

拟胚体对成体细胞参与胚胎嵌合的影响

曹鸿国¹, 李运生¹, 曲秀霞², 邓宏魁²

(¹安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; ²北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要: 试验尝试构建成体细胞同小鼠早期胚胎的嵌合共生胚胎。取成年人皮肤组织的成纤维细胞, 慢病毒转染皮肤成纤维细胞标记 EGFP 荧光蛋白, 同小鼠早期 8- 细胞胚胎进行嵌合。结果显示慢病毒高效标记人皮肤成纤维细胞表达 EGFP 荧光蛋白, 通过皮肤成纤维细胞与小鼠胚胎干细胞形成的拟胚体环境作用后, 皮肤成纤维细胞成功与小鼠胚胎形成嵌合胚, 嵌合囊胚形成率为 38.08%, 表达 EGFP 荧光蛋白的皮肤成纤维细胞能够嵌合到小鼠胚胎的不同部位。嵌合胚在胚胎干细胞分离培养环境下进行培养, 嵌合到小鼠内细胞团的皮肤成纤维细胞参与小鼠内细胞团的组成, 参与小鼠内细胞团组成的胚胎占嵌合胚比率为 1.74%。小鼠胚胎干细胞拟胚体环境作用可以成功介导人皮肤成纤维细胞同小鼠早期胚胎形成嵌合共生体系。

关键词: 拟胚体; 成纤维细胞; 胚胎; 嵌合

中图分类号: Q813.5 **文献标识码:** A

The Effect on Chimeric Embryo Construction from Fibroblasts and Early Embryos about Mouse Embryoid Body

Cao Hongguo¹, Li Yunsheng¹, Qu Xiuxia², Deng Hongkui²

(¹College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

²College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

Abstract: Chimeric embryos from mouse embryos and human fibroblasts were constructed. The fibroblasts from adult foreskin were isolated, cultured and transfected EGFP with lentivirus vectors, and then chimeric embryos were constructed with mouse embryos and fibroblasts. The results showed that human fibroblasts efficiently expressed EGFP after transfected with lentivirus vectors. 38.08 % chimeric embryos were constructed successfully with mouse embryos and EGFP fibroblasts which were from embryoid bodies of mouse embryonic stem cells and EGFP fibroblasts. EGFP fibroblasts were taken part in different ingredient of chimeric embryos. Under the circumstance of embryonic stem cell isolation and culture, EGFP fibroblasts in 1.74 % chimeric embryos became the member of inner cell masses on feeder cells. Human fibroblasts can become chimeric embryos with mouse embryos by the microenvironment of mouse embryoid bodies.

Key words: embryoid body, fibroblast, embryo, chimera

胚胎嵌合是把不同个体的动物胚胎通过人为操作在特定环境条件下共同发育成为具有不同基因型胚胎的过程。早期胚胎的卵裂球细胞具有发育的全能性或全能性, 常作为嵌合胚胎生产的细胞来源。除胚胎细胞参与胚胎嵌合外, 研究发现一些类型的成体细胞也能够参与早期胚胎发育。在国内, 黄淑帧教授等采用子宫

内注射技术将造血干细胞注入山羊胚胎内, 形成嵌合体山羊, 在分娩出山羊的多个组织器官中检测到造血干细胞的植入和分化成机体组成细胞^[1]。在国外, Kulesa 等利用早期胚胎微环境把注射到鸡胚胎中的人恶性黑色素瘤细胞成功地转变成正常色素细胞, 这些细胞参与鸡胚细胞组成^[2]。在嵌合胚胎中, 不同基因型的

基金项目: 国家 973 项目“干细胞增殖分化机理的研究”(2001CB510106)资助。

第一作者简介: 曹鸿国, 男, 1975 年出生, 博士, 主要从事细胞工程方面的研究。通信地址: 230036 安徽合肥安徽农业大学动物科技学院。Tel: 05515786357, E-mail: caohongguo1@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2008-04-03, **修回日期:** 2008-07-04。

细胞形成共生的胚胎体系。嵌合胚胎发育形成嵌合体动物,嵌合体动物广泛应用于动物生殖发育、动物机体免疫和动物模型制作等方面的研究。嵌合胚胎的制作将为人类遗传性疾病的治疗、组织细胞的损伤修复、异种器官移植、免疫耐受以及细胞移植、生长、分化、基因表达调控等方面的研究提供理想模型。但目前尚未见体外培养条件下成功构建成体细胞早期胚胎的嵌合共生体系,此次试验尝试构建人类正常机体组成细胞与小鼠早期胚胎嵌合共生的微环境体系,为深入研究成年机体细胞在胚胎微环境中的生长发育和基因表达调控等提供理想的研究方法和动物模型。

1 材料和方法

1.1 试验时间、地点

2005年9月—2006年5月在北京大学医学部实验动物中心进行相关试验。

1.2 皮肤成纤维细胞的培养

成年男性包皮材料来自临床包皮切割个体,实验材料由北京大学第三医院提供。取新鲜成年个体包皮皮肤材料,75%酒精短暂浸泡消毒,无菌PBS液多次洗涤,小心剪下包皮皮肤的皮下组织,不用结构致密的表皮和真皮,用小剪刀将皮下组织剪成小组织块。取新鲜的培养液把6cm培养皿底部事先用培养液浸润,培养液为含20%胎牛血清的高糖DMEM培养液,用小镊子把组织块均匀地放置于培养皿底部,吸出培养皿内多余的培养液,翻转倒置培养皿,37℃培养箱中培养。2~3h后,添加新鲜的培养液,37℃培养箱中继续培养,2d后去除没有贴壁的组织块继续培养,待组织块中迁出的细胞长满培养皿后,胰酶消化传代。

1.3 皮肤成纤维细胞EGFP荧光标记

慢病毒转染EGFP荧光蛋白于人皮肤成纤维细胞,慢病毒载体PLL3.7带有EGFP荧光蛋白基因,在293T细胞上包装具有感染能力的病毒,包毒前20~24h消化传代293T细胞,包毒时293T细胞铺满60%~80%的培养皿。包毒时把PLL3.7载体质粒同VSVG、RSV-REV、pMDLg/pRRE质粒进行按比例混合,利用磷酸钙沉淀介导在293T细胞内包装成具有感染活性的病毒颗粒,48h后收集转染用病毒液,病毒液经过离心浓缩后,加入到铺满50%培养皿底部的人皮肤成纤维细胞培养液中,添加polybrene提高转染效率,37℃培养箱中培养。

1.4 小鼠ES细胞同皮肤成纤维细胞拟胚体体系构建

小鼠ES细胞系R1为实验室固有细胞系,培养液为的高糖DMEM培养液(含20%胎牛血清,1%非必需氨基酸,0.1mM β -巯基乙醇,1%谷胺酰胺溶液,1

000U/mlLIF)。小鼠ES细胞饲养层为12.5d小鼠胎儿成纤维细胞。R1细胞系每天半量换液,2d传代一次。取生长状态较好的R1细胞,PBS液洗涤,胰酶消化,收集单个R1细胞,离心洗涤。取生长状态较好的EGFP阳性人皮肤成纤维细胞,PBS液洗涤,消化成单个细胞,PBS液洗涤收集,将两种细胞进行混合,离心去上清,添加适量的ES细胞培养液悬浮细胞,取6cm培养皿的上盖,将两种细胞的悬液滴在培养皿上盖的内壁上,培养皿中添加适量的PBS液体,盖上培养皿上盖37℃培养箱进行悬滴培养。

1.5 皮肤成纤维细胞同小鼠胚胎的嵌合

杀死怀孕2.5d的ICR小鼠,从体内取出8-细胞或早期桑葚胚阶段的胚胎。把培养皿用钝性针头在培养液滴中制作合适的嵌合凹槽,早期胚胎培养液为M16液体。将收集到的小鼠早期胚胎用Tyrodes液进行瞬时消化处理,在短暂的时间内去掉透明带。用检胚针把去掉透明带的小鼠早期胚胎小心移入嵌合槽中。

消化传代人皮肤成纤维细胞,调整传代的人皮肤成纤维细胞密度,对传代培养到新培养皿上的人包皮细胞添加DMEM/F12培养液含20%KSR(Knockout serum replacement),0.1mM β -巯基乙醇,1%非必需氨基酸,1mM谷胺酰胺,8unit/ml庆大霉素,传代培养的人皮肤成纤维细胞形成大小不等的细胞集落。

取R1细胞同EGFP阳性人皮肤成纤维细胞形成的拟胚体细胞集落或EGFP阳性人皮肤成纤维细胞形成的细胞集落,用操作针制作多个细胞组成的细胞团,把细胞团放入胚胎嵌合槽中,用操作针调整细胞团使其与小鼠早期胚胎彼此接触。把制作好的嵌合培养皿放入37℃培养箱中进行培养,第2天观察EGFP阳性人皮肤成纤维细胞同小鼠胚胎的嵌合情况。用未经小鼠ES细胞拟胚体环境处理的EGFP阳性人皮肤成纤维细胞同小鼠早期胚胎进行嵌合作为对照。

1.6 皮肤成纤维细胞嵌合胚的体外培养

把EGFP阳性人皮肤成纤维细胞成功嵌合的小鼠早期嵌合囊胚移植到由12.5d小鼠胎儿成纤维细胞制作的饲养层上,添加小鼠ES细胞培养液,另含4ng/mlbFGF,放入37℃培养箱中培养。

2 结果与分析

2.1 皮肤成纤维细胞的形态

来自成年人包皮皮肤的成纤维细胞呈梭形,细胞形态一致,没有上皮样铺路石状细胞长出,细胞具有快速的生长增殖特性,可以稳定传代,在1:2进行传代的情况下细胞每隔3~4d时进行传代一次,生长中的人皮肤成纤维细胞形态较为铺展,随着生长密度的增加,细胞铺

满培养皿后细胞逐步变得细长,呈现典型的梭形形态。

2.2 EGFP 荧光蛋白皮肤成纤维细胞的表达

慢病毒载体高效地转染人皮肤细胞表达 EGFP 荧光蛋白, 转染后人皮肤细胞稳定地表达 EGFP 荧光蛋

白, 流式细胞仪检测细胞 EGFP 荧光表达阳性率为 99.85%(图 1,2)。EGFP 阳性人皮肤细胞在无血清培养条件下形成大小不等的细胞集落, 荧光显微镜下呈 EGFP 强阳性(图 3,4)。



图 1 铺满培养皿的人包皮皮肤成纤维细胞形态, ×100;

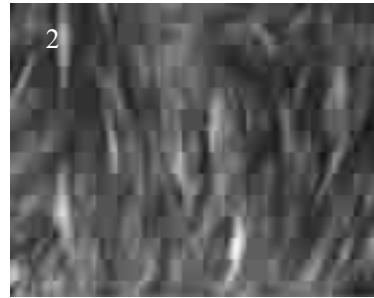


图 2 慢病毒转染的 EGFP 人皮肤成纤维细胞在荧光显微镜下的形态, ×100;

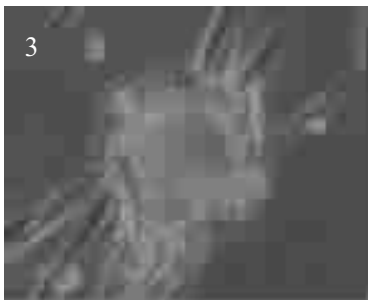


图 3 EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞在无血清培养条件下形成的细胞集落, ×100;

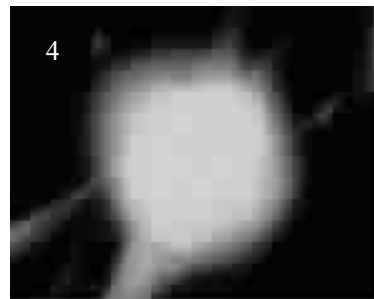


图 4 EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞集落在荧光显微镜下的形态, ×100;

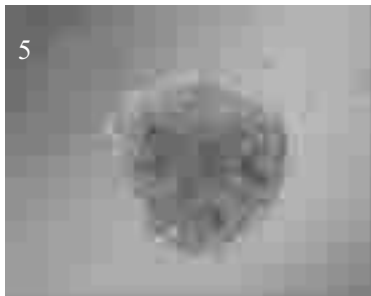


图 5 EGFP 阳性人成纤维细胞团粘附在小鼠桑椹胚或早期囊胚周围, ×200;

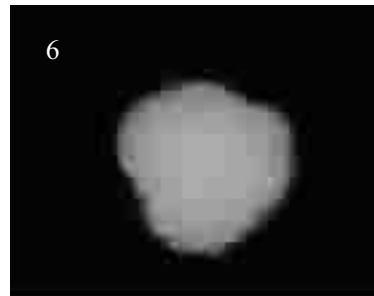


图 6 EGFP 阳性人成纤维细胞团粘附在小鼠晚期囊胚周围, ×400;

2.3 皮肤成纤维细胞拟胚体的形成

EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞同小鼠 ES 细胞系 R1 细胞经过 24 h 的悬滴培养形成大小不等的拟胚体, 拟胚体边缘整齐, 界限清晰, 颜色发亮而有光泽。在荧光显微镜下显示 EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞均匀地分散到由 R1 细胞形成的拟胚体中, 整个拟胚体形成一个绿色荧光的拟胚体球(图 5,6)。

2.4 皮肤成纤维细胞早期嵌合胚的发育

取人皮肤成纤维细胞拟胚体的多个细胞形成的细胞集落同小鼠早期 8- 细胞胚胎进行嵌合, 在嵌合凹槽中经过嵌合培养后能够成功同小鼠胚胎发生嵌合, 顺利整合入小鼠早期或晚期囊胚的不同部位, 38.08 %

(115/302) 的胚胎能够形成嵌合胚。在荧光显微镜下 EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞同小鼠囊胚有效嵌合, 表达荧光蛋白的人皮肤成纤维细胞分布到小鼠囊胚滋养层或内细胞团的不同部位, 参与小鼠胚胎的组成。无血清培养条件下形成的 EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞集落中分离出的多个细胞形成的细胞团, 在相同情况下, 取这些细胞团直接同小鼠早期 8- 细胞胚胎在嵌合凹槽中进行嵌合培养后, EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞不能有效地嵌合入小鼠胚胎, 在荧光显微镜下呈现出 EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞团粘附在小鼠早期囊胚或晚期囊胚外周, EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞在小鼠胚胎外围形成细胞球。人皮肤成纤维细胞小球状 EGFP

细胞团在荧光显微镜下呈现出很强激发荧光(图7,8)。相同情况下,经过小鼠ES细胞拟胚体作用的EGFP阳性人皮肤成纤维细胞嵌入小鼠胚胎后,荧光显微镜下在小鼠早期胚胎中的EGFP阳性人皮肤成纤维细胞绿



图7 EGFP阳性人成纤维细胞同小鼠ES细胞形成的拟胚体形态,×100;



图9 来自小鼠拟胚体的EGFP阳性人成纤维细胞同小鼠胚胎的嵌合囊胚形态,×400;

2.5 皮肤成纤维细胞参与小鼠胚胎内细胞团组成

把晚期EGFP阳性人皮肤成纤维细胞嵌合囊胚移植到小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上,在ES细胞培养环境条件下小鼠嵌合胚内细胞团逐渐增大,嵌合胚胎逐渐粘附到饲养层上进行生长。对于没有经过小鼠ES细胞拟胚体环境作用的EGFP阳性人皮肤成纤维细胞在嵌合过程中粘附在小鼠胚胎周围,这些胚胎在移入小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上进行培养时,在嵌合胚没有粘附到饲养层之前,嵌合胚外围粘附的EGFP阳



图11 在ES细胞分离培养条件下EGFP阳性人成纤维细胞参与小鼠嵌合胚内细胞团组成,×200;

色荧光相对较弱(图9,10)。相同情况下单个EGFP阳性人皮肤成纤维细胞在嵌合凹槽中经过嵌合培养后不能嵌入小鼠早期胚胎,主要表现为EGFP阳性人皮肤成纤维细胞贴附在嵌合凹槽壁上进行生长。

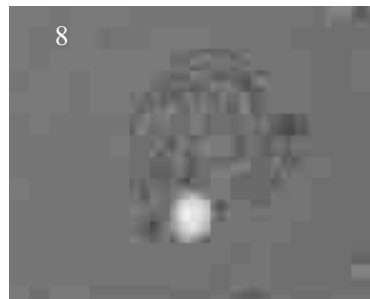


图8 EGFP阳性人成纤维细胞同小鼠ES细胞形成的拟胚体在荧光显微镜下的形态,×100;



图10 来自小鼠拟胚体的EGFP阳性人成纤维细胞同小鼠胚胎的嵌合囊胚在荧光显微镜下的形态,×400;

性人皮肤成纤维细胞就迁移到饲养层上,呈现铺展状或纤维状生长。对于经过小鼠ES细胞拟胚体环境作用的EGFP阳性人皮肤成纤维细胞,经过ES细胞分离培养环境作用后,荧光显微镜下EGFP阳性人皮肤成纤维细胞同嵌合胚的内细胞团细胞生长在一起,参与嵌合胚内细胞团细胞组成(图11,12)。在嵌合囊胚中1.74%(2/115)的嵌合囊胚人皮肤成纤维细胞参与嵌合胚内细胞团组成,人皮肤成纤维细胞分布到嵌合胚内细胞团细胞之间,形成嵌合内细胞团(表1)。

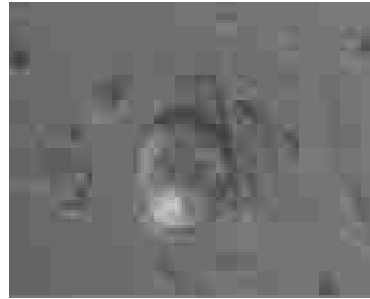


图12 在ES细胞分离培养条件下EGFP阳性人成纤维细胞参与小鼠嵌合胚内细胞团组成的荧光显微镜下形态,×200

表1 皮肤成纤维细胞在小鼠嵌合胚中的体外生长发育情况

8-细胞嵌合胚数 / 枚	嵌合囊胚数 / 枚	参与内细胞团组成胚数 / 枚
302	115 (115/302, 38.08 %)	2 (2/115, 1.74 %)

3 讨论

在成功构建人皮肤成纤维细胞与早期胚胎的嵌合共生体系中,采用的成体细胞来自成年男性的包皮皮肤材料,人包皮材料具有取材方便,来源广泛,对供体损害较小等优点,目前已成为人体皮肤材料的主要来源之一。人包皮皮肤来源的细胞具有多种功能,被广泛应用于生命科学研究的许多领域。Chen等^[3]研究发现人包皮成纤维细胞在常规培养条件下具有干细胞的多能性,在体外诱导条件下可以诱导分化为脂肪细胞、软骨细胞等多种类型的细胞。人包皮成纤维细胞表达肾上腺素受体,目前作为细胞模型广泛应用于药物与受体相互作用引起的分子调节机制方面的研究^[4]。来源于人包皮组织的成纤维细胞在胚胎干细胞的培养过程中作为小鼠胚胎干细胞的饲养层,可以有效维持小鼠胚胎干细胞的干细胞特征^[5]。相对于人胚胎干细胞而言,人包皮成纤维细胞作为胚胎干细胞的饲养层,可以较好地维持人胚胎干细胞的干细胞特征,有效地维持人胚胎干细胞的未分化状态^[6-9]。来自人体包皮或其它部位的皮肤成纤维细胞通过逆转录病毒载体介导转染 *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* 和 *LIN 28*^[10] 或 *Oct 4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*^[11] 四种基因,表达外源基因的人成纤维细胞呈现出人胚胎干细胞扁平集落形态、表达人胚胎干细胞干细胞标记、体外分能够分化多种其它类型细胞、在小鼠体内形成畸胎瘤等多种胚胎干细胞特征。通过慢病毒质粒载体介导人皮肤成纤维细胞高效表达绿色荧光蛋白,成纤维细胞绿色荧光蛋白表达阳性率为99.85%。慢病毒载体作为一类重组逆转录病毒载体,目前已成为一种重要的基因转移工具被应用于基因导入和细胞分子生物学研究领域^[12,13]。慢病毒是逆转录病毒家族的成员,病毒能够利用自身组分将外源基因整合入宿主细胞基因组DNA中,从而使外源基因随着宿主细胞的分裂增殖和传代而稳定表达。慢病毒载体介导人成纤维细胞高效稳定表达绿色荧光蛋白,证实了慢病毒对于人体原代细胞的强大导入外源基因功能。在实验中发现人包皮皮肤成纤维细胞具有良好的生长性能和稳定的传代能力,为了避免来源于皮肤组织多种类型干细胞在胚胎嵌合构建过程中的干扰,在皮肤成纤维细胞分离培养过程中未添加干细胞生长所必需的细胞因子,通过多次传代形成生长性能稳定和细胞形态一致的成纤维细胞,从而为人成体细胞在胚胎微环境体系中的生长发育研究奠定基础。

在嵌合环境条件下,人皮肤成纤维细胞不能直接同小鼠早期胚胎进行有效嵌合。经过小鼠胚胎干细胞形成的拟胚体环境作用后,人皮肤成纤维细胞能够有

效地嵌入小鼠早期胚胎,并参与小鼠内细胞团组成。分析认为人皮肤成纤维细胞在小鼠胚胎干细胞拟胚体环境中,小鼠胚胎干细胞分泌产生的细胞信号分子通过环境介质或细胞间桥作用于人皮肤成纤维细胞,细胞之间的信息传递会影响人皮肤成纤维细胞细胞核表达信息蛋白,细胞基因表达模式的变化会改变人成纤维细胞原有的生长发育特性和细胞表面的分子组成,产生与早期胚胎细胞相似的一些特征,细胞膜表面的整合素参与小鼠早期胚胎的嵌合。整合素是一类普遍存在于细胞表面的跨膜糖蛋白,是细胞粘附分子家族中的一员,广泛分布于细胞表面的粘附受体,主要功能为细胞间粘附与信号传递,参与细胞整合、胚胎着床及生长发育等^[14-17]。Tian等^[18]研究证实了细胞的外部环境信号通过细胞表面的受体以及相应的信号通路传递最终使细胞内基因表达发生改变,影响细胞的生长发育。在干细胞诱导分化的研究中,模拟体内细胞分化发育的微环境,体外培养条件下人造血微环境的基质细胞能促进人胚胎干细胞向造血细胞分化得到证实^[19-23]。Chen等^[24]用嘌呤类似物诱导肌管细胞形成多能性祖细胞,在成骨或脂肪分化培养基条件下转化为成骨细胞或脂肪细胞的表型。Gage^[25]研究表明从成年海马获得的干细胞移植到成年大鼠嗅球附近时,分化为表达酪氨酸羟化酶的神经元,将相同的神经干细胞移植到海马后,分化为典型的海马锥体神经元。移植的神经干细胞在白质大多发育为星形胶质细胞,而在灰质大多发育为神经元。微环境中的多种细胞因子可与细胞表面的特异性受体结合,激活受体下游信号通路,促进细胞的存活或抑制干细胞的凋亡,维持细胞在微环境中的存活和分化^[26,27]。众多的研究结果证实了细胞生长发育的微环境能够影响或决定细胞命运。

通过小鼠胚胎干细胞拟胚体环境作用的人皮肤成纤维细胞能够同小鼠早期胚胎形成嵌合共生的胚胎体系,但是在研究中发现人皮肤成纤维细胞嵌合囊胚的形成率较低。分析认为人皮肤成纤维细胞和小鼠早期胚胎的嵌合体系还存在一些问题,需要对嵌合共生体系的诸多环节进行完善和改进,将会显著提高人皮肤成纤维细胞嵌合囊胚的形成率。首先,调整人皮肤成纤维细胞和小鼠胚胎干细胞之间的比例关系。通过调整两者之间的比例,使小鼠胚胎干细胞拟胚体环境既能影响人皮肤成纤维细胞的生长状态,又能较好地协同人皮肤成纤维细胞同小鼠早期胚胎形成嵌合共生体系。其次,对于用于嵌合的人皮肤成纤维细胞和小鼠胚胎干细胞拟胚体的细胞集落,从大的细胞团块上进行分离时,要保持分离出的小细胞集落周围边界整齐、细

胞集落致密。只有小细胞集落边缘整齐且细胞集落比较致密时才有利于同小鼠早期胚胎充分接触,形成嵌合共生胚。然后,尝试在嵌合用培养液中添加 LIF 或相关的细胞因子。在使用人皮肤成纤维细胞拟胚体细胞集落嵌合时,发现部分嵌合用的细胞集落不能参与嵌合而出现细胞集落死亡,主要表现为荧光显微镜下表达绿色荧光蛋白的人皮肤成纤维细胞失去荧光,细胞集落粘附在胚胎外周(见图 9、10)。分析认为在嵌合用的培养液中缺乏小鼠胚胎干细胞维持未分化状态所必须的 LIF,在未添加 LIF 的情况下小鼠胚胎干细胞同数量较多的人皮肤成纤维细胞一起生长时容易出现衰老死亡。总之,通过对嵌合共生体系中的一些环节进行改进和完善,会显著提高嵌合胚的形成比率。

此次研究中通过胚胎干细胞拟胚体环境介导,人皮肤成纤维细胞能够成功嵌合入小鼠胚胎形成嵌合共生体系,为研究成体细胞在胚胎微环境的生长发育和分子调控机制等奠定了基础和提供了思路。

参考文献

- [1] Zeng F, Chen M J, Baldwin D A, et al. Multiorgan engraftment and differentiation of human cord blood CD34⁺ Lin-cells in goats assessed by gene expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(20):7801-806.
- [2] Kulesa P M, Kasemeier-Kulesa J C, Teddy J M, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3752-3757.
- [3] Chen F G, Zhang W J, Bi D, et al. Clonal analysis of nestin (-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci*, 2007, 120 (Pt16):2875-2883.
- [4] Sterin-Borda L, Furlan C, Orman B, et al. Differential regulation on human skin fibroblast by alpha1 adrenergic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(9):1401-1142.
- [5] Meng G L, Zur Nieden N I, Liu S Y, et al. Properties of murine embryonic stem cells maintained on human foreskin fibroblasts without LIF. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(4): 614-622.
- [6] Amit M, Margulets V, Segev H, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 2003, 68(6): 2150-2156.
- [7] Inzunza J, Gertow K, Strömberg M A, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells*, 2005, 23(4): 544-549.
- [8] Valbuena D, Galán A, Sánchez E, et al. Derivation and characterization of three new Spanish human embryonic stem cell lines (VAL-3 -4 -5) on human feeder and in serum-free conditions. *Reprod Biomed*, 2006, 13(6): 875-886.
- [9] Nieto A, Cabrera C M, Catalina P, et al. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. *Cell Biol Int*, 2007, 31 (3): 269-278.
- [10] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318 (5858): 1917-1920.
- [11] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [12] LinksGaly A, Roncarolo M G, Thrasher A J. Development of lentiviral gene therapy for Wiskott Aldrich syndrome. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8(2): 181-190.
- [13] Tannemaat M R, Boer G J, Verhaagen J, et al. Genetic modification of human sural nerve segments by a lentiviral vector encoding nerve growth factor. *Neurosurgery*, 2007, 61(6): 1286-1294.
- [14] Kim M, Carman C V, Yang W, et al. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin {alpha}L{beta}2. *J Cell Biol*, 2004, 167(6): 1241-1253.
- [15] Luo B H, Carman C V, Springer T A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 619-647.
- [16] Shimaoka M, Takagi J, Springer T A. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002, 31: 485-516.
- [17] Illera M J, Lorenzo P L, Gui Y T, et al. A role for alphavbeta3 integrin during implantation in the rabbit model. *Biol Reprod*, 2003, 68 (3): 766-771.
- [18] Tian X, Morris J K, Linehan J L, et al. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp Hematol*, 2004, 32(10): 1000-1009.
- [19] Kaufman D S, Hanson E T, Lewis R L, et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(19): 10716-10721.
- [20] Vodyanik M A, Bork J A, Thomson J A, et al. Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*, 2005, 105(2): 617-626.
- [21] Qiu C, Hanson E, Olivier E, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Exp Hematol*, 2005, 33(12): 1450-1458.
- [22] Fu J R, Liu W L, Zhou Y F, et al. Expansive effects of aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cells on hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118 (23): 1979-1986.
- [23] Wang J, Zhao H P, Lin G, et al. In vitro hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells induced by co-culture with human bone marrow stromal cells and low dose cytokines. *Cell Biol Int*, 2005, 29(8): 654-561.
- [24] Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz P G, et al. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(2): 410-411.
- [25] Gage F H. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287 (25): 1433-1438.
- [26] Davis M E, Hsieh P C, Takahashi T, et al. Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006, 103(21): 8155-8160.
- [27] Fu X, Sun X, Li X, et al. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo. *Lancet*, 2001, 358(9287): 1067-1068.