

技术与方法

白来航鸡胃部间充质干细胞的分离培养及鉴定

秦欣欣^{1,2*} 孙楠^{1,2} 芮磊³ 李赞东³

(¹江西理工大学赣州市流域污染模拟与控制重点实验室, 赣州 341000; ²江西理工大学江西省环境岩土与工程灾害控制重点实验室, 赣州 341000; ³中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 该研究采用16日龄白来航鸡胃部组织分离培养胃部间充质干细胞(G-MSCs), 观察G-MSCs生长特性, 为鸡体外研究方法的开发奠定实验基础。细胞生长曲线表明, 白来航鸡G-MSCs在体外培养条件下具有良好的扩增能力, 且P3代细胞的增殖能力更好。通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)确定了细胞表面标记物的表达情况, *CD29*、*CD44*、*CD73*、*CD71*、*CD90*、*CD105*呈阳性表达, *CD31*、*CD45*、*CD34*呈阴性表达。成骨诱导实验确定了G-MSCs具有成骨分化和成脂肪分化能力。利用微粒体培养进行成骨分化研究, 结果表明微粒体培养能够诱导形成成骨组织块, 但成骨诱导率不高。最后利用细胞划痕发现, G-MSCs具有体外迁移能力。该研究成功地从白来航鸡胃部组织中分离培养出了G-MSCs并鉴定了其生物学特性, 为鸡G-MSCs的研究奠定了基础, 为利用G-MSCs进行胃癌等疾病的治疗提供了新思路。

关键词 白来航鸡; 胃部间充质干细胞; 培养; 鉴定

Isolation, Culture and Characterization of Gastric Mesenchymal Stem Cells from White Leghorns

QIN Xinxin^{1,2*}, SUN Nan^{1,2}, RUI Lei³, LI Zandong³

(¹Ganzhou Key Laboratory of Basin Pollution Simulation and Control, Jiangxi University of Science and Technology, Ganzhou 341000, China; ²Jiangxi Provincial Key Laboratory of Environmental Geotechnology and Engineering Disaster Control, Jiangxi University of Science and Technology, Ganzhou 341000, China; ³State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The aim of this study was to explore the growth characteristics of G-MSCs (gastric mesenchymal stem cells) isolated from 16-day-old White Leghorns, which provided methods for *in vitro* chicken research. Cell growth curve showed that G-MSCs possessed a good amplification ability *in vitro*. A better amplification ability occurred in P3 generation. The expression of cell surface markers was determined by RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). The *CD29*, *CD44*, *CD73*, *CD71*, *CD90* and *CD105* were positively expressed, while *CD31*, *CD45* and *CD34* were negatively expressed. Osteogenic induction experiment confirmed that G-MSCs could differentiate into osteogenic and adipogenic cells. Some osteogenic tissue blocks could be formed via a microsomal osteogenesis induction, with a low osteogenesis rate. An *in vitro* migration could also

收稿日期: 2021-05-26 接受日期: 2021-11-02

国家重点基础研究发展计划(973项目)(批准号: 2013CB945000)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15779089927, E-mail: nacy_101@126.com

Received: May 26, 2021 Accepted: November 2, 2021

This work was supported by the National Basic Research (973 Program) (Grant No.2013CB945000)

*Corresponding author. Tel: +86-15779089927, E-mail: nacy_101@126.com

be observed from the target G-MSCs via cell scratch. The G-MSCs of White Leghorns were successfully isolated and identified, providing a basis for the further research on chicken G-MSCs and gastric cancer diseases treatment.

Keywords White Leghorns; gastric mesenchymal stem cells; culture; identification

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是当前最有研究前途的干细胞之一,其来源极其丰富,包括骨髓^[1]、脂肪^[2]、脐带^[3]、脐带血^[4]、胎盘^[5]、牙髓^[6]、皮肤^[7]等。MSCs具有自我更新能力,能够进行体外扩增并具有多种分化潜能。与胚胎干细胞相比, MSCs更易于进行体外培养且存在较少的伦理问题^[8-9]。体内移植实验表明, MSCs不易引起免疫排斥反应,能够参与机体的免疫调节及组织修复过程,并具有细胞归巢等功能^[10-11]。

MSCs被广泛应用于基础研究和临床医学研究。相关研究发现, MSCs可以延长组织不相容植皮的存活时间,即使采用“第三方”(非供体也非受体)MSCs输注,仍能抑制受体免疫排斥反应^[12];将MSCs通过尾静脉注入创伤性脑损伤鼠后,其神经及运动功能明显恢复。损伤侧MSCs分布明显多于未损伤侧,表明MSCs可以减少局部脑缺血引起的神经损伤^[13];骨髓来源MSCs能使胃癌细胞SGC-7901和KATO-III侵袭能力显著增强,其中KATO-III CD133⁺细胞侵袭能力增强趋势比CD133⁻更加明显^[14]; MSCs通过旁分泌生长因子和抗凋亡因子或分化为肿瘤相关成纤维细胞来发挥生长刺激作用,提高肿瘤生长、转移速率,增强耐药性,并为癌细胞提供有利的细胞微环境^[15]。

目前MSCs的相关研究多集中于哺乳动物和人类^[16],禽类MSCs的研究相对较少。有研究表明,鸡的骨髓^[17]、脐带^[18]、皮肤^[19]及肺^[20]等组织器官中均可培养出MSCs,但胃作为消化系统重要组成器官是癌症高发器官之一,胃部组织中是否能分离培养出MSCs,且培养出的MSCs特性如何均仍不清楚。本研究以胚胎期白来航鸡为研究对象,分离培养白来航鸡胃部间充质干细胞(gastric mesenchymal stem cells, G-MSCs)。通过反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)、体外扩增、诱导分化等实验方法对G-MSCs的生物学特性进行了研究,为后期进一步研究G-MSCs的特性及利用G-MSCs进行胃癌等疾病的治疗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂及材料

白来航鸡种蛋由中国农业大学提供。细胞培养瓶、细胞培养板、细胞小室购自Coming公司; 0.2 μmol/L滤器购自Millipore公司; DMEM高糖培养基、DMEM低糖培养基、DMEM/F12培养基购自Hyclone公司; 氨苄青霉素和链霉素购自北京北方同正生物技术发展有限公司; 胰酶、IV型胶原酶、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、地塞米松、β-甘油磷酸钠、抗坏血酸、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、吡啶美辛购自Sigma公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibco公司; GoScript反转录试剂盒购自Promega公司; DNA Ladder Marker购自天根生化科技(北京)有限公司; PCR Premix购自TaKaRa公司; 胰岛素、EGF、bFGF、TGF-β3购自Peprotech公司; 油红O、茜素红、碱性磷酸酶购自北京百澳瑞德科技有限公司。

1.2 细胞分离、培养

取受精后孵化16日的白来航鸡种蛋,用75%酒精喷擦种蛋表面,将鸡胚取出放入无菌培养皿中,剥离胃部组织,用磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗6次,将其转入无菌烧杯中。再将胃组织剪成约1 mm³的正方体小块,加入0.5% IV型胶原蛋白酶溶液,混匀后于37 °C下消化约30 min,加入等体积的含血清培养基终止消化,用移液器将细胞吹散。用200目细胞筛过滤细胞,将细胞悬液转入离心管中,室温400 ×g离心10 min。弃掉上清液,加入培养基调整细胞浓度为1×10⁶个/mL,将细胞接种到细胞培养瓶中,加入适量完全培养基(含10 ng/mL bFGF、10 ng/mL EGF、10% FBS、1%青霉素-链霉素双抗),放入37 °C、5% CO₂培养箱中进行培养。24 h后换液,除去未贴壁细胞,以后每两天换1次液,待细胞融合度达到80%~90%时,将细胞悬液稀释2或3倍,在含相同培养基的新细胞培养瓶中进行传代,将原代细胞记为P0,传代细胞依次标记为P1、P2……Pn。

1.3 体外扩增检测

取生长状态良好的P3、P8代白来航鸡G-MSCs,待细胞融合度达到80%左右时收集细胞,并将其分别

接种在24孔板中,每孔细胞浓度为 1×10^4 个/mL,再将其放入37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h,然后随机选3孔细胞,消化、计数,连续进行8天。根据收集的数据绘制细胞生长曲线,并计算细胞的群体倍增时间(population doubling time, PDT)。PDT计算公式如下:

$$PDT = \frac{0.301(t-t_0)}{\log N_t - \log N_0} \quad (1)$$

其中, t : 对数生长期结束的时间(h); t_0 : 对数生长期开始的时间(h); N_t : 对数生长期结束时的细胞数量; N_0 : 对数生长期开始时的细胞数量。

1.4 白来航鸡G-MSCs表面标记物鉴定

利用RT-PCR检测白来航鸡G-MSCs表面标记物,根据鸡*gapdh*、*CD29*、*CD31*、*CD34*、*CD44*、*CD45*、*CD71*、*CD73*、*CD90*、*CD105*基因的ORF序列设计RT-PCR鉴定引物,引物序列信息如表1所示。

1.5 成骨诱导

将0.5 μmol/L地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 μg/mL抗坏血酸、10% FBS、1%青霉素-链霉素双抗溶解于DMEM低糖培养基中,配制成骨诱导液,并用0.22 μm注射器式微孔过滤器过滤除菌。取P3代白来航鸡G-MSCs,用贴壁法将细胞培养至融合度约为70%时,加入成骨诱导液进行成骨诱导。每两天换1次诱导液,诱导14天后用茜素红(Alizarin red)进行染色,观察成骨诱导情况。同时,取100 μL约含 1×10^5 个P3代白来航鸡G-MSCs的细胞悬浮液,加入到6孔培养板中间,在周围滴加约200 μL完全培养基,孵育4 h后加入2 mL成骨诱导液进行成骨组织块诱导。每两天换1次诱导液,培养21天后,将成骨组织块样品进行脱水、透明、浸蜡、包埋处理,然后进行组织切片,37℃过夜烘干。用

碱性磷酸酶-美蓝(alkaline phosphatase-methylene blue, ALP-MB)进行染色,显微镜下观察实验结果。

1.6 成脂诱导

将0.5 mmol/L IBMX、10 mg/mL胰岛素、1 μmol/L地塞米松、200 μmol/L吡啶美辛、10% FBS、1%青霉素-链霉素双抗溶解于DMEM高糖培养基中,配制成脂诱导液,并用0.22 μm注射器式微孔过滤器过滤除菌。取P3代白来航鸡G-MSCs进行贴壁培养,当融合度约为70%时,加入成脂诱导液进行成脂诱导。每两天换1次诱导液,诱导14天后用油红(Oil red)进行染色,观察成脂诱导情况。

1.7 细胞迁移

取P3代白来航鸡G-MSCs进行贴壁培养,当细胞融合度为80%左右时,弃掉培养基,用无菌枪头划线。用PBS清洗3次,去除损伤的细胞,加入完全培养基培养,分别在12、24、48 h时,观察划线部位细胞的生长情况。

取P3代白来航鸡G-MSCs,将完全培养基更换为无血清的细胞培养基继续培养细胞24 h后,弃掉培养基,用0.25%胰酶进行消化反应,并收集细胞。用含BSA的无血清培养基重悬细胞,调整细胞浓度至 5×10^5 个/mL。将Transwell小室放入24孔板中,取100 μL细胞悬液加入Transwell小室。在24孔板下室中加入600 μL含20% FBS的完全培养基。分别在培养24、48 h后,将Transwell小室取出,弃掉孔中的培养液,用无菌PBS缓冲液洗2次。甲醇固定30 min,风干小室,加入0.1%结晶紫染色20 min。用棉签擦掉上层未迁移的细胞,用无菌PBS冲洗3次,在40×物镜下随机选取5个视野观察细胞迁移情况。

表1 RT-PCR鉴定引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR identification

基因 Gene	产物大小 Amplicon size	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>CD29</i>	208 bp	TCT GCC CGA TGC GAT GAC TTG	TTT GCG GTT CCC CGA CTC TTA G
<i>CD44</i>	206 bp	GCA ACA GAA ACG AGG AGC AA	TCC CCT GGA GTT GTG TCA TG
<i>CD71</i>	105 bp	CTG GAT AAT GCA GCG TTC CC	ACC CTT AGT GTC CAG GAA GC
<i>CD90</i>	143 bp	GCC GCT ATG AGA ACA AGA CC	GTT CTT GTG CAT GGT GAC GT
<i>CD105</i>	229 bp	AGA ACG CCA CAC ACT TCA TG	ACC TCC TTG TTG ACC TCC AG
<i>CD31</i>	221 bp	CAG GCA AAG GAG ACG CAC GAT	CTT CTG GCA GCT CAC AAC GT
<i>CD34</i>	204 bp	ACT CGC ATC CAG AGA ACA CA	TGA TGT TGT GGC ACG TGA TG
<i>CD45</i>	233 bp	GAA CAG CCG CAG CGT CCC A	TTT GTC CAT TCT GGG CAG GGT A
<i>CD73</i>	247 bp	TCA CAG CCA GGG AAT GAT GT	CCA TGA AGG GAT ATG GGC CA
<i>gapdh</i>	118 bp	AGC CAT TCC TCC ACC TTT GA	CCA TCA AGT CCA CAA CAC GG

1.8 统计学分析

所有实验数据均采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量数据用平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)的方式表示。组间比较使用 *t* 检验分析; $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 细胞形态

将从白来航鸡胃部组织中分离出的细胞进行体外培养, 培养 48 h 后在显微镜下观察到大量的未贴壁细胞, 更换细胞培养液去除未贴壁的细胞后, 观察到少量成纤维样贴壁细胞。原代培养 3~5 天后, 于显微镜下拍照观察 P0 代细胞的生长状态, 结果如图 1 所示, 此时的细胞形态并不单一, 呈三角形、多边形、长梭形等多种形态, 所含杂质细胞较多, 混有圆形或类圆形杂质细胞。经过传代之后的细胞形态逐渐变得单一, 当细胞传到 P3 代时纯度较高, 细胞呈纺锤状形态, 并有涡旋生长的态势。当传代到 P8 代时, 细胞形态与 P3 代细胞相比未发生明显变化。

2.2 细胞生长曲线

由图 2 可见, 白来航鸡 P3 和 P8 代 G-MSCs 的生长

潜伏期均为 1~3 天, 在 4~6 天进入对数生长期, 第 7 天以后开始进入平台期。研究显示, 人胃癌组织中 MSCs 细胞生长的对数期为 4~9 天, 第 10 天后进入生长平台期^[21], 其体外扩增能力次于白来航鸡 G-MSCs。根据公式(1)计算 G-MSCs 的 PDT, 结果发现 P3 代 PDT 约为 32 h, P8 代 PDT 约为 34 h。细胞生长曲线和 PDT 结果均表明, P3 与 P8 代细胞都具有旺盛的细胞活力和较强的扩增能力, 其中, P3 代细胞的增殖能力优于 P8 代。

2.3 表面标记物检测

本文利用 RT-PCR 技术, 检测白来航鸡 G-MSCs 表面标记物。选用增殖能力较强的 P3 代细胞, 以白来航鸡 *gapdh* 基因为内参, 检测 9 种常用的 MSCs 相关表面标记物。表面标记基因的检测结果如图 3 所示, 其中 *CD29*、*CD44*、*CD73*、*CD71*、*CD90*、*CD105* 在白来航鸡 G-MSCs 中呈阳性表达, 而 *CD31*、*CD45*、*CD34* 呈阴性表达。

2.4 成骨诱导

在培养初期成骨诱导组细胞形态与对照组基本相同, 培养 7 天后诱导组细胞呈聚集性生长(图 4A)。培养 10 天左右, 诱导组钙结节变得明显(图 4B)。培养 14 天后, 利用茜素红分别对诱导组与对照组细胞进行染色。诱导组的细胞被染成红色, 染色

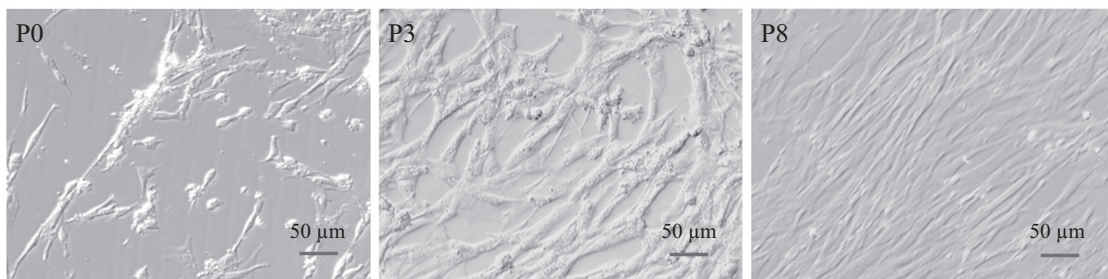


图1 不同时期白来航鸡G-MSCs的细胞形态

Fig.1 Cell morphology of White Leghorns G-MSCs at different periods

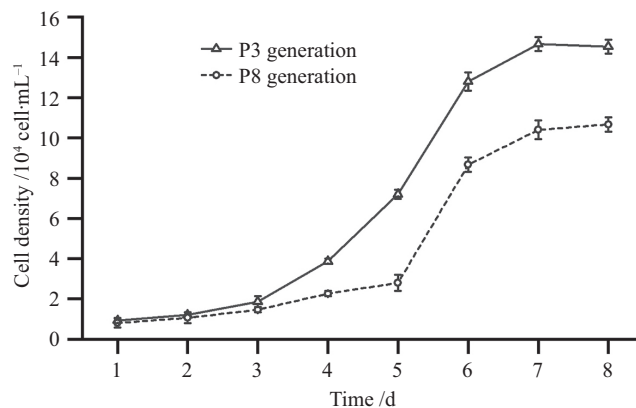


图2 白来航鸡P3和P8代G-MSCs细胞生长曲线

Fig.2 Growth curves of G-MSCs in P3 and P8 generations of White Leghorns

结果呈阳性(图4C), 对照组细胞茜素红染色结果为阴性(图4D)。以上实验结果表明, 白来航鸡G-MSCs具有成骨分化潜能。图4E中箭头所指为利用微粒体培养的方法诱导21天形成的成骨组织块。对成骨组织块进行细胞化学染色, 结果发现, 组织块中成骨细胞所占比例约为20%, 被ALP染成棕褐色(图4F); 非成骨细胞约占80%, 被MB染成蓝色(图4G)。

2.5 成脂诱导

G-MSCs体外成脂诱导结果发现, 诱导组细胞随着诱导进行, 细胞密度降低, 细胞形态发生改变, 由长梭形变扁变大, 细胞内部出现小的脂肪滴; 对照组细胞密度增加, 形态不发生改变。随着诱导时间的增加, 诱导组细胞内部脂肪滴逐渐增多, 诱导14天后利用油红O进行染色, 结果如图5A所示, 诱导组肥

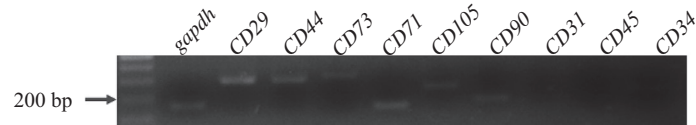
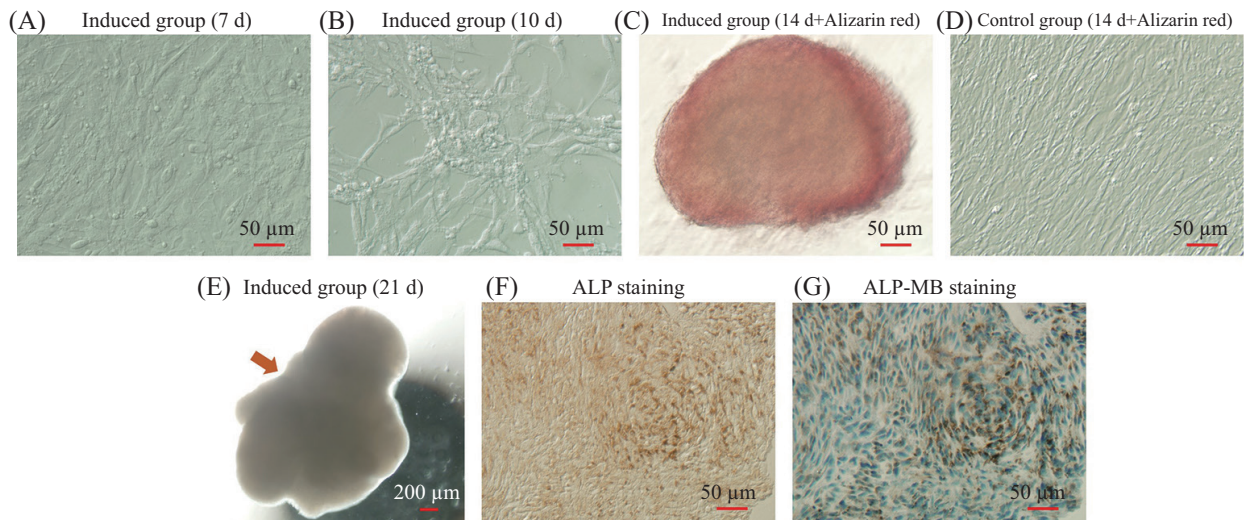


图3 白来航鸡G-MSCs细胞表面标记物表达情况

Fig.3 Expression of cell surface markers of G-MSCs in White Leghorns

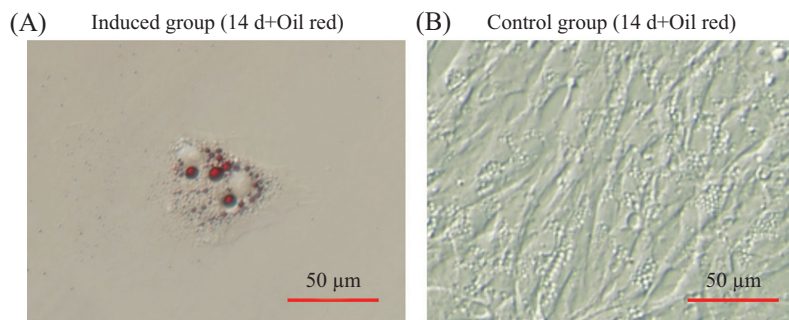


A: 培养7天的诱导组细胞; B: 培养10天的诱导组细胞; C: 培养14天, 茜素红染色后的诱导组细胞; D: 培养14天, 茜素红染色后的对照组细胞; E: 箭头所指为诱导21天形成的成骨组织块; F: 成骨组织块中的成骨细胞被ALP染成棕褐色; G: 成骨组织块中的非成骨细胞被MB染成蓝色。

A: 7-day-cultured induced group cells; B: 10-day-cultured induced group cells; C: 14-day-cultured induced group cells with Alizarin red staining; D: 14-day-cultured control group cells with Alizarin red staining; E: the arrow indicated the osteogenic tissue blocks induced at 21 days; F: osteoblasts were stained brown by ALP; G: non-osteoblasts were stained blue by MB.

图4 白来航鸡G-MSCs成骨诱导

Fig.4 Osteogenesis induction of White Leghorns G-MSCs



A: 培养14天, 油红染色后的诱导组细胞; B: 培养14天, 油红染色后的对照组细胞。

A: 14-day-cultured induced group cells with Oil red staining; B: 14-day-cultured control group cells with Oil red staining.

图5 白来航鸡G-MSCs成脂诱导

Fig.5 Adipogenic induction of White Leghorns G-MSCs

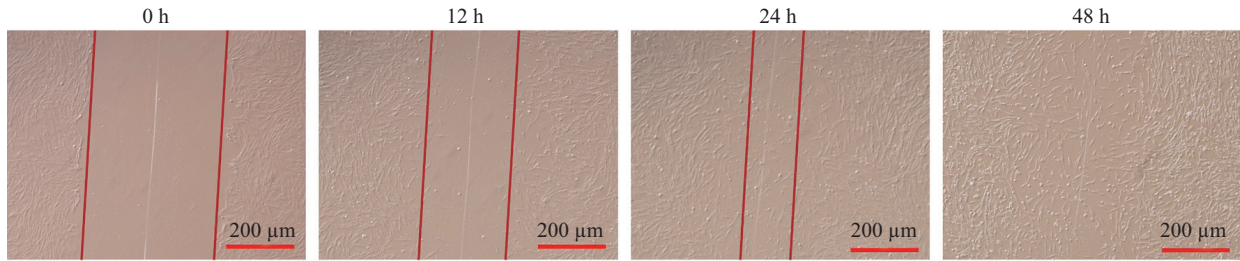
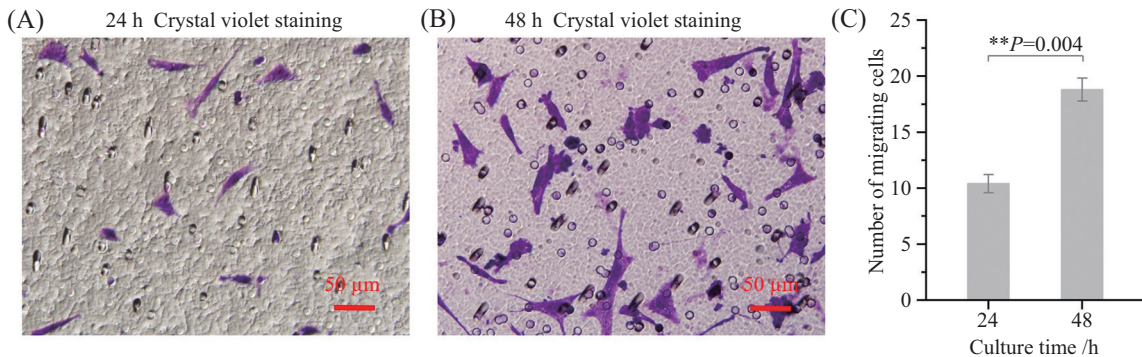


图6 白来航鸡G-MSCs细胞划痕实验结果

Fig.6 Results of wound healing assay of White Leghorns G-MSCs



A: 培养24 h的细胞小室镜检图片; B: 培养48 h的细胞小室镜检图片; C: 不同培养时间的细胞迁移个数对比, $**P<0.01$ 。

A: microscopic image of cells cultured for 24 h; B: microscopic image of cells cultured for 48 h; C: comparison for the number of migrating cells at different culture time, $**P<0.01$.

图7 白来航鸡G-MSCs细胞小室实验结果

Fig.7 Results of Transwell assay of White Leghorns G-MSCs

大扁平细胞中的脂肪滴被油红O染成橙红色; 对照组细胞油红O染色无明显颜色变化(图5B)。

2.6 细胞迁移

细胞划痕实验结果如图6所示, 分别在0、12、24和48 h观察细胞迁移情况, 并利用Image-ProPlus 6.0计算细胞迁移率。结果表明, 12 h时, MSCs已经向损伤部位迁移, G-MSCs的迁移率约为28%; 24 h时, 约50%的损伤面积被修复, 迁移率约为55%; 48 h时, 细胞划痕造成的损伤痕迹已不明显, 损伤部位几乎被完全修复。细胞划痕实验证明, 白来航鸡G-MSCs具有体外迁移能力。细胞划痕修复受细胞迁移和细胞扩增两方面的影响, 为了进一步了解白来航鸡G-MSCs的体外迁移情况, 后续用细胞小室实验进一步验证(图7A和图7B)。在体外培养24 h时, 白来航鸡G-MSCs能够迁移到细胞小室下室; 在培养48 h时, 迁移到细胞小室下室的细胞个数约为24 h的2倍(图7C)。

3 讨论

由于MSCs不存在特异性的标记物, 因此, 无法

通过特异性标记物的检测对其进行鉴定, 只能通过多种表面标记物的共同检测及MSCs的功能进行逆向鉴定^[22-23]。有研究发现, 人类不同来源的MSCs中表面标记物表达不同^[24-25]。已有关于鸡的不同来源的MSCs研究表明, 鸡骨髓MSCs^[17]和脐带MSCs^[18]表达表面标记物CD29、CD44、CD73、CD71, 不表达CD34和CD31; 鸡真皮来源MSCs^[19]中只检测了CD44、CD73、CD71和CD34表面标记物的表达情况, 其结果与骨髓、脐带来源MSCs相似。

本研究检测了白来航鸡G-MSCs的9种细胞表面标记物的表达情况, 与以往鸡衍生MSCs研究相比, 增加了CD90、CD105和CD45的检测。白来航鸡G-MSCs中表面标记物CD90、CD105呈阳性表达, CD45呈阴性表达。表面标记物CD90是细胞黏附分子免疫球蛋白超家族的一员, 参与调节细胞-细胞、细胞-细胞质之间的反应, 在细胞黏附、转移中起重要作用^[26]; CD105分子是一种I型膜必需蛋白, 是TGF-β的受体蛋白, 与血管生成、肿瘤的生长有着紧密联系^[27]。这两个表面标记物均可为后续

研究G-MSCs的迁移及其与胃癌细胞间的相互作用奠定基础。*CD45*和*CD34*均是造血干细胞表面标记物,*CD45*的阴性表达进一步说明所培养的细胞不具有造血干细胞特性。表面标记物*CD29*、*CD44*、*CD73*、*CD71*及内皮细胞表面标记物*CD31*表达情况与其他组织器官分离培养出的MSCs相似,初步证明培养的细胞为G-MSCs。

多向分化潜能是鉴定MSCs的主要指标之一^[28-29],本研究通过成骨分化和成脂分化探讨白来航鸡G-MSCs的多向分化潜能。结果表明,白来航鸡G-MSCs与其他来源的MSCs相似^[1-3,17-19],具有成骨分化和成脂分化能力。本研究中除了采用传统的贴壁培养进行体外成骨诱导实验外,还利用微粒体培养诱导白来航鸡G-MSCs成骨分化,结果显示微粒体培养能够诱导形成成骨组织块,但其成骨诱导率与贴壁培养相比并没有获得显著提高。以往有研究表明,立体培养可以模拟体内生长环境,提高MSCs的分化能力^[30],本研究中微粒体培养成骨效率不高可能是由微粒体培养的细胞成球后,球体内部细胞与成骨诱导液接触不到位,使微粒体培养的细胞与成骨诱导液之间的接触面积小于贴壁培养的接触面积造成的;也可能是由微粒体培养的细胞成球后其生物学性能发生改变引起的。

MSCs具有迁移能力,在利用MSCs进行疾病治疗时,MSCs的迁移能力决定治疗效果^[31-33]。以往鸡衍生的MSCs研究中很少对MSCs的迁移能力进行探讨,本研究利用细胞划痕和细胞小室两种实验方法验证白来航鸡G-MSCs的体外迁移能力。结果显示,白来航鸡G-MSCs在体外培养时,能够修复损伤部位,具有体外迁移能力。细胞迁移实验表明,白来航鸡G-MSCs的细胞特性与从人类及哺乳动物中分离培养的MSCs相似^[34-35]。

本研究成功从白来航鸡胃部分离出了MSCs并完成了相关鉴定,建立了适合白来航鸡G-MSCs的体外培养体系和鉴定方法,为构建禽类胃部衍生的MSCs库奠定了基础,也为骨组织工程、立体培养技术及消化系统修复提供了研究对象。

参考文献 (References)

[1] BARRY F, BOYNTON R E, LIU B, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 268(2): 189-200.
[2] BANAS A, TERATANI T, YAMAMOTO Y, et al. Adipose

tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2007, 46(1): 219-28.
[3] ROMANOV Y A, SVINTSITSKAYA V A, SMIRNOV V N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 105-10.
[4] LEE O K, KUO T K, CHEN W M, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood [J]. *Blood*, 2004, 103(5): 1669-75.
[5] ANKER P S I, SCHERJON S A, KLEIJBURG-VAN DER KEUR C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1338-45.
[6] NOUEBAKHSH N, TALEBI A, MOUSAVI B, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from dental pulp of exfoliated human deciduous teeth [J]. *Cell J*, 2008, 10(2): 101-8.
[7] ZHAO Z, LIAO L, CAO Y, et al. Establishment and properties of fetal dermis-derived mesenchymal stem cell lines: plasticity *in vitro* and hematopoietic protection *in vivo* [J]. *Bone Marrow Transpl*, 2005, 36(4): 355-65.
[8] CHAMBERLAIN G, FOX J, ASHTON B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2739-49.
[9] DING D C, SHYU W C, LIN S Z. Mesenchymal stem cells [J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(1): 5-14.
[10] BIANCO P. "Mesenchymal" stem cells [J]. *Annu Rev Cell Dev Bi*, 2014, 30: 677-704.
[11] MA S, XIE N, LI W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(2): 216-25.
[12] BARTHOLOMEW A, STURGEON C, NELSON M, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells have significant immunosuppressive activity [J]. *Exp Hematol*, 1999, 27(7): 123.
[13] MAHMOOD A, LU D, LI Y, et al. Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats [J]. *J Neurosurg*, 2001, 94(4): 589-95.
[14] 王守练, 俞继卫, 姬诺, 等. 骨髓来源间充质干细胞对胃癌细胞侵袭转移的影响及其机制探讨 [J]. *国际外科学杂志 (WANG S L, YU J W, JI N, et al. Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on invasion and metastasis of gastric cancer cells and its mechanism [J]. Int J Surg*, 2018, 45(4): 258-62.
[15] SHAMAI Y, ALPEROVICH D C, YAKHINI Z, et al. Reciprocal reprogramming of cancer cells and associated mesenchymal stem cells in gastric cancer [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(2): 176-89.
[16] KISIEL A H, MCDUFFEE L A, MASAOUD E, et al. Isolation, characterization, and *in vitro* proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum [J]. *Am J Vet Res*, 2012, 73(8): 1305-17.
[17] BAI C, HOU L, MA Y, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from chicken bone marrow [J]. *Cell Tissue Bank*, 2013, 14(3): 437-51.
[18] BAI C, LI X, HOU L, et al. Biological characterization of chicken mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord Wharton's jelly [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 376(1): 95-102.
[19] GAO Y, BAI C, XIONG H, et al. Isolation and characterization of chicken dermis-derived mesenchymal stem/progenitor cells [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013(14): 626258.

- [20] 田少囡, 候玲玲, 关伟军, 等. 北京油鸡肺间充质干细胞的分离培养及鉴定[J]. 生物技术通报(TIAN S N, HOU L L, GUAN W J, et al. Isolation, culture and identification of pulmonary mesenchymal stem cells in Beijing Fatty chicken [J]. Biotech Bull), 2011, 12(233): 139-45.
- [21] 张明凯, 李玉明, 蒋宏, 等. 人胃癌组织中间充质干细胞的生物学稳定性分析[J]. 中华临床医师杂志(电子版)(ZHANG M K, LI Y M, JIANG H, et al. The biological stability characteristics of mesenchymal stem cells from human gastric cancer research [J]. Chin J Clinicians, Electronic Edition), 2012, 6(16): 4603-6.
- [22] WILLIAMS A R, HARE J M. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease [J]. Circ Res, 2011, 109(8): 923-40.
- [23] PITTENGER M F, MARTIN B J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics [J]. Circ Res, 2004, 95(1): 9-20.
- [24] AL-NBAHEEN M, ALI D, BOUSLIMI A, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential [J]. Stem Cell Rev Rep, 2013, 9(1): 32-43.
- [25] MATIGIAN N, BROOKE G, ZAIBAK F, et al. Multipotent human stromal cells isolated from cord blood, term placenta and adult bone marrow show distinct differences in gene expression pattern [J]. Genom Data, 2015, 3: 70-4.
- [26] REGE T A, HAGOOD J S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis [J]. FASEB J, 2006, 20(8): 1045-54.
- [27] DALLAS N A, SAMUEL S, XIA L, et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(7): 1931-7.
- [28] LEE R H, KIM B C, CHOI I S, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue [J]. Cell Physiol Biochem, 2004, 14(4/5/6): 311-24.
- [29] MIAO Z, JIN J, CHEN L, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Cell Biol Int, 2006, 30(9): 681-7.
- [30] 梁瑜, 乔勇, 刘星志, 等. 三维成球培养优化间充质干细胞的研究进展[J]. 中国材料进展(LIANG Y, QIAO Y, LIU X Z, et al. Progress in optimization of mesenchymal stem cells by three-dimensional spheroid culture [J]. Materials China), 2020, 39(4): 278-86.
- [31] NAGAYA N, KANGAWA K, ITOH T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy [J]. Circulation, 2005, 112(8): 1128-35.
- [32] KRAMPERA M, PIZZOLO G, APRILI G, et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair [J]. Bone, 2006, 39(4): 678-83.
- [33] SOHNI A, VERFAILLIE C M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking [J]. Stem Cells Int, 2013: 130763.
- [34] XU F, SHI J, YU B, et al. Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas *in vitro* [J]. Oncol Rep, 2010, 23(6): 1561-7.
- [35] RUSTER B, GRACE B, SEITZ O, et al. Induction and detection of human mesenchymal stem cell migration in the 48-well reusable transwell assay [J]. Stem Cells and Dev, 2005, 14(2): 231-5.