

人胚胎干细胞建系及培养的研究进展

姜祖韵¹,袁毅君^{1,2},赵小立¹,张 铭¹

(1. 浙江大学生命科学学院,浙江 杭州 310012;

2. 天水师范学院生命科学与化学学院,甘肃 天水 741000)

[摘要] 人胚胎干细胞的培养是了解人胚胎发育机制和实现治疗性克隆的前提。在人胚胎干细胞建系和维持过程中,胚胎材料来源、内细胞团分离、扩增传代、冻存复苏等均为难点。从鼠源饲养层、人源饲养层到无饲养层培养系统的发展,以及体细胞核移植技术平台的建立,奠定了治疗性克隆的基础。

[关键词] 干细胞;胚胎;细胞分离;细胞培养;细胞系;综述文献

[中图分类号] R 394;Q 813 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2006)01-0108-05

人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, HES)是一类具有体内和体外发育多潜能性的细胞。由于人胚胎干细胞可以作为研究人类疾病的模型和治疗性克隆的工具,因此将广泛应用于人类发育生物学和医学治疗的研究,是21世纪生物医学的一个热点^[1-2]。至今为止,在美国NIH网站上,登记的HES细胞系一共有78株,其中只有11株HES系正常,可供后期实验使用(<http://stemcells.nih.gov/registry/>)。与MES相比^[3],由于HES在培养过程中存在增殖慢,培养条件和稳定性要求高,操作难,易污染,冻存复苏率低等问题,因此建立优化的培养系统,提供大规模培养HES的技术是利用HES的先决条件。现就HES建系及维持方法、胚胎材料来源、饲养层等与培养系统相关的最新研究进展进行综述。

1 人胚胎干细胞系的建立及维持

HES起源于体外受精卵发育到囊胚期的内细胞团(inner cell mass, ICM)。常规脱带去滋养层后,最终将ICM接种于饲养层上,7~10 d待克隆增殖后,初步分离ICM,再次接种于新鲜饲养层上,继续传代^[1]。由于HES的倍增时间一般需要24~72 h,因此5~10 d才能传代1次^[4]。建系之初五代是HES生长的“瓶颈期”,

之后HES增殖速度加快,生长活性增加^[5]。HES建系的标准包括体外传代的代数、克隆形成能力、核型、碱性磷酸酶(AKP)、特异性表面分子抗原(SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81),以及特异分子Oct-4、Nanog等^[1,4-5]。

常规HES的培养对血清的质量和批号要求很高,血清中许多不明的生长因子对于HES的自我更新具有决定性作用。为此,发展了无血清培养体系。在无血清培养体系中,血清替代物(serum replacement, SR)替换了血清,并添加4 ng/ml的碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),这使得培养过程更稳定,易操作。如果无bFGF, HES在2周内分化,这说明bFGF在HES的自我更新中有重要的作用。但是,在血清存在条件下, bFGF没有明显作用^[6]。至今没有单独利用血清替代物成功建系的报道,可能建系之初需要血清中的多种成分共同促进内细胞团的增殖并维持不分化状

收稿日期:2004-08-30 修回日期:2005-04-21

基金项目:浙江省重大项目(No:J 20020579-30116);湖州中心医院合作项目(No:H20010984-32536)。

作者简介:姜祖韵(1980—),女,硕士,从事细胞生物学研究。

通讯作者:张 铭(1949—),教授,博导,从事细胞生物学研究和教学;E-mail:zhangming_ls@zju.edu.cn

态。虽然LIF不能维持HES的未分化状态,但是多数建系的培养液中,仍然添加了至少1 000 U的LIF,用以维持HES的自我更新^[4]。

在HES的传代培养过程中,由于部分HES细胞自发分化,因此常利用机械法挑取不分化的HES细胞集落,将其划成小块传代^[1]。这种传代方法低效率,长耗时,费人力,易污染,只适合小规模HES培养^[7]。然而也有利用中性蛋白酶或胶原酶传代的^[5]。最近,哈佛Cowan等人成功建系的17个细胞株,在建系之初的五代利用机械划取法传代,但以后利用0.05%的胰酶/EDTA酶解成功传代,这种方法学上的改进,节省大量的时间和人力,推进了HES的大规模培养^[4]。

HES的冻存和复苏多数采用普通的梯度冻存方法,冻存液为10%DMSO,10%~90%的FBS,剩余成分为HES培养液^[4,8-9],高浓度的FBS对于HES的保护作用强。但是,常规冻存方法的复苏率很低,通常只有1%~10%。探索最佳的冻存复苏方法,仍旧是HES培养过程中的一个难点。另外,由于双抗对于HES细胞生长有一定影响,为防止污染的发生,建立合适的抗生素培养体系已成为大规模培养系统中的重要环节。

2 胚胎来源及其质量控制

从当前的研究来看,发育到囊胚期的新鲜优质胚胎成为获取HES的主要材料^[1,4,7-8]。李涛等人认为高质量的囊胚才可能得到生长快速的原代克隆并传代,建系机会高^[10]。但是,由于受到伦理学上的限制,不能获取足够新鲜的受精卵,严重阻碍了HES的建系和研究。临床上一般要选择形态和质量上级别最高的胚胎进行人体移植,以获得高的妊娠率,滞缓发育的胚胎通常丢弃。另外,每次取卵受精后,除了植入母体的胚胎外,多余的胚胎被冻存起来,以备今后之用,当冻存的胚胎不再需要时,也被丢弃。研究人员利用这些不良或者多余的胚胎也成功建立了HES系。胚胎来源的扩展,避免了伦理学的争论,为HES的建系提供了材料。

2.1 冷冻复苏胚胎 Richards等复苏体外受精后3 d冻存的8细胞胚胎,利用连续培养体

系,培养到囊胚期,成功建系^[11]。Park等复苏了20个冻存5年的卵裂期胚胎培养到囊胚,并复苏了20个囊胚期冻存的胚胎,分别建立了2个和7个HES细胞系^[12]。Cowan等人复苏了58个囊胚期冻存的胚胎,从中成功建成了5个HES细胞系;复苏了286个6~12个细胞期的胚胎,进一步培养到囊胚期,从中建立了12个HES细胞系^[4]。由此看来,复苏囊胚期胚胎建系的成功率比复苏卵裂期冻存胚胎体外培养到囊胚期再建系的成功率要高。

2.2 劣质胚胎 囊胚质量在IVF中是获得高妊娠率的关键,一般把囊胚分成6个等级,1级最好,6级最差。从3级囊胚开始,内细胞团细胞和滋养层细胞各自被再次分为ABC3个等级^[13]。Maisam等从19个胚胎中获得了4个HES细胞系,这4个细胞系均为级别在3CC或质量更差的囊胚中获得^[14]。在体外受精后,还常常可以得到1个或者3个原核(pronuclei, PN)的非整倍体受精卵,这些受精卵也不能用于植入体内。Suss等人培养了60个非整倍体受精卵,其中9个发育到囊胚期,去除透明带后,直接接种在鼠源饲养层上,6个贴壁,1个成功建立HES系^[15]。Cowan等人建系的17个细胞株,其中3个起源于即将丢弃的质量差的囊胚,4个起源于一般级别的囊胚^[4]。这显示了HES细胞系对囊胚的质量要求没有试管婴儿高,可以利用废弃的胚胎作为获得HES细胞的来源,以避免伦理学上的冲突。

2.3 体细胞起源胚胎 上海第二医科大学盛慧珍等利用体细胞核移植技术(somatic cell nuclear transfer, SCNT),将不同年龄人的体细胞核转移到兔子的去核卵细胞中,在体外进一步培养后,成功建立了具有自我更新和分化能力的HES细胞系^[16]。卢光琇等人成功地将人供体细胞核注射到人成熟卵母细胞中,卵母细胞激活后,去除雌原核而保留体细胞核,经过体外培养后,有少量核移植胚发育到囊胚阶段^[17],准备进一步建立HES细胞系。韩国Hwang等人也利用SCNT技术,将体细胞核移植到人卵母细胞中,成功建立HES细胞系^[18]。这为治疗性克隆的实现提供了技术平台。

3 饲养层共培养系统

在体外细胞培养过程中,有的细胞其生长和分化需要另一类细胞提供环境和生长因子,即饲养层细胞(feeder layer cells)。胚胎干细胞的饲养层是指与胚胎干细胞共培养时,能模拟体内附着环境,分泌各种因子,维持胚胎干细胞自我更新状态的一类细胞。一般是经过丝裂霉素C或 γ 射线处理过后,失去分裂能力的单层细胞。

3.1 小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)饲养层 MEF是最常用的HES的饲养层细胞^[1,4-6]。MEF能分泌LIF等多种细胞因子,LIF可以维持MES不分化状态,但是LIF对HES没有很大的作用^[1],所以现在还不确切知道MEF分泌的哪一类生长因子在维持HES的自我更新。制作MEF的小鼠品系可能也有关系,多数文献报道利用远交系或杂交系的小鼠成功建系和维持HES生长,例如CD^[1]、ICR^[4]、昆明鼠^[5]、C57/BL6 $\times$ 129/Sv等^[7]。HES一旦建系后,可能对建系所用的MEF品系具有一定的依赖性,因此保证MEF的稳定性在HES培养过程中非常重要。但是由于MEF直接起源于小鼠胚胎,可能带来异种蛋白或成为污染源,造成不易获得纯净HES。

3.2 STO饲养层 STO细胞是小鼠成纤维细胞株,唯一1例HEG细胞系是利用STO作为细胞系建系的,并具有不可替代性,这可能与STO分泌某种特殊的生长因子有关^[2]。韩国利用丝裂霉素C处理的STO细胞系作为饲养层,已经建立了来源于体外受精后的新鲜囊胚^[19]和冻存复苏受精卵生长到囊胚期的胚胎的HES系^[12]。STO是一个永久细胞系,比MEF更具有可操作性和稳定性。但是由于STO长期传代,变异性高,因此其分泌细胞因子的能力可能下降。

3.3 人源饲养层 为了能在细胞治疗中应用HES,必须建立一个无鼠源的培养体系,用于防止小鼠饲养层带来的各种病毒和支原体等交叉污染。Richards利用起源于MEF的HES系,成功维持在人胚胎肌肉细胞(human fetal muscle, FM)、胚胎表皮细胞(fetal skin, FS)和成人输卵管上皮细胞(human adult fallopian tubal

epithelial cell, AFT)上,已超过20代。同时还利用14周流产胎儿的FM和人血清替换鼠源饲养层和胎牛血清,添加胰岛素-转铁蛋白-硒G补充成分(insulin-transferrin-selenium G supplement),成功建立了1株HES细胞系,这种培养体系减少了鼠源污染发生的可能,为大规模培养HES和直接应用于临床奠定了基础^[11]。

Amit等人利用胎牛血清,血清替代物和人血清培养分别建立了人包皮细胞系,维持了42代以上。用其作为饲养层,添加血清替代物,成功传代HES 57代^[9]。随后,Hovatta等利用商品化的人包皮成纤维细胞系作为饲养层,从5个囊胚中建立了2个HES细胞系^[20]。这些HES细胞系和起源于MEF的细胞系没有发现存在任何差异。这说明利用人包皮成纤维细胞系完全可以替代MEF,作为HES的饲养层细胞,既避免了鼠源的污染,也比MEF更稳定。Cheng等人利用辐照后的人骨髓基质细胞(human marrow stromal cells, hMSCs)在无血清条件下对HES进行扩增培养,传代13代后仍然维持单一表型、分化潜能和正常核型,能表达SSEA-4、Oct-4等分子标记^[21]。

3.4 无饲养层培养系统 利用饲养层培养有其局限性,比如饲养层细胞和HES之间相互复杂的作用会掩盖外源因子对HES的作用,而饲养层细胞也可能由于逃避生长抑制而污染HES。另外,两种细胞的存在使得对HES体外增殖和分化发育的生化特性及分子生物学机制的分析变得复杂。为了克服这种局限性,发展了非饲养层培养体系,从而能大规模地培养HES,加快其临床应用。Xu等利用Matrigel和层粘连蛋白(laminin)作为外源胞外基质,添加MEF条件培养液,实现了无饲养层培养HES,增殖了130倍^[22]。Amit等人最近利用层粘连蛋白作为胞外基质,添加15%SR,以及TGF β 、LIF和bFGF等多种生长因子,建立了HES无动物培养系统^[23]。

4 展望

实现HES的成功建系和大规模培养后的临床应用,首先需要大量的胚胎。伦理学的限制,使得人胚胎的获得成为难点。以前的研究表

明囊胚质量越好建系越容易成功,但是研究者尝试用质量不好的胚胎也成功建系,开阔了胚胎材料来源的途径。但是在发育过程中,以这种方式获得的 HES 细胞系是否和正常起源的 HES 细胞系完全一样,还有待今后的研究验证。利用体细胞核移植技术建立 HES 细胞系的成功为治疗性克隆的实现提供了技术平台,但是异种细胞核移植,是否会改变其发育过程,尚待肯定。另外, HES 的培养过程和 MES 的培养过程相比,仍旧烦琐复杂,操作不便,还需进一步明确维持 HES 自我更新的分子机制,探索最佳的传代和冻存方法,建立并推广成熟的 HES 无饲养层无血清培养系统。这些努力将会为 HES 临床上的广泛应用铺平道路。

References:

- [1] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. **Science**, 1998, 282: 1 145—1 147
- [2] SHAMBLOTT M J, AXELMAN J, WANG S P, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1998, 95: 13 726—13 731.
- [3] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. **Nature**, 1981, 292: 154—156.
- [4] COWAN C A, KLIMANSKAYA I, MDMAHON J, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts [J]. **N Engl J Med**, 2004, 350(13): 1 353—1 356.
- [5] HE Zhi-xu, HUANG Shao-liang, LI Yu, et al (何志旭, 黄绍良, 李 予, 等). Human embryonic stem cells preliminarily established in China [J]. **Chin Med J** (中华医学杂志), 2002, 82(19): 1 314—1 318. (in Chinese)
- [6] AMIT M, CARPENTER M K, INOKUMA M S, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture [J]. **Dev Biol**, 2000, 227: 271—278.
- [7] REUBINOFF B E, PERA M F, FONG C Y, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro [J]. **Nat Biotechnol**, 2000, 18(4): 399—404.
- [8] LANZENDORF S E, BOYD C A, et al. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines [J]. **Fertil Steril**, 2001, 76(1): 132—137.
- [9] AMIT M, MARGULETS V, SEGEV H, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells [J]. **Biol Reprod**, 2003, 68(6): 2 150—2 156.
- [10] LI Tao, MAI Qing-yun, ZHOU Chan-quan, et al (李 涛, 麦庆云, 周灿权, 等). Studies on the clonal growth and passage of human embryonic stem cells [J]. **Acta Anatomica Sinica** (解剖学报), 2003, 34(6): 652—656. (in Chinese)
- [11] RICHARDS M, FONG C Y, CHAN W K, et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells [J]. **Nat Biotechnol**, 2002, 20(9): 933—936.
- [12] PARK S P, LEE Y J, LEE K S, et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers [J]. **Hum Reprod**, 2004, 19(3): 676—684.
- [13] GARDNER D K, LANE M, STEVENS J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer [J]. **Fertil Steril**, 2000, 73(6): 1 155—1 158.
- [14] MITALIPOVA M, CALHOUN J, SHIN S, et al. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos [J]. **Stem cells**, 2003, 21(5): 521—526.
- [15] SUSS-TOBY E, GERECHT-NIR S, AMIT M, et al. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote [J]. **Hum Reprod**, 2004, 19(3): 670—675.
- [16] CHEN Y, HE Z X, Liu A, et al. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes [J]. **Cell Res**, 2003, 13(4): 251—263.
- [17] HWANG W S, RYU Y J, PARK J H, et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst [J]. **Science**, 2004, 303(5664): 1 669—1 674.
- [18] LU Chang-fu, LIN Ge, XIE Chang-qing, et al.

(陆长富, 林戈, 谢常青, 等). The establishment of human somatic cloned embryo [J]. **Chin Sci Bull (科学通报)**, 2003, 48(17): 1 844—1 847. (in Chinese)

[19] PARK J H, KIM S J, OH E J, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell lines [J]. **Biol Reprod**, 2003, 69(6):2 007—2 014.

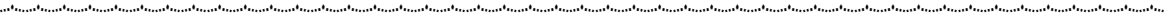
[20] HOWATTA O, MIKKOLA M, GERTOW K, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells [J]. **Hum Reprod**, 2003, 18(7):1 404—1 409.

[21] CHENG L, HAMMOND H, YE Z, et al. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture [J]. **Stem Cells**, 2003, 21(2):131—142.

[22] XU C H, INOKUMA A, M S, DENHAM J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. **Nat biotechnol**, 2001, 19:971—975.

[23] AMIT M, SHARIKI C, MARGULETS V, et al. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells [J]. **Biol Reprod**, 2004, 70(3):837—845.

[责任编辑 黄晓花]



浙江大学申报 2005 国家自然科学基金项目获得可喜成绩

2005 年我校在国家自然科学基金项目的申报工作中成绩显著,共批准各类基金项目 324 项,批准经费 9 847 万元;其中面上项目 300 项,批准经费 7 270 万元;重点、重大项目 10 项,批准经费 1 880 万元;专项基金 6 项,批准经费 77 万元;杰出青年基金 5 项,批准经费 500 万元;海外及港澳青年学者合作基金 3 项,批准经费 120 万元。可喜的是,我校在保持近几年国家自然科学基金项目批准经费数持续增长的同时,今年在面上项目批准项数、批准经费数名列全国第二位,重点项目批准数达到 10 项。