

胚胎干细胞体外定向诱导分化研究进展*

宋晓平, 窦忠英

(西北农林科技大学 家畜生殖内分泌与胚胎工程农业部重点开放实验室, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 胚胎干细胞是由早期内细胞团分离的一种多潜能细胞, 在体外分化抑制培养时, 可保持未分化状态而无限增殖。一旦撤除分化抑制因素, 或添加适当的诱导剂, ES 细胞可分化为内胚层、中胚层和外胚层的多种类型的特化细胞。文章综述了体外定向诱导 ES 细胞分化为造血细胞、心肌细胞、神经细胞、脂肪细胞、胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞、成骨细胞、软骨细胞和黑素细胞等的途径和方法。

[关键词] 胚胎干细胞; 定向诱导分化; 生物工程

[中图分类号] Q 813.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)02-0161-05

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)是来自内细胞团(inner cell mass, ICM)的一种多潜能细胞, 具有自我更新、高度增殖和多向分化的能力。1981 年, Evans 等^[1]首次从小鼠延迟着床的胚泡中获得了 ES 细胞, 随后, 人们相继得到了不同动物的 ES 细胞。在体外, 分化抑制培养可使 ES 细胞保持未分化状态而无限增殖, 一旦撤除分化抑制因素, 又可分化为包括内胚层、中胚层和外胚层的多种类型的细胞^[2,3], 培养基条件适宜时, ES 细胞则可发生定向分化。1998 年, 人类 ES 细胞系的建立^[4,5], 引起了世界范围内的广泛关注和巨大反响, 1999 年, Science 将 ES 细胞研究列为世界十大科学进展之首。目前, ES 细胞定向诱导分化已成为干细胞工程领域的热点和难点课题。本文综述了近年来 ES 细胞体外定向诱导分化为造血细胞、心肌细胞、神经细胞等不同特殊类型细胞的方法和途径。

1 体外定向诱导分化方法

在体胚胎分化过程中, 组织的发生和身体构造的形成具有时空顺序性和相互诱导性。体外诱导分化的原理, 就是选择适当的诱导剂和诱导模式, 通过诱导物与细胞表面受体结合或使细胞发生轻度可逆性损伤等, 使被诱导细胞按预定的细胞类型方向分化。目前, 在 ES 细胞体外定向诱导分化时, 多先将 ES 细胞悬浮培养形成类胚体(embryoid bodies, EBs), 再将 EBs 消化成单细胞贴壁培养, 并于不同的培养阶段添加不同种类和不同浓度的条件培养

液、化学物质或细胞因子, 直接促进 ES 细胞定向分化为某种特殊类型的细胞^[6], 或培养条件对某些类型的细胞分化起抑制作用, 从而高效诱导目的细胞的分化^[7]。对被诱导分化的细胞还可作进一步的筛选培养^[8,9], 以获得高度纯化的分化细胞。

2 体外定向诱导分化细胞

目前, 已报道的自 ES 细胞诱导分化的细胞主要包括造血细胞、心肌细胞、神经细胞、脂肪细胞、胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞、成骨细胞、软骨细胞和黑素细胞等。

2.1 造血细胞

干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)和胚胎条件培养液可诱导小鼠 ES 细胞分化为造血干/祖细胞。诱导第 6 天, CD 34⁺ 细胞为 86%, 而 SCF、白细胞介素(IL-6)和原代骨髓基质细胞饲养层可使这些造血干/祖细胞进一步分化为 B 淋巴细胞系。诱导第 14 天, 大多数为 D 34⁺ CD 38⁺ 浆细胞^[10], 诱导形成的功能上类似于正常胎儿肝源或骨髓源的 B 系细胞, 脂多糖刺激时能分泌免疫球蛋白^[11]。

在不添加外源因子的条件下, ES-D3 细胞与骨髓基质 OP9 细胞共培养, 第 5 天时即出现分化的造血祖细胞, 第 14 天时 90% 以上的 ES 细胞分化为嗜中性粒细胞、巨噬细胞、红细胞、浆细胞、巨核细胞和 B 淋巴细胞, 培养基中添加 200 mg/L 的巨噬细胞克隆刺激因子(M-CSF), 第 10 天时巨噬细胞的数量剧增, 90% 以上的分化细胞为巨噬细胞^[12]。

* [收稿日期] 2002-09-26

[基金项目] 国家“973”项目(G1999054301-5); 国家自然科学基金资助项目(39970363)

[作者简介] 宋晓平(1963-), 男, 陕西周至人, 副教授, 在读博士, 主要从事胚胎干细胞体外定向诱导分化的研究。

将 ES-D3 细胞与骨髓基质细胞 RPQ 10 单层共培养,同时添加 L-6、L-3 和 L-7 时,ES 细胞可分化为 T 淋巴祖细胞($\text{J}\alpha\text{ro75}^+$)、B 淋巴祖细胞(B-220^+)及其他造血祖细胞(Thy-1^+ , PgP-1^+ , c-kit^+),这些分化细胞可重建 T-和 B-淋巴细胞缺陷型 *scid* 小鼠的淋巴组织,在亚致死量放射线照射的正常鼠体内,也可产生成熟的 T、B 淋巴细胞^[13]。

2.2 心肌细胞

ES 细胞源的 EBs 在含 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 维生素 A 酸(RA)的 BRL 细胞条件培养液中贴壁培养诱导分化 15 d 时,开始出现有节律收缩的心肌样细胞团,透射电镜观察证实,收缩的细胞内存在明显的肌原纤维、肌小节、闰盘以及丰富的充满嵴的线粒体等典型的心肌细胞特有结构^[6]。

电场可诱导 EBs 阳极侧的超极化和阴极侧的去极化,4 d 龄的 EBs 经 250 和 500 V/m 场强的单直流场脉冲作用 90 s,分化成跳动心肌细胞团的数量和跳动区域的面积明显增加,过氧化氢(H_2O_2)或维生素 K_3 可促进 EBs 中心肌的生成,而自由基清除剂 *trolox* 等则产生抑制作用,磷脂酰肌醇激酶-3 抑制剂和渥曼青霉素可完全阻止 EBs 向心肌的分化^[14,15]。

相关因子研究表明,具有表皮生长因子(EGF)样结构域的生长因子 *Cripto-1* (*Cr-1*)是体外形成收缩心肌细胞所必需的因子^[16]。转录因子 *GA TA-4*, *GA TA-5*, *GA TA-6* 可参与调节心基因的表达和心肌分化,但 *GA TA-4* 缺失的 ES 细胞仍保留分化为心肌细胞的能力,*GA TA-5* 或 *GA TA-6* 可能具有补偿 *GA TA-4* 的作用^[17]。

2.3 神经细胞

神经生长因子(NGF)可促进 EBs 中神经元样细胞的形成^[18]。在 EBs 悬浮培养过程中添加 $0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ RA,可使贴壁培养的 EBs 在 48 h 内出现神经元样细胞,4~6 d 时达到最多,细胞间形成丰富的网络样结构,这些细胞都能特异地与神经微丝蛋白(NF)抗体反应,神经突起中抗体反应最为明显;8~10 d 后,神经元样细胞逐渐减少,神经突起逐渐变细、缩短,网络结构逐渐消失^[19]。骨形态发生蛋白-4(BMP-4)可阻止 RA 对小鼠 ES 细胞的神经化作用而促进其向中胚层分化^[20],而应用血清饥饿法抑制中胚层分化,添加碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)可促进神经前体细胞形成,并进一步应用神经营养因子,可显著提高多巴胺(DA)能神经元的数量,并能有效维持存活和显著促进细胞增殖^[7]。

EBs 单细胞贴壁培养,经 $0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ RA 诱导分化的细胞表达胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、 γ -氨基丁酸(GABA)、酪氨酸羟化酶(TH)和脑因子-1(BF-1)等神经元相关蛋白^[21]。采用 4-/4+ 诱导法, $0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 RA 可诱导 ES 细胞分化为 GFAP 抗体染色阴性和 NF 抗体染色阳性的成熟神经元细胞,第 8 天神经元细胞的分化比例达最大值(31.7%)^[22]。用 RA 诱导 ES 细胞不仅可获得 GABA 神经元,也可获得 DA 神经元^[13],且分化的神经祖细胞冻存后仍具有扩增和分化为功能性神经元的能力^[23]。

PA6 基质细胞表面存在强有力的神经化活性物 SD1A,将猕猴 ES 细胞接种于 PA6 细胞单层上分化培养 2 周时,所诱导的神经元细胞中 35% 为 TH^+ 神经元,这些神经元可产生有效量的 DA ($1.0\text{ pmol}/10^7$ 细胞),且这种分化的发生要比胚胎中快(10 d/35 d)^[24]。小鼠 ES 细胞与 PA6 基质细胞共培养,可高效诱导分化为能产生 DA 的 TH^+ 神经元,这些 DA 神经元移植后可整合于小鼠纹状体并表达 TH^[25]。

单层培养的 ES-5 细胞,添加 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ RA 与 1 mmol/L 双丁酰基环腺苷单磷酸(dBcAMP),可使诱导产生的分化细胞比例高达 90%~95%,分化早期的神经胶质细胞占分化细胞的 90%~95%^[6]。将 ES 细胞在 ESM 培养基中培养 4 d 后,添加 $0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ RA 再诱导培养 4 d,使 ES 细胞形成 EBs,多数 EBs 细胞呈神经祖细胞免疫标志巢素(nestin)阳性,离散的 EBs 细胞在神经细胞基础培养液中可形成神经元、星形细胞和少突神经胶质细胞,纯化培养后可使少突神经胶质细胞纯度达 92%,并具有重新形成轴突髓鞘的作用^[8,9]。

2.4 脂肪细胞

EBs 经 10 nmol/L RA 处理后,可检测到脂肪特殊基因 PPAR γ 和 *adip sin* 的高效表达,而单个 EBs 经低浓度 RA 预处理可产生脂肪细胞和骨骼肌细胞,RA 浓度高于 10 nmol/L 时,肌浆蛋白素(myogenin)的表达被抑制,而脂肪酸结合蛋白(a-FABP)的表达增加^[26]。在 ES 细胞体外分化为脂肪细胞过程中,RA 可能起着至关重要的作用,即在 ES 细胞形成 EBs 的早期分化阶段,必须先用 RA 作短时间处理。在 EBs 形成的 2~5 d,相当于 ES 细胞的随意分化期,添加 RA 以影响 ES 细胞的分化,随后,在相当于 ES 细胞的终末分化期,应用脂肪形成激素,如在 7~20 d 添加 85 nmol/L 胰岛素(Ins)

和 2 nmol/L 三碘甲状腺氨酸(T₃), 脂肪细胞的形成比例可达 50%~70%, 缺乏 RA 处理组仅为 2%~5%。但在 EBs 形成的早期阶段, 单独或联合应用 Ins, T₃, 地塞米松或脂肪特殊基因(PPARs) 强效激活剂均可导致低水平的脂肪发生(5%)^[27]。由 EBs 形成的脂肪细胞对胰岛素和 β 肾上腺能兴奋剂, 分别表现出脂肪形成活性和脂解活性。

2.5 胰岛细胞

ES 细胞悬浮培养 4 d 后形成 EBs, 并筛选培养巢素(nestin) 阳性细胞 6~7 d, 随后添加丝裂原 B27, bFGF 培养胰腺内分泌前体细胞 6 d, 撤除丝裂原后添加烟碱可诱导分化为分泌胰岛素的胰岛细胞^[28]。在此过程中, ES 细胞首先转化为 nestin 阳性细胞, 随后出现胰岛素和 β 微管蛋白 III(TUJ1, 神经元特异抗原) 阳性细胞, 撤除丝裂原后, 胰岛素强阳性细胞和成熟神经元逐渐增加, 分化为胰岛素阳性细胞的比例可达 31.5%。分化形成的细胞群与在胰岛局部解剖相似, 具有分泌胰岛素(β 细胞)、胰高血糖素(α 细胞)、抑生长素(δ 细胞)和胰腺多肽(PP 细胞)的功能, 移植于链脲菌素性糖尿病小鼠的肩部皮下, 胰岛样细胞群可在体内存活并表达胰岛素, 移植后第 12 天出现导管化, 移植小鼠可存活较长时间^[28]。

2.6 内皮细胞

利用具过度表达转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的 ES 细胞, 在 RA 培养液中经悬滴培养先形成 EBs, 继续贴壁培养后, EBs 周围呈辐射状长出许多血管样结构^[29,30], 这些管状结构由内皮细胞排列组成^[31], TGF- $\beta 1$ 可促进内皮细胞形成索状结构^[29]。进一步研究表明, TGF- $\beta 1$ 可能是通过细胞外基质行使其形成血管的功能。此外, ES 细胞经重组 TGF- $\beta 1$ 处理后, 能检测到 bFGF 基因表达, 从而提示 bFGF 可能具有促进内皮细胞和血管形成的作用^[30]。ES 细胞在体外聚积形成 EBs 的前 12 d, 潜伏转移生长因子- β 结合蛋白 1(LTBP-1) 的表达增加, 12~24 d 保持恒定, 其后开始下降。LTBP-1 多克隆抗体可抑制内皮特化基因 ICAM-2 和 von Willebrand 因子的表达, 并延迟已分化内皮细胞形成索状结构^[29]。在 ES 细胞分化过程中, LTBP-1 可能通过 TGF- β 依赖机制影响内皮细胞形成索状结构。

2.7 上皮细胞

培养基中添加 10 g/L 的 NGF, 可使 60% 单层培养的猕猴 ES 细胞分化为上皮样细胞^[32]。

Kawasaki 等^[33] 报道, 将猕猴 ES 细胞在 PA6 基质

细胞层上培养 3 周时, 意外地发现, 约 8% 的 ES 细胞克隆中含有大量色素沉着的上皮细胞, 这些细胞呈多角形紧密排列, 明显不同于黑素细胞, 细胞增殖速度相当快, 视杯标记 Pax6 为阳性, 为视网膜色素上皮细胞, 而 SD1A 处理小鼠 ES 细胞或猕猴 ES 细胞培养于胶原包被的培养皿时则极少出现这种现象。

2.8 成骨细胞

将小鼠 ES 细胞培养于含血清培养基, 并补充维生素 C (Vc)、 β 磷酸甘油(β glycerophosphate) 和地塞米松(dexamethasone) 或 RA, 或与胎儿成骨细胞共培养诱导分化, ES 细胞可形成由 50~100 个细胞组成的离散的矿化骨小结, 且细胞外基质中含有胶原-1(collagen-1) 和骨钙素(osteocalcin)。地塞米松协同 Vc 或单独应用 β 磷酸甘油都能大量诱导骨小结的生成, 添加培养 14 d 后, 骨小结数量可增加 7 倍; ES 细胞与成骨细胞共培养比 ES 细胞单独培养形成的骨小结数量增加 5 倍^[34]。

2.9 软骨细胞

ES 细胞诱导分化为软骨细胞的条件较为苛刻, 一般成功率也较低。Baker 等^[35] 报道, 将 ROSA β geo 基因转染 ES 细胞, 在缺乏新霉素(geneticin, G418) 的情况下, 这种 ES 细胞在体外能被诱导分化为软骨细胞。首先将 ES 细胞聚集成 EBs, 用体积分数 10% 小牛血清代替胎牛血清, 培养液中含有 $1 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 2~3 d 更换培养液。50 d 后 EBs 中出现软骨细胞, 经 1% 阿尔辛蓝(Alcian blue) 液染色, 显示出明显的软骨细胞特征, 细胞间存在着 II 型胶原。培养基中添加 TGF- β 后, Alcian blue 蓝染区域略有减少, 而 BMP-2 和 BMP-4 则具有诱导软骨分化的作用, 且应用 BMP-2 的诱导作用具有时间依赖性, 这与其补充软骨祖细胞的作用相一致^[36]。

2.10 黑素细胞

ES 细胞在体外可高效诱导分化为黑素细胞。ES 细胞与骨髓基质细胞共培养时, 可产生少量黑素细胞(melanocytes), 但在 SCF 和 c-Kit 受体酪氨酸激酶配体存在时, 地塞米松对这种诱导具有促进作用。用不能产生造血细胞的 SCL/tal-1^(-/-) 细胞进一步证实了 c-Kit 在祖细胞的表达, 所产生细胞的形态、对生长因子的活性和黑素基因标记的表达均清楚地表明, 这些细胞是黑素细胞^[37]。

3 结 语

在体外, ES 细胞定向诱导分化的研究尚处于起

步阶段。虽然,定向分化的细胞类型还相当有限,但这些研究成果已在生物学基础研究和临床医学领域,显示出了潜在的异乎寻常的应用前景。ES 细胞被定向诱导分化为各种具有特殊功能的细胞培养体系的建立,将使人们对正常生物体发育过程中所发生的复杂事件、异常的细胞特化和细胞分裂有更加

深刻的认识,诱导分化的特殊类型的细胞将为细胞治疗和组织治疗,甚至器官移植提供新的来源。一旦人们在体外能够完全控制 ES 细胞的分化方向,必将引发一场新的生物医学革命,人类完美修复或替代因遗传或后天疾病引起的重要组织、器官的缺陷及损伤的梦想将得以实现。

[参考文献]

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292: 154- 156
- [2] Doetschman T C, Eistetter H, Katz M, et al The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium [J]. J Embryol Exp Morphol, 1985, 87: 27- 45
- [3] Suemori H, Tada T, Torii R, et al Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI[J]. Dev Dyn, 2001, 222(2): 273- 279
- [4] Thomson J A, Itskovitz Eldor J, Shapiro S S, et al Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282: 1145- 1147
- [5] Shamblo M J, Axelman J, Wang S P, et al Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95 (23): 13726 - 13731
- [6] 徐 洁, 丛笑倩, 姚 鑫 维生素A 酸和双丁酰环腺苷单磷酸对小鼠胚胎干细胞的诱导分化[J]. 实验生物学报, 1991, 24(4): 353- 367
- [7] Guan K, Chang H, Rolletschek A, et al Embryonic stem cell-derived neurogenesis: retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells[J]. Cell Tissue Res, 2001, 305(2): 171- 176
- [8] Liu S, Qu Y, Stewart T J, et al Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 6126- 6131
- [9] Gutierrez-Ramos J C, Palacios R. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocytes *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89: 9171- 9175
- [10] 徐 令, 乔春平, 黄绍良, 等 体外定向诱导胚胎干细胞为造血细胞[J]. 科学通报, 2000, 45(8): 815- 820
- [11] Cho S K, Webber T D, Carlyle J R, et al Functional characterization of B lymphocytes generated *in vitro* from embryonic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 9797- 9802
- [12] Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture[J]. Science, 1994, 265: 1098- 1101
- [13] Brustle O, Jones K N, Learish R D, et al Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants[J]. Science, 1999, 285: 754- 756
- [14] Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, et al Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells[J]. J Cell Biochem, 1999, 75(4): 710- 723
- [15] Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, et al Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol-3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells[J]. FEBS Lett, 2000, 476(3): 218- 223
- [16] Xu C H, Giovanna L, Adamson E D, et al Specific arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1[J]. Dev Biol, 1998, 196: 237- 247
- [17] Narita N, Bielinska M, Wilson D B. Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells[J]. Development, 1996, 122: 3755- 3764
- [18] Wobus A M, Grosse R, Schoneich J. Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells *in vitro*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1988, 154(2): 965- 973
- [19] 韩 嵘, 汤富酬, 尚克刚 小鼠 ES 细胞可在体外诱导分化为神经元样细胞[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2002, 38(2): 192- 196
- [20] Finley M F, Devata S, Huettner J E. BMP-4 inhibits neural differentiation of murine embryonic stem cells[J]. J Neurobiol, 1999, 40(3): 271- 287
- [21] 唐仕波, 邱观婷, 黄 冰 胚胎干细胞向神经细胞诱导分化的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(12): 936- 938
- [22] 汤富酬, 韩 嵘, 薛友纺, 等 不同 ES 细胞系体外定向诱导神经细胞分化的比较[J]. 遗传, 2001, 23(5): 439- 441
- [23] Hancock C R, Wetherington J P, Lambert A N, et al Neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271(2): 418- 421
- [24] Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, et al Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal

- cell-derived inducing activity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(3): 1580- 1585
- [25] Kawasaki H, Mizuseki K, Niishikawa S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity[J]. *Neuron*, 2000, 28(1): 31- 40
- [26] Dani C. Embryonic stem cell-derived adipogenesis[J]. *Cells Tissues Organs*, 1999, 165 (3- 4): 173- 180
- [27] Dani C, Smith A G, Dessolin S, et al. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*[J]. *J Cell Sci*, 1997, 110: 1279- 1285
- [28] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets[J]. *Science*, 2001, 292: 1389- 1394
- [29] Gualandris A, Annes J P, Ares M, et al. The latent transforming growth factor beta binding protein-1 promotes *in vitro* differentiation of embryonic stem cells into endothelium[J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(12): 4295- 4308
- [30] 丛笑倩, 姚 鑫. ES 细胞分化为血管样结构的机理探讨——TGF- β 在血管形成中的作用[J]. *实验生物学报*, 1996, 29(3): 273- 285
- [31] Wang R, Clark R, Bantch B L. Embryonic stem cell derived cystic embryoid bodies from vascular channels: an *in vitro* model of blood vessel development[J]. *Development*, 1992, 114: 303- 316
- [32] Pei Y, Ji W. *In vitro* induced differentiation of rhesus embryo stem cell[J]. *Dev Reprod Biol*, 2001, 10(Suppl): 112
- [33] Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, et al. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(3): 1580- 1585
- [34] Buttery L D, Bourne S, Xynos J D, et al. Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells[J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(1): 89- 99
- [35] Baker R K, Haendel M A, Swanson B J, et al. *In vitro* preselection of gene trapped embryonic stem cell clones for characterizing novel developmentally regulated genes in the mouse[J]. *Dev Biol*, 1997, 185: 201- 214
- [36] Kramer J, Hegert C, Guan K, et al. Embryonic stem cell derived chondrogenic differentiation *in vitro*: activation by BMP-2 and BMP-4[J]. *Mech Dev*, 2000, 92(2): 193- 205
- [37] Yamane T, Hayashi S I, Mizoguchi M, et al. Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture[J]. *Dev Dyn*, 1999, 216(4/5): 450- 458

The study progress of induced commitment and differentiation of ES cells *in vitro*

SONG Xiao-ping, DOU Zhong-yong

(Laboratory of Livestock Reproductive Endocrinology and Embryobiotechnology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract Embryonic stem cells are pluripotent cells derived from the inner cell mass of early blastocysts that can be propagated indefinitely in the primitive undifferentiated state under *in vitro* differentiation-inhibited culture. Under appropriate conditions embryonic stem cells have been shown to differentiate *in vitro* to multiple cell types of endoderm, mesoderm and ectoderm. This paper reviews the pathways of ES cells *in vitro* being committed and differentiated to hematopoietic cells, cardiomyocytes, neural cells, adipocytes, pancreatic islets, endothelial cells, epithelia, osteoblasts, chondroblast and melanocytes.

Key words: embryonic stem cells; induced commitment and differentiation; biotechnology