

文章编号:1000 - 0615(2004)05 - 0493 - 06

不同因子对花鲈胚胎干细胞增殖的影响

叶寒青^{1,2}, 陈松林¹, 沙珍霞¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海水产大学生命与科学技术学院, 上海 200090)

摘要:胚胎干细胞(ES 细胞)是从动物早期发育胚胎中分离出来的具有发育全能性的一种未分化细胞系。维持花鲈胚胎干细胞(LJES1)的体外生长、增殖及未分化状态需要在培养基中添加一些生长因子。实验通过配制省略 1 种或多种因子的培养基 PESM 0~10, 计数 LJES1 细胞在各培养基中增殖的数量, 确定各种生长因子对 LJES1 细胞的增殖作用。同时, 对 LIF 因子和 bFGF 因子的作用进行了重点的研究, 发现 LIF 因子对早期的 LJES1 细胞增殖几乎没有作用, 其主要作用是维持 LJES1 细胞的未分化状态, 但对晚期 LJES1 细胞的增殖有一定的作用; bFGF 因子对 LJES1 细胞有强烈的刺激增殖的作用; 鲈鱼胚胎抽提液(PEE)以及鲈鱼血清(FS)也促进了 LJES1 细胞的增殖, 2-巯基乙醇(2-ME)具有还原血清中的含硫化合物、防止过氧化物对 LJES1 细胞的损害及促进贴壁的作用, 因而也促进了 LJES1 细胞的增殖。

关键词:花鲈; 胚胎干细胞; 生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子; 白血病抑制因子

中图分类号: S917

文献标识码: A

The effect of different factors on the proliferation of embryonic stem cells derived from *Lateolabrax japonicus*

YE Han-qing^{1,2}, CHEN Song-lin¹, SHA Zhen-xia¹

(1. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources Certificated by the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China;

2. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Embryonic stem cells (ES cells) are undifferentiated permanent cell line derived from inner cell mass cells and primordial germ cells of early developing embryos. Some growth factors were needed in culture medium to maintain LJES1 growth, proliferation and undifferentiation for a long time culture in vitro. Effects of various factors on the proliferation of LJES1 cells were examined by counting the number of multiplied cells in various mediums (PESM0 - 10) omitting one or several factors. Furthermore, emphasis was focused on LIF and bFGF factor effects. LIF nearly had no effect on proliferation of early LJES1, just maintaining its undifferentiation, but it had a little effect on late LJES1; bFGF had a significant stimulative effect on the proliferation of LJES1. The number of LJES1 increased linearly at lower concentrations up to 2ng/ml bFGF, a nearly 2 - 3 fold increase was obtained, at higher than 2ng/ml concentration the proliferation-promoting effect was further enhanced but not significantly. Both sea perch embryo extract (PEE) and sea perch serum (FS) promoted the proliferation of

收稿日期: 2003-05-28

资助项目: 国家自然科学基金项目(30170740); “十五” 863 课题(2202AA629180); 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室院士基金特别资助

作者简介: 叶寒青(1977 -), 男, 安徽桐城人, 硕士研究生, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: yehq@ysfri.ac.cn

通讯作者: 陈松林, 男, 湖北武汉人, 研究员, 博导, 主要从事鱼类生物技术研究。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

LJES1, but their proliferating effect on LJES1 was not so significant as bFGF. The addition of 2-ME reduced the damage of peroxide on LJES1 cells, enhanced cell adhesion and promoted cell proliferation.

Key words: *Lateolabrax japonicus*; embryonic stem cell; growth factor; basic fibroblast growth factor (bFGF); leukemia inhibitory factor (LIF)

胚胎干细胞(ES细胞)是从动物早期发育胚胎中分离出来的具有发育全能性的一种未分化细胞系。自从英国的 Evans 和 Kaufman^[1]首次利用成纤维滋养层建立了小鼠胚胎干细胞以来,利用滋养层培养的猪、牛、羊、灵长类的胚胎干细胞系相继建立起来,在鱼类上,目前只在小型模式鱼类斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)^[2, 3]和青鳉 (*Oryzias latipes*)^[4, 5]上建立了胚胎干细胞系并利用其开展了基因打靶实验^[6-8]。最初的胚胎干细胞都是利用成纤维滋养层来分离培养的,成纤维滋养层分泌的分化抑制因子 DIA 抑制了 ES 细胞的分化。1988年,Williams 等^[9]利用重组 LIF 因子代替成纤维滋养层培养小鼠 ES 细胞,发现 LIF 因子可以抑制 ES 细胞的分化。于是,人们利用无滋养层的条件培养基等多种培养体系分离培养了各种动物的 ES 细胞系。实验室利用 PESM6 (DMEM 培养基添加 15% FBS、1% 鱼血清、以及胚胎抽提液、LIF 因子、2-ME、bFGF 因子)分离培养了花鲈胚胎干细胞(LJES1)并建系^[10]。为了进一步探明培养基中各种因子对 LJES1 增殖的影响,研究了不同生长因子对花鲈 ES 样细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 花鲈胚胎干细胞培养基(perch ES cell medium,简称为 PESM)的配制

PESM6(完全培养基)是将 DMEM 基础培养液,加 100U·mL⁻¹青霉素、100μg·mL⁻¹链霉素、15% 胎牛血清(FBS)、50mM 2-巯基乙醇(2-ME)、2.5ng·mL⁻¹成纤维生长因子(bFGF)、1ng·mL⁻¹白血病抑制因子(LIF)、花鲈胚胎抽提液(PEE)、和 1% 的同种鱼血清(FS)构成完全培养基;PESM0 是 DMEM 基础培养液,加 100U·mL⁻¹青霉素、100μg·mL⁻¹链霉素、15% 胎牛血清(FBS);PESM1 是在完全培养基的基础上省略 LIF 因子;PESM2 是在完全培养基的基础上省略 bFGF 因子;PESM3 是在完全培养基的基础上省略 PEE 因子;PESM4 是在完全培养基的基础上省略 FS 因子;PESM5 是在完全培养基的基础上省

略 2-ME 因子;PESM7 是在完全培养基的基础上省略 bFGF 和 PEE 两种因子;PESM8 是在完全培养基的基础上省略 PEE 和 FS 两种因子;PESM9 是在完全培养基的基础上省略 bFGF 和 FS 两种因子;PESM10 是在完全培养基的基础上省略 bFGF、PEE 及 FS 等 3 种因子。培养基的最终 pH 均为 7.2~7.4。

以上试剂除胚胎抽提液和花鲈血清为实验室提取外,均购自 Gibco 公司。

1.2 花鲈 ES 细胞(LJES1)的培养及计数方法

LJES1 细胞系由实验室建立,现已传代至第 80 代,生长良好。LJES1 细胞系的培养、传代按已发表的方法进行^[10]。

细胞计数采用血球计数板进行,先将细胞用胰酶消化成单个细胞,吸取少许混合均匀的细胞悬液滴加于计数板上,轻轻的盖上盖玻片,静置 1 min 后,在显微镜下计数四角大格内的细胞数量,计算细胞密度。

1.3 不同因子对花鲈胚胎干细胞(LJES1)增殖的影响

分别将早期 LJES1 细胞(P15)及后期 LJES1 细胞(P60)以 2×10⁴ 的密度接种于 24 孔培养板中,分别设置 3 个重复组,培养 2 d 后换一次培养基,4~5 d 后,胰酶消化,用细胞计数板计数细胞数量,取平均值。比较细胞在缺少不同成份的培养基中的增殖状况,判定各成份对 LJES1 细胞增殖的影响;同时对早期和后期的 LJES1 细胞对各成份的反应做了比较。

1.4 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对 LJES1 细胞增殖的影响

配制了不同浓度的 bFGF 因子的完全培养基,分别将早代 LJES1 细胞(P15)及晚代 LJES1 细胞(P60)以 2×10⁴ 的密度接种于 24 孔培养板中,分别设置 3 个重复组,培养 2 d 后换一次培养基,4~5 d 后,胰酶消化,用细胞计数板计数细胞数量,取平均值。

1.5 白血病抑制因子(LIF)对 LJES1 细胞增殖的影响

配制了不同浓度的 LIF 因子的完全培养基,分别将早代 LJES1 细胞(P15)及晚代 LJES1 细胞(P60)以 2×10^4 的密度接种于 24 孔培养板中,分别设置 3 个重复组,培养 2 d 后换一次培养基,4~5 d 后,胰酶消化,用细胞计数板计细胞数量,取平均值。

1.6 数据统计分析

实验中所获得的结果以平均值 \pm 标准误差表示。数据分析采用 SPSS 统计分析软件,用单因素方差分析(one-way ANOVA)中的 LSD(least-significant difference)法对组间均值进行多重比较,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著, $P < 0.01$ 时认为差异极显著。

2 实验结果

2.1 不同生长因子分别对第 15、60 代 LJES1 细胞增殖的影响

不同生长因子对第 15、60 代 LJES1 细胞增殖的影响结果见图 1 和图 2。

从图 1 和图 2 显示的 LJES1 细胞增殖的结果来看,经 4~5 d 培养后,细胞在完全培养基(PESM6)中增殖数量最高,除早代(P15)的 PESM1 组,与其它组都有极显著的差异($P < 0.01$)。但

对早代(P15)和晚代(P60)细胞而言,在省略 LIF 因子(PESM1)培养基中获得的数量有所不同,其中早代(P15)细胞在 PESM1 和 PESM6 中数量差异不显著,但晚代(P60)PESM1 中细胞数量和 PESM6 中的细胞数量差异极显著(LSD, $P < 0.01$),说明 LIF 因子对早代 LJES1 细胞的增殖几乎不起作用,但对后期 LJES1 细胞却起了增殖的作用。无论是早代(P15)还是后期(P60)LJES1 细胞,在完全培养基(PESM6)中增殖几乎是省略 bFGF 因子的培养基(PESM2)中的 2~3 倍,说明 bFGF 因子有强烈的刺激 LJES1 细胞增殖的作用。省略了 2-ME 因子的培养基(PESM5)与完全培养基(PESM6)相比,早期 LJES1 细胞(P15)要比后期(P60)细胞更依赖于 2-ME 因子。在省略 PEE(PESM3)和省略 FS(PESM4)的培养基中,细胞增殖都明显抑制,且抑制作用基本相同,但没有 bFGF 因子对 LJES1 细胞的增殖作用明显;在省略 2~3 种因子的培养基(PESM7、PESM8、PESM9、PESM10)中,细胞增殖受抑制更加明显。LJES1 细胞在 PESM0(只添加血清)中增殖数量最少,但比起接种数量仍有增殖。

2.2 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对 LJES1 细胞增殖的影响

碱性成纤维生长因子对 LJES1 细胞增殖的影响结果见图 3。

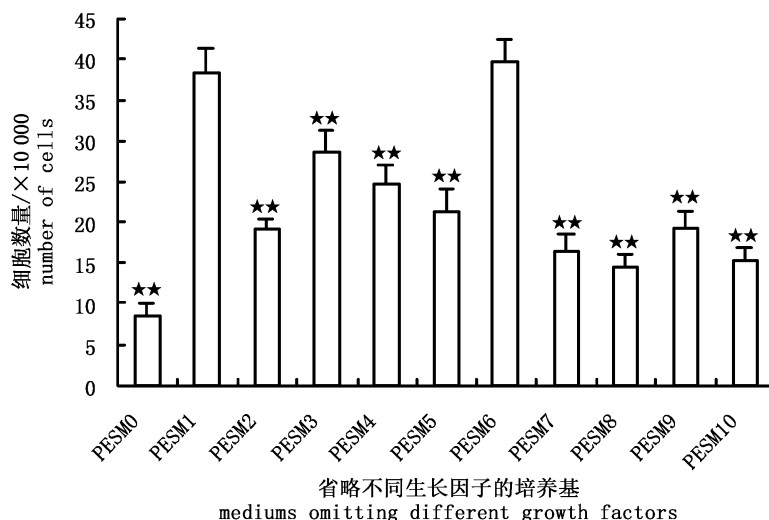


图 1 不同生长因子对早期 LJES1 (P15) 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of growth factors on the proliferation of early LJES1 (P15) cells

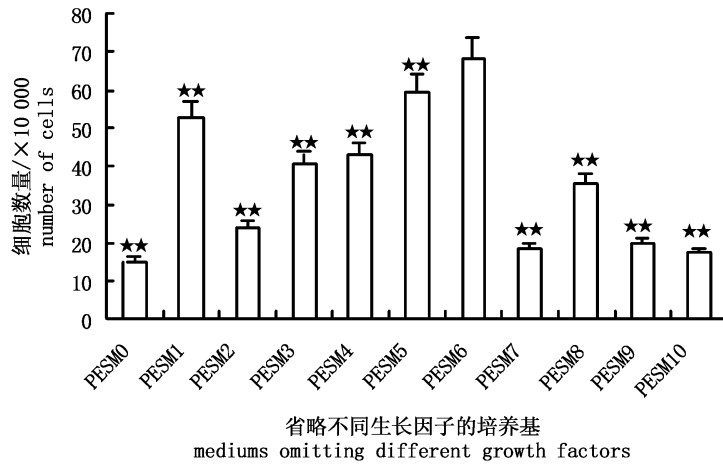


图2 不同生长因子对后期 LJ ES1 (P60) 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of growth factors on the proliferation of late LJ ES1 (P60) cells

PESM6: 完全培养基; PESM0: 省略 LIF、bFGF、2-ME、PEE 及 FS 因子; PESM1: 省略 LIF 因子; PESM2: 省略 bFGF 因子; PESM3: 省略 PEE 因子; PESM4: 省略 FS 因子; PESM5: 省略 2-ME 因子; PESM7: 省略 bFGF 和 PEE 两种因子; PESM8: 省略 PEE 和 FS 两种因子; PESM9: 省略 bFGF 和 FS 两种因子; PESM10: 省略 bFGF、PEE 及 FS 三种因子。所有数据表示为平均值 \pm 标准误 ($n=3$), 用 LSD 法将其它各组数据与 PESM6 组比较, **表示差异极显著

PESM6: Complete medium; PESM0: -LIF, bFGF, 2-ME, PEE and FS; PESM1: -LIF; PESM2: -bFGF; PESM3: -PEE; PESM4: -FS; PESM5: -2-ME; PESM7: -bFGF and PEE; PESM8: -PEE and FS; PESM9: -bFGF and FS; PESM10: -bFGF, PEE and FS. All data were expressed as mean \pm SE ($n=3$), PESM6 group VS other group with LSD, **: $P < 0.01$, LSD

从图3可以看出, bFGF 因子能够强烈的刺激 LJ ES1 细胞的增殖, 在培养基中添加 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 bFGF 因子即可明显刺激 LJ ES1 细胞的增殖, bFGF 因子刺激 LJ ES1 细胞增殖的效应和其浓度有很大的关系, bFGF 因子浓度越高, 细胞增殖得越快, 但高于 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度, 对早期 LJ ES1 (P15) 细胞增殖作用不再明显 (细胞数量在 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时差异不显著, LSD), 对后期 LJ ES1 (P60) 细胞增殖作用也不明显 (细胞数量在 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时差异不显著, LSD), 但从折线的斜率可以看出, 后期细胞 LJ ES1 (P15) 增殖速率稍高于早期细胞。

2.3 白血病抑制因子(LIF)对 LJES1 细胞增殖的影响

从图4可以看出, LIF 因子对于早代 (P15) LJ ES1 细胞几乎没有任何刺激增殖的作用, 也不随浓度的增加有任何明显的变化; 对后期 (P60) 的 LJ ES1 细胞, $0.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LIF 因子就能刺激增殖作用, 但其浓度增加到 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其刺激增殖作用并不比 $0.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时有所增加, 因而可知 LIF 因子对早期 LJ ES1 细胞没有任何促进增殖

作用, 但能刺激后期 LJ ES1 细胞增殖 (细胞数量在 $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 $0.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时差异显著, $P < 0.05$, LSD), 当浓度 $> 0.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其刺激后期 LJ ES1 细胞增殖的效应并不随浓度的增加而增加。

3 讨论

3.1 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的作用

bFGF 因子最初是从牛脑垂体和脑组织中分离得到的, 因其有刺激 3T3 成纤维细胞分裂增殖的作用而得名, 后来发现 bFGF 因子对很多细胞都有促有丝分裂的作用^[11]。实验中观察到 bFGF 因子对 LJ ES1 细胞增殖具有强烈的刺激作用, 且刺激增殖的作用随浓度的增加而增加, 其有效浓度上限为 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Hong 等^[5]也发现 bFGF 因子在极低浓度到 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间, 其刺激青鳉胚胎干细胞 (MBE) 增殖的作用呈线性增长趋势, MBE 细胞几乎增长了 3 倍; 当浓度在 $5 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其刺激效应仍在增强, 但不再明显, 这与实验的结果基本一致。

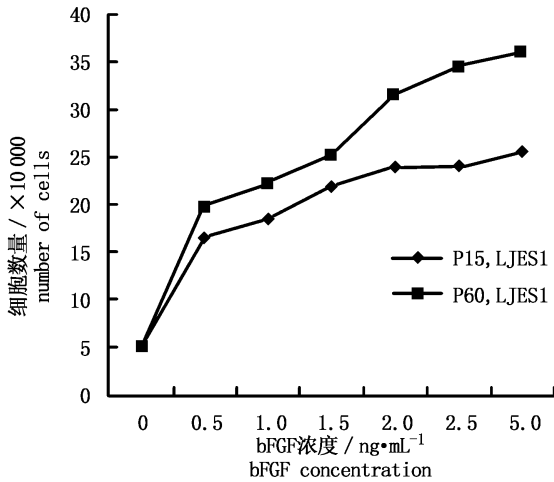


图3 bFGF对LJES1细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of bFGF on proliferation of LJES1 cells

所有数据表示为平均值 \pm 标准误 ($n=3$)，用LSD法对LJES1(P60)细胞数量比较，bFGF浓度为 $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与 $1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组差异不显著，与其它组差异都极显著， $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与 $2.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组差异不显著，与其它组差异显著；对LJES1(P15)细胞数量比较，bFGF浓度为 $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与 $1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组差异不显著，与其它组差异都显著， $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与 $2.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组差异不显著，与其它组差异显著

All data were expressed as mean \pm SE ($n=3$), compared with the number of LJES1(P60) cells by LSD, $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group VS $1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group: not significant, $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group VS other group: $P<0.01$, LSD; $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group VS $2.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group: not significant; $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group VS other group: $P<0.05$, LSD. Compared with the number of LJES1(P15) cells, $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group VS $1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group: not sharp; $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group VS other group: $P<0.05$, LSD; $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group VS $2.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group: not significant; $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ group VS other group: $P<0.05$, LSD

3.2 白血病抑制因子(LIF)的作用

在ES细胞分离与克隆研究的初期，人们常用与小鼠成纤维细胞或其无限系(STO)饲养层共培养，抑制细胞的分化而使其分裂增殖，后来Williams等^[9]发现成纤维滋养层细胞分泌的分化抑制因子DIA及LIF因子(后来证实DIA和LIF因子为同一因子)可以抑制ES细胞的分化，在缺乏DIA因子的ES细胞培养体系中，ES细胞分化成各种细胞，他们还重组了LIF因子，将这种ES细胞注射到囊胚中，形成了生殖系嵌合体，从而证实重组的LIF因子同样能够维持ES细胞的多能性。Pease等^[12, 13]在培养基中添加 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的

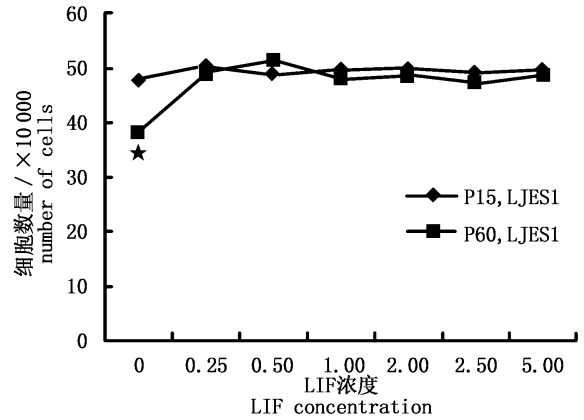


图4 LIF因子对LJES1细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect of LIF on proliferation of LJES1 cells

所有数据表示为平均值 \pm 标准误 ($n=3$)，用LSD法对LJES1(P15)细胞各组数量比较，差异都不显著；对LJES1(P60)细胞各组数量比较，只有组与其它组差异显著 ($P<0.05$)

All data were expressed as mean \pm SE ($n=3$), compared with the number of LJES1(P15) cells by LSD, the differences of all groups are not significant, compared with the number of LJES1(P60) cells, only group vs other group: $P<0.05$, LSD

重组LIF因子，有效抑制了鼠类ES细胞的分化。Hong等^[5]用人重组LIF因子在青鳉ES细胞(MBE)长期传代培养中发现并无抑制分化的作用，他们认为人LIF因子的非保守性使其对异源动物并不起作用。Wakamatsu等^[4]建立青鳉ES细胞系以及Sun等^[3]建立斑马鱼ES细胞系都在培养基中添加了LIF因子，但没有对LIF因子的作用做具体的研究。在实验中，观察到LIF因子对早期LJES1细胞的分化抑制有一定的作用，当细胞传至30代左右形成稳定细胞系后，其对细胞分化的抑制作用不再明显，在无LIF因子的培养基中，晚期(P35)的LJES1细胞传了5~6代仍然没有分化(叶寒青等，未发表结果)。因此，推测在LJES1细胞形成稳定细胞系之前，LIF因子起抑制分化的作用，LJES1细胞形成稳定的细胞系后，细胞抑制分化不再依赖LIF因子。除抑制ES细胞分化外，有人认为LIF因子对小鼠等几种哺乳动物ES细胞具有促生长的作用^[11, 14]，从实验观察到LIF因子对晚期(P60)LJES1细胞的增殖有一定刺激作用，但对早期(P15)LJES1细胞的增殖无明显刺激作用，其原因有待进一步研究。

3.3 其它因子的作用

虹鳟胚胎抽提液对几种已建立的鱼类细胞系及斑马鱼胚胎干细胞的生长、增殖都起促有丝分裂的作用^[15,16]; Hong 等^[5]也认为青鳉胚胎抽提液对青鳉ES细胞(MBE)具有促生长的作用。在实验中也发现花鲈胚胎抽提液(PEE)与花鲈血清(FS),都可以刺激LJES1细胞的增殖,它们的作用基本相同,在缺少胚胎抽提液(PESM3)与缺少鱼血清(PESM4)的培养基培养下,LJES1细胞生长速度基本相似,生长都受到抑制。2-巯基乙醇(2-ME)是一种还原剂,可使血清的含硫化合物还原为谷胱甘肽、以消除细胞培养中产生的过氧化物的毒害作用。此外,其还可以促进DNA合成,具有诱导细胞增殖和促进胚胎细胞贴壁的作用。在实验中,发现2-ME的存在促进了LJES1细胞的增殖,这可能和其促进细胞贴壁及在细胞培养基中还原血清中的含硫化合物,防止过氧化物对LJES1细胞的损害,从而优化了细胞生长的微环境有关,但对于早期和晚期的LJES1细胞而言,其增殖作用大小稍有差异,其它因子的增殖作用也有一定的区别,我们推测这可能与建立稳定细胞系前后对细胞微环境依赖性大小不同及细胞贴壁能力大小有关,LJES1细胞在形成稳定细胞系前比形成稳定细胞系后对细胞环境质量要求更高,所以对2-ME依赖性更强,这种推测还有待进一步证实。

参考文献:

- [1] Evans M J, Kanfman M H. Establishment in culture of pluripotential cell from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(9): 154 - 159.
- [2] Sun L, Bradford C S, Barnes D. Feeder cell cultures for zebrafish embryonal cells in vitro[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1995, 4: 43 - 50.
- [3] Sun L, Bradford C S. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1995, 4(3): 193 - 199.
- [4] Wakamatsu Y, Ozato K, Sasado T. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3: 185 - 191.
- [5] Hong Y, Scharl M. Establishment and growth responses of early medakafish embryonic cells in feeder layer-free cultures[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1996, 5: 93 - 104.
- [6] Chen S L, Hong Y, Scherer S, et al. Lack of ultraviolet-light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53[J]. Gene, 2001, 264: 197 - 203.
- [7] Chen S L, Hong Y H, Scharl M. Cloning, structural analysis and construction of homologous recombination vector of p53 gene in medaka fish (*Oryzias latipes*) [J]. Acta Zool Sin, 2002, 48(4): 519 - 526. [陈松林, 洪云汉, Scharl M. 青鳉p53基因克隆、结构分析及同源重组载体构建[J]. 动物学报, 2002, 48(4): 519 - 526.]
- [8] Chen S L, Hong Y H, Scharl M. Development of a positive-negative selection procedure for gene targeting in fish cell[J]. Aquac, 2002, 214: 67 - 79.
- [9] Williams R L, Hilton D J, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells[J]. Nature, 1988, Dec 15: 336: 684 - 687.
- [10] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) blastula embryo[J]. Aquac, 2003, 218: 141 - 151.
- [11] Matsui Y, Zsebo K, Hogan B L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. Cell, 1992, 70: 841 - 847.
- [12] Pease S, Williams R L. Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor[J]. Exp cell Res, 1990, 190(2): 209 - 211.
- [13] Pease S, Braghetta P, Gearing D, et al. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF) [J]. Dev Biol, 1990, Oct; 141(2): 344 - 352.
- [14] Piquet P C, Grey L, Mereau A, et al. Are LIF and related cytokines functionally equivalent? [J]. Exp cell Res, 1994, 213: 340 - 347.
- [15] Collodi P, Barnes D. Mitogenic activity from trout embryos[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 3498 - 3502.
- [16] Collodi P, Kamei Y, Ernst T, et al. Culture of cells from zebrafish (*Brachydanioerio*) embryo and adult tissues[J]. Cell Biol Toxicol, 1992, 8: 43 - 61.