

# 丝裂霉素 C 处理后鼠胚成纤维细胞活力分析\*

余树民<sup>1,2</sup>, 王 晗<sup>1</sup>, 窦忠英<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 陕西 杨凌 712100; 2 四川农业大学 动物科技学院, 四川 雅安 625000)

**[摘 要]** 为了探讨丝裂霉素 C 处理后鼠胚成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast, MEF)活力的变化规律, 试验用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  丝裂霉素 C 处理 MEF, 研究丝裂霉素 C 处理时间及其处理后细胞接种量、血清浓度和细胞代次对 MEF 活力的影响。结果表明, 用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  丝裂霉素 C 处理 2 和 3 h, MEF 活力比处理 4 h 的稳定, 处理 2 h 的 MEF 活力与处理 3 h 的没有显著差异; 用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  丝裂霉素 C 处理 3 h 后, MEF 以  $(0.8 \sim 1.6) \times 10^4/\text{孔}$  接种 96 孔板, 其活力比  $2.0 \times 10^4/\text{孔}$  和  $4.0 \times 10^4/\text{孔}$  接种的稳定; 用含体积分数 10% 犊牛血清培养液培养的 MEF 活力, 比用含体积分数 2%, 5%, 15% 和 20% 犊牛血清培养液培养的稳定; 第 1, 3 代 MEF 活力比第 5, 7 代的稳定。表明, 用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  丝裂霉素 C 处理 2~3 h, 第 1, 3 代 MEF 以  $(0.8 \sim 1.6) \times 10^4/\text{孔}$  接种 96 孔板, 用含体积分数 10% 犊牛血清培养液培养, 是利用丝裂霉素 C 制备 MEF 饲养层的适宜条件。

**[关键词]** 胎鼠成纤维细胞; MTT; 丝裂霉素 C; 细胞活力

**[中图分类号]** Q813.1<sup>+</sup>1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)05-0001-05

## Analysis of vital maintenance of mouse embryonic fibroblasts after treatment of mitomycin

YU Shu-min<sup>1,2</sup>, WANG Han<sup>1</sup>, DOU Zhong-ying<sup>1</sup>

(1 Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Animal Sci-Tech College, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625000, China)

**Abstract:** This paper analyzed cell vitality and maintenance time of MEF after treatment of mitomycin C by means of MTT method, thereby compared effects of treating time of mitomycin C, cell plating densities, serum concentration, and cell passages on MEF vitalities after mitomycin C treatment. The results suggested that cell vitality sustained more stably after 2 hours and 3 hours than 4 hours of mitomycin treatment at the concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . After inactivation with mitomycin C at the concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , cell vitality sustained more stably at the plating densities of  $(0.8 - 1.6) \times 10^4/\text{well}$  into the 96-well plate than that at  $2.0 \times 10^4/\text{well}$  and  $4.0 \times 10^4/\text{well}$  respectively. Meanwhile, MEF vitality maintained longer cultured in the medium supplemented with 10% (V/V) of newborn cattle serum than 2%, 5%, 15%, 20% (V/V) of newborn cattle serum respectively. Furthermore, MEF vitalities at the first passage and the third passage sustained more stably than its vitalities at the fifth passage and the seventh passage. At last, with 2 - 3 hours of mitomycin C at the concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MEF at the first passage and the third passage, plated at the plating densities of  $(0.8 - 1.6) \times 10^4/\text{well}$  into the 96-well plate in the medium supplemented with 10% newborn cattle serum was proved to be the fit condition in preparation for MEF feeder layers.

\* [收稿日期] 2006-11-08

[基金项目] 国家“863”计划项目(2005AA21905); 教育部重大项目(03160); 陕西省重大科技专项(2006KZ05-G1)。

[作者简介] 余树民(1968-), 男, 四川汉源人, 在读博士, 主要从事小鼠胚胎干细胞研究。E-mail: yayushumin@163.com

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

**Key words:** mouse embryonic fibroblast; MTT; mitomycin C; cell vitality.

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs)是当今生命科学研究的热点之一。目前,虽然已经建立了小鼠和人的 ESCs 无饲养层培养体系<sup>[1-2]</sup>,但饲养层细胞仍常用于 ESCs 和胚胎生殖细胞(Embryonic germ cells, EGCs)的分离和培养,而且绝大多数小鼠和人的 ESCs 系仍用饲养层体系来维持培养。自 1981 年成功建立小鼠 ESCs 系以来<sup>[3-4]</sup>,鼠胚成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast, MEF)是使用最多的饲养层细胞之一。因此,优化 MEF 饲养层制备条件,是分离培养 ESCs 的关键环节。目前有关 MEF 作为饲养层的研究报道,主要集中在 MEF 分离的适宜材料(如胎鼠日龄)、培养条件、细胞代次以及丝裂霉素 C 处理的时间和浓度等方面<sup>[5-10]</sup>,而对丝裂霉素 C 处理后,不同条件下 MEF 活力维持的研究报道却很少。为此,本试验研究了丝裂霉素 C 处理时间及其处理后细胞接种量、血清浓度和细胞代次对 MEF 活力的影响,以为优化 MEF 饲养层的制备条件提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 8 周龄以上昆明系小鼠,体重 22~30 g,购自第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 高糖 DMEM、L-谷氨酰胺购自 Gibco 公司,β-巯基乙醇购自 Merck 公司,胰蛋白酶购自华美公司,丝裂霉素 C 购自浙江海正药业有限公司,犊牛血清购自浙江四季青公司,其他试剂如无标注均购自 Sigma 公司。Elx800UV 酶标仪购自 Bio-tek 仪器公司。细胞培养液:在高糖 DMEM 溶液中添加体积分数 10% 犊牛血清、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、2 mmol/L L-谷氨酰胺和 100 U/mL 青链霉素,0.22 μm 滤膜过滤除菌,4℃ 保存。细胞消化液:在 PBS 中添加质量浓度为 0.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L EDTA 配制而成,0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装后 -20℃ 冻存。细胞冻存液:在高糖 DMEM 溶液中,添加体积分数为 20% 犊牛血清和 10% 二甲基亚砜,0.22 μm 滤膜过滤除菌。丝裂霉素 C 溶液:用 PBS 或高糖 DMEM 溶液溶解,配成 500 μg/mL 的储备液,分装后 -20℃ 冻存。噻唑兰(MTT)溶液:用 PBS 溶解 MTT,配成 5 mg/mL 的溶液,分装后避光保存。十二烷基磺酸钠(SDS)溶液:用 PBS 溶解 SDS,配成 100 g/L 的溶

液,分装后 4℃ 避光保存。

### 1.2 MEF 的分离培养

取胎龄为 12.5~14 d(见阴道栓起计 0.5 d)的妊娠小鼠,按文献[11]的方法分离 MEF。细胞在 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养。当细胞增殖达到 80%~90% 融合时,进行传代或冻存。

### 1.3 丝裂霉素 C 处理后不同条件下 MEF 活力分析

选择对数生长期的 MEF,用 10 μg/mL 丝裂霉素 C 处理,处理时间根据试验设计而定。处理结束后,用 PBS 洗 3~5 次,细胞消化液作用 3~5 min,用细胞培养液中和,1000 r/min 离心 3~5 min,制成 2 × 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup> 的细胞悬液,接种 96 孔板,在 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 和饱和湿度的条件下培养。96 孔板中每孔添加 0.1 mL 培养液。

#### 1.3.1 丝裂霉素 C 处理时间对 MEF 活力的影响

以第 3 代 MEF 为供试细胞,用丝裂霉素 C 分别处理 2, 3 和 4 h,以 1.6 × 10<sup>4</sup>/孔的细胞量接种 96 孔板,用含体积分数 10% 犊牛血清的培养液培养,分别在第 1, 3, 5, 7, 9 和 11 天利用 MTT 法测定 MEF 活力。

1.3.2 MEF 接种量对其活力的影响 以第 3 代 MEF 为供试细胞,用丝裂霉素 C 处理 3 h,分别以 0.8 × 10<sup>4</sup>, 1.2 × 10<sup>4</sup>, 1.6 × 10<sup>4</sup>, 2 × 10<sup>4</sup> 和 4 × 10<sup>4</sup>/孔的细胞量接种 96 孔板,用含体积分数 10% 犊牛血清的培养液培养,在第 2, 4, 6, 8, 10, 12 和 14 天利用 MTT 法测定 MEF 活力。

1.3.3 血清浓度对 MEF 活力的影响 以第 3 代 MEF 为供试细胞,用丝裂霉素 C 处理 3 h,以 1.2 × 10<sup>4</sup>/孔的细胞量接种 96 孔板,分别用含体积分数为 2%, 5%, 10%, 15% 和 20% 犊牛血清的培养液培养,在第 2, 4, 6, 8, 10, 12 和 14 天利用 MTT 法测定 MEF 活力。

1.3.4 MEF 传代次数对其活力的影响 以第 1, 3, 5 和 7 代 MEF 为供试细胞,用丝裂霉素 C 处理 3 h,以 1.2 × 10<sup>4</sup>/孔的细胞量接种 96 孔板,用含体积分数 10% 犊牛血清的培养液培养,在第 2, 4, 6, 8, 10, 12 和 14 天利用 MTT 法测定 MEF 活力。

### 1.4 MEF 活力的测定

(1) 细胞计数法。丝裂霉素 C 处理后的 MEF 在接种到 96 孔板之前,用血球计数板计数,计算细胞悬液的浓度。(2) MTT 法。按上述试验设计,在一定时间点吸出培养液,然后加入 5 mg/mL MTT 溶液 50 μL/孔,作用 3~4 h,再加入 100 g/L SDS

溶液 50 μL/孔,混匀,培养过夜,在酶标仪上测定 OD 值(双波:490,630 nm)。每一样品设置 3 个重复。

1.5 结果统计分析

采用 SPSS10.0 软件,对结果进行组内卡方检验。

2 结果与分析

2.1 丝裂霉素 C 处理时间对 MEF 活力的影响

由表 1 可知,丝裂霉素 C 处理 2 和 3 h,MEF 在

第 1~9 天活力均没有显著变化 ( $P > 0.05$ ),第 11 天 MEF 活力与第 9 天相比没有显著差异,但显著低于第 7 天 ( $P < 0.05$ );丝裂霉素 C 处理 4 h,MEF 在第 1~3 天活力没有显著变化 ( $P > 0.05$ )。表明,丝裂霉素 C 处理 2 和 3 h,MEF 活力较处理 4 h 的稳定,处理 2 h 的 MEF 活力与处理 3 h 的没有显著差异。

表 1 丝裂霉素 C 处理时间对 MEF 活力的影响

Table 1 Affects of treating time of mitomycin C on MEF vitalities

处理时间/h Treating time	培养时间/d Culture time					
	1	3	5	7	9	11
2	1.386 ± 0.092 a	1.447 ± 0.034 a	1.452 ± 0.022 a	1.407 ± 0.079 a	1.349 ± 0.087 ab	1.211 ± 0.132 b
	1.532 ± 0.031 a	1.545 ± 0.022 a	1.499 ± 0.015 a	1.510 ± 0.104 a	1.370 ± 0.096 ab	1.365 ± 0.041 b
3	1.529 ± 0.053 a	1.538 ± 0.031 a	1.453 ± 0.001 a	1.420 ± 0.065 b	1.283 ± 0.026 c	1.190 ± 0.033 d
4						

注:数据为 OD 值的平均值和标准差;相同小写字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ),不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Note: The numbers refer to averages and derivation of OD data;the numbers marked by the same small letters represent no significant difference between them ( $P > 0.05$ ), and the numbers marked by the different small letters represent the significant difference between them ( $P < 0.05$ ). The same for following remarks.

2.2 MEF 接种量对其活力的影响

由表 2 可知,以  $0.8 \times 10^4$  和  $1.2 \times 10^4$ /孔的细胞量接种 96 孔板,MEF 活力在第 2~12 天均没有显著变化 ( $P > 0.05$ );以  $1.6 \times 10^4$ /孔细胞量接种 96 孔板,MEF 活力在第 2~10 天没有显著变化 ( $P > 0.05$ );以  $2 \times 10^4$ /孔的细胞量接种 96 孔板,MEF 活

力在第 2~8 天没有显著变化 ( $P > 0.05$ );以  $4 \times 10^4$ /孔的细胞量接种 96 孔板,MEF 活力在第 2~6 天没有显著变化 ( $P > 0.05$ )。表明,以  $(0.8 \sim 1.6) \times 10^4$ /孔的细胞量接种 96 孔板,MEF 活力比  $2.0 \times 10^4$  和  $4.0 \times 10^4$ /孔接种的稳定。

表 2 MEF 接种量对其活力的影响

Table 2 Affects of plating densities on MEF vitalities

接种密度/ $\times 10^4$ 孔 Plating densities	培养时间/d Culture time						
	2	4	6	8	10	12	14
0.8	1.468 ± 0.063 a	1.443 ± 0.028 a	1.447 ± 0.031 a	1.436 ± 0.051 a	1.430 ± 0.082 a	1.439 ± 0.045 a	1.066 ± 0.037 b
	1.504 ± 0.063 a	1.483 ± 0.028 a	1.501 ± 0.056 a	1.498 ± 0.056 a	1.442 ± 0.102 a	1.425 ± 0.085 a	1.152 ± 0.011 b
1.2	1.546 ± 0.019 a	1.533 ± 0.012 a	1.531 ± 0.026 a	1.523 ± 0.024 a	1.515 ± 0.007 a	1.441 ± 0.016 b	1.128 ± 0.051 c
	1.547 ± 0.081 a	1.512 ± 0.110 a	1.478 ± 0.020 a	1.454 ± 0.025 a	1.128 ± 0.014 b	1.053 ± 0.041 bc	0.963 ± 0.082 c
2.0	1.525 ± 0.046 a	1.494 ± 0.009 a	1.485 ± 0.029 a	1.258 ± 0.154 b	1.147 ± 0.069 b	0.957 ± 0.102 c	0.760 ± 0.033 d
4.0							

2.3 血清浓度对 MEF 活力的影响

由表 3 可知,用含体积分数 2% 犊牛血清培养,MEF 活力在第 2~10 天没有显著变化 ( $P > 0.05$ ),但一直呈下降趋势;用含体积分数 5% 犊牛血清培养,MEF 活力在第 2~8 天没有显著变化 ( $P > 0.05$ );用含体积分数 10% 犊牛血清培养,MEF 活力在第 2~12 天没有显著变化 ( $P > 0.05$ );用含体积分数 15% 犊牛血清培养,MEF 活力在第 4 天显

著低于第 2 天 ( $P < 0.05$ ),第 4~8 天活力没有显著变化 ( $P > 0.05$ ),第 10 天活力显著低于第 8 天 ( $P < 0.05$ );用含体积分数 20% 犊牛血清培养,MEF 活力在第 2~6 天没有显著变化 ( $P > 0.05$ )。表明,用含体积分数 10% 犊牛血清培养,MEF 活力比分别用含体积分数为 2%、5%、15% 和 20% 犊牛血清培养的稳定。

表 3 血清浓度对 MEF 活力的影响

Table 2 Affects of serum concentration on MEF vitalities

血清体积分数/ % Serum concentration	培养时间/ d Culture time						
	2	4	6	8	10	12	14
2	1.383 ± 0.029 a	1.361 ± 0.052 ab	1.342 ± 0.024 ab	1.340 ± 0.091 ab	1.296 ± 0.014 ab	1.198 ± 0.019 b	1.197 ± 0.014 c
5	1.499 ± 0.050 a	1.516 ± 0.019 a	1.497 ± 0.029 a	1.489 ± 0.025 a	1.478 ± 0.030 b	1.376 ± 0.123 b	1.152 ± 0.089 c
10	1.504 ± 0.025 a	1.485 ± 0.021 a	1.483 ± 0.051 a	1.501 ± 0.056 a	1.498 ± 0.056 a	1.442 ± 0.102 a	1.425 ± 0.085 b
15	1.651 ± 0.040 a	1.396 ± 0.008 b	1.388 ± 0.055 b	1.381 ± 0.002 b	1.346 ± 0.037 c	0.896 ± 0.197 c	0.885 ± 0.211 d
20	1.640 ± 0.149 a	1.395 ± 0.006 a	1.464 ± 0.013 a	1.449 ± 0.024 b	1.199 ± 0.003 bc	1.118 ± 0.007 c	1.065 ± 0.075 d

## 2.4 MEF 传代次数对其活力的影响

由表 4 可知,第 1 和 3 代 MEF 活力在第 2~12 天没有显著变化 ( $P>0.05$ );第 5 代 MEF 活力在第 2~10 天没有显著变化 ( $P>0.05$ );第 7 代 MEF 在

第 2~6 天活力没有显著变化 ( $P>0.05$ )。表明,丝裂霉素 C 处理后第 1 和 3 代 MEF 活力比第 5 和 7 代稳定。

表 4 MEF 传代次数对其活力的影响

Table 4 Affects of MEF passages on its vitalities

MEF 代数 MEF passages	培养时间/ d Culture time						
	2	4	6	8	10	12	14
1	1.557 ± 0.014 a	1.547 ± 0.008 a	1.544 ± 0.012 a	1.547 ± 0.025 a	1.542 ± 0.015 a	1.536 ± 0.016 a	1.312 ± 0.021 b
3	1.563 ± 0.020 a	1.549 ± 0.018 a	1.544 ± 0.006 a	1.542 ± 0.015 a	1.530 ± 0.020 a	1.520 ± 0.032 a	1.387 ± 0.020 b
5	1.546 ± 0.007 a	1.544 ± 0.008 a	1.540 ± 0.013 a	1.534 ± 0.011 a	1.495 ± 0.010 a	1.288 ± 0.107 b	1.008 ± 0.115 c
7	1.546 ± 0.014 a	1.540 ± 0.017 a	1.514 ± 0.017 a	1.217 ± 0.031 b	1.124 ± 0.012 bc	0.993 ± 0.133 c	0.755 ± 0.081 d

## 3 讨论

在 ESCs 分离和培养过程中,饲养层细胞可为 ESCs 生长和维持未分化状态提供适宜微环境<sup>[12-13]</sup>,MEF 是使用非常广泛的饲养层细胞之一。目前,MEF 饲养层细胞的制备方法,在不同实验室甚至同一实验室不同人员之间有很大差异,试验人员均根据自己的经验进行操作,所以影响了 ESCs 和 EGCs 分离建系效率的提高。

## 3.1 丝裂霉素 C 处理时间对 MEF 活力的影响

丝裂霉素可与细胞 DNA 交联,解聚 DNA 双链,抑制 DNA 分子复制<sup>[14]</sup>,使细胞失去增殖能力,而细胞代谢和合成细胞因子的能力不变,常被许多实验室用于制备饲养层细胞。关于丝裂霉素 C 处理的适宜浓度和时间,目前报道不统一。刘民等<sup>[7]</sup>、王国云等<sup>[8]</sup>和招霞等<sup>[9]</sup>报道,用 20 μg/mL 丝裂霉素 C 处理 MEF 2~4 h,细胞活力可维持 9~10 d;杨奇等<sup>[10]</sup>报道,用 10 μg/mL 丝裂霉素 C 处理 1.5~2 h 较为适宜;V í zlav 等<sup>[15]</sup>报道,制备 MEF 饲养层细胞时,用 2 μg/mL 丝裂霉素 C 处理过夜。本试验结果表明,用 10 μg/mL 丝裂霉素 C 处理 2~

3 h,MEF 活力维持 9 天无显著变化,比处理 4 h 的稳定。

## 3.2 细胞接种量对丝裂霉素 C 处理后 MEF 活力的影响

细胞接种量是制备饲养层细胞的一个重要参数,其与营养液同化、营养成分消耗、细胞因子生成水平、ESCs 贴壁及其克隆形成率有密切关系<sup>[16]</sup>。目前,不同文献推荐的细胞接种密度各不相同,为  $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2 \sim 7.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ <sup>[16]</sup>。本试验结果表明,MEF 以  $(0.8 \sim 1.6) \times 10^4/\text{孔}$  接种 96 孔板,比以  $2 \times 10^4/\text{孔}$  和  $4 \times 10^4/\text{孔}$  接种的活力稳定。提示,接种密度过高会缩短饲养层细胞活力的维持时间。在试验期间,跟踪监测培养液 pH 值的变化,表明 MEF 以  $(0.8 \sim 1.6) \times 10^4/\text{孔}$  接种,培养期间即使不换培养液,其 pH 值在 14 d 内可稳定在 7.0~7.4;而以  $4 \times 10^4/\text{孔}$  接种,pH 值在第 8 d 即降到 6.8。说明接种密度过高导致培养液快速酸化,可能是丝裂霉素 C 处理后,MEF 活力维持时间缩短的主要原因之一。

## 3.3 血清浓度对丝裂霉素 C 处理后 MEF 活力的影响

MEF 分离培养通常用含体积分数 10% 犊牛血

清的高糖 DMEM, 而分离培养 ESCs 和 EGCs, 又常使用含体积分数 15% ~ 20% 胎牛血清或血清替代物<sup>[11, 15]</sup>的培养液, 改变血清浓度是否会影响饲养层细胞活力, 目前未见报道。本试验结果表明, 用含体积分数 10% 犊牛血清的培养液培养丝裂霉素 C 处理后的 MEF, 其活力比用含体积分数 2%, 5%, 15% 和 20% 犊牛血清的稳定。说明丝裂霉素 C 处理前后, 用同样的血清浓度培养有利于 MEF 活力维持稳定, 而改变血清浓度对丝裂霉素 C 处理后 MEF 活力的维持不利, 血清浓度过高会缩短了 MEF 活力维持时间。

### 3.4 传代次数对丝裂霉素 C 处理后 MEF 活力的影响

MEF 在体外培养后, 通常在 5 ~ 7 代进入生长低谷, 而表现增殖能力降低, 形态扁平立体感差, 胞体增大, 胞浆颗粒增多, 胞间出现空斑等老化现象。现已证实, MEF 的这种特性是因为使用含血清培养液而引起的<sup>[17]</sup>。本试验结果显示, 丝裂霉素 C 处理第 5 和 7 代, MEF 的活力明显不如第 1、3 代稳定, 活力维持时间明显缩短。同时本试验还观察到, 第 5 和 7 代 MEF 经过丝裂霉素 C 处理后重新接种, 许多细胞悬浮不能贴壁, 进一步证实了老化 MEF 不适宜用于制备饲养层细胞。

### [参考文献]

- [1] Williams R L, Hilton D J, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells[J]. *Nature*, 1988, 336:684-687.
- [2] Xu C, Inokuma M S, Denham J, Golds K, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells[J]. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19:971-974.
- [3] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292:154-156.
- [4] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981, 78 (12): 7634-7638.
- [5] 王杏利, 龚忠英. 小鼠胎儿成纤维细胞的分离培养及饲养层制备[J]. *陕西农业科学*, 1999, (6): 17-19.
- [6] 张怡, 赵连三, 汪成孝, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离与培养[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2003, 34(2): 344-346.
- [7] 刘民, 李柏青. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离、扩增和抑制[J]. *中国实验动物学杂志*, 2002, 12(4): 215-219.
- [8] 王国云, 李栋, 张辉, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞饲养层制备条件的研究[J]. *山东大学(医学版)*, 2005, 43(5): 397-400.
- [9] 招霞, 孙海翔, 胡娅莉, 等. ICR 小鼠胚胎成纤维细胞的培养及饲养层的制作[J]. *医学研究生学报*, 2006, 19(1): 36-39.
- [10] 杨奇, 史远刚, 龚忠英. 影响小鼠胎儿成纤维细胞饲养层的因素[J]. *动物医学进展*, 2001, 22(4): 45-47.
- [11] 纳吉 A, 格斯滕斯坦 M, 文特斯滕 K, 等. 小鼠胚胎操作实验指南[影印版][M]. 北京: 科学出版社, 2004: 371-375.
- [12] Barbara S M, Kye Yoon Park, Kevin G C, et al. Toward xenon-free culture of human embryonic stem cells[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, 38 (7): 1063-1075.
- [13] Irina K, Young C, Lorraine M, et al. Human embryonic stem cells derived without feeder cells[J]. *Lancet*, 2005, 365: 1636-41. [14] 耿洪业, 王少华. 实用治疗药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 247-248.
- [15] V í zlav B, Sonia B, Luk á, et al. An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24: 844-849.
- [16] Boon C H, Hua L, Tong C. Feeder cell density - a key parameter in human embryonic stem cell culture[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2004, 40: 255-257.
- [17] Deryk T L, Janice I F, Cathleen L R, et al. Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum [J]. *Science*, 1987, 236: 200-202.