

悬滴培养法促进鸡胚胎干细胞形成类胚体

张 蕾^{1,2}, 王宵燕¹, 左其生¹, 路镇宇¹, 王 飞¹, 纪艳芹¹, 王颖洁¹, 张亚妮^{1*}, 李碧春^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;

2. 江苏农牧科技职业学院, 泰州 225300)

摘 要: 本研究旨在通过悬浮培养法培养鸡胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs), 摸索鸡胚胎干细胞形成类胚体(Embryoid body, EB)的最佳方案, 以期提高鸡胚胎干细胞体外诱导效率。将鸡 ESCs 培养传代至第 3 代, 采用 1×10^4 、 3×10^4 和 6×10^4 mL^{-1} 3 个细胞浓度, 使用悬滴培养后, 观察类胚体的形成效率。对悬滴培养形成的类胚体进行形态学观察, qRT-PCR 检测干细胞标记基因的表达, 免疫细胞化学检测相关蛋白的表达, 并进行类胚体自分化检测和核型分析。 3×10^4 mL^{-1} 细胞浓度生成的类胚体数量最高, 单个视野下可观察到约 267 个类胚体, 且形成的类胚体大小均一, 呈圆球状。qRT-PCR 检测结果表明, 在类胚体形成 48 h 内, 干细胞标记基因 *Nanog*、*Sox2*、*Oct4* 和 *C-kit* 仍维持表达。免疫细胞化学检测显示, 该方法形成的类胚体表面抗原检测 *Nanog* 和 SSEA-1 呈阳性。自分化检测三胚层分化标记基因 SOX17、SMA 和 TUJ-1 呈阳性。核型分析显示, 悬滴培养形成的类胚体具有并保持正常的核型。鸡 ESCs 悬滴培养形成类胚体的适宜细胞浓度为 3×10^4 mL^{-1} , 且形成的类胚体可分化成 3 个胚层, 用于体外定向诱导过程。本研究建立了鸡 ESCs 体外悬滴培养形成类胚体的培养体系, 为后期信号通路的体外验证提供试验基础。

关键词: 类胚体; 悬滴培养; 鸡; 胚胎干细胞

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)08-1333-08

Embryoid Body Formation from Chicken Embryonic Stem Cells through Suspension Culture

ZHANG Lei^{1,2}, WANG Xiao-yan¹, ZUO Qi-sheng¹, LU Zhen-yu¹, WANG Fei¹, JI Yan-qin¹,
WANG Ying-jie¹, ZHANG Ya-ni^{1*}, LI Bi-chun^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Breeding Reproduction and Molecular Design for Jiangsu Province,
College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

Abstract: This experiment was conducted to explore the best suspension culture system for embryoid body (EB) formation from chicken embryonic stem cells (ESCs), and to improve the induction efficiency of chicken ESCs *in vitro*. Pure clones from the third generation of chicken ESCs was collected, re-suspended the cells into 3 cell concentrations: 1×10^4 , 3×10^4 and 6×10^4 mL^{-1} to make suspension culture. Morphology changes of EB were observed, qRT-PCR and immunofluorescence methods were used to detect the marker genes' expression, self-differentiation and karyotype analysis were made to make full test of EB. The results showed that, the amount of EB with 3×10^4 mL^{-1} cell concentration was higher than the other groups, and the number of EB reached 267 in one single view with the same spherical shape. The stem cell marker genes *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* and *C-kit* remained expression with 48 h of EB formation, and stem cell surface specific anti-

收稿日期: 2014-12-11

基金项目: 国家自然科学基金(31272429; 31472087); 江苏省研究生科研创新基金(CXZZ13_0909)

作者简介: 张 蕾(1987-), 女, 江苏常州人, 博士, 主要从事胚胎干细胞体外诱导研究, E-mail: leizhang17@sina.com

* 通信作者: 张亚妮, 讲师, 博士, 主要从事动物遗传工程研究; 李碧春, 教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程与遗传工程研究, E-mail: yubeli@

gen (*Nanog* and *SSEA-1*) detection was positive. After self-differentiation of EB, 3 embryonic germ layers specific antigen (*SOX17*, *SMA* and *TUJ-1*) detection all showed positive. Karyotype analysis showed that the formatted EB maintained normal karyotype. The results indicated that the suitable concentration for chicken ESCs form the EB through suspension culture was $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, and the formatted EB had viability to provide experimental foundation for chicken ESCs induction *in vitro*.

Key words: embryoid body; suspension culture; chicken; embryonic stem cells

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs)具有多向分化的潜能,能够分化成包括内胚层、中胚层和外胚层 3 个胚层在内的各种类型细胞,因此 ESCs 不仅仅可应用于早期胚胎发育的研究,还可作为细胞替代治疗和药物筛选等的细胞来源。胚胎干细胞的诱导分化是指在体外将胚胎干细胞定向诱导分化成具有功能的其他类型细胞,纯化的 ESCs 在非细胞因子体外培养条件下(无白血病抑制因子等细胞分化抑制因子)可自发形成类胚体(Embryoid body, EB)^[1-4]。EB 由分化细胞和未分化细胞组成,在形成阶段具有较强的分化潜能,故在 EB 早期形成阶段常被用于生产不同细胞系^[5]。EB 还被广泛用于特定组织细胞的诱导分化,有助于提高定向诱导的分化效率^[6-7]。因此,EB 的制备已经成为干细胞研究不可或缺的工具^[8-10]。

家禽是发育生物学中重要的动物模型,且从鸡胚中可以获得能够满足研究需要的鸡 ESCs,克服了取材和伦理上的限制。本课题组一直致力于家鸡 ESCs 的体外定向诱导分化研究^[11-13],通过特定的诱导体系诱导鸡 ESCs 形成雄性生殖细胞,然而诱导效率较低。本研究以家鸡为研究对象,采用悬滴培养方法,用不同细胞浓度的 ESCs 形成类胚体,并通过形态学、qRT-PCR 和免疫细胞化学检测形成的类胚体中全能性基因的表达。摸索鸡 ESCs 悬滴培养形成类胚体的最佳条件,通过类胚体进行体外诱导,从而进一步提高鸡雄性生殖细胞的诱导效率。该研究为进一步优化鸡 ESCs 向生殖细胞定向分化提供理论和试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜受精蛋来自中国农业科学院家禽研究所实验禽场如皋黄鸡鸡群。按 H. Eyal-Giladi 等^[14]方法分为Ⅸ~Ⅺ期,采用产蛋后 5 h 以内的鸡蛋进行鸡胚盘细胞的分离。

主要试剂:高糖 DMEM(Gibco, 美国);胎牛血清(Hyclone, 美国); β -巯基乙醇(BBI, 加拿大);胚胎阶段特异抗原 1(*SSEA-1*)、*Sox2* 和 IgG-FITC(Genetimes)(博奥森, 北京);鸡血清、L-谷氨酰胺、碱性成纤维生长因子(bFGF)、人干细胞因子(hSCF)、鼠白血病抑制因子(mLIF)(Sigma, 美国)。反转录试剂盒、荧光定量试剂盒(天根, 北京)。

1.2 方法

1.2.1 鸡 ESCs 的分离培养及鉴定 参照孙敏等^[13] ESCs 分离培养及传代步骤进行。

1.2.2 悬滴培养鸡 ESCs 将鸡 ESCs 培养传代至第 3 代,待 ESCs 克隆开始形成,大小相差不大时,加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Collage IV, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 消化 10 min, 加入含 5% FBS 的 DMEM 终止消化,收集 ESCs 克隆并制成细胞悬液。将细胞悬液进行细胞计数,设立 3 个细胞浓度: 1×10^4 、 3×10^4 和 $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, 每组 3 个重复。将 10 cm 的培养皿上盖打开,内表面朝上,25 μL 细胞悬液,逐滴整齐地滴加在皿盖上;在皿内加上 3 mL PBS 后,小心将皿盖扣至皿底上,再将培养皿放入培养箱中。采用倒置显微镜每隔 24 h 观察各组细胞的形态变化情况。

1.2.3 qRT-PCR 检测 各组细胞悬滴培养后,分别提取 0、24 和 48 h 的细胞总 RNA。每个时期均有 3 个重复。将获取的总 RNA 反转录试剂盒合成 cDNA,以 *\beta actin* 为内参基因,进行 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 所需引物信息见表 1。

1.2.4 免疫细胞化学检测 悬滴培养 48 h 后,用微量移液器将各组悬滴培养后形成的 EB 吸出,分别接种到多聚赖氨酸处理过的 24 孔板内。待细胞贴壁后,用 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 漂洗 3 次后,用 10% BSA-PBS 封闭液 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。分别滴加 1:200 倍稀释的一抗 anti-Nanog 和 anti-SSEA-1, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 45 min 后, PBST 漂洗 3 次。再以 1:100 倍稀释的 FITC 标记的二抗于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 45 min。PBST 漂洗 3 次后,甘油封片,倒置显

表 1 qRT-PCR 鉴定所需基因引物及片段大小

Table 1 Primer information for qRT-PCR

基因名称 Gene name	碱基序列(5'→3') Primer sequence		片段大小/bp Size
	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	
<i>Nanog</i>	F:TGGTTTCAGAACCAACGAATGAAG	R:TGCACTGGTTCACAGCCTGAAG	180
<i>Sox2</i>	F:GAAGATGCACAACCTCGGAGATCAG	R:GAGCCGTTTGGCTTCGTCA	100
<i>Oct4</i>	F:ACCAGCATCGAGACCAACGTGA	R:TTGCAGAACCAGACCCGGACA	117
<i>βactin</i>	F:CAGCCATCTTTCTTGGGTAT	R:CTGTGATCTCCTTCTGCATCC	164

显微镜下观察、拍照。

1.2.5 核型分析 悬滴培养 48 h 后,用含有 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 秋水仙素的高糖 DMEM 培养基培养 2~3 h。微量移液器将各组悬滴培养后形成的 EB 吸出,用 0.25%胰酶消化细胞。参照徐琪等^[15]方法进行核型分析。

1.2.6 数据处理 所有数据均采用 Office2010 Excel 进行统计处理,以“平均值±标准误”表示,采用 SPSS19.0 进行双因素方差分析。

2 结果

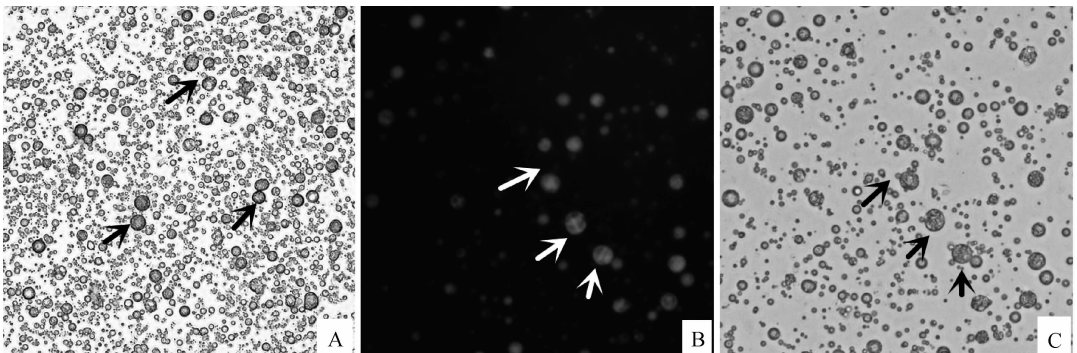
2.1 鸡 ESCs 的特异性鉴定

培养至第 3 代的 ESCs 可形成明显的细胞克隆,且克隆边界清晰,呈鸟巢状。对这些克隆进行多能性鉴定,结果显示:经 AKP 染色后,ESCs 克隆呈现棕红色(图 1A);SSEA-1 染色后,可在荧光显微镜下观察到 ESCs 表面的绿色荧光(图 1B)。该结果表明第 3 代的 ESCs 克隆保持有干性,还处于未分化状态。

2.2 悬滴培养制备类胚体

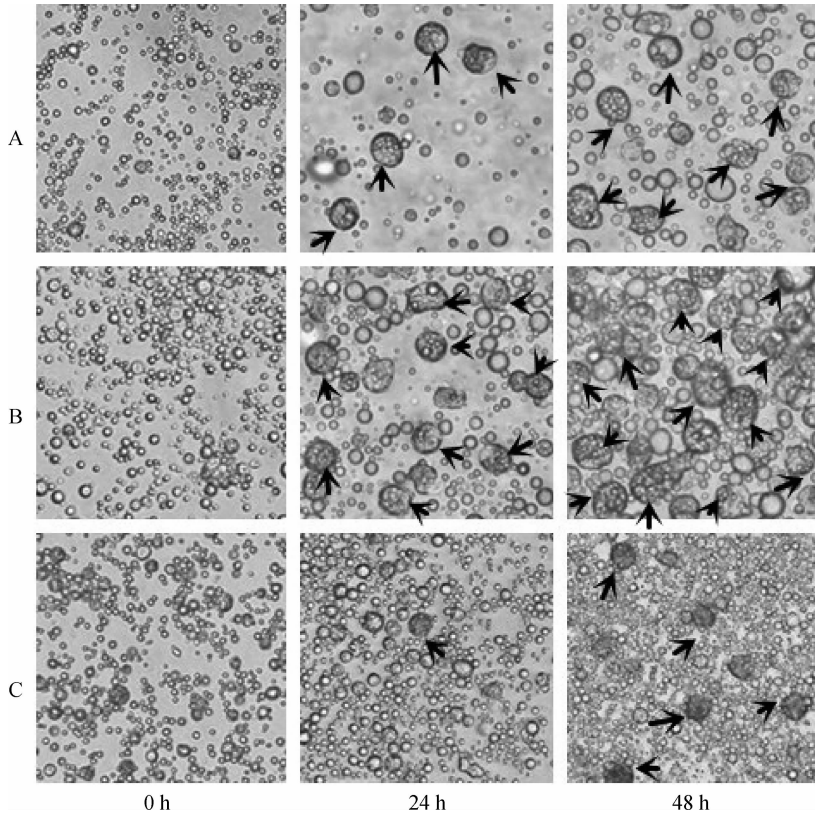
将培养至第 3 代鸡 ESCs 细胞消化成单细胞,用普通培养液分别重悬细胞至 1×10^4 、 3×10^4 和

$6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 3 个细胞浓度,进行悬滴培养。采用倒置显微镜在 0、24 和 48 h 观察各组细胞的形态变化情况(图 2)。单个视野内对形成的类胚体计数,统计 24 和 48 h 类胚体的形成数量,每组 3 个重复。结果发现: $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度悬滴培养 24 h 出现少量有 10~15 个细胞构成的圆球状类胚体,48 h 类胚体数量增多,体积增大,隐约可见中心有囊腔形成(图 2A); $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度悬滴培养 24 h 出现较多圆球状类胚体,48 h 类胚体体积增大,且数量增加,开始形成囊腔(图 2B); $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度悬滴培养 24 h 细胞开始增殖,并开始出现细胞聚集,有单个类胚体形成,且类胚体体积较小,约由 3~8 个细胞构成,48 h 出现少量圆球状类胚体,此时类胚体体积小于其他两组,未观察到囊腔形成(图 2C)。对单个视野下类胚体形成数量统计发现,悬滴培养 24 h 后, $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度单个视野下约有 22 个类胚体形成; $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度约有 53 个类胚体形成,显著高于其他两个试验组; $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度下细胞开始增殖并形成细胞集落,仅有约 3 个类胚体形成。悬滴培养 48 h 后,各组类胚体体积增大,且数量有不同程度的增加,对 1×10^4 、 3×10^4 和 $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 3 个细胞浓度形成的



A. ESCs 的 AKP 染色结果;B. ESCs 的 SSEA-1 染色结果(暗场);C. ESCs 的 SSEA-1 染色结果(明场)。→, ESCs 克隆
A. Stained ESCs by AKP;B. Stained ESCs by SSEA-1(dark field);C. Stained ESCs by SSEA-1(light field). →, ESCs clone

图 1 第 3 代鸡 ESCs 的特异性鉴定 400×
Fig. 1 Identification of the 3rd generation chicken ESCs 400×



A. $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度悬滴培养 24 h 出现少量圆球状类胚体, 48 h 类胚体数量增多, 体积增大, 隐约可见中心有囊腔形成; B. $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度悬滴培养 24 h 出现较多圆球状类胚体, 48 h 类胚体体积增大, 且数量大量增加; C. $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度悬滴培养 24 h 细胞开始增殖, 并出现少量集落, 48 h 出现少量圆球状类胚体。→. 类胚体

图 2 不同细胞浓度不同时间点 ESCs 细胞形态变化 $400 \times$

Fig. 2 The cell morphologic change at different time spots under different cell concentrations $400 \times$

类胚体统计数分别为 57、267 和 37。 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度悬滴培养 48 h 后, 类胚体数量极显著高于其他两个试验组(表 2)。

表 2 不同细胞浓度不同时间点 EBs 形成数量

Table 2 The number of EB at different time spot under different cell concentrations

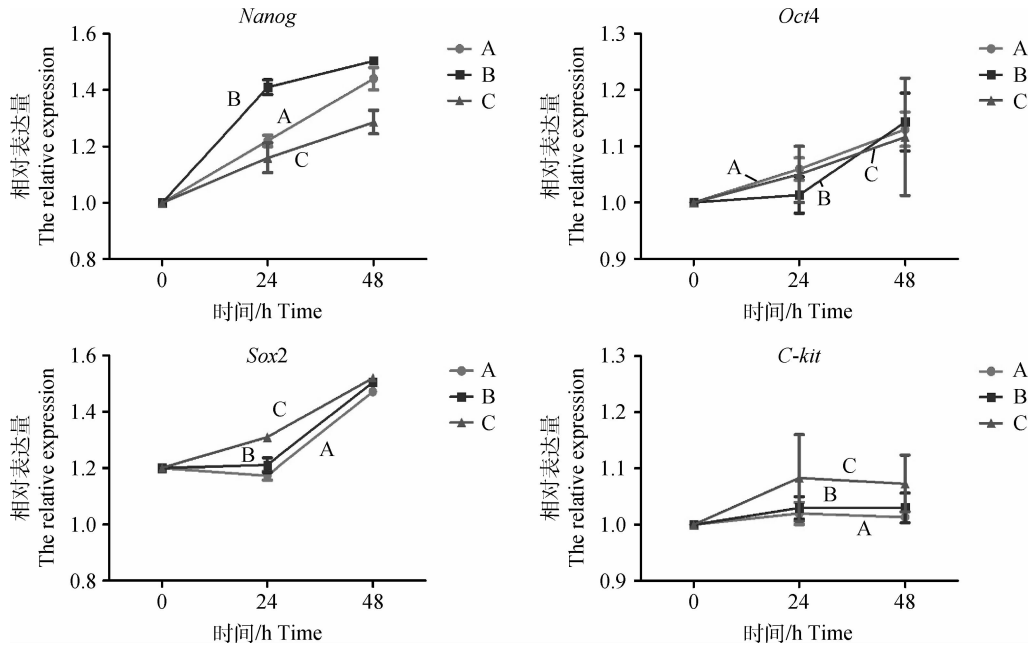
细胞浓度/ $(\times 10^4 \text{ mL}^{-1})$ Cell concentration	0 h	24 h	48 h
1	0	22 ± 3	57 ± 2
3	0	$53 \pm 3^*$	$267 \pm 10^{**}$
6	0	3 ± 1	37 ± 3

*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$

2.3 悬滴培养过程中相关全能性基因的 qRT-PCR 检测

以 βactin 为内参基因, 将 0 h 的 ESCs 细胞表

达量设为空白对照, 应用 qRT-PCR 技术对干细胞相关基因 *Nanog*、*Sox2*、*C-kit* 和 *Oct4* 的表达情况进行检测, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析相对定量结果, SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析。结果显示, 1×10^4 、 3×10^4 和 $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 3 个细胞浓度 48 h 悬滴培养期间, 干细胞相关基因 *Nanog*、*Sox2*、*C-kit* 和 *Oct4* 持续表达(图 3)。各组基因相对表达量如表 3 所示, $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度 48 h 悬滴培养后, *Nanog*、*Sox2*、*C-kit* 和 *Oct4* 相对表达量分别为 1.68、1.13、1.48 和 1.01; $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度 48 h 悬滴培养后, *Nanog*、*Sox2*、*C-kit* 和 *Oct4* 相对表达量分别为 1.76、1.10、1.52 和 1.05; $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度 48 h 悬滴培养后, *Nanog*、*Sox2*、*C-kit* 和 *Oct4* 相对表达量分别为 1.80、1.15、1.32 和 1.02, 各组基因表达量无显著性差异。



A. 1×10^4 mL⁻¹ 细胞浓度; B. 3×10^4 mL⁻¹ 细胞浓度; C. 6×10^4 mL⁻¹ 细胞浓度。图 4 同

A. 1×10^4 cell concentration; B. 3×10^4 mL⁻¹ cell concentration; C. 6×10^4 mL⁻¹ cell concentration. The same as Fig. 4

图 3 悬滴培养 48 h ESCs 的干性基因 *Nanog*、*Sox2*、*C-kit* 和 *Oct4* 的表达变化

Fig. 3 Relative expression levels of *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* and *C-kit* after 48 h hanging-drop culture

2.4 免疫细胞化学检测特异性标记物的表达

对各细胞浓度悬滴培养 48 h 后的类胚体进行表面抗原 SSEA-1 和 *Nanog* 检测。结果显示,悬滴培养所形成的类胚体 SSEA-1 和 *Nanog* 检测呈阳性反应,荧光下分别呈黄绿色和红色;DAPI 染色为蓝色(图 4)。表明悬滴培养 48 h 所获取的类胚体中的细胞处于未分化状态。

2.5 类胚体自发分化验证

获取 3×10^4 mL⁻¹ 细胞浓度悬滴培养获得的类胚体,使用 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基继续培养。培养过程中隔天换液,定期观察类胚体的自发分化情况。并对自发分化获得的细胞进行 SOX17 (内胚层)、SMA(Smooth Muscle Actin)(中胚层)和 TUJ-1(β III-tubulin)(外胚层)免疫荧光鉴定(图 5)。间接免疫组化染色结果表明,类胚体自发分化后内胚层标记蛋白 SOX17,中胚层标记蛋白 SMA 和外胚层标记蛋白 TUJ-1 表达呈阳性。结果表明,所获得的类胚体具有分化为 3 个胚层的能力。

2.6 类胚体细胞核型分析

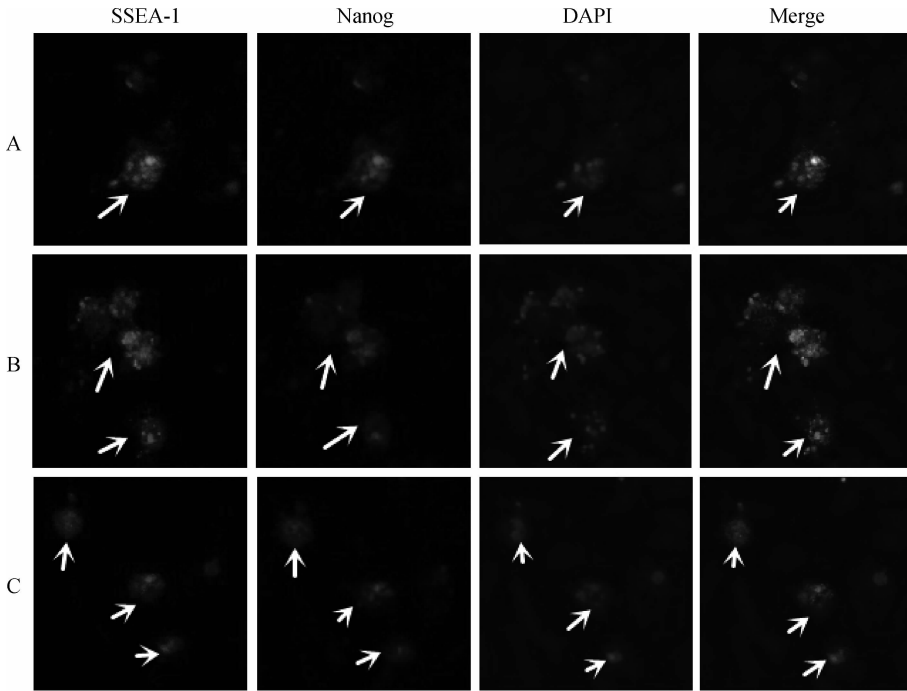
通过 3×10^4 mL⁻¹ 细胞浓度悬滴培养获得类胚体,对其染色体进行核型分析。选择良好分裂相,在显微镜下计数染色体数目。结果表明,悬滴培养形

成的类胚体具有并保持正常的核型,为 38 条常染色体和 2 条性染色体(图 6)。

3 讨论

类胚体是由胚胎干细胞体外培养获得的,具有向多个方向分化的潜能。类胚体是 ESCs 细胞发育的启动,在特定的细胞因子和微环境中可对其进行定向诱导,从而产生特定细胞。EB 最早由 A. Takeda^[16] 观察并描述,被认为是一种卵巢肿瘤内发生的现象;此后 G. B. Pierce 等^[17] 研究发现,EB 可以用来形成畸胎瘤或畸胎瘤;G. R. Martin 等^[18] 克隆畸胎瘤细胞进行体外培养形成了具有分化功能的 EB;M. J. Evans 和 M. H. Kaufman^[19] 体外培养老鼠的胚胎干细胞形成 EB。近年来,类胚体被广泛应用于体外定向诱导过程,陈明等^[6] 通过类胚体的体外形成,诱导生成小鼠心肌细胞。陈惠芹等^[8] 通过添加诱导剂,促进拟胚体中原始造血干细胞发生。而现有研究中,针对家禽类胚体形成的研究较少,尚未见有详细的报道。

本课题组一直致力于家鸡雄性生殖细胞的分化研究,目前已初步建立鸡 ESCs 向雄性生殖细胞分化的体外诱导体系,但是诱导效率较低,产生的雄性

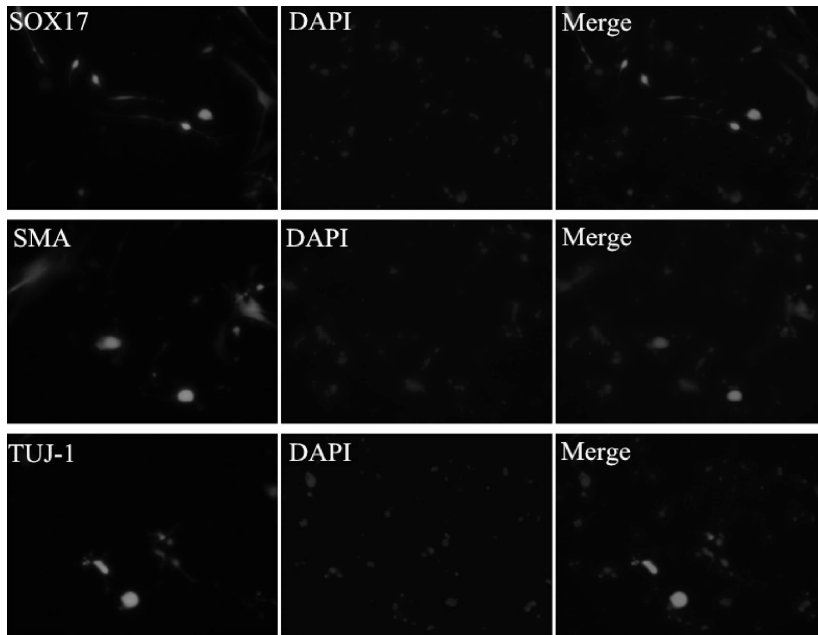


间接免疫荧光法检测各试验组悬滴培养 48 h 后,类胚体中干性标记蛋白的表达情况;绿色荧光为 SSEA-1 蛋白,红色荧光为 Nanog 蛋白,蓝色为 DAPI 染色,Merge 代表合并图。→. EB

After 48 h hanging-drop culture,immunocytochemistry showed EB was positive for SSEA-1(green),Nanog(red) and DAPI (blue) in all 3 groups,Merge were showed respectively. →. EB

图 4 类胚体中的蛋白免疫细胞化学检测 400×

Fig. 4 Expression of proteins in EB detected by immunocytochemistry 400×



类胚体自分化后检测三胚层标记基因:SOX17 (内胚层)、SMA (中胚层)和 TUJ-1 (外胚层)的表达,蓝色为 DAPI 染色,Merge 代表合并图

After EB differentiated *in vitro*,the marker genes of 3 layer were detected by immunocytochemistry:SOX17 (endo-derm),SMA (mesoderm) and TUJ-1 (ectoderm).DAPI (blue),Merge were showed respectively

图 5 类胚体体外自分化免疫荧光检测 200×

Fig. 5 Differentiation of EB *in vitro* detected by immunocytochemistry 200×

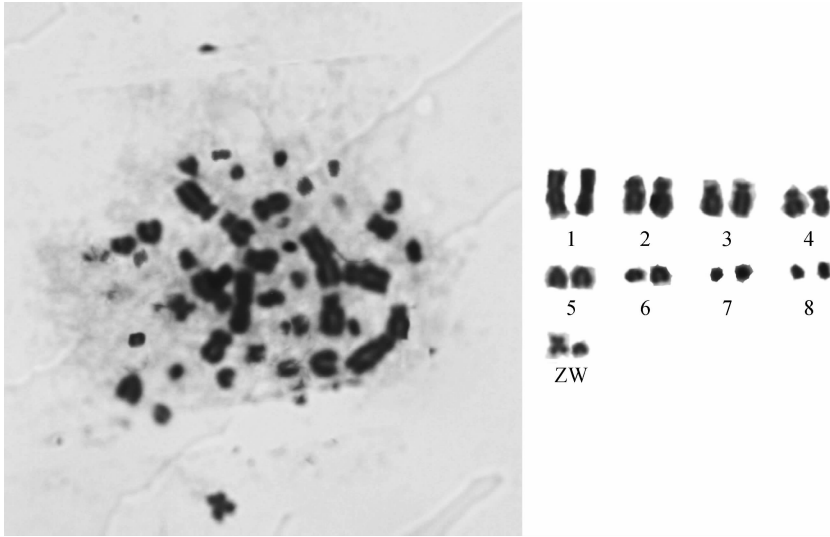


图 6 类胚体的染色体核型分析 1 000×
Fig. 6 Karyotype analysis of EB 1 000×

生殖样细胞数量较少。因此,本研究在悬滴培养的基础上,摸索鸡 ESCs 形成类胚体的最佳体系,以期提高体外诱导鸡 ESCs 生成雄性生殖细胞的诱导效率。采用 1×10^4 、 3×10^4 和 $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 3 个细胞浓度,使用悬滴培养后观察类胚体的形成效率。研究发现,在 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞浓度下,通过不含干细胞维持因子的培养液悬滴培养 48 h,类胚体数量呈对数上升,表明 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 为鸡 ESCs 体外悬滴培养形成类胚体的最适浓度,这与张良等^[3]结论相符。

为了克服普通悬滴培养法产生 EB 数量少,EB 大小和分化阶段不一致的问题,本研究对悬滴培养法进行了长时间的摸索和改进,采用第 3 代鸡 ESCs 形成的克隆进行类胚体培养,能获得相对较多的 EB,且大小基本一致,可重复性高。对形成的类胚体进行 qRT-PCR 检测发现,其持续表达干性基因 *Nanog*、*Sox2*、*Oct4* 和 *C-kit*,且免疫细胞化学检测 *Nanog* 和 SSEA-1 呈阳性。另外,对悬滴培养形成的类胚体进行核型分析,发现类胚体在形成过程中具有正常的核型。试验结果表明,本研究采用悬滴培养法形成类胚体具有分化潜能,能够用于体外定向诱导过程。

4 结 论

本研究采用悬滴培养法,成功建立鸡胚胎干细胞类胚体体外快速形成技术,确定 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 为鸡 ESCs 体外悬滴培养形成类胚体的最适浓度。所获得的 EB 数量相对较多,大小均一,持续表达全能

性标记基因并具有分化为 3 个胚层的能力,且染色体核型正常。该研究为进一步优化鸡 ESCs 向生殖细胞定向分化体系奠定了理论和试验基础。

参考文献 (References):

- [1] SHARMA G T, DUBEY P K, VERMA O P, et al. Collagen-IV supported embryoid bodies formation and differentiation from buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(3): 378-384.
- [2] ITSKOVITZ-ELDOR J, SCHULDINER M, KARSENTI D, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers[J]. *Mol Med*, 2000, 6(2): 88.
- [3] 张 良, 黄 冰, 唐仕波, 等. 体外培养拟胚体条件的探讨[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(4): 700-702.
ZHANG L, HUANG B, TANG S B, et al. The explore of embryoid culture system *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2004, 20(4): 700-702. (in Chinese)
- [4] 赵惠萍, 王绮如. 胚胎干细胞形成拟胚体的几个影响因素[J]. 湖南医科大学学报, 2003, 28(1): 85-86.
ZHAO H P, WANG Q R. Influence factors of the formation of embryoid bodies[J]. *Bulletin of Human Medical University*, 2003, 28(1): 85-86. (in Chinese)
- [5] RUNGARUNLERT S, TECHAKUMPHU M, PIRITY M K, et al. Embryoid body formation from embryonic and induced pluripotent stem cells: Benefits of bioreactors[J]. *World J Stem Cells*, 2009, 1(1): 11.

- [6] 陈明,毕琳琳,赵芳,等.拟胚体高密度培养促进小鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化[J].天津医药,2013,41(8):782-785.
CHEN M, BI L L, ZHAO F, et al. High density culture of embryoid bodies enhanced cardiac differentiation of murine embryonic stem cells[J]. *Tianjin Medical Journal*, 2013, 41(8):782-785. (in Chinese)
- [7] 彭红梅,陈贵安.人类胚胎干细胞体外分化形成包含多种细胞的类胚体[J].北京大学学报:医学版,2005,36(6):605-608.
PENG H M, CHEN G A. Human embryonic stem cells forming embryoid bodies comprising multiple types of cells [J]. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2005, 36(6):605-608. (in Chinese)
- [8] 陈惠芹,张绪超,黄绍良,等.BMP-4与VEGF促进拟胚体中原始造血干细胞发生的实验研究[J].中国实验血液学杂志,2008,16(4):855-858.
CHEN H Q, ZHANG X C, HUANG S L, et al. BMP-4 and VEGF promote development of hematopoietic stem cells during the embryoid body formation from embryonic stem cells[J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2008, 16(4):855-858. (in Chinese)
- [9] 田孝祥,韩雅玲,康健,等.利用胚胎干细胞建立贴壁制备类胚体的新方法[J].沈阳部队医药,2006,19(2):82-84.
TIAN X X, HAN Y L, KANG J, et al. A novel method for preparing embryoid bodies with attached embryonic stem cells[J]. *Shenyang Military Medicine*, 2006, 19(2):82-84. (in Chinese)
- [10] 刘卫生,王英杰,刘涛,等.模拟微重力条件下小鼠拟胚体形成及分化的初步观察[J].第三军医大学学报,2008,30(17):1594-1597.
LIU W S, WANG Y J, LIU T, et al. The formation and differentiation of mouse embryoid bodies under simulating microgravity[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2008, 30(17):1594-1597. (in Chinese)
- [11] 孙敏,施青青,傅德智,等.鸡胚ESC和SSCs特定基因表达差异的研究[J].生物技术,2011,21(3):16-19.
SUN M, SHI Q Q, FU D Z, et al. Study of the expression of gene cell differentiation associated genes on chicken ESC and SSCs[J]. *Biotechnology*, 2011, 21(3):16-19. (in Chinese)
- [12] 施青青,张振韬,李鹏程,等.BMP4诱导鸡胚胎干细胞向雄性生殖细胞分化的研究[J].畜牧兽医学报,2013,44(11):1749-1757.
SHI Q Q, ZHANG Z T, LI P C, et al. Study on differentiation of chicken embryonic stem cells to male germ cells by BMP4[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(11):1749-1757. (in Chinese)
- [13] 孙敏.鸡胚胎干细胞诱导为雄性生殖细胞及转基因鸡的制备[D].扬州:扬州大学,2012.
SUN M. Study on male germ cell derived from chicken embryonic stem cell and the generation of transgenic chicken [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2012. (in Chinese)
- [14] EYAL-GILADI H, KAYAK S. From cleavage to primitive streak formation; a complementary normal table and a new look at the first stage of the development of the chick; I. General morphology[J]. *Dev Biol*, 1976, 49:321-337.
- [15] 徐琪,陈国宏,张学余,等.3个地方鸡种的核型及其近似系数分析[J].畜牧兽医学报,2004,35(4):362-366.
XU Q, CHEN G H, ZHANG X Y, et al. Comparison on karyotype of three Chinese native chickens and their cluster analysis[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2004, 35(4):362-366. (in Chinese)
- [16] TAKEDA A, ISHIZUKA T, GOTO T, et al. Polyembryoma of ovary producing alpha-fetoprotein and HCG; Immunoperoxidase and electron microscopic study[J]. *Cancer*, 1982, 49(9):1878-1889.
- [17] PIERCE G B, SPEERS W C. Tumors as caricatures of the process of tissue renewal; prospects for therapy by directing differentiation[J]. *Cancer Res*, 1988, 48(8):1996-2004.
- [18] MARTIN G R, EVANS M J. Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation *in vitro* [J]. *Cell*, 1975, 6(4):467-474.
- [19] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5819):154-156.

(编辑 程金华)