

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.05.003

干细胞神经定向分化研究与医学转化^{*}

胡宝洋

(中国科学院动物研究所, 干细胞与转化研究重点实验室, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)



胡宝洋, 1978 级校友。博士、研究员、博士研究生导师, 中国科学院“百人计划”引进海外杰出人才, 中国科学院动物研究所干细胞与神经再生研究组组长。兼任中国科学技术大学、安徽大学博士研究生导师。美国神经科学学会会员、美国眼科与视觉学会会员。1995 年获济宁医学院医学学士, 2004 年获复旦大学博士学位。2005 年赴美国威斯康星大学 (University of Wisconsin-Madison) 从事博士后研究, 2009 年任该校助理科学家 (Assistant Scientist)。2011 年 1 月引入中国科学院动物研究所。

主要从事干细胞与再生医学领域的研究。围绕干细胞研究及医学转化, 重点研究全能干细胞向神经系的分化机制、人类干细胞生物学的独特性、干细胞功能评价及再生医学应用的系统化评估等科学问题。指导人胚干细胞、iPS 细胞等多能干细胞定向分化为中枢神经系统的各种神经与胶质细胞。发现正确分化的细胞亚类对于成功修复特定损伤具有重要意义; 同一信号在不同种系的干细胞分化中作用不同; iPS 细胞系间神经分化潜能的差异性更加明显。成果发表于 Cell Stem Cell, PNAS, Development 等主流杂志, 相关技术已获得美国专利。这些研究成果在解答生命科学基础问题的同时, 有广阔的应用前景。

目前承担国家重大科学计划、“973”计划、国家自然科学基金、中国科学战略先导专项等课题。

摘 要 作为一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞, 人类多能性干细胞, 包括人胚干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 及人诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 等, 能进一步分化成为多种类型的功能细胞, 修复受损组织, 有望为解决退行性疾病与组织损伤等难题提供新的途径。根据发育生物学理论, 目前已建立有效的干细胞分化方案, 可将人多能干细胞分化为特定类型的神经元和胶质细胞, 包括 GABA 能、多巴胺能、脊髓运动神经元, 以及星形胶质细胞和少突胶质细胞。本文综述了当前干细胞生物学中的与神经分化相关的几个热点问题, 着重介绍人类与小鼠干细胞生物学方面的差异及干细胞研究向再生医学转化中的问题, 特别是我国干细胞研究医学转化所面临的机遇与挑战。这些问题的解决将对提高我国的干细胞研究水平, 推动干细胞研究向医学应用转化具有重要意义。

关键词 干细胞; 再生医学; 细胞移植; 转化研究

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)10-316-06

Neural differentiation and its clinical translation of human stem cells

HU Bao-yang

(Key Laboratory of Translational Stem Cell Research State Key Laboratory of Reproductive Biology

Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Human pluripotent stem cells (PSCs) such as embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) hold great promise in regenerative medicine as they are an important source of functional cells for potential cell replacement. These human PSCs have the full potential to give rise to any type of cells in the body. Using the developmental principles of neural lineage specification, human ESCs and iPSCs have been efficiently differentiated to regional and functional specific neurons and glia, such as striatal gamma-aminobutyric acid (GA-

^{*} [基金项目] 国家重大科学计划 (编号: 2012CB966302, 2012CBA03107)、国家自然科学基金 (编号: 31171430) 及中国科学院干细胞与再生医学战略先导专项 (编号: XDA01040109)

BA)-ergic neurons, midbrain dopaminergic neurons, spinal motor neurons, myelin sheath forming oligodendrocytes and regional specific astrocytes. Here, we present our understanding on several hot topics in the field of stem cell research, with extra concentration on the neural differentiation of human pluripotent stem cells, the unique aspects of the human stem cell biology and the medical translation of stem cell research in China. Such information is valuable to prosper the stem cell research in our country and would be instrumental to accelerate the translation of these researches into regenerative medicine.

Key words: Stem cells; Regenerative medicine; Cell transplantation; Translational research

1 引言

退行性疾病与组织损伤是影响人类健康的重要原因之一。由于以药物治疗与外科手术为主的经典医学在治疗这类疾病方面已进入瓶颈期,要实现结构与功能的完美修复,尚面临巨大挑战。干细胞能够自我更新并可分化为特定细胞类型用于修复病损,用具有再生能力的干细胞替代病损组织有望为解决这些难题提供新的途径。

胚胎干细胞是一类多能干细胞,可分化为体内所有细胞类型。小鼠的胚胎干细胞早在 20 世纪七、八十年代已被分离并建系。直到 1998 年,人类胚胎干细胞才由美国学者 James Thomson 首次分离建系。几乎同时,John Gearhart 为首的研究组从人胚的生殖嵴中也分离出具有全能性的胚胎生殖干细胞。利用这些小鼠和人的多能干细胞系,人们逐步揭示了干细胞多能性调控与细胞定向分化的机制^[1-5],并从多能干细胞分化获得了诸如神经元、胶质细胞、心肌、肝细胞等多种细胞类型^[6-10],为实现干细胞的再生医学应用奠定了良好的基础。近年来,诱导性多能干细胞与直接转分化方面的研究进展突飞猛进,为干细胞研究领域拓展了更为广阔的空间。Shinya Yamanaka 因在 iPS 细胞及重编程方面的贡献获得 2012 年诺贝尔生理学或医学奖。这些成果将逐渐解决制约干细胞应用的伦理及免疫学问题等瓶颈问题,使干细胞研究的临床转化更具希望。本文着重综述人类多能干细胞的特性、神经定向分化的理论基础,神经上皮及几类源于神经管腹侧神经元的分化方案,并着重介绍人类与小鼠干细胞神经分化的一些差异,旨在促使研究者在借鉴经典发育生物学理论指导干细胞分化时慎重考虑,引起研究者对人类干细胞生物学的独特性的重视。同时,我们还分析了干细胞研究向再生医学转化中的问题,特别是我国干细胞研究医学转化的挑战。

2 人类与小鼠胚胎干细胞的多能性及差异

人们对于哺乳类干细胞多能性的认识多来源

对小鼠胚胎干细胞的研究。通过这些研究,细胞多能性、自我更新与定向分化机制逐渐阐明。不论小鼠还是人类,细胞的多能性主要由一个由转录因子 Oct4 为核心,同时包括 Sox2 与 Nanog 的多能性网络调控。尽管该多能性环路在人与小鼠多能干细胞中相对保守,但人与小鼠的胚胎干细胞在诸多方面存在差异,这些多能性因子的下游通路以及相应的精细调控可能并不完全一致。比较明显的差别是,这两类胚胎干细胞所需的培养条件完全不同,细胞所形成克隆的形态、生长、表面标记及潜能状态均不一样。除此以外,它们的不同还体现在基本的分子标记与调控多能性与分化的信号通路上^[1]。至于这种差别是由种系间的本质不同引起,抑或是由于发育时程的不匹配所致,目前尚不明确。两类干细胞之间的差异也因而成为干细胞生物学研究的一个重要问题^[2]。

近期,一种新类型的多能干细胞从着床后的小鼠上胚层细胞分离出来,这种细胞称作 Epi-Stem Cell (Epi-SC)。小鼠的 Epi-SC 与 ESC 非常不同,但与人的 ESC 在生长条件、分子标记、转录网络以及表观状态等极为相似^[3-4]。这些发现提示,人与小鼠胚胎干细胞间的差异有可能是由于两类细胞代表不同的发育时期所致;人胚干细胞本质上有可能是人类的 Epi-SC,只是目前的培养条件不能够使人多能干细胞保持在较高级的多能性水平。但是,神经分化研究也发现,两类细胞在后期分化时也存在差异。如 FGF2 能够促进小鼠少突细胞分化,但却抑制人少突细胞的生成。因此,对于人和小鼠干细胞间所呈现的这些不同,种系差异仍可能是重要因素。

人胚干细胞的定向分化重演了早期神经发育

神经分化于神经外胚层形成时开始。在邻近神经诱导信号的作用下,神经外胚层形成一个盘样结构,称为神经盘。最早的神经干细胞就位于神经盘中。随着发育进程,神经盘的两侧向上卷起,并在中线上融合,形成一个管样的结构,称作神经管。神经管内的细胞在不同梯度的塑型因子如视黄酸(RA)和 Sonic Hedgehog (SHH)的作用下,可以

获得其颅尾和腹背方位的位置标记。在脑部,由腹侧向背侧渐低的 SHH 可将脑腹侧进一步区分为背外侧的膝外侧隆起和腹侧的膝内侧隆起^[5]。在脊髓,从高到低的梯度 SHH 可以将脊髓腹侧进一步区分为五个区域,自腹侧依次表达转录因子 Nkx2.2、Nkx6.1、Olig2、Irx3 和 Pax6。从腹侧起的第二个区域内,表达 Olig2 细胞形成一个 pMN 区。该区内的细胞在发育的不同时期可以分化为不同细胞类型,在较早期,可分化为运动神经元。随后,该区域内的细胞可以分化为少突胶质细胞^[6]。

由于人胚干细胞是由内细胞团所分离,这些细胞基本上代表了被长期扩增的内细胞团细胞。尽管在体外经过长期传代培养,人多能干细胞仍能保持其多能性和多向分化潜能。因此,前面所述的塑型过程和理论应适用于指导人胚干细胞的神经分化。目前,依据发育生物学的基本理论,已建立起了一套化学成分确定的神经定向分化系统。根据这种分化方案,人多能干细胞首先从滋养层细胞上分离,在悬浮培养中形成细胞聚集团块,后变为球状。当人胚干细胞脱离其生长条件后,细胞便开始分化。这些悬浮培养的细胞球在不存在额外塑型因子的情况下于第 7 天开始表达转录因子 Pax6。如果生长于培养面上,这些早期的神经上皮细胞于一周后形成明显的环状结构,并开始表达其他神经系的标记物如 Sox1^[7-8]。激活 FGF 信号通路,或抑制 SMAD 通路,会明显促神经分化^[9-10]。当细胞表达 Pax6 但尚未表达 Sox1 时,它们能在塑型因子的作用被定向分化至特定细胞谱系。例如,在视黄酸 RA 作用下,本来向颅侧分化的细胞转而向脊髓分化。但是,RA 能对细胞起作用的时间窗口往往非常短暂,只有几天时间,一旦细胞开始表达 Sox1,这些细胞便不能再被分化为脊髓细胞。

在神经分化时,细胞依次表达 Pax6 及 Sox1 等转录因子,与胚胎发育过程中原始神经上皮与较确定的神经上皮的出现时间非常吻合。因此,人类多能干细胞向神经分化较好地模拟了人类神经发育早期的主要过程,且时间区分明显,各时期的标记物清楚,是研究人类神经发育的良好模型。

除了悬浮为主的分化方案外,人胚干细胞还可以在贴壁状态下分化。在这种情况下,需要在分化较早期就应用两种 SMAD 的抑制物, Noggin 与 SB431542,以阻止人胚干细胞在失去多能性维持条件的情况下分化为滋养层细胞或中、内胚层细胞^[10]。这种分化方案可以将超过 80% 的人多能干细胞转变为 PAX6+ 神经系细胞,进而能分化为各

种细胞亚类。相较前种方案,这种分化方法看起来更省时。但由于细胞较早的被转变为不能继续分化的神经细胞,最终的细胞产量很大程度上需要依靠最初用于分化的多能干细胞数量。同时,分化时程的缩短在节省时间的同时,使得向精确细胞亚类的分化更为困难。

3 中枢神经系统几种功能细胞的分化

3.1 GABA 能神经元

如前所述,人原始神经上皮细胞在不存在额外塑型因子的情况下,倾向于分化为吻-背侧的细胞类型。在中等剂量的腹侧化塑型因子 SHH 作用下,细胞表达 Gsx2 与较低的 Pax6,这与脑内 LGE 的细胞相似。在撤除 SHH 后,这些 LGE 样细胞可进一步分化 GABA 能神经元,除表达纹状体的标记物 Meis2 与 Ctip2 外,还表达 GABA、GAD 65/67 及 DARPP32。经过 5 周的分化,有超过 80% 的细胞可成为表达 DARPP32 的 GABA 能神经元^[11]。在移植入单侧纹状体损伤的小鼠模型后,这些中等大小的 GABA 能神经元前体能进一步分化,重建被损伤的纹状体结构,并带来行为学的改善。更为有趣的是,将同步分化的脊髓 GABA 中间神经元移植到同样的小鼠模型,并不能完成损伤结构的重建和功能的恢复,表明特定神经元类型在特定损伤的功能性修复中的重要作用^[11]。

3.2 中脑多巴胺能神经元(DA)

迄今,中脑多巴胺能神经元(DA)是干细胞研究中最受关注和最广为研究的细胞类型。这是由于干细胞分化的 DA 神经元能替代黑质内变性的神经元,因而具有良好的应用前景。此外,由 PD 病人重编程而获得的 iPS 细胞能分化为携带疾病表型的 DA 神经元,可用于研究 PD 的病理学机制。根据中脑 DA 神经元所处的位置,常用的分化策略是在人多能干细胞分化到神经前体细胞阶段加入中脑部位的塑型因子 FGF8 和 SHH,或者是借助滋养细胞,如 PA6 细胞、MS5 细胞^[12-16]或中脑星形胶质细胞^[17]来促进分化。应用分化方法一般可得到较高比例较高的 TH+ 神经元。但是,这些 TH+ 神经元却很少表达中脑标记物,提示通过这些方案分化的细胞并不是真正意义上的中脑 DA 神经元。这一问题的解决同样得益于发育生物学的进展。研究表明,中脑 DA 神经元起源于神经管的基板中表达 FoxA2 的细胞。多数表达 FoxA2 的细胞不具有神经细胞的特征。当同时表达顶板标记物 LimX1A 时,这些 FoxA2+ 细胞可

分化为中脑多巴胺神经元。根据这些发现,通过有序的联合调控腹侧化 SHH 信号与背侧化 WNT 信号,可从人多能干细胞分化出真正的中脑 DA 神经元^[18]。

体外分化 DA 神经元的功能可通过 6-OHDA 损伤纹状体的动物模型验证。细胞移植之后通过阿扑吗啡或苯丙胺诱导的旋转测试验证其运动障碍是否得到改善。研究表明,通过上述方案分化的神经前体细胞可进一步分化为 DA 神经元,并可带来行为功能的改善^[18-20]。

3.3 脊髓运动神经元

人原始神经上皮细胞在有低剂量 RA 存在时倾向于向脊髓细胞分化。RA 能够抑制吻侧化转录因子如 Otx2 和 Foxg1 的表达,而激活尾侧化转录因子包括 Hoxb4, Hoxc5 和 Hoxc8 的表达。在分化的第 3 周加入腹侧化因子 SHH,能有效地使细胞向分化为表达 Olig2 的腹侧运动神经元前体。在移除 RA 和 SHH 后,超过 50% 的细胞表达更确定的运动神经元标记物 Mnx1 (HB9)、Lhx3 和 Isl 1/2^[19-21]。加入 GDNF, IGF 和 BDNF 后继续培养,这些神经元逐渐成熟,表达递质合成酶,如 ChAT 和 VACHT 等,并能诱发动作电位。更为重要的是,在与肌细胞共培养时,这些运动神经元与可引起乙酰胆碱受体在肌小管处聚集,表明由人多能干细胞分化的运动神经元有运动神经元的功能^[21-23]。

3.4 少突胶质细胞

发育过程中, pMN 区域的 Olig2+ 的神经前体除能分化为运动神经元外,还可在后期分化为少突胶质细胞。在上述分化体系中,第 23 天起后的一周内加入 FGF2,可完全阻止 Olig2+ 前体细胞向运动神经元分化,转而促进 Olig2+ /Nkx2.2+ 的预定向少突胶质细胞前体(pre-OPCs)产生,于第 5 周得到超过 80% 的 pre-OPCs。然而,直至 2 个月,这些 pre-OPCs 才形成 Sox10+ /PDGFR+ 的少突胶质细胞前体(OPCs)。在此期间,持续的 SHH 信号与 Olig2 表达对 OPC 分化至关重要。在移植到髓鞘损伤的小鼠脑内后,人多能性干细胞定向分化的 OPCs 能够分化为成熟的少突胶质细胞,重塑髓鞘,表明这些体外分化的细胞已经获得了真正的少突胶质细胞的功能^[24-25]。

3.5 星型胶质细胞

星型胶质细胞的分化也与体内分化过程基本一致,在分化的第 4~8 周,可得到表达 S100 β 的星型胶质细胞前体或未成熟的星型胶质细胞^[26-29]。这些细胞于 8~12 周表达 CD44 和 GFAP。在培养 180d 后,几乎所有的星型胶质细胞均为 NFIA

阳性^[26-27]。通过电生理分析可以确定这些由人多能干细胞分化的星形胶质细胞成熟与否。另外,当与神经元共培养时,星形胶质细胞形态发生改变,并且有明显的瞬时向外电流的减少,证明星形胶质细胞的成熟。

与神经元类似,星形胶质细胞有一定的区域特征,并且因区域不同而具有不同的功能。在上述分化体系中,如在第 10 天至 21 天分别加入 RA 和 FGF8,将在分化的第 30 天获得脊髓与中脑的前体细胞。加入 SHH 可促使细胞向腹侧分化,并于胶质细胞发生阶段产生具有区域特性的星形胶质细胞。即便被移植入小鼠脑内后很长时间,由人多能干细胞分化的脊髓星形胶质细胞仍能够保持其固有的区域特性^[26-27]。

4 干细胞研究医学转化的问题与挑战

通过多能干细胞定向分化获得功能细胞,为干细胞的再生医学应用带来了希望,使干细胞研究成为最有希望实现转化突破的领域,引起各国政府、科技界、企业和公众的高度关注。在转化医学的框架下,欧美国家及日本等发达国家均将干细胞与再生医学领域作为国家科技发展的重要战略部署,并力推干细胞的临床应用。美国和英国已批准部分干细胞临床应用研究计划,涉及的疾病包括退行性神经病变、视网膜黄斑变性、小儿脑部损伤、脊髓损伤等。凭借在 iPS 细胞领域捷足先登的优势,日本有计划的专利了该领域的相关技术,正积极筹划 iPS 细胞分化产品的临床应用。近几年,这些国家均重视干细胞与再生医学相关的研发投入。美国由于经济不景气,削减了许多研究领域研究经费,但仍力保干细胞与再生医学相关的支持力度。日本为抢占在亚洲乃至全球干细胞与再生医学领域的领先地位,在 2012 财年对干细胞和再生医学研究相关的预算增加 9%,达 9.32 亿美元;同时,这些国家的医药企业也正在调整各自的策略,并将成为干细胞和转化研究的主体。

尽管如此,从全球看,干细胞研究的医学转化尚不够乐观,安全、有效及可行的干细胞临床应用尚未达到。目前干细胞研究与医学转化体现出两个明显的趋势,一是干细胞的基础研究,包括定向分化虽已取得一定进展,但能够真正进入临床应用的产品相对较少。二是在缺少充足的临床研究数据支持下,干细胞治疗在一些国家被滥用,引发一系列伦理、医疗和社会问题。

干细胞研究医学转化的障碍有多方面因素。

就干细胞研究而言,尽管有些方面进展较快,但干细胞领域仍有许多基础问题,如多能性机制、定向分化机制、重编程与转分化机制等尚未得到完全回答,在一定程度上制约了干细胞向应用领域的转化。转化研究领域的重要问题,如理想的干细胞来源、完善的分化方案、干细胞及产品的规模化生产、细胞移植的规范,疾病动物模型及相关评价指标、免疫学问题的解决、干细胞体内示踪、植入细胞的体内存活及与宿主组织的整合、植入细胞的功能评价、致畸与致癌风险、标准化临床治疗方案仍未得到很好的解答。从干细胞应用层面,干细胞临床治疗面临的最大问题是其应用的安全性、有效性及可控性。尽管许多干细胞相关的产品与技术已经在动物模型中得以验证,但在临床试验中,由于细胞数量、可移植的患者人群及临床试验设计等各种原因,在实施过程中难以达到严格的随机、双盲对照和大样本量等要求,导致临床试验的结果与评价无法实现完全的客观公正,从而阻碍了干细胞疗法向临床应用的转化。从宏观角度,相关的技术规范、标准、伦理准则等也有待完善。由于伦理和传统方面的原因,干细胞,尤其是针对人类胚胎干细胞的研究在科技发达国家曾一度受到诸多限制,在一定程度上限制了干细胞的应用和发展。总之,干细胞的转化研究仍面临着严峻的任务。

为推动干细胞研究的医学转化,在强化干细胞基本科学问题研究的基础上,需要畅通干细胞研究与应用转化通道。参照生物制品或药品、结合临床需求建立统一、规范、明确的临床级干细胞标准;依据标准,建立多样化的临床级干细胞系与规范化的功能细胞获得技术;针对影响我国人民健康的重要疾病如神经退行性疾病、代谢类疾病、心血管疾病等,完善干细胞应用的临床前研究,建立标准化的干细胞移植治疗方案,推动干细胞产品的临床试验和干细胞产品的市场化。结合中国人口健康水平、社会发展实际水平和现有的法律法规,建立各种干细胞产品化的行业规范和国家标准。建立干细胞治疗的医疗规范,完善相关法规,推动干细胞和再生医学转化的平稳和健康发展。

另一方面,对于快速发展的领域,政策的制订往往落后于技术进步,因此会导致领域和行业的暂时性不规范。干细胞的临床转化应用面临着同样的问题。在亚洲和东欧一些地区,造血干细胞以外的治疗性干细胞移植多有开展。尤其在中国,有许多单位在缺少基础研究数据支持基础上,直接将安全性、有效性尚未得到验证的细胞产品用于治疗,成为影响干细胞研究与正常转化的严重问题。这

些问题在相当范围内得到关注,在国际上使中国本来正常进行的干细胞转化研究备受诟病。因此,为促进干细胞在再生医学领域的转化应用,需要进一步完善干细胞医学转化的政策导向与法规制度,保障实验室与临床研究间建立起畅通的双向通道,实现基础研究向医学应用有效、健康的转化。针对这些问题,2008年12月,国际干细胞研究学会(ISSCR)发布了《干细胞临床转化指南》(Guidelines for clinical translation of stem cells),对干细胞研究向临床转化的各方面的题进行了讨论,并提出建议[30]。该指南为各国制定相关政策提供了依据,在一定程度上促进了干细胞治疗方法的研发进程和产业化发展进程。

5 中国的干细胞研究与医学转化现状

干细胞研究是相对较新的一门学科,中国的干细胞与再生医学研究与其它国家起点相近。近十几年来,国内吸引了一大批受到良好科研训练的干细胞研究者,较集中的分布于国内一些科技发达地区的研究院所和高校。“十一五”期间,在国家973计划、重大研究计划、863计划等专项支持下,我国的干细胞研究已经取得了较大进步。通过项目带动了领域的发展,培养了干细胞研究的团队,取得了一系列突出的成果,为我国的干细胞研究奠定了人才、学科、技术、基地等的良好基础。“十二五”期间,国家将更加重视干细胞研究,专门设立了“干细胞研究重大科学研究计划”,积极推动干细胞研究在生命科学、生物技术、医药卫生和农牧业等领域的转化,为促进人民的健康和国民经济的发展服务。按照国家的科技发展方针,结合国家在干细胞研究领域的战略需求和国内外的研究现状,国家在干细胞领域将以干细胞研究为切入点,以医学转化为总体研究目标,发挥基础研究和转化型应用研究方面的优势,加速干细胞理论和临床研究,开发干细胞产品和以干细胞为靶点的调控药物,建立干细胞临床应用的方法和标准,并发展干细胞临床治疗新技术,伦理新规范。作为国际上干细胞研究与转化应用领域的主要力量,我国政府和科学家也积极出台了相关法规、政策的制定。2011年底,由科技部会同中科院、自然科学基金会等部门成立了国家干细胞研究指导协调委员会,对我国干细胞研究进行总体设计、科学规划,联动协调,强化国家战略。2012年初,卫生部展开了关于开展干细胞临床研究和应用自查自纠工作,从而使干细胞治疗技术科学、有序地发展,干细胞临床研究和应用行为更加

规范。相信在这些政策与制度的指导下,我国干细胞与再生医学原始创新能力和国际竞争力一定会有较短的时期内得到全面提升。

参考文献:

- [1] Okita K, Yamanaka S. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2006, 1(1):103-111.
- [2] Rossant J. Stem cells and early lineage development[J]. *Cell*, 2008, 132(4):527-531.
- [3] Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos[J]. *Nature*, 2007, 448(7150):191-195.
- [4] Tesar P J, Chenoweth J G, Brook F A, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7150):196-199.
- [5] Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, et al. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain[J]. *Development*, 2001, 128(19):3759-3771.
- [6] Fancy SP, Chan JR, Baranzini SE, et al. Myelin regeneration: a recapitulation of development? [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34(21-43).
- [7] Pankratz MT, Li XJ, Lavaute TM, et al. Directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(6):1511-1520.
- [8] Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(12):1129-1133.
- [9] LaVaute TM, Yoo YD, Pankratz MT, et al. Regulation of neural specification from human embryonic stem cells by BMP and FGF[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(8):1741-1749.
- [10] Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(3):275-280.
- [11] Ma L, Hu B, Liu Y, et al. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4):455-464.
- [12] Sonntag KC, Pruszk J, Yoshizaki T, et al. Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(2):411-418.
- [13] Park CH, Minn YK, Lee JY, et al. In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons[J]. *J Neurochem*, 2005, 92(5):1265-1276.
- [14] Zeng X, Cai J, Chen J, et al. Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(6):925-940.
- [15] Schulz TC, Noggle SA, Palmarini GM, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to dopaminergic neurons in serum-free suspension culture[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7):1218-1238.
- [16] Perrier AL, Tabar V, Barberi T, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(34):12543-12548.
- [17] 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(11):1259-1268.
- [18] Kriks S, Shim JW, Piao J, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease[J]. *Nature*, 2011, 480(7378):547-551.
- [19] Fasano CA, Chambers SM, Lee G, et al. Efficient derivation of functional floor plate tissue from human embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(4):336-347.
- [20] Yang D, Zhang ZJ, Oldenburg M, et al. Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1):55-63.
- [21] Hu BY, Weick JP, Yu J, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(9):4335-4340.
- [22] Hu BY, Zhang SC. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(9):1295-1304.
- [23] Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(2):215-221.
- [24] Hu BY, Du ZW, Zhang SC. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(11):1614-1622.
- [25] Hu BY, Du ZW, Li XJ, et al. Human oligodendrocytes from embryonic stem cells: conserved SHH signaling networks and divergent FGF effects[J]. *Development*, 2009, 136(9):1443-1452.
- [26] Krencik R, Zhang SC. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(11):1710-1717.
- [27] Krencik R, Weick JP, Liu Y, et al. Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(6):528-534.
- [28] Pal U, Chaudhury S, Sarkar PK. Tubulin and glial fibrillary acidic protein gene expression in developing fetal human brain at midgestation[J]. *Neurochem Res*, 1999, 24(5):637-641.
- [29] Wilkinson M, Hume R, Strange R, et al. Glial and neuronal differentiation in the human fetal brain 9-23 weeks of gestation[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1990, 16(3):193-204.
- [30] Hyun I, Lindvall O, Ahrlund-Richter L, et al. New ISSCR guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6):607-609.

(收稿日期 2012-10-05)