论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1594-04

模拟微重力条件下小鼠拟胚体形成及分化的初步观察

刘卫生[1,2],王英杰[1],刘 涛[1],张世昌[1] ([1]第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038;[2]延安大学附属医院心血管内科,陕西 延安 716000)

摘 要:目的 研究模拟微重力条件下小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESc)拟胚体(embryoid bodies,EBs)的形成及分化。**方法** 胰酶消化普通培养的小鼠胚胎干细胞,调整细胞数为 $1\times10^6\cdot ml^{-1}$,移入可模拟微重力的旋转型生物反应器内进行培养,显微镜动态观察鼠 EBs 的形成,苏木精-伊红染色观察 ESc 的组织细胞分化情况,检测培养过程中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的漏出量。取不同时相的 EBs,接种 6 孔培养板培养 3 ~ 5 d,倒置相差显微镜观察 EBs 来源细胞的分化。**结果** 生物反应器旋转培养 24 h 即可肉眼观察到大量多细胞聚集体形成,相差显微镜和立体显微镜下发现,72 h 后细胞聚集体进一步形成均一的 EBs。随培养时间延长 EBs 体积不断增大,并不断有新的 EBs 出现。HE 染色显示,EBs 中的 ESc 呈现多组织多细胞分化特征,培养后期(12 d 以后)较大 EBs 中心有不同程度的坏死,伴 LDH 漏出量的明显升高。接种 EBs 于 6 孔培养板后,镜下观察到不同类型的细胞,如内皮样细胞、成纤维样细胞、肝细胞样细胞、血管样结构以及可自发性搏动的心肌样细胞。**结论** ESc 在模拟微重力条件下可大量快速形成 EBs,伴有不同类型的组织细胞分化。旋转型生物反应器可作为 ESc 研究的有用工具。

关键词:胚胎干细胞 拟胚体 分化 生物反应器 微重力
中图法分类号:R329-33;R329.21;R339.5 **文献标识码:**A

The formation and differentiation of mouse embryoid bodies under simulating microgravity

LIU Wei-sheng[1,2], WANG Ying-jie[1], LIU Tao[1], ZHANG Shi-chang[1] ([1]Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Yan 'an University, Yan 'an Shanxi 716000, China)

Abstract: Objective To study the formation and differentiation of mouse embryoid bodies (EBs) under simulating microgravity. Methods Mouse embryonic stem cells (ES cells) were dissociated with trypsin and seeded onto the rotary bioreactor simulating microgravity at a concentration of $1\times10^6\cdot ml^{-1}$. The bioreactor was set to rotate at low speed at 37 ℃ in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. The formation and differentiation of EBs were observed under microscope and by hematoxylin/eosin (HE) staining. LDH leakage analysis was performed. The EBs were seeded in 6-well plates and cultured for 3 to 5 days. The differentiation of EBs derived cells was examined by phase contrast microscope. Results A lot of multicellular aggregations were seen after 24-hour rotary culture. Phase-contract microscope and stereomicroscope showed that homogeneous EBs formed from these aggregations after 72-hour culture. The volume of EBs gradually increased, accompanied with the generation of new EBs. HE staining demonstrated the characteristics of multicellular differentiation of EBs cell-derived cells. Necrosis occurred in the center of some large EBs after 12-day cultivation, meanwhile the LDH leakage was increased. Blood vessels structure, endothelioid cells, fibroblasts, hepatocyte-like cells, and spontaneously beating cardiocyte-like cells were observed under phase-contract microscope after EBs seeding on 6-well plates. Conclusion Under simulating microgravity, a great quantity of EBs were differentiated from mouse ES cells and formed quickly. These results reveal that rotary bioreactor should be a useful tool for ES cell research.

Key words: embryonic stem cell; embryoid bodies; differentiation; bioreactor; microgravity

基金项目:国家自然科学基金(30670526);第三军医大学留学回国人员科研启动基金(2007XG47)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(306700526) and the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars by Third Military Medical University(2007XG47)

作者简介:刘卫生,女,陕西省子长县人,副主任医师,副教授,主要从事心律失常方面的研究,发表论文 8 篇。电话:(0911)2881218,E-mail:liuweisheng@yahoo.cn
通信作者:王英杰,电话:(023)68754475-8062

收稿日期:2007-09-19 **修回日期:**2007-10-11

体外模拟胚胎发育的拟胚体（embryoid bodies，EBs）是胚胎干细胞（embryonic stem cell，ESc）研究的重要手段，以往有关研究中大多采用‘悬滴法’方法制备 EBs[1]，该方法虽然有效可靠，但制备过程较为繁琐，形成 EBs 时间较长，数量较少，难以满足大量研究的需要。鉴于悬浮状态是胚胎和 EBs 形成的基本条件，本实验采用能模拟产生微重力环境的旋转型生物反应器进行 EBs 形成的初步研究，旨在探讨微重力、旋转生物反应器对 ESc 形成 EBs 及细胞分化的影响，为 ESc 的深入研究和应用提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　细胞来源与生长条件

鼠 ESc CCE 株购自加拿大 StemCell Technologies 公司，细胞接种于被覆明胶的培养瓶内，生长于含 0.1 mmol/L 非必需氨基酸、2 mmol/L L-谷酰胺、0.1 mmol/L 二羟基丙硫醇、1 000 U/ml LIF（recombinant mouse leukemia inhibitory factor）和 15% 胎牛血清的 IMDM 培养液中。

1.2　EBs 的形成

1% 胰酶-EDTA 消化未分化状态的 ESc，用去除 LIF 的上述 ESc 培养液调整细胞数为 $1\times10^6\cdot ml^{-1}$，移入旋转型生物反应器（由美国 Synthecon 公司提供）内，反应器容积为 50 ml。利用空气移动原理，用补充加注培养液的方法排空反应器内气泡。固定反应器于旋转制动装置，并放入细胞培养箱内，在 37°C、5% CO_2 条件下，以 25 r/min 的速度低速转动生物反应器。在旋转培养 ESc 初期，定期观察反应器内气泡产生情况，随时停止转动，补充培养液以排空气泡。

1.3　EBs 的细胞分化

于 ESc 旋转培养后第 3 天更换 ESc 分化培养液，该培养液系在 ESc 培养液中添加 1% 二甲基亚酚、10^{-7} mol/L 地塞米松、10 ng/ml FGF4（fibroblast growth factor 4，Sigma）、10 ng/ml oncostatin M（R&D Systems 产品）、5 mg/L 胰岛素、5 mg/L 转铁蛋白、5 mg/L硒（GIBCO）、50 U/ml 青霉素和 50 μg/ml 链霉素。更换液体时先静置反应器 30 min，使 EBs 自然沉降，从反应器移液口小心吸取 70% 培养液，补充新鲜培养液。分化培养液每 3 天更换 1 次，18 d 后终止 EBs 形成与分化培养。

1.4　EBs 形成的观察

分别运用肉眼观测、数码相机（Sony T33）照相记录的方法和倒置相差显微镜（IX50；Olympus）、立体显微镜（SZX12；Olympus），动态观察 EBs 的形成情况。

1.5　EBs 切片 HE 染色

在 EBs 形成和培养过程中，定期采用自然沉降法收集 EBs，10% 福尔马林固定 24 h，常规过程处理，石蜡包埋、切片（4 μm），苏木精-伊红染色，普通光镜下观察 ESc 的组织分化情况。

1.6　EBs 来源细胞分化的观察

为更清楚地了解 EBs 来源细胞的分化情况，分别将 6、9、12 d 的 EBs 接种于 6 孔培养板，用相同的培养液继续培养 3～5 d，倒置相差显微镜观察 EBs 来源细胞的分化。

1.7　乳酸脱氢酶漏出量检测

每 3 天更换培养液时，留取 2 ml 培养上清，离心 -20 ℃保存，自动生化分析仪上检测不同培养时间培养上清液中乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）的水平。

2　结果

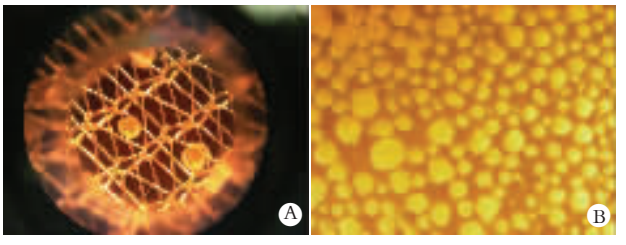
2.1　EBs 形成的观察

将 ESc 移入微重力生物反应器，旋转、悬浮培养 24 h 后，肉眼即可观察到细小的 ESc 聚集体，随培养时间延长，聚集体的数量和体积明显增加，72 h 后细胞聚集体进一步形成小米粒大小、均匀一致的 EBs（图 1）。



图 1　生物反应器培养 ESc 72 h 后形成的 EBs

透过反应器外壳，倒置相差显微镜下见，形成初期的 EBs 呈圆球形，散落于反应器气体交换膜的网格上，球体较致密（图 2A）。1 周后 EBs 的大小和形态较前不尽一致，部分 EBs 的密度有所降低。将培养 1、2 周的 EBs 取出，置立体显微镜下观察发现，1 周内的 EBs 形态较为一致，均呈实心球样，仅少数小的 EBs 呈空泡状（图 2B）。1 周后，EBs 的大小悬殊，形态明显不规整，易见巨大型 EBs，同时，EBs 的空泡化也较前多见。

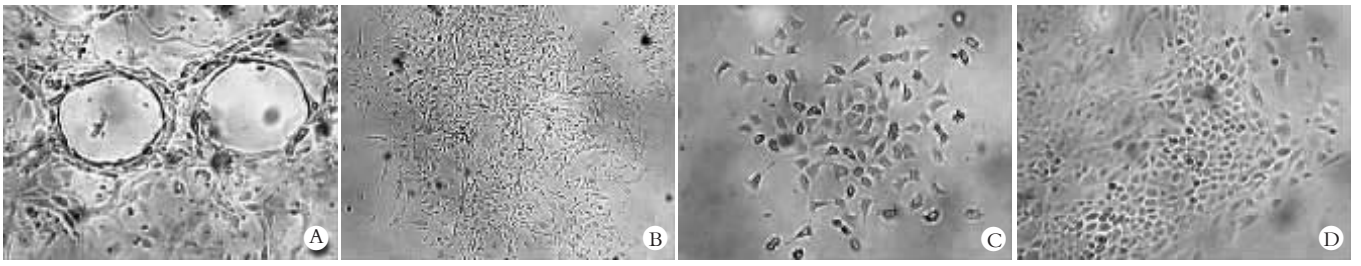


A：倒置相差显微镜观察结果；B 立体显微镜观察结果

图 2　培养 1 周前后的 EBs　（×40）

2.2　EBs 切片 HE 染色

HE 染色观察结果显示，形成初期（旋转、悬浮培养 3 d）的 EBs 由均一的 ESc 组成。在非特异诱导培养液的作用下，培养 5 d 的 EBs 内出现不同类型的组织细胞，如柱状上皮样细胞、腺样结构、血管样结构等。随培养时间延长，EBs 组织细胞类型更为复杂和多样。培养 12 d 以后，部分 EBs 中心的细胞出现不同程度的坏死，EBs 越大，坏死程度越明显。



A:血管样结构(×100);B:成纤维样细胞(×40);C:肝细胞样细胞(×100);D:内皮样细胞(×100)

图3 EBs来源细胞的分化 (倒置相差显微镜)

2.3 EBs来源细胞的分化

取EBs接种于6孔培养板后,EBs来源细胞很快移行至培养板贴壁生长,3~5 d后倒置相差显微镜观察到不同类型的细胞,如内皮样细胞、成纤维样细胞、肝细胞样细胞、血管样结构(图3)以及可自发性搏动的心肌样细胞。其中,6、9 d的EBs来源细胞分化的细胞类型以内皮样细胞及血管样结构多见,12 d的EBs来源细胞分化出成纤维样细胞、肝细胞样细胞较明显。

2.4 LDH漏出量

旋转、悬浮培养前期,LDH漏出量随着时间的延长而逐步降低,培养9 d时达最低点。以后,LDH漏出量逐渐回升,培养15和18 d时明显升高(图4)。

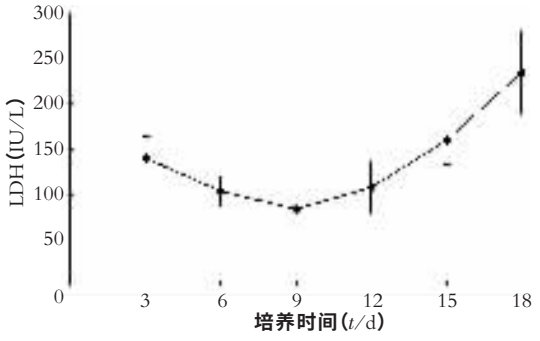


图4 EBs形成培养过程中LDH漏出量

3 讨论

旋转型生物反应器(又称微重力生物反应器)是美国国家宇航局模拟太空失重状态研发的一种组织细胞培养装置,该反应器的主要特点是通过共轴旋转产生一种模拟的微重力环境,使培养的组织或细胞在近似失重的状态下生长[2]。由于微重力条件下培养的组织或细胞所受到的剪切力很小,加之反应器优良的气体交换界面和氧合作用,使其成为组织细胞悬浮培养的最佳选择,尤其适合于细胞的聚集和三维立体组织培养,因而已广泛应用于多种组织细胞的三维培养及其相关组织工程的研究[3,4]。近年来也应用于干细胞研究领域,如人脐血间充质细胞的分化培养[5,6]。

本研究将小鼠ESc置于旋转型生物反应器内,进行微重力环境下EBs形成的体外实验,结果显示,在旋转培养24 h后,ESc即相互黏附,形成肉眼可见的多细胞聚集体。与旋转搅拌法不同,由于旋转型生物反应器的旋转速度较低,且属于共轴匀速转动,故细胞之间的作用相对温和,即易于细胞的相互黏附,又不至于造成细胞损伤,因而在短时间内就进一步有效地形成较为均匀一致的EBs。我们在实验中注意到,不同的细胞接种浓度、旋转速度、间歇性旋转等对形成EBs的大小、密度以及中心细胞的坏死有明显的影响(结果未显示),这些影响因素的最佳结合可能是有效制备大量高质量EBs的关键。因此,尽管本实验初步证实了模拟微重力环境对EBs形成的有效性,但还需要进一步扩大分组实验,对各种参数进行优化组合,以建立用旋转型生物反应器大量形成理想EBs的可靠方法。

通过HE染色,本实验初步观察到EBs形成中,ESc的分化与变化过程。EBs形成6 d的组织切片中即出现不同类型的组织细胞,如柱状上皮样细胞、腺样结构、血管样结构等。进一步将EBs平板培养后,EBs来源细胞中也出现内皮样细胞、成纤维样细胞、肝细胞样细胞、血管样结构以及可自发性搏动的心肌样细胞,显示ESc多细胞、多组织分化的特征[7]。在旋转型生物反应器内形成EBs的过程中,随着培养时间延长,EBs的大小出现悬殊变化,由于物质传输与营养供给的不足,较大EBs中心的细胞出现不同程度的坏死。尽管这种情况较悬滴法和旋转搅拌法形成的EBs少见,出现的时间也较晚,但同样提示,用模拟微重力条件形成EBs的时间不宜过长,体积不宜过大。从促进ESc分化的角度考虑,早期给予适宜的诱导分化刺激,有望在EBs形成的同时,对ESc进行有效的定向分化,以满足不同组织器官组织工程研究的需要[8]。

参考文献:

[1] Asahina K, Fujimori H, Shimizu-Saito K, *et al*. Expression of the liver-specific gene Cyp7a1 reveals hepatic differentiation in embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells [J]. Genes Cells,

2004，9(12)：1297－1308.

[2] Chen J，Chen R，Gao S. Morphological characteristics and proliferation of keratocytes cultured under simulated microgravity[J]. Artif Organs，2007，31(9)：722－731.

[3] Coward S M，Selden C，Mantalaris A，*et al*. Proliferation rates of HepG2 cells encapsulated in alginate are increased in a microgravity environment compared with static cultures[J]. Artif Organs，2005，29(2)：152－158.

[4] Chunqiu Z，Xizheng Z，Han W，*et al*. Direct compression as an appropriately mechanical environment in bone tissue reconstruction in vitro[J]. Med Hypotheses，2006，67(6)：1414－1418.

[5] Yuge L，Kajiume T，Tahara H，*et al*. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation[J]. Stem Cells Dev，2006，15(6)：921－929.

[6] McGuckin C P，Forraz N，Baradez M O，*et al*. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood[J]. Cell Prolif，2005，38(4)：245－255.

[7] Draper J S，Moore H D，Ruban L N，*et al*. Culture and characterization of human embryonic stem cells[J]. Stem Cells Dev，2004，13(4)：325－336.

[8] Doss M X，Koehler C I，Gissel C，*et al*. Embryonic stem cells：a promising tool for cell replacement therapy[J]. J Cell Mol Med，2004，8(4)：465－473.

（编辑　王　红）

（上接 1590 页）

属耳环接触部位）均有皮疹表现。

65 例泛发性斑丘疹水疱型的皮疹主要分布于四肢外露部、眼睑、耳垂及耳后、颈部、腹部（尤其为脐周）、背部等部位，皮疹以基本对称性的斑丘疹和小水疱为特点，多数患者由于长期摩擦刺激，皮损呈不同程度的苔藓样变。其中 58 例（89.23%）有脐周皮疹，52 例（95.38%）患者皮疹表现具有明显的季节性，另有 3 例（4.62%）为全年发病。

16 例屈侧皮炎型的皮疹主要对称性地分布于肘、膝屈侧，表现为红斑、丘疹和水疱，过度刺激的情况下可有渗出性改变。本型患者 13 例伴有脐周皮肤损害（占 81.25%）；11 例（68.75%）皮疹表现具有明显的季节性，5 例（31.25%）全年发病。

2.2　变应原检测结果

金属变应原分布为：镍 28 例（34.57%）、铝 19 例（23.45%）、铬 17 例（21.00%）、汞 15 例（18.52%）、钴 14 例（17.28%）、钯 9 例（11.11%）、镉 7 例（8.64%）、铅 5 例（6.17%）、铜 2 例（2.47%）。部分患者存在 2 种以上变应原。

2.3　治疗及随访

所有患者均嘱严格避免接触外界金属（如钥匙、皮带、钮扣等）。此外，对于全年均发病的患者，还需要注意避免口服吸收金属（主要来源为金属餐具）。

药物治疗方面，予以皮质类固醇激素外用，口服氯雷他定片，部分皮损范围较大者给予奴夫卡因静脉封闭治疗或短期系统应用皮质类固醇激素，皮损肥厚苔藓样变明显者，予以醋酸曲安奈德注射液局部封闭治疗。一般 2～3 周可基本治愈。

随访 6～12 个月。81 例患者中有 40 例（49.38%）存在一次或多次复发，复发与接触金属有关，避免接触后可很快治愈。季节性发病患者的复发率低于全年发病患者，分别为 34 例（46.58%）、6 例（75%）。

3　讨论

SCD 根据临床表现可分为：汗疱疹型、既往斑贴试验阳性部位和既往皮炎部位皮损复发、泛发性斑丘水疱疹型、屈侧皮炎型、Baboon 综合征（狒狒综合征）、多形红斑和血管炎等类型。本研究对 81 例患者进行分类，主要表现为泛发性斑丘水疱疹型和屈侧皮炎型。

临床上常易误诊为神经性皮炎、湿疹等，其主要原因是：①刘玲玲等[2]于 2002 年首次在国内正式报道 SCD，因此许多临床医师对本病缺乏全面的了解和深入研究。②SCD 的确诊主要依赖皮肤斑贴试验和口服激发试验，但可供临床使用的变应原种类有限，从而给临床诊断带来困难。③SCD 的临床表现多变，缺少特异性。本研究表明：以皮炎或湿疹样表现为主的患者，其金属直接接触部位（尤其是脐周），常出现皮疹，颇具特异性，是对 SCD 的重要诊断提示，该结果与朱国兴等[3]的研究结果一致。

国外研究认为金属所致的 SCD 以镍、铬、钴等为主，并且主要通过口服吸收致敏[4]。但本研究的结果与国外资料有一定区别：我们发现主要金属变应原依次为镍、铝、铬、汞、钴、钯等，提示应增加金属变应原的检测范围。本研究表明，SCD 主要通过外界接触金属致敏，其主要依据为：①多数患者金属直接接触部位（如脐周为皮带金属头接触部位）有明显皮疹。②多数患者发病具有季节性（季节发病者为 90.12%，全年发病者仅为 9.88%），以炎热季节发生，寒冷季节可明显好转或消退为特征，且皮疹好发生于外露部位。③严格避免外界接触金属后可以预防复发，只有少数患者需要考虑口服吸收致敏的可能性。

关键词：系统性接触性皮炎；金属；变应原

中图法分类号：R758.22　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 赵　辨. 临床皮肤科学[M]. 第 3 版. 南京：江苏科学技术出版社，2001：601－602.

[2] 刘玲玲，窦　侠，朱学骏. 系统性接触性皮炎 8 例分析[J]. 临床皮肤科杂志，2002，31(7)：421－423.

[3] 朱国兴，陆　春，赖　维，等. 51 例系统性接触性皮炎的临床分析[J]. 国际免疫学杂志，2006，29(4)：201－204.

[4] Hostynek J J. Sensitization to nickel：etiology，epidemiology，immune reactions，prevention，and therapy[J]. Rev Environ Health，2006，21(4)：253－280.

（编辑　王小寒）