# CF-1小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的制备***

卢 海[1]，张 志[2]，赵毅超[1]，饶小惠[1]，江金群[2]，孟 镔[3]，艾 民[4]，潘明新[1]，高 毅[1]

## Preparation of CF-1 mouse embryonic fibroblast feeder layers

Lu Hai[1], Zhang Zhi[1], Zhao Yi-chao[1], Rao Xiao-hui[1],Jiang Jin-qun[2], Meng Bin[3], Ai Min[4], Pan Ming-xin[1], Gao Yi[1]

**Abstract**

**BACKGROUND:** Mouse embryo fibroblasts as the feeder layer for growth of stem cells exhibit better effects than the circumstance without feeder layer because they can secrete some factors which can promote the growth of stem cells and inhibit the differentiation of stem cells.
**OBJECTIVE:** To establish the optimal method for isolation and culture of CF-1 mouse embryo fibroblast feeder layer and investigate the optimal concentration of mitomycin C in inhibiting the proliferation of fibroblasts and the processing time.
**METHODS:** Fetal mice were taken from CF-1 mice at pregnancy days 10–15. Primary fibroblasts were isolated and treated with different concentrations (5, 10, 15, 20 mg/L) of mitomycin C for different time periods (1, 1.5, 2, 2.5, 3 hours) to prepare feeder layers. Cell proliferation was observed. Human induced pluripotent stem cells or embryonic stem cells were cultured on mitomycin C-treated feeder layer and the growth of cell colonies was observed.
**RESULTS AND CONCLUSION:** The optimal fetal age for preparing CF-1 mouse embryo fibroblast feeder layer was 13.0–14.0 days. Treatment with 10 mg mitomycin C for 2.5 hours showed optimal effects on inhibiting the proliferation of CF-1 mouse embryo fibroblasts and fibroblast feeder layer could maintain 5–7 days. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells can develop into typical “bird nest”-shaped colony of stem cells after treatment with 10 mg/L mitomycin C for 2.5 hours.

Lu H, Zhang Z, Zhao YC, Rao XH, Jiang JQ, Meng B, Ai M, Pan MX, Gao Y. Preparation of CF-1 mouse embryonic fibroblast feeder layers.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(10): 1786-1790. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

[1]Second Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China; [2]Anhui Bangbu Medical College, Bangbu 233030, Anhui Province, China; [3]Medical College of Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui Province, China; [4]the 305 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100017, China

Lu Hai, Studying for master’s degree, Physician, Second Department of Hepatobiliary Surgery, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China
hysa1985@yahoo.com.cn

Corresponding author: Gao Yi, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Second Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China
gaoyi6146@163.com

Supported by; the Science Research Program of Military Medicine and Hygiene, No.08Z017*; National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program), No.2006AA02A141*

Received: 2011-12-16
Accepted: 2012-01-22

**摘要**

**背景：**小鼠胚胎成纤维细胞作为干细胞生长用饲养层，优于无饲养层，它能够分泌一些既促进干细胞生长又能抑制干细胞分化的因子。
**目的：**建立CF-1小鼠胚胎成纤维细胞饲养层最佳的分离培养方法，分析丝裂霉素C抑制成纤维细胞增殖的最佳浓度与时间，用于培养诱导多能性干细胞。
**方法：**取孕10~15 d CF-1小鼠，分离胎鼠原代成纤维细胞，经不同质量浓度(5，10，15，20 mg/L)丝裂霉素C处理不同时间(1，1.5，2，2.5，3 h)制备饲养层，并观察其增殖情况。将人诱导多潜能干细胞或胚胎干细胞在丝裂霉素C处理过的饲养层上培养，观察细胞集落生长情况。
**结果与结论：**制备CF-1小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的最佳胎龄为13.0~14.0 d。丝裂霉素C抑制CF-1小鼠胚胎成纤维细胞增殖的最佳浓度及作用时间为10 mg/L，2.5 h，成纤维细胞饲养层可以维持5~7 d。诱导多能性干细胞与胚胎干细胞在经10 mg/L丝裂霉素C处理2.5 h后饲养层上能发育成典型的“鸟巢”状干细胞集落。
**关键词：**胚胎成纤维细胞；诱导多潜能分化干细胞；饲养层；丝裂霉素C；细胞集落
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.10.017

卢海，张志，赵毅超，饶小惠，江金群，孟镔，艾民，潘明新，高毅. CF-1小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的制备[J].中国组织工程研究，2012，16(10):1786-1790. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

胚胎干细胞是从囊胚内细胞团中分离出来的原始全能干细胞，是所有成体干细胞和成熟细胞的分化源头，具有分化为所有组织与细胞的潜能[1-6]；诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cells，iPS)是由体细胞在体外通过重编程方式获得的与胚胎干细胞类似的全能干细胞，能够向不同的组织分化[7-13]，胚胎干细胞与iPS细胞在体外培养极易自发分化，必须在培养体系中加入一些抑制分化因子或在饲养层体系中维持培养。单独添加抑制分化因子效果不是很理想。鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast，MEF)饲养层体系可以合成与分泌多种细胞因子，如胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子等促有丝分裂因子和白血病抑制因子等细胞分化抑制因子[14-16]。

目前MEF饲养层制备主要的方法有γ射线照射或丝裂霉素C处理[2, 4, 6, 8, 13, 17]。γ射线的优点是可大批处理MEF细胞，但是一些小的实验室不具备实验条件，因此多数实验研究仍采用丝裂霉素C处理MEF来制备饲养层[5,18-19]。很多研究小组采用如胎儿包皮成纤维细胞、人胎盘成纤维细胞等人源性细胞作为饲养层或制备条件培养基，但并不是所有的人源细胞都能很好地支持干细胞生长与扩增，而且异体来源的细胞依然存在交叉污染问题[20]。无饲养层培养体

系虽也有报道，但其对维持干细胞生长的稳定性仍有待研究[19,21-25]，但MEF作为干细胞培养饲养层是最早最常用的方法，成本低廉，取材方便，能有效产生抑制干细胞自发分化和促进其增殖的细胞因子，尽管国内对MEF也有报道，但对CF-1小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的详细制备未见报道。

本实验以CF-1小鼠为实验材料，探索CF-1小鼠胚胎成纤维细胞培养及饲养层制备的最佳条件，为后期深入研究胚胎干细胞与iPS细胞提供实验基础。

## 1 材料和方法

**设计**：细胞形态学观察实验。

**时间及地点**：于2010-09/2011-01在南方医科大学再生医学研究所完成。

**材料**：

**实验动物**：实验用SPF级孕10~15 d CF-1小鼠，由中国科学院广州生物医药与健康研究院提供。

**人胚胎干细胞与脐带间充质细胞重编程获得iPS细胞**：来源于南方医科大学珠江医院再生医学研究所。

**主要试剂**：

| 主要试剂 | 来源 | 货号 |
|---|---|---|
| DMEM(高糖) | Gibco | C11995500BT |
| FBS | PAA | A15-101 |
| KSR | invitrogen | 10828028 |
| 0.25%胰酶(0.02%EDTA) | Gibco | 25200056 |
| 0.05%胰酶(0.02%EDTA) | Gibco | 25300054 |
| 丝裂霉素 C | Kyowa Hakko Kogyo | X20010040 |
| 非必须氨基酸(NEAA) | Gibco1 | 1140050 |
| 二甲基亚砜(DMSO) | Millipore | 196055 |
| β-2 巯基乙醇 | Gibco | 21985023 |
| GlutaMax 100x | Gibco | 35050061 |
| 青链霉素溶液 | Gibco | 15140122 |
| bFGF | invitrogen | 13256029 |

**方法**：

**溶液配置**：①MEF培养基：DMEM(高糖)，体积分数10%FBS，1%NEAA，1%青链霉素，1%β-2巯基乙醇。②MEF冻存培养基：体积分数90%FBS，10%DMSO。③丝裂霉素C贮存液(100×，1 g/L)。④DPBS配制5 g/L的MTT。⑤干细胞培养基：DMEM/F12，10%KSR，1%NEAA，1%青链霉素，1%β-2巯基乙醇，0.1%碱性成纤维细胞生长因子。

**原代MEF细胞分离与培养**：①将孕10~15 d CF-1小鼠颈椎脱臼处死。②放入体积分数75%乙醇中浸泡5~8 min。③无菌取出子宫，DPBS(含1%青链霉素)洗涤血迹(一般洗涤三四次)。④剪开子宫，取出胎鼠，DPBS(含1%青链霉素)洗涤3次。⑤用无菌镊子去除胎鼠的头、四肢、内脏，仅保留躯干，DPBS洗涤躯干3次。⑥用无菌眼科剪剪碎躯干，15~20 min。⑦加入等体积混合的0.25%与0.05%胰酶10 mL，继续剪2.0~3.0 min至躯干成1 $mm^3$以下的碎块。37 ℃，体积分数5%$CO_2$，95%湿度培养箱中15 min，每隔3.0~4.0 min取出培养皿，用吸管轻轻吹打0.5~1.0 min。⑧加入等体积的MEF培养基终止消化，1 080 r/min，离心10 min，MEF培养基重悬细胞。⑨细胞接种至10 cm培养皿中(约每个培养皿接种一个胚胎)，37 ℃，体积分数5%$CO_2$，95%湿度培养箱内培养。每2 d 80%换液1次。

**MEF传代及冻存与复苏**：原代MEF细胞汇合生长至80%~90%并仍处于对数生长期时进行消化传代，0.05%胰酶3 mL/10 cm皿，37 ℃，体积分数5%的$CO_2$，95%湿度培养箱3 min，显微镜下观察，当细胞回缩变圆时立即用新鲜培养基终止消化，1 080 r/min，离心4 min后，按1∶4重新接种至新的培养皿，或按照1∶3冻存，冻存后细胞经过检测支原体检测后及可放入液氮长期保存待用。MEF复苏时，从液氮中取出并快速于事先准备的37 ℃水浴锅中，快速轻轻晃动(注意不要让水淹过管盖)，待仅剩很少一部分冰块时，停止水浴，体积分数75%乙醇棉球擦拭冻存管，将冻存管中的MEF液加到15 mL离心管中，逐滴加入MEF培养基，边加边轻轻晃动离心管，1 050 r/min，离心4 min，吸弃上清，用MEF培养基重悬后接种至培养皿中，37 ℃，体积分数5%$CO_2$，95%湿度培养箱内培养。

**饲养层的制备**：一般采用第3代MEF制备饲养层。显微镜下观察细胞汇合生长至90%左右时，用质量浓度5，10，15，20 mg/L丝裂霉素C于37 ℃，体积分数5%的$CO_2$，95%湿度培养箱1，1.5，2，2.5，3 h后，吸弃丝裂霉素C，DPBS洗涤三四次，加入0.05%胰酶3 mL/培养皿，消化好后加3 mL/培养皿MEF培养基终止消化，吹下细胞收集至50 mL离心管，1 080 r/min，离心5~8 min，经支原体检测阴性后冻存备用。

**MTT法测定细胞数量**：96孔培养板细胞培养1，3，5，7 d终止培养，终止前4 h吸弃100 μL培养上清，加入MTT 20 μL，继续培养4 h，最后用DMSO 150 μL终止培养，轻轻振荡10 min，检

[1] 南方医科大学珠江医院肝胆二科，广东省广州市 510280；[2] 安徽蚌埠医学院，安徽省蚌埠市 233030；[3] 安徽理工大学医学院，安徽省淮南市 232001；[4] 解放军第305医院，北京市 100017

卢海★，男，1985年生，江苏省淮安市人，汉族，南方医科大学在读硕士，医师，主要从事干细胞方面研究。
hysa1985@yahoo.com.cn

通讯作者：高毅，主任医师，教授，博士生导师，南方医科大学珠江医院肝胆二科，广东省广州市 510280
gaoyi6146@163.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:1673-8225(2012)10-01786-05

收稿日期: 2011-12-16
修回日期: 2012-01-22
(20111115026/GW·S)

测560 nm处*A*值。

**用饲养层细胞培养人胚胎干细胞与iPS细胞：**采用以上实验获得的丝裂霉素C最佳质量浓度和作用时间处理MEF，并接种至0.1%明胶包被的培养皿中，培养24 h后，吸弃培养基，用DMEM/F12洗涤一二次，将人胚胎干细胞与iPS细胞接种至饲养层中培养，显微镜下观察胚胎干细胞及iPS细胞生长情况。

**主要观察指标：**①ICR小鼠胚胎成纤维细胞的增殖情况。②不同质量浓度与不同时间丝裂霉素C处理后的MEF细胞活性。③干细胞在制备饲养层上的生长状态。

**统计学分析：**采用SPSS 13.0统计学软件分析实验数据，采用Dunnett-*t* 检验，以$P < 0.05$为差异有显著性意义。

## 2 结果

2.1 MCF-1小鼠胚胎成纤维细胞的生长形态 MEF是贴壁生长型细胞，大小不均，一般需要4~6 h细胞开始贴壁生长，12 h进入对数生长期；原代细胞一般需要8~10 h开始贴壁，经过二三天后达90%。显微镜下观察，细胞成梭形、不规则等形状，胞质透明，中间可见卵圆形核。起初细胞间隙明显，随着细胞增殖，细胞生长呈放射状或旋涡状生长，原代中杂细胞较多，传二代后细胞形态较原代形态单一，原代细胞见图1，丝裂霉素处理后的饲养层细胞见图2。

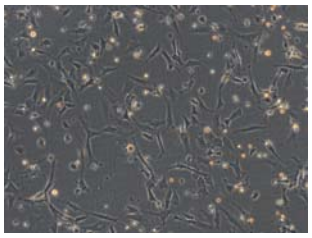


Figure 1 Primary CF-1 mouse embryonic fibroblasts (×100)
图 1 原代 CF-1 小鼠胚胎成纤维细胞(×100)

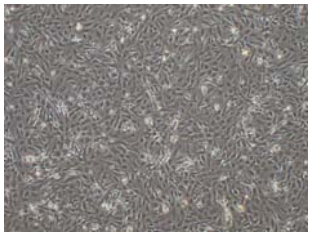


Figure 2 CF-1 mouse embryonic fibroblasts after mitomycin C treatment (×100)
图 2 丝裂霉素 C 处理后的鼠胚成纤维细胞(×100)

2.2 饲养层的制备 制备CF-1小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的最佳胎龄为13.0~14.0 d。选择5，10，15，20 mg/L丝裂霉素C处理CF-1小鼠胚胎成纤维细胞1，1.5，2，2.5，3 h后，测细胞培养1，3，5，7 d细胞数，结果见图3。

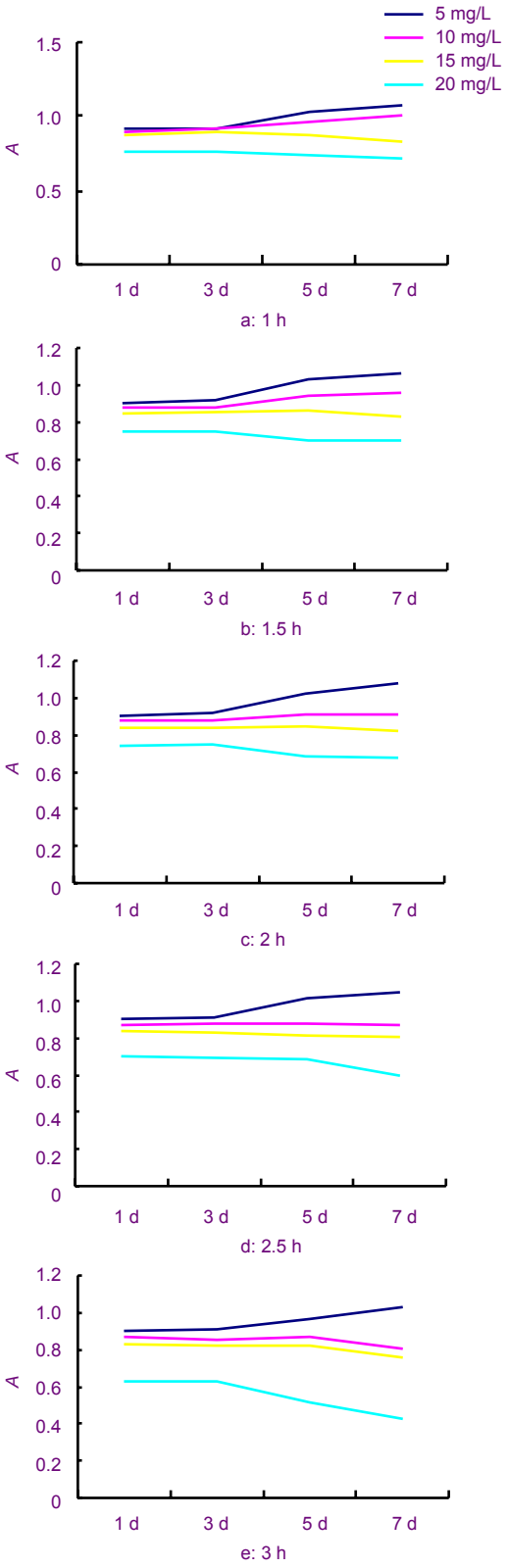
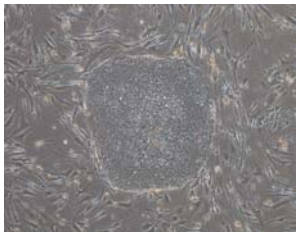


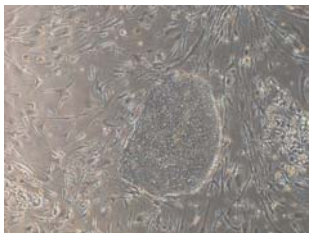

Figure 3 Proliferation of mouse embryonic fibroblasts after treatment with different concentrations of mitomycin C for different time
图 3 不同质量浓度丝裂霉素 C 处理不同时间后鼠胚成纤维细胞的增殖情况

从图3中可得出丝裂霉素C质量浓度为10 mg/L，处理2.5 h，能抑制MEF增殖，但不死亡，与刚开始接种细胞数量相比差异有显著性意义($P < 0.05$)；丝裂霉素C质量浓度较低时(5 mg/L)，处理时间延长对MEF无明显的抑制作用；丝裂霉素C质量浓度过高(>10 mg/L)，无论时间长短，对MEF抑制明显，大量细胞死亡。

2.3 胚胎干细胞与iPS细胞在饲养层上的生长结果 贴壁后的胚胎干细胞与iPS细胞增殖迅速，将周围的饲养层挤开，五六天可以形成典型的胚胎干细胞或iPS集落，细胞排列紧密，界限清楚，细胞核大，见图4。



a: Induced pluripotent stem cells



b: Embryonic stem cells

Figure 4 Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells develop into typical “bird nest”-shaped colony of stem cells after treatment with mitomycin C

图 4 诱导多能性干细胞或胚胎干细胞在鼠胚成纤维细胞饲养层上均发育成典型的“鸟巢”状干细胞集落

## 3 讨论

饲养层是将具有黏附能力的细胞用紫外线或丝裂霉素C处理后作克隆样细胞生长的底物，且能产生促进克隆样细胞增殖和抑制其分化的细胞层。饲养层经射线或丝裂霉素C处理后，虽然失去分裂能力，但仍能生存并有同化培养液的能力，为胚胎发育提供一个近似体内细胞生长发育的环境[5,16,26-27]。MEF饲养层能分泌抑制干细胞自主分化的细胞因子，保持胚胎干细胞和iPS细胞的未分化和增殖状态，但MEF细胞生命周期有限，为了满足胚胎干细胞和iPS细胞的培养需要，必须不断制备新的MEF。

目前国内制备MEF最常使用的是昆明小鼠，为中国特有的封闭群小鼠，因其适应性强，繁殖能力高，容易获取，被广泛用于各类动物实验[23-24]。国外实验室已经开始使用CF-1小鼠制备MEF饲养层细胞，但各实验室在制备细节上不同，所获取的饲养层细胞的状态也不同，国内使用CF-1小鼠制备MEF饲养层报道甚少。本实验选择CF-1小鼠进行胚胎干细胞和iPS细胞的饲养层制备，在分离培养，丝裂霉素处理质量浓度及时间方面进行探讨，探索CF-1小鼠MEF的分离和饲养层制备的最佳条件。

胎龄影响MEF分离培养，尽管胚胎成纤维细胞存在于小鼠胚胎生长发育的各个阶段，但有资料显示12~16 d为合适胎龄，13.5 d为最佳胎龄[4, 6, 14, 17, 27]，胎龄较小时，胎鼠小、柔软，不易操作，难以完全去除头、尾、四肢和内脏，获得的细胞中混有大量的神经母细胞和红细胞影响饲养层质量；胎龄较大，鼠骨骼已成型，组织难以剪碎，且细胞间连接紧密，难以消化。本实验选择13.5 d CF-1孕鼠，实验结果显示在37 ℃，体积分数5%$CO_2$，95%湿度培养箱内经过0.15%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化15 min所获得的细胞数量最多，增殖速度快，活性好，传代培养活性较可查文献的0.25%和0.05%的好。细胞传代培养发现，降低胰蛋白酶浓度，适当延长消化时间，可明显减少胰蛋白酶对细胞的损伤。

本实验结果表明，原代分离的CF-1小鼠MEF细胞4代以前生长状态好，以后便出现衰老现象，因此使用4代以前细胞做饲养层，又由于原代，1代，2代含有少许杂细胞，4代细胞有时已出现衰老现象，所以一般选择3代细胞作为饲养层。制备饲养层关键是对MEF进行预处理，使其有良好分泌功能的同时，失去增殖能力，以免其与胚胎干细胞或iPS细胞竞争营养。胚胎干细胞与iPS细胞扩增过程中保持未分化状态需要饲养层分泌足够的细胞因子抑制其分化，这就要求饲养层细胞纯度要高，生长状态好。经丝裂霉素C处理的MEF，细胞仍处于有分泌活性，能分泌一些细胞因子促进胚胎干细胞与iPS细胞增殖，并保持其未分化状态。制备MEF过程中需要对丝裂霉素C质量浓度及处理时间调控，处理不足无法抑制其增殖，处理过度则会造成细胞大量死亡，实验结果表明丝裂霉素C最佳工作质量浓度为10 mg/L，作用时间为2.5 h，制备的饲养层效果最佳，可维持10 d以上不出现细胞的大量死亡。

胚胎干细胞或iPS细胞接种到CF-1小鼠饲养层上，MEF分泌一些细胞因子如白血病抑制因子等，抑制细胞分化，成纤维细胞生长因子等促进细胞增殖，使得接种的胚胎干细胞或iPS细胞迅速增殖，形成典型的克隆样细胞集落，并保持未分化的细胞状态。

MEF取材方便，所需费用少，因此，MEF是分离培养胚胎干细胞或iPS细胞做早使用的饲养层，也是目前研究胚胎干细胞与iPS细胞最常用的饲养层。

## 4 参考文献

[1] Thomson JA,Itskovitz-Eldor J,Shapiro SS,et al.Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.Science.1998; 282 (5391): 1145-1147.

[2] Cascio S,Zaret KS.Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation.Development. 1991;113(1):217-225.
[3] O'Shea KS.Embryonic stem cell models of development. Anat Rec.1999;257(1):32-41.
[4] Rooney GE, Nistor GI, Barry FB,et al.In vitro differentiation potential of human embryonic versus adult stem cells. Regen Med.2010;5(3):365-379.
[5] Evans MJ, Kaufman MH.Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.Nature.1981;292(5819):154-156.
[6] Martin GR.Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A.1981;78(12):7634-7638.
[7] Okita K,Ichisaka T,Yamanaka S.Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.Nature. 2007; 448(7151):313-317.
[8] Yu J,Vodyanik MA,Smuga-Otto K,et al.Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.Science.2007; 318 (5858):1917-1920.
[9] Unger C,Felldin U,Nordenskjöld A,et al.Derivation of human skin fibroblast lines for feeder cells of human embryonic stem cells. Curr Protoc Stem Cell Biol.2008;Chapter 1: Unit 1C.7.
[10] Maherali N,Sridharan R,Xie W,et al.Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell. 2007;1(1):55-70.
[11] Park IH,Zhao R,West JA,et al.Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature.2008;451(7175): 141-146.
[12] Takahashi K,Tanabe K,Ohnuki M,et al.Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007;131(5):861-872.
[13] Takahashi K,Yamanaka S.Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell.2006;126(4):663-676.
[14] Balasubramanian S,Jasty S,Sitalakshmi G,et al.Influence of feeder layer on the expression of stem cell markers in cultured limbal corneal epithelial cells.Indian J Med Res.2008;128(5): 616-622.
[15] Page RL, Ambady S, Holmes WF,et al.Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. Cloning Stem Cells.2009;11(3):417-426.
[16] Camarasa M,Brison D,Kimber SJ,et al.Naturally immortalised mouse embryonic fibroblast lines support human embryonic stem cell growth. Cloning Stem Cells.2009;11(3):453-462.
[17] Fernandes AM,Marinho PA,Sartore RC,et al.Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. Braz J Med Biol Res.2009;42(6):515-522.
[18] Lee JB,Song JM,Lee JE,et al.Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells.Reproduction. 2004; 128(6):727-735.
[19] Vallier L.Serum-free and feeder-free culture conditions for human embryonic stem cells. Methods Mol Biol.2011;690: 57-66.
[20] Qin Y,Ji H,Wu Y,et al.Chromosomal instability of murine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term culture and development of cloned embryos. Cloning Stem Cells.2009;11(3): 445-452.
[21] Awan A,Oliveri RS,Jensen PL,et al.Immunoflourescence and mRNA analysis of human embryonic stem cells (hESCs) grown under feeder-free conditions. Methods Mol Biol.2010;584: 195-210.
[22] Braam SR,Denning C,Mummery CL. Genetic manipulation of human embryonic stem cells in serum and feeder-free media. Methods Mol Biol.2010;584:413-423.
[23] Hernandez D,Ruban L,Mason C.Feeder-free culture of human embryonic stem cells for scalable expansion in a reproducible manner.Stem Cells Dev. 2011;20(6):1089-1098.
[24] Li Z,Leung M,Hopper R,et al.Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. Biomaterials.2010;31(3):404-412.
[25] Hannan NR,Jamshidi P,Pera MF,et al.BMP-11 and myostatin support undifferentiated growth of human embryonic stem cells in feeder-free cultures. Cloning Stem Cells.2009;11(3):427-435.
[26] Feng S,Mo L,Wu R,et al.Establishment of an exogenous LIF-free culture system for mouse embryonic stem cells. Cloning Stem Cells.2009;11(3):437-443.
[27] Lee JB,Lee JE,Park JH,et al.Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition.Biol Reprod. 2005;72(1):42-49.

来自本文课题的更多信息--

*基金声明*：全军医药卫生科研基金项目(08Z017)，国家高科技发展计划—863 计划(2006AA02A141)项目。

*作者贡献*：实验设计、实验过程及文章撰写均由第一作者完成，统计由第二作者完成，其他作者查新文献。

*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。

*伦理要求*：实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

*文章概要*：

文章要点：首次对如何制备 CF-1 小鼠胚胎成纤维细胞饲养层作了详细的报道，有别于目前国内主要以 ICR 小鼠、昆明小鼠等胚胎成纤维细胞作为饲养层。

关键信息：CF-1 小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层能够维持生长 5~7 d，这符合干细胞传代生长特征。

研究的创新之处与不足：在干细胞研究过程中发现，CF-1 小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层能很好地支持人源性干细胞生长，优于其他饲养层，但由于实验条件限制，并没有与其他种属小鼠成纤维细胞饲养层做统计学处理。