

当归红芪超滤膜提取物诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的实验研究

聂 蕾¹ 殷祎隆² 刘永琦¹ 樊 秦¹ 苏 韫¹

摘要 **目的** 观察并评价当归红芪超滤膜提取物(简称中药合剂)诱导小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow derived stroma cells, BMSCs)分化为神经样细胞的效果。**方法** 体外培养小鼠 BMSCs 后加入药物并分为 5 组:空白组、6 g/L 中药合剂组(简称低剂量组)、12 g/L 中药合剂组(简称高剂量组)及 3 g/L 中药合剂联合 0.5 mmol/L β -巯基乙醇用药组(简称联合组)、 β -巯基乙醇阳性对照组(简称对照组)。通过甲苯胺蓝染色观察各组诱导分化为神经样细胞的效果,应用免疫组织化学及免疫荧光技术检测分化后细胞所表达的神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、巢蛋白(nestin)、神经丝蛋白(neurofilament protein, NFP)、微管结合蛋白 2(microtubule-associated protein-2, MAP2)及神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP) 5 种神经特异性蛋白的差异,并应用流式细胞分析技术(flow cytometry, FCM)检测各组细胞生长周期的变化。**结果** 诱导后细胞形态发生神经样细胞改变,两个中药合剂组的形态特征性均弱于联合组和对照组;除空白组外,上述 5 种蛋白在各组的表达为阳性,表达程度均为对照组最高($P < 0.05$),联合组次之($P < 0.05$);经流式细胞术检测细胞增殖率比较:对照组最低($P < 0.05$),高、低剂量组较高($P < 0.05$),联合组次之($P < 0.05$)。**结论** 中药合剂可较为有效地诱导小鼠 BMSCs 分化为神经样细胞,诱导能力虽弱于对照组,但对于分化后细胞的增殖作用明显。联合组可有效诱导 BMSCs 分化为神经样细胞并使细胞有较高的增殖能力,可能是用于临床研究目前较为理想的用药途径。

关键词 当归红芪超滤膜提取物;骨髓间充质干细胞;分化;神经样细胞

Ultrafiltration Membrane Extract Mixture from *Angelica sinensis* and *Hedysarum polybotrys* Induced Transdifferentiation of BMSCs in Mice: an Experimental Research NIE Lei¹, YIN Yi-long², LIU Yong-qi¹, FAN Qin¹, and SU Yun¹ 1 Department of Etiological Biology and Immunology, Basic Faculty, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou (730000), China; 2 Department of Etiological Biology and Immunology, Medical College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou (730030), China.

ABSTRACT **Objective** To observe and evaluate the effect of transdifferentiation of bone marrow derived stroma cells (BMSCs) into nerve cells by ultrafiltration membrane extract mixture from *Angelica sinensis* and *Hedysarum polybotrys*. **Methods** The BMSCs *in vitro* cultured after treated by ultrafiltration membrane extract mixture from *Angelica sinensis* and *Hedysarum polybotrys* were divided into 5 groups, i.e., the blank group, the low dose group (6 g/L mixture), the high dose group (12 g/L mixture), the combination group (3 g/L mixture + 0.5 mmol/L β -mercaptoethanol), and the positive control group (β -mercaptoethanol). The effects of transdifferentiation of nerve cells were observed using toluidine blue staining in each group. The differences of 5 specific neuroproteins, i.e. neuron-specific enolase (NSE), nestin, neurofilament protein (NFP), microtubule associated protein 2 (MAP2), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were detected using immunohistochemical technique and immunofluorescent technique respectively. The changes of the cell cycle were detected using flow cytometry (FCM). **Results** After induction BMSCs changed morphologically. The morphological features were weaker in the high and low dose groups than in the combination group and the positive group. Except the blank group, the aforesaid

基金项目:2010 年度甘肃省教育厅科研项目(No. 1006B-06)

作者单位:1. 甘肃中医学院基础课部病原生物学与免疫学教研室(兰州 730000); 2. 西北民族大学医学院病原生物学与免疫学教研室(兰州 730030)

通讯作者:聂 蕾, Tel:13669340277, E-mail:budina@sina.com

5 proteins expressed positively in the rest groups. Their expression levels were highest in the positive control group ($P < 0.05$), followed by the combination group ($P < 0.05$). As for the cell proliferation rate detected by FCM, it was the lowest in the positive control group, followed by high dose group, low dose group, and then the combination group (all $P < 0.05$). Conclusions The ultrafiltration membrane extract mixture from *Angelica sinensis* and *Hedysarum polybotrys* could effectively induce the transdifferentiation of BMSCs into nerve cells. Its inducing capacities were weaker in the positive control group, but it showed marked proliferation effects on differentiated cells. Therefore, the mixture might be a more ideal medication pathway for effectively inducing BMSCs' transdifferentiation into nerve cells, which might have higher proliferation and be used for clinical research.

KEYWORDS ultrafiltration membrane extract mixture from *Angelica sinensis* and *Hedysarum polybotrys*; bone marrow stroma cell; transdifferentiation; nerve cell

诱导后小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow derived stroma cells, BMSCs)向神经样细胞的转化研究,对于解决临床神经修复抑或是中枢神经系统的重建问题具有极为重大的意义^[1]。大量的实验已经证明,多种诱导剂,如维甲酸、二甲基亚砷、 β -巯基乙醇及甘油^[2,3]等的效能在基础研究领域是值得肯定的,但是这一类化学制剂大都有极为明显的细胞毒性,并不适合使用于临床^[2,3]。因此寻找高效而又安全的诱导剂才是此类研究的当前重点所在。

中草药提取技术的发展,使得其研究前景很为乐观。采用超滤膜分离技术精制其水提液即当归红芪超滤膜提取物对小鼠 BMSCs 进行体外诱导实验,以期对益气活血中药、甘肃道地药材——当归红芪合剂的治疗效用进一步拓展,为临床治疗提供良好的实验依据。

材料与方法

1 细胞株 小鼠骨髓间充质干细胞细胞株-D1 细胞(BMSC-D1),序列号:CRL-10915,美国 ATCC 公司,解放军兰州军区兰州总医院骨科研究所惠赠。

2 药物 中药材当归、红芪生药由甘肃中医学院附属医院药房提供。按照文献[4]所提供的方法以生药煎煮→粗滤→浓缩→微滤(应用陶瓷膜)→超滤(应用聚丙烯腈中空纤维超滤膜,截留分子量为 10 万的超滤物)→浓缩后喷干,每克生药[(当归、红芪质量比 1:5)合当归红芪超滤膜提取物(简称中药合剂)干燥粉 0.141 g,主要含有阿魏酸、芒柄花素等药用有效成分]; β -巯基乙醇,购自 Sigma-Aldrich(上海) Trading Co., Ltd,产品编号:M7522。

3 试剂及仪器 培养基 D/F12、胰蛋白酶为美国 GIBCO 公司产品;胎牛血清购自兰州民海生物工程有限公司;碘化丙啶(propidium iodide, PI)为 Sigma 产

品;甲苯胺蓝为上海试剂三厂生产;兔抗小鼠神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、巢蛋白(nestin)、神经丝蛋白(neurofilament protein, NFP)、微管结合蛋白 2(microtubule-associated protein-2, MAP2)及神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、SABC 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒、FITC 标记的山羊抗兔 IgG 试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。纯净水系统,美国 Millipore 公司,型号 Mini2Q Biocel;二氧化碳培养箱,德国 Heraeus 公司,型号 BB16UV;超净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司,型号 VS21300L;倒置相差光学显微镜,日本 Olympus 公司,型号 IX71;数码荧光显微镜,日本 Olympus 公司,型号 CX41;流式细胞仪,美国 Beckman Coulter 公司,型号 COULTER EPICS XL-100。

4 方法

4.1 小鼠 BMSC-D1 细胞株的培养 常规培养于含 10% 灭活胎牛血清,青、链霉素各 100 U/mL 的 D/F12 培养液中,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱内贴壁培养,每周更换 2 次培养液。细胞达 80% 融合时,用 0.25% 胰酶消化传代^[5]。

4.2 诱导小鼠 BMSC-D1 细胞株向神经样细胞分化及分组方法 培养细胞以 2.5×10^5 /mL 接种到 6 孔培养板中,弃培养液,加入 1 mL 预诱导液:终浓度分别为 6、12 g/L 的中药合剂(在预实验中选用 1.5、3、6、12、24 g/L 5 个浓度的当归红芪膜超滤物诱导液,经过比较分析:3~12 g/L 当归红芪膜超滤物均有诱导分化能力,浓度为 12 g/L 当归红芪膜超滤物诱导液在 BMSCs 的神经诱导分化过程中效果最好,因此中药合剂组最终选用 6、12 g/L),体积分数为 15% 胎牛血清的 D/F12 完全培养液,空白组不加入药物,每组另设 2 个副孔,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱内继续培养。24 h 后更换诱导液:终浓度分别

为 6、12 g/L 的中药合剂,无血清 D/F12 培养液,空白组不加入药物,于上述 CO₂ 孵箱内诱导 5 h。依据以上不同处理,可将培养细胞分为:空白组、6 g/L 中药合剂组(简称低剂量组)、12 g/L 中药合剂组(简称高剂量组)。同理,设立 3 g/L 中药合剂联合 0.5 mmol/L β -巯基乙醇用药组(简称联合组),1 mmol/L β -巯基乙醇阳性对照组(简称对照组)。

4.3 观察项目及检测方法

4.3.1 细胞形态学观察 取诱导 5 h 的细胞爬片,用 1% 甲苯胺蓝水溶液室温下染 3 min,自来水清洗,倒置显微镜下观察各组细胞形态的改变及神经元细胞质的特征性结构尼氏小体的形成并拍照。

4.3.2 神经细胞标志物 NSE 及 nestin 的免疫组织化学鉴定 取出预先放置于 6 孔培养板中爬满细胞的盖玻片,用 4% 多聚甲醛固定,行免疫细胞化学染色。一抗分别为 NSE 抗体和 nestin 抗体。每组均用 0.01 mol/L PBS 代替作为阴性对照。参照试剂说明书 0.01 mol/L PBS 冲洗后,0.5% triton-100 穿透,3% H₂O₂ 孵育以完全消除内源性过氧化物酶。滴加封闭血清室温孵育 15 min,去除封闭血清后滴加一抗置于 4 ℃ 过夜孵育,再与二抗孵育 0.5 h, DAB 显色、脱水、透明、封片,光镜下观察,以细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性,未着色为阴性。

4.3.3 神经细胞标志物 NFP、MAP2 及 GFAP 的免疫荧光技术检测 取出预先放置于 6 孔培养板中爬满细胞的盖玻片,用 4% 多聚甲醛固定,行免疫细胞化学染色。一抗分别为 NFP 抗体、MAP2 抗体及 GFAP 抗体。每组均用 0.01 mol/L PBS 代替作为阴性对照。参照试剂说明书 0.01 mol/L PBS 冲洗后,0.5% triton-100 穿透,3% H₂O₂ 孵育以完全消除内源性过氧化物酶,滴加封闭血清室温孵育 15 min,去除封闭血清后滴加一抗置于 4 ℃ 过夜孵育,再与 FITC 标记的山羊抗兔 IgG(二抗)避光孵育 45 min, PBS 洗涤后,荧光显微镜下观察并拍照,阳性细胞发出绿色荧光。进行免疫组化及免疫荧光检测的细胞爬片,在高倍镜视野下每张片连续选取 10 个不重叠视野计数神经样阳性细胞,每组共计 3 张,并计算诱导后神经样细胞平均分化率,公式为:(神经样阳性细胞数/视野内全部细胞数) × 100%。

4.3.4 细胞周期检测 收集各组诱导后细胞, PBS 洗涤, 75% 冷乙醇固定, PI 避光染色 30 min 上机, 每组取 5 个样本, 以流式细胞仪测定细胞周期分布。

4.4 统计学方法 采用 SPSS 10.5 统计学软

件进行统计分析,参数用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多个独立样本秩和检验,两两比较采用 *Nemenyi* 法。细胞周期分布采用单因素方差分析,两两比较采用 *LSD* 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠 BMSC-D1 细胞株形态学观察(图 1) 细胞呈扁平梭形,少数有短小突起。



图 1 未染色小鼠 BMSC-D1 细胞株 (×400)

2 经诱导后细胞形态学观察(图 2) 空白组细胞突触不明显,尼氏小体未见;低剂量组细胞突触明显,尼氏小体不清晰;高剂量组部分细胞胞体收缩形成双极状或三角形,可见少量尼氏小体;联合组细胞多极突触形成,胞体收缩明显,部分细胞突触端存在多个棒状突起,尼氏小体不清晰;对照组细胞突触形成网格状,

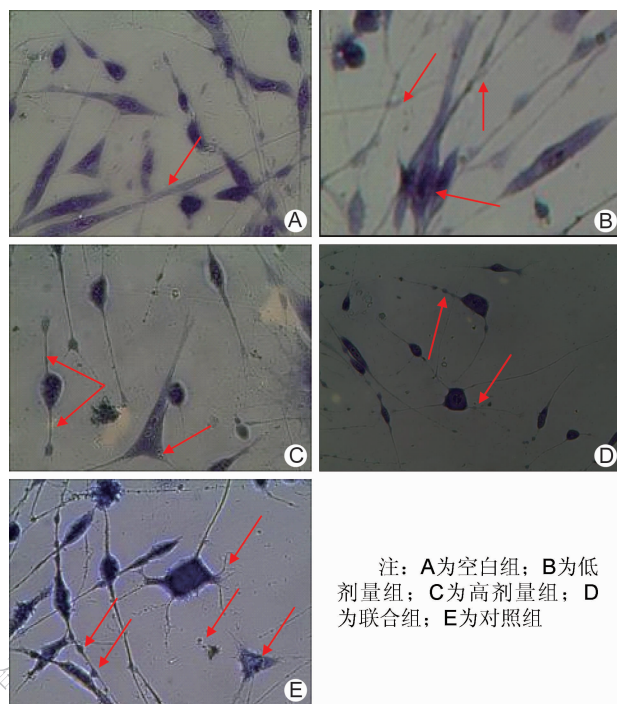


图 2 经诱导后各组细胞形态学观察 (甲苯胺蓝染色, ×400)

多极突触形成,部分胞体突触端存在多个棒状突起,可见尼氏小体,另外,细胞发生裂解,故有明显细小的碎片形成。

3 经诱导后各组 NSE、nestin、NFP、MAP2 及 GFAP 免疫组化及免疫荧光检测结果(图 3~7) 免疫组化及免疫荧光显示:空白组 5 个指标均无明显阳

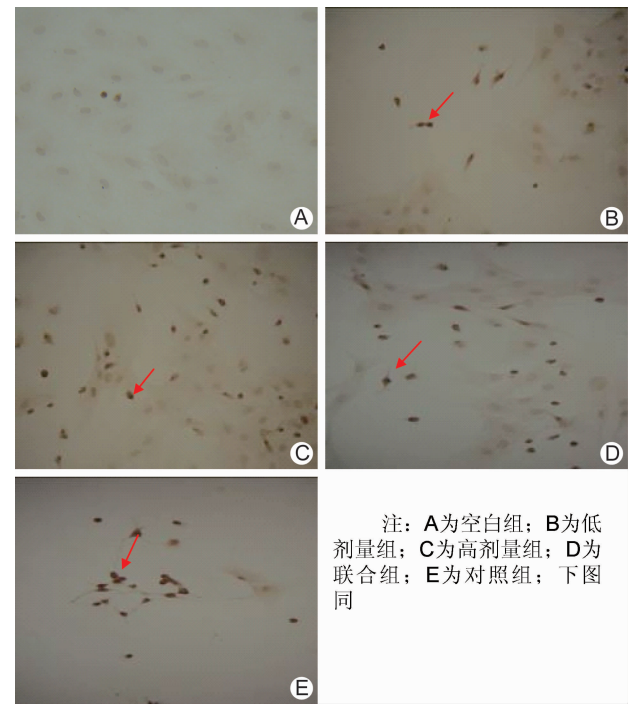


图 3 各组 NSE 免疫组化结果 (DAB 显色, ×100)

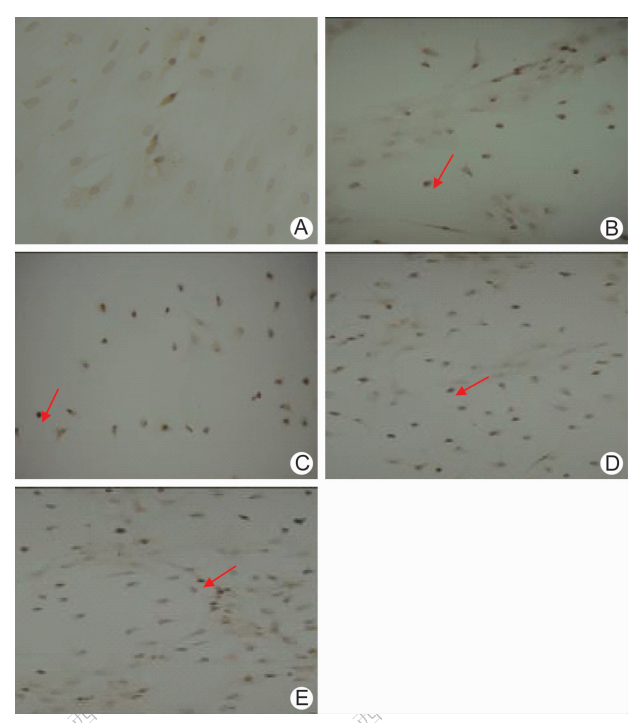


图 4 各组 nestin 免疫组化结果 (DAB 显色, ×100)

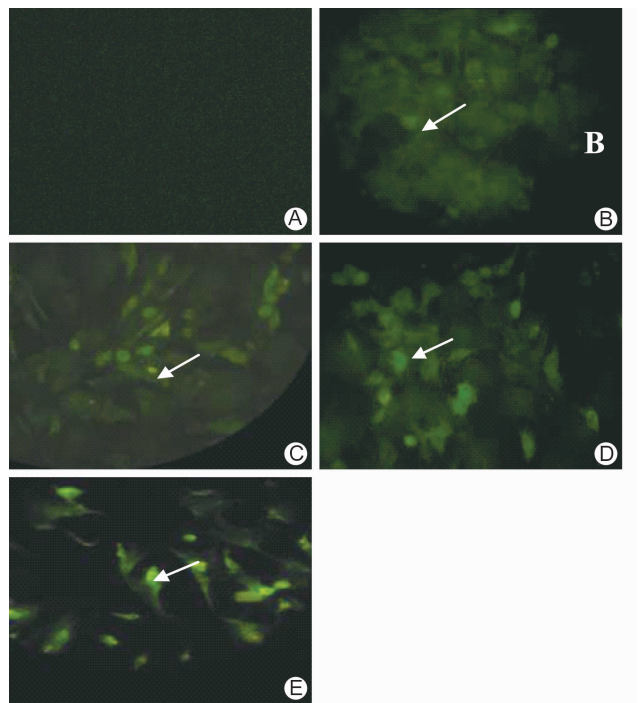


图 5 各组 NFP 免疫荧光结果 (FITC 标记, ×100)

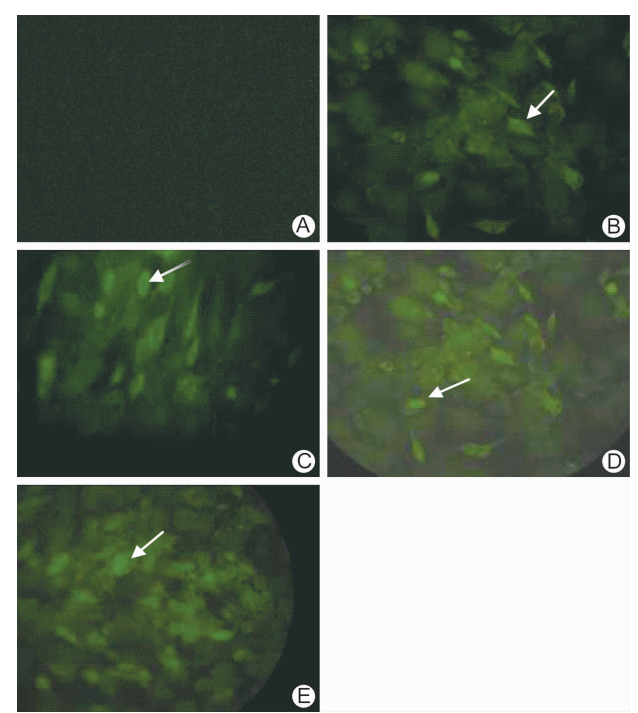


图 6 各组 MAP2 免疫荧光结果(FITC 标记, ×100)

性变化;免疫组化 NSE 及 nestin 显示:低剂量组、高剂量组、联合组及对照组诱导细胞胞体内均有明显的棕黄色颗粒出现(即阳性表达)。其中对照组较其他各组阳性变化更为明显,联合组与对照组阳性细胞数量较其他两组明显增加。免疫荧光 NFP、MAP2 及 GFAP 显示经诱导后各组均有阳性绿色荧光表达。其中 NFP 的表达在上述各组呈依次增强趋势;MAP2

联合组与对照组阳性细胞数量较其他两组明显增加; GFAP 各组表达均较弱,对照组强于其他各组。

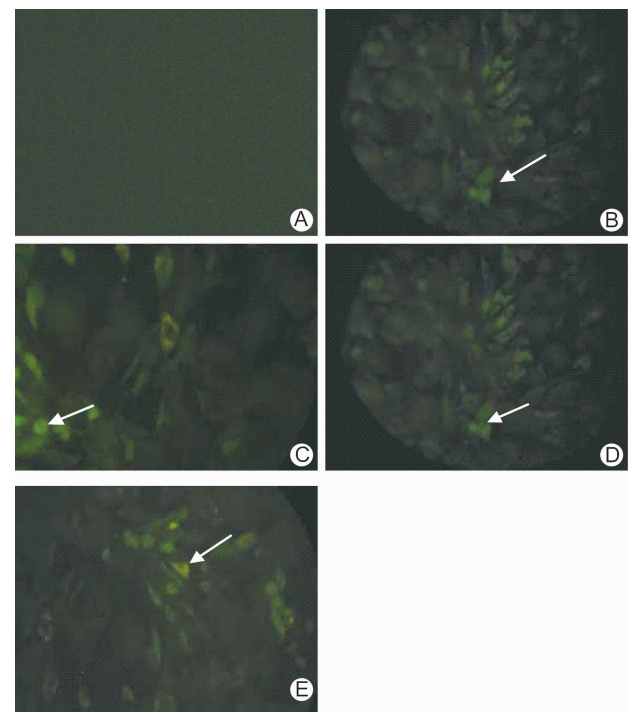


图 7 各组 GFAP 免疫荧光结果 (FITC 标记, ×100)

4 经诱导后各组细胞平均分化率的比较(表 1) 与空白组比较,各用药组的 NSE、nestin、NFP、MAP2 及 GFAP 神经特异性蛋白的表达均有统计学意义($P < 0.05$),表明当归红芪超滤膜提取物和 β -巯基乙醇均能诱导 BMSCs 分化为神经样细胞,以 β -巯基乙醇诱导效果更为明显,联合组次之;与低剂量组比较,高剂量组仅 NFP 有统计学意义($P < 0.05$),即高剂量当归红芪超滤膜提取物比低剂量诱导 BMSCs 分化为神经纤维的能力略强,而联合组、对照组的 5 种神经特异性蛋白的表达与低剂量组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与高剂量组比较,除 NFP 外,联合组 NSE、nestin、MAP2 及 GFAP 神经特异性蛋白的表达均有统计学意义($P < 0.05$),表明联合组诱导 BMSCs

分化为神经元或神经内分泌细胞、神经上皮干细胞、表达特异性神经细胞微管、分化为星形胶质细胞的潜能强于高剂量组,对照组 5 种神经特异性蛋白的表达均有统计学意义($P < 0.05$);与联合组比较,对照组除 GFAP 外,其余 4 种神经特异性蛋白的表达均有统计学意义($P < 0.05$),表明对照组诱导 BMSCs 分化为神经元或神经内分泌细胞、神经上皮干细胞、神经纤维以及表达特异性神经细胞微管的潜能比联合组要强,但分化成星形胶质细胞的能力差异无统计学意义($P > 0.05$)。

5 经诱导后各组细胞周期分布比较(表 2) 与空白组比较,各用药组在 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期的分布均有统计学意义($P < 0.05$), G_0/G_1 期延长,表明细胞因药物影响,大部分时间细胞活动停滞,S 期变短,说明细胞的 DNA 复制能力变弱,细胞分裂能力降低, G_2/M 期延长,说明药物一定程度上使得细胞分裂发生相对阻滞,影响了 DNA 复制后的细胞有丝分裂过程;与低剂量组比较,高剂量组细胞周期分布无统计学意义($P > 0.05$),说明 6、12 g/L 当归红芪超滤膜提取物对细胞周期影响无明显差异;与低、高剂量组比较,联合组、对照组在 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期的分布均有统计学意义($P < 0.05$);与联合组比较,对照组在 S 期、 G_2/M 期分布有统计学意义($P < 0.05$),说明对照组细胞因药物影响,细胞的 DNA 复制能力很弱,细胞分裂能力低,大部分时间细胞分裂阻滞,或是休眠或是凋亡(图 2-E 中有细胞碎片的形成)。

表 2 5 组细胞周期分布比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
空白	5	33.83 $\pm$ 1.03	58.86 $\pm$ 1.15	7.26 $\pm$ 0.36
低剂量	5	44.07 $\pm$ 1.25 *	48.14 $\pm$ 1.53 *	7.79 $\pm$ 0.26 *
高剂量	5	46.08 $\pm$ 1.20 *	46.02 $\pm$ 1.30 *	7.90 $\pm$ 0.22 *
联合	5	55.82 $\pm$ 2.35 * Δ Δ	36.86 $\pm$ 1.17 * Δ Δ	8.52 $\pm$ 0.26 * Δ Δ
对照	5	55.72 $\pm$ 1.18 * Δ Δ $\circ$	27.30 $\pm$ 1.04 * Δ Δ $\circ$	16.98 $\pm$ 0.49 * Δ Δ $\circ$

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与联合组比较, $\circ P < 0.05$

表 1 5 组相关神经特异性蛋白的组间表达比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	NSE	nestin	NFP	MAP2	GFAP
空白	30	1.13 $\pm$ 1.32	2.66 $\pm$ 1.58	—	—	—
低剂量	30	14.00 $\pm$ 7.59 *	13.30 $\pm$ 7.19 *	6.34 $\pm$ 2.09 *	4.72 $\pm$ 1.67 *	1.69 $\pm$ 0.06 *
高剂量	30	11.17 $\pm$ 6.23 *	10.33 $\pm$ 5.77 *	16.12 $\pm$ 5.64 * Δ	5.53 $\pm$ 2.42 *	1.62 $\pm$ 0.34 *
联合	30	24.92 $\pm$ 5.81 * Δ Δ	24.08 $\pm$ 5.53 * Δ Δ	27.12 $\pm$ 6.62 * Δ	13.82 $\pm$ 3.48 * Δ Δ	5.36 $\pm$ 0.83 * Δ Δ
对照	30	54.90 $\pm$ 11.73 * Δ Δ $\circ$	52.18 $\pm$ 10.83 * Δ Δ $\circ$	60.09 $\pm$ 7.72 * Δ Δ $\circ$	26.69 $\pm$ 3.91 * Δ Δ $\circ$	6.67 $\pm$ 1.57 * Δ Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与联合组比较, $\circ P < 0.05$

讨 论

本实验选用中草药当归、红芪,取自当归补血汤,是金元时代李东垣《内外伤辨惑论》中所创造的益气补血的经典名方,由当归、黄芪按 1:5 组成,临床应用广泛,红芪作为黄芪的代用品,广泛用于临床。

BMSCs 可定向神经样细胞分化的研究对神经损伤的修复价值是显而易见的。而本研究相关的体外实验关键在于就下述问题进行探讨和说明:(1)如何判定药物诱导后所分化的细胞的性质及诱导细胞分化率;(2)分化细胞的活力及增殖能力。

实验选取小鼠 BMSC-D1 细胞株最终来源是美国 ATCC 公司,这种细胞株在纯度及增殖能力等各个方面上较原代培养细胞更好。神经样细胞的鉴定目前主要是通过检测其特异性蛋白的表达来完成,本次试验着重选取 NSE^[6], nestin^[7], NFP^[8], MAP2^[9] 及 GFAP^[10] 这 5 种神经样特异性相关蛋白,是从多种分化层面探索诱导后细胞的分化结果,如:分化为神经元或神经内分泌细胞、神经上皮干细胞、神经纤维以及表达特异性神经细胞微管、星形胶质细胞的潜能等的强弱。中药合剂可诱导小鼠 BMSCs 不同程度的表达上述 5 种神经特异性相关蛋白,即诱导后细胞可分化为神经样细胞。从诱导效率来看,中药合剂组明显弱于对照组,呈现一种低表达状态;从诱导性质来看,中药合剂组 NSE、nestin 及 NFP 的表达量要相对高于 MAP2 及 GFAP,这说明诱导后细胞已具备少量分化为神经元或神经内分泌细胞、神经上皮干细胞及神经纤维的能力,但特异性神经细胞微管、星形胶质细胞的表达效率很低。综上考虑,单纯使用中药合剂的诱导效果有限。

从诱导后分化细胞的存活率以及增殖状况来看,中药合剂组诱导后细胞的增殖能力强于 β -巯基乙醇,这就可以证明中药合剂具有良好的细胞维生性和促细胞增殖能力。

故此,中药合剂与化学诱导剂的优缺点存在互补性。从联合组实验数据来看:诱导细胞分化效果两倍于甚至更高于中药合剂组,细胞增殖能力介于中药合剂组和 β -巯基乙醇组之间。那么是否能够利用此中和诱导结果并服务于后续研究呢?这将受到细胞分化率、分化程度以及分化性质等方面规范性与否的影响,当前的国内外研究尚不足以产生此类标准定义,这也是阻碍在体研究和临床研究的难点之一。另外,本次试验联合用药的剂量摸索、时量效应等未充分进行也对实验的完成度有明显的影响。从长远看,体外培养

分化细胞转入体内抑或在体细胞分化研究都需要可靠、稳定的诱导药物,现有的国内外研究尚不能达到这种要求,大量的研究工作尚待开展与深入。

参 考 文 献

- [1] Brohlin M, Mahay D, Novikov LN, et al. Characterization of human mesenchymal stem cells falling differentiation into Schwann cell-like cells [J]. Neurosci Res, 2009, 64(1): 41-49.
- [2] Mahy D, Terenghi G, Shawcross SG. Schwann cell mediated trophic effects by differentiated mesenchymal stem cells [J]. Exp Cell Res, 2008, 314(14): 2692-2701.
- [3] Keilhoff G, Goehl A, Langnase K, et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells [J]. Eur J Cell Biol, 2006, 85(1): 11-24.
- [4] 关欣,李应东,刘凯,等.当归黄芪超滤膜提取物预处理对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤保护作用的研究 [J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(4): 70-72.
- [5] 裴晶晶,吴润,赵红斌,等. Ca^{2+} 信号介导红景天苷促进小鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞的定向分化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 14(10): 1808-1812.
- [6] Marangos PJ, Schmechel D, Parma AM, et al. Measurement of neuron-specific enolase (NSE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous tissue [J]. Neurochemistry, 2006, 33(1): 319-329.
- [7] Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(3): 998-1003.
- [8] Nixon RA. The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology [J]. Brain Pathol, 2008, 3(1): 29-38.
- [9] Bernhardt R, Matus A. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons [J]. Comp Neurol, 2007, 226(2): 203-221.
- [10] Garcia AD, Doan NB, Imura T, et al. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain [J]. Nature Neurosci, 2004, 7(11): 1233-1241.

(收稿:2012-09-24 修回:2013-02-28)