

# 探讨保持胚胎干细胞全能性的体外培养条件

邱观婷<sup>1</sup>, 黄冰<sup>2</sup>, 唐仕波<sup>1</sup>, 胡洁<sup>1</sup>, 刘志雄<sup>1</sup>

(中山医科大学 1. 中山眼科中心玻璃体视网膜实验室, 广州 510060; 2. 实验动物中心, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】探讨保持胚胎干细胞(ES cells)全能性的体外培养条件。【方法】将 ES-D3 细胞株培养在 SNL 饲养层细胞和原代小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上以及在无饲养层的条件下, 培养基中加入小鼠白血病抑制因子(mLIF)或用 Buffalo Rat Liver(BRL)条件培养基进行培养, 并对培养细胞进行碱性磷酸酶检测和染色体分析。【结果】ES-D3 在上述培养体系中能形成正常形态的克隆, 并且经多次传代后碱性磷酸酶检测为阳性, 而且核型保持稳定。【结论】说明上述各种培养体系均能保持 ES-D3 的高度未分化状态及正常的二倍体核型。

**关键词:** 胚胎干细胞; 培养基; 条件性

中图分类号: R329.28; 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)02-0100-04

## The Investigation of Cell Culture Conditions Maintained Embryonic Stem Cells as Totipotent Cells

QIU Guan-ting<sup>1</sup>, HUANG Bing<sup>2</sup>, TANG Shi-bo<sup>1</sup>, HU Jie<sup>1</sup>, LIU Zhi-xiong<sup>1</sup>

(1. Vitreoretinal Laboratory, Zhongshan Ophthalmic Center, Guangzhou 510060;

2. Experimental Animal Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the culture conditions of embryonic stem (ES) cells which can retain their totipotency. 【Method】ES-D3 cells were cultured in the presence of feeder layer cells including SNL cell line and primary mouse embryonic fibroblast (PM EF) and in the absence of feeder layer provided the medium supplemented with purified murine leukemia inhibitory factor (mLIF) or buffalo rat liver (BRL) condition media respectively. The alkaline phosphatase (AKP) test and karyotype analysis were carried out. 【Results】ES-D3 could develop normal clone on the above mentioned cell culture systems. Moreover, ES-D3 cells within the colonies continued to express AKP over many passages and keep their normal karyotype. 【Conclusions】It indicated that above-mentioned culture systems could effectively maintain ES-D3 cells undifferentiated state and normal diploid karyotype.

**Key words:** embryonic stem cells; culture media; conditioned

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)是从早期胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)或桑椹胚分离出来能在体外长期培养的高度未分化的全能(totipotent)细胞系。在体外, 它能保持正常的二倍体核型, 能发育为含外、中、内三个胚层的胚胎体, 在体内能参与包括生殖系在内的各个组织器官的发育形成包括生殖系的嵌合体。ES 细胞为研究

胚胎的发育发生和细胞的分化以及转基因动物等方面提供了有用的工具。自从 1981 年, Evans 和 Kaufman 以及 Martin 相继用不同的方法直接从小鼠囊胚的 ICM 中成功地得到多潜能的 ES 细胞以来, 人们先后从猪、牛、兔、羊、猴等哺乳动物分离得到 ES 细胞<sup>[1~3]</sup>。1998 年 6 月, Thomson 等建立了人类的 ES 细胞系<sup>[4]</sup>。特别是近年来对 ES 细胞

收稿日期: 1999-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770790)

作者简介: 邱观婷(1969-)女, 江西赣州人, 1998 年攻读博士学位, 唐仕波, 博士, 教授, 导师。

向神经细胞、造血细胞、心肌细胞等定向诱导分化的研究,为难治性血液系统疾病和神经变性疾病等提供了组织、器官移植的原材料。同时,ES细胞在药物的开发利用、遗传性疾病的防治以及基因的筛选和功能研究等方面展示了广阔的应用前景。然而,ES细胞的体外培养是进行上述各项研究的前提与基础。ES细胞在体外要保持其全能性和不断增殖需要严格的培养条件,一方面要保持细胞快速分裂增殖,另一方面要最大限度地抑制其分化。常用的方法是用原代的小鼠胚胎成纤维细胞(primary mouse embryonic fibroblast, PMEF)作饲养层进行体外培养。本实验在国内首次使用SNL和无饲养层的条件培养基等多种培养体系进行ES-D3的体外培养并比较其异同,将为ES细胞的体外诱导分化实验及基因转染等研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞培养基

ES细胞培养基:DMEM(含高糖、谷氨酰胺,不含丙酮),胎牛血清,新生牛血清,0.1 mol/L 2-巯基乙醇, L-谷氨酰胺 0.1 mmol/L。无饲养层细胞培养时需加入  $10^6$  IU/L 小鼠白血病抑制因子(murine leukemia inhibitory factor, mLIF)。以上均为GIBICO公司产品。

饲养层细胞培养基:DMEM(含高糖、L-谷氨酰胺,GIBICO公司产品),胎牛血清(四季青公司产品),用作SNL培养时需加L-谷氨酰胺。

### 1.2 BRL 条件培养基的制备

以  $5 \times 10^5$  个大鼠肝癌细胞种植于 T<sub>25</sub> 的细胞培养瓶使用 ES 细胞培养液,但不含 2-巯基乙醇及 mLIF。收集培养 3 d 的培养上清过滤,按一定比例(4:6)加入 ES 细胞培养液制成 BRL(Buffalo Rat Liver)条件培养基用作 ES-D3 培养用。

### 1.3 小鼠原代胚胎成纤维细胞(PMEF)饲养层的制备

取 12~13 d 昆明小鼠胚胎去头、四肢和内脏,PBS 冲洗,将组织块剪成约 1 mm 大小的碎片,再用 PBS 洗两次,胰蛋白酶消化,加等量饲养层细胞培养液中和,室温下静置 10 min,取上层混悬液离心沉淀 2 次,接种于 T<sub>25</sub> 长颈瓶内培养,加入饲养层细胞培养液,每天换液一次,3~4 d 消化传代一次,第 6 代以前的 PMEF 均可用作 ES 细胞的饲养层。

使用前用丝裂酶素 10 mg/L 处理 2 h 使饲养层细胞失去增殖能力。处理过的细胞在 5 d 内使用为好。PMEF 饲养层细胞密度为  $1 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup>。

### 1.4 SNL 饲养层细胞系的培养

SNL 细胞系是在 STO 饲养层细胞中转 mLIF 基因和 neo<sup>r</sup> 基因的饲养层细胞株,它能分泌 mLIF 因子抑制 ES 的分化。体外培养条件基本同 MEF 饲养层,但需加 L-谷氨酰胺。

### 1.5 ES-D3 细胞系的培养

ES-D3 来源于 129/Sv+/+ 小鼠囊胚的 ICM,是一株多潜能的 ES 细胞系<sup>[5]</sup>。将保存于液氮中的 ES-D3 取出后立即置 37℃~39℃ 水中解冻复温,加入 ES 细胞培养液稀释冻存液二甲基亚砜,离心沉淀,去上清,将 ES-D3 分别种植于丝裂霉素处理过的 MEF 和 SNL 饲养层细胞上以及含 mLIF 的无饲养层 ES 细胞培养基中培养,ES-D3 细胞密度为  $2 \times 10^6$  /cm<sup>2</sup>。一般 2~3 d 传代一次,用胰蛋白酶消化,一般以消化成单个细胞或 2~3 个细胞聚集体为好,消化过度则 ES 克隆不易形成,消化不够则易形成分化克隆。

### 1.6 ES-D3 碱性磷酸酶检测

用 Gomori  $\alpha$ -萘基磷酸法,其原理为:碱性磷酸酶在碱性条件下将  $\alpha$ -萘基磷酸水解出  $\alpha$ -萘酚,然后与固蓝 B 盐在酶活性部位偶联形成紫红色不溶性盐。将在无饲养层细胞培养第 9 代的 ES-D3 用冷丙酮固定,去固定液后风干,置含  $\alpha$ -萘基磷酸钠和固蓝 B 的孵育液中 10~20 min 后流水洗涤,再用醋酸水溶液浸洗,流水冲洗树胶封片。

### 1.7 ES-D3 细胞染色体分析

用无饲养层培养的 ES 细胞,消化传代后培养 48 h,加秋水仙素 0.02 g/L 处理 2 h,胰酶消化收获细胞,加入 KCl 低渗溶液置 37℃ 22 min,用甲醇:冰醋酸(3:1)反复固定 3 次后滴片,置 60℃ 烤箱中烘片约 4~5 h。将制备好的染色体涂片经胰酶消化显带后用新鲜配置的 Giemsa 溶液染色,流水冲洗干净,吹干,树胶封片,在油镜下观察结果。

### 1.8 体外分化实验

将 ES-D3 消化成单层后置无粘附性的细菌培养皿中悬浮培养,培养基用去 mLIF 的 ES 细胞培养液,隔日换液。12~14 d 后将胚胎体打散,观察其中所含的细胞类型。

## 2 结 果

### 2.1 ES-D3 细胞的生长情况

ES 细胞的一般形态: 细胞呈小集落、贴壁生长, 集落边缘清晰、光滑, 细胞排列紧密, 细胞之间界限不清; 消化后的单个 ES 细胞小、亮、圆形, 边界清, 胞浆少, 细胞核大, 核仁明显(图 1)。消化后一般 4~6 h 可贴壁, ES 克隆较难消化吹散, 细胞间粘附性强。

本实验比较了 ES 在有饲养层(包括 MEF、SNL 饲养层)和无饲养层(包括 BRL 条件培养基以及加 mLIF 的培养基)上培养的生长情况。实验结果表明, MEF 在促进 ES 细胞集落的形成和生长方面明显优于 SNL 细胞系; 而且 ES 细胞在有饲养层上比在无饲养层上生长增殖得更快。在上述各种培养体系中 ES 细胞的形态也稍有不同: ES-D3 在 MEF 上生长最快, 在 MEF 上形成的克隆较扁平, 结构均匀, 表面光滑, 呈长梭形或椭圆形, 边缘光滑、清楚(图 2)。ES-D3 在 SNL 上形成的克隆呈短梭形, 隆起较高, 边界清(图 3)。ES-D3 在含  $10^6$  IU/L mLIF 的无饲养层中培养, 能保持其未分化状态, 形成的克隆形态多样, 边缘清楚, 表面光滑、均匀(图 4)。在 BRL 条件培养基上培养时形成的克隆与用 LIF 的无饲养层培养基形成的集落基本相似。

## 2.2 碱性磷酸酶检测结果

ES-D3 在无饲养层的条件培养基中培养传代 10 次后, 碱性磷酸酶检测为强阳性(图 5); 在 MEF、SNL 饲养层上培养传代 7 次后碱性磷酸酶检测均为强阳性。

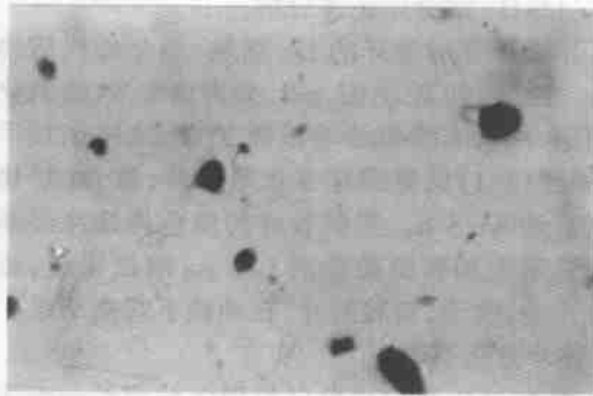


图 5 ES D3 碱性磷酸酶强阳性表达(10×10)

Fig. 5 Strong positive expression of ES D3 against AKP

## 2.3 核型分析结果

ES-D3 在 SNL 上以及无饲养层的条件培养基上培养经多次传代后能保持正常二倍体核型, 染色体数 70% 为 40XY, 26% 为 39XY。

## 2.4 体外分化实验结果

ES-D3 在无饲养层以及不含 mLIF 的 ES 细胞培养基中培养 12~14 d, 在体外能发育成含 3 个胚层的胚胎体。

## 3 讨论

### 3.1 ES 细胞的一般特性

ES 细胞是培养细胞与动物个体之间、体细胞与生殖细胞之间的桥梁。它具有 4 个特性: ①它是全能的; ②它能在体外无限制地扩增; ③在体外可进行基因工程处理; ④能形成嵌合体动物。其中全能性是 ES 细胞最主要的特征, 本研究分别对 ES 细胞在 PMEF 和 SNL 饲养层上培养以及无饲养层的 BRL 条件培养基和含 LIF 的条件培养基进行体外培养, 经多次传代后 AKP 检测为强阳性, 体外分化实验证明 ES-D3 仍能保持其向各胚层分化的特性。

由于正常的二倍体核型是 ES 细胞参与形成嵌合体动物及保持其多潜能性的一个重要条件, 本研究同时对在 SNL 饲养层细胞上培养 5~6 代的 ES 细胞传到无饲养层上培养, 多次传代后进行核型分析, 结果表明上述培养体系能够保持 ES 细胞正常的二倍体核型, 染色体类型与正常小鼠相同, 均为顶端着丝点。

### 3.2 ES 细胞体外培养的基本条件

由于 ES 细胞来源于分裂增殖非常活跃的早期胚胎细胞, 维持其生长代谢所需的营养要充足。所以用于 ES 细胞培养的 DMEM 为含高糖和谷氨酰胺, 同时加胎牛血清、新生牛血清、2-巯基乙醇。选择高糖的 DMEM 主要是提高 ES 细胞的增殖速度, 同时又能提供饲养层细胞生长所需的能量。ES 细胞对谷氨酰胺要求较高, 它是细胞合成蛋白质与核酸所必需的, 而且谷氨酰胺在溶液中易分解, 一般须保存在  $-20^{\circ}\text{C}$ , 所以使用前须重新加入。2-巯基乙醇除了对胚胎细胞的分裂增殖有促进作用外, 还可还原血清中的含硫化合物, 防止过氧化物对 ES 细胞的损害。

### 3.3 保持 ES 细胞全能性的培养条件

由于 ES 细胞生长速度快, 每 18~24 h 就分裂一次, 消耗的营养物质多, 每天需换液一次, 每 2 d 传代一次, 培养时需注意: 为了防止自发分化, 传代密度需相对高, 保持细胞之间的相互作用以促进细

胞的分裂增殖,胰酶消化时要尽量打散使之成单个或双个。密度太小或饲养层质量太差均可使ES细胞生长停滞,另外培养时尽量不要使培养液过度成酸性。

要保持ES细胞的多潜能性关键是最大限度地抑制其分化。PMEF和SNL饲养层细胞能分泌分化抑制因子抑制ES细胞的分化,但使用前须经丝裂霉素处理或 $\gamma$ 射线照射( $3 \times 10^3$  rad)。而丝裂霉素对ES细胞有毒性,接种ES细胞前须反复冲洗。PMEF是原代小鼠成纤维细胞株,由于PMEF饲养层细胞传代有限(一般在第5代之前使用为好),需不断地制备;另一方面,为了适应ES细胞进行各种研究的需要,我们采用了不同的培养体系进行培养。目前有已经有成系的饲养层细胞SNL细胞株,能在体外无限制传代,制成单层后可用于ES细胞的培养,同时由于该细胞系同时转染了LIF基因和neo<sup>r</sup>基因,适合作为基因转染的ES细胞培养。

研究表明:ES细胞表面有较多的LIF受体(190~330/细胞),结合于ES细胞上的LIF受体是特异性的,而且LIF对ES细胞的分化抑制作用是浓度依从性的<sup>[6]</sup>。要维持ES细胞的未分化状态,形成好的克隆,LIF的量须在(5~10) $\times 10^5$  IU/L以上,培养液中直接加入足够剂量的LIF,在无饲养层的条件下能有效地抑制ES细胞的分化<sup>[7]</sup>。通常在STO、SNL、BRL、膀胱癌5637细胞的培养基中有也有相当高的LIF含量,约为(5~10) $\times 10^5$  IU/L<sup>[8,9]</sup>。本实验对ES-D3采用不同的无饲养层培养方法(包括培养基中加入mLIF和BRL条件培养基)均能保持其全能性特性,为ES细胞的定向诱导分化研究奠定基础,同时,采用无饲养层的方法进行培养,还能排除处理饲养层细胞时所用丝裂霉素对ES细胞的毒性作用。

(本文图1~4见插图2)

(致谢:衷心感谢中山医科大学实验动物中心为本研究提供良好的实验条件和陈系古教授的大力支持;衷心感谢中山医科大学病理生理教研室李树浓教授、眼科中心葛坚

教授提供ES-D3细胞株;衷心感谢香港大学Dr Suja Kim教授、实验动物中心陈系古教授提供SNL细胞株)

#### 参考文献:

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154.
- [2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(12): 7634.
- [3] Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 7844.
- [4] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Sciences*, 1998, 282(5391): 1145.
- [5] Doetschman T. Targetted correction of mutant HPRRT gene in mouse embryonic stem cells [J]. *Nature*, 1987, 330(6148): 576.
- [6] Hilton D J, Nicola N A, Metcalf D, *et al.* Specific binding of murine leukemia inhibitory factor to normal and leukemic monocytic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(16): 5971.
- [7] Shirley P, Lindsay W R. Formation of germ line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF) [J]. *Exp Cell Res* 1990(2), 190: 209.
- [8] Shirley P, Paola B, David G, *et al.* Isolation of embryonic stem cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF) [J]. *Dev Biol*, 1990, 141(2): 344.
- [9] Smith A G, Hooper M L. Buffalo rat liver cells produce a differentiated activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells [J]. *Dev Biol*, 1987, 121(1): 1.

(编辑 刘清海)

探讨保持胚胎干细胞全能性的体外培养条件 (正文见第 100 页)

The Investigation of Cell Culture Conditions

Maintained Embryonic Stem Cell as Totipotent Cells (Text in page 100)

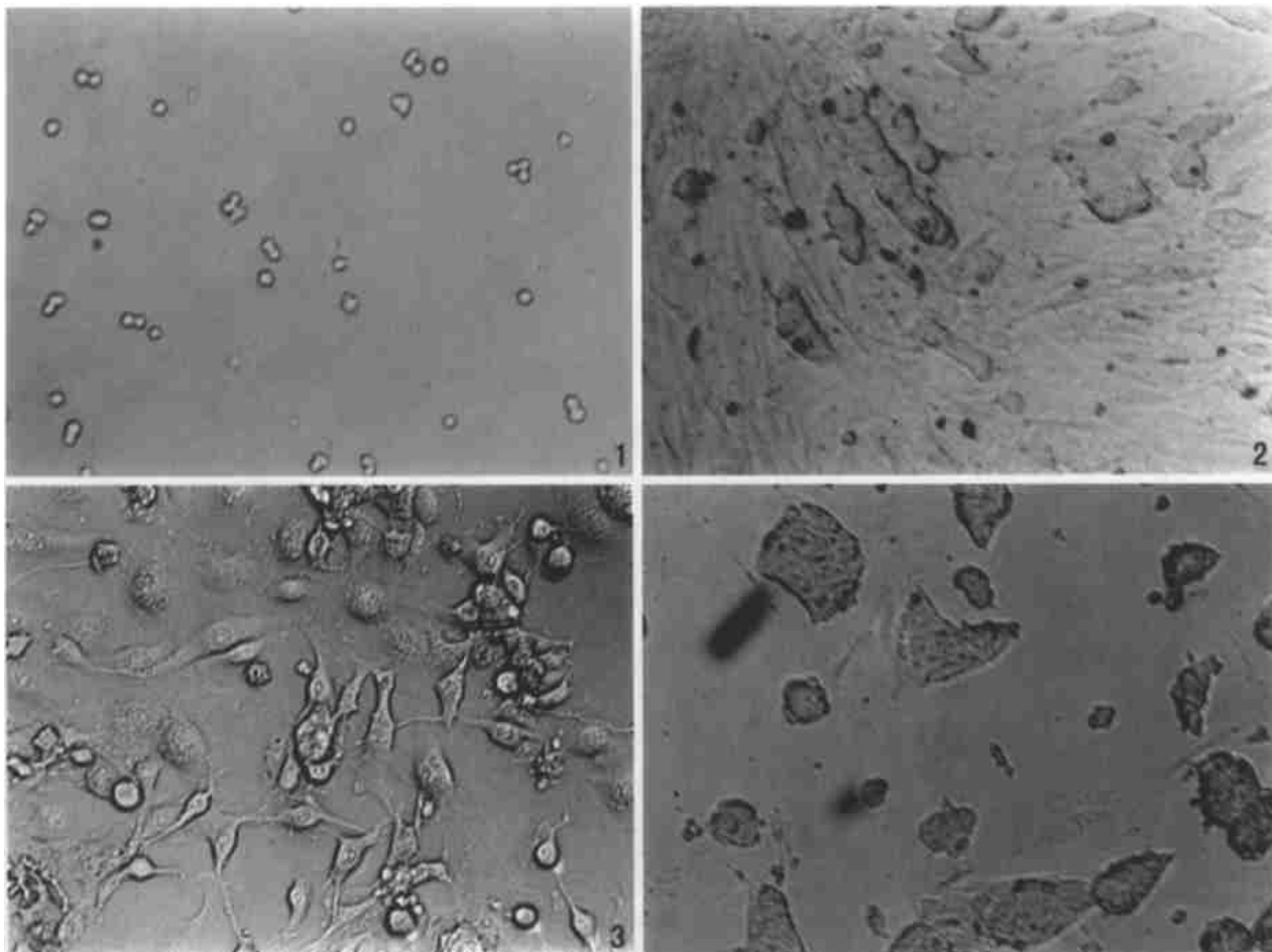


图 1 消化后的单个 ES 细胞(10×10)

图 2 ES-D3 在 PMEF 上形成的克隆(10×10)

图 3 ES-D3 在 SNL 上形成的克隆(10×10)

图 4 ES-D3 在含 mLIF 的无饲养层培养基中形成的克隆(10×10)

Fig. 1 Morphology of single ES cell after digestion

Fig. 2 ES-D3 clones in the presence of PMEF feeder layer

Fig. 3 ES-D3 clones in the presence of SNL feeder layer

Fig. 4 ES-D3 clones in the absence of feeder layer but supplemented with m LIF