

人成纤维细胞饲养层的制备及其对胚胎 干细胞生长支持作用

米 菁¹ 何志旭^{1Δ} 段茂利² 王志华¹ 杨 燕¹

¹贵阳医学院干细胞研究中心-贵阳医学院附属医院儿科 贵州 贵阳 550004;

²瑞典卡罗琳斯卡医科大学临床神经科学部 瑞典 斯德哥尔摩 17176)

【摘要】 目的 为建立不含动物细胞成分的人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESc)体外培养系统,用人包皮成纤维细胞(human postnatal foreskin fibroblasts, hPFF)制备细胞饲养层并观察其对 hESc 体外生长的支持功能及生物学特性的维持作用。方法 利用儿童阴茎包皮环切术后遗弃包皮组织分离培养成纤维细胞,纯化增殖细胞,采用 35Gy γ 射线照射灭活法制备成饲养层。将 hESc(HS181 细胞株)接种在该饲养层上,连续传代至 20 代,倒置显微镜观察其形态学变化,测定其细胞碱性磷酸酶活性,类胚体形成实验及干细胞转录因子表达,严重联合免疫缺陷的小鼠(severe combined immune deficiency mice, SCID)体内畸胎瘤形成及体内全能分化特性实验对 hESc 生物学特性进行鉴定。结果 hPFF 体外培养过程中生长增殖旺盛,连续传 20 代以上能保持正常细胞形态学和生物学特性。经 γ 射线照射使其停止增殖,24 h 内能较好地保持细胞活力和形态学特征,具备饲养层细胞基本条件。HS181 hESc 在 hPFF 上传到 20 代仍能较好地保持未分化状态,细胞呈克隆性生长,高度表达碱性磷酸酶及 Oct-4、Nanog 等胚胎干细胞转录因子;悬浮法培养连续传 20 代的 hESc 可获得由 3 个胚层细胞所形成的类胚体(Embryoid bodies, EB)结构,可检测到 CD90、Flt-1、Nestin 基因的表达,证明得到的类胚体中包含了 3 个胚层细胞,说明 hESc 具有体外多能性特征。体内全能分化实验显示:将第 20 代的 hESc 接种到 SCID 小鼠体内,6 周后可形成畸胎瘤,组织学切片分析其包含了源于全部 3 个胚层的各种分化细胞,直接证明其具有体内多向分化的全能性。结论 hPFF 可作为一种来源丰富,取材方便的人源化饲养层细胞,能有效地支持 hESc 体外生长。克服了目前 hESc 建系和体外培养过程中使用动物细胞饲养层带来的异种蛋白污染和致病微生物的危险,初步解决了 hESc 临床应用的生物安全性问题。

【关键词】 胚胎干细胞; 成纤维细胞; 饲养层; 人类

【中图分类号】 R 318.5 **【文献标识码】** A

Human postnatal foreskin fibroblasts as feeder cells to support human embryonic stem cell growth

MI Qiang¹, HE Zhi-xu^{1Δ}, DUAN Mao-li², WANG Zhi-hua¹, YANG Yan¹

¹Stem Cell Research Center of Guiyang Medical University-Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; ²Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet, 17176 Stockholm, Sweden)

【Abstract】 Objective To investigate whether human fibroblasts cells as feeder layers were capable of supporting the growth of human embryonic stem cells *in vitro*. We now describe the hESc lines (HS181) that had been derived from the beginning using human postnatal foreskin fibroblasts (hPFF) as feeder cells, serum replacement (SR) medium and continued undifferentiated growth. And then we characterize hESc through their biological characteristics. **Methods** Foreskins were obtained from the postnatal babies after circumcision and were donated by their parents. After the primary cell

科技部国际科技合作重点项目(2004DFA03400),教育部科研重点项目(205142),教育部春辉计划合作项目(Z2005-1-52003),贵州省省长资金项目(黔科教办[2006]07号)

^ΔCorresponding author Tel:0851-6908098; E-mail:Hezx306@yahoo.com.cn

culture with enzymatic digestion method and purification, we got the human postnatal foreskin fibroblasts cell lines. Cellular morphologies were observed under inverted phase contrast microscopy with hematoxylin-eosin staining. The cultured cells were identified by vimentin immunofluorescence cell staining, and they were used as feeder cells to culture hESc. The culture medium applied to culture of the hESc (HS181) consisted of Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium (Knockout DMEM) supplemented with SR medium and basic fibroblast growth factor (bFGF). After exponentially growing HS181 cells from passage 7 to passage 20 were identified hESc through their biological characteristics. The lines expressed markers of pluripotent hESCs (alkaline phosphatase, Oct-4 and Nanog). The pluripotency was shown in embryoid bodies *in vitro*, and the pluripotency of line181 was also shown *in vivo* by teratoma formation in severe combined immunodeficiency/beige mice. **Results** By morphological and vimentin immunocytochemical staining identification, we got the stable hPFF cell lines. The coactions of SR with bFGF culture medium and hPFF as feeder cells play an important role in proliferation and undifferentiation of hESc *in vitro*. To identify growth situation of the passage 20th HS181 cell line from morphological observation, its pluripotency and undifferentiation *in vitro* was analyzed, and alkaline phosphatase (AKP), the markers Oct-4 and Nanog, was expressed. The embryoid bodies formed with the suspending method from lines HS181 expressed CD90, Flt-1 and Nestin as constituents of the three germ cell layers by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). This testified that the passage 20 hESc still kept pluripotency *in vitro*. Pluripotency *in vivo* of the passage 20 HS181 cell line was shown by teratoma formation in severe combined immune deficiency (SCID) mice. **Conclusions** The culture of hESc in SR with bFGF medium and on hPFF feeder cells as an alternative is one of the optimal culture systems. The culture system that we applied can keep hESc undifferentiated after more than 20 passages propagation. This is a step toward xeno-free conditions and facilitates the usage of these hESc in transplantation.

【Key words】 embryonic stem cell; foreskin fibroblast; feeder cells; human

目前胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESc)建系和体外传代培养中普遍使用的饲养层细胞均来源于“小鼠胚胎成纤维细胞”(mouse embryonic fibroblast, MEFs)。但是由于MEFs来源于啮齿类动物,对人类来说,存在异种蛋白抗原和携带在人类致病的未知病毒等危险,从而限制了ESc在临床的应用。近年来国外研究者已陆续使用成人输卵管上皮细胞^[1]、人骨髓基质细胞^[2]、人胎盘羊膜上皮细胞^[3]等成功建立了人体组织来源的细胞饲养层,发现能有效地支持人类ESc的生长。虽然上述组织细胞解决了种属来源的问题,但取材上存在较大障碍,涉及医学伦理问题,且带有一定的创伤性。故本研究试图应用人类生理过程中废弃组织——人包皮环切术后废弃的组织建立细胞饲养层支持人类ESc的生长。

材料和方 法

材料 经患者及家属同意,卡罗林斯卡医科大学伦理委员会批准。无菌取卡罗林斯卡医科大学附属医院普外科儿童包皮环切术后废弃包皮组织。人

胚胎干细胞(HS181)由瑞典卡罗琳斯卡 Huddinge 附属医院临床细胞和生殖中心 Outi Hovatta 教授提供。严重联合免疫缺陷小鼠(severe combined immunodeficient mice, SCID):购于丹麦的 M&B 实验动物公司 SCID 研究中心。Iscove's Medium IMEM,胎牛血清,胰蛋白酶,PBS液(Gibco公司),鼠抗人波形蛋白抗体,Alexa 488 耦联的羊抗鼠 IgG 抗体(Invitrogen);Knockout-DMEM,血清替代品,L-谷氨酰胺,非必需氨基酸, β -巯基乙醇,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF);SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR,100 bp DNA Ladder Marker(以上试剂均购自 Invitrogen 公司);引物序列(Santa Cruz Biotech, Inc., Santa Cruz, CA);碱性磷酸酶试剂盒(Invitrogen 公司);Dispase (Gibco 公司),RNeasy mini kits(Qiagen 公司)。

方 法

hPFF 的分离培养、鉴定及饲养层的制备 无菌取儿童包皮环切术后废弃包皮组织,按 Kursad Turksen^[4]的方法获取成纤维细胞,原代培养细胞 80%~90%融合后进行传代扩增。细胞鉴定分别采用常规苏木精-伊红染色^[4]及免疫荧光细胞化学染

色法^[4]进行形态学观察。传代5代以上的hPFF可用于饲养层的制备,制备前常规消化收集hPFF单细胞悬液,使用35Gy γ 射线照射细胞9分钟4秒后以 1.8×10^5 /mL密度接种于6孔培养皿中,置于37 $^{\circ}$ C培养。当达80%~90%贴壁时,可用于hESc培养。

hESc在hPFF上传代及生长情况的观察 人胚胎干细胞株HS181细胞复苏后按 $3 \sim 5 \times 10^5$ /mL的细胞密度接种在hPFF饲养层上,培养液为85% Knockout-DMEM,内含15%血清代替品/SR、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、4 ng/mL碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。置37 $^{\circ}$ C,5% CO₂饱和湿度条件下培养,隔日换液。待HS181细胞在饲养层长成圆形或椭圆形克隆,数量较为密集时进行传代培养。传代时倾弃培养液,加入10 mg/mL Dispase消化8~10 min,机械剥离贴壁的胚胎干细胞,收集离心,调整细胞悬液浓度为 1×10^5 /mL,重新接种在新的饲养层上进行传代扩增。每天用倒置光学显微镜观察hESc生长情况及克隆集落形成的形态学变化,并拍照。

类胚体(Embryoid bodies, EB)形成实验 将连续传代第20代hESc用10 mg/mL的Dispase消

化,收集细胞,用类胚体培养液重悬,调整细胞密度为 1×10^4 /mL,悬浮培养在无饲养层的35 mm半径的细菌培养皿中,内含75% Knockout-DMEM、20%胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、0.1 mmol/L β -巯基乙醇,置37 $^{\circ}$ C,5% CO₂饱和湿度条件下培养。第2天,摇动培养皿,防止形成的类胚体贴壁,隔日换液。每天用倒置光学显微镜观察其形态学变化,并拍照。

碱性磷酸酶染色 采用重氮盐方法检测,用第20代的克隆生长良好的hESc,弃培养液,用蒸馏水洗3遍,晾干,加固定液固定5~10 min,用蒸馏水洗3遍,晾干,按照说明书顺序操作,最后中性树脂胶封片,镜下观察染色结果并摄片。

RT-PCR法检测hESc和EB的表达转录因子 按RNA提取试剂盒的说明书,提取第20代hESc和悬浮培养形成的类胚体总RNA,使用RT-PCR法分别检测hESc多能干性的特异性生物学标志Oct-4及Nanog基因的表达,以及类胚体中3个胚层来源的细胞特异性基因CD90、Flt-1和Nestin的表达。引物的设计参照以往的文献^[5],同时以 β -actin作为内参照,反应产物在2%琼脂糖凝胶上进行电泳,再用凝胶图像分析系统进行处理。应用的引物的序列和反应条件见表1,表2。

表1 人胚胎干细胞的RT-PCR的引物序列和反应条件

Tab 1 Primer sequence and PCR conditions for expression analysis of the listed genes of hESc

Gene	Primer sequences	Size(bp)	Annealing temperature($^{\circ}$ C)	[MgCl ₂](mmol/L)
Oct-4	F:5'-AGGATCACCTGGGATATACACA-3'; R:5'-AAGCTAAGCTGCAGAGCCTCA-3'	120	55	1.5
Nanog	F:5'-TTCCTCCTCTTCCTCTATAC-3'; R:5'-TTTCACTCATCTTCACACGTC-3'	960	60	1.5
β -actin(House keeping gene)	F:5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3'; R:5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'	353	58	3.0

表2 类胚体的RT-PCR的引物序列和反应条件

Tab 2 Primer sequence and PCR conditions for expression analysis of the listed genes of EB

Gene	Primer sequences	Size(bp)	Annealing temperature($^{\circ}$ C)	[MgCl ₂](mmol/L)
CD90	F:5'-ATGAACCTGGCCATCAGCATCGC-3'; R:5'-TCACAGGGACATGAAATCCGTGG-3'	525	55	2.0
Flt-1	F:5'-ATCAGAGATCAGGAAGCACC-3'; R:5'-GGAACCTCATCTGGGTCCAT-3'	441	51	3.0
Nestin	F:5'-CAGCTGGCGCACCTCAAGAATG-3'; R:5'-AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG-3'	208	55	2.0
β -actin(House keeping gene)	F:5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3'; R:5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'	353	58	3.0

人胚胎干细胞的体内全能实验 消化收集连续传代20代以上的hESC,调整细胞浓度为 $3 \sim 5 \times 10^6$

/mL,接种0.5 mL上述浓度的细胞悬液到7周龄的雄性SCID小鼠的睾丸包膜内。另一只同龄的SCID小鼠

的睾丸包膜内注射相同细胞数量的人成纤维细胞悬液作为对照。每周观察并触诊畸胎瘤的生长情况,于第6周拉颈处死小鼠,摘取瘤体,测量肿瘤大小,并将其用中性甲醛过夜固定 HE 染色,行常规组织病理学检查。

结 果

hPFF 的形态学特性及鉴定 原代培养的 hPFF 倒置显微镜下观察,7~12 h 的细胞呈圆形、椭圆形及成团块状,仅有少数伸展,48~72 h 细胞生长最快,变成梭形。5~7 d 后融合达 80%;传代培

养时,2~3 d 后细胞融合,呈单层生长,形态呈多角形,鹅卵石状镶嵌排列,边界清晰,胞浆丰富,胞核圆形或椭圆形,偶见双核。多次传代(30 代以内)培养后成纤维细胞呈优势生长,细胞活性达 90%。hPFF 的形态(图 1A)。在第 3 代时,进行苏木精-伊红染色,光镜观察显示细胞为多角形或长梭形,胞核为淡蓝色,胞浆为粉红色(图 1B)。细胞用免疫荧光细胞化学染色方法检测 hPFF 波形蛋白的表达,在荧光显微镜下观察到绿色长梭形的和多角形的 hPFF(图 1C)。

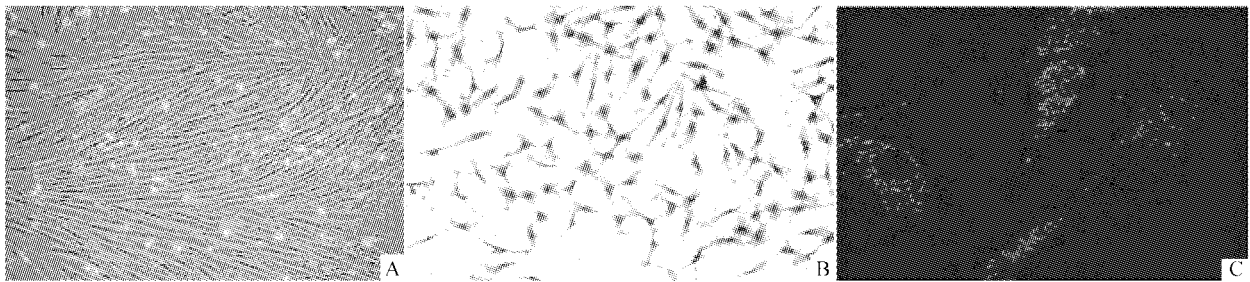


图 1 人包皮成纤维细胞的形态和鉴定

Fig 1 The morphology and certification of human postnatal foreskin fibroblasts

A: The 3rd passage human postnatal foreskin fibroblasts cultured for 5 days after propagation($\times 100$); B: The 3rd passage hPFF after HE staining($\times 100$), the light blue nuclear and pink cytoplasm appear in the oblong hPFF; C: The 3rd passage hPFF after immunocytochemical staining of vimentin($\times 200$), hPFF are oblong and green.

在 hPFF 饲养层上生长的 hESc 情况和鉴定

hESc 接种在 hPFF 饲养层上后,一般 24 h,可见典型的克隆状的生长。克隆呈多边形或椭圆形集落生长,克隆内的细胞紧密聚集在一起,细胞的界限不清

楚,形似鸟巢,hESc 的集落与饲养层细胞之间的边界清楚,集落无分化的迹象(图 2A)。高倍镜下可以见 hESc 集落是将饲养层细胞推开生长的(图 2B)。

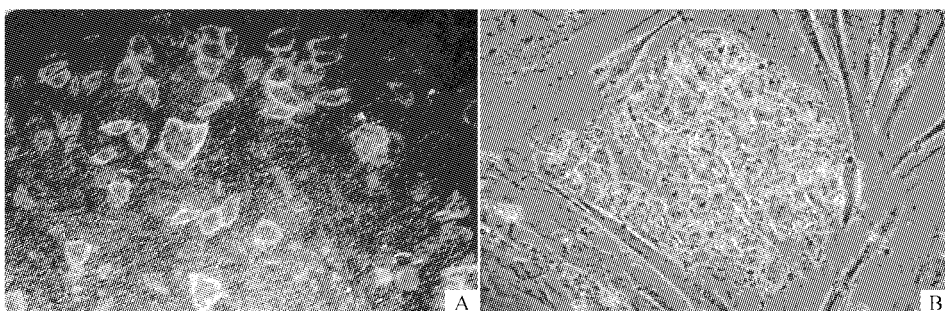


图 2 hPFF 上生长的 hESc 形态(P9)

Fig 2 The morphology of hESCs' colonies cultured on hPFF feeder layers

A: Under low magnification($\times 100$), there are many hESc colonies with different shapes oblong, polygonal and round. The boundaries of undifferentiated colonies were clear; B: An undifferentiated colony of the 9th hESc growing on hPFF feeder layers 24 hours after propagation, hESc colony pushed hPFF feeder layer aside and attached the bottom of dish growing($\times 400$).

体外分化能力和鉴定 hESc 在不含饲养层的悬浮培养系统中培养 2 d 后即形成小的细胞团,在第 4 天即为标准的类胚体,高倍镜下细胞间黏附紧密,克隆边界清楚光滑,胚体饱满,透明度高,悬浮于培养液中(图 3)。

碱性磷酸酶染色 hESc 在 hPFF 上传 20 代以后进行 AKP 染色,结果表明 hESc 被染成深红色,而周边的饲养层没有被着色(图 4)。

hESc 的 Oct-4、Nanog 基因检测情况 在 hPFF 饲养层上生长 20 代以上的 hESc 提取 RNA 后经

RT-PCR 反应,琼脂糖凝胶电泳后显示,在 120 bp 和 353 bp 位置分别出现 Oct-4 和 Nanog 的条带。表明此时的 hESc 仍然具备胚胎干性的特征,处于未分化状态(图 5)。

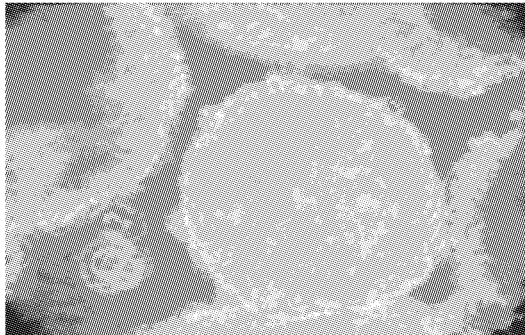


图 3 P20 hESc 形成的类胚体(4天)($\times 400$)

Fig 3 Four-day embryoid bodies formation from passage 20th hESc ($\times 400$)

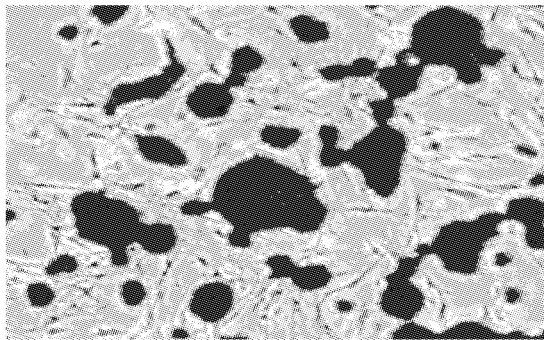


图 4 生长在 hPFF 饲养层上第 20 代 hESc 的 AKP 染色

Fig 4 AKP staining of hESc cultured on hPFF feeder layer for 20th passages

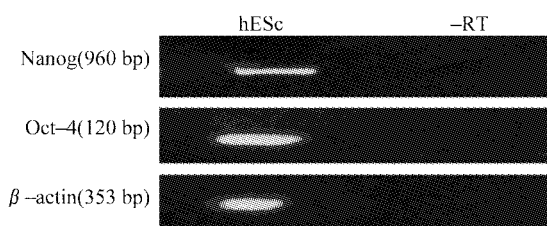


图 5 第 20 代 hESc 的 Oct-4、Nanog 和管家基因 β -actin 电泳图

Fig 5 RT-PCR analysis of hESc undifferentiated markers Oct-4 and Nanog expression from cell line hESc 20th passage, with β -actin as the house keeping control as revealed by reverse transcription polymerase chain reaction

The first lane shows mRNA expression of hESc sample; the second lane shows negative control

hESc 形成的类胚体中 CD90、Flt-1 和 Nestin 基因的表达 通过悬浮法培养人胚胎干细胞获得的由 3 个胚层细胞组成的类胚体,提取 RNA 后经 RT-PCR 反应,产物通过琼脂糖凝胶电泳后显示,分别出现 525 bp 的 CD90, 441 bp 的 Flt-1, 208 bp 的

Nestin 基因表达产物。证明得到的类胚体中包含了内、中、外 3 个胚层的细胞(图 6)。

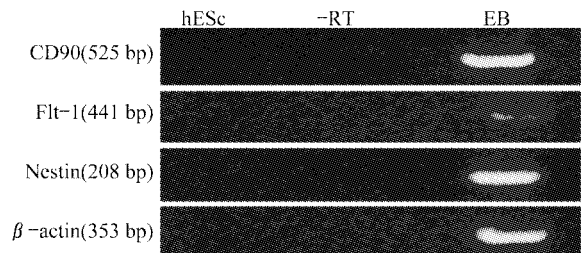


图 6 第 20 代 hESc 类胚体的 CD90、Flt-1、Nestin 和管家基因 β -actin 电泳图

Fig 6 Embryoid bodies from 20th passage hESc expressed markers for three embryonic germ layers CD90, Flt-1 and Nestin, the three markers of 20th passage undifferentiated hESc were negative, with β -actin as the house keeping control as revealed by RT-PCR

The first lane shows mRNA expression of hESc sample; the second lane shows negative control, the third lane shows mRNA expression of EB sample

畸胎瘤形成以及组织分化的情况 SCID 小鼠睾丸包膜内接种在 hPFF 上连续传代第 20 代 hESc 细胞悬液后第 5 天即可在接种部位触到米粒大小柔软的包块,随时间延长,包块进行性增大,在第 2 周时接种处的皮肤逐渐隆起,颜色变黑,瘤体质地也逐渐变韧。而对照小鼠在相同的时间段未见包块形成和皮肤的隆起。观察 6 周后处死动物剥离瘤块,瘤样包块边界清楚,与周围组织无粘连,大小为 4.1 cm \times 3.2 cm \times 4.2 cm。解剖发现由囊腔和实性区组成,部分囊腔充满胶冻样物。进行病理组织学检查显示该肿块包含 3 个胚层的组织结构:有外胚层来源的上皮组织,毛囊,神经纤维;同时还可见中胚层成分,如肌肉、软骨、骨组织;也可见内胚层成分,黏膜上皮等。具备畸胎瘤的病理组织学特征(图 7)。

讨 论

随着 hESc 体外分离培养和建系成功,为其开发由 hESc 做为“种子”细胞来源的组织工程产品和细胞替代治疗应用与临床提供了可能性。但是目前成功建立的 hESc 系多由小鼠 MEF 来源的细胞作为 hESc 生长的饲养层,这就对 hESc 的临床应用造成了障碍,人们不得不为其生物安全性担忧。要解决这个问题可以从两个方面着手:(1) 建立不含饲养层的 ESc 培养体系;(2) 使用人类自身来源的组织细胞建立饲养层系统。小鼠 ESc 在不含饲养层的培养体系中可以在一定时间内较好地维持生长和

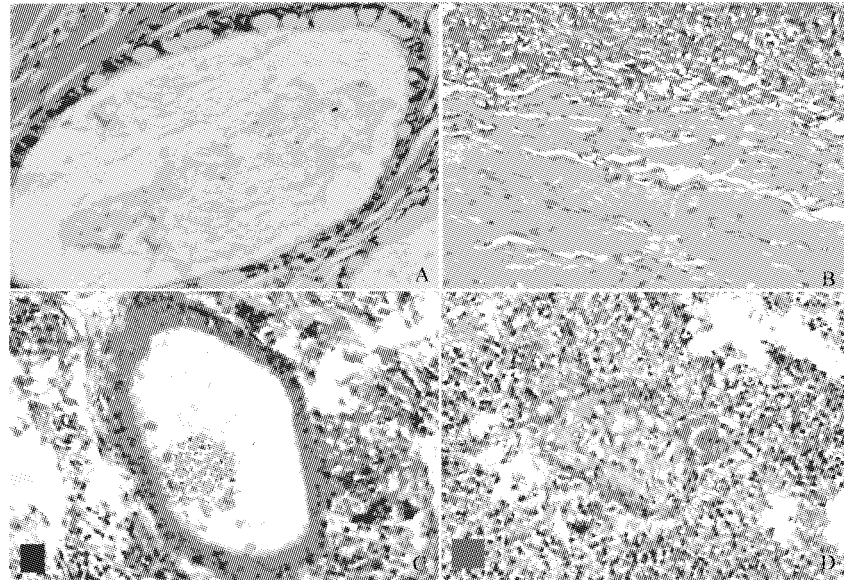


图7 hESc来源的畸胎瘤HE染色后组织学检查($\times 200$)

Fig 7 Teratomas formed after injection of hESc beneath the testicular capsule of SCID/beige mice with tissue components of all three embryonic germ cell layers by Hematoxylin and Eosin-stained paraffin-embedded section($\times 200$)

- A: Entodermal development of gut-like structure lined with mucinous epithelium;
 B: Mesodermal differentiation is demonstrated by striated muscle;
 C: Teratoma tissue with differentiation to hair follicle;
 D: Teratoma tissue containing components characteristic of neural epithelium.

保持胚胎干细胞特性,但是 hESc 在脱离饲养层后极易发生分化,同时细胞生长增殖缓慢,传代扩增困难。目前尚无理想的不含饲养层的 hESc 培养体系开发出来。相对来说,采用人类组织细胞替代 MEFs 开发支持 hESc 的培养生长体系较易实现。目前这方面的研究已有了一些进展。Richards 等^[1]发现人胎儿肌肉成纤维细胞,人皮肤成纤维细胞和成人输卵管上皮细胞能够在体外支持 hESc 多能性。John Hopkins 小组科学家发现,人骨髓基质细胞也能作为 hESc 的饲养层,使 ES 在没有分化的情况下增殖发育。上述研究虽然初步回答了人类组织细胞来源的饲养层建立的可能性问题,但是实施起来有一定困难。无论是人骨髓基质细胞还是人输卵管上皮细胞来源均非常不易,还受到伦理学限制。因此,开发一种来源方便,更加便捷实用的人组织细胞饲养层技术就成为一个迫切需要解决的问题。

而人类儿童包皮环切后遗弃的组织细胞用于 hESc 饲养层生长支持系统,具有以下优点:(1) 相对人体其他的组织器官来说,阴茎包皮组织是人体的废弃组织,来源较方便;(2) hPFF 生长增殖快速(传代后 2~3 d 就可以达到 80% 融合),其培养条件简单,比其他的细胞更易体外大规模培养,不存在伦理方面的限制;(3) hPFF 经过长期传代(>30 代)后,仍可以支持 hESc(20 代以内)体外未分化生长,

并保持良好的胚胎干性。通过对生长在 hPFF 上的第 20 代 hESc 进行 RT-PCR 分析,其表面胚胎干性的标记物 Oct-4, Nanog 表达强阳性。Oct-4 是 hESc 保持未分化状态的标志,在 ES 状态时转录最强,从分化 6 d 后转录开始下降,第 10 天完全消失,说明 hESc 的多潜能性的消失。同样 Nanog 是近年来被发现的一个 ES 自我更新维持因子,其可控制其他基因的活动,既能使 ES 分化为其他细胞,又能使干细胞保持自己的特性,并无限分裂下去,同时只有在 ES 中才起作用,在已分化的成体细胞中,该基因处于休眠状态。当撤掉饲养层,悬浮培养 hESc,第 2 天就形成了含有 3 个胚层细胞的类胚体,通过 RT-PCR 分析证实 EBs 中含有 3 个胚层的表面标记物 CD90, Flt-1, Nestin 表达阳性;同时对生长在 hPFF 上的第 20 代 hESc 的 CD90, Flt-1, Nestin 进行 RT-PCR 分析其结果为阴性。Richards 等^[1]使用的人类胎儿肌肉成纤维细胞,人类皮肤成纤维细胞和成人输卵管上皮细胞虽可支持 hESc 的生长,但其只培养到第 4 代就用来作为饲养层支持 hESc 的生长,这些饲养层细胞可否在体外大量扩增有待于进一步验证。John Hopkins 小组获取人的骨髓基质细胞的过程极为复杂,要经过多个步骤对其进行提取纯化,易引起污染。

在 hPFF 原代培养时发现,包皮组织的细胞成

分是成纤维细胞、纤维细胞、上皮细胞等。其在接种后 10~12 h 可见明显的伪足贴附于培养瓶底。此时换液可将杂细胞洗走,留下的为贴壁的成纤维细胞。再经传代,细胞纯度达 99%。hPFF 的中间丝结构蛋白为波形蛋白,以此作为该细胞鉴定的相对特异性标志^[6]。该细胞系细胞生长旺盛,状态良好,至今可冻存复苏连续培养超过 30 代仍具有较强的体外增殖能力,在经过灭活后细胞可以存活近 10 d,从而更有利于 hESc 的生长,其可较长期的使用。采用该细胞系作为饲养层,至今 hESc 传代 20 次仍保持未分化状态及多向分化潜能,避免了异种蛋白的污染。hPFF 饲养层对 hESc 有两方面的作用:首先,由于 hPFF 可合成并分泌成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF) 等促有丝分裂因子,从而可以促进 hESc 的增殖;其次,该饲养层细胞也可以分泌 LIF 等细胞分化抑制因子,从而抑制 hESc 的分化。成纤维细胞所产生的因子往往位于细胞膜上,hESc 与饲养层细胞直接接触才能最大限度地接受刺激^[7]。Bongso 等^[8]认为,hESc 附着饲养层是启动其快速增殖的信号。Wobus 等报道^[9]用 γ -射线处理饲养层细胞效果显著优于丝裂霉素 C,因丝裂霉素对 ES 有毒性,接种 ES 前需反复冲洗,否则会导致 ES 染色体变异,失去多能干性而分化,甚至死亡。我们应用 γ -射线照射制备饲养层细胞,此方法简单快捷,大大降低了饲养层制备的工作量。

本实验培养体系使用 Knockout-DMEM 取代了高糖 DMEM,Knockout-DMEM 渗透压更接近正常的胚胎组织,针对 ES 设计的培养液。该培养体系中添加 20% KnockOut SR, GIBCO 公司推出了无血清胚胎干细胞培养基,不但省去了每批购买 FBS 时由于 FBS 中可能含有血红蛋白和内毒素而需要进行烦琐的筛选工作,更重要的是排除 FBS 中一些促分化因子的干扰^[10],同时保存了血清的优点。Thomson 等^[11]认为,像其他体外培养的人体细胞一样,hESc 也要求 bFGF 的存在以促进增殖,又能促进外胚层和中胚层标记的表达。

就目前而言,本实验使用的培养体系是一个较

为完善的培养体系,其不但解决了 hESc 低产量的问题,而且降低了其他动物饲养层和胎牛血清带来的异种蛋白污染和病原传播问题,该系统成功地培养 hESc,使 hESc 应用于临床成为可能。

参 考 文 献

- [1] Richards M, Fong CY, Chan WK, *et al.* Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(9): 933-936.
- [2] Cheng L, Hammond H, Ye Z, *et al.* Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cell in culture[J]. *Stem Cells*, 2003, 21(2): 131-142.
- [3] Kanji Miyamoto, Kazuhiko Hayashi, Toshio Suzuki, *et al.* Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2004, 22: 433-440.
- [4] Kursad Turksen. Embryonic Stem Cell Protocols [M]. Ottawa: Ottawa Health Research Institute, 2006: 446-469.
- [5] Imreh MP, Gertow K, Cedervall J, *et al.* *In vivo* culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells[J]. *J Cellular Biochem*, 2006, 99(2): 508-516.
- [6] Li W, Hayashida Y, He H, *et al.* The fate of limb epithelial progenitor cells during explant culture on intact amniotic membrane[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(2): 605-613.
- [7] Xu C, Inokuma MS, Denham J, *et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(10): 971-974.
- [8] Bongso A, Fong CY, Ng SC, *et al.* The growth of inner cell mass from human blastocysts[J]. *Theriogenol*, 1994, 41: 167-171.
- [9] Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85: 635-678.
- [10] Mindy DG, Mary LT, Juliet LA, *et al.* Serum-free culture of murine ES cells[J]. *Focus*, 1998, 20(5): 8-11.
- [11] Thomson JA, Itskowitz-Eldor J, Shaoiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282: 1145-1147.

(收稿日期: 2007-10-30; 编辑: 王蔚)