

研究报告

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

黄东煜^{1,2}, 张志坚^{1,2,3}, 陈柏龄^{1,2}, 吴秀丽², 王柠^{1,2,3}, 张彦定⁴

1 福建医科大学附属第一医院神经内科, 福州 350005

2 福建省神经病学研究所, 福州 350005

3 福建医科大学神经生物学中心, 福州 350004

4 福建省师范大学生命科学学院, 福州 350007

摘要: 为研究经 *Bdnf* 基因修饰的骨髓间质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)对脑梗死的协同治疗作用, 构建带有大鼠 *Bdnf* 基因之慢病毒载体, 并感染大鼠骨髓间质干细胞(Rat mesenchymal stem cells, rMSCs)。运用线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型, 经尾静脉注射移植, 对照组注射 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)1 mL, *Bdnf*-rMSCs 和 Mock-rMSCs 组分别注射 *Bdnf*-rMSCs 细胞悬液以及未插入目的基因的空病毒载体感染后的 rMSCs 细胞悬液各 1 mL。各组大鼠分别于术后 24 h、移植后 2 周及 2 月应用 modified Neurological Severity Scores (mNSS)评价神经功能状况。结果显示, 与对照组相比, Mock-rMSCs 及 *Bdnf*-rMSCs 移植组神经功能改善明显, mNSS 评分差异有统计学意义($P<0.001$), 而且 *Bdnf*-rMSCs 移植组明显优于 Mock-rMSCs 移植组($P<0.001$)。移植后 2 周及 2 月, 与对照组相比两移植组梗死区脑组织结构恢复较好, 均可见 EGFP 阳性细胞在梗死区及其周边区聚集并存活, 并有部分细胞出现神经元样改变。*Bdnf*-rMSCs 移植组中移植细胞大量表达 BDNF, 两移植组中均有部分植入细胞表达神经细胞表面标志物。研究表明 *Bdnf* 基因修饰的 rMSCs 经静脉移植后可迁移至脑梗死灶周围, 向神经细胞分化并长期存活。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, 这为将来基因工程干细胞移植治疗脑梗死提供了实验依据。

关键词: 骨髓间质干细胞, 脑源性神经生长因子(BDNF), 静脉移植, 大鼠, 脑梗死

Therapeutic Efficacy of Lentiviral Vector Mediated *Bdnf* Gene-modified MSCs in Cerebral Infarction

Dongyu Huang^{1,2}, Zhijian Zhang^{1,2,3}, Bailing Chen^{1,2}, Xiuli Wu², Ning Wang^{1,2,3}, and Yanding Zhang⁴

1 Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

2 Fujian Provincial Institute of Neurology, Fuzhou 350005, China

3 Center of Neurobiology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

4 College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

Abstract: Pretreatment with brain-derived neurotrophic factor(BDNF) reduces ischemic damage after focal cerebral ischemia, and bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs) were reported to ameliorate functional deficits after stroke in rats. Here we investigate the synergistically therapeutic effects of BDNF gene-modified MSCs on cerebral infarction. We transfected MSCs with the BDNF gene using a lentivirus-based system and

Received: November 6, 2007; **Accepted:** March 11, 2008

Supported by: the United Fujian Provincial Health and Education Project for Tackling the Key Research, China (No. WKJ2005-2-011).

Corresponding author: Zhijian Zhang. Tel: +86-591-87982028; Fax: +86-591-87982028; E-mail: zzjzjfy@medmail.com.cn

卫生部科学研究基金——福建省卫生教育联合攻关计划项目(No. WKJ2005-2-011)资助。

investigated whether the BDNF-modified MSCs contributed to improved functional recovery in a rat transient middle cerebral artery occlusion(MCAO) model. Compared to untreated rats, rats that received both MSCs and BDNF-MSCs showed significantly more functional recovery. The difference in modified neurological severity score(mNSS) was statistically significant($P<0.001$). Recovery was better in BDNF-MSCs than in MSCs($P<0.001$). At the second week and second month after the systemic delivery of blank vector-modified MSCs and BDNF-modified MSCs, the treated rats exhibited more significant recovery than the control, including the accumulation and living of enhanced green fluorescence protein(EGFP)-positive cells in the infarct area and surrounding areas, neuron-like changes, expression of surface markers of neural cells, and a large amount of BDNF expression in the BDNF-MSCs-treated group. Our findings suggest that BDNF-gene-modified rMSCs can migrate to surrounding areas of the cerebral infarction lesion, differentiate into neural cells, and survive for extended periods. With the synergy of BDNF, they may promote the recovery of the neurological function following cerebral infarction and represent a new strategy for stem cell-based therapy.

Keywords: mesenchymal stem cells, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), intravenous transplantation, rat, cerebral infarction

已有多项研究证实骨髓间质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)及脑源性神经生长因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)对脑缺血损伤后神经元的保护和替代修复均有积极的治疗作用^[1-5]。基于上述理论,本研究采用慢病毒载体介导 *Bdnf* 基因高效修饰大鼠骨髓间质干细胞(Rat mesenchymal stem cells, rMSCs)获得稳定及高量表达 BDNF 的 rMSCs(*Bdnf*-rMSCs),将此细胞经静脉移植入大鼠中动脉栓塞模型的大鼠体内以观察二者协同治疗脑梗死的效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物

2月龄,250~300 g 清洁级雄性近交系 F344 大鼠 61 只[由中国科学院上海实验动物中心提供。实验动物质量许可证号: SCXK(沪)2003-0003;实验动物使用许可证号: SYXK(闽)2004-0007]。动物常温饲养,自由摄食、饮水,光照 12 h,术前 12 h 禁食。

1.2 主要材料

慢病毒载体质粒 PNL-IRES2-EGFP,包装质粒 HELPER,包膜质粒 VSVG 以及 293T 细胞均由美国杜兰大学陈一平教授惠赠。Top10 菌:由福建医科大学林建银教授惠赠。

主要试剂:逆转录酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I (Promega),高保真 *Pfu* ultra DNA 聚合酶(Stratagen),Trizol 以及脂质体 lipofectamin2000(Invitrogen),质粒抽提试剂盒(Qiagen),胎牛血清(PAA),DMEM(GIBCO),胰酶-EDTA(GIBCO),青链霉素(GIBCO)。其他试剂均为进口或国产化学分析纯。

引物合成、测序均送上海博亚生物公司。

抗体:兔抗鼠 BDNF 多克隆抗体(Santa Cruz),羊抗兔 IgG/HRP 试剂盒,兔抗大鼠 GFAP 多克隆抗体,兔抗大鼠 NSE 多克隆抗体,小鼠抗人 NF-200 单克隆抗体,TRITC 标记羊抗兔 IgG,TRITC 标记兔抗小鼠 IgG(北京中山生物公司)。

1.3 方法

1.3.1 带有 *Bdnf* 基因慢病毒载体构建、鉴定

rMSCs 的分离扩增、培养;慢病毒感染 rMSCs 及感染后检测鉴定参见本研究小组以往研究结果^[6]。

1.3.2 制作大鼠中动脉栓塞(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型

参照 Zea Longa 方法^[7]并加以改进。模型成功的标志为栓塞对侧肢体偏瘫,行走时向对侧转圈。假手术组大鼠接受手术,但栓线不插入颈内动脉颅内段,在颈内颈外动脉分叉处肉眼观察下前进 0.5 cm 即固定结扎作为对照组($n=8$)。

1.3.3 实验动物分组

将 MCAO 模型大鼠 48 只(已剔除术后死亡 3 只,术后无体征 2 只)用随机数字表法分为 3 组:*Bdnf*-rMSCs 组 16 只,Mock-rMSCs 组 16 只,对照组 16 只。各组再根据时间点不同(移植后 2 周及 2 月)分为 2 组,每组 8 只。MCAO 模型建立后 24 h,再次麻醉大鼠,*Bdnf*-rMSCs 组经尾静脉移植 *Bdnf* 基因修饰后的 rMSCs 单细胞悬液 1 mL(相当于约 5×10^6 个细胞),Mock-rMSCs 静脉移植组经尾静脉移植空病毒载体感染的 rMSCs 单细胞悬液 1 mL(相当于约 5×10^6 个细胞),对照组经尾静脉注射 0.1 mol/L PBS 1 mL。移植后将大鼠置于室温控制在 20~25°C 的动

物房(清洁级)中恢复正常饲养。

1.3.4 行为学观察

应用神经损伤严重程度评分(Modified neurological severity score, mNSS)^[8]进行行为学观察。于 MCAO 术后 24 h 及移植后 2 周、2 月采用双盲法进行 NSS 评价各组动物神经功能状况。mNSS 包括运动试验和平衡木试验, 根据所能完成任务的分值统计得分。mNSS 总分为 12 分, 评分越高表明神经功能损伤越严重。

1.3.5 荧光免疫组织化学观察

取各组大鼠脑组织后置 10% 甲醛固定 4 h, 30% 蔗糖溶液浸泡脱水 3 d。冰冻切片机冰冻切片, 以前囟为起始, 切成等厚(15 μ m)冠状切面脑片, 每隔一片抽取一片作甘油封片荧光显微镜观察, 其余存放于 4°C, 用于荧光免疫组化观察。PBS 清洗脑片 3 次; 滴加 3% H_2O_2 至铺满整个脑片, 室温静置 10 min; PBS 清洗 3 次; 加入枸橼酸盐至液面盖过脑片, 微波炉高火加热 10 min 修复抗原; PBS 清洗 3 次; 分别滴加一抗(抗 BDNF、抗 NSE、抗 NF-200、抗 GFAP)(1:100 PBS 配制)至铺满整个脑片, 放置于湿盒中 4°C 孵育过夜。次日取出, PBS 洗 3 次; 分别滴加 TRITC 标记的相应二抗(1:100 PBS 配制)至铺满整个脑片, 湿盒中 37°C 避光孵育 1 h; 吸水纸吸干水分, 甘油封片, 避光晾干, 荧光显微镜观察结果与未做荧光组化前结果对比。阴性对照组以 PBS 代替一抗, 其余步骤均同前。

1.3.6 统计学分析

对 *Bdnf*-rMSCs 移植组, Mock-rMSCs 移植组与对照组三组间术后 24 h, 移植后 2 周及 2 月的 mNSS 评分用 Excel 软件及 SPSS11.0 软件行独立样本 *t* 检验(Indenpandent samples test)。取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MCAO 模型评估

MCAO 术后大鼠均出现手术侧 Horner 征, 并出现右侧前肢屈曲内收, 前进不能, 向右绕圈, 站立不稳, 平衡能力明显减弱。手术后大鼠 mNSS 评分平均值为 10.75, 证明为成功模型。而假手术组均无上述症状。

2.2 行为学观察结果

各组数据经正态性检验均为正态分布(表 1)。

大鼠 MCAO 后 24 h、*Bdnf*-rMSCs 组、Mock-rMSCs 组及对照组的 mNSS 评分差异没有显著性意义($P=0.867$)。移植后 2 周每组大鼠的运动和平衡功能较 MCAO 术后均有不同程度的恢复, 但通过 mNSS 评分的统计学分析发现 *Bdnf*-rMSCs 组与 Mock-rMSCs 组的恢复均优于 PBS 组, 组间差别有显著性意义($P<0.001$), 而且 *Bdnf*-rMSCs 组的恢复好于 Mock-rMSCs 组, 两组间差别亦有显著性意义($P<0.001$), 这种差别可保持到移植后 2 月。

表 1 各组各时间点 mNSS 评分对比($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of mNSS of different groups at different time ($\bar{x} \pm s, n=8$)

	Control group	Mock-rMSCs group	BDNF-rMSCs group
Post-operative 24h	10.88 \pm 1.126	10.63 \pm 0.744	10.75 \pm 0.886
Post-transplantational 2 w	7.88 \pm 0.835	4.63 \pm 0.744*	1.63 \pm 0.518*#
Post-transplantational 2 m	5.38 \pm 0.744	2.50 \pm 0.535*	1.25 \pm 0.463*#

* $P<0.001$ vs control; # $P<0.001$ vs Mock-rMSCs group

2.3 荧光免疫化学结果

移植后 2 周, 脑组织切片直接于 488 nm 波长光激发下观察, 发现 Mock-rMSCs 组及 *Bdnf*-rMSCs 组脑梗死侧缺血区及周围有大量 EGFP 阳性细胞, 健侧罕见, 而对照组未发现(图 1)。当应用抗 BDNF 抗体行免疫荧光组化(应用 tritc 标记二抗)后 *Bdnf*-rMSCs 组中大多数 EGFP 阳性细胞在另一 557 nm 波长光激发下还发出红色荧光说明有 BDNF 表达, 而 Mock-rMSCs 组中 EGFP 阳性细胞几乎未见红色荧光, 两组脑片中均可见丰富红色荧光细胞(动物模型本身的细胞表达)。说明移植后 *Bdnf* 基因修饰的 rMSCs 在脑内仍可大量表达 BDNF, 虽然 Mock-rMSCs 组在体外用 RT-PCR 及 Western blotting 的方法可检测到 BDNF 表达, 但其表达量与 *Bdnf*-rMSCs 组的差异有显著性意义, 因此, 在体内可能由于其表达量相对较低而未能检测到。进一步应用抗 NSE、抗 GFAP 及抗 NF 等神经细胞相关表面标记物抗体行荧光免疫化学染色后, 荧光显微镜下发现两移植组中均有部分 EGFP 阳性细胞可激发出红色荧光, 并有部分细胞呈现神经细胞样改变, 说明部分移植细胞能够表达神经元以及神经胶质细胞的标志物(结果未显示)。移植后 2 月, 我们仍能在缺血区及周围观察到大量的 EGFP 细胞, 部分细胞

呈神经细胞样改变, 经过抗 NSE、抗 NF 及抗 GFAP 等神经细胞相关表面标志物抗体行荧光免疫化学染

色后, 可以观察到与移植后 2 周同样的结果(图 2、3)。未观察到明显成瘤迹象(结果未显示)。

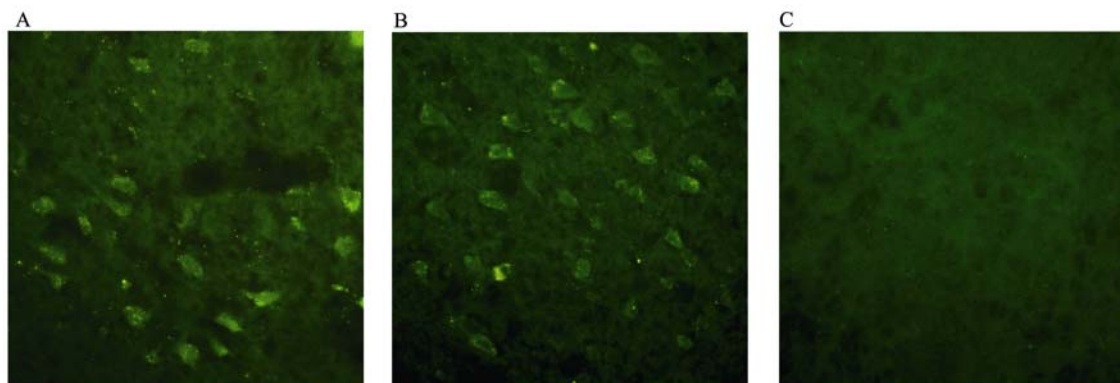


图 1 移植后 2 周 EGFP 阳性细胞分布结果($\times 200$)

Fig. 1 Results of the distribution of the EGFP (EGFP+) positive cells after 2 weeks of transplanting($\times 200$)

A: EGFP+ cells were localized around the ischemic focus by the fluorescence microscope in the *Bdnf*-rMSCs group;
B: EGFP+ cells were localized around the ischemic focus by the fluorescence microscope in the Mock-rMSCs group;
C: there was no EGFP+ cells found in the healthy side of brain in above two groups

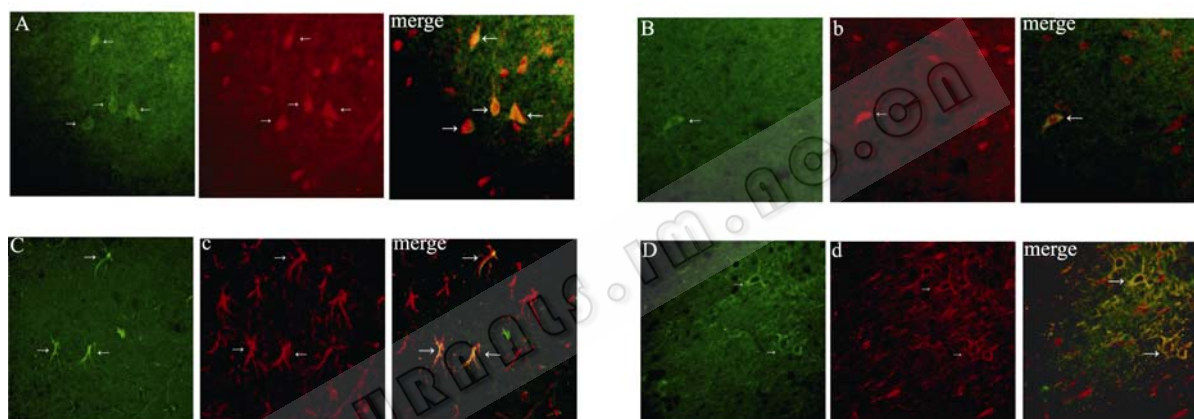


图 2 移植后 2 月 *Bdnf*-rMSCs 组免疫荧光组化结果($\times 200$)

Fig. 2 Results of immunohistochemical staining after 2 months of transplantation in the *Bdnf*-rMSCs group($\times 200$)

The figures of the A,B,C,D show that the EGFP+ cells(arrows) were localized around the ischemic focus. The figures of the a,b,c,d show that those EGFP+ cells of figures A,B,C,D(arrows) expressed BDNF or various neural cell surface markers respectively: in detail, (a) for BDNF(+); (b) for NSE(+); (c) for GFAP(+); (d) for NF(+). The merged images are showed in the figures 'merge'

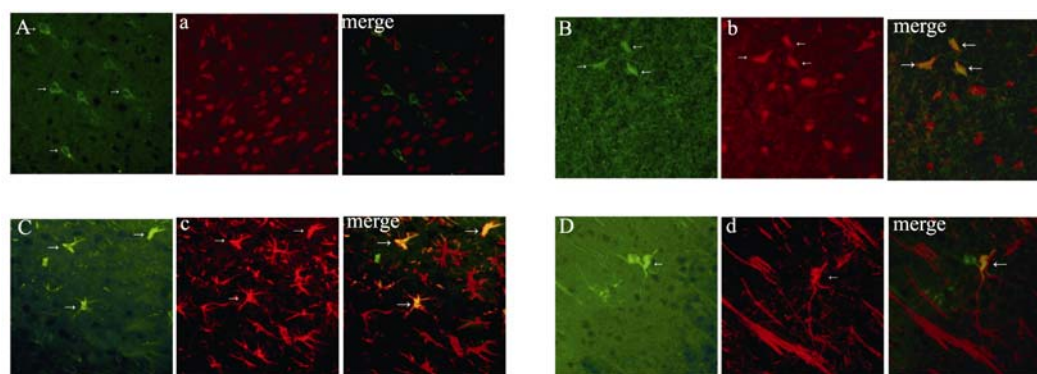


图 3 移植后 2 月 Mock-rMSCs 组免疫荧光组化结果($\times 200$)

Fig. 3 Results of immunohistochemical staining after 2 months of transplantation in the Mock-rMSCs group($\times 200$)

The figures of the A,B,C,D show that the EGFP+ cells (arrows) were localized around the ischemic focus. The figures of the a,b,c,d show that those EGFP+ cells of figures A,B,C,D (arrows) expressed various neural cell surface markers respectively, but don't express BDNF: in detail, (a) for BDNF(-); (b) for NSE(+); (c) for GFAP(+); (d) for NF(+). The merged images are showed in the figures 'merge'

3 讨论

脑缺血梗死后如果不能在一定时间内改善血供,将导致缺血区神经元死亡,其后果是不可逆的,目前临床上对此仍缺乏有效的方法,这也是脑梗死预后不良的关键原因。关于神经修复或再生的疗法是将来治疗脑梗死的主要方向。BDNF 是脑内最重要的神经营养因子之一,具有维持、调控以及促进神经细胞生长的作用。其可能机制包括:通过调节细胞膜上钙离子通道蛋白的表达而影响钙离子流;通过抗自由基损伤,提高细胞内抗氧化酶的活性及刺激细胞的修复,促进表达正常神经元功能所必需的分子并维持正常信号的传递等^[9]。多年来许多研究表明其对脑缺血损伤有着积极的保护及修复作用^[1,10]。

MSCs 是骨髓中非造血干细胞,在骨髓中主要起支持和营养造血干细胞作用。研究发现这种细胞具有干细胞持续增殖和多向分化的潜能,近来国内外实验研究均表明 MSCs 能够分化成神经细胞^[11,12]。同时,近年来有学者认为干细胞的可塑性实际上是移植的供体细胞和不同的组织细胞融合后细胞基因组重组的结果^[13,14]。经多项研究证实,这种融合现象确实存在,但发生率较低。因此,目前大多数学者认为干细胞的可塑性包括了分化与融合这两种现象。由于 MSCs 的可塑性,且具有取材方便、免疫排斥反应弱,少受伦理学制约,移植方便等特点,使其成为移植细胞和基因载体应用于脑梗死的治疗。国内外已有很多研究^[15,16]表明从骨髓中分离培养的 MSCs 移植后,其能够在体内存活并聚集在损伤区域,分化表达神经细胞的标志物,并对宿主的神经细胞存活及神经再生起到了积极的作用。静脉移植相对于其他移植方法例如局部定向注射移植而言,具有安全、有效、更贴近临床等优点,因此通过静脉移植无疑是一种更加有效而且现实的方法,这已经本研究小组前期工作证实^[17],而且在移植后 MSCs 主要分布聚集在缺血灶周围,而在其他脏器分布很少^[18]。目前 MSCs 经血管移植后迁移、在脑内存活、分化的机制尚未完全明了。其中 MSCs 移植后向病损部位迁移是其发挥治疗作用的首要条件。其可能机制是脑组织损伤后释放一些细胞黏附分子、炎症因子、趋化因子,及进入体内的 MSCs 表面也产生一些细胞黏附分子对其的迁移产生一定的趋化作用,本研究小组前期研究表明基质细胞衍

生因子-1(SDF-1)及其配体在这一趋化过程中起到了重要作用^[19]。同时脑缺血后血脑屏障的破坏,也有助于静脉移植入的 MSCs 进入缺血脑区。

越来越多的研究表明将合适的营养因子导入合适载体细胞进而移植入靶点对于脑梗死将会是一种非常有效的治疗途径。因此,转基因骨髓间质干细胞移植已成为脑内移植治疗研究的重要方向。移植后的载体细胞既能替代缺血损伤造成的神经元丢失,又能大量分泌营养因子从而发挥双重治疗作用。Zhao^[20]等通过构建 *Bdnf* 逆转录病毒载体感染 MSCs,发现基因修饰后 MSCs 大量表达分泌 BDNF,并且经维甲酸诱导后分化为神经细胞,免疫组化检测到神经元特异的表面标志。因此设想若能将 *Bdnf*-MSCs 基因工程干细胞移植入缺血损伤脑内,不仅 MSCs 本身可以替代损伤及凋亡的神经元,并能通过旁分泌作用促进周围组织细胞的修复再生,以达到双重治疗功效。Kazuhiko^[21]等应用 *Bdnf* 腺病毒载体感染 MSCs,移植 MCAO 大鼠脑后发现 *Bdnf*-MSCs 移植后表达及分泌的 BDNF 量比单纯移植 MSCs 高 23 倍,移植 7~14 d 后 *Bdnf*-MSCs 组功能恢复明显高于对照组, MRI 显示梗死范围亦明显小于对照组。这些研究均提示经 *Bdnf* 基因修饰 MSCs 应用于脑缺血治疗将成为一个快捷有效可行的方法。而 Nomura^[22]等通过静脉移植经 *Bdnf* 基因修饰的人 MSCs 入 MCAO 大鼠体内,发现其不仅能减少梗死体积、改善神经功能恢复,而且治疗效果比单纯 MSCs 移植组好。

与上述二者的研究相比,本实验研究采用了更佳性能的慢病毒载体,通过它的介导使得感染后的 rMSCs 可以长期稳定而高效的表达所插入的目的基因 *Bdnf*。通过实验发现 *Bdnf*-rMSCs 和 Mock-rMSCs 分别经静脉移植入 MCAO 大鼠体内后,两者均可促进 MCAO 大鼠的神经功能的恢复。两移植组移植后 2 周及 2 月大鼠神经功能改善较对照组明显, mNSS 评分差异有显著性意义,但两移植组间 mNSS 评分差异也有显著性意义, *Bdnf*-rMSCs 组明显优于 Mock-rMSCs 组。移植后 2 周及 2 月两移植组细胞均迁移定居于缺血损伤区及其周边区域,并可稳定表达 BDNF。两组均有部分移植细胞分化为神经元样细胞并表达神经细胞的特异性标志物 NSE、NF 及 GFAP 等,前期研究显示其 NSE、NF 表达率在 2%~3%左右, GFAP 在 6%~8%左右^[23]。这些都说明

了 *Bdnf*-rMSCs 基因工程干细胞移植后确能通过分化而发挥替代治疗并可分泌营养因子改善局部内环境促进神经功能恢复的双重治疗作用, 是否存在融合现象须设计额外的实验以证实。而且通过 2 月观察并未发现成瘤倾向。更长期的效果仍待观察。

REFERENCES

- [1] Zhang Y, Pardridge WM. Blood-brain barrier targeting of BDNF improves motor function in rats with middle cerebral artery occlusion. *Brain Research*, 2006, **1111**(1): 227-229.
- [2] Sommer C, Kollmar R, Schwab S, *et al.* Exogenous brain-derived neurotrophic factor prevents postischemic downregulation of [3H]muscimol binding to GABA(A) receptors in the cortical penumbra. *Molecular Brain Research*, 2003, **111**(1-2): 24-30.
- [3] Hirouchi M, Ukai Y. Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 2002, **120**(2): 107-113.
- [4] Tao H, Rao R, Ma DD, *et al.* Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. *Development, Growth & Differentiation*, 2005, **47**(6): 423-433.
- [5] Feng YD, Zhang SM, Xu YM, *et al.* The experimental study on rat mesenchymal stem cells induced to differentiate into nerve-like cells *in vitro*. *Chinese Journal of Neuroimmunology and Neurology*, 2003, **10**(4): 262-267. 冯永东, 张苏明, 许予明, 等. 体外诱导大鼠骨髓间质干细胞分化为神经样细胞的实验研究. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2003, **10**(4): 262-267.
- [6] Huang DY, Zhang ZJ, Chen BL, *et al.* Construction of rat *Bdnf* gene lentiviral vector and its expression in mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(2): 235-240. 黄东煜, 张志坚, 陈柏龄, 等. 大鼠 *Bdnf* 基因慢病毒载体的构建及其在骨髓间质干细胞中的表达. *生物工程学报*, 2007, **23**(2): 235-240.
- [7] Zea Longa E, Weinstein PR, Calson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, **20**(1): 84-91.
- [8] Ahmad I, Tang L. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, **270**: 5172-5211.
- [9] Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, *et al.* Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1999, **19**: 1220-1228.
- [10] Kiprianova I, Freiman TM, Desiderato S, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. *Journal of Neuroscience Research*, 1999, **56**(1): 21-27.
- [11] Tao H, Rao R, Ma DD, *et al.* Cytokine induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell free condition. *Development, Growth and Differentiation*, 2005, **47**(6): 423-433.
- [12] Long X, Olszewski M, Huang W, *et al.* Neural cell differentiation *in vitro* from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 2005, **14**(1): 65-69.
- [13] Ying QL, Nichols J, Evans EP, *et al.* Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 2002, **416**: 545-548.
- [14] Wang X, Willenbring H, Akkari Y, *et al.* Cell fusion is the principal source of bone marrow derived hepatocytes. *Nature*, 2003, **422**: 897-901.
- [15] Li Y, Chen J, Zhang CL, *et al.* Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*, 2005, **49**(3): 407-417.
- [16] Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, *et al.* Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuroregulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Experimental Neurology*, 2006, **198**(1): 54-64.
- [17] Zhang ZJ, Wang W, Chen SY, *et al.* Effect of intravenous administration of rat mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in rats. *Journal of Fujian Medical University*, 2007, **41**(2): 114-117. 张志坚, 王伟, 陈施艳, 等. 经静脉移植骨髓间质干细胞治疗脑梗死. *福建医科大学学报*, 2007, **41**(2): 114-117.
- [18] Chen DP, Zhang ZJ, Wu XL, *et al.* Distribution of intravenously grafted bone marrow mesenchymal stem cells in the viscera tissues of rats before and after cerebral ischemia. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2007, **11**(50): 10160-10164. 陈东平, 张志坚, 吴秀丽, 等. 经静脉移植骨髓间质干细胞在脑缺血前后大鼠脏器组织中的分布. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, **11**(50): 10160-10164.
- [19] Zhang ZJ, Zhang JL, Chen DP, *et al.* Effect of Stromal Cell-derived Factor-1 on the Migration of Mesenchymal Stem Cells. *Chinese Journal of Clinical Neurosciences*, 2006, **14**(6): 571-576. 张志坚, 张佳林, 陈东平, 等. 基质细胞衍生因子-1 对间质干细胞迁移的影响. *中国临床神经科学*, 2006, **14**(6): 571-576.
- [20] Zhao LX, Zhang J, Cao F, *et al.* Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection. *Experimental Neurology*, 2004, **190**(2): 396-406.
- [21] Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, *et al.* BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Molecular Therapy*, 2004, **2**(9): 189-197.
- [22] Nomura T, Honmou O, Harada K, *et al.* I. v. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene modified-human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*, 2005, **136**(1): 161-169.
- [23] Wang W, Zhang ZJ, Wu XL, *et al.* Comparison of Intravenous Adminstrating of rMSO and fBMC after Cerebral Ischemia in Adult Rats. *Journal of Fujian Medical University*, 2008, **42**(1): 1-5. 王伟, 张志坚, 吴秀丽, 等. 大鼠骨髓间质干细胞和新鲜骨髓细胞静脉移植治疗脑梗死的疗效. *福建医科大学学报*, 2008, **42**(1): 1-5.