

·技术与方法·

提高人胚胎干细胞建系率的优选培养体系与方法 *

骆玉梅^{1,2} 范 勇¹ 陈欣洁¹ 李少英¹ 郑育红¹ 徐 霞^{2△} 孙筱放^{1△}

(1 广州医学院第三附属医院 广东 广州 510150 2 广州医学院检验系 广东 广州 510182)

摘要 目的:建立一种从废弃胚胎中提高囊胚形成率和质量的培养体系,寻找多种促进内细胞团(ICM)数目增多、贴壁、增值的方法,提高人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)建系效率,建立人胚胎干细胞库。方法:将 179 枚 IVFDay3 废弃的胚胎放入优选培养体系中培养(G2.5 培养液中添加 10%人血清蛋白,人白细胞抑制生长因子(hLIF),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF))。到 Day7 将形成的囊胚全部用机械法分离 ICM,接种于丝裂霉素 C 灭活处理的原代小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上,培养 8-9 天,每 4-5 天传代 1 次。结果:优选培养体系的囊胚形成率为 29.1%(52/179),其中 A 级囊胚形成率为 11.2%(20/179),50 个 ICM 贴壁生长,20 个出现克隆形态,成功建立 11 株 hESC(FY-hES-11 至 FY-hES-21)。11 株 hESC 均具有共同的多能性生物学特性。结论:优选培养体系可以明显提高囊胚形成的质量,促进 ICM 的增值,纯熟的机械切割法可以避免损伤 ICM 并提高其贴壁率,原代灭活的 MEF 饲养层可以明显促进细胞增殖。

关键词 优选培养液 机械切割法 建系 人胚胎干细胞

中图分类号 R329 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)11-2167-06

The Modified Culture Medium and Special Method to Increase the Derivation of Human Embryonic Stem Cells*

LUO Yu-mei^{1,2}, FAN Yong¹, CHEN Xin-jie¹, LI Shao-ying¹, ZHENG Yu-hong¹, XU Xia^{2△}, SUN Xiao-fang^{1△}

(1 The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510150, China;

2 Department of Medical Laboratory Science, Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510182, China)

ABSTRACT Objective: To establish a modified culture medium to improve the blastocyst formation rate and quality from the discarded embryos, and find good methods to promote the number of inner cell mass (ICM) increase, adherence and growth, so as to increase the derivation of human embryonic stem cells (human embryonic stem cell, hESC) and build hESC bank. **Methods:** We collected 179 Day3 discarded embryos into the modified culture medium (G2.5 medium supplemented with 10% human serum albumin, human leukocyte inhibiting growth factor (hLIF), basic fibroblast growth factor (bFGF)). At Day7 separated ICM from the blastocyst and seeded on the mouse embryonic fibroblasts (MEF) of passage 0 which have been inactivated by mitomycin C. The cells were cultured 8 to 9 days with hESC medium and passaged every 4 to 5 days. **Results:** The data showed that the formation of blastocyst in the modified culture medium was 29.1% (52/179), and the blastocyst formation rate with grade A was 11.2% (20/179). The number of ICM adherence were 50, and 20 clones appeared, finally established of 11 hESC which name were (FY-hES-11 to FY-hES-21). All of the hESC lines with common pluripotent biological characteristic. **Conclusions:** Our Studies have shown that the modified culture medium can improve the blastocyst formation rate and increase the number of the ICM. The proficiency skill of mechanical cutting method can avoid damage the ICM and improve the rate of ICM adherence. MEF of passage 0 inactivated as feeder layer can promote cell proliferation significantly.

Key words: Modified culture medium; Mechanical cutting method; Derivation; Human embryonic stem cells

Chinese Library Classification(CLC): R329 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)11-2167-06

前言

人类胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)是由囊胚的内细胞团(inner cell mass, ICM)分离培养而来,具有自我更

新和多向分化潜能^[1],其最为深远的潜在用途是能诱导为特定的细胞和组织,这为受损的组织恢复和疾病治疗带来极大的希望^[2],但其存在着供体与受体之间的组织免疫排斥问题,约需要 200 株 hESC 来满足不同的 HLA 配型^[3,4],因此有必要建立

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30871378, 31171229),广东省科技计划项目(2008B090500258, 2009A030200010)和

广东省重大科技专项(20110812)资助

作者简介:骆玉梅(1983-),女,硕士研究生,专业方向:免疫学、生殖与遗传。Tel: 020-81292065; E-mail: mei.2002@163.com

△通讯作者:徐霞(1962-),女,教授,硕士生导师,研究方向:免疫学。Tel:020-84271652; E-mail: xuxia503@yahoo.com.cn

孙筱放(1960-),女,教授,硕士生导师,研究方向:生殖与遗传。Tel: 020-81292202; E-mail: xiaofangsun@hotmail.com

(收稿日期:2011-9-27 接受日期:2011-10-24)

hESC 库。但是目前 hESC 总体建系效率不高^[5-7], 囊胚质量是影响建系效率的重要因素, 而用于 hESC 研究的胚胎大部分来源于体外受精实验室(IVF)中心, 这些废弃的胚胎很少发育到囊胚期, 即使形成囊胚, ICM 细胞数目也很少, 给建系带来一定困难。bFGF 是一种重要的细胞增殖分化调节剂, 可刺激多种细胞增殖, 有利于 ICM 细胞数目的扩增, LIF 是一种多功能细胞因子, 它具有抑制 ES 细胞自发分化的能力, 也有利于增加囊胚形成率及 ICM 细胞的数目^[8]。目前处理囊胚的方法主要有全胚培养法、免疫外科法和机械法。免疫外科法采用兔抗人的全血清, 豚鼠补体等分离 ICM, 难以避免动物源污染^[1]。机械法没有用任何化学物质, 直接采用细玻璃管或针头等将外滋养层细胞剔除, 分离出 ICM, 避免了抗体和补体所造成的异源性病原微生物污染, 是今后 hES 细胞无动物源污染培养体系中分离 ICM 的主要方法^[9]。饲养层是影响 hESC 生长的关键因素, 它能分泌 hESC 体外生长所需要的 FGF 等促有丝分裂因子及 LIF 等细胞分化抑制因子, 提供合适的微环境^[10]。本研究通过优化各种影响 ICM 生长、贴壁、增殖的条件, 提高 hESC 建系效率, 建立一套稳定的人胚胎干细胞培养体系, 建立人胚胎干细胞库, 为细胞治疗、胚胎发育、药物筛选、基因治疗以及遗传、表观遗传机制研究提供更多的模型以满足生物医学发展的需要。

1 材料与方法

1.1 胚胎收集、及分级

1.1.1 胚胎收集 收集广州医学院第三附属医院生殖医学中心体外受精(in vitro fertilization, IVF)和单精注射(ICI)后 Day3 不适宜进行胚胎移植或冷冻的低质量胚胎, 经捐助夫妇知情同意用于本实验。收集 2008 年 12 月到 2009 年 3 月 179 个 Day3 废弃的胚胎, 用优选培养体系培养(G2.5 培养液中添加 10% 人血清蛋白、2000U/ml hLIF、10 ng/ml bFGF), 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 2-4 天。

1.1.2 胚胎分级 生殖中心 Day3 的废弃胚胎, 每天观察胚胎发育情况至 Day7, 并且对形成的囊胚进行分级(参照 Gardner 囊胚分级法)根据囊胚的扩张和孵出状态给予 1-6 级的评分^[11]。1 级: 早期囊胚, 囊胚腔小于胚胎体积的一半; 2 级: 囊胚期, 囊腔体积超过胚胎的一半; 3 级: 完全囊胚期, 囊腔体积充满整个胚胎; 4 级: 扩张期囊胚, 囊腔扩张, 直径大于最初的胚胎直径, 透明带变薄; 5 级: 正孵出囊胚期, 滋养层从透明带中孵出; 6 级: 完全孵出囊胚期, 囊胚完全从透明带中孵出。对于 3-6 级的囊胚根据内细胞团数目的多少可分为 A、B、C 三级: A 级, 内细胞团细胞数目多且排列致密, 大小明显可见; B 级, 内细胞团细胞数目少并且排列疏散, 大小可见; C 级, 内细胞团细胞数目很少, 几乎不见。滋养层细胞分级: A 级: 很多细胞形成连续的上皮; B

级: 较少的细胞形成疏散的上皮; C 级: 仅很少几个大细胞。例如 6AA, 表示囊胚完全从透明带孵出, 内细胞团细胞数目多且排列致密, 滋养层细胞很多, 形成连续的上皮。选取可见内细胞团的囊胚, 然后将该囊胚用于人胚胎干细胞建系。

1.2 机械法分离内细胞团

将囊胚直接放入 hESC 培养液滴中洗涤 2-3 次, 在解剖镜下用自制的玻璃细针(30μm 粗细), 在内细胞团(ICM)的两侧切割去除外滋养层, 尽量避免损伤 ICM, 分离后将 ICM 接种到提前一天制备的丝裂霉素-C 处理的原代小鼠胚胎成纤维细胞上。

1.3 人胚胎干细胞(hESC)传代

37℃ 5% CO₂ 培养箱培养至第 8-9 天, 由 ICM 长出的克隆出现, 用自制的玻璃细针轻轻将它切割成 2-3 块, 将其转到新鲜制备的上。在开始 5 代之内都用机械切割法传代。第 5 代以后, 用 1mg/ml 胶原酶 (Gibco, USA) 消化传代, 每天换液, 每隔 4-5 天传代一次。hESC 培养液: knockout-Dulbecco (DMEM) (Gibco) 添加 15% 血清替代物(SR, Gibco), 5% 胎牛血清(FBS, Hyclone, USA), 2 mmol/L 谷氨酰胺(Gibco), 0.1 mmol/L β- 巯基乙醇(Gibco), 0.1 mmol/L 非必需氨基酸(NEAAs) (Gibco), 100 units/ml 青霉素 (Gibco), 100 μg/ml 链霉素(Gibco), 10 ng/ml bFGF (Invitrogen) 和 2000 U/ml hLIF(Chemicon)。hESC 传至第十代后, 培养液中不添加 hLIF。

1.4 人胚胎干细胞特征鉴定

1.4.1 碱性磷酸酶(AKP)染色 去除培养液, PBS 洗一遍, 用 4% 多聚甲醛固定 2 分钟, PBS 液洗 2 遍; 加入碱性磷酸酶孵育液(博士德), 避光, 室温孵育 30 分钟, PBS 液冲洗一遍, 光镜下观察结果。

1.4.2 免疫组织化学检测 去除培养液, 用 4% 多聚甲醛固定 30 分钟, PBS 冲洗 3 遍, 每次 5 分钟, 0.1% TritonX-100/PBS 作用 10 min; 加入 4% 山羊血清封闭液室温孵育 1 小时; 滴加一抗 SSEA-3 (Chemicon) SSEA-4 (Chemicon)、TRA-1-60 (Chemicon)、TRA-1-81 (Chemicon)、OCT4 (Abcam) (PBS 液 1:100 稀释) 室温孵育 1 小时, PBS 冲洗 3 遍, 每次 5 分钟; 荧光标记(FITC)二抗(Invitrogen)在室温孵育 1 小时, PBS 冲洗 3 遍, 每次 5 分钟; Hoechst33342 进行核染色, PBS 覆盖后荧光显微镜观察染色。

1.4.3 hESC 表达的分子标记检测 提取 hESC 总 DNA(参照 Qiagen 公司试剂说明), PCR 扩增 hESC 多能分子标记基因包括 OCT4, NANOG 和干细胞分化的标记基因 AFP(内胚层), NEUROD1(外胚层)和 HBZ(中胚层), 引物见表(1)。将 PCR 扩增产物分别用 1.5% 琼脂糖凝胶, 电泳 30min, 观察扩增条带, 记录结果进行了分析。用 FY-hES-1 作为对照。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table1 RT-PCR primer sequences

Gene	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'
OCT4	cttgctgcagaagtgggtggaggaa	ctgcagtggtgggttcgggca
NANOG	cagaaggcctcagcacctac	attgttccaggtctggttc
AFP	agaacctgtcacaagctgtg	gacagcaagctgaggatgtc
NEUROD1	aagccatgaacgcagaggaggact	agctgtccatggtaccgtaa
HBZ	ctgaccaagactgagaggac	atgtcgtgatgctcttcac
GAPDH	ggagtcaacggatttggtcg	tcctggaagatggtgatggg

1.4.4 体外分化能力检测 用 1mg/ml 的胶原酶 处理 hES 细胞 5-10 分钟 ,加入拟胚体培养液(hESC 培养液不添加 hLIF 和 bFGF) ,吹打成小细胞团 ,转入细菌培养皿内悬浮培养 2 天后 更换至新的细菌培养皿 ,此后每 2 天换一次液 ,到拟胚体形成 ;将培养至第 7 天的拟胚体转入 0.1%明胶包被的培养皿内贴壁培养 ,使其进行自发分化 2 周后收集细胞进行 hESC 分化的标记基因检测。

1.4.5 体内分化能力检测 用 1mg/ml 的胶原酶 处理 hES 细胞 5-10 分钟 ,吹散后 ,将 300-400 个小克隆接种到 6 周龄雌性的 SCID 小鼠腹腔皮下 ,4 周后观察肿瘤生长情况 ,8 周后处死小鼠 ,摘除肿块 ,用 10%福尔马林固定 4-8 小时 ,石蜡包埋 ,苏木素和伊红染色 ,高倍镜下观察组织三胚层分化情况。

1.4.6 染色体核型分析 选取处于指数生长期的 hESC 进行核型分析 ,加入秋水仙素(终浓度为 $0.25 \mu\text{g/ml}$) ,放置 37°C 5% CO_2 培养箱继续培养 3.5 小时。用吸管吹打 ,使大部分圆形的分裂中期的细胞从皿底脱落 ,将培养液转入离心管内 ,1000rpm 离心 5 分钟 ;弃上清液 ,留沉淀细胞。加入 0.4%枸橼酸钠与 0.4%氯化钠(1:1)的低渗液 ,用吸管吹打均匀 , 37°C 水浴箱中静置 5 分钟 ;然后用固定液(甲醇与冰醋酸为 3:1)固定 3 次 ,G 带显色后 ,高倍镜下观察至少 20 个分裂中期细胞染色体。

1.4.7 个体识别(短串联重复位点 STR 分析) 采用 Qiagen 试剂盒提取细胞 DNA ,进行 PCR 扩增 ,产物在 ABI 3100 遗传分析仪上进行毛细管电泳 ,分析 16 个短串联重复位点 ,以便个体识别。16 个位点为 D8S1179、D21S11、D7S820、CSF1PO、D3S1358、TH01、D13S317、D16S539、D2S1338、D19S433、vWA、TPOX、D18S51、Amelogenin、D5S818、FGA 或 PentaE 和 PentaD。

2.1 囊胚形成率与建系情况

在本实验中 ,观察从 day3 到 day7 废弃胚胎的发育情况 ,31.4% (56/179) 停滞在 2-4 细胞期 ,16.2% (29/179) 发育到 6-8 细胞 ,52.5% (94/179) 形成桑葚胚 ,29.1% (52/179) 形成囊胚 ;其中有 11.2% (20/179) 的囊胚发育到 A 级 ,采用机械法分离囊胚内细胞团。分离 52 枚囊胚的 ICM 接种于饲养层上 ,50 个贴壁生长 ,20 个出现克隆形态 ,成功建立 11 株 hES 细胞 ,命名为 (FY-hES-11 至 FY-hES-21) ,建系率为 21.15% (11/52) (图 1A-D)。

2.2 11 株 hESC 特征鉴定(表 2)

建立的 11 株 hESC 均具有相同的形态学特征 ,核大而明显 ,有一个或多个核仁 ,核质比高 ,在体外培养时呈集落状生长 ,碱性磷酸酶活性呈强阳性(1E)。表达人早期胚胎阶段特异性抗原 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81(图 2A-D)。未分化标记物 OCT4、NANOG 在各个细胞系中均呈阳性表达 (图 3A)。体外分化潜能检测 :每株 hESC 都能形成 EB ,并表达分化标志物 AFP (内胚层)、HBZ (中胚层)、NEUROD1 (外胚层)(图 3B) ,表明各 hESC 在体外可以分化成三个胚层的细胞。体内分化潜能检测 :每株 hESC 注射入 SCID 小鼠 4-5 周后能形成畸胎瘤 ,组织学检查发现均可以分化成三个胚层细胞 ,鳞状上皮细胞 (外胚层)、软骨组织 (中胚层)、腺体组织细胞 (内胚层)(图 4A-C)。hESC 体外长期培养 ,G 带染色分析均显示正常的核型 46,XX 或 46,XY(图 4D-E)。

2.3 短串联重复序列(short tandem repeats, STR)

16 个位点结果显示各个 hESC 均来自于不同的胚胎 (表 3)。

2 结果

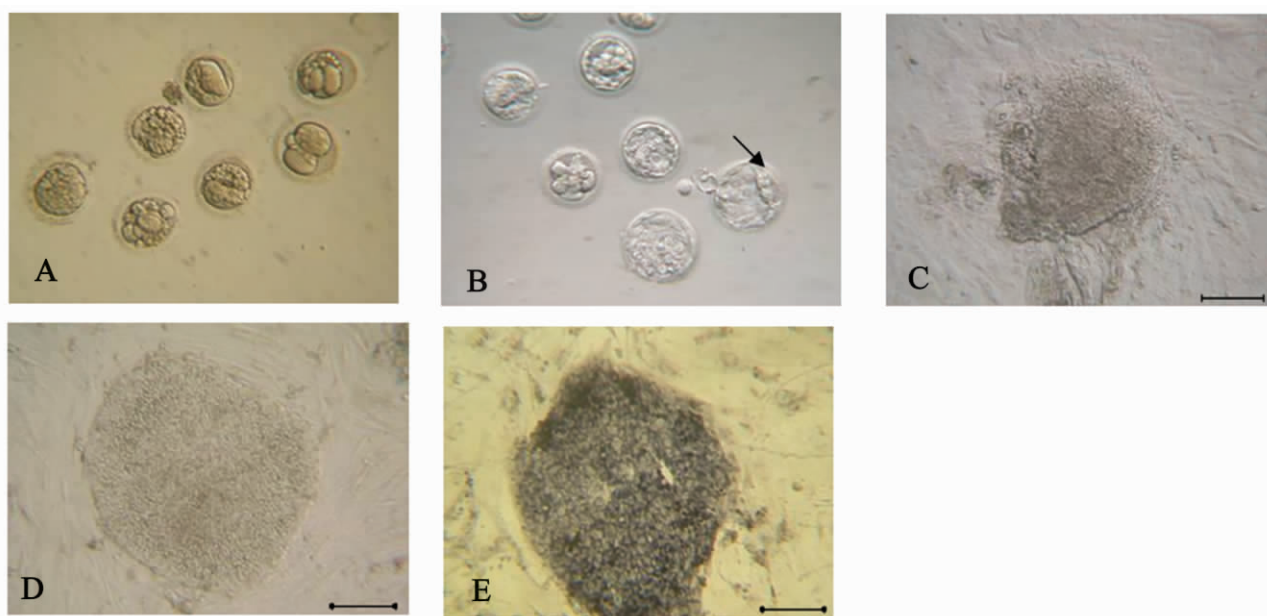


图 1 人胚胎干细胞建系情况 (A)第 3 天低质量胚胎 (B)在优选培养液中培养至第 6 天的囊胚 ,箭头指示为内细胞团 (C)原代 hESC 克隆呈鸟巢状生长 (D)hESC 机械法传代后形态 (E)hESC 碱性磷酸酶(AKP)表达阳性。

Fig.1 The derivation of human embryonic stem cells (A) The representative of day-3 poor quality embryos. (B) Representative of day-6 blastocyst after culturing in modified medium, arrow indicates ICM. (C) Origin morphology of hESC clone (D) Morphology of hESC colony passage by mechanical cutting method under invert microscope. (E) AKP staining hESC

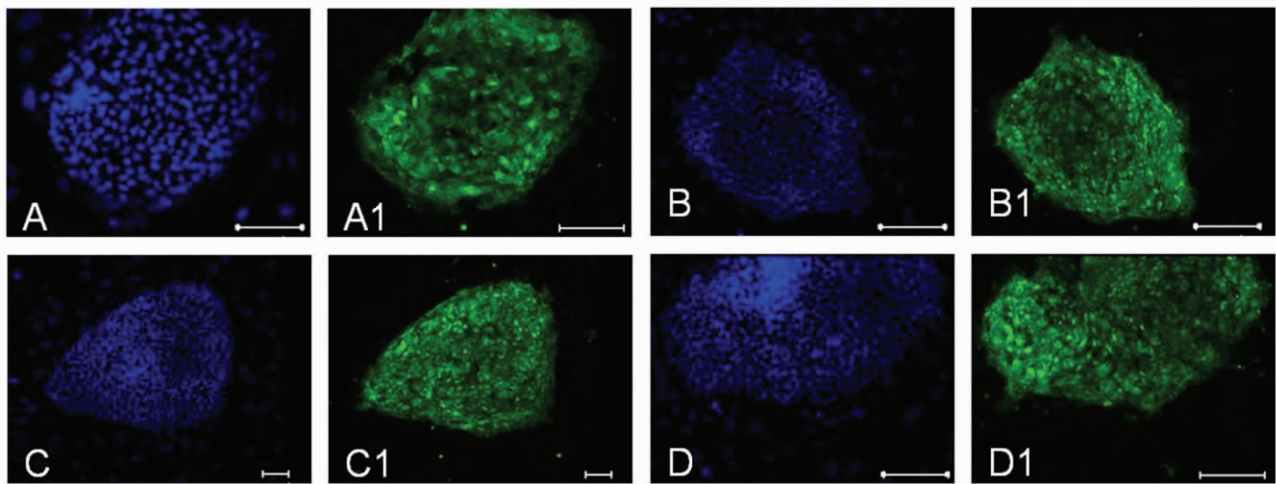


图2 人早期胚胎阶段特异性抗原免疫荧光染色 (A1) SSEA-3 (B1) SSEA-4 ;(C1) TRA-1-60 ;(D1)TRA-1-81 ;(A-D)用 Hoechst33342 进行核染色。

Fig.2 Immunostaining analysis of human embryonic stem cells with anti-SSEA-3 (green), anti-SSEA-4 (green), anti-TRA-1-60 (green), anti-TRA-1-81 (green) (A1-D1). Hoechst33342 staining for the nuclear of colonies (A)-(D).

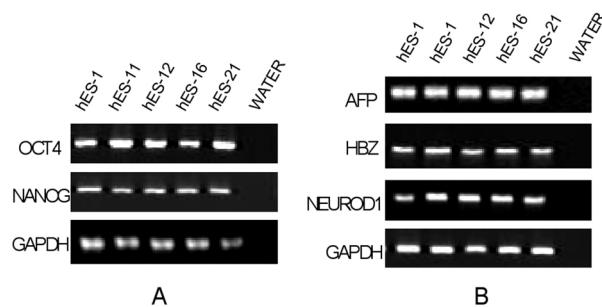


图3 hESC 基因检测 (A) RT-PCR 检测 FY-hES-11, 12, 16,21 均表达未分化标记物 OCT4、NANOG ,用 FY-hES-1 做对照。(B) RT-PCR 检测 FY-hES-11, 12, 16, 21 均表达分化标志物 AFP、HBZ、NEUROD1。

Fig.3 hESC gene expression (A) RT-PCR analysis the pluripotency gene of OCT4 and NANOG expressed in FY-hES-11, 12, 16, 21 cells, using FY-hES-1 cell as control. (B) RT-PCR analysis the differentiate genes of AFP, HBZ, NEUROD1 expressed in FY-hES-11, 12, 16, 21 cells.

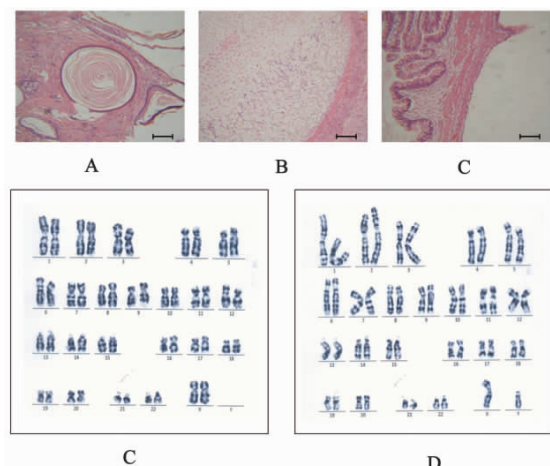


图4 畸胎瘤经苏木素和伊红染色后病理分析 (A) 扁平上皮细胞 (外胚层) (B) 软骨组织 (中胚层) (C) 腺体组织 (内胚层)。G 带显色后 FY-hESCs 的核型分析 (C)46,XX (D)46,XY。

Fig.4 Immunohistology analysis of teratomas by H&E staining. (A) Squamous cells (ectoderm). (B) Cartilaginous tissue (mesoderm). (C) Glandular tissue (endoderm). Karyotype analysis of FY-hESCs by G-banding. (C) 46, XX. (D) 46, XY.

表2 人胚胎干细胞系的特征

Table 2 Characterization of FY-hESC lines

FY-hES	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Passage	63	60	40	40	35	30	25	20	20	20	20
AKP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SSEA-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SSEA-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRA-1-60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRA-1-81	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OCT4gene expression	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NANOG gene expression	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Normal karyotype	46,XX	46,XY	46,XX	46,XY	46,XY	46,XY	46,XX	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY
Teratoma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
STR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表 3 11 株 hESC 系 16 个 STR 位点图

Table 3 16 different genetic loci short tandem repeats (STR) of hESC lines

FY-hES	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
D8S1179	11/15	14/15	11/12	11/13	12/14	12/16	13/14	11/13	14/15	10/13	13/15
D21S11	30/32	30	28/29	29/31	31.2/32.2	31.2/32.2	29	29/30	30/31	30/31	28/30
D7S820	10/11	11/12	8	13/14	10/11	8/10	11	9/12	12	8/11	9/11
CSF1PO	11/12	12/13	10/11	12	10/12	10	11/12	12/13	9/11	10/14	11/12
D3S1358	17/19	15/17	17/18	15/16	11/15	11/15	14/18	16/17	15/17	15	16/17
TH01	7	7/9	7/9	8/9	9	7/8	6	7/9	7	8/9.3	7/9
D13S317	8	12	8	8	8/11	8/11	8	8	10	11	10/11
D16S539	12/13	8/13	9/10	11	9/10	9/112	9	13	9	9	12/13
D2S1338	--	18/21	20/23	--	19	19/25	19/24	18/24	23	20/23	20/23
D19S433	--	13/15.2	14.2/16.2	13/14.2	12/15.2	14.2/15.2	14/15	14/15.2	13/14	14	14
vWA	16/18	16/17	16/17	16/19	18/19	17/19	14/16	14/16	18	14/17	14/16
TPOX	8	8/9	8	8/12	8/11	8	9/11	8	8/11	10/11	9/11
D18s51	16/17	14/15	13/16	13/15	14/15	17/19	14/16	14/17	17/18	12/14	16
Amelogenin	x	X/Y	X	X/Y	X/Y	X/Y	X	X/Y	X/Y	X	X/Y
D5S818	9/11	11/12	11/12	10/11	11	7/12	11/13	10/11	7/11	10/11	11/12
FGA	22/23	22	19/24	19/24	19/24	18/23	22/25	22/24	22/23	22/24	22/24
PentaE	17/19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PentaD	9/14	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

3 讨论

人类胚胎干细胞(hESCs)具有自我更新和多向分化潜能,细胞替代治疗是胚胎干细胞最快可能临床应用的层次,如对脊髓损伤、帕金森病、视网膜病变、糖尿病等的治疗,而组织替代治疗和器官移植治疗需要组织工程学的配合,是临床应用的中/远期前景。但是要应用于临床必须先解决供体与受体之间的组织配型问题,其中一个解决办法就是建立 hESC 库。但是目前用人废弃胚胎建立 hESC 的建系率很低,仅 0.3%-1.5%^[5,6],因此如何提高 hESC 的建系率成为关键问题。囊胚质量是影响建系效率的主要因素,新鲜高质量的囊胚能够获得优良的 ICM,这是建立 hESC 的理想来源,然而由于社会伦理的限制,很难获得足够新鲜的囊胚,因此提高 hESC 建系率的首要办法是改善囊胚培养体系提高囊胚质量。

本研究选择在常规胚胎培养体系(G2.5 培养液中添加 10%人血清蛋白)中联合添加 2000U/ml hLIF 和 10ng/ml bFGF,观察废弃胚胎从第 3 天到第 7 天的发育过程,统计 4 级囊胚到 6 级囊胚的形成情况,其中形成囊胚 52 个,形成率为 29.1%,而 A 级囊胚 20 个,形成率为 11.2%。我们发现优选培养体系的囊胚形成率明显高于常规培体系,进一步验证了 bFGF 与 LIF 联合应用可刺激胚胎细胞增殖,有利于 ICM 细胞数目的扩增,增加囊胚形成率。机械法没有用任何化学物质,避免了免疫外科法带来的抗体和补体所造成的异源性病原微生物污染^[1],因此是今后 hES 细胞无动物源污染培养体系中分离 ICM 的主要方法^[9]。我们用自制的玻璃细针(30um 粗细)分离 52 枚囊胚的 ICM,这种玻璃细针比较纤细和具有很好的柔韧性,可以很好

的分离 ICM 并避免对其损伤,并去除外滋养层细胞,因为外滋养层细胞会竞争性抑制 ICM 的增殖。但机械切割法与操作人员的技术纯熟程度密切相关,所以我们先用自制的玻璃细针在小鼠囊胚上进行反复练习,掌握一定技巧后再对人的囊胚 ICM 进行切割分离。接种在饲养层上的 52 个 ICM,50 个贴壁生长,20 个出现克隆形态,建立 11 株 hESC,建系高达率 21.15% (11/52),这明显要高于其它的机械切割法和免疫外科法^[5,6,9],证明了本实验所采用纯熟的机械切割法可以很好地避免损伤 ICM 并明显提高其贴壁效率,并在此后克隆的前 5 代传代中能很好地减少对细胞的损伤,从而提高人胚胎干细胞建系率。饲养层是影响 hESC 生长的关键因素,它能分泌 hESC 体外生长所需要的 FGF 等促有丝分裂因子及 LIF 等细胞分化抑制因子,提供合适的微环境^[6],ICM 的扩增对微环境的要求甚高,我们发现选用状态良好处于生长对数期的原代 MEF 细胞进行丝裂霉素 C 处理后做为饲养层比第三代或更后代次具有更好的状态,更能持久地分泌因子满足原代克隆的生长需求,促进细胞增殖,提高原代克隆形成率,提高人胚胎干细胞建系率。而 hESC 稳定传代第 5 以后,对饲养层的要求则明显降低。

本实验建立的 11 株细胞都具有 hESC 相同的形态学特征;表达人早期胚胎阶段特异性抗原 SSEA-3,SSEA-4,TRA-1-60 和 TRA-1-81,表达 OCT4,NANOG 多能性有关的关键蛋白;悬浮培养或过度生长可形成拟胚体并表达分化标记物;在 SCID 小鼠体内可形成畸胎瘤,能分化成三个胚层细胞,STR 为 hESC 培养过程中作为身份识别发挥重要的作用^[10],分析结果显示 11 株 hESC 均来源于不同的胚胎。有研究发现非整倍体和嵌合现象在低质量的胚胎中经常发现^[12,13],但本实验结果显

示 hESC 在体外长期培养均能维持正常的二倍体核型和带型 46,XY 或 46,XX, 其中 FY-hES-11, FY-hES-12 已传到 60 代, 仍保持正常的核型特征和干细胞的多能性特征, 证明我们建立的培养、消化、传代体系能很好地满足 hESC 的生长需要, 使其在减数分裂过程中严格选择正常的整倍体细胞。

综上所述, 本实验室通过优化各种影响 ICM 生长、贴壁、增殖的条件, 从而提高 hESC 建系效率, 并建立一套稳定的人胚胎干细胞传代、复苏的培养体系, 建立人胚胎干细胞库, 为细胞治疗、胚胎发育、药物筛选、基因治疗以及遗传、表观遗传机制研究提供更多的模型, 以满足生物医学发展的需要。

参考文献(References)

- [1] Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro M. A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. (Science), 1998, 282(5391): 1145-1147
- [2] Lim, U. M., K. S. Sidhu, and B. E. Tuch. Derivation of Motor Neurons from three Clonal Human Embryonic Stem Cell Lines [J]. (Curr Neurol Neurosci), 2006, 3(4): 281-288
- [3] Rao, M. S. and J. M. Auerbach. Estimating human embryonic stem-cell numbers [J]. (Lancet), 2006, 367(9511): 650
- [4] Civin, C. I. and M. S. Rao. How many human embryonic stem cell lines are sufficient A U.S. perspective [J]. (Stem Cells), 2006, 24(4): 800-803
- [5] Chen, H., K. Qian, J. Hu, D. Liu et al. The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores [J]. (Hum Reprod), 2005, 20(8): 2201-2206
- [6] Genbacev, O., A. Krtolica, T. Zdravkovic, E, et al. Serum-free deriva-

tion of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders [J]. (Fertil Steril), 2005, 83(5): 1517-1529

- [7] Lerou, P. H., A. Yabuuchi, H. Huo, A. Takeuchi, et al. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos [J]. (Nat Biotechnol), 2008, 26(2): 212-214
- [8] Dunlison, G. F., D. H. Barlow, and I. L. Sargent. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium [J]. (Hum Reprod), 1996, 11(1): 191-196
- [9] Hovatta, O., M. Mikkola, K. Gertow, A. M. Stromberg, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells [J]. (Hum Reprod), 2003, 18(7): 1404-1409
- [10] Steer, C. V., C. L. Mills, S. L. Tan, et al. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme [J]. (Hum Reprod), 1992, 7(1): 117-119
- [11] Plaia, T. W., R. Josephson, Y. Liu, X. Zeng, et al. Characterization of a new NIH-registered variant human embryonic stem cell line, BG01V: a tool for human embryonic stem cell research [J]. (Stem Cells), 2006, 24(3): 531-546
- [12] Magli, M. C., L. Gianaroli, A. P. Ferraretti, et al. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement [J]. (Fertil Steril), 2007, 87(3): 534-541
- [13] Munne, S., S. Chen, P. Colls, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos [J]. (Reprod Biomed Online), 2007, 14(5): 628-634

(上接第 2159 页)

参考文献(References)

- [1] Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. Pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2001, 2(5): 657-662
- [2] 陈庆华, 张强. 药物微囊化新技术及应用. 人民卫生出版社, 2008, 1
- [3] Huang M, Jiang W, Huang X, Huang Z, Wang J. Study on Stability of L-dopa Methyl Ester Hydrochloride Solution [J]. China Pharmaceuticals, 2008, 17(8): 29-30
- [4] Brime B., Ballesteros MP, Frutos P. Preparation and in vitro character-

ization of gelatin microspheres containing Levodopa for nasal administration [J]. J. Microencapsul., 2000, 17(6): 777-784

- [5] ArVca B., KaYa HS., Moghdamb A., Akalanb N., HVncala A.A. Carbidopa/levodopa-loaded biodegradable microspheres: in vivo evaluation on experimental Parkinsonism in rats [J]. 2005. 102(3): 689-697
- [6] Patrick B.O'Donnell, James W.Mcginity. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique [J]. Adv. Drug Deliv. Rev., 1997, 28(1): 25-42