

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01567

# 一种新的人胚胎干细胞自身来源的滋养层支持其体外培养

安世民, 曾桥, 滕祥云, 龙志高, 李娟, 潘乾, 鄢玲仟, 梁德生, 夏昆, 夏家辉, 张灼华  
中南大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078

**摘要:** 通过人胚胎干细胞(Human embryonic stem cells, hESCs)经体内分化获取间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)为人胚胎干细胞提供一种新的滋养层。将约  $5 \times 10^6$  个 hESCs 注射入重症免疫联合缺陷小鼠形成畸胎瘤, 8 周后再从畸胎瘤中分离 MSCs 并鉴定, 将 MSCs 作为 hESCs 的滋养层细胞, 并检测和观察 hESCs 的生长情况、细胞特性和分化能力。从畸胎瘤中获得了纯度较高的具有类似骨髓来源的 MSC 特性的细胞群, 其形态相似、表面抗原标志相似(CD34 和 CD45 阴性, CD29、CD49b、CD105、CD73 和 CD90 阳性), 经诱导可以向成骨细胞和成脂细胞分化。将 hESCs 在 MSCs 滋养层细胞上传代培养 10 代以上, hESCs 依然具有正常的细胞形态, 反转录 PCR 证实其特异转录因子 *Oct4*、*Nanog* 的表达, 干细胞表面标记 SSEA-1 显示为阴性, SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 显示为阳性, 碱性磷酸酶染色显示为阳性, 并且核型正常。体外 EB 形成和体内畸胎瘤形成证明了其全能性。因此来源于 hESCs 本身的 MSCs 可以被用来作为支持胚胎干细胞生长并维持其未分化状态的滋养层细胞。

**关键词:** 人胚胎干细胞; 间充质干细胞; 滋养层

## Growing of human embryonic stem cells on feeders derived from themselves

AN Shi-Min, ZENG Qiao, TENG Xiang-Yun, LONG Zhi-Gao, LI Juan, PAN Qian, WU Ling-Qian, LIANG De-Sheng, XIA Kun, XIA Jia-Hui, ZHANG Zhuo-Hua

National Lab of Medical Genetics, Central South University, Changsha 410078, China

**Abstract:** This study was carried out to determine whether mesenchymal stem cells (MSCs) derived from teratoma of human embryonic stem cells (hESCs) function as feeder cells to support hESCs growth. Approximately  $5 \times 10^6$  hESCs were injected into the hind limb muscle of each SCID-beige mouse to form teratoma. After 8 weeks, the MSCs were isolated from the teratoma and cultured in Mesencult medium. Purified MSCs were then used as the feeder cells for hESCs culture. High purity MSCs derived from teratoma were isolated. The cells were morphologically similar to bone marrow MSCs

收稿日期: 2008-03-11; 修回日期: 2008-04-18

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 项目)项目(编号 2004CB518601)和国家自然科学基金重点项目(编号 :30730052)资助 [Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2004CB518601) and the National Natural Science Foundation of China (No. 30730052)]

作者简介: 安世民(1984-), 男, 甘肃天水人, 硕士研究生, 研究方向: 细胞分子生物学、干细胞分化调控和表观遗传学。Tel: 13601738984; E-mail: csuanshimin@yahoo.com.cn  
曾桥(1975-), 男, 湖南衡阳人, 博士研究生, 研究方向: 人类胚胎干细胞与分化、生殖医学辅助生殖技术。Tel: 13707482653; E-mail: zengqiao@cnlmg.com  
安世民、曾桥为并列第一作者。

通讯作者: 张灼华(1963-), 男, 湖南长沙人, 博士, 博士生导师, 研究方向: 遗传学。Tel: 0731-4805357; E-mail: nlmglcy@xysm.net

(bMSCs). The teratoma-derived MSCs were negative for CD34 and CD45 but positive for CD29, CD49b, CD105, CD73, and CD90, which resembled those expressed by bMSCs. After passaged on MSCs feeder cells more than 10 passages, hESCs maintained hESC characteristics in morphology. Reverse PCR showed the expression of Oct4 and Nanog. SSEA-1 was negative and SSEA-4, TRA-1-60, and TRA-1-81 were positive. Alkaline phosphatase staining showed positive results. The karyotype remained normal. Moreover, the hESCs cultured on teratoma-derived MSCs formed teratoma *in vivo* and embryoid body *in vitro* confirmed their pluripotency. Accordingly, MSCs derived from hESCs by *in vivo* differentiation can be used as the feeder cells for hESCs culture.

**Keywords:** human embryonic stem cell; mesenchymal stem cell; feeder cells

人胚胎干细胞(Human embryonic stem cells, hESCs)来自于早期的囊胚或桑椹胚,它具有以下两个最重要的特性:全能性和自我更新能力。该特性使得其在再生医学和器官移植等领域具有潜在的重大意义。自 1998 年美国威斯康星大学的 Thomson 教授建立世界上第一株胚胎干细胞系<sup>[1]</sup>到目前为止,在 NIH 已经注册了 70 株胚胎干细胞系(<http://stemcells.nih.gov/>)。大多数人胚胎干细胞系是培养在来源于小鼠胚胎成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast cells, MEF)的滋养层细胞上,MEF 细胞通过与 hESC 直接接触及分泌多种因子维持人胚胎干细胞未分化状态。这种培养体系中的 hESCs 在应用于临床治疗时存在多个障碍,其中之一是动物源性病原体的交叉污染<sup>[2]</sup>。因此如何建立一种人源性的培养体系,避免治疗中动物源性污染有着重大意义。本研究通过将 hESCs 进行体内分化得到 MSCs 并作为滋养层细胞,对培养在 MSCs 上的 hESCs 进行传代观察,以期研究和建立一种适合于 hESCs 的人源化滋养层培养体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 胚胎干细胞和实验动物

本实验采用的胚胎干细胞是购自美国 NIH 注册的 HSF6 胚胎干细胞株,核型 46, XX; 实验小鼠是购自北京维通利华动物有限公司的 SCID-beige 小鼠。

#### 1.1.2 主要试剂

Mesencult Media 购自 STEM CELL 公司;胎牛血清(FBS)、DMEM-F12 培养基购自 Gibco 公司;血清替代物(Knockout serum replacement)、Knockout DMEM、谷氨酰胺、 $\beta$ -巯基乙醇、非必需氨基酸、双抗、人碱性成纤维生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)、分散酶(Dispase)和 型胶原酶

(Collagenase Type )、胰酶、Hank's 平衡盐溶液、PBS 购自 Invitrogen 公司;明胶(Gelatin)购自 Sigma 公司;碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)检测试剂盒购自 Vector Lab 公司;胚胎干细胞鉴定试剂盒(ES Cell Characterization Kit)购自 Chemicon 公司;PE 标记的小鼠抗人 CD73、CD90、CD29、CD49b、CD34 以及 FITC 标记的 CD14、CD45 购自 BD pharmingen 公司。丝裂霉素 C、地塞米松、 $\beta$ -磷酸甘油、IBMX、胰岛素购自 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 畸胎瘤形成

常规传代培养 hESCs 的方法见文献[3],机械切割法和酶消化法均可。将长至 80%~90%融合的约  $5 \times 10^6$  HeSCs 通过酶消化法收集,注射 4 到 8 周龄的 SCID-beige 小鼠后腿肌间隙,经过约 8 周后,将 SCID-beige 小鼠行断颈处死,在无菌条件下取出畸胎瘤。

#### 1.2.2 间充质干细胞(MSC)的获取

在无菌条件下,将畸胎瘤剪碎,37 胰酶消化 20 min,加入含有 10%FBS 的 Mesencult 培养基中止消化,吹打至单细胞悬液,450 r/min 离心 5 min,加含有 10%FBS 的 Mesencult 培养基培养于培养瓶中,每天加 bFGF 至 10 ng/mL。待细胞长至 90%汇合度后,传代培养。

#### 1.2.3 MSC 向成骨和成脂诱导

成骨诱导:将长至 80%左右汇合度的 P3、P6 代细胞消化,以  $1 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 的密度接种于 24 孔板, Mesencult 培养基培养;待细胞汇合度达 95%左右时换为诱导培养基:高糖 DMEM、地塞米松( $10^{-8}$  mol/L)、 $\beta$ -磷酸甘油(10 mmol/L)、抗坏血酸(50  $\mu$ g/mL)。每 3~4 d 全量换液。对照孔用 Mesencult 培养基培养。诱导 4 周后用 Von Kossa 法染色鉴定和碱性磷酸酶染色。成脂诱导:将长至 80%左右汇

合度的 P3、P6 细胞消化, 以  $1 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 的密度接种于 24 孔板, Mesencult 培养基培养; 待细胞汇合度达 95% 左右时换为诱导培养基: DMEM/F12、FBS(1%)、地塞米松( $10^{-7}$  mol/L)、胰岛素(6 ng/mL)、IBMX (100  $\mu$ g/mL)。每 3~4 d 全量换液。对照孔用 Mesencult 培养基培养。诱导 3 周后用油红 O 法染色鉴定。

#### 1.2.4 流式细胞术检测 MSC 表面标志

将 P2 代或 P7 代的 MSCs 通过 0.05% 的胰酶消化收集, 用 PBS 悬浮调整密度到  $1.0$  至  $5.0 \times 10^5$  个/mL, 将细胞与 CD105(SH2)、CD73(SH3 和 SH4)、CD90、CD45 和 CD34 以及对照抗体室温孵育 30 min, 用 PBS 洗涤细胞两次, 用 1% 多聚甲醛固定细胞, 流式细胞术检测。

#### 1.2.5 MSCs 作为滋养层细胞

将 P3 或 P7 代的 MSCs 以及对照细胞 MEF 细胞铺于六孔板中, 待其长至 95% 融合时, 用丝裂霉素 C 处理; 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中处理 2.5 h 后, 用 10% FBS 加 DMEM 培养基洗涤 5 次, 加培养基过夜。第二天在将胚胎干细胞铺于滋养层细胞之前 1 h 将培养基换成胚胎干细胞培养基。将传代的胚胎干细胞克隆团块铺于滋养层细胞之上, 加 bFGF 至终浓度为 10 ng/mL, 每日换液。

#### 1.2.6 ES 细胞特异性抗原和核型鉴定

将 hESCs 在 MSCs 滋养层细胞上传代培养 10 代以后, 用胚胎干细胞鉴定试剂盒进行鉴定。4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 羊血清室温封闭抗原, 分别加入小鼠抗人 SSEA-1(stage-specific embryonic antigen-1)、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 单克隆抗体染色 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 加入荧光标记的羊抗小鼠二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗涤后, 荧光显微镜观察。按照说明书用碱性磷酸酶(AKP)检测试剂盒染色检测。常规行 G 显带核型鉴定。

#### 1.2.7 反转录 PCR 实验检测 ES 细胞特异转录因子

收集 hES 细胞进行常规 RNA 抽提和反转录 PCR, GAPDH 引物上游序列: AATCCCATCACCATTCTTCCA, 下游序列: TGAGTCCTTCCACGATACC AA; Oct4 引物上游序列: AAGGGCAAGCGATCAA GC, 下游序列: GGAAAGGGACCGAGGAGTA; Nanog 引物上游序列: CCTATGCCTGTGATTTGTGG, 下游序列: GAAGTGGTTGTTTGCCTTT。复性温度均为 57 $^{\circ}$ C。

#### 1.2.8 ES 细胞体内外分化能力检测

将 ES 细胞在体外悬浮培养进行 EB 形成试验测

试其体外分化能力检测; 将 ES 细胞进行 SCID-beige 小鼠体内畸胎瘤试验测试其体内分化能力检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 畸胎瘤形成

在将 hESCs 注射入 SCID-beige 小鼠后腿肌间隙后, 在第 4 周的时候可以明显看到肿块隆起, 在第 8 周取出畸胎瘤。

### 2.2 MSCs 的培养

原代 MSCs 48 h 后可见许多细胞贴壁, 细胞形态多为圆形, 偶见短梭形细胞。第 2~3 d 可见由几个短梭形细胞组成的小集落, 散在分布的细胞形态多呈短梭形或多角形, 个别细胞宽大扁平。3~5 d 后细胞生长加速, 7 d 左右接近汇合, 此时细胞形态多为梭形, 核居中, 可见 2~3 个核仁。传代后的细胞 24 h 内完全贴壁并伸展为梭形, 均匀分布生长, 2~3 d 即可传代一次, 细胞以梭形为主(图 1)。

### 2.3 MSCs 向成骨诱导

MSCs 经在成骨诱导培养基中培养 1 周后, 可观察到少许 MSCs 细胞形态发生变化, 由梭形向多角形转变, 并且随时间推移越来越多, 聚集成团。3 周后, 观察到较大的细胞结节。在第 4 周, 用 Von Kossa 法染色可以看到黑色结节, 表明钙沉积的情况。成骨细胞因包埋在钙化基质中所以细胞轮廓不清楚。碱性磷酸酶活性是成骨细胞分化成熟的重要标志之一, 在诱导第 2 周时, 经染色后表现为强阳性。对照组染色结果为阴性(图 2)。

### 2.4 MSCs 向成脂诱导

MSCs 在成脂诱导培养基中培养 1 周后, 细胞胞质内开始出现微小脂滴; 随着时间推移, 脂滴数目逐渐增多, 并且脂泡开始长大。第 3 周时, 可以观察到细胞内出现富集的脂质小泡(图 3)。油红 O 染色法显示脂滴呈橙红色, 胞核显示蓝色。对照组未见脂滴。

### 2.5 流式细胞术检测 MSCs 表面标志

流式细胞术检测 MSCs 表面标记显示 CD45 和 CD34 阴性, 而 P3 至 P7 的 MSCs 约 85% 到 97% 显示 CD29、CD49b、CD105(SH2)、CD73(SH3 和 SH4)、CD90 阳性。其他的非阳性的细胞可能是已分化的 MSCs 或其他尚未分化的干细胞(图 4)。

### 2.6 培养在 MSCs 滋养层细胞上的胚胎干细胞

将 hESCs 传代至 MSCs 滋养层细胞上后, 细胞依

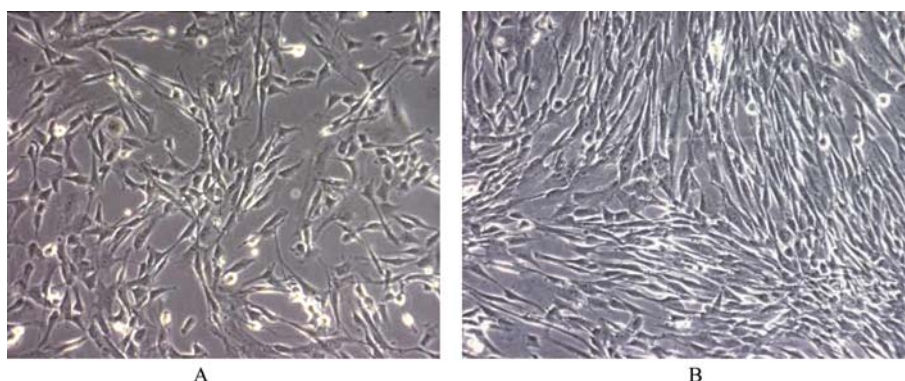


图 1 MSC 形态

A: 原代 MSC; B: 第 5 代 MSC ( $\times 10$ )。

Fig. 1 Phase contrast image of MSCs

A: Primary MSCs culture; B: MSCs culture, passage 5 ( $\times 10$ ).

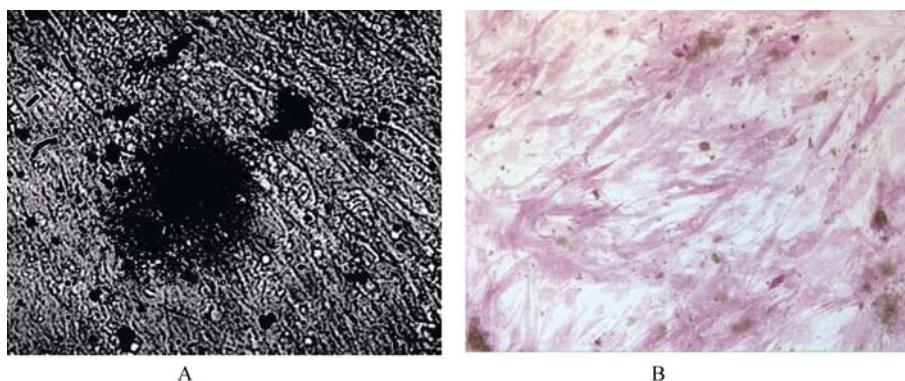


图 2 MSC 成骨诱导染色

A: Von Konssa 染色显示钙结节( $\times 20$ ); B: 碱性磷酸酶显示阳性( $\times 10$ )。

Fig. 2 Staining of MSCs after osteogenic induction

A: Vonkonssa staining shows mineralization deposits ( $\times 20$ ); B: Alkaline phosphatase staining ( $\times 10$ ).

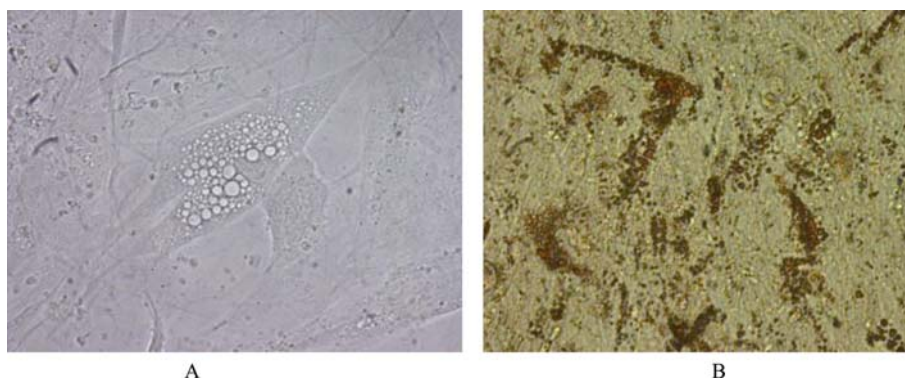


图 3 MSC 成脂诱导

A: MSC 经诱导形成的脂泡( $\times 40$ ); B: 油红 O 法染色显示红色脂滴( $\times 10$ )。

Fig. 3 Staining of MSCs after adipogenic induction

A: Lipid vacuole in MSCs ( $\times 40$ ); B: Oil red O staining shows red adipocyte.

然呈圆形克隆性生长, 并且保持未分化状态。克隆边界清楚, 生长状态良好。与培养在 MEF 滋养层上的对照组相比, MSCs 滋养层上的 hESCs 生长速度较慢。经连续传代培养, 其克隆形态未发生明显变化(图 5)。

## 2.7 胚胎干细胞表面标记物和特异性转录因子鉴定

将培养在 MSCs 滋养层上的胚胎干细胞经连续传代 10 代后, 进行 SSEA-1、SSEA-4、TRA-1-60、



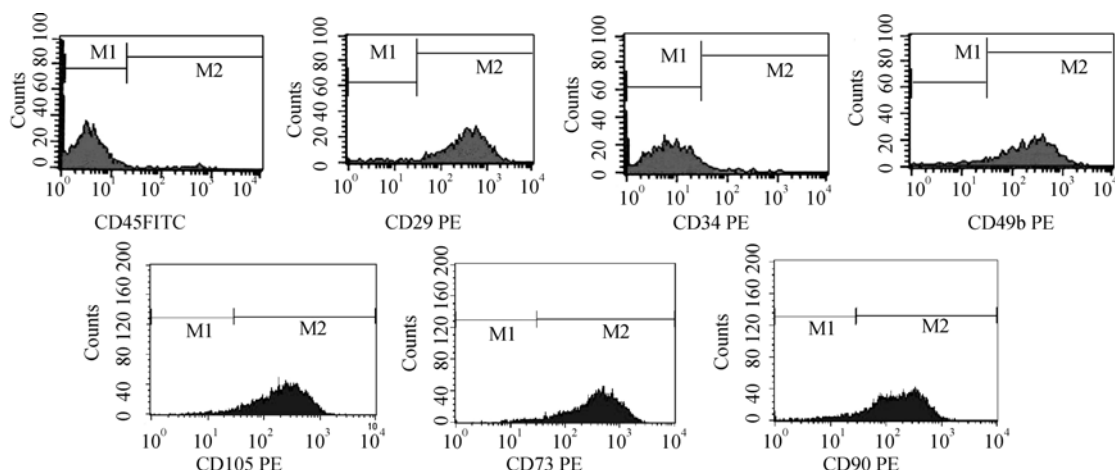


图 4 流式细胞仪检测 MSCs 的表面抗原标记

Fig. 4 Expression of surface markers of MSCs analyzed by flow cytometry

TRA-1-81 免疫荧光鉴定, 结果显示 SSEA-1 阴性, SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 阳性。经碱性磷酸酶染色鉴定, 显示碱性磷酸酶阳性。G 显带核型分析显示为正常核型 46, XX。通过反转录 PCR 证实了 hES 细胞特异性转录因子 *Oct4* 和 *Nanog* 基因的表达 (图 6), 表明其细胞全能特性未变。

## 2.8 分化能力检测

培养在 MSCs 滋养层细胞上的 hES 细胞体外分化能形成 EB, 体内分化能形成畸胎瘤 (图 7), 表明了培养在 MSCs 上的 hESCs 具有全能分化潜力。

## 3 讨论

人胚胎干细胞由于其潜在的巨大应用价值而成为当今重要的研究对象。目前大多数胚胎干细胞系都是在鼠源性的 MEF 滋养层上培养。通过这种滋养层细胞建立和培养的胚胎干细胞系存在着动物源性蛋白, 并且可能会被感染性的动物源性病毒如逆转录病毒污染, 因此极大的限制了这些细胞株对于临床基因来源的细胞仍存在一定的交叉污染危险。

床用途的潜在价值<sup>[2]</sup>。因此, 许多新的胚胎干细胞系试图建立在无外源物质的培养体系中。目前, 科学家们尝试了一些使用人源滋养层细胞来培养胚胎干细胞系, 如人骨髓来源的间充质干细胞<sup>[4]</sup>、胎儿肌肉或胎儿皮肤细胞<sup>[5]</sup>、新生儿包皮成纤维细胞<sup>[6]</sup>、成人子宫内膜细胞<sup>[7]</sup>、人胎盘成纤维细胞<sup>[8]</sup>。然而, 各种不同的来源的细胞具有不同的能力以支持 hESCs 的生长, 并不是所有人源细胞都能很好地支持 hES 细胞的生长, Richards 等<sup>[9]</sup>比较了几种不同的

人源滋养层细胞, 发现培养效果相对 MEF 要差。用人源滋养层细胞比如胎儿组织存在很多伦理问题, 而且用 Carpenter 等<sup>[10]</sup>建立了 hES 细胞无饲养层培养体系, 以及 Li 等<sup>[11]</sup>发现无饲养层细胞无血清的培养体系亦可以成功的维持 hES 细胞的生长。对 ES 细胞自体来源滋养层的研究, 研究报道从 ES 细胞自体分化得到的成纤维细胞也具有支持 ES 细胞未分化生长的能力, 这不仅在 hES 细胞的研究中得到了该结论<sup>[12-14]</sup>, 在老鼠的 ES 细胞中也得到了相似的结果<sup>[15]</sup>。

近来的研究报道了多种 hES 细胞经体外自发分化<sup>[16]</sup>或者与 OP9 细胞共培养<sup>[17]</sup>而获得高纯度 MSCs 方法。我们的研究表明, 将 hES 细胞注入重症免疫联合缺陷小鼠形成畸胎瘤, 再从畸胎瘤中可以得到高纯度的类似的 MSCs。畸胎瘤是由 hES 细胞在体内分化而来, 是具有三个胚层来源的细胞混合体。Mesencult 培养基能够在细胞体外培养时纯化扩增和培养 MSC。我们在将原代的畸胎瘤剪碎和消化后, 用 Mesencult 培养基在体外进行传代纯化培养, 经过数代的纯化, 经流式细胞术检测其细胞表面特异分子抗原、成骨和成脂细胞诱导等实验证实该 MSC 具有 85% 以上的细胞纯度。从 hES 细胞经体内分化得到大量的纯度较高的 MSCs, 这对于将来研究 MSCs 的生物学特性和治疗用途都具有重要的意义。

这些来源于胚胎干细胞本身的 MSCs, 由于经过了在重症免疫联合缺陷小鼠形成畸胎瘤的阶段, 所以从一定程度上减少了这些 MSCs 潜在的病毒污染的可能性。因为如果有可能的病毒污染, 则会导致重症免疫联合缺陷小鼠的死亡, 从而 hES 细胞在重症免疫联合缺陷小鼠身体内无法获得畸胎瘤。

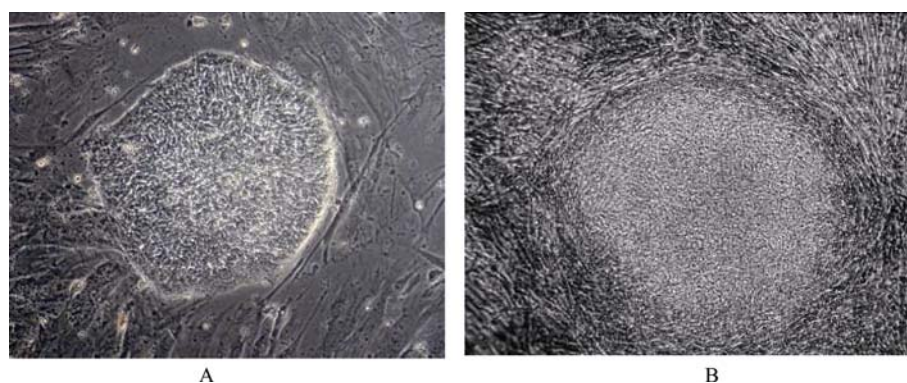


图 5 hES 细胞的生长状况

A: 生长在 MEF 滋养层上的 hESCs( $\times 10$ ); B: 生长在 MSC 滋养层上的 hESCs( $\times 10$ ).

Fig. 5 Growth of hESCs

A: hESCs grown on MEF feeder cells ( $\times 10$ ); B: hESCs grown on MSC feeder cells ( $\times 10$ ).

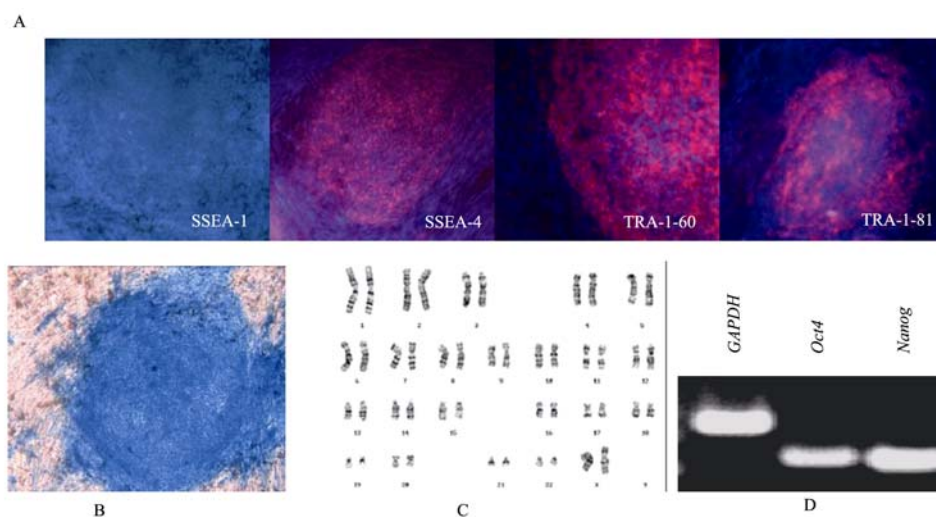


图 6 hES 细胞的鉴定

A: SSEA-1 染色阴性, SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 染色阳性( $\times 10$ ); B: 碱性磷酸酶染色阳性( $\times 10$ ); C: 核型鉴定正常; D: RT-PCR 显示 hES 细胞正常表达 *Oct4* 和 *Nanog*。

Fig. 6 Characterization of hESCs

A: Staining of hESCs shows negative in SSEA-1, and positive in SSEA-4, TRA-1-60, and TRA-1-81 ( $\times 10$ ); B: Alkaline phosphatase staining of hESCs shows positive ( $\times 10$ ); C: Karyotype analysis shows normal; D: Electrophoresis of hESCs specific transcription factors.

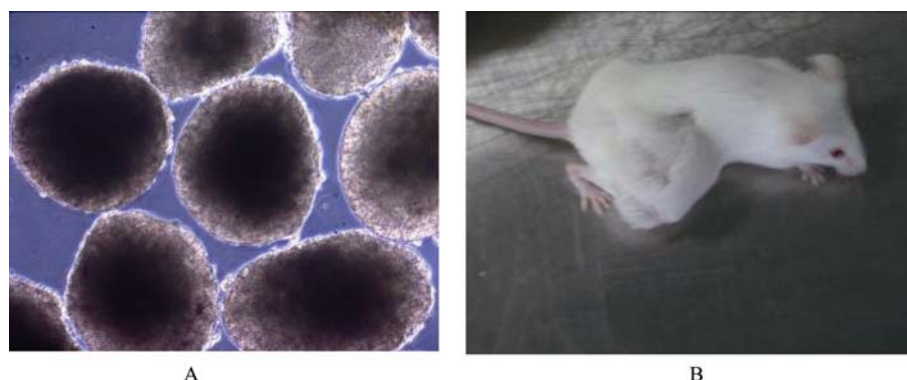


图 7 hES 细胞分化能力检测

A: 在体外培养形成 EB; B: 体内分化形成畸胎瘤。

Fig. 7 The pluripotency of hESCs

A: hESCs form EB *in vitro*; B: hESCs form teratoma in SCID mouse.

这些来源于 hES 细胞本身的 MSCs 可以被用来作为支持 hES 细胞生长并维持其未分化状态的滋养层细胞。这些 MSCs 可能像 MEF 一样, 可以分泌一些维持 hES 细胞未分化状态和促进其生长的因子。通过对培养于 MSCs 上的 hES 细胞进行特异性转录因子 *Oct4*、*Nanog* 的反转录 PCR 和 hES 细胞特异性抗原染色, 证实了 hES 细胞的全能性指标。

和其他人源性的滋养层细胞的研究相比, 本研究使用的滋养层细胞是来源于人胚胎干细胞本身。因此具有来源取材方便, 在一定程度上减少了外源物质污染的风险等优点。MEF 细胞作为滋养层通常只能限定在 5 代以内, 否则无法很好的维持 hESCs 的生长, 并且随着代次增多其扩增能力减退。而从 hESCs 本身来源的 MSCs 具有干细胞的特性, 可以得到大量的扩增, 并且不同代次之间对于维持 hESCs 生长没有明显差别。

本研究从 hES 细胞在 SCID-beige 小鼠体内形成的畸胎瘤中分离得到了 MSCs, 考虑到畸胎瘤的生长所需要的养份均由鼠提供, 当畸胎瘤生长到一定大小时还有可能出现血管。因此在分离的 MSCs 中是否会有鼠的 MSCs 存在, 我们对此进行了 MSCs 的体外培养和大量的核型鉴定, 证明该 MSCs 确实是来源于人, 而没有混入鼠的 MSCs。

总之, 我们证明了来源于 hES 细胞体内分化而来的 MSCs 能够作为滋养层支持 hESCs 的生长和维持其未分化状态, 但具体机制及对 hESC 的长期影响尚需进一步研究。我们的工作为获取 MSCs 提供了一个新的途径, 为 hES 细胞培养中滋养层细胞的来源提供了一个新的思路。

#### 参考文献(References):

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391): 1145–1147.[\[DOI\]](#)
- [2] Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*, 2005, 11(2): 228–232.[\[DOI\]](#)
- [3] Oh SK, Kim HS, Park YB, Seol HW, Kim YY, Cho MS, Ku SY, Choi YM, Kim DW, Moon SY. Methods for expansion of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23(5): 605–609.[\[DOI\]](#)
- [4] Cheng LZ, Hammond H, Ye ZH, Zhan XC, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells*, 2003, 21(2): 131–142.[\[DOI\]](#)
- [5] Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotech*, 2002, 20(9): 933–936.[\[DOI\]](#)
- [6] Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andäng M, Åhrlund-Richter L. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod*, 2003, 18(7): 1404–1409.[\[DOI\]](#)
- [7] Lee JB, Song JM, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kang SM, Kwon JN, Kim MK, Roh SI, Yoon HS. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction*, 2004, 128(6): 727–735.[\[DOI\]](#)
- [8] Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S, Nath A, Caceres E, McMaster M, McDonagh S, Li Y, Mandalam R, Lebkowski J, Fisher SJ. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril*, 2005, 83(5): 1517–1529.[\[DOI\]](#)
- [9] Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2003, (5): 546–656.
- [10] Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, Lucero M, Rao MS. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn*, 2004, 229(2): 243–258.[\[DOI\]](#)
- [11] Li Y, Powell S, Brunette E, Lebkowski J, Mandalam R. Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 91(6): 688–698.[\[DOI\]](#)
- [12] Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, Murdoch A, Strachan T, Stojkovic M. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23(3): 306–314.[\[DOI\]](#)
- [13] Yoo SJ, Yoon BS, Kim JM, Song JM, Roh S, You S, Yoon HS. Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells. *Exp Mol Med*, 2005, 37(5): 399–407.
- [14] Wang Q, Fang ZF, Jin F, Lu Y, Gai H, Sheng HZ. Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells*, 2005, 23(9): 1221–1227.[\[DOI\]](#)
- [15] SHI Ying-Tang, TANG Fan, CHU Jian-Xin. Feeders derived from embryonic stem cells supports embryonic stem cells growth. *J Shanghai Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2006, 26(5): 470–476.  
施英唐, 唐帆, 褚建新. 胚胎干细胞来源的饲养细胞支持自体胚胎干细胞生长. *上海交通大学学报(医学版)*, 2006, 26(5): 470–476.
- [16] Olivier EN, Rybicki AC, Bouhassira EE. Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24(8): 1914–1922.[\[DOI\]](#)
- [17] Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med*, 2005, 2(6): e161.[\[DOI\]](#)