

慢病毒介导的稳定表达 bFGF 的 胎儿肝脏基质细胞株的建立*

习佳飞 王韞芳 张 鹏 袁红丰 施双双

闫 舫 陈 琳 白慈贤 南雪 裴雪涛**

(军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要 通过重组慢病毒系统感染人胎儿肝脏基质细胞(fetal liver stromal cell, FLSC), 建立了能够稳定、高效表达碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的细胞株 bFGF/FLSC. 从流产胎儿肝脏组织分离富集基质细胞, 对其进行了生长特性和表面标志的鉴定, 其在体外维持传代 35 代, 依然保持正常的染色体核型. 从胎儿骨髓间充质干细胞中克隆得到 bFGF 基因, 构建重组慢病毒载体, 感染 FLSC, 根据荧光表达强弱进行流式分选, 获得能够继续稳定传代的低表达和高表达 bFGF 的两株细胞, RT-PCR 和蛋白质印迹证实, 细胞株中 bFGF 基因的稳定表达. RT-PCR 结果显示, 弱荧光和强荧光表达细胞的 bFGF, 在 mRNA 水平的表达分别是转染空载体细胞的 2.33 倍和 6.19 倍; 蛋白质印迹结果显示, 在蛋白质水平表达分别是 1.76 倍和 5.05 倍. 用建立的 bFGF/FLSC 作饲养层细胞体外培养人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES), 结果证明, 其能在无或少量添加外源 bFGF 的条件下, 维持人 ES 细胞增殖及其干性达 20 代. bFGF/FLSC 细胞株的建立, 将为构建低成本、安全高效的人胚胎干细胞的培养体系及研究造血细胞的发育分化提供适宜的微环境.

关键词 胎儿肝脏, 基质细胞, 慢病毒, 碱性成纤维细胞生长因子, 转基因, 人胚胎干细胞

学科分类号 Q: 786

人胚胎干细胞系(human embryonic stem cell lines, hESCs)的建立及其向不同类型的组织细胞分化的研究, 越来越激发起人们将其应用于细胞治疗的热情^[1~5]. 然而, ES 细胞培养中的安全性以及培养高成本始终是制约其应用的瓶颈, 是 hES 细胞最终应用于细胞治疗需要解决的关键问题. 为了避免动物源性污染, 提高今后应用的安全性, 目前人们正在尝试利用不同的人源细胞作饲养层来培养 ES 细胞^[6~10]. 人胎儿肝脏基质细胞(fetal liver stromal cell, FLSC)因其来源于胚胎发育期的重要器官, 有望能作为饲养层细胞支持 hES 细胞的体外培养, 而需要降低培养成本主要是要减少外源细胞因子的加入.

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF 或 FGF-2)是成纤维细胞生长因子家族的基本成员, 在多种细胞(成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、神经细胞等)的增殖、迁移、分化和生存中起到重要的支持作用^[11], 尤其在 hES 细胞的体外培养体系中发挥不可忽视的基础性

作用^[12]. 人 bFGF 有 5 个亚型, 分别为 18、22、22.5、24 和 34 ku, 其中 18 ku 为基本亚型, 其通过旁分泌和自分泌途径来促进细胞增殖和迁移^[13].

我们利用慢病毒载体系统建立了稳定表达 bFGF 因子 18 ku 亚型的人 FLSC, 证实其高效产生分泌型的 bFGF 因子, 期望以该转基因基质细胞作饲养层替代动物源性细胞, 减少外源细胞因子的引入, 降低培养成本, 构建新的人 ES 细胞的体外培养体系.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞. 携带加强型绿色荧光蛋

*国家重点基础研究发展规划(973)项目(2005CB522702)、国家高技术“863”计划领域重大专项(2005AA219010)和北京市科委重大项目培育专项(Z0005190043331)项目资助.

** 通讯联系人. Tel: 010-66932240, Fax: 010-68104807

E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2006-07-20, 接受日期: 2006-08-20

白(enhance green fluorescent protein, eGFP) 基因的慢病毒载体为意大利 Luigi Naldini 教授惠赠^[4]; 慢病毒包装质粒 pLP1、pLP2 和包膜质粒 pLP/VSVG 购自 Invitrogen 公司; pGEM-T 载体购自 Promega 公司; 感受态菌购自天为时代公司; 人 ES 细胞 PKU-1 由解放军总医院妇产科提供^[15].

1.1.2 主要试剂. TRIzol 试剂、lipofectamine 2000 和 Opti-MEM® I 培养基购自 Invitrogen 公司; T4DNA 连接酶、dNTP、TaqDNA 聚合酶、AMV 逆转录试剂盒、DNA Marker DL2000 以及限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I、*Sal* I 购自大连宝生物公司; DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; 高糖 DMEM 和 DF-12 培养基购自 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 Biochrom 公司; 小鼠抗人 bFGF 单克隆抗体和重组 bFGF 细胞因子购自 R&D 公司; 小鼠抗人 SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-4)、Oct-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81 单克隆抗体购自 Chemicon 公司; 兔抗人 β -actin 抗体和蛋白质印迹化学发光检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司; FITC (fluorescein isothiocyanate) 标记的小鼠抗人 CD44、CD45、CD71、CD90 和 PE (phycoerythrin) 标记的小鼠抗人 CD29、CD34 单克隆抗体购自 Pharmingen 公司; 封闭用的羊血清, FITC 和 PE 标记的小鼠抗人 IgG 抗体, 罗丹明标记的羊抗小鼠荧光二抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠和羊抗兔 IgG 抗体均购自中杉金桥公司; 血清替代物 (serum replacement)、谷氨酰胺、 β -巯基乙醇购自 Gibco 公司; 非必需氨基酸 (non-essential amino acids, NEAA) 购自 HyClone 公司.

1.2 方法

1.2.1 重组慢病毒载体的构建. 设计 bFGF 基因的 PCR 引物, 正向引物 5' AAC TGC AGA TGG CAG CCG GGA GCA TC 3', 反向引物 5' ACG CGT CGA CTC AGC TCT TAG CAG ACA TTG GAA GAA 3', 在 2 条引物中分别加入 *Pst* I 和 *Sal* I 的限制性酶切位点, 退火温度为 54℃, RT-PCR 方法自胎儿骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 总 RNA 中克隆 bFGF 基因, 所得 PCR 产物片段大小为 486 bp. bFGF 基因连入 T 载体后用 *EcoR* I 酶切鉴定, 酶切产物回收纯化后连入慢病毒载体, 重组慢病毒载体用 *Pst* I 和 *Sal* I 酶切鉴定.

1.2.2 慢病毒包装. 培养 293-FT 包装细胞, 培养基为: 高糖 DMEM 添加 10% FBS、0.1 mmol/L

NEAA、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1%青-链霉素、500 mg/L G418. 准备携带有 bFGF 基因的慢病毒载体和包装质粒 pLP1、pLP2、包膜质粒 pLP/VSVG, 在无血清 Opti-MEM® I 培养基中制备 DNA-lipofectamine 2000 复合物, 胰酶消化收集 293-FT 细胞, 计数约 6×10^6 个细胞重悬到 5 ml 的生长培养基中, 将 293-FT 包装细胞与 DNA-lipofectamine 2000 复合物混匀后加入含有 5 ml 生长培养基的 10 cm 细胞培养皿中, 包装所用培养基中不含抗生素, 次日用含有 1 mmol/L 丙酮酸钠的完全培养基更换含有 DNA-lipofectamine 2000 复合物的培养基, 转染 48~72 h 后, 收集上清于 15 ml 的无菌离心管中, 4℃, 3000 r/min 离心 15 min 去除细胞碎片, 病毒上清冻存于 -70℃ 备用.

1.2.3 FLSC 的分离、培养. 征得流产患者同意取其 14 周胎龄流产胎儿, 在无菌环境下分离肝脏组织, 用生理盐水灌注血管, 将组织中血液充分冲出, 取合适大小的组织块, 去除筋膜等, 用剪刀将肝脏组织剪成 1 mm³ 大小组织块, 将其种于 25 mm² 的培养瓶中, 倒置于 5% 的 CO₂ 孵箱中, 30 min 后将培养瓶翻转, 加入约 3 ml 培养基 (高糖 DMEM 和 DF-12 培养基 1:1 混合后加入 10% FBS), 放入孵箱中继续培养, 大约 2 天后可见有细胞从组织块边缘爬出, 继续培养当细胞铺满培养瓶底 90% 时, 将其用 0.25% 胰酶消化下来, 种入新瓶中, 24 h 后换液去除不贴壁的细胞及残留组织块, 细胞长满以后常规传代培养.

1.2.4 噻唑蓝 (MTT) 比色法绘制 FLSC 的生长曲线. 用 0.25% 胰酶消化第 20 代 FLSC, 以 10^4 个细胞每孔接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200 μ l, 每块板接种 9 孔, 共 6 块板. 将培养板放入细胞培养箱, 待细胞贴壁后取一个培养板, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μ l, 然后继续在孵箱中孵育 4 h, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 150 μ l DMSO, 振荡 10 min, 使甲臜充分溶解, 选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值, 测 3 次, 记录结果, 作为第 0 天数据. 以后每隔 24 h 取出一个孔板, 进行 MTT 比色, 以时间为横轴, 光吸收值为纵轴绘制 FLSC 生长曲线.

1.2.5 FLSC 核型分析. 取培养至第 35 代的 FLSC, 加入 0.04 mg/L 的秋水仙素, 然后置于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中继续培养 5 h, 胰酶消化后离心、洗涤收集细胞. 细胞沉淀中加入预热至 37℃ 的 0.075 mol/L KCl, 室温静置 20 min, 加少许固定液

预固定后离心, 然后加入固定液固定 30 min, 离心, 滴片, 室温干燥后 Giemsa 染色, 双蒸水冲洗后烘干, 显微镜下观察结果.

1.2.6 流式细胞术检测 FLSC 表面标志. 分离的 FLSC 体外培养传至第 18 代时胰酶消化收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 细胞计数后等分成 8 管, 分别标记待测表面抗原抗体及对照抗体, 每管细胞数不少于 5×10^5 , 室温避光标记 30 min 后, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 1% 多聚甲醛固定细胞, 流式细胞术检测细胞表面标志.

1.2.7 细胞转染和转染后 FLSC 流式细胞术分选. 第 6 代 FLSC, 长至 80% 汇合时取 3 ml 毒液加入含有 3 ml 细胞培养基的细胞培养瓶中, 加入 6 mg/L 的 Polybrene 促进病毒的转染效率, 转染 6 h 后换液, 加入新鲜培养基以促进细胞生长. 转染后的 FLSC 荧光显微镜下观察转染效率, 对转染后细胞进行流式分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS), 将转染后 FLSC 根据 eGFP 表达的强度分为弱荧光和强荧光表达 2 组.

1.2.8 RT-PCR 方法检测转染细胞的 bFGF 表达. 分别取 1×10^6 个转染空载体的 FLSC 和分选后的弱荧光和强荧光表达的 FLSC, 提取细胞总 RNA 后, 用 RT-PCR 方法检测 bFGF 基因在 mRNA 水平的表达, 用 β -actin 基因作为内参, 其正向引物 5' GAT CCA CAT CTG CTG GAA GG 3'; 反向引物 5' AAG TGT GAC GTT GAC ATC CG 3', 退火温度为 54°C, 片段大小 222 bp. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Alpha Imager3300 软件对结果进行分析.

1.2.9 蛋白质印迹方法检测转染细胞的 bFGF 表达. 分别取 1×10^6 个转染空载体的 FLSC 和分选后的弱荧光和强荧光表达的 FLSC, 用放射性免疫沉淀裂解缓冲液 (RIPA) 裂解细胞, 进行不连续 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 用半干式电转的方法将蛋白质转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 经与相应的一抗和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗孵育后, 化学发光试剂于暗室自显影. 同样用 β -actin 蛋白作为内参, 用 Alpha Imager3300 软件对结果进行分析.

1.2.10 bFGF/FLSC 作饲养层培养人 ES 细胞 PKU-1. PKU-1 细胞的常规传代培养参照文献[15]. 培养中的 bFGF/FLSC 细胞长至 90% 汇合时, 用 6 mg/L 丝裂霉素 -C 作用 2 h 后, 0.25% 胰酶消化, 按 1.5×10^5 个细胞接种至 24 孔板中作饲养层. 传至

102 代的 PKU-1 细胞胶原酶常规消化后转至 bFGF/FLSC 上培养, 其中弱荧光表达的 FLSC 作饲养层加入 2 μ g/L 的重组 bFGF, 而强荧光表达的则不加入外源的 bFGF, 5~7 天后细胞长满时常规传代.

1.2.11 免疫荧光检测人 ES 细胞的特异性抗原的表达. 以 bFGF/FLSC 作饲养层传至 115 代的 PKU-1 细胞, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 羊血清室温封闭抗原 30 min (对于检测 Oct-4 的细胞在封闭前用 0.1% 的 Triton X-100 破膜 15 min), 分别加入小鼠抗人 SSEA-4、Oct-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81 单克隆抗体 37°C 孵育 1 h 后, 加入荧光标记的羊抗小鼠二抗, 37°C 孵育 30 min, PBS 冲洗后, 荧光显微镜下观察荧光表达情况.

2 结 果

2.1 重组 T 载体和慢病毒载体酶切鉴定及测序

重组 T 载体用 *EcoR* I 单酶切, 重组慢病毒载体用 *Pst* I 和 *Sal* I 双酶切, 均得到目的片段 bFGF (图 1), 经基因测序证明与 GenBank 报道的序列完全一致.

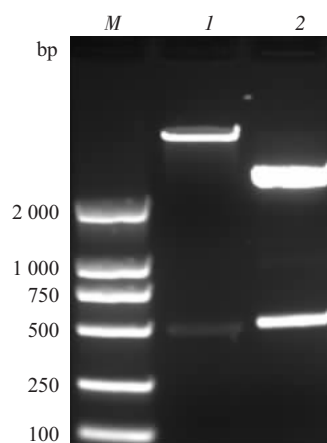


Fig. 1 Identification of recombinant plasmid by restrict endonuclease digestion

M: DL2000 marker; 1: Recombinant lentiviral plasmid cut with *Pst* I / *Sal* I; 2: Recombinant T vector cut with *EcoR* I.

2.2 慢病毒包装

包装 24 h 后即可见到 293-FT 细胞内有 eGFP 表达, 表达绿 eGFP 的细胞超过 95% (图 2a), 包装效率很高, 伴随着包膜质粒 VSVG 的表达, 逐渐出现 293-FT 细胞的多细胞合胞体 (图 2b), 包装 72 h 后培养上清为淡黄色, 收集毒液备用.

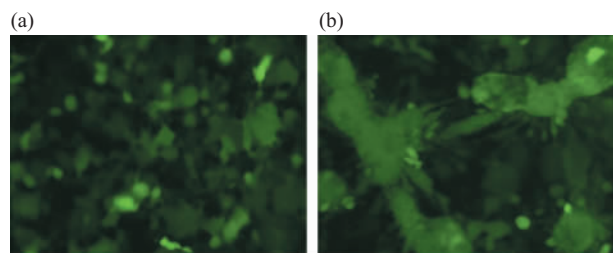


Fig. 2 Producing lentivirus in 293FT Cells

(a) The eGFP expression of 293FT cells that producing lentivirus by fluorescence microscope. (b) The appearance of multinucleated syncytia of 293FT cells by the expression of the VSVG glycoprotein. 100 $\times$.

2.3 FLSC 的鉴定

14 周胎龄的 FLSC 在体外能传代 35 代, 细胞体积较大, 呈长梭状生长(图 3), 与 MSC 相似, 传至 20 代的细胞用 MTT 比色法测定其生长曲线(图 4), 细胞增殖旺盛, 在选择的时间段内未出现明显的增殖平台期, 传至第 35 代时进行了核型分析, 细胞仍保持正常核型(图 5), 所分离的细胞在体外长期传代时能保持其遗传稳定性.

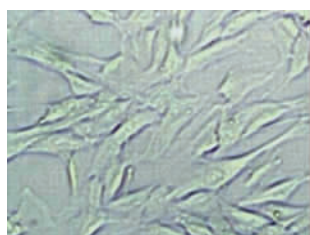


Fig. 3 Morphology of the FLSCs (100 $\times$)

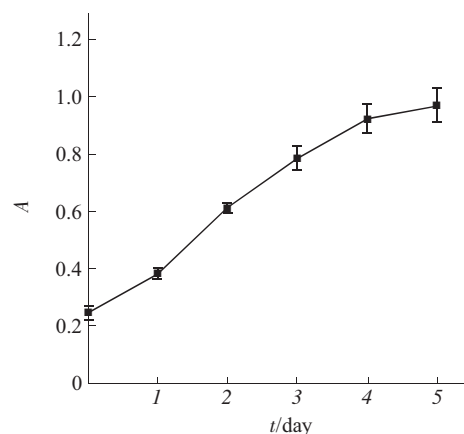


Fig. 4 Growth curve of FLSCs for 20 passages

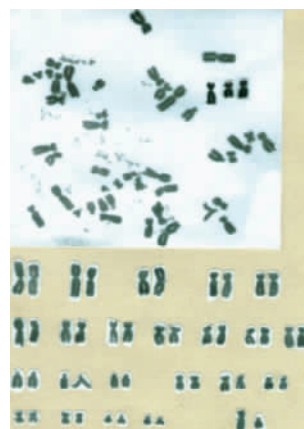


Fig. 5 Normal 46,XY karyotype of FLSCs for 35 passages

流式细胞术检测 FLSC 的表面标志表达情况的结果显示(图 6), 造血细胞表面分子 CD34 和 CD45 阳性率分别为 0.59%和 1.94%, 为阴性表达, 而基质细胞的常见表面分子 CD29、CD44 和 CD90 阳

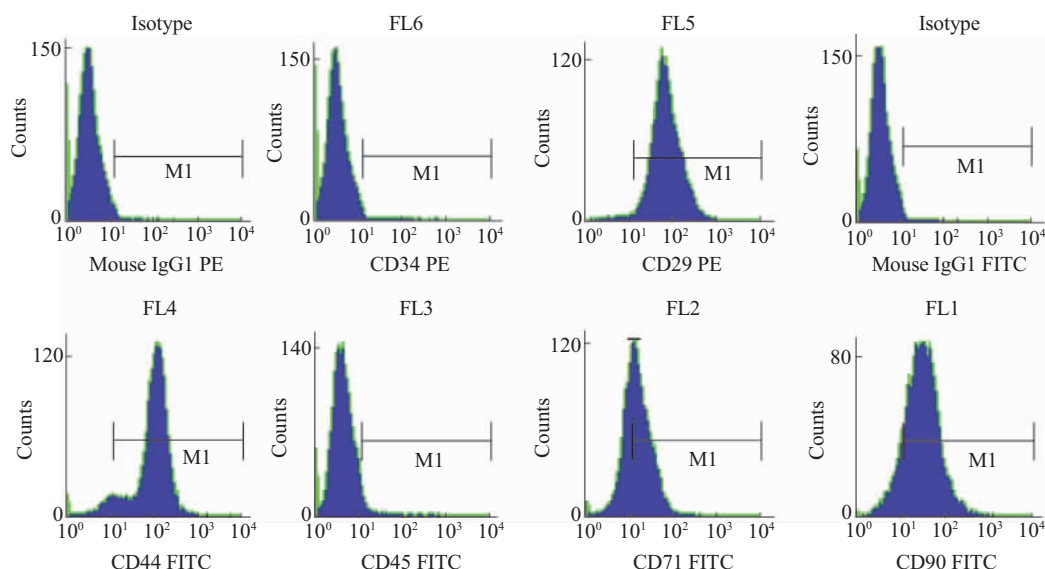


Fig. 6 Surface marker of FLSCs analyzed by flow cytometry

性率分别为 98.79%、93.88%和 84.20%，为高阳性表达，CD71 的阳性表达率为 54.28 %.

2.4 转染 FLSC 及流式细胞术分选转染后 FLSC

携带 bFGF 的慢病毒高效率的转染 FLSC，转染后的细胞通过流式分选将细胞分为弱荧光表达和

强荧光表达的 2 组(图 7)，分别选择 P3 和 P4 2 组作为弱荧光表达和强荧光表达. 分选前后的细胞荧光显微镜下观察荧光表达情况，弱荧光表达细胞和强荧光表达细胞荧光强弱对比明显，细胞大小亦有差别(图 8).

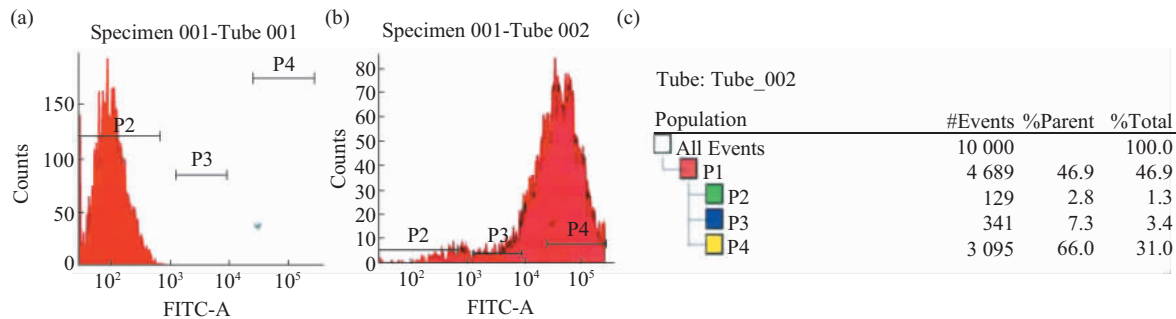


Fig. 7 Weak and strong eGFP expression FLSCs sorted by FACS

(a) The FLSCs that don't express eGFP. (b) The zonation of the selected FLSCs, P3 represent the weak eGFP expression, P4 represent the strong eGFP expression. (c) The exact number that show the sorting process.

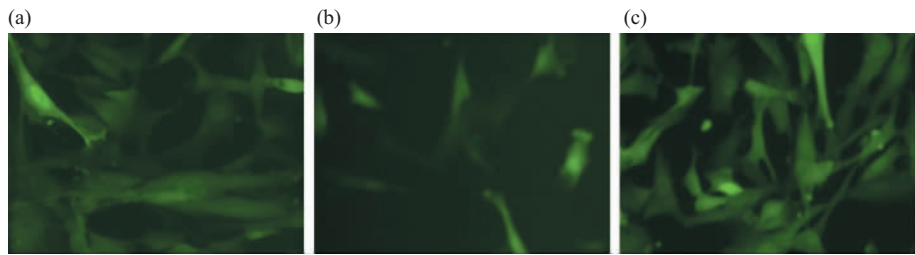


Fig. 8 eGFP expression of non-sorted and sorted transfected-FLSCs imaged by fluorescence microscope

(a) Non-sorted FLSCs. (b) Weak eGFP expression FLSCs. (c) Strong eGFP expression FLSCs. 100×.

2.5 bFGF 基因在 FLSC 中表达鉴定

RT-PCR 检测转染空载体、弱荧光表达和强荧光表达 FLSC 的 bFGF 基因在 mRNA 水平的表达. 在转染空载体的细胞中 bFGF 有微量的表达，强荧光表达的细胞 bFGF 基因的表达明显高于弱荧光表达细胞(图 9). 结果用 Alpha Imager3300 分析软件

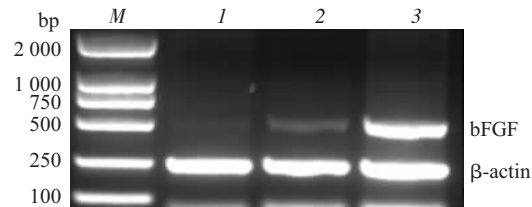


Fig. 9 Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of bFGF gene expression of FLSCs

M: DL2000 marker; 1: The FLSCs that transfected by the control lentivirus; 2: Weak eGFP expression FLSCs; 3: Strong eGFP expression FLSCs.

进行半定量分析，弱荧光和强荧光表达细胞的 bFGF 在 mRNA 水平表达分别是转染空载体细胞的 2.33 倍和 6.19 倍.

图 10 是蛋白质印迹检测转染空载体、弱荧光表达和强荧光表达 FLSC 的 bFGF 基因在蛋白质水

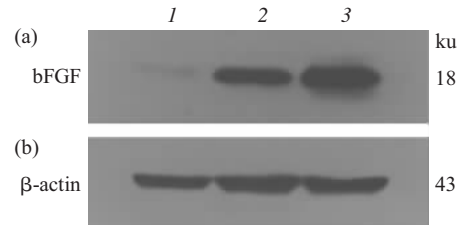


Fig. 10 Analysis of bFGF expression of FLSCs by Western-blot

(a) The expression of bFGF analysed by Western-blot. (b) The expression of β -actin analysed by Western-blot. 1: The FLSCs that transfected by the control lentivirus; 2: Weak eGFP expression FLSCs; 3: Strong eGFP expression FLSCs.

平的表达. 在转染空载体的细胞中 bFGF 有微量的表达, 强荧光表达的细胞 bFGF 基因的表达明显高于弱荧光表达细胞. 结果同样用 Alpha Imager3300 分析软件进行半定量分析, 弱荧光和强荧光表达细胞的 bFGF, 在蛋白质水平表达分别是转染空载体细胞的 1.76 倍和 5.05 倍.

2.6 bFGF/FLSC 作饲养层细胞培养人胚胎干细胞

bFGF/FLSC 作为饲养层细胞能在维持人 ES 细

胞达 20 代, 细胞克隆及增殖能力与小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)相比无明显差异. 免疫荧光检测在 bFGF/FLSC 上培养传至 15 代的 PKU-1 细胞的特异性抗原 SSEA-4、Oct-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81 的表达, 结果表明, 4 种证明人 ES 细胞干性的特异性抗原均高效地表达(图 11).

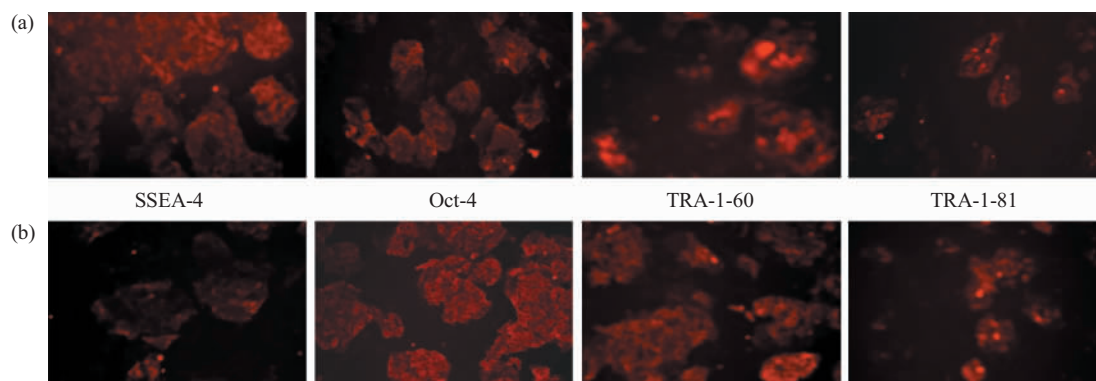


Fig. 11 Fluorescent immunocytochemistry of PKU-1 cells on bFGF/FLSCs for 15 passages

(a) PKU-1 cells cultured on weak eGFP expression FLSCs. (b) PKU-1 cells cultured on strong eGFP expression FLSCs.(100×)

3 讨 论

hES细胞由于其无限的增殖能力和分化上的全能性, 是细胞治疗的理想种子细胞, 成为目前研究的热点, 在治疗神经系统疾病^[16]、心脏疾病^[17]和造血系统疾病^[18]等疾病中都具有极大的应用前景. 但目前的 hES 细胞建系及培养时多采用动物源性饲养层. 有研究证实利用动物源性细胞作饲养层培养的 ES 细胞表达非人源的唾液酸 Neu5Gc, 这种 hES 细胞来源的分化细胞用于细胞治疗时可能引起人体针对非人抗原的免疫反应, 影响移植细胞的功能发挥^[19], 为今后的临床应用增加了极大的危险性. 开发人源的饲养层细胞可能是解决安全问题的一个有效途径.

事实上, 目前常规用小鼠 MEF 作为饲养层细胞来体外培养 hES 细胞是一个偶然的巧合^[20], 我们有理由相信人源饲养层也能发挥理想的 hES 细胞干性维持的作用, 而 FLSC 就是一个可能的选择. 我们分离的 14 周胎龄的 FLSC 能够在体外维持传代达 35 代, 在体外长期传代时生长特性和遗传性状保持稳定, 细胞表面标志与 BMSCs 基本一致.

慢病毒载体系统具有如下特点: 病毒不具备自

身复制能力, 具有自身灭活作用; 宿主范围广, 人、鼠等多种属多类型细胞都能高效感染; 在稳定整合宿主基因组的基础上增加了高效感染静止期细胞以及高表达外源蛋白并且能逃避甲基化抑制的特点. 慢病毒载体系统的这些特点使其在分子生物学、细胞生物学等多种学科多个领域得到广泛应用.

与小鼠 ES 细胞培养中白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)一样, hES 细胞的培养体系中都需常规添加 bFGF 以维持其不分化特性. 有研究证实, hES 细胞在无饲养细胞的支持时, 应用 bFGF 或与其他细胞因子共同应用也可在体外维持一定时间^[21,22]. 但商品化的细胞因子价格昂贵, 限制了其大规模应用. 而利用慢病毒系统在 hES 细胞的饲养层中转染 bFGF 基因, 使其饲养细胞自身持续分泌一定量的、有生物学活性的 bFGF, 从而避免添加外源细胞因子, 极大降低大规模培养 hES 细胞的成本.

应用慢病毒系统建立的低表达和高表达 bFGF 的 FLSC, 目前在体外已稳定传代达 15 代, 其绿色荧光表达和 bFGF 基因的表达仍保持稳定, 我们的实验亦证实, 人 ES 细胞 PKU-1 可以在丝裂霉素-C 抑制生长的 bFGF/FLSC 上稳定传代, 并能维持

其干性, 因此, 可以用表达 bFGF 的 FLSC 作饲养层构建新的 hES 细胞的培养体系, 其不引入动物源性细胞, 而且不需要添加任何外源的细胞因子, 实现真正的安全、高效、低成本的 hES 细胞的培养方法, 以此建立新的人 ES 细胞系并在体外大规模培养人 ES 细胞, 有望为细胞治疗提供安全、充足的种子细胞。

参 考 文 献

- Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282** (5391): 1145~1147
- Reubinoff B E, Pera M F, Fong C Y, *et al.* Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol*, 2000, **18** (4): 399~404
- Xu C, Police S, Rao N, *et al.* Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res*, 2002, **91** (6): 501~508
- Chadwick K, Wang L, Li L, *et al.* Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*, 2003, **102** (3): 906~915
- Zhang S C, Wernig M, Duncan I D, *et al.* *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** (12): 1129~1133
- Richards M, Fong C Y, Chan W K, *et al.* Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (9): 933~936
- Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, *et al.* A culture system using foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod*, 2003, **18** (7): 1404~1409
- Richards M, Tan S, Fong C-Y, *et al.* Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2003, **21** (5): 546~556
- Amit M, Margulets V, Segev H, *et al.* Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 2003, **68** (6): 2150~2156
- Cheng L, Hammond H, Zhaohui Y, *et al.* Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells*, 2003, **21** (2): 131~142
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, *et al.* Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*, 1997, **18** (1): 26~45
- Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S, *et al.* Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, **23** (8): 1200~1211
- Delrieu I. The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett*, 2000, **468** (1): 6~10
- Amendola M, Venneri M A, Biffi A, *et al.* Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (1): 108~116
- Peng H M, Chen G A. Neural precursors derived from human embryonic stem cells. *Sci Chin Ser C*, 2005, **48** (3): 295~299
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*, 2006, **441** (7097): 1094~1096
- Srivastava D, Ivey K N. Potential of stem-cell-based therapies for heart disease. *Nature*, 2006, **441** (7097): 1097~1099
- Bordignon C. Stem-cell therapies for blood diseases. *Nature*, 2006, **441** (7097): 1100~1102
- Martin M J, Muotri A, Gage F, *et al.* Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Medicine*, 2005, **11** (2): 228~232
- Ludwig T E, Levenstein M E, Jones J M, *et al.* Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*, 2006, **24** (2): 185~187
- Xu C H, Rosler e, Jiang J J, *et al.* Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells*, 2005, **23** (3): 315~323
- Levenstein M E, Ludwig T E, Xu R H, *et al.* Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 2006, **24** (3): 568~574

Establishment of Fetal Liver Stroma Cell Lines Which Stably Express Basic Fibroblast Growth Factor by Lentiviral System*

XI Jia-Fei, WANG Yun-Fang, ZHANG Peng, YUAN Hong-Feng, SHI Shuang-Shuang,

YAN Fang, CHEN Lin, BAI Ci-Xian, NAN Xue, PEI Xue-Tao**

(Research Center of Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Basic fibroblast growth factor (bFGF or FGF-2) plays an important role in modulating proliferation, migration, differentiation and survival of various cells, such as fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells and neural cells. The fetal liver stromal cell lines (FLSCs) expressing bFGF stably has been established by lentiviral system. The FLSCs were isolated from aborted fetus with informed consent, the growth character was identified by MTT method and the surface marker analyzed by flow cytometry. The cells could maintain normal

karyotype after passaged for 35 generations. The coding region of 18 ku bFGF was cloned from fetal bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) by RT-PCR. The bFGF recombinant lentiviral plasmid was steadily transfected into FLSCs. The low and high bFGF-expression FLSCs that transfected by the recombinant lentivirus were sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) according to weak and strong eGFP expression. Analysis of weak and strong eGFP expression transfected FLSCs by RT-PCR and Western-blot demonstrated the stable expression of bFGF after 15 passages. The bFGF expression at mRNA level of weak and strong eGFP expression FLSCs are 2.33 and 6.19-fold for the FLSCs transfected by the control lentivirus, and then at the protein level are 1.76 and 5.05-fold. hES cells can be maintained for 20 passages using the bFGF/FLSCs as feeder layers supplemented with a little or no additional recombinant bFGF. The establishment of bFGF/FLSCs could be acted as feeder cells for sustainment of human embryonic stem cell *in vitro* by supplying an eligible microenvironment free of animal feeder layers.

Key words fetal liver, stromal cells, lentivirus, basic fibroblast growth factor (bFGF), transgene, human embryonic stem cells

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2005CB522702), State 863 High Technology R&D Project of China (2005AA219010) and The Special Incubating funds of Beijing Municipal Science and Technology Commission (Z0005190043331).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66932240, Fax: 86-10-68104807, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: July 20, 2006 Accepted: August 20, 2006