KISEP Original Article
臨床耳鼻：第15卷 第2號 2004
J Clinical Otolaryngol 2004;15:227-233

Subventricular Zone과 Olfactory Bulb에서 신경줄기세포의 배양에 대한 연구

부산대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 생화학교실,[2] 부산대학교병원 의학연구소[3]
이일우[1] · 이현순[1] · 정진섭[2] · 박희영[3] · 노환중[1]

Isolation of Neural Stem Cells from the Subventricular Zone and the Olfactory Bulb of Neonatal Mice

IL-Woo Lee, MD[1], Hyun-Sun Lee, MD[1], Jin-Sup Jung, MD[2],
Hee-Young Park, MD[3] and Hwan-Jung Roh, MD[1]
[1]Department of Otolaryngology and [2]Physiology, College of Medicine,
Pusan National University and [3]Medical Research Institute,
Pusan National University Hospital, Busan, Korea

－ABSTRACT－

Background : Neural stem cells are present in adult brain as well as fetal brain and have capacity for self-renewal and pluripotenciality in vitro culture. Therefore, they can be used to treat neurological damages in various degenerative disorders. **Objectives** : This study was designated to isolate neural stem cells from the central nervous system of neonatal mice, and to examine the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial and neuronal differentiation in mouse neural stem cells. **Materials and Methods** : Cells isolated from the subventricular zone (SVZ) and the olfactory bulb of the 2－3 day old mice brain were grown as neurospheres in the presence of leukemia inhibitoy factor and fibroblast growth factor-2. RT-PCR analysis showed that Oct-4 was expressed in neural stem cells, of which expression was markedly decreased by induction of differentiation, and that neural differentiation of neural stem cells induced expression of various neural markers. **Results** : Neural stem cells were differentiated into neuronal and glial cells. BDNF increased neurite outgrowth during differentiation of neural stem cells. Western blot analysis demonstrated that BDNF induced expression of synaptophysin, a neuronal marker, and inhibited expression of glial fibrillry acidic protein, a glial marker. **Conclusions** : These results indicated that neural stem cells can be isolated from the subventricular zone and the olfactory bulb of neonatal mice, and that BDNF induces neural differentiation and inhibits glial differentiation in neural stem cells. **(J Clinical Otolaryngol 2004;15:227-233)**

KEY WORDS : Stem cell · Olfactory bulb · Culture.

서 론

모든 조직은 발달과정동안 조직의 재생을 유도할 수 있는 조직특이적인 줄기세포를 포함하고 있다. 중추신경계는 전통적으로 재생이 불가능한 기관으로 분류되어왔다. 그러나, 최근의 연구는 성체 포유동물의 중추신경계에도

논문접수일 : 2004년 10월 1일
심사완료일 : 2004년 11월 30일
교신저자 : 노환중, 602 - 739 부산광역시 서구 아미동 1가 10 부산대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (051) 240 - 7333 · 전송 : (051) 246 - 8668 E - mail : rohhj@pusan.ac.kr

줄기세포의 특성을 가진 줄기세포가 존재함이 보고되었다.[1] 이러한 신경줄기세포는 다양한 동물에서 초기발달단계의 중추신경계[2]와 신경생성이 성체에서도 일어나는 subventricular zone(SVZ) 및 hippocampus의 dentate gyrus 등[3]에 존재하는 것으로 알려져 있다. 신경줄기세포는 생체외에서 신경세포 및 교세포의 전구세포로 분화되며[4] 생체에 투여시 다양한 뇌영역으로 이동하여 분화됨이 보고되어[5] 신경조직재생을 위한 이식치료의 세포공급원으로 이용될 수 있다. 실제로 이를 이용한 생체이식술에 의한 신경기능의 회복이 보고되고 있다.[6] 또한 최근 신경줄기세포가 다른 세포로도 분화될 수 있음이 보고되어[7] 다른조직의 재생에 이용될 가능성이 제안되고 있다.

한편 비과영역에서 후각 장애의 빈도는 19.1% 그 중 무취증의 빈도는 5.8%[8]로 신경줄기세포를 무취증 환자에 이식하면 신경 세포로 분화되어 후각 신경회복을 기대할 수 있으나 이에 대한 연구는 이루어지고 있지 않다. 이들 연구를 통하여 분리된 신경줄기세포는 다양한 퇴행성 신경질환뿐만 아니라 후각기능장애의 치료기술개발에도 활용될 수 있을 것이다.

성체 설치류의 뇌에서 신경세포의 생성은 dentate gyrus와 대뇌피질의 subgranular region[9]과 olfactor bulb[10]에서 보고되고 있고 subventricular zone에 존재하는 신경줄기세포의 일부는 olfactory bulb로 이동하는 것으로 보고되었다.[11] 따라서, olfactory bulb가 신경줄기세포의 공급원이 될 가능성이 있다. 특히 이 부분은 약간의 후각장애를 감수하면 인체에서 자가조직을 분리할 수 있는 부위이다.

Neurotrphin은 신경성장인자(nerve growth factor), brain - derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin - 3 및 neurotrophin 4/5를 포함하는 단백질의 family이다. 신경세포에 대한 neurotrophin의 작용은 특정 신경세포에 존재하는 receptor tyrosine kinase의 일종인 Trk family에 의해 매개된다. 모든 neurotrophin의 수용체는 저친화성을 나타내는 p75와 고친화성을 나타내는 TrkA, TrkB 및 TrkC의 두 군으로 분류된다.[12] BDNF는 발달하는 신경계 및 신경전구세포에서 신경세포의 생존 및 분화를 유도하는 것으로 알려져 있으며[13] 성숙한 신경계에서 synaptic plasticity와 신경손상에 대한 신경세포의 보호작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.[14] 이러한 BDNF의 작용은 TrkB에 의해 주로 매개되는 것으로 알려져 있다.[12]

본 연구에서는 신생생쥐뇌의 subventricular zone과 olfactory bulb에서 신경줄기세포를 분리배양하고 이들의 신경분화를 관찰하였으며 이에 대한 BDNF의 효과를 조사하였다.

실험재료 및 방법

사용된 실험동물과 시약들

신경줄기세포 분리를 위해 성장한 잡종1세대(CBA/C57BL6J)쥐를 사용하였다. 성장인자와 항체는 recombinant human fibroblast growth factors - 2(hrFGF - 2), human recombinant leukemia inhibitory factor(hrLIF)(Sigma St. Louis, MO), human recombinant brain - derived neurotrophic factor(BDNF)(INC Biomedicals Inc., Ohio), polyclonal glial fibrillary acidic protein (GFAP) 항체(DAKO, A/S, Denmark), monoclonal synaptophysin, myelin acidic protein 2(MAP2), γ - aminobutyric acid(GABA)항체(Sigma, St. Louis, MO)를 구입하여 사용하였다. 이외의 시약들은 Sigma에서 구입하였다.

생쥐의 신경 전구 세포의 분리와 배양

생후 2~3일된 생쥐의 뇌의 subventricular zone 및 olfactory bulb부분의 조직을 절개하여 멸균된 Hank's balanced salt solution(HBSS) 세척 후, 0.1% trypsin과 0.04% DNAase함유된 HBSS에서 처리하였다. 이렇게 분리된 단일 세포들을 hrFGF - 2(5 ng/ml)와 hrLIF(10 ng/ml)가 함유된 neurobasal(NB) 배지(GIBCO BRL)에서 neurospheres형태로 배양시켰다. 세포 분화를 위해 neurospheres를 poly D - Lysine(PDL 10 mg/ml)가 처리된 배양접시에서 4일간 BDNF(10 ng/ml)처리하거나 처리하지 않은 상태에서 배양하였다. 형태적 연구와 특정한 항체에 대한 면역학적 분석을 위해 10일간 분화를 유도하였다.

역전사효소 중합효소연쇄반응

RNAzol B(Tel Test, Friendswood, Tex, USA)를

사용하여 세포에서 total RNA를 추출하였다. oligo - dT primer를 사용하여 역전사반응(polymerase chain reaction, PCR)을시켜 cDNA를 합성하고 20 pmol 의 특정 primers를 사용하여 35회(94℃, 1 min ; 50℃, 1 min ; 72℃, 1min) 증폭시켰다. PCR반응 후 산물은 1.5%, 2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. β - Actin primer를 양적 표준으로 사용하였고. 역전사효소 중합효소연쇄반응에 사용된 primers들은 Table 1에 제시하였다.

면역화학검사

신경줄기세포의 분화를 유도한 후 세포를 phosphate buffered saline(PBS)에 4% paraformaldehyde를 포함한 용액으로 실온에서 20분간 고정하고 PBS에 0.2% Triton X - 100을 포함한 용액으로 처리한 후 PBS에 희석한 10% 정상 염소혈청으로 비특이적 결합을 억제시켰다. 이후 GFAP, MAP2 및 GABA에 대한 일차항체로 37℃에서 60분간 반응하였고 PBS로 세척 후 alkaline phosphate - conjugated goat antimouse or antirabbit secondary antibody로 37℃에서 반응시켰다. 검체를 Fluor - mount로 mounting하고 현미경으로 관찰하였다(Nikon Microphoto Microscope(Tokyo, Japan)).

Immunoblotting

신경전구세포에 20 mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X - 100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluroride, 10 g/ml aprotinin와 1 mM so-

Table 1. PCR primers

Gene	Product (bp)	PCR primers (5'→3')
GFAP	346	5'-TTG CAG ACC TCA CAG ACG CTG CGT-3'
		5'-CGG TTT TCT TCG CCC TCC AGC AAT-3'
Glutaminase	560	5'-GCA CAG ACA TGG TTG GGA TAC TAG-3'
		5'-GCA GGG CTG TTC TGG AGT CG-3'
Oct-4	320	5'-CGC ACC ACT GGC ATT GTC AT-3'
		5'-TTC TCC TTG ATG TCA CGC AC-3'
Tyroxine hydroxylase	188	5'-GTG TTC CAG TGC ACC CAG TA-3'
		5'-AGC GTG GAC AGC TTC TCA AT-3'
β-actin	757	5'-TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3'
		5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3'

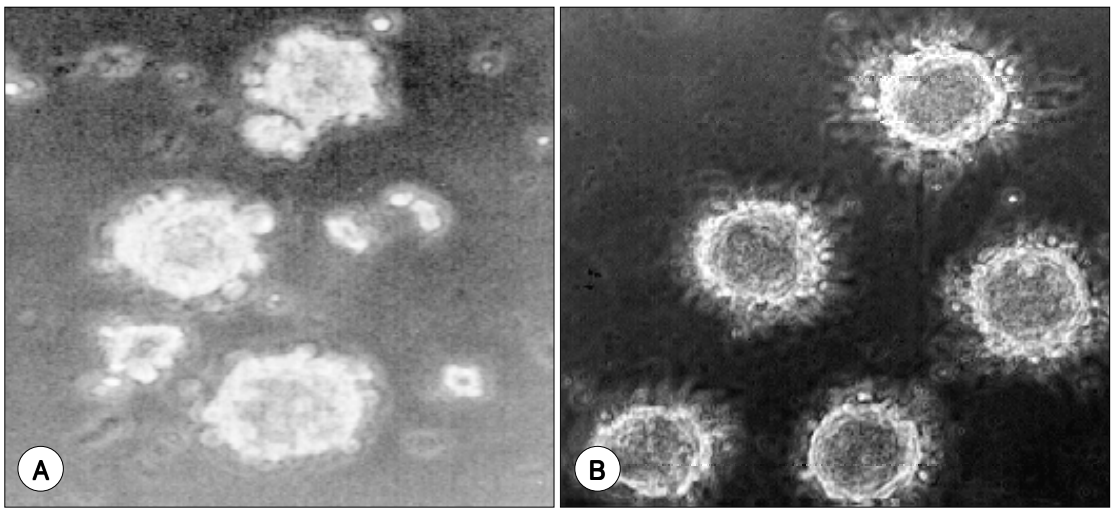

Fig. 1. Photographs of neurospheres which were formed from neural stem cells isolated from the subventricular zone (A) and the olfactory bulb (B) of neonatal mice. Cells isolated from the subventricular zone (A) and the olfactory bulb (B) of neonatal mice were grown as neurospheres in neurobasal medium that leukemia inhibitory factor and fibroblast growth factor were supplemented.

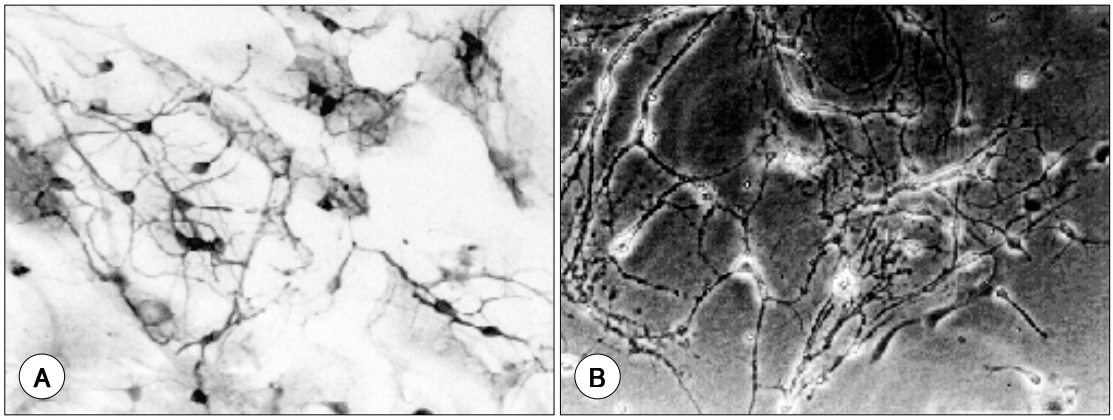

Fig. 2. Photographs of neural cells derived by differentiation of neurospheres isolated from subventricular zone (A) and olfactory bulb (B). Neural differentiation was induced by plating neurospheres on PDL-coated culture dishes in neurobasal medium.

dium orthovanadate를 함유한 용해 완충액을 처리하여 단백질시료를 추출하였다. 추출한 protein(80~100 g/well)을 12.5% acrylamide gel에 전기영동 후 hybond ECL nitrocellulose 막(Amersharm Pharmacia Biotech)에 전기적인 전사를 시킨다. 그 nitrocellulose 막을 rabbit polyclonal glial fibrillar acidic protein(GFAP)와 monoclonal synaptophysin항체에 반응시킨 후 horsedish peroxidase가 결합된 antirabbit antimouse IgG 항체(Amersham Pharmacia Biotech)에 반응시켜 enhanced chemiluminescence(Amersham Pharmacia Biotech)로 면역를 확인하였다.

실험결과

생쥐의 subventricular zone과 olfactory bulb에서 신경줄기세포의 분리 및 배양

생후 2~3일된 신생생쥐의 뇌에서 세포를 분리하여 10 ng/ml의 fibroblast growth factor 및 LIF가 존재하는 용액에서 배양한 결과 neurosphere가 형성됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

본 실험에서 분리한 배양한 세포가 신경세포로 분화될 수 있는 지를 확인하기 위하여 neurosphere를 PDL로 coating한 배양용기에 neurobasal medium을 첨가하여 분화를 유도하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 배양 2주 후 SVZ 및 olfactory bulb에서 분리한 neurosphere가

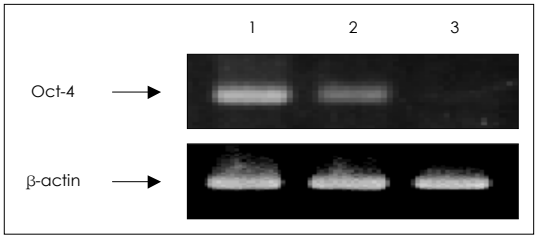

Fig. 3. RT-PCR analysis of Oct-4 expression in neuronal stem cells. Neural stem cells were differentiated to neural cells for 15 days and total RNAs were isolated. Oct-4 and β-actin primers were used for RT-PCR. Lane 1 ; undifferentiated cells, Lane 2 ; cells differentiated for 5 days, Lane 3 ; cells differentiated for 15 days.

신경세포의 형태를 가지고 분화되었다. Neurosphere형태로 유지된 신경줄기세포는 5회이상 계대배양후도 분화능을 유지하였으며 냉동보관 후도 분화능의 유의한 변화는 나타나지 않았다.

신경줄기세포분화유도에 의한 분화신경 marker들의 발현변화

신경세포로의 분화를 유도한 줄기세포에서 분화 marker들의 발현변화를 분자생물학적 및 면역화학검사에 의하여 조사하였다. POU transcription factor인 Oct-4는 포유동물의 배아세포에서 pluripotent cell의 초기형성과 유지에 필수적인 것으로 보고되었다.[15] 신경줄기세포에도 이 단백질이 발현되는지 이의 발현이 분화유도에 의하여 변화하는지를 역전사중합반응에 의하여 확인하였

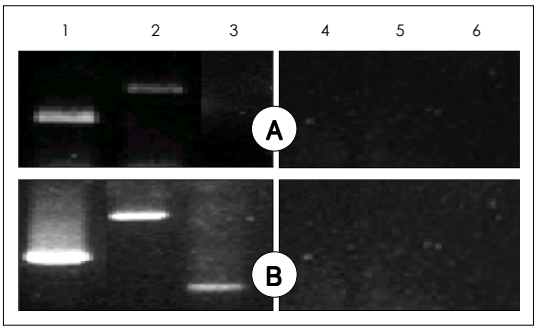

Fig. 4. Expression of neural markers induced by differentiation of neurospheres. Neurospheres derived from SVA (A) and olfactory bulb (B) were differentiated for 15 days, and total RNAs were isolated from control (lane 4, 5, 6) or differentiated cells (lane 1, 2, 3). Expression of neural markers was analyzed by RT-PCR. Lane 1 and 4 ; GFAP, lane 2 and 5 ; Glutaminase, lane 3 and 6 ; Tyroxine hydroxylase.

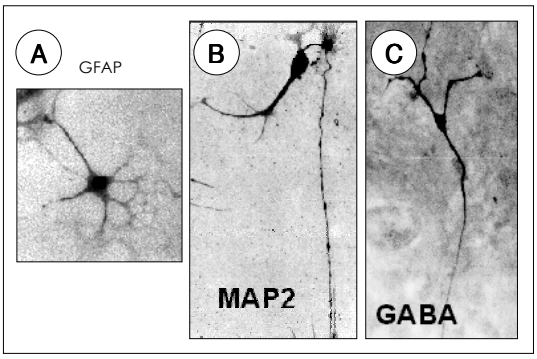

Fig. 5. Immunohistochemistry of neural cells derived from the induction of differentiation of neurospheres. A : A cell immunoreactive to GFAP. B : A cell immunoreactive to MAP-2. C : A cell immunoreactive to GABA.

다. SVZ에서 분리한 미분화상태의 신경줄기세포에서 Oct-4의 발현이 관찰되었고 이의 발현이 분화유도에 시간에 따라 현저히 감소함이 확인되었다(Fig. 3).

SVZ와 olfactory bulb에서 분리한 신경줄기세포의 분화유도에 의한 분화된 신경 marker들의 발현변화를 역전사 중합반응으로 검사하였다. 미분화세포에서 이들 marker들의 발현은 확인되지 않았으며 신경세포의 marker인 glutaminase과 glial marker인 GFAP의 발현이 현저히 증가하였고 olfactory bulb에서 분리한 신경줄기세포는 분화유도시 SVZ에서 분리한 신경줄기세포와 달리 tyroxine hydroxylase의 발현이 확인되었다(Fig. 4).

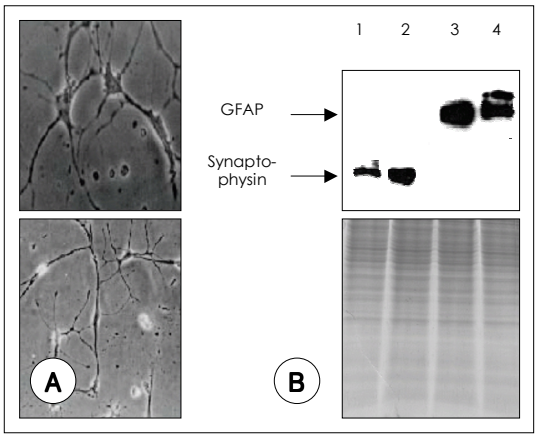

Fig. 6. Effect of BDNF on morphology (A) and expression of synaptophysin and GFAP (B) in neural stem cells. Neural differentiation were induced in the presence or absence of BDNF. A : Morphology of cells was examined by phase contrast microscopy. Upper panel represents cells differentiated in the absence of BDNF. Lower panel represents cells differentiated in the presence of BDNF. B : Expression of GFAP and synaptophysin were examined by Western blot analysis. Lower panel represents a protein gel stained with comassie brilliant blue-G250. Lane 1,3 ; neural cells differentiated in the absence of BDNF, Lane 2,4 ; neural cells differentiated in the presence of BDNF.

분화유도된 신경줄기세포에서 분화신경 marker들의 발현을 면역조직검사에 의해 조사하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 교세포의 marker인 GFAP에 양성반응을 나타내는 세포, 신경세포의 marker인 MAP2에 양성반응을 나타내는 세포 및 GABA에 양성반응을 나타내는 세포가 관찰되었다.

BDNF의 신경분화에 대한 효과

분리배양한 신경줄기세포의 분화에 대한 BDNF의 효과를 조사하기 위하여 분리한 neurosphere로 부터 신경분화를 유도할 때 10 ng/ml BDNF를 첨가하여 배양하였다. BDNF의 첨가시 세포증식능에는 변화없이 신경줄기세포로부터 분화된 신경의 neurite outgrowth가 현저히 증가함이 관찰되었다(Fig. 6A). BDNF가 신경줄기세포의 신경 및 교세포로의 분화에 어떤 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 glial marker인 GFAP와 neuronal marker인 synaptophysin의 발현에 대한 BDNF의 효과를 Western blot으로 확인하였다. BDNF의 존재하에 분화를 유도하였을 때 GFAP의 발현은 감소하고 synap-

tophysin의 발현은 현저히 증가함이 관찰되었다(Fig. 6B).

고 찰

현재 Parkinson씨 병, 알츠하이머병, Huntington씨 병 등의 신경변성질환의 치료에는 약물이나 신경외과적 치료법이 이용되고 있으나 이 방법들은 신경변성의 진행을 방지하거나 손상된 신경을 복원하는데는 효과적이지 못하다. 최근 세포이식이라는 새로운 치료방법이 제안되고 있다. 이 방법은 적절한 세포를 이식하여 이식된 세포로부터 조직재생과 신경기능회복 및 증상완화를 시도하는 방법이다.[16] 파킨슨씨병에서 줄기세포를 이용한 이식치료의 효과가 실험동물에서도 증명된바가 있다.[17]

본 연구에서 신생생쥐의 subventricular zone뿐만 아니라 olfactory bulb에서도 신경세포 및 교세포로 분화가 가능한 신경줄기세포분리배양과 증식이 가능함을 증명하였다. Olfactory bulb로 부터 신경줄기세포의 분리는 신경재생치료에서 여러 가지 의미를 가진다. 중추신경계의 이 부분은 높은 재생능을 가지고 있으므로 신경변성질환의 세포치료를 위한 자가세포 제공원으로 이용될 수 있다. 이 부분으로부터 세포의 획득은 부분적인 후두구 절제술로부터 채취한 조직에서 가능하며 세포를 시험관외에서 분리 증식시켜 신경세포로 분화되는 지를 확인한 후 다양한 신경변성질환의 자가이식치료에 이용될 수 있다. 특히 이들 세포에서 SVZ에서 분리한 줄기세포와 달리 분화유도시 tyroxine hyroxylase의 발현되었다. 줄기세포의 분화에 주위환경의 역할은 잘 알려져 있으며 신경줄기세포의 경우에도 이식부위에 따라 세포의 분화가 다르게 일어날 수 있음이 알려지고 있고 인체의 후두구에 thyroxine hydroxylase - positive cell이 존재함이 보고되어 있어[18] olfactory bulb에 존재하는 신경줄기세포에 dopaminergic neuron의 전구세포가 존재할 가능성이 있다. 따라서, olfactory bulb에서 분리한 신경줄기세포가 파킨슨씨 병의 자가이식치료에 이용될 가능성을 시사한다. 나아가 무취증 환자에서 신경줄기 세포를 이식하면 후각세포로도 분화할 수 있는 가능성을 시사한다.

BDNF는 중추신경계에서 신경세포의 생존을 향상시키며[14] 신경돌기의 성장, 축색돌기 및 수상돌기의 분화, 시냅스의 가소성 등을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[13] 본 연구에서 BDNF는 SVZ 및 olfactory bulb에서 분리한 신경줄기세포의 신경세포로의 분화를 촉진할 뿐만아니라 교세포로의 분화를 억제하였다. BDNF의 이러한 효과는 망막의 Muller cell에서도 보고된 바있다.[19] 이러한 결과는 중추신경손상시 truncated form의 TrkB의 발현이 증가하고 이들이 BDNF나 NT - 4/5같은 TrkB ligand의 작용을 감소시킴으로서 reactive gliosis를 증가시키는 것으로 보고된 결과와도 일치한다.[20] 본 연구에서 교세포의 전구세포가 BDNF수용체를 발현하는지는 조사하지 않았지만 최근의 연구결과는 astrocyte가 TrkB를 발현하고 BDNF에 대해 반응하는 것으로 보고되었다.[21]

본 연구의 결과 신경줄기세포에 Oct - 4가 발현됨이 관찰되었고 이 발현이 분화유도에 의해 억제됨이 확인되었다. 일반적으로 Oct - 4는 생식선과 배아줄기세포에 국한되어 발현되며 배아줄기세포의 pluripotency를 결정하는데 중요한 역할을 하는 곳으로 알려져 있다.[15] 최근 신경줄기세포가 혈액세포나 골격근세포로도 분화하는 pluripotency를 가짐이 보고되었다.[22] 따라서, 신경줄기세포 중 일부가 다른세포로도 분화할 수 있는 pluripotency를 가진 것으로 판단되며 이는 Oct - 4의 발현과 무관하지 않은 것으로 생각된다.

중심 단어 : 줄기 세포 · 후구 · 배양.

이 논문은 2004년도 부산대학교병원 의학연구소 연구비(2004 - 15)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

1) McKay RDG. *Stem-like cells in the central nervous system. Cell 1997;58:815-21.*
2) Zigova T, Betarbet R, Soteres BJ, Brock S, Bakay RA, Luskin MB. *A comparison of the patterns of migration and the distribu-tion of homotopically transplanted neonatal subventricular zone cells and heterotopically transplanted ventricular zone cells. Dev Biol 1996;173:459-74.*
3) Vicario-Abejon C, Cunningham MG, McKay RD. *Cerebellar pre-cursors transplanted to the neonatal dentate gyrus express features characteristic of hippocampal neurons. Neuron 1995;15:105-14.*
4) Shihabuddin LS, Palmer TD, Gage FH. *The search for neural progenitor cells: Prospects for the therapy of neurodegenerative disease. Mol Med Today 1999;5:474-80.*
5) Fishell G. *Striatal precursors adopt cortical identities in response to local cues. Development 1995;121:803-12.*
6) Murray M, Fischer I. *Transplantation and gene therapy:*

combined approaches for repair of spinal cord injury. Neuroscientist 2001;7:28-41.

7) Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, *et al. Generalized potential of adult neural stem cells. Science 2000;288:1660-3.*

8) Bramerson A, Johansson L, Ek L, Nordin S, Bende M. *Prevalence of olfactory dysfunction: the skovde population-based study. Laryngoscope 2004;114:733-7.*

9) Kaplan MS. *Neurogenesis in 3 month-old rat visual cortex. J Comp Neurol 1981;239:117-25.*

10) Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. *Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. Neurosci Lett 2000; 291:17-20.*

11) Bonfanti L, Theodosis D. *Expression of polysialylated neural cell adesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat rostral extension and in the olfactory bulb. J Neurosci 1994;62:291-305.*

12) Friedman WJ, Greene LA. *Neurotrophin signaling via Trks and p75. Exp Cell Res 1996;253:131-42.*

13) Tucker KL, Meyer M, Barde YA. *Neurotrophins are required for nerve growth during development. Nat Neurosci 2001; 4:29-37.*

14) Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P. *BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. Nature 2001;411:86-9.*

15) Pesce M, Scholer HR. *Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. Stem Cells 2001;19:271-8.*

16) Gage FH. *Cell therapy. Nature 1998;392:18-24.*

17) Akerud P, Canals JM, Snyder EY, Arenas E. *Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. J Neurosci 2001;21:8108-18.*

18) Hoogland PV, Huisman E. *Tyrosine hydroxylase immunoreactive structures in the aged human olfactory bulb and olfactory peduncle. J Chem Neuroanat 1999;17:153-6.*

19) Lewis GP, Linberg KA, Geller SF, Guerin CJ, Fisher SK. *Effects of the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor in an experimental model of retinal detachment. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:1530-44.*

20) Liebl DJ, Huang W, Young W, Parada LF. *Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord. Exp Neurol 2001;167:15-26.*

21) Climent E, Sancho-Tello M, Minana R, Barettino D, Guerri C. *Astrocytes in culture express the full-length Trk-B receptor and respond to brain derived neurotrophic factor by changing intracellular calcium levels: effect of ethanol exposure in rats. Neurosci Lett 2000;288:53-6.*

22) Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, *et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. Nat Neurosci 2000;3:986-91.*