

· 专论与综述 ·

干细胞植入缺血大脑后功能研究进展 *

王 林¹ 马 杰^{1△}

(上海交通大学附属新华医院 上海 200092)

摘要: 目前, 干细胞移植在多个中枢神经系统疾病的研究和临床应用中取得突破性进展。其中, 干细胞移植治疗脑缺血疾病是细胞移植治疗研究中最活跃的领域。但是, 移植细胞是否具有神经元的功能及细胞移植治疗的机制目前存在很多争议。本文就干细胞移植治疗缺血性脑疾病后移植细胞的功能和治疗缺血性脑疾病机制的可能途径的研究情况作一综述。

关键词: 干细胞 缺血性脑疾病 细胞功能 旁分泌效应

中图分类号: Q813 R743 R322.8 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)11-2184-03

Progress in Stem Cell Implantation for Ischemic Brain Diseases*

WANG Lin¹, MA Jie^{1△}

(Affiliated Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

ABSTRACT: The ischemic brain disease is one of the most common and severe diseases of the central nervous system. Nowadays, stem cell therapy, as a novel approach to treat these diseases, attracts great interest in both basic and clinic research. However, the mechanisms of the implanted stem cells functioning in the host remain to be determined. There are debates on questions like whether the stem cells display expected activities after transplantation, or whether paracrine pathway plays the major role. This review summarizes the progress in the recent research on the functions of the implanted stem cells after surgery and the possible mechanisms underlying this novel therapy.

Key words: Stem cell; Ischemic brain disease; Cell function; Paracrine pathway

Chinese Library Classification(CLC): Q813, R743, R322.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2184-03

用健康的细胞取代患病或衰老的细胞的概念,特别是使用多能干细胞,改变了成熟细胞无法再生的保守观点。由此,干细胞移植已成为神经科学前沿研究的热点问题之一,并且在多个中枢神经系统疾病的研究和临床应用中取得突破性进展。其中,干细胞移植治疗脑缺血疾病是目前细胞移植治疗研究中最活跃的领域。但是,移植细胞是否具有神经元的功能及细胞移植治疗的机制目前存在很多争议^[1]。本文就干细胞移植治疗缺血性脑疾病后移植细胞的功能和治疗缺血性脑疾病机制的可能途径的研究情况作一综述。

1 干细胞的定义和类型

严格的说,干细胞最主要的特质是多能潜性和自我更新的能力。多能性是能够分化成多种细胞类型的功能。因此,干细胞的功能应能在体内适当的组织重组。自我更新指细胞通过分裂自己相同的副本,至少有一个分裂子细胞必须具有相同的分化潜能,作为母代的自我更新。

胚胎干细胞(ESCs)具有最广泛的潜能性。这些细胞,是从囊胚内细胞团分离出来,并能生发为所有的细胞类型。1998年 Thomson^[1]等首先建立了胚胎干细胞的细胞系。另外,成年哺乳动物还包含大量的成体干细胞,具有“组织特异性”,倾向于分化成所在组织的各种细胞,但成体干细胞具有分化转化的能力,即指在一定条件下生发成另一种组织的特异性细胞的能力。

1999年 Jackson等用肌肉来源的干细胞在小鼠体内分化成各种血细胞^[2]。另有研究已证明分化转化难以复制,从而导致这一现象的普遍不确定性^[3]。此外,在某些情况下,体内分化转化的研究报告某些类型的细胞可与来自无关的成熟器官的细胞融合^[4]。因此,胚胎干细胞目前仍是多能性干细胞的黄金标准。也有文献报道从小鼠的睾丸组织分离出胚胎干细胞样的细胞^[5],也许这表明机体成熟器官也可能获得多能干细胞。

最近的研究表明,通过核重编程使终末分化的体细胞成为诱导多能干细胞(iPS)。Takahashi^[6]发现4个基因(基因 Oct3/4, SOX2 和 c-Myc 和 Klf4),足以将小鼠成纤维细胞诱导成胚胎干细胞样细胞。Wernig等报告 Parkinson 病模型小鼠体内 iPS 细胞分化成多巴胺神经元并修正神经缺陷^[7]。这些研究表明 iPS 细胞与胚胎源性胚胎干细胞的行为相同,但 iPS 细胞在缺血性脑疾病中的作用还有待研究。

2 干细胞移植

干细胞的作用最经常讨论的涉及替换因疾病损失或伤害的细胞,即“细胞替代疗法”。干细胞体外分化成目的细胞移植或前分化的细胞前体细胞移植都是可行的方法,或者直接移植干细胞让它在体内自发分化为所需细胞。

2.1 移植细胞的识别

干细胞移植治疗缺血性脑疾病的一个挑战是能否在干细

* 基金项目: 国家重点基础发展规划项目(973 项目)(2010CB945203) 国家自然科学基金(30770731),

上海优秀学科带头人计划(09XD1403300)

作者简介: 王林(1979-) 男,博士研究生,主要研究方向: 干细胞移植治疗新生儿缺氧缺血性脑病的临床与基础研究。

△通讯作者: 马杰 电话: 021-65790000 E-mail: majie365@hotmail.com。

(收稿日期: 2010-12-10 接受日期: 2010-12-31)

胞移植入中枢神经系统后准确鉴别出存活或者分化成各种分化型的移植细胞。适用于移植前的许多细胞质或可透过膜的标记是容易和方便,但他们一旦在大脑中可能出现泄漏,导致误认宿主细胞作为移植细胞。因此,Cao等认为需要包括稳定的转基因标签、物种特异性标志物和非扩散的核标记,例如BrdU作为标记^[8]。但是,移植后移植细胞死亡释放胸苷类似物并在宿主细胞分裂期间与之合并^[9]。因此,内源性神经干细胞和它们的后代往往含有移植细胞来源的BrdU,难以与移植细胞区分。胸苷类似物所以不能被认为是适当的移植细胞的标记。转基因的磁共振成像可探测的标记的发展可能允许严格的纵向量化和移植细胞定位^[10]。但是现在看来,即使转基因标记不能作为转化分化明确的证据。两种细胞的融合可导致成熟细胞携带外源性无关基因。例如,据报道,神经干细胞可能是多能性的,将神经干细胞注入发育中的小鼠囊胚后产生的小鼠整个身体的不同组织表达神经干细胞源性的转基因标记^[11]。然而,Ying认为神经干细胞与宿主细胞可能大量产生融合,因此上述结论不得不放弃^[4]。所以,同时证明拥有转基因标记和缺乏宿主的遗传物质可以明确地证实是移植细胞或是转化分化的细胞。

2.2 移植细胞基因的稳定性

体外培养传代的ESCs会积累大量的核型异常。这种情况可能会在成人干细胞加剧,其中,虽然他们可能有些端粒酶表达,但表达不能足够以防止端粒缩短^[12]。因此,大量的核型不稳定可能导致干细胞在体外培养的广泛期间在某些情况下产生恶变^[13]。为了便于在体外自我更新的同时最大限度地减少发生的核型变化,众多的研究者赞成使用已传代最小数量和使用特定的传代技术的细胞^[14]。或者通过过表达例如Ras的原癌基因使细胞达到永生,还可以直接过表达端粒酶^[15]。永生细胞株往往选择有利的生长和分化特性,可能与没有经过永生化的神经干细胞实有实质上不同。例如,永生化神经干细胞系能产生多巴胺的神经元,而原始神经干细胞一般不能。因此永生细胞株得出的结果推广到母代干细胞群。有人建议永生细胞系能确保良好的特点,稳定的细胞;然而,有人则认为,永生化呈现一个令人无法接受的风险增加以后恶性变可能。为了解决这一问题,一些研究者培养了在特定的条件下能够永生的细胞系^[16]。最后,任何有基因改造的细胞可能带有破坏参与周期调控的基因的风险。因此,在临床应用基因改造的细胞之前仔细修饰应转基因整合位点和细胞行为。

2.3 干细胞移植的模型鼠

Zheng等^[17]从出生后1-6天的结合绿色荧光蛋白(GFP)的转基因新生小鼠的室管膜下区提取多能的纯合区星形细胞干细胞。这些细胞是胶质纤维酸性蛋白阳性 β -III-微管蛋白,NeuN和成熟神经元标记阴性^[18]。24小时或5天之后,多能的星形胶质干细胞移植到产后7天缺血缺氧的SD大鼠脑^[17]。GFP阳性细胞成功地转化为神经元 β -III-微管蛋白和NeuN阳性,而且位于梗死区并远离注射区。但是这种观察是不定量的,而且,作者没有说明任何组织学或行为上的改进。

Park^[19]等将来自外部新生小鼠小脑的生发层的克隆多能神经前体细胞与聚合物支架(聚羟基乙酸,PGA)进行体外培养4天,制成神经干/祖细胞-PGA的复合物。在7天后把神经干/祖细胞-PGA的复合物移植入产后7天缺血缺氧的SD大鼠脑。移植的神经干细胞不仅分化成神经细胞,少突胶质细胞,星形胶质细胞,而且移植细胞来源的神经元和宿主细胞来源的神经元形成神经网络。这种神经网络从胼胝体延长至对侧半球。虽然Park等报告神经功能,如旋转减弱单方面评估,似乎得到

改善,但他们并没有定量分析行为的改善。

Ma^[20]等采用7d龄C57小鼠进行缺血缺氧,术后第2~3天,将用标记lacZ基因小鼠ESCs来源的神经前体细胞植入小鼠损伤侧脑室,发现ESc来源神经前体细胞移植入缺血缺氧脑内后,长期存活,主要迁移、分布于受损的海马,且分化为NF阳性的神经元,同时病理学检测亦发现细胞移植后受损海马内的神经细胞数量明显增加。这些植入损伤脑内构成海马结构并分化为神经元的细胞。可能对改善缺血缺氧小鼠的学习和记忆功能起到重要作用。

3 干细胞移植后细胞功能

3.1 神经干细胞

神经干细胞可以从胚胎和成年哺乳动物中枢神经系统的许多区域分离出来。在EGF和/或bFGF存在的条件下培养,神经干细胞能繁殖成细胞增殖集群称为神经球。近期研究表明神经球,实际上是一个异质细胞的集合包括真正的干细胞,祖细胞,分化的后代。这是相对于胚胎干细胞,在适当的信号分子的存在能够保持相当同质的细胞群。神经干细胞可以生成多种类的神经元也和胚胎干细胞不同。NSCs基因表达的概况往往指向神经干细胞在EGF和/或bFGF存在的条件下扩展成神经球所采用的脑概况。与此相一致,许多情况下试图让神经干细胞分化成中枢神经系统其他区域的细胞无法成功,例如多巴胺能神经元,小脑浦肯野细胞和运动神经元等。然而成功的证实了神经干细胞可以分化为脑中风受影响最常见的部分的细胞表型,例如皮质投射神经元^[21],中间神经原^[22],海马锥体神经元^[23]。体内实验已证实神经干细胞来源的神经元能逆行标记突触结合,产生神经元动作电位^[21]。最近的研究表明NSCs具有更多样化的命运,包括运动神经元可从单层培养的神经干细胞取得,最常见的基板上层粘连蛋白。这可能反映了使用这种技术维持一个不太成熟的细胞类型的能力。另一研究表明从胚胎干细胞或幼年或成年大脑来源的神经干细胞可能通过这种技术保持为放射状胶质细胞^[24]。

神经干细胞能分化为神经元,星形胶质细胞,少突细胞,甚至可能内皮细胞层表明神经干细胞能够取代大部分缺血而受到影响的细胞类型。但是,临床前研究的实际结果有相当不同,神经干细胞,包括人类,可以在移植后生存并有一种逐渐过渡到梗死区域的倾向^[25],产生功能性神经元^[21],可能与宿主细胞连接^[19]。虽然一些研究已经发现后移植到正常非神经源性区域后神经干细胞分化成神经胶质细胞为主^[26],层粘连蛋白培养的细胞移植后发现具有暴发性神经分化。大多数研究没有观察到神经干细胞移植后梗死面积有很大的变化^[11,25]。

3.2 胚胎干细胞

胚胎干细胞,其中包括最近介绍iPS细胞,包括目前可得到的最多能的干细胞,能够被分化成各种体细胞类型,包括功能性神经元^[27]和神经胶质^[28]。小鼠胚胎干细胞^[29]或人胚胎干细胞^[30]来源的体内细胞移植通过电生理证实了突触融合。因此胚胎干细胞可以为移植提供几乎无限供应所需细胞。然而,体内移植后胚胎干细胞也形成畸胎瘤。虽然众多的技术提高分化成神经细胞的百分比,很少有方法产生一个完全同质的细胞群体,完全没有存在形成畸胎瘤潜在性的未分化细胞。因此,例如抗生素选择,荧光激活细胞分选等方法经常使用使分化之后的神经细胞纯化。也许现在最有效的分化方法本质上消除了多能干细胞在EGF和bFGF环境下单层增殖时低密度自发分化。由此产生的细胞与相同培养条件下神经干细胞相比,是否更有效

仍有待确定。

为了避免畸胎瘤的形成,许多胚胎来源细胞移植的研究采用定向分化前体神经细胞或神经元的细胞。虽然某些疾病模型,允许胚胎干细胞生成的细胞类型是神经干细胞很难获得的,如多巴胺能神经元^[30,31]和运动神经元^[32],中风后移植胚胎干细胞来源的细胞结果与应用脑源性的神经干细胞相似,尽管也许产生了较高比例的神经元。移植进入缺血脑后,胚胎来源的神经元符合电生理功能和突触连接的标准^[33]。然而,新生的胚胎来源的神经元和中风后行为学的改善的明确的相关性还有待证明。

3.3 骨髓和脐血源性细胞

许多移植入缺血脑后有良好效果的多种类型的细胞可从骨髓获得。脐带血含有丰富的一小部分可以在正常骨髓中发现的祖细胞,并且,如骨髓,被证明含有多能细胞^[34]。骨髓来源细胞和脐带细胞,特别是包括 CD34 的部分,已被证明急剧减少梗死面积并改善功能^[35]。骨髓基质干细胞(MSCs)或许是在中风动物模型最常用的骨髓细胞。有几项研究表明,骨髓基质细胞,如骨髓单个核细胞和脐血细胞,在体外和体内都可生成神经元^[36,37]。颅内或血管注射后都能观察到实质性的功能性益处。虽然骨髓基质细胞在体外循环损伤相关的信号迁移,骨髓基质细胞似乎在移植到大脑生存度很低^[38]。因此,在这个机制下的能得到的功能利益很渺茫。

虽然原本称为骨髓基质细胞,多能成体祖细胞(MAPCs)已成为较正常 MSCs 有更大的潜能的骨髓来源细胞^[39]。具体来说,MAPCs 已报告产生所有三个胚层的功能性细胞类型,包括在体外展现出成熟的电生理特性的神经元^[40]。与骨髓基质细胞一样,MAPCs 已被证实可以改善中风模型鼠的行为学。还有一些其他的骨髓来源的似于 MAPCs 多能干细胞群类,这些都没有证实在神经分化后有成熟电生理功能,也没有在缺血性脑损伤模型中测试。

4 细胞移植的旁分泌效应

另一种以利再生的方法可能是受伤的区域富集周围的环境。神经营养因子发挥维持和提高中央和外周神经系统的神经元的特定数量的重要的作用。有报道称几种神经营养因子帮助拯救神经元和神经损伤的修复。包括神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质细胞源性神经生长因子(GDNF)、胰岛素样生长因子、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子(TGF)- β 3、神经营养因子 3 (NT-3)、NT-4/5、和 NT-6。虽然这些神经营养因子也被称为是新生大鼠缺氧缺血后上调^[41],这似乎是内源性上调不足以支持干细胞神经分化的。迄今为止,bFGF-2 似乎是促进新生脑损伤神经再生最有希望因素。Monfils 等^[42]在新生大鼠运动皮质的大脑病变后连续使用 7 天 50ng/kg 的 bFGF 并观察到治疗组有显著神经恢复和突触形成。这是伴随着前肢运动的改善。近来, Park 等^[43]移植转导逆转录病毒编码 NT-3 的神经干细胞的亚克隆到新生小鼠单侧缺氧缺血的脑损伤区域。他们观察神经干细胞来源的神经元与来自非转导干细胞的神经元数量相比提高了 80%。供体来源的干细胞分化的神经细胞成功地证明为胆碱能、GABA 能,或谷氨酸亚型神经元。这些结果表明,在成功的干细胞治疗中调整损伤周围的环境重要性。

5 问题与展望

综上所述,干细胞移植治疗缺血缺氧模型鼠的效果应该是确切的。目前的焦点在于移植后神经功能和行为学的改善起主导因素的是细胞替代作用还是旁分泌作用,或者脑缺血损伤后

内源性神经干细胞的迁移、分化和定居是更重要的因素?移植细胞在体内的电生理特性,如何整合入神经网络应该是研究的重点,而且不能仅限于横向比较,更应该纵向比较,记录移植后相当长的一段时间内的功能变化,这样才能揭示细胞移植的机制,为临床应用干细胞治疗缺血性脑疾病打下良好的基础。

参考文献(References)

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147
- [2] Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(25):14482-14486
- [3] Giles J. The trouble with replication [J]. Nature, 2006, 442:344-347
- [4] Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. 2002. Changing potency by spontaneous fusion [J]. Nature, 2002, 416:545-548
- [5] Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis [J]. Nature, 2006, 440:1199-1203
- [6] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. Cell, 2007, 131:861-872
- [7] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105:5856-5861
- [8] Cao QL, Onifer SM, Whittemore SR. Labeling stem cells in vitro for identification of their differentiated phenotypes after grafting into the CNS [J]. Methods Mol Biol, 2002, 198:307-318
- [9] Burns TC, Ortiz-Gonzalez XR, Gutierrez-Perez M, et al. Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution [J]. Stem Cells, 2006, 24:1121-1127
- [10] Deans AE, Wadghiri YZ, Bernas LM, et al. Cellular MRI contrast via coexpression of transferrin receptor and ferritin [J]. Magn Reson Med, 2006, 56:51-59
- [11] Clarke DL, Johansson CD, Wilbertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells [J]. Science, 2000, 288:1660-1663
- [12] Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells [J]. Br J Cancer, 2007, 96:1020-1024
- [13] Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation [J]. Stem Cells, 2006, 24:1095-1103
- [14] Thomson A, Wojtacha D, Hewitt Z, et al. Human embryonic stem cells passaged using enzymatic methods retain a normal karyotype and express CD30 [J]. Cloning Stem Cells, 2008, 10:89-106
- [15] Roy NS, Nakano T, Keyoung HM, et al. Telomerase immortalization of neuronally restricted progenitor cells derived from the human fetal spinal cord [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22:297-305
- [16] Pollock K, Stroemer P, Patel S, et al. A conditional immortal clonal stem line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke [J]. Exp Neurol, 2006, 199:143-155
- [17] Zheng T, Rossignol C, Leibovici A, et al. Transplantation of multipotent astrocytic stem cells into a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Brain Res, 2006, 1112:99-105
- [18] Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, et al. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97:13883-13888
- [19] Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20:1111-1117 (下转第 2162 页)

- propensity[J]. *Evolution and Human Behavior*, 2009, 30:77-84
- [18] Briers B, Pandelaere M, Dewitte S, et al. Hungry for money: The desire for caloric resources increases the desire for financial resources and vice versa[J]. *Psychological Science*, 2006, 17(11):939-943
- [19] Dovidio JF. Helping behavior and altruism: an empirical and conceptual overview. *Advances in experimental social psychology* [J]. *Advances in Experimental Social Psychology*, 1984, 17: 361-427
- [20] DeWall CN, Baumeister RF, Gailliot MT, et al. Depletion makes the heart grow less helpful: Helping as a function of self-regulatory energy and genetic relatedness [J]. *Personality and Social Psychology Bulletin*, 2008, 34:1653-1662
- [21] DeWall CN, Deckman T, Gailliot MT, et al. Sweetened blood cools hot tempers: physiological self-control and aggression [J]. *Aggressive Behavior*, 2011, 37:73-80
- [22] Baumeister RF, Heatherton T F, Tice DM. *Losing control: How and why people fail at self-regulation* [M]. 1994, San Diego, CA: Academic Press
- [23] Watson D, Clark LA, Tellegen A. Development and validation of brief measures of Positive and Negative Affect: The PANAS scales [J]. *Journal of Personality and Social Psychology*, 1988, 54: 1063-1070
- [24] Bruner JS, Goodman CC. Value and Need as Organizing Factors in Perception [J]. *Journal of Abnormal and Social Psychology*, 1947, 42: 33-44
- [25] 张卫东, 刁静 & Constance J. Schick. 正、负性情绪的跨文化心理测量: PANAS 维度结构检验 [J]. *心理科学*, 2004, 27(1): 77 - 79
- Zhang WD, Diao J. The Cross-cultural Measurement of Positive and Negative Affect Examining the Dimensionality of PANAS [J]. *Psychological Science*, 2004, 27(1): 77-79
- [26] 李琦, 刘爱萍, 罗劲. 金钱镇痛理论述评 [J]. *心理科学进展*, 2010, 18(08): 1283-1289
- Li Q, Liu AP, Luo J. A Review of Theory About Money Analgesia [J]. *Advances in Psychological Science*, 2010, 18(08): 1283-1289
- (上接第 2186 页)
- [20] Ma J, Wang Y, Yang JH. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells [J]. *Neurochem Int*. 2007 Jul 51(1):57-65
- [21] Englund U, Bjorklund A, Wictorin K, et al. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 99:17089-17094
- [22] Scheffler B, Walton NM, Lin DD, et al. Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 102:9355-9358
- [23] Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Multipotentiality, homing properties, and pyramidal neurogenesis of CNS-derived LeX(ssea-1)+/CXCR4+ stem cells [J]. *FASEB J* 2005 19:1860-1862
- [24] Conti L, Pollard SM, Gorb T, et al. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell [J]. *PLoS Biol* 2005 3: 283
- [25] Kelly S, Bliss TM, Shah AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 101:11839-11844
- [26] Eriksson C, Bjorklund A, Wictorin K. Neuronal differentiation following transplantation of expanded mouse neurosphere cultures derived from different embryonic forebrain regions [J]. *Exp Neurol* 2003 184:615-635
- [27] Benninger F, Beck H, Wernig M, et al. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in hippocampal slice cultures [J]. *J Neurosci* 2003 23:7075-7083
- [28] Scheffler B, Schmandt T, Schroder W, et al. Functional network integration of embryonic stem cell-derived astrocytes in hippocampal slice cultures [J]. *Development* 2003 130:5533-5541
- [29] Wernig M, Benninger F, Schmandt T, et al. Functional integration of embryonic stem cell derived neurons in vivo [J]. *J Neurosci* 2004 24:5258-5268
- [30] Roy NS, Cleren C, Singh SK, et al. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes [J]. *Nat Med* 2006 12: 1259 - 1268
- [31] Morizane A, Takahashi J, Shinoyama M, et al. Generation of graftable dopaminergic neuron progenitors from mouse ES cells by a combination of coculture and neurosphere methods [J]. *J Neurosci Res* 2006 83:1015-1027
- [32] Plachta N, Bibel M, Tucker KL, Barde YA. Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells [J]. *Development* 2004 131:5449-5456
- [33] Buhnenmann C, Scholz A, Bernreuther C, et al. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats [J]. *Brain* 2006 129:3238-3248
- [34] 程文广, 罗高兴, 黄正跟, 等. 人脐带血间充质干细胞体外分离培养及生物学特性研究 [J]. *现代生物医学进展* 2008 8(3):424- 426
- CHENG Wen-guang, LUO Gao-xing, HUANG Zheng-gen, et al. Study on Isolation and Culture of Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Blood in Vitro and Their Biological Characteristics [J]. *PROGRESS IN MODERN BIOMEDICINE*, 2008, 8(3) :424-426
- [35] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model [J]. *J Clin Invest* 2004 114:330-338
- [36] Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 282:148-152
- [37] Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Su CY, Li H. Intracerebral peripherally blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats [J]. *J Neurosci* 2006 26:3444-3453
- [38] Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia [J]. *Stem Cells* 2006 24:2483-2492
- [39] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002 418: 41-49
- [40] Zeng L, Rahrmann E, Hu Q, et al. Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow [J]. *Stem Cells* 2006 24:2355-2366
- [41] Ikeda T, Koo H, Xia YX, Ikenoue T, Choi BH. Upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the neonatal rat brain following ischemic/hypoxic injury [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2002, 20: 555-562
- [42] Monfils MH, Driscoll I, Kamitakahara H, et al. FGF-2-induced cell proliferation stimulates anatomical, neurophysiological and functional recovery from neonatal motor cortex injury [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 24:739-749
- [43] Park KI, Himes BT, Stieg PE, et al. Neural stem cells may be uniquely suited for combined gene therapy and cell replacement: evidence from engraftment of neurotrophin-3-expressing stem cells in hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Exp Neurol*, 2006, 199:179-190