

促红细胞生成素体外诱导神经干细胞的分化

赵岩¹, 王喜良¹, 肖宇龙¹, 霍洪军¹, 江建明², 闫慧博³(¹内蒙古医科大学第二附属医院脊柱外科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030; ²南方医科大学南方医院脊柱骨科外科, 广东省广州市 510515; ³南方医科大学第三附属医院脊柱外科, 广东省广州市 510630)

文章亮点:

1 研究表明促红细胞生成素除能调节红细胞生成以增加组织供氧外, 还具有抗氧化、抗凋亡、抗炎及促进血管生成的作用, 在对肝脏缺血再灌注损伤的保护具有一定的生物学机制: ①清除自由基, 抗氧化作用。②减轻钙超载。③抗凋亡作用。④抗炎作用。⑤促进血管生成作用。

2 实验发现促红细胞生成素在体外能够有效地诱导神经干细胞向神经元的分化, 并可明显提高其向神经元的转化率。

关键词:

干细胞; 分化; 促红细胞生成素; 神经干细胞; 神经元; 脊髓损伤; 培养; 诱导; 转化率

主题词:

红细胞生成素; 神经干细胞; 细胞分化; 组织工程

基金资助:

内蒙古自治区科技厅自然科学基金资助课题(2011MS1139)

摘要

背景:近年来, 神经干细胞被认为是治疗脊髓损伤的理想移植细胞, 但其在宿主体内自然分化为神经元的比例较低, 严重制约了其修复脊髓损伤的效果。

目的:分析促红细胞生成素体外诱导神经干细胞分化的作用。

方法:从新生 Wistar 大鼠海马组织中无菌条件下分离神经干细胞, 进行体外分离、培养及免疫荧光鉴定。然后取第3代的神经干细胞, 随机分为0.5, 5, 50 U/mL 促红细胞生成素组和对照组, 分别加入0.5, 5, 50, 0 U/mL 促红细胞生成素。

结果与结论:0.5, 5, 50 U/mL 促红细胞生成素组神经元的转化率较对照组明显提高($P < 0.05$), 5, 50 U/mL 促红细胞生成素组神经元的转化率高于0.5 U/mL 促红细胞生成素组($P < 0.05$), 但5, 50 U/mL 促红细胞生成素组中神经元数量接近($P > 0.05$)。说明促红细胞生成素在体外能够有效地诱导神经干细胞向神经元的分化, 并可明显提高其向神经元的转化率。

赵岩, 王喜良, 肖宇龙, 霍洪军, 江建明, 闫慧博. 促红细胞生成素体外诱导神经干细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(45):7337-7341.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.45.022

Differentiation of neural stem cells induced by erythropoietin *in vitro*

Zhao Yan¹, Wang Xi-liang¹, Xiao Yu-long¹, Huo Hong-jun¹, Jiang Jian-ming², Yan Hui-bo³ (¹Department of Thoracolumbar Spine Surgery, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Department of Orthopedic and Spinal Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; ³Department of Spinal Surgery, Third Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In recent years, neural stem cells are considered to be ideal for the treatment of spinal cord injury, but the proportion of its natural differentiation into neurons in the host body is relatively low, which severely restricts the therapeutic effect on spinal cord injury.

OBJECTIVE: To investigate the effect of erythropoietin on the differentiation of neural stem cells *in vitro*.

METHODS: Under sterile condition, neural stem cells from the hippocampus of neonatal Wistar rats were isolated, cultured and identified by immunofluorescence *in vitro*. The third generation of neural stem cells were randomly divided into 0.5, 5, 50 U/mL erythropoietin groups and control group (with no erythropoietin).

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the differentiation rate of neural stem cells was significantly improved in the 0.5, 5, 50 U/mL erythropoietin groups ($P < 0.05$); moreover, the differentiation rate of neural stem cells in the 5, 50 U/mL erythropoietin groups was higher than that in the 0.5 U/mL erythropoietin group ($P < 0.05$). In addition, there was no significant difference between the 5, 50 U/mL erythropoietin groups ($P > 0.05$). These findings indicate that erythropoietin can effectively induce the differentiation of neural stem cells into neurons *in vitro*, and moreover, it can significantly improve the

赵岩, 男, 1977年生, 内蒙古自治区赤峰市人, 汉族, 2010年南方医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事脊髓损伤的基础和临床研究。

通讯作者: 肖宇龙, 主任医师, 内蒙古医科大学第二附属医院脊柱外科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)45-07337-05

稿件接受: 2015-09-25

http://www.crter.org

Zhao Yan, M.D., Associate chief physician, Department of Thoracolumbar Spine Surgery, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: Xiao Yu-long, Chief physician, Department of Thoracolumbar Spine Surgery, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Accepted: 2015-09-25

differentiation rate of neural stem cells into neurons.

Subject headings: Erythropoietin; Neural Stem Cells; Cell Differentiation; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Scientific Committee of Inner Mongolia Autonomous Region, No. 2011MS1139

Zhao Y, Wang XL, Xiao YL, Huo HJ, Jiang JM, Yan HB. Differentiation of neural stem cells induced by erythropoietin in vitro. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(45):7337-7341.

0 引言 Introduction

神经干细胞具有增殖与自我更新潜能较高, 便于体外诱导和操作, 具备早期胚胎细胞特性, 多向分化潜能, 即可分化为神经元和神经胶质细胞, 归巢性, 迁移播散能力强等优势, 比其他干细胞更适合治疗脊髓损伤^[1-4]。然而, 研究发现神经干细胞在宿主体内自然分化为神经元的比例仅为1%^[5], 严重制约了神经干细胞移植修复脊髓损伤的效果。因此, 如何诱导以及提高神经干细胞向神经元分化的比例对今后神经干细胞移植治疗脊髓损伤具有非常重要的意义。

近年来研究发现促红细胞生成素不仅有促进前体红细胞分化的作用^[6-9], 还有促进神经干细胞的生长、发育以及抗神经细胞凋亡等作用, 并通过上述作用而对中枢神经系统起到保护作用^[10-11]。实验拟以不同浓度的促红细胞生成素干预神经干细胞分化, 观察其对神经干细胞向神经元转化的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外比较观察细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年3月在内蒙古医科大学实验中心完成。

1.3 材料

神经干细胞分化研究使用的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
表皮生长因子、阿糖胞苷、胰蛋白酶、多聚赖氨酸、牛垂体提取液、碱性成纤维细胞生长因子、5-BrdU	Sigma公司
DMEM-F12 培养基、胎牛血清	GIBCO公司
SABC免疫组化试剂盒、神经元特异性烯醇化酶(兔抗大鼠)、巢蛋白抗体(兔抗大鼠)、羊抗兔Cy3-IgG、B27 添加剂、羊抗兔异硫氰酸荧光素-IgG	武汉博士德公司
促红细胞生成素(10 000 IU/支, 批号: 2014071168)	沈阳三生制药有限责任公司
25 cm ² 塑料培养瓶	Corning公司
荧光显微镜(TE2000-S)	日本Nikon公司
Leica Qwin 图像分析系统	德国莱卡公司
解剖显微镜(型号: BIX-103G)	陆希科技公司

实验动物: 新生24 h的Wistar大鼠5只, 性别不限, 由

内蒙古大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(蒙)2002-0001。实验动物的饲养和使用遵守国家有关的法律和规定, 符合动物伦理学要求。

1.4 方法

1.4.1 神经干细胞的分离及培养 取新生24 h的Wistar大鼠, 麻醉后脱臼处死, 无菌条件下完整分离取出大鼠海马组织, 置于4 °C D-Hank's液中冰浴, 解剖显微镜下剥除海马组织表面的软脑膜、血管膜, 剥除清楚后迅速将其放入Hanks缓冲液中漂洗3次, 移至含有适量DMEM-F12培养液的培养皿中。将海马组织块剪成约1 mm³左右的小块, 吹打呈匀浆状, 再用200目滤网过滤细胞匀浆制成单细胞悬液。最后调整细胞浓度为5×10⁸ L⁻¹接种于25 cm²的培养瓶中, 再在培养瓶中加入无血清细胞条件培养液[含2% B27、碱性成纤维细胞生长因子(20 μg/L)和表皮生长因子(20 μg/L)的DMEM-F12]。最后将培养瓶放入体积分数5% CO₂、37 °C、80%湿度的培养箱中, 每隔两三天半量换液1次。

1.4.2 神经干细胞的鉴定 原代培养7-9 d后, 待神经干细胞球充满培养瓶, 且体积基本一样时, 用吸管轻柔地吹打使其沉于培养瓶底部, 然后将其移入离心管内, 800 r/min离心5 min, 收集神经干细胞, 弃上清液后, 吹打, 将神经球分离为单细胞悬液。细胞分瓶传代培养, 细胞浓度为5×10⁸ L⁻¹, 每两三天半量换液1次。原代及第3代的神经干细胞悬液中加入含5 μmol/L 5-BrdU的神经干细胞培养基, 培养5 d后将神经球移至含有0.1%多聚赖氨酸的盖玻片上, 然后置于体积分数5% CO₂、37 °C、80%湿度的培养箱中培养2 h。0.01 mol/L PBS(pH 7.2)洗, 免疫荧光鉴定5-BrdU阳性细胞(即神经干细胞)。

另取原代培养和第3代培养的神经球滴在含有0.1%多聚赖氨酸的盖玻片上, 在体积分数5% CO₂、37 °C、80%湿度的培养箱中孵育2 h, 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)洗, 免疫组织化学鉴定巢蛋白。

去除神经干细胞培养液中的碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子, 加入PBS, 然后将神经干细胞滴在涂布0.1%多聚赖氨酸的无菌盖玻片上, 在体积分数5% CO₂、37 °C、80%湿度的培养箱孵育, 观察其分化为神经元的情况, 7 d后取出盖玻片, 应用0.01 mol/L PBS(pH 7.2)洗, 免疫组织化学鉴定神经元特异性烯醇化酶表达。

1.4.3 细胞分组 将分离培养的第3代神经干细胞悬液接种在含有促红细胞生成素的培养基中, 细胞浓度为5×

$10^8 L^{-1}$, 分为0.5, 5, 50 U/mL促红细胞生成素组和对照组, 分别加入0.5, 5, 50, 0 U/mL促红细胞生成素, 放入体积分数5% CO_2 、37 °C、饱和湿度的培养箱中培养。培养4, 7, 14 d后, 对各组细胞行神经元特异性烯醇化酶免疫荧光鉴定, 阳性细胞为神经元, 荧光相差显微镜下计算神经干细胞分化为神经元的比率。

1.5 主要观察指标 神经元特异性烯醇化酶的表达及神经干细胞分化为神经元的比率。

1.6 统计学分析 应用SPSS 13.0统计学软件对实验数据进行统计学分析, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析对多组间样本均数进行比较, 进一步两两比较采用LSD法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 神经干细胞的形态及鉴定结果 从新生大鼠海马组织中分离的单个细胞近似圆形, 且其大小相近, 培养两三天后大多数细胞死亡, 只有少数细胞进入有丝分裂期, 镜下可见明显细胞核分裂相, 分裂相的细胞逐渐聚集成团。细胞培养四五天后, 可见数个到数十个由细胞组成呈悬浮状的球状细胞团, 这些细胞团体积很小, 折光性强, 突起不明显, 边界清楚, 大多呈褐色, 边缘见较小毛刺, 称为“神经球”。细胞培养6-8 d后, 这些神经球明显增大, 中心部分颜色较深, 但边缘颜色较浅(图1)。把传代后的神经球制备成单细胞悬液, 经两三天的培养, 可见这些单个细胞出现分裂现象, 并重新形成小的细胞团, 五六天后培养液中出现散在的、大小不等的神经球, 7 d时形成大的神经球, 其边界清楚、折光性强。这表明从海马组织分离的细胞具有自我增殖、分裂能力。

原代及第3代培养的神经干细胞中均表达神经干细胞标记物巢蛋白(图2A), 提示分离培养的神经干细胞具有胚胎源性。5-BrdU标记5 d后, 约70%的原代神经干细胞呈阳性, 约60%的第3代神经干细胞呈阳性(图2B)。说明分离培养的细胞是神经干细胞并具有分裂增殖能力。

去除神经干细胞培养液中的碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子, 加入体积分数10%的胎牛血清培养12 h后, 神经干细胞开始贴壁, 24 h后可见细胞团中的细胞自向外伸出突起, 并开始向细胞团周围迁移(图3A)。培养7 d后可观察到细胞团中的细胞逐渐向外迁出, 相互之间形成网络状联系。14 d后免疫组化染色观察显示只有少数细胞呈神经元特异性烯醇化酶阳性表达(图3B), 大多数细胞最终分化为星形胶质细胞, 神经干细胞自然分化成神经元的比率 $< 5\%$ 。

2.2 促红细胞生成素体外诱导神经干细胞分化 被神经元特异性烯醇化酶-异硫氰酸荧光素荧光标记的神经元在荧光显微镜下发出绿色荧光, 多数为多极神经元, 少数为双极神经元或假单极神经元, 发出较长的轴突(图3C)。分化培养3, 7, 14 d后0.5 U/mL促红细胞生成素组可见少量

的神经元聚集生长(图3D), 5, 50 U/mL促红细胞生成素组中可见多个神经元聚集生长(图3E)。

0.5, 5, 50 U/mL促红细胞生成素组神经元的转化率较对照组明显提高($P < 0.05$), 5, 50 U/mL促红细胞生成素组神经元的转化率高于0.5 U/mL促红细胞生成素组($P < 0.05$), 但5, 50 U/mL促红细胞生成素组中神经元数量接近($P > 0.05$), 见表1。

表1 促红细胞生成素对神经干细胞分化为神经元比例的影响

($\bar{x} \pm s$, %)

Table 1 Effect of erythropoietin on percentage of neural stem cells differentiating into neurons

组别	培养时间(d)		
	4	7	14
对照组	4.81±0.81	4.91±0.76	5.01±0.78
0.5 U/mL 促红细胞生成素组	10.23±1.53 ^a	11.23±1.65 ^a	11.43±1.81 ^a
5 U/mL 促红细胞生成素组	19.93±2.38 ^{ab}	21.30±1.95 ^{ab}	21.18±1.74 ^{ab}
50 U/mL 促红细胞生成素组	19.23±1.78 ^{ab}	21.48±1.34 ^{ab}	21.41±1.54 ^{ab}

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与0.5 U/mL 促红细胞生成素组相比, ^b $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

近年来神经干细胞是神经科学领域研究的热点。神经干细胞存在于胚胎、胎儿和成人的室管膜下区、脑室下区、纹状体、齿状回、脑皮质等部位, 应用体外培养方法也可获得神经干细胞^[12-15]。本实验从新生 Wistar 大鼠海马组织中无菌条件下分离神经干细胞, 进行体外分离、培养及免疫荧光鉴定。本实验巢蛋白作为神经干细胞的标记物, 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; 神经干细胞与促红细胞生成素共培养4, 7, 14 d后, 神经元特异性烯醇化酶在各实验组中的阳性表达, 表明促红细胞生成素在体外能够有效地诱导神经干细胞向神经元的分化。

众多研究表明神经干细胞移植入脊髓损伤区域后可促进近端轴突再生, 并使再生轴突穿过损伤区域到达远端, 从而完全或部分地恢复神经功能^[16-18]。但神经干细胞在宿主体内自然分化为神经元的比例仅为1%, 而分化为胶质细胞和少突胶质细胞却分别达到占31.2%和50.3%^[19]。这严重制约了神经干细胞移植对脊髓损伤的修复作用。因此, 如何诱导、提高神经干细胞向神经元分化的比例对今后神经干细胞移植治疗脊髓损伤具有非常重要的意义。既往许多研究采用多种药物或神经生长因子对神经干细胞进行体外诱导分化, 但分化的效果不尽相同^[20-23]。

本研究以不同浓度的促红细胞生成素干预神经干细胞分化, 观察其对神经干细胞向神经元转化的影响。研究结果显示: 分化培养后0.5 U/mL促红细胞生成素组中可见到少量的神经元聚集生长, 5, 50 U/mL促红细胞生成素组中

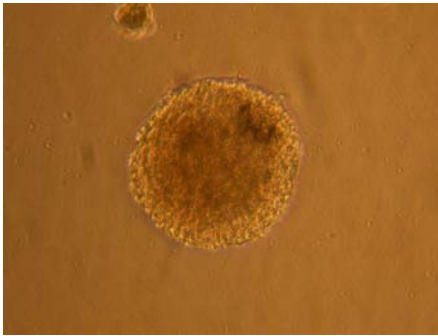


图1 第3代神经干细胞球形态(x200)
Figure 1 Morphology of third generation of neural stem cell spheres (x200)

图注: 神经干细胞球折光性强, 体积很小, 边界清楚。

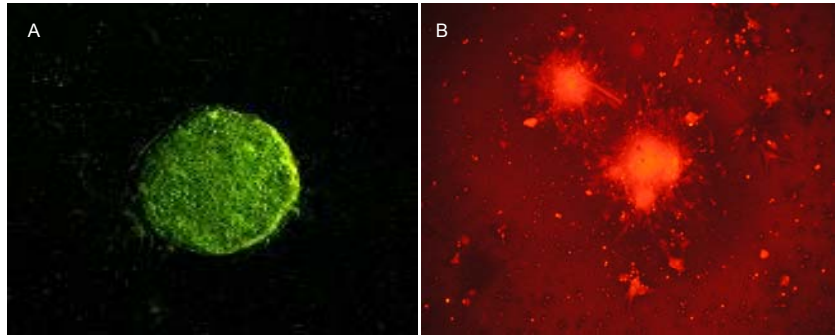


图2 第3代神经干细胞的鉴定结果(x200)
Figure 2 Identification results of third generation of neural stem cells (x200)

图注: 图中 A 为神经干细胞呈巢蛋白阳性, 发出绿色荧光; B 为 5-BrdU 标记 5 d 后, 神经干细胞呈阳性。

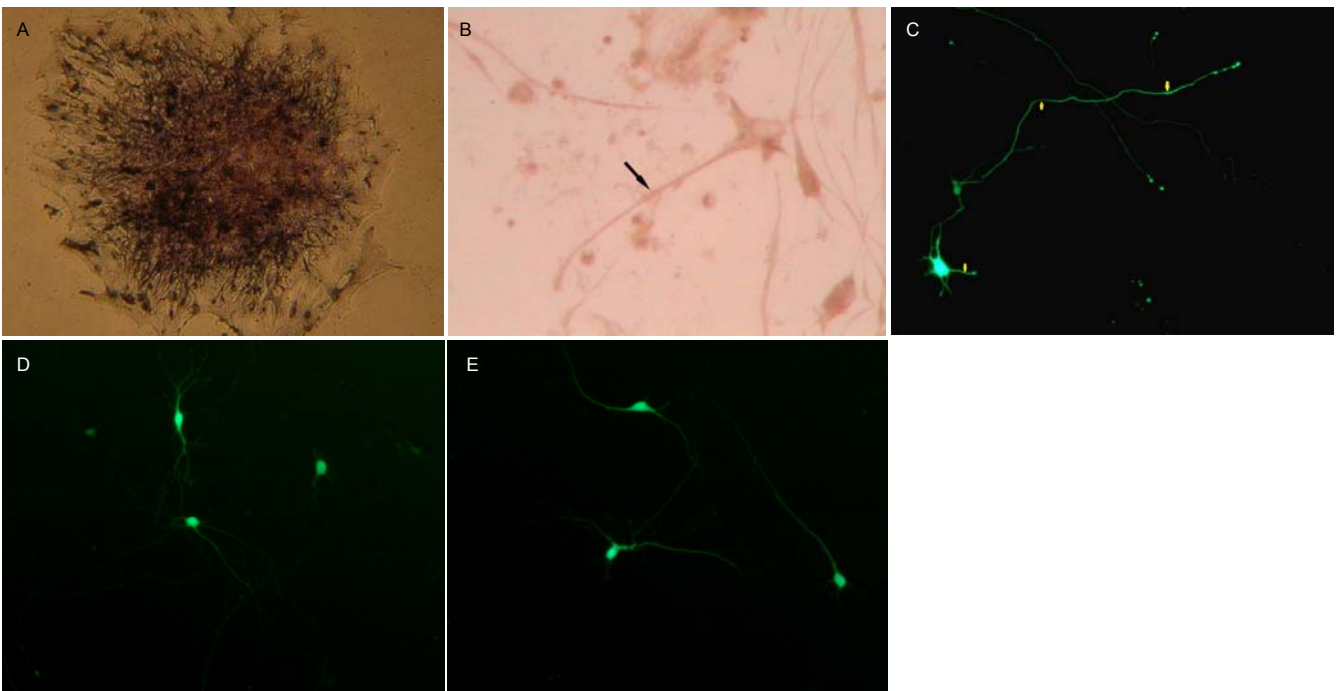


图3 促红细胞生成素对神经干细胞分化的影响(x200)
Figure 3 Effect of erythropoietin on differentiation of neural stem cells (x200)

图注: 图中 A 为第3代神经干细胞培养 24 h 后开始贴壁迁徙、分化; B 为在诱导分化 14 d 时, 第3代神经干细胞自然分化为神经元, 箭头所指为神经元轴突; C 为 0.5 U/mL 促红细胞生成素组神经元诱导分化 14 d 时, 呈神经元特异性烯醇化酶阳性; D 为 5 U/mL 促红细胞生成素组神经元诱导分化 14 d 时, 呈神经元特异性烯醇化酶阳性; E 为 50 U/mL 促红细胞生成素组神经元诱导分化 14 d 时, 呈神经元特异性烯醇化酶阳性。

可见到多个神经元聚集生长, 并且神经元数量明显多于对照组, 而 5, 50 U/mL 促红细胞生成素组中神经元数量接近。0.5, 5, 50 U/mL 促红细胞生成素组神经元的转化率均明显高于对照组, 且 5, 50 U/mL 促红细胞生成素组神经元的转化率高于 0.5 U/mL 促红细胞生成素组, 但 5, 50 U/mL 促红细胞生成素组神经元的转化率接近。实验证实促红细胞生成素在体外能够有效地诱导神经干细胞向神经元的分化, 并可明显提高其向神经元的转化率。

但由于神经干细胞的增殖、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, 所以不管采用那种方法诱导神经干细胞向神经元细胞分化, 效果均有

一定的限制, 这也是制约神经干细胞移植治疗脊髓损伤的一大瓶颈。本课题组今后将继续深入研究神经干细胞定向分化的诱导因素及其分化机制, 为实现神经干细胞移植治疗脊髓损伤提供实验理论依据。

作者贡献: 实验设计者为肖宇龙、赵岩, 实施者为王喜良、闫慧博, 评估者为霍洪军、江建明。所有作者均经过正规培训, 采用盲法评估。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经内蒙古医科大学动物实验伦理委员会批准, 实验中对动物处置符合动物伦理学要求。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

学术术语: 促红细胞生成素的体内合成? 促红细胞生成素主要由肾皮质、肾小管周围的间质细胞(如成纤维细胞、内皮细胞等), 少部分在肝细胞和巨噬细胞中合成。可以促进早期红系祖细胞的增殖与分化, 但主要作用于晚期红系祖细胞。在缺氧刺激下, 肾也可释放促红细胞生成素, 促进晚期红系祖细胞增殖并向幼稚红细胞分化, 同时促进血红蛋白合成和骨髓对网织红细胞的释放, 使血液中成熟的红细胞增加, 从而使机体的缺氧得到缓解。当促红细胞生成素的浓度和红细胞数量增加到一定水平时, 会反馈性抑制促红细胞生成素的合成与释放, 以维持红细胞数量的相对恒定。

作者声明: 文章第一作者对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Rietze RL, Reynolds BA. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol.* 2006;419:3-23.
- [2] 赵明,高娟娟,蒋惠云,等.神经干细胞治疗中枢神经系统损伤的研究进展[J].*基础医学论坛*,2015,19(1):118-120.
- [3] Mothe AJ, Tator CH. Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury. *Int J Dev Neurosci.* 2013;31(7):701-713.
- [4] Andres RH, Horie N, Slikker W, et al. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain.* 2011;134(Pt 6):1777-1789.
- [5] Parr AM, Kulbatski I, Tator CH. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2007;24(5):835-845.
- [6] Obara N, Suzuki N, Kim K, et al. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood.* 2008;111(10):5223-5232.
- [7] Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Lippi G. Erythropoietin receptor (EpoR) agonism is used to treat a wide range of disease. *Mol Med.* 2013;19:62-64.
- [8] Bondurant MC, Koury MJ. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol.* 1986;6(7):2731-2733.
- [9] Shoemaker CB, Mitscock LD. Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. *Mol Cell Biol.* 1986;6(3):849-858.
- [10] Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(16): 10659-10664.
- [11] Giese AK, Frahm J, Hübner R, et al. Erythropoietin and the effect of oxygen during proliferation and differentiation of human neural progenitor cells. *BMC Cell Biol.* 2010;11:94.
- [12] 徐富翠,邹礼乐,梅欣明,等.神经干细胞培养及其影响因素[J].*中国组织工程研究*,2013;17(10):1835-1840.
- [13] Andres RH, Horie N, Slikker W, et al. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain.* 2011;134(Pt 6):1777-1789.
- [14] Salazar DL, Uchida N, Hamers FP, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in an early chronic spinal cord injury NOD-scid mouse model. *PLoS One.* 2010;5(8):e12272.
- [15] 张殿君,刘一,付长峰,等.新生大鼠脊髓源性神经干细胞的分离培养及分化鉴定[J].*吉林大学学报(医学版)*,2009;35(2):230-233.
- [16] Sasaki M, Hains BC, Lankford KL, et al. Protection of corticospinal tract neurons after dorsal spinal cord transection and engraftment of olfactory ensheathing cells. *Glia.* 2006; 53(4):352-359.
- [17] Keyvan-Fouladi N, Raisman G, Li Y. Functional repair of the corticospinal tract by delayed transplantation of olfactory ensheathing cells in adult rats. *J Neurosci.* 2003;23(28): 9428-9434.
- [18] López-Vales R, Forés J, Navarro X, et al. Olfactory ensheathing glia graft in combination with FK506 administration promote repair after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2006;24(3):443-454.
- [19] Parr AM, Kulbatski I, Tator CH. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2007;24(5):835-845.
- [20] Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000;287(5457):1427-1430.
- [21] Hermanson O, Jepsen K, Rosenfeld MG. N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature.* 2002; 419(6910):934-939.
- [22] 苏肖英,汪海涛,孟茜,等.神经生长因子诱导神经干细胞分化的作用机制探讨[J].*广东医学*,2012,33(1):44-48.
- [23] Zhang L, Jiang H, Hu Z. Concentration-dependent effect of nerve growth factor on cell fate determination of neural progenitors. *Stem Cells Dev.* 2011;20(10):1723-1731.