-吞噬细胞集落形成单位 (CFU-GM) 的测定

采用半固体琼脂培养法,1 mL 培养体系中含  $1 \times 10^5$  个有核细胞,20%胎牛血清,0.3%琼脂,GM-CSF 20  $\mu$ g/L,Epo 2000 U/L,混匀后加于 24 孔板,每组设 3 个复孔,置 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 7 d,于倒置显微镜下计数集落,以大于 40 个细胞的细胞团为一个集落<sup>[6]</sup>。

#### 1.6 细胞表型的测定

使用 MiniMACS 磁性吸附性分离装置分离纯化 CD3<sup>+</sup> 细胞、CD14<sup>+</sup> 细胞、CD34<sup>+</sup> 细胞,再取 100  $\mu$ L 单个核细胞悬液(细胞浓度约  $1 \times 10^6$ ),加入 10  $\mu$ L FITC 等标记的特异性荧光直标单抗,阴性对照加入荧光标记的无关单抗,避光 4  $^{\circ}$ C 30 min,加入 500  $\mu$ L PBS 重悬成单细胞悬液上机检测。

#### 1.7 统计学方法

采用 SPSS17.0 进行统计分析,计数资料以频数(率)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,计量资料以均数 $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,满足正态分布和方差齐性检测资料采用 t 检验比较组间差异,非正态分布或方差不齐资料采用 Mann-Whitney U 检验比较组间差异, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 MNCs 回收率和台盼蓝拒染率

分离前 MNCs 样本计数平均值为  $(0.68 \pm 0.13) \times 10^8$ ,分离后 HES 法 MNCs 计数为  $(0.58 \pm 0.12) \times 10^8$ ,高于 Ficoll 法  $(0.32 \pm 0.09) \times 10^8$ ,HES 法回收率高于 Ficoll 法( $t=35.67, P < 0.05$ ),台盼蓝拒染率两组间差异无统计学意义,结果见表 1。

表 1 不同分离方法对脐血造血干细胞 MNCs 回收率和台盼蓝拒染率的影响 ( $n=31, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of different separation methods for recollection rate of MNCs and Trypan blue dye viability ( $n=31, \bar{x} \pm s$ )

| 组别<br>Group               | 分离后 MNCs 计数/ $\times 10^8$<br>MNCs counts after separation | MNCs 回收率/%<br>Recollection rate of MNCs | 台盼蓝拒染率/%<br>Trypan blue dye viability |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| HES 法<br>HES method       | $0.58 \pm 0.12$                                            | $85.29 \pm 3.79$                        | $93.54 \pm 1.82$                      |
| Ficoll 法<br>Ficoll method | $0.32 \pm 0.09$                                            | $47.06 \pm 4.61$                        | $93.61 \pm 1.77$                      |
| t                         | 9.65                                                       | 35.67                                   | 0.15                                  |
| P                         | <0.001                                                     | <0.001                                  | 0.878                                 |

#### 2.2 CFU-GM 数比较

分离后获得的 MNCsc 经半固体琼脂培养后,对 CFU-GM 进行计数,结果显示,HES 法 CFU-GM 计数值为  $(67.31 \pm 11.57)/1 \times 10^5$  MNCs, Ficoll 法计数为  $(28.54 \pm 6.39)/1 \times 10^5$  MNCs,差异有统计学意义( $t=16.33, P < 0.05$ )。

#### 2.3 MNCs 各表型密度比较

随机选取其中 20 份脐血进行表型测定,结果显示 HES 法的 CD34<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> 密度均高于 Ficoll 法,差异有统计学意义,结果见表 2。

## 3 讨论

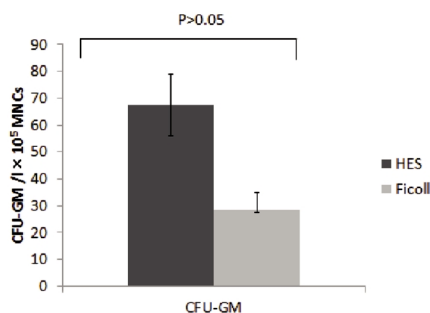


图 1 不同分离方法 CFU-GM 计数比较

Fig.1 CFU-GM count in different separation methods

脐血中储存有大量的造血干细胞,其为具有分化潜能的原始细胞,具备高度的自我更新和增殖的能力,能保持干细胞数量恒定,并能在特定因素的影响或诱导下,进一步分化为各系祖细胞及成熟细胞,从而重建人体造血和免疫系统<sup>[7-10]</sup>,目前造血干细胞在治疗血液疾病、自身免疫性疾病、恶性肿瘤、先天代谢失常等多种危及生命的疾病上发挥着重大的潜能<sup>[11-16]</sup>。干细胞移植过程中细胞的有效活性是移植成功的关键,而脐血干细胞分离技术则影响到细胞分离率和细胞的有效活性。

脐血分离以收集富含脐血干细胞的 MNCs 为目的。目前脐血分离技术主要有 HES 沉淀法、Ficoll 密度梯度离心法、单克隆抗体加流式细胞仪分析法、免疫磁珠分选法等,不同方法对脐血 MNCs 的回收率、台盼蓝拒染率以及 CFU-GM 计数报道不一<sup>[5]</sup>。本研究比较了最为常用的 HES 沉淀法和 Ficoll 密度梯度离心法的分离纯化效果,结果显示,HES 沉淀法的 MNCs 回收率和 CFU-GM 计数间存在差异,提示 HES 沉淀法能获得更多的 MNCs 和 CFU-GM 集落,其分离效果优于 Ficoll 密度梯度离心法;脐血中的 CD34<sup>+</sup> 细胞群是代表脐血中的 HSCs/HPCs 增殖分化能力的主要标志<sup>[17-19]</sup>,HES 沉淀法 CD34<sup>+</sup> 的表达水平高于 Ficoll 密度梯度离心法,说明 HES 沉淀法能阻止单个核细胞的沉降,能够保证足够的 CD34<sup>+</sup> 细胞以满足的临

表 2 不同分离方法 MNCs 各表型密度比较 (n=20,  $\times 10^5/\text{ml}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )Table 2 Comparison of various MNCs phenotypes density in different separation methods (n=20,  $\times 10^5/\text{ml}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别<br>Group               | CD3 <sup>+</sup> 细胞<br>CD3 <sup>+</sup> cells | CD14 <sup>+</sup> 细胞<br>CD14 <sup>+</sup> cells | CD34 <sup>+</sup> 细胞<br>CD34 <sup>+</sup> cells |
|---------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| HES 法<br>HES method       | 21.35 $\pm$ 4.23                              | 4.28 $\pm$ 1.65                                 | 1.27 $\pm$ 0.49                                 |
| Ficoll 法<br>Ficoll method | 12.01 $\pm$ 5.76                              | 3.19 $\pm$ 1.02                                 | 0.51 $\pm$ 0.14                                 |
| Z                         | 5.76                                          | 2.51                                            | 6.67                                            |
| P                         | <0.001                                        | 0.016                                           | <0.001                                          |

床应用。

HES 法在分离脐血过程中通过加速红细胞的沉降速度以去除脐血中的红细胞,在具体操作中,为了使红细胞和单个核细胞更容易分离,我们加入了树脂海棉筛,其在没有影响到其它分离步骤的同时提高了分离效果;而 Ficoll 密度梯度离心法仅是富集单一比重的单个红细胞,并没有考虑到在不同的分化阶段 CD34<sup>+</sup> 的比重不一的情况,且由于离心力的不同,有可能会使部分单个核细胞混在血浆中或沉降入红细胞内,造成核细胞的丢失。研究中,我们还发现 HES 法分离的 CD3<sup>+</sup> 和 CD14<sup>+</sup> 细胞数也明显高于 Ficoll 密度梯度离心法,CD3<sup>+</sup> 和 CD14<sup>+</sup> 细胞与移植后的排斥反应密切相关<sup>[20,21]</sup>,但脐血干细胞移植较骨髓移植等方法本身就具有低排斥反应发生率的特点,HES 法是否会降低排斥反应和其严重程度尚需进一步研究。

综上所述,HES 分离法可获得相对较高的 MNCs 回收率和 CFU-GM 集落,通过分离纯化后的 CD34<sup>+</sup> 细胞表达水平高,是目前人脐血干细胞理想的分离方法。

#### 参考文献(References)

- [1] 党建红. 脐血干细胞的生物学特性及其应用[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(2): 89-92, 96  
Dang Jian-hong. Cord Blood Stem Cell: Basic Biology and Transplantation[J]. J Int Obstet Gynecol, 2011, 38(2): 89-92, 96
- [2] 王广宇, 赵芳, 朱旅云. 脐血干细胞的免疫学特性概述 [J]. 医学综述, 2010, 16(2): 184-186  
Wang Guang-yu, Zhao Fang, Zhu Lv-yun. Overview on immunological properties of cord blood stem cells[J]. Medical recapitulate, 2010, 16(2): 184-186
- [3] R. R. Jenq, Van den Brink. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer[J]. Nature reviews Cancer, 2010, 10(3): 213-221
- [4] 汪健. 促进脐血造血干细胞应用于成人移植的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2012, 35(3): 227-231  
Wang Jian. Applied research progress of hematopoietic stem cells for cord blood transplantation in adult[J]. International Blood Transfusion and Hematology, 2012, 35(3): 227-231
- [5] 王颖超, 殷楚云, 冯磊, 等. 三种不同方法分离脐血造血干细胞的效果比较[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(10): 766-768, 794  
Wang Ying-chao, Yin Chu-yun, Feng Lei, et al. Comparison of 3 Different Methods on Isolation of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells [J]. Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2012, 27(10): 766-768, 794
- [6] 高杨, 李立, 冉江华, 等. 两种分离脐血间充质干细胞的方法比较 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(19): 3472-3475  
Gao Yang, Li Li, Ran Jiang-hua, et al. Comparison of two isolation methods for umbilical cord blood mesenchymal stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(19): 3472-3475
- [7] J. Y. Bertrand, N. C. Chi, B. Santoso, et al. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development [J]. Nature, 2010, 464(7285): 108-111
- [8] L. Ding, T. L. Saunders, G. Enikolopov, et al. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells [J]. Nature, 2012, 481(7382): 457-462
- [9] B. Gan, J. Hu, S. Jiang, et al. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells[J]. Nature, 2010, 468(7324): 701-704
- [10] 籍凤宇, 李佳佳, 陈秀莉, 等. 脐血干细胞向不同体细胞分化的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012, 12(1): 30-36  
Ji Feng-yu, Li Jia-jia, Chen Xiu-li, et al. Research Progress of Umbilical Cord Blood Stem Cells Differentiated into Various Kinds of Somatic Cells[J]. Biotechnology Bulletin, 2012, 12(1): 30-36
- [11] 李昀, 卢光琇. 细胞移植治疗脑瘫的研究现状[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(18): 3558-3561  
Li Yun, Lu Guang-xiu. The Status of Cell Therapy for Cerebral Palsy [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(18): 3558-3561
- [12] 宋红, 付霞, 董蕾蕾. 静脉移植脐血干细胞可抑制脑缺血大鼠的神经细胞凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(6): 1032-1035  
Song Hong, Fu Xia, Dong Lei-lei. Intravenous administration of human umbilical cord blood stem cells reduces nerve cell apoptosis of cerebral ischemia rats [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2012, 16(6): 1032-1035
- [13] 孙虹, 翁立新. 干细胞在神经创伤修复中的应用 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 12(45): 8535-8542  
Sun hong, Weng Li-xin. Stem cells for repair of traumatic nerve injury[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2012, 12(45): 8535-8542
- [14] 罗瞳, 李利平. 脐血干细胞与创面修复 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(5): 986-988  
Luo Tong, Li Li-ping. Umbilical cord blood stem cell and wound repair[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(5): 986-988
- [15] 杨华强, 王云甫, 杜玲, 等. 脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的临床疗效[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(23): 4497-4499

- Yang Hua-qiang, Wang Yun-fu, Du Ling. Therapeutic effect of human umbilical cord blood stem cells transplantation in patients with decompensated cirrhosis [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(23): 4497-4499
- [16] 杜玲, 杨华强, 罗国君. 脐血干细胞移植治疗中间型脊髓性肌萎缩症 1 例并文献复习[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(9): 1764-1766
- Du Ling, Yang Hua-qiang, Luo Guo-jun. Umbilical Cord Blood Stem Cells Transplantation for Intermediate Spinal Muscular Atrophy: Report and Review of Literature of One Case [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(9): 1764-1766
- [17] 谭业辉, 刘晓亮, 王畅, 等. 造血干细胞动员中外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞的变化趋势及其对采集的影响 [J]. 中华器官移植杂志, 2012, 33(2): 90-93
- Tan Ye-hui, Liu Xiao-liang, Wang Chang, et al. Variation of peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells during hematopoietic stem cell mobilization and its influence on collection [J]. Chinese Journal of Organ Transplantation, 2012, 33(2): 90-93
- [18] 汪健, 孙自敏, 李庆, 等. 体外扩增对脐带血 CD34<sup>+</sup> 细胞归巢相关分子影响的研究[J]. 临床输血与检验, 2013, 15(3): 219-224
- Wang Jian, Sun Zi-min, Li Qing, et al. Study on Influence of the Homing Related Molecules on Umbilical Cord Blood CD34<sup>+</sup> Cells after Amplified with Cytokines in vitro [J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2013, 15(3): 219-224
- [19] 张乐, 赵丹丹, 夏冰, 等. 骨髓增生异常综合征中 CD34<sup>+</sup> 细胞 CXCR4 的表达及其与细胞迁移的相关性[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 13(18): 1081-1084
- Zhang Yue, Zhao Dan-dan, Xia Bing, et al. CXCR4 expression of bone marrow CD34<sup>+</sup> cells in myelodysplastic syndromes and its correlation with cell migration [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2013, 13(18): 1081-1084
- [20] 尹建平, 张义成, 刘胜洪, 等. 造血干细胞移植后 HLA-G 表达与移植抗宿主反应的相关性研究 [J]. 中国输血杂志, 2012, 12(10): 1017-1021
- Yin Jian-ping, Zhang Yi-cheng, Liu Sheng-hong, et al. Correlation of HLA-G expression with graft-versus-host reaction following HSCT [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2012, 12(10): 1017-1021

(上接第 5650 页)

- [8] Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain [J]. Genome Biol, 2004, 5(9): R68
- [9] Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification[J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(6): 1469-1477
- [10] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33): 12481-12486
- [11] Wu C, Gong Y, Sun A, et al. The human MTHFR rs4846049 polymorphism increases coronary heart disease risk through modifying miRNA binding[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2013, 23(7): 693-698
- [12] Kim WH, Min KT, Jeon YJ, et al. Association study of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in Korean population [J]. Gene, 2012, 504(1): 92-97
- [13] Zhang M, Jin M, Yu Y, et al. Associations of miRNA polymorphisms and female physiological characteristics with breast cancer risk in Chinese population[J]. Eur J Cancer Care (Engl), 2012, 21(2): 274-280
- [14] Min KT, Kim JW, Jeon YJ, et al. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population [J]. Mol Carcinog, 2012, 51 Suppl 1: E65-73
- [15] Jeon YJ, Kim OJ, Kim SY, et al. Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ischemic stroke and silent brain infarction risk [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(2): 420-430
- [16] Liu Y, Ma Y, Zhang B, et al. Genetic Polymorphisms in Pre-microRNAs and Risk of Ischemic Stroke in a Chinese Population [J]. J Mol Neurosci, 2014, 52(2): 473-480
- [17] Hu Z, Chen J, Tian T, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival [J]. J Clin Invest, 2008, 118(7): 2600-2608
- [18] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006
- [19] Liu DZ, Tian Y, Ander BP, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(1): 92-101
- [20] Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, et al. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients[J]. Plos One, 2009, 4(11): e7689
- [21] Zeng L, Liu J, Wang Y, et al. MicroRNA-210 as a novel blood biomarker in acute cerebral ischemia [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2011, 3: 1265-1272