



人羊膜上皮细胞治疗中枢神经系统疾病

曲春辉, 秦 川, 巨荣凯

(北京协和医学院中国医学科学院医学实验动物研究所病理室, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)是从胎盘内膜内壁分离纯化的一种可表达干细胞表面标记物的细胞。受精后第 8 天 hAECs 开始形成, 这些细胞具有干细胞多向分化潜能。hAECs 具有促进小鼠脑内神经递质水平增加、减少炎症反应、分泌神经营养因子等营养、支持神经元存活的作用。应用实验动物模型研究对阿尔兹海默病、帕金森氏病、脊髓损伤、脑卒中等疾病都具有治疗效果。本文根据近年发表的研究报告, 总结 hAECs 移植对中枢神经系统疾病的治疗作用, 以探讨 hAECs 移植对中枢神经损伤保护机制的理论基础。

【关键词】 人羊膜上皮细胞; 阿尔兹海默病; 帕金森氏病; 脊髓损伤; 脑血管病症

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 12-0075-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.012.015

Therapeutic effects of human amnion epithelial cells on central nervous system diseases: a review

QU Chun-hui, QIN Chuan, JU Rong-kai

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Human amniotic epithelial cells (HAECs) are isolated and extracted from placenta inner membrane and express embryonic stem cell surface markers. The HAECs are formed at 8th day from the epiblast after fertilization and possess multiple differentiation potentials. HAECs have the potential differentiation ability into all three germ layers: endoderm, mesoderm, and ectoderm. HAECs promote therapeutic and preventive effects and especially play an important role in treatment of central nervous system diseases. These stem cells inhibit inflammatory reaction and release neurotrophic factors to support the function of neurons. HAECs also exhibit alleviative effect on animal models of Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), spinal cord injury (SCI), stroke, etc. The present review summarizes the recent advances of therapeutic approaches of hAECs on central nervous system diseases and explores their protective mechanisms.

【Key words】 Human amnion epithelial cells; Alzheimer's disease; Parkinson's disease; Spinal cord injury; Ischemic cerebrovascular diseases

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划)课题实施方案。

[作者简介] 曲春辉, 女, 硕士研究生, E-mail: quchunhui626@163.com。

[通讯作者] 巨荣凯, 博士, E-mail: rongkaiju@163.com。

中枢神经系统疾病包括中枢神经系统感染、早发性的神经功能障碍、晚发性的神经退行性疾病、自身免疫和炎症疾病等。目前这些疾病没有有效的治疗药物和方法,尤其是对于神经退行性疾病,例如阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)等,引起脑组织重量减轻、脑体积减少,特定脑区功能下降,中神经元死亡,神经元数量明显减少,严重影响患者的生活质量。中枢神经系统疾病中死亡的中神经元不会再生,因此脑功能恢复缓慢。对于这种疾病,临床上功能康复治疗仅是防止肌肉组织萎缩,缓解运动功能障碍,药物治疗仅是对症的姑息治疗,没有对疾病的病理改变进行改善修复,因此仅能缓解症状,没有起到根本的治疗作用。目前基于干细胞的自身生物学特性,干细胞可分化为特异性的细胞类型,并维持细胞间在生理、病理条件下的体内平衡^[1]。在神经系统疾病治疗方面得到了广泛的关注,为治疗神经系统疾病提供新的途径。

羊膜位于胚胎绒毛膜内侧,是一层无血管、神经、淋巴、肌肉的透明薄膜,与发育中的胎儿联系紧密。人羊膜来源的细胞主要由两类细胞构成:人羊膜上皮细胞(human amnion epithelial cells, hAECs)和人羊膜间充质细胞(human amnion mesenchyme cells, hAMCs)。hAECs 具有多向分化潜能,并具有低免疫源性及免疫协同抑制作用,同时可避免胎盘干细胞实验及临床应用中的伦理问题^[2],在干细胞领域中具有广阔应用前景。1910 年 Davis 等研究报告将胎膜应用到皮肤移植的经验^[3],20 世纪 90 年代初,羊膜也已广泛应用到临床治疗中,包括烧伤、慢性溃疡、腹腔内粘连、髋关节置换术、角膜修复、神经修复等疾病^[4]。可见 hAECs 成为再生医学中有明显治疗效果的一种细胞资源。本文将讨论 hAECs 的生物学特性和治疗几种中枢神经系统疾病的机制。

1 hAECs 生物学特性

hAECs 可向三个胚层的细胞进行分化:内胚层、中胚层和外胚层,如心肌样细胞、肝样细胞、神经胶质细胞、神经元细胞和胰岛样细胞等。hAECs 可阳性表达胚胎细胞标志物 SSEA-3、SSEA-4 和多能性干细胞标记物 OCT4、SOX-2、Nanog,具有胚胎干细胞和多能干细胞的特性;此外还表达肿瘤排斥抗原(tumor rejection antigen, TRA) TRA1-60、TRA1-81、

TRA2-5 等^[5]。hAECs 可分泌产生表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、角化细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)等,这些因子与上皮细胞增殖、迁移和分化有关,并能促进上皮再生^[6]。hAECs 还具有神经细胞分化潜能,可表达神经细胞或胶质细胞标记物:神经纤维蛋白(neurofilament proteins, NF)、微管相关蛋白(microtubule-associated protein-2, MAP2)、髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)等^[7, 8]。体外培养和诱导的 hAECs 可分化为不同比例的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。有证据表明, hAECs 培养 4d 后免疫染色表达神经元标记物 NES、MAP2,星形胶质细胞标记物 GFAP,以及少突胶质细胞的标记物(GALC)等^[7, 9, 10]。hAECs 可表达间充质细胞表型标记物:CD105、CD73、CD90 等,不表达造血干细胞标志物 CD34、CD45 等^[11, 12]。

hAECs 具有低免疫原性和有效的免疫抑制能力。hAECs 不表达人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) HLA-A、-B、-C 抗体和 $\beta 2$ 微球蛋白^[13],表明细胞移植后不会发生急性排斥反应^[4]。移植到其他个体中时,免疫排斥反应发生率低。hAECs 不表达端粒酶^[5],因此不会发生致瘤性,对于细胞移植治疗相对安全。

hAECs 具有合成分泌神经递质的功能,如合成释放乙酰胆碱、神经营养因子等。在脑损伤的治疗中,hAECs 的广泛治疗潜能被大量证实。有报道称羊膜上皮细胞可分化成为成熟的神经细胞并合成释放神经递质,包括乙酰胆碱、去甲肾上腺素、多巴胺等^[5]。这些都是中枢神经系统中重要的神经递质,与神经系统退行性疾病发生相关。移植羊膜上皮细胞治疗可能成为治疗中枢神经系统疾病中有价值的治疗方法。

2 hAECs 移植治疗阿尔兹海默病

阿尔茨海默症是一种中枢神经系统退行性疾病,主要的临床表现为记忆减退、认知障碍及人格改变等。异常的神经网络活动,突触数量减少和特异性神经元死亡都是 AD 认知功能下降的主要原因。AD 的主要病理特点是神经元外毒性淀粉样寡聚体和蛋白质沉积,神经元内 tau 蛋白过度磷酸化形成神经纤维缠结,突触功能失调等^[14]。其中淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)水解产

生的淀粉样沉积和 tau 蛋白多度磷酸化形成神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NTFs) 是主要因素。 β -淀粉样蛋白 (beta-amyloid protein, A β) 是 APP 经分泌酶水解产生,被认为是 AD 发生的关键。tau 蛋白是一种微管相关蛋白,与神经元的骨架相互作用并有促进细胞内信号转导的作用。tau 蛋白也可能与淀粉样蛋白协同作用产生神经功能障碍。

目前药物治疗只是针对 AD 对症治疗,没有显著的治疗效果。近年来干细胞移植治疗疾病引起广泛关注,其中羊膜来源的细胞具有多潜能分化和自我更新的能力,在细胞移植和再生医学的技术中越来越受到重视^[15]。

有实验证实,hACEs 移植到 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠侧脑室内,8 周后发现细胞能够存活而无过度生长、增殖。移植的 hACEs 向第三脑室迁移并在体外表达 OCT4 和 Nanog,移植区周围没有炎症反应发生。经行为学 6-旋臂水迷宫检测发现,APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠空间记忆能力较细胞移植前有明显改善。通过高效液相色谱检测大脑额叶皮层和海马的乙酰胆碱水平增加,A β 沉积数量减少。基底前脑胆碱能神经元和海马区神经纤维较对照组明显增多^[16]。

hAECs 可释放多种神经营养因子,如脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子-3 (neurotrophin-3, NT-3)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 等^[13]。有研究表明,神经营养因子调节外周和中枢神经系统神经细胞存活,并对神经元具有营养保护作用^[17]。在海马区,BDNF 对突触的可塑性和记忆的形成都至关重要,BDNF 可修复损伤突触,恢复突触可塑性,缓解认知功能障碍^[18],长时程增强是记忆形成的先决条件,也是由 BDNF 与酪氨酸激酶 B (tyrosine kinase B, TrkB) 受体结合所维持^[19]。有研究指出 BDNF 减少是 AD 发生的一个因素^[20]。NGF 也对 AD 的胆碱能神经元提供保护作用,基底前脑胆碱能神经元表达的 TrkA 受体与 NGF 结合能促进和维持海马和皮层神经元的突触联系。中断 NGF 或 BDNF 的任何一种神经营养因子的表达,或者改变 TrkA 或 TrkB 受体的水平,都能导致记忆形成受损和神经元的退化^[19]。

以上研究结果表明,hACEs 的移植能减少 A β 沉积数量,增加海马区神经纤维数量,并能改善 AD 模型小鼠空间学习记忆能力。hAECs 释放的神经营养

因子对神经元、突触的生长、存活具有保护作用。

3 hAECs 移植治疗帕金森氏病

帕金森氏病是一种以黑质多巴胺神经元渐进性死亡并伴有纹状体多巴胺合成减少的神经退行性疾病。毒性物质 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 和鱼藤酮 (rotenone) 都可引起黑质区多巴胺能神经元变性丢失^[21]。富亮氨酸的重复激酶 2 (leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2) 的突变是 PD 最常见的原因^[22, 23]。

Kakishita 等人发现 hAECs 可分泌合成多巴胺神经递质,纹状体注射 6-羟基多巴胺引起神经元损伤的 PD 模型中,2 周后发现黑质区多巴胺能神经元数量持续性减少^[24]。将 hAECs 移植入 6-羟基多巴胺纹状体灌注损伤的 PD 模型大鼠纹状体内,2 周后可发现移植细胞存活。rt-PCR 和 Western blot 显示 hAECs 细胞高表达多巴胺限速酶—酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH); 分离 hAECs 进行培养,与普通培养基中进行比较,hAECs 培养基可增加多巴胺能神经元存活,同时也保护受 6-羟基多巴胺损伤的 TH-阳性神经元的形态和功能^[25]。移植 hAECs 至大鼠中脑内,移植 2 周后,大鼠中脑内发现移植细胞能够存活而无过度生长,并且黑质区多巴胺能神经细胞数量明显增加^[26]。酶联免疫吸附法检测 hAECs 能在 PD 动物模型脑内存活并能释放神经营养因子 BDNF、NT-3。有研究证实,这些因子对多巴胺细胞提供神经营养作用,这些营养因子能增加多巴胺能神经元存活的数量^[27]。

以上结果表明,hAECs 可提高多巴胺能神经元的存活,所分泌的因子对多巴胺神经元具有营养支持作用^[26]。但是细胞移植也存在存活率低等缺陷,目前实验关于 PD 患者多巴胺能神经元丢失替代治疗,还需要进一步研究,以增加细胞移植存活率及多巴胺神经递质的释放,为 PD 患者行为活动的改善提供依据。

4 hAECs 移植治疗脊髓损伤

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 可因各种因素 (外伤、炎症、肿瘤等) 引起,造成病人脊髓损害平面以下运动、感觉及内脏括约肌功能的永久性障碍,出现截瘫,使患者面临终生残疾。脊髓损伤目前并没有有效治疗方法。有研究发现,干细胞移植具有维持神经细胞存活,促进神经功能恢复的功

能。干细胞移植入脊髓损伤横断腔内,这些细胞分泌神经营养因子促进神经元存活和血管生长,有助于损伤的恢复^[28]。

hAECs 具有修复脊髓损伤的潜能。Sankar 等人发现,显微手术完全横断灵长类动物模型 T11-T12 脊髓节段,hAECs 移植入脊髓损伤动物模型脊髓横断腔内,移植后 15~60 d 后发现,hAECs 细胞可在受损脊髓节段周围内存活,在脊髓损伤横断面没有胶质瘢痕、损伤处没有结缔组织浸润,说明 hAECs 在中枢神经系统内具有低免疫排斥反应的潜能。此外 hAECs 移植后,轴突间相互连接增加^[29],从而达到恢复脊髓运动功能的效果。有研究指出,hAECs 能促进宿主轴突的生长,并可完全消除脊髓损伤模型大鼠的胶质瘢痕的形成^[30]。

研究人员在大鼠脊髓 T10 节段水平行椎板切除术,使硬脊膜和软脊膜开放、脊髓横断后,大鼠后肢瘫痪。立刻用明胶海绵吸收 hAECs 悬浮细胞移植到脊髓损伤大鼠的损伤部位。hAECs 移植 2 周后,后肢运动功能迅速恢复,在移植 4 周时达到稳定水平。移植后 8 周通过旷场 BBB 评分系统检测后肢运动功能,发现移植细胞组 BBB 评分为明显改善,从评分中看移植细胞达到了使前后肢协调运动的能力^[29],说明 hAECs 移植恢复了损伤的神经传导通路。

hAECs 也可减轻大鼠脊髓损伤后的机械性痛觉超敏。hAECs 移植 T13 脊髓半切大鼠损伤部位,对脊髓损伤导致的机械性痛觉超敏 (mechanical allodynia, MA) 具有缓解作用。脊髓损伤 13 d 后,MA 和热痛觉过敏 (thermal hyperalgesia, TH) 加重。损伤 14 d,移植 hAECs 至脊髓损伤部位,28 d 后,疼痛行为学检测脊髓损伤导致的 MA 和 TH 的改变,发现 MA 明显减弱,但对 TH 没有治疗效果,说明 hAECs 能减轻脊髓损伤引起的同侧后爪 MA。同时 hAECs 可明显减少因脊髓损伤导致 NMDA 受体 NR1 亚单位磷酸化 (pNR1) 增加和小胶质细胞标记物 F4/80 在脊髓中的表达,但没有使 GFAP 或诱导一氧化氮合酶 (induced nitric oxide synthase, iNOS) 表达增加。通过此研究表明移植 hAECs 至脊髓损伤处能抑制 MA,这可能与脊髓小胶质细胞激活的调节和 NR1 磷酸化有关^[31]。

hAECs 移植至脊髓横断损伤位置后没有神经胶质瘢痕生成,hAECs 不仅能够存活、支持宿主轴突生长,而且抑制了在损伤部位断端神经胶质瘢痕和囊

肿的形成,有利于中枢神经系轴突再生^[32]

5 hAECs 移植治疗脑血管病

脑卒中 (stroke) 是一种缺血性脑血管病,由于治疗有效时间窗仅 4.5 h^[33],脑卒中发生时脑血流突然中断,损伤部位组织缺血、缺氧,可在数分钟内出现神经元死亡。目前治疗很难使脑卒中患者恢复正常生活能力,更不能从根本上解决中枢神经系统神经元再生、神经通路重建和功能修复的问题。有研究认为,hAECs 能改善卒中预后,可能免疫反应的调节、神经损伤和细胞功能恢复、神经组织分化、神经递质的分泌有关^[34, 35]。

有研究发现:hAECs 对疾病起到治疗效果可能通过很多机制发挥作用。第一,hAECs 能分泌神经营养因子促进损伤区神经元细胞的修复。第二,hAECs 有多潜能特性,他们能分化成神经细胞的并取代受损伤和死亡的细胞。第三,hAECs 在中枢神经系统内分泌一些细胞因子、生长因子、激素和/或神经递质来修复细胞损伤。最后,hAECs 能根据脑损伤调节炎症反应改善中风预后。hAECs 分泌抗炎和抗增殖因子,从而影响中性粒细胞和巨噬细胞的趋药性并且抑制 T-细胞和 B-细胞在体外增殖^[35]。hAECs 的免疫调节特性通过抑制 T 淋巴细胞增殖,减少促炎症细胞因子 IL-1 α 和 IL-1 β 的表达,具有免疫调节的作用^[36],并能产生基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的抑制因子和炎症反应相关的蛋白水解酶。另外,虽然 hAECs 的 HLA-G 的表达能使细胞避开免疫系统,表现出的抗炎作用可能是通过减少激活的 CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡和抑制 CD4⁺ T 淋巴细胞的增殖体现出来^[37]。

Broughton 等人发现 hAECs 直接注射大脑中动脉阻塞 24 h 后的大鼠脑内,脑卒中 16 d 后发现梗死体积缩小,并且改善了横梁行走,旋转等行为学。而且通过 caspase-3 水平检测,在移植细胞周围的凋亡细胞数量明显减少^[38]。治疗脑卒中的研究,hAECs 脑室内注射能减轻侧脑室出血大鼠模型的水肿症状,改善运动缺陷情况。

有研究人员利用大脑中动脉闭塞大鼠模型观察 hAECs 对脑组织缺血的影响。移植 hAECs 至大鼠损伤侧纹状体内。应用 RT-PCR 方法检测移植细胞存活状况,发现 hAECs 在免疫组化显示 hAECs 在 3 周内能连续迁移至大鼠脑内缺血区域并表达 MAP2、GFAP 等神经细胞标志物、神经干细胞标记

物 Nestin 和干细胞标记物 OCT4。移植 3 周后,通过平衡木试验、旋转试验检测大鼠行为学功能,发现较对照组相比运动功能有明显改善。梗死面积从第 2 天至第 18 天逐渐减小,在损伤周围,细胞凋亡减少,检测凋亡相关基因 caspase-3 水平下降^[39]。

通过研究实验说明 hAECs 移植至损伤区域可存活并能分化成神经细胞,补充损伤区域的受损细胞,行为检测结果表明移植细胞的实验组较对照组相比,运动障碍改善明显。hAECs 移植后脑组织梗死面积逐渐减小,说明 hAECs 能促进损伤区细胞存活数量增加,恢复损伤区功能。

6 总结与展望

目前有多种干细胞对疾病进行治疗,包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs),诱导多能型干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),神经干细胞(neural stem cells, NSCs),间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。其中 ESCs 是多分化潜能的细胞,然而使用 ESCs 存在伦理学、免疫排斥等问题,而且由于 ESCs 具有自我增殖的能力,移植后可能会形成畸胎瘤。iPSCs 可分化成多种细胞类型,具有 ESCs 的特性,因此避免了伦理问题的争议。这种细胞也应用于 CNS 损伤的治疗,如 SCI, stroke 等,但一些实验也证实 iPSCs 可导致肿瘤的形成。NSCs 可分化成多种神经细胞,如神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。虽然 NSCs 移植后也有脑和脊髓肿瘤形成的报道,但这种细胞同样涉及伦理问题。MSCs 来源于骨髓和脐带,能分化成神经样细胞、内皮细胞等。实验研究证实 MSCs 能减少中风后细胞凋亡并促进细胞增殖。与其他细胞不同的是 MSCs 移植后没有肿瘤形成,但没有直接的证据显示 MSCs 可分化成有功能性的神经细胞。从骨髓中分离 MSCs 的方式也是一种侵入性的伤害。hAECs 与以上干细胞相比,有自身的优势,首先, hAECs 是一种可自我增殖和具有多项分化潜能的成体干细胞,可分泌 BDNF、NGF 等神经营养因子,这些神经营养因子对神经元具有修复、营养支持的作用。其次, hAECs 免疫源性低,细胞移植后不易引起排斥反应,能减少炎症因子 IFN γ 和 TNF 的释放,通过抑制 T 淋巴细胞增殖,减少促炎症细胞因子 IL-1 α 和 IL-1 β 的表达,具有免疫调节的作用。再次,从 hAECs 对中枢神经系统损伤模型的治疗中发现, hAECs 能分化为神经元细胞、星形胶质细胞取代受

损伤或死亡的细胞,恢复受损伤区域的功能,改善模型动物的行为学和病理学改变。并且 hAECs 移植后没有肿瘤形成,比其他干细胞相对安全。最后, hAECs 是来源于分娩后废弃胎盘,因此避免了伦理问题的争议。但 hAECs 移植也存在一些问题,如细胞移植后产生的治疗效果能否持续性的维持;是否具有促进血管生成的功能有待证实。

hAECs 移植到损伤部位治疗中枢神经系统疾病,主要由于 hAECs 有干细胞的特性,可自我增殖更新并能分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞。在中枢神经系统损伤时,会伴随大量神经元数量的减少,脑功能明显减退,并且神经元死亡后不能再生。hAECs 可替代发挥部分死亡神经元功能,产生神经网络回路;也可分泌神经营养因子,支持、营养神经元,减缓神经细胞死亡。移植后损伤部位由于干细胞增殖可减小损伤区域,分泌的神经营养因子维持神经元功能,促进损伤周围细胞存活。因此可恢复损伤部位的功能,达到治疗效果。

本文主要叙述 hAECs 对中枢神经系统疾病的治疗作用以及对中枢神经损伤保护机制的探讨。通过实验证实 hAECs 对神经系统有保护作用,并能促进神经元修复,利用 hAECs 的这些特性, hAECs 有望为细胞移植治疗中枢神经系统疾病提供新的途径和线索。

参考文献:

- [1] Upadhyay G, Shankar S, Srivastava RK. Stem cells in neurological disorders: emerging therapy with stunning hopes [J]. Mol Neurobiol, 2014, 23.
- [2] Hao Y, Ma DH, Hwang DG, et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane [J]. Cornea, 2000, 19(3): 348-352.
- [3] Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation [J]. Br J Ophthalmol, 1999, 83(6): 748-752.
- [4] Fairbairn NG, MA Randolph MA, Redmond RW. The clinical applications of human amnion in plastic surgery [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2014, 67(5): 662-675.
- [5] Miki T, Lehmann T, Cai H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(10): 1549-1559.
- [6] Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane [J]. Curr Eye Res, 2000, 20(3): 173-177.
- [7] Yan ZJ, Zhang P, Hu YQ, et al. Neural stem-like cells derived from human amnion tissue are effective in treating traumatic brain injury in rat [J]. Neurochem Res, 2013, 38(5): 1022-1033.
- [8] Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, et al. Expression of

- markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells[J]. *Neurosci Lett*, 1996, 209(1): 9-12.
- [9] Ilancheran S, Michalska A, Peh G, et al. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential[J]. *Biol Reprod*, 2007, 77(3): 577-588.
- [10] Ishii T, Ohsugi K, Nakamura S, et al. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system[J]. *Neurosci Lett*, 1999, 268(3): 131-134.
- [11] Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients[J]. *Ann Neurol*, 2005, 57(6): 874-882.
- [12] da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(9): 2287-2299.
- [13] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 62(4): 585-590.
- [14] Gorelick PB. Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease[J]. *Stroke*, 2004, 35(11 Suppl 1): 2620-2622.
- [15] Toda A, Okabe M, Yoshida T, et al. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues[J]. *J Pharmacol Sci*, 2007, 105(3): 215-228.
- [16] Xue SR, Chen CF, Dong WL, et al. Intracerebroventricular transplantation of human amniotic epithelial cells ameliorates spatial memory deficit in the doubly transgenic mice coexpressing APP^{swe} and PS1^{DeltaE9}-deleted genes[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(17): 2642-2658.
- [17] Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 677-736.
- [18] Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, et al. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(32): 13594-13599.
- [19] Allen SJ, Watson JJ, Dawbarn D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2011, 9(4): 559-573.
- [20] Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease[J]. *Nat Med*, 2009, 15(3): 331-337.
- [21] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models[J]. *Neuron*, 2003, 39(6): 889-909.
- [22] Davie CA. A review of Parkinson's disease[J]. *Br Med Bull*, 2008, 86: 109-127.
- [23] Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(R1): R48-59.
- [24] Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat[J]. *Neuroscience*, 1994, 59(2): 401-415.
- [25] Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, et al. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy[J]. *Exp Neurol*, 2000, 165(1): 27-34.
- [26] Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, et al. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions[J]. *Brain Res*, 2003, 980(1): 48-56.
- [27] Ebert AD, Beres AJ, Barber AE, et al. Human neural progenitor cells over-expressing IGF-1 protect dopamine neurons and restore function in a rat model of Parkinson's disease[J]. *Exp Neurol*, 2008, 209(1): 213-223.
- [28] Ravikumar R, Narayanan S, Baskar S, et al. Autologous stem cell injection for spinal cord injury - a clinical study from India[J]. *J Stem Cells Regen Med*, 2007, 3(1): 24-25.
- [29] Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research[J]. *Neuroscience*, 2003, 118(1): 11-17.
- [30] Wu ZY, Hui GZ. Materials for neuro-transplantation and the amnion[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119(16): 1323-1326.
- [31] Roh DH, Seo MS, Choi HS, et al. Transplantation of human umbilical cord blood or amniotic epithelial stem cells alleviates mechanical allodynia after spinal cord injury in rats[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(9): 1577-1590.
- [32] Wu ZY, Hui GZ, Lu Y, et al. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119(24): 2101-2107.
- [33] Del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, et al. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2009, 40(8): 2945-2948.
- [34] Tao J, Ji F, Liu B, et al. Improvement of deficits by transplantation of lentiviral vector-modified human amniotic mesenchymal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Brain Res*, 2012, 1448: 1-10.
- [35] Li H, Niederkorn JY, Neelam S, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(3): 900-907.
- [36] Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, et al. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix[J]. *Br J Ophthalmol*, 2001, 85(4): 444-449.
- [37] Banas RA, C Trumpower, C Bentlejewski, et al. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells[J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(6): 321-328.

- [38] Broughton BR, R Lim, TV Arumugam, et al. Post-stroke inflammation and the potential efficacy of novel stem cell therapies; focus on amnion epithelial cells [J]. *Front Cell Neurosci*, 2012, 6: 66.
- [39] Liu T, Wu J, Huang Q, et al. Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model[J]. *Shock*, 2008, 29(5): 603–611.
- 〔修回日期〕2014-10-09

(上接第 74 页)

- [24] Gook DA, Edgar DH, Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(8): 2061–2068.
- [25] Moniruzzaman M, Bao RM, Taketsuru H, et al. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts [J]. *Theriogenology*, 2009, 72(2): 280–288.
- [26] Santos RR, Tharasanit T, Van Haefen T, et al. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods [J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 327(1): 167–176.
- [27] Wang X, Catt S, Pangestu M, et al. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice [J]. *Reproduction*, 2009, 138(3): 527–535.
- [28] Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury [J]. *Exp Cell Res*, 1972, 71(2): 345–355.
- [29] Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling [J]. *Biol Reprod*. 1996, 54(5): 1059–1069.
- [30] Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique [J]. *Fertil Steril*, 1999, 72(6): 1073–1078.
- [31] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification; a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51(1): 53–58.
- [32] Chen SU, Chien CL, Wu MY, et al. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovary tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice [J]. *Hum Reprod*. 2006, 21(11): 2794–2800.
- [33] Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro ferolization, and somatic cell nuclear transfer [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(2): 513–518.
- [34] Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, et al. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue [J]. *Theriogenology*, 2011, 76(5): 933–941.
- [35] Wang Y, Xiao Z, Li L, et al. Novel needle immersed vitrification; a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation [J]. *Hum Reprod*. 2008, 23(10): 2256–2265.
- [36] Xiao Z, Wang Y, Li L, et al. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(6): 2323–2328.
- [37] Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals [J]. *Animal Reprod Sci*, 2000, 60: 357–364.
- 〔修回日期〕2014-10-19