

·基础研究·

胚胎干细胞体外诱导分化为 CD34⁺造血前体细胞周其锋¹, 何志旭², 冯炼强¹, 黄绍良², 李树浓³

(中山大学 1. 免疫学教研室, 2. 孙逸仙纪念医院儿科, 3. 病理生理学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)体外诱导分化, 制备 CD34⁺造血前体细胞。【方法】胚胎干细胞在含甲基纤维素培养液中分化形成胚胎体(embryoid body, EB), 然后加入造血刺激因子诱导产生 CD34⁺造血前体细胞, 间接免疫荧光及流式细胞仪检测分化结果。【结果】胚胎干细胞分化第 9~15 天均有 CD34⁺细胞, 第 13 天比例最高, 可达 17.36%。【结论】胚胎干细胞分化成胚胎体, 在造血刺激因子的存在下, 可大量获得 CD34⁺造血前体细胞。

关键词: 胚胎; 细胞分化; 造血干细胞

中图分类号: R321; R329 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)5S-0001-02

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)是从囊胚期内细胞团分离得到的^[1,2], 不仅可以在体外长期传代培养, 而且具有向几乎所有组织细胞类型(胚胎滋养层细胞除外)分化的发育全能性^[3], 因此在组织损伤性疾病等的临床治疗方面, 胚胎干细胞显示出广阔的应用前景。本研究应用相应造血刺激因子体外诱导小鼠胚胎干细胞分化为 CD34⁺造血前体细胞, 目的是为进一步研究胚胎干细胞来源造血前体细胞的特性建立基础。

1 材料与方 法

1.1 小鼠胚胎干细胞株 ESE 14.1 细胞传代培养

常规方法复苏 ESE 14.1 细胞于明胶处理过的 25 mL 培养瓶中, 培养液为高糖 DMED, 含 0.01 g/L 鼠白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF), 48 h 后换液, 3 d 后胰酶消化传代。

1.2 ESE 14.1 细胞分化培养

取生长状态好的 ESE 14.1 细胞, 胰酶消化, 用 IMDM 分化培养液(含 9 g/L 甲基纤维素、0.04 g/L 鼠干细胞因子)配成单细胞悬液, 调整细胞数每毫升 2 000 个, 种于 6 孔板, 每孔 2~3 mL, 第 6 天添加含 0.18 g/L 鼠干细胞因子, 0.03 g/L 人白细胞介素-3, 0.03 g/L 人白细胞介素-6 3 000 U/L 人促红细胞生成素的 IMDM 液每孔 1~2 mL; 分化的空白对照组仅用 9 g/L 甲基纤维素的 IMDM 液, 不含任何细胞因子。

1.3 CD34⁺细胞的免疫荧光检测

分化第 5 天起, 每天吸取 1 孔分化细胞, 至 10 mL 离心管, 用 2~3 mL 的 PBS 冲洗 6 孔板, 并入离心管, 1 500 r/min ($r=12$ cm)离心 10 min, 弃上清, PBS 清洗 2 次, 胰酶消化 2~3 min, 适量 PBS 冲洗, 再次离心并弃上清, PBS 重悬细胞, 调整细胞数至每毫升 5×10^6 ; 取 100 μ L 细胞悬液至 1 mL 的 Eppendorf 管中, 3 000 r/min ($r=12$ cm)离心 10 min, 弃上清, 留沉淀, 加入 25 μ L 大鼠抗小鼠 CD34 单抗, 对照孔加 PBS, 混匀, 置 4 $^{\circ}$ C 作用 30 min, 取出后用 PBS 洗 3 次, 再加入 50 μ L 兔抗大鼠 IgG-FITC(含 1 g/L 的 Evan 氏蓝), 4 $^{\circ}$ C

避光作用 30 min, 用 PBS 洗 3 次, 离心后加 20 μ L 的 PBS 混匀, 滴片立即在荧光显微镜下观察。

1.4 流式细胞仪检测

取上述剩余细胞悬液 50 μ L, 分别加入 2 μ L 抗小鼠 CD34-FITC 和 2 μ L 抗小鼠 CD38-PE 荧光标记抗体; 设阴性对照管分别加入 2 μ L 小鼠 IgG1-FITC 和 2 μ L 小鼠 IgG1-PE, 4 $^{\circ}$ C 作用 30 min, 再加 PBS 液 2 mL, 混匀, 2 000 r/min ($r=12$ cm)离心 10 min, 去上清, 加入 450 μ L 固定液, 混匀, 置 4 $^{\circ}$ C, 待上机检测 PE 和 FITC 单标记和双标记参数。

2 结 果

2.1 镜下观察传代培养的 ESE 14.1 细胞

未分化的胚胎干细胞贴壁成巢状生长, 难以辨认单个细胞形态, 而在巢状细胞团周围散在分布少量形态多样的细胞, 是已分化细胞(图 1)。

2.2 镜下观察分化培养的 ESE 14.1 细胞

2~3 天起可见悬浮生长的胚胎体(embryoid body), 由几个细胞构成; 随着细胞的分裂和分化, 胚胎体逐渐增大, 分化第 6 天可见形状各异的较大胚胎体, 故选于第 6 天添加造血刺激因子(图 2)。

2.3 间接免疫荧光检测分化细胞表面抗原 CD34

Evan 氏蓝复染使细胞在荧光显微镜下呈红色, FITC 标记荧光抗本呈黄绿色, 故红色的细胞膜上发黄绿色荧光的为阳性细胞。分化第 9 天至第 15 天, 均可见 CD34 阳性细胞(图 3)。

2.4 流式细胞仪检测 9~15 d 的分化细胞

分化第 13 天 CD34⁺细胞比例最高, 可达 17.36%。分化对照组因为没有添加任何细胞因子, 实际上是胚胎干细胞在甲基纤维素培养液中形成胚胎体的自由分化体系, 故 CD34⁺细胞比例较低, 仅为 0.35%。

3 讨 论

为使胚胎干细胞在传代培养过程中保持不分化, 一般都采用将胚胎干细胞种于胚胎成纤维细胞等滋养层细胞上培

收稿日期: 2002-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970319)

作者简介: 周其锋(1966-), 男, 江苏盐城人, 博士生, 讲师, 李树浓, 教授, 博士生导师, 本课题负责人。

养^[4]。本研究采用培养液中添加白血病抑制因子的方法,可良好保持胚胎干细胞的未分化状态,而无需滋养层细胞,这样在接下来进行的诱导分化过程,及以后将进行的分化过程信号传导及基因调控等分子生物学研究中,可避免滋养层细胞可能带来的干扰。

目前尚无诱导胚胎干细胞发育为纯的分化细胞群的方法。本室已采用分步诱导的方法体外诱导胚胎干细胞分化为其它造血细胞^[3],其分化效率较高。本研究则在去除白血病抑制因子后,使胚胎干细胞在含甲基纤维素的培养液中分化形成胚胎体,然后在培养液中添加干细胞因子、白细胞介素-3、白细胞介素-6和促红细胞生成素等几种造血刺激因子以增加 CD34⁺造血前体细胞的产量,结果是分化第9日开始出现 CD34⁺造血前体细胞,分化第13天其含量可达17.36%,此法分化率虽低于前述的分步诱导,但其步骤简单,需时较短,各种造血因子消耗较少,且其产生的相关细胞已足够用于进一步研究胚胎干细胞来源造血前体细胞的特性,所以应当成为胚胎干细胞体外诱导分化的另一种可行方

法。

(本文图1~3见封2)

参考文献:

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(9): 154.
- [2] Gail R M. 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] Bradley A, Evans M, Kaufman M H, et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines[J]. Nature, 1984, 309: 255.
- [4] Palacios R, Golinski E, Samaridis J. In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(76): 7530.
- [5] 乔春平,李树浓,黄绍良,等.从胚胎干细胞诱导发育为浆细胞的体外实验研究[J].中国病理生理杂志,1999,15(1):24.

(编辑 张敏瑞)

气相色谱-质谱选择离子法测定人尿中阿拉伯糖醇 D/L 比率

张选红¹, 林广云¹, 蔡葵花¹, 席丽艳², 郑文晖¹

(1. 中山大学中山医学院分析测试中心, 广东 广州 510089; 2. 中山大学附属第二医院皮肤科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】建立一种测定人尿样中阿拉伯糖醇 D/L 比率的方法。【方法】用气相色谱-质谱联用技术(选择离子监测)检测人尿中阿拉伯糖醇 D/L 比率。【结果】人尿样中阿拉伯糖醇 D/L 比率精密度、稳定性符合规定, RSD(%)均小于 10%; 线性范围为 0.1~20 mg·L⁻¹, 相关系数为 0.9997 (n=5); D-阿拉伯糖醇、L-阿拉伯糖醇的最低检测限均为 20 μg·L⁻¹ (S/N=3)。【结论】本实验方法简便、快速、准确, 可用于系统性念珠菌病的诊断。

关键词: 气相色谱-质谱; 选择离子法; 阿拉伯糖醇

中图分类号: R972.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)5S-0002-03

系统性念珠菌病, 是一种高发病率和高死亡率的疾病^[1]。近年来, 其发病率正在逐渐增高, 对其诊断方法的要求也越来越高, 因此, 一种快速而准确的方法对其早期诊断至关重要。D-阿拉伯糖醇是感染系统性念珠菌的主要代谢产物, 正常人的血中和尿中都存在 D-阿拉伯糖醇和 L-阿拉伯糖醇^[2], 但因二者含量均很低, 给实际测定带来困难。国内尚未有人应用测定阿拉伯糖醇 D/L 比率来诊断早期感染系统性念珠菌病。我们利用 GC/MS 技术, 根据其灵敏度高、准确性强的特点, 结合衍生化试剂^[3]将阿拉伯糖醇的羟基卤代酰化, 使极性大的阿拉伯糖醇衍生成极性小的化合物, 再在手性柱上将阿拉伯糖醇的 D 型与 L 型分离, 从而建立了一种检测阿拉伯糖醇 D/L 比率的快速而准确的方法, 为系统性念珠菌病的诊断提供一种新的途径。

1 实验部分

1.1 标准品与试剂

D-阿拉伯糖醇标准品: 含量 > 99%, 批号为 400560/

144099 FluKa 产品; L-阿拉伯糖醇标准品: 含量 > 99%, 批号为 359100/1598 FluKa 产品; 正己烷、乙醚均为国产分析纯; 乙腈, 美国 Fisherbrand HPLC 级; 二氯甲烷: 进口色谱纯; 三氟乙酸酐, ACROS Organics New Jersey, USA; 实验用水为新鲜双蒸水。

1.2 仪器与材料

美国 HP10134B 气质联用系统: 包括 HP5890 II GC、MSD5971A 及 10134B 软件系统。

其它: CP7502-WCOT fused silica 柱; LXJ II 型离心沉淀机; 800 型离心机; 有机微孔滤管; DZF-3 型真空干燥箱; XW-90 型旋涡混合器; Mettler AE-260 分析电子天平; hp 微量进样针 10 μL; Finnpiptette 精密移液器。

1.3 分析条件

色谱条件: 采用程序升温, 100 °C 开始, 保持 1 min, 以每 min 7 °C 升温速率升到 125 °C, 保持 3.5 min; 再以每 min 15 °C 升温程序升到 180 °C, 保持 8 min; 进样口温度 170 °C; 载气为高纯氦(He), 纯度 ≥ 99.999%, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 总

收稿日期: 2002-05-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970043)

作者简介: 张选红(1976-), 女, 广东兴宁人, 药师。

胚胎干细胞体外诱导分化为 CD34⁺造血前体细胞 (正文见第 1 页)

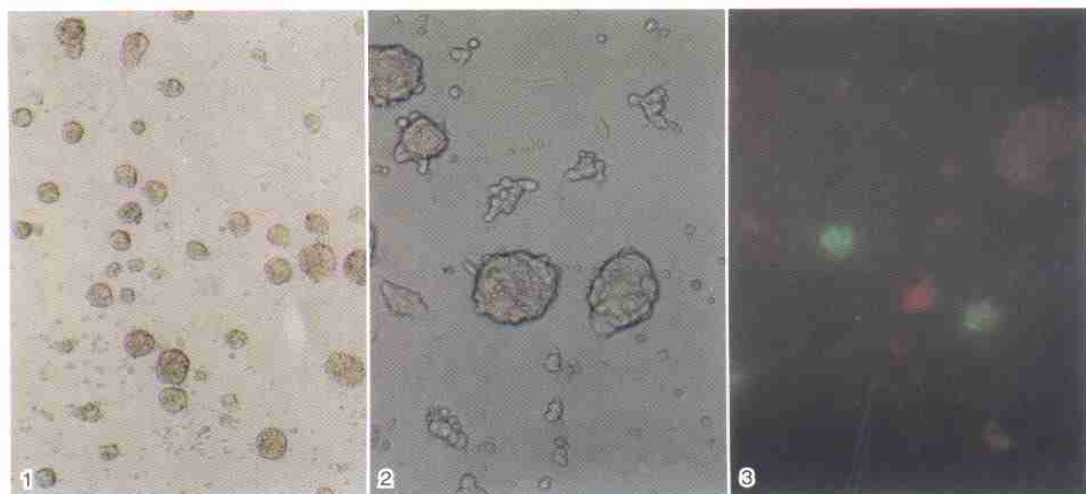


图 1 未分化的 ESE14.1 细胞 ($\times 40$)
 图 2 分化第 6 天的胚胎体 ($\times 40$)
 图 3 分化第 9 天免疫荧光阳性的细胞 ($\times 100$)

自控微波技术在肾穿刺活检六胺银染色中的应用 (正文见第 143 页)

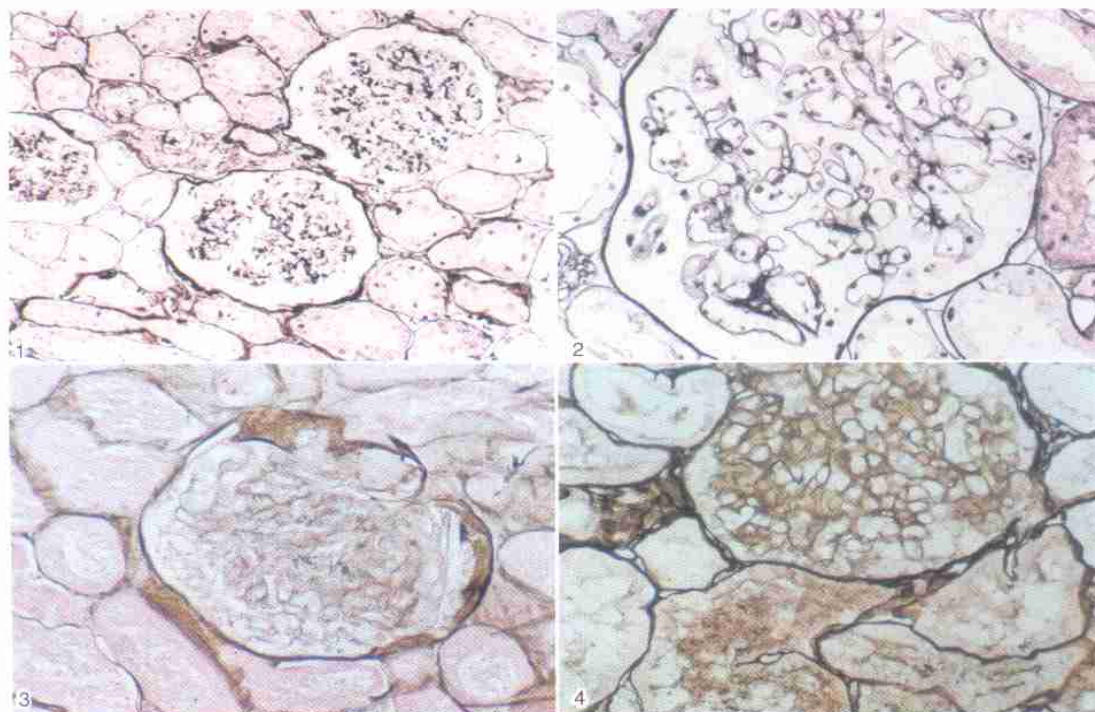


图 1 应用自控微波仪促进肾穿刺组织六胺银染色 ($\times 100$)
 显示肾基底膜, 呈黑色
 图 2 应用自控微波仪促进肾穿刺组织六胺银染色 ($\times 400$)
 显示肾基底膜, 呈黑色
 图 3 应用家用微波炉促进肾穿刺组织六胺银染色 ($\times 200$)
 显示肾基底膜, 呈黑色, 肾小球毛细血管基底膜着色浅, 并有银沉淀
 图 4 应用家用微波炉促进肾穿刺组织六胺银染色 ($\times 200$)
 显示肾基底膜, 呈黑色, 肾小球基底膜着色过深, 并有银沉淀