

小鼠 ES 细胞条件培养基对绵羊类胚胎干细胞克隆、传代的影响

白昌明^{1,3}, 王新庄^{1*}, 闫颖颖², 和小娥¹, 张静芳²

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100;

3. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘要: 本研究以无血清培养基为基础培养液, 旨在探求小鼠 ES 细胞条件培养液 (ESCCM) 和 2 种不同饲养层对绵羊类 ES 细胞分离、克隆效率的影响。绵羊内细胞团从胚胎中分离得到后, 分别以小鼠胎儿成纤维细胞 (MEF) 和绵羊胎儿成纤维细胞 (SEF) 为饲养层进行培养。结果在 MEF 饲养层上, 绵羊类 ES 细胞在 ESCCM 新培养系统中可稳定传至第 10 代, 而使用基础培养液最多传至 5 代。而在 SEF 饲养层上, 绵羊类 ES 细胞在 ESCCM 新培养系统中仅能传至 3 代。表明使用 ESCCM 和 MEF 能促进绵羊类 ES 细胞的分离和克隆。对类 ES 细胞进行核型分析、AKP 染色及体外分化能力检测, 证实所分离的类 ES 细胞符合 ES 细胞的主要特征, 而且发现这些类 ES 细胞可以表达胚胎干细胞关键转录因子 Nanog。结果表明, ESCCM 可显著提高绵羊类 ES 细胞的分离克隆效率, 原因可能是小鼠 ES 细胞在生长过程中可能分泌某些重要的细胞因子, 从而达到促进绵羊 ES 细胞增殖的作用。且 MEF 比 SEF 更适合于绵羊类 ES 细胞的分离和传代。

关键词: 绵羊类 ES 细胞; 小鼠 ES 细胞条件培养基; 自我更新

中图分类号: S814; Q813.11

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)09-1327-06

The Effects of Mouse ES Cell Conditioned Medium on Isolation and Cloning of Sheep Embryonic Stem-like Cells

BAI Chang-ming^{1,3}, WANG Xin-zhuang^{1*}, YAN Ying-ying², HE Xiao-e¹, ZHANG Jing-fang²

(1. College of Husbandry and Animal Medicine Engineering, Henan Agricultural University,

Zhengzhou 450002, China; 2. College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and

Forestry University, Yangling 712100, China; 3. Institute of Zoology, Chinese

Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: In order to evaluate the efficiency of mouse embryonic stem cells conditioned medium (ESCCM) and two kinds of feeder layers on self-renewal of sheep embryonic stem-like cells, serum-free media was used to derive sheep embryonic stem (ES)-like cells from embryos. Inner cell masses (ICM) were isolated and grown on the mouse embryonic fibroblasts (MEF) and sheep embryonic fibroblasts (SEF) as feeder layers respectively. The sheep ES-like cells were found to be easily obtained and remained undifferentiated for 10 passages in the new culture system with MEF, and 3 passages with SEF feeder layer. However, when cultured in medium without ESCCM, goat ES-like cells could not survive for more than 5 passages. Sheep ES-like cells isolated from ICMs had a normal karyotype and highly expressed alkaline phosphatase. Multiple differentiation potency of the ES-like cells was confirmed by expressing a novel ES cells specifically expressed transcription factor (Nanog) and forming embryoid bodies in suspension culture. These

收稿日期: 2008-09-05

基金项目: 河南农业大学人才引进基金

作者简介: 白昌明(1982-), 男, 河南扶沟人, 博士, 主要从事胚胎干细胞建系和应用研究, E-mail: cmbai@ioz.ac.cn

* 通讯作者: 王新庄, E-mail: wangxinzhuang@yahoo.com.cn

results suggest that mouse ES cells might secrete some factors which play important roles in promoting sheep ES-like cells' self-renewal. Additionally, the results also indicated that MEF is more suitable for the isolation and passage of sheep ES-like cells.

Key words: sheep embryonic stem-like cell; mouse embryonic stem cells conditioned medium; self-renewal

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES cells)是从早期胚胎内细胞团(Inner cell mass, ICM)分离出来、可在体外连续增殖而不分化并具备全能性的细胞^[1-3]。分离克隆 ES 细胞最常用的方法是饲养层法。在 ES 细胞研究早期,主要采用鼠胚胎成纤维细胞(Mouse embryo fibroblast, MEF)或同源胎儿成纤维细胞作饲养层细胞^[4],用条件培养基培养 ES 细胞^[1-5]。Martin^[2]用培养过畸胎瘤细胞的培养液配置的条件培养液首次成功地分离出了小鼠 ES 细胞。由于条件培养基里含有多种细胞因子,能较好地维持 ES 细胞的自我更新和增殖,故在 ES 细胞研究的初期,条件培养基被广泛采用。目前,研究得比较多的是用 Buffalo 大鼠肝脏细胞株 BRL(BRL-CM)和大鼠心肌细胞制作条件培养基(RH-CM),并证明这 2 种细胞均能分泌抑制胚胎干细胞分化的因子,可有效抑制 ES 细胞的分化,促进其生长^[5-6]。但是这些研究仅仅从外源性分泌因子角度来研究 ES 细胞增殖和多能性维持,而忽视了 ES 细胞通过自分泌和旁分泌方式产生的细胞因子在 ES 细胞增殖和多能性维持方面的潜在作用^[7]。正是基于这一点,我们希望能通过使用这些含有自分泌和旁分泌因子的小鼠 ES 细胞条件培养基,达到提高绵羊 ES 细胞分离、克隆和建系效率的目的。

本研究以受精后 5.5~6 d 的小尾寒羊胚胎为材料,探讨了小鼠胚胎干细胞条件培养基(Mouse embryonic stem cells conditioned medium, ESC-CM)和 MEF 或 SEF 对绵羊类 ES 细胞分离、传代的影响,希望达到优化绵羊类 ES 细胞培养系统的目的。

1 材料与方 法

1.1 绵羊胚胎的收集与培养

胚胎供体为健康的 3~4 岁小尾寒羊,采用的是递减法注射促卵泡素(FSH)(4 mL/4 mL、3 mL/3 mL、2 mL/2 mL、1 mL/1 mL),连续 4 d 早晚间隔 12 h 注射进行超数排卵处理,经处理的母羊发情后进行人工授精,分别于授精后 5.5~6 d 经外科手

术法用含 5% 新生牛血清的 PBS 冲胚液冲取胚胎,将收集到的胚胎用 PBS 液清洗 3~4 次后装管,然后迅速带回实验室,于已制备好的饲养层上培养^[8]。

1.2 饲养层细胞的制备

绵羊胎儿取自附近屠宰站, KM 小鼠购自河南医科大学实验动物中心。原代小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)取自怀孕 13~14 d 的孕鼠。培养基为含 15% 胎牛血清(Gibco)的 DMEM/F-12,另添加 2 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺(Sigma)、100 IU·mL⁻¹青霉素+100 IU·mL⁻¹链霉素。在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养,取对数生长期的 MEF,加入含 5 μg·mL⁻¹ 丝裂霉素 C 溶液(mitomycin-C, Sigma)的 DMEM/F-12 液(含 15% 胎牛血清)处理 2~3 h,倒出丝裂霉素 C 溶液, DPBS(Gibco)洗涤 4~6 次,用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化细胞,以 3×10⁶ 个·mL⁻¹ 密度接种于经 0.1% 明胶(Gelatin, Sigma)水溶液处理的 4 孔培养皿(NUNC)上,每孔接种 0.6 mL 细胞悬液。用前 2 h 更换为 ES 细胞培养液或 ESCCM^[9]。SEF 的分离培养与 MEF 的操作过程相同。

1.3 小鼠 ES 细胞条件培养液制备

取怀孕 3~4 d 小鼠,常规方法冲取胚胎接种到新制 MEF 饲养层上,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养,ES 细胞基础培养液为含 15% KSR(Gibco)的 knockoutDMEM/F-12(Gibco),另添加 2 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺(Sigma),100 IU·mL⁻¹ 青霉素+100 IU·mL⁻¹ 链霉素,0.1 mmol·L⁻¹ β-巯基乙醇,1 000 IU·mL⁻¹ LIF(Sigma)和 10 ng·mL⁻¹ bFGF,以 1:2 比例传代培养。以后每 48 h 收集培养液 1 次,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,收集上清液,0.2 μm 孔径滤器过滤,冻存^[10]。

1.4 绵羊内细胞团的分离、传代

所获取的绵羊胚胎分别于不同饲养层上的培养液 A(含 40% ESCCM 的 ES 细胞条件培养液)中和以 MEF 为饲养层的培养液 B(ES 细胞基础培养液)中培养 7~9 d,待内细胞团(ICM)充分长大、出现卵圆柱状或岛状形态时,对其进行分离。在体视显微

镜下(40×),用拉制的巴氏管将 ICM 从下层的滋养层细胞切割下来,转入 PBS 液滴中洗涤 2 次,再转入上层覆盖石蜡油的 Tryple 消化液(Gibco)滴中,在 CO₂ 培养箱中作用 5 min 左右。用另一支口径小于 ICM 细胞团的巴氏管吸入含血清的培养液,轻轻将细胞团离散为细胞小团块。将离散后的微滴内容物转入一个新制饲养层 4 孔培养板内继续培养,每日观察,每 2 d 更换培养液 1 次。经 4~6 d 培养类 ES 细胞集落,待其边缘开始出现细胞分化时进行传代,记为 F₁,用相同的方法对 F₁ 代类 ES 细胞集落进行分离、传代后,重新接种于饲养层上,再出现的 ES 集落记为 F₂,依次类推^[8,10]。

1.5 碱性磷酸酶染色

对得到的 ES 细胞进行碱性磷酸酶染色鉴定,按试剂盒(南京建成生物工程研究所)提供的方案进行操作。

1.6 核型分析

取处于旺盛生长期的类 ES 细胞,消化、离心,用细胞培养液制成悬液,接种于培养皿中,移入培养箱培养 20~72 h。吸出培养液,用含 0.2 μg·mL⁻¹秋水仙素的培养液继续培养 3~4 h。消化离心后,用 0.075 mol·L⁻¹ KCl(Sigma)在 38.5 °C 低渗处理 30 min。而后用新鲜配置的固定液(甲醇:冰醋酸按 3:1)固定后以 50~60 cm 距离滴片。最后用 5% 吉姆萨染色液室温下作用 10 min,自来水冲洗载玻片背面。在 1 000× 油镜下观察染色体的分布情况^[11]。

1.7 ES 细胞体外分化能力鉴定

将 ES 细胞消化成小细胞团或单个细胞后,接种于铺有 10 g·L⁻¹ 低熔点琼脂糖的 60 mm 培养皿上,悬浮培养,培养液含有 15% 胎牛血清、2 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺(Sigma)和 100 IU·mL⁻¹ 青霉素+100 IU·mL⁻¹ 链霉素的 knockoutDMEM/F-12,每 2 d 换液 1 次,取 5 d 左右形成的类胚体,接种于 0.1% 明胶铺被的 4 孔培养皿内,观察分化细胞的产生情况^[7,11]。

1.8 Nanog 基因的表达检测

RNA 提取和反转录具体步骤按试剂盒提供的说明书进行,反转录出第一条 cDNA 链以后,进行 PCR 扩增。同时,利用 *βactin*(持家基因,作为阳性对照)对绵羊类 ES 细胞的 mRNA 进行 RT-PCR 扩增。*Nanog* 上游引物为 5'-ACCTCAGTCTCCAG-CAAA-3',下游引物为 5'-AGAGTTCACCAA-CACCC-3',预期产物大小为 209 bp。*Oct-4* 上游引

物为 5'-GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTTC-3',下游引物为 5'-CAAAGCTCCAGGTTCTCT-TG-3',预期产物大小为 636 bp。*βactin* 上游引物为 5'-CCATCGGCAATGAGCC-3',下游引物为 5'-CCGTGTTGGCGTAGAGGT-3',预期产物大小为 149 bp。PCR 条件为:95 °C 4 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 1.5 min,30 个循环;72 °C 15 min。最后用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 *Nanog* 的表达情况^[11]。

2 结果

2.1 绵羊类 ES 细胞的分离与培养

本试验共从 30 只小尾寒羊中采集到 56 枚可用胚(图 1)。把收集到的绵羊胚胎接种到制备好的饲养层上,24 h 后囊胚腔扩大,内细胞团集中于胚胎的一侧,部分胚胎开始脱去透明带,60 h 后大部分胚胎已脱去透明带。脱去透明带的囊胚贴壁后,囊胚外层的滋养层细胞长出,贴壁在饲养层细胞上,同时内细胞团也开始迅速增殖,细胞变小变紧密。内细胞团呈克隆样生长,可与滋养层细胞明显区分,此时胚外内胚层并不明显。第 3 天,胚外内胚层已经形成,呈长梭形紧紧包裹在内细胞团之外。胚胎培养 4~6 d 后,胚胎的内细胞团增殖为山丘样,形似山丘状隆起。在这些内细胞团的密集细胞中有立体感强、折光好的立体结构(图 2)。贴壁的胚胎开始生长较缓慢,随后生长速度加快。羊胚贴壁生长 7~8 d 后,可将内细胞团离散进行传代。AKP 染色后,ICM 表现出强阳性。ICM 集落越大,立体感越强(图 3),在随后的传代过程中越容易成功。相反,呈现扁平状的 ICM,通常会在随后的培养过程中发生分化,难以传代。

2.2 不同培养基和饲养层对绵羊类 ES 细胞分离培养的影响

在同种饲养层(MEF)条件下,接种于培养液 B 中的胚胎有 75%(15/20)脱带并贴壁生长,与接种于培养液 A 中胚胎的贴壁率 78.5%(16/20)相比差异不显著。但接种于培养液 A 中的胚胎有 2 个传至 10 代,而接种于培养液 B 中的胚胎仅有 1 个传到第 5 代(表 1)。结果表明,培养液 A 更有利于绵羊类 ES 细胞的传代。

同时使用优化的培养液 A 的情况下,接种于饲养层 MEF 上的胚胎贴壁率为 78.5%(16/20),显著高于接种于 SEF 上的贴壁率 56.2%(9/16),传代数也明显高于 SEF 组(表 1)。结果表明,与 SEF 相比,MEF 更有利于绵羊类 ES 细胞的分离传代。

表 1 绵羊类胚胎干细胞在不同培养液及饲养层上的生长、传代情况

Table 1 Passages of sheep ES-like cells cultured in different media and on different feeder layers

培养液 Medium	饲养层 Feeder layer	处理胚胎数 No. of embryos	胚胎贴壁率 Percentage of attached ICM	绵羊类 ES 细胞传代情况 The passages of the ES-like cells									
				F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
A	MEF	20	78.5%(16/20) ^a	12	9	8	7	5	3	2	2	2	2
B	MEF	20	75.0%(15/20) ^a	10	7	4	2	1	0	0	0	0	0
A	SEF	16	56.2%(9/16) ^b	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0

上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)

Different letters in the same row means significant difference between treatments ($P < 0.05$), same letter in the same row means no significant difference between treatments ($P > 0.05$)

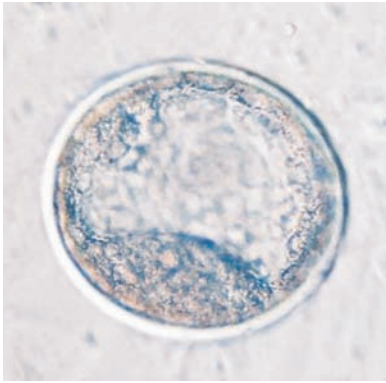


图 1 绵羊囊胚(100×)
Fig. 1 Sheep Blastocyst(100×)

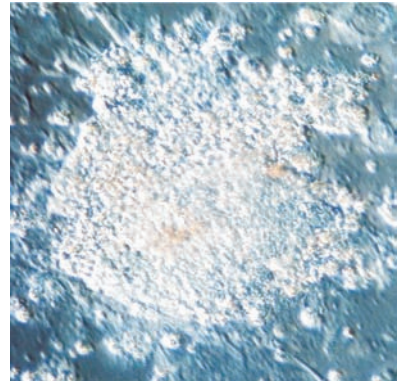


图 2 贴壁生长的 ICM(200×)
Fig. 2 Adhesion of ICM to flask(200×)

2.3 AKP 染色

AKP 染色阳性是未分化 ES 的典型特征, 检测表明未分化的类 ES 细胞经碱性磷酸酶(AKP)染色为蓝紫色, 而饲养层细胞和分化的细胞不着色(图 3)。

2.4 核型分析

将传至 7 代的绵羊类 ES 细胞集落进行染色体分析, 结果表明, 76%(26/34)能维持正常的二倍体核型(图 4)。保持正常的核型不仅是建立能稳定传

代的 ES 细胞系的前提, 也是 ES 细胞保持多能性和全能性的基础。

2.5 ES 细胞体外分化能力

将典型 ES 细胞集落细胞消化为小团块, 在铺有 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 低熔点琼脂糖培养皿中悬浮培养, 细胞集落可以自发地相互聚集, 5 d 后有球形 EB(类胚体)形成(图 5)。说明该绵羊类 ES 细胞具有体外分化多能性的潜能。

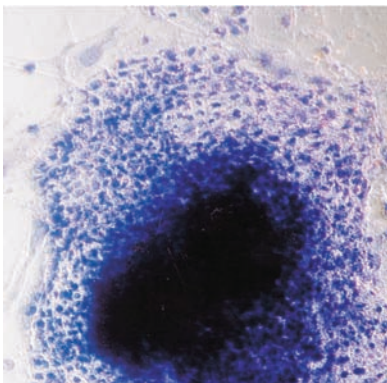


图 3 ES 细胞的 AKP 染色(100×)
Fig. 3 Positive staining for AKP
(100×)

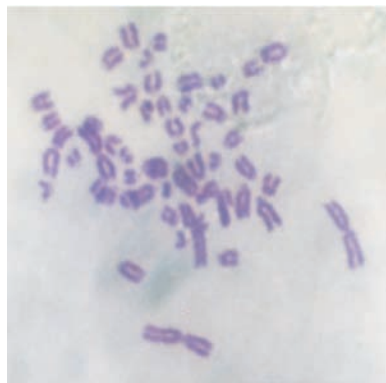


图 4 正常的二倍体核型(1 000×)
Fig. 4 The normal karyotype of
ES-like cells(1 000×)

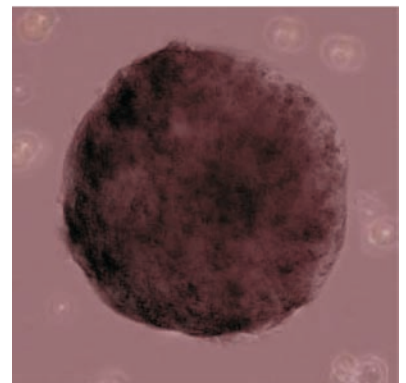
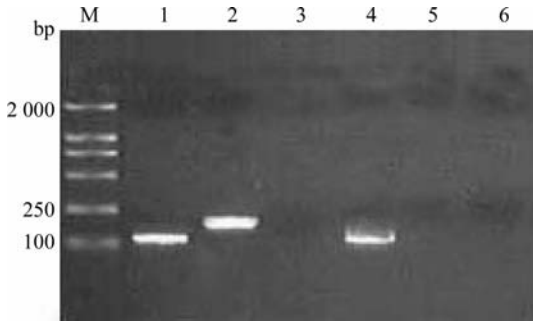


图 5 类胚体(100×)
Fig. 5 Embryoid body(100×)

2.6 RT-PCR 检测

从检测结果(图 6)可以看出绵羊类 ES 细胞和 MEF 均可表达看家基因 $\beta actin$, 而只有绵羊类 ES 细胞可以表达 $Nanog$ 。



1. 绵羊类 ES 细胞表达 $\beta actin$; 2. 绵羊类 ES 细胞表达 $Nanog$; 3. 绵羊类 ES 细胞未表达 $Oct-4$; 4. MEF 细胞表达 $\beta actin$; 5. MEF 未表达 $Oct-4$; 6. MEF 未表达 $Nanog$; M. DNA 相对分子质量标准

1. $\beta actin$ was expressed in sheep ES-like cells; 2. $Nanog$ was expressed in sheep ES-like cells; 3. $Oct-4$ was not expressed in sheep ES-like cells; 4. $\beta actin$ was expressed in MEF; 5. $Oct-4$ was not expressed in MEF; 6. $Nanog$ was not expressed in MEF; M. DNA marker

图 6 特异性转录因子在绵羊类胚胎干细胞中的表达情况

Fig. 6 The specific mRNA expression in sheep ES-like cells

3 讨论

由试验结果可知,添加 40% ESCCM 条件培养液能促进绵羊类 ES 细胞的克隆、传代,并且传代后的类 ES 细胞仍然保持了其分化的多能性和稳定核型。2 种饲养层相比较,MEF 较 SEF 更适合于绵羊类 ES 细胞的分离、传代。

饲养层对维持 ES 细胞的未分化状态具有重要作用。饲养层来源主要有:STO 细胞系、MEF 和同源胎儿成纤维细胞。但不同动物对饲养层细胞有一定选择性。尚克刚等^[12]比较了 STO 和 PMEF 饲养层在分离小鼠 ES 细胞时的不同效果,尽管使用这 2 种饲养层均获得了来自小鼠囊胚的 ES 细胞,但 STO 维持生长的 ES 细胞存活率和嵌合力均低于 PMEF,且核型异常的 ES 细胞的比率相对较高。将羊、猪和小鼠胚胎在不同的饲养层上培养发现,羊整胚或分离的 ICM 在 STO 饲养层上不扩展,但在羊胎儿成纤维细胞饲养层上能很好地增殖^[13]。在胎牛肝成纤维细胞 (bFLF) 上能分离到绵羊和山羊类

ES 细胞,但在 STO、OTE(绵羊输卵管上皮细胞)、OUE(绵羊子宫上皮细胞)等饲养层上却不能分离到^[14]。

本试验采用 MEF 和 SEF 进行绵羊类 ES 细胞分离、克隆。在 ESCCM 培养体系下,绵羊类 ES 细胞在 MEF 和 SEF 上的贴壁率分别为 78.5%、56.2%。在 MEF 上共分离到 16 个类 ES 细胞集落,其中有 2 个集落传至第 10 代;在 SEF 上分离到 9 个类 ES 细胞集落,其中有 2 个集落传至第 3 代。2 种饲养层细胞对胚胎细胞的贴壁率、内细胞团的增殖率的影响有显著差异。所得绵羊类 ES 细胞能表达 ES 细胞特异性转录因子 $Nanog$, 而没有发现有 $Oct-4$ 的表达(图 6),可能是由于小鼠 $Oct-4$ 的特异性引物(目前缺乏绵羊 $Oct-4$ 基因序列信息设计特异性引物)不适宜于扩增绵羊 $Oct-4$ 的 mRNA 序列所造成的。

小鼠 ESCCM 对绵羊 ES 细胞的分离、克隆的促进作用,可能是由于小鼠 ES 细胞分泌产生多种 ES 细胞特异性细胞因子。之前的研究表明 LIF(白血病抑制因子)、 $Oct-4$ 和 $Nanog$ 等细胞因子在小鼠 ES 细胞的全能性维持以及增殖中起到了关键的作用^[15-17]。其中 LIF 通过 gp130 受体激活 Jak/STAT 信号通路来促进 ES 细胞增殖^[17]。 $Oct-4$ 能通过多种调控机制激活或抑制不同靶基因的转录。 $Oct-4$ 基因敲除小鼠虽然能发育到类似囊胚的阶段,然而该囊胚 ICM 中的细胞不具有发育全能性。ES 细胞自身也能分泌 $Oct-4$, 并在维持干细胞全能性方面起着重要作用^[16]。近年来,利用数据库表达差异筛选和 cDNA 库功能差异筛选发现 $Nanog$ 是维持 ES 细胞全能性的又一重要转录因子^[18]。Mitsui 等^[19]的研究证明 $Nanog$ 是独立于 LIF/gp130 之外的另外一个途径。在本试验中,3 组都添加了等量的 LIF,然而使用含有 ESCCM 培养基的试验组中绵羊类 ES 细胞最高传至 10 代,而不含 ESCCM 的试验组中类 ES 细胞最高传至 5 代。这一点说明除 LIF 之外还有其他未知的细胞因子参与了 ES 细胞的全能性维持及增殖过程。可能 ESCCM 中的这些未知因子正是通过调节 $Oct-4$ 的表达对 ES 细胞起作用的。这还需要做进一步的研究来探明究竟是哪种因子在这个过程中起作用。

尽管利用小鼠 ESCCM 条件培养液可使绵羊类 ES 细胞传至 10 代,并保持未分化状态,但是在随后的传代过程中,发现大部分类 ES 细胞逐渐分化。

这说明小鼠 ESCCM 条件培养液还不能完全阻止绵羊类 ES 细胞的未分化状态。可能因为绵羊类 ES 细胞的全能性维持还与绵羊类 ES 细胞之间的相互作用有关,而在类 ES 细胞传代过程中又必须把干细胞集落消化为单细胞,否则得到的干细胞团很容易分化。这一矛盾关系可能也是绵羊类 ES 细胞不能稳定建系的一个原因。

4 结 论

本研究以无血清培养基为基础培养液,探讨了添加小鼠 ES 细胞条件培养液以及使用 MEF 或 SEF 2 种不同饲养层对绵羊类 ES 细胞分离、克隆效率的影响,得出以下结论:在基础培养基的基础上,添加 40% ESCCM 可以显著提高绵羊类 ES 细胞的传代效率;同时使用优化的条件培养基时,MEF 比 SEF 更适合于绵羊类 ES 细胞的分离和传代。

致谢:感谢冯勋伟、李义书、王轶敏等为本试验绵羊胚胎的冲取和试剂、耗材采购过程中提供诸多帮助。

参考文献:

- [1] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156.
- [2] MARTIN G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 1981, 78(12): 7634-7638.
- [3] SMITH T, HOOPER M. Medium conditioned by feeder cells inhibits the differentiation of embryonal carcinoma cultures [J]. *Experimental Cell Research*, 1983, 145(2): 458-462.
- [4] WOBUS A, HOLZHAUSEN H, JAKEL P, et al. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from mouse embryo [J]. *Exp Cell Res*, 1984, 152: 212-219.
- [5] 童 英, 邹冀中, 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 [J]. 北京大学学报(自然科学版), 2000, 36(4): 472-476.
- [6] 韩 嵘, 柴桂莹, 尚克刚. 大鼠心肌条件培养基对形成小鼠 ES 细胞集落的影响 [J]. 北京大学学报(自然科学版), 1997, 33(2): 185-188.
- [7] TIAN H B, WANG H, SHA H Y, et al. Factors de-

rived from mouse embryonic stem cells promote self-renewal of goat embryonic stem-like cells [J]. *Cell Biology International*, 2006, 30(5): 452-458.

- [8] 白昌明, 刘丑生, 王新庄, 等. 不同培养体系对绵羊类胚胎干细胞分离、传代的影响 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(7): 1268-1273.
- [9] 李吉霞, 王新庄, 李权武, 等. 昆明白小鼠胚胎生殖细胞的分离与培养 [J]. 中国兽医科技, 2005, 35(10): 790-793.
- [10] 郭志林, 王新庄, 王 木, 等. 影响昆明小鼠和 BALB/c 小鼠 ES 细胞分离、克隆、传代的若干因素 [J]. 中国兽医学报, 2006, 26(4): 448-450.
- [11] 王 宏, 田海滨, 陈 娟, 等. Knockout 血清替代品可提高 C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞建系效率 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(3): 269-272.
- [12] 尚克刚, 胡新立, 李子玉, 等. 饲养层对维持新建 ES 细胞系的影响 [J]. 北京大学学报(自然科学版), 1994, 30(4): 500-508.
- [13] PIEDRAHITA J A, AMDERSON G B, BONDY R, et al. Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines [J]. *Theriogenology*, 1990, 34(5): 866-877.
- [14] MEINECKE-TILLMANN S, MEINECKE B. Isolation of ES-like cell lines from bovine and caprine pre-implantation embryos [J]. *J Anim Breed Genet*, 1996, 113: 413-421.
- [15] NICHOLS J, ZEVNIK B, ANASTASSIADIS K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 [J]. *Cell*, 1998, 95(3): 379-391.
- [16] PESCE M, SCHOLER HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(4): 271-278.
- [17] RAZ R, LEE CK, CANNIZZARO L, et al. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency [J]. *Proceedings of National Academy of Science*, 1999, 96(6): 2846-2851.
- [18] CHAMBERS I, COLBY D, ROBERTSON M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2003, 113(5): 643-655.
- [19] MITSUI K, TOKUZAWA Y, ITOH H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells [J]. *Cell*, 2003, 113(5): 631-642.