

·临床研究·

## 携带 $\alpha$ -地中海贫血基因人胚胎干细胞系的建立

麦庆云, 邓捷, 彭文林, 庄广伦, 周灿权\*  
(中山大学附属第一医院生殖中心, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】建立携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因人胚胎干细胞系。【方法】收集经胚胎种植前遗传学诊断技术诊断为携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的囊胚,机械法分离内细胞团,用无血清培养基进行人胚胎干细胞培养,建立携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的人胚胎干细胞系。对所得人胚胎干细胞进行 $\alpha$ -地中海贫血基因的DNA序列分析与全能性鉴定。【结果】本研究共收集44枚PGD筛查后囊胚,分离12个囊胚内细胞团,建立两株人胚胎干细胞系。两株人胚胎干细胞系均携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因。两株胚胎干细胞系均有正常的染色体核型、OCT-4基因与细胞表面抗原SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60与TRA-1-80的表达,能够向三胚层细胞分化。【结论】携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的人胚胎干细胞具有向三胚层细胞分化的全能性,携带致病基因的胚胎可用于建立携带遗传疾病基因的人胚胎干细胞系。

**关键词:**人类胚胎干细胞;  $\alpha$ -地中海贫血; 多能性

**中图分类号:** R321-33      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2009)05-0551-05

### Establishment of Human Embryonic Stem Cell Lines Carrying with $\alpha$ -Thalasimia Gene

MAI Qing-yun, DENG Jie, PENG Wen-lin, ZHUANG Guang-lun, ZHOU Can-quan\*  
(Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To establish human embryonic stem cell lines carrying with  $\alpha$ -thalasimia gene. 【Methods】  $\alpha$ -Thalasimia homozygote affected blastocysts were collected from preimplantation genetic diagnosis (PGD) treatment cycles and the inner cell masses were isolated by mechanical method. Serum-free culture medium was used in the cultivation of human embryonic stem cells.  $\alpha$ -thalasimia genes of two embryonic stem cell lines were confirmed by DNA sequence analysis. The pluripotency of two embryonic stem cell lines were identified. 【Results】 In this study, we collected 44 blastocysts carrying with  $\alpha$ -thalasimia gene and established two embryonic stem cell lines. Both embryonic stem cell lines are  $\alpha$ -thalasimia homozygote affected and retained the property of pluripotent cells. Two cells lines had normal karyotypes and expressed transcription factor OCT-4, stage specific expressed antigen-4 (SSEA-4), SSEA-3, TRA-1-60, and TRA-1-80. Both ES cell lines kept the capability to differentiate to the cells and tissues derived from three germ layers. 【Conclusions】 Embryonic stem cells carrying with  $\alpha$ -thalasimia gene retained pluripotency. Embryos affected with disease gene can be used for isolation of human embryonic stem cell lines carrying with inherited disease gene.

**Key words:** human embryonic stem cells;  $\alpha$ -thalasimia; pluripotency

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(5): 551-555; 576]

人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC)具有无限增殖及多向分化潜能特性,由于在体外对干细胞进行基因操作仍然能够维持其特性,因此胚胎干细胞被认为是未来遗传疾病基因治疗靶细胞之一,可能为遗传疾病的治疗开辟一

个全新的领域<sup>[1]</sup>。我们不仅能够利用携带遗传病基因的hESC系充分了解遗传缺陷与疾病发生发展的相关病理生理机制,并且可利用hESC进行遗传疾病基因修复,为遗传疾病治疗提供体外基因治疗的研究基础,因此有必要建立各种携带人类

收稿日期: 2009-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(30801239);广东省自然科学基金(07301429);教育部博士点新青年教师基金(200805581164)

作者简介: 麦庆云,博士,讲师,研究方向:生殖内分泌与人类胚胎干细胞, E-mail: maiqingyun@yahoo.com.cn; \* 通信作者: 周灿权, E-mail: zhoucanquan@hotmail.com

遗传疾病基因的人胚胎干细胞系。我国东南沿海是 $\alpha$ -地中海贫血的高发地区,携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的胎儿由于血红蛋白生成障碍导致胎儿宫内水肿及死胎,目前我们仅能够通过产前筛查避免患儿的出生,而对 $\alpha$ -地中海贫血纯合子胎儿无有效的治疗措施<sup>[2]</sup>,建立携带 $\alpha$ -地中海贫血基因的人胚胎干细胞系是对 $\alpha$ -地中海贫血的体外基因治疗方式进行探讨的基础。目前尚未有携带 $\alpha$ -地中海贫血基因的hESC系建立报道,本研究通过收集经PGD技术筛查出的携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的胚胎,进行内细胞团分离与体外培养,建立携带 $\alpha$ -地中海贫血基因的hESC系,为进行 $\alpha$ -地中海贫血的基因治疗奠定细胞基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因胚胎的获取

携带 $\alpha$ -地中海贫血杂合子基因的夫妇于本中心进行体外受精、单卵裂球胚胎活检与卵裂球单基因诊断及胚胎移植治疗。女方先行控制性超排卵治疗,所获得卵子在体外行单精子卵胞浆注射受精后行胚胎培养。胚胎在体外培养至第3天,利用卵裂球活检术(机械法或激光打孔法)由每个胚胎获得1~2个卵裂球,进行单细胞聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR),以诊断胚胎是否携带 $\alpha$ -地中海贫血基因<sup>[3]</sup>。未携带 $\alpha$ -地中海贫血基因或携带 $\alpha$ -地中海贫血杂合子基因的胚胎被移植到女方子宫腔,而诊断为携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的胚胎则在体外继续培养至囊胚。

### 1.2 携带 $\alpha$ -地中海贫血基因人胚胎干细胞的分离与培养

1.2.1 囊胚培养与内细胞团(inner cell mass, ICM)的分离 携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的胚胎被移入Quinn's囊胚培养液中(Quinn's Advantage TM Blastocyst Medium)进行囊胚培养,将囊胚腔充分扩张或孵出的囊胚移入hESC培养液中,在解剖显微镜下用25 G的针头将ICM与大部分滋养细胞机械剥离,分离出的ICM直接种到经丝裂霉素C(sigma)处理的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblastocyst cells, MEFS)上,进行hESC原代克隆的培养<sup>[4]</sup>。

1.2.2 hESC的原代培养与细胞传代 hESC培养液由以下成分组成:800 mL/L Knout-DMEM

(Gibco)、200 mL/L Serum-Replacement (Gibco)、1 mmol/L 谷氨酰胺(Sigma)、0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇(Sigma)、1%非必需氨基酸(Sigma)、50 U/mL 青霉素(Sigma)、50  $\mu$ g/mL 链霉素(Sigma)、4 ng/mL b-Fibroblast Growth Factor (Gibco)。ICM种植到MEFS后6~14 d,根据巢式细胞团块的生长情况,将原代克隆中由小圆形细胞组成的细胞团块进行机械分离并种植到新的饲养层细胞。待hESC生长稳定后,每4~7 d利用1%胶原酶IV(sigma)传代,并常规对hESC进行慢速冷冻<sup>[2]</sup>。

### 1.3 hESC的 $\alpha$ -地中海贫血基因与全能性鉴定

1.3.1 hESC的 $\alpha$ -地中海贫血基因检测 提取hESC的DNA,PCR检测 $\alpha$ -地中海贫血基因(引物:5'-GTGTTGTCAGTATTGGAGGGA 3';5'-CTACTGCAGCCTTGA ACTCC 3')。将PCR扩增产物纯化,进行ABI377电泳测序<sup>[3]</sup>。

1.3.2 hESC特异性标志和全能性的鉴定 将hESC种植到有MEFS包被的盖玻片上,用40 g/L多聚甲醛固定,通过免疫组化方法检测hESC特异性细胞表面抗原SSEA-4、SSEA-3、SSEA-1、TRA-1-60与TRA-1-80(Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of IOWA)的表达。用改良钙钴法检测hESC碱性磷酸酶的活性。反转录聚合酶链式反应(reverse transcript-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测未分化hESC全能性基因OCT-4(引物:5'-CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA-3';5'-CTGCAGTGTGGTTTCGGGCA-3')的表达。当hESC处于稳定增殖状态后,每5代进行一次细胞染色体核型鉴定<sup>[5]</sup>。

为检测hESC在体内向三胚层细胞分化的能力,将未分化的hESC团块进行悬浮培养,形成胚胎小体(embryonic body, EB)后继续培养10 d左右,收集EB细胞进行细胞特性染色检测是否EB内包含来源三胚层细胞;收集未分化hESC克隆,制成细胞悬液,注射至严重联合免疫缺陷小鼠睾丸和单侧前后腿内,观察8~12周,摘取瘤体进行常规病理组织切片及苏木精-伊红染色,分析组织细胞结构。

## 2 结 果

### 2.1 建立携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的hESC系两株

本研究共收集44枚经PGD技术筛查出的携

带  $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的胚胎, 并获得具有 ICM 的囊胚 12 枚, 12 个 ICM 种植到 MEFS 上后 3 个 ICM 没有贴壁, 贴壁的 ICM 均有细胞生长形成原代克隆。所形成的 9 个原代克隆中, 有 4 个可见到有小圆形细胞生长。其中 3 个原代克隆生长较快, 种植后第 2~3 天即可见细胞团块增大, 团块内细胞小圆形, 排列紧密, 周围有少量体积大呈圆形或梭形排列不规则的滋养细胞, 培养至第 5 天即可见巢氏生长克隆, 细胞小圆形、排列紧密。高倍镜下细胞核大、核浆比例高、核仁清楚, 培养至 6~7 d 可将小圆形细胞所形成的克隆进行切割传代。传代后小圆形细胞可增殖形成扁平状克隆(图 1)。目前已建立两株 hESC 系, 分别命名为  $\alpha$ -hES-1 与  $\alpha$ -hES-2。 $\alpha$ -hES-1 已体外传代超过 10 个月, 传至 46 代后将所有细胞冷冻保存。 $\alpha$ -hES-2 在体外传代至 72 代后将所有细胞冷冻保存。其余 ICM 种植后仅见滋养细胞生长, 无 ES 细胞样细胞团块生长, 未进行机械传代。

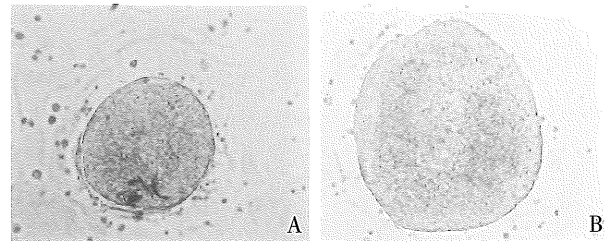


图 1  $\alpha$ -hES 细胞克隆

Fig.1 Morphology of  $\alpha$ -hES colony under invert microscope

A:  $\alpha$ -hES-1 colony,  $\times 100$ ; B:  $\alpha$ -hES-2 colony,  $\times 100$

### 2.2 $\alpha$ -hES-1 和 $\alpha$ -hES-2 细胞 $\alpha$ -地中海贫血基因缺失状态的 PCR 检测

$\alpha$ -hES-1 和  $\alpha$ -hES-2 细胞均检测出  $\alpha$ -地中海贫血基因的缺失片段。PCR 检测  $\alpha$ -hES-1 的  $\alpha$ -地中海贫血基因缺失状态如图 2A, 利用荧光定量 PCR 对  $\alpha$ -hES-2 的  $\alpha$ -地中海贫血基因缺失状态的检测结果如图 2B。

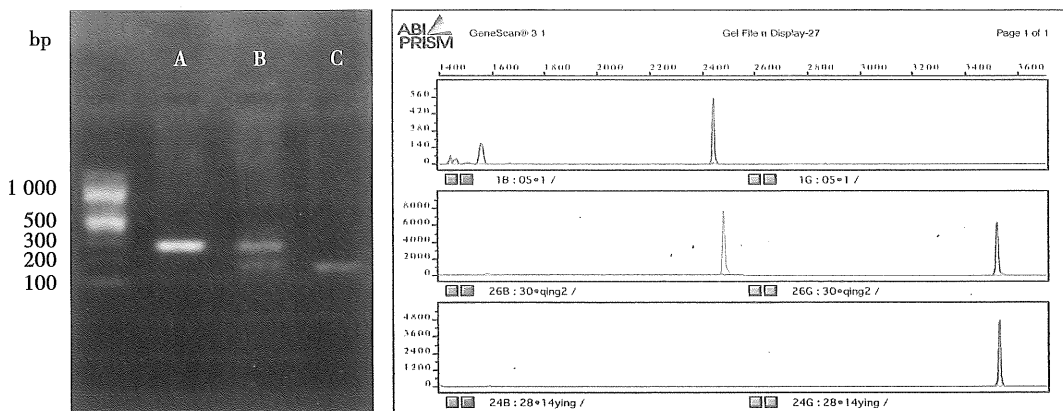


图 2  $\alpha$ -hES-1(A)与  $\alpha$ -hES-2 (B) 细胞  $\alpha$ -地中海贫血基因缺失状态的 PCR 检测

Fig.2 PCR analysis of  $\alpha$ -thalathimia genetic defection in  $\alpha$ -hES-1 and  $\alpha$ -hES-2

A: PCR analysis of  $\alpha$ -thalathimia genetic defection in  $\alpha$ -hES-1, Lane A was normal control and product was 286 bp, Lane B was heterozygote of  $\alpha$ -thalathimia and products were 286 bp and 180 bp, Lane C was  $\alpha$ -hES-1 and product was 180 bp; B: Fluorescent quantitation PCR analysis of  $\alpha$ -thalathimia genetic defection in  $\alpha$ -hES-2, Lane 1 was  $\alpha$ -hES-2 and product was 180 bp. Lane 2 was heterozygote of  $\alpha$ -thalathimia and products were 286 bp and 180 bp, Lane 3 was normal control and product was 286 bp.

### 2.3 hESC 的全能性鉴定及体外分化结果

$\alpha$ -hES-1 和  $\alpha$ -hES-2 核型分析结果均为 46XY, 在体外培养过程中每 10 代进行一次核型分析结果显示两株 hESC 均可维持正常核型。 $\alpha$ -hES-1 和  $\alpha$ -hES-2 克隆碱性磷酸酶检测显示未分化细胞浆内均有灰黑色颗粒沉淀。 $\alpha$ -hES-1 和  $\alpha$ -hES-2 细胞 hESC 表面抗原表达一致, SSEA-1 不表达, SSEA-4 抗原表达呈强阳性, SSEA-3 表达呈

弱阳性, TRA-1-60 与 TRA-1-80 表达呈阳性。将  $\alpha$ -hES-1 和  $\alpha$ -hES-2 未分化细胞悬液注入 SCID 小鼠后可见畸胎瘤形成, 切片 HE 染色可见来源于三胚层的细胞与组织结构。胚胎体切片行 CD31、NSE、Vimentin 染色呈阳性, 分别表示干细胞在体外可自主分化为管腔内皮细胞、原始神经细胞与中胚层细胞(图 3)。RT-PCR 检测  $\alpha$ -hES-1 和  $\alpha$ -hES-2 未分化细胞可见 200 bp 的 OCT-4 电泳条带(图 4)。

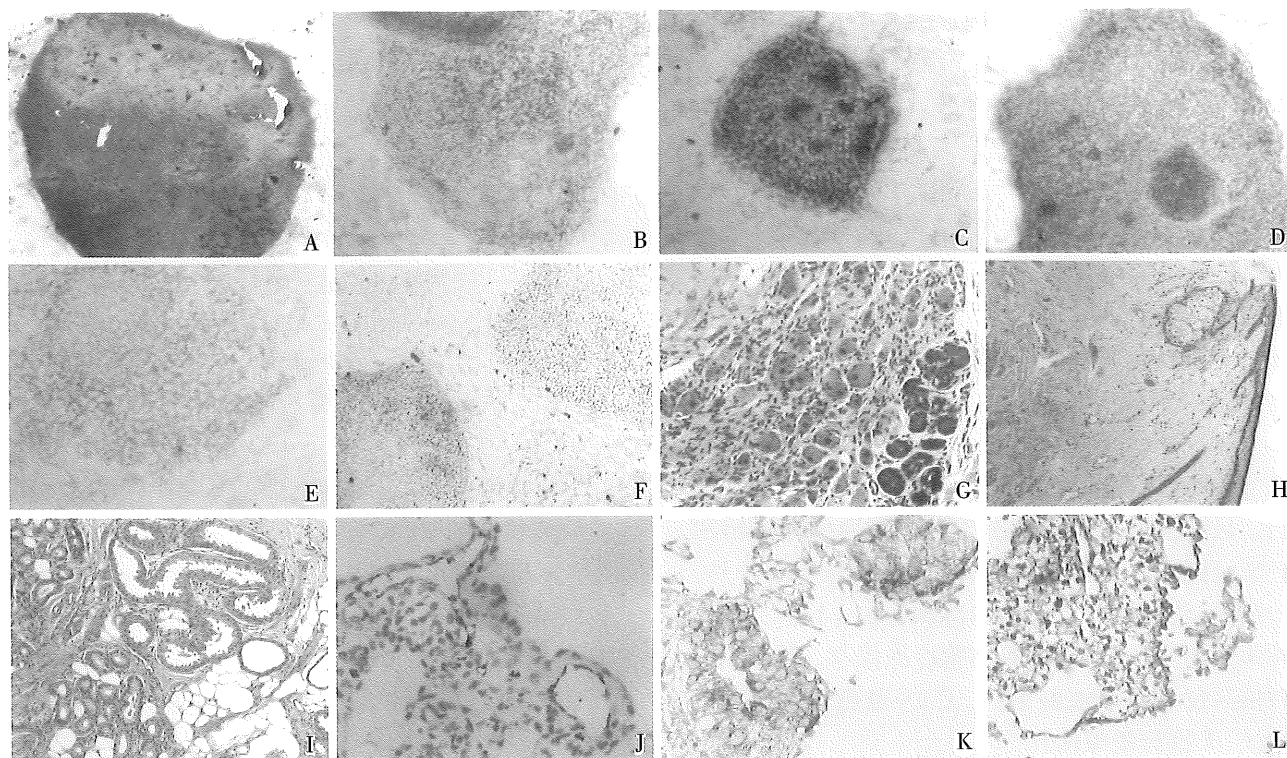


图 3 未分化  $\alpha$ -hESC 细胞表面抗原的免疫组化结果与干细胞体内分化为畸胎瘤切片、体外分化结果

Fig.3 AP and immunostaining of stem cell markers for  $\alpha$ -hESC cell line and histopathology analysis of teratoma and EB resulting from differentiation of  $\alpha$ -hESC cells

A: AKP staining of hESC is positive, 100  $\times$ ; B: SSEA-3 staining of hESC is positive, 100  $\times$ ; C: SSEA-4 staining of hESC is positive, 50  $\times$ ; D: TRA-1-60 staining of hESC is positive, 100  $\times$ ; E: TRA-1-80 staining of hESC is positive, 100  $\times$ ; F: SSEA-1 staining of hESC is negative, 50  $\times$ ; G-I: Histopathology analysis of teratoma. G: primordial nerve cells, 100  $\times$ ; H: glandulae sebaceae, 100  $\times$ ; I: intestinal gland, 100  $\times$ ; J-L: Immunostaining of EB, 100 $\times$ ; J: CD31 staining is positive; K: NSE staining is positive; L: Vimentin staining is positive

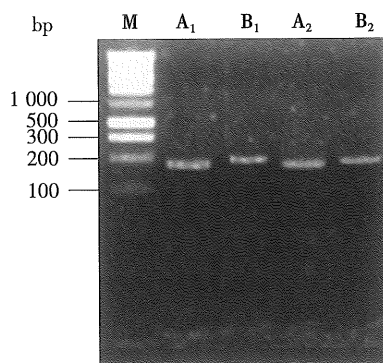


图 4 RT-PCR 检测  $\alpha$ -hES-1 和  $\alpha$ -hES-2 的 Oct-4 的表达

Fig.3 RT-PCR analysis of expression of Oct-4 in  $\alpha$ -hES-1 and  $\alpha$ -hES-2

RT-PCR analysis of Oct-4 of  $\alpha$ -hES-1 and  $\alpha$ -hES-2. A1:  $\beta$ -actin of hES-1; B1: OCT-4 of hES-1; A2:  $\beta$ -actin of hES-2; B2: OCT-4 of hES-2.

### 3 讨论

1980年小鼠 ES 细胞系建立后就被广泛应于

携带人类遗传性疾病基因的小鼠 ES 细胞疾病模型,使我们能够对人类遗传性疾病的发病机理与病理生理机制有一定的了解<sup>[6-9]</sup>。但人类和小鼠在生物学特性上存在极大差别,因此建立携带人类遗传性疾病基因的 hESC 系不仅可为人类遗传性疾病的 hESC 体外基因操作提供良好的细胞资源,而且对研究各种遗传性疾病在发育发生学过程中的疾病发生机制有重要的意义。

目前建立携带遗传性疾病基因的 hESC 系有两种方式:一是来源于遗传疾病患者体细胞核移植的重构胚胎,通过分离囊胚 ICM 来建立与患者有相同基因背景的 hESC 系;另外一种是通过 PGD 技术筛查出携带异常遗传背景的胚胎并建立具有特异性异常遗传背景的 hESC 系。人类体细胞核移植技术尚未成熟且人类卵子来源困难,无法满足建立个体化携带遗传疾病基因干细胞系的需要。PGD 技术自 1990 年开始应用于早期胚胎特定遗传背景的筛查,目前能够通过 FISH、PCR 技术

以及 CGH 等技术进行筛查,而筛选出的携带致病遗传基因胚胎成为了建立携带遗传疾病基因人胚胎干细胞系的较好资源。2003 年 Pieckering 等<sup>[10]</sup>就提出可通过 PGD 技术可进行具有特殊遗传背景的人胚胎干细胞系的建立。2005 年 Verlinsky 等<sup>[11]</sup>报道利用经 PGD 诊断为携带致病遗传基因的胚胎建立了多种携带遗传疾病基因的 hESC 系,其中包括: $\beta$ -地中海贫血、范可尼氏贫血、神经纤维瘤、舞蹈病、神经性肌营养不良、神经纤维瘤、肾上腺脑蛋白营养不良、马凡氏综合征。随着分子生物学技术的发展,利用 siRNA 和转基因技术修复细胞中有缺陷的基因有可能使细胞恢复正常功能,而基因治疗的靶细胞多为具有有限生长周期的成体细胞,因此经基因修正的成体细胞移入宿主体内一旦发生凋亡将会导致基因治疗作用的消失<sup>[12]</sup>。由于 hESC 具有无限增殖潜能特性,在体外对 hESC 进行基因修复后诱导为目的细胞再进行宿主移植,是目前具有前景的遗传疾病治疗方法之一;同时携带遗传疾病基因人类胚胎干细胞亦为目前新药的研发提供了较好的靶细胞疾病模型<sup>[1]</sup>。

本研究选择了中国南方地区较为高发的 $\alpha$ -地中海贫血遗传疾病为模型,通过收集经 PGD 技术筛查出的携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的胚胎进行 hESC 的分离,首次报道建立两株携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因 hESC 系,分别为 $\alpha$ -hESC-1 和 $\alpha$ -hESC-2。两株携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的 hESC 的细胞形态与正常 hESC 无明显差异,未分化细胞克隆为扁平状、克隆边界清楚;细胞为小圆形,边界清楚,核胞比例高,核仁大且清楚。且细胞的增殖周期也无明显差异,每 4~5 d 传代 1 次,这表明携带 $\alpha$ -地中海贫血基因的 hESC 在未分化状态与正常胚胎来 hESC 在细胞形态学没有区别。

本研究对 $\alpha$ -hESC-1 和 $\alpha$ -hESC-2 进行了 hESC 细胞全能性鉴定。两株 $\alpha$ -hESC 系表达正常 hESC 特有的细胞表面标志:SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 与 TRA-1-80,不表达 SSEA-1。两株 ESC 系的 Gomori 氏染色可见未分化 ES 细胞浆内存在大量黑色颗粒,表明 AKP 活性高,细胞具备活跃的转运功能。OCT-4 是 POU 家族的一个转录因子,它的表达与 ES 细胞的未分化状况非常相关,该基因是控制小鼠 ESC 自我增殖复制的关键因子,未分

化的正常人 ES 细胞也可检测到高水平的 OCT-4 的表达,将 OCT-4 敲除后的 hESC 可自然向三胚层细胞分化。对未分化 $\alpha$ -hES-1 与 $\alpha$ -hES-2 的细胞进行 RT-PCR 检测提示高水平的 OCT-4 表达。

将未分化的 $\alpha$ -hESC 进行悬浮培养能形成胚胎体,它是由多种分化细胞组成的三维空间结构。在对 $\alpha$ -hES-1 与 $\alpha$ -hES-2 细胞的胚胎体进行切片后苏木精-伊红染色后可有肠上皮样结构、肌肉纤维样结构、腺体样结构、脂肪组织样结构等。同时对胚胎体切片进行 CD31、Vimentin 与 NSE 染色均呈阳性,来源于内胚层的细胞 CD31 表达呈阳性,来源于间叶组织的细胞 Vimentin 呈阳性,而来源于外胚层的神经细胞 NSE 呈阳性,说明了 $\alpha$ -hES-1 与 $\alpha$ -hES-2 具有向三胚层细胞分化的潜能。将 $\alpha$ -hES-1 与 $\alpha$ -hES-2 未分化细胞分别注入到 SCID 小鼠体内,均可形成畸胎瘤肿块,组织切片可见三胚层细胞来源的细胞与结构,证实了 $\alpha$ -hES-1 与 $\alpha$ -hES-2 细胞具有全能性。

由于人类胚胎来源的匮乏以及伦理道德的限制,目前多数国家对破坏正常胚胎进行人 ES 细胞研究仍存在很大争议,因此利用携带致病遗传病基因的胚胎进行 hESC 系的建立可避免伦理学的争论,且本研究证实携带 $\alpha$ -地中海贫血纯合子基因的人 ES 细胞仍然具有全能性,可用于非造血系统细胞的移植治疗。我们亦发现单纯 $\alpha$ -地中海贫血基因缺失的 Bart's 水肿胎儿并无其它发育缺陷,这为将来携带 $\alpha$ -地中海贫血基因的 ES 细胞用于移植治疗的安全性提供了依据。携带 $\alpha$ -地中海贫血疾病基因的人 ES 细胞系的建立,为利用转基因技术以携带 $\alpha$ -地中海贫血基因的 ES 细胞为靶细胞进行造血机能的恢复提供了良好的实验材料与实验基础,也为将来各种具有基因缺陷疾病基因治疗的临床应用提供体外细胞治疗的实验模型。

#### 参考文献:

- [1] Ben-Yosef D, Malcov M, Eiges R. PGD-derived human embryonic stem cell lines as a powerful tool for the study of human genetic disorders [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 282(1-2): 153-158.
- [2] 陈晨春,仇小强.  $\alpha$ -地中海贫血流行状况 [J]. *中国妇幼保健*, 2009, 24(10): 858-861.
- [3] 邓捷,彭文林,刘颖,等. 应用荧光聚合酶链反应对 $\alpha$ -地中海贫血进行植入前遗传学诊断 [J]. *中华*