

周围神经组织液对大鼠EPI-NCSCs体外分化的影响

张路^{1,2,3} 张洁元¹ 刘彬^{2,3} 刘争⁴ 李兵仓^{1*}

¹第三军医大学大坪医院野战外科研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042;

²西南大学生命科学学院, 重庆 400715; ³淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715;

⁴重庆医科大学生理学教研室/神经科学研究中心, 重庆 400016)

摘要 为了探讨周围神经组织环境因素对EPI-NCSCs(epidermal neural crest stem cells)分化的影响, 该文用坐骨神经组织提取液为环境因素, 对体外培养的EPI-NCSCs进行分化诱导。以正常培养的EPI-NCSCs为对照组, 细胞培养液成分为: DMEM/F12、10% FBS、2% B27、20 ng/mL bFGF。在细胞培养液中添加1%周围神经组织液作为实验组。MTT结果显示, 周围神经组织液对EPI-NCSCs的活性和增殖无影响; 对照组和实验组EPI-NCSCs都呈多种形态。RT-PCR分析显示, 在对照组和实验组中EPI-NCSCs均表达GFAP、S-100、 β -III Tubulin(Tuj1), 但在实验组中, 这三种蛋白的表达量均高于对照组。免疫组化分析显示, 在对照组中, EPI-NCSCs同时表现了雪旺细胞和早期神经元的鉴定特征; 在实验组中, EPI-NCSCs没有神经元的鉴定特征, 只表达雪旺氏细胞的鉴定特征。这表明, 周围神经组织液可以诱导体外培养的EPI-NCSCs向雪旺氏细胞分化。

关键词 表皮神经嵴干细胞; 雪旺氏细胞; 周围神经; 分化; 胶质纤维酸性蛋白

The Effect of Peripheral Nerve Tissue Fluid on the Differentiation of Rat EPI-NCSCs *In Vitro*

Zhang Lu^{1,2,3}, Zhang Jieyuan¹, Liu Bin^{2,3}, Liu Zheng⁴, Li Bingcang^{1*}

¹Research Institute of Surgery, Daping Hospital/State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; ²School of Life Science, South West University, Chongqing 400715, China;

³Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;

⁴Department of Physiology/Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract In order to explore environmental factors of peripheral nerve for EPI-NCSCs differentiation, we used sciatic nerve tissue extract as inducing factors for EPI-NCSCs (epidermal neural crest stem cells) *in vitro* differentiation. Normal culture EPI-NCSCs were used as control in culture medium containing DMEM/F12, 10% FBS (fetal bovine serum), 2% B27 and 20 ng/mL bFGF (basic fibroblast growth factor). Peripheral nerve tissue fluid (1%) was added to cell culture medium as the experiment group. MTT showed that peripheral nerve tissue fluid added into culture medium had no effect on the survive and proliferation of EPI-NCSCs compared with those of the control group; EPI-NCSCs showed different morphology in the control group and experiment group; RT-PCR analysis showed that GFAP, S-100 and β -III Tubulin (Tuj1) were expressed in the control group and experiment group. However, the expression levels of three pro-

收稿日期: 2013-10-16 接受日期: 2013-12-23

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB518106)、创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室1类研究课题(批准号: SKLZZ201003)和国家自然科学基金(批准号: 31271036、81371341)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68757469, E-mail: bcli1118@yahoo.com

Received: October 16, 2013 Accepted: December 23, 2013

This work was supported by the Major State Basic Research Project of China (Grant No.2012CB518106), the State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury (Grant No.SKLZZ201003) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271036, 81371341)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68757469, E-mail: bcli1118@yahoo.com

网络出版时间: 2014-03-24 11:01

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0334.html>

teins in the experiment group were higher than those in the control group. Immunohistochemical analysis revealed that in the control group EPI-NCSCs appeared to be β -III Tubulin positive. In the experiment group, EPI-NCSCs were S-100 and GFAP positive through immunocytochemistry. All these results demonstrated that peripheral nerve tissue fluid (1%) could be added to culture medium to induce EPI-NCSCs to differentiate towards Schwann cells *in vitro*.

Key words epidermal neural crest stem cells; Schwann cell; peripheral nerve; differentiation; glial fibrillary acidic protein

干细胞因其具有多种分化潜能^[1-2], 被广泛应用于动物组织和器官的再生研究中。干细胞的分化方向受多种因素的影响^[1-3], 其中细胞所处的环境因素是所有因素中的重要因素^[4]。表皮神经嵴干细胞(epidermal neural crest stem cells, EPI-NCSCs)取材方便, 便于分离纯化, 体外增殖快, 具有多种分化潜能, 从而受到再生医学领域的广泛关注^[5]。坐骨神经组织提取液除含有神经纤维、神经膜等有关蛋白外, 雪旺氏细胞分泌物也包含其中, 可用于环境因素对EPI-NCSCs体外分化的影响的研究。以往鲜有坐骨神经提取液对EPI-NCSCs分化影响的研究报道, 为此本文用坐骨神经组织提取液作为环境因素, 在体外培养观察及其对EPI-NCSCs分化诱导, 为后续周围神经损伤修复研究提供体外实验证据。

1 材料与方法

1.1 EPI-NCSCs的原代培养鉴定与免疫细胞化学(S-100、GFAP、 β -III Tubulin)分析

按照参考文献[6], 取1只GFP SD大鼠(雌性, 体重200 g, 由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供), 过量麻醉致死, 取其触须垫, 解剖出完整毛囊, 切除毛囊球部, 剖开结缔组织鞘, 取出毛囊外根鞘, 保持隆突部的完整。置于被鼠尾胶原包埋过的培养皿中, 25 min后加入1.5 mL培养液(含DMEM/F12、10% FBS、2% B27、20 ng/mL bFGF), 37 °C、5% CO₂条件下培养。3 d后半量换液, 6 d后剔除毛囊, 0.25%胰蛋白酶消化传代培养, 培养液同前, 每3 d换液一次。

将黏附有细胞的载玻片用PBS漂洗3次, 用4%多聚甲醛常温下固定30 min, PBS漂洗3次, 每次5 min, 用3% BSA室温封闭30 min, 倾去液体, 加入小鼠抗大鼠Nestin(1:100, Abcam, 美国)和兔抗大鼠SOX10(1:1 000, Abcam, 美国), 4 °C孵育过夜。PBS漂洗3次, 每次10 min。加入Alexa Flour 594山羊抗兔IgG(1:50, 上海碧云天生物技术有限公司)和Cy5山

羊抗小鼠IgG(1:50, 上海碧云天生物技术有限公司), 37 °C孵育1 h。PBS漂洗3次, 每次10 min。室温晾干避光, 抗荧光淬灭剂(上海碧云天生物技术有限公司)封片。BX50型荧光显微镜(Olympus, 日本)下观察。

培养1周时, 用PBS漂洗3次, 而后4%多聚甲醛常温下固定30 min, PBS漂洗3次, 每次5 min, 用3% BSA(Biosharp, 韩国)室温封闭30 min, 倾去液体, 加入小鼠抗大鼠GFAP(Abcam, 美国)、小鼠抗大鼠S-100-(Abcam, 美国)、小鼠抗大鼠 β -III Tubulin(Sigma, 美国), 4 °C孵育过夜。PBS漂洗3次, 每次10 min。加入TRITC山羊抗小鼠IgG(1:100, 上海碧云天生物技术有限公司), 37 °C孵育1 h。PBS漂洗3次, 每次10 min。最后用5 μ g/mL的Hoechst33342(Sigma, 美国)工作液37 °C孵育30 min染细胞核, PBS漂洗3次, 每次10 min; 室温晾干避光, 抗荧光淬灭剂(上海碧云天生物技术有限公司)封片。荧光显微镜下观察。

1.2 周围神经组织液的制备

取普通SD大鼠(220 g, 第三军医大学大坪医院实验动物中心)8只, 用3%戊巴比妥钠(Sigma, 美国)麻醉致死, 在无菌条件下取出两侧坐骨神经, 剪碎后匀浆, 用离心机(TDL-50B医用台式离心机, 上海)3 000 r/min离心10 min, 保留上清液, 用0.22 μ m过滤膜过滤除菌, 4 °C保存备用。

1.3 周围神经组织液对EPI-NCSCs体外分化的影响

1.3.1 实验分组 以正常培养的EPI-NCSCs为对照组, 细胞培养液成分为: DMEM/F12(GIBCO, 美国)、10% FBS(GIBCO, 美国)、2% B27(Sigma, 美国)、20 ng/mL bFGF(Sigma, 美国)。实验组: 在细胞培养液中添加1%周围神经组织液。培养1周后进行检测。

1.3.2 形态学观察 将密度为 1×10^6 /mL的细胞悬液接种到被鼠尾胶原包被的盖玻片上, 在37 °C、5% CO₂孵箱内培养。培养1周后, 用0.1 mol/L PBS漂洗3次, 荧光显微镜观察。同时, 爬片上的细胞用0.1 mol/L PBS漂洗3次, 2.5%戊二醛固定, 酒精脱水 and 叔丁醇置换, 再喷金, 扫描电子显微镜进行观察。

1.3.3 MTT分析 用鼠尾胶原蛋白I型(生友生物技术有限公司, 中国)包埋96孔板后, 用 γ 射线照射灭菌, 接种浓度为 1×10^6 /mL的细胞悬液($n=3$)。在 37°C 、 5% CO_2 条件下分别培养1, 3, 5, 7 d, 去上清液, 加入MTT工作液 $100 \mu\text{L}$ (含DMEM/F12+20% FBS培养基稀释, 终浓度为 1 mg/mL) 37°C 孵育4 h, 再加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲亚砷(上海生工生物工程有限公司)溶液, DDHZ-300台式恒温振荡器 37°C 震荡孵育30 min, 直至结晶产物完全溶解, 用未经处理的96孔板为对照组。用全波长酶标测定仪(Thermo, USA)在 570 nm 波长处检测其 D 值。

1.3.4 RT-PCR(*S-100*, *GFAP*, β -III *Tubulin*) 收集6孔细胞, 移入 1.5 mL EP管中, 加 1 mL Trizol(北京天根生化科技有限公司), 冰上裂解20 min, 加 $1/5$ 体积(0.2 mL)氯仿(成都市科龙化工试剂厂), 漩涡振荡混匀; 4°C 、 $15\ 000 \text{ r/min}$ 离心5 min; 转上层水相(约 $400 \mu\text{L}$)于另一 1.5 mL EP管中; 加等体积异丙醇(成都市科龙化工试剂厂)(约 $400 \mu\text{L}$), 振荡混匀; 4°C 、 $15\ 000 \text{ r/min}$ 离心20 min; 弃上清, 加冰预冷的 75% 乙醇(重庆川东化工有限公司) 1 mL ; 4°C 、 $15\ 000 \text{ r/min}$ 离心5 min; 弃上清, 加无水乙醇(重庆川东化工有限公司) 1 mL ; 4°C 、 $15\ 000 \text{ r/min}$ 离心5 min; 弃上清, 空气干燥 $5\sim 10 \text{ min}$; 溶于 $40 \mu\text{L}$ 1% DEPC(罗氏, 美国)水中, -70°C 保存待用。cDNA制备用Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒(ToYoBo公司, 日本)。

根据GenBank上所查*S-100*、*GFAP*、 β -III *Tubulin*序列, 用GeneTool软件设计引物, 上游引物分别列于表1。

在定量PCR体系中加入 $2.0 \mu\text{L}$ cDNA、目的基因上下引物各 $0.5 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{L}$ $2 \times \text{SYBR Green}$ 、 $7.0 \mu\text{L}$ ddH_2O , 每个样本3个复孔, 加完样后上荧光定量PCR仪反应。反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 57°C

30 s, 72°C 30 s, 40个循环; 72°C 10 min。PCR反应结束后, 每个样本取 $10 \mu\text{L}$ 进行琼脂糖凝胶电泳, 拍照分析比较目的基因在细胞中表达情况。

2 结果

2.1 原代培养的EPI-NCSCs

GFP-SD大鼠毛囊在体外培养6 d后, 从毛囊隆突区处爬出很多细胞(图1A)。经第一次传代后, GFP来源的EPI-NCSCs细胞在荧光显微镜下被激发出绿色荧光(图1B), 用小鼠抗大鼠Nestin(图1D)和兔抗大鼠SOX10(图1E)荧光免疫组化鉴定, 胞浆分别被激发出蓝色和红荧光, 从而确定原代培养的细胞为EPI-NCSCs。

2.2 MTT

在1周的培养期内, 正常培养的对照组和实验组EPI-NCSCs的体外增殖速率及趋势无显著差异($P>0.05$)(图2)。

2.3 RT-PCR分析

对照组(正常培养基)和实验组细胞都表达*GFAP*、*S-100*、 β -III *Tubulin*(*Tuj1*), 但在实验组中, 这三种基因的表达量均高于对照组($P<0.05$)(图3)。

2.4 EPI-NCSCs形态学观察

经过3 d的体外培养, 对照组的EPI-NCSCs(图4A和图4A1)细胞形态为不规则形, 细胞长度介于 $60\sim 110 \mu\text{m}$, 细胞核直径在 $10\sim 20 \mu\text{m}$ 之间。实验组细胞形态(图4B和图4B1)与对照组无明显区别。

2.5 免疫细胞化学分析

经过1周的体外培养, 在荧光显微镜不同波长下对EPI-NCSCs表达*GFAP*的情况进行观察(图5)。同一视野, 对照组EPI-NCSCs显示*GFAP*为阴性(图5C), 实验组EPI-NCSCs表达*GFAP*(图5C1)。

由于图5A~5C和图5A1~5C1分别是在同一视野

表1 三种蛋白基因上下引物游序列

Table 1 The forward and reverse primer sequence of three genes

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物大小(bp) Size (bp)
<i>S-100</i>	F: ACG CCA CTG CCG AGG AGG R: GGG AGG ACA GAG CCA AGT GGA	281
<i>GFAP</i>	F: CCC TCC CCC ACA GCG AAT C R: GCC CTC CTC TGT CCG TGT CCT A	194
β -III <i>Tubulin</i>	F: GCC CTC CAT CCC CAC AAC R: CAG CTT CCG AGA GGG TAC ACT AA	191

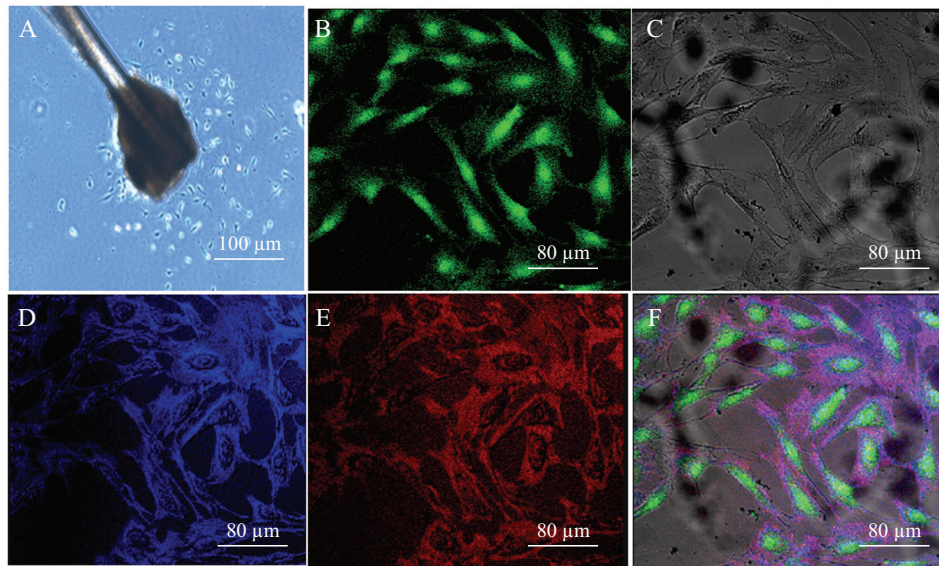


图1 EPI-NCSCs的原代培养及鉴定
A: 3 d时细胞从毛囊爬出来; B: 荧光显微镜结果(GFP); C: 相差显微镜结果; D: Nestin免疫组化鉴定; E: SOX10免疫组化鉴定; F: GFP/Nestin/SOX10。
A: after 3 days, cells were emigrated from hair follicle; B: GFP expression in cells; C: phase contrast image; D: Nestin expression in EPI-NCSCs; E: SOX10 expression in EPI-NCSCs; F: GFP/Nestin/SOX10.

Fig.1 Primary culture and identification of EPI-NCSC

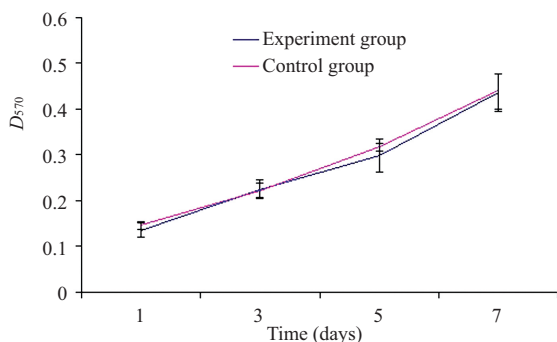


图2 MTT分析
Fig.2 MTT analysis

下的图像, 实验组和对照组的细胞数量可以分别从图5A、图5B和图5A1、图5B1中计算出来。分别与图5C和图5C1中的GFAP阳性细胞数量进行比较, 由此可以估算出对照组中EPI-NCSCs的GFAP阳性率为7%, 实验组中EPI-NCSCs的GFAP阳性率为95%。

体外培养1 w时, 用S-100酸性钙结合蛋白免疫组合试剂盒处理后, 对照组EPI-NCSCs表达S-100细胞数占0%(图6A~图6C)。而实验组EPI-NCSCs(图6A1~图6C1)阳性率为90%。

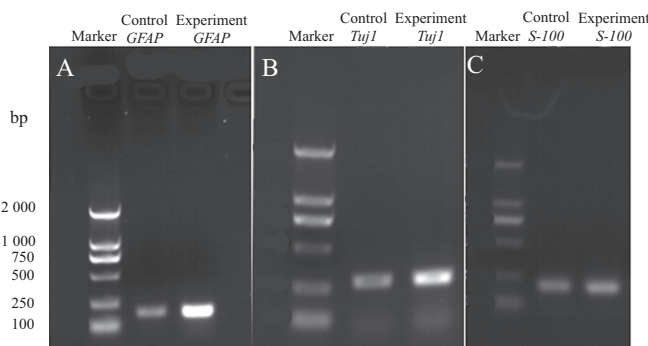
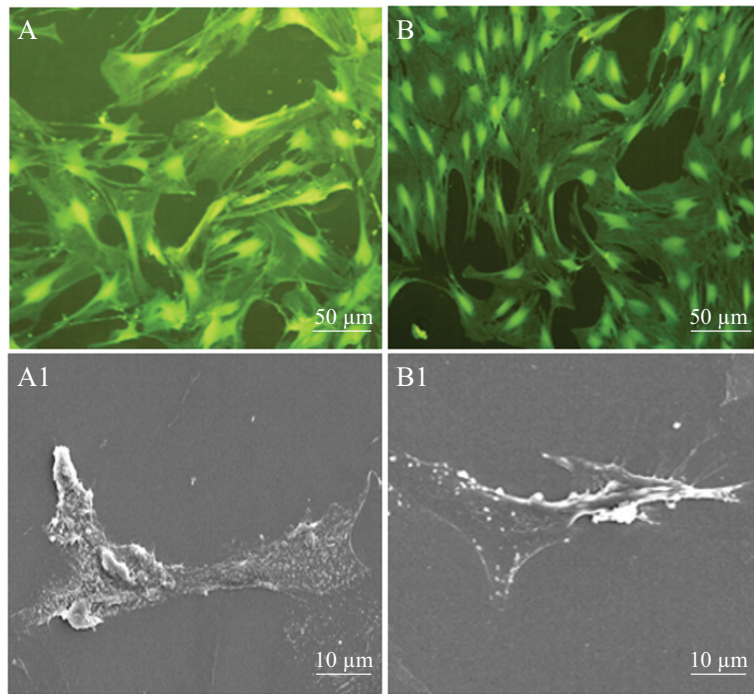


图3 RT-PCR检测S-100、GFAP、β-III Tubulin mRNA的表达
A: 实时定量PCR显示GFAP基因在对照组和实验组中表达量; B: 实时定量PCR显示S-100基因在对照组和实验组中表达量; C: 实时定量PCR显示Tuji1(β-III Tubulin)基因在对照组和实验组中表达量; D: 三种基因的相对表达量。*P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较。

A: the expression of GFAP mRNA in the control and experiment group by RT-PCR; B: the expression of S-100 mRNA in the control and experiment group by RT-PCR; C: the expression of Tuji1(β-III Tubulin) mRNA in the control and experiment group by RT-PCR; D: the relative expression quantification of the three genes. *P<0.05, **P<0.01 vs control group.

图3 RT-PCR检测S-100、GFAP、β-III Tubulin mRNA的表达
Fig.3 RT-PCR analysis of S-100, GFAP and β-III Tubulin mRNA expression

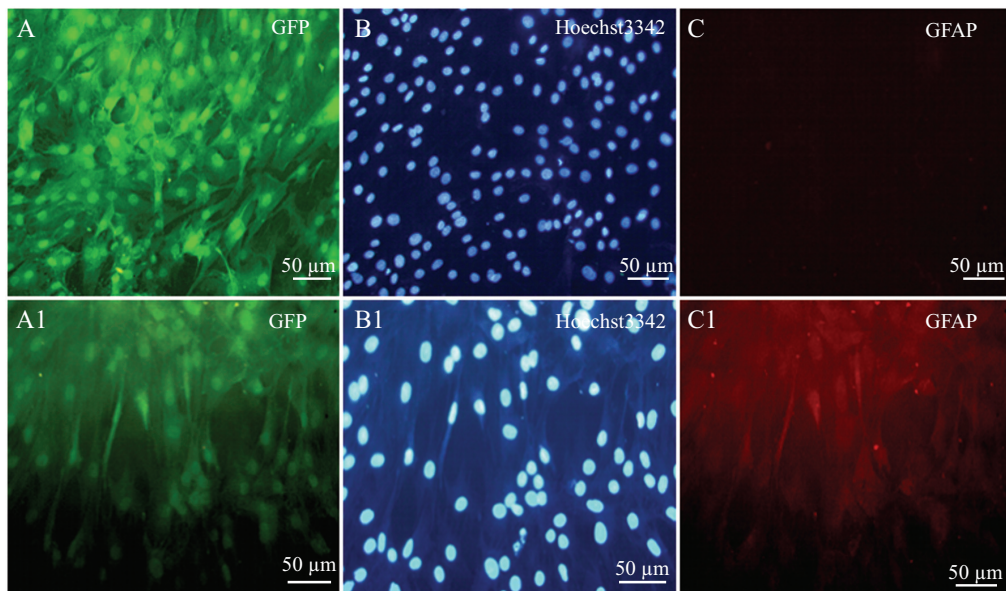


A: 对照组荧光显微镜结果; B: 实验组荧光显微镜结果; A1: 对照组扫描电镜结果; B1: 实验组扫描电镜结果。

A: control group observation by fluorescence microscopy; B: experiment group observation by fluorescence microscopy; A1: control group observation by SEM; B1: experiment group observation by SEM.

图4 细胞形态

Fig.4 Cell morphology

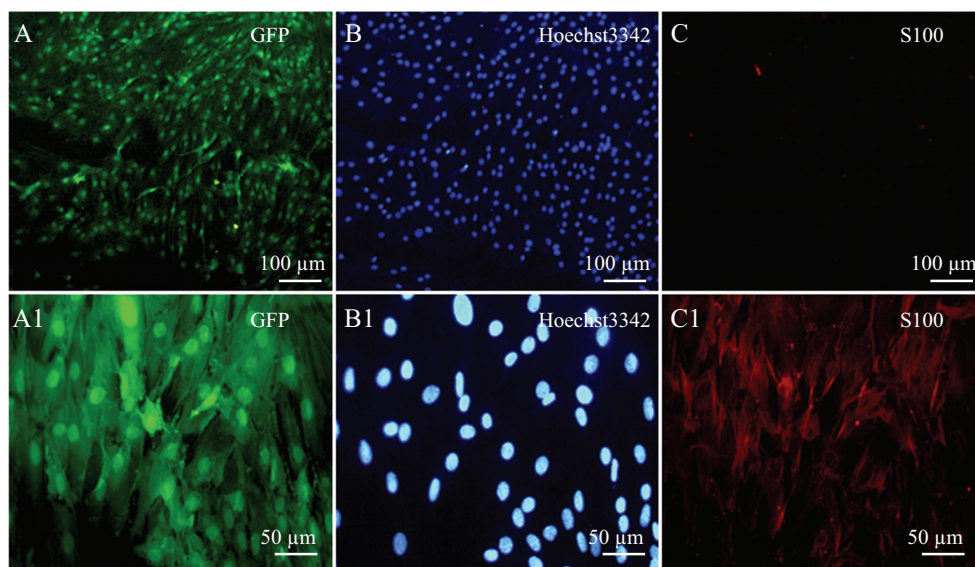


A: 对照组GFP; B: 对照组Hoechst33342染核; C: 对照组GFAP; A1: 实验组GFP; B1: 实验组Hoechst33342染核; C1: 实验组GFAP。

A: GFP of control group; B: Nuclear stained by Hoechst33342 in control group; C: GFAP expression in control group; A1: GFP of experiment group; B1: Nuclear stained by Hoechst33342 in experiment group; C1: GFAP expression in experiment group.

图5 胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组化鉴定

Fig.5 GFAP immunohistochemistry identification

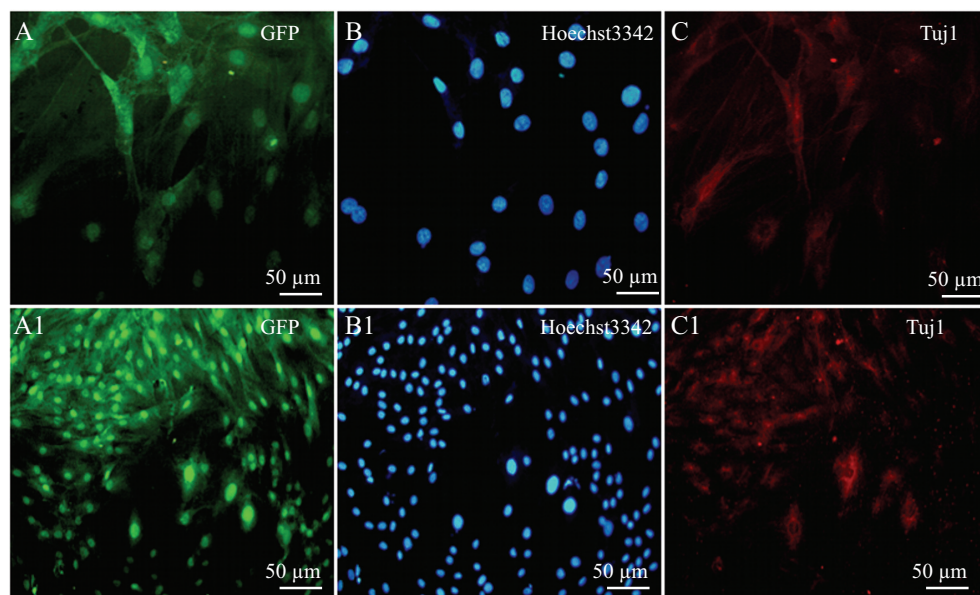


A: 对照组GFP; B: 对照组Hoechst33342染核; C: 对照组S-100; A1: 实验组GFP; B1: 实验组Hoechst33342染核; C1: 实验组S-100。

A: GFP of control group; B: nuclear stained by Hoechst33342 in control group; C: S-100 expression in control group; A1: GFP of experiment group; B1: nuclear stained by Hoechst33342 in experiment group; C1: S-100 expression in experiment group.

图6 酸性钙结合蛋白(S-100)免疫组化鉴定

Fig.6 S-100 immunohistochemistry identification



A: 对照组GFP; B: 对照组Hoechst33342染核; C: 对照组β-III Tubulin(Tuj1); A1: 实验组GFP; B1: 实验组Hoechst33342染核; C1: 实验组β-III Tubulin(Tuj1)。

A: GFP of control group; B: nuclear stained by Hoechst33342 in control group; C: β-III Tubulin (Tuj1) expression in control group; A1: GFP of experiment group; B1: nuclear stained by Hoechst33342 in experiment group; C1: β-III Tubulin (Tuj1) expression in experiment group.

图7 β-III Tubulin神经特异性微管蛋白免疫组化鉴定

Fig.7 β-III Tubulin immunohistochemistry identification

体外培养1 w时, 对照组EPI-NCSCs(图7A~图7C)表达β-III Tubulin的细胞百分比为52%, 实验组EPI-NCSCs表达β-III Tubulin的细胞百分比为33%(图7A1~图7C1)。

3 讨论

Nestin是神经干细胞的标志物^[7-8], 在本研究中原代培养的细胞为Nestin阳性, 本文所用培养方法与Amoh等^[6]的培养方法相同, 由此可确定所培养的细

胞为EPI-NCSCs。

β -III Tubulin为早期神经元标志物^[7],在对照组中表达 β -III Tubulin的细胞数占52%,实验组表达 β -III Tubulin细胞数为33%,即正常培养条件下EPI-NCSCs向早期神经元分化细胞数占优势,而在培养液中添加1%周围神经组织液后EPI-NCSCs向神经元分化的趋势被阻止。卢静等^[13]曾报道神经嵴干细胞(NCSCs)应用雪旺氏细胞培养液时,可诱导神经嵴干细胞分化形成较多成熟神经元,胶质细胞比例可达0.75:1。神经嵴干细胞的分化是通过胞内、外众多成份相互作用起作用。已证实表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)能够促进神经嵴干细胞增殖,白血病抑制因子(leukaemia inhibitor factor, LIF)能够维持干细胞状态。促进神经嵴干细胞向神经元分化的细胞因子主要有: BDNF、BMP2/4等,而促进神经嵴干细胞向神经胶质细胞分化的细胞因子主要有neuregulin。这些影响因素在神经嵴干细胞增殖分化中的作用并不是孤立的,因子之间、因子与细胞外基质相互作用、细胞之间、神经嵴干细胞所处的不同细胞阶段以及迁移部位都会影响神经嵴干细胞的增殖分化。

雪旺氏细胞早期从前体转化为成熟体的时候均表达Sox10^[9], S-100是雪旺氏细胞的标志物^[8], GFAP是神经胶质细胞的标志物^[7]。本实验中,正常培养的EPI-NCSCs为Sox10阳性,表达GFAP的细胞占7%, S-100阳性率为0%,即不表现出向雪旺氏细胞分化的趋势。实验组EPI-NCSCs表达GFAP的细胞数占95%, S-100阳性率为90%,即周围神经组织液可诱导EPI-NCSCs向雪旺氏细胞分化。

神经嵴干细胞可以在体外大量扩增,且与神经系统具有高度的同源性,其修复周围神经损伤的应用前景最为广阔。虽然可以从不同年龄不同部位的神经组织取材,但其生物学特性存在明显差别,成体神经嵴干细胞分化形成胶质细胞较神经元多^[14-15],早期胚胎的神经嵴干细胞分化成神经元的比例较大^[16-17]。Aquino JB等^[18]将boundary cap来源的神经嵴干细胞移植入离断的坐骨神经共培养时,发现神经嵴干细胞可形成大量成熟的雪旺氏细胞,进而改善神经再生的微环境,促进周围神经再生和功能恢复。Yasuyuki等^[6]报道, EPI-NCSCs在体外培养条件下有48%细胞分化为神经元, 30%的细

胞分化为神经胶质细胞, 还有其他细胞如角质细胞(18%)、平滑肌细胞(2%)、黑色素细胞(2%)等。将EPI-NCSCs移植至小鼠坐骨神经缺损处可使其转分化为雪旺细胞^[8]。本文正常培养的EPI-NCSCs和实验组EPI-NCSCs的形态多样,形态无明显差异。

本实验通过MTT法观察到加入1%的周围神经组织液后对EPI-NCSCs存活和增殖没有影响。RT-PCR分析在对照组和实验组中, EPI-NCSCs表达S-100、GFAP和 β -III Tubulin有差异。实验组EPI-NCSCs表达GFAP、S-100和 β -III Tubulin均高于对照组。而GFAP和S-100是雪旺氏细胞的标志蛋白,说明加入1%的周围神经组织液后EPI-NCSCs有向雪旺氏细胞分化的趋势。周围神经损伤后再生,其功能恢复主要依赖于SCs提供一个神经再生的微环境,同时增殖的雪旺细胞在基膜围成的神经膜管内有序地排列形成一条实心的细胞索Bungner带,同时再生轴突进入Bungner带,随后大部分雪旺细胞凋亡,存活的雪旺细胞开始与轴突1:1匹配并包绕轴突形成髓鞘,再生轴突延伸至效应器,重新建立突触联系。SCs是周围神经的主要结构和功能细胞,神经损伤后它对神经再生和功能恢复起着重要的作用^[11-12]。Tessa等^[10]报道雪旺氏细胞移植缺损7 mm大鼠坐骨神经, 6 w后轴突再生。周围神经损伤的修复也需要神经元再生,在对照组中EPI-NCSCs有向神经元方向分化的趋势,但在实验组, EPI-NCSCs表达的 β -III Tubulin高于对照组,所以需要进一步完善调控EPI-NCSCs分化方向。

EPI-NCSCs是一种具有多向分化潜能的干细胞,研究其定向诱导分化的条件,对于周围神经损伤修复起到重要作用。本实验的研究结果表明,周围神经组织液可以诱导体外培养的EPI-NCSCs向雪旺氏细胞分化。

参考文献 (References)

- 1 Yang YJ, Baltus AE, Mathew RS, Murphy EA, Evrony GD, Gonzalez DM, *et al.* Microcephaly gene links trithorax and REST/NRSF to control neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell* 2012; 151(5): 1097-12.
- 2 韩正滨, 陈红星, 邓继先. 脂肪源性干细胞的多向分化潜力及应用前景. *生物工程学报*(Han Zhengbin, Chen Hongxing, Deng Jixian. Multipotential differentiation and potential applications of adipose-derived stem cells. *Chin J Biotech*) 2007; 23(2): 195-200.
- 3 陈家欢, 魏育蕾, 彭莎, 王华岩. 猪羊水干细胞特异向跳动心肌细胞诱导分化. *生物工程学报*(Chen Jiahuan, Wei Yulei, Peng

- Sha, Wang Huayan. Differentiation of porcine amniotic fluid stem cells into the beating cardiomyocytes. *Chin J Biotech* 2011; 27(8): 1206-14.
- 4 郭 勇, 刘 璐, 郝庆新, 李瑞欣, 张西正, 王 亮, 等. 体外培养所形成的细胞外基质对MC3T3-E1细胞生长和分化的影响. *生物工程学报*(Guo Yong, Liu Lu, Hao Qingxin, Li Ruixin, Zhang Xizheng, Wang Liang, *et al.* Effects of extracellular matrix produced *in vitro* on growth and differentiation of MC3T3-E1 cells. *Chin J Biotech* 2011; 27(11): 1606-12.
- 5 Hu YF, Zhang ZJ, Sieber-Blum M. An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature. *Stem Cells* 2006; 24(12): 2692-702.
- 6 Yasuyuki A, Li LN, Kensei K, Sheldon P, Robert MH. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(15): 5530-4.
- 7 柳太云, 熊 符, 林 军, 王传森, 张 成. 人骨髓间充质干细胞移植促进脑梗死大鼠神经细胞再生和神经功能恢复. *中国组织工程研究*(Liu Taiyun, Xiong Fu, Lin Jun, Wang Chuansen, Zhang Cheng. Human bone marrow mesenchymal stem cells transplantation induces neural regeneration and improves the recovery of nerve function in a rat stroke model. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res* 2012; 16(1): 70-5.
- 8 刘 芳, 许家军, 张传森, 党瑞山, 陈尔瑜. 成年大鼠毛囊神经嵴干细胞的培养、鉴定及初步诱导分化. *解剖学杂志*(Liu Fang, Xu Jiajun, Zhang Chuansen, Dang Ruishan, Chen Eryu. Culture, identification and primary induced differentiation of hair follicles neural crest stem cell from adult rat. *Chin J Clin Anat* 2006; 9(5): 647-9.
- 9 贺 斌, 刘世清, 李皓桓. 吡咯喹啉醌对许旺细胞增殖及Sox10表达的影响. *中国组织工程研究与临床康复*(He Bin, Liu Shiqing, Li Haohuan. Effects of pyrroloquinoline quinone Schwann cells proliferation and Sox10. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res* 2010; 4(19): 3554-7.
- 10 Tessa H, Cathryn S, Daniel H, Joseph V. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 2000; 6(2): 119-27.
- 11 Fansa H, Keilhoff G. Comparison of different biogenic matrices seeded with cultured Schwann cells for bridging peripheral nerve defects. *Neurol Res* 2004; 26(2): 167-73.
- 12 Kristine E. Schmalengerg, Kathryn E. Uhrich. Micropatterned polymer substrates control alignment of proliferating Schwann cells to direct neuronal regeneration. *Biomaterials* 2005; 26(12): 1423-30.
- 13 卢 静, 孙晋浩, 张 静, 丛 丽, 綦晓霞, 庄 园, 等. 躯干神经嵴干细胞体外培养及其增殖、分化的实验研究. *山东大学学报(医学版)*(Lu Jing, Sun Jinhao, Zhang jing, Cong Li, Qi Xiaoxia, Zhuang Yuan, *et al.* Culture, proliferation, and differentiation of trunk neural crest stem cells in early embryos of rats: An *in vitro* experiment. *Journal of Shan Dong University, Health Sciences* 2009; 47(4): 46-9.
- 14 Critti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, *et al.* Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *Neurosci* 1996; 16(3): 1091-100.
- 15 Theo DP, Eleni AM, Andrew RW, Frank S, Fred HG. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *Neurosci* 1999; 19(19): 8487-97.
- 16 Koichi U, Hideyuki O, Takuro H, Yutaka M, Yoshikuni T, Tatsuji N, *et al.* Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses With Xenogeneic Rat Neurons. *J Neurosci Res* 2003; 72(6): 661-9.
- 17 Yamada M, Uchida K, Hayashi T, Mine Y, Kawase T. Vigorous neuronal differentiation of amplified and grafted basic fibroblast growth factor-responsive neurospheres derived from neuroepithelial stem cells. *Cell Transplant* 2004; 13(4): 421-8.
- 18 Aquino JB, Hjerling-Leffler J, Koltzenburg M, Edlund T, Villar MJ, Ernfors P. *In vitro* and *in vivo* differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. *Exp Neurol* 2006; 198(2): 438-49.