

# 3 种培养体系下人胚胎干细胞神经诱导分化的比较

袁 丁<sup>1,2</sup>, 林 戈<sup>1,2</sup>, 卢光琇<sup>1,2</sup>

(1 人类干细胞国家工程研究中心, 湖南 长沙 410078; 2 中南大学 生殖与干细胞工程研究所, 湖南 长沙 410078)

【摘 要】 【目的】比较人胚胎干细胞在人胚胎成纤维细胞、鼠胚胎成纤维细胞饲养层和无饲养层 3 个诱导体系下形成神经上皮祖细胞的能力。【方法】将人胚胎干细胞在人、鼠胚胎成纤维细胞饲养层或无饲养层体系中诱导 10 d 后, 检测其胚胎干细胞和神经上皮祖细胞相关基因(*Oct4*、*Nestin*、*Pax6*、*Sox1*、*Sox2*、*Sox3*、 $\beta$ -*actin*) 的表达, 用免疫荧光染色法检测神经上皮祖细胞抗原标记 *Pax6*、*Musashi*、*Nestin* 和胚胎干细胞抗原标记 SSEA4 的表达。【结果】3 种诱导体系下均有神经上皮祖细胞形成, 均表达神经上皮祖细胞抗原标记 *Pax6*、*Musashi*、*Nestin* 及 *Pax6*、*Nestin*、*Sox* 家族基因。无饲养层体系诱导后的细胞, *Oct4* 基因的表达高于有饲养层体系; 其 SSEA4 染色阳性细胞比例为  $(26.3 \pm 3.5)\%$ , 高于有饲养层体系; 其 *Pax6* 和 *Musashi* 染色阳性细胞比例分别为  $(81.0 \pm 3.0)\%$ ,  $(79.0 \pm 4.4)\%$ , 均低于有饲养层细胞体系。【结论】人胚胎干细胞在有饲养层和无饲养层体系中均可诱导分化形成神经上皮祖细胞, 但无饲养层体系的效率相对较低, 且有未分化胚胎干细胞残余。

【关键词】 胚胎干细胞; 神经诱导; 饲养层细胞

【中图分类号】 Q813.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)04-0031-06

## Comparison of neural induction of human embryonic stem cells in three culture systems

YUAN Ding<sup>1,2</sup>, LIN Ge<sup>1,2</sup>, LU Guang-xiu<sup>1,2</sup>

(1 National Engineering and Research Center of Human Stem Cells, Changsha, Hu'nan, 410078, China;

2 Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hu'nan 410078, China)

**Abstract:** 【Objective】 The study was done to compare the induction efficiency of human embryonic stem cells to neuroepithelial progenitor cells in human embryonic fibroblasts, mouse embryonic fibroblasts and feeder free systems. 【Method】 Human embryonic stem cells cultured on human or mouse feeder cells or in feeder free conditions were induced into neuroepithelial progenitor cells, and 10 days later embryonic stem cell related genes and neuroepithelial progenitor related genes were tested, so were immunofluorescence cytochemistry of neuroepithelial progenitor markers *Pax6*, *Musashi* and *Nestin* and embryonic stem cell marker SSEA4. 【Result】 Neuroepithelial progenitors could be induced in three inducing systems, expressing neuroepithelial progenitor antigen markers *Pax6*, *Musashi* and *Nestin* as well as *Pax6*, *Nestin* and *Sox* family genes. The expression of *Oct4* in feeder free system was higher than that in feeder containing systems, so was SSEA4 positive cell percentage, which was  $(26.3 \pm 3.5)\%$ , while *Pax6* and *Musashi* positive cell percentage was lower than that in feeder containing systems, which was  $(81.0 \pm 3.0)\%$  and  $(79.0 \pm 4.4)\%$  respectively. 【Conclusion】 Human embryonic stem cells can differentiate into neuroepithelial progenitor cells in both feeder containing and feeder free systems, yet feeder free system has a relatively

\* [收稿日期] 2010-01-10

[基金项目] 国家“863”计划项目(2006AA02A102); 国家“973”计划项目(2007CB948103)

[作者简介] 袁 丁(1978—), 女, 湖南长沙人, 在读博士, 主要从事干细胞诱导分化研究。E-mail: dianayd66@yahoo.com.cn

[通信作者] 卢光琇(1939—), 女, 湖北天门人, 教授, 博士生导师, 主要从事干细胞工程及生殖与不孕临床科学研究。

E-mail: luxgdirector@yahoo.com

lower inductive efficiency with part of undifferentiated embryonic stem cells.

**Key words:** embryonic stem cell; neural induction; feeder cell

胚胎干细胞向神经系统诱导分化一直是干细胞领域的研究重点。神经上皮是胚胎发育过程中最早特化出来的组织之一,对其体外发生的研究有助于人们了解神经系统的早期发育。人胚胎干细胞(Human embryonic stem cells, HESC)具有多向分化潜能及体外扩增能力,研究其向神经上皮祖细胞(Neuroepithelial progenitor cells, NPC)的诱导分化,是进一步研究神经细胞定向诱导分化的必经之路,同时也为神经系统的早期发育提供了良好材料和体外模型。早期的研究多通过将胚胎干细胞形成“拟胚体”后,诱导其向神经前体细胞分化,但这种分化是一种自发的分化过程<sup>[1-2]</sup>。有研究表明,与基质细胞共培养可以提高神经诱导的效率,但这种基质细胞来源的诱导活性更多地表现为促进多巴胺能神经元的产生<sup>[3-4]</sup>。将胚胎干细胞常规培养在饲养层细胞上,直接在小鼠胚胎成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblasts, MEF)饲养层上进行诱导分化,可以获得较高的诱导效率<sup>[5]</sup>。但是关于在小鼠或人胚胎成纤维细胞(Human embryonic fibroblasts, HEF)饲养层及无饲养层(Feeder free, FF)培养体系下, HESC 神经诱导分化效果的比较尚未见文献报道。为此,本研究采用 HEF 和 MEF 饲养层及 FF 等 3 种培养体系,将 HESC 体外诱导分化为早期的神经上皮细胞,比较各种诱导体系下产生 NPC 的效率,以期建立优化的无饲养层 HESC 神经诱导体系提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 1 株 HESC(*ch*HES-8)、2 株 HEF(HEF-D 和 HEF-L)和 1 株 MEF,均由中南大学生殖与干细胞工程研究所建立,饲养层上的 HESC 生长良好,核型正常<sup>[6]</sup>。

1.1.2 试剂与仪器 DMEM/F12、Knockout Serum Replacement、胎牛血清、山羊血清、D-PBS、N2 supplement、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、成纤维细胞生长因子 2(Fibroblast growth factor 2, FGF2)、羊抗小鼠 Alexa Fluor 488、羊抗兔 Alexa Fluor 488,均为 Gibco 公司产品; Matrigel, 为 BD 公司产品; 小鼠抗人 SSEA4, 为 R&D 公司产品; 小鼠抗人 Musashi、小鼠抗人 Nestin, 均为 Chemicon 公司产

品; 兔抗人 Pax6, 为 DSHB 公司产品;  $\beta$ -巯基乙醇、DAPI, 为 Sigma 公司产品;  $2\times$  Green Go Taq Reaction Buffer, 为 Promega 公司产品。荧光显微镜, 为 Nikon 公司产品。

### 1.2 HESC 在 HEF、MEF 体系中的培养

将 HESC 分别培养在 HEF、MEF 饲养层上, 每天换液, 6~7 d 机械传代 1 次, 培养基为 DMEM/F12+体积分数 15% Knockout Serum Replacement+0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇+1 mmol/L L-谷氨酰胺+体积分数 1% 非必需氨基酸+4 ng/mL FGF2, 于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱内培养<sup>[6]</sup>。

### 1.3 HESC 在 FF 体系中的培养

选取饲养层上未分化 HESC 克隆, 机械切割成小细胞团, 于 Matrigel 处理后的 6 孔板上贴壁培养, 采用的培养基为 HEF 条件培养基(HEF 条件培养基为培养人胚胎成纤维细胞 24 h 后的 HESC 培养基), 每天定时收集, 过滤后备用。使用前添加 4 ng/mL 的 FGF2, 于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱内培养。

### 1.4 神经上皮祖细胞的诱导分化

HESC 传代培养 4~5 d 后, 将培养基更换为神经诱导培养基(DMEM/F12+体积分数 1% N2 supplement+1 mmol/L L-谷氨酰胺+体积分数 1% 非必需氨基酸+4 ng/mL FGF2)。培养 10 d, 收集分化细胞, 检测胚胎干细胞和神经上皮祖细胞相关基因(*Oct4*、*Nestin*、*Pax6*、*Sox1*、*Sox2*、*Sox3*、 $\beta$ *actin*)的表达, 并进行抗原免疫荧光染色分析。

#### 1.4.1 神经上皮祖细胞 RNA 的抽提和 RT-PCR

(1) 引物的设计与合成。根据所检测基因的 cDNA 序列, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计相应引物, 引物由上海英竣公司合成。引物序列及反应条件见表 1。

(2) RT-PCR。收集诱导第 10 天的分化细胞, 采用 Trizol 试剂盒抽提总 RNA, RT-PCR 检测 *Oct4*、*Nestin*、*Pax6*、*Sox1*、*Sox2* 和 *Sox3* 等基因的表达情况, 并以  $\beta$ *actin* 基因为内参基因。PCR 反应体系为 10  $\mu$ L:  $2\times$  Green Go Taq Reaction Buffer 5  $\mu$ L, 上下游引物(10 pmol/L)各 0.1  $\mu$ L, 模板 DNA (50 ng/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 加双蒸水至 10  $\mu$ L。PCR 反应

程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,53~ 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。64 ℃ 退火 1 min(退火温度因引物而异),72 ℃ 延伸

表 1 不同基因的引物序列及退火温度

Table 1 Primer sequences and annealing temperatures of genes

| 基因名称<br>Gene  | 上游引物(5'→3')<br>Upstream primer | 下游引物(5'→3')<br>Downstream primer | 退火温度/℃<br>Annealing temperature |
|---------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Oct4</i>   | CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA      | CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA            | 64                              |
| <i>Nestin</i> | GAAACTCAAGCACCAC               | TTTAAACTCCAGCCATCC               | 53                              |
| <i>Pax6</i>   | AACAGACACAGCCCTCACAAACA        | CGGGAAGTGAAGTGGAACTGAC           | 58                              |
| <i>Sox1</i>   | CAATGCGGGGAGGAGAAGTC           | CTCTGGACCAAAGTGTGGCG             | 54                              |
| <i>Sox2</i>   | AGTCTCCAAGCGACGAAAAA           | GCAAGAAGCCTCTCCTTGAA             | 54                              |
| <i>Sox3</i>   | GAGGGCTGAAAGTTTGCTG            | CCCAGCCTACAAAGGTGAAA             | 55                              |
| <i>βactin</i> | CGCACCCTGGCCATTGTCAT           | TTCTCCTGGATGTCACGCAC             | 60                              |

1.4.2 抗原免疫荧光染色 分别收集 3 个体系诱导第 10 天的细胞,用质量分数 0.25%胰酶消化 5 min,制备成单细胞悬液,于防脱载玻片上制成细胞滴片,风干,加入体积分数 4%多聚甲醛,室温固定 20 min,胞内抗原用体积分数 0.2% Triton-X-100 室温处理 10 min,体积分数 4%山羊血清室温封闭 30 min,加入体积分数 4%山羊血清稀释的一抗(兔抗人 Pax6 (1:5 000 倍稀释)、小鼠抗人 Nestin (1:50 倍稀释)、小鼠抗人 Musashi(1:500 倍稀释)、小鼠抗人 SSEA4(1:50 倍稀释))。4 ℃ 湿盒内孵育过夜,再用与一抗相对应的二抗(羊抗小鼠 Alexa Fluor 488(1:1 000 倍稀释)、羊抗兔 Alexa Fluor488(1:1 000 倍稀释)于室温避光孵育 1 h,DAPI 染核,Nikon 荧光显微镜下观察,统计阳性细

胞数,计算阳性细胞比例。

1.5 统计学分析

试验重复 3 次,数据以“平均值±标准差( $\bar{x} \pm S$ )”表示,采用 SPSS V 13.0 软件进行统计学分析, $P<0.05$  表示统计学差异显著。

2 结果与分析

2.1 3 种诱导体系下 NPC 的形态学观察

在 HEF、MEF 和 FF 体系中培养的 HESC,传代后 4~5 d 时,克隆平铺,细胞增殖旺盛,折光性好,此时将 HESC 培养基更换为无血清的化学限定性神经诱导培养基,4~5 d 后即可看到 HESC 克隆表现出明显的形态学差异。3 种诱导体系下 NPC 的形态学观察如图 1 所示。

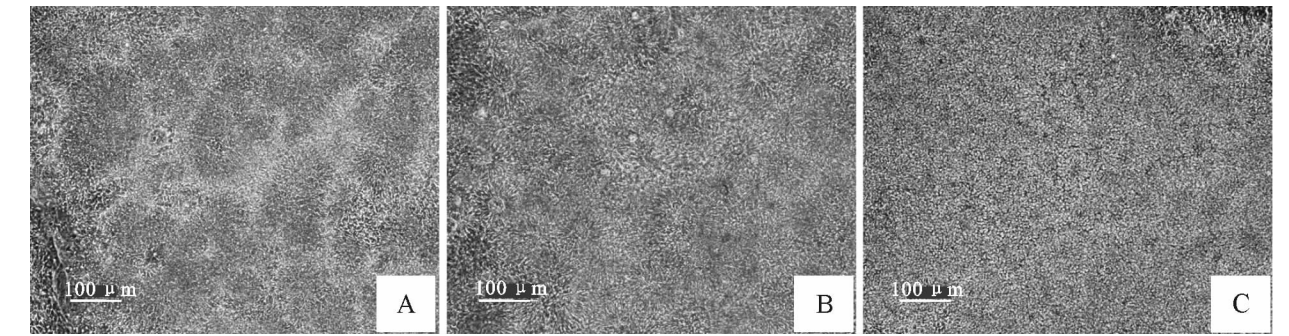


图 1 3 种诱导体系下 NPC 的形态学观察(100×)

A. HEF 体系; B. MEF 体系; C. FF 体系

Fig. 1 Morphology of neuroepithelial progenitor cells in three inductive systems (100×)

A. HEF system; B. MEF system; C. FF system

3 种体系下,胚胎干细胞克隆周边的细胞继续向外平铺扩张,呈单层生长,中央的细胞则逐渐堆积增厚,呈多层生长,且增厚的面积越来越大;至培养第 7 天时,HEF 和 MEF 体系中,HESC 克隆内 90%以上面积都是增厚的区域。增厚区域内的细胞排列非常紧密,呈长梭形,98%以上的克隆细胞排列形成早期的 rosette 结构,仅在克隆边缘还有部分单

层细胞残留;之后继续培养 2~3 d,可见 rosette 结构更为明显、密集(图 1-A,B)。FF 体系中,中央细胞堆积增厚的程度较 HEF 和 MEF 小,第 7 天时克隆中央形成的 rosette 结构较 HEF 和 MEF 少;第 10 天时,克隆厚度仍较 HEF 和 MEF 小,且克隆周边还有较多的单层细胞未形成 rosette 结构(图 1-C)。

2.2 NPC 基因的表达

检测 3 种诱导体系中形成的神经上皮 rosette 结构的基因表达情况,结果发现,诱导分化第 10 天,干细胞多能性标记 *Oct4* 在 HEF 和 MEF 体系培养 NPC 中的表达均较未分化胚胎干细胞(HESC)明显下调,而在 FF 体系中 *Oct4* 的表达仅轻微下调;多能性标记 *Sox2* 和神经干细胞标记 *Nestin* 在 3 个体系

培养的 NPC 中均持续表达;神经前体细胞标记 *Sox3* 在 3 个体系培养的 NPC 中均有表达,其中在 FF 体系培养的 NPC 中表达略高;NPC 标记 *Pax6* 在 3 个体系培养的 NPC 中均有表达,其中在 HEF 体系中的表达高于 MEF 和 FF 体系;晚期神经上皮标记 *Sox1* 在 3 个体系培养的 NPC 中均无表达,提示形成的神经上皮还处于早期阶段(图 2)。

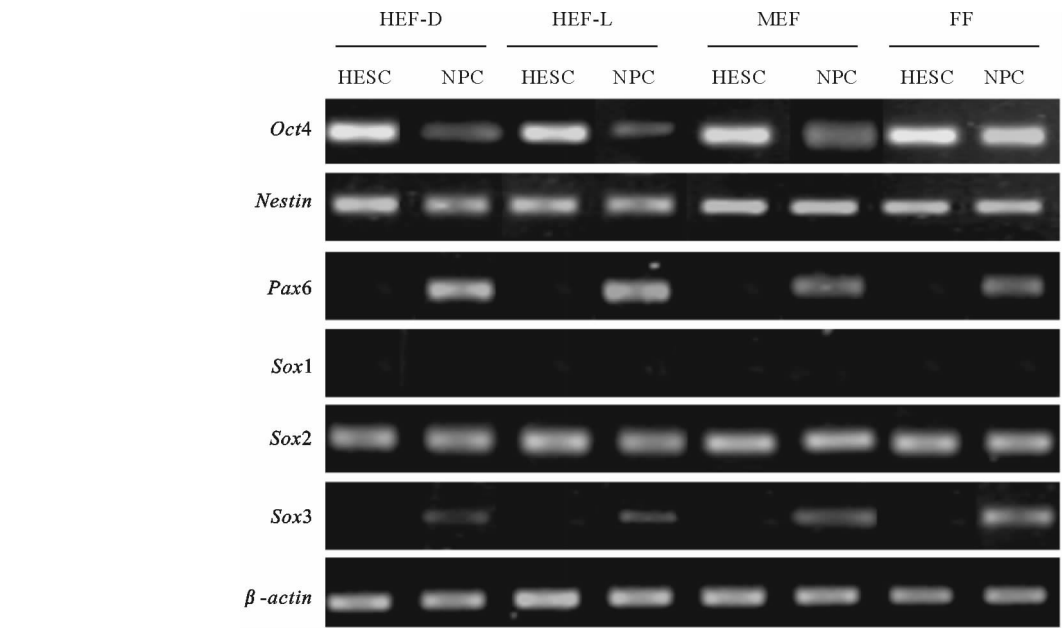


图 2 3 种诱导体系下 NPC 的基因表达谱

Fig. 2 Gene expression profile of neuroepithelial progenitor cells in three inductive systems

2.3 NPC 标记的抗原染色计数

HEF 体系中, NPC 标记的 *Pax6*、*Musashi*、*Nestin* 和未分化胚胎干细胞标记 *SSEA4* 的免疫荧

光染色分析结果显示,诱导第 10 天形成的 NPC 均表达 *Pax6*、*Musashi* 和 *Nestin*(图 3)。

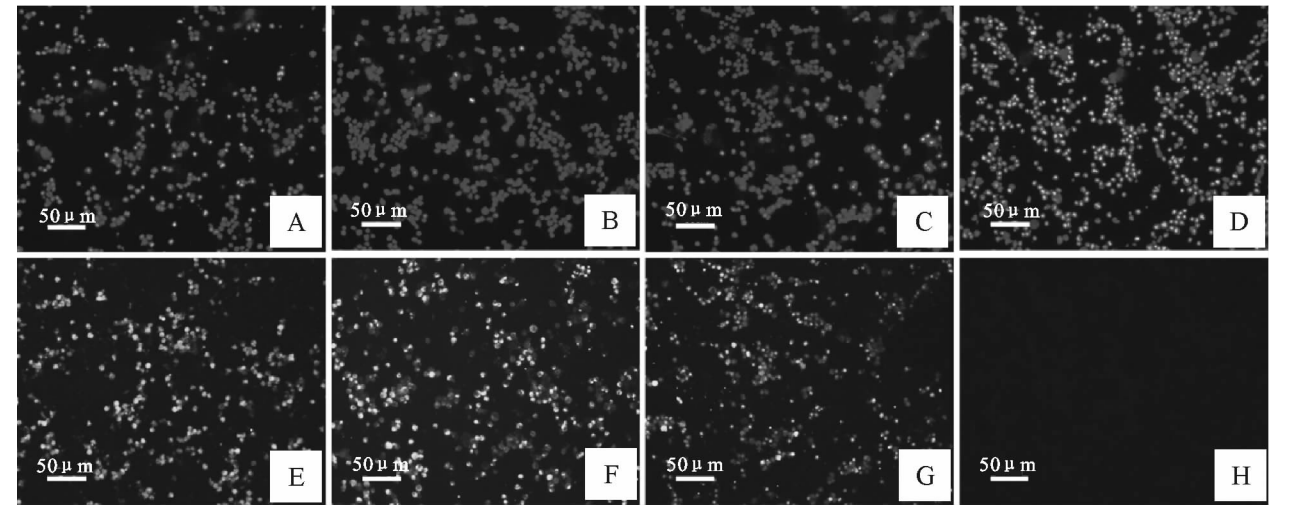


图 3 HEF 体系中 NPC 标记的抗原染色结果(200×)

A~D. 为 DAPI 染色;E~H. 分别为 *Pax6*、*Musashi*、*Nestin* 和 *SSEA4* 染色

Fig. 3 Staining of neuroepithelial progenitor cells derived from HEF system (200×)

A—D. DAPI staining; E—H. *Pax6*, *Musashi*, *Nestin* and *SSEA4* staining respectively

由图 4 可知,在 HEF、MEF、FF 3 个诱导体系中,Nestin 阳性细胞比例分别为 $(93.0 \pm 2.6)\%$ 、 $(91.0 \pm 3.0)\%$ 和 $(87.7 \pm 2.5)\%$ ,三者没有明显差异;Pax6 阳性细胞比例分别为 $(92.0 \pm 3.0)\%$ 、 $(89.7 \pm 1.5)\%$ 和 $(81.0 \pm 3.0)\%$ ,HEF 和 MEF 体系显著高于 FF 体系;Musashi 阳性细胞比例分别为

$(89.0 \pm 3.6)\%$ 、 $(87.7 \pm 2.5)\%$ 和 $(79.0 \pm 4.4)\%$ ,HEF 和 MEF 体系显著高于 FF 体系;SSEA4 阳性细胞比例分别为 $(3.7 \pm 1.2)\%$ 、 $(2.3 \pm 1.5)\%$ 和 $(26.3 \pm 3.5)\%$ ,HEF 和 MEF 体系显著低于 FF 体系。

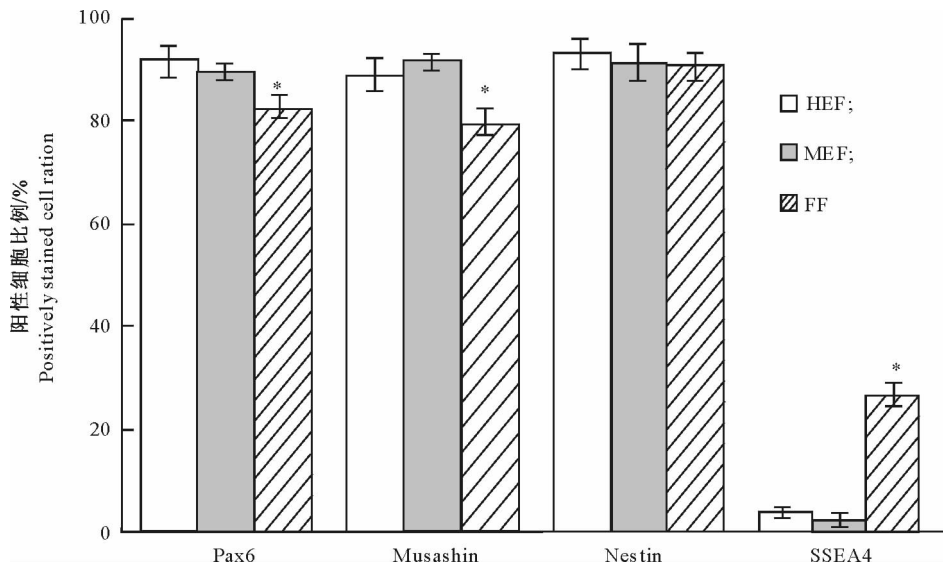


图 4 3 种诱导体系下 NPC 染色的计数分析

\* 示 FF 组与 HEF 和 MEF 组比较差异显著( $P<0.05$ )

Fig. 4 Counting analysis of staining of neuroepithelial progenitor cells derived from three inductive systems

\* indicated FF group compared with HEF and MEF group ( $P<0.05$ )

### 3 讨 论

自从建系以来,HESC 的神经诱导分化一直是干细胞研究领域的热点。在 HESC 的悬浮培养和自发分化中,都可以发现神经上皮的发生,神经系统的诱导分化被认为是最可能率先用于临床治疗的研究方向之一<sup>[7]</sup>。早期的神经诱导是通过“拟胚体”的自发分化来进行的,但形成的细胞仍是含有多种自发分化细胞的较为混杂的细胞群<sup>[2]</sup>。有研究发现,当胚胎干细胞与基质细胞共培养时,有些基质细胞,如 PA6、MS5 具有一定的神经诱导能力,但是这种诱导能力似乎更多倾向于产生多巴胺能神经元前体<sup>[8-9]</sup>。Shin 等<sup>[5]</sup>发现,在 MEF 上培养的 HESC 可直接诱导分化为神经前体,在体外多次传代培养后仍能维持其前体细胞的特征。

本研究发现,人或鼠胚胎成纤维细胞在无血清的培养环境中,均能有效地诱导 HESC 分化为早期的 NPC,产生典型的形态学改变,表达 Pax6、Musashi、Nestin 等 NPC 的抗原标记和相关基因<sup>[10]</sup>。在 HESC 的直接诱导中仅将 HESC 培养基更换为

无血清的神经诱导培养基,其较 HESC 培养基去除了血清成分,添加了无血清成分的 N2,共同添加了 4 ng/mL FGF2。有研究发现,即使在神经诱导培养基中不添加 FGF2,神经上皮还会发生,只是效率较低,所以认为即使 FGF2 是神经诱导的重要信号分子,在胚胎干细胞的神经发生中却不是最重要的添加因子<sup>[11-12]</sup>。如果培养基中含有骨形态蛋白样活性的成分,如血清等,则会显著影响神经上皮的发生<sup>[13-15]</sup>。这表明胚胎的早期神经发育是以“默认模式”为基础的多种诱导因素共同作用的结果,这个“默认模式”的前提条件是抑制骨形态蛋白的活性,其能促进神经上皮发生。本试验中,HESC 在有饲养层细胞的诱导体系中,仅将培养基更换为无血清的神经诱导培养基,即可有效促进 NPC 发生;然而在无饲养层的诱导体系中,虽然也可以诱导 NPC 发生,但其效率明显低于有饲养层诱导体系,而且有更多的细胞诱导后仍旧表达胚胎干细胞的标记 SSEA4,且其 Oct4 基因的表达明显高于有饲养层体系获得的细胞,说明无饲养层的诱导体系虽然采用了与有饲养层体系相同的无血清神经诱导培养基,

其诱导作用还不能完全达到同步,尚有部分未分化的胚胎干细胞残余。笔者推测,这可能与饲养层细胞的缺失有关,因为人或鼠胚胎成纤维细胞均能分泌多种成纤维细胞生长因子,包括 FGF2,这些因子不仅可以维持胚胎干细胞的存活,而且也可有效促进神经上皮的发生<sup>[16]</sup>;同时,2 种细胞接触培养,饲养层细胞作为细胞外基质给胚胎干细胞提供一个良好的神经诱导微环境,这可能对胚胎干细胞的神经上皮发生起到很好的促进和支持作用。

尽管如此,用于临床治疗的神经前体细胞或神经细胞需要大规模的培养,无动物源性、无血清的培养和诱导体系是最理想的培养体系,NPC 诱导分化的无饲养层诱导体系仍然是研究的重点。虽有研究表明,能在各个不同分化阶段获得神经前体细胞,但却难以获得高度纯化的早期神经上皮祖细胞,并使之维持其早期原始状态和分化潜能<sup>[17-19]</sup>。本研究发现,胚胎成纤维细胞提供了一种有利于神经上皮发生的微环境,有助于提高神经上皮祖细胞的诱导和纯化,对其作用机制的研究可能会促进无饲养层诱导体系的优化。

## [参考文献]

- [1] Reubinoff B E,Itsykson P,Turetsky T,et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2001,19(12):1134-1140.
- [2] Zhang S C,Wernig M,Duncan I D,et al. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol,2001,19(12):1129-1133.
- [3] Takagi Y,Takahashi J,Saiki H,et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a parkinson primate model [J]. J Clin Invest,2005,115(1):102-109.
- [4] Vazin T,Chen J,Lee C T,et al. Assessment of stromal-derived inducing activity in the generation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells [J]. Stem Cells,2008,26(6):1517-1525.
- [5] Shin S,Mitalipova M,Noggle S,et al. Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions [J]. Stem Cells,2006,24(1):25-138.
- [6] Zhou J,Ou-Yang Q,Li J,et al. Human feeder cells support establishment and definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells [J]. Stem Cells Dev,2008,17(4):737-749.
- [7] Zhang S C,Li X J,Johnson M A,et al. Human embryonic stem cells for brain repair? [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008,363(1489):87-99.
- [8] Kawasaki H,Suemori H,Mizuseki K,et al. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2002,99(3):1580-1585.
- [9] Erceg S,Ronaghi M,Stojkovic M. Human embryonic stem cell differentiation toward regional specific neural precursors [J]. Stem Cell,2009,27(1):78-87.
- [10] Zhang S C. Neural subtype specification from embryonic stem cells [J]. Brain Pathol,2006,16(2):132-142.
- [11] Li X J,Zhang S C. *In vitro* differentiation of neural precursors from human embryonic stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2006,331:169-177.
- [12] Pankratz M T,Li X J,Lavaute T M,et al. Directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage [J]. Stem Cells,2007,25(6):1511-1520.
- [13] Gerrard L,Rodgers L,Cui W. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling [J]. Stem Cells,2005,23(9):1234-1241.
- [14] Lavaute T M,Yoo Y D,Pankratz M T,et al. Regulation of neural specification from human embryonic stem cells by BMP and FGF [J]. Stem Cells,2009,27(8):1741-1749.
- [15] Hendrickx M, Van X H,Leyns L. Anterior-posterior patterning of neural differentiated embryonic stem cells by canonical Wnts,Fgfs,Bmp4 and their respective antagonists [J]. Dev Growth Differ,2009,51(8):687-698.
- [16] Gong J,Sagiv O,Cai H,et al. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors [J]. Exp Eye Res,2008,86(6):957-965.
- [17] Cho M S,Lee Y E,Kim J Y,et al. Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2008,105(9):3392-3397.
- [18] Schulz T C,Palmarini G M,Noggle S A,et al. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells [J]. BMC Neurosci,2003,4:27.
- [19] Ying Q L,Stavridis M,Griffiths D,et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture [J]. Nat Biotechnol, 2003,21(2):183-186.