技术与方法 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.009

人胚胎生殖细胞饲养层的制备

姜 蓉,黎晓莉,吴 宏,王 璐
(重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室、干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立稳定高效的人包皮成纤维细胞(Human foreskin fibroblasts,HFF)饲养层培养体系,用于培养人胚胎生殖细胞(Embryonic germ cells,EGCs)。方法:取 4~5 岁小儿包皮,采用机械法和组织消化法分离、培养成纤维细胞,倒置相差显微镜观察细胞生长状况,免疫细胞化学法、MTT 法、流式细胞术检测细胞纯度、生长曲线及细胞周期,筛选丝裂霉素 C 作用的最佳浓度和时间。分离 5~11 周人胚胎原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs)并培养于经丝裂霉素 C 处理的 HFF 饲养层上,观察人 EGCs 生长情况。结果:机械法和组织消化法结合分离 HFF 方法可靠,纯度高,细胞生长活性好,能快速进入对数生长期,细胞周期与细胞生长曲线保持一致,细胞可以传 60 代以上,P3~P30 代均适宜作饲养层;丝裂霉素 C 抑制细胞增殖的适宜浓度及时间为 12.5 mg/L 作用 2.5 h;分离的人 PGCs 在该饲养层上培养可形成典型的 EGCs 集落,体外连续培养超过 3 代。结论:HFF 饲养层能有效地支持人 EGCs 的生长。

【关键词】人胚胎生殖细胞;包皮成纤维细胞;饲养层
【中国图书分类法分类号】R321.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-10-12

The preparation of human embryonic germ cell feeder layer

JIANG Rong, LI Xiao-li, WU Hong, WANG Lu
(*Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a stable and effective system of human foreskin fibroblast (HFF) feeder layer in order to culture human embryonic germ cells (EGCs) in vitro. *Methods*: The HFF were isolated and cultured from the 4~5 year old children's foreskin through mechanical method and primary tissue digestion. The condition of cell growth was observed under inverted phase contrast microscope. The purity of cells, cell growth curve and cell cycle of HFF were detected by immunocytochemistry, MTT and flow cytometry. The optimal concentration of mitomycin C and the time for treating with mitomycin C on HFF were determined by MTT assay. The primordial germ cells from human embryos of 5~11 weeks were isolated; EGCs were cultured on the HFF feeder layer treated by mitomycin C and the state of cells growth was observed. *Results*: The mechanical method and primary tissue digestion was a credible and efficient way to obtain primary HFF, with which the cells had high purity and active proliferative abilities, and quickly entered exponential phase of growth. The cell cycle corresponded to cell growth curve. The fibroblasts, with an anticipated life span of 60 generations, were used in our experiments after 3~30 generations. HFF proliferation could be efficiently repressed after being treated with mitomycin C 12.5 mg/L for 2.5 h. Human EGCs cultured in the HFF feeder layer could form typical embryo germocyte colony and last P3 generations continuously. *Conclusion*: HFF feeder layer could efficiently support the growth of human EGCs.

【Key words】human embryonic germ cell; foreskin fibroblast; feeder layer

人胚胎生殖细胞(Embryonic germ cells,EGCs)是自原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs)分离得到的一种多能干细胞[1]。可用于研究诱导细胞分化的模型以及研究 EGCs 发育、分化和成熟的调节机制及生殖系肿瘤发生[2]。但是人 EGCs 体外培养难度较大,关键在于分化抑制,即在培养体系中要加入分化抑制物或将其培养在能分泌分化抑制因子的饲养层细胞上,优化其培养体系必将促进其发展。小儿包皮来源广泛,取材方便,在人胚胎组织工程领域,已用做人胚胎干细胞(Embryonic stem cell,ES cell)体外培养的饲养层并取得成功[3]。故本文采用人包皮成纤维细胞(Human foreskin fibroblasts,HFF)作为饲养层,探讨包皮成纤维细胞分离培养的最适条件,丝裂霉素 C 处理饲养层的适宜条件,旨在为体外培养人 EGCs 提供更为可靠的保证。

作者介绍:姜 蓉(1962-),女,高级实验师,
研究方向:干细胞生物学与形态学研究技术。
通信作者:吴 宏,女,教授,Email:wuhong6368@126.com。
基金项目:重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ090318)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(Fetal bovine serums,FBS)(Gibco 公司),L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、青链霉素(Hyclone 公司),Ⅰ型胶原酶(Invitrogen 公司),胰蛋白酶、2-巯基乙醇 (Sigma 公司),鼠抗人波形蛋白(Vimentin) 抗体、SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒 (北京中杉公司),丝裂酶素 C(Kyowa Hakko Kgyo 公司),四甲基偶氮噻唑蓝(Methyl thiazolye tetrazolium,MTT)(Amresco 公司)。

1.1.2 儿童包皮 收集 4~5 岁儿童包皮环切术后包皮(重庆医科大学附属儿童医院提供)。

1.1.3 人工流产胚胎 收集 5~11 周人工流产胚胎(重庆市南坪生殖健康中心及重庆市妇幼保健院提供,经学校伦理委员会讨论通过)。

1.2 方法

1.2.1 HFF 分离培养 ①无菌条件下取儿童包皮环切术后包皮,用无菌 PBS 清洗 3 次;②剪去皮下组织,将皮片置于 0.25%胰酶、4℃消化过夜(12~16 h)或 37℃,5%CO_2 培养箱孵育 2 h;③用眼科镊采取机械法分离表皮与真皮;④将真皮片用无菌 PBS 清洗 3 次后用眼科剪将其剪成约 1 mm^3 大小组织块;⑤将组织块移入离心管中,加入 0.2% Ⅰ型胶原酶溶液吹打均匀,37℃,5%CO_2 培养箱消化 4 h,经 150 目不锈钢滤网过滤消化液;⑥收集消化液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,以同样的方法再离心 1 次;⑦用 10% FBS 的DMEM 培养液重新悬浮细胞混匀,台盼兰染色计数,以 1×10^6 个/ml 接种于 T_{25} 培养瓶,在 37℃、5%CO_2 培养箱中培养,每 3 d 换培养液。

1.2.2 HFF 的传代 原代培养 7~10 d 待细胞长满瓶底的 80%即可传代。向 T_{25} 培养瓶中加入 2 ml 0.25%胰酶,待大部分细胞收缩变圆即加入等量含 10%FBS 的 DMEM 终止消化,将消化液离心(1 000 r/min × 5 min)后用含 10%FBS 培养液重新悬浮,按 1:3 的比例传代培养。以后每 3 d 按同样方法传代。

1.2.3 HFF 纯度鉴定 取 P3 代细胞制备细胞爬片,对该细胞进行 Vimentin 免疫细胞化学染色:按 SP 试剂盒说明操作,一抗(抗 Vimentin 单克隆抗体)稀释度为 1:50,生物素标记的二抗 (通用型) 稀释度为 1:200,DAB 显色后苏木素复染、脱水、透明、封片。以磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline,PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.2.4 HFF 生长曲线测定 取 P_3、P_9、P_{15}、P_{20}、P_{25}、P_{30} 代细胞以 5×10^3 个/ml 接种在 96 孔板,各代细胞均复种 6 孔,分别于培养的第 1~7 天用 MTT 法检测波长为 450 nm 处 OD 值并绘制生长曲线图。

1.2.5 HFF 细胞周期测定 消化 P_3、P_9、P_{15}、P_{20}、P_{25}、P_{30} 代细胞,收集制成单细胞悬液,70%冰乙酸固定过夜,PBS 洗涤 2 次,加入 200 μl 牛胰核糖核酸酶(1 mg/ml),37℃水浴孵育 30 min;加入碘化丙啶染色液(50 μg/ml)避光反应 30 min,流式细胞仪检测,Multicycle 软件分析。

1.2.6 丝裂霉素 C 作用 HFF 条件的筛选 分别以 10、12.5、15、17.5、20 mg/L 浓度丝裂霉素 C 作用 HFF 2、2.5、3、3.5、4 h,共 25 个条件组。处理后 PBS 洗涤 4 次,消化并接种到 96 孔板,每孔加入 200 μl,细胞密度为 2×10^6 个/ml。每组种植 6 个复孔。分别培养 1、2、3、4 d,用 MTT 法检测波长为 450 nm 处 OD 值。

1.2.7 人 EGCs 饲养层的制备 取 3~30 代对数生长期 HFF,终浓度 12.5 mg/L 丝裂酶素 C 处理 2.5 h,PBS 充分洗涤,消化细胞以每孔 2×10^5 个细胞种植在用 0.1%明胶处理后的 24 孔培养板上,置 37℃、5%CO_2 培养箱培养待用,4 h 后可以用作饲养层。用前更换为胚胎生殖细胞培养基。

1.2.8 人 EGCs 在饲养层上的生长 无菌条件下取 5~11 周人胚胎生殖嵴,用 0.01% 胶原酶在 37℃、5%CO_2 培养箱中消化 3~4 h,倒置相差显微镜下观察见组织块完全分散则终止消化,将消化液离心 2 次(1 000 r/min × 5 min)后将细胞种植于事先制备好饲养层的 24 孔培养板中,培养体系为高糖 DMEM、20%FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、0.1 mmol/L 2-巯基乙醇、10×10^4 IU/L 青霉素和 10×10^4 IU/L 链霉素。置 37℃、5%CO_2 培养箱中培养,隔天更换培养基。原代细胞在种植 5~7 d 后形成鸟巢状集落或桑葚状集落,用 0.01%胶原酶室温下消化 10 min,离心沉淀 2 次(1 000 r/min×5 min)后将细胞接种在新的饲养层上,每天换液。

1.2.9 统计学处理 经 SPSS17.0 软件进行析因设计方差分析和多重比较的 *Dunnett t* 检验。

2 结 果

2.1 HFF 的分离培养

剪去皮下组织的皮片经 0.25%胰酶、4℃消化过夜(12~16 h)或 37℃,5%CO_2 孵育 2 h 处理,然后采取机械法分离表皮与真皮,结果发现前者更容易彻底分离表皮与真皮(图 1、2),从而获得更纯的成纤维细胞。0.2% Ⅰ型胶原酶消化 4 h 获得的细胞活力佳,生长快。



图 1 4℃消化过夜后去除表皮的皮片(HE 染色,100×)

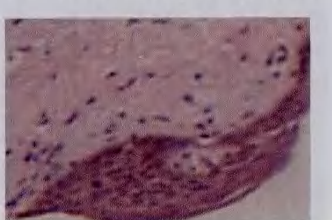


图 2 37℃,5%CO_2 孵育 2 h 去除表皮的皮片(HE 染色,200×)

2.2 HFF 的体外生长与传代

HFF 原代培养约 2 h 细胞开始贴壁，12 h 细胞贴壁并伸展，其间有少量扁平多角形，紧密相靠的上皮样细胞，种植后 5~7 d 细胞铺满培养瓶底，形成漩涡状、栅栏状或放射状有序排列；细胞形态多样，梭形、不规则星形、多边形，胞质向外伸出伪足；细胞核呈卵圆形，居中，偶见双核。传代培养开始贴壁时间约为 20 min，原代细胞经传代后上皮样细胞逐渐减少，到第 3 代时已基本消失（图 3、4）。本实验室所培养的HFF在体外已连续传代超过 60 代（图 5）。



图 3 P_3 代培养 3 d 的 HFF（未染色，200×）

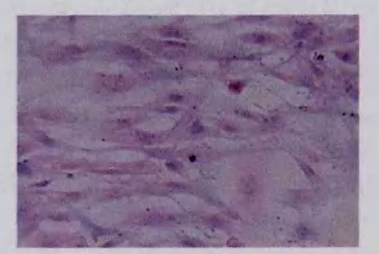


图 4 P_3 代培养 1 d 的 HFF（HE 染色，200×）

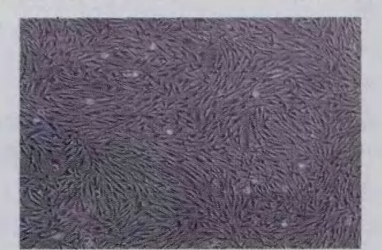


图 5 P_{45} 代培养 3 d 的 HFF（未染色，100×）

2.3 HFF 纯度鉴定

P_3 代细胞免疫细胞化学染色显示：95%以上的细胞 Vimentin 染色呈阳性，阳性细胞表现为胞质呈棕黄色。细胞的形态结构和生长情况表明培养的细胞为较纯净的成纤维细胞（图 6）。

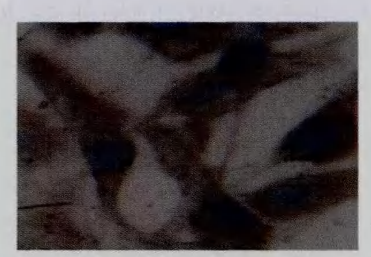


图 6 P_3 代 HFF 波形蛋白染色阳性（400×）

2.4 HFF 生长曲线与细胞周期检测

MTT 法检测 P_3、P_9、P_{15}、P_{20}、P_{25}、P_{30} 代细胞处于停滞期时间极短，在第 1~6 天均处于对数生长期，增殖能力旺盛，第 7 天开始处于平台期（图 7）。流式细胞仪检测发现 P_3、P_9、P_{15}、P_{20}、P_{25}、P_{30} 代细胞周期大多数处于 G_0/G_1 期（表 1）。

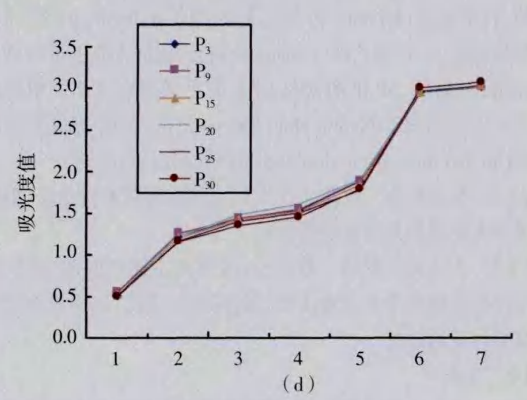


图 7 P_3 ~P_{30} 代细胞生长曲线

表 1 P_3 ~ P_{30} 代 HFF 细胞周期各时相比例（n=3，$\bar{x} \pm s$）

HFF	G_0/G_1 期（%）	S期（%）	G_2/M 期（%）
P_3	83.10 ± 7.61	5.81 ± 1.72	11.10 ± 7.00
P_9	84.24 ± 5.66	5.78 ± 1.73	9.98 ± 4.59
P_{15}	81.54 ± 5.77	8.04 ± 1.25	10.42 ± 4.75
P_{20}	82.93 ± 8.98	6.72 ± 2.04	10.35 ± 8.07
P_{25}	82.03 ± 8.98	7.36 ± 2.16	10.61 ± 7.02
P_{30}	81.84 ± 4.25	7.11 ± 1.91	11.05 ± 5.71

2.5 丝裂霉素 C 作用 HFF 浓度、时间筛选

实验表明不同浓度丝裂霉素 C 作用不同时间 HFF 生长抑制效果不同（$F_{\text{丝裂霉素 C 浓度}}$= 430.76，P<0.05；$F_{\text{作用时间}}$= 508.05，P<0.05）。HFF 培养 1、2、3、4 d，450 nm 波长测 OD 值结果见表 2。由表 2 可知一定范围内随着作用浓度增加或时间延长抑制作用增强，甚至出现细胞死亡（丝裂霉素 C 与作用时间交互项的 F=18.04，P<0.05）。虽在几种浓度及作用时间下细胞的增殖在培养第 2 天得到控制（与培养 1 d 的 OD 值比较，P>0.05），但随着培养进入第 3 天和第 4 天，细胞继续增殖或被过度抑制使 OD 值发生显著改变；而丝裂霉素 C 浓度为 12.5 mg/L 作用 2.5 h 后培养第 2 天与第 4 天虽 OD 值有变化，但变化趋势不大，且培养至第 3 天抑制效果较好，与 1 d 相比无显著性差异，提示细胞既无明显增殖又无死亡。

2.6 人 EGCs 在 HFF 饲养层上的生长

人 EGCs 在 HFF 饲养层上培养 5~7 d 可形成典型的鸟巢状、桑葚状集落，部分集落形态不规则，集落边界清楚，有明显立体感和边缘折光性。集落内细胞核质比大，细胞间结合紧密，边界不清（图 8）。体外连续培养超过 3 代（图 9）。

3 讨 论

EGCs 与 ES 细胞增殖具有相似特性，二者主要差异在于

表 2 不同浓度丝裂霉素 C 作用不同时间后 HFF 增殖情况的比较（n=6，$\bar{x} \pm s$）

丝裂霉素 C 浓度（mg/L）	作用时间（h）	培养时间 1 d	2 d	3 d	4 d
10	2	1.218 ± 0.013	1.307 ± 0.028	1.315 ± 0.034	1.788 ± 0.037
	2.5	1.256 ± 0.031	1.254 ± 0.027*	1.428 ± 0.029	1.620 ± 0.032
	3	1.227 ± 0.007	1.275 ± 0.044	1.322 ± 0.021	1.710 ± 0.031
	3.5	1.172 ± 0.039	1.044 ± 0.035	0.983 ± 0.026	0.868 ± 0.024
	4	1.198 ± 0.032	1.126 ± 0.018	0.865 ± 0.038	0.904 ± 0.039
12.5	2	1.235 ± 0.016	1.126 ± 0.017	1.327 ± 0.019	1.748 ± 0.014
	2.5	1.252 ± 0.005	1.274 ± 0.004	1.242 ± 0.005*	1.221 ± 0.009
	3	1.179 ± 0.024	1.155 ± 0.026*	1.061 ± 0.026	1.046 ± 0.034
	3.5	1.257 ± 0.019	1.040 ± 0.021	0.884 ± 0.026	0.775 ± 0.015
	4	1.258 ± 0.035	1.017 ± 0.024	0.914 ± 0.029	0.693 ± 0.017
15	2	1.238 ± 0.025	1.470 ± 0.012	1.767 ± 0.008	1.856 ± 0.025
	2.5	1.315 ± 0.026	1.316 ± 0.026*	1.359 ± 0.021	1.024 ± 0.028
	3	1.222 ± 0.003	1.160 ± 0.041	0.970 ± 0.020	0.895 ± 0.028
	3.5	1.228 ± 0.007	1.256 ± 0.037*	0.873 ± 0.014	0.793 ± 0.037
	4	1.346 ± 0.038	1.162 ± 0.011	0.836 ± 0.016	0.785 ± 0.026
17.5	2	1.241 ± 0.017	1.057 ± 0.034	1.048 ± 0.036	1.057 ± 0.029
	2.5	1.166 ± 0.011	1.059 ± 0.036	0.866 ± 0.016	0.882 ± 0.018
	3	1.237 ± 0.019	0.859 ± 0.027	0.776 ± 0.029	0.542 ± 0.032
	3.5	1.226 ± 0.019	0.743 ± 0.040	0.870 ± 0.018	0.423 ± 0.035
	4	1.234 ± 0.021	0.871 ± 0.023	0.664 ± 0.018	0.340 ± 0.031
20	2	1.242 ± 0.015	1.290 ± 0.013	1.096 ± 0.014	1.023 ± 0.021
	2.5	1.481 ± 0.014	0.917 ± 0.037	0.986 ± 0.018	0.581 ± 0.055
	3	1.182 ± 0.014	1.004 ± 0.004	0.692 ± 0.026	0.465 ± 0.011
	3.5	1.164 ± 0.038	0.987 ± 0.013	0.443 ± 0.038	0.470 ± 0.025
	4	1.279 ± 0.019	0.829 ± 0.036	0.443 ± 0.038	0.382 ± 0.012

*：与培养 1 d 的 OD 值比较，$P > 0.05$

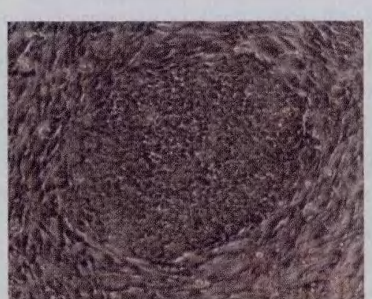


图 8 HFF 饲养层上原代培养第 5 天人 EGCs 集落（未染色，200×）

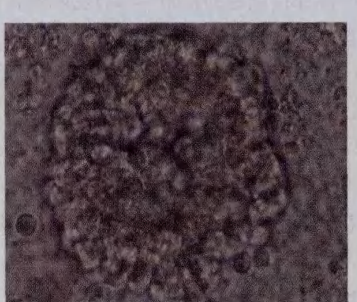


图 9 HFF 饲养层上第 3 代培养第 5 天人 EGCs 集落（未染色，400×）

EGCs经外因修饰，具生殖细胞系特征，故将其作为向生殖细胞分化的种子细胞较 ES 细胞更为合适。但 EGCs 体外增殖困难一直是制约其研究和应用的瓶颈，适宜的培养体系是突破这个瓶颈的关键[4]，而饲养层对 EGCs 体外成功培养起着举足轻重的作用，其机制主要表现为促进细胞的增殖和抑制其分化。前者主要通过饲养层细胞分泌成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子等多种促有丝分裂因子发挥作用；后者主要通过饲养层分泌白血病抑制因子等细胞分化抑制因子发挥作用[5]。饲养层的质量是决定 EGCs 生长的重要因素之一，而饲养层的质量直接取决于细胞的活性、浓度、纯度以及丝裂霉素 C 处理后细胞增殖抑制的程度。目前用于人 EGCs 培养的饲养层有异源动物成纤维细胞（小鼠原代成纤维细胞、STO 细胞株等）及人源性成纤维细胞（子宫内膜基质细胞、人胚胎成纤维细胞等）。小鼠来源的饲养层细胞虽然使用普遍，获得容易，经实验证实维持胚胎干细胞的效果可靠[6,7]，但可能给培养体系带来异种蛋白和遗传物质，引起不良反应[3,8-10]，因此胚胎生殖细胞的临床应用需要寻求更适宜的培养条件[11]。故来源于人的饲养层是人 EGCs 体外培养研

究的热点。但胚胎及子宫内膜等来源的饲养层受到标本来源及伦理道德的限制。包皮环切术后小儿包皮来源广泛，取材方便，且不受伦理道德的限制。Amit 等[3]用人包皮成纤维细胞作饲养层培养人 ES 细胞获得成功，因此我们制备包皮环切术后小儿包皮成纤维细胞饲养层，观察其对人 EGCs 生长的影响。

如何获得最大量、活性高、纯度大的成纤维细胞是人包皮成纤维细胞饲养层制备需要解决的关键问题。我们采用机械法和组织消化法相结合分离包皮的表皮与真皮，结果发现 0.25%胰酶、4℃消化过夜（12~16 h）是适合分离表皮与真皮的条件；之后用 0.2% Ⅰ型胶原酶消化真皮片 4 h 获得的成纤维细胞数量多，活力佳，生长快，且 P_3 代成纤维细胞的纯度达到 95%以上。细胞体外培养到 30 代仍保持旺盛的增殖能力，P_3、P_9、P_{15}、P_{20}、P_{25}、P_{30} 代细胞的生长曲线没有明显的滞留期，在 1~6 d 都处于快速增殖期，第 7 天开始处于平台期，细胞周期大多数处于 G_0/G_1 期，为细胞进入 S 期做准备，细胞周期与细胞生长曲线保持一致。因此，包皮成纤维细胞 P_3~P_{30} 代均适宜作饲养层。这样大大减少了胚胎生殖细胞培养的工作量和成本。

有关丝裂霉素 C 处理饲养层的研究报道较多，但结果差异较大[12-14]，可能与饲养层细胞来源、各实验者具体操作方法不同有关。本实验为了建立可靠的胚胎生殖细胞培养平台，对实验所用丝裂霉素 C 的作用浓度、时间做了较为详细的筛选。实验结果表明丝裂霉素 C 抑制包皮成纤维细胞生长与作用浓度和时间均相关，丝裂霉素 C 浓度太高作用时间太长会导致细胞死亡，浓度太低作用时间太短又不能抑制细胞的增殖，选择适宜的浓度和作用时间使丝裂霉素 C 在抑制细胞增殖能力的同时能保持细胞的粘附性和分泌功能是成功制备饲养层的关键，在我们的实验中丝裂霉素 C 浓度为 12.5 mg/L 作用 2.5 h 抑制饲养层增殖效果好，不导致饲养层细胞大量死亡，且可以存活约 2 周，结合细胞生长曲线可看出实验制备的饲养层在 7 d 内完全能维持在稳定水平。人 EGCs 在制备的 HFF 饲养层上培养显示该饲养层能支持人 EGCs 的生长，在原代培养第 5~7 天即出现典型 EGCs 集落，体外连续培养超过 3 代。

本实验探讨了人包皮成纤维细胞作为人 EGCs 培养饲养层的可能性及制备的最适宜实验条件，成功分离培养了人 EGCs，为本课题组成功搭建了胚胎生殖细胞实验操作平台，也为人包皮成纤维细胞在干细胞和组织工程领域的广泛应用打下一定基础。

参 考 文 献

[1] Gearhart J.New potential for human embryonic stem cells[J].Science,1998,282(5391):1061-1062.

[2] Stewart C L,Gadi I.Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line[J].Development Biology,1994,161(2):626-628.

[3] Amit M,Margulets V,Segev H,et al.Human feederlayers for human embryonic stem cells[J].Biology of Reproduction,2003,68(14):2150-2156.

[4] Taupin P.Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy:challenges and new strategies[J].Med Sci Monit,2006,12(4):75-78.

[5] 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.

[6] 胡嘉波，麻全慧，胡三强，等.人胚胎干细胞饲养层的制备及生物学活性[J].中国组织工程研究与临床康复，2011，15(23)：4233-4236.

[7] Xie X Y,Asimina Hiona,Andrew Lee,et al.Effects of long-term culture on human embryonic stem cell aging[J].Stem Cells,2011,20(1):127-138.

[8] Amit M,Shariki C,Margulets V,et al.Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells[J].Biology of Reproduction,2004,70(3):837-845.

[9] Rosler E S,Fisk G J,Ares X,et al.Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions[J].Developmental Dynamics,2004,229(2):259-274.

[10] Richards M,Fong C Y,Chan W K,et al.Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells[J].Nature Biotechnology,2002,20(9):933-936.

[11] Moore H.The medium is the message[J].Nat Biotechnol,2006,24(2):160-161.

[12] 熊吉信，刘小春，杨春江，等.小鼠胚胎干细胞饲养层的制备及两种不同饲养层的比较[J].江西医学院学报，2006，46(4)：5-9.

[13] 时伟红，安志兴，董婉维.由体外受精囊胚获得 ICR 小鼠 ES 细胞[J].动物医学进展，2002，23(4)：97-99.

[14] 王 璐，王亚平.小鼠胚胎干细胞饲养层制备条件的研究[J].重庆医科大学学报，2008，33(1)：77-81.

（责任编辑：关蕴良）