

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.007

移植脑源性神经生长因子修饰骨髓间充质干细胞对帕金森病大鼠模型治疗作用的实验研究

赵钢勇¹, 张平², 赵慧新², 代瑞廷², 张本恕²

(河北大学 1. 生物技术研究中心; 2. 附属医院神经内科, 保定 071000)

【摘要】目的:观察移植 pIRESneo-EGFP-BDNF 修饰骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)对帕金森病(Parkinson's disease, PD)大鼠的研究。**方法:**将 pEGFP(N1)-BDNF 质粒进行改造与 pIRESneo 相连接, 构建高拷贝质粒 pIRESneo-EGFP-BDNF, 采用电穿孔法转染骨髓 MSCs; 制备 PD 大鼠模型, 随机分为假手术组、PD 组、MSCs 组、脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)组, 经侧脑室移植 MSCs 或 pIRESneo-EGFP-BDNF 修饰骨髓 MSCs 术后 2、4、8 周, 腹腔注射阿朴吗啡诱导 PD 大鼠旋转行为; 采用 Western blot 方法测定中脑黑质 BDNF、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)蛋白的含量。**结果:**双酶切鉴定 pIRESneo-EGFP-BDNF 构建成功; 移植术后 2、4、8 周 MSCs 组和 BDNF 组大鼠与 PD 组比较旋转次数明显减少 ($P<0.05$), 以 BDNF 组较 MSCs 组比较改善更为明显 ($P<0.05$); 移植细胞干预 PD 模型 8 周后中脑黑质 BDNF、TH 蛋白的含量, BDNF 组较 MSCs 组、PD 组明显增高 ($P<0.05$)。**结论:**经侧脑室移植 pIRESneo-EGFP-BDNF 修饰的骨髓 MSCs 能明显改善 PD 大鼠的行为能力, 显著提高中脑黑质 BDNF、TH 蛋白的含量。

【关键词】脑源性神经生长因子; 间充质干细胞; 侧脑室; 质粒; 电穿孔; 帕金森病; 酪氨酸羟化酶

【中国图书分类法分类号】R741

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-02-01

Experimental study on efficacy of bone marrow mesenchymal stem cell modified by plasmid pIRESneo-EGFP-BDNF in treatment of rats with Parkinson's disease

ZHAO Gangyong¹, ZHANG Ping², ZHAO Huixin², DAI Ruiting², ZHANG Benshu²

(1. Research Center of Biotechnology; 2. Department of Neurology, the Affiliated Hospital, Hebei University)

【Abstract】Objective: To investigate efficacy of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) modified by plasmid pIRESneo-EGFP-BDNF in treatment of rats with Parkinson's disease (PD). **Methods:** pIRESneo-EGFP-BDNF plasmid was established by reconstructing pEGFP(N1)-BDNF plasmid and bone marrow MSCs was transfected by electroporation. PD rat models were set up by 6-OHDA and then divided into four groups randomly: sham group, PD group, MSCs group and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) group. Rotating behaviors of rats were induced by intraperitoneal injection of Apomorphine at 2, 4, 8 weeks after bone marrow MSCs transplantation or MSCs modification of plasmid pIRESneo-EGFP-BDNF through cerebral lateral ventricle. BDNF protein and tyrosine hydroxylase (TH) protein in mesencephalic nigra were measured by Western blot. **Results:** Plasmids pIRESneo-EGFP-BDNF were constructed successfully, which was identified by double digestion. Rotation numbers were significantly decreased in MSCs group and BDNF group than in PD group at 2, 4, 8 weeks after the transplantation ($P<0.05$), with more evident improvement in BDNF group than in MSCs group ($P<0.05$). Levels of BDNF protein and TH protein in nigra at 8 weeks after PD model being intervened by cell transplantation were increased significantly in BDNF group than in MSCs group and PD group. **Conclusions:** Transplantation of pIRESneo-EGFP-BDNF modified MSCs through cerebral lateral ventricle can improve PD rats' behavior and increase BDNF and TH protein levels.

【Key words】 brain-derived neurotrophic factor; mesenchymal stem cells; cerebral lateral ventricle; plasmid; electroporation; Parkinson's disease; tyrosine hydroxylase

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是老年人常见的神经系统退行性疾病, 主要病理改变是大脑黑

作者介绍: 赵钢勇, Email: jyzhao1998@yahoo.com.cn,

研究方向: 生物技术。

通信作者: 张平, Email: hbdxhospital@tom.com。

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划资助项目(编号: 08206120D)。

质多巴胺神经元选择性丢失, 导致脑内分泌的多巴胺递质降低, 以运动减少、肌张力强直、肢体震颤及体位不稳为主要临床症状。目前临床以药物治疗为主, 左旋多巴可以改善临床症状, 但仅是一种递质替代治疗, 不能中止或逆转病程。脑源性神经生长因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是神

经生长因子家族成员之一,其主要生物学作用是维持神经元的存活和功能^[1-2],研究证实,BDNF 对多巴胺能神经元具有特异性、选择性保护作用。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多向分化潜能,植入体内后可迁移到相应的病变部位,因此本实验构建真核表达携带 BDNF 质粒转染骨髓 MSCs,观察经侧脑室移植到 PD 大鼠模型的实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、质粒抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司, G418、阿朴吗啡(APO)购自美国 Sigma 公司, L-DMEM 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 兔抗鼠 BDNF 抗体以及兔抗鼠酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体购自 Santa Cruz 公司, HRP 标记抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, PVDF 膜购自 Millipore 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司。其它普通试剂为国产或进口分装分析纯试剂。

1.1.2 菌种、质粒 大肠杆菌 DH5 α 、真核表达质粒 pEGFP(N1)-BDNF, 质粒 pIRESneo 均由上海生工生物工程有限公司提供。

1.1.3 实验动物 健康雄性成年 SD 大鼠 48 只, 体质量 280~300 g; 雄性 3 周 SD 大鼠 6 只, 体质量 100~120 g; 均购自河北医科大学实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒的提取 使用质粒提取试剂盒自含有 pEGFP(N1)-BDNF 质粒或 pIRESneo 质粒的大肠杆菌菌液中分别提取 pEGFP(N1)-BDNF 和 pIRESneo 质粒(按照试剂盒说明书操作)。

1.2.2 pIRESneo-EGFP-BDNF 的构建 本实验委托上海生物工程有限公司合成 BDNF 全长基因, 并将其克隆到 pEGFP(N1) 载体上, 构建了 pEGFP(N1)-BDNF 重组质粒。但是在做转染的过程中, 该质粒提取量总是很低, 无法得到适于转染的浓度。因 pEGFP(N1)-BDNF 的多克隆位点上游有 1 个稀有酶 *Eco* 47 III 的酶切位点(平末端酶), 且在 EGFP 的下游有 1 个 *Not* I 的酶切位点, 所以将其克隆到高效表达载体 pIRESneo 上后再进行转染实验。将 pEGFP(N1)-BDNF 进行 *Eco* 47 III 和 *Not* I 双酶切, pIRESneo 进行 *Eco* R V 和 *Not* I 双酶切, 20 μ l 反应体系中质粒 DNA 8.0 μ l, 10 $\times$ Buffer 2.0 μ l, 限制性内切酶分别是 0.5 μ l, 灭菌水 0.9 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温浴 12 h。回收纯化 DNA 后, 经 T4DNA 连接酶连接, pIRESneo-EGFP-BDNF 的构建成功。

1.2.3 双酶切鉴定 pIRESneo-EGFP-BDNF 将连接后的质粒热转化至 *E.coli*(DH5 α) 中, 涂布平板过夜培养。挑选菌落, 提取质粒后, *Xho* I + *Bam* H I 和 *Xho* I + *Not* I 以 10 μ l 体系做双酶切检测, 确认目的片断是否插入。

1.2.4 骨髓 MSCs 培养 无菌条件下取 3 周 SD 大鼠胫骨和

股骨, 用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和链霉素的 L-DMEM 冲出骨髓, 充分吹打成单细胞悬液, 接种, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 孵箱培养, 48 h 后更换培养液, 弃去未贴壁细胞, 此后每 3~4 d 换液 1 次, 当 MSCs 生长接近 90% 融合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 吹打成单细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用含 10% 胎牛血清的 L-DMEM 悬浮沉淀, 按 1:3 比例传代。

1.2.5 重组质粒 pIRESneo-EGFP-BDNF 电穿孔法转染骨髓 MSCs 取第 3 代或第 5 代骨髓 MSCs, 待细胞融合度 70%~80% 时, 胰酶消化, 加含血清培养基终止消化后 500 r/min, 离心 5 min。按 GTS 公司 NeuroPORTER™ 转染试剂说明书操作(电转染仪购自 Bio-Rad 公司), 设置电转化参数: 电压 280 V, 20 ms。携带 BDNF 基因的质粒 pIRESneo-EGFP-BDNF 或空质粒 pIRESneo, 电转染后培养 48 h, 换成含 100 μ g/ml G418 的 15% FBS 培养基进行筛选, 2~3 d 换液, 共筛选 10~14 d。去除 G418, 用 DMEM(含 15% FBS)培养 5~7 d, 荧光倒置显微镜观察转染细胞形态。

1.2.6 用 Western blot 法检测细胞中 BDNF 蛋白的表达 分别计数骨髓 MSCs、空质粒转染的骨髓 MSCs 及携带 BDNF 基因转染的骨髓 MSCs 各 5 $\times$ 10⁶ 个, 去除培养液, 用预冷的 PBS 洗 2、3 遍。加入 0.5 ml RIPA 裂解液适量(使用前加入 PMSF 至终浓度 1 mmol/L), 轻摇培养瓶或用枪吹打数下使裂解液和细胞充分接触, 冰上放置 5 min 后, 用细胞刮铲将裂解产物和细胞碎片一起转移至 1.5 ml EP 管中, 10 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 3~5 min 沉淀细胞碎片, 上清液即为细胞蛋白提取物, 取少量, 以牛血清白蛋白 BSA 为标准品, 用改良 Lowry 法测定蛋白的浓度后, 将细胞裂解物重悬在 2 $\times$ 上样缓冲液后 100 $^{\circ}$ C, 变性 5 min, 冷却至室温后上样(30 μ l 每孔), 采用 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白条带转到 PVDF 膜上, 5%脱脂奶粉 TBST 溶液用于封闭与稀释一抗, 室温温和振荡封闭 1 h 后, 兔抗鼠 BDNF 抗体(1:1 000)孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜。采用 1 $\times$ TBST 溶液洗膜, 4 $\times$ 10 min, 加入 HRP 标记羊抗兔 II 抗(1:3 000), 室温振荡孵育 1 h, 洗膜, 步骤同前, 最后加入 ECL 显色发光试剂, 暗室中进行胶片显影。

1.2.7 PD 模型及制作动物分组 术前 10%水合氯醛以 0.35 ml/100 g 腹腔注射麻醉 SD 大鼠, 然后置于脑立体定位仪上, 固定头部, 暴露顶骨, 参照大鼠脑立体定位图谱^[3], 确定黑质坐标: 前囟后 5.0 mm, 正中右侧 2.0 mm, 硬膜下 8.0 mm 以及中脑内侧束前囟后 4.4 mm, 正中右侧 1.2 mm, 硬膜下 8.0 mm, 用小针刀钻开颅骨, 用 5 μ l 微量注射器抽取 2 μ l 6-OHDA(4 μ g/ μ l, 溶于含有 0.2%抗坏血酸的无菌生理盐水中)后刺破硬膜, 每个点各注射 2 μ l, 缓慢注射 5 min, 注射完毕停针 10 min, 缓慢退针, 庆大霉素局部冲洗, 缝合皮肤, 清醒后自由进食。造模后 2 周, 大鼠腹腔注射 0.01%阿朴吗啡 5 ml/kg, 诱发其旋转行为, 注射 30 min, 记录旋转次数, 平均每分钟大于 7 次视为模型成功。成功制备 PD 模型 36 只, 随机分为 PD 组(PD 模型)、MSCs 组(移植 MSCs 治疗)、BDNF 组(移植质粒修饰的骨髓 MSCs), 每组各 12 只。假手术组 12 只 SD 大鼠, 以等量生理盐水代替 6-OHDA。

1.2.8 实验组模型制备及行为学测试 MSCs 组: PD 模型制备成功后, 10%水合氯醛以 0.35 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 参

照图谱^[3],定位左侧脑室,前囟后 1.0 mm,中线左侧旁开 1.5 mm 为穿刺点,用微量注射器刺破硬膜,垂直进针达硬膜下 4.0 mm,进入侧脑室,缓慢注入 10 μ l 细胞(约 5×10^6 个细胞),注射时间超过 15 min,留针 10 min。注射完毕后退针,余步骤同前。BDNF 组:手术步骤同 MSCs 组,经侧脑室注入 10 μ l pIRESneo-EGFP-BDNF 转染的骨髓 MSCs(约 5×10^6 个细胞)。移植术后 2、4、8 周腹腔注射 APO 0.5 mg/kg 诱导旋转,观察并记录 30 min。假手术组和 PD 组给等量生理盐水代替移植的细胞。

1.2.9 移植干预 8 周后黑质 TH、BDNF 蛋白表达 移植干预 8 周后,各组随机取 6 只大鼠,快速断头处死,迅速取出的大脑,冰浴上分离出中脑黑质,用试剂盒提取组织总蛋白,用 BCA 试剂盒测定其蛋白质的含量。采用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,浓缩胶为 5%。蛋白质上样量 20 μ l,电泳完毕后,电压 100 V 转膜 45 min 将凝胶上的蛋白条带转移到 PVDF 膜上,用 1% BSA 室温下封闭过夜,然后分别与 I 抗(兔抗鼠 TH 抗体或兔抗鼠 BDNF 抗体,用 1:1 000 封闭液稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗 5 min $\times$ 3 次,然后用 HRP 标记的羊抗兔 II 抗(1:3 000)室温孵育 1 h,再用 TBST 洗 5 min $\times$ 3 次。最后将膜与化学发光增强剂室温孵育 1 min 后封入保鲜膜,压入胶片,曝光显影。以 β -actin 作为内参,用 Quantity One 软件进行灰度分析,扫描灰度值用光密度值表示。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用重复测量方差分析;经方差齐性检验后,若数据方差齐,采用单因素方差分析,组间均数两两比较采用 LSD 检验;若方差不齐,采用 Welch 法分析,组间均数比较采用 Dunnett T3 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓 MSCs 培养

接种 24 h 后可见散在成纤维状细胞贴壁,3 d 后见少量集落形成,10 d 左右细胞迅速增殖至接近融合,第 1 代至第 2 代细胞形态不很规则,有的成梭形,有的扁平宽大,有的成不规则形,传至第 3 代细胞纯度达 98%,细胞形态渐趋均一,形状呈漩涡状,为长梭形。

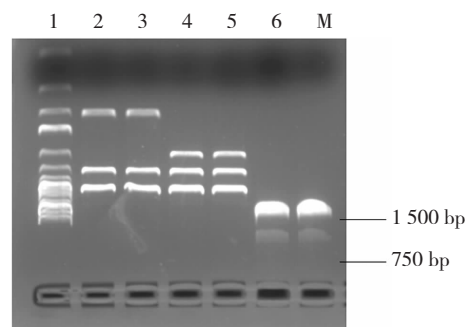
2.2 重组质粒的酶切鉴定(图 1)

将构建好的重组克隆转化大肠杆菌,次日在固体 LB 培养基上挑选克隆,然后提取质粒并收集,进行酶切鉴定。由图 1 可以看出,挑选的重组 pIRESneo-EGFP-BDNF 的 3 号和 8 号克隆经 *Xho* I 和 *Bam* H I 双酶切之后都切出了 750 bp 大小的条带,而经 *Xho* I 和 *Not* I 均切出了 1 500 bp 大小的条带。由重组质粒构建路线中 pIRESneo-EGFP-BDNF 的图谱可以看出,750 bp 的条带为切出的 BDNF 基因的大小,1 500 bp 的条带为切出的 BDNF 连接 EGFP 基因的大小,可见 3 号和 8 号克隆均为构建成功的重组克隆。

2.3 Western blot 检测结果

将构建成功的 pIRESneo-EGFP-BDNF 电穿孔法转染骨

髓 MSCs,经 G418 筛选后,用 Western blot 法检测细胞中 BDNF 蛋白的表达。由图 2 可见,约 27 kD 的地方可见带型,显示 pIRESneo-EGFP-BDNF 转染骨髓 MSCs 中检测到 BDNF 的表达,而骨髓 MSCs、空质粒转染骨髓 MSCs 中 BDNF 表达较低。



M. marker; 1. 8 号克隆; 2. 3 号克隆; 3. 3 号克隆用 *Xho* I + *Not* I; 4. 8 号克隆用 *Xho* I + *Not* I; 5. 3 号克隆用 *Xho* I + *Bam* H I; 6. 8 号克隆用 *Xho* I + *Bam* H I

图 1 质粒 pIRESneo-EGFP-BDNF 酶切鉴定图

Fig.1 Restriction enzyme identification of plasmid pIRESneo-EGFP-BDNF



MSCs CON BDNF

MSCs. 骨髓 MSCs; CON. 质粒 pIRESneo 转染骨髓 MSCs;

BDNF. 质粒 pIRESneo-EGFP-BDNF 转染骨髓 MSCs

图 2 pIRESneo-EGFP-BDNF 质粒在骨髓 MSCs 中的表达

Fig.2 Expressions of plasmid pIRESneo-EGFP-BDNF in bone marrow MSCs

2.4 pIRESneo-EGFP-BDNF 质粒转染骨髓 MSCs

电转染后部分细胞死亡,G418 筛选过程中未转染基因的细胞逐渐死亡,转染基因的细胞则存活下来。撤除 G418 5~7 d 后,细胞状态良好,在荧光显微镜下观察转染结果见图 3。

2.5 行为学检测结果(表 1)

注射阿朴吗啡后,假手术组大鼠向左、右侧旋转次数相似,6-OHDA 右侧毁损黑质 + 中脑内侧束的大鼠,先表现僵直状态,以健侧前肢或后肢为支点,呈现身体环曲、首尾相接的向右侧旋转、伴觅食样动作,平均大于 7 圈/min。部分 PD 大鼠出现嗅探、震颤、后肢挠抓、嘶咬异物、烦躁不安及激惹等现象。经重复测量方差分析表明 2、4、8 周各组大鼠旋转圈数有明显差异,具有统计学意义($F=80.818, P<0.001$),MSCs 组、BDNF 组大鼠在移植术后 2、4 周和 8 周,与 PD 组大鼠比

较仍有僵硬、撕咬、烦躁不安等现象,但旋转圈数较移植前明显减少($P=0.003, P=0.04, P=0.001$),第 4、8 周 BDNF 组与 MSCs 组比较改善最明显($P=0.029, P=0.005$)。

表 1 各组大鼠移植术后旋转圈数比较 (圈/min, $\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab.1 Comparison of rotation frequency among groups after the transplantation (rotations/min, $\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	2周	4周	8周
假手术组	2.25 ± 0.96	2.08 ± 0.79	1.83 ± 0.83
PD组	12.33 ± 1.82 ^a	10.08 ± 2.54 ^a	9.25 ± 2.45 ^a
MSCs组	10.16 ± 1.64 ^b	7.41 ± 1.73 ^b	5.25 ± 1.71 ^b
BDNF组	8.91 ± 2.10 ^b	5.16 ± 1.80 ^{bc}	3.00 ± 0.85 ^{bc}
<i>F</i> 或 F' 值	79.488	59.426	38.431
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:a,与假手术组比较, $P<0.05$;b,与 PD 组比较, $P<0.05$;c,与 MSCs 组比较, $P<0.05$

2.6 Western blot 检测 BDNF 蛋白、TH 蛋白表达 (图 4、5)

移植干预 8 周后,各组大鼠中脑黑质表达 BDNF 蛋白、TH 蛋白,以 PD 组表达最低,假手术组表达最高且二者相比较差异有统计学意义;MSCs 组、BDNF 组 BDNF 蛋白、TH 蛋白的表达均较 PD 组有所提高且差异有统计学意义($P<0.001, P=0.035$)且 BDNF 组与 MSCs 组比较表达提高明显($P=0.002$)。

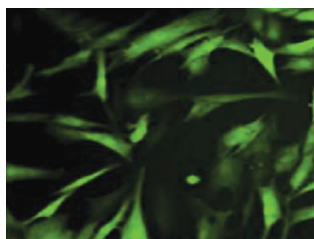
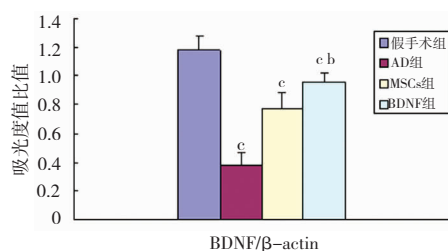
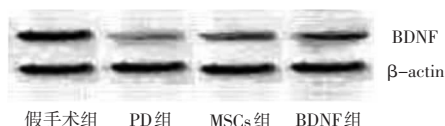


图 3 转染 pIRESneo-EGFP-BDNF 的骨髓 MSCs (400 ×)

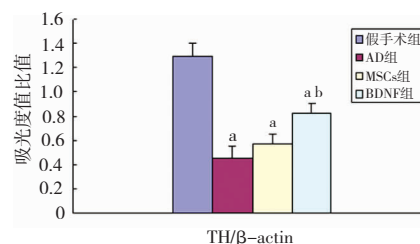
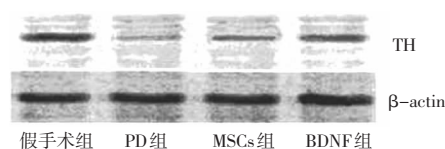
Fig.3 Bone marrow MSCs transfected with plasmid pIRESneo-EGFP-BDNF (400 ×)



b. 与 PD 组比较, $P<0.05$;c,与 MSCs 组比较, $P<0.05$

图 4 移植干预 8 周后各组大鼠黑质 BDNF 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.4 Changes in expressions of BDNF protein in nigra in each group at 8 weeks after the transplantation ($\bar{x} \pm s, n=6$)



a. 与 PD 组比较, $P<0.05$;b. 与 MSCs 组比较, $P<0.05$

图 5 移植干预 8 周后各组大鼠黑质 TH 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.5 Changes in expressions of TH protein in nigra in each group at 8 weeks after the transplantation ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

目前 PD 的治疗主要是补充多巴胺的不足,包括补充多巴胺和 TH(多巴胺合成的限速酶),最近研究主要集中在怎么挽救幸存神经元的治疗,包括神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)的治疗。NTFs 是靶组织分泌的一组特异性蛋白质分子,有促进和维持神经细胞生长、存活、分化和执行功能的作用。它对神经元有特异性,但不刺激细胞分裂。BDNF 作为神经生长因子家族成员,与神经系统发育有着密切关系,不仅对中枢神经元的发育、增殖分化、存活起重要作用,而且对损伤后神经元的修复与功能重塑也起了重要作用^[4]。研究证实 PD 患者脑脊液中 BDNF 水平明显增高,认为 BDNF 有可能与 PD 的病理生理改变密切相关^[4]。BDNF 可通过其高亲和力受体 trkB 发挥生物活性^[5-6],支持中脑多巴胺能神经元存活,通过减少钙离子内流、抗自由基损伤、抑制细胞凋亡等作用使多巴胺能神经元免受神经毒素作用,因而在一定程度上能阻止或延缓多巴胺能神经元的退行性改变^[7]。

然后 BDNF 属于大分子物质不能通过血脑屏障,从循环途径应用 BDNF 并不能直接作用于神经细胞,限制了 BDNF 在中枢神经系统疾病治疗中的应用^[8-10],骨髓 MSCs 具有自我更新能力及多向分化潜能;来源丰富、采集方便;可自体回输、体外扩增迅速;容易转入外源基因。研究证实,采用物理、化学或生物方法对骨髓 MSCs 进行基因修饰,在体内和体外都能使骨髓 MSCs 高效表达目的蛋白,而其

自身作为干细胞的特性也不受影响^[11-13]。Wang 等^[14]发现,静脉移植腺病毒介导 BDNF 感染鼠骨髓 MSCs 干预脊髓损伤,发现脊髓损伤区 BDNF 和神经微丝-200 明显增高,脊髓损伤明显减轻。黄东煜等^[15]发现 BDNF 修饰骨髓 MSCs 移植干预脑梗死,移植组中移植细胞大量表达 BDNF,且部分植入细胞表达神经细胞表面标志物,表明移植后的干细胞可与其分泌的 BDNF 协同促进脑梗死后神经功能恢复。质粒 pIRESneo 具有真核和原核细胞启动子序列,为穿梭质粒,具有 neo/kan 抗药性基因,集克隆、测序与表达于一体的高效表达载体^[14]。因此本实验构建以 EGFP 为报告基因,携带 BDNF 的质粒 pIRESneo-EGFP-BDNF,采用电穿孔法转染骨髓 MSCs,经过条件培养基筛选约 2 周后,转染率可达 80% 左右;并且将成功转染骨髓 MSCs,经侧脑室移植 PD 模型,观察移植后 2、4、8 周 PD 大鼠旋转圈数明显减少,对 PD 大鼠的行为学改善较仅移植 MSCs 比较明显,并且移植干预 8 周后中脑黑质 BDNF 蛋白、TH 蛋白含量明显增高,推测 pIRESneo-EGFP-BDNF 转染骨髓 MSCs 经侧脑室移植后有可能迁移到中脑黑质,且持续释放 BDNF,对黑质的多巴胺神经元具有保护作用,抑制多巴胺神经元的凋亡,从而改善 PD 大鼠的主动活动性,另外经侧脑室移植模拟了人的蛛网膜下腔途径,具有临床可行性。但是移植的细胞在体内的迁徙、存活时间且是否存在其他机制,还需要进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Siegel G J, Chauhan N B. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2000, 33(2-3): 199-227.
- [2] Mufson E J, Counts S E, Fahnestock M, et al. Cholinergic molecular substrates of mild cognitive impairment in the elderly[J]. Curr Alzheimer Res, 2007, 4(4): 340-350.
- [3] Paxinos G, Watson C. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 诸葛启钊, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [4] Salehi Z, Mashayekhi F. Brain-derived neurotrophic factor concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease[J]. J Clin Neurosci, 2009, 16(1): 90-93.
- [5] Numakawa T, Yokomaku D, Richards M, et al. Functional interactions between steroid hormones and neurotrophin BDNF[J]. World J Biol Chem, 2010, 1(5): 133-143.
- [6] Somoza R, Juri C, Baes M, et al. Intraneural transplantation of epigenetically induced BDNF-secreting human mesenchymal stem cells: implications for cell-based therapies in Parkinson's disease[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16(11): 1530-1540.
- [7] Oo T F, Marchionini D M, Yarygina O, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates early postnatal developmental cell death of dopamine neurons of the substantia nigra in vivo[J]. Mol Cell Neurosci, 2009, 41(4): 440-447.
- [8] Griesbach G S, Gomez-Pinilla F, Hovda D A. The upregulation of plasticity-related proteins following TBI is disrupted with acute voluntary exercise[J]. Brain Res, 2004, 1016(2): 154-162.
- [9] Oyesiku N M, Evans C O, Houston S, et al. Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain[J]. Brain Res, 1999, 833(2): 161-172.
- [10] Pardridge W M. Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier[J]. Arch Neurol, 2002, 59(1): 35-40.
- [11] Valero A, Post J N, van Nieuwkastele J W, et al. Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device[J]. Lab chip, 2008, 8(1): 62-67.
- [12] Meinel L, Hofmann S, Betz O, et al. Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2[J]. Biomaterials, 2006, 27(28): 4993-5002.
- [13] Kyriakou C A, Yong K L, Benjamin R, et al. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) expressing truncated soluble vascular endothelial growth factor receptor (tsFlk-1) following lentiviral-mediated gene transfer inhibit growth of Burkitt's lymphoma in a murine model[J]. J Gene Med, 2006, 8(3): 253-264.
- [14] Wang C S, Lin J H, Wu C Y, et al. Adenovirus-mediated human brain-derived neurotrophic factor gene-modified bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2011, 6(16): 1211-1216.
- [15] 黄东煜, 张志坚, 陈柏龄, 等. 慢病毒载体介导 Bdnf 基因修饰的骨髓间质干细胞移植治疗脑梗死[J]. 生物工程学报, 2008, 24(7): 1174-1179.
- [16] Huang D Y, Zhang Z J, Chen B L, et al. Therapeutic efficacy of lentiviral vector mediated Bdnf gene-modified MSCs in treating cerebral infarction [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(7): 1174-1179.
- [16] Plotnikov A N, Shlapakova I, Szabolcs M J, et al. Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart[J]. Circulation, 2007, 116(7): 706-713.

(责任编辑: 冉明会)