人胚胎干细胞支原体感染的检测和控制 *

邓磊玉 林 戈 卢光琇△

(中南大学生殖与干细胞工程研究所 人类干细胞国家工程研究中心 湖南 长沙 410078)

摘要 目的：优化检测人胚胎干细胞支原体感染的方法,寻找控制支原体感染的途径。**方法：**利用 hoeshest33258 染色检测感染支原体的人胚胎干细胞,接触感染培养基的人胚胎成纤维细胞,比较两种方法检测效果；利用 RNApolymerase Ⅱ作为新的鉴定指标,直接检测感染支原体的人胚胎干细胞；利用抗支原体药物对感染细胞进行处理，检测处理后细胞的感染状态。**结果：**hoechest33258 染色后,受支原体感染人胚胎干细胞检测效果不明显,接触感染培养基的人胚胎成纤维细胞在培养 7 天后有拉丝状染色分布；RNApolymerase Ⅱ染色则能直接检测出受感染的人胚胎干细胞表面粘附的支原体；利用抗支原体药物 Plasmocin 对感染细胞进行处理后 hoechest33258 拉丝状染色基本消失,但持续培养后重新出现。**结论：**间接法使用 hoechest33258 染色或者直接利用 RNApolymerase Ⅱ染色都能够很好地检测人胚胎干细胞培养过程中的支原体感染。抗支原体药物 Plasmocin 能够有效减轻支原体感染情况,但是不能完全杀灭支原体。

关键词：人胚胎干细胞；支原体；免疫荧光；抗支原体药物

中图分类号：Q2-3 Q75 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2011)08-1451-03

Examination and control of mycoplasma infection in human embryonic stem cell culture*

DENG Lei-yu, LIN Ge, LU Guang-xiu△

(Institute of Reproductive & Stem Cell Engineering, Central South University, National Engineering & Research Center of Human Stem Cells, Xiangya Road 88#, Changsha, Hunan, China, 410078)

ABSTRACT Objective: To optimize mycoplasma detection with immunofluorescence methods and control the mycoplasma infection in human embryonic stem cell (hES) culture. Methods: Compare the two methods for mycoplasma detection by hoeshest33258, one for direct staining of hES clones, another for indirect staining of feeder cells which touched hES culture medium sample. Took RNApolymerase Ⅱ as a new detector for hES infection. Detect mycoplasma infection after Plasmocin treatment. Results: Hoechest33258 stanining showed linear stanining results when indirect sample were tested but there were no distinct results in direct staining sample. RNApolymerase Ⅱ was a good detector for mycoplasma infection. Linear stanining of hoeshest33258 almost disappeared after Plasmocin treatment but appeared again in 2 months when withdrew the treatment. Conclusions: Indirect staining of hoeshest33258 and RNApolymerase Ⅱ staining are both available methods for mycoplasma detection. Plasmocin does not cure mycoplasma infection but relieves it.

Key Words: human embryonic stem cell; mycoplasma; immunofluorence; Plasmocin

Chinese Library Classification(CLC):Q2-3 Q75 Document code:A

Article ID:1673-6273(2011)08-1451-03

前言

人胚胎干细胞具有不断增殖的能力，这为得到大量的移植细胞提供了可能[1],但长期培养过程中可能受到的微生物感染是需要排除的安全隐患。支原体感染与细菌或真菌感染不同,培养物在短时间内没有明显的肉眼可见的性状改变,但一旦支原体繁殖旺盛就会对细胞的生长状态和使用造成严重影响,并且容易在细胞株间交叉感染。支原体感染后的人胚胎干细胞不仅会状态不佳,且会带来遗传物质不稳定的隐患。当实验室出现支原体感染的细胞时,容易与其它细胞交叉感染,带来更多的危害。本文将对支原体感染的检测及防治方法进行探讨。

1 材料和方法

1.1 试剂

文中所述人胚胎干细胞系和成纤维细胞系均由本室建立。Hoechest33258 染料购自 sigma 公司,RNApolymerase Ⅱ一抗体购自 Covance 公司,荧光二抗购自 Invitrogen 公司。抗支原体药物购自 Invivogen 公司。

人胚胎干细胞基础培养基为 DMEM F12 (Invitrogen),使用前添加 15%SR (Invitrogen)、0.1mMβ -ME (Invitrogen)、2mM

* 基金项目：国家高技术研究发展计划(863 项目)(2006AA02A102),国家重点基础研究发展计划(973 项目)(2007CB948103),高等学校博士学科点专项科研基金(20090162110017)

作者简介：邓磊玉(19-),女,博士,主要研究方向：人类胚胎干细胞

△通讯作者：卢光琇,电话：：0731-84805319,E-mail: lugxdirector@yahoo.com.cn

(收稿日期：2011-02-06 接受日期：2011-02-28)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

L-Glu (sigma)、4ng/ml bFGF (Invitrogen)、1%非必需氨基酸(sigma)。人胚胎成纤维细胞基础培养基为 Hi-DMEM (Invitrogen)使用前添加 10%FBS (Invitrogen)。

其它试剂有,胰酶(Invitrogen),丝裂霉素 C (sigma),甲醇,冰醋酸(湖南师大试剂厂),Plasmocin (InvivoGen)。

1.2 方法

1.2.1 人胚胎干细胞的培养 六孔板中培养,机械切割法传代,每周传代一次,将切割下的细胞团种植于 FEEDER 上用人胚胎干细胞培养基共培养,每天更换新鲜培养基。培养箱条件为,37℃,5%CO_2,水盘应保证有充足灭菌双蒸水。

1.2.2 人成纤维细胞的培养 胰酶消化传代,每周传代一次,使用 7-10 代细胞,制作 FEEDER 前用 10μ g/ml 丝裂霉素 C 处理 2.5 小时,无钙无镁 PBS 洗 2 遍后胰酶消化,种植于六孔板,人胚胎干细胞传代前更换人胚胎干细胞培养基。

1.2.3 利用 Hoechest33258 监测人胚胎干细胞的支原体感染与 FEEDER 共培养的人胚胎干细胞可利用机械传代后剩余的细胞进行监测。用于监测的细胞应加入充足培养基后培养 7-10 天,此期间不更换培养基。检测时取出待检培养皿,吸去旧培养基用 DPBS 洗 1 遍,尽量吸干 DPBS,待细胞稍干后用新鲜配制的固定液(甲醇∶冰醋酸=3:1)固定 15 分钟,DPBS 洗 2 遍,如果需要节约试剂,可用组化笔画直径 0.5cm 左右小圈,滴入适量 Hoechest33258 染液覆盖监测细胞,10-20 分钟后吸去染液,DPBS 洗 2 遍,荧光显微镜下观察。

无 FEEDER 体系下培养的人胚胎干细胞使用间接感染法,准备种好 feeder 的培养板,取 200ul 待测样本培养基混入 feeder 培养基中,培养 7 天后用上述相同的方法检测 feeder 感染情况。

1.2.4 利用 RNApolymerase Ⅱ检测人胚胎干细胞的支原体感染 检测时取出待检培养皿,吸去旧培养基用 DPBS 洗 1 遍,尽量吸干 DPBS,用新鲜配制的固定液(甲醇∶冰醋酸=3:1)固定 15 分钟,DPBS 洗 2 遍,加入 RNApolymerase Ⅱ一抗室温孵育 1 小时,DPBS 洗 2 遍,加入二抗孵育 1 小时,DPBS 洗 2 遍,镜检。

1.2.5 利用抗支原体药物控制人胚胎干细胞的支原体感染 在人胚胎干细胞培养基中按 1:1000 浓度加入 Plasmocin,每天换液,持续两个培养周期(14 天)。

2 结果

2.1 利用免疫荧光法检测支原体感染的效果

人胚胎干细胞本身的形态特点是呈克隆状生长,细胞核质比大且呈圆形,利用传统的 Hoechest33258 染色进行检测时,不易看出是否有支原体感染(图 1A)与没有感染细胞(图 1B)之间的差别。如果待检的人胚胎干细胞是与饲养层共培养,可以在检测时直接观测饲养层细胞是否出现丝状染色即可(图 1C)。对于无饲养层体系下培养的人胚胎干细胞,可用间接感染法,检测被间接感染的饲养层细胞呈阳性(图 1D)。

此外,RNApolymerase Ⅱ亦能体现出感染(图 2A)和未感染细胞(图 2B)之间的差异。前者出现渣滓样小亮点,后者则很干净,仅体现出人胚胎干细胞核的染色。

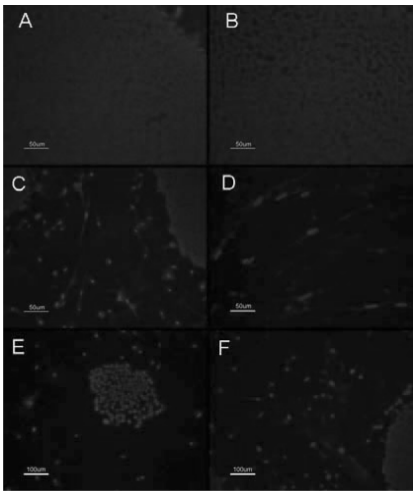

图 1 Hoechest33258 染色图

Fig 1 Hoechest33258 staining

A. 有支原体感染的人胚胎干细胞克隆;B.没有支原体感染的人胚胎干细胞克隆;C. 有支原体感染时与人胚胎干细胞共培养的饲养层细胞出现丝状染色;D.间接感染的饲养层细胞也呈现丝状染色;E.添加 Plasmocin 培养两周后丝状染色基本消失;F. 去除 Plasmocin 培养 4 周后丝状染色重新出现。

Figure 1. Hoechest33258 staining. A. hES clone with mycoplasma infection; B. hES clone without mycoplasma infection; C. Co-cultured feeder cells showed the linear-like staining; D.Feeder cells touched medium of infected hES showed the linear-like staining; E. Linear-like staining almost disappeared after Plasmocin treatment for two weeks; F. Linear-like staining appeared again in 2 months when withdrew the treatment.

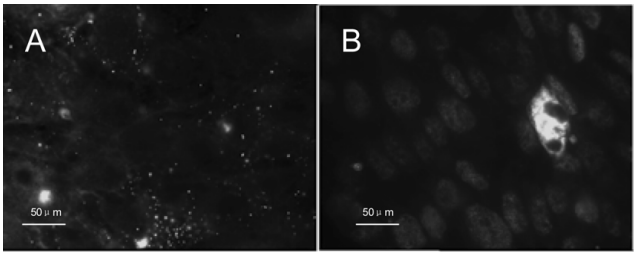

图 2 RNA polymerase Ⅱ染色

Fig 2 RNA polymerase staining

A. 支原体感染 hES 克隆;B. 无支原体感染 hES 克隆。

Fig 2 RNApolymerase Ⅱstaining. A. hES clone with mycoplasma infection; B. hES clone without mycoplasma infection.

2.2 抗支原体药物能够有效控制支原体感染,但无法彻底杀灭支原体

经过抗支原体药物 Plasmocin 两周的处理后,支原体感染明显减轻,Hoechest33258 染色未见明显丝状染色(图 1E),但停药 4 周后,感染加重,Hoechest33258 染色可见明显丝状染色(图 1F)。

3 讨论

要进行严格的筛查[2,3]。由于其自身的永生化特点,培养过程往往也具有连续性,长时间的连续培养和体外操作使胚胎干细胞容易受到外来微生物的污染而失去其临床和科研意义[4]。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

支原体感染在细胞培养过程中是一种常见的污染类型，人胚胎干细胞培养过程中除环境因素之外[5]，一些特定的培养物如胎牛血清、feeder 细胞都有可能带来支原体感染的风险。

支原体感染后的细胞往往生长状态不佳，死细胞增多，甚至遗传稳定性也受到影响[6]。因此，对细胞培养过程中支原体感染的检测和控制就显得尤为重要。支原体检测的方法很多培养法，DNA 荧光染色法，PCR 法[7]，单克隆抗体免疫荧光法[8]，生化发光法，DNA 探针杂交法近年来均有文献报道，在人胚胎干细胞培养过程中使用的方法多为 DNA 荧光染色法，生化发光法和 PCR 法。本文中使用的 Hoechest33258 染色为 DNA 荧光染色法，该法操作简单，成本低廉，经过简介感染的方式能够很好地检测人胚胎干细胞的支原体感染。生化发光法和 PCR 法较 DNA 荧光染色法敏感，但是成本相对较高且易造成假阳性，需要有经验的实验室经过优化后采用。本文中也采用免疫荧光法，利用 RNApolymerase Ⅱ作为指标检测支原体感染，可以作为一种新参考。

对于支原体感染细胞的治疗，方法并不如临床治疗支原体丰富[9,10]。支原体感染后的胚胎干细胞经过抗支原体药物处理后能够在短时间内控制支原体的生长，但无法完全治愈。因此，此法只适合短期内挽救细胞实验，不适合处理仍需继续培养的人胚胎干细胞。由于同实验室内培养的细胞株之间容易交叉感染，在没有找到更好的治疗支原体感染方法前，感染细胞建议妥善管理或丢弃。

参考文献 (References)

[1 Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research [J]. BMC Med, 2009 Jun 11;7:29

[2] Crook, J. M., T. T. Peura, et al. The generation of six clinical-grade human embryonic stem cell lines[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 490-4

[3] O'Rourke, P. P., M. Abelman, et al. Centralized banks for human embryonic stem cells: a worthwhile challenge [J]. Cell Stem Cell, 2008,2(4): 307-12

[4] Carol B. Ware, Angelique M.et.al. A Comparison of NIH-Approved Human ES Cell Line[J]s. Stem Cells, 2005:0452

[5] Cobo, F., G. N. Stacey, et al. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation." [J]. Appl Microbiol Biotechno-l,2005,68(4): 456-66

[6] Paton, G. R., J. P. Jacobs, et al Chromosome changes in human diploid-cell cultures infected with Mycoplasma [J]. Nature,1965, 207 (992): 43-5

[7] Molla Kazemiha, V., M. A. Shokrgozar, et al. PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience[J]. Cytotechnology ,2009,61(3): 117-24

[8] Payment, P., M. Corbeil, et al. Detection of Mycoplasma hominis and Mycoplasma orale in cell cultures by immunofluorescence [J]. Can J Microbiol,1978,24(6): 689-92

[9] Paessler, M., A. Levinson, et al. Disseminated Mycoplasma orale infection in a patient with common variable immunodeficiency syndrome[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 200244(2): 201-4

[10] Wei, W. Continuous versus intermittent azithromycin administration for treatment of Mycoplasma pneumonia-induced pneumonia: effects and drug resistance in rats [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2008,30(8): 1918-9, 1922

（上接第 1466 页）

[9] Goetze JP, JF Rehfeld, J Carlsen, et al. Apelin: a new plasma marker of cardiopulmonary disease[J]. Regul Pept, 2006, 133(1-3): 134-138

[10] Chong KS, RS Gardner, JJ Morton, et al. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2006, 8(4): 355-360

[11] 李梅秀, 田国忠, 欧叶涛, 等.大鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定[J]. 解剖学研究, 2005(03): 176-178.
Li Meixiu, Tian Guozhong, Ou Yetao, et al. The establishment of a chronic heart failure model by adrinmycin and the judgement of the indexes[J]. Anat Res, 2005(03):176-178 (In Chinese)

[12] Tonnessen T, G Christensen, E Oie, et al. Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats [J]. Cardiovasc Res,1997, 33(3):601-610

[13] 朱秒章, 袁文俊, 傅博威, 等.心血管生理学和临床[M].第 1 版.(北京)高等教育出版社, 2004: 224-227
Zhu Miaozhang, Yuan Wenjun, Fu Bowei, et al. Physiology and clinical of cardiovascular [M]. The fist edtion. (Bei Jing) Higher Education Press, 2004:224-227 (In Chinese)

[14] Jougasaki M, CM Wei, LJ McKinley, et al. Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure[J]. Circulation, 1995, 92(3): 286-289

[15] Nishikimi, T, Y Saito, K Kitamura, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 1995, 26(6): 1424-1431

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net