

# 人脂肪来源间充质干细胞成骨及成软骨的潜能★

朱寅<sup>1</sup>, 徐卫袁<sup>2</sup>, 王文加<sup>3</sup>, 张兴祥<sup>2</sup>, 严飞<sup>2</sup>, 沙卫平<sup>2</sup>, 朱现玮<sup>1</sup>

## Osteogenic and chondrogenic differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells

Zhu Yin<sup>1</sup>, Xu Wei-yuan<sup>2</sup>, Wang Wen-jia<sup>3</sup>, Zhang Xing-xiang<sup>2</sup>, Yan Fei<sup>2</sup>, Sha Wei-ping<sup>2</sup>, Zhu Xian-wei<sup>1</sup>

### 文章亮点:

实验成功体外分离、培养人脂肪来源间充质干细胞。人脂肪来源间充质干细胞具有向成骨细胞和软骨细胞分化的潜能。

### Abstract

**BACKGROUND:** Human adipose-derived mesenchymal stem cells are a kind of adult stem cells with the high ability of proliferation and multi-lineage differentiation. They can be acquired from the cosmetic liposuction operation with rich sources of raw material and the selections are very convenient. They have a potential value in the field of bioremediation.

**OBJECTIVE:** To establish a method of isolating and culturing human adipose-derived mesenchymal stem cells and investigate the proficiency of basic biological characteristics and the potential ability of osteogenic and chondrogenic differentiation.

**METHODS:** The adipose tissue was taken from the liposuction operation, human adipose-derived mesenchymal stem cells were isolated by type II collagen enzyme digestion and then cultured *in vitro*. Cell morphology was observed, cell cycle was determined, and cell surface markers were identified with flow cytometry. Passage 3 cells were assigned to two induction groups A, B and two control groups A, B. Then the cells were induced to differentiate into osteoblasts and chondrocytes with different culture media *in vitro*. The differentiated cells were identified by histochemical staining, immunocytochemical staining and RT-PCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After *in vitro* culture, human adipose-derived mesenchymal stem cells showed the desmoids shape. The primary cells adhered to the wall in 24 hours, and then formed the colony after 5-7 days. The passaged cells adhered to the wall in 4-6 hours and maintained the same shape. Cell cycle studies showed that cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub>/M accounted for (88±2)%, (88±2)% and 0.03% respectively. The flow cytometry examination showed that the cells were positive for CD29 and CD105 but they were negative for CD45. RT-PCR showed that after osteogenic induction, human adipose-derived mesenchymal stem cells had positive osteopontin mRNA expression; after chondrogenic induction, cells had positive type II collagen mRNA expression. Human adipose-derived mesenchymal stem cells were successfully isolated and cultured and the cells exhibit the potential to differentiate into osteoblasts and chondrocytes.

Zhu Y, Xu WY, Wang WJ, Zhang XX, Yan F, Sha WP, Zhu XW. Osteogenic and chondrogenic differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(32): 5953-5958. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

### 摘要

**背景:** 人脂肪来源间充质干细胞是种具有较强的体外增殖和多系分化能力的成体干细胞, 可以从美容吸脂手术中获得, 取材方便, 原料来源丰富, 在生物治疗应用方面蕴藏着巨大的价值。

**目的:** 体外分离、培养人脂肪来源间充质干细胞, 探讨其基本生物学特性及成骨成软骨的潜能。

**方法:** 取美容吸脂获得的脂肪组织, 采用II型胶原酶消化法分离人脂肪来源间充质干细胞并进行体外培养; 观察细胞形态、测定细胞周期、流式细胞仪鉴定细胞表面标志; 取第3代细胞, 分别加入成骨诱导培养基及成软骨诱导培养基行体外成骨及成软骨诱导。

**结果与结论:** 体外培养人脂肪来源间充质干细胞呈纤维样形态, 原代细胞24 h内贴壁, 培养5~7 d后开始形成细胞集落; 经细胞周期检测显示G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S和G<sub>2</sub>/M所占比例分别为(88±2)%, (12±2)%和0.03%。经流式细胞仪检测CD29和CD105呈阳性表达, CD34和CD45呈阴性表达。RT-PCR检测显示, 人脂肪间充质干细胞经成骨诱导分化后细胞中骨桥蛋白mRNA呈阳性表达, 经软骨诱导分化后细胞中II型胶原mRNA呈阳性表达。结果证实, 实验成功体外分离、培养人脂肪来源间充质干细胞, 其具有向成骨细胞和软骨细胞分化的潜能。

**关键词:** 脂肪来源间充质干细胞; 成骨细胞; 软骨细胞; 多向分化; 骨桥蛋白; II型胶原; 干细胞

<sup>1</sup>Clinical Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China;  
<sup>2</sup>Department of Orthopedics, First People's Hospital of Zhangjiagang, Zhangjiagang 215600, Jiangsu Province, China;  
<sup>3</sup>Central Laboratory, First People's Hospital of Zhangjiagang, Zhangjiagang 215600, Jiangsu Province, China

Zhu Yin★, Studying for master's degree, Clinical Medical College of Jiangsu University, Zhangjiagang 215600, Jiangsu Province, China  
zhuyin871113@qq.com

Corresponding author: Xu Wei-yuan, M.D., Professor, Chief physician, Department of Orthopedics, First People's Hospital of Zhangjiagang, Zhangjiagang 215600, Jiangsu Province, China  
xwyl43@163.com

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.32.012

Received: 2012-04-25  
Accepted: 2012-06-11

<sup>1</sup> 江苏大学临床医学院, 江苏省镇江市 212013; <sup>2</sup> 张家港市第一人民医院骨科, 江苏省张家港市 215600; <sup>3</sup> 张家港市第一人民医院中心实验室, 江苏省张家港市 215600

朱寅★, 男, 1987年生, 江苏省张家港市人, 汉族, 江苏大学在读硕士, 主要从事脊柱外科、创伤骨科和组织工程方面的研究。  
Zhuyin871113@qq.com

通讯作者: 徐卫袁, 博士, 教授, 主任医师, 张家港市第一人民医院骨科, 江苏省张家港市 215600  
xwyl43@163.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344 (2012)32-05953-06

收稿日期: 2012-04-25  
修回日期: 2012-06-11  
(20120425037/WJ) S)

朱寅, 徐卫袁, 王文加, 张兴祥, 严飞, 沙卫平, 朱现玮. 人脂肪来源间充质干细胞成骨及成软骨的潜能[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(32):5953-5958. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

## 0 引言

脂肪来源间充质干细胞也称脂肪基质来源干细胞, 是组织工程中常用的一种成体干细胞, 凭借来源丰富、取材容易、对机体损伤小、体外增殖迅速和生物学性状稳定等优点, 已成为比骨髓间充质干细胞更为理想的间充质干细胞<sup>[1-2]</sup>。但目前脂肪来源间充质干细胞的分离、培养、纯化仍缺乏标准化方法, 脂肪来源间充质干细胞诱导分化技术还不成熟, 鉴定分化细胞过于简单。

实验从吸脂中获取脂肪抽提液, 从中分离出脂肪来源间充质干细胞, 旨在建立一套可行较高的体外分离、培养人脂肪来源间充质干细胞的方法, 探讨其基本生物学特性, 并且从分子水平鉴定其向成骨细胞及软骨细胞分化潜能, 明确诱导环境, 为脂肪来源间充质干细胞构建组织工程化骨与软骨提供细胞模型参考。

## 1 材料和方法

**设计:** 体外细胞学观察实验。

**时间及地点:** 于2011-10/2012-04在苏州大学附属张家港医院中心实验室完成。

**材料:** 脂肪抽吸物由苏州大学附属张家港医院烧伤整形外科提供, 行脂肪抽吸术患者均为女性12例, 年龄30~65岁, 肝炎病毒标志物、梅毒、人类免疫缺陷病毒检测结果均阴性, 吸脂部位为腰腹部。根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》<sup>[3]</sup>, 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书。

### 试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
II型胶原酶	美国 SIGMA 公司
鼠抗 CD44 单克隆抗体, FITC 标记鼠抗 CD105 单克隆抗体, PE 标记鼠抗 CD29、CD45 单克隆抗体	美国 SIGMA 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
凝胶分析系统	美国 PHAMACIA 公司

### 实验方法:

**人脂肪间充质干细胞的分离与培养:** 无菌吸取脂肪抽吸获得的脂肪抽提液, 用PBS反复冲洗数次, 去残留在局麻药和大部分血细胞。用体积分数0.075% II型胶原酶37 °C消化30 min, 间或搅拌。1 500 r/min, 离心5 min, 吸弃上层脂肪后, 混匀用200目筛网过滤去除细胞外间质及大块碎片。将获得的细胞悬液1 200 r/min, 离心15 min, 细胞沉淀用PBS洗涤后, 用基础培养液(含20%胎牛血清的DMEM培养液)调整细胞密度至(1.0~2.0)× 10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>, 种于25 cm<sup>2</sup>的培养瓶中, 置于37 °C、体积分数95%空气、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。培养48 h后, 吸出悬浮细胞液体, 以去除大部分的血细胞和脂滴, 更换新培养基。每隔3 d换液1次。观察生长情况并照相。培养10 d左右细胞生长至占培养瓶底面的80%时进行传代培养记为P1, 细胞分离液为0.25%胰酶/0.02%EDTA/PBS。

**人脂肪间充质干细胞细胞周期测定:** 收集贴壁及已悬浮的细胞, 1 500 r/min, 离心5 min, PBS洗2次, 70%冰乙醇于-20 °C固定18 h, PBS洗2次, 加入PI(propidium iodide)溶液(PI质量浓度50 g/L, Rnase质量浓度100 μg/L, 体积分数0.1%TritonX-100), 调整细胞为1×10<sup>6</sup>个, 4 °C避光染色3 min, 用流式细胞仪检测。采用软件ModFit LT™ 3.0处理, 得出各细胞周期及凋亡细胞百分比。

**人脂肪间充质干细胞表面抗原标志的鉴定:** 取P2对数生长期细胞, 用细胞分离液(0.25%胰酶/0.02%EDTA/PBS)消化。PBS洗涤3次, 制备成终浓度为1×10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>的细胞悬液, 分装入试管中, 每管0.1 mL。分别加入相应检测抗体(CD29-FITC, CD105-PE, CD45-FITC, CD34-FITC), 同时以加入基础培养液的细胞作为阴性对照。室温放置20 min后, 加入PBS 2 mL, 1 000 r/min, 离心5 min, 弃上清, 加入300 μLPBS重悬细胞, 流式细胞仪检测。

**人脂肪间充质干细胞向成骨细胞的诱导及鉴定:** 取P3细胞生长至占培养皿底面60%时, 分为成骨诱导组及对照组, 在成骨诱导组中加入

含有10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠, 质量浓度50 mg/L维生素C,  $10^{-7}$  mol/L地塞米松, 体积分数10%FBS, DMEM/F12的成骨诱导培养液培养, 同时在对照组中仅加入基础培养基, 每隔3 d换液1次。诱导至21 d取出细胞爬片, 分别进行Vankossa银染色及RT-PCR检测。分析成骨细胞诱导分化过程中特异性蛋白-骨桥蛋白mRNA的表达。引物信息见表1。

表1 人脂肪间充质干细胞各引物序列  
Table 1 Primer sequences of human adipose-derived mesenchymal stem cells

Gene	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Annealing (°C)
Osteopontin	Upstream: CTA GGC ATC ACC TGT GCC ATA CC	375	58
	Downstream: CAG TGA CCA GTT CAT CAG ATT CAT C		
	Collagen II		
Downstream: TCA CCT GGT TTT CCA CCT TC			
GAPDH	Upstream: ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	232	58
	Downstream: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA		

**人脂肪间充质干细胞向软骨细胞的诱导及鉴定:** 取 P3 细胞生长至占培养皿底面 60%时, 分为成软骨诱导组及对照组, 在成软骨诱导组中加入含有体积分数10%FBS, 质量浓度 2 mg/L 胰岛素、3 mg/L 转铁蛋白、1 mmol/L 丙酮酸、100 nmol/L 地塞米松、质量浓度 10  $\mu$ g/L 转化生长因子  $\beta$  的 DMEM/F12 成软骨诱导培养液培养, 同时设仅加入基础培养基的阴性对照组, 每隔 3 d 换液 1 次。诱导至 14 d 取出细胞爬片, 分别进行甲苯胺蓝染色、II 型胶原免疫组化染色及 RT-PCR 检测, 分析软骨细胞诱导分化过程中特异性蛋白 II 型胶原 mRNA 的表达。

**主要观察指标:** ①培养后人脂肪间充质干细胞形态。②采用流式细胞仪检测细胞周期及P3代细胞表面标志表达。③成骨诱导及成软骨诱导前后形态变化。④成骨诱导分化后 Vankossa 银染色情况及骨桥蛋白的 mRNA 表达变化。⑤成软骨诱导后甲苯胺蓝、II 型胶原免疫组化染色情况及 II 型胶原的 mRNA 表达变化。

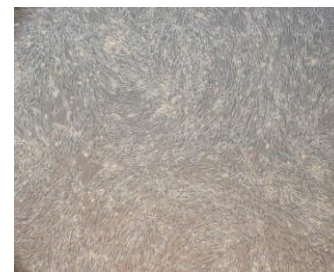
## 2 结果

**2.1 人脂肪间充质干细胞的形态** 原代培养的细胞在接种24 h内逐渐贴壁, 可见少量贴壁细胞, 细胞不均一, 贴壁细胞90%伸展生长, 呈长梭形、单核、含1~3个核

仁。培养5~7 d后细胞开始增殖, 形成多处细胞集落, 镜下可见较多的形态均一的细胞组成的细胞集落。见图1a。传代细胞4~6 h即可贴壁, 多次传代后细胞维持成纤维样形态与原代相似, 镜下可见较多分裂相, 细胞高密度生长时呈漩涡状或放射状生长排列, 见图1b。



a: Primary cultured for 3 d



b: Passage 3

Figure 1 Morphology of human adipose-derived mesenchymal stem cells ( $\times 100$ )  
图1 人脂肪间充质干细胞形态 ( $\times 100$ )

**2.2 人脂肪间充质干细胞的周期变化** 流式细胞仪检测细胞周期结果显示,  $G_0/G_1$ 期细胞占(88 $\pm$ 2)%, S期细胞占(12 $\pm$ 2)%, 处于 $G_2/M$ 期的细胞仅为极少数。见图2。

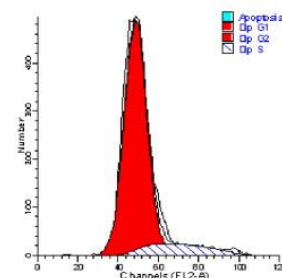
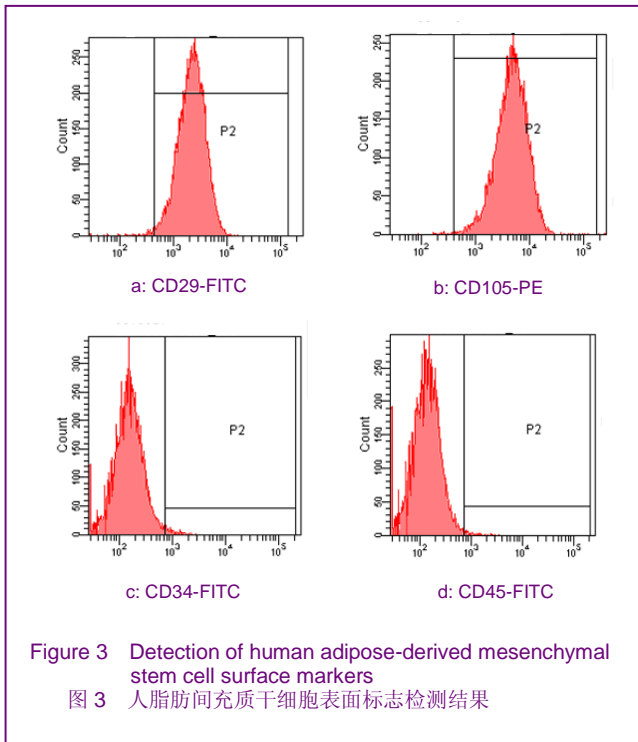
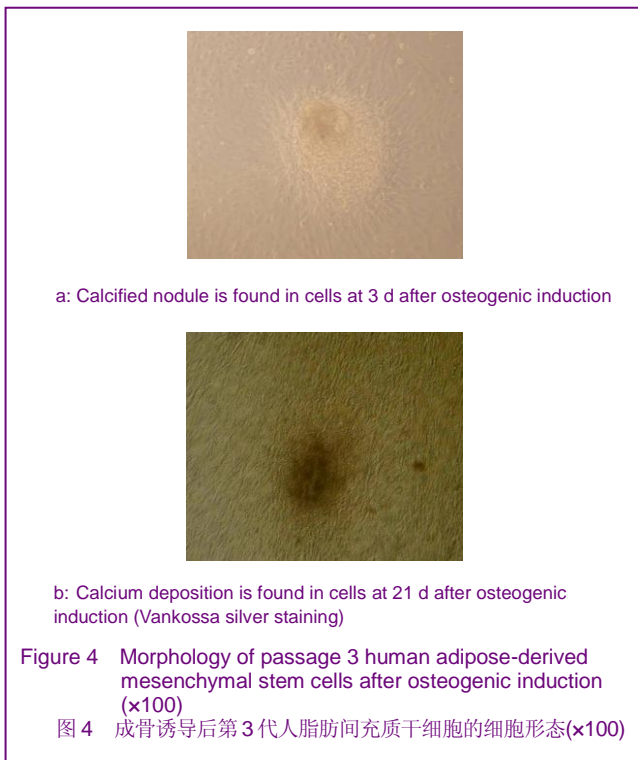


Figure 2 Cell cycle of passage 3 human adipose-derived mesenchymal stem cells  
图2 第3代人脂肪间充质干细胞的细胞周期变化

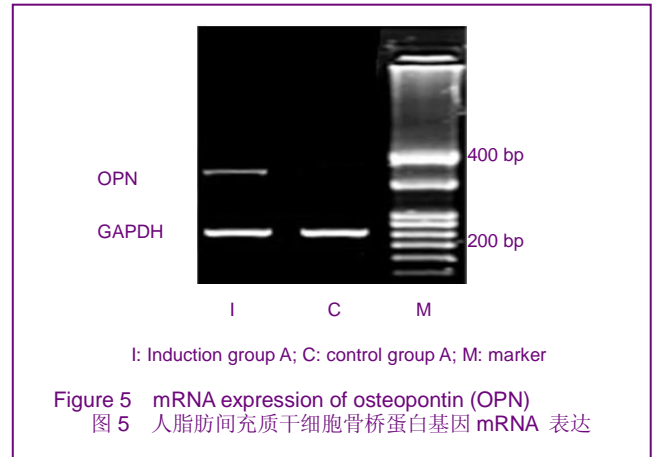
**2.3 人脂肪间充质干细胞表面标志检测结果** 流式细胞仪检测结果显示, 第3代人脂肪间充质干细胞CD29、CD105呈阳性表达; 而CD34、CD45呈阴性表达。见图3。



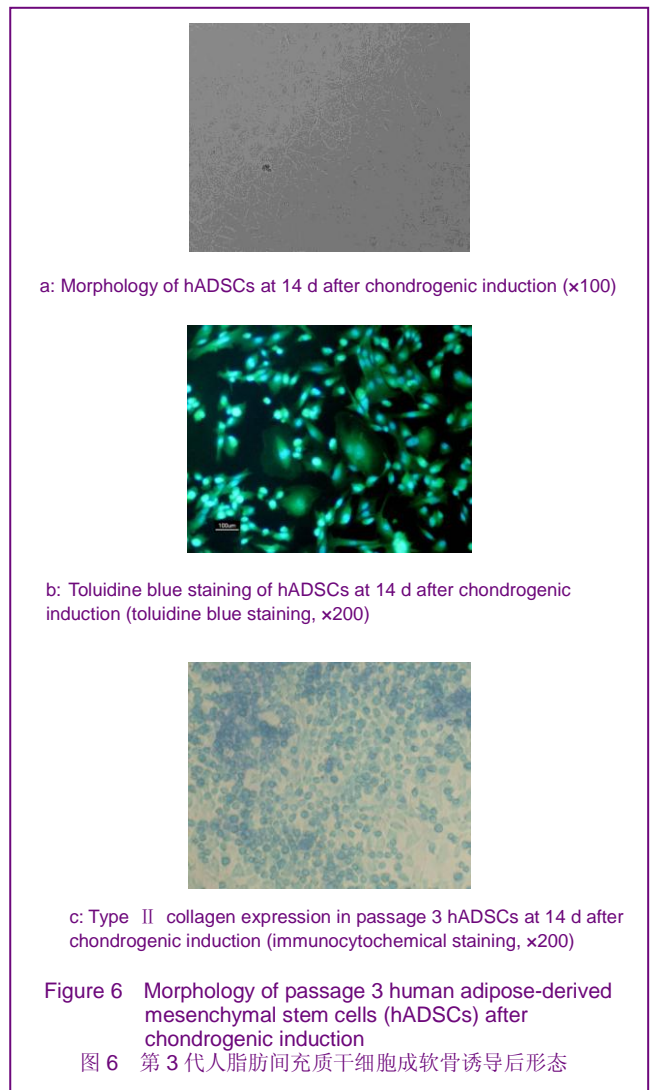
2.4 人脂肪间充质干细胞成骨诱导结果 分别在成骨诱导14, 21 d时, 倒置显微镜下见成骨诱导组中出现钙化结节, Vankossa银染色, 呈深棕黑色, 对照组中未见细胞染色, 见图4。

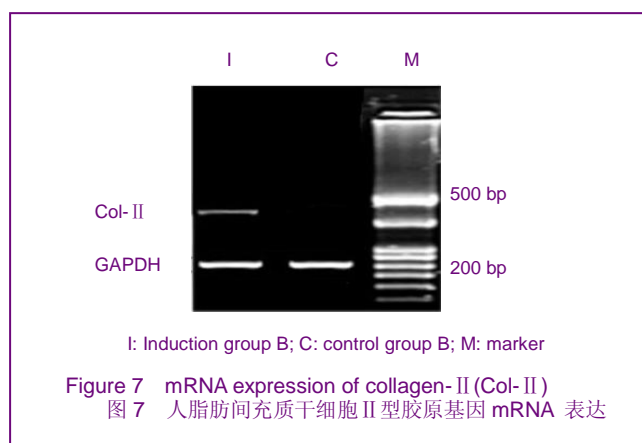


RT-PCR检测出人脂肪间充质干细胞可表达骨桥蛋白 mRNA。证实脂肪来源的间充质干细胞有成骨的潜能。见图5。



2.5 人脂肪间充质干细胞成软骨诱导结果 诱导14 d后, 倒置显微镜下见成软骨诱导组细胞形态变为铺路石样, 甲苯胺蓝染色, 细胞周围有蓝色基质染色, 对照组B未见细胞染色; 经II型胶原免疫荧光染色结果呈阳性; RT-PCR检测出表达软骨细胞诱导分化过程中特异性蛋白collagen- II mRNA。证实脂肪来源的间充质干细胞有成软骨的潜能。见图6, 7。





### 3 讨论

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞,分为胚胎干细胞和成体干细胞2大类。胚胎干细胞的分化潜能较大,可以向内、中、外3个胚层的各种细胞和组织分化<sup>[4-5]</sup>,但是因伦理学及使用安全性等问题,引起了世界范围内的争议而限制了其广泛应用。

成体干细胞也有多向分化潜能,广泛存在于机体的各个组织中,取材容易,不存在伦理学问题,在组织工程和基因治疗等方面具有广泛的应用前景,近年来受到密切关注。研究较多的成体干细胞是骨髓间充质干细胞,但其主要来自骨髓,因而来源有限,取材困难、不易被患者接受。Zuk等<sup>[6]</sup>于2001年从抽脂术抽取的脂肪悬液中提取出有多种分化潜能的细胞,命名为人脂肪间充质干细胞。

脂肪来源间充质干细胞与其它干细胞相比,具有显著的优越性:①取材简单、来源广泛。②供区损伤小。③体外扩增快,倍增时间短。④具有免疫抑制作用<sup>[7]</sup>,可自体干细胞移植,亦为异体移植的可能性提供了理论基础。

目前脂肪来源间充质干细胞的分离、培养、纯化、鉴定仍缺乏标准化方法。实验将贴壁筛选法与尽量控制消化时间相结合,采用体积分数0.075%的II型胶原酶消化法,控制消化时间及尽量去除血细胞,增加了培养的成功率,成功分离出易于体外培养,并能稳定增殖的人脂肪间充质干细胞,经多次传代后细胞维持成纤维样形态,且增殖迅速,为大量培养脂肪间充质干细胞奠定了基础。在脂肪来源的间充质干细胞的鉴定方面,由于脂肪来源间充质干细胞缺乏特异的表面标志,故结果不尽相同<sup>[8]</sup>。

实验检测了体外培养的P3代细胞的表面抗原,发现

CD29、CD44、CD105阳性,证明细胞为基质细胞类,CD45阴性则排除了内皮细胞和造血干细胞的污染,与以往文献的研究结果相符<sup>[9]</sup>。通过流式细胞仪对细胞进行周期检测,发现大多数细胞处于静止期,是一群处于未分化状态非定向细胞,保留了自我更新和增殖能力,少部分处于功能态,这符合干细胞的特性,该结果也支持培养的贴壁细胞为间充质干细胞。

脂肪来源间充质干细胞具有强大的多向分化潜能<sup>[10-13]</sup>,在体内的分化受多种因素影响,各种因素之间相互作用形成一个复杂的网络系统,完全模拟体内作用机制在体外培养细胞,短时间内还难以实现。为进一步确认实验所得细胞具有干细胞特性,对细胞分别进行成骨诱导培养液和成软骨诱导培养液培养。脂肪来源间充质干细胞诱导后的鉴定方法较多,实验选取了Vankossa银染色及RT-PCR检测骨桥蛋白进行成骨鉴定。钙化结节是成骨细胞分泌功能的检测指标之一,骨桥蛋白是成骨细胞诱导分化过程中特异性蛋白。

对成软骨细胞的鉴定选取甲苯胺蓝染色、II型胶原免疫组化染色及RT-PCR检测II型胶原的表达。II型胶原被认为是软骨细胞最特异的表面标记之一,是软骨细胞诱导分化过程中特异性蛋白。甲苯胺蓝染色阳性,证明软骨特异性的细胞外基质形成。实验证实:脂肪来源间充质干细胞在成骨诱导条件下培养后的细胞具有成骨细胞的特征;在成软骨诱导条件下培养后的细胞具有软骨细胞的特征。

综上所述,实验成功建立了一套可行性较高的体外分离、培养人脂肪来源间充质干细胞的方法并在特定的诱导剂作用的条件下向成骨及软骨细胞分化,明确了向成骨细胞及软骨细胞诱导的条件,为脂肪来源间充质干细胞构建组织工程化骨与软骨提供细胞模型参考。但其定向诱导后的细胞与正常成骨细胞、软骨细胞的功能是否有差异,能否在体内成骨及成软骨,所形成的骨及软骨能否达到临床要求,这些问题都有待进一步的研究。

### 4 参考文献

- [1] Lu W, Jin Y, Zhang YJ. Linchuang Kouqing Yixue Zazhi. 2006; 22(7):398-401.  
陆伟,金岩,张勇杰.SD大鼠脂肪组织来源干细胞体外生物学特性研究[J].临床口腔医学杂志,2006,22(7):398-401.
- [2] Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, et al. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. Cancer Res. 2008;68(11):4229-4238.
- [3] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01.

- [4] Cai YN, Yuan XD, Ou Y, et al. Apoptosis during  $\beta$ -mercaptoethanol-induced differentiation of adult adipose-derived stromal cells into neurons. *Neural Regen Res.* 2011;6(10):750-755.
- [5] Zhou J, Tian GP, Wang JE, et al. In vitro differentiation of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stromal stem cells into neuronal-like cells. *Neural Regen Res.* 2011;6(19):1467-1472.
- [6] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.
- [7] Yan J, Li L, Zhang Q. In vitro study on induction systems for marrow mesenchymal stem cells to chondrocytes. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2006;20(11):1114-1118.
- [8] Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, et al. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal(hADAS)cells. *Stem Cells.* 2005;23(3):412-423.
- [9] Lu F, Mizuno H, Uysal CA, et al. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(1):50-58.
- [10] Stosich MS, Mao JJ. Adipose tissue engineering from human adult stem cells; clinical implications in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119:71-83.
- [11] Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27:6052-6063.
- [12] Betre H, Ong SR, Guilak F, et al. Chondrocytic differentiation of human adipose adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterial.* 2006;27(1):91-99.
- [13] Huang JI, Zuk PA, Jones NF, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg.* 2004;113:585-594.

来自本文课题的更多信息一

**作者贡献:** 文章全部作者均参加了本次实验的设计, 实施及评估, 均受过正规培训。

**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:** 根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》, 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书。

**文章概要:** 实验采用脂肪来源间充质干细胞为对象, 建立一种体外分离、培养人脂肪来源间充质干细胞的方法, 并探讨其基本生物学特性及成骨成软骨的潜能。

本期专题: 用于胚胎干细胞培养的饲养层细胞

- 1 人胚胎干细胞饲养层的制备及生物学活性, 见2011年15卷23期4233页。
- 2 制作胚胎干细胞饲养层细胞条件的优化, 见2010年14卷36期6768页。
- 3 人胚胎干细胞在人源和鼠源饲养层上的生长特性比较, 见2009年13卷49期9757页。
- 4 人胚胎干细胞无血清无饲养层培养体系的建立, 见2009年13卷45期8889页。
- 5 小鼠饲养层细胞制备与小鼠胚胎干细胞SF1-G的培养, 见2010年14卷23期4303页。
- 6 小鼠胚胎及人包皮成纤维细胞按比例制成混合饲养层上的人胚胎干细胞生长状态, 见2008年12卷3期424页。

**1 人胚胎干细胞饲养层的制备及生物学活性**  
 胡嘉波(江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏省镇江市 212001)  
**推荐理由:** 实验采用胰蛋白酶分步消化法制备小鼠成纤维细胞, 此方法所获得的小鼠胚胎成纤维细胞复苏后有较高的生物学活性, 可为人胚胎干细胞传代培养提供大量的、稳定的、优质的

饲养层细胞。见2011年23期4233-4236页。

**2 制作胚胎干细胞饲养层细胞条件的优化**  
 张万里(华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科, 湖北省武汉市 430022)  
**推荐理由:** 首次全面系统研究了胰酶、丝裂霉素和冻存等因素在小鼠胚胎成纤维细胞制作过程中的影响, 提供了科学定量的数据支持, 研究表明缩短胰酶消化时间和程序性降温能提高小鼠胚胎成纤维细胞生存率; 丝裂霉素 20 mg/L 作用 2 h 和 10 mg/L 作用 2.5 h 复活的小鼠胚胎成纤维细胞最适宜制作胚胎干细胞饲养层细胞, 为胚胎干细胞培养提供半定量理论依据。见2010年36期6768-6771页。

**3 人胚胎干细胞在人源和鼠源饲养层上的生长特性比较**  
 胡智兴(昆明医学院药理学教研室, 云南省昆明市 650031; 昆明医学院生物工程中心, 云南省昆明市 650031)  
**推荐理由:** 实验分别利用永生化人成纤维细胞和小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层, 培养人胚胎干细胞株 BG02, 通过对比其生长特性以及全能性标记表达的差异, 探讨不同来源饲

养层对人胚胎干细胞生长的影响。结果发现在这两种饲养层上的人胚胎干细胞形态相似, 均表达人胚胎干细胞的特异性标志物; 但在永生化人成纤维细胞饲养层的人胚胎干细胞 Oct-4 阳性率更高, 细胞倍增时间更长。这些结果说明人胚胎干细胞在人源和鼠源成纤维细胞饲养层的体外培养生物学特性有明显不同, 实验对于筛选 BG02 细胞株最优化培养体系并运用于临床具有现实意义。见2009年49期9757-9760页。

**4 人胚胎干细胞无血清无饲养层培养体系的建立**  
 胡智兴(昆明医学院药理学教研室, 云南省昆明市 650031)

**5 小鼠饲养层细胞制备与小鼠胚胎干细胞SF1-G的培养**  
 刘峰(中南大学湘雅医院内分泌科, 湖南省长沙市 410008)

**6 小鼠胚胎及人包皮成纤维细胞按比例制成混合饲养层上的人胚胎干细胞生长状态**  
 李斌(海南医学院, 海南省海口市 571101; 海南医学院附属医院生殖医学中心, 海南省海口市 570102)

内容详见: www.CRTER.org