

· 基础研究 ·

## 猪 naive-like 胚胎干细胞向神经细胞体外诱导分化

王晨宇,张曼玲,姜海滨,金永,赵丽华,刘曼菱,陈俏羽,王俊政,尤志欢,张红,李荣凤\*

南京医科大学江苏省异种移植重点实验室,江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的:将猪 naive-like 胚胎干细胞体外定向诱导分化为神经细胞,为猪多能干细胞诱导神经分化方法的建立提供参考。方法:利用小分子化合物 $\beta$ -巯基乙醇、B-27、肝素等组成的神经诱导培养液,采用直接分化法,分化得到神经样细胞,对其进行神经特异性基因表达鉴定,同时检测分化后的细胞是否已经丧失多能性。结果:分化所得到的神经细胞具有明显的神经细胞结构特征,RT-PCR和免疫荧光结果显示分化后的神经细胞表达多种神经细胞特异性基因,qPCR结果显示分化后多能因子的表达显著降低,神经特异性基因表达显著升高,免疫荧光结果经统计分析后显示,低分子量神经微丝蛋白(light neurofilament protein, NF-L)阳性细胞率可达79%。结论:成功实现了体外直接诱导猪 naive-like 胚胎干细胞向神经细胞分化,为神经系统疾病修复与治疗研究奠定了基础。

**[关键词]** 猪胚胎干细胞;神经细胞;小分子;诱导分化

**[中图分类号]** Q813

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)06-829-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20190608

## The induced differentiation of naive-like porcine embryonic stem cells into nerve cells *in vitro*

Wang Chenyu, Zhang Manling, Jiang Haibin, Jin Yong, Zhao Lihua, Liu Manling, Chen Qiaoyu, Wang Junzheng, You Zhihuan, Zhang Hong, Li Rongfeng\*

Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** Porcine naive-like embryonic stem cells were induced to differentiate into neural cells *in vitro*, which provided basic information for the repair and treatment of the neurological disease. **Methods:** The neural-inducing culture medium with small molecule compounds  $\beta$ -mercaptoethanol, B-27 and heparin was used to differentiate the porcine naive-like embryonic stem cells towards the neural-like cells. We have derived neural-like cells with identification of the neural specific gene expression. We detected whether these cells could show limited pluripotency. **Results:** The neural-like cells had obvious neuronal cell structure. RT-PCR and immunofluorescence data showed that the differentiated neurons expressed a variety of neural cell-specific genes. QPCR results showed that the expression of pluripotent factors was decreased significantly after differentiation process and the expression of nerve-specific genes was significantly increased. The results of immunofluorescence showed that the rate of light neurofilament protein (NF-L) positive cells reached 79%. **Conclusion:** Neural cells could be directly induced from porcine naive-like embryonic stem cells *in vitro*.

**[Key words]** porcine embryonic stem cells; nerve cells; small molecules; induced differentiation

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06): 829-834]

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)是从囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)中获得的具有无限自我更新能力、多向分化潜能和种间嵌合能力的一

类全能细胞<sup>[1]</sup>,同时胚胎干细胞是生物工程、医学、遗传学及器官移植等基础医学理论研究中的重要工具<sup>[2]</sup>。猪是研究人类疾病的良好动物模型,由于其在生理解剖等方面与人相似使得猪具有许多小鼠所不具备的优势,如亨廷顿舞蹈症模型研究<sup>[3]</sup>,同时猪也可用于异种器官移植研究<sup>[4]</sup>。目前关于猪胚胎干细胞建系已有相关报道<sup>[5-6]</sup>,但是未能获得与小

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31371487)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: lirongfeng@njmu.edu.cn

鼠胚胎干细胞有相同分化潜能并具有种系嵌合能力的猪胚胎干细胞系。

将胚胎干细胞体外诱导为神经细胞,以建立体外定向分化神经细胞的方法,可以帮助进一步理解神经系统的发育过程,提供相关的组织和细胞用于细胞疗法,进而为细胞移植提供无免疫原性的细胞来源。目前关于猪多潜能干细胞定向分化为神经细胞鲜有报道,因而尚无确切的猪胚胎干细胞定向分化诱导为神经细胞的方法。之前在人和小鼠多潜能干细胞定向分化为神经细胞的方法主要有3种:维甲酸诱导法<sup>[7]</sup>、生长因子诱导法<sup>[8]</sup>及直接分化法<sup>[9]</sup>,直接分化法需要3周以上的时间才能获得神经样细胞,而另外2个方法均需要先形成拟胚体(embryoid body, EB)后再进一步分化。目前,关于猪多潜能干细胞体外诱导神经细胞的分化缺少相关文献支持,本研究采用实验室自建系猪 naive-like 胚胎干细胞系,参考人和小鼠多潜能干细胞诱导神经细胞分化的培养液配方<sup>[10-11]</sup>,并在此基础上略作调整,尝试将猪 naive-like 胚胎干细胞定向分化为神经细胞,以期能为猪多能干细胞体外诱导分化为神经细胞方法的建立提供相关参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠胎儿成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)购自南京医科大学实验动物中心,猪 naive-like 胚胎干细胞系为南京医科大学江苏省异种移植重点实验室建系,猪脑组织为南京医科大学江苏省异种移植重点实验室猪场自行取材。

细胞培养用试剂:高糖 DMEM(1×)、Knock-Out™ DMEM(1×)、DMEM/F12(1:1)(1×)、Neurobasal Medium、FBS、KnockOut™ SR、MEM NEAA(100×)、2-Mercaptoethanol、Pen Strep、N-2 Supplement、B-27 Supplement、0.25% Trypsin-EDTA(1×)、bFGF、DPBS(Gibco 公司,美国);BSA、L-Glutamine、L-Ascorbic acid、CHIR99021、PD0325901、DMSO、明胶(Sigma 公司,美国);SB431542、Doxycycline hyclate(Tocris 公司,英国), Mouse LIF(Millipore 公司,美国);insulin(Roche 公司,美国);丝裂霉素 C(Wako 公司,日本)。

细胞鉴定用试剂:多聚甲醛、Triton® X-100、Fluoroshield™ with DAPI(Sigma 公司,美国);RNAiso-Plus、RNase-free Water、100 bp DNA Ladder、Ex Taq(TaKaRa 公司,日本);Hi Script II Q RT SuperMix

for qPCR(+gDNA Wiper)、2×Taq Master Mix、2×ChamQ SYBR qPCR MasterMix(南京诺唯赞生物科技有限公司)。OCT4(Santa Cruz Biotechnology 公司,美国),SOX2(Calbiochem 公司,德国),低分子量神经微丝蛋白(light neurofilament protein, NF-L, Millipore 公司,美国),β III-tubulin(Cell Signaling 公司,美国),Goat anti-Rabbit IgG Rhodamine(Rockland 公司,德国),Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 546(Life Technology 公司,美国)。

实时定量 PCR 仪(Roche 公司,美国);荧光倒置显微镜(Nikon 公司,日本);细胞培养箱(Thermo 公司,美国);生物倒置显微镜(Olympus 公司,日本);PCR 仪(ABI 公司,美国);高速冷冻离心机(Eppendorf 公司,德国);凝胶成像仪(Bio-Rad 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 原代小鼠胎儿成纤维细胞的分离和培养

取 13.5 d 的 ICR 品系孕鼠,断颈处死后将含鼠胚的子宫完全取出,用眼科镊去除鼠胚的头、四肢以及内脏,将躯干皮肤组织移入培养皿中用 0.25% 胰酶消化 5~10 min,加入培养液后吹打混匀终止胰酶作用,1 500 r/min 离心 5 min 后,弃上清,加入培养液后将其分别接种到 10 cm 培养皿中,第 2 天换液,待细胞长满后冻存。

#### 1.2.2 饲养层细胞的制备

解冻 P0 代 MEF 于 10 cm 培养皿中对细胞进行传代培养,取 P4 代以内的 MEF 用含有 10 μg/mL 丝裂霉素 C 的培养液处理 2.5~3.0 h 后,胰酶消化成单细胞对其进行计数,按 4×10<sup>5</sup> 个/孔的密度将细胞加入到 0.1% 明胶预处理的 6 孔板中,之后将细胞放入培养箱中备用。

#### 1.2.3 猪 naive-like 胚胎干细胞的解冻与培养

准备 15 mL 离心管,加入预热后的 5 mL 培养液,从液氮中取出冻存管于 37 °C 水浴锅内解冻后将细胞加入离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清加液体吹匀后计数,接入预先用丝裂霉素 C 处理的 MEF 饲养层上,干细胞培养液为 LBX 培养液。

#### 1.2.4 猪神经样细胞的诱导分化

将预先培养好的猪 naive-like 胚胎干细胞用 0.25% Trypsin 消化 2 min 后终止消化,将干细胞消化成单细胞,差时贴壁后以 1×10<sup>4</sup> 个/孔均匀接入 0.1% 明胶预处理的 6 孔板中,用 LBX 培养液进行培养,待干细胞形成克隆后,更换为神经分化诱导培养液。神经分化诱导培养液配方为:34%DMEM/F12(1:1)(1×)、20%DMEM(1×)、35%Neurobasal Medium、5.5×

10<sup>-5</sup> mol/L 2-Mercaptoethanol、1% B-27 Supplement、10% FBS、1 mg/mL heparin。每隔 2 d 更换 1 次培养液,经过 5 d 的分化培养后获得由猪胚胎干细胞分化得到的类神经样细胞。

### 1.2.5 RT-PCR 及 real time RT-PCR 鉴定神经标志性基因的表达

使用 TRIzol 法提取猪胚胎干细胞及分化后得到的类神经样细胞的总 RNA,使用 Hi Script<sup>®</sup> II Q RT Super Mix for qPCR 试剂盒将提取的各细胞总 RNA 反转录为 cDNA,引物序列见表 1,具体步骤如下:RNA 反转录为 cDNA:①取 1 个 RNase-free PCR 管,加入 500 ng RNA,之后补加 RNase-free 水至 6 μL;②向其中加入 2 μL 4×gDNA Wiper Mix,轻轻混匀,42 °C 反应 2 min;③之后加入 2 μL 5×HiScript<sup>®</sup> II qRT SuperMix II,轻轻混匀,进行逆转录反应,反应程序为:25 °C 10 min,50 °C 30 min,85 °C 5 min;④反应结束后,将产物用 RNase-free 水稀释 5 倍,-20 °C 保存。

RT-PCR 步骤:①在合成的引物中加入 ddH<sub>2</sub>O,配制成 10 μmol/L 溶液备用;②按照如下所示配制 20 μL 反应体系:2×Taq Master Mix 10 μL,上下游引物各 1 μL,模板 cDNA 1 μL 以及 ddH<sub>2</sub>O 7 μL;③将 PCR 管放置于 PCR 仪上,进行 PCR 反应,反应程序为:95 °C 5 min,95 °C 30 s、退火 30 s(温度见表 1)、72 °C 1 min(35 个周期),72 °C 10 min,4 °C 保存;④将反应产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,拍照。

### 1.2.6 免疫荧光染色鉴定蛋白表达水平

弃掉干细胞培养液,使用 DPBS 洗 1 遍,5 min;4% 多聚甲醛室温固定 10 min,DPBS 洗 3 遍,每遍 5 min;向细胞中加入 1% Triton X-100(溶于 DPBS 中)室温通透 1 h;DPBS 洗 3 遍,每遍 5 min;使用 10% 山羊血清室温封闭 1 h;用封闭液按 1:100 稀释一抗;移除封闭液,加入一抗 OCT4、SOX2、NF-L 和 β III-Tubulin,4 °C 孵育过夜;移除一抗,DPBS 洗 3 遍,每遍 5 min;使用封闭液按 1:1 000 稀释二抗 Goat anti-Rabbit IgG Rhodamine、Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 546,避光加入二抗,室温孵育 1 h;移除二抗,用 DPBS 洗 2 遍,每遍 5 min,避光;向细胞中加入适量 Fluoroshield<sup>™</sup> with DAPI,荧光显微镜下观察染色情况。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 进行统计分析,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,取 3 次实验相对 C<sub>T</sub> 值,计算 2<sup>-ΔC<sub>T</sub></sup> 并用 GraphPad Prism5 软件做图,多组比较采用单因素方差分析,进行方差齐性检验,并用 LSD-*t* 检验进行

表 1 引物序列

Table 1 Name of primer sequences		
基因名称	引物序列(5'→3')	退火温度(°C)
OCT4	F:ACAAGGAGAAGCTGGAGCCGAAC R:CCGCAGCTTACACATGTTCTTGAAA	60
SOX2	F:GCCTGGGCGCCGAGTGGA R:GGGCGAGCCGTTTCATGTAGGTCTG	62
KLF4	F:TACGACCTGGCGGCACGGTG R:GGTGGCGCAGATTCTCGGCTG	62
c-MYC	F:AGGTCCGAGTCGGGCTCATCT R:ATCTGGTCACGCAGGGCAAAA	54
NEUROD1	F:AGGAGCACGAGGCAGACAAGAAGGA R:CAGGTTGGTGGTGGTTGGGATAAG	51
TF	F:GATGGACTCCTCGCTGTA R:TTTCCCACCACTGTTTATG	50
GABBR1	F:GAACCCTGCCAACACC R:ACCCTCCAATCCACTTAT	50
CD4	F:TGCCAAGTGGAAGACAAG R:AGGTGAGTGGGAAGGAGA	51
Tuj1	F:GCTACTTCGTGGAGTGGATC R:TCTTGACGTTGTTGGGGATC	56
Map2	F:TCAGGCTCCCAGCGTATTTA R:GGTTACTCCATCCTTGTTC	58
GAPDH	F:CTCAACGACCACTTCGTCAA R:TCTGGGATGGAAACTGGAAG	57

两两比较, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 猪 naive-like 胚胎干细胞细胞系的建立

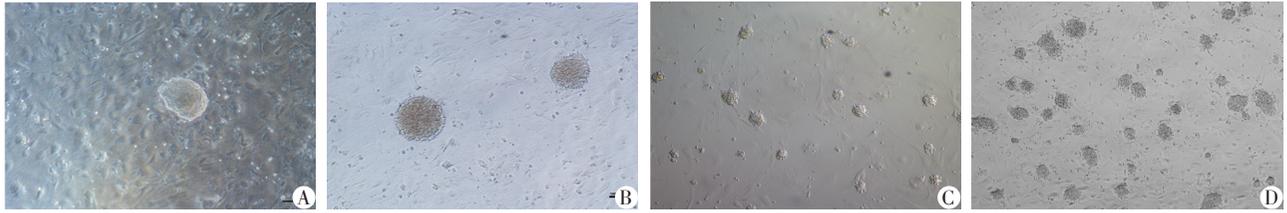
猪 naive-like 胚胎干细胞为本实验室建系,其克隆形态呈三维立体状(图 1),该细胞可经胰酶进行单细胞传代培养,3 d 传代 1 次,可传代 60 代以上。对该细胞进行免疫荧光染色,结果显示猪 naive-like 胚胎干细胞主要表达多能性因子 OCT4、SOX2(图 2)。

### 2.2 猪 naive-like 胚胎干细胞诱导分化为类神经细胞

将猪 naive-like 胚胎干细胞传代至第 25 代,胰酶消化后经差时贴壁直接铺于明胶预处理后的 4 孔板中,生长 3 d 后如图 3A 所示,之后更换为神经诱导培养液,经过 3 d 培养后细胞形态发生明显变化,出现明显神经细胞结构(图 3B),到第 5 天时,细胞形态继续发生变化,出现明显的细胞体、轴突及树突等神经细胞特征性结构(图 3C、D),高度类似于神经元细胞。

### 2.3 类神经元细胞 RT-PCR 及 Q-PCR 鉴定结果

将经 5 d 诱导分化后得到的类神经细胞消化后



A: P0代(×100); B: P3代(×100); C: P20代(×40); D: P45代(×40)。

图1 猪 naive-like 胚胎干细胞传代培养

Figure 1 Subculture of pig naive-like embryonic stem cells

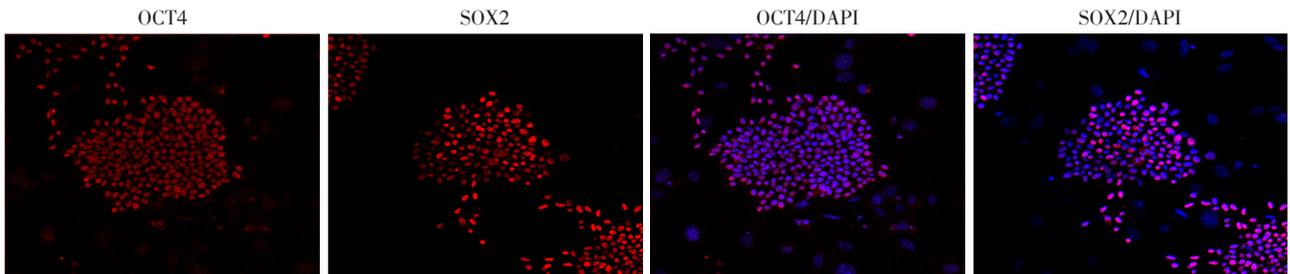
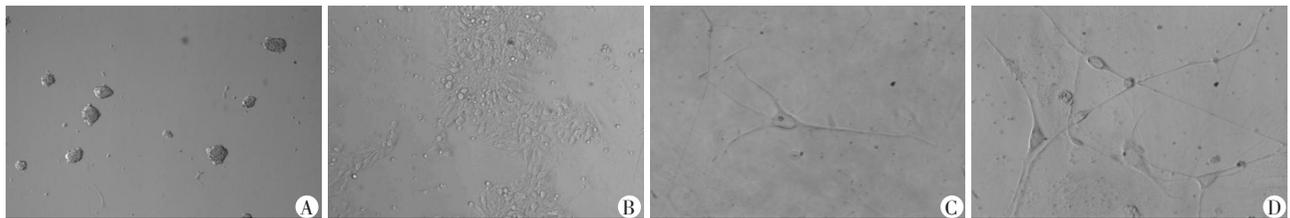


图2 猪胚胎干细胞 OCT4、SOX2 免疫荧光染色(×200)

Figure 2 Immunofluorescence staining of pig naive-like embryonic stem cells(×200)



A: 细胞克隆分化前状态(×100); B: 定向分化第5天(×100); C、D: 分化得到的类神经细胞(×400)。

图3 猪胚胎干细胞体外定向诱导分化为神经细胞

Figure 3 pESCs was induced into nerve cells directly *in vitro*

提取总 RNA, 进行反转录 PCR 后, 通过荧光实时定量 PCR 比较分化前后多能性因子 OCT4、SOX2、KLF4 及 c-MYC 的表达差异, 结果显示分化后 4 个多能性相关基因的表达都显著降低(图 4); 通过 RT-PCR 鉴定神经特异性基因 MAP2、TUJ1 的表达, 结果见图 5, 分化第 5 天的细胞中表达这 2 个基因; 进一步通过荧光定量 PCR 比较分化前后细胞中神经特异性基因 NEUROD1、TF、GABBR1、CD4 的表达差异, 结果显示在分化后的细胞中 4 个基因的表达均有显著提高(图 6), 其中 NEUROD1、TF 表达提升最为显著, 差异均有统计学意义, 进一步证明了分化后得到的细胞为神经细胞。

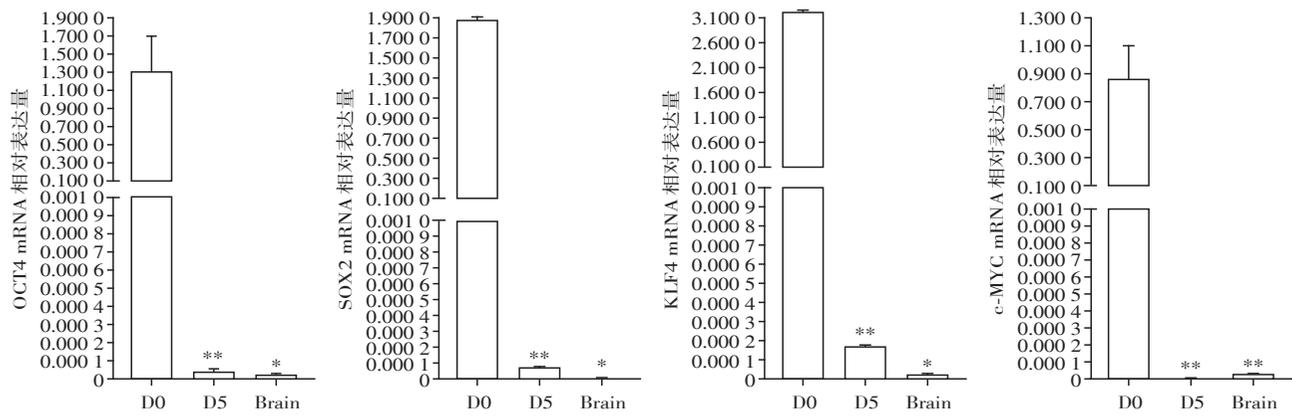
#### 2.4 神经细胞免疫荧光鉴定结果及分化效率分析

对分化第 5 天的神经细胞进行免疫荧光染色, 结果如图 7 所示, 分化后的神经细胞表达神经标志性蛋白、NF-L 和  $\beta$  III-tubulin。每组随机选 5 个非重叠视野, 进行阳性细胞和总细胞计数, 计算平均阳

性细胞率。结果显示, 分化后细胞中 NF-L 阳性率可达 79% 左右;  $\beta$ -tubulin 阳性率可达 56% 左右, 总细胞中具有明显细胞体和突起的类神经细胞占比可达 48% 左右。

### 3 讨论

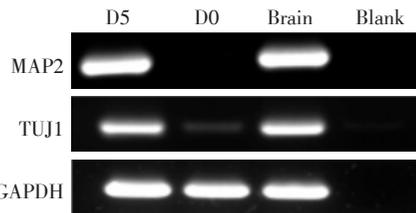
截至目前, 猪 naive 胚胎干细胞系仍未真正建立, 本实验室建系所获得的猪 naive-like 细胞系是目前较为接近 naive 状态的细胞系之一。本研究通过对猪 naive-like 胚胎干细胞进行小分子化合物直接诱导, 成功将呈三维立体状的猪 naive-like 胚胎干细胞诱导为神经细胞, 该细胞具有明显的细胞体和突起结构, 且具有神经元所特有的轴突和树突结构; 经 RT-PCR 鉴定, 诱导得到的神经细胞表达神经细胞标志性因子 MAP2 和 TUJ1; 经荧光实时定量 PCR 鉴定, 经 5 d 体外诱导后, 原本在猪胚胎干细胞中所表达的多能干性因子 OCT4、SOX2、KLF4 及 c-MYC



D0: 分化第0天; D5: 分化第5天; Brain: 成熟猪脑神经组织, 作为阳性参考。与D0比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图4 qPCR 鉴定猪胚胎干细胞和分化神经细胞中多能因子OCT4、SOX2、KLF4及c-MYC的表达

Figure 4 qPCR was used to identify the expression of OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC in pESCs and differentiated nerve cells



D5、D0: 分化第5和第0天的细胞; Brain: 成熟猪脑神经组织作为阳性参照, Blank: ddH<sub>2</sub>O作为空白对照。

图5 RT-PCR 鉴定猪胚胎干细胞和分化神经细胞中神经相关基因表达

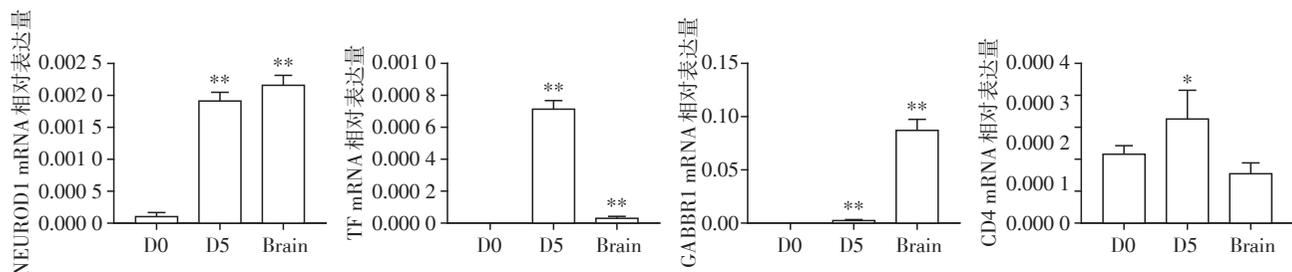
Figure 5 RT-PCR was used to identify the expression of neuron-related genes in pES cells and differentiated nerve cells

在诱导分化后的细胞中表达强度已大大降低, 而该细胞中神经细胞标志性因子NEUROD1、TF、GABBR1、CD4的表达大幅增高; 对分化得到的类神经元细胞进行免疫荧光染色, 结果显示该细胞表达神经特异性因子NF-L和 $\beta$ -tubulin。综上所述, 猪 naive-like 胚胎干细胞诱导分化得到的神经细胞具有部分

神经元特征, 可称之为神经细胞。

目前体外定向诱导多能细胞向神经细胞分化的方法有EB诱导法、直接分化法、共培养法、基因定向诱导法等<sup>[12]</sup>。之前将猪多能细胞诱导分化为神经细胞的方法大部分都是先经过EB后再进行神经分化, 步骤相对繁琐, 周期相对较长。与此前的方法相比, 本研究采用直接分化的方法, 省去先诱导为EB的步骤进而避免了3个胚层共存的干扰, 提高了分化的纯度, 有利于进一步研究应用, 且时间周期仅需5 d左右, 操作更加简便, 降低了在分化诱导液中长期培养所带来的风险。

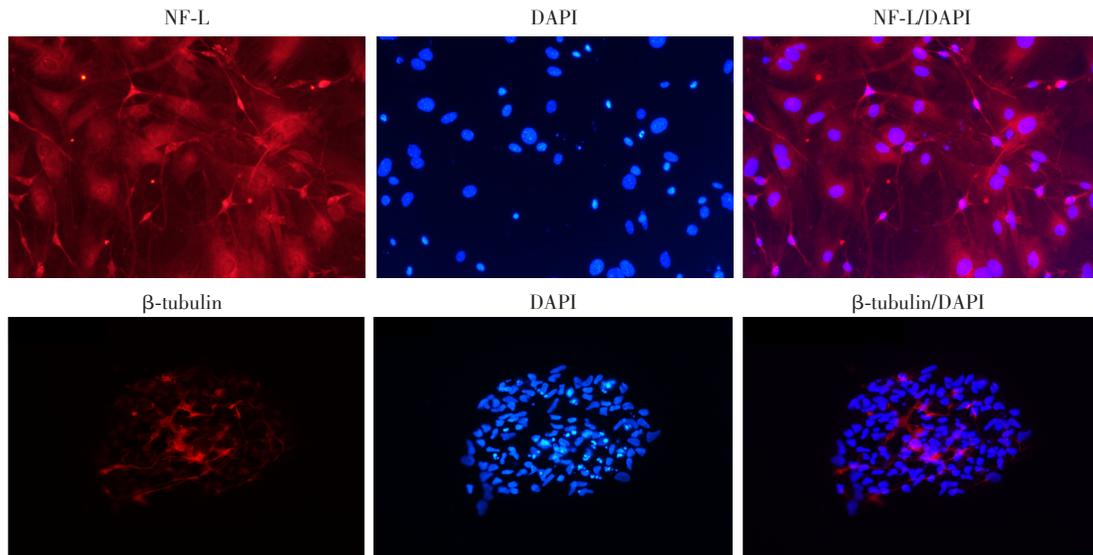
研究胚胎干细胞向神经细胞分化有助于人们了解胚胎神经细胞发育的过程、机制变化并且进一步了解与神经系统发育相关的某些基因, 体外定向分化神经细胞体系的建立更是为之后筛选神经系统疾病药物提供了可用的材料。虽然到目前为止, 尚未有采用神经干细胞进行移植治疗致瘤的报道, 但是胚胎干细胞来源的神经细胞应用于临床移植



D0: 分化第0天; D5: 分化第5天; Brain: 成熟猪脑神经组织作为阳性参考。与D0比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图6 qPCR 鉴定猪胚胎干细胞和分化神经细胞中神经特异性因子NEUROD1、TF、GABBR1、CD4的表达情况

Figure 6 qPCR was used to identify the expression of NEUROD1, TF, GABBR1 and CD4 in pES and differentiated nerve cells

图7 神经细胞标记物NF-L、 $\beta$ -tubulin免疫荧光染色( $\times 200$ )Figure 7 Immunofluorescence staining of nerve cell markers NF-L and  $\beta$ -tubulin ( $\times 200$ )

治疗神经系统疾病最大的隐患就是潜在的畸胎瘤问题<sup>[13]</sup>,因此,分化后的神经细胞应用于临床移植治疗对分化效率以及细胞的分离纯化水平提出了极高的要求,未来需要在这一方面进一步优化,才可能达成临床广泛应用<sup>[14]</sup>。

综上所述,本研究建立了通过体外小分子诱导猪 naive-like 胚胎干细胞直接分化为神经细胞的方法,该方法简便快速高效,分化得到的神经细胞均匀并且具有较高的纯度,为猪胚胎干细胞向神经诱导体系的进一步研究奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos[J]. Nature, 2007, 448(7150): 191-195
- [2] Roger CS, Abraham WM, Brogden KA, et al. The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 295(2): 240-263
- [3] Yan S, Tu Z, Liu Z, et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease[J]. Cell, 2018, 173(4): 989-1002
- [4] Petersen B, Carnwath JW, Niemann H. The perspectives for porcine-to-human xenografts [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2009, 32(2): 91-105
- [5] Hou DR, Jin Y, Nie XW, et al. Derivation of porcine embryonic stem-like cells from *in vitro*-produced blastocyst-stage embryos[J]. Sci Rep, 2016, 6: 25838
- [6] 姜海滨, 张曼玲, 赵丽华, 等. 猪 naive-like 诱导性多能

- 干细胞系的建立及红色荧光蛋白标记[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(8): 915-925
- [7] Rohwedel J, Guan K, Wobus AM. Induction of cellular differentiation by retinoic acid *in vitro* [J]. Cells Tissues Organs, 1999, 165(3-4): 190-202
- [8] Du ZW, Chen H, Liu H, et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6626
- [9] Li M, Ma W, Hou Y, et al. Improved isolation and culture of embryonic stem cells from Chinese miniature pig [J]. J Reprod Dev, 2004, 50(3): 35-42
- [10] 李哲, 方明珠, 陈红, 等. 两种体系下诱导多潜能干细胞定向分化为运动神经元前体细胞的差异[J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24(3): 1006-9771
- [11] 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
- [12] Yu S, Huai L, Henry Y, et al. Mechanisms controlling embryonic stem cell self-renewal and differentiation [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2006, 16(3): 211-231
- [13] 张青, 周翠冰, 戴一凡, 等. 神经细胞异种移植的研究进展[J]. 器官移植, 2017, 8(4): 328-332
- [14] McDonald J, Liu XY, Liu S, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord [J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1410-1412

[收稿日期] 2018-12-27