

• 研究原著 •

骨髓间充质干细胞移植治疗老年性痴呆模型大鼠的行为学检测

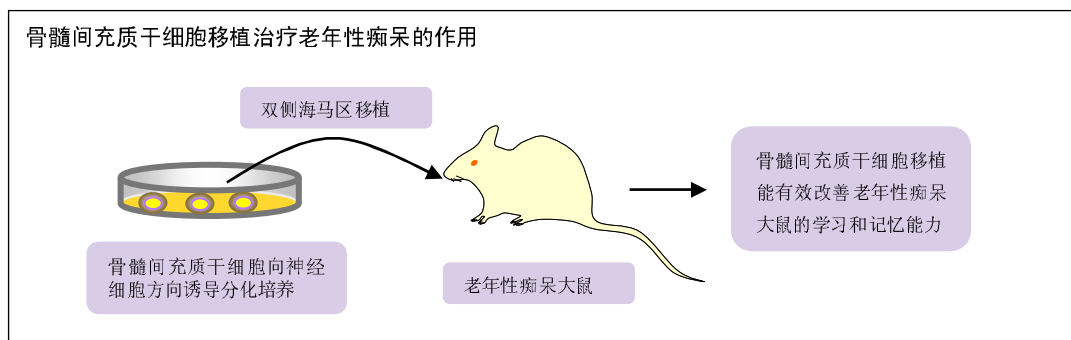
张颖, 郭建华, 闫洪娟, 罗秋华, 李鑫萍, 郭玮, 王海霞(邯郸市第一医院老年病二科, 河北省邯郸市 056000)

引用本文: 张颖, 郭建华, 闫洪娟, 罗秋华, 李鑫萍, 郭玮, 王海霞. 骨髓间充质干细胞移植治疗老年性痴呆模型大鼠的行为学检测[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(36):5371-5377.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.36.008

ORCID: 0000-0002-2858-3952(张颖)

文章快速阅读:



张颖, 女, 1973 年生, 河北省涉县人, 汉族, 2003 年河北医科大学毕业, 副主任医师, 主要从事老年痴呆相关疾病的研究。

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)36-05371-07

稿件接受: 2016-06-23

文题释义:

Morris 水迷宫: 是英国心理学家 Morris 于 20 世纪 80 年(1981)代初设计并应用于脑学习记忆机制研究的一种实验手段, 其在阿尔茨海默病研究中的应用非常普遍。较为经典的 Morris 水迷宫, 测试程序主要包括定位航行试验和空间探索试验两个部分。

定位航行试验: 历时数天, 每天将大鼠面向池壁分别从 4 个入水点放入水中若干次, 记录其寻找到隐藏在水面下平台的时间(逃避潜伏期)。

空间探索试验: 是在定位航行试验后去除平台, 然后任选一个入水点将大鼠放入水池中, 记录其在一定时间内的游泳轨迹, 考察大鼠对原平台的记忆。

摘要

背景: 最近研究证实, 骨髓间充质干细胞在体外可诱导分化成为神经元样细胞, 体内移植后可修复神经损伤。

目的: 观察骨髓间充质干细胞移植对老年性痴呆大鼠学习及记忆能力的影响。

方法: 将 30 只成年 SD 雄性大鼠分为 3 组: 假手术对照组、干细胞治疗组及模型对照组, 后 2 组脑内注射 β -淀粉样蛋白 1-40 制作老年性痴呆模型, 造模后 3 周, 干细胞治疗组大鼠双侧海马区注射诱导分化后的骨髓间充质干细胞悬液, 模型对照组和假手术组不做任何处理。采用 Morris 水迷宫检测各组实验大鼠学习记忆能力, 苏木精-伊红染色观察脑组织病理形态变化。

结果与结论: ①造模成功后, 模型对照组大鼠的逃避潜伏期高于假手术对照组, 跨越平台次数低于假手术对照组; ②细胞移植后第 1, 2, 4, 8, 10 周, 随着治疗时间的延长, 干细胞治疗组大鼠的逃避潜伏期明显缩短, 跨越平台次数明显增加。与模型对照组相比, 干细胞治疗组大鼠的学习、记忆能力有所改善; ③干细胞治疗组脑组织细胞形态比较完整, 细胞变性、坏死数量与模型对照组相比明显减少; ④结果表明, 骨髓间充质干细胞移植能有效改善老年性痴呆大鼠的学习和记忆能力, 对老年性痴呆有一定的治疗作用。

关键词:

干细胞; 移植; 骨髓间充质干细胞; 老年性痴呆; 学习记忆; 大鼠

主题词:

骨髓; 间质干细胞移植; 阿尔茨海默病; 组织工程

基金资助:

河北省医学科学研究重点课题(20130921)

Zhang Ying, Associate
chief physician, Second
Department of Geriatrics,
First Hospital of Handan,
Handan 056000, Hebei
Province, China

Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves behavior performance of senile dementia rats

Zhang Ying, Guo Jian-hua, Yan Hong-juan, Luo Qiu-hua, Li Xin-ping, Guo Wei, Wang Hai-xia (Second Department of Geriatrics, First Hospital of Handan, Handan 056000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: More recently, studies have demonstrated that bone marrow mesenchymal stem cells can be induced *in vitro* to differentiate into neuron-like cells that are used for *in vivo* transplantation to repair nerve damage.

OBJECTIVE: To study the effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on learning and memory ability of senile dementia rats.

METHODS: Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normal control group, stem cell therapy group and model control group. Rats in the latter two groups were used to establish animal models of senile dementia by intracranial injection of β -amyloid 1-40. Three weeks after modeling, rats were given bilateral hippocampal injection of induced bone marrow mesenchymal stem cell suspension in the stem cell therapy group, whereas no treatment was given in the normal control and model control groups. Morris water maze test was used to detect learning and memory ability of rats, and rat's brain tissues were detected pathologically using hematoxylin-eosin staining.

RESULTS AND CONCLUSION: After modeling, the escape latency was higher and the cross-platform frequency was lower in the model control group compared with the normal control group. After cell transplantation, the escape latency and cross-platform frequency were gradually shortened and increased with time, respectively. Compared with the model control group, the learning and memory abilities of rats were improved in the stem cell therapy group. The brain tissues were relatively intact in structure and exhibited less cell degeneration and necrosis in the stem cell therapy group compared with the model control group. To conclude, bone marrow mesenchymal stem cell transplantation exerts certain therapeutic effects on senile dementia by effectively improving the learning and memory ability.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Alzheimer Disease; Tissue Engineering

Funding: the Medical Research Project of Hebei Province, No. 20130921

Cite this article: Zhang Y, Guo JH, Yan HJ, Luo QH, Li XP, Guo W, Wang HX. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves behavior performance of senile dementia rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(36):5371-5377.

0 引言 Introduction

老年性痴呆又称阿尔茨海默病,是大脑的衰老、萎缩,大脑功能受到严重损坏而引起的认知功能、记忆功能、人际交往能力、人格等智能障碍的一种综合征。老年性痴呆与患者的年龄呈现出一定的相关性,是一种不可逆的神经系统退行性疾病^[1]。人类的神经元缺乏再生能力,中枢神经系统损伤后的修复相当困难,近年来对其研究主要集中在干细胞移植治疗脑和脊髓病变上^[2-7]。老年性痴呆发病机制尚不十分明确,目前暂时没有有效的治疗方法^[8]。

目前,针对老年性痴呆的临床治疗药物主要有胆碱酯酶抑制剂、分泌酶抑制剂、过渡金属元素螯合剂、HMG-CoA 还原酶抑制剂和 β 淀粉样蛋白疫苗^[9]。上述方法只能暂时缓解病症,并不能从根本上修复变性、坏死的脑神经细胞,有效阻止病情的发展,而且具有较强的不良反应,疗效不能持久,因此急需找出一种新的治疗

方法。

近年来,干细胞移植在医学上的应用越来越得到关注,并且在临床实践中取得了很多成就^[10-13],例如治疗脊髓损伤性疾病、脑梗死、缺血性脑血管疾病^[14-16]。用于治疗老年性痴呆的干细胞主要有骨髓间充质干细胞和神经干细胞。神经干细胞在应用方面有自身的制约性,主要是因为来源有限及伦理学方面的问题。骨髓间充质干细胞以其来源广泛、取材方便、易于体外扩增、体内存活率高、免疫反应小等优点^[17],成为了极佳的细胞代替治疗的靶细胞^[18]。

实验采用文献报道方法建立急性阿尔茨海默病大鼠模型^[19],将体外分离、培养、增殖、分化的骨髓间充质干细胞移植到大鼠海马脑区,应用Morris水迷宫检测系统对各组大鼠作定位航行实验和空间探索实验,记录大鼠的运动、学习和记忆能力的变化,观察骨髓间充质干细胞移植的治疗效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组对照实验。

1.2 时间及地点 于2014年5月至2015年5月在邯郸市第一医院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康成年雄性SD大鼠30只, 体重200–250 g, 购于广州中医药大学实验动物中心。将30只大鼠随机分为3组: 假手术对照组、干细胞治疗组、模型对照组。每组10只。5月龄清洁级SD大鼠10只, 购于广州中医药大学实验动物中心, 用于骨髓间充质干细胞的体外培养。

1.3.2 试剂和仪器 β -淀粉样蛋白1–40(北京博奥森生物科技有限公司); 胎牛血清(Hyclone公司); 兔抗大鼠双皮素(北京中杉公司); 兔抗人神经元特异性烯醇化酶、鼠抗人5'-溴脱氧尿嘧啶单克隆抗体、兔抗人胶原纤维酸性蛋白多克隆抗体(SEROTEC公司); Polymer双染检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); HEPES(Sigma公司)。Morris 水迷宫(广东省中医院神经外科研究所); 大鼠立体定位仪(西安西北光电仪器制造有效公司); 二氧化碳培养箱BPN-80CW(上海达平仪器有限公司); 恒温干燥箱(Fisher公司); 倒置电子显微镜(日本Nikon公司); 超高速离心机(Beckmann-Coulter公司); 75 cm²培养瓶(美国Corning公司); 流式细胞仪XL100(美国COULTER公司); 电子天平(sartorius, Fisher)。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞的体外分离、培养、诱导分化 采用颈椎脱臼法将5月龄SD大鼠急性处死, 在无菌环境下, 取其股骨及胫骨, 用抽取细胞标准培养液的5 mL注射器冲洗骨髓腔, 将冲洗出的细胞悬液以1 000 r/min离心10 min, 弃去上清液, 叠加于淋巴细胞分离液上层, 继续离心30 min, 弃去上清液, 加入细胞标准培养液重悬细胞, 接种到75 cm²培养瓶中, 置于37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱培养, 24 h后更换培养液, 弃去非贴壁细胞。待原代细胞生长至瓶底80%左右时, 吸弃培养基, 加入胰蛋白酶液和EDTA液对细胞进行消化, 加入标准培养液中中止消化, 离心10 min, 弃去上清液, 重新加入标准培养液重悬细胞, 以1:2比例传代培养。

取生长状态良好的第3代骨髓间充质干细胞, 经胰酶消化后接种于12孔板中, 当细胞融合达60%左右, 去掉旧培养液, 加入预诱导培养液(含20 μ g/L碱性成纤维细胞生长因子, 20 μ g/L表皮细胞生长因子及体积

分数为10%胎牛血清的DMEM培养液), 在37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱培养, 48 h后去除预诱导培养液, 加入完全诱导液(含20 μ g/L神经生长因子、0.5 mg/L维甲酸的DMEM培养液), 以后每3 d更换新鲜诱导液, 备用^[20]。

取第3代诱导分化后骨髓间充质干细胞, 于细胞移植前24 h, 掺入5 μ mol/L BrdU进行标记, 24 h后将上述细胞用0.25%胰蛋白酶液和0.02%EDTA液消化, 离心, 洗涤, 细胞计数后加入生理盐水配制成细胞悬液, 备用。

1.4.2 阿尔茨海默病大鼠模型的制作 取健康成年SD大鼠30只, 均以10%水合氯醛腹腔注射麻醉, 用立体定位仪头杆将其头部固定, 颅顶区备皮安尔碘消毒, 分离骨膜使其颅骨完全暴露, 用牙科钻打开颅骨后, 将孵育为凝聚状态的 β -淀粉样蛋白1–40溶液5 μ L缓慢注入干细胞治疗组和模型对照组大鼠左右两侧海马, 假手术对照组注射5 μ L生理盐水, 消毒后缝合头皮, 置于室温环境下自然苏醒。

1.4.3 诱导分化后骨髓间充质干细胞脑内定向移植造模成功3周后进行骨髓间充质干细胞移植, 大鼠腹腔注射10%水合氯醛麻醉后, 用立体定位仪头杆将其头部固定, 颅顶区备皮安尔碘消毒, 分离骨膜使其颅骨完全暴露, 用微量进样器将诱导分化后的骨髓间充质干细胞悬液10 μ L立体定位缓慢注入大鼠双侧海马区(约 1.0×10^7 个细胞), 留针5 min, 缝合头皮, 置于室温环境下自然苏醒。假手术对照组与模型对照组不做任何处理。

1.4.4 Morris水迷宫系统检测 分别于造模后2周和细胞移植后第1, 2, 4, 8, 10周用Morris水迷宫测试大鼠学习记忆能力。①定位航行实验: 连续训练4 d, 每天训练5次, 2次训练之间间隔20–25 min, 将大鼠放入水迷宫中, 观察大鼠在水中找到平台并爬上平台的时间, 记为逃避潜伏期。如果大鼠在120 s内未找到平台, 则人为将其引导到平台, 并停留10 s, 将逃避潜伏期记为120 s; ②空间探索实验: 第5天最后一次训练完后撤去平台, 将大鼠由原先平台区域的对侧放入水中, 观察大鼠60 s内进入该区域的次数。

1.4.5 病理学分析 细胞移植后10周, 采用灌注法将各组大鼠处死, 首先取脑进行石蜡切片固定及包埋处理, 然后用病理切片机进行切片, 厚度约为5 μ m, 60 °C烘干1 h。苏木精-伊红染色: 先将切片入二甲苯20 min脱蜡, 然后分别加入无水乙醇10 min, 体积分数为95%乙

醇5 min, 体积分数为80%乙醇3 min, 蒸馏水冲洗, 切片于苏木精染液中浸泡10 min, 蒸馏水冲洗, 加入体积分数为70%, 80%, 95%乙醇脱水, 加入伊红乙醇溶液浸染2 min, 入体积分数为95%乙醇分色, 蒸馏水洗, 脱水, 透明, 中性树胶封固, 光学显微镜观察。

1.5 主要观察指标 ①骨髓间充质干细胞诱导分化后形态学特征; ②大鼠逃避潜伏期; ③大鼠跨越平台次数; ④脑组织病理学形态。

1.6 统计学分析 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 用SPSS 13.0统计软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞培养及诱导分化结果 用标准细胞培养液培养骨髓单个核细胞, 24 h后有少量细胞贴壁, 48 h后贴壁细胞数目明显增多, 细胞呈圆形或长梭形。在培养的前3 d细胞集落由1个或几个细胞组成, 细胞增殖较慢, 细胞数变化不明显。培养5-7 d细胞开始迅速增殖, 细胞形态出现较大变化, 可见纺锤形和星形多突起的细胞贴壁生长。当细胞生长至80%-90%融合时进行消化传代。传代后的细胞生长增殖迅速, 1周内即可达到完全融合。随着换液传代次数的增加, 未贴壁细胞逐渐减少, 细胞形态变得较为一致, 细胞呈长梭形, 可散在生长, 有明显的梭形细胞集落呈克隆样生长, 逐渐纯化, 见图1。

通过体外诱导分化, 出现神经元样细胞, 胞体圆而亮, 折光性强, 形态不一, 有简单的单极、双极细胞, 也有多极细胞, 见图2。

2.2 实验动物数量分析 大鼠造模以及治疗过程中均无死亡, 进入结果分析30只SD大鼠。

2.3 Morris水迷宫行为学测试结果 造模成功后, 模型对照组大鼠的逃避潜伏期平均值高于假手术对照组, 跨越平台次数低于假手术对照组。干细胞治疗组大鼠在治

疗后第1, 2, 4, 8, 10周, 逃避潜伏期随时间推移而缩短, 跨越平台次数随时间推移而增加。干细胞治疗组与模型对照组比较, 逃避潜伏期有大幅度缩短, 跨越平台次数大幅度增多($P < 0.05$), 见表1, 2。

2.4 病理学检测结果 假手术对照组大鼠脑组织皮质细胞形态完整、结构正常, 海马组织中锥体细胞排列整齐, 细胞核大, 核仁清晰(图3A); 模型对照组大鼠脑组织呈现出弥漫性损伤, 光镜下见海马、大脑皮质部分神经细胞核固缩、碎裂、溶解、坏死或消失, 胶质细胞增生、炎细胞浸润(图3B); 干细胞治疗组细胞形态比较完整, 细胞变性、坏死数量与模型对照组相比明显减少(图3C)。

表1 各组大鼠逃避潜伏期 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, s)
Table 1 Escape latency of rats in each group

组别	造模后	治疗后
假手术对照组	40.11±5.76	26.35±4.17
模型对照组	59.35±6.27	51.59±7.48
细胞治疗组	59.88±5.96	
第1周		50.12±9.01
第2周		43.38±4.98
第4周		36.18±7.24
第8周		30.57±6.35
第10周		27.63±8.13

表2 各组大鼠跨越平台次数 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 2 Cross-platform frequency of rats in each group

组别	造模后	治疗后
假手术对照组	4.90±1.03	7.00±0.72
模型对照组	1.90±0.67	1.80±0.48
细胞治疗组	2.00±0.26	
第1周		2.70±1.34
第2周		3.50±1.56
第4周		4.90±0.97
第8周		5.20±1.35
第10周		5.60±1.13

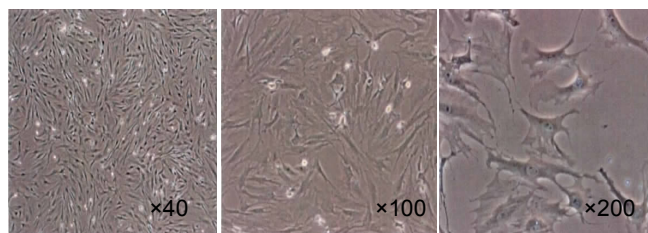


图1 骨髓间充质干细胞的形态

Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells under optical microscopy

图注: 细胞呈长梭形, 似纤维样细胞, 散在生长, 有明显的梭形细胞集落呈克隆样生长。

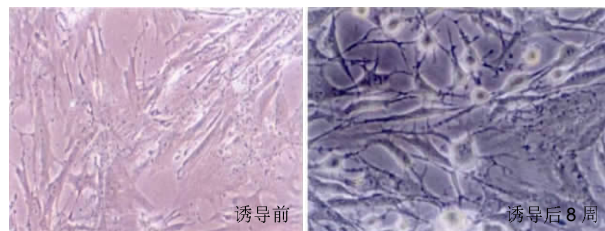


图2 光镜下骨髓间充质干细胞诱导前后形态学变化($\times 100$)

Figure 2 Morphological changes of bone marrow mesenchymal stem cells before and after induction under optical microscopy ($\times 100$)

图注: 诱导后出现神经元样细胞, 细胞胞体圆而亮, 折光性强, 形态不一, 有单极、双极以及多极细胞。

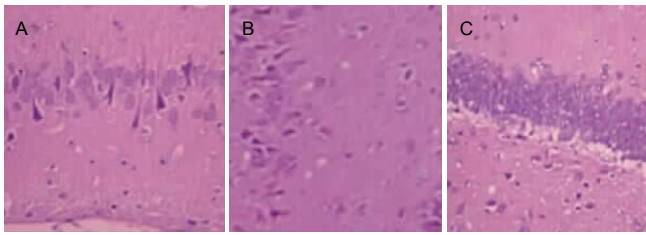


图3 各组大鼠脑组织切片苏木精-伊红染色($\times 400$)

Figure 3 Detection of rat brain tissue in each group by hematoxylin-eosin staining ($\times 400$)

图注: 图中A为假手术对照组, 大鼠脑组织皮质细胞形态完整、结构正常; 海马组织中锥体细胞排列整齐, 细胞核大, 核仁清晰; B为模型对照组, 大鼠脑组织呈现出弥漫性损伤, 海马、大脑皮质部分神经细胞核固缩、碎裂、溶解、坏死或消失, 胶质细胞增生、炎细胞浸润; C为干细胞治疗组, 细胞形态比较完整, 细胞变性、坏死数量明显减少。

3 讨论 Discussion

老年性痴呆是引起老年人认知功能持续减退最常见的疾病。老年性痴呆的病理特征主要包括脑萎缩、神经细胞的丧失、老年斑、颗粒空泡变性、神经元纤维缠结^[21], 可能的致病机制主要包括: ① β -淀粉样蛋白的细胞毒性作用, β -淀粉样蛋白促使机体内的小胶质细胞大量分泌高水平的神经毒素诱导神经细胞凋亡, 抑制胆碱能神经系统^[6-7]。大量研究结果表明, 老年性痴呆患者脑内神经细胞和突触丢失也是由于 β -淀粉样蛋白的存在^[22]。因此, β -淀粉样蛋白诱发的神经细胞凋亡极有可能是老年性痴呆认知功能障碍的主要病理基础; ②Tau蛋白学说; ③ApoE学说; ④自由基损伤、氧化应激学说; ⑤突触素中枢神经炎性损害; ⑥早老素学说^[23-35]。目前暂时没有特效治疗方法, 老年性痴呆的治疗仍以药物为主, 临床上采用的药物包括AChE抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂、脑循环改善剂、脑代谢激活剂、钙离子拮抗剂、抗氧化剂、抗炎药物、神经营养因子自由基清除剂、钾通道阻滞剂、雌激素和中药治疗等。这些药物的治疗作用主要集中在老年性痴呆的早期, 不能真正治愈晚期老年性痴呆患者, 因此, 急需找出一种新的有效的治疗方法。有研究学者发现, 部分干细胞仍然存在于成年哺乳动物脑内, 并且可以在脑细胞受到损伤时进行细胞增殖并分化成为神经细胞, 修复自身受损的神经系统, 因此干细胞移植治疗老年性痴呆具有巨大的研究意义。

干细胞包括胚胎干细胞、骨髓干细胞、神经干细胞等。理论上讲, 任何一种中枢神经疾病都可归结为神经干细胞功能的紊乱。骨髓干细胞具有多向分化潜

能, 在体外可诱导分化成为神经元样细胞, 体内移植后可以存活、迁移、分化为神经细胞, 可在一定程度上促进损伤神经系统功能的恢复^[36-37], 而且骨髓干细胞取材方便, 来源广泛, 在体外易于扩增, 移植入机体后产生的免疫反应排斥弱。因此, 骨髓干细胞是一种极好的治疗神经系统疾病的靶细胞。大量的研究数据表示, 骨髓干细胞可以通过特定的方式, 在体外分化为神经元细胞, 在老年性痴呆大鼠动物模型中可以增加微血管密度, 减少神经细胞凋亡, 提高老年性痴呆大鼠的治疗效果^[38]。

哺乳动物纹状体、大脑皮质、脑干、海马、丘脑都是对缺血损伤敏感区域, 其中海马区最为显著^[39-40]。海马是大脑边缘系统的组成部分, 是一种重要的中枢结构, 在学习记忆过程中起着举足轻重的作用^[41-42]。海马组织主要负责存储信息, 是学习和记忆的关键部位, 不过海马组织只是一个暂存系统, 当接触到一种信息后便被存于海马组织, 然后大脑会定期的检查这个信息, 有没有被再次使用, 如果在某一个时期内这个信息被连续的多次使用, 那么便判定这个信息是有用的, 然后把他转存到大脑另一个地方, 以固化的形式做永久的保存, 但是海马组织的破坏会影响人的长期记忆能力, 海马组织会随着人年龄的增长而萎缩, 导致功能下降, 形成老年性痴呆。

老年性痴呆的重要临床症状和特征是智力障碍和记忆力减退, 所以对学习、运动、记忆能力检测是判断治疗老年性痴呆模型治疗效果的指标之一^[43]。Morris水迷宫实验是近些年建立起来的判断动物学习记忆的重要实验方法, 已经成为了老年病学、神经药理学、神经心理学、神经生理学研究的重要方法。

实验利用脑皮质老年斑的主要成分 β -淀粉样蛋白诱导, 形成老年性痴呆大鼠模型。造模成功后, 模型对照组与假手术对照组比较, 逃避潜伏期延长, 跨越平台次数减少。随着时间的推移, 干细胞治疗组大鼠的潜伏期与跨越平台的次数均无明显变化, 结果表明骨髓间充质干细胞移植可以提高老年性痴呆大鼠的学习、记忆能力, 但其作用机制有待进一步研究。

作者贡献: 实验设计为张颖、郭建华, 实验实施为张颖、郭玮, 实验评估为张颖、郭建华、闫洪娟、罗秋华, 资料收集为李鑫萍、郭玮、王海霞。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 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。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Howard KL, Filley CM. Advances in genetic testing for Alzheimer's disease. *Rev Neurol Dis.* 2009;6(1):26-32.
- [2] Park D, Yang YH, Bae DK, et al. Improvement of cognitive function and physical activity of aging mice by human neural stem cells over-expressing choline acetyltransferase. *Neurobiol Aging.* 2013;34(11):2639-2646.
- [3] Miller RH, Bai L, Lennon DP, et al. The potential of mesenchymal stem cells for neural repair. *Discov Med.* 2010;9(46):236-242.
- [4] Deng YB, Ye WB, Hu ZZ, et al. Intravenously administered BMSCs reduce neuronal apoptosis and promote neuronal proliferation through the release of VEGF after stroke in rats. *Neurol Res.* 2010;32(2):148-156.
- [5] Andres RH, Horie N, Slikker W, et al. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain.* 2011;134(Pt 6):1777-1789.
- [6] Delcroix GJ, Garbayo E, Sindji L, et al. The therapeutic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells combined with pharmacologically active microcarriers transplanted in hemi-parkinsonian rats. *Biomaterials.* 2011;32(6):1560-1573.
- [7] Si L, Xu T, Wang F, et al. X-box-binding protein 1-modified neural stem cells for treatment of Parkinson's disease. *Neural Regen Res.* 2012;7(10):736-740.
- [8] 孙治坤,陈生弟.阿尔茨海默病的治疗[J].上海交通大学学报,2008,28(5): 596-599.
- [9] Matsuoka Y, Jouroukhin Y, Gray AJ, et al. A neuronal microtubule-interacting agent, NAPVSIPQ, reduces tau pathology and enhances cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325(1):146-153.
- [10] Srivareerat M, Tran TT, Alzoubi KH, et al. Chronic psychosocial stress exacerbates impairment of cognition and long-term potentiation in beta-amyloid rat model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2009;65(11):918-926.
- [11] Calabrese B, Shaked GM, Tabarean IV, et al. Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by naturally-secreted amyloid-beta protein. *Mol Cell Neurosci.* 2007;35(2):183-193.
- [12] Mahmood A, Lu D, Lu M, et al. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery.* 2003;53(3):697-702.
- [13] 袁章,杨拯,徐艳,等.骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化及其在神经修复中的应用[J].中国康复医学杂志,2009,24(8):766-769.
- [14] Hwang DH, Shin HY, Kim BG. Fortuitous benefits of activity-based rehabilitation in stem cell-based therapy for spinal cord repair: enhancing graft survival. *Neural Regen Res.* 2015; 10 (10): 1589-1590.
- [15] Yin Y, Zhou X, Guan X, et al. In vivo tracking of human adipose-derived stem cells labeled with ferumoxytol in rats with middle cerebral artery occlusion by magnetic resonance imaging. *Neural Regen Res.* 2015; 10(6): 909-915.
- [16] Yu HB, Chen PD, Yang ZX, et al. Electro-acupuncture at Conception and Governor vessels and transplantation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells for treating cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res.* 2014;9(1): 84-91.
- [17] Cho SR, Kim YR, Kang HS, et al. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2009; 18(12):1359-1368.
- [18] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest.* 2004;113(12):1701.
- [19] 乔之龙,郭蕾,李菲.补肾益智汤对老年痴呆模型大鼠中枢神经递质的影响[J].中华中医药学刊,2009,27(12):2565-2568.
- [20] 吴斌,吴永超,郑启新,等.骨髓基质干细胞在IKVAV多肽纳米纤维凝胶表面增殖、黏附及向神经细胞诱导分化的研究[J].中华创伤骨科杂志,2007,9(8):740-744.
- [21] Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(5):321-334.

- [22] Biswas SC, Shi Y, Vonsattel JP, et al. Bim is elevated in Alzheimer's disease neurons and is required for beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 2007;27(4):893-900.
- [23] Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 2007;327(3):449-462.
- [24] Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM, et al. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res*. 2005; 23(6):1383-1389.
- [25] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-372.
- [26] Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10): 3499-3506.
- [27] Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003;101(9):3722-3729.
- [28] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-3843.
- [29] Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, et al. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484-1490.
- [30] Zhang W, Ge W, Li C, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*. 2004;13(3):263-271.
- [31] Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005;105(5):2214-2219.
- [32] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-1822.
- [33] Suvà ML, Riggi N, Stehle JC, et al. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*. 2009;69(5):1776-1781.
- [34] Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449(7162):557-563.
- [35] Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*. 2007; 21(2):304-310.
- [36] Cho JS, Park HW, Park SK, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells enhances axonal outgrowth and cell survival in an organotypic spinal cord slice culture. *Neurosci Lett*. 2009;454(1):43-48.
- [37] 黄洁萍, 翁金森, 王锋, 等. 骨髓间充质干细胞移植对急性脊髓损伤大鼠神经功能恢复及Nogo-A 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(7):582-586.
- [38] Zheng XR, Zhang SS, Yin F, et al. Neuroprotection of VEGF-expression neural stem cells in neonatal cerebral palsy rats. *Behav Brain Res*. 2012;230(1): 108-115.
- [39] Araki T, Kato H, Kogure K. Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course. *Acta Neurol Scand*. 1989;80(6):548-553.
- [40] Bartsch T, Schönfeld R, Müller FJ, et al. Focal lesions of human hippocampal CA1 neurons in transient global amnesia impair place memory. *Science*. 2010;328 (5984):1412-1415.
- [41] 柯尊记. 老年学习记忆减退的神经行为学基础[J]. 生理科学进展, 1997, 28(4): 328-330.
- [42] Perez-Cruz C, Nolte MW, van Gaalen MM, et al. Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011;31(10): 3926-3934.
- [43] Li Y, Yu X, Lin S, et al. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 356(3):780-784.