

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.10.023 [http://www.crter.org]

刘晓刚, 邓宇斌, 蔡辉. 胶质细胞源性神经营养因子对猴骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(10):1856-1861.

胶质细胞源性神经营养因子对猴骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的影响***

刘晓刚¹, 邓宇斌², 蔡辉¹

1 北京市垂杨柳医院病理科, 北京市 100022

2 中山大学中山医学院病理学与病理生理学教研室, 广东省广州市 510080

文章亮点:

实验以灵长类动物骨髓间充质干细胞为观察对象, 以中国特色的中药成分隐丹参酮为成神经诱导剂, 其在诱导分化为神经元样细胞过程中存在凋亡现象, 给予胶质细胞源性神经营养因子干预后可显著降低神经元样细胞的凋亡水平。

关键词:

干细胞; 干细胞与中医药; 胶质细胞源性神经营养因子; 隐丹参酮; 诱导; 分化; 骨髓间充质干细胞; 神经元样细胞; 细胞凋亡; 诱导剂; 流式细胞仪; 猕猴; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 鉴于骨髓间充质干细胞体外分化为神经样细胞的最终研究目的, 是将诱导后的细胞移植入体内参与损伤神经系统的修复过程, 因此, 保证移植细胞的活性显得十分重要。

目的: 探讨胶质细胞源性神经营养因子对隐丹参酮体外诱导猴骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的保护作用。

方法: 以隐丹参酮为诱导剂诱导第8代猴骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞, 应用流式细胞仪检测不同时段诱导细胞的凋亡百分比(每间隔0.5 h为1组, 共12组)。选择细胞凋亡百分比比较高的一个时段, 观察添加不同质量浓度胶质细胞源性神经营养因子(0-100 μg/L, 共11组)对诱导细胞凋亡的影响。

结果与结论: 诱导后细胞凋亡百分比逐渐升高, 约4 h时达到峰值, 维持约1 h后下降($P < 0.05$)。随着胶质细胞源性神经营养因子质量浓度由0 μg/L提高到30 μg/L, 细胞凋亡百分比逐渐下降($P < 0.05$)。当胶质细胞源性神经营养因子质量浓度超过30 μg/L后, 细胞凋亡水平受胶质细胞源性神经营养因子质量浓度影响不再显著。结果可见胶质细胞源性神经营养因子在隐丹参酮体外诱导猴骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞过程中具有保护作用。

刘晓刚★, 男, 1978年生, 山西省晋中市人, 汉族, 2005年中山大学毕业, 硕士, 主要从事干细胞研究。
chinalark@163.com

通讯作者: 邓宇斌, 教授, 博士生导师, 中山大学中山医学院病理学与病理生理学教研室, 广东省广州市 510080
albert@gzsums.edu.cn

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344
(2013)10-01856-06

收稿日期: 2012-05-07

修回日期: 2012-07-31

(20120507010/M·C)

Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes neuron-like cell differentiation of mesenchymal stem cells

Liu Xiao-gang¹, Deng Yu-bin², Cai Hui¹

1 Department of Pathology, Beijing Chuiyangliu Hospital, Beijing 100022, China

2 Department of Pathology and Pathophysiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: The ultimate purpose for inducing the bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into neuron-like cells *in vitro* is to transplant the induced cells into the body and repair the damaged nervous system. So, it is important to ensure the activity of the transplanted cells.

OBJECTIVE: To investigate the protective effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on neuron-like

Liu Xiao-gang★, Master,
Department of Pathology,
Beijing Chuiyangliu Hospital,
Beijing 100022, China
chinalark@163.com

Corresponding author: Deng
Yu-bin, Professor, Doctoral
supervisor, Department of
Pathology and
Pathophysiology, Zhongshan
School of Medicine, Sun
Yat-sen University, Guangzhou
510080, Guangdong Province,
China
albert@gzsums.edu.cn

Supported by: National Natural
Science Foundation of China,
No. 30271327*; Master's and
Doctoral Foundation of Beijing
Chuiyangliu Hospital, No.
2010J06*

Received: 2012-05-07

Accepted: 2012-07-31

cells differentiated from mucaca mulatta bone marrow mesenchymal stem cells induced with cryptotanshinone *in vitro*.

METHODS: The passage 8 mucaca mulatta bone marrow mesenchymal stem cells were induced with cryptotanshinone to differentiate into neuron-like cells, and the percentage of apoptosis of the induced cells at different time points after induction was detected with flow cytometry (0.5 hour was one group, a total of 12 hours). The period with higher apoptosis percentage was selected to observe the effect of different concentrations of glial cell line-derived neurotrophic factor (0–100 µg/L, totally eleven groups) on the apoptosis of the induced cells.

RESULTS AND CONCLUSION: Cell apoptosis percentage after induction was increased gradually over time and reached a peak about 4 hours, and decreased after 1 hour ($P < 0.05$). Cell apoptosis percentage was decreased gradually when the concentration of glial cell line-derived neurotrophic factor increased from 0 µg/L to 30 µg/L ($P < 0.05$), and more remarkable change were not found when glial cell line-derived neurotrophic factor concentration reached 30 µg/L. The results show that glial cell line-derived neurotrophic factor has the protective effect on the neuron-like cells differentiated from mucaca mulatta bone marrow mesenchymal stem cells induced with cryptotanshinone *in vitro*.

Key Words: stem cells; stem cells and traditional Chinese medicine; glial cell line-derived neurotrophic factor; cryptotanshinone; induction; differentiation; bone marrow mesenchymal stem cells; neuron-like cells; apoptosis; inducing agent; flow cytometry; mucaca mulatta; stem cell photographs-containing paper

Liu XG, Deng YB, Cai H. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes neuron-like cell differentiation of mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013; 17(10):1856-1861.

0 引言

骨髓间充质干细胞属于成体干细胞的一种, 对于骨髓内环境的稳定具有重要的支持作用。研究表明, 骨髓间充质干细胞具有多胚层分化潜能^[1-3], 体外可以诱导骨髓间充质干细胞定向分化为神经样细胞^[4-8], 并且技术日趋成熟, 为其治疗神经系统损伤性疾病的可能性提供了平台。研究表明, 隐丹参酮是骨髓间充质干细胞体外分化为神经样细胞的有效诱导成分^[9-10], 且无毒副作用而备受关注。鉴于骨髓间充质干细胞体外分化为神经样细胞的最终研究目的, 是要将诱导后的细胞移植入体内参与损伤神经系统的修复过程, 因此, 保证移植细胞的活性显得十分重要, 否则不可能取得真正意义上的治疗效果。胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)具有促进多种神经元存活与分化的功能^[11-14], 是一种重要的神经保护因子。实验旨在研究隐丹参酮诱导骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞过程中胶质细胞源性神经营养因子对诱导细胞的保护作用。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察。

时间及地点: 实验于2005年1月至2011年10月在中山大学中山医学院病理生理学教研室及北京市垂杨柳医院病理科完成。

材料:

实验动物: 健康恒河猴8只, 雄性, 二三岁龄, 体质量3.0–4.0 kg, 由华南灵长类动物研究中心提供, 动物许可证号: SCXK(粤)2004-0010。

试剂及仪器: L-DMEM 培养基(Gibco), 胎牛血清(Hyclone), Ficoll-Paque 分离液(Pharmacia), 胰蛋白酶(上海生化试剂厂产品), 隐丹参酮(广州药检所), 胶质细胞源性神经营养因子(Pepro Tech EC Ltd.), 碘化丙啶(Sigma), 倒置相差显微镜(Olympus), FACSCalibur 流式细胞仪(BD)。

实验方法:

猴骨髓间充质干细胞的分离、培养及扩增: 将猴用盐酸氯胺酮注射液按10 mg/kg肌注麻醉

后, 俯卧于手术操作台上, 四肢固定。选取髂前上嵴为穿刺部位, 然后在该部位剪毛, 皮肤消毒, 铺无菌洞巾。12号骨穿针穿刺进入骨髓腔, 用10 mL注射器抽取1 mL生理盐水(内含肝素120 U), 反复抽吸针管湿润注射器管壁, 缓慢抽取骨髓约5 mL, 同时适当振荡针管。将获取的骨髓转入离心管, 1 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心5 min, 弃上清及脂肪层, 细胞沉淀用2倍体积的L-DMEM培养液充分混匀, 用吸管轻轻叠加到密度为1.073 g/mL的Ficoll-Paque分离液上(细胞悬液与分离液体积比为2:3), 2 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心25 min, 小心吸取界面层的单核细胞, 然后用L-DMEM培养液洗涤3次。细胞计数, 用L-DMEM(含体积分数为15%胎牛血清)完全培养液调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于25 mL培养瓶, 置于37 °C, 体积分数为5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。3 d或4 d首次换液, 以后每隔2 d或3 d换液1次, 倒置相差显微镜下逐日观察细胞形态、贴壁及生长情况。

猴骨髓间充质干细胞的传代培养: 当原代细胞融合度达80%时, 用0.25%胰酶消化液(含1 mmol/L的EDTA)消化, 1 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心5 min, 弃去上清, 细胞沉淀按1:2传代。待第1代细胞融合度达80%时, 按上述方法1:2传代, 第3代以后按1:3传代, 第5代以后按1:5传代。

猴骨髓间充质干细胞诱导分化为神经元样细胞及凋亡检测: 将融合后的第7代猴骨髓间充质干细胞消化后, 按1:5传代, 待细胞融合度达到80%时, 去除原培养液, PBS洗2次, 加入成神经诱导液(含隐丹参酮20 mg/L的无血清L-DMEM培养基), 显微镜下观察细胞形态变化。按诱导时间分为12组(每间隔0.5 h为1组, $n=16$), 分别消化计数, 使细胞数 $>1.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 离心, 去除上清至0.1 mL左右; 轻轻悬浮细胞, 缓慢滴加-20 °C预冷的2 mL体积分数为70%乙醇固定, 尽可能使细胞分散, 置于-20 °C过夜; 离心, 去上清, 加入1 mL染色液(2 g/L碘化丙啶200 μL , 10 g/L RNaseA 500 μL , 用含Ca⁺、Mg⁺的PBS稀释至10 mL), 37 °C孵育30 min; 用流式细胞仪进行检测, 计算反应细胞凋亡水平的凋亡百分比(Pcnt)。

$$\text{Pcnt} = (\text{subG}_1 / \text{subG}_1 + \text{G}_0 \text{G}_1) \%$$

其中, subG₁期为亚二倍体, 是细胞凋亡的特征之一; G₀期为暂时离开细胞周期, 停止细胞分裂, 去执行一定生物学功能的细胞所处的时期; G₁期为DNA合成前期。

根据凋亡检测结果, 在凋亡水平较高的时段, 按添

加胶质细胞源性神经营养因子的质量浓度(0 $\mu\text{g/L}$ 逐渐增加至100 $\mu\text{g/L}$)再分为11组($n=16$), 按照上述方法进行干预4 h后检测凋亡率。

主要观察指标: 细胞形态, 细胞凋亡率。

统计学分析: 所得数据应用SPSS 11.0统计软件采用单因素方差分析处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 猴骨髓间充质干细胞的分离、培养及扩增 细胞接种24 h后, 出现部分细胞贴壁生长现象, 72 h后首次进行全培养液更换, 首次换液后24-48 h可观察到贴壁细胞数量明显增加, 细胞呈长梭形, 细胞集落相互连接, 见图1。12 d左右, 细胞集落达到80%融合度, 主要呈漩涡状生长方式。

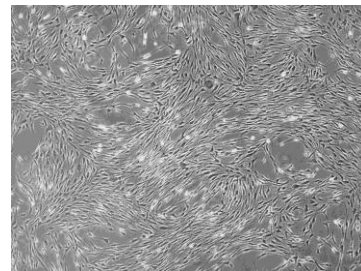


图1 原代培养的猴骨髓间充质干细胞呈长梭形, 呈流水样、巢状排列($\times 100$)

Figure 1 Primary cultured mucaca multta bone marrow mesenchymal stem cells showed long spindle-shaped appearance and nest-like arrangement ($\times 100$)

第8代细胞仍然保持着与原代细胞相同的特性, 克隆性生长, 呈成纤维细胞形态, 漩涡状排列, 见图2。

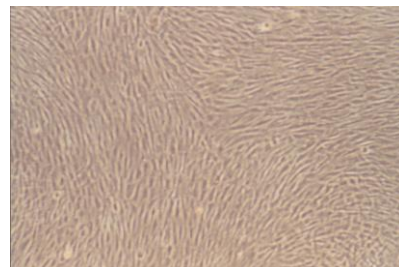


图2 第8代培养的猴骨髓间充质干细胞形态及排列结构仍保持了原代骨髓间充质干细胞的特征($\times 100$)

Figure 2 Passage 8 mucaca multta bone marrow mesenchymal stem cells showed similar feature to primary cells ($\times 100$)

2.2 猴骨髓间充质干细胞诱导分化为神经元样细胞 隐

丹参酮诱导后10 min, 猴骨髓间充质干细胞形态即发生变化, 0.5 h后变化开始显著: 胞体逐渐变化为锥体形, 并形成轴突、树突样结构, 突起相互连接形成网络样形态, 见图3。

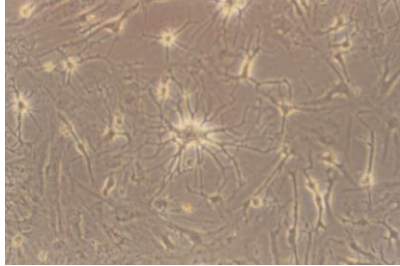


图3 猴骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞, 胞体转变为椎体型, 轴突及树突样结构形成并互相连接(x200)

Figure 3 Mucaca multta bone marrow mesenchymal stem cells could differentiate into neuron-like cells, and the cells showed cone-shaped appearance with axon-like and dendrite-like structure (x200)

2.3 猴骨髓间充质干细胞凋亡率 猴骨髓间充质干细胞凋亡水平随着诱导时间延长而逐渐升高, 4 h时达到峰值($P < 0.05$), 持续约1 h后下降, 见表1。

表1 含隐丹参酮的成神经诱导液诱导后不同时段猴骨髓间充质干细胞凋亡率

Table 1 The apoptosis rate of mucaca multta bone marrow mesenchymal stem cells at different time points after induction with cryptotanshinone-containing neural induction medium ($\bar{x} \pm s, n=16, \%$)

诱导时间(h)	凋亡率
0	0.56±0.26
0.5	1.56±0.40
1.0	2.68±0.35
1.5	3.03±0.31
2.0	5.56±0.48
2.5	6.05±0.38
3.0	7.14±0.38
3.5	7.73±0.41
4.0	9.02±0.85
4.5	8.66±0.56
5.0	8.62±0.56
6.0	6.16±0.79

单因素方差分析, 4 h组, 4.5 h组, 5 h组与其他各组两两比较, $P < 0.05$ 。

注: 猴骨髓间充质干细胞凋亡水平随着诱导时间延长而逐渐升高, 4 h时达到峰值, 持续约1 h后下降。

细胞凋亡水平随着胶质细胞源性神经营养因子浓度增加而降低($P < 0.05$), 当胶质细胞源性神经营养因子质量浓度 $>30 \mu\text{g/L}$ 时, 并不能够进一步显著降低凋亡水平, 见表2。

表2 不同质量浓度胶质细胞源性神经营养因子对隐丹参酮诱导后猴骨髓间充质干细胞凋亡率的影响

Table 2 Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor with different concentrations on the apoptosis rate of mucaca multta bone marrow mesenchymal stem cells after induced with cryptotanshinone ($\bar{x} \pm s, n=16, \%$)

胶质细胞源性神经营养因子质量浓度 ($\mu\text{g/L}$)	凋亡率
0	9.02±0.85
1	7.78±0.36
3	7.48±0.42
5	6.85±0.77
10	6.07±0.57
15	5.61±0.42
20	4.90±0.72
30	4.15±0.46
40	4.11±0.35
50	4.08±0.34
100	4.06±0.32

单因素方差分析, 0 $\mu\text{g/L}$ 组与其他各组两两比较, $P < 0.05$ 。

注: 细胞凋亡水平随着胶质细胞源性神经营养因子浓度增加而降低, 当质量浓度 $>30 \mu\text{g/L}$ 时, 增加胶质细胞源性神经营养因子质量浓度并不能够进一步显著降低凋亡水平。

3 讨论

骨髓间充质干细胞是从骨髓中分离出的一种非造血类成体干细胞, 具有易于获取, 易于培养与扩增, 免疫原性弱, 能够整合外源性基因等优点^[15-22], 并且具有多胚层分化能力, 能够分化为多种神经细胞, 使其成为细胞移植治疗中枢系统损伤性疾病的理想材料^[23-28], 在应用上的优势甚至超过了神经干细胞。

研究表明, 骨髓间充质干细胞可以通过血脑屏障, 在脑组织内分化为神经元和神经胶质细胞, 并能够促进神经功能的恢复^[29]。然而这种体内自然诱导方式具有很大的不确定性, 移植治疗的效果并不十分乐观, 甚至有形成肿瘤的风险性。因此, 目前研究的热点之一为体外诱导骨髓间充质干细胞分化为神经细胞, 而后再进行移植, 这种策略目的明确, 可能更有利于促进中枢神经系统功能的有效恢复。体外诱导骨髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法很多, 并且日益成熟, 主要包括细胞因子诱导、中药成分诱导、细胞共培养诱导及提高细胞内环磷腺苷诱导等4类^[30-34]。

实验中采用了隐丹参酮作为体外诱导剂, 隐丹参酮是从唇形科植物丹参的干燥根及根茎中提取的二萜醌

类有效单体, 具有抗氧化、抗衰老的药理作用, 相关研究表明, 隐丹参酮是一种骨髓间充质干细胞体外分化为神经元样细胞的有效诱导成分, 并且不存在毒副作用, 是一种理想的骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的诱导剂。

在实验中, 随着诱导时间的延长, 细胞的凋亡水平在一定时段内是逐渐上升的, 约4 h时达到凋亡峰值, 而后不再升高甚至下降。这种现象表明, 体外诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞过程中是存在凋亡现象的, 可能与细胞类型转换, 而微环境不能提供相应的支持营养物质有关, 多种信号转导途径可能参与了这一过程; 随着诱导时间的增加, 骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的比例增加, 因而凋亡水平也在不断上升; 而后期出现凋亡水平下降的现象可能是由于长时间缺乏营养支持, 此时细胞出现坏死, 而不再以凋亡的方式为主。为了有效使用诱导后神经细胞进行移植以达到治疗效果, 防止移植细胞发生凋亡是一个重要的环节。研究表明, 通过上调抗凋亡基因 *Bcl-xL*, 可以延长移植细胞的存活期, *Bcl-xL* 是 *Bcl-2* 家族抗凋亡能力最强的分子之一^[35]。胶质细胞源性神经营养因子属于 $\beta 2$ 转化生长因子超家族的成员, 对于多种神经元, 包括多巴胺能神经元和运动神经元都有着较强的促存活和修复作用。研究表明, 胶质细胞源性神经营养因子能够增强大鼠脊髓运动神经元 *Bcl-2* 表达, 减少神经元凋亡, 可能与胶质细胞源性神经营养因子和膜受体结合有关, 可以激活一系列胞内反应, 上调 *Bcl-2* 基因的表达^[36]。在实验中, 通过添加胶质细胞源性神经营养因子, 可以显著降低诱导后神经元样细胞的凋亡水平, 并且作用强度在一定范围内随着浓度的升高而增强, 当胶质细胞源性神经营养因子质量浓度超过 $30 \mu\text{g/L}$ 后, 作用强度不再随着质量浓度的进一步提高而显著变化, 可能与胶质细胞源性神经营养因子和膜受体的结合位点已饱和有关。

总之, 当体外诱导骨髓间充质干细胞分化为神经细胞移植治疗中枢神经系统损伤性疾病时, 既要保证诱导的效果, 又要考虑到移植细胞的活性, 二者综合考虑找到最佳的诱导移植时间点, 才有可能保证移植取得更佳的效果。

致谢: 感谢科教科刘丽萍老师在实验实施过程中的协调工作。

基金资助: 国家自然科学基金(30271327); 北京市垂杨柳医院硕博基金(2010J06)。

作者贡献: 实验设计为第一、二作者, 实验实施为第一作者, 实验评估为第二作者, 资料收集为第三作者。第一作者成文, 第二作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Park BW, Kang EJ, Byun JH, et al. In vitro and in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. *Differentiation*. 2012;83(5):249-259.
- [2] Ghaedi M, Soleimani M, Shabani I, et al. Hepatic differentiation from human mesenchymal stem cells on a novel nanofiber scaffold. *Cell Mol Biol Lett*. 2012;17(1):89-106.
- [3] Bojin FM, Gruia AT, Cristea MI, et al. Adipocytes differentiated in vitro from rat mesenchymal stem cells lack essential free fatty acids compared to adult adipocytes. *Stem Cells Dev*. 2012; 21(4):507-512.
- [4] Liu XG, Deng YB, Cai H. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(10): 1813-1816.
刘晓刚, 邓宇斌, 蔡辉. 碱性成纤维细胞生长因子与猴骨髓间充质干细胞增殖及向神经元前体细胞分化: 不同质量浓度对诱导剂隐丹参酮作用有差异吗[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(10):1813-1816.
- [5] Wang Y, He W, Bian H, et al. Small molecule induction of neural-like cells from bone marrow-mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2012;113(5):1527-1536.
- [6] Wang XS, Li HF, Zhao Y, et al. Radix Astragali-induced differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Neural Regen Res*. 2009;4(7):497-502.
- [7] Ma K, Fox L, Shi G, et al. Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Neurol Res*. 2011;33(10):1083-1093.
- [8] Yin YQ, Chen B, Ke JL, et al. Xuefuzhuyu injection induces neuronal differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Neural Regen Res*. 2011;6(3):177-182.
- [9] Deng YB, Yuan QT, Liu XG, et al. Functional recovery after rhesus monkey spinal cord injury by transplantation of bone marrow mesenchymal-stem cell-derived neurons. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118(18):1533-1541.
- [10] Deng YB, Liu XG, Liu ZG, et al. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytherapy*. 2006;8(3):210-214.

- [11] Savitt J, Singh D, Zhang C, et al. The in vivo response of stem and other undifferentiated spermatogonia to the reversible inhibition of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in the adult. *Stem Cells*. 2012;30(4):732-740.
- [12] Cass WA, Peters LE, Fletcher AM, et al. Evoked dopamine overflow is augmented in the striatum of calcitriol treated rats. *Neurochem Int*. 2012;60(2):186-191.
- [13] Baudry C, Reichardt F, Marchix J, et al. Diet-induced obesity has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system: involvement of leptin and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Physiol*. 2012;590(Pt 3):533-544.
- [14] Airavaara M, Pletnikova O, Doyle ME, et al. Identification of novel GDNF isoforms and cis-antisense GDNFOS gene and their regulation in human middle temporal gyrus of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2011;286(52):45093-45102.
- [15] Yi T, Lee DS, Jeon MS, et al. Gene expression profile reveals that STAT2 is involved in the immunosuppressive function of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Gene*. 2012;497(2):131-139.
- [16] Park HW, Cho JS, Park CK, et al. Directed induction of functional motor neuron-like cells from genetically engineered human mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2012;7(4):e35244.
- [17] Hao L, Wang J, Zou Z, et al. Transplantation of BMSCs expressing hPDGF-A/hBD2 promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury. *Gene Ther*. 2009;16(1):34-42.
- [18] Gauglitz GG, Jeschke MG. Combined gene and stem cell therapy for cutaneous wound healing. *Mol Pharm*. 2011;8(5):1471-1479.
- [19] Dong SW, Ying DJ, Duan XJ, et al. Bone regeneration using an acellular extracellular matrix and bone marrow mesenchymal stem cells expressing Cbfa1. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73(10):2226-2233.
- [20] Liu H, Honmou O, Harada K, et al. Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia. *Brain*. 2006;129(Pt 10):2734-2745.
- [21] Horita Y, Honmou O, Harada K, et al. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *J Neurosci Res*. 2006;84(7):1495-1504.
- [22] Toyama K, Honmou O, Harada K, et al. Therapeutic benefits of angiogenic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2009;216(1):47-55.
- [23] Jin GZ, Cho SJ, Choi EG, et al. Rat mesenchymal stem cells increase tyrosine hydroxylase expression and dopamine content in ventral mesencephalic cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2008;32(11):1433-1438.
- [24] Peng Y, Zhang QM, You H, et al. Growth-associated protein 43 and neural cell adhesion molecule expression following bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of ischemic brain injury. *Neural Regen Res*. 2010;5(13):975-980.
- [25] Wang D, Zhang JJ. Electrophysiological functional recovery in a rat model of spinal cord hemisection injury following bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation under hypothermia. *Neural Regen Res*. 2012;7(10):749-755.
- [26] Glavaski-Joksimovic A, Virag T, Chang QA, et al. Reversal of dopaminergic degeneration in a parkinsonian rat following micrografting of human bone marrow-derived neural progenitors. *Cell Transplant*. 2009;18(7):801-814.
- [27] Naruse K, Sato J, Funakubo M, et al. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy. *PLoS One*. 2011;6(11):e27458.
- [28] Ma K, Fox L, Shi G, et al. Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Neurol Res*. 2011;33(10):1083-1093.
- [29] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(19):10711-10716.
- [30] Zhang H, Sun TW. *Guoji Gukexue Zazhi*. 2011;32(2):104-107. 张杭, 孙天威. 骨髓间充质干细胞分化为神经细胞研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2011,32(2):104-107.
- [31] Sun D, Bullock MR, McGinn MJ, et al. Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2009;216(1):56-65.
- [32] Pei JJ, Wu R, Zhao HB, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(10):1808-1812. 裴晶晶, 吴润, 赵红斌, 等. Ca²⁺信号介导红景天苷促进小鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞的定向分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010,14(10):1808-1812.
- [33] Ni WF, Yin LH, Lu J, et al. In vitro neural differentiation of bone marrow stromal cells induced by cocultured olfactory ensheathing cells. *Neurosci Lett*. 2010;475(2):99-103.
- [34] Deng J, Petersen BE, Steindler DA, et al. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells*. 2006;24(4):1054-1064.
- [35] Kim SU, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J Neurosci Res*. 2009;87(10):2183-2200.
- [36] Wang CL, Su JB, E LL, et al. *Jiepo Xuebao*. 2001;32(2):132-135. 王常利, 苏剑斌, 鄂玲玲, 等. GDNF及HSV-GDNF对坐骨神经损伤大鼠脊髓运动神经元Bcl-2表达的影响[J]. 解剖学报, 2001, 32(2):132-135.