

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.40.012 [http://www.crter.org]
孙加斌, 顾翔, 潘月晴. 人胚胎成纤维细胞饲养层的制备[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40):7096-7101.

人胚胎成纤维细胞饲养层的制备**

孙加斌¹, 顾翔¹, 潘月晴² (江苏省苏北人民医院, ¹心内科, ²妇产科, 江苏省扬州市 225001)

文章亮点:

1 因为人胚胎成纤维细胞能很好地支持人胚胎干细胞、人胚胎生殖细胞等人干细胞的生长, 从而推测人胚胎成纤维细胞亦能为人骨髓极小胚胎样干细胞体外培养扩增提供良好的微环境。课题组设计以人胚胎成纤维细胞制备饲养层, 用来培养流式细胞仪分选后的人骨髓极小胚胎样干细胞。

2 通过分析比较, 12 mg/L 丝裂霉素 C 作用 3 h 后能较好地抑制人胚胎成纤维细胞的增殖, 并且保持其活力约 2 周, 可以在很长一段时间内用作饲养层。此外处理完毕后需用 PBS 冲洗 10 次, 每次 3 min, 尽可能去除残留的丝裂霉素 C, 避免残留物对极小胚胎样干细胞产生不良作用。

3 文章所涉及的极小胚胎样干细胞研究在国际干细胞领域刚刚兴起, 国内尚很少有此方面报道。一旦体外培养扩增成功, 可为极小胚胎样干细胞的临床研究与应用带来巨大的帮助。但体外干细胞培养扩增条件十分严格, 必须做好充分准备。

关键词:

干细胞; 干细胞培养与分化; 人胚胎成纤维细胞; 极小胚胎样干细胞; 细胞培养; 细胞分离; 饲养层; 胚胎; 扩增; 骨髓; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

主题词:

干细胞; 成纤维细胞; 骨髓; 细胞培养技术

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81170104)*

摘要

背景: 极小胚胎样干细胞是近年来发现的一种具有类似胚胎干细胞生物学特性的非造血干细胞, 但其体外培养扩增的方法报道极少。有研究推测, 人胚胎成纤维细胞能为人骨髓极小胚胎样干细胞体外培养扩增提供良好的微环境。

目的: 从人胚胎躯干中分离、培养人胚胎成纤维细胞, 制备人胚胎成纤维细胞饲养层用于人骨髓极小胚胎样干细胞的培养。

方法: 利用胰酶消化法从孕 5-9 周龄人胚胎躯干中分离培养人胚胎成纤维细胞。制作饲养层, 使用不同浓度丝裂霉素 C 处理后, 用于培养分选后的人骨髓极小胚胎样干细胞, 以细胞形态、生长曲线作为胚胎成纤维细胞和饲养层的评价指标。

结果与结论: 从人胚胎中成功分离培养出人胚胎成纤维细胞, 该细胞可传代 24 代以上, 且经过传代及冻存复苏后生物学特性无改变。丝裂霉素 C 低于 12 mg/L 时, 人胚胎成纤维细胞增殖不能完全抑制; 高于 14 mg/L, 人胚胎成纤维细胞可能死亡。12 mg/L 丝裂霉素 C 作用 3 h 后能较好地抑制人胚胎成纤维细胞的增殖, 并且保持其活力约 2 周, 可以在很长一段时间内用作人骨髓极小胚胎样干细胞的饲养层。

Preparation of a feeder layer of human embryonic fibroblasts

Sun Jia-bin¹, Gu Xiang¹, Pan Yue-qing² (¹Department of Cardiology, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Very small embryonic-like stem cells are a kind of non-hemopoietic stem cells, which have similar biological characteristics to embryonic stem cells. But the method of its culture and *in vitro* proliferation is rarely reported. Studies have speculated that human embryonic fibroblasts can provide a good microenvironment for *in vitro* culture and proliferation of very small embryonic-like stem cells.

OBJECTIVE: To isolate and cultivate human embryonic fibroblasts derived from human embryonic trunks and to establish a feeder layer culture system of human embryonic fibroblasts for culturing very small embryonic-like stem cells derived from human bone marrow.

METHODS: The human embryonic fibroblasts were isolated from the subcutaneous connective tissue of human embryos at pregnant 5-9 weeks using trypsin digestion method. Different concentrations of mitomycin C were used to pretreat feeder layers, which were used for cultivating very small embryonic-like stem cells derived from human bone marrow. The effects of human embryonic fibroblasts and feeder layers were assessed by cell

孙加斌★, 男, 1987 年生, 山东省邹城市人, 汉族, 扬州大学医学院在读硕士, 主要从事心血管疾病基础及临床方面的研究。sunjiabin529@126.com

通讯作者: 顾翔, 教授, 主任医师, 博士生导师, 江苏省苏北人民医院心血管内科(扬州大学第一临床医学院), 江苏扬州市 225001 sbyygx@medmail.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)40-07096-06

收稿日期: 2013-03-09
修回日期: 2013-04-07
(201303011/G·W)

Sun Jia-bin★, Studying for master's degree, Department of Cardiology, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China sunjiabin529@126.com

Corresponding author: Gu Xiang, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Cardiology, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China sbyygx@medmail.com.cn

Received: 2013-03-09
Accepted: 2013-04-07

morphology and growth curves.

RESULTS AND CONCLUSION: The human embryonic fibroblasts were successfully isolated and cultivated from human embryos, and they could be passaged beyond the 24th generation. The biologic characteristics of the cells had no changes after passage and cryopreservation. The optimal concentration of mytomycin C to inhibit proliferation of human embryonic fibroblasts was 12 mg/L for 3 hours. The human embryonic fibroblasts derived from human embryos are successfully isolated and cultivated and to produce feeder layers for very small embryonic-like stem cells derived from human bone marrow.

Subject headings: stem cells; fibroblasts; bone marrow; cell culture techniques

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81170104*

Sun JB, Gu X, Pan YQ. Preparation of a feeder layer of human embryonic fibroblasts. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(40):7096-7101.

0 引言 Introduction

极小胚胎样干细胞是一种多能非造血干细胞^[1-8], 具有类似胚胎干细胞的生物学特性, 可以向包括心肌和血管内皮细胞在内的3个胚层的细胞分化, 表明了极小胚胎样干细胞具有多分化潜能特性, 且无免疫排异, 并能改善急性心肌梗死后的心功能和心脏重构^[9], 甚至已有学者认为极小胚胎样干细胞是成体组织的真正意义上的干细胞, 而骨髓间充质干细胞和造血干细胞实际上是由极小胚胎样干细胞进一步分化所生成的祖细胞, 因而极小胚胎样干细胞为心血管再生医学研究带来新的前景^[10-13]。

极小胚胎样干细胞是由美国路易斯维尔大学 Kucia 等^[1]2006年首先从成年小鼠骨髓单个核细胞中成功分离出来并命名, 表型为 Sca-1⁺lin⁻CD45⁻, 表达原始多能干细胞标志, 直径仅为 2-4 μm, 较血小板大, 红细胞小, 细胞核大, 含常染色质。随后的研究发现在人和小鼠的骨髓、脐血、周围血及多个器官中也存在, 但它们的数量很少, 占总的单个核细胞的 0.01%-0.02%^[2-8], 这些细胞的数量仅在较年轻个体中较多, 分离后体外扩增也十分困难, 因此极小胚胎样干细胞的数量限制了其临床应用。为了解决这一难题, 科研人员做了大量研究, 研究表明: 如果在机体应激如急性心肌梗死的条件下, 动员到外周血中的极小胚胎样干细胞数量将显著增加^[14], 此外粒细胞集落刺激因子可以动员极小胚胎样干细胞至外周血^[4, 15], 并且这些极小胚胎样干细胞具有向心肌等细胞分化的能力, 从而为提供有效数量的极小胚胎样干细胞应用于临床开辟了新路径; 此外发现小鼠极小胚胎样干细胞与 C2C12 小鼠成肌细胞培养层共同培养时可以形成类胚体^[1, 16], 并且从类胚体中获取的细胞与极小胚胎样干细胞具有相同的生物特异性, 同时可以形成新的类胚体, 从而使极小胚胎样干细胞扩增, 但人类极小胚胎样干细胞并未出现该现象, 提示存在种属特异性, 需要某种特异性因子^[16]。最近有学者认为 Oct-4 和相关印记基因在调控极小胚胎样干细胞的增殖及发育过程中

起着关键作用^[17], 以及 SDF-1/CXCR4 等化学趋化轴对极小胚胎样干细胞在骨髓定居、外周血及损伤组织器官中的归巢有重大影响^[8]。

杨跃进等^[18]利用免疫磁珠分选的方法得到极小胚胎样干细胞, 再通过条件培养基进行体外培养获得了一定数量的极小胚胎样干细胞, 但要进行移植治疗急性心肌梗死仍远远不够。目前国内外对骨髓极小胚胎样干细胞的研究报道较少, 并且大都仅对其生物学特性探索, 前期作者已成功分离并鉴定出人骨髓极小胚胎样干细胞, 为更好地研究其特性需达到一定数量, 因此为其体外培养扩增寻找优越的土壤, 具有一定创新性。本课题组拟使用人胚胎成纤维细胞制备饲养层, 用来培养流式细胞仪分选后的人骨髓极小胚胎样干细胞。因为人胚胎成纤维细胞能很好地支持人胚胎干细胞、人胚胎生殖细胞等人干细胞的生长^[19-22], 从而推测人胚胎成纤维细胞亦能为人骨髓极小胚胎样干细胞体外培养扩增提供良好的微环境, 得到一定量的骨髓极小胚胎样干细胞, 为进一步临床研究奠定坚实的基础。

本实验分离培养 5-9 周龄人胚胎来源的成纤维细胞, 对其生物学特性以及作为饲养层使用时细胞代数的选择、丝裂霉素 C 处理浓度和时间等方面进行详细探讨, 从而建立最佳饲养层培养体系, 为进一步开展有关人骨髓人胚胎成纤维细胞体外培养、扩增奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 对比观察实验。

时间和地点: 于 2012 年 6 至 11 月在扬州大学农学院实验、流式细胞分析实验室完成。

材料:

药物流产后胚胎: 胚胎来源于江苏省苏北人民医院妇产科 1 例行药物流产的 27 岁健康女性, 根据 1994 年中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》^[23], 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书。

人胚胎成纤维细胞分离培养及饲养层制备实验的主要试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|--------------------------------------|-----------------|
| 细胞培养瓶、细胞冻存管 | Corning 公司 |
| 高糖 DMEM 培养液、含 0.02% EDTA 的 0.25%胰蛋白酶 | Gibco 公司 |
| 胎牛血清 | HyClone 公司 |
| 丝裂霉素 C | 大连美仑生物技术有限公司 |
| 青霉素和链霉素 | 江苏碧云天公司 |
| 核糖核酸酶 | 中国 Fermentas 公司 |
| 碘化丙啶 | 美国 Sigma 公司 |
| 噻唑蓝 | 美国 Amresco 公司 |
| 5810R 型离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| Olympus 相差倒置显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| 流式细胞仪 | 美国 BD 公司 |
| 细胞CO ₂ 恒温培养箱 | 美国 Forma 公司 |
| 超净工作台 | 中国苏州卓越净化设备有限公司 |

方法:

原代人胚胎成纤维细胞的分离与培养: 从江苏省苏北人民医院妇产科收集合法孕5-9周的人药物流产胚胎(在无菌条件下操作)。用含双抗的PBS冲洗获取的胚胎组织6-8次,分离胚胎(置于冰上),仅留胚胎躯干部,将其剪碎成约1 mm×1 mm×1 mm的组织块,用含0.02%EDTA的0.25%胰蛋白酶充分混匀,在37 °C消化4-6 min后,即加入等体积的培养液终止消化,然后用325目滤布过滤得到细胞悬液,以1 000 r/min 离心5 min,去上清后用含体积分数10%胎牛血清的高糖DMEM培养基(含丙酮酸钠)重悬细胞,接种于面积为25 cm²的培养瓶中,置于体积分数5%CO₂ 95%湿度、37 °C培养箱中培养。在倒置显微镜下观察,当细胞90%长满时,以1:3的比例对其进行传代,并于液氮中保存^[24-25]。

人胚胎成纤维细胞的冻存与复苏: 消化收集对数生长期的人胚胎成纤维细胞,加入冻存液配制成浓度为7×10⁸-1×10⁹ L⁻¹细胞悬液,每支冻存管分装入1.5-1.8 mL。逐步降温后冻存管移入液氮罐中,可保存1年。从液氮罐中取出冻存的细胞后立即投入到37 °C水浴中,待融化为悬液后离心收集细胞,置于体积分数5%CO₂ 95%湿度、37 °C培养箱中孵育^[26]。

人胚胎成纤维细胞的生长曲线: 取第4, 8和12代人胚胎成纤维细胞,以2×10³/孔的细胞浓度接种于24 孔板分10组,每组3个复孔。置于体积分数5%CO₂, 95%湿度、37 °C培养箱中培养。逐日于相同时间点选取1组,用锥虫蓝染色后计数活细胞数,并计算其平均细胞数。以培养时间为横轴,以细胞数为纵轴,绘制细胞生长曲线,用Patterson公式计算细胞在对数生长期的倍增时间^[27]。

人胚胎成纤维细胞的生长周期: 消化收集第8代人胚胎成纤维细胞,约为1×10⁶个细胞,用PBS洗涤1次后,加入体积分数70%乙醇于4 °C固定至少2 h,然后再用PBS

洗涤2次,与核糖核酸酶(100 mg/L)和碘化丙啶(10 mg/L)混匀,4 °C避光孵育1 h,流式细胞仪检测DNA含量。

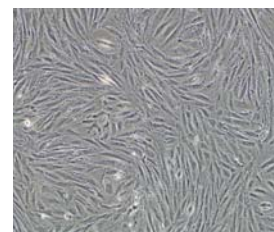
人胚胎成纤维细胞饲养层的制备及丝裂霉素C对人胚胎成纤维细胞增殖影响: 取第6-10代对数生长期人胚胎成纤维细胞为饲养细胞,在培养液中加入特定浓度丝裂霉素C进行处理,在培养箱中孵育3 h。弃去含丝裂霉素C的培养液,PBS冲洗4-6次去除残余的丝裂霉素C,消化饲养细胞种植到预先用0.9%明胶处理过的培养板上(接种浓度6×10⁷ L⁻¹),置于体积分数5%CO₂, 95%湿度、37 °C培养箱中培养备用。同时为探讨丝裂霉素C对人胚胎成纤维细胞饲养层处理的最佳浓度及时间,实验选用10, 12, 14 mg/L 3种丝裂霉素C质量浓度对人胚胎成纤维细胞进行处理,同时设置未处理组作为对照,用MTT比色法测定人胚胎成纤维细胞数量^[28]。

主要观察指标: ①人胚胎成纤维细胞在光镜下的形态结构:呈鱼群状或漩涡状。②人胚胎成纤维细胞的生长曲线与生长周期。③不同质量浓度丝裂霉素C对人胚胎成纤维细胞增殖的影响。④丝裂霉素C处理时间对人胚胎成纤维细胞增殖的影响。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 17.0 for windows统计软件进行数据处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素 χ^2 检验检测组间数据的差异。

2 结果 Results

2.1 人胚胎成纤维细胞的分离培养及生物学特性 人胚胎成纤维细胞属于贴壁生长型,将分离后的原代人胚胎成纤维细胞接种于25 cm²培养瓶中,部分细胞8 h贴壁,去除未贴壁细胞,加入新的培养液继续培养。第3代人胚胎成纤维细胞形态基本均一,呈长梭形,周边向外伸出纤维状伪足,生长较为迅速,每当长满培养瓶90%时,按1:3比例传代,平均三四天传代,当90%长满时呈鱼群状或漩涡状,见图1。

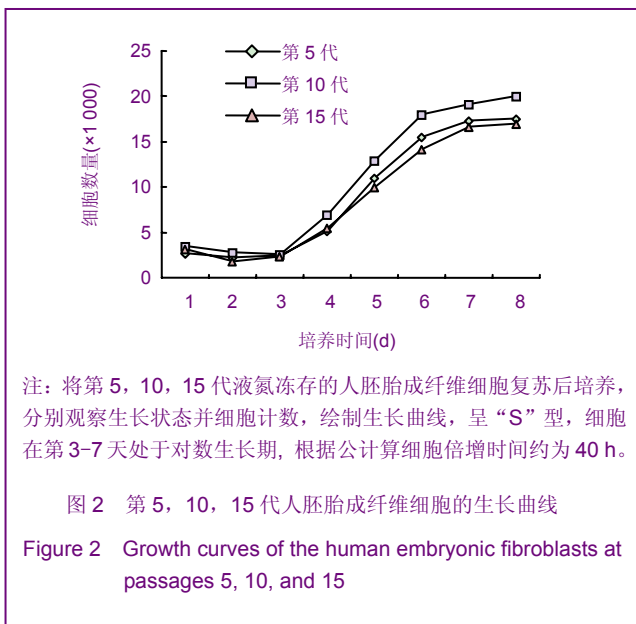


注:在相差倒置显微镜下,可见第3代人胚胎成纤维细胞贴壁生长,呈条带状或漩涡状。

图1 第3代人胚胎成纤维细胞的生物学特性(相差倒置显微镜,×100)

Figure 1 Morphology of the human embryonic fibroblasts at passage 3 (Inverted phase contrast microscope, ×100)

已传24代以上, 第16代后细胞较前生长缓慢, 形态发生变化, 出现较多明显粗颗粒区, 呈衰老征象。细胞冻存于液氮可长期保存, 复苏后细胞存活率可达95%以上, 且细胞状态和增殖能力无明显变化。所绘制的该细胞生长曲线近似“S”形, 细胞在第3-7天处于对数生长期, 根据公计算细胞倍增时间约为40 h, 见图2。其中第8代细胞周期分析表明, G₀/G₁期、S期和G₂/M期所占比例分别为49.8%、6.65%和43.55%, 可见大部分细胞处于静息期(49.8%), 少部分细胞处于活跃的增殖期(6.65%)。



2.2 不同质量浓度丝裂霉素C对人胚胎成纤维细胞饲养层的影响 见表1。

表1 不同质量浓度丝裂霉素C对人胚胎成纤维细胞增殖的影响

Table 1 Effects of different-concentration mitomycin C on human embryonic fibroblast proliferation (x̄±s, A)

| 时间 | 丝裂霉素C (mg/L) | | | |
|-----|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0 | 10 | 12 | 14 |
| 1 d | 1.196±0.029 | 1.189±0.013 | 1.191±0.012 | 1.175±0.026 |
| 2 d | 1.825±0.018 | 1.437±0.022 | 1.143±0.017 ^a | 0.872±0.016 ^a |
| 3 d | 2.612±0.015 | 1.498±0.021 ^a | 1.167±0.020 ^a | 0.895±0.023 ^a |
| 4 d | 3.453±0.016 | 1.586±0.019 ^a | 1.131±0.015 ^a | 0.756±0.022 ^a |
| 5 d | 4.217±0.023 | 1.765±0.017 ^a | 1.152±0.022 ^a | 0.673±0.019 ^a |

与对照组(丝裂霉素C 0 mg/L)相比, ^aP < 0.05。

注: 表中数据为使用 MTT 比色法测定人胚胎成纤维细胞活力时, 酶标仪上测定的 A 值。结果提示丝裂霉素 C 为 12 mg/L 时能明显抑制胚胎成纤维细胞的有丝分裂, 即成纤维细胞增殖被抑制。丝裂霉素 C 为 14 mg/L 时虽然与对照组差异有显著性意义, 但成纤维细胞出现死亡, 不宜做饲养层。

用10, 12, 14 mg/L 3组不同质量浓度的丝裂霉素C

处理可抑制人胚胎成纤维细胞增殖, 在保持其生存能力的同时, 细胞形态不变, 但数目不再增加, 培养液消耗量明显下降。经12 mg/L丝裂霉素C作用第7代人胚胎成纤维细胞3 h, 能明显抑制胚胎成纤维细胞的有丝分裂, 连续观察5 d, 使用MTT比色法测定人胚胎成纤维细胞活力, 酶标仪上测定的吸光度值(A)差异有显著性意义(P < 0.05)。丝裂霉素C低于12 mg/L时, 细胞增殖不能完全抑制; 高于14 mg/L, 细胞可能死亡。

在经12 mg/L的丝裂霉素C处理后的饲养层细胞可在体外存活16 d以上, 可维持人骨髓极小胚胎样干细胞在体外的扩增, 本课题组前期研究发现人骨髓极小胚胎样干细胞在条件培养基中第4-7天增殖明显。

2.3 丝裂霉素C处理时间对人胚胎成纤维细胞饲养层的影响

用12 mg/L丝裂霉素C处理第7代人胚胎成纤维细胞, 分别处理2, 3, 4 h, 以6×10⁷ L⁻¹的接种浓度接种在24孔板内, 分别在培养的第1, 3, 5, 7, 9天利用MTT比色法测定人胚胎成纤维细胞活力。经12 mg/L丝裂霉素C作用第7代人胚胎成纤维细胞3 h, 在保持其生存能力的同时, 细胞形态不变, 但数目不再增加, 能明显抑制胚胎成纤维细胞的有丝分裂, 见表2。

表2 质量浓度为12 mg/L丝裂霉素C的处理时间对第7代人胚胎成纤维细胞增殖的影响

Table 2 Effect of treating time of 12 mg/L mitomycin C on passage 7 human embryonic fibroblast proliferation (x̄±s, A)

| 培养时间(d) | 丝裂霉素C处理时间 | | |
|---------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| | 2 h | 3 h | 4 h |
| 1 | 1.237±0.016 | 1.185±0.012 ^a | 1.163±0.025 ^a |
| 3 | 1.362±0.022 | 1.136±0.016 ^a | 0.865±0.018 ^a |
| 5 | 1.553±0.028 | 1.178±0.020 ^a | 0.743±0.027 ^a |
| 7 | 1.749±0.035 | 1.152±0.017 ^a | 0.556±0.030 ^a |
| 9 | 1.963±0.047 | 1.146±0.023 ^a | 0.379±0.036 ^a |

与处理2 h组相比, ^aP < 0.05

注: 表中数据为使用 MTT 比色法测定人胚胎成纤维细胞活力时, 酶标仪上测定的 A 值。提示 12 mg/L 丝裂霉素 C 作用 3 h 后能较好地抑制人胚胎成纤维细胞的增殖。另外处理 4 h 组在第 7 天时有部分成纤维细胞出现死亡。

3 讨论 Discussion

极小胚胎样干细胞是一种具有多向分化潜能, 生物学特性类似胚胎干细胞的种子细胞, 与先前广泛研究的间充质干细胞相比, 体积小, 更幼稚, 分化能力更强, 并有可能成为解决干细胞冠状动脉回输导致栓塞问题的新方法, 若作为移植治疗心肌梗死的种子细胞, 相信前景广阔。此外, 最近研究发现极小胚胎样干细胞拥有许多临床应用潜能: ①可用于中枢神经系统损伤的修

复, 如脑卒中、创伤性脑损伤、脊髓损伤、神经变性疾病(阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、亨廷顿病)^[29-30]。②在链脲霉素所致的糖尿病中, 骨髓移植可改善胰腺功能, 相关研究表明是骨髓中极小胚胎样干细胞在发挥重要作用^[31]。③可分化为视网膜细胞, 为广大眼晴疾病患者带来新的希望^[32]。④可以分化为骨骼组织, 修复坏死或损伤的骨组织^[33], 这些无疑为干细胞治疗领域带来新的福音, 因此研究极小胚胎样干细胞具有重要意义, 但极小胚胎样干细胞在人和动物骨髓、脐带血、外周血及多个器官中含量十分稀少, 占总的单个核细胞的0.01%-0.02%^[6], 因此极小胚胎样干细胞的体外扩增培养十分重要, 实验旨在探索使用人胚胎成纤维细胞作为饲养层体外扩增培养人骨髓极小胚胎样干细胞。

目前有相关报道用人胚胎成纤维细胞作为饲养层培养胚胎干细胞以及胚胎生殖细胞^[19-21], 国内也有学者尝试和探讨^[34], 但使用人胚胎成纤维细胞作为饲养层体外扩增培养人骨髓极小胚胎样干细胞国内外目前尚无报道。同时已有人胚胎成纤维细胞分离培养的研究报道^[24, 35], 但人胚胎成纤维细胞的分离和饲养层制作在技术上仍需考究。此外, 分离人胚胎成纤维细胞来源的胚胎受到伦理学方面的限制, 标本的获取和实验过程必须严格按照伦理学的规定进行操作。

本实验取孕5-9周龄合法药物流产胚胎组织分离培养人胚胎成纤维细胞并进行人胚胎成纤维细胞饲养层制备, 对人胚胎成纤维细胞的生物学特性、人胚胎成纤维细胞饲养层制作时细胞代数的选择、丝裂霉素C使用浓度及处理时间方面进行详细比较, 从而探讨人胚胎成纤维细胞作为饲养层培养的最佳状态。实验分离培养的人胚胎成纤维细胞在体外已经培养了24代以上, 经过冻存复苏生物学特性未发生改变。而极小胚胎样干细胞具有类似胚胎干细胞的生物学特性, 体外极容易分化, 因此对于其饲养层应需要具有足够的生长因子及抑制因子分泌, 这要求人胚胎成纤维细胞应有较高的纯度和良好的生长状态。实验结果表明, 原代分离的人胚胎成纤维细胞13代前长势良好, 此后逐渐出现衰老征象, 因此最好选用13代之前的人胚胎成纤维细胞作为饲养层。另外制备饲养层前对人胚胎成纤维细胞进行预处理十分关键, 使其在保持分泌功能的基础上失去增殖能力, 避免与极小胚胎样干细胞发生生长竞争。目前最常用的是使用丝裂霉素C^[28, 36], 其原理为通过烷化作用与细胞DNA交联, 使其双链解聚, 抑制DNA复制, 在处理过程中需对时间和剂量进行调控。该过程直接影响人胚胎成纤维细胞的生长状态, 处理不足无法有效抑制其增殖; 过量则造成人胚胎成纤维细胞死亡, 不但丧失分泌相关因子的功能, 而且释放的DNA碎片和溶酶体酶会对所培养的极小胚胎样干细胞造成损伤。通过分析比较, 12 mg/L丝裂霉素C作用3 h后能较好地

抑制人胚胎成纤维细胞的增殖, 并且保持其活力约2周, 可以在很长一段时间内用作饲养层。此外处理完毕后需用PBS冲洗10次, 每次3 min, 尽可能去除残留的丝裂霉素C, 避免残留物对极小胚胎样干细胞产生毒副作用。

综上所述, 本实验建立了人胚胎成纤维细胞的分离、培养及饲养层制备体系, 为进一步探讨和应用人胚胎成纤维细胞作为饲养层培养人骨髓极小胚胎样干细胞奠定了坚实的基础。

致谢: 扬州大学动科学院李碧春教授给予本次实验指导, 提供实验平台、提供工作方便, 在此表示衷心的感谢。

作者贡献: 孙加斌负责实验设计及实施, 实验评估者为孙加斌、顾翔、潘月晴。样本资料收集者为潘月晴、孙加斌, 孙加斌成文(统计学处理者), 顾翔审校, 孙加斌对文章负责。

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。

伦理要求: 实验对样本材料的处理方法符合中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》。样本提供者在充分了解本实验方案的前提下签署“知情同意书”, 干预方案获医院伦理委员会批准。

学术术语: 极小胚胎样干细胞-是一种具有多向分化潜能, 生物学特性类似胚胎干细胞的种子细胞, 与先前广泛研究的间充质干细胞相比, 体积小, 更幼稚, 分化能力更强。但极小胚胎样干细胞在人和动物骨髓、脐带血、外周血及多个器官中含量十分稀少, 因此极小胚胎样干细胞的体外扩增培养十分重要。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Kucia M, Reza R, Campbell FR, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*. 2006; 20(5):857-869.
- [2] Wojakowski W, Tendera M, Kucia M, et al. Mobilization of bone marrow-derived Oct-4+ SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(1):1-9.
- [3] Kucia M, Wysoczynski M, Wu W, et al. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*. 2008;26(8):2083-2092.
- [4] Halasa M, Baskiewicz-Masiuk M, Dabkowska E, et al. An efficient two-step method to purify very small embryonic-like(VSEL) stem cells from umbilical cord blood (UCB). *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(2):239-243.
- [5] Zuba-Surma EK, Kucia M, Dawn B, et al. Bone marrow-derived pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSELs) are mobilized after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(5):865-873.

- [6] Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*. 2007;21(2): 297-303
- [7] Paczkowska E, Kucia M, Koziarska D, et al. Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. *Stroke*. 2009;40(4): 1237-1244
- [8] Ratajczak MZ, Kucia M, Ratajczak J, et al. A multi-instrumental approach to identify and purify very small embryonic like stem cells (VSELs) from adult tissues. *Micron*. 2009;40(3):386-393.
- [9] Zuba-Surma EK, Guo Y, Taher H, et al. Transplantation of expanded bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells (VSEL-SCs) improves left ventricular function and remodeling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2011;15(6):1319-1328.
- [10] Wu JH, Wang HJ, Tan YZ, et al. Characterization of Rat Very Small Embryonic-Like Stem Cells and Cardiac Repair After Cell Transplantation for Myocardial Infarction. *Stem Cells Dev*. 2012;21(8):1367-1379.
- [11] Zhang Q, Yang YJ, Qian HY, et al. Very small embryonic-like stem cells (VSELs)-a new promising candidate for use in cardiac regeneration. *Ageing Res Rev*. 2011;10:173-177.
- [12] Pang R, Zhang Y, Pan X, et al. Embryonic-like stem cell derived from adult bone marrow: immature morphology, cell surface markers, ultramicrostructure and differentiation into multinucleated fibers in vitro. *Cell Mol Biol*. 2010;56: 1276-1285.
- [13] Bhartiya D, Shaikh A, Nagvenkar P, et al. Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy. *Stem Cells Dev*. 2012;21:1-6.
- [14] Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Ziada KM, et al. Evidence of Mobilization of Pluripotent Stem Cells into Peripheral Blood of Patients with Myocardial Ischemia. *Exp Hematol*. 2010; 38: 1131-1142.
- [15] 郭慧娟,王健,张兴秀,等. 粒细胞集落刺激因子对骨髓极小胚胎样干细胞的动员和募集[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(14):2530-2534.
- [16] Kucia M, Wysoczynski M, Ratajczak J, et al. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res*. 2008;331(1):125-134.
- [17] Shin DM, Zuba-Surma EK, Wu W, et al. Novel epigenetic mechanisms that control pluripotency and quiescence of adult bone marrow-derived Oct4(+) very small embryonic-like stem cells. *Leukemia*. 2009;23:2042-2051.
- [18] 杨跃进,王红.一种分选人骨髓极小胚胎样干细胞的方法. *中国* 201110132905.0[P]. 2011-11-02.
- [19] 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.
- [20] Li F, Liu Y, Chen D, et al. Leukemia inhibitory factor-expressing human embryonic lung fibroblasts as feeder cells for human embryonic germ cells. *Cells Tissues Organs*. 2007;186 (4): 221-228
- [21] Sidhu KS, Lie KH, Tseh BE. Transgenic human fetal fibroblasts as feeder layer for human embryonic stem cell lineage selection. *Stem Cells Dev*. 2006;15(5):741-747
- [22] Kibschull M, Mileikovsky M, Michael IP, et al. Human embryonic fibroblasts support single cell enzymatic expansion of human embryonic stem cells in xeno-free cultures. *Stem Cell Res*. 2011; 6(1):70-82.
- [23] 中华人民共和国国务院. 医疗机构管理条例. 1994-2-26.
- [24] Wang YB, Chen B, Wang YC, et al. The feeder layer of human embryonic fibroblasts supports the growth of human spermatogonial stem cells. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2008; 14(12):1063-1068.
- [25] Lapan AD, Gussoni E. Isolation and characterization of human fetal myoblasts. *Methods Mol Biol*. 2012;798:3-19.
- [26] 常志存, 窦忠英, 高志敏. 人胚胎成纤维细胞的冷冻保存[J]. *西北农业学报*, 2000, 9(1):6-9.
- [27] Na RS, Zhao QJ, Jin da P, et al. Establishment and biological characteristics of Ujumqin sheep fibroblast line. *Cytotechnology*. 2010;62(1):43-52.
- [28] 余树民, 王晗, 窦忠英. 丝裂霉素C处理后鼠胚成纤维细胞活力分析[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2007, 35(5):1-5.
- [29] Paczkowska E, Dabkowska E, Nowacki P, et al. Stem cell-based therapy in central nervous system diseases. *Neurol Neurochir Pol*. 2009;43(6):550-558.
- [30] Paczkowska E, Kucia M, Koziarska D, et al. Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. *Stroke*. 2009;(4): 1237-1244.
- [31] Huang Y, Kucia M, Hussain LR, et al. Bone marrow transplantation temporarily improves pancreatic function in streptozotocin-induced diabetes: potential involvement of very small embryonic-like cells. *Transplantation*. 2010;89(6): 677-685.
- [32] Liu Y, Gao L, Zuba-Surma EK, et al. Identification of small Sca-1(+), Lin(-), CD45(-) multipotential cells in the neonatal murine retina. *Exp Hematol*. 2009;(9):1096-1107.
- [33] Havens AM, Shiozawa Y, Jung Y, et al. Human very small embryonic-like cells generate skeletal structures, in vivo. *Stem Cells Dev*. 2013;22(4):622-630.
- [34] 陈永珍, 李芳, 陈谦, 等. 人胚胎成纤维细胞对人胚胎生殖细胞生长的作用[J]. *解剖学杂志*, 2005, 28(6):625-628.
- [35] 王英, 何津, 李玉林. 人胚胎成纤维细胞的分离、培养和鉴定及人胚胎生殖细胞体外生长所需细胞因子的表达[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2007, 33(2):245-248.
- [36] Nieto A, Cabrera CM, Catalina P, et al. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. *Cell Biol Int*. 2007;31(3):269-278.