

# 胎鼠大脑皮质神经干细胞的分离培养和鉴定：有向多种成体神经干细胞分化的潜能吗？\*☆

贺月秋，陈惠金，钱龙华，陈冠仪

## Preparation, cultivation and identification of neural stem cells in fetal rat cerebral cortex: Do they have multiple differentiation potency?

He Yue-qiu, Chen Hui-jin, Qian Long-hua, Chen Guan-yi

Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

He Yue-qiu☆, Doctor, Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Chen Hui-jin, Chief physician, Professor, Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Supported by: the Project Foundation of Shanghai Municipal Education Commission, No. 05BZ08\*

Received: 2009-08-07  
Accepted: 2009-12-01

### Abstract

**BACKGROUND:** Periventricular leukomalacia is a major syndrome of premature infant brain injury, which has been not prevented and cured yet. Theoretically, neural stem cells which were transplanted into white matter with an absence of oligodendroglial cells might be an ideal method to cure periventricular leukomalacia.

**OBJECTIVE:** To prepare the multi-lineage potential of neural stem cells for the use of intraventricular transplantation.

**METHODS:** Cerebral cortex was obtained from 12-14-day fetal rats and sectioned into 1.0-mm<sup>3</sup> sections. The single cell suspension was separated and purified. The neurospheres were incubated with DMEM/F12 culture medium containing fetal bovine serum to observe primary and passage culture of neural stem cells. The differentiation of neural stem cells was determined using immunohistochemical method.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The viability of cultured neural stem cells was (94.3±2.2)%. The neurosphere was formed at day 3 after primary culture. The proliferation of neurosphere slowed down after 10-passage culture, and some cells became old. All neurospheres were positively Nestin-staining, thus they were considered as neural stem cells. A further incubation of 4-passage neurospheres, immunohistochemical method indicated that the neurosphere was positively GFAP, β-tubulin, and O4 staining, respectively. This suggested that cultured neural stem cells are able to self-renew, proliferate, and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendroglial cells.

He YQ, Chen HJ, Qian LH, Chen GY. Preparation, cultivation and identification of neural stem cells in fetal rat cerebral cortex: Do they have multiple differentiation potency? Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6): 962-966. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 脑室周围白质软化是早产儿脑损伤的主要类型，迄今尚无防治方法。对丢失大量少突胶质细胞的白质进行神经干细胞移植，理论上应是治疗脑室周围白质软化最为理想的方案。

**目的:** 体外培养制备具有多向分化潜能的胎鼠神经干细胞，以供后期实验经脑室移植应用。

**方法:** 取孕 12~14 d 胎鼠大脑皮质组织，剪成 1.0 mm<sup>3</sup> 小块制备单细胞悬液分离纯化，待形成细胞球后加入含小牛血清的 DMEM/F12 培养基进行诱导分化培养。观察神经干细胞的原代、传代培养情况，免疫组化法对神经干细胞分化情况进行鉴定。

**结果与结论:** 培养的神经干细胞活力为(94.3±2.2)%，原代培养 3 d 形成神经球，体外传至 10 代左右，神经球的细胞团增殖速度明显减慢，部分细胞老化。各代神经球均呈巢蛋白染色阳性，可确认为神经干细胞。进一步对第 4 代神经球诱导分化培养后，免疫组化结果分别呈 GFAP、β-tubulin 和 O4 阳性。提示所制备的神经干细胞具有自我更新和增殖能力，并具备向神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞分化的潜能。

**关键词:** 脑室周围白质软化；分化；神经干细胞；干细胞；胎鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.06.003

贺月秋，陈惠金，钱龙华，陈冠仪.胎鼠大脑皮质神经干细胞的分离培养和鉴定：有向多种成体神经干细胞分化的潜能吗？[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2010，14(6):962-966. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

脑室周围白质软化是早产儿脑损伤的主要类型，其后常引起脑瘫以及认知障碍等神经发育后遗症。缺血、感染等因素导致发育中的少突胶质细胞坏死和凋亡，致使髓鞘形成受损，是诠释脑室周围白质软化发病机制的主要学说。迄今尚

未能确认任一可治疗脑室周围白质软化的有效药物，近年来神经干细胞在神经生物学领域的研究进展，为脑室周围白质软化的治疗提供了新的思路。

虽然新生动物脑内尤其是室管膜下区富含神经干细胞，也存在内源性神经干细胞的修复功能，但这种内源性的修复作用十分有限<sup>[1]</sup>。设想对大量丢失少突胶质细胞的脑白质进行

神经干细胞移植, 使其分化形成少突胶质细胞, 促进脑白质髓鞘化, 理论上应是治疗脑室周围白质软化最为理想的方案。

进行神经干细胞的制备、培养和鉴定, 是对脑室周围白质软化新生大鼠进行外源性神经干细胞移植治疗的先决条件。实验采用E12~14胎鼠大脑皮质进行分离后纯化培养, 并对培养的神经干细胞进行干细胞标志物鉴定和诱导分化鉴定, 以期为进一步进行经脑室内神经干细胞移植奠定实验基础。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外观察。

**时间及地点:** 于2006-05/2007-04在上海交通大学附属新华医院中心实验室内完成。

**材料:** SD大鼠雌雄各半, 体质量220~250 g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(沪2003-0002), 按雌雄1:1于每晚6点合笼, 次晨检查出阴栓子为妊娠0 d, 取孕12~14 d大鼠进行实验, 每只鼠含胚胎10~15只, 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

**实验用主要试剂与仪器:**

试剂与仪器	来源
DMEM/F12 无血清专用培养基、Gibco	
青霉素、链霉素、B27 无血清添加物	
小牛血清	杭州四季青公司
碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子	Protech
L-谷胺酰胺	Sigma
O4 单克隆抗体	R&D
$\beta$ -tublin 兔抗大鼠多克隆抗体	Santa Cruz Biotechnology Inc
Nestin 兔抗大鼠多克隆抗体	北京博奥森生物技术有限公司
GFAP 兔抗大鼠多克隆抗体	Neomakers
SABC 免疫组化 KIT 试剂盒	北京中杉
DAB 显色试剂盒	武汉博士德
CO <sub>2</sub> 孵箱	Thermoforma

**实验方法:**

**干细胞培养液的配制<sup>[2]</sup>:** 将DMEM/F12加入三蒸水900 mL搅拌溶解, 并加入NaHCO<sub>3</sub> 1.2 g, 搅拌溶解均匀后定容到1 000 mL, 过滤除菌、分装, 置4 °C冰箱保存备用。每次接种培养前, 在1 mL DEME/F12培养液中按1:50加入B27, 并分别加入碱性成纤维细胞

生长因子20  $\mu$ g/L、表皮生长因子20  $\mu$ g/L、青霉素100 U/mL、链霉素100 U/mL。

**胎鼠神经干细胞的制备和培养<sup>[3-4]</sup>:** 将孕12~14 d大鼠乙醚麻醉后, 浸入盛有体积分数为75%乙醇的烧杯中5~10 min, 取出后置超净台无菌木板上, 用眼科剪和止血钳剪开腹部皮肤, 打开腹腔, 切取子宫, 将子宫放入无菌100 mm培养皿中, 移入另一超净台继续操作。用眼科剪剪开子宫角, 取出胎鼠, 暴露出两侧大脑半球以及小脑。用弯眼科镊夹取两侧大脑皮质组织2 mm $\times$ 1 mm $\times$ 0.5 mm大小, 小心移入另一100 mm一次性培养皿中, 用D-Hank's液冲洗。小心剥除脑膜和血管后, 将脑组织剪成1.0 mm<sup>3</sup>小块, 吸管吹打成单细胞悬液于200, 400目不锈钢筛网中。处理成均匀的单细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 置条件培养基(DMEM/F12 6 mL、碱性成纤维细胞生长因子20  $\mu$ g/L、表皮生长因子 20  $\mu$ g/L、B27 20 mL/L及青、链霉素100 U/mL)中重新悬浮细胞, 定容到4 mL或8 mL, 锥虫蓝染色计数。按照每个25 mL培养瓶中接种 $0.25 \times 10^9$  L<sup>-1</sup>培养液进行接种。置37 °C、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内进行常规培养, 每两三天半量换液1次, 每六七天传代1次。每次传代后, 以1:2比例进行扩增培养, 同时用锥虫蓝拒染法在相差显微镜下进行细胞计数, 并计算细胞活力, 每3 d给予半量换液, 并增补碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子。培养期间, 每天在相差显微镜下观察细胞生长情况, 随机选取视野进行照相, 记录实验结果。

**胎鼠神经干细胞的标志物鉴定<sup>[5]</sup>:** 取第4代神经干细胞球, 离心后将神经球接种到预用1%多聚赖氨酸处理的6孔板小玻片上, 置37 °C、CO<sub>2</sub>培养箱内孵育2 h, 细胞贴壁后用免疫组化方法进行神经干细胞标志物巢蛋白鉴定, 滴加山羊血清封闭切片30 min后, 用滤纸吸去多余的血清; 加入巢蛋白(1:200)4 °C过夜孵育; PBS洗3次, 3.0~5.0 min/次, 去除非特异吸附抗体; 加入kit盒中的生物素标记的山羊抗小鼠第二抗体, 37 °C孵育1 h后, PBS洗3次, 3.0~5.0 min/次。加入kit盒中的辣根过氧化物酶标记链卵白素(streptavidin)工作液孵育45 min。PBS洗3次, 3.0~5.0 min/次。加入DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>液, 室温下在显微镜监视下显色5.0~10.0 min; 待DAB充分显色后, 蒸馏水冲洗以终止染色; 苏木精复染后, 用无水乙醇脱水和二甲苯透明中性树脂干燥后封固, 照相观察。以0.01 mol/L

上海交通大学医学院附属新华医院, 上海市儿科学研究所, 上海市200092

贺月秋<sup>\*</sup>, 女, 1974年生, 四川省泸定市人, 汉族, 2007年上海交通大学医学院毕业, 博士, 主要从事新生儿脑损伤方面的研究。

通讯作者: 陈惠金, 主任医师, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院, 上海市儿科学研究所, 上海市200092

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225  
(2010)06-00962-05

收稿日期: 2009-08-07  
修回日期: 2009-12-01  
(20090707004/  
ZS-H)

PBS取代一抗作为阴性对照, 如结果为阴性, 提示阳性染色为特异。

**神经干细胞的诱导分化培养及鉴定<sup>[6-9]</sup>:** 将上述方法制得的神经干细胞球, 经消化、吹打为单细胞悬液后, 用400目不锈钢筛网过滤, 置放到预用1%多聚赖氨酸处理的6孔板中, 加入含体积分数为10%小牛血清的DMEM/F12培养基, 进行诱导分化培养10~14 d。用40 g/L多聚甲醛固定30 min后, 用PBS清洗3次, 3.0~5.0 min/次, 37 °C烤干。加入0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 再用0.3% Triton-X100/0.01 mol/L PBS洗涤后, 用PBS洗3次, 3.0~5.0 min/次。免疫组化方法其余步骤参考上段。一抗滴度分别为: GFAP(星形胶质细胞标记)1 : 200;  $\beta$ -tublin(神经元标记)1 : 300; O4(少突胶质细胞前体标记)1 : 300。

**图像采集及数据分析:** 应用Nicon ECLIPSE TE2000-U倒置生物显微镜观察, 并进行图像采集。

**主要观察指标:** ①神经干细胞的原代、传代、诱导分化培养情况。②神经干细胞的鉴定。

**设计、实施、评估者:** 设计为通讯作者, 实施为第一、三、四作者, 评估为第一、二作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

## 2 结果

**2.1 神经干细胞的原代培养情况** 锥虫蓝拒染法显示分离后的单细胞悬液细胞活力为(94.3±2.2)%。单细胞悬液于接种后10~15 min迅速沉底, 倒置显微镜下观察到细胞光滑, 胞质透亮; 24 h可见细胞分裂; 3 d左右出现大小、数量不等、折光性呈悬浮状生长的细胞团, 即神经球的形成, 球内细胞形态规则、大小一致, 无突起生长; 五六天后神经球巨大, 部分沉底, 神经球外围细胞向周边迁移, 有突起分化, 贴壁生长, 见图1; 10 d后, 大部分细胞已贴壁, 贴壁后的细胞从表面发出一些树枝状和片状突起, 分化的细胞彼此通过突起相互连接, 形成网络状结构。



Figure 1 Primary culture of neurosphere (×200)  
图1 原代培养的神经干细胞球(×200)

**2.2 神经干细胞的传代培养情况** 六七天后神经球传至第2代, 镜下观察视野清晰, 基本无悬浮物, 第2代细胞团呈圆形, 由数十至数百个细胞组成, 其形态和原代神经球基本相同, 未看见分裂相, 见图2。培养到第3代的神经球大小、直径及形态较一致, 较少有分化。体外培养10代左右, 神经干细胞球的细胞团增殖速度比原代明显减慢, 部分老化。

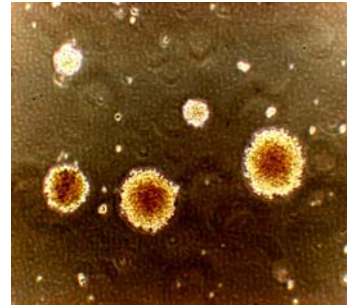


Figure 2 Second-passage culture of neurosphere (×200)  
图2 第2代培养的神经球(×200)

**2.3 神经干细胞的诱导分化培养情况** 诱导分化培养的神经干细胞很快贴壁生长, 胞体呈圆形。数小时后从细胞团边缘开始有突起伸出, 24 h内绝大多数细胞贴壁生长, 见图3。诱导分化培养2 d后, 胞体增加, 长出两个或多个突起的细胞数目明显增加, 突起逐渐伸展, 部分出现分支。诱导分化培养4 d, 可见细胞突起之间相互连接形成网状, 见图4。继续培养到6 d, 细胞均匀分布在培养板中, 单层生长, 呈现神经元和胶质细胞的形态特征。胞体继续增加, 突起增多、变长, 细胞折光性增强, 细胞突起之间相互连接的网络状更加稠密。10~14 d见各细胞团之间所伸出的突起相互缠绕, 可辨认出不同的细胞形态, 如呈多角形散在的胶质细胞、典型的突起长、细胞小的神经元形态细胞, 以及呈现分支短、细胞小的少突胶质细胞等。

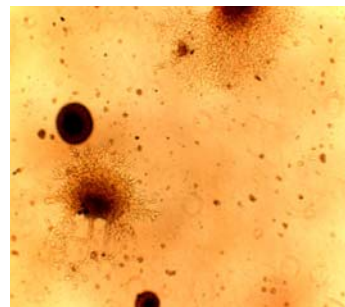


Figure 3 Adhesion growth of neurosphere (×200)  
图3 呈贴壁生长的神经球(×200)

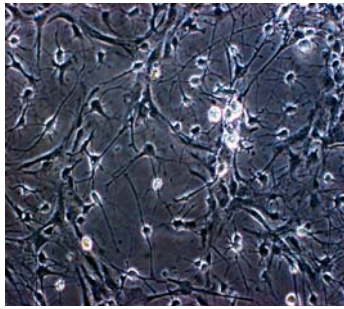


Figure 4 Induced differentiation of neurosphere (×200)  
图4 诱导分化培养的神经干细胞(×200)

**2.4 神经干细胞的标志物鉴定结果** 对第4代神经球的免疫组化分析结果显示, 巢蛋白染色部位主要在胞浆, 各代神经球中均呈现巢蛋白染色阳性, 可确认为神经干细胞, 见图5a。进一步对第4代神经球进行诱导分化培养后, 免疫组化结果分别呈GFAP,  $\beta$ -tubulin和O4阳性。在分化细胞中, 呈现多量 $\beta$ -tubulin阳性细胞, 提示为神经元, 其体积小, 有明显的较长突起, 分支较多, 呈双极或多级细胞, 见图5b。GFAP阳性细胞即为星型胶质细胞, 其细胞体积较大, 突起多而短, 有的呈膜片状, 见图5c。O4阳性细胞提示为少突胶质细胞前体, 在集落中其细胞体积最小, 突起很少且短, 见图5d。

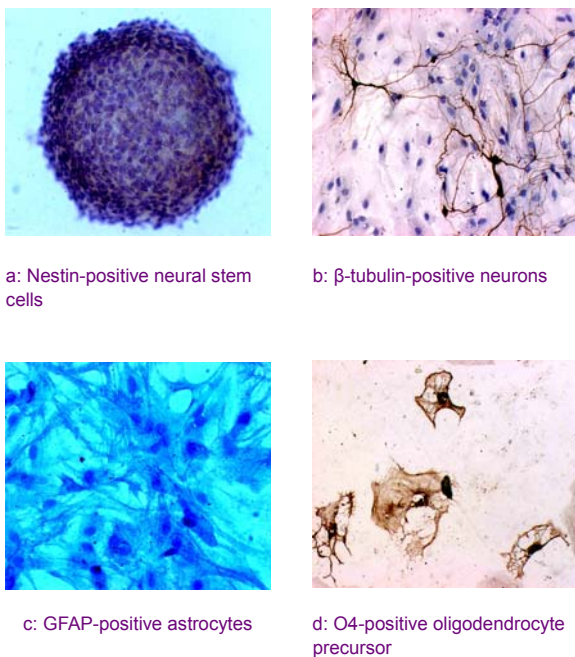


Figure 5 Identification of neural stem cells (×400)  
图5 神经干细胞诱导分化鉴定结果(×400)

### 3 讨论

胚胎和新生动物脑内富含成体神经干细胞, 其主要集中在嗅球、前脑、侧脑室室管膜下区、海马、脊髓、小脑(部分后脑)和大脑皮质共7个区域, 尤其室管膜下区是神经发育和中枢神经再生的重点部位<sup>[10-11]</sup>。成年动物脑内的神经干细胞则数量稀少, 主要位于室管膜下区部位, 目前多选用胚胎成体神经干细胞用于移植治疗研究。外源性神经干细胞移植不仅可以在移植物体内存活, 并可以诱导内源性神经干细胞的发生<sup>[12]</sup>。对成年动物的移植研究已有较长时间, 对新生动物的研究则相对较少。从有限的新生动物神经干细胞移植实验结果表明, 新生动物具有明显优于成年动物的移植内环境及移植效果, 因而对新生动物进行脑内神经干细胞移植, 较成年动物具有更好的可行性。研究证实, 新生动物脑正处于发育状态, 脑内促生长、促分裂因子的表达均十分活跃, 神经细胞赖以迁移的放射状胶质细胞尚未消失, 对新生动物进行脑内神经干细胞移植, 所植入神经干细胞的增殖、迁移、分化、轴突形成以及髓鞘化等能力, 将均为成年动物所望尘莫及, 因而外源性的修复作用在新生动物脑内较成年动物具有更明显的效果。

实验通过分离孕12~14 d胎鼠大脑皮质的成体神经干细胞进行纯化培养, 成功培养了成体神经干细胞。可见呈悬浮状生长的神经干细胞在3 d左右形成神经细胞球, 其体积并逐渐增大, 每六七天传代1次。培养的第1~3代神经球少见分化, 因而第1~3代均可视为纯神经球。经过特性的神经干细胞标志物巢蛋白鉴定, 各代神经球中几乎均呈巢蛋白染色阳性, 因而可确认培养物为神经干细胞, 并表明所培养的神经干细胞具有稳定的自我更新和增殖能力<sup>[6]</sup>。

1992年, 有作者利用含有表皮生长因子的无血清培养基悬浮培养鼠脑的纹状体细胞, 证实该细胞群具有未分化特点<sup>[7]</sup>。实验采用含碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、B27的无血清培养基, 所培养的神经干细胞可以自我更新, 增值迅速, 传代稳定, 并保持未分化特点, 因此该培养基可推荐用于神经干细胞的培养。在培养过程中观察到所培养的神经干细胞经过反复传代后, 至10代左右神经干细胞球的细胞团增殖速度比原代明显减慢, 且部分老化。因而今后如何建立一个能稳定传代的神经干细胞系尚待进一步探讨<sup>[13]</sup>。

实验曾尝试通过单细胞克隆的方法进行神经干细胞的培养纯化, 但发现经机械分离后的单细胞悬液不易形成神经球, 这可能与神经干细胞的生长特点需要与其他神经干细胞互相支持生长有关, 其可能还需要依赖其他神经干细胞分泌的各种细胞因子以及细胞外基质分子的作用, 在多个神经干细胞聚集在一起、分泌一些利

于神经干细胞生长的细胞因子的情况下, 神经干细胞才能正常生长。当培养的细胞密度不够时, 培养液中所分泌的各种细胞因子浓度也不足, 因而不能满足神经干细胞的生长需求<sup>[14]</sup>。

实验中每个培养瓶的细胞接种密度为 $0.25 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。注意到细胞接种密度小于或等于 $0.25 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ (25 mL培养瓶)时, 细胞生长差, 神经干细胞球形成较少; 而细胞接种密度大于或等于 $0.25 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ (25 mL培养瓶)时, 细胞生长则过于旺盛, 神经干细胞成片生长, 营养消耗大, 导致很快死亡。因而掌握合宜的细胞接种密度对能否成功培养至关重要。

将第4代神经干细胞放入去除B27、碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、并含有体积分数为10%小牛血清的分化培养基进一步诱导分化培养, 显示其迅速贴壁生长, 并逐渐出现突起和分支, 培养至4 d可见细胞突起之间相互连接形成网状并逐渐稠密。10~14 d可辨认出不同的细胞形态, 如呈多角形的散在胶质细胞、典型的突起长、细胞小的神经元形态细胞, 以及呈现分支短、细胞小的少突胶质细胞等。免疫组化结果分别证实呈GFAP、 $\beta$ -tublin和O4阳性的胶质细胞、神经元以及少突胶质细胞前体。其中呈现多量 $\beta$ -tublin阳性神经元, 其体积小, 明显的较长突起, 分支较多, 呈双极或多级细胞为其特征。GFAP阳性胶质细胞, 表现为细胞体积较大, 突起多而短, 有的呈膜片状。O4阳性少突胶质细胞前体, 在集落中其细胞体积最小, 突起很少且短。上述细胞形态观察以及免疫组化分析结果证实, 所培养的成体神经干细胞完全具备向多种神经细胞类型分化的潜能, 这也和其他作者的研究结果相似<sup>[15]</sup>。

实验通过对孕14 d胎鼠大脑皮质进行分离后纯化培养, 并对培养的成体神经干细胞进行干细胞标志物鉴定和诱导分化鉴定, 确认所培养的细胞确系成体神经干细胞, 并完全具备向多种神经细胞类型分化的潜能。应用上述培养的神经干细胞, 课题组成功对脑室周围白质软化新生大鼠进行了经脑室神经干细胞移植, 证实经脑室植入的外源性神经干细胞在脑内具有良好的迁移和分化能力, 在脑室周围主要分化为少突胶质细胞前体, 移植后21 d光镜和电镜显示脑白质病理明显改善, 髓鞘形成显著增加<sup>[16-17]</sup>。

#### 4 参考文献

[1] McTigue DM, Tripathi RB. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem*. 2008;107(1): 1-19.  
 [2] Jin K, LaFevre-Bernt M, Sun Y, et al. FGF-2 promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18189-18194.  
 [3] Marchenko S, Flanagan L. Counting human neural stem cells. *J Vis Exp*. 2007;(7):262.

[4] Nishino H, Hida H, Takei N, et al. Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum. *Exp Neurol*. 2000;164(1):209-214.  
 [5] Kurokawa M. Effects of nestin-antisense treatment in mice on memory-related performance. *Int J Neurosci*. 2008;118(5): 693-704.  
 [6] Itokazu Y, Kitada M, Dezawa M, et al. Choroid plexus ependymal cells host neural progenitor cells in the rat. *Glia*. 2006;53(1): 32-42.  
 [7] Lee Y, Su M, Messing A, et al. Astrocyte heterogeneity revealed by expression of a GFAP-LacZ transgene. *Glia*. 2006;53(7): 677-678.  
 [8] Rieske P, Azizi SA, Augelli B, et al. A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages. *Eur J Neurosci*. 2007;25(1):31-37.  
 [9] Rivera FJ, Couillard-Despres S, Pedre X, et al. Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(10):2209-2219.  
 [10] Duan X, Kang E, Liu CY, et al. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2008;18(1):108-115.  
 [11] Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 1997; 8(6):389-404.  
 [12] Ke Y, Chi L, Xu R, et al. Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice. *Stem Cells*. 2006;24(4):1011-1019.  
 [13] Shanley DK, Sullivan AM. Alterations in cellular phenotypes differentiating from embryonic rat brain neurosphere cultures by immunoselection of neuronal progenitors. *Brain Res*. 2006; 1067(1): 85-94.  
 [14] Gao L, Miller RH. Specification of optic nerve oligodendrocyte precursors by retinal ganglion cell axons. *J Neurosci*. 2006;26(29): 7619-7628.  
 [15] Villa A, Snyder EY, Vescovi A, et al. Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Exp Neurol*. 2000;161(1):67-84.  
 [16] He YQ, Chen HJ, Qian LH, et al. *Zhongguo Dangdai Erke Zazhi*. 2008;10(3): 362-366.  
 贺月秋, 陈惠金, 钱龙华, 等. 经脑室神经干细胞移植对脑室周围白质软化新生大鼠的脑病理评估[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(3):362-366.  
 [17] He YQ, Chen HJ, Qian LH, et al. *Shiyong Erke Linchuang Zazhi*. 2008;23(20): 1610-1612.  
 贺月秋, 陈惠金, 钱龙华, 等. 经脑室神经干细胞移植治疗脑室周围白质软化新生大鼠电镜下脑病理评估[J]. *实用儿科临床杂志*, 2008, 23(20): 1610-1612.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 上海市教委课题基金资助项目(05BZ08)。

**利益冲突:** 赞助情况不存在利益冲突。

**课题的创新点:** 课题组在国内最早系统研究新生儿脑损伤, 此项课题拟对脑室周围白质软化新生大鼠进行胚胎神经干细胞经脑室移植, 以期在今后脑室周围白质软化的成功治愈探索新的治疗途径。

**课题评估的“金标准”:** 采用含碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、B27的无血清培养基, 对孕12~14 d胎鼠大脑皮质的成体神经干细胞成功进行纯化培养, 并应用免疫组化方法对培养的成体神经干细胞进行巢蛋白鉴定和诱导分化鉴定, 所采用的免疫标志物经典、客观。

**课题的偏倚与不足:** 因时间有限, 实验未能对神经干细胞进行分化率测定。

**提供临床借鉴的价值:** 胚鼠神经干细胞的成功制备, 为下一步对脑室周围白质软化新生大鼠动物模型进行经脑室神经干细胞移植奠定了实验基础。经脑室神经干细胞移植对脑室周围白质软化具有很大的治疗潜力, 为今后成功防治早产儿这一最常见的脑损伤顽症提供了新的可行性途径。