

# 稳定高效合成多巴胺的骨髓间充质干细胞系的创建和鉴定

刘阳<sup>1</sup>, 常俊彦<sup>1</sup>, 王悦<sup>1</sup>, 杨盼<sup>1</sup>, 马彩云<sup>1</sup>, 刘高峰<sup>1</sup>, 郭侯<sup>2</sup>, 刘长青<sup>1</sup>, 王春景<sup>1\*</sup>

1 蚌埠医学院生命科学学院, 安徽 蚌埠 233000

2 蚌埠医学院检验医学院, 安徽 蚌埠 233000

刘阳, 常俊彦, 王悦, 杨盼, 马彩云, 刘高峰, 郭侯, 刘长青, 王春景. 稳定高效合成多巴胺的骨髓间充质干细胞系的创建和鉴定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1773-1788.

LIU Yang, CHANG Junyan, WANG Yue, YANG Pan, MA Caiyun, LIU Gaofeng, GUO Yu, LIU Changqing, WANG Chunjing. Establishment and characterization of bone marrow mesenchymal stem cell lines stably synthesizing high-level dopamine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1773-1788.

**摘要:** 创建能稳定合成多巴胺(dopamine, DA)递质的三转基因(tyrosine hydroxylase/dopamine decarboxylase/GTP cyclohydrolase 1, TH/DDC/GCH1)的骨髓间充质干细胞系(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs), 移植至帕金森大鼠模型脑内, 为帕金森病(Parkinson's disease, PD)的临床治疗提供实验依据。通过三转基因的重组慢病毒创建能稳定合成并分泌 DA 递质的 DA-BMSCs 稳定转染细胞系, 利用反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、蛋白免疫印迹(Western blotting)、免疫荧光等技术检测 BMSCs 中三转基因(TH/DDC/GCH1)的表达, 采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测 DA 的合成情况。染色体 G-带法检测 DA-BMSCs 的遗传稳定性。将 DA-BMSCs 移植于 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)偏侧损毁帕金森大鼠模型右脑的前脑内侧束(medial forebrain bundle, MFB)区, 检测其在 PD 大鼠脑内微环境中的存活、分化情况。阿扑吗啡(apomorphine, APO)诱导旋转实验检测 DA-BMSCs 移

资助项目: 国家自然科学基金(81771381); 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2021ZD0085, KJ2021A0774, KJ2021A0784); 安徽省重点研发计划(2022e07020030, 2022e07020032); 蚌埠医学院研究生科研创新计划项目(Byycx21050); 国家级大学生创新创业训练项目资助(202110367043, 202110367044, 20210367058); 蚌埠医学院厅重点科研平台开放课题(AHTT2022B001)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81771381), the Natural Science Foundation of Colleges and Universities of Anhui Province (KJ2021ZD0085, KJ2021A0774, KJ2021A0784), the Key Research and Development Program of Anhui Province (2022e07020030, 2022e07020032), the Postgraduate Research Innovation Program of Bengbu Medical College (Byycx21050), the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (202110367043, 202110367044, 20210367058), and the Key Research Platform Open Subjects of the Department of Bengbu Medical College (AHTT2022B001).

\*Corresponding author. Tel: +86-552-3175291, E-mail: wchjrosa@bbmc.edu.cn

Received: 2022-09-07; Accepted: 2022-12-14

植后 PD 大鼠的运动障碍改善情况。DA-BMSCs 细胞系中 TH/DDC/GCH1 三转基因均能够稳定高效表达, 而正常 BMSCs 对照组中均不表达。三转基因感染组(DA-BMSCs)和 LV-TH 感染组细胞培养上清液中 DA 浓度极其显著高于 BMSCs 空白对照组( $P < 0.0001$ )。传代后的 DA-BMSCs 仍能稳定合成 DA, 并保持正常二倍体核型(94.5%)。DA-BMSCs 移植 PD 大鼠脑内 4 周后, 显著改善 PD 大鼠模型的运动障碍, 在脑内微环境中大量存活, 分化为 TH<sup>+</sup>和 GFAP<sup>+</sup>细胞, 并显著上调脑移植区域的 DA 水平。本研究成功创建了能稳定分泌 DA, 在大鼠脑中大量存活并分化的三转基因 DA-BMSCs 细胞系, 为 DA-BMSCs 工程化培养与移植治疗 PD 奠定基础。

**关键词:** 帕金森病; 大鼠间充质干细胞; 酪氨酸羟化酶; 多巴胺脱羧酶; GTP 环化水解酶 1; 多巴胺

## Establishment and characterization of bone marrow mesenchymal stem cell lines stably synthesizing high-level dopamine

LIU Yang<sup>1</sup>, CHANG Junyan<sup>1</sup>, WANG Yue<sup>1</sup>, YANG Pan<sup>1</sup>, MA Caiyun<sup>1</sup>, LIU Gaofeng<sup>1</sup>, GUO Yu<sup>2</sup>, LIU Changqing<sup>1</sup>, WANG Chunjing<sup>1\*</sup>

1 School of Life Sciences, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui, China

2 School of Laboratory Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui, China

**Abstract:** A triple-transgenic (tyrosine hydroxylase/dopamine decarboxylase/GTP cyclohydrolase 1, TH/DDC/GCH1) bone marrow mesenchymal stem cell line (BMSCs) capable of stably synthesizing dopamine (DA) transmitters were established to provide experimental evidence for the clinical treatment of Parkinson's disease (PD) by using this cell line. The DA-BMSCs cell line that could stably synthesize and secrete DA transmitters was established by using the triple transgenic recombinant lentivirus. The triple transgenes (TH/DDC/GCH1) expression in DA-BMSCs was detected using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blotting, and immunofluorescence. Moreover, the secretion of DA was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and high-performance liquid chromatography (HPLC). Chromosome G-banding analysis was used to detect the genetic stability of DA-BMSCs. Subsequently, the DA-BMSCs were stereotactically transplanted into the right medial forebrain bundle (MFB) of Parkinson's rat models to detect their survival and differentiation in the intracerebral microenvironment of PD rats. Apomorphine (APO)-induced rotation test was used to detect the improvement of motor dysfunction in PD rat models with cell transplantation. The TH, DDC and GCH1 were expressed stably and efficiently in the DA-BMSCs cell line, but not expressed in the normal rat BMSCs. The concentration of DA in the cell culture supernatant of the triple transgenic group (DA-BMSCs) and the LV-TH group was extremely significantly higher than that of the standard BMSCs control group ( $P < 0.0001$ ). After passage, DA-BMSCs stably produced DA. Karyotype G-banding analysis showed that the

vast majority of DA-BMSCs maintained normal diploid karyotypes (94.5%). Moreover, after 4 weeks of transplantation into the brain of PD rats, DA-BMSCs significantly improved the movement disorder of PD rat models, survived in a large amount in the brain microenvironment, differentiated into TH-positive and GFAP-positive cells, and upregulated the DA level in the injured area of the brain. The triple-transgenic DA-BMSCs cell line that stably produced DA, survived in large numbers, and differentiated in the rat brain was successfully established, laying a foundation for the treatment of PD using engineered culture and transplantation of DA-BMSCs.

**Keywords:** Parkinson's disease (PD); rat mesenchymal stem cells; tyrosine hydroxylase; dopamine decarboxylase; GTP cyclohydrolase 1; dopamine

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一类重要的中枢神经系统退行性疾病,因脑中路易小体的聚集引起中脑黑质-纹状体通路的多巴胺能神经元变性大量死亡,导致脑内多巴胺(dopamine, DA)递质释放的下降而引起的一系列神经功能障碍<sup>[1-3]</sup>,现已成为神经系统疾病治疗的热点之一。临床上以左旋多巴(levodopa, L-DOPA)为代表的常规药物治疗手段,多是通过补充左旋多巴在剩余的多巴胺神经元中生成多巴胺发挥作用。然而,这类以消耗剩余的多巴胺神经元的治疗方式只能在一定时间内延缓症状,不能彻底治愈病症,且后期副作用大<sup>[4]</sup>。作为PD治疗研究方向之一的细胞移植治疗,主要是通过移植干细胞或者干细胞来源的神经前体细胞替代凋亡的多巴胺能神经元以恢复神经传递发挥功能,同时保护剩余的DA神经元,已成为治疗PD的重要途径<sup>[5]</sup>。

随着PD致病机制深入研究,通过基因治疗重建缺失的多巴胺神经元并提升DA的合成分泌功能来根治PD成为可能。作为脑内重要递质的多巴胺,其合成主要由酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、多巴胺脱羧酶(dopamine decarboxylase, DDC)和三磷酸鸟苷环化水解酶1(GTP cyclohydrolase 1, GCH1)这3种限速酶所调控<sup>[6-7]</sup>。多巴胺神经元内的TH在四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)辅助因子的作用下催化脑内的游离L-酪氨酸转化为左旋多巴,左旋多

巴又可被DDC催化为神经递质多巴胺释放到体内,而辅助因子BH4是由GTP经GCH1催化生成的<sup>[8-9]</sup>。因此,过表达TH、DDC、GCH1这3种DA合成的关键酶被认为能增加DA递质的合成,而且携带人TH、DDC和GCH1基因的腺病毒对帕金森动物模型和临床患者均取得明显的治疗效果<sup>[10-11]</sup>。

本研究构建携带DA合成途径3种关键酶基因的LV-TH和LV-DDC+GCH1两种慢病毒,将这两种慢病毒同时感染大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),使不表达TH、DDC和GCH1的BMSCs细胞系过表达这3种关键酶基因,进而建立能稳定高效合成DA的骨髓间充质干细胞系(dopamine-expressing bone marrow mesenchymal stem cells, DA-BMSCs),以期为DA-BMSCs移植治疗PD提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 BMSCs的分离培养和克隆团鉴定

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级的Sprague-Dawley (SD)大鼠购自山东省实验动物中心,所有实验动物程序均由蚌埠医学院动物护理和使用伦理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准(批准号2022-139)。颈椎脱臼法处死4周龄大小的SD大鼠,完整剥离大鼠股骨和胫骨,经磷酸缓冲盐溶

液(phosphate buffered saline, PBS)清洗去除碎骨和碎肉后, 剪去两端软骨, 5 mL 注射器吸取 DMEM:F12 培养基(Gibco Life Technologies 公司)从骨中冲洗出细胞悬液, 该培养基含有 10%的胎牛血清(Gibco Life Technologies 公司), 1×MEM 非必需氨基酸(non-essential amino acids, NEAA, Gibco Life Technologies 公司), 10 ng/mL 成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2, R&D Systems 公司), 1 mmol/mL L-glutamine (Gibco Life Technologies 公司), 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素(Gibco Life Technologies 公司), 细胞悬液经 200 目筛网过滤后转入 T25 培养瓶(Corning 公司)中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中贴壁培养和连续传至第 3 代进行纯化。在直径 6 cm 的细胞培养皿(Corning 公司)中以 100/皿细胞密度接种纯化后的 BMSCs, 培养 10–14 d, 4%多聚甲醛固定 10 min, 蒸馏水洗涤 2 min, 结晶紫染色液(上海碧云天生物有限公司)染色 30 min, 显微镜下统计克隆团数量并拍照。

## 1.2 慢病毒的构建

NCBI 数据库搜寻目的基因人 TH 1 (NM\_199292)、人 DDC (NM\_001082971)、人 GCH1 (NM\_001024024)的编码序列(coding sequence, CDS), 选用慢病毒表达载体 pHBLV-CMV-MCS-3flag-EF1-mCherry-T2A-Puro (简称 LV-mCherry, 红色荧光), pHBLV-CMV-EF1-ZsGreen-P2A-BSD (简称 LV-ZsGreen, 绿色荧光)构建携带目的基因的慢病毒载体。将扩增的 TH 基因插入 LV-mCherry, 构建目的载体 pHBLV-CMV-TH-3flag-EF1-mCherry-T2A-Puro (简写成 LV-TH), 将 DDC 和 GCH1 序列插入 LV-ZsGreen, 构建目的载体 pHBLV-CMV-DDC-T2A-GCH1-EF1-ZsGreen-P2A-BSD (简写成 LV-DDC-GCH1), 均通过测序进行验证。慢病毒载体构建、慢病毒包装与滴度

测定由上海汉恒生物科技有限公司代为完成, 病毒滴度为  $1 \times 10^8$  TU/mL。

## 1.3 慢病毒感染 BMSCs

选用第 3 代(P3) BMSCs 通过半量感染的方式进行感染实验。在含有转剂聚凝胺(6 μg/mL)的 DF-12 培养基, 加入 LV-TH [感染复数(multiplicity of infection, MOI): 7.5]和 LV-DDC-GCH1 (感染复数 MOI: 5.0)的过表达慢病毒, 并对对应空载病毒为对照, 使用 1/2 体积含慢病毒的 DF-12 培养基感染 BMSCs, 4 h 后补足剩余的 1/2 的完全 DF-12 培养基体积, 感染约 24 h 后, 吸去含病毒培养基, 换上新鲜的完全 DF-12 培养基, 继续培养 2 d 后基因表达可达到峰值。对过表达慢病毒感染的细胞进行 DAPI 染色, 在荧光显微镜下对感染阳性细胞(红色/绿色荧光)/总细胞数(DAPI 染色计数)进行统计, 计算感染效率。感染的细胞在含有 2 μg/mL 的嘌呤霉素(puromycin, puro)或 1.5 μg/mL 的灭瘟素(blasticidin, BSD)的 DF-12 培养基中培养 3 d 进行纯化。

## 1.4 免疫荧光染色

采用 4%多聚甲醛将接种在玻片上细胞固定 18 min, 0.2% tritonX-100 通透 8 min, 接着用 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和 10%驴血清封闭 1 h, 然后将 CD29、CD44、CD73、CD90、CD34、CD45 (1:200, Bioss Biotechnology 公司)、TH (1:500, Abcam 公司)、GFAP (1:200, Abcam 公司)、DDC、GCH1 (1:500, Santa Cruz 公司)一抗与样品 4 °C 孵育过夜, 次日加入二抗 Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647 或 Cy3 (Jackson Labs 公司)室温孵育 1 h, DAPI 染核 5 min, 荧光显微镜(BX53, Olympus 公司)观察和分析染色结果。

## 1.5 Western blotting、RT-PCR 和 qRT-PCR

利用细胞总蛋白提取试剂盒提取各实验组总蛋白(上海碧云天生物有限公司), 经 BCA 法测定浓度, 各组样品均取 20 μg 总蛋白进行 8%

SDS-PAGE (恒压 120 V), 电转移至 PVDF 膜上 (恒流 120 mA), 加入封闭液在室温封闭 1 h, 加入 TH、DDC、GCH1 (1:500)、GAPDH (1:1 000, Proteintech 公司) 一抗孵育 4 °C 过夜, 次日二抗羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体、羊抗兔 IgG-HRP 抗体 (1:1 000, Invitrogen 公司) 室温孵育 1 h, ECL 化学显影液显影条带, 经凝胶成像仪 (Bio-Rad 公司) 图像采集, Image lab 软件对蛋白表达情况进行分析。

采用 Trizol 法 (Invitrogen 公司) 提取细胞总 RNA, 检测 RNA 样品的浓度, 进而使用 Prime Script™ RT Master Mix 试剂盒 (TaKaRa 公司) 将 RNA 逆转录成 cDNA, 并使用基因特异性引物进行 PCR 扩增 (引物序列见表 1), 产物经 1% 琼脂糖凝胶恒压电泳后, 经凝胶成像仪 (BIO-RAD 公司) 采集图像。

用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 测定 DA-BMSCs 中 TH、DDC 和 GCH1 的表达量。qRT-PCR 使用 TB Green™ Premix Ex

Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa 公司) 20 μL 体系, 循环条件如下: 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 40 次。以 GAPDH 为内参基因, 根据  $\Delta\Delta C_t$  法得出基因的相对表达量。使用 QuantStudio™ Real-Time PCR System 软件 (Applied Biosystems 公司) 对数据进行分析。

## 1.6 染色体 G 带分析

将三转基因感染纯化后 DA-BMSCs 培养至对数生长期, 每个 T25 培养瓶滴加 (10 μg/mL) 秋水仙素 100 μL, 培养 4 h 后, 消化收集细胞, 1 500 r/min 离心 10 min, 去上清, 加入 6 mL 低渗溶液 (75 mmol/L KCl) 吹打处理, 37 °C 低渗 30 min, 离心后加入 6 mL 固定液 (甲醇:冰醋酸=3:1) 混匀后 37 °C 静置 5 min。玻片预冷, 30 cm 高度滴片, 快速过火固定, 75 °C 烤片固定 7 h, 0.025% 胰酶消化 30 s, 吉姆萨 (Giemsa) 染色液染色 6 min, 在油镜下观察分布良好处于分裂中期的染色体核型, 并用 VideoTesT-Karyo 3.1 软件 (NatureGene Corp 公司) 进行分析<sup>[12]</sup>。

表 1 目的基因 PCR 扩增引物序列

Table 1 Primers used for target gene amplification

Name	Primer sequences (5'→3')	Bases	Size (bp)
H-TH-F	CCAGTCAGTCTACTTCGTGT	20	107
H-TH-R	TGTACGGGTCGAACTCA	18	
H-DDC-F	GATGCTGGAACACCAAAGG	20	279
H-DDC-R	CCTGATCGGATGAGTAAGC	19	
H-GCH1-F	AACGAGCTGAACCTCCCTA	19	170
H-GCH1-R	GCATCGTTTAGGACATCTGAG	21	
R-CD29-F	TTGCCAACCAAGTGACATA	19	582
R-CD29-R	CTCCAGCCAATCAGCGACC	19	
R-CD44-F	ATTCCCCAAAGGTGACGCT	19	310
R-CD44-R	AGGGCACGGATGCTCTAAC	19	
R-CD73-F	AGATGAAGTCACTGCGTTGC	20	509
R-CD73-R	TCAGGTTTCCCATGTTGC	18	
R-CD90-F	TCCAAGCCACGACTTCATTT	21	463
R-CD90-R	TACTGGGCGATACTTTCAACA	21	
R-CD34-F	TAACTTGACTTCTGTTGCCTCG	22	541
R-CD34-R	GCTCTTCTCCCCTTTCCTTC	20	
R-CD45-F	AAAGAGGAAATGGCTCCTCAG	21	258
R-CD45-R	CTATTTCTGTGCTTGTGGTGG	21	

F: Forward primer; R: Reverse primer.

## 1.7 DA 浓度测定

收集各组培养 3 d 的细胞上清液, 转移至无菌离心管中, 4 °C、3 000 r/min 离心 20 min, 留取上清, 保存在-80 °C待检。对移植 4 周的大鼠施行颈椎脱臼致死, 剥离脑组织。取移植区域脑组织, 称重, 加入 9 倍体积的 PBS 溶液, 冷冻破碎机破碎, 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 留取上清。使用多巴胺酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]检测 DA 浓度。反应孔中加入 50  $\mu$ L 的标准品或样本, 并立即加入 50  $\mu$ L 多巴胺抗体工作液, 封板后 37 °C 孵育 45 min。洗涤液洗涤 4 次后, 加入 100  $\mu$ L HRP 标记链霉亲和素工作液继续孵育 30 min。洗涤 4 次, 反应孔加入 90  $\mu$ L 显色剂 37 °C 避光显色 15 min。50  $\mu$ L 终止液终止显色, 酶标仪 450 nm 波长测定 OD 值, 计算浓度。

为了印证 ELISA 检测的上清液的 DA 结果, 采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 对上清液的 DA 水平进行检测。将上述处理后的上清样本 50  $\mu$ L 中加入 250  $\mu$ L 高氯酸沉淀剂 (含 0.35 mol/L 高氯酸和 1.5 mmol/L 半胱氨酸), 充分混匀后静置 10 min, 18 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清再次离心, 取上清待测。流动相由 50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 0.08 mmol/L EDTA 组成的 A 相, 以及甲醇组成 B 相构成。C18 柱 (YMC-Triart, 4.6 mm $\times$ 100 mm, 5  $\mu$ m) 为色谱柱, 柱温箱温度 40 °C。采用 15% B 相, 1 mL/mL 的等量洗脱程序。每个样本进样量 20  $\mu$ L, 分析 10 min。

## 1.8 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 诱导 PD 大鼠模型制备

3% 戊巴比妥腹腔注射麻醉 180–200 g 左右的 SD 大鼠, 待充分麻醉后固定于脑立体定位仪上, 剥离骨膜暴露大鼠颅骨, 参考大鼠脑立体定

位图谱<sup>[13]</sup>, 以大鼠脑前凶点为基点, 确定右侧前脑内侧束 (medial forebrain bundle, MFB) 注射位点: ① AP-4.4 mm, ML-1.2 mm, DV-7.8 mm; ② AP-4.0 mm, ML-0.8 mm, DV-8.0 mm。牙科钻颅骨钻孔, 每个位点用微量注射器以 1  $\mu$ L/2 min 的注射速度注射 4  $\mu$ L 的 4  $\mu$ g/ $\mu$ L 6-OHDA 溶液 (Sigma 公司, 溶于含有 0.2% 维生素 C 的生理盐水, -20 °C 保存), 留针 8 min。缓慢拔针, 缝合伤口。术后 1 周内连续腹腔注射青霉素, 预防术后感染, 并悉心观察术后恢复状态。

## 1.9 行为学检测

阿扑吗啡 (apomorphine, APO) 诱导旋转实验: 在建模后 2 周时, 对建模大鼠腹腔注射 0.5 mg/kg APO, 记录 30 min 大鼠的对侧旋转圈数, 若旋转圈数达 30 min > 210 圈, 即视为建模成功。细胞移植 4 周后, 对各组大鼠进行 APO 诱导旋转检测, 评估运动障碍改善情况。

## 1.10 大鼠分组和细胞移植

大鼠分组: 建模成功的 15 只大鼠随机分为 3 组: 模型组、BMSCs 组、DA-BMSCs 组, 并以 5 只同等条件喂养未做任何处理的 SD 大鼠为正常对照组。细胞移植: 收集细胞, PBS 溶液制成浓度约  $(1.25 \times 10^4) - (1.5 \times 10^4)$  / $\mu$ L 细胞悬液, 模型组以 PBS 溶液代替, 细胞移植操作同 PD 大鼠模型制备, 每只大鼠注入 8  $\mu$ L 细胞悬液。

## 1.11 脑组织切片制备

取术后 4 周的 PD 大鼠, 3% 戊巴比妥腹腔注射麻醉后固定于手术解剖台进行心脏灌注。提前引流瓶中准备 200 mL 生理盐水, 灌注针从左心室插入主动脉弓, 打开流量调节器, 并迅速剪开右心耳, 引流血液, 观察大鼠状态保证灌注通路流畅。待流出的液体澄清, 肝部苍白, 换用 200 mL 4% 多聚甲醛灌注固定。在冰上迅速剥离脑组织, 4% 多聚甲醛 4 °C 继续固定 4 h, 25% 蔗糖 4 °C 充分脱水, -80 °C 环境冻存。使用 OCT

包埋剂(Sakura 公司)包埋脑组织,冰冻切片机在 12–20  $\mu\text{m}$  切片厚度连续冠状切片,切片进行 DAPI 染色观察移植细胞存活情况。

### 1.12 数据统计

使用 Graph Pad Prism 7.0 统计学软件对各组 DA 浓度变化进行处理。组间比较采用单因素方差分析,进一步的组间两两比较采用 LSD 检验,多重比较采用 Sidak 检验。所得的实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 BMSCs 的分离培养和鉴定

从大鼠骨髓中冲出 BMSCs 经过一夜贴壁培养,粘附于培养瓶底部,呈成纤维细胞样的短梭形或者双极状,部分呈旋涡状,并混有部分其他骨髓细胞(图 1A1)。继续培养 7–10 d 后,可见成纤维样的细胞汇聚成紧密的单细胞层。

经连续传代至 P4,可获得典型的纺锤形成纤维样单细胞层,形态均一,增殖能力强(图 1A2)。传至 P6 仍具有较好的稳定性,细胞的形态和增殖能力均未见明显的形态差异(图 1A3)。P10 以后细胞逐渐呈现扁平化,胞体的轮廓不清晰,细碎颗粒感增强,增殖能力和折光性均下降。将纯化后 P4 的 BMSCs 以 100/皿的细胞密度接种于细胞培养皿中培养 10–14 d 左右,可明显观察到间充质干细胞的克隆样成团生长现象,用结晶紫染色后呈现紧密的细胞团结构(图 1A4)。

免疫荧光和 RT-PCR 检测表明,培养的 BMSCs (P3)能够显著表达间充质干细胞表面抗原标志物 CD29、CD44、CD73、CD90,而不表达造血谱系细胞标志物 CD34 和 CD45 (图 1B–C),符合间充质来源的干细胞特征性标志物特征,表明已成功分离培养出纯化的 BMSCs。

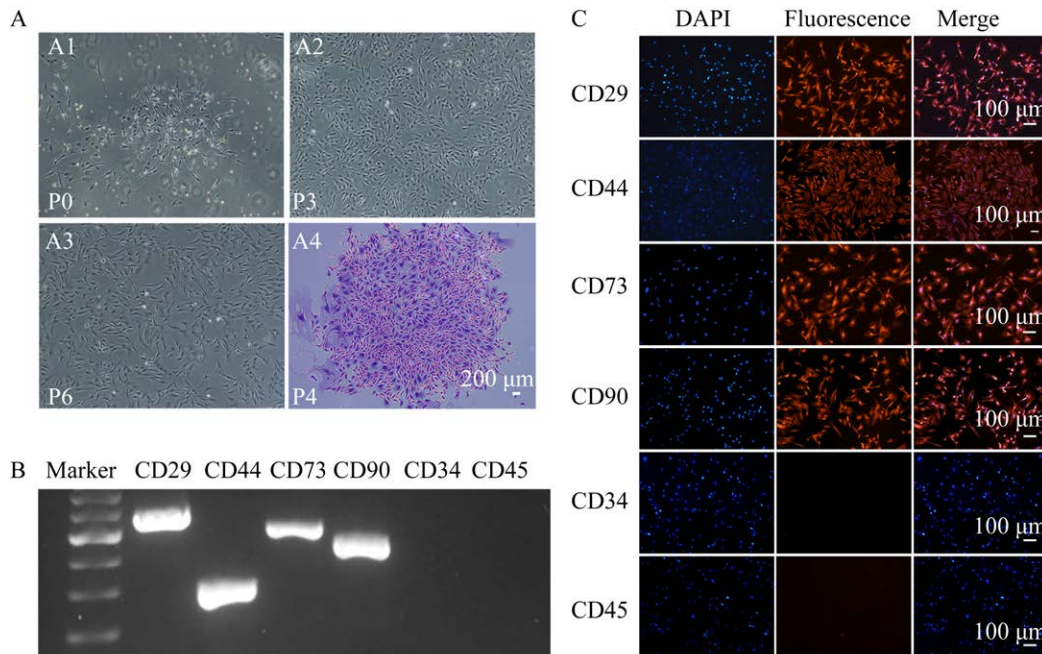


图 1 BMSCs 的细胞形态、克隆团形成以及特异性标记物的检测

Figure 1 Cell morphology, clonal cluster formation and detection of specific markers of BMSCs. A1: Cells of P0; A2: Cells of P3; A3: Cells of P6; A4: Clonal cluster of the P4 cells stained with crystal violet. B: mRNA expression levels of specific marker genes were detected by RT-PCR. C: Immunofluorescent staining of specific markers in BMSCs.

## 2.2 过表达 TH、DDC、GCH1 基因慢病毒载体的构建和感染 BMSCs 后荧光蛋白表达

选用第 2 代三载体慢病毒系统, 以确保慢病毒载体能够安全和有效地应用于 BMSCs 细胞系。构建的携带 3 种关键酶基因的 2 种慢病毒载体示意图结构如图 2A 所示, 其中 DDC 和 GCH1 基因插入同一个慢病毒载体 LV-ZsGreen 中, 用自剪切多肽 T2A 相连, 而 TH 插入另一

个慢病毒载体 LV-mCherry 中, LV-TH 过表达慢病毒和对应对照病毒携带荧光蛋白基因 *mCherry* 和抗性基因 *puro*, 表达红色荧光蛋白; LV-DDC-GCH1 过表达慢病毒和对应对照病毒携带荧光蛋白基因 *ZsGreen* 和抗性基因 *BSD*, 表达绿色荧光蛋白。慢病毒载体上的荧光蛋白基因和抗性基因的表达均通过 *EF1* 启动子驱动表达。

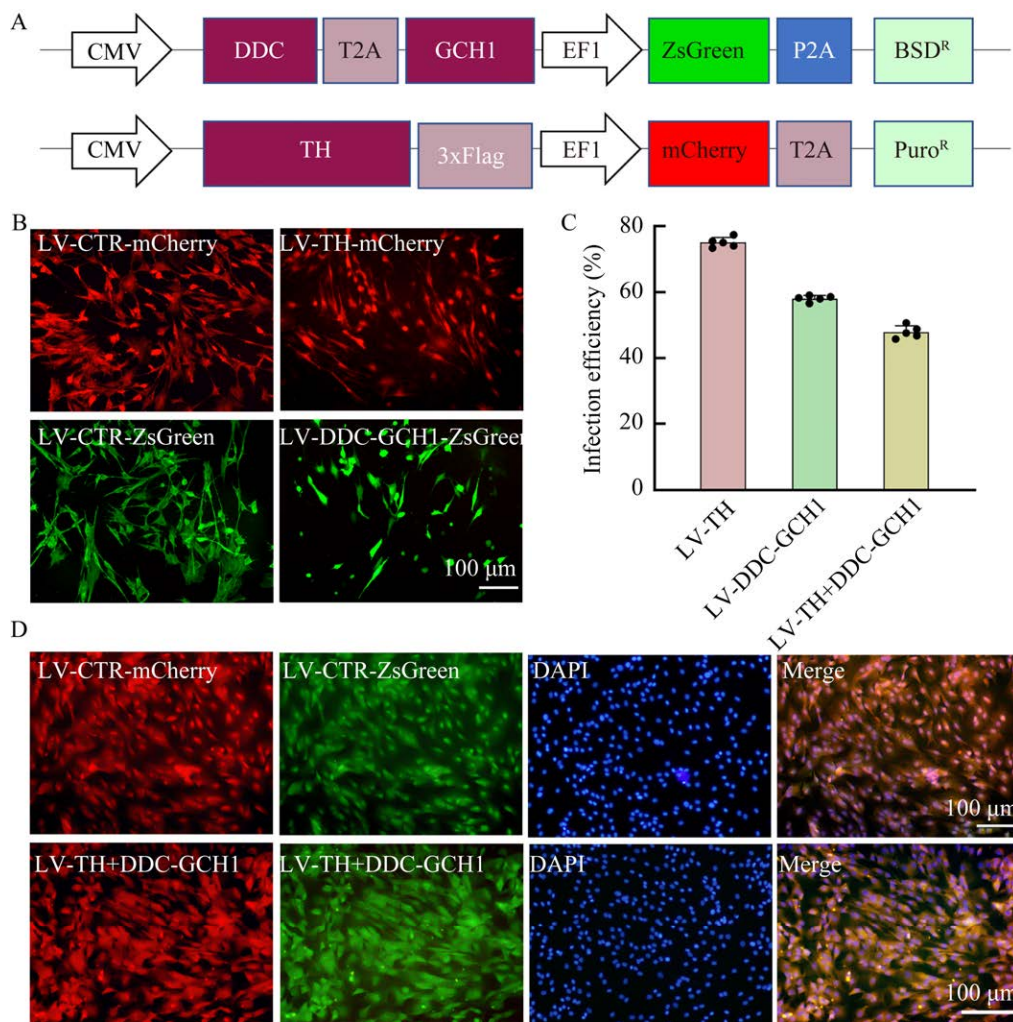


图 2 构建的慢病毒载体结构和感染 BMSCs 后荧光表达情况

Figure 2 Structure of the constructed lentiviral vectors and fluorescent protein expression of infected BMSCs. A: Structure of the constructed lentiviral vectors. B: Fluorescent protein expression of control lentivirus and single overexpressing lentivirus three days after infection of BMSCs. C: Infection efficiency of the constructed lentivirus. D: Fluorescence expression of BMSCs that could stably express two overexpressing lentiviruses or control lentiviruses simultaneously after purification. Scale bar=100 μm, data was presented as  $\bar{x} \pm s$ .



慢病毒在助转剂聚凝胺的作用下感染 BMSCs 细胞系 2 d 后出现荧光, 3 d 后达到丰度。采用免疫荧光显微镜分析荧光蛋白的表达确定慢病毒的感染效率。如图 2B 所示, 感染 BMSCs 细胞系 3 d 后, 可见对照病毒和目的基因慢病毒均得到良好的表达, 对照慢病毒的荧光强度比目的基因慢病毒相对较强。慢病毒 LV-TH 的感染效率为  $75.04\% \pm 0.68\%$ , LV-DDC-GCH1 的感染效率为  $58.05\% \pm 0.92\%$ , 双病毒同时感染的感染效率为  $47.89\% \pm 1.89\%$  (图 2C)。BMSCs 在病毒感染 3 d 后经胰蛋白酶消化、传代以及冻存复苏,

仍具有良好的细胞活性和较强的荧光蛋白表达, 可用于建立稳定的感染细胞系。将两种慢病毒同时感染 BMSCs, 感染 3 d 后根据慢病毒载体上携带的抗性基因进行抗生素筛选, 得到三转基因 (TH/DDC/GCH1) 感染的 BMSCs 细胞系, 细胞的 2 种荧光蛋白表达强度明显增强 (图 2D)。

### 2.3 过表达 LV-DDC-GCH1、LV-TH 慢病毒感染 BMSCs 后目的基因表达

通过 Western blotting (图 3A、3C) 和 RT-PCR (图 3B) 分析病毒感染后各实验组 TH、DDC、GCH1 的表达, 结果显示 DDC 和 GCH1

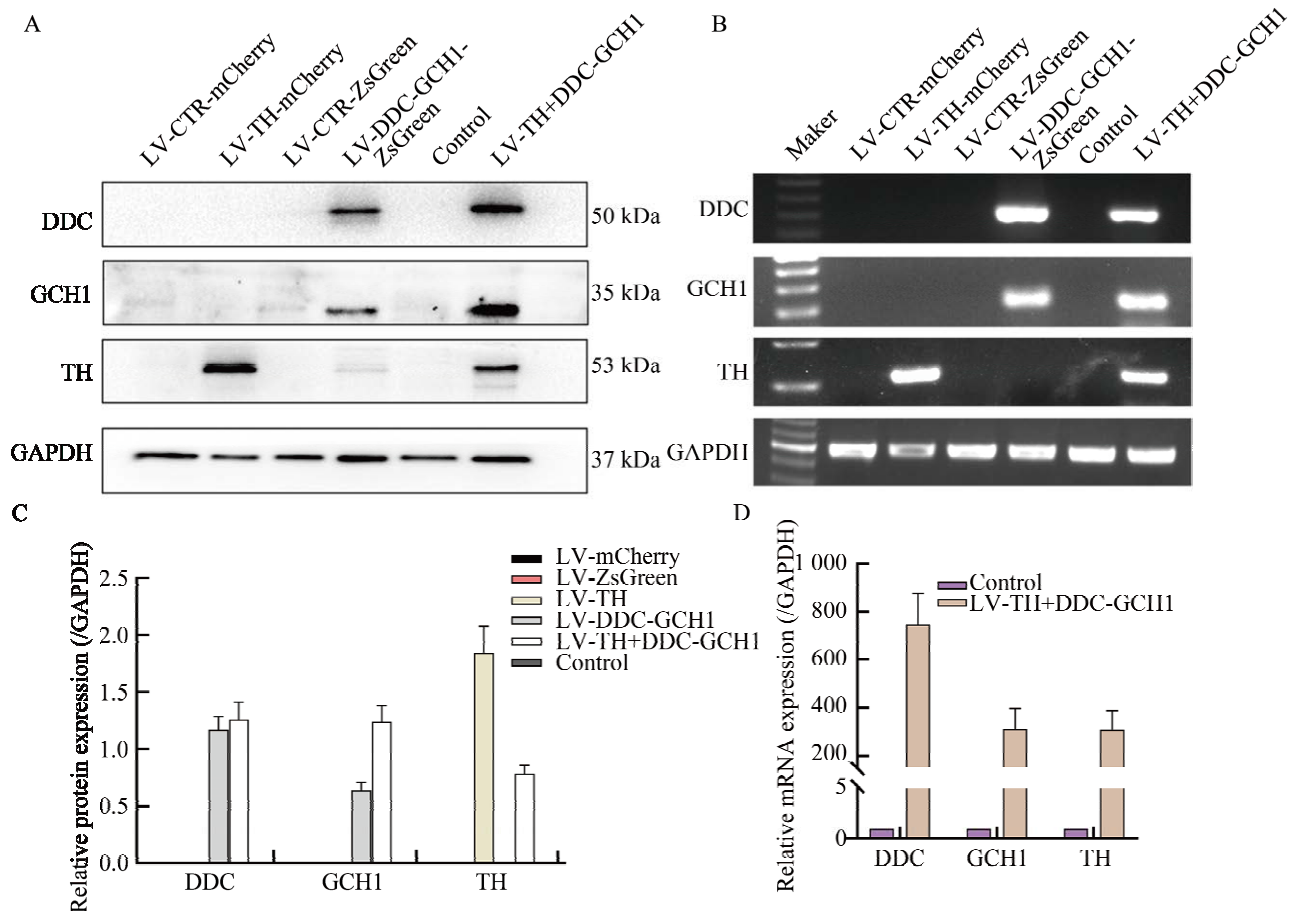


图3 慢病毒感染 BMSCs 后 TH、DDC 和 GCH1 表达

Figure 3 Expressions of TH, DDC and GCH1 genes in transduced rat BMSCs. A: Relative intensity of TH, DDC and GCH1 protein was analyzed by Western blotting in each group. B: Relative mRNA levels of TH, DDC and GCH1 were analyzed by RT-PCR. C: Relative protein expression of TH, DDC, and GCH1. D: Relative mRNA expression of TH, DDC, and GCH1. Data was presented as  $\bar{x} \pm s$ .

基因在 LV-DDC-GCH1 感染组和三转基因感染组(LV-TH+DDC-GCH1)表达, LV-TH 感染组、各对照慢病毒感染组(LV-CTR-mCherry、LV-CTR-ZsGreen)和无病毒感染的空白对照组(control)均未表达; TH 基因在 LV-TH 感染组和三转基因感染组表达, LV-DDC-GCH1 感染组、对照慢病毒感染组和 Control 组都未显出有基因的表达, 符合预期结果。

qRT-PCR 结果显示(图 3D), 相对于对照组, 三转基因感染组的 DDC、GCH1 和 TH 基因表达量分别上升(746.90±129.61)倍、(309.57±87.70)倍和(306.88±82.44)倍, 结果具有极显著差异。

以上结果表明创建的三转基因慢病毒感染 BMSCs 细胞系, 能够稳定过表达 TH、DDC 和 GCH1 3 种 DA 合成途径的限速酶。

## 2.4 各组细胞培养上清液中分泌 DA 的浓度检测

收集感染后第 1 代和第 2 代各组细胞的培养 3 d 的细胞培养上清液, 使用 ELISA 试剂盒检测各组的上清液中的 DA 浓度(图 4A)。结果表明, 第 1 代的对照组、LV-TH 感染组、LV-DDC-GCH1 感染组、三转基因感染组的 DA 浓度分别为 (187.20±38.52) pg/mL、(1 191.00±90.31) pg/mL、(322.50±52.23) pg/mL、(2 451.00±240.30) pg/mL。第 2 代的对照组、LV-TH 感染组、LV-DDC-GCH1 感染组、三转基因感染组的 DA 浓度分别为 (139.80±39.03) pg/mL、(935.80±161.20) pg/mL、(366.90±124.80) pg/mL、(2 100.00±240.90) pg/mL。两代的细胞, 与各自的对照组相比, 三转基因感染组和 LV-TH 感染组均极其显著高于对照组 ( $P < 0.000 1$ )。其中第 1 代的三转基因感染组

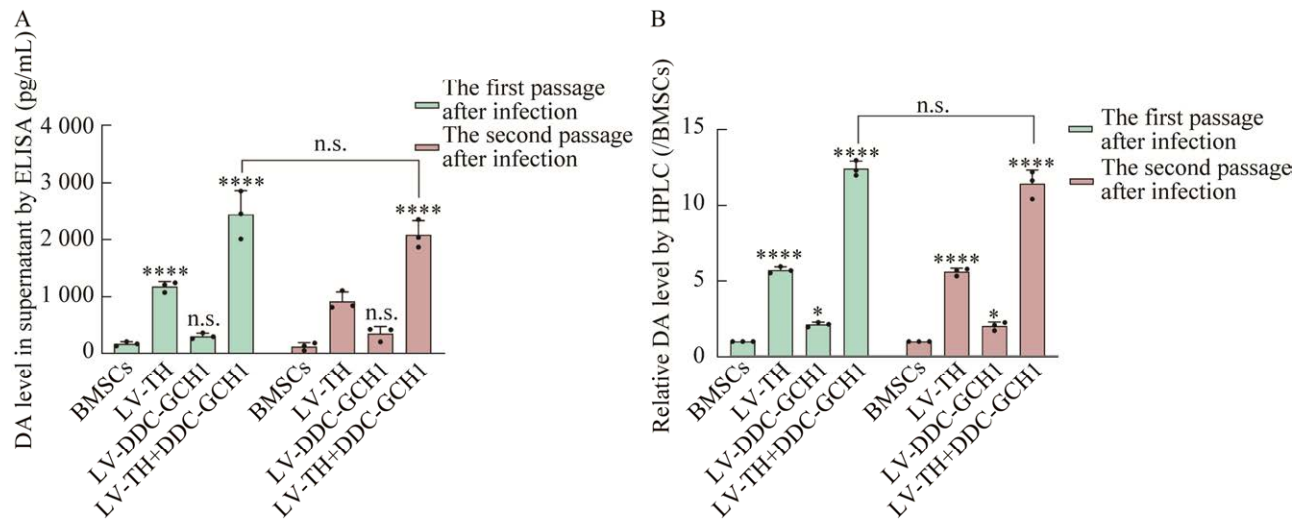


图 4 各组细胞培养上清液中 DA 浓度

Figure 4 Concentration of DA in culture supernatant of cells of each group. A: DA level in culture supernatant by ELISA. Compared with the respective control group, LV-TH+DDC-GCH1 group and LV-TH infection group were significantly higher than that of the control group. Compared with the first passage after infection, the expression of DA in LV-TH+DDC-GCH1 group had no significant change in the second passage after infection. B: Relative DA level by HPLC. Data was presented as  $\bar{x} \pm s$ . n.s.=No significance; \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*  $P < 0.000 1$ .

的 DA 浓度是对照组的 13.09 倍, 而 LV-TH 感染组 DA 浓度是对照组的 6.37 倍。第 2 代的三转基因感染组的 DA 浓度是对照组的 15.02 倍, LV-TH 感染组的 DA 浓度是对照组的 6.69 倍。相比之下, LV-DDC-GCH1 感染组的 DA 浓度提高均并不明显, 与对照组相比无统计学意义 ( $P>0.05$ )。两代各组之间比较无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

此外, HPLC 的 DA 检测结果也印证 ELISA 结果(图 4B)。与各自的对照组相比, 三转基因感染组的 DA 水平均极其显著的上升( $P<0.0001$ )。其中第一代的三转基因感染组的 DA 水平上升了( $12.45\pm 0.50$ )倍, 第 2 代的三转基因感染组上升了( $11.44\pm 0.92$ )倍。

综上所述, 表明 TH 相对于 DDC-GCH1 这两个关键酶组合, 更有利于促进 DA 的合成。慢病毒感染的细胞传代以后, 能稳定合成 DA。本研究成功创建了稳定高效表达 DA 的 BMSCs (DA-BMSCs) 细胞系。

## 2.5 DA-BMSCs 染色体核型分析

为了确定慢病毒感染后, 是否对 BMSCs 的染色体稳定性有所影响, 我们对 DA-BMSCs 进行染色体 G-显带核型分析。发现感染后的 BMSCs 的染色体数目  $2n=42$  的频率为 94.5%, 染色体结构未见异常, 表明 DA-BMSCs 细胞系

能够保持其正常二倍体核型, 未受慢病毒感染的影 响, 具有良好的遗传稳定性(图 5)。

## 2.6 细胞移植 PD 大鼠

PD 大鼠建模、分组和行为学检测的时间流程图如图 6A 所示。图 6B 是 6-OHDA 损伤和细胞移植的脑内 MFB 位点的示意图。将 DA-BMSCs 借助脑立体定位仪(图 6C)移植 PD 大鼠模型 MFB 区, 在移植后 4 周时, APO 诱导对侧旋转实验(图 6D)检测各组大鼠运动障碍情况。结果显示(图 6E), 模型组、BMSCs 组和 DA-BMSCs 组的 4 周 APO 诱导旋转圈数分别为  $306\pm 15$ 、 $254\pm 16$ 、 $154\pm 15$ 。相较于模型组, DA-BMSCs 组和 BMSCs 组的旋转行为均显著下降( $P<0.05$ )。其中 DA-BMSCs 组下降得更为明显 ( $P<0.0001$ ), 对照组因未受到损伤, 未出现 APO 诱导旋转行为。综上所述, DA-BMSCs 移植 PD 大鼠模型 4 周时运动障碍行为极其显著改善。

## 2.7 脑切片免疫荧光

DA-BMSCs 移植 4 周后, 大鼠全脑冠状面冰冻切片免疫荧光检测显示, DA-BMSCs 在大鼠脑内移植位点能够存活, 可见存在大量的细胞表达荧光(图 7A1), 形成明显的移植区域, 并有一部分细胞发生远距离迁移。而且移植细胞形态大多呈球形或多边形, 同时表达红色 mCherry 和绿色荧光 ZsGreen 的细胞系为移植脑内 DA-BMSCs,

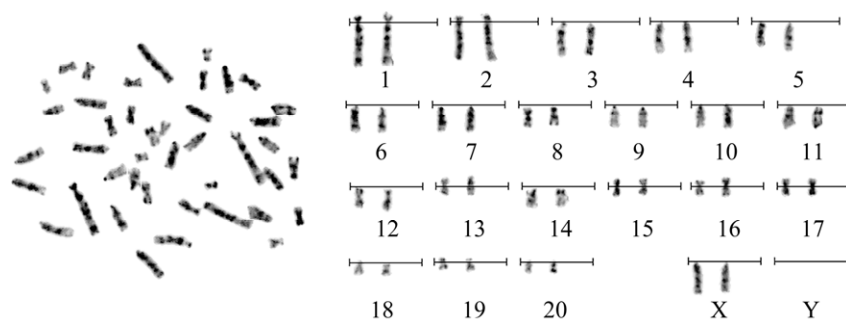


图 5 大鼠 DA-BMSCs 核型(42, XX)

Figure 5 Karyotype of rat DA-BMSCs (42, XX).

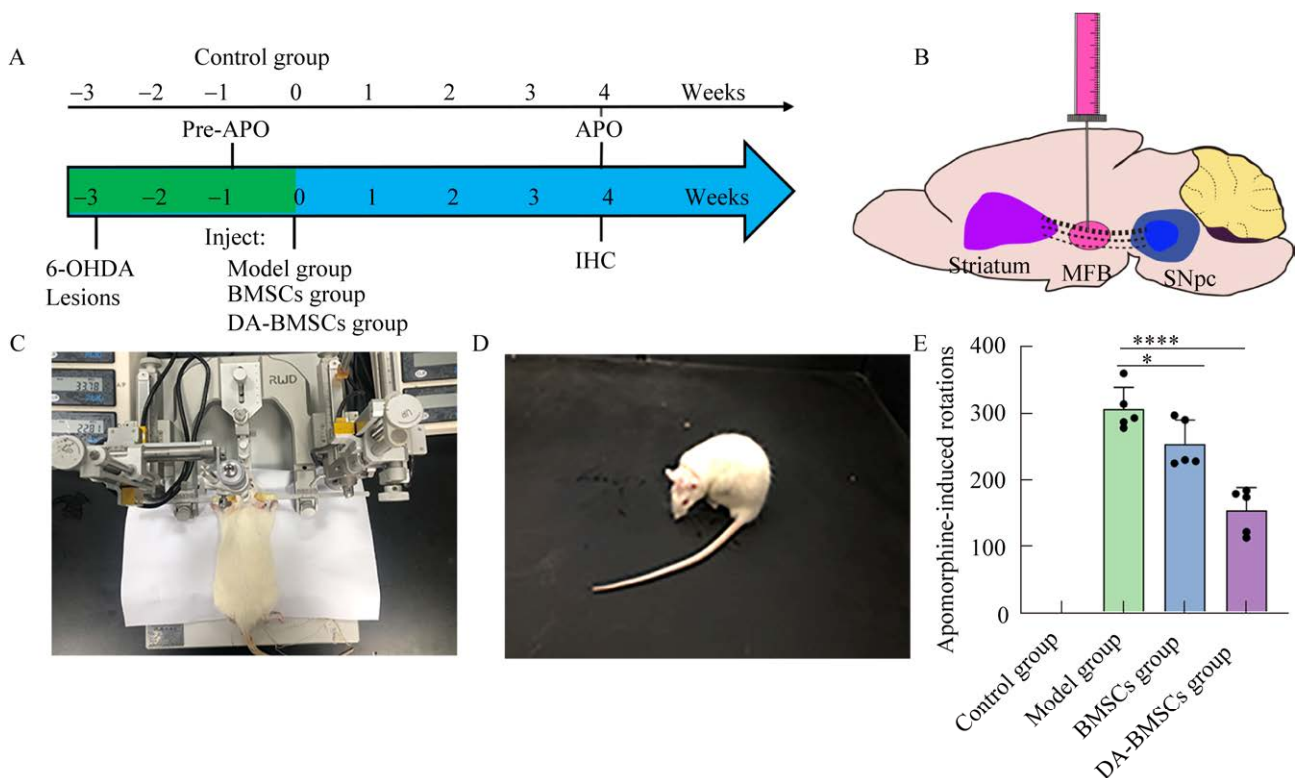


图 6 6-OHDA 诱导的 PD 大鼠模型和 DA-BMSCs 移植后行为学评估

Figure 6 6-OHDA-induced PD model of rats and behavioral evaluation after DA-BMSCs transplantation. A: A flow chart for experimental design and animal groups. B: The sites of cells transplantation and 6-OHDA injury. C: The experimental rats were fixed on the stereotaxic apparatus, and the rat model of Parkinson's disease was induced. D: Apomorphine-induced rotations. E: Rotation behavior evaluation of each group for 30 min after injected 4 weeks. Data was presented as  $\bar{x} \pm s$ . \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

部分聚集于 PD 大鼠模型 6-OHDA 损伤部位，表明移植到 PD 大鼠脑组织中的 DA-BMSCs 散布于移植区域各处，能大量存活(图 7A2)。移植的 DA-BMSCs 在脑内能表达星形胶质细胞标志物 GFAP 和多巴胺能神经元标志物 TH (图 7B)，具有分化为多种神经元的能力。这些结果表明移植到 PD 大鼠脑组织中的 DA-BMSCs 不仅能大量存活，而且还能分化为多巴胺能神经元和星形胶质细胞，参与 PD 大鼠的损伤修复。

## 2.8 脑移植区的 DA 浓度

DA-BMSCs 移植 4 周后，ELISA 检测大鼠脑内移植区域的 DA 浓度。结果表明(图 8)，对照组、模型组、BMSCs 组和 DA-BMSCs 组的 DA 浓度分别为(419.5±10.4) pg/g、(61.86±7.09) pg/g、(120.30±6.32) pg/g 和(273.6±9.97) pg/g。相较于模型组，BMSCs 组和 DA-BMSCs 组的 DA 浓度均显著上调，具有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中 BMSCs 组 DA 浓度上调了 1.94 倍，DA-BMSCs 组上调了 4.42 倍。

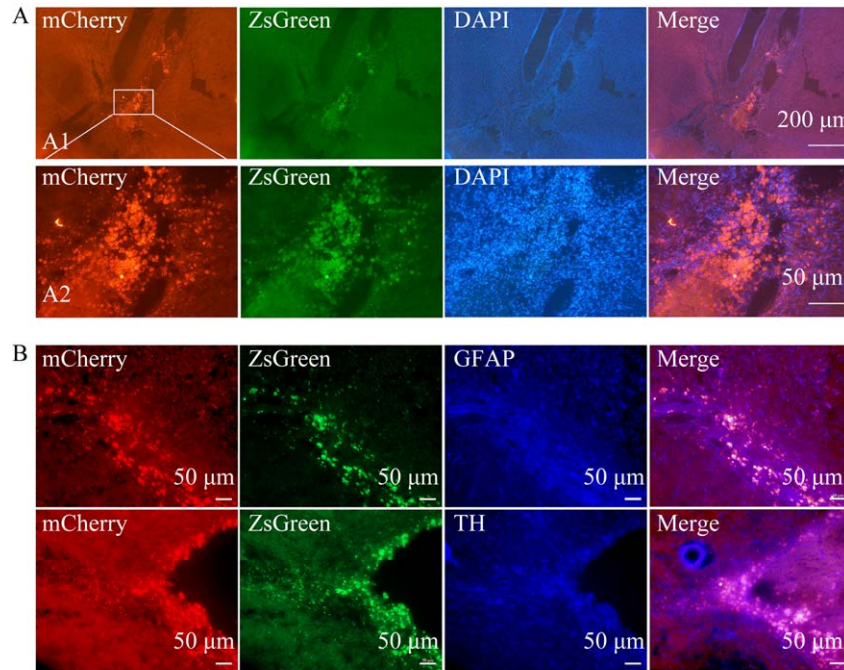


图 7 移植 DA-BMSCs 4 周后注射部位的荧光表达

Figure 7 Fluorescence expression at the injection site 4 weeks after transplantation of DA-BMSCs. A: There were a large amount of DA-BMSCs at the injection site. A2 was the enlarged view of A1. DA-BMSCs were spherical and polygonal. Immunofluorescence showed mCherry (red), ZsGreen (green), and nucleus (blue) in DA-BMSCs. B: DA-BMSCs transplanted for 4 weeks differentiated into GFAP<sup>+</sup> and TH<sup>+</sup> neurons *in vivo*.

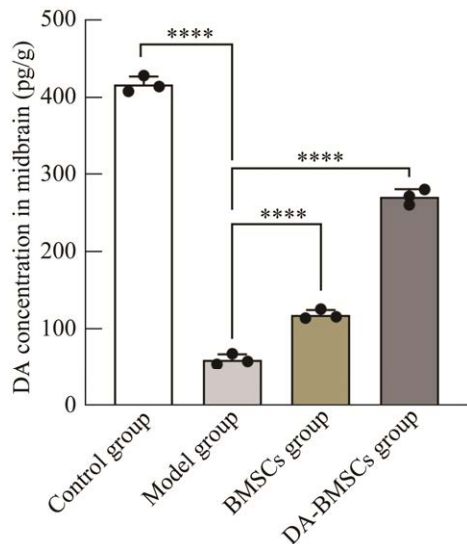


图 8 脑移植区域的 DA 浓度

Figure 8 DA concentration in the brain transplanted area. Compared with the model group, the DA concentration in the BMSCs group and the DA-BMSCs group was significantly upregulated. Data was presented as  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

### 3 讨论与结论

MSCs 具有低免疫排斥反应、无畸胎瘤和伦理问题、易于获取等优点, 并且 MSCs 还具有旁分泌作用和抗凋亡作用, 能够释放细胞因子, 改善周围微环境, 迁移到损伤区域并参与修复能力<sup>[14-15]</sup>, 因此, MSCs 已成为干细胞治疗帕金森病的热点细胞之一。然而, MSCs 虽然具有分化为神经细胞的能力, 却无法大量定向分化为能够合成和分泌 DA 的多巴胺神经元, 并在体内发挥功能。通过基因治疗联合 MSCs, 获得大量稳定合成和分泌 DA 的 MSCs 细胞, 从根本上治疗 PD, 因此如何改造 MSCs 也成为治疗 PD 的焦点和热点。

目前基因编辑治疗 PD 主要集中在 3 个方向: 恢复神经递质失衡的相关基因<sup>[16-18]</sup>; 提高神

神经元存活率的相关基因<sup>[19-20]</sup>;控制发病机制的相关基因的表达<sup>[21]</sup>。PD 神经通路上的神经递质主要为多巴胺和  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA), 通过控制神经递质合成路径上关键酶基因的表达就可以调节神经元信号, 恢复神经递质失衡来治疗 PD<sup>[22]</sup>。

TH、DDC 和 GCH1 作为多巴胺合成路径上的关键酶, 有研究表明注射腺病毒 AAV-TH、AAV-DDC 和 AAV-GCH1 到 PD 动物模型大脑纹状体中, 能显著提高其脑内 DA 的合成, 改善其行为学缺陷, 并且单独注射 AAV-TH 相对于 AAV-DDC 和 AAV-GCH1 导致更多的 DA 产生和行为学改善<sup>[23]</sup>。另外有研究显示 AAV-DDC 移植到 PD 患者脑内, 能够显著改善患者的行为障碍, 提高患者生活质量<sup>[24]</sup>。但向脑内直接注射病毒, 感染细胞类型和定位具有不确定性, 是否会影响脑内重要细胞的活性和功能, 有待进一步研究。此外, 相对于慢病毒, 腺病毒不能保证基因长期稳定表达。

本研究通过构建过表达 TH、DDC 和 GCH1 三转基因的重组慢病毒, 感染 BMSCs, 使原本不产生 DA 的 BMSCs 高效合成 DA, 从而替代 PD 脑中脑黑质中缺失的多巴胺能神经元, 发挥合成 DA 递质的功能。但由于构建同时能表达 TH、DDC 和 GCH1 3 个基因的慢病毒载体分子量过大, 不利于慢病毒的感染。因此, 本研究构建了 2 个慢病毒载体, 分别携带 TH 和 DDC-GCH1 基因。通过感染 BMSCs 后慢病毒载体上携带的荧光蛋白表达表明慢病毒转染成功, 并分别运用 Western blotting 法和 RT-PCR 法检测各组的 TH、DDC 和 GCH1 的表达差异, 表明三转基因感染组同时过表达 DDC、GCH1 和 TH 基因。因此, 本研究成功使原本不表达 DDC、GCH1 和 TH 基因的 BMSCs 高表达这些关键酶基因。

HPLC 和 ELISA 的检测培养上清液结果表

明, 三转基因感染组和 LV-TH 感染组都比空白对照组 DA 合成量有极其显著的提高, 而 LV-DDC-GCH1 感染组的 DA 合成量相较于空白对照组提高并不明显, 传代后的细胞依旧能稳定合成多巴胺。令人意外的是, 我们的结果表明, 同样作为 DA 合成路径的关键酶, TH 比 DDC、GCH1 具有更高的促进 DA 合成的能力。有研究表明, PD 主要是  $\alpha$  突触核蛋白抑制 TH 色氨酸 (Ser40) 磷酸化, 使得 TH 活性失调, 从而导致 DA 合成减少引起的<sup>[25]</sup>。因此, TH 活性对于 PD 至关重要。

而创建的 DA-BMSCs 细胞系能否在体内存活, 对移植治疗 PD 大鼠模型亦至关重要。作为多巴胺神经毒素的 6-OHDA, 能够诱导多巴胺神经元死亡, 已被广泛应用于 PD 动物实验模型的构建<sup>[26-27]</sup>。APO 诱导的不对称旋转实验是由于脑内双侧多巴胺受体 D2 被 APO 激活不一致引起对侧旋转运动, 因而被认为是检测单侧注射 6-OHDA 引起的运动障碍病变强度的国际通用标准<sup>[28-29]</sup>。PD 动物模型的 APO 诱导旋转实验的旋转圈数的下降视为行为学的改善。将 DA-BMSCs 移植到大鼠右侧前脑内侧束区 4 周后, PD 大鼠模型的 APO 诱导旋转实验圈数显著下降, 运动障碍行为得到极其显著改善。全脑切片的免疫荧光检测显示, 移植的 DA-BMSCs 可在宿主脑内大量存活并形成明显的移植区域, 而且携带的荧光蛋白也强烈表达。移植的 DA-BMSCs 在体内分化为多巴胺能神经元和星形胶质细胞, 并显著上调脑中的 DA 浓度, 从而显著改善 PD 大鼠行为障碍。因此相较于未改造的 BMSCs, 基因改造的 DA-BMSCs 不仅具有 BMSCs 原本的功能, 还兼具了合成 DA 的功能, 可替代中脑黑质中多巴胺神经元合成 DA 的功能, 对黑质-纹状体多巴胺环路发挥修复效应。

综上所述, 本研究通过利用慢病毒感染法创

建了能稳定合成 DA 三转基因 BMSCs 细胞系, 并具备体内与体外分泌 DA 的潜能, 为 DA-BMSCs 工程化培养与移植治疗 PD 奠定基础。

## REFERENCES

- [1] GIL-MARTINEZ AL, CUENCA-BERMEJO L, GONZALEZ-CUELLO AM, SANCHEZ-RODRIGO C, PARRADO A, VYAS S, FERNANDEZ-VILLALBA E, HERRERO MT. Identification of differentially expressed genes profiles in a combined mouse model of Parkinsonism and colitis[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 13147.
- [2] BJÖRKLUND A, DUNNETT SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update[J]. *Trends in Neurosciences*, 2007, 30(5): 194-202.
- [3] POEWE W, SEPPI K, TANNER CM, HALLIDAY GM, BRUNDIN P, VOLKMANN J, SCHRAG AE, LANG AE. Parkinson disease[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3: 17013.
- [4] BUTTERY PC, BARKER RA. Treating Parkinson's disease in the 21st century: can stem cell transplantation compete?[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2014, 522(12): 2802-2816.
- [5] SUGAYA K, VAIDYA M. Stem Cell Therapies for Neurodegenerative Diseases[A]// *Advances in Experimental Medicine and Biology[M]*. Cham: Springer International Publishing, 2018: 61-84.
- [6] NAGATSU T, NAGATSU I. Tyrosine hydroxylase (TH), its cofactor tetrahydrobiopterin (BH4), other catecholamine-related enzymes, and their human genes in relation to the drug and gene therapies of Parkinson's disease (PD): historical overview and future prospects[J]. *Journal of Neural Transmission*, 2016, 123(11): 1255-1278.
- [7] CARLSSON T, BJÖRKLUND T, KIRIK D. Restoration of the striatal dopamine synthesis for parkinson's disease: viral vector-mediated enzyme replacement strategy[J]. *Current Gene Therapy*, 2007, 7(2): 109-120.
- [8] ZHU YZ, ZHANG J, ZENG YJ. Overview of tyrosine hydroxylase in parkinson's disease[J]. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 2012, 11(4): 350-358.
- [9] CEDERFJÄLL E, SAHIN G, KIRIK D, BJÖRKLUND T. Design of a single AAV vector for coexpression of TH and GCH1 to establish continuous DOPA synthesis in a rat model of parkinson's disease[J]. *Molecular Therapy*, 2012, 20(7): 1315-1326.
- [10] ROSENBLAD C, LI Q, PIOLI EY, DOVERO S, ANTUNES AS, AGÚNDEZ L, BARDELLI M, LINDEN RM, HENCKAERTS E, BJÖRKLUND A, BEZARD E, BJÖRKLUND T. Vector-mediated L-3,4-dihydroxyphenylalanine delivery reverses motor impairments in a primate model of Parkinson's disease[J]. *Brain*, 2019, 142(8): 2402-2416.
- [11] NUTT JG, CURTZE C, HILLER A, ANDERSON S, LARSON PS, van LAAR AD, RICHARDSON RM, THOMPSON ME, SEDKOV A, LEINONEN M, RAVINA B, BANKIEWICZ KS, CHRISTINE CW. Aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy enhances levodopa response in parkinson's disease[J]. *Movement Disorders*, 2020, 35(5): 851-858.
- [12] LI XC, GUO Y, YAO YX, HUA JL, MA YH, LIU CQ, GUAN WJ. Reversine increases the plasticity of long-term cryopreserved fibroblasts to multipotent progenitor cells through activation of Oct4[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2016, 12(1): 53-62.
- [13] PAXINOS G, WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates[M]*. 6th ed. Amsterdam, The Netherlands: Academic Press/Elsevier, 2007
- [14] TEIXEIRA FG, CARVALHO MM, PANCHALINGAM KM, RODRIGUES AJ, MENDES-PINHEIRO B, ANJO S, MANADAS B, BEHIE LA, SOUSA N, SALGADO AJ. Impact of the secretome of human mesenchymal stem cells on brain structure and animal behavior in a rat model of parkinson's disease[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2017, 6(2): 634-646.
- [15] ARUTYUNYAN I, ELCHANINOV A, MAKAROV A, FATKHUDDINOV T. Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy[J]. *Stem Cells International*, 2016, 2016: 1-17.
- [16] SAN SEBASTIAN W, RICHARDSON RM, KELLS AP, LAMARRE C, BRINGAS J, PIVIROTTI P, SALEGIO EA, DeARMOND SJ, FORSAYETH J, BANKIEWICZ KS. Safety and tolerability of magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery of AAV2-hAADC with a novel delivery platform in nonhuman primate *Striatum*[J]. *Human Gene Therapy*, 2012, 23(2): 210-217.
- [17] CEDERFJÄLL E, BROOM L, KIRIK D. Controlled striatal DOPA production from a gene delivery system in a rodent model of parkinson's disease[J]. *Molecular Therapy*, 2015, 23(5): 896-906.
- [18] LUO J, KAPLITT MG, FITZSIMONS HL, ZUZGA DS, LIU YH, OSHINSKY ML, DURING MJ. Subthalamic *GAD* gene therapy in a parkinson's disease rat model[J]. *Science*, 2002, 298(5592): 425-429.

- [19] GANTNER CW, de LUZY IR, KAUHAUSEN JA, MORIARTY N, NICLIS JC, BYE CR, PENNA V, HUNT CPJ, ERMINE CM, POUTON CW, KIRIK D, THOMPSON LH, PARISH CL. Viral delivery of GDNF promotes functional integration of human stem cell grafts in parkinson's disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(4): 511-526.e5.
- [20] REN ZH, WANG JY, WANG SY, ZOU CL, LI XB, GUAN YQ, CHEN ZG, ALEX ZHANG Y. Autologous transplantation of GDNF-expressing mesenchymal stem cells protects against MPTP-induced damage in cynomolgus monkeys[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2786.
- [21] BENSKEY MJ, SELLSNOW RC, SANDOVAL IM, SORTWELL CE, LIPTON JW, MANFREDSSON FP. Silencing alpha synuclein in mature nigral neurons results in rapid neuroinflammation and subsequent toxicity[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018, 11: 36.
- [22] ROBERTS BM, DOIG NM, BRIMBLECOMBE KR, LOPES EF, SIDDORN RE, THRELFELL S, CONNOR-ROBSON N, BENGGA-VERGNIORY N, PASTERNAK N, WADE-MARTINS R, MAGILL PJ, CRAGG SJ. GABA uptake transporters support dopamine release in dorsal striatum with maladaptive downregulation in a Parkinsonism model[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4958.
- [23] SHEN Y, MURAMATSU SI, IKEGUCHI K, FUJIMOTO KI, FAN DS, OGAWA M, MIZUKAMI H, URABE M, KUME A, NAGATSU I, URANO F, SUZUKI T, ICHINOSE H, NAGATSU T, MONAHAN J, NAKANO I, OZAWA K. Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of parkinson's disease[J]. *Human Gene Therapy*, 2000, 11(11): 1509-1519.
- [24] MITTERMEYER G, CHRISTINE CW, ROSENBLUTH KH, BAKER SL, STARR P, LARSON P, KAPLAN PL, FORSAYETH J, AMINOFF MJ, BANKIEWICZ KS. Long-term evaluation of a phase 1 study of *AADC* gene therapy for parkinson's disease[J]. *Human Gene Therapy*, 2012, 23(4): 377-381.
- [25] KEO A, MAHFOUZ A, INGRASSIA AMT, MENEBOO JP, VILLENET C, MUTEZ E, COMPTDAER T, LELIEVELDT BPF, FIGEAC M, CHARTIER-HARLIN MC, van de BERG WDJ, van HILTEN JJ, REINDERS MJT. Transcriptomic signatures of brain regional vulnerability to Parkinson's disease[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 101.
- [26] ZHANG LW, PENG SJ, SUN JY, YAO J, KANG J, HU YS, FANG JG. A specific fluorescent probe reveals compromised activity of methionine sulfoxide reductases in Parkinson's disease[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(4): 2966-2972.
- [27] WESTPHAL R, SIMMONS C, MESQUITA MB, WOOD TC, WILLIAMS SCR, VERNON AC, CASH D. Characterization of the resting-state brain network topology in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0172394.
- [28] PANDY V, NARASINGAM M, MOHAMED Z. Antipsychotic-like activity of noni (*Morinda citrifolia* linn.) in mice[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 12(1): 1-9.
- [29] ANTIPOVA VA, HOLZMANN C, SCHMITT O, WREE A, HAWLITSCHKA A. Botulinum neurotoxin A injected ipsilaterally or contralaterally into the *Striatum* in the rat 6-OHDA model of unilateral Parkinson's disease differently affects behavior[J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2017, 11: 119.

(本文责编 郝丽芳)