



## 病毒载体介导BDNF基因表达在大鼠神经元AD模型中的作用

阿尔茨海默病(AD)又称为老年性痴呆,是一种慢性神经退行性疾病。神经营养因子在维持神经系统的功能中具有重要的作用,其家族的成员主要包括神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)、神经营养素-4/5(NT-4/5)等。BDNF作为其中的一个重要成员,在中枢神经系统(CNS)广泛地表达,保护神经元对抗神经毒性物质、局部缺血和氧化等各种损伤,防止内源或外源因素导致的细胞凋亡。在体内,BDNF与神经元存活、增殖、轴突生长、突触可塑性以及学习和记忆等有密切的关系[1], [2]。在体外,BDNF可保护培养的神经元,防止损伤、血清剥夺等引起的细胞凋亡[3]。有研究表明在许多神经退行性疾病患者BDNF的水平是降低的[4]。资料显示,外源性给予BDNF可明显改善AD患者的症状,对神经元的退行性改变表现出明显的保护效应[5]。但是,外周给予BDNF仅仅能部分地通过血脑屏障(BBB),很难达到有效的脑内血药浓度。为了探讨BDNF在治疗慢性CNS疾病有效的给药途径,我们选择腺伴随病毒(AAV)[6], [7]作为基因转移的载体,研究在体外进行BDNF表达的生物学效应,在此基础上进一步寻找能有效进入中枢的给药途径,为临床应用提供新的手段。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 试剂  $\beta$ -淀粉样肽( $\beta$ -amyloid peptide, A $\beta$ )25-35片段购自北京肽合成中心,MTT四唑盐、多聚赖氨酸购自Sigma,DMEM培养基、胰蛋白酶购自GIBCO公司,pGEM-T Easy质粒购自Promega,胎牛血清、Bcl-2抗体、BDNF抗体及免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司,Eco RI、Bam HI限制性内切酶、耐热性DNA聚合酶、T4DNA连接酶购自华美生物工程公司,Ca<sup>2+</sup>荧光探针fluo-3AM、双标凋亡检测试剂Annexin V-FITC和PI购自宝泰克生物工程公司。

1.1.2 实验动物 新生1-3 d SD大鼠,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

#### 1.2 方法

1.2.1 构建重组AAV穿梭质粒pSSHG/hBDNF 由于hBDNF编码序列位于单一外显子上,故可直接以正常人血白细胞DNA作为模板[8],根据GenBank(M61181)提供的序列设计引物,使用PCR技术克隆hBDNF基因,PCR产物用T4DNA连接酶连接到pGEM-T载体,进行序列测定和分析。将质粒pSSHG/Neo与pGEM-T/hBDNF分别用限制性内切酶Eco RI和Bam HI双酶切,分离获得hBDNF基因片段及线性化的pSSHG,T4DNA连接酶连接(图1),将连接产物转化DH5 $\alpha$ 大肠杆菌、筛选阳性转化菌扩大培养,提取质粒DNA进行酶切鉴定,测序鉴定克隆的目的基因。

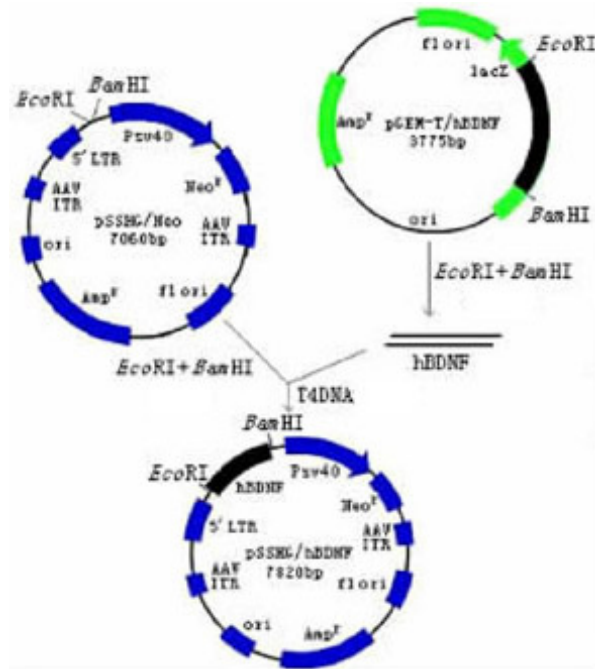


图1 构建AAV重组质粒pSSHG/hBDNF

Fig.1 Schematic chart of the construction of the pSSHG /hBDNF recombinant AAV plasmid

1.2.2 rAAV/hBDNF病毒载体的收获 复苏人胚肾293包装细胞系，至细胞生长至80%成片时，使用磷酸钙沉淀法将重组质粒pSSHG /hBDNF、包装质粒pAAV/Ad及腺病毒辅助质粒pFG140三质粒共转染293细胞，3 d后收获病毒并使用蔗糖梯度离心法进行纯化。

1.2.3 PCR鉴定重组病毒 取50  $\mu$ l纯化好的病毒液加入蛋白酶K溶液降解病毒衣壳蛋白，提取病毒DNA溶于50  $\mu$ l TE中备用。以提取的病毒DNA作模板，使用在1.2.1中合成的引物进行PCR，鉴定hBDNF目的基因是否成功重组入病毒基因组。

1.2.4 斑点杂交法确定病毒滴度 以标准浓度pSSHG /hBDNF质粒(1  $\mu$ g/ $\mu$ l)按10倍比稀释点样于NC膜上，将1.2.3中提取的病毒DNA按2倍比稀释点样于NC膜上，与BDNF基因的地高辛标记DNA探针进行杂交，68  $^{\circ}$ C作用20 h后，与地高辛-辣根过氧化物酶复合物作用，37  $^{\circ}$ C作用30 min，显色液显色，确定病毒DNA样品所对应的标准质粒浓度范围。病毒DNA由pSSHG/hBDNF质粒包装获得，其碱基数目为7.82 kb，核酸相对分子质量为7820 $\times$ 635=5.0 $\times$ 10<sup>6</sup>，根据获得的病毒样品DNA浓度，确定其摩尔质量，计算病毒DNA分子数目以确定病毒数量。

1.2.5 神经元培养 取新生1-3 d SD大鼠，取脑并分离出双侧海马组织，剪碎后用0.25%胰蛋白酶液消化，37  $^{\circ}$ C，20min。收集分离的海马神经元并重悬于添加了10%(V/V)胎牛血清的DMEM培养基中。细胞以1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml的密度接种于96孔板和铺有玻片的24孔板。24 h添加终浓度为10  $\mu$ mol/L的阿糖胞苷以抑制非神经元生长。

1.2.6 实验分组 将细胞分为正常对照组，AD模型组，空病毒对照组和BDNF治疗组。其中正常对照组为普通培养的神经元；AD模型组为从第2天起在培养液中添加终浓度20  $\mu$ mol/L的  $\text{A}\beta$ 25-35( $\text{A}\beta$ 全长的25-35位氨基酸片段，具有与 $\text{A}\beta$ 全长相似的神毒性作用[9])；BDNF治疗组又分为单转BDNF基因组(仅在培养的第2天以滴度为10<sup>8</sup>个病毒/ml的AAV-hBDNF转染)，BDNF预防 $\text{A}\beta$ 损伤实验组(培养的第2天进行AAV-hBDNF转染，24 h后换用含20  $\mu$ mol/L  $\text{A}\beta$ 25-35的培养液培养)和BDNF治疗 $\text{A}\beta$ 损伤实验组(从培养的第2天起使用含20  $\mu$ mol/L  $\text{A}\beta$ 25-35的培养液培养，24 h后进行AAV-hBDNF转染)；空病毒对照组为未重组外源基因的空AAV病毒颗粒转染正常神经元作为对照。

1.2.7 MTT检测细胞活力 各组以每孔20  $\mu$ l MTT四唑盐添加到各复孔中，37  $^{\circ}$ C孵育4 h。150  $\mu$ l的二甲基亚砜加入各孔溶解蓝色结晶，振荡，使用多孔扫描分光光度计在490 nm波长测定光密度。根据D( $\lambda$ )值计算细胞存活率。计算公式：细胞存活率(%)=实验组D( $\lambda$ ) / 对照组D( $\lambda$ )  $\times$ 100%。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组细胞,用冷PBS洗涤2次,以 $1 \times 10^6$ /ml的浓度在结合缓冲液中重悬。室温下取100  $\mu$ l的细胞,每组做3个复管,加入5  $\mu$ l Annexin V-FITC和5  $\mu$ l PI荧光染料,轻轻振荡、混匀,避光室温下孵育15 min。加入400  $\mu$ l染色缓冲液,立即上流式细胞仪分析。

1.2.9 BDNF及Bcl-2的免疫细胞化学检测 从24孔板中取出被覆细胞的盖玻片,用丙酮室温固定10 min,细胞片用PBS洗3次,每次5 min,正常山羊血清室温孵育30 min,用BDNF及Bcl-2一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS洗3次,HRP酶标二抗37  $^{\circ}$ C孵育1 h, PBS洗3次, DAB显色。莱卡QWin图像分析系统分析。

1.2.10 激光共聚焦显微镜测量 $[Ca^{2+}]_i$ 变化 将24孔板中取出的细胞片放入特制的槽内,用无色的D-Hank's液洗2遍,在含有 $Ca^{2+}$ 荧光探针fluo-3AM(终浓度10  $\mu$ mol/L)的D-Hank's液中37  $^{\circ}$ C孵育40 min,使fluo-3AM解离出的fluo-3与 $Ca^{2+}$ 发生结合,用D-Hank's液洗2遍除去未反应的探针, MRC-1024激光共聚焦显微镜测量fluo-3荧光,激发波长488 nm,发射波长526 nm。以EGTA螯合钙离子后测量零钙值, Triton-X-100作用后测量饱和钙值,计算 $[Ca^{2+}]_i$ 。

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times [F - F_{min} / (F_{max} - F)]$$

Kd: Fluo-3和 $Ca^{2+}$ 的解离系数(400 nmol/L); F: 细胞内的荧光强度测量值;  $F_{max}$ : 饱和钙时细胞内的荧光强度;  $F_{min}$ : 零钙时细胞内的荧光强度。

1.2.11 统计方法 使用SPSS10.0数理统计软件处理,运用组间单因素方差分析检验,数据用 $x \pm s$ 表示; 1.2.9中获得的结果使用图像分析统计软件Bio-II Q Analyze Program处理。

## 2 结果

### 2.1 重组pSSHG/hBDNF质粒鉴定

重组质粒pSSHG/hBDNF的大小为7.82 kb,经限制性内切酶Eco RI和Bam HI酶切后,理论上应该产生7.06 kb及760 bp两个片段,结果显示,重组质粒大小、酶解片段大小和理论值一致(图2),测序结果与GenBank提供的已知序列(M61181)一致。

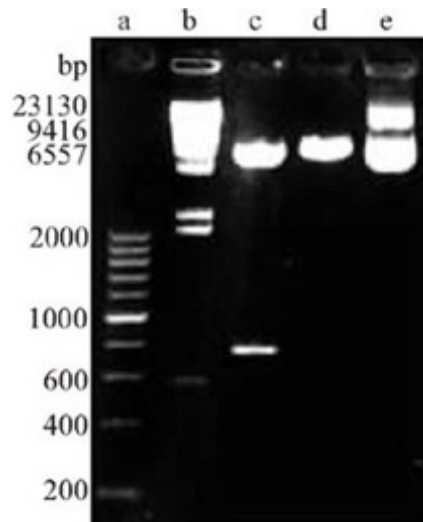


图2 重组质粒pSSHG/hBDNF的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pSSHG/ hBDNF

Lane a: 200 bp PCR marker; Lane b:  $\lambda$ DNA/Hin dIII marker; Lane c: Eco RI+Bam H digestion (7.06 kb and 760 bp); Lane d: Eco RI digestion (7.82 kb); Lane e: pSSHG/hBDNF plasmid

### 2.2 AAV病毒的PCR鉴定

PCR结果显示在提取的病毒DNA中扩增出了760 bp大小的基因片段(图3),表明hBDNF外源基因成功重组入病毒基因组中。

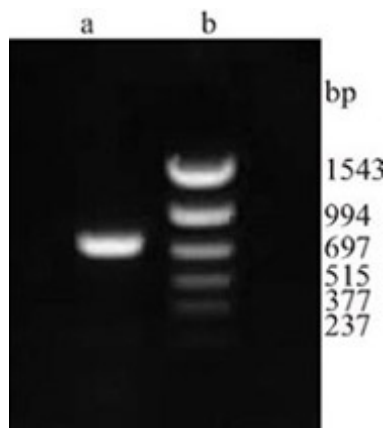


图3 重组病毒DNA的PCR鉴定结果

Fig.3 PCR result for the recombinant viral DNA identification  
 4a: PCR product (760 bp); b: PCR marker

### 2.3 AAV病毒滴度测定(图4)

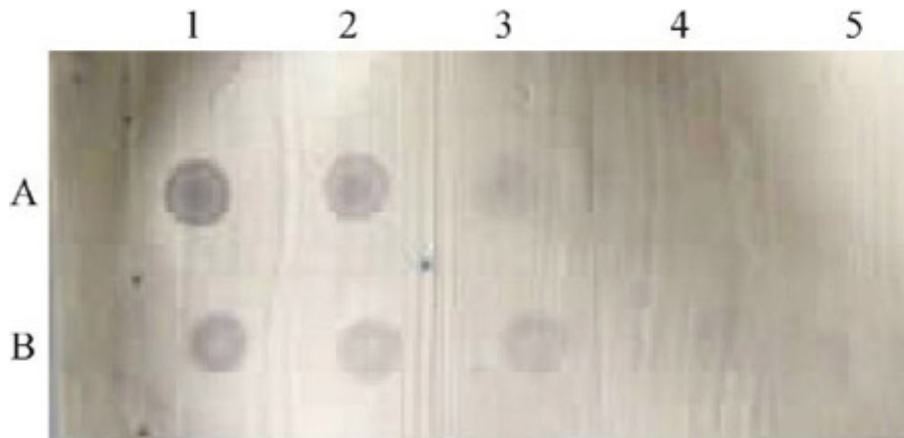


图4 病毒滴度的BDNF斑点杂交结果

Fig.4 Dot blot hybridization for titration of pSSHG/hBDNF  
 A: Standard concentration of pSSHG/hBDNF plasmid (Lanes1-5: 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , 10  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , 1  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , 100  $\text{pg}/\mu\text{l}$ , respectively); B: Extracted viral DNA (Lanes1: Basal concentration; Lanes2-5: Concentrations of double dilution, respectively)

如图4所示，A组为标准浓度的pSSHG/hBDNF质粒，浓度由分别为1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，100  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，10  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，1  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，100  $\text{pg}/\mu\text{l}$ 。提取的病毒DNA斑点杂交显色结果显示病毒DNA的浓度在(10-100)  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，即每ml病毒液中pSSHG/hBDNF含量为(10-100)  $\mu\text{g}$ ，pSSHG/hBDNF相对分子质量为 $5.0 \times 10^6$ ，计算其摩尔质量为 $2 \times 10^{12}$ - $2 \times 10^{11}$  mol，确定每ml病毒液中分子数目为 $1.2 \times 10^{12}$ - $1.2 \times 10^{13}$ 个分子，重组病毒的滴度为 $1.2 \times 10^{12}$ - $1.2 \times 10^{13}$ 个病毒颗粒/ml。

### 2.4 MTT检测hBDNF表达对海马神经元的保护作用

MTT检测结果显示表达的BDNF对正常神经元表现出营养效应(图5)。在神经元正常生长期培养的第9天，正常对照组、空病毒对照组和单转BDNF基因组(AAV-hBDNF组)之间细胞活力相比无显著性差异( $P > 0.05$ )。随培养时间增长，正常的原代培养神经元开始出现自然死亡，AAV-hBDNF组神经元在培养的第12天和15天细胞活力显著性高于对照组( $P < 0.05$ )，降低了正常神经元的死亡率，延长神经元的生存时间。空病毒对照组与正常对照组之间相比差异无显著性( $P > 0.05$ )，显示AAV载体本身对神经元无明显影响。

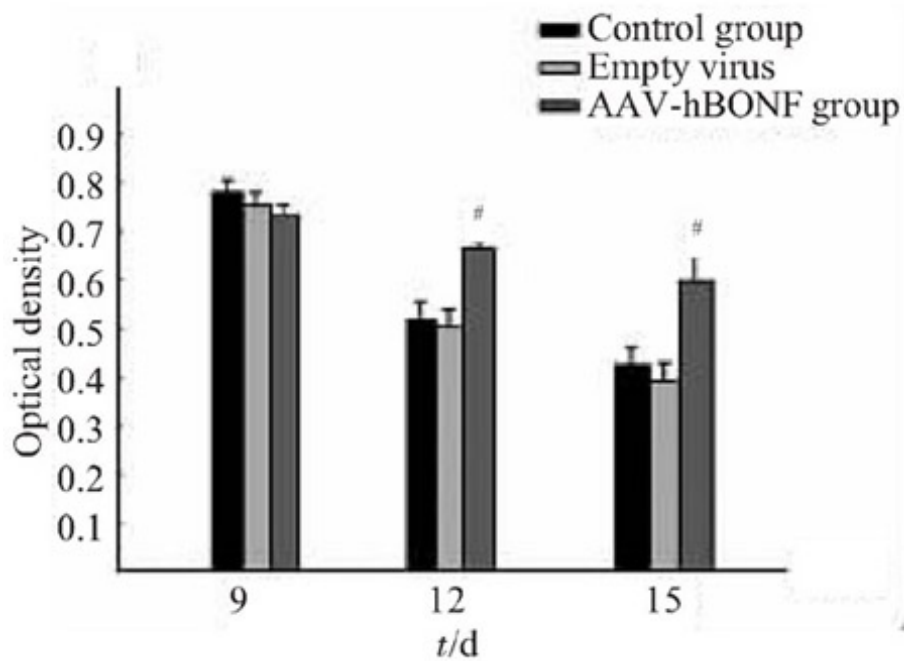


图5 延长培养时间hBDNF对神经细胞的作用

Fig.5 Effects of hBDNF on the neurons after prolonged cultured time  
# P<0.05 vs control group

在BDNF保护神经元抵抗A $\beta$ 损伤的实验中，正常对照组细胞存活率记为100%，AD模型组受到A $\beta$ 的神经毒性作用，显示胞体皱缩和退变，细胞存活率降低至54.1%；在hBDNF+A $\beta$ 实验组，预先在神经元内表达的BDNF显示了对A $\beta$ 损伤的预防性保护作用，细胞存活率达到79.7%，较损伤模型组提高了25.6%；在A $\beta$ +hBDNF实验组，表达的BDNF也具有抑制A $\beta$ 损伤的作用，细胞存活率达到78.4%，较损伤模型组提高了24.3%，两实验组之间相比差异无显著性，提示表达的BDNF对A $\beta$ 的损伤具有预防和治疗的双重作用。

### 2.5 流式细胞术判断细胞凋亡情况(图6)

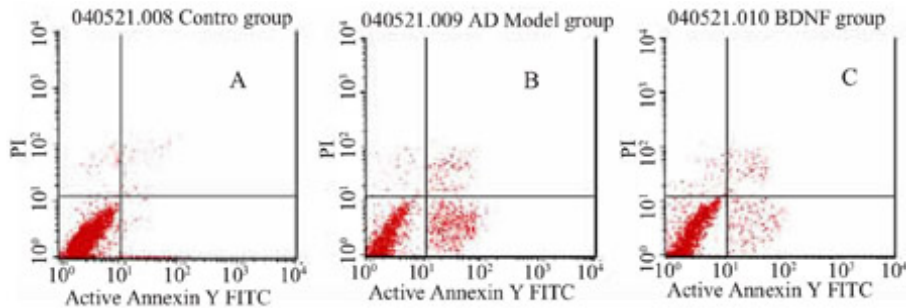


图6 流式细胞术凋亡双标结果

Fig.6 Flow cytometry for cell apoptosis detection  
A: control group B: AD model group C: A $\beta$ +BDNF group

如图显示右下象限AnnexinV-FITC染色阳性、PI阴性细胞为早期凋亡细胞；右上象限AnnexinV-FITC、PI染色双阳性细胞为晚期凋亡及坏死细胞；左下象限Annexin-FITC、PI染色双阴性细胞为活细胞；左上象限仅PI染色阳性为处理时损伤的细胞。显示损伤模型组早期凋亡细胞数量显著增多，坏死细胞数量少量增多，主要以凋亡为主(图6B)；BDNF实验组早期凋亡细胞数量较AD模型组显著降低(P<0.05)，坏死细胞数量未见显著差异(图6C)，表明BDNF抑制了以凋亡为主要形式的细胞死亡。

### 2.6 BDNF免疫细胞化学染色结果

使用抗BDNF抗体进行免疫细胞化学染色检测BDNF免疫反应水平，在BDNF实验组神经元的胞体和突起可见

高水平的BDNF免疫着色(图7B, 100×)。莱卡QWin图像分析软件分析显示BDNF免疫阳性神经元的数目和着色强度明显增强, 与对照组相比有显著性差异。

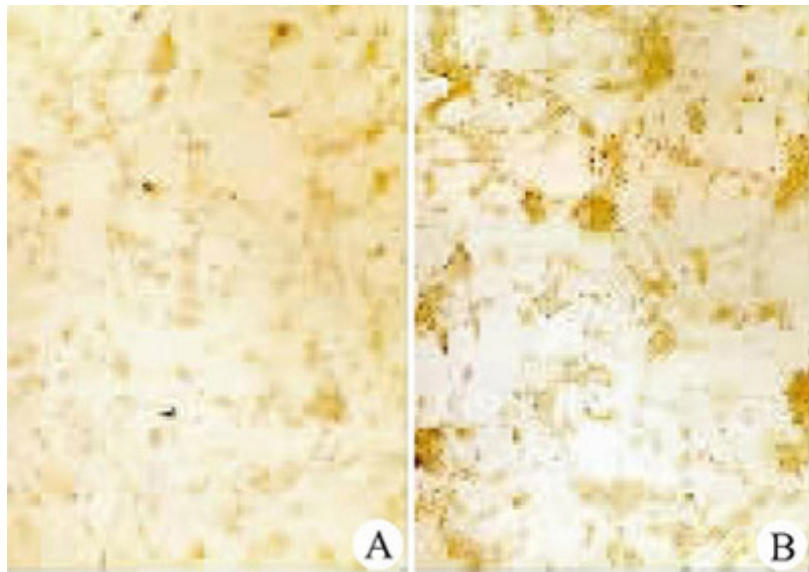


图7 BDNF免疫细胞化学染色结果(核用苏木素复染)

Fig.7 BDNF immunocytochemical staining of the rat neurons (the nucleus restained by haematoxylin, original magnification: ×100)

A: Control group; B: AAV-hBDNF group

### 2.7 Bcl-2免疫细胞化学染色结果

莱卡QWin图像分析结果(图8)显示正常对照组Bcl-2免疫反应阳性细胞平均数量为 $57.84 \pm 5.37$ , 阳性细胞平均灰度值为 $68.13 \pm 4.92$ ; AD模型组阳性细胞平均数量为 $23.25 \pm 3.49$ , 平均灰度值为 $79.49 \pm 7.53$ , 与对照组相比AD模型组阳性细胞的数量和着色强度显著降低( $P < 0.05$ , 图像分析中着色强度越高其灰度值越低)。A $\beta$ +BDNF实验组阳性细胞平均数量为 $45.16 \pm 4.62$ , 平均灰度值为 $61.30 \pm 5.56$ , 与AD模型组相比阳性神经元的数量增多和着色增强, 经统计学分析差异有显著性( $P < 0.05$ )。与正常对照组相比, 由于A $\beta$ +BDNF实验组细胞整体数量低, 所以阳性细胞数量稍低, 但单个细胞的平均灰度值显示实验组Bcl-2蛋白表达水平高于正常。

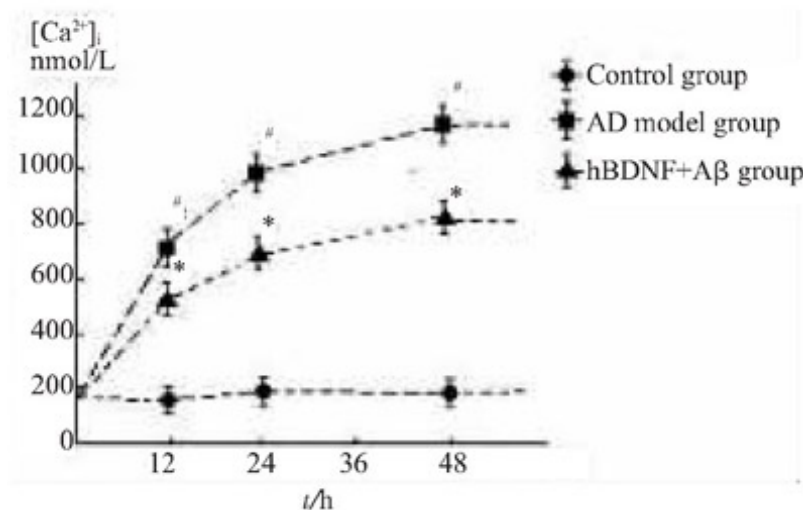


图8 激光共聚焦显微镜检测钙荧光的改变

Fig.8 Changes of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fluorescence detected by laser scanning confocal microscopy

### 2.8 LSCM观察结果

图8显示, 对照组正常海马细胞内平均 $[Ca^{2+}]_i$ 位于基线水平, 为 $174.56 \pm 43.22$  nmol/L, 仅见一些无规律的小的钙波。损伤模型组显示出明显的钙振荡, 在 $A\beta$ 作用12, 24, 48 h后细胞内钙荧光强度逐渐增强, 显示 $[Ca^{2+}]_i$ 分别达到 $(680.49 \pm 63.30)$ ,  $(987.38 \pm 79.41)$ ,  $(1147.62 \pm 89.91)$  nmol/L, 随后维持在较高的水平。hBDNF+ $A\beta$ 实验组细胞内钙荧光强度显示了相似地钙振荡, 但 $[Ca^{2+}]_i$ 的峰值低于损伤模型组,  $[Ca^{2+}]_i$ 分别达到 $(460.2 \pm 52.19)$ ,  $(674.97 \pm 31.93)$ ,  $(750.42 \pm 22.67)$  nmol/L。经统计学检验, 在BDNF实验组和损伤模型组间有显著性差异。

### 3 讨论

在神经系统的发育时期, BDNF通过结合于酪氨酸激酶受体活化细胞内的信号通路, 显示了明显的促进神经元存活作用, 调节在不同的效应器官建立适当的神经分布密度。资料显示部分的AD患者在海马结构、颞叶以及其它的皮质区有BDNF的mRNA水平和蛋白质含量的减少, 给予AD患者外源性BDNF将减少胆碱能神经元的退化性改变比率并改善其功能[10]。因此, BDNF成为一个良好的用于维持CNS神经元的功能来治疗AD的药物。BDNF作用的发挥有赖于其有效的中枢血药浓度, 外周静脉内给药是一种简便、无损伤的给药途径, 但由于存在于血液循环中的降解和BBB的通透性两个主要问题, 很难完成中枢神经的保护效应[11]。为了解决这些问题, 一些研究聚焦于对BDNF蛋白的化学修饰(如嵌合肽技术等), 这些技术被证明是有效的但是复杂且昂贵, 不适于慢性疾病的长期治疗。BDNF的中枢给药同样被证明是有效的[12], 但是, 中枢多次给药以及持久的输注设备的存在会引起对神经组织的额外损伤。因此, 我们尝试使用AAV载体携带目的基因, 通过较小损伤的方式使之进入中枢并长期表达。AAV载体本身是一种缺陷病毒, 资料显示在人群中80%的个体呈现AAV血清阳性, 无致病性, 而且它能有效感染神经元这种分化终末细胞, 显示出在CNS疾病基因治疗中的巨大潜力[7], [13]。在这个研究中, 我们使用AAV转染神经细胞进行BDNF的表达, 评估其抑制 $A\beta$ 的神经毒作用的现象和机制。

实验结果显示成功构建了AD细胞模型, 通过MTT分析AD模型组细胞存活率降低至54.1%, 较正常对照组降低了45.9%; 流式细胞学分析表现为AnnexinV-FITC染色阳性细胞增多, 反应出发生早期凋亡的特征; 通过Bcl-2蛋白的免疫细胞化学染色显示与正常对照组相比Bcl-2阳性细胞的数量减少, 细胞的Bcl-2蛋白表达量降低; 激光共聚焦检测显示在 $A\beta$ 作用后 $[Ca^{2+}]_i$ 进行性增高, 在48 h时达到 $1147.62 \pm 89.91$  nmol/L的高峰随后维持在较高的水平。根据实验结果分析 $A\beta$ 有效诱导了神经元的凋亡, 在 $A\beta$ 的神经毒性作用下, 通过影响细胞信号传递途径, 启动细胞的凋亡通路, 表现为降低bcl-2抗凋亡基因的表达, 与邵梅等[14]的研究结果相似, 推测其同时与上调表达的凋亡基因相互作用, 进而引起细胞内钙超载。 $Ca^{2+}$ 的内环境稳定被破坏又会引起核酸内切酶的活化、自由基的产生或磷脂酶的过度活化等, 最终导致神经元的凋亡[15]。有文献资料报道在损伤后的脑组织可观察到Bcl-2反应阳性细胞的增多, 判断这种上调是在损伤后数小时出现的代偿性保护反应, 当时间延长, 细胞的凋亡途径被启动后, 即开始显示出凋亡蛋白的上调和抗凋亡蛋白的下调; 另一方面, 脑组织是一个有机的整体, 在损伤区周围的各种细胞也会发生代偿性保护反应, 表现为此区细胞抗凋亡蛋白的持续增多, 从而限制损伤的反应进一步向周围扩展。

另外实验结果显示AAV对培养的神经元进行了有效的转染, 在AAV-hBDNF组BDNF蛋白表达较对照组显著增高。表达的BDNF表现出良好的生物学效应, 在普通培养的神经元显示出营养作用, 可延长体外培养神经元的存活时间; 对 $A\beta$ 的神经毒性起到了预防和治疗的作用, 提高了损伤神经元的抗凋亡能力, 表现为发生凋亡的细胞数量减少, 细胞存活率较AD模型组显著提高。免疫细胞化学染色结果显示BDNF实验组Bcl-2阳性细胞的数量和细胞的Bcl-2蛋白表达量较AD模型组显著增多。激光共聚焦检测显示与损伤模型组相比BDNF实验组 $[Ca^{2+}]_i$ 的峰值显著降低, 有效维持了 $[Ca^{2+}]_i$ 平衡。分析表达的BDNF在AD模型神经元中的抗凋亡效应主要是通过上调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达, Bcl-2蛋白定位于线粒体内膜、核膜和内质网膜上, 这些部位有丰富的细胞内钙储备, 推测Bcl-2通过直接或间接的影响钙储备的释放, 抑制细胞内钙超载是其抗凋亡作用的重要环节之一, 其机制有待于进一步探讨。

综上所述, 通过AAV有效地转染神经元并表达了目的基因, 表达的BDNF通过上调抗凋亡蛋白和维持细胞内

钙浓度的相对稳定有效抑制了A $\beta$ 诱导的神经元凋亡。以上实验结果将为下一步的动物模型给药方式的研究提供可靠的依据。

#### 参考文献:

- [1]Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(1): 24-32.
- [2]Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory[J]. Life Sci, 2002, 70(7):735-44.
- [3]Labelle C, Leclerc N. Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2000, 123(1): 1-11.
- [4]Connor B, Young D, Yan Q, et al. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1997, 49(1-2): 71-81.
- [5]Egleton RD, Davis TP. Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain[J]. Peptides, 1997, 18(9): 1431-9.
- [6]Blits B, Oudega M, Boer GJ, et al. Adeno-associated viral vector-mediated neurotrophin gene transfer in the injured adult rat spinal cord improves hind-limb function[J]. Neuroscience, 2003, 118(1):271-81.
- [7]Klein RL, Meyer EM, Peel AL, et al. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors[J]. Exp Neurol, 1998, 150(2): 183-94.
- [8]陈燕, 张瑛, 李金照, 等. 人脑源性神经营养因子基因表达[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(6):536-9.
- [9]Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, et al. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity[J]. J Neurochem, 1995, 64(1): 253-65.
- [10]Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, et al. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2000, 76(2): 347-54.
- [11]Sakane T, Pardridge WM. Carboxyl-directed pegylation of brain-derived neurotrophic factor markedly reduces systemic clearance with minimal loss of biologic activity[J]. Pharm Res, 1997, 14(8): 1085-91.
- [12]Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, et al. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17(5): 500-6.
- [13]Monahan PE, Jooss K, Sands MS. Safety of adeno-associated virus gene therapy vectors: a current evaluation[J]. Expert Opin Drug Saf, 2002, 1(1): 79-91.
- [14]邵梅, 陈生弟, 刘振国, 等. Bcl-2家族参与 $\beta$ 淀粉样蛋白对PC12细胞的致凋亡作用[J]. 中国神经科学杂志, 2003, 19(3):161-6.
- [15]Gwag BJ, Canzoniero LM, Sensi SL, et al. Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons[J]. Neuroscience, 1999, 90(4): 1339-48.