

人胚胎干细胞建系的研究现状与存在的问题

孟国良* 尚克刚 丁明孝

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 人胚胎干细胞系的建立,对人类胚胎发生和人类发育生物学研究、人类新基因的发现和功能研究以及基因治疗、细胞和组织的移植治疗等领域的突破性进展具有重大意义;回顾了人胚胎干细胞建系研究的历程,就建系的几种方案、路线、意义和可行性进行了探讨,详细系统地说明了迄今为止建立人胚胎干细胞系所需要的饲养层类型、培养基组成、添加细胞因子种类及其作用;分析了建立和维持人胚胎干细胞系所需消化酶的种类及其作用以及目前常用的几种传代方法;从若干方面总结了人胚胎干细胞系的鉴定方法,并对建立和维持人胚胎干细胞系中存在的若干问题进行了剖析,提出了目前急待解决的问题。

关键词 人胚胎干细胞,人胚胎生殖细胞,多能性,分化,端粒酶

中图分类号 Q813 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)02-0131-05

小鼠胚胎干细胞(ES细胞)系的建立,为其它动物及人类胚胎干细胞的分离和体外培养开辟了通道。自1981年英国剑桥大学的Evans和Kaufman^[1]以及美国加州大学旧金山分校的Martin^[2]用不同的方法成功分离、建立了小鼠胚胎干细胞系以来,人们先后建立了鱼类、鸟类、哺乳动物^[3-13]以及人类的ES细胞系或类ES细胞系^[14,15]。

1998年,美国威斯康星大学的Thomson^[14]和霍普金斯大学的Gearhart小组^[15]分别报道了他们用不同材料、不同方法成功分离、建立了具有多方向分化潜能和永久增殖能力的人胚胎干细胞(ES细胞)系和人胚胎生殖细胞(EG细胞)系(也有人把二者统称为胚胎干细胞系)。人胚胎干细胞系的建立,引起了各国政府和研究人员的极大兴趣,并为此引发了关于伦理、道德等方面的激烈争论,各国政府也纷纷制定了相关法律。尽管如此,科学工作者在短短的1~2年时间里,在人ES细胞定向分化、细胞与组织的移植治疗等方面取得了瞩目的成就,这项研究分别被美国《Science》杂志和《Times》周刊评为1999年和20世纪末世界十大科技成就之首。

人胚胎干细胞系的分离和体外成功培养,在人类生命科学研究的理论和实践中将产生重大的意义和影响。人ES细胞可用于体外研究人类胚胎发生发育及非正常发育,有助于理解发育过程的机理、认识生命和疾病现象,从而进一步丰富、完善和发展人类发育生物学;通过对其体外分化和定向分化的研究,识别某些靶基因,为人类新基因的发现及其功能的研究提供了一种新方法;临床上,在生育缺陷的控制和检测等方面的研究中将发挥重要作用,尤其为基因治疗、细胞和组织的移植治疗的突破性进展提供了不可替代的细胞

资源^[16-20]。

上述各项重大研究的基础在于体外分离、培养永恒增殖的、具有多能或全能性的人胚胎干细胞系。到目前为止,有关人ES细胞建系成功的报道仅有3例^[14,15,21],用于建系的培养系统还不够完善,建系和培养过程中还存在不少问题。这些问题的存在限制了人ES细胞的研究和应用,因此进一步完善人ES细胞的培养系统已成为当务之急。

1 人胚胎干细胞建系的研究历程

1984年Thompson^[22]和Andrews^[23]两个小组分别报道从人的畸胎瘤获得了可在体外分化为神经及其它细胞类型的克隆细胞系,随后,Pera等人^[24]从人的畸胎瘤中分离得到的这类细胞系可分化为代表三个胚层的不同组织,这种来自畸胎瘤的细胞系被称之为EC细胞系。人的EC细胞系往往具有非整倍体核型,通常自然分化为体细胞和组织的能力较低,况且由于EC细胞的致癌性,使这种干细胞在理论研究和实际中的应用受到了限制^[25-27]。然而,这些尝试性的工作初步表明了分离、培养人ES细胞的可行性;1994年,Bongso等人^[28]以人输卵管上皮细胞为饲养层,在IVF组织培养液中,将体外受精的21枚原核期胚胎培养至囊胚,然后在Chang氏培养基中添加人白血病抑制因子(hLIF)继续培养,第一次获得了可增殖传代的类人ES细胞克隆,并传代培养至第二代;1995年,Thomson^[29]以小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)做饲养层,以添加了20%FBS及多种微量添加物的DMEM为培养基,第一次从恒河猴囊胚中分离建立了3株灵长类ES细胞系,其中1株在体外传代培养1年多时间,另2株在体

外培养 3 个月以上,均具有稳定正常的核型和分化为滋养层及三个胚层不同组织的能力;1996 年, Thomson 等^[30]建立了 8 个猴的 ES 细胞系,其中 2 株在体外培养长达 1 年有余,仍维持了正常核型和未分化状态,在撤掉饲养层的情况下,可分化为包括滋养层和内胚层在内的多种细胞类型;1998 年, Thomson^[14]利用临床上自愿捐献的体外受精的胚胎在 G1.2 和 G2.2 培养基中培养至囊胚,然后以 γ -射线灭活的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)为饲养层,以补加 20% FBS 及多种微量添加物的 DMEM 为培养基,从 14 个囊胚的内细胞团(ICM)中分离出 5 个人的 ES 细胞系,这些细胞系具有高的端粒酶活性和正常核型,其中 4 株在体外培养了 5~6 个月,1 株在体外培养了 8 个月(32 代),5 个细胞系都保持了形成 3 个胚层不同组织和细胞的能力;同年, Gearhart 小组^[15]以 5~9 周胎儿生殖脊和肠系膜为材料,以 γ -射线灭活的 STO/STO 细胞是来自 SIM 小鼠胚胎的(S)对硫代鸟嘌呤(Thioguanine, T)和乌本苷(Ouabain, O)有抗性的成纤维细胞系]为饲养层,以添加 15% FBS 和其它微量添加物及多种生物因子的 DMEM 为培养基,分离出 5 个 EG 细胞系,其特征与小鼠 ES 和 EG 细胞系相似,所获得的细胞在 MEF、HEF(人胚胎成纤维细胞)及明胶处理过的培养皿上培养是不成功的,这些饲养层和基质不能替代 STO 来建立 EG 细胞系;2000 年, Reubinoff^[21]采用与 Thomson 相似的方法从 4 个人的囊胚中获得 2 株人 ES 细胞系,这 2 株 ES 细胞系增殖速度快、核型正常,在未分化状态下已分别在体外传代培养 64 和 44 代,群体倍增分别为 384 和 264,注射到严重联合性免疫缺陷小鼠(SCID)体内能分化为来自 3 个胚层的不同组织,体外可分化为滋养层和各种体细胞类型。同时,表达多能干细胞所特有的转录因子 Oct-4。同年, Ami^[31]从体外培养的 6~7 个月的人 ES 细胞系中,以 MEF 为饲养层,以添加了 bFGF 的无血清培养液为培养基,在 384 个单细胞中获得 2 个可扩大培养的克隆细胞系,这两个克隆细胞系,经 6 个月的传代培养,仍维持了母代 ES 细胞系的正常核型、表达特异标记和多分化潜能。

2 人胚胎干细胞建系路线

2.1 囊胚法

将人工受精得到的胚胎培养至囊胚,分离培养其内 ICM,进一步分离、培养增殖的 ICM 及 ES 细胞集落,扩大培养后即得到人 ES 细胞系。Thomson 和 Reubinoff 是采用这一方法分别建立起人 ES 细胞系的,即:体外受精胚胎→囊胚→脱去透明带→裂解滋养层细胞→MEF 上培养分离的 ICM→离散增殖的 ICM 为细胞团块→重新接种在 MEF 上培养→出现多个 ES 样集落→扩大培养→核型、带型分析及鉴定→成系。

2.2 胎儿原始生殖细胞(PGCs)法

从 5~9 周流产胎儿分离、培养 PGCs 细胞,获得具有多分化潜能的胚胎生殖细胞系(EG 细胞系),有人将其称为生殖干细胞(Germ Stem Cell, 即 GS),也有人将其和来自囊胚的多能干细胞统称为人胚胎干细胞(即 ES 细胞)。Gearhart 小

组从流产胎儿的 PGCs 中建立了 5 个人多能 EG 细胞系:

人胎儿生殖脊及肠系膜→离散为单细胞或小细胞团→STO 饲养层上培养→出现 ES 样集落→离散后重新接种到 STO 饲养层上培养→扩大培养→分析、鉴定→成系。

2.3 核移植细胞法

首先将人卵母细胞脱核,然后将体细胞的细胞核转移到去核卵细胞中,再将这种经核转移处理的卵细胞进行体外培养,待囊胚形成后分离、培养其内细胞团,获得人 ES 细胞的过程与囊胚法相似。不过,用这种方法获得的是携带特定个体遗传物质的胚胎干细胞,是治疗性克隆的珍贵细胞资源。建系的技术路线示意图如下^[32]:

病人体细胞→体细胞核移入去核卵母细胞→卵裂期的胚→囊胚期的胚→培养分离的 ICM→分离、扩大培养 ES 细胞→遗传基因的改造或修饰→定向分化为特定的组织→组织移植给病人。

也有研究者利用其它哺乳类动物的卵细胞作为人体细胞核受体进行细胞核转移研究,如用牛的卵细胞进行的人类 ES 细胞的克隆实验,还有人利用胚胎干细胞的细胞质与成人细胞核形成融合细胞,对核内遗传信息重新编程,从而实现体细胞的多能或全能化。但是,由于在伦理、技术以及机理方面尚存在不少问题,这两方面的研究还在探索之中,目前还没有肯定的研究结论^[32, 33]。

3 建立和维持人胚胎干细胞系的条件

3.1 饲养层

饲养层是建立和维持人 ES 细胞系的必要条件。迄今为止,已分离得到的非人灵长类和人胚胎干细胞系无一不是在饲养层条件下建立和维持的。除人 EG 细胞系是以 STO 细胞为饲养层建立的之外^[15],非人灵长类和人胚胎干细胞系均以小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)为饲养层建立的^[14, 21, 29, 30]。在无饲养层的情况下,人 ES 细胞毫无例外地分化为多种细胞类型^[25, 27]。到目前为止,还没有发现一种细胞因子或条件培养基能够替代饲养层细胞的作用。已有的结论表明,MEF 作为建立人 ES 细胞系的饲养层是可行的、有效的。其它饲养层,如人胚胎成纤维细胞及输卵管上皮细胞,均不能替代 MEF 的作用^[14, 15, 21, 28]。在小鼠 EG 细胞的建系和维持过程中,MEF 也是其必要条件之一。而在仅有的一例关于人 EG 细胞系的建系报道中,用 MEF 作为饲养层却是不成功的,而 STO 饲养层在人 EG 细胞建系中具有不可替代的作用^[15]。这一结论是很难解释的,因为仅有一例报道,尚不能确定 MEF 在人 EG 细胞建系中的确切作用。

3.2 培养基组成

用于人和其它动物胚胎干细胞分离培养的培养基的组成大同小异,一般采用 DMEM(无丙酮酸钠、4500mg/L 葡萄糖)培养液,补加 15%~20% 的胎牛血清(Hyclone)和其它一些微量成分如 β -ME、非必需氨基酸、谷氨酰胺等,如 Thomson 和 Reubinoff 所采用的培养基组成分别为:DMEM + 20% 胎牛血清 + 100mg/L 谷氨酰胺 + 100mg/L β -ME + 1% 非必需氨基

酸,DMEM + 20% 胎牛血清 + 2mmol/L 谷氨酰胺 + 0.1mmol/L β -ME + 1% 非必需氨基酸 + 50IU/mL 青霉素 + 50 μ g/mL 链霉素 + 2000IU/mL hLIF。这两组配方并无本质区别,主要不同在于后者添加了人白血病抑制因子(hLIF),但 Reubinoff 的研究工作证明了 hLIF 在人胚胎干细胞建系和维持过程中是没有作用的。Gearhart 等人在建立 EG 细胞系中所用的培养基组成为:DMEM + 15% 胎牛血清 + 2mmol/L 谷氨酰胺 + 0.1mmol/L β -ME + 0.1mmol/L 非必需氨基酸 + 1mmol/L 丙酮酸钠 + 100IU/mL 青霉素 + 100 μ g/mL 链霉素 + 2000IU/mL hLIF + 1ng/mL hFGF + 10 μ mol/L Forskolin(毛喉素),从这一培养基组成可以看出,其与前二者的主要不同在于培养基中添加了多种细胞因子。现在已经清楚,无论是小鼠 EG 细胞系还是人 EG 细胞系的建立和维持,LIF、FGF、forskolin 都是不可缺少的^[14,15,25,27,35]。

3.3 增殖的 ICM、胚胎干细胞克隆的离散及扩大培养

到目前为止,在人胚胎干细胞建系和培养过程中还没有找到一种理想的消化液。人的 ES 细胞在胰蛋白酶(Trypsin)消化液中很容易离散为单个细胞,而单个 ES 细胞是很难形成克隆的;人的 EG 细胞恰恰相反,对 Trypsin 消化液有相当强的抗性,很难将 EG 细胞克隆离散为单个细胞悬液,只能分离为细胞团块。所以在人 ES 和 EG 建系和培养过程中所用的消化液是不一样的^[14,15,21,29]。

1994 年,Bongso 在最初分离人 ES 细胞时,曾以 0.5% Trypsin-0.53% EDTA 消化液离散 ICM 和人 ES 细胞克隆,但 ES 细胞克隆仅传递 2 代,并未建成系。没有建成 ES 细胞系的原因,除了饲养层和培养基等因素外,可能也与消化液不理想有关。在 2 例人胚胎干细胞建系成功的报道中,均以以下方法继代培养 ES 细胞:首先用 1mol/L EDTA 的无 Ca^{2+} / Mg^{2+} PBS、或 10mg/mL 中性蛋白酶、或机械法离散增殖的 ICM,接着用毛细管机械法离散出现的 ES 细胞集落,再用 1mg/mL 的 IV 型胶原酶或机械法进行扩增和传代培养。细胞团块的大小以 50~100 个细胞为宜,单细胞和小细胞团块重新接种后很难增殖。在人 ES 细胞单细胞克隆研究中,用 0.05% Trypsin-0.25% EDTA 将细胞消化为单细胞悬液,结果仅得到 2 个可以进一步扩大培养的克隆,可见单个细胞的增殖是极其困难的,克隆的扩大培养,则用 IV 型胶原酶。在建立人 EG 细胞系时,用 0.05% Trypsin-0.53% EDTA 或 0.25% Trypsin 进行扩大培养是可行的。

4 人胚胎干细胞的生物学特性及鉴定方法

人胚胎干细胞是来自着床前胚胎或胎儿原始生殖细胞(PGCs)的、可在体外未分化状态下长期增殖传代培养的、具有稳定的二倍体核型和多能干细胞表面特异标记的、可分化为 3 个胚层来源的各种组织和细胞类型的永久细胞系^[14,15,25,27]。胚胎干细胞鉴定的理论基础是其生物学特性。

4.1 人胚胎干细胞特点及其集落形态

人胚胎干细胞与小鼠胚胎干细胞相似:细胞体积小,核大而明显,有一个或多个核仁,核质比高。ES 细胞在体外培

养时呈集落状生长,就集落形态而言,人的 EG 细胞集落与小鼠 ES 细胞集落更接近,呈紧密牢固结合、多层密集立体生长的无明显细胞界限的集落;而人的 ES 集落与小鼠的明显不同,呈相对松散、扁平状集落,集落内细胞界限隐约可见^[14,15,25,27,35]。

4.2 核型分析

人胚胎干细胞具有正常稳定的二倍体核型和带型。Thomson 等人所建立的 5 个细胞系中,3 个具有正常 XY 核型,2 个具有 XX 核型,其中 H9 细胞系经 6 个月的培养仍维持正常的 XX 核型;Gearhart 等建立的 EG 细胞系在 8~10 代(60~70d)进行了核型分析,在 5 个 EG 细胞系中,3 个为 XX 核型,2 个为 XY 核型,核型正常稳定;Reubinoff 建立的 2 个 XX 核型人 ES 细胞系 HES-1 和 HES-2 分别在 5~7、14~18、22~26、44~46 代和 6~8、40~42 代进行了核型检测,结果表明,两个细胞系在体外培养数十代后仍保持了正常核型;Amit 等人从体外培养 6 个月 H9 细胞系中克隆出 2 个 ES 细胞系 H9.1 和 H9.2,这 2 个细胞系在体外继续培养 8 个月仍保持了正常的 XX 核型。

4.3 碱性磷酸酶活性测定

碱性磷酸酶(AKP)活性常被用来作为鉴定胚胎干细胞及其分化与否的重要标志,非人灵长类和人胚胎干细胞碱性磷酸酶活性呈阳性,已分化的细胞呈弱阳性或阴性^[15,30]。

4.4 人胚胎干细胞特异性表面抗原的表达

人胚胎干细胞表面抗原的表达与小鼠 ES 细胞存在明显的种属差异,如小鼠 ES 细胞表达早期胚胎细胞的特异性表面抗原 SSEA-1,但并不表达 SSEA-3 和 SSEA-4^[36];而人 ES 细胞则表达人早期胚胎阶段特异性抗原 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81;人 EG 细胞表达 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81。人的 ES 细胞表现 SSEA-1 阴性,而人的 EG 细胞、小鼠的 ES 细胞和 EG 细胞则表现 SSEA-1 阳性。目前认为,SSEA-1 的表达与否,可能反映了相对扁平疏松结合的 ES 细胞集落(SSEA-1 阴性)与多层叠垛集落的 ES 细胞(SSEA-1 阳性)之间存在的差异^[14,15,25,27,31]。

4.5 胚胎干细胞的端粒酶活性

端粒酶是增加染色体末端端粒序列、维持端粒长度的一种核糖核蛋白,端粒长度对其复制寿命具有很重要的作用,端粒酶的表达与人细胞系的永生程度高度相关;向人的某些二倍体细胞中重新导入端粒酶活性将会延长其复制寿命;人的二倍体细胞不表达端粒酶活性,随着年龄的增长,其染色体端体变短,在组织培养过程中,经过有限的增殖期后,即进入复制衰老状态。相反,在生殖细胞系和胚胎细胞中,端粒酶高水平表达^[37,38]。因此,人 ES 细胞系高水平端粒酶活性的表达,表明其复制寿命要长于体细胞的复制寿命^[14,21]。

一般而言,端粒酶的活性与端粒长度的维持是相关的,人 ES 细胞系表达高水平端粒酶活性,说明这类细胞体外未分化状态培养的永久性。

4.6 转录因子 Oct-4 的表达

Oct-4 是 POU 区域的一个转录因子,在小鼠,它只限定

在多潜能细胞中表达^[39]。最近的研究结果直接表明,受精卵所表达的 Oct-4 对于建立自 ICM 的多能干细胞来说是必需的^[40]。Oct-4 也在人的 EC 细胞中表达^[24,41]。用 RT-PCR 分析人 ES 细胞的 mRNA,结果表明,人的 ES 细胞也表达 Oct-4。克隆 PCR 产物并测序,显示了其与 Oct-4 序列的一致性^[21]。人和小鼠的 ES 细胞都表达转录因子 Oct-4,当 ES 细胞分化时,其表达能力大大降低。Oct-4 可能是哺乳动物不同发育阶段多潜能细胞所特有的少数特异的调控分子之一。

4.7 体内外分化能力鉴定

将人 ES 细胞或 EG 细胞注射到 SCID 小鼠体内将产生畸胎瘤,每个畸胎瘤都包括内胚层、中胚层和外胚层三个胚层的不同组织和细胞类型^[14,45,21]。在体外经过长期培养和重新亚克隆的人 ES 细胞系,都能保持其多方向分化潜能^[21,31]。

人 ES 细胞在缺乏小鼠胚胎成纤维细胞饲养层时,无论培养基中是否添加 LIF,都会分化为滋养层和各种细胞类型^[21]。高密度培养的情况下可获得与早期着床后的胚胎非常相似的类胚体。

5 人胚胎干细胞建系中存在的问题

(1)与小鼠囊胚不同,人的囊胚在体外培养情况下不容易自行脱去透明带,用囊胚的免疫手术法建立人的 ES 细胞系,如果操作不熟练、去除透明带和滋养层所用的链酶蛋白酶(Pronase)、抗血清和补体的浓度及作用时间不合适,就不容易彻底去除滋养层或是造成 ICM 受损,从而影响 ICM 的完整性、贴壁能力及生长状况。如果滋养层去除不净,贴壁生长的 ICM 在生长过程中会很快发生分化。

(2)受材料来源限制,无法像小鼠 ES 细胞那样建系,限制了各种实验方案的实施和可行性探讨。

(3)目前为止,还没有找到一种理想的人 ES 细胞传代培养的消化液和离散方法。离散 ICM 增长物、ES 样集落以及扩大培养所应用的方法和消化液还不尽人意,每次离散或传代都有大量细胞死亡。重新接种的 ES 细胞团块在 50~100 个细胞时,才可能长成新的 ES 细胞集落;细胞团块在 10 个细胞以下时,很难再生长为新的集落^[14,21]。Amit 等人在进行人 ES 细胞克隆时,在接种的 384 个单细胞中,只出现了 2 个可以扩大培养的克隆,而且其要求的条件极其苛刻^[31]。目前的培养系统和培养条件仅仅是亚适合的,而不是理想的。

(4)人的 ES 细胞系是饲养层依赖型的^[14,45,21],在建系和培养过程中缺乏对 LIF 及该细胞因子家族相关成员的反应。在无饲养层的情况下,无论培养基中有无 LIF 等因子,ES 细胞都将发生分化^[14,21];而人的 EG 细胞有所不同,至少部分依赖于 LIF 和 bFGF^[15]。

(5)在不明人早期胚胎发生的机理、相关基因的开放、表达、调控及信号传导路径的情况下,采用模仿建立小鼠 ES 细胞系的方法建立人的 ES 细胞系有很大的偶然性。

(6)迄今为止,除 Thomson、Gearhart、Reubinoff 等的报道外,尚无其它成功建系的例子,国内也在这方面进行了探索,但到目前为止还没有真正建成一株人胚胎干细胞系。

由此可见,人胚胎干细胞建系方面的研究,还有许多工作要做,只有真正解决了建系过程中的这些问题,才可能为后续的一系列研究开辟道路、奠定基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Evens M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryo. *Nature*, 1981, **292**: 154 ~ 156
- [2] Martin G R. 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**: 7634 ~ 7638
- [3] Hong Y, Winkler C, Scharl M. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*). *Mech Dev*, 1996, **60**: 33 ~ 34
- [4] Sun L, Bradford C S, Ghosh *et al.* ES-like cell culture derived from early zebrafish embryos. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995b, **4**: 193 ~ 199
- [5] Pain B, Clark M E, Shen M *et al.* Long-term *in vitro* culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*, 1996, **122**: 2339 ~ 2348
- [6] Raved K H. Derivation of pluripotential embryonic cells from the rabbit. *Trans Assoc Am Physicians*, 1992, **105**: 197 ~ 203
- [7] Iannaccone P M, Taborn G W, Garton R L *et al.* Pluripotent stem cells from the rat are capable of producing chimera. *Dev Biol*, 1994, **163**: 288 ~ 292
- [8] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J *et al.* Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nature Biotech*, 1998, **16**: 642 ~ 646
- [9] Doetschman T, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol*, 1998, **127**: 224 ~ 227
- [10] Sukoyan M A, Vatocin S Y, Golubitsa A N *et al.* Embryonic stem cells derived from morulae inner cell mass and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev*, 1993, **36**: 148 ~ 158
- [11] Wheeler M B. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev*, 1994, **6**: 563 ~ 568
- [12] Chen L R, Shiue Y L, Bertolini L *et al.* Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryo. *Theriogenology*, 1999, **52**: 195 ~ 212
- [13] Thomson J A, Kalishman J, Golos T G *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 7844 ~ 7848
- [14] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282**: 1145 ~ 1147
- [15] Shambhott M J, Axelman J, Wang S *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 13726 ~ 13731
- [16] Odorico J S, Kaufman D S, Thomson J A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 2001, **19**: 193 ~ 204
- [17] Marshall E. A versatile cell line raises scientific hopes, legal questions. *Science*, 1998, **282**: 1014 ~ 1015
- [18] Vogel G. Harnessing the power of stem cells. *Science*, 1998, **283**: 1432 ~ 1437
- [19] Rathjen P D, Lake J, Whyatt L M *et al.* Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biological gene therapy. *Reprod Fert Dev*, 1998, **10**: 31 ~ 47
- [20] Gearhart J. New potential for human embryonic stem cells. *Science*, 1998, **282**: 1061 ~ 1062

- [21] Reubinoff B E , Pera M F , Fong C Y *et al* . Embryonic stem cell lines from human blastocysts :somatic differentiation *in vitro* . *Nat Biotechnol* ,2000 ,**18** :399 ~ 404
- [22] Thompson S , Stern P L , Webb M *et al* . Cloned human teratoma cells differentiate into neuron-like cells and other cell type in retinocidic acid . *J Cell Sci* ,1984 **72** :37 ~ 64
- [23] Andrew P W , Damjanov I , Simon D *et al* . Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2 . *Lab Invest* ,1984 **50** :147 ~ 162
- [24] Pera M F , Cooper S , Mills L *et al* . Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells . *Differentiation* ,1989 **42** :10 ~ 23
- [25] Pera M F , Reubinoff B F , Trounson A . Human embryonic stem cells . *J Cell Sci* ,2000 **113** :5 ~ 10
- [26] Andrew P W . Human teratocarcinomas . *Biochim Biophys Acta* ,1988 ,**948** :17 ~ 36
- [27] Thomson J A , Odorico J S . Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines . *Tibtech* ,2000 **18** :53 ~ 57
- [28] Bongso A , Fong C Y , Ng S C *et al* . Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts . *Hum Reprod* ,1994 **9** :2110 ~ 2117
- [29] Thomson J A , Kalishman J , Golos T G *et al* . Isolation of a primate embryonic stem cell line . *Proc Natl Acad Sci USA* ,1995 **92** :7844 ~ 7848
- [30] Thomson J A , Kalishman J , Golos T G *et al* . Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts . *Biol Reprod* ,1996 **55** :254 ~ 259
- [31] Amit M , Carpenter M K , Inokuma M S *et al* . Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture . *Dev Biol* ,2000 **227** :271 ~ 278
- [32] Solter D , Gearhart J . Enhanced putting stem cells to work . *Science* ,1998 **283** :1468 ~ 1478
- [33] Marshall E . Claim of human-cow embryo created with skepticism . *Science* ,1998 **282** :1390 ~ 1391
- [34] Matsui Y , Zsebo K , Hogan B L M . Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture . *Cell* ,1992 **70** :841 ~ 847
- [35] Thomson J A , Marshall V S . Primate embryonic stem cells . *Curr Top Dev Biol* ,1998 **38** :133 ~ 165
- [36] Ozawa M *et al* . Ssea-1 , a stage-specific embryonic antigen of the mouse , is carried by the glycoprotein-bound large carbohydrate in embryonal carcinoma cells . *Cell Differ* ,1985 **16** :169 ~ 173
- [37] Betts D H , King W A . Telomerase activity and telomere detection during early bovine development . *Dev Genet* ,1999 **25** :397 ~ 403
- [38] Brenne C A , Wolry Y M , Adlter R R *et al* . Alternative splicing of the telomerase catalytic subunit in human oocytes and embryos . *Mol Hum Reprod* ,1999 **5** :845 ~ 850
- [39] Scholer H R , Hatzopoulos A K , Balling R *et al* . A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis :evidence for germline-specific expression of an OCT factor . *The EMBO J* ,1989 **8** :2543 ~ 2550
- [40] Nichols J *et al* . Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor oct4 . *Cell* ,1998 **95** :379 ~ 391
- [41] Pera M F *et al* . Differentiation of pluripotent teratocarcinoma stem cells induced by bone morphogenetic protein-2 . *Reprod Fertil Dev* ,1999 **10** :551 ~ 556

Current State of Establishing and Maintaining Human Embryonic Stem Cell Lines and Key Problems in These Studies

MENG Guo-Liang* SHANG Ke-Gang DING Ming-Xiao
(College of Life Sciences , Peking University , Beijing 100871 , China)

Abstract Derivation of human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines has widespread and far-reaching significance on human basic research and transplantation therapies. Human pluripotential stem cells provide an exciting new model for studying early human embryogenesis , understanding normal human development and abnormal development , provide a powerful system for discovering human novel genes and testing their function , offer new strategies for discovering of novel growth factors and medicines and promise a renewable source of cells for tissue transplantation , cell replacement and gene therapies. Research history of establishment of human ES and EG cell lines is reviewed. Several methods of establishment of these cell lines involving in the protocol , route , significance and possibility are discussed. Selection of the feeder layer , medium , and supplemental cytokines and their roles in establishing and maintaining human ES and EG cell lines at present are illustrated in detail systematically. Effects and used methods of several kinds of digestive enzyme in propagations are prepared. Several methods for identifying human ES and EG cells are summarized. At the end , some key problems which are urgent to resolve in these studies at present are put forward and analyzed.

Key words human embryonic stem cells , human embryonic germ cells , pluripotent , differentiation , telomerases

Received : 07-24-2001

* Corresponding author. Tel 86-10-62751858 ; E-mail : menggl@263.net