

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000369

胚胎中脑神经干细胞的培养及分化条件探讨

晋贞超¹, 邓小兰¹, 刘品月¹, 袁莉¹, 姜蓉¹, 王健², 王亚平¹, 郑敏¹

(1. 重庆医科大学干细胞与组织工程研究所干细胞研究平台, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第二医院神经内科, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的培养方法以及各种条件对 NSCs 生长状况的影响。**方法:**取 SD 大鼠胚胎中脑, 在含细胞因子碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和内皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)的无血清培养基中培养扩增, 得到的神经球用神经巢蛋白 nestin 抗体鉴定和 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxy uridine, Brdu)掺入检测增殖能力。血清诱导分化后用免疫荧光做星形胶质细胞酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和神经元特异性Ⅲ型微管蛋白(neuron-specific class Ⅲ β -tubulin, β -Ⅲ-tublin)的双标检测。研究进一步观察了细胞因子 bFGF 和 EGF 单用及合用对克隆形成数量的影响及不同接种密度和白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)对细胞生长的影响。**结果:**神经球 nestin 免疫荧光表达显示强阳性; Brdu 掺入实验显示神经球细胞具有很好的增殖能力; 分化后免疫双标结果得到了 GFAP(68.32 ± 5.70)%和 β -Ⅲ-tublin(21.65 ± 3.40)%的阳性表达; 当 2 种因子同时存在时细胞克隆数量优于单因子作用组($P < 0.05$, 与 EGF 组比较; $P < 0.01$, 与 bFGF 组比较); 与对照组比较 LIF 作用组细胞数量明显增多($F = 2\ 630.114$, $P = 0.000$); 细胞接种密度对神经球的数量有明显影响($F = 155.100$, $P = 0.001$), 在 $(0.5 \sim 16.0) \times 10^5$ 个/ml 密度范围内, 神经球数量随着接种密度增加而增加。**结论:**bFGF 和 EGF 2 种细胞因子对 NSCs 的生长是必须的; 长期传代过程中 LIF 能促进 NSCs 的生长; NSCs 生长有密度依赖性, 但接种密度应该控制在适宜范围内。

【关键词】神经干细胞; 细胞培养; 分化; 白血抑制因子**【中图分类号】**Q254; Q246**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-08-29

Investigation on cultural conditions of neural stem cells from embryonic midbrain

Jin Zhenchao¹, Deng Xiaolan¹, Liu Pinyue¹, Yuan Li¹, Jiang Rong¹, Wang Jian², Wang Yaping, Zheng Min¹

(1. Institute of Stem Cells and Tissue Engineering, Chongqing Medical University;

2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the cultural condition of neural stem cells(NSCs) from embryonic midbrain. **Methods:** Midrains of embryonic SD rice(12.5 d) were used. Cells were maintained and expanded in the medium with serum-free supplement containing basic fibroblast growth factor(bFGF) and epidermal growth factor(EGF). The cultured neurospheres were identified by neuroepithelial stem cell protein(nestin). 5-bromodeoxyuridine(Brdu) was added into the medium to see the proliferative ability. Differentiation of cultured NSC was checked by immunocytochemistry to see the expression of glial fibrillary acidic protein(GFAP), and β -Ⅲ tublin. Clone forming of different cell densities was checked. The effects of separated and combined use of FGF and EGF on cell growth were investigated. Effect of different inoculation density $(0.5 \sim 16.0) \times 10^5$ /ml and leukemia inhibitory factor(LIF) on cell growth was also taken into consideration. **Results:** The cultured neurospheres positively expressed nestin. Brdu tests showed that most NSC in neurospheres had proliferative capacity. After differentiation, NSCs differentiated into cells expressing GFAP(68.32 ± 5.70)% or β -Ⅲ tublin(21.65 ± 3.40)%. Cell clone numbers were higher in EGF and bFGF combined use group than in separated use group($P < 0.05$, compared with those of EGF group; $P < 0.01$, compared with those of bFGF group). Number of cells was significantly increased in LIF group than in control group($F = 2\ 630.114$, $P = 0.000$). The results of different inoculation density showed that cell density had significant impact on the number of neural spheres($F = 155.100$, $P = 0.001$). The number of neural spheres increased within the inoculation

density from 0.5×10^5 /ml to 16.0×10^5 /ml. **Conclusion:** Cytokines bFGF and EGF is necessary for the growth of NSCs. LIF promotes the growth of NSCs during long-term culture. In a suitable range, NSCs clone forming shows density-dependent.**【Key words】**neural stem cells; cell culture; differentiation; leukemia inhibitory factor

作者介绍: 晋贞超, Email: 382251826@qq.com,

研究方向: 神经生物学。

通信作者: 郑敏, Email: zmdwj625@gmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 31100985); 重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2010BB5096)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1505.005.html>

(2014-07-15)

研究证实,在胚胎脑和成年脑内均存在具有自我更新能力和多项分化潜能的神经干细胞(neural stem cells, NSCs)^[1],能分化产生神经元和神经胶质细胞。胚胎期的一部分神经干细胞以非增殖的静态方式长期存在于神经系统中。神经干细胞的体外获取可通过直接从神经组织分离培养、其他来源多能干细胞诱导分化、永生化的神经干细胞 3 种途径实现^[2]。培养方法有悬浮和贴壁 2 种,而悬浮法是最常用的方法^[3]。现在如何获得具有较好增殖能力、低密度成球和能够反复进行传代的 NSCs 仍是困扰 NSCs 研究的基本问题。胚胎期神经干细胞具有显著的长期增殖潜能,在培养中能提供无限增殖的可能^[4],因此本研究借鉴传统培养方法^[5-7],选定 12.5 d SD 胚胎大鼠中脑作为细胞来源,除观察了碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和内皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)单独作用与合用的促增殖效果,还观察了胚胎干细胞生长必须的白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)因子和不同接种密度对 NSCs 生长的影响,力求探索出 NSCs 培养的最适方法和最佳生长条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 普通清洁级 SD 大鼠(250 ± 20)g 5 只,孕龄 12.5 d,由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12(Hyclone);B27(Gibco,美国);bFGF(Sigma,美国);EGF(Sigma,美国);DNase I (Sigma,美国);胰蛋白酶(Hyclone);HBSS(重庆惠而利生物技术有限公司);PBS(重庆惠而利生物技术有限公司粉剂自配);5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxy uridine, Brdu)(Sigma,美国);台盼蓝(Sigma,美国);多聚赖氨酸(Sigma,美国);胎牛血清(杭州四季青公司);LIF(Sigma,美国);山羊血清封闭液(北京中山金桥生物制品公司);兔抗鼠单克隆抗体:nestin (Chemicon,美国)、神经元特异性Ⅲ型微管蛋白(neuron-specific class Ⅲ β -tubulin, β -Ⅲ-tublin)(Chemicon,美国)、星形胶质细胞酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)(武汉三鹰生物技术有限公司);山羊抗兔单克隆荧光二抗:3H-吖啶菁类染料-CY3(北京中山金桥生物制品公司);异硫氰酸荧光素-FITC(北京中山金桥生物制品公司);DAPI(4',6-di-amidino-2-phenylindole, Beyotime 公司,美国);Alarma blue (Promega,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 神经前体细胞的培养 怀孕 12.5 d 的孕鼠,水合氯醛深度麻醉,无菌操作的条件下,剪开母鼠腹部,取出胎鼠。开颅摘取胚鼠脑,HBSS 液冲洗几次后切取中脑部位剪碎,加入 0.125%胰蛋白酶消化 30 min。用含 10%牛血清 DMEM/F12

中止反应之后加入 0.01% DNase I,吸管轻柔吹打成单细胞悬液,离心(200 × g, 5 min)后去上清,用 NSCs 培养基:DMEM/F12(1:1)、2% B27、20 ng/ml bFGF 和 20 ng/ml EGF 重悬细胞,用台盼蓝染色后计数细胞,按 5×10^5 个/ml 接种至 10 ml 培养瓶中,放入 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养,2 d 半量换液 1 次,5 ~ 7 d 全量换液 1 次,待原代克隆形成由数百个细胞聚集成的球团时,再次分离克隆制成单细胞悬液,按 5×10^5 个/ml 接种培养。此后每 5~7 d 机械分离克隆传代 1 次,方法同前。

1.2.2 神经球免疫检测

1.2.2.1 Brdu 检测细胞增殖能力 培养的 NSC 神经球在培养基加入 Brdu 培养使终浓度为 1 mg/ml 作用 24 h 后转移至有多聚赖氨酸涂布盖玻片的 6 孔培养板里,贴壁 2 h 后取出爬片,室温下干燥后用 4%多聚甲醛固定 30 min,先用 0.01 mol/L 柠檬酸 65 °C 处理 1 h, Triton-100X 处理 10 min,冷 0.1 mol/L 盐酸处理 10 min,2 mol/L 盐酸 37 °C 处理 30 min,山羊血清封闭液封闭 30 min 后加入 Brdu 一抗(1:100),4 °C 过夜,第 2 天 37 °C 复温 1 h, PBS 清洗 3 遍后加入荧光二抗 CY3, 40 min 后清洗,再用 DAPI 复染细胞核,封片后用荧光显微镜观察。所有细胞核均应被 DAPI 染成蓝色荧光,增殖中的细胞核同时呈现 Brdu 掺入后的红色荧光。

1.2.2.2 Nestin 免疫荧光检测 NSC 神经球接种于 6 孔板中爬片后取出固定 30 min,用山羊血清封闭 30 min 后直接加 Nestin 一抗,其他步骤同上。荧光显微镜观察细胞胞浆应呈 Nestin 表达的红色荧光,胞核呈 DAPI 的蓝色荧光。

1.2.3 不同细胞种植密度对原代克隆形成的影响 原代培养中,将细胞以 0.5×10^5 、 1×10^5 、 2×10^5 、 4×10^5 、 8×10^5 、 1.6×10^6 个/ml 的不同密度分组接种于 24 孔板中,分别计数克隆形成数。

1.2.4 不同细胞因子对原代克隆形成的影响 原代培养中,将细胞以 5×10^5 个/ml 接种后,分为 4 组,分别为不加因子组、bFGF 20 ng/ml 组、EGF 20 ng/ml 组、bFGF 20 ng/ml+EGF 20 ng/ml 组,培养 7 d 后分别计数克隆形成数和测定细胞数量。

1.2.5 LIF 对 NSCs 的扩增作用 研究考察了 LIF 对 NSCs 增殖的影响作用。将细胞分为 LIF 组和无 LIF(对照)组, LIF 组中加入 5 ng/ml 的 LIF,分别在原代 P0、培养第 1 代 P1、P2、P3、P4、P5、P6 代计数 NSCs 扩增倍数。

1.2.6 克隆诱导分化 原代培养的 NSC 神经球经以 2×10^5 个/ml 浓度种植于预先置有多聚赖氨酸涂布盖玻片的 6 孔培养板里,并加入含血清培养基(5%的胎牛血清+DMEM/F12),培养 5~7 d 后取出爬片,4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗后山羊血清封闭液封闭 30 min,加一抗 β -Ⅲ-tublin(1:100)后 4 °C 过夜,第 2 天 37 °C 复温 1 h, PBS 清洗 3 遍后加 CY3 红色荧光二抗 37 °C, 40 min, PBS 清洗 3 遍后加 GFAP(1:100)后 4 °C 过夜,第 2 天 37 °C 复温 1 h, PBS 清洗 3 遍后加 FITC 绿色荧光二抗 37 °C, 40 min, PBS 清洗 3 遍后 DAPI 复染细胞核 5 min 后清洗封片,荧光显微镜下观察记录结果。结果预期在同一视野下可见不同形态细胞在红色和蓝色荧光下胞浆呈现不同的荧光颜色。

1.3 统计学处理

采用统计分析软件 SPSS 19.0 进行统计分析。所得实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。种植密度对克隆形成的影响、细胞因子对增殖的影响组间比较采用单因素方差分析, LIF 作用组间采用重复测量资料的方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 克隆分析

原代培养细胞在无血清培养基中生长 2 d 后一部分细胞死亡, 部分细胞分裂形成 2~4 个细胞的细胞团, 随着时间的推移细胞数目迅速增加, 到 7 d 时生长成为数十个细胞到数百个细胞的集落, 成悬浮球形生长, 细胞形态规则, 未见明显的突起(图 1)。

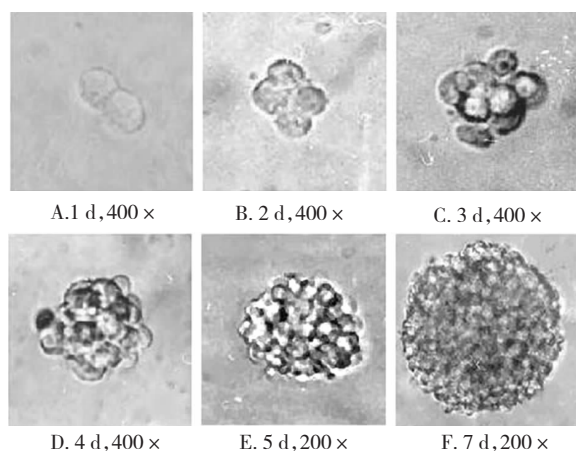


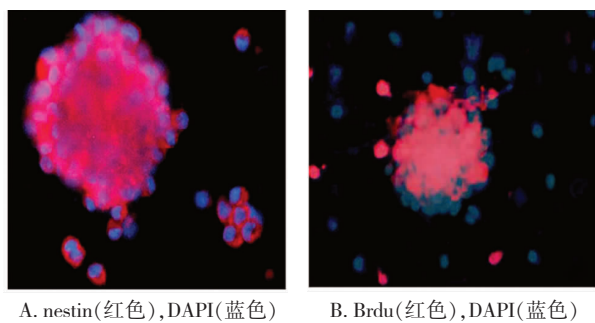
图 1 NSC 单细胞克隆实验

Fig.1 NSC single cell cloning experiments

传代培养中形成的克隆与原代培养相似, 采用有限稀释法标记仅有 1 个细胞的培养孔并动态观察。在原代培养中克隆形成率约为 2%, 而次代克隆及随后的亚克隆中克隆形成率则明显升高, 在 20%~40% 之间, 10 代后的细胞仍具有克隆能力。

2.2 nestin 表达和增殖能力检测结果

贴壁 2 h 的细胞 nestin 免疫荧光染色结果显示 nestin 强阳性(图 2A)。BrdU 检测神经球增殖能力结果显示 NSCs 具有较强的增殖能力(图 2B)。



A. nestin(红色), DAPI(蓝色)

B. BrdU(红色), DAPI(蓝色)

图 2 培养 7 d 的 NSCs (400 $\times$)

Fig.2 NSCs cultured for 7 d (400 $\times$)

2.3 不同细胞种植密度对克隆形成的影响结果

以不同密度接种细胞, 结果见表 1。结果显示细胞密度对于神经球的数量有明显影响 ($F=155.100, P=0.001$)。

表 1 不同细胞种植密度的克隆形成数量 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab.1 Clone forming in different cell densities ($\bar{x} \pm s, n=4$)

细胞密度 ($\times 10^5/\text{ml}$)	形成克隆数量
0.5	5 ± 2
1	22 ± 5
2	75 ± 12
4	200 ± 26
8	426 ± 52
16	508 ± 60

2.4 细胞因子对克隆形成的影响

不用细胞因子组细胞大量死亡或不增殖, 单用 EGF 和 bFGF 对 NSCs 都有增殖促进作用, 能形成神经球, EGF 作用较强, 而二者合用效果更加明显, 形成神经球的数量、大小优于单用组和不用组。用 Alarma blue 测细胞增殖情况, 统计分析显示存在统计学差异 ($F=45.840, P=0.000$)。作用 7 d 后合用细胞因子组测得 OD 值为 0.97 ± 0.10 , 较 bFGF 单用组 (0.48 ± 0.05), 明显增加 ($P=0.010$), 较 EGF 单用组 (0.77 ± 0.06) 有所增加 ($P=0.028$)。见图 3。

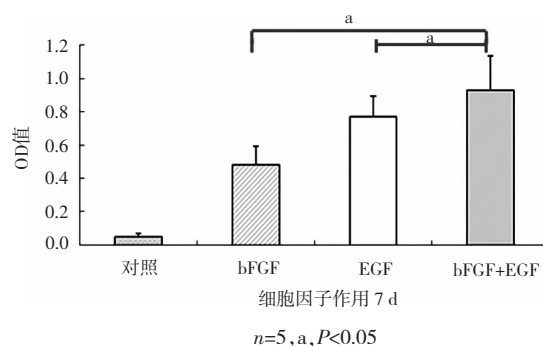


图 3 细胞因子对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.3 Effects of different cytokines on cell proliferation ($\bar{x} \pm s$)

2.5 LIF 对 NSCs 作用结果

LIF 对细胞扩增倍数的影响结果见图 4。统计分析显示 LIF 组和对照组间细胞扩增倍数具有统计学差异 ($F=2630.114, P=0.000$)。其中 P6 LIF 组 (27.06 ± 1.44) 与对照组 (6.28 ± 0.79) 比较, $P=0.000$ 。

2.6 NSCs 诱导分化结果

原代克隆及其亚克隆 NSCs 贴壁 2~4 h 后即发现有突起从团块边缘长出, 2 d 后即有不同形态的细胞从克隆周围出现, 7 d 后出现大量不同形态的新生神经细胞。免疫荧光双标检测到 β -III-tubulin 和 GFAP 阳性细胞(图 5), 证实了 NSCs 分化后形成了神经元和胶质细胞, 随机选择 5 个视野进行计数。 β -III-tubulin+阳性率为 (21.65 ± 3.40)%, GFAP 阳性率为 (68.32 ± 5.70)%, β -III-tubulin+GFAP+细胞比例约为 1:3.2。

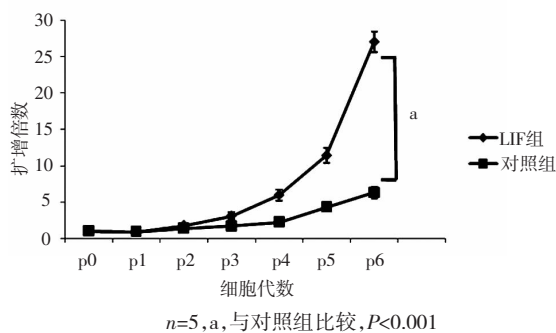
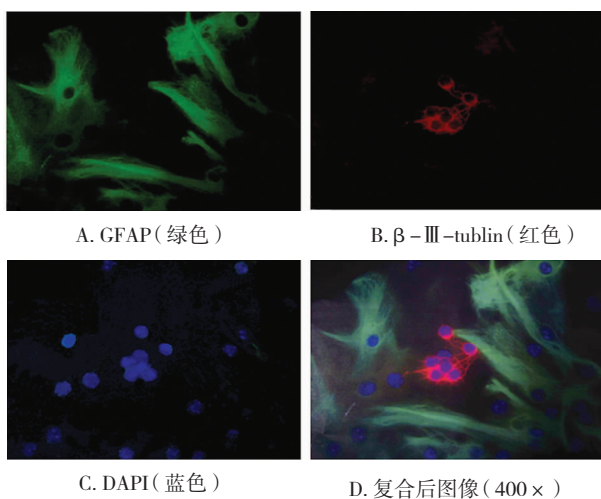
图4 LIF对NSCs生长的影响($\bar{x} \pm s$)Fig.4 Effects of LIF on the growth of NSCs ($\bar{x} \pm s$)

图5 NSCs诱导分化后表达

Fig.5 Expression of NSCs after the induced differentiation

3 讨论

NSCs能分化为神经元和胶质细胞,能以细胞替代和营养支持的方式给予机体自我更新的能力,也能有效地分化为机体所需的细胞类型。干细胞移植可以帮助克服神经组织本身的缺陷,代替失去的元素,并能分泌一些有用的因子,提供宿主细胞营养支持,是未来细胞替代治疗中枢神经系统疾病的理想种子细胞^[8]。探讨 NSCs 的培养条件可以为其深入研究打下基础。

为排除多细胞聚集的可能性,本研究采用了单细胞克隆的方法证明单个细胞能够分裂增殖成为克隆。克隆形成实验表明一个克隆中部分细胞不可避免死亡和分化(可能为祖细胞和成熟细胞),但仍有 20%~40%的细胞具有克隆能力,表明这部分细胞具有自我更新能力。连续传代结果同样证明了NSCs的克隆能力。自我更新和多向分化潜在在 NSCs 鉴定中发挥重要作用且比其他属性更为可靠^[9]。获得

的 NSCs 用 Brdu 免疫荧光检测,结果证明得到的细胞具有很强的增殖能力。诱导分化后,使用免疫双标染色证明了克隆细胞具有分化为神经元、星形胶质细胞的能力,并得到了神经元和胶质两个方向的分化。特异性抗原 nestin 的表达起始于神经板的形成,在神经迁移及神经分化开始后逐渐消失。本研究获得的 NSCs 免疫荧光结果显示 nestin 的强阳性,说明细胞处于神经干细胞阶段。

既往研究发现低密度接种不能形成 NSCs 的有效增殖,其存活与生长需要一定的细胞密度支持,因此本研究以不同细胞密度接种观察克隆形成,结果显示以 $(2\sim8) \times 10^5$ 个/ml 密度接种最佳,过高并不能带来克隆形成的成倍增加。用不同细胞因子培养神经球结果显示,合用时培养 7 d 后 NSCs 的 OD 值明显高于单因子的作用,说明神经球的快速增殖在这两种因子同时存在时结果明显高于单因子作用。这可能与 EGF 和 bFGF 受体在干细胞发育中出现的时间不一致,单用一种因子可能只能对出现特异受体阶段的干细胞的增殖起作用,合用时则可以动员不同阶段的干细胞有关。

本研究还观察了 LIF 在培养中对 NSCs 增殖的作用。LIF 的生物学功能是抑制胚胎干细胞分化,是胚胎干细胞培养中不可缺少的因子。有研究发现在血清环境中 LIF 能明显抑制神经干细胞的自发分化,并维持其多能性^[10-11]。而在 NSCs 连续传代培养中加入 LIF 结果显示,40 d 以前,LIF 组和对照组无太大区别,40 d 后 LIF 组细胞克隆数增加的速度明显高于对照组,说明 LIF 能加快 NSCs 增殖速度,提高其长期增殖能力,这可能与 LIF 抑制分化并保持干细胞特性有关。

NSCs 的出现为神经退行性疾病如帕金森病、阿尔海默病的功能重建带来了希望,无论是作为脑组织移植的供体,还是作为体内诱导分化的靶细胞,NSCs 都为中枢神经系统功能重建和神经再生提供了一条新的途径。NSCs 的体外培养是对其进行深入研究的基础,本实验对 NSCs 的培养条件进行了有意义的探讨,为取得更好的 NSCs 培养效果提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] Robertson MJ, Gipp P, Schaffer DV. Neural stem cell engineering: directed differentiation of adult and embryonic stem cells into neurons [J]. Front Biosci, 2008(13): 21-50.
- [2] 王霞, 韦霄, 郑唯, 等. 大鼠胚胎脑新皮质神经干细胞的体外分离培养方法研究[J]. 卫生研究, 2010, 3(6): 674-681.

神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000341

EV71 入侵人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞机制的初步研究

郭晓丽, 刘泉波, 张祯祯, 毛华伟

(重庆医科大学附属儿童医院感染科、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:初步研究肠道病毒 71 型(enterovirus type 71, EV71)入侵人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的机制。**方法:**将临床 EV71 分离株接种于人横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RD)细胞, 扩增和纯化病毒; MTT 法检测不同病毒胞吞途径阻断剂对 SK-N-SH 细胞生长抑制作用; 用特异性的化学阻断剂预处理靶细胞后, TaqMan real-time PCR 验证其对 EV71 mRNA 表达的影响。**结果:**RD 细胞能够成功扩增出 EV71 病毒, 病毒滴度为 1×10^5 TCID₅₀。随着药物浓度梯度的增加, SK-N-SH 细胞的生长增殖受到抑制。TaqMan 荧光定量 RT-PCR 结果显示氯丙嗪(chlorpromazine, CPZ)能够抑制 EV71 mRNA 的表达($P < 0.05$), 制霉菌素(nystatin, NT)对其影响不大($P > 0.05$)。**结论:**初步推测 EV71 入侵 SK-N-SH 细胞是通过网格蛋白依赖性的内吞作用入胞。

【关键词】肠道病毒 71 型; 人神经母细胞瘤细胞; 网格蛋白; 内吞途径

【中图分类号】R373.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-02-13

Mechanism of enterovirus 71 entering into human neuroblastoma cells

Guo Xiaoli, Liu Quanbo, Zhang Zhenzhen, Mao Huawei

(Department of Infection, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To research the mechanism of enterovirus type 71 (EV71) entering into human neuroblastoma SK-N-SH cells.

作者介绍:郭晓丽, Email: guoxiaoli912@sina.com,

研究方向: EV71 入侵易感宿主细胞机制的研究。

通信作者:刘泉波, Email: Liuqb1223@sina.com。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2012jjA0160)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1506.006.html>
(2014-06-09)

Methods: The clinical EV71 isolates were inoculated from human rhabdomyosarcoma (RD) cells for amplifying and purifying virus. MTT assay was conducted to detect the effect of different virus endocytosis blockers on inhibition of SK-N-SH cells. The impact of target cells SK-N-SH on EV71 mRNA

[3] Rafael AI, Almeida A, Santos P, et al. A role for transforming growth factor-beta apoptotic signaling pathway in liver injury induced by ingestion of water contaminated with high levels of Cr(VI)[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 224(2): 163-173.

[4] Bifari F, Pacelli L, Krampera M. Immunological properties of embryonic and adult stem cells[J]. World J Stem Cells, 2010, 2(3): 50-60.

[5] Santa-Olalla J, Covarrubias L. Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), and basic fibroblast growth factor (bFGF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon[J]. J Neurosci Res, 1995, 42(2): 172-183.

[6] Bithell A, Finch SE, Hornby MF, et al. Fibroblast growth factor 2 maintains the neurogenic capacity of embryonic neural progenitor cells in vitro but changes their neuronal subtype specification[J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2008, 26(6): 1565-1574.

[7] Vergaño-Vera E, Méndez-Gómez HR, Hurtado-Chong A, et al.

FGF-2 increases the expression of neurogenic genes and promotes the migration and differentiation of neurons derived from transplanted neural stem/progenitor cell[J]. Neuroscience, 2009, 162(1): 39-54.

[8] De Feo D, Merlini A, Laterza C, et al. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection[J]. Curr Opin Neurol, 2012, 25(3): 322-333.

[9] Deleyrolle LP, Rietze RL, Reynolds BA. The neurosphere assay, a method under scrutiny[J]. Acta Neuropsychiatrica, 2008, 20(1): 2-8.

[10] Hanington PC, Patten SA, Reaume LM, et al. Analysis of leukemia inhibitory factor and leukemia inhibitory factor receptor in embryonic and adult zebrafish (Danio rerio)[J]. Dev Biol, 2008, 314(2): 250-260.

[11] 刘建新, 郝晓柯, 王瑞安, 等. 白血病抑制因子对体外培养神经干细胞影响的试验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1248-1250.

(责任编辑: 冉明会)