

人诱导多能干细胞向外周神经元分化的实验研究

林婉颐, 黄利华, 周立文, 石 翾, 赖兴强, 李伟强*
(中山大学干细胞与组织工程研究中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨人诱导多能干细胞(hiPS 细胞)在体外向外周神经元分化的能力。【方法】人诱导多能干细胞在无饲养层培养条件下维持培养,然后在神经培养基中悬浮培养分化为神经球,通过把神经球贴壁在多聚赖氨酸和层粘连蛋白包被的培养板上,利用流式分选细胞方法获得神经嵴干细胞(NCSC),通过把神经嵴干细胞在外周神经诱导培养基中诱导分化,获得外周神经元,利用免疫荧光染色的方法检测神经嵴干细胞和外周神经元的标记物。【结果】贴壁的神神经球出现特征性的神经花环(Neural rosettes)结构,神经嵴干细胞从神经花环发生迁移;神经嵴干细胞向外周神经元诱导后出现神经丝结构,并表达外周神经元特异性标记物。【结论】人诱导多能干细胞在体外能高效向外周神经元分化。

关键词:人诱导多能干细胞;外周神经元;神经嵴干细胞

中图分类号:Q254 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2014)03-0431-07

Derivation of Peripheral Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells

LIN Wan-yi, HUANG Li-hua, ZHOU Li-wen, SHI Xuan, LAI Xing-qiang, LI Wei-qiang*
(Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To discuss peripheral neurons differentiation ability of human induced pluripotent stem cells.【Methods】The human induced pluripotent stem cells were maintained under feeder-free condition. Then hiPS cells can give rise to neurospheres in suspension culture with neural culture medium. When neurospheres were replated on the poly-L-lysine/laminin-coated dish, the neural crest stem cells emerged and were enriched by FACS. Then the neural crest stem cells differentiate into peripheral neurons, which can be identified by immunocytochemical assays.【Results】When neurospheres were cultured under adherent condition, the neural rosettes emerged and a great amount of neural crest stem cells migrated from the rosette structures. The peripheral neurons were induced from the neural crest stem cells and expressed the special markers.【Conclusion】hiPS cells were successfully induced to peripheral neurons.

Key words: human induced pluripotent stem cells; peripheral nerves system; peripheral neuron; neural crest stem cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(3):431-437]

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)是通过在成体细胞转导入外源因子,细胞发生重编程从而变为具有多能性的干细胞。iPS 细胞具有与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)类似的性质:表达全能基因和蛋白,染色体的端粒酶高度甲基化,在体内和体外具有分化成三胚层细胞的能力^[1]。目前已经能成功将皮肤纤

维细胞、肝细胞、血细胞、前列腺癌细胞和尿源细胞诱导为 iPS^[2]。iPS 细胞作为一种多能干细胞,因其无伦理学争议和适合自体移植,在再生医学和组织工程、疾病模型和发育研究都具有很大的应用前景。长期以来,成年哺乳动物的神经系统被认为在损伤后不可再生。但随着多能干细胞的出现和神经科学的研究进展,利用干细胞的多向分

收稿日期:2014-01-03

基金项目:国家自然科学基金(81271265)

作者简介:林婉颐,硕士研究生,研究方向:多能干细胞向神经嵴干细胞分化相关研究,E-mail:winnie1987@msn.cn; * 通信作者:李伟强,副教授,硕士生导师,E-mail:liweiq6@mail.sysu.edu.cn

化潜能,能够作为中枢和外周神经系统疾病及损伤的替代治疗及其病理机制研究。目前研究证明,ES/iPS 能成功分化为少突胶质细胞、运动神经元、多巴胺神经元、星形胶质细胞,为脊髓损伤、多发性硬化、脊髓性肌萎缩,为帕金森病和胶质细胞相关疾病等神经系统疾病提供替代治疗的希望。神经嵴干细胞(neural crest stem cells, NCSC)是外周神经元的干细胞,具有多能性和迁移性的生物学特点^[3]。神经嵴干细胞在脊柱动物神经管闭合过程中,在神经板边界处出现^[4-5],随后从神经上皮发生迁移,之后在不同的组织或器官定植生长并分化为不同的衍生物^[4],包括外周神经系统的外周神经元、施旺细胞,肠道神经系统,色素细胞,颅面部的间叶细胞等。因此,本研究通过将 hiPS 细胞诱导分化并获得神经嵴干细胞,再进一步诱导神经嵴干细胞分化,获得外周神经元,从而探讨高效获得外周神经元的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

hiPS 细胞为实验室自建细胞系,来自于健康成人捐献的皮肤成纤维细胞,编号为 HDF2-hiPSC,已进行规范化的冻存和复苏。先天重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠由中山大学北校区动物中心提供,实验过程中对动物的处置符合医学伦理学的标准。

1.2 试 剂

Essential 8 培养基、DMEM/F12 培养基、Neurobasal 培养基、 α -MEM 培养基、胎牛血清(FBS)、0.5 mol/L EDTA 溶液、N2、B27、L-谷氨酰胺、2-巯基乙醇购于 Invitrogen 公司;Magrigel、HNK1 流式抗体、P75 流式抗体购于 BD 公司;碱性成纤维生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、抗坏血酸(ascorbic acid, AA)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、神经营养蛋白(neurotrophin-3, NT-3)购于 Peprotech 公司;cyclic AMP(cAMP)、HNK1 抗体、多聚赖氨酸(poly-L-lysine, PL)购于 Sigma 公司;P75 抗体购于 Promega 公司;Sox10 抗体购于 R&D 公司;Nestin 抗体购于 abcam 公司;

Brn3a 抗体、SSEA4 抗体、tra-1-81 抗体、tra-1-60 抗体、Sox2 抗体和层粘连蛋白(laminin, LN)购于 Millipore 公司;Peripherin 抗体购于 Santa Cruz 公司;Oct4 抗体、Nanog 抗体购于 Cell Signal Technology 公司。

1.3 方 法

1.3.1 hiPS 细胞体内分化能力鉴定 将 hiPS 细胞消化为单细胞悬液,取 0.2 mL 的 2.5×10^7 /mL 细胞悬液,皮下注射于 SCID 老鼠右侧腹股沟。30 d 后取肿瘤进行石蜡切片,进行伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)。

1.3.2 细胞分子标记物免疫荧光检测 细胞用 40 g/L 多聚甲醛常温固定 15 ~ 30 min,用 0.1% TritonX-100 与 2% BSA 或二抗宿主血清混合穿透封闭 40 ~ 50 min,加入一抗 4℃ 孵育过夜。吸去一抗后用 PBS 洗 4 次,加入荧光标记的二抗室温孵育 40 min,用 PBS 洗 4 次,用 DAPI 复染细胞核。

1.3.3 人诱导多能干细胞的维持培养 培养板中加入浓度为 1:30 的 Matrigel 铺板 4℃ 过夜,使用前放培养箱孵育至少半小时。hiPS 细胞完全培养基为 Essential 8 培养基,每天换液;4 ~ 5 d 传代,传代时用 0.5 mmol/L 的 EDTA 常温处理 5 ~ 6 min,克隆出现间隙即可吸去 EDTA,加入培养基终止消化,用玻璃吸管把克隆吹成小块状,种到已用 Matrigel 铺板的培养板上。干细胞全能性标志物免疫荧光染色抗体种属和浓度如下:兔抗 Sox2 抗体(1:400),兔抗 Oct4 抗体(1:400),兔抗 Nanog 抗体(1:400),鼠抗 Tra-1-60 抗体(1:400),鼠抗 Tra-1-81 抗体(1:400),鼠抗 SSEA4 抗体(1:400)。

1.3.4 神经嵴干细胞的分化培养及鉴定 神经培养基配方为 DMEM/F12 和 Neurobasal 培养基以 1:1 比例混合,添加 N2 和 B27,2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺,0.1 mmol/L 的 2-巯基乙醇,20 ng/mL 的 bFGF 和 20 ng/mL 的 EGF。hiPS 细胞用 0.5 mmol/L 的 EDTA 消化成小块状,用神经培养基重悬后接种到 Petri 培养皿中悬浮培养形成神经球。悬浮 5d 后把神经球接种到用 15 μ g/mL 的 PL 和 1 μ g/mL 的 laminin 包被的培养板中。神经嵴干细胞用免疫荧光染色检测,抗体种属和浓度如下:鼠抗 HNK1 抗体(1:300),兔抗 P75 抗体(1:300),鼠抗 Sox10 抗体(1:100)和兔抗 Nestin 抗体(1:1000)。

1.3.5 外周神经元的诱导分化和鉴定 利用流式细胞分选术分选 HNK1 和 P75 双阳性的神经嵴干

细胞,纯化后的细胞在神经元诱导培养基中进行诱导培养。神经元诱导培养基配方为:DMEM/F12培养基,添加 N2,10 ng/mL 的 BDNF,0.2 mmol/L 的 AA,10 ng/mL 的 GDNF,10 ng/mL 的 NGF,10 ng/mL 的 NT-3 和 0.5 mmol/L 的 cAMP。诱导 2 周后用免疫荧光技术检测标记物及浓度如下所示:兔抗 Brn3a 抗体(1:300)和羊抗 Peripherin 抗体(1:200)。

2 结果

2.1 人诱导多能干细胞的生物学特性的鉴定

hiPS 细胞在无饲养层培养条件下进行维持培养,细胞镜下可见为圆形或椭圆形的克隆状生长,边界光滑清晰,折光性好。利用免疫荧光染色,检测胚胎干细胞特异性标记物的表达,可见 hiPS 细胞表达转录因子 Sox2、Oct4、Nanog (绿色荧光,图 1),细胞膜表达 Tra-1-60、Tra-1-81、SSEA4(红色荧光,图 1)。

将 hiPS 细胞悬液皮下注射 SCID 小鼠,一周

后可见注射部位有肿块形成,每天观察肿物生长情况。30 d 后取肿物,固定后送中山大学附属第一医院病理科进行石蜡包埋切片和 HE 染色。镜下观察可见典型的原始神经管、透明软骨和支气管腺体组织结构(图 2),提示细胞在体内具有三胚层组织分化的能力。

2.2 人诱导多能干细胞定向神经嵴干细胞分化

hiPS 细胞消化后种植在 Petri 皿中悬浮培养,在神经培养基中可形成神经球。悬浮的神经球球体中出现神经花环结构(图 3A),神经球贴壁后可见神经花环结构,在多聚赖氨酸(PL)和层粘连蛋白(laminin)包被的培养板中,大量的细胞从神经花环处迁移出来(图 3B)。通过流式分选的方法,把 HNK1 和 P75 双阳的细胞分选出来,双阳率达 90%以上,分选获得的细胞在 PL/laminin 包被的培养板上进行贴壁培养(图 3C)。

利用免疫荧光检测细胞,可见神经花环周边的细胞表达神经嵴干细胞标志物 HNK1 和 P75,迁移的细胞表达 HNK1 和神经嵴干细胞特异性转录因子 Sox10,分化中的细胞表达经典神经标志物

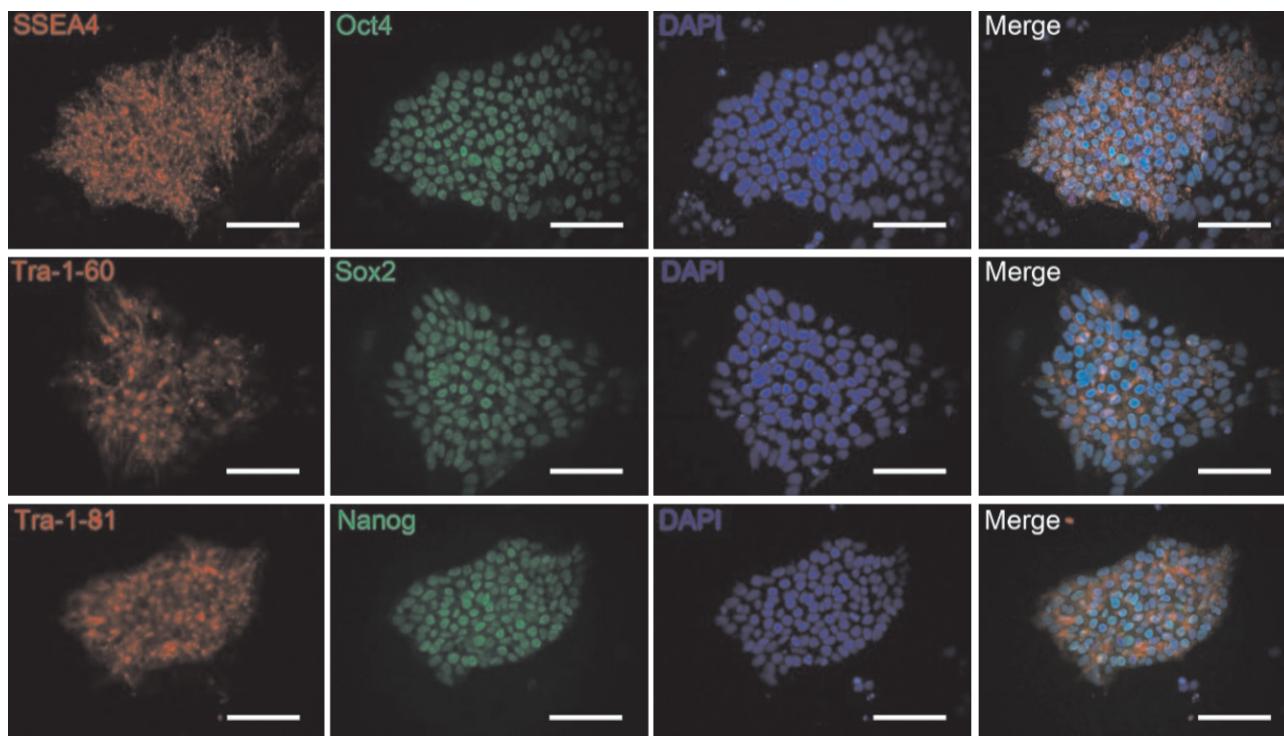


图 1 hiPS 多能性标志物检测

Fig.1 Immunostaining of pluripotent markers expressed by human iPS cells

The results showed that hiPS cells expressed typical pluripotent markers of human embryonic stem cells: SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81, Oct4, Sox2, and Nanog. (Bar = 100 μ m)

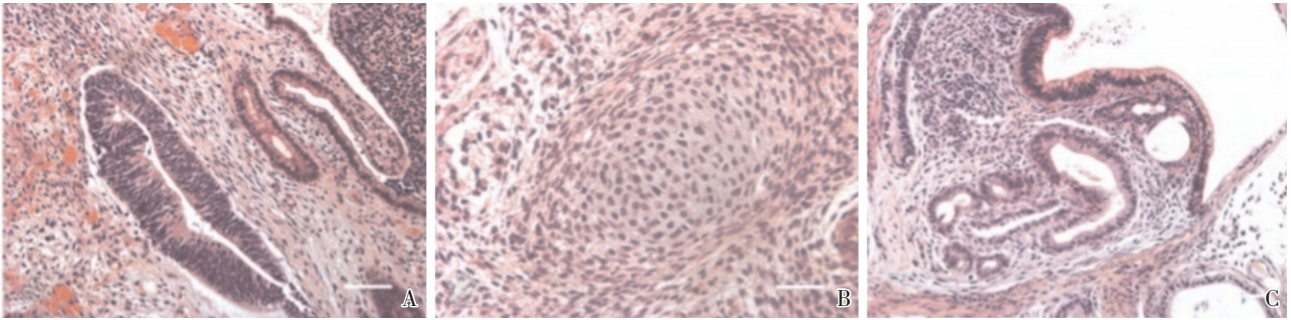


图 2 hiPS 体内分化为畸胎瘤的组织学检测

Fig.2 Histological analysis of teratoma from the hiPS cells

The teratoma from hiPS cells contained tissues from the three germ layers, including: (A) ectoderm: original neural tubes; (B) mesoderm: cartilage; (C) endoderm: glandular epithelium. (Bar = 100 μ m)

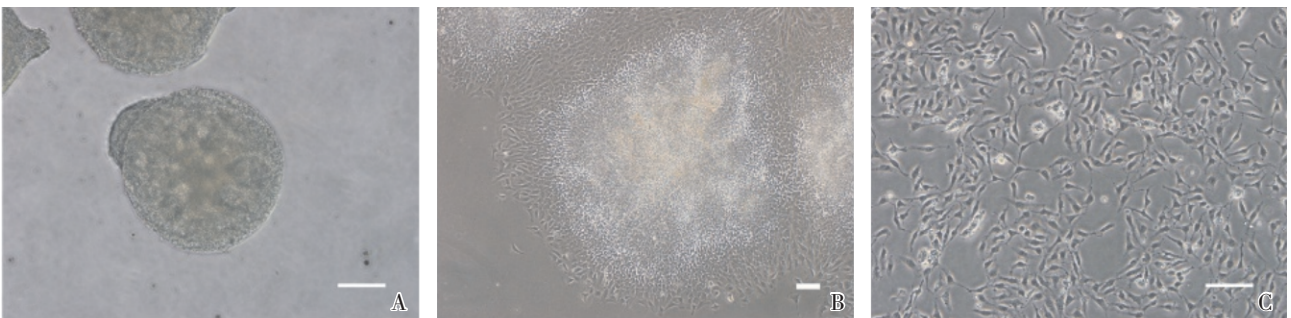


图 3 hiPS 诱导分化为神经嵴干细胞

Fig.3 Derivation of neural crest stem cells from hiPS cells

The hiPS cells can differentiate into neural crest stem cells through the neural rosettes stage: neural spheres appeared in suspension condition (A), the neural spheres were plated on PL/laminin coated dish, the neural rosettes emerged (B). The NCSC were enriched after FACS (C). (Bar = 100 μ m)

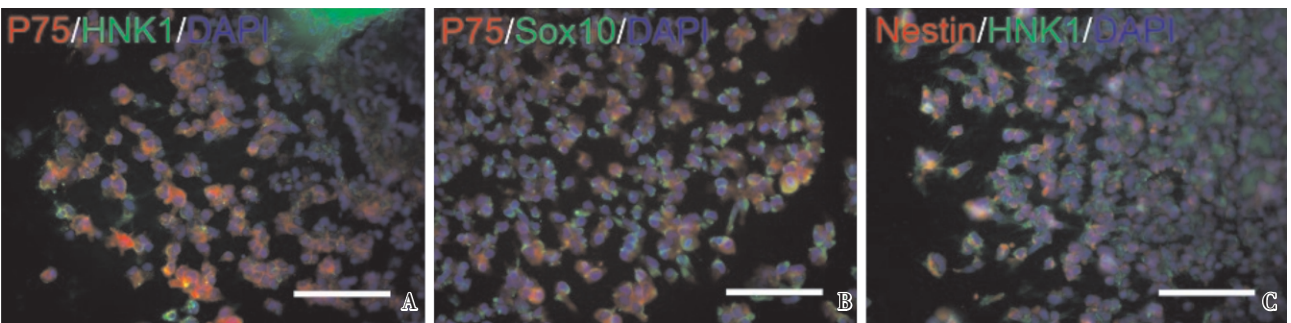
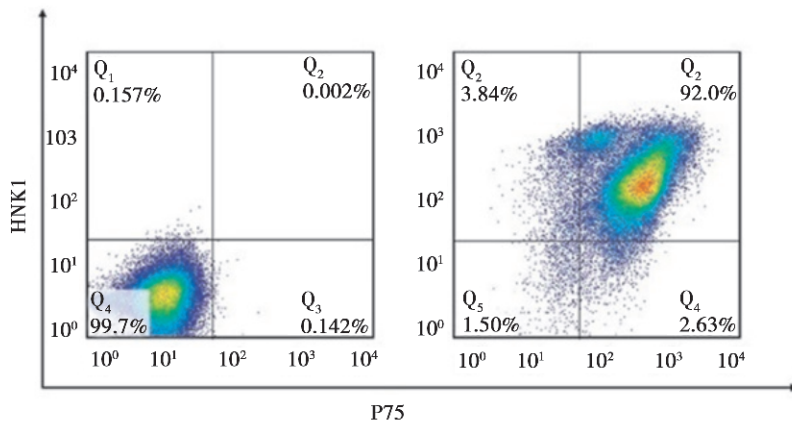


图 4 神经嵴干细胞的神经特异性标志物检测

Fig.4 Immunofluorescent staining of the neural crest stem cells markers

The NCS cells migrated from the neural rosette structure, expressed the NCSC specific marker HNK1 and P75 (A), P75 co-expressed with transcriptional factor Sox10 (B), HNK1 were co-stained with classical neural marker Nestin (C). (Bar = 100 μ m)

P75 和 Nestin(图 4)。利用神经球贴壁的方法,获得的迁移细胞表达神经标志物和神经嵴干细胞特异性标志物,说明通过本方法,可把 hiPS 大量诱导分化为神经嵴干细胞。

2.3 神经嵴干细胞诱导分化成外周神经元

神经嵴干细胞是周围神经系统的干细胞,神经嵴干细胞具有分化为外周神经元和施旺细胞的功能。神经嵴干细胞在传代后第三天换成神经元诱导培养基,神经元诱导培养基不含 bFGF 和 EGF, 添加了 AA、BDNF、GDNF、NT-3、NGF、cAMP。在诱导 2 周后,大部分细胞发生形态变化,出现细丝状的神经纤维(图 5)。利用免疫荧光法检测,神经元细胞表达外周神经元标志物 Peripherin, 和感觉神经元标志物 Brn3a(图 6)。Brn3a 阳性率为(75.0 ± 5.3)%, Peripherin 阳性率为(90 ± 4.6)%。

3 讨论

许多疾病会影响到外周神经系统,导致外周神经系统的器质病变或机能失调,如遗传性的神经病变疾病家族型自主神经异常(familial dysautonomia)、病毒侵犯感觉神经元(如水痘病

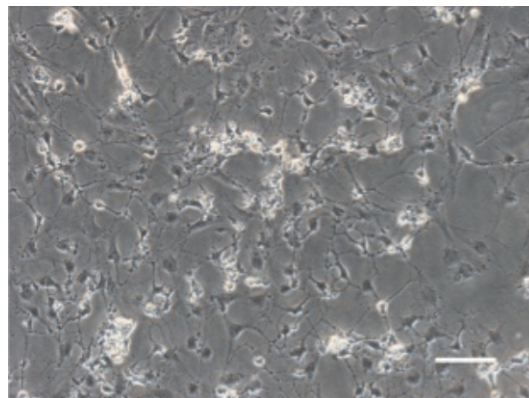


图 5 神经嵴干细胞分化为外周神经元

Fig.5 Differentiation of NCSC into peripheral neurons
(Bar = 100 μm)

毒)、和 HIV 相关的外周感觉神经病变等。神经嵴干细胞是外周神经系统(PNS)的前体细胞,是一种具有多能性和迁移性的干细胞^[3-7]。脊柱动物的胚胎发育的原肠胚和神经管发育阶段,NCSC 短暂出现在神经板的边缘,即神经上皮和非神经上皮的交界处^[4-5]。NCSC 细胞离开神经管,其迁移路径遍布胚胎整体,随后在不同的组织或器官定植生长并分化为不同的衍生物^[4],包括外周神经系统的外周神经元、施万细胞,肠道神经系统,色素细胞,

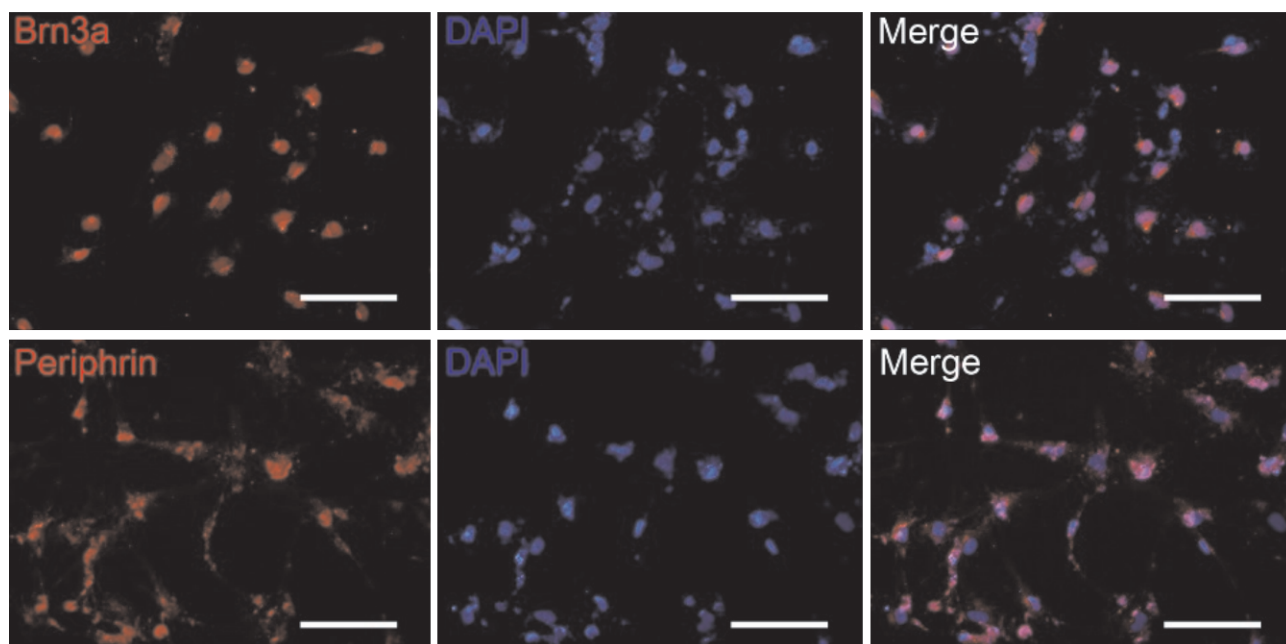


图 6 外周神经元的特异性标志物检测

Fig.6 Immunofluorescent staining of specific markers expressing of peripheral neurons

The results indicated that peripheral neurons differentiated from the NCSC expressed the specific marker: Brn3a and Peripherin. (Bar = 100 μm)

颅面部的间叶细胞等。由于神经嵴干细胞是外周神经系统的干细胞,本研究诱导首先诱导 hiPS 细胞分化为神经嵴干细胞,再将其进一步诱导分化为外周神经元,该分化体系可以帮助我们研究外周神经的遗传和发育机制,并为利用 hiPS 来源的外周神经元治疗外周神经系统相关疾病提供了新的思路和细胞来源的治疗,及在神经发育和遗传方面的机制探讨。

关于外周神经元的分化,目前研究主要利用人 ES 细胞进行研究。人 ES 细胞具有自我更新和多向分化能力,可以有效分化为外周神经元。然而人 ES 研究因其来源于早期胚胎而具有伦理争议,而且人 ES 细胞来源的分化细胞进行异体移植时存在排斥反应,限制了其临床应用。而从成体细胞重编程获得的诱导多能干细胞没有伦理学争议,适合自体移植,并且具有与胚胎干细胞相似的多能性,在再生医学的细胞治疗和个性化治疗中都具有很好的应用前景。因此,近年来多利用 hiPS 作为细胞来源研究神经分化,但大部分研究都是用正常或疾病来源的 hiPS 细胞定向分化为中枢神经系统的神经元^[8-13],或利用 hiPS 细胞诱导分化为外周神经元的干细胞,即神经嵴干细胞^[14-18],针对外周神经元的高效定向分化体系目前报道极少。

另外,在外周神经元诱导方法上,前期研究多采用基质细胞共培养的方式。如 hES 细胞与小鼠基质细胞 PA6 细胞共培养^[19-22],获得包含神经前体细胞的神经球,进一步分化可获得成熟神经元。这种方法的缺陷是培养条件不明确,诱导时间非常长(至少 21 d)但效率低(只有小于 1%的细胞能表达外周感觉神经元的标志物^[20])。还有报道利用 hES 细胞与 MS5 基质细胞共培养可以获得中枢神经细胞及部分神经嵴干细胞,流式分选后的神经嵴干细胞可以分化为外周神经元^[7]。MS5 共培养结合小分子抑制剂可增加神经嵴干细胞的比例^[6,8],或单独利用双重 SMAD 通路抑制剂 SB431542 和 Noggin 诱导获得神经嵴干细胞^[8,19],即可通过神经嵴干细胞获得成熟外周神经元。

本研究目的是利用 hiPS 细胞为来源,探讨获得外周神经元的快捷、高效的分化方案,为外周神经系统疾病的细胞治疗提供可能性。因此,本研究利用分阶段诱导的方法进行外周神经元的定向分化。首先,hiPS 细胞在组合生长因子 bFGF 和 EGF

条件下,悬浮培养获得富含神经花环结构的神经球,避免了与基质细胞共培养的動物源性及其产生的成分不明确的因子。神经花环结构在目前研究中被认为是相对于体内的神经上皮^[17,23-25],实验中可以观察到神经球贴壁后,大量细胞从神经花环结构处迁移,此诱导方法与体内的发育更加相似。并且对比于小分子诱导法必须把 hESC/hiPS 消化成单个细胞进行诱导,而且持续添加抑制剂,此方法更加简单、低廉和安全,重复性也更好。通过流式分选方法富集的神经嵴干细胞,效率高达 90%以上。其次,利用含 AA、BDNF、GDNF、NT-3、NGF、cAMP 的无血清培养液,可以进一步高效地将神经嵴干细胞诱导分化为外周神经元。

本研究首先进行了 hiPS 的生物学特性进行分析和鉴定,hiPS 表达 ES 细胞特异性标志物,通过畸胎瘤实验证明其在体内具有三胚层分化能力,证明了本实验使用的细胞系 hiPS 具有自我更新和多向分化潜能。将 hiPS 在神经培养基中悬浮培养形成神经球,贴壁后的神经花环周围出现大量迁移细胞,表达经典的神经系统标记物 P75 和 Nestin,和神经嵴细胞神经嵴干细胞特异性标志物 HNK1 和 Sox10,证明通过本研究的分化方法,能成功获得神经嵴细胞神经嵴干细胞。利用流式分选富集神经嵴细胞神经嵴干细胞,再对神经嵴细胞神经嵴干细胞进行扩展培养和分化,把外周神经元的获得率大大提升。

hiPS 来源的在神经嵴细胞神经嵴干细胞进行神经元诱导的过程中,可见细胞发生形态变化,出现神经纤维结构,并且能表达外周神经系统标志物 Peripherin 和感觉神经元标志物 Brn3a。说明通过本研究的分化系统,可以利用 hiPS 作为来源,富集神经嵴细胞神经嵴干细胞,从而有效地获得大量外周神经元。随着研究的深入和完善,人类有望利用神经嵴细胞神经嵴干细胞治疗多种外周神经疾病。

参考文献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [2] Moad M, Pal D, Hepburn AC, et al. A novel model of urinary tract differentiation, tissue regeneration, and disease: reprogramming human prostate and bladder

- cells into induced pluripotent stem cells [J]. *Eur Urol*, 2013, 64(5): 753–761.
- [3] Bronner ME, Ledouarin NM. Development and evolution of the neural crest: An overview [J]. *Dev Biol*, 2012, 366(1): 2–9.
- [4] Theveneau E, Mayor R. Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration [J]. *Dev Biol*, 2012, 366(1): 34–54.
- [5] Artinger KB. The fascinating world of neural crest cells [J]. *Cell Adh Migr*, 2010, 4(4): 551–552.
- [6] Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ, et al. Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(4): 688–701.
- [7] Lee G, Kim H, Elkabetz Y, et al. Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(12): 1468–1475.
- [8] Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(3): 275–280.
- [9] Curchoe CL, Maurer J, Mckeown SJ, et al. Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13890.
- [10] Rhee YH, Ko JY, Chang MY, et al. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2326–2335.
- [11] Sanchez-Danes A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, et al. Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(5): 380–395.
- [12] Cooper O, Hargus G, Deleidi M, et al. Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPS cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 45(3): 258–266.
- [13] Yahata N, Asai M, Kitaoka S, et al. Anti-Abeta drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25788.
- [14] Falk A, Koch P, Kesavan J, et al. Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29597.
- [15] Kriks S, Shim J W, Piao J, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease [J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 547–551.
- [16] Menendez L, Yatskevych TA, Antin PB, et al. Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(48): 19240–19245.
- [17] Liu Q, Spusta SC, Mi R, et al. Human neural crest stem cells derived from human ESCs and induced pluripotent stem cells: induction, maintenance, and differentiation into functional schwann cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(4): 266–278.
- [18] Menendez L, Kulik MJ, Page AT, et al. Directed differentiation of human pluripotent cells to neural crest stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(1): 203–212.
- [19] Jiang X, Gwee Y, Mckeown SJ, et al. Isolation and characterization of neural crest stem cells derived from in vitro-differentiated human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(7): 1059–1070.
- [20] Pomp O, Brokhman I, Ben-Dor I, et al. Generation of peripheral sensory and sympathetic neurons and neural crest cells from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(7): 923–930.
- [21] Pomp O, Brokhman I, Ziegler L, et al. PA6-induced human embryonic stem cell-derived neurospheres: a new source of human peripheral sensory neurons and neural crest cells [J]. *Brain Res*, 2008, 12(30): 50–60.
- [22] Brokhman I, Gamarnik-Ziegler L, Pomp O, et al. Peripheral sensory neurons differentiate from neural precursors derived from human embryonic stem cells [J]. *Differentiation*, 2008, 76(2): 145–155.
- [23] Cimadamore F, Fishwick K, Giusto E, et al. Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(5): 538–551.
- [24] Curchoe CL, Russo J, Terskikh AV. hESC derived neuro-epithelial rosettes recapitulate early mammalian neurulation events; an in vitro model [J]. *Stem Cell Res*, 2012, 8(2): 239–246.
- [25] Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al S G, et al. Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(2): 152–165.