

大鼠 *Bdnf* 基因慢病毒载体的构建及其在骨髓间质干细胞中的表达 Construction of Rat *Bdnf* Gene Lentiviral Vector and Its Expression in Mesenchymal Stem Cells

黄东煜^{1,2}, 张志坚^{1,2,3*}, 陈柏龄^{1,2}, 吴秀丽², 王 柠^{1,2,3}, 张彦定⁴

HUANG Dong-Yu^{1,2}, ZHANG Zhi-Jian^{1,2,3*}, CHEN Bai-Ling^{1,2}, WU Xiu-Li², WANG Ning^{1,2,3} and ZHANG Yan-Ding⁴

1 福建医科大学附属第一医院神经内科 福州 350005

2 福建省神经病学研究所 福州 350005

3 福建医科大学神经生物学中心 福州 350004

4 福建省师范大学生命科学学院 福州 350007

1 Department of Neurology, The First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

2 Fujian Research Institute of Neurology, Fuzhou 350005, China

3 Center of Neuroscience, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

4 College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

摘 要 骨髓间质干细胞(MSCs)是目前基因工程正在探讨应用的靶细胞,为构建带有脑源性神经营养因子(*Bdnf*)基因慢病毒载体并使其在大鼠骨髓间质干细胞中表达,采用 RT-PCR 技术获得大鼠 *Bdnf* 基因编码区(CDS)片段,限制性内切酶酶切和基因重组构建慢病毒载体质粒 PNL-BDNF-IRES₂-EGFP,在脂质体介导下与包装质粒 HELPER,包膜质粒 VSVG 共转染 293T 细胞包装生产慢病毒。所获慢病毒感染大鼠 MSCs(rMSCs)后,PCR 和免疫细胞化学法检测在 rMSCs 中 *Bdnf* 基因的插入和表达。结果显示所获的 *Bdnf* 基因经测序后与 GenBank 报道序列完全一致。重组慢病毒载体质粒 PNL-BDNF-IRES₂-EGFP 经鉴定正确。三质粒共转染 293T 细胞成功,收集、浓缩病毒后测定其滴度为 6.7×10^7 TU/mL,PCR 证实 *Bdnf* 基因插入病毒基因组。感染 rMSCs 后 RT-PCR、免疫细胞化学染色及 Western 检测各组细胞均有 BDNF 蛋白表达,其中试验组 BDNF-rMSCs 更大量表达 BDNF,与其余 2 组(Mock-rMSCs、rMSCs)比较差异具有统计学意义。构建带有 *Bdnf* 基因慢病毒载体并在大鼠骨髓间质干细胞中成功表达,为今后基因修饰干细胞的移植后长期观察研究奠定了基础。

关键词 慢病毒, BDNF, 骨髓间质干细胞, 大鼠

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0235-06

Abstract Recently, mesenchymal stem cells (MSCs) have been one of the target cells of gene engineering. To construct the lentiviral (LV) vectors carrying the brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*) gene, the rat mesenchymal stem cells (rMSCs) were infected and finally the *Bdnf* gene-modified rMSCs was obtained. The CDS region of the rat *Bdnf* gene was obtained with reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the transfer plasmid (PNL-BDNF-IRES₂-EGFP) of the LV vector was constructed. The three plasmids of LV vector: PNL-BDNF-IRES₂-EGFP, HELPER, and VSVG were cotransfected to 293T cells to produce the LV vectors, which enabled the coexpression of the *Bdnf* gene and the enhanced green fluorescent

Received: August 10, 2006; Accepted: November 17, 2006.

This work was supported by a grant from United Fujian Provincial Health and Education Project for Tackling the Key Research, China (No. WKJ2005-2-011).

* Corresponding author. Tel: +86-591-87982028; Fax: +86-591-87982028; E-mail: zzjzjy@medmail.com.cn

卫生部科学研究基金—福建省卫生教育联合攻关计划资助项目(No. WKJ2005-2-011) © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

protein (Egfp) gene. rMSCs were separated from the bone marrow of 2-month-old F344 rats, cultured *in vitro*, and identified. rMSCs were infected by the LV vectors that were produced already and were identified with fluorescent microscope, RT-PCR, immunocytochemical staining, and western blot. The result of sequencing showed that the sequence of the cloned Bdnf gene was consistent with that reported in the GenBank. The PNL-BDNF-IRES2-EGFP plasmid that was identified showed the correct sequence. After the 3 plasmids of LV vectors were cotransfected to the 293T cells, considerable green fluorescence in 293T cells was observed under the fluorescent microscope; the supernatant was collected and concentrated using ultracentrifugation, and the titer of the replication-defective LV vector particles measured was found to be 6.7×10^7 TU/mL. After the constructed LV vectors infected the rMSCs, the results obtained using RT-PCR, immunocytochemical staining, and western blot showed that the expression of BDNF in the Bdnf-rMSCs group (experimental group, EG) was significantly higher than that in the PNL-IRES2-EGFP-rMSCs group (mock group, MG) and the rMSCs group (control group, CG) at both mRNA and protein levels. LV vectors carrying the *Bdnf* gene were constructed successfully. The *Bdnf* gene-modified rMSCs could express BDNF to a higher degree. This greatly facilitates the next step in the study, such as the long period of therapeutic observation of cerebral ischemia with *Bdnf* gene-modified rMSCs.

Key words lentiviral vector, BDNF, mesenchymal stem cells, rat

骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)由于其具有多向分化潜能与在体内可向急性损伤部位迁移的特性,成为干细胞治疗研究的热点,也逐渐成为基因治疗的主要靶细胞。利用慢病毒载体能高效感染骨髓间质干细胞,使其成为基因治疗的载体,通过体内干细胞移植,从而使治疗基因更集中在病变部位,同时减少病毒载体的使用量而减少不良事件的发生,因此本研究构建带有大鼠脑源性神经营养因子基因(*Bdnf*)慢病毒载体并使目的基因在大鼠 MSCs(rMSCs)中表达。

1 材料和方法

1.1 主要材料

(1)慢病毒载体质粒 PNL-IRES₂-EGFP,包装质粒 HELPER,包膜质粒 VSVG 以及 293T 细胞均由美国杜兰大学陈一平教授惠赠。(2)Top10 菌:由福建医科大学林建银教授惠赠。(3)主要试剂:逆转录酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I (Promega),高保真 Pfu ultra DNA 聚合酶(Stratagen),Trizol 以及脂质体 lipofectamin2000(Invitrogen),polybrene(Sigma),质粒抽提试剂盒(Qiagen),DNA 凝胶回收试剂盒(上海博亚生物公司),胎牛血清(PAA),DMEM(GIBCO),胰酶-EDTA(GIBCO),青链霉素(GIBCO)。其他试剂均为进口或国产化学分析纯。(4)引物合成、测序均送上海博亚生物公司。(5)抗体:兔抗鼠 BDNF 多克隆抗体(Santa Cruz),羊抗兔 IgG/HRP 试剂盒(北京中山生物公司),羊抗鼠 β -actin 抗体(GIBCO)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成:根据 GenBank 大鼠 *Bdnf* 基因 CDS 区合成相应引物,另根据载体质粒 PNL-

IRES₂-EGFP 要求在引物中引入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点,因此设计合成的上游引物序列为:5'-ACGCGTCGACATGACCATCCTTTTC-3',下游引物序列为:5'-CGGGATC CCTATCTTCCCCTTTAATG-3'。所得的 PCR 产物大小为 768bp。

1.2.2 海马组织提取大鼠总 RNA:用 Trizol 试剂提取近交系 F344 大鼠海马总 RNA,甲醛变性凝胶电泳检测,并测定其 $\lambda 260$ 和 $\lambda 280$ 的吸光度,检测所提取 RNA 的浓度及纯度。

1.2.3 目的基因的获取:大鼠 RNA 经逆转录为 cDNA 后,以此作为模板,加入 *Bdnf* 基因上、下游引物,在 Pfu ultra 高保真 DNA 聚合酶作用下 94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 45 s,54℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1.5min,共 30 个循环,72℃ 延伸 10 min 合成 *Bdnf* 基因。琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PNL-BDNF-IRES₂-EGFP 重组质粒的构建:

(1)*Bdnf* 基因亚克隆扩增:PCR 产物加上 A 尾后琼脂糖电泳检测,切胶回收目的片段并纯化。T4 DNA 连接酶作用下纯化后产物连接 PuCm-T 载体 4℃ 过夜。CaCl₂ 法转化感受态 Top10 菌,菌液涂于 IPTG、X-gal LB 平板 37℃ 过夜。挑选白色阳性克隆摇菌扩增并小量抽提质粒,*Bam*H I 及 *Sal* I 双酶切琼脂糖电泳鉴定正确后送测序。

(2)PNL-BDNF-IRES₂-EGFP 重组质粒构建:*Bam*H I、*Sal* I 双酶切载体质粒 PNL-IRES₂-EGFP,琼脂糖电泳鉴定后回收纯化目的片段。T4 DNA 连接酶作用下将测序正确的 *Bdnf* 基因片段与双酶切后的载体质粒 4℃ 连接过夜。CaCl₂ 法转化感受态 Top10 菌,涂布含氨苄青霉素的 LB 选择平板,37℃ 过夜,次日随机挑取阳性菌落继续扩增,小量抽提

质粒。

(3) PNL-BDNF-IRES₂-EGFP 重组质粒的鉴定: 抽提的质粒经 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切, 琼脂糖电泳检测, 回收 768bp 处片段委托博亚生物公司测序。

1.2.5 重组慢病毒的包装及鉴定: 通过质粒中量抽提试剂盒制备 PNL-BDNF-IRES₂-EGFP、PNL-IRES₂-EGFP、HELPER、VSVG 等质粒。慢病毒三质粒按 1:1:1 比例混合, 利用脂质体 Lipofectamin2000 共转染 293T 细胞。48h 至 72h 观察出现强绿色荧光并有细胞融合现象时收集上清, 4500r/min 离心 15min, 0.45 μ m 滤器过滤。50 000g 4 $^{\circ}$ C 离心 2.5h 浓缩病毒, 按不同比例稀释后加入 polybrene 至终浓度为 8 μ g/mL 感染 293T 细胞测定滴度。取 2 μ L 病毒液煮沸 10min, 冰浴 15min 并以此作为模板, 加入 *Bdnf* 上、下游引物 PCR 鉴定。

1.2.6 rMSCs 的分离和扩增培养: 无菌条件下取 2 月龄 F344 雄性大鼠股骨、胫骨, 充分冲洗骨髓腔, 将骨髓液叠加于大鼠淋巴细胞分离液上(骨髓液与淋巴细胞分离液的比例为 5:3), 2500r/min 离心 30min。吸取单核细胞层加入适量含 15% 胎牛血清以及 100u/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的低糖 DMEM 完全培养液培养。当细胞融合达 90% 以上时 0.25% 胰酶-EDTA 消化传代。流式细胞术测定培养的细胞 CD34、CD45、CD29、CD90 表达。

1.2.7 慢病毒感染 rMSCs: 弃去 MSC 原培养液, 取浓缩后病毒原液 2mL, 加入 polybrene 至终浓度为 8 μ g/mL 感染 rMSCs, 24h 后更换为低糖 DMEM 完全培养液继续培养。48h 后观察荧光。实验组为带有 *Bdnf* 基因慢病毒感染的 rMSCs (BDNF-rMSCs 组), 对照组分别为未携带任何目的基因慢病毒感染的 rMSCs (Mock-rMSCs, 空载体组) 以及未经感染的 rMSCs (空白组)。

1.2.8 细胞免疫化学染色: 三组细胞均以 2×10^4 /mL 传代于 24mm \times 24mm 玻片上培养, 80% 融合后以冷丙酮固定后二步法行细胞免疫化学检测 BDNF 表达情况。

1.2.9 RT-PCR 检测: 分别抽提三组细胞总 RNA, 加入大鼠 β -actin 基因引物作为内参(上游: 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3', 下游: 5'-CTCAGGGCAGCGGAACCGCTCATTGCCAAT-3'。产物大小约为 310bp), 同时加入 *Bdnf* 基因引物行 RT-PCR 反应以及灰度分析, 以检测各组 rMSCs 中 *Bdnf* 基因在 mRNA 水平的表达情况。每组随机读取 5 次灰度分析数据, 取二者比值平均值为结果行独立样本 *t* 检验 (Independent Samples Test) 取 $\alpha = 0.05$ 。

1.2.10 Western blot 检测 BDNF 表达: 分别取上述三组生长良好的约 2×10^6 个细胞加入蛋白裂解液充分裂解, 100 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 各取 50 μ L 进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 封闭后加入 1:500 抗 β -actin 抗体, 洗膜, 以 HRT 标记的二抗结合, 显色, 曝光, 显影定影。调平各组蛋白浓度。解析硝酸纤维素膜, 封闭后再次加入 1:500 抗 BDNF 多克隆抗体结合, 洗膜, 以 HRT 标记的二抗结合, 显色, 曝光, 显影定影。每组随机读取 5 次灰度分析数据, 取二者比值平均值为结果行独立样本 *t* 检验 (Independent Samples Test) 取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 总 RNA 抽提

Trizol 试剂抽提总 RNA 经测定 $\lambda_{260}:\lambda_{280} = 1.92$, 说明所提取 RNA 纯度好, 甲醛变性凝胶电泳显示 28s, 18s, 5s, 5.8s, tRNA 三条条带, 28s 的亮度是 18s 的 2 倍。还看到一条由 tRNA 5.8s rRNA 和 5s rRNA 组成的、较模糊迁移较快的带(见图 1)。

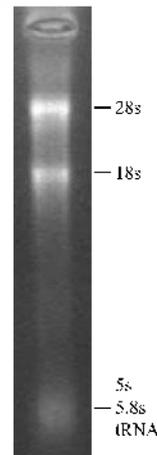


图 1 甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 结果

Fig.1 RNA denaturing gel electrophoresis

2.2 *Bdnf* 基因 RT-PCR 结果

RT-PCR 后琼脂糖电泳可见 768bp 处有特异条带(见图 2)。

2.3 PNL-BDNF-IRES₂-EGFP 重组质粒鉴定

Bdnf 基因 TA 克隆后经 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切后琼脂糖电泳可见 768bp 目的片段(见图 3), 回收纯化测序结果正确无突变或缺失。重组质粒 PNL-BDNF-IRES₂-EGFP 经双酶切后琼脂糖电泳、测序后得出相同结果(见图 4)。

2.4 慢病毒包装结果

慢病毒载体三质粒共转染 293T 细胞后 48h ~ 72h 荧光显微镜观察可见强绿色荧光(见图 5)

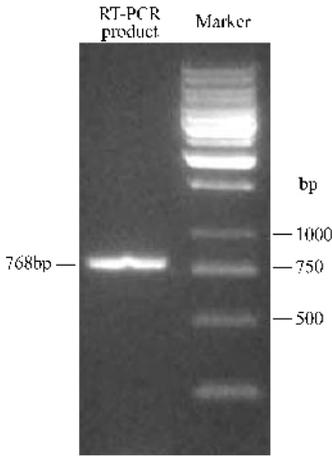


图2 Bdnf 基因 RT-PCR 后电泳结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis pattern of the RT-PCR product of Bdnf gene

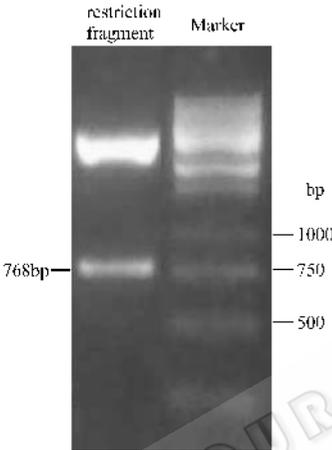


图3 BDNF-PuCmT 重组质粒酶切鉴定

Fig.3 Recombinant plasmid BDNF-PuCmT was identified with restriction enzyme (Sal I and BamH I)

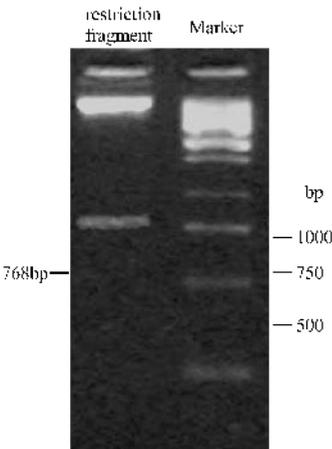


图4 PNL-BDNF-IRES₂-EGFP 重组质粒酶切鉴定

Fig.4 Recombinant plasmid PNL-BDNF-IRES₂-EGFP was identified with restriction enzyme(Sal I and BamH I) (Mock-rMSCs 组得到相同结果,数据未显示),浓缩后感染 293T 细胞测定滴度为 6.7×10^7 TU/mL。取

病毒基因组 DNA 行 PCR 后电泳检测可见 768bp Bdnf 基因片段(见图 6)。

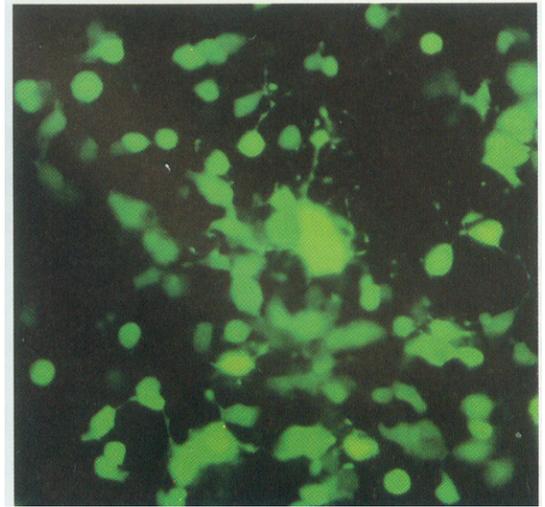


图5 荧光显微镜下慢病毒载体三质粒系统共转染 293T 细胞所见(× 200)

Fig.5 EGFP expression in the lentiviral 3 plasmids co-transfected 293T cells under fluorescence microscope(× 200)

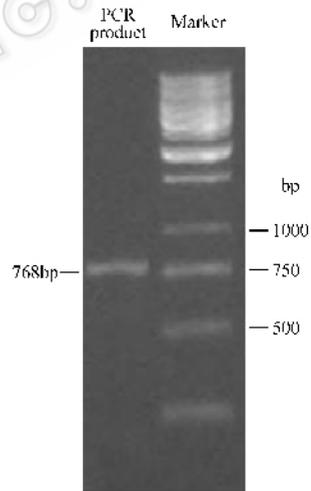


图6 病毒基因组 DNA PCR 结果

Fig.6 Agarose gel electrophoresis pattern of the PCR product of virus genome after construction

2.5 慢病毒感染 rMSCs 结果

经流式细胞术检测所培养的细胞 CD90、CD34、CD45 表达阴性,CD29 表达阳性(数据未显示),证实所分离培养为 MSCs,与文献报道一致^[1]。感染 48h 后荧光显微镜观察可见 BDNF-rMSCs 组以及 Mock-rMSCs 组均可见绿色荧光(见图 7、8),荧光随着细胞传代可持续,而空白组未见特异性绿色荧光(数据未显示)。细胞免疫化学染色检测可见 BDNF-rMSCs 组 BDNF 表达阳性,胞浆内大量棕褐色颗粒沉积,而 Mock-rMSCs 组及空白组细胞 BDNF 表达均为弱阳性,胞浆内仅有少量棕褐色颗粒沉积(见图 9A、B、C)。分别抽提 3 组细胞总 RNA,同时以大鼠 Bdnf 基



图 7 BDNF-rMSCs 组感染后 24h 荧光显微镜观察见大量绿色荧光 (×200)

Fig.7 EGFP expression in the BDNF-rMSCs after infection under fluorescent microscope(×200)



图 8 Mock-rMSCs 组感染后 24h 荧光显微镜观察见大量绿色荧光 (×200)

Fig.8 EGFP expression in the Mock-rMSCs after infection under fluorescent microscope(×200)

因引物以及大鼠 β -actin 基因引物作为内参行 RT-PCR。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后做灰度分析并统

计学分析得出结果 :与 Mock-rMSCs 组及空白组相比 ,BDNF-rMSCs 组的电泳条带灰度值较高 ,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。而 Mock-rMSCs 组与空白组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明相对于 Mock-rMSCs 组与空白组 ,在 mRNA 水平 BDNF-rMSCs 组确有更大量的 BDNF 表达(见图 10)。提取三组细胞蛋白先后以抗 β -actin 抗体及抗 BDNF 抗体行 Western blot ,可见 40kD 大小 β -actin 蛋白及 28kD 大小 BDNF 蛋白。行灰度分析并统计学分析得出结果 :与 Mock-rMSCs 组及空白组相比 ,BDNF-rMSCs 组

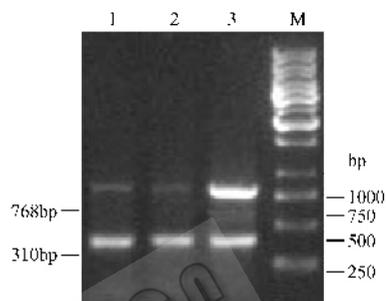


图 10 Mock-rMSCs、rMSCs、BDNF-rMSCs RT-PCR 结果

Fig. 10 Agarose gel electrophoresis pattern of the RT-PCR products of Mock-rMSCs , rMSCs and BDNF-rMSCs

1 : Mock-rMSCs ; 2 : rMSCs ; 3 : BDNF-rMSCs .

的电泳条带灰度值较高 ,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。而 Mock-rMSCs 组与空白组之间 $P > 0.05$,二者间无统计学差异。上述结果证明了在蛋白水平 BDNF-rMSCs 组能更大量地表达 BDNF(图 11)。

3 讨论

把遗传物质转移到靶细胞中的方法有许多 ,以往的研究大多使用逆转录病毒和腺病毒作为载体。传统的逆转录病毒载体虽然能把目的基因整合至靶细胞基因组 ,实现稳定表达 ,但只能感染分裂期细胞 ,腺病毒载体虽然可以感染分裂期以及非分裂期细胞 ,但是只能实现瞬时表达。因此 ,如何将目的基因高效转染靶细胞并能长期稳定表达 ,成为基因工

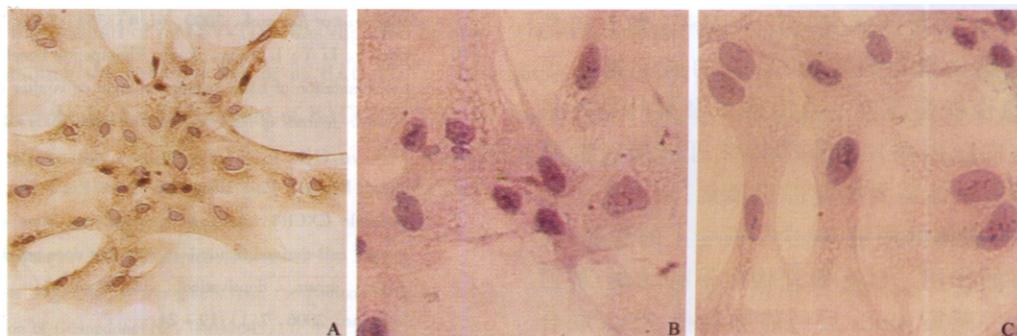


图 9 BDNF-rMSCs 组 (A , ×100) , Mock-rMSCs 组 (B , ×200) 和空白组 (C , ×200) 细胞免疫化学结果

Fig.9 BDNF-rMSC(A , ×100) , Mock-rMSC(B , ×200) and rMSCs(C , ×200)

immunocytochemical staining with BDNF antibody

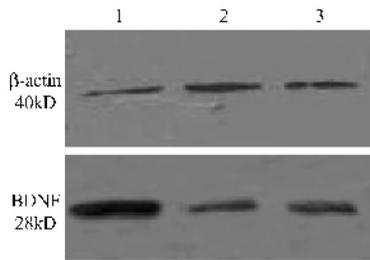


图 11 BDNF-rMSCs、Mock-rMSCs、rMSCs Western blot 结果
Fig. 11 Western blot result of BDNF-rMSCs, Mock-rMSCs and rMSCs
1: BDNF-rMSCs; 2: Mock-rMSCs; 3: rMSCs.

程研究热点。慢病毒载体正符合了这些要求,它能感染分裂期及非分裂期细胞;能使目的基因整合至靶细胞基因组从而实现长期表达;转移的基因片段容量大;可向同一细胞引入多种不同的基因,或对同一细胞反复感染;不易诱发宿主免疫反应,其生物安全性也得以大幅提高^[2]。慢病毒载体已发展到采用三质粒包装系统^[3-4],包括载体质粒、包装质粒和包膜质粒。本研究采用的第二代慢病毒载体系统的载体质粒缺乏 HIV-1 增强子及启动子序列,因此即使存在所有的病毒蛋白也不能转录出病毒 RNA,从而形成仅有一次性感染能力、复制缺陷型的病毒,生物安全性得以提高。同时,本研究所使用慢病毒载体之载体质粒基因序列中的目的基因与 *Egfp* 基因之间以 IRES(内部核糖体进入位点)相连接,使二者转录出一条单顺反子,同时翻译出两种蛋白,从而通过观察 EGFP 的表达直观地观测目的基因的表达。

BDNF 是脑内最主要的神经营养因子之一,具有维持以及促进神经细胞生长的作用。多年来许多研究表明其对脑缺血损伤有着积极的保护及修复作用^[5-8]。因此 BDNF 已成为基因治疗脑缺血损伤首选目的基因。研究发现 MSCs 在一定条件下于体内、体外均可分化为神经元样细胞,表达神经元特殊的表面标记,更有学者移植 MSCs 治疗脑梗死取得一定效果^[9,10]。大量的研究均提示 MSCs 具有向急性损伤病灶趋化聚集的现象,新近的研究揭示了 MSCs 可向急性损伤部位主动迁移并聚集的可能机制^[11]。MSCs 向脑内病灶聚集的特性可以使经静脉转入的基因在机体需要的靶部位聚集,从而大大减少了 MSCs 与载体的用量,减少了安全上的隐患,而又发挥应有的作用。已有研究构建带有 *Bdnf* 基因腺病毒载体并感染 MSCs 后经静脉移植 MSCs 联合治疗脑梗死可获得短期明显疗效^[12]。这些结果均揭示了基因治疗研究的一个新方向。

为实现转入基因的长期稳定表达,并对慢病毒

载体的生物安全性作出较长期观察评估,本实验成功构建了带有 *Bdnf* 基因第二代慢病毒载体,并成功感染 rMSCs,使 rMSCs 大量表达 BDNF 蛋白,同时证实了载体所带 EGFP 的示踪作用。这些初步研究为进一步移植后长期观察评估奠定了基础,在此基础上课题组正在进行长期的定时观察。期待 MSC 能携带目的基因 *Bdnf* 迁移至损伤部位,如脑梗死灶,发挥基因与干细胞治疗的协同作用,对损伤组织进行修复,促进更好的机体功能恢复。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of Cell Biochemistry*, 2003, **89**(6): 1235 - 1249.
- [2] Kafri T, Van Praag H, Gage FH, et al. Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Molecular Therapy*, 2000, **1**(6): 516 - 521.
- [3] Xu K, Ma H, McCown TJ, et al. Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Molecular Therapy*, 2001, **3**(1): 97 - 104.
- [4] Gary L, Buchsacher Jr, Flossie Wong-Staal. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*, 2000, **95**(8): 2499 - 2504.
- [5] Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature*, 1992, **360**(6460): 757.
- [6] Kishin A, Ishige Y, Tatsuno T, et al. BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. *Experimental Neurology*, 1997, **144**(2): 273 - 286.
- [7] Kiprianova I, Freiman TM, Desiderato S, et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. *Journal of Neuroscience Research*, 1999, **56**(1): 21 - 27.
- [8] Zhang Y, Pardridge WM. Blood-brain barrier targeting of BDNF improves motor function in rats with middle cerebral artery occlusion. *Brain Research*, 2006, **1111**(1): 227 - 229.
- [9] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 2000, **61**(4): 364 - 370.
- [10] Chen J, Li Y, L Wang, et al. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Journal of Neuroscience Research*, 2001, **189**(1-2): 49 - 57.
- [11] Shyam Bhakta, Ping Hong and Omer Koc. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 *in vitro* but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 2006, **7**(1): 19 - 24.
- [12] Nomura T, Honmou O, Harada K, et al. I.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult