

## · 实验研究 ·

# 尼克酰胺对人胚胎干细胞向神经嵴细胞分化的诱导作用

段豪云<sup>1</sup> 李文静<sup>1</sup> 贾艳妮<sup>2</sup> 赵灿<sup>2</sup> 周庆军<sup>1</sup> 李宗义<sup>1</sup><sup>1</sup>山东第一医科大学附属眼科研究所 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地,青岛 266071;<sup>2</sup>山东第一医科大学附属眼科研究所 山东第一医科大学附属眼科医院(山东省眼科医院),济南 250000

通信作者:李宗义,Email:lizongyi119@163.com

**【摘要】 目的** 探讨尼克酰胺(NIC)在人胚胎干细胞(hESCs)诱导分化为神经嵴细胞过程中的作用,为hESCs进一步分化为角膜内皮细胞提供实验基础。**方法** 取培养5~7 d的hESCs细胞系H1进行诱导,根据诱导培养基中干预组分不同分为未添加NIC组(仅使用诱导培养基)、NIC添加组(含10 mmol/L NIC的诱导培养基)、NIC+白藜芦醇(Res)组(含10 mmol/L NIC、10 μmol/L Res的诱导培养基)和Sirtinol组(含10 μmol/L Sirtinol的诱导培养基),其中Res和Sirtinol分别为SIRT1活性激动剂和抑制剂,各组连续诱导7 d。采用实时荧光定量PCR法检测诱导1、3、5、7 d hESCs及神经嵴细胞标志物mRNA相对表达量;诱导后7 d,采用免疫荧光染色法测定hESCs来源神经嵴细胞相关标志蛋白的表达,采用流式细胞术分析hESCs来源神经嵴细胞表面标志物神经生长因子受体(P75)和人自然杀伤因子1(HNK-1)阳性细胞比率,以评价NIC诱导效率及调控SIRT1对HNK-1表达的影响。**结果** 与未添加NIC组相比,NIC添加组处理5 d后全能性基因八聚体结合转录因子4(OCT4)和同源域蛋白(NANOG)mRNA相对表达量显著降低,神经嵴细胞标志物P75、HNK-1、SRY相关HMG盒9(SOX9)和SOX10 mRNA相对表达量显著升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。免疫荧光染色结果显示,未添加NIC组神经嵴细胞标志物P75表达较弱,HNK-1仅有零星表达,转录因子激活蛋白2β(AP-2β)及成对同源域转录因子2(PITX2)均未见阳性着色;NIC添加组细胞中P75、HNK-1、AP-2β及PITX2均呈广泛的强阳性表达。NIC添加组P75<sup>+</sup>HNK-1<sup>+</sup>和P75<sup>+</sup>细胞比率明显高于未添加NIC组,差异均有统计学意义( $t=8.481, P=0.001; t=2.987, P=0.041$ )。未添加NIC组、NIC添加组、NIC+Res组和Sirtinol组HNK-1<sup>+</sup>细胞比率分别为(34.267±12.522)%、(89.633±1.358)%、(64.667±6.429)%和(86.300±3.460)%,总体比较差异有统计学意义( $F=36.799, P<0.001$ ),其中,NIC+Res组HNK-1<sup>+</sup>细胞比率均明显低于NIC添加组和Sirtinol组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。**结论** NIC可通过抑制SIRT1的活性促进HNK-1表达,提高hESCs来源神经嵴细胞的分化效率,为神经嵴细胞相关疾病的治疗,如角膜内皮移植提供新的种子细胞来源。

**【关键词】** 神经嵴;尼克酰胺;诱导分化;人胚胎干细胞**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81700811、81900834);山东省自然科学基金项目(ZR2018LH008);山东第一医科大学学术提升计划项目(2019RC008)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200624-00450

## Promoting effect of nicotinamide on generation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells

Duan Haoyun<sup>1</sup>, Li Wenjing<sup>1</sup>, Jia Yanni<sup>2</sup>, Zhao Can<sup>2</sup>, Zhou Qingjun<sup>1</sup>, Li Zongyi<sup>1</sup><sup>1</sup>Eye Institute of Shandong First Medical University, State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Qingdao 266071, China; <sup>2</sup>Eye Institute of Shandong First Medical University, Eye Hospital of Shandong First Medical University (Shandong Eye Hospital), Jinan 250000, China

Corresponding author: Li Zongyi, Email: lizongyi119@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the role of nicotinamide (NIC) in the differentiation of neural crest cells from human embryonic stem cells (hESCs), and lay the foundation for the induction of hESC-derived corneal endothelial cells. **Methods** hESCs line H1 cultured for 5–7 days was used for induction. According to the different

components of the neural crest induction medium, cells were assigned into different groups for 7-days induction, including group treated without NIC cultured in induction medium only, group treated with NIC cultured in induction medium containing 10 mmol/L NIC, NIC+resveratrol (Res) group cultured in induction medium containing 10 mmol/L NIC and 10  $\mu$ mol/L Res and Sirtinol group cultured in induction medium containing 10  $\mu$ mol/L Sirtinol. Res and Sirtinol were used as SIRT1 activity agonist and inhibitor, respectively. The relative mRNA expression levels of hESCs and neural crest cell markers were detected by real-time fluorescence quantitative PCR at 1, 3, 5 and 7 days during the induction. The expression of neural crest cells markers after 7 days of induction was assayed by immunofluorescence staining. The induction efficiency of NIC and the effect of SIRT1 regulation on human natural killer 1 (HNK-1) positive cells expression were evaluated through flow cytometry analysis of percentages of nerve growth factor receptor (P75) and HNK-1<sup>+</sup> cells. **Results** Compared with the group treated without NIC, the mRNA expressions of totipotent genes octamer transcription factor 4 (OCT4) and homeodomain proteins (NANOG) were significantly decreased, and the mRNA expression levels of neural crest cell markers P75, HNK-1, SRY-related HMG box (SOX) 9 and SOX10 were significantly increased in the group treated with NIC after 5 days of induction (all at  $P < 0.05$ ). In the group treated without NIC, P75 was weakly expressed, and HNK-1 was sporadically expressed, and transcription factor AP-2 $\beta$  (AP-2 $\beta$ ) and paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2) were not detected. In the group treated with NIC, P75, HNK-1, AP-2 $\beta$  and PITX2 were strongly expressed. The proportion of P75<sup>+</sup> HNK-1<sup>+</sup> cells and P75<sup>+</sup> cells were both significantly higher in the group treated with NIC than without NIC ( $t = 8.481, P = 0.001; t = 2.987, P = 0.041$ ). The percentage of HNK-1<sup>+</sup> cells in groups treated without and with NIC, NIC+Res group and Sirtinol group were  $(34.267 \pm 12.522)\%$ ,  $(89.633 \pm 1.358)\%$ ,  $(64.667 \pm 6.429)\%$  and  $(86.300 \pm 3.460)\%$ , respectively, with a statistically significant overall difference ( $F = 36.799, P < 0.001$ ). The proportion of HNK-1<sup>+</sup> cells in NIC+Res group was significantly lower than that in the groups treated with NIC and Sirtinol (all at  $P < 0.05$ ).

**Conclusions** NIC promotes the differentiation of hESCs-derived neural crest cells by inhibiting the activity of SIRT1 to enhance the expression of HNK-1. NIC treatment may provide a new strategy for source of seed cells in the treatment of neural crest cell-related diseases, such as corneal endothelial transplantation.

[Key words] Neural crest; Nicotinamide; Cell differentiation; Human embryonic stem cells

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81700811, 81900834); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2018LH008); Academic Promotion Program of Shandong First Medical University (2019RC008)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200624-00450

角膜移植是当前临床治疗角膜内皮病变和内皮失代偿的首选方式,然而角膜供体的严重匮乏制约了其临床应用。2018年,研究者利用培养的原代人角膜内皮细胞对大疱性角膜病变患者进行注射移植获得成功,为角膜内皮功能失代偿的治疗提供了新途径<sup>[1]</sup>。然而,该方法仍不能摆脱对供体材料的需求<sup>[2]</sup>。因此,寻找其他的细胞来源仍是目前的研究热点之一。在脊椎动物眼胚胎发育过程中,角膜内皮的形成源于颅面部神经嵴细胞的迁移和分化<sup>[3-4]</sup>。人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)因具有无限的自我更新和多向分化能力成为良好的种子细胞来源<sup>[5-6]</sup>。将hESCs诱导分化为神经嵴细胞,再进一步诱导分化为角膜内皮细胞是获得足量内皮细胞的有效方法。采用饲养层细胞共培养或条件培养基等方式诱导hESCs分化模拟了体内发育过程<sup>[7-8]</sup>,然而诱导体系成分的不确定极易导致细胞异质性的产生,且诱导时间长、神经嵴细胞诱导效率低<sup>[9]</sup>,影响了目的细胞的获得。随

着神经嵴分化过程中信号通路的研究,对BMP/SMAD、WNT、转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )等信号通路进行调控,在无饲养层条件下利用小分子化合物,如糖原合成酶激酶3、TGF- $\beta$ 抑制剂能够促使hESCs由神经外胚层向神经嵴细胞分化<sup>[10-12]</sup>。此外,联合生长因子及多种信号通路抑制剂的“鸡尾酒”体系也被用于神经嵴细胞的诱导<sup>[13-14]</sup>。但上述方法仍存在诱导时间较长、诱导体系复杂、可能伴随其他神经外胚层细胞混杂、诱导试剂费用昂贵等问题<sup>[15-16]</sup>。进一步简化诱导体系,经济、高效获得较高纯度的hESCs来源神经嵴细胞将极大促进角膜内皮再生领域的发展。尼克酰胺(nicotinamide, NIC)可用于干细胞重编程,促进并维持干细胞向视网膜色素上皮、神经、胰腺等不同谱系分化,是维持干细胞多能性、调节诱导分化的重要因子<sup>[6, 17-20]</sup>。本研究拟探讨NIC在hESCs诱导分化为神经嵴细胞过程中的作用,以期在hESCs进一步分化为角膜内皮细胞提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

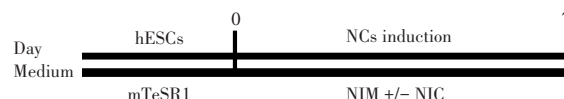
**1.1.1 细胞来源** hESCs 细胞系 H1 由陆军军医大学第一附属医院眼科阴正勤教授课题组惠赠。

**1.1.2 主要试剂及仪器** hESCs 无血清培养基 mTeSR™1、ReLeSR™ 消化液(加拿大 Stem Cell 公司); DF12 培养基、血清替代物(knockout serum replacement, KSR)、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇(美国 Gibco 公司); 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(美国 R&D 公司); 逆转录试剂盒(RR037A, 日本 TaKaRa 公司); SYBR GreenER(美国 Qiagen 公司); DAPI(上海碧云天生物科技公司); 兔抗人成对同源域转录因子 2(paired-like homeodomain transcription factor 2, PITX2) 多克隆抗体(ab98297, 1:200)、兔抗人转录因子激活蛋白 2β(transcription factor AP-2β, AP-2β) 多克隆抗体(ab221094, 1:100)(美国 Abcam 公司); 兔抗人 P75 多克隆抗体(OM267105, 1:150)(美国 Omnimabs 公司); 小鼠抗人自然杀伤因子 1(human natural killer 1, HNK-1) 单克隆抗体(C6680, 1:50)(美国 Sigma 公司); Alexa Fluor 488 标记驴抗兔 IgG(A21206)、Alexa Fluor 488 标记驴抗小鼠 IgG(A21202)(美国 Invitrogen 公司); 流式检测抗体 P75(抗人 CD271-PE, 345106, 1:100)、HNK-1(抗人 CD57-FITC, 359604, 1:100)(美国 Biolegend 公司); NIC、Sirtinol、白藜芦醇(resveratrol, Res)(美国 Sigma 公司); Matrigel 354277(美国 Corning 公司)。NanoDrop One 超微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司); PCR 仪(Rotor-Gene Q, 德国 Qiagen 公司); 激光扫描共聚焦显微镜(Eclipse TE2000-U, 日本尼康公司); 流式细胞仪(Aria II, 美国 BD 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 hESCs 的培养及诱导分化** 采用 mTeSR™1 将 H1 细胞培养在 Matrigel 包被的培养板中, 每天换液。培养 5~7 d 至 hESCs 克隆接近融合时使用 ReLeSR™ 消化, 以 1:10 比例传代。传代后倒置相差显微镜下观察 H1 细胞扩增至约 70% 融合, 进行诱导分化。根据诱导培养基(DF12、体积分数 20% KSR、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、bFGF、β-巯基乙醇)中干预组分不同分为未添加 NIC 组(仅使用诱导培养基)、NIC 添加组(含 10 mmol/L NIC 的诱导培养基)、NIC+Res 组(含 10 mmol/L NIC 和 10 μmol/L Res 的诱导培养基)和 Sirtinol 组(含 10 μmol/L Sirtinol 的诱导培养基)。各组细胞每天换液, 连续诱导 7 d。小分子化合物 NIC

诱导 hESCs 分化为神经嵴细胞流程如图 1 所示。



**图 1 hESCs 来源神经嵴细胞诱导流程示意图** hESCs: 人胚胎干细胞; NCs: 神经嵴细胞; NIM: 神经嵴诱导培养基; NIC: 尼克酰胺  
**Figure 1 Schematic diagram of hESCs-derived neural crest cells induction process** hESCs: human embryonic stem cells; NCs: neural crest cells; NIM: neural crest induction medium; NIC: nicotinamide

**1.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测 hESCs 和神经嵴相关标志物的基因表达** 分别收集诱导 1、3、5、7 d 未添加 NIC 组和 NIC 添加组的诱导细胞并提取总 RNA, 采用 NanoDrop One 测得 RNA 浓度以及纯度。以提取的总 RNA 为模板, 按照逆转录试剂盒提供的步骤逆转录为 cDNA, 配制 20 μl 体系, 37 ℃ 反应 15 min, 85 ℃ 反应 5 s, 4 ℃ 终止反应。以 cDNA 为模板加入 SYBR GreenER 和相应引物进行实时荧光定量 PCR; 引物由青岛德海达生物技术有限公司合成, 各引物序列见表 1。PCR 反应条件: 95 ℃ 预变性 2 min; 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火并延伸 10 s, 扩增 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算各基因的相对表达量。所有实验均重复 3 次以上。

**表 1 目的基因引物序列**  
**Table 1 Primer sequences of target genes**

| 引物    | 引物序列(5'-3')                 | 扩增片段长度(bp) |
|-------|-----------------------------|------------|
| OCT4  | 正向: CTGGGGTTCTATTGGGAAG     | 222        |
|       | 反向: GTTGCTCTCACTCGGTTCT     |            |
| NANOG | 正向: ACCTCAGCTACAAACAGGTGAAG | 140        |
|       | 反向: AGAGTAAAGCTGGGGTAGGT    |            |
| SOX10 | 正向: CCTCACAGATCGCTACACC     | 161        |
|       | 反向: CATATAGGAGAAGGCCAGTAGA  |            |
| P75   | 正向: TTCATCCACGATATTGTCAGG   | 137        |
|       | 反向: GCTGGGGTAAGTGTACTGCC    |            |
| HNK-1 | 正向: CAGCGAAGCCAGGCTACT      | 166        |
|       | 反向: CATTACCAGCACTGGCTTCT    |            |
| SOX9  | 正向: CCCAACAGATCGCTACAG      | 100        |
|       | 反向: GAGTTCTGGTGGTGGTGTAGTC  |            |
| GAPDH | 正向: CATGTTGCTCATGGGTGTGAA   | 150        |
|       | 反向: CATGGACTGTGGTCATGAGTCCT |            |

注: OCT4: 八聚体结合转录因子 4; NANOG: 同源域蛋白; SOX: SRY 相关 HMG 盒; P75: 神经营养因子受体; HNK-1: 人自然杀伤因子 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Note: OCT4: octamer transcription factor 4; NANOG: homeodomain proteins; SOX: SRY-related HMG box; P75: neurotrophic factor receptor; HNK-1: human natural killer 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

**1.2.3 免疫荧光染色法测定 hESCs 来源神经嵴细胞相关标志蛋白表达** 未添加 NIC 组和 NIC 添加组诱



导培养 7 d 的细胞样品使用质量分数 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗 3 次, 体积分数 0.1% Triton-X100 破膜 10 min, PBS 洗 3 次, 质量分数 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 吸去封闭液分别加入 P75、HNK-1、AP-2 $\beta$  和 PITX2 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日, PBS 清洗 3 次, 加入荧光二抗 (1:300) 室温避光孵育 1 h。DAPI 复染细胞核 10 min, 激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。所有实验均重复 3 次以上。

**1.2.4 流式细胞术分析 hESCs 来源神经嵴细胞表面标志物阳性细胞比率** 未添加 NIC 组和 NIC 添加组细胞样品使用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化, 制备细胞悬液。使用含体积分数 2% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)-PBS 清洗细胞 2 遍, 250 $\times$ g 离心 5 min, 150  $\mu\text{l}$  细胞染色缓冲液 (2% FBS-PBS) 重悬细胞, 加入 P75-PE 和 HNK-1-FITC, 4  $^{\circ}\text{C}$  染色 30 min。染色结束后 PBS 洗涤细胞 2 遍上机检测, 使用流式细胞仪对 2 个组细胞进行分析。收集 NIC+Res 组及 Sirtinol 组细胞样品进行 HNK-1-FITC 流式染色分析, 比较各组 HNK-1 $^{+}$  细胞比率。所有实验均重复 3 次以上。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实接近正态分布, 以  $\bar{x}\pm s$  表示。未添加 NIC 组和 NIC 添加组诱导不同时间点 OCT4、NANOG、P75、HNK-1、SOX9、SOX10 mRNA 相对表达量总体差异比较采用两因素方差分析, 两两比较采用 LSD- $t$  检验; 未添加 NIC 组和 NIC 添加组诱导 7 d 后 P75 $^{+}$  和 HNK-1 $^{+}$  细胞比率差异比较采用独立样本  $t$  检验; 未添加 NIC 组、NIC 添加组、NIC+Res 组和 Sirtinol 组间 HNK-1 $^{+}$  细胞比率总体比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- $t$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 未添加 NIC 组与 NIC 添加组不同时间点全能性及神经嵴细胞相关基因 mRNA 相对表达量比较**

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, NIC 添加组与未添加 NIC 组诱导不同时间点全能性基因 OCT4 和 NANOG mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 (OCT4:  $F_{\text{分组}} = 61.370, P<0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 21.460, P<0.001$ ; NANOG:  $F_{\text{分组}} = 26.210, P<0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 3.410, P=0.043$ )。其中与未添加 NIC 组相比, NIC 添加组诱导 3、5、7 d 时 OCT4 mRNA 相对表达量显著降低, 诱导 3 d 和 5 d 时 NANOG mRNA 相对表达量显著降低, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。2 个组诱导后不同时间点神经嵴细胞标志物 P75、HNK-1、SOX9 及 SOX10 的 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (P75:  $F_{\text{分组}} = 29.210, P<0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 31.220, P<0.001$ ; HNK-1:  $F_{\text{分组}} = 96.350, P<0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 17.700, P<0.001$ ; SOX9:  $F_{\text{分组}} = 55.330, P<0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 17.990, P<0.001$ ; SOX10:  $F_{\text{分组}} = 54.740, P<0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 18.640, P<0.001$ )。与未添加 NIC 组比较, NIC 添加组 P75 和 SOX10 mRNA 相对表达量在诱导 3、5、7 d 时升高, HNK-1 mRNA 相对表达量在诱导 5 d 和 7 d 升高, SOX9 mRNA 相对表达量在诱导 1、3、5、7 d 时升高, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ ) (表 2~7)。

**表 2 诱导不同时间点未添加 NIC 组与 NIC 添加组 OCT4 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )**  
**Table 2 Comparison of relative expression levels of OCT4 mRNA between two groups at different time points ( $\bar{x}\pm s$ )**

| 组别        | 样本量 | 诱导不同时间点 OCT4 mRNA 相对表达量 |                                |                                |                                |
|-----------|-----|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|           |     | 1 d                     | 3 d                            | 5 d                            | 7 d                            |
| 未添加 NIC 组 | 3   | 0.623 $\pm$ 0.126       | 0.777 $\pm$ 0.070              | 0.592 $\pm$ 0.062              | 0.489 $\pm$ 0.031              |
| NIC 添加组   | 3   | 0.557 $\pm$ 0.062       | 0.477 $\pm$ 0.101 <sup>a</sup> | 0.364 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup> | 0.155 $\pm$ 0.044 <sup>a</sup> |

注:  $F_{\text{分组}} = 61.370, P<0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 21.460, P<0.001$ 。与相应时间点未添加 NIC 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$  (两因素方差分析, LSD- $t$  检验) NIC: 尼克酰胺; OCT4: 八聚体结合转录因子 4

Note:  $F_{\text{group}} = 61.370, P<0.001$ ;  $F_{\text{time}} = 21.460, P<0.001$ . Compared with the group treated without NIC at corresponding time points, <sup>a</sup> $P<0.05$  (Two-way ANOVA, LSD- $t$  test) NIC: nicotinamide; OCT4: octamer transcription factor 4

**表 3 诱导不同时间点未添加 NIC 组与 NIC 添加组 NANOG mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )**  
**Table 3 Comparison of relative expression levels of NANOG mRNA between two groups at different time points ( $\bar{x}\pm s$ )**

| 组别        | 样本量 | 诱导不同时间点 NANOG mRNA 相对表达量 |                                |                                |                   |
|-----------|-----|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
|           |     | 1 d                      | 3 d                            | 5 d                            | 7 d               |
| 未添加 NIC 组 | 3   | 0.647 $\pm$ 0.088        | 0.836 $\pm$ 0.301              | 0.727 $\pm$ 0.341              | 0.376 $\pm$ 0.190 |
| NIC 添加组   | 3   | 0.600 $\pm$ 0.128        | 0.279 $\pm$ 0.121 <sup>a</sup> | 0.151 $\pm$ 0.102 <sup>a</sup> | 0.073 $\pm$ 0.058 |

注:  $F_{\text{分组}} = 26.210, P<0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 3.410, P=0.043$ 。与相应时间点未添加 NIC 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$  (两因素方差分析, LSD- $t$  检验) NIC: 尼克酰胺; NANOG: 同源域蛋白

Note:  $F_{\text{group}} = 26.210, P<0.001$ ;  $F_{\text{time}} = 3.410, P=0.043$ . Compared with the group treated without NIC at corresponding time points, <sup>a</sup> $P<0.05$  (Two-way ANOVA, LSD- $t$  test) NIC: nicotinamide; NANOG: homeodomain proteins

**表 4 诱导不同时间点未添加 NIC 组与 NIC 添加组 P75 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 4 Comparison of relative expression levels of P75 mRNA between two groups at different time points ( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别        | 样本量 | 诱导不同时间点 P75 mRNA 相对表达量 |                          |                          |                          |
|-----------|-----|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|           |     | 1 d                    | 3 d                      | 5 d                      | 7 d                      |
| 未添加 NIC 组 | 3   | 0.979±0.190            | 1.348±0.412              | 1.702±0.262              | 1.630±0.112              |
| NIC 添加组   | 3   | 0.845±0.073            | 1.995±0.195 <sup>a</sup> | 2.813±0.291 <sup>a</sup> | 2.220±0.297 <sup>a</sup> |

注:  $F_{\text{分组}} = 29.210, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 31.220, P < 0.001$ . 与相应时间点未添加 NIC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) NIC: 尼克酰胺; P75: 神经营养因子受体  
 Note:  $F_{\text{group}} = 29.210, P < 0.001; F_{\text{time}} = 31.220, P < 0.001$ . Compared with the group treated without NIC at corresponding time points, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) NIC: nicotinamide; P75: neurotrophic factor receptor

**表 5 诱导不同时间点未添加 NIC 与 NIC 添加组 HNK-1 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 5 Comparison of relative expression levels of HNK-1 mRNA between two groups at different time points ( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别        | 样本量 | 诱导不同时间点 HNK-1 mRNA 相对表达量 |             |                          |                          |
|-----------|-----|--------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|
|           |     | 1 d                      | 3 d         | 5 d                      | 7 d                      |
| 未添加 NIC 组 | 3   | 0.411±0.053              | 0.708±0.192 | 0.440±0.113              | 0.462±0.056              |
| NIC 添加组   | 3   | 0.553±0.111              | 0.895±0.155 | 1.049±0.154 <sup>a</sup> | 1.563±0.117 <sup>a</sup> |

注:  $F_{\text{分组}} = 96.350, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 17.700, P < 0.001$ . 与相应时间点未添加 NIC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) NIC: 尼克酰胺; HNK-1: 人自然杀伤因子 1  
 Note:  $F_{\text{group}} = 96.350, P < 0.001; F_{\text{time}} = 17.700, P < 0.001$ . Compared with the group treated without NIC at corresponding time points, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) NIC: nicotinamide; HNK-1: human natural killer 1

**表 6 诱导不同时间点未添加 NIC 组与 NIC 添加组 SOX9 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 6 Comparison of relative expression levels of SOX9 mRNA between two groups at different time points ( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别        | 样本量 | 诱导不同时间点 SOX9 mRNA 相对表达量  |                          |                          |                          |
|-----------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|           |     | 1 d                      | 3 d                      | 5 d                      | 7 d                      |
| 未添加 NIC 组 | 3   | 0.504±0.238              | 0.732±0.044              | 1.231±0.145              | 1.490±0.277              |
| NIC 添加组   | 3   | 1.055±0.365 <sup>a</sup> | 1.851±0.287 <sup>a</sup> | 1.847±0.090 <sup>a</sup> | 2.257±0.346 <sup>a</sup> |

注:  $F_{\text{分组}} = 55.330, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 17.990, P < 0.001$ . 与相应时间点未添加 NIC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) NIC: 尼克酰胺; SOX9: SRY 相关 HMG 盒 9  
 Note:  $F_{\text{group}} = 55.330, P < 0.001; F_{\text{time}} = 17.990, P < 0.001$ . Compared with the group treated without NIC at corresponding time points, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) NIC: nicotinamide; SOX9: SRY-related HMG box 9

**表 7 诱导不同时间点未添加 NIC 组与 NIC 添加组 SOX10 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 7 Comparison of relative expression levels of SOX10 mRNA between two groups at different time points ( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别        | 样本量 | 诱导不同时间点 SOX10 mRNA 相对表达量 |                          |                          |                          |
|-----------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|           |     | 1 d                      | 3 d                      | 5 d                      | 7 d                      |
| 未添加 NIC 组 | 3   | 0.434±0.120              | 0.811±0.289              | 1.150±0.358              | 1.120±0.596              |
| NIC 添加组   | 3   | 0.740±0.233              | 2.188±0.263 <sup>a</sup> | 2.186±0.548 <sup>a</sup> | 3.625±0.667 <sup>a</sup> |

注:  $F_{\text{分组}} = 54.740, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 18.640, P < 0.001$ . 与相应时间点未添加 NIC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) NIC: 尼克酰胺; SOX10: SRY 相关 HMG 盒 10  
 Note:  $F_{\text{group}} = 54.740, P < 0.001; F_{\text{time}} = 18.640, P < 0.001$ . Compared with the group treated without NIC at corresponding time points, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) NIC: nicotinamide; SOX10: SRY-related HMG box 10

**2.2 未添加 NIC 组与 NIC 添加组 hESCs 来源神经嵴细胞的形态变化和免疫荧光鉴定**

诱导后 7 d, 未添加 NIC 组诱导细胞排列欠规则, 细胞间形态差异较大, 部分呈长梭形; NIC 添加组细胞形态更规则, 呈多边形排布 (图 2)。免疫荧光染色鉴定结果显示, 未添加 NIC 组诱导细胞中神经嵴标志性蛋白 P75 表达较弱, HNK-1 仅有零星表达, AP-2β 及 PITX2 均未见阳性着色, NIC 添加组细胞中 P75、HNK-1、AP-2β 及 PITX2 均呈广泛强阳性表达 (图 3)。

**2.3 未添加 NIC 组与 NIC 添加组 hESCs 来源 P75<sup>+</sup>HNK-1<sup>+</sup> 和 P75<sup>+</sup> 细胞比率比较**

流式细胞术检测结果显示, 未添加 NIC 组 P75<sup>+</sup> HNK-1<sup>+</sup> 和 P75<sup>+</sup> 细胞比率分别为 (33.200±11.197)% 和 (81.100±9.553)%, 低于 NIC 添加组的 (88.433±1.365)% 和 (97.700±1.179)%, 差异均有统计学意义 ( $t = 8.481, P = 0.001; t = 2.987, P = 0.041$ ) (图 4)。

**2.4 各组 hESCs 来源 HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率比较**

流式细胞术检测结果显示, 未添加 NIC 组、NIC 添加组、NIC + Res 组和 Sirtinol 组 HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率分别为 (34.267±12.522)%、(89.633±1.358)%、(64.667±6.429)% 和 (86.300±3.460)%, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 36.799, P < 0.001$ ); 其中, NIC + Res 组 HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率均低于 NIC 添加组和 Sirtinol 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 5)。



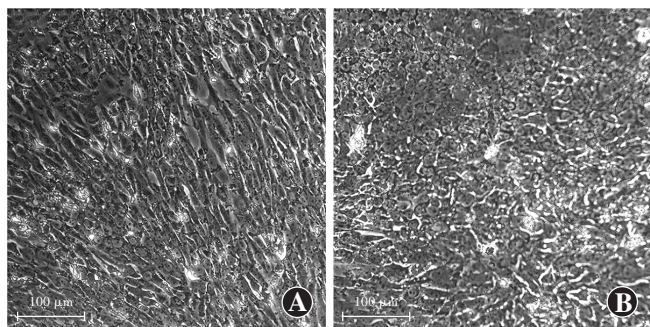


图2 未添加 NIC 组与 NIC 添加组 hESCs 来源神经嵴细胞形态 ( $\times 100$ , 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) A: 诱导后 7 d, 未添加 NIC 组细胞排列欠规则 B: 诱导后 7 d, NIC 添加组细胞形态呈多边形排布

**Figure 2 Morphology of hESCs-derived neural crest cells in groups treated with and without NIC ( $\times 100$ , bar = 100  $\mu\text{m}$ )** A: Irregular arrangement of hESCs-derived neural crest cells was seen in group treated without NIC after 7 days of induction B: Polygonal arrangement of hESCs-derived neural crest cells was observed in group treated with NIC after 7 days of induction

### 3 讨论

既往研究显示,神经嵴细胞作为脊椎动物胚胎发育过程中的一种瞬态干细胞,能够产生多种具有临床意义的组织细胞<sup>[21-23]</sup>。在眼的胚胎发育过程中,角膜内皮、小梁网、睫状肌等多个组织结构的发生均来源于神经嵴细胞的迁移和分化<sup>[3-4]</sup>。Ju 等<sup>[24]</sup>研究发现,来自大鼠神经嵴细胞的角膜内皮细胞能够修复大鼠的角膜内皮缺损。随着干细胞技术的不断发展,利用干细胞对病变组织进行修复成为具有良好前景的治疗手段<sup>[5,25]</sup>。然而神经嵴细胞的分离、干细胞治疗的安全性筛选均对目的细胞的产量有着较高要求<sup>[26]</sup>。因此,经济、高效地诱导多能干细胞分化为神经嵴细胞成为定向获得角膜内皮细胞等衍生细胞的关键步骤。本研究发现, NIC 能够通过调节 SIRT1 活性提高 hESCs 来源 HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率,最终促进 hESCs 向神经嵴细胞分化。

WNT、BMP 和 FGF 信号通路在脊椎动物神经嵴细胞形成过程中具有重要作用,基于此既往研究建立了多种神经嵴诱导体系<sup>[14]</sup>。如使用 SMAD 抑制剂、TGF- $\beta$  抑制剂调控 WNT/BMP/TGF- $\beta$  信号,促使 hESCs 经由神经外胚层生成神经嵴细胞;或同时联合表皮生长因子、bFGF 促进神经干细胞向神经嵴细胞分化,并维持神经嵴细胞的增生能力和高迁移性<sup>[10-12]</sup>。本研究结果显示,仅通过使用 NIC 即可高效完成诱导 hESCs 向神经嵴细胞的分化过程,且诱导时间较短、无其他分化阶段干扰,所获得细胞高表达神经嵴细胞特异性基因 *SOX10*、*SOX9*、*P75*、*HNK-1* 及相应蛋白标志物 *P75*、*HNK-1*、*AP-2 $\beta$*  和 *PITX2*。

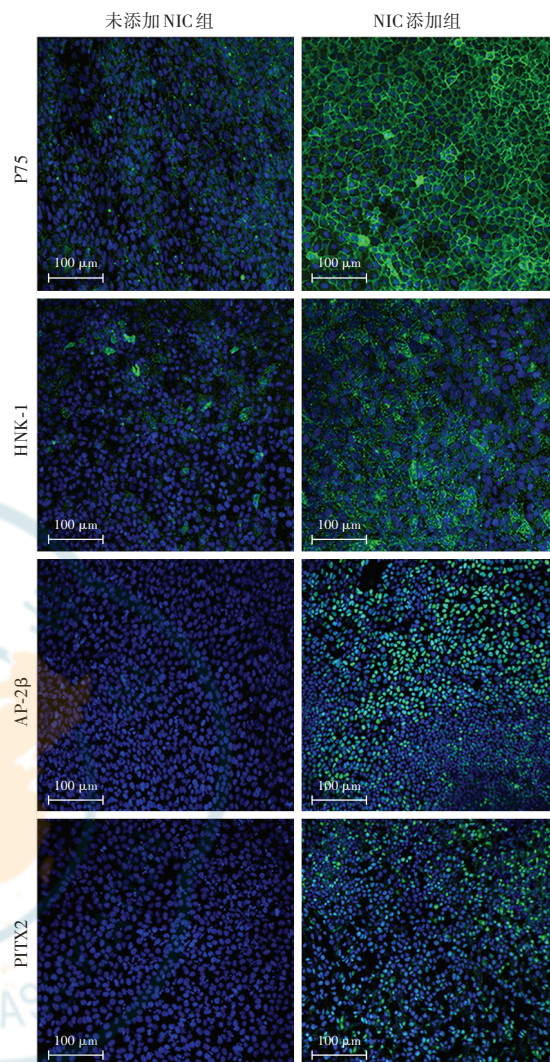
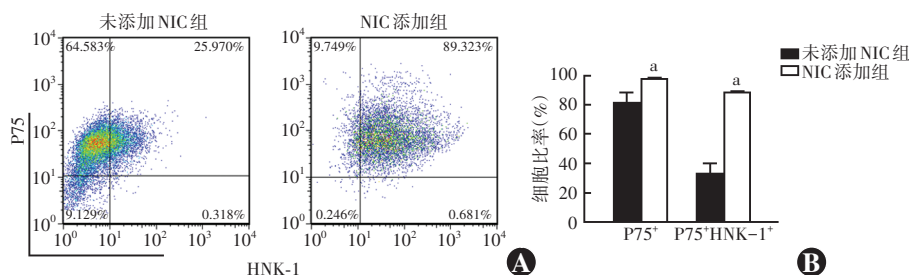


图3 hESCs 来源神经嵴细胞相关标志物表达情况 (Alexa Fluor 488/DAPI  $\times 100$ , 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) 未添加 NIC 组诱导细胞中神经嵴标志蛋白 P75 表达较弱, HNK-1 仅有零星表达, AP-2 $\beta$  及 PITX2 均未见阳性着色, NIC 添加组细胞中 P75、HNK-1、AP-2 $\beta$  及 PITX2 均呈广泛强阳性表达 (绿色荧光为各标志物表达情况, 细胞核呈蓝色荧光) NIC: 尼克酰胺; P75: 神经生长因子受体; HNK-1: 人自然杀伤因子 1; AP-2 $\beta$ : 转录因子激活蛋白 2 $\beta$ ; PITX2: 成对同源域转录因子 2

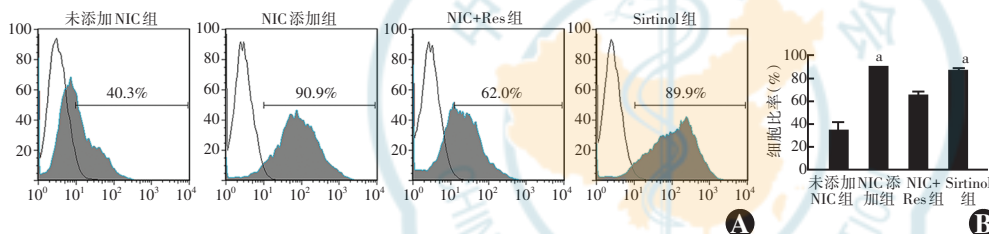
**Figure 3 Expression of neural crest cell markers in hESCs-derived neural crest cells (Alexa Fluor 488/DAPI  $\times 100$ , bar = 100  $\mu\text{m}$ )** Weak expression of P75 and a little expression of HNK-1 were seen in group treated without NIC, and AP-2 $\beta$  and PITX2 were not expressed. Strong expressions of P75, HNK-1, AP-2 $\beta$  and PITX2 were observed in group treated without NIC (Cell markers showed green fluorescence, and nuclei presented blue fluorescence) NIC: nicotinamide; P75: neurotrophic factor receptor; HNK-1: human natural killer 1; AP-2 $\beta$ : transcription factor AP-2 $\beta$ ; PITX2: paired-like homeodomain transcription factor 2

HNK-1 是一种髓鞘相关蛋白,能够结合细胞黏附分子的碳水化合物表位,参与细胞与细胞、细胞与基质之间的相互作用。研究报道 HNK-1 在神经嵴细胞迁移过程中高表达<sup>[27-29]</sup>,当神经嵴细胞分化成熟时 HNK-1 表达减弱或消失<sup>[30]</sup>。因此,是否表达 HNK-1



**图4 流式细胞分析 hESCs 来源神经嵴细胞中 P75<sup>+</sup> 及 HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率** A: 诱导后 7 d, NIC 添加组诱导细胞中 P75<sup>+</sup> HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率较未添加 NIC 组明显升高 B: 诱导后 7 d, 2 个组细胞中 P75<sup>+</sup> 和 P75<sup>+</sup> HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率比较 与未添加 NIC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) NIC: 尼克酰胺; HNK-1: 人自然杀伤因子 1; P75: 神经营养因子受体

**Figure 4 Percentage of P75<sup>+</sup> and HNK-1<sup>+</sup> cells in hESCs-derived neural crest cells by flow cytometry** A: The percentage of P75<sup>+</sup> HNK-1<sup>+</sup> cells was significantly higher in group treated with NIC than that in group treated without NIC after 7 days of induction B: Comparison of the proportions of P75<sup>+</sup> and P75<sup>+</sup> HNK-1<sup>+</sup> cells between two groups after 7 days of induction Compared with the group treated without NIC, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) NIC: nicotinamide; HNK-1: human natural killer 1; P75: neurotrophic factor receptor



**图5 调控 SIRT1 对 HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率的影响** A: 各组诱导后 7 d 流式细胞图 B: 各组 HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率比较  $F = 36.799$ ,  $P < 0.001$ . 与 NIC+Res 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) NIC: 尼克酰胺; Res: 白藜芦醇

**Figure 5 Impact of SIRT1 regulation on the percentage of HNK-1<sup>+</sup> cells** A: Flow cytometry of HNK-1<sup>+</sup> cells after 7 days of induction B: Comparison of the percentage of HNK-1<sup>+</sup> cells  $F = 36.799$ ,  $P < 0.001$ . Compared with the NIC+Res group, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 3$ ) NIC: nicotinamide; Res: resveratrol

能够反映诱导细胞是否处于神经嵴细胞阶段。本研究对诱导细胞中 P75<sup>+</sup> HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率进行分析发现, NIC 显著提高了 P75<sup>+</sup> HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率, 尤其提高了诱导细胞中 HNK-1 的表达 (HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率  $\geq 90\%$ ), 而未添加 NIC 组 HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率不足 40%; 免疫荧光染色也显示, 未添加 NIC 组细胞几乎不表达其他神经嵴标志物, 如 AP-2 $\beta$  和 PITX2, 说明 NIC 具有促进 HNK-1 表达, 诱导 hESCs 向神经嵴细胞分化的作用。

根据以往研究, NIC 能够抑制 SIRT1 活性, 调控细胞命运<sup>[15, 17-19]</sup>。为探索 NIC 是否通过抑制 SIRT1 从而诱导神经嵴细胞的产生, 本研究分别使用 SIRT1 激动剂 Res 及抑制剂 Sirtinol 对 hESCs 向神经嵴细胞分化的过程进行干预和模拟, 并通过流式分析对神经嵴细胞重要表面标志物 HNK-1<sup>+</sup> 细胞比率进行评价, 结果显示 SIRT1 抑制剂 Sirtinol 表现出与 NIC 类似的诱导

效果, 同样促进了 HNK-1<sup>+</sup> 细胞的产生; 而 SIRT1 激动剂 Res 则会抵抗 NIC 对 HNK-1<sup>+</sup> 细胞的诱导效应, 说明 NIC 很可能通过调控 SIRT1 信号通路介导神经嵴细胞的分化过程。也有研究表明, 通过调节 Rho 激酶 (Rho-associated kinase, ROCK)/Myosin II 通路, 可以不依赖 WNT/ $\beta$ -catenin 信号影响神经嵴细胞的分化命运<sup>[31]</sup>。NIC 对 ROCK、酪蛋白激酶 1 等多种激酶也具有抑制活性<sup>[20]</sup>, 其对神经嵴细胞的诱导分化作用是否也部分通过调控 ROCK/Myosin II 进行, 仍需要进一步研究证实。

此外, 作为维生素 B3 的酰胺形式, NIC 具有多种生物学功能, 广泛参与细胞营养、抗氧化、抗凋亡等生物学过程, 其是否也参与了神经嵴细胞的体外维持也需要加以验证。

综上所述, 本研究发现 NIC 可以用于高效生成 hESCs 来源神经嵴细胞, 为其他眼部神经嵴衍生细胞的进一步诱导分化提供稳定的细胞来源支持, 也为神经嵴细胞

相关的疾病治疗, 如角膜内皮移植提供了新的种子细胞来源。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**志谢** 感谢陆军军医大学第一附属医院眼科阴正勤教授提供 H1 细胞系

**作者贡献声明** 段豪云: 参与设计实验、实施研究、采集/分析数据、起草及修改文章; 李文静、贾艳妮、赵灿: 实施研究、采集/分析数据; 周庆军: 参与选题的确定; 李宗义: 参与实验设计的把控、文章审阅及定稿

## 参考文献

- [1] Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, et al. Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy [J]. N Engl J Med, 2018, 378(11): 995-1003. DOI: 10.1056/NEJMoa1712770.
- [2] 徐建江, 洪佳旭. 正确认识角膜内皮移植新技术: 前房内注射角膜内皮细胞 [J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(3): 161-163. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.001.

Xu JJ, Hong JX. A novel technique of endothelium keratoplasty: injection of corneal endothelial cells into anterior chamber [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(3): 161-163. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.001.



- [3] Delfino-Machín M, Chipperfield TR, Rodrigues FS, et al. The proliferating field of neural crest stem cells [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(12): 3242–3254. DOI: 10.1002/dvdy. 21314.
- [4] Gage PJ, Rhoades W, Prucka SK, et al. Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(11): 4200–4208. DOI: 10.1167/iov.05-0691.
- [5] 瞿杨洛娃, 欧尚坤, 刘婷婷, 等. 一种基于胚胎干细胞构建角膜上皮样组织的新方法 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(11): 826–833. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.003.  
Qu YLW, Ou SK, Liu TT, et al. A new method for constructing engineered corneal epithelium based on embryonic stem cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36(11): 826–833. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.003.
- [6] 刘秋慧, 王菁, 田蓉, 等. 无动物源性成分培养体系快速诱导人胚胎干细胞向视网膜色素上皮细胞的分化 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(6): 484–488. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.002.  
Liu QH, Wang J, Tian R, et al. Rapid differentiation of human ESCs into RPE cells by defined xeno-free culture system [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(6): 484–488. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.002.
- [7] Shao C, Fu Y, Lu W, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction [J]. *Cells Tissues Organs*, 2011, 193(4): 253–263. DOI: 10.1159/000319797.
- [8] Chen X, Wu L, Li Z, et al. Directed differentiation of human corneal endothelial cells from human embryonic stem cells by using cell-conditioned culture media [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(7): 3028–3036. DOI: 10.1167/iov.17-23627.
- [9] Jiang X, Gwe Y, McKeown SJ, et al. Isolation and characterization of neural crest stem cells derived from *in vitro*-differentiated human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(7): 1059–1070. DOI: 10.1089/scd.2008.0362.
- [10] Menendez L, Kulik MJ, Page AT, et al. Directed differentiation of human pluripotent cells to neural crest stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(1): 203–212. DOI: 10.1038/nprot.2012.156.
- [11] Menendez L, Yatskevych TA, Antin PB, et al. Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(48): 19240–19245 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22084120/>. DOI: 10.1073/pnas.1113746108.
- [12] Zhu Q, Li M, Yan C, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells to neural crest stem cells, functional peripheral neurons, and corneal keratocytes [J/OL]. *Biotechnol J*, 2017, 12(12): 1700067 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28762648/>. DOI: 10.1002/biot.201700067.
- [13] Cimaadamore F, Fishwick K, Giusto E, et al. Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(5): 538–551. DOI: 10.1016/j.stem.2011.03.011.
- [14] Leung AW, Murdoch B, Salem AF, et al. WNT/ $\beta$ -catenin signaling mediates human neural crest induction via a pre-neural border intermediate [J]. *Development*, 2016, 143(3): 398–410. DOI: 10.1242/dev.130849.
- [15] Milet C, Monsoro-Burq AH. Embryonic stem cell strategies to explore neural crest development in human embryos [J]. *Dev Biol*, 2012, 366(1): 96–99. DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.01.016.
- [16] 孙琳, 吴欣怡. 模拟人角膜内皮细胞微环境诱导人胚胎干细胞分化为角膜内皮细胞的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(9): 844–847. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.017.  
Sun L, Wu XY. Advances in differentiation of human embryonic stem cells into corneal endothelial cells under the mimical microenvironment [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(9): 844–847. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.017.
- [17] Zhu D, Xie M, Gademann F, et al. Protective effects of human iPSC-derived retinal pigmented epithelial cells on retinal degenerative disease [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 98 [2022-04-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32131893/>. DOI: 10.1186/s13287-020-01608-8.
- [18] Vaca P, Berná G, Araujo R, et al. Nicotinamide induces differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(5): 969–974. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.11.019.
- [19] Son MJ, Son MY, Seol B, et al. Nicotinamide overcomes pluripotency deficits and reprogramming barriers [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(6): 1121–1135. DOI: 10.1002/stem.1368.
- [20] Meng Y, Ren Z, Xu F, et al. Nicotinamide promotes cell survival and differentiation as kinase inhibitor in human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 11(6): 1347–1356. DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.10.023.
- [21] Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration [J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(12): 715–722. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.09.012.
- [22] Vandamme N, Berx G. From neural crest cells to melanocytes: cellular plasticity during development and beyond [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(10): 1919–1934. DOI: 10.1007/s00018-019-03049-w.
- [23] Wang J, Wang X, Sun Z, et al. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(9): 1375–1383. DOI: 10.1089/scd.2009.0258.
- [24] Ju C, Zhang K, Wu X. Derivation of corneal endothelial cell-like cells from rat neural crest cells *in vitro* [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e42378 [2022-04-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22860120/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0042378.
- [25] Kirkeby A, Nolbrant S, Tiklova K, et al. Predictive markers guide differentiation to improve graft outcome in clinical translation of hESC-based therapy for Parkinson's disease [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(1): 135–148. DOI: 10.1016/j.stem.2016.09.004.
- [26] Zhu W, Gramlich OW, Laboissonniere L, et al. Transplantation of iPSC-derived TM cells rescues glaucoma phenotypes *in vivo* [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(25): E3492–E3500 [2022-04-18]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27274060/>. DOI: 10.1073/pnas.1604153113.
- [27] Künemund V, Jungalwala FB, Fischer G, et al. The L2/HNK-1 carbohydrate of neural cell adhesion molecules is involved in cell interactions [J]. *J Cell Biol*, 1988, 106(1): 213–223. DOI: 10.1083/jeb.106.1.213.
- [28] Thies A, Schachner M, Berger J, et al. The developmentally regulated neural crest-associated glycotop HNK-1 predicts metastasis in cutaneous malignant melanoma [J]. *J Pathol*, 2004, 203(4): 933–939. DOI: 10.1002/path.1595.
- [29] Bronner-Fraser M. Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody [J]. *Dev Biol*, 1987, 123(2): 321–331. DOI: 10.1016/0012-1606(87)90390-3.
- [30] Vincent M, Thiery JP. A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evolution in peripheral and central nervous system [J]. *Dev Biol*, 1984, 103(2): 468–481. DOI: 10.1016/0012-1606(84)90334-8.
- [31] Kim K, Ossipova O, Sokol SY. Neural crest specification by inhibition of the ROCK/Myosin II pathway [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(3): 674–685. DOI: 10.1002/stem.1877.

(收稿日期: 2022-04-20 修回日期: 2022-11-02)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

