

一种新的培养人胚胎干细胞的包被基质

朱海林^{1,2}, 巩慧², 周向雅², 杨金亮¹, 魏于全¹, 陈慧敏^{1,2}

(1. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041; 2. 江阴司特易生物技术有限公司, 江苏 江阴 214400)

【摘要】 目的 开发一种新的培养人胚胎干细胞(hESC)的包被基质,使hESC的培养更加简便。方法 用甲醇固定的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)作为包被基质,人胚胎干细胞系X-01在该基质上生长,每隔5~6d传代一次,培养10代后,对人胚胎干细胞特性进行检测,包括细胞形态、碱性磷酸酶染色、相关多能性基因的表达和分化能力。结果 hESC在新的基质上生长良好,经10次传代后仍能保持典型的hESC克隆形态。碱性磷酸酶染色阳性,免疫荧光染色Oct4、SSEA4、Tra-1-60为阳性,体外分化可形成拟胚体。结论 此种固定的基质可以大量制备,长期保存,并可以长期维持hESC的未分化状态,为人胚胎干细胞的体外扩增探索出了一个新的途径。

【关键词】 人胚胎干细胞;小鼠胚胎成纤维细胞;甲醇固定;基质;MEF蛋白质复合物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014)03-0088-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.018

Development of a new coating substrate for human embryonic stem cell culture

ZHU Hai-lin^{1,2}, GONG Hui², ZHOU Xiang-ya², YANG Jin-liang¹, WEI Yu-quan¹, CHEN Hui-min^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. Jiangyin StemEasy Biotech, Ltd., Jiangyin, Jiangsu 214400)

【Abstract】 Objective To reduce the animal component contamination for human embryonic stem cells (hESCs) and to simplify hESCs culture process, we develop a new coating substrate which can support the hESCs growth without differentiation, and is easy to store and use. **Methods** Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were fixed on the surface of plate by methanol. hESCs were cultured on this new substrate and were passaged every 5 to 6 days. After 10 passages, we checked the cell morphology, alkaline phosphatase expression, embryonic specific markers and the differentiation ability in vitro. **Results** After 10 passages, the hESCs grew well on this new substrate and maintained the typical hESCs morphology. Alkaline phosphatase staining was positive. Immunofluorescence staining showed that the expressions of Oct4, SSEA4, Tra-1-60 were positive. The cells formed embryoid body in vitro. **Conclusions** This methanol-fixed MEF substrate can support the growth of undifferentiated hESCs. The coating material can be produced in large scale and stored for a long time. It provides a new and relatively easy way to amplify hESCs.

【Key words】 Human embryonic stem cell; Mouse embryonic fibroblast; Methanol fixation; Mouse embryonic fibroblast, MEF-protein complex

自从1998年获得第一个人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC)细胞系^[1], hESC常用

培养方法是在小鼠胚胎成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast, MEF)上进行培养。这种共培养体系

[作者简介] 朱海林(1984-)女,四川大学生物治疗国家重点实验室在读硕士。研究方向:人胚胎干细胞的培养体系的研究。E-mail: zhusealin@sina.com

[通讯作者] 陈慧敏,四川大学客座教授,博士生导师。E-mail: huimin.chen@stemeasy.com

可以很好地维持 hESCs 的生长,但是操作过程非常繁琐。首先将 P3 代的 MEF 细胞用丝裂霉素 C 或伽马射线处理,使其失去增殖能力。其次在 hESCs 培养前需要预铺 MEF,MEF 的状态和密度都直接影响着 hESCs 的生长。为了简化培养体系,很多人尝试用各种细胞外基质代替饲养层细胞。2001 年, Xu 等^[3]用基质胶(Matrigel)作为包被材料,包被培养耗材,成功地培养了 hESCs。至今,在无饲养层培养 hESCs 体系中,基质胶是最常用的包被材料。但是基质胶来源于小鼠 EHS 肉瘤,可能含有致癌物质。Ludwig 等^[4]用含有胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白的 ECM 混合物或分别用单独一种 ECM 蛋白包被,取代基质胶。尽管 ECM 蛋白包被表面代替了饲养层细胞,但是它们并不适合 hESC 的大量扩增,首先,生产和纯化这些蛋白的成本非常高;其次,包被纯化蛋白需要优化条件。比如,需要达到一定的厚度;需要在无菌条件下进行很长时间(几小时)的包被^[5]。所有这些都限制了它们的大规模应用。Stelling 等^[6]研究发现 MEF 表面的硫酸乙酰肝素对 hESCs 的生长很重要,他们用 70% 乙醇固定的 MEF 作为 hESCs 生长的基质,将污染 Neu5Gc 鼠源成分的 hESCs 细胞比例降低了 30%^[2]。本文在此方法的基础上做了改进,选择了 90% 的甲醇固定的 MEF 作为 hESCs 生长的基质,这种基质制备方法简单,可大量制备并在 4℃ 长期保存,为 hESCs 的体外扩增提供了一个新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及实验动物

本实验所用的人胚胎干细胞系 X-01^[7]购自上海斯丹赛生物技术有限公司。所用的实验动物是 3 只孕 12.5d 的 SPF 级 CF-1 小鼠(MEF 的来源),雌性,8 周龄,体重 30~35 g。来源于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2011-0011】。实验在四川大学生物治疗国家重点实验室【SYXK(川)2009-045】

1.1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(Hyclone, SV30087.02)、DMEM(Hyclone, SV30022.01B)、DMEM-F12(Hyclone, SV30022.01B)、血清替代物(knockout serum replacement, KSR)(Gibco, 10828-028)、谷氨酰胺(Corning, R25-005)、 β -巯基乙醇(Sigma,

M7522)、非必需氨基酸(Gibco, 11140)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(Peprotech, 100-18B)、IV 型胶原酶(type IV collagenase)(Gibco, 17104019)、分散酶(dispace)(Gibco, 17105041)、0.25% 胰蛋白酶(Gibco, 25200); CO₂ 细胞培养箱(Thermo, 3111, 美国),超净台(YJ-VS 型, 无锡),荧光倒置相差显微镜(Leica, DM1300, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 MEF 的分离和培养

将孕 12.5 d 的 CF-1 小鼠安乐死,无菌条件下取出 CF-1 小鼠的子宫, PBS 漂洗,取出胎鼠;去除胎鼠的头、内脏和四肢;将胎鼠躯干剪成约 1 mm³ 的碎块,0.25% 胰酶消化 5 min;加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,吹打为单细胞悬液,将细胞接种于细胞培养瓶中,置于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。将传至第三代的 MEF 细胞用剂量 30 Grey 伽马射线照射,使其失去增殖能力,作为 hESCs 传统培养方法的饲养层。

1.2.2 90% 甲醇固定 MEF 基质的制备

将 P3 代 MEF 培养 2~3 d 达到 80%~90% 汇合率后用 PBS 洗一次,加入 90% 甲醇,室温固定 5~10 min,吸掉,超净台里吹干,4℃ 保存。

1.2.3 hESCs 的培养

在灭活的 MEF 饲养层上,hESCs 按传统方法培养,DMEM/F12 加入 20% 的 KnockoutTM Serum Replacement (KSR), 10 ng/mL bFGF, 1% NEAA, 0.5% L-谷氨酰胺,0.1 mmol/L β 巯基乙醇。hESCs 的传代用 1 mg/mL 的 IV 型胶原酶 37℃ 消化 30min,吹打成合适大小即可。在甲醇固定的 MEF 基质上,hESCs 的培养条件为 DMEM/F12 加入 20% 的 KnockoutTM Serum Replacement (KSR), 10 ng/mL bFGF, 1% 非必需氨基酸(NEAA), 0.5% L-谷氨酰胺,0.1 mmol/L β 巯基乙醇和 1~2 倍的 MEF PM。hESCs 的传代用 1 mg/mL 的 dispace(分散酶)37℃ 消化 10 min,吹打成合适大小即可。

1.2.4 hESCs 的相关检测

(1)hESCs 碱性磷酸酶染色检测:使用上海斯丹赛公司的碱性磷酸酶染色试剂盒对生长在甲醇固定基质板上第 10 代的 hESCs 进行染色。具体操作步骤见试剂盒说明书。

(2)hESCs 特异性抗原的检测:将 hESCs 在固定化的基质上培养 10 代后,取适量细胞接种于包被了固定化基质的 24 孔板内,培养 3 d 后,4% 多聚甲

醛室温固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 在无乙醇中浸泡两次, 每次 20 min (仅限于核蛋白, 如 Oct4); 加入含 5% BSA 和 0.4% Triton-X 100 的 PBS 37°C 封闭 1h, 分别加入小鼠抗人一抗 OCT4、SSEA4、Tra-1-60, 4°C 过夜; PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 分别加入荧光标记的羊抗鼠二抗, 37°C 孵育 1h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min 加入细胞核染料 DAPI, 室温 5 min, PBS 洗涤后荧光显微镜下观察拍照。

(3) hESCs 体外分化能力检测: 将生长在甲醇固定基质板上第 10 代的 hESCs 用 1 mg/mL dispase (分散酶) 消化下来, 吹打成略小于正常传代大小的团块, 加入 EB 培养基 (80% DMEM/F12, 20% 的 KSR, 1% NEAA, 0.5% L-谷氨酰胺, 0.1 mmol/L β 巯基乙醇) 悬浮培养在低吸附培养板上, 隔 2~3 d 换液一次, 每日观察细胞形态变化。

2 结果

2.1 在甲醇固定的 MEF 基质培养板上生长的 hESCs 的相关鉴定

2.1.1 hESCs 的形态学观察

在甲醇固定浓度分别是 50% (图 1A)、70% (图 1B)、80% (图 1C) 的 MEF 基质板上, hESC 克隆形

态松散, 边界模糊。在固定浓度 100% (图 1D) 的 MEF 基质板上, hESC 克隆贴壁不佳。而在固定浓度 90% (图 1E) 的 MEF 基质板上, hESC 克隆形态致密, 边缘界限清晰, 无分化迹象, 与灭活的 MEF 上生长的 hESCs (图 1F) 相比, 克隆形态略显不规则。

2.1.2 hESCs 的碱性磷酸酶染色和多能性基因表达的鉴定

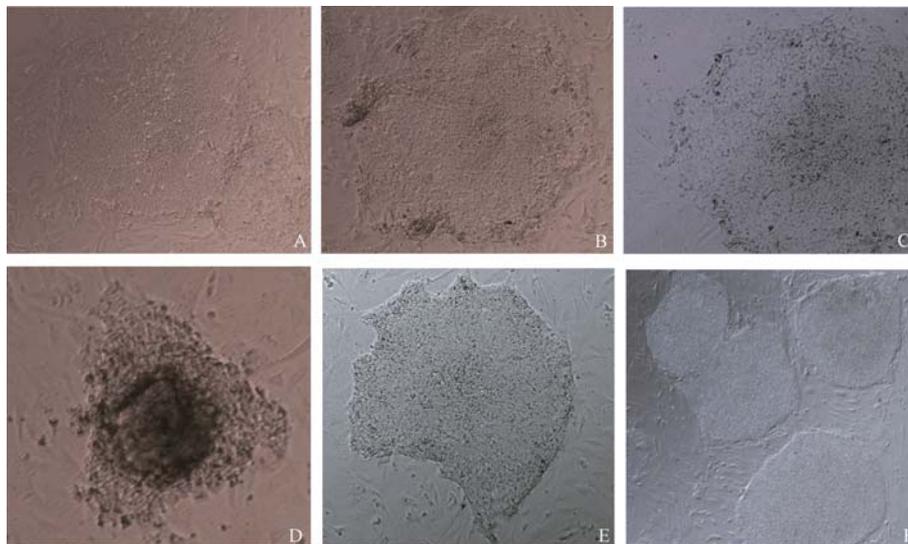
在甲醇固定 MEF 基质上培养 10 代后, hESCs 的碱性磷酸酶染色鉴定为阳性 (图 2A), Oct4 (图 2C), SSEA4 (图 2E), Tra-1-60 (图 2G) 的免疫染色阳性。说明甲醇固定的 MEF 基质板可以很好地维持 hESCs 的多能性 (图 2 见彩插 5)。

2.1.3 hESCs 体外分化能力检测

将甲醇固定的基质上生长的 hESCs 消化下来吹打成小块, 悬浮培养在低吸附培养板上, 经过一周的培养后形成拟胚体 (图 3)。

2.2 MEF PM 对于 hESCs 在 MEF 基质板上的生长是必须的

固定后的 MEF 不能分泌细胞因子, 所以我们在 hESCs 的培养基中加入了 1~2 \times MEF PM (MEF 蛋白质复合物)。结果显示加入了 MEF PM 的 hESCs 培养基, 与甲醇固定的 MEF 基质板配合使用可以很好



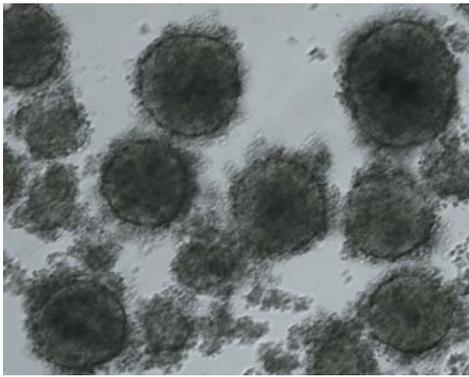
注: A-E: 生长在不同浓度甲醇固定 MEF 基质上的 hESCs, 甲醇固定浓度分别是 A: 50%, B: 70%, C: 80%, D: 100%, E: 90%; F: 生长在灭活的 MEF 饲养层上的 hESCs。

图 1 生长在灭活的 MEF 饲养层上和固定化基质板上的 hESCs 形态特征

Note: A-E: hESCs grew on MEF substrate which was fixed with different concentrations of methanol. The concentration of methanol was A: 50%, B: 70%, C: 80%, D: 100%, E: 90%; F: hESCs grew on inactivated MEF feeder cells

Fig. 1 Morphology of hESCs grew on the inactivated MEF feeder cells and methanol fixed MEF substrate

地维持 hESC 的生长(见图 4)。

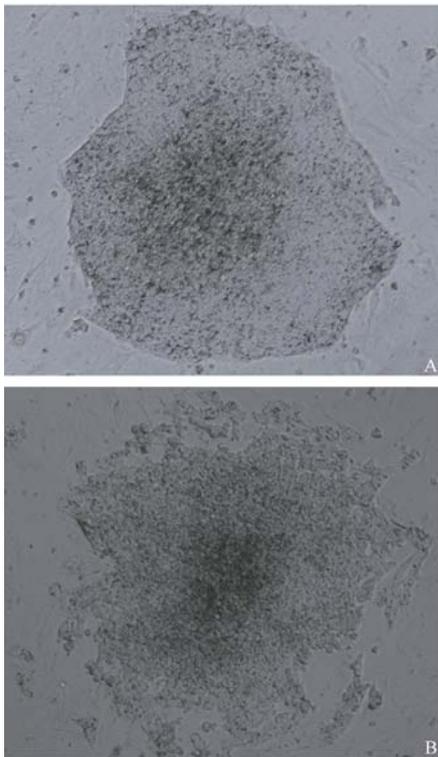


注:拟胚体形态。

图 3 hESC 体外分化能力检测

Note: Morphology of the embryoids.

Fig. 3 Assessment of the ability of hESC to differentiate into embryoids in vitro



注:A:hESC 培养基中加了 $2 \times$ MEF PM; B:hESC 培养基中未加 MEF PM。

图 4 MEF PM 可以维持 hESC 在固定化 MEF 基质板上的生长

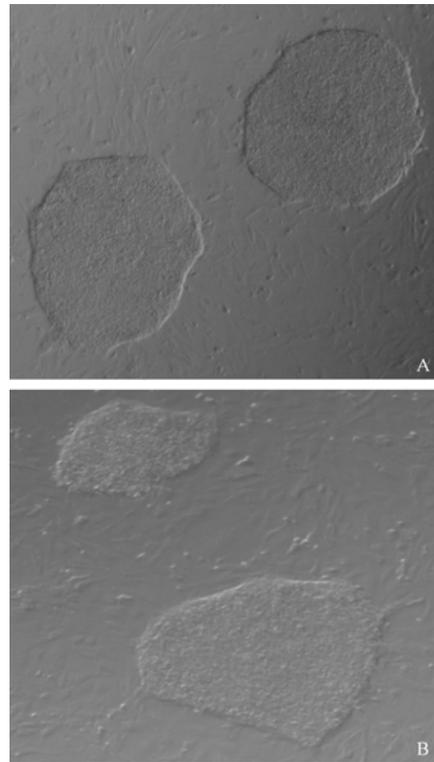
Note: A: hESC medium with $2 \times$ MEF PM; B: hESC medium without MEF PM.

Fig. 4 MEF PM supports the growth of undifferentiated hESCs on fixed MEF substrate.

2.3 甲醇固定化 MEF 基质培养板可以长期保存

我们比较了 4℃ 存放不同时间的甲醇固定化

MEF 基质培养板,支持 hESC 生长的能力。结果显示,4℃ 存放三个月的甲醇固定化 MEF 基质培养板,仍然能维持 hESC 未分化地生长(见图 5)。



注:A: hESC 生长在 4℃ 存放一周的甲醇固定化 MEF 基质培养板上;B:hESC 生长在 4℃ 存放 3 个月的甲醇固定化 MEF 基质培养板上。

图 5 甲醇固定化 MEF 基质可以长期保存

Note: A: hESC grew on methanol-fixed MEF substrate that had been stored at 4℃ for 1 week; B: hESC grew on methanol-fixed MEF substrate that had been stored at 4℃ for 3 months

Fig. 5 Methanol-fixed MEF substrate can be stored for a long time

3 讨论

hESC 需要在合适的基质上生长。传统的方法是在灭活的 MEF 上培养 hESC。这种培养方法耗时且繁琐,首先需要将 P3 代的 MEF 细胞用丝裂霉素 C 或 γ 射线灭活,让其不再具有增殖能力。MEF 铺板 1~2d 后再将 hES 放上去,MEF 的密度需准确计算,过多或过少的 MEF 细胞密度都会影响 hESC 的生长。灭活的 MEF 细胞培养 7~10 d 后就不能支持 hESC 的生长。我们采用了 90% 甲醇固定 MEF 作为基质,使 hESC 的培养变得更加简便。MEF 不需灭活,正常培养 2~3 d 达到 80%~90% 的汇合率便可进行甲

醇固定。固定后的基质板可以在 4℃ 长期保存,所以用这种方法可以一次性大量制备供 hESCs 的长期培养所用的培养耗材。之前也有报道用化学固定 MEF 作为基质,2012 年,Yue 等^[8]用 2.5% 的戊二醛固定饲养层作为基质培养小鼠胚胎干细胞。但是戊二醛固定后需要反复冲洗,增加了操作步骤,且我们的实验证明戊二醛固定后的基质不适合培养 hESCs(结果尚未发表)。2012 年,Stelling 等^[6]用 70% 乙醇固定 MEF 作为基质培养 hESCs,取得了较好的结果。但是戊二醛和乙醇固定后,细胞形态都变得模糊。我们采用了甲醇固定,因为甲醇作为固定剂可以很好地维持饲养层细胞的形态。选择 90% 的甲醇固定浓度是因为过低的浓度(50%,70%,80%)固定不牢,MEF 细胞容易脱落,hESCs 在上面生长的形态松散,易于分化。过高的浓度(100%)固定后,hESCs 的贴壁性下降。90% 甲醇固定后的包被基质,易于干燥,不会残留有毒物质,易于贴壁。

灭活的饲养层细胞除了提供 hESCs 生长所需的基质,还可分泌细胞因子,而固定后的 MEF 不再具有分泌细胞因子的功能,所以需要加入 MEF 的条件培养基。条件培养基的收集方法是将 MEF 培养至 100% 汇合后,加入 hESC 的完全培养基,每隔 24 h 收集一次。收集到的条件培养基与新鲜的 hESCs 完全培养基 1:1 混合后,就可以用于 hESCs 无饲养层条件下的培养。条件培养基中不仅含有 MEF 分泌的细胞因子,还含有 MEF 的代谢产物,这些代谢产物是不利于 hESCs 生长的。而我们研发的 MEF PM 大大降低了 MEF 的代谢产物,含有的细胞因子浓度也更高,可以达到条件培养基中所含细胞因子浓度的 100 倍。

碱性磷酸酶的活性,核抗原(Oct4),膜抗原(SSEA4),胞浆抗原(Tra-1-60)的表达以及体外分化形成拟胚体,是检测 hESCs 多能性的指标。用我们制备的甲醇固定 MEF 基质板结合使用加入了终浓度 1~2 倍的 MEF-PM 的 hESCs 完全培养基,hESCs 连续培养 10 代后,仍然保持典型的 hESCs 克隆形态,碱性磷酸酶染色阳性,免疫荧光染色显示 Oct4,SSEA4,Tra-1-60 表达为阳性,体外分化可形成拟胚体。说明甲醇固定 MEF 基质可以很好地维持 hESCs 的多能性。

hESCs 细胞具有分化为三胚层的多能性,在临床上的应用前景广阔。临床级别的 hESCs 培养系统必

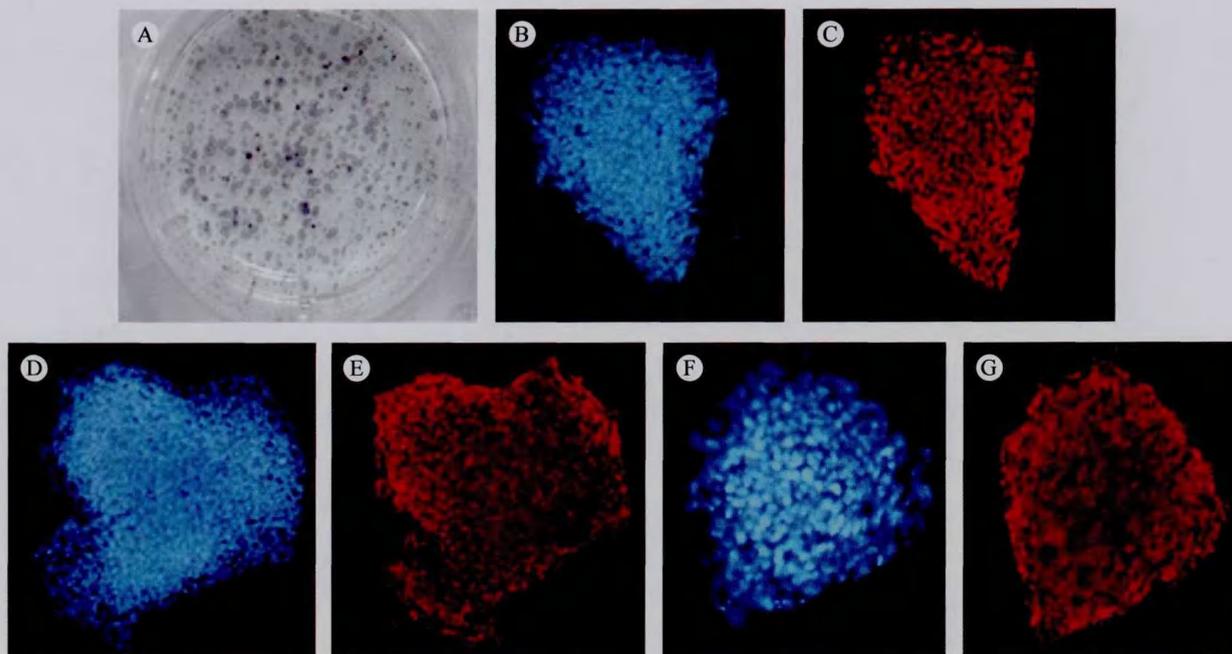
须是无异源成分的,而 MEF 细胞表面会表达 Neu5Gc 这种鼠源性成分,所以在 hESCs 与 MEF 共培养体系中,hESCs 污染了异源物质。采用固定 MEF 作为基质,一定程度上可能会减少异源成分污染。在以后的研究中,我们将选取一些人源的饲养层细胞,比如人脐带间充质细胞^[9],制备无异源成分的包被基质。MEF 全细胞固定还有一些问题需要解决,hESCs 在该基质上长期传代后,贴壁性会略有下降,可能是 MEF 分泌的一些促进 hESCs 贴壁的细胞外基质粘附在培养板上,在 MEF 全细胞固定的过程中被 MEF 细胞遮盖,影响了 hESCs 的贴壁。在今后的研究中,我们将采取一些方法,让促进 hESCs 贴壁的细胞外基质能充分暴露,并将寻找一些人源性的饲养层细胞,制备全人源的包被基质。

(本文图 2 见彩插 5。)

参 考 文 献

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282:1145-1147.
- [2] Martin MJ, Muotri A, Gage F, et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid [J]. *Nat Med*, 2005, 11(2):228-232.
- [3] Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*. 2001, 19(10):971-974.
- [4] 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.
- [5] Yap LY, Li J, Phang IY, et al. Defining a threshold surface density of vitronectin for the stable expansion of human embryonic stem cells [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(2):193-207.
- [6] Stelling MP, Lages YM, Tovar AM, et al. Matrix-bound heparan sulfate is essential for the growth and pluripotency of human embryonic stem cells [J]. *Glycobiology*, 2013, 23(3):337-345.
- [7] Wu Z, Li H, Rao L, et al. Derivation and characterization of human embryonic stem cell lines from the Chinese population [J]. *J Genet Genomics*. 2011, 38(1):13-20.
- [8] Yue XS, Fujishiro M, Nishioka C, et al. Feeder cells support the culture of induced pluripotent stem cells even after chemical fixation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e32707:1-9.
- [9] 刘峰,徐永胜,俞海燕,等.人脐带间充质干细胞作为维持人胚胎细胞生长饲养层细胞的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(4):271-276.

[收稿日期] 2013-10-08

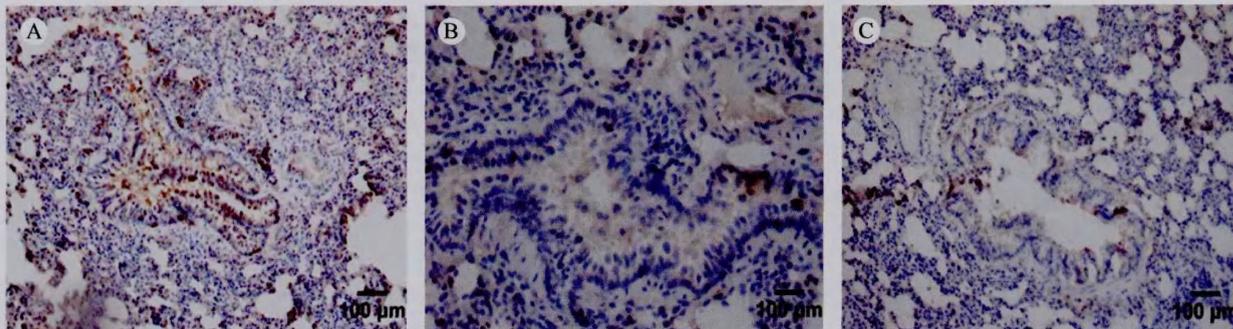


注: A: AP 染色为阳性; B, D, F: DAPI 核染; C: Oct4 染色为阳性;
E: SSEA4 染色为阳性; G: Tra-1-60 染色为阳性。

图 2 hESCs 在甲醇固定培养板上连续传 10 代后多能性基因表达的免疫染色鉴定

Note: A: hESCs with positive staining of alkaline phosphatase; B, D, F: hESCs nuclear staining with DAPI;
C, E, G: hESCs with positive staining of Oct4, SSEA4 and Tra-1-60.

Fig. 2 Alkaline phosphatase staining of hESCs and detection of specific markers of hESCs cultured on methanol-fixed MEF substrate after 10 passages



注: A: 正常对照组; B: 造模 14 d 组; C: 造模 28 d 组。

图 1 各组大鼠肺部免疫组化结果

Fig. 1 Immunohistochemical changes in the rat lung tissues.

(Immunohistochemical staining, A: Normal control group; B: Modeling group for 14 days; C: Modeling group for 28 days)