

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.010

Nurr-1 基因转染促进脂肪干细胞的神经分化*

杨亚锋 马 腾 革 军 权 鑫 朱 澍 黄景辉[△] 罗卓荆[△]

(第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究孤儿核受体相关基因 1(Nurr-1)对脂肪干细胞(adipose tissue-derived stem cells, ADSC)向神经元方向分化的潜在作用。**方法:**流式细胞术与成骨、成脂诱导技术鉴定脂肪干细胞;Nurr-1 基因转染脂肪干细胞后,应用神经特异性标志物 MAP-2, β -tubulin 的免疫荧光染色评估其向神经方向分化的能力。**结果:**流式细胞术结果表明培养的细胞 CD29, CD44 表达 90%以上, CD45, CD90 表达均低于 1.5%, 经过诱导后, 油红 O、茜素红 S 染色均呈阳性, 表明所培养的细胞为脂肪干细胞;慢病毒转染 Nurr-1 基因后, 免疫荧光染色检测 MAP-2, β -tubulin 的免疫荧光强度显著增加;RT-PCR 结果显示 Nurr-1 转染的脂肪干细胞的 MAP-2, β -tubulin, NF200 的表达量显著提高。**结论:**Nurr-1 基因转染能促进脂肪干细胞向神经方向分化, 为神经损伤和神经退行性病变的治疗提供了新途径。

关键词:脂肪干细胞;孤儿核受体相关基因 1;神经分化;慢病毒

中图分类号:Q95-3;R741.02;R745 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)15-2839-05

Enhanced Neural Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells by Nurr-1 Gene Transfection*

YANG Ya-feng, MA Teng, GE Jun, QUAN Xin, ZHU Shu, HUANG Jing-hui[△], LUO Zhuo-jing[△]

(Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710033, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role of Nurr-1 gene over-expression in neuronal differentiation of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs). **Methods:** The characterization of ADSCs was performed with flow cytometric technology, adipogenic induction and osteogenic induction. The differentiation of ADSCs into neuron-like cells was examined by immunofluorescence staining and RT-PCR. The gene expression of microtubule-associated protein 2 (MAP-2), β -tubulin and neurofilaments 200 (NF-200), was examined by RT-PCR. The proliferation of cells after Nurr-1 gene transfection was characterized using a CCK-8 assay. **Results:** Flow cytometric analysis demonstrated that cells were positive for CD90 and CD29, but only 0.3% of the cells were positive for CD31 and 1.2% of the cells were positive for CD45. After differentiation into adipocytes, the cells were stained with Oil Red O, and red colored lipid vacuoles were visualized. After osteogenic differentiation, the cells were stained with Alizarin-Red-S, and an immense production of mineral deposits was displayed. The MAP-2 and β -tubulin were positive in Nurr-1 group after immunofluorescence staining. The gene and protein expression of MAP-2 and β -tubulin was significantly enhanced compared with control group. **Conclusion:** Nurr-1 gene transfection is able to enhance the neuronal differentiation of ADSCs, which highlights the potential application in the treatment of neurodegenerative diseases and neurotrauma in nervous system.

Key words: Adipose tissue-derived stem cells; Nurr-1 gene; Neuronal differentiation; Lentiviral

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R471.02; R745 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)15-2839-05

前言

神经损伤与神经退行性病变造成病灶区域大量神经元损伤或死亡^[1,2]。以往研究应用药物、手术等治疗方法改善此类损伤的症状,减少神经元丢失,但效果不太理想^[3-5]。目前,干细胞疗法被广泛应用于神经损伤部位^[6-8]。在各种类型的干细胞中,ADSCs 以其来源丰富、易取材、分化能力强等优点引起越来越多的重视^[9,10]。但因其自发向神经方向分化的能力低,因此,寻找一种方法能够促进脂肪干细胞向神经方向分化,用以治疗中

枢神经损伤,具有重大意义。

Nurr-1 为孤儿核受体转录因子超家族中的一员,与胚胎发育、细胞分化以及中脑多巴胺能神经元的发育和存活密切相关,具有促进多巴胺神经元的分化、成熟、迁移、分化等功能^[11-13]。研究表明,Nurr-1 基因在多巴胺能神经元发育分化过程中起关键作用,而这种作用与细胞外信号调节激酶信号通路有关^[14]。实验证实,在胚胎前体细胞中过表达 Nurr-1 基因能促进其向神经元方向分化,并抑制其向神经胶质细胞方向分化^[15]。此外,对骨髓干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)进行

* 基金项目:国家重点基础发展规划项目 "973 项目" (2014CB542206);长江学者和创新团队发展计划(IRT1053);

国家自然科学基金(30973052;81371947;81201389)

作者简介:杨亚锋(1989-),男,硕士研究生,主要研究方向:脊柱脊髓损伤,E-mail: yangyafeng00@126.com

[△] 通讯作者:黄景辉,罗卓荆,E-mail: zhuojingl@163.com

(收稿日期:2014-02-12 接受日期:2014-03-10)

Nurr-1 基因转染,也能促进其向神经方向分化^[9]。综上所述,Nurr-1 基因具有促进胚胎前体细胞与 BMMSCs 的神经分化作用,但 Nurr-1 基因对 ADSCs 向神经分化的作用尚未有文献报道。本实验选用在大鼠 ADSCs 内转染 Nurr-1 基因的方法,研究该基因对 ADSCs 神经分化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

3-4 周健康 Sprague Dawley (SD)大鼠(由第四军医大学实验动物中心提供),细胞培养基 DMEM/F12(Gibco,美国),0.1% 一型胶原酶(Sigma-Aldrich,美国)、PBS、胎牛血清(Gibco,美国)、FITC-CD31、APC-CD29、PE-CD90、PE-CD45 (B&D,美国)、地塞米松(Sigma-Aldrich,美国)、胰岛素(Sigma-Aldrich,美国)、吡啶美辛(Sigma-Aldrich,美国)、IBMX(Sigma-Aldrich,美国)、油红 O、 β -甘油磷酸钠、维生素 C、CCK-8 试剂盒、MAP-2 抗体(Sigma-Aldrich,美国)、 β -tubulin 抗体(Sigma-Aldrich,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪干细胞的分离、培养和鉴定 取 3 周龄的 SD 大鼠 2 只,颈椎脱臼处死,75% 的酒精浸泡 8 min;无菌条件下取出其腹股沟部皮下脂肪,PBS 冲洗,充分剪碎后,于 1% 一型胶原酶中振荡消化 30-40 min;等量的含 10% 胎牛血清的 DMEM/DF12 培养基终止消化,1 200 r/min 离心 8 min,去上清;用含 10% 胎牛血清的 DMEM/DF12 培养基重悬细胞,以 1×10^5 个/cm² 接种于 25 cm² 培养瓶,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。经 2 天换液 1 次,细胞增殖、铺满至培养瓶底约 80%,接近融合状态时,用 0.25% 胰酶/0.02% EDTA 消化、传代,每 6-7 天传代 1 次,第 3 代至第 5 代的细胞用于实验。

1×10^6 个/ml 脂肪干细胞分别加入 FITC-CD31、APC-CD29、PE-CD90、PE-CD45 抗体,4℃ 孵育 30 min,PBS 洗涤后立即送检,进行流式分子鉴定。成骨、成脂诱导:选用 3~5 代大鼠脂肪干细胞,至 80% 密度后培养于成骨和成脂诱导培养液,培养 3 周,用茜素红 S 染色和油红 O 染色鉴定。成骨诱导培养液的成分为 DMEM/DF12,10% FBS,0.1 μ mol/L 地塞米松,50 μ mol/L 维生素 C 磷酸酯,10 mmol/L β -磷酸甘油钠。成脂诱导培养液成分为 DMEM/DF12,10% FBS,0.5 mmol/L 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤,1 μ mol/L 地塞米松,10 μ mol/L 胰岛素,200 μ mol/L 吡啶美辛。

1.2.2 慢病毒感染脂肪干细胞 取对数生长期的 293T 细胞, 2×10^6 个/cm² 接种于 10 cm² 培养皿中,待细胞密度达 60%~70% 时换液,将各质粒和磷酸钙混合液转移至含单层细胞的培养液中,轻轻混匀,培养 6 h 后更换培养基;转染 48 h 后收集病毒上清液,于 4℃、4000 r/min 离心 10 min;收集离心后的上清液并过滤;4℃、25000 r/min 离心 2 h 后用无血清培养液溶解病毒沉淀,-80℃ 分装保存备用。将第 3 代 ADSCs 消化后以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中培养,待细胞生长至 70%~80% 汇合时,以 MOI=10 加入病毒,感染细胞 24 h 后换液,观察 24、48、72、96 h 后荧光表达情况,同时对其细胞活性进行 CCK-8 检测。

1.2.3 免疫荧光染色 培养的细胞加入 4% 多聚甲醛溶液

(paraformaldehyde,PFA)固定 20 min;PBS 溶液清洗三遍后,10% 山羊血清封闭 30 min;加入一抗小鼠抗大鼠 β -tubulin(1:200),兔抗大鼠 MAP-2(1:200)后 4℃ 孵育过夜;第二天室温下复温一小时,洗片后加入山羊抗兔-TRITC 和山羊抗小鼠-FITC(1:100),室温下孵育 1 h,清洗后进行 DAPI(1:500)染核,5 min 后 PBS 溶液清洗;甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.2.4 RT-PCR 检测 分别提取对照组和 Nurr-1 基因转染组的细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 MAP-2 上游引物 5'AGCCTGCAGCTCTGCCTTTA3',下游引物 5'CTTCCAGTGCAGCTGTTTGTTTC 3',扩增片段长度为 382 bp; β -tubulin 上游引物 5' CACACCCGCCACCAGTTCGCA3',下游引物 5' GCGGACTGTTACTGAGCTGCG 3',扩增片段长度为 278 bp;NF200 上游引物 5'CAGAGTACGCTGCAGTCAGAGG3',下游引物 5'CTCTTGGGCAGAGCGCATAG 3' 采用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒,按照说明书进行荧光定量 PCR 反应。反应体系为 20,反应条件为 95℃ 预变性 30 s,40 次循环内 95℃ 变性 5 s,59℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,反应结束后进行扩增曲线和溶解曲线的分析。

1.2.5 Western blotting 检测 提取对照组和基因转染组蛋白后,加入等量的 loading buffer,振荡混匀,100℃ 煮沸 5 min,离心后依次在梳孔中加入蛋白样品,110 V 电泳至胶下缘。取胶、转膜、并将膜放 5% 脱脂牛奶的封闭液中室温封闭 2 h。洗膜 3 次后加入一抗 MAP-2, β -tubulin(1:1000)。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,洗膜并用辣根过氧化物酶--DAB 法染色。当出现明显的棕色蛋白条带后用三蒸水停止染色。用灰度仪扫描棕色蛋白条带。

1.2.6 统计学处理 应用 SPSS 15.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准误表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs 的鉴定与诱导分化

脂肪干细胞具有多向分化潜能,诱导后可向脂肪细胞分化,油红 O 染色后可见镜下红色脂滴(Fig. 1B-a)。在成骨诱导液环境下培养后,其向成骨细胞分化,茜素红 S 染色后,出现广泛的深红色钙盐沉积物(Fig 1B-b)。经流式细胞仪检测发现,培养的第三代脂肪干细胞 CD29、CD90 的阳性表达率高达 99.9% 和 99.5%,CD31、CD45 的阳性表达率为 0.3% 和 1.2%(Fig. 1A),上述结果说明本研究培养的细胞为 ADSCs。

2.2 Nurr-1 基因的转染与表达

细胞转染 72 h 后,荧光显微镜下观察 GFP 组和 GFP/Nurr-1 组(Fig. 2A),均有绿色荧光标记,并统计了各个时间段的 Nurr-1 基因转染效率,分别达到 $32.1 \pm 4.8\%$ (24 h), $48.9 \pm 5.1\%$ (48 h), $73.2 \pm 3.8\%$ (72 h), $75.6 \pm 3.1\%$ (96 h)(Fig. 2B)。蛋白检测表明 Nurr-1 在 Nurr-1/GFP 组的表达量显著高于对照组和 GFP 组(Fig. 2C);对其细胞活性进行 CCK-8 检测后发现,基因转染后 12 h、24 h、48 h,Nurr-1 组的 CCK-8 值分别为对照组的 33.2% ($P < 0.01$)、43.6% ($P < 0.01$)、63.6% ($P < 0.05$),72 h 后,Nurr-1 组与对照组没有显著差异(Fig. 2D)。

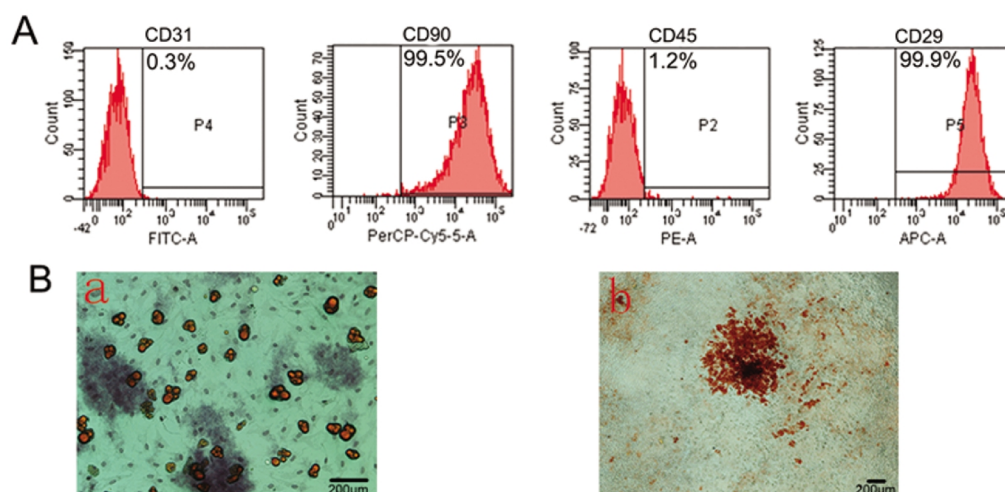


图1 脂肪干细胞的鉴定:A:流式细胞分子鉴定 CD29, CD44, CD45 和 CD90。B:对脂肪干细胞进行成脂,成骨诱导后,分别进行油红 O, 茜素红染色。比例尺:200 μm

Fig. 1 The characterization of ADSCs. (A) Flow cytometry of the third passaged ADSCs for CD29, CD44, CD45 and CD90. (B) Histological staining of ADSCs cultured under (a) adipogenic and (b) osteogenic medium conditions in vitro. ADSCs cultured under adipogenic and osteogenic medium conditions were stained by Oil Red O and Alizarin Red S, respectively. Scale bar = 200 μm

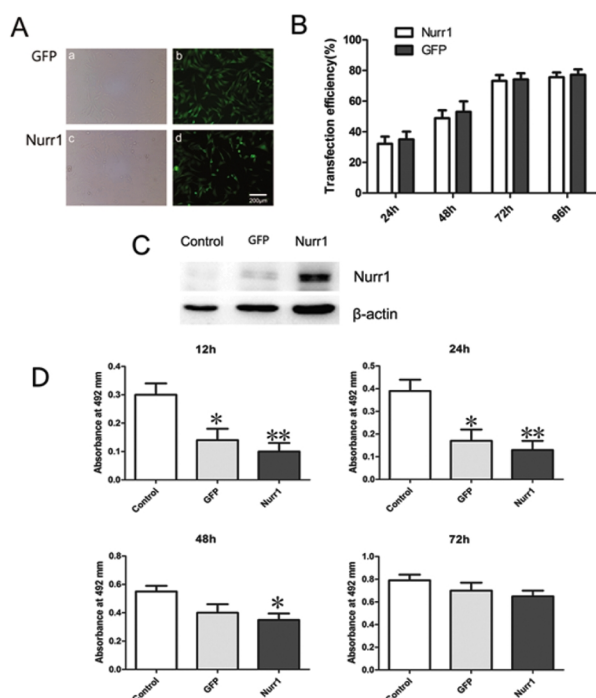


图2 Nurr-1 转染效率检测:A 脂肪干细胞分别转染 GFP 基因(a, b)和 Nurr-1/GFP 基因(c, d)72h 后普通显微镜与荧光显微镜观察。比例尺:200 μm 。B Nurr-1 转染率统计图。C 对照组, GFP 组, Nurr-1/GFP 组 Nurr-1 的蛋白表达情况。D 不同时间点, 对照组, GFP 组, Nurr-1/GFP 组的 CCK-8 检测。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 2 Overexpression of Nurr-1 in ADSCs. (A) ADSCs were transfected with GFP (a, b) or Nurr-1/GFP gene (c, d) at 72 h. The images showed transfected cells as viewed by fluorescence (a, c) and phase contrast microscopy (b, d). Scale bar = 200 μm . (B) The transfection rates of ADSCs were calculated. (C) The protein levels of Nurr-1 were determined for the control group, GFP group, Nurr-1/GFP transfection group. (D) The CCK-8 values in each group were obtained by averaging the results of four samples in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA when compared to control group.

2.3 Nurr-1 基因转染脂肪干细胞对其神经分化的作用

对 Nurr-1 转染组和对照组进行 MAP-2 及 β -tubulin 双标免疫荧光检测。如图 3A 所示, 对照组中, MAP-2 和 β -tubulin 抗体表达阴性, 但在 Nurr-1 转染组中 MAP-2 和 β -tubulin 抗体的表达呈强阳性。其中 MAP-2 的阳性率为 $32.31 \pm 2.46\%$ ($P < 0.01$), β -tubulin 的阳性率为 $39.72 \pm 4.03\%$ ($P < 0.01$) (Fig. 3B)。

2.4 RT-PCR 检测

采用 RT-PCR 方法检测 Nurr-1 基因转染细胞后, 神经特异性标记基因 MAP-2、 β -tubulin、NF200 的基因表达情况。检测发现, 相比对照组, Nurr-1 基因转染组的 MAP-2、 β -tubulin、NF200 基因水平显著上升, 分别上升了 5.19 ($P < 0.01$)、6.03 ($P < 0.01$)、4.01 ($P < 0.01$) 倍 (Fig. 4)。

2.5 Western blotting 检测

用 western blotting 方法检测 Nurr-1 基因转染细胞后, 神经特异性标记分子 MAP-2 和 β -tubulin 的蛋白表达情况。Western blotting 条带显示 Nurr-1 组的 MAP-2 和 β -tubulin 表达均显著增加, 对其进行灰度值测定显示, 相比对照组, Nurr-1 基因转染组的 MAP-2 和 β -tubulin 蛋白水平显著上升, 分别上升了 4.08 ($P < 0.01$) 和 4.51 ($P < 0.01$) 倍 (Fig. 5)。

3 讨论

神经元再生是神经损伤修复和神经退行性病变治疗的难点之一。近年来, 随着干细胞研究的迅猛发展, 组织工程学和基因疗法被广泛应用于神经损伤和神经退行性病变。本实验主要研究了 Nurr-1 基因转染对脂肪干细胞向神经方向分化的作用。我们对培养的细胞进行流式分子鉴定, 发现脂肪干细胞高表达 CD29、CD44, 几乎不表达 CD45、CD90。通过对细胞进行成脂、成骨诱导, 证明本研究所取得的细胞为脂肪干细胞; 应用慢病毒作为载体来进行基因转染, 转染效率达到 75.6%, 并且使 Nurr-1 基因在细胞内得到稳定表达。同时对转染的细胞进行免疫荧光染色, 发现其 MAP-2、 β -tubulin 染色成阳性, 统计

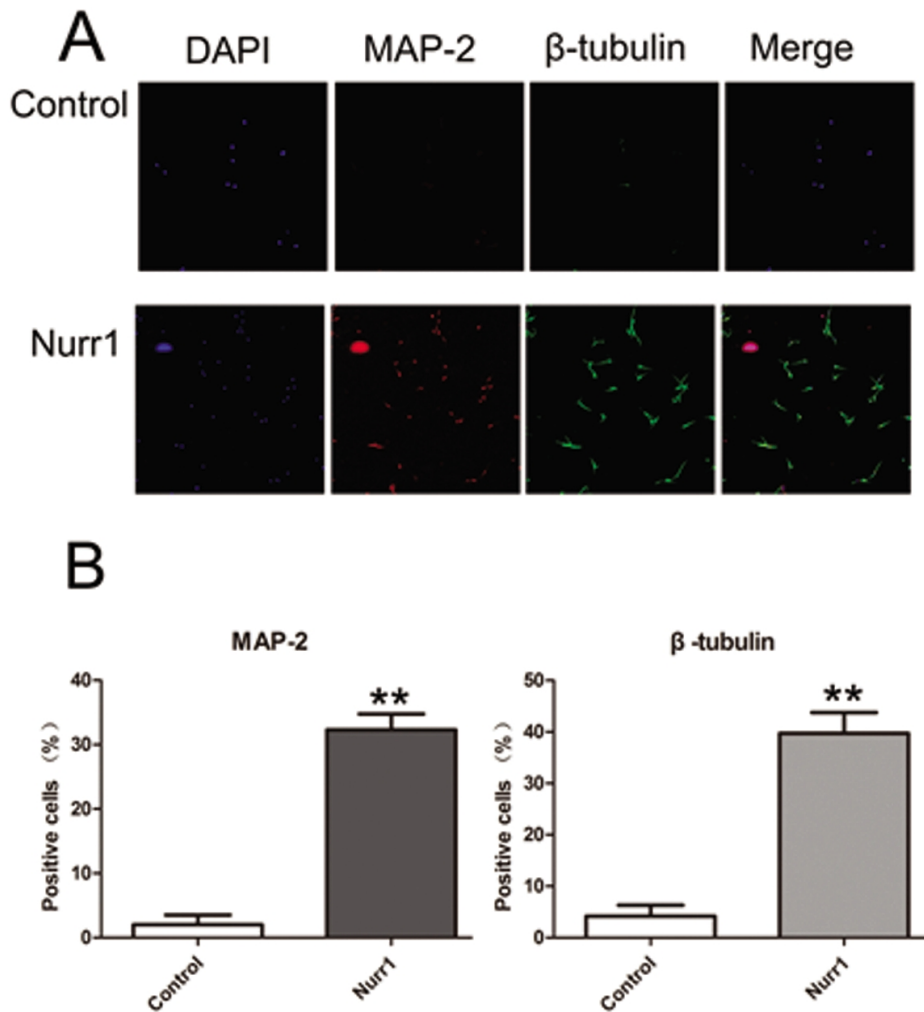


图3 Nurr-1 基因转染脂肪干细胞后神经分化检测:A 免疫荧光检测。B MAP-2,β -tubulin 阳性率检测。与对照组比较,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

Fig. 3 The effect of Nurr-1 over-expression on neuronal differentiation of ADSCs. (A) Localization of neurogenic markers in ADSCs by confocal microscopy. TRITC labeled MAP-2 and FITC labeled β -tubulin were used for immunohistological analysis. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 200 μm. (B) The number of neural marker positive cells was counted. Values shown are mean ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

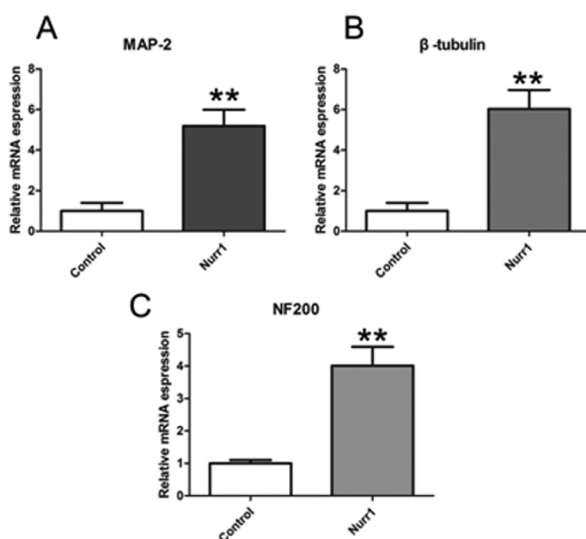


图4 对照组和 Nurr-1 基因转染组 MAP-2, NF-200 和 β -tubulin 基因表达检测。与对照组比较,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

Fig. 4 The mRNA levels of MAP-2, NF-200 and β -tubulin in control group and Nurr-1 transfection group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

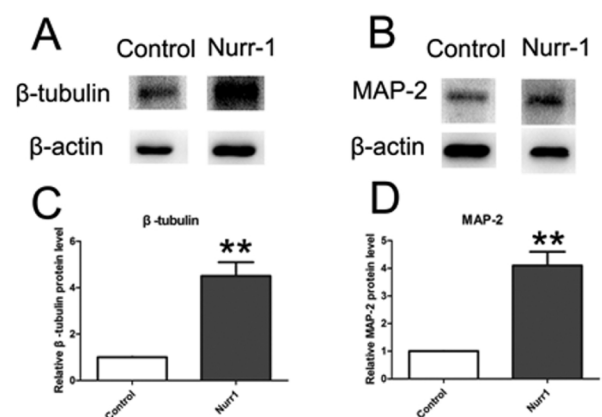


图5 对照组和 Nurr-1 基因转染组 MAP-2 和 β -tubulin 蛋白表达检测。与对照组比较,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

Fig. 5 The protein levels of MAP-2 and β -tubulin in control group and Nurr-1 transfection group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

结果表明 MAP-2, β -tubulin 的阳性率相比对照组显著提高。对转染后的细胞进行基因水平检测, 发现 MAP-2, β -tubulin、NF200 表达量显著增加。综上所述, Nurr-1 基因转染脂肪干细胞, 可明显促进其向神经方向分化, 使脂肪干细胞能更好的应用于神经损伤和神经退行性病变。

细胞移植是一种具有广阔前景的治疗方法, 可用于治疗神经损伤和神经退行性病变^[17,18]。研究表明, 胚胎干细胞, 神经干细胞, 骨髓干细胞等已被广泛应用于神经系统疾病的治疗中^[19-21]。相比其他干细胞, 脂肪干细胞具有来源广泛, 易获得, 高分化潜能等特点^[9,10]。迄今为止, 很多方法被用于促进脂肪干细胞的神经分化^[22-24]。但分化率依然很低, 极大限制了脂肪干细胞的应用。

Nurr-1 基因是来自孤儿核受体家族的一种转录因子, 先前的研究证明 Nurr-1 基因在多巴胺能神经元的形成、分化、成熟中起重要作用^[11-13,15]。细胞分子水平的研究表明, 在骨髓干细胞中过表达 Nurr-1 能促进骨髓干细胞的神经分化, 使细胞呈现类神经元的形态, 并上调神经标志分子的表达^[6]。在胚胎前体细胞中过表达 Nurr-1 基因后能引起脑源性神经营养因子 (BDNF), 胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF), 神经营养蛋白 (NT-3), 神经营养蛋白 4 和神经营养蛋白 5 的表达上调^[15]。因此, Nurr-1 基因转染具有促进干细胞神经分化的潜能。本实验首次证实了 Nurr-1 基因转染能促进脂肪干细胞向神经方向分化, 使用慢病毒载体, 其转染率高达 75.6%。转染后的细胞在形态上类似神经细胞, 并且引起 MAP-2, β -tubulin、NF200 等神经标志物的表达上调, 表明 Nurr-1 基因转染可启动脂肪干细胞的神经分化, 但是关于 Nurr-1 转染引起脂肪干细胞神经分化的机制研究还不清楚。有研究证实, Nurr-1 基因的激活与细胞外信号调节激酶信号通路 (ERK) 有关^[14], 提示 ERK 通路的激活可能与 Nurr-1 基因转染引起的神经分化有关。这种通过 Nurr-1 基因转染技术得到的脂肪干细胞为神经损伤和神经退行性病变提供了新的治疗靶点。

参考文献 (References)

- [1] Waldmeier PC, Tatton WG. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 210-218
- [2] Licker V, Kõvari E, Hochstrasser DF, et al. Proteomics in human Parkinson's disease research [J]. *J Proteomics*, 2009, 73: 10-29
- [3] Lu L, Zhao C, Liu Y, et al. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease [J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2005, 15: 46-51
- [4] Lim ST, Airavaara M, Harvey BK. Viral vectors for neurotrophic factor delivery: a gene therapy approach for neurotrophic factor delivery: A gene therapy approach for neurodegenerative diseases of the CNS [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61: 14-26
- [5] Strutt AM, Lai EC, Jankovic J, et al. Five-year follow-up of unilateral posteroventral pallidotomy in Parkinson's disease [J]. *Surg Neurol*, 2009, 71: 551-228
- [6] Shihabuddin LS, Aubert I. Stem cell transplantation for neurometabolic and neurodegenerative diseases [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 58: 845-854
- [7] Gao A, Peng Y, Deng Y, et al. Potential therapeutic applications of differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) in the treatment of neurodegenerative diseases [J]. *Neuroscience*, 2013, 228: 47-59
- [8] Sugaya K. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases [J]. *Int Rev Cytol*, 2003, 228: 1-30
- [9] Zhang HT, Liu ZL, Yao XQ, et al. Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14: 1203-1214
- [10] Taha MF, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells [J]. *Tissue Cell*, 2010, 42: 211-216
- [11] Tornqvist N, Hermanson E, Perlmann T, et al. Generation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in ventral mesencephalic tissue of Nurr1 deficient mice [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 133: 37-47
- [12] Li Y, Cong B, Ma C, et al. Expression of Nurr1 during rat brain and spinal cord development [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 488: 49-54
- [13] Jankovic J, Chen S, Le WD. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 77: 128-138
- [14] Kim SY. The Dopamine D2 Receptor Regulates the Development of Dopaminergic Neurons via Extracellular Signal-Regulated Kinase and Nurr1 Activation [J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 4567-4576
- [15] Bae EJ, Lee HS, Park CH, et al. Orphan nuclear receptor Nurr1 induces neuron differentiation from embryonic cortical precursor cells via an extrinsic paracrine mechanism [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583: 1505-1510
- [16] Park JS, Yang HN, Woo DG, et al. Exogenous Nurr1 gene expression in electrically-stimulated human MSCs and the induction of neurogenesis [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 7300-7308
- [17] Brodhun M, Bauer R, Patt S. Potential stem cell therapy and application in neurotrauma [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2004, 56: 103-112
- [18] Longhi L, Zanier ER, Royo N, et al. Stem cell transplantation as a therapeutic strategy for traumatic brain injury [J]. *Transpl Immunol*, 2005, 15: 143-148
- [19] Kang HC, Kim DS, Kim JY, et al. Behavioral improvement after transplantation of neural precursors derived from embryonic stem cells into the globally ischemic brain of adolescent rats [J]. *Brain Dev*, 2010, 32: 658-668
- [20] Huang B, Tabata Y, Gao JQ. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents and potential targeted gene delivery vehicle for brain diseases [J]. *J Control Release*, 2012, 162: 464-473
- [21] Wu W, Chen X, Hu C, et al. Transplantation of neural stem cells expressing hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) improves behavioral recovery in a rat stroke model [J]. *J Clin Neurosci*, 2010, 17: 92-95
- [22] Ahmadi N, Razavi S, Kazemi M, et al. Stability of neural differentiation in human adipose derived stem cells by two induction protocols [J]. *Tissue Cell*, 2012, 44: 87-94
- [23] Ning H, Huang YC, Banie L, et al. MicroRNA regulation of neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stem cells [J]. *Differentiation*, 2009, 78: 253-259
- [24] Abdanipour A, Tiraihi T. Induction of adipose-derived stem cell into motoneuron-like cells using selegiline as preinducer [J]. *Brain Res*, 2012, 1440: 23-33