

含 GDNF 基因的慢病毒载体的构建和其在人胚胎神经干细胞中的表达

王淑艳¹, 任萍¹, 谢淑², 朱宛宛¹, 王暘¹, 关云谦¹, 张愚¹

1 首都医科大学 宣武医院细胞治疗中心, 北京 100053

2 国家人类基因组北方研究中心, 北京 100176

摘要: 利用含胶质源性神经营养因子(Glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)基因的慢病毒载体转染了人胚胎来源的神经干细胞, 探讨了转染后 GDNF 在神经干细胞中的体外表达水平及其影响因素。首先 GDNF 基因被克隆入慢病毒载体, 通过瞬时转染法包装出病毒上清, 经滴度鉴定后分别按拷贝数为 1、2.5、5、10 转染神经干细胞。转染后细胞经过潮霉素筛选得到均一表达 GDNF 的神经干细胞体系。其后分别利用酶联免疫吸附(ELISA)方法和 Real-time PCR 方法测定不同转染组细胞在不同时间点 GDNF 的蛋白分泌水平和基因表达水平。实验中构建了表达 GDNF 基因的慢病毒载体, 包装出的病毒上清在体外培养条件下成功转染了神经干细胞, 经潮霉素筛选可以得到均一的持续表达分泌 GDNF 的人胚胎皮层神经干细胞体系。实验结果表明转染拷贝数可以影响 GDNF 的分泌水平, 相同条件下转染拷贝数越高, GDNF 分泌量越多, 其基因表达水平越高。因此, 含 GDNF 的慢病毒载体可以成功转染人胚胎来源的神经干细胞, 使其持续表达 GDNF, 转染过程中可以通过拷贝数在一定水平上控制 GDNF 的蛋白分泌水平和基因表达水平。

关键词: 胶质源性神经营养因子, 神经干细胞, 慢病毒载体, 转染

Construction of Lentiviral Vectors Encoding GDNF and GDNF Expression in Human Neural Stem Cells

Shuyan Wang¹, Ping Ren¹, Shu Xie², Wanwan Zhu¹, Yang Wang¹, Yunqian Guan¹, and Yu Zhang¹

1 Cell Therapy Center, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

2 Chinese National Human Genome Center, Beijing 100176, China

Abstract: We transfected human neural stem cells using lentiviral vectors encoding glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) to study its expression level *in vitro* and to get a stable cell line expressing GDNF. First, GDNF gene was sub-cloned into the lentiviral transfer vectors. Then, the recombinant lentiviral supernatants were packaged by 293T cells through three plasmids transient co-transfection method using standard lipofectamine reagent. The viral titers were tested by the transfection efficiency of 293T cells. At the same time, human neural stem cells (hNSC) were transfected under different multiplicity of infection. GDNF gene expression level and protein secretion level of hNSC were tested by real-time PCR and ELISA methods after transfection. Lentiviral

Received: April 3, 2008; **Accepted:** September 2, 2008

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 3042801040), National Basic Research Program of China (No. 2006CB943703), Science Program of Beijing Municipal Science & Technology Commission (No. D07050701350703).

Corresponding author: Yunqian Guan. Tel: +86-10-83198274; E-mail: guanyunqian@yahoo.com.cn

国家自然科学基金项目(No. 3042801040), 国家重点基础研究计划 (No. 2006CB943703), 北京市科委科技计划(No. D07050701350703)资助。

vectors encoding GDNF were constructed. Using lentiviral vectors encoding GDNF we successfully transfected human neural stem cells, and got a stable neural stem cell lines over-expressing GDNF. Furthermore, the results indicated that GDNF expression was influenced by the multiplicity of infection. Human neural stem cells could over-express GDNF through lentiviral vectors transfection. Its gene expression level and protein expression level correlate with the multiplicity of infection.

Keywords: GDNF, neural stem cells, lentiviral vectors, transduction

胶质源性神经营养因子(GDNF)是一种具有神经营养和神经保护作用的神经营养因子,多种动物模型的研究证实 GDNF 能够促进多巴胺能神经元、运动神经元的存活及损伤后神经突触的重建^[1-4]。但由于 GDNF 是一种大分子蛋白质,难以通过血脑屏障到达局部病变脑组织,这成为阻碍其临床应用的主要原因。解决这一问题的途径之一是基因治疗和细胞治疗相结合,选择合适的干细胞类型,通过体外转基因的方法使其表达分泌 GDNF,再将细胞移植入病变部位使 GDNF 可以长期持续的表达并释放,实现其神经营养功能。神经干细胞具有自我增殖和多向分化为神经元和胶质细胞的能力,为神经退行性疾病的细胞治疗带来了希望。神经干细胞移植实验证实,移植入动物模型脑内的神经干细胞能够整合入局部脑组织,在一定范围内迁移并分化成为神经元和胶质细胞^[5]。神经干细胞也因此被作为携带 GDNF 的一种细胞载体。研究证实,将过表达 GDNF 的神经干细胞移植入灵长类和鼠类的帕金森动物模型的病变部位,动物的行为学评分明显提高^[4,6]。说明过表达 GDNF 基因的神经干细胞是一种较好的细胞治疗载体。由于神经干细胞分裂增殖相对缓慢,特别是经过长期的传代培养后,处于分裂增殖状态的细胞比例会逐步下降^[7],直接进行质粒转染,未取得良好的效果,慢病毒载体的特有优势使其成为对神经干细胞进行 GDNF 基因修饰的最佳选择。

首先,慢病毒载体可以高效转染分裂缓慢的细胞,以及处于分化终末状态的细胞,如神经元和胶质细胞等^[8];其次,慢病毒载体可以使外源基因整合入靶细胞基因组中,使其长期表达^[9];同时慢病毒载体可以容纳 8~10 kb 的大片段外源基因;另外,慢病毒载体不会引起导致靶细胞死亡的免疫反应^[10]。随着慢病毒载体的设计进展,具有较强功能的管家基因启动子,如 EF1- α 、PGK 等被引入了载体系统,并实现了在同一载体中表达 2 个外源基因的功能^[11]。这一进展可有助于利用慢病毒载体更好

的表达外源基因,另一方面可以同时表达抗性基因和细胞标记基因。

本研究构建了由 EF1- α 驱动的编码 GDNF 的慢病毒载体,成功转染了人胚胎皮层来源的神经干细胞。由于本载体含有 2 个启动子,在 EF1- α 驱动 GDNF 基因表达的同时,另外一个启动子 PGK 驱动潮霉素抗性基因的表达(载体示意图见图 1-D)。转染成功后细胞同时表达 GDNF 和潮霉素抗性基因,通过在体外培养过程中加入潮霉素进行筛选,得到了更为均一的可持续分泌 GDNF 的神经干细胞体系。同时,测定了这一载体不同拷贝数转染条件下 GDNF 分泌量,为过表达 GDNF 的神经干细胞移植治疗神经退行性疾病提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及质粒

原代神经干细胞取自人胚胎自然流产胎儿(宣武医院妇产科提供,经伦理委员会批准),经体外扩增培养后用于实验。293T 细胞由北京大学生命科学院惠赠。包含人 GDNF 的质粒 PLNCX-2 获赠于首都医科大学神经科学研究所,慢病毒穿梭质粒 DUET101 及包装质粒 CMV Δ R8.91, PMD.G 由美国 Johns Hopkins 大学程教授惠赠。

1.1.2 试剂

细胞培养试剂 DMEM-F12、DMEM、胎牛血清、牛血清白蛋白、N2、青链霉素等购自美国 Invitrogen 公司。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),表皮生长因子购自美国 R&D 公司。分子克隆试剂限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, DNA 聚合酶购自美国 NEB 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, polybrene 购自 Sigma 公司。潮霉素(Hygromycin) 购自罗氏公司。RNA 提取试剂 TRIzol, 逆转录酶 SSII 购自美国 Invitrogen 公司。Real-time PCR 试剂购自大连宝生物公司。

1.2 方法

1.2.1 神经干细胞培养

原代神经干细胞取自人胚胎自然流产胎儿(8~16周)(宣武医院妇产科提供,经伦理委员会批准)。取材过程参照以前的方法^[7],单细胞悬液过400目滤网去除组织残渣,胎盘蓝计数后以 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种。3d左右可见小的细胞集落形成,1周可见神经球。每隔3天半量换液,待神经球生长至直径50 μm 左右时,进行剪切传代。待神经球扩增到一定数量后,将神经球用胰酶打散成单细胞悬液后^[12],再以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种。

1.2.2 含 GDNF 基因的慢病毒载体构建和病毒上清的包装

GDNF 编码序列全长为 558 bp。根据慢病毒载体质粒结构,设计了包含 *Xba* I 和 *Bsr*GI 两个酶切位点的扩增 GDNF 的引物。上游引物: 5'-TTCTAGAC CACCATGAAGTTATGGGATGTCGTG-3', 下划线部分为加入的酶切位点 *Xba* I, 酶切位点前面加入保护碱基 T, 其后的 CCACC 为 Kozark 序列, 再其后是从 GDNF 起始密码 ATG 开始的一段序列。下游引物: 5'-CATGTACATCAGATACATCCACACCTTTTAGC G-3', 下划线部分为加入的酶切位点 *Bsr*GI, 前面同样加入保护碱基, 其后为 GDNF 基因序列中包含终止密码的一段序列。通过 PCR 方法, 以质粒 pLNCX-2 为模板, 用高保真的 DNA 聚合酶扩增出 GDNF 基因序列全长。将所得 PCR 产物用 *Xba* I 和 *Bsr*GI 两个酶进行双酶切反应, 产物回收后备用。同时对慢病毒载体的转移质粒 DUET101 进行 *Xba* I 和 *Bsr*GI 双酶切反应, 琼脂糖凝胶电泳分离小片段, 玻璃奶凝胶回收方法回收载体片段。T4 DNA 连接酶连接 GDNF PCR 产物和回收的载体片段, 连接产物转化感受态细菌 Stbl-3, 铺板后进行菌液 PCR 鉴定, 选取阳性克隆, 提取质粒后进行酶切及测序鉴定。

慢病毒颗粒的包装采用脂质体介导的瞬时转染方法进行, 转染前一天将 293T 细胞传代于多聚赖氨酸包被的直径为 100 mm 的培养皿中, 每皿细胞总数约为 5×10^6 , 培养 24 h, 待细胞 70%~80% 汇合后进行转染。转染过程中, 首先将构建好的编码 GDNF 和 GFP 的转移质粒 DUET101, 编码慢病毒载体 gag, pol 结构的质粒 CMV Δ 8.91, 以及编码 VSV-G 结构的质

粒 PMD.G 按一定比例溶于含 800 μL OPTI-MEM 的聚苯乙烯管中, 同时将脂质体按一定比例溶于等体积的 OPTI-MEM 中, 室温放置 5 min。然后将分别含有 DNA 和脂质体的溶液混合, 轻柔混匀, 室温静置 20 min。弃去原有的 293T 细胞培养基, 加入 8 mL OPTI-MEM 培养基, 随后加入 DNA 和脂质体混合液, 混合均匀。待加入转染混合液培养 8~12 h 后, 完全弃去转染混合液, 换成 ITS 培养基收集病毒上清。此后分别于换液 24 h 和 48 h 后收集上清, 所得上清用 0.45 μm 滤器过滤去除细胞碎片, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。收集好的病毒上清用 Centricon plus-20 浓缩, 所得浓缩病毒转染 293T 细胞进行滴度鉴定后, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于下一步实验。

1.2.3 慢病毒载体转染神经干细胞

由于神经干细胞以神经球的形式悬浮生长, 为提高转染效率, 转染前 1 天, 将神经球用胰酶消化, 打散成单细胞悬液^[12], 以 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于六孔板中, 培养 12 h 后, 分别以转染拷贝数为 1、2.5、5、10 加入 GDNF 和 GFP 的慢病毒载体上清。以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度加入凝聚胺(Polybrene)培养 20 h, 换新鲜培养基。转染后 1 周, 将神经球打散成单细胞悬液, 荧光显微镜下观察并计数 GFP 阳性细胞百分比。进一步用流式细胞仪测定 GFP 阳性神经干细胞的百分比, 分析转染效率。对于只含有 GDNF 不表达荧光标记的上清, 采用转化后第 5 天加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素进行筛选, 筛选后 72 h, 未能成功转化神经干细胞会死亡。以转染 GFP 的神经干细胞作为对照, 分析筛选效率, 转染成功的神经干细胞扩增后用于下一步实验。

1.2.4 转染前后 GDNF 蛋白表达分泌测定

将转染完成后不同 MOI 值的皮层神经干细胞用潮霉素筛选后进行扩增, 神经球打散成单细胞悬液, 以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中, 加入 2 mL 培养液, 培养 3 d 使其处于增殖状态, 加入新鲜培养基后分别取 24 h、48 h 后上清 1 mL 冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 中准备测定 GDNF 浓度。每种拷贝数接种 3 孔, 同样分别测定了接种 3、7、10、21、40 d 时每 1×10^6 个细胞的 GDNF 分泌量, GDNF 测定采用 ELISA 测定方法, 具体参照 Promega 公司提供的 GDNF 酶联免疫吸附检测试剂盒的实验步骤进行。

1.2.5 转染前后 GDNF 的基因表达水平测定

首先用 TRIzol 法提取各组神经干细胞的 mRNA, 用无 RNA 酶的 DNA 酶处理提取的 RNA 样品, 除去 RNA 样品中的 DNA 污染。以随机引物为引物将处理过的 mRNA 逆转录成 cDNA。用 Real-time PCR 方法比较转染前后和不同拷贝数转染组间 GDNF 基因表达量有无差异。GDNF 扩增引物为: 上游, 5'-ACTGACTTGGGTCTGGGCTATG-3'; 下游, 5'-TTT GTCACCTACCAGCCTTCTATTT-3'。扩增片段大小为 134 bp。以 18S rRNA 为内参, 扩增引物为: 上游, 5'-ACTCAACACGGGAAACCTCA-3'; 下游, 5'-AA CCAGACAAATC GCTCCAC-3'。扩增片段大小为 123 bp。

1.2.6 统计学分析

测定结果均以平均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS11.1 统计学软件进行方差分析, 检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 实验结果

2.1 神经干细胞原代培养与传代

原代取材的人胚胎皮层神经干细胞培养 1 周后, 可见神经球形成。此时神经球各胞体间结合紧密, 性质均一, 折光性较强, 待神经球长到 0.5 mm 左右

时, 开始进行剪切传代。经过 3~4 次剪切传代, 神经球扩增至一定数量, 采用消化振荡法将神经球打散成单细胞悬液^[12], 以 2×10^5 密度接种进行传代, 此时由单细胞形成神经球的周期明显缩短, 传代 1 周后可以得到 2~3 倍的细胞。细胞传代 10 次以后, 体外培养 2 个月左右, 进行了分化增殖能力鉴定, 用于下一步实验。

2.2 含 GDNF 基因慢病毒载体的构建和病毒载体的包装

以包含 GDNF 基因序列的质粒 PLNCX2 为模板, 经 PCR 扩增后, 2% 琼脂糖凝胶电泳显示与目的片段大小相符的条带(图 1A)。慢病毒载体经 *Xba* I/*Bsr*GI 双酶切后, 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳显示载体中位于两酶切位点间的原有片段被分离, 载体被切割成线性(图 1B)。PCR 产物和经凝胶回收的载体片段 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌感受态细胞后挑选阳性克隆, 扩增后提取质粒进行酶切鉴定可见与 GDNF 基因大小相符的片段被分离(图 1C)。经测序插入片段与 GenBank 中长度为 558 bp 的 GDNF 序列相符, 说明 GDNF 基因已经被克隆入慢病毒载体。

慢病毒载体系统的 3 个质粒 DUET101、CMV Δ 8.91 和 PMD.G 按一定比例共转染 293T 细胞, 收集转染后 24 h、48 h 的上清浓缩后, 转染 293T 细胞,

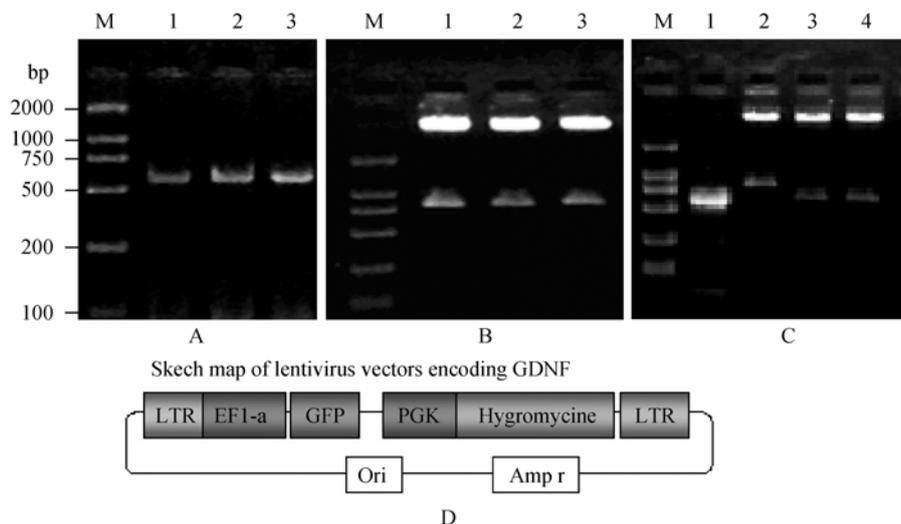


图 1 含 GDNF 基因的慢病毒载体构建

Fig. 1 Construction of lentivirus vectors encoding GDNF

(A) result of GDNF gene PCR with enzyme sites (1-3: three repeats); (B) enzyme digestion result of DUET101 plasmids. The original DNA was separated after enzyme digestion (1-3: three repeats); (C) ligation result of DUET101-GDNF plasmids enzyme digestion (1: GDNF PCR production as a control; 2: the enzyme digestion result of original plasmids; 3, 4: the enzyme digestion result of pasmids encoding GDNF after ligation; M: DNA marker); (D) picture of lentiviral vectors encoding GDNF. EF1-a and PGK promote GDNF and hygromycin gene alternatively. LTR refers to the long terminal region of lentiviral vectors

计数 GFP 阳性细胞百分比, 进行滴度鉴定, $T = 5.2 \times 10^6$ TU/mL(TU, Transduction unit)。转染 GDNF 的 293T 细胞 GDNF 抗体染色计数阳性细胞比例, 滴度为 4.6×10^6 TU/mL。

2.3 神经干细胞的转化

神经球打散成单细胞悬液后, 含 GDNF 和 GFP 的浓缩病毒上清分别以不同的 MOI 值进行转化, 实验结果表明, 慢病毒载体可以成功转染神经干细胞, 使其表达绿色荧光蛋白和 GDNF(图 2B、2D)。转染 GFP 的神经干细胞打散成单细胞悬液流式细胞仪测定转化效率为 30%左右(图 2G)所示。100 μ g/mL 潮霉素筛选 3 d 后, 流式细胞仪测定 GFP 阳性细胞比例在 90%以上(图 2H), 说明经过抗生素筛选, 可以得到纯度较高的表达 GFP 和 GDNF 的神经干细胞。

2.4 转染前后 GDNF 蛋白表达分泌测定

转染 GDNF 的皮层神经干细胞经 100 μ g/mL 的潮霉素筛选 3 d 后, 分别测定了各组不同时期每 10^6 个细胞每小时 GDNF 的分泌量。ANOVA 分析, 各组与对照组间 $P < 0.05$, 对照组与转染组之间均有显著性差异。各转染组之间, MOI=1, 2.5 与 MOI=5, 10 组间分析 $P < 0.05$, 差异有显著性(图 3)。另外随时间的延长, GDNF 可以持续表达 1 月以上, GDNF 分泌量没有明显改变(图 4)。

2.5 转染前后 GDNF 基因表达水平测定

首先, 通过标准曲线扩增得到 GDNF 和 18S rRNA 的标准曲线分别为: $Y = -0.28X + 8.72$, $R^2 = 0.993$; $Y = -0.29X + 8.23$, $R^2 = 0.991$ 。取相同稀释倍数的 cDNA 为模板进行扩增。实验结果分析表明, 通过内参 18S rRNA 的标准化, 在转染不同拷贝数条件下 GDNF mRNA 的表达水平与对照组相比, 都有不同比例的增高。增高的倍数与转染拷贝数相关, 转染拷贝数越高, 增高比例越大。其中, MOI=0.5 组, GDNF 的 mRNA 的表达水平比对照组平均增高 2.05 倍; MOI=1 组, 平均增高 14.17 倍; MOI=2.5, 平均增高 21.35 倍; MOI=5 组, 平均增高 81.73 倍; MOI=10 组, 平均增高 99.42 倍(图 5)。

3 讨论

本研究构建了由管家基因启动子 EF1-a 驱动的表达 GDNF 的慢病毒载体。试验证实, 携带 GDNF

和 GFP 基因的慢病毒载体可在体外成功转染神经干细胞, 使其持续表达 GDNF 和 GFP。由于转染成功的神经干细胞同时表达潮霉素抗性基因, 经过体外加入潮霉素进行筛选, 可以得到均一表达 GDNF 和 GFP 的神经干细胞体系。运用这种过表达 GDNF 的神经干细胞进行移植将进一步提高移植治疗的安全性和有效性。

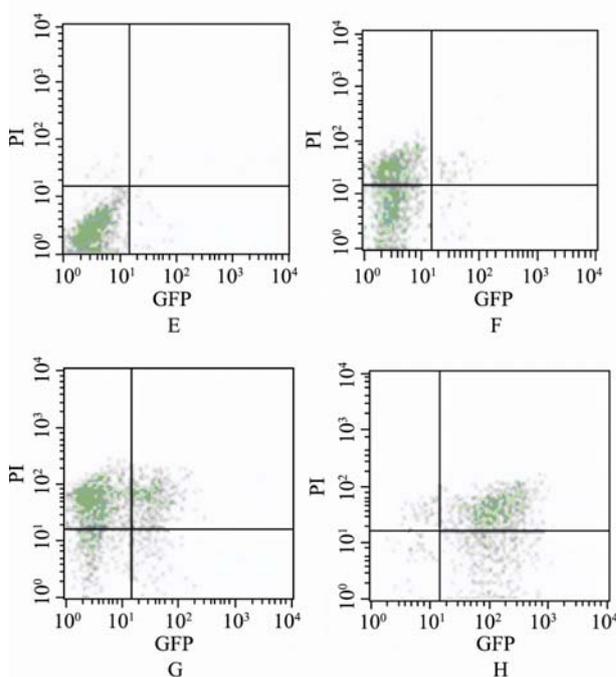
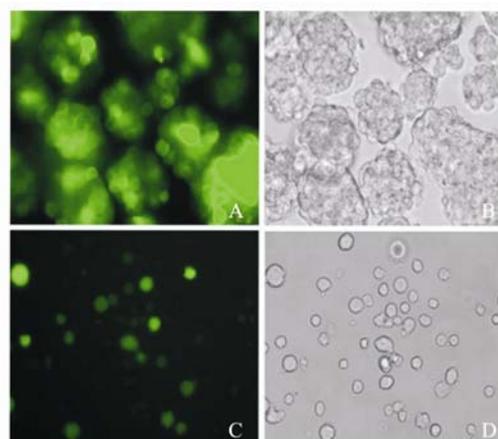


图 2 含 GFP 的慢病毒载体转染神经干细胞后第 12 天荧光显微镜观察和流式检测结果

Fig. 2 Lentiviral vectors transfection efficiency identification and FACS results after 12 days

A: Neurospheres expressing GFP under fluorescence microscope (400 \times); B: Neurospheres observed under light microscope (400 \times); C: 95% single cells were GFP positive under fluorescence microscope (400 \times); D: Single cells dissociated from neurospheres under microscope (400 \times); E: 293T cells as positive control. GFP was positive, and PI was positive; F: 293T Cells as positive control. GFP was positive, and PI was positive; G: hNSC FACS result before hygromycin selection, 38.5% hNSC were GFP positive; H: hNSC FACS result after hygromycin selection, 99.5% hNSC were GFP positive

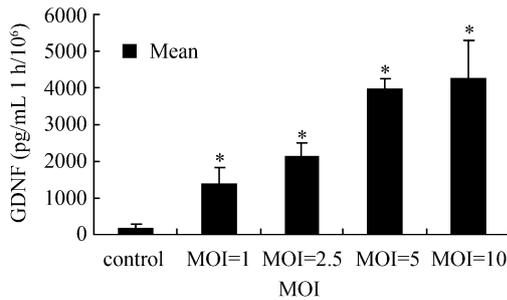


图3 不同拷贝数条件下 GDNF 分泌情况 ELISA 测定结果
Fig. 3 ELISA results about GDNF secretion level of hNSC under different MOI

After hygromycin selection (100 µg/mL), the GDNF secretion level of hNSC were tested using ELISA method. The results indicated that hNSC transfected GDNF over-expressed GDNF significantly comparing with control. GDNF secretion level increased accompanied MOI improved (ANOVA analysis, *P<0.05)

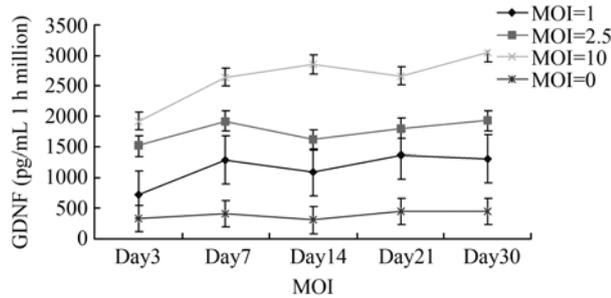


图4 转染后不同时期 hNSC 分泌 GDNF 的 ELISA 测定
Fig. 4 hNSC GDNF secretion level after GDNF transfection

After hygromycin selection, hNSC were continuously cultured for more than one month, GDNF secretion level at different time were tested. The results were indicated that LV-GDNF modified hNSC over-expressed. GDNF continuously, the GDNF secretion level and the relationship between GDNF secretion level and MOI were stable

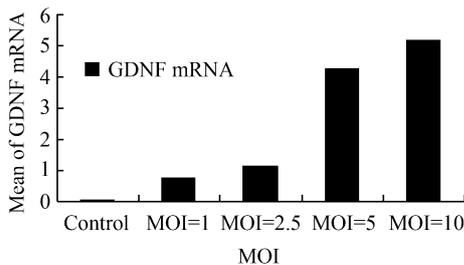


图5 以不同拷贝数转染 GDNF 后神经干细胞 GDNF mRNA 表达水平比较

Fig. 5 Comparison of GDNF mRNA expression level of neural stem cells at different transfection MOI

Compare with the control group, the GDNF mRNA expression level of neural stem cells increased averagely 14.17 times, 21.35 times, 81.73 times and 99.42 times when MOI equal to one, 2.5, 5, and 10 respectively. The expression level of 18S rRNA was as reference in this experiment

本试验对转染 GDNF 后神经干细胞的 GDNF 分泌水平进行了连续监测,发现 GDNF 可在体外持续表达分泌,且分泌水平没有随时间延长发生明显的

改变。在经潮霉素筛选后的长期培养中,转染后的神经干细胞可以保持原有的生物学特性。因此,可以在今后的研究中对过表达 GDNF 的神经干细胞进行长期的培养并可以建立稳定的细胞体系,为今后的研究提供参考。

以前的很多研究证实过量的 GDNF 注入会带来副作用^[13]。因此,体外研究转染后神经干细胞表达 GDNF 的分泌水平神经干细胞的移植治疗神经退行性疾病有重要意义。本实验通过控制转染过程中慢病毒载体的拷贝数对转染后神经干细胞 GDNF 的分泌水平进行了研究。发现不同拷贝数条件下,相同数量的神经干细胞相同时间内 GDNF 的基因表达水平和蛋白分泌水平有所不同。相同条件下,拷贝数越高,GDNF 基因表达和蛋白分泌水平都有增加趋势,统计学分析,拷贝数不同组间有显著性差异。这一结果表明,有希望通过控制慢病毒载体转染的拷贝数来控制 GDNF 的分泌水平,为今后的应用研究提供更详尽的实验数据。

研究证实,慢病毒载体是对神经干细胞进行 GDNF 基因修饰的较好选择。因此可以通过慢病毒载体介导的基因修饰方式使神经干细胞过表达 GDNF,并通过药物筛选方式获得持续表达分泌 GDNF 的细胞体系。同时有可能通过控制转染拷贝数在一定水平上调整 GDNF 的分泌水平。实验中也发现了需要进一步解决的问题,例如如何更准确的控制基因转染的拷贝数,以及高拷贝数的转染是否会对神经干细胞的生物学特性有所影响等。

REFERENCES

- [1] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, *et al.* GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 1993, **260**(5111): 1130-1132.
- [2] Gill SS, Patel NK, Hottom GR, *et al.* Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med*, 2003, **9**(5): 589-595.
- [3] Patel NK, Bunnage M, Plaha P, *et al.* Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *ANN Neurol*, 2005, **57**(2): 298-302.
- [4] Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, *et al.* Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, 2000, **290**(5492): 767-773.

- [5] Kelly S, Bliss TM, Shan AK. *et al.* Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 11839–11844.
- [6] Bjorklund A, Kirik D, Rosenblad C, *et al.* Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res*, 2000, **886**(1-2): 82–98.
- [7] Sun P, Dong K, Dong CX, *et al.* The characteristics of neural stem cells derived from human fetal cortex and hippocampus in default differentiation. *Chin J Neurosurg*, 2006, **22**(10): 620–623.
孙鹏, 董恺, 董朝轩, 等. 人胚额叶皮层和海马干细胞的自主分化研究. 中华神经外科杂志, 2006, **22**(10): 620–623.
- [8] Lai, Z, Brady RO. Gene transfer into the central nervous system in vivo using a recombinant lentivirus vector. *J Neurosci Res*, 2002, **67**: 363–371.
- [9] Naldini L, Blomer U, Gage FH, *et al.* Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 11382–11388.
- [10] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, *et al.* Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J Virol*, 1998, **72**: 9873–9880.
- [11] Yu X, Zhan X, Cheng L, *et al.* Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. *Mol Ther*, 2003, **7**: 827–838.
- [12] Dong K, Zhang Y. A new method of dispersing neurospheres into single cells. *J Capital Med Univ*, 2006, **27**(5): 620–622.
董恺, 张愚. 一种新的将神经球分散为单细胞悬液的方法. 首都医科大学学报, 2006, **27**(5): 620–622.
- [13] Georgievska B, Kirik D, Bjorklund A, *et al.* Aberrant sprouting and downregulation of tyrosine hydroxylase in lesioned nigrostriatal dopamine neurons induced by long-lasting overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in the striatum by lentiviral gene transfer. *Exp Neurol*, 2002, **177**(2): 461–474.

《生物工程学报》英文版简介

为了加快期刊的国际化进程, 扩大国际交流, 本刊与国际知名的爱思唯尔出版公司(Elsevier)达成协议, 合作出版英文电子版《Chinese Journal of Biotechnology》, 该刊与中文版同步, 月刊。出版后置于爱思唯尔庞大的 ScienceDirect 网络出版平台上, 我刊网址: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075>。

爱思唯尔是国际著名的出版公司, 《Cell》等知名杂志便出自该公司。ScienceDirect 是爱思唯尔建立的世界最全面的服务于多学科研究型图书馆的电子数据库。研究人员通过它能在在线访问超过 1800 种期刊和 400 万篇电子版全文。《生物工程学报》英文版借助这个庞大而成熟的平台, 将可以大大地提高文章的浏览量, 扩大期刊及作者在国内外的影响, 提高文章的被引频次。同时, 出版英文电子版将可克服与国外文字沟通的障碍, 使作者的科研成果能在第一时间为国际同行所了解。

本刊的栏目有综述、研究报告、研究简报和技术与方法等, 范围包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程、发酵工程、生化工程、代谢工程、组织工程、生物制药、生物芯片、生物反应器及生物信息学等, 涉及生物技术各个领域, 非常欢迎广大科研人员踊跃投稿。直接投英文稿件而被录用的, 也将同时发表在中文印刷版上。本刊将增加英文稿件的刊出量, 并邀请国外专家对录用英文稿件进行英文润色, 部分优质稿件将参考专家意见予以优先发表。英文版不再另收版面费。

具体做法是: 每期从中文版中精选出 5~10 篇稿件译成英文, 凡具备以下条件之一者即可入选: 1. 在理论方面有新发现或新见解。2. 在应用方面取得新进展, 达到新水平。3. 在技术方面建立新方法或改进已有的方法。选中后通知作者译成英文, 经编辑部审核送爱思唯尔出版公司进行文字加工, 再返回作者进行内容确证。

投稿时请注意以下事项: 1. 稿件撰写时, 应力求叙述清楚, 避免语法错误和用词不当。2. 突出创新点, 用具体材料、数据加以说明与论证。3. 加强图表注释, 使读者在不读正文的情况下能正确理解图表的涵义。

欲了解更详细的信息, 请关注我们网页的更新或联络编辑部:

电话: 010-64807509; 传真: 010-64807327; E-mail: cjb@im.ac.cn