

路亚岚,石桂英,王克维,等. 骨髓间充质干细胞治疗阿尔兹海默病模型小鼠研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 122-127.

Lu YL, Shi GY, Wang KW, et al. Progress in research using mouse models of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 122-127.

doi: 10. 3969/ j. issn. 1671-7856. 2021. 06. 019

骨髓间充质干细胞治疗阿尔兹海默病模型小鼠研究进展

路亚岚,石桂英,王克维,白琳*

(中国医学科学院医学实验动物研究所 北京协和医学院比较医学中心 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021)

【摘要】 阿尔兹海默病(AD)是一类以认知记忆障碍为主要表现的神经退行性疾病。目前,AD 的临床治疗以药物为主,但药物治疗仅能改善症状,不能有效阻止疾病进展,且对中晚期患者疗效欠佳。干细胞具有自我更新和多向分化能力,在 AD 治疗中有着广阔的应用前景。骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)作为最早发现的间充质干细胞,来源方便,易于体外分离、培养、扩增和纯化;具有自我更新及分化为神经样细胞的潜能;其分泌因子具有免疫调控和微环境重塑的能力,因此在 AD 的临床治疗中有广阔的应用前景。本文综述了国内外 BM-MSCs 治疗 AD 的研究现状,主要包括 BM-MSCs 直接移植,基因修饰后 BM-MSCs 移植以及 BM-MSCs 源外泌体移植治疗,深入讨论 BM-MSCs 治疗阿尔兹海默病模型小鼠的效果、机理及其优缺点,为骨髓间充质干细胞应用于临床提供了数据支撑。

【关键词】 骨髓间充质干细胞;阿尔兹海默病;模型小鼠;基因修饰;外泌体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 06-0122-06

Progress in research using mouse models of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of Alzheimer's disease

LU Yalan, SHI Guiying, WANG Kewei, BAI Lin*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS) Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC) NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Disease, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by impairment of cognitive memory. The clinical treatment of AD is currently dominated by a few drugs; however, these drugs can only be applied to relieve symptoms without slowing or stopping the progression of AD. Moreover, these drugs have weaker effects in patients with advanced AD. Stem cell therapy is recognized as a promising approach for AD therapy because of the self-renewal and multi-directional differentiation ability of stem cells. As the first described mesenchymal stem cells, bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) are reported to easily expand in the *in vitro* condition, readily differentiate into neuron-like cells, and contribute to immunomodulation and microenvironment remodeling by producing abundant immunomodulatory molecules. All of these properties endow BM-MSCs a potentially significant role in the clinical treatment

[基金项目] 国家重点研发计划(2017YFA0105202);北京市自然科学基金重点项目(5171001);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2019-12M-1-004)。

[作者简介] 路亚岚(1990—)女,博士,助理研究员,主要从事干细胞治疗方向研究。E-mail:luyalan01080@sina.com

[通信作者] 白琳(1984—)女,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事干细胞治疗方向研究。E-mail:bailin49@163.com

of AD. This paper summarizes the current information about the application of BM-MSCs in AD treatment, including direct transplantation of BM-MSCs, transplantation of genetically modified BM-MSCs, and injection of BM-MSC-derived exosomes. The therapeutic effects and underlying mechanisms as well as the advantages and disadvantages of BM-MSCs in AD treatment are also discussed to provide fundamental support for the future clinical application of BM-MSCs.

【 Keywords 】 bone marrow mesenchymal stem cells; Alzheimer's disease; mouse model; gene modification; exosome

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD), 又称老年痴呆症, 是一种原发性中枢神经系统退行性疾病。AD 是一种慢性疾病, 患者处于无外显症状的临床前期时间约 8~10 年, 65 岁以上老人发病率约 1%~3%^[1]。AD 的发病率随年龄增长呈逐渐上升趋势, 据报道, 70 岁以后年龄每增加 5 岁, AD 的危险性随之增加 1 倍^[2]。流行病学资料显示, 我国 AD 患者人数已超过 800 万, 约占全球的 1/5^[3]。随着我国人口老龄化程度的加剧, AD 成为继心血管疾病、肿瘤和脑卒中之后的第 4 位杀手。AD 的主要临床表现包括渐进性记忆障碍、失语、失用、失认、执行功能障碍以及人格和行为改变, 并伴随有一系列精神病症状^[4]。随着病情呈进行性加重, 后期患者几乎无法正常思考和判断, 生活不能自理。确诊 AD 后, 男性患者平均生存时间约 4.2 年, 女性患者约 5.7 年^[5]。AD 的发生给患者及其家庭和社会带来了巨大的身心痛苦和经济负担^[6]。

AD 发病机理复杂, 其神经病理学特征, 主要包括老年斑、神经原纤维缠结以及神经元和突触的丢失^[7]。老年斑以细胞外沉积的 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 为核心, 周围是受损的轴突和树突以及胶质细胞; 神经原纤维缠结是由过度磷酸化的 Tau 蛋白沉积所致, 其主要聚集在神经元胞内, 此外也可在树突和轴突聚集, 分别形成纤维网线和老年斑炎冠。AD 患者常常伴随着神经元和突触的丢失, 多见于颞顶叶和额叶及扣带回部位^[8-9]。这些病理特征导致脑神经元结构异常、神经网络破坏和神经元信息交流障碍, 是 AD 患者认知记忆功能障碍和精神行为异常的主要原因。

目前, AD 治疗以胆碱酯酶抑制剂和 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA) 拮抗剂为主^[10]。前者主要通过降低乙酰胆碱的水解速度从而提高其在患者体内的含量, 后者通过抑制 AD 患者过度激活的 NMDA 受体、减少神经元凋亡来发挥作用。它们可维持退化的神经元功能, 但无再生修复功能, 因此对于早期 AD 患者的疗效较好, 但中晚期患者收效甚微, 而且这些药物

治疗并不能阻断 AD 病程进展。到目前为止, 确诊的 AD 患者往往为中后期, 且常伴随多种代谢疾病, 可用治疗方法非常有限。此外, 中草药和针灸对 AD 患者的临床症状也有不同程度的缓解, 主要通过调理机体代谢和营养神经达到缓解症状的效果, 但对 AD 的治疗并无针对性, 且个体间疗效差异较大^[11-12]。因此, 进一步研究 AD 的新治疗方法是临床急需攻关的重大问题。

1 BM-MSCs 治疗 AD 模型小鼠的细胞和动物模型概述

1.1 骨髓间充质干细胞特征

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs) 来源于中胚层, 具有自我更新和多向分化潜能, 且其免疫源性低, 在再生医学治疗中作为“种子”细胞, 是治疗 AD 的新型方法^[13]。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BM-MSCs) 来源于骨髓基质干细胞, 作为最早被发现的 MSCs, 是探讨 MSCs 应用研究的“金标准”^[14]。BM-MSCs 分离操作简单, 可体外培养; 它的免疫源性低, 可异体移植, 在动物体内长期存活; 而且它的应用符合伦理要求, 是干细胞治疗中的理想选择^[4]。

进一步深入研究发现 BM-MSCs 具有归巢性, 移植后可转移至损伤和炎症部位, 它不仅能向骨、软骨和脂肪组织分化, 还能在特定条件下分化为神经样细胞, 可补充和替代已退化的神经元, 因此具有神经元再生潜能。近年来, 研究显示 BM-MSCs 不仅可以激活小胶质细胞、促进吞噬 A β 蛋白并释放 A β 降解酶以减少老年斑沉积, 而且还可以通过促进细胞自噬功能, 增强对 A β 蛋白的清除以延缓 AD 的进展^[15]。此外, BM-MSCs 可分泌多种生长因子和抗炎因子, 诱导血管生成和神经发生, 增加突触连接, 调节免疫微环境, 减少神经元凋亡, 维持神经元活性^[16]。因此, BM-MSCs 不仅可预防/治疗早期患者, 对中晚期患者的治疗也有广阔的应用前景。

1.2 BM-MSCs 治疗常用的 AD 模型动物

目前, 细胞移植治疗中常用的 AD 模型动物主要模拟淀粉样变性的病理特征, 分为 A β 诱导的 AD

模型动物和遗传修饰的模型动物两类。 $A\beta$ 是老年斑的主要成分,在海马/脑室注射聚集态 $A\beta$ ($A\beta 1-42$, $A\beta 1-40$, $A\beta 25-35$) 片段可导致神经元凋亡,引起胶质细胞增生的炎症反应进而产生淀粉样变性,模拟老年斑的病理现象,形成学习记忆能力衰退的 AD 动物模型^[17]。该种造模方法操作简单,造模成功率高、稳定性好且耗时短,不仅可用于小鼠,也可以用于大鼠模型构建。然而该方法在注射的过程中会难以避免造成脑组织穿透性机械损伤,造成不可预知的神经功能受损。

细胞移植治疗中常用的遗传修饰的动物模型为针对淀粉样前蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、早老素 1 (presenilin-1, PS1) 和相关基因突变体构建的多重转基因小鼠模型。APP^{swe}/PS1dE9 (APP^{K670N, M671L} PSEN1 ^{$\Delta E9$} , APP/PS1) 双转小鼠是最常用的遗传修饰 AD 小鼠模型,该双转小鼠表达突变的 APP 和 PS1 融合体,4 月龄时皮层与海马产生淀粉样蛋白沉淀,7 月龄水迷宫实验中可检测到认知记忆功能障碍;三转小鼠模型 3×Tg (APP^{K670N, M671L} PSEN1^{M146V} MAPT^{P301L}), 6 月龄时皮层与海马有弥散分布地坚实淀粉样蛋白沉积,6 月龄时通过水迷宫可观察到认知功能障碍;5×FAD (APP^{K670N, M671L} APP^{V717I} APP^{V716V} PSEN1^{M146L} PSEN1^{L286V}) 小鼠是携带 5 个家族性基因突变的 APP/PS1 的 AD 转基因小鼠,该种小鼠从 2 个月起皮层即出现老年斑沉积,并随着月龄逐渐增加,4~5 月龄时通过 Y 迷宫可观察到认知功能障碍^[18]。迄今为止,尚未发现能够完全模拟 AD 的病理进程的动物模型。因此,在具体的科学实践中应根据实验需求和条件来选择合适的实验动物模型^[19]。

2 BM-MSCs 治疗 AD 模型小鼠的效果、机理及其特点

2.1 BM-MSCs 直接移植治疗 AD 动物模型

BM-MSCs 直接移植治疗 AD 动物模型,通过水迷宫实验发现 BM-MSCs 治疗组小鼠的潜伏期缩短、穿台次数增加,空间学习记忆能力增强,并接近对照野生型 (wild type, WT) 小鼠水平^[20-21]。结果显示, BM-MSCs 可向损伤部位迁移,治疗组小鼠皮层和海马的淀粉样蛋白沉积减少,进一步分析发现 $A\beta$ 降解酶增加,例如脑啡肽酶 (neprilysin), $A\beta$ 周围小胶质细胞数量增加,海马内新生血管数量增加,它们可促进 $A\beta$ 的降解和转运。同时, BM-MSCs 减少 APP/PS1 小鼠脑内 Tau 蛋白的磷酸化水平^[22-23]。

也有研究发现 BM-MSCs 可调控微环境的免疫活性, Lee 等^[24] 发现 BM-MSCs 可抑制小胶质细胞的过度激活,其中炎症因子肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor α , TNF α), 白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL1 β) 表达降低,抗炎因子白细胞介素 (interleukin 10, IL10) 表达增加。Garcia 等^[25] 发现类似现象, BM-MSCs 治疗组小鼠海马区的老年斑显著减少,并伴随着星型胶质细胞和小胶质细胞数量显著减少。BM-MSCs 还可通过分泌因子调控神经元活性,据报道发现 BM-MSCs 通过下调核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 表达,降低氧化应激水平,减少神经元凋亡;也可通过上调营养因子,例如:脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF), 神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达,增加神经元标志物 NeuN 的阳性细胞数量,促进神经元修复。此外,还可通过减少乙酰胆碱和多巴胺的表达,促进谷氨酸神经递质的表达。在分子通路水平上, BM-MSCs 移植治疗组可上调糖原合成酶激酶-3 (Glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β) 表达量,激活 Wnt 信号通路,促进海马区神经发生,增进神经元内源性修复^[26]。基于临床前动物模型的良好疗效,国际上开展了多项 AD 治疗的临床实验,其中美国开展了两项同种异体 BM-MSCs 治疗 AD 的临床研究,目前两者分别处于在 1 期和 2 期阶段 (NCT02600130 和 NCT02833792)^[27]。

随着细胞传代培养, BM-MSCs 逐渐出现衰老表型,传代次数对 BM-MSCs 的干性特征和分泌因子有显著影响,衰老死亡的 BM-MSCs 将丧失治疗能力。全骨髓贴壁法分离的小鼠 BM-MSCs 在第 4 代可保持较好形态和多向分化能力。然而,随着传代次数进一步增加, BM-MSCs 会出现细胞生长速度缓慢、核固缩、脱离等衰老特征。大鼠 BM-MSCs 的表面抗原 CD29、CD44 和 CD90 表达随传代次数逐渐增加,经过 5~6 代后达到顶峰,之后开始逐渐下降。人源 BM-MSCs 随着传代次数增加,其增殖能力和分化能力也均降低^[28]。梁维等发现第 6 代的 BM-MSCs 向神经干方向分化能力最强^[29],一般认为 7 代之前的 BM-MSCs 有较强干细胞活性,适用于移植治疗研究。

2.2 基因修饰的 BM-MSCs 移植治疗 AD 小鼠模型

随着对 AD 发病机理研究和认识的不断深入,

众多参与 AD 发生发展过程的重要调控蛋白、RNA 分子被相继发现。BM-MSCs 可作为一种新型基因治疗的载体细胞,通过基因修饰方法对其进行改造,将基因治疗与细胞治疗相结合,使 BM-MSCs 和调控分子的效应叠加,更能有效缓解/阻止甚至逆转 AD 的发展进程。目前研究比较多的调控分子主要包括具有调控神经元生长和胶质细胞活性的分泌因子和非编码 RNA。BM-MSCs 的基因修饰方法包括电转导入、病毒导入以及转基因动物直接分离。其中,尽管病毒载体介导的基因修饰方法具有较高的潜在成瘤风险,但因其操作简便,在临床前实验中可进行相关探索性研究。据报道,基因修饰后的 BM-MSCs 治疗 AD 的副反应和成瘤能力可能高于单纯的 BM-MSCs 细胞;因此,对其安全性进行充分验证将是后续研究工作的重点之一。另外,导入目标基因的 BM-MSCs 所处的代数会相应增加,干细胞的干性特征、生长特征以及分泌特征等会受到影响,在实践中应予以充分验证和考量。

Garcia 等^[25]在过表达 VEGF 的 BM-MSCs 治疗 APP/PS1 小鼠的实验中发现,治疗 6 月龄 AD 小鼠模型,潜伏期 WT $\approx$ AD (VEGF-BM-MSCs) < AD (BM-MSCs) < AD (saline),对于 9 月龄小鼠,潜伏期表现为 WT $\approx$ AD (VEGF-BM-MSCs) < AD (BM-MSCs) < AD (saline),四组小鼠中位数没有交叉,差异显著;对于 12 月龄 AD 小鼠,BM-MSCs 组无法明显缓解行为障碍,而过表达 VEGF 的 BM-MSCs 组小鼠潜伏期低于 AD 组模型小鼠。据此,过表达 VEGF 的 BM-MSCs 具有更强缓解 AD 认知障碍能力,且在中晚期 AD 小鼠中优势显著。分子水平上,过表达 VEGF 组的 BM-MSCs 可显著促进各个月龄 AD 小鼠的微血管生成,减少 A β 淀粉样蛋白沉积。Liu 等^[30]在 Antisense-miR-937 过表达的 BM-MSCs 组中得到了类似的结论,miR-937 敲降治疗组 AD 小鼠的潜伏期缩短、穿台次数增加,优于单纯的 BM-MSCs 移植治疗组。分子水平上,miR-937 敲降的 BM-MSCs 更显著的减少老年斑沉积,明显提高 BDNF 的表达,但两组在调控星型胶质细胞和小胶质细胞的数量中,没有显著差异。研究者通过分离过表达 CC 趋化因子配体 5 (C-C motif chemokine ligand 5, CCL5)过表达小鼠的 BM-MSCs,发现其通过调节小胶质细胞激活,减少淀粉样蛋白沉积继而促进学习记忆功能的恢复^[31]。因此,在 BM-MSCs 中过表达靶基因以增强 AD 模型动物的学习认知能力具有可

行性,其分子机理与过表达的靶基因功能密切相关。

2.3 BM-MSCs 源外泌体治疗 AD 动物模型

近年来,作为脱细胞治疗手段,源于干细胞的囊泡外泌体引起学者的广泛关注。外泌体由磷脂双分子层包绕可溶性物质组成的复杂混合内容物构成,直径为 30~150 nm^[32]。由于其可携带多种生物活性物质(蛋白质、DNA 和 RNA 等),通过膜融合或内吞作用被受体细胞摄取,穿过血脑屏障,作用于神经元及其微环境中的多种细胞^[33]。外泌体携带的多种生物活性物质,可参与机体正常的生理功能及多种疾病的病理进程^[29]。因此,外泌体可规避传统 BM-MSCs 应用中的局限性,外源性分离或者修饰外泌体内容物有望成为理想的“脱细胞”治疗手段。

Perets 等^[34]在 AD 小鼠注射了分离自 MSCs 的外泌体,24 h 后,实验人员观察发现外泌体具有向神经损伤区域迁移和归巢的能力,该功能与神经免疫反应的趋化能力密切相关。Reza-Zaldivar 等^[35]发现来源于 MSCs 的外泌体可增强神经的可塑性,减缓 A β 诱导的 AD 小鼠认知障碍,进一步实验发现外泌体激活了 SVZ 区的神经元生成,减少 A β 淀粉样蛋白的沉积。Xin 等^[36]将从 BM-MSCs 中超速离心分离的外泌体移植入中风的大鼠模型中,发现 BM-MSCs 神经损伤得到缓解,这些外泌体中包含可以促进 A β 蛋白降解的血清胱抑素 C (Cystatin C)。外泌体还可通过将 A β 转运至小胶质细胞的溶酶体中促进 A β 清除;此外,外泌体能够通过释放脑啡肽酶/miRNA/鞘磷脂激活蛋白等多种方式营养神经元^[37-40],从而改善认知功能。Nakano 等^[41]发现 BM-MSCs 来源的外泌体可转移入损伤的神经元和星型胶质细胞。多项研究发现外泌体携带的多种活性物质,尤其是小 RNA (MicroRNA, miRNA),在调控靶基因表达,增进治疗效果方面有重要作用^[42]。

BM-MSCs 在移植治疗中可能出现细胞排斥和血栓形成等风险,但其衍生的外泌体有如下优势:(1)体积较小,可通过血脑屏障,生物利用率高;(2)便于改造,使其大量携带目标的治疗效应因子;(3)可通过改造膜表面的受体-配体,定向某类细胞,靶向给药;(4)可通过静脉常规性给药,为药物研发提供了便利;(5)其纳米级尺寸,在给药中降低了微血管血栓形成的可能性^[43]。

尽管外泌体在 AD 的诊断和治疗中优势显著,

但将其应用于临床仍有诸多问题需要解决,包括:(1)精确诱导细胞分泌含特定物质的外泌体的机制和方法尚未明确;(2)如何最大效率地将生物活性物质加载到外泌体中;(3)如何使外泌体选择性地靶向细胞并精确释放其内容物;(4)应用外泌体治疗的生物安全性也需要进一步的明确;(5)如何简便的获得大量外泌体。综上,外泌体在 AD 治疗中的作用及其机制的研究将为阿尔兹海默病的诊断和治疗提供新的方向。

3 BM-MSCs 治疗阿尔兹海默病模型小鼠的展望

BM-MSCs 用于 AD 的模型小鼠治疗已经有数十年的历史,积累了大量的经验。数据显示 BM-MSCs 可缓解多种 AD 模型小鼠认知功能障碍,但 BM-MSCs 应用于临床还需要克服诸多问题,主要包括以下几个方面:(1)规范移植细胞/外泌体使用方案:目前大量的临床前期研究中,细胞/外泌体的质量要求和数量使用比较混乱,缺乏统一标准。随着大量 BM-MSCs 研究的开展,应制定统一的指导方案,既有助于多项研究的横向比较,为临床试验开展提供可靠的数据支撑,也会避免不必要的重复和浪费。(2)确定干细胞输送到目标脑区的给药方式:目前治疗 AD 动物模型的给药方式包括脑立体定位注射和尾静脉注射两种,其中动物实验中以脑立体定位注射海马区居多,在功能区达到较高的细胞浓度,用于探索 BM-MSCs 的治疗效果。该方法为损伤性操作,一般单次治疗,在临床应用中有一定的局限性。此外,研究者通过尾静脉多次注射 BM-MSCs 治疗 AD 小鼠模型,也可在一定程度缓解 AD 小鼠症状,但该方法的优化和疗效收益需要进一步实验验证和评估。近期,Santamaria 等^[44]发现鼻腔内移植的 MSCs 分泌物也可以缓解 AD 小鼠的认知障碍,该方法是一种非侵入性方法,且可多次吸入给药,损伤较小,但文献报道较少,可作为新的备选方法在科学实践中确定其有效性和稳定性;(3)进一步评价 BM-MSCs 使用安全性:干细胞治疗的安全性是和有效性同等重要的问题,有研究发现胚胎干细胞治疗帕金森病时,多只大鼠死于干细胞形成的肿瘤,因此,包括 BM-MSCs 在内的干细胞治疗应该对于潜在的危險性充分论证,才能应用于临床实践^[45-46]。尽管 BM-MSCs 走向临床还有一段距离,随着其治疗 AD 的机制进一步被披露,安全性得到进一步验证,以及实验条件的日益成熟,BM-MSCs 定将为 MSCs 治疗 AD 和其他神经系统疾病的治疗

做出巨大的贡献。

参考文献:

- [1] Masters CL, Bateman R, Blennow K, et al. Alzheimer's disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 15(1): 15056.
- [2] Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease [J]. Eur J Neurol, 2018, 25(1): 59-70.
- [3] 曾武,彭立辉.骨髓间充质干细胞移植治疗阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 湘南学院学报(医学版), 2017, 19(1): 65-68.
- [4] Joe E, Ringman JM. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention [J]. BMJ, 2019, 367: l6217.
- [5] Larson EB, Shadlen MF, Wang L, et al. Survival after initial diagnosis of Alzheimer's disease [J]. ANN Intern Med, 2004, 140(7): 501-509.
- [6] Karlawish J, Jack CR Jr, Rocca WA, et al. Alzheimer's disease: The next frontier-special report 2017 [J]. Alzheimers Dement, 2017, 13(4): 374-380.
- [7] Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology [J]. Neuropathology, 2020, 40(1): 22-29.
- [8] Jahn H. Memory loss in Alzheimer's disease [J]. Dialogues Clin Neurosci, 2013, 15(4): 445-454.
- [9] 薛小燕,郭小华,李敏,等.阿尔茨海默病发病机理的研究进展 [J]. 神经药理学报, 2011, 1(6): 37-47.
- [10] Fessel J. Alzheimer's disease combination treatment [J]. Neurobiol Aging, 2018, (63): 165.
- [11] Yang WT, Zheng XW, Chen S, et al. Chinese herbal medicine for Alzheimer's disease: Clinical evidence and possible mechanism of neurogenesis [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 141: 143-155.
- [12] Zhou J, Peng W, Xu M, et al. The effectiveness and safety of acupuncture for patients with Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(22): e933.
- [13] Brown C, McKee C, Bakshi S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2019, 13(9): 1738-1755.
- [14] Levy O, Kuai R, Siren EMJ, et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies [J]. Sci Adv, 2020, 6(30): eaba6884.
- [15] Shin JY, Park HJ, Kim HN, et al. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models [J]. Autophagy, 2014, 10(1): 32-44.
- [16] Qin C, Lu Y, Wang K, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells improves cognitive deficits and alleviates neuropathology in animal models of Alzheimer's disease: a meta-analytic review on potential mechanisms [J]. Transl Neurodegener, 2020, 9(1): 20.
- [17] Gong YH, Hua N, Zang X, et al. Melatonin ameliorates $A\beta_{1-42}$ -induced Alzheimer's cognitive deficits in mouse model [J]. J Pharm Pharmacol, 2018, 70(1): 70-80.

- [18] Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease; experimental models and reality [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133 (2): 155–175.
- [19] Foidl BM, Humpel C. Can mouse models mimic sporadic Alzheimer's disease? [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15 (3): 401–406.
- [20] 李文玉, 金日龙, 胡兴越. PKH26 标记的骨髓间质干细胞在阿尔茨海默病大鼠中的迁移 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2012, 41(6): 659–664.
- [21] Kanamaru T, Kamimura N, Yokota T, et al. Intravenous transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells prevents memory impairment in transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Brain Res*, 2015, 1605: 49–58.
- [22] Lee JK, Jin HK, Endo S, et al. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(2): 329–343.
- [23] Li B, Gonzalez-Toledo ME, Piao CS, et al. Stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor reduce beta-amyloid deposits in the brains of APP/PS1 transgenic mice [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2011, 3(2): 8.
- [24] Lee JK, Jin HK, Bae JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate amyloid β -induced memory impairment and apoptosis by inhibiting neuronal cell death [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2010, 7(6): 540–548.
- [25] Garcia KO, Ornellas FL, Martin PK, et al. Therapeutic effects of the transplantation of VEGF overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells in the hippocampus of murine model of Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6: 30.
- [26] Naaldijk Y, Jäger C, Fabian C, et al. Effect of systemic transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuropathology markers in APP/PS1 Alzheimer mice [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2017, 4(43): 299–314.
- [27] Staff NP, Jones DT, Singer W. Mesenchymal stromal cell therapies for neurodegenerative diseases [J]. *Mayo Clinic proceedings*, 2019, 94(5): 892–905.
- [28] 李萍, 金世柱, 张明, 等. 骨髓间充质干细胞传代扩增培养与干细胞干性的维持关系的研究 [J]. *国际免疫学杂志*, 2015, 38(6): 507–511.
- [29] 梁维, 刘洲, 许志恩, 等. 细胞传代对骨髓间充质干细胞向神经干细胞分化的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20 (41): 6092–6097.
- [30] Liu Z, Wang C, Wang X, et al. Therapeutic effects of transplantation of As-MiR-937-expressing mesenchymal stem cells in murine model of Alzheimer's disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(1): 321–330.
- [31] Lee JK, Schuchman EH, Jin HK, et al. Soluble CCL5 derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells and activated by amyloid β ameliorates Alzheimer's disease in mice by recruiting bone marrow-induced microglia immune responses [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(7): 1544–1555.
- [32] 孙理华, 王娟, 张岳, 等. 间充质干细胞来源的外泌体通过 miRNA-21-5p 调节心脏自噬并影响心肌梗死大鼠的心脏功能 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 88–96.
- [33] Guo M, Yin Z, Chen F, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome: a promising alternative in the therapy of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2020, 12(1): 109.
- [34] Perets N, Betzer O, Shapira R, et al. Golden exosomes selectively target brain pathologies in neurodegenerative and neurodevelopmental disorders [J]. *Nano Lett*, 2019, 19(6): 3422–3431.
- [35] Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, Gutiérrez-Mercado YK, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote neurogenesis and cognitive function recovery in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(9): 1626–1634.
- [36] Xin H, Li Y, Cui Y, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(11): 1711–1715.
- [37] Yang L, Zhai Y, Hao Y, et al. The regulatory functionality of exosomes derived from hUMSCs in 3D culture for Alzheimer's disease therapy [J]. *Small*, 2020, 16(3): e1906273.
- [38] Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1197.
- [39] Iranifar E, Seresht BM, Momeni F, et al. Exosomes and microRNAs: New potential therapeutic candidates in Alzheimer disease therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (3): 2296–2305.
- [40] Jia Y, Cao N, Zhai Ji, et al. HGF mediates clinical-grade human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improved functional recovery in a senescence-accelerated mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7 (17): 1903809.
- [41] Nakano M, Nagaishi K, Konari N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24805.
- [42] Jiang L, Dong H, Cao H, et al. Exosomes in pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 3329–3335.
- [43] Yin Q, Ji X, Lv R, et al. Targetting exosomes as a new biomarker and therapeutic approach for Alzheimer's disease [J]. *Clin Interv Aging*, 2020, 15: 195–205.
- [44] Santamaria G, Brandi E, Vitola P, et al. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell secretome repairs the brain of Alzheimer's mice [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 28(1): 203–218.
- [45] 刘雨潇, 张继建, 张慧茹, 等. 干细胞与肿瘤研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21(6): 18–20, 66.
- [46] Fan X, Sun D, Tang X, et al. Stem-cell challenges in the treatment of Alzheimer's disease: a long way from bench to bedside [J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(5): 957–978.