

建立植入前遗传学检测人胚胎来源的无动物源性干细胞系

张丹, 王增艳, 麦庆云, 蔡炳, 曾艳红, 周灿权
(中山大学附属第一医院生殖中心//广东省生殖医学重点实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】在无动物源性的干细胞培养体系中建立植入前遗传学检测(PGT)胚胎来源的人胚胎干细胞系,为医学研究提供疾病模型。【方法】在我们的研究中,对无动物源性的人类包皮成纤维细胞饲养层(XF-HFF)与成分确定的培养基(CDM)构建的无动物源性培养体系进行了评估。在该培养体系中,利用染色体平衡易位患者PGT来源的废弃胚胎建立一个新的人胚胎干细胞(hESC)细胞系。【结果】新建立的人胚胎干细胞系在无动物源性培养系统中可长期培养传代(>45个代次)。核型分析显示,在传代45代次后,新建立的人胚胎干细胞仍保持一致的核型。XF-HFF/CDM中的hESC仍保持多能性。通过荧光免疫染色检测到SSEA-3、SSEA-4、SSEA-1、TRA-1-60、TRA-1-81等多能标志物的表达;RT-PCR分析显示,在XF-HFF/CDM培养体系上生长的hESC中存在干细胞标记。小鼠体内实验也证实了hESC在体内维持其多能性。【结论】本研究建立了PGT来源的人胚胎干细胞系,为进一步建立携带遗传疾病基因的hESC系并为临床研究和治疗提供疾病模型打下了基础。

关键词:人胚胎干细胞;无动物源性;胚胎植入前遗传性诊断来源的

中图分类号:R329 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2019)04-0510-08

Established a Preimplantation Genetic Testing-derived and Xeno-free Human Embryonic Stem Cell Line

ZHANG Dan, WANG Zeng-yan, MAI Qing-yun, CAI Bing, ZENG Yan-hong, ZHOU Can-quan
(Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital// Guangdong Provincial Key Laboratory of Reproductive Medicine; Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: ZHOU Can-quan; E-mail: zhoucquan@hotmail.com

Abstract: 【Objective】 A human embryonic stem cell line derived from Preimplantation genetic testing (PGT) embryos was established in a xeno-free stem cell culture system to provide disease models for medical research. 【Methods】 The xeno-free culture system using xeno-free human foreskin fibroblast feeder layers (XF-HFF) mixed with commercially available chemically-defined medium (CDM) was assessed. In the culture system, a new hESC cell line was established using discarded embryos derived from PGT in patients with chromosomal balance translocation. 【Results】 The new available stem cell line was successfully cultured in the xeno-free culture system for a long time (> 45 passages). The karyotype analysis revealed that the new line kept the same karyotype over 45 passages. Moreover, the expression of pluripotent markers was detected by fluorescent immunostaining including SSEA-3, SSEA-4, SSEA-1, TRA-1-60, and TRA-1-81. RT-PCR analysis showed that the stem cell markers were present in hESC grown on XF-HFF-CDM. In addition, the teratoma formation analysis demonstrated that the cells cultured in XF-HFF/CDM maintained their pluripotency in vivo. 【Conclusions】 Our study may provide the possibility to establish embryonic stem cells with certain pathogenic genes, which could be applied for clinical research and treatment.

Key words: human embryonic stem cells; xeno-free; PGT-derived

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(3): 510-517]

收稿日期: 2019-01-03

基金项目: 广东省生殖医学重点实验室(2012A061400003)

作者简介: 张丹, 硕士, 主治医师, 研究方向: 生殖医学, E-mail: guangzhoudandan@163.com; 周灿权, 通信作者, 教授, 研究方向: 生殖医学,

E-mail: zhoucquan@hotmail.com

建立达到药品质量管理规范 GMP 标准的人胚干细胞(human embryonic stem cells, hESC)系要求 hESC 的原代分离、培养传代和冻存的每一步都要避免动物源性成分的污染^[1]。目前在成分确定的培养基(chemical defined medium, CDM)中的建系大多是在含动物成分培养体系中建立的原代克隆,经数次传代后再转移至 CDM 培养体系中,但并不清楚在这样一个转换过程中 hESC 通过适应会改变多少 hESC 的特性^[2-4]。因此,在完全无动物源性的培养体系中原代建立新的 hESC 系就显得尤为必要。我们之前的研究^[5]已经证实了新构建的无外源性(xeno-free, XF)培养体系支持 hESC 生长的能力优于 feeder-free 培养体系,但是研究中培养的两株 hESC 系也不是在 XF 体系中原代建立的。利用胚胎植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing, PGT)患者的废弃胚胎建立的干细胞系为单基因疾病的研究提供了最佳的细胞模型。在本研究中,我们利用在本中心行 PGT 的染色体平衡易位患者的废弃胚胎,使用机械切割法获得内细胞团(inner cell mass, ICM)并且传代,以期建立完全没有接触动物成分的 hESC 系,为 hESC 向临床的应用和单基因疾病细胞模型的建立提供了基础。

1 材料与方 法

1.1 无动物源性的 hESC 培养体系

此体系为我们之前新构建的培养体系^[5]。收集 2016 年 8 月至 12 月因一方染色体相互易位在我中心接受 PGT 治疗的夫妇的废弃胚胎共 12 枚,在患者签署知情同意后用于本实验的干细胞建系。以上材料均得到患者知情同意并得到中山大学附属第一医院伦理委员会的批准。

1.2 无动物源性人包皮饲养层的制备及培养

无菌条件下取包皮环切术后的小儿包皮,用含双抗的 PBS 冲洗 3~5 遍,然后在 TrypLE Select (Invitrogen, 美国)中 4℃ 浸泡过夜。分离去除表皮后,用眼科剪将真皮剪碎,加入 TrypLE Select 于 37℃ 消化 30 min。然后加入含体积分数 10% HS (Sigma, 美国)、90% DMEM (Invitrogen, 美国)和体积分数 0.5% 双抗 (HyClone, 美国)的 AF-HFF 培养基中终止消化,用吸管反复吹打后 1 200×g 离心 5 min,将上清液丢弃,用 AF-HFF 培养液重悬细

胞,以(5~10)×10⁴/mL 的密度接种于培养皿中。待生长 1 周左右,当细胞生长达到 90% 面积以上融合时,使用 TrypLE Select 消化,按 1:5 的比例传代。包皮成纤维细胞培养至 8 代左右,开始用丝裂霉素灭活 2 h,制备成包皮饲养层细胞,用于 hESC 的培养。以上材料均得到患者知情同意并得到中山大学附属第一医院伦理委员会的批准。

1.3 机械切割法分离 ICM 及其原代培养

12 枚行 PGT 患者培养至 D3 的废弃胚胎,用机械切割法去除透明带,或者活检后因染色体异常的废弃胚胎发育至囊胚阶段后,等待囊胚自然孵出。将去除透明带的囊胚移入 CDM (HEScGRO medium, Chemicon, 美国)中,充分洗涤 3 次,有明显 ICM 的囊胚,用 1 mL 的注射器针头去除滋养层细胞后,将 ICM 种植在使用 AF 培养体系的培养皿中;无明显 ICM 形成或 ICM 细胞数极少的囊胚,则将整个囊胚种植于新的培养皿中。每天观察 ICM 的生长情况,每隔 2~3 d 换液。原代培养培养 7~14 d 后,挑出克隆中央细胞致密、未分化的团块,用 1 mL 的注射器针头在解剖显微镜下将克隆机械地分成 3~4 块,然后将小细胞团种植于新的培养皿中。每隔 5~7 d 克隆显著增殖或者发现有细胞分化迹象时,使用机械切割法按照 1:3~1:6 的比例进行传代。

1.4 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 多聚甲醛固定 20 min。用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,再用体积分数 0.1% Triton X100 (Sigma, 美国)打孔 10 min,0.01 mol/L PBS 洗 3 次。接下来用体积分数 10% 山羊血清 (HyClone, 美国)室温下封闭 30 min,然后分别加入 4 种一抗 (SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81, 1:50; Chemicon, 美国)。4℃ 孵育过夜后,再用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,加入荧光标记的羊抗人的对应二抗 (Invitrogen, 美国),室温下孵育 1 h,加入 DAPI (Sigma, 美国)染核 5 min,0.01 mol/L PBS 洗 3 次。最后封片胶封片,待胶干后,在荧光显微镜下观察结果。

1.5 RT-PCR 检测 hESC 的多能性

收集 1×10⁶ 的细胞量行 RT-PCR,测定 hESC 多能性因子 Octamer-binding transcription factor 3/4 (OCT3/4)、anoghomeobox (Nanog)、POU class homeobox (POU5F1; 表 1)。参照总 RNA 提取试剂盒 (Qia-gen, 美国)说明用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。RT-

PCR依据试剂盒(Invitrogen,美国)说明进行操作。逆转录反应体系为20 μL ,其中总RNA 2 μL 、5 \times RT buffer 4 μL 、10 mmol/L dNTP mix 1 μL 、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ oligo(Dt)20 1 μL 、20 U/ μL RNA 酶抑制剂1 μL 、200 U/ μL M-MLV 逆转录酶1 μL ,剩余体积由DEPC H₂O 补充,反应在42 $^{\circ}\text{C}$ 作用1 h,进行cDNA的延伸。95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,使酶失活,然后保存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。PCR反应体系25 μL ,其中模板2 μL 、上下游引物各1 μL 、PCR Master Mix 12.5 μL 、dd H₂O 补充至25 μL 。PCR反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 作用5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 作用7 min。PCR产物行2%琼脂糖电泳,凝胶成像分析系统下观察照相。

1.6 体外分化实验

用IV型胶原酶将hESC从人成纤维细胞饲养层(human fibroblast cell feeder, HFF)上消化下来,转移至低粘附性的6孔板中培养。分化培养试剂由体积分数80%DMEM、体积分数20%FBS、1 mmol/L L-glutamine、0.1 mmol/L β -mercaptoethanol和1 mmol/L MEM nonessential amino acids组成。经过7~10 d的悬浮培养后,在显微镜下观察类胚体的形成。收集到类胚体后,提取RNA检测分化相关基因Reduced Expression 1 (*REX-1*)、sex determining region Y-box2 (*SOX-2*)、Lin-28 homolog A (*LIN 28*)、Nucleophosmin-1 (*NPM1*)和Growth Differentiation Factor 3 (*GDF3*)的表达(表1)。

表1 检测干细胞多能性和分化相关基因的RT-PCR引物序列

Table 1 the primer sequence used for polymerase chain reaction and determination of pluripotency and differentiation genes

gene	Forward primer sequence(5'-3')	Reverse primer sequence(5'-3')
<i>Oct 3/4</i>	GACAACAATGAGAACCTTCAGGAGA	TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA
<i>Nanog</i>	CAGAAGCCTCAGCACCTAC	CTGTCCAGGCCTGATGTGT
<i>POU5F1</i>	GACAACAATGAGAACCTTCAGGAGA	TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA
<i>REX-1</i>	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA	CAGCATCCTAAACAGCTCGCAGAAT
<i>SOX-2</i>	CCCCCGCGGCAATAGCA	TCGGCGCCGGGAGATACAT
<i>LIN 28</i>	AGTAAGCTGCACATGGAAGG	ATTGTGGCTCAATTCTGTGC
<i>NPM1</i>	TGGTGCAAAGGATGAGTTGC3	GTCATCATCTTCATCAGCAGC
<i>GDF3</i>	AGACTTATGCTACGTAAAGGAGCT	CTTTGATGGCAGACAGGTTAAAGT
<i>β-Actin</i>	CGGATGTCCACGTCACTT	GTTGCTATCCAGGCTGTGGT

Oct-3/4: octamer-binding transcription factor 3/4; *Nanog*: nanog homeobox; *POU5F1*: POU class 5 homeobox 1; *REX-1*: reduced expression 1; *SOX-2*: sex determining region Y-box 2; *LIN 28*: Lin-28 homolog A; *NPM1*: Nucleophosmin-1; *GDF3*: growth differentiation factor 3

1.7 体内分化实验

细胞用胶原酶消化,离心,沉淀,以PBS悬浮,浓度约 $1\times 10^6/\text{mL}$,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(中山大学医学院动物实验中心)后腿肌肉内,每侧0.1 mL(约 1×10^6 个细胞)。8~10周后可见小鼠腿部有肿块长出,10周后处死小鼠,将畸胎瘤组织用40 g/L多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE染色后显微镜下观察是否存在内、中、外3个胚层的组织。

1.8 hESC核型的检测

将准备用于核型检测的hESC传代至无饲养层的Matrigel包被的培养皿上,隔天换液。当细胞

培养3~4 d,增殖迅速时,加入秋水仙素处理3 h,经2.5 g/L的TrypLE Select消化成单个细胞后,常规空气干燥法制片,Giemsa染色。

2 结果

2.1 AF-hESC系的生长情况

我们前期尝试使用Tyrode's solution法去除透明带和滋养外细胞,获得的ICM转移至无动物源性人包皮饲养层(xeno-free human foreskin fibroblast feeder layers, XF-HFF)XF-HFF/CDM条件下培养3~7 d,ICM逐渐分化,最终未能形成干细胞克隆团(图1A)。而12枚PGT来源的废弃胚胎使用机

械切割法去除透明带和滋养外细胞后,有1枚胚胎获得的ICM在最初的几次传代中观察到有来源于ICM的hESC样的外生物生长,伴随滋养细胞来源的分化细胞(图1B)。随后进一步机械传代hESC样细胞,分化的细胞逐渐消失,新的hESC系形成清晰的克隆边界,细胞表现出典型的hESC形态学特征,即细胞间紧密连接形成鸟巢状克隆,并有高的核质比例(图1C)。目前建立的这一

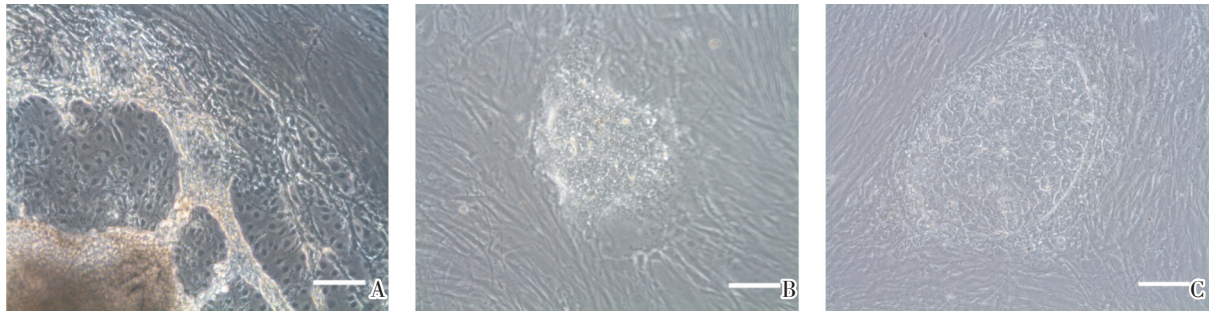
株hESC系已传代超过40代次,仍保持正常的hESC克隆形态。

2.2 免疫荧光检测

对新建立的hESC系在传代培养中以及解冻后进行免疫荧光染色,克隆均表达hESC未分化表面标记物SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-60和Tra-1-81(图2)。

2.3 RT-PCR检测

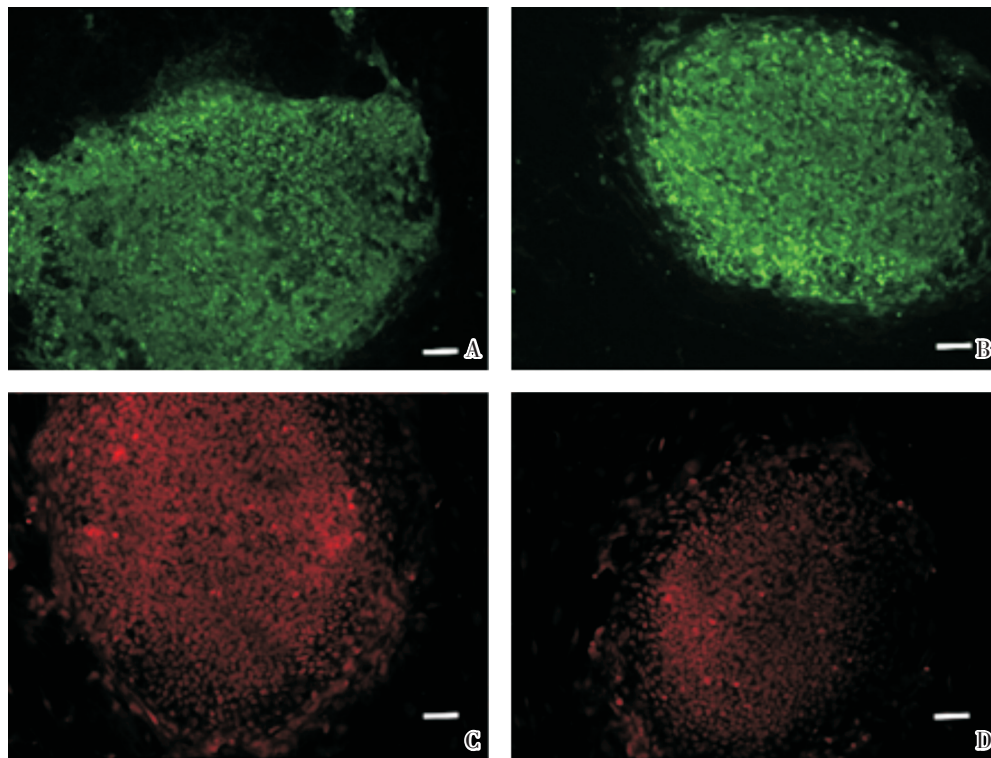
hESC多能性因子和类胚体的3个胚层的表达



A: hESC showed a differentiated state within 3-7 days cultured in XF-HFF/CDM condition. B: hESC exhibited the distinct colonies with clearly defined borders after mechanical passaging. C: The morphology of hESC cultured in XF-HFF/CDM medium for more than 20 passages with a high nucleus/cytoplasm ratio. The scale bar represents 50 μm .

图1 在无动物源性培养体系中建立的人胚胎干细胞克隆形态

Fig.1 The morphology of hESC colonies cultured in xeno-free hESC culture conditions



A: SSEA-3; B: SSEA-4; C: Tra-1-60; D: Tra-1-81. SSEA: stage-specific embryonic antigen; Tra: tumor rejection antigen. The scale bar represents 50 μm .

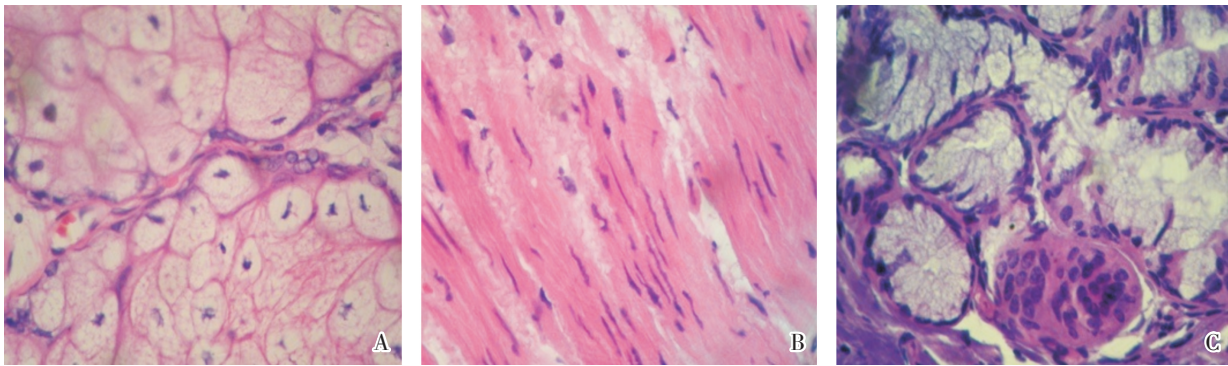
图2 XF/HFF-CDM培养体系中hESC的干细胞标志物表达

Fig.2 Expression of stem cell markers in hESC grown in XF-HFF/CDM

AF-hESC系传代至32代时,收集一定量的细胞量行RT-PCR,结果表明新建立的hESC系表达干细胞多能性因子 Octamer-binding transcription factor 3/4(*OCT3/4*)、Nanoghomeobox(*Nanog*)、POU class 5 homeobox 1(*POU5F1*)(图3)。为进一步检测干细胞系的分化能力,我们将hESC在无饲养层的低粘附皿中用20%FBS-DMEM培养基经过7~10 d的悬浮培养,观察到有类胚体的形成。收集类胚体,加Trizol处理后用于RT-PCR检测到分化相关基因 *REX-1*、*SOX-2*、*LIN28*、*NPM1* 和 *GDF3* 基因的表达(图3),证实新建立的hESC系在体外具有分化的能力。

2.4 形态学结果提示分化潜能

将AF-hESC注入严重免疫缺陷(SCID)小鼠体内能形成畸胎瘤,包括了来源于外、中、内3个胚层的组织:皮脂腺、肌纤维和肠上皮等(图4)。



A: ectoderm: sebaceous gland; B: endoderm: muscle fiber; C: mesoderm: intestinal epithelium($\times 20$)

图4 在XF-HFF/CDM培养体系中新建立的hESC系的体内分化实验

Fig.4 In vivo analysis of the pluripotency of hESC cultured in XF-HFF/CDM

t(1;20)(p13.3;q13.1;图5)。分别对第15、20、25、30代次和解冻后第36代的hESC进行了5次核型鉴定,均为同一异常核型。

3 讨论

hESC建系及培养过程中,外源性成分主要来源于这几个方面:①饲养层细胞或无饲养层基质的动物性成分,或者暴露于含动物蛋白的培养基中;②hESC培养基中添加的动物蛋白血清,如FBS和SR;③常用于去除滋养层细胞获得ICM的免疫外科法也会使胚胎接触动物蛋白。一直以来,研究者们就致力于优化hESC的培养体系,消除培养体系中的动物源性成分,以期获得完全无动物源性的hESC培养体系和hESC系。

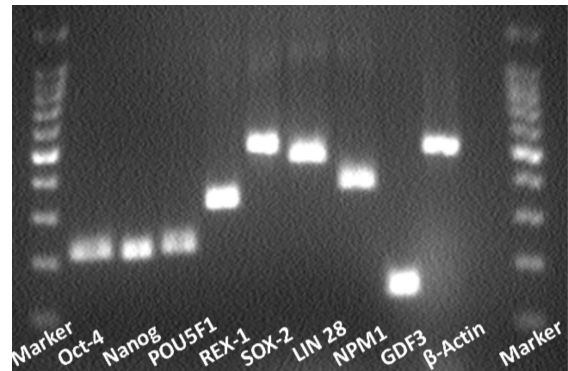


图3 hESC多能性因子的表达

Fig.3 Expression of stem cell markers

这表明AF-hESC具有多向分化潜能。

2.5 染色体核型结果

对建立的干细胞系进行核型鉴定为46,XY,

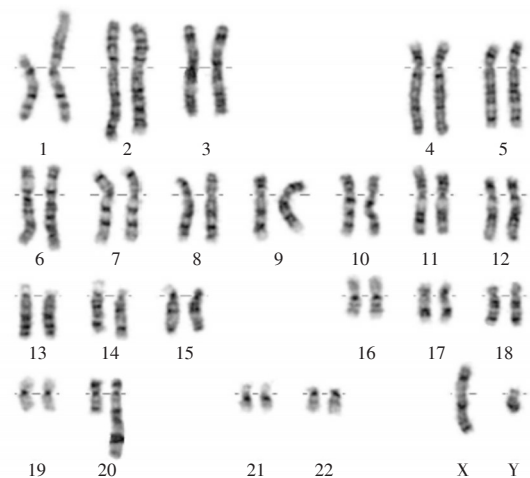


图5 在XF-HFF/CDM培养体系中新建立的hESC系的染色体核型鉴定

Fig.5 G-banding chromosome analysis of the new hESC-line cultured in XF-HFF/CDM

饲养层为hESC的生长所不可或缺。已有证据表明与饲养层有关的多种信号通路参与了hESC多能性的维持。例如饲养层细胞分泌多种生长因子,包括生长因子家族(FGFs)、转化生长因子、激活素A、Wnt family member 3(Wnt3)、骨形态生成蛋白(BMP)拮抗信号等。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状态生长^[2,3,6-11]。与昂贵的成分确定的基质胶相比,人包皮成纤维细胞来源及制备方便,并可长期传代反复利用,已被证实是支持hESC未分化生长的最佳饲养层以及制备条件培养基的饲养层细胞之一^[12-14]。我们建立的AF-HFF在饲养层来源和培养基方面都去除了动物成分的影响,并且使用时间长,在体外培养可长达一个月,仍具有支持hESC生长的能力,大大降低了饲养层制备的繁琐。

建立新的临床级hESC系,分离ICM非常重要。免疫外科法是较为常用的获取ICM的经典方法,成功率高^[15]。但是该法是将胚胎与动物血清(兔抗小鼠的血清)共同孵育,直接接触了动物成分。机械法是待囊胚自然孵出或机械切除透明带后种植于培养皿,培养5d后分离出扩大增殖的ICM细胞进一步传代。此方法避免了接触动物成分,但操作困难,不容易完全去除滋养细胞,而且内胚层样细胞形成使得hESC增殖能力低且极易分化,因而成功率低。对于ICM不明显、细胞数极少的ICM,可在去除透明带后行全囊胚培养。本研究中采用机械切割法或全囊胚法来获得ICM来建立hESC系,以避免ICM分离过程中动物蛋白的污染。血清是培养体系中的关键物质,hESC首先是建立在添加了血清的培养基以及饲养层上的^[15-17],这与当初鼠胚胎干细胞(mESC)系建立的培养条件及其相似。尽管如此,能维持hESC和mESC自我更新的因子之间存在很大的差异。例如,白血病抑制因子(LIF)通过结合LIF受体和gp130来激活JKA/Stat3信号通路^[18-20],而激活的Stat3信号足以维持mESC在含有血清的培养基中增殖和未分化生长。还有研究认为在去除血清的培养基中,BMPs可以协同LIF诱导表达Id基因来维持mESC的自我更新^[21-23]。但是添加LIF与或激活Stat3信号通路却不足以维持hESC自我更新^[6,24]。

在饲养层体系中,以往对免疫外科法和机械法建系率的报道分别为1.8%~37.5%和9.1%~26%。

对在添加不同血清的培养基中的建系率也不尽相同(FCS:5.6%;SR:1.8%~20%;HS:9.1%)。本研究采用机械切割法分离ICM以及不含血清的CDM来培养原代hESC克隆,最终囊胚建系率均较低(1/12)。分析其原因除了上面提到的机械法的缺点所导致外,在本实验中影响建系效率的因素还可能有:①用于建系的废弃胚胎本身来源于染色体异常的患者,胚胎存在染色体异常可能性大;②废胚质量较差,主要为D3小于6细胞的废弃胚胎,或者是行活检后因染色体异常废弃的胚胎,胚胎质量和活检对胚胎的损伤以及囊胚孵出率都有可能影响建系效率;③既往的建系大多是在有血清的培养体系中进行,而本研究中从原代克隆开始就在无血清条件下培养。无血清条件对原代克隆生长的影响可能导致了低的建系率。虽然本研究的建系率低,但不失为一种全新的尝试,建立的hESC系从原代开始就未接触过血清及动物源性物质。在以后的研究中,我们需要借鉴前人的经验,并对培养体系的因子组成进行进一步调整优化,以进一步提高建系效率,有望为批量化建立临床级的hESC系提供可行方案。

使用无血清的CDM来建立hESC系,就需要了解和满足原代克隆生长所需的条件和机制。许多研究中使用CDM的成分不一,但共用的因子有白蛋白、转铁蛋白、胰岛素和bFGF,说明这些因子是维持hESC的自我更新中的关键性因子。本研究中使用的CDM培养基就是主要由DMEM/F12、人胰岛素、转铁蛋白、人血清白蛋白和bFGF(20 ng/mL)等组成。胰岛素一种是胎儿期所需的重要生长因子,过高或过低的胰岛素都会影响新生儿的生长发育:胰岛素受体的变异可引起严重的新生儿生长受限,而暴露于高浓度的胰岛素可导致巨大胎儿。bFGF和Wnt家族成员对哺乳动物的生长发育和ESC的信号传达起着重要作用。白蛋白是血清中主要的蛋白,作为一种载体蛋白,其主要作用是调节类固醇、甲状腺素和其它亲脂类激素。另外,它还有抗氧化作用,可以结合脂肪酸、离子、药物以及代谢产物。而且胆固醇还是甾体激素的前体。Meng等^[25]在2008年尝试构建同样一个hESC培养体系,但研究者的目的在于验证他们建立的AF-HFF系是否具有支持hESC生长的能力,并未对该培养体系进行深入的分析,也没有进一步建立完全无动物源性的hESC系。而我

们在证实了这个培养体系能维持hESC长期未分化增殖能力后,进一步证实了这个培养体系具有支持原代克隆生长的能力,成功地获得了新的hESC系,为临床级的hESC的获得提供了更优化的培养体系和更大的可能。但是,我们的结果显示,该培养体系的建系率要远低于其他含血清的培养体系,提示该培养体系仍存在某些缺陷,在将来的研究中还需要努力去完善。

hESC在体外长期培养、传代和冻存可造成染色体突变,因此,hESC经长期体外培养后鉴定其核型的稳定性非常重要。常用的hESC传代为酶消化法传代,它具有传代速度快的优点。但是用于细胞传代的酶中常含有动物成分,而且酶长期消化细胞容易引起细胞基因的缺失,而机械法在去除动物成分和维持正常的核型上避免了酶法传代的缺陷,但缺点是劳动强度大,耗时长,不适用于扩增临床治疗大批量hESC。Ludwing等^[26]在一个成分确定的完全无动物源成分的培养系统TesR1中建立了两个新的hESC系,但是两个hESC系在该系统传代过程中先后发生了染色体畸变,可能为长期酶法传代或者长期处于超生理浓度的生长因子(如100 ng/mL bFGF)的刺激下所致,也可能与培养体系中存在某些促进染色体变异或者缺少某些维持核型稳定的因子有关。我们从细胞系建立后第15代起,每传代5代直至45代次均对AF-hESC进行核型鉴定,证实均为同一异常核型

46,XY,t(1;20)(p13.3;q13.1),并且与该胚胎的活检核型相符。因此我们认为该xeno-free体系具有让新建立的hESC系长期保持核型稳定的能力。近年来,多潜能诱导性的干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)的出现为干细胞系的来源提供了另一种的途径,并且避免了伦理学争议等问题,已成为干细胞研究的热点。但是,iPS细胞系仍然存在许多问题。人胚胎干细胞中尚未解决的问题,如干细胞自我更新和分化等行为的调控机制、体外定向分化诱导等,iPS同样不能解决。而另一方面,iPS细胞又引入了诸多新的问题,例如诱导体细胞重编程的分子机制尚不明确、逆转录病毒和慢病毒的载体有诱发肿瘤的潜在风险、基因转染也存在感染的潜在风险、iPS细胞的转染率等等。由此看来,人胚胎干细胞特别是PGT来源的携带遗传性疾病(例如地中海贫血、脊髓肌萎缩、遗传性耳聋等一系列单基因疾病)的hESC系的建立,在临床应用及研究等方面仍具有不可替代的优势,临床级的人胚胎干细胞在临床治疗和基础研究领域仍具有广阔的应用前景^[27]。

但是,建立符合临床标准的hESC系只是临床治疗的第一步,并不是终极目标。hESC在疾病治疗中是扮演活性药物成分还是原材料的角色,或者只是中间产物,到目前还没有明确定位。在hESC系建立以后,大规模的生产繁殖以及定向分化,还存在着更大的挑战。

参考文献

- [1] Zhang D, Mai Q, Li T, et al. Comparison of a xeno-free and serum-free culture system for human embryonic stem cells with conventional culture systems[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 101.
- [2] Lu J, Hou R, Booth C J, et al. Defined culture conditions of human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(15): 5688-5693.
- [3] Yao S, Chen S, Clark J, et al. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(18): 6907-6912.
- [4] Cheng A, Cain SA, Tian P, et al. Recombinant extracellular matrix protein fragments support human embryonic stem cell chondrogenesis[J]. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(11-12): 968-978.
- [5] 张丹,麦庆云,李涛,等. 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[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2012, 33(6): 828-834.
- [6] Zhang D, Mai QY, Li T, et al. Comparison of A novel xeno-free culture system with other different culture systems for HESC[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2012, 33(6): 828-834.
- [7] Xu RH, Peck RM, Li DS, et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells[J]. *Nat Methods*, 2005, 2(3): 185-190.
- [8] Wang L, Li L, Menendez P, et al. Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse

- embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development[J]. *Blood*, 2005, 105(12):4598-4603.
- [8] Xu C, Rosler E, Jiang J, et al. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(3):315-323.
- [9] 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[J]. *Nat Med*, 2004, 10(1):55-63.
- [10] Kim SJ, Cheon SH, Yoo SJ, et al. Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(2):534-540.
- [11] 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.
- [12] Richards M, Tan S, Fong CY, et al. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2003, 21(5):546-556.
- [13] Amit M, Itskovitz-Eldor J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells[J]. *J Anat*, 2002, 200(Pt 3):225-232.
- [14] Amit M, Margulets V, Segev H, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(6):2150-2156.
- [15] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282(5391):1145-1147.
- [16] Park SP, Lee YJ, Lee KS, 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.
- [17] Pan C, Hicks A, Guan X, et al. SNL fibroblast feeder layers support derivation and maintenance of human induced pluripotent stem cells[J]. *J Genet Genomics*, 2010, 37(4):241-248.
- [18] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides[J]. *Nature*, 1988, 336(6200):688-690.
- [19] Williams RL, Hilton DJ, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells[J]. *Nature*, 1988, 336(6200):684-687.
- [20] Purpura KA, Morin J, Zandstra PW. Analysis of the temporal and concentration-dependent effects of BMP-4, VEGF, and TPO on development of embryonic stem cell-derived mesoderm and blood progenitors in a defined, serum-free media[J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(9):1186-1198.
- [21] Ying QL, Nichols J, Chambers I, et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3[J]. *Cell*, 2003, 115(3):281-292.
- [22] Morikawa M, Koinuma D, Mizutani A, et al. BMP Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal through Distinct Functions of Different Kruppel-like Factors[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(1):64-73.
- [23] Watanabe M, Fung ES, Chan FB, et al. BMP4 acts as a dorsal telencephalic morphogen in a mouse embryonic stem cell culture system[J]. *Biol Open*, 2016, 5(12):1834-1843.
- [24] Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(5):770-778.
- [25] Meng G, Liu S, Krawetz R, et al. A novel method for generating xeno-free human feeder cells for human embryonic stem cell culture[J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(3):413-422.
- [26] 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.
- [27] McGill TJ, Bohana-Kashtan O, Stoddard JW, et al. Long-term efficacy of GMP grade Xeno-free hESC-derived RPE cells following transplantation[J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2017, 6(3):17.

(编辑 余菁)