3 讨论

本研究中我们共收集了23枚冻融后胚胎，根据Nagy等[8]报道的胚胎分级标准，通过序贯培养，体外继续培养3～4 d，评分Ⅲ～Ⅳ级评分低的废弃胚胎，有15.4%(2/13)发育到囊胚阶段，明显低于评分Ⅱ级评分好的胚胎[20.0%(2/10)]，与Farhi等[9]认为D3低评分胚胎的囊胚发育率低相吻合。每年生殖中心都有行FET周期胚胎冻融后复苏率<50%的体外废弃胚胎，但仍然有低质量的胚胎可以发育为形态正常的囊胚[10-12]。我们在实验中发现，质量差的胚胎继续培养可形成囊胚，用这些胚胎进行胚胎干细胞的分离培养，可以缓解hESC分离培养的材料短缺问题。

由于滋养层(trophoderm，TE)会与ICM竞争培养基的营养，抑制了ICM增殖，并且诱导其分化，因此必须将TE尽量去除。从囊胚中分离ICM是hESC建系的第1步，也是最关键的一步。常用分离ICM的方法有机械法和免疫刀法。

考虑到所得囊胚质量，我们采用了全囊胚培养法获得hESC系——NS1，它们具有hESC的共有生物学特性：未分化的细胞AKP、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81呈阳性，SSEA-1呈阴性，而分化的hESC SSEA-1呈阳性。悬浮培养或过度生长可形成拟胚体，在SCID小鼠体内可形成畸胎瘤。核型为正常46XY，表达胚胎干细胞的特异基因。在以后的实验中，我们可以尝试其他囊胚培养法分离ICM来提高ICM的获得率并提高建系率。

参考文献：

[1] Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, *et al*. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(2 Pt 1): 755-758.

[2] Zhang X, Stojkvic P, Przyborski S, *et al*. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos[J]. Stem Cells, 2006, 24(12): 2669-2676.

[3] Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, *et al*. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 113-117.

[4] Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, *et al*. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres[J]. Nature, 2006, 444(7118): 481-485.

[5] Landry D W, Zucker H A. Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells[J]. J Clin Invest, 2004, 114(9): 1184-1186.

[6] Jurisicova A, Acton B M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development[J]. Reproduction, 2004, 128(3): 281-291.

[7] Hardy K, Spanos S, Becker D, *et al*. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(4): 1655-1660.

[8] Nagy Z, Liu J, Cecile J, *et al*. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection[J]. Fertil Steril, 1995, 63(4): 808-815.

[9] Farhi J, Nahum H, Weissman A, *et al*. The value of culturing to the blastocyst stage of supernumerary embryos not suitable for freezing after embryo transfer at day 3[J]. Fertil Steril, 2001, 76(3 Suppl 1): S118.

[10] Alikani M, Calderon G, Tomkin G, *et al*. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture *in-vitro*[J]. Hum Reprod, 2000, 15(12): 2634-2643.

[11] Hardy K, Stark J, Winston R M. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos[J]. Biol Reprod, 2003, 68(4): 1165-1169.

[12] Racowsky C, Combelles C M, Nureddin A, *et al*. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability[J]. Reprod Biomed Online, 2003, 6(3): 323-331.

(收稿：2010-05-06 修回：2010-07-04)
(编辑 张 维)

中国科技核心期刊《中华临床医师杂志(电子版)》2011年度征稿征订

《中华临床医师杂志(电子版)》由国家卫生部主管，中华医学会主办，是中国科技论文统计源期刊，中国科技核心期刊。半月刊，全年出刊24期，定价672元，国内刊号CN 11-9147/R，邮发代号80-728，以电子版、纸版导读同时面向全国公开出版发行，被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。本刊2011年上半年刊出重点栏目分别为：耳鼻咽喉、口腔颌面部肿瘤；泌尿生殖系肿瘤；儿童心脑血管病；乳腺肿瘤；脊柱及关节疾病；内镜在消化系统疾病中的应用；呼吸系统肿瘤；内分泌及代谢疾病；肠内及肠外营养；高血压及并发症；肝胆肿瘤；危重症的处理等。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志！欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文！

地 址：北京市100035-50信箱 编辑部 收 邮 编：100035

电 话：(010)62219211 传 真：(010)62222508 E-mail：Lcdoctor@163.com

网 址：www.clinicmed.net