

## 人源饲养层对人胚胎干细胞生长的影响

刘彩霞<sup>1,2</sup>, 周灿权<sup>1</sup>, 李 涛<sup>1</sup>, 闻安民<sup>2</sup>

(1. 中山大学附属第一医院妇产科生殖中心, 广东 广州 510080; 2. 广东省人民医院生殖中心//广东省医学科学院)

**摘要:**【目的】选择最佳人源饲养层,并检测不同组织来源的人源饲养层细胞碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的分泌情况,探讨其水平与人胚胎干细胞(hESCs)生长是否相关。【方法】原代培养包皮真皮、子宫内膜基质、绒毛、输卵管、胎儿真皮、胎儿肌肉及胎鼠成纤维细胞(MEFs);按组织来源分为 7 组(MEFs 为对照),同期接种同一株 hESCs,从饲养层细胞密度、丝裂霉素作用时间等,寻找不同饲养层适合 hESCs 生长的最佳条件;按人体组织分 6 组,ELISA 方法检测各种人源饲养层细胞分泌的 bFGF。【结果】根据饲养层细胞生长特性,饲养层从优到劣依次为:包皮、子宫内膜、绒毛、输卵管、胎皮、胎肌;根据 hESCs 生长状况,饲养层排序为:包皮、输卵管、子宫内膜、绒毛、胎肌、胎皮。输卵管、包皮、绒毛、胎肌、子宫内膜、胎皮分泌的 bFGF( $\text{pg} \cdot 10^{-5} \cdot \text{mL}^{-1}$ )分别为  $13.23 \pm 3.39$ ,  $1.99 \pm 0.17$ ,  $1.40 \pm 0.17$ ,  $2.02 \pm 1.59$ ,  $0.38 \pm 0.28$ ,  $0.29 \pm 0.29$ 。输卵管与其它组织细胞分泌的 bFGF 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );包皮、绒毛、胎肌之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与子宫内膜、胎皮差异有统计学意义( $P < 0.05$ );子宫内膜与胎皮之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。【结论】包皮来源的饲养层最佳,输卵管细胞分泌的 bFGF 量最高,饲养层细胞自身分泌的 bFGF 和 hESCs 生长无必然相关性。

**关键词:** 人源饲养层; 人胚胎干细胞; 碱性成纤维细胞生长因子

**中图分类号:** R543.31      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2010)01-0033-06

### Effect of Human Feeders on Growth of Human Embryonic Stem Cells

LIU Cai-xia<sup>1,2</sup>, ZHOU Can-quan<sup>2</sup>, LI Tao<sup>1</sup>, WEN An-min<sup>2</sup>

(1. Department of Assisted Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Assisted Reproductive Medicine, Guangdong General Hospital//Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 The aim was to choose the best feeder layer by observing the effects of various human feeders supporting human embryonic stem cells (hESCs), and to probe the correlation between the levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) secreted by feeders and the growth of the hESCs. 【Methods】 The primary cells from various tissues were cultured, including foreskin, stromal endometrium, villus, adult fallopian tubal, fetal skin, fetal muscle and mouse embryonic fibroblasts (MEFs). The hESCs were transferred to various feeders, and then the best condition was probed, which was based on the feeder density and the time of mitomycin-C acting on the feeder. Comparing the characteristics of the hESCs, the best feeder was chosen of all kinds of feeders from various tissues that support the hESCs. The level of bFGF secreted by various feeders was detected using ELISA. 【Results】 All of tested feeders could support the hESCs growth for over 10 passages in the culture, especially the foreskin and the adult fallopian tubal. The density of feeders was related with the morphology and the differentiation rate of the hESCs. According to the characteristics of feeder, the feeder ranking was as follows: foreskin, stromal endometrium, villus, adult fallopian tubal, fetal skin and fetal muscle. Based on the characteristics of the hESCs, the order of feeders was: foreskin, adult fallopian tubal, stromal endometrium, villus, fetal muscle and fetal skin. The levels of bFGF ( $\text{pg} \cdot 10^{-5} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) secreted by various feeders were as follows: adult fallopian tubal ( $13.23 \pm 3.39$ ), foreskin ( $1.99 \pm 0.17$ ), villus ( $1.40 \pm 0.17$ ), fetal muscle ( $2.02 \pm 1.59$ ), stromal endometrium ( $0.38 \pm 0.28$ ), and fetal skin ( $0.29 \pm 0.29$ ). 【Conclusion】 The foreskin and the adult fallopian

收稿日期: 2009-04-01

基金项目: 国家 863 计划项目(20060102A1022); 国家 863 计划项目(2005AA219010); 广州市科技计划项目(2006Z3C7111)

作者简介: 刘彩霞, 硕士, E-mail: lcxmbdm@126.com; \* 通信作者: 周灿权, 教授, 博士生导师, E-mail: zhoucquan@hotmail.com

tubal could support the hESCs better than others though all of them could do, especially the foreskin. The bFGF that secreted by the adult fallopian tubal was the highest of all. The correlation was not obvious between the levels of bFGF secreted by feeders and the growth of the hESCs.

**Key words:** human feeder layer; human embryonic stem cells; basic fibroblast growth factor

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1): 33-38]

基础与临床研究表明, 胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)及其衍生细胞移植后可以有效修复受损组织<sup>[1-5]</sup>。而 hESCs 增殖需要营养物质及生长因子, 鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)制作饲养层是最早和最常用的方法<sup>[6-7]</sup>。然而, MEFs 可能将鼠类病毒传染给患者, 干细胞治疗人类疾病时, 必须要求无动物源性培养。近几年, 人胚胎成纤维、包皮、输卵管上皮、子宫内膜等组织来源的细胞<sup>[8-11]</sup>, 均有报道可以支持 hESCs 的生长, 但对于各种人源饲养层的评价尚存在争议, 各实验室结论不同。为选择最佳人源饲养层, 引导人源组织的取舍和应用, 本研究选用包皮、子宫内膜、绒毛、输卵管、胎儿皮肤、肌肉, 6 种不同的胎儿、小儿及成人组织作饲养层, 以 MEFs 为对照, 比较了它们对人胚胎干细胞的支持情况。MEFs 促进增殖作用主要是由于能分泌成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等促有丝分裂因子, 但人源饲养层中生长因子含量复杂, 哪些因子可促进 hESCs 增殖和抑制分化目前尚未明了。一般认为添加外源性合成的(basic fibroblast growth factor, bFGF)有利于 hESCs 的生长, 但饲养层细胞自身分泌的 bFGF 和 hESCs 生长是否存在相关性呢? 我们测定了不同人源饲养层细胞分泌的 bFGF, 首次尝试从饲养层细胞自身分泌的 bFGF 角度探讨其与支持 hESCs 的生长是否存在相关性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 hESCs 本课题组从人囊胚中分离培养并经过鉴定的第 30 代细胞。

1.1.2 组织来源 取自中山大学附属一院。包皮: 小儿外科的包皮环切术; 子宫内膜: 生殖中心子宫内膜诊刮术; 胎儿皮肤、肌肉: 胎儿中心胎儿引产术; 输卵管、绒毛: 妇产科输卵管切除术和胎儿流产术; 胎鼠购自中山大学动物中心。

1.1.3 试剂及培养液 Human FGF Basic Immunoassay

Kit (DFB50 RD, USA); 成纤维细胞培养液: 90% 高糖 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM; invitrogen, USA), 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, USA), 100 IU/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素 (Sigma, USA); hESCs 培养液: 80% Knockout-DMEM, 20% Knockout-SR, L-谷氨酰胺 100  $\times$   $\beta$ -巯基乙醇 1.8  $\mu$ l/mL (Invitrogen, USA), 100 IU/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素、非必需氨基酸 100  $\times$  (Sigma, USA)。

### 1.2 方 法

1.2.1 原代细胞培养 包皮、胎儿皮肤, 胰酶过夜冷消化, 取真皮胶原酶 IV 消化; 胎儿肌肉、绒毛、胎鼠, 0.25% 胰酶消化; 子宫内膜, 0.1% 胶原酶 I 消化后, 将腺体沉淀取基质细胞; 输卵管, 0.25% 胰酶消化后, 将基质和上皮层分离, 取基质层用 0.1% 胶原酶 IV 消化。

1.2.2 最佳饲养层条件选择 用 10 mg/L 的丝裂霉素 C 分别作用各种细胞 1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h, 用同一规格的培养皿, 制作不同密度的饲养层, 机械法将 hESCs 克隆切成 3 ~ 16 块, 转移到铺有饲养层的培养皿中, 选择最佳作用时间和密度。冻存大量同批次细胞备用, 复苏后计数铺皿细胞数和未贴壁细胞数, 按丝裂霉素处理和未处理分 2 组, 比较丝裂霉素 C 对不同细胞复苏率的影响。复苏率 = (铺皿细胞数 - 未贴壁细胞数) / 铺皿细胞数

1.2.3 饲养层比较 用同一规格的培养皿, 接种相同的 hESCs 克隆数, 计算在各种饲养层最佳条件下 hESCs 的贴壁率、生长率、分化率, 比较饲养层优劣。贴壁率 = 贴壁克隆 / 传代克隆; 生长率 = 生长克隆 / 贴壁克隆; 分化率 = (部分分化克隆 + 已分化克隆) / 克隆总数。

1.2.4 bFGF 检测 10 mg/L 的丝裂霉素 C 作用各种细胞 2 h, 计数后放入培养皿, 3 d 后吸取培养液, 离心取上清; 利用酶联免疫吸附实验的双抗体夹心法, 按照 DFB50 RD 试剂盒说明操作。

1.2.5 统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 12.0 软件进行统计处理, 采用单因素方差分析比较各实验组之间的差异性。

## 2 结 果

### 2.1 不同饲养层细胞试用情况

hESCs 的生长形态及分化情况和饲养层细胞密度有关, 饲养层密度小, 克隆薄、圆; 饲养层密度大, 克隆厚、沿纤维方向生长。各种人源饲养层在

一定程度上均可支持 hESCs 生长, 以包皮较稳定 (表 1, 图 1)。

### 2.2 丝裂霉素 C 对不同细胞复苏率的影响

对包皮、子宫内膜、绒毛、MEFs 等细胞复苏率无明显影响; 胎儿肌肉、胎儿皮肤、输卵管细胞处理后较未处理复苏率变差 (表 2)。

表 1 不同饲养层细胞试用情况

Table 1 State of various human feeders supporting human embryonic stem cells

Feeder type	Latest feeder passage	Suitable hours of mitomycin-C treatment (h)	Suitable feeder density ( $\times 10^4/\text{cm}^2$ )	Feeder passages of probation	Latest hESCs passage
Foreskin	55	2.0 ~ 2.5	2.5 ~ 3.0	P5 ~ P31	30
Stromal endometrium	15	2.0 ~ 2.5	2 ~ 2.5	P5 ~ P12	10
Villus	15	2.0 ~ 2.5	1.4 ~ 1.8	P5 ~ P12	10
Fallopian tubal	12	1.5	0.8 ~ 1.0	P5 ~ P11	20
Fetal skin	12	1.5	1.4 ~ 1.6	P5 ~ P11	10
Fetal muscle	12	1.5	1.4 ~ 1.6	P5 ~ P11	10
MEFs	5	2.0 ~ 2.5	1 ~ 1.2	P4 ~ P5	30

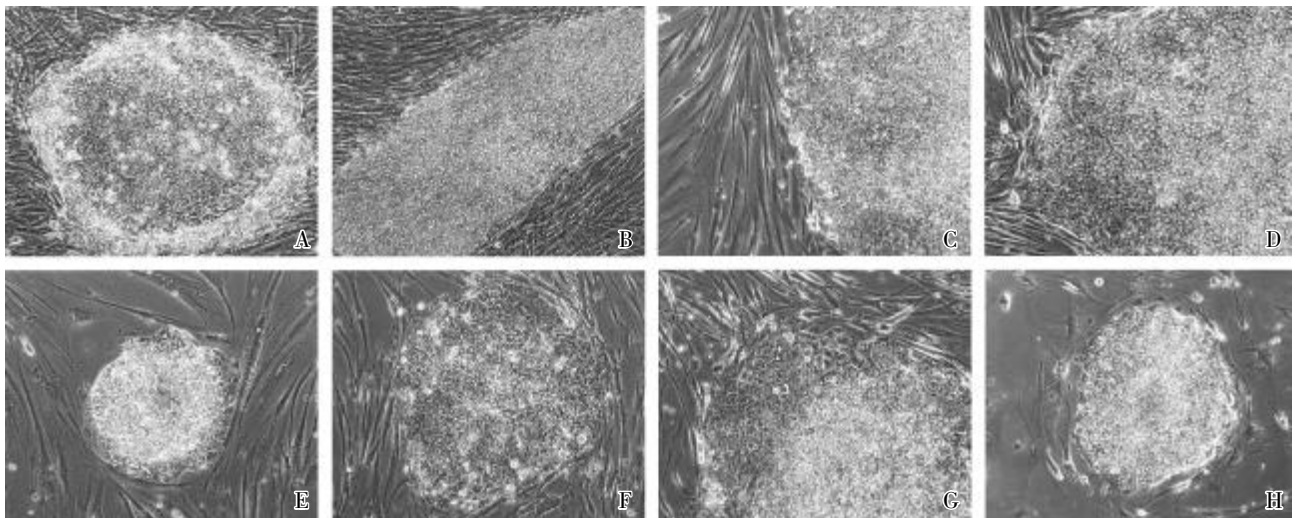


图 1 不同饲养层上 hESCs 形态

Fig.1 hESCs morphology of various human feeders

A: foreskin; B: foreskin; C: stromal endometrium; D: villus; E: fallopian tubal; F: fetal skin; G: fetal muscle; H: MEFs;  $\times 100$

表 2 丝裂霉素 (10 mg/L) 处理对不同细胞复苏率的影响

Table 2 Influence of the mitomycin-C (10 mg/L) treatment on the survival rates of cryopreserved-thawed cells (%)

Group	Foreskin	Stromal endometrium	Villus	Fallopian tubal	Fetal skin	Fetal muscle	MEFs
1	98.6	95.0	94.5	70.6	80.5	76.4	98.2
2	97.5	93.2	93.5	50.5	70.3	65.9	96.5

Group 1: the survival rates of cryopreserved-thawed cells without the mitomycin-C

Group 2: the survival rates of cryopreserved-thawed cells with the mitomycin-C

### 2.3 hESCs 的生长状态

未分化 hESCs: 细胞小圆形, 排列紧密, 核仁清楚; 已分化细胞: 细胞大, 梭形或多角形, 细胞排列疏松。未分化克隆: 克隆中未分化细胞 > 80%, 可继续传代; 部分分化克隆: 克隆中未分化细胞 50% ~ 80%, 可通过机械法将未分化部分继续传代; 已分化克隆: 克隆中未分化细胞 < 50%, 不能继续传代。

hESCs 在包皮上贴壁率, 生长率和分化率和 MEFs 类似; 在输卵管上贴壁率波动大, 但分化率较低, 形态较好; 在胎皮、胎肌上贴壁率和生长率较 MEFs 差。

贴壁率: 包皮、MEFs 之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 与其它组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 子宫内膜、绒毛之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 和胎皮、胎肌、输卵管差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 胎皮、胎肌差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) 和输卵管差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

生长率: 包皮、MEFs 之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 与其它组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 子宫内膜、绒毛、输卵管之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 与胎皮、胎肌差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 胎皮、胎肌差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

分化率: 输卵管和所有组之间差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 其它组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 3, 图 2)。

表 3 hESCs 在各种饲养层上的生长状态

Table 3 State of hESCs growing on various human

feeders ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Feeder type	Rates of adherence	Rates of growth	Rates of differentiation
Foreskin	96.95 ± 1.05	97.68 ± 1.60	4.44 ± 0.44
Stromal endometrium	92.10 ± 1.56	94.13 ± 1.82	3.50 ± 0.22
Villus	92.58 ± 1.64	94.33 ± 1.25	3.80 ± 0.29
Fallopian tubal	70.18 ± 1.60	94.98 ± 1.39	0.88 ± 0.25
Fetal skin	86.45 ± 1.69	90.07 ± 1.67	4.15 ± 0.27
Fetal muscle	88.43 ± 1.70	90.50 ± 2.09	3.75 ± 0.21
MEFs	97.55 ± 1.68	97.90 ± 0.61	4.35 ± 0.59

### 2.4 不同组织的饲养层细胞分泌 bFGF 结果

输卵管与其它组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 包皮、绒毛、胎肌之间差异无统计学意义 ( $P$

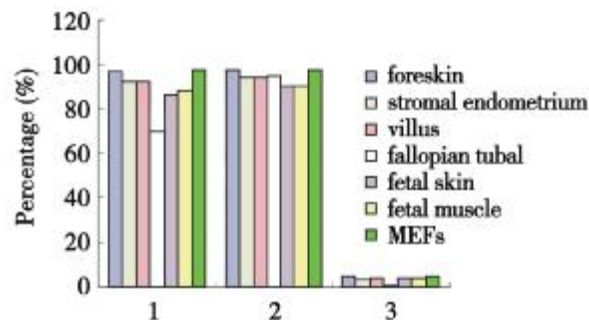


图 2 hESCs 在各种饲养层上的生长状态

Fig.2 State of hESCs growing on various human feeders

1: rates of adherence; 2: rates of growth; 3: rates of differentiation

> 0.05); 包皮、绒毛、胎肌与子宫内膜、胎皮之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 内膜与胎皮之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。标准曲线  $r = 0.99868$  说明本次实验技术性误差很小。(表 4, 图 3)

表 4 不同组织的饲养层分泌 bFGF 量

Table 4 Level of bFGF secreted by various feeders

( $10^{-5} \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Feeder type	bFGF
Foreskin	1.99 ± 0.17
Stromal endometrium	0.38 ± 0.28
Villus	1.40 ± 0.17
Fallopian tubal	13.23 ± 3.39
Fetal skin	0.29 ± 0.29
Fetal muscle	2.02 ± 1.59

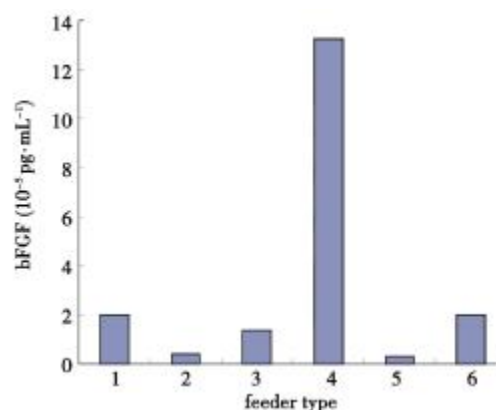


图 3 不同组织的饲养层细胞分泌的 bFGF 量

Fig. 3 Level of bFGF secreted by various feeders

1: foreskin; 2: stromal endometrium; 3: villus; 4: fallopian tuba; 5: fetal skin; 6: fetal muscle;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

### 3 讨 论

1998年 Thomson<sup>[6]</sup>首次报道从囊胚中获得了 hESCs,其发育全能性为细胞治疗和组织替代等医学领域带来广阔的研究前景,现在已成为生物医学领域的热点。传统上,培养 hESCs 用 MEFs、无限生长系 STO 细胞做饲养层。由于混杂了小鼠细胞,且 hESCs 暴露于小鼠的逆转录病毒中,这必将给临床应用带来麻烦。目前,无饲养层、无血清、无动物源成分的培养体系尚不完善,饲养层仍是 hESCs 建系时不可缺少的因素。为了减少动物源成分,人源饲养层研究是一个必要的过渡阶段。本研究从人成纤维细胞的生长状态、传代情况与 MEFs 作比较,探讨了人成纤维细胞用于培养 hESCs 的可行性。

所用不同组织来源的细胞,在传代 2、3 次后形态均呈纤维状,但生长特性、老化进程不同。包皮增殖力最旺盛,其中一株 3 岁男孩的包皮细胞传 55 代,在 40 代时核型仍正常,与文献报道至少可以传 42 代才出现老化吻合。另外一株 17 岁男孩的包皮细胞,培养到 32 代时增殖力依然旺盛。子宫内膜基质和绒毛细胞传 15 代,增殖能力无明显减弱。输卵管基质细胞第四代增殖能力开始下降,细胞出现老化,胞体增大、胞浆内颗粒增多。胎儿皮肤和肌肉细胞增殖力居中,三代之后接触抑制明显,出现局部大片脱落,但细胞长满 80% 前仍可以继续传代,而其它细胞无抑制脱落现象。胎鼠成纤维细胞早代增殖力旺盛,可复层生长而无接触抑制,第四代之后,几乎不再增殖,5 代后细胞明显老化。细胞形态与传代密度有关,密度适宜,形态较好;传代过稀,增殖减慢,则胞体变大,胞浆内颗粒增多,传代周期变长。人成纤维细胞和 MEFs 在体外均为贴壁生长型细胞,与 MEFs 相比,人成纤维细胞寿命更长,在生长状况上与 MEFs 类似,在使用期限上优于后者。

本结论与大多数文献报道包皮可以支持 hESCs 生长、建系相符<sup>[12-14]</sup>。但与 2003 年 Mark Richards<sup>[15]</sup>认为胎儿肌肉可作为最佳饲养层有异议,可能与细胞培养条件不同有关。本实验中,胎儿肌肉细胞接触抑制明显,易脱落,饲养层细胞本身状态不佳。Richards 描述胎儿肌肉较其它饲养层上的上 hESCs 克隆厚,本实验中观察到 hESCs 的

生长形态及分化情况和饲养层细胞密度有关,而与组织来源无明显关系。无论哪种饲养层,饲养层细胞密度大,则 hESCs 克隆厚,形态除与切割形状有关外,多沿纤维方向生长,反之则薄,呈圆形、椭圆形。

丝裂霉素处理后的各种饲养层,输卵管细胞分泌的 bFGF 量最高,SPSS 统计分析与其它组间差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。但 hESCs 在包皮和输卵管上生长形态均好,说明饲养层细胞自身分泌的 bFGF 和 hESCs 的生长虽然可能有一定关系,但无必然相关性。表现为输卵管细胞支持 hESCs 生长时密度低,其它组织来源的细胞密度高。但也可能与输卵管细胞体积较大有一定关系。当然,细胞培养液中各种生长因子含量甚微,各种因子协同作用复杂,需要联合其它因素才能进一步探讨它们的作用。

虽然输卵管分泌的 bFGF 较高,密度要求比 MEFs 低,传代的 hESCs 分化少形态好,胶原酶消化效果与 MEFs 类似。但是输卵管上生长的 hESCs 贴壁率波动很大,实验中曾有另一株 hESCs 超过 50% 以上的克隆不贴壁现象。这可能与 hESCs 系不同有关,也可能与培养液的批次有关。另外,输卵管需要筛选(比如排除恶性肿瘤患者),来源相对困难,且在第四代后增殖力明显下降,老化较早,这些都限制了它的应用。子宫内膜增殖力相对旺盛,来源也很充足,所以也是一种值得推荐的饲养层;胎儿肌肉和皮肤,细胞本身传代需要严格控制时间,否则会“集体自杀”——大片脱落,给实验带来一定的不便。这种现象其它细胞尚未见发生。另外,在如今可以控制受孕的医疗条件下,引产的正常胎儿来源非常困难且涉及到伦理问题。

尽管我们实验表明流产胎儿的绒毛也可以支持 hESCs 生长,国内外尚未见报道,但绒毛取材相对困难,也牵涉到伦理问题。所以,应该倡议饲养层的选择不在于标新立异,而在于方便、适用。虽然似乎多种人源成纤维细胞在一定程度上均可支持 hESCs 生长,本研究显示包皮可作为人源饲养层的首选,并且,我们在包皮上成功地建立了一株新的 hESCs 系。包皮的优势体现在来源充足、属医疗废物,一般不需要病理检查,无伦理学问题;本身传代久,增殖力强,旺盛时可 1:7 传代;不同包皮系、冷冻复苏后及高代次细胞支持 hESCs 生长的能力均无差异,实验中最高用到 31 代。而 MEFs

在第 5 代时增殖力即明显下降呈老化状态, 实验多用 3 ~ 4 代。与 MEFs 相比, 包皮的储备量是很惊人的, 这就减轻了反复培养原代饲养层细胞的工作负荷。

现阶段的培养方法尚不能在短期内大量扩增 hESCs, 减少动物源性物质只是基本前提, 最终目标是找到类似鼠胚胎干细胞培养中的骨形态发生蛋白拮抗剂 Noggin 和白白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 作用的细胞因子<sup>[16-17]</sup>, 使 hESCs 的自我更新具有可控性, 建立起无饲养层、无血清和无动物来源成分的稳定的、标准的培养体系。

#### 参考文献:

- [1] Cho MS, Hwang DY, Kim DW. Efficient derivation of functional dopaminergic neurons from human embryonic stem cells on a large scale [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(12):1888-1894.
- [2] Lu SJ, Ivanova Y, Feng Q, et al. Hemangioblasts from human embryonic stem cells generate multilayered blood vessels with functional smooth muscle cells [J]. *Regen Med*, 2009, 4(1):37-47.
- [3] Kärner E, Bäckesjö CM, Cedervall J, et al. Dynamics of gene expression during bone matrix formation in osteogenic cultures derived from human embryonic stem cells in vitro [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(2):110-118.
- [4] Mao GH, Chen GA, Bai HY, et al. The reversal of hyperglycaemia in diabetic mice using PLGA scaffolds seeded with islet-like cells derived from human embryonic stem cells [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(9):1706-1714.
- [5] Li Z, Han Z, Wu JC. Transplantation of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for vascular diseases [J]. *Cell Biochem*, 2009, 106(2):194-199.
- [6] Thomson JA, Itskovitz EJ, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell line derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391):1145-1147.
- [7] Inamdar MS, Venu P, Srinivas MS, et al. Derivation and characterization of two sibling human embryonic stem cell lines from discarded Grade III embryos [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(3):423-433.
- [8] Kumar N, Hinduja I, Nagvenkar P, et al. Derivation and characterization of two genetically unique human embryonic stem cell lines on in-house derived human feeders [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(3):435-445.
- [9] Sidhu KS, Ryan JP, Tuch BE. Derivation of a new human embryonic stem cell line, endeavour-1, and its clonal propagation [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(1):41-51.
- [10] Meng G, Liu S, Krawetz R, et al. A novel method for generating xeno-free human feeder cells for human embryonic stem cell culture [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(3):413-422.
- [11] Lee JB, Lee JE, Park JH, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(1):42-49.
- [12] Ellerström C, Strehl R, Moya K, et al. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(10):2170-2176.
- [13] Ström S, Inzunza J, Grinnemo KH, et al. Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(12):3051-3058.
- [14] Feki A, Bosman A, Dubuisson JB, et al. Derivation of the first Swiss human embryonic stem cell line from a single blastomere of an arrested four-cell stage embryo [J]. *Swiss Med Wkly*, 2008, 138(37-38):540-550.
- [15] Mark Richards. Comparative evaluation of various human feeders or prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(7):546-556.
- [16] Trouillas M, Saucourt C, Guillotin B, et al. Three LIF-dependent signatures and gene clusters with atypical expression profiles, identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10:73.
- [17] Chiba S, Lee YM, Zhou W, et al. Noggin enhances dopamine neuron production from human embryonic stem cells and improves behavioral outcome after transplantation into Parkinsonian rats [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(11):2810-2820.

(编辑 张恩健)