

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01231

小鼠孤雌胚胎干细胞的建立及其向运动神经元分化的初探

王振东^{1,2}, 薛媛¹, 单智焱¹, 郑重¹, 李雪¹, 吴嫣爽¹, 孙瑞珍¹, 石健¹, 李明杰¹, 刘忠华², 雷蕾¹

1. 哈尔滨医科大学组织学与胚胎学教研室, 哈尔滨 150081;
2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

摘要: 文章采用小鼠的孤雌囊胚建立胚胎干细胞系, 探究其向运动神经元分化的可能, 为临床治疗以及研究基因组印记与神经分化的关系提供理论基础。结果表明: 卵母细胞孤雌激活率达到 93.26%, 成功建立了 8 个孤雌胚胎干细胞系, 建系率达到 23.53%。克隆表达多潜能标记 Oct4 及细胞表面标记 SSEA-1, 有高水平的碱性磷酸酶活性, 在细胞第 10 代和第 30 代时核型分析检测显示为正常的 40 条染色体。体内、外均分化出三胚层来源的细胞。联合应用全反式维甲酸(RA)、音猬因子(Shh)及细胞外基质, 小鼠孤雌胚胎干细胞可被诱导表达运动神经元的标志性标记 HB9、Olig2。

关键词: 孤雌胚胎干细胞; 印记基因; 运动神经元; 分化; 维甲酸; 音猬因子

Generation of mouse parthenogenetic embryonic stem cells and preliminary study of the differentiation ability to motor neurons

WANG Zhen-Dong^{1,2}, XUE Yuan¹, SHAN Zhi-Yan¹, ZHENG Zhong¹, LI Xue¹,
WU Yan-Shuang¹, SUN Rui-Zhen¹, SHI Jian¹, LI Ming-Jie¹, LIU Zhong-Hua², LEI Lei¹

1. Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China;
2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: In this study, we generated embryonic stem cells from parthenogenetic embryos (PESCs), and induced them to differentiate to motor neurons, which could be an alternative source of histocompatible cells for replacement of therapy and theoretical foundation for studying the relationship of genome imprint and neural differentiation. The parthenogenetic activation rate of B6D2F1 mouse oocytes was 93.26%. We established eight parthenogenetic embryonic stem cell lines and the establishment rate from parthenogenetic embryos was 23.53%. The pluripotency marker Oct4, the cell surface marker SSEA-1, and alkaline phosphatase exhibited in PESCs. Karyotype analysis showed normal 40 chromosomes when examined at passages 10 and 30, which was in accordance with their oocyte origins. Three germinal layers were differentiated in

收稿日期: 2011-01-25; 修回日期: 2011-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30871431, 31000645)资助

作者简介: 王振东, 硕士研究生, 专业方向: 发育生物学。Tel: 0451-86674518; E-mail: geraldon1122@yahoo.com.cn

通讯作者: 雷蕾, 博士, 教授, 研究方向: 干细胞与治疗性克隆。E-mail: leil086@yahoo.com.cn

刘忠华, 博士, 教授, 研究方向: 猪体细胞克隆技术与机理研究、转基因猪技术机理与应用、干细胞的培养与应用。E-mail: liu086@yahoo.com

网络出版时间: 2011-8-24 11:11:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110824.1111.006.html>

vivo and *in vitro*. Mouse PESC, which were treated by tretinoin and sonic hedgehog with extracellular matrix, could generate motor neurons that expressed the specific markers such as HB9 and Olig2.

Keywords: parthenogenetic embryonic stem cells; imprinted genes; motor neurons; differentiation; Tretinoin (RA); Sonic hedgehog (Shh)

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs)是来源于囊胚内细胞团(Inner cell mass, ICM)的具有自我更新和多潜能性的一类细胞。可以作为种子细胞应用于再生医学。但建立ESCs时破坏了胚胎的完整,因此研究和应用都受到伦理及法律等方面的制约。孤雌生殖是某些昆虫、低等脊椎动物的一种单性生殖方式,单个卵在没有精子参与的情况下可以发育成一个胚胎。从孤雌胚胎建立的孤雌胚胎干细胞(Parthenogenetic embryonic stem cells, PESC)具有与正常受精获得的胚胎干细胞相同的性质,同时不受伦理及法律的制约,可应用于组织修复、疾病治疗等医学领域^[1,2]。目前已成功建立了小鼠、兔、非人灵长类和人的PESC系^[1-5]。

胚胎干细胞可作为研究胚胎早期细胞谱系决定的体外模型。

体内脊髓运动神经元的发生有以下 3 个步骤:外胚层细胞的原始神经化;神经细胞的尾侧定位;尾侧定位的神经细胞的腹侧定位^[6,7]。这一过程是在一系列的信号调节下完成的。首先外胚层细胞在骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)、成纤维生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)和 WNT 信号的调节下形成原始的头侧神经元前体^[7];尾侧的信号,如全反式维甲酸(Tretinoin, RA),为头侧神经元前体提供了在脊髓上的定位^[8];之后腹侧信号音猬因子(Sonic hedgehog, Shh)诱导脊髓的神经前体细胞形成运动神经元前体。运动神经元前体的诱导依赖于 Shh 的活性,高水平的 Shh 信号可诱导细胞表达运动神经元前体特征性的同源结构域和碱性螺旋-环-螺旋蛋白^[9]。

目前 ESCs 有两种神经诱导分化的方法:一种是利用 RA 等小分子物质进行诱导^[10],另一种是有诱导活性的基质细胞系 PA6 作为神经诱导物进行共培养^[11,12]。我们前期利用第一种方法,通过模拟体内运动神经元分化的过程,添加 RA、Shh 并经基质程序

性作用获得了由 ESCs 分化的脊髓运动神经元^[13]。运动神经元病是运动神经元(Motor neuron)选择性变性导致进行性肌无力和死亡,目前尚无有效治疗方法,利用 ESCs 分化为运动神经元进行替代治疗是一种可能的治疗方法^[14-16]。ESCs 来源于早期胚胎,某些细胞表面免疫相关蛋白(如组织相容性复合体,即 MHC)还未表达,移植治疗时的免疫排斥效应不大,易于通过 NK 细胞的识别而免于发生排斥反应^[17]。在本研究中,我们尝试使用外源性的 RA 和 Shh 小分子来诱导 PESC 分化形成运动神经元,为运动神经元病的干细胞治疗提供了良好的实验基础。

1 材料和方法

1.1 小鼠卵母细胞孤雌激活

6~8 w 龄雌性 B6D2F1 小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),自由采食饮水。腹腔注射 7.5 IU PMSG(宁波第二激素厂),48 h 后注射 5 IU hCG(宁波第二激素厂)。注射 hCG 13 h 后处死小鼠,收集 MII 期卵母细胞。预先配制激活液,在无 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 CZB 培养液中加入 10 mmol/L SrCl_2 (Sigma)和 5 $\mu\text{g/mL}$ 细胞松弛素 B(Sigma)。将卵母细胞放入激活液中 6 h 后放入 CZB 操作液中清洗,之后将孤雌胚胎移入 37℃、5% CO_2 的 KSOM 微滴中培养。

1.2 小鼠 PESC 的分离培养

利用酸性操作液去除孤雌囊胚透明带,并移至饲养层细胞上,37℃、5% CO_2 培养。其中,培养液采用含 20%(体积分数)Knockout™ 血清替代物(Invitrogen)的 Knockout™ D-MEM(Invitrogen),并加入白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF; Invitrogen)抑制分化。利用机械法分离细胞团并以 0.25% 胰酶消化传代,直到形成典型胚胎干细胞集落,改为常规胰酶消化传代。稳定传代后,改用常规胚胎干细胞培养液(含 10% 胎牛血清的高糖 D-MEM)培养。

1.3 小鼠 PSCs 特性的鉴定

1.3.1 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)活性的检测

将小鼠 PSCs 细胞接种到铺有明胶的盖玻片上培养 24 h, 按照 AKP 染色试剂盒(南京建成生物工程研究所)的操作说明进行检测。

1.3.2 细胞表面抗原的检测

将小鼠 PSCs 接种到铺有明胶的盖玻片上培养 24 h, 以 4%多聚甲醛常温固定 1 h, 免疫荧光染色观察多潜能细胞标记 Oct4 和 SSEA-1 的表达。

1.3.3 核型分析

0.25%胰酶消化后的细胞在 0.075 mol/L KCl 中 37℃低渗处理 15 min, 以甲醇:冰醋酸(3:1)于 4℃固定 20 min。将细胞悬液滴在-20℃预冷的载玻片上。晾干后以 Giemsa 染色 10 min, 在 100×物镜的油镜下对染色体标本观察、计数并拍照。

1.4 小鼠 PSCs 体内分化能力的检测

将含有 1×10^6 个 PSCs 的 100 μ L 细胞悬液注射到裸鼠的后肢及背部皮下, 4~6 w 后处死裸鼠, 收集畸胎瘤, 以 4%多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, H.E. 染色观察^[18]。

1.5 小鼠 PSCs 体外分化能力的检测

通过 EBs 的形成来检测 PSCs 的体外分化能力。将小鼠 PSCs 以 0.25%胰酶常规消化, 接种到低黏附的细菌培养皿中, 更换为 EBs 培养液(含 15%胎牛血清的高糖 D-MEM)进行培养, 隔天换液。10 d 后收集 EBs, 以 4%多聚甲醛室温固定、梯度蔗糖处理后, OCT 包埋, 做冰冻切片。免疫荧光染色观察 3 个胚层的分子标记的表达: 外胚层 Nestin 和 NF-L、中胚层 α -SMA 和 PECAM、内胚层 AFP。

1.6 小鼠 PSCs 向运动神经元诱导分化

小鼠 PSCs 形成 EBs 4 d 后, 在 EBs 培养液中加入 2 μ mol/L RA 培养 2 d, 之后添加 30 nmol/L Shh(R&D)继续培养 2 d, 将处理后的 EBs 放入预处理的 4 孔板中。预处理过程为: 在 4 孔板中加入添加 PLO(poly-L-ornithine, Sigma)基质的 D-MEM:F12(1:1)培养液孵育 4 d, 之后弃掉基质培养液并加

入 1 μ g/mL 层粘连蛋白(Laminin, Invitrogen)孵育 1 h, 弃液待用。EBs 以胰酶消化后接种到处理好的 4 孔板中。采用神经干细胞培养液, 即在等体积的 DMEM:F12 中加入神经细胞培养基(Neurobasal, Invitrogen)以及 1%N2、2%B27(N2 和 B27 均购于 Invitrogen), 每天换液。在 4 孔板中培养 11 d 后, 以 4%多聚甲醛室温固定, 免疫荧光染色观察是否含有神经元标记 Olig2、Tuj1 和 HB9 的表达; 并以基质处理组和 RA+基质处理组作为阴性对照组, 观察 Olig2 的表达。

1.7 印记基因和多潜能基因的 RT-PCR 分析

使用 Trizol 一步法分别从 PSCs、R1 胚胎干细胞、EBs 及小鼠胎儿成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast, MEF)中提取总 mRNA。取 1 μ g mRNA 经 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa)逆转录得到相应的 cDNA, 取上述 cDNA 为模版进行 PCR 扩增。引物序列、扩增片段长度、复性温度见表 1。

1.8 免疫荧光染色

按照常规的免疫荧光染色的方法操作。其中一抗分别采用鼠源单克隆抗体 Oct4、SSEA-1、NF-L、 α -SMA、PECAM、AFP 和 Olig2(Santa Cruz), Nestin(Chemical), Tuj1(碧云天生物技术研究), 山羊源单克隆抗体 HB9(Abcam); 二抗分别采用 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG, TRITC 标记的牛抗山羊抗体(Sigma)。核染料为 Hoechst33342(Sigma)。

1.9 统计数据及分析

实验数据经 Student *t*-检验进行统计学计算分析, $P < 0.05$ 为差异性有显著性意义, 所有数据用均数 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 小鼠 PSCs 的分离培养和传代

3 只雌性 B6D2F1 小鼠收集得到 89 枚 M 期卵母细胞, 分别置于 3 个微滴中激活并继续培养。SrCl₂ 法激活率为 93.26%, 囊胚率 92.77%。每只小鼠挑选 11~12 枚囊胚接种到饲养层上, 最终经鉴定得到 8 个 PSCs 细胞系(表 2)。

表 1 引物序列及复性温度

基因	引物序列(5'→3')	目的片段(bp)	复性温度(°C)
<i>Oct4</i>	F: CTGTAGGGAGGGCTTCGGGCACTT R: CTGAGGGCCAGGCAGGAGCACGAG	216	58
<i>Nanog</i>	F: ATGAGTGTGGGTCTTCCTGGTCC R: GACTCCACCAGGTGAAATATGA	918	62
<i>H19</i>	F: TGTA AACCTCTTTGGCAATGCTGCC R: TATTGATGGACCCAGGACCTCTGGT	200	55
<i>Igf2</i>	F: CGCCCTTCTCCTCCGATC R: CGCCCTTCTCCTCCGATC	110	60
<i>Peg3</i>	F: ATGTACCATCACGAAGACGACACC R: CTCGGCATCCTGGGATCGAGACTC	125	60
<i>Snrpn</i>	F: GCTGCTGTTGCTGCTACTGCTAGC R: GCAGTAAGAGGGGTCAAAAAGCTTGC	233	60
<i>Ndn</i>	F: CTCCTCTGCTGGTCTCCAC R: TCCTTCACCAACACGTACCA	435	61
<i>Igf2r</i>	F: CAGGTAGCGAAAAGTGGTAAAGT R: GCCTGGTCTGTTTCTGTGATTG	469	60
<i>Gtl2</i>	F: ACATGAACCTGTTTCCAGCC R: ATCCTGGGGTCCTCAGTCTT	381	60
<i>Ube3a</i>	F: TCGTTACGCTTCTCTTCCGT R: GGAGGGATGAGGATCACAGA	560	61
<i>GAPDH</i>	F: TGAAGGTCGGTGAACGGAT R: CAGGGGGCTAAGCAGTTGGT	980	60

表 2 小鼠孤雌激活率、PESCs 建系率

卵母细胞数	2-细胞数(%)	囊胚数	接种囊胚数	建系数(%)
89	83(93.26)	77(92.77)	34	8(23.53)

2.2 小鼠 PESCs 特性的鉴定

PESCs 在饲养层上呈现典型 ESCs 形态学特征,边缘光滑,与饲养层分界清晰,细胞间界限不清。细胞显示高水平的碱性磷酸酶活性。核型分析结果显示为 40 条。免疫荧光染色显示多潜能标记 Oct4 及小鼠胚胎干细胞表面标记 SSEA-1 的表达(图 1),实验结果表明,建立的 PESCs 具有 ESCs 特有的多能性以及正常二倍体核型的 40 条染色体。

2.3 小鼠 PESCs 体内分化能力的检测

将 PESCs 注射到裸鼠的后肢及背部皮下(图 2A)。2 w 内可形成畸胎瘤,6 w 后取畸胎瘤做组织学检测,显示其含有所有 3 个胚层的结构。其中,图 2B 为来源于外胚层的神经细胞,图 2C 为中胚层来源的血细胞,图 2D 为内胚层来源的黏液腺。实验结果表明,PESCs 在体内能够分化成三胚层来源的细胞。

2.4 小鼠 PESCs 体外分化能力的检测

体外诱导分化产生的 EBs 做冰冻切片,免疫荧光分析显示表达 3 个胚层的分子标记:外胚层 NF-L

和 Nestin,中胚层 α -SMA 和 PECAM,内胚层 AFP(图 3)。实验结果表明,PESCs 在体外能够分化成三胚层来源的细胞。

2.5 小鼠 PESCs 向运动神经元诱导分化

处理后的 EBs 接种到 PLO 基质上培养 2~3 d 后,发现能够贴附生长的 EBs 向外伸出大量上皮样细胞,而未贴壁的 EBs 不能进行分化。接种后 7 d,可观察到 EBs 周围有许多细长的突起。免疫荧光染色显示 EBs 表达神经元特异标记 *Tuj1*,同时也观察到了运动神经元标记 *HB9* 和 *Olig2* 的表达(图 4)。而只应用基质处理组和 RA+基质处理组中没有观察到运动神经元标记 *Olig2* 的表达。实验结果表明,联合应用 RA、Shh 及细胞外基质可以得到表达特异标记的运动神经元。

2.6 RT-PCR 分析

RT-PCR 结果显示,PESCs 的多潜能基因 *Oct4* 和 *Nanog* 表达水平与 R1 ESCs 系无显著差别。在 PESCs 中不仅检测到了母源表达的印记基因(*H19*、*Gtl2*、*Igf2r*、*Ube3a*),也检测到了父源表达的印记基因(*Igf2*、*Snrpn*、*Peg3*、*Ndn*)。PESCs、EBs 2d、EBs 8 d 分别与 R1 进行两两比较。PESCs 的印记基因 *H19*、*Igf2r*、*Igf2* 及 *Ndn* 表达量显著高于 R1;EBs 形成 8 d 时,*H19* 的表达量显著高于 R1(图 5)。

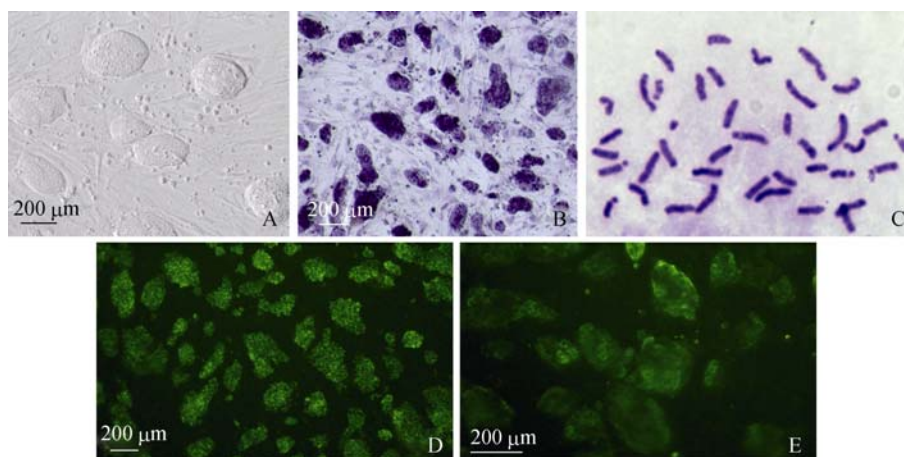


图 1 小鼠 PESC 特性的鉴定

A: PESC 形态学图片; B: AKP 活性染色; C: Giemsa 核型分析; D: Oct4 免疫荧光染色; E: SSEA-1 免疫荧光染色。

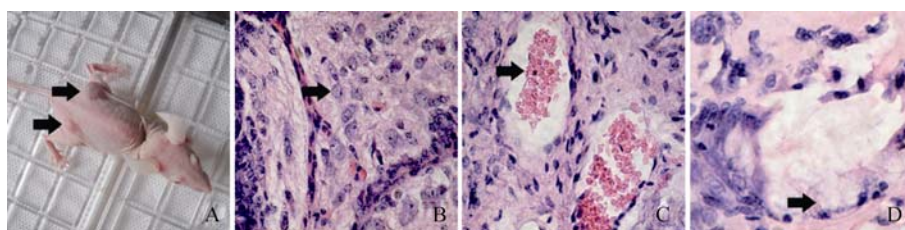


图 2 小鼠 PESC 体内分化能力的检测

A: 注射 PESC 6 w 后的裸鼠(黑色箭头所示为畸胎瘤); B: 外胚层结构细胞; C: 中胚层结构细胞; D: 内胚层结构细胞。图中以黑色箭头指出。

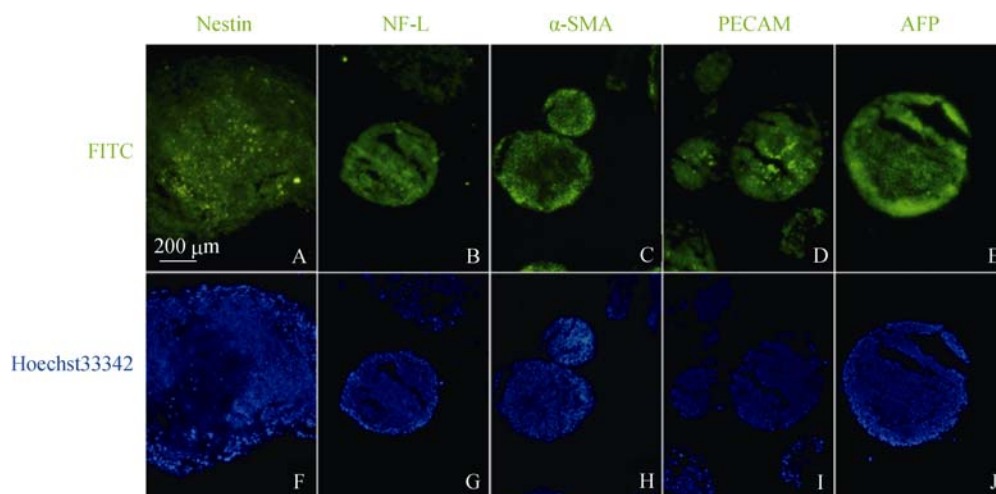


图 3 小鼠 PESC 体外分化能力的检测

A~E: Nestin、NF-L、 α -SMA、PECAM、AFP 阳性的细胞; F~J: A~E 的核染色。

3 讨论

目前对于向运动神经元分化的研究主要集中在神经干细胞和骨髓间充质干细胞两种来源,这两种

细胞移植后存在免疫排斥,尚无应用于临床治疗的报道。而对于 PESC 的神经分化潜能也仅停留于神经前体细胞及神经胶质细胞的分化^[19~22]。最近研究表明,小鼠 PESC 不能有效产生终末分化的神经元

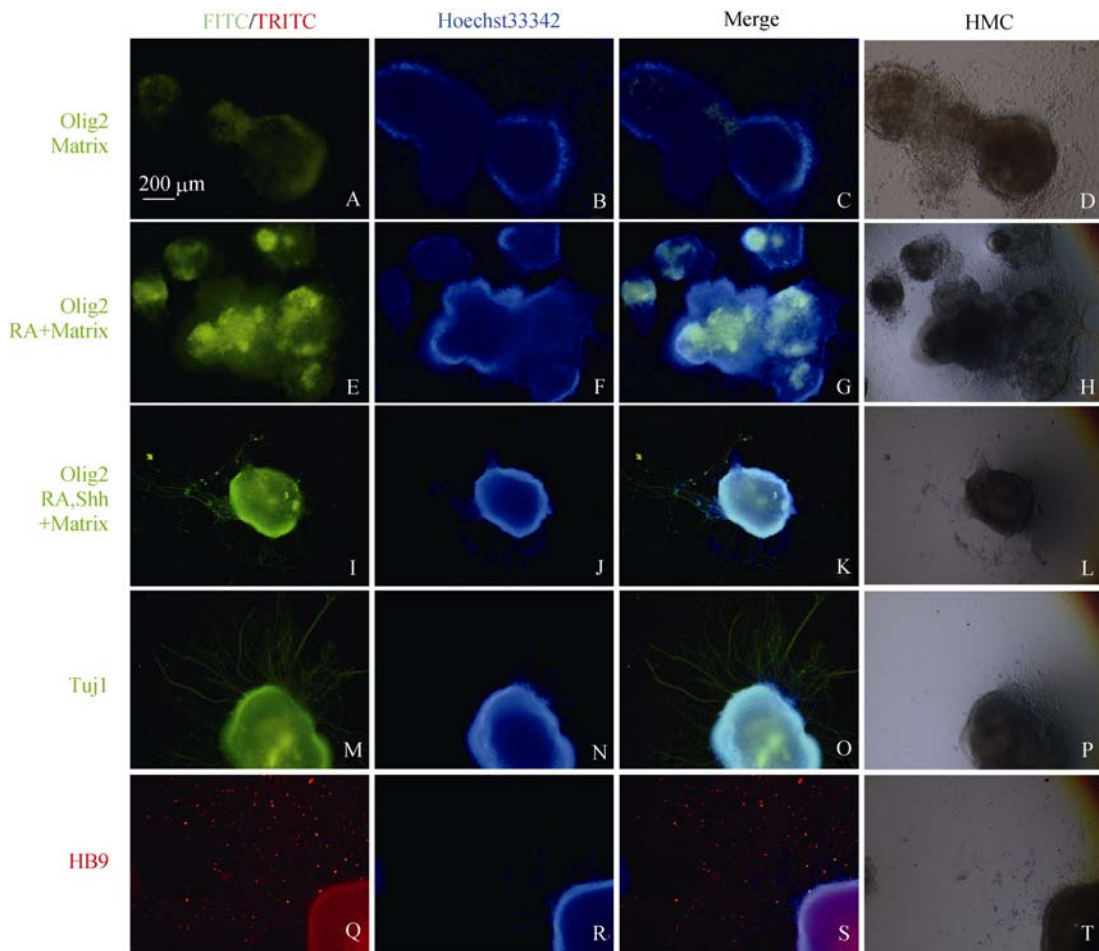


图 4 小鼠 PSCs 向运动神经元诱导分化

A~L: Olig2 阳性细胞; M~P: Tuj1 阳性细胞; Q~T: HB9 阳性细胞; A~D: 基质处理组; E~H: RA+基质处理组; I~L: RA、Shh+基质处理组; B、F、J、N 和 R 为核染色; C、G、K、O 和 S 为 2 通道合成图; D、H、L、P 和 T 为光镜图。

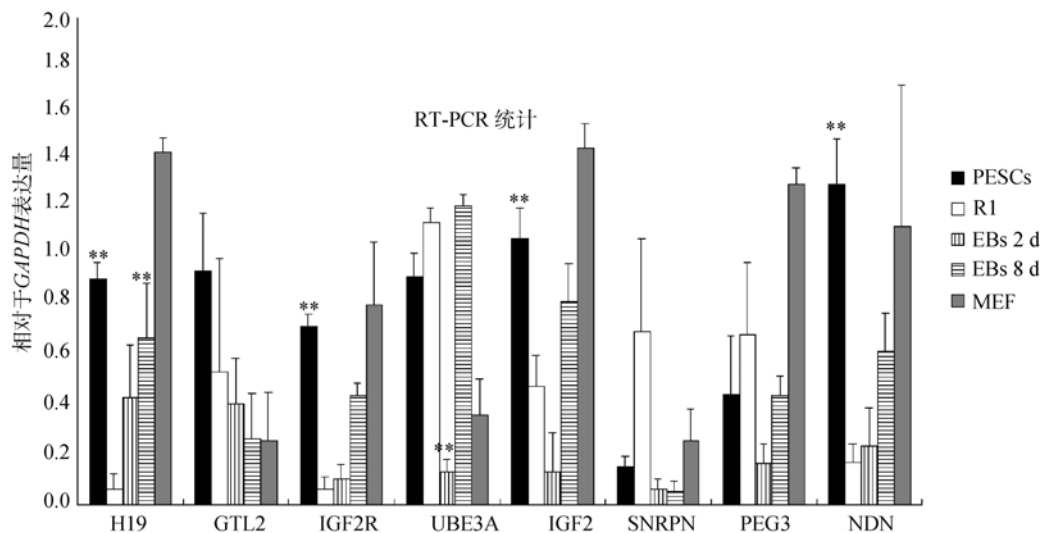


图 5 不同印记基因的相对 *GAPDH* 的表达量

类型^[23], 但微环境的调节可以影响这一分化过程。有报导指出, 高浓度的RA处理能够促进神经谱系的基因表达并且抑制中胚层的基因表达, 在EBs形成后无血清培养可以使神经细胞进行选择^[10], 而RA促进ESC的神经谱系分化时, 具有浓度依赖性, 低浓度RA诱导ESC分化为神经前体细胞, 高浓度RA促进神经前体细胞分化为成熟的神经元和神经胶质细胞^[24, 25]。我们通过转录因子和细胞外基质的联合应用初步从PESCs获得了运动神经元。这些神经元能够表达运动神经元特异标记Olig2 和HB9。但其功能还需要进一步的电生理等的验证。与我们之前的研究相比, 从PESCs得到运动神经元的比例较低。这可能是由于两种ESC之间可能存在一定的差别, 能够诱导常规ESC的转录因子的剂量未必能完全成功诱导PESCs的神经分化。同时印记基因的表达模式不同也可能是导致这一结果的原因。体内发育的研究证明, 神经管的尾侧和背腹轴的发育模式是通过许多诱导因子(包括RA、Shh和BMPs)来定向的。本研究尝试应用这些诱导信号使PESCs直接分化为运动神经元。结果显示RA和Shh信号以及PLO基质的联合应用成功地诱导PESCs产生了运动神经元, Laminin的应用促进了神经突起的生长。表明可以通过改良诱导条件从PESCs有效获得目的细胞从而应用于替代治疗。

哺乳动物母源和父源基因组的共同贡献对于正常发育是必须的, 这是由于基因组的亲本等位基因的特异性修饰, 即基因组印记。基因组印记与胚胎发育及一些人类疾病都有着密切的关系。例如, *Igf2* 基因印记丢失可导致多种肿瘤的发生, 如Wilm's瘤^[26]; Prader-Willi综合征是由于印记基因(如*Snrpn*)在大脑中高表达所致^[27]。孤雌胚胎仅有母源性基因组, 因此基因印记是异常的, 但从孤雌囊胚建立胚胎干细胞系的过程是一个通过表观遗传学修饰使细胞具有多能性和永生性的过程。我们的实验表明, PESCs不仅表达母源表达的印记基因(*H19*、*Gtl2*、*Igf2r*、*Ube3a*), 也表达父源表达的印记基因(*Igf2*、*Snrpn*、*Peg3*、*Ndn*), 显示了一些父源印记基因的激活, 这可能与体外操作相关^[28]。而Li等^[29]的研究显示PESCs表达父源印记基因, 可能与早期胚胎的整体去甲基化同时发生, 体外分离和培养条件可以降低母源的甲基化印记, 促进孤雌胚胎干细胞中父源表达的印

记基因的表达并且维持母源表达的印记基因的表达。这与我们所检测的结果是一致的。PESCs在长期体外培养过程中确实发生了与其来源的孤雌胚胎不同的印记基因改变, 但是具体机制仍有待进一步研究。

PESCs代表了一种组织相容性干细胞的潜在来源, 建立PESCs系是构建患者自身特异性多能干细胞的方法之一, 由于遗传物质全部来自于卵母细胞, 其人类白细胞抗原(HLA)与供卵者完全匹配, 分化后得到的功能细胞移植到供卵者体内, 相当于自体移植, 不会引起免疫排斥反应, 因此对于育龄女性患者是非常有利的。由于PESCs来源于孤雌囊胚, MHC等细胞表面免疫相关蛋白还未表达^[17], 我们用RA、Shh和细胞外基质结合的方法直接诱导PESCs分化产生的运动神经元相对于非自体神经干细胞及骨髓间充质干细胞来源的运动神经元的免疫排斥反应小。虽然其安全性还有待研究, 但对科研和临床应用具有极大的价值。

参考文献(References):

- [1] Brevini TAL, Pennarossa G, Antonini S, Gandolfi F. Parthenogenesis as an approach to pluripotency: advantages and limitations involved. *Stem Cell Rev*, 2008, 4(3): 127–135. DOI
- [2] Dighe V, Clepper L, Pedersen D, Byrne J, Ferguson B, Gokhale S, Penedo MCT, Wolf D, Mitalipov S. Heterozygous embryonic stem cell lines derived from nonhuman primate parthenotes. *Stem Cells*, 2008, 26(3): 756–766. DOI
- [3] Alexander B, Coppola G, Di Bernardino D, Rho GJ, St John E, Betts DH, King WA. The effect of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cycloheximide (CHX) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(1): 20–30. DOI
- [4] Wada T, Honda M, Minami I, Tooi N, Amagai Y, Nakatsuji N, Aiba K. Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6722. DOI
- [5] Yi YJ, Park CS. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. *Anim Reprod Sci*, 2005, 86(3–4): 297–304. DOI
- [6] Jessell TM. Neuronal specification in the spinal cord: in-

- ductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*, 2000, 1(1): 20–29. [DOI](#)
- [7] Wilson SI, Rydström A, Trimborn T, Willert K, Nusse R, Jessell TM, Edlund T. The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature*, 2001, 411(6835): 325–330. [DOI](#)
- [8] Muhr J, Graziano E, Wilson S, Jessell TM, Edlund T. Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. *Neuron*, 1999, 23(4): 689–702. [DOI](#)
- [9] Briscoe J, Ericson J. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(1): 43–49. [DOI](#)
- [10] Qian HR, Yang Y. Neuron differentiation and neuritogenesis stimulated by N-acetylcysteine (NAC). *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(7): 907–912. [DOI](#)
- [11] Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, 2000, 28(1): 31–40. [DOI](#)
- [12] Anjomshoa M, Karbalaie K, Mardani M, Razavi S, Tanhaei S, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H. Generation of motor neurons by coculture of retinoic acid-pretreated embryonic stem cells with chicken notochords. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(2): 259–267. [DOI](#)
- [13] Shan ZY, Liu F, Lei L, Li QM, Jin LH, Wu YS, Li X, Shen JL. Generation of dorsal spinal cord GABAergic neurons from mouse embryonic stem cells. *Cell Reprogram*, 2011, 13(1): 85–91. [DOI](#)
- [14] Nayak MS, Kim YS, Goldman M, Keirstead HS, Kerr DA. Cellular therapies in motor neuron diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1762(11–12): 1128–1138. [DOI](#)
- [15] Fois AF, Wotton CJ, Yeates D, Turner MR, Goldacre MJ. Cancer in patients with motor neuron disease, multiple sclerosis and Parkinson's disease: record linkage studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010, 81(2): 215–221. [DOI](#)
- [16] Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, Umbach JA, Richter L, Lindgren A, Conway AE, Clark AT, Goldman SA, Plath K, Wiedau-Pazos M, Kornblum HI, Lowry WE. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells*, 2009, 27(4): 806–811. [DOI](#)
- [17] Rideout WM 3rd, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*, 2002, 109(1): 17–27. [DOI](#)
- [18] 孟国良, 滕路, 薛友纺, 尚克刚. BALB/c小鼠胚胎干细胞系建立的方法学探讨. *遗传学报*, 2002, 29(7): 581–588. [DOI](#)
- [19] Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, Walker SJ, Gutin PH, Vilner L, Tabar V, Dominko T, Kane J, Wettstein PJ, Lanza RP, Studer L, Vrana KE, West MD. Parthenogenetic stem cells in non-human primates. *Science*, 2002, 295(5556): 819. [DOI](#)
- [20] Do JT, Joo JY, Han DW, Araúzo-Bravo MJ, Kim MJ, Greber B, Zaehres H, Sobek-Klocke I, Chung HM, Schöler HR. Generation of parthenogenetic induced pluripotent stem cells from parthenogenetic neural stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27(12): 2962–2968. [DOI](#)
- [21] Hu BY, Zhang SC. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc*, 2009, 4(9): 1295–1304. [DOI](#)
- [22] Vrana KE, Hipp JD, Goss AM, McCool BA, Riddle DR, Walker SJ, Wettstein PJ, Studer LP, Tabar V, Cunniff K, Chapman K, Vilner L, West MD, Grant KA, Cibelli JB. Nonhuman primate parthenogenetic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(Suppl. 1): 11911–11916. [DOI](#)
- [23] Hikichi T, Wakayama S, Mizutani E, Takashima Y, Kishigami S, van Thuan N, Ohta H, Thuy Bui H, Nishikawa SI, Wakayama T. Differentiation potential of parthenogenetic embryonic stem cells is improved by nuclear transfer. *Stem Cells*, 2007, 25(1): 46–53. [DOI](#)
- [24] Peljto M, Dasen JS, Mazzoni EO, Jessell TM, Wichterle H. Functional diversity of ESC-derived motor neuron subtypes revealed through intraspinal transplantation. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(3): 355–366. [DOI](#)
- [25] Cibelli JB, Cunniff K, Vrana KE. Embryonic stem cells from parthenotes. *Methods Enzymol*, 2006, 418: 117–135. [DOI](#)
- [26] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2): 143–153. [DOI](#)
- [27] Andrieu D, Watrin F, Niinobe M, Yoshikawa K, Muscatelli F, Fernandez PA. Expression of the Prader-Willi gene *Needin* during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and p75NTR expression. *Gene Expr Patterns*, 2003, 3(6): 761–765. [DOI](#)
- [28] Schumacher A, Doerfler W. Influence of in vitro manipulation on the stability of methylation patterns in the *Snurf/Snrpn*-imprinting region in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(4): 1566–1576. [DOI](#)
- [29] Li C, Chen ZS, Liu Z, Huang JJ, Zhang W, Zhou LJ, Keefe DL, Liu L. Correlation of expression and methylation of imprinted genes with pluripotency of parthenogenetic em-

bryonic stem cells. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(12): 2177–

2187. [DOI](#)