

人胚胎干细胞神经分化的方法探讨

赖文玉¹, 曾巧慧¹, 吴燕云¹, 成福义², 李攀龙², 李伟强^{2*}

(中山大学 1. 附属第二医院 儿科, 广东 广州 510120; 2. 中山医学院, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】利用新建系的人胚胎干细胞株 SYSU-7, 运用胚体形成的方法, 探讨不同的分化条件对胚胎干细胞神经分化的影响。【方法】首先检测人胚胎干细胞株 SYSU-7 的 Oct4, SSEA4 (stage-specific embryonic antigen-4)、TRA-1-60 和 AKP (Alkaline phosphatase) 等胚胎干细胞特异性标志物的表达及体内外三胚层分化的能力; 之后, 应用含 20% Knockout Serum Replacement (KSR) 的培养液和神经干细胞培养液 (neural progenitor medium, NPM) 分别诱导细胞形成悬浮的拟胚体 (悬浮时间为 4 d 或 7 d), 然后将拟胚体贴壁于多聚鸟氨酸 (Polyornithine, PO) 和纤维粘连蛋白 (Fibronectin, FN) 包被的培养皿中继续培养 4~10 d。在分化的不同时间点利用免疫荧光染色的方法检测胚胎干细胞和神经细胞相关的标志性抗原。【结果】SYSU-7 胚胎干细胞表达未分化细胞特异性标志 Oct4, SSEA4, TRA-1-60, AKP 染色呈强阳性, 在体内外具有向三胚层分化的潜能; 在体外诱导其向神经分化, 结果发现 KSR 培养液比神经干细胞培养液更有利于胚胎干细胞的神经分化, 悬浮生长 7 d 的拟胚体贴壁后出现特征性的玫瑰花环样结构 (rosette structure) 的时间更早、数量更多。【结论】SYSU-7 细胞系具有自我更新及多向分化潜能等胚胎干细胞特性。本实验为研究人胚胎干细胞的神经分化提供了新的细胞模型和研究思路。

关键词: 人胚胎干细胞; 神经分化

中图分类号: Q254

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)05-0694-07

Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells

LAI Wen-yu¹, ZENG Qiao-hui, WU Yan-yun, CHENG Fu-yi², LI Pan-long², LI Wei-qiang^{2*}

(1. Department of Paediatrics, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To explore the neural differentiation potential of a new human embryonic stem cell line, SYSU-7, through embryoid body formation under different culture condition. 【Methods】Detail characterization of SYSU-7 cells were carried out by detecting the expression of Oct4, SSEA4, TRA-1-60, AKP, and multi-lineage differentiation capacity in vivo and in vitro. 20% KSR medium (KSR) and neural progenitor medium (NPM) were used to induce neural differentiation of SYSU-7 cells, respectively. Embryoid bodies (EBs) were generated and cultured in suspension for 4d or 7d before attached to polyornithine and fibronectin (PO+FN) coated culture dishes. Neural stem/progenitor cells derived from SYSU-7 cells were identified by the immunocytochemical assays. 【Results】The immunostaining analysis showed that SYSU-7 cells expressed the undifferentiated marker Oct4, SSEA4, and TRA-1-60, as well as the AKP. The results also demonstrated that SYSU-7 cells have the capacity to differentiate into three germ layers both in vitro and in vivo. KSR medium was found to be superior to NPM for neural differentiation of SYSU-7 cells. EBs cultured in suspension for 7 d resulted in earlier appearance and greater amount of rosette structures than 4-day EBs. 【Conclusion】SYSU-7 cells possessed the distinct characteristics of human embryonic stem cells, self-renew and pluripotency. The results provided a new cell model and may have implications for neural differentiation studies.

Key words: human embryonic stem cells; neural differentiation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2011, 32(5): 694-700]

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES 细胞) 来源于胚胎时期的桑葚胚或者囊胚的内细胞团^[1-2],

可以分化成身体的各种组织细胞。ES 细胞在体外可以大量扩增并诱导分化为特定的组织细胞如造

收稿日期: 2011-04-01

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目 (9451008901002230)

作者简介: 赖文玉, 医学博士, 研究方向: 小鼠胚胎干细胞的神经分化, E-mail: wenyulai98@yahoo.com.cn; * 通信作者: 李伟强, 博士后, E-mail: weiqiangli1980@yahoo.com.cn

血细胞、心肌细胞和肝细胞等^[3-5],在发育生物学、基因功能和药物筛选等研究有着广泛的应用前景。前期的研究表明,人ES细胞可以大量的分化为神经系统的各种终末细胞,包括多巴胺神经元、运动神经元、少突胶质细胞和视网膜神经细胞等^[6-9],为神经系统的损伤性疾病和退行性疾病,如帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等的治疗带来了新的希望。2009年,美国药管局首次批准了美国杰龙生物医药公司利用人胚胎干细胞的分化细胞医治脊髓损伤病人的试验。目前,人ES细胞神经分化的方法主要采用拟胚体形成法^[10-11],另外还有单层诱导法^[12-13]和基质细胞共培养法^[14-15]。拟胚体形成法是在人ES细胞传代4~5d后,用胶原酶或中性蛋白酶将细胞消化成团块状,接种在低黏附性的培养皿中,用神经诱导培养液悬浮培养4~7d后进行贴壁,然后分离玫瑰花环样结构得到神经干/祖细胞并进一步诱导细胞的分化成熟。研究表明血清里面含有BMP家族的信号分子^[16],能够抑制ES细胞的神经分化,因此神经诱导培养液中不含血清,一般使用血清替代物^[11]或神经干细胞培养液进行诱导^[12]。由于不同的人ES细胞的定向分化能力存在差异,而且由于培养环境的不同(不同实验室所使用的饲养层细胞和培养液成份等的差异),往往导致相同的诱导方案在不同的人ES细胞株取得不同的分化效率。在本研究中,我们首先对新建的人ES细胞SYSU-7进行鉴定,并利用SYSU-7细胞进行神经分化的研究,探讨不同的诱导培养液和悬浮培养的时间对SYSU-7细胞向神经干细胞分化的影响,以寻找简单高效的神经分化方案。

1 材料与方 法

1.1 材 料

6~8周龄先天重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)老鼠和ICR小鼠,均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

高糖DMEM培养基、knockout DMEM培养基、KSR(knockout serum replacement, KSR)、N2, B27, IV型胶原酶(Collagenase IV)和 dispase(中性蛋白

酶)均购于美国Invitrogen公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于美国Hyclone公司;碱性成纤维生长因子(bFGF)及表皮生长因子(EGF)购于美国Peprotech公司;免疫组化用一抗Oct4、SSEA4和TRA-1-60抗体,多聚鸟氨酸和人纤维粘连蛋白均购于美国Millipore公司;免疫组化用一抗 β III-tubulin(Tuj1)抗体、Synapsin抗体、GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein)抗体、ALB(albumin)抗体、Fibronectin抗体、SOX2抗体均购于美国R&D公司。二抗包括山羊抗小鼠、山羊抗兔IgG抗体购于美国Jackson公司。BCIP-NBT试剂盒购于美国Santa Cruze公司。

1.3 方 法

1.3.1 胚胎干细胞及其分化细胞的分子标记物的检测 取增殖旺盛的SYSU-7细胞或分化细胞用40g/L的多聚甲醛溶液固定20~30min,用0.1% Triton X-100 in PBS室温穿透即将检测胞浆标记孔的细胞30min;胞膜分子标记检测组则加入0.01mol/L PBS。使用二抗宿主的血清封闭45min,去掉血清后,加入一抗4℃过夜。所用一抗包括Oct4(1:200)、SSEA4(1:200)、TRA-1-60(1:200)、Tuj1(1:1000)、GFAP(1:1000)、ALB(1:200)、Fibronectin(1:100)和SOX2(1:500)。0.01mol/L PBS洗3次后,加入荧光标记的二抗后室温孵育1h。最后用1 μ g/mL Hoechst33342复染细胞核。荧光显微镜下观察拍照。

1.3.2 碱性磷酸酶染色 细胞接种在饲养层细胞上4~5d后,吸去培养液,PBS洗涤3次,40g/L多聚甲醛液固定30min。然后按照说明书加入适量BCIP-NBT染色液,在室温下染色30~60min,显微镜下观察染色的结果并拍照。

1.3.3 SYSU-7细胞体外分化能力的检测 SYSU-7细胞用1mg/mL胶原酶在37℃下消化5~10min后,接种在Petri培养皿中,用含200mL/L血清(FBS)的胚体培养液培养7d后,可见明显的拟胚体形成。为了诱导细胞进一步分化,将胚体转移到2%明胶包被的细胞培养6孔板中继续培养。3周后,取这些细胞作免疫荧光染色。其中,外胚层用抗Tuj-1抗体、内胚层用抗ALB抗体,而中胚层则用抗Fibronectin抗体分别鉴定胚体中三个胚层细胞类型的存在。

1.3.4 SYSU-7细胞体内分化能力的检测 取传代后4~6d的细胞,用胶原酶消化成小团块状,

用培养液终止消化后收集细胞。用 100 ~ 200 μL 无血清培养液重悬细胞,细胞密度约为 $(5 \sim 8) \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$ 注射进 SCID 鼠的背部皮下。视长成的肿瘤的大小,通常在 8 ~ 12 周左右,取出肿瘤,4%PFA 固定过夜。取部分组织送病理作石蜡切片和常规 HE 染色,观察有无三胚层组织结构形成。

1.3.5 核型分析 将传至 30 代的 SYSU-7 细胞用 0.2 $\mu\text{g/L}$ 的秋水仙素处理 2 ~ 4 h,吸去秋水仙素,以 1 mg/mL 胶原酶消化为单细胞悬液,用人 ES 培养液重悬后送中山大学遗传教研室做核型分析。

1.3.6 SYSU-7 细胞的定向神经分化 取传代后 5~6 d 状态较好的细胞,PBS 洗两次,加入 1 mg/mL 中性蛋白酶(Dispase)37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 5 ~ 10 min,镜下观察到克隆中细胞变圆,边缘卷起时,加入含血清培养液终止消化并用吸管轻缓反复吹打成小团块状,使细胞充分脱壁,收集细胞悬液,离心(1 100 r/min, $r = 15 \text{ cm}$, 4 min)。去除上清液,分别用无血清的 KSR 培养液或神经干细胞(NPM, N2B27+bFGF+EGF)培养液重悬细胞。在细菌培养皿中悬浮培养 4 ~ 7 d 并形成拟胚体。将 4 d 或 7 d 的拟胚体贴壁于预先用多聚鸟氨酸和纤维粘连蛋白包被的 6 孔板中,密度为 20 ~ 40 个/孔,用神经干细胞培养液(NPM)继续培养 4 ~ 10 d。每天在镜下观察有无玫瑰花环结构的出现,用免疫荧光染色检测神经细胞相关的分子标记,包括 Sox2/TRA-1-60, Tuj1 和 GFAP 四种抗体。

2 结 果

2.1 SYSU-7 细胞的分子标记的检测结果

相差显微镜下观察 SYSU-7 细胞具有较高的核质比例、明显的核仁,在小鼠胚胎成纤维细胞上和 bFGF 的作用下可以保持未分化状态。克隆扁平,成圆形或椭圆形,细胞单层排列紧密在 MEF 上,边界清晰(图 1A)。碱性磷酸酶(AKP)染色的结果可见细胞表达 AKP 呈强阳性(图 1B),而周围的饲养层细胞不着色。对细胞进行免疫荧光染色检测胚胎干细胞特异的分子标记,可见细胞表达 Oct4(细胞核,图 1C)、SSEA4(细胞膜,图 1D)和 TRA-1-60(细胞膜,图 1E),符合人胚胎干细胞的表达特征。

2.2 SYSU-7 细胞的体外、体内分化能力的检测

和核型分析

在体外分化实验中,SYSU-7 细胞在低黏附性的 Petri 培养皿中培养 7 d,可见拟胚体形成(图 2A);7 d 后将细胞贴壁于 2%的明胶上,用同样的培养液继续贴壁培养。取贴壁三周的分化细胞,进行免疫荧光染色。结果显示,胚体中含有 3 个胚层来源的细胞类型,其中可见表达 Tuj1 的外胚层细胞(图 2B),ALB 染色阳性的内胚层细胞(图 2C)和表达 Fibronectin 的中胚层细胞(图 2D)。

在将 SYSU-7 细胞注射到 SCID 小鼠的体内 8 ~ 12 周后,将小鼠处死并取出肿瘤(均具有完整包膜),进行石蜡切片和 HE 染色。镜下观察切片可见 3 个胚层来源的细胞类型,包括外胚层的神经管样结构(图 2E),内胚层的消化道内皮细胞(图 2F)和中胚层的软骨细胞(图 2G)。

核型分析结果显示 SYSU-7 细胞为正常核型 46XX,说明该干细胞属于核型正常的细胞系(图 2H)。

2.3 SYSU-7 细胞的定向神经分化

分化的第 1 天,细胞用中性蛋白酶消化后形成一定大小的细胞团块,在细菌培养皿中用无血清的 KSR 或 NPM(N2B27+bFGF+EGF)培养液培养。从第 2 天起,在两种培养液中均可见细胞团块聚合形成球状结构悬浮生长(即形成拟胚体),也有少量的小的细胞团块未形成球状结构而逐渐变黑、死亡。拟胚体悬浮 4 ~ 7 d 后逐渐增殖长大形成致密的球状结构(图 3A,3D)。此时我们取两种培养液中 4 d 和 7 d 的拟胚体进行冰冻切片和免疫荧光染色,使用的抗体为 anti-SOX2(绿色二抗)和 anti-TRA-1-60(红色二抗),用 Hoechst33342 复染细胞核。结果发现,在悬浮培养的第 4 天或第 7 天,部分 NPM-EBs 的细胞同时表达 Sox2 和 TRA-1-60(图 3B,C);而 KSR-EBs 大部分细胞仅表达 Sox2,只有很少部分的细胞同时表达了 TRA-1-60(图 3E,F)。从染色结果还可以看到,随着时间的延长,拟胚体中共表达 Sox2 和 TRA-1-60 的细胞逐渐减少。

取悬浮培养 4 d 或 7 d 的拟胚体,接种在多聚鸟氨酸和纤维粘连蛋白包被的 6 孔板上,密度为 20 ~ 40 个/孔,用神经干细胞培养液(NPM)继续培养 4 ~ 10 d。镜下观察发现,培养 4 d 的拟胚体(4d-EBs)贴壁 4 ~ 5 d 后,开始观察到具有形成突触潜能的神经元。继续培养到 9 ~ 10 d 时开始出

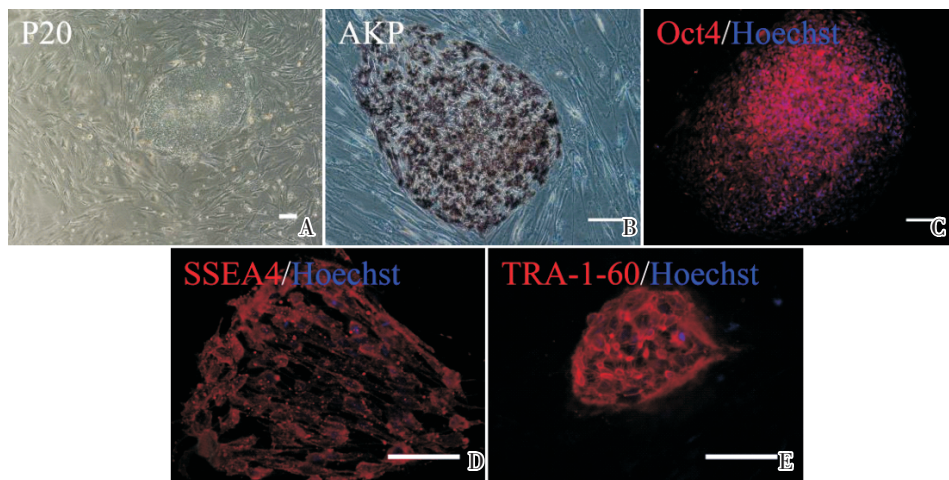


图 1 SYSU-7 细胞的分子标记的表达检测

Fig. 1 Detection of embryonic stem cell markers in SYSU-7 cells

The results showed that SYSU-7 cells were morphology typical of human embryonic stem cells (A) and they expressed AKP (B), Oct4 (C), SSEA4 (D), and TRA-1-60 (E). bar=100 μ m

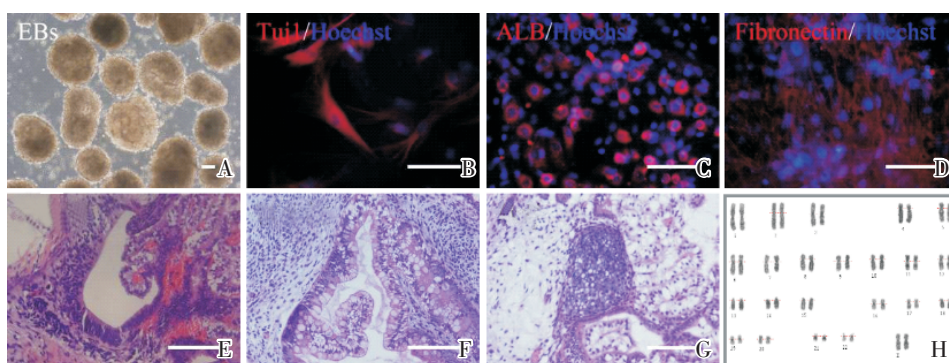


图 2 SYSU-7 细胞的体外、体内分化和核型分析

Fig.2 In vitro and in vivo differentiation assay and karyotype analysis of SYSU-7 cells

SYSU-7 cells formed embryoid bodies (A) in suspension culture without MEF feeder cells or bFGF. Immunofluorescence analysis showed that some of differentiated SYSU-7 cells expressed Tuj1 (B), ALB (C), or Fibronectin (D). Histological analysis of teratoma formed by SYSU-7 cells revealed that the teratoma contained neural tube (ectoderm, E), digestive tract epithelium (endoderm, F) and chondrocytes (mesoderm, G). And karyotype analysis indicated that SYSU-7 cells had a normal karyotype (46XX, H). bar=100 μ m

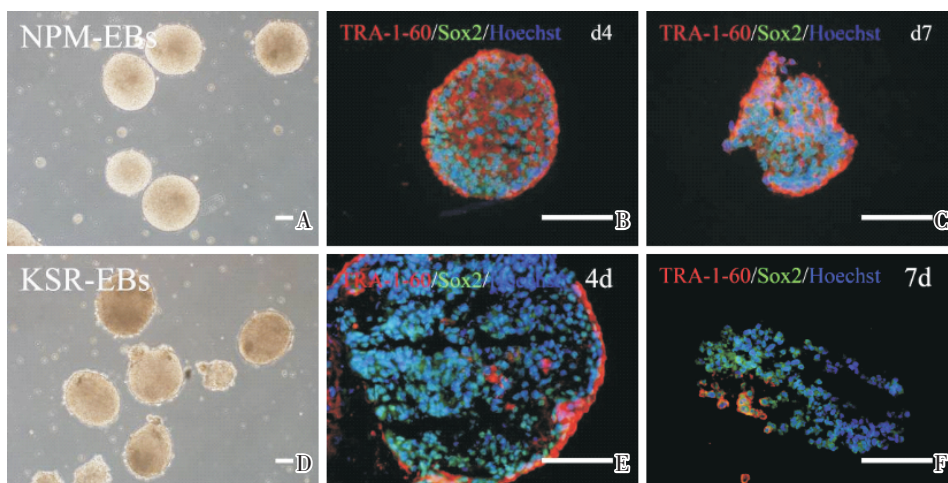


图 3 SYSU-7 细胞在神经诱导培养液中形成的拟胚体

Fig.3 Embryoid body formation of SYSU-7 cells in neural induction medium

A and D, embryoid body formation in NPM medium and KSR medium; B, C, immunofluorescence analysis of embryoid bodies in NPM medium. Most of the cells inside EBs expressed Sox2 and TRA-1-60 simultaneously; E, F, immunofluorescence analysis of embryoid bodies in KSR medium. Most of the cells inside EBs expressed Sox2 but not TRA-1-60. bar=100 μ m

现玫瑰花环样结构, 这些结构多集中于贴壁胚体的中央, 成簇分布, 与周围的细胞有明显的分界线, 而且 KSR 组出现的玫瑰花环样结构明显多于 NPM 组(图 4A、E)。培养 7 d 的拟胚体(7d-EBs)贴壁 1 d 后细胞从拟胚体中长出。NPM 组可以观察到人 ES 样的细胞(图 4B), 具有较高的核质比例、明显的核仁, 未见具有形成突触潜能神经元细胞; KSR 组则未见有人 ES 样的细胞, 可以观察到具有形成突触潜能神经元细胞(图 4F)。贴壁 4 天后, NPM 和 KSR 组均可以观察到玫瑰花环样结构的形成和具有形成突触潜能的神经元, 而且 KSR 组出现的这两种结构明显多于 NPM 组(图 4C、G)。此时对两组的贴壁细胞进行染色。使用 Sox2(绿色二抗)/TRA-1-60(红色二抗)抗体共染, 发现 NPM 组的细胞约 50%~60%的细胞表达 Sox2, 但有小部分 Sox2 阳性细胞同时表达 TRA-1-60(图 4D); KSR 组的细胞越有 70%~80%表达 Sox2, 而且未见有细胞同时表达 TRA-1-60(图 4H)。

另外, 使用 Tuj1、Synapsin 和 GFAP 抗体进行染色, 可见两组分化细胞均有染色阳性的细胞存在, 其中 NPM 组细胞的 Tuj1(图 5A)、Synapsin 阳性率(图 5B)低于 KSR 组(图 5D、E), 而 GFAP 表达阳性率未见有明显的区别(图 5C、F)。

3 讨 论

在使用拟胚体形成法研究神经分化的文献报道中, 大多数的研究者使用了 KSR, NPM 或 NPM+noggin 3 种不同的培养基进行拟胚体的悬浮培养。其中 noggin 是 BMP 信号通路的抑制剂, 研究表明 noggin 可以明显提高人 ES 细胞神经外胚层分化的效率, 同时抑制细胞向中、内胚层的细胞类型分化^[13]。然而, 由于该方法需要在诱导过程中添加高浓度的 noggin(500~700 ng/mL), 因此在进行大量的 ES 细胞分化实验时成本较高。因此, 本研究试图寻找简单高效的诱导方案, 选用 KSR/NPM

的诱导体系进行比较。另外, 在预实验的过程中, 我们比较了 3 种常用于神经分化的细胞外基质(多聚鸟氨酸加层粘连蛋白, 多聚鸟氨酸加纤维粘连蛋白以及明胶)对于拟胚体贴壁和分化的影响, 结果发现多聚鸟氨酸加层粘连蛋白不利于 SYSU-7 拟胚体的贴壁; 明胶虽然有助于拟胚体贴壁, 但是贴壁以后玫瑰花环样结构的形成的时间较长, 数量较少; 而多聚鸟氨酸加纤维粘连蛋白则可同时达到良好的贴壁和促进神经分化的效果(未发表资料), 因此本次实验中选用多聚鸟氨酸加纤维粘连蛋白作为细胞外基质用于后续的分化研究。

在本研究中, 我们首先对 SYSU-7 细胞的生物学特性进行分析鉴定。发现 SYSU-7 细胞表达 ES 细胞的特异性标志 Oct4、SSEA4, TRA-1-60, AKP 染色呈强阳性, 在体内外均具有向三胚层分化的能力, 证实 SYSU-7 细胞系具有自我更新及多向分化潜能等人 ES 细胞特性。

在应用 SYSU-7 细胞进行神经分化的实验中, 我们发现部分 NPM-EBs 的细胞同时表达 Sox2 和 TRA-1-60, 而 KSR-EBs 大部分细胞仅表达 Sox2。一般认为 Sox2 表达于 ES 细胞和神经干细胞, 而 TRA-1-60 只表达于 ES 细胞中。因此, NPM-EBs 中存在的部分同时表达 Sox2 和 TRA-1-60 的细胞应该是未分化的 ES 细胞, 而 KSR-EBs 中这种未分化细胞很少, 多数为只表达 Sox2 的神经干细胞, 说明 KSR 更有利于 SYSU-7 细胞的神经分化。随着悬浮时间的延长, 还可以观察到同时表达 Sox2 和 TRA-1-60 的未分化细胞逐渐减少。

取部分悬浮培养 4 d 和 7 d 的拟胚体贴壁于多聚鸟氨酸和纤维粘连蛋白包被的孔板中, 用 NPM 的培养液继续培养。4d-EBs 贴壁 4~5 d 后开始观察到具有形成突触潜能的神经元细胞, 继续培养到 9~10 d 时才开始出现玫瑰花环样结构; 而 7d-EBs 贴壁 1 d 后观察到具有形成突触潜能的神经元的出现, 在贴壁第 4 天就可以观察到大量玫瑰花环样结构的形成, 据此我们认为悬浮

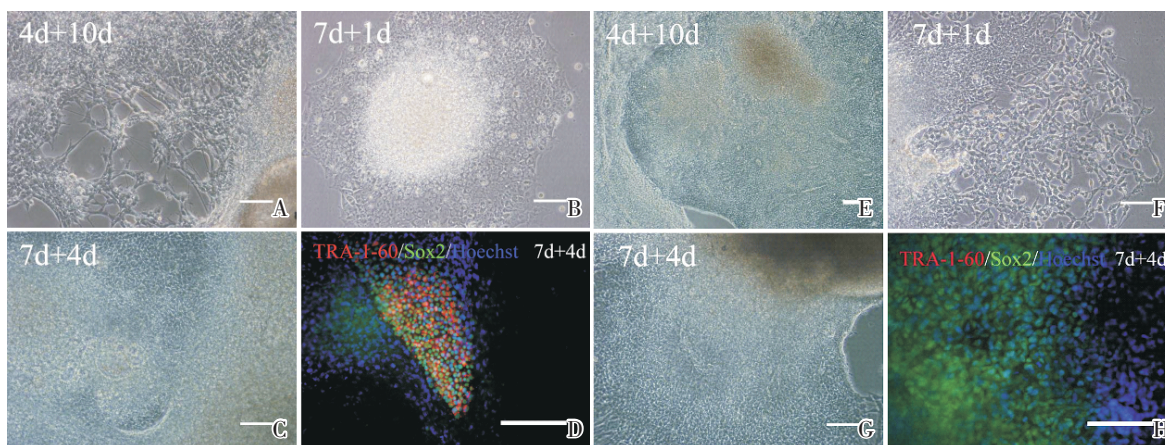


图 4 SYSU-7 细胞形成的拟胚体的贴壁分化

Fig.4 EBs of SYSU-7 cells were plated onto an adhesive substrate for further differentiation

A, E, synapse-like structure and rosette structure were observed after 4d-EBs were attached and cultured for 10 days. Quantities of rosette structure formed by NPM-EBs (A) were markedly lower than that by KSR-EBs (E); B, F, ES-like cells were found and no synapse-like structure appeared after NPM-7d-EBs were attached and cultured 1 day (b). However, KSR-7d-EBs derived cells formed synapse-like structure and no ES-like cells existed (F); C, G, KSR-7d-EBs (c) formed more rosette structures than NPM-7d-EBs (G) when plated onto an adhesive substrate and cultured for 4 days; d, h, the results of immunofluorescence analysis showed that 50%~60% NPM-7d-EBs derived cells expressed Sox2 and a small part of it coexpressed Sox2 and TRA-1-60 (d), while 70% ~ 80% KSR-7d-EBs derived cells exclusively expressed Sox2 but not TRA-1-60 (h). bar=100 μ m

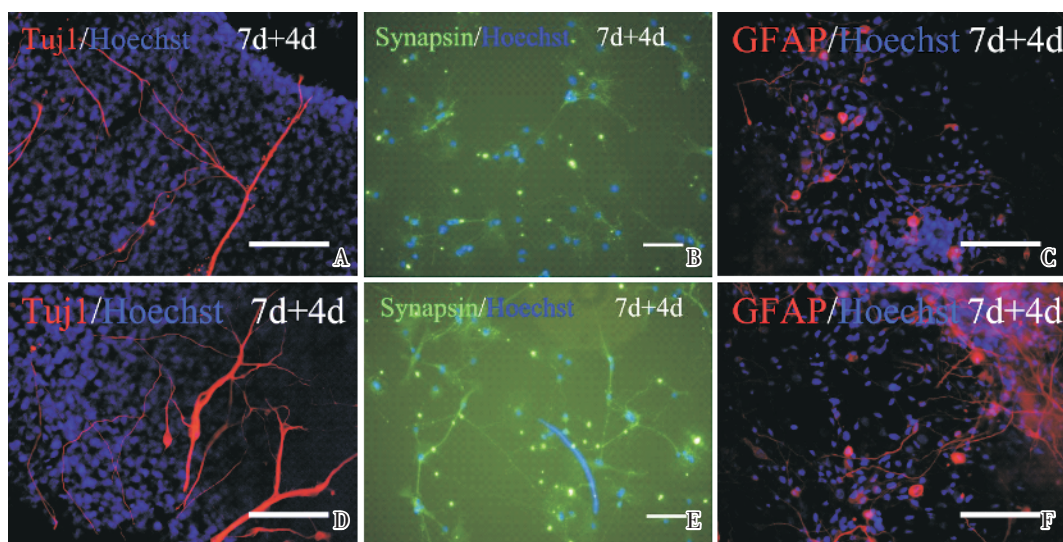


图 5 SYSU-7 细胞形成的拟胚体 (7d-EBs) 的贴壁分化

Fig.5 7d-EBs of SYSU-7 cells that were attached and cultured for another 4 days were analyzed by immunoassaying

The results showed that some of the differentiated cells from NPM-EBs (A-C) and KSR-EBs (D-F) were Tuj1 (A, D), Synapsin (B, E) or GFAP (C, F) positive bar=100 μ m

培养 7 d 更有利于 SYSU-7 细胞的神经分化,可以在较短的时间里得到大量的神经前体细胞。比较 NPM-7d-EBs 和 KSR-7d-EBs 贴壁第 4 天的细胞,我们在镜下观察到在 NPM-7d-EBs 组还存在未分化的 ES 样细胞,用免疫荧光染色的方法也证实了这一点,在 NPM-7d-EBs 组的贴壁细胞中存

在同时表达 Sox2 和 TRA-1-60 的未分化细胞,而在 KSR-7d-EBs 的贴壁细胞中没有;另外 Sox2 抗体染色的结果发现,50%~60%的 NPM-7d-EBs 细胞和 70% ~ 80% KSR-7d-EBs 细胞表达 Sox2,这从另外一个方面证实了 KSR 比 NPM 更有利于 SYSU-7 细胞的神经分化。

因此,我们认为应用 KSR 悬浮培养 7 d,使用多聚鸟氨酸加纤维粘连蛋白的细胞外基质帮助拟胚体贴壁,用 NPM 的培养基作进一步的诱导分化的方法更适合于 SYSU-7 细胞的神经分化,可以获得大量的神经干细胞。然而,本实验未能获得功能性的终末神经元,有待于进一步的研究;另外,最新的研究成果表明,诱导多能干细胞^[17-18]在形态学、基因表达状况和表观遗传修饰方面都与 ES 细胞十分相似,因而在临床应用和基础研究方面都有极高的价值,我们将进一步探讨该方法是否适合于人诱导多能干细胞的神经分化。综上所述,本研究为人胚胎干细胞/诱导多能干细胞的神经分化提供了新的细胞模型和研究思路。

参考文献:

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156.
- [2] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(3691): 1145-1147.
- [3] Chadwick K, Wang L, Li L, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Blood*, 2003, 102(3): 906-915.
- [4] Takahashi T, Lord B, Schulze PC, et al. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes [J]. *Circulation*, 2003, 107(14): 1912-1916.
- [5] Naujok O, Francini F, Picton S, et al. A new experimental protocol for preferential differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells [J]. *Cell Transplant*, 2008, 17(10-11): 1231-1242.
- [6] Cho MS, Hwang DY, Kim DW. Efficient derivation of functional dopaminergic neurons from human embryonic stem cells on a large scale [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(12): 1888-1894.
- [7] Li XJ, Hu BY, Jones SA, et al. Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 886-893.
- [8] Hu BY, Du ZW, Zhang SC. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(11): 1614-1622.
- [9] Osakada F, Jin ZB, Hirami Y, et al. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 17): 3169-3179.
- [10] Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, et al. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells [J]. *Exp Neurol*, 2001, 172(2): 383-397.
- [11] Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotech*, 2001, 19(12): 1129-1133.
- [12] Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotech*, 2001, 19(12): 1134-1140.
- [13] Gerrard L, Rodgers L, Cui W. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling [J]. *Stem Cells*, 23(9): 1234-1241.
- [14] Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity [J]. *Neuron*, 2000, 28(1): 31-40.
- [15] Rathjen J, Haines BP, Hudson KM, et al. Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: homogeneous formation and differentiation of a neuroectoderm population [J]. *Development*, 2002, 129(11): 2649-2661.
- [16] Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture [J]. *Nat Biotech*, 2003, 21(2): 183-186.
- [17] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [18] 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.

(编辑 张思健)