



论 文

恒河猴骨髓干细胞诱导分化为胆碱能神经元

祁颖^①, 张凤妍^②, 宋革^①, 孙雪荣^①, 江儒章^①, 陈梦飞^①, 葛坚^{①*}

① 中山大学眼科中心国家重点实验室, 广州 510060;

② 郑州大学第一附属医院眼科, 郑州 450052

* 联系人, E-mail: gejian@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2009-07-19; 接受日期: 2009-09-29

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB512207)和国家自然科学基金(批准号: 30600695/C030309)资助项目

摘要 本研究旨在寻找有效的恒河猴骨髓干细胞向胆碱能神经元分化的诱导方案. 诱导分为 4 个组: 基础诱导组、SHH 诱导组、RA 诱导组、SHH+RA 诱导组. 基础诱导组由细胞培养液和 Forskolin 组成. SHH 诱导组是在基础诱导组加入 SHH. RA 诱导组是在基础诱导组加上 RA. SHH+RA 诱导组是在基础诱导组加入 SHH 和 RA. 4 个诱导组均使细胞呈现神经细胞形态, 均使 nestin, neuronspecific nuclear protein 的 mRNA 水平增高. 基础诱导组不表达 synapsin. SHH 组不能使细胞呈现神经元静息膜电位水平. RA 诱导组和 SHH+RA 诱导组能使细胞呈现神经细胞静息膜电位水平. SHH+RA 组表达更多的 synapsin. 可见 SHH+RA 是各组中诱导效率最好的.

关键词骨髓干细胞
神经分化
恒河猴

骨髓干细胞能够高效安全地分化为其他组织细胞, 并且它的应用不受伦理道德的限制, 因而越来越受到人们的关注. 目前骨髓干细胞已经能够分化为成骨细胞^[1]、脂肪细胞^[2]、软骨细胞^[2]和神经细胞. 骨髓干细胞向神经细胞分化的能力引起了人们的关注. 目前报道了多种将骨髓干细胞分化为神经细胞的方法, 包括化学方法^[3]、细胞因子^[4]、化学物质和细胞因子^[5], 与神经组织或细胞共培养^[6,7]和转染加细胞因子^[8].

Forskolin(腺苷酸环化酶活性刺激剂)增加了细胞内环磷酸腺苷浓度, 环磷酸腺苷在神经细胞分化的过程中起着重要的作用. 碱性成纤维细胞能够帮助神经细胞生存并刺激其生长. Sonic hedgehog(SHH)是一种分泌型形态素^[9], 决定脊椎动物腹侧神经元分化特征, 同时是一种有丝分裂原, 调节神经干细胞增殖和促进胚胎与成人脑的生长^[10,11]. 维甲酸(retinoid acid, RA)能够诱导骨髓干细胞表达神经细胞标志^[12].

SHH和RA能够协同使小鼠骨髓干细胞诱导分化为谷氨酰胺能感觉神经元^[13]. 在本实验中将不同的诱导分化剂以不同的方式组合起来, 尝试找出一种最好的诱导分化方案.

恒河猴是与人类遗传关系最近的物种之一, 在医学研究中已经成为一种重要的研究工具. 本研究观察了恒河猴骨髓干细胞生长特点和神经分化过程.

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用恒河猴年龄为 1~3 岁, 所有的动物操作程序符合国家重点实验室动物管理委员会制定的操作规程.

1.2 细胞培养

利用氯胺酮和利多卡因局部麻醉恒河猴后, 从胫骨或股骨处抽取 5~10 mL 骨髓液, 注射器事先抽取 6000 U 肝素. 用 ficoll-paque plus(GE Healthcare)密度

梯度离心法分离单核细胞。细胞在加入10%胎牛血清(Gibco)低糖DMEM(L-DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA)培养液中培养, 置于37℃ 5% CO₂培养箱。培养3天, 移去漂浮细胞。培养5天后用0.25%胰蛋白酶溶液消化传代细胞于新的培养瓶。用血细胞计数器计数细胞, 细胞倍增时间的计算公式是: $TD(h)=t \times \log 2 / (\log NT - \log N_0)$ 。TD为细胞倍增时间, t 为细胞培养时间, LogNT和LogN₀分别指细胞培养开始和结束时的细胞数。

1.3 流式细胞技术

骨髓干细胞用0.25%胰蛋白酶溶液传代后, 以 2×10^6 个/mL密度重悬于含有中性磷酸盐缓冲溶液(PBS)的反应管中。骨髓干细胞用4%冷多聚甲醛固定30 min后, 用含有2%胎牛血清PBS冲洗。细胞分别于不同的一抗4℃孵育过夜。本实验中所用的一抗包括: 鼠抗人细胞CD29(1:1000, BD生物科学, 目录号557059), 鼠抗人CD34(1:1000, BD生物科学, 目录号550619)和鼠抗人CD45(1:1000, BD生物科学, 目录号557059)。样品用流式细胞仪^[4]检测。数据分析使用flow cytometry Express软件。

1.4 诱导分组

收集第3~8代的骨髓干细胞, 以 5×10^4 个/mL细胞密度种植于包被有多聚赖氨酸(Sigma公司)的6孔板上, 加入不同的诱导液: (1) 基础诱导液: 培养液, 50 μmol/L Forskolin(Sigma); (2) SHH诱导组: 250 ng/mL Sonic hedgehog(SHH)(R&D Systems)和基础诱导液; (3) RA诱导组: 0.5 μmol/L all-trans retinoic acid(RA)(Sigma, USA)和基础诱导液; (4) SHH+RA诱导组: 250 ng/mL Sonic hedgehog(SHH)(R&D Systems)、0.5 μmol/L all-trans retinoic acid(RA)(Sigma, USA)和基础诱导液。

1.5 免疫细胞化学和免疫荧光

细胞用4%多聚甲醛室温下固定10 min, PBS清洗3次。1% Triton X-100(体积比)室温渗透15 min, PBS清洗3次。室温下含3%兔血清的PBS阻断非特异性结合。细胞4℃过夜孵育一抗后, 室温2 h进行检测。本实验中所用到的一抗及其稀释浓度如下: 小鼠抗nestin(1:1000, Chemicon, 美国), 小鼠抗neurons-

pecific nuclear protein(NSE)(1:1000, Chemicon, 美国), 小鼠抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP, 1:1000, Millipore), 突触素(小鼠单克隆抗体, Boster, 中国), 5羟色胺(5-HT, 1:300, 兔多克隆抗体, Boster, 中国), 乙酰胆碱酯酶(AChE, 1:300, 兔多克隆抗体, Boster, 中国), 谷氨酸(1:300, 兔多克隆抗体, Boster, 中国), γ-氨基丁酸(γ-氨基丁酸, 1:300, 兔多克隆抗体, Boster, 中国), 酪氨酸羟化酶(TH, 1:300, 兔多克隆抗体, Boster, 中国)。PBS清洗3次后, 细胞二抗在室温下孵育2 h, 本实验所应用的二抗有: 驴抗小鼠IgG抗体 Alexa Fluor 488(1:1000, invitrogen, 美国), 多克隆绵羊抗小鼠免疫球蛋白 cy3(1:100, sigma, 美国), 驴抗兔IgG抗体 Alexa Fluor 594 (1:1000, invitrogen, 美国)。暗室室温下 DAPI(4,6'-diamidino-2-p-henylindole; Chemicon; 1:1000)孵育细胞5 min。阴性对照用PBS代替一抗, 细胞在激光共聚焦或荧光显微镜下检测。结果用Image Pro Plus软件进行分析。

1.6 实时定量PCR

根据厂商提供的协议使用 Trizol(TaKaRa, 广州, 中国), 从细胞中提取总RNA。使用RNA的随机引物和AMV逆转录酶合成cDNA。使用LightCycler DNA Master SYBR green I kit(LightCycler, Roche Diagnostics)和LightCycler系统进行实时定量PCR, 管家基因使用glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)作为内参对照。用相对C_T原理定量基因表达, 将基因表达的C_T值与GAPDH的C_T值对比计算相对基因表达量。然后再比较诱导后细胞与骨髓干细胞C_T值的区别。用Primer Premier(Premier Biosoft International, Palo Alto, CA)软件设计引物, 本实验中所应用的引物见表1。

1.7 电压敏感荧光染料检测细胞膜电位水平

Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxonol (DiBAC4(3))激发波长493 nm, 发射波长516 nm (Molecular Probes, 美国)是检测细胞膜电位水平的电压敏感荧光染料。DiBAC4(3)荧光强度可以粗略半定量估计细胞膜静息电位水平^[15]。超极化导致细胞内染料排出荧光强度下降, 去极化导致染料流入细胞内荧光强度增加。DiBAC4(3)溶解于丙酮中, 储存浓度1

表 1 本实验所用 PCR 序列

基因	引物
<i>nestin</i>	Sense 5'-AGGGCACCATTCTCATCAAC-3' Antisense 5'-TAGAGCAGCTGCGAGTACCA-3'
<i>NSE</i>	Sense 5'-ACAAACTCCTGGTGTGCAAAACC-3' Antisense 5'-CTTTGTCGTGGACCCATTCT-3'
<i>SOX2</i> ^{a)}	Sense 5'-GGGAGGCTACTTCCTCATCC-3' Antisense 5'-GGCAGCTGAAGGTAATGAGC-3'
<i>GAPDH</i>	Sense 5'-GTGTCACCGGGACAAGAACT-3' Antisense 5'-CGTCAGCGGTAGCTCTCAG-3'

a) *SOX2*: *SRY* 基因(性别决定区 Y)2

mg/L. 使用时, 将其加入细胞培养液中, 终浓度为 10 μ g/mL. 室温下放置 20 min 后进行荧光检测. 照射条件是强汞灯, 150 W, 曝光时间 5 s. 结果分析使用 Image Pro Plus 软件.

1.8 统计学分析

所有的实验至少重复 3 次. 描述性统计结果包括平均数 $\pm$ 标准误. 两组或者多组之间的统计学差异用 *F* 方差分析后用 Student's *t*-test 或者 ANOVA 单因素方差分析. *P*<0.05 和 *P*<0.001 代表有统计学意义.

2 结果

2.1 骨髓干细胞的形态学特点和细胞表面抗原表达

恒河猴骨髓干细胞首先被分离后培养, 原代细胞生长较慢, 并以克隆的形式进行生长, 如箭头所示(图 1(A)). 这些细胞可以被用于传代. 在进行一次或两代传代后, 骨髓干细胞在形态表现上趋于一致, 类似纺锤体型(图 1(B)). 这些细胞在前 3 天繁殖较慢, 在随后 3~4 天增殖较快. 在第 1, 5, 10 代细胞中都观察到这种现象. 第 1, 5, 10 代细胞的增殖时间分别为 (76.4 $\pm$ 1.23), (77.5 $\pm$ 3.86)和(84.4 $\pm$ 4.51) h. 骨髓干细胞高度表达 CD29(98.99 $\pm$ 5.34)%, 极少表达 CD34(0.12 $\pm$ 1.38)%和 CD45(0.44 $\pm$ 1.34)%(图 1(C)).

2.2 不同的诱导方案诱导骨髓干细胞

(1) 不同的诱导方案诱导骨髓干细胞后形态学变化. 在所有的诱导组中, 骨髓干细胞的细胞质都朝着核的方向收缩, 形成多极细胞形态, 旁边有触

突一样的结构伸出. 形成典型的神经细胞形态(图 2(A)~(D)).

(2) 实时定量 PCR 检测诱导后细胞基因表达水平. 检测了诱导前后细胞表达 *nestin*, *SOX2* 和 *NSE* 的 mRNA 水平. 在所有的诱导组中, *nestin*, *SOX2* 和 *NSE* 的 mRNA 水平都有所增加. 与骨髓干细胞相比诱导后细胞所表达的 *nestin*, *SOX2* 和 *NSE* 的 mRNA

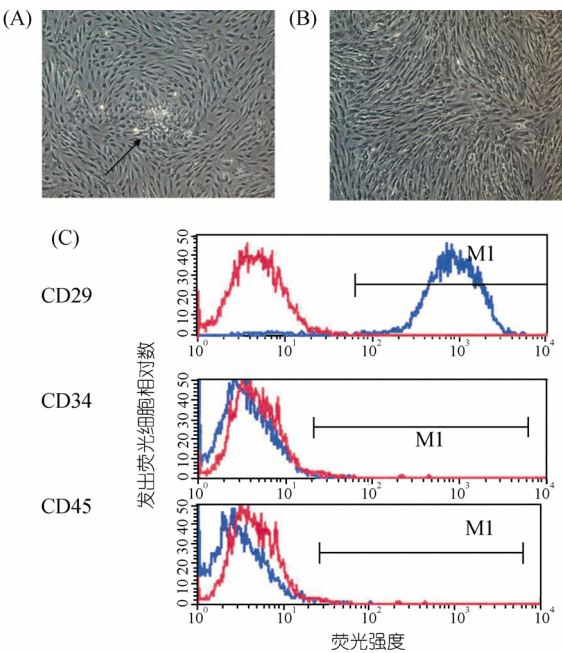


图 1 恒河猴骨髓干细胞特点

(A) 第 1 代细胞, 箭头表示细胞克隆形成, $\times 50$; (B) 第 3 代细胞, 细胞显示纺锤体形状, $\times 50$; (C) 骨髓干细胞表面抗原流式结果

水平比诱导前增加了数倍. 在 SHH+RA 诱导组, nestin 的表达量增加了 5 倍, NSE 的表达量增加了 6 倍多(图 3).

(3) 诱导后神经细胞抗原表达的改变. 检测了所有诱导组的神经细胞标志. 在基础诱导组中, 几乎检测不到 nestin, GFAP 和 synapsin 的表达. 在 SHH, RA 和 SHH+RA 诱导组中, nestin 的阳性表达率分别是 $(35.2 \pm 2.56)\%$, $(55.8 \pm 2.37)\%$ 和 $(73.3 \pm 3.58)\%$. 神经胶质细胞标志 GFAP 的阳性表达率在 SHH, RA, SHH+RA 诱导组中分别是 $(1.41 \pm 1.46)\%$, $(1.62 \pm 1.15)\%$ 和 $(0.74 \pm 1.16)\%$. 在基础, SHH, RA 和 SHH+RA 诱导组, NSE 的阳性表达率分别是 $(58.2 \pm 2.96)\%$, $(82.9 \pm 5.73)\%$, $(95.7 \pm 4.21)\%$ 和 $(96.8 \pm 6.63)\%$. 成熟神经元结构突触相关抗原 synapsin 的阳性表达率在 SHH, RA 和 SHH+RA 诱导组分别是 $(23.7 \pm 2.46)\%$, $(58.6 \pm 3.71)\%$ 和 $(98.9 \pm 4.55)\%$ (图 4).

(4) 不同诱导组中神经递质的表达. 检测了神经系统内主要的神经递质, 包括 5-羟色胺、乙酰胆碱、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸和酪氨酸羟化酶. 基础诱导组不表达任何神经递质. 这里只显示其他 3 个诱导组的结果.

在 SHH, RA 和 SHH+RA 诱导组中, 5-羟色胺的阳性表达率是 $(1.58 \pm 0.72)\%$, $(10.34 \pm 2.35)\%$ 和 $(20.23 \pm 3.54)\%$. 所有的诱导组都不表达谷氨酰胺. γ -氨基丁酸在 SHH, RA 和 SHH+RA 诱导组的阳性表达率分别是 $(1.21 \pm 0.84)\%$, $(7.51 \pm 2.83)\%$ 和 $(3.76 \pm 1.04)\%$. 在 SHH, RA 和 SHH+RA 诱导组, 乙酰胆碱的阳性表达率分别是 $(45.8 \pm 4.76)\%$, $(87.69 \pm 8.81)\%$ 和 $(94.32 \pm 5.63)\%$ (图 5).

(5) 膜电位敏感荧光染料 DiBAC4(3) 检测诱导后细胞膜静息电位水平. 荧光染料强度下降的百分比见表 2. 在第 7 和 14 天, RA 和 SHH+RA 诱导组能够使荧光强度下降 15%~20%. 以前的研究表明^[16], 骨髓干细胞静息膜电位水平是 -50 mV. DiBAC4(3) 所产生的荧光强度每下降 1%, 表示细胞膜电位水平下降 1 mV. 因此可以推断, 在 RA 和 SHH+RA 诱导组中, 诱导后的细胞静息膜电位水平大致在 -65 ~ -70 mV, 近似于成熟神经细胞的静息膜电位水平^[17].

3 讨论

作为重要的实验动物之一, 恒河猴已被应用到许多基础研究. 有研究揭示了恒河猴骨髓干细胞的一些

特点. 有报道, 通过灌注法采集的恒河猴骨髓干细胞比抽吸法所取得的细胞纯度高、成活率高^[18], 所以有学者建议, 通过灌注法采集恒河猴骨髓干细胞. 但是灌注法对动物造成的伤害较大, 本实验依然采用传统的抽吸法收集细胞. 实验结果表明, 这种方法也可以取得纯度较高的细胞, 且可以传至 15 代.

把 forsokin 加入到培养液中作为基础诱导组. 基础诱导组可以使骨髓干细胞显示神经细胞形态, 表达未成熟神经细胞标志, 但是不表达成熟神经细胞标志, 例如突触素. 这说明基础诱导组不是一个成功的神经诱导方案.

SHH 是 hedgehog 信号分子家族的成员之一. SHH 是有脊索和底板分泌的信号蛋白质. 最初认为它的主要作用是负责中枢神经系统的背腹形成^[19], 后来的研究表明 SHH 涉及到了更广泛的生物活动过程, 包括胚胎形成和成人的活动神经过程. 所有的 hedgehog 信号家族分子都是通过相同的信号通路起作用的. 此信号通路是首先激活 Patched1(Ptc1)受体和 Smoothened(Smo)受体, 然后激活 Gli 转录因子^[20]. Kondo 等人^[21]报道, SHH 能够使小鼠骨髓干细胞呈现神经细胞形态和表达神经干细胞标志. 本实验中 SHH 诱导组能够使恒河猴骨髓干细胞呈现神经细胞形态, 表达神经干细胞标志, 同时表达成熟神经细胞标志突触素. 说明本实验支持其他学者的研究结果. 但因为 SHH 诱导组不能使细胞呈现成熟神经元静息膜电位水平, 所以 SHH 诱导组也不是一个成熟的神经细胞诱导方案.

RA 是由轴旁中胚层分泌的神经分化调节因子^[22], RA 通过它的受体 RARa 和 RARb 起作用^[23]. Sanchez-Ramos 等人^[5]报道, 把 RA、表皮生长因子(EGF)和脑源生长因子(BDNF)组合在一起诱导小鼠和人的骨髓干细胞, 细胞可以表达特定的神经细胞标志, 如 nestin 和 NSE. Kim 等人^[24]和 Jin 等人^[25]研究发现, RA、碱性成纤维细胞生长因子和神经生长因子一起可以使细胞表达神经细胞标志, 例如神经纤维蛋白和神经细胞微管蛋白. 本研究中, RA 诱导组也显示了比较强的神经分化能力, RA 诱导组可以使骨髓干细胞表达成熟的神经元标志和乙酰胆碱神经递质, 并能使诱导后的细胞呈现成熟神经元静息膜电位水

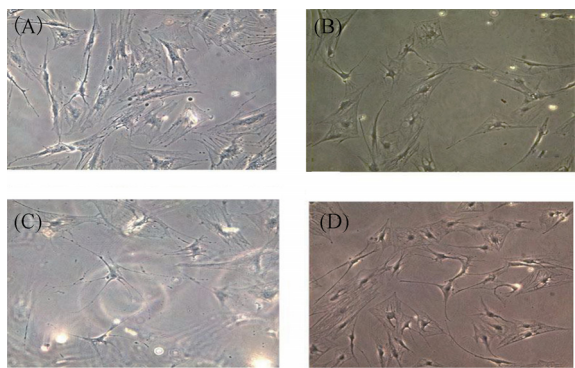


图 2 骨髓干细胞在不同的诱导方案中都形成了神经细胞样形态
(A) 基础诱导组; (B) SHH 诱导组; (C) RA 诱导组; (D) SHH+RA 诱导组. $\times 100$

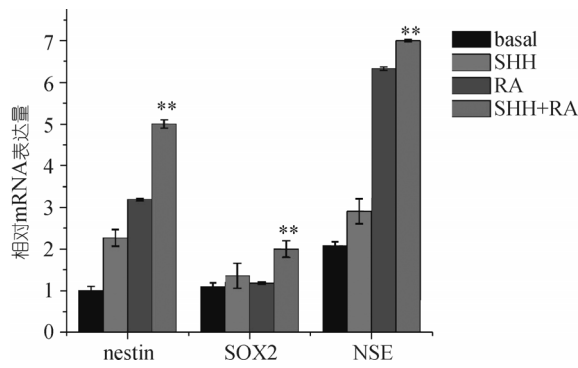


图 3 实时定量 PCR 显示了诱导前后基因表达水平的变化
**, $P < 0.001$

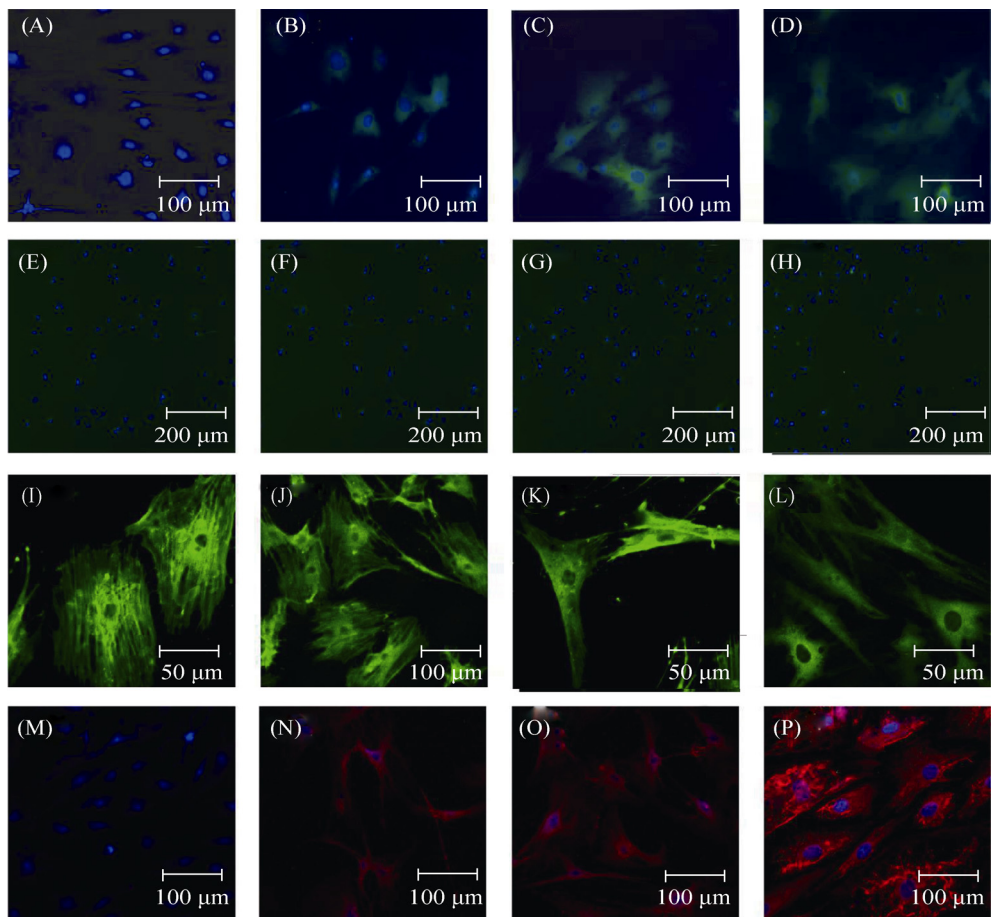


图 4 诱导前后神经细胞标志的表达
(A)~(D) nestin; (E)~(H) GFAP; (I)~(L) NSE; (M)~(P) synapsin. (A), (E), (I), (M) 基础诱导组; (B), (F), (J), (N) SHH 诱导组; (C), (G), (K), (O) 为 RA 诱导组; (D), (H), (L), (P) 为 SHH+RA 诱导组

表 2 不同诱导组免疫荧光强度的下降^{a)}

	基础诱导组	SHH 诱导组	RA 诱导组	SHH+RA 诱导组
第 1 天	-	-	+	++
第 7 天	-	+	+++	+++
第 14 天	-	+	+++	+++

a) -: <5%下降; +: 5%~10%下降; ++: 10%~15%下降; +++: 15%~20%下降

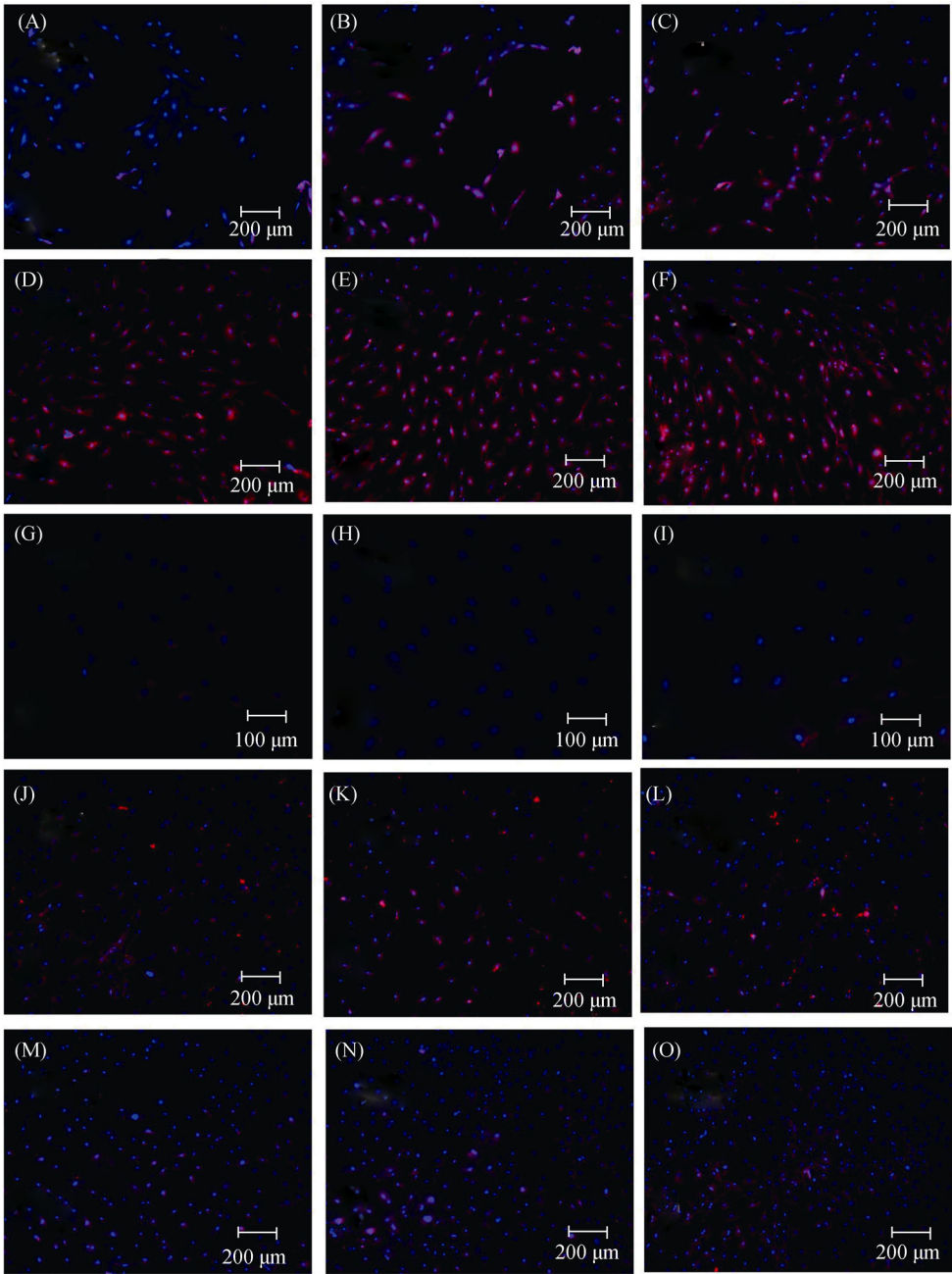


图 5 不同诱导组表达神经递质的免疫检测结果

(A)~(C) 5-羟色胺; (D)~(F) 乙酰胆碱; (G)~(I) 谷氨酰胺; (J)~(L) γ -氨基丁酸; (M)~(O) 酪氨酸羟化酶. (A), (D), (G), (J), (M) SHH 诱导组; (B), (E), (H), (K), (W) RA 诱导组; (C), (F), (I), (L), (O) SHH+RA 诱导组

平. 而 SHH+RA 诱导组不但能够诱导细胞呈现神经细胞形态, 表达神经细胞标志和乙酰胆碱神经递质, 而且呈现成熟神经元静息膜电位水平. SHH+RA 诱导组比 RA 诱导组能够使更多的细胞表达突触素, 所以 SHH+RA 诱导组是诱导能力最强的组合.

成熟的神经诱导方案包括合成和分泌神经递质. 主要的神经递质包括 5-羟色胺、乙酰胆碱、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸和酪氨酸羟化酶. 一些研究表明其能够完成细胞向多巴胺神经元^[26], 羟胺神经元^[27], 氨基丁酸神经元^[28]的分化. 另有一些研究结果^[29]表明, 其能够使胚胎干细胞分化为胆碱能神经前体细胞. 本研究结果表明, RA 和 SHH+RA 诱导组能够使恒河猴骨髓干细胞分化为胆碱能神经元.

在 RA 和 SHH+RA 诱导组, 诱导后的细胞表现出的静息膜电位水平为 $-65 \sim -70$ mV, 这与成熟神经元静息膜电位水平接近, 说明本诱导方案使细胞具备

了部分电生理功能. 这为进一步诱导有功能的胆碱能神经元及临床治疗提供了研究思路, 例如神经系统疾病, 尤其是神经肌肉接头处疾病的治疗, 该诱导方案可以提供种子细胞.

4 结论

本研究观察了恒河猴骨髓干细胞的形态学特点, 并发现它们高表达间充质干细胞标志, 低表达血祖细胞标志. 基础诱导组使骨髓干细胞呈现神经细胞形态, 表达未成熟神经细胞标志. SHH 诱导组使细胞表达成熟神经细胞标志, 但不表达神经递质. RA 和 SHH+RA 诱导组能够使骨髓干细胞表达成熟神经元标志, 神经递质和呈现神经元静息膜电位水平. 因为 SHH+RA 比 RA 诱导组能够使细胞表达更多的突触素, 所以 SHH+RA 诱导组是诱导能力最强的组.

参考文献

- 1 Titorencu I J V, Constantinescu E, Gafencu A V, et al. Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells. *Cytotherapy*, 2007, 9: 682—696[DOI]
- 2 Pittenger M F M A, Beck S C, Jaiswal R K, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143—147[DOI]
- 3 Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000, 61: 364—370[DOI]
- 4 Jiang Y H, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418: 41—49[DOI]
- 5 Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol*, 2000, 164: 247—256[DOI]
- 6 Wislet-Gendebien S, Leprince P, Moonen G, et al. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci*, 2003, 116: 3295—3302[DOI]
- 7 Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells*, 2005, 23: 392—402[DOI]
- 8 Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*, 2004, 113: 1701—1710
- 9 Briscoe J, Pierani A, Jessell T M, et al. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*, 2000, 101: 435—445[DOI]
- 10 Britto J, Tannahill D, Keynes R. A critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 103—110[DOI]
- 11 Lai K, Kaspar B K, Gage F H, et al. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nat Neurosci*, 2003, 6: 21—27[DOI]
- 12 Greco S J, Zhou C, Ye J H, et al. An interdisciplinary approach and characterization of neuronal cells transdifferentiated from human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2007, 16: 811—826[DOI]
- 13 Kondo T J S, Yoder M C, Romand R, et al. Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 4789—4794[DOI]
- 14 Choi C B, Cho Y K, Prakash K V, et al. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells.

- Biochem Biophys. Res. Commun., 2006, 350: 138—146
- 15 Yamada A N G, Ohya S, Muraki K, et al. Usefulness and limitation of DiBAC₄(3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in HEK293 cells. *Jpn J Pharmacol*, 2001, 86: 342—350 [\[DOI\]](#)
- 16 Heubach J F, Leutheuser J, Bock M, et al. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol*, 2004, 554: 659—672 [\[DOI\]](#)
- 17 Schmidt-Hieber C JP, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 2004, 429: 184—187 [\[DOI\]](#)
- 18 Kushida T, Inaba M, Ikebukuro K, et al. Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeys at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT. *Stem Cells*, 2002, 20: 155—162 [\[DOI\]](#)
- 19 Marti E, Bovalenta P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci*, 2002, 25: 89—96 [\[DOI\]](#)
- 20 Ho K S, Scott M P. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*, 2002, 12: 57—63 [\[DOI\]](#)
- 21 Kondo T, Johnson S A, Yoder M C, et al. Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 4789—4794 [\[DOI\]](#)
- 22 Clagett-Dame M, McNeill E M, Muley P D. Role of all-Trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J Neurobiol*, 2006, 66: 739—756 [\[DOI\]](#)
- 23 Dmetrichuk J M, Carlone R L, Jones T R B, et al. Detection of endogenous retinoids in the molluscan CNS and characterization of the trophic and tropic actions of 9-cis retinoic acid on isolated neurons. *J Neurosci*, 2008, 28: 13014—13024 [\[DOI\]](#)
- 24 Kim B J, Seo J H, Bubien J K, et al. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells *in vitro*. *Neuroreport*, 2002, 13: 1185—1188 [\[DOI\]](#)
- 25 Jin K L, Mao X O, Bateau S, et al. Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression. *Exp Neurol*, 2003, 184: 78—89 [\[DOI\]](#)
- 26 Dezawa M K H, Hoshino M, Cho H, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*, 2004, 113: 1701—1710
- 27 Kumar M, Kaushalya S K, Gressens P, et al. Optimized derivation and functional characterization of 5-HT neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 2009, 18: 615—627 [\[DOI\]](#)
- 28 Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, et al. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 909—916 [\[DOI\]](#)
- 29 Lee H S G, Elkabetz Y, Schofield C M, et al. Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells*, 2007, 25: 1931—1939 [\[DOI\]](#)