

无血清培养山羊内细胞团的研究

杨炜峰, 葛秀国, 杨春荣, 马晓玲, 华进联, 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 杨凌 712100)

[摘要] 对32只关中奶山羊进行超排处理, 获得胚胎263枚, 其中囊胚122枚。采用机械法、酶消化法和免疫外科法分离囊胚83枚, 得到内细胞团(ICM)65个。将ICM培养于小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上, 研究含血清和无血清条件下ICM的增殖规律, 并比较添加不同生长因子对ICM增殖的影响。结果表明, 无血清培养时, ICM细胞增殖相对较慢, 分化减少; 添加LIF、bFGF、两种同时添加或均不添加对原代ESC样集落形成率的影响不显著($P > 0.05$), 但添加10 ng/mL bFGF稍微有助于ICM增殖。山羊ICM适宜于无血清培养。

[关键词] 山羊; 血清替代品; 内细胞团; 胚胎干细胞; 免疫外科

[中图分类号] Q813.1⁺; S827

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0001-05

The study of serum-free culture of goat inner cell mass

YANG Wei-feng, GE Xiu-guo, YANG Chun-rong, MA Xiao-ling, HUA Jin-lian, DOU Zhong-ying

(Shaanxi Center of Stem Cell Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: A total of 32 Guanzhong dairy goats were superovulated with a result of 263 embryos including 122 blastocysts, 65 intact inner cell mass (ICM) obtained from 83 blastocysts by mechanical incision, enzymatic digestion, or immunosurgery methods. The propagation characteristics of ICM were studied both in serum-containing and serum-replacement media on a feeder layer of mitomycin-inactivated mouse embryo fibroblasts (MEF). The result indicates that the differentiation of ICM decreased in serum-free media, although the proliferation of ICM was slower in the condition of serum-free than in the serum-medium. The proliferation condition of ICM (total 30) were cultured by addition of different growth factors in serum-free media, there were no statistical differences of primary colony formation among the four groups (added to LIF, bFGF, both or none) on MEF cell feeder layer ($P > 0.05$), however, addition of 10 ng/mL bFGF may slightly promote the proliferation of goat ICM. These results suggest that it is suitable to culture goat ICM in serum-free media.

Key words: goat; serum replacement; inner cell mass; embryonic stem cell; immunosurgery

小鼠胚胎干细胞(ESC, embryonic stem cell)具有的无限增殖和多向分化潜能, 引起了研究者探讨其他物种ESC的兴趣^[1-2]。参照小鼠ESC建系的方法, 在猪^[3]、牛^[4]、鸡^[5]、貂^[6]、恒河猴^[7]和人^[8]等物种上陆续建立了稳定增殖的ESC系, 而山羊至今还没有成功建系的报道。Udy等^[9]用大鼠肝脏细胞条件培养液培养山羊ICM, 结果发现低浓度氧有助于山

羊类ESC的存活, 但最多只能传3代。Meinecke-Tillmann等^[10]从山羊囊胚内细胞团(ICM)和胚盘中分离培养山羊类ESC, 发现牛胎肝成纤维细胞有助于山羊类ESC的传代培养, 但传代后始终混有内胚层样细胞且不能稳定增殖, 大多类ESC在3~4代死亡。Tian等^[11]发现, 山羊囊胚在小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)饲养层上不能形成类ESC集落, 而ICM

° [收稿日期] 2006-01-10

[基金项目] 国家“863”计划项目(2005AA219050); 教育部重大项目(03160)

[作者简介] 杨炜峰(1977-), 男, 河南登封人, 在读博士, 主要从事胚胎干细胞建系研究。E-mail: weifengyang@126.com

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事干细胞生物学研究。E-mail: douzhongying@china.com

适宜于分离山羊类ESC;小鼠ESC条件培养液可以促进山羊类ESC自我更新,但最高传至8代。桑润滋等^[12]将山羊桑椹胚和囊胚分别培养于MEF饲养层或同源山羊胎儿成纤维细胞饲养层,结果发现后者更有利于山羊类ESC培养,最高传至5代。可见,对山羊ESC稳定增殖所需的微环境还不清楚,不同实验室对添加条件培养液的研究结果并不一致,而且缺乏对山羊ICM增殖规律的详细研究。胎牛血清(FBS)是小鼠ESC培养基常用的营养成分,但由于FBS中含有未知的促进ESC分化的因子,目前大多采用成分确定的血清替代品(serum replacement, SR)进行ES细胞培养。Amir等^[13]用SR代替血清成功建立了人的ESC系。可见SR有助于ESC培养条件的筛选。本研究参照人ESC无血清培养体系,探索了适宜于山羊ICM生长和传代的条件,以期在无血清培养山羊ESC研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

32只非泌乳期成年关中奶山羊由西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心羊场提供,健康状况良好。超排用药:卵泡刺激素(FSH),10 mg/瓶,中科院动物研究所;氯前列烯醇,0.2 mg/支,上海市计划生育科学研究所;孕酮栓(CDR-G,含孕酮0.3 g/枚),新西兰生产。MEF培养液:含体积分数10%新生牛血清(NBS)、0.1 mmol/L β -巯基乙醇(β Me, Merck公司产品)、100 IU/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素的高糖DMEM(Gibco公司产品)。山羊含血清ESC培养液:含体积分数15% FBS(Gibco公司产品)、2 mmol/L谷氨酰胺(L-glutamine, Gibco公司产品)、0.1 mmol/L β Me、100 IU/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素的高糖DMEM。山羊ESC无血清培养液是将FBS改为体积分数15%的SR,其他成分同山羊含血清ESC培养液。ESC切割刀,购自瑞典Swemed实验室。

1.2 山羊超排与胚胎采集

试验于2005年3~4月和9~12月进行。奶山羊放CDR-G栓后第12天早开始肌注FSH,连续注射4 d(剂量分别为1.75, 1.0, 0.75和0.25 mg/(只·次)),每天早晚各1次(间隔12 h);并在第14天晚和第15天早肌注FSH的同时,肌注氯前列

烯醇各0.2 mg;在第15天晚注射FSH后去栓。去栓后每6 h观察发情1次,并及时配种。配种后7~9 d时,腹中线手术法采胚,体视镜下检胚。

1.3 山羊囊胚ICM的分离

1.3.1 机械法分离囊胚ICM 早期囊胚和扩张囊胚于分割前用5 g/L链酶蛋白酶处理0.5~1 min,以除去透明带;孵化胚直接进行分割,分割方法参考文献[14],操作液为添加20.85 mmol/L HEPES(Gibco公司产品)的山羊含血清ESC培养液。分割时,于灭菌玻璃或塑料培养皿内滴0.1~0.2 mL操作液,用玻璃吸管将胚胎移于液滴中,每滴放1枚胚胎。在50~80倍的立体显微镜下,用左手调整培养皿使胚胎处于适当的操作位置,用右手的拇指、食指和中指配合夹住玻璃针(直径约30 μ m)或ESC切割刀柄部,以小指和无名指作固定点以增加稳定性。用玻璃针拨动胚胎,使其ICM与玻璃针方向平行,然后将玻璃针置于胚胎上靠近ICM的部位,垂直施加压力,当针接触到皿底时,右手稍向左侧用力,将胚胎一分为二。再用两根直径约20 μ m玻璃针将滋养层细胞与ICM分开。

1.3.2 酶消化法分离囊胚ICM 将囊胚用链酶蛋白酶脱带处理后,参照李明等^[15]报道的方法进行试验。在室温下,用含0.4 g/L已二胺四乙酸(EDTA)的2.5 g/L胰蛋白酶消化5 min后,于解剖镜下观察,若发现滋养层细胞开始脱落,迅速将囊胚移入操作液中,并在解剖镜下借助细玻璃针分离出ICM。

1.3.3 免疫外科法分离囊胚ICM 将除去透明带的山羊囊胚,在无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS中洗3遍,然后将胚胎加入到1:16(体积比)倍稀释的兔抗山羊血清中作用30 min。再在PBS中洗3遍,以除去可能残留的抗体。之后移入豚鼠血清中,作用30 min。然后用吸尿管吸到操作液中,轻轻吹打,除去溶解的滋养层细胞,即可得到ICM。若未能除去滋养层细胞,可用1:4或1:8(体积比)倍稀释的兔抗山羊抗血清重新作用,重复上述操作。

1.4 血清与生长因子对山羊ICM体外培养的影响

1.4.1 血清 提前3~24 h制作MEF饲养层,选择传至1~3代的MEF细胞,用10 μ g/mL丝裂霉素C(Sigma公司产品)处理2 h后,离心2~3次以除去可能残留的丝裂霉素C,并按 1.0×10^5 /孔将细胞接种到预先用1 g/L明胶处理的四孔板中。将获得的ICM转入ESC培养液中洗2遍后,接种于MEF饲养层上,每孔接种1枚胚胎的ICM。培养液分别为山羊含血清ESC培养液和无血清培养液,每组分

别对5个ICM进行比较。接种2 d后观察ICM的贴壁增殖情况。随后每天观察1次ICM的增殖情况,并更换培养液。

1.4.2 生长因子 分以下3组比较无血清培养液中不同生长因子对山羊ICM增殖和抑制其分化的影响:(1)添加1 000 IU/mL小鼠LIF(Gibco公司产品);(2)添加10 ng/mL人bFGF(Gibco公司产品);(3)添加1 000 IU/mL小鼠LIF和10 ng/mL人bFGF。对照组不添加任何生长因子。

1.5 山羊ICM与ESC样集落的鉴定

1.5.1 形态学鉴定 在倒置显微镜下观察山羊ICM生长行为,并记录其形态特征。

1.5.2 AKP染色 用40 g/L多聚甲醛PBS溶液室温固定ICM或ESC样集落5 min。用无Ca²⁺、Mg²⁺ PBS冲洗3次,每次间隔10 min。再加入AKP液(0.2 mg/mL α-萘酚磷酸盐,1 mg/mL 坚固红TR盐,

0.1 mol/L Tris-Base,调节pH为8.2)作用10~20 min。吸出染色液,用PBS冲洗后,倒置显微镜下观察,阳性细胞为紫红色,阴性细胞不着色。

1.5.3 免疫组化染色 对细胞表面标志抗原SSEA-1、SSEA-4和Oct4(抗体购自Invitrogen公司),采用免疫组化染色SP法进行鉴定(试剂盒购自北京中杉金桥公司),具体操作按照试剂盒说明书进行。倒置显微镜下观察,阳性细胞为棕红色,阴性细胞不着色。

2 结果与分析

2.1 山羊胚胎采集结果

32只关中奶山羊中,24只采集到胚胎,共采胚胎263枚,可用胚225枚,占采胚总数的85.6%,其中囊胚122枚(早期囊胚39枚,扩张囊胚38枚,孵化胚45枚(图1A))。

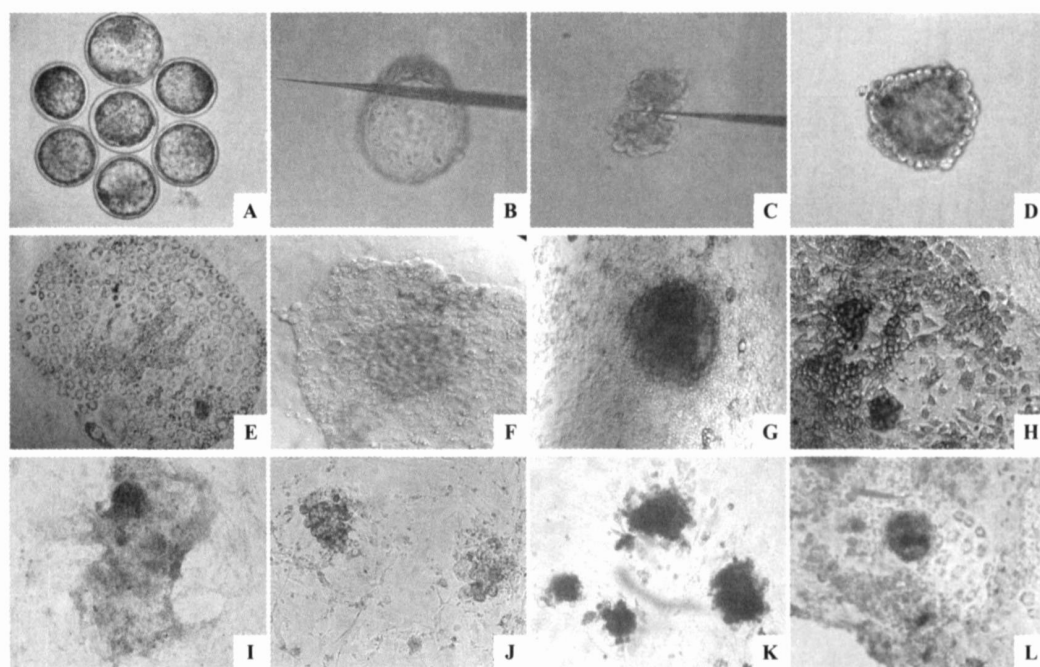


图1 山羊胚胎和类ESC集落特征

A. 山羊扩张囊胚($\times 50$); B. 机械法分离山羊ICM($\times 100$); C. 酶消化法分离山羊ICM($\times 100$); D. 免疫外科处理的山羊胚胎($\times 100$); E. ICM增殖后的形态($\times 50$),中央为不规则排列的上皮样细胞; F. ICM增殖后呈“煎蛋”样($\times 50$); G. ICM增殖后呈典型类ESC集落($\times 50$); H. 原代ESC样集落AKP染色($\times 100$),集落样细胞呈阳性,其余为弱阳性或阴性; I. 传至3代的ESC样集落($\times 50$); J. 传至6代的ESC样集落($\times 100$); K. 传至9代的ESC样集落($\times 50$),细胞变大变黑,传代后死亡; L. 第3代ESC样集落Oct4染色($\times 200$),集落样细胞呈阳性,其余为弱阳性或阴性。

Fig 1 Characterization of goat embryos and derived ESC-like colonies

A. Goat expanded blastocysts ($\times 50$); B. Isolation goat ICM by mechanical incision ($\times 100$); C. Isolation goat ICM by enzymatic digestion ($\times 100$); D. Goat blastocyst after treated by immunosurgery ($\times 100$); E. Morphology of proliferated ICM, with random distribution of epithelium-like cell in the center ($\times 50$); F. The appearance of proliferated ICM was like “fried eggs” ($\times 50$); G. The appearance of proliferated ICM was typical ESC-like colonies ($\times 50$); H. Primary ESC-like colonies showed positive staining for AKP, other cells were weak or negative staining ($\times 100$); I. Passage 3 goat ESC-like colonies ($\times 50$); J. Passage 6 goat ESC-like colonies ($\times 100$); K. Passage 9 goat ESC-like colonies, which had big cells and died after subculture ($\times 50$); L. Passage 3 ESC-like colonies showed positive staining for Oct4, other cells were weak or negative staining ($\times 200$).

2 2 山羊 ICM 的分离效果

3 种方法共分离囊胚 83 枚, 得到 ICM 65 个(表 1)。由表 1 可知, 机械法(分离的 ICM 见图 1 B)和酶消化法(分离的 ICM 见图 1 C)适合于分离扩张囊胚

和孵化胚, 不适合于分离早期囊胚; 免疫外科法(分离的山羊胚胎见图 1 D)对早期囊胚、扩张囊胚和孵化胚均适用。分离得到 ICM 细胞的形态特征与胚胎质量密切相关, 而且 ICM 中细胞的大小不一致。

表1 不同分离方法对山羊囊胚 ICM 的分离效果

Table 1 Results of isolating ICM from goat blastocysts by different methods

分离方法 Isolation method	ICM 分离成功率/% Success rate of isolating ICM		
	早期囊胚 Early blastocysts	扩张囊胚 Expanded blastocysts	孵化胚 Hatched blastocysts
机械法 Mechanical incision	0 (0/3)	66.7 (2/3)	60.0 (3/5)
酶消化法 Enzymatic digestion	20 (1/5)	80.0 (4/5)	100.0 (5/5)
免疫外科法 Immunosurgery	80 (4/5)	90.9 (20/22)	86.7 (26/30)

2 3 血清和生长因子对山羊 ICM 体外培养的影响结果

2 3 1 血清 在含血清培养条件下, 接种 2 d 时 5 个 ICM 均贴壁; 而无血清培养条件下, 有 1 个 ICM 漂浮于培养液中。4~7 d 后, 含血清培养条件下 ICM 增殖较快, 但同时周边空泡样细胞也大量增殖; 而无

血清培养条件下, ICM 增殖相对较慢, 周边空泡样细胞相对较少。

2 3 2 生长因子 由表 2 可知, 在以 MEF 为饲养层的条件下, LIF、bFGF、LIF+bFGF 和对照组原代 ESC 样集落形成率差异不显著 ($P > 0.05$), 但添加 bFGF 稍微有助于 ICM 增殖。

表2 生长因子对无血清培养山羊 ICM 的影响

Table 2 Effects of cytokine on the serum-free culture of goat ICM

组别 Group	接种 ICM 数 No. of ICM seeded	贴壁率/% Attached	原代类 ESC 集落形成率/% Forming rate of primary ESC-like colonies	类 ESC 细胞最高传代数 The highest passages of ES-like cells
LIF	8	75.0 (6/8)	50.0 (4/8)	4
bFGF	9	77.8 (7/9)	55.6 (5/9)	9
LIF+bFGF	8	75.0 (6/8)	62.5 (5/8)	7
对照组 CK	5	80.0 (4/5)	60.0 (3/5)	3

2 4 山羊 ICM 与类 ESC 集落的鉴定

2 4 1 山羊 ICM 与类 ESC 集落的形态学特征 山羊 ICM 接种后, 2 d 内贴壁, 同时其周围逐渐出现空泡样细胞, ICM 逐步完全分化。4~7 d 后, ICM 呈不同的形态, 大致包括以下几种: (1) 全部为上皮样细胞, 没有典型的集落样结构出现; (2) 边缘为扁平的空泡样细胞, 中央为不规则排列的上皮样细胞(图 1 E); (3) 集落逐渐发黑, 镜下呈“煎蛋”样(图 1 F); (4) 边缘为空泡样细胞, 中央类 ESC 集落逐渐长大, 呈立体感较强的山包状, 由小圆形细胞组成(图 1 G); (5) 空泡样上皮细胞逐渐出现弥散型的类 ESC 集落, 集落体积比较小(图 1 H)。

2 4 2 山羊 ICM 和类 ESC 集落的鉴定 山羊 ICM 和类 ESC 集落传代后, 小圆形细胞迅速增殖, 同时空泡样的分化细胞增多, 继续传代后虽然可重新形成类 ESC 集落, 但不能保证其稳定存活, 大多数类 ESC 集落在传至 3~4 代时死亡, 最高一株传至 9 代(图 1 I, J, K)。ICM 和类 ESC 集落 AKP 染色呈阳性(图 1 H), Oct4(图 1 L)和 SSEA-1 免疫组化染色

也呈阳性, SSEA-4 染色呈阴性。已分化细胞呈弱阳性或阴性, 饲养层细胞呈阴性。

3 讨论

3 1 山羊 ICM 为混合细胞群体

Rossant 等^[16]研究发现, 小鼠 ICM 表达 Oct4 或 Gata6(一种促分化基因), 说明其为混合细胞群体。曹贵方等^[17]的研究表明, 山羊 ICM 位于腔的一侧, 分三层排列: 最内层细胞为单层梭形, 斜向囊胚腔突入; 最外层细胞为单层柱状或立方或半月形, 与滋养层细胞相延续; 内外层之间是多边形细胞构成的中层; 滋养层细胞为单层扁平或低柱状; 在 ICM 外没有看到滋养层的扁柱状细胞, 但 ICM 最外层的立方状或者半月形细胞与滋养层细胞相延续, 可能从功能上还是属滋养层细胞, 只是形态不同而已。Meinecke-Tilmann 等^[10]发现, 山羊类 ESC 在培养过程中始终混杂有内胚层样细胞。本研究中, 山羊 ICM 增殖后出现不同类型的细胞, 因此作者推测山羊 ICM 为混合的细胞群体。山羊 ICM 在体外增殖后

出现的由小圆形细胞组成的集落, 可能为山羊ESC, 但对其体外稳定增殖的条件目前还不明确^[11]。

3.2 无血清培养山羊 ICM 的优点与局限性

由于不同批次 FBS 间可能存在较大差异, 不一定均适宜于 ESC 的培养, 这就要求试验前必须对 FBS 进行筛选。在 小鼠和人 ESC 研究上, 已证明采用 SR 替代 FBS 可以提高建系成功率^[13, 18-19]。SR 是一种成分已知的血清替代物, 其中不含促进细胞分化的因子。因此, SR 为细胞体外培养提供了一个相对恒定的培养环境。但是, 适宜于培养小鼠和人 ESC 的 SR, 并不一定是培养山羊 ICM 的最佳物质。本研究结果表明, 用 SR 培养山羊 ICM 是可行的, 而且添加 bFGF 有助于 ICM 的细胞增殖。但是, SR 的一个缺点是不能促进细胞贴壁, 这无疑增加了 ICM 传代后漂浮的机率, 进而降低建系效率^[18]。FBS 可以促 ICM 贴壁, 因此作者认为进一步研究可采用 FBS 和 SR 相结合的方法, 即在传代时使用 FBS 培养, 以促进 ICM 或类 ESC 的贴附; 待其贴壁后更换为 SR 培养, 以减少细胞分化的发生, 这将有助于山羊 ESC 系的建立。

SR 为筛选适用于山羊 ICM 和类 ESC 培养的生长因子提供了较为稳定的营养成份, 但维持山羊 ESC 稳定增殖的关键因子还不清楚。LIF 对抑制小鼠 ESC 分化和维持其多能性有关键性的作用^[1-2]; bFGF 对维持人 ESC 增殖和保持其多能性有重要作用^[7]。Tian 等^[11]认为, ESC 的增殖和多能性状态维持, 除了饲养层分泌的生长因子外, ESC 自身的未知内分泌因子也起到重要作用, 如小鼠 ESC 条件培养液可以促进山羊类 ESC 自我更新, 但其分子机制还不明确。本研究结果发现, 血清培养液中添加 LIF、bFGF 或两种同时添加, 对原代 ESC 样集落形成率的影响差异不显著 ($P > 0.05$), 而添加 bFGF 组稍微有助于 ICM 增殖。

4 小结与展望

本研究结果表明, 无血清培养山羊 ICM 是可行的。尽管小鼠和人 ESC 建系的方法已被详尽报道, 然而依其为参照, 在 山羊上仍无建系成功的报道。目前还不完全清楚早期胚胎细胞转化为 ESC 的分子机制, 也不清楚为何某些品系的小鼠很难建立 ESC 系^[20], 因此探讨家畜 ESC 系的建立方法仍有重要价值。Buehr 等^[21]通过追踪 ICM 和上胚层中多能性基因 *Oct4* 的表达发现, 仅有一小部分快速生长的细胞表达 *Oct4*, 上胚层中也仅有一小部分细胞能转变到稳定增殖的多能性状态, 最后成为 ESC。本研究发

现, 山羊 ICM 在体外增殖会出现一些小圆形细胞, 呈集落样生长, 但未能得到如在小鼠上一样稳定增殖的 ES 细胞, 表明山羊 ESC 样细胞自我更新机制与小鼠不同。目前对维持山羊 ESC 样细胞增殖和自我更新的微环境还不清楚。ESC 建系的关键是提供稳定的、适宜的培养条件和有效的传代方法, 无血清培养将为进一步筛选山羊 ESC 体外培养需要的微环境提供便利。

[参考文献]

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-156
- [2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1981, 78: 7634-7638
- [3] Tsung H C, Du Z W, Rui R, et al The culture and establishment of embryonic germ (EG) cell lines from Chinese mini swine[J]. Cell Research, 2003, 13(3): 195-202
- [4] Wang L, Duan E, Sung L, et al Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos[J]. Biology of Reproduction, 2005, 73: 149-155
- [5] Pain B, Clark M E, Shen M, et al Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities [J]. Development, 1996, 122: 2339-2348
- [6] Sukoyan M A, Golubitsa A N, Zhelezova A I, et al Isolation and cultivation of blastocyst-derived stem cell lines from American mink (*Mustela vison*) [J]. Mol Reprod Dev, 1992, 33(4): 418-431
- [7] Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, et al Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) [J]. Biol Reprod, 1996, 55: 254-259
- [8] 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
- [9] Udy G B, Wells D N. Low oxygen atmosphere initially increases the survival and multiplication of putative goat embryonic stem cells[J]. Theriogenology, 1996, 45: 237
- [10] Meinecke-Tilmann S, Meinecke B. Isolation of ES-like cell lines from ovine and caprine preimplantation embryos[J]. Anim Breed Genet, 1996, 113: 413-425
- [11] Tian H, Wang H, Sha H, et al Factors derived from mouse embryonic stem cells promote self-renewal of goat embryonic stem-like cells[J]. Cell Biol Int, 2006, 30(5): 452-458

(下转第 10 页)

- Reprod, 2003, 69: 2045-2052
- [8] Lonergan P, Khatir H, Carolan C, et al Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h[J]. J Reprod Fertil, 1997, 109: 355-365
- [9] Hashimoto S, Minami N, Takakura R, et al Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*[J]. Biol Reprod, 2002, 66: 1696-1701
- [10] Ponderato N, Crotti G, Turini P, et al Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVF and IVF[J]. Mol Reprod Dev, 2002, 62: 513-518
- [11] Eppig J J, Downs S M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation[J]. Biol Reprod, 1984, 30: 1-11
- [12] 陈大元 受精生物学-受精机制与生殖工程[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- [13] Thomas R E, Armstrong D T, Gilchrist R B. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3', 5' monophosphate levels[J]. Biol Reprod, 2004, 70: 548-556
- [14] Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, et al Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development[J]. Biol Reprod, 2006, 74: 177-184
- [15] Nogueira D, Cortvrindt R, Everaerd B, et al Effects of long-term *in vitro* exposure to phosphodiesterase type-3 inhibitors on follicle and oocyte development[J]. Reproduction, 2005, 130: 177-186
- [16] Thomas R E, Armstrong D T, Gilchrist R B. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation[J]. Dev Biol, 2002: 244: 215-225

(上接第5页)

- [12] 桑润滋, 韩建永, 孙国杰, 等 山羊类ES细胞的分离与克隆[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 403-407
- [13] Amit M, Shariki C, Margulets V, et al Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells[J]. Biol Reprod, 2004, 70: 837-845
- [14] 马保华, 王光亚, 赵晓娥, 等 生产条件下安哥拉山羊胚胎徒手分割研究[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(1): 403-407
- [15] 李明, 李永海, 张东, 等 一种简单的分离猪囊胚内细胞团的方法[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(3): 349-350
- [16] Rossant J, Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 358: 1341-1349
- [17] 曹贵方, 张涌, 李裕强, 等 山羊胚胎的卵裂与囊胚形成的光学研究[J]. 内蒙古畜牧科学, 1999(4): 1-4
- [18] Bryja V, Bonilla S, Cajánek L, et al An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2006, 24: 844-849
- [19] Peng H M, Chen G A. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines[J]. Hum Reprod, 2006, 21: 217-222
- [20] Tesar P J. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2005, 102: 8239-8244
- [21] Buehr M, Nichols J, Stenhouse F, et al Rapid loss of oct4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines[J]. Biol Reprod, 2003, 68: 222-229