文章编号:1000-5404(2010)19-2137-03

短篇论著

不同剂量碱性成纤维细胞因子对人类胚胎干细胞生长、凋亡和DNA完整性的影响

罗树伟,林 戈,孙 争,谢平原,刘天成,卢光琇 (410078 长沙,中南大学生殖与干细胞研究所,国家干细胞工程技术研究中心)

【摘要】 目的 探讨碱性成纤维细胞因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)浓度对人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells,hESCs)特性的影响。方法 建立化学限定性hESCs培养体系,以有饲养细胞培养体系作为参照,比较4、40 ng/ml和100 ng/ml bFGF对hESCs多能性标记、细胞周期、细胞凋亡和DNA完整性的影响。结果 ①低浓度bFGF(4 ng/ml)足以维持hESCs在化学限定性培养基(基础培养基DMEM/F12,N2,B27,简称NB体系)中培养;②bFGF可以抑制hESCs细胞凋亡,且具有剂量依赖性,而对hESCs细胞周期没有影响;③bFGF有助于hESCs DNA完整性维持,在NB体系加入4 ng/ml bFGF时,hESCs在DNA水平上存在75个异常区域,而在加入40 ng/ml bFGF时,只存在1个异常区域。结论 高剂量bFGF有助于hESCs体外快速扩增和hESCs DNA完整性维持。提高bFGF浓度为hESCs体外培养所必需。

【关键词】 人类胚胎干细胞;饲养细胞;碱性成纤维细胞生长因子;比较基因组杂交

【中图法分类号】 R321;R329.2;R341 **【文献标志码】** A

1998年Thomson等[1]建立了世界上第1株人类胚胎干细胞系。人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells,hESCs)具有无限的自我复制能力和多向分化潜能,是治疗退行性病变的种子细胞,如Parkinson病、脊髓损伤、糖尿病等[2],同时hESCs也是研究人类早期发育的理想材料。hESCs饲养细胞培养体系准备饲养细胞的劳动强度大以及存在感染动物病毒的潜在危险,为此,国内外学者建立了化学限定性培养体系,在这些体系中,碱性成纤维细胞因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)是最常加入的细胞因子[3,4]。本研究主要比较无饲养细胞培养体系下不同浓度bFGF对hESCs体外培养的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

ChhESC-8、ChhESC-18、ChhESC-22 hESCs系为本研究所自建hESCs系[5],按照常规培养在胚胎成纤维细胞饲养细胞体系(human embryonic fibroblast feeder cells,HEF)下,培养基为85% DMEM/F12,15%替代血清(replacement serum,SR),1%非必需氨基酸,0.1 mmol/L β-巯基乙醇,每6~7天机械切割传代1次,hESCs在HEF体系下培养27代后,转入到化学限定性培养体系下培养,hESCs在化学限定性体系下培养时以100克隆/2.89 cm^2克隆密度种植,培养基为DMEM/F12,N2添加物,B27添加物,0.1 mmol/L β-巯基乙醇(简称NB体系),同时分别添加3种不同浓度的bFGF(4、40、100 ng/ml),分别称为NB4、NB40、NB100体系,每天换液1次,每6天传代1次。培养皿采用胎牛血清(FBS)预处理4 h。hESCs在NB体系下培养29代后,对其多能性、分子标记、细胞周期和细胞凋亡进行检测。在计算hESCs生长速度时,未分化hESCs以40 000/孔种植在1孔板中,每天取3孔计数细胞数目,连续计数6 d。

1.2 细胞免疫化学染色

4%多聚甲醛室温固定hESCs 20 min,0.1% Triton X-100处理10 min,然后采用4%山羊血清37 ℃封闭30 min。抗Oct4抗体(Chemicon)按照1∶50,抗TRA-1-60抗体(Chemicon)和SSEA-4(Chemicon)抗体以1∶100比例稀释,室温孵育60 min,然后洗涤3次,加入FITC标记的二抗(1∶400)室温孵育60 min,DPBS洗涤3次,加入DAPI(1∶1000)10 s后荧光显微镜下观察结果。

1.3 碱性磷酸酶(AKP)染色

采用试剂盒Fast Red Substrate Pack(00-2234,Gibco)检测,hESCs克隆采用70%乙醇-20 ℃固定2 h,双蒸水洗涤3次,加入配制好的AKP染液室温孵育10 min,加双蒸水洗涤,镜下摄像观察。

1.4 细胞流式检测

hESCs采用Trypsin/EDTA消化成单细胞,HEF和NB体系下分别取细胞4×10^5,用FACS buffer(HBSS+2% 山羊血清+0.1% NaN_3)悬浮,20%山羊血清封闭非特异性染色30 min,分别加入抗SSEA-4抗体和抗TRA-1-60抗体,室温孵育60 min,以同型对照作为参照,洗涤2次,加入FITC标记的荧光IgG二抗,室温孵育60 min,洗涤2次后上机检测。细胞周期和细胞凋亡检测同样将hESCs细胞离散成单细胞悬液,按照细胞周期检测试剂盒,细胞凋亡检测试剂盒说明操作。

1.5 核型分析

hESCs采用Colchicine(Sigma,C27650)处理2.5 h,然后送本所细胞遗传实验室行G显带分析,hESCs约每5代进行1次检测。

1.6 hESCs DNA比较基因组杂交(aCGH)芯片检测

收集10^7未分化hESCs(HEF体系下第6代和第59代,HEF体系下培养第27代后转入NB4和NB40体系下培养32代),抽提DNA,送上海生物芯片公司进行Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH(185K Array Set)芯片分析。

【基金项目】 国家自然科学基金(2006AA02A102)

【通信作者】 卢光琇,E-mail:lgxdirector@yahoo.com.cn

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 hESCs 在 NB4 条件下状态观察

hESCs 系 ChhESC-8 由 HEF 体系转入到 NB 体系时，NB4 体系下，在前 3 代内绝大多数 hESCs 克隆发生分化，未分化克隆百分比在第 3 代时降低到 30%，随后逐渐增高，在第 11 代时，几乎所有的克隆处于未分化状态，不存在背景分化。而在 NB40 和 NB100 体下，未分化克隆百分比在早期阶段依然维持高水平状态。NB 体系下 hESCs 和 HEF 体系下 hESCs 一样高表达分子标记 Oct4、SSEA-4、TRA-1-60（图 1），AKP 染色阳性，在体内可分化成 3 胚层细胞。

2.2 bFGF 对 hESCs 细胞周期和细胞凋亡的影响

HEF、NB4、NB40 和 NB100 体系下细胞倍增时间分别为（40.07 ± 1.01）、（37.33 ± 0.79）、（30.94 ± 1.63）h 和（22.00 ± 2.29）h（$P < 0.05$），S 期细胞比率分别为（41.75 ± 1.05）%、（42.90 ± 3.02）%、（41.48 ± 2.04）% 和（41.34 ± 5.72）%，细胞凋亡率分别为（13.50 ± 1.52）%、（8.44 ± 1.11）%、（5.96 ± 1.27）% 和（3.61 ± 1.05）%。

2.3 bFGF 对 hESCs 分子标记阳性比率的影响

通过对 HEF 和 NB 体系下 hESCs 分子标记 TRA-1-60 和 SSEA-4 FACS 分析，HEF、NB4、NB40 和 NB100 体系下，TRA-1-60 阳性细胞比率分别为（71.6 ± 1.8）%、（93.0 ± 2.8）%、（87.8 ± 1.8）% 和（83.1 ± 7.8）%（$P < 0.01$），SSEA-4 阳性细胞比率分别（81.5 ± 5.5）%、（97.3 ± 0.8）%、（95.5 ± 2.5）% 和（95.9 ± 2.4）%（$P < 0.01$）。

2.4 bFGF 对 NB 体系下 hESCs DNA 细微结构的影响

各培养条件下 hESCs 染色体 G 显带未发现明显改变，Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH 芯片分析结果显示，与 HEF 体系下培养 6 代细胞相比较，HEF 体系下 hESCs 培养 59 代以后表现出单一的 DNA 结构缺失异常（Chr 22 q13.1 – 13.2，缺失 0.7 Mb），NB4 体系下培养 32 代后表现出 75 个区域异常。其中 74 个区域表现出缺失异常（绿色），1 个区域表现出扩增异常（红色），涉及 19 条染色体，NB40 体系下培养 32 代后表现出单一区域扩增异常（Chr 20 q11.21，扩增 0.4 Mb）（图 2）。

3 讨论

hESCs 可以在饲养细胞培养体系和化学限定性培养体系中维持未分化状态。本研究结果表明 4 ng/ml bFGF 足以维持化学限定性培养体系下 hESCs 未分化

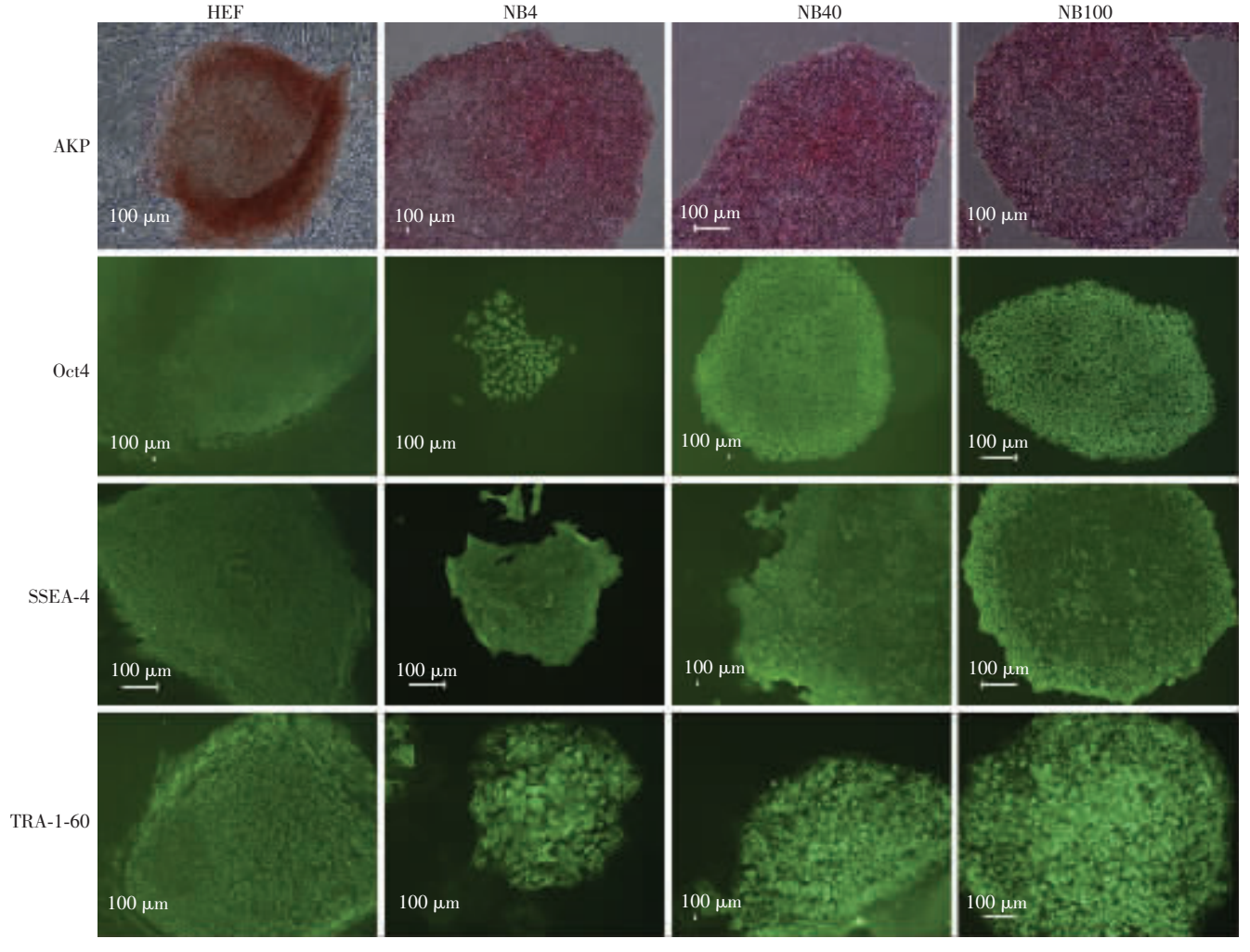
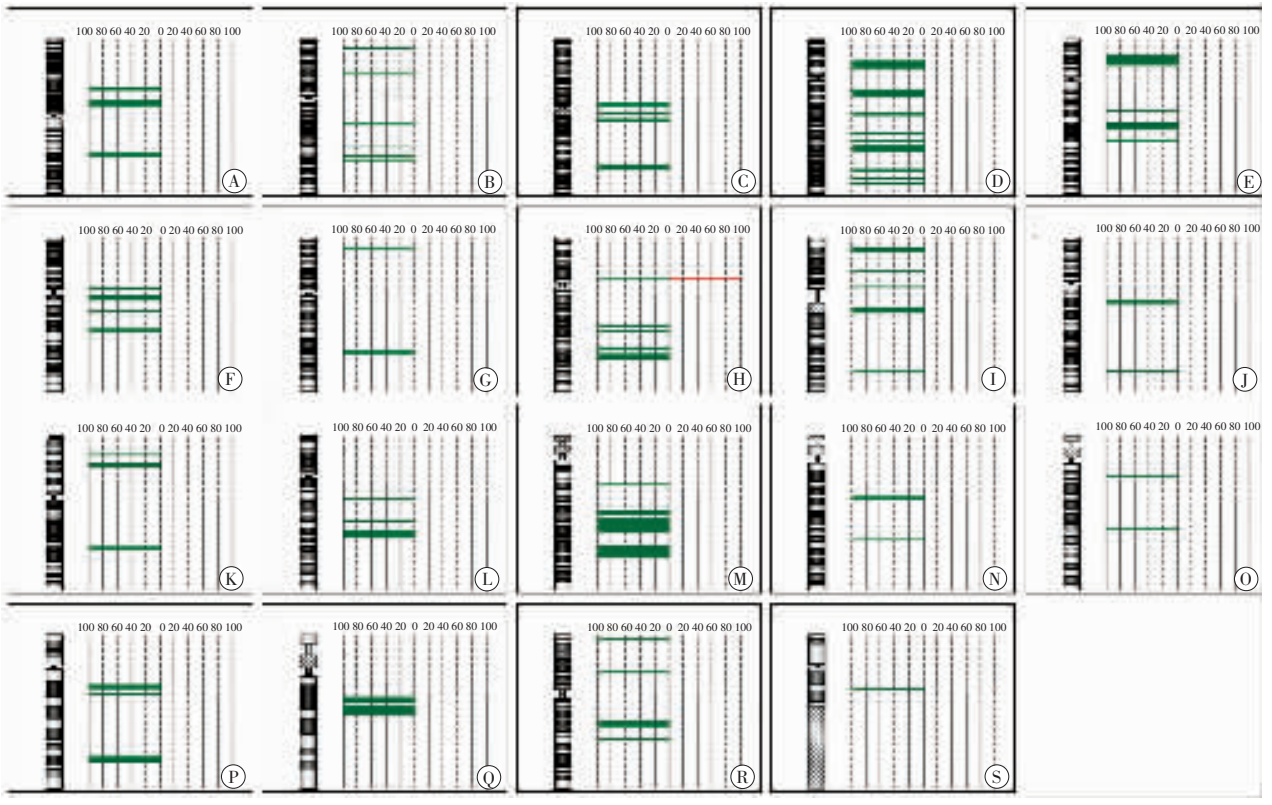


图 1 HEF 和 NB 体系下 hESCs AKP 染色和多能性标记物（Oct4、SSEA-4 和 TRA-1-60）免疫细胞化学染色观察



A～O：1～15 号染色体；P：18 号染色体；Q：21 号染色体；R：X 染色体；S：Y 染色体

图 2　NB 体系下 hESCs 比较基因组杂交芯片分析

状态，高浓度 bFGF 不是维持 hESCs 未分化状态所必需。在 NB 体系培养过程中，有一个重要的因素不可忽略——hESCs 种植密度，后续实验进一步表明 hESCs 在高克隆密度种植时，可以不依赖外源性的细胞因子，而在低克隆密度时 hESCs 不能维持未分化状态，提示提高克隆密度具有代偿外源性 bFGF 作用。国外研究表明，hESCs bFGF 可以促进 hESCs 表达细胞因子胰岛素样生长因子 2（IGF2）[6]，而 hESCs 自身表达 bFGF 基因和受体，存在自分泌作用，高克隆密度种植 hESCs 可能是通过增强其自分泌作用来降低对外源性 bFGF 浓度依赖，具体的机制需进一步阐明。bFGF 可以降低 hESCs 细胞凋亡，而对细胞周期没有影响，对 hESCs 促生长作用主要是通过抑制细胞凋亡来实现的。

尽管本研究中 NB 体系下 hESCs 在染色体 G 显带水平上并没有表现出异常，但是更加准确的 aCGH 芯片结果显示 hESCs 存在 DNA 结构上的精细改变。当 bFGF 浓度增加到 40 ng/ml 时，NB4 体系下存在的 DNA 异常可以被逆转，高浓度 bFGF 可能激活了某种 DNA 损伤机制。Baker 等[7]研究发现 hESCs 核型异常可以反映 hESCs 自我复制的适应性改变，基因遗传的改变使得 hESCs 更适合增殖和恶性肿瘤转变。在 hESCs 由 HEF 体系转入到 NB4 体系的早期阶段，多数克隆发生分化，NB4 体系下 hESCs 可能承受了较大的生存压力，只有少数发生 DNA 微小改变的 hESCs 才能维持未分化状态，随着传代培养的进行，这些 hESCs 被选择下来。从这个观点来看，高剂量 bFGF 是 hESCs 化学限定性培养体系所必需，可以维持其 DNA 完整性。

参考文献：

[1] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145－1147.

[2] 周光纪，屈纪富，徐海伟，等. 胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞分化的体外诱导[J]. 第三军医大学学报，2006，28(9)：903－906.

[3] Yao S, Chen S, Clark J, *et al*. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(18): 6907－6912.

[4] Levenstein M E, Ludwig T E, Xu R H, *et al*. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal[J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 568－574.

[5] Zhou J, Ou-Yang Q, Li J, *et al*. Human feeder cells support establishment and definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(4): 737－749.

[6] Bendall S C, Stewart M H, Menendez P, *et al*. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells *in vitro*[J]. Nature, 2007, 448(7157): 1015－1021.

[7] Baker D E, Harrison N J, Maltby, E, *et al*. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*[J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(2): 207－215.

（收稿 2010-03-23 修回 2010-05-01）
（编辑　王小宴）