

文章编号 1006-8147(2014)03-0172-05

论 著

# BDNF 和 TERT 联合转染 BMSCs 对血管性痴呆大鼠学习记忆功能恢复及海马 CA1 区超微结构的影响

王 菲<sup>1</sup>, 常光明<sup>2</sup>, 耿 鑫<sup>3</sup>

(1.天津医科大学总医院神经内科, 天津 300052; 2. 天津医科大学总医院检验科, 天津 300052; 3.天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 教育部免疫微环境与疾病重点实验室, 天津 300070)

**摘要** 目的:研究脑源性神经营养因子(BDNF)和端粒酶逆转录酶(TERT)联合转染的骨髓基质干细胞(BMSCs)对血管性痴呆(VD)大鼠学习记忆功能恢复的作用,进一步探讨 VD 的有效治疗途径。方法:经大鼠股骨分离并鉴定 BMSCs, 构建 pLXSN-TERT 重组子后转化至 BMSCs, 软琼脂克隆形成实验检测体外培养的 TERT-BMSCs 的成瘤性。应用 Ad5-BDNF 转染 TERT-BMSCs, 构建 BDNF-TERT 联合转染的 BMSCs。将 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 4 组:对照组、VD 组、BMSCs 组、BDNF-TERT-BMSCs 组。采用两血管阻断法制备 VD 模型。采用 Morris 水迷宫测试方法测试各组大鼠空间学习记忆力。应用 RT-PCR 和 Western blot 方法分别检测各组大鼠海马 CA1 区 BDNF、TrkB、SYN 基因 mRNA 和蛋白表达情况, 应用透射电镜观察各组大鼠海马 CA1 区超微结构变化。结果:行为学实验 Morris 水迷宫测试结果及超微病理透射电镜观察均显示 BMSCs 和 BDNF-TERT-BMSCs 对血管性痴呆大鼠有改善作用, 且 BDNF-TERT-BMSCs 较 BMSCs 的作用更为显著。荧光实时定量 RT-PCR 和 Western blot 结果显示, BMSCs 组和 BDNF-TERT-BMSCs 组中 BDNF、TrkB、SYN mRNA 及蛋白表达水平均较痴呆模型组增高 ( $P<0.05$ ), 且 BDNF-TERT-BMSCs 组较 BMSCs 组增加更为显著, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。结论:BDNF-TERT 联合转染 BMSCs 较普通的 BMSCs 对 VD 有更好的治疗效果, 可明显改善 VD 大鼠的学习记忆功能的恢复。

**关键词** 血管性痴呆;骨髓基质干细胞;脑源性神经营养因子;端粒酶;突触素;大鼠

中图分类号 R743

文献标志码 A

## BMSCs co-transfected with BDNF and TERT improve the ability of cognition and ultra-structure in the hippocampal CA1 region of the rats with vascular dementia

WANG Fei<sup>1</sup>, CHANG Guang-ming<sup>2</sup>, GENG Xin<sup>3</sup>

(1.Department of Neurology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2.Department of Clinical Laboratory, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 3.Department of Biochemistry and Molecular Biology, Key laboratory of Immune Microenvironment and Diseases of Ministry of Education, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To study the effects of BMSCs co-transfected with TERT and BDNF on the expression of BDNF, TrkB and SYN in hippocampal CA1 region of rats model with vascular dementia (VD). **Methods:** Rat BMSCs were isolated and identified, then transfected by pLXSN-TERT recombinant. Colony formation assay in soft agar was used to detect the tumorigenicity of BMSCs *in vitro*. TERT-BMSCs were transfected with Ad5-BDNF. Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups (10 rats in normal control group, 10 in dementia model group, 10 in BMSCs group, and 10 in BDNF-TERT-BMSCs group). Two-vessel occlusion was employed to make VD models. Morris water maze test was done to detect the ability of spatial learning and memory. Then the expression of BDNF, TrkB and SYN in hippocampal CA1 region were determined by real-time RT-PCR and Western blot. The ultra-micro structures of synapses in the four groups were detected by transmission electron microscope. **Results:** The behavior and morphology of the VD rats treated by BMSCs were enhanced. The average expression of BDNF, TrkB, SYN mRNA and protein in VD group was significantly lower than that in control group ( $P<0.05$ ). The average expression of BDNF, TrkB, SYN protein in BDNF-TERT-BMSCs group were higher than those in BMSCs group and VD group ( $P<0.05$ ). The ultra-structure of synapses in BDNF-TERT-BMSCs group was improved significantly compared to BMSCs group and VD group. **Conclusion:** BMSCs co-transfected with TERT and BDNF could improve the ability of spatial learning and memory in VD rats. The mechanism might be associated with enhancement of the expression of BDNF, TrkB and SYN mRNA and protein and it might have an effect on the synaptic plasticity in hippocampal CA1 area.

**Key words** vascular dementia; bone marrow mesenchymal stem cells; brain derived neurotrophic factor; telomerase; synaptophysin; rat

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81100805);天津市高校科技发展计划基金资助项目(20080107);基因工程教育部重点实验室开放研究基金资助项目(201302)

作者简介 王菲(1979-),女,主治医师,博士,研究方向:分子神经病学;通信作者:耿鑫, E-mail: gengx@tmu.edu.cn。

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是脑血管病所致脑损害引起的智力障碍,其发病呈上升趋势,特别是在亚洲国家中,VD为老年期痴呆的首发原因。对于VD的治疗研究在不断探索之中<sup>[1-3]</sup>。细胞替代疗法是通过补充机体组织某种细胞的数量达到修复组织及恢复组织正常功能的治疗方法,其中干细胞治疗是近些年研究较多的细胞疗法之一。骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是骨髓内除造血干细胞之外的一类干细胞,在一定的诱导条件下,可向神经元细胞分化<sup>[4-5]</sup>;有取材方便、体外易培养、增殖快、免疫原性较弱等优点,是组织工程中理想的种子细胞。有研究报道,移植BMSCs能促进大鼠缺血脑组织血管新生以及脑组织重塑。然而BMSCs在应用中经常会出现分化能力丧失、过早老化、增殖状况不稳定等生物学现象,影响其发挥神经保护功能,这与其端粒酶活性的不足有关<sup>[6-7]</sup>。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)能促进和维持内源性神经细胞生长、存活,可提高BMSCs向神经元样细胞分化,对脑组织起到神经保护作用<sup>[8]</sup>。BDNF及其受体酪氨酸激酶受体B(tyrosine kinase B, TrkB)对神经元的生存、生长、分化有重要的影响,可减少损伤神经元的细胞凋亡<sup>[9]</sup>。突触素(synaptophysin, SYN)是突触前区的特征性标志物,其密度和分布可间接反应神经元突触的数量、密度和分布情况<sup>[10]</sup>。本文通过行为学、分子生物学及形态学等多种分析方法,观察端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和BDNF联合转染修饰的BMSCs是否对VD大鼠的行为记忆功能有恢复治疗作用,其作用是否优于普通BMSCs,为今后寻找更有效的VD治疗手段提供线索。

## 1 材料与方法

**1.1 大鼠BMSCs的分离和鉴定** 80 g左右Wistar大鼠处死后,无菌条件下分离双侧股骨,用含10% FBS的L-DMEM培养基反复冲洗骨髓腔,37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育。细胞传至第5代,消化收集细胞,PBS洗涤,100 μL PBS中加入约1×10<sup>6</sup>个细胞,分别加入适量FITC标记CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD90抗体,室温避光放置30 min, PBS洗涤,1%多聚甲醛600 μL重悬细胞,流式细胞仪检测。

**1.2 TERT转染BMSCs** 按照文献方法,构建逆转录病毒载体pLXSN-TERT重组子<sup>[11]</sup>。BMSCs接种到6孔板,分为以下3组细胞:BMSCs对照组、pLXSN组、pLXSN-TERT组,至细胞90%汇合率时,按每孔4 μg载体、10 μL Lipofectamine 2000、2.5 mL L-

DMEM进行转染,6 h后更换完全培养基,24 h后1:10传代,48 h后加入200 μg/mL G418筛选。10 d后,BMSCs对照组改以50 μg/mL G418维持。取TERT转染的BMSCs,培养2个月后,应用实时定量RT-PCR检测TERT mRNA的表达,应用端粒重复扩增法(telomere repeat amplification protocol, TRAP)进行端粒酶活性的检测。

**1.3 软琼脂克隆形成实验检测体外培养BMSCs的成瘤性** 于6孔培养板各孔底添加3 mL含0.9%琼脂糖的DMEM培养基,置于细胞培养箱过夜凝固;取对数生长期细胞,常规胰蛋白酶消化,细胞计数;用含10% FBS的DMEM配置终浓度为0.36%低熔点琼脂糖的混合液,取2 mL混合液与含2×10<sup>4</sup>个细胞悬液均匀混合,迅速滴加至6孔板中,至培养箱过夜;次日取出于各孔中分别加入200 μL含10% FBS的DMEM培养基,之后每周更换培养液;4~6周后倒置显微镜下计数细胞克隆个数,C6胶质瘤细胞做为阳性对照。

**1.4 BDNF转染TERT-BMSCs** 以0.25%胰蛋白酶消化TERT-BMSCs,以每孔约1×10<sup>6</sup>个细胞接种,按感染复数(multiple of infection, MOI)为100 pfu/cell值,将Ad5-BDNF 75 μL加入培养皿中,轻摇混匀,培养孵育2 h,再加入含有20% FBS的DMEM培养基,培养48 h。

**1.5 VD动物模型的制作** 选择健康雄性Wistar大鼠40只,体质量260~300 g,购自军事医学科学院实验动物中心。将大鼠随机分为4组,分别为正常对照组、痴呆模型组、BMSCs组、BDNF-TERT-BMSCs组,每组各10只。血管性痴呆大鼠模型的制备参照Ni等<sup>[12]</sup>的方法,采用双侧颈总动脉结扎(2VO)方法制作。术后2 d存活的模型大鼠进行Morris水迷宫测试。以大鼠全时程平均逃避潜伏期时间的均值作为VD的确定指标。

**1.6 BMSCs细胞移植** 浓度为4×10<sup>6</sup>个/mL的BMSCs和BDNF-TERT-BMSCs,经尾静脉分别向BMSCs组大鼠和BDNF-TERT-BMSCs组大鼠体内注射1 mL。

**1.7 水迷宫测试** 采用Morris水迷宫方法<sup>[13]</sup>测试大鼠认知功能,包括定位航行实验和空间探索实验。

**1.8 荧光实时定量RT-PCR检测** BMSCs移植大鼠2个月后,Trizol法提取各组大鼠海马CA1区脑组织RNA,逆转录酶作用下合成cDNA,Taq酶作用下进行PCR反应。实时荧光定量PCR法检测BDNF、TrkB、SYN mRNA表达水平,以β-actin作为内参。体系总体积为20 μL,含2 μL cDNA,0.5 μmol/L引物

和 SYBR Green I。反应条件为:94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环 30 次。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。引物序列及产物片段长度如表 1 所示。

表 1 荧光实时定量 RT-PCR 中的各引物序列及扩增产物片段长度

Tab 1 Primers and the length of products in real-time RT-PCR analysis

基因名称	引物序列	片段长度/bp
TERT	sense: 5'-TCCGCACGTT GGTGCCCAG-3'	203
	antisense: 5'-CCTCTCACCGCGCTCGCA AA-3'	
BDNF	sense: GTG ACA GTA GTA GCG AGT GGG	278
	Anti-sense: TAT CCT TAT GAA CCG CCA GCA	
TrkB	sense: CCA AGA GGC TAA ATC CAG TCC	248
	anti-sense: CCA GGT TAC CAA CAT FFF AAT A	
Synaptophysin	sense: CCC TAC ATT CAC CCA CTT CTC C	363
	anti-sense: TTA TCT CCT CTC TGC CCG TTT C	
$\beta$ -actin	sense: GAG ACC TAC AAG ACC CCA GCC	445
	anti-sense: TCG GCG CAT CGG TAC CGC TCA	

**1.9 蛋白免疫印迹检测** 取各组大鼠海马 CA1 区脑组织约 250 g,加 1 mL 含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂,匀浆后抽提总蛋白。用 BCA 蛋白质定量法测定样品浓度。采用变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白。蛋白质转移到 PVDF 膜,30 mA 恒流条件下,4 ℃ 转移过夜。膜在 5% 脱脂奶粉溶液中室温孵育 1 h 以封闭膜上的非特异结合。加入 BDNF、TrkB、SYN 一抗室温孵育 1.5 h,加入 HRP 标记的二抗体,室温孵育 1 h。加入 HRP 标记的 actin 抗体。化学发光法检测,经 X 胶片曝光显影。图片扫描保存,目的蛋白的灰度值除以内参 actin 的灰度值以校正误差,所得结果即为目的蛋白相对含量。

**1.10 透射电镜** 取各组大鼠脑组织海马 CA1 区,经固定、包埋、切片、染色,采用 JEM-1010 透射电镜观察。

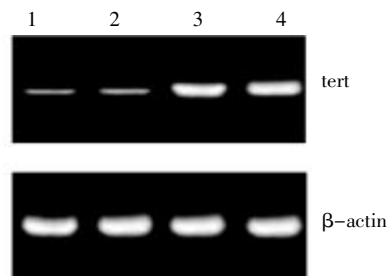
**1.11 统计学处理** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 15.0 统计软件包进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析检验,用 Student's *t* 检验进行两两比较, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 BMSCs 的分离和鉴定** 骨髓细胞悬液接种到塑料培养皿,24~72 h 可见有少量细胞贴壁,此后细胞逐渐聚集,至 14 d 细胞传代培养。细胞扩增至第 5 代,形状呈梭形。经流式细胞仪检测,表面标记物 CD29、CD44、CD90 阳性,阳性率分别为 98.32%、99.27%、97.92%,CD31、CD34、CD45 表达阴性。

**2.2 TERT mRNA 及端粒酶活性检测** TERT-

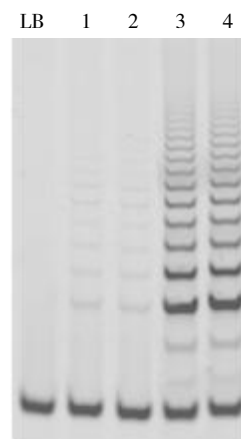
BMSCs 组较 BMSCs 对照组及 pLXSN 组增殖速度明显提高。TERT-BMSCs 组与 BMSCs 对照组及 pLXSN 组比较,TERT mRNA 表达水平明显增高( $P < 0.05$ ),端粒酶活性明显增高( $P < 0.05$ )(图 1,图 2)。



1. BMSCs 对照组;2. pLXSN 组;3. TERT-BMSCs 组;4. C6 细胞(作为阳性对照)

图 1 TERT mRNA 在各组细胞中的表达水平

Fig 1 Expression level of TERT mRNA in each group



LB. Lysis Buffer(裂解液,作为阴性对照);1. BMSCs 对照组;2. pLXSN 组;3. TERT-BMSCs 组;4. C6 细胞(作为阳性对照)

图 2 应用 TRAP 方法检测各组细胞端粒酶活性

Fig 2 The analysis of telomerase activity by TRAP in each group

**2.4 软琼脂克隆形成实验** 接种 C6 胶质瘤细胞有大量克隆形成,而 BMSCs 组、TERT-BMSCs 组均没有细胞克隆形成,表明 C6 胶质瘤细胞有较强的克隆形成能力,但体外培养的 BMSCs 和 TERT-BMSCs 均不具备成瘤能力。两组细胞移植到大鼠后,大鼠均无死亡,24 周后未见肿瘤形成。

## 2.5 各组大鼠水迷宫的测试结果

**2.5.1 定位航行实验测试结果** 痴呆模型组大鼠连续 3 d 的全时程平均逃避潜伏期及游泳路程与正常对照比较延长( $P < 0.05$ ),BMSCs 组、BDNF-TERT-BMSCs 组大鼠与痴呆模型组比较缩短( $P < 0.05$ );BDNF-TERT-BMSCs 组与 BMSCs 组比较学习记忆能力改善更加显著,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表2 定位航行实验结果( $\bar{x} \pm s$ )Tab 2 Results of the positioning navigation test( $\bar{x} \pm s$ )

组别	全时程平均逃避潜伏期/s	游泳路程/cm
对照组	20.37±3.14	512.54±24.42
VD 组	64.25±8.38*	1236.23±129.36*
BMSCs 组	45.34±7.42 <sup>#</sup>	921.57±61.21 <sup>#</sup>
BDNF-TERT-BMSCs 组	34.29±5.93 <sup>##</sup>	734.76±58.41 <sup>##</sup>

与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与 VD 组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 BMSCs 组比较,<sup>##</sup> $P<0.05$

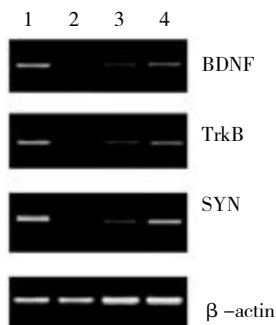
2.5.2 空间探索实验测试结果 BMSCs 组、BDNF-TERT-BMSCs 组大鼠在原平台所在象限游泳时间及在原平台象限游泳路程占总路程的百分比与痴呆模型组比较延长( $P<0.05$ );BDNF-TERT-BMSCs 组与 BMSCs 组比较,学习记忆能力改善更为显著,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 3。

表3 空间探索实验结果( $\bar{x} \pm s$ )Tab 3 Results of the space exploration test( $\bar{x} \pm s$ )

组别	在原平台象限游泳时间/s	在原平台象限游泳路程占总路程百分比/%
对照组	73.43±11.32	63.54±6.46
VD 组	29.58±7.45*	20.38±4.78*
BMSCs 组	42.75±8.47 <sup>#</sup>	39.88±5.67 <sup>#</sup>
BDNF-TERT-BMSCs 组	63.54±9.56 <sup>##</sup>	52.95±5.12 <sup>##</sup>

与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与 VD 组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 BMSCs 组比较,<sup>##</sup> $P<0.05$

2.6 各组大鼠脑组织 BDNF、TrkB、SYN mRNA 表达情况 荧光实时定量 RT-PCR 结果表明,BMSCs 组和 BDNF-TERT-BMSCs 组 BDNF、TrkB、SYN mRNA 表达较痴呆模型组升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且 BDNF-TERT-BMSCs 组与 BMSCs 组比较,3 种基因 mRNA 表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 3。

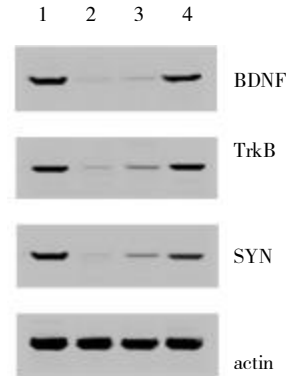


1. 对照组;2.VD 组;3. BMSCs 组;4. BDNF-TERT-BMSCs 组

图3 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF、TrkB、SYN mRNA 表达情况

Fig 3 Expression of BDNF, TrkB, and SYN mRNA of each group in hippocampal CA1 area

2.7 各组大鼠脑组织 BDNF、TrkB、SYN 蛋白表达情况 BMSCs 组和 BDNF-TERT-BMSCs 组 BDNF、TrkB、SYN 蛋白表达水平均较痴呆模型组升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且 BDNF-TERT-BMSCs 组与 BMSCs 组比较,3 种蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 4。



1. 对照组;2.VD 组;3. BMSCs 组;4. BDNF-TERT-BMSCs 组

图4 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF、TrkB、SYN 蛋白表达情况

Fig 4 Expression of BDNF, TrkB, and SYN protein of each group in hippocampal CA1 area

2.8 透射电镜观察结果 BDNF-TERT-BMSCs 组与 BMSCs 组比较,突触间隙显示更为清晰,突触结构更接近于正常。结果表明,BDNF-TERT-BMSCs 组比 BMSCs 组在大鼠海马 CA1 区超微结构改善上有明显变化。

### 3 讨论

VD 是痴呆的最常见原因之一,仅次于阿尔茨海默病。VD 发病的分子机制仍然不清楚,近年来 VD 的治疗学方面也在不断发展。到目前为止,仍没有统一和有效的治疗 VD 方法<sup>[13]</sup>。

端粒酶是一种核糖核蛋白酶,在大多数真核生物染色体复制中发挥重要作用。TERT 是端粒酶中具有反转录酶活性的催化亚基,是端粒酶中的重要组成部分<sup>[14]</sup>。目前,BMSCs 成为治疗中枢神经系统疾病新的治疗策略之一。BMSCs 可穿透血脑屏障而迁移到大脑组织起到神经保护作用<sup>[15]</sup>。Tang 等<sup>[16]</sup>报道,应用慢病毒介导的 TERT 和 VEGF 转染至 BMSCs,发现 BMSCs 的增殖活性和血管生成能力明显增加,且没有促肿瘤发生的作用。在本研究中,我们应用携带 TERT 的重组 pLXSN 反转录病毒载体转染 BMSCs,使 BMSCs 获得了较高的端粒酶活性,提高生长增殖速度,避免 BMSCs 因过早衰老而凋亡。

BDNF 发挥生物学效应主要依赖于与其特异性受体 TrkB 的结合。BDNF 在神经元等靶组织合成分泌后运输到突触间隙,作用于其受体 TrkB。BDNF 及其受体 TrkB 对神经元的生存、生长、分化有重要

的影响,减少损伤神经元的细胞凋亡<sup>[17]</sup>。本研究,经 BDNF 和 TERT 联合转染的 BMSCs 移植到 VD 大鼠,在大鼠海马 CA1 区 BDNF、TrkB 的 mRNA 和蛋白表达水平较普通的 BMSCs 组明显增高。水迷宫实验中大鼠的学习记忆能力明显改善,且比普通 BMSCs 治疗组改善的效果更加明显,差异具有统计学意义。

有研究表明,BDNF 与 TrkB 可增加突触可塑性,提高突触末端密度和促进树突及轴突的生长。作为突触前特征性标志物 SYN 的密度和分布可间接反应神经元突触的数量、密度和分布情况。BMSCs 移植到大鼠后可透过血脑屏障,从而有利于神经细胞的生长,形成新的树突和轴突<sup>[18]</sup>。本研究发现,BMSCs 组和 BDNF-TERT-BMSCs 组,海马 CA1 区 SYN 的表达量较痴呆模型组增加,且 BDNF-TERT-BMSCs 组增加更为显著。

综上所述,我们推测 BDNF 和 TERT 联合转染 BMSCs 对 VD 认知功能障碍有治疗作用,其作用可能与突触可塑性相关,但具体机制尚待进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] Ikejima C, Yasuno F, Mizukami K, et al. Prevalence and causes of early-onset dementia in Japan: a population-based study [J]. *Stroke*, 2009, 40(8):2709
- [2] Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia [J]. *Neuron*, 2013, 80(4): 844
- [3] Akinyemi R O, Mukaetova-Ladinska E B, Attems J, et al. Vascular risk factors and neurodegeneration in ageing related dementias: Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2013, 10 (6): 642
- [4] Hu Y, Tan H B, Wang X M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma [J]. *Clin Interv Aging*, 2013, 8:1467
- [5] Li M D, Atkins H, Bubela T. The global landscape of stem cell clinical trials [J]. *Regen Med*, 2014, 9(1):27
- [6] Van G S, Leerink M, Kakinohana O, et al. Amelioration of motor/sensory dysfunction and spasticity in a rat model of acute lumbar spinal cord injury by human neural stem cell transplantation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 28, 4(3):57
- [7] Banfi A, Bianchi G, Notaro R, et al. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells [J]. *Tissue Eng*, 2002, 8 (6):901
- [8] Baxter M A, Wynn R F, Jowitt S N, et al. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion [J]. *Stem Cells*, 2004, 22 (5): 675
- [9] Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, et al. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2 [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 287 (1): 98
- [10] Chen Z Z, Xu R X, Jiang X D, et al. Lack of telomerase activity in rabbit bone marrow stromal cells during differentiation along neural pathway [J]. *Chin J Traumatol*, 2006, 9 (4): 201
- [11] Bokara K K, Kwon K H, Nho Y, et al. Retroviral expression of arginine decarboxylase attenuates oxidative burden in mouse cortical neural stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20 (3):527
- [12] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats [J]. *Brain Res*, 1994, 653 (1/2): 231
- [13] 王菲,耿鑫,陶华英,等.重复经颅磁刺激对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 BDNF、NMDAR1、SYN 表达及超微结构的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2010, 36(7):397
- [14] Boccardi V, Herbig U. Telomerase gene therapy: a novel approach to combat aging [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(8):685
- [15] Razavi S, Razavi M R, Kheirollahi-Kouhestani M, et al. Co-culture with neurotrophic factor secreting cells induced from adipose-derived stem cells: Promotes neurogenic differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(3):381
- [16] Tang H, Xiang Y, Jiang X, et al. Dual expression of hTERT and VEGF prolongs life span and enhances angiogenic ability of aged BMSCs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(4):502
- [17] Cheeran B, Talelli P, Mori F, et al. A common polymorphism in the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS [J]. *J Physiol*, 2008, 586 (23):5717
- [18] Sun S, Chen G, Xu M, et al. Differentiation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells transplanted through the spleen in rats with portal hypertension [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e83523

(2014-01-03 收稿)