

小胶质细胞活化刺激骨髓间充质干细胞释放胶质细胞源性神经营养因子保护多巴胺能神经元的实验☆

范东艳¹, 王 苹², 刘 然^{1,3}, 牛凤兰¹, 杜 波²

Microglia activation stimulates bone marrow mesenchymal stem cells to release gliocyte-derived neurotrophic factor for protection of dopaminergic neurons

Fan Dong-yan¹, Wang Ping², Liu Ran^{1,3}, Niu Feng-lan¹, Du Bo²

Abstract

BACKGROUND: Studies are very few regarding the specific reaction of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) to activated microglia. Moreover, it remains unclear how MSCs maintain dopaminergic neuronal survival under specific microenvironment.

OBJECTIVE: To explore the effect of BMSCs stimulated by activated microglia on dopaminergic neuron survival.

METHODS: BMSCs were isolated from Wistar rats by attachment method, and *in vitro* cultured; microglia was activated, and dopaminergic neurons were cultured by enzyme digestion method. The experiment included 5 groups: BMSCs, microglia, lipopolysaccharide (LPS)+microglia; BMSCs+LPS+microglia groups, in which the dopaminergic neurons were cultured with corresponding culture medium; the dopaminergic neurons alone group was cultured with 10% fetal bovine serum+ DMEM/F12. The effect of different microenvironment on dopaminergic neuron survival and gliocyte-derived neurotrophic factor released from BMSCs were detected by immunofluorescence technique.

RESULTS AND CONCLUSION: The release of gliocyte-derived neurotrophic factor in groups involving BMSCs was greater than corresponding control group. Tyrosine hydroxylase immunofluorescence showed that neuronal survival of dopaminergic neurons alone group was 15%, microglia group was 10%, LPS+microglia was 5%, but BMSCs+LPS+microglia group was 28%, significantly greater than the other groups ($P < 0.05$). In addition, survival of *in vitro* cultured dopaminergic neurons was decreased with increasing culture duration, but the survival of dopaminergic neurons in group involving BMSCs was significantly greater than corresponding control group. This indicates that microglia activation stimulated BMSCs to upregulate gliocyte-derived neurotrophic factor to prevent dopaminergic neurons from toxic injury, and inhibit delayed death of dopaminergic neurons.

¹Teaching and Research Section of Toxicology, College of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China; ²Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, First Clinical Hospital, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China; ³Changchun Blood Center, Changchun 130000, Jilin Province, China

Fan Dong-yan☆, Studying for doctorate, Teaching and Research Section of Toxicology, College of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
Dongyan_fan@yahoo.com.cn

Fan DY, Wang P, Liu R, Niu FL, Du B. Microglia activation stimulates bone marrow mesenchymal stem cells to release gliocyte-derived neurotrophic factor for protection of dopaminergic neurons. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6): 979-984. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 目前尚未见骨髓间充质干细胞对活化的小胶质细胞特异性反应的报道, 且有关骨髓间充质干细胞在特定微环境下如何维持多巴胺能神经元的存活也缺乏相应的实验证据。

目的: 观察骨髓间充质干细胞在活化的小胶质细胞刺激下保护多巴胺能神经元存活的作用。

方法: 取 Wistar 大鼠, 贴壁法分离培养骨髓间充质干细胞, 体外培养并活化小胶质细胞, 酶消化法培养中脑多巴胺能神经元。实验分为 5 组: 骨髓间充质干细胞组; 小胶质细胞组; 脂多糖+小胶质细胞组; 骨髓间充质干细胞+脂多糖+小胶质细胞组; 分别取各实验组的培养上清, 对中脑多巴胺能神经元进行培养。单纯多巴胺能神经元组采用体积分数为 10% 胎牛血清+DMEM/F12 进行培养。采用免疫荧光技术检测不同微环境对多巴胺能神经元存活的影响及不同微环境对骨髓间充质干细胞释放胶质细胞源性神经营养因子的影响。

结果与结论: 含有骨髓间充质干细胞的实验组胶质细胞源性神经营养因子的释放量均较相应的对照组高。酪氨酸羟化酶免疫荧光染色结果发现, 单纯多巴胺能神经元组神经元的存活率为 15%; 小胶质细胞组多巴胺能神经元的存活率为 10%; 骨髓间充质干细胞组多巴胺能神经元的存活率为 35%; 脂多糖+小胶质细胞组多巴胺能神经元的存活率为 5%; 而骨髓间充质干细胞+脂多糖+小胶质细胞组多巴胺能神经元的存活率达到了 28%, 高于除骨髓间充质干细胞组外的其他各组 ($P < 0.05$)。此外体外培养多巴胺能神经元存活率随培养时间延长下降, 但含有骨髓间充质干细胞实验组的多巴胺能神经元存活率明显高于相应对照组。提示小胶质细胞活化刺激骨髓间充质干细胞上调胶质细胞源性神经营养因子表达, 使得多巴胺能神经元免受毒素的损害, 抑制了多巴胺能神经元的延迟性死亡。

关键词: 多巴胺能神经元; 骨髓间充质干细胞; 胶质细胞源性神经营养因子; 小胶质细胞; 帕金森病

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.06.006

Correspondence to: Du Bo, Doctor, Associate professor, Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, First Clinical Hospital, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
dubo2222@hotmail.com

Received: 2009-10-20
Accepted: 2010-01-06

范东艳, 王苹, 刘然, 牛凤兰, 杜波. 小胶质细胞活化刺激骨髓间充质干细胞释放胶质细胞源性神经营养因子保护多巴胺能神经元的实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6):979-984. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

¹ 吉林大学公共卫生学院毒理学教研室, 吉林省长春市 130021; ² 吉林大学第一附属医院耳鼻喉-头颈外科, 吉林省长春市 130021; ³ 长春市中心血站, 吉林省长春市 130000

范东艳*, 女, 1973年生, 吉林省吉林市人, 汉族, 吉林大学在读博士, 主要从事干细胞性质及应用的研究。
Dongyan_fan@yahoo.com.cn

通讯作者: 杜波, 博士, 副教授, 吉林大学第一附属医院耳鼻喉-头颈外科, 吉林省长春市 130021
dubo2222@hotmail.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)06-00973-06

收稿日期: 2009-10-20
修回日期: 2010-01-06
(20091020003/WL-A)

0 引言

帕金森病的主要病理表现为黑质纹状体系统多巴胺能神经元的变性。大量研究显示炎症反应在神经变性疾病中发挥重要作用^[1]。

炎症反应是机体抵御损伤和感染的第一道防线。脑内炎症的主要特征是胶质细胞的激活, 尤其是小胶质细胞(microglia, MG)的激活。MG是脑内的巨噬细胞, 它在神经元的生存和整个生命活动中起着支持、营养、保护和修复等重要作用, 是神经组织中不可缺少的成分。有研究显示, MG的激活参与了多巴胺能神经元变性的过程^[2]。活化后的MG在中枢神经系统病变中发挥损伤和促修复的双重作用^[3-4]。因此如何在特定的微环境下控制炎症, 延缓多巴胺能神经元退行性病变是帕金森病治疗中亟待解决的问题。

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)具有多向分化潜能, 在特定的环境下可以分化成为包括多巴胺能神经元在内的多种成体组织细胞。有研究提示BMSCs具有控制炎症和抑制免疫反应的作用^[5]。大量研究显示BMSCs能够向特异性神经元分化, 替代损伤或死亡的神经细胞^[6], 并且在微环境诱导下分泌各种神经营养因子使受损的神经细胞恢复^[7]。有研究证明, 移植入动物脑内的干细胞能够表达对多巴胺神经元具有保护作用的营养因子——胶质细胞源性神经营养因子(glia cell-line derived neurotrophic factor, GDNF)^[8], 但其机制尚不明确。由于GDNF对中枢多巴胺能神经元有特异性营养的功能且对于损伤后的多巴胺能神经元有挽救、促存活作用, 并能有效预防及延缓体内多巴胺能神经元的退行性病变^[9]。因此探讨以MG为代表的微环境下, BMSCs能否通过释放GDNF保护多巴胺能神经元的问题尚无明确答案。

为进一步分析特定微环境下BMSCs如何发挥保护多巴胺能神经元作用, 本实验以MG为切入点, 以经典的MG激活剂脂多糖激活MG^[10], 分析BMSCs在不同微环境条件下GDNF的分泌量, 证实炎症反应存在的情况下GDNF释放量上调, 并在此基础上证实由于GDNF的表达上调, 多巴胺能神经元特异性细胞标志蛋白——酪氨酸羟化酶表达增强。从体外实验揭示BMSCs特定的微环境下可通过上调GDNF释放量保护多巴胺能神经元, 为进一步研究BMSCs单独或联

合移植治疗帕金森病提供依据。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对比观察。

时间及地点: 实验于2009-03在吉林省耳鼻喉咽喉研究所和教育部吉林大学人兽共患病重点实验室完成。

材料: 2周龄Wistar大鼠、孕14 d Wistar大鼠、新生24 h Wistar大鼠均由吉林大学白求恩医学院实验动物中心提供(动物质量合格证号: SCXK-(吉)2007-0003), 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12、胎牛血清、胰蛋白酶	Invitrogen公司
酪氨酸羟化酶多克隆抗体、兔抗人CD29、CD44	Santa cruz公司
脂多糖	Sigma公司
Alexa Fluor 555标记山羊抗兔IgG	Invitrogen公司
ELISA试剂盒	Promega公司
CO ₂ 气体恒温培养箱	SANYO
倒置相差显微镜、Fluview 1000	Olympus
激光扫描共聚焦显微镜	

实验过程:

BMSCs的分离培养、传代: 无菌条件下取2周龄Wistar大鼠双侧股骨, 剥离附着于其上软组织, 用无血清DMEM反复冲洗, 直到骨髓腔发白, 1 000 r/min离心10 min, 去上清, 用含有体积分数为15%胎牛血清的DMEM制成细胞悬液, 200目滤网过滤, 细胞计数, 调节细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于35 mm培养皿内, 等到细胞完全贴壁后行第1次换液, 以后每隔3 d换1次液。

细胞融合达到60%传代。弃掉培养基, 加入适量0.25%胰酶消化约1 min, 加入适量血清终止消化, 轻轻吹打制成细胞悬液, 1 000 r/min离心10 min, 弃上清, 加入含有体积分数为15%血清的DMEM制成细胞悬液, 200目滤网过滤, 细胞计数, 调整细胞浓度 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于35 mm培养皿内。

MG的分离培养、激活^[28]: 取新生24 h Wistar大鼠, 无菌条件取出大脑皮质, 解剖显微镜下去除软脑膜, 将剥净软脑膜的皮质置于预冷的

无血清DMEM-F12内, 剪成1 mm×1 mm碎块, 加入0.05%胰酶体积为组织块的5~10倍, 37 °C振动消化30 min, 加入适量血清终止消化, 1 000 r/min离心10 min, 去上清, 加入含有体积分数为10%血清的DMEM/F12, 制成细胞悬液, 200目滤网过滤, 细胞计数, 调整细胞浓度 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于35 mm培养皿内。接种3 h后换全液, 以后每隔3 d换1次液。

培养约2周后, 镜下可见细胞分层现象, 下层贴壁的为星形胶质细胞, 黏附于其上较小的为MG。此时弃掉培养基, 加入0.25%胰酶消化约30 s, 加入适量血清终止消化, 轻轻摇晃培养皿, 将MG悬浮, 取细胞悬液1 000 r/min离心10 min, 加入含有体积分数为10%血清的DMEM-F12, 制成细胞悬液, 200目滤网过滤, 细胞计数, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于35 mm培养皿内。

培养细胞密度达到80%后分别向细胞培养液内加入脂多糖终质量浓度15 $\mu\text{g/L}$, 刺激1 h后换掉含有脂多糖的培养液, 并清洗3遍。

中脑多巴胺能神经元的分离^[18]: 孕14 d Wistar大鼠深度麻醉, 无菌剖腹取出胚胎, 将胚胎浸于培养基中, 用显微剪刀从近尾处断头。将头移入一个新的培养皿, 并置于解剖显微镜下, 剥离脑外包绕的组织。可以在头骨上做一个正中切口, 将脑组织取出移入盛有新鲜培养基的培养皿内, 分离中脑嘴侧盖部组织, 将取下的组织转移至离心管内, 以1 g/L胰酶和1 g/L胶原酶联合消化15 min。用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基终止消化, 吸管轻柔吹打数次, 滤掉组织块, 1 000 r/min离心10 min, 弃上清, 以无血清DMEM/F12培养基再次重悬, 200目滤网过滤, 计数细胞存活率为90%, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于35 mm培养皿中。

实验分为5组: BMSCs组、MG组、脂多糖+MG组、BMSCs+脂多糖+MG组, 分别取各实验组的培养上清, 对中脑多巴胺能神经元进行培养, 继续培养10 d。单纯多巴胺能神经元组不使用实验组培养上清, 仅用DMEM/F12。

酶联免疫吸附实验(ELISA)检测GDNF: 收取培养上清液, 用于检测GDNF的水平。检测方法参照Promega公司的说明书进行, 抗体包被, 将GDNF单克隆抗体用包被缓冲液1:1 000稀释后, 加入96孔板中, 100 $\mu\text{L/孔}$, 4 °C孵育过夜。抗体封闭, 弃除抗体包被液, 每孔加入200 μL 封闭缓冲液, 室温作用1 h。GDNF标准曲线制备。每孔中加入100 μL 待测上清, 室温摇荡500 r/min, 孵育6 h。弃除样品, 用洗涤缓冲液洗涤3次。96孔板中加入抗GDNF的多克隆抗体, 100 $\mu\text{L/孔}$, 4 °C孵育过夜。洗涤缓冲液重复洗涤3次。96孔板中加入检测抗体, 100 $\mu\text{L/孔}$ 。室温孵育2 h。用洗涤缓冲液重复洗涤3次。

每孔中加入100 μL TMB I溶液显色, 室温孵育15 min, 每孔加入100 μL INHCl终止反应, 孔中的蓝色液体变成黄色。用酶标仪读取波长450 nm处吸光度值。读板在终止反应后30 min内进行。绘制标准曲线, 计算样品GDNF水平。

免疫染色检测酪氨酸羟化酶表达: 细胞弃上清, 以40 g/L多聚甲醛孵育10 min; 0.1 mol/L PBS洗3次, 5 min/次; 以含1%BSA, 0.1%Triton的0.1 mol/L PBS室温下封闭30 min; 兔抗鼠GDNF孵育4 °C过夜; 0.1 mol/L PBS洗3次, 5 min/次; Alexa Fluor 555标记山羊抗兔IgG, 室温下孵育1 h; 0.1 mol/L PBS洗3次, 5 min/次; 甘油封固。

主要观察指标: 采用免疫荧光技术检测不同微环境对多巴胺能神经元存活的影响; 不同微环境对BMSCs释放GDNF的影响。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一、四作者, 干预实施为第一、二、三作者, 评估由第五作者完成, 均接受过系统培训, 未采用盲法评估。

统计学分析: 由第二作者采用Sigma Stat.2.03软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用单因素方差分析, q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BMSCs形态学特征 流式细胞仪检测结果显示, 第3代BMSCs表达CD29, CD44等干细胞标记。倒置显微镜下原代培养24 h的BMSCs呈单个分散分布, 贴壁; 48 h后形成细胞团簇; 72 h后进入快速增殖期, 细胞以长梭形为主; 7 d后细胞逐渐融合增多, 见图1。

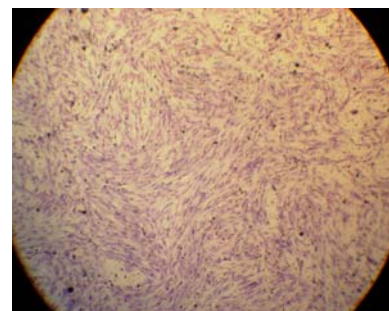
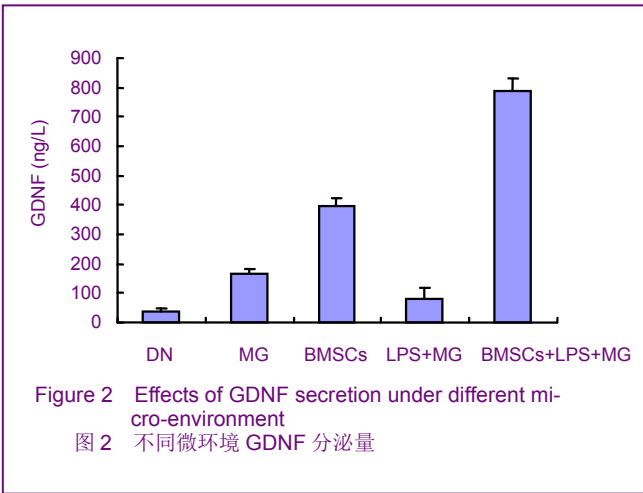
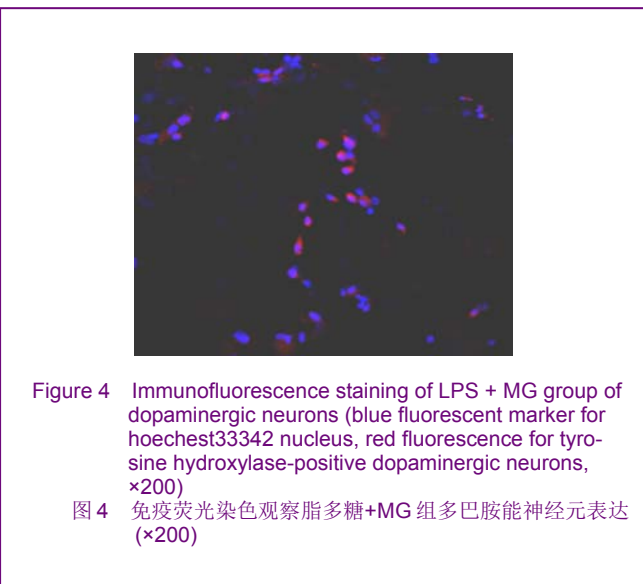
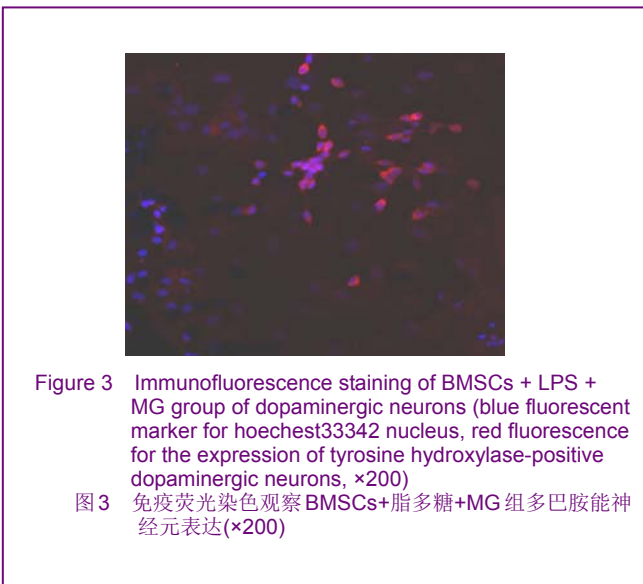


Figure 1 Primary cultured bone marrow mesenchymal stem cells 7 d, spindle-shaped, order arranged (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)
图1 原代培养BMSCs 7 d呈梭形, 排列有序(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

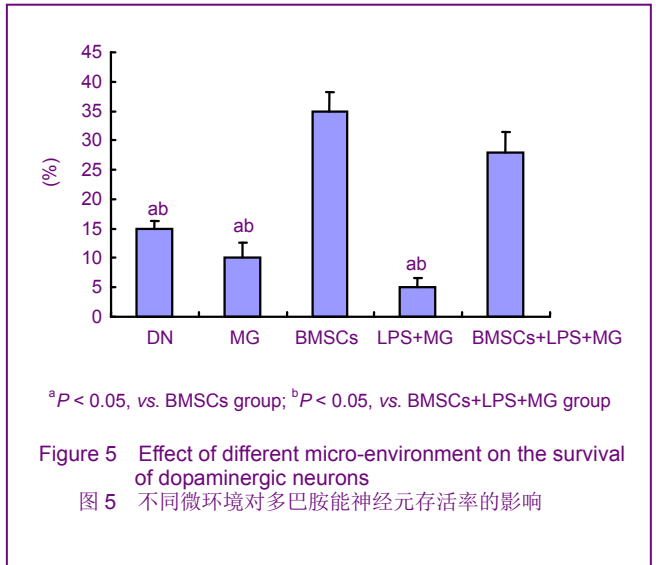
2.2 不同微环境GDNF的表达 ELISA试剂盒检测显示在各实验组GDNF水平各有不同。BMSCs组的GDNF表达较MG组高; 脂多糖+MG组的GDNF表达最少; BMSCs+脂多糖+MG组GDNF分泌量最高; 单纯多巴胺能神经元组仅见微量GDNF分泌, 见图2。



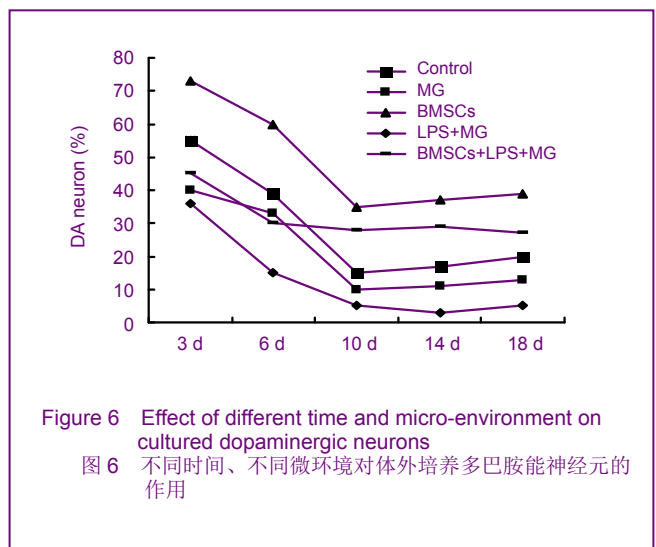
2.3 多巴胺能神经元特异性免疫荧光染色 多巴胺能神经元表达特异性细胞标志蛋白——酪氨酸羟化酶, 实验采用免疫荧光技术鉴定中脑多巴胺能神经元的水平。多巴胺能神经元阳性细胞呈红色荧光, 见图3, 4。



2.4 BMSCs对多巴胺能神经元存活的影响 各组的培养上清液对多巴胺能神经元持续培养10 d时, 计数多巴胺能神经元的存活率。结果显示, 单纯多巴胺能神经元组神经元的存活率为15%; MG组的多巴胺能神经元存活率为10%; BMSCs组的多巴胺能神经元存活率为35%; 脂多糖+MG组的多巴胺能神经元存活率为5%; 而BMSCs+脂多糖+MG组的多巴胺能神经元存活率达到了28%, 高于除BMSCs组外的其他各组($P < 0.05$), 见图5。



观察各个不同干扰因素对多巴胺能神经元的作用, 在培养不同时间收获细胞, 酪氨酸羟化酶染色确定神经元的存活, 结果发现, 体外培养多巴胺能神经元存活率随培养时间延长下降, 但是BMSCs组作用的多巴胺能神经元存活率明显高于其他各组, 见图6。



3 讨论

BMSCs是一种基质细胞, 可以自我更新, 繁殖产

生更多的干细胞,同时具有很强的可塑性,在特定条件下,可以分化为3个胚层来源的组织细胞包括神经细胞、心肌、血管等多种组织细胞。由于BMSCs具有取材容易、细胞增殖快、移植排斥反应弱、能过血脑屏障等优越特点^[11],使其成为治疗神经系统疾病理想的种子细胞。有研究发现细胞移植后帕金森模型小鼠黑质区神经干细胞的数量明显增加,新生的多巴胺能神经元也显著增加^[12]。也有研究证实干细胞移植治疗帕金森病大鼠的进食困难是通过保护神经元免受毒素损害的作用实现的^[13]。这些研究均发现干细胞移植后对帕金森病治疗的作用,但其机制并不一致,有研究认为干细胞分泌的各种细胞因子起了重要的作用。

实验中单纯使用DNEM/F12培养多巴胺能神经元,分别于培养不同时间检测酪氨酸羟化酶阳性细胞率,发现在培养的第6天有39%的多巴胺能神经元存活,8 d后随培养进间的延长多巴胺能神经元的存活率明显减少,这与文献报道一致^[14]。BMSCs与中脑细胞共培养10 d后,通过酪氨酸羟化酶免疫荧光染色确定多巴胺能神经元的存活率,发现BMSCs组多巴胺能神经元的存活率明显高于单纯多巴胺能神经元组,尤其是BMSCs+脂多糖+MG组的多巴胺能神经元存活率达到了28%,高于除BMSCs组外的其他各组($P < 0.05$)。说明BMSCs可能分泌某些神经营养因子,抑制了多巴胺能神经元的延迟性死亡,并挽救一些多巴胺能神经元从而提高了存活率。进一步实验证实,添加BMSCs的实验组均有GDNF表达,其表达量均较未添加BMSCs的实验组高,单纯多巴胺能神经元组仅见极少量GDNF表达。从理论上讲BMSCs+LPS+MG组多巴胺能神经元的存活率应高于BMSCs组,但是实际情况与预期相左,这可能是由于脂多糖刺激MG活化后使培养上清中存在一些自由基和炎性因子,虽然加入BMSCs可能对这些物质有一定的抑制作用,但也不一定能够完全抵消其对多巴胺能神经元的损伤作用,也可能是存在一些未知的干扰因素,导致该结果的出现,这有待于进一步的研究。

神经营养因子是神经元存活和发挥功能的基础,在体内多巴胺能神经元存活不仅需要从血液中摄取营养物质,而且需要多种神经营养因子的支持,这些因子可来自神经细胞本身,也可来自外周细胞包括神经胶质细胞等^[20-30]。当神经元出现退行性变处于凋亡前状态,若给予积极的干预措施,有望逆转或减缓神经元退行性改变。体外培养神经元在培养过程中随培养时间延长出现凋亡,如果在这个过程中补充神经营养因子,就能挽救一些多巴胺能神经元。GDNF不仅对多巴胺能神经元具有营养、支持和保护作用,而且还能促进神经前体细胞向多巴胺能神经元分化^[15-17]。观察不同时间、不同微环境对体外培养多巴胺能神经元的作用,发现一有趣现象,单纯培养多巴胺能神经元随时间延长,细胞明显减

少。而添加BMSCs的实验组中多巴胺能神经元的存活明显高于未添加组。作者认为这可能是由于BMSCs分泌的GDNF对多巴胺能神经元具有营养、支持和保护作用,同时还促进神经前体细胞向多巴胺能神经元分化。培养的多巴胺能神经元取材于胚胎期中脑嘴侧被盖部,这个区域除含有大量的多巴胺能神经元外,还有许多神经前体细胞,这些前体细胞具有多种分化潜能,在GDNF作用下能够诱导多巴胺能表型出现,分化成新的多巴胺能神经元。实验中通过酪氨酸羟化酶染色观察到BMSCs+脂多糖+MG组的酪氨酸羟化酶阳性细胞较脂多糖+MG组阳性率高。这也可能是与BMSCs对处于活化的MG表现出GDNF的高表达,从而对多巴胺能神经元起到保护、恢复及促分化的作用。

有研究发现BMSCs本身能够释放一定量的GDNF^[19],本实验利用BMSCs培养上清液对多巴胺能神经元培养后,多巴胺能神经元存活率较其他组高的原因可能就是由于BMSCs释放了一定量GDNF起到了对神经元的保护作用。实验中还观察到由于环境因素的不同,BMSCs释放GDNF量不同,这可能是由于在特定的微环境下开启了BMSCs的某些特定内部传导通路从而达到保护相应组织器官的目的,这一结果验证了BMSCs能够根据环境因子的不同而调节其相应的蛋白表达。

实验中采用ELISA法对各个实验组培养上清中的GDNF水平进行分析,证实含有BMSCs实验组GDNF水平均较未含有BMSCs组高。尤其是BMSCs+脂多糖+MG组GDNF的表达为最高,证实BMSCs对处于活化状态的MG反应出在生物学行为上的特异性。

本实验表明,BMSCs可以通过上调GDNF的表达保护多巴胺能神经元,从而使其免受毒素的损害,证明BMSCs可通过释放营养因子达到保护神经细胞的目的,为BMSCs的移植治疗提供理论依据。

4 参考文献

- [1] Sun SG, Li G, Cao XB, et al. Zhonghua Shenjing Waiké Zazhi. 2003;36(6):401-403. 孙圣刚,黎钢,曹学兵,等.帕金森病与炎症反应关系研究进展[J].中华神经科杂志,2003,36(6):401-403.
- [2] Fiszer U, Piotrowska K, Korlak J, et al. The immunological status in Parkinson's disease. Med Lab Sci. 1991;48(3):196-200.
- [3] Noda M, Kettenmann H, Wada K. Anti-inflammatory effects of kinins via microglia in the central nervous system. Biol Chem. 2006;387(2):167-171.
- [4] Xiang Z, Haroutunian V, Ho L, et al. Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia. Dis Markers. 2006;22(1-2):95-102.
- [5] Rojas M, Xu J, Woods CR, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. Am J Respir Cell Mol Biol. 2005;33(2):145-152.
- [6] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res. 2000;61(4):364-370.
- [7] McLeod M, Hong M, Mukhida K, et al. Erythropoietin and GDNF enhance ventral mesencephalic fiber outgrowth and capillary proliferation following neural transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Eur J Neurosci. 2006;24(2):361-370.

- [8] Kitayama T, Onitsuka Y, Song L, et al. Assessing an eating disorder induced by 6-OHDA and the possibility of nerve regeneration therapy by transplantation of neural progenitor cells in rats. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 2007;27(3):109-116.
- [9] Ju HY, Liu YM. *Zhongguo Shiyuan Zhenduanxue*. 2006;10(2):205-207.
鞠海英, 刘永茂. 胶质细胞源性神经营养因子的生物学研究[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(2): 205-207.
- [10] Raouf R, Chabot-Dore AJ, Ase AR, et al. Differential regulation of microglial P2X4 and P2X7 ATP receptors following LPS-induced activation. *Neuropharmacology*. 2007;53(4):496-504.
- [11] Xiang P, Xia WJ, Wang LR, et al. *Zhongshan Yike Daxue Xuebao*. 2001;22(5):321.
项鹏, 夏文杰, 王连荣, 等. 丹参注射液诱导间充质干细胞定向诱导为神经元样细胞[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(5): 321.
- [12] Maries E, Kordower JH, Chu Y, et al. Focal not widespread grafts induce novel dyskinetic behavior in parkinsonian rats. *Neurobiol Dis*. 2006;21(1):165-180.
- [13] Zhao M, Momma S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(13):7925-7930.
- [14] Fan DY, Wang P, Tang Y, et al. *Zhongfeng yu Shenjing Jibing Zazhi*. 2008;25(5):557-560.
范东艳, 王苹, 汤勇, 等. 神经营养因子对体外培养中脑多巴胺能神经元存活和分化的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25(5): 557-560.
- [15] Kong X, Li X, Cai Z, et al. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2008;28(4):569-579.
- [16] Isacson O, Kordower JH. Future of cell and gene therapies for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2008;64 Suppl 2:S122-138.
- [17] Chu TH, Li SY, Guo A, et al. Implantation of neurotrophic factor-treated sensory nerve graft enhances survival and axonal regeneration of motoneurons after spinal root avulsion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(1):94-101.
- [18] Shimoda K, Sauve Y. A high percentage yield of tyrosine hydroxylase positive cells from rat E 14 mesencephalic cell culture. *Brain Res*. 1992;586(2):319-331.
- [19] Xu SL, Zhang Y, Chen B. *Zhongguo Yaoli Tongxun*. 2007;24(2):22-23.
徐胜利, 张愚, 陈彪. 表达人胶质细胞生长因子的人神经前体细胞移植可促进帕金森病大鼠多巴胺能神经元修复[J]. 中国药理通讯, 2007, 24(2): 22-23.
- [20] Slevin JT, Gash DM, Smith CD, et al. Unilateral intraputamenal glial cell line derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: response to 1 year each of treatment and withdrawal. *Neurosurg Focus*. 2006;20(5):E1.
- [21] Lang AE, Gill S, Patel NK, et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neuro*. 2006;59(3):459-466.
- [22] Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, et al. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science New York, NY*. 2008;319:1683-1687.
- [23] Lynch G, Rex CS, Gall CM. LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology*. 2007;52(1):12-23.
- [24] Tourandokht B, Mehrdad R, Mohammad RJ, et al. Neuroprotective effect of genistein in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat model. *Phytother Res*. 2009;23(1):132-135.
- [25] Zecca L, Wilms H, Geick S, et al. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2008;116(1):47-55.
- [26] Greenblatt DY, Cayo MA, Adler JT. Valproic acid activates Notch1 signaling and induces apoptosis in medullary thyroid cancer cells. *Ann Surg*. 2008;247(6):1036-1040.
- [27] Kim YS, Choi DH, Block ML, et al. A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. *FASEB J*. 2007;21(1):179-187.
- [28] Zhao H, Zhu CG, Wei Y, et al. *Zhongguo Zuzhi Huaxue yu Xibao Huaxue Zazhi*. 2007;16(1):115-121.
赵虎, 朱长庚, 魏瑛, 等. 小胶质细胞纯化分离培养方法的改良[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(1): 115-121.
- [29] Mingam R, De Smedt V, Amédée T, et al. In vitro and in vivo evidence for a role of the P2X7 receptor in the release of IL-1 beta in the murine brain. *Brain Behav Immun*. 2008;22(2):234-244.
- [30] Qin L, Wu X, Block ML, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007;55(5):453-462.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 无其他利益冲突。

课题的创新点/意义: 课题旨在通过实验手段探讨细胞移植治疗帕金森病的机制。通过观察骨髓间充质干细胞影响多巴胺能神经元存活的机制, 发现不同环境因子作用下骨髓间充质干细胞胶质细胞源性神经营养因子的释放量不同。证明骨髓间充质干细胞可以通过释放营养因子达到保护神经细胞的目的, 为骨髓间充质干细胞的移植治疗提供理论依据。

课题评估的“金标准”: 实验主要观察指标是检测不同微环境对多巴胺能神经元存活的影响, 酪氨酸羟化酶染色是判断多巴胺能神经元的金标准, 尽管不是惟一的标准。

设计或课题的偏倚与不足: 实验初步证实骨髓间充质干细胞由于释放营养因子维持和促进多巴胺能神经元的存活, 但尚不能证实酪氨酸羟化酶阳性神经元的来源, 例如其是否来源于神经前体细胞分化, 还是维持了原有多巴胺能神经元存活。

提供临床借鉴的价值: 骨髓间充质干细胞获取简便, 体外培养容易, 细胞分裂、增殖快, 排斥反应弱, 而且可以通过血脑屏障, 因此应用骨髓间充质干细胞治疗神经系统疾病具有广阔前景。本课题名称“小胶质细胞活化刺激骨髓间充质干细胞释放胶质细胞源性神经营养因子保护多巴胺能神经元的实验研究”旨在通过骨髓间充质干细胞的体外培养, 使用活化的小胶质细胞干预, 观察其对多巴胺能神经元增殖、存活的影响, 希望能深入研究骨髓间充质干细胞移植治疗神经系统疾病的作用机制, 为其应用于临床移植治疗提供实验室依据。