

基础研究

人羊膜间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤后 NGF、BDNF 和 Nogo-A mRNA 表达的影响

喻皇飞¹, 马晶晶², 方 宁¹, 余丽梅¹, 章 涛¹, 刘祖林¹, 陈代雄¹

(1 遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室 563003 贵州省遵义市;

2 贵州省遵义市第一人民医院检验科 563003)

【摘要】目的:观察人羊膜间充质干细胞(hAMSCs)移植对大鼠脊髓损伤后神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)及轴突生长抑制因子(Nogo-A)mRNA 表达的影响。**方法:**成年雌性 SD 大鼠 24 只,随机分成 hAMSCs 移植组(12 只)、磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(12 只)。体外分离培养、鉴定 hAMSCs,并以终浓度为 10 μ g/ml 4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)荧光染料标记 hAMSCs。在建立大鼠 T11 脊髓全横断损伤模型后,立即以微量注射器吸取约 3 $\times$ 10⁶ 个 hAMSCs 悬液于横断损伤处头尾两端原位移植,对照组注射相同体积的 PBS 液。分别于术后 3d、7d 利用荧光显微镜观察 hAMSCs 存活情况,并采用 RT-PCR 分析损伤脊髓段 NGF mRNA、BDNF mRNA 及 Nogo-A mRNA 的表达。**结果:**术后 3d 和 7d hAMSCs 移植组均可观察到植入的 hAMSCs 在宿主脊髓组织内存活。术后 3d、7d, hAMSCs 移植组 NGF mRNA 的表达均高于对照组 ($P<0.05$, $P<0.01$), Nogo-A mRNA 的表达均低于对照组 ($P<0.05$); 术后 3d 时 hAMSCs 移植组 BDNF mRNA 的表达与对照组比较无显著性差异 ($P>0.05$), 但术后 7d 其表达高于对照组 ($P<0.05$)。 **结论:**hAMSCs 移植可上调大鼠受损脊髓组织内 NGF mRNA 和 BDNF mRNA 的表达、下调 Nogo-A mRNA 的表达,有利于促进脊髓损伤后的功能修复。

【关键词】脊髓损伤;移植;人羊膜间充质干细胞;神经营养因子;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.10.10

中图分类号:R683.2, Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2013)-10-0924-06

Effects of human amnion-derived mesenchymal stem cells transplantation on the expression of NGF mRNA, BDNF mRNA, Nogo-A mRNA in rats after spinal cord injury/YU Huangfei, MA Jingjing, FANG Ning, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(10): 924-929

【Abstract】 Objectives: To observe the effects of human amniotic mesenchymal stem cells(hAMSCs) transplantation on the expression of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and axonal growth inhibitor(Nogo-A) mRNA in rats after spinal cord injury. **Methods:** Twenty-four adult female SD rats were randomly divided into transplantation group and control group. Transected spinal cord injury(SCI) model in rats was established. Isolation, culture and identification of hAMSCs in vitro were performed, and 10 μ g/ml DAPI was used to label cultured hAMSCs. About 3 $\times$ 10⁶ hAMSCs absorbed by a microsyringe were transplanted into the head and tail end lesions immediately after establishing of animal model, the control group was injected by equal volume of PBS. The survival hAMSCs in the injured spinal cord were observed by fluorescence microscope at 3, 7 days post-operation. Meanwhile, the expression of NGF mRNA, BDNF mRNA and Nogo-A mRNA in the injured spinal cord was detected by RT-PCR. **Results:** The grafting hAMSCs were observed in the host spinal cord tissue at 3d and 7d post operation. RT-PCR results showed the expression of NGF mRNA in transplantation group was significantly higher than that in control group($P<0.05$, $P<0.01$) regardless of timepoint, and the expression of Nogo-A mRNA was lower than that in the control group($P<0.05$). However, compared with the control group, the expression of BDNF mRNA at 3d after operation showed no significant difference ($P>0.05$), but at 7d after operation, the expression of BDNF mRNA in transplantation group was remarkably higher than that of control group($P<0.05$). **Conclusions:** The transplantation of hAMSCs

基金项目:贵州省科技厅联合基金资助项目[编号:黔科合 J 字 LKZ (2010)19 号]

第一作者简介:男(1983-),医学硕士,讲师,研究方向:干细胞治疗脊髓损伤,干细胞与再生医学

电话:(0852)8608140 E-mail:yhfei163@163.com

can regulate the expression of neurotrophic factors in injured spinal cord tissue, which may contribute to the improvement of neurological function of rats after SCI.

【Key words】 Spinal cord injury; Transplantation; Human amnion-derived mesenchymal stem cell; Neurotrophic factor; Rats

【Author's address】 Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, 563003, China

对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)目前尚无确切有效的临床治疗手段。近年来,利用干细胞移植治疗脊髓损伤已成为该领域的研究热点。人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)具有多谱系分化潜能^[1-3],是一种典型的成体干细胞。我们利用 hAMSCs 移植治疗大鼠脊髓损伤,发现其对脊髓损伤大鼠神经功能的恢复具有积极的促进作用,但其具体机制不得而知^[4]。本研究旨在观察大鼠脊髓损伤后利用 hAMSCs 移植对受损脊髓组织内神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及轴突生长抑制因子(Nogo-A)相应 mRNA 表达的影响,进一步探索 hAMSCs 移植促进大鼠脊髓损伤后修复的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

成年雌性 SD 大鼠,体重为(220±20g),购于第三军医大学动物实验中心(许可证号:SCXK(渝)2007-0005)。人羊膜取自经产妇知情同意后足月剖宫产胎盘。

1.2 主要试剂和仪器

LG-DMEM 培养基、胎牛血清和胶原酶 II (Gibco 公司),胰酶(Amresco 公司),流式细胞术检测用荧光抗体(BD 公司),TRIZOL 试剂、RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司),鼠源性 NGF、BDNF、Nogo-A 及 β -actin 引物(上海生工),PCR 扩增仪(Biorad 公司),核酸蛋白测定仪(Thermo 公司),流式细胞仪(FACSCalibur, BD 公司)。

1.3 hAMSCs 的分离培养

从胎盘组织机械分离羊膜,磷酸盐缓冲液(PBS)充分洗涤,剪成碎片,用含 0.02% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)的 0.05% 胰蛋白酶消化 3 次以去除上皮细胞,未消化的组织碎片用 PBS 液冲洗,加入含有 0.075mg/ml DNase I 的 0.75mg/ml

的胶原酶,于 37℃、200r/min 旋转消化 2h 至组织完全消化,300 目钢网过滤,收集细胞滤液,离心洗涤。细胞沉淀悬浮于 LG-DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、2mmol/L L-谷氨酰胺、1mmol/L 丙酮酸钠、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素)中,调整细胞密度按 $2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种,于 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,第 3 天更换新的培养基,至细胞生长汇合度达 80% 以上即进行传代培养,倒置相差显微镜观察细胞形态。

1.4 hAMSCs 表型鉴定

调整原代培养的 hAMSCs 细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,取 200 μ l 细胞悬液分别加入荧光标记单抗 CD14-FITC、CD19-PE、CD34-PE、CD44-FITC、CD45-FITC、CD73-PE、CD90-FITC、CD105-PE、HLA-DR-PerCP 各 3 μ l,混匀,室温避光孵育 20min, PBS 充分洗涤后上流式细胞仪(FACSCalibur, BD 公司)检测分析,同型对照为荧光素标记的小鼠 IgG。

1.5 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)标记 hAMSCs

取第 3 代 hAMSCs 以终浓度为 10 μ g/ml DAPI 荧光染料的完全培养基标记细胞 30min,荧光显微镜观察细胞标记率。PBS 洗涤两遍后胰酶消化,收集细胞悬液,1000r/min 离心 5min,弃上清,加入 PBS 液重悬细胞,调整细胞密度至 5×10^3 个/ μ l 单细胞悬液,放置于冰盒内,备用。

1.6 脊髓损伤模型制作及 hAMSCs 移植

SD 大鼠 24 只,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,以 T11 为中心,暴露 T11 棘突和椎板,用咬骨钳咬除椎板棘突,充分显露脊髓 T11 段。用手术刀片快速横断暴露的脊髓并往返复切 3 次,将两断端轻轻提起以证实脊髓完全切断后,随机分为细胞移植组和 PBS 对照组。细胞移植组用微量注射器将 hAMSCs 悬液缓慢注入到脊髓两断端头侧和尾侧邻近区域的灰白质交界处(距脊髓表面约 0.7mm)每点 3 μ l,总细胞数约 3×10^6 个,对照组按

同法注射等量 PBS 液,退针前留针 5min,再以医用生物蛋白胶封闭注射孔。术后 3d、7d 各组分别取 6 只大鼠处死,以损伤处为中心取出上下段脊髓标本约 80~100mg,剥离脊髓组织外膜,迅速置于-80℃冰箱中备用。

1.7 脊髓组织中 hAMSCs 存活检测

所取脊髓组织迅速包埋固定,置于恒温冷冻切片仪内行连续矢状切片(厚约 8μm),室温晾干后用荧光显微镜观察,以 PBS 组大鼠脊髓组织为参照,视野内出现亮蓝色信号为阳性目标。

1.8 脊髓组织总 RNA 提取

组织总 RNA 按 TRIZOL 提取试剂盒操作说明书进行,利用核酸蛋白测定仪分析所提 RNA 的纯度及浓度。

1.9 NGF、BDNF 与 Nogo-A mRNA 表达的检测

①引物序列:NGF(产物)上游引物为 5'-GTCAGTGTGTGGCTTGGAGATA-3',下游引物为 5'-GCAGTATGAGTTCCAGTGCTTG-3'。BDNF(产物)上游引物为 5'-TCACAGCGGCAGATAA-3',下游引物 5'-GCCCCGAACATACGATT-3'。Nogo-A(产物)上游引物为 5'-GGAAGTAGGGATGTGC-3',下游引物为 5'-TTCGGTTGCTGAGGTA-3'。用 β-actin 为内参(产物),上游引物为 5'-CACC-CGCGAGTACAACCTTC-3',下游引物为 5'-CC-CATACCCACCATCACACC-3'。②逆转录反应:在 20μl 逆转录反应体系中,加入 2μl RNA,引物各 1μl,在设定条件下进行反应。③PCR 扩增:取 cDNA 3μl,上下游引物各 1μl,TaqDNA 聚合酶 0.2μl,加入 PCR 反应体系中扩增。反应条件为预变性:95℃ 30s,1 个循环;PCR 反应:95℃ 5s,60℃ 30s,共 40 个循环,每个样本重复 3 次,每次复设 3 孔。所得数据根据比较 Ct 值法进行计算: $\Delta\Delta Ct = [\text{实验组}(\text{Ct 目的基因} - \text{Ct 内参})] - [\text{对照组}(\text{Ct 目的基因} - \text{Ct 内参})]$, $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.10 统计学分析

所有数据以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 13.0 软件包对实验数据进行统计分析。各基因表达量变化按上文中所列比较 Ct 值法进行计算,组间差异比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 hAMSCs 的形态及表型特征

原代培养 hAMSCs 增殖迅速,4~5d 后汇合度可达 90%以上,镜下观察细胞呈梭形、多角形,贴壁生长,单层放射状或漩涡状紧密排列(图 1)。流式细胞仪分析结果显示,培养的 hAMSCs 不同程度表达间充质干细胞分子标志 CD44、CD73、CD90 和 CD105,不表达 CD14、CD19、CD34、CD45 及 HLA-DR(图 2)。

2.2 移植 hAMSCs 在宿主体内存活情况

脊髓损伤大鼠 hAMSCs 移植后 3d,可见较多染色阳性 hAMSCs 在受损组织内存活,荧光显微镜下呈明亮的蓝色荧光,主要沿针道分布于灰白质交界区(图 3a);移植后 7d 仍可见少量存活的 hAMSCs,已向周围受损脊髓组织迁移(图 3b)。

2.3 大鼠损伤脊髓 NGF mRNA、BDNF mRNA 及 Nogo-A mRNA 的表达

hAMSCs 移植组大鼠在术后 3d、7d 脊髓损伤组织内 NGF mRNA 的表达均强于 PBS 对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);BDNF mRNA 的表达在 hAMSCs 移植后 3d 与对照组无明显差异,而在 hAMSCs 移植后 7d 则显著高于对照组 ($P < 0.05$);在 hAMSCs 移植后 3d、7d,损伤大鼠脊髓组织内 Nogo-A mRNA 的表达均低于对照组 ($P < 0.05$, 表 1)。

3 讨论

大量研究显示,来源于人羊膜组织的 hAMSCs 在体外适宜条件下可向三个胚层细胞分化,如神经细胞、心肌细胞、胰腺细胞、成骨及软骨细胞等^[5-8]。同时,hAMSCs 低表达 HLA-A、B、C,不表达 HLA-DR,异种移植不发生免疫排斥反应^[9]。由于 hAMSCs 来源于分娩后被丢弃的胎盘羊膜组织,无伦理学争议,来源丰富,这些优势赋予了 hAMSCs 相比于其他来源的间充质干细胞在再生医学领域具有更加广阔的应用前景。

目前尚无特异性标志鉴定 hAMSCs,对其鉴定主要参照国际干细胞治疗协会所建议的有关间充质干细胞的鉴定标志进行^[10]。本研究中所分离的 hAMSCs 表达 CD44、CD73、CD90、CD105,不表达 CD14、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR,说明所分离的目标细胞具有典型的间充质干细胞表型特征。

脊髓损伤后急性期由于局部充血水肿、炎细胞浸润等诸多不利因素的影响,导致大量脊髓神

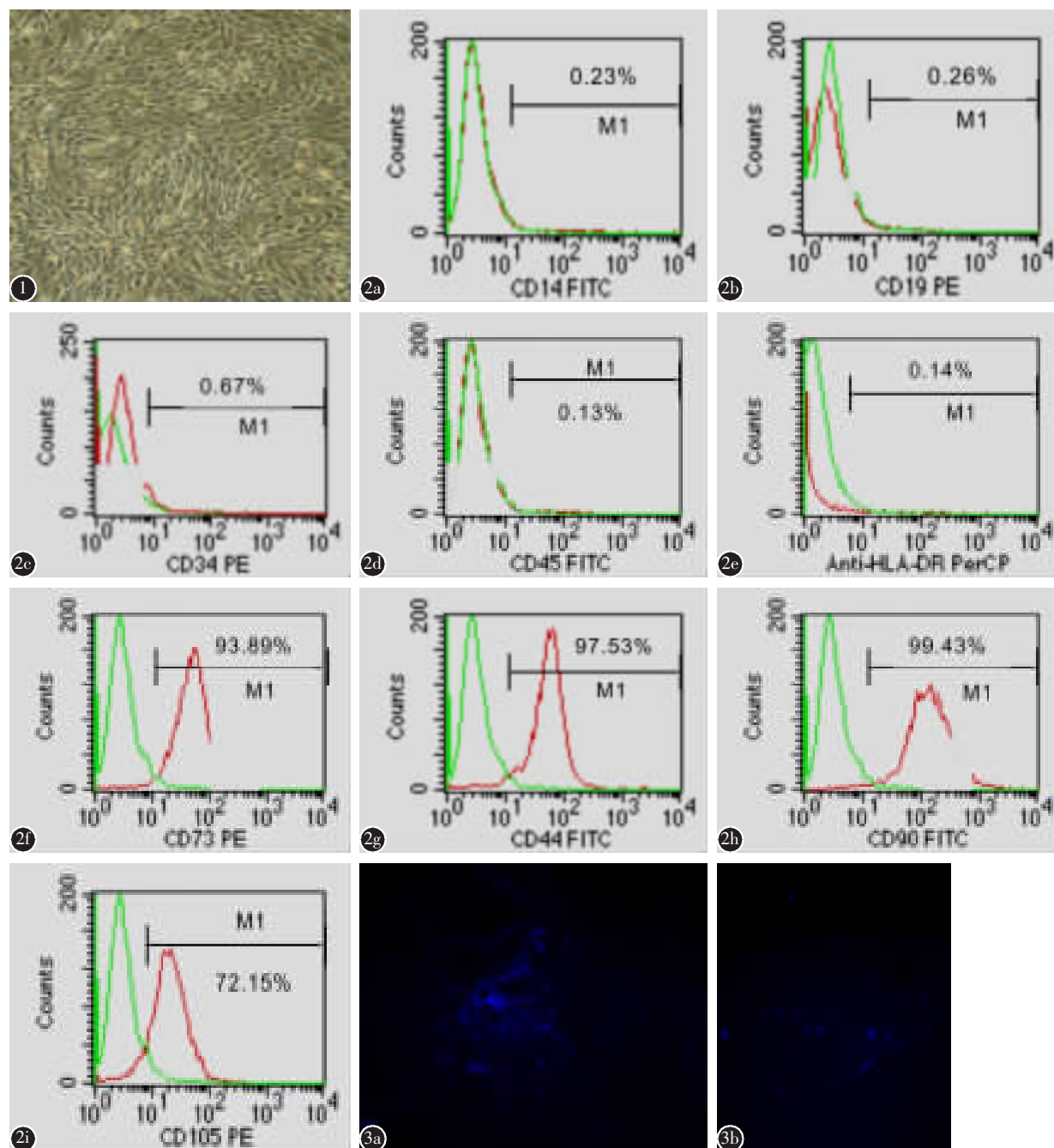


图 1 倒置相差显微镜下观察原代培养的 hAMSCs 为梭形、多角形,呈漩涡放射状生长(×100) 图 2 流式细胞仪分析显示原代培养的 hAMSCs 阳性表达间充质干细胞标志 CD73 (93.89%)、CD44 (97.53%)、CD90 (99.43%) 及 CD105 (72.15%),不表达 CD14、CD19、CD34、CD45 及 HLA-DR 图 3 荧光显微镜观察(×100) a hAMSCs 移植后 3d 在损伤脊髓组织内有较多的 DAPI 阳性细胞存活,呈明亮的蓝色荧光 b 移植后 7d 仍有部分 DAPI 阳性细胞存活

Figure 1 Morphology of primary cultured hAMSCs were spindle or triangle-like cells, which were presented as radiated growth observed by inverted phase contrast microscope(×100) **Figure 2** In primary cultured hAMSCs, flow cytometry analysis results showed that the expression level of CD73, CD44, CD90 and CD105 were 93.89%, 97.53%, 99.43% and 72.15% respectively, but another cell surface markers such as CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR were absent **Figure 3** As showed by fluorescence microscopy(×100) a There were more DAPI positive cells survived in the traumatized spinal cord at 3d after hAMSCs transplantation, which displayed bright blue fluorescence b There were still some DAPI positive cells existed at 7d after hAMSCs transplantation

表 1 脊髓损伤大鼠术后不同时间点 NGF mRNA、BDNF mRNA 及 Nogo-A mRNA 的表达

Table 1 Expression of NGF mRNA, BDNF mRNA and Nogo-A mRNA at different time points after hAMSCs transplantation in spinal cord injured rats

	术后 3d 的 mRNA 表达 mRNA expression level in 3d(Ct value)				术后 7d 的 mRNA 表达 mRNA expression level in 7d(Ct value)			
	NGF	BDNF	Nogo-A	β -actin	NGF	BDNF	Nogo-A	β -actin
hAMSCs 移植组 Transplantation group	24.40±0.45 ^①	30.62±1.68	21.76±0.98 ^①	17.80±0.59	24.56±0.98 ^②	27.11±0.87 ^②	19.29±1.13 ^①	17.29±0.18
PBS 对照组 Control group	23.80±0.29	29.06±1.20	20.55±0.34	17.14±0.38	25.28±1.11	28.52±0.90	19.52±1.21	18.00±0.33

注:两组中各基因表达量的高低按文中所列公式计算。①与对照组比较 $P<0.05$; ②与对照组比较 $P<0.01$

Note: The changes of each gene expression in two groups were calculated with the formulae as previously shown. ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with control group, $P<0.01$

经细胞在短时间内快速死亡,利用外源性干细胞移植治疗的策略不仅基于所植入的细胞能在受损组织内分化成神经细胞以替代补充宿主死亡神经细胞的假设,同时还寄希望于所植入的细胞能够刺激分泌某些有利于病损组织自我修复的营养因子或细胞因子,以更加有力地促进脊髓神经功能的修复重建。尽管大量实验研究显示利用不同来源间充质干细胞移植能有效促进脊髓损伤后的组织学修复与神经功能重建,但其具体的机制仍不十分明确,所得结论亦各不相同^[11-14]。我们在前期研究中利用明胶海绵吸附 hAMSCs 移植治疗全脊髓横断损伤的大鼠,发现 hAMSCs 能有效促进受损脊髓远端神经细胞的存活,进而促进实验大鼠神经功能的康复^[4]。基于此现象的发现,为避免未吸收的明胶海绵对组织 RNA 提取的影响,本研究中我们在脊髓损伤后直接将 hAMSCs 注射移植于受损组织内,尽管在移植后 7d 仍可发现少量 DAPI 标记阳性 hAMSCs 细胞定植于损伤脊髓内并向周围迁移,但毕竟损伤后即刻移植细胞,严峻的损伤微环境对外源性干细胞的存活具有重要影响^[15]。

在中枢神经系统内,NGF 是一种分子量为 14kD 的神经细胞生长调节因子,广泛存在于中枢神经系统,对神经元的发育、再生及其功能特化等方面有着重要调控作用。BDNF 同样作为中枢神经系统另一种重要的神经营养因子,能维持和促进多种感觉神经元、胆碱能神经元、多巴胺能神经元的发育、分化、生长与再生,能改善神经元的病理状态,对损伤后运动神经元死亡具有较强的阻止效应。BDNF 的上调也可通过 TrkB 受体能持续刺激受损的神经元轴突及髓鞘的再生^[16]。而

Nogo-A 是目前发现的由少突胶质细胞表达的最重要的轴突生长抑制因子,其作用主要是抑制轴突再生,促进生长锥塌陷及胶质瘢痕形成^[17]。在本研究中,我们着重观察了 hAMSCs 移植对受损脊髓组织内这三种神经因子相应 mRNA 表达的变化,结果显示无论在 hAMSCs 移植后 3d 或 7d,移植组 NGF mRNA 表达均高于对照组;BDNF mRNA 尽管在 hAMSCs 移植后 3d 无变化,在移植后 7d 却显著高于对照组;说明脊髓损伤后 hAMSCs 移植可上调受损组织内 NGF、BDNF mRNA 的表达。Alexanian 等^[18]的研究显示,骨髓 MSCs 移植可通过促进 NGF、BDNF 等多种神经因子的表达以利于受损脊髓组织修复和轴突再生。由此提示 hAMSCs 对 NGF mRNA、BDNF mRNA 的调控同样可能是其促进脊髓损伤后的修复因素之一。同时,我们还观察到 hAMSCs 移植后 Nogo-A mRNA 的表达较对照组降低。说明脊髓损伤后利用 hAMSCs 移植不仅可以上调受损组织内有利于组织修复的神经营养因子(NGF、BDNF),还能下调再生修复阻碍因子(Nogo-A)的表达。有研究显示 hAMSCs 在宿主体内通过旁分泌胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、表皮生长因子(EGF)及白介素-8(IL-8)等多种细胞因子和抗炎因子调节和改善损伤微环境,使宿主受损组织藉以得以有效保护^[19]。我们在实验中观察到 NGF、BDNF 及 Nogo-A 相应 mRNA 所出现的表达变化是否涉及其他因子的分泌及其具体的调控机制,有待进一步研究证实。

4 参考文献

1. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, et al. The amniotic mem-

- brane as a source of stem cells[J]. *Histol Histopathol*, 2010, 25(1): 91–98.
2. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro[J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 11–14.
 3. Díaz-Prado S, Muinos-López E, Hermida-Gómez T, et al. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(4): 846–857.
 4. 喻皇飞, 方宁, 陈代雄, 等. 人羊膜间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤神经功能恢复的影响[J]. *中华神经外科杂志*, 2012, 28(4): 412–415.
 5. Manochantr S, Tantrawatpan C, Kheolamai P, et al. Isolation, characterization and neural differentiation potential of amnion derived mesenchymal stem cells[J]. *J Med Assoc Thai*, 2010, 93(Suppl 7): S183–191.
 6. 张路, 方宁, 陈代雄, 等. 人羊膜间充质细胞具有向心肌样细胞分化的特性[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(12): 84–89.
 7. 彭琳, 王建, 卢光琇. 人羊膜间充质细胞的分离培养及向胰岛样细胞诱导分化[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(1): 5–10.
 8. 宋秀军, 陈代雄, 方宁, 等. 人羊膜间充质细胞具有分化成软骨及成骨细胞的潜能 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(50): 10056–10060.
 9. Bailo M, Soncini M, Vertua E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta [J]. *Transplantation*, 2004, 78(10): 1439–1448.
 10. Hyun I, Lindvall O, Ahrlund-Richter L, et al. New ISSCR guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 607–609.
 11. Quertainmont R, Cantinieux D, Botman O, et al. Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39500–e39514.
 12. Ban DX, Ning GZ, Feng SQ, et al. Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells: the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats [J]. *Regen Med*, 2011, 6(6): 707–720.
 13. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(8): 1614–1625.
 14. Pal R, Gopinath C, Rao NM, et al. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury [J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(6): 792–806.
 15. 陈少强, 林建华. 不同移植时间窗对静脉移植骨髓间充质干细胞在大鼠损伤脊髓内存活和迁移的影响[J]. *解剖学杂志*, 2009, 32(2): 190–194.
 16. Gómez-Pinilla F, Huie JR, Ying Z, et al. BDNF and learning: evidence that instrumental training promotes learning within the spinal cord by up-regulating BDNF expression[J]. *Neuroscience*, 2007, 148(4): 893–906.
 17. Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, et al. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13): 5393–5406.
 18. Alexanian AR, Maiman DJ, Kurpad SN, et al. In vitro and in vivo characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment[J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(6): 1123–1130.
 19. Kim SW, Zhang HZ, Guo L, et al. Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41105–e41115.

(收稿日期:2012-12-10 末次修回日期:2013-04-21)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)