

# 人胚胎干细胞在无血清mTeSR®1培养基中维持培养和向内皮细胞的诱导分化★

李向东, 王纪文, 魏国峰

## Human embryonic stem cells maintained and cultured in serum-free medium mTeSR®1 and induced into endothelial cells differentiation

Li Xiang-dong, Wang Ji-wen, Wei Guo-feng

### Abstract

**BACKGROUND:** Containing fetal bovine serum medium is used in the traditional culture and amplification method of human embryonic stem cells (hESCs), and this method relies on feeder layer cell culture and significantly limits culture formula of stem cells *in vitro*. In addition, the intervention of heterologous serum components significantly increases pathogen contamination and the probability of immune rejection.

**OBJECTIVE:** To elucidate the feasibility of serum-free medium mTeSR®1 on the hESCs long term cultured *in vitro* and to establish a platform of induced hESC differentiate into endothelial cells.

**METHODS:** Serum-free medium mTeSR®1 was applied to culture *in vitro* and amplify hESCs line H9 by non-feeder layer cell dependent. After more than 40 times passage *in vitro*, the growth morphology of hESCs was observed by inverted microscope, and their phenotype was evaluated by immunofluorescence staining method. Moreover, a conditioned medium was utilized to induce hESCs line H9 to differentiate into endothelial cells. The phenotype and function of ESC-derived endothelial cells were assayed by immunofluorescence staining, quantitative RT-PCR, and low-density lipoprotein (LDL) uptaking experiment.

**RESULTS AND CONCLUSION:** mTeSR®1 medium can support hESCs line H9 long term amplification *in vitro* by non-feeder layer cell dependent and maintain its potential of undifferentiated stem cells. When the hESCs were cultivated under a conditioned medium with vascular endothelial cell supplementation, the cells were induced differentiation into H9 endothelial-like cells. These cells not only one of important surface markers of endothelial cells (*kdr*, *pecam*) and expressed CD31, but also uptake LDL, formed vascular-like structure during the differentiation. The system of culture and induced differentiation experiment provided can support the proliferation and differentiation behavior of ESCs.

Li XD, Wang JW, Wei GF. Human embryonic stem cells maintained and cultured in serum-free medium mTeSR®1 and induced into endothelial cells differentiation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(10): 1827-1831. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 传统的人胚胎干细胞培养扩增方法中应用含动物血清培养基, 并依赖饲养层细胞培养, 这种培养方法显著制约了干细胞的体外培养规模; 另外异源动物血清成分介入, 使病原污染及免疫排斥的概率显著增加。

**目的:** 明确应用无血清培养基 mTeSR®1 对人胚胎干细胞进行长期体外培养的可行性, 并建立诱导人胚胎干细胞分化为血管内皮细胞的相关技术平台。

**方法:** 采用无血清培养基 mTeSR®1 以非饲养层细胞依赖的方式体外培养、扩增人胚胎干细胞株 H9。经过 40 余次体外传代后, 于倒置显微镜下观察其生长形态, 并利用免疫荧光染色方法评估其细胞表型。此外, 应用条件培养基诱导 H9 细胞株向内皮细胞方向分化。利用免疫荧光染色技术, 定量 RT-PCR 以及低密度脂蛋白摄取实验对该胚胎干细胞源内皮细胞的表型及功能进行评价、分析。

**结果与结论:** mTeSR®1 培养基能够支持 H9 细胞株在体外以非饲养层依赖的方式进行长期扩增, 同时维持其未分化的干细胞潜能。添加血管内皮细胞的培养条件培养基能够定向诱导 H9 细胞向内皮细胞方向分化。该胚胎干细胞源内皮细胞不但表达内皮细胞的标志基因(*kdr*, *pecam*)和标记蛋白 CD31, 而且还能够摄取低密度脂蛋白, 形成类似微血管结构。提示实验中所提供的培养及诱导分化体系能够支持胚胎干细胞的增殖与分化行为。

**关键词:** 无血清培养基; 胚胎干细胞; 内皮细胞; 分化; 血管内皮生长因子

doi: 10.3969/j.issn.1673-8225.2011.10.025

李向东, 王纪文, 魏国峰. 人胚胎干细胞在无血清 mTeSR®1 培养基中维持培养和向内皮细胞的诱导分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10):1827-1831. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province, China

Li Xiang-dong★  
Master, Associate chief physician, Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province, China  
dodo58782002@yahoo.com.cn

Correspondence to:  
Wei Guo-feng,  
Master, Chief physician, Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province, China  
Guofeng1204@yahoo.com.cn

Received: 2010-10-23  
Accepted: 2011-02-14

大连医科大学附属第二医院心血管内科, 辽宁省大连市 116023

李向东★, 男, 1969年生, 辽宁省宽甸县人, 汉族, 1993年大连医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事心血管方面的研究。dodo58782002@yahoo.com.cn

通讯作者: 魏国峰, 硕士, 主任医师, 大连医科大学附属第二医院心血管内科, 辽宁省大连市 116023 guofeng1204@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2011)10-01827-05

收稿日期: 2010-10-23  
修回日期: 2010-02-14  
(20101023005/WL · L)

## 0 引言

胚胎干细胞是一类兼具有自我更新及全向分化潜能的特定细胞群, 即在合适的体内或体外条件下, 能够分化为内、中、外3个胚层来源的前体或终末细胞。人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)的成功体外分离与建系, 使得近年来有关胚胎干细胞诱导分化的研究日益成为生命科学领域, 尤其是医学组织工程研究中的关注热点<sup>[1-3]</sup>。目前, 有关胚胎干细胞的主要研究内容之一就是: 如何对胚胎干细胞进行体外诱导和人工操作以最大限度获取具有理想表型的胚胎干细胞源种子细胞, 最终应用于: ①组织损伤性疾病的细胞替代治疗。②疾病发育模型的体外构建<sup>[4-5]</sup>。

血管组织工程技术作为组织工程研究领域的重要分支, 目前已经成为血管损伤性疾病的替代治疗以及组织器官体外重建相关研究中颇具前景优势的理想技术手段<sup>[6-7]</sup>。但由于原代内皮细胞来源有限, 分离复杂且体外增殖能力相对低下, 使得“种子细胞”这一要素问题仍成为制约血管组织工程技术的重要“瓶颈”<sup>[8-9]</sup>。2002年, Levenberg等<sup>[10]</sup>首次报道hESCs能够自发性分化为血管内皮细胞的相关结果, 该研究不但促进了胚胎干细胞源血管内皮细胞(或内皮前体细胞)诱导分化、分离鉴定的相关研究, 而且也为血管组织工程提供了来源充足, 表型理想的“种子细胞”。但值得指出的是, 目前有关胚胎干细胞源血管内皮细胞的研究性报道中, 大多数仍采用经饲养层细胞扩增的hESCs, 并且在培养基中添加动物血清以维持hESCs的未分化表型, 然后选用条件培养基进行诱导分化<sup>[11-13]</sup>。很显然, 这些异源细胞以及血清的掺入将会对下游移植应用性研究产生严重的制约。实验尝试应用无血清培养基(mTeSR®1)对hESCs进行饲养层细胞非依赖性的体外扩增, 并利用含有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的条件培养基对hESCs进行体外诱导分化, 以期获取具有更为理想形态结构和功能的胚胎干细胞来源内皮细胞以应用于后期临床移植应用, 同时为实验室研究工作建立相关的技术平台。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞形态学观察实验。

**时间及地点:** 实验于2008-09/2009-04在大连医科大学附属二院中心实验室完成。

**材料:**

**主要试剂及仪器:**

细胞、试剂及仪器	来源
人胚胎干细胞系 H9, 38~42 代 mTeSR®1 培养基	WiCell Research Center Stem Cell Technologies, USA
DEMEM-F12 培养基、内皮细胞生长培养基(endothelial growth medium-2, ECM-2)、VEGF、Dil-Ac-低密度脂蛋白(Dil-Ac-LDL)	Invitrogen
Matrigel、Alexa Fluor647-CD31	BD Biosciences
2%明胶溶液	Sigma
抗体抗 oct-3/4、抗 nanog(鼠抗人)	R&D systems
RNA 提取试剂盒	QIAGEN
real time RT-PCR 试剂盒	Applied Biosystems
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱(VWR)、ABI Prism 7000 Real-time PCR 仪(Applied Biosystems)	USA
体视显微镜(Leica EZ4 D)、激光共聚焦显微镜(Leica SP2)	Germany
OLYMPUS 相差显微镜(BX51)	Japan

**实验方法:**

**hESCs的体外培养:** 复苏H9细胞(含饲养层细胞)接种于经Matrigel包被的6孔细胞培养板, 加入无血清mTeSR®1培养基(2 mL/孔)维持培养。为保持其理想的未分化状态, 采用dispase酶(1 g/L)机械方法按照1:4比率进行传代。初始的饲养层细胞(来自于原冻存细胞)在传代过程中数目逐渐少, 在3~5次传代后完全消失, 从而转变为无饲养层细胞培养模式。培养过程中每天观察细胞的形态及生长情况, 每天更换培养基, 并在体视显微镜下及时去除发生分化的细胞集落。

**hESCs诱导分化为内皮细胞:** 应用低贴附培养皿经悬浮培养方法制备拟胚体。具体而言, H9细胞经1 g/L dispase孵育后制备细胞团悬液, 置于低贴附培养皿内经悬浮培养24 h后大体可见大小均一的拟胚体形成。继续悬浮培养5 d后, 拟胚体转入贴壁培养阶段。期间均采用含有50 µg/L VEGF的条件诱导培养基ECM-2, 隔日更换培养基。该诱导培养基需新鲜配制, 以确保生长因子的最佳活性。将拟胚体分别接种至经0.1%明胶包被的细胞培养板或细胞培养盖玻片上, 待细胞充分贴壁后添加适量培养基, 继续培养至15 d, 期间隔日换液。定期观察细胞生长及分化情况。

**免疫组织化学技术鉴定细胞表型:** 收集细胞样品(未分化H9细胞及经诱导分化的细胞), 经PBS清洗后, 体积分数为90%乙醇固定1.0~2.0 h。PBS清洗后, 在依次经0.1%Triton X-100和3%BSA处理(各15~20 min), 分别与相应抗体于4 °C条件下孵育过夜: SSEA-4 (1 : 80), Oct-4(1 : 80), Alexa Fluor647-CD31 (1 : 100)。PBS清洗后, 继续与相应二抗IgG-FITC或IgG-TRITC于室温下孵育2 h(Alexa Fluor647-CD31毋需与二抗孵育, 可直接进行观察检测)。最后, 经DAPI复染细胞核后清洗、封固, 并在激光共聚焦显微镜下观察、拍照。

**Dil-Ac-LDL摄取实验:** H9细胞经诱导分化至15 d后, 吸弃培养孔内培养基, 加入含10 mg/L Dil-Ac-LDL的新鲜培养基, 37 °C孵育4 h后再次吸弃该培养基, 经PBS洗涤后, 以体积分数为4%甲醛溶液于室温下固定30 min, PBS再次洗涤后直接置于激光共聚焦显微镜下检测分化细胞的摄取情况。

**Real time RT-PCR检测内皮细胞基因的表达:** 收集细胞样品, Trizol裂解细胞后直接进行总RNA的提取, 具体操作参照Trizol试剂说明书, 终样品测定 $A_{260/280}$ 确定RNA质量。RT反应总体积20  $\mu$ L, RNA样品各1  $\mu$ g, 反应条件为: 42 °C 2 h, 99 °C 5 min, 终产物cDNA于-70 °C保存。PCR反应总体积50  $\mu$ L, 引物探针为: *kdr* (Hs00911700), *pecam* (Hs00169777), *gapdh* (Hs99999905, Applied Biosystems), 其中*gapdh*基因作为参照基因。自发性分化组(无VEGF添加, 仅应用常规细胞生长培养基)设为对照组。应用ABI Prism 7000检测系统及相应软件对RT-PCR产物进行分析。

## 2 结果

**2.1 hESCs在无血清培养条件下的形态观察** 在无血清、非饲养层细胞培养条件下, hESCs经过多次传代后(> 40代), 展示其正常的形态特征, 即细胞集落形状规则, 中央部位因多层细胞堆积而略显隆起, 边缘整洁清晰, 见图1。

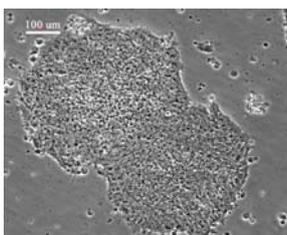
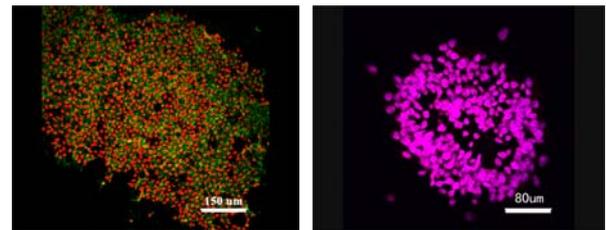


Figure 1 The growth morphology of H9 cells cultured with mTeSR@1 medium (Inverted microscope,  $\times 100$ )  
图1 H9细胞在 mTeSR@1 培养基中的生长形态(倒置显微镜,  $\times 100$ )

单个细胞核质比较大, 说明这些细胞尚处于相对幼

稚的发育阶段, 生长状态佳。该条件下, hESCs每经过五六天扩增后需要进行常规传代, 该特征与传统培养条件下(含有FBS及饲养层细胞)hESCs的特征相一致。

**2.2 hESCs未分化细胞表型的鉴定** 免疫荧光染色结果显示: 经扩增的hESCs集落内细胞均能够高水平表达未分化干细胞标记蛋白SSEA-4, Oct-4, 见图2。说明该培养条件不但能够促进hESCs的体外扩增, 而且还有利于其维持自身未分化的细胞表型。因此, 在该培养条件下, hESCs仍拥有理想的多向分化干细胞潜能, 可应用于下游有关内皮细胞诱导分化的研究。



a: SSEA-4, green, PI-stained nuclei b: Oct-4, red, DAPI-stained nuclei

Figure 2 The detection of embryonic stem cells undifferentiated cells phenotype could express undifferentiated marker proteins

图2 hESCs未分化细胞表型检测, 均能够表达未分化标记蛋白

### 2.3 胚胎干细胞源内皮细胞的鉴定

**免疫组织化学的鉴定:** 经条件培养基分化诱导后, 部分分化细胞在免疫荧光染色检测中显示出抗CD31染色(+), 且表达部位集中于细胞膜。该表达方式与表达水平与阳性对照组(原代人血管内皮细胞)相类似, 说明该阳性染色细胞即为经由体外诱导分化所获得的hESCs源内皮细胞, 见图3。但值得指出的是, 这些CD31(+)阳性细胞不同于平面贴壁培养的原代内皮细胞, 后者展示出典型的平面鹅卵石形态特征, 而前者则能够充分的伸展、彼此连接, 从而形成类微血管结构。

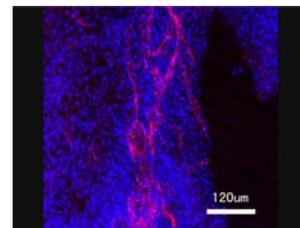


Figure 3 CD31-positive staining of human embryonic stem cells-derived endothelial cells assayed by immunohistochemistry

图3 免疫组织化学鉴定 hESC 源内皮细胞 CD31 阳性染色

**Dil-Ac-LDL摄取活性:** LDL摄取实验是对内皮细胞功能活性进行鉴定和评估的重要指标。hESCs经诱导分化后, 其中的部分细胞能够主动摄取被荧光标记的LDL(Dil-Ac-LDL), 细胞质内呈现若干红色颗粒, 见图4。

该结果进一步证明这些细胞具有与内皮细胞相似的生物学功能活性。

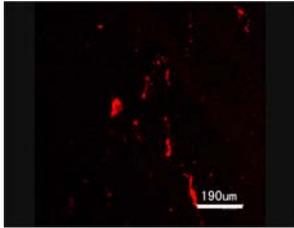


Figure 4 Uptaking of Dil-Ac-LDL (red) by induction and differentiation of human embryonic stem cells-derived

图4 hESCs 经诱导分化后, 部分细胞能够摄取 Dil-Ac-LDL

**Real time RT-PCR检测基因表达:** Real time RT-PCR 的检测结果见图5, 经过15 d的体外诱导, 逐渐走向分化的hESCs能够表达内皮细胞标志基因 *kdr* 和 *pecam*, 同时丧失了未分化标志基因 *oct-3/4* 在mRNA水平的表达。与自发性分化组相比较, 诱导组的内皮细胞标志基因表达水平显著提高, 表明含有VEGF的条件培养基能够促进hESCs向内皮细胞的定向分化。

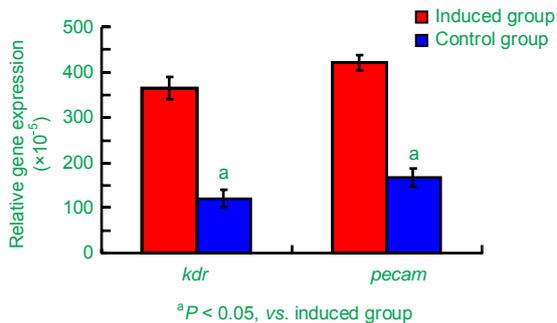


Figure 5 The *kdr* and *pecam* gene expression of human embryonic stem cells-derived endothelial cells

图5 hESC 源内皮细胞 *kdr* 及 *pecam* 基因表达水平

### 3 讨论

胚胎干细胞因其自身所具有的无限自我更新能力以及多向分化的潜能而成为现代发育生物学和干细胞组织工程领域研究的核心问题之一<sup>[1-2]</sup>。目前有关hESCs的研究均集中在以下两个方面: ①如何实现hESCs的批量体外扩增以解决供体细胞的数量问题。②如何实现hESCs的高效、定向分化以满足其临床应用中对于细胞质量的要求。而有关hESCs的体外扩增问题, 目前传统的培养方法即是: 以小鼠来源的胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) 作为饲养层细胞, 利用含动物血清培养基, 通过共培养的方式来实现hESCs的体外传代<sup>[1]</sup>。需要指出的是: 虽然当前该方法已经被广泛应用并被证明能够维持干细胞的表型和潜

能, 但是这种依赖饲养层细胞的培养方式将会显著制约干细胞的体外培养规模, 无法实现“批量”扩增, 从而也无法满足下游组织工程研究对于细胞数量的要求。更为重要的是, 异源动物细胞及血清成分的介入, 使得病原污染、免疫排斥的概率也显著增加。新近的研究证明: 经由传统方法所扩增的hESCs能够摄取并表达一种特殊的唾液酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)<sup>[14]</sup>。而该种唾液酸在人体组织细胞内并没有表达, 所以一旦将上述来源的干细胞或相应的经诱导分化的靶细胞应用于移植治疗, 接受该移植物的个体必将会产生强烈的免疫排斥反应。由此可见, 若将胚胎干细胞真正应用于临床替代治疗, 必须对当前的传统培养方式进行改进和优化。建立一种非饲养层细胞依赖、无动物血清添加的优化培养方法——将有可能解决干细胞研究与应用中有关胚胎干细胞规模化扩增的“瓶颈”问题。

实验采用无动物血清的mTeSR®1培养基, 以不依赖饲养层细胞的方式对hESCs进行体外扩增。实际上, 作为一种商品化的培养基, mTeSR®1已在国外相关实验室应用以支持干细胞以feeder-free, serum-free的方式生长<sup>[15-18]</sup>。但在国内尚无相关报道。此外, 对于该种培养方法, 目前国际上尚无有关长期体外传代后对其干细胞表型及分化潜能影响的研究性报道。实验应用mTeSR®1培养基对H9细胞进行长期的体外传代(> 40代)和扩增, 并对细胞的未分化表型及分化潜能进行检测。结果表明: 经过40余代的体外扩增, hESCs不但显示出正常的生长速度和形态学特征, 而且能够高水平表达未分化标记蛋白SSEA-4和Oct-4。这表明该细胞所特有的未分化表型并未发生改变, 从而也证明了该培养条件有利于hESCs在体外长期培养的过程中维持其自身的干细胞潜能。

接下来, 实验还进一步对该扩增细胞的体外分化能力进行了检测。基于题目组有关血管组织工程的研究方向, 以干细胞源内皮细胞作为模型分化体系, 采用添加VEGF的条件培养基对hESCs进行体外诱导。结合细胞生长、相应的形态学、real time RT-PCR以及细胞功能检测结果得知: 在该诱导条件下, hESCs具有向多胚层分化的能力, 其中部分细胞不但能够表达内皮细胞的标志基因(*kdr*, *pecam*)和标记蛋白CD31, 而且还具有成熟内皮细胞的功能, 即主动摄取低密度脂蛋白。此外, CLSM图像还提示: 这些ES源内皮细胞还能够彼此建立细胞连接, 从而促进其组织化发育, 形成类似微血管的形态结构。由此可见, 该培养及诱导分化体系不但能支持胚胎干细胞的增殖与分化行为, 而且还利于分化细胞向组织化及功能化方面发育, 这将在很大程度上改进干细胞源目的细胞的“质量”参数。

需要指出的是, 虽然hESCs分化为血管内皮细胞的潜能已经被越来越多的研究工作所证实, 有关的诱导分

化方法也不断的在更新, 但有关诱导定向分化过程中所涉及的细胞因子以及细胞外基质微环境条件以及相应的作用机制仍有待于进一步阐明<sup>[19-20]</sup>。此外, 若将 hESCs 真正应用于临床治疗, 仍迫切需要建立有效的分离和分化方法, 以提供高纯度、高活性、高质量的 hESC 源目的细胞作为供体细胞。这些都意味着有关干细胞的应用性研究将是一项长期却充满挑战的课题, 需要多个学科、多位研究者的共同探索与努力。

#### 4 参考文献

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
- [2] Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cells lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged period of culture. *Dev Biol*. 2000;227(2):271-278.
- [3] Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*. 2003;131(7):1651-1662.
- [4] Wobus AM, Kaomei G, Shan J, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(6):1525-1539.
- [5] Kahan BW, Jacobson LM, Hullett DA, et al. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: An in vitro model to study islet differentiation. *Diabetes*. 2003; 52(8):2016-2024.
- [6] Kusuma S, Gerecht S. Engineering blood vessels using stem cells: innovative approaches to treat vascular disorders. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8(10):1433-1445.
- [7] Sun G, Gerecht S. Vascular regeneration: engineering the stem cell microenvironment. *Regen Med*. 2009;4(3):435-447.
- [8] Lan ZY, Xiong M. *Zhongguo Meirong Yixue*. 2009;18(9):1382-1385.  
兰志勇,熊猛.血管组织工程中内皮种子细胞的干细胞来源研究进展[J].中国美容医学,2009,18(9):1382-1385.
- [9] Bai H, Wang ZZ. Directing human embryonic stem cells to generate vascular progenitor cells. *Gene Ther*. 2008;15(2):89-95.
- [10] Levenberg S, Golub JS, Amit M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4391-4396.
- [11] Lu SJ, Feng Q, Caballero S, et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat Methods*. 2007;4(6):501-509.
- [12] Goldman O, Feraud O, Boyer-Di Ponio J, et al. A boost of BMP4 accelerates the commitment of human embryonic stem cells to the endothelial lineage. *Stem Cells*. 2009;27(8):1750-1759.
- [13] Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, et al. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(1):80-89.
- [14] Martin MJ, Muotri A, Gage F, et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*. 2005; 11(2):228-232.
- [15] Ludwig TA, Thomson J. Defined feeder-independent medium for human embryonic stem cell culture. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2007;Chapter 1:Unit 1C.2.
- [16] Lei T, Jacob S, Ajil-Zaraa I, et al. Xeno-free derivation and culture of human embryonic stem cells: current status, problems and challenges. *Cell Res*. 2007;17(8):682-688.
- [17] Skottman H, Narkilahti S, Hovatta O. Challenges and approaches to the culture of pluripotent human embryonic stem cells. *Regen Med*. 2007;2(3):265-273.
- [18] Amit M, Shariki C, Margulets V, et al. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod*. 2004;70(3):837-845.
- [19] Park SW, Koh YJ, Jeon J, et al. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into functional CD34+ progenitor cells by combined modulation of MEK/ERK and BMP4 signaling pathways. *Blood*. 2010;[Epub ahead of print]
- [20] Levenberg S, Ferreira LS, Chen-Konak L, et al. Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Protoc*. 2010;5(6):1115-1126.

#### 来自本文课题的更多信息--

**作者贡献:** 实验设计, 实验实施, 实验评估, 资料收集均由第一作者完成, 成文, 审校由第二作者完成并对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验没有与相关伦理道德冲突的内容。

**本文创新性:** mTeSR@1 已在国外相关实验室应用以支持干细胞以无血清无饲养层的方式生长, 但在国内尚无相关报道。实验采用无动物血清的 mTeSR@1 培养基, 以不依赖饲养层细胞的方式对人胚胎干细胞进行体外扩增, 结果显示该培养及诱导分化体系不但能支持胚胎干细胞的增殖与分化行为, 而且还利于分化细胞向组织化及功能化方面发育。



### CRTER 杂志关注“脂肪干细胞”研究热点②: 本刊学术部

- 脂肪干细胞经低浓度骨形成蛋白2或骨形成蛋白7短期诱导后软骨及骨基因的表达
- 海绵状 I 型胶原蛋白与兔脂肪干细胞的生物相容性
- 脂肪干细胞与软骨细胞的共培养
- 腺病毒介导骨形态蛋白9基因转染兔脂肪干细胞
- 软骨形态发生蛋白1诱导仔鼠脂肪干细胞裸鼠体内软骨的分化
- 大鼠脂肪干细胞与细菌纤维素膜的复合培养
- 兔软骨基质支架与脂肪干细胞的生物相容性
- 降钙素基因相关肽诱导脂肪干细胞向成骨细胞的分化
- 兔不同部位脂肪干细胞体外培养的生物特性比较
- 脂肪干细胞和骨髓单个核细胞自体移植治疗心肌梗死作用的比较
- 兔脂肪干细胞的体外分离培养特性
- 自体脂肪干细胞移植脑冻伤大鼠脑内的作用
- 体外分离培养人皮下脂肪干细胞的生物学特性及影响因素
- 兔自体脂肪干细胞成骨诱导后经皮注射修复骨缺损
- 腺病毒介导人骨形态发生蛋白2基因在兔脂肪干细胞的表达与成骨分化效应
- 脂肪干细胞与骨髓间充质干细胞心肌分化特性的比较
- 人脂肪干细胞体外培养特性及成脂成软骨分化