

胚胎干细胞诱导分化研究进展*

马勇江, 杨学义, 窦忠英

(西北农林科技大学 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 哺乳动物胚胎干细胞一般可从胚胎囊胚内细胞团分离得到, 具有在体外保持不分化的无限增殖能力, 在合适的培养条件下, 胚胎干细胞可定向诱导分化形成多种细胞类型。人们对胚胎干细胞进行体外培养与定向分化可以得到大量同源细胞, 以应用于患疾病的细胞或器官移植治疗等研究。文章概述了胚胎干细胞增殖与分化的信号调节机制、诱导分化方法, 国内外研究概况及展望4个方面的内容。

[关键词] 胚胎干细胞; 诱导分化; 信号调节机制

[中图分类号] Q 813.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0025-05

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)自20世纪80年代首次从小鼠囊胚内细胞团分离得到并建系以来^[1,2], ES细胞诱导分化研究一直就是热点话题, 特别是1998年人类ES细胞的建系成功^[3], 更是对干细胞研究起到了推波助澜的作用。由于ES细胞具有体外不分化的无限增殖潜能和处于合适的培养条件下, 可分化形成多种细胞类型的分化潜能, 人们期望通过对ES细胞进行体外定向诱导分化得到特定的细胞系(例如, 心肌细胞、神经细胞、造血细胞等), 将其用于一些疾病(例如, 帕金森氏病、心脏病、糖尿病等)的细胞移植治疗或进行药物筛选等研究。近年来, 人类在ES细胞体外定向诱导分化上已取得一些成功, 这为人类开展上述研究奠定了基础。现就ES细胞增殖与分化的信号调节机制、ES细胞诱导分化国内外研究进展和展望进行概述。

1 胚胎干细胞增殖与分化的信号调节机制

体外培养ES细胞, 其在增殖及未分化状态时表现出对细胞因子的依赖性^[4]。例如: 体外培养小鼠ES细胞, 撤除白血病抑制因子(LIF)会出现分化。近年来, 对ES细胞增殖或分化调节机制的许多研究表明, 胞外信号调节通路——信号转导及转录活化蛋白3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)及胞外信号调节激酶

(extracellular signal-regulated kinase, ERK)在ES细胞增殖(Self-Renewal)及其诱导分化方面起重要作用。这两条信号通路, 可能确定是选择分化, 还是选择增殖。这些信号的选择性抑制或活化将加强人们对ES细胞增殖、分化的控制研究。

ES细胞增殖或分化的信号调节模式为^[4]: 胞外信号(配体)与细胞表面受体结合后, 激活与该受体耦联的酪氨酸激酶(JAK), JAK活化后使STAT3和ERK上的酪氨酸磷酸化, 活化后的STAT3和ERK进一步调节ES细胞特定基因的表达, 使其增殖或分化。此外, 酪氨酸磷酸酶(SHP-2)亦可直接或通过调节ERK的活性间接参与ES细胞增殖或分化的调节。

1.1 STAT3信号通路对胚胎干细胞增殖及分化的调节

1.1.1 STAT3信号通路对胚胎干细胞增殖的调节

STAT3信号通路在介导对ES细胞的生物学反应上发挥重要功能。细胞因子(如, IL-6、LIF等)通过信号受体复合物gp130(细胞因子受体超家族中的一员)激活JAK及STAT3的信号级联传导作用于ES细胞内的靶基因, 调节其增殖^[5]。缺失功能性gp130, 则STAT3活性降低, 阻断了细胞因子LIF信号通路, 进而导致LIF不能抑制ES细胞分化^[6]。当ES细胞用维甲酸(retinoic acid, RA)诱导或撤除LIF而出现分化时, 酪氨酸磷酸化的STAT3的含

* [收稿日期] 2002-03-13

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划基金资助项目(G1999054301-5)

[作者简介] 马勇江(1974-), 男, 江西临川人, 在读博士, 主要从事哺乳动物胚胎干细胞研究。

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎干细胞和动物克隆研究。E-mail: Douzhongying@china.com

量迅速降低,其DNA结合活性降低。STAT3 活性水平对于维持ES细胞未分化状态起决定作用^[7,8]。

1.1.2 STAT3 对胚胎干细胞分化的调节

STAT3 对ES细胞分化的调节机制具体表现在以下几个方面: (1)STAT3 维持与ES细胞多能性有关的特异基因(例如, *oct-4* 基因)的表达。STAT3 调节 *oct-4* 持续表达,而 *oct-4* 基因表达产物转录因子 Oct-4 对于胚胎多能性干细胞的确立与维持是必不可缺少的^[9]。(2)STAT3 可调节ES细胞的细胞周期。对STAT3 突变(STAT^{-/-})细胞及BAF3 类型细胞 gp130 信号的研究结果显示,STAT3 活性与周期蛋白依赖激酶抑制因子 p^{27kip1} 的表达减少有关,进一步得出STAT3 可加速细胞周期的进程。(3)STAT3 抑制指导分化的信号转导蛋白的活性^[10,11]。通过对多种细胞类型的 gp130 检测,发现STAT3 与ERK 信号存在一种互相拮抗的关系。比如,活化后的ERK 促进分化细胞系的建立,而STAT3 可阻断ERK 的活化。另外,STAT3 信号通路与ERK 信号通路在基因表达水平上相互竞争,调节分化基因的表达。例如,STAT3 与DNA结合位点结合后,占据了ERK 的结合位点,从而关闭分化基因的表达;相反,ERK 先与DNA结合位点结合后,STAT3 则不能再结合,从而诱导分化基因的表达。

1.2 ERK 信号通路对胚胎干细胞增殖及分化的调节

1.2.1 SHP-2/ERK 信号对胚胎干细胞增殖的调节 ERK 信号通路对ES细胞的增殖具有调节作用。ES细胞用PD098059(活化ERK的丝裂原激活的蛋白激酶的激酶(MEK)抑制剂)处理后,ES细胞的增殖不受影响,表明ERK 信号不能直接调节干细胞的增殖^[12]。粒细胞集落刺激因子受体(G-CSFR)/gp130 突变受体(Y118 SHP-2 结合位点突变为苯丙氨酸)稳定导入ES细胞的实验表明,突变SHP-2 受体可指导ES细胞的增殖,且其实质为突变受体延长了STAT3 信号活化作用,增强了ES细胞增殖能力,SHP-2 表达时可负调节ES细胞的增殖信号,SHP-2 的不表达对于维持ES细胞的增殖是必要的^[12]。

1.2.2 SHP-2/ERK 信号对胚胎干细胞分化的调节 SHP-2 对ES细胞的分化调节具有重要作用。催化无活性SHP-2 的过量表达可抑制体外单层培养及胚胎中ES细胞的分化^[12]。小鼠SHP-2^{Δ46~110}或SHP-2 突变的纯合胚胎在妊娠8.5~10.5 d 发生死亡,SHP-2^{Δ46~110} 胚胎死亡鉴定结果表明,死亡胚胎

胚内中胚层及胚外中胚层异常^[13]。因此,SHP-2 对胚胎早期分化进程具有重要的调节作用。同时,ERK 活化是通过诱导细胞周期蛋白D1 的表达调节G1 期并使细胞处于G1 期所必须的,ERK 可能有助于与分化有关基因的表达。

2 胚胎干细胞诱导分化的一般方法

目前由ES细胞体外诱导分化获得目的细胞一般有3种方法,即细胞因子诱导法、选择性标记法和特异转录因子异位表达法。

2.1 细胞因子诱导法

在体外诱导ES细胞分化方面,对细胞因子诱导法研究的最为广泛和深入,获得的研究成果到目前为止也最多。体外培养下,ES细胞对细胞因子具有依赖性^[4]。培养过程中添加或撤除某一或某些细胞因子可指导ES细胞的增殖或分化。目前,利用细胞因子诱导ES细胞朝一定方向分化时,一般采用分阶段的办法,即先得到类胚体(embryoid bodies, EBs),再在EBs 的基础上进一步诱导使其分化为目的细胞。在各阶段添加的细胞因子不同,具体表现为细胞因子种类、浓度或组合的不同。目前利用此法,国内外学者已得到多种目的细胞,如:造血细胞、心肌细胞、神经细胞等。但是,利用此法获得的目的细胞纯度不高,这是ES细胞内在的全能性发育程序所决定的,因此,将ES细胞诱导形成同一类细胞的定向分化研究,是一项探索性很强的研究课题。

2.2 选择性标记基因筛选目的细胞法

选择性标记基因导入小鼠ES细胞已有成功的报道,但人ES细胞目前仍未见报道。Klug 等^[14]建立了一种带有选择性标记基因(新霉素抗性基因)的小鼠ES细胞。体外分化时,在培养体系中加入新霉素,由于采用一种心脏特异性启动子启动ES细胞分化的心肌细胞表达新霉素抗性基因,从而使分化的心肌细胞存活,而非心肌细胞被破坏,得到近似单一的心肌细胞群。Li 等^[15]建立了一个有效纯化神经上皮祖细胞的系统,将新霉素抗性基因导入小鼠ES细胞并使其在Sox2 基因控制下,离体分化时只有Sox2 基因表达,新霉素抗性基因才表达,而Sox2 基因表达仅局限于早期神经板,因此,在培养体系中加入新霉素就可能纯化神经上皮祖细胞,其随后分化形成神经细胞,组成神经网络,而无其他类型细胞。Kolossov 等^[16]将编码绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的基因导入小鼠ES细胞,并使其在心肌α肌动蛋白(αactin)启动子控制

之下, 这样只有分化的心肌细胞能表达 GFP, 因此用流式细胞仪分离便可得到高纯度的心肌细胞。利用此法可获得高纯度的目的细胞, 但是由于对 ES 细胞进行了遗传操作, 所得的目的细胞的安全性仍有待于评价。

2.3 特异性转录因子异位表达法

特异性转录因子异位表达就是将细胞系特异表达基因导入 ES 细胞, 并使其表达, 产生特异性转录因子。细胞系特定转录因子的异位表达可诱导 ES 细胞分化为目的细胞系。例如, 成肌细胞决定基因 (myoD), 同源异型基因 B4 和 11 (HoxB4 和 Hox11) 的组成型异位表达可诱导小鼠 ES 细胞分化为肌肉细胞^[17]、造血细胞^[18]。然而, ES 细胞内诱导分化基因的组成型表达可能对 ES 细胞的增殖产生危害或诱导不可预料的分化。因此利用此法诱导 ES 细胞分化为目的细胞系, 必须建立一适宜细胞系特异性转录因子的异位表达载体系统。Vallier 等^[19]构建了一双顺反子基因诱捕载体, 该载体可驱动外源基因在体内及离体的条件下表达, 且对导入 ES 细胞无损伤作用。利用此法可获得高纯度的目的细胞, 同样亦存在目的细胞的安全性问题。

3 国内外胚胎干细胞诱导分化研究概况

体外培养下, 小鼠 ES 细胞自发分化可形成造血细胞、心肌细胞、脂肪细胞、神经细胞、角质细胞等多种细胞类型^[20]。人 ES 细胞自发分化亦可形成上皮细胞、成纤维细胞、神经细胞等多种类型细胞^[21]。近年来, ES 细胞体外定向诱导分化也取得一定进展, 人类已成功地诱导了小鼠和人的 ES 细胞向造血细胞、神经细胞、脂肪细胞、胰岛细胞等多种细胞分化。

3.1 造血细胞

在 ES 细胞体外诱导分化的研究中, 造血细胞是报道最多的一种分化细胞类型。一系列研究已证实, 体外诱导分化体系中, 同样存在着体内胚胎造血细胞发育的分子机制和细胞发育事件, 例如, 小鼠胚胎造血细胞发育中, 在怀孕 7.5 d 时最早在卵黄囊血岛内出现大而核的前成红细胞, 随后在怀孕 10~11 d 时, 产生造血细胞的潜能从卵黄囊转移到胚胎肝脏时, 这些前成红细胞逐渐消失。同样在小鼠 ES 体外分化研究中, 在 EBs 形成第 4 天时, 首先出现前成红细胞, EBs 生长至第 10~12 天时, 前成红细胞也逐渐消失。另一方面, 不论在胚胎卵黄囊还是

EBs 中, 成熟红细胞和髓细胞都是在前成红细胞出现后不久才产生。近年, Nakano 等^[22]诱导小鼠 ES 细胞分化形成造血干细胞。此外, Nakano^[23]建立一新的小鼠胎肝基质细胞系—OP9 细胞系, 它不能产生功能性巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF), 将 ES 细胞在 OP9 细胞饲养层上培养, 可有效地使其向造血细胞分化, 并进一步分化为成体红细胞、骨髓细胞和 B 系淋巴细胞。Palacios 等^[24]将小鼠 ES 细胞置于含 L-3, L-6 和 RPQ 10 饲养层细胞系上培养, 并加入培养 FL S4 1 胎肝饲养层细胞系的上清液, 培养 5~7 d 后, 将此诱导的细胞注入经致死量照射的受体小鼠, 于 15~20 d 后检测, 发现 ES 细胞诱导分化的细胞能重建经致死剂量⁶⁰Co γ 射线照射受体小鼠淋巴、髓系和红细胞系的造血功能。1998 年, 徐令等^[25]、常万存等^[26]分离和克隆出人类 ES 细胞, 并先后将其诱导分化形成浆细胞^[27]、造血细胞^[28]。上述进展为分析 ES 细胞分化为造血细胞的早期决定与分化机理和过程, 为临床上移植或输血应用的血源找到了一个新的突破口。

3.2 神经细胞

在 ES 细胞体外分化实验中, EBs 在特定条件下贴壁培养时也能分化出神经细胞, 但效率不高。Bain 等^[29]将小鼠 ES 细胞在无 LIF 的培养液中培养 4 d, 其分化形成 EBs 后添加维甲酸继续培养 4 d, 然后用胰蛋白酶进行消化, 之后在粘性底物 (adhesive substrate) 上单层培养, 几天之内可观察到大量神经元样细胞, 约占总细胞数的 40%, 这些神经元样细胞不仅表达专一性的神经丝 M 和 β -微管蛋白, 还有钠、钾、钙等离子通道的特征。Okabe 等^[30]采用另一种方法诱导小鼠 ES 细胞分化也得到神经元细胞: ES 细胞在标准培养液 (不添加维甲酸) 中培养 4 d 后形成 EBs, 然后将 EBs 转到粘性底物上培养, 此时用无血清培养液, 代替标准培养液, 几天之后, 许多细胞死亡, 而活细胞表达神经元和神经胶质细胞的共同前体细胞专一性标志——巢蛋白 (nestin), 当碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 存在时, 这些 nestin 阳性细胞分化成神经元和神经胶质细胞。这表明 ES 细胞在特定的体外分化体系中存在神经细胞早期决定与分化的机制, 因而 ES 细胞也是研究神经细胞发育的较理想模型。近年, Brustle 等^[31]诱导小鼠 ES 细胞使其定向分化成神经胶质细胞, 再将他们注射到患有遗传性髓鞘形成缺陷的小鼠的脊髓束中, 这些胶质细胞在小鼠体内形成髓鞘并包绕神经纤维。因此, 诱导分化的 ES 细

胞有可能成为移植用细胞的新来源之一。

3.3 心肌和肌肉细胞

在小鼠ES细胞体外分化实验中,EBs在一定的条件下贴壁数天后,常发现某些分化细胞团的局部区域出现有节律的自发收缩现象,对其进行电镜观察,发现收缩的细胞内存在着肌原纤维、肌小节和闰盘等典型心肌细胞特有结构。除心肌细胞外,决定骨骼肌发育的基因Myf-5,Myogenin,MyoD等在ES细胞EBs的分化细胞中能够表达,而且表达时序与在体胚胎发育中相同。ES细胞EBs贴壁培养1~2周后一般都能出现肌肉细胞,继续培养则融合成肌管,显示出骨骼肌发育的典型特征。近年,Kehat等^[32]建立了人ES细胞分化形成心肌细胞的诱导分化系统。用IV型胶原酶(1 g/L, 20 min)消化人ES细胞集落,得到许多小集落(3~20细胞/集落),之后ES细胞按 5×10^6 细胞/dm²组织细胞培养皿的细胞浓度悬浮培养7~10 d,形成EBs后,将EBs按1~5类胚体/孔的浓度培养于质量分数为0.1%明胶包被的培养皿中,在贴壁后4~22 d可观察到大约8.1%EBs发生自发收缩现象(收缩频率为 (94 ± 33) 次/min)。此外,该研究表明,改变ES细胞浓度虽对EBs形成数目有影响,但不影响具有跳动功能的EBs形成率;在悬浮培养过程中添加体积分数为0.75%的二甲基亚砜(DMSO)对ES细胞分化形成心肌细胞无明显刺激作用(添加DMSO后,大约10.1%EBs出现自发收缩现象)。2000年,本实验室研究人员对分离培养的人类ES细胞进行体外分化,亦得到与Kehat等^[32]人相同的心脏跳动样细胞团。

3.4 胰岛细胞

体外诱导ES细胞分化为胰岛样细胞仅有个别报道。Lumelsky等^[33]采用分步诱导方式诱导小鼠ES细胞分化形成功能性胰岛样结构(能分泌胰岛素

及其他胰内分泌激素)。具体方法为,将未分化的小鼠ES细胞在明胶包被的培养皿中培养2~3 d,无饲养层细胞,培养液中添加LIF;第二步,转入无LIF的ES细胞培养液中悬浮培养4 d,此时ES细胞分化形成EBs,其富含nestin阳性细胞;第三步,无血清培养液(ITSFn)中培养EBs 6~7 d,大部分非nestin阳性细胞死亡;第四步,将nestin阳性细胞于N₂无血清培养液(含B₂₇基质)中培养6 d,培养时添加bFGF;第五步,撤掉bFGF,最终形成功能性胰岛样结构。

3.5 脂肪细胞

ES细胞分化为脂肪细胞已有报道。Dani等^[34]采取先用维甲酸短期(2~5 d)处理ES细胞早期分化产物EBs,后再添加脂肪生成激素(85 nmol/L胰岛素+2 nmol/L三碘甲腺原氨酸(T₃))培养的方法,诱导ES细胞分化,这种方法得到的脂肪细胞含量为50%~70%,而无维甲酸处理仅有2%~5%。

4 胚胎干细胞诱导分化研究展望

ES细胞的诱导分化研究意味着人类要控制他们的分化,导向产生一种单一类型的分化细胞,这是一个探索性很强的课题。近几年来,人类已建立了多个小鼠和人ES细胞体外诱导分化体系,尽管这些分化体系存在或多或少的不足之处,但是,这些体系的初步建立表明人类已在该领域迈出了可喜的一步。随着人类对细胞分化的分子机制的更多了解,必将进一步发现在基因表达调控方面许多细胞类型专一的转录因子、细胞专一蛋白或细胞因子在细胞决定、定型及分化中的作用,必将有更多优化的体外诱导体系建立。通过ES细胞定向分化得到目的细胞进行细胞、组织的修复和移植治疗并不是遥不可及的。

[参考文献]

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. Nature, 1981, 292(9): 154- 156
- [2] Gail R M. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981, 78(12): 7634- 7638
- [3] Thomson J A, Itskovitz E J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145- 1147.
- [4] Burdon T, Chambers I, Stracey C, et al. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells [J]. Cells Tissues Organs, 1999, 165: 131- 143
- [5] Darnell J E, Kerr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins [J]. Science, 1994, 264: 1415- 1421.

- [6] Ernst M, Norak U, Nicholson S E, et al The carboxyl-terminal domains of gp130-related cytokine receptors are necessary for suppressing embryonic stem cell differentiation: Involvement of STAT3[J]. J Biol Chem, 1999, 274(14): 9729- 9737.
- [7] Niwa H, Burdon T, Chambers I, et al Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3[J]. Gene & Development, 1998, 12: 2048- 2060.
- [8] Raz R, Lee C K, Cannizzaro L A, et al Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(6): 2846- 2851.
- [9] Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, et al Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4[J]. Cell, 1998, 95: 379- 391.
- [10] Fukada T M, Hibi Y, Yamanaka M, et al Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: Involvement of STAT3 in antiapoptosis[J]. Immunity, 1996, 5: 449- 460.
- [11] Bonni A Y, Sun M, Nadal-Vicens, et al Regulation of gliogenesis in the central nervous system by JAK-STAT signaling pathway[J]. Science, 1997, 278: 477- 483.
- [12] Burdon T, Stracey C, Chamber I, et al Suppression of SHP-2 and ERK signaling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells[J]. Dev Biol, 1999, 210: 30- 43.
- [13] Arrandale J M, Gore-Willse A, Rocks S, et al Insulin signaling in mice expressing reduced levels of Shp[J]. J Biol Chem, 1996, 271: 21353- 21358.
- [14] Klug M G, Soonpa M H, Kol G Y, et al Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts [J]. J Clin Invest, 1996, 98: 216- 224.
- [15] Li M, Pevny L, Lovell-Badge R, et al Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection[J]. Curr Biol, 1998, 8: 971- 974.
- [16] Kolossov E, Fleischmann B K, Liu Q, et al Functional characteristics of ES cell-driven cardiac precursor cells identified by tissue specific expression of the green fluorescent protein[J]. J Cell Biol 1998, 143: 2045- 2056.
- [17] Dinsmore J, Ratliff J, Deacon T, et al Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation[J]. Cell Transplant, 1996, 5: 131- 143.
- [18] Keller G, Wall C, Fong A Z, et al Overexpression of Hox 11 leads to the immortalization of embryonic precursors with both primitive and definitive hematopoietic potential[J]. Blood, 1998, 92(3): 877- 887.
- [19] Vallier L, Mancip J, Markossian S, et al An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their *in vitro* and *in vivo* differentiated derivatives[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(5): 2467- 2472.
- [20] Odorico J S, Kaufman D S, Thomson J A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines[J]. Stem Cells, 2001, 19(3): 193- 204.
- [21] 华进联. 源于原始生殖细胞的人、小鼠ES细胞的分离克隆[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2001.
- [22] Nakano T, Kodama H. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic cells in culture[J]. Science, 1994, 265: 1098- 1101.
- [23] Nakano T. *In vitro* development of hematopoietic system from mouse embryonic stem cells: a new approach for embryonic hematopoiesis[J]. International Journal of Hematology, 1996, 65: 1- 8.
- [24] Palacios R, Golunski E, Samaridis J, et al *In vitro* generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(16): 7530- 7534.
- [25] 徐 令, 黄绍良, 李树浓, 等. 人类的胚胎干细胞的分离和培养[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 77- 78.
- [26] 常万存, 窦忠英, 马鸿飞, 等. 原始生殖细胞的人类胚胎干细胞克隆[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(6): 105- 107.
- [27] 乔春平, 李树荣, 黄绍良, 等. 从胚胎干细胞诱导发育为浆细胞的体外实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(1): 24- 27.
- [28] 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.
- [29] Bain G, Kitchens D, Yao M, et al Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*[J]. Dev Biol, 1995, 168: 342- 357.
- [30] Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro A C, et al Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*[J]. Mech Dev, 1996, 59: 89- 102.
- [31] Brustle O, Jones K N, Learch R D, et al Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants[J]. Science, 1999, 285(5428): 754- 756.
- [32] Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes[J]. J Clin Invest, 2001, 108(3): 407- 414.
- [33] 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.
- [34] 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.

(下转第34页)

- Res, 1991, 197: 191- 199
- [7] Boris Z, Marilyn V D, Warren S, et al Establishment and characterization of bovine mammary epithelial cell line unique properties *in vitro* cell[J]. Dev Biol, 1996, 32: 138- 148
- [8] Hung T H, Michael P. HH2A, an immortalized bovine mammary epithelial cell line, expresses the gene encoding mammary derived growth inhibitor (MDGI) *in vitro* cell[J]. Dev Biol, 1995, 31 A: 25- 29
- [9] Ehmman V L, Peterson W D, M isfeldt D S To grow mouse mammary epithelial cells in culture[J]. J Cell Biol, 1984, 98: 1026- 1032
- [10] Guzman R C, Osborn R C, Bartley J C, et al *In Vitro* transformation of mouse mammary epithelial cells grown serum free inside collagen gels[J]. Cancer Res, 1987, 47: 275- 279

Establishment of culture system in goat mammary epithelial cell

OUYANG Wu-qing, QIAN Ju-fen

(College of Animal Sciences and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Culture system in goat mammary epithelial cell was established to study the proliferation and differentiation and molecular mechanism of gene express in mammary epithelial cell. The mammary tissues from healthy goat second born duration of lactation have been cultured *in vitro*. The basic medium is RPM 1640 and 15% fetal calf serum, and EGF ($10 \mu\text{g/L}$), insulin (0.1 mg/L), E_2 ($1 \mu\text{g/L}$), hydrocortisone (0.1 mg/L), P (1 mg/L), penicillin (0.1 g/L) and streptomycin (0.05 g/L) were added. The cell cultured on the plastics that covered collagen. The cell biological properties were observed and investigated from the cell planting survival efficiency, cell population doubling time, cell growth curve and cell division index. The results showed that the goat mammary epithelial cell grows well and proliferates vigorously in this culture system. The electrophoresis and western blot of the products of the cell showed that the cultured cell is goat mammary epithelial cell, and it has a function that expresses the goat casein.

Key words: goat; mammary epithelial cell; culture system

(上接第 29 页)

Research progress on induced differentiation of embryonic stem cells

MA Yong-jiang, YANG Xue-yi, DOU Zhong-ying

(State Cell Engineering Technology Research Center of Shaanxi Province,
Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Embryonic stem cells were derived from the inner cell masses of cultured blastocysts in mammal and capable of unlimited, undifferentiated proliferation *in vitro*. At the same time, embryonic stem cells could also be directly induced to differentiate in culture into a variety of cell types under appropriate conditions. Homogeneous populations of cells produced by directed differentiation *in vitro* could be applied to study the cell replacement therapies of disease, etc. This paper elaborated signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation on induced differentiation of embryonic stem cells, methods of induced differentiation of embryonic stem cells, research progress and prospects on induced differentiation of embryonic stem cells.

Key words: embryonic stem cells; induced differentiation; signaling mechanisms