

胚胎神经上皮干细胞脑内移植治疗大鼠帕金森病

王家增(山东医学高等专科学校, 山东省临沂市 276002)

文章亮点:

实验的特点是将克隆增殖后的胚胎神经上皮干细胞分别移植到帕金森病大鼠模型的纹状体、黑质和侧脑室内, 观察不同部位移植后供体细胞的存活和分化情况。观察到移植细胞分化为酪氨酸羟化酶阳性神经元并增加其内的多巴胺含量, 可有效改善大鼠的旋转行为。

关键词:

干细胞; 胚胎干细胞; 神经上皮干细胞; 帕金森病; 绿色荧光蛋白; 迁徙; 多巴胺; 酪氨酸羟化酶

主题词:

胚胎干细胞; 帕金森病; 多巴胺; 酪氨酸单氧化酶

基金资助:

山东省高等学校科技计划项目(J10LF58)

摘要

背景: 研究表明胚胎干细胞移植可改善血管性痴呆大鼠的学习记忆功能, 增强神经的可塑性, 诱导自身定向迁移并分化为成熟神经元。

目的: 观察胚胎神经上皮干细胞脑内移植治疗帕金森病大鼠及移植细胞的迁徙情况。

方法: 将绿色荧光蛋白转基因鼠的胚胎神经上皮干细胞分别移植到帕金森病大鼠的黑质、纹状体和侧脑室内, 移植后检测移植细胞的存活、迁徙与分化; 利用高效液相色谱法检测实验动物脑内多巴胺神经递质的含量; 对比实验动物旋转行为的改变, 评估胚胎神经上皮干细胞移植对帕金森病大鼠的治疗作用。

结果与结论: 移植细胞存活良好且分化出了酪氨酸羟化酶阳性细胞, 向黑质纹状体环路迁徙趋势明显; 脑内多巴胺含量增加, 动物旋转行为改善明显。表明移植到帕金森病大鼠脑内的神经上皮干细胞多向黑质纹状体环路迁徙, 且可增加脑内多巴胺神经递质的含量治疗帕金森病。

王家增. 胚胎神经上皮干细胞脑内移植治疗大鼠帕金森病[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(14):2200-2205.

Transplantation of embryonic neuroepithelial stem cells into the brain of Parkinson disease rats

Wang Jia-zeng (Shandong Medical Collage, Linyi 276002, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that embryonic stem cell transplantation may improve learning and memory abilities in rats with vascular dementia, enhance neural plasticity, stereotaxically migrate and differentiate into mature neurons.

OBJECTIVE: To investigate the improvement of Parkinson disease rats following the neuroepithelial stem cells were transplanted into the brain and the migration of the transplanted cells.

METHODS: The neuroepithelial stem cells derived from green fluorescent protein transgenic mice were stereotaxically transplanted into the substantia nigra, striatum and lateral cerebral ventricle of Parkinson disease rats. The survival, migration and differentiation of transplanted neuroepithelial stem cells were examined at different time of transplantation, and the relationship between the change of rotation behavior and content of dopamine were analyzed. Therapeutic effects of embryonic neuroepithelial stem cells transplantation in Parkinson disease rats were assessed.

RESULTS AND CONCLUSION: Transplanted cells survived well and were positive for tyrosine hydroxylase. Cells migrated from the transplanted region to the substantia nigra. The rotational behavior of Parkinson's diseases rats recovered greatly and the dopamine content was raised after the transplantation of neuroepithelial stem cells. These findings indicate that the neuroepithelial stem cells would migrate to the substantia nigra after transplanted into the brain of Parkinson disease rats, and Parkinson disease could be treated following the increasing of dopamine content in the striatum.

Subject headings: embryonic stem cells; Parkinson disease; dopamine; tyrosine 3-monooxygenase

Funding: A Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program, No. J10LF58

Wang JZ. Transplantation of embryonic neuroepithelial stem cells into the brain of Parkinson disease rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(14):2200-2205.

王家增, 男, 1977年生, 山东省沂南县人, 汉族, 2007年山东大学毕业, 硕士, 副教授, 现于山东医学高等专科学校任教, 主要从事神经再生与移植的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.14.011
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)14-02200-06
稿件接受: 2014-01-23

Wang Jia-zeng, Master, Associate professor, Shandong Medical Collage, Linyi 276002, Shandong Province, China

Accepted: 2014-01-23

0 引言 Introduction

帕金森病是中老年人中常见的中枢神经退行性疾病, 其发病率与年龄的增长呈明显的正相关。有研究报道, 帕金森病的发病率从50-59岁年龄段的0.017%到70-79岁年龄段的0.093%, 以近1.5%的比例呈逐年递增^[1-2]。帕金森病是众多功能异常组成的综合征, 尤其是早期的非运动症状涉及到人体内的多个功能系统, 如偶然性嗅觉丢失^[3]、快波睡眠障碍^[4]、一过性晕厥、尿失禁、吞咽困难、表情木讷、节律性感觉丢失、污言秽语、健忘、妄想等。帕金森病最早的运动功能障碍多表现在精细运动的不协调^[5]。而遗憾的是这些症状往往不能引起患者及其家属的重视, 甚至在临床诊断中也不会被作为帕金森病诊断的依据。

帕金森病是多个系统、多种功能异常的综合征, 其发病机制也纷繁复杂。目前, 对帕金森病发病因素的研究, 虽然形成了遗传因素学说^[6-8]、环境因素学说^[9-11]、氧化应激学说^[12-14]、细胞凋亡学说、免疫学说等众多学说, 但都没能形成确切的解释, 甚至不同的研究还得出截然相反的结论^[15-19]。相对于发病因素的不确定性, 帕金森病的病理变化目前已基本明确, 主要是黑质内多巴胺能神经元的进行性丢失、黑质纹状体环路毁损、脑内多巴胺神经递质水平下降, 从而影响了对运动的调节和控制^[20-21]。

大量的研究表明, 帕金森病是一种不能治愈、且渐进性加重的中枢神经系统退行性变性疾病, 提高患者的生活质量和身体功能是治疗该病的主要目标。但以左旋多巴为主的药物治疗, 不但在治疗效果上具有很强的时效性和剂量依赖性^[22-24], 而且不良反应明显。在其他治疗方法中, 外科治疗不但手术指征严格, 而且副面影响较重; 基因治疗尚处于起始研究阶段, 且需要良好的载体细胞; 而目前广泛认为潜力最大、应用前景最好的治疗策略是以神经干细胞为供体细胞的细胞替代疗法^[25-28]。细胞替代疗法是一种将供体组织或细胞, 以特定的方式植入到患者体内, 并在患者体内存活、分化, 以弥补细胞损失的治疗方法^[29]。在帕金森病的细胞替代疗法中, 神经干细胞凭借着优越的先天性条件, 成为公认的优良的供体细胞。

神经干细胞是一类未分化细胞, 具有自我更新及多向分化的潜能, 生理状态下可分化为神经元和神经胶质细胞。先前的研究表明神经干细胞作为替代细胞, 异体移植到帕金森病患者的脑内后, 可分化出功能性的多巴胺能神经元, 在一定程度上弥补了黑质内多巴胺能神经元的减少, 对帕金森病起到一定的治疗作用^[30-31]。神经上皮干细胞是起源于早期胚胎神经管前段的最原始的神经干细胞, 具有活跃的增殖和分化能力, 异体移植后较成体的神经干细胞具有更强的适应性和生物活性^[32]。

神经干细胞移植治疗帕金森病的研究在取得重大成就的同时, 仍有许多问题需要解决, 比如在研究中发现神经干细胞的来源不同, 移植部位、移植时机和移植方式的不同, 都直接影响着治疗效果。寻找治疗效果好且安全的移

植途径, 已成为目前研究中除提高供体细胞存活率、延长存活时间外的重要研究内容。

实验将携带绿色荧光蛋白基因的胚胎神经管上皮干细胞定向植入到帕金森病大鼠模型的脑内, 对比观察不同点移植后供体细胞的存活、迁徙、分化及移植后脑内多巴胺含量的变化, 评估各点移植对帕金森病的治疗作用。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 分组对照观察。

时间及地点: 实验于2010年7月至2012年12月在山东医学高等专科学校完成。

材料: 体质量为180-220 g的成年雄性Wistar大鼠80只, 由山东大学实验动物中心提供。

胚胎神经上皮干细胞脑内移植治疗大鼠帕金森病实验所用细胞及试剂:

细胞及试剂	来源
绿色荧光蛋白转基因鼠胚胎神经上皮干细胞	由香港中文大学惠赠
B27、碱性成纤维细胞生长因子和DMEM/F12	Gibico公司
小鼠抗大鼠TH单克隆抗体和6-羟基多巴	Sigma公司
Nestin	neomarker公司
FITC标记的二抗	北京中杉金桥生物技术有限公司

实验方法:

帕金森病大鼠模型制作: 成年雄性Wistar大鼠80只, 采用单侧注射6-羟基多巴胺毁损黑质致密部的方法建立帕金森病大鼠模型。腹腔注射15 g/L戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉, 按前囟后(AP)5.0、旁开(ML)2.0、硬膜下(V)8.0的坐标(单位: mm), 按1 μ L/min的速度注射6-羟基多巴4 μ L, 留针5 min。术后2周和4周时颈部皮下注射0.1%的阿扑吗啡0.2 mL/只, 诱导其单侧旋转, 连续观察1 h, 并记录旋转圈数。选取旋转计数> 7 r/min的大鼠作为制作成功的帕金森病模型。

细胞移植: 将来源于绿色荧光蛋白转基因鼠胚胎神经上皮干细胞按文献^[33]的方法进行克隆、传代培养, 并进行神经干细胞特异的Nestin染色鉴定; 取第3-5代神经球(图1A)在严格无菌的条件下制成细胞悬液, 并调整细胞浓度至 $2 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 待用。

将制备好的细胞悬液立体定向移植到帕金森病大鼠模型毁损侧的脑内, 根据移植部位具体分为纹状体内移植组、侧脑室内移植组和黑质内移植组, 植入点坐标如下: 纹状体组: A(前囟前): 1.0 mm, L(旁开): 2.5 mm, V(深度): 5.0 mm; 侧脑室组: A: -1.0 mm, L: 1.4 mm, V: 3.8 mm; 黑质组: A: -5.0 mm, L: 2.0 mm, V: 8.0 mm; 每个坐标点均以1 μ L/min的速度注射5 μ L细胞悬液, 注射完成后留针5 min。各组均移植帕金森病大鼠20只, 以未进行移植的帕金森病大鼠模型作为对照组, 移植后按分组标记后正常饲料喂养。

旋转行为检测: 分别于移植后1, 2, 4, 8, 16周时, 从各组中随机抽取大鼠4只, 向其颈部皮下注射新鲜配制的0.1%的阿扑吗啡0.2 mL/只, 诱发其单侧旋转, 观察并记录1 h内的旋转圈数。按实验分组分别取平均数。

取材: 待旋转行为检测完成后, 各组中任选2只大鼠麻醉后快速断头取脑, 在冰台上分离出移植侧纹状体, 称质量后置于1 mL含0.4 mol/L亚硫酸钠和0.1 mol/L冰冷高氯酸的溶液中, 玻璃匀浆器手动匀浆30次, 4 °C下以12 000 r/min离心15 min, 取上清液加于孔径为0.45 μm的滤膜上过滤, 将所得滤液标记后置于-70 °C超低温冰箱贮存, 待行色谱分析测定多巴胺的含量。具体方法参照文献[34]进行。

随后将各移植组中剩余的2只帕金森病大鼠在戊巴比妥腹腔麻醉下, 用40 g/L的多聚甲醛PBS溶液经左心室灌注固定, 取脑后依次进行后固定、沉糖、OCT冻存液包埋、-70 °C超低温冻存备用。

移植细胞检测: 将冻存的脑组织行-20 °C恒冷连续冰冻切片, 厚度为20 μm, 贴片后直接于荧光显微镜下观察移植细胞的存活、迁徙状况; 此后将组织切片进行常规的酪氨酸羟化酶免疫组织荧光染色, 检测移植细胞的分化状况。

多巴胺含量测定: 取各期储备的纹状体组织液各20 μL注入高效液相色谱电化学检测系统测定多巴胺的含量, 具体方法参照文献[35]进行。流动相 (Na₂HPO₄: 0.11 mmol/L, 乙二胺四乙酸二钠: 0.5 mmol/L, SOS: 1 mmol/L, 甲醇: 11%)经0.45 μm过滤器过滤并超声脱气后, 用5%磷酸调pH值至3.5, 流速为1 mL/min, 电化学检测器检测电压+0.70 V^[36]。

主要观察指标: ①大鼠旋转行为检测结果。②绿色荧光蛋白转基因鼠胚胎神经上皮干细胞移植到帕金森病大鼠模型的脑内检测结果。③大鼠脑多巴胺含量测定结果。

统计学分析: 将实验所得的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 13.0软件采用多组资料的方差分析进行统计处理, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠80只, 分为4组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 大鼠旋转行为检测结果 移植后1, 2, 4, 8, 16周的旋转行为检测结果显示, 移植后1周, 3个细胞移植组动物的旋转行为即有改善, 以黑质内移植组的改善最为明显; 2周时改善效果明显, 4周时实验组动物的旋转圈数明显减少, 移植后8, 16周时, 移植组动物的旋转行为都明显低于对照组动物, 3个移植组动物间的旋转圈数也有差异(图2)。方差分析显示实验组与对照组间的差异有显著性意义($P < 0.01$)。

2.3 移植细胞检测结果

荧光显微镜直接观察: 绿色荧光蛋白转基因鼠胚胎神经上皮干细胞移植到帕金森病大鼠模型的脑内, 在移植后1周的组织切片上, 大部分的移植细胞在移植区内成团分布, 这些细胞均可激发出明亮的绿色荧光(图1B)。移植后2周移植细胞已经开始从移植区向周围扩散, 纹状体内的移植细胞主要向黑质方向迁徙(图1C), 植入侧脑室的供体细胞或贴附在侧脑室壁上, 或沿室管膜分布, 少量细胞已迁徙至邻近的脑实质中(图1D); 而移植到黑质内的供体细胞则多向周边尤其是纹状体方向扩散, 且距离较小。移植后4周的移植区内, 有些移植细胞已具备成熟细胞的形态特征, 胞体呈椭圆形, 突起较长, 与其他细胞间形成了密切接触。移植后8周组织切片中的移植细胞形态更加完善, 突起更长; 在移植后16周组织切片的移植区以外可见到迁移出的成熟细胞(图1E), 表明移植细胞已整合到宿主脑内。

免疫组织化学染色: 经免疫组织化学染色, 在移植后4周以后的组织切片中均检测到了既能激发出绿色荧光, 又呈酪氨酸羟化酶阳性的细胞, 这些细胞的数量随术后时间的延长逐渐增多, 在移植后16周的组织切片中检测到了形态更加完善、整合到宿主组织中的酪氨酸羟化酶阳性细胞(图3)。

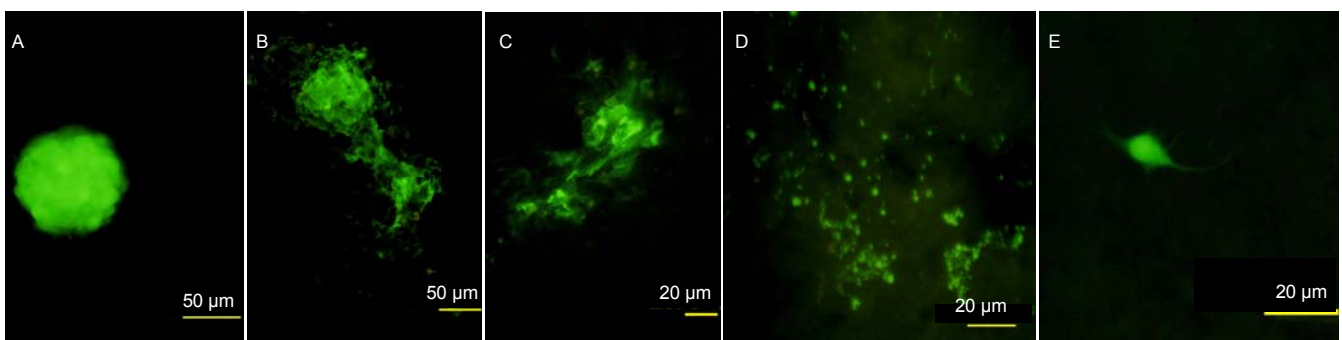


图1 绿色荧光蛋白转基因鼠胚胎神经上皮干细胞移植帕金森病大鼠模型脑内前后检测结果(荧光显微镜观察)

Figure 1 Fluorescence microscopy observation after embryonic neuroepithelial stem cells transplantation into the brain of Parkinson disease rats

图注: 图中A为悬浮培养7 d时形成的神经球($\times 200$); B为移植后1周的组织切片在荧光显微镜下直接观察到的存活的移植细胞($\times 300$); C为移植后2周纹状体内存活的移植细胞正在迁徙($\times 300$); D为移植后2周侧脑室内存活的移植细胞进行迁徙($\times 300$); E为移植后16周存活的移植细胞($\times 300$)。

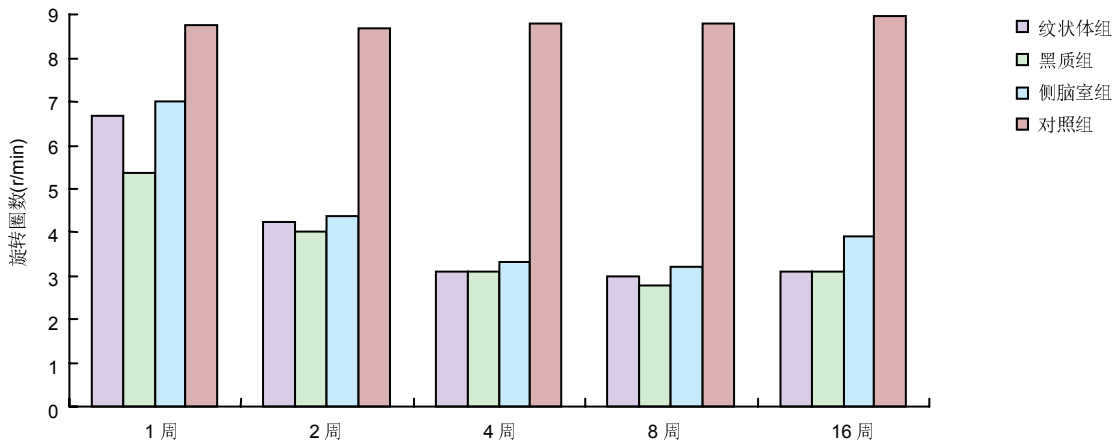


图2 绿色荧光蛋白阳性胚胎神经上皮干细胞移植组与对照组帕金森病模型鼠诱发旋转计数的比较

Figure 2 The comparison of apomorphine-induced rotations between the control Parkinson disease rats and the Parkinson disease rats grafted with neuroepithelial stem cells

图注: 各时间点大鼠旋转圈数较对照组明显减少。

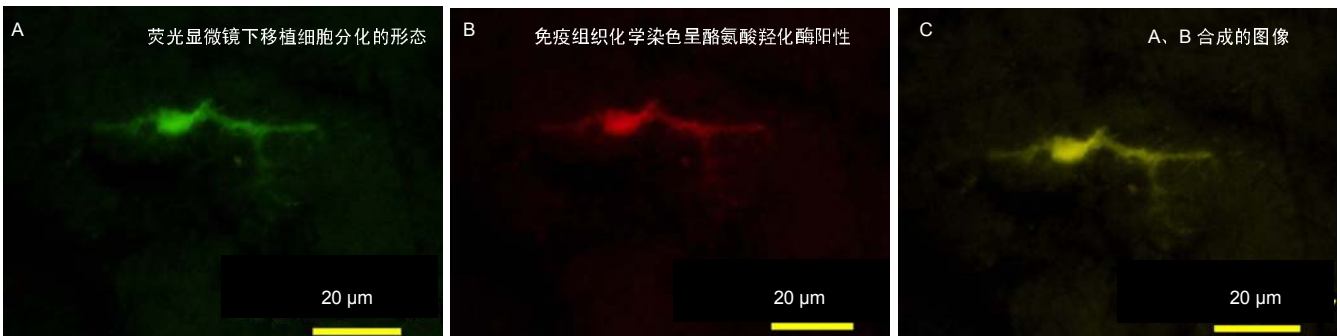


图3 移植后16周移植细胞在帕金森病大鼠宿主脑内分化成的酪氨酸羟化酶阳性细胞($\times 300$)

Figure 3 Cells positive for tyrosine hydroxylase 16 weeks after embryonic neuroepithelial stem cells transplantation into the brain of Parkinson disease rats ($\times 300$)

图注: 检测到了形态更加完善、整合到宿主组织中的酪氨酸羟化酶阳性细胞。

2.4 大鼠脑多巴胺含量测定结果 经高效液相色谱分析显示, 各移植组毁损侧纹状体内多巴胺的含量均明显高于对照组($P < 0.01$)且以黑质组的增加幅度最大(表1)。

表1 胚胎神经上皮干细胞移植后大鼠纹状体内多巴胺的含量
Table 1 The dopamine content in the striatum of the Parkinson disease rats undergoing neuroepithelial stem cells transplantation ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/g}$)

时间	对照组	纹状体组	黑质组	侧脑室组
1周	278 \pm 13	331 \pm 27	380 \pm 19	293 \pm 31
2周	273 \pm 25	487 \pm 48	501 \pm 23	456 \pm 44
4周	271 \pm 31	742 \pm 67	753 \pm 15	705 \pm 27
8周	269 \pm 37	781 \pm 43	798 \pm 21	718 \pm 35
16周	257 \pm 60	670 \pm 48	745 \pm 33	563 \pm 42

表注: 经高效液相色谱分析显示, 各移植组毁损侧纹状体内多巴胺的含量均明显高于对照组。

3 讨论 Discussion

实验将克隆增殖后的胚胎神经上皮干细胞分别移植到帕金森病大鼠模型的纹状体、黑质和侧脑室内, 观察不同部位移植后供体细胞的存活和分化情况。结果证实, 供体细胞移植到上述部位后均存活良好, 在各阶段的移植区内都检测到了可激发出绿色荧光的移植细胞。在4周以后的组

织切片中还检测到了既能激发出绿色荧光, 又呈酪氨酸羟化酶阳性的细胞。因实验所用的宿主为普通Wistar大鼠制作的帕金森病模型, 由此可以推定移植细胞已在宿主脑内分化成了多巴胺能神经元。这与实验室前期的研究结果完全一致^[37]。

神经干细胞良好的迁徙能力是设计本实验的依据之一。实验中将胚胎神经上皮干细胞分别移植到帕金森病大鼠的黑质、纹状体和侧脑室内, 旨在观察它们的迁徙情况, 以期获得移植的胚胎神经上皮干细胞在帕金森病大鼠脑内迁徙的规律性。结果显示, 移植到纹状体内的供体细胞, 主要沿着黑质-纹状体环路向后下偏内侧的黑质致密部迁徙; 移植到侧脑室内的供体细胞基本沿脑室壁分布, 仅有少量细胞迁徙至邻近的实质中。而移植到黑质内的细胞则基本局限在黑质范围内, 极少有迁移到较远部位的。这与神经干细胞对炎症、损伤等的趋向性密切相关^[38]。

实验中通过向黑质致密部注射6-羟基多巴胺, 基本上全部毁损了黑质的内源性神经元, 黑质的微环境也受到了破坏。供体细胞移植到黑质后, 由于黑质微环境的失衡, 对供体细胞的排斥反应较弱, 移植细胞较易存活; 同时,

黑质内源性神经元已消失殆尽, 急需神经细胞补充, 因此, 移植到黑质内的供体细胞基本不会迁移出黑质部位。纹状体与黑质之间在生理状态下有着密切的纤维连接。黑质毁损后这一纤维连接也受到了破坏, 越靠近黑质的区域毁损越重。当神经干细胞移植到纹状体内后就向着毁损严重、免疫排斥反应弱的部位迁徙, 由此就形成了纹状体内的移植细胞多向着黑质方向迁徙的现象。

移植细胞对疾病的疗效是细胞替代疗法的最高目标。实验中为了评测移植细胞对帕金森病大鼠的治疗作用, 首先在移植后的不同时间, 利用阿扑吗啡可诱导帕金森病大鼠向单侧旋转的特性, 检测了各组动物旋转行为的改变。为了进一步确定症状改善与移植细胞间的关系, 实验不仅从形态学上检测到了移植细胞分化成的酪氨酸羟化酶阳性细胞, 还利用高效液相色谱法测定了实验动物脑内多巴胺的含量。结果显示, 胚胎神经上皮干细胞移植到帕金森病大鼠脑内后, 纹状体内的多巴胺神经递质水平明显高于对照组, 其变化幅度与帕金森病大鼠旋转行为的改善呈正相关。

综合实验结果发现, 胚胎神经上皮干细胞移植到帕金森病大鼠的黑质内治疗作用出现的最早, 且持续良好。推测这可能是由于当细胞移植到毁损的黑质内时, 在一定程度上缓解了6-羟基多巴胺对内源性神经元的进一步损伤, 同时部分修复了内环境的失调, 促进了DA递质靶细胞对现有多巴胺的有效利用。而植入到纹状体和侧脑室内的胚胎神经上皮干细胞须适应了相应部位的内环境后才能发挥作用, 因此治疗效果出现较晚。

当然, 移植细胞对帕金森病大鼠的治疗作用更主要的是依靠供体细胞在宿主脑内分化出的功能性酪氨酸羟化酶阳性神经元和刺激宿主组织中原有神经干细胞的分化以及调节局部免疫微环境等修复受损组织^[39-40]。近年来的研究发现, 成年动物的黑质内存在具有向神经元分化潜质的神经干细胞^[41-42], 这从另一方面说明黑质的微环境适合神经干细胞的生存并能诱导其向神经元分化。因此, 移植到黑质内的胚胎神经上皮干细胞不仅短时间内可以改善实验动物的旋转行为, 而且对帕金森病大鼠有持续疗效。

纹状体作为众多细胞移植研究的靶组织, 亦可诱导神经干细胞分化为多巴胺能神经元并进行功能重建^[43], 神经干细胞植入到纹状体内对帕金森病大鼠的疗效与植入到黑质内没有明显差别。但帕金森病患者受损的是黑质而非纹状体, 将外源性神经干细胞植入到正常的纹状体内, 无疑是对纹状体的一次创伤。且有报道指出神经干细胞移植到成鼠纹状体内6个月后可扩散到全脑^[44]。如此广泛的迁徙难免会带来一些不良反应。侧脑室内移植虽然也有明显的治疗效果, 但侧脑室是脑脊液产生和循环的重要部位, 有研究证实, 神经干细胞移植到侧脑室后, 能迁移到嗅球、海马旁回、小脑、纹状体、大脑皮质等多种脑组织中^[45-46], 因迁徙而产生的不良反应同样难以避

免。

因此, 综合移植细胞对帕金森病的疗效和迁徙情况可知, 将供体细胞直接植入到受损的黑质内是最直接、有效且安全的移植方式, 这不仅保证了疗效, 也避免了供体细胞迁徙到其他部位引起的不良反应。

作者贡献: 设计、实施、评估均为本文作者, 受过专业培训。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

学术术语: 酪氨酸羟化酶-是负责催化氨基酸L-酪氨酸转变为二羟基苯丙氨酸(多巴)的酶。因此它使用四氢生物蝶呤作为辅酶。多巴是多巴胺的一个前体, 相应地, 后者亦是去甲肾上腺素与肾上腺素的前体。在人体中, 酪氨酸羟化酶由酪氨酸羟化酶基因编码出来。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, et al. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology*.1999;52: 1214-1220.
- [2] de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, et al. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology*.1995;45: 2143-46.
- [3] Doty RL, Bromley SM, Stern MB. Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. *Neurodegeneration*.1995;4: 93-97.
- [4] Iranzo A, Santamaría J, Rye DB, et al. Characteristics of idiopathic REM sleep behavior disorder and that associated with MSA and PD. *Neurology*.2005;65: 247-252.
- [5] Andrew JL, John H, Tamas R. Parkinson's disease. *Lancet*. 2009;373: 2055-2066.
- [6] Paísan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*.2004;44: 595-600.
- [7] Healy DG, Falchi M, O-Sullivan SS, et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*.2008;7: 583-590.
- [8] Ozansoy M, Başak AN. The Central Theme of Parkinson's Disease: α -Synuclein. *Mol Neurobiol*.2013;47:460-465.
- [9] Tanner CM. Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies. *Adv Neurol*.2003; 91:133-142.
- [10] Taylor KS, Counsell CE, Gordon JC, et al. Screening for undiagnosed parkinsonism among older people in general practice. *Age Ageing*.2005;34: 501-504.
- [11] Dick FD, De PG, Ahmadi A, et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med*.2007; 64: 666-672.
- [12] [Clark IE, Dodson MW, Jiang C, et al. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*.2006; 441: 1162-1166.

- [13] Park J, Lee SB, Lee S, et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*.2006; 441: 1157-1161.
- [14] Olanow CW, McNaught KS. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Mov Disord*.2006; 21: 1806-1823.
- [15] Allam, MF,Campbell MJ,Hofman A,et al.Smoking and Parkinson's disease: systematic review of prospective studies. *Mov Disord*, 2004; 19: 614-621.
- [16] Hernán MA,Zhang SM,Rueda-deCastro AM,et al. Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Ann Neurol*.2001; 50: 780-786.
- [17] Ascherio A, Weisskopf MG, O'Reilly EJ.Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. *Am J Epidemiol*.2004; 160: 977-984..
- [18] Ascherio A, Chen H, Schwarzschild MA, et al. Caffeine, postmenopausal estrogen, and risk of Parkinson's disease. *Neurology*.2003; 60: 790-795.
- [19] Evans AH, Lawrence AD,Potts J.Relationship between impulsive sensation seeking traits, smoking, alcohol and caffeine intake, and Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.2006; 77: 317-321.
- [20] Sundberg, Bogetofte, Lawson et al.Improved Cell Therapy Protocols for Parkinson's Disease Based on Differentiation Efficiency and Safety of hESC-, hiPSC-, and Non-Human Primate iPSC-Derived Dopaminergic Neurons. *stem cells*. 2013;31:1548-1562.
- [21] Yan Z, Maosheng S, Hongjun L,et al.Recovery of behavioral symptoms in hemi-parkinsonian rhesus monkeys through combined gene and stem cell therapy. *Cytotherapy*. 2013; 15(4):467-480.
- [22] Katzenschlager R, Head J, Schraq A, et al.Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology*. 2008;71: 474-480.
- [23] Fahn S, Oakes D, Shoulson I, et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med*.2004;351: 2498-508.
- [24] Hely MA, Reid WG, Adena MA, et al. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord*.2008; 23: 837-844.
- [25] Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, et al.Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002; 418: 50-56.
- [26] Ben-Hur T, Idelson M, Khaner H, et al.Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells*.2004; 22: 1246-1255.
- [27] Kurowska Z, Englund E, Widner H, et al. Signs of Degeneration in 12–22-Year Old Grafts of Mesencephalic Dopamine Neurons in Patients with Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2011;1(1):83-92.
- [28] Pawitan JA. Prospect of cell therapy for Parkinson's disease. *Anat Cell Biol*. 2011;44:256-264.
- [29] Anders B, Kordower JH. Cell Therapy for Parkinson's Disease: What Next?. *Movement Disorders*.2013;28(1):110-115.
- [30] Duke CM, Taylor HS.Stem cells and the reproductive system: Historical perspective and future directions. *Maturitas*. 2013; 6036(10):1-6.
- [31] Seung UK, Hong JL, Yun BK. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology*. 2013;33: 491–504.
- [32] Sun J, Gao Y, Yang L, et al. Neural-tube-derived neuroepithelial stem cells: a new transplant resource for Parkinson's disease. *Neuroreport*. 2007;18(6):543-547.
- [33] 王家增.GFP转基因鼠胚胎神经上皮干细胞的体外培养[J]. *山东大学学报:医学版*, 2009,47(9):49-53.
- [34] 郑敏,王亚平,裴雪涛,等.神经干细胞移植对帕金森病模型大鼠的治疗作用[J].*基础医学与临床*,2007,27(8):841-845.
- [35] Serra PA, Esposito G, Enrico P, et al. Manganese increases L-DOPA autooxidation in the striatum of the freelymoving rat: potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease.*Br J Pharmacol*.2000; 130(4): 937-945.
- [36] 王家增. 携带绿色荧光蛋白基因的神经上皮干细胞移植治疗帕金森病[J].*中国组织工程研究*,2012;16(6):1080-1084.
- [37] Jinhao S, Qing G, Katherine M, et al.Dopaminergic differentiation of grafted GFP transgenic neuroepithelial stem cells in the brain of a rat model of parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2007;420(5): 23-28.
- [38] 王普清,孙圣刚,张允健,等黑质内注射脂多糖对多巴胺能神经元和小胶质细胞活性的影响[J].*中国康复*,2008,23(6):380-382.
- [39] Caplan AI.Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*.2009;217(2): 318-324.
- [40] Hegarty SV, Sullivan AM, O'Keeffe GW. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev Biol*. 2013;379(2):123-38.
- [41] Shan X,Chi L,Bishop M,et al.Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease-like mice. *Stem Cells*.2006;24(5) : 1280-1287.
- [42] van den Berge SA, van Strien ME, Hol EM. Resident adult neural stem cells in Parkinson's disease-The brain's own repair system?.*Eur J Pharmacol*.2013;4:058-069.
- [43] Nishino H, Hida H, Takei N, et al. Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum. *Exp Neurol*.2000;164(1):209-214.
- [44] Hurelbrink CB, Armstrong RJ, Dunnett SB, et al. Neural cells from primary human striatal xenografts migrate extensively in the adult rat CNS. *Eur J Neurosci*. 2002;15(7):1255-1266.
- [45] Tamaki S, Eckert K, He D, et al. Engraftment for sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res*.2002;69(6):976-986.
- [46] Fei L, Jiang CC, Feng LY, et al.Transplantation of primary cultured embryonic mesencephalic neural precursor cells for treating Parkinsonian rats.*Neural Regen Res*.2006;1(1):6-9.