·论著·

重组胶质细胞源性神经营养因子腺病毒保护小鼠中脑多巴胺能神经元

高 红,王建军,张 蔚,蒋玉辉,牛东滨,王晓民△
(北京大学神经科学研究所,北京大学基础医学院神经生物学系,北京 100083)

[关键词] 帕金森病;胶质细胞源性神经营养因子;重组腺病毒;多巴胺;MPTP

[摘 要] 目的:观察携带大鼠来源的胶质细胞源性神经营养因子(rGDNF)的重组腺病毒在小鼠帕金森模型中有无保护中脑多巴胺(DA)能神经元对抗神经毒素甲基-苯基-四氢吡啶(MPTP)损伤的作用。方法:将LacZ重组腺病毒(Ad-LacZ)通过脑立体定位仪注入小鼠单侧纹状体,分别于注射后24 h、72 h、10 d和30 d灌流取脑做X-Gal染色,观察报告基因在小鼠脑内的表达情况;将rGDNF重组腺病毒(Ad-rGDNF)通过脑立体定位仪注入小鼠单侧纹状体。两者均于72 h后给予MPTP损伤中脑DA能神经元,1周后用高压液相色谱分析纹状体中DA、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)和高香草酸(HVA)的含量。结果:Ad-LacZ注射后24 h表达较弱,72 h逐渐增强,10 d仍可见到较强表达,30 d则逐渐减弱。LacZ基因的表达范围比较局限,胶质细胞和神经元都能被感染,并且未见明显的腺病毒载体引起的细胞毒性作用。注射Ad-rGDNF侧纹状体DA含量较MPTP损伤组和MPTP + Ad-LacZ组显著升高,而未注射侧无明显升高。此外,DA主要代谢产物DOPAC和HVA的含量也明显升高,而DOPAC/DA、HVA/DA比值则明显降低。结论:Ad-rGDNF能显著保护中脑DA能神经元对抗MPTP的损伤。

[中图分类号] R742.5 [文献标识码] A [文章编号] 1671-167X(2003)03-0256-05

Recombinant adenovirus carrying glial cell line-derived neurotrophic factor gene protect midbrain dopaminergic neurons in mice

GAO Hong, WANG Jianjun, ZHANG Wei, JIANG Yuhui, NIU Dongbin, WANG Xiaomin△
(Neuroscience Research Institute, Peking University; Department of Neurobiology, Peking University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100083, China)

KEY WORDS Parkinson disease; Glial cell line-derived neurotrophic factor; Recombinant adenovirus; Dopamine; MPTP

SUMMARY **Objective:** To observe the protective effects of recombinant adenovirus expressing glial cell line-derived neurotrophic factor (Ad-rGDNF) on the midbrain dopaminergic neurons against MPTP damage. **Methods:** Recombinant adenovirus carrying LacZ gene (Ad-LacZ) was injected into the murine striatum using the stereotaxic apparatus. The murine brains were perfused and dissected, then stained with X-Gal subsequently at 24 hours, 72 hours, 10 days and 30 days after injection. In another experiment, MPTP was injected subcutaneously into the mice 72 hours after the intrastriatal injection of Ad-rGDNF (1×10^8 pfu·ml^{-1}). The murine striatum was removed to evaluate the content of DA, DOPAC and HVA by HPLC-ECD 1 week later. **Results:** X-Gal staining indicated the expression of LacZ gene 24 hours after injection of Ad-LacZ. Stronger expression was also detected at the end of 72 hours and 10 days, but decreased 30 days later. In addition, the LacZ gene expression was localized and detectable in both neurons and glial cells. There was no apparent cytotoxic effect induced by Ad-LacZ alone. In MPTP-treated mice, the content of dopamine decreased 80 % compared to that in the saline-treated ones. The DA content of MPTP + Ad-rGDNF group on injected side was significantly higher than that of MPTP alone group and MPTP + Ad-LacZ group. Changes in the content of DOPAC and HVA followed the same pattern. The ratio of DOPAC/DA and HVA/DA on injected side also decreased significantly. However, no significant change was observed on uninjected side. **Conclusion:** The results suggested that recombinant adenoviral vector expressing rGDNF can protect DA neurons against MPTP injury.

(J Peking Univ [Health Sci], 2003, 35:256-260)

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目基金(G1999054008)和国家自然科学基金(30170304)资助 Supported by the Major State Basic Research Development Program of People's Republic of China (G1999054008) and the National Natural Science Foundation of China (30170304)

△Corresponding author email, xmwang@bjmu.edu.cn

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一种常见的多发于中老年人的神经系统退行性疾病,其主要病理改变为中脑黑质多巴胺(dopamine,DA)能神经元进行性变性坏死。目前认为,PD 治疗的关键和理想模式不仅是有效提高纹状体内 DA 含量,而且应该考虑如何挽救已经变性和濒临死亡的 DA 能神经元、减缓乃至终止其进一步退变。胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)是一种属于 TGF-β 超家族成员的神经营养因子,它能特异性促进体外培养的中脑 DA 能神经元存活、分化,增加突触末梢对 DA 的摄取[1],保护 DA 能神经元对抗 6-羟多巴胺(6-hydroxydopamine,6-OHDA)和甲基-苯基-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrohydropyridine,MPTP)等神经毒素的损伤[2],因而在 PD 治疗的基础研究和临床应用中显示出广阔的发展前景。但是,GDNF 蛋白本身不能通过血脑屏障,神经系统单次或多次给药不仅疗效不持久,而且危险性大、费用昂贵,自发活动增加和体重减轻等副作用也十分明显,病人难以接受[3,4]。如何将 GDNF 基因通过适当的载体靶向性地导入病变脑区,使之稳定地表达 GDNF 蛋白并作用于受损的 DA 能神经元而不影响其它神经元,是 GDNF 应用于 PD 临床治疗所面临的挑战。本研究以 GDNF 基因为靶基因,以复制缺陷型重组腺病毒为载体,转导 MPTP 诱发的小鼠 PD 模型,采用色谱分析、组织化学和细胞生物学等方法,观察 Ad-rGDNF 对中脑 DA 能神经元对抗神经毒素 MPTP 损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 重组腺病毒的扩增

含 10 %(体积分数)胎牛血清的 DMEM 培养液培养 293 细胞至 80 %成片,吸出培养液并用 PBS 洗涤细胞两次,加入 2 ml 病毒储存液[5],浸染 1～2 h。随后吸出浸染液,换含 5 %(体积分数)胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养。数天后,待大部分细胞出现细胞病变后,轻轻吸出培养液并保存。加入 2 ml 无血清 DMEM 培养液,吸管小心吹打使细胞完全脱落,离心收集细胞,每 5×10^7 个细胞加入 1 ml 无血清 DMEM 培养液重悬细胞,于 -20 ℃和 37 ℃水浴反复冻融 4 次,冻融液离心后 -70 ℃储存。

1.2 病毒滴度测定

按每孔 2×10^6 个细胞的量将 293 细胞接种于 2 个 6 孔板,培养过夜。取 0.1 ml 病毒液加入 0.9 ml 无血清 DMEM 培养液中,充分混匀后取 0.1 ml 依次作 10 倍倍比稀释至第 10 管。用 PBS 洗涤细胞 2～3 次,自第 1 管开始,每 1 稀释管取 0.5 ml 细胞。浸染 1 h 后弃病毒液,换常规培养液继续培养,48 h 后出现细胞病变,蚀斑在 4～5 d 可以看到,在 6～8 d 计数。依下列公式计算病毒滴度:病毒滴度(pfu·ml^{-1}) = 空斑均数 ×稀释度的倒数 ÷病毒量。公式中 pfu 为蚀斑形成单位(plaque forming unit, pfu)。测得重组 GDNF,LacZ 腺病毒的滴度分别为 2×10^8 pfu·ml^{-1}和 3×10^8 pfu·ml^{-1}。

1.3 试验动物分组

C57BL/6J 小鼠(北京大学医学部实验动物中心提供)49 只,雄性,体重 25～30 g,随机分为 4 组:(1)正常生理盐水对照组;(2)MPTP 损伤组;(3)Ad-LacZ 加上 MPTP 损伤组;(4)Ad-rGDNF 加上 MPTP 损伤组。当单侧纹状体内注射 Ad-rGDNF 或 Ad-LacZ,正常对照组和 MPTP 损伤组则注射 PBS。术后 72 h,正常对照组注射生理盐水,其余皮下注射 MPTP 40 mg·kg^{-1}。损伤后第 7 天,迅速将小鼠断头处死,取两侧纹状体,通过 HPLC-ECD 测定其中 DA 及其代谢产物 3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)和高香草酸(homovanillic acid,HVA)的含量。

1.4 X-Gal 染色

用 PBS/氯化镁洗涤脑片 3 次,0.25 %(体积分数)戊二醛室温固定脑片 10～15 min,然后再用 PBS/氯化镁洗 3 次(第 1 次和第 3 次快洗,第 2 次洗 10 min),于 37 ℃用 X-Gal 染液染细胞 24 h。为长期保存标本,可分别用体积分数 70 %、80 %、90 %乙醇和无水乙醇梯度脱水各 5 min,加甘油封片。4 ℃避光保存。

1.5 高效液相色谱组织样品的预处理

样品自 -80 ℃冰箱取出立即置于冰上,每管加入 0.5 ml 冰冷 A 液(0.4 mmol·L^{-1} $HClO_4$ 23 ml,用蒸馏水稀释至 1 000 ml),置冰浴中用超声波匀浆器匀浆 1 min,冰浴 10 min,4 ℃,12 000 r·min^{-1},离心 15 min,取上清至一新的小离心管,加入 1/2 体积冰冷 B 液(6.4 g 柠檬酸钾,52.25 g 磷酸氢二钾,0.74 g EDTA 溶于 1 000 ml 水中),冰浴静置 10 min,4 ℃,12 000 r·min^{-1},离心 15 min。取 150 μl 上清进样分析。

1.6 高效液相色谱进行样品分析及含量计算

设定最大柱压 34.32 MPa,流速 12 ml·min^{-1},ECD 设定电压 0.8 V,样品检测时间为 40 min。各标准品工作液分别进样,检测并记录其保留时间,作为定性指标。进样 150 μl,根据色谱峰面积从标准

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

曲线上求出其相应含量,并除以组织湿重,所得值为每克组织中各物质的含量。

1.7 统计学处理

在 STATISTICA 软件中用 One Way ANOVA 分析继之以 Newman-Keuls post hoc 检验比较各组之间差别的显著性。数据用 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$表示。

2 结果

2.1 Ad-LacZ 在小鼠纹状体内的表达和时程观察

纹状体注射 2×10^8 pfu·ml^{-1} Ad-LacZ 4 μl, 24 h 后,X-Gal 染色即能观察到被蓝染的神经组织,表明 LacZ 基因已开始表达,此时表达量相对较少且范围局限,其他脑区未见表达(图 1A,B)。注射 72 h 后,组织蓝染程度加深,说明靶基因表达量增加,但表达范围仍很局限(图 1 C,D)。10 d 后,纹状体内可见较强表达,组织蓝染范围较前有所扩大,但其他脑区仍未见表达(图 1E,F)。30 d 后,LacZ 基因表达明显较少,局部有扩散的趋势(图 1G,F)。以上观察结果表明,复制缺陷型重组腺病毒能高效感染神经细胞并表达目的基因,而且在所观察的 4 个不同的时间点均未见到腺病毒引起的细胞毒性作用。

2.2 小鼠单侧纹状体注射 Ad-rGDNF 对中脑 DA 能神经元对抗 MPTP 损伤的影响

2.2.1 小鼠行为学观察 给 C57BL/6J 小鼠皮下注射 MPTP 40 mg·kg^{-1}后 5 min,小鼠出现高频震颤、凝视、弓背、竖尾和呼吸急促等急性症状,上述症状持续约 20～30 min,24 h 后有所缓解。此后依然能观察到小鼠行动迟缓、四肢僵直和运动减少等症状,饮食饮水也明显减少,体重减轻,个别动物死亡。由于本次实验所用小鼠体重偏大,年龄偏老,其行动迟缓、僵直等症状较明显,而且死亡率较高。但是 Ad-rGDNF 保护组小鼠生理状态相对较好,自发活动较多,四肢僵硬不明显,饮食和体重下降程度较小。

2.2.2 皮下注射 MPTP 对小鼠纹状体 DA、DOPAC、HVA 及 DA 代谢率的影响 本次实验给小鼠皮下注射 MPTP 40 mg·kg^{-1}损伤后,纹状体内 DA 含量较正常对照组明显降低,DOPAC、HVA 也分别降低(表 1)。反应 DA 代谢率的 DOPAC/DA、HVA/DA 比值明显升高,其中 HVA/DA 比值升高尤为显著(表 2)。

表 1 重组腺病毒 Ad-rGDNF 对 MPTP 模型小鼠双侧纹状体内 DA 及其代谢产物 DOPAC、HVA 含量的影响△

Table 1 The effect of recombinant adenovirus Ad-rGDNF on the content of DA, DOPAC and HVA△

Group	n	Uninjection side			Injection side		
		DA	DOPAC	HVA	DA	DOPAC	HVA
Control	8	828.13 ±18.44	351.91 ±43.32	137.92 ±15.36	659.58 ±48.23	298.51 ±25.39	116.50 ±9.36
MPTP	6	93.84 ±16.91	64.71 ±11.03	72.99 ±12.23	84.14 ±14.06**	74.19 ±10.75*	85.03 ±7.30**
MPTP+Ad-LacZ	7	266.78 ±99.18	104.30 ±26.60	99.92 ±15.72	280.77 ±90.84*	136.94 ±32.21	105.89 ±20.06*
MPTP+Ad-rGDNF	8	190.15 ±37.27*	94.66 ±13.32**	82.46 ±9.95**	534.31 ±114.02	188.20 ±32.33	159.69 ±16.79

△amount of substance per g tissue; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ *vs* the injection side of MPTP+Ad-rGDNF group.

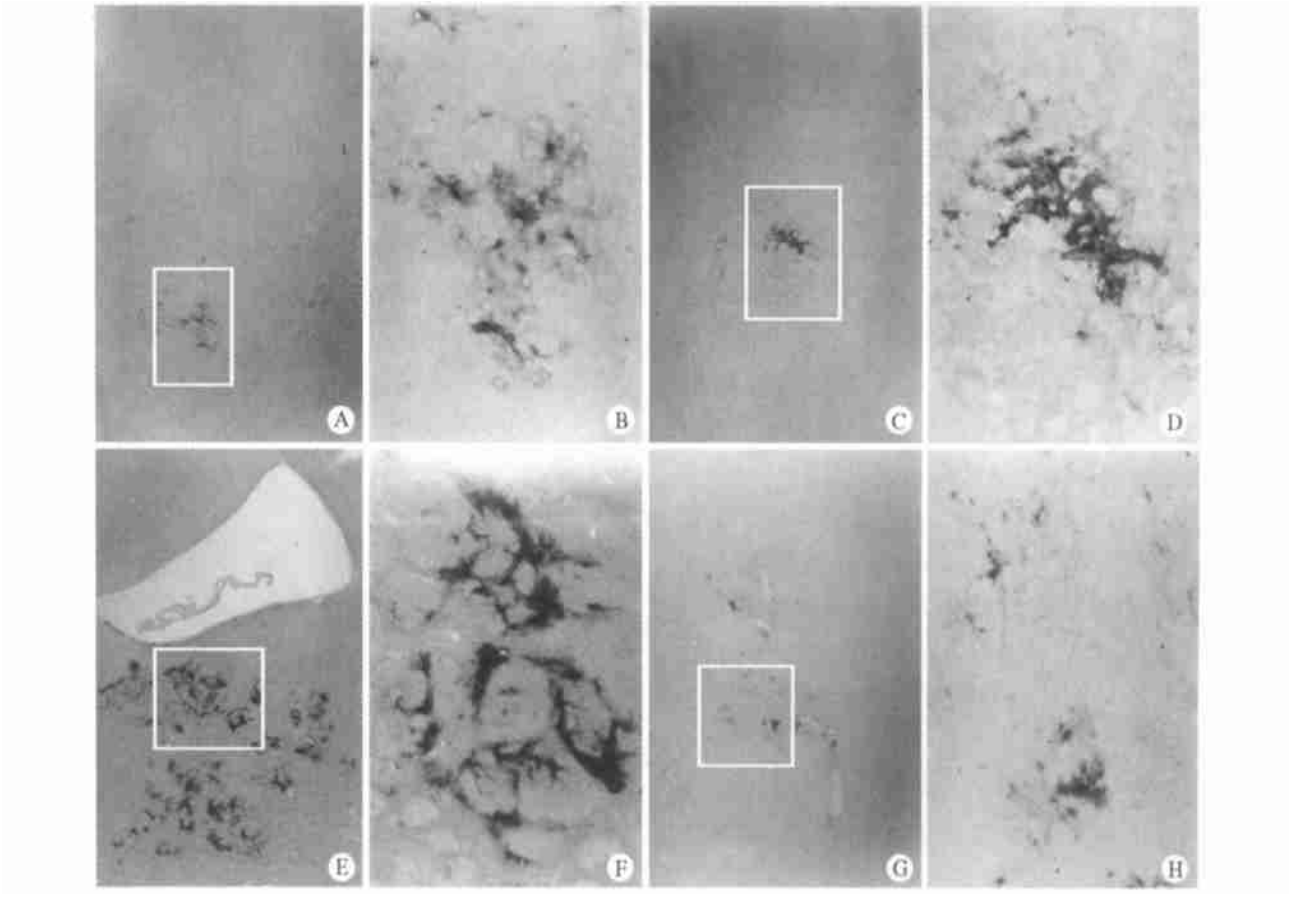
表 2 重组腺病毒 Ad-rGDNF 对 MPTP 模型小鼠双侧纹状体内 DOPAC/DA、HVA/DA 比值的影响

Table 2 The effect of recombinant adenovirus Ad-rGDNF on the ratio of DOPAC/DA and HVA/DA

Group	n	Uninjection side		Injection side	
		DOPAC/DA	HVA/DA	DOPAC/DA	HVA/DA
Control	8	0.58 ±0.17	0.31 ±0.15	0.45 ±0.02	0.18 ±0.01
MPTP	6	0.72 ±0.08	0.82 ±0.10	0.91 ±0.07**	1.11 ±0.11**
MPTP+Ad-LacZ	7	0.71 ±0.13	0.62 ±0.15	0.59 ±0.07*#	0.54 ±0.13#
MPTP+Ad-rGDNF	8	0.57 ±0.07	0.51 ±0.07*	0.37 ±0.02	0.35 ±0.04

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ *vs* the injection side of MPTP+Ad-rGDNF group; # $P<0.05$ vs the uninjection side of MPTP+Ad-LacZ group.

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.



A(×50), B(×200): 24 hours after injection; C(×50), D(×200): 72 hours after injection; E(×50), F(×200): 10 days after injection; G(×50), H(×200): 30 days after injection.

图 1　LacZ 基因在小鼠纹状体的表达情况

Figure 1　Expression of LacZ in murine striatum

2.2.3　单侧纹状体内注射 Ad-rGDNF 对小鼠纹状体内 DA、DOPAC 和 HVA 含量及 DA 代谢率的影响　给 C57BL/6J 小鼠皮下注射 MPTP 前 72 h 先于单侧纹状体内注射 2×10^{8} pfu·ml^{-1} Ad-rGDNF 4 μl,旨在观察 Ad-rGDNF 有无保护中脑 DA 能神经元对抗 MPTP 损伤的作用,对照组则注射同等剂量的 Ad-LacZ。如表 1 所示,注射 Ad-rGDNF 一侧纹状体内 DA 含量显著高于未注射侧、MPTP 损伤组及 Ad-LacZ 对照组,为正常对照组的(81 ±18) %,而未注射一侧只有(23 ±5) %。从 DA 代谢产物 DOPAC、HVA 含量来看,Ad-rGDNF 注射侧也明显高于未注射侧、MPTP 损伤组及 Ad-LacZ 对照组。如表 2 所示,Ad-rGDNF 注射侧 DOPAC/DA、HVA/DA 比值显著低于未注射侧、MPTP 损伤组、Ad-LacZ 对照组,表明 Ad-rGDNF 不仅能维持纹状体 DA、DOPAC 和 HVA 的含量,而且能防止 MPTP 所致 DA 代谢率升高。此外,Ad-LacZ 对照组 DOPAC/DA、HVA/DA 比值较 MPTP 损伤组也有降低,但仍明显高于 Ad-rGDNF 保护组,表明 Ad-LacZ 可能对纹状体 DA 的代谢也有一定影响。

3　讨论

目前,在 PD 研究中最为常用的两种动物模型应属 6-OHDA 模型和 MPTP 模型。其中 MPTP 模型是目前应用十分广泛、研究详尽的理想 PD 动物模型[6]。啮齿类动物只有 C57BL/6J 小鼠比较敏感,而大鼠不敏感。Heikkila 等[7]给 C57BL/6J 小鼠皮下注射 40 mg·kg^{-1} MPTP,12 d 后发现纹状体 DA 含量下降 80 %,其主要代谢产物 DOPAC、HVA 也明显降低,这种损伤程度与 PD 病人纹状体内 DA 损耗程度基本相当。由于 C57BL/6J 小鼠价格低廉,容易获得,而且模型制备的成功率为 100 %,故可以取代灵长类动物而成为目前广泛应用的 PD 模型。实验中我们发现,当小鼠体重较轻(20～25 g)、年龄较小时,纹状体 DA 含量较正常降低 78 %,当小鼠体重较大(25～30 g),年龄较老时,纹状体 DA 含量降低 89 %。这表明 MPTP 不仅能够损伤 C57BL/6J 小鼠中脑 DA 能神经元,导致纹状体 DA 含量显著降低,而且年龄因素对 MPTP 神经毒性的敏感性也有一定影响,年龄越大则越敏感,这与

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd.　All rights reserved.

Irwin等[8]报道基本一致。

复制缺陷型重组腺病毒载体是近年来发展起来的一种新型载体,它的宿主范围十分广泛,可高效感染分裂期和非分裂期细胞,不整合至宿主细胞染色体,因而可以避免因随机整合而造成的插入突变、干扰细胞正常基因的复制和转录,甚至激活一些癌基因的表达。重组腺病毒介导的 LacZ 基因于脑内能高效感染神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞并表达 LacZ 基因[9-11]。Ridoux 等[12]则发现重组腺病毒载体可自突触末梢逆轴浆转运至神经元脑体,这对 PD 及其他神经系统退行性疾病的基因治疗十分有意义。对神经营养因子 GDNF 基因的研究表明,不仅大鼠纹状体内注射重组腺病毒携带的 GDNF 基因能有效预防 6-OHDA 对黑质 DA 能神经元的损伤[13],小鼠纹状体内注射也能防止 MPTP 对 DA 能神经元的损伤[14]。

利用包装细胞体内同源重组原理和技术,我室徐国恒博士[5]成功构建了介导 rGDNF、LacZ 基因转染和表达的复制缺陷型重组腺病毒载体,体外实验表明 Ad-rGDNF 可高效感染 SH-SY5Y 细胞、PC12 细胞、MN9D 细胞及原代中脑 DA 能神经元,并能保护 MN9D 细胞对抗 MPTP 损伤[15]。为观察 Ad-rGDNF 能否高效感染在体神经细胞、保护中脑 DA 能神经元对抗 MPTP 损伤,本研究首先以 LacZ 基因作为报告基因,观察了 Ad-LacZ 在小鼠纹状体内的表达情况。我们构建的重组腺病毒载体在体内确能高效感染神经细胞并表达目的基因,而且表达时间较长。重组腺病毒感染范围局限,不波及其他脑区神经细胞,也未观察到病毒载体引起的细胞毒性作用,故可以用作中枢神经系统基因转移的载体。

以 Ad-LacZ 在纹状体内的表达情况为依据,我们选择了 2×10^8 pfu·ml^{-1}病毒滴度进行脑内注射,并于注射 Ad-rGDNF 后 72 h 给小鼠注射 MPTP 以损伤中脑 DA 能神经元。高效液相色谱检测结果表明 Ad-rGDNF 注射侧纹状体内 DA、DOPAC 和 HVA 含量显著高于未注射侧、MPTP 损伤组和 Ad-LacZ 对照组,而反映 DA 代谢率的 DOPAC/DA 和 HVA/DA 比值明显降低。与文献[14]相比,我们不仅检测了 DA 含量,还检测了 DA 的代谢产物 DOPAC 和 HVA 的含量,取得了与 DA 一样的结果;更重要的是我们比较了 DOPAC/DA 和 HVA/DA 比值,发现 DOPAC 和 HVA 的含量升高的同时,DOPAC/DA 和 HVA/DA 比值却比对照组更小,从而可能导致行为学的改善。这说明在体内 Ad-rGDNF确能有效保护中脑 DA 能神经元对抗 MPTP 损伤,维持纹状体内 DA 代谢水平,这对 PD 的有效防治具有一定意义。

值得注意的是,重组腺病毒载体在体内引起的免疫排斥反应和细胞毒性作用[16]正越来越受到研究人员的重视。虽然我们在实验中未发现重组腺病毒的细胞毒性作用,但发现 Ad-LacZ 表达有逐渐减弱、减少的趋势,这是否与机体的免疫排斥反应有关,还需进一步实验证实。

参考文献

1 Lin LF, Doherty DH, Lile JD, *et al*. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons[J]. Science, 1993, 260(5111): 1130-1132
2 Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, *et al*. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo[J]. Nature, 1995, 373(6512): 335-339
3 Hudson J, Granholm AC, Gerhardt GA, *et al*. Glial cell line-derived neurotrophic factor augments midbrain dopaminergic circuits *in vivo*[J]. Brain Res Bull, 1995, 36(5): 425-432
4 Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, *et al*. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF[J]. Nature, 1996, 380(6571): 252-255
5 徐国恒,凌 雁,万 有,等. GDNF 重组腺病毒的构建及促进多巴胺能神经元存活的研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15:133-141
6 Gerlach M, Riederer P, Przuntek H, *et al*. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease[J]. Eur J Pharmacol, 1991, 208(4): 273-286
7 Heikkila RE, Sieber BA, Manzino L, *et al*. Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse[J]. Mol Chem Neuropathol, 1989, 10(3): 171-183
8 Irwin I, DeLanney LE, Forno LS, *et al*. The evolution of nigrostriatal neurochemical changes in the MPTP-treated squirrel monkey[J]. Brain Res, 1990, 531(1-2): 242-252
9 Akli S, Caillaud C, Vigne E, *et al*. Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors[J]. Nat Genet, 1993, 3(3): 224-228
10 Bajocchi G, Feldman SH, Crystal RG, *et al*. Direct *in vivo* gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using recombinant adenovirus vectors[J]. Nat Genet, 1993, 3(3): 229-234
11 Le Gal LS, Robert JJ, Berrard S, *et al*. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain[J]. Science, 1993, 259(5097): 988-990
12 Ridoux V, Robert JJ, Zhang X, *et al*. Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers[J]. Brain Res, 1994, 648(1): 171-175
13 Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, *et al*. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy[J]. Science, 1997, 275(5301): 838-841
14 Kojima H, Abiru Y, Sakajiri K, *et al*. Adenovirus-mediated transduction with human glial cell line-derived neurotrophic factor gene prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopamine depletion in striatum of mouse brain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 238(2): 569-573
15 凌 雁,徐国恒,万 有,等. GDNF 重组腺病毒增加 MN9D 细胞多巴胺合成和释放[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15: 128-131
16 Peltekian E, Parrish E, Bouchard C, *et al*. Adenovirus-mediated gene transfer to the brain: methodological assessment[J]. J Neurosci Methods, 1997, 71(1): 77-84

(2003-03-14 收稿)
(本文编辑:赵 波)

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.