

# 促红细胞生成素体外培养鼠胚胎皮质神经干细胞的分化\*\*

袁丽丽<sup>1</sup>, 杜红梅<sup>2</sup>, 管英俊<sup>2</sup>, 孔佑华<sup>1</sup>

## Differentiation of rat embryonic cerebral cortex neural stem cells cultured by erythropoietin *in vitro*

Yuan Li-li<sup>1</sup>, Du Hong-mei<sup>2</sup>, Guan Ying-jun<sup>2</sup>, Kong You-hua<sup>1</sup>

### Abstract

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology of Jining Medical College, Jining 272067, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Department of Histology and Embryology of Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China

Yuan Li-li★, Master, Lecturer, Department of Histology and Embryology of Jining Medical College, Jining 272067, Shandong Province, China  
liliyuan79@yahoo.com.cn

Supported by: Youth Research Foundation of Jining Medical University, No. 2008jnmq-25\*

Received: 2011-06-18  
Accepted: 2011-10-20

**BACKGROUND:** Erythropoietin (EPO) is early known as a kind of growth factor. In recent years, there are many studies about the protective effect of erythropoietin on the central nervous system *in vivo*.

**OBJECTIVE:** To explore the effects of EPO on the apoptosis and differentiation of rat embryonic cerebral cortex neural stem cells *in vitro*.

**METHODS:** The embryonic cerebral cortex were isolate from Sprague-Dawley rats that pregnant for 14 days under sterile conditions, the cells were cultured and differentiated in the suspension medium and then adherent induction. The neural stem cells were detected by nestin immune cell fluorescence staining, microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and glia fibrillary acid protein was used to detect the differentiation of neural stem cells. The third passage of neural stem cells were obtained and 0.5, 5, 50, 500 U/mL EPO were added into the medium, and in the control group, there was no EPO adding. Caspase-3 was used to detect the apoptosis of neural stem cells, and MAP-2 was used to detect the differentiation of neural stem cells to neuron.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The expression of the caspase-3 in neural sphere was decreased after added EPO ( $\geq 5$  U/mL), and the expression of the MAP-2 positive cells was increased obviously after differentiation ( $P < 0.01$ ). The present results suggest that EPO can decrease the apoptosis of the neural stem cells and promote neural stem cells to differentiate into neurons *in vitro*.

Yuan LL, Du HM, Guan YJ, Kong YH. Differentiation of rat embryonic cerebral cortex neural stem cells cultured by erythropoietin *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(49): 9174-9177.  
[http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

### 摘要

**背景:** 促红细胞生成素最早作为生长因子被认识, 近些年来其对于中枢神经系统保护作用的体内研究较多。

**目的:** 观察促红细胞生成素对体外培养大鼠胚胎皮质神经干细胞凋亡及分化的影响。

**方法:** 无菌条件下取孕 14 d SD 大鼠胚胎皮质, 体外先悬浮增殖培养后贴壁诱导分化。巢蛋白免疫细胞荧光染色检测神经干细胞, 以微管相关蛋白 2、神经胶质原纤维酸性蛋白检测神经干细胞分化。取第 3 代神经干细胞向培养基中添加 0.5, 5, 50, 500 U/mL 的促红细胞生成素, 另设不添加促红细胞生成素的对照。应用半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 检测神经干细胞凋亡, 微管相关蛋白 2 检测神经干细胞向神经元方向的分化。

**结果与结论:** 加入  $\geq 5$  U/mL 促红细胞生成素, 神经球内半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 表达显著下降( $P < 0.01$ ), 分化培养后微管相关蛋白 2 阳性细胞较对照明显升高( $P < 0.01$ )。提示促红细胞生成素可降低体外培养鼠胚胎皮质神经干细胞的凋亡率, 促进其神经干细胞向神经元方向分化。

**关键词:** 促红细胞生成素; 神经干细胞; 培养; 凋亡; 分化

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.49.012

袁丽丽, 杜红梅, 管英俊, 孔佑华. 促红细胞生成素体外培养鼠胚胎皮质神经干细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(49):9174-9177. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

<sup>1</sup> 济宁医学院组织胚胎学教研室, 山东省济宁市 272067; <sup>2</sup> 潍坊医学院组织胚胎学教研室, 山东省潍坊市 261053

袁丽丽★, 女, 1979 年生, 山东省青州市人, 汉族, 2007 年潍坊医学院毕业, 硕士, 讲师, 主要从事神经再生与修复研究。  
liliyuan79@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2011)49-09174-04

收稿日期: 2011-06-18  
修回日期: 2011-10-20  
(20110525016/G · C)

## 0 引言

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种酸性热稳定糖蛋白, 作为一种重要的造血因子早被广泛认识<sup>[1-4]</sup>。近来研究发现, EPO 可通过调节神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的生长、发育, 抗神经细胞凋亡等对中枢神经系统起到保护作用<sup>[5-7]</sup>。

本实验对鼠胚胎皮质行体外培养, 鉴定为 NSCs 后, 加入不同浓度的 EPO 行悬浮培养和分化培养, 观察 EPO 对体外培养鼠胚胎皮质 NSCs 凋亡及分化的影响。

## 1 材料和方法

**设计:** 对比观察细胞学体外实验。

**时间及地点:** 于 2007-03/2009-02 在潍坊医学院组胚实验室、济宁医学院形态学实验室完成。

**材料:** 雌性、雄性成年未经产 SD 大鼠由潍坊医学院实验动物中心提供, 3~6 月龄, 体质量 250~280 g, 实验动物的饲养和使用遵守国家有关的法律和规定。将成年雌雄 SD 大鼠于晚 8 pm 按 2:1 比例合笼, 次日 8 am 阴道涂片查精子, 查到精子者记为 E0d。

生长培养基: DMEM/F12(1:1, Hyclone)、2% B27(Gibco)、20  $\mu\text{g/L}$  碱性成纤维细胞生长因子(Sigma)、20  $\mu\text{g/L}$  表皮细胞生长因子(Sigma)、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素。分化培养基: DMEM/F12(1:1, Hyclone)、体积分数10%胎牛血清(杭州四季青)、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素。

#### 主要试剂及仪器:

| 主要试剂及仪器                                                   | 来源               |
|-----------------------------------------------------------|------------------|
| EPO                                                       | 沈阳三生制药有限责任公司     |
| 小鼠抗巢蛋白、小鼠抗神经胶质原纤维酸性蛋白(glia fibrillary acid protein, GFAP) | Accurat Chemical |
| 小鼠抗微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP-2)     | 武汉博士德生物有限公司      |
| 小鼠抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)                              | 北京中杉生物科技有限公司     |
| 倒置显微镜                                                     | 日本 OLYMPOS 公司    |
| Leica DMIRE2 型荧光相差倒置显微镜、Leica Qwin 图像分析系统                 | 德国莱卡公司           |

#### 方法:

##### NSCs培养和鉴定:

NSCs的分离和传代: 取胚胎14 d(E14d)SD大鼠, 麻醉后脱臼处死, 无菌分离鼠胚脑皮质, 用文献[8-9]等取材及培养方法生长培养基悬浮培养及传代, 传第3代细胞记为P3。每日观察细胞生长状况, 适时采集照片。

将生长培养基培养7 d的P3代细胞悬液离心弃上清, 加入血清培养基, 将神经球以适当的密度接种入预先置入L-多聚赖氨酸包被盖玻片的24孔培养板中, 培养6~8 h后取出盖玻片行巢蛋白的免疫荧光染色。

鼠胚大脑皮质NSCs的自然分化: 取P3代的神经球悬液离心弃上清, 加入血清培养基重悬细胞, 用文献[8-9]等培养方法行NSCs分化<sup>[8-9]</sup>。每日倒置相差显微镜下观察细胞生长状况, 7 d后行MAP-2、GFAP免疫荧光染色。

免疫细胞荧光染色: 0.01 mol/L的PBS(pH 7.2)冲洗冷丙酮固定的细胞爬片。用文献[8-9]等方法行巢蛋白、MAP-2、GFAP免疫细胞荧光染色、观察、拍照。对照实验: 以0.01 mol/L PBS代替第一抗体, 其余步骤相同。

实验分组: 将P3 NSCs单细胞悬液接种于添加EPO的生长培养基中, 根据EPO的终浓度随机分为4个实验组, 即0.5, 5, 50, 500 U/mL组, 另设不加EPO的对照组。放入37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内静置培养, 换液方法同上, 7 d后将各组分别接种于含体积分数10%FBS的分化培养基中, 实验组添加EPO, 对照组不加EPO。6~8 h后每组随机取4张爬有细胞的盖玻片冷丙酮固定10 min, 进行Caspase-3免疫荧光染色。分化培养7 d后行MAP-2免疫细胞荧光染色, 每组4张玻片荧光显微镜下每张随机计数5个视野计数MAP-2染色

阳性细胞的数目和Hoechst33258复染的细胞数目。每组均设复孔, 实验重复3次。

Caspase-3与 MAP-2免疫细胞荧光染色: 方法同免疫细胞荧光染色。

主要观察指标: Caspase-3在各实验组及对照组培养NSCs中的阳性表达; NSCs爬片分化培养7 d后MAP-2在各实验组及对照组细胞内的阳性表达。

统计学分析: 由袁丽丽进行统计学处理, 数据采用SPSS 11.5统计软件处理, 各组率的比较采用 $\chi^2$ 检验法(Chi-square test)。

## 2 结果

### 2.1 NSCs鉴定结果

倒置相差显微镜观察结果: 从SD大鼠E14d鼠胚脑皮质分离得到的单细胞, 悬浮生长, 呈圆球形, 细胞饱满, 折光性强, 锥虫蓝染色计数活细胞>96%。获取的细胞在无血清培养基中培养至第5~7天, 神经球多由数十个到数百个细胞组成, 细胞排列紧密。传代培养后, 单细胞可增殖形成由数十至数百个细胞构成的神经球。

免疫细胞染色和荧光染色结果: 巢蛋白免疫细胞荧光染色结果示, 神经球细胞胞浆呈现红色荧光(图1)。MAP-2免疫细胞荧光染色示, 阳性细胞胞浆及突起呈红色, 胞体较小、突起长(图2)。GFAP免疫细胞荧光染色示, 阳性细胞胞浆及突起呈红色, 胞体较大、突起粗而短(图3)。

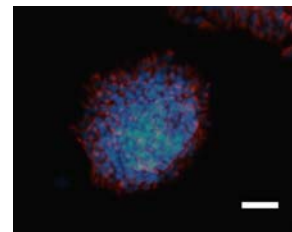


Figure 1 Nestin-positive cells (red) detected by neurospheres immunofluorescence staining (Scale bar=100  $\mu\text{m}$ )  
图1 神经球免疫荧光细胞化学染色, 示巢蛋白阳性细胞(标尺=100  $\mu\text{m}$ )

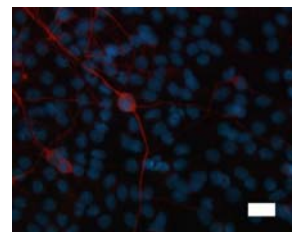


Figure 2 Microtubule-associated protein 2 positive cells (red) detected by immunofluorescence staining after cultured in neural stem cells seeded culture medium for 7 d (Scale bar=50  $\mu\text{m}$ )  
图2 神经干细胞爬片分化培养基培养7 d免疫荧光细胞化学染色, 示微管相关蛋白2阳性细胞(标尺=50  $\mu\text{m}$ )

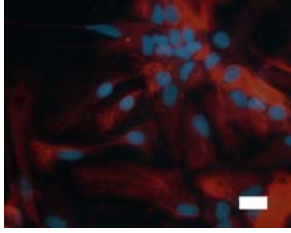


Figure 3 Glia fibrillary acid protein positive cells (red) detected by immunofluorescytochemistry staining after cultured in neural stem cells seeded culture medium for 7 d (Scale bar=50 μm)  
图3 神经干细胞爬片分化培养基培养 7 d 免疫荧光细胞化学染色, 示神经胶质纤维酸性蛋白阳性细胞(标尺=50 μm)

## 2.2 EPO掺入实验结果

倒置相差显微镜观察结果: 细胞接种48 h时, EPO各组细胞分裂相明显多于对照组; 随着培养时间的延长, 神经球数量逐渐增多, 普遍大于对照组, 尤其是EPO剂量为5 U/mL和大于5 U/mL的各组, 神经球数量明显高于正常对照组。

神经球内的细胞凋亡检测结果: Caspase-3免疫细胞荧光化学染色结果显示, 神经球内小部分细胞Caspase-3表达阳性, 胞浆呈红色(图4), 数据统计结果显示, EPO剂量为 $\geq 5$  U/mL各实验组的Caspase-3阳性细胞表达率显著低于对照组( $P < 0.05$ ), 差异有显著性意义, 见表1。

表1 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3在神经干细胞内的表达  
Table 1 Expression of caspase-3 in neural stem cells

| Group        | Expression of caspase-3 |          | Total  | Positive rate (%) |
|--------------|-------------------------|----------|--------|-------------------|
|              | Positive                | Negative |        |                   |
| Control      | 360                     | 2 828    | 3 188  | 11.3              |
| 0.5 U/ml EPO | 330                     | 2 955    | 3 285  | 10.0              |
| 5 U/mL EPO   | 294                     | 3 306    | 3 600  | 8.2 <sup>a</sup>  |
| 50 U/mL EPO  | 283                     | 3 356    | 3 639  | 7.8 <sup>a</sup>  |
| 500 U/mL EPO | 281                     | 3 375    | 3 656  | 7.7 <sup>a</sup>  |
| Total        | 1 548                   | 15 820   | 17 368 | 8.9               |

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. control group. EPO: erythropoietin

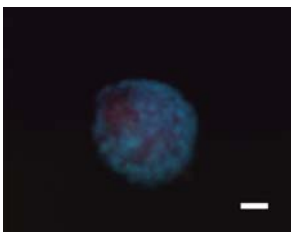


Figure 4 Caspase-3 positive cells (red) detected by neural stem cells immunofluorescytochemistry staining in 5 U/mL erythropoietin group (Scale bar=100 μm)  
图4 促红细胞生成素 5 U/mL 组神经干细胞免疫细胞荧光化学染色, 示半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3阳性细胞(标尺=100 μm)

神经球向神经元方向分化结果: 神经球爬片7 d, MAP-2

免疫细胞荧光染色, 数据统计结果显示,  $EPO \geq 5$  U/mL各实验组的MAP-2阳性细胞表达率显著低于对照组( $P < 0.05$ ), 差异有显著性意义, 见表2及图5。

表2 神经干细胞分化培养 7 d 神经元内微管相关蛋白2阳性表达  
Table 2 Expression of microtubule-associated protein 2 in neurons after neural stem cells cultured for 7 d by differentiating suspension

| Group        | Expression of caspase-3 |          | Total  | Positive rate (%) |
|--------------|-------------------------|----------|--------|-------------------|
|              | Positive                | Negative |        |                   |
| Control      | 1 233                   | 5 779    | 7 012  | 17.6              |
| 0.5 U/ml EPO | 1 262                   | 5 827    | 7 089  | 17.8              |
| 5 U/mL EPO   | 1 342                   | 5 757    | 7 099  | 18.9 <sup>a</sup> |
| 50 U/mL EPO  | 1 416                   | 6 037    | 7 453  | 19.0 <sup>a</sup> |
| 500 U/mL EPO | 1 436                   | 5 694    | 7 130  | 20.1 <sup>a</sup> |
| Total        | 6 689                   | 29 094   | 35 783 | 18.7              |

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. control group. EPO: erythropoietin

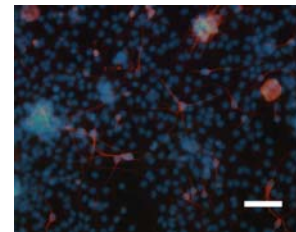


Figure 5 Microtubule-associated protein 2 positive cells (red) detected by neural stem cells immunofluorescytochemistry staining in 5 U/mL erythropoietin group at 7 d after neural stem cells culture and differentiation (Scale bar=100 μm)  
图5 促红细胞生成素 5 U/mL 组神经干细胞分化培养 7 d 免疫细胞荧光染色, 示微管相关蛋白2阳性表达(标尺=100 μm)

## 3 讨论

当今神经科学领域NSCs是研究热点。NSCs存在于胚胎、胎儿和成人的脑室下区、齿状回、纹状体、室管膜下区、脑皮质等部位, 其体外培养也可以获得NSCs<sup>[10-13]</sup>, 本实验从SD大鼠分离胚胎14 d的鼠胚胎皮质体外培养细胞。本实验巢蛋白作为NSCs的标记物, 生长培养基培养的细胞免疫细胞荧光染色结果呈巢蛋白阳性; 鼠胚胎皮质NSCs在生长培养基贴壁分化7 d行MAP-2、GFAP免疫荧光细胞化学染色, 示分化细胞有特异性抗原表达。表明悬浮培养得到的细胞为NSCs, 且具有分化为神经元、星形胶质细胞的潜能。

众多研究表明, EPO及其受体对于神经细胞正常发育具有重要作用<sup>[14-17]</sup>。体内实验表明, EPO可抑制NSCs凋亡促进其增殖和分化<sup>[14,18-19]</sup>。赵舒武等<sup>[20]</sup>研究发现, 胚胎神经管NSCs, EPO抑制NSCs凋亡促进其向神经元分化, 与本实验中体外培养的胚胎脑皮质NSCs, EPO



抑制NSCs凋亡促进其向神经元分化相吻合。虽然细胞来源不同但体外培养的结果相一致。有研究表明在缺氧/缺血时,通过缺氧诱导因子系统及JAK/STAT通路来影响EPO及其受体对中枢神经系统实现保护作用<sup>[21-24]</sup>。EPO和 EPO-R结合后,激活蛋白酪氨酸激酶,迅速诱导细胞内多种蛋白质酪氨酸磷酸化,启动信号转导通路如Ras有丝分裂原激活蛋白激酶等将信号传到细胞核核因子1,控制NSCs的增殖和分化,甚至表现为认知能力的提高。EPO直接作用脑内皮细胞分泌脑源性神经营养因子,后者通过旁分泌方式促进神经发生<sup>[25]</sup>,有研究发现,Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进尤其是向神经元方向分化<sup>[26-30]</sup>,也有研究表明EPO可抑制谷氨酸在体外诱导的神经元死亡<sup>[31]</sup>。

体外培养的NSCs分泌多种神经营养因子,本实验EPO对体外脑皮质NSCs的抗凋亡促进向神经元分化作用可考虑通过以下方式:①直接作用于体外培养的NSCs促进其分泌多种神经营养因子,再抑制临近的NSCs凋亡。②通过信号转导通路、钙离子通道等途径发挥作用。

总之,NSCs的增殖、发育和分化受外来信号和自身基因共同调节,是一个非常复杂的过程,将继续深入研究NSCs定向分化的诱导因素及其分化机制,为实现NSCs移植治疗中枢神经系统疾病提供理论基础。

#### 4 参考文献

- [1] Obara N, Suzuki N, Kim K, et al. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*. 2008; 111:5223-5232.
- [2] Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*. 1992;72:449-489.
- [3] Bondurant MC, Koury MJ. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol*. 1986; 6: 2731-2733.
- [4] Shoemaker CB, Mitsock LD. Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. *Mol Cell Biol*. 1986; 6: 849-858.
- [5] Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:10659-10664.
- [6] Siren AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 4044-4049.
- [7] Xue ZM, Hu M, Zhang CH, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(23):4194-4198. 薛政民,胡萌,张长海,等.不同浓度重组人促红细胞生成素对神经干细胞体外培养增殖的影响[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(23):4194-4198.
- [8] Yuan LL, Ma DD, Du HM, et al. Jiepou Kexue Jinzhan. 2010;16(6):550-553. 袁丽丽,马登殿,杜红梅,等.促红细胞生成素促进体外鼠脑皮质神经干细胞增殖[J].解剖科学进展, 2010, 16(6):550-553.
- [9] Yuan LL, Guan YJ, Du HM, et al. Shenjing Jiepouxue Zazhi. 2008;24(4): 343-348. 袁丽丽,管英俊,杜红梅,等.缺氧对体外培养的鼠脑皮质神经干细胞增殖、分化及凋亡的影响[J].神经解剖学杂志, 2008,24(4): 343-348.
- [10] Bonilla S, Silva A, Valdés L, et al. Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. *Neuroscience*. 2005; 133: 85-95.
- [11] Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, et al. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci*. 2002;22(2):437-445.
- [12] Ji LL, Tong L, Wang ZY. Jiepou Kexue Jinzhan. 2007;13(2): 180-182. 季莉莉,佟雷,王振宇.神经干细胞的生物学特性和体外培养鉴定[J].解剖科学进展, 2007,13(2):180-182.

- [13] McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*. 1997; 276: 66-71.
- [14] Yu X, Shacka JJ, Eells JB, et al. Erythropoietin receptor signaling is required for normal brain development. *Development*. 2002; 129:505-516.
- [15] Siren AL, Fasshauer T, Bartels C, et al. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics*. 2009; 6:108-127.
- [16] Wallach I, Zhang J, Hartmann A, et al. Erythropoietin-receptor gene regulation in neuronal cells. *Pediatr Res*. 2009; 65:619-624.
- [17] Zhang W, Lü SY, Yu ZY, et al. Effects of erythropoietin on the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and Bax after facial nerve axotomy in rats. *Neural Regen Res*. 2011;6(6):444-449.
- [18] Wen TC, Rogido M, Genetta T, et al. Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett*. 2004; 355:165-168.
- [19] Kellert BA, McPherson RJ, Juul SE. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res*. 2007; 61: 451-455.
- [20] Zhao SW, Gao YM, Zhang XL, et al. Shenjing Jiepouxue Zazhi. 2007;23(5):549-553. 赵舒武,高英茂,张晓丽,等. EPO对体外培养的神经干细胞增殖、分化和凋亡的影响[J].神经解剖学杂志, 2007,23(5):549-553.
- [21] Ostrowski D, Ehrenreich H, Heinrich R. Erythropoietin promotes survival and regeneration of insect neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience*. 2011;188:95-108.
- [22] Chang YC, Huang CC. Perinatal brain injury and regulation of transcription. *Curr Opin Neurol*. 2006; 19: 141-147.
- [23] Sargin D, El-Kordi A, Agarwal A, et al. Expression of constitutively active erythropoietin receptor in pyramidal neurons of cortex and hippocampus boosts higher cognitive functions in mice. *BMC Biol*. 2011;9:27.
- [24] Ehrenreich H, Bartels C, Sargin D, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of human brain disease: focus on cognition. *Ren Nutr*. 2008;18:146-153.
- [25] Wang L, Zhang Z, Wang Y, et al. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 2004; 35: 1732-1737.
- [26] Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, et al. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*. 2004; 131:2791-2801.
- [27] Muroyama Y, Fujihara M, Ikeya M. Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev*. 2002; 16:548-554.
- [28] Chenn A, Walsh C. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*. 2002; 297:365-374.
- [29] Yu J, Kim J, Song G. Increase in proliferation and differentiation of neural progenitor cells isolated from postnatal and adult mice brain by Wnt-3a and Wnt-5a. *Mol Cell Biochem*. 2006; 288:17-28.
- [30] Lee H, Kleber M, Hari L, et al. Instructive role of Wnt/ $\beta$ -catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science*. 2004; 303:1020-1029.
- [31] Morishita E, Masuda S, Nagao M, et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997; 76: 105-116.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 济宁医学院青年科研基金项目资助项目(2008jynq-25), 课题名称: EPO对体外鼠脑皮质神经干细胞增殖、分化及凋亡的影响。

**作者贡献:** 实验设计者为管英俊、袁丽丽,实施者为袁丽丽、杜红梅,评估者为孔佑华。皆经过正规培训,采用盲法评估。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验中对动物处置符合动物伦理学要求。

**本文创新性:** 检索 CNKI、万方、PUBMED/SPRINGERLINK 数据库,发现 EPO对神经干细胞的影响在国内外同类研究中体内研究较多,体外脑皮质神经干细胞研究较少,未发现与本文内容相同的文献。文章创新性特点:①突出对大鼠胚胎脑皮质神经干细胞的影响。②研究 EPO单一因素对体外培养神经干细胞凋亡与分化的影响。