维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0925-04

胚胎干细胞自我更新的信号转导途径和体外培养系统的研究进展

刘西茹 综述,丘 彦,徐红兵 审校

(重庆医科大学附属第一医院生殖中心,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R321-33 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-06-03

胚胎干细胞(embryonic stem cells,ES 细胞)主要来自囊胚内细胞团及受精卵发育至桑堪胚之前的早期胚胎细胞,或者从胎儿生殖嵴分离得到的原生殖细胞以及体细胞核转移至去核卵母细胞后培育出来的全能细胞。自 1981 年 Evans 和 Kaufman 等成功地分离、建立了小鼠胚胎干细胞系以来,历经将近 20 年,第一株人 ES 细胞系在美国威斯康星大学成功建立。同年,另一研究小组用流产胎儿性腺成功地分离和培养了人胚胎生殖细胞系 (embryonic germ cells,EG 细胞)。二者可统称为胚胎干细胞系。ES 细胞不但成为研究早期胚胎发生、细胞组织分化、基因表达调控等发育生物学事件的一个理想模型,更重要的是人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells,hESC)可为临床上细胞移植、组织替代和器官克隆提供新的细胞来源,为多种难治性疾病的治疗带来希望;同时 hESC 在确定药物作用靶点、药物毒性检测、药物的开发利用等方面也有着不可取代的优势。ES 细胞有两个最显著的特征即:自我更新和发育全能性。研究表明,ES 细胞的自我更新同时受到细胞生长环境和内源性调节因子的控制。近年来胚胎干细胞自我更新机制和定向分化条件的研究是干细胞研究的热点,也是胚胎干细胞得以临床广泛应用的前提。本文将就 ES 细胞自我更新相关的信号转导途径及体外培养系统来作一综述。

1 胚胎干细胞自我更新相关的信号转导途径

很多研究表明:多条信号转导通路和多种转录调节因子都参与胚胎干细胞体内体外不分化状态的维持[1],阐述如下:

1.1 LIF-LIFR/gp130-JAK-STAT3 途径

该途径是小鼠胚胎干细胞自我更新的重要途径。LIF (leukemia inhibitor factor)是 IL-6 家族成员之一,对小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mES cells)体外多潜能性的维持发挥着重要的作用[2]。LIF 与 ESC 表面低亲和力 LIF 受体(LIFR)结合,使其活化成为高亲和力受体,后者再与细胞因子亚单位 gp130(glycoprotein 130)迅速聚合形成异二聚体,共同介导信号转导[3,4]。gp130 介导的 LIF 信号传导通路最终通过激活下游转录因子 STAT3 来维持 mES 细胞的不分化状态。STAT3 的激活才是 mES 细胞自我更新的关键。相反,STAT3 功能丧失则引起胚胎干细胞分化[5]。

JAK- STAT3 途径是细胞增殖分化的重要信号转导途径,在生物体发育过程中也起重要作用[6]。JAK(Just another kinase 或 janus kinase) 是胞浆中一类可溶性的非受体酪氨酸蛋白激酶,分子量为 120~140kD,结构中不含 SH2 和 SH3 结构域。现在已经发现有 4 个成员 (JAK1,JAK2,JAK3 与 TYK2),在胚胎干细胞增殖分化过程中起作用的 JAK 成员主要有 JAK1,JAK2 与 TYK2,它们主要是通过激活转录因子 STAT3 来促进胚胎干细胞的自我更新[7]。

SHP2 是 gp130 信号转导途径的另一个较为重要的效应分子。它是一种酪氨酸磷酸酶,能水解酪氨酸上的磷酸基团。SHP2 通过氨基末端的 SH2 结构域与受体结合。SHP2 为 ERK 的上游分子,另外 SHP2 还可以通过 Grb^2,Grb^2 结合蛋白(Grb^2-associated binderprotein 1, Gabl)等分子激活 ERK 信号转导通路。SHP2 是胚胎干细胞自我更新的负调节因子。STAT3 可被 SHP2 脱磷酸化,SHP2 缺陷也可以维持胚胎干细胞的未分化状态,但这一状态不能长久维持,并且在这一过程中还有一些异常分化细胞产生[7]。

1.2 MAPK 途径

该途径通过促分化而抑制 ES 细胞的自我更新。Ras/MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号转导途径对细胞生长、增殖、分化发育及癌细胞生长起重要作用[8]。研究发现,细胞外调节激酶 1/2 (extracellular regulated kinase 1/2, ERK-1/2) 信号通路在胚胎早期发育过程中具有重要作用,ERK 突变的胚胎不能形成正常的外胚层和外囊胚,这似乎表明 ERK-1/2 在滋养层干细胞(trophoblast stem cells, TS)增殖中起作用。但是 ERK-1/2 的活化在 ES 细胞的增殖过程中是可有可无的,相反它的活化能干扰 ES 细胞的自我更新并且能促进分化。ERK-1/2 在维持 ES 细胞自我更新与分化之间的平衡、在胚胎早期发育过程中似乎都发挥作用[9]。

作者介绍:刘西茹(1979-),女,硕士生,住院医师,
主要研究方向:生殖内分泌。

维普资讯 http://www.cqvip.com

研究[10]发现gp130能使MAP激酶磷酸化进而激活ERK-1/2级联反应;ERK-1/2的激活并没有促进ES细胞的增殖,相反它的激活却降低了ES细胞的自我更新能力。在LIFR-gp130二聚体介导的信号转导过程中,SHP2是一个很重要的中介分子。SHP2的酪氨酸残基磷酸化后为Grb2提供结合位点,SHP2还与Gab1联系,通过Gab1间接与Grb2结合,从而激活MAPK。gp130的Y757是SHP2与gp130结合进而被磷酸化的重要位点,这一位点的突变会阻断Ras-MAPK途径的激活但不影响依赖于LIF的ES细胞增殖。此外,SHP2失活或者用ERK-1/2的抑制剂PD98059来抑制ERK-1/2的活性都能够促进ES细胞的自我更新;ERK磷酸酶的高表达也具有类似的作用[11],然而对ERK途径的抑制不能替代ES细胞自我更新过程中STAT3的作用,但是可以增强其作用。目前这种促进作用是通过直接作用还是间接作用还不是很清楚。Grb2或SHP2的基因缺失也会抑制胚胎干细胞分化在Grb2-/-的ES细胞中重新转入Grb2-Sos复合体或Ras的活性形式,能重塑ES的正常分化功能。这都表明ERK的活化能够抑制ES细胞的自我更新并促进分化[10]。STAT3与ERKs激活后作用相反,它们之间的相互协调对于维持ES细胞的自我更新和分化之间的平衡具有重要作用。

1.3 BMP-Id 途径

BMP4在促进胚胎干细胞自我更新中作用不明显,但是最近研究发现BMP4可以通过Id(inhibitor of differentiation)途径抑制胚胎干细胞向神经系统分化。BMP4可以诱导smad进而激活Id蛋白表达,而Id能够抑制诱导ES细胞向神经分化的因子的表达,从而维持胚胎干细胞的自我更新。BMP4在维持ES细胞自我更新中的这一作用需要在LIF的存在下才能实现,这是因为BMP4单独存在时能诱导ES细胞向内胚层和中胚层分化,LIF通过LIF-STAT3途径抑制了BMP4的这一促分化作用,但是对BMP4诱导的Id表达没有作用,从而共同维持ES细胞的自我更新。以前认为LIF是小鼠胚胎干细胞不分化的充分条件,可能是因为血清培养基掩盖了BMP4的作用[12]。没有LIF时,BMP4促进ES细胞向除神经系统外的所有细胞分化,ES细胞在有BMP4和LIF的培养基中则可以完成自我更新。此外,BMP4的激活还能够抑制MAPK和P38的活性,用MAPK的抑制剂PD98059和P38抑制剂SB203580能够模拟BMP4激活时的促胚胎干细胞自我更新作用。MAPK和P38可以抑制Id的表达,BMP4可能是通过抑制MAPK和P38活性来促进Id的表达[13],从而在ES细胞自我更新过程中发挥作用。但是BMP4到底通过怎样的途径激活Id的表达,还需要进一步研究。

1.4 Wnt 途径

Wnt途径在动物发育过程中起关键作用,它能够调节胚胎干细胞在皮肤、神经系统、血液系统的命运决定[14]。有报道称,用GSK-3(glycogen synthase kinase-3)的特异性抑制剂BIO(6-bromoindirubin3-oxime)抑制GSK-3的活性从而激活Wnt途径。BIO是人工合成的化学制剂,可以特异性的抑制GSK-3的磷酸化活性,从而模拟Wnt与受体结合后所导致的GSK-3活性抑制,激活Wnt的下游信号转导途径。研究发现,BIO通过激活Wnt途径可以促进Oct-3/4,Rex-1,Nanog(Oct-3/4,Rex-1,Nanog是维持胚胎干细胞多潜能性的重要转录因子[15])等转录因子的表达,维持多种胚胎干细胞的自我更新[16]。还有研究表明,Wnt能够上调BMP2,BMP4,BMP7的表达,能够调节BMP4的表达抑制胚胎干细胞向神经的分化;还可能通过激活上调HoxB4,$Notch^{-1}$以及Hes^{-1}来抑制分化[15]。Wnt途径可能是ES细胞自我更新的主要途径。

1.5 其他重要的信号分子

①Oct-3/4是未分化的ESC自身表达的表面抗原,它们也具有抑制ESC分化的作用,但是其作用机制仍需依赖LIF-gp130-Stat3信号途径[17]。Oct-3/4:为POU家族的转录因子,由Pou5f1基因编码,是植入前胚胎发育的重要调节因子,特异性的表达于多种全能性细胞:卵母细胞、原始生殖细胞、早期植入前胚胎、原始外胚层、ICM和ES细胞。Oct-3/4是细胞全能性的标志,它能够促使ICM形成、维持胚胎干细胞未分化状态并促进其增殖。目前,Oct-3/4的表达水平已作为衡量ES细胞是否发生分化的常用指标。在ES细胞的发生中,Oct-3/4通过诱导生长因子FGF-4的表达和分泌,影响干细胞周围滋养层细胞的成熟,从而调节ES细胞的分化。

②nanog因子作为一种同源结构蛋白在多潜能ES和EG细胞中表达,当细胞发生分化时表达下调。nanog可以抑制ESC分化,而不依赖LIF2-gp130-Stat3信号途径,在保持ESC的全能性方面发挥重要作用[18],其具体机制尚未明确,其中一个可能的机制是转录抑制促进分化的基因,如,GATA4和GATA6,具体有待于进一步研究。

综上所述,LIF-LIFR/gp130-JAK-STAT3,Wnt,Oct-3/4和Nanog是目前已知的维持胚胎干细胞全能性的主要途径。LIF-LIFR/gp130-JAK-STAT3信号转导通路的激活足以维持某些小鼠的ES细胞在体外保持不分化状态,SHP2-ERK途径为LIF的另外一条下游信号转导通路,虽然不是ES细胞自我更新的必需途径,但在一定程度上可对ES细胞依赖于LIF的自我更新过程起调节作用。LIF虽然在体外可以维持部分小鼠ES细胞不分化,但是人的ES细胞在LIF的存在下不能保持其发育上的全能性,并且在体内LIF对于胚胎的生长发育也不是必需的,这些都说明LIF-STAT3途径并不是ES细胞自我更新的本质机制。与此不同,Wnt途径可上调c-myc的表达,可能是ES细胞自我更新的主要途径。转录因子Oct-3/4和Nanog特异地表达于全能性的细胞中,近几年的研究表明它们才是维持胚胎干细胞自我更新最关键的因子。

2 体外培养和扩增ES细胞的系统

胚胎干细胞体外培养必须满足2个基本条件,即促进细胞分裂增殖的同时抑制细胞分化。饲养层细胞可满足上述

维普资讯 http://www.cqvip.com

条件。影响 ES 细胞分离克隆的因素很多,其中饲养层的研究颇多。饲养层的影响主要体现在饲养层种类、丝裂霉素处理饲养层的时间、饲养层细胞的代数和饲养层细胞的密度等。动物种类不同对饲养层种类的要求也不同。最可靠的方法是根据动物种类筛选最佳饲养层,饲养层的选择直接关系到胚胎干细胞分离克隆的效果。

2.1 小鼠或人来源的饲养层培养系统

常用的饲养层细胞有小鼠胚胎成纤维细胞(murine embryonic fibroblast,MEF)和 STO 细胞等。经 γ 射线照射或丝裂霉素 -C 等处理后,这些细胞虽失去分裂能力,但仍可生存并有同化培养液的能力。使用 MEF 作为饲养层培养人 ES 细胞是最早和最常用的方法。目前维持人 ES 细胞的自我更新常常需要 MEF 作为饲养层的存在。其促增殖作用主要是由于能分泌成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)等促有丝分裂因子,同时营造类似于体内移植时的培养环境,使细胞的贴壁过程与胚胎在体内的附着过程相似,内细胞团快速增殖。其分化抑制作用则是由于能分泌白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor,LIF)等细胞分化抑制因子[19]。然而,使用 MEF 培养 ES 细胞有以下几方面的不足:①MEF 可能将动物病原通过培养系统传播给人 ES 细胞[20]。②需要制备大量的 MEF。因为 MEF 生命期有限,不能在体外长期传代,且其产生促增生因子和抑制分化因子的能力会随着传代时间的延长而减弱甚至丧失;③不易获得纯的 ES 细胞作为生化和分子生物学方面的分析;④死亡的 MEF 的染色体的释放可能会引起 ES 细胞的突变及影响正常核型的保持。

为了避免上述问题,多位学者建立了以人来源的胚胎或成体细胞作为饲养层的无动物来源成分的培养系统。分别用人胚胎成纤维细胞或成体输卵管上皮细胞、人的骨髓基质细胞、人包皮细胞、人胎盘上皮细胞代替 MEF 作为饲养层,均可以维持人 ES 细胞长期未分化的增殖状态[20,21]。尽管用人来源的细胞解决了生物安全问题,但以人饲养层为基础的培养系统仍然需要饲养层细胞和人 ES 细胞的同时生长。并且,临床细胞替代治疗常需要大量的细胞,目前的培养方法尚不能在短时间内大量扩增未分化的人 ES 细胞。因此,建立无动物来源成分和无饲养层的培养系统对大规模培养人 ES 细胞具有重要的临床应用价值。

2.2 无饲养层培养系统

无饲养层培养系统是在基础培养基中加入促进增殖和抑制分化的因子制备成条件培养基,或者利用各种能分泌以上因子的细胞制备条件培养基。不使用饲养层细胞而使用条件培养基培养人 ES 细胞是一种趋势。目前无饲养层系统培养人 ES 细胞主要经历以下 3 个阶段的发展:无血清系统、含动物来源基质和培养基的培养系统以及无动物来源成分的培养系统。

2.2.1 无血清培养系统

胎牛血清是 ES 细胞培养液中不可缺少的成分,在促进 ES 细胞增殖方面起到很好的作用。然而有如下缺点:①成分复杂,不利于整合到 ES 细胞基因组中的外源性基因功能的测定;②可能含有一些未知的促进 ES 细胞分化的因子;③含有微量的血红蛋白和内毒素,会干扰 ES 细胞的生长。采用无血清的培养系统,可避免以上缺陷[20]。无血清培养系统使用 Knockout DMEM 取代一般的高糖 DMEM,用 Knockout SR (serum replacement) 取代胎牛血清,并用人重组 bFGF 代替 LIF。实验结果表明,该系统能产生更多的人 ES 克隆。而且 Knockout SR 的成分是确定的,避免了血清中不明因子的影响。

2.2.2 含动物来源基质和培养基的培养系统

该培养系统在 Matrigel 基质上接种人 ES 细胞,用 100% MEF 条件培养基并添加 2%SR 以及 bFGF[22]。在该系统中,人 ES 细胞可以长期保持正常的核型、稳定的增长率、高端粒酶活性、未分化 ES 细胞的表型以及多向分化的潜能。然而,该方法仍然需要大量培养 MEF 以提供条件培养基。更重要的是,应用 MEF 条件培养基仍然可能将动物病原传播给人 ES 细胞。除此之外,matrigel 是从小鼠肉瘤中提取出来的基底膜基质成分。因此,选择无动物来源的细胞外基质和条件培养基,建立无动物来源成分的无饲养层培养系统来培养人 ES 细胞是最理想的趋势。

2.2.3 无动物来源成分的培养系统

该系统可以用不含动物成分的基质替代饲养层细胞,用人细胞来源的条件培养基或在基础培养基中加入人来源的促进增殖和抑制分化的因子,从而建立适于大规模扩增人 ES 细胞的无动物来源成分的培养系统。2001 年,Xu 等[22]提出,无饲养层培养人 ES 细胞在 matrigel 或 laminin 上形成的未分化克隆比在 fibronectin 或Ⅳ型胶原上的未分化克隆多。然而,即使在 matrigel 或 laminin,MEF 条件培养基仍然是必需的,因为后者可以为人 ES 细胞的生长提供可溶性信号和黏附信号的双重需要。Yamamoto 等[23]在无饲养层细胞的基础上,用 DMEM/F12 培养基添加血清和 LIF 可以保持人 ES 细胞的未分化状态。2004 年,Carpenter 等[24]和 Rosler 等[25]分别建立长期无饲养层培养人 ES 细胞的培养体系。同年,Amit 等[26]也建立了无饲养层和无血清的培养系统。该系统以 85% Knockout DMEM 为基础培养基,用 15% Knockout SR 和 bFGF 替代血清,在此基础上添加保持未分化和促进人 ES 细胞增殖的细胞因子:TGFβ,LIF;bFGF 和 fibronectin 基质。TGFβ1 在 Matrigel 基质中有表达,支持无饲养层条件下人 ES 细胞的生长,并且可以抑制人 ES 细胞的分化[22]。Fibronectin 可以增加细胞与培养皿的黏附,并可通过其受体 integrin 激活一系列信号途径调节细胞的活动,包括细胞的增殖、凋亡和分化等。而且,人 ES 细胞高表达 FGF1 型受体、LIF 受体和 integrin α6β1,弱表达 TGFβⅡ型受体。其中,经 TGFβ1 和 bFGF 组合或 TGFβ1、LIF 和 bFGF 组合处理后,在人 fibronectin 上生长的人 ES 细胞的生长率、克隆形成率以及未分化状态的维持效果最好。在该系统中,人 ES 细胞可以连续传 50 代以上,仍能保持高度的增殖能力、正常的核型

维普资讯 http://www.cqvip.com

以及向 3 个胚层分化的潜能。然而与 MEF 饲养层上生长的人 ES 细胞相比，其增殖和分化潜能均略降低。在该系统中，SR 含有 albumax，它是一种富含脂类的牛血清白蛋白。因此，该系统还不是一种完全无动物来源成分的培养系统。总之，该系统可以成功地培养人 ES 细胞，并且可降低动物病原传播给人 ES 细胞的危险性。

综上所述，采用无饲养层培养系统可以提高培养人 ES 细胞操作的方便性、可重复性以及规模性。为了提高无饲养层培养人 ES 细胞方法的效果，可在培养基中添加合适的细胞因子组合或选择合适的条件培养基。

目前胚胎干细胞的临床应用主要存在两方面的问题：①来源有限，没有足够数量的移植用胚胎干细胞；②由于胚胎干细胞具有不断自我更新的潜能，移植后有形成畸胎瘤的风险。因此，胚胎干细胞的发育分化、自我更新机制及体外培养系统的研究对胚胎干细胞的体外建系和体外扩增、胚胎干细胞的定向分化调控等方面的研究都有极其重要的意义，同时为胚胎干细胞在临床上的广泛应用提供理论依据和实践基础。

参 考 文 献

[1] Kristensen DM, Kalisz M, Nielsen JH. Cytokine signalling in embryonic stem cells[J].APMIS,2005;113(11-12):756-772.

[2] Williams RL,Hilton DJ,Pease S,et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells[J]. Nature, 1988;336(6200): 684-687.

[3] Chojnacki A,Shimazaki T,Gregg C,et al.Glycoprotein 130 signaling regulates Notch1 expression and activation in the self-renewal of mammalian forebrain neural stem cells [J]. J Neurosci,2003;23 (5): 1730-1741.

[4] Gearing D P,Thut CJ,VandeBos T, et al.Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer,gp130.EMBO J,1991;10(10): 2839-2848.

[5] Niwa H,Burdon T,Chambers I,et al. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3[J].Genes Dev,1998; 12(13): 2048-2060.

[6] Hombria JC,Brown S.The fertile field of Drosophila Jak/STAT signalling[J].Curr Biol,2002;12(16): R569-575.

[7] Matsuda T, Nakamura T, Nakao K,et al.STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells[J]. EMBO J,1999;18(15): 4261-4269.

[8] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al.Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway: regulation and physiological funcdons[J]. Endocr Rev,2001;22: 153-183.

[9] Meloche S,Vella F D,Voisin L,et al.Erk2 Signaling and early embryo stem cell self-renewal[J]. Cell Cycle, 2004;3(3): 241-243.

[10] Burdon T,Smith A,Savatier P. Signalling,cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells[J]. Trends Cell Biol,2002;12(9):432-438.

[11] Burdon T,Stracey C,Chambers I,et al. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells[J]. Dev Biol, 1999;210(1): 30-43.

[12] Ying Q L, Nichols J. Chambers I, et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3[J]. Cell, 2003;115(3):281-292.

[13] Qi X,Li TG,Hao J,et al. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2004;101(16):6027-6032.

[14] Cadigan K M,Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev,1997;11(24): 3286-3305.

[15] Constantinescu S.Sternness, fusion and renewal of hematopoietic and embryonic stem cells[J]. J Cell Mol Med, 2003; 7(2):103-112.

[16] 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.

[17] Nisbimoto M, Miyagi S, Yamagishi T,et al. Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus[J].Mol Cell Biol, 2005;25(12):5084-5094.

[18] Mitsui K,Tokuzawa Y,Itoh H,et a1. The homeoprotein nanog is required forma intenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.Cell 2003;113(5):631-642.

[19] Chambers I,Colby D,Robertson M,et a1.Functional expression cloning of nanog a pluripotency sustaining factor in erbryonic stem cells[J].Cell, 2003; 113(5):643-655.

[20] Richards M,Fong CY,Chan WK,et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem c ells[J].Nat Biotechnol,2002;20(9):933-936.

[21] Miyamoto K,Hayashi K,Suzuki T,et al. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells[J]. Stem Cell,2004;22(4): 433-440.

[22] Xu C,Inokuma MS,Denham T,et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J].Nat Biotechnol,2001;19 (10): 971-974.

[23] Yamamoto M,Tachibana T,Hashimoto H,et al. The differentiation of early embryonic stem cells into adipocytes-like cells[J].Hum Cell,2003;16 (3): 117-122.

[24] Carpenter MK,Rosler ES,Fisk GJ,et al.Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system[J].Dev Dyn,2004;229(2):243-258.

[25] Rosler ES,Fisk GJ,Ares X,et al.Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions[J].Dev Dyn,2004;229(2): 259-274.

[26] Amit M,Shariki C,Margulets V,et al. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells[J].Biol Reprod,2004;70(3): 837-845.