技术方法

文章编号:1000-5404(2010)23-2568-03

冻融后2-细胞胚胎发育至囊胚建立人胚胎干细胞系

杨 华[1],刘 锋[1],王 钦[1],邓志华[1],邹 彦[1],史秋雯[1],丘 映[1],李东升[2] (530031 南宁,广西壮族自治区南宁市第二人民医院生殖医疗中心[1];442000 湖北 十堰,湖北省太和医院郧阳医学院胚胎干细胞重点实验室[2])

【摘要】 目的 用解冻后废弃胚胎及部分患者捐献的冷冻胚胎建立胚胎干细胞系。方法 用程序解冻法解冻2001-2007年来我生殖中心就诊的患者剩余冷冻胚胎,培养至囊胚,Pronase酶去除透明带后,全囊胚置于小鼠饲养层(MEF)中培养获得原代细胞,机械法结合Ⅳ型胶原酶消化法传代,并利用细胞形态观察、免疫荧光染色、核型分析、畸胎瘤切片胚层分析方法对所建胚胎干细胞系进行鉴定。结果 序贯培养23枚废弃胚胎,有4枚培养到囊胚阶段;去除透明带后有2枚在MEF上贴壁生长,但只有1株成功扩增稳定传代至第80代;细胞集落呈典型的鸟巢状,有稳定的46XY核型;细胞系表达SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60和TRA-1-81抗原,RT-PCR检测有Nanog、Oct-4、Sox2等基因表达;同时在体外能分化为内、中、外3个胚层。结论 解冻后2~3细胞Ⅲ~Ⅳ级的废弃胚胎仍具有发育形成囊胚的潜能,并利用所得囊胚采用酶去透明带全胚培养法能建立稳定增殖的hESC细胞系。

【关键词】 人胚胎干细胞系;废弃胚胎;2-细胞

【中图法分类号】 R329.21

【文献标志码】 B

人胚胎干细胞(human embryonic stem cell,hESC)是从早期的胚胎内细胞团(inner cell mass,ICM)分离培养成的全能性干细胞,其在体外培养过程中可以维持干细胞的未分化状态、正常的二倍体核型及无限的增殖能力,具有体内外分化能力和种系的嵌合能力[1]。目前,大部分全能性hESC系都是从5~8 d的剩余囊胚的ICM中分离而来,只有很少部分是从评分低的囊胚或桑葚胚中分离而来。

目前,大部分研究已经证实了从小于10细胞的早期卵裂胚胎中获得hESC系[2-4]。以前研究显示大部分被认为发育停止的体外受精卵,只有一小部分的可以发育到桑葚胚或囊胚阶段[5-7]。最近有研究表明,发育迟缓的胚胎也可能成为hESC的另一来源,建系率为0.8%,甚至发育阻滞的胚胎仍表达全能性基因,在饲养层或细胞外基质上能形成原代细胞[2]。

利用本中心体外受精-胚胎移植胚胎冻融后只有2个细胞复活的胚胎以及患者怀孕后捐赠的冷冻胚胎,序贯培养至囊胚阶段,从这些来源的囊胚中我们成功的分离出一株hESC系——NS1。

1 材料与方法

1.1 胚胎来源

2001-2007年来我生殖中心行FET周期胚胎冻融后,复苏率<50%的体外废弃胚胎,以及解冻患者怀孕后捐赠的冷冻胚胎,经患者签署用于科学研究的相关知情同意书后,序贯培养至囊胚阶段。解冻试剂为Quinn's Advantige Thawing Media Kit,参照解冻试剂盒说明解冻,复苏胚胎置于Quinn's Advantige Blastcysts Medium(美国SAGE *In-vitro* Fertilization公司)液中培养。

1.2 小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的制备

无菌取出妊娠12.5日龄的ICR小鼠(北京维通利华购买)胎鼠,去除头和内脏,残余部分用PBS冲洗干净。0.25%胰酶+0.02% EDTA 4 ℃消化过夜,次日加入等体积的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)培养液终止,制成细胞悬液,以1×10^5/ml的密度接种于含MEF培养液的T75培养瓶(美国Corning公司)中。MEF培养液以高糖DMEM培养基(Germany)为基础液,添加10%胎牛血清(HyClone)、0.1 mmol/L β巯基乙醇(GIBCO)、1% NEAA(vitrolife)、以及100 IU庆大霉素。接种细胞置于37 ℃、6% CO_2饱和湿度环境培养,隔天换液,4~5 d待细胞铺满瓶底用0.25%胰酶+0.02% EDTA消化收集细胞原代冻存。部分细胞传至3~4代用1 mg/ml丝裂霉素C处理2.5 h后,按1×10^6/ml接种到预先用0.1%明胶处理过的35 mm培养皿(美国BD)中,置于培养箱中备用。

1.3 ICM的分离及hESC传代

由于获得囊胚质量欠佳,内细胞团数量较少,故采用全囊胚培养法。将扩张囊胚于0.2% Pronase(Sigma)中作用1.5~2 min,镜下观察透明带变软或出现缺口后立即移到新鲜培养液中洗2~3遍,吹打数下,将透明带尽量去除。将整个囊胚接种于预先准备好的MEF中培养,在接种囊胚之前将MEF培养液换为hESC培养液。hESC培养液以DMEM/DF12培养基(Germany)为基础培养液,添加20% SR(knock out serum replacement,GIBCO)、0.1 mmol/L β巯基乙醇(GIBCO)、1% NEAA(vitrolife)、4 ng/ml bFGF(invitrogen)以及100 IU庆大霉素。隔天换液1次,隔天观察贴壁生长情况。13~14 d后挑出克隆中央较致密、呈典型未分化细胞形态的细胞团,机械分散成5~6块。将分散的细胞团重新接种到新的饲养层上生长,每天换hESC培养液。

细胞系建立后,每隔5~7天传代1次。使用1 mg/ml的Ⅳ

【基金项目】 南宁市科学与技术开发计划项目(200801024C)

【通信作者】 丘 映,电话:(0771)4824317,E-mail:nnqying@sina.com
李东升,电话:(0719)8801418,E-mail:dsli1698@yahoo.com

型胶原酶把细胞消化成含 50～100 细胞的团块，以 1∶3的比例传代。由于人 ES 细胞培养一段时间后可能会发生生物学特性改变，所以详细记录传代情况，并将传代数低的人 ES 细胞冻存。

1.4 hESC 的鉴定

从以下 6 个方面对所建细胞系进行生物学鉴定：①镜下观察细胞集落生长形态，是否具有典型的 hESC 集落呈鸟巢样；②利用免疫荧光细胞化学法检测所建细胞系是否有 hESC 特异性 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81 抗原表达，所用试剂盒为 SCR002(USA，chemico)；③以 β-actin 内参基因，RT-PCR 检测胚胎干细胞特异基因 Oct4、Sox2、Rex1、Nanog 的表达，所用引物序列为：Oct4 上游引物 5′-TGGGGGTTCTATTTGGGAAGG-3′，下游引物：5′-GTTCGCTTTCTCTTTCGGGC-3′，193 bp；Nanog 上游引物：5′-TGCCTCACACGAGACTGTC-3′，下游引物：5′-TGCTATTCTTCGGCCAGTTG-3′，171 bp；Sox2 上游引物：5′-CAACGGCAGCTACAGCA-3′，下游引物：5′-GGAGTGGGAGGAAGAGGT-3′，283 bp；Rex1 上游引物：5′-GCGTACGCAAATTAAAGTCCAGA-3′，下游引物：5′-CAGCATCCTAAACAGCTCGCAGAAT-3′，306 bp；β-actin 上游引物 5′-CCACGAAACTACCTTCAACTC-3′，下游引物 5′-GCCATGCCAATCTCATCTT-3′，287 bp。④对稳定传代细胞系进行染色体核型 G 带分析，检测长期传代细胞系的核型稳定性；⑤将 hESC 制成浓度大约为 10^7/ml 细胞悬液，注入联合免疫缺陷(SCID)鼠大腿内侧(约 10^6 细胞)，8 周后观察体外分化畸胎瘤的形成及组织切片观察内、中、外 3 个胚层的形成情况。

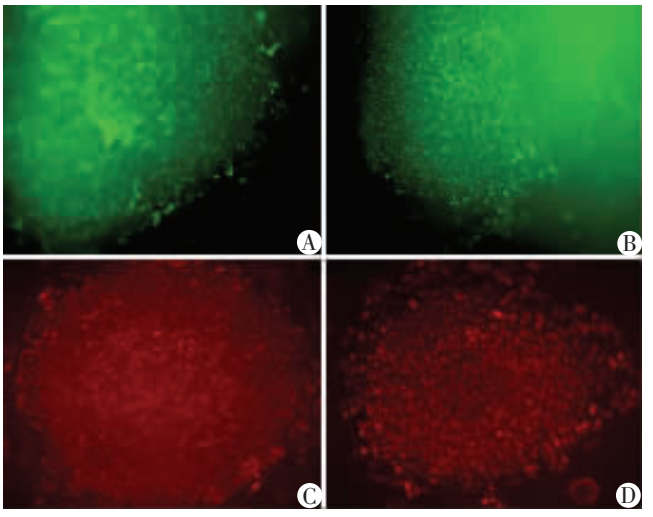
2 结果

2.1 囊胚培养及 hESC 增殖传代

序贯培养 23 枚解冻胚胎，有 4 枚(17%)发育到囊胚阶段，其中 1 枚为解冻后复活 2 个卵裂球的胚胎发育而成；去透明带后全囊胚接种到 MEF 上，有 2 枚贴壁生长，其中 1 枚胚胎在贴壁生长 5 d 后自行浮起退化，另 1 枚胚胎继续生长至 10 d 后有明显隆起状并扩增迅速，第 13 天采用机械法分割成数块传代培养。细胞集落呈典型鸟巢状生长，集落内细胞界限清楚、核大、核仁清晰、细胞核/质比例高；集落周边与 MEF 饲养层界限清楚，无分化迹象，原代培养 13 d 后机械法传代，以后可增殖 6～7 d 后常规按 1∶3比例传代，传代后第 2 天即可见贴壁细胞呈小集落生长，集落逐渐增大，中央逐渐隆起。hESC 系现稳定增殖至 80 代。

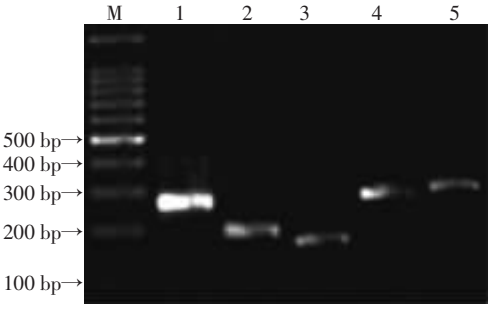
2.2 hESC 的鉴定

稳定增殖细胞系进行 hESC 生物学鉴定：①细胞集落呈典型鸟巢状生长，集落内细胞界限清楚、核大、核仁清晰，细胞核质比例高；②在传代过程中，NS1 细胞系保持的 46XY 核型，无发生核型改变；③细胞系表达 hESC 特异性表面抗原 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81(图 1)；④RT-PCR 检测细胞系有 hESC 细胞特异性基因 Oct4、Sox2、Rex1 和 Nanog 表达(图 2)；⑤细胞系所制备细胞悬液在注射 SCID 鼠大腿内侧，8 周后有明显的畸胎瘤形成，取出畸胎瘤组织切片后观察有内、中、外 3 个胚层相关组织形成(图 3)。



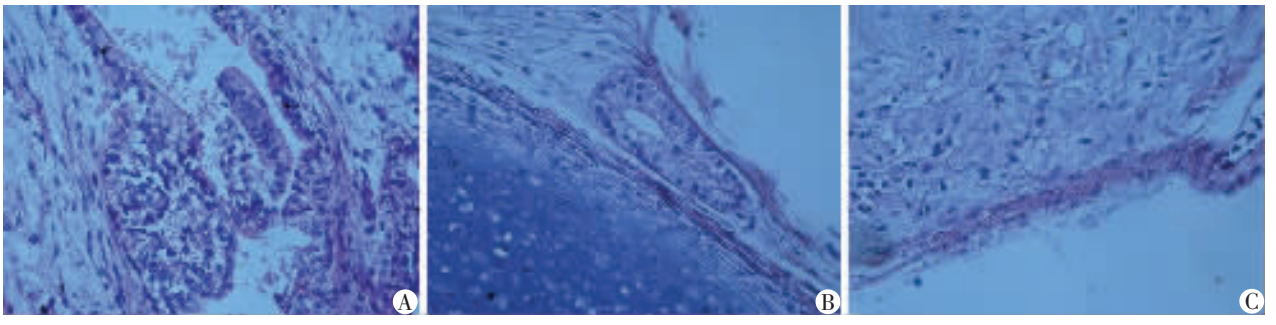
A：SSEA-3；B：SSEA-4；C：TRA-1-60；D：TRA-1-81

图 1 免疫荧光染色观察 NS1 细胞系 hESC 特异性抗原染色呈阳性 (×200)



M：标准；1：β-actin；2：Oct4；3：Nanog；4：Sox2；5：Rex1

图 2 RT-PCR 检测 NS1 细胞系有 hESC 特异全能性基因表达



A：内胚层；B：中胚层；C：外胚层

图 3 NS1 细胞悬液注射 SCID 鼠 8 周后畸胎瘤组织切片 HE 染色观察(×200)

3 讨论

本研究中我们共收集了23枚冻融后胚胎，根据Nagy等[8]报道的胚胎分级标准，通过序贯培养，体外继续培养3～4 d，评分Ⅲ～Ⅳ级评分低的废弃胚胎，有15.4%(2/13)发育到囊胚阶段，明显低于评分Ⅱ级评分好的胚胎[20.0%(2/10)]，与Farhi等[9]认为D3低评分胚胎的囊胚发育率低相吻合。每年生殖中心都有行FET周期胚胎冻融后复苏率<50%的体外废弃胚胎，但仍然有低质量的胚胎可以发育为形态正常的囊胚[10-12]。我们在实验中发现，质量差的胚胎继续培养可形成囊胚，用这些胚胎进行胚胎干细胞的分离培养，可以缓解hESC分离培养的材料短缺问题。

由于滋养层(trophoderm，TE)会与ICM竞争培养基的营养，抑制了ICM增殖，并且诱导其分化，因此必须将TE尽量去除。从囊胚中分离ICM是hESC建系的第1步，也是最关键的一步。常用分离ICM的方法有机械法和免疫刀法。

考虑到所得囊胚质量，我们采用了全囊胚培养法获得hESC系——NS1，它们具有hESC的共有生物学特性：未分化的细胞AKP、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81呈阳性，SSEA-1呈阴性，而分化的hESC SSEA-1呈阳性。悬浮培养或过度生长可形成拟胚体，在SCID小鼠体内可形成畸胎瘤。核型为正常46XY，表达胚胎干细胞的特异基因。在以后的实验中，我们可以尝试其他囊胚培养法分离ICM来提高ICM的获得率并提高建系率。

参考文献：

[1] Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, *et al*. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(2 Pt 1): 755-758.

[2] Zhang X, Stojkvic P, Przyborski S, *et al*. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos[J]. Stem Cells, 2006, 24(12): 2669-2676.

[3] Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, *et al*. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 113-117.

[4] Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, *et al*. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres[J]. Nature, 2006, 444(7118): 481-485.

[5] Landry D W, Zucker H A. Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells[J]. J Clin Invest, 2004, 114(9): 1184-1186.

[6] Jurisicova A, Acton B M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development[J]. Reproduction, 2004, 128(3): 281-291.

[7] Hardy K, Spanos S, Becker D, *et al*. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(4): 1655-1660.

[8] Nagy Z, Liu J, Cecile J, *et al*. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection[J]. Fertil Steril, 1995, 63(4): 808-815.

[9] Farhi J, Nahum H, Weissman A, *et al*. The value of culturing to the blastocyst stage of supernumerary embryos not suitable for freezing after embryo transfer at day 3[J]. Fertil Steril, 2001, 76(3 Suppl 1): S118.

[10] Alikani M, Calderon G, Tomkin G, *et al*. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture *in-vitro*[J]. Hum Reprod, 2000, 15(12): 2634-2643.

[11] Hardy K, Stark J, Winston R M. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos[J]. Biol Reprod, 2003, 68(4): 1165-1169.

[12] Racowsky C, Combelles C M, Nureddin A, *et al*. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability[J]. Reprod Biomed Online, 2003, 6(3): 323-331.

(收稿：2010-05-06 修回：2010-07-04)
(编辑 张 维)

中国科技核心期刊《中华临床医师杂志(电子版)》2011年度征稿征订

《中华临床医师杂志(电子版)》由国家卫生部主管，中华医学会主办，是中国科技论文统计源期刊，中国科技核心期刊。半月刊，全年出刊24期，定价672元，国内刊号CN 11-9147/R，邮发代号80-728，以电子版、纸版导读同时面向全国公开出版发行，被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。本刊2011年上半年刊出重点栏目分别为：耳鼻咽喉、口腔颌面部肿瘤；泌尿生殖系肿瘤；儿童心脑血管病；乳腺肿瘤；脊柱及关节疾病；内镜在消化系统疾病中的应用；呼吸系统肿瘤；内分泌及代谢疾病；肠内及肠外营养；高血压及并发症；肝胆肿瘤；危重症的处理等。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志！欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文！

地 址：北京市100035-50信箱 编辑部 收 邮 编：100035

电 话：(010)62219211 传 真：(010)62222508 E-mail：Lcdoctor@163.com

网 址：www.clinicmed.net