

活率下降的主要原因可能是细胞凋亡。

心肌细胞的抗氧化能力强弱与心肌细胞凋亡存在着密切联系。缺氧条件下,细胞内防御体系被激活,其抗氧化作用主要通过 3 条途径:①消除自由基和活性氧以免引发脂质过氧化;②分解过氧化物,阻断氧化链;③除去起催化作用的金属离子。GSH - Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化 H_2O_2 分解的酶,催化还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 对 H_2O_2 的还原反应,可起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。细胞内总抗氧化能力和 GSH - Px 活性的变化,是反应细胞对缺氧耐受的重要指标。由于缺氧可诱导细胞内产生大量自由基,过量积累会对细胞产生不可逆的损伤,最终导致细胞坏死或凋亡;而 GSH - Px 在细胞缺氧时活性增加,可有效清除自由基等有害物质,保护细胞免受损伤。新近研究表明,Res 抗缺氧诱导心肌细胞凋亡作用与 SIRT1 - FoxO1 通路有关^[6]。本研究发现在给予 Res 干预后,心肌细胞总抗氧化能力和 GSH - Px 活性显著升高,推测 Res 可能通过上调心肌细胞 GSH - Px 活性,提高其细胞内总

抗氧化能力,从而减轻缺氧诱导心肌细胞凋亡程度,其机制尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Lin JF, Lin SM, Chih CL, *et al.* Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats[J]. *Life Sci*, 2008, 83(9-10):313-317
- 2 Tsai SK, Hung LM, Fu YT, *et al.* Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats [J]. *J Vasc Surg*, 2007, 46(2):346-353
- 3 Lee M, Kim S, Kwon OK, *et al.* Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(4):418-424
- 4 Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials[J]. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2009, 2(5):409-418
- 5 Abbate A, Morales C, De Falco M, *et al.* Ischemia and apoptosis in an animal model of permanent infarct-related artery occlusion[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 121(1):109-111
- 6 Chen CJ, Yu W, Fu YC, *et al.* Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1 - FoxO1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(3):389-393

(收稿:2010-01-05)

γ 射线预处理制备胚胎干细胞滋养层的实验研究

刘尧 杨明 王惠 杨卫兵 秦茂林 李红丽

摘要 目的 筛选并建立稳定、高效的胚胎干细胞滋养层细胞体外培养的最佳条件,利于胚胎干细胞的培养。方法 清洁级昆明系孕 12.5 天、14.5 天、18.5 天雌鼠和新生 (P0) 昆明小鼠各 5 只。无菌取上述各孕龄小鼠胚胎分离培养原代鼠胚成纤维细胞 (MEF) 并传代;以 $^{60}Co\gamma$ 射线 (30Gy, 20℃) 分别照射 10、20、25min 后制备滋养层细胞。结果 胚龄及 $^{60}Co\gamma$ 射线照射对 MEF 的细胞活性、生长增生和分泌功能有影响。(1) 细胞活性状态:①E12.5 天、E14.5 天、E18 天鼠胚和 P0 来源的第 3~5 代 MEF 活性均较好。E18.5 天鼠胚和 P0 来源的第 6 代 MEF, 后期深染变形细胞的比例增多达 32%, 与 E14.5 天鼠胚来源同代细胞相比有显著差异 ($P < 0.05$);②E14.5 天来源的第 3~6 代细胞采用 $^{60}Co\gamma$ 射线照射 10min 组, 细胞仍生长迅速。照射 20min 组, 细胞可维持存活达 20 天以上, 细胞密度无显著变化。照射 25min 组, 细胞存活 14 天左右且细胞密度无显著增加。(2) 细胞分泌功能:①E14.5 天鼠胚来源的第 3~6 代 MEF 以及用 $^{60}Co\gamma$ 射线照射 10min 组和 20min 组并培养 5 天时均可见较多数目的 I 型胶原蛋白免疫阳性细胞, 且染色较深;② $^{60}Co\gamma$ 射线照射 25min 组, 培养 5 天后第 3~4 代 MEF 中 I 型胶原蛋白阳性细胞数目与正常组相比无明显差异;但第 5 代后 MEF 中 I 型胶原蛋白阳性细胞数目减少, 染色浅淡。结论 E14.5 天鼠胚来源的第 3~6 代是用于制备滋养层的最佳来源; $^{60}Co\gamma$ 射线 (30Gy, 20℃) 照射 20min 可作为预处理制备滋养层细胞的最佳条件。

关键词 小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 胚胎干细胞 (ESC) 滋养层 $^{60}Co\gamma$ 射线

Study on the Pretreatment of Embryonic Stem Cell Feeder Layers by γ - Irradiation. Liu Yao, Yang Ming, Wang Hui, Yang Weibing, Qin Maolin, Li Hongli. Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, Third Military Medical University of Chinese

基金项目:广西壮族自治区科学研究与技术开发基金资助(桂科攻 0592007-1G);解放军第一八一医院科研基金

作者单位:400038 重庆,解放军第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室(刘尧、秦茂林、李红丽);541002 桂林,解放军第一八一医院皮肤科(杨明、王惠、杨卫兵)

通讯作者:李红丽,电子邮箱:lihlimm@163.com

PLA, Sichuan 400038, China

Abstract Objective To establish a stable and effective system of embryonic stem cell feeder layer in order to culture embryonic stem cell in vitro. **Methods** Mouse primary embryonic fibroblasts were sterilely prepared from mouse fetus of different embryonic ages. When embryonic fibroblasts grew and contacted each other, they then were treated with $^{60}\text{Co}\gamma$ - irradiation for 10, 20 and 25 minute. **Results** The cell viability, proliferation and secretion were affected by the embryonic age and $^{60}\text{Co}\gamma$ - irradiation. (1) Viability: ① All the passages of MEFs from third to fifth, derived from E12.5, E14.5, E18.5 embryo and P0 postnatal mouse, had good cytoactivities. The sixth passage of MEFs from E18.5 and P0 mouse had more than 32% amoeboid cells and were significantly different from the same passage of E14.5 cells ($P < 0.05$); ② The third to sixth passages of MEFs from E14.5 embryo still grew quickly after 10min irradiation, survived more than 20 days with remaining cell density after 20min irradiation, and survived about 14 days with no changes cell density after 25min irradiation. (2) Secretion: ① MEFs from third to sixth passage, derived from E14.5 embryo, after $^{60}\text{Co}\gamma$ - irradiation and cultured for 5 days, were strongly I - type collagen protein positive cells; ② For MEFs from third to fourth passage, after 25min $^{60}\text{Co}\gamma$ - irradiation and cultured for 5 days, the number of positive cells of I - type collagen protein was no different with control group; but after fifth passage, the positive cells of I - type collagen protein decreased and light dying. **Conclusion** The optimal origin of feeder layers were the third to sixth passages. E14.5 derived MEFs 20min $^{60}\text{Co}\gamma$ - irradiation (30 Gy, 20°C) was the optimal condition for preparing feeder layer cells.

Key words Mouse embryonic fibroblast (MEF); Embryonic stem cell (ESC); Feeder layers; $^{60}\text{Co}\gamma$ - irradiation

近年来,尽管无滋养层培养胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 的报道逐渐增多,但借助小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 作为滋养层仍是经典的 ESC 体外培养方式。ESC 的体外培养获得成功为研究机体各系统发育分化的调控机制及组织移植开拓了一个全新领域。ESC 可从早期胚胎内细胞团 (inner cell mass, ICM)^[1] 和原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC)^[2] 中分离而获得,但其在体外培养体系中极不稳定、极易分化成其他细胞,故 ESC 的体外培养体系能否稳定、高效的提供维持 ESC 原有的全能性和无限增生能力的外界环境是 ESC 体外培养成功的首要条件。Lim 等^[3] 研究 ESC 体外培养的滋养层后证实 MEF 分泌因子可有效促进 ESC 细胞的增生和抑制其分化。目前已有较多实验的结果表明在 ESC 体外培养体系中滋养层的质量是决定 ESC 细胞有效克隆的重要因素之一^[4]。但至今有关不同动物或不同时相来源的滋养层的质量即滋养层细胞的活性、纯度、密度以及不同方式预处理滋养层后对细胞增生抑制的程度等的报道仍存在较大差异。因此,本文拟通过分离和培养不同时相来源的 MEF,采用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线预处理滋养层,观察并比较预处理前后滋养层细胞的生长活性和分泌功能状态的差异,探讨建立稳定、高效的滋养层体系的适宜条件,为胚胎干细胞的体外稳定培养及建系等应用提供实验依据。

材料与方法

1. 标本来源:成年昆明种小鼠,本校动物中心提供。于下

午 18:00 按雌雄 1:1 合笼,次日晨 8:00 取出,查见阴栓者定为孕期 E0 天,下午 16:00 定为 E0.5 天。孕鼠均在 E12.5 天、14.5 天、18.5 天和新生 1 天时采用颈椎脱臼法处死,获得鼠胚。

2. 主要试剂:高糖型 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司产品),L - 谷氨酰胺及 2 巯基乙醇 (美国 Amresco 公司产品),胎牛血清 (FBS,天津 TBD 公司产品),二甲亚砜 (DMSO,上海西宝公司产品),重组人白血病抑制因子 (hrLIF,美国 MILLOPOR 公司),胰蛋白酶 (美国 ICN 公司),非必需氨基酸及明胶 (美国 Sigma 公司产品)。I 型胶原蛋白抗体 (博士德公司)。

3. 原代 MEF 分离培养和传代^[5]:MEFs 的分离培养、传代、冻存和复苏:选取各时相小鼠脱臼处死,无菌条件下取出胎鼠,分离全层皮肤组织,用无血清的 DMEM 冲洗后用消毒刀片刮碎直到成为黏稠浆状,加入 0.25% 胰酶消化液,37°C 振荡消化 30min,终止消化后过 200 目细胞筛,1200r/min 离心过滤液 6min,弃上清液,重新加入含 10% FBS 的高糖 DME,打散细胞并进行细胞计数,按 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种在 25cm^2 的培养瓶内,37°C,5% CO_2 条件下培养。24h 后换液,去掉组织块和死细胞,待细胞贴满瓶底后传代。以后每 3 天换液,按 1:3 传代连续传至第 6 ~ 10 代。取对数生长期的 2 ~ 10 代 MEF,消化后收集细胞,用 1ml 细胞冻存液 (70% 的完全培养液,20% FBS,10% DMSO) 重悬细胞。4°C 冰箱 15 min,移入 -20°C 冰箱 30min, -80°C 冰箱过夜,次日晨移入液氮罐中。复苏时将冻存管取出后立即移入 37°C 水浴中解冻,用培养液洗涤 1 遍。复苏细胞按 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于培养瓶内。出生 0 天的小鼠和人胚胎用 75% 乙醇消毒体表皮 2 遍,培养、传代,冻存、复苏 MEFs 的方法一致。

4. 活细胞拒染法染色和衰老细胞计数:先配制成 0.4% 台盼蓝 (trypan blue) 水溶液。将 9 滴细胞悬液移入一离心管中,加入 1 滴台盼蓝溶液,混匀。直接染色不超过 3min。结果

死细胞染成蓝色,活细胞不着色。然后于镜下取不同视野计数 100 个细胞中活细胞的比率。衰老细胞计数随机选取培养不同时间的实验各组 MEF 细胞分别记录 200 倍镜下 5 个以上视野计数 500 个空泡、变形的 MEF 细胞的数目,计算出衰老细胞的百分比。

5. ⁶⁰Coγ 射线预处理滋养层的制备和照射后细胞生长状态的检测:选鼠胚各时相点来源的已长满第 3~5 代的 MEF 培养瓶,以 ⁶⁰Coγ 射线^[6] (30Gy, 20℃) 分别照射 10min、20min 和 25min。照射后立即换液,在 37℃, 5% 的 CO₂ 培养箱内孵育 24h 后,用 0.25% EDTA/胰酶消化后按 1×10³/ml 的密度将细胞种植到预先用 0.1% 明胶处理的 24 孔板上,分 8 组,每组 3 孔,继续培养 14 天。1~7 天和第 14 天每日计数一组细胞,取均值绘制成图即细胞生长曲线。细胞仍照常规方法传代并冻存,用于制备滋养层。

6. 免疫细胞化学染色:取出长满细胞的盖玻片,80% 乙醇固定培养细胞 10min,3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶;滴加正常山羊血清工作液 37℃ 封闭 30min;加小鼠抗 I 型胶原蛋白(1:200,购自武汉 BOSTER 公司)一抗,4℃ 冰箱过夜;次日滴加生物素标记羊抗小鼠二抗(购自武汉 BOSTER 公司),37℃ 孵育 40min;滴加羊抗小鼠辣根酶标记链酶卵白素工作液,37℃ 孵育 40min;DAB(购自北京中杉金桥)显色 5~10min;细胞用苏木精复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。空白对照组以 0.01mol/L PBS 代替一抗,其余步骤相同。

7. 统计学分析:采用 SPSS11.0 进行分析,各组计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验结果以 *P* < 0.05 为差异有显著性意义。

结 果

1. MEFs 的生长形态及台盼蓝活细胞拒染观察: E12.5 天鼠胚~P0 来源的原代 MEF 培养约 24h 后,细胞贴壁生长,未铺满瓶时镜下细胞大部分呈梭形,少数呈多边形或不规则形,在胞质内可见细胞核,细胞生长较快。传代后 3~4 天就能长满。此时细胞连成片,细胞形态不易辨认,随细胞数的不断增加,部分细胞变成圆形,重叠并脱落。若继续培养,可见细胞内颗粒增多,呈空泡状,直至细胞破碎死亡。E12.5 天鼠胚来源的 MEF 培养第 1~3 代时细胞边缘光滑、胞体透明。但此时仍含部分小组织块、红细胞等杂细胞(第 126 页彩图 2A),细胞需进一步纯化。第 5 代细胞则可见部分细胞内颗粒增多,深染色细胞逐渐增多,细胞状态不稳定。E14.5 天鼠胚来源的 MEF 培养第 1~2 代成纤维细胞形态多样,为短梭形,突起少;染色较淡,界限清楚,胞体透明,但细胞数目少。第 3 和第 5 代细胞可见细胞边缘光滑、多为长梭形细胞,突起较长,胞体透明;细胞密度适中,呈放射状相

互交错排列(第 126 页彩图 2B),偶见深染色细胞。E18.5 天鼠胚和 P0 来源的 MEF 培养第 5~6 代后可见部分细胞外形肿胀,突起变短或消失,胞内可见空泡增多(第 126 页彩图 2C),出现典型的细胞衰老特征;贴壁能力变差,细胞变薄。第 6 代后期深染变形细胞的比例增多达 32%,与 E14.5 天鼠胚来源同代细胞相比有显著差异(*P* < 0.05;表 1、图 1)。

表 1 不同胎龄鼠胚来源各代 MEF 死细胞的比率

死细胞比率 (%)	MEF 代数			
	3	4	5	6
E12.5	1.7 ± 1.5	4.6 ± 2.5	5.0 ± 1.7	14.3 ± 4.5
E14.5	1.3 ± 1.5	4.3 ± 0.6	5.3 ± 0.6	9.8 ± 4.4
E18.5	3.7 ± 1.2	5.7 ± 3	14.7 ± 5.9	27.7 ± 3.8
P0	5.6 ± 0.6	11.7 ± 5.1	18.7 ± 4.7	32 ± 2.6 *

* *P* < 0.05, vs 6 代 E14.5 天组

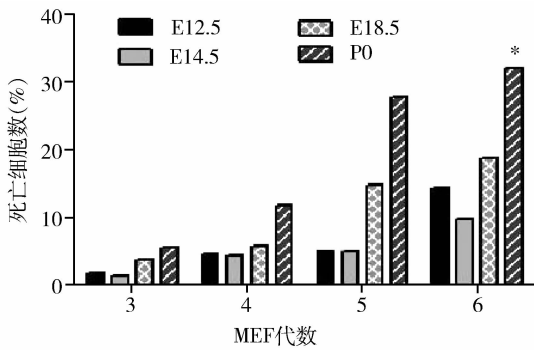


图 1 不同胎龄各代 MEF 中死亡细胞的检测结果

2. ⁶⁰Coγ 射线预处理后滋养层细胞的生长状态: 见图 2、表 2,可知,(1)用 ⁶⁰Coγ 射线(30Gy, 20℃)照射 10min 组,E14.5 天鼠胚来源的 MEF 第 3~6 代细胞形状无明显变化,细胞仍有较强增生能力,培养 3 天后细胞密集增多,5 天可见细胞重叠变成圆形,7 天后可见部分卷曲脱落细胞并随培养而逐渐增多。(2)用 ⁶⁰Coγ 射线(30Gy, 20℃)照射 20min 组,E14.5 天鼠胚来源的 MEF 第 3~6 代细胞形状无明显变化,且细胞密度无明显增多或减少,可维持存活近 20 天,20 天后可见部分细胞出现卷曲脱落,细胞内空泡增多,死亡破碎细胞逐渐增多。(3)用 ⁶⁰Coγ 射线(30Gy, 20℃)照射 25min 组,E14.5 天鼠胚来源的 MEF 第 3~4 代细胞可维持存活 14 天左右,细胞形状未见明显改变。照射第 6 代细胞培养 10 天后出现明显空泡,变形、脱落的细胞明显增多,约占 61%,细胞变稀疏(第 126 页彩图 2D)。

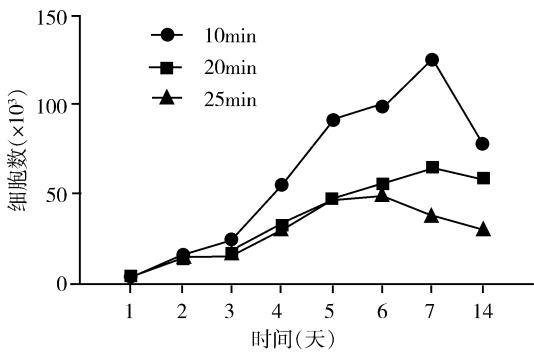


图2 ⁶⁰Co γ 射线照射时间后MEF生长曲线

表2 ⁶⁰Co γ 射线照射后细胞密度计数结果

细胞密度	天数							
	1	2	3	4	5	6	7	14
10min ($\times 10^3$)	3.8	17.2	23.7	56.3	91.8	99.4	125.2	78.2
20min($\times 10^3$)	4.3	16.3	17.9	33.2	47.6	56.2	65.2	59.3
25min($\times 10^3$)	3.4	14.4	16.2	30.2	48.1	49.4	37.8	30.3

表3 第6代MEF⁶⁰Co γ 射线照射不同
时间组衰老细胞计数比较

6代MEF(%)	天数		
	10	14	20
10min	42.8 $\pm$ 1.5	50.2 $\pm$ 3.7	82.9 $\pm$ 5.6 *
20min	17.9 $\pm$ 2.7	32.3 $\pm$ 4.5	48.8 $\pm$ 6.5
25min	61.4 $\pm$ 3.9 *	72.4 $\pm$ 5.4 *	88.7 $\pm$ 4.8 *

* P < 0.05

3. 免疫细胞化学染色结果:(1)照射前:正常 E14.5 小鼠胚来源的 MEF 第 1~2 代细胞可见较多 I 型胶原蛋白免疫阳性细胞,但染色浅淡。第 3 代和第 6 代细胞含 I 型胶原蛋白免疫阳性细胞数目较多,染色较深呈棕色;阳性细胞呈梭形(第 126 页彩图 3A),突起长、或呈不规则三角形;细胞核较为粗大,可见有 1~2 个细胞核;核不着色。第 6 代至以后 MEF 可见 I 型胶原蛋白免疫阳性细胞数目呈逐渐下降趋势,染色深浅不一。(2)照射后:用⁶⁰Co γ 射线(30Gy, 20℃)照射 10min、20min 和 25min 组, E14.5 小鼠胚来源的第 3~4

纯度且冻存复苏存活率较高的 MEF。本实验对比观察了不同胚胎日龄来源的 MEF 结果显示细胞增生能力和活性存在一定的差异。其中 E14.5 天小鼠胚胎的分离效果最佳,所获杂细胞少纯度高且数量多,第 2~6 代细胞均有较强的增生能力,细胞寿命长,明显优于 E12.5 天、E18.5 天及 P0 来源的 MEF。这一结果与 Michalska 的实验结论一致^[10]。提示 E14.5 天小鼠胚来源的 MEF 是制备滋养层的较佳来源。

此外,Michalska 的实验也提示 E12.5 天鼠胚也是制备滋养层的另一来源,但本实验结果显示采用 E12.5 天鼠胚来源的 MEF 尽管第 3~4 代细胞增生能力强,活性好,仍含部分杂细胞,细胞纯化所需时间较长。此外,由于胚胎体积小,组织含水量高,消化时间不宜控制(时间短则不易分离,时间长则细胞对消化较敏感,不宜存活)等特点,操作也不易控制。其第 5 代细胞即可见空泡细胞增加,提示细胞寿命较短,较易老化。本实验也观察了 E18.5 天及 P0 来源的 MEF 第 3~4 代细胞同样显示活性高,增生能力强的特点,但第 6 代细胞中衰老细胞增多、细胞活性明显降低。提示 E18.5 天及 P0 来源的 MEF 细胞状态不良,不稳定易于老化,可用细胞代数有限。不仅增大了体外培养的工作量和经费,所制备的滋养层因过多衰老细胞而降低质量。既往研究还表明若将 ESC 置于衰老的滋养层表面进行培养时,ESC 集落松散,表面及周围形成许多颗粒细胞,巨型细胞和上皮样细胞,认为衰老的滋养层可诱导 ESC 的体外分化^[11],对

代 MEF 培养 5 天后 3 组细胞 I 型胶原蛋白免疫阳性细胞数目均较多,染色较深(第 126 页彩图 3B)。但照射 25min 组,自第 5 代细胞后 MEF 培养 5 天后, I 型胶原蛋白免疫阳性细胞数目明显减少,染色深浅不均。

讨 论

近年来探索采用替代 MEF 的无饲养层的条件培养 ESC 的报道逐渐增多^[6~8],如在培养液中同时加入 TGF β 、LIF 及 bFGF 并辅以 fibronectin;或采用 MEF 的条件培养液作为添加成分等方式培养 ESC 已获得较好结果,但是由于维持人 ESC 细胞未分化状态的关键因素仍然未知,仍然未能找到一种有效的无饲养层培养方法。近年来大量的实验表明 MEF 作为滋养层可通过与 ESC 相互接触并向培养液中分泌因子提供 ESC 体外去分化的条件^[9]。由此认为滋养层的质量对于支持 ESC 长期体外存活并保持未分化状态具有重要作用。尽管 MEF 来源广泛,但其生命期有限,为满足 ESC 的培养需要,必须获得大量、高活性、高

ESC 体外稳定培养不利。

ESC 在滋养层上生长对滋养层细胞的密度要求较高^[12]。研究提示培养液中营养成分有限,如果滋养层细胞增生较快、密度过高,在与 ESC 竞争养分的同时滋养层细胞本身营养不足容易老化,易发生卷层现象,将 ESC 包裹其中,无法分离。相反滋养层细胞密度过低,分泌分化抑制因子不足,附着性降低,滋养层细胞也容易衰老,ESC 极易发生分化。可见预处理 MEF 是制备滋养层细胞的另一重要环节。目前国内预处理滋养层的方法多是采用丝裂霉素 C,其作用机制是通过烷化作用与细胞 DNA 交联,使其双链解聚,从而抑制 DNA 的复制^[5]。由于所用药物的产地以及操作者给药具体方法的不同,其抑制细胞增生的结果差异较大;本实验采用⁶⁰Co γ 射线预处理滋养层的方式,通过⁶⁰Co γ 射线造成细胞 DNA 的氧化性损伤,达到抑制 DNA 的复制的效果。既往 Michalska 的研究^[10]提示⁶⁰Co γ 射线在 30 ~ 100Gy 的剂量范围照射 MEF 后均能达到抑制细胞增生的效果。本实验采用 30Gy 剂量,对 E14.5 天第 3 ~ 6 代细胞照射不同时间后结果显示照射 20min 组,细胞细胞形状、密度无明显变化,可存活近 20 天左右,提示细胞增生能力明显降低。照射 10min 组,E14.5 天第 3 ~ 6 代细胞培养 5 天后细胞密度增加较快,提示短时间照射对细胞的增生能力并没有任何影响。照射 25min 组第 3 ~ 5 代细胞存活仅 10 天左右,随培养时间延长衰老、变形细胞增多,细胞变稀疏,提示长时间照射不仅降低细胞增生能力,也导致细胞活性的降低。既往研究已证实大剂量或长时间⁶⁰Co γ 射线照射主要加速了细胞凋亡的发生。

滋养层细胞是如何支持 ESC 生长,目前其机制仍然不十分清楚。Lim 等^[3]在对 MEF 培养液中成分进行分析后证实其内含有的包括细胞内蛋白、细胞外基质和细胞膜蛋白在内的 136 种蛋白。滋养层通过向培养液中分泌成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子等促有丝分裂因子促进细胞的增生,以及通过分泌白血病抑制因子(LIF)等分化抑制因子抑制其分化两方面来起作用^[13]。而预处理 MEF 尤为重要,是滋养层在失去增生能力的基础上应保持其自身的分泌功能。本实验为评价滋养层细胞分泌能力采用 I 型胶原蛋白免疫染色技术,结果显示照射前 E14.5 天鼠胚来源的 MEF 第 3 ~ 6 代细胞中免疫阳性细胞数目均较多,染色较深,提示此阶段细胞分泌功能旺盛。照射 20min 组,培养 5 天后可见分泌 I 型胶原蛋白的细胞仍较多,提示滋养层细胞仍保持一定的分泌

功能。照射 25min 组,第 5 代细胞培养 5 天后分泌 I 型胶原蛋白的细胞数目减少,染色深浅不一,提示此时滋养层细胞的分泌功能有所下降。

综上所述,E14.5 天鼠胚来源的 MEF 第 3 ~ 6 代细胞活性强是制备滋养层的较佳来源;采用⁶⁰Co γ 射线(30Gy)照射 20min 是预处理制备滋养层的较佳条件。本实验的优点在于可精确调节照射剂量及时间,重复性强并可同时大批量制备滋养层,为达到稳定、快速地大规模扩增 ESC 的需求提供了技术基础。

参考文献

- 1 Evans M J, Kanfman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981,292(5819):154 - 156
- 2 Mataui Y, Zsebo K, Hogan BLM. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. *Cell*, 1992,70(5):841 - 847
- 3 Lim, J. W. E, Bodnar, A. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics*,2002,2:1187 - 1203
- 4 Khademosseini A, Ferreira L, Blumling J 3rd, *et al.* Co - culture of human embryonic stem cells with murine embryonic fibroblasts on microwell - patterned substrates[J]. *Biomaterials*,2006,27(36):5968 - 5977
- 5 Conner DA. Mouse embryo fibroblast (MEF) feeder cell preparation [J]. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001,Chapter 23;Unit 23.2
- 6 Braam SR, Denning C, Matsa E, *et al.* Feeder - free culture of human embryonic stem cells in conditioned medium for efficient genetic modification[J]. *Nat Protoc*,2008,3(9):1435 - 1443
- 7 Meng G, Liu S, Krawetz R, *et al.* A novel method for generating xeno - free human feeder cells for human embryonic stem cell culture[J]. *Stem Cells Dev*,2008,17(3):413 - 422
- 8 Amit M. Feeder - layer free culture system for human embryonic stem cells[J]. *Methods Mol Biol*,2007,407:11 - 20
- 9 Villa - Diaz LG, Pacut C, Slawny NA, *et al.* Analysis of the factors that limit the ability of feeder cells to maintain the undifferentiated state of human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells Dev*,2009,18(4):641 - 651
- 10 Anna E. Michalska. Isolation and Propagation of Mouse Embryonic Fibroblasts and Preparation of Mouse Embryonic Feeder Layer Cells[J]. *Current Protocols in Stem Cell Biology*,2007,1C.3.1 - 1C.3.17
- 11 Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, *et al.* Hyaluronic acid hydrogel for controlled self - renewal and differentiation of human embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2007,104(27):11298 - 11303
- 12 陈红, 钱坤, 张苏明, 等. 昆明白小鼠胎鼠成纤维细胞不同接种密度对人胚胎干细胞的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007,11(3):443 - 446
- 13 Zhou D, Liu T, Zhou X, *et al.* Three key variables involved in feeder preparation for the maintenance of human embryonic stem cells[J]. *Cell Biol Int*,2009,33(7):796 - 800 (收稿:2009 - 12 - 24)

(修回:2010 - 01 - 27)