

# 兔抗人外周血单核细胞、兔抗猴脾脏淋巴细胞免疫血清的制备及其在分离人和猕猴胚胎内细胞团中的应用

张秀珍<sup>1,2</sup>, 采克俊<sup>1</sup>, 王淑芬<sup>1,2</sup>, 胡智兴<sup>1,2</sup>, 裴轶劲<sup>1</sup>, 季维智<sup>1,\*</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 采用梯度离心的方法用淋巴细胞分离液从浓缩的人白细胞悬液中分离人外周血单核细胞, 从猕猴新鲜脾脏中研磨分离猕猴脾脏淋巴细胞; 分别将人外周血单核细胞和猕猴脾脏淋巴细胞作为免疫原, 每次通过耳缘静脉注射  $4 \times 10^8$  个细胞免疫日本大耳白兔, 每周免疫一次, 共免疫 3 次, 制备兔抗人外周血单核细胞和兔抗猕猴脾脏淋巴细胞免疫血清。体外培养人和猕猴胚胎至囊胚, 采用制备的免疫血清, 分离人和猕猴囊胚内细胞团, 用于建立人和猕猴胚胎干细胞系。结果如下: (1) 用半微量细胞毒实验法测得兔抗人外周血单核细胞免疫血清和兔抗猕猴脾脏淋巴细胞免疫血清的效价分别为 1:320 和 1:640; (2) 两种免疫血清成功地裂解了 15 个人囊胚和 33 个猕猴囊胚的滋养层细胞, 分离出了内细胞团, 表明免疫血清的制备取得了成功, 为建立人和猕猴胚胎干细胞系奠定了基础。

**关键词:** 免疫外科手术法; 免疫血清; 分离内细胞团; 人囊胚; 猕猴囊胚; 胚胎干细胞

**中图分类号:** Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254–5853 (2006) 01–0048–06

## Preparation of Rabbit Anti-Human PBMC Antiserum and Rabbit Anti-Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Spleen Cell Antiserum and Their Application in Isolating Human and Monkey Inner Cell Masses

ZHANG Xiu-zhen<sup>1,2</sup>, CAI Ke-jun<sup>1</sup>, WANG Shu-fen<sup>1,2</sup>,  
HU Zhi-xing<sup>1,2</sup>, PEI Yi-jing<sup>1</sup>, JI Wei-zhi<sup>1,\*</sup>

(1. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from blood by ficoll-hypaque density gradient centrifugation and rhesus monkey spleen cells were isolated from fresh spleens. To isolate inner cell masses (ICMs) by immunosurgery from human or rhesus monkey embryos and establish embryonic stem cell (ES cell) lines, antisera were prepared by injecting rabbits with human PBMC or rhesus monkey spleen cells, with  $4 \times 10^8$  cells every time, once a week and three times in all, respectively. Our results were listed as below: 1) Rabbit anti-human PBMC antiserum has a titer around 1:320 and rabbit anti-rhesus spleen cell antiserum has a titer around 1:640; 2) The trophoblasts were lysed by immunosurgery using the rabbit anti-human PBMC or anti-rhesus spleen cell antiserum followed by exposure to guinea pig complement. ICMs were successfully isolated from 15 human blastocysts and 33 monkey blastocysts. These results indicated that our antisera could be used for collecting human or monkey ICM cells and they would play important roles in isolating new human or rhesus monkey ES cells in the future.

\* 收稿日期: 2005–10–11; 接受日期: 2005–12–19

基金项目: 云南省自然科学基金重点项目 (2001C0009Z)

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn

第一作者简介: 张秀珍, 女, 博士研究生, 主要从事胚胎干细胞培养和分化研究, 现工作于山东理工大学生命科学院。

**Key words:** Antiserum; Embryonic stem cell; Immunosurgery; Inner cell mass; Human blastocyst; Rhesus monkey blastocyst

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES cells) 是从囊胚内细胞团 (inner cell mass, ICM) 分离出来的、能在体外无限增殖、高度未分化的全能性细胞, 可用于研究胚胎发育、细胞分化、人类遗传疾病的调控机理, 为器官移植提供原材料, 具有广阔的应用前景, 因而成为生物医学研究的热点。分离培养胚胎干细胞是胚胎干细胞研究和应用的基础和前提, 分离胚胎干细胞的首要步骤是分离内细胞团, 主要有两种方法: 机械法和免疫外科手术法。机械法复杂费时, 难以彻底去除滋养层细胞, 残留的滋养层细胞在后续培养中容易导致胚胎干细胞分化 (Pickering, 2003), 因此越来越多的学者采用免疫外科手术法。免疫外科手术法是基于哺乳动物囊胚滋养层细胞间的紧密连接对免疫球蛋白等大分子物质具有非特异性屏障作用, 使抗体只能结合在滋养层细胞上, 不能透过滋养层结合到内细胞团上 (Handyside & Barton, 1977)。免疫血清先与囊胚孵育, 洗去多余免疫血清, 再与补体孵育, 通过补体介导的细胞毒作用裂解滋养层细胞, 有效分离出内细胞团 (Hogan & Tilly, 1978a, b; Solter & Knowles, 1975; Spielmann et al, 1980)。

免疫外科手术法首先在小鼠胚胎上取得成功, 小鼠脾淋巴细胞与小鼠胚胎滋养层细胞有相同的抗原决定簇, 兔抗鼠脾细胞免疫血清可以与滋养层细胞结合, 裂解滋养层细胞 (Solter & Knowles, 1975)。由于缺少针对灵长类囊胚的免疫血清, 各国学者在分离人胚胎干细胞时分别尝试了多种免疫血清: 如兔抗人滋养层细胞系 BeWo 细胞的免疫血清 (Thomson et al, 1998; Lanzendorf et al, 2001); 兔抗人全血免疫血清 (Hwang et al, 2004; Park et al, 2003; Pickering et al, 2003; Reubinoff et al, 2000; Stojkovic et al, 2004); 兔抗人红细胞免疫血清 (Cowan et al, 2004; Klimanskaya et al, 2005); 兔抗绒猴脾脏细胞免疫血清 (Thomson et al, 1996)。由于受免疫血清的限制 (国外实验室一般自行制备, 无成熟产品), 国内还没有建立分离猕猴内细胞团的免疫外科手术法, 采用同种方法分离人内细胞团的研究也比较少, 影响了我国灵长类胚胎干细胞的研究进展。

为了分离人和猕猴的胚胎干细胞, 本实验室采

用猕猴脾淋巴细胞作为免疫原制备兔抗猕猴血清。人的脾脏难以获取, 鉴于脾细胞主要是淋巴细胞, 所以从人外周血中分离单核细胞 (其中主要是淋巴细胞) 作为免疫原制备兔抗人外周血单核细胞免疫血清。并进一步考察了这两种免疫血清是否能够用于分离人和猕猴囊胚内细胞团。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康日本大耳白兔 6 只, 购自中国医科院昆明医学生物研究所, 体重 2.5 ~ 3 kg, 分两组, 每组 3 只, 分别用其制备兔抗人外周血单核细胞免疫血清和兔抗猕猴脾脏淋巴细胞免疫血清。采用细胞毒实验法检测免疫前兔血清, 发现无天然毒性。5 只健康豚鼠, 体重 200 ~ 250 g, 购自昆明医学院动物科, 用于制备补体。

### 1.2 试剂

RPMI-1640、DMEM、mCNRL-1066、G2 培养基购自 Gibco 公司。淋巴细胞分离液购自 TBD 生物技术发展中心 [比重 ( $1.077 \pm 0.001$ ) g/L]。

### 1.3 制备免疫原

1.3.1 分离人外周血单核细胞 浓缩白细胞购自云南省昆明市中心血站, 用 RPMI-1640 培养基将细胞稀释 1 倍, 按 2:1 添加到淋巴细胞分离液之上, 于 18 ~ 20 °C, 2 000 r/min 离心 20 min。离心后, 液体分为 4 层, 由上至下依次为血浆、单核细胞、淋巴细胞分离液、红细胞和粒细胞。单核细胞层较薄, 呈灰白色, 用毛细吸管轻轻吸出转移到新的离心管中, 用 5 倍体积的 RPMI-1640 依次以 2 000 和 1 500 r/min 离心 10 min, 洗涤两次, 去除混杂的血小板 (Feng, 1998)。重悬细胞, 浓度为  $1 \times 10^8$  细胞/mL。台盼兰染色检查细胞活性, 活细胞比率在 95% 以上用于实验。

1.3.2 分离猕猴脾脏淋巴细胞 新鲜脾脏取自用于制药工业的健康猕猴, 去除结缔组织和脂肪, 用冷的 PBS 洗去血液和夹杂物, 剪碎脾脏, 用毛玻片研磨, 经孔径为 80  $\mu$ m 不锈钢丝网过滤, 收集单核细胞悬液, 1 200 r/min 离心 10 min, 低渗溶血去除红细胞, 用 RPMI-1640 培养基反复离心洗涤, 至细胞团呈乳白色。重悬细胞, 调整浓度为  $1 \times 10^8$  细

胞/mL。以上操作细胞均置于 0~4℃冰浴中。台盼兰染色,活细胞比率 95% 以上用于实验。

#### 1.4 免疫兔子

第 1 组兔子每只耳缘静脉缓慢注射  $4 \times 10^8$  个人外周血单核细胞,第 2 组兔子每只耳缘静脉缓慢注射  $4 \times 10^8$  个猕猴脾淋巴细胞。每 7 天免疫 1 次,连续免疫 3 次 (Jian & Chang, 1994; Hogan et al, 1994)。

#### 1.5 制备补体

5 只健康豚鼠,心脏穿刺取血,置 4℃冰箱 1 h,收集析出的血清,混合,每管 50  $\mu$ L 分装, -70℃保存。

#### 1.6 测定抗体效价

第 3 次免疫后 7 d,取少量兔血,采用半微量细胞毒试验法 (Jian et al, 1994; Feng, 1998) 测定抗体效价。以兔抗人外周血单核细胞免疫血清为例,检测步骤如下:在 96 孔板中,每孔加入 10  $\mu$ L 二倍系列稀释的兔抗人外周血单核细胞免疫血清,每个稀释度做 12 孔重复。每孔加入 10  $\mu$ L 人外周血单核细胞 ( $2 \times 10^6$  细胞/mL),振荡混匀。覆盖石蜡油,以防挥发,于 37℃培养箱 (5% CO<sub>2</sub>, 下同) 中孵育 10 min,再加入不同稀释度的补体: 1:10, 1:20, 1:30 和 1:40,每孔 40  $\mu$ L,每个稀释度 3 孔重复。同时设 3 组对照: a. 只加入人外周血单核细胞,不加抗体和补体; b. 加入人外周血单核细胞,加抗血清,不加补体; c. 加入人外周血单核细胞,不加抗血清,加补体,以检测抗血清和补体有无非特异性毒作用。在 37℃孵育 30 min 后,每孔加入 20  $\mu$ L 5% 曙红 Y 孵育 10 min 染色,区分死细胞和活细胞。每孔加 30  $\mu$ L 10% 中性福尔马林固定 4 h 后, Nikon 倒置显微镜下观察,死细胞呈暗红色,无折光性,体积变大;活细胞不着色,折光性强,大小正常。进行细胞计数,每孔死细胞和活细胞共计数 200 个,重复孔取平均值,计算细胞的死亡率,减去对照 a 中细胞的自然死亡率,得到相应抗体-补体毒作用的细胞死亡率。以引起 50% 细胞死亡的最大抗血清稀释度作为效价。

同样,从猕猴外周血中分离单核细胞作为靶细胞检测兔抗猕猴脾脏淋巴细胞免疫血清的效价。

实验重复 3 次,每次每个浓度做 3 孔重复。

#### 1.7 冻存抗血清

检测效价后发现免疫血清可以裂解细胞,将被免疫的兔子心脏穿刺取血,分离血清,56℃灭活

30 min,每管 50  $\mu$ L 分装, -20℃冻存。

#### 1.8 免疫外科手术法分离人和猕猴胚胎内细胞团

1.8.1 胚胎培养 34 枚临床上淘汰的人类 4~8 细胞期胚胎,在 G2 培养基中培养至囊胚。用激素刺激猕猴超数排卵,采集体内成熟卵母细胞,或从未经激素刺激的猕猴卵巢中剥离出卵母细胞,体外培养成熟;体外受精后,在含 20% 新生牛血清 (NCS) 的 mCNRL-1066 培养基中发育到囊胚 (Zheng et al, 2001a, b, c)。

1.8.2 裂解滋养层细胞,分离内细胞团 19 枚人囊胚和 39 枚猕猴囊胚,用 0.5% protease 蛋白酶消化 2~3 min 后,在预先平衡的 DMEM + 10% NCS 中洗 3 次,转到 1:20 稀释的兔抗人外周血单核细胞或兔抗猴脾脏淋巴细胞免疫血清中,于 37℃孵育 30 min。在 DMEM + 10% NCS 中充分洗 3~5 次,每次 5 min,转移到 1:20 稀释的补体中,37℃孵育,5~10 min 观察一次。统计数据以平均值  $\pm$  标准误差表示,统计分析采用 SPSS12.0 软件进行 LSD 分析,  $P < 0.05$  限定为差异性显著。

## 2 结果与分析

#### 2.1 兔抗人外周血单核细胞和兔抗猕猴脾脏淋巴细胞免疫血清的效价

兔抗人外周血单核细胞、兔抗猴脾脏淋巴细胞免疫血清效价和补体最适稀释度测定结果见表 1。

兔抗人外周血单核细胞免疫血清在补体的共同作用下可以裂解人外周血单核细胞,表明所制备的抗体有效。对照组 a、b、c 细胞死亡率分别为  $(13.0 \pm 3.00)\%$ 、 $(13.0 \pm 1.2)\%$  和  $(12.1 \pm 3.0)\%$ ,三者无显著差异 ( $P > 0.05$ )。所以抗体和补体无天然毒性。

用半微量细胞毒试验法测定抗体效价时,补体 1:10 和 1:20 稀释,细胞 100% 死亡;1:30 和 1:40 稀释时,细胞不能 100% 死亡,可能是补体稀释度过高。补体稀释度 1:20,兔抗人外周血单核细胞免疫血清 1:320 稀释,使过半的细胞死亡 [ $(68.8 \pm 3.8)\% - (13.0 \pm 3.0)\% > 50\%$ ],故兔抗人外周血单核细胞免疫血清效价大约是 1:320。

补体 1:20 稀释,以猕猴外周血单核细胞作靶细胞,设类似的 3 个对照,测定兔抗猴脾脏细胞免疫血清的效价,结果如表 2 所示。兔抗猴脾脏细胞免疫血清在补体的共同作用下,可以裂解猕猴外周血单核细胞,对照组 a、b 和 c 细胞死亡率无显著

表 1 不同稀释度的兔抗人外周血单核细胞免疫血清（或兔抗猴脾脏淋巴细胞免疫血清）和补体中人外周血单核细胞（或猕猴外周血单核细胞）死亡百分率（平均值±标准误）

Tab. 1 The mortality of human or monkey peripheral blood mononuclear cells (hPBMC or mPBMC) in different dilution of rabbit-anti-human or rabbit-anti-monkey antiserum and complement (mean ± SE, n = 3)

|                                                    |                                           | 人单核细胞死亡率<br>Mortality of hPBMC ( % ) |            |            |            | 猕猴单核细胞死亡率<br>Mortality of mPBMC<br>( % ) |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------------------------------------|
| 对照组 Control                                        | 不加补体、抗体<br>No antiserum<br>and complement | 13 ± 3.0                             |            |            |            | 7.1 ± 0.5                                |
|                                                    | 不加抗体<br>No antiserum                      | 12.1 ± 3.0                           |            |            |            | 8.0 ± 1.1                                |
|                                                    | 不加补体<br>No complement                     | 13 ± 1.2                             |            |            |            | 7.5 ± 0.7                                |
| 补体稀释<br>Dilution of complement                     |                                           | 1:10                                 | 1:20       | 1:30       | 1:40       | 1:20                                     |
| 抗体倍比稀释<br>Doubling dilution of rabbit<br>antiserum | 1:10                                      | 100                                  | 100        | 95.9 ± 3.2 | 86.2 ± 1.9 | 100                                      |
|                                                    | 1:20                                      | 100                                  | 100        | 95.2 ± 1.0 | 87.3 ± 2.6 | 100                                      |
|                                                    | 1:40                                      | 100                                  | 98.2 ± 0.7 | 91.6 ± 2.2 | 77.1 ± 4.8 | 100                                      |
|                                                    | 1:80                                      | 98.4 ± 1.6                           | 95.3 ± 0.6 | 75.5 ± 2.6 | 63.6 ± 2.3 | 100                                      |
|                                                    | 1:160                                     | 84.3 ± 0.4                           | 84.3 ± 1.2 | 58.4 ± 1.7 | 57.9 ± 1.4 | 93.4 ± 0.2                               |
|                                                    | 1:320                                     | 37.2 ± 3.8                           | 68.8 ± 3.8 | 46.7 ± 2.0 | 57.3 ± 6.8 | 90.3 ± 0.9                               |
|                                                    | 1:640                                     | 28.8 ± 6.0                           | 40.5 ± 4.5 | 37.3 ± 2.3 | 58.3 ± 3.9 | 68.5 ± 4.7                               |
|                                                    | 1:1280                                    | 19.1 ± 1.0                           | 22.3 ± 0.8 | 21.2 ± 2.8 | 36.9 ± 3.7 | 18.2 ± 4.2                               |
|                                                    | 1:2560                                    | 16.5 ± 0.5                           | 20.4 ± 2.2 | 19.2 ± 4.9 | 21.4 ± 0.9 | 11.2 ± 2.1                               |

差异 (  $P > 0.05$  ), 说明抗体和补体无天然毒作用。补体 1:20 稀释, 抗体 1:640 稀释时, 细胞死亡过半 [ (  $68.5 \pm 4.7$  )% - (  $7.1 \pm 0.5$  )%  $> 50\%$  ], 故兔抗猴脾脏淋巴细胞免疫血清效价约为 1:640。

2.2 免疫外科手术法分离出内细胞团

人和猕猴胚胎体外培养 7 d 得到扩张囊胚 ( 图 1: A 和 D ), 与补体孵育后, 滋养层细胞逐渐膨大, 空泡化 ( 图 1: B 和 E ), 进而裂解。用玻璃针吹吸几次, 去掉滋养层细胞, 得到 ICM。所获 ICM 用 DMEM + 10%NCS 洗 3 次后, 接种到已准备好的小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上。3 d 后, 内细胞团贴附在饲养层上 ( 图 1: C 和 F )。采用自制的免疫血清用免疫外科手术法成功地从 15 枚人囊胚和 33 枚猕猴囊胚中分离出 ICM, 并用于分离人和猕猴 ES 细胞。

3 讨 论

国内灵长类胚胎干细胞研究进展缓慢, 主要是因为分离胚胎干细胞存在困难。国外分离人或猕猴胚胎干细胞绝大多数都采用免疫外科手术法, 这种方法可以方便有效地裂解滋养层细胞, 分离出内细胞团。国内受免疫血清的限制, 多采用机械法分离内细胞团, 内细胞团细胞在培养过程中受到滋养层

细胞的影响而分化丢失, 建系难以成功。本实验室在分离人和猕猴胚胎干细胞实验中发现, 机械法不易获得纯的未分化的胚胎干细胞, 因此制备了兔抗猴脾脏淋巴细胞免疫血清, 并创造性地用人外周血单核细胞免疫兔子, 制备了其免疫血清。实验表明这两种免疫血清可以成功地用于分离人和猕猴胚胎内细胞团, 其中使用兔抗人外周血单核细胞免疫血清分离人胚胎内细胞团, 国内外还没有报道。

实验表明所制备的兔抗人外周血单核细胞和兔抗猴脾脏淋巴细胞免疫血清作用于人囊胚和猕猴囊胚, 使其滋养层空泡化进而裂解, 与 Solter & Knowles ( 1975 ) 和 Handyside & Barton ( 1977 ) 报道的免疫血清和补体裂解小鼠囊胚滋养层细胞的结果一致, 可以简便有效地分离胚胎内细胞团。本实验室成功地建立了免疫外科手术法分离内细胞团, 为进一步分离培养人和猕猴胚胎干细胞奠定了基础。

人和猕猴在进化上亲缘关系较近, 以淋巴细胞为免疫原制备的多抗可能会有免疫交叉反应, 本实验室以人、猕猴外周血单核细胞作为靶细胞, 分别用兔抗人外周血单核细胞免疫血清、兔抗猴脾脏淋巴细胞免疫血清, 辅以补体与之作用, 发现两种免疫血清都可以裂解人和猕猴的外周血单核细胞。

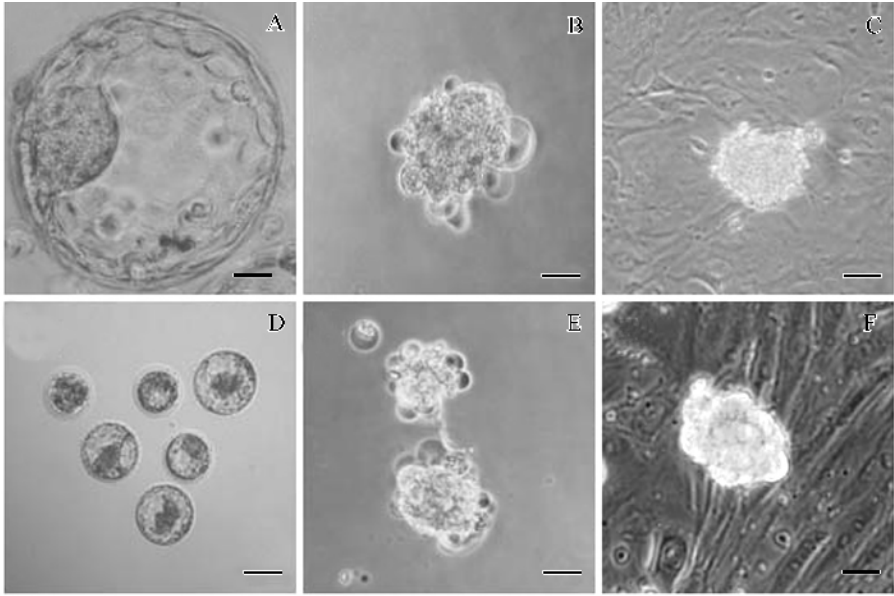


图 1 免疫外科手术法分离人 (A - C) 和猕猴 (D - F) 囊胚内细胞团

Fig. 1 Isolation inner cell masses by immunosurgery from human (A - C) and monkey (D - F) blastocysts

A, D: 体外培养的囊胚; B, E: 在抗体和补体的作用下, 囊胚滋养层细胞膨胀, 空泡化; C, F: 机械吹打去除裂解的滋养层细胞, 得到内细胞团。标尺: A, B, C, E, F 为 50 μm; D 为 200 μm。

Human blastocysts (A) and monkey blastocysts (D) cultured *in vitro*; Trophoblast cells of human blastocysts (B) and monkey blastocysts (E) undergoing complement lysis after antiserum treatment; Isolated human ICMs (C) and monkey ICMs (F) post-lysis attached to mice embryonic fibroblast cells. Bar: (A, B, C, E, F) 50 μm; (D) 200 μm.

同时用两种免疫血清辅以补体与小鼠囊胚作用, 未发现裂解作用 (结果未显示)。可能是人和猕猴与小鼠的亲缘关系远, 其免疫血清与小鼠胚胎滋养层细胞无免疫交叉反应。我们成功建立了猕猴免疫外

科手术法, 同时也发现兔抗人外周血单核细胞免疫血清可用于分离猕猴胚胎干细胞, 解决商品化的猕猴免疫血清较少的问题, 促进猕猴胚胎干细胞的分离建系。

参考文献:

Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, McManus J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA. 2004. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts [J]. *N Engl J Med*, **350**: 1353 - 1356.

Feng W. 1998. Isolate immunocytes and bioassay their functions [A]. In: Shen GX, Zhou RL. *Modern Technology in Immunology* [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Publishing House, 288 - 327. [冯玮. 1998. 免疫细胞的分离与功能检测. 见: 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 288 - 327.]

Handyside AH, Barton SC. 1977. Evaluation of the technique of immunosurgery for the isolation of inner cell masses from mouse blastocysts [J]. *J Embryol Exp Morph*, **37**: 217 - 226.

Hogan B, Tilly R. 1978a. *In vitro* development of inner cell masses isolated immunosurgically from mouse blastocysts: I. Inner cell masses from 3.5-day p. c. blastocysts incubated for 24 h before immunosurgery [J]. *J Embryol Exp Morph*, **45**: 93 - 105.

Hogan B, Tilly R. 1978b. *In vitro* development of inner cell masses isolated immunosurgically from mouse blastocysts: II. Inner cell masses from 3.5- to 4.0-day p. c. blastocysts [J]. *J Embryol Exp Morph*, **45**: 107 - 121.

Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. *In vitro* manipulation of preimplantation embryo [A]. In: *Manipulating the Mouse Embryo*. Second edition [M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 190 - 216.

Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY. 2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst [J]. *Science*, **303**: 1669 - 1674.

Jian YQL, Chang GCXJ. 1994. The technique of immunogery for the isolation of inner cell masses from rat blastocysts [A]. In: Jian YQL, Zhang ZC, Xu CS. *Protocols in Mammalian Development Engineering* [M]. Nanjing: Nanjing University Publishing House, 143 - 151. [菅原七郎, 长谷川喜久. 1994. 免疫手术法——内细胞团分离法. 见: 菅原七郎, 张志超, 徐春生. 哺乳动物发育工程实验方法. 南京: 南京大学出版社, 143 - 151.]

Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, Johnson J, West MD, Lanza R. 2005. Human embryonic stem cells derived without feeder cells [J]. *Lancet*, **365**: 1636 - 1641.

Lanzendorf SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S, Hodgen GD. 2001. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines [J]. *Fertil Steril*, **76**: 132 - 137.

Park JH , Kim SJ , Oh EJ , Moon SY , Roh SI , Kim CG , Yoon HS . 2003 . Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO , a permanently growing cell line [ J ] . *Biol Reprod* , **69** : 2007 – 2014 .

Pickering SJ , Braude PR , Patel M , Burns CJ , Trussler J , Bolton V , Minger S . 2003 . Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research [ J ] . *Reprod Biomed Online* , **7** ( 3 ) : 353 – 364 .

Reubinoff BE , Pera MF , Fong CY , Trounson A , Bongso A . 2000 . Embryonic stem cell lines from human blastocysts : Somatic differentiation *in vitro* [ J ] . *Nat Biotechnol* , **18** : 399 – 404 .

Solter D , Knowles BB . 1975 . Immunosurgery of mouse blastocyst [ J ] . *Proc Nat Acad Sci USA* , **72** : 5099 – 5012 .

Spielmann H , Jacob-Muller U , Beckord W . 1980 . Immunosurgical studies on inner cell mass development in rat and mouse blastocysts before and during implantation *in vitro* [ J ] . *J Embryol Exp Morphol* , **60** : 255 – 269 .

Stojkovic M , Lako M , Strachan T , Murdoch A . 2004 . Derivation , growth and applications of human embryonic stem cells [ J ] . *Reproduction* , **128** : 259 – 267 .

Thomson JA , Itskovitz-Eldor J , Shapiro SS , Waknitz MA , Swiergiel JJ , Marshall VS , Jones JM . 1998 . Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [ J ] . *Science* , **282** : 1145 – 1147 .

Thomson JA , Kalishman J , Golos TG , Durning M , Harris CP , Hearn JP . 1996 . Pluripotent cell lines derived from common marmoset ( *Callithrix jacchus* ) blastocysts [ J ] . *Biol Reprod* , **55** ( 2 ) : 254 – 259 .

Zheng P , Bavister BD , Ji W . 2001a . Energy substrate requirement for *in vitro* maturation of oocytes from unstimulated adult rhesus monkeys [ J ] . *Mol Reprod Dev* , **58** : 348 – 355 .

Zheng P , Si W , Wang H , Zou R , Bavister BD , Ji W . 2001b . Effect of age and breeding season on the developmental capacity of oocytes from unstimulated and follicle-stimulating hormone-stimulated rhesus monkeys [ J ] . *Biol Reprod* , **64** : 1417 – 1421 .

Zheng P , Wang H , Bavister BD , Ji W . 2001c . Maturation of rhesus monkey oocytes in chemically defined culture media and their functional assessment by IVF and embryo development [ J ] . *Hum Reprod* , **16** : 300 – 305 .

## 《动物学研究》致谢作者、审稿人，诚邀英文稿件

2005 年本刊收到稿件 412 篇，比上一年增加 85 篇。值此新年伊始之际，我们真诚地感谢国内动物学研究领域各学科的科研工作者及研究生对本刊的鼎力支持！同时也真诚地感谢审稿专家为本刊审稿做出的积极贡献！

根据 2005 年《动物学研究》在加拿大一个针对发展中国家的生物学项目网站的点击情况，本刊“浏览全文”的点击率不高，一个重要的原因就是本刊发表的论文绝大多数是中文。为此，为加强本刊论文在国外的显示度，敬请作者尽可能用英文投稿，我们对质量较高的英文稿件将适当减免发表费。

《动物学研究》编辑部

2006 年 1 月 18 日