

小鼠胚胎干细胞建系技术研究进展

余树民^{①②} 徐小明^① 华进联^① 窦忠英^{①*}

(① 西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心 陕西 杨凌 712100 ;

② 四川农业大学动物科技学院 四川 雅安 625000)

摘要 :目前,对小鼠胚胎干细胞的研究较为深入,并已成为研究细胞分化及信号转导、新基因发现及功能鉴定、器官发生、人类疾病和药物开发等的有效手段。胚胎干细胞建系是一项基础性工作。虽然技术日趋成熟,有些品系小鼠的胚胎干细胞建系已是常规技术,但不同品系小鼠胚胎干细胞的建系效率仍有很大差异,建系途径和方法各有特点,一个品系胚胎干细胞的建系方法不一定都适用于其他品系。本文从小鼠胚胎干细胞建系的途径、分离操作技术、培养体系等方面进行综述,并就与之相关的有些问题提出思考和对策。

关键词 :小鼠胚胎干细胞系;胚胎干细胞;内细胞团;多分化潜能

中图分类号:文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)01-128-06

Mouse Embryonic Stem Cells : Advances in Technology

YU Shu-Min^{①②} XU Xiao-Ming^① HUA Jin-Lian^① DOU Zhong-Ying^①

(① *The Research Centre of Stem Cell Engineering and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100 ;*

② *Animal Sci-Tech College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625000, China*)

Abstract :Mouse embryonic stem cells, which are most intensively studied among all kinds of animal embryonic stem cells, have been widely used in studies of differentiation and signal transduction of cells, identification and function of new genes, organogenesis, pathogenesis of human diseases, pharmaceutical development. Establishment of embryonic stem cell lines is a kind of basic work, and its related technologies have been increasingly improved and have become the routine technologies in some strains. However, there exist significant differences in methods, schemes and efficiencies when different strains are used for developing embryonic stem cell lines. The methods for establishing embryonic stem cell lines of one strain of mice do not always work when other strains are used to establish embryonic stem cell lines, especially when used in different laboratories. This paper focuses on addressing technological advances in embryonic stem cell establishment, including methods, isolation procedures, culture systems, and pluripotency maintenance.

Key words :Mouse embryonic stem cell lines; Embryonic stem cells; Inner cell mass; Pluripotency

近 20 多年来,胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)一直是生命科学领域的研究热点。尤其是 1998 年建立了人类 ES 细胞系^[1,2]后,更是掀起了研究 ES 细胞的热潮。ES 细胞可在体外无限增殖和保持未分化状态,具有分化为体内各种细胞的潜能,同时便于遗传操作。小鼠作为模型动物,在医学、农业、生物工程等领域被

广泛使用,小鼠 ES 细胞已成为研究细胞分化、

基金项目 国家“863”资助项目(No. 2002AA216161),教育部重大科技专项(No. 03160)陕西省重点攻关项目;

* 通讯作者, E-mail: douzhongying@china.com;

第一作者介绍 余树民,男,讲师,研究方向:胚胎干细胞建系和分子生物学研究, E-mail: yushumin0826@126.com。

收稿日期 2005-06-20, 修回日期 2005-11-18

器官发生、新基因发现和功能研究、人类疾病和药物开发等的有效手段^[3]。建立不同品系小鼠 ES 细胞系是一项基础工作,不仅是各项研究的基础材料,而且为相关研究提供技术平台。有关小鼠 ES 细胞建系的研究文献已不计其数,国外出版过许多小鼠 ES 细胞建系的技术指南,但可供公共使用的小鼠 ES 细胞系仍较少,而国外的建系方法也不完全适用于国内的情况。本文拟从小鼠 ES 细胞建系的途径、分离操作技术、培养体系方面作一综述。

1 小鼠胚胎干细胞的建系途径

1.1 利用体内发育的早期胚胎建立小鼠 ES 细胞系 以体内发育 3.5~4.0 日龄囊胚的内细胞团(inner cell mass, ICM)作为分离小鼠 ES 细胞的起始材料,一直是建立小鼠 ES 细胞系的主要途径。但也有利用 8-细胞胚胎、桑椹胚、延迟着床囊胚及上胚层细胞为材料成功建立小鼠 ES 细胞系的报道^[4-8]。最近,Paul J. Tesar (2005)报道用小鼠 4-细胞、8-细胞和桑椹胚阶段的胚胎建立了 ES 细胞系,并且显示桑椹胚源 ES 细胞有高的种系嵌合能力,能分化为胚外外胚层细胞,这是从内细胞团和上胚层细胞分离的 ES 细胞所不具备的,提示从不同发育阶段胚胎分离的 ES 细胞可能具有不同的分化潜力^[9]。

1.2 通过体细胞核移植建立小鼠 ES 细胞系 克隆羊“多利”的诞生,证明终末分化细胞核具有发育全能性,通过核移植建立 ES 细胞系是一条现实可行的途径。目前有报道以胎儿神经细胞、小鼠颗粒细胞、淋巴细胞、尾尖皮肤细胞为供核细胞,建立了核移植小鼠 ES 细胞系^[10-13],核移植小鼠 ES 细胞具有与常规 ES 细胞相同的特性。但目前建系成功率低,一般不超过 5%^[13,14]。核移植小鼠 ES 细胞的成功建系拓宽了 ES 细胞的来源,陈莹等、Woo Suk Hwang 等分别建立了人的核移植 ES 细胞系^[15-17]。利用核移植自体 ES 细胞的分化物进行移植,可避免排斥反应的发生,从而诞生了“治疗性克隆”的概念。

1.3 利用孤雌胚胎建立小鼠 ES 细胞系 哺乳

动物卵母细胞在一定条件下能自行发育到囊胚,所以分离孤雌囊胚 ICM 可建立 ES 细胞系。Lin 等报道利用未受精 M II 期卵母细胞建立了孤雌胚源的同型纯合小鼠 ES 细胞系,结果显示孤雌胚源小鼠 ES 细胞具有常规小鼠 ES 细胞的特性^[18]。但有人提出孤雌胚源的小鼠 ES 细胞存在基因失调,如胰岛素样生长因子-1 受体基因和胰岛素样生长因子-2 基因在孤雌囊胚不表达^[19]。所以,该种 ES 细胞及其分化细胞移植体内后与常规 ES 细胞有何差异,仍需要深入研究。

1.4 自原始生殖细胞克隆转化而来的胚胎干细胞 从受精后 8.5~12.5 日龄小鼠胚胎背肠系膜和/或生殖嵴分离原始生殖细胞(promordial germ cells, PGCs),Matsui 等首先报道建立了小鼠多潜能干细胞系,结果显示 PGCs 在集落形态、生长特性、细胞表面标志、分化潜能与 ES 细胞类似,并具有种系嵌合的能力^[20]。为与附植前胚胎来源的 ES 细胞相区别,现称其为胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EGCs)。

2 ES 细胞的分离操作技术

2.1 ICM 的分离方法 分离 ICM 的方法有全胚培养法、免疫外科法和显微外科法。全胚培养法是模拟胚胎体内附植的过程,使胚胎贴附到基质或饲养层上并脱去透明带,ICM 细胞生长形成未分化的细胞集落,最后用酶消化和/或机械剥离获得 ICM 细胞。免疫外科法是用酸或链蛋白酶去透明带之后,使裸胚与兔抗鼠脾淋巴细胞抗体、补体分别作用一段时间,滋养层细胞破裂崩解,再机械分离 ICM 细胞。显微外科法则是在去透明带之后,直接剥离滋养层细胞而获得 ICM 细胞,Brook 等通过该方法分离着床期和延迟着床胚胎的上胚层细胞建立了小鼠 ES 细胞系^[8]。全胚培养和免疫外科经常用于分离 ICM 细胞,二者操作简便容易掌握,显微外科法则难于掌握。

2.2 ICM 离散时机的选择 在适宜时机离散 ICM 细胞,有助于重新接种后形成 ES 细胞集落。孟国良等报道在培养 4 d 离散 BALB/C 小

鼠 ICM 集落比在培养 6 d 离散容易形成 ES 细胞集落^[21]。童英等报道离散培养 3 d 的 C57BL/6J 小鼠 ICM 集落建立的小鼠 ES 细胞系具有较高的嵌合能力,而离散 4 d 的 C57BL/6J 小鼠 ICM 集落建立的小鼠 ES 细胞系其嵌合率却只有 4.8%^[22]。孟国良等报道胚胎培养后 4~6 d、3~3.5 d、4 d、4~5 d、4~5 d,分别是 129/ter、C57BL/6J、BALB/C、KM、ICR 品系小鼠 ICM 集落适宜的离散时间^[23]。因此,选择 ICM 离散时机需综合考虑品系来源、培养条件、胚胎贴壁时间、ICM 集落形态、细胞分化速度等因素,经验的积累有助于正确选择 ICM 集落的离散时机。

2.3 ICM 集落及 ES 细胞的消化条件 通常用胰酶-EDTA 消化液离散消化 ICM 和 ES 细胞,但 Brook 等、Tesar 报道用链蛋白酶和含 EGTA 的 OC 营养液分别处理上胚层组织及不同发育阶段胚胎贴壁形成的未分化细胞集落,二者都建立了小鼠 ES 细胞系^[8,9]。对于胰酶-EDTA 消化液,不同文献报道所使用的浓度各不相同,但都在 0.05%~0.25% 的范围内变动。研究显示不同品系小鼠 ES 细胞对胰酶的敏感度存在很大差异,如 BALB/C 小鼠 ES 细胞对胰酶就较敏感^[21]。使用低浓度消化液,在消化过程中反复吹打、连续消化等便于细胞与消化液均匀作用,有利于重新接种后 ES 细胞集落形成和核型完整维持^[21,24]。为降低消化液对细胞的损伤,可按 1% 的比例添加鸡血清^[24]。建系小鼠 ES 细胞传代需要稳定的消化操作条件,因此应针对特定细胞系建立适宜的消化操作条件。

3 小鼠胚胎干细胞体外培养技术及其多分化潜能的维持

小鼠 ES 细胞的建系过程是 ES 细胞与体外环境相互选择和适应的过程,适宜的培养体系有利于维持小鼠 ES 细胞核型完整和多分化潜能。

3.1 饲养层为基础的培养体系 饲养层细胞通过合成分化抑制因子(differentiation inhibitory activities, DIA)和作为胚胎、ES 细胞贴附的基质,促进 ES 细胞增殖并抑制分化,为 ES 细胞提

供生长环境和信号。目前使用最普遍的饲养层细胞是鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)及其无限系 STO 细胞。通常以 12.5~16.5 日龄的小鼠胚胎为材料分离 MEF,以 3~5 代的 MEF 作为饲养层,许多 MEF 在 6 代以后因活力退化不适宜用作饲养层。MEF 和 STO 细胞作为饲养层,均可维持小鼠 ES 细胞的未分化状态和多分化潜能,在一定代次内保持细胞核型完整。二者相比,STO 细胞不容易维持 ES 细胞的核型完整,尤其是高代次的 STO 细胞^[25,26]。另外,还可用卵巢、输卵管、子宫内膜细胞、鸡胎肝成纤维细胞、膀胱癌细胞、子宫颈癌鳞状上皮细胞等作为饲养层培养小鼠 ES 细胞。用饲养层分离培养 ES 细胞具有很多缺点,如增加了许多操作环节,不容易控制实验条件,当对 ES 细胞进行遗传操作时不利于细胞筛选,不利于对 ES 细胞进行准确的生化分析,不利于人 ES 细胞及其分化细胞用于临床。

3.2 无饲养层为基础的培养体系 无饲养层培养小鼠 ES 细胞可方便地对 ES 细胞进行遗传操作,所以建立无饲养层培养体系是一种发展趋势。目前主要通过三个途径实现小鼠 ES 细胞的无饲养层培养:①在 ES 细胞培养基中添加白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF),添加 LIF 可使小鼠 ES 细胞在无饲养层条件下保持未分化状态^[27],但是离开了血清或饲养层, LIF 并不能有效地促使小鼠 ES 细胞增殖和抑制分化^[28];②利用条件培养液培养 ES 细胞,童英等报道利用大鼠心肌细胞条件培养液在无饲养层条件下成功建立了 C57BL/6J 的 mES 细胞系^[29],孟国良等报道大鼠心肌细胞条件培养液在无饲养层时可使小鼠 ES 细胞连续传 20 代,保持核型完整和未分化状态,并且促进小鼠 ES 细胞贴壁,提高 ES 细胞的增殖速度^[30];③利用转基因技术构建转基因的小鼠 ES 细胞系。Yamane 等报道表达抗凋亡蛋白 Bcl-2 的转基因小鼠 ES 细胞,在 LIF 存在的情况下不需要血清和饲养层也能增殖并保持其固有特性^[28]。为促进 ES 细胞贴壁,常用 0.1% 明胶或 IV 胶原包被培养皿,有人也用多聚氨酸、纤连蛋白^[31]。

3.3 胚胎干细胞的培养基组成与类型

3.3.1 ES 细胞常规培养基组成 ES 细胞培养基通常在高糖 DMEM 的基础上添加血清、 β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、LIF 等配制而成。尚克刚等报道高糖培养基有助于胚胎贴壁、ICM 集落形成和 ES 细胞增殖、丙酮酸钠不利于囊胚贴壁、ICM 集落形成和 ES 细胞增殖^[32]。常规的 ES 细胞培养基都要添加胎牛血清,添加浓度通常为 15% ~ 20%,添加血清可促进胚胎贴壁、ICM 集落形成和 ES 细胞增殖。但血清中常含有一些无法确定的细胞因子诱导 ES 细胞分化,而且不同种类批次的血清成分可能存在很大差异,所以在 ES 细胞建系过程中应对血清的种类、来源、批次进行筛选,尽量使用同批次血清^[25]。目前已有血清替代物出售,Horii 等利用无血清培养基分离建立了小鼠 EG 细胞系^[33],Cheng 等利用无血清培养基建立了小鼠 ES 细胞系,结果显示无血清培养基在 EG、ES 细胞的建系效率及核型维持、种系嵌合能力方面优于常规培养基^[34]。但使用血清替代物培养,需要高密度接种细胞才能促使 ES 细胞增殖和克隆形成,因而不利于 ES 细胞的单细胞克隆^[35]。

LIF 是各种小鼠 ES 细胞培养基使用最多的细胞因子,LIF 的作用是抑制 ICM 和 ES 细胞分化,Furue 等报道无饲养层时,在无血清培养基中 LIF 还具有抗凋亡的作用^[36]。LIF 在培养基中的添加浓度,不同的文献各有不同,成系的小鼠 ES 细胞一般添加 500 ~ 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。不同品系小鼠 ES 细胞分离培养所需 LIF 的浓度存在差异,Baharvand 等报道分离 C57BL/6 和 BALB/C 的小鼠 ES 细胞所需 LIF 的浓度就存在较大差异^[37],Nagafuchi 等从非肥胖型糖尿病小鼠分离 ES 细胞时 LIF 的添加量达到 10 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[38]。所以,应根据 ES 细胞的品系来源、培养体系通过实验来确定培养基中 LIF 的最佳浓度。

3.3.2 ES 细胞条件培养液 即是将特定细胞培养一段时间后,回收其培养液,经过离心、透析、过滤,使用时以一定比例与基础营养液、血清等配制而成。条件培养液在有饲养层或无饲

养层的条件下可支持 ICM、ES 细胞增殖并可抑制细胞分化。韩嵘等利用大鼠心肌细胞条件培养液在无饲养层的情况下培养 C57BL/6J 小鼠胚胎,显示胚胎贴壁率、ICM 增殖率和 ES 细胞集落形成率与以 MEF 为饲养层的培养结果没有差异^[39]。目前国内应用大鼠心肌条件培养液已建立了 129、C57BL/6J、BALB/C 等品系的小鼠 ES 细胞系^[21, 24, 29]。用于制备条件培养液的细胞还有 BRL、HBL-B63、PC10-6R(转染 LIF 基因的 COS 细胞亚系)、PSA-1、T3、鸡胚肝细胞、人膀胱癌细胞系 5637 等。使用条件培养基分离培养 ES 细胞可节约费用,但条件培养基含有多种不确定因子,所以也不利于对 ES 细胞进行准确的生化分析。

4 小鼠胚胎干细胞建系存在的问题与对策

小鼠 ES 细胞建系技术日趋成熟,并已成功应用于以小鼠 ES 细胞为材料的各类研究。综合上述小鼠 ES 细胞建系技术的各个方面,笔者认为下面问题还需深入研究。

有些品系小鼠 ES 细胞的建系效率仍需进一步提高。目前,除 129 品系小鼠 ES 细胞建系比较容易外,其他品系小鼠 ES 细胞的建系效率仍不高,国内 BALB/C 小鼠的建系成功率还不到 15%^[21]。开发新型条件培养基并优化其制备技术,是一条提高小鼠 ES 细胞建系效率切实可行的途径。Schoonjans 等利用转染兔源 LIF 基因的兔成纤维细胞系制备条件培养基,成功地使 BALB/C 小鼠的 ES 细胞建系率达到 41%,C57BL/6N 小鼠的建系率达到 58%^[40],国内大鼠心肌细胞条件培养基的成功应用也使小鼠 ES 细胞的建系效率得到提高^[21, 23, 24, 29]。

目前各种培养体系均能维持 ES 细胞的未分化状态,但存在不能长期维持 ES 细胞核型完整的问题。随着传代次数增加,核型完整的 ES 细胞总是不同程度地减少。首先是稳定 ES 细胞的培养体系和操作条件,如果不得已改变培养体系和操作条件,应通过实验进行调整;另外,在传代培养中跟踪检测 ES 细胞的核型变化。

用于小鼠 ES 细胞分离培养的饲养层细胞需要进一步筛选优化。饲养层在小鼠 ES 细胞建系过程中被广泛采用,前已述及 MEF 和 STO 的不足。筛选能稳定传代和高活力的细胞用作饲养层,有助于稳定 ES 细胞的培养条件;构建稳定表达抗性因子的转基因品系小鼠,从转基因小鼠分离 MEF 是解决目前 MEF 缺乏抗性因子的一条途径。

建立无血清、无饲养层 ES 细胞分离培养体系,该体系可准确研究 ES 细胞对环境变化的反应,为人类 ES 细胞应用于临床奠定基础。最近, Klimanskaya 等报道在无血清和无饲养层条件下建立了人类 ES 细胞系^[41]。

参 考 文 献

- [1] Thomson J A , Itskovitz E J , Shapiro S S , *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* ,1998 , **282** :1 145 ~ 1 147.
- [2] Shambhott M J , Axelman J , Wang S , *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from culture human primordial germ cell. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1998 , **95** :13 726 ~ 13 731.
- [3] Christopher P Austin , James F Battey , Allan Bradley , *et al.* The knockout mouse project. *Nature Genetics* ,2004 , **36** :921 ~ 924.
- [4] Evans M J , Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* ,1981 , **292** :154 ~ 156.
- [5] Ledermann B , Burki K. Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. *Exp Cell Res* ,1991 , **197** (2) 254 ~ 258.
- [6] Suko Y A , Votolin S Y , Alevtina N , *et al.* Embryonic stem cell derived from morulae inner cell mass and blastocysts of mink : comparisons of their pluripotencies. *Molecular Reproduction and Development* ,1993 , **36** :148 ~ 158.
- [7] Delhaise F , Bralton V , Schuurbiens N , *et al.* Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. *Eur J Morphol* ,1996 , **34** (4) 237 ~ 243.
- [8] Brook F A , Gardner R L . The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1997 , **94** :5 700 ~ 5 712.
- [9] Paul J Tesar. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 , **102** :8 239 ~ 8 344.
- [10] Kawase E , Yamazaki Y , Yagi T , *et al.* Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis* ,2000 , **28** :156 ~ 163.
- [11] Munsie M J , Michalska A E , O'Brien C M , *et al.* Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Current Biology* ,2000 , **10** :989 ~ 992.
- [12] Wakayama T , Tabar V , Rodriguez I , *et al.* Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 2000 , **292** :740 ~ 743.
- [13] Hochedlinger K , Rudolf J. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* , 2002 , **415** :1 035 ~ 1 038.
- [14] Hochedlinger K , Rudolf J. Nuclear transplantation , embryonic stem cells , and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* , 2003 , **349** :275 ~ 286.
- [15] Ying Chen , Zhi Xu He , Ailian Liu , *et al.* Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Research* ,2003 , **13** (4) 251 ~ 263.
- [16] Woo Suk Hwang , Young June Ryu , Jong Hyuk Park , *et al.* Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* ,2004 , **303** :1 669 ~ 1 674.
- [17] Woo Suk Hwang , Sung Il Roh , Byeong Chun Lee , *et al.* Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* ,2005 , **308** :1 777 ~ 1 783.
- [18] Lin H , Lei J , Wininger D , *et al.* Multilineage potential of homozygous stem cells derived from Metaphase II oocytes. *Stem Cells* 2003 , **21** :152 ~ 161.
- [19] Erin D , Newman-Smith , Zena Werb. Stem cell defects in parthenogenetic preimplantation embryos. *Development* ,1995 , **121** :2 069 ~ 2 077.
- [20] Matsui Y , Zsebo K , Hogan B L M , *et al.* Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* ,1992 , **70** :841 ~ 847.
- [21] 孟国良 ,滕路 ,薛友纺等. BALB/C 小鼠胚胎干细胞系建立的方法学探讨. *遗传学报* ,2002 , **29** (7) :581 ~ 588.
- [22] 童英 ,韩嵘 ,郑玉兰等. 具有高效种系嵌合能力的 C57BL/6J 小鼠 ES 细胞系的建立. *遗传学报* ,1999 , **26** (5) :468 ~ 473.
- [23] Meng Guo-Liang , Tang Fu-Chou , Shang Ke-Gang , *et al.* Comparison of the method establishing embryonic stem cell lines from five different mouse strain. *Genetica Sinica* 2003 , **30** (10) 933 ~ 942.
- [24] 孟国良 ,汤富酬 ,尚克刚等. 高效建立 129/ter, C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞系的方法学探讨. *生物工程学报* ,2002 , **18** (6) :740 ~ 743.
- [25] 孟国良 ,汤富酬 ,滕路等. 小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)建系和维持过程中的问题和对策. *遗传* ,2001 , **23** (3) :292

- ~ 294.
- [26] 尚克刚, 胡新立, 李子玉等. 饲养层对新建 ES 细胞系的影响. 北京大学学报(自然科学版), 1994, **30**(4): 500 ~ 506.
- [27] Williams R L, Hilton D J, Pease S, *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 1988, **336**: 684 ~ 687.
- [28] Toshiyuki Yamane, Scott J Dylla, Manja Muijtjens, *et al.* Enforced Bcl-2 expression overrides serum and feeder cell requirements for mouse embryonic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 312 ~ 317.
- [29] 董英, 邹翼中, 尚克刚. 用大鼠心肌条件培养基建立来源于 C57BL/6J 小鼠的 ES 细胞系. 北京大学学报(自然科学版), 2000, **36**(4): 472 ~ 476.
- [30] 孟国良, 滕路, 邹翼中等. 大鼠心脏细胞条件培养基对小鼠 ES 细胞特性的维持. 遗传学报, 2001, **28**(10): 911 ~ 920.
- [31] 黄冰, 黄文革, 钟女奇等. 小鼠胚胎干细胞在六种培养体系的培养观察. 中国实验动物学报, 2000, **8**(1): 1 ~ 6.
- [32] 尚克刚, 李子玉, 吴鹤龄. 建立小鼠胚胎多能干细胞系(ES 细胞系)的几个主要影响因素. 遗传学报, 1992, **19**(6): 491 ~ 496.
- [33] Takuro Horii, Yasumitsu Nagao, Tomoyuki Tokunaga, *et al.* Serum-free culture of murine primordial germ cells and embryonic germ cells. *Therigenology*, 2003, **59**: 1257 ~ 1264.
- [34] Jun Cheng, Amalia Dutra, Aya Takesono, *et al.* Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media. *Genesis*, 2004, **39**: 100 ~ 104.
- [35] Kazuya Ogawa, Hisanori Matsui, Satoshi Ohtsuka, *et al.* A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to Cells*, 2004, **9**: 471 ~ 477.
- [36] Miho Furue, Tetsuji Okamoto, Yohei Hayashi Okochi, *et al.* Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2005, **41**: 19 ~ 28.
- [37] Hossein Baharvand, Klaus Ingo Matthaei. Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/C mouse strains. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2004, **40**: 76 ~ 81.
- [38] Nagafuchi S, Katsuta H, Kogawa K, *et al.* Establishment of an embryonic stem cell line derived from a nonobese diabetic (NOD) mouse: *in vivo* differentiation into lymphocytes and potential for germ line transmission. *FEBS*, 1999, **A55**: 101 ~ 104.
- [39] 韩嵘, 柴桂萱, 尚克刚等. 大鼠心肌条件培养基对形成小鼠 ES 细胞集落的影响. 北京大学学报(自然科学版), 1997, **33**(2): 185 ~ 188.
- [40] Luc Schoonjans, Veerle Kreemers, Sophie Danloy, *et al.* Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. *Stem Cells*, 2003, **21**: 90 ~ 97.
- [41] Inina Klimanskaya, Young Chung, Lorraine Meisner, *et al.* Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet*, 2005, **365**: 1636 ~ 1641.