

输注重组 GDNF 过表达的间质干细胞改善肾毒性血清肾炎肾功能

纳 宁¹, 黄正宇^{1*}, 洪良庆¹, 李敏如², 缪 斌¹, 华学锋¹
(中山大学附属第三医院 1. 肾脏移植科, 2. 肝脏移植科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】观察输注 GDNF 过表达的骨髓间质干细胞对大鼠肾毒性血清肾炎(NSN)的疗效。【方法】构建含绿色荧光蛋白的胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)重组腺病毒表达质粒(pAd-GDNF-GFP)并转染骨髓间质干细胞(MSC)。成年雌性 SD 大鼠肾毒性血清肾炎模型 20 只,分为 3 组,实验组 8 只大鼠经肾动脉输注转染 pAd-GDNF-GFP 阳性 MSC,6 只输注 pAd-GFP(不含 GDNF)阳性 MSC 和 6 只输注培养基作为对照。病理切片 HE 染色观察各组肾脏病理变化情况,测定血清肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)并计算肌酐清除率。对数据组间差异进行 ANOVA 方差分析。【结果】实验组病理 HE 染色可见肾小球的病变程度减轻,肾小管坏死和扩张减少,炎症细胞的聚集减少,肾脏组织细胞结构修复完整,提示炎症得到改善。同时实验组蛋白尿症状减轻,血清肌酐(Cr)和尿素氮降低,肌酐清除率改善,与对照组差别具有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】输注 GDNF 过表达的 MSC 能够改善 NSN 大鼠肾功能和逆转发病肾脏的病理改变,起到了较好的治疗效果。

关键词: 胶质细胞源性神经营养因子; 过表达; 骨髓间质干细胞; 肾毒性血清肾炎; 肾功能

中图分类号: R692 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2011)05-0600-06

Transplantation of MSC with Overexpressing Recombinant pAdGDNFGFP Improved Renal Function of Nephrotoxic Serum Nephritis Rats

NA Ning¹, HUANG Zheng-yu^{1*}, HONG Liang-qing¹, LI Min-ru², MIAO Bin², HUA Xue-feng¹
(1. Department of Kidney Transplantation, 2. Department of Liver Transplantation, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 The nephrotoxic serum nephritis animal model was constructed to investigate the therapy effect of glial cell linederived neurotrophic factor (GDNF) overexpression of bone marrow mesenchymal stem cell and improving renal function to the nephrotoxic serum nephritis (NSN), and the clinical efficacy was evaluated. 【Methods】 MSC was transfected with adenovirus expression vector containing GDNF, evaluate the transfection efficiency. Then MSC with overexpressing GDNF was injected to rats through the left renal artery, pathological and biochemical changes were detected to see the improvement of renal function. MSC with GDNF overexpression were located and counted in kidney tissue by fluorescence experiments to evaluate its efficacy. 【Results】 After infusion, the MSC were located in the renal cortex, serum creatinine, uremic nitrogen and urinary protein of NSN rats infused pAdGDNFGFP statistically decreased compared with control group, renal function was statistically ameliorated, $P < 0.05$; pathology results showed that the GDNF overexpressing group had lower renal damage score than the control group, $P < 0.05$. 【Conclusion】 GDNF well improved renal function and pathological changes in NSN rats, the protection of GDNF overexpressing mesenchymal stem cells to NSN rat kidney provided a kind of new idea to for various diseases such as NSN.

Key words: glial cell linederived neurotrophic factor (GDNF); overexpressing; marrow mesenchymal stem cells (MSC); nephrotoxic serum nephritis (NSN); renal function

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(5):600-605]

收稿日期: 2011-03-09

基金项目: 广东省科技计划项目(2008B080703016)

作者简介: 纳宁, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 移植免疫耐受, E-mail: huangzhengyu@126.com; * 通信作者: 黄正宇, 主治医师, E-mail: hzhengyu@yahoo.cn

肾毒性血清肾炎(nephrotoxic serum nephritis, NSN)是一种由抗肾小球基底膜(glomerular basement membrane, GBM)抗体介导的一种全身性疾病^[1]。临床上多表现为肾脏和肺部、中枢神经系统等受累。常于短期内导致患者肾功能衰竭。早期行血浆置换及甲基强的松龙冲击可以收到一定的缓解疗效,但效果不明显。传统治疗方法的困境促使学者探索新的思路。研究显示这种抗GBM抗体介导的全身性病理改变在病变器官可以通过分泌的一些特异的细胞因子如形态发生素引起骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)的趋化迁移和再分化从而进行组织修复^[2]。MSC的这种潜能引起了用体外回输MSC治疗NSN的研究。而胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是一种高度保守的神经营养因子^[3-4],动物实验证实重组的GDNF能促进神经元的生长和分化,并能拯救体内运动神经元^[5-6]。GDNF可用于治疗多种神经退行性病变^[7]。不仅如此,GDNF还可以作为干细胞增殖和分化的一种形态发生素^[8]。基于此,本研究旨在通过输注GDNF过表达MSC治疗NSN大鼠,观察其肾功能改善的状况,并进一步评价其疗效。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

SD雄性大鼠20只,鼠龄8~10周,体质量(250±30)g;均购自中山大学实验动物中心,饲养条件和实验条件均符合SPF(Specific Pathogen Free)级标准。绿色荧光蛋白腺病毒载体(pAdenovirus vector-green fluorescent protein, pAd-GFP)购自Qbiogene公司,293细胞购自Invitrogen公司,脂质体购自BD公司,鼠抗内参基因抗体(anti-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, anti-GAPDH)和抗GDNF(anti-GDNF)单克隆抗体购自Abcam公司。6、24和96孔细胞培养板购自美国Corning。DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)购自美国Gibco,胎牛血清购自国天津中科院瀚洋生物工程有限公司。

1.2 骨髓间质干细胞分离和培养

抽取正常人骨髓,每毫升骨髓加100 U肝素抗凝,充分混匀后Hanks液混匀后,以淋巴细胞分离液:稀释骨髓的比例=1:2将稀释骨髓缓慢加入

ficoll液面上(密度1.077),水平离心机20℃条件下500×g离心25~30 min。从界面上取出的单核细胞(mononuclear, MNC)用胎牛血清(fetal bovine serum, PBS)液洗涤2~3次后,加适量培养液计数。细胞数达到10⁶~10⁷/mL后即进行原代培养,按5×10⁶/mL浓度接种于50 mL培养瓶中(1×10⁶/cm²培养瓶),每瓶含5 mL DMEM完全培养液。在体积分数为5%的CO₂和37℃条件下静止培养,3 d后换液去除非贴壁细胞,以后每3~4 d半量换液1次,10~12 d细胞达90%融合时传代并保存备用^[9]。

1.3 重组腺病毒表达质粒pAd-GDNF-GFP并转染骨髓间质干细胞

1.3.1 腺病毒载体的构建和滴度测定 提取人外周血RNA并进行逆转录,根据人GDNF mRNA(NM_001190468)设计引物扩增其开放读码框基因片段,所设计的上游和下游引物分别为5'-AGATCTATGCAGTCTTTGCCTA-3'和5'-CGGAGTTTAAACTAGA TACA-3',并在两侧分别引入Bgl II和Pme I两个酶切位点,扩增片段706 bp,引物由Invitrogen公司合成。扩增条件:94℃4 min,94℃30 s,56℃45 s,72℃2 min,30个循环后72℃延伸10 min,10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收目的片段。将GDNF基因聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)产物连接于pMDT载体上,转化TOP10感受态细菌,蓝白斑实验筛选白色阳性克隆摇菌,抽提质粒,用双酶切鉴定。分别对穿梭质粒pAd-GFP和GDNF片段进行Bgl II和Pme I双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳回收;回收的载体片断和目的基因16℃连接过夜,取5 μL连接产物转化TOP10感受态细菌,用氨苄青霉素LB培养基平板进行筛选,挑出单克隆,摇菌过夜抽提质粒、双酶切鉴定正确的重组腺病毒载体命名为pAd-GDNF-GFP。重组质粒磷酸钙共沉淀法转染HEK293A细胞,并用TCID50(tissue cell infectious dosage 50, TCID50)法测定重组腺病毒滴度。

1.3.2 腺病毒载体转染MSC细胞 实验分为两组,用pAd-GDNF-GFP重组质粒和pAd-GFP(不含GDNF)同时转染MSC细胞。取第3代生长旺盛的MSC 5×10⁴个,分别与0.25、2.5、5、12.5、25感染复数((multiplicity of infection, MOI)的病毒液在8 μg/mL的凝聚胺(Polybrene)条件下,30℃2 500 r/min(r=13.5 cm)离心作用2~4 h后,种回12

孔板中,每孔含 10% 的 FBS 的 DMEM 1 mL,在 37 °C 的二氧化碳培养箱继续培养过夜。12 h 后换液,此后每 2 ~ 3 d 换液 1 次并观察荧光表达情况,培养 1 ~ 2 周后流式分析转染效率。

1.4 肾毒性血清肾炎模型构建

参照文献[10-11],以梯度筛网法获得大鼠肾小球,超声粉碎,离心,得富含 GBM 的沉积物,调至 10 mg/mL;取 1 mL GBM 与等量的完全弗氏佐剂乳化,于新西兰大白兔皮下注射,每 2 周 1 次,共 10 次,在最后一次注射后 10 d 取血清,热灭活后以大鼠红细胞吸附,以 1 mL(含 1 mg)正常兔 IgG 与等量完全弗氏佐剂乳化,于大鼠腹腔注射,8 d 后以上述免疫大鼠 GBM 抗血清按体质量 10 mL/kg 给大鼠作静脉注射,构建大鼠肾毒性血清肾炎(NSN)模型。

1.5 pAd-GDNF-GFP 转染的 MSC 输注 NSN 大鼠

成年雌性 SD 大鼠,体质量(250 ± 30)g。模型构建成功后进行 MSC 输注治疗^[12]。上述转染的 pAd-GDNF-GFP 重组质粒的 MSC 在 37 °C 的二氧化碳培养箱继续培养,显微镜下细胞浓度调整在 1×10^6 个/mL 培养基并在后并在半小时使用用于经 NSN 大鼠肾动脉输注 MSC,实验分为 3 组,第 1 组 8 只,输注 pAd-GDNF-GFP 重组质粒转染(也即 GDNF 过表达)的 MSC;第 2 组 6 只,输注上述转染 pAd-GFP 质粒转染的(不含 GDNF)MSC;第 3 组 6 只,仅输注上述培养基。

1.6 输注治疗后 MSC 靶器官内亚定位及肾组织病理和肾功能实验

输注治疗实验后取大鼠肾脏组织,制备肾脏冰冻切片观察 GFP 绿色荧光蛋白并进行阳性细胞计数。同时取大鼠肾组织标本,甲醛溶液固定,石蜡切片,HE 染色观察病理变化^[13]。收集 MSC 回输 NSN 大鼠前后不同时间血清,留取 24 h 大鼠尿量,测定血清肌酐(serum creatinine, Cr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和蛋白尿等,并计算肌酐清除率;用日立自动生化分析仪器测定尿电解质、蛋白质和葡萄糖浓度。

1.7 统计分析

实验数据采用均值 ± 标准差表示,并用 ANOVA 方差分析和 *t* 检验对数据进行分析,以 *P*

< 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 骨髓间质干细胞分离和培养

原代培养 3 d 后,倒置显微镜下可见单个或少量成群落生长的贴壁细胞,形态大多呈短梭形,有一个核位于中央,可见核仁。7 ~ 10 d 后,细胞集落不断地扩大并形成融合单层,细胞形态大多呈长梭形或多角形。经胰酶消化传代培养后,MSC 不再以集落方式生长,而呈均匀分布生长,形态以长梭形为主,符合 MSC 的细胞形态特征

2.2 腺病毒载体的构建和滴度测定

构建的 pAd-GDNF-GFP 重组质粒线性化后和空载体 pAd-GFP 转染人胚肾(human embryonic kidney, HEK)293A 细胞,在 HEK293A 细胞中包装产生相应的重组腺病毒。转染后 36 ~ 48 h,在荧光显微镜下观察:293 细胞部分体积变大变圆,呈半贴壁状态,可见明显的绿色荧光。5 ~ 7 d 后,可观察到包装成功的病毒感染周围细胞所形成的噬斑。10 ~ 14 d 左右,90% 以上细胞携带绿色荧光并呈悬浮生长,说明病毒在细胞中已包装成功。此时收取细胞,-80 °C/37 °C 之间反复冻融 3 次,离心收取上清。pAd-GDNF-GFP 及 pAd-GFP 经 2 次在 293 细胞内的扩增,收取冻融后的细胞上清并浓缩纯化, $A_{260\text{nm}}$ 值测量法测定病毒滴度:重组 pAd-GDNF-GFP 滴度为 2.5×10^{10} VP/mL;pAd-GFP 对照腺病毒滴度为 1.2×10^{10} VP/mL。

2.3 重组 pAd-GDNF-GFP 腺病毒载体转染 MSC 细胞

转染 3 d 后,约 80% 的干细胞可见到绿色荧光蛋白表达,而对照组未见绿色荧光;不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)腺病毒感染 MSC 后,可见转染效率随 MOI 增加而增加,在 12.5 MOI 时转染效率最高;腺病毒感染 MSC 后进行传代培养,Western blot 实验证实 GDNF 大量稳定表达,而转染空载体的对照组未见 GDNF 表达(图 1)。

2.4 肾毒性血清肾炎模型构建

SD 大鼠注射 GBM 抗血清后 2 d 即出现蛋白尿伴有血肌酐浓度升高,第 4 天达高峰,1 周后蛋

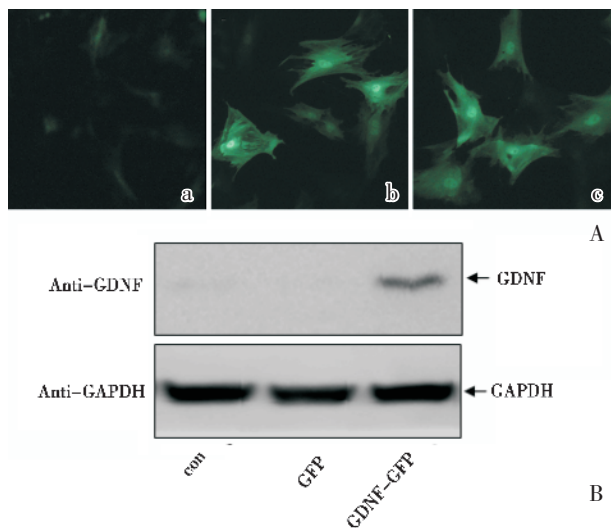


图 1 GDNF-GFP 在 MSC 中的显像

Fig.1 Appearance of GDNF-GFP in MSC cells

A: Successful transduction of the GDNF-GFP vector into MSC cells confirmed by fluorescence microscopy. a were MSC cells without treatment, b were MSC cells transduced with viral vector-GFP, c were MSC cells transduced with the viral vector-GDNF-GFP. (Bars = 25 μ m.) B: Western blot analysis was used to investigate the transduction in different group with the anti-GDNF antibody, the GAPDH as compared control. a-c group were same to A.

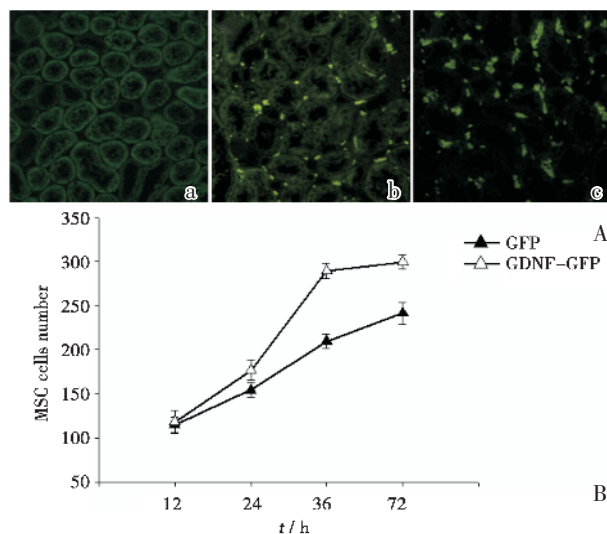


图 2 大鼠肾组织 MSC 及 GDNF 过表达 MSC 的亚定位

Fig.2 The localization of MSC and GDNF over-expressing MSC in renal tissue of NSN rats

A: Localization of MSC delivered at the subcapsule of the kidney, 3 day after inoculation. a were rats that had NTN and received medium (a), MSC-GFP (b) or MSC-GDNF-GFP (c) into the left renal artery on day 3 after disease induction. B: The number of the MSC with GFP or GDNF-GFP viral vectors in injury renal tissue at different time courses. Δ was GDNF-GFP vector, \blacktriangle was GFP vector.

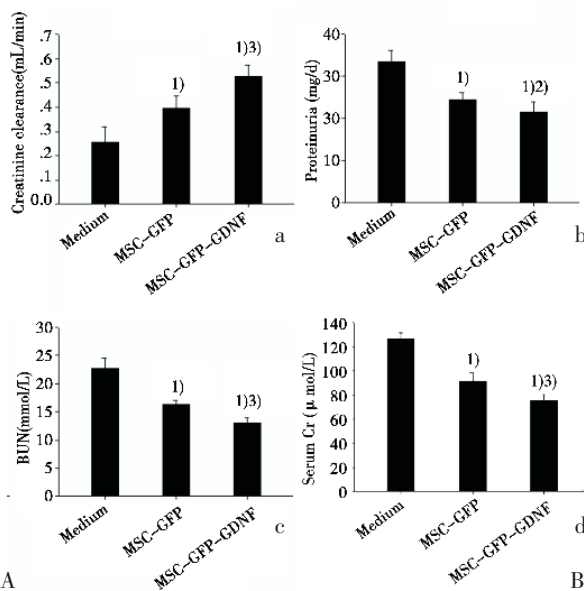
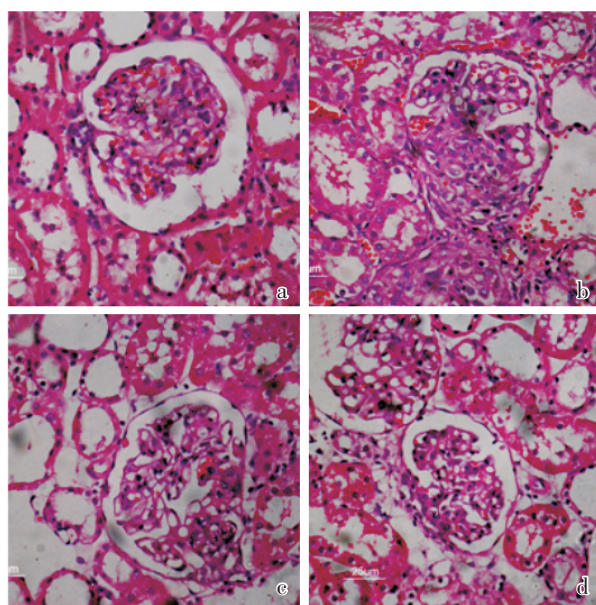


图 3 GDNF 过表达干细胞对 NSN 大鼠的肾损伤的疗效

Fig.3 The effects of GDNF over-expressing MSC on NSN rats.

A: The pathology of rat renal tissues in each group (HE staining). a: Renal tissue of normal rats injected with saline; b: rats induced NSN model; c: NSN rats with MSC; d: NSN rats with GDNF over-expressing MSC. B: The levels of creatinine clearance(a), proteinuria(b), BUN(c) and Cr(d) in serum. Each column represents the mean of acquired data (\pm SD), Significant differences compared to medium, 1) $P < 0.01$ compared to MSC-GFP, 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$.

白尿逐渐减少。NSN 大鼠肾脏组织 HE 染色呈现肾小管坏死、扩张,刷状缘损伤,炎性细胞浸润等,与对照组明显不同,提示模型构建成功。

2.5 MSC 输注后在大鼠肾脏组织中的亚定位

通过荧光显微镜观察可见转染含有 GFP 腺病毒载体的 MSC 广泛存在于肾病变部位,但是转染 pAd-GDNF-GFP 的试验组绿色荧光比较强比较集中,而 pAd-GFP 组绿色荧光比较弥漫(图 2A)。进一步通过分析绿色荧光的强度对 MSC 细胞进行计数,结果显示肾病变部位 pAd-GDNF-GFP 转染组 MSC 的细胞数目和聚集速度峰值明显高于 pAd-GFP 组, $P < 0.05$ 。这充分表明这提示 GDNF 的过表达能够促进 MSC 对肾毒性血清肾炎大鼠肾脏病变部位的趋向性。

2.6 GDNF 过表达 MSC 对 NSN 大鼠肾功能和病理的影响

病理结果提示 NSN 大鼠输注 MSC,肾小球的病变程度减轻,而输注 GDNF 过表达干细胞实验组的这一作用显得更加明显,肾小管坏死和扩张明显减轻,炎症细胞浸润减少,肾脏组织细胞结构恢复较好,这说明 GDNF 能够促进干细胞向的肾组织的分化(图 3A)。

同时生化指标分析结果提示,与 GFP-MSC 组相比,输注 GDNF 过表达 MSC 实验组更能显著降低大鼠的蛋白尿症状,并能显著降低血清 Cr、BUN 水平,增加肌酐清除率,差别有统计学意义 ($P < 0.05$),而输注培养基的对照组不具有此功效, ($P < 0.05$)。表明输注 GDNF 过表达的 MSC 能够明显改善 NSN 大鼠的肾功能(图 3B)。

3 讨论

经过本课题的研究我们证实所分离的骨髓间质干细胞转染 pAd-GDNF-GFP 腺病毒重组质粒后,输注 NSN 大鼠,可明显改善肾功能和肾脏组织病理,这说明输注重组 GDNF 过表达的骨髓间质干细胞(MSC)对肾毒性血清肾炎具有重要的治疗价值。众所周知 MSC 是一类保留向各种组织细胞比如骨组织、脂肪组织、肾组织、血液细胞等分化潜能的细胞,这一潜能某些特定情况下,比如炎症、肿瘤等,常常能够重新激发并分化为相应组织。MSC 的这种治疗功能加上获得比较容易,且不存在伦理问题,使得基于 MSC 的多重疾病的干细

胞生物治疗在临床上彰显了较好的应用前景^[14]。在本研究中我们明显看到 MSC 具有对肾脏保护和修复功能,特别是对病变后肾功能的恢复具有显著效果^[15-16]。然而临床上利用 GDNF 结合骨髓间质干细胞治疗各种肾炎尚无相关报道。

在本实验中,GDNF 过表达 MSC 输注 NSN 大鼠后,这些细胞成功地改善了大鼠肾功能,明显的降低了血清肌酐和尿素氮水平,改善了蛋白尿的症状,组织病理结构也有了明显的恢复。为了考察这一疗效我们设置了不表达 GDNF 的 GFP-MSC 对照组作为平行实验,结果表明效果其疗效明显差于 GDNF 过表达组,差别具有统计学意义。GDNF 的治疗作用是显而易见的。在临床上多种神经退行性疾病中的发展过程中,GDNF 发挥的是一种组织形态发生素的作用,它能够调节干细胞的趋向和分化,对组织病变具有逆转作用。有研究表明机体病变组织器官能分泌一系列细胞生长因子和趋化因子,例如脂肪细胞分化的关键因子- β 转化生长因子(transforming growth factor, TGF- β)等^[17-18],而 GDNF 则与这些因子具有广泛的相互作用^[19-20]。MSC 细胞表面含有大量结合上述细胞因子的受体,所以 GDNF 对 MSC 细胞的趋化性具有重要意义,但是这种趋化性的详细的机制还需要进一步研究。

临床上对某些疾病如果能够将诸如 MSC 一样,实现靶向治疗,无疑将是疾病治疗方法的一个重大突破^[21],但是实际操作有一定难度。但是本研究关于输注重组 GDNF 过表达的 MSC 能改善肾毒性血清肾炎的肾功能这一发现,对临床疾病治疗的方法提供了新的思路。诚然,MSC 治疗的生物安全性,比如如何防止不必要的分化和防止过分化,将是一个重要课题。本课题将继续进行深入研究。

参考文献:

- [1] Hunt SJ, Santa Cruz DJ. Eosinophilic cellulitis: histologic features in a cutaneous mastocytoma [J]. *Dermatologica*, 1991, 182(2): 132-134.
- [2] Silber SJ. Pregnancy after vasovasostomy for vasectomy reversal: a study of factors affecting long-term return of fertility in 282 patients followed for 10 years [J]. *Hum Reprod*, 1989, 4(3): 318-322.
- [3] Lee K, Kunugi H, Nanko S. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene and schizophrenia:

- polymorphism screening and association analysis [J]. *Psychiatry Res*, 2001, 104(1): 11-17.
- [4] Williams HJ, Norton N, Peirce T, et al. Association analysis of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene in schizophrenia [J]. *Schizophr Res*, 2007, 97(1-3): 271-276.
- [5] Grondin R, Gash DM. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease [J]. *J Neurol*, 1998, 245(11 Suppl 3): P35-42.
- [6] Akerud P, Canals JM, Snyder EY, et al. Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(20): 8108-8118.
- [7] Walton, KM. GDNF: a novel factor with therapeutic potential for neurodegenerative disorders [J]. *Mol Neurobiol*, 1999, 19(1): 43-59.
- [8] Cullen-McEwen LA, Kett MM, Dowling J, et al. Nephron number, renal function, and arterial pressure in aged GDNF heterozygous mice [J]. *Hypertension*, 2003, 41(2): 335-340.
- [9] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex [J]. *Scand J Immunol*, 2003, 57(1): 11-20.
- [10] Chen SM, Mukoyama T, Sato N, et al. Induction of nephrotoxic serum nephritis in inbred mice and suppressive effect of colchicine on the development of this nephritis [J]. *Pharmacol Res*, 2002, 45(4): 319-324.
- [11] Brockman EB, Tarantino PA, Hobden JA, et al. Keratotomy model of pseudomonas keratitis: gentamicin chemotherapy [J]. *Refract Corneal Surg*, 1992, 8(1): 39-43.
- [12] Kunter U, Rong S, Djuric Z, et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(8): 2202-2212.
- [13] Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, et al. VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(7): 913-923.
- [14] Dorman DC. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals; Petroleum distillates and turpentine [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1990, 20(2): 505-513.
- [15] Qian H, Yang H, Xu W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 22(3): 325-332.
- [16] da Silva LB, Palma PV, Cury PM, et al. Evaluation of stem cell administration in a model of kidney ischemia-reperfusion injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(13): 1609-1616.
- [17] Ahdjoudj S, Lasmoles F, Holy X, et al. Transforming growth factor beta2 inhibits adipocyte differentiation induced by skeletal unloading in rat bone marrow stroma [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(4): 668-677.
- [18] Teruel T, Valverde AM, Benito M, et al. Transforming growth factor beta 1 induces differentiation-specific gene expression in fetal rat brown adipocytes [J]. *FEBS Lett*, 1995, 364(2): 193-197.
- [19] Onla-or S, Winstein CJ. Function of the 'direct' and 'indirect' pathways of the basal ganglia motor loop: evidence from reciprocal aiming movements in Parkinson's disease [J]. *Brain Res Cogn Brain Res*, 2001, 10(3): 329-332.
- [20] Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? [J]. *Mol Cell Neurosci*, 1999, 13(5): 313-325.
- [21] Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery; the pulmonary first-pass effect [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(5): 683-692.

(编辑 徐杰)