

# 碱性成纤维细胞生长因子对胚胎干细胞来源集落形成细胞的作用\*\*

李娜, 石增立, 王跃嗣

## Effect of basic fibroblast growth factor on the formation of blast-colony-forming cell derived from embryonic stem cells

Li Na, Shi Zeng-li, Wang Yue-si

### Abstract

**BACKGROUND:** Some studies show that basic fibroblast growth factor (bFGF) strongly expresses during the process of embryonic stem cells differentiation into hematopoietic stem cell, yolk sac blood, and fetal liver hematopoiesis.

**OBJECTIVE:** To study the regulation of bFGF on the blast-colony-forming cell (BL-CFC) by adding bFGF in the medium of embryoid body generation.

**METHODS:** The third to fifth generations of the primary mouse embryonic fibroblasts were recovered, and then incubated with the DMEM medium containing mitomycin C for 2.5 hours in order to lose the proliferative capacity. Then cells were suspended into single cell by trypsinization and inoculated in the gelatin-coated bottle at the density of  $10 \times 10^4/\text{cm}^2$ . After culturing for 24 hours, mouse embryonic stem cells (mESC) of D3 were recovered and placed on the feeder layer cells. According to the composition of medium in embryoid body generation, mESCs were divided into two groups: group A: standard medium + VEGF + SCF; group B: standard medium + VEGF + SCF + bFGF. Each group was cultured for 3 days and 6 days respectively, and the cloning number of BL-CFC was quantified, as well as Flk-1<sup>+</sup> expression was observed by immunofluorescence staining. Positive number and average absorbance were analyzed using IMAGE-PRO PLUS imaging analysis system.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Adding bFGF in the course of embryoid body growth could significantly increase the number of BL-CFC ( $P < 0.01$ ), and the positive results of Flk-1 and the average absorbance were also increased significantly ( $P < 0.01$ ). bFGF effectively promoted embryoid body amplification and proliferation of BL-CFC.

Li N, Shi ZL, Wang YS. Effect of basic fibroblast growth factor on the formation of blast-colony-forming cell derived from embryonic stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(14): 2579-2582. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Department of Pathophysiology, Binzhou Medical College, Yantai 264003, Shandong Province, China

Li Na★, Studying for master's degree, Department of Pathophysiology, Binzhou Medical College, Yantai 264003, Shandong Province, China lina\_200703@163.com

Correspondence to: Shi Zeng-li, Professor, Department of Pathophysiology, Binzhou Medical College, Yantai 264003, Shandong Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30801353\*

Received: 2009-12-30 Accepted: 2010-02-10

滨州医学院病理生理学教研室, 山东省烟台市 264003

李娜★, 女, 1982年生, 山东省滨州市人, 汉族, 滨州医学院在读硕士, 主要从事造血干细胞发育、扩增调控方面的研究。lina\_200703@163.com

通讯作者: 石增立, 教授, 滨州医学院党委书记, 滨州医学院病理生理学教研室, 山东省烟台市 264003

中图分类号: R394.2 文献标识码: B 文章编号: 1673-8225 (2010)14-02579-04

收稿日期: 2009-12-30 修回日期: 2010-02-10 (20091230010/GW·H)

### 摘要

**背景:** 有研究表明, 在卵黄囊造血、胎肝造血和在胚胎干细胞向造血干细胞分化过程中, 碱性成纤维细胞生长因子可强烈表达。

**目的:** 在拟胚体培养阶段施加碱性成纤维细胞生长因子, 验证碱性成纤维细胞生长因子对集落形成细胞产生的调控作用。

**方法:** 购买小鼠胚胎干细胞 D3 细胞系, 取第 3~5 代小鼠原代胚胎成纤维细胞, 加入新配制含丝裂霉素 C 的 DMEM 生长培养基孵育 2.5 h, 使饲养层细胞失去增殖能力; 加入胰酶消化适度, 离心后制成单细胞悬液, 以  $10 \times 10^4/\text{cm}^2$  的密度种至用明胶包被的培养瓶中, 放入孵箱内培养 24 h 之后使用。复苏胚胎干细胞 D3 细胞并将其接种于饲养层细胞之上。在拟胚体培养阶段按培养基成分不同分为 2 组: 对照组(标准培养基+血管内皮生长因子+干细胞因子组)、实验组(标准培养基+血管内皮生长因子+干细胞因子+碱性成纤维细胞生长因子组)。各组于培养 3, 6d 时分别计数克隆形成数, 通过免疫荧光法检测 Flk-1<sup>+</sup> 细胞表达情况, 并用 IMAGE-PRO PLUS 图像分析系统统计阳性细胞数及平均吸光度值。

**结果与结论:** 与对照组比较, 在拟胚体培养阶段加入碱性成纤维细胞生长因子可显著增加集落形成细胞的数量 ( $P < 0.01$ ), Flk-1 阳性细胞数及平均吸光度值也显著增加 ( $P < 0.01$ )。证明碱性成纤维细胞生长因子能够有效地促进胚胎体的扩增以及成血管血液干细胞的产生与增殖。

**关键词:** 拟胚体; 集落形成细胞; 碱性成纤维细胞生长因子; 小鼠胚胎干细胞; 造血干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.14.022

李娜, 石增立, 王跃嗣. 碱性成纤维细胞生长因子对胚胎干细胞来源集落形成细胞的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(14):2579-2582. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

胚胎干细胞来源的集落形成细胞是研究成血管血液干细胞的主要体外模型。成血管血液干细胞是造血干细胞的前体细胞, 具有双潜能性, 是造血干细胞和成血管母细胞的祖细胞。因此其在胚胎造血和血管形成过程中具有

重要作用<sup>[1]</sup>。碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)是一个相对分子质量 18 000~24 000 的多肽, 在体内广泛分布, 许多起源于中胚层及神经外胚层的组织和器官都能大量表达碱性成纤维细胞生长因子<sup>[2]</sup>。有研究表明, 在卵黄囊造血、胎肝造血和在胚胎干细胞向造血干细胞分化过程中, bFGF 可强烈表达<sup>[3]</sup>。本实验在拟胚体培养阶段施加

bFGF, 通过观察相关指标来进一步证明bFGF能够有效促进胚胎体的扩增以及成血管血液干细胞的产生和增殖。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外观察。

**时间及地点:** 于2008-07/2009-10在滨州医学院中心实验室完成。

**材料:** 昆明种属小白鼠由滨州医学院实验动物中心提供, 按雌雄比例2:1合笼。取怀孕13 d小鼠, 用于胚胎成纤维细胞制备。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。小鼠胚胎干细胞D3细胞系购自中国科学院上海生命科学研究所以。

**主要试剂:**

试剂	来源
高糖DMEM培养基、IMDM培养基、胎牛血清	Hyclone公司
L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、β-巯基乙醇、胰蛋白酶	Hyclone公司
0.9%甲基纤维素, 小鼠干细胞因子	PeptoTech公司
小鼠血管内皮生长因子 (VEGF), 小鼠碱性成纤维细胞生长因子	PeptoTech公司
ESGRO	MILLIPORE公司
抗坏血酸, 丝裂霉素C	Sigma公司
小鼠Flk-1多克隆抗体, FITC标记的羊抗小鼠二抗	北京中杉金桥公司

**实验方法:**

**原代小鼠胚胎成纤维细胞制备:** 取怀孕13 d小鼠, 断颈处死, 用无菌剪刀和镊子暴露子宫, 取出整个子宫。胚胎成纤维细胞制备方法参照Ding等<sup>[4]</sup>的方法。

**饲养层细胞制备:** 制备方法参照Nagy等<sup>[5]</sup>方法。取长满的第3~5代小鼠原代胚胎成纤维细胞, 弃去旧培养液, 加入新配制含丝裂霉素C(10 mg/L)的DMEM生长培养基, 孵育2.5 h, 使饲养层细胞失去增殖能力。弃培养液, 用PBS液洗3次, 加入胰酶消化适度, 离心后制成单细胞悬液, 以 $10 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>的密度种至用明胶包被的培养瓶中, 放入孵箱内培养24 h之后即可使用。

**胚胎干细胞支持培养:** 培养方法参照Kurosawa等<sup>[6]</sup>方法。胚胎干细胞从液氮中取出后迅速置于37 °C水浴中解冻, 待完全融化后移入预先加有培养液的离心管中, 离心弃上清, 按一定密度接种于饲养层细胞之上, 放入37 °C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>孵箱中培养。每天换液, 两三天传代一次。所用培养液为高糖DMEM, 体积分数15%胎牛血清, 2 mmol/L谷氨酰胺, 0.1 mmol/L β-巯基乙醇, 非必需氨基酸, 25 mg/L抗坏血酸, 10<sup>6</sup> U/LESGRO。

**胚胎干细胞分化形成拟胚体:** 用0.05%的胰蛋白酶消化胚胎干细胞获得单细胞悬液后, 以 $2.5 \times 10^4$ 个细胞/

60 mm细菌培养皿的密度种入拟胚体培养体系。体系组成: 标准培养基(IMDM、体积分数15%胎牛血清、0.9%甲基纤维素、2 mmol/L谷氨酰胺, 0.1 mmol/L β-巯基乙醇, 非必需氨基酸, 25 mg/L 抗坏血酸), 5 μg/L 血管内皮生长因子、50 μg/L干细胞因子。按培养基成分不同分为2组: 对照组(标准培养基+血管内皮生长因子+干细胞因子组)、实验组(标准培养基+血管内皮生长因子+干细胞因子+2 μg/L bFGF组<sup>[7]</sup>)。培养条件均为37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度。

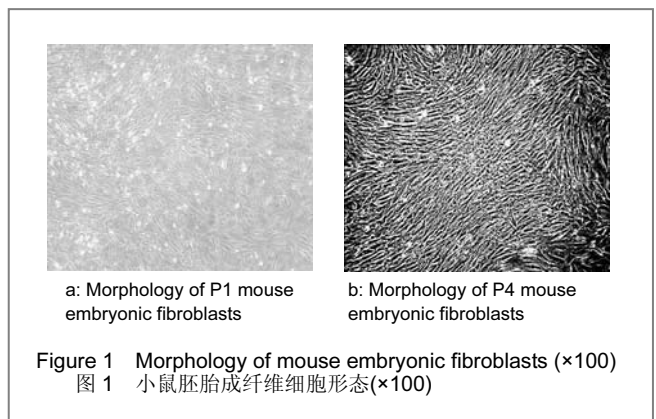
**免疫荧光染色:** 分别于拟胚体培养的第3, 6天吸取各组细胞进行细胞爬片, 用40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS轻轻漂洗3次; 羊血清封闭30 min; 加1:100的羊抗小鼠Flk-1抗体50 μL, 37 °C孵育1h, PBS轻轻漂洗3次; 避光室温下加兔抗羊FITC荧光抗体50 μL, 37 °C孵育1 h, 避光下PBS轻轻漂洗3次, ddH<sub>2</sub>O洗1次; 95%甘油封固; 荧光显微镜下观察并拍摄。

**设计、实施、评估者:** 第一作者实施、第二、三作者评估。

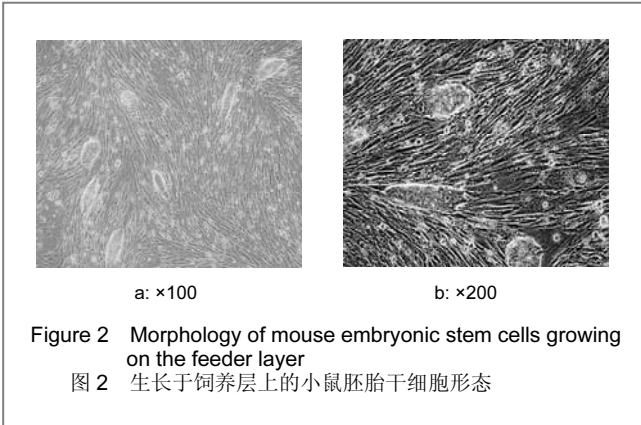
**图像处理与统计学分析:** 采用IMAGE-PRO PLUS图像分析系统对免疫荧光阳性细胞进行测量分析, 结果以阳性细胞数和平均吸光度值(A值)表示。由第一作者采用SPSS12.0统计软件包分析实验结果, 所获数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行方差齐性检验及组间方差分析。

## 2 结果

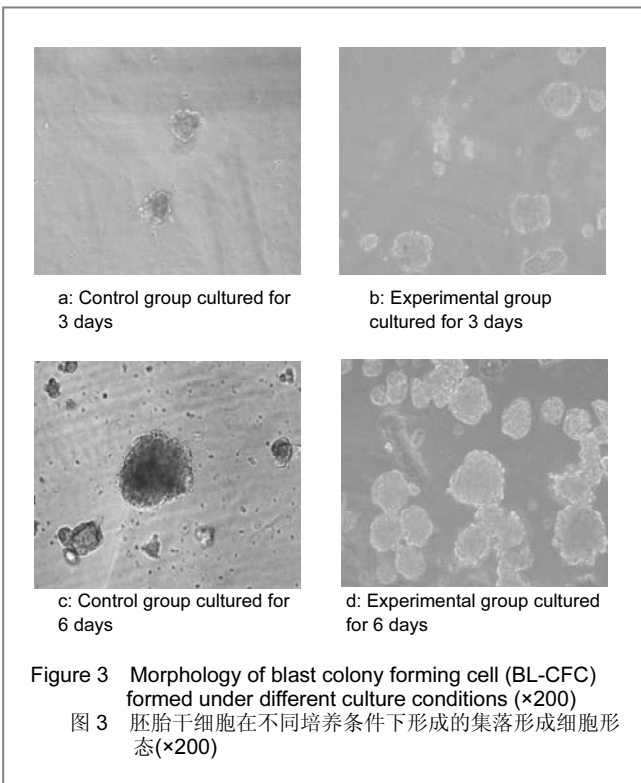
**2.1 小鼠胚胎成纤维细胞的形态观察与培养特点** 原代培养的小鼠胚胎成纤维细胞培养瓶接种后1 h即开始贴壁, 24 h贴壁生长后大部分细胞呈纤维样, 少部分为圆形、不规则形等, 部分细胞悬浮不贴壁。更换培养液去除不贴壁细胞与死细胞, 细胞生长迅速, 2~4 d细胞相互接触布满培养瓶。1:3传代, 随着传代次数的增加, 圆形与不规则形的细胞数量逐渐减少, 第三四代后细胞形态基本呈纤维状, 此时细胞分泌的白血病抑制因子水平最高, 杂细胞数量最少, 最适宜用做制备饲养层。见图1。



**2.2 小鼠胚胎干细胞形态观察** 在原代小鼠胚胎成纤维细胞制备的饲养层上培养的小鼠胚胎干细胞呈未分化状态生长, 镜下呈现明显细胞集落, 突起状生长, 克隆边缘清晰, 折光性强, 细胞小, 排列紧密, 界限清楚。见图2。



**2.3 集落形成细胞形态观察** 见图3, 4。



拟胚体培养阶段添加bFGF可增加集落形成细胞的形成数量, 分别于3, 6 d用倒置荧光显微镜观察, 可见与对照组相比, bFGF处理组克隆数目以及Fik-1阳性细胞比例显著增加。

采用IMAGE-PRO PLUS图像分析系统对免疫荧光阳性细胞进行测量分析, 结果显示与对照组相比 FIK-1阳性细胞数及平均吸光度值均有显著增加, 见图5, 表1。

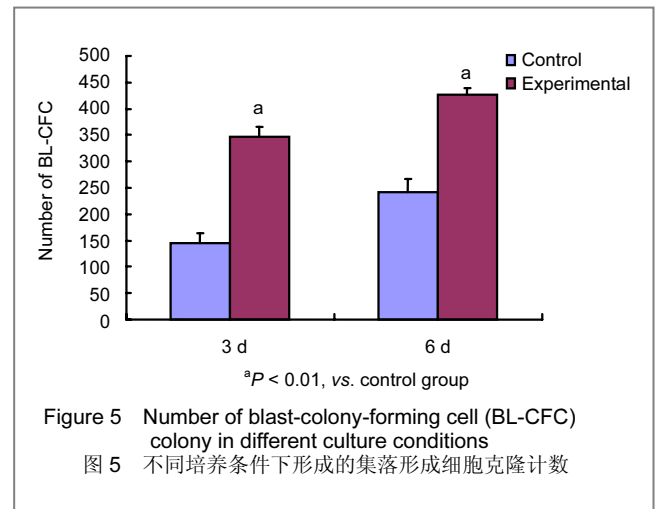
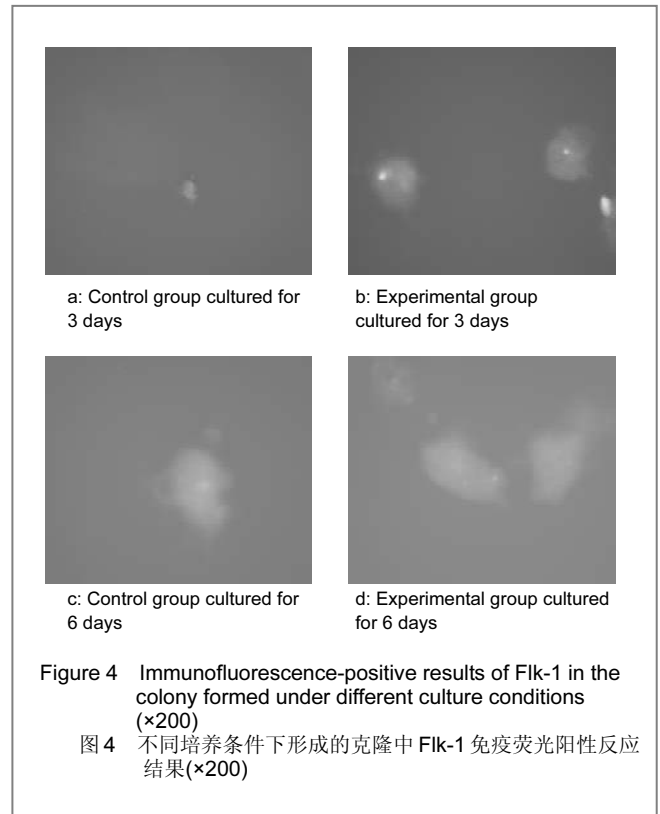


表1 不同培养条件下形成的克隆中 Fik-1 免疫荧光反应结果  
Table 1 Immunofluorescence results of Fik-1 in the colony formed under different culture conditions (x±s)

Group	3 d		6 d	
	Positive number	Absorbance	Positive number	Absorbance
Control	104.00±1.63	1.240±0.050	234.33±6.79	1.280±0.020
Experimental	134.33±2.05 <sup>a</sup>	1.350±0.004 <sup>a</sup>	276.67±1.15 <sup>a</sup>	1.390±0.005 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.01, vs. control group

### 3 讨论

成血管血液干细胞在胚胎造血和血管形成过程中具有重要作用<sup>[7]</sup>。最新研究证实, 成血管血液干细胞的发育起始了胚胎干细胞的造血分化<sup>[8]</sup>。而且研究证实, 成血管血液干细胞是连接原始造血和永久造血的一个中间关键环节<sup>[9]</sup>。Yao等<sup>[10]</sup>在AGM区发现具有成血管血液干细胞特性的高扩增潜能的细胞群体, 是永久造血的前体细胞。胚胎干细胞可在体外高效分化产生三维的分化细胞团, 称之为胚胎体。在胚胎体内造血细胞和内皮细胞发育可模拟类似体内事件如包含有血管网络的卵黄囊血岛, 其内含有造血细胞<sup>[11]</sup>。胚胎干细胞分化2.5~3.5 d形成一个独特的细胞群—暴式集落形成细胞。在暴式集落中细胞表达共同的造血和内皮细胞几个基因, 如SCL, CD34和Flk-1等<sup>[12]</sup>。另外, 暴式细胞可产生原始的和永久的造血细胞以及内皮细胞。基于上述研究, 胚胎干细胞来源的集落形成细胞被认为可以代表成血管血液干细胞。Ema等<sup>[13]</sup>的试验证实胚胎干细胞分化过程中在血管内皮生长因子作用下, 集落形成细胞形成暴式集落, 集落细胞表达受体Flk-1基因, Flk-1被显著上调, 表达Flk-1的细胞可分化形成造血细胞和内皮细胞。因此表明Flk-1是成血管血液干细胞/集落形成细胞的标志。

bFGF在体内分布广泛, 生物学行为具有多效性<sup>[14]</sup>。具有很强的促细胞分裂增殖活性<sup>[15]</sup>。bFGF通过与靶细胞上的受体结合而发生作用, 因此细胞内合成的bFGF需分泌至细胞外才能发挥生物学作用, 但bFGF的mRNA翻译产物缺少引导它们向细胞外分泌的信号序列, 其分泌途径与经典途径不同, 除了可能是细胞受损或死亡后释出, 还有自分泌和旁分泌起作用。

本实验在拟胚体培养阶段施加bFGF进行培养, 分别于3, 6 d计数克隆形成数, 通过免疫荧光法检测Flk-1<sup>+</sup>细胞表达情况, 并用IMAGE-PRO PLUS图像分析系统统计阳性细胞数及平均吸光度值, 结果显示拟胚体培养阶段添加bFGF可增加集落形成细胞的形成数量, Flk-1阳性细胞数及平均吸光度值均有显著增加, 由此证明bFGF能够有效地促进胚胎体的扩增以及成血管血液干细胞的产生和增殖。但是目前bFGF还尚未清楚, 需要通过进一步研究来明确其发挥作用的相关途径, 如Wnt通路、Shh通路、Notch通路等。从而为优化胚胎干细胞向造血干细胞分化的试剂体系, 提高分化效率, 高效获得造血干细胞提供了理论依据。

### 4 参考文献

[1] Choi K, Kennedy M, Kazarov A, et al. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 1998;125(4):725-732.

[2] Faloon P, Arentson E, Kazarov A, et al. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development*. 2000; 127:1931-1941.

[3] Wang YS, Li JY, Jin SH, et al. *Zhonghua Xueyexue Zazhi*. 2008; 29(8): 535-539.  
王跃嗣, 李建远, 靳韶华, 等. 碱性成纤维细胞生长因子在胚胎卵黄囊造血过程中的表达[J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29(8): 535-539.

[4] Ding L, Liang XG, Lou YJ, et al. Time-dependence of cardiomyocyte differentiation disturbed by peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibitor GW6471 in murine embryonic stem cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(5):634-642.

[5] Nagy A, Rossant J, Nagy R, et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(18):8424-8428.

[6] Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Biosci Bioeng*. 2007;103(5): 389-398.

[7] Yao HY, Liu B, Yuan Y, et al. *Zhongguo Shiyao Xueyexue Zazhi*. 2003;11(4):345-349.  
要晖宇, 刘兵, 原野, 等. 胚胎干细胞来源的BL-CFC可产生高增殖潜能造血祖细胞[J]. *中国实验血液学杂志*, 2003, 11(4):345-349.

[8] Kennedy M, Souza SL, Lynch-Kattman M, et al. Development of hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood*. 2007;109(7):2679-2687.

[9] Tober J, Koniski A, McGrath KE, et al. The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood*. 2007; 109(4):1433-1441.

[10] Yao H, Liu B, Wang X, et al. Identification of high proliferative potential precursor with hemangioblastic activity in the mouse Aorta-Gonad-Mesonephros region. *Stem Cells*. 2007;25(6):1423-1430.

[11] Weitzer G. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies: an in vitro model of eutherian pregastrulation development and early gastrulation. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;174: 21-51.

[12] Patterson LJ, Gering M, Eckfeldt CE, et al. The transcription factors *Scf* and *Lmo2* act together during development of the hemangioblast in zebrafish. *Blood*. 2007; 109(6):2389-2398.

[13] Ema M, Faloon P, Zhang WJ, et al. Combinatorial effects of Flk-1 and Tall on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev*. 2003; 17(3):380-393.

[14] Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor 2. *Int J Biochem Biol*. 2002;32(2): 115-124.

[15] Fei Y, Xiao L, Hurley MM. Fibroblast growth factor 2 positively regulates expression of activating transcription factor 4 in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):335-339.

#### 来自本文课题的更多信息一

**基金资助:** 国家自然科学基金资助项目(30801353)。

**利益冲突:** 无利益冲突。

**课题的意义:** 有研究表明, 在卵黄囊造血、胎肝造血和在胚胎干细胞向造血干细胞分化过程中, 碱性成纤维细胞生长因子可强烈表达。本实验在拟胚体培养阶段施加碱性成纤维细胞生长因子, 验证碱性成纤维细胞生长因子对集落形成细胞产生的调控作用, 为优化优化胚胎干细胞向造血干细胞分化的试剂体系提供初步依据。

**课题评估的“金标准”:** Flk-1 是成血管血液干细胞的特异性标志。

**课题的偏倚与不足:** 胚胎干细胞的研究需要投入大量的资金, 细胞株、相关的培养基、细胞因子、抗体等都比较昂贵, 所以实验未设计碱性成纤维细胞生长因子的浓度梯度, 摸索一下碱性成纤维细胞生长因子的最佳浓度, 而是直接采用了相关文献中的碱性成纤维细胞生长因子用量。

**提供临床借鉴的价值:** 如果课题能预期获得碱性成纤维细胞生长因子在血细胞形成过程中的动力学变化, 加强成血管血液干细胞的发育分化研究, 将有利于优化胚胎干细胞向造血干细胞分化的试剂体系, 提高分化效率, 高效获得造血干细胞, 更有利于提高造血干细胞的临床应用价值, 同时将为干细胞治疗白血病等恶性血液病开拓新思路 and 提供理论依据。