

hBMSCs 幼年食蟹猴脑内移植的安全评价、迁移及分布

李加美^{1,2}, 朱华², 姚志刚^{1,2}, 邓威², 李秦³, 马春梅², 秦川^{2*}

(1. 山东大学附属省立医院病理科, 济南 250021;
2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院, 实验动物研究所病理室, 北京 100021;
3. 中国医学科学院实验动物研究所 Motac 合作实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 评价 hBMSCs 幼年食蟹猴脑内移植的安全性, 并进一步观察 hBMSCs 在脑内的迁移和分布情况, 为治疗儿童中枢神经系统疾病建立新的技术平台及理论依据。**方法** 直接向幼年性食蟹猴脑内注射 hBMSCs, 通过 HE 染色和免疫组化的方法观察注射部位炎症反应及免疫排斥情况; 通过对 hBMSCs 体外标记示踪和携带的男性特异基因的检测, 观察移植后 hBMSCs 在脑内的迁移及分布情况。**结果** 研究结果显示直接脑内注射 hBMSCs 未引起受试动物出现全身症状, 移植部位脑组织炎症反应局限, 未见明显免疫排斥反应, 未见脑组织变性坏死和明显胶质细胞增生聚集。hBMSCs 移植 4 周后, 仍大量存活, 并可在脑内广泛迁移, 其迁移分布具有一定的规律性, 可观察到不同移植受体细胞分布重叠现象。另外, hBMSCs 迁移分布具有从前脑向后脑迁移及向血管和室管膜下迁移的趋势。**结论** hBMSCs 直接脑内注射移植安全性好; hBMSCs 可以在脑内长期存活并迁移。

【关键词】 人骨髓间充质干细胞; 食蟹猴; 迁移; 分布

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)09-0007-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.09.002

Safety evaluation, migration and distribution of human bone marrow derived-mesenchymal stem cells in the CNS of young macaca fascicularis

LI Jia-mei^{1,2}, ZHU Hua², YAO Zhi-gang^{1,2}, DENG Wei², LI Qin³, MA Chun-mei², QIN Chuan^{2*}

(1. Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China;
2. Department of Pathology, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 3. China Motac collaborative laboratory, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the safety of hBMSCs transplantation and to observe their migration and distribution in the brain of young macaca fascicularis. To establish a new technology platform and theoretical basis for the treatment of central nervous system diseases in children. **Methods** Labelled hBMSCs were transplanted into the striatum of young macaca fascicularis. Brain sections were examined to evaluate the inflammatory reaction and immunological rejection of local injection sites by HE observation and immunohistochemical staining. Migration and distribution of transplanted-hBMSCs was observed by real-time fluorescence quantitative PCR of male DNA and fluorescence microscope. **Results** The results showed that the direct intracerebral injection of hBMSCs did not cause systemic symptoms in animals. There is no inflammatory reaction and immunological rejection was detected, and degeneration and necrosis of neural cells and

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81502568, 81402479), 山东省医药科技发展计划项目(2014WS0355)。

[作者简介] 李加美(1981-), 女, 主治医师, 研究方向: 干细胞。E-mail: lijiaimei366@126.com。

[通讯作者] 秦川(1959-), 女, 教授, 研究方向: 阿尔兹海默病的比较医学。E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

proliferation of glial cells were absent in the local injection sites. The transplanted hBMSCs survived, and migrated into the brain after 4 weeks transplantation. Its migration and distribution have certain regularity and were overlapping between transplant recipients. In addition, hBMSCs tended to extend rostrally into the forebrain and showed preference of migrating toward the blood vessels and below the ependyma. **Conclusions** Intracerebral transplantation of hBMSCs is safe. And hBMSCs can survive and migrate into the brain.

【Key words】 Human bone marrow derived-mesenchymal stem cells; *Macaca fascicularis*; Migration; Distribution

发生在儿童的神经变性疾病及大脑外伤性损害等均可引起严重的临床神经功能障碍,这些疾病包括脑瘫、运动功能紊乱、缺血缺氧性脑病、脑外伤等,多表现为神经元的变性缺失,神经系统无法产生新的神经元、建立新的突触联系,致使中枢神经系统损伤后结构和功能难以恢复。而目前现有的临床治疗方法有限,不能达到有效恢复神经功能的目的,因此,保护神经免受损伤并促进神经再生对神经系统疾病的治疗至为关键。动物实验及临床实验均证明应用干细胞为基础的细胞治疗可以阻止并修复神经系统损伤^[1-3]。

骨髓间充质干细胞 (bone marrow derived-mesenchymal stem cells, BMSCs) 为骨髓来源的多能干细胞,具有多向分化潜能、获取方便、易于分离培养和鉴定、遗传背景稳定及体内植入免疫反应比较弱等优点。自从首次报道其在脑内可以向神经细胞分化后, BMSCs 移植治疗中枢神经系统疾病就成为了研究热点。本实验采用的人 BMSCs (hBMSCs) 来源于健康志愿者,前期工作已证实其在体外具有多向分化的潜能、并能快速扩增、可诱导免疫耐受、能减轻或抑制移植物抗宿主病等,在神经系统疾病、自身免疫性疾病及血液病的临床前期及临床研究中颇受重视^[4, 5]。在神经系统疾病动物模型实验中,静脉及经脑移植的 MSCs 能够穿过血脑屏障迁移到损伤部位脑组织^[6-8]。MSC 为基础的治疗对中枢神经系统疾病的治疗安全而有效^[9],已成功应用于多种神经系统疾病动物模型的治疗中,如脑出血、阿尔兹海默病和帕金森病^[10-13]。很多实验均证实应用 MSCs 治疗幼年性脑缺血损伤模型非常有效,如脑瘫患者。MSCs 移植已经成为可行、有效和安全的治疗方法,对神经功能的恢复效果明显^[10]。

目前 MSCs 的移植途径主要包括直接脑内注射和间接通过静脉、动脉及腹腔注射等。间接途径移植为全身治疗,到达病变部位的时间较长,细胞数量较少,发挥作用较慢。而脑内注射移植为局部治疗,创伤小,起效快,并且脑内的免疫应答能力比较弱,因此直接脑内注射成为局部治疗中枢神经系统疾病的优先选择。但 hBMSCs 直接脑内移植的安全性如何?

其脑内移植后能否进行迁移? 这些都是 hBMSCs 临床应用前期亟需解决的问题。我们通过将 hBMSCs 直接脑内移植到幼年食蟹猴脑内,观察 hBMSCs 在脑内注射的安全、迁移和分布情况,为 hBMSCs 在儿童神经系统疾病的治疗应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

食蟹猴 10 只 (2~3 个月),具体体重、年龄及细胞移植情况见表 1,由军事医学科学院实验动物中心提供 [SCXK (军) 2002-001]。动物用悬挂在脖颈处刻有档案号的标牌作为该动物的编号,动物进入动物室检疫两周。动物实验后由随其母单笼饲养。10 只食蟹猴随机分为生理盐水对照组 ($n=2$), hBMSCs 移植组 ($n=8$)。每组分为 2 周和 4 周 (表 1)。动物使用申请批准号: MC-07-6008。

1.2 hBMSCs 标记

hBMSCs 由中国医学科学院北京协和医学院基础研究所组织工程中心提供。CM-DiI (固体) 溶解于 DMSO,浓度为 1 mg/mL。取第 4~5 代细胞,待细胞融合度达到 80%~90% 时,加入 2 mL 25% 胰酶,镜下观察见细胞回缩后,立即倒掉消化液,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 2~3 mL,轻轻吹打使细胞之间分散成单个细胞,加培养基至 10 mL 继续吹打成单细胞悬液,并于镜下观察。离心: 1000 rpm/min 离心 10 min。去上清,用无血清新鲜培养基重悬细胞,将配好的 CM-DiI 溶液加入到细胞悬液中,使其终浓度为 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。37℃ 孵育 5 min, 4℃ 孵育 15 min,此过程要避光处理。用生理盐水混悬细胞,调整其密度为 10000 个/ μL 。

1.3 hBMSCs 脑内移植

麻醉后的动物采用俯卧位固定在立体定位仪上,五点法 (上颌托、双侧外耳道、双侧眶下缘中点) 固定头部,读取坐标并设为坐标原点。根据注射的部位 (右侧尾状核头部) 得出注射点坐标。Antero-posterior (AP) = +16, Depth (D) = +20, lateral (L) = -4, AP 代表前后方向, D 代表注射深度, L 代表侧方坐标。hBMSCs 用微量加样器注射到右侧尾

表 1 食蟹猴的生理指标及实验分组情况
Tab. 1 Physical characteristic and experimental grouping of macaca fascicularis

动物 Animal	性别 Gender	年龄(月) Age (months)	体重(kg) Weight (kg)	细胞剂量 Cell dose ($\times 10^6$)	CM-DiI 标记 CM-DiI labeled	结束点(周) End point (weeks)
L01	F	3.0	1.00	生理盐水	N	2
L02	F	3.0	0.95	1	N	2
L03	F	3.0	1.20	1	N	2
L04	F	3.0	1.20	1	N	4
L05	F	3.2	1.30	1	N	4
L06	F	3.4	1.25	1	Y	2
L07	F	2.8	0.90	1	Y	4
L08	F	3.2	1.00	1	Y	4
L09	F	2.3	0.90	1	Y	2
L10	F	3.5	1.45	生理盐水	N	4

状核;注射细胞数量为 1×10^6 个细胞,注射体积为 125 μL ,注射速率:10 $\mu\text{L}/\text{min}$,注射完后留针 3 min;生理盐水对照组注射等体积生理盐水。无菌手术在中国医学科学院实验动物研究所进行[SYXK(京)2005-0042],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.4 脑组织取材

解剖前麻醉动物,待动物进入麻醉状态后,股动脉放血处死。开颅取脑,脑组织取材在中国医学科学院实验动物研究所进行[SYXK(京)2005-0042]。具体取材参考 Isakova 等^[10]的方法(图 1)。图中白色区域大约 4~6 mm 用来切冰冻切片直接观察荧光或者石蜡包埋做免疫组织化学染色和原位杂交。浅灰色区域大约 3 mm,脑组织脑冠状面被平均分成 100~200 mg 的小块,用来提取组织 DNA,放入冻存管 -80℃ 保存。深灰色区域大约 2 mm 用来提取组织总 RNA。

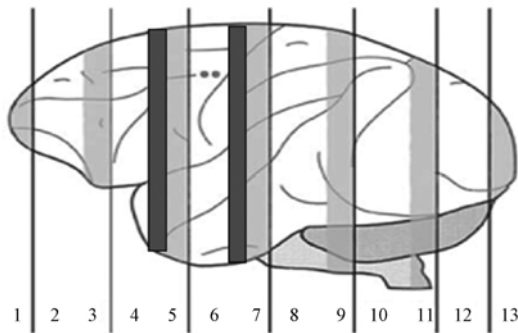


图 1 大脑取材示意图

Fig. 1 The schematic diagram of usagae of brain tissue

1.5 hBMSCs 脑内移植的局部炎症反应和免疫反应

动物麻醉后,先经生理盐水(1 L/kg)灌注,再经

10% 中性福尔马林(1 L/kg)灌注后取脑组织。大鼠脑组织平均分为 4 部位,每部分厚度大约 1 cm。标本经 10% 中性福尔马林固定、石蜡包埋切片、苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察。

1.6 hBMSCs 脑内移植迁移的检测

1.6.1 CM-DiI 荧光检测

白色区域(4~6 mm)组织取材后,立即用 OCT 包埋,恒温冷冻切片机切片,切片厚度为 10 μm ,每部分组织共切取 20 张切片,经 4℃ 多聚甲醛固定 10 min 后晾干,与 -80℃ 冰箱保存。观察时,将切片从冰箱取出,室温放置 30 min, PBS 洗 10 min 后,直接用含有 DAPI 的封片剂封片,5 min 后直接置于倒置荧光显微镜下观察,并做记录。

1.6.2 Real-time PCR 检测 SRY 基因

通过检测男性 Y 染色体特有基因 SRY 基因,观察 hBMSCs 的迁移和移植情况。脑组织沿冠状面分成 12~14 个脑冠状面,厚度为 3 mm 或 6 mm,将每个厚为 3 mm 的脑冠状面分成重量为 100~200 mg 的小组织块,提取组织总 DNA。制备标准品的制备并建立标准曲线。每个脑组织样本重复 4 次,根据标准曲线得出所检样本中男性 DNA 的含量。95℃ 3 min, 95℃ 30 s, 60℃ 30 s 45 个循环。人 SRY 基因引物序列 Forward: 5'-GGCGAAGATGCTGCCGAAG-3', Backward: 5'-TTCGCTGCAGAGTACCGAAGC-3', 荧光报告探针: FAM-TGCAGTTTGCTTCCGG CAGATCC-TAMRA

2 结果

2.1 移植后一般情况观察

术后动物呼吸平稳,饮食和排泄均正常,四肢运动正常。头部伤口干燥结痂,无红肿及渗出。和

hBMSCs 移植前相比,移植后 1 周和 2 周,血液中的白细胞及分类细胞学均未见明显异常。

2.2 局部炎症反应和排斥反应

通过观察 HE 染色和对炎细胞、参与免疫反应的抗原提呈细胞及效应细胞的检测来观察局部炎症反应及排斥反应。结果发现,注射部位脑组织轻微空泡变性,少量泡沫细胞聚集,未见其他炎细胞浸润,未见明显水肿和神经元变性坏死(图 2),其他脏器和器官组织学检查也未见异常。免疫组织化学结果显示,移植局部脑组织,CD4、CD8、CD57 和 HLA-DR 均呈阴性表达,CD68 和 CD45 可见个别阳性细胞,在移植对照组也可见到。

2.3 CM-DiI 荧光观察结果

CM-DiI 荧光示踪结果发现,hBMSCs 在脑内能够广泛迁移,每个脑冠状面均能观察到 CM-DiI 的红色荧光信号。移植后 2 周,hBMSCs 在脑内迁移范围广泛,每个脑冠状面均能观察到 CM-DiI 的红色荧光信号,以移植部位所在脑冠状面(第 1、2 和 4 脑冠状面)荧光信号比较密集,第 2 个脑冠状面的荧光信号仍然聚集于与注射部位相对应的区域,其他冠状切面也能观察到少量的荧光信号。移植后 4 周,hBMSCs 在脑内的迁移更为广泛,每个冠状面均能观察到 CM-DiI 荧光信号,移植部位所在脑冠状面信号仍然最为密集,第 2、4、5 和 6 脑冠状面均能观察到较多且弥散分布的荧光信号,与移植 2 周相比,荧光信号的分布更为分散,该结果提示随着时间的变化,hBMSCs 在脑内逐步迁移(图 3)。

2.4 hBMSCs 移植后迁 SRY 基因检测

从 SRY 基因 DNA 分布图观察,hBMSCs 移植后,每个脑冠状面均能检测到 SRY 基因的存在,不同受体之间存在重叠现象。移植后 2 周,男性 DNA 主要分布与第 2、3、4 和 5 脑冠状面,其含量峰值位于第 3 个脑冠状面(注射部位所在脑冠状面),其左右相邻脑冠面的含量也明显高于其他冠面。移植后 4 周,男性 DNA 主要分布于 3、4、5、6 和 7 脑冠状面,其含量峰值位于第 5 个面,总体 DNA 含量较高的脑冠状面为 3、4、5、6 脑冠状面(图 4)。MSCs 移植 4 周后的分布区域要比移植后 2 周的分布广泛,呈现从前往后迁移的趋势。检测到 SRY 基因的位置与观察到荧光信号的位置基本保持一致。具体分布见图 5。

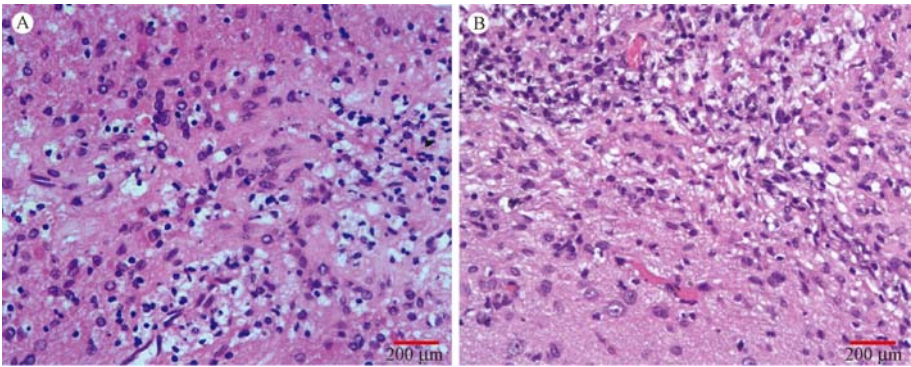
3 讨论

神经系统的疾病复杂多样,大多呈慢性过程,

且往往导致严重的后果,由于脑内神经不能再生,因此这些疾病治疗起来比较困难,到目前为止,临床仍没有很好的治疗方法。干细胞的应用,为这类疾病的治疗带来了希望。MSCs 能够在脑内迁移和分化,加上其获取简单,体外扩增容易,能够被修饰表达特异重组蛋白,使得它们成为神经系统疾病治疗的首选种子细胞,为 MSCs 的临床应用奠定了理论基础。

有研究证实小鼠骨髓来源的 BMSCs,同种移植后,能够在脑内长期存活并广泛迁移^[14, 15],Munoz-Elias 将大鼠来源的 MSCs 向胚胎大鼠的脑室内注射,发现 MSCs 可以移植、迁移和分化,并能够长时间的存活^[16],Isakova 等^[10]将恒河猴的 BMSCs 同种移植到大脑尾状核,发现其可在恒河猴脑内长期存活达 6 个月,并能在脑内广泛迁移,并且发现直接脑内移植是安全的。直接注射到小脑的未经修饰的 MSCs 可以减轻 Niemann-Pick C 型疾病中的炎症反应^[17]。尽管有很多学者已经做过非人类 BMSCs 在小鼠、大鼠和恒河猴等实验动物直接脑内注射安全有效,MSCs 并能脑内广泛迁移,但 hBMSCs 直接脑内注射非人灵长类的安全性如何,尚没有文献报道。

为了评估脑内移植 hBMSCs 局部治疗的安全性及其在脑内的迁移情况,该研究参考了 Isakova 等^[10]的研究方法,将 hBMSCs 直接注射到幼年食蟹猴大脑尾状核内,观察对幼年食蟹猴健康、行为及注射局部脑组织的影响,并通过 real-time PCR 和体外标记 hBMSCs 的方法,观察 hBMSCs 在脑内的移植水平和迁移情况。纹状体包括豆状核和尾状核,后者是由部分复杂的连接大脑皮质、基底核以及丘脑的回路组成,具有广泛的认知和运动功能,纹状体-丘脑回路包括拮抗纹状体回路,与行为、运动控制有关,该部位与多种肌张力障碍和运动障碍疾病相关,选择该部位注射,更能评价 hBMSCs 移植的安全性,为上述疾病的治疗奠定基础。我们的研究结果显示 hBMSCs 直接脑内注射后未引起明显副作用,包括移植侧的一过性偏瘫、饮食饮水障碍、脑水肿症状以及情绪变化等。局部注射部位未发现脑组织的水肿、变性坏死,炎细胞浸润以及明显的胶质细胞聚集。hBMSCs 移植后的短期内(4 周),受试动物未见明显副作用,提示它们对该操作的耐受性比较好,脑内直接注射干细胞移植法治疗神经系统疾病是安全可行的。该研究对 hBMSCs 直接脑内注射的安全可行性进行验证,对 hBMSCs 脑内移植

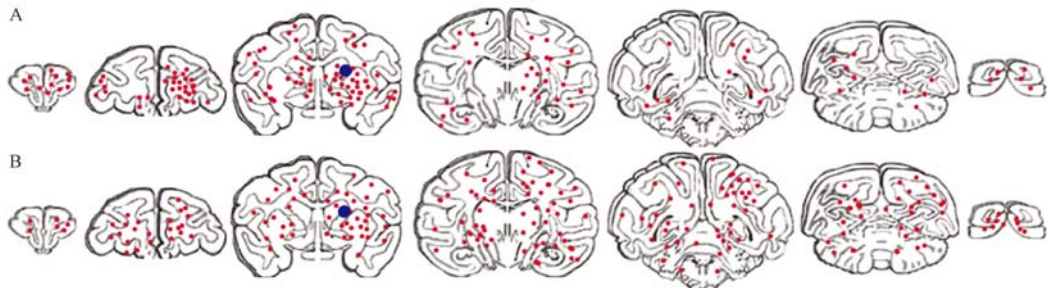


注：(A)hBMSCs 移植后 2 周；(B)hBMSCs 移植后 4 周。

图 2 hBMSCs 移植部位脑组织 HE 染色

Note. (A) 2 weeks post-transplantation; (B) 4 weeks post-transplantation.

Fig. 2 HE staining of injection sites of hBMSCs transplantation



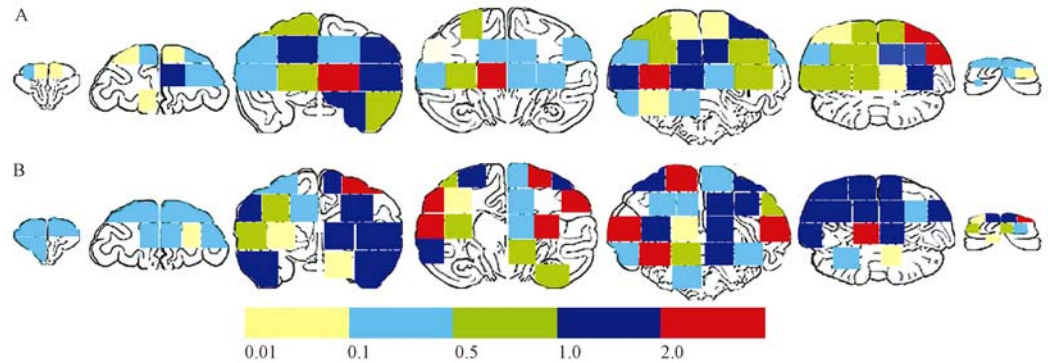
注：A 和 B 分别代表 hBMSCs 移植后 2 周和 4 周；蓝色的点代表注射位置；红色小圆点代表迁移的 CM-DiI 标记的 hBMSCs。

图 3 CM-DiI 示踪荧光分布示意图

Note. A and B showed the distribution of hMSCs after 2 weeks and 4 weeks transplantation respectively;

Blue round spots indicate the injection site; the red round spots represent migrated CM-DiI labeled hMSCs.

Fig. 3 Plotting the fluorescent singles in each brain slice



注：A 和 B 分别代表 hBMSCs 移植后 2 周和 4 周；不同的颜色代表不同的 DNA 含量；颜色条下方的数据单位为 ng。

图 4 SRY 基因含量分布示意图

Note. A and B showed the distribution of hMSCs after 2 weeks and 4 weeks transplantation respectively;

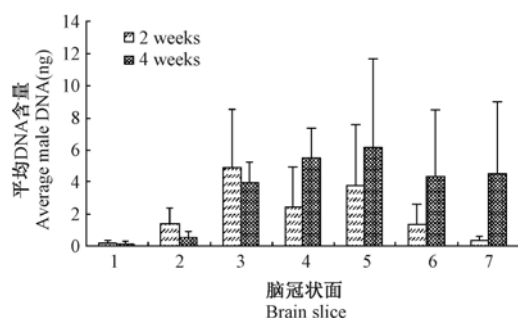
The different color represents different content of SRY gene;The unit under the colour bar is ng.

Fig. 4 Sketch diagram of SRY gene content distribution

后的迁移能力进行了检测,为将来其在神经系统疾病中的临床应用提供理论依据。

为了检测干细胞移植后在脑内前迁移和分布情况,我们应用 CM-DiI 体外示踪及体内特异性 SRY 基因检测的方法,比较准确的示踪移植到脑内的

hBMSCs。Real-time PCR 结果显示 hBMSCs 可以在脑内广泛迁移,这些数据可以代表整个大脑的 1/3 的干细胞的移植水平。由 real-time PCR 的数据绘制成的柱状图发现,每个脑冠状面检测到的基因的含量以注射部位所在脑冠状面及相邻脑冠状面比



注:移植后 2 周,男性 DNA 的含量峰值位于第 3 个面,而 hBMSCs 移植后 4 周,男性 DNA 的含量峰值位于第 5 个面。

图 5 hBMSCs 脑内移植水平评价

Note. The peak content of male DNA located in the third brain section after 2 weeks transplantation and in the fifth brain section after 4 weeks transplantation.

Fig. 5 Evaluation of hBMSC engraftment in the CNS

较高,但在前脑和小脑也可以检测到,并且显示移植的细胞多定位在某些特定的区域。尽管 hBMSCs 是单侧注射的,但是双侧大脑半球均可以检测到 SRY 基因存在,而且不同移植受体之间,一些区域 hBMSCs 移植存在着重叠,从柱状图我们可以推断出,虽然 SRY 基因的含量在移植后 2 周和 4 周没有统计学上的差异,但是随着移植时间的推移, hBMSCs 的迁移有沿着头部向尾部迁移的趋势。CM-DiI 荧光信号检测结果同时也绘制成不同脑冠状面的分布图,结果显示 hBMSCs 的迁移具有从头部向尾部迁移的趋势,与 real-time PCR 的结果相一致。荧光观察还发现大量的 hBMSCs 向血管周、脑室旁进行迁移,部分血管内及脑室内也可观察到荧光信号,这提示 MSCs 还可能通过血液循环和脑脊液循环进行快速的迁移。

我们移植 hBMSCs 到幼年食蟹猴脑内,结果证实直接脑内注射短期内(4 周)局部脑组织没有观察到炎症反应和免疫反应,并且可以在脑内持续存活和迁移,这为 hBMSCs 的临床应用治疗儿童中枢神经系统疾病打下了理论基础。但 hBMSCs 长期移植的安全性还需进一步实验证明,而 hBMSCs 的迁移机制也是复杂多样的,也还需要进一步研究阐明。

参考文献:

[1] Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, *et al.* Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells [J]. *Front Neurosci*, 2013,7:194.
[2] Dailey T, Tajiri N, Kaneko Y, *et al.* Regeneration of neuronal cells following cerebral injury [J]. *Front Neurol Neurosci*,

2013,32:54-61.

[3] Hsu YC, Chen SL, Wang DY, *et al.* Stem cell-based therapy in neural repair [J]. *Biomed J*, 2013,36(3):98-105.
[4] van Velthoven CT, Sheldon RA, Kavelaars A, *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation attenuates brain injury after neonatal stroke [J]. *Stroke*, 2013,44(5):1426-1432.
[5] van Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage [J]. *Pediatr Res*, 2012,71:474-481.
[6] Okuma Y, Wang F, Toyoshima A, *et al.* Mannitol enhances therapeutic effects of intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells into the brain after traumatic brain injury [J]. *Neurosci Lett*, 2013,554:156-161.
[7] Liu L, Eckert MA, Riazifar H, *et al.* From blood to the brain: can systemically transplanted mesenchymal stem cells cross the blood-brain barrier? [J]. *Stem Cells Int*, 2013,2013:435093.
[8] Forostyak S, Jendelova P, Sykova E. The role of mesenchymal stromal cells in spinal cord injury, regenerative medicine and possible clinical applications [J]. *Biochimie*, 2013,95(12):2257-2270.
[9] Li J, Zhu H, Liu Y, *et al.* Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in Macaca fascicularis [J]. *Brain Res*, 2010,1334:65-72.
[10] Isakova IA, Baker K, Dufour J, *et al.* Preclinical evaluation of adult stem cell engraftment and toxicity in the CNS of rhesus macaques [J]. *Mol Ther*, 2006,13(6):1173-1184.
[11] Yun HM, Kim HS, Park KR, *et al.* Placenta-derived mesenchymal stem cells improve memory dysfunction in an Aβ1-42-infused mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Cell Death Dis*, 2013,4:e958.
[12] Kim KS, Kim HS, Park JM, *et al.* Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an Alzheimer's disease model [J]. *Neurobiol Aging*, 2013,34(10):2408-2420.
[13] Glavaski-Joksimovic A, Bohn MC. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2013,247:25-38.
[14] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999,96(19):10711-10716.
[15] McBride C, Gaupp D, Phinney DG. Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real-time PCR [J]. *Cytherapy*, 2003,5(1):7-18.
[16] Muñoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, *et al.* Adult Bone Marrow Stromal Cells in the Embryonic Brain: Engraftment, Migration, Differentiation, and Long-Term Survival [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2004,24(19):4585-4595.
[17] Bae JS, Furuya S, Ahn SJ, *et al.* Neuroglial activation in Niemann-Pick type C mice is suppressed by intracerebral transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells [J]. *Neurosci Lett*, 2005,381(3):234-236.

[修回日期]2016-03-08