DOI:10.16016/j.1000-5404.201501052

论著

移植用小鼠胶质前体细胞的培养及其移植后形态和功能初探

杨志奇[1],张 宽[1],马秦龙[2],邓 平[2],陈纯海[2],周 舟[2],谌小维[1] (400038 重庆,第三军医大学:基础医学部脑研究中心[1],军事预防医学院劳动卫生学教研室[2])

[摘要] **目的** 完善体外分离培养移植用胶质前体细胞的方法,并运用双光子显微镜在活体动物水平,对小鼠大脑皮层移植的胶质细胞进行单细胞水平的在体功能研究。**方法** 体外分离培养小鼠胚胎神经干细胞,并将其诱导为胶质前体细胞及星形胶质细胞。分别用Nestin、A_2B_5以及GFAP对体外培养的神经干细胞、胶质前体细胞以及星形胶质细胞进行形态学鉴定。体外给予ATP及毒胡萝卜素(Thapsigargin),对体外分化的星形胶质细胞进行功能学鉴定。将以上诱导得到的胶质前体细胞移植入成年小鼠大脑皮层,并在移植12周后对其进行形态学观察。另外,应用双光子活体钙成像技术,观察移植胶质细胞对ATP刺激的反应。**结果** ①体外诱导神经干细胞成为胶质前体细胞(A_2B_5阳性)的比率达到(87.4±3.4)%,继续将其诱导为成熟星形胶质细胞(GFAP阳性)的比率达到(83.4±3.3)%。②体外诱导而来的星形胶质细胞可对ATP及毒胡萝卜素产生钙反应。③移植进入成年小鼠皮层的胶质前体细胞,在移植12周后仍可存活,并可分化为成熟的星形胶质细胞。④双光子活体钙成像实验证实,ATP可诱导活体小鼠皮层内移植细胞产生钙信号。**结论** 神经干细胞来源的胶质前体细胞在移植进入成年小鼠皮层内可分化为成熟星形胶质细胞,并至少存活12周。另外,胶质前体细胞在移植4周后,便可在活体动物大脑皮层内具备功能活动。

[关键词] 神经干细胞;胶质前体细胞;星形胶质细胞;钙信号;移植
[中图法分类号] R322.81;R329-33;R329.2 [文献标志码] A

Culture of mouse glial progenitors for transplantation and their morphology and function

Yang Zhiqi[1], Zhang Kuan[1], Ma Qinlong[2], Deng Ping[2], Chen Chunhai[2], Zhou Zhou[2], Chen Xiaowei[1] ([1]Brain Research Center, College of Basic Medical Sciences, [2]Department of Occupational Health, College of Preventive Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To improve a method for isolating and culturing glial progenitors for transplantation, and study *in vivo* function of the engrafted glial progenitors in cortex in single cell level by two-photon imaging. **Methods** Neural stem cells (NSCs) were isolated from the embryonic cortex, and cultured *in vitro*. Then, the cells were induced into glial progenitors and astrocytes. In order to detect the cellular morphology, Nestin, A_2B_5 and GFAP as markers of NSCs, glial progenitors and astrocytes, respectively, were detected. In order to detect the cellular function, calcium responses of the astrocytes to ATP and thapsigargin were recorded by confocal imaging. The glial progenitors were engrafted into the cerebral cortex of adult mice, and the morphology of the engrafted cells was observed by immunostaining after 12 weeks. *In vivo* two-photon imaging was adopted to observe calcium signals of the engrafted cells stimulated with ATP after 4 weeks. **Results** The percentage of glial progenitors (A_2B_5-positive cells) derived from the NSCs accounted for (87.4±3.4)%, while that of astrocytes (GFAP-positive cells) derived from the glial progenitors aclounted for (83.4±3.3)%. The astrocytes derived from the NSCs could respond to ATP and thapsigargin. The

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(31400933)
[通信作者] 谌小维,E-mail: xiaowei_chen@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1427.026.html(2015-03-27)

engrafted glial progenitors could survive and differentiate into the astrocytes after 12 weeks. *In vivo* two-photon imaging showed that ATP could induce the engrafted cells in the cortex to generate calcium signals after 4 weeks. **Conclusion** The engrafted glial progenitors derived from the NSCs can survive for at least 12 weeks and differentiate into the astrocytes in the cortex. In addition, the engrafted glial progenitors function in the cortex after 4 weeks.

[**Key words**] neural stem cells; glial progenitors; astrocytes; calcium signals; engraftment

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (31400933). Corresponding author: Chen Xiaowei, Tel: 86-23-68752267, E-mail: xiaowei_chen@tmmu.edu.cn

星形胶质细胞在脑内具有重要的生理功能,除了能够促进血管再生,修复损伤血脑屏障[1],还具有释放免疫抑制分子,参与抗炎反应[2]等功能。另有研究表明,脑卒中[3]、脊髓侧索硬化症[4]以及衰老[5]均可以引起星形胶质细胞的功能缺陷。Bradbury 等[6]报道在胆碱能缺失的大鼠脑内移植星形胶质细胞,可以使其记忆、认知功能得以恢复。在新生小鼠脑内移植人类胶质前体细胞,也可增强小鼠的学习记忆能力[7]。但由于技术手段的限制,到目前为止,有关胶质细胞移植的研究仅限于细胞形态学以及动物行为学观察,至今尚少见移植细胞在动物整体水平的功能研究。所以移植后的胶质细胞在动物整体水平是否具有功能尚不清楚。

双光子显微镜具备在活体动物水平观察深层组织结构,并对单个细胞进行功能成像的特点。因此本实验利用双光子显微镜,对移植后神经胶质细胞的功能进行了在体细胞水平观察,为今后胶质细胞移植的研究提供了实验依据及资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂与仪器

动物:E13-14 FVB/N 小鼠,由第三军医大学实验动物中心提供。

试剂:DMEM/F12(HyClone 公司),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,Sigma 公司)、B27(50 ×,Gibbo 公司),表皮生长因子(EGF, Sigma 公司),睫状神经营养因子(CNTF, Sigma 公司),Accutase 酶(eBioscience 公司),左旋多聚赖氨酸(PLL,Sigma 公司),一抗:Nestin(鼠源,Beyotime),A_2B_5(兔源、Abcam 公司),GFAP(羊源 Abcam 公司),二抗:Alexa Fluor 594® 驴抗鼠、驴抗兔、驴抗羊(Invitrogen 公司),DAPI(C1002,Beyotime),钙荧光染料(Flou8, Invitrogen 公司),(Rhod2-AM, Invitrogen 公司)ATP(Sigma 公司),毒红萝卜素(Thapsigargin,Sigma 公司)。Ringer's 溶液125 mmol/L NaCl, 4.5 mmol/L KCl, 26 mmol/L $NaHCO_3$, 1.25 mmol/L NaH_2PO_4, 2 mmol/L $CaCl_2$,1 mmol/L $MgCl_2$,20 mmol/L 葡萄糖 (pH 7.4)。

仪器:CO_2恒温细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司),超净工作台(苏州净化设备公司),台式低温高速离心机(美国 Beckman 公司),数字单臂脑立体定位仪(68025,瑞沃德公司),神经生物注射针(美国 Hamiltan 公司),微量注射泵(英国 Wpiinc 公司),激光共聚焦显微镜及图像采集分析系统(德国 Leica-SP5),双光子显微镜(中国 Abort 公司)冰冻切片机(德国 Leica-FV2000),水浴箱,无菌手术包。

1.2 胚胎神经干细胞分离、培养

取 E13 ~ 14 d FVB/N 小鼠 1 只,20% 乌拉坦麻醉,75% 酒精腹部消毒。依次剪开腹部皮肤、腹膜,充分暴露子宫。剪断子宫系膜及血管,分离子宫,置于含酒精的培养皿中,转移至超净台。剪开子宫壁,逐个分离胎鼠,放入含少量基础培养基中。暴露双侧大脑半球,剪取端脑组织,置于含基础培养基的培养皿中洗净。用手术刀片切碎组织,加入基础培养基,吸管吹打分散,200 目细胞筛过滤。以 5×10^5/mL 密度将分离细胞接种于完全培养基中,每 3 天换液,每 6 天传代培养。

1.3 胶质前体细胞的诱导

生长于完全培养基(DMEM/F12、B27、20 ng/mL bFGF、20 ng/mL EGF、双抗)中的胚胎神经干细胞培养 6 d 后,增殖成神经球。用 Accutase 酶于 37 ℃消化 5 min,使神经球解离成为单细胞悬液。以 1×10^5/mL 的密度接种于 0.5% 多聚赖氨酸包被的共聚焦培养皿及直径 15 mm 的细胞爬片。待细胞贴壁后换分化培养基(DMEM/F12、B27、10 ng/mL CNTF、30% FBS、双抗)诱导分化。

1.4 星形胶质细胞的诱导

接种于共聚焦培养皿神经干细胞诱导分化培养 3 d 后,成为神经胶质前体细胞,贴壁生长于培养皿底部。用灭菌吸管缓慢吸出培养皿中的诱导分化液,培养于自然分化培养基(DMEM/F12、1% FBS、双抗)中,放入细胞孵育箱内培养 14 d,每 3 天更换 1 次培养基。

1.5 神经干细胞免疫荧光鉴定

取原代神经球接种到多聚赖氨酸包被的 24 孔细胞培养板中,37 ℃培养 24 h 后,4% 多聚甲醛室温固定

25 min,PBS 洗 10 min×3 次,5% 正常驴血清室温封闭 1 h,0.3% Triton X-100 室温通透 30 min,加入鼠源的抗 Nestin 单克隆抗体(1∶300),4 ℃孵育过夜。次日用 PBS 洗 5 min×3 次后,加入 Alexa Fluor 594® 驴抗鼠荧光二抗(1∶500)湿盒内避光孵育 1 h。PBS 洗 5 min×3 次后,加入 DAPI 避光染细胞核,PBS 洗 5 min×3 次后,抗荧光淬灭剂封片后于荧光显微镜下观察。

1.6 不同培养时间点神经干细胞分化潜能的鉴定

将神经球消化为单细胞悬液,以 1×10^5/mL 密度接种到多聚赖氨酸包被的载玻片上,于诱导分化第 3 天和第 14 天时,取出盖玻片分别进行 A_2B_5 和 GFAP 的免疫荧光染色。随机选取 10 个视野,分别计数 A_2B_5、GFAP 阳性细胞数,计算胶质细胞前体和星形胶质细胞的阳性率。

1.7 激光共聚焦显微镜检测分化的星形胶质细胞钙信号

将神经球分离为单细胞悬液,以 1×10^5/mL 密度将细胞接种至多聚赖氨酸包被的共聚焦培养皿上,诱导分化 14 d 后,用基础培养基洗涤 2 次,加入 Fluo 8(10 μmol/L)钙荧光染料,在细胞孵育箱内孵育 20 min,基础培养基洗涤 3 次,将培养皿放置激光共聚焦显微镜下记录荧光信号,10 s 后加入 ATP(50 μmol/L),检测细胞荧光变化;用相同的方法加入 Thapsigargin(20 μmol/L)后观察星形胶质细胞钙荧光变化。

1.8 听皮层移植星形胶质祖细胞

分离 E14 d GFP-FVB/N 小鼠神经干细胞,用分化培养基诱导培养 3 d,制成 1×10^5/mL 单细胞悬液。用 1% 戊巴比妥钠麻醉成年 FVB/N 小鼠并固定于小鼠立体定位仪上,定位初级听觉皮层(Au,前囟后:-2.5 mm,中线旁:4.5 mm)并开颅。以 10 nL/s 速度,用神经生物针在皮层 Au 注射单细胞悬液 500 nL,注射深度为皮层下 0.3 mm。凡士林封闭骨窗,缝合手术切口。

1.9 免疫组化检测移植细胞

实验小鼠在移植后 12 周后过度麻醉,4% PFA 灌注固定,脑组织浸泡 30% 蔗糖脱水,冰冻切片。PBS 洗涤 5 min,1% Triton X-100 室温通透 50 min,加入羊源的抗 GFAP 单克隆抗体(1∶300),4 ℃孵育过夜。次日用 PBS 洗 5 min×3 次后,加入 Alexa Fluor 594® 驴抗羊荧光二抗(1∶500)避光孵育 1 h。PBS 洗 5 min×3 次后,加入 DAPI 避光染细胞核,PBS 洗 5 min 3 次后,抗荧光淬灭剂封片镜下观察。

1.10 在体双光子成像检测移植细胞的钙活动

移植胶质前体细胞 4 周后的小鼠,被放置加热板上(37.5~38 ℃),含有 1% ~1.5% 的异氟烷的纯氧麻醉。用颅骨钻磨薄听皮层移植细胞区域的颅骨,打磨区域的大小(2 mm×2.5 mm),将定制小皿粘于打磨区域上,小心地掀除多余的颅骨。手术后小鼠被转移至双光子记录装置下,将异氟烷浓度降低至 0.8% ~1.2%。首先用 920 nm 波长的激发光观察 EGFP 移植细胞,并将 Rhod 2-AM(500 μmol/L)钙荧光染料滴在开颅的脑组织表面,等待 5 min,使 Rhod 2 钙荧光染料能够扩散入移植细胞胞内。Ringer's 溶液灌流洗涤 40 min。选用 800 nm 波长的激发光观察胶质细胞,与之前 920 nm 波长所观察的图像进行对照,确保移植胶质细胞吸收了 Rhod 2-AM 钙荧光染料。用另一只操作臂的玻璃微电极吸取 ATP(500 μmol/L),将电极插至已被 Rhod 2-AM 荧光染料标记的移植胶质细胞周围,轻轻吹入 ATP,用 800 nm 波长的激发光观察移植胶质细胞的钙荧光变化。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,所有钙信号分析采用 Igor 软件,实验数据行采用独立样本 t 检验。

2 结果

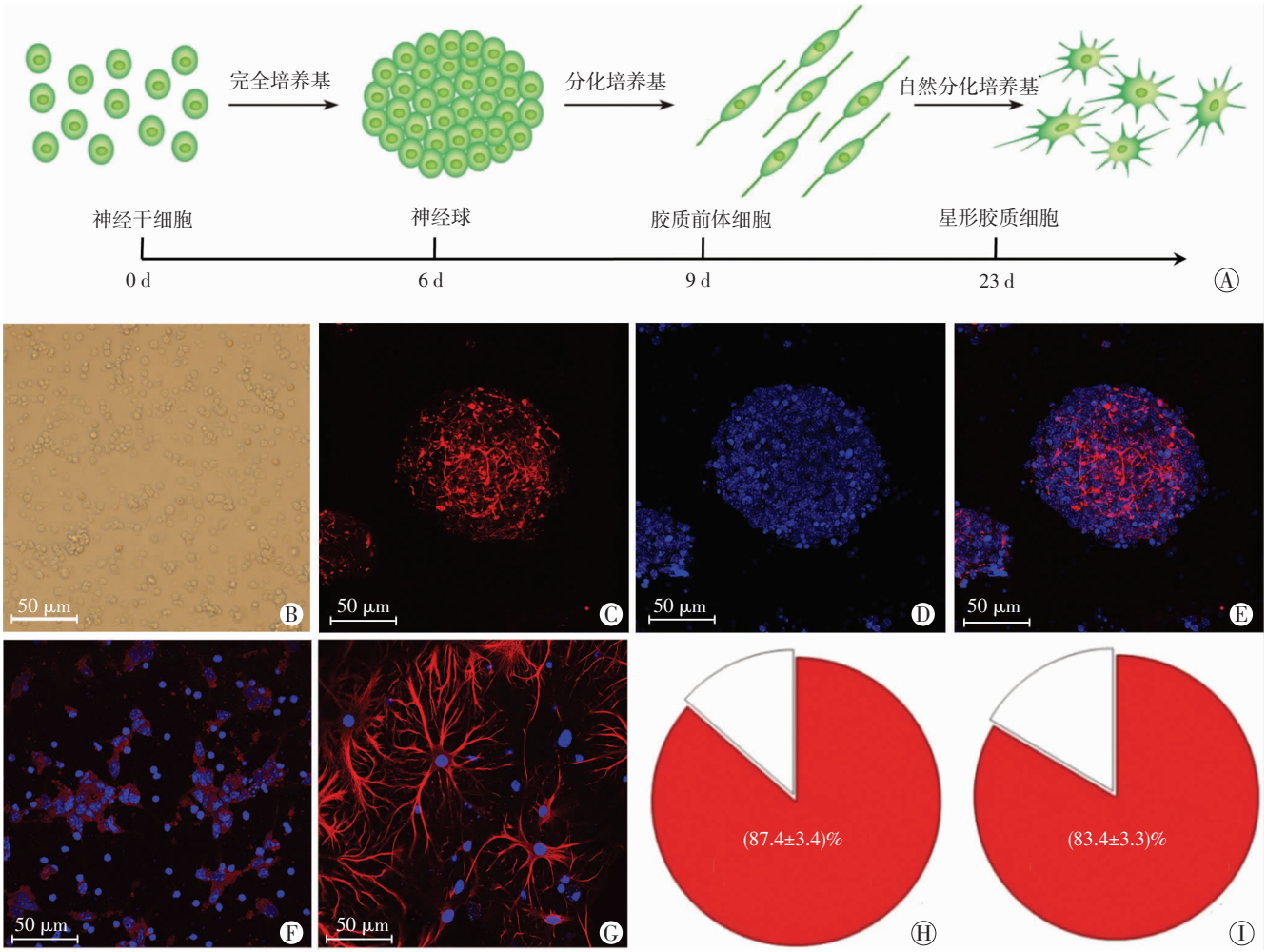
2.1 胚胎神经干细胞向胶质前体细胞的体外诱导及其分化能力检测

体外分离、培养、诱导神经干细胞的方法如下示意图所示(图 1A)。体外分离的小鼠胚胎神经干细胞(图 1B)在完全培养基中培养 6 d 后,增殖成神经球,并表达神经干细胞的标记分子 Nestin(图 1C~E)。以上神经干细胞在分化培养基继续培养 3 d 后,绝大多数神经干细胞可表达胶质前体细胞的标志分子 A_2B_5(图 1 F、H)。

另外,结果显示,以上分化得到的胶质前体细胞,在自然分化培养基中,绝大多数可在体外分化为成熟的星形胶质细胞,并表达星形胶质细胞的标记分子 GFAP(图 1G、I)。

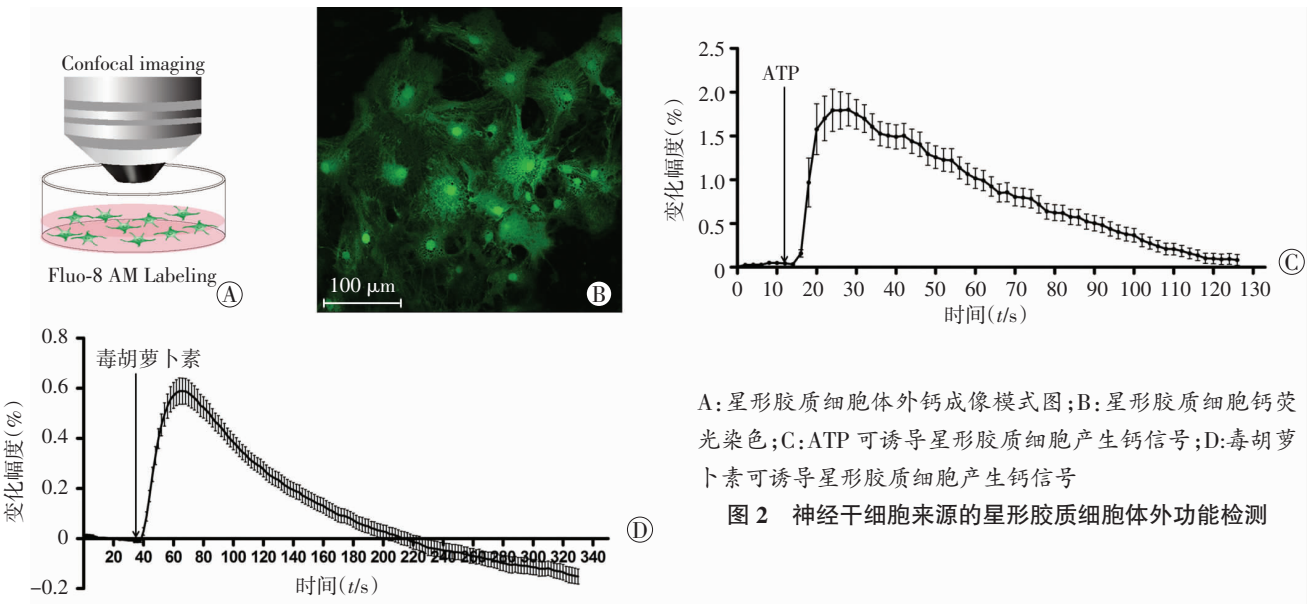
2.2 胶质前体细胞来源的星形胶质细胞体外功能检测

图 2A 为星形胶质细胞体外钙成像模式图。首先星形胶质细胞被 Fluo-8 钙荧光染料所标记(图 2B)。体外钙成像结果显示,ATP 及毒胡萝卜素均可诱导以上胶质前体细胞分化而来的星形胶质细胞产生钙信号。其中,50 μmol/L ATP 所诱导的体外星形胶质细胞钙信号变化幅度可达(179±24)%(n=15, 图 2C),20 μmol/L 毒胡萝卜素所诱导的星形胶质细胞钙信号变化幅度可达(58.9±5.2)%(n=15,图 2D)。表明由胶质前体细胞来源的星形胶质细胞可表达正常功能的 ATP 受体,并具有正常的细胞内钙应答系统。



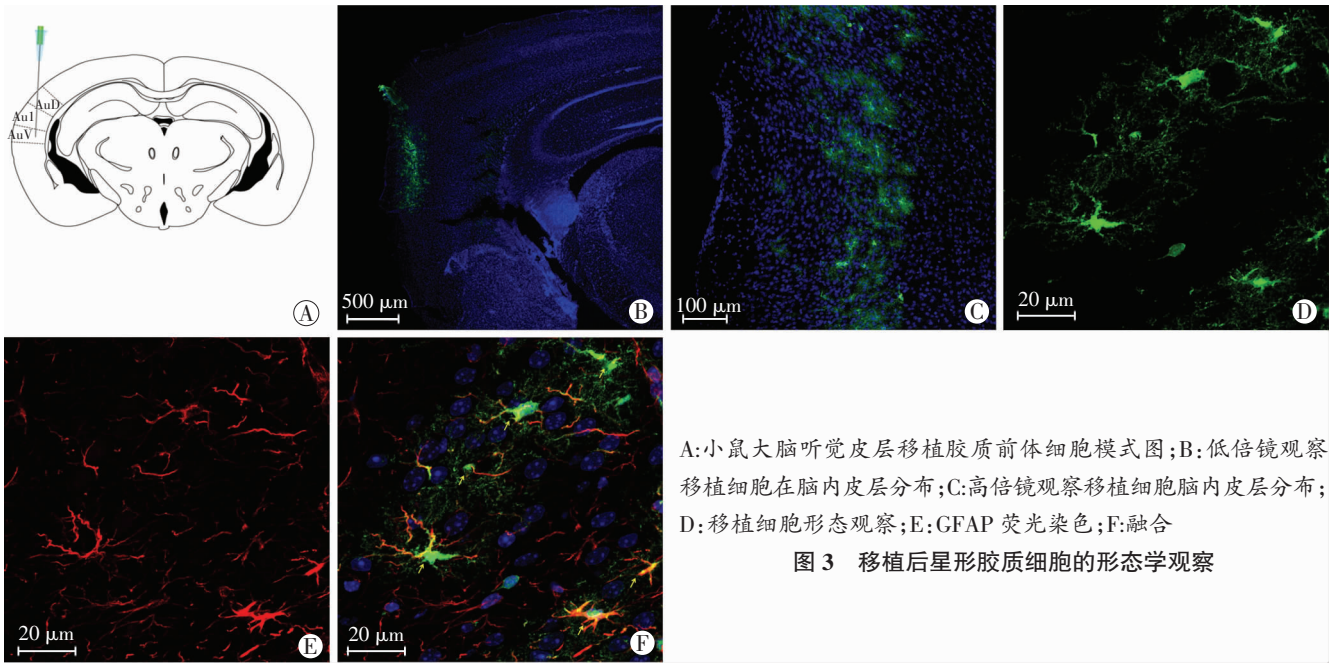
A:神经干细胞的体外分离、诱导及培养流程;B:神经干细胞悬液;C:Nestin 荧光标记神经干细胞;D:神经球细胞核染色;E:融合;F:A_2B_5 荧光标记胶质前体细胞;G:GFAP 标记星形胶质细胞;H:胶质前体细胞分化率;I:星形胶质细胞分化率

图 1　神经干细胞的体外分离、培养及体外诱导



A:星形胶质细胞体外钙成像模式图;B:星形胶质细胞钙荧光染色;C:ATP 可诱导星形胶质细胞产生钙信号;D:毒胡萝卜素可诱导星形胶质细胞产生钙信号

图 2　神经干细胞来源的星形胶质细胞体外功能检测



A:小鼠大脑听觉皮层移植胶质前体细胞模式图;B:低倍镜观察移植细胞在脑内皮层分布;C:高倍镜观察移植细胞脑内皮层分布;D:移植细胞形态观察;E:GFAP 荧光染色;F:融合

图 3　移植后星形胶质细胞的形态学观察

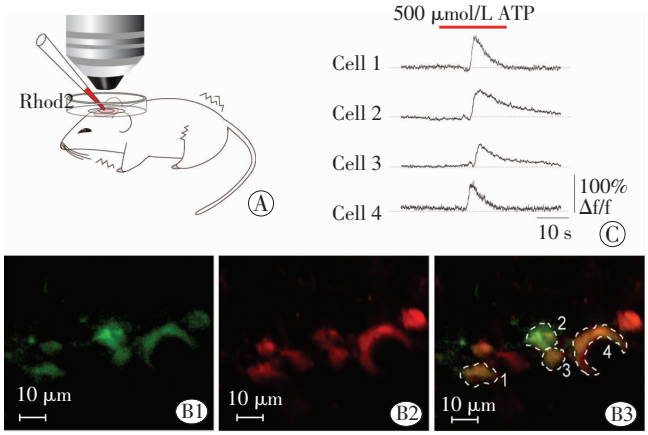
2.3　移植后胶质前体细胞在成年小鼠皮层内的分化及形态鉴定

将体外诱导得到的胶质前体细胞移植进入成年小鼠的初级听觉皮层(Au1)及次级听觉皮层(AuV 和 AuD)内(图 3A)。结果显示,在移植后 12 周,移植进入成年小鼠皮层的 EGFP 阳性胶质前体细胞仍可存活(图 3B、C),并且可表达成熟星形胶质细胞的标志分子 GFAP(图 3E ~ F),且具有典型的星形胶质细胞的形态特征,即辐射状细胞突起结构(图 3D ~ F)。

2.4　移植后胶质细胞在成年小鼠皮层内的在体双光子钙成像观察

在活体动物水平,通过双光子显微镜对活体小鼠皮层内移植后胶质细胞的钙活动进行了观察(图 4A)。结果显示,在 920 nm 波长的激发光下,小鼠皮层内移植的 EGFP 胶质前体细胞呈现绿色荧光,在825 nm 波长的激发光下,小鼠皮层内胶质细胞可以被 Rhod-2(胶质细胞的特异荧光染料)所标记。结果说明移植胶质细胞(EGFP 阳性细胞)同样可以被 Rhod-2 标记(图 4B)。

在移植胶质细胞周围给予 500 μmol/L 的 ATP 刺激,发现移植胶质细胞 1、2、3、4 均发生了钙活动,与对照组相比具有明显统计学差异($n = 15$, $P < 0.01$)。结果表明,在胶质前体细胞移植 4 周后,皮层内移植胶质细胞便可对 ATP 刺激产生相应的反应。从而提示胶质前体细胞在移植 4 周后,便可表达具有正常功能的 ATP 受体。



A:双光子活体动物钙成像模式图;B1:皮层内移植胶质细胞(EGFP 阳性)双光子钙成像结果;B2:Rhod-2 所标记的皮层内胶质细胞双光子钙成像结果;B3:融合;C:移植胶质细胞可对 ATP 产生钙反应

图 4　小鼠皮层内移植胶质细胞的在体双光子钙成像观察

3　讨论

本研究完善了体外分离、培养移植用胶质前体细胞的方法,并运用双光子在体钙成像技术,在活体动物水平对小鼠大脑皮层移植胶质细胞的生理功能进行了检测。研究发现,在胶质前体细胞移植 4 周后,小鼠皮层内移植胶质细胞便可对 ATP 刺激产生相应的钙反应。结果说明胶质前体细胞在移植 4 周后,便可以表达具有正常功能的 ATP 受体,从而在活体动物水平证实移植胶质细胞在脑内具备功能活动。

星形胶质细胞是中枢神经系统数量最多的细胞[8],在神经网络构建和功能信息处理过程中发挥重

要作用[9]，尤其是其具有分泌、吸收神经递质[10]，维持血脑屏障的功能[11]。疾病研究证实，阿尔茨海默症患者脑内伴随星形胶质细胞谷氨酸转运体水平降低[12]，并且星形胶质细胞可以对缺血造成的脑损伤起到营养、修复等保护作用[13-14]。另外，胶质细胞移植实验表明，胶质细胞移植后可以提高脑卒中小鼠的学习记忆能力[3]，并且可以改善脊髓侧索硬化症小鼠的运动功能[4]，所以胶质细胞移植作为一种潜在的临床治疗手段逐渐受到人们的关注。

但由于目前技术手段的限制，有关胶质细胞移植方面的研究，仅停留在细胞形态学及动物行为学的研究层面。Han 等[7]应用双光子显微镜对移植胶质细胞进行了研究，但其研究仅局限在离体脑片上；Greenberg 等[15]通过双光子在体成像技术，对脊髓内移植胶质细胞进行了观察，但其研究只限于在体形态学水平。对于在活体动物水平，移植胶质细胞是否具备正常的生理功能目前尚不清楚。本研究应用双光子活体钙成像技术，即将双光子显微镜技术与在体细胞钙染色技术相结合，从而在活体动物水平，对单个移植胶质细胞的生理功能进行了检测。通过实验，我们在活体动物大脑皮层内记录到了由 ATP 所诱导的单个移植胶质细胞的钙活动，从而在活体动物水平证实移植胶质细胞可具备部分正常生理功能。

另外本实验基于 Barberi 等[16]方法，利用 CNTF 诱导神经干细胞向胶质前体细胞分化。但与之不同的是，本实验简化了分化诱导步骤，使得诱导时间缩短了 15 d。另外，免疫组化结果显示，胶质前体细胞的分化率达到 87% 左右，星形胶质细胞的分化率达到 83% 左右。本结果与 Krencik 等[17]报道类似。

综上所述，本研究完善了移植用胶质前体细胞的分离诱导方法，并通过形态学、体外钙成像技术对移植胶质前体细胞的体内、外分化潜能进行了鉴定。更重要的是，本研究还应用双光子活体钙成像技术对移植胶质细胞进行了单细胞水平的活体功能学检测，从而在活体动物水平证明移植胶质细胞在脑内具备功能活动。故本研究为今后移植细胞在体功能研究提供了新方法，为胶质细胞移植实验提供了新的实验依据。

参考文献：

[1] Abulrob A, Brunette E, Slinn J, *et al*. Dynamic analysis of the blood-brain barrier disruption in experimental stroke using time domain *in vivo* fluorescence imaging[J]. Mol Imaging, 2008, 7(6): 248-262.

[2] Barreto G, White R E, Ouyang Y, *et al*. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke [J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2011, 11(2): 164-173.

[3] Jiang P, Chen C, Wang R, *et al*. hESC-derived $Olig^{2+}$ progenitors generate a subtype of astroglia with protective effects against ischaemic brain injury [J]. Nat Commun, 2013, 4: 2196.

[4] Lepore A C, Rauck B, Dejea C, *et al*. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease[J]. Nat Neurosci, 2008, 11(11): 1294-1301.

[5] Shao W, Zhang S Z, Tang M, *et al*. Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via αB-crystallin[J]. Nature, 2013, 494(7435): 90-94.

[6] Bradbury E J, Kershaw T R, Marchbanks R M, *et al*. Astrocyte transplants alleviate lesion induced memory deficits independently of cholinergic recovery[J]. Neuroscience, 1995, 65(4): 955-972.

[7] Han X, Chen M, Wang F, *et al*. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(3): 342-353.

[8] 郑向红，许颖. 神经胶质细胞作用的研究进展[J]. 海峡药学，2013，25(3)：210-213.

[9] Liu Y, Li C. Firing rate propagation through neuronal-astrocytic network [J]. IEEE Trans Neural Netw Learn Syst, 2013, 24(5): 789-799.

[10] Santello M, Volterra A. Synaptic modulation by astrocytes via Ca^{2+}-dependent glutamate release[J]. Neuroscience, 2009, 158(1): 253-259.

[11] Orellana J A, Martinez A D, Retamal M A. Gap junction channels and hemichannels in the CNS: regulation by signaling molecules[J]. Neuropharmacology, 2013, 75: 567-582.

[12] Tian G, Kong Q, Lai L, *et al*. Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 2010, 113(4): 978-989.

[13] Tadimalla A, Belmont P J, Thuerauf D J, *et al*. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia-inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart[J]. Circ Res, 2008, 103(11): 1249-1258.

[14] Chu L F, Wang W T, Ghanta V K, *et al*. Ischemic brain cell-derived conditioned medium protects astrocytes against ischemia through GDNF/ERK/NF-κB signaling pathway [J]. Brain Res, 2008, 1239: 24-35.

[15] Greenberg M L, Weinger J G, Matheu M P, *et al*. Two-photon imaging of remyelination of spinal cord axons by engrafted neural precursor cells in a viral model of multiple sclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(22): E2349-E2355.

[16] Barberi T, Klivenyi P, Calingasan N Y, *et al*. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(10): 1200-1207.

[17] Krencik R, Weick J P, Liu Y, *et al*. Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(6): 528-534.

（收稿：2015-01-07；修回：2015-03-04）

（编辑　王小宴）