

北京油鸡胚胎肝脏间充质干细胞的生物学特性

牧 仁^{1,2} 边艳超^{1,2} 浦亚斌² 李向臣² 王凤龙¹ 关伟军²

1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

摘要 从 7 日龄北京油鸡胚胎肝脏中分离间充质干细胞, 原代培养并传代至 15 代, 免疫荧光法检测造血祖细胞/肝卵圆细胞的表面标志物 CD34、CK19 呈阴性表达; RT-PCR 检测 CD29、CD44、CD71、CD73 呈阳性表达。尝试不同培养条件对细胞生长曲线的影响, 选取最佳培养方案, 同时对细胞进行细胞周期测定。肝脏间充质干细胞通过不同诱导液被成功诱导分化成脂肪细胞、心肌细胞, 结果表明, 从鸡胎肝中分离获得的间充质干细胞具有和人类间充质干细胞相似的生物学特性及分化潜能, 其所具有多向分化的潜能, 为今后临床广泛应用提供了可能。

关键词 北京油鸡; 间充质干细胞; 生长曲线; 诱导分化

中图分类号 S 831 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0099-07

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是来源于早期中胚层的一类具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞, 存在于机体各个组织内, 具有贴壁能力, 体外能够大量扩增和免疫原性低的特点, 其在特定条件下可向成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞和肌细胞等细胞类型分化, 是一种较为理想的细胞治疗应用的种子细胞。

北京油鸡是中国特有的肉蛋兼用型优良家禽品种, 曾为清代宫廷御用鸡种, 距今已有 300 余年历史, 其肉质细腻、肉味鲜美、蛋质优良、生活力强、遗传性稳定, 适合北京地区散养。21 世纪初北京油鸡已处于畜禽遗传资源受威胁等级目录中仅高于濒临灭绝等级的濒危资源等级^[1], 已被列入国家级畜禽遗传资源保护名录^[2], 同时北京油鸡是国内 37 个受到严重威胁的畜禽遗传资源品种之一。笔者应用现阶段主流细胞生物学研究方法, 对中国特有家禽品种北京油鸡胎肝 MSCs 生物学特性进行研究, 以期达到丰富畜禽 MSCs 研究的物种范畴, 揭示北京油鸡胎肝 MSCs 适合的培养条件、保存及分化过程中的一些特性的目的, 并为今后的深入研究提供一些借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

北京油鸡入孵 7 日龄胚胎由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所昌平实验基地种禽场提供。

1.2 主要试剂

MEM、DF-12、FBS 购自美国 GIBCO 公司, 胰蛋白酶、地塞米松、胰岛素、IBMX、5-氮胞苷、DMSO 购自美国 Sigma 公司, bFGF 购自英国 Peprtech 公司, CK19(兔抗鸡, 1:100)、CD34(兔抗鸡, 1:100) 购自日本 MBL 公司, MHC(鼠抗鸡, 1:100) 抗体购自美国 DSHB 公司, FITC 标记的羊抗兔二抗、FITC 标记的羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥 (2F-0311、2F-0312), RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa (DR001A) 公司, RT-PCR Marker 均为北京天根生产 Marker I (MD101), 引物合成由上海生工生物工程有限公司进行。

1.3 鸡胎肝 MSCs 分离培养

无菌环境中取入孵 7 日龄鸡胚置于装有 PBS 溶液的平皿中, 眼科手术器械分离鸡胚肝脏, 同时剔除肝脏韧带, PBS 漂洗胚胎肝脏 3 遍, 挤压排尽胚胎

收稿日期: 2013-03-15

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08009-003-006, 2011ZX08012-002-06)、基本科研业务项目(2012z1072)和国家家养动物种质资源平台项目(2012)

牧 仁, 博士研究生, 研究方向: 畜禽干细胞及动物传染病与分子病理学. E-mail: mmarstina@126.com

通讯作者: 关伟军, 教授. 研究方向: 畜禽干细胞及遗传资源保护. E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn

王凤龙, 教授. 研究方向: 动物传染病与分子病理学. E-mail: wangfenglloo@sohu.com

肝脏内血液,冲洗后的胚胎肝脏放置于干燥空平皿中,用眼科剪将胚肝剪碎为约 1.0 mm^3 大小组织块,加入 2 mL 0.125% (质量分数)胰蛋白酶溶液(美国 Sigma 公司), 37°C 消化 20 min 后加入 5 mL 含 10% FBS MEM 培养基终止消化,轻轻吹打消化的组织块,使细胞从组织中充分分离,经 $75 \mu\text{m}$ 细胞筛滤过,除去未消化组织块, $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min ,弃上清。用事先配制的 4 组培养基(I:含 10% FBS MEM 培养基;II:含 10% FBS、 5 ng/mL bFGF MEM 培养基;III:含 10% FBS DMEM/F12 培养基;IV:含 10% FBS、 5 ng/mL bFGF DMEM/F12 培养基)分别将离心的细胞重悬并细胞计数,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL 后接种于六孔培养板中,每孔 1.5 mL 。原代分离细胞 24 h 后更换培养基,去除未贴壁细胞。每天对细胞进行观察,每 $2 \sim 3 \text{ d}$ 换液 1 次,记录细胞传代时间。

常规消化法收集细胞,用细胞冻存液(50% FBS+ 10% DMSO+ 40% DMEM)重悬细胞,将悬液移置冻存管中, -80°C 冰箱过夜,次日投入液氮中长期保存。细胞复苏时将冻存管从液氮中取出,投入 42°C 水浴锅中使其迅速融化,移至含有新培养液的培养板中,于 37°C 、饱和湿度 5% CO_2 培养箱中继续培养, 24 h 后更换培养液。

1.4 不同培养条件鸡胎肝 MSCs 生长曲线测定

取 4 组不同培养基 P3 代状态良好的细胞消化后计数,调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,接种于 24 孔板,每孔 $100 \mu\text{L}$ 。从第 2 天起至细胞长满,连续每天随机选取 3 孔,连续 7 d 。使用血球计数板于倒置显微镜下进行计数,每孔计数重复 3 遍取其平均数,以时间(d)为横坐标,细胞数为纵坐标绘制生长曲线,比较 4 种培养基对细胞生长速度的影响。

1.5 鸡胎肝 MSCs 细胞周期检测

取最佳培养基培养的 P7 代对数生长期的鸡胎肝 MSCs,用 0.125% 胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞悬液,加入含 10% FBS DF-12 培养基终止消化, $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min ,弃上清,用 PBS 将细胞重悬, $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 4 min ,重复 1 次,去除细胞碎片,弃净 PBS 加入 4°C 预冷的 70% 乙醇,置于 4°C 固定 18 h 以上。之后 $1\ 200 \text{ r/min}$ 离心 8 min ,弃去乙醇,加入 PBS 重悬, $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 4 min ,弃去 PBS,加入 $100 \mu\text{g/mL}$ PI 染液,于 4°C 避光着色 20 min ,流式细胞仪(BECKMAN COULTER, cytomics FC500MPL)检测。

1.6 鸡胎肝 MSCs 鉴定

取入孵 7 日龄北京油鸡胚胎肝脏冷冻切片,包埋剂进行包埋,切片后使用经多聚赖氨酸包被的载玻片贴片备用,北京油鸡 P3 代肝脏 MSCs 经爬片后再与胚肝组织切片一起固定、通透、封闭处理,之后加入 1% BSA 稀释的一抗 CK19(兔抗鸡, $1:100$)、CD34(兔抗鸡, $1:100$)室温孵育 1 h ,PBS 冲洗细胞 3 次,每次 5 min ;加入 FITC 标记的羊抗兔二抗($1:100$)暗室中室温孵育 1 h ,PBS 洗 3 次;激光共聚焦显微镜(Nikon TE-2000-E Japan)拍照。

取 60 mm 培养皿培养生长至 90% P3 代细胞,酶消化法收集细胞提取总 RNA,调整 RNA 质量浓度为 $500 \text{ ng}/\mu\text{L}$;参照 TaKaRa Taq RT-PCR 试剂盒反转录总 RNA 为 cDNA,根据 TaKaRa Ex Taq 试剂盒说明扩增 MSCs 标志物 CD29、CD44、CD71、CD73 和内参 GAPDH 并检测表达强度,Marker 为北京天根 Marker I。引物序列见表 1。

1.7 鸡胎肝 MSCs 诱导分化及检测

分别取 60 mm 培养皿培养的 P7 代生长至 $40\% \sim 50\%$ 细胞,吸净培养板中旧培养液,加入 2 mL PBS 清洗 2 遍。脂肪细胞诱导液(10^{-6} mol/L 地塞米松 + 10 mg/L 胰岛素 + $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ IBMX + DMEM/F-12 完全培养基)、心肌细胞诱导液(5-氮胞苷贮存液稀释成终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的工作液);心肌细胞诱导液添加 24 h 后吸净培养板中诱导液,PBS 清洗 2 遍,加入含 10% FBS 的 DF-12 基础培养基。每日观察细胞生长状态及细胞的形态变化,适时进行细胞诱导鉴定。

诱导的脂肪细胞进行油红 O 染色。诱导后的心肌细胞参照细胞鉴定进行 MHC 免疫组化检测。并分别取诱导后的脂肪细胞、心肌细胞用提取总 RNA 使用 TaKaRa Taq RT-PCR 试剂盒检测 PPAR- γ 、LPL、Desmin、MyoD1 及内参 GAPDH 表达的强度,Marker 为北京天根 Marker I (引物序列见表 1)。

2 结果与分析

2.1 鸡胎肝 MSCs 不同培养基条件下形态学观察及冻存复苏结果

倒置显微镜下观察细胞形态(图 1),刚分离获得的未贴壁,鸡胎肝 MSCs 圆形,强折光性;培养 24 h 后细胞贴壁,少量漂浮未贴壁,为梭形及多角形,镜下形态类成纤维细胞;初期细胞生长较为缓

表 1 RT-PCR 鉴定引物序列
Table 1 Primer sequences used in RT-PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ Temperature	循环数 Cycle	片段大小/bp Fragment size
<i>CD29</i>	F:GAACGGACAGATATGCAACGG R:TAGAACCAGCAGTCACCAACG	60	30	300
<i>CD44</i>	F:CATCGTTGCTGCCCTCCT R:ACCGCTACACTCCACTCTTCAT	58	30	290
<i>CD71</i>	F:CCCAGGCTTCCCTTCGT R:GGGCTCCAATCACAAACATAC	56	30	305
<i>CD73</i>	F:AGTGCAAACATTAAGGGAAAA R:CCTCCAATAACAACATCCACTCCT	58	30	310
<i>PPAR-γ</i>	F:CTGTCTGCGATGGATGAT R:AATAGGGAGGAGAAGGAG	47.3	30	199
<i>LPL</i>	F:AGTGAAGTCAGGCGAAAC R:ACAAGGCACCAGATT	48.7	30	477
<i>Desmin</i>	F:GGGCTTTCTCCTACCTGC R:GCTTCCTTGCCATCCTGT	57	30	240
<i>MyoD1</i>	F:GCTACTACACGGAATCACCA R:GGGCTCCACTGTCACTCA	57	30	198
<i>GAPDH</i>	F:TAAAGGCGAGATGGTGAAG R:ACGCTCCTGGAAGATAGTGAT	53	30	244

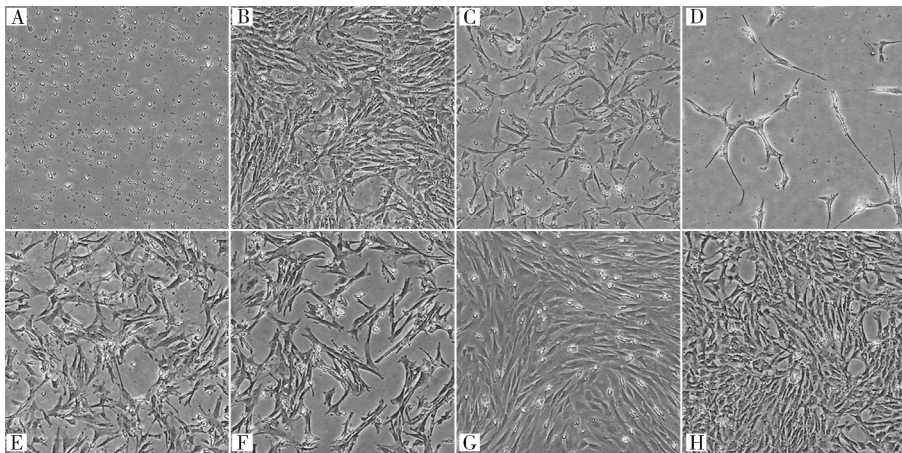


图 1 北京油鸡间充质干细胞形态(40×)

Fig. 1 Morphology of mesenchymal stem cells from Beijing fatty chicken

慢,同时镜下可见混杂有铺路石状的卵圆细胞;随着培养时间的延长 MSCs 成单层片状生长,遮光性较强。在 4 种培养条件下均可生长至 90% 并传代培养,随细胞传代培养混杂的卵原细胞逐渐消失,当细胞传代至 P3 代时,镜下已无混杂铺路石状卵圆细胞。4 种培养条件原代传代时间分别为:8.0、6.5、7.0、5.0 d。P1 代、P2 代细胞所需传代时间除 IV 为

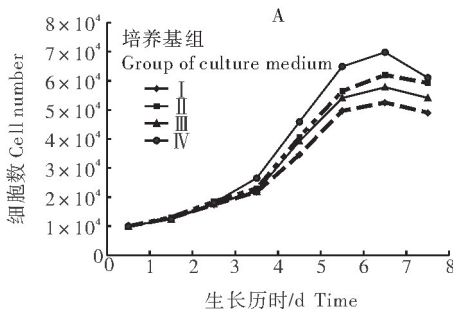
24 h,其余 3 种均为 30 h 左右。

在后续培养过程中采用 IV 培养基共培养 15 代,细胞传代超过 P8 代时,细胞的传代时间明显延长达 3~5 d,当细胞传代达 13 代时出现明显的老化迹象,表现为细胞遮光性下降,部分细胞呈平铺状,开始出现空泡。P15 代细胞生长无法达到 70%,且传代后细胞贴壁数量极少,不再生长,无法传代。

鸡胎肝 MSCs 冻存前与复苏后在形态上差异不明显,生长状态等同于常规传代培养,且冻存复苏前后细胞存活率均大于 90%,符合细胞冻存保存条件,可以作为保存北京油鸡这一中国特有地方家禽品种的一种方法。

2.2 不同培养条件鸡胎肝 MSCs 细胞生长曲线测定结果

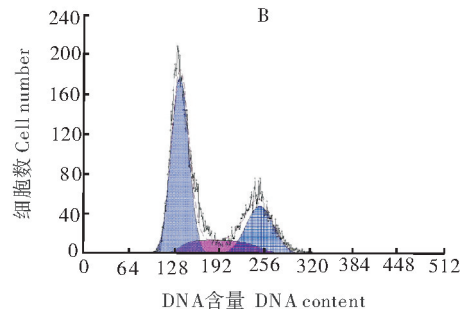
4 种培养基条件下添加了 bFGF 的 FD-12 D 培养基(IV)细胞生长曲线明显优于其他 3 组,同取原代分离培养 5 d 的细胞,倒置显微镜下观察,细胞生长状况良好,优于其他 3 组,同时原代生长达到可进



行传代的汇合程度的时间最短(图 2-A)。

2.3 鸡胎肝 MSCs 细胞周期检测结果

采用流式细胞仪分析第 7 代鸡胎肝 MSCs 细胞周期(DNA 含量),结果如图 2-B 所示, $G_{0/1}$ 期细胞占细胞总数的 23.38%,S 期细胞占细胞总数的 20.14%, G_2 期细胞占细胞总数的 56.48%。检测结果显示,绝大多数细胞处于静止期 G_2 ,为有丝分裂的准备期,DNA 合成后期即将进入分裂期, $G_{0/1}$ 期细胞所占比例较低,说明细胞暂不增殖及不增殖细胞所占比例小于 23.38%。说明分离培养细胞在体外培养的环境下具有较强的扩增能力。



A:北京油鸡间充质干细胞不同培养基生长曲线 Cell growth curves of mesenchymal stem cells from Beijing fatty chicken different medium growth; B:北京油鸡间充质干细胞细胞周期 Mesenchymal stem cells from Beijing fatty chicken cell cycle.

图 2 北京油鸡间充质干细胞生长曲线及细胞周期

Fig.2 Cell growth curves of mesenchymal stem cells from Beijing fatty chicken and cell cycle

2.4 鸡胎肝 MSCs 鉴定结果

进行鸡胚胎肝脏切片,结果发现卵原细胞标志物 CK19、造血祖细胞标志物 CD34 阳性表达;分离培养 P3 代鸡胎肝 MSCs CK19、CD34 阴性表达,检测 RT-PCR 检测鸡胎肝 MSCs 表面特异性标志物 CD29、CD44、CD71、CD73 均成阳性表达(图 3)。表明试验所分离培养的细胞为鸡胎肝 MSCs,而非胚胎肝脏中可能存在的卵原细胞及造血祖细胞。

2.5 鸡胎肝 MSCs 诱导分化及检测

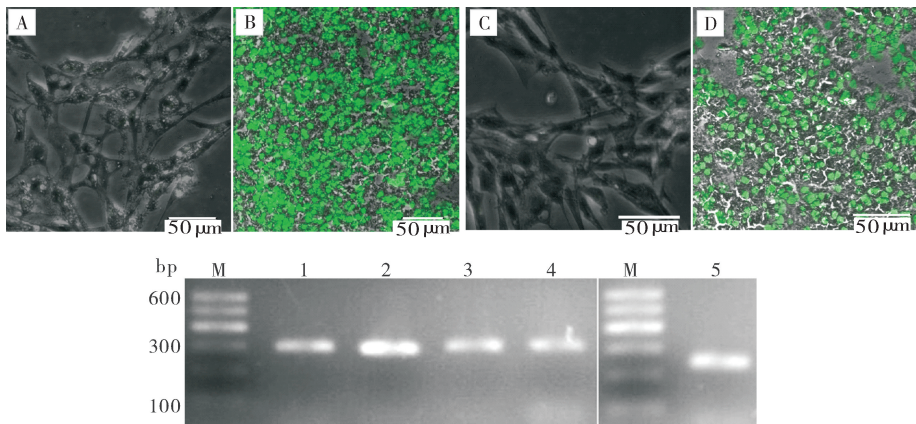
鸡胎肝 MSCs 诱导分化及检测结果如图 4 所示。鸡胎肝 MSCs 向脂肪细胞诱导分化,细胞加入脂肪诱导液 2 d 后体积增大,同时光镜下胞质内可见遮光性很强的呈淡黄色的小脂滴,随着诱导分化时间的延长,脂滴数量增多并相互融合形成大而圆的脂滴,诱导 6 d 后,油红 O 染色呈阳性,RT-PCR 检测脂肪细胞特异性表面标志 ppar γ 、LPL 均呈阳性表达。

鸡胎肝 MSCs 向心肌细胞诱导分化 24 h 后,细

胞无明显变化,有个别细胞出现死亡漂浮。更换为标准培养液后,细胞与普通传代培养状态相似,培养 5 d 开始出现个别细胞融合现象,随着培养时间的延长,融合的细胞逐渐增多,并呈不规则性平行部分融合排列,经过 25 d 成肌诱导后,细胞数量明显增多,呈现非单层细胞结构,出现多核肌管。经免疫细胞化学染色法检测肌管特异性标志 MHC 呈阳性表达。

3 讨论

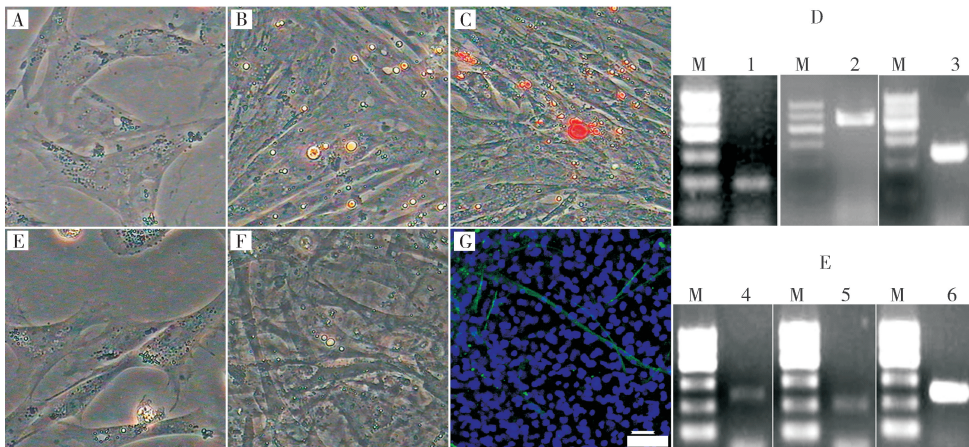
我国是世界上畜禽品种资源大国,拥有古老而独特的地方畜禽品种,但我国许多特有地方品种尚未被开发利用就已灭绝,非常可惜^[3]。而很多畜禽品种则受到引进品种的替代及改良,其种群保有数量堪忧,以北京油鸡为代表的中国特有家禽品种如萧山鸡、矮脚鸡等的状况也不容乐观。虽然目前已有通过成纤维细胞保存畜禽遗传资源这一种途径^[4],但相较于干细胞成纤维细胞属于终末分化,虽然包含全部遗传信息,但在细胞 RNA 转录水平层级的研究价值大大低于干细胞,且 MSCs 具有更强的



A: 鸡间充质干细胞不表达 CK19 Chicken mesenchymal stem cells do not express CK19; B: 鸡胎肝组织表达 CK19 Chicken fetal liver tissue express CK19; C: 鸡间充质干细胞不表达 CD34 Chicken mesenchymal stem cells do not express CD34; D: 鸡胎肝组织表达 CD34 Chicken fetal liver tissue express CD34. 标尺 = 50 μm Bar = 50 μm . M: Marker I (600 bp); 1: CD29 (300 bp); 2: CD44 (290 bp); 3: CD71 (305 bp); 4: CD73 (310 bp); 5: GAPDH (244 bp).

图 3 北京油鸡间充质干细胞鉴定

Fig. 3 Identification of mesenchymal stem cells from Beijing fatty chicken



A: 向脂肪细胞诱导前的 P7 代细胞 P7 cells before induced to the adipocyte; B: 向脂肪细胞诱导后细胞形态 Morphology of the cells after induction to adipocyte; C: 诱导后油红 O 染色脂滴呈红色 The lipid droplets was positive expression under red oil O dyed; D: 成脂诱导后 RT-PCR 鉴定 RT-PCR identification of adipogenic differentiation; E: 向心肌细胞诱导前的 P7 代细胞 P7 cells before induced to the myocardial cells; F: 向心肌细胞诱导后细胞形态 Morphology of the cells after induction to myocardial cells; G: 向心肌细胞诱导后表达 MHC MHC expressed after induction to myocardial cells; M: Marker I ; 1: ppar γ (199 bp); 2: LPL (477 bp); 3: GAPDH (244 bp); 4: Desmin (240 bp); 5: MyoD1 (198 bp); 6: GAPDH (244 bp); 标尺 = 50 μm Bar = 50 μm .

图 4 北京油鸡间充质干细胞诱导分化及鉴定 (200 \times)

Fig. 4 Beijing fatty chicken mesenchymal stem cells induced differentiation and identification

自我更新能力和成纤维细胞所不具备的多向分化潜能,所以在物种遗传资源保存上,干细胞比成纤维细胞更加适合进行遗传资源的保存。

早期 MSCs 的研究主要集中在骨髓 MSCs,之后研究者也不断从其他组织,如脂肪、脐带、胎盘、骨实质和肌肉等中成功分离获得 MSCs^[5]并进行了大量相关研究。MSCs 在成体的分布更广泛,甚至在牙髓中也存在 MSCs^[6]。MSCs 所具备的优点使其

一直是干细胞研究中的热点。虽然目前的研究已非常深入,但对畜禽 MSCs 研究还是相对较少。

笔者通过使用不同培养条件进行对比,发现北京油鸡胎肝 MSCs 最适合在含微量 bFGF 的 DF-12 含血清培养基中生长,其生长曲线及传代时间均优于不含 bFGF 及 MEM 培养基,说明微量 bFGF 具有促进干细胞的有丝分裂能力,而 MSCs 的增值能力更强更适合使用 DF-12 这类营养成分更丰富的培

培养基;细胞在体外适宜的条件下成功传代达 15 代,但并未达到无限细胞系,这也说明 MSCs 是一个异质性群体的事实^[7]。目前没有证据证明 MSCs 在体内的细胞表型是怎样的,所有试验结果都是基于 MSCs 在体外扩增许多倍之后的细胞群体来检测的,即使是原代细胞,它也是由最初的几十到几百个细胞扩增而来。这就不可避免使得 MSCs 在体外扩增过程中要分化或衰老,丧失一部分或者全部分化能力,变成单一祖细胞或者成熟细胞,随着扩增倍数的增加、细胞代次的增高,出现分化的细胞在整个细胞群体中的比例会逐渐增大,这也是目前在 MSCs 研究中亟待解决的实际应用问题。

分离培养到的鸡胎肝 MSCs(免疫细胞化学检测)不表达肝脏卵圆细胞特异性标志物 CK19^[8]及造血祖细胞标志物 CD34^[9],而这两种标志物在鸡胚胎肝脏中呈阳性表达,说明,我们所分离培养的细胞不是鸡胚胎肝脏中可能存在的卵原细胞或造血祖细胞;而 RT-PCR 检测 MSCs 特异性标志物 CD29、CD44、CD71、CD73 均呈阳性表达,印证了免疫细胞化学检测的结果。同时细胞被诱导成脂肪细胞和心肌细胞的分化类型,表明分离的细胞具有向其他细胞类型分化的潜能,符合干细胞的定义。本研究中细胞向脂肪细胞分化所需时间较其他物种及人类短^[10],可能与细胞对诱导液的敏感度有关,这一点值得今后继续进行深入研究。5-氮杂胞苷作为一种促使 MSCs 向心肌细胞分化的诱导剂已得到确认^[11]。本试验过程中分化的心肌细胞虽未在镜下观察到自律性的搏动^[12],但出现呈短圆柱形、有分支相连、其细胞核位于细胞中央的典型的心肌细胞形态。分化得到的脂肪细胞、心肌细胞分别表达 PPAR- γ 、LPL 和 Desmin、MyoD1 标志物,与 Gong^[12]、Makino 等^[13]所报道的分化细胞标志物一致,油红 O 染色及 MHC 免疫组化结果呈阳性,说明鸡胚肝脏 MSCs 向脂肪细胞、心肌细胞分化是可行的、可信的。虽然所分离培养的 MSCs 在化学诱导的条件下可以顺利分化为目的细胞,且化学诱导法简单易行,但是缺点也很明显,诱导效率无法保证,对细胞的伤害比较大,如 5-氮胞苷具有细胞毒性作用,尽管在试验中以低浓度诱导,但仍不排除其对细胞增殖的抑制。Tomita 等^[14]发现,5-氮胞苷浓度越高,诱导作用越强,50 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷作用 1 d,即见 MSCs 成肌分化,但伴有较高的毒性作用。目前多数观点认为 MSCs 的分化方向与微环境“壁

龕”(niche)密切相关^[15-16]。“壁龕”的组织成分相当复杂,不同组织的细胞微环境有着各不相同的因子。可能这就是诱导进入不同组织的 MSCs 获得靶组织的表型、向不同细胞谱系分化的主要原因之一。同时亦有研究表明 MSCs 的分化效率与物理因素有关^[17],目前已有学者使用细胞因子对间充质按细胞进行诱导分化取得了成功^[18]。这也是 MSCs 未来深入研究的一个方向,即微环境及物理因素对 MSCs 分化的影响。

MSCs 被证实具有支持造血干细胞增殖的能力^[19-21],其不仅可作为细胞治疗的种子细胞,亦可提供辅助治疗功能,简化治疗过程,加速治疗进度,减轻治疗痛苦。同时 MSCs 适合冷冻保存,可以作为遗传资源保存的一种形式,未来可筹建干细胞库以满足细胞治疗的需要,为其应用拓展更广阔的空间。

参 考 文 献

- [1] 马月辉,徐桂芳,王端云,等.中国畜禽遗传资源信息动态研究[J].中国农业科学,2002,35(5):552-555.
- [2] 刘刚.国家级畜禽遗传资源保护名录[J].四川农业科技,2007(5):42-43.
- [3] 吕宝铨.保护我国地方畜禽品种路在何方[J].当代畜牧,2011(5):54-55.
- [4] GUAN W J, WANG D J, BAI C Y. Biological characteristic of an embryonic fibroblast line from Xiaoshan chicken for genetic conservation[J]. Journal of Cell and Animal Biology, 2012, 6(4):46-53.
- [5] 王恒湘,郭子宽.间充质干细胞在组织再生应用中的诸多问题[J].组织工程与重建外科杂志,2008,4(5):241-245.
- [6] OHAZAMA A, MODINO S A, MILETICH I, et al. Stem cell based tissue engineering of murine teeth[J]. J Dent Res, 2004, 83:518-522.
- [7] COLTER D C, SEKIYA I, PROCKOP D J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells[J]. Proc Natl Acad Sci, 2001, 98(14):7841-7845.
- [8] CHIU C C, SHEU J C, CHEN C H, et al. Global gene expression profiling reveals a key role of CD44 in hepatic oval-cell reaction after 2-AAF/CCl4 injury in rodents[J]. Histochem Cell Biol, 2009, 132:479-489.
- [9] SEONG J M, KIM B C. Stem cells in bone tissue engineering[J]. Biomed Mater, 2010, 5(6):062001.
- [10] 张睿婷,韩之波,王涛,等.人胎盘绒毛膜来源间充质干细胞的生物学特性[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(10):1823-1826.
- [11] 阮中宝,杨向军,陈各才,等.5-氮杂胞苷诱导人脐带间充质干细胞向心肌样细胞的分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(36):6705-6708.

- [12] GONG X L, HOU L L, BAI C Y, et al. Isolation and biological characteristics of chicken adipose-derived progenitor[J]. *Cells, DNA and Cell Biology*, 2011, 30(7): 453-460.
- [13] MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro* [J]. *Clin Invest*, 1999, 103: 697-705.
- [14] TOMITA S, LI R K, WEISEL R D, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function[J]. *Circulation*, 1999, 100(Suppl): 247-256.
- [15] AUGELLO A, KURTH T B, DE BARI C. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches[J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 20: 121-133.
- [16] KOLF C M, CHO E, TUAN R S. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(1): 204.
- [17] 周倩, 周燕, 叶朝阳, 等. 人羊膜间充质干细胞在微载体动态培养体系中的扩增和成骨诱导分化[J]. *高校化学工程学报*, 2011, 25(6): 991-996.
- [18] BIRMINGHAM E, MCHUGH P E. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche[J]. *Eur Cells Materials*, 2012, 12(23): 13-27.
- [19] DEANS R J, MOSELAY A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(8): 875-884.
- [20] LE BLANC K, RINGDEN O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation[J]. *Cur Opin Immunol*, 2006, 18(5): 586-591.
- [21] LU L L, LIU Y J, YANG S G, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials [J]. *Haematologica*, 2006, 91(8): 1017-1026.

Biological characterization of mesenchymal stem cells from Beijing fatty chicken fetal liver

MU Ren^{1,2} BIAN Yan-chao^{1,2} PU Ya-bin² LI Xiang-chen² WANG Feng-long¹ GUAN Wei-jun²

1. *College of Animal Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;*

2. *Institute of Beijing Animal Science and Veterinary, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) from chicken fetal liver are multipotent stem cells that can differentiate *in vitro* into various terminally differentiated cells. The majority of studies of MSCs have been focused on human. In this study, chicken liver-derived MSCs were isolated from 7-day-old embryo of Beijing fatty chickens. Primary liver-derived MSCs were sub-cultured to passage 15. The surface markers, CD29, CD44, CD71 and CD73 of liver-derived MSCs were detected by RT-PCR and the surface markers, CD34 and CK19 of hematopoietic progenitor cells/hepatic oval cells were not detected by immunofluorescence. The best culture conditions were determined by drawing growth curve and the cells cycle were investigated. Liver-derived MSCs were successfully induced and differentiated into adipocytes and myocardial cells. The results suggested that the MSCs isolated from chicken fetal liver possess similar biological characteristics with those derived from human, and their multilineage potential would provide many possible applications.

Key words Beijing fatty chicken; mesenchymal stem cells; growth curve; differentiation potential

(责任编辑:边书京)