

研究论文

食蟹猴胚胎干细胞向间充质前体细胞 诱导分化及鉴定

任振华^{1,2} 王佳茵¹ 朱宛宛¹ 邹春林¹ 张 愚^{1*}¹首都医科大学宣武医院细胞生物室, 北京 100053; ²安徽医科大学人体解剖学教研室, 合肥 230032)

摘要 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可以诱导分化成脂肪、软骨、骨骼和骨骼肌细胞, 并可作为骨骼、软骨或肌肉移植中的再生干细胞, 广泛应用于细胞治疗和组织工程。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有体外培养无限增殖和多向分化的特性, 能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型。该研究通过无血清条件下诱导食蟹猴ESCs形成类胚体(embryoid bodies, EBs), 然后在血清条件下贴壁分化EBs成间充质前体细胞(mesenchymal precursor cells, MPCs), 再经过长期体外培养, 纯化和扩增MPCs。结果显示, 纯化后的MPCs具有MSCs生物学特征, 并能在体外诱导分化成脂肪细胞和骨细胞。将这些细胞皮下注射给SCID小鼠, 并未发现形成肿瘤, 提示食蟹猴ESCs来源的MPCs具有一定的安全性。

关键词 食蟹猴胚胎干细胞; 间充质前体细胞; 诱导; 分化

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源于发育早期的中胚层和外胚层, 因其具有多向分化潜能、造血支持、促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点而日益受到人们的关注。如间充质干细胞在体内或体外特定的诱导条件下, 可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞, 连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能, 可作为理想的种子细胞, 用于衰老和病变引起的组织器官损伤修复^[1-3]。

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有无限扩增和向所有体细胞分化的能力, 其临床前景是生产组织和细胞用于“细胞疗法”, 为移植提供细胞材料。然而, 胚胎干细胞的致瘤性一直是其临床应用的障碍, 体外诱导胚胎干细胞向特定细胞分化, 有望解决其致瘤性问题^[4-5]。

本研究采用贴壁分化类胚体(embryoid bodies, EBs)成间充质前体细胞(mesenchymal precursor cells, MPCs), 经过长期体外培养, 纯化和扩增MPCs, 获得一群具有间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)特征的细胞群, 这群细胞具有很强的增殖能力和多向分化潜能。将这些细胞皮下注射给NOD/SCID小鼠, 并未发现肿瘤形成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 食蟹猴TW1胚胎干细胞系由美国Stanford大学Palmer实验室惠赠。免疫缺陷(SCID)小鼠由首都医科大学动物中心提供, 动物的饲养和实验均得到首都医科大学伦理委员会的批准。

1.1.2 主要试剂 Knock-out DMEM培养液、Knock-out血清替代物(KSR)、DMEM、 α -MEM、胎牛血清(FBS)、非必需氨基酸(NEAA)、 β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺、青链霉素(P-S)和1×D-PBS均购自于Invitrogen公司; IV型胶原酶和油红O购自Sigma公司; 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自R&D公司; 0.25% trypsin-EDTA购自GIBCO; 荧光抗体CD106、CD73、CD90、CD14、CD34、CD45、CD19和HLA-DR购自Pharmingen公司, CD105购自Serotec公司, STRO-1购自Santa Cruz公司; 单克隆兔抗alpha smooth muscle actin (α -SMA)购自Sigma公司; 单克隆鼠抗Vimentin购自Chemicon公司; MSCs分化试剂盒购自Lonza Walkersville公司; 其他为国产分析纯。

收稿日期: 2011-06-15 接受日期: 2011-08-22

高等学校博士学科点专项科研基金(No.20091107120004)和安徽医科大学博士科研资助基金(No.XJ201008)资助项目

*通讯作者。Tel: 010-83198889, E-mail: yaz@bjssap.org

1.2 方法

1.2.1 ESCs体外培养 食蟹猴ESCs体外培养方法按文献[6]报道, 简略如下, 于ESCs培养前1 d, 准备MEF滋养层, 复苏食蟹猴胚胎干细胞, 加入monkey ESCs培养基, 包括80% Knock-out DMEM培养液、20% Knock-out血清替代物、1% NEAA、2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、4 ng/mL bFGF和1%青链霉素。食蟹猴TW1胚胎干细胞克隆出现70%~80%融合时, 加入1 mg/mL的Collagenase IV, 37 °C作用3~4 min, Nikon倒置显微镜下观察细胞克隆边缘卷起, 弃去Collagenase IV, 加入monkey ESCs培养基, 用2 mL移液管头切割克隆, 再用Pasteur管吹打细胞团, 使细胞尽量分散, 500 r/min离心5 min, 细胞重悬于monkey ESCs培养基中, 按1:5的比例传代, 隔1 d全量换液, 每5~7 d传代一次。

1.2.2 EBs培养 按照之前文献报道的方法^[7], 用1 mg/mL IV型胶原酶消化ESCs克隆, 机械法分割成约50个细胞/团的小块, 500 r/min离心5 min, 细胞重悬于不含bFGF和 β -巯基乙醇的monkey ESCs培养基

中, 低粘附性Petri dish (Corning公司)中悬浮培养, 每2 d半量换培养液, 连续培养形成拟胚体(embryoid bodies, EBs)。

1.2.3 EBs贴壁分化 按照之前文献报道的方法^[8-9], 略作改动, 具体步骤如下: 取第6 d的EBs, 将其转移到0.1%明胶铺盘的培养皿中, 培养基为MSCs增殖培养基, 包括90% α -MEM、10%胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺和1%青链霉素, 贴壁培养, 每2 d换培养基1次, 培养5~7 d后机械法剔除中心高密度部分细胞, 保留周边铺展的贴壁细胞并传代扩增。贴壁细胞间充质前体细胞(mesenchymal precursor cells, MPCs)以 2×10^4 /cm²密度种植, 0.25% trypsin-EDTA消化传代, 每3~5 d传代1次, 如此反复传代5次以上。

1.2.4 MPCs表面标志 MPCs被消化收集, PBS洗涤2次, 重悬在包含1% BSA的PBS, 分别加入荧光标记的单抗CD14、CD19、CD34、CD45、CD73、CD90、CD105、CD106和Stro-1抗体, 4 °C避光孵育30 min。流式细胞仪检测, Win MDI 2.9软件分析结果。荧光抗体详见表1。

表1 流式细胞仪荧光抗体

Table 1 Details of fluorescent antibody used in flow cytometry

抗体名称 Fluorescent antibody	克隆编号 Clone number	荧光 Fluorescent	来源公司 Source	网站 Website
CD106	51-10C9	FITC	PharMingen, San Diego, CA	
CD73	AD2	PE	PharMingen, San Diego, CA	
CD90	5E10	FITC	PharMingen, San Diego, CA	
CD14	M ϕ P9	Percp	PharMingen, San Diego, CA	http://www.pharMingen.com
CD34	8G12	APC	PharMingen, San Diego, CA	
CD45	2D1	Percp	PharMingen, San Diego, CA	
CD19	SJ25C1	FITC	PharMingen, San Diego, CA	
HLA-DR	L243 (G46-6)	FITC	PharMingen, San Diego, CA	
CD105	Clone SN6	FITC	Serotec, Oxford	http://www.serotec.com
Stro-1		PE	Santa Cruz Biotechnology Inc.	http://www.scbt.com

1.2.5 MPCs体外分化 按照Lonza Walkersville公司的操作步骤, 参考文献[10], MPCs分化成脂肪、骨和软骨细胞。对于成脂肪分化, MPCs以 2.1×10^4 /cm²密度种植, 细胞达到100%融合后, 加入诱导/维持培养基, 培养3个循环, 每个循环5~6 d, 之后继续在维持培养基中培养5~7 d。福尔马林固定, 油红O染色。对于成骨分化, MPCs以 3.1×10^3 /cm²密度种植, 24 h后更换成骨诱导培养基, 每3 d换液, 连续培养21 d, 固

定后, 冯-科萨染色。

1.2.6 免疫化学检测 培养的MPCs用4%的多聚甲醛固定15 min, PBS洗涤2次, 0.03% Triton X-100透化40 min, 5%血清封闭1 h后, 分别加入多克隆兔抗Nestin和单克隆鼠抗Vimentin一抗, 4 °C过夜, 室温复温30 min后, 分别加入相应的二抗, 室温1 h, PBS洗涤2次, 1% DAPI复染。10%甘油封片, Nikon TE2000E荧光显微镜下观察拍片。

1.2.7 MPCs核型检测 秋水仙素处理贴壁细胞后, 0.125% trypsin消化收集细胞, 加入0.075 mol/L KCl低渗液, 37 °C水浴20 min, 离心5 min, 弃去低渗液, 新鲜配制的预冷的卡诺氏固定液固定4次, 干净的预冷的载玻片滴片, 室温下空气自然干燥后, 10% 吉姆萨染液染色30 min, 自来水冲洗后, 室温下自然干燥。显微镜下观察, 选取分散良好的分裂相, 配对染色体。

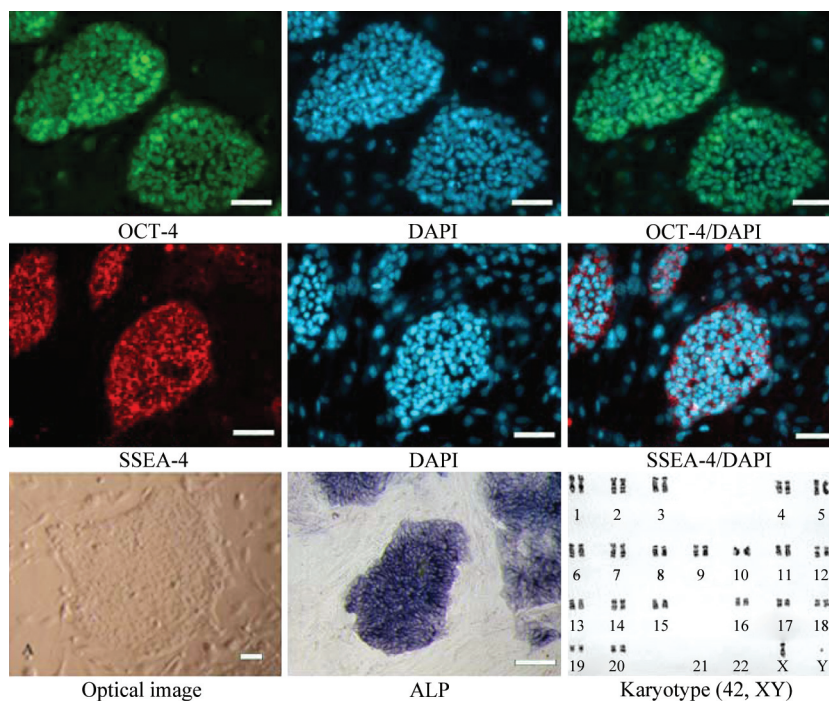
1.2.8 体内成瘤实验 收集两个10 cm培养皿的MPCs, 细胞数量为 1×10^7 , 注入5周龄的免疫缺陷(SCID)小鼠大腿皮下, 正常饲养4~8周后, 检测有无皮下肿瘤形成。食蟹猴ESCs和MSCs作为阳性和阴性对照。

2 结果

2.1 ESCs分化和MPCs扩增

食蟹猴TW1胚胎干细胞在MEF滋养层上呈克隆样生长, 克隆形态多为近圆形, 也有不规则形态, 边界清晰(图2A)。免疫荧光染色结果显示Oct-4、SSEA-4阳性, 而SSEA-3和SSEA-1染色均为阴性(数据未显示), 碱性磷酸酶染色阳性, 核型正常(42, XY)(图1)。

食蟹猴ESCs在去除了bFGF和 β -巯基乙醇的培养基中悬浮培养6 d, 形成的球形EBs(图2B), 在EBs没有融合成更大的球体之前, 接着将EBs接种到明胶铺盘的培养皿中贴壁培养, 显微镜下挑选直径大小一致的EB, 每个60 mm的培养皿接种10个EBs, 在含有胎牛血清的MSCs培养基中培养3 d后, 可见细



食蟹猴TW1细胞Oct-4、SSEA-4阳性, 而SSEA-3和SSEA-1染色均为阴性(数据未显示), 碱性磷酸酶染色阳性, 核型正常(42, XY)。标尺=100 μ m。Cynomolgus monkey ESCs (TW1) stained positive for Oct-4 and SSEA-4, but negative for SSEA-3 and SSEA-1. Moreover, ESCs stained positive for alkaline phosphatase, and have normal karyotype (42, XY). Bar=100 μ m.

图1 食蟹猴ESCs体外检测

Fig.1 Identification of cynomolgus monkey embryonic stem cells *in vitro*

胞从EBs中向周边迁移, 细胞形态多样, 包括卵圆形、多角形和长梭形等, 5~7 d围绕EBs周围向外迁移的细胞明显增多, EBs中心区域紧密重叠的细胞染色变深(图2C), 此时在显微镜下, 用细胞刮将中心区

域密集重叠的细胞去除, 尽量多的去除中心区域的细胞, 用胰蛋白酶消化传代。

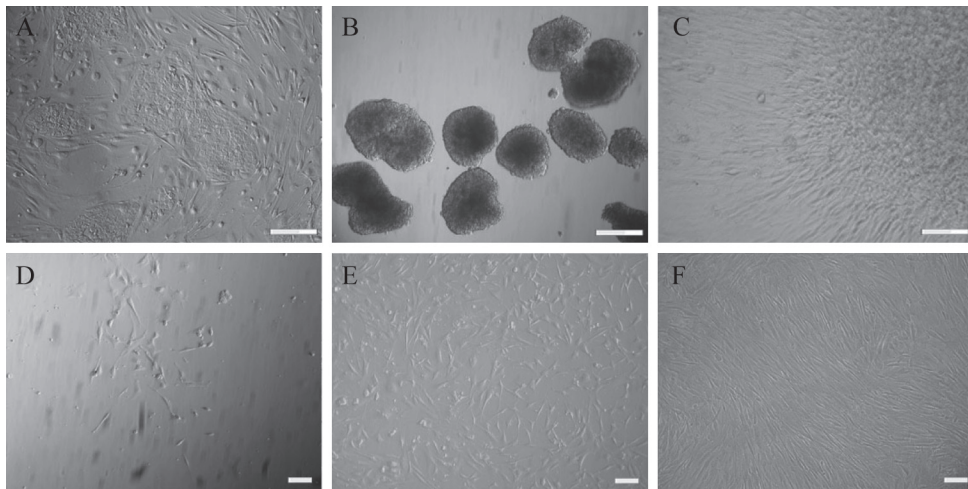
来自于食蟹猴ESCs的第1代MPCs细胞, 低密度种植在含血清的MSCs培养基中, 细胞开始生长缓慢,

细胞形态各异, 低密度下可见梭形细胞, 并呈克隆样生长(图2D), 6~8 d细胞数量增多, 各克隆相互接触, 细胞密度增大, 长梭形细胞数量增多(图2E), 10~12 d细胞可达融合后传代。从第2代开始, 细胞增殖速度加快, 每隔3~4 d传代一次, 传5代以上, 细胞形态与MSCs基本一致, 呈纺锤形, 涡旋状排列生长(图2F)。

2.2 MPCs细胞表型分析

体外含血清MSCs培养基中培养MPCs, 经过

多次传代(传代10次以上), MPCs与成体骨髓来源的MSCs相似^[1], 表达中胚层标志波形蛋白(Vimentin)和平滑肌肌动蛋白(α -SMA) (图3), 但不表达外胚层标志巢蛋白(Nestin, 图片未显示)。流式细胞仪检测结果也显示, MPCs与MSCs相似, 表达高水平的CD73和CD105 (SH2), 以及中等水平的CD90、CD106 (VCAM) 和Stro-1, 不表达CD14、CD19、CD34、CD45和HLA-DR (图4)。



A: 食蟹猴ESCs在MEF上培养; B: ESCs在无bFGF和 β -巯基乙醇的培养基悬浮培养成EBs (6 d); C: 细胞从贴壁种植的EBs (7 d)向周围迁移; D: 迁移细胞(MPCs)第1代培养(2 d); E: 迁移细胞(MPCs)第1代培养(6 d); F: 体外多次传代后的MPCs (10代以上)。标尺=100 μ m。

A: cynomolgus monkey ESCs were cultured in MEF; B: suspension culture of EBs in the medium without bFGF and β -mercaptoethanol; C: cell migration from adherent EBs; D: the migrated cells were cultured 2 days in MSC medium; E: the migrated cells were cultured 6 days in MSC medium; F: MPCs passaged more than 10 passages. Bar=100 μ m.

图2 食蟹猴ESCs体外分化成MPCs

Fig.2 Differentiation of cynomolgus monkey ESCs into MPCs

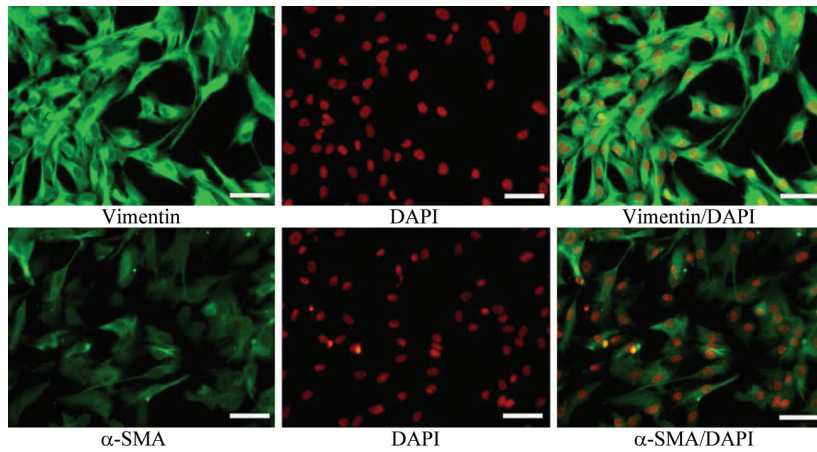
2.3 多向分化能力鉴定

为检测MPCs的分化潜能, 多次传代后的MPCs (10代以上), 体外诱导分化成脂肪和骨细胞。成脂肪诱导2周后, 细胞质内充满脂滴, 油红O染色呈红色, 诱导3个循环(总共22 d)后, 阳性细胞比例高达80%以上(图5A), 对照组(未诱导组)呈阴性(图5B)。成骨诱导21 d后, 细胞聚集, 呈结节状, 中性区域细胞内钙质沉积, 冯·科萨染色呈棕褐色(图5C), 而对照组(未诱导组)未见明显的细胞聚集成结节状, 冯·科萨

染色阴性(图5D)。

2.4 MPCs核型及体内致瘤

G带核型分析显示, 长期体外培养的食蟹猴TW1细胞系, 核型正常(42, XY) (图1), 经过EBs诱导分化成MPCs, 血清条件下多次传代后, MPCs核型检测正常(42, XY) (图5E)。将体外多次传代的MPC (1×10^7 个细胞)注入6只SCID小鼠皮下, 最长8周后, 未发现形成肿瘤。阳性对照组注射食蟹猴ESCs, 6只SCID小鼠皮下均见肿瘤形成, 体积大小不一。阴性对照MSCs未见

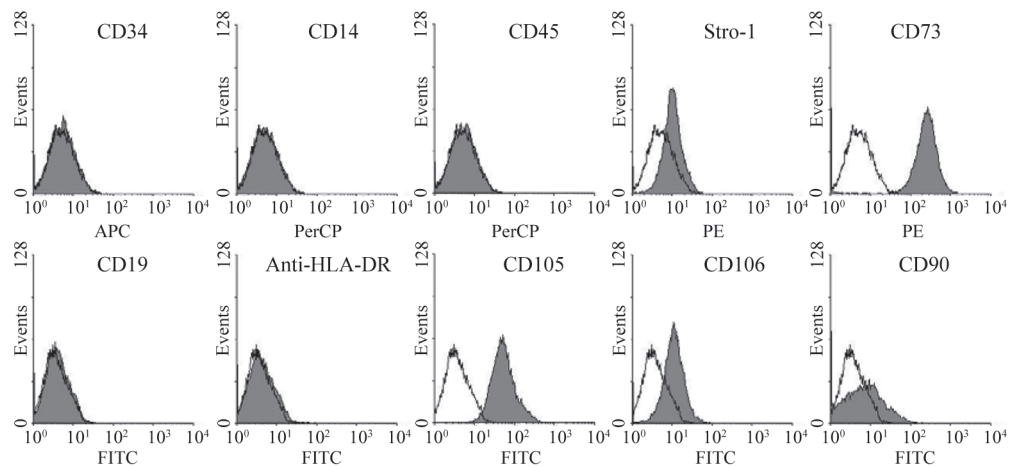


多次体外传代的MPCs, 表现成体MSCs特性, 表达波形蛋白(Vimentin)和平滑肌肌动蛋白(α -SMA)。标尺=100 μ m。

After subculture for several passages (over 10 times), MPCs derived from ESCs had the biological characteristics of MSCs, and expressed vimentin and smooth muscle actin (α -SMA). Bar=100 μ m.

图3 MPCs免疫荧光染色

Fig.3 Immunofluorescent staining of MPCs

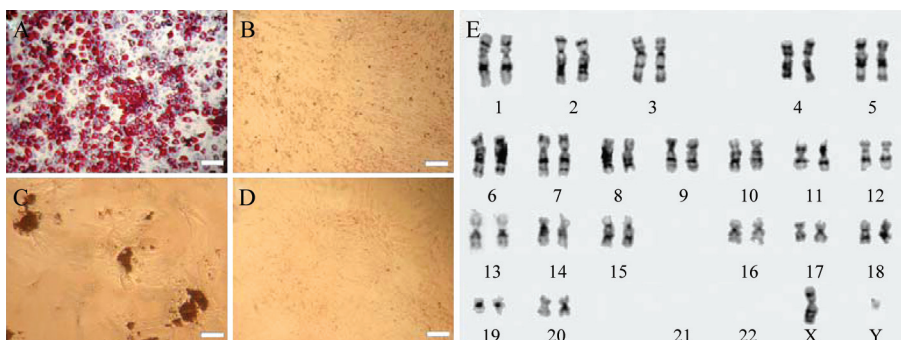


多次体外传代的MPCs, 与MSCs相似, 表达高水平的CD73和CD105 (SH2), 以及中等水平的CD90、CD106 (VCAM)和Stro-1, 不表达CD14、CD19、CD34、CD45和HLA-DR。

Similarly with MSCs, MPCs derived from ESCs after subculture for several passages (over 10 times), expressed CD73 and CD105 in high level, and CD90, CD106 (VCAM) and Stro-1 in medium level, and did not express CD14, CD19, CD34, CD45 and HLA-DR.

图4 MPCs细胞表面标志

Fig.4 Cell surface markers of MPCs



体外诱导分化成脂肪(A和B)和骨(C和D), 其中, B和D为阴性对照, 标尺=100 μ m; E: 多次体外传代培养的MPCs核型正常(42, XY)。

MPCs were differentiated into osteogenic (A) and adipogenic (C) cells, (B) and (D) were negative control. Bar=100 μ m; E: MPCs had normal karyotype (42, XY) after subculture for several passages (over 10 times).

图5 MPCs体外诱导分化及核型

Fig.5 Induced differentiation *in vitro* of MPCs and karyotype testing for MPCs

肿瘤形成(结果没有显示)。

3 讨论

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其具有高度的自我更新能力和多向分化潜能,以及可以自体取材、低免疫反应性等优点而备受关注,已成为细胞替代治疗的理想种子细胞。研究显示, MSCs能分化成为骨、软骨、肌腱等各种组织细胞,参与组织损伤修复^[12-13]。MSCs来源广泛,包括成体来源(胎儿和自体)和胚胎干细胞来源。胎儿来源的MSCs不可避免面临伦理学等问题,最佳选择是自体骨髓来源的MSCs,避免了伦理学和移植免疫反应等问题,但自体来源的MSCs,由于个体差异,特别个体年龄的影响, MSCs的增殖分化等细胞生物学特征千差万别,直接影响移植治疗的效果。同时自体或其他供体来源的MSCs,不可避免的伴有取材损伤,以及供体提供的MSCs数量有限。因此,来自于ESCs无限量的MPCs是一种选择,同时ESCs来源来的MPCs,也能做到移植细胞的标准化,包括移植细胞的数量,细胞生物学特性等指标^[11]。

实现体外ESCs定向分化一直是干细胞研究的热点。ESCs很难直接诱导分化成为特定的组织或细胞,仅有的几种分化方案分别针对的是向神经细胞^[14-15]、定向造血干细胞^[16]、内皮细胞^[17]和心肌细胞^[18]分化的。之前的研究显示, ESCs向中胚层组织细胞分化,多见于直接向成骨分化^[19]。最近研究报道, ESCs可诱导分化成MSCs,这种来源于ESCs的MSCs具有成体骨髓来源的MSCs特征^[20-21], ESCs向特定组织细胞分化通常采用分步诱导的方法,首先,在悬浮培养中使胚胎干细胞自发分化形成类胚体,其中包含3个胚层的前体细胞,然后通过改变培养条件,如添加特殊生长因子和提供特定细胞外基质等,使细胞选择性分化增殖,最终获得目的细胞^[22-23]。或者采用条件培养的方法,如与小鼠骨髓来源的间质细胞系OP9共培养,可以诱导ESCs分化成为多潜能的间质细胞^[24]。

本研究体外诱导分化食蟹猴ESCs成为MPCs,在含有血清的培养中多次传代,最终获得的MPCs(体外传代10代以上),免疫荧光和流式细胞仪检测MPCs表达MSCs的标志物,如波形蛋白(Vimentin)、平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、CD106 (VCAM)、CD105 (SH2)、CD73和CD90。进一步的体外分化实验证实, MPCs能分化成脂肪和骨细胞。另一方面, MPCs作

为干细胞移植的来源细胞之一, MPCs移植安全性也是应该考虑的问题。本研究在体外长期培养MPCs(最长15代),检测核型正常,同时将这些细胞注射到SICD小鼠皮下,并未发现肿瘤形成,因此,本实验结果提示,食蟹猴ESCs来源的MPCs具有MSCs的细胞生物学特征,并且用于干细胞移植具有一定的安全性,有望成为细胞治疗或组织工程的种子细胞来源。

参考文献 (References)

- 1 Aicher WK, Bühring HJ, Hart M, Rolauffs B, Badke A, Klein G. Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells-potential and pitfalls. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63(4/5): 342-51.
- 2 Hwang NS, Im SG, Wu PB, Bichara DA, Zhao X, Randolph MA, *et al.* Chondrogenic priming adipose-mesenchymal stem cells for cartilage tissue regeneration. *Pharm Res* 2011; 28(6): 1395-405.
- 3 Lim JY, Loisel AE, Lee JS, Zhang Y, Salvi JD, Donahue HJ. Optimizing the osteogenic potential of adult stem cells for skeletal regeneration. *J Orthop Res* 2011; doi: 10.1002/jor.21441.
- 4 Park KD, Seong SK, Park YM, Choi Y, Park JH, Lee SH, *et al.* Telomerase reverse transcriptase related with telomerase activity regulates tumorigenic potential of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20(1): 149-57.
- 5 Aznar J, Sánchez JL. Embryonic stem cells: Are useful in clinic treatments? *J Physiol Biochem* 2011; 67(1): 141-4.
- 6 Yamamoto M, Tase N, Okuno T, Kondo Y, Akiba S, Shimozawa N, *et al.* Monitoring of gene expression in differentiation of embryoid bodies from cynomolgus monkey embryonic stem cells in the presence of bisphenol A. *J Toxicol Sci* 2007; 32(3): 301-10.
- 7 Hwang NS, Varghese S, Lee HJ, Zhang Z, Ye Z, Bae J, *et al.* *In vivo* commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(52): 20641-6.
- 8 Hwang NS, Varghese S, Elisseeff J. Derivation of chondrogenically-committed cells from human embryonic cells for cartilage tissue regeneration. *PLoS One* 2008; 3(6): e2498.
- 9 Mahmood A, Harkness L, Schröder HD, Abdallah BM, Kassem M. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/activin/nodal signaling using SB-431542. *J Bone Miner Res* 2010; 25(6): 1216-33.
- 10 Kim BS, Lee CC, Christensen JE, Huser TR, Chan JW, Tarantal AF. Growth, differentiation, and biochemical signatures of rhesus monkey mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 185-98.
- 11 Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* 2005; 2(6): e161.
- 12 Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: A user's guide. *Stem Cells*

- Dev 2010; 19(10): 1449-70.
- 13 Santos JL, Pandita D, Rodrigues J, Pêgo AP, Granja PL, Tomás H. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: Methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Curr Gene Ther* 2011; 11(1): 46-57.
- 14 Shimada H, Yoshimura N, Tsuji A, Kunisada T. Differentiation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells: Modulation of differentiation by FGF-20. *J Biosci Bioeng* 2009; 107(4): 447-54.
- 15 Vazin T, Becker KG, Chen J, Spivak CE, Lupica CR, Zhang Y, *et al.* A novel combination of factors, termed SPIE, which promotes dopaminergic neuron differentiation from human embryonic stem cells. *PLoS One* 2009; 4(8): e6606.
- 16 Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(19): 10716-21.
- 17 Moon SH, Kim JS, Park SJ, Lee HJ, Do JT, Chung HM. A system for treating ischemic disease using human embryonic stem cell-derived endothelial cells without direct incorporation. *Biomaterials* 2011; 32(27): 6445-55.
- 18 Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: Role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003; 107(21): 2733-40.
- 19 Vazin T, Chen J, Lee CT, Amable R, Freed WJ. Assessment of stromal-derived inducing activity in the generation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(6): 1517-25.
- 20 Hematti P. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: An overview. *Methods Mol Biol* 2011; 690: 163-74.
- 21 Karlsson C, Emanuelsson K, Wessberg F, Kajic K, Axell MZ, Eriksson PS, *et al.* Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors-Potential in regenerative medicine. *Stem Cell Res* 2009; 3(1): 39-50.
- 22 Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: *In vitro* differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2007; 103(5): 389-98.
- 23 Bratt-Leal AM, Carpenedo RL, McDevitt TC. Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol Prog* 2009; 25(1): 43-51.
- 24 Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* 2005; 2(6): e161.

Induction and Identification of Mesenchymal Precursor Cells from Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells

Ren Zhenhua^{1,2}, Wang Jiayin¹, Zhu Wanwan¹, Zou Chunlin¹, Zhang Y. Alex^{1*}

¹Cell Biology Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China; ²Department of Anatomy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) have received considerable attention in recent years for various therapeutic approaches. The reason is that MSCs have the ability to expand *in vitro* and differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages, which could then be used for cell therapy and tissue engineering. Embryonic stem cells (ESCs) are pluripotent cells with unlimited proliferation and differentiating into any cell type of the body. In this study, cynomolgus monkey ESCs were cultured in the absence of serum to form embryoid bodies (EBs), and then EBs were transferred for adherent culture in the presence of serum. Mesenchymal precursor cells (MPCs) migrated from EBs were selectively isolated and expanded. The results showed that MPCs derived from ESCs had the biological characteristics of mesenchymal stem cells (MSCs), and could be differentiated into osteogenic and adipogenic cells. NOD/SCID mice injected with MPCs did not show signs of tumor development. The results suggested that MPCs derived from cynomolgus monkey ESCs had certain the safety of its clinical application.

Key words cynomolgus monkey embryonic stem cells; mesenchymal precursor cells; induction; differentiation

Received: June 15, 2011 Accepted: August 22, 2011

This work was supported by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Colleges (No.20091107120004) and Research Assistance Fund of Anhui Medical University (No.XJ201008)

*Correspondence. Tel: 86-10-6318 4557, E-mail: yaz@bjsap.org