

·技术研究·

无动物源性成分人胚胎干细胞培养体系与其它人胚胎干细胞培养体系的比较

张 丹, 麦庆云, 李 涛, 徐艳文, 丁晨辉, 宏苹苹, 曾艳红, 周灿权^{1*}

(中山大学附属第一医院生殖中心, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】通过比较 hESC 在各培养体系中未分化表面标记物及以多能性因子的表达, 进一步筛选出更优化、安全有效的 hESC 培养体系。【方法】四种培养体系分别为: 新建立的无动物源性的人包皮饲养层(XF-HFF)联合成分确定培养基(CDM)的无动物源性培养体系(XF-HFF/CDM), 对照组为 XF-HFF 联合添加了 200 mL/L 人血清(HS)的培养基的培养体系(XF-HFF/HS), HS 包被的培养皿联合 CDM 的无饲养层培养体系(HS-Matrix/CDM), 以及传统的人包皮饲养层(XC-HFF)联合添加了 200 mL/L 血清替代物(KSR)的培养基的培养体系。通过观察克隆形态、细胞计数、免疫荧光、流式细胞术、荧光定量 PCR, 来比较 4 种 hESC 培养体系中的细胞增殖率、未分化表面标记物和多能性因子的表达情况, 以及 hESC 在 XF-HFF/CDM 培养体系中长期培养后, 对其未分化状态、多能性和染色体完整性的检测。【结果】在几种培养体系中, 同一代次的 hESC 表达 SSEA-4, TRA-1-60, Oct3/4 和 hTERT 的情况在 XF-HFF/CDM 组和 XC-HFF/KSR 组中相似($P > 0.01$), 且均高于其它两组培养体系($P < 0.01$)。hESC 在 XF-HFF/CDM 培养体系中长期培养超过 40 代次, 仍能表达 hESC 未分化表面标记物 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 及多能性因子 hTERT, Oct3/4, 在 SCID 小鼠体内能分化成含 3 个胚层的畸胎瘤, 以及保持完整的二倍体核型。【结论】新构建的完全无动物源性的 hESC 培养体系的培养效率与传统添加 KSR 的培养体系相似, 且优于相同 CDM 下的无饲养层培养体系以及相同饲养层下的含人血清的干细胞培养条件。

关键词: 人胚胎干细胞; 无外源性成分; 成分确定; 比较; 培养

中图分类号: R329.2*8

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)06-0828-07

Comparison of A Novel Xeno-free Culture System with Other Different Culture Systems for HESC

ZHANG Dan, MAI Qing-yun, LI Tao, XU Yan-wen, DING Cheng-hui, HONG Ping-ping, ZENG Yan-hong,

ZHOU Can-quan^{*}

(Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】 By comparing the undifferentiated and pluripotent marks of hESC in four different culture systems to evaluate and promote more optimal hESC culture environment. 【Methods】 The four culture systems consist of xeno-free human foreskin fibroblasts (XF-HFF) combined with chemically-defined medium (CDM) (XF-HFF/CDM group), XF-HFF combined with 200 mL/L HS medium (XF-HFF/HS group), HS-matrix coated on plates without feeder layers combined with CDM (HS-matrix/CDM group), and xeno-contained human foreskin fibroblasts (XC-HFF) combined with 200 mL/L KSR medium (XC-HFF/KSR group). The culture efficiencies were evaluated by morphology, cell growth curve, flow cytometry and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) among these culture systems. Further more, we characterized the stemness of hESC after long-term culture in XF-HFF/CDM culture system. 【Results】 The rates of characteristic surface undifferentiated markers (SSEA4, Tra1-60) and proliferate factors (hTERT, Oct3/4) expression of hESC cultured in XF-HFF/CDM were significantly higher than which in XF-HFF/HS and in HS-matrix/CDM ($P < 0.01$), but were comparable to which in XC-HFF/KSR. After long-term cultured in XF-HFF/CDM,

收稿日期: 2012-07-14

基金项目: 国家“863”项目(2005AA219010); 国家“973”项目(2007CB948103)

作者简介: 张丹, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 生殖医学, E-mail: guangzhoudandan@163.com; * 通信作者: 周灿权, 博士生导师, 教授, 研究方向: 生殖医学, E-mail: zhoucanquan@hotmail.com

hESC still expressed surface undifferentiated markers of SSEA3, SSEA4 and pluripotent markers of hTERT, Oct3/4, and maintained pluripotency and karyotype stability, over 40 passages. 【Conclusion】 The new xeno-free culture conditions demonstrated similar culture efficiency to KSR medium with HFF, and were more effective than CDM with HS-matrix, or HS medium with HFF.

Key words: human embryonic stem cell; xeno-free; chemically-defined medium; comparison; culture

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6):828-834]

人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 不仅为基础研究提供了独特的模型, 而且在细胞移植治疗方面存在巨大的应用前景。但是, 培养系统中动物源性成分以及不明确成分的使用, 使得 hESC 的应用与研究受到了根本性的限制。饲养层培养体系中的饲养层细胞为 hESC 的生长提供了一个理想的微环境: 一方面通过分泌粘附因子和产生细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 促进 hESC 的贴壁, 另一方面通过分泌各种生长因子如 bFGF (basic fibroblast growth factor)、TGF β (transforming growth factor β)、Noggin、SCF (stem cell factor)、LIF (leukemia inhibitory factor) 等, 促进 hESC 的增殖和抑制其自主分化^[1-3]。而且对饲养层细胞的条件培养基进行高通量筛选分析, 有望逐步明确由饲养层细胞分泌的对干细胞生长起着各种作用的各种细胞因子^[4-5]。而无饲养层培养体系在各个实验室和细胞系之间的培养结果并不一致^[6-7]。但是, 人血清与动物血清一样, 含有的未知因子有可能诱导 hESC 的分化或死亡, 并且不利于明确 hESC 培养成分。所以, 建立一个稳定的、无动物源性且成分确定的 hESC 培养体系是目前努力的方向。本研究中使用无动物源性的人包皮饲养层 (xeno-free human feeder cells, XF-HFF) 以及商品化的成分确定干细胞培养基 (chemically-defined medium, CDM) 将饲养层细胞和成分确定培养基的优点相结合, 构建了一个新的完全无动物源性的 (xeno-free, XF) hESC 培养体系。通过两个 hESC 系在该培养体系以及其它培养体系中形态学、增殖情况、分化率、克隆形成率和未分化表面标记物、多能性的表达等方面的比较, 来评估我们构建的这个无动物源性干细胞培养体系的安全性和有效性, 为 hESC 的基础研究及临床应用提供更为安全有效的培养方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

hESC-1 和 hESC-2 为本实验室已建立并鉴定

的两个人胚胎干细胞系; 小儿包皮来自于中山大学附属第一医院小儿外科的包皮环切手术; 人血清来自于 AB 型的健康献血男性; 废弃胚胎来自于本生殖中心的 IVF-ET (in vitro fertilization and embryo transfer) 患者; 严重免疫缺陷 (severe combined immune deficiency, SCID) 小鼠购自中山大学实验动物中心。以上材料均获得患者的知情同意以及中山大学伦理委员会的批准。

1.2 人血清的制备

按照 Ellerstrom 等^[2]描述的方法, 选择同型血型的健康男性捐赠的血液, 储存于 4~8℃。经 1000 $\times$ g 8 min 离心后取上清血清, 并经灭火、分装, 储存与 -20℃ 备用。

1.3 XF-HFF 的制备及培养

无菌条件下取包皮环切术后的小儿包皮, 按照 Ellerstrom 等^[2]描述的方法使用 100 mL/L HS-DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen) 制备及培养完全无动物源性的人包皮成纤维细胞。一般采用 15 代之内的 XF-HFF 作为饲养层。将灭活的 XF-HFF 细胞以 1.5×10^4 cell/cm² 的密度接种到细胞培养皿 (Falcon) 中, 临用前换成 CDM 干细胞培养液。对照组 HFF 为使用含 100 mL/L Fetal Bovine Serum (FBS) 培养基培养的同一个个体的包皮饲养层 (xeno-contained HFF, XC-HFF)。

1.4 HS-Matrix 包被培养皿的准备

在细胞培养皿中铺上约 0.5 cm 厚度的 HS, 室温下放置 1 h 后将培养皿中的 HS 全部吸走后, 在室温下再干燥 1 h, 然后放 4℃ 冰箱保存备用。

1.5 几种干细胞培养体系的组成

将在传统的含 200 mL/L 血清替代物 (knockout serum replacement, KSR) (Invitrogen) 培养体系 (XC-HFF/KSR) 中建立的两个干细胞系 hESC-1, hESC-2, 在传代至 25 代次时分别转移至不同的培养条件: 新建立的 XF-HFF 联合 CDM (HEScGRO, Chemicon) 的无动物源性培养体系 (XF-HFF/CDM), 对照组为 XF-HFF 联合 200 mL/L HS-Knockout-DMEM (Invitrogen) 的培养体

系(XF-HFF/HS),以及用 HS 包被的培养皿联合 CDM 的无饲养层培养体系(HS-Matrix/CDM)。

1.6 各培养系统中 hESC 的生长曲线

hESC 在各培养体系中继续培养至第 6 代,以相同的密度(4×10^4 /皿)接种于各自培养体系中,每隔 2 d 取每个培养体系中的 3 个皿进行计数。连续计数 3 个代次。

1.7 流式细胞术测定 hESC 在几种培养体系中 SSEA-4, TRA-1-81 的表达

用 TrypLE Select (Invitrogen) 将 hESC 消化成单个细胞,并确定活细胞数>95%。用预冷的 PBS-100 mL/L 羊血清-sodium azide 重悬细胞,计数细胞密度约 $1 \sim 5 \times 10^6$ /L。用 EP 管每管分装约 100 μ L 的细胞重悬液,加入一抗 SSEA-4 或 TRA-1-81(1:100 Chemicon),室温下孵育 30 min,用 PBS 洗 3 次,加入 Alexa-488 (Invitrogen) 标记的相应二抗,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20~30 min。用 PBS 再次洗 3 次,细胞重悬于预冷的 PBS-30g/L BSA-sodium azide 中,立即上机。

1.8 荧光定量 PCR 检测 Oct3/4 和 hTERT 的表达

参照总 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Total RNA Kit, Qiagen, Valencia, CA) 的说明,提取总 RNA。然后用 DNA-Free DNase (Ambion) 处理提取的 RNA。核酸蛋白紫外分析仪检测 RNA 的质量和浓度。使用 ABI 7500 全自动荧光定量 PCR 仪,选择 real-time quantity Taq-Man one step RT-PCR 反应体系进行检测:48 $^{\circ}$ C 条件下 RT30min;95 $^{\circ}$ C 10 min 激活 Amplitaq gold polymerase;95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min,扩增 40 个循环。Oct 3/4 的上游引物序列为 (NM-002701)5' GAAACCCACACTGCAGCAGA3', 下游引物序列 5' CACATCCTTCTCGAGCCCA3', 探针序列为 FAM-5' CAGCCACATCGCCCAGCAGC3'

-TAM。hTERT 和 18S 的引物和探针从 Applied Biosystems 购买。利用 $\Delta\Delta CT$ 法,相对定量,将目的基因的表达与看家基因 18S 的表达对比。实验完毕后,将结果导入 Excel 中进行数据分析。

1.9 免疫荧光检测 hESC 表面未分化抗原

吸去培养液,用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,40 g/L 多聚甲醛液固定 20 min 后,1 mL/L Triton X100 打孔 10 min (Sigma-Aldrich)。然后用 100 mL/L 山羊血清室温下封闭 30 min。分别加入一抗(SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81; Chemicon),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入 Alexa488 标记的羊抗人的对应二抗 (Invitrogen),室温下孵育 1 h。加入 DAPI (Sigma-Aldrich) 染核 5 min,荧光显微镜下观察结果 (Nikon, Eclipse TE-2000 U fluorescence microscope)。

1.10 RT-PCR 检测 hESC 多能性因子的表达

用 Trizol 试剂法从 106 个 ESC 中提取总 RNA,反转录试剂盒反转录得 cDNA 第 1 链。经 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳分析目标基因的表达。hTERT (sense)5' CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA3', hTERT (antisense)5' GAACAGTGCCTTCACCCTCGA3', Nanog (sense)5' GATCGGGCCCCGCCACCATGAGTGTGGA TCCAGC TTG3', Nanog (antisense)5' GATCGAGC TCCATCTTCACACGTCTTCAGGTTG3', Oct3 / 4 (sense)5' GAAGGTATTACGCCAAAC3', Oct3 / 4 (antisense)5' CTTAATCCAAAAACCCTGG3', GAPDH (sense)5' GTCAGTGCTGGACCTGACCT3', GAPDH (antisense)5' CACCACCCTGTTGCTGTAG C3'。PCR 条件为:95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.11 体内多向分化潜能的检测

细胞用胶原酶消化,离心,沉淀,以 PBS 悬浮,浓度约 1×10^6 mL⁻¹,用 1 mL 注射器将细胞悬液注入 SCID 小鼠后腿肌肉内,每侧 0.1 mL (约 1×10^6 个

表 1 hESC 在 XF-hESC 培养体系与其它培养体系中形成率及分化率的比较

Table 1 Culture efficacy of XF-HFF/CDM condition and other culture condition on the survival and differentiation rates of hES cells-1 after transferred 40 passages

Group	Colony formation rate (%) ¹⁾	Differentiation rate (%) ²⁾
XF-HFF/CDM(P ₂₅₊₆)	91.25 $\pm$ 2.22	6.00 $\pm$ 1.83
HS-Matrix/CDM(P ₂₅₊₆)	26.5 $\pm$ 2.08 ³⁾	85.00 $\pm$ 3.60 ³⁾
XF-HFF/HS(P ₂₅₊₆)	77.75 $\pm$ 2.21 ³⁾	86.00 $\pm$ 3.37 ³⁾
XC-HFF/KSR(P ₂₅₊₆)	93.75 $\pm$ 2.22	5.50 $\pm$ 2.02

1) Number of hES cell colonies / total number of hES cell colonies; 2) Number of hES cell colonies with partial or whole differentiation / total number of hES cell colonies; 3) $P < 0.01$, control groups versus new culture condition group.

细胞)。10~12 周后可见小鼠腿部有肿块长出,16 周后处死小鼠,将肿瘤组织用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,普通 HE 染色后显微镜下观察。

1.12 核型分析

用 0.4 μg/mL 秋水仙素处理培养第 3 天的 hESC 3 h, 用玻璃针挑取 hESC 集落, 经 2.5 g/L TrypLE Select 消化成单个细胞后, 常规空气干燥法制片, Giemsa 染色。

1.13 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件包计算,对计量资料进行 *t* 检验,对多组定量资料的比较用方差分析,对率的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 hESC 形态学上的观察比较

两个 hESC 系 hESC-1, hESC-2 分别在培养至 25 代时,由原来的 XC-HFF/KSR 培养体系转移至其它各培养体系。在转换至 XF-HFF/CDM 培养体系后的前 3 代, hESC 未达到稳定培养, 克隆形成率低, 分化率高(表 1)。但是经过挑选未分化克隆进一步传代后, 第 5 代开始克隆形成率及未分化形态(图 1A)与在 XC-HFF/KSR 培养体系中的 hESC 克隆基本相似(图 1B), 即显微镜下多个细胞聚集在一起形似鸟巢, 克隆边界清楚, 细胞折光性强, 核质比高。目前两个 hESC 系在 XF-HFF/CDM 培养体系中传代超过 40 代, 形态基本保持不变, 增殖速度恒定, 约 6~7 d 传代一次。两个 hESC 系从 XC-HFF/KSR 培养体系转换到含人血清的 XF-HFF/HS 培养体系以及无饲养层的 HS-Matrix/CDM 培养体系中后, 两组观察到了相似的生长现象, 即克隆贴壁率下降(表 1), 贴壁的克隆变薄, 细胞排列较松散, 核质比降低, 而且大部分分化, 继续

表 2 流式细胞术检测 SSEA-4 和 TRA-1-60 的表达
Table 2 FACS Analysis for SSEA-4 and TRA-1-60

	of hESC-1	
	SSEA-4/%	TRA-1-60/%
XF-HFF/CDM(P ₂₅₊₆)	92.55 ± 2.15	92.7 ± 0.75
XF-HFF/HS (P ₂₅₊₆)	72.1 ± 1.49	72.3 ± 1.3
Matrix-HS/CDM(P ₂₅₊₆)	75.3 ± 2.20	64.4 ± 1.04
XC-HFF/KSR(P ₂₅₊₆)	97.7 ± 1.22	98.7 ± 0.55

传至 6 代后大部分克隆已基本分化(图 1C,D)。

2.2 几种培养体系中 hESC 的生长曲线

hESC 在各培养体系中继续培养至第 6 代, 在 XF-HFF/CDM 和 XC-HFF/KSR 培养体系中, hESC 呈典型的倍增增殖生长曲线, 两组的增殖速率接近。但 XF-HFF/HS 和 HS-Matrix/CDM 培养体系中的 hESC 一直保持低的增殖速率, 且在第 6 代后几乎不再增殖(图 2)。

2.3 流式细胞术检测 hESC 表达未分化表面标记物

对转移培养体系后培养至第 6 代次的每组 hESC 进行 3 次重复流式细胞术检测, 流式细胞术检测 hESC 表面未分化标记物 SSEA-4 和 TRA-1-60 的表达量, 在 XF-HFF/CDM 和 XC-HFF/KSR 培养体系中标记物的阳性率均高于在 XF-HFF/HS 和 HS-Matrix/CDM 培养体系中标记物的阳性率, 差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 2, 图 3)。

2.4 荧光定量 PCR 检测 4 组培养体系中 hESC 表达多能性因子 hTERT, Oct3/4 的情况

采用单因素方差分析分别比较两种因子在 4 组之间的差异, $F(hTERT) = 8.318, P < 0.01$; $F(Oct3/4) = 27.107, P < 0.01$, 因此可以认为 4 组培养体系中的 hESC 在 hTERT 及 Oct3/4 的表达上有差别。进一步采用 LSD-*t* 比较两种多能性因子

表 3 不同代次 hESC-1 在 XF 培养体系中表达 hESC 表面未分化标记物的情况

Table 3 Long-term validation of morphology and marker expression in hESC-1 cultured on xeno-free human foreskin fibroblast and in chemical defined medium system

Passage	Morphology	SSEA-3	SSEA-4	Tra-1-60	Tra-1-81
3	Differentiated	-	-	-	-
6	Undifferentiated	+	+	+	+
15	Undifferentiated	+	+	+	+
21	Undifferentiated	+	+	+	+
33	Undifferentiated	+	+	+	+

+: > 90% of the cells are positive; -: < 5% of the cells are positive.

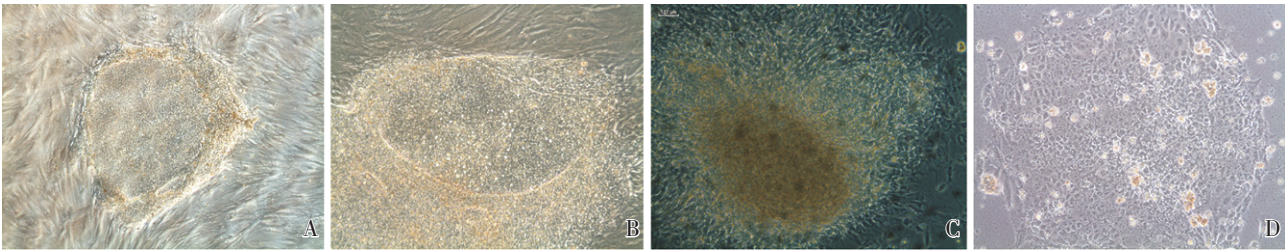


图 1 hESC 在四种培养体系中的形态

Fig.1 Comparison of the morphology of hESC -1 cultured on different four culture systems

A: On XF-HFF in CDM medium after 40 passages, $\times 5$; B: On XC-HFF in KSR medium after 40 passages, $\times 10$; C: On XF-HFF in HS medium after 5 passages, $\times 10$; D: On HS-Matrix in CDM medium after 5 passages, $\times 20$.

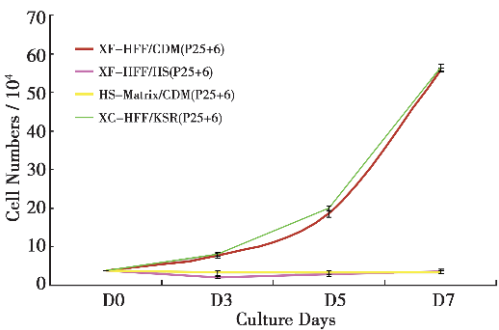


图 2 几种培养体系中 hESC 的生长曲线

Fig.2 Growth curve analysis of hESC cells cultured in four different condition

在各组间的表达差异。结果显示,四组间 hTERT、Oct3/4 的相对表达量,XF-HFF/CDM 组与 XC-HFF/KSR 组之间的差异没有统计学差异 ($P > 0.01$), XF-HFF/HS 组 HS-Matrix/CDM 组之间的差异也没有统计学差异 ($P > 0.01$), 但 XF-HFF/CDM、XC-HFF/KSR 两组的相对表达量高于 XF-HFF/HS、HS-Matrix/CDM 两组, 其差异均有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 4)。

2.5 hESC 在 XF 培养体系中长期传代后相关干细胞特性的鉴定

hESC 在新的培养体系中前 3 代次没有检测到 SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 及 Tra-1-81 的表达或表达强度较弱; 培养至 6 代后可以检测到 hESC 各未分化表面标记物为阳性(表 3)。hESC 继续传代 40 代次后,免疫荧光及 RT-PCR 分别检测其仍能表达各种 hESC 未分化表面标记物以及多能性因子。将 XF-hESC 培养体系中传代 42 代次的 hES 细胞注入 SCID 小鼠体内,经过 2 个月后形成了包括三个胚层组织的畸胎瘤。对其核型的检测证实 hESC 在 XF 培养体系中经长期传代后,仍

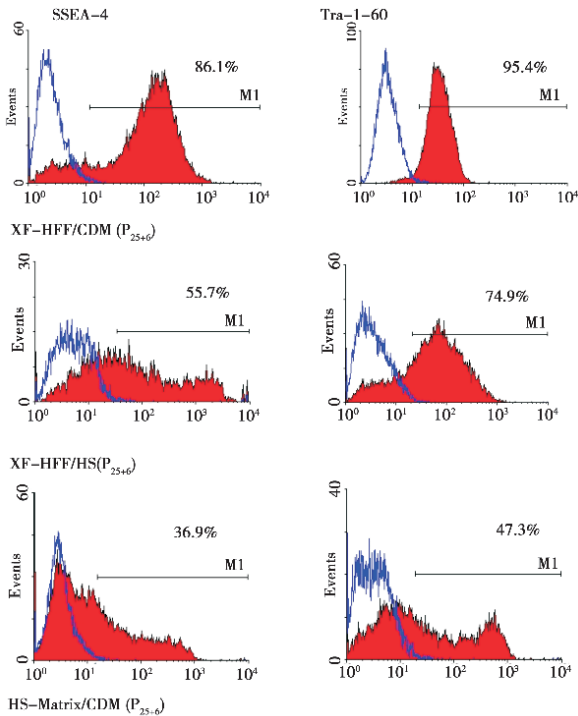


图 3 流式细胞术比较各个培养体系中 hESC 表达 SSEA-4 和 Tra-1-60 的情况

Fig.3 Cells cultured in different condition were analyzed on day 6 by fluorescence-activated cell sorting for SSEA-4 and TRA-1-60

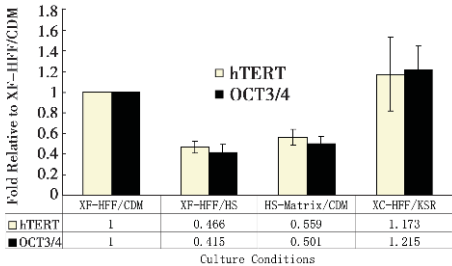


图 4 荧光定量 PCR 检测各培养体系中 hTERT 和 Oct3/4 的表达情况

Fig.4 qRT-PCR TaqMan analysis of hTERT and Oct3/4 expression in human embryonic stem cells maintained in various condition

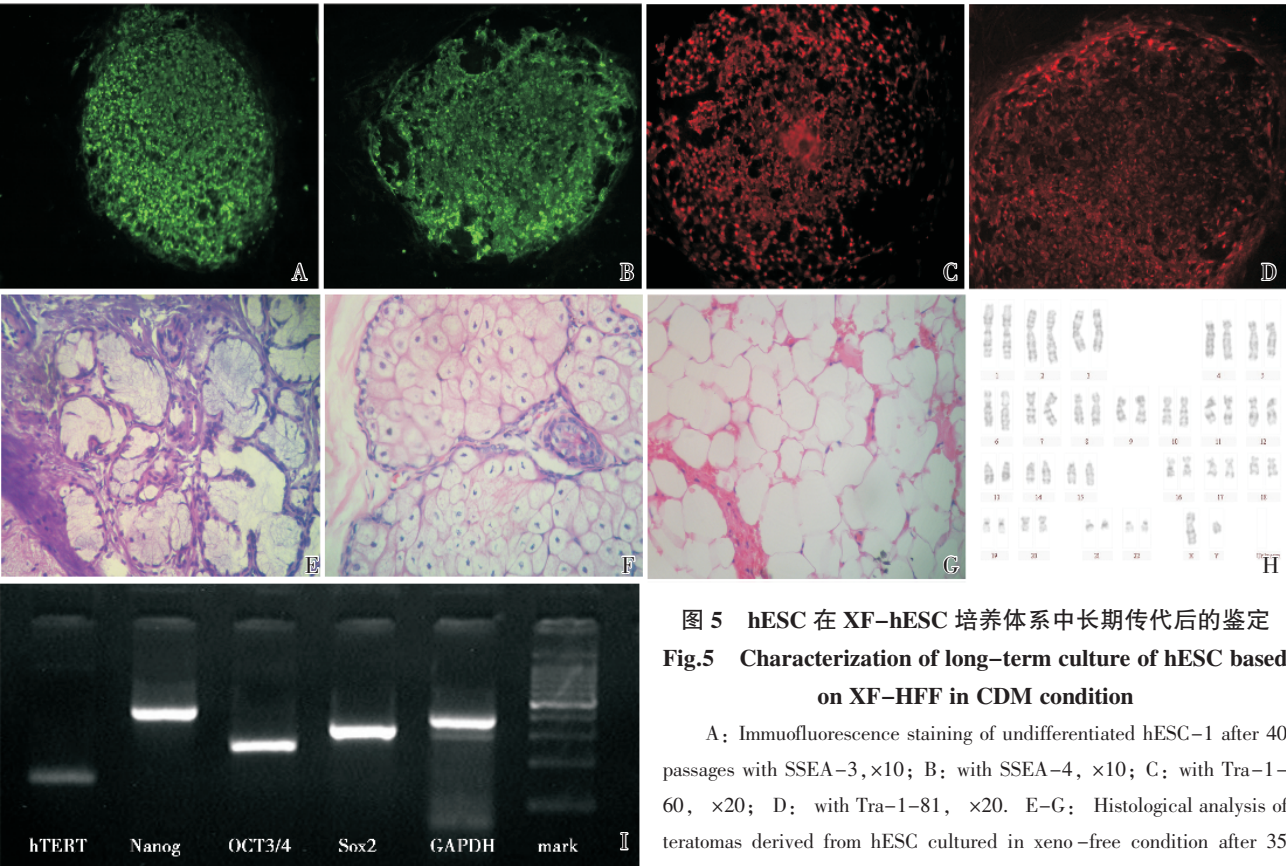


图 5 hESC 在 XF-hESC 培养体系中长期传代后的鉴定
Fig.5 Characterization of long-term culture of hESC based on XF-HFF in CDM condition

A: Immunofluorescence staining of undifferentiated hESC-1 after 40 passages with SSEA-3,×10; B: with SSEA-4, ×10; C: with Tra-1-60, ×20; D: with Tra-1-81, ×20. E-G: Histological analysis of teratomas derived from hESC cultured in xeno-free condition after 35 passages. E: gut-like epithelium (endoderm), ×20; F: sebaceous gland (ectoderm), ×20; G: adipose tissue (mesoderm), ×20; H: Diploid normal karyotype of hESC after 40 passages; I: RT-PCR analysis demonstrating undifferentiated hESC grown on XF condition (passage 40) maintained expression of undifferentiated cell markers. PCR products obtained using primers specific for Oct3/4, hTERT, SOX2, Nanog and GAPDH genes

保持正常的二倍体核型(图 5)。

3 讨 论

近年来,许多研究者已经在优化 hESC 培养体系上取得了诸多进展,但在去除动物成分、明确作用机制和提高培养效率之间仍难以做到各项兼顾。尽管饲养层与血清一样,被认为是影响研究 hESC 自我更新机制的因素,但是饲养层细胞为成分确定培养基的研究提供了基础^[7]。目前的研究已提示多种与饲养层有关的信号通路参与了 hESC 多能性的维持。例如饲养层细胞分泌多种生长因子,包括 FGFs、TGF、activinA、Wnt3、BMP 拮抗信号等等。这些因子通过相互协同作用,可以维持 hESC 在 feeder-free 培养体系中的未分化生长。有研究对饲养层细胞的条件培养基中蛋白成分进行高通量筛选分析,发现由饲养层细胞分泌了对细胞生长起着各种作用的上百种细胞因子,其中就

包含了对维持 hESC 自我更新与多能性的其关键性作用的这些因子^[8-9]。虽然成分明确的无饲养层培养体系是较理想的符合临床标准的培养体系,但大多数无饲养层培养体系仍未达到真正完全无动物源性(如 Matrigel 和 BSA 的使用)^[10-12],而且其安全性和有效性还有待进一步证实^[13]。因此我们认为,饲养层在优化培养体系中仍具有不可替代的优势。

饲养层培养体系中添加 KSR 的培养基被证实是目前最有效的维持 hESC 自我更新与增殖的培养基^[14]。有研究认为一些商品化的无动物源性培养基或者血清替代成分以及人血清都不能达到与传统的 KSR 相似的 hESC 培养效率^[15]。也有研究者证实用人血清作为基质胶构建的无饲养层培养体系^[16],具有支持 hESC 长期未分化生长的能力。但人血清的成分不明确以及批次的不稳定使其在不同实验室的研究结果相差甚远。我们的研究发现用人血清作为基质胶或者作为 hESC 培养

基都不能很好地支持 hESC 的生长。

既往研究提示^[17],能维持 hESC 未分化状态的胎儿包皮成纤维细胞饲养层,其 bFGF、gremlin (BPM4 的抑制物)和 ECM 成分物质的表达都要高于不能维持 hESC 未分化状态的胎儿肺成纤维饲养层。因而可以认为,饲养层支持干细胞生长的能力很大程度上与其自身的分泌与黏附功能密切相关。本研究中使用 CDM 的饲养层体系较无饲养层体系有更好的维持 hESC 未分化状态和多能性的能力,同样也提示饲养层培养体系中可能有更完善的因子或信号通路^[18-19]。

我们观察到在含 KSR 的培养体系中建立的两个 hESC 系,最终能够在无动物源性培养体系中传代超过 40 代次,但需要经历一个逐步适应的过程,表现为在转换条件后的前 3 代左右有较高的分化背景。而在 Lu 等的研究中^[7],hESC 可以直接适应无饲养层培养体系中条件培养基(CM)和成分确定培养基(CDM)之间的转换。这种差别可能与我们使用不同的培养体系或干细胞系有关,也可能是由于血清替代物和成分确定培养基所含的细胞因子不同而激活或抑制的信号通路不同所致。另外有研究显示,分化细胞的存在可以通过引起其它未分化 ESCs 的分化或凋亡而导致培养体系中未分化 ESCs 的消减^[20],减少分化细胞的存在从而促进 ESCs 维持未分化的状态。因而推测 XF 培养体系中 hESC 逐渐恢复未分化状态也可能与我们挑选未分化克隆进行传代,而减少了分化克隆的存在有关。

hESC 在体外长期传代后,会发生核型的变异,这可能与 hESC 在体外培养环境中受不适宜的因子或信号刺激有关^[21-22]。本研究中两个 hESC 系转换至新构建的 XF 培养体系中继续传代超过 40 代次,仍保持正常核型以及 hESC 的基本生物学特性,说明构建的这个培养体系是维持 hESC 体外生长较适宜安全的培养条件。

参考文献:

- [1] Amit M, Margulets V, Segev H, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(6): 2150-2156.
- [2] Ellerstrom C, Strehl R, Moya K, et al. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(10): 2170-2176.
- [3] Amit M, Itskovitz-Eldor J. Feeder-free culture of human embryonic stem cells [J]. *Methods Enzymol*, 2006, 420: 37-49.
- [4] Lim JW, Bodnar A. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells [J]. *Proteomics*, 2002, 2(9): 1187-1203.
- [5] Prowse AB, Mcquade LR, Bryant KJ, et al. A proteome analysis of conditioned media from human neonatal fibroblasts used in the maintenance of human embryonic stem cells[J]. *Proteomics*, 2005, 5(4): 978-989.
- [6] Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(4): 489-495.
- [7] Lu J, Hou R, Booth CJ, et al. Defined culture conditions of human embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(15): 5688-5693.
- [8] Brimble SN, Zeng X, Weiler DA, 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[J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(6): 585-597.
- [9] Draper JS, Smith K, Gokhale P, et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(1): 53-54.
- [10] Lu J, Hou R, Booth C J, et al. Defined culture conditions of human embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(15): 5688-5693.
- [11] Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, et al. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 568-574.
- [12] Liu Y, Song Z, Zhao Y, et al. A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346(1): 131-139.
- [13] Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(2): 185-187.
- [14] Koivisto H, Hyvarinen M, Stromberg AM, et al. Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor [J]. *Reprod Biomed Online*, 2004, 9(3): 330-337.
- [15] Rajala K, Hakala H, Panula S, et al. Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic

(下转第 847 页 to page 847)