大韓不妊學會誌: 第29卷 第2號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 2, 2002, 6

단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포의 기능성 심근세포 형성

마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소[1], 건국대학교 축산대학[2], 마리아병원[3]

신현아[1] · 김은영[1] · 이영재[1] · 이금실[1] · 박은미[1]
이훈택[2] · 정길생[2] · 박세필[1] · 임진호[3]

Functional Cardiomyocytes Formation Derived from Parthenogenetic Mouse Embryonic Stem Cells

Hyun Ah Shin[1], Eun Young Kim[1], Young Jae Lee[1], Keum Sil Lee[1], Eun Mi Park[1], Hoon Taek Lee[2], Kil Saeng Chung[2], Sepill Park[1], Jin Ho Lim[3]

Maria Infertility Medical Institute / Maria Biotech, Seoul 130-110[1], College of Animal Husbandry, Kon Kuk University[2], Maria Hospital, Seoul 130-110[3], Korea

Objective: This study was to establish a reproducible differentiation system from the parthenogenetic mouse embryonic stem (P-mES02) cells into functional cardiomyocytes like as in vitro fertilization mouse embryonic stem (mES01) cells.

Materials and Methods: To induce differentiation, P-mES02 cells were dissociated and aggregated in suspension culture environment for embryoid body (EB) formation. For differentiation into cardiomyocytes, day 4 EBs were treated with 0.75% dimethyl sulfoxide (DMSO) for another 4 days (4-/4+) and then were plated onto gelatin-coated dish. Cultured cells were observed daily using an inverted light microscope to determine the day of contraction onset and total duration of continuous contractile activity for each contracting focus. This frequency was compared with the results of DMSO not treated P-mES02 group (4-/4-) and mES01 groups (4-/4+ or 4-/4-). For confirm the generation of cardiomyocytes, beating cell masses were treated with trypsin-EDTA, dispersed cells were plated onto glass coverslips and incubated for 48 h. Attached cells were fixed using 4% paraformaldehyde and incubated with specific antibodies (Abs) to detect cardiomyocytes (anti-sarcomeric ?-actinin Ab, 1:100; anti-cardiac troponin I Ab, 1:2000) for 1 h. And the cells were finally treated with FITC or TRITC labelled 2nd Abs, respectively, then they were examined under fluorescence microscopy.

Results: Rhythmically contracting areas in mES01 or P-mES02 cells were firstly appeared at 9 or 10 days after EBs plating, respectively. The highest cumulative frequency of beating EBs was not different in both treatment groups (mES01 and P-mES02, 4-/4+) with the results of 61.3 % at 13 days and 69.8% at 15 days, respectively. Also, the contracting duration of individual beating EBs was different from minimal 7 days to maximal 53 days. However, DMSO not treated groups (mES01 and P-mES02, 4-/4-)

주관책임자: 박세필, 우) 130-110 서울특별시 동대문구 신설동 103-11, 마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소
Tel: (02) 2250-5653, Fax: (02) 2250-5669, e-mail: sppark@mail.mariababy.com
본 연구는 보건복지부 바이오보건기술개발사업 우수 핵심사업연구비 (01-PJ10-PG8-01EC01-0010)의 지원에 의하여 이루어진 것임.
This study was supported by a grant (01-PJ10-PG8-01EC01-0010) of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea.

also had contracting characteristics although their frequency was a few compared to those of DMSO treated groups (6.0% and 4.0%). Cells recovered from the spontaneously contracting areas within EBs in both treated groups were stained positively with muscle specific anti-sarcomeric ?-actinin Ab and cardiac specific anti-cardiac troponin I Ab.

Conclusion: This study demonstrated that the P-mES02 cell-derived cardiomyocytes displayed similarly structural properties to mES01 cell-derived cardiomyocytes and that the DMSO treatment enhanced the cardiomyocytes differentiation in vitro.

Key Words: Parthenogenetic mouse embryonic stem cell, Cardiomyocyte, Differentiation, DMSO, Contraction

배아줄기세포 (embryonic stem cell, ES cell)는 조직을 구성하는 각 세포로 분화 (differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하며, 줄기세포는 외부 환경에 의한 분화 자극이 가해지면 특정세포로 분화할 수 있는 유연성 (plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.[1] 1981년 Martin에 의하여 처음 생쥐의 초기 배아에서 배아줄기세포 (mouse embryonic stem cell, mES cell)를 분리하는데 성공하였고,[2] Evans와 Kaufman 등에 의하여 최초로 생쥐 배아줄기세포를 확립하는데 성공한 이래,[3] 최근에는 확립된 생쥐 배아줄기세포를 이용하여 심근세포,[4] 신경세포,[5,6] 혈액세포[7] 등으로 분화시키는 다양한 분화 연구가 진행되고 있다.

특히 체외에서 심근세포로의 분화 연구는 배아줄기세포를 이용하여 embryoid bodies (EBs)를 형성시킨 후, 심근세포 유도물질로 알려진 dimethyl sulfoxide (DMSO),[8] bone morphogenic protein (BMP)[2,4] 또는 fibroblast growth factor (FGF)[2,4] 등을 이용하여 실시되고 있다.[9] 이와 같이 유도된 심근세포는 자발적이며 규칙적인 수축성 (contraction)을 가진 근세포 (myocytes)의 발현으로 확인된다.[8]

단위발생으로 확립된 배아줄기세포 (parthenogentic mouse embryonic stem cell, P-mES)에 대한 연구는 1998년 일본의 Kanagawa 등에 의해 생쥐 배아줄기세포로부터 embryoid body 형성 가능성으로 분화능력이 있을 것으로 보고되었고,[10] Cibelli 등에 의해 영장류에서 단위발생 유래 배아줄기세포를 확립하여 체외에서 신경세포로의 분화와 면역결핍성 쥐에 이식하였을 때 teratoma가 형성되어 내배엽 (내장과 호흡상피세포), 외배엽 (신경, melanocytes, 표피, 모세포), 중배엽 (연골, 근육, 뼈세포)으로 체내에서 분화가 이루어짐이 확인되었다.[11] 특히 단위발생란에서 확립된 배아줄기세포는 체외수정란에서 확립된 배아줄기세포의 장점을 모두 가지고 있으면서, 향후 난치병 치료에 이용시 필요한 배아줄기세포의 제작에서 문제가 될 수 있는 윤리적 문제를 최소화 시킬 수 있는 대체 연구로서의 가능성을 시사하고 있다.

따라서, 본 연구는 단위발생을 통해 확립된 생쥐 배아줄기세포로부터의 기능성 심근세포로의 분화가 체외수정을 통해 확립된 생쥐 배아줄기세포를 이용하였을 때와 유사한 결과를 얻을 수 있는지의 여부를 조사하고자 실시하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 실험에 사용된 생쥐 배아줄기세포는 현재 본 연구소에서 보유하고 있는 체외수정란으로부터 확립된 mES 세포 (mES01)와 단위발생란으로부터 확립된 P-mES 세포 (P-mES02)를 사용하였다. 실험에 사용된 두 종류의 배아줄기세포는 미분화 특성으로 인지되고 있는 alkaline phosphatase, SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen) 및 transcription factor Oct-4가 발현되었으며, GTG-banding으로 실시한 염색체 분석 결과에서 40개의 염색체가 확인되었다.

2. 연구 방법

1) 생쥐 배아줄기세포의 배양

mES01과 P-mES02 배아줄기세포는 0.1%의 gelatin이 피복된 배양접시에서 배양하였으며, 배양액으로는 Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium

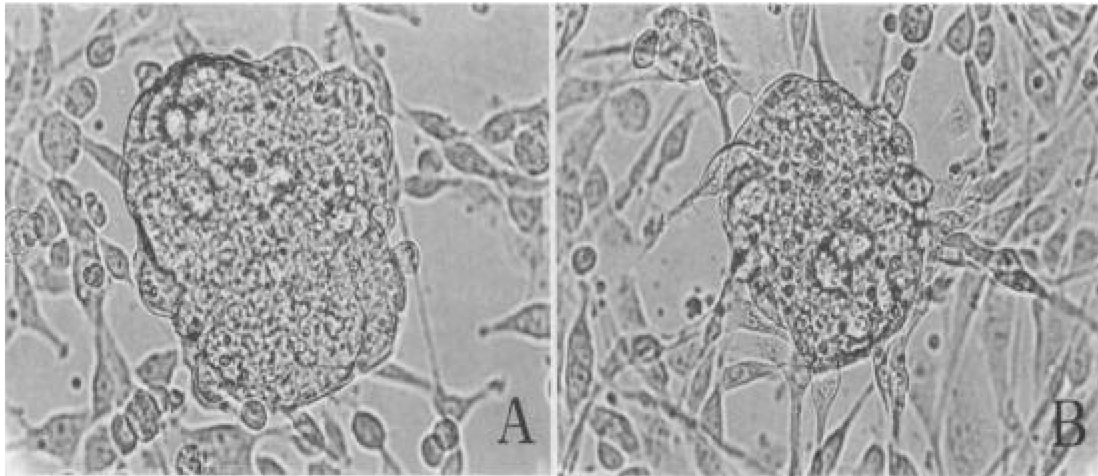

Figure 1. ES colony derived from IVF mouse embryos **(A)** and parthenogenetic mouse embryos **(B)** (×200).

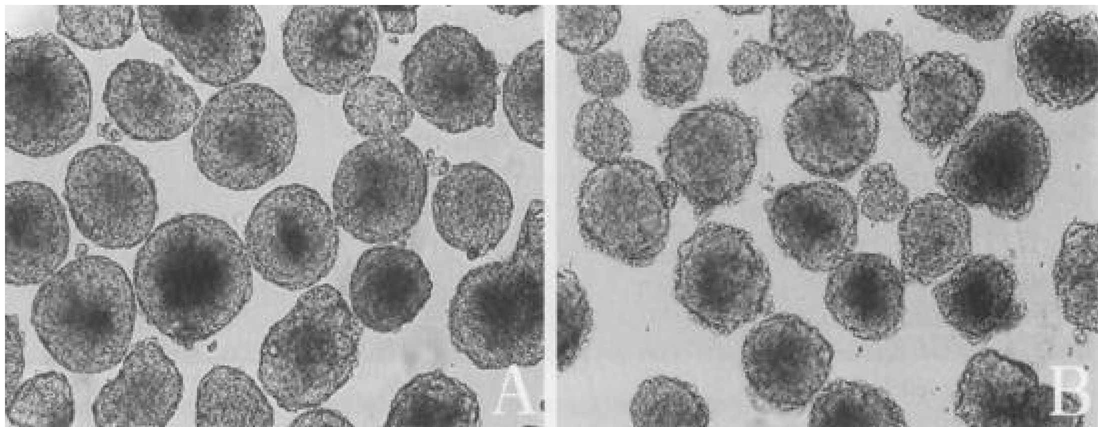

Figure 2. Day 8 EBs developed from mES cells **(A)** and P-mES cells **(B)** after exposure in suspension culture environment wo/w 0.75% DMSO serial treatment for 4 days, respectively (4-/4+) (×100).

(KO-DMEM; no-pyruvate, high-glucose formulation, Gibco)을 기본 배양액으로 하여, 20% FBS (Hyclone), 1 mM L-glutamine (Gibco), 1% nonessential amino acid stock (Sigma), 0.1 mM ?-mercaptoethanol (Sigma), mouse LIF 10^4 units/ml (Chemicon)을 첨가하여 사용하였다.

2) Embryoid body 형성

mES01과 P-mES02 배아줄기세포는 0.25% trypsin-EDTA (Gibco)를 이용하여 단일세포로 분산시킨 후 4×10^6의 세포를 각각 58-mm bacteriological Petri dish (#1007, Falcon)에 부유, 배양하여 세포들을 서로 응집시켜 EB라고 하는 구상의 세포 덩어리를 형성시킨다. 배양액으로는 mouse LIF가 첨가되지 않은 DMEM/F12를 기본 배양액으로 10% FBS (Hyclone)를 첨가하여 사용하였다.

3) 심근세포로의 분화 유도

실험군은 배아줄기세포를 부유, 배양하여 EBs를 형성시키는 동안 분화 유도제로 알려진 DMSO를 첨가하여 심근 분화를 유도하였다. 4일 동안 부유, 배양된 EBs에 0.75%의 DMSO를 첨가하여 4일간 추가 부유, 배양하여 분화 유도를 실시하였다 (4-/4+ 방법). 대조군은 EBs를 형성시키는 8일 동안 DMSO를 첨가하지 않고 심근 분화를 유도하였다. 8일 후 대조군과 실험군의 EBs는 0.1%의 gelatin이 피복된 배

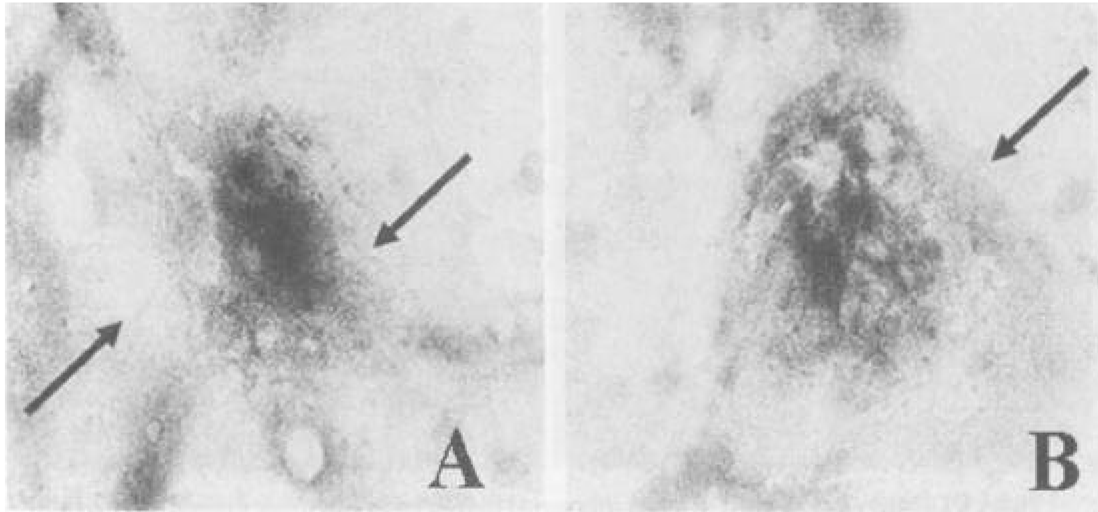

Figure 3. *In virto* differentiated beating cardiomyocytes from mES cells **(A)** and P-mES cells **(B)**. About 10 days after EB plating, generation of regularly contracting cardiomyocytes (arrow) was started in both group (×200).

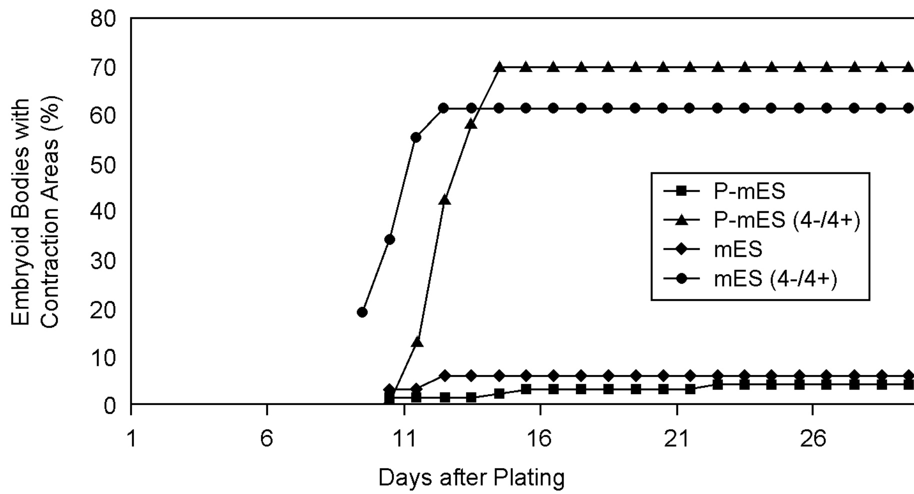

Figure 4. Cumulative percentage of EBs containing spontaneously contracting areas in control group (mES 4-/4- and P-mES 4-/4-) and induced contracting areas in treatment group (mES 4-/4+ and P-mES 4-/4+) (r=3).

양접시에 1.91-cm^2 당 1~5개 EBs의 밀도로 plating 하였다. 그 후 수축 (contraction)이 일어나는지 현미경 하에서 매일 관찰하였다. 심근세포로의 분화 유도는 3회 반복을 실시하였다.

4) 심근세포의 확인

(1) 형태학적 관찰

실험군과 대조군의 심근세포로의 분화 양상은 현미경 하에서 plating 후 30일까지 매일 관찰, 수축 현상이 나타나는 시점과 지속 기간을 확인하였다. 확인된 EBs의 수축 시점과 지속 기간은 누적 비율 (%)로 나타내었다.

(2) 면역세포화학적 염색 방법

EB에서 심근세포로 분화된 세포는 그 구조적인 특성을 확인하기 위해서 면역세포화학 염색 방법을 이용하였다. 외형상 수축이 보이는 부분의 세포 덩어리는 micropiptte를 이용하여 물리적으로 분리한 후

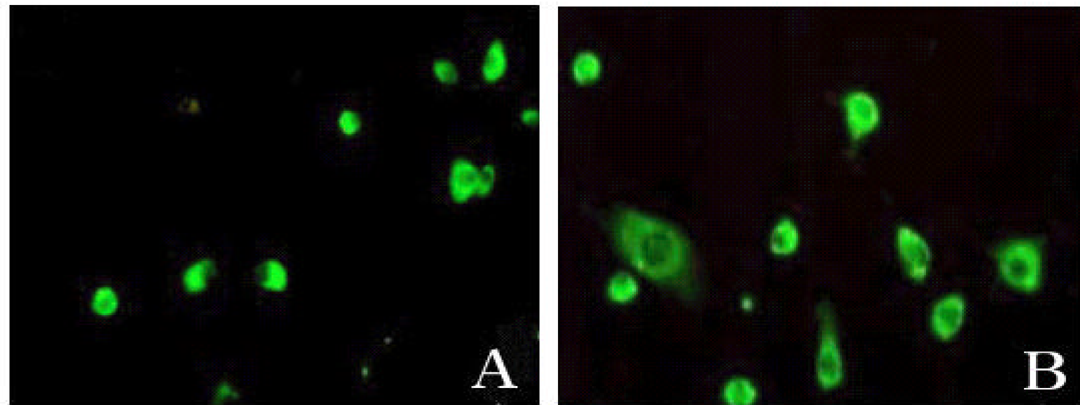

Figure 5. Immunostaining of dispersed cells from a beating cardiomyocytes (recovered at day 16 after EBs plating) with muscle specific anti-sarcomeric ?-actinin mAb's. Cardiomyocytes derived from mES cells **(A)** and P-mES cells **(B)** (×200).

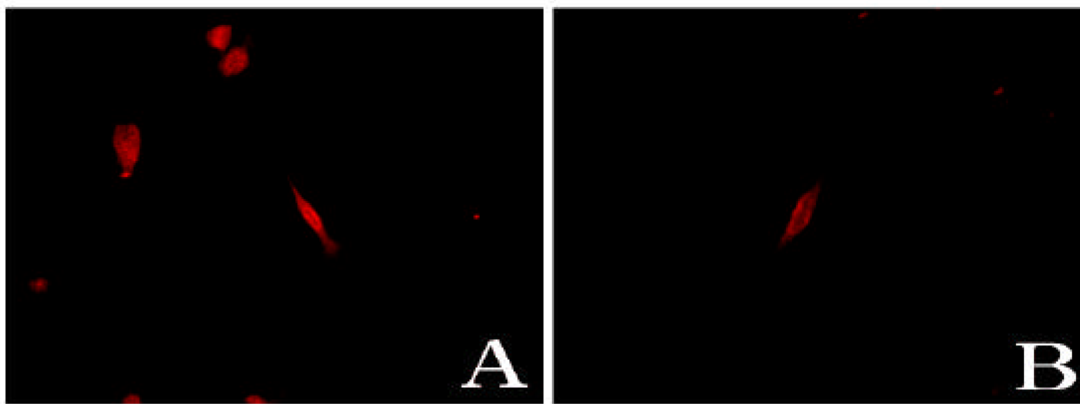

Figure 6. Immunostaining of dispersed cells from a beating cardiomyocytes (recovered at day 16 after EBs plating) with cardiac muscle specific cTnI mAb's. Cardiomyocytes derived from mES cells **(A)** and P-mES cells **(B)** (×200).

효소적 방법 (0.25% trypsin-EDTA, 37°C에서 5분간 처리)을 이용하여 분산시켰다. 분산시킨 세포는 개개의 세포를 확인할 수 있는 낮은 농도로 (4×10^4 cells/ml) 유리 coverslips에 plating 하여 48시간 배양하였다. 배양 후 세포는 염색을 위해서 4% paraformaldehyde로 고정한 후 0.5% Triton X-100 (Sigma)로 침투시키고 10% BSA로 1시간 blocking 하였다. 심근세포를 확인하기 위한 일차 항체로는 muscle actin에 대한 특이성이 있는 anti-sarcomeric ?-actinin mAb's (1 : 100, Sigma)와 cardiac muscle에 대한 특이성이 있는 anti-cardiac trophonin mAb's I (cTnI, 1:2000, Chemicon)을 이용하여 4°C에서 overnight 하였다. 일차 항체에 대한 반응 정도는 Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (1 : 50, Jackson)와 Rhodamine(TRITC)-conjugated goat anti-mouse IgM (1 : 200, Jackson)을 각각 이용하여 실온에서 30분간 반응시켜 형광 현미경 하에서 관찰하였다.

결 과

체외수정란과 단위발생란에서 유래된 배아줄기세포를 형태학적으로 관찰한 결과 P-mES02는 mES01과 유사한 형태의 배아줄기세포 덩어리와 EBs가 형성되는 것을 확인하였다 (Figure 1, 2). mES01과 P-mES02에서 유래된 배아줄기세포는 모두 경계가 뚜렷하고 둥근 덩어리 형태로 유지되는 것이 관찰되

었다. 분화 초기 단계인 EBs는 부유, 배양 후 1~2일째부터 응집 현상이 나타나 3~4일째에는 EB의 형태를 갖추기 시작하며, 그 후 6~8일째는 완전한 구형의 EBs 형태가 관찰되었다.

실험군과 대조군의 EBs에서 분화된 심근세포는 일차적으로 형태학적인 구분인 rhythmically contracting areas가 관찰되었으며, 이러한 결과는 규칙적인 심박수 (heart beat, 60회 이상/1분)로 확인되었다 (Figure 3). Figure 4는 plating 후 수축 현상이 나타나는 시점, 수축 현상이 나타나는 EBs의 수와 수축의 지속 기간을 누적 비율로 나타낸 그래프이다. mES01의 경우 rhythmically contracting areas는 plating 후 9일째, P-mES02는 10일째 처음 나타났으며, 가장 많은 수축 현상을 나타내는 EBs의 누적 비율은 mES01의 경우 61.3% (plating 후 13일째), P-mES02의 경우 69.83% (plating 후 15일째)로 두 군간에 차이가 없음이 확인되었다. 또한 두 실험군의 수축의 지속 기간은 최소 7일에서 최대 53일까지 강한 beating이 확인되었다. 대조군의 경우도 mES01과 P-mES02 모두 자발적인 수축 (spontaneous contraction)이 관찰되었으나 (6.0%와 4.0%), DMSO를 처리한 실험군과는 상당한 차이를 나타내었다.

EBs에서 분화된 세포의 구조적 특성을 확인하기 위한 면역세포화학적 염색의 결과는 Figure 5와 6에서 나타낸 바와 같이, mES01과 P-mES02 모두 muscle actin이 확인되었으며 (Figure 5), 또한 cardiac muscle이 확인되었다 (Figure 6). 따라서 mES01과 P-mES02에서 분화된 세포의 특성이 수축성 심근세포 (contracting myocytes)임을 확인할 수 있었다.

고 찰

본 연구는 체외에서 단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포로부터 유도물질을 사용하여 기능성 심근세포를 배양접시내에서 재현성 있게 만들 수 있으며, 체외수정 유래 배아줄기세포로부터 얻어진 심근세포와 유사한 기능을 나타내는 것을 처음으로 제시하였다. 단위발생란에서 확립된 배아줄기세포는 체외수정란에서 확립된 배아줄기세포와 마찬가지로 형태학적으로 미분화 상태를 유지하는 특성을 가지며, 이를 이용한 신경 분화 연구에서도 외부 환경에 의한 분화 자극이 가해지면 특정세포로 분화할 수 있는 유연성 (plasticity)을 가지고 있는 것이 확인되었다.[11] 또한 단위발생란에서 확립된 배아줄기세포는 향후 난치병 치료에 이용시 배아줄기세포가 갖고 있는 윤리적 문제를 최소화 시킬 수 있는 대체 연구로서의 가능성을 시사하고 있다.[1,11]

포유동물에 있어 심근세포의 특징은 출생 후 증식을 할 수 없는 영구세포 (permanent cell)로 알려져 있으며, 신경세포, 골격근 등이 여기에 속한다. 또한 재생능력이 아주 제한되어 있어 심장에서 일어나는 큰 손상은 결합조직에 의한 반흔조직으로 대치된다. 그러므로 심근세포의 손상은 심장의 정상적인 기능을 수행할 수 없게 되며 심근세포의 이식만이 궁극적인 치료 방법이 될 수 있다.[12,13] 그러나 현재 공여세포로서 심근세포 이식을 위한 충분한 수를 얻기에는 많은 문제점이 있으며, 이식과정에서 나타나는 문제를 선결해야 하는 문제가 남아있다. 그러므로 체외에서 생쥐 배아줄기세포로부터의 심근세포로의 분화 연구는 향후 인간의 질병 치료를 위한 세포대체요법 분야에서는 중요한 정보를 제공할 수 있는 장점을 가지고 있다.[12] 또한 포유동물에 있어서 발달 초기에 나타나는 심근세포의 excitability에 대한 정보를 얻을 수 있는 중요한 모델로 이용할 수 있다. 즉 초기 단계의 심근세포는 체내에서 얻을 수 없으나 (E8.5~E10.5), EBs에서 분화된 심근세포는 이 시기의 심근세포에 대한 특성을 관찰할 수 있는 좋은 모델이 되며,[14,15] 유전자의 발현, 근섬유의 생성 (myofibrillogenesis), 이온 경로의 발달과 기능, 수용체의 발달 그리고 칼슘 handling에도 중요한 정보를 제공한다.[8,16,17]

체외에서 배아줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법에는 각각의 EBs를 부유, 배양하여 심근세포로 분화시키는 부유 배양 방법 (suspension culture)과 EBs를 형성시킨 후 0.1% gelatin이 피복된 배양접시에서 배양하여 심근세포로 분화시키는 부착성 배양 방법 (attached culture) 두 가지로 나눌 수 있다. 부착성 배양 방법은 EBs에서 분화된 심근세포의 수축 개시 시점과 수축의 지속 기간을 부유 배양 방법보다 더 복합적으로 관찰할 수 있었으며, 지속적인 수축능이 높다. 즉, 부유 배양 방법에서 분화된 심근세포는 7일 이하의 beating을 나타내었으나, 부착성 배

양 방법은 최소 9일부터 최대 75일까지 beating을 나타내었다.[18,19] 본 실험에서도 이와 같이 부착성 배양 방법을 이용하여 체외수정 유래 배아줄기세포와 단위발생 유래 배아줄기세포가 모두 최소 7일 이상부터 최대 53일까지 강한 beating을 나타내는 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

체외에서 배아줄기세포를 심근세포로 분화시 stimulant로 알려진 DMSO는 처리 농도에 따라 심근세포 외에 다른 특정세포로 분화시킬 수 있다고 알려져 있다. 체외에서 EBs의 형성시 0.8%의 DMSO 첨가는 심근세포 뿐만 아니라 상피세포 (epithelium), 골격근 (skeletal muscle)으로 분화시킬 수 있으며, 1%의 DMSO 첨가는 haematopoiesis에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.[20,21] 본 실험에서는 기초 실험을 통해 얻어진 결과를 토대로 체외에서 EBs의 형성시 0.75%의 DMSO를 첨가하여 분화시킨 결과, DMSO를 처리하지 않은 대조군보다 체외수정 유래와 단위발생 유래 배아줄기세포 모두에서 심근세포로 분화되는 비율이 높았으며, 특히 단위발생 유래 배아줄기세포에서 심근세포로 분화되는 비율이 체외수정 유래 배아줄기세포보다 높았다. 이와 같은 결과는 상기 기술한 연구자들이 보고한 바와 같이, DMSO 첨가가 심근세포로 분화시키는데 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그러나, 인간에 있어 체외에서 배아줄기세포를 심근 분화시 0.75%의 DMSO 첨가는 심근세포로 분화하는데 효과가 없었는데 이는 종간의 차이라 사료된다.[8] 현재까지 단위발생 유래 배아줄기세포를 이용한 몇몇 분화 연구가 실시되었으나,[10,11] 심근세포로의 분화 연구는 전무한 상태로서 본 실험의 결과는 앞으로 체외에서 단위발생 유래 배아줄기세포를 이용한 심근세포의 분화 연구에 좋은 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

생쥐 배아줄기세포에서 유래된 심근세포를 확인하는 방법에는 형태학적 관찰로 수축 현상의 확인 외에 심근세포를 인지하는 항체를 이용한 면역세포화학적 염색 방법,[9] transmission electron microscopy를 이용한 구조 분석법,[14,22] Ca^{2+} transients의 측정[4,15,23] 그리고 심근세포에 대한 특이 유전자의 발현 연구 방법 등이 있다.[12] 본 연구에서는 심근세포를 확인하는 여러 방법 중 형태학적 관찰과 면역세포화학적 염색 방법을 이용하였으며, 상기 기술한 연구자들이 보고한 바와 같이 형태학적으로 체외수정 유래 배아줄기세포와 단위발생 유래 배아줄기세포 모두 분화된 심근세포에서 수축 현상을 확인할 수 있었다. 또한 면역세포화학적 염색 방법을 이용하여 muscle actin과 cardiac muscle이 발현되는 것이 확인되어 체외수정 유래 배아줄기세포와 단위발생 유래 배아줄기세포에서 분화된 세포의 특성이 수축성 심근세포 (contracting myocytes)임을 재차 확인할 수 있었다. 비록 본 연구에서는 이상의 방법 외 다른 방법을 이용하여 기능성 확인을 실시하지 못했으나, 본 연구는 앞으로 생쥐 배아줄기세포 뿐만 아니라 인간 배아줄기세포로부터의 기능성 심근세포를 형성시키는데 있어 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

또한, 정상적인 배아에서 심장 형성은 myocardial과 endocardial precursors로의 분화 후 cardiac valves 형성을 유도한다. 이런 과정은 생쥐 배아의 경우 12일째, 인간의 배아에서는 35일째 처음 나타난다. 이와 같은 현상은 종간, 세포주에 따라 차이가 나며, 또한 체외에서 분화시 외부 환경에 의한 세포에 주어지는 분화 자극 요인에 의해 달라지기도 한다.[24] 체외에서 심근세포로의 분화를 최대화 하기 위해서는 종의 특징, 사용되는 serum의 농도, EBs의 부유 배양 기간, 성장인자 (growth factor), 또는 기질 (stroma)의 이용 등 여러 가지 요인을 고려해야 할 것이다.[8]

따라서, 본 실험에서 얻은 단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포로부터의 기능성 심근세포로의 분화 연구는 윤리적 문제가 해결될 수 있는 새로운 배아줄기세포주의 공급을 가능하게 함을 의미하고, 이러한 기술이 인간 배아줄기세포에 적용되었을 때 향후 인간의 심장질환 치료를 위한 유전자 치료법, 약물실험, 조직 공학 기술, 세포대체요법 분야에 기초적인 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Doetschman TC, Eistetter H, Kata M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol 1985; 87: 27-45.

2. Martin GR. Isolation of pluripotent cell line fom early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7634-8.
3. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from moues embryos. Nature 1981; 292: 154-6.
4. Heinrich S, Theben T, Hescheler J, Lindner M, Brandt MC, Wartenberg M. Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281: H411-H421.
5. Andressen C, Stocker E, Klinz FJ, Lenka N, Hescheler J, Fleischmann B, Arnhold S, Addicks K. Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. Stem Cells 2001; 19(5): 419-24.
6. Arnhold S, Lenartz D, Kruttwig K, Klinz FJ, Kolossov E, Hescheler J, Sturm V, Andressen C, Addicks K. Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum. J Neurosurg 2000; 93: 1026-32.
7. Filippi MD, Porteu F, Pesteur FL, Schiavon V, Millot GA, Vainchenker W, de Sauvage FJ, Dubart Kupperschmitt A, Sainteny F. Requirement for mitogen-activated protein kinase activation in the response of embryonic stem cell-derived hematopoietic cells to thrombopoietin in vitro. Blood 2002 Feb 15; 99(4): 1174-82.
8. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Invest 2001; 108: 407-14.
9. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: Implications for myocardium regeneration. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 10733-8.
10. Park JI, Yoshida I, Tada T, Takagi N, Takahashi Y, Kanagawa H. Differentiative potential of a mouse parthenogenetic embryonic stem cell line revealed by embryoid body formation in vitro. Jpn J Vet Res 1998; 46: 19-28.
11. Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, Walker SJ, Gutin PH, Vilner L, Tabar V, Dominko T, Kane J, Wettstein PJ, Lanza RP, Studer L, Vrana KE, West MD. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. Science 2002; 295: 819-20.
12. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiation embryonic stem cells from stable intracardic grafts. J Clin Invest 1996; 98: 216-24.
13. Muller M, Flechmann BK, Selnert S, Ji GJ, Endl E, Middeler G, Muller OJ, Schlenke P, Frese S, Wobus AM, Hescheler J, Katus HA, Franz WM. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. FASEB 2000; 14: 2540-8.
14. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. Cardiovasc Res 1997; 36: 408-28.
15. Gryshchenko O, Fischer IR, Dittrich M, Viatchenko-Karpinski S, Soest J, Bohm-Pinger M, Igelmund P, Fleischmann BK, Hescheler J. Role of ATP-dependent K+ channels in the electrical excitability of early embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. J Cell Sci 1999; 112: 2903-12.
16. Davies MP, An RH, Doevendans P, Kubalak S, Chien KR, Kass RS. Developmental Changes in Ionic Channel Activity in the Embryonic Murine Heart. Circ Res 1996; 78: 15-25.
17. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M,

Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. Circ Res 1994; 75: 233-44.

18. Metzger JM, Lin WI, Johnston RA, Westfall MV, Samuelson LC. Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis. Circ Res 1996; 76: 710-9.
19. Robbins J, Doetschman T, Jones WK, Sanchez A. Embryonic stem cells as a model for cardiogenesis. Trends Cardiovasc Med 1992; 2: 44-50.
20. Vidricaire G, Jardine K, McBurney MW. Expression of the Brachyury gene during mesoderm development in differentiating embryonal carcinoma cell cultures. Development 1994; 120: 115-22.
21. Lako M, Lindsay S, Lincoln J, Cairns PM, Armstrong L, Hole N. Characterisation of Wnt gene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells in vitro: role of Wnt3 in enhancing haematopoietic differentiation. Mechanisms of Development 2001; 103: 49-59.
22. Chacko KJ. Observations on the ultrastructure of developing myocardium of rat embryos. J Morphol 1976; 150: 681-709.
23. Viatchenko-Karpinski S, Fleischmann BK, Liu Q, Sauer H, Gryshchenko O, Ji GJ, Hescheler J. Intracellular Ca^{2+} oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development. Proc Natl Acad Sci 1999; 96: 8259-64.
24. Stainier DY. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. Nat Res Genet 2001; 2: 39-48.