

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.11.004

小鼠胃 Cajal 间质细胞分离与培养实验方法探讨*

李亚欢¹ 王淑艳¹ 张冬梅² 赵冉冉¹ 王 飞¹蒋锋利¹ 赵宏照¹ 李丽娜¹ 李 翠³ 宗晨钟¹ 陈 萌^{1Δ}

(1 北京中医药大学中医学院 北京 100029; 2 北京中医药大学东直门医院 北京 100700; 3 北京市二龙路医院 北京 100032)

摘要 目的:尝试优化体外培养 Balb/c 小鼠胃 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)的实验方法,为深入探索该细胞的生理病理作用机制提供基础。**方法:**无菌条件下取出小鼠胃组织,使用酶解法消化分离细胞,将细胞悬液接种于含有 SCF(干细胞因子)的 M199 培养基中培养,并进行传代。倒置显微镜下观察不同时间段细胞生长状态,采用 ICC 特异性标志物 c-Kit(酪氨酸激酶受体)进行免疫荧光鉴定。**结果:**细胞培养 24 h 后基本已贴壁,呈梭形或三角形,有短突起;72 h 后细胞胞体变大,突起伸长;5 d 后,细胞之间通过突起彼此相互连接,开始形成网状结构;传代后细胞依然保持其固有特征。免疫荧光鉴定可见细胞 c-Kit 抗体荧光染色阳性。**结论:**使用酶解法成功分离细胞,细胞数量较多但不增殖,传代后可见细胞纯度较好,稳定培养 3 周以上后细胞形态逐渐发生变化并开始凋亡。

关键词: Cajal 间质细胞;分离与培养;方法研究

中文分类号: R-33; Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)11-2019-04

Experimental Study on Isolation and Culture of Interstitial Cells of Cajal in Mice Stomach*

LI Ya-huan¹, WANG Shu-yan¹, ZHANG Dong-mei², ZHAO Ran-ran¹, WANG Fei¹,JIANG Feng-li¹, ZHAO Hong-zhao¹, LI Li-na¹, LI Cui³, ZONG Chen-zhong¹, CHEN Meng^{1Δ}

(1 School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China;

2 Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China;

3 Beijing Municipal Erlonglu Hospital, Beijing, 100032, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the experimental method of culturing Interstitial Cells of Cajal in Balb/c mouse stomach in vitro, and to provide a basis for further exploring its physiological and pathological mechanism. **Methods:** The gastric tissues of mice were removed under the sterile conditions, and the cells were digested and separated by enzymatic digestion. The cell suspension was inoculated in M199 medium containing Stem Cell Factor and passaged. The cell growth state of different time points was observed under the inverted microscope, and the ICC specific marker c-Kit (tyrosine kinase receptor) was used for immunofluorescence. **Results:** After cultured for 24 hours, the cells were almost adherent, fusiform or triangular with short protuberances. After 72 hours, the cell bodies became larger and the protuberances were elongated. After 5 days, between the cells connected to each other through projection, began to form a network structure. And after passage cells still maintain its inherent characteristics. Immunofluorescence showed that cells stained positive for c-Kit antibody. **Conclusion:** The ICC was successfully separated by enzymolysis. The number of cells was larger but not proliferating. After passage, the cell purity was better. After more than 3 weeks of stable culture, the cell morphology gradually changed and began to apoptosis.

Key words: Interstitial cells of Cajal; Isolation and culture; Method study

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)11-2019-04

前言

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是一类分布于消化道自主神经末梢与平滑肌细胞(Smooth muscle cell, SMC)之间的特殊间质细胞,它们被认为是胃肠道(GI)肌肉中的起搏细胞,ICC 网络结构的缺乏,数量的减少或完整性的改

变都可能会对 GI 系统的运动性产生重大影响^[1-3]。近几年,人们在腺体、脉管系统、泌尿生殖系统中亦陆续鉴定出此类间质细胞,并开始重视 ICC 在胃肠道以外器官和组织中的作用,试图阐明它们的形态结构与生理功能^[4-7]。事实上,很多与 ICC 异常的相关疾病的发病机制仍不明确,而细胞体外培养的影响因素单一而明确,对于探讨 ICC 的生理病理作用机制有显著优势,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81673869;81173192);北京中医药大学在读研究生项目(2017-JYB-XS-008)

作者简介:李亚欢(1991-),硕士研究生,主要研究方向:仲景的脉证方药体系研究,E-mail: 15123513881@163.com

Δ 通讯作者:陈萌(1970-),硕士生导师,教授,主要研究方向:仲景的脉证方药体系研究,E-mail: chinmed@yeah.net,电话:010-64287073

(收稿日期:2018-02-27 接受日期:2018-03-22)

因此摸索出一种稳定的体外培养 ICC 方法具有非常重要的意义。目前,国内外学者虽然有对 Balb/c 小鼠的胃肠 ICC 通过酶解法进行过较为成功的分离与培养,但是结果仍然存在诸如细胞量少、纯度较低等问题,因此,结合相关文献^[8-10],本实验尝试对 ICC 在分离与培养的细节上进行改善,为研究 ICC 的科研工作者们提供借鉴方法,以期为进一步研究 ICC 的功能及相应的信号转导机制提供一定的条件。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物:Balb/c 小鼠,5~7 d,雌雄不限,20 只,采购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。试剂:M199 培养基、FBS 胎牛血清、青霉素-链霉素(双抗)、L-谷氨酰胺、胶原酶 II 型、0.25% Trypsin-EDTA 胰酶均购自美国 Gibco 公司,BSA 牛血清白蛋白、胰蛋白酶抑制剂均购自美国 Sigma 公司,SCF 干细胞因子购自美国 Peprotech 公司,ATP 购自德国 Recho 公司,c-Kit (D13A2) XP[®] Rabbit mAb、Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor[®] 488 Conjugate) 均购自美国 Cell Signaling 公司,封闭用正常山羊血清购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 配制酶解液 用电子天平称取胶原酶 II 型 13 mg,BSA 20 mg,胰蛋白酶抑制剂 20 mg,放入小烧杯中,加入 10 mL D-Hank's 及 50 μ L ATP,待充分溶解后用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌备用。

1.2.2 细胞的分离与培养 (1)小鼠禁食 12 h,颈椎脱臼法处死,75% 酒精消毒,在超净台中剪开腹腔,将胃完整取出,放入加有双抗的 D-Hank's 液的无菌平皿里;(2)小心剥去系膜、血管、黏膜层等,再用前述干净的 D-Hank's 液冲洗 2~3 次,移至另一个未使用的无菌平皿中;(3)将分离出的胃组织剪碎至 1~2 mm³ 小块,加入适量酶解液(根据胃组织的量而定),37℃ 培养箱中消化 30 min,每 5 min 轻轻摇晃一次以使消化充分;(4)消化完毕后加入与第(3)步中酶解液等量的 M199 培养基终止消化,反复吹打至少 5 min 让细胞更好地脱离大块组织,移入 15 mL 离心管中;(5)4℃,1000 rpm 离心 5 min,去上清液,M199 重悬反复吹打,过 200 目筛网;(6)再次离心 4℃/2000 rpm/15 min,弃上清,用 M199 完全培养基(含 5 μ g/L SCF、10% FBS、1% 双抗、2 mmol/L L-谷氨酰胺)重悬后将细胞接种至预先包被鼠尾胶的 6 孔培养板中,放入 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.3 细胞的换液及传代 24 h 后换液一次,用 D-Hank's 液冲去尚未贴壁及状态不好的细胞,之后 2~3 d 换液一次,期间倒置显微镜下观察细胞生长状态。用 0.25% 胰酶消化细胞,4℃/1000 rpm/5 min,重悬细胞,使用细胞计数器将细胞浓度调整至 1 $\times$ 10⁵/mL,接种于 6 孔培养板中继续培养。

1.2.4 免疫荧光鉴定 将传代后的细胞接种于 12 孔板中,待稳定生长 3 d 后进行免疫荧光染色:(1)用枪头吸出孔内培养基,PBS(0.01 mol/L,pH 7.2-7.4)漂洗 3 $\times$ 2 min;(2)使用 4% 多聚甲醛将细胞室温固定 30 min,PBS 漂洗 3 $\times$ 2 min;(3)加入含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 室温条件下作用 15 min 对细胞进

行透膜处理,PBS 漂洗 3 $\times$ 2 min;(4)加入 5% 正常山羊血清 37℃ 条件下封闭 60 min,PBS 漂洗 3 $\times$ 2 min;(5)加入兔抗小鼠 c-Kit(1:100)抗体,置于 4℃ 过夜,(6)次日,PBS 漂洗 3 $\times$ 2 min 后加入羊抗兔 IgG 荧光标记二抗(1:250)室温避光孵育 60 min;(7)吸出二抗,用 PBS 漂洗 3 次后激光共聚焦显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 ICC 的形态观察

胃 ICC 细胞培养 24 h 后,倒置显微镜下观察可见 ICC 基本已贴壁,呈梭形或三角形,突起较短,其中混杂有少量 SMC (见图 1-A);72 h 后可见 ICC 胞体变大,核周有少量胞浆,突起伸长,SMC 增长不显著,与 ICC 能从形态上分辨(见图 1-B1);培养 5~7 d 后,自核区胞体发出 2~4 条细长突起,同时细胞之间彼此相互连接,开始形成网状结构(见图 1-C1);细胞在传代生长至 15 d 后,ICC 突起向各方向伸出,在初级分支上亦可见次级分支,细胞间通过突起彼此相连,交织成网络状(见图 1-D1);细胞生长至 21 d 时,观察到 ICC 开始凋亡,少量细胞可见细胞膜出现发泡现象,细长突起边缘出现一些小的球形突起(见图 1-E);30 d 后荧光显微镜下观察到 ICC 体积明显皱缩、变小、变圆,发泡现象严重,可见凋亡小体(见图 1-F)。

2.2 ICC 的鉴定

进行免疫荧光染色后,在激光共聚焦显微镜下可观察到细胞 c-Kit 绿色阳性显色(见图 2),极少量肥大细胞也呈阳性,但可从形态上辨识。

3 讨论

1889 年,西班牙神经解剖学家圣地亚哥·拉蒙·卡哈尔(Santiago Ramon y Cajal)发表了第一篇有关间质细胞的短论文,这些细胞后来与他的名字联系了起来。在这篇论文中,Golgi 方法(银染法)被应用于豚鼠和大鼠的肠组织,并首次在消化道肌肉层观察并描述了 Cajal 间质细胞的形态和结构。后来人们进一步研究发现,这些细胞是胃肠道起搏细胞,胃肠动力障碍性疾病与他们的分布和形态学异常有关。长期以来,体外 ICC 培养一直较为困难,这大大减缓了 ICC 基础研究的发展,而且 ICC 本身不增殖,所以能尽可能的分离出更多的细胞显得尤为重要。本实验,我们在参考前人做法的基础上,通过进一步的研究摸索,总结了一些关于培养 ICC 的心得。

3.1 避免污染

避免污染是 ICC 培养的基础,这在所有细胞实验中均需遵循的原则,已进食新生鼠务必禁食 12 h 以上,并使用含有双抗的 D-Hank's 液反复清洗组织 2~3 次,此期间严格无菌操作。重悬细胞等实验流程,严格把控操作时间,时间过长不利于 ICC 的贴壁。此外,为使 ICC 进一步良好生长创造条件,参考大多文献,发现新分离出来的细胞在 24 h 换液最佳,可将未贴壁以及活力较差的细胞洗去,换液时间过短会丢失部分未贴壁细胞,而换液时间过长则可能造成细胞污染。在 ICC 的分离接种及每次镜下观察等过程中应尽量缩短时间。

3.2 培养基与清洗液的选择

在培养基的选择上,有使用 DMEM^[11,12]作为基本培养基

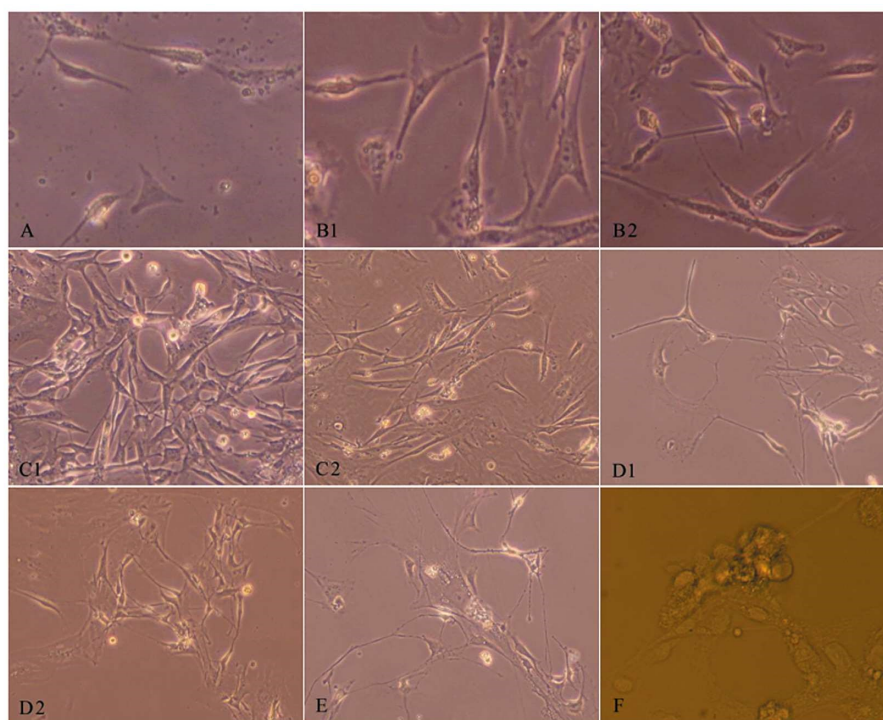
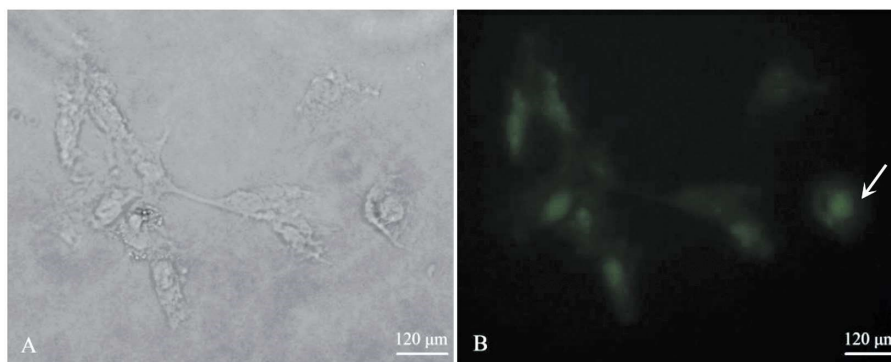


图 1 ICC 不同培养时间细胞形态变化

A、24 h 后细胞胞体较小,有短小突起($\times 200$);B1、72 h 后细胞胞体变大,突起伸长($\times 200$);
C1、5 d 后细胞突起伸向不同方向,相互连接,形成网络状($\times 100$);D1、15 d 后细胞在初级分支上发出次级分支,彼此相连交织成网络状($\times 100$);
E、第 21 d 细胞膜有起泡现象,细长突起边缘有一些小的球形突起($\times 100$);
F、30 d 后细胞体积皱缩、变小、变圆,发泡现象严重,有凋亡小体($\times 400$)。B2、C2、D2 为对照组,细胞胞体较瘦小,突起较短。

Fig. 1 ICC cell morphology at different culture time

A, After 24 hours, cell body was smaller and had a short protuberance ($\times 200$); B1, 72 hours after cell body becomes larger, protuberance ($\times 200$); C1, 5 days after the protuberances of the cells extend in different directions and connect with each other to form a network ($\times 100$); D1, After 15 days, the cells give rise to secondary branches on the primary branches, which are interconnected into a network ($\times 100$); E, 21 days cell membrane has blistering phenomenon, the edge of Slender protrusions have some small spherical protrusions ($\times 100$); F, After 30 days, cell volume shrinks, becomes smaller and round, foaming phenomenon is serious with apoptotic bodies ($\times 400$). B2, C2 and D2 for the control group, cell body is relatively thin, protruding shorter.

图 2 ICC 免疫荧光染色($\times 400$)

A: 明场摄影; B: 暗场中免疫荧光染色细胞 c-Kit 阳性, 箭头所指为肥大细胞, 含极少量。

Fig. 2 ICC immunofluorescence staining ($\times 400$)

A: Bright field photograph; B: Immunofluorescence stained cells field c-Kit positive in the dark, the arrow refers to the mast cells, with a very small amount.

的,也有使用 M199 作为 ICC^[10,13]的培养基,我们在这两者之间通过实验做了比较。从细胞生长情况来看,使用 M199 作为基本培养基,可见细胞的形态、胞浆的充盈度及细胞的整体状态(见图 1-C1、C2、D1、D2),均优于使用 DMEM 作为基本培养基。因此,我们猜测可能来源于胃肠道组织的 ICC 细胞,用

M199 作为培养基优于 DMEM。同时,关于细胞清洗液的选择,有许多文献使用 PBS 缓冲液,而我们在实验中选择不含的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 D-Hank's 液,因为溶液中的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 会降低胰蛋白酶活力,可能会影响后期细胞传代时胰酶消化的功能,从而影响 ICC 的生长。

3.3 酶解液的配制

关于酶解液的配制,在实验中我们发现每次现配现用其作用优于直接将其配好后长期储存在 -20°C ,因此,我们一般都在实验当天配制酶解液,究其原因可能是长期保存酶解液会影响它的消化功能。关于消化细胞时酶解液的使用量,实验中我们一般每10只小鼠的胃组织加入5 mL的酶解液。由于酶浓度过高或消化时间较长会对ICC产生一定损害^[14],故在酶解液中添加胰酶抑制剂、BSA等作为保护剂,这点在有些文献中亦有提及^[15]。

3.4 使用 Ficoll400 的问题

许多文献中都提到使用Ficoll400分离原代细胞的方法,经过反复实验,我们发现,从细胞生长状况来讲,所分离的细胞长势不及未采取Ficoll400分离的细胞,细胞形态瘦小,生长缓慢(见图1-B1、B2)。推测可能SMC有能分泌某种促使ICC生长的物质,还需要进一步实验得到验证。

3.5 不足之处

本实验的不足之处在于做免疫荧光鉴定时,未采用细胞爬片,细胞培养板的材质对细胞的折光性有一定影响,故拍摄到的荧光强度较弱,再者,用于做鉴定的细胞已经是第3代,且培养时间超过3周,细胞形态开始发生变化或逐渐凋亡,故所作荧光图质量欠缺,但是鉴定结果仍然能显示细胞c-Kit染色阳性,表明所取细胞是Cajal间质细胞,我们将在后期的实验中完善此部分。

综上,通过对酶解液配制的时间、培养基中L-谷氨酰胺的添加、非Ficoll400的使用以及消化离心时间的把握等细节上的摸索改进,本实验较为成功地优化了体外培养Balb/c小鼠胃Cajal间质细胞的实验方法,所取细胞数量较多,纯度较高。酶解液中的ATP、M199完全培养基中的L-谷氨酰胺可能都对细胞起保护、促生长作用,尽管M199培养基中本身含有L-谷氨酰胺,但是由于它在溶液中很不稳定^[16],所以我们在配制完全培养基时会重新适量添加。SCF重组鼠类干细胞因子维持着ICC的分化、生长、发育及表型^[17-19],有研究者^[20]尝试使用同源血清进行培养ICC,而未采用SCF,也取得一定效果。在后期我们将进一步进行比较实验,致力于找到培养ICC的最优方法。

参考文献(References)

- [1] A Pasternak, M Szura, K Gil, et al. Interstitial cells of Cajal - systematic review[J]. *Folia Morphol*, 2016, 75(3): 281-286
- [2] Zhou J, O'Connor MD, Ho V. The Potential for Gut Organoid Derived Interstitial Cells of Cajal in Replacement Therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 1-17
- [3] Randa M Mostafa, Yasser M Moustafa, Hosam Hamdy. Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(26): 3239-3248
- [4] Domino M, Pawlinski B, Zabielski R, et al. C-kit receptor immunopositive interstitial cells (Cajal - type) in the porcine reproductive tract[J]. *Acta Vet Scand*, 2017, 59(1): 32
- [5] Stephen Fedigan, Eamonn Bradley, Timothy Webb, et al. Effects of new - generation TMEM16A inhibitors on calcium - activated chloride currents in rabbit urethral interstitial cells of Cajal [J]. *Pflü gers Archiv European Journal of Physiology*, 2017, 469(11): 1443-1455
- [6] Velickov A, Mitrovic O, Djordjevic B, et al. The effect of bilberries on diabetes - related alterations of interstitial cells of Cajal in the lower oesophageal sphincter in rats [J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32 (6): 639-647
- [7] Huang ZP, Qiu H, Yang Y, et al. The Role of Interstitial Cells of Cajal in Acute Cholecystitis in Guinea Pig Gallbladder [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(5): 1775-1784
- [8] Sang Weon Lee, Sung Jin Kim, Hyungwoo Kim, et al. Effects of *Prunus mume* Siebold & Zucc. in the pacemaking activity of interstitial cells of Cajal in murine small intestine [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 13(1): 327-334
- [9] Noo Ri Hong, Hyun Soo Park, Tae Seok Ahn, et al. Ginsenoside Re inhibits pacemaker potentials via adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and the cyclic guanosine monophosphate/nitric oxide-dependent pathway in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2015, 39(4): 314-321
- [10] 高显奎, 余跃, 李京培, 等. 胃 Cajal 间质细胞的分离和培养 [J]. *安徽医科大学学报*, 2009, 44(4): 522-524
Gao Xian-kui, Yu Yue, Li Jing-pei, et al. Isolation and culture of gastric interstitial cell of Cajal [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2009, 44(4): 522-524
- [11] 刘登群, 龙爽, 王军平, 等. 成年 C57BL/6 小鼠空肠 Cajal 间质细胞的分离、培养及鉴定[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2011, 20(6): 538-541
Liu Deng-qun, Long Shuang, Wang Jun-ping, et al. Isolation, culture and identification of interstitial cells of Cajal from jejunum of adult C57BL/6 mouse [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 20 (6): 538-541
- [12] 付卫华, 沈文浩, 李为兵, 等. 成年大鼠阴茎海绵体 cajal 间质细胞的分离、培养与鉴定[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(16): 3004-3006
Fu Wei-hua, Shen Wen-hao, Li Wei-bing, et al. Isolation, culture and identification of interstitial cells of cajal in adult rat corpus cavernosum[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2010, 10(16): 3004-3006
- [13] 柳利明, 农晰婷, 秦榕, 等. 体外分离培养小鼠胃 Cajal 间质细胞的实验方法研究[J]. *昆明医学院学报*, 2010, 31(3): 11-13
Liu Li-ming, Nong Xi-ting, Qin Rong, et al. The Investigation of Isolation and Culture of Gastric Interstitial Cells of Cajal in Mice [J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2010, 31(3): 11-13
- [14] 张程程, 彭艳, 陈海交, 等. 成年 SD 大鼠胃窦 Cajal 间质细胞分离、培养及鉴定[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(11): 1226-1230
Zhang Cheng-cheng, Peng Yan, Chen Hai-jiao, et al. Isolation, Culture and Identification of Interstitial Cells of Cajal in Gastric Antrum of Adult Rats [J]. *Journal of Hunan University of Chinese Medicine*, 2017, 37(11): 1226-1230
- [15] Wu J J, Rothman T P, Gershon M D. Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand[J]. *Neurosci Res*, 2000, 59(3): 384-401
- [16] 汪谦. 现代医学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009, 2: 166
Wang Qian. Modern medical experimental methods [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009, 2: 166 (下转第 2027 页)

- [9] Gwak M S, Cao L, Li L, et al. Isoflurane preconditioning reduces oxygen -glucose deprivation-induced neuronal injury via B-cell lymphoma 2 protein [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2011, 31(1): 262-265
- [10] 张睿, 杨祖悌, 张同寅, 等. 异氟烷对创伤性脑损伤大鼠的神经保护作用及作用机制研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2015, 23(8): 38-42
- Zhang Rui, Yang Zu-ti, Zhang Tong-yan, et al. Neuroprotective effect of isoflurane in rats with traumatic brain injury and its mechanism[J]. *Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vasculat Disease*, 2015, 23 (8): 38-42
- [11] Zheng S, Z Zuo. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases[J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 65(5): 1172-1180
- [12] Zhou JX, Ding G R, Zhang J, et al. Detrimental effect of electromagnetic pulse exposure on permeability of in vitro blood brain-barrier model[J]. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26: 128-137
- [13] Qia L B, Ding G R, Li K C, et al. The role of protein kinase C in the opening of blood-brain barrier induced by electromagnetic pulse[J]. *Toxicology*, 2010, 273: 29-34
- [14] Jiang D P, Li JH, Zhang J, et al. Long-term electromagnetic pulse exposure induces Abeta deposition and cognitive dysfunction through oxidative stress and over expression of APP and BACE1 [J]. *Brain Res*, 2016, 1642: 10-19
- [15] 张进, 邓斌, 徐浩, 等. 电磁脉冲辐射致大鼠皮额叶神经元超微结构损伤效应及对空间学习记忆能力的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29: 360-364
- Zhang Jin, Deng Bin, Xu Hao, et al. The effect of electromagnetic pulse on neuronal ultrastructure and the space learning and memory ability in rats[J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2013, 29: 360-364
- [16] Yang LL, Zhou Y, Tian W D, et al. Electromagnetic pulse activated brain microglia via the p38 MAPK pathway [J]. *Neurotoxicology*, 2016, 52: 144-149
- [17] Yan W, Chen Z, Chen J, et al. Isoflurane preconditioning protects rat brain from ischemia reperfusion injury via up-regulating the HIF-1 α expression through Akt/m TOR/s6K activation [J]. *Cell Mol Biol*. 2016, 62(2): 38-44
- [18] 邱炎, 董斌, 蔡晓岚. 异氟烷预处理对脑缺血大鼠脑保护作用研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(8): 1099-1101
- Qiu Yan, Dong Bin, Cai Xiao-lan. Study on the protective effect of isoflurane preconditioning on cerebral ischemia in rats [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2015, 50(8): 1099-1101
- [19] Gwak M S, Cao L, Li L, et al. Isoflurane preconditioning reduces oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury via B-cell lymphoma 2 protein[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2011, 31: 262-265
- [20] Yang Yu, Richard D Ye. Microglial A β Receptors in Alzheimer's Disease[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2015, 35(1): 71-83
- [21] Bihua Bie, Jiang Wu, Hui Yang, et al. Epigenetic suppression of neuroligin 1 underlies amyloid-induced memory deficiency[J]. *Nature Neuroscience*, 2014, 2(17): 223-231
- [22] Weiwei Ma, Bingjie Ding, Huanling Yu, et al. Genistein Alleviates β -Amyloid-Induced Inflammatory Damage Through Regulating Toll-Like Receptor 4/Nuclear Factor κ B [J]. *Med Food*, 2015, 18(3): 273-279
- [23] Meyers CA, Albitar M, Estey E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome[J]. *Cancer*, 2005, 104(4): 788-793
- [24] Hyman C, Hofer M, Barde YA, et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra [J]. *Nature*, 1991, 350(6315): 230-232
- [25] Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(3): 209-219
- [26] Faria MC, Goncalves GS, Rocha NP, et al. Increased plasma levels of BDNF and inflammatory markers in Alzheimer's disease[J]. *Psychiatr Res*, 2014, 53: 166-172
- [27] Fahnstock, M, Garzon, D, Holsinger, RM, et al. Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? [J]. *Neural Transm Suppl*, 2002, (62): 241-252
- [28] Marcal Vilar, Helena Mira. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles[J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 26
- [29] Sid E O'Bryant, Valerie L Hobson, James R Hall, et al. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Are Specifically Associated with Memory Performance among Alzheimer's Disease Cases. *Dement[J]. Geriatr Cogn Disord*, 2011, 31(1): 31-36
- [30] Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease[J]. *Nat Med*, 2009, 15(3): 331-337

(上接第 2022 页)

- [17] Feng J, Gao J, Zhou S, et al. Role of stem cell factor in the regulation of ICC proliferation and detrusor contraction in rats with an underactive bladder[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1516-1522
- [18] Tan YY, Ji ZL, Zhao G, et al. Decreased SCF/c-kit signaling pathway contributes to loss of interstitial cells of Cajal in gallstone disease[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(11): 4099-4106
- [19] Jie Chen, Lei Du, Yong-Tao Xiao, et al. Disruption of interstitial cells of Cajal networks after massive small bowel resection [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2013, 22: 3415-3422
- [20] 宁海恩, 凌江红, 张智, 等. 酶解法分离与同源血清培养 SD 大鼠胃 Cajal 间质细胞的实验研究[J]. *广西中医药大学学报*, 2016, 19(1): 8-12
- Ning Hai-en, Ling Jiang-hong, Zhang Zhi, et al. Experimental study on isolation of gastric interstitial cells of Cajal from SD rat by enzymatic hydrolysis and homologous serum culture [J]. *Journal of Guangxi University of Chinese Medicine*, 2016, 19(1): 8-12