

· 论 著 ·

不同浓度 GDNF 诱导神经干细胞向多巴胺能神经元分化研究<sup>\*</sup>陈梅玲<sup>1</sup>, 沈岳飞<sup>2</sup>, 李清华<sup>1</sup>, 刘开祥<sup>1</sup>, 曾爱源<sup>1</sup>, 林小慧<sup>1</sup>

(1. 桂林医学院附属医院神经内科, 广西桂林 541001; 2. 广西医科大学附属第一医院神经内科, 南宁 530021)

**摘要:**目的 观察不同浓度胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)对神经干细胞(NSCs)向多巴胺(DA)能神经元分化的影响。**方法** 取新生鼠脑组织体外分离培养 NSCs, 第 2 代 NSCs 诱导培养基中分别加入 0、5、10、20 ng/mL GDNF 进行诱导。用逆转录-聚合酶链反应检测诱导后细胞酪氨酸羟化酶(TH)mRNA 的表达, 免疫细胞化学染色鉴定 NSCs, 检测 NSCs 向 DA 能神经元分化率。**结果** 各诱导组均表达 TH mRNA。神经球具有自我更新和表达巢蛋白的能力, 诱导分化后的细胞能表达神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞特异性抗原。与空白对照组比较, GDNF 诱导组 TH 阳性细胞率均明显升高( $P<0.05$ ); 且 10、20 ng/mL GDNF 诱导组升高幅度明显高于 5 ng/mL GDNF 诱导组( $P<0.05$ ), 10、20 ng/mL GDNF 诱导组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 从新生鼠脑组织分离出 NSCs。不同浓度的 GDNF 均能促进 NSCs 向 DA 能神经元分化, GDNF 浓度从 10 ng/mL 提高到 20 ng/mL 时 TH 阳性细胞率无明显变化。

**关键词:** 细胞分化; 胶质细胞源性神经营养因子; 神经干细胞; 多巴胺能神经元

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)22-2185-03

Research on the induction of differentiation of neural stem cells with dopaminergic neurons by different concentrations of glial cell line-derived neurotrophic factors<sup>\*</sup>

Chen Meiling<sup>1</sup>, Shen Yuefei<sup>2</sup>, Li Qinghua<sup>1</sup>, Liu Kaixiang<sup>1</sup>, Zeng Aiyuan<sup>1</sup>, Lin Xiaohui<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China;

2. Department of Neurology, First Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of glial cell line-derived neurotrophic factor with different concentrations on the differentiation of neural stem cells (NSCs) into dopamine (DA) neurons in vitro. **Methods** The primary NSCs were isolated from the whole brains of neonatal rats. 0, 5, 10, 20 ng/mL GDNFs were added into the second generation of NSCs to induce DA neurons for 10 days. Tyrosine hydroxylase (TH) mRNA was detected by RT-PCR; NSCs and DA neurons differentiation from NSCs were detected by immunocytochemical stain assay. **Results** All groups could express TH mRNA. The neurospheres had the capacity of self-renewing, expression of nestin, and could differentiate into multi-directions. Specific antigens of neurons, astrocytes and oligodendrocytes were also expressed. Compared with blank control group, GDNF increased the proportion of TH-positive cells ( $P<0.05$ ), 10, 20 ng/mL GDNF were significantly higher than that of 5 ng/mL group ( $P<0.05$ ), while no significant difference was found between 10, 20 ng/mL GDNF groups ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The NSCs were isolated from the brains of neonatal rats. GDNF could promote the differentiation of NSCs into DA neurons, and TH positive cell rate changed minimally when GDNF was increased from 10 to 20 ng/mL.

**Key words:** cell differentiation; glial cell line-derived neurotrophic factor; neural stem cells; dopaminergic neurons

胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是一种具有多生物学活性的神经营养因子, 具有强大的神经保护作用, 其对多巴胺(dopamine, DA)能神经元的相对特异性的营养作用的研究虽多限于基础研究, 但已取得相当结果。本实验探讨不同浓度的 GDNF 对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)向 DA 能神经元分化的影响, 为发现高效率的 DA 能神经元分化诱导方案及为 DA 能神经元脑内移植治疗帕金森病(parkinson's disease, PD)提供基础的实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 新生 24 h 内清洁级 SD 大鼠由广西医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK 桂 2003-0003。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

**1.2 试剂** 培养基 DMEM/F12、B27 购自 Gibco, 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、GDNF 购自 Peprotech、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青、兔抗人 Nestin 多克隆抗体和兔抗人神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)多克隆抗体购自北京中杉金桥公司, 兔抗人胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体购自武汉博士德公司, 小鼠抗人 2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶(cyclic nucleotide phosphodiesterase, CNP)抗体购自 Neo Markers, Supervision<sup>TM</sup> HRP 二步法检测试剂盒购自上海长岛生物技术有限公司, 兔抗细胞酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)多克隆抗体购自北京博奥森公司, Trizol 购自 Invitrogen 公司, cDNA 第一链合成逆转录试剂盒购自 MBI

<sup>\*</sup> 基金项目: 广西自然科学基金资助项目(桂科自 0832140); 广西卫生厅基金资助项目(Z2010309)。

公司, Taq DNA 聚合酶购自 Fermentas, TH 及磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物由上海生工合成。

**1.3 新生鼠全脑 NSCs 的分离和培养** 选择新生 24 h 内清洁级 SD 大鼠, 75% 乙醇浸泡消毒后断头处死, 取出脑组织, 在解剖显微镜下小心剥离脑膜及血管, 将取出的脑组织剪成小块, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化 10 min 左右, 用含 bFGF 20 ng/mL 和 EGF 20 ng/mL 的 DMEM/F12 培养基漂洗细胞, 重复离心 2 次。然后加入适量培养液, 调整细胞密度至  $5 \times 10^5$ /mL, 接种至 25 mL 培养瓶。在 37 °C 饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>、95% 空气的二氧化碳培养箱中培养。首次换液采用分瓶法, 以后每 2~3 天半量换液 1 次, 5~7 d 传代 1 次。

**1.4 NSCs 的诱导分化** 取第 2 代的 NSCs 以  $5 \times 10^5$ /mL 的密度接种于预先经 PLL 包被盖玻片的 24 孔培养板和培养瓶, 其中拟行免疫细胞化学检测的细胞种入培养板, 拟行逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测的细胞种入 50 mL 培养瓶。分别加入以下培养液: A 组(空白对照组)DMEM/F12+10% FBS+2% B27, B、C、D 组分别在 A 组基础上加入 5、10、20 ng/mL GDNF。以后每 3 天半量换液 1 次, 分化 10 d 后终止诱导。

**1.5 免疫细胞化学染色** 取出终止诱导的细胞爬片, 用 0.01 M PBS(pH7.4)洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.5% TritonX-100 中室温下孵育标本 10 min, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01 M PBS 配制)处理标本 15 min, 一抗分别为小鼠抗人 Nestin 单克隆抗体、兔抗人 NSE 多克隆抗体、兔抗人 GFAP 多克隆抗体、小鼠抗人 CNP 单克隆抗体、兔抗 TH 多克隆抗体及兔抗 DAT 多克隆抗体, 4 °C 湿盒过夜(一抗用含 5% 正常羊血清的 PBS 稀释), 滴加二抗 37 °C 孵育标本 30 min, A 液孵育 20 min, B 液 37 °C 孵育标本 30 min, 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)避光显色 5~10 min, 苏木素复染, 自来水返蓝, 中性树胶封片, 显微镜下观察、拍照。

**1.6 RT-PCR 检测各诱导组细胞 TH 基因 mRNA 的表达** 细胞总 RNA 提取采用 Trizol 一步法, 以各诱导组提取的细胞总 RNA 为模板, Oligo(dT)18 为引物, 按照 RevertAid™ First Strand cDNA synthesis Kit(Fermentas)试剂盒说明书合成 cDNA。TH 基因引物序列: 上游引物 5'-CAT CGG ACG GCG ACA GAG T-3', 下游引物 5'-TCA CGG GCG GAC AGT AGA CC-3', PCR 扩增片段大小为 795 bp。内参 GAPDH 基因引物序列: 上游引物 5'-GCA GTG ATG GCA TGG ACT GT-3', 下游引物 5'-TCA TTG ACC TCA ACT ACA TG-3', PCR 扩增片段大小为 475 bp。按以下反应条件进行产物扩增: 95 °C、5 min, 95 °C、45 s, 63 °C、45 s, 72 °C、1 min, 72 °C、5 min, 30 个循环。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像分析系统分析拍照。

**1.7 统计学处理** TH 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 即为所得 TH 阳性细胞率。采用 SPSS13.0 统计软件进行方差分析及两两比较, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

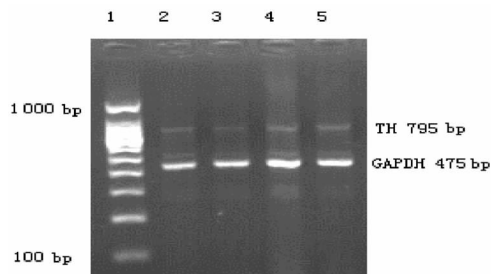
## 2 结 果

**2.1 NSCs 的培养及诱导分化情况** 新生 SD 大鼠原代分离的单细胞在镜下观察呈圆球形、大小均一、折光性较强、不贴壁

及分散存在。随后的培养过程中细胞团内细胞增多, 可见呈悬浮生长的由几十个到上百个圆球形细胞构成的神经球。细胞传代培养后, 小的神经球不断增殖变大, 培养 7 d 后, 仍出现与原代培养相同的大量呈悬浮状态的神经球。

倒置相差显微镜下观察, 在不同诱导条件下, 神经球 3~4 h 贴壁, 24 h 后球体外围细胞沿着长突起向外迁移, 整个球体似菊花状。诱导分化 10 d 终止, 大部分神经球已完全分散为单个细胞。与 A 组比较, B、C、D 组的神经球较容易贴壁, 分化细胞向外迁移速度快、突起长而粗、胞体大而清晰, C、D 组更明显(封 2 图 1、2)。

**2.2 RT-PCR 检测结果** B、C、D 组经 RT-PCR 扩增后, 均得到 795 bp 的扩增片段(图 3), 与 TH 基因预期的产物片段长度基本一致, 说明各诱导组的细胞经 RT-PCR 检测均有 TH mRNA 的表达。



1: 标准品; 2: 空白对照组; 3: 5 ng/mL GDNF 诱导组; 4: 10 ng/mL GDNF 诱导组; 5: 20 ng/mL GDNF 诱导组。

图 3 RT-PCR 检测各组细胞 TH mRNA 的表达

## 2.3 免疫细胞化学染色结果

**2.3.1 NSCs 的鉴定** 传代的神经球 Nestin 染色阳性, 神经球能分化为 NSE、GFAP 及 CNP 阳性细胞, 表明其有多向分化潜能, 具有 NSCs 的基本特征(图 4、5, 封 2 图 6、7)。

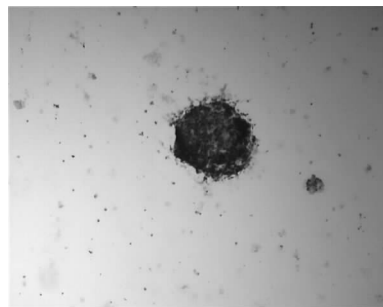


图 4 神经球 Nestin 染色阳性( $\times 200$ )

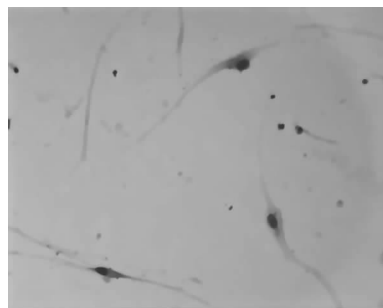


图 5 NSCs 分化为神经元, NSE 染色阳性( $\times 400$ )

**2.3.2 NSCs 向 DA 能神经元分化的检测** 各组均可见 TH 及 DAT 阳性细胞, TH、DAT 阳性细胞胞浆呈棕黄色, 胞核无

表达(封 2 图 8、9)。各组 TH 阳性细胞率分别为:A 组( $1.17 \pm 0.70$ )%、B 组( $3.74 \pm 1.01$ )%、C 组( $6.66 \pm 1.38$ )%、D 组( $6.40 \pm 1.95$ )%。与 A 组比较,B、C、D 组 TH 阳性细胞率均明显提高( $P < 0.05$ )。与 B 组比较,C、D 组 TH 阳性细胞率均明显提高( $P < 0.05$ )。C、D 组 TH 阳性细胞率基本相同( $P > 0.05$ )。提示在 5~20 ng/mL 范围内,随着 GDNF 浓度的升高,TH 阳性细胞率逐渐升高,但 GDNF 浓度从 10 ng/mL 增加至 20 ng/mL 时 TH 阳性细胞率无明显变化。

### 3 讨 论

黑质纹状体的 DA 能神经元的退行性改变是 PD 发病的主要环节,由于 PD 病变区域较为明确,被认为是神经细胞移植治疗最有希望治愈的中枢神经系统疾患之一<sup>[1-2]</sup>。自然状态下,NSCs 分化为 DA 能神经元的比例较低,在移植前将 NSCs 定向诱导分化为 DA 能神经元后再进行体内移植可能更好地改善 PD 患者由于黑质 DA 能神经元丢失引起的一系列临床症状,应该更加适合 PD 细胞替代治疗的需要<sup>[3]</sup>。在进行 PD 细胞移植治疗的研究进程中,除了寻求合适的细胞系,如何将各种有分化潜能的细胞诱导为含量丰富的、有功能的 DA 能神经元一直是研究的焦点之一。目前体外诱导 NSCs 向 DA 能神经元分化的实验方法主要分为以下几种:神经营养因子或细胞因子诱导<sup>[4-8]</sup>、与其他组织共培养、化学试剂诱导、基因转染或基因修饰等<sup>[9]</sup>。

神经营养因子是能支持神经元存活,促进其生长、分化及维持其功能的一类化学因子,包括神经营养因子(neurotrophin, NT)家族、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、GDNF 以及一些生长因子和细胞因子等,这些营养因子对 DA 能神经元的存活和分化均有一定的作用,其中研究较多的是 GDNF 和 NT 家族中的脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)。但是对于 GDNF 在 DA 神经元分化过程中的最佳浓度研究较少,本实验对此进行了研究。

1993 年, Lin 等<sup>[10]</sup>从大鼠胶质细胞来源的 B49 细胞株的条件培养基中成功分离纯化了 GDNF。GDNF 属转化生长因子- $\beta$  超家族,在中枢神经系统,高水平的 GDNF mRNA 见于发育期纹状体,而在成年期表达水平较低<sup>[11]</sup>。原来认为 GDNF 是 DA 能神经元专一性营养因子,随后的研究发现它是一种多效能的神经营养因子,在神经元的功能维持和损伤修复方面有其他神经营养因子不能比拟的强效作用,对运动神经元、基底前脑胆碱能神经元、交感神经元及感觉神经元均有营养作用,但研究最多、最受关注的仍是其对 DA 能神经元的营养作用。许多研究表明它对 DA 能神经元有靶源性的营养作用和神经保护作用<sup>[12-13]</sup>。Roussa 和 Krieglstein<sup>[14]</sup>在小鼠胚胎期第 12 天的腹侧中脑神经细胞培养体系中加入外源性的 GDNF 后,表达早期 DA 能神经元标记物如 Nurr1 和 Ptx3 的细胞数目明显高于对照组。黄娟等<sup>[4]</sup>在中脑 NSCs 培养基础上加入 GDNF 后 TH 阳性细胞率为 13.41%,而对照组为 3.49%。TH 是 DA 合成的限速酶,它的活性受 3 种丝氨酸残基 Ser-19、Ser-31 和 Ser-40 磷酸化的调节, Kobori 等<sup>[15]</sup>通过在鼠原代中脑神经细胞培养体系中加入 GDNF 后,发现 GDNF 通过提高 Ser-31 和 Ser-40 的磷酸化水平而使 DA 的合成增加,故认为 GDNF 除了对 DA 的存活起重要作用外尚能直接增加 DA 的合

成。基于前人研究基础,为进一步探索 GDNF 诱导 NSCs 向 DA 能神经元分化的最佳浓度,本实验在体外培养的第 2 代 NSCs 培养基中给予不同浓度的 GDNF 诱导,结果显示不同浓度 GDNF 诱导组与空白对照组比较能提高 TH 阳性细胞率,与国内外的报道相一致。在 5~20 ng/mL 范围内,随着 GDNF 浓度的升高,TH 阳性细胞率逐渐升高,高剂量诱导时 NSCs 向 DA 能神经元分化作用更显著,并且细胞形态更成熟。GDNF 浓度从 10 ng/mL 增加至 20 ng/mL 时 TH 阳性细胞率无明显变化,表明在本研究浓度范围内 10 ng/mL GDNF 具有最佳的诱导效率。目前 GDNF 诱导 NSCs 向 DA 能神经元分化的机制尚未明确, Wang 等<sup>[6]</sup>认为 GDNF 通过 PI3-K/Akt 通路介导对 DA 能神经元存活和分化起到重要的作用。

本组实验结果表明, GDNF 能促进 NSCs 向 DA 能神经元分化及成熟, GDNF 定向诱导 DA 能神经元分化是否是在 TH 基因转录水平上起作用? 还有待于进一步研究。随着 GDNF 的研究进一步深入,相信其将成为一种可供临床使用的有效药物。

### 参考文献:

- [1] Paul G, Ahn YH, Li JY, et al. Transplantation in Parkinson's disease: The future looks bright[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 557: 221-248.
- [2] Galvin KA, Jones DG. Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system[J]. *Med J*, 2002, 177(6): 316-318.
- [3] Ben-Hur T, Idelson M, Khaner H, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1246-1255.
- [4] 黄娟, 戴冀斌, 陆蔚天, 等. GDNF 与 IL-1 $\beta$  体外诱导小鼠中脑神经干细胞分化作用的实验研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2006, 15(2): 119-123.
- [5] 丁继国, 丁文杰, 李光. 白细胞介素 1 $\beta$  体外诱导鼠胚胎中脑神经干细胞的分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(3): 406-410.
- [6] Wang HJ, Cao JP, Yu JK, et al. Role of PI3-K/Akt pathway and its effect on glial cell line-derived neurotrophic factor in midbrain dopamine cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(2): 166-172.
- [7] Roussa E, Wiehle M, Dünker N, et al. Transforming growth factor beta is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo; ectopic induction in dorsal mesencephalon[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(9): 2120-2129.
- [8] 辛志成, 周政, 杨辉, 等. SVZa 神经干细胞诱导分化为多巴胺能神经元的实验研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(5): 481-483.
- [9] Park CH, Kang JS, Shin YH, et al. Acquisition of in vitro and in vivo functionality of Nurr1-induced dopamine neurons[J]. *FASEB J*, 2006, 20(14): 2553-2555.
- [10] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: (下转第 2190 页)

IL-6/STAT3 信号通路下游肝再生相关基因表达异常,最终致使硬化肝脏再生障碍。但什么原因导致 IL-6 表达异常,以及下游肝再生相关基因有何异常变化,仍需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Atta HM. Gene therapy for liver regeneration: experimental studies and prospects for clinical trials [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(32): 4019-4030.
- [2] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2006, 43(2 Suppl 1): S45-53.
- [3] 余小舫,戴植本. 实验性肝硬化大鼠肝部分切除后的再生 [J]. *同济医科大学学报*, 1988, 2(2): 93-96.
- [4] Yang S, Leow CK, Tan TM. Expression patterns of cytokine, growth factor and cell cycle-related genes after partial hepatectomy in rats with thioacetamide-induced cirrhosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(7): 1063-1070.
- [5] Masson S, Scotté M, Garnier S, et al. Differential expression of apoptosis-associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats [J]. *Apoptosis*, 2000, 5(2): 173-179.
- [6] Nishino M, Imuro Y, Ueki T, et al. Hepatocyte growth factor improves survival after partial hepatectomy in cirrhotic rats suppressing apoptosis of hepatocytes [J]. *Surgery*, 2008, 144(3): 374-384.
- [7] Lam SP, Luk JM, Man K, et al. Activation of interleukin-6-induced glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3 pathway in mesenchymal stem cells enhances hepatic differentiation, proliferation, and liver regeneration [J]. *Liver Transplant*, 2010, 16(10): 1195-1206.
- [8] Michalopoulos GK. Liver regeneration [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2): 286-300.
- [9] Rychtrmoe D, Libra A, Buncek M, et al. Studying liver regeneration by means of molecular biology: how far we are in interpreting the findings [J]. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2009, 52(3): 91-99.
- [10] Jin X, Zimmers TA, Perez EA, et al. Paradoxical effects of short-and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair [J]. *Hepatology*, 2006, 43(3): 474-484.
- [11] Tiberio GA, Tiberio L, Benetti A, et al. IL-6 promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy [J]. *Cytokine*, 2008, 42(3): 372-378.
- [12] Marques JM, Belza I, Holtmann B, et al. Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the liver against apoptosis [J]. *Hepatology*, 2007, 45(3): 639-648.
- [13] Yang ZT, Lau CK, Lam SP, et al. Cardiotrophin-1 enhances regeneration of cirrhotic liver remnant after hepatectomy through promotion of angiogenesis and cell proliferation [J]. *Liver Int*, 2008, 28(5): 622-631.
- [14] Leu JI, Crissey MA, Leu JP, et al. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response liver injury [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(2): 414-424.
- [15] Li W, Liang X, Kellendonk C, et al. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32): 28411-28417.
- [16] Moh A, Iwamoto Y, Chai GX, et al. Role of STAT3 in liver regeneration: survival, DNA synthesis, inflammatory reaction and liver mass recovery [J]. *Lab Invest*, 2007, 87(10): 1018-1028.
- [17] Sakuda S, Tamura S, Yamada A, et al. Activation of signal transducer and activator transcription 3 and expression of suppressor of cytokine signal 1 during liver regeneration in rats [J]. *J Hepatol*, 2002, 36(3): 378-384.
- [18] Horiguchi N, Ishac EJ, Gao B. Liver regeneration is suppressed in alcoholic cirrhosis: correlation with decreased STAT3 activation [J]. *Alcohol*, 2007, 41(4): 271-280.
- [19] Starkel P, De Saeger C, Leclercq I, et al. Deficient Stat3 DNA-binding is associated with high Pias3 expression and a positive anti-apoptotic balance in human end-stage alcoholic and hepatitis C cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(4): 687-695.
- (收稿日期: 2010-10-11 修回日期: 2011-05-22)
- (上接第 2187 页)
- a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science*, 1993, 260(5111): 1130-1132.
- [11] 陈生弟. 帕金森病临床新技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2002: 218-219.
- [12] Kholodilov N, Yarygina O, Oo TF, et al. Regulation of the development of mesencephalic dopaminergic systems by the selective expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in their targets [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(12): 3136-3146.
- [13] Yasuhara T, Shingo T, Date I. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for Parkinson's disease [J]. *Acta Med Okayama*, 2007, 61(2): 51-56.
- [14] Roussa E, Kriegstein K. GDNF promotes neuronal differentiation and dopaminergic development of mouse mesencephalic neurospheres [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 361(1-3): 52-55.
- [15] Kbori N, Waymire JC, Haycock JW, et al. Enhancement of tyrosine hydroxylase phosphorylation and activity by glial cell line-derived neurotrophic factor [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 2182-2191.
- (收稿日期: 2010-10-17 修回日期: 2011-06-27)