

DOI: 10.13376/j.cblls/2018108

文章编号: 1004-0374(2018)08-0906-05

人胚胎干细胞建系的研究进展

陈枕枕, 牛昱宇*

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

摘要: 人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 具有自我更新和分化的潜能, 自成功建立细胞系以来学者们一直在改进建系方法和培养体系, 如避免异源污染 (基质胶的研究、无饲养层和无血清培养体系的研究等) 以建立优质的细胞系, 获得更高全能性的干细胞 (采用不同小分子的组合培养干细胞或建系), 这些研究已经取得巨大成果。现通过胚胎来源、内细胞团 (inner cell mass, ICM) 分离、hESCs 培养体系 3 个方面综述 hESCs 建系的研究进展。

关键词: 人; 胚胎干细胞; 建系; 细胞培养法

中图分类号: Q813; R329 **文献标志码:** A

Progress on derivation of human embryonic stem cell

CHEN Zhen-Zhen, NIU Yu-Yu*

(College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Human embryonic stem cells (hESCs) have the potential of self-renewal and differentiation. Since it has been successfully established from embryo, scholars have been improving the method and culture system to obtain high-quality cell lines. The process of derivation is especially important cause it's the basis for follow-up experiments. This review summarizes embryonic origin, inner cell mass (ICM) separation and hESC culture system to present the progress of hESC lineage.

Key words: human; embryonic stem cells; derivation; cell culture

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 是从早期胚胎的内细胞团 (inner cell mass, ICM) 或单卵裂球中分离培养得到的一类细胞, 其主要特点在于自我更新能力和产生机体内所有细胞的潜能。1981年, Evans 和 Kaufman^[1] 用小鼠胚胎成功建立鼠胚胎干细胞系 (mouse embryonic stem cells, mESCs)。随后, 研究人员开始探索建立人胚胎干细胞系 (human embryonic stem cells, hESCs) 的方法。直至 1998 年, Thomson 等^[2] 从体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 的早期胚胎中分离得到 hESCs, 这一研究成果在世界范围内引起了巨大反响。

时至今日, hESCs 的研究仍是全球研究的热门领域之一。学者们一直致力于改进 ICM 分离方法、寻找更适合 hESCs 生长的培养基, 以得到全能性更强的 hESCs。本文将从胚胎来源、ICM 的分离方法、hES 细胞培养体系三个方面对 hESCs 建系的研究进

展进行综述。

1 胚胎来源

目前, hES 细胞建系的胚胎来源主要有两种。一是自愿捐献, 包括接受辅助生殖治疗, 如 IVF 或胞浆内单精子显微注射 (intra-cytoplasmic sperm injection, ICSI) 的患者未使用的胚胎等, 这种来源的胚胎在使用前必须经捐献者同意, 签署知情协议书后方可使用; 另外一种是通过体细胞核移植技术 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 得到的囊胚, 即将体细胞的细胞核注入去核卵母细胞中, 激活其发育后得到的囊胚^[3]。

收稿日期: 2018-04-26; 修回日期: 2018-05-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2016-YFA0101401)

*通信作者: E-mail: niuyy@lpcb.cn

2 ICM的分离方法

滋养层 (trophectoderm, TE) 细胞生长速度要快于 ICM, 且分布在 ICM 外周, 体外建系过程中生长旺盛的 TE 细胞会抑制 ICM 的生长, 阻碍 ICM 与培养基的接触。hES 细胞建系过程中除去 TE 细胞有助于提高建系效率、缩短建系时间, 帮助 ICM 增殖^[4]。分离 ICM 的方法主要有免疫外科法、机械分离法、全胚培养法、激光法和单卵裂球法, 5 种分离方法建系效率的比较见表 1。

2.1 免疫外科法

免疫外科法是目前使用最多的方法, 成功率高。自 1998 年 Thomson 等^[2] 用该法得到 ICM 并成功建立 hES 细胞系以来, 许多研究人员仍沿用此法。其原理是用链酶蛋白酶 (Pronase) 处理去除透明带, 再用抗人的血清处理, 然后移至含豚鼠补体的溶液中, 囊胚的滋养层 (TE) 细胞发生免疫溶解, 再用机械的方法挑出 ICM。免疫外科法能较为完整地除去 TE 细胞, 但也有人认为含有动物源性的抗体和补体会对得到的 hES 细胞造成污染, 对于临床应用来说并不是获取 ICM 最理想的方法。

2.2 机械分割法

顾名思义, 机械分割法是用借助特定的工具将 TE 细胞去除, 使 ICM 暴露在建系培养基中, 从而得到 ES 细胞系。2007 年, Ström 等^[5] 率先使用一种针状工具分离 ICM 并成功建立 hES 细胞系, 效率约为 26%。机械分割法避免了免疫外科法中动物源性抗体的潜在污染, 成本低, 但该法对实验人员的操作要求比较高, TE 细胞去除不完全。

2.3 全胚培养法

全胚培养法与免疫外科法大致相似, 不同的是酶解法脱掉透明带后, 直接将囊胚放入培养皿中, 而不经过机械法挑取 ICM。全胚培养法最初是由 Kim 等^[4] 发明, 初衷是囊胚的质量较差, 无法使用免疫外科或机械分离法去除 TE 细胞。这种方法操作简单, 没有动物源性的潜在污染, 但由于没有去

除 TE 细胞, 其建系效率及质量都不如上述两种。

2.4 激光法

激光法是近年来发展起来的, 其原理是用激光把 TE 细胞杀死, 以获得纯净的 ICM, 用于 hES 细胞建系。这种方法最早是 Cortes 等^[8] 提出的, 后来也被广泛应用于 hES 细胞建系^[6,9]。激光法能够完整的去除 TE 细胞, 并且无动物源性潜在污染, 但成本较高, 对实验人员的操作要求也比较高。

2.5 单卵裂球法

单卵裂球法最早是 Klimanskaya 等^[7] 提出的, 他们将 8-cell 胚胎在酸性台式液 (Tyrode's solution) 中短暂暴露破坏透明带后, 取出单个卵裂球, 放入 Quinn's 囊胚培养液中, 待其分裂 1~2 次后将这些细胞放入 MEF 上培养。Yang 等^[10] 从囊胚中取出单细胞放入人包皮成纤维细胞 (human foreskin fibroblasts, HFF) 中直接培养而不经其体外分裂过程。此外, Zdravkovic 等^[11] 也用 8-cell 单卵裂球成功建立 hES 细胞系。单卵裂球建系法不以牺牲胚胎为代价, 不存在 TE 细胞的去除问题, 但这种方法对实验人员的操作要求很高, 不适合初学者使用。

3 hES细胞培养体系

hES 细胞的培养基一般为 DMEM/F12, 添加血清替代物 (serum replacement, SR)、2-巯基乙醇、碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、谷氨酰胺、非必需氨基酸^[12], 根据饲养层的有无可以分为含饲养层和无饲养层体系两种。

3.1 含饲养层培养体系

自 Thomson 等^[2] 使用丝裂霉素 C 或 γ 射线灭活的小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 作为饲养层成功建系以来, 含饲养层培养体系一直被大多数研究人员所接受, 至今仍是 hES 细胞培养最常见的体系^[13-14]。这种体系中培养的 hES 细胞状态比较稳定, 但 MEF 在体外培养代次有限 (一般为 8 代左右, 饲养层常用第 4 代左右), 人力物力耗费大, 且是鼠源物质, 给 hES 细胞的临床应用

表1 ICM分离方法比较

分离方法	优点	缺点	建系效率
免疫外科法	能较为完整地除去TE细胞	含有动物源性的抗体和补体会对得到的hES细胞造成污染	12.5% ^[2]
机械分割法	避免异源污染, 成本低	对实验人员的操作要求比较高, TE细胞去除不完全	26% ^[5]
全胚培养法	操作简单, 没有动物源性的潜在污染	TE细胞去除不完全	11.1% ^[4]
激光法	能够完整的去除TE细胞, 无动物源性潜在污染	成本较高, 对实验人员的操作要求也比较高	20% ^[6]
单卵裂球法	不以牺牲胚胎为代价	实验人员的操作要求很高	29% ^[7]

带来安全隐患。

为避免异源污染,韩国学者用人羊水细胞 (human amniotic fluid cells, HAF) 作为饲养层,并用 SR 代替血清培养 hES 细胞,这一研究使 hES 细胞摆脱动物源污染^[15]。除此之外,研究人员还用羊水中充质干细胞^[16]、骨髓间充质细胞^[17]、毛囊间充质^[18]、成纤维细胞^[19]作为饲养层,为临床应用奠定基础。

3.2 无饲养层培养体系建系及培养

3.2.1 基质胶的发现与使用

饲养层体系建系、培养 hES 细胞的局限性使学者们渴望寻求一种基质,来代替 MEF 或其他类型的饲养层为 hES 细胞的生长提供营养。

Teotia 等^[20]用人源饲养层细胞的条件培养基来培养 hESCs,条件培养基是细胞处于对数生长期时回收的培养基,经过滤除菌后再次使用,但这种培养基培养细胞容易分化。Miyazaki 等^[21]发现 hES 细胞主要表达整合素 $\alpha 6\beta 1$,其主要结合层黏连蛋白 (recombinant human laminin, rhLM) -111、-332 和 -511/-521。当将 hESCs 接种到 rhLM 上时,细胞确实明显地黏附于 rhLM-332,并且 rhLM-511 和 rhLM-111 的黏附程度较低。hESCs 可以在这三种 rhLM 上增殖,同时保持它们的多能性。这些结果显示 rhLM-111、-332 和 -511 是扩展未分化 hESCs 的良好底物。

此外,用作基质胶的还有 Matrigel,它与 rhLM 都是无饲养层培养体系中常用的基质胶,主要成分是层粘连蛋白、IV 型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白等。Xu 等^[22]认为这两种基质胶仍存在异种污染的潜在风险,因此,Xu 等用辣根过氧化物酶和过氧化氢交联酪胺部分得到 HA-Tyr (hyaluronic acid-tyramine) 水凝胶,用其作为基质进行 3D 培养后发现 hES 细胞仍具有全能性,他们认为这种基质可以完全通过化学方法来获得,是比较理想的基质胶选择。

3.2.2 无血清培养基的研究

防止异源污染的另一种方法是使用成分明确的培养基,即无血清培养体系。无血清培养体系的研究主要包括美国 Thomson 实验室和北京大学邓宏魁实验室。

2006 年,首次分离出 hESCs 的 Thomson 实验室使用一种成分明确的培养基 TeSR1 和 Matrigel 包被的培养皿共同维持 hESCs 的生长^[23]。同年,该实验室又报道了对 TeSR1 培养基的改进——以斑马鱼来源的 bFGF (zebrafish basic fibroblast growth factor, zbFGF) 取代了人源 bFGF,即 mTeSR1^[24]。2011 年,Thomson 实验室又提出只含有 8 种成分的培养基(即

E8) 就可以保证维持人诱导多能干细胞 (human induced pluri-potent stem cells, hiPSCs) 的自我更新和全能性^[25]。这两种培养基都被 StemCell 公司产品化,从而推出了完全成分确定的无血清培养基,即 mTeSRTM1 和 TeSRTM-E8TM。

此外,邓宏魁实验室一直沿用 NBF 培养体系,即 DMEM/F12 中添加 N2、B27、bFGF 来支持 hESCs 的自我更新和增殖^[26],但这种培养基并没有商品化生产。近来,该实验室在之前的基础上添加 Human LIF、CHIR99021、(S)-(+)-dimethindene maleate、minocycline hydrochloride 四种小分子可以得到全能性更强的扩展多潜能干细胞 (extended pluripotent stem cells, EPSCs)^[27]。

3.3 培养体系的优化

hESCs 的自我更新是通过若干个信号通路,如 FGF2^[28]、MAPK/ERK^[29]、PI3K/AKT^[30]、IGF^[31]、SphK^[32] 以及 Activin/Nodal^[33] 的活化或抑制来实现的,这些信号通路对 hESCs 的维持意义重大。

3.3.1 使用小分子化合物维持 hESCs 全能性

Ying 等^[34]发现 MEK 抑制剂 PD0325901 和 GSK3 抑制剂 CHIR99021 联合使用(即 2i),就能够充分维持 ESCs 的自我更新。还有一些实验室在培养基中添加鞘氨醇-1-磷酸(S1P)和血小板衍生生长因子(PDGF)来维持 hESCs 的多能性^[35]。

3.3.2 优化不同小分子的组合得到 Naïve 状态 hESCs

Naïve 状态 hESCs 具有形成嵌合胚胎的能力,即可以通过四倍体补偿形成完全由 Naïve 干细胞来源的胚胎,而 Primed 干细胞不具备该能力。就 Primed 干细胞而言,不同细胞系之间基因表达的异质性比较大,存在细胞系之间分化能力的差异,而 Naïve 干细胞在不同细胞系之间基因表达的异质性较小,分化能力不存在明显差别^[36]。

得到 Naïve 干细胞的途径主要有两种。一是直接从 ICM 中分离得到,英国剑桥团队的最新研究表明这种方法完全可行^[37],但此种方法研究较少,还不够成熟。二是通过改变培养体系将 Primed 转化为 Naïve 干细胞,这类研究目前较多。

Bao 等^[38]在培养基中加入 4 种小分子 (ActA、BMP4、CHIR99021 和 LIF) 激活 TGF- β 、抑制 GSK3 信号通路,将 hESCs 转化为超甲基化 Naïve 干细胞,这些细胞与 Naïve 干细胞相比表现出稳定的高甲基化表观基因组和大部分完整的印记,是介于 Naïve 和 Primed 之间的一种状态。邓宏魁实验室在 Bao 的基础上,用 (S)-(+)-dimethindene maleate 和 minocycline

hydrochloride 替换 ActA 和 BMP4 培养 hESCs, 得到扩展多潜能干细胞 (EPSCs)^[27]。由这种细胞产生的嵌合体小鼠在胎盘和胎儿体内均检测到 EPSCs 来源的细胞的存在, 并成功通过四倍体补偿的方法成功发育为小鼠个体, 这些特征正是 Naïve 干细胞才有的。Jaenisch 实验室则在培养基中加入了更多的小分子, 即 MEK、GSK3、BRAF、ROCK、SRC 等 5 种信号通路抑制剂培养 Primed 干细胞, 发现这些细胞中原本失活的 X 染色体在 Naïve 培养基中重新被激活, 甲基化水平也普遍降低, 从而得到 Naïve 干细胞^[39-40]。

4 展望

hES 细胞于 1998 年首次建立, 从那时起, 建系和培养方法都得到了显著改进和简化。目前研究人员可以在成分明确的无动物源条件下建立和培养 hESCs, 可以得到全能性很高的扩展多潜能干细胞系^[27]; ICM 的来源不再局限于被遗弃的胚胎, 近年有许多研究表明可以从孤性胚胎中分离得到, 如从直接激活 MII 的卵母细胞形成的孤雌囊胚中分离得到的孤雌胚胎干细胞 (parthenogenetic haploid embryonic stem cells, PG-haESCs)^[41], 以及用精子替换卵母细胞核形成的胚胎中分离而来的孤雄胚胎干细胞 (androgenetic haploid embryonic stem cells, AG-haESCs)^[42], 这两种 ES 细胞也已成功建系。使用无饲养层体系建立 hESCs 细胞系也成为目前研究的热点^[43]。这些细胞系的建立为遗传学研究提供了重要工具, 一定程度上也缓解了干细胞来源方面的道德压力^[44]。

对于治疗各种疾病的细胞疗法而言, hESCs 是再生医学方面的一个巨大希望^[45]。此外, 具有靶向分化的 hESCs 的广泛应用可以成为研究早期胚胎发育途径、疾病病原学和药物毒理学测试的有力工具。2012 年 FDA 批准了首次使用干细胞治疗黄斑变性的临床试验^[46], 我国在 2017 年也报道了利用 hESCs 治疗帕金森病的案例^[47]。这些研究的推进, 让人们看到了干细胞在未来临床研究中的希望, 但碍于道德伦理方面的束缚, 干细胞治疗还有很长的路要走。

[参 考 文 献]

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154-6
- [2] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145-7
- [3] de Souza N. Stem cells: human stem cells from cloned embryos. *Nat Methods*, 2013, 10: 606
- [4] Kim HS, Oh SK, Park YB, et al. Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23: 1228-33
- [5] Ström S, Inzunza J, Grinnemo KH, et al. Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. *Human Reprod*, 2007, 22: 3051-8
- [6] Wu R, Xu C, Jin F, et al. Derivation, characterization and differentiation of a new human embryonic stem cell line from a Chinese hatched blastocyst assisted by a non-contact laser system. *Hum Cell*, 2010, 23: 89-102
- [7] Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, et al. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1963-72
- [8] Cortes JL, Sánchez L, Catalina P, et al. Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 255-67
- [9] Zhu H, Behr B, Reddy VV, et al. Human embryonic stem cell lines with lesions in FOXP3 and NF1. *PLoS One*, 2016, 11: e0151836
- [10] Yang G, Mai QY, Li T, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from single blastomeres of low-quality embryos by direct plating. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30: 953-61
- [11] Zdravkovic T, Nazor KL, Larocque N, et al. Human stem cells from single blastomeres reveal pathways of embryonic or trophoblast fate specification. *Development*, 2015, 142: 4010-25
- [12] Amit M, Itskovitz-Eldor J. Morphology of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells cultured in feeder layer-free conditions [M]// Amit M, Itskovitz-Eldor J. *Atlas of human pluripotent stem cells. Stem cell biology and regenerative medicine*. Totowa: Humana Press, 2012
- [13] Gaur M, Ramathal C, Reijo Pera RA, et al. Isolation of human testicular cells and co-culture with embryonic stem cells. *Reproduction*, 2018, 155: 151-64
- [14] Ye JP, Bates N, Soteriou D, et al. High quality clinical grade human embryonic stem cell lines derived from fresh discarded embryos. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8: 128
- [15] Jung J, Baek JA, Seol HW, et al. Propagation of human embryonic stem cells on human amniotic fluid cells as feeder cells in xeno-free culture conditions. *Dev Reprod*, 2016, 20: 63-71
- [16] Soong YK, Huang SY, Yeh CH, et al. The use of human amniotic fluid mesenchymal stem cells as the feeder layer to establish human embryonic stem cell lines. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9: E302-7
- [17] Havasi P, Nabioni M, Soleimani M, et al. Mesenchymal stem cells as an appropriate feeder layer for prolonged *in vitro* culture of human induced pluripotent stem cells. *Mol Biol Rep*, 2013, 40: 3023-31

- [18] Coelho de Oliveira VC, Silva Dos Santos D, Vairo L, et al. Hair follicle-derived mesenchymal cells support undifferentiated growth of embryonic stem cells. *Exp Ther Med*, 2017, 13: 1779-88
- [19] Unger C, Felldin U, Nordenskiöld A, et al. Derivation of human skin fibroblast lines for feeder cells of human embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2008, Chapter 1: Unit 1C.7
- [20] Teotia P, Sharma S, Airan B, et al. Feeder & basic fibroblast growth factor-free culture of human embryonic stem cells: role of conditioned medium from immortalized human feeders. *Indian J Med Res*, 2016, 144: 838-51
- [21] Miyazaki T, Futaki S, Hasegawa K, et al. Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375: 27-32
- [22] Xu KM, Narayanan K, Lee F, et al. Enzyme-mediated hyaluronic acid-tyramine hydrogels for the propagation of human embryonic stem cells in 3D. *Acta Biomater*, 2015, 24: 159-71
- [23] Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 2006, 24: 185-87
- [24] Ludwig TE, Bergendahl V, Levenstein ME, et al. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Methods*, 2006, 3: 637-46
- [25] Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*, 2011, 8: 424-9
- [26] Liu YX, Song ZH, Zhao Y, et al. A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346: 131-9
- [27] Yang Y, Liu B, Xu J, et al. Derivation of pluripotent stem cells with *in vivo* embryonic and extraembryonic potency. *Cell*, 2017, 169: 243-57
- [28] Kole D, Grella A, Dolivo D, et al. High molecular weight FGF2 isoforms demonstrate canonical receptor-mediated activity and support human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cell Res*, 2017, 21: 106-16
- [29] Yin C, Fufa T, Chandrasekar G, et al. Phenotypic screen identifies a small molecule modulating ERK2 and promoting stem cell proliferation. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 726
- [30] Safaeinejad Z, Nabiani M, Peymani M, et al. Resveratrol promotes human embryonic stem cells self-renewal by targeting SIRT1-ERK signaling pathway. *Eur J Cell Biol*, 2017, 96: 665-72
- [31] Jung ML, Renke T, Nowak O, et al. Modulation of the IGF system and proliferation in human endometrial stromal cells by metformin: a dose-dependent effect. *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 292: 465-72
- [32] Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in mammalian cells. *Molecules*, 2017, 22: E344
- [33] Bertero A, Madrigal P, Galli A, et al. Activin/Nodal signaling and NANOG orchestrate human embryonic stem cell fate decisions by controlling the H3K4me3 chromatin mark. *Genes Dev*, 2015, 29: 702-17
- [34] Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, 453: 519-23
- [35] Wong RC, Pera MF, Pebay A. Maintenance of human embryonic stem cells by sphingosine-1-phosphate and platelet-derived growth factor. *Methods Mol Biol*, 2018, 1697: 133-40
- [36] Pfeuty B, Kress C, Pain B. Network features and dynamical landscape of naive and primed pluripotency. *Biophys J*, 2018, 114: 237-48
- [37] Guo G, von Meyenn F, Rostovskaya M, et al. Epigenetic resetting of human pluripotency. *Development*, 2017, 144: 2748-63
- [38] Bao S, Tang WW, Wu B, et al. Derivation of hypermethylated pluripotent embryonic stem cells with high potency. *Cell Res*, 2018, 28: 22-34
- [39] Theunissen TW, Powell BE, Wang HY, et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 471-87
- [40] Sahakyan A, Kim R, Chronis C, et al. Human naïve pluripotent stem cells model X-chromosome dampening and X-inactivation. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 87-101
- [41] Mai Q, Mai X, Huang X, et al. Imprinting status of two human parthenogenetic embryonic stem cell lines: analysis of 63 imprinted genes expression levels in undifferentiated and early differentiated stages. *Stem Cells Dev*, 2018, 27: 430-9
- [42] Ding CH, Huang SX, Qi Q, et al. Derivation of a homozygous human androgenetic embryonic stem cell line. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 2307-16
- [43] Kaur J, Tilkins ML, Eckert R, et al. Methods for culturing human embryonic stem cells in a xeno-free system. *Methods Mol Biol*, 2013, 997: 115-26
- [44] Bai M, Wu Y, Li J. Generation and application of mammalian haploid embryonic stem cells. *J Intern Med*, 2016, 280: 236-45
- [45] Yu GY, Cao T, Zou XH, et al. Development of human embryonic stem cell platforms for human health-safety evaluation. *J Beijing Univ (Heal Sci)*, 2016, 48: 1-4
- [46] Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*, 2012, 379: 713-20
- [47] Cyranoski D. Trials of embryonic stem cells to launch in China. *Nature*, 2017, 546: 15-6