

Cryopreservation and Culture of Neural Stem Cells Isolated from Postnatal Rat

Jing Zhang¹, Xianjiang Kang¹, Chen Zhou¹, Ping Zhang², Shumei Mu¹, Han Zhang¹

¹College of Life-Science, Hebei University, Baoding

²Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding

Email: bingyujing1014@163.com; xjkang@hbu.edu.cn

Received: Sep. 1st, 2011; revised: Sep. 17th, 2011; accepted: Sep. 19th, 2011.

Abstract: Objective: to isolate and culture neural stem cells from postnatal rat and to observe the viability and biological property of these cells after cryopreservation. **Methods:** the neural stem cells isolated from hippocampus of the postnatal rat were cultured in culture solution without blood serum. After amplification, the cells were cultured in different concentration of freeze-stored liquid which contained 0, 5%, 10%, 15%, 20% DMSO and fetal calf serum, then stored in refrigerator of 80 centigrade below zero one week, two weeks and one month respectively. Through resuscitation training and testing, then we detected the recovery rate of the NSCs. **Results:** after cryopreservation and culture of neural stem cells isolated from postnatal rat, most of them were growth well and formed into the new cell clones, then the recovery rate of the cells were detected with Trypan Blue. There was significant difference in 10% DMSO and it has the highest recovery rate, which is 54.00 ± 1.73 , 59.00 ± 1.16 , 58.00 ± 2.08 . **Conclusion:** the neural stem cells derived from postnatal rat were able to culture, cryopreservation and resuscitation, which did not change their biological properties.

Keywords: Neural Stem Cells; Postnatal Rat; Culture *in Vitro*; Cryopreservation; Resuscitation

新生大鼠神经干细胞的体外培养与冷冻复苏

张 静¹, 康现江¹, 周 辰¹, 张 平², 穆淑梅¹, 张 晗¹

¹河北大学生命科学学院, 保定

²河北大学附属医院, 保定

Email: bingyujing1014@163.com; xjkang@hbu.edu.cn

收稿日期: 2011年9月1日; 修回日期: 2011年9月17日; 录用日期: 2011年9月19日

摘 要: 目的: 分离培养新生 SD 大鼠神经干细胞(NSCs), 观察应用不同浓度的二甲基亚砷(DMSO)作为冷冻保护剂冷冻保存不同时间的神经干细胞复苏后, 其活力及生物学特性的鉴定。 **方法:** 在含细胞因子表皮生长因子及碱性成纤维细胞生长因子的无血清培养液中培养新生大鼠海马神经干细胞。经传代扩增后, 培养于含有 0、5%、10%、15%、20%不同浓度的二甲基亚砷和胎牛血清的神经干细胞冻存液中, 在-80℃冰箱中分别冻存 1 周、2 周及一个月后, 复苏培养并鉴定, 然后对其复苏率进行检测。 **结果:** 新生大鼠海马神经干细胞经冷冻复苏后, 大多数细胞生长良好并形成新的克隆球。台盼蓝染色检测冻存 1 周、2 周及一个月后的复苏率, 含有 10%二甲基亚砷的复苏率最高且具有显著性差异 ($P < 0.05$), 不同冻存时间的复苏率分别为 54.00 ± 1.73 , 59.00 ± 1.16 , 58.00 ± 2.08 。 **结论:** 神经干细胞能在体外适宜的条件下进行培养及冻存、复苏, 并且复苏后不影响其原有的生物学特性。

关键词: 神经干细胞; 新生大鼠; 体外培养; 冻存; 复苏

1. 引言

神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)的发现是在

研究造血发生和神经发育的基础上开始的, Anderson 在 1989 年, 参照造血干细胞的性质首次提出了神经干

细胞的概念^[1]。1992年 Reynolds等^[2]和 Richards^[3]等先后从成年鼠纹状体中分离出神经干细胞,早期的研究集中于胚胎期CNS和PNS中分离神经干细胞。1998年 Eriksson等^[4]指出成人海马和侧脑室同样能够进行神经发生。Johansson等^[5]从成人侧脑室和海马分离到神经干细胞,在体外培养条件下增殖和分化,形成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。现已从胚胎期或成体神经系统中多个部位包括脊髓、大脑皮层、前脑基底层、海马区、神经脊即外周神经系统及小脑等分离得到^[6],这些实验表明,哺乳动物的神经系统中存在有神经干细胞。神经干细胞具有自我复制和多向分化潜能特性^[7]。胚胎神经发生过程中,神经干细胞在神经管壁增殖,新生细胞沿放射状纤维迁移到脑的特定位置。神经管腔最终发育为成年脑的脑室系统。近几年的研究已证实,无论是发育中的胚胎还是成年个体脑区,均有神经干细胞存在^[3,8,9]。从胚胎期哺乳动物大部分脑区,如胚胎脑皮层、海马、纹状体等区域都分离出了神经干细胞^[10]。成体神经干细胞的取材以脑室下区,包括嗅球和海马齿状回的颗粒细胞层为主^[11]。为获得来源方便的神经干细胞,建立一种能够长期储存并维持其生物学特性的方法对促进神经科学的基础和临床移植的研究具有重要意义^[12]。

1949年至1960年这段时间可称为冷冻保存的“甘油时期”。这一时期的冷冻保存一般都是以甘油作为保护剂。1959年, Lovelock等人发现了一种新的化学试剂二甲基亚砜。而用于冷冻保存的仪器也有了明显的发展。进入80年代以来,由于热物理学、化学、工程和生物学、医学等学科的相互渗透和交叉,低温生物学的研究得到了快速的发展。到了20世纪,随着科学方法的不断进步以及冷冻方法的不断完善,低温保存技术广泛地应用到临床上。

近几来,一些研究表明移植神经干细胞治疗急、慢性脊髓损伤以及多种神经系统疾病如多发性硬化症、Parkinson病、缺血性脑损伤方面具有广阔的临床应用前景。为获得来源方便的神经干细胞,开展有效的干细胞移植及建立干细胞库,需要长期低温保存神经干细胞。由于神经干细胞低温保存效果的优劣直接影响着神经干细胞的数量和质量,因此冷冻后神经干细胞的复苏率以及是否具有生物学特性将成为决定移植成功与否的重要因素之一。

本文通过对出生24h内的SD大鼠海马分离出神经干细胞,并进行体外培养、冷冻与复苏,通过对复苏后神经干细胞的基本生物学特性的分析,为深入研究神经干细胞的生物学特性及临床应用提供基础参考。

2. 材料和方法

2.1. 材料

SD大鼠(由河北医科大学动物中心提供)、DMEM/F12培养基(购于Gibco公司)、B₂₇(购于Gibco公司)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF, 购于PEPROTECH公司)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF, 购于PEPROTECH公司)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 购于Hyclone公司)、谷氨酰胺(购于Biosharp公司)、青霉素和链霉素(购于华北制药厂)、胰蛋白酶、多聚赖氨酸(购于Sigma公司)、兔抗大鼠、巢蛋白(nestin)抗体、RBITC标记山羊抗兔IgG(购于北京博奥森生物技术有限公司)。

2.2. 神经干细胞的分离培养

2.2.1. 神经干细胞的分离

将出生24h内的新生SD大鼠用75%酒精消毒头部后,断头处死,无菌条件下在D-Hank's液中剥去皮肤,取出大脑,在DMEM/F12基本培养基中分离出海马,加入0.25%胰蛋白酶,于37℃水浴锅中消化10min,将胰蛋白酶吸出,加入5mL添加10%血清的DMEM/F12培养基终止消化。1000rpm/min离心5min,弃去上清,加入1mL NSCs完全培养基(含2%B₂₇, 20μg/L bFGF, 20μg/L EGF, 1×10⁵U/L青霉素及1×10⁵μg/L链霉素的DMEM/F12培养基),400目筛网过滤后,台盼蓝染色计算活细胞数^[13]。

2.2.2. 原代细胞培养

细胞密度为5×10⁵个/mL,接种于50mL培养瓶中,置37℃,5%CO₂,饱和湿度的培养箱中培养,以后每3d半量换液,并补加细胞因子bFGF(20μg/L),EGF(20μg/L)。

2.2.3. 传代细胞培养

原代细胞在培养约6~7d左右,大部分细胞增殖

至由数百个细胞形成的大克隆球时进行传代。将克隆球打散后, 取上清液与完全培养基 1:1 混合细胞悬液, 并补加细胞因子, 此后每 6~7 d 传代一次。

2.3. 神经干细胞的冻存与复苏

取生长良好的第 3 代细胞, 计数后收集细胞至离心管, 于 1000 rpm/min 离心 5 min 后弃去上清, 经 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化使之成为单细胞悬液, 台盼蓝染色计算冷冻前活细胞总数。加入冻存液, 调至 3×10^6 个/mL 的活细胞密度, 将细胞悬液转移到冻存管中, 每管 1 mL, 封口作好标记。置入冻存盒里, 于 -80°C 冰箱中保存。

冻存保护液的组成成分及各成分的配比如下:

20% FBS + 80% DMEM/F12 (简称 D₀ 组)

20% FBS + 75% DMEM/F12 + 5% DMSO (简称 D₅ 组)

20% FBS + 70% DMEM/F12 + 10% DMSO (简称 D₁₀ 组)

20% FBS + 65% DMEM/F12 + 15% DMSO (简称 D₁₅ 组)

20% FBS + 60% DMEM/F12 + 20% DMSO (简称 D₂₀ 组)

将配好的冻存保护液分装至 1.5 mL 冻存管中, 每管 1 mL, 每组 3 管, 4°C 预冷备用。

冻存 1 周、2 周及一个月后, 将冻存管从 -80°C 冰箱中取出, 立即置于 37°C 水浴中, 轻轻摇动冻存管使冻存液快速融解。将液体移入 37°C 预热的 10 mL 基本培养基中, 1000 rpm/min 离心 5 min, 弃去上清, 台盼蓝染色计算复苏后活细胞总数, 调整活细胞密度为 $1.8\sim 2.0 \times 10^5$ 个/mL 接种于 50 mL 培养瓶中, 继续培养, 换液与传代的时间方法均与 NSCs 的培养方法相同。

2.4. 神经干细胞复苏率的计算

$$\text{复苏率} = \frac{\text{复苏后的活细胞数}}{\text{冻存的细胞数}} \times 100\%$$

按以上公式计算其复苏率, 所得各组数据用 spss16.0 软件进行统计分析^[14]。

2.5. 神经干细胞复苏后的免疫荧光鉴定

取生长良好的神经干细胞克隆球, 接种至预先用多聚赖氨酸包被的无菌盖玻片上, 培养 2 h, 用于 Nestin 鉴定。

于荧光显微镜下观察并拍照, 555 nm 激发光激发

显示红色荧光为阳性。阴性对照组是选择相同时期的细胞以同样的方法只是用 PBS 代替一抗来进行鉴定。

2.6. 神经干细胞复苏后诱导分化及鉴定

选取复苏后继续培养的神经干细胞克隆球, 接种至预先放置多聚赖氨酸包被的无菌盖玻片的培养皿中进行培养, 以 DMEM/F12 + 1% B27 + 10% FBS 作为诱导分化培养液, 每 3 d 半量换液, 待神经干细胞诱导分化至第 8 d 时进行免疫荧光鉴定。

3. 结果

3.1. 细胞形态学观察

接种 2 h 后, 倒置显微镜下观察, 可见数目较多的单个圆形细胞, 细胞核大, 胞质较少, 折光率较高, 细胞个体大小相近(图 1(A)); 亦可见少量未打散的, 由少数几个细胞组成的小细胞团(图 1(B))。随着培养时间的延长, 克隆球逐渐增殖、变大, 至 6~7 d 时, 已增殖为数百个细胞组成的大克隆球, 整体呈圆形(图 1(C)), 部分克隆球连接在一起呈串珠样(图 1(D)), 此时应传代培养。

以机械分离的方法将神经干细胞克隆球分散 24h 后, 可见到培养液中既有单个细胞, 也有形状不太规则的小克隆球存在(图 2(A))。传代后的神经干细胞培养 6~7 d 后即可形成数百个细胞形成的克隆球(图 2(B))。

3.2. DMSO 浓度和培养时间对神经干细胞冷冻复苏后的影响

选取不同浓度的 DMSO 冻存不同的时间, 分别冻存一周、两周及一个月(如表 1~3)后对神经干细胞的复苏率进行统计学分析(如图 3~5)。

3.3. 神经干细胞复苏后诱导分化及免疫荧光鉴定

冻存的神经干细胞复苏后以 1×10^6 个/mL 的活细胞密度培养。观察发现冻存前与复苏后细胞的形态及其生物学特性没有明显差别。细胞均呈透亮悬生长, 培养 2~4 d 后, 形成干细胞克隆球。这些克隆球均呈 nestin 阳性反应(图 6(A)), 对照组呈阴性(图 6(B))。

采用添加 10% 血清的 DMEM/F12 培养基进行

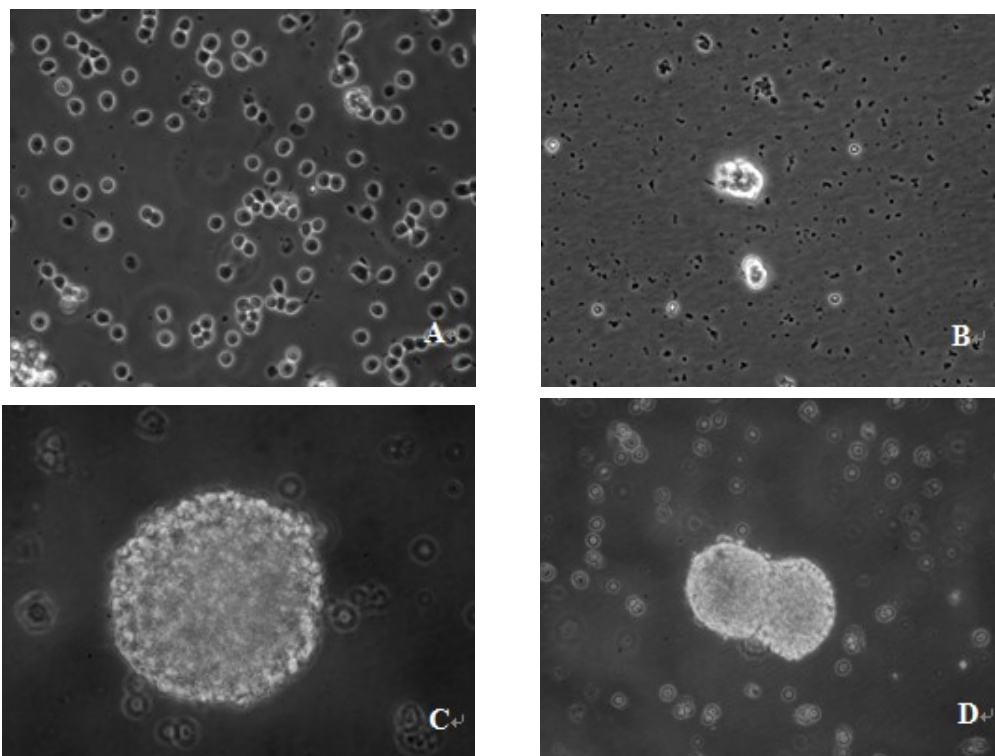


Figure 1. Microscopic observation of the primary culturing NSCs. A) NSCs: 2 h after inoculated ($\times 400$); B) NSCs: 24 h after inoculated ($\times 400$); C) NSCs: 7 d after inoculated, the cells continued to proliferate into cell balls (about several hundred cells per cell ball) ($\times 400$); D) NSCs cell balls grown in series ($\times 200$)

图 1. 原代培养 NSCs 的显微观察。A) 接种 2 h 的 NSCs ($\times 400$); B) 接种 24 h 的 NSCs ($\times 400$); C) 接种 7 d 的 NSCs, 增殖为数百个细胞组成的大克隆球 ($\times 400$); D) 部分克隆球串联在一起生长 ($\times 200$)

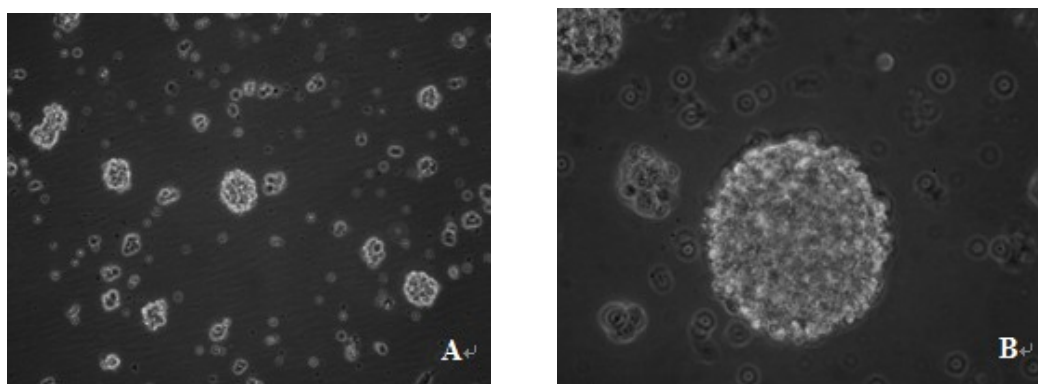


Figure 2. Microscopic observation of the subculturing NSCs. A) NSCs: 24 h after passaged ($\times 100$); B) NSCs cell ball: 7 d after passaged ($\times 400$)

图 2. 传代培养 NSCs 的显微观察。A) 传代 24 h 的 NSCs ($\times 100$); B) 传代培养 7 d 的 NSCs 克隆球 ($\times 400$)

Table 1. The resuscitation rate of the NSCs after one week cryopreservation
表 1. NSCs 冻存 1 周后的复苏率

组别	冻存时间(d)	复苏率(%)			复苏率均值(%) ($\bar{x} \pm SE$)
		1	2	3	
D ₀	7	2	1	-	#1.00 \pm 0.58
D ₅	7	15	10	14	#13.00 \pm 1.53
D ₁₀	7	54	51	57	54.00 \pm 1.73
D ₁₅	7	35	39	30	#34.67 \pm 2.60
D ₂₀	7	17	20	19	#18.50 \pm 1.50

$P < 0.05$ vs D₁₀.

Table 2. The resuscitation rate of the NSCs after two weeks cryopreservation
表 2. NSCs 冻存 2 周后的复苏率

组别	冻存时间(d)	复苏率(%)			复苏率均值(%) ($\bar{x} \pm SE$)
		1	2	3	
D ₀	14	1	-	-	#0.33 ± 0.33
D ₅	14	13	15	12	#13.33 ± 0.88
D ₁₀	14	59	57	61	59.00 ± 1.16
D ₁₅	14	37	38	38	#37.67 ± 0.33
D ₂₀	14	18	17	15	#17.50 ± 0.50

#P < 0.05 vs D₁₀.

Table 3. The resuscitation rate of the NSCs after one month cryopreservation
表 3. NSCs 冻存一个月后的复苏率

组别	冻存时间(m)	复苏率(%)			复苏率均值(%) ($\bar{x} \pm SE$)
		1	2	3	
D ₀	1	2	-	1	#1.00 ± 0.58
D ₅	1	11	16	13	#13.33 ± 1.45
D ₁₀	1	62	55	57	58.00 ± 2.08
D ₁₅	1	35	33	33	#33.67 ± 0.67
D ₂₀	1	17	15	12	#14.67 ± 1.45

#P < 0.05 vs D₁₀.

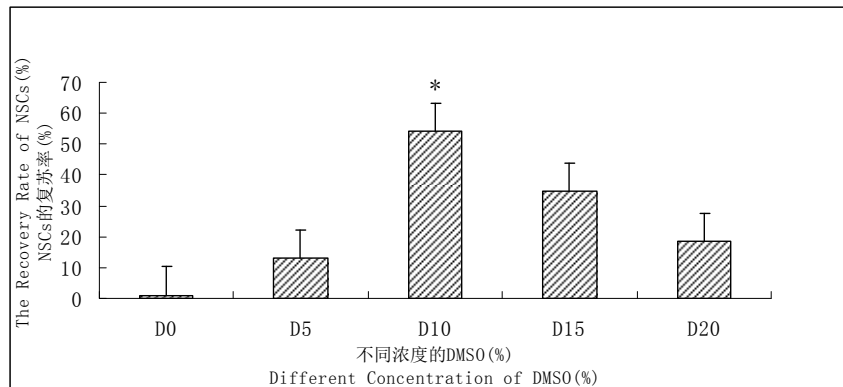


Figure 3. The resuscitation rate of the NSCs after one week cryopreservation
图 3. NSCs 冻存 1 周后的复苏率

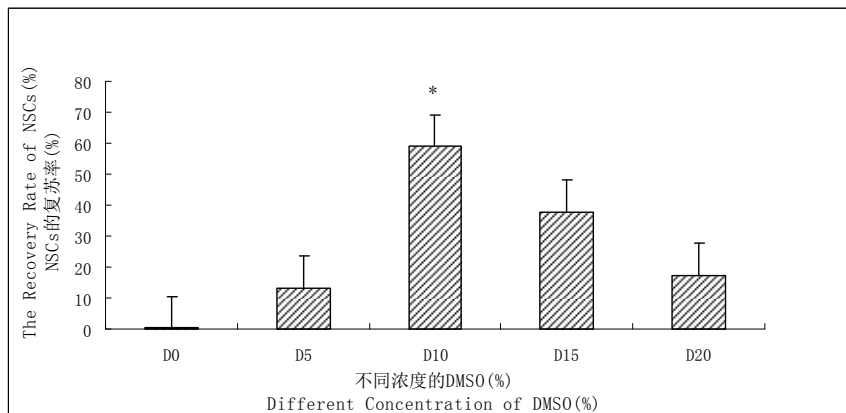


Figure 4. The resuscitation rate of the NSCs after two weeks cryopreservation
图 4. NSCs 冻存 2 周后的复苏率

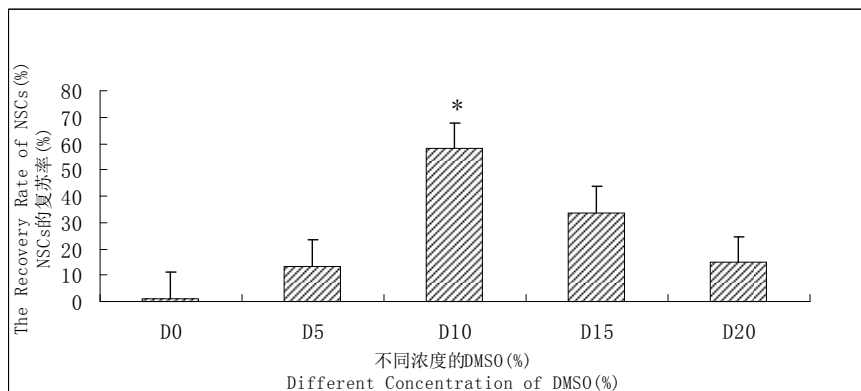


Figure 5. The resuscitation rate of the NSCs after one month cryopreservation
图 5. NSCs 冻存 1 个月后的复苏率

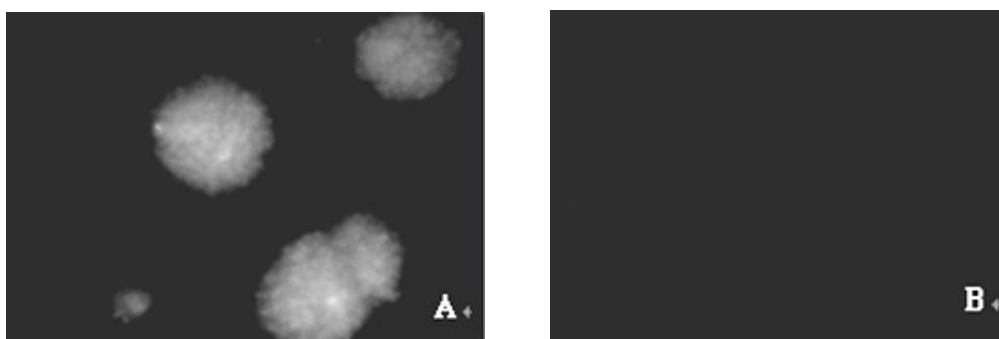


Figure 6. The immunofluorescence of NSCs. A) the cell balls were positive for nsetin and irregular shaped ($\times 200$); B) the negative controls didn't show the specific fluorescence ($\times 400$)

图 6. NSCs 免疫荧光鉴定。A) 克隆球显示 nsetin 阳性，形状不规则($\times 200$)；B) 阴性对照不显示荧光($\times 400$)

诱导分化，克隆球经诱导 12 h 左右开始贴壁，随分化培养时间的延长，可见许多单个细胞逐渐从克隆球中“逃逸”(图 7(a))。体外培养的神经干细胞能够分化为多种细胞类型，包括神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞，经免疫荧光鉴定均为阳性(图 7(b~d))。

4. 讨论

神经干细胞是一种能够持续增殖，具有自我更新和多种分化潜能的细胞^[15]，它能够分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。有研究显示，将体外稳定传代几年的神经干细胞植入成人脑内，仍具有分化为神经细胞的潜能^[16]。神经干细胞移植入创伤性动物模型后，能够在一定程度上恢复受损神经系统的功能^[17]，并且在移植治疗中枢神经系统慢性退变性疾病中，也取得了明确的效果^[18]，其临床应用具有广阔的前景。体外长期维持神经干细胞的生存需要耗费大量的人力和物力，而且随细胞传代次数增多，其增殖能

力会逐渐下降，细胞衰老、凋亡的现象难以避免。这些都对神经干细胞的均质性、生物活性和实验进程产生影响，易造成实验结果不够准确。因此，对培养细胞的冻存显得尤为重要。适时地将生长状态良好的细胞低温贮存，不仅可以解决上述问题，且可以在由于污染等原因造成细胞丢失时，作为备份使用。

与其他体外培养物的冷冻保存相同，神经干细胞的低温冻存的效果主要与冷冻速率、合适的冷冻保护剂、冻存温度和复温速率有关。不同的冷冻速度既能使细胞内发生不同的生理变化，也可以对细胞产生不同的损伤。当冷冻速度过慢时，细胞脱水严重，细胞体积严重收缩，超过一定程度时即失去活性。同时冷冻速度过慢，还会引起细胞外溶液部分结冰，从而使细胞外未结冰的溶液中溶质浓度增高，产生溶质损伤。当冷冻速度过快时，细胞内水分来不及外渗，会形成较大冰晶，造成细胞膜及细胞器的破坏，产生细胞内冰晶损伤。超快速玻璃化冷冻对细胞存活来说是最为

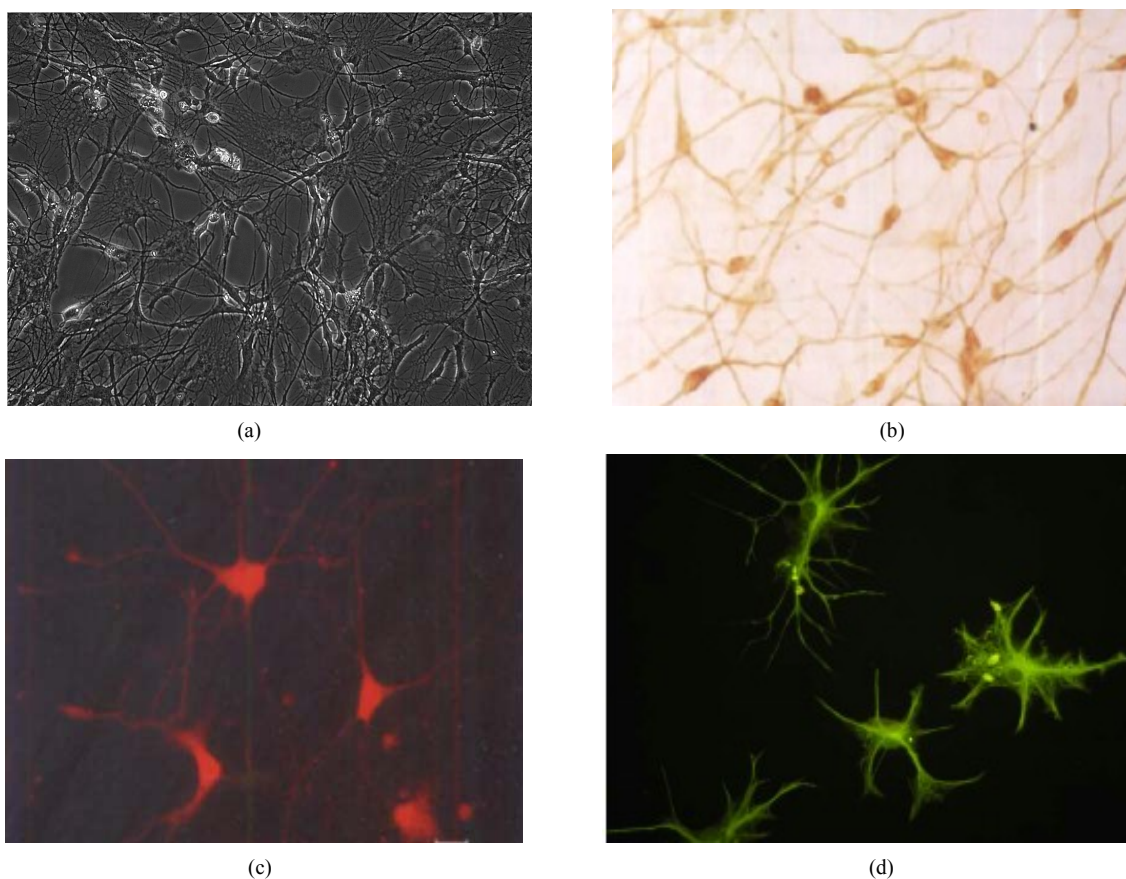


Figure 7. Microscopic observation of the differentiation NSCs. a) NSCs: 3 d after induced differentiation ($\times 100$); b), c), d) The immunofluorescence were positive of the neurons, astrocytes, and oligodendrocytes ($\times 400$)

图 7. NSCs 分化后的显微观察。a) 诱导分化 3d 的 NSCs($\times 100$); b)、c)、d)分别为免疫荧光鉴定呈阳性的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞($\times 400$)

理想的冷冻方法。细胞内外呈玻璃化凝固，无冰晶形成或形成很小的冰晶，对细胞膜和细胞器不致造成损伤，细胞也不会高浓度的溶质中长时间暴露而受损。

冷冻保护剂是可以保护细胞免受冷冻损伤的物质，分为渗透性和非渗透性两类。本实验选用的 DMSO 属于渗透性冷冻保护剂。其作用机理是在细胞冷冻悬液完全凝固之前，渗透到细胞内，在细胞内外产生一定的摩尔浓度，降低细胞内外未结冰溶液中的电解质浓度，较好地防止冷冻低温对细胞带来的损伤^[19]。同时，细胞内水分也不会过分外渗，避免了细胞过分脱水皱缩。DMSO 并不防止细胞内结冰，在使用该类冷冻保护剂时，需要一定的时间进行预冷，让甘油或 DMSO 等成分渗透到细胞内，在细胞内外达到平衡以起到充分的保护作用。目前 DMSO 的应用比甘油更为广泛，但要注意的是，DMSO 在常温下对细胞的毒性作用较大，而在 4℃ 时，其毒性作用大大减弱，且仍

能以较快的速度渗透到细胞内。所以，冻存时 DMSO 平衡多在 4℃ 下进行，一般需要 40~60 min。

不同的细胞和生物体以及使用不同的冷冻保存方法要取得同样的冷冻保存效果，冷冻保存温度可以不同。但从实际和效益的观点出发，液氮温度(-196℃)是目前最佳的冷冻保存温度。在-196℃ 时，细胞的生命活动几乎完全停止，但复苏后细胞的结构和功能完好。如果冷冻过程得当，一般生物样品在-196℃ 下均可保存十年以上^[20]。本实验为了便于操作，将细胞冻存于-80℃ 低温冰箱。如果将其放在液氮中保存效果是否更好一些，还有待于进一步研究。

冷冻保护体外培养物，除了必须有最佳的冷冻速率、合适的冷冻保护剂和冻存温度外，在复苏时也必须要有最佳的复温速率，这样才能保证最后获得最佳冷冻保存效果。由于细胞外的溶液比细胞内液先融化，若冻存物复温缓慢会使得细胞处于高浓度溶液中的时

间延长,引起细胞损伤,而且还有可能重新形成较大的冰晶,对复苏效果产生不利的影响,所以在1~2 min内恢复至常温为宜。

对于在体外呈悬浮状生长的神经干细胞来说,将克隆球制备成单细胞悬液有两种方法,即机械分离法^[21]和酶消化法^[22]。在其他条件相同的条件下,我们比较了机械分离法和胰蛋白酶法对大鼠神经干细胞的影响^[23]。结果显示这两种方法都可以获得单细胞,但是各有优缺点。胰蛋白酶处理后获得的细胞形态规则,但是存活率低,生长缓慢。机械分离法虽然无上述之缺点,但是吹打组织时的切割力会造成大量细胞的死亡,因此获得的活细胞数量较少。近年来的报道大都采用单酶或多酶复合消化,结合控制吹打次数和力度,可以获得更多具有较高活力的单细胞,如采用筛网过滤则效果更好。

要想成功地将神经干细胞冻存与复苏,不仅要求细胞能耐受冻存复苏的过程,而且更重要的是要求存活神经干细胞必须保持该细胞原有的生物学特性^[24]。尽管在冻存过程中受到不同程度的损伤,但冷冻保存既可以减弱移植物的免疫原性,提高移植的成功率,又可为各种组织配型的干细胞库的建立及移植手术的实施提供方便。

5. 结论

存在于胚胎与成年哺乳动物脑内的神经干细胞具有广阔的临床应用前景,不论是现阶段的研究还是将来的临床应用都需要大量的神经干细胞,但目前神经干细胞量远远不能满足科研和临床应用并且神经干细胞的长期扩增和可靠分化存在困难,因此许多研究人员致力于干细胞的冻存研究,希望可以解决这一问题。本实验通过对新生大鼠的神经干细胞进行培养、传代,观察神经干细胞在自然条件下的分化过程,采用不同浓度的DMSO对细胞进行冻存、复苏并计算其复苏率,并对不同冻存时间后的神经干细胞进行诱导分化,我们得出10%的DMSO对神经干细胞的复苏率的影响有显著差异($P < 0.05$),并可以诱导分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,这说明新生大鼠神经干细胞低温冻存、复苏并不影响其增殖及多向分化等生物学特性。这对于我们研究神经干细胞的冻存并长期保存神经干细胞提供了很好的依据。

6. 致谢

本文研究得到河北省科技厅资助项目:BD AF 基因工程细胞治疗帕金森病研究(08206120D)的资助,作者在这里表示感谢。

参考文献 (References)

- [1] 黄毓,覃甲仁. 神经干细胞的研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2004, 21(2): 308-310.
- [2] B. A. Reynolds, S. Weiss. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, 255(5052): 1707-1710.
- [3] L. J. Richards, T. J. Kilpatrick and P. F. Bartlett. De novo generation of neural cells from the adult mouse brain. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*, 1992, 89(18): 8591-8595.
- [4] P. S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *National Medecine*, 1998, 4(11): 1313-1317.
- [5] C. B. Johansson, M. Svensson, L. Wallstedt, et al. Neural stem cells in the adult human brain. *Experimental Cell Research*, 1999, 253(2): 733-736.
- [6] S. Temple. The development of neural stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859): 112-117.
- [7] 罗小丹,沈岳飞. 神经干细胞定向诱导分化为多巴胺能神经元的进展[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(4): 469-473.
- [8] V. G. Kukekvo, E. D. Laywell, O. Suslov, et al. Multipotent stem cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Experimental Neurology*, 1999, 156(2): 333-344.
- [9] B. A. Reynolds, A. Weiss. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, 255(5052): 1707-1710.
- [10] A. A. Davis, S. Temple. A self-renewing multipotential stem cells in embryonic rat cerebral cortex. *Nature*, 1994, 372(6503): 263-266.
- [11] J. Dietrich, M. C. Easterday. Developing concepts in neural stem cells. *Trends in Neurosciences*, 2002, 25(3): 129-131.
- [12] M. Nakamura, Y. Toyama and H. Okano. Transplantation of neural stem cells for spinal cord injury. *Shinkeigaku*, 2005, 45(11): 874-876.
- [13] 陈凯,康现江,张平等. 大鼠海马神经干细胞的分离培养与免疫荧光鉴定[J]. 医学研究教育, 2010, 27(2): 1-3.
- [14] Z. Q. Shu, X. J. Kang, H. H. Chen, et al. Development of a reliable low-cost controlled cooling rate instruments for the cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Cytherapy*, 2010, 12(2): 161-169.
- [15] R. McKay. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997, 276(5309): 66-71.
- [16] N. Gaiano, G. Fishell. Transplantation as a tool to study progenitors within the vertebrate nervous system. *Neurobiol*, 1998, 36(2): 152-161.
- [17] Y. Ogawa, K. Sawamoto, T. Miyata, et al. Transplantation of *in vitro*-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *Journal of Neuroscience Research*, 2002, 69(6): 925-933.
- [18] P. Akerud, J. M. Canals, E. Y. Snyder, et al. Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, 2001, 21(20): 8108-8118.
- [19] 周燕琼,刘小辉,刘幸平等. 人肝癌细胞冷冻保存方法研究[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(6): 714-715.

- [20] X. M. Zhou, X. J. Kang, Z. Q. Shu, et al. Cryopreservation of peripheral blood stem cells using a box-in-box cooling device. *Biopreservation and Boibanking*, 2009, 7(2): 107-114.
- [21] A. Gritti, E. A. Parati, L. Cova, et al. Multipotential stem cells from the Adultmouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *The Journal of Neuroscience*, 1996, 16(3): 1091-1100.
- [22] N. Uchida, D. W. Buck, D. He, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*, 2000, 97(26): 14720-14725.
- [23] 胡钧涛, 涂汉军, 张力等. 大鼠胚胎神经干细胞两种不同分离、传代方法的比较[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2006, 32(2): 164-166.
- [24] W. W. Tornford, G. P. Duff and H. J. Mankin. Experimental freezepreservation of chondrocytes. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 1985, 7(197): 11-14.