

体外分离培养昆明小鼠胚胎干细胞最佳胚龄的筛选： 孕2.5 d与3.5 d及4.5 d比较***

张海锋¹, 单伟², 秦书俭²

Screening of optimal embryonic time for *in vitro* separation and culture of Kunming mouse embryonic stem cells: Comparison among 2.5, 3.5, and 4.5 pregnant days

Zhang Hai-feng¹, Shan Wei², Qin Shu-jian²

Abstract

BACKGROUND: Genotype of Kunming mice was similar to human population, thus an establishment of embryonic stem cell line is beneficial for research of transgenic animal. However, the best time to collect embryo has been less reported yet.**OBJECTIVE:** To find the best time to collect embryos from Kunming mice.**METHODS:** The embryos were collected from mother mice of 2.5, 3.5, and 4.5 pregnant days. Microscope was used to evaluate the growth condition of embryos, embryo attaching rate (A/C), inner cell mass (ICM) growing rate (I/C), embryonic stem cells (ESCs) clone growing rate (P1/C) and ESCs subclone growing rate (P2/C). The cells were then stained with alkaline phosphatase.**RESULTS AND CONCLUSION:** Most of the 2.5-pregnant-day embryos were 16-cell-phase embryos. The 3.5-pregnant-day embryos were morulas while the 4.5-pregnant-day embryos were blastulas. There were no significant differences in A/C, I/C, P1/C, P2/C between 2.5 and 3.5 pregnant days ($P > 0.05$). The 4.5-pregnant-day indicators mentioned above were significantly greater than those two groups; therefore, 4.5-pregnant-day embryos were the best source to culture, clone, isolate and passage ESCs.

¹Department of Anatomy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China; ²Department of Anatomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Zhang Hai-feng★, Master, Department of Anatomy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China
pearlbead2004@sina.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20032142*; the Project Foundation of Xuzhou Medical College, No. 08KJ19*

Received: 2009-10-29
Accepted: 2010-01-14

Zhang HG, Shan W, Qin SJ. Screening of optimal embryonic time for *in vitro* separation and culture of Kunming mouse embryonic stem cells: Comparison among 2.5, 3.5, and 4.5 pregnant days. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(10): 1780-1784. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 昆明小鼠基因型与人类近似, 建立昆明小鼠胚胎干细胞系有利于其转基因动物的获得, 但目前对于何时收集胚胎尚无明确报道。

目的: 探讨体外分离培养昆明小鼠胚胎干细胞的最佳胚龄。

方法: 分别从孕 2.5 d, 3.5 d 和 4.5 d 的昆明系母鼠子宫中分离收集胚胎, 于显微镜下观察胚胎的形态、贴壁情况、内细胞团形成情况、胚胎干细胞克隆率、胚胎干细胞亚克隆率等, 并进行碱性磷酸酶染色。

结果与结论: 孕 2.5 d 采集的胚胎多为 16 细胞期胚胎, 孕 3.5 d 采集的胚胎多为桑椹胚, 孕 4.5 d 采集的胚胎多为囊胚。孕 2.5 d 胚胎和孕 3.5 d 胚胎的贴壁率、内细胞团形成率、胚胎干细胞克隆率、胚胎干细胞亚克隆率均无明显差异 ($P > 0.05$); 孕 4.5 d 胚胎上述指标均显著高于前两者, 更适合作为胚胎干细胞培养、克隆、分离、传代的材料。

关键词: 昆明小鼠; 胚龄; 内细胞团; 胚胎; 胚胎干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.10.014

张海锋, 单伟, 秦书俭. 体外分离培养昆明小鼠胚胎干细胞最佳胚龄的筛选: 孕 2.5 d 与 3.5 d 及 4.5 d 比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1780-1784. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

胚胎干细胞是从早期胚胎内细胞团或原始生殖细胞分离出来的, 能在体外长久培养且具有多向分化潜能和种系嵌合能力的细胞系^[1-3]。胚胎干细胞的用途很广, 涉及医学和生物工程的许多领域^[4-8]。

目前实验中常用的小鼠胚胎干细胞系绝大多数来自 129 品系, 但 129 品系小鼠易感染多种疾病, 具高频自发畸胎瘤, 其胚胎干细胞容易发生癌化, 因此该品系小鼠不宜用于免疫学和细胞、组织移植等研究^[9]。

昆明小鼠一种国产远交系小鼠, 其基因型与人类近似, 建立昆明小鼠的胚胎干细胞系有利于其转基因动物的获得, 能够为国内科研工作更好地服务。目前虽有关于昆明小鼠胚胎干细胞的一些研究, 但对于何时收集胚胎尚无明确报道。实验旨在筛选体外分离培养昆明小鼠胚胎干细胞的最佳胚龄。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对比观察。

时间及地点: 于 2006-03/2007-06 在辽宁医学院解剖实验室完成。

材料: 昆明系雄鼠21只, 雌鼠20只, 8周龄, 雌雄鼠合笼, 每天早上观察阴道栓, 见栓当天上午定为孕0.5 d。由辽宁医学院实验动物中心提供, 动物质量合格证号: SYX(辽)2003-0011, 实验过程中对动物的处置符合1988年国家科委《实验动物管理条例》的规定^[10]。

主要试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
L-DMEM 培养基	Gibco 公司
H-DMEM 培养基、白血病抑制因子	Sigma 公司
胎牛血清	中国医学科学院生物工程研究所
丝裂霉素 C	浙江海正
NBT-BCIP 染色试剂盒	华美公司
CO ₂ 培养箱	美国 SIM 公司
CKX41 型倒置显微镜	日本 Olympus 公司

实验方法:

小鼠胚胎成纤维细胞的分离培养及饲养层制备: 取孕12.5~14.5 d母鼠, 断颈处死, 无菌条件下取出胎鼠, 去除头部、尾部、内脏和四肢, 用无菌眼科剪将躯干部剪成1 mm×1 mm×1 mm以下的碎块, 用滤网过滤细胞法^[11]分离培养小鼠胚胎成纤维细胞, 并制备小鼠胚胎成纤维细胞饲养单层。

胚胎的收集与培养: 分别取孕2.5 d, 3.5 d, 4.5 d母鼠断颈处死, 无菌条件下取出子宫; 用1 mL无菌注射器吸入冲胚液, 从子宫角端进针, 保证针头进入子宫腔内, 将冲胚液快速推入子宫腔; 每侧子宫注入冲胚液0.2~0.5 mL, 冲胚液会将胚胎冲出; 将盛有胚胎和冲胚液的平皿置于40~100倍倒置显微镜下, 用移液器收集胚胎, 参考文献^[12-17]的方法进行培养。

生物学特性观察: 每日于显微镜下观察并记录胚胎的生长情况, 包括形态、贴壁情况、内细胞团形成情况等。

碱性磷酸酶检测: 胚胎经40 g/L多聚甲醛固定0.5~2.0 h, PBS洗涤3次; 用TSM-I(0.1 mol/L Tris, 0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L MgCl₂, pH 8.0)平衡, 重复3次; 再用TSM-II(0.1 mol/L Tris, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgCl₂, pH 9.5)平衡, 重复3次; 加入NBT(350 mg/L)/BCIP(180 mg/L), 37 °C避光反应30 min; 三蒸水洗涤3次, 显微镜下观察。

主要观察指标: ①不同胚龄的胚胎生物学特

征比较。②不同胚龄的胚胎体外培养情况比较。

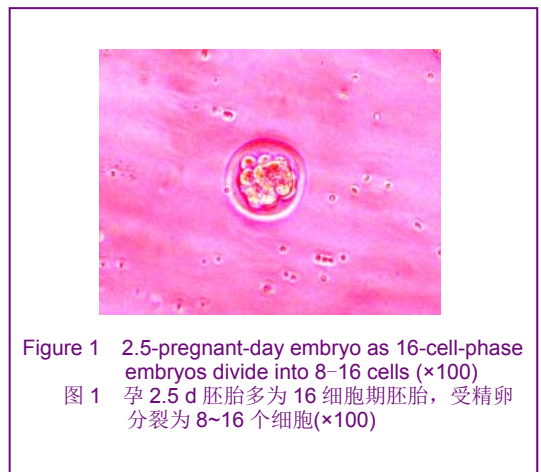
设计、实施、评估者: 实验设计和结果评估为第一、三作者, 干预实施为第一、二作者, 经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.5软件进行统计处理, 所得数据采用 q 检验分析。

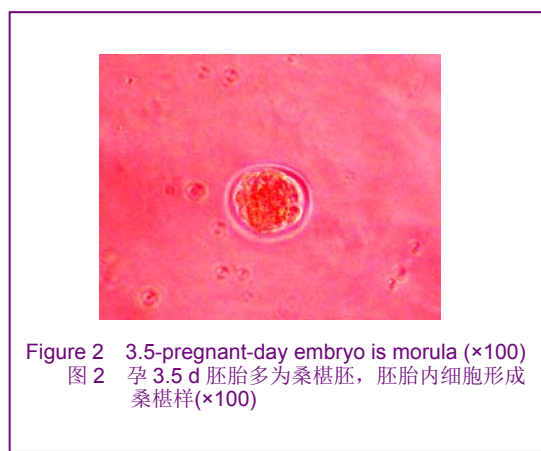
2 结果

2.1 收集小鼠胚胎数量分析 实验共收集孕2.5 d昆明小鼠胚胎57枚, 孕3.5 d昆明小鼠胚胎91枚, 孕4.5 d昆明小鼠胚胎69枚。

2.2 不同胚龄的胚胎生物学特征比较 孕2.5 d昆明小鼠胚胎多为16细胞期胚胎, 受精卵分裂为8~16个细胞, 外包以透明带, 未形成滋养层, 见图1。



孕3.5 d昆明小鼠胚胎多为桑椹胚, 胚胎内细胞形成桑椹样, 周围有透明带包绕, 见图2。



孕4.5 d昆明小鼠胚胎多为囊胚, 囊腔明显, 滋养层被囊腔推到一侧, 有些形成内细胞团, 透明带未破, 见图3。碱性磷酸酶染色检测呈强阳性, 见图4。

¹ 徐州医学院解剖教研室, 江苏省徐州市 221004 ;
² 辽宁医学院解剖教研室, 辽宁省锦州市 121001

张海锋★, 男, 1980年生, 河南省焦作市人, 汉族, 2004年辽宁医学院毕业, 硕士, 主要从事组织工程学细胞方面的研究。
pearlbead2004@sina.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)10-01780-05

收稿日期: 2009-10-29
修回日期: 2010-01-14
(20090829010/ZS-H)

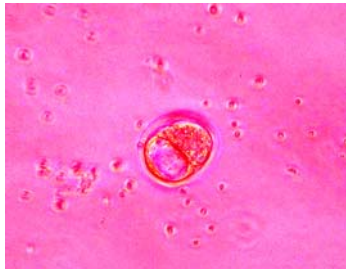


Figure 3 4.5-pregnant-day embryos mostly present with blastocyst, showing clear capsular space, chorionic ectoderm, and some of them form inner cell mass (×100)

图3 孕4.5 d 胚胎多为囊胚, 囊腔明显, 可见滋养层, 有些形成内细胞团(×100)

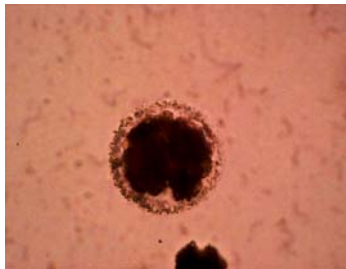


Figure 4 5-pregnant-day embryos are strongly positive for alkaline phosphatase staining (×100)

图4 孕4.5 d 胚胎碱性磷酸酶染色检测呈强阳性(×100)

2.3 不同胚龄的胚胎体外培养情况比较 不同胚龄的胚胎其贴壁率、内细胞团形成率、胚胎干细胞克隆率(P1)、胚胎干细胞亚克隆率(P2)见表1~3。

表1 孕2.5 d 胚胎体外生长情况
Table 1 Growth condition of 2.5-pregnant-day embryo cultured *in vitro*

Batch	Attaching rate		ICM growing rate		Passage			
	A/C	%	I/C	%	P1/C	%	P2/C	%
1	1/5	20.0	0/5	0	0/5	0	0/5	0
2	3/6	50.0	2/6	33.3	0/6	0	0/6	0
3	4/7	57.1	2/7	28.6	0/7	0	0/7	0
4	2/4	50.0	0/4	0	0/4	0	0/4	0
5	3/8	37.5	0/8	0	0/8	0	0/8	0
6	5/8	62.5	3/8	37.5	1/8	12.5	0/8	0
7	5/10	50.0	1/10	10.0	0/10	0	0/10	0
8	1/4	25.0	0/4	0	0/4	0	0/4	0
9	3/5	60.0	1/5	20.0	0/5	0	0/5	0
Total	27/57	47.4	9/57	15.8	1/57	1.75	0/57	0

ICM: inner cell mass; ESCs: embryonic stem cells; A/C: embryo attaching rate; I/C: ICM growing rate; P1/C: ESCs clones growing rate; P2/C: ESCs subclones growing rate

表2 孕3.5 d 胚胎体外生长情况
Table 2 Growth condition of 3.5-pregnant-day embryo cultured *in vitro*

Batch	Attaching rate		ICM growing rate		Passage			
	A/C	%	I/C	%	P1/C	%	P2/C	%
1	3/5	60.0	1/5	20.0	0/5	0	0/5	0
2	2/5	40.0	0/5	0	0/5	0	0/5	0
3	4/7	57.1	4/7	57.1	2/7	28.6	1/7	14.3
4	3/7	42.9	3/7	42.9	1/7	14.3	0/7	0
5	5/8	62.5	4/8	50.0	1/8	12.5	1/8	12.5
6	4/7	57.1	4/7	57.1	2/7	28.6	0/7	0
7	4/4	100.0	4/4	100.0	2/4	50.0	1/4	25.0
8	3/6	50.0	3/6	50.0	1/6	16.7	1/6	16.7
9	2/5	40.0	0/5	0	0/5	0	0/5	0
10	2/5	40.0	1/5	20.0	0/5	0	0/5	0
11	3/7	42.9	2/7	28.6	0/7	0	0/7	0
12	6/12	50.0	5/12	41.7	2/12	16.7	1/12	8.3
13	3/5	60.0	1/5	20.0	0/5	0	0/5	0
14	2/4	50.0	0/4	0	0/4	0	0/4	0
15	2/4	50.0	1/4	0	0/4	0	0/4	0
Total	48/91	52.7	33/91	36.2	11/91	12.1	5/91	5.5

ICM: inner cell mass; ESCs: embryonic stem cells; A/C: embryo attaching rate; I/C: ICM growing rate; P1/C: ESCs clones growing rate; P2/C: ESCs subclones growing rate

表3 孕4.5 d 胚胎体外生长情况
Table 3 Growth condition of 4.5-pregnant-day embryo cultured *in vitro*

Batch	Attaching rate		ICM growing rate		Passage			
	A/C	%	I/C	%	P1/C	%	P2/C	%
1	2/4	50.0	1/4	25.0	0/4	0	0/4	0
2	8/9	88.9	6/9	66.7	6/9	66.7	3/9	33.3
3	2/6	33.3	1/6	16.7	1/6	16.7	0/6	0
4	8/12	66.7	8/12	66.7	4/12	33.3	1/12	8.3
5	5/8	62.5	5/8	62.5	5/8	62.5	1/8	12.5
6	4/5	80.0	4/5	80.0	4/5	80.0	0/5	0
7	6/8	75.0	5/8	62.5	5/8	62.5	2/8	25.0
8	5/7	71.4	5/7	71.4	4/7	57.1	1/7	14.3
9	10/10	100.0	10/10	100.0	9/10	90.0	4/10	40.0
Total	50/69	72.5	45/69	65.2	38/69	55.1	12/69	17.4

ICM: inner cell mass; ESCs: embryonic stem cells; A/C: embryo attaching rate; I/C: ICM growing rate; P1/C: ESCs clones growing rate; P2/C: ESCs subclones growing rate

孕2.5 d胚胎和孕3.5 d胚胎的贴壁率差异无显著性意义($P > 0.05$), 孕4.5 d胚胎的贴壁率显著高于前两者。孕2.5 d, 3.5 d, 4.5 d胚胎的内细胞团形成率、胚胎干细胞克隆率、胚胎干细胞亚克隆率差异均有显著性意义($P < 0.05$), 见表4。由此看出孕4.5 d昆明小鼠胚胎更适合作为胚胎干细胞培养、克隆、分离、传代的材料。

表4 不同胚龄的胚胎体外生长情况比较
Table 4 Comparison of embryos at different embryonic time

Comparison	Attaching rate		ICM growing rate	
	t	P	t	P
2.5 d vs. 3.5 d	1.105	0.278	1.940	0.042 ^a
2.5 d vs. 4.5 d	3.075	0.004 ^b	4.115	0.000 ^b
3.5 d vs. 4.5 d	2.332	0.027 ^a	2.660	0.012 ^a

Comparison	P1 rate		P2 rate	
	t	P	t	P
2.5 d vs. 3.5 d	2.368	0.021 ^a	2.370	0.021 ^a
2.5 d vs. 4.5 d	5.795	0.000 ^b	3.299	0.003 ^b
3.5 d vs. 4.5 d	5.212	0.000 ^b	2.365	0.022 ^a

ICM: inner cell mass; ^aP < 0.05, ^bP < 0.01

3 讨论

胚胎干细胞的用途很广, 涉及医学和生物工程的许多领域, 尤其在细胞替代治疗中具有潜在应用价值, 因此国内外在这些方面有许多研究^[18-26]。由于小鼠胚胎干细胞的经济性和可操作性, 历来受到科学界的重视。小鼠胚胎干细胞的体外分离培养是一项复杂的工作, 受多种因素的影响, 选择恰当的时间来收集胚胎以分离内细胞团, 对以后的胚胎干细胞的分离培养是一个极为重要的影响因素。因此, 在进行小鼠胚胎干细胞研究中, 胚龄至关重要。为了进行胚胎干细胞的培养, 收集胚胎的时间必须在胚胎着床以前, 同时也需要胚胎在体内有一定的发育, 以使胚胎更好的适应体外培养环境, 实验中多选孕2.5~4.5 d来收集胚胎。Eistetter等^[27]采用培养小鼠桑椹胚单个卵裂球建成胚胎干细胞系, 其成功率比用囊胚要高的多, 可能由于桑椹胚处于比囊胚更早的发育阶段, 有更多的细胞保持发育的全能性, 而且他采用的是桑椹胚单个卵裂球, 去除了滋养层的分化诱导作用, 因此胚胎干细胞建系成功率高。Wells等^[28]用小鼠延迟囊胚建成胚胎干细胞系, 其建系成功率达47.7%, 但建成的干细胞系是否容易分化, 却未报道。

对于昆明小鼠来说, 由于其种属特异性, 在体外进行分离培养并传代的胚胎干细胞成功率一直比较低。实验中培养的昆明小鼠胚胎, 孕2.5 d胚胎80%为16细胞期胚胎, 内细胞团形成率和胚胎干细胞克隆形成率都较差, 可能因为孕2.5 d胚胎处于胚泡发育早期, 对体外培养适应能力较差, 大部分都在收集培养后72~96 h自发死亡, 甚至不再发育。孕3.5 d胚胎75%为桑椹胚, 孕4.5 d胚胎100%为囊胚, 与李卫东等^[29]实验结果近似。胚胎贴壁率孕4.5 d胚胎明显高于孕3.5 d胚胎($P < 0.05$), 这与董晓等^[30]研究结果略有不同, 原因可能是培养皿中铺

设的明胶对于囊胚的贴附作用强于桑椹胚, 或是处于胚胎发育后期的囊胚表面可能形成一些贴附因子, 从而造成囊胚的贴壁率明显强于桑椹胚。内细胞团形成率孕4.5 d胚胎明显高于孕3.5 d胚胎($P < 0.05$), 表明孕期越晚, 采集的胚胎越容易形成内细胞团, 但胚龄超过4.5 d的胚胎可能已经在子宫着床, 不能再被冲出。胚胎干细胞克隆形成情况孕4.5 d胚胎明显好于孕3.5 d胚胎($P < 0.05$), 可以说昆明小鼠囊胚贴壁率、内细胞团出现率、传代情况均显著好于桑椹胚, 原因可能是因为囊胚处于胚胎发育较晚时期, 对体外培养系统的适应能力较强; 而桑椹胚胚胎发育小, 实验中采用的体外培养系统可能不完全适宜于桑椹胚发育, 培养后容易退化。胚龄越大, 内细胞团进一步增殖和扩大, 贴壁后有足够数量的内细胞团细胞发育形成胚胎干细胞株, 因此胚胎干细胞株出现的概率就越大、数量就越多, 分离时表现出细胞黏性强, 不致由于吹打而过于分散, 从而成功传代率就越高。但同时可能出现内细胞团细胞易分化的现象, 可能是因为饲养层细胞的诱导或者饲养细胞分化抑制因子分泌不足所造成的, 这样在进行体外培养时, 加入适量的白血病抑制因子是非常必要的。实验表明孕4.5 d胚胎更适合作为分离培养昆明小鼠胚胎干细胞的材料。

4 参考文献

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(9):154-156.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(12): 7634-7638.
- Piedrahita JA, Anderson GB, Bonduant RH. On the isolation of embryonic stem cell: Comparative behavior of murine, porcine, ovine embryos. *Theriogenology*. 1990;34(5): 879-901.
- Van Der Kooy D, Weiss S. Why Stem cells? *Science*. 2000; 287(5457): 1439-1441.
- Watt FM, Hogan BLM. Out of eode: stem cells and their Niches. *Science*. 2000;287: 1427-1430.
- Thomson JA. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Technical Tips Online*. 2000;18: 53-57.
- Vogel G. Harnessing the power of stem cells. *Science*. 1998; 283:1432.
- Marshall E. Versatile cell line raises scientific hope, legal, questions. *Science*. 1998;282: 1014.
- Kirschstein R, Skirboll LR. Beijing: Renmin Weisheng Chubanshe. 2003: 214-227.
- Kirschstein R, Skirboll LR. 干细胞研究进展与未来[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 214-227.
- The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals. 1988-10-31.
- 国家科委. 实验动物管理条例. 1988-10-31.
- Zhang HF, Shan W, Qin SJ. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;11(11): 2001-2004.
- 张海锋, 单伟, 秦书俭. 不同分离方法对鼠胚胎成纤维细胞生长影响的比较[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(11): 2001-2004.
- Situ ZQ, Wu J, Xi'an: Shijie Tushu Chubanshe. 1996: 86-87.
- 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 86-87.
- Xue SQ. Beijing: Kexue Chubanshe. 2001: 516-517.
- 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 516-517.
- Turksen K. *Embryonic Stem Cell Protocols (Vol 2) 2nd ed.* Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2006: 149-159.
- Wang TH, Li LY, McDonald JW. Beijing: Kexue Chubanshe. 2009: 116-124.
- 王廷华, 李力燕, McDonald JW. 干细胞理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 116-124.

[16] Nagy A, Gertsenstein M. Manipulating the Mouse Embryo - A Laboratory Manual. Beijing: Chemical Industry Press.2006: 269-295.

[17] Sullivan S, Cowan CA. Human Embryonic Stem Cells-The Practical Handbook. John Wiley & Sons Ltd.2007: 25-34.

[18] Schindehutte J, Fukumitsu H. In Vivo and In vitro Tissue-Specific Expression of Green Fluorescent Protein Using the Cre-Lox System in Mouse Embryonic Stem Cells. Stem Cells.2005;23: 10-15.

[19] Clement S, Stouffs M. Expression and function of α -smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation. J Cell Sci.2007;120: 229-238.

[20] Singh AM, Li FQ. Chibby, an Antagonist of the Wnt/ β -Catenin Pathway, Facilitates Cardiomyocyte Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. Circulation. 2007;115: 617-626.

[21] Poon E, Clermont F. TGF β inhibition of yolk-sac-like differentiation of human embryonic stem-cell-derived embryoid bodies illustrates differences between early mouse and human development. J Cell Sci.2006;119: 759-768.

[22] Passier R, Oostwaard DW. Increased Cardiomyocyte Differentiation from Human Embryonic Stem Cells in Serum-Free Cultures. Stem Cells.2005;23: 772-780.

[23] Burridge PW, Anderson D. Improved Human Embryonic Stem Cell Embryoid Body Homogeneity and Cardiomyocyte Differentiation from a Novel V-96 Plate Aggregation System Highlights Interline Variability. Stem Cells.2007;25:929-938.

[24] Brederlau A, Correia AS. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells to a Rat Model of Parkinson's Disease: Effect of In Vitro Differentiation on Graft Survival and Teratoma Formation. Stem Cells.2006;24: 1433-1440.

[25] Lee HJ, Shamy GA. Directed Differentiation and Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Motoneurons. Stem Cells. 2007;25: 1931-1939.

[26] Adachi K, Kawase E. Establishment of the Gene-Inducible System in Primate Embryonic Stem Cell lines. Stem Cells.2006;24: 2566-2572.

[27] Eistetter HR. Pluripotent embryonic stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae. Dev Growth and Different.1988;31: 275-282.

[28] Wells DN. Factors influencing the isolation of murine embryo stem cells. Theriogenology.1991;35(1): 293.

[29] Li WD,Zhang XG,Chang J,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008; 12(21): 4060-4064. 李卫东, 张晓刚, 常静, 等. 昆明小鼠胚胎干细胞的分离培养方法[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(21): 4060-4064.

[30] Dong X,Feng ST,Zheng X.Xumu Shouyi Xuebao. 2002;33(5): 433-438. 董晓, 冯书堂, 郑行. 小鼠胚胎干细胞培养、克隆、分离、传代研究[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(5): 433-438.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 辽宁省自然科学基金 (20032142); 徐州医学院课题基金 (08KJ19)。

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 课题主要内容为从受孕小鼠体内获得发育至桑椹胚或胚泡阶段的早期胚胎, 用机械法分离、胰酶消化内细胞团得到原始的胚胎干细胞悬液; 将得到的胚胎干细胞置于 MEF 饲养层上或单用条件培养基(含白血病抑制因子) 分别进行培养, 比较体外培养的效果; 最后对得到的胚胎干细胞用形态学观察、表面标记检测、体内外分化实验来进行检测鉴定; 将成功培养得到的胚胎干细胞定向分化为神经细胞, 以移植治疗脊髓损伤动物, 为胚胎干细胞的临床应用提供一些实验依据。

课题评估的“金标准”: 胚胎干细胞的鉴定需要从以下 3 方面来进行检测: ①形态学观察。②特异性表面标记检测。③体内外分化实验。实验均已进行上述检测。

课题的偏倚与不足: 实验在特异表面标记检测中, 仅做了简单易行的碱性磷酸酶检测, 因时间和经费方面的限制, 并未做阶段特异性胚胎表面抗原(SSEA)和 Oct-4 的检测。

提供临床借鉴的价值: 胚胎干细胞在细胞替代治疗中具有潜在应用价值。一定条件下胚胎干细胞可定向诱导分化成内皮、骨、软骨、平滑肌、心肌、骨骼肌、神经胶质、原始神经节及复层鳞状上皮细胞, 是细胞、组织甚至器官移植供体的理想来源, 有望成为帕金森病、糖尿病、骨关节炎及风湿性关节炎、白血病、再生障碍性贫血、心肌病等仅由一种或少数几种细胞死亡或功能失调所致疾病的有效根治手段。

有关干细胞治疗心脏病的学术争鸣: 本刊学术部

内容简介	网站点击更多
有关干细胞移植治疗心血管疾病的探索和争议: 文章在选择合适的具有分化潜能的干细胞, 干细胞移植的安全性评估, 干细胞移植的有效性评估, 干细胞移植的途径及移植时间等问题上进行了探讨。	www.crter.org/Html/2009_09_27/2_65650_2009_09_27_67923.html
有关干细胞移植治疗冠心病: 大量基础研究和临床研究发现, 干细胞移植可以增加细胞因子的释放, 促进缺血区域新生血管的形成, 改善心肌灌注, 减少心室扩张及心室重构。因此, 干细胞是否可以成为冠心病治疗最具前景的新方法? 干细胞移植治疗心脏病的结果以及是否具有致心律失常作用呢?	www.crter.org/Html/2009_10_23/2_65650_2009_10_23_71866.html
有关干细胞治疗冠心病的临床研究目前仍处于审慎状态, 问题何在? 从 2001 年首次开展后, 已经有超过 2 000 例心脏病患者接受了或者正在接受干细胞治疗。然而, 还有一些临床研究和部分动物实验提示, 干细胞移植远期疗效及安全性方面存在着一定的争议。	www.crter.org/Html/2009_11_03/2_65650_2009_11_03_80914.html
造血干细胞移植治疗白血病有效, 那么干细胞治疗其他疾病是否也可信? 日前, 英国科学家在实验室用人类胚胎干细胞培育出人类精子, 在医学界引起震动.....	www.crter.org/Html/2009_10_30/2_65650_2009_10_30_80257.html