

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.004

无血清无饲养层培养体系在绵羊胚胎干细胞分离中的应用

陈 博^{1,2} 赵云程¹ 林嘉鹏¹ 孙晓岩² 陈雪梅² 黄俊成^{1,Δ}

(1 新疆畜牧科学院农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室 新疆 乌鲁木齐 830000;

2 东莞石龙人民医院 广东 东莞 523321)

摘要 目的:本文采用 N2B27 无血清无饲养层的完全已知成份的培养体系,通过机械分离法分离不同阶段的绵羊囊胚,观察不同阶段囊胚对分离绵羊类胚胎干细胞的影响。**方法:**本实验采用 N2B27 无血清无饲养层成份完全已知的培养体系,利用机械分离法对不同阶段的绵羊囊胚进行分离,观察其绵羊类胚胎干细胞的原代集落形成率,以及 AKP 染色,多潜能性候选基因 Oct-4 和 Sox-2 免疫荧光检测。**结果:**分离早期阶段绵羊囊胚获得的绵羊类胚胎干细胞的形成率显著低于扩张(孵化)阶段囊胚(19.6%(11/56) vs 36.9%(31/84))(P<0.05),同时早期和扩张(孵化)阶段绵羊囊胚的 AKP 染色和多潜能性候选基因 Oct-4、Sox-2 的表达呈阳性。**结论:**N2B27 无血清无饲养层培养体系是一种有效分离绵羊类胚胎干细胞的培养基,同时分离绵羊扩张(孵化)阶段的囊胚可以显著的提高原代类胚胎干细胞的建系率,为提高绵羊类胚胎干细胞的建系奠定了基础。

关键词:胚胎干细胞;囊胚;绵羊胚胎;N2B27

中图分类号:Q95-3,Q813.1+1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)06-1012-05

The Application of the Separation of Sheep Embryonic Stem Cells in Serum-and Feeder-free Conditions

CHEN Bo^{1,2}, ZHAO Yun-cheng¹, LIN Jia-peng¹, SUN Xiao-yan², CHEN Xue-mei², HUANG Jun-cheng^{1,Δ}

(1 Key Laboratory of Animal & Veterinary Biotechnology of MOA, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi, Xinjiang, 830000, China;

2 Dongguan Shilong People's Hospital, Guangdong, Guangzhou, 523321, China)

ABSTRACT Objective: To observe the influence of the separation of sheep embryonic stem cells *in vitro* culture blastocysts at different developmental stages by N2B27 serum- and feeder-free conditions. **Methods:** Mechanical separation was used to isolate the *in vitro* culture blastocysts at different developmental stages by N2B27 serum- and feeder-free conditions, and then we observed the formation rates of primary oESC-like, AKP dyeing, expression of multipotent candidate genes Oct-4 and Sox-2. **Results:** The formation rates of oESC-like of early blastocysts was lower extended blastocysts (19.6% (11/56) vs 36.9%(31/84))(P<0.05). It was all positive for the assays of alkaline phosphatase and expression of multipotent candidate genes Oct-4 and Sox-2. **Conclusion:** This is an effective method that the separation of sheep embryonic stem cells in N2B27 serum- and feeder-free conditions. The extended blastocysts can improve the formation rates of primary oESC-like.

Key words: Embryonic stem cells; Blastocyst; Sheep embryo; N2B27

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q813.1+1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)06-1012-05

前言

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)技术在优质遗传资源的迅速普及和转基因家畜的生产方面具有十分广阔的应用前景,它比传统繁殖育种技术更高效,周期更短;比体细胞克隆成本更低,效率更高,因此更有利于在农业中的应用。但是截至目前为止,仅有小鼠个别品系^[1,2]、人^[3]、大鼠^[4]等获得了大家公认的 ESC。尤其是绵羊胚胎干细胞(ovine embryonic stem cell, OESC)的研究相对滞后。目前,采用常规 ESC 分离培养方案,绵羊 ESC 分离、培养仅能获得原代^[5],第 3 代^[6],第 5 代^[7],第 8 代^[8]的绵羊 ESC,且分离效率低、长期培养难度大等一系列问

题,极大制约了 ESC 技术在绵羊遗传育种中的研究与应用。

本实验室通过借鉴小鼠、人和大鼠等胚胎干细胞建系经验,结合国际最新干细胞调控机制研究成果,筛选出一套 N2B27 无血清无饲养层培养成分明确的绵羊胚胎干细胞培养体系,突破了绵羊胚胎干细胞常规培养、传代、建系过程中的瓶颈问题^[9]。本实验在我实验室前期的实验基础上,运用 N2B27 无血清无饲养层培养成分明确的培养体系,采用机械分离法对早期和扩张(孵化)阶段的绵羊囊胚分别进行建系,通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)和多潜能候选基因的检测,评定绵羊类胚胎干细胞的建系率,以及寻找出最适宜分离绵羊类胚胎干细胞阶段的囊胚,为后期提高绵羊胚胎干细胞建系奠定

* 基金项目:新疆自治区科技计划项目(201111113);新疆自治区科技支疆项目(201291147);

国家转基因重大专项(2011ZX08008-003);国家自然科学基金(U1203381)

作者简介:陈博(1984-),男,硕士研究生,研究方向:动物胚胎工程学,电话:15199456824, E-mail:64876837@qq.com

Δ 通讯作者:黄俊成(1968-),男,研究员,博士,研究方向:胚胎工程,电话:13999912246, E-mail:h_jc@sina.com

(收稿日期:2013-08-23 接受日期:2013-09-18)

基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM/F-12 (Invitrogen, 11320033, American), Tryple Express (Gibco, 12605-010, American), N-2 Supplement (Invitrogen, 17502048, American), B-27 Supplement (Invitrogen, 17504044, American), MEN NEAA (Sigma, G8540, American), CHIR99021 (Stemgent, 04-0004, American), L-Glutamine (Sigma, G8540, American), β -Mercaptoethanol (Amresco, 0482, American), bFGF (Sigma, B6766, American), Mineral oil (Sigma, M8410, American), 青霉素 (鼎国, DH231-1, China), 链霉素 (鼎国, DH325-1, China), TCM-199 (Gibco, 12340030, American), Hepes (Sigma, H6147, American), PVA (Sigma, P8136, American), FBS (Hyclone, SH3008403), FSH (Sigma, F8174, American), LH (Sigma, L5269, American), AKP 检测试剂盒 (Sigma, 86R-1KT, American), Triton-X100 (Solarbio, T8200, China), 荧光一抗: Oct-4 (MILLIPORE, MAB4401, American), Sox-2 (Santa, Y-17, American), 荧光二抗: 山羊抗小鼠 (中杉金桥, ZF-0312, China), 其他试剂均为 Sigma 公司。

1.2 溶液及培养基配制

(1) 抽卵液: TCM-199 hepes+1mg/mL PVA+0.7 mg/mL 肝素钠;

(2) 成熟培养液: TCM-199-HCO₃+10% FBS+0.05IU/mL FSH+0.05IU/mL LH+1 μ g/mL Estradiol+24.2 mg/L Sodium pyruvate+0.1mM cysteamine+10ng/mL EGF;

(3) 受精液: SOF+20% 发情羊血清 +6 IU/mL 肝素钠 +100IU/mL 庆大霉素;

(4) 培养液: SOF+3mg/mL BSA;

(5) 胚胎干细胞选择性培养液: DMEM/F12+10 μ L/mL N-2 Supplement+20 μ L/mL B-27 Supplement+1 μ L/mL β -Mercaptoethanol+10 μ L/mL MEN NEAA+10 μ L/mL L-Glutamine+80ng/mL bFGF+3 μ M CHIR99021。

1.3 试验材料

1.3.1 卵母细胞的获取 获取屠宰场内宰杀半小时以内的绵羊卵巢组织并剪去周围多余脂肪, 放入含有青、链霉素 (各 1000IU/mL) 的 37℃ 灭菌生理盐水中, 用保温杯尽快运回实验室。经灭菌生理盐水清洗 3 次, 然后用带有 12 号针头的 10 mL 注射器从直径为 3~5 mm 的卵泡中抽取卵母细胞, 在立体显微镜下挑选生发泡期 (GV 期) 完整、细胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体 (COCs)。

1.3.2 卵母细胞体外培养 通过卵母细胞形态学挑出较好的卵母细胞在成熟培养液中充分洗涤, 按 25 枚/滴的密度放入平衡 2-4 小时用矿物油覆盖的成熟液滴中, 在 38.6℃、5% CO₂ 的培养箱内培养 22~24 小时。用预热的 0.1% 透明质酸酶轻轻吹打体外成熟的卵母细胞, 保留 1-2 层颗粒细胞即可。然后用受精液充分洗涤, 分别将其放入用矿物油覆盖的平衡过的受精液滴中 (25 枚/滴)。解冻绵羊冻精, 将其轻轻的等分加入装有受精液的离心管底部, 采用上游法收获活力较好的精子, 按 2×10^6 个/mL 的密度将精子混悬液加入含有卵母细胞的受精

液滴中在培养箱内使其共同孵育 18 小时。体外受精 18 小时后, 用毛细管吹打掉假定受精胚周围剩余的颗粒细胞, 然后用胚胎培养液充分洗涤, 放入已覆盖矿物油提前平衡过的胚胎培养液中 (50 枚/孔密度), 在三气培养条件下连续培养 7 天。

2 实验方法

2.1 绵羊囊胚的收集

绵羊卵母细胞从体外受精发育到囊胚阶段一般是 7~9 天, 而囊胚的变化也要经历早期、扩张和孵化阶段, 我们在收集囊胚时发现有一部分早期囊胚形态的囊胚很难发育至扩张囊胚阶段。因此我们将囊胚期囊胚分为 2 组: 早期囊胚和扩张囊胚 (包括孵化囊胚)。用机械分离法分离不同发育阶段的囊胚。

2.2 绵羊类胚胎干细胞的分离和培养

将体外培养早期和扩张 (孵化) 阶段的绵羊囊胚, 在体式显微镜下将其放入 Tyrode's solution acidic 中观察, 当透明带逐渐变薄时立即将其换入 ESC 培养液中充分洗涤, 然后将其转入平衡好的 oESC 培养液中用机械分离法剥离囊胚内细胞团 (ICM), 并且使其固定在该培养皿中培养 6-9 天且每天观察。若发现有类似于 ESC 形态的绵羊类胚胎干细胞 (ovine embryonic stem-like cell, OESC-like), 将其从滋养外胚层中剥离、切割后接种到新的培养基中, 从第三代以后可以逐步用 Tryple Express 消化来替代机械传代法。

将分离得到的若干 oESC-like 集落, 在体式显微镜下将其放入 Tryple Express 中, 观察这些集落由原来的致密状态逐渐松散呈草莓状后立即转入 oESC 培养液中充分洗涤, 然后放入用矿物油覆盖且平衡好的 oESC 基础培养基中, 将其吹散至单个集落, 再放入 38.6℃、5% CO₂ 的饱和湿度的培养箱内培养, 每 3-5 天传代一次。

2.3 碱性磷酸酶与免疫荧光检测

将收集的 oESC-like 一部分按 Alkaline Phosphatase (AKP) 试剂盒说明书对其进行染色检测。

另一部分 oESC-like 进行免疫荧光检测: PBS 洗三次 → 4% 多聚甲醛固定 1 h → PBS 洗三次 → 0.3% Triton-X100 透化 5 min → PBS 洗三次 → 5% BSA 封闭 1 h → PBS 洗三次 → 一抗 4℃ 过夜 → PBS 洗三次 → 二抗和 DAPI 1 h 37℃ → PBS 洗三次 → 显微镜观察照相。

3 结果与分析

3.1 卵母细胞培养结果

从绵羊卵巢组织中收集的 GV 期卵母细胞 (图 1A), 在成熟培养液中经体外培养 24 小时后达到成熟 (图 1B), 接着将稀释好的精子混悬液加入含有卵母细胞的受精液滴中共同孵育 18 小时, 然后将卵母细胞的颗粒细胞去除掉, 放入三气培养条件中培养 7-9 天 (图 1C)。收获的囊胚大致有扩张囊胚 (图 1D), 早期囊胚 (图 1E) 和孵化囊胚 (图 1F)。

3.2 绵羊类胚胎干细胞的分离培养

用机械分离法剥离体外培养获得的早期和扩张 (孵化) 阶段囊胚的 ICM。由表 1 可知, 通过机械分离法我们从 84 枚扩张 (孵化) 阶段的囊胚中分离出 31 枚假定的绵羊 ICM, ICM 的分离数量显著高于早期阶段的囊胚 (36.9% vs 19.6%) ($P < 0.05$)。

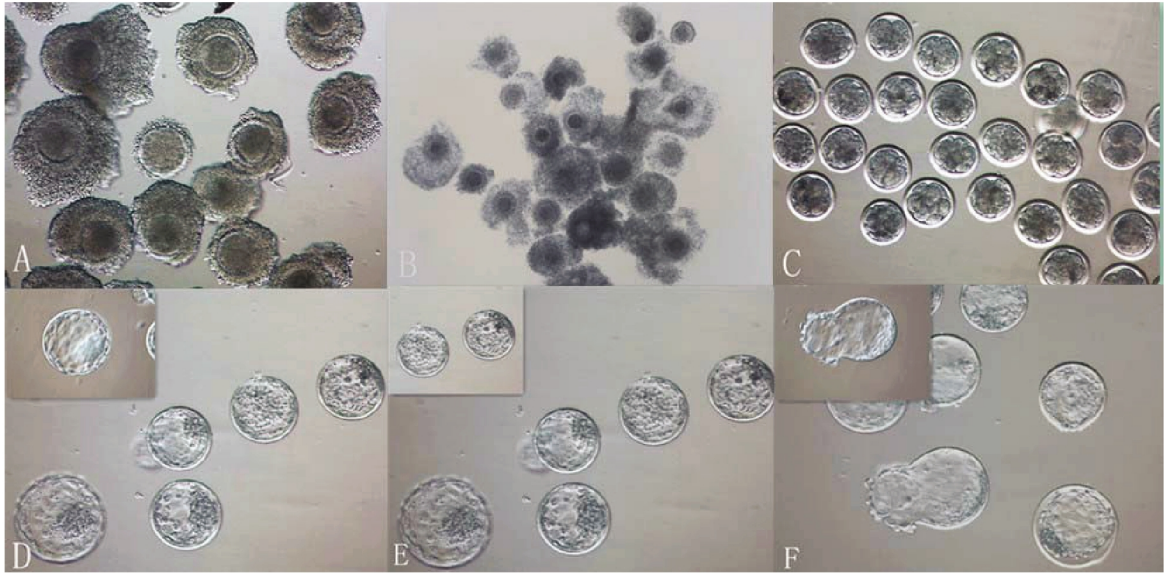


图 1 绵羊卵母细胞体外培养

Fig.1 Ovine oocytes developed *in vitro* culture

* 注:A 为 GV 期卵母细胞;B 为成熟 24h 卵母细胞;C 为卵裂期胚胎;D 为囊胚期胚胎(扩展阶段);E 为囊胚期胚胎(早期阶段);F 为囊胚期胚胎(孵化阶段)。
*Note: A the GV stage oocytes; B mature oocytes; C the cleavage stage embryos; D the blastocyst stage embryos (extending stage); E the blastocyst stage embryos (early stage); F the blastocyst stage embryos (hatched period).

表 1 囊胚内细胞团的分离

Table 1 Separation of inner cell mass of balstocyst

Balstocyst	Collection time(Day)	Embryo number (trunk)	ICM number (trunk)	ICM separation
Extended (Hatched) Balstocyst	7-9	84	31	36.9%
Early Balstocyst	7-9	56	11	19.6% *

注:与对照组相比,带 * 具有统计学意义。
Note: Compared with the control group,* means significant on statistics.

最初分离的 ICM 细胞集落呈现出由小而圆、界限不清的细胞构成圆形隆起,隆起中心有时呈深色区,边缘呈非光滑状态(图 2 A 和 B)。随传代时间的推移集落不断增殖逐渐向上生

长呈多层性,且该集落边缘整齐、折光性强、细胞间堆叠紧密、彼此极易聚集,中心区渐渐内陷,最终形成鸟巢状集落,与 mES 细胞特征相似(图 2 C)。

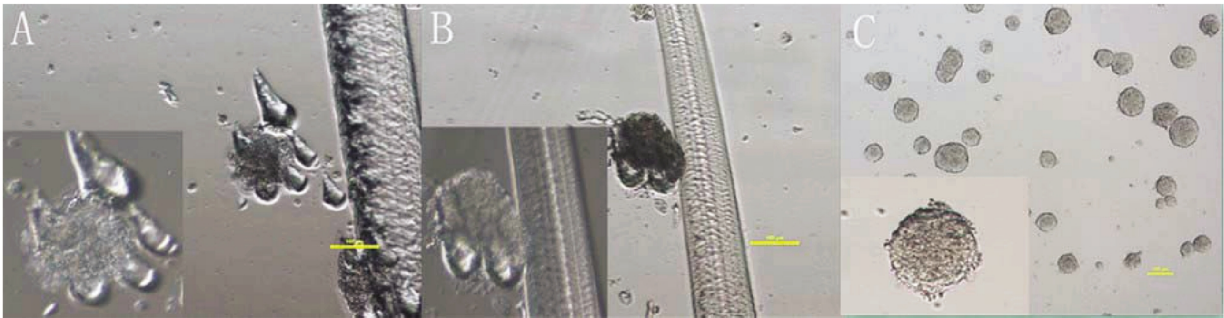


图 2 原代和传代后的绵羊类胚胎干细胞

Fig.2 Primary and Passage lines of oESC-like

* 注:A 为早期囊胚分离的 ICM;B 为扩张(孵化)囊胚分离的 ICM;C 为传代后的胚胎类干细胞。

*Note: A the separation of early blastocyst ICM; B expanding (hatched) blastocyst ICM of separation; C passage of embryonic stem cells.

3.3 碱性磷酸酶与免疫荧光检测

上图 A 和 B 分别为早期和扩张阶段囊胚经分离、传代后获得的 oESC-like, 经碱性磷酸酶染色后呈棕红色(图 3A 和

B)。而分化的胚胎干细胞的周边细胞呈弥散式生长,碱性磷酸酶活性降低,集落逐步呈平铺式生长,界限模糊。

Oct-4、Sox-2 在胚胎发育过程和 ESC 中表达^[10],Oct-4 在某

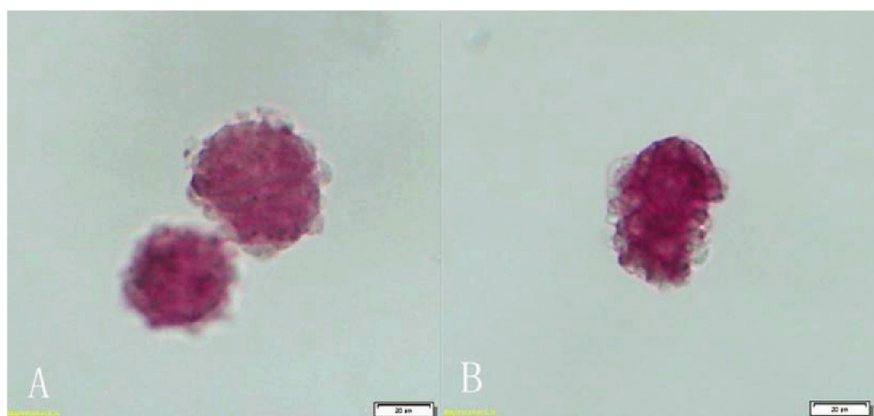


图3 绵羊类胚胎干细胞 AKP 染色

Fig.3 AKP dying of oESC-like

* 注:A 为早期阶段囊胚分离 ICM 的 AKP 染色;B 为扩张(孵化)阶段囊胚分离 ICM 的 AKP 染色。

*Note: A the early stages separation of blastocyst ICM of AKP staining; B expanding (hatched) stages separation of blastocyst ICM of AKP staining.

些成体干细胞中也有表达,但在分化终端细胞中没有表达^[11]。同时由上图可知,我们从早期囊胚(图 4A 和 B)和扩张囊胚(图 4C 和 D)中分离获得的 oESC-like 经过多潜能性候选基因

Oct-4 和 Sox-2 免疫荧光检测结果呈阳性,而荧光二抗的专一性检测作为阴性对照(图 4E 和 F)。同时本实验所分离获得的 oESC-like 在后期的体内外分化实验中形成神经细胞和畸胎瘤^[9]。

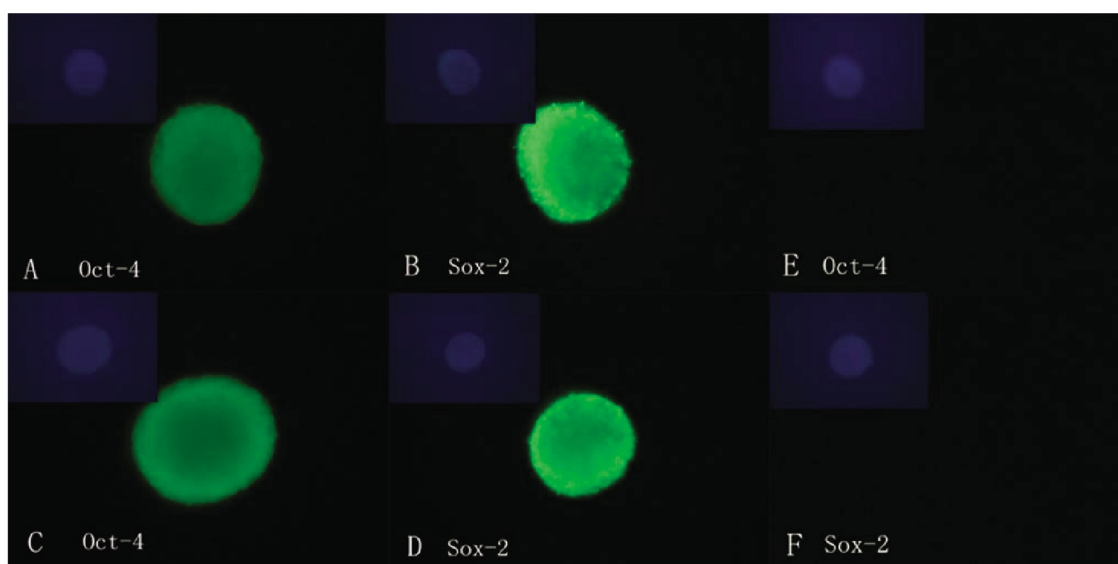


图4 Oct-4 和 Sox-2 免疫荧光检测

Fig.4 Immunofluorescence detection of Oct-4 and Sox-2

* 注:A 和 B 为早期阶段囊胚分离绵羊类胚胎干细胞 Oct4 和 Sox2 免疫荧光检测;C 和 D 为扩张(孵化)阶段囊胚分离绵羊类胚胎干细胞 Oct4 和 Sox2 免疫荧光检测;E 和 F 为阴性对照。

*Note: A and B were separated sheep embryonic-like stem cells in the early blastocyst stages of Oct4 and Sox2 immunofluorescence detection; C and D were separated the sheep embryo stem cell of expanded blastocyst (hatched) Oct4 and Sox2 immunofluorescence detection; E and F negative control.

4 讨论

近年来,有研究者通过 "Separate and Seed" 方法能有效的从牛囊胚中分离原代 ESC 系^[12]。同时也有研究者已经证明在无血清培养条件下可以成功分离 mESC^[13],hESC^[14],rESC^[14]且使其保持未分化状态。在此基础上,我们结合 mESC,hESC 和 rESC 在自我更新中所被涉及到的 Wnt、STAT3 和 FGF 等信号通路的调控机制在完全已知成分培养基中建立了一种选择性培养体系来衍生 oESC-like,这种已知成分培养基包含 DMEM/F12,

N2,B27,GSK3 特殊抑制剂(CHIR99021)和基本成纤维细胞生长因子(bFGF)^[9]。

对于培养体系的描述,我们从绵羊不同阶段囊胚中可以分离得到 ICM,经传代培养后 oESC-like 呈三维立体结构与 mES 细胞特征相似(图 2C),并且表达胚胎干细胞特异性基因(Oct-4 和 Sox2),同时本实验所分离获得的 oESC-like 在后期的体内外分化实验中形成神经细胞和畸胎瘤^[9]。并且有研究表明,Wnt 信号通路在提高小鼠,人类和大鼠 ESC 自我更新中是通过抑制 GSK3 来实现的^[15],而 CHIR99021 是 GSK3 的抑制剂,虽然

我们可以通过添加 CHIR99021 有效的从绵羊囊胚中分离原代 ICM,但是其增殖作用经继续传代培养后逐渐降低^[9],这些足以说明 CHIR 不能支持来源于绵羊囊胚分离 ICM 的长时间增殖和扩展。除 Wnt 信号通路之外,高浓度的 bFGF 可以支持 hESC 无需饲养层细胞,我们将 bFGF 结合 CHIR99021 使 oESC-like 的增殖作用呈 2 倍扩增,并且 bFGF 对 oESC 支持的剂量呈反应关系^[9]。通过添加 FGFR 的抑制剂 SU 后,集落的增殖显著下降,这与 hESC 的报道相似^[10]。

然而在有蹄类动物 ES 细胞系建立过程中,对于其原始 ICM 培养的选择时间是不明确的。在某种程度上,这将影响着蹄类动物囊胚 ES 细胞的分化。在绵羊卵母细胞体外培养过程中,我们将囊胚阶段分为早期和扩张囊胚阶段。由表 1 结果可知,使用平皿机械分离法从 84 枚扩张阶段囊胚中获得 31 枚 oESC-like (31/84,36.9%) 显著高于早期阶段囊胚分离结果 (11/56,19.6%)($P<0.05$)。因此,在不同阶段的囊胚对 ICM 的分离是具有一定影响性的。这可能由于不同阶段囊胚的囊胚腔大小不一致而导致不能正确的分离来自囊胚的 ICM,或者在分离囊胚 ICM 的同时由于囊胚腔过小而对 ICM 有一定的损伤。同时我们还发现,ICM 的质量是 ICM 产出的关键,并且一定数量的 ICM 的被用于最初培养,这可能会促进 ICM 的形成(可能包括自身分泌或旁分泌作用促进 ICM 细胞的增殖)。但是滋养外胚层细胞在培养阶段常常会妨碍 ICM 的生长和增加 ESC 分化的可能性^[11]。因此我们实验显示出在最初培养过程中适时除去滋养外胚层对于 ICM 的产生和增殖是必须的,而且随后残留的滋养外胚层在无血清培养条件下 1-3 代时会死亡。本实验分离出的 ICM 经传代培养后通过碱性磷酸酶和多潜能性基因 Oct-4 和 Sox-2 的检测结果显示呈阳性,结合本实验室前期的实验结果分析可以说明通过此方法分离的 oESC-like 尚处于未分化阶段。

综上所述,我们发现在这种成分明确的无血清无饲养层培养体系下,可以有效的分离获得未分化的 oESC-like,并且对于在明确培养基上衍生绵羊类胚胎干细胞是第一次报告,同时扩张(孵化)阶段的囊胚对于分离且获得较多数量的 oESC-like 具有促进作用,从而可以降低对囊胚数量的要求。因此,这种成分明确的无血清无饲养层培养体系对于理解家畜 ESC 的衍生和特征提供了一个基础的参考,并且也确立了对于 ICM 产出的关键因素之一的最适宜囊胚阶段,同时通过添加一些细胞因子或抑制剂对于维持家畜 ESC 自我更新和多能性方面的信号通路作用尚需进一步研究,并且为后期优化绵羊类胚胎干细胞的培养系统奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292: 154-156
- [2] Martin, GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci, 1981, 78: 7634-7638
- [3] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147
- [4] Buehr M, Meek S, Blair K, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts [J]. Cell, 2008, 135(7): 1287-1298
- [5] Talbot NC, Rexroad CE Jr, Pursel VG, et al. Alkaline phosphatase staining of pig and sheep epiblast cells in culture[J]. Mol Reprod Dev, 1993, 36(2): 139-147
- [6] Zhu SX, Sun Z, Zhang JP. Ovine (Ovis aries) blastula from an in vitro production system and isolation of primary embryonic stem cell [J]. Zygote, 2007, 15(1): 35-41
- [7] Dattena M, Pilichi S, Rocca S, et al. Sheep embryonic stem-like cells transplanted in full-thickness cartilage defects [J]. Tissue Eng Regen Med, 2009, 3(3): 175-187
- [8] 白昌明, 刘丑生, 王志刚, 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
Bai Chang-ming, Liu Chou-sheng, Wang Zhi-gang, et al. Effect of different culture systems dry separation, passage cells of sheep embryos [J]. Journal of biological engineering, 2008, 24 (7): 1268-1273
- [9] Zhao Y, Lin J, Wang L, et al. Derivation and characterization of ovine embryonic stem-like cell lines in semi-defined medium without feeder cells [J]. Exp Zool A Ecol Genet Physiol, 2011, 315 (10): 639-648
- [10] Pesce M, Scholer HR. Oct-4: control of totipotency and germ line determination [J]. Mol Reprod Dev, 2000, 55(4): 452-457
- [11] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. Nature, 2002, 418(10): 412-491
- [12] Cao S, Wang F, Chen Z, et al. Isolation and culture of primary bovine embryonic stem cell colonies by a novel method [J]. Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol, 2009, 311(5): 368-376
- [13] Andang M, Moliner A, Doege, et al. Optimized mouse ES cell culture system by suspension growth in a fully defined medium [J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1013-1017
- [14] Liu Y, Song Z, Zhao Y, et al. A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells [J]. Biochem Bio Res Com, 2006, 346 (1): 131-139
- [15] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor[J]. Nat Med, 2004, 10(1): 55-63
- [16] Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, et al. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal [J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 568-574
- [17] Bongso A, Fong CY, Ng SC, et al. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts [J]. Hum Reprod, 1994, 9(11): 2110-2117