

## 实验技术

## 人胎儿脊髓神经干细胞的分离培养

刘欣春, 朱悦\*

中国医科大学附属第一医院骨科, 沈阳 110001

**摘要:** 本文旨在探讨是否能够从低温保存的流产儿分离培养出脊髓神经干细胞。将 14 周流产儿在 4℃ 下保存, 2、6 和 12 h 后取脊髓, 将颈段、胸段、腰骶段分别进行无血清培养, 并用胎牛血清诱导分化。用克隆培养的方法验证培养细胞的干细胞特性; 用免疫荧光细胞化学的方法检测神经干细胞标志 nestin 及干细胞诱导分化后神经元标志 MAP2、星形胶质细胞标志 GFAP、胆碱能标志 ChAT, 并比较不同时间点以及不同部位分离的神经干细胞的差异。在各个时间点, 从颈段、胸段、腰骶段脊髓均分离培养出具有连续增殖能力的神经球, 其中腰骶段分离出的神经球数量最多, 12 h 组各段分离出的神经球较 2、6 h 组显著减少。各段培养中的神经球均为 nestin 阳性, 诱导分化后均能够产生 GFAP 阳性星形胶质细胞、MAP2 阳性神经元以及 ChAT 阳性胆碱能神经元。各段培养中的神经干细胞的克隆形成能力相似。以上结果表明, 从低温保存的人胎儿能够分离培养出脊髓神经干细胞, 这为基础研究以及未来治疗应用提供了新的细胞来源。

**关键词:** 人; 流产儿; 脊髓; 神经干细胞; 培养

**中图分类号:** R338; R329.2

## Isolation of neural stem cells from the spinal cords of human fetus

LIU Xin-Chun, ZHU Yue\*

*Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China*

**Abstract:** Neural stem cells are a potential therapeutic source for cellular transplantation therapy in neurological diseases. The present paper was aimed to investigate whether neural stem cells could be obtained from the spinal cords of low temperature preserved abortuses. Fourteen weeks old abortuses were stored in a refrigerator at 4°C without any additional treatments for 2, 6 and 12 h before use. The spinal cords were anatomized out and divided into cervical cords, thoracic cords and lumbar/sacral cords. Then the spinal cord segments were used for cell culture separately. Neural stem cells were isolated from the segments and cultured in bFGF, EGF and N2 supplement containing free-serum DMEM/F12 (1:1) medium. In order to examine the differentiation potential, the stem cells were induced to differentiate with 5% fetal bovine serum on poly-L-lysine substrate. Clonal culture was carried out to demonstrate that the isolated cells met the standard of stem cells. Indirect fluorescent immunocytochemistry was used to examine the expressions of neural stem cell marker (nestin), neuron marker (MAP2), astrocyte marker (GFAP) and cholinergic marker (ChAT). The stem cells in different cultures were compared. One-way analysis of variance and Kruskal-Wallis test were used for the statistical comparison. As a result, neural stem cells were obtained from all the spinal cord segments with different postmortem intervals. Both the cells on the surface and inside the neurospheres showed nestin immunoreactivity. Therefore, nearly all the cells that composed the neurospheres were nestin-positive undifferentiated cells. When the spheres were induced to differentiate, they could yield GFAP-positive astrocytes and MAP2-positive neurons including ChAT-positive cholinergic neurons. Primary neurospheres could be dissociated mechanically, expand in subcultures and maintain the differentiation potential. In clonal cultures, single cells from a single primary sphere could give rise to new neurospheres, which had the same differentiation potential as the primary spheres. The lumbar/sacral cord cultures gave rise to the most abundant primary neurospheres. When the preservation time of the fetus was prolonged to 12 h, the number of primary neurospheres decreased sharply. The clonal formation and phenotype capacity were similar in all cultures. In conclusion, spinal neural stem cells can be isolated from low temperature preserved abortuses and represent an alternative source for experimental and potential therapeutic purposes.

**Key words:** humans; aborted fetus; spinal cord; neural stem cell; culture

Received 2006-03-22 Accepted 2006-04-30

This work was supported by the Technical Innovation and Research Foundation of Shengyang, Liaoning Province (No.345074).

\*Corresponding author. Tel: +86-24-83283380; E-mail: zhuyuedr@163.com

包括人在内的成年哺乳动物的海马和SVZ (subventricular zone)区存在神经发生(neurogenesis), 这种神经发生是由中枢神经系统内的干细胞增殖分化而来。虽然这些干细胞的具体位置还不明确, 但从包括人在内的很多动物的胚胎或成体脑组织中都分离得到了神经干细胞。神经干细胞在中枢神经系统损伤时会有增殖反应, 但大部分都分化成胶质细胞, 而不是在损伤中损失的神经元, 这也可能是中枢神经系统损伤不易康复的原因, 因此细胞移植被认为是治疗中枢神经系统损伤的解决方案之一<sup>[1]</sup>。

胚胎组织移植对帕金森病和亨廷顿病有显著疗效, 但供体组织有限是其应用的最大限制<sup>[2]</sup>。胚胎干细胞因具有广泛的分化潜能而受到广泛的关注, 但多向分化潜能同时也限制了其移植治疗, 胚胎干细胞在移植前必须限定在特定的神经细胞世系<sup>[3,4]</sup>。神经干细胞因其在体外能够连续扩增并保持分化潜能被认为是移植治疗的候选细胞之一, 虽然还有很多问题待解决, 但神经干细胞已经展现出了一定的治疗潜力<sup>[1]</sup>。

为了比较不同来源神经干细胞的特性, 探寻适合移植治疗的神经干细胞, 研究者已经从人胚胎和成人的包括脊髓在内的各个脑区分离神经干细胞进行研究, 但目前还未见从成体脊髓分离的报道<sup>[5]</sup>。除了新鲜组织, 神经干细胞还能够从保存的人<sup>[6-9]</sup>和动物尸体<sup>[10-12]</sup>分离得到。到目前为止还未见从保存的胎儿尸体分离培养脊髓神经干细胞的报道。本研究将探讨从4℃保存的14周龄流产儿分离培养脊髓神经干细胞的可能性。

## 1 材料与方法

**1.1 主要实验材料及试剂** Hanks平衡盐溶液、胰蛋白酶、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、N2添加剂、DMEM/F12 (1:1)培养基(Gibco公司); 胎牛血清(Hyclone公司); 多聚赖氨酸、BSA、PI (Sigma公司); 鼠抗MAP2、兔抗ChAT (Chemicon公司); 兔抗GFAP (北京中杉金桥公司); 兔抗nestin、正常山羊血清、Cy3标记羊抗鼠IgG、FITC羊抗兔IgG (武汉博士德公司); To-Pro-3 (Molecular Probes公司)。

**1.2 脊髓神经干细胞的原代培养** 根据Weiss等<sup>[13]</sup>的神经干细胞分离培养方法作简单的修改, 简述如下。经家属同意, 取相近大小和体重的流产儿3个(14周龄, 无畸形), 不作任何特殊处理, 置于

4℃冰箱中保存。分别于2、6和12 h后将脊髓取出进行神经干细胞的分离培养。颈段、胸段和腰骶段分别进行培养。脊髓组织在4℃不含Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的Hanks平衡盐溶液中剪成小于1 mm<sup>3</sup>的小块, 用0.125%胰蛋白酶在37℃下振动消化30 min, 然后加入胎牛血清终止消化。组织用细巴斯德管轻轻敲打后, 离心收集细胞(1 000 r/min, 5 min, 离心机Eppendorf 5810R V3.9), 用生长培养基[含有20 ng/ml bFGF、20 ng/ml EGF和N2添加剂的DMEM/F12 (1:1)培养基]重悬浮。调整细胞浓度至1×10<sup>5</sup>个活细胞/ml, 每5×10<sup>5</sup>个细胞(5 ml)接种到玻璃培养瓶中。细胞在37℃, 5% CO<sub>2</sub>条件下进行培养。每7 d进行半量换液, 每4 d加入新的bFGF和EGF。7~9 d后, 细胞用机械分离法进行传代。

**1.3 脊髓神经干细胞的克隆培养** 根据Weiss等<sup>[13]</sup>的方法, 简述如下。原代培养8 d后, 将神经球转移到35 mm平皿中。在显微镜下, 将直径200~300 μm的神经球挑出转移到含有200 μl生长培养基的500 μl EP管中, 吹打20~40次制成细胞悬液, 调整细胞浓度至1~2个/10 μl, 整个过程均在无菌条件下进行。然后将细胞转移到96孔板中进行培养, 每孔加入10 μl细胞悬液, 用生长培养基补足至200 μl。培养24 h后, 镜下观察, 将含有一个活细胞的孔做标记, 8 d后观察单个细胞是否能产生神经球。

**1.4 脊髓神经干细胞的分化培养** 离心收集原代或传代培养8~10 d的神经球, 用分化培养基[含5%胎牛血清的DMEM/F12 (1:1)培养基]重悬浮, 将细胞悬液接种到置有包被多聚赖氨酸盖玻片的24孔板中(1 ml/孔)。克隆神经球培养8~10 d后, 在显微镜下挑出, 同样接种到24孔板中, 用分化培养基诱导分化(1 ml/孔)。分化培养8 d后取出细胞爬片进行间接免疫荧光染色。

**1.5 免疫细胞化学的组织处理** 离心收集原代或传代培养8~10 d的神经球, 克隆培养中的神经球则在显微镜下挑出。收集的神经球用0.01 mol/L PBS漂洗, 4℃的4%多聚甲醛溶液固定30 min, 然后分别用两种方法处理: 一部分神经球滴在涂有多聚赖氨酸的载玻片上, 用免疫荧光方法检测神经球表面细胞的nestin反应性; 另一部分神经球用0.01 mol/L PBS漂洗, OCT包埋, 10 μm层厚冰冻切片, 丙酮固定5 min, 用免疫荧光方法检测神经球内部细胞的nestin反应性。各分化培养中的细胞爬片用

0.01 mol/L PBS 漂洗, 4°C 的 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min 备用。

**1.6 免疫细胞化学** 本实验采用间接免疫细胞化学的方法进行检测, 所有步骤均在室温下进行, 正常山羊血清、一抗和二抗都用含 1% BSA 和 0.25% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 进行稀释, 标本用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2) 漂洗, 简述如下。标本漂洗后(5 min×3 次), 用 10% 正常山羊血清封闭 1 h, 除去多余血清后, 一抗孵育过夜。一抗及稀释度如下: 兔抗 nestin (1:300)、鼠抗 MAP2 (1:200)、兔抗 ChAT (1:500)、兔抗 GFAP (1:1)。洗去未结合一抗(5 min×3 次), 加入二抗孵育 2 h。二抗及稀释度如下: Cy3 标记羊抗鼠 IgG (1:50)、FITC 羊抗兔 IgG (1:50)。PI 或 To-Pro-3 用于核复染。洗去二抗及复染剂(5 min×4 次), 标本用抗淬灭介质封片。完整神经球的荧光图像用安装在 Olympus BX60 显微镜上的 Spot RT 数码相机拍摄, 神经球切片及细胞爬片的荧光图像用 Leica TCS SP2 共聚焦激光扫描显微镜拍摄。

**1.7 定量及统计分析** 原代培养的第 6 天, 每个

培养随机选取 3 瓶细胞用来做神经球的计数分析。每瓶(5 ml)神经球用吸管轻轻吹打混匀后, 平均分配到 48 孔板的 20 个孔中(250  $\mu$ l/孔), 随机选取 4 个孔用来计数。神经球用 Olympus-IX71 倒置显微镜的 10 倍物镜进行观察, 选取中央视野的神经球计数。这样, 每个培养共选取 12 个视野进行神经球计数。为了检测分化培养中分化细胞的表型构成, 每个培养至少选取 3 个标本进行 MAP2 阳性细胞、GFAP 阳性细胞以及 ChAT 阳性细胞的计数, 总细胞数由 To-Pro-3 核复染计数获得, 每个培养大约共计数 400 个细胞。不同培养之间的差异用单因素方差分析和 Kruskal-Wallis test 进行检验。

## 2 结果

### 2.1 神经干细胞的原代、传代及分化培养

在原代培养的第 3 天能够清楚地观察到神经干细胞以漂浮的细胞团的方式生长, 即形成神经球, 培养 7 d 后, 神经球的直径可增加到几百微米, 由数百个细胞构成(图 1A)。神经球的表面细胞(图 1B)及内部细胞(图 1C~E)几乎都表达 nestin (50 个/50 个

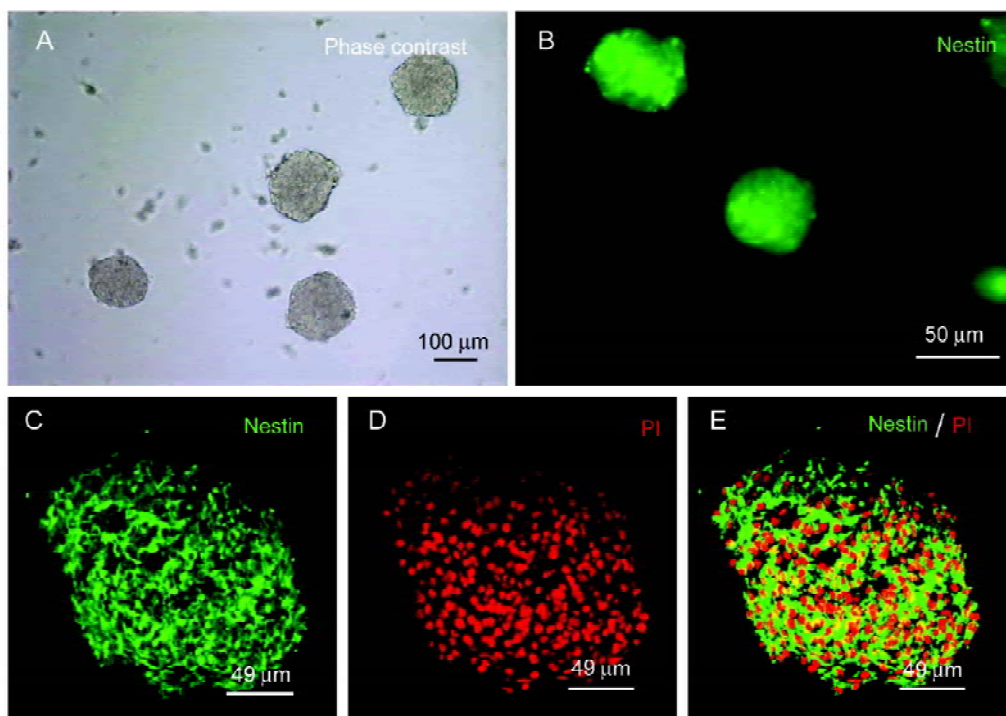


图 1. 培养中的神经干细胞及神经球的 nestin 免疫荧光染色

Fig. 1. Neural stem cells in culture and nestin immunofluorescence staining of neurospheres. A: Phase contrast image of neurospheres in culture 8 d later. Scale bar, 100  $\mu$ m. B: Nestin immunofluorescence staining of the cells on neurosphere surface. Nestin-green. Scale bar, 50  $\mu$ m. C~E: Nestin immunofluorescence staining of neurosphere sections. Scale bar, 49  $\mu$ m. C: Nestin-green. D: PI-red. E: Merged image of C and D.

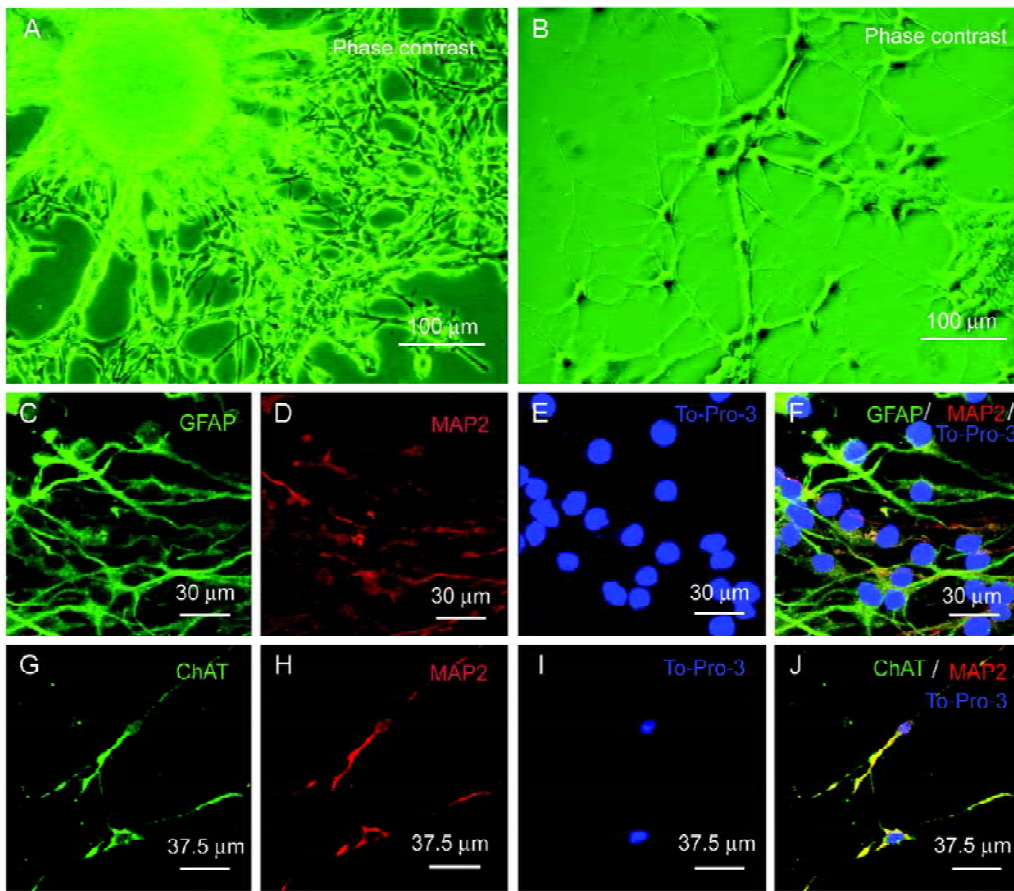


图 2. 神经干细胞的分化培养及分化细胞的免疫荧光染色

Fig. 2. Differentiation culture of neural stem cells and immunofluorescence staining of the differentiated cells. A~B: Phase contrast image of the cells in differentiation culture. Scale bar, 100 μm. A: Neurospheres attached to coverslips and migrated outward. B: Differentiated cells showed features of nervous system cells. C~F: GFAP and MAP2 immunofluorescence staining of differentiated cells. Scale bar, 30 μm. C: GFAP-green. D: MAP2-red. E: To-Pro-3-blue. F: Merged images of C, D and E. G~J: ChAT and MAP2 immunofluorescence staining of differentiated cells. Scale bar, 37.5 μm. G: ChAT-green. H: MAP2-red. I: To-Pro-3-blue. J: Merged images of G, H and I.

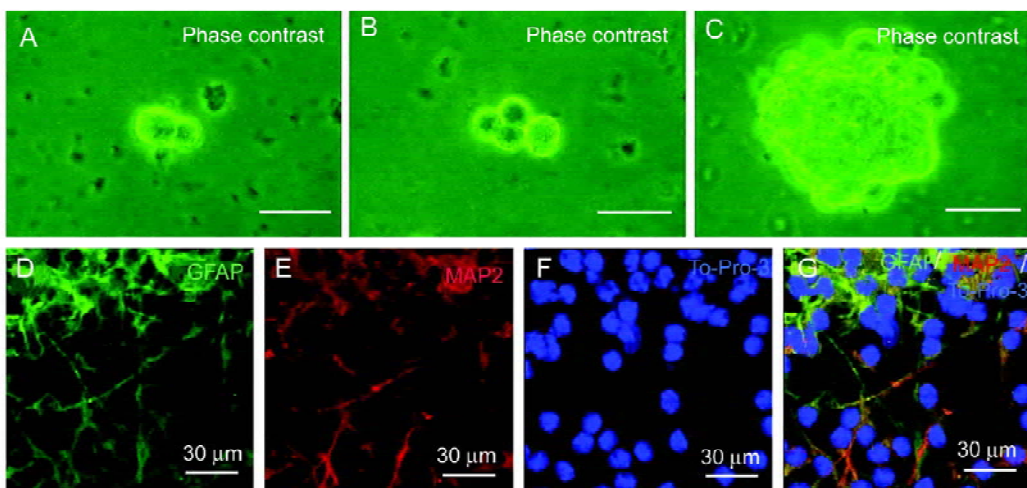


图 3. 神经干细胞的克隆培养及克隆神经球分化细胞的免疫荧光染色

Fig. 3. Clonal culture of neural stem cells and immunofluorescence staining of the differentiated cells from clonal neurospheres. A~C: Neural stem cells in clonal culture. Scale bar, 30 μm. A: Two-cell stage. B: Four-cell stage. C: Expanded to hundreds of cells. D~G: GFAP and MAP2 immunofluorescence staining of the differentiated cells from clonal neurospheres. Scale bar, 30 μm. D: GFAP-green. E: MAP2-red. F: To-Pro-3-blue. G: Merged images of D, E and F.

神经球, 18 个原代培养)。因此几乎整个神经球都由 nestin 阳性细胞构成。

在分化培养中, 第 2 天就可以见到神经球贴附盖玻片, 细胞向四周迁出, 长出突起(图 2A), 逐渐显露出神经系统细胞的特征(图 2B)。这些细胞中可见 MAP2 阳性神经元和 GFAP 阳性星形胶质细胞(图 2C~F)(54 个/54 个细胞爬片, 18 个分化培养)。

神经球能够连续传代, 保持未分化状态, 持续表达 nestin (32 个/32 个神经球, 18 个传代培养, 第 5 代), 并且传代的神经球在分化培养中仍能够分化出神经元和胶质细胞(54 个/54 个神经球, 18 个传代培养, 第 5 代)。

## 2.2 神经干细胞的克隆培养

在神经干细胞的克隆培养中, 单个细胞能够长成神经球(图 3A~C), 单个神经球至少能够产生 35 个克隆神经球(54 个/54 个原代神经球, 18 个原代培养)。这些新的神经球也由 nestin 阳性细胞构成。同原代神经球一样, 这些克隆神经球在分化培养中也能够分化成神经元和胶质细胞(图 3D~G)。

## 2.3 不同培养之间的比较

首先, 比较不同低温保存时间以及不同脊髓节段分离培养神经干细胞的效率的差异。在各个时间点, 分离培养得到的神经球数均是腰骶段最多, 其中胸段又多于颈段。随着保存时间的延长, 培养得到的神经球数越来越少, 保存 12 h 时更明显减少(图 4)。

再次, 比较不同原代培养中神经干细胞形成克

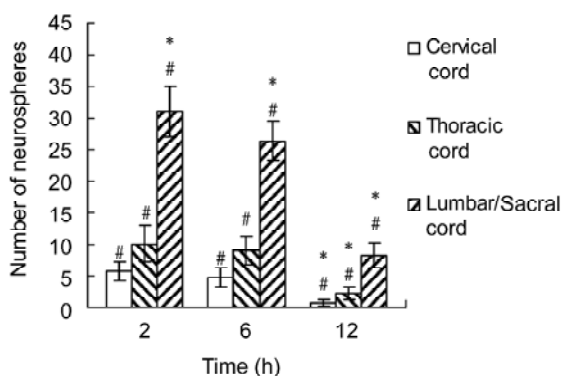


图 4. 不同原代培养中神经球数目的比较

Fig. 4. Comparison of the number of neurospheres from different primary cultures. mean±SD. # $P<0.05$  comparing the number of spheres from different segments (with the same postmortem interval), \* $P<0.05$  comparing the number of spheres from the homonymous segments (with different postmortem intervals).

隆神经球的能力。单个神经球能够产生 35~52 个克隆神经球(54 个原代神经球, 18 个原代培养), 各培养之间没有显著差异。

最后, 比较原代、传代(第 5 代)及克隆培养中神经球的分化能力。在本实验的分化条件下, 各培养中神经球的分化能力相近, 约有 20% 分化细胞是 MAP2 阳性神经元, 45% 分化细胞是 GFAP 阳性星形胶质细胞。

## 2.4 脊髓神经干细胞能够分化成胆碱能神经元

乙酰胆碱在脊髓的运动功能中有重要的调节作用<sup>[14]</sup>, 因此本实验检测分离培养的神经干细胞是否能够分化成胆碱能神经元。结果, 在各分化培养中均检测到 ChAT 和 MAP2 双染阳性的胆碱能神经元(图 2G~J)(50/54 个样本, 原代神经球、传代神经球和克隆神经球的分化培养共 36 个), 但分化比例较低(0.6%)。

## 3 讨论

神经干细胞的评定标准为: 能够自我更新、扩增, 在适当的条件下能够分化出神经系统的主要细胞类型(神经元和胶质细胞), 并且由其扩增的克隆应该保持相同的特性<sup>[15,16]</sup>。本研究应用含 bFGF 和 EGF 的无血清培养基从低温保存的流产儿成功分离培养出脊髓神经干细胞, 细胞以悬浮的神经球方式生长, 并且能够连续传代; 神经球绝大部分细胞呈 nestin (未分化的神经上皮细胞的标志)阳性, 也就是说神经球是由未分化的细胞构成; 原代和传代培养中的神经球均能分化成 MAP2 阳性神经元和 GFAP 阳性星形胶质细胞; 在克隆培养中, 单个细胞能够形成与原代神经球特性相同的神经球, 这更有力地说明本实验分离得到的细胞是神经干细胞。因此本研究首次证明了从低温保存的流产儿能够分离培养出脊髓神经干细胞。

中枢神经系统在缺血和缺氧时很快就会出现不可逆性病理改变<sup>[17]</sup>, 本研究从低温保存的流产儿分离培养出脊髓神经干细胞, 说明在胎儿死亡及死后的保存过程中仍有神经干细胞存活。在一个类似的研究中, Xu 等<sup>[12]</sup>从 4°C 保存的新生及成年大鼠的尸体分离得到 SVZ 区神经干细胞, 甚至在死亡 6 d 后仍可从新生鼠尸体分离得到神经干细胞, 他们发现在动物死后, SVZ 区仍有细胞摄取 BrdU, 并有大量 nestin 阳性细胞, 这些细胞都位于血管床的附近, 因此 Xu 等认为动物死后干细胞正是从这些血

管床摄取营养，存活下来，因而才能够进行分离培养。除了SVZ区神经干细胞，Laywell等<sup>[10]</sup>从4℃保存6d的成年小鼠尸体分离得到脊髓神经干细胞，同时证明4℃保存比室温保存效果好。我们推测成鼠脊髓神经干细胞在动物死后仍能够存活的原因：(1)成年哺乳动物脊髓的神经干细胞是室管膜细胞或软膜下的星形胶质细胞<sup>[18,19]</sup>，动物死后干细胞浸泡在脑脊液中，可从中获取营养；(2)干细胞的代谢率低<sup>[20]</sup>。本研究中，脊髓神经干细胞的成功分离培养也可能因为干细胞能够从脑脊液中获取营养，以及低温造成的低代谢共同促使干细胞在胎儿死后得以继续存活。从保存12h的流产儿分离得到的神经球数量明显减少，说明随着死后时间的延长有更多的脊髓神经干细胞死亡。

在2、6和12h组中腰骶段分离出的神经干细胞明显多于颈段和胸段，说明腰骶段脊髓中有更多细胞对bFGF和EGF有反应性或者在保存过程中存活下来。值得一提的是，这种趋势与成鼠脊髓神经干细胞分离培养的情况类似<sup>[13]</sup>。

如前所述，无论是在不同脊髓节段分离的神经干细胞，还是在死亡后不同保存时间分离的神经干细胞都具有相似的克隆形成能力和分化潜能，因此我们可以认为：(1)颈段、胸段和腰骶段分离的神经干细胞本质上是同一种细胞；(2)流产儿保存时间的长短不影响神经干细胞的性质，这与鼠尸体神经干细胞研究的情况类似<sup>[12]</sup>。

为了用替代方法治疗有神经元损伤的病人，如何使神经干细胞向特定类型神经元定向分化一直是当前神经生物学领域的挑战之一。在本研究中分离培养的神经干细胞能够分化成脊髓的神经元类型之一，即胆碱能神经元，说明这些干细胞也具有治疗脊髓损伤或其它神经元疾病的潜能。

比较从胚胎期、新生儿期、婴幼儿期及成年期尸体分离培养(死亡后相同的时间分离)的神经干细胞，发现胚胎期分离的神经干细胞具有更强的增殖能力<sup>[7,9,12]</sup>；从老龄动物尸体分离的神经干细胞增殖到最高神经球密度需要更长的时间<sup>[12]</sup>，人尸体神经干细胞的分离培养中也发现供体的年龄对神经干细胞的增殖与分化潜能有重要的影响<sup>[7]</sup>；并且成体神经干细胞在体外培养的传代能力有限，长期体外培养也不能产生足够数量的神经元<sup>[5]</sup>。因此，从低温保存流产儿成功分离培养出脊髓神经干细胞为实验和治疗应用提供了新的细胞来源。

## 参考文献

- 1 Cao Q, Benton RL, Whitemore SR. Stem cell repair of central nervous system injury. *J Neurosci Res* 2002; 68(5): 501-510.
- 2 Björklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000; 3: 537-544.
- 3 Watt FM, Hogan BL. Out of eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287: 1427-1430.
- 4 Stavridis MP, Smith AG. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 45-49.
- 5 Galvin KA, Jones DG. Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system. *Med J* 2002; 177(6): 316-318.
- 6 Klassen H, Ziaieian B, Kirov II, Young MJ, Schwartz PH. Isolation of retinal progenitor cells from post-mortem human tissue and comparison with autologous brain progenitors. *J Neurosci Res* 2004; 77: 334-343.
- 7 Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 2001; 411: 42-43.
- 8 Roisen FJ, Klueber KM, Lu CL, Hatcher LM, Dozier A, Shields CB, Maguire S. Adult human olfactory stem cells. *Brain Res* 2001; 890: 11-22.
- 9 Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ, Su H, O'Dowd DK, Klassen H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res* 2003; 74: 838-851.
- 10 Laywell ED, Kukekov VG, Steindler DA. Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted postmortem intervals. *Exp Neurol* 1999; 156(2): 430-433.
- 11 Laywell ED, Kukekov VG, Suslov O, Zheng T, Steindler DA. Production and analysis of neurospheres from acutely dissociated and postmortem CNS specimens. *Methods Mol Biol* 2002; 198: 15-27.
- 12 Xu Y, Kimura K, Matsumoto N, Ide C. Isolation of neural stem cells from the forebrain of deceased early postnatal and adult rats with protracted post-mortem intervals. *J Neurosci Res* 2003; 74(4): 533-540.
- 13 Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 1996; 16(23): 7599-7609.
- 14 Milner LD, Landmesser LT. Cholinergic and GABAergic inputs drive patterned spontaneous motoneuron activity before target contact. *J Neurosci* 1999; 19: 3007-3022.
- 15 Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichstall P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi

- AL. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 1996; 16: 1091-1100.
- 16 Reynolds BA, Weiss S. Clonal and populations analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic precursor is a stem cell. *Dev Biol* 1996; 175: 1-13.
- 17 Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 127-136
- 18 Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96(1): 25-34.
- 19 Shibuya S, Miyamoto O, Auer RN, Itano T, Mori S, Norimatsu H. Embryonic intermediate filament, nestin, expression following traumatic spinal cord injury in adult rats. *Neuroscience* 2002; 114(4): 905-916.
- 20 Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 1994; 13(5): 1071-1082.