

肝细胞生长因子促进猕猴胚胎干细胞来源 的神经前体细胞的增殖

李荣荣^{1,2}, 陈洪伟^{1,2}, 陈栋梁^{1,2}, 王淑芬^{1,2}, 张敬^{1,2}, 陈锐³, 季维智^{1,*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南省动物生殖生物学重点实验室, 云南 昆明 650223;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 中国科学技术大学, 合肥 230000)

摘要: 肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一个多效应因子, 在神经系统中具有重要作用。早期的研究发现采用 HGF 和 G5 supplement 结合 EB (embryoid body) 法可诱导猕猴胚胎干细胞 (rhesus embryonic stem cells, rESCs) 定向分化成高纯度的可移植的神经前体细胞 (neural progenitors), 但对于 HGF 在整个诱导分化过程中的具体作用及机制还不清楚。本研究改进先前研究体系, 采用单层培养法, 同时添加 HGF 和 bFGF (basic fibroblast growth factor, 碱性成纤维细胞生长因子) 诱导 rESCs 在两周内定向分化为高纯度 [(81.66±4.37)%] 的神经前体细胞, 并且单独添加 HGF 或 bFGF 以及两者都没有添加的条件下也得到了相似比例的神经前体细胞, 表明外源性的 HGF 在诱导 rESCs 向神经前体细胞转变的过程中对于神经细胞命运的决定并不起作用; 进一步研究发现 HGF 能有效地促进神经前体细胞的增殖, 并且与 bFGF 具有协同作用。总之, 本研究建立了一种更为简单的诱导 rESCs 分化成神经细胞的方法, 发现外源性的 HGF 在 rESCs 向神经前体细胞分化的过程中并没有神经诱导的作用, 但能与 bFGF 协同作用促进 rESCs 来源的神经前体细胞的增殖。

关键词: 猕猴胚胎干细胞; 神经前体细胞; HGF

中图分类号: Q813; Q959.848 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853-(2008)05-0518-011

Hepatocyte Growth Factor Promotes the Proliferation of the Neural Progenitors Derived from Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells

LI Rong-rong^{1,2}, CHEN Hong-wei^{1,2}, CHEN Dong-liang^{1,2}, WANG Shu-fen^{1,2},
ZHANG jing^{1,2}, CHEN Rui³, JI Wei-zhi^{1,*}

(1. Yunnan Key Laboratory for Animal Reproductive Biology, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming 650223, China;
2. Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China; 3. University of Science and Technology of China, Hefei 230000)

Abstract: Hepatocyte growth factor (HGF) is a pleiotropic factor, which plays an important role in the nervous system. Previously, we had produced highly enriched (88.3±8.1%) transplantable populations of neural progenitors from rhesus monkey embryonic stem cells (rESCs) using an embryoid body (EB) system containing HGF and G5 supplement. However, the exact role of HGF in the neural differentiation process as well as the mechanism of HGF is not clear. Here, on the basis of the ameliorated differentiation system, we efficiently produced populations of neural progenitors (81.66±4.37%) from rESCs in an adherent monoculture system containing HGF and basic fibroblast growth factor (bFGF) within two weeks. Moreover, we obtained similar results with the systems containing either HGF or bFGF alone, or neither of them, which implied that extrinsic HGF can not determine the neural fate of the rESCs in the differentiation process. Further results suggested HGF with bFGF synergistically promoted the proliferation of the neural progenitors derived from rESCs. In conclusion, through this study, a much simpler method of inducing rESCs differentiation towards neural cells has been established and extrinsic HGF did not function in neural induction from rESCs to neural progenitor cells. However, HGF with bFGF synergistically promoted the proliferation of the neural progenitors derived from rESCs.

Key words: Rhesus monkey embryonic stem cells; Neural progenitors; Hepatocyte growth factor

收稿日期: 2008-05-21; 接受日期: 2008-06-05

基金项目: 973 计划 (2006CB701505, 2007CB947701); 中科院创新工程试点经费 (KSCX2-YW-R-47); 国家自然科学基金 (30570906, 30700159, 30700425)

*通讯作者 (Corresponding author), Tel/fax: +86-0871-5139413, E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF), 又称扩散因子(scatter factor, SF), 是一种分泌型肝素亲和糖蛋白, 具有多种生物学效应。c-Met 是 HGF 的唯一受体, 是由原癌基因 *c-met* 编码的跨膜蛋白, 具有酪氨酸激酶活性(Bottaro et al, 1991; Naldini et al, 1991; Comoglio, 1993)。在胚胎发育过程中, c-Met 广泛表达于各种组织或器官的上皮细胞, 而 HGF 广泛表达于邻近组织的间充质细胞(Sonnenberg et al, 1993; Takayama et al, 1996)。HGF 通过旁分泌的形式与受体 c-Met 结合并激活该受体的酪氨酸激酶活性从而调节上皮细胞的增殖、分化、迁移、凋亡及器官的形态建成等(Furlong, 1992; Uehara & Kitamura 1992; Sonnenberg et al, 1993; Brinkmann et al, 1995; Takebayashi et al, 1995; Takayama et al, 1996); 在成体中, 一些器官受到损伤后及在再生过程中, HGF 和 c-Met 的表达会高度上调从而促进细胞的增殖、迁移、抑制细胞的死亡等 (Nakamura et al, 1984; Nakamura, 1991; Michalopoulos & DeFrances, 1997)。

作为多效应因子, HGF 在神经系统的发育过程中也具有重要的作用。已有研究表明在大脑发育过程及成体神经系统的多种神经元中都表达 c-Met, 有些神经元还共表达 HGF(Honda et al, 1995)。HGF 不仅能促进神经元及胶质细胞的存活, 还能促进神经元轴突的生长, 引导运动神经元的轴突到达目的位置(Ebens et al, 1996; Hamanoue et al, 1996; Maina et al, 1997)。脊髓损伤后 HGF 和 c-Met 的表达都上调, HGF 能有效地促进神经元和少突胶质细胞的存活, 轴突的再生, 从而恢复损伤脊髓的功能(Kitamura et al, 2007; Shimamura et al, 2007)。目前有研究表明 HGF 在早期神经系统的发育过程中具有重要的作用 (Takayama et al, 1996; Trovato et al, 2007), 但是关于 HGF 在早期神经系统发育中具体作用的研究较少。早期在鸡胚上的研究推测, HGF 或 HGF 的类似物在鸡胚神经系统早期发育过程中可能起到神经诱导的作用(Stern & Ireland, 1993; Bronner-Fraser, 1995); 但是进一步的研究发现, HGF 并不是早期神经诱导因子, 它只是促进鸡胚外胚层保持对神经诱导信号的应答, 要充分完成诱导外胚层分化成神经细胞还需要一些下游神经诱导信号的作用(Streit et al, 1997; Streit & Stern, 1997), 可见, HGF 在鸡胚神经系统发育过程中的神经诱导

作用还存在争议。并且关于 HGF 在高等哺乳动物(包括灵长类)神经系统发育过程中神经诱导作用的报道更少, 因此 HGF 是否具有神经诱导作用还需要进一步的研究。同时, 由于 HGF 具有多种生物学效应, 其在神经系统发育过程中是否还具有其他作用, 包括能否促进神经前体细胞的存活、增殖, 神经细胞的迁移、成熟等, 目前都几乎没有报道, 这些问题同样是以后需要研究的方向。

我们早先的研究发现, 采用 HGF 和 G5 supplement 结合 EB 法可诱导 rESCs 定向分化成高纯度[$(88.3 \pm 8.1)\%$]的可移植的神经前体细胞(neural progenitors), 并且发现在诱导过程中单独添加 HGF 或 bFGF 分别得到了 $(65 \pm 8.3)\%$, $(68 \pm 7.2)\%$ 的神经前体细胞, 比对照组[$(15 \pm 12)\%$]要高, 但是比联合添加 HGF 和 G5 supplement 低(Li et al, 2005)。但是对于 HGF 在整个诱导分化过程中所起的具体作用尚不明确, 即 HGF 是直接决定 rESCs 向神经细胞分化的命运, 还是通过促进神经前体细胞的增殖从而间接地提高神经前体细胞的比例; 同时, HGF 与 G5 supplement 联合作用 rESCs 得到最高比例的神经前体细胞的原因也不清楚。所以, 本研究旨在进一步研究 HGF 在整个分化过程中的具体作用及 HGF 与其它因子的关系。G5 supplement 是由多种因子(包括 bFGF)组成的复合物, 以前的实验多表明 bFGF 在神经系统的发育过程中起着重要的作用(Kudoh et al, 2004; Delaune et al, 2005; Mason, 2007), 因此我们重点研究 HGF 与 bFGF 在此分化过程中的关系。此外, 目前很多的研究表明在诱导胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)向神经细胞分化的过程中采用单层培养法比采用 EB 培养法更具优越性(Ying & Smith, 2003; Ying et al, 2003; Gerrard et al, 2005; Shin et al, 2006)。所以, 我们改进以前的方法, 用 bFGF 替代 G5 supplement, 并用单层培养法诱导体系代替 EB 法诱导体系, 即本研究采用单层培养法, 先是联合应用 HGF 和 bFGF 诱导 rESCs 向神经细胞分化, 进而研究 HGF 在这个诱导分化体系中的具体作用及其与 bFGF 的关系。结果表明外源性的 HGF 在诱导 rESCs 向神经前体细胞转变的过程中, 对于神经细胞命运的决定并不起作用, 但是 HGF 与 bFGF 具有协同作用能有效地促进神经前体细胞的增殖。

1 材料和方法

1.1 rESCs 的培养

rESCs 细胞系 R366.4(美国威斯康星大学 Thomson JA 教授馈赠)培养在用丝裂霉素($5\mu\text{g}/\text{mL}$)处理过的小鼠饲养层(小鼠胚胎成纤维细胞, MEF)上。rESCs 培养基成分为: 85% DMEM(Gibco), 15% dFBS (defined fetal bovine serum, Hyclone), 1% 必需氨基酸(Gibco), 2 mmol/L L-谷氨酰胺 (Sigma), 0.1 mmol/L β -巯基乙醇, 50 Unit/mL 青-链霉素 (Sigma)。每天换液。每隔 5—7 天用 $10\text{ mg}/\text{mL}$ 的 Dispase (Invitrogen)消化 rESCs 集落, 离心, 重悬后接种到新铺的 MEF 上进行传代培养。

1.2 定向诱导 rESCs 分化成神经前体细胞

首先用 $10\text{ mg}/\text{mL}$ Dispase 将 rESCs 消化 10—15 min, 当 rESCs 团块卷起时, 将 Dispase 吸出, 向培养板内添加 10%NBS (小牛血清)的 DMEM 放置于培养箱, 等 rESCs 团块飘起时, 将 rESCs 团块转到 DMEM/F12 (1:1, Gibco)中, 最后在显微镜下将大小合适 (约 1000 个细胞)的 rESCs 团块转移到多孔板中。这整个过程既可以洗去 Dispase 和血清, 从而保证分化是在无血清的体系中进行, 又能保证 rESCs 团块大小适合单层培养的要求, 并且不携带任何饲养层。分化液的基础培养液为神经分化培养液(neural differentiation culture media, NDCM): DMEM/F12 (1:1, Gibco)、 $1\times\text{ITS}$ (Gibco)、 $1.0\text{ g}/\text{L}$ 牛血清白蛋白(Sigma)、 $1.0\text{ g}/\text{L}$ 葡萄糖(Sigma)、 $1.0\text{ g}/\text{L}$ 乳糖(Sigma)、 $0.03\text{ g}/\text{L}$ 脯氨酸(Sigma)、 $11\mu\text{g}/\text{L}$ 亚油酸(Sigma)、 $5\text{ mmol}/\text{L}$ 谷氨酰胺(Sigma)和 $2\text{ mmol}/\text{L}$ 烟碱(Sigma)。bFGF (Chemicon)、HGF (Chemicon)在诱导分化的第一天加入 NDCM 中。实验分为 4 组:(1)基础液 NDCM: 不添加任何因子, [NDCM 组]; (2) bFGF ($10\text{ ng}/\text{mL}$)+NDCM, [bFGF 组]; (3) HGF($10\text{ ng}/\text{mL}$)+NDCM, [HGF 组]; (4) bFGF($10\text{ ng}/\text{mL}$)+HGF($10\text{ ng}/\text{mL}$)+NDCM, [bFGF+HGF 组]。隔天换一次分化液, 诱导分化 8 天左右传代, 第 12 天采用 Hoechst 33342 和 Nestin 进行染色, 统计 Nestin 阳性细胞的比例, 评价不同条件下神经前体细胞的比例。

神经前体细胞扩增培养时, 通过机械法切割成小团块, 离心后, 将细胞团块重新悬浮于神经分化培养液中, 转移到 0.5%明胶包被的培养皿中以单层或神经球的方式继续培养, 使用的培养基为含 HGF+bFGF 的 NDCM 液。

1.3 免疫细胞化学染色 (ICC)

用 4%多聚甲醛在室温下固定细胞 20min, 0.4% Triton X-100 透膜 15 min, 用 PBS 冲洗 3 遍后; 加入 5%的羊血清室温下封闭 0.5h, 加入一抗 37°C 孵育 40min 或 4°C 过夜, 去掉一抗后, PBS 冲洗 3 次, 加入用 Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE) 或 Texas Red (TR) 标记的二抗 37°C 孵育 30 min 或室温作用 1h。FITC、PE 及 TR 标记的相应二抗均购于 Santa Cruz 公司。以不添加一抗, 而添加二抗的细胞作为阴性对照组, 检测二抗的非特异性结合情况。一抗包括: Oct4 兔抗多克隆抗体 (1:100; Santa Cruz), Nestin 鼠抗单克隆抗体(1:200; Chemicon)、 $\beta\text{III-tubulin}$ 兔抗多克隆抗体(1:200; Abcam), O4 鼠抗单克隆抗体(1:100; Chemicon)、MAP2 兔抗多克隆抗体 (1:200; Chemicon)、神经胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) 兔抗多克隆抗体(1:1000; Chemicon), c-Met 鼠抗单克隆抗体 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$; R & D systems)。染色后的细胞用 Hoechst33342 或 PI 标记细胞核。免疫标记的细胞在共聚焦显微镜下 (Zeiss, LSM 510 META) 进行检测, 每次实验检测的细胞数大约为 1000 个。

1.4 RNA 提取和 RT-PCR

细胞总 RNA 采用 TRIZOL RNA (Invitrogen) 试剂盒提取, 其具体方法按照试剂盒的说明书进行。采用 DNaseI 消化总 RNA 中可能含有的基因组 DNA, 去除 DNA 的污染。将提取的总 RNA ($1\mu\text{g}$) 在反转录酶的作用下, 反转录成单链 cDNA。用 $1\mu\text{L}$ cDNA 作为模板, 加入基因的特异引物进行 PCR 扩增。PCR 引物是针对人、小鼠和大鼠基因的保守序列区域进行设计的。PCR 引物的正义链、反义链的序列以及相应的 PCR 反应条件、产物的大小详见表 1。 $3\mu\text{L}$ 的 PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳, 电泳的条带通过溴化乙啶染色后, 在紫外条件下以看家基因 GAPDH 为标准, 用 Quantity-One 软件 (Bio-Rad)通过电泳条带的强弱程度, 评价基因表达量的高低。

1.5 BrdU (5-溴脱氧尿嘧啶核苷) 标记检测神经前体细胞的增殖

将[bFGF+HGF]组来源的分化第 12 天的神经前体细胞按 1:5 传代, 细胞贴壁后用 DMEM/F12 (1:1) 洗一次后分别换成不同的培养基: (1) 基础液 NDCM, 对照组; (2) bFGF($10\text{ ng}/\text{mL}$)+NDCM, [bFGF 组]; (3) HGF($10\text{ ng}/\text{mL}$)+NDCM, [HGF 组];

(4) bFGF(10ng/mL)+HGF(10ng/mL)+NDCM, [bFGF+HGF 组], 48h 后向培养基中添加 BrdU(10 μ mol/L, Sigma)孵育 1.5h 后用 4%的多聚甲醛于 4 $^{\circ}$ C 固定 30min, 然后用 0.1 mol/L PBS(pH=7.4, 含 0.5%的 Triton X-100)洗 3 遍, 每遍 5min, 用 HCl(1 mol/L)在冰上孵育 10min (使 DNA 变性解开双链), 再用 HCl (2 mol/L) 在室温孵育 10min, 然后转到 37 $^{\circ}$ C 培养箱内孵育 20min, 用 0.1 mol/L PBS 洗 3 遍, 用 0.1 mol/L 的硼酸在室温下孵育 12min, 用 0.1 mol/L

PBS(pH=7.4, 含 0.5%的 Triton X-100)洗 3 遍, 加入 0.5%的羊血清封闭 1h, 加 BrdU 的一抗 (兔抗单克隆 1 : 100; Abcam) 于 4 $^{\circ}$ C 过夜, 去掉一抗后, PBS 冲洗 3 遍, 加 Alexa Fluor 594 标记的二抗室温作用 1h, 以不添加一抗, 而添加二抗的细胞作为阴性对照组, 检测二抗的非特异性结合情况。染色后的细胞用 YOYO 标记细胞核。免疫标记的细胞在共聚焦显微镜 (Zeiss, LSM 510 META) 下进行检测, 每次实验检测的细胞数大约为 1000 个。

表 1 基因的引物序列及相应的反应条件及产物的大小

Tab. 1 Genes, primer sequences, annealing temperatures and product lengths

基因名称 Gene	引物序列 Primer sequence	退火温度 Annealing temperature($^{\circ}$ C)	产物大小 Product lengths(bp)
GAPDH	Forward:5'-TGAAGGTCGGAGTCAACCGGA-3' Reverse:5'-TGGTGCAGGAGGCATTGCTG-3'	55	449
AFP	Forward: 5' AAATACATCCAGGAGAGCCA 3' Reverse: 5' CTGAGCTTGGCACAGATCCT 3'	55	416
PAX6	Forward: 5'GGCAACCTACGCAAGATGGC3' Reverse: 5'TGAGGGCTGTGTCTGTTCCGG3'	55	459
Nestin	Forward: 5'-AGAGGGGAATTCCTGGAG-3' Reverse: 5'-CTGAGGACCAGGACTCTCTA-3'	54	490
Nkx2.1	Forward: 5' ACAAGAAAGTGGGCATGGAG3 Reverse: 5' GTTCCTCATGGTGTCTCTGGT3'	54	248
Otx2	Forward:5'GAAGCTCCATATCCCTGGGTGGAAAG3' Reverse:5'CCATGACCTATACTCAGGCTCAGG3'	52	211
SOX1	Forward: 5'TTTCTGGAAGTGTCTGGGTG 3' Reverse: 5'TGGCATTGGCTATTTCATCT 3'	47	54
En2	Forward: 5' GACAACATCCTGCGGCCCGAG3' Reverse: 5'CTGTGCCATGAGGTGCACGGC3'	52	720
Gbx2	Forward: 5'CGGTAACCTCGACAAGGC3' Reverse:5'AGCGAGAAGCTCTCCTCCTTGC3	52	198
Hoxb4	Forward: 5'CCTGGATGCGCAAAGTTC3' Reverse: 5GTGTTGGGCAACTGTGGTC3'	54	250
Brachyury	Forward: 5'CGGAACAATTCTCCAACCTATT3' Reverse: 5'GTACTGGCTGTCCACGATGTCT3'	55	357

1.6 流式细胞仪检测 nestin 阳性的神经前体细胞的比例

将分化第 12 天 [bFGF组]和[bFGF+HGF组]的细胞用 0.05%的胰酶消化成单个细胞, 用 10% NBS 的DMEM终止消化; 用PBS洗一遍, 加 4%的多聚甲醛室温固定 20min; 用含 5% NBS的PBS洗一遍, 加 0.4%的Triton X-100 室温透膜处理 15min; 用含 5% NBS的PBS洗一遍, 加一抗Nestin单克隆抗体 (1 : 200; Chemicon)37 $^{\circ}$ C水浴 30min; 用含 5% NBS的PBS洗一遍, 加二抗室温孵育 30 min; 用含 5% NBS的PBS洗一遍, 加含 5% NBS的PBS重悬细胞; 用流式细胞仪检测, 每次实验检测细胞数大约为 1×10^6 个(3 次重复)。

1.7 统计分析

统计数据 (3 次重复) 以平均值士标准误(SE) 进行表示。统计分析采用 SPSS10.0 软件进行 LSD (least-significant difference, 最小显著差数法) 分析。P<0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 rESCs 分化得到高比例的 nestin+神经前体细胞

培养在 MEF 上的 rESCs 具有典型的胚胎干细胞的形态特征, 细胞呈圆形或椭圆形, 核质比高, 细胞排列紧密, 细胞之间界限明确 (图 1A)。在分化过程中, rESCs 团块可在 0.5%明胶包被的培养皿

上有效地贴壁,在分化 48h 左右一些细胞开始死亡,细胞增殖很慢;但是,72 h 后细胞增殖加快,且细胞死亡减弱,细胞形态逐渐由圆形或椭圆形变为细长条形;分化的第 7 天神经样细胞呈密集排列,出现一些玫瑰花环结构(rosettes),继续培养 2—3 d 后,Rosettes 形成神经管(neural tubes)样的结构(图 1B—D);而非神经细胞团块逐渐变黑,随着培养时间的延长,一些团块直接飘起,最终死亡(图 1, G, H)。RT-PCR 结果显示,分化第 5 天的细胞开始表达神经上皮细胞的标志 PAX6,第 8 天开始表达神经上皮细胞的标志 SOX1(数据未显示)。

免疫组化检测结果显示在联合添加 HGF 和 bFGF 的条件下分化第 12 天的细胞绝大部分呈 Nestin 阳性(图 2A)。流式细胞仪检测结果显示 83.48% 的细胞呈 Nestin 阳性(图 2B)。将 Nestin 分别与神经元的标志 MAP2 及 rESCs 的干性标志 OCT4 共染,发现分化第 12 天的细胞呈 Nestin⁺/MAP2⁻/OCT4⁻(图 2A),即分化第 12 天的细胞不表达 rESCs 干性标志基因 OCT4,也不表达神经前体细胞终端分化型细胞的标志基因 MAP2,只表达神经前体细胞的标志基因 Nestin,说明此时的细胞为神

经前体细胞。为了进一步证明 Nestin 阳性的神经前体细胞中无非神经细胞的污染,分别取第 12 天的细胞及在添加 bFGF 和 HGF 的条件下继续培养一周后的细胞,提取 RNA 进行 RT-PCR 分析,结果显示中胚层标志基因(Brachyury)和内胚层的标志基因(AFP)均无表达,而只表达神经前体细胞的标志基因 Nestin(数据未显示),所以分化第 12d 的细胞是神经前体细胞。进一步的结果显示 HGF+bFGF 组的神经前体细胞主要表达前脑(Otx2)和脊髓(Hoxb4)的标志基因,而中脑(EN2)及后脑(Gbx2)的标志基因不表达(图 2C)。

Nestin⁺的神经前体细胞可以在 HGF+bFGF 的条件下进行单层培养(图 1E),但随着培养时间的延长,神经前体细胞的贴壁能力逐步降低,逐渐形成神经球(图 1F),并保持持续的增殖能力。

将培养第 20 天左右的细胞(第 3 代, P3)分割成小的细胞团块传代,并撤除培养基中的 bFGF 和 HGF 使其终端分化一周,结果绝大部分细胞表达早期神经元的标志 β III-Tubulin(图 3A),部分细胞开始表达成熟神经元的标志 MAP2(图 3B),但是没有 GFAP⁺的星型胶质细胞和 O4⁺的少突胶质细胞

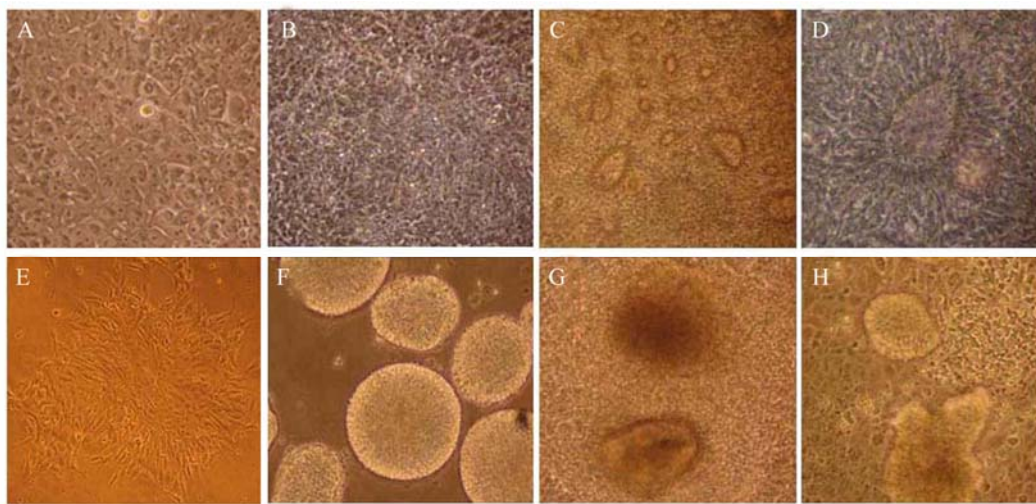


图 1 分化过程中不同时期的细胞形态

Fig. 1 Different morphologies of the cells at different stages in the process of neural differentiation

A: 培养在小鼠饲养层上的 rESCs(the rhesus monkey embryonic stem cells cultured on mouse embryonic fibroblast feeder layers); B: 分化第 7 天的细胞(the cells on day 7 post differentiation); C: 分化第 7 天的玫瑰花环结构 (the rosette structures on day 7 post differentiation); D: 分化第 9 天的神经管样结构(the neural tube-like structures on day 9 post differentiation); E: 贴壁培养的神前体细胞的形态(the morphology of neural progenitors cultured in adherent system); F: 悬浮培养的神球 (the neurospheres in suspension culture); G: 分化第 7 天非神经细胞(the non-neural cells on day 7 post differentiation); H: 分化第 10 天非神经细胞 (the non-neural cells on day 10 post differentiation)。

C, E, $\times 100$, A, B, D, F, G, H, $\times 200$.

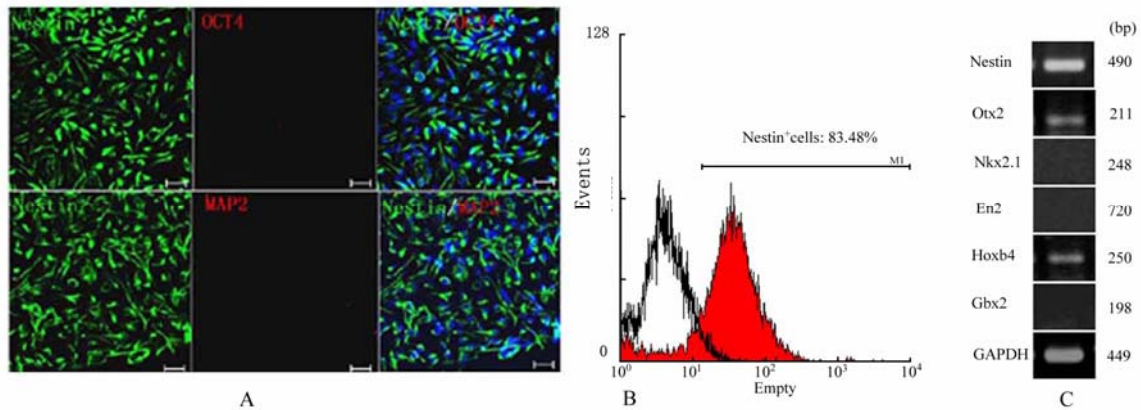


图 2 分化第 12d 的神经前体细胞

Fig. 2 The neural progenitors (NPs) on day 12 post differentiation

A: 神经前体细胞呈Nestin⁺/MAP2⁻/OCT4⁺(Nestin⁺/MAP2⁻/OCT4⁺, neural progenitors)。绿色为Nestin; 红色为OCT4 或MAP2; 蓝色为Hoechst33342 标记的细胞核(green: Nestin; red: OCT4 or MAP2; nuclei were stained with Hoechst 33342, blue); 标尺=50 μ m (Scale bars=50 μ m); B: 流式细胞仪检测由bFGF+HGF组分化得到的Nestin⁺细胞的比例 (the proportion of nestin⁺ cells in bFGF+HGF group detected by flow cytometry); C: 神经前体细胞的脑区特征: 表达前脑 (Otx2) 和脊髓 (Hoxb4) 的标志基因[the regional identity of the neural progenitor: expressing forebrain (Otx2) and spinal cord (Hoxb4) markers]。

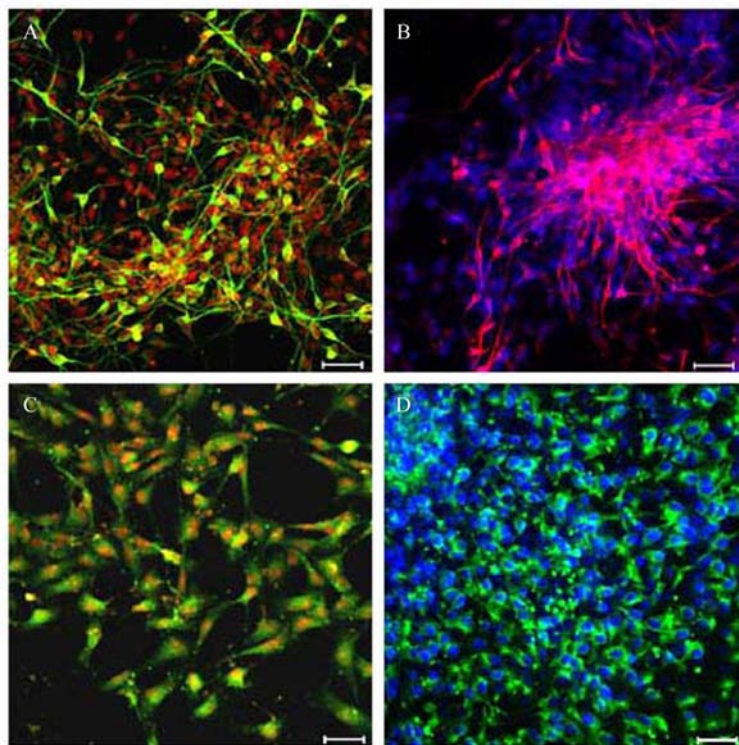


图 3 rESCs 细胞来源的 NPs 的体外分化

Fig. 3 Differentiation of NPs derived from rESCs *in vitro*

NPs 具有多能性, 在体外分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞 (NPs are multipotent, being capable of differentiating into neurons, astrocytes and oligodendrocytes)。

A: 神经元: 表达 β -III tubulin, 绿色 (neurons: β -III tubulin, green); B: 神经元: 表达 MAP2, 红色 (neurons: MAP2, red); C: 星形胶质细胞: 表达 GFAP, 绿色 (astrocytes: GFAP, green); D: 少突胶质细胞: 表达 O4 绿色 (oligodendrocytes: O4, green)。

A, C 红色为 PI (PI, red); B, D 蓝色为 Hoechst33342 标记的细胞核 (nuclei were stained with Hoeschst33342, blue); 标尺=50 μ m (scale bars = 50 μ m)。

出现。而只有在bFGF和HGF的条件下继续培养的神经前体细胞(第6代, P6)才能终端分化为GFAP⁺星型胶质细胞(图3C)和O4⁺少突胶质细胞(图3D), 并且随着体外培养时间的延长, 神经前体细胞主要分化为少突胶质细胞, 说明由rESCs分化得到的Nestin⁺的神经前体细胞具有向3个谱系神经细胞分化的能力。

2.2 c-Met 在神经分化过程中的表达变化

因为 c-Met 是 HGF 的唯一受体, HGF 要发挥作用必须有 c-Met 的表达, 分别固定分化第 0 天 rESCs (培养在 MEF 上), 第 4 天由 rESC 向神经前体细胞过渡的细胞, 第 12 天神经前体细胞, 检测 c-Met 的表达。结果显示 rESCs 中 c-Met 无表达, 但是强表达胚胎干细胞的标志基因 OCT4, (图 4A); 随着分化的进行, c-Met 开始在过渡期细胞中表达, 而 OCT4 的表达减弱(图 4B); 在神经前体细胞中 c-Met 强表达, 并且已完全检测不到 OCT4 的表达(图 4C)。所以在 rESC 向神经细胞分化过程中, c-Met 从无到有, 并逐渐增多; 而 OCT4 的表达逐渐下降, 表明在 rESCs 向神经细胞诱导分化的过程中需要 OCT4 的短暂表达, 这和前人的研究结果一致

(Shimozaki et al, 2003; Perrier et al, 2004; Gerrard et al, 2005)。

2.3 不同分化组可诱导 rESC 分化得到相似比例的神经前体细胞

不同分化组(NDCM 对照组, bFGF 组, HGF 组, bFGF+HGF 组)在诱导 rESCs 向神经细胞分化的早期, 细胞增殖度及状态存在差异。NDCM 和 HGF 组相似: 细胞死亡较多, 增殖速度很慢; 而 bFGF 和 bFGF+HGF 组相似: 细胞死亡较少, 且增殖速度较快, 而后在分化过程中向培养基中添加 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的 bFGF 受体的抑制剂 SU5402, 结果细胞大量死亡, 说明在诱导分化的过程中 bFGF 能显著的促进细胞的存活和增殖, 而外源的 HGF 对过渡期细胞的存活和增殖无明显的作用。

免疫组化检测 NDCM 对照组, bFGF 组, HGF 组, bFGF +HGF 组分化第 12 d 的细胞中 Nestin 阳性细胞的比例, 结果显示 NDCM 对照组为 (71.88 \pm 5.45) %, bFGF 组为 (78.26 \pm 4.25) %, HGF 组为 (76.93 \pm 2.59) %, bFGF+HGF 组为 (81.66 \pm 4.37) %。可见, 在不同分化组之间 Nestin⁺ 的神经前体细

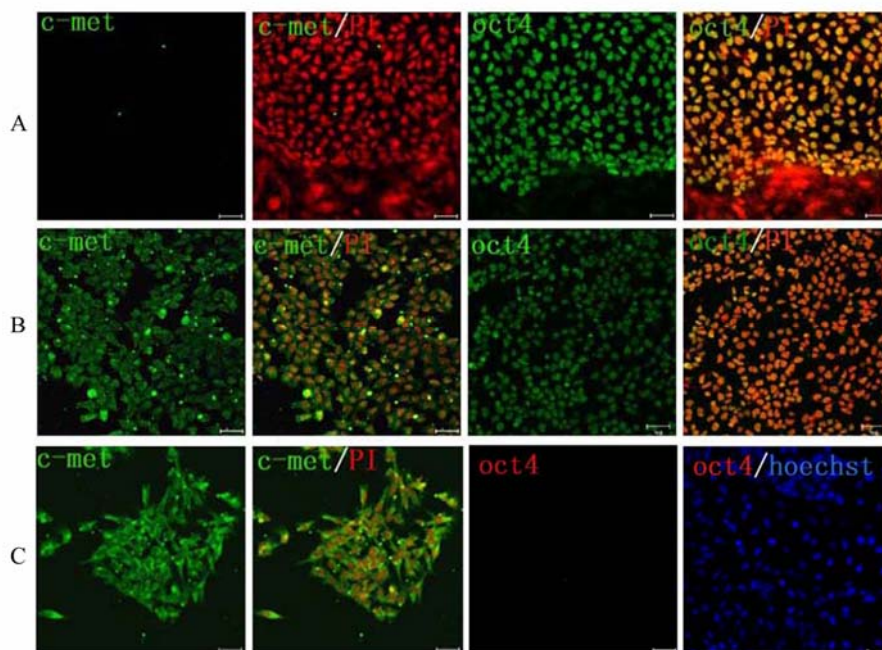


图 4 神经分化过程中 c-Met 的表达

Fig. 4 The expression of c-Met in neural differentiation

A: 培养在 MEF 上的 rESCs: c-Met 不表达, OCT4 强表达 (the rESCs cultured on MEF did not express c-Met at all, but they expressed OCT4 strongly); B: 分化第 4 天的细胞, c-Met 开始表达, OCT4 表达降低 (the differentiating cells on the 4th day started expressing c-Met; however, the expression of OCT4 reduced); C: 分化第 12 天的神经前体细胞, c-Met 强表达, OCT4 呈阴性 (the neural progenitors on the 12th day expressed c-Met strongly, but the expression of OCT4 was not observed)。标尺=50 μm (scale bars=50 μm)。

胞的比例无显著差异($P>0.05$) (图 5A)。流式结果也显示 bFGF+HGF 组 $[(80.10\pm 8.49)\%]$ 与 bFGF 组 $[(75.80\pm 9.53)\%]$ Nestin 阳性细胞的比例无显著差异 ($P>0.05$) (图 5B), 这与免疫组化的结果相符。

所以外源性的 HGF 和 bFGF 在诱导 rESCs 向神经前体细胞转变的过程中对于神经细胞命运的决定并无明显的作用。

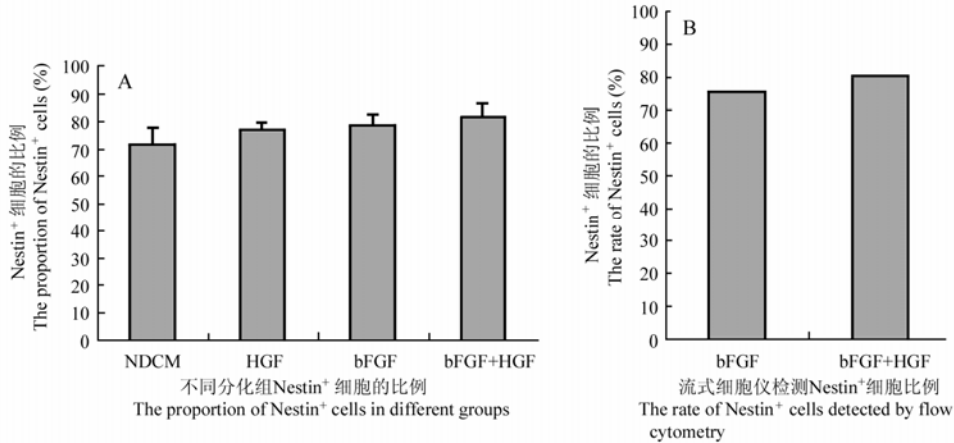


图 5 不同分化组Nestin⁺细胞的比例

Fig. 5 The proportion of Nestin⁺ cells in different groups

A: 免疫组化检测NDCM、HGF组、bFGF组和bFGF+HGF组Nestin⁺细胞的比例,各组间Nestin⁺细胞的比例无明显差异, $P>0.05$ (the proportion of Nestin⁺ cells in NDCM group, HGF group, bFGF group and bFGF+HGF group detected by immunocytochemistry, and there were no significant differences between different groups, $P>0.05$); B: 流式检测bFGF组和bFGF+HGF组Nestin⁺细胞的比例,两者间无明显差异, $P>0.05$ (the proportion of Nestin⁺ cells in bFGF group and bFGF+HGF group detected by Flow Cytometry, there were no significant differences between them, $P>0.05$).

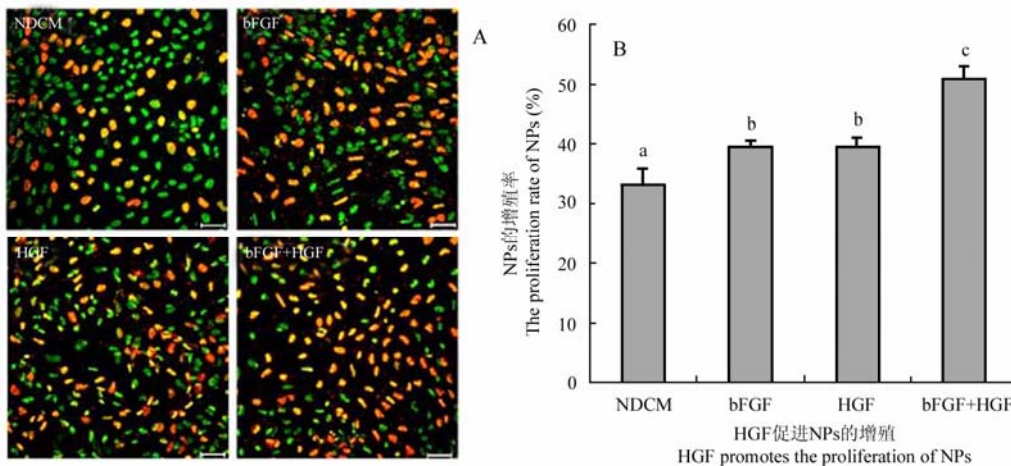


图 6 BrdU 检测不同培养条件下神经前体细胞的增殖情况

Fig. 6 Proliferation of NPs in different media detected by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation

A: 免疫组化检测不同培养条件下BrdU⁺细胞的比例。红色为BrdU阳性的细胞核;绿色为YOYO标记的所有细胞的细胞核 (the proportion of BrdU⁺ cells cultured in different medium were detected by immunocytochemistry. Nuclei incorporated with BrdU, red; nuclei of all cells stained by YOYO, green); B: 对免疫组化检测不同培养条件下BrdU⁺细胞的比例进行LSD分析 (the proportion of BrdU⁺ cells in different culture medium detected by immunocytochemistry were statistically analyzed using the LSD test)。

图中柱上不同字母表示有显著差异, $c>b>a$, $P<0.05$ (values in the figures with different lowercase letters indicate significant difference, $c>b>a$, $P<0.05$)。

2.4 HGF 促进神经前体细胞的增殖

分化第 12 天的神经前体细胞换成不同的培养基,培养 48h 后添加 BrdU,作用 1.5h 后,检测 BrdU

阳性细胞的比例,结果为: 1) 基础液 NDCM (对照组): $(33.14\pm 2.63)\%$; 2) bFGF 组: $(39.42\pm 1.03)\%$; 3) HGF 组: $(39.55\pm 1.55)\%$; 4) bFGF+HGF 组:

(50.77 ± 2.05)%, 表明 HGF 组和 bFGF 组细胞增殖率相似并且显著高于对照组 ($P < 0.05$); 而 bFGF+HGF 组细胞增殖率最快, 明显高于 HGF 组和 bFGF 组 ($P < 0.05$), 特别是与对照组比, 差异更加明显 ($P < 0.05$) (图 6)。这说明 HGF 能促进神经前体细胞的增殖, 并且与 bFGF 具有协同作用。

3 讨论

HGF 是一种广泛表达的多效应因子, 在胚胎发育及成体神经系统中都有 HGF 及受体 c-Met 的表达, 但是对于 HGF 在早期神经系统发育 (特别是哺乳动物) 中的具体作用还不明确, 这方面的研究还很少。我们先前采用 HGF 和 G5 supplement 结合 EB 法可诱导 rESCs 定向分化成高纯度 [(88.3 ± 8.1) %] 的可移植的神经前体细胞, 并且在分化过程中单独添加 HGF 或 bFGF 分别得到了 (65 ± 8.3)%, (68 ± 7.2)% 的神经前体细胞, 比对照组 [(15 ± 12) %] 要高, 但是比联合添加 HGF 和 G5 supplement [(88.3 ± 8.1) %] 低 (Li et al, 2005), 这表明 HGF 在神经系统发育中确实具有重要的作用, 但是 HGF 在整个分化过程中的具体作用及不同分化组间形成不同比例的神经前体细胞的原因等还不清楚。

在此基础上, 我们改进先前的 EB 诱导分化体系。一方面采用单层培养法诱导体系来代替 EB 法诱导体系, 在短时间内就可以得到大量的神经细胞, 同时诱导分化液不含血清, 其成分简单明确, 这样得到的神经细胞不含有动物源成分的污染, 这是细胞替代治疗最关键的问题之一, 为将来细胞替代性治疗提供安全基础 (Ying & Smith, 2003; Ying et al, 2003; Shin et al, 2006); 另一方面用 bFGF 替代成分复杂的 G5 supplement, 简化了分化液的成分, 从而可以具体研究某种因子在神经分化中的作用及各因子之间的关系, 为研究神经细胞分化的分子机制搭建了一个平台。结果显示, 采用单层培养的方式, 将 rESCs 团块直接贴壁培养在含 bFGF 和 HGF 的成分确定的诱导分化液中, 得到了高比例的神经前体细胞, 这种神经前体细胞还具有多能性, 能终端分化形成神经元和胶质神经细胞 (图 3), 同时这些神经前体细胞还具有特异的脑区特性 (表达前脑和脊髓的标志基因) (图 2C), 这表明这个单层诱导分化体系能有效地诱导 rESCs 定向分化为神经细胞, 从而建立了一种更简单的神经诱导分化体系, 并且使单独研究 HGF 在这个分化过程的具体作用

成为可能。

HGF 必须与其唯一受体 c-Met 结合才能发挥它的作用, 在本研究中, 我们检测了在整个诱导分化过程中 HGF 的受体 c-Met 的表达情况, 结果发现随着诱导分化的开始 c-Met 才开始表达 (图 4), 在神经前体细胞中强表达, 这与来源于小鼠胚胎的神经干细胞也表达 c-Met 是一致的 (Kokuzawa et al, 2003), 说明在神经系统发育过程中, HGF 的受体是表达的, HGF 在这个过程可能具有重要的作用。但是, 免疫组化的结果也显示在分化的过程中所有的细胞都是 c-Met 阳性 (阳性对照和阴性对照实验已证明这个结果不是假阳性), 这说明 c-Met 并非特异性地在神经细胞中表达, 而是广泛表达于多种细胞类型, 这和早期的研究结果一致: 即在胚胎发育的过程中, c-Met 广泛表达于各种组织或器官的上皮细胞, 并且在神经系统的大脑皮层、嗅球、初级嗅觉皮层、海马和小脑的神经元中 c-Met 均有分布 (Sonnenberg et al, 1993; Jung et al, 1994; Honda et al, 1995; Takayama et al, 1996; Miyazawa et al, 1998)。

为检测外源的 HGF 与 bFGF 在 rESCs 向神经细胞分化的过程中是否具有神经诱导的作用, 采用不同的诱导分化条件处理 rESCs, 结果各组 (NDCM 组, bFGF 组, HGF 组, bFGF + HGF 组) 得到相似比例的 Nestin⁺ 神经前体细胞 (图 5A), 表明外源的 HGF 和 bFGF 并不能决定 rESCs 向神经细胞的转化, 这和前人的研究结果一致, HGF 并没有直接的神经诱导作用 (Streit et al, 1997; Streit & Stern 1997)。进一步研究发现 HGF 和 bFGF 能促进 rESCs 来源的神经前体细胞的增殖, 并且两者具有协同作用 (图 6), 与 HGF 在小鼠胚胎来源的神经干细胞的中的作用相似 (Kokuzawa et al, 2003)。根据以上结果可以推测, 在先前的 EB 诱导分化过程中 (Li et al, 2005), HGF 和 bFGF 是通过促进神经前体细胞的增殖间接地提高了神经前体细胞的比例。

比较单层培养法诱导体系 (NDCM 组: 71.88 ± 5.45 %, HGF 组 76.93 ± 2.59 %, bFGF 组: 78.26 ± 4.25 %) 和我们先前的 EB 法诱导体系 (NDCM 组: 15 ± 12 %, HGF 组 65 ± 8.3 %, bFGF 组: 68.5 ± 7.2 %) 各组 Nestin⁺ 神经前体细胞的比例, 一方面, 两个体系中用 bFGF (bFGF 组) 或 HGF (HGF 组) 诱导 rESCs 向神经细胞分化都得到了相似比例的神经前体细胞; NDCM 对照组的的结果在两个分化体系中差异却很大: 在单层培养法诱导体系中 NDCM 对照组、

bFGF组和HGF组得到相似比例的神经前体细胞,而我们先前的EB法诱导体系中NDCM对照组神经前体细胞的比例明显比bFGF组和HGF组低,鉴于前人对神经分化机制的研究及本研究的结果分析得出:这种差异主要是由于两个分化体系特性的不同而引起的。第一,在单层培养法诱导体系中,整个单层培养环境自始至终都不含血清,细胞呈单层贴壁生长,且细胞密度较小,细胞之间的相互作用比较弱,rESCs可能在内源性因子(如内源性bFGF)的作用下遵循Default模型自发分化为神经细胞,并且细胞能均一的受到诱导环境的影响,分化具有较高的同步性,细胞比较均一,而外源因子只是起到促进细胞存活及增殖的作用(Grunz & Tacke, 1989; Sato & Sargent, 1989; Tropepe et al, 2001; Munoz-Sanjuan & Brivanlou, 2002; Ying et al, 2003);第二,单层分化体系对神经细胞具有筛选作用:在分化过程中,分化48h左右一些细胞开始死亡,细胞增殖很慢,72h后细胞增殖加快,在分化的第7天神经样细胞已长得非常致密,并出现了一些玫瑰花环(rosettes),继续培养2—3天,Rosettes形成类似神经管样的结构,而非神经细胞团块变黑死亡,甚至部分团块直接飘起死亡,使绝大部分非神经细胞因不适合此分化体系被筛选掉而留下神经细胞(图1: B—D, G, H)。所以结合以上两点,可以解释在单层培养体系中NDCM对照组(不添加HGF及bFGF)同样能够得到与bFGF组、HGF组相似比例的神经前体细胞。然而在先前的EB诱导分化体系中,一方面因为EB本身是一个早期胚胎的类似物,可以模拟体内早期胚胎的发育过程,由3个胚

层来源的多种类型的细胞组成,EB中神经细胞的比例很低(Bain et al, 1995),同时在EB的培养过程中培养基中含血清,而血清抑制ES细胞向神经细胞的分化(Kawasaki et al, 2000; Ying et al, 2003),并且其他非神经细胞可能会抑制神经细胞的形成,这就更降低了神经细胞的比例;另一方面在先前的EB体系中,形成的EB要悬滴及悬浮培养9天后才转成贴壁培养,同时换成分化液,这时整个EB含有大量的非神经细胞,所以当将第9天的EB转成贴壁培养后,在不添加任何因子的情况下,细胞自发分化,最终形成低比例的神经前体细胞,而在添加了HGF, bFGF的条件下,因为HGF和bFGF能促进神经前体细胞的增殖,并且具有协同作用,所以间接地提高了神经前体细胞的比例,最终导致bFGF组、HGF组Nestin⁺的神经前体细胞的比例明显的高于NDCM对照组。另一方面比较在这两个体系下得到的神经前体细胞的比例,发现单层培养体系中各组神经前体细胞的比例都分别比EB体系中相应组高,这更体现了单层培养的优越性。

总之,本研究表明,采用单层培养法,同时添加HGF和bFGF能诱导rESCs在两周内定向分化为高纯度的神经前体细胞,发现外源性的HGF在诱导rESCs向神经前体细胞转变过程中,对于神经细胞命运的决定并不起作用,但是HGF能有效地促进神经前体细胞的增殖,并且与bFGF具有协同作用。这不仅建立了一种更简单的神经诱导分化体系,同时也为进一步研究HGF的作用机制奠定了基础。

参考文献:

- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro* [J]. *Developmental biology*, **168**(2): 342-357.
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. 1991. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product [J]. *Science*, **251**(4995): 802-804.
- Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner KM, Birchmeier W. 1995. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells [J]. *The Journal of Cell Biology*, **131**(6 Pt 1): 1573-1586.
- Bronner-Fraser M. 1995. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in early development: evidence for a role in neural induction [J]. *Trends in Genetics*, **11**(11): 423-425.
- Comoglio PM. 1993. Structure, biosynthesis and biochemical properties of the HGF receptor in normal and malignant cells [J]. *Exs*, **65**: 131-165.
- Delaune E, Lemaire P, Kodjabachian L. 2005. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition [J]. *Development*, **132**(2): 299-310.
- Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG Jr, Blatt F, Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M. 1996. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons [J]. *Neuron*, **17**(6): 1157-1172.
- Furlong RA. 1992. The biology of hepatocyte growth factor/scatter factor [J]. *Bioessays*, **14**(9): 613-617.
- Gerrard L, Rodgers L, Cui W. 2005. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling [J]. *Stem cells*, **23**(9): 1234-1241.
- Grunz H, Tacke L. 1989. Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer [J]. *Cell Differentiation and Development*, **28**(3): 211-217.
- Hamanoue M, Takemoto N, Matsumoto K, Nakamura T, Nakajima K, Kohsaka S. 1996. Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on central nervous system neurons *in vitro* [J]. *Journal of Neuroscience*

- Research*, **43**(5): 554-564.
- Honda S, Kagoshima M, Wanaka A, Tohyama M, Matsumoto K, Nakamura T. 1995. Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain: Implication as neurotrophic factor [J]. *Brain Research*, **32**(2): 197-210.
- Jung W, Castren E, Odenthal M, Vande Woude GF, Ishii T, Dienes HP, Lindholm D, Schirmacher P. 1994. Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain [J]. *The Journal of Cell Biology*, **126**(2): 485-494.
- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity [J]. *Neuron*, **28**(1): 31-40.
- Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin RS, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. 2007. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury [J]. *Journal of Neuroscience Research*, **85**(11): 2332-2342.
- Kokuzawa J, Yoshimura S, Kitajima H, Shinoda J, Kaku Y, Iwama T, Morishita R, Shimazaki T, Okano H, Kunisada T, Sakai N. 2003. Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from mouse embryos [J]. *Molecular and Cellular Neurosciences*, **24**(1): 190-197.
- Kudoh T, Concha ML, Houart C, Dawid I.B, Wilson SW. 2004. Combinatorial Fgf and Bmp signalling patterns the gastrula ectoderm into prospective neural and epidermal domains [J]. *Development*, **131**(15): 3581-3592.
- Li T, Zheng J, Xie Y, Wang S, Zhang X, Li J, Jin L, Ma Y, Wolf DP, Zhou Q, Ji W. 2005. Transplantable neural progenitor populations derived from rhesus monkey embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, **23**(9): 1295-1303.
- Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. 1997. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons [J]. *Genes & Development*, **11**(24): 3341-3350.
- Mason I. 2007. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development [J]. *Nature Reviews. Neuroscience*, **8**(8): 583-596.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. 1997. Liver regeneration [J]. *Science*, **276**(5309): 60-66.
- Miyazawa T, Matsumoto K, Ohmichi H, Katoh H, Yamashita T, Nakamura T. 1998. Protection of hippocampal neurons from ischemia-induced delayed neuronal death by hepatocyte growth factor: a novel neurotrophic factor [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, **18**(4): 345-348.
- Munoz-Sanjuan I, Brivanlou AH. 2002. Neural induction, the default model and embryonic stem cells [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, **3**(4): 271-280.
- Nakamura T. 1991. Structure and function of hepatocyte growth factor [J]. *Progress in Growth Factor Research*, **3**(1): 67-85.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. 1984. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **122**(3): 1450-1459.
- Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM. 1991. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET [J]. *Oncogene*, **6**(4): 501-504.
- Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L. 2004. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(34): 12543-12548.
- Sato SM, Sargent TD. 1989. Development of neural inducing capacity in dissociated *Xenopus* embryos [J]. *Developmental biology*, **134**(1): 263-266.
- Shimamura M, Sato N, Sata M, Wakayama K, Ogihara T, Morishita R. 2007. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met after spinal cord injury in rats [J]. *Brain Research*, **1151**: 188-194.
- Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T. 2003. Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures [J]. *Development*, **130**(11): 2505-2512.
- Shin S, Mitalipova M, Noggle S, Tibbitts D, Venable A, Rao R, Stice S.L. 2006. Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions [J]. *Stem Cells*, **24**(1): 125-138.
- Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C. 1993. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development [J]. *The Journal of Cell Biology*, **123**(1): 223-235.
- Stern CD, Ireland GW. 1993. HGF-SF: A neural inducing molecule in vertebrate embryos? [J] *Exs*, **65**: 369-380.
- Streit A, Sockanathan S, Perez L, Rex M, Scotting PJ, Sharpe PT, Lovell-Badge R, Stern CD. 1997. Preventing the loss of competence for neural induction: HGF/SF, L5 and Sox-2 [J]. *Development*, **124**(6): 1191-1202.
- Streit AC, Stern CD. 1997. Competence for neural induction: HGF/SF, HGF1/MSP and the c-Met receptor [J]. *Ciba Foundation symposium*, **212**: 155-165; discussion 165-158.
- Takayama H, La Rochelle WJ, Anver M, Bockman DE, Merlino G. 1996. Scatter factor/hepatocyte growth factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(12): 5866-5871.
- Takebayashi T, Iwamoto M, Jikko A, Matsumura T, Enomoto-Iwamoto M, Myoukai F, Koyama E, Yamaai T, Matsumoto K, Nakamura T, et al. 1995. Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and proteoglycan synthesis of chondrocytes [J]. *The Journal of Cell Biology*, **129**(5): 1411-1419.
- Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D. 2001. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism [J]. *Neuron*, **30**(1): 65-78.
- Trovato M, D'Armiento M, Lavra L, Olivieri A, Dominici R, Vitarelli E, Grosso M, Vecchione R, Barresi G, Sciacchitano S. 2007. Expression of p53/HGF/c-met/STAT3 signal in fetuses with neural tube defects [J]. *Virchows Archiv*, **450**(2): 203-210.
- Uehara Y, Kitamura N. 1992. Expression of a human hepatocyte growth factor/scatter factor cDNA in MDCK epithelial cells influences cell morphology, motility, and anchorage-independent growth [J]. *The Journal of Cell Biology*, **117**(4): 889-894.
- Ying QL, Smith AG. 2003. Defined conditions for neural commitment and differentiation [J]. *Methods in Enzymology*, **365**: 327-341.
- Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. 2003. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture [J]. *Nature Biotechnology*, **21**(2): 183-186.