

增强型绿色荧光蛋白转染对大鼠骨髓间充质干细胞体外神经元样细胞分化的影响

李亚伟, 王冰, 吕国华, 刘伟东, 李磊

(中南大学湘雅二医院脊柱外科, 长沙 410011)

[摘要] 目的:利用质粒载体将增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)转染大鼠骨髓间充质干细胞(rat mesenchymal stem cells, rMSC),研究EGFP对rMSC体外诱导分化神经元样细胞的影响。方法:以质粒为载体将EGFP基因转染rMSC,流式细胞仪检测转染后rMSC的表面标志物,并对转染EGFP的rMSC在体外向神经元方向诱导分化。结果:转染EGFP基因的rMSC与未转染的rMSC在细胞形态学和生长特性方面一致。转染EGFP基因的rMSC在细胞表面标志物上符合rMSC的特点,呈CD44(+),CD11b(-),CD45(-),经体外培养后可诱导分化神经元样细胞,并且2组诱导分化神经元样细胞阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:转染EGFP基因对rMSC在体外诱导分化神经元样细胞无明显影响,EGFP可作研究rMSC分化潜能机制的有效示踪标志。

[关键词] 增强型绿色荧光蛋白; 骨髓间充质干细胞; 诱导分化; 神经元样细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.12.010

Effect of transfection of enhanced green fluorescent protein gene on neuron-like differentiation of rat mesenchymal stem cells

LI Yawei, WANG Bing, LÜ Guohua, LIU Weidong, LI Lei

(Department of Spinal Surgery, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: Objective To determine the effect of transfection of enhanced green fluorescent protein (EGFP) on neuron-like differentiation of rat mesenchymal stem cells (rMSC) with plasmid vector. **Methods** In vitro cultured rMSC was transfected with plasmid vector containing EGFP, and its surface marker and differentiation neuron-like cells were detected. **Results** There was no significant difference in the morphology and surface markers between the EGFP-rMSC and rMSC. The cell surface markers of EGFP-rMSC including expression of CD44(+), CD11b(-) and CD45(-) remained similar to those of rMSC. EGFP-rMSC presented the differentiated potential to neuron-like cells. There was no statistical difference in the positive ratio of neuron-like differentiation between the EGFP-rMSC and rMSC ($P > 0.05$). **Conclusion** EGFP does not affect the neuron-like differentiation potential of rMSC, and can be used as the trace marker in the study of

收稿日期 (Date of reception) 2011-04-01

作者简介 (Biography) 李亚伟, 博士研究生, 主要从事脊柱与脊髓损伤修复方面的研究。

通信作者 (Corresponding author) 王冰, E-mail: bingwang20021972@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation item) 湖南省科技厅基金(2009SK3167)。 This work was supported by the funds from the Department of Science and Technology of Hunan Province, P. R. China (2009SK3167).

differentiation potential of rMSC.

Key words: enhanced green fluorescent protein; mesenchymal stem cell; differentiation; neuron-like cell

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中枢神经系统的严重创伤。如何修复损伤的脊髓是目前治疗的难点。研究^[1-3]表明:采用生物学方法,尤其是进行干细胞移植,对中枢神经系统损伤、缺血、变性等病理改变有明显的修复作用而逐渐成为研究热点。干细胞种类来源广泛,包括胚胎干细胞、神经干细胞、骨髓间充质干细胞等,其中骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)因有取材方便、无异体移植排斥和能够定向分化神经元样细胞等优点而被用于脊髓损伤研究,并取得一些进展^[3-6],然而其确切机制尚不清楚。近年来,采用适当的分子示踪标记 MSC,已成为研究其在体内外向神经元方向分化的重要方法^[7-8]。增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)作为常用的分子标志物,已被用于实时定位检测 MSC 移植后的分化和基因表达^[9]。但是,EGFP 转染 MSC 后,对 MSC 的生长增殖特性,尤其对其横向分化能力是否有影响尚缺乏可靠依据;并且转染后的 MSC 是否仍表达原 MSC 细胞表面标志物报道较少。为此,本研究拟将 EGFP 基因转染大鼠 MSC,旨在证实 EGFP 转染未对 MSC 的增殖和向神经元细胞分化造成影响,转染 EGFP 基因后在细胞表面标志物仍符合 MSC 的特点,未改变细胞生物学性状和表面标志物,从而为下一步在脊髓损伤模型中进行 MSC 体内实验提供研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

清洁级成年 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 160 ~ 220 g,由中南大学湘雅二医院动物实验室提供;L-DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、Opti-MEM 均购自美国 Gibco 公司;0.01 mol/L pH7.2 PBS(粉剂)购自福州迈新生物技术开发公司;0.25% 胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司;流式抗体 mouse anti-CD44,11b,45 购自美国 Biolegend 公司; β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, β -ME)购自湖南师范大学化学试剂厂;重组人碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth

factor, bFGF)购自美国 Peprotech 公司;增强型绿色荧光蛋白质粒(pEGFP-N1)由中南大学医学遗传学国家重点实验室提供;Spin 质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;兔抗大鼠 TuJ-1 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 rMSC 的分离培养

SD 大鼠经断头法处死,无菌条件下取出双侧股骨和胫骨,在 D-Hank's 液中清除附着于骨的肌肉组织,剪开两端骨髓,用 10 mL 注射器吸取 5 mL L-DMEM 完全培养液,从骨髓的一端反复冲洗骨髓腔,将骨髓腔内的骨髓冲洗液收集于无菌离心管中以 500 g 离心 5 min,弃去上清液,加入血清培养液,充分吹打至单细胞悬液,直接接种于 25 cm² 塑料培养瓶,置于 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中,3 d 后首次换液,换液前用 0.01 mol/L 的 PBS 轻轻冲洗培养瓶,以去除未贴壁的细胞,当 SD 大鼠 rMSC 原代细胞培养形成克隆并且细胞融合达 80% 后,用 0.25% 胰蛋白酶在 37 °C 条件下消化,进行传代、扩增培养。镜下观察,待 rMSC 消化成单个细胞,用 L-DMEM 完全培养液中止消化,并反复吹打,制成单细胞悬液,将细胞悬液收集到离心管内,以 500 g 离心 5 min,弃上清,加 L-DMEM 完全培养液重悬细胞并按 1:2 比例传代。每 3 d 换液 1 次,并逐日观察细胞的生长情况,待细胞融合 80% ~ 90% 时,进行下一次传代,再次传代时按 1:3 比例进行。经 2 ~ 3 次传代培养,使 rMSC 逐渐得到纯化和扩增。倒置相差显微镜下逐日观察细胞的形态。

1.3 EGFP 基因转染 rMSC

取第 4 代 rMSC,以 2×10^4 /mL 浓度接种至 6 孔培养板,37 °C 培养过夜,待细胞 70% ~ 80% 融合时进行基因转染,于转染前 4 h 更换新的 L-DMEM 完全培养液。制备 pEGFP-N1 cDNA 与 Lipofectamine 2000 复合物(DNA:Lipofectamine 2000 = 1:2.5),室温放置 30 min,吸去培养孔中原培养液,用 PBS 冲洗 2 次。每孔加入 Opti-MEM 1 mL,再逐滴缓慢加入 DNA-lipofectamine 2000 复合物。对照孔加入 Opti-MEM 1 mL。4 h 后,小心吸去培养孔中培养液,用

PBS 冲洗 2 次,每孔加入 *L*-DMEM 完全培养液 2 mL。转染 24 h 后,倒置荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达。

1.4 G418 筛选 EGFP 阳性细胞克隆

上述转染细胞以 37 °C, CO₂ 浓度为 5% 的条件开放培养 24 h 后,见大量悬浮死细胞,弃上清,加入含 10% FBS 高糖 DMEM 培养基 15 mL,以 37 °C, CO₂ 浓度为 5% 的条件继续培养 24 h,加入 G418 至筛选终浓度为 200 μg/mL。每 2 d 换液 1 次,1 周后见正常对照细胞死亡,偶见细胞小克隆形成。G418 筛选浓度 200 μg/mL 续筛 1 周后,细胞 60% ~ 70% 汇合时按 1:4 传代。

1.5 rMSC 表面标志的鉴定

分别选取生长良好的 rMSC 和 EGFP-rMSC 细胞,将细胞消化制备成单细胞悬液,每个样品约 3 × 10⁵ 个细胞。500 g 离心 5 min,以 500 μL PBS 重悬。将重悬后的细胞悬液转移至流式检测管中,分别加入 CD44, CD11b, CD45 抗体 5 μL。避光 4 °C 孵育 30 min。加入 500 μL PBS,500 g 离心 5 min,弃上清,洗脱未结合上的抗体。加入 300 μL PBS,混匀后进行流式细胞仪检测。

1.6 EGFP-rMSC 向神经元方向诱导分化

取 rMSC 和 EGFP-rMSC 细胞,分别以 2 × 10⁴/mL 浓度接种于 24 孔板内,待细胞 70% ~ 80% 融合时,将 bFGF (10 ng/mL) 和 β-ME (1 mmol/mL) 加入 2 组细胞孔板。取贴壁 48 h 后表达稳定的细胞,在倒置相差显微镜及荧光显微镜下连续观察细胞形态变化。

1.7 诱导细胞免疫荧光鉴定

将贴壁 48 h 后的 2 种细胞去掉培养基, PBS 洗涤后 4% 多聚甲醛室温下固定 20 min; PBS 洗涤 2 次,室温下 0.1% Triton-X 100/PBS 渗透 1 h; 再用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min; 用新鲜配制封闭液 (5 mg/mL FBS/PBS) 室温下封闭 30 min; 将兔抗鼠的多克隆抗体 (抗 TuJ-1 抗体 1:50) 加入封闭液中,然后加入上述 2 组样本中,室温下反应 2 h; PBS 洗涤 3 次,每次 10 min; 用 PBS 配制 Cy3 荧光标记的山羊抗兔二抗 (1:400), 加至上述样品中,4 °C 下过夜; PBS

洗涤 3 次,每次 10 min; 加 DAPI 于一洗净的滴加了封片剂的载玻片上染核,将玻片翻转后封片,荧光显微镜下观察并拍照。2 组细胞在 5, 24, 48 和 72 h 时间点随机取 300 个细胞,计数 TuJ-1 反应阳性细胞所占比例。

1.8 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,两组间比较采用 Student's *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EGFP-rMSC 体外培养与扩增

原代培养的细胞在第 3 天换液时观察发现表面有大量漂浮血细胞,换液后可以观察到培养瓶底贴壁生长的多种细胞形态,以梭形为主。胞体透亮,折光性好,细胞核较大,呈卵圆形或扁圆形,可见 1 ~ 2 个核仁,细胞呈梭形并带有 2 ~ 3 个突起; 6 d 时可见培养瓶底贴壁的梭形细胞增多,并可见到少量细胞集落形成; 9 d 时,梭形细胞集落增多,细胞形态逐渐变为长梭形。原代细胞在培养 15 d 左右有 70% ~ 80% 融合,传代后 24 h 内细胞完全贴壁,3 ~ 4 d 即可融合。

转染 pEGFP-N1 载体后,经过 G418 筛选,8 ~ 12 h 开始贴壁,24 ~ 36 h 完全贴壁,传代后 1 d,细胞散在均匀分布于瓶底。形态重新变为长梭形成纤维细胞样。传代后 10 d,细胞基本长满瓶底,行下一次传代。至第 3 代时,细胞形态已成为均匀一致的成纤维细胞样,细胞集落呈现典型的漩涡状生长。转染 24 h 后,在荧光显微镜下可观察到细胞发出绿色荧光 (图 1)。

2.2 EGFP-rMSC 表面标志测定结果

经流式细胞仪检测,Cell Quest 软件分析,rMSC 和 EGFP-rMSC 2 组细胞的特异性表面标志物 CD44 阳性,CD11b 和 CD45 阴性 (图 2),2 组细胞各标志物细胞阳性率之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

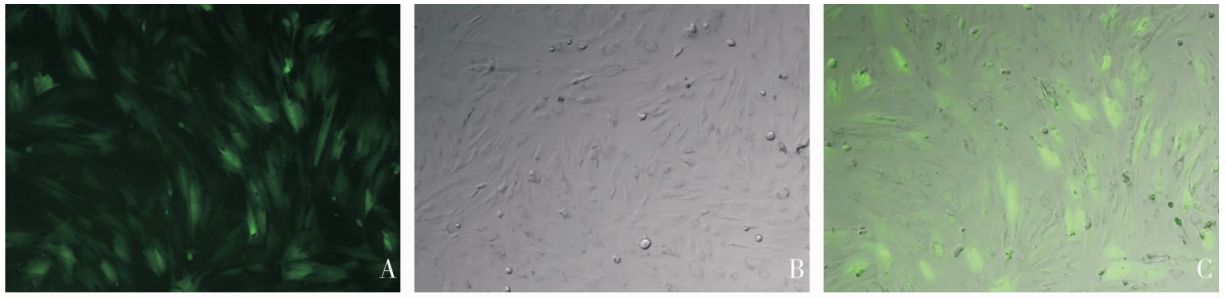


图1 EGFP-rMSC 的细胞形态(×200)。A:EGFP-rMSC 在荧光显微镜下发出绿色荧光;B:EGFP-rMSC 在可见光下细胞形态仍以梭形为主;C:荧光和可见光下观察。

Fig. 1 rMSC transfected after 24 h by EGFP(×200). A:rMSC transfected by EGFP shows granule-shape in fluorescence; B:Cell morphology of EGFP-rMSC is spindle-shape in visible light; C: EGFP-rMSC is observed in the visible light and fluorescence.

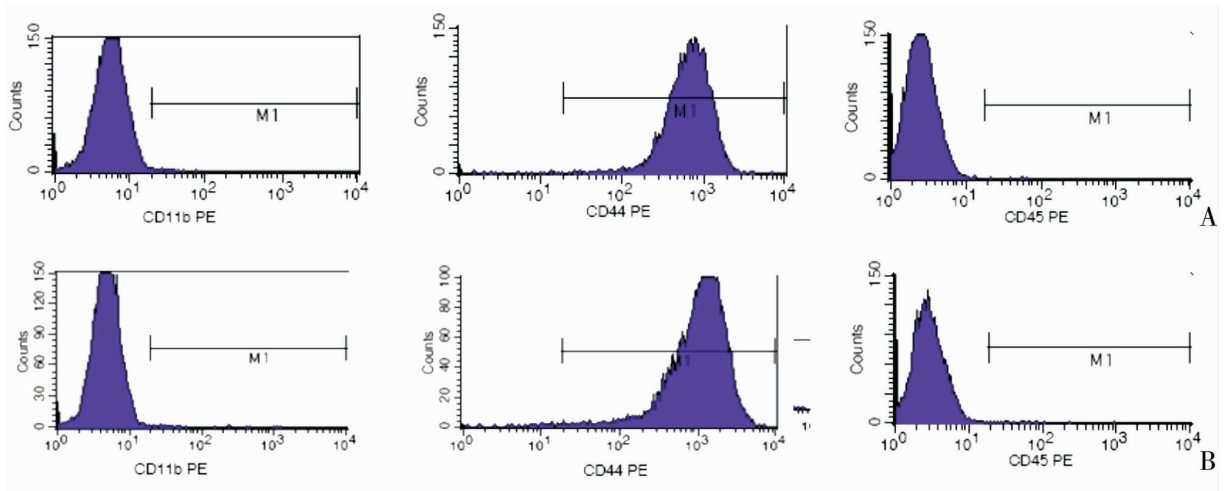


图2 MSC 细胞表面标志物测定。A:rMSC 组; B:EGFP-rMSC 组。

Fig. 2 Determination of cell surface markers of MSC. A:rMSC group; B:EGFP-rMSC group.

表1 2组细胞标志物阳性率比较($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

Tab. 1 Comparison of positive rates of cell markers in the 2 groups($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

组别	CD44 阳性率	CD11b 阳性率	CD45 阳性率
rMSC	97.30 ± 1.51	0.71 ± 0.12	0.22 ± 0.06
EGFP-rMSC	98.10 ± 1.24	0.67 ± 0.11	0.31 ± 0.07

2.3 EGFP-rMSC 诱导分化神经元样细胞

加入诱导剂 bFGF 和 β-ME 诱导 5 h 后,细胞质开始向核回缩,胞体变小,72 h 后胞体有数个短小突起和一个较长的突起,呈典型的双极、多极及锥形,

具有较强的折光性。荧光显微镜下可见诱导后细胞仍产生明亮的绿色荧光,并且与神经元特异性表达产物抗体 anti-TuJ-1 反应阳性;DAPI 细胞核染色可观测到存活的细胞核被染成蓝色(图 3)。

2.4 两组神经元样细胞阳性率比较

诱导后分别在 5,24,48 和 72 h 时间点检测分化神经元样细胞阳性率,rMSC 组分别为(46.44 ± 5.50)%,(60.67 ± 5.16)%,(40.48 ± 4.10)%和(21.57 ± 3.37)%;EGFP-rMSC 组分别为(51.16 ± 9.08)%,(65.09 ± 8.97)%,(37.59 ± 4.72)%和(30.55 ± 1.36)%。2 组细胞在各个时间点神经元样细胞阳性率差异无统计学意义(P>0.05)。

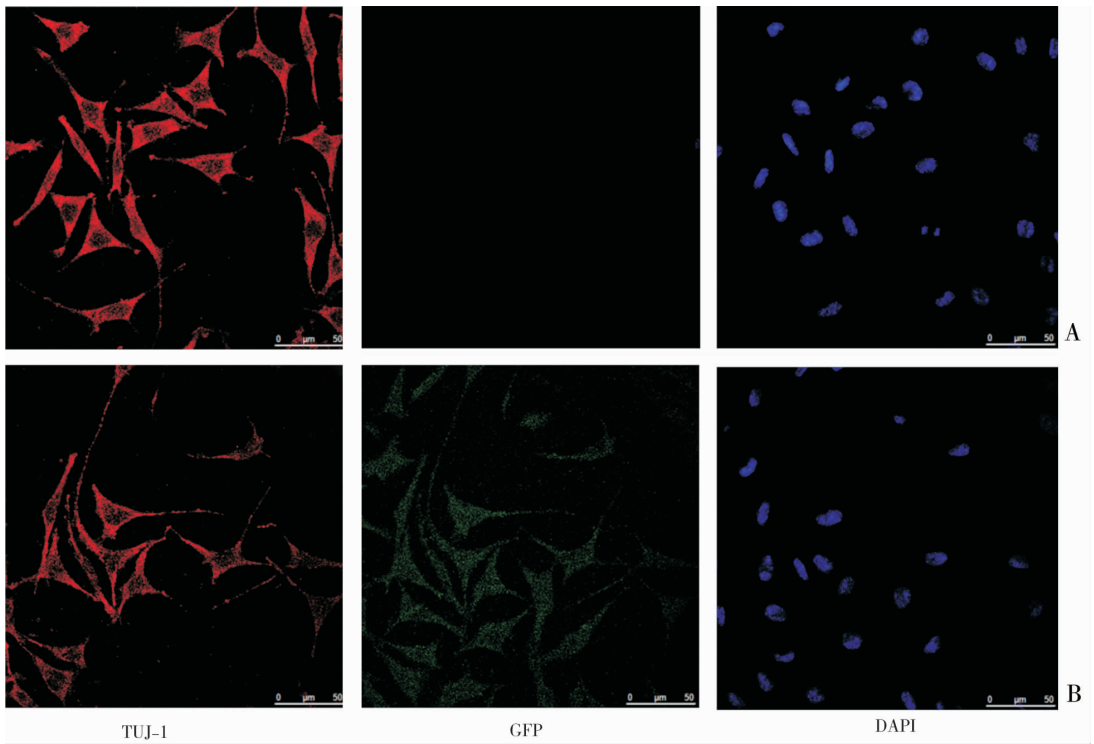


图3 2组MSC细胞分化神经元样细胞免疫荧光染色($\times 400$)。A:rMSC组。诱导后 anti-TuJ-1 抗体免疫荧光染色,分化成神经元样细胞 TUJ-1 显示阳性(红色);由于未转染 EGFP,因此不能检测到 GFP 阳性细胞; B:EGFP-rMSC 组。诱导后 anti-TuJ-1 抗体免疫荧光染色,分化成神经元样细胞 TUJ-1 显示阳性(红色);由于 rMSC 稳定表达 EGFP,因此大部分细胞同时也是 GFP 阳性细胞,2组 DAPI 染核,呈蓝色。

Fig. 3 Immunofluorescence staining of neuron-like cells in the 2 groups($\times 400$). A:rMSC group. Cells differentiation into neuron-like cells are positive for TUJ-1 (red), and negative for GFP fluorescence; B:EGFP-rMSC group. Cells differentiation into neuron-like cells are positive for TUJ-1 (red), and positive for GFP fluorescence; DAPI nuclear staining is blue in the 2 groups.

3 讨 论

应用 MSC 移植治疗脊髓损伤,通常需要借助细胞标记来评价其存活、迁徙及分化机制。常用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记法,3H 标记法、菲立磁(Feridex)标记法、辣根过氧化物酶(HRP)标记法,以及 Y 染色体原位杂交等方法追踪^[10-13]。而 EGFP 标记方法具有稳定持久、对细胞无毒害、检测时方便快捷不需添加底物及荧光保持时间长,较其它方法更简便,且有较强特异性,能直接用于活细胞测定等优势,近年来已逐渐成为一种理想的活细胞实时定位观察标记方法^[14]。研究^[15]表明:作为 GFP 的一个突变体,EGFP 产生的荧光强度较 GFP 提高 35 倍,从而大大增强了其作为报告基因的检测灵敏度。

然而,将 EGFP 转染 MSC 的载体选择和 EGFP 细胞毒性是否影响 MSC 向神经元方向分化尚无明确结论。目前,常用的 EGFP 标记干细胞的方式有 3 种:质粒载体转染、病毒载体转染和 GFP 基因动物。考虑到病毒感染所涉及的安全性隐患^[16-17]及在大鼠

等稍大动物中 GFP 转基因技术尚不成熟的问题^[18],本研究选择质粒为载体将 EGFP 基因转染 rMSC,同时应用抗生素筛选来提高质粒转染效率;结果表明采用脂质体 Lipofectamine 2000^[19]在体外将 EGFP 基因成功转染 rMSC 和用 G418 筛选后,2 周左右可获得稳定表达 EGFP 的 MSC,EGFP 的表达可以持续 1 个月或以上。转染后的细胞在荧光显微镜下发绿色荧光,呈“全细胞型”,转染率达 80% 以上。

EGFP 转染 MSC 后,对 MSC 的生长增殖特性,尤其对其横向分化能力是否有影响尚缺乏可靠依据,本实验发现 EGFP-rMSC 传代 1 d 后,细胞形态重新变为长梭形纤维细胞样,至第 3 代时,细胞形态已成为均匀一致的成纤维细胞样,细胞集落呈现典型的漩涡状生长。同未转染的 rMSC 相比,EGFP-rMSC 在细胞传代时间、细胞形态及生长特点上基本一致,表明 EGFP 基因对 rMSC 的生长和增殖不受影响;并且本研究通过流式细胞仪检测验证 EGFP-rMSC 仍呈 CD44(+),CD11b(-),CD45(-),从而证实转染 EGFP 基因后细胞表面标志物仍符合 rMSC 的特点^[20]。

笔者将转染 *EGFP* 基因的 rMSC 与未转染的 rMSC 分别在 5,24,48 及 72 h 不同时间点进行对照比较,发现 2 组细胞在体外诱导后均可表达神经元特异性标志物 TuJ-1^[21],细胞阳性率差异无统计学意义,证明转入 *EGFP* 基因未影响 rMSC 在体外向神经元方向分化。通过荧光显微镜观察,EGFP-rMSC 转染后仍然有 EGFP 强阳性表达,证实 EGFP 作为干细胞示踪标记在 MSC 体外诱导分化中的有效性。

MSC 向神经元分化后细胞的鉴定是另一关注问题。本研究应用 bFGF 和 β -ME 作为诱导剂^[22-23]对转染 *EGFP* 基因的 rMSC 进行体外诱导实验,诱导后的细胞形态上发生变化,呈典型的双极、多极及锥形,具有较强的折光性,形态学上与神经元细胞一致,通过免疫荧光显示诱导后的细胞表达神经元特异性标志物 TuJ-1,从而证实 EGFP-rMSC 在 bFGF 和 β -ME 诱导下可以向神经元方向分化。该类细胞具有神经元细胞形态特征并表达神经元细胞标志物,但是缺乏具有神经元细胞电生理学特性及神经功能的证据,因此,笔者将此类细胞称为神经元样细胞。

总之,通过本研究证实 EGFP 转染未对 MSC 的增殖、神经元方向分化造成影响,同时证实转染 *EGFP* 基因后的 MSC 细胞表面标志物仍符合 MSC 的特点,未改变细胞生物学性状和表面标志物,从而为下一步在 MSC 移植治疗脊髓损伤中,体内追踪和研究其存活、迁徙、分化机制提供了一个可靠的标记方法。

参考文献:

- [1] McDonald J W, Liu X Z, Qu Y, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord[J]. *Nat Med*, 1999, 5 (12): 1410-1412.
- [2] Copray S, Balasubramanian V, Levenga J, et al. Olig2 overexpression induces the in vitro differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes[J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (4): 1001-1010.
- [3] Satake K, Lou J, Lenke L G. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue [J]. *Spine*, 2004, 29(18): 1971-1979.
- [4] Phinney D G, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(10): 1255-1265.
- [5] Phinney D G, Prockop D J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11):2896-2902.
- [6] Siminiak T, Kurpisz M. Myocardial replacement therapy [J]. *Circulation*, 2003, 108(10):1167-1171.
- [7] Chen A, Siow B, Blamire A M, et al. Transplantation of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a model of perinatal brain injury[J]. *Stem Cell Res*, 2010, 5(3):255-266.
- [8] Hokai M, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Bone marrow stro-

- mal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms[J]. *Neurosci Res*, 2008, 86(5):1024-1035.
- [9] Satake K, Lou J, Lenke L G. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29(18):1971-1979.
- [10] Booth B W, Boulanger C A, Smith G H. Selective segregation of DNA strands persists in long-label-retaining mammary cells during pregnancy [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10 (5): R90.
- [11] Zhang S, He H, Lu W, et al. Tracking intrahepatically transplanted islets labeled with Feridex-polyethyleneimine complex using a clinical 3.0-T magnetic resonance imaging scanner[J]. *Pancreas*, 2009, 38(3):293-302.
- [12] Li W, Liu Z, Lin H, et al. Label-free colorimetric assay for methyltransferase activity based on a novel methylation-responsive DNase strategy[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(5):1935-1941.
- [13] Mezey E, Chandross K J. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 405(3): 297-302.
- [14] Tomioka R. Expression of EGFP by adenovirus-mediated gene transfer in the central nervous system[J]. *Methods Mol Biol*. 2009, 515(6):97-106.
- [15] Li H, Yu B, Zhang Y, et al. Jagged protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(2):320-325.
- [16] Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, et al. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors [J]. *Gene Ther*, 2001, 8 (17): 1343-1346.
- [17] Ahn W S, Bae S M, Chung J E, et al. Evaluation of adeno-associated virus 2 and human papilloma virus 16 and 18 infection in cervical cancer biopsies[J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 89 (1): 105-111.
- [18] Mothe A J, Kulbatski I, van Bendegem R L, et al. Analysis of green fluorescent protein expression in transgenic rats for tracking transplanted neural stem/progenitor cells[J]. *J Histochem Cytochem* 2005, 53(10):1215-1216.
- [19] Tomita S, Shenoy A, Fukata Y, et al. Stargazin interacts functionally with the AMPA receptor glutamate-binding module[J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52(1):87-91.
- [20] Anokhina E B, Buravkova L B. Heterogeneity of stromal precursor cells isolated from rat bone marrow [J]. *Tsitologiya*, 2007, 49(1):40-47.
- [21] Jouhilahti E M, Peltonen S, Peltonen J. Class III beta-tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types. [J]. *Histochem Cytochem*, 2008, 56(12):1113-1119.
- [22] Deng W, Obrocka M, Fischer I, et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282 (1): 148-152.
- [23] Sanchez R J, Song S, Cardozo P F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro [J]. *Exp Neuro*, 2000, 164 (2): 247-256.