



干细胞培养

近年来，干细胞不止是生命科学和医学研究的热点，也常是人们茶余饭后的谈资。从布什否决干细胞研究法案到黄禹锡造假风波，干细胞研究总是占据报纸的大幅版面。为什么这么热门？因为干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞，有望用来修复那些被疾病和创伤所破坏的各种各样的细胞和组织，从而为多种慢性疾病的治疗带来了希望，例如帕金森病、老年痴呆症、糖尿病、心血管疾病，甚至癌症。

干细胞根据细胞来源的不同，可分为胚胎干细胞和成体干细胞两大类。当受精卵分裂发育成囊胚时，内层细胞团（Inner Cell Mass）的细胞即为胚胎干细胞。胚胎干细胞具有全能性，可以自我更新并具有分化为体内所有组织的能力。进一步说，胚胎干细胞（ES 细胞）是一种高度未分化细胞。它具有发育的全能性，能分化出成体动物的所有组织和器官，包括生殖细胞。成体干细胞是指存在于组织中的未分化细胞，该种细胞能够自我更新并能够分化形成组成该类组织的细胞，包括间充质细胞、造血干细胞、神经干细胞等。成年动物的许多组织和器官，比如表皮和造血系统，具有修复和再生的能力，成体干细胞在其中起着关键的作用。然而与胚胎干细胞不同的是，这种干细胞在培养时生存时间有限并且只能分化成有限的几种细胞类型。

目前干细胞有几百种之多，而且它们的培养特性也各异，就重复性而言，干细胞培养领域还面临着极大的困难。为干细胞提供一个最佳的培养条件，尤其是保证细胞处于未分化状态或者在需要的时候使细胞向专一的方向分化，是干细胞研究中最大的挑战。

干细胞的培养

最初的胚胎干细胞培养都少不了小鼠胚胎成纤维（MEF）细胞制备的滋养层。MEF 向培养基中分泌一些未知因子，能支持干细胞生长。后来，研究人员发现在培养小鼠 ES 细胞时，向培养基中添加白血病抑制因子（LIF）可以代替滋养层细胞而维持 ES 细胞的自我更新能力，但 LIF 并不能维持人类胚胎干细胞（hESC）的未分化状态。因此大部分实验室还在使用细胞滋养层。然而，MEF 细胞在体外的增殖能力较差，且随着传代次数增加，其支持 hESC 生长的能力降低，需要不断地制备原代 MEF 细胞，昂贵、费时。而且鼠源性的 MEF 可能引起动物源性病原体或支原体的污染，因此很多研究组尝试用各种人源细胞直接作为饲养层。但也不是所有人源细胞都能很好地支持 hESC 的生长，而且用异体来源的细胞仍存在一定的交叉污染危险。基于这些原因，研究人员希望能开发出无滋养层、无血清、成分确定的 hESC 培养体系。

BD 生物科学公司、加拿大 StemCell 公司就和著名的 WiCell 研究所建立了战略合作关系，开发出更优化、无滋养层的人胚胎干细胞培养环境，包括成分确定的无血清培养液和合适的培养基质。

StemCell 公司优化了 WiCell 研究所的 mTeSR 1 培养液配方，并将其商品化。mTeSR 1 培养液是一种完全、成分确定的无血清培养液。在 BD 公司 Matrigel 基质上，mTeSR 1 可用于未分化状态 hESC 的维持和扩增，而不必添加其他生长因子。在 mTeSR 1 中未分化的 hESC 保持多能标记如 Oct-3/4 和 SSEA-3 的高表达。在畸胎瘤测定中，hESC 可分化成三种胚层的能力也证明了其多能性。

hESC 理想的培养环境包括无血清及成分确定的培养液和一个适合 hESC 生长的培养表面。BD 的 Matrigel 基质大家应该都听说过吧，是一种从 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 小鼠恶性肿瘤基膜分离的再生基膜，主要成分是层粘蛋白、IV 型胶原和蛋白糖苷肝素硫酸盐，还包含了生长因子、基质金属蛋白酶等。BD 公司在此基础上开发了一种更适合 hESC 生长的优化表面——Matrigel hESC-qualified Matrix，能与 StemCell 公司的 mTeSR 1 相匹配，为 hESC 研究提供了必需的重复性和一致性。mTeSR 1 和 BD Matrigel™ 基质的结合使用可培养各种 WiCell hESC 多至 20 代。

Invitrogen 也推出了 StemPro hESC SFM——一种完全确定的无血清培养基，用于培养人胚胎干细胞。它已经证明能在一系列 hESC 中维持细胞的多能性。Geltrex matrix 则是与 StemPro hESC SFM 配套使用的基质。它的主要成分与 Matrigel 类似，但简化了生长因子，使批次间稳定性提高，并模拟了体内的环境，为细胞培养提供了一种 3D 脚手架，使细胞真正感到宾至如归。另外，Invitrogen 还推出了首个用于人类胚胎干细胞培养的完全确定的基质——CELLstart。它不含细胞来源成分，可以支持 hESC 贴壁和

扩增，并维持多能性和分化能力。CELLstart 也能用于间充质干细胞和神经干细胞。

Invitrogen 公司还推出 STEMPro MSC SFM，专门用于间充质干细胞 (MSC) 或来源于骨髓的干细胞的培养。它是完全限定的，意味着培养基中的每一种成分都是已知量的，因而排除了显著的批间差。这种培养基能使 MSC 维持未分化状态超过 9 代，而用传统的加血清培养基培养的细胞在 5 代后就开始出现分化。

但也不是所有的干细胞都喜欢无血清培养基，有些在无血清培养基中生长缓慢，状态不佳。这时，你也可以有别的选择，譬如血清替代物或特别的血清。Thermo Scientific HyClone 就提供了 AdvanceSTEM Serum Replacement 和 ES-Qualified FBS，适合于支持胚胎干细胞的生长。除此之外，赛默飞世尔科技还与 CET 达成协议为研究人员提供多种人源成体干细胞、生长培养基和分化培养基。对所有的 CET 干细胞都确认了已知的基质细胞，干细胞和造血细胞标记。并且每一个系统都用流式细胞仪进行了分析并且确保纯度>95%。所有的干细胞都经过测试并且保证 HIV-1, HIV-2, B 型肝炎和 C 型肝炎均为阴性。所有的 CET 干细胞在销售之前仅在不含有任何额外生长因子的培养基和血清中生长，这样可以使分化的可能性降低。它还与 Primogenix 公司达成协议，为研究者提供小鼠胚胎干细胞：129/X1 和 B6N。

这些都是赛默飞世尔干细胞卓越计划 (Stem Cell Excellence Program) 的一部分。这个干细胞卓越产品线除了 Thermo Scientific HyClone AdvanceSTEM 试剂、试剂盒和干细胞系外，还包括 Dharmacon 先进的 RNAi 技术；Nalgene 和 Nunc 的高质量塑

料制品；Sorvall, Heraeus, Forma 和 Revco 久经考验的实验室仪器；Barnstead 的纯水；以及 Nautilus LIMS 软件和 Matrix 自动移液操作产品。这些产品将用于干细胞研究的多个方面，包括干细胞收集和制备、扩增和分化、鉴定和分析、以及储存和运输。

R&D 公司也推出了神经干细胞的扩增试剂盒，用于神经干细胞在无血清培养基中的体外扩增。每个试剂盒中除了 N2 添加剂外，还包含了促进神经前体细胞增殖的生长因子，如 bFGF、EGF 等。另外，R&D 还有造血干细胞的生长因子组，包含促进 HSC 体外扩增的多个生长因子——Flt-3 Ligand, SCF, 和 Tpo。

干细胞的分化

干细胞研究人员面临的另一重大挑战就是使细胞正确分化，也就是分化成你想要的细胞类型。赛默飞世尔科技就有一系列 AdvanceSTEM 分化试剂盒，能将间充质干细胞快速分化成脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞。不久前，它还推出了 AdvanceSTEM 神经分化试剂盒，专门用于支持间充质干细胞分化成神经细胞。分化后的神经细胞可用于研究多种包括帕金森病在内的神经退行性疾病。该试剂盒包括包含有特异生长因子的细胞培养基以及生长添加剂，该生长因子能够促使干细胞分化。在加入到需要分化的干细胞之前仅需要将培养基及添加剂混合即可。Invitrogen 也推出了 STEMPRO Adipogenesis 和 STEMPRO Osteogenesis 分化试剂盒。这些

试剂盒包含了培养基和特殊的添加剂，能诱导 MSC 分化形成脂肪细胞或骨细胞，让研究者去研究 MSC 如何分化成多种组织类型。

还有许多工具让研究人员来检测分化。一向以抗体见长的 R&D 就有多种检测干细胞分化的抗体。Invitrogen 还有一个名为 BG01V/hOG 的细胞系，用 GFP 报告基因来监测分化。在细胞处于多潜能状态时，启动子 Oct4 具有活性，细胞就会表达 GFP。这样研究者可以很容易观察到细胞的分化，而不用做基因或蛋白表达分析。

分化也可以通过追踪与细胞状态相关的标记来检测。人类胚胎干细胞在分化和未分化的状态，表现出特有的早期分化标记。

Invitrogen 的 STEMPRO® EZChek Human Tri-Lineage Multiplex PCR Kit 可以检测 hESC 的早期分化标记 (Oct4, AFP, ACTC1, and Sox1)。这个试剂盒可在一个 PCR 反应中快速检测细胞的分化状态和分化成三胚层细胞的可能性。

干细胞研究的终极目标是临床上的细胞移植治疗。要达到这样的高度，干细胞的培养必须满足稳定、标准化、无污染、长期培养后染色体保持稳定状态这些先决条件。虽然目前还无法达到这些条件，但各研究机构和厂商都在这个领域都投入了大量的研究精力，相信在不久的将来，干细胞培养系统将会为临床应用铺平道路。

(生物通 余亮)