



明胶铺底培养人胚胎干细胞的初步研究

李扬*, 林昌盛*, 王莉*, 刘英, 牟晓宁, 马跃, 李凌松†

北京大学干细胞中心, 北京 100191;
北京市妇产医院生殖医学中心, 北京 100026;
中国科学院生物物理研究所, 北京 100101

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: lingsongli@bjmu.edu.cn

2009-06-29 收稿, 2009-08-19 接受

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB943603, 2006CB503905)和科技部国际合作项目(批准号: 20070192)资助

摘要 基质胶是人胚胎干细胞的无饲养层培养体系中常规使用的包被材料, 但其价格昂贵同时不方便使用. 本文研究了明胶作为替代包被材料的可能性. 结果表明, 明胶能够维持经胰蛋白酶消化的人胚胎干细胞的未分化状态. 生长在明胶上的胚胎干细胞表达多能性标志物, 具有畸胎瘤形成能力同时维持正常核型. 对在明胶上培养了 10 代的人胚胎干细胞进行检测, 结果显示这些细胞仍然表达高水平的 Oct4. 同时, 与基质胶上生长的人胚胎干细胞相比, 明胶上生长的人胚胎干细胞能够形成相似大小和数量的碱性磷酸酶阳性集落($P>0.05$), 同时生长在两种包被材料上的人胚胎干细胞含有相似比例的 SSEA-4 阳性细胞(95.1% vs 94.3%, $P>0.05$). 这个基于明胶的培养方法可能会帮助我们低成本地对人胚胎干细胞进行大规模扩增

关键词

人胚胎干细胞
明胶
基质胶
无饲养层培养
多能性

人胚胎干细胞用于治疗人类疾病的前景广阔^[1,2]. 一个低成本高效同时便于操作的培养体系对于无分化扩增人胚胎干细胞进行再生治疗至关重要^[3]. 因为 hESC 需要锚定生长才能形成集落, 因此有必要寻找既像基质胶那样能够有效支持 hESC 生长, 同时又费用较低的包被材料^[4-8].

在培养液中添加有高浓度碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的条件下, 人们已经检测到几种类型的基质能够效率不同地支持人胚胎干细胞的无分化生长^[4-7]. 层黏连蛋白和基质胶支持 hESC 生长的效果比较好, 但是胶原的支持作用却不好^[4,7-11]. 如果在纤黏连蛋白上生长, hESC 在种植后很短的时间内就会发生分化^[5,8,11]. 此外还有其他研究检测了其他的底物, 如人血清、小鼠成纤维细胞的细胞外基质和合成材料支持 hESC 自我复制的作用^[7,10,12-14].

明胶能够支持小鼠胚胎干细胞的不分化生长, 也是与上述所有包被材料相比最为经济的一种材料. 但研究表明, 明胶并不支持经胶原酶消化后的 hESC 的生长^[11]. 由于明胶中含有胶原酶的底物, 我们猜测这可能是由于胶原酶作用的结果.

为了证实上述猜测, 本文研究了明胶是否能够支持胰蛋白酶而非胶原酶消化后的 hESCs 的长期扩增.

1 材料和方法

() 人胚胎干细胞系 PUSC-1 的建立和培养. 冷冻胚胎来源于临床上进行体外受精患者的捐赠, 胚胎的使用获得患者知情同意并且得到北京大学伦理委员会批准. 胚胎培养到囊胚阶段, 免疫手术法分离内细胞团^[15], 并接种到丝裂霉素 C 灭活的小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上. 人胚胎干细胞培养基包括

引用格式: 李扬, 林昌盛, 王莉, 等. 明胶铺底培养人胚胎干细胞的初步研究. 科学通报, 2009, 54: 2813-2818

Li Y, Lin C S, Wang L, et al. Maintenance of human embryonic stem cell on gelatin. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0630-4

80% Knock-out DMEM (Gibco), 20%的血清替代品 (Gibco), 0.1 mmol/L β -巯基乙醇(Gibco), 1%非必需的氨基酸(Hyclone), 2 mmol/L 谷氨酰胺(Hyclone), 4 ng/mL 人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) (Sigma). 人胚胎干细胞进行传代用 1 mg/mL 胶原酶 (Gibco) 37 $^{\circ}$ C 消化 10~15 min, 然后接种到新鲜制备的饲养层上, 每天换液, 5~7 d 传代一次.

() 制备条件培养基. 小鼠胚胎成纤维细胞 (2~5 代)经丝裂霉素 C 处理后胰酶消化接种到 60 mm 的培养板上, 培养基为高糖的 DMEM (Hyclone), 添加 10%胎牛血清(Hyclone), 2 mmol/L 谷氨酰胺(Hyclone). 待细胞贴壁后, 换入人胚胎干细胞培养基. 24 h 后, 收集培养基即为条件培养基, 再换入新鲜人胚胎干细胞培养基, 每天收集, 收集 7~10 天. 条件培养基在用于培养人胚胎干细胞之前另加入 4 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子. 收集的条件培养基 4 $^{\circ}$ C 可以保存一周, -20 $^{\circ}$ C 可以存放 2 个月.

() 底物铺底. 基质胶(Becton Dickinson)按 1 : 20 稀释到预冷的 Knock-out DMEM 中然后铺到培养板上, 室温放置 1 h. 0.1%明胶(Sigma)铺到培养板上室温放置 1 h. 在接种人胚胎干细胞前将基质胶和明胶溶液吸出.

() 人胚胎干细胞从饲养层上转移到基质胶或明胶上. 将饲养层上连续培养 65 代的 PUSC-转移到基质胶或明胶包被的培养板上. 基质胶转移用胶原酶 进行消化, 明胶转移用胰酶消化. 处理方法如下: 1 mg/mL 胶原酶 37 $^{\circ}$ C 消化细胞 10~15 min, 培养基中用吸管吹打成小细胞团块, 接种于基质胶包被的培养板上; 0.05%胰酶消化细胞 1~2 min 后, 吸管吹打成小块接种于 0.1%明胶包被的培养板上.

() 免疫荧光与化学法染色. 以下抗体 SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Sox2 (Chemicon), Nanog, SSEA-1, SSEA-3, Oct-4 (Santa Cruz Biotechnology)用于人胚胎干细胞的免疫荧光检测. 细胞经 4%多聚甲醛固定, 10%山羊血清室温封闭 30 min, 然后一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 小鼠或兔血清用于阴性对照. PBS 洗 3 遍, 小鼠或兔的荧光二抗室温避光孵育 1 h. PBS 洗 3 遍后荧光镜下观察染色结果.

碱性磷酸酶检测采用细胞化学法, 4%多聚甲醛固定细胞, 加入碱性磷酸酶缓冲液(100 mmol/L

Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl₂, pH 9.5)洗 1 遍, 与 NBT/BCIP 染色液(Roche)室温下避光孵育至着色满意时, 用 PBS 冲洗终止. 以细胞着色为蓝色或紫蓝色为阳性.

() 核型分析. 秋水仙素处理细胞 3~4 h, 胰酶消化并重悬于 0.075 mol/L KCL, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 然后固定液(甲醇 : 冰醋酸 = 3 : 1)固定 5 min, 离心固定重复 3 次. 收获细胞, 利用标准的 G 显带技术及相关软件分析染色体配对.

() 畸胎瘤. 人胚胎干细胞经胶原酶 消化, 离心, 沉淀, 用 PBS 悬浮, 用 1 mL 注射器将细胞悬液注入严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠后腿肌肉内. 4~6 周后可见小鼠腿部有肿块长出, 肿瘤组织经固定, 石蜡包埋, 切片并用苏木精伊红染色进行观察.

() 免疫印迹分析 Oct4 的表达. 在基质胶和明胶传至第 10 代的人胚胎干细胞用蛋白裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.5%脱氧胆酸钠, 1% NP-40)裂解. 20 mg 裂解蛋白用 10%聚丙烯酰胺凝胶分离, 转移到硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉封闭, 4 $^{\circ}$ C 一抗过夜. TBST (20 mmol/L Tris- HCl, pH 7.6, 136 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 洗膜后与 IRDye700 或 800-连接的荧光二抗室温孵育 1 h, 然后通过 Li-Cor Odyssey 成像系统进行显影.

() 流式细胞分析. 基质胶和明胶上传至 12 代的人胚胎干细胞胰酶消化成单细胞悬液, 与 PE 标记的 SSEA-4 抗体(eBioscience) 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 小鼠 IgG2b-PE 被用作同型对照. 细胞染色用 FACS caliberTM 流式细胞仪的 CellQuest 软件进行分析.

() 统计分析. 所有数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm SD$)表示. 采用 SPSS 软件 *t* 检验用于组间比较. $P<0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 人胚胎干细胞系 PUSC-1 的建立及鉴定

6 个胚胎由行体外受精治疗不孕症的夫妇捐赠, 并签署了知情同意书. 通过免疫手术法分离内细胞团, 最终得到一个人胚胎干细胞系 PUSC-1. 由于初始细胞较少, 所以在前 5 代用机械分离法传代, 随后细胞数量增多, 再用胶原酶 进行传代. 高倍镜下显

示这些细胞具有明显的核仁,且胞核与胞浆的比率高。PUSC-1 与以前报道的人胚胎干细胞不仅在形态学上极为相似,而且还表达特异性多潜能标志物(图 1(a)~(k)). PUSC-1 在体外连续传 70 代保持未分化状态,同时保持正常的染色体核型(46, XX)(图 1(l)). PUSC-1 注入到 SCID 小鼠后腿肌肉内可以形成畸胎瘤,畸胎瘤切片苏木精伊红染色结果显示畸胎瘤包含有 3 个胚层来源的组织细胞(图 1(m)~(p)).

2.2 明胶上生长的人胚胎干细胞的鉴定

人胚胎干细胞用胶原酶 或胰酶消化分别传到基质胶或明胶包被的培养板上,第 2 天观察细胞大部分贴壁,随后几天细胞克隆不断长大。从形态上看,在明胶上生长的细胞克隆与基质胶上生长的十分相似(图 2(a)和(b)),但比在饲养层上生长的(图 2(c))看

起来要扁平一些。随后,我们从标志物、核型分析及体内多潜能方面对生长在明胶上的人胚胎干细胞进行鉴定。在明胶上生长的人胚胎干细胞克隆碱性磷酸酶染色阳性(图 2(d)),表达 Oct4, Sox2 和 SSEA-4(图 2(e)~(g));并且传 15 代后仍保持正常的核型(图 2(h));细胞在 SCID 小鼠体内可以形成具有三胚层组织细胞的畸胎瘤(图 2(i)~(l)).

2.3 明胶和基质胶培养人胚胎干细胞的比较

通过检测人胚胎干细胞 Oct4, 碱性磷酸酶和 SSEA-4 的表达,比较明胶和基质胶上培养人胚胎干细胞的增殖能力。免疫印迹实验结果表明,在明胶和基质胶上生长的人胚胎干细胞都表达 Oct4, 并且表达量无明显差异(图 3(a)). 人胚胎干细胞经胶原酶 或胰酶消化分别接种到基质胶或明胶包被的培养板

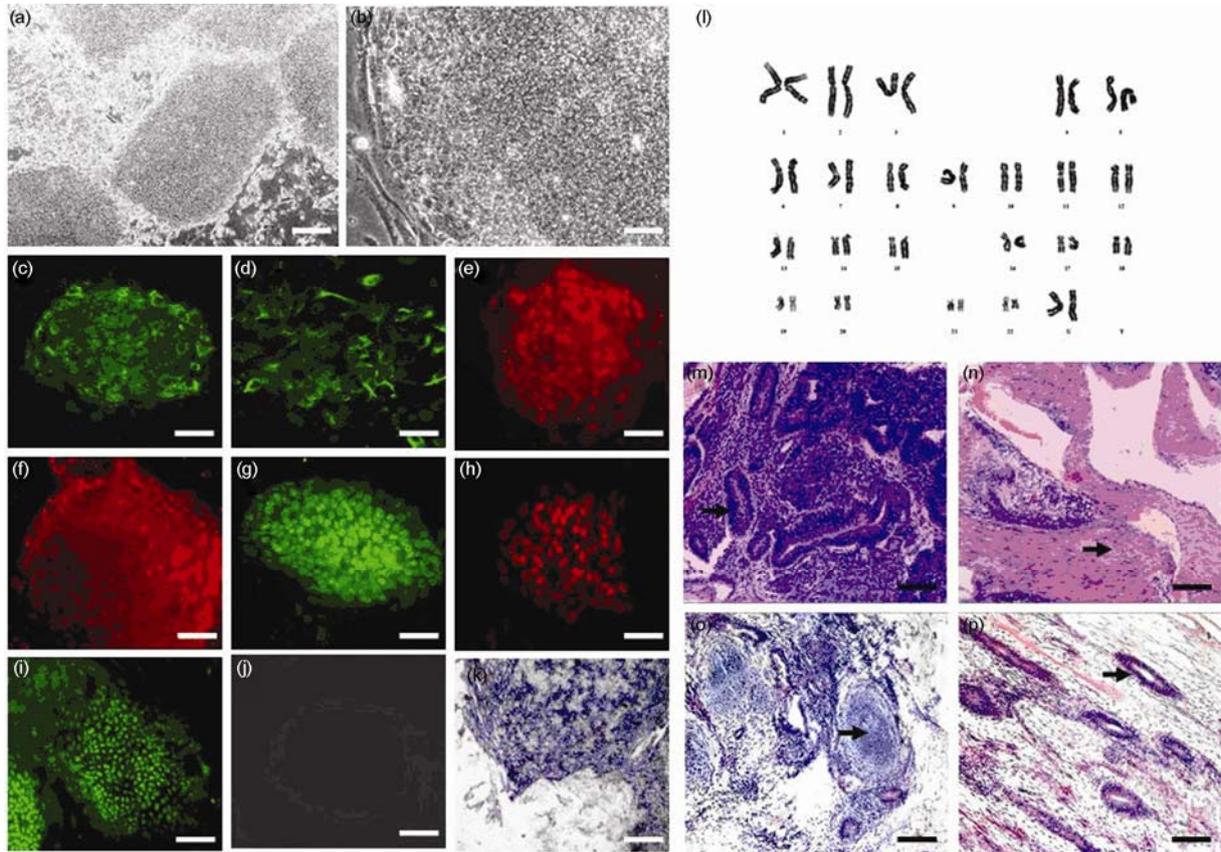


图 1 胚胎干细胞系 PUSC-1 的鉴定

(a) PUSC-1 在低倍镜下呈现相对扁平的克隆; (b) 在高倍镜下克隆中单个细胞具有明显的核仁, 并且胞核与胞浆的比率高未分化的人胚胎干细胞表达 SSEA-3(c), SSEA-4(d), Tra-1-60(e), Tra-1-81(f), Oct4(g), Nanog(h), Sox2(i), 但不表达 SSEA-1 (j); 未分化的细胞还高表达碱性磷酸酶(k); PUSC-1 保持正常的 46, XX 核型(l); 细胞注入 SCID 小鼠后腿肌肉所形成的畸胎瘤包含三胚层来源的组织细胞, 包括神经管(m)、肌肉(n)、软骨(o)及管腺状组织(p)

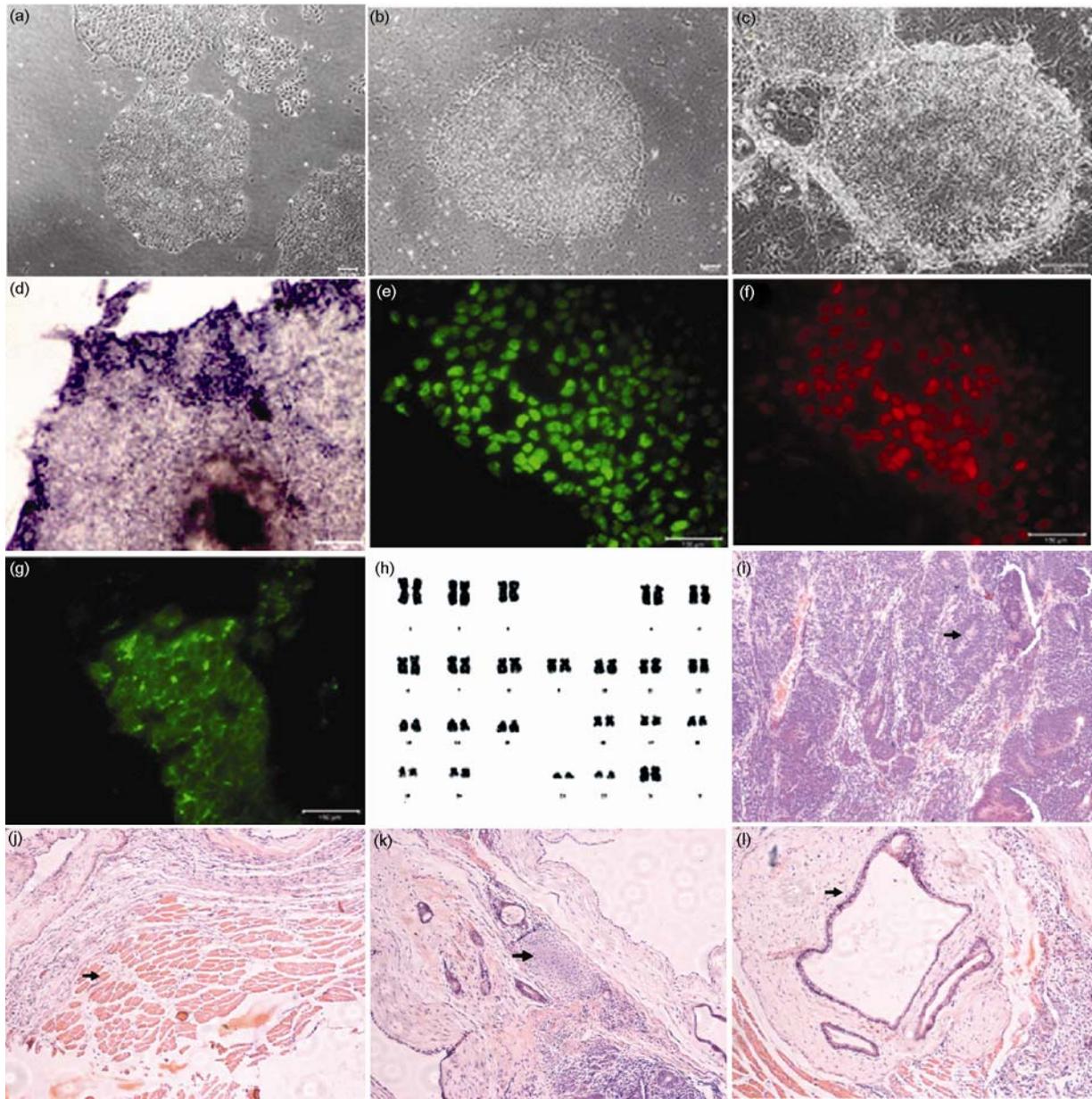


图2 PUSC-1 维持在明胶上的特性

在明胶上生长的细胞克隆(a)与基质胶上生长的细胞克隆(b)十分相似, 但比在饲养层上生长的细胞克隆(c)看起来要扁平一些. 细胞表达碱性磷酸酶(d)、Oct4(e)、Sox2(f)和 SSEA-4(g), 并且传 15 代后仍保持正常的核型(h); 细胞在 SCID 小鼠体内可以形成具有三胚层组织细胞的畸胎瘤, 包括神经管(i)、肌肉(j)、软骨(k)及管腺状组织(l)

上, 培养 5~6 d 后用碱性磷酸酶染色, 并在 200 倍显微视野下对碱性磷酸酶阳性的克隆进行计数. 如图 3(b)所示, 在两种基质上培养的碱性磷酸酶阳性克隆无论在大小上还是数目上都无明显差别($P > 0.05$). 同时我们通过流式细胞仪量化了两种基质上人胚胎干

细胞 SSEA-4 的阳性率, 结果表明, 在明胶和基质胶上的人胚胎干细胞 SSEA-4 阳性率分别为 94.3%和 95.1%, 二者之间无明显差别($P > 0.05$) (图 3(c)).

2.4 明胶支持 H-1 人胚胎干细胞的不分化生长

H-1 人胚胎干细胞用胰酶消化后传到明胶包被

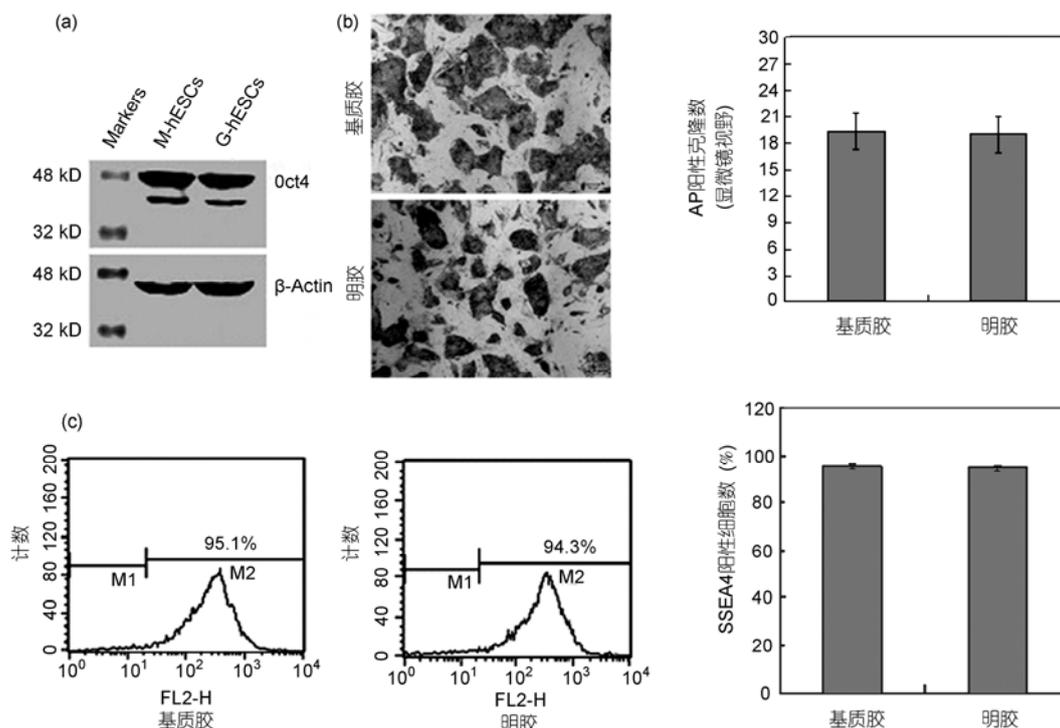


图3 明胶上和基质胶上的人胚胎干细胞特性的比较

(a) 免疫印迹实验结果表明, 在明胶和基质胶上生长的人胚胎干细胞都表达高水平的 Oct4; (b) 在两种基质上培养的碱性磷酸酶阳性克隆无论在大小上还是数目上都无明显差别($P>0.05$); (c) 在明胶和基质胶上的人胚胎干细胞 SSEA-4 阳性率分别为 94.3%和 95.1%, 二者之间无明显差别($P>0.05$)

的培养板上. 在明胶上生长的 H-1 人胚胎干细胞克隆的形态扁平(图 4(a)). 这些克隆碱性磷酸酶染色呈阳性(图 4(b)), 表达 Oct4, Sox2 和 SSEA-4(图 4(c)~(f)); 并且传 20 代后仍保持正常的核型(图 4(f)).

3 讨论

为临床研究进行的任何大规模扩增 hESC 的尝试中, 一个限定的低成本高效的培养体系都会是第一个无法或缺的目标^[3]. hESC 锚定生长并形成单一的集落样形态, 因此目前的扩增方法都会围绕基质的使用^[4-6]. 本研究发现, 胰蛋白酶消化后, 明胶能够支持 hESCs 的长期不分化生长. 与基质胶上生长的 hESCs 相比, 明胶上生长的 hESCs 表达相似水平的 Oct4, 形成相似大小和数目的 AKP 阳性集落, 同时含有相似比例的 SSEA-4 阳性细胞.

虽然基质胶常规应用于 hESCs 的无饲养层培养, 除了它的小鼠肉瘤来源引发的安全问题, 这种材料昂贵的价格也很大程度地限制了 hESCs 的大规模生

产. 与基质胶相比, 明胶是细胞培养中广泛应用的包被材料. 虽然它是动物来源的, 但是根据世界卫生组织(World Health Organisation, WHO)和欧盟健康消费者保护总署(The European Commission for Health and Consumer Protection)的规定, 明胶被认为是一种健康安全的食物 <http://www.gelatine.org/en/gelatinesafety/682.htm>. 同时, 明胶用做包被材料的成本仅为基质胶的万分之一.

本研究成功地在明胶包被的培养皿中维持了人胚胎干细胞 PUSC-1 和 H1 hESCs. 但是, 之前的研究认为, 胶原酶 消化后, hESCs 无法在明胶上生长^[11]. 究其原因, 我们认为明胶作为不可逆的水解胶原形式, 很可能是胶原酶 的底物.

我们还需要进一步的研究证实明胶用于临床大规模扩增 hESCs 包被材料的可行性. 但是, 这个基于明胶的培养方法为以科学研究为目的的大规模扩增 hESCs 提供了帮助.

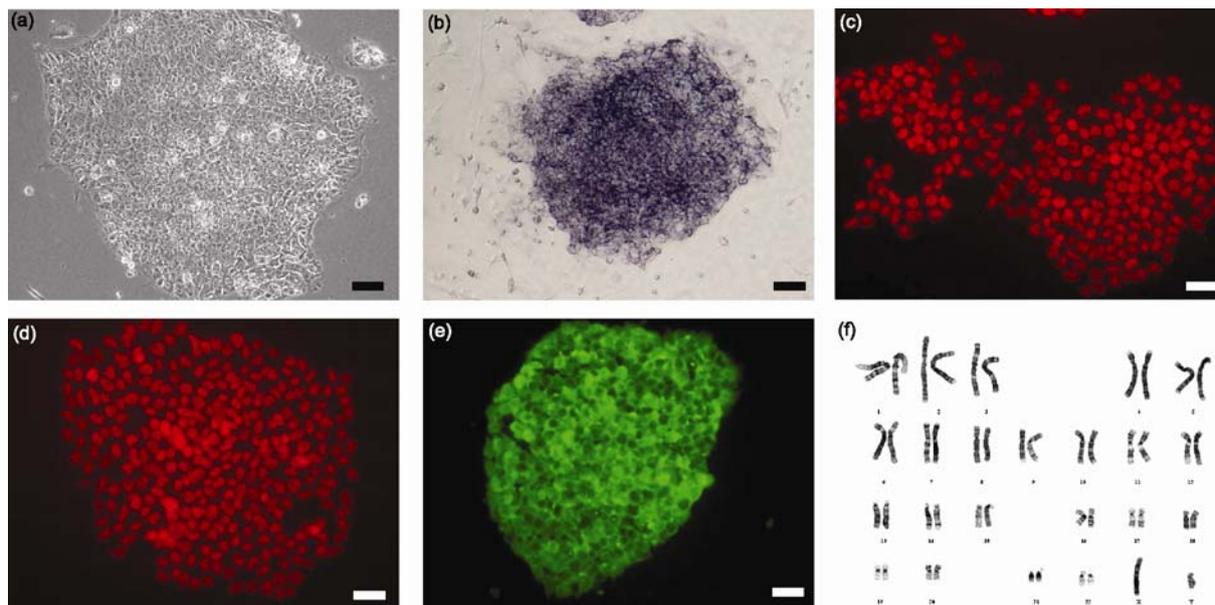


图4 人胚胎干细胞系 H1 维持在明胶上的特性

(a) H1 胚胎干细胞克隆在明胶上生长的形态. 在明胶上生长的 H1 胚胎干细胞克隆表达碱性磷酸酶(b), Oct4(c), Sox2(d)和 SSEA-4(e), 并且传 20 代后仍保持正常的核型(f)

参考文献

- 1 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: 399—404[doi]
- 2 Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145—1147[doi]
- 3 Bongso A. RMaFCY. From human embryos to clinically compliant embryonic stem cells: Blastocyst culture, xeno-free derivation and cryopreservation, properties and applications of embryonic stem cells. Singapore: World Scientific Publishing, 2005
- 4 Rosler E S, Fisk G J, Ares X, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn*, 2004, 229: 259—274[doi]
- 5 Amit M, Shariki C, Margulets V, et al. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 2004, 70: 837—845[doi]
- 6 Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 2004, 10: 55—63[doi]
- 7 Xu R H, Peck R M, Li D S, et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods*, 2005, 2: 185—190[doi]
- 8 Brimble S N, Zeng X, Weiler D A, et al. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev*, 2004, 13: 585—597
- 9 Beattie G M, Lopez A D, Bucay N, et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells*, 2005, 23: 489—495[doi]
- 10 Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, et al. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet*, 2005, 365: 1636—1641[doi]
- 11 Xu C, Inokuma M S, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 971—974[doi]
- 12 Stojkovic P, Lako M, Przyborski S, et al. Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23: 895—902[doi]
- 13 Yim E K, Leong K W. Proliferation and differentiation of human embryonic germ cell derivatives in bioactive polymeric fibrous scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2005, 16: 1193—1217[doi]
- 14 Li Y J, Chung E H, Rodriguez R T, et al. Hydrogels as artificial matrices for human embryonic stem cell self-renewal. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 79: 1—5
- 15 Solter D, Knowles B B. Immunotherapy of mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72: 5099—5102[doi]