

陈志衡,吴刘成,景谨,等. SMA模型小鼠骨髓间充质干细胞体外培养体系的建立[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 679-685.

Chen ZH, Wu LC, Jing J, et al. An *in vitro* culture system for bone marrow mesenchymal stem cells in a mouse SMA model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 679-685.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.011

SMA模型小鼠骨髓间充质干细胞体外培养体系的建立

陈志衡^{1,2}, 吴刘成¹, 景谨¹, 朱顺星^{1*}

(1. 南通大学实验动物中心, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学江苏省教育部神经再生重点实验室, 江苏 南通 226001)

【摘要】 目的 建立脊髓型肌萎缩症(SMA)小鼠骨髓间充质干细胞(BMMSC)体外培养体系, 研究反义寡核苷酸(ASO)对其生物学特性的影响, 为深入研究 SMA 发病机制及药物筛选提供可靠的体内模拟工具细胞。**方法** 选取刚出生 4 d 的 SMA 小鼠, CO₂ 窒息法处死后, 于 75% 乙醇中浸泡, 分离、纯化骨髓细胞。细胞荧光检测细胞表面标志物; RT-PCR 及 Western Blot 研究 ASO 对运动神经元存活基因 2(SMN2) 外显子(exon7) 列入水平以及运动神经元存活(SMN) 蛋白表达量; EDU 法和 TUNEL 法检测细胞增殖和凋亡能力。**结果** 体外分离培养的 SMA 模型小鼠 BMMSC 具有贴壁生长、可以传代等特点; 对 P3 代 BMMSC 进行细胞免疫荧光鉴定结果显示: CD44、CD29 高表达, CD34、CD45 低表达; 转染 ASO 后细胞 SMN2 exon7 列入率显著上升以及 SMN 蛋白表达量显著上调, 并显著促进细胞增殖能力, 同时核内 Gemini bodies (gems) 数量也有所增多。**结论** 成功建立 SMA 小鼠 BMMSC 体外培养体系, 通过阳性药物 ASO 验证可促进 BMMSC SMN2 exon7 列入及 SMN 蛋白表达, 为 SMN2 相关调控机制及药物筛选提供一种新的工具细胞。

【关键词】 SMA 小鼠; 骨髓间充质干细胞; ASO; 运动神经元存活 2 基因; 细胞增殖

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0679-07

An *in vitro* culture system for bone marrow mesenchymal stem cells in a mouse SMA model

CHEN Zhiheng^{1,2}, WU Liucheng¹, JING Jin¹, ZHU Shunxing^{1*}

(1. Laboratory Animal Center of Nantong University, Nantong 226001, China. 2. Key Laboratory of Neuroregeneration of Jiangsu and Ministry of Education of Nantong University, Nantong 226001)

Corresponding author: ZHU Shunxing. E-mail: ZSX@ntu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a culture system of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) *in vitro* in a mouse spinal muscular atrophy (SMA) model, study the antisense oligonucleotide (ASO) influence of its biological characteristics, and establish a reliable simulation tool with the SMA model for the in depth study of the pathogenesis of SMA and drug screening. **Methods** The marrow of the femur and humeral bones of four-day-old SMA mice were harvested. The surface markers of BMMSCs were identified by immunofluorescence. The survival motor neuron gene 2 (SMN2) exon7 inclusion level and survival motor neuron (SMN) protein expression were detected by RT-PCR and Western Blot. The cell proliferation and apoptosis were detected by an EDU kit and TUNEL kit. **Results** The BMMSCs isolated and cultured *in vitro* from SMA mice showed adherent growth and the ability to passage. P3 generation BMMSCs were identified by cellular immunofluorescence, in which the positive markers of CD44 and CD29 were highly expressed, and the negative markers of CD34 and CD45 expression were low. SMN2 exon7 inclusion and SMN protein expression increased significantly after ASO transfected the cells, and the proliferation was significantly promoted, while the number of

[作者简介] 陈志衡(1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经退行性疾病。Email: 1634917858@qq.com

[通信作者] 朱顺星(1968—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 疾病动物模型。Email: ZSX@ntu.edu.cn

gemi bodies within the nucleus also increased. **Conclusions** A BMMSC *in vitro* culture system for SMA mice was successfully established to promote the inclusion of BMMSC *SMN2* exon7 and the expression of SMN protein via ASO verification as a new tool cell for the study of *SMN2*-related regulatory mechanisms and drug screening.

【Keywords】 SMA mice; BMMSC; ASO; *SMN2*; cell proliferation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA), 一种罕见的由于脊髓前角发生退行性病变, 导致运动神经元功能退化、肌肉萎缩的常染色体隐性的神经退行性遗传病^[1-2], 是婴儿致死率最常见的遗传性神经疾病之一, 在新生儿中患病率达 1/6000^[2]。目前通过修正 *SMN2* (survival of motor neuron 2) 基因^[3]; 或增加 *SMN2* exon7 的列入^[4]; 或对患者的 *SMN1* 基因进行替代进而达到挽救 SMA 患者的效果^[5]。或将 SMA 患者皮肤成纤维细胞或尿液分离的肾小管上皮细胞诱导成 iPSC (induced pluripotent stem cells, 诱导多能干细胞), 进一步将 iPSC 诱导分化成运动神经元细胞, 进而对患者进行治疗^[6-7], 但是诱导产生 iPSC 的过程繁琐复杂、周期长。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC) 具有贴壁生长、增殖能力强、分化程度低等优点^[8-9], 目前已用于人、大鼠、小鼠等相关疾病模型的研究^[10], 但有关 SMA 模型小鼠骨髓间充质干细胞的研究暂无报道。本研究探索分离培养 SMA 模型小鼠的骨髓间充质干细胞, 并将其作为 SMA 相关药物研发及筛选的工具细胞, 为治疗 SMA 疾病相关药物的研发及筛选提供一种工具细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

所使用 SMA 模型鼠来源于 Jackson laboratory, 在南通大学实验动物中心保种扩繁【SCXK (苏) 2019-0001】。实验用 SPF 级 FVB. Cg-Smn1^{tm1Hung} Tg (*SMN2*) 2Hung/J 雄鼠 (*smn*^{-/-} *SMN2*^{2tg/2tg}) 4 只, 8 ~ 10 周龄, 体重在 28 ~ 30 g; 雌鼠 (*smn*^{-/-} *SMN2*^{2tg/2tg}) 8 只, 8 ~ 10 周龄, 体重在 22 ~ 25 g, 饲养于南通大学实验动物中心 SPF 级屏障【SYXK (苏) 2017-0045】。饲养环境: 温度 (21 ± 1) °C、相对湿度 (55 ± 5)%, 12 h/12 h 光/暗循环。将 1 雄和 2 雌进行配种繁殖, 自由采食、饮水, 定期更换笼具、垫料, 每日观察老鼠状态, 孕鼠及时分笼, 记录生产时间, 选取

刚出生 4 d 的小鼠 (基因型: *smn*^{-/-} *SMN2*^{2tg/2tg}) 8 只, 雌雄不拘, 体重在 2 ~ 4 g。实验过程中对小鼠的操作经南通大学动物伦理委员会伦理学审批 (S20201203-301)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DME/F12 (Hyclone, SH20023.01), FBS (Gibco, A3160802), 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, 2185855), Anti-SMN/Gemin 1 (Abcam, ab108531), Anti-integrin beta-1/CD29 (Proteintech, 12594-1-AP), Anti-CD44 (Proteintech 15675-1-AP), Anti-CD34 (Proteintech, 14486-1-AP), Anti-CD45 (Proteintech, 20103-1-AP), Anti-β-Actin (Santa Cruz, sc-47778), Anti-α-Tubulin (Cell Signaling Technology, #3873), LipofectamineTM 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific, L3000001), 抗荧光淬灭液 (含 DAPI) (Beyotime, P0131), EDU 检测试剂盒 (Beyotime, C0071S), TUNEL 检测试剂盒 (Vazyme, A112-01)。

NanoDropTM 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, OD-1000, 美国), 荧光显微镜 (OLYMPUS, BX51, 日本) 和倒置光学显微镜 (OLYMPUS, CKX31SF, 日本), MuLi 显影仪 (Tanon, Tanon-5200, 中国), 电泳仪及湿转膜系统 (BIO-Rad, PowerPac Basic, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 SMA BMMSC 原代培养

取出生 4 d 的 SMA 小鼠尾尖, 进行快速基因型鉴定, 选取基因型为 *smn*^{-/-} *SMN2*^{2tg/2tg} 的小鼠进行 BMMSC 提取分离实验: 将小鼠置于可封闭的安乐死装置中, 释放 CO₂ 使其窒息而亡, 于 75% 乙醇中浸泡, 取其四肢, 剥离肌肉, 取股骨以及肱骨骨髓, 用含 10% FBS 的 DME/F12 完全培养基培养, 次日进行换液^[11]。倒置显微镜观察细胞形态, 待其长满 (70% ~ 80%) 后记为 P0, 用 0.25% 胰酶消化, 进行传代培养。P3 代细胞用于后续实验。

1.2.2 SMA BMMSC 细胞鉴定

以每毫升 1 × 10⁶ 个将 P3 代细胞接种于含有小圆玻片的六孔板中, 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱内

过夜培养。次日,将小圆玻片固定,封闭后孵育一抗^[12-13],4℃过夜;第3天,洗去未结合的一抗,室温避光孵育荧光二抗2h,洗去未结合的二抗,加入抗荧光淬灭液(含 DAPI),封片,拍照。

1.2.3 SMA BMMSC 细胞转染

以每毫升 1×10^6 个将 P3 代细胞接种于六孔板中,待其长至 70% ~ 80% 进行细胞转染实验。设置空白对照组与实验组:实验组中加入 ASO10-29 (以下简称 ASO,一种反义寡核苷酸)^[14],37℃,5% CO₂ 培养箱培养 48 h。

1.2.4 RT-PCR 及 SMN2 FL 表达分析

利用 TRIzol 法收集 Total RNA,用 NanoDrop™1000 Spectrophotometer 检测细胞 Total RNA 浓度。取 1 μg Total RNA 进行逆转录反应,按 Reverse Transcriptase 试剂盒说明进行 RT-PCR 反应。以此 RT 产物为模板进行 PCR 反应(反应条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min 循环 35 次;72℃,7 min)。SMN 基因引物序列(5'-3') : Forward: ATAATTCACCCACACCTCCC; Reverse: TTGCCACATACGCCTCACATAC。

取少量 PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳,120 V,30 min,核酸成像系统显影拍照。将剩下的 PCR 产物中加入 DdeI 限制性内切酶,37℃ 水浴,酶切过夜。次日,将酶切过夜的产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,110 V,60 min。核酸成像系统显影拍照,计算 SMN2 exon7 列入比率^[4]。

1.2.5 Western Blot

收集蛋白,使用 NanoDrop™1000 Spectrophotometer 检测蛋白浓度,调整上样量为 30 μg。用 10% PAGE 凝胶进行蛋白电泳,转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,4℃ 孵育过夜,洗去未结合的一抗,室温孵育二抗 2 h,洗去未结合的二抗。用 MuLi 显影仪显影,Image J 软件对结果进行定量分析。

1.2.6 细胞免疫荧光检测 SMN 蛋白表达情况

将 P3 代细胞接种于含有小圆玻片的 12 孔板内,转染 48 h 后进行细胞免疫荧光实验。将小圆玻片固定、通透、封闭后,4℃ 孵育一抗过夜。第 2 天,洗去未结合的一抗,室温避光孵育二抗 2 h,加入抗荧光淬灭液(含 DAPI),封片,使用荧光显微镜拍照。

1.2.7 EDU 法检测 SMA BMMSC 细胞增殖

按照 EDU 检测试剂盒说明对转染 48 h 后的 P3 代细胞进行细胞增殖实验。每孔加入 500 μL 10 mol/L EDU 溶液,37℃ 孵育 2 h,洗去未反应的 EDU 溶液,4% 多聚甲醛固定,0.5% TritonX-100 进行通透,洗去通透液,每孔加入 500 μL Click 反应液,室温避光孵育 30 min,洗去未反应的 Click,加入抗荧光淬灭封片液(含 DAPI),封片,拍照。

1.2.8 TUNEL 法检测 SMA BMMSC 细胞凋亡

按照 TUNEL 检测试剂盒说明对转染 48 h 后的 P3 代细胞进行细胞凋亡实验。用 4% 多聚甲醛固定,洗去多聚甲醛溶液,加入 0.5% TritonX-100 进行通透,加入 $1 \times$ Equilibration Buffer 室温平衡 30 min,避光加入 50 μL TdT 缓冲液,37℃ 孵育 1 h,洗去未反应的 TdT,滴加抗荧光淬灭液(含 DAPI),封片,使用荧光显微镜拍照。

1.3 统计学分析

每组实验重复 3 次,使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行画图分析和 Image J 软件进行灰度分析。分组之间数据分析使用 *t* 检验, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

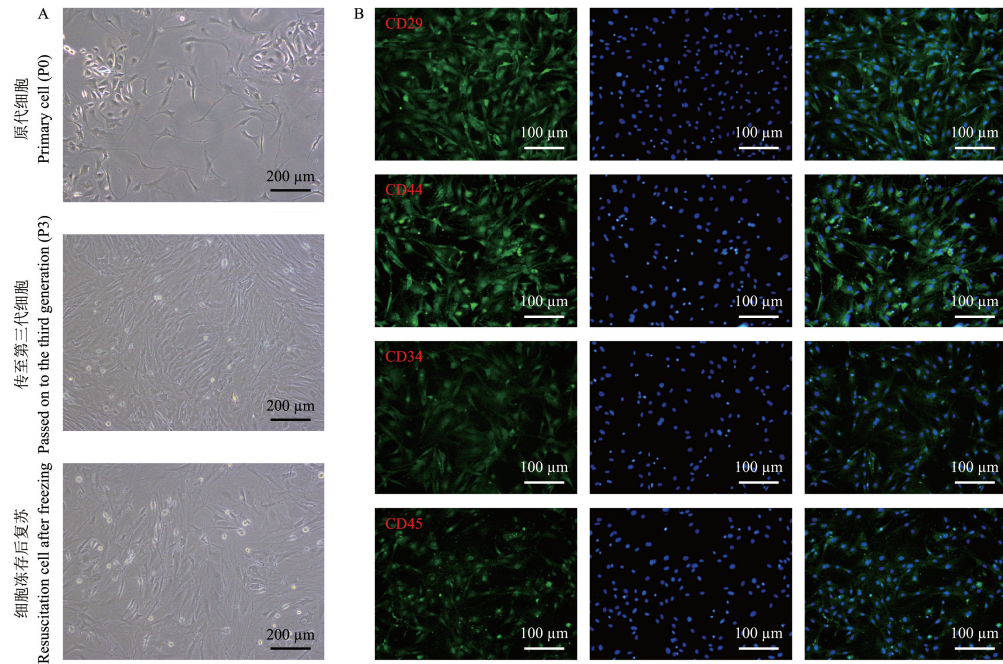
2 结果

2.1 SMA 小鼠 BMMSC 培养体系的建立

所提取分离、纯化的 SMA BMMSC 具有贴壁生长、可进行传代及可冻存等特点,细胞形态呈梭形或扁平型,传至 P3 代后细胞形态稳定(见图 1A)。对 P3 代 BMMSC 进行细胞免疫荧光鉴定实验,发现 BMMSC 表面标志物 CD29、CD44 分子均高表达,造血细胞表面标志物 CD34、CD45 分子不表达或低表达(见图 1B)。因此,所提取分离得到的 SMA 模型小鼠 BMMSC 具有骨髓间充质干细胞的特征。

2.2 ASO 显著促进 SMN2 exon7 列入水平及 SMN 蛋白表达

通过 PCR 及酶切反应结果表明:实验组与对照组相比 SMN2 exon7 的列入水平显著上升,SMN2 有功能的全长基因显著增多,SMN2 exon7 列入比率由原来的 46% 上升至 88% ($n = 3, P < 0.05$) (见图 2A,图 2B)。通过 Western Blot 实验结果表明:实验组与对照组相比 SMN 蛋白表达量显著上调,SMN/ β -Actin 比值由原来的 1 上升至 2.2 ($n = 3, P < 0.05$) (见图 2C,图 2D)。

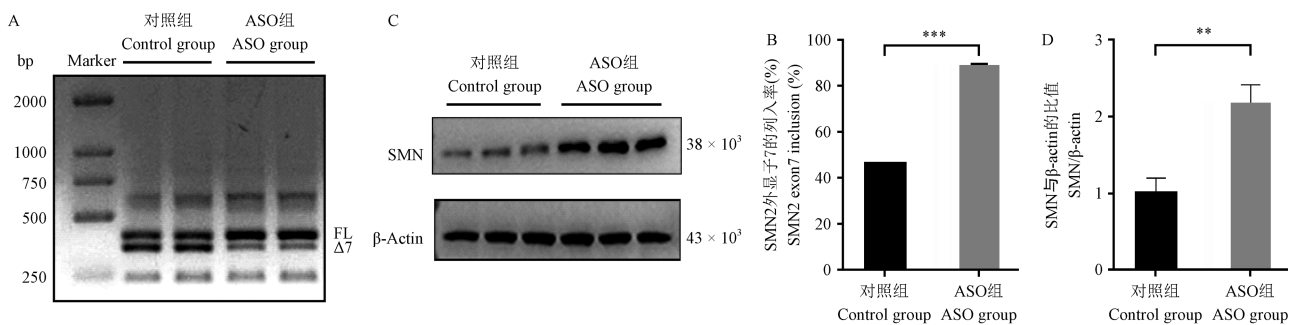


注:A:原代细胞(P0)、第三代细胞(P3)以及冻存后细胞复苏形态;B:免疫荧光鉴定 BMMSC 表面特征分子。

图 1 SMA BMMSC 原代培养及形态鉴定

Note. A. Morphology of primary cells (P0) and third-generation cells (P3) and resuscitation cell after freezing. B. Identification of characteristic molecules on the surface of BMMSC by immunofluorescence.

Figure 1 Primary culture and morphological identification of SMA BMMSC



注:A:PCR 及酶切后电泳结果;FL:Full-length;Δ7:exon 7-skipped;B:A 的定量分析;C:蛋白印迹结果;D:C 的定量分析;与 NC 组相比,** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 2 转染 ASO 后 SMN2 exon7 列入水平及 SMN 蛋白表达情况

Note. A. Electrophoresis results after PCR and restriction digestion. FL. Full-length. Δ7. exon 7-skipped. B. Quantitative analysis of A. C. Western Blot results. D. Quantitative analysis of C. Compared with the NC group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

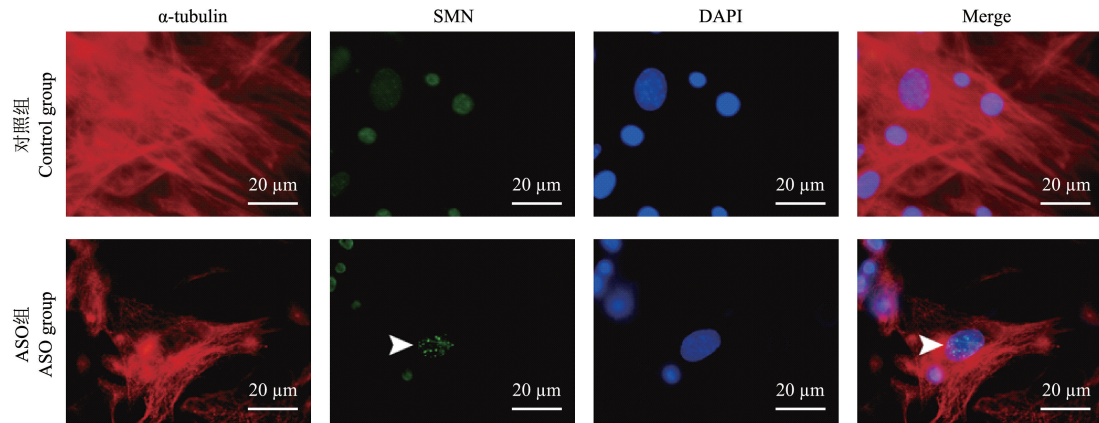
Figure 2 SMN2 exon7 inclusion level and SMN protein expression after ASO transfection

2.3 ASO 促进细胞核内 Gemini bodies (gems) 数量明显增多

通过细胞免疫荧光实验,以 Anti-SMN/Gemin1 标记绿色荧光,DAPI 标记蓝色荧光, α -Tubulin 标记红色荧光。实验组与对照组相比细胞核内 Gemini bodies 数量显著增多($P < 0.05$) (见图 3)。

2.4 ASO 显著促进 SMA BMMSC 细胞增殖能力而不影响其凋亡

免疫荧光实验结果表明:实验组与对照组相比 EDU 标记的细胞核数量显著增加 ($n = 5, P < 0.05$) (见图 4A,图 4B),表明 ASO 促进 SMA 模型小鼠 BMMSC 细胞增殖。实验组与对照组 TUNEL 标记的细胞核数量没有差异,不具有统计学意义 ($n = 5, P > 0.05$) (见图 4C,图 4D),表明 ASO 不影响 SMA 模型小鼠 BMMSC 细胞凋亡。

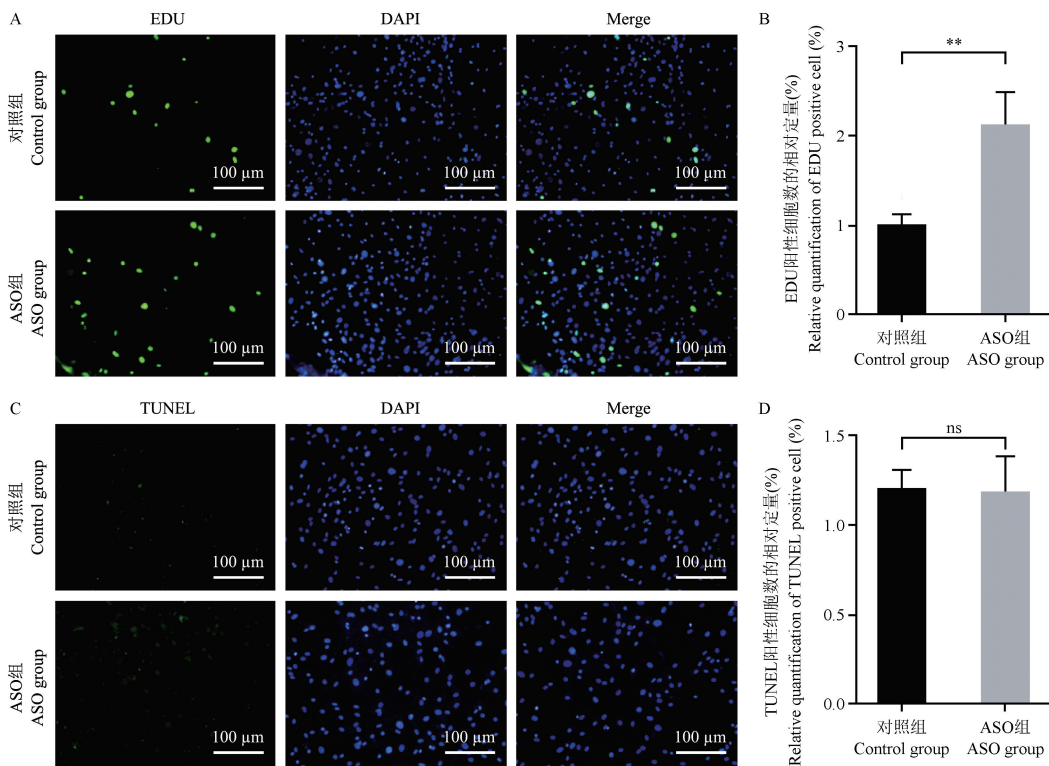


注:细胞免疫荧光检测对照组与实验组细胞核内 Gemini 小体数量,α-tubulin 标记细胞骨架,箭头所指示即为 Gemini 小体。

图 3 转染 ASO 后细胞免疫荧光观察核内 SMN 蛋白表达情况(n=5)

Note. Cellular immunofluorescence was used to detect the number of Gemini bodies in the nucleus of the control group and the experimental group, and α-tubulin labeled the cytoskeleton. The arrow indicates the Gemini body.

Figure 3 Observation of SMN protein expression in the nucleus by immunofluorescence after ASO transfection(n=5)



注:A:EDU 细胞增殖实验;B:A 的相对定量分析;C:TUNEL 细胞凋亡实验;D:C 的相对定量分析。EDU 和 TUNEL 绿色荧光标记。

图 4 转染 ASO 后 EDU 法和 TUNEL 法检测 SMA BMMSC 增殖和凋亡情况

Note. A. EDU cell proliferation experiment. B. Relative quantitative analysis of A. C. TUNEL cell proliferation experiment. D. Relative quantitative analysis of C. EDU and TUNEL were labeled with green fluorescence.

Figure 4 Detection of proliferation and apoptosis of SMA BMMSC by EDU and TUNEL after ASO transfection

3 讨论

SMA 患者的致病基因是位于 5 号染色体上的运动神经元存活 1 基因 (survival motor neuron 1, *SMN1*), 它发生病变导致 SMA 疾病的发生^[15]。*SMN2* 作为 *SMN1* 的同源基因, 其外显子 7 的第六位碱基发生突变, 使得外显子 7 不能正常列入, 导致编码产生的仅大约 10% 为有功能的 SMN 全长蛋白, 用来维持 SMA 患者的生存^[16]。目前新生儿中该疾病缺陷基因携带者占 1/40 ~ 60^[17], 占比较多的一类 SMA 患者, 存活不超过 2 周岁^[18]。

研发 SMA 疾病相关药物对于治疗 SMA 疾病至关重要, 目前主要将 SMA 疾病模型小鼠作为体内药物研发的载体, 直接在 SMA 疾病模型小鼠体内进行试验^[4, 19], 成本高, 工作繁琐。但是构建的 SMA 转基因小鼠, 由于本身 SMN 基因缺失, 仅有 2 个拷贝的 *SMN2*, 产生的 SMN 蛋白极少^[14], 神经系统及外周神经系统功能发生异常, 小鼠出生后状态逐渐变差, 10 d 左右死亡^[20], 因此用于发病机制研究和药物筛选比较困难。

那么, 探索一种疾病动物细胞模型用于研发 SMA 疾病相关药物至关重要。本研究前期曾尝试 SMA 小鼠其他组织细胞进行体外培养, 但由于不能传代、冻存等原因而放弃。骨髓间充质干细胞具有贴壁生长、增殖能力强、分化程度低等优点, 目前已广泛用于各种疾病的研究, 特别是在一些神经退行性疾病例如帕金森^[21]、阿尔兹海默症^[22]等已有相关报道。同时, 骨髓间充质干细胞在大鼠^[10]、小鼠^[23]、猪^[24]等动物以及人^[25]已有相关报道。本研究通过构建 SMA 模型小鼠 BMMSC 培养体系, 在体外实验上对药物进行初步筛选、验证。骨髓间充质干细胞来源于骨髓, 具有间充质干细胞的特性, 不属于造血干细胞^[8]。通过细胞免疫荧光实验检测其细胞表面标志物表达情况。结果发现 BMMSC 高表达骨髓间充质干细胞表面标志物 CD44、CD29, 并不表达或低表达造血细胞的表面标志物 CD45、CD34。本研究表明: 所提取、分离、纯化的 SMA 模型小鼠 BMMSC 具有贴壁生长、可以传代等特点, 同时具有骨髓间充质干细胞的特性。同时所提取的 BMMSC 来源于 SMA 模型小鼠, 这是体外最真实的模。其本身具有 SMA 疾病的特征: *SMN2* exon7 列入水平以及 SMN 蛋白表达均较低。因此, 可初步将其作为体外研究 SMA 疾病的载体细胞。

目前已合成了一些药物如 Spinrazas^[26]、Zolgensma^[27]、Evrysdi^[28]、Apitegromab^[29] 等已用于治疗 SMA 疾病。其中 Spinrazas 是第一款被用于 SMA 疾病治疗的药物, 该药是一种反义寡核苷酸, 通过侧脑室注射给药方式进行治疗^[30]。它通过与 *SMN2* 内含子 7 上的 ISS (intron splicing silencer, 内含子剪接沉默子) 序列结合, 进而使剪接沉默子不能与 ISS 序列结合, 使内含子 7 发生正常剪接过程, 从而使 *SMN2* exon7 正常的列入, 增加有功能性 SMN 全长蛋白的数量^[4]。ASO10-29 是一种反义寡核苷酸^[14], 与 Spinrazas 相似, 可作为治疗 SMA 相关模型的阳性对照药物。本研究发现经 ASO10-29 治疗后 *SMN2* exon7 列入显著上升以及 SMN 蛋白表达显著上调。同时, 通过凋亡和增殖实验发现: ASO10-29 不影响 SMA 模型小鼠 BMMSC 凋亡, 却促进 SMA 模型小鼠 BMMSC 细胞增殖。表明本研究建立的 SMA BMMSC 是一种体外研究 *SMN2* 基因功能或药物筛选的最佳工具细胞。

本研究从 SMA 小鼠自体所提取、分离培养并鉴定的 BMMSC, 具有贴壁生长、获得简便以及可传代的优点, 且 ASO 能够通过上调 BMMSC 细胞 *SMN2* FL 基因和 SMN 蛋白, 促进其增殖。因此, 该 BMMSC 可用于研究 *SMN2* 基因相关分子机制, 以及药物前期大量初筛, 具有广泛的临床前期应用价值。

参 考 文 献 (References)

- [1] Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy [J]. *Neurol Clin*, 2015, 33(4): 831-846.
- [2] Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of > 72,400 specimens [J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20(1): 27-32.
- [3] Hua Y, Sahashi K, Hung G, et al. Antisense correction of *SMN2* splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(15): 1634-1644.
- [4] Hua Y, Sahashi K, Rigo F, et al. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model [J]. *Nature*, 2011, 478(7367): 123-126.
- [5] Zhou M, Hu Z, Qiu L, et al. Seamless genetic conversion of *SMN2* to *SMN1* via CRISPR/Cpf1 and single-stranded oligodeoxynucleotides in spinal muscular atrophy patient-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(11): 1252-1263.
- [6] Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient [J]. *Nature*, 2009, 457(7227): 277-280.
- [7] Ovechkina VS, Maretina MA, Egorova AA, et al. Generation of a spinal muscular atrophy type III patient-specific induced

- pluripotent stem cell line ICGi003-A [J]. *Stem Cell Res*, 2020, 48: 101938.
- [8] 李建国, 颀孙永勋, 冉丕鑫, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(12): 28-31.
- Li JG, Zhuan SYX, Ran PX, et al. Isolation, culture and identification of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow [J]. *Chin J Comp Med*, 2008, 18(12): 28-31.
- [9] Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, et al. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1370(1): 109-118.
- [10] 赵宣淇, 张钰, 秦川, 等. 神经营养因子-3 基因修饰的骨髓间充质干细胞和水凝胶联合应用对脊髓损伤模型大鼠的治疗作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(7): 1-12.
- Zhao XQ, Zhang Y, Qin C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells modified with the neurotrophic factor-3 gene combined with hydrogels for the treatment of spinal cord injury in rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2008, 18(12): 28-31.
- [11] Abou Nader Z, Espéli M, Balabanian K, et al. Culture, expansion and differentiation of mouse bone-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2308: 35-46.
- [12] Oostendorp RA, Spitzer E, Reischbach G, et al. Antibodies to the beta 1-integrin chain, CD44, or ICAM-3 stimulate adhesion of blast colony-forming cells and may inhibit their growth [J]. *Exp Hematol*, 1997, 25(4): 345-349.
- [13] Guo W, Spiller KV, Tang J, et al. Hypoxia depletes contaminating CD45⁺ hematopoietic cells from murine bone marrow stromal cell (BMSC) cultures; methods for BMSC culture purification [J]. *Stem Cell Res*, 2021, 53: 102317.
- [14] Sheng L, Wan B, Feng P, et al. Downregulation of survivin contributes to cell-cycle arrest during postnatal cardiac development in a severe spinal muscular atrophy mouse model [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(3): 486-498.
- [15] Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3 [J]. *Nature*, 1990, 344(6266): 540-541.
- [16] Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, et al. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57(4): 805-808.
- [17] Prior TW. Professional practice and guidelines committee. carrier screening for spinal muscular atrophy [J]. *Genet Med*, 2008, 10(11): 840-842.
- [18] Farrar MA, Vucic S, Johnston HM, et al. Pathophysiological insights derived by natural history and motor function of spinal muscular atrophy [J]. *J Pediatr*, 2013, 162(1): 155-159.
- [19] Bebee TW, Dominguez CE, Chandler DS. Mouse models of SMA: tools for disease characterization and therapeutic development [J]. *Hum Genet*, 2012, 131(8): 1277-1293.
- [20] Wan B, Feng P, Guan Z, et al. A severe mouse model of spinal muscular atrophy develops early systemic inflammation [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(23): 4061-4076.
- [21] 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.
- [22] Ramezani M, Komaki A, Hashemi-Firouzi N, et al. Therapeutic effects of melatonin-treated bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) in a rat model of Alzheimer's disease [J]. *J Chem Neuroanat*, 2020, 108: 101804.
- [23] Jin J, Ou Q, Wang Z, et al. BMSC-derived extracellular vesicles intervened the pathogenic changes of scleroderma in mice through miRNAs [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 327.
- [24] Shi D, Zhang J, Zhou Q, et al. Quantitative evaluation of human bone mesenchymal stem cells rescuing fulminant hepatic failure in pigs [J]. *Gut*, 2017, 66(5): 955-964.
- [25] Li S, Stöckl S, Lukas C, et al. Curcumin-primed human BMSC-derived extracellular vesicles reverse IL-1 β -induced catabolic responses of OA chondrocytes by upregulating miR-126-3p [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 252.
- [26] Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense oligonucleotide therapies for neurodegenerative diseases [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2019, 42: 385-406.
- [27] Menduti G, Rasà DM, Stanga S, et al. Drug screening and drug repositioning as promising therapeutic approaches for spinal muscular atrophy treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 592234.
- [28] Singh RN, Ottesen EW, Singh NN. The first orally deliverable small molecule for the treatment of spinal muscular atrophy [J]. *Neurosci Insights*, 2020, 15: 2633.
- [29] Barrett D, Bilic S, Chyung Y, et al. A randomized phase 1 safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the novel myostatin inhibitor apitegromab (SRK-015): a potential treatment for spinal muscular atrophy [J]. *Adv Ther*, 2021, 38(6): 3203-3222.
- [30] Neil EE, Bisaccia EK. Nusinersen: a novel antisense oligonucleotide for the treatment of spinal muscular atrophy [J]. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2019, 24(3): 194-203.

[收稿日期] 2021-11-06