

NGF 和 PTEN 双基因诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化效果观察

林平 陈毅 梁淑霞 李焘 邵依娜 赵有顺 吴咏军 涂迎春 黄志丹 安涛

【摘要】 目的 探讨神经生长因子(NGF)的过表达(NGF^{high})与 10 号染色体上的磷酸酶和张力蛋白同源物丢失(PTEN)的下调($PTEN^{low}$)相结合对大鼠骨髓间充质干细胞(MSC)提升周围神经再生能力的影响。方法 将绿色荧光蛋白(GFP)标记的 OriCell™ SD 大鼠 MSC(MSC/GFP)分为两组,实验组通过 NGF 基因稳定转染和 PTEN 基因的小干扰 RNA 干扰瞬时沉默构建双基因修饰的 $NGF^{high}/PTEN^{low}$ 大鼠 MSC/GFP,对照组为未经基因修饰的大鼠 MSC/GFP。采用细胞增殖/毒性检测试剂盒(CCK-8)和氧-葡萄糖剥夺实验检测两组细胞的增殖和凋亡情况;实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测两组细胞 NGF、PTEN 和巢蛋白-1(Nestin-1) mRNA 和蛋白表达情况。结果 CCK-8 检测结果显示双基因修饰的 $NGF^{high}/PTEN^{low}$ 大鼠 MSC/GFP 具有更强的增殖能力;氧-葡萄糖剥夺模型中 $NGF^{high}/PTEN^{low}$ 大鼠 MSC/GFP 具有更强的生存能力;qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,双基因修饰上调了 NGF、Nestin-1 的表达和下调了 PTEN 的表达。结论 双基因修饰的 $NGF^{high}/PTEN^{low}$ 大鼠 MSC/GFP 具有更强分化为神经元样细胞的能力,因此,双基因定向诱导大鼠 MSC 分化有利于神经元再生,从而提升周围神经再生能力。

【关键词】 神经生长因子 10 号染色体上的磷酸酶和张力蛋白同源物丢失 骨髓间充质干细胞 巢蛋白-1 分化和再生

NGF and PTEN dual genes induce differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells to neuron-like cells LIN Ping, CHEN Yi, LIANG Shuxia, et al. Department of Orthopedics, Jinhua Hospital of Zhejiang University (Jinhua Municipal Central Hospital), Jinhua 321000, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of overexpression of nerve growth factor(NGF) and phosphatase and tensin homologs deleted on chromosome 10(PTEN) dual genes on the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) to neuron-like cells. **Methods** The OriCell™ SD rat MSC cells were labeled with green fluorescent protein(MSC/GFP cells) was divided into 2 groups: the rat MSC/GFP cells were transfected with NGF gene and small RNA interference of PTEN to construct $NGF^{high}/PTEN^{low}$ MSC/GFP cells in experimental group, and the rat MSC/GFP cells were not modified in control group. CCK-8 and oxygen glucose deprivation test were used to detect the proliferation and apoptosis of cells in each group; qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of NGF, PTEN and Nestin-1 mRNA and protein in each group. **Results** The double gene modified $NGF^{high}/PTEN^{low}$ rat MSC/GFP cells had stronger proliferation ability as showed in CCK-8 results and had stronger survival ability as showed in oxygen glucose deprivation model; qRT-PCR and Western blot results showed that the expression of Nestin-1, NGF was up-regulated and PTEN was down-regulated by the double gene modification. **Conclusion** The double gene modified $NGF^{high}/PTEN^{low}$ rat MSC/GFP cells have stronger ability to differentiate into neuron-like cells, indicating that the differentiation of MSC induced by double gene orientation might be used for the regeneration of neurons and peripheral nerves.

【Key words】 Nerve growth factor Phosphatase and tensin homologs deleted on chromosome 10 Bone marrow mesenchymal stem cells Nestin-1 Differentiation and regeneration

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2020.42.10.2019-3274

基金项目:上海市周围神经显微外科重点实验室、手功能重建卫生部重点实验室基金项目(17DZ2270500);浙江省实验动物科技计划项目(2016C37094)

作者单位:321000 浙江大学金华医院(金华市中心医院)骨科

通信作者:陈毅, E-mail: cheniyi0427163@163.com

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, MSC)能够高度增殖分化,并且通过诱导向脂肪、骨、肌肉及神经等多种组织细胞进行分化^[1-3]。既往研究已证实 MSC 通过基因修饰或适当的诱导剂后,具有在特定基因表达和功能特性的神经元细胞中分化的潜力^[4-7]。此外,植入 MSC 对微环境信号有反应并分化为神经元样细胞,这些神经元样细胞可诱导动物坐骨神经再生^[8-9]。MSC 还具有分泌神经营养因子的能力,有助于修复受损神经元^[10]。因此, MSC 作为理想的种子细胞,为外周神经细胞损伤的临床治疗提供了机会。然而,有研究表明 MSC 的神经源性分化能力有限,移植入动物体内后再生能力不足限制了 MSC 作为种子细胞在研究中的应用。巢蛋白-1(Nestin-1)为神经元的特征性标志物。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是神经营养蛋白的成员,对调节神经元的生长、发育、分化、存活及损伤神经的再生修复具有重要作用和临床意义。10 号染色体上的磷酸酶和张力蛋白同源物丢失(phosphatase and tensin homologs deleted on chromosome 10, PTEN)已被证实哺乳动物的中枢神经系统中广泛表达,并且优先在神经元中表达^[11]。PTEN 基因的缺失或抑制能够促进轴突再生^[12]。但迄今未见 NGF 过表达与 PTEN 瞬时下调相结合提升 MSC 向神经元样细胞分化,从而影响对周围神经再生能力的相关研究。为进一步证实 NGF 与 PTEN 双基因修饰对 MSC 向神经元样细胞分化的影响,从而影响对周围神经再生能力,笔者拟通过增强 NGF 过表达和 PTEN 瞬时下调对 MSC 进行双基因修饰,观察双基因修饰后的 MSC 向 Nestin-1 阳性细胞(神经元样细胞)分化的能力,为其提升周围神经再生能力提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 具有绿色荧光蛋白(GFP)标记的 Ori-Cell™ SD 大鼠 MSC (MSC/GFP)(Cat.No.RASMX-01101)购自美国 Cyagen Biosciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠 MSC 的培养 复苏 SD 大鼠来源的 MSC/GFP, 将其接种到含有 OriCell™ MSC 生长培养基的 25cm² 培养瓶中,放在 37℃, 5%CO₂ 培养箱内培养。每 3d 更换 1 次生长培养基。细胞长满至 80%~90%时,使用 0.25%胰蛋白酶(含 0.02%的 EDTA)进行消化,离心收集细胞后传代,收集第 3 代细胞用于后续实验。用荧光显微镜观察细胞表达绿色荧光情况。

1.2.2 大鼠 MSC/GFP 表面标志物检测 采用流式细胞术。将第 3 代大鼠 MSC/GFP 使用胰蛋白酶消化后调整

细胞悬液浓度,以每管 1×10⁶ 个/ml 的细胞与细胞表面标志物 CD29、CD34、CD44、CD45 的一抗(美国 eBioscience 公司)混合,然后再与异硫氰酸荧光素(FITC,美国 BD 公司)偶联的二抗混合,4℃避光孵育 30min 后,使用流式细胞仪进行检测。

1.2.3 MSC/GFP 的成骨和脂肪形成分化能力检测 将大鼠 MSC/GFP 用胰蛋白酶消化并接种于成骨分化培养基(含 10%胎牛血清、50mg/L 抗坏血酸、0.1μmol/L 地塞米松、10mmol/L β-甘油磷酸盐的 DMEM 培养基)和脂肪形成分化培养基(含 10%胎牛血清、10mg/L 胰岛素、1μmol/L 地塞米松、0.5mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、0.2mmol/L 罗格列酮的 DMEM 培养基),37℃, 5%CO₂ 培养箱培养。每 3d 更换 1 次分化培养基,在诱导后第 19 天,使用茜素红 S 染色和油红 O 染色鉴定成骨分化和脂肪形成分化。

1.2.4 重组质粒 pEF1ANeo01-NGF 的构建及转染 设计特异性引物(NGF-XbaI-F: 3'-CTAGTCTAGAGC-CACCATGTCCATGTTGTTCTACACTC-5', NGF-BamHI-R: 3'-TCAGGATCCGCCTCTTCTTGCAGCCTTCCTG-5'),使用 Takara PrimerSTAR Max DNA 聚合酶从大鼠 cDNA 中 PCR 扩增含有 XbaI 和 BamHI 核酸内切酶位点的 NGF 序列。构建重组质粒 pEF1ANeo01-NGF,测序分析重组质粒 pEF1ANeo01-NGF。使用 LipoHigh 将重组质粒 pEF1ANeo01-NGF 转染到大鼠 MSC/GFP 中,转染后 24h,加入最佳筛选浓度(500μg/ml)的遗传霉素(G418),每隔 2d 更换新的含有最佳筛选浓度 G418 的培养液,连续培养 4 周。收集抗性细胞,获得稳定转染细胞株,命名为大鼠 NGF^{high}MSC/GFP。

1.2.5 小干扰 RNA(siRNA)干扰瞬时下调大鼠 NGF^{high}MSC/GFP 中 PTEN 的表达 设计 PTEN siRNA 干扰序列:有义:5'-GAGGCGCUAUGUAUAUAUdTdT-3',反义:5'-AUAUAUAUACAUAAGCGCCUCdTdG-3'。取对数生长期的第 3 代细胞接种于 24 孔板,至细胞达到 80%~90%汇合。siRNA 转染培养细胞,5h 后更换含有 10%胎牛血清且不含抗生素的 DMEM,培养 48h。通过实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别测定 PTEN mRNA 和蛋白相对表达量。siRNA 转染后的细胞命名为 NGF^{high}/PTEN^{low} 大鼠 MSC/GFP。

1.2.6 实验分组 实验组为双基因修饰的 NGF^{high}/PTEN^{low} 大鼠 MSC/GFP, 对照组为未经基因修饰的大鼠 MSC/GFP。

1.2.7 NGF、PTEN 和 Nestin-1 mRNA 相对表达量检测 使用 Trizol 试剂从各组细胞中提取总 RNA,吸光度(OD)₂₆₀

/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 内提示样品 RNA 满足实验要求。根据说明书,使用 BioRT cDNA Strand Synthesis Kit 逆转录第一链 cDNA。将 RNA 反转录成 cDNA。使用 2×Taq PCR Master Mix 进行,进行 qRT-PCR 分析。用于扩增 NGF、PTEN、Nestin-1 和内参 GAPDH 的特异性引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
NGF	正向 CAACAGGACTCACAGGAGCAAGC
	反向 GATGTCCGTGGCTGTGGTCTTATC
PTEN	正向 ATTCCCACTCAGAGGCGCTA
	反向 AGCTGGCAGACCACAACTG
Nestin-1	正向 ATGAGGAAGGAGCAGATCAGGAG
	反向 CAGCACCTCTCAAGCCATCATCC
GAPDH	正向 GTCTTCACCACCATGAGAAGGCTG
	反向 TGAGGTCCACCACCTGTTGCTGTA

1.2.8 NGF、PTEN 和 Nestin-1 蛋白相对表达量检测 裂解提取各组细胞总蛋白,BCA 测定蛋白浓度。调整蛋白浓度,等量总蛋白上样,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质样品,并转移到硝酸纤维素膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 1h,分别加入 NGF、PTEN 和 Nestin-1 一抗(英国 Abcam 公司),4℃孵育过夜。TBST 漂洗,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗工作液,室温孵育 1~2h。TBST 漂洗,然后使用蛋白质印迹 ECL 荧光检测试剂进行检测。

1.2.9 NGF^{high}/PTEN^{low} 大鼠 MSC/GFP 的细胞活力测定 采用细胞增殖/毒性检测试剂盒(CCK-8)。将两组细胞以 2 000 个细胞/孔的密度接种到 96 孔板中,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。分别于 24、48 和 72h 进行取样检测,加入 10μl CCK-8 后,将细胞在 37℃下培养 4h,用微量滴定板读数仪分析 450nm 处的光密度。进行了 5 次独立实验。

1.2.10 氧-葡萄糖剥夺实验 通过检测氧-葡萄糖剥夺诱导的细胞凋亡,分析双基因遗传诱导对大鼠 MSC/GFP 存活的影响。将两组细胞接种于无血清和无葡萄糖的人工脑脊液(ACSF)(pH 7.4),其中含有 125mmol/L 氯化钠,5mmol/L 氯化钾,25.7mmol/L 碳酸氢钠,2mmol/L 硫酸镁,1.2mmol/L 磷酸二氢钠和 10mmol/L 蔗糖。细胞在 37℃,90%N₂,9%CO₂ 和 1%O₂ 环境下孵育。4h 后,用生长培养基替换 ACSF,将细胞在正常氧条件下 37℃培养 2h,收集细胞悬液。根据 Annexin V 凋亡试剂盒的说明,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料

以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 大鼠 MSC/GFP 绿色荧光和表面标志物表达情况检测 双基因未修饰前,对 OriCell™ 大鼠 MSC/GFP 的绿色荧光表达情况进行观察,发现次代培养时,显示出强烈的绿色荧光。约 90% 的第 3 代细胞仍可见荧光信号,见图 1(插页)。使用表面标志物 CD29、CD34、CD44、CD45 抗体对第 3 代大鼠 MSC/GFP 进行流式细胞术分析,通过明确确定的细胞表面抗原表达来分析大鼠 MSC/GFP 的规格和纯度。结果显示(99.29±3.12)% 的细胞 CD44 阳性,(96.41±2.33)% 的细胞 CD29 阳性,(8.91±0.66)% 的细胞 CD34 阳性,(6.79±1.01)% 的细胞 CD45 阳性,见图 2(插页)。

2.2 大鼠 MSC/GFP 的成骨和脂肪形成分化能力检测 将大鼠 MSC/GFP 在成骨分化培养基中培养 19d 后(图 3a,插页),在显微镜下观察到红色矿化结节(图 3b,插页)。此外,脂肪形成分化培养基中生长的大鼠 MSC/GFP 不断扩大,可见细胞内脂滴(图 3c,插页)。显微镜下见油红 O 染色呈阳性反应(图 3d,插页)。

2.3 构建重组质粒 pEF1ANeo01-NGF 凝胶电泳显示在成功从大鼠 cDNA PCR 扩增产生约 0.72kb 的目的片段 NGF(图 4a)。XbaI 和 BamHI 酶切鉴定重组质粒,显示出 5.4 和 0.72kb 两个片段(图 4b)。对重组质粒 pEF1ANeo01-NGF 进行测序,单点突变发生在 186(T-C)(图 4c),在大鼠 NGF 的氨基酸序列中未发现突变(图 4d)。因此,上述数据表明成功构建了携带大鼠 NGF 片段的重组质粒。

2.4 两组细胞 NGF、PTEN 和 Nestin-1 mRNA 和蛋白相对表达量比较 实验组大鼠 MSC/GFP 中 NGF 和 Nestin-1 mRNA 和蛋白相对表达量均高于对照组,而 PTEN mRNA 和蛋白相对表达量均低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图 5。

2.5 双基因修饰调控对大鼠 MSC/GFP 细胞活力的影响 CCK-8 实验表明,实验组大鼠 MSC/GFP 在 48、72h 时间点的 OD 值均高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果表明双基因修饰可以促进大鼠 MSC/GFP 的增殖(图 6)。

2.6 双基因修饰调控对大鼠 MSC/GFP 氧-葡萄糖剥夺诱导的增殖和凋亡的影响 对照组和实验组在正常缺氧条件下存活率相当,细胞存活率分别为 93.92% 和 95.21%。氧-葡萄糖剥夺处理后,实验组存活率为

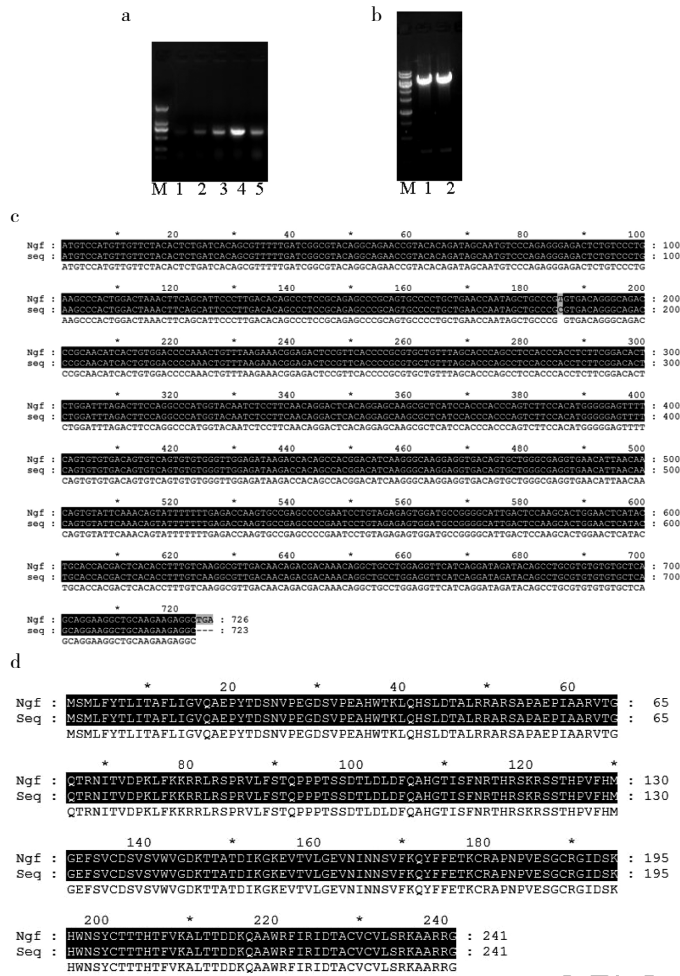


图4 重组载体 pEF1Neo01-NGF 的鉴定(a:扩增产生约 0.72kb 的 DNA 片段,M:DL 2000 DNA 标记,1~5:阳性克隆;b:重组载体 pEF1Neo01-NGF 用内切核酸酶 XbaI 和 BamHI 消化,显示出 5.4 和 0.72kb 片段,M:1kb DNA Ladder,1~2:通过双核酸内切酶消化的产物;c:DNA 测序显示 186(T-C)处的单突变;d:编码的氨基酸序列与大鼠 NGF 精确匹配)

65.03%,明显高于对照组的 51.77%,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图7)。表明双基因修饰可以促进大鼠 MSC/GFP 的存活。

3 讨论

MSC 是指骨髓基质内非造血干细胞来源的细胞亚群,具有自我更新、多向分化潜能、对机体损伤小、易得性强、高增殖特性、易于基因操作等优点,成为再生医学领域研究应用最为广泛的成体干细胞^[13]。MSC 可能作用机制包括:MSC 向损伤组织迁移和抑制宿主免疫反应的能力;MSC 的去分化和再分化;MSC 直接分化为上皮细胞或消化道干细胞;MSC 与消化道干细胞或成熟上皮细胞融合;MSC 参与损伤微环境的重建^[14]。此外,MSC 虽表现出了神经再生的能力,但其有效性仍有待提高。

本研究在培养过程中对 MSC/GFP 的荧光信号持续进行检测,并对 OriCell™ SD 大鼠 MSC/GFP 的质量进行评价。通过检测 MSC/GFP 中 CD29、CD44、CD34、CD45 等多种抗原标志物的表达,发现大多数 MSC/GFP CD29 和 CD44 表达呈阳性,但只有少数细胞 CD34 和 CD45 表达呈阳性,大鼠 MSC/GFP 特异性抗原标志物的表达模式与 MSC 的既定表型是一致的^[15],由此鉴定了 MSC/GFP 的纯度。本研究还发现大鼠 MSC/GFP 能够在成骨和成脂分化培养基中生长,并对茜素红 S 和油红 O 呈阳性染色,表明大鼠 MSC/GFP 具有多能分化能力。因此,笔者认为 OriCell™ 大鼠 MSC/GFP 具有高效的特异性和多潜能,可为将来进一步实验研究提供理论基础。

NGF 具有增强周围神经损伤愈合的能力,并且通过产生神经肽信号和受体促进 MSC 向神经元样细胞分化^[16-17]。而 PTEN 是一种细胞内固有表达的非分泌型蛋白,能够通过 PTEN/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号传导通路完成细胞突起的生长,其表达受抑制有利于损伤的周围神经的再生。因此,本研究初步探索了大鼠 MSC/GFP 中 NGF 和 PTEN 的固有表达,结果显示大鼠 MSC/GFP 呈现 NGF 低表达以及 PTEN 高表达,该结果与之前的研究一致:在 SD 大鼠 MSC 中几乎没有检测到 NGF 的表达^[18],而 PTEN 在大鼠 MSC 中有表达^[19]。多项

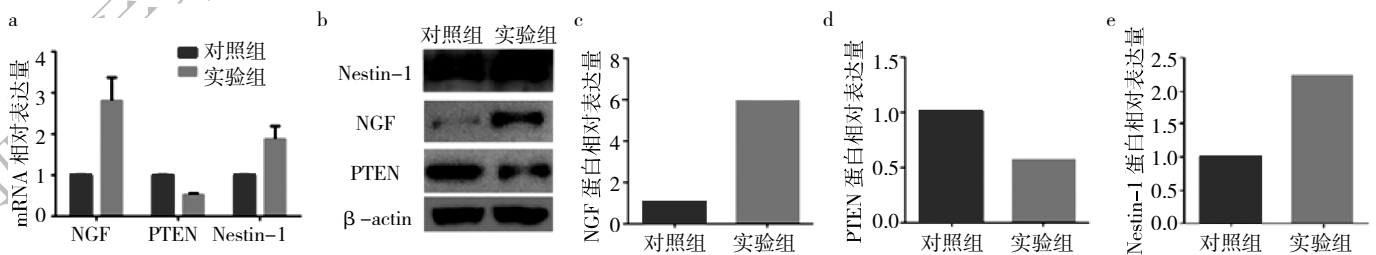


图5 两组细胞 NGF、PTEN 和 Nestin-1 mRNA 和蛋白相对表达量比较(a:两组细胞 NGF、PTEN 和 Nestin-1 mRNA 相对表达量比较;b:两组细胞 NGF、PTEN 和 Nestin-1 蛋白相对表达的电泳图;c:两组细胞 NGF 蛋白相对表达量比较;d:两组细胞 PTEN 蛋白相对表达量比较;e:两组细胞 Nestin-1 蛋白相对表达量比较)

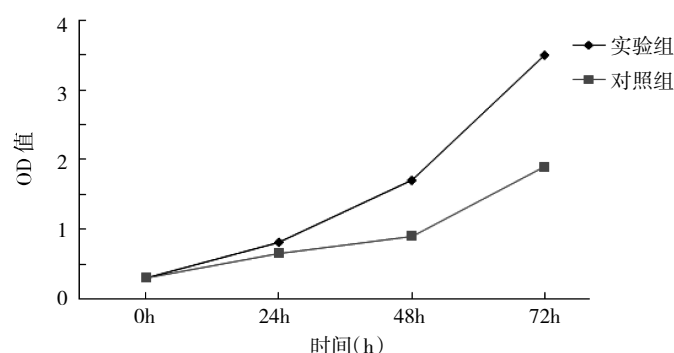


图6 CCK-8 测定细胞增殖

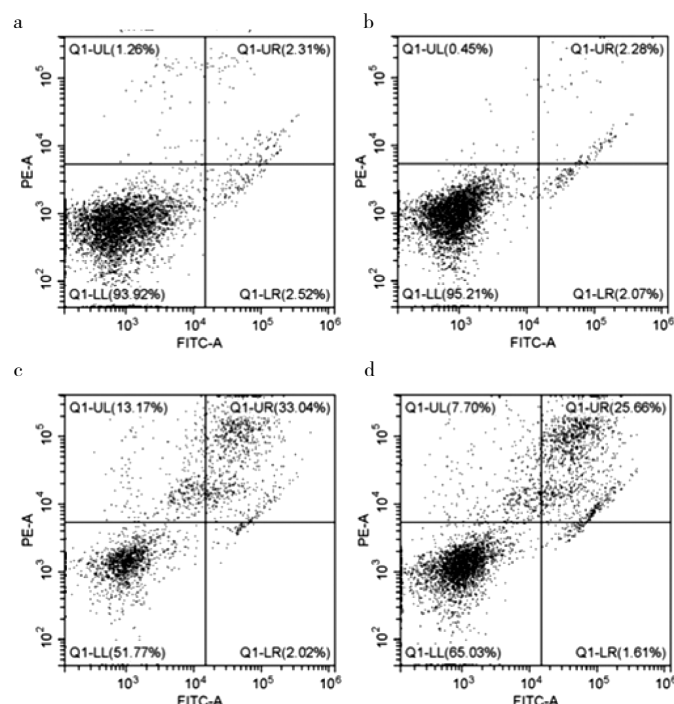


图7 由大鼠 MSC/GFP 和 $NGF^{high}/PTEN^{low}$ 大鼠 MSC/GFP 的氧-葡萄糖剥夺诱导的细胞凋亡(a:在生长培养基和常规条件下培养的大鼠 MSC/GFP;b:在生长培养基和常规条件下培养的 $NGF^{high}/PTEN^{low}$ 大鼠 MSC/GFP;c:用氧-葡萄糖剥夺处理的大鼠 MSC/GFP;d:用氧-葡萄糖剥夺处理的 $NGF^{high}/PTEN^{low}$ 大鼠 MSC/GFP)

研究表明,PTEN 能够下调磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)/mTOR 促存活信号^[20-21],而 PI3K/Akt 信号通路的激活被证明是 NGF 促进 MSC 增殖的关键^[22]。此外,Akt 在介导 NGF 在 MSC 向神经元分化和抗神经元凋亡中具有一定的作用^[23-24]。目前,Zhang 等^[25]发现 MSC 在 NGF 培养基中能够发挥神经保护作用,其原因在于 MSC 能够触发 NGF-PI3K/Akt/mTOR 信号通路。因此,大鼠 MSC/GFP 固有的较强 PTEN 可以通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路和抑制 NGF 的作用来减弱受损外周神经的再生。

为了增强大鼠 MSC/GFP 修复受损外周神经的作用,本研究通过转染含有大鼠 NGF 片段的重组质粒对 NGF 进行过表达,同时采用特异性小 RNA 干扰瞬时下调 PTEN,但 PTEN 并没有永久性的敲除。PTEN 作为一个主要的肿瘤抑制因子,在中枢神经系统、心、肝、肾、胃肠道及皮肤等全身多器官均有表达,既往研究也显示 PTEN 的药理学抑制可能是一种抗癌治疗方法^[13,26]。笔者发现 siRNA 干扰可瞬时下调 MSC/GFP 中 PTEN 的表达,而转染重组质粒 pEF1ANeo01-NGF 可使 NGF 的表达上调。此外,本研究还揭示了双基因修饰对大鼠 MSC 增殖的积极作用。为了评估双基因修饰对生物学行为的影响,还检测了氧-葡萄糖剥夺诱导的细胞凋亡。结果显示,双基因修饰促进细胞存活,有利于再生的应用。上述信号传导途径也能够调控双基因修饰对在氧-葡萄糖剥夺条件下培养的 MSC 的增殖和存活。

为了探索双基因修饰能否增强大鼠 MSC 的神经元分化,本研究对是否进行双基因修饰细胞中的神经元分化标志物 Nestin-1 表达进行了评估,结果发现大鼠 MSC/GFP 的 Nestin-1 表达较弱,这与之前的报道一致^[27-28],但双基因修饰在 mRNA 和蛋白水平上 Nestin-1 表达却显著上调。上述发现表明大鼠 $NGF^{high}/PTEN^{low}$ MSC/GFP 更倾向于神经元细胞分化,其原因可能为高表达的 NGF 抑制了 PTEN 介导的信号通路。

综上所述,大鼠骨髓来源的 MSC/GFP 在机体固有地低表达 NGF 并高表达 PTEN。通过 NGF 的过表达和 PTEN 的瞬时下调进行双基因修饰能够使大鼠骨髓来源的 MSC 获得较强的分化为 Nestin-1 阳性细胞(神经元样细胞)的能力,由此表明双基因的修饰增强了 MSC 的神经再生能力,但具体的调控机制有待于进一步研究探讨。

4 参考文献

- [1] Xie H, Yang F, Deng L, et al. The performance of a bone-derived scaffold material in the repair of critical bone defects in a rhesus monkey model[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(22): 3314-3324. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.001.
- [2] Matsushita T, Lankford KL, Arroyo EJ, et al. Diffuse and persistent blood-spinal cord barrier disruption after contusive spinal cord injury rapidly recovers following intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Exp Neurol*, 2015, 267(5): 152-164. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.03.001.
- [3] 翁益云,滕银燕,杨德壕,等.骨髓间充质干细胞治疗实验性自身免疫性重症肌无力的作用机制探讨[J]. *浙江医学*, 2016, 18(38): 1483-1486.
- [4] Mohammadi R, Azizi S, Delirez N, et al. The use of undifferentiated bone marrow stromal cells for sciatic nerve regeneration in rats[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2012, 41(5): 650-656. DOI: 10.1016/

- j.ijom.2011.10.028.
- [5] Bai S, Zhou H, Wu L. Bone marrow stromal cells improved functional recovery in spinal cord injury rats partly via the Toll-like receptor-4/nuclear factor- κ B signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1):444–448. DOI:10.3892/etm.2018.6907.
 - [6] Farzi-Molan A, Babashah S, Bakhshinejad B, et al. Down-regulation of the non-coding RNA H19 and its derived miR-675 is concomitant with up-regulation of insulin-like growth factor receptor type 1 during neural-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(8): 940–948. DOI:10.1002/cbin.10960.
 - [7] Zhu L, Liu T, Cai J, et al. Repair and regeneration of lumbosacral nerve defects in rats with chitosan conduits containing bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Injury*, 2015, 46(11):2156–2163. DOI:10.1016/j.injury.2015.08.035.
 - [8] Wu J, Yu W, Chen Y, et al. Intrastriatal transplantation of GDNF-engineered BMSCs and its neuroprotection in lactacystin-induced Parkinsonian rat model[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35(3):495–502. DOI:10.1007/s11064-009-0086-6.
 - [9] Mohammadi R, Azizi S, Delirez N, et al. Comparison of beneficial effects of undifferentiated cultured bone marrow stromal cells and omental adipose-derived nucleated cell fractions on sciatic nerve regeneration[J]. *Muscle Nerve*, 2011, 43(2):157–163. DOI: 10.1002/mus.21895.
 - [10] 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. DOI:10.1016/j.biochi.2013.08.004.
 - [11] Chen H, Xiang J, Wu J, et al. Expression patterns and role of PTEN in rat peripheral nerve development and injury[J]. *Neurosci Lett*, 2018, 29(676):78–84. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.04.016.
 - [12] Huang Z, Hu Z, Xie P, et al. Tyrosine-mutated AAV2-mediated shRNA silencing of PTEN promotes axon regeneration of adult optic nerve[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0174096. DOI: 10.1371/journal.pone.0174096.
 - [13] Lin L, Lin H, Bai S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) improved functional recovery of spinal cord injury partly by promoting axonal regeneration[J]. *Neurochem Int*, 2018, 115(5): 80–84. DOI:10.1016/j.neuint.2018.02.007.
 - [14] 朱美飞, 江荣林, 雷澍, 等. DMOG 促进骨髓间充质干细胞血管新生作用的研究[J]. *浙江医学*, 2016, 11(38):779–782.
 - [15] Wang Z, Deng Q, Zhang X, et al. Treatment of injured neurons with bone marrow stem cells cotransfected by hTERT and Ad-BDNF in vitro[J]. *J Mol Neurosci*, 2009, 38(3): 265–272. DOI: 10.1007/s12031-009-9208-5.
 - [16] Ding J, Cheng Y, Gao S, et al. Effects of nerve growth factor and Noggin-modified bone marrow stromal cells on stroke in rats[J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(2):222–230. DOI:10.1002/jnr.22535.
 - [17] Colafrancesco V, Villoslada P. Targeting NGF pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases[J]. *Arch Ital Biol*, 2011, 149(2): 183–192. DOI:10.4449/aib.v149i2.1376.
 - [18] Hu Y, Zhang Y, Tian K, et al. Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor dual gene modification on rat bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1):49–58. DOI:10.3892/mmr.2015.4553.
 - [19] Liu X, Chen T, Wu Y, et al. Role and mechanism of PTEN in adiponectin-induced osteogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1):712–717. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.12.076.
 - [20] Shi XF, Wang H, Xiao FJ, et al. MiRNA-486 regulates angiogenic activity and survival of mesenchymal stem cells under hypoxia through modulating Akt signal[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(3): 670–677. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.084.
 - [21] Song BQ, Chi Y, Li X, et al. Inhibition of Notch Signaling Promotes the Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through Autophagy Activation and PTEN-PI3K/AKT/mTOR Pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(5): 1991–2002. DOI: 10.1159/000430167.
 - [22] Wang WX, Hu XY, Xie XJ, et al. Nerve growth factor induces cord formation of mesenchymal stem cell by promoting proliferation and activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(12):1483–1490. DOI:10.1038/aps.2011.141.
 - [23] Yuan J, Huang G, Xiao Z, et al. Overexpression of β -NGF promotes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neurons through regulation of AKT and MAPK pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 383(1–2):201–211. DOI:10.1007/s11010-013-1768-6.
 - [24] Wang Q, Sun G, Gao C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells attenuate 2,5-hexanedione-induced neuronal apoptosis through a NGF/AKT-dependent pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 5(6): 34715–34722. DOI:10.1038/srep34715.
 - [25] Zhang X, Kong Y, Sun Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells conditioned medium protects VSC4.1 cells against 2,5-hexanedione-induced autophagy via NGF-PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Brain Res*, 2018, 1696(12):1–9. DOI:10.1016/j.brainres.2018.04.028.
 - [26] Augello G, Puleio R, Emma MR, et al. A PTEN inhibitor displays preclinical activity against hepatocarcinoma cells[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(4):573–583. DOI: 10.1080/15384101.2016.1138183.
 - [27] Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sumide K, et al. Prospectively Isolated Human Bone Marrow Cell-Derived MSCs Support Primitive Human CD34-Negative Hematopoietic Stem Cells[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(5): 1554–1565. DOI:10.1002/stem.1941.
 - [28] Johnstone SA, Liley M, Dalby MJ, et al. Comparison of human olfactory and skeletal MSCs using osteogenic nanotopography to demonstrate bone-specific bioactivity of the surfaces [J]. *Acta Biomater*, 2015, 13(2): 266–276. DOI:10.1016/j.actbio.2014.11.027.

(收稿日期:2019-12-12)

(本文编辑:陈丽)