

# 乳鼠海马神经干细胞的体外分离、扩增和分化研究

白瑞樱<sup>1</sup> 张紫娟<sup>2</sup> 王亚莉<sup>1</sup> 李新娟<sup>1</sup> 程远<sup>1</sup> 魏林郁<sup>1</sup> 薛红<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>新乡医学院生理学与神经生物学教研室, 新乡 453003; <sup>2</sup>河南中医学院基础医学院, 郑州 450008)

**摘要** 探讨海马神经干细胞(neural stem cells, NSCs)在体外分离扩增和诱导分化的可行性。无菌条件下分离新生(24 h)SD大鼠海马神经干细胞, 采用无血清培养和胎牛血清诱导分化。免疫荧光染色技术分别检测诱导前细胞巢蛋白(Nestin)的表达, 以及分化细胞的神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达, 以鉴定细胞类型。流式细胞仪检测神经干细胞分化前后增殖能力的变化。结果显示: 从乳鼠海马分离培养的细胞生长状态良好, 具有克隆增殖能力, 并呈Nestin表达阳性, 分化后可出现NSE及GFAP表达阳性的细胞。流式细胞仪检测显示: 诱导前, 细胞增殖活跃, S+G<sub>2</sub>/M期细胞为(36.27±1.99)%, 而分化各阶段(3, 7, 10 d) S+G<sub>2</sub>/M期细胞比例与诱导前(Ctrl)相比则明显下降( $P<0.05$ ), 分别为(26.39±1.10)%、(26.33±1.33)%和(24.54±1.12)%。这些结果表明乳鼠海马存在神经干细胞, 并具有自我更新和多向分化的潜能, 可用于基础和临床的相关研究。

**关键词** 神经干细胞; 分离; 扩增; 分化; 鉴定

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是具有自我更新和多向分化潜能的细胞(图1), 在理论研究和临床应用上有着广泛的前景, 是当今生命科学领域研究的热点<sup>[1-3]</sup>。虽然有关NSCs的研究已取得一些进展, 但许多结果并未得到一致的认可。作为研究不同脑区NSCs生物学特性的一部分, 本实验在无菌条件下体外分离培养乳鼠海马NSCs, 观察其增殖分化过程, 掌握其生长规律和特性, 希望为进一步的深入研究和使用NSCs奠定理论和实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康新生(24 h)SD大鼠, 雌雄不限, 由新乡医学院动物中心提供(证书编号: SYXK 2006-0012)。实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定<sup>[4]</sup>。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12、B27(Gibco公司), bFGF、EGF(Sigma公司), 牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclone公司), 兔抗鼠Nestin多克隆抗体、兔抗鼠NSE多克隆抗体、兔抗鼠GFAP单克隆抗体、FITC标记山羊抗兔IgG、TRITC-标记的山羊抗兔IgG(碧云天生物技术研究所)。

### 1.2 方法

1.2.1 NSCs的分离和原代培养<sup>[5-6]</sup> 新生(24 h)SD

大鼠, 常规消毒皮肤, 置-20 °C低温麻醉8 min, 置于层流细胞培养室取材, 用眼科剪剪开头皮和颅骨, 迅速取出脑组织, Hank's漂洗, 并分离出海马组织, 置于盛有DMEM/F12基础培养液的平皿中, 换另外一眼科剪仔细剥离脑膜和血管, 反复剪切组织, 收集到50 mL离心管中, Pasteur吸管轻轻反复吹打, 200 μm的滤网过滤去除组织块制成单细胞悬液, 离心弃上清, 无血清完全培养液: DMEM/F12+2% B27+20 ng/mL EGF+20 ng/mL bFGF重悬细胞。经苔盼蓝染色、计数, 调整细胞密度至 $1\times 10^5$ /mL, 接种于T-75培养瓶, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱静置培养。每隔72 h半量换液1次。

1.2.2 NSCs的单细胞克隆培养 将悬浮生长的克隆球收集入离心管中, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清, 加入少许无血清完全培养液, 用Pasteur吸管轻轻吹打进行机械分离, 尽量使其分散成单细胞悬液, 经苔盼蓝染色、计数, 采用有限稀释法将悬液稀释到10/mL, 接种于96孔培养板, 镜下标记只有1个细胞的培养孔, 每孔培养液定容至200 μL, 放入培养箱中培养并连续观察, 在形成新的克隆球后进行细胞传

收稿日期: 2012-03-22 接受日期: 2012-07-18

国家自然科学基金(No.31000514)和新乡医学院高学历人才科研资助项目(No.2007502002)资助

\*通讯作者。Tel: 0373-3029104, E-mail: jrdizhen@126.com

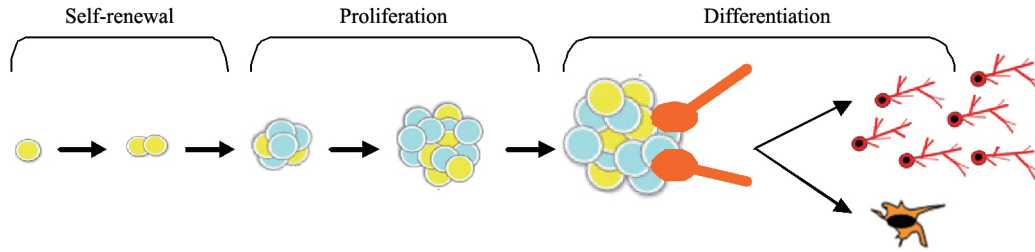


图1 神经干细胞增殖分化示意图(根据参考文献[1]改编)

Fig.1 The figure outlines the behavior of proliferation and differentiation of NSCs(modified from reference [1])

代培养。

**1.2.3 NSCs单细胞克隆的传代培养** 将单细胞克隆实验中形成的克隆球收集入离心管中, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清, 加入少许无血清完全培养液, 用Pasteur吸管轻轻吹打进行机械分离, 尽量使其分散成单细胞悬液, 细胞计数后, 调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 接种于T-25培养瓶。置于 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 的细胞培养箱静置培养。细胞传代后生长迅速, 每隔48~72 h半量换液1次, 每隔7~10 d传代1次。

**1.2.4 NSCs单细胞克隆的诱导分化<sup>[5-6]</sup>** 收集单细胞克隆第4代( $P_4$ )克隆球, PBS洗涤3次, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清, 加入神经诱导培养液: DMEM/F12+10% FBS重悬细胞, Pasteur吸管轻轻吹打进行机械分离, 尽量使其分散成单细胞悬液, 以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 细胞密度接种于T-75培养瓶和6孔板中(孔中预先放置用多聚赖氨酸处理的盖玻片), 置于 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 的细胞培养箱静置培养。每隔48~72 h半量换液1次。

**1.2.5 免疫荧光细胞化学染色** 收集原代培养和单细胞克隆培养的克隆球, 涂片(载玻片预先用多聚赖氨酸处理)处理后, 进行巢蛋白(Nestin)免疫荧光单标染色; 诱导分化的细胞进行神经元特异性烯醇化酶(NSE)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫荧光单标染色。取生长有细胞的玻片, 用4%多聚甲醛固定15 min,  $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 室温孵育10 min, 5% BSA封闭10 min, 分别加入兔抗鼠Nestin多克隆抗体(1:200)、兔抗鼠NSE多克隆抗体(1:200)、兔抗鼠GFAP单克隆抗体(1:100), 并设阴性对照, 用PBS液代替一抗,  $4^\circ\text{C}$ 过夜,  $37^\circ\text{C}$ 孵育2 h。以下操作需避光进行。加入FITC-标记的山羊抗兔IgG, TRITC-标记的山羊抗兔IgG,  $37^\circ\text{C}$ 孵育40 min, 用荧光封片剂封片, 荧光显微镜下观察结果。

**1.2.6 细胞增殖活性的测定** 收集不同发育阶段的细胞( $P_4$ 代克隆球, 诱导分化后3, 7, 10 d的神经元样细胞)进行碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色。细胞经PBS洗涤3次, 用70%的乙醇固定,  $4^\circ\text{C}$ 过夜, PBS洗涤3次,  $500 \mu\text{L}$  PI缓冲液( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  PI+ $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  RNase)重悬细胞, 室温避光染色30 min。用流式细胞仪分析细胞周期时相的变化, 以判断细胞增殖情况。每组计数10 000个细胞。

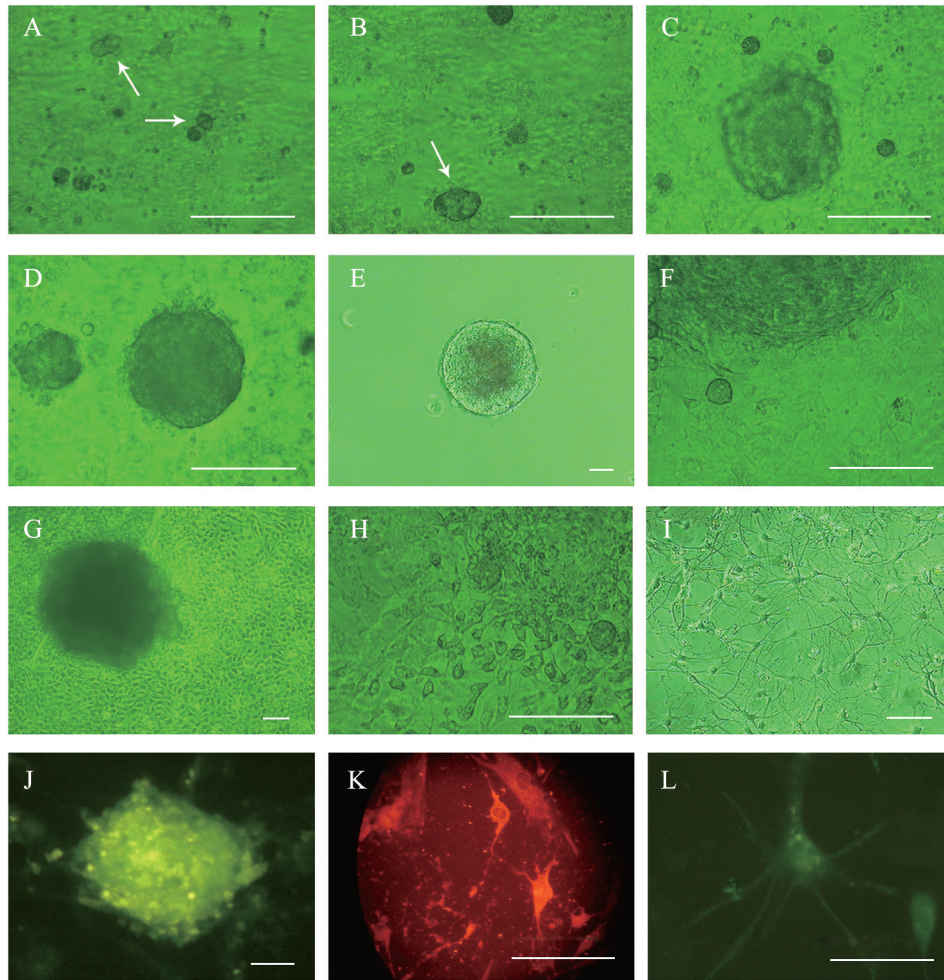
**1.2.7 统计学分析** 应用Sigma Plot软件对数据进行统计分析。结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析和LSD检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 NSCs的增殖生长及鉴定

倒置显微镜下观察细胞生长变化: 原代细胞接种后, 可见较多细胞碎片形成, 培养1~2 d, 部分细胞开始分裂, 并聚集悬浮生长(图2A)。3~5 d后, 大量细胞退化死亡, 少量细胞增殖成大小不一, 不规则的球形或桑葚状细胞集落(图2B)。6~9 d后, 细胞集落渐变成由几十至数百个细胞聚集在一起的克隆球, 球体透亮, 中心膨隆, 边缘清晰, 立体感强(图2C)。培养时间继续延长, 随着换液, 培养液中的细胞碎片越来越少, 培养背景逐渐清亮。12~16 d后, 克隆球直径继续增大, 中央区域因细胞数量明显增加而遮光性降低(图2D)。为防止中央区细胞出现营养供给不足, 及时传代。将原代培养的神经球以机械吹打法制成单细胞悬液, 进行单细胞克隆和传代培养, 得到较多与原代相同的典型神经球(图2E), 其球体规则, 边缘光滑, 遮光性强。免疫荧光结果显示, 原代神经球和单细胞克隆的神经球均呈巢蛋白染色阳性, 发出绿色荧光(图2J)。





A: 原代培养第2 d, 细胞开始分裂增殖并聚集悬浮生长; B: 原代培养第3 d, 细胞增殖形成不规则的细胞集落; C: 原代培养第9 d, 细胞增殖形成神经球; D: 原代培养第15 d, 神经球遮光性降低; E: 单细胞克隆传代培养, 神经球生长良好; F: 单细胞克隆神经球诱导分化第2 d, 细胞开始从贴壁的神神经球中迁移出来; G: 诱导分化第5 d, 迁出的细胞呈放射状分布; H: 诱导分化第12 d, 细胞基本已从神经球中迁出; I: 多数分化细胞呈神经元样形态, 突起之间交互形成网状; J: 巢蛋白免疫荧光阳性的神经球; K: NSE免疫荧光阳性的神经元样细胞; L: GFAP免疫荧光阳性的星形胶质样细胞。标尺=30  $\mu\text{m}$ 。

A: cells have started to split and aggregate in suspension after primary cultured 2 days; B: proliferating cells formed irregular cell colonies after primary cultured 3 days; C: proliferating cells formed neurospheres after primary cultured 9 days; D: the neurosphere became low refractivity after primary cultured 15 days; E: the neurosphere grew well after successive passages; F: the differentiated cells have started to migrate away from the neurosphere after induced 2 days; G: the radiating processes developed from the neurosphere after induced 5 days; H: the cells have almost migrated away from the neurosphere after induced 12 days; I: most differentiated cells showed neuronal-like shapes and interacted forming network; J: Nestin-positive neurosphere; K: NSE-positive neuronal-like cells; L: GFAP-positive astroglia-like cells. Bar=30  $\mu\text{m}$ .

图2 神经干细胞的体外培养和免疫荧光染色鉴定

Fig.2 The cultivation of NSCs *in vitro* and immunofluorescence for identification

## 2.2 NSCs的分化培养及鉴定

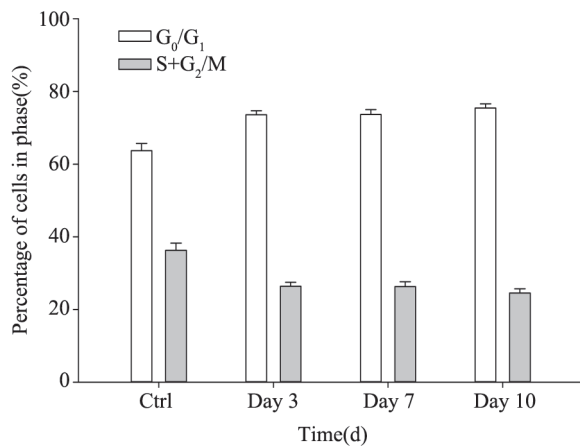
经单细胞克隆增殖, 细胞纯化后, 悬浮生长的神经球在诱导条件下培养24 h后开始贴壁生长, 2~3 d后少量细胞开始从神经球边缘迁移出来, 逐渐分化(图2F)。贴壁生长5~7 d后, 神经球周围迁出较多细胞, 呈放射状分布(图2G)。贴壁生长8~12 d后, 因多数细胞的迁出, 神经球失去球状立体外观, 迁出的细

胞分散形成单细胞层, 细胞伸出较短的突起(图2H)。随着分化时间的推移, 细胞基本从神经球中全部游走出来, 多数分化细胞呈神经元样形态, 其胞体圆形、饱满, 遮光性强, 并伸出1~2个较长突起, 突起不断延长, 交互形成网状(图2I), 免疫荧光结果呈NSE染色阳性, 发出红色荧光(图2K)。少数细胞分化成具有多个较短突起的星形胶质样细胞, 免疫荧光结

果呈GFAP染色阳性,发出绿色荧光(图2L)。

### 2.3 细胞增殖活性的测定

流式细胞仪检测细胞周期,将S+G<sub>2</sub>/M期的细胞百分比作为反映细胞增殖活性的指标,以判定细胞增殖情况。结果显示,诱导前P<sub>4</sub>代NSCs处于S+G<sub>2</sub>/M期的细胞比例较高为(36.27±1.99)%,表明干细胞处于增殖状态。诱导后其细胞周期分布出现明显变化(图3),与诱导前(Ctrl)相比,诱导分化不同阶段(3, 7, 10 d) S+G<sub>2</sub>/M期的细胞比例均明显降低( $P<0.05$ ),分别为(26.39±1.10)%、(26.33±1.33)%和(24.54±1.12)%,提示诱导分化的细胞大多停滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,细胞增殖已发生抑制,细胞进入分化状态。



各时间点处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S+G<sub>2</sub>/M期的细胞百分比。

The graph shows the percentage of cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-phase and (S+G<sub>2</sub>/M)-phase at different developmental stages.

图3 流式细胞仪检测细胞周期

Fig.3 Cell cycle detected by flow cytometry

## 3 讨论

目前,NSCs不仅作为主要的供体细胞能在神经系统疾病中做细胞移植治疗,同时也是基因工程中良好的细胞载体。正是由于NSCs的应用前景较为广泛,而备受国内外研究者关注<sup>[1-3,7]</sup>。但由于NSCs在成年脑内数量较少且分散存在,远远不能满足科学研究和临床应用的需要。那么建立稳定可靠的NSCs体外培养模型,无疑为人们对NSCs的深入研究和移植应用提供了较好的平台。

如何分离获得NSCs或含有NSCs的悬液,是进行NSCs相关研究的关键。目前常用的分离和培养方法主要是酶消化法和机械分离法<sup>[8-9]</sup>。酶消化法

是通过酶解细胞间的紧密连接和网络结构来实现获取NSCs的目的。此种方法操作方便,虽然能在较短的时间获得数量较多的细胞,但很难准确地把握酶解作用的最佳时间。且酶消化法可能会损伤NSCs表面的受体,使其对神经生长因子的敏感性降低或丧失,从而影响了细胞的活性。机械分离法则是通过实验器材来获得NSCs,只要操作得当,对细胞的损伤较小,细胞存活率高,活性好。本实验采用机械分离法来分离细胞。因为实验选材为乳鼠海马组织,组织发育还很幼稚,细胞外基质、结缔组织含量较少,细胞间的联系相对松散,所以通过眼科剪和Pasteur吸管等器械的机械操作,能较好地细胞的分离和培养。

在干细胞体外培养的过程中,一个关键的问题就是如何维持其未分化状态并大量扩增。实验选用不含血清的培养液,在培养过程中其他细胞由于缺乏血清支持而逐渐死亡,杂质细胞得以去除,NSCs被逐步筛选出来。B27添加剂含有多种促进干细胞生长和存活的微量元素。EGF和bFGF作为有丝分裂原,可进一步促进NSCs的分裂增殖。神经球是体外培养NSCs的标志性形态特征<sup>[5-6]</sup>。Mori等<sup>[10]</sup>在研究中证明,神经球是由干细胞的克隆聚集而成的(图1)。本实验从乳鼠海马分离获得细胞,采用无血清培养液进行培养,细胞增殖形成克隆球,悬浮生长。细胞通过吸收培养液中的营养物质和氧来维持新陈代谢,不断地进行克隆。增殖的细胞聚集在一起,又可以通过吸收彼此间释放的促生长因子而更好地生长。这样,大量的细胞聚集会使神经球的体积迅速增加,而过度的细胞聚集对于细胞的增殖则是不利的,因为克隆球的直径过度增加时,球体中央区域的细胞会处于缺少营养物和氧的状态<sup>[11-12]</sup>。实验中,为避免克隆球生长过大,通过Pasteur吸管轻轻地吹打,进行传代处理,使克隆球分散成为单细胞或小克隆球,以利于干细胞更好地进行自我增殖。且通过不断地换液和传代处理,杂质细胞可以逐渐清除,NSCs不断自我纯化。在单细胞克隆的培养过程中,经多次连续传代,可获得大量生长良好的神经球,其神经球的形态、结构与原代神经球基本相同,表明实验分离培养的NSCs具有连续稳定传代的能力。同时,流式细胞仪检测第四代克隆球细胞周期,显示S+G<sub>2</sub>/M期的细胞比例较高为(36.27±1.99)%,传代后的细胞生长状态良好,处于较为活跃的DNA合成和



分裂期, 细胞增殖活性较强, 增殖速度较快, 表明实验分离培养的NSCs具有良好的持续增殖能力。免疫荧光结果显示原代及传代的克隆球均呈巢蛋白染色阳性。Nestin是哺乳类的主要细胞骨架蛋白, 为第IV类中间丝蛋白, 被认为是NSCs的标志物。实验结果证明, 本实验分离获得的细胞其增殖特性及免疫荧光染色结果均符合NSCs的自我更新和克隆增殖特征。NSCs作为细胞替代治疗研究中的主要供体细胞, 一直以来, 因其在成体中数量稀少和异体移植的免疫排斥反应而受到限制。而NSCs在体外增殖纯化的过程中, 抗原呈递细胞等非干细胞的其他细胞已被层层筛选掉, 而单细胞克隆产生的NSCs较之原代的NSCs免疫原性更低<sup>[13]</sup>, 因而可作为良好的供体细胞, 与宿主细胞进行更好的整合。

单细胞克隆的NSCs是否适合于移植, 还要取决于细胞是否能保持多向分化的潜能。实验采用含胎牛血清的诱导液对神经球进行诱导, 进一步观察了NSCs的分化特征。血清中含有多种活性因子, 包括促细胞分化的相关因子。在诱导条件下, 神经球开始贴壁生长, 并逐渐分化。与诱导前的干细胞(Ctrl)相比, 分化细胞S+G<sub>2</sub>/M期的细胞百分比明显减少( $P<0.05$ ), 分化后细胞大多停滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。细胞周期的长短主要决定于G<sub>1</sub>期, G<sub>1</sub>期阻滞使NSCs生长周期延长, 细胞增殖发生抑制。细胞周期检测结果提示诱导过程干扰NSCs的DNA合成, NSCs已经结束增殖, 进入分化状态。与此同时, 形态学观察显示多数细胞分化成典型神经元样形态, 少数细胞则分化成具有星形胶质形态的细胞。NSE和GFAP分别是神经元和星形胶质细胞的特异性标志物, 分化的细胞其免疫染色结果分别显示为NSE、GFAP染色阳性。本实验室以往的工作<sup>[14]</sup>和最新的数据都表明, NSCs能诱导分化为神经元样细胞和神经胶质细胞。以上结果表明, 实验分离扩增的NSCs具有多向分化的潜能。

综上所述, 实验结果符合鉴定NSCs的标准: 具有自我更新和多向分化潜能, 表明实验成功分离培养了NSCs。NSCs体外培养的目的是通过细胞培养技术建立一个能观察、分析和检测NSCs的分子生物学和细胞学体系, 并进一步精确调控NSCs的生长,

从而为NSCs安全有效地应用于基础研究和临床治疗奠定基础。

### 参考文献 (References)

- 1 Ahmed S, Gan HT, Lam CS, Poonepalli A, Ramasamy S, Tay Y, *et al.* Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *Cell Adh Migr* 2009; 3(4): 412-24.
- 2 Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL. Neural stem cells: An overview. *Circ Res* 2003; 92(6): 598-608.
- 3 Chang KA, Kim JA, Kim S, Joo Y, Shin KY, Kim S, *et al.* Therapeutic potentials of neural stem cells treated with fluoxetine in Alzheimer's disease. *Neurochem* 2012; 3(17): 613-21.
- 4 关于善待实验动物的指导性意见. 中华人民共和国科学技术部 (Guidance suggestions for the care and use of laboratory animals. The ministry of science and technology of the People's Republic of China), 2006-09-30.
- 5 Sataoshi S, Takehiko S, Hiroaki K, Kazunobu S, Christian G, Schuichi K, *et al.* Purinergic signaling promotes proliferation of adult mouse subventricular zone cell. *Neurosci* 2012; 32(27): 9238-47.
- 6 Mayu L, Masahiro O, Teruaki K, Kana M, Toshiaki T, Takashi N, *et al.* Proliferation and differentiation of neural stem cells irradiated with X-rays in logarithmic growth phase. *Neurosci* 2012; 73(3): 263-8.
- 7 Taupin P. Stem cells engineering for cell-based therapy. *J Neural Eng* 2007; 4(3): 59-63.
- 8 Vescovi AL, Snyder EY. Establishment and properties of neural stem cell clones: Plasticity *in vitro* and *in vivo*. *Brain Pathol* 1999; 9(3): 569-98.
- 9 An YH, Wang HY, Gao ZX, Wang ZC. Differentiation of rat neural stem cells and its relationship with environment. *Biomed Environ Sci* 2004; 17(1): 1-7.
- 10 Mori H, Ninomiya K, Kino-oka M, Shofuda T, Islam MO, Yamasaki M, *et al.* Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *Neurosci* 2006; 84(8): 1682-91.
- 11 Glicklis R, Merchuk JC, Cohen S. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnol Bioeng* 2004; 86(6): 672-80.
- 12 Singec I, Knoth R, Meyer RP, Maciaczyk J, Volk B, Nikkhah G, *et al.* Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods* 2006; 3(10): 801-6.
- 13 Harrower TP, Tyers P, Hooks Y, Barker RA. Long-term survival and integration of porcine expanded neural precursor cell grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2006; 197(1): 56-69.
- 14 Xing Y, Zhang ZJ, Jing Y, Han XF, Xu Y, Yan WH. The change of potassium current of neural stem cells cultured *in vitro* from newborn rat hippocampus. *Appl Physiol* 2008; 24(3): 306-9.

## The Research of Isolation, Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells from the Newborn Rat Hippocampus *in vitro*

Bai Ruiying<sup>1</sup>, Zhang Zijuan<sup>2</sup>, Wang Yali<sup>1</sup>, Li Xinjuan<sup>1</sup>, Cheng Yuan<sup>1</sup>, Wei Linyu<sup>1</sup>, Xue Hong<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Physiology and Neurobiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; <sup>2</sup>Basic Medical Sciences of Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

**Abstract** The experiment aimed to explore the feasibility of the isolation, proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) from the hippocampus *in vitro*. NSCs were isolated sterilely from the hippocampus of newborn (24 h) SD rat, which were cultured in the serum-free medium and induced to differentiate by the fetal bovine serum induction medium. Immunofluorescence was performed to detect Nestin, NSE and GFAP in order to identify the cell types, respectively. And flow cytometry was used to determine proliferative activity of NSCs before and after induction. The results demonstrated that the cells isolated from the hippocampus had the ability of proliferation and could further form clone spheres and express Nestin. In addition, the differentiated cells expressed NSE and GFAP, respectively. Meanwhile, the results from flow cytometry showed that NSCs were actively dividing and the percentage of cells in S+G<sub>2</sub>/M was (36.27±1.99)%. However, at development stages of differentiation (3, 7, 10 d), the percentages of cells in S+G<sub>2</sub>/M were obviously decreased ( $P<0.05$ ), which were (26.39±1.10)%, (26.33±1.33)%, (24.54±1.12)%, respectively. In conclusion, neural stem cells exist in the hippocampus of newborn (24 h) rat, which have the ability of self-renewal and multipotent differentiation, and would be very useful for basic and clinic research.

**Key words** neural stem cells; isolation; proliferation; differentiation; identify

---

Received: March 22, 2012 Accepted: July 18, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31000514) and the Scientific Research Project for Talent with High Education of Xinxiang Medical University (No.2007502002)

\*Corresponding author. Tel: 86-373-3029104, E-mail: jrdizhen@126.com