基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0393-04

以间充质干细胞为饲养层分离培养昆明小鼠胚胎干细胞

郑丽娜[1],张晓刚[1],汤为学[2],王佳南[1]
(1. 重庆医科大学附属第一医院心内科;2. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨以间充质干细胞作为饲养层细胞分离培养昆明小鼠胚胎干细胞(Embryonic stem cell,ES 细胞)的方法。方法:以鼠间充质干细胞作为饲养层,收集受孕 3.5~4 d 昆明小鼠的囊胚和桑椹胚进行培养,筛选纯化细胞集落,使其稳定传代后,采用光镜,碱性磷酸酶染色及 Oct-4 染色对其形态学和生物学性状进行初步鉴定。结果:以间充质干细胞作为饲养层细胞分离培养的昆明小鼠 ES 有其典型的形态学特征:集落呈鸟巢状,边缘清楚,表面平滑,结构致密,隆起生长,细胞之间界限不清楚;单个细胞体积小、核大;对 ES 细胞碱性磷酸酶进行检测,未分化的 ES 细胞显微镜下为黄褐色,分化的不着色;Oct-4 染色阳性。结论:以间充质干细胞作为饲养层细胞分离培养昆明小鼠胚胎干细胞可行,得到的胚胎干细胞能保持特殊的形态和未分化状态。

【关键词】小鼠;胚胎干细胞;间充质干细胞;分化
【中国图书分类法分类号】R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-26

Isolation, culture and identification of murine embryonic stem cells of Kunming species

ZHENG Li-na, et al
(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: By cocculture with mesenchymal stem cells as feeder cells, we observe whether we can isolate and culture embryonic stem cells(ES cells) which maintain undifferentiated and multipotential. *Methods*: tissues and cell types were used in basical research to cure disease. The blastocysts of 3.5 d from Kunming species mice were collected and cultured on mesenchymal stem cells layers. The embryonic stem cell colonies were preliminarily identified by light microscope AKP staining and Oct-4 staining in morphology and biological character. *Results*: The embryonic stem cell colonies by cocculture with mesenchymal stem cells as feeder cells were identified. The results showed that: 1. all the ES cells had its typical morphological characteristics such as nestlike colonies, round or elliptic, with clear edge and smooth surface, strong refraction , significant swelling growth, compactness of cell aggragation and indistinction between two edges of neighbour cells within a colony, relatively bigger nuclear compared with little cytoplasm, i.e., high ratio of the nuclear-cytoplasm; 2.after the AKP staining, all of the ES cells showed strong AKP activity as same as the ES cells of F0, and on the contrary, the embryonic fibroblast cells had no expression of AKP showing the lost of staining; 3. after the Oct-4 staining, all of the ES cells showed strong Occt-4 activity. *Conclusion*: By cocculture with mesenchymal stem cells as cells, we can isolate and culture embryonic stem cells (ES cells) which maintain undifferentiated and multipotential.

【Key words】Mouse; Embryonic stem cell; Mesenchymal stem cells; Isolation

小鼠胚胎干细胞(Embryonic stem,ES 细胞)是从附植前早期胚胎内细胞团(Inner cell mass,ICM)或附植后原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs)分离克隆出来的一种具无限增殖能力和全向分化能力的细胞[1~5]。ES 细胞是研究动物胚胎早期发生、细胞分化、基因调控等发育生物学基本问题的理想模型,也是组织工程、药理学和临床医学研究的重要工具。研究小鼠胚胎干细胞始终是为人胚胎干细胞的应用做准备,人胚胎干细胞的分离培养必须要饲养层细胞,目前运用最多的饲养层细胞仍是小鼠成纤维细胞,本实验采用以骨髓间充质干细胞为饲养层分离培养昆明种小鼠 ES 细胞,并通过核型检测,组织化学染色对其生物学性状进行观察,从中探讨用

作者介绍:郑丽娜(1982-),女,硕士,
研究方向:胚胎干细胞向心肌细胞定向分化。
通讯作者:张晓刚,男,教授,E-mail:zxg0233@sina.com。
基金项目:重庆市科委自然科学基金(STC,2006BB5434)。

此方法能否分离培养昆明种小鼠胚胎干细胞。

1 材料和方法

1.1 实验动物

发情期昆明种小鼠（10～12 周龄），购自重庆医科大学实验动物中心，室温颗粒饲料喂养，常规饮水，雌鼠于中午 12:00 腹腔注射孕马血清绒毛膜促性腺激素（PMSG）8 IU，48 h 腹腔注射人绒毛膜促性腺激素（HCG）8 IU，雌雄性鼠 1:1 合笼，次晨检查阴栓，有阴栓检出者即为受精 0.5 d。

1.2 主要试剂

DMEMF12 培养基（Gibco 公司），H-DMEM 培养基（Gibco 公司），L-DMEM 培养基（Gibco 公司），新生牛血清（NBS 杭州四季青公司），胎牛血清（FBS，Gibco 公司），白血病抑制因子（LIF 赠送），β-2-巯基乙醇（Gibco 公司）。非必须氨基酸（Gibco 公司），孕马血清绒毛膜促性腺激素（PMSG 杭州动物药品厂），人绒毛膜促性腺激素（HCG 宁波第二激素厂），丝裂霉素（Sigma 公司），碱性磷酸酶（AKP）试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠间充质干细胞的制备[6] 无菌取出雄性 SD 大鼠股骨。用碘伏和酒精各浸泡 3，15 min，在除股骨两端打孔，用低糖培养液冲洗骨髓，过滤骨髓悬夜后，以 800 r/5 min 离心，收集细胞沉淀，用含 10%FBS 的 L-DMEM 培养夜置悬后接种于包被 0.1%明胶的塑料瓶，置于 37℃，5%CO_2，饱和湿度培养箱中孵育，第 3 d 首次全量换夜，第 7～8 d 细胞连成片，铺满瓶底的 80%时用 0.25%胰蛋白酶（含 0.02%EDTA）传代，以后每 3～4 d 传代。

1.3.2 饲养层细胞的处理 取间充质干细胞，细胞铺满瓶底 80%时消化接种于培养板上，用 5～20 mg/L 丝裂霉素处理 1～3 h 后用 PBS 洗 5～6 次，加入培养液后，1 周内备用。

1.3.3 间充质干细胞鉴定 用免疫组化方法对间充质干细胞进行 CD34 和 CD44 检测，按试剂盒说明操作。

1.3.4 昆明小鼠 ES 细胞集落的获得[7,8] 分别无菌取出孕 3.5、4 d 的小鼠子宫，用含冲胚液（含 10%小牛血清的 DMEM-F12）的注射器从一侧子宫冲洗子宫壁，在体视显微镜下收集桑椹胚或囊胚移入已接种饲养层的 6 孔板中，用 DMEM-F12+10% FBS+0.1%非必须氨基酸 +1 000 IU/mlLIF+0.1 mmol/L β-2-巯基乙醇 +0.1 mmol/L 谷氨酰胺培养，每 2～3 d 半量换液培养到 4～5 d，待 ICM 充分长大，出现卵圆柱状或岛状形态时。用毛细针挑出 ICM 细胞，对其进行分离。在体视显微镜下（60×），用精细拉制的巴氏管将 ICM 从下层的滋胚层细胞切割下来，转入 PBS 液滴中洗涤 2 次，再转入上层覆盖石蜡油的 0.125%胰酶消化液滴中。在 CO_2 培养箱中作用 2～3 min。用另一支口径小于 ICM 细胞团的巴氏管吸入含血清培养液，轻轻将细胞团离散为 3～4 个细胞的小团块，将离散后的微滴内容物转入一个新制饲养层 24 孔培养板内继续培养，每日观察，每 2 d 更换 1 次培养液。3～5 d 后选取单个 ES 集落，离散集落后，再重复上述过程两次，观察这些集落能否稳定传代。光镜下观察 ES 细胞形态。

1.3.5 ES 细胞碱性磷酸酶染色 用偶氮联法对 ES 细胞进行 AKP 染色，染色过程按试剂盒说明进行，胞浆中出现棕褐色颗粒为阳性。

1.3.6 ES 细胞 Oct-4 染色 染色过程按试剂盒说明进行。

1.4 实验数据统计学处理

经 SAR8.2 软件进行卡方检验。

2 结 果

2.1 间充质干细胞（Mesenchymal stem cells，MSCs）光镜下形态及鉴定

见图 1~5。

2.2 不同状态间充质干细胞对小鼠 ICM 形成的影响

见表 1~3。

2.3 胚胎的生长过程（见图 6~图 9）及 ES 细胞的生长状态（ES 细胞克隆）（见图 10）

ES 细胞集落相似，呈“鸟巢”状，将周围的骨髓间充质干细胞饲养层推开生长，细胞小而圆，边界不清，排列紧密，细胞核大（见图 10）。ICM 细胞离散后 3~5 d 可形成 ES 细胞集落。

2.4 ES 细胞 AKP 组织化学染色

ES 细胞内存在高浓度的 AKP，组织化学染色可见细胞内有大量的棕褐色细胞沉积（见图 11）。

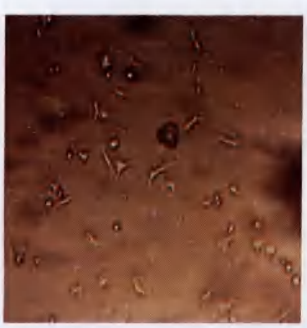


图 1 原代 3 dMSCs（×100）



图 2 传代 24 hMSCs（×100）



图 3 第 4 代 MSCs（×100）



图 4 CD44 染色阳性（×100）



图 5 CD34 染色阴性(×100)

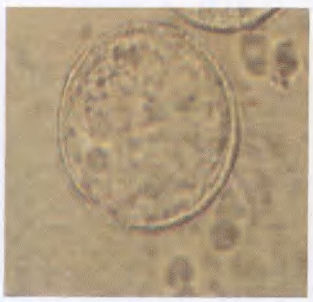


图 6 4 d 囊胚(×100)



图 7 生长 1 d 的胚胎(×100)



图 8 生长 3 d 的胚胎(×100)



图 9 生长 5 d 的胚胎(×100)



图 10 传代胚胎干细胞集落(×100)

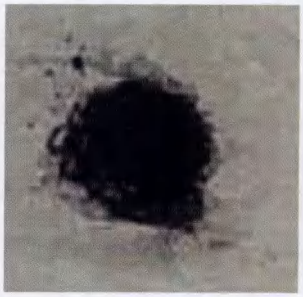


图 11 ES 细胞 AKP 染色阳性(×100)

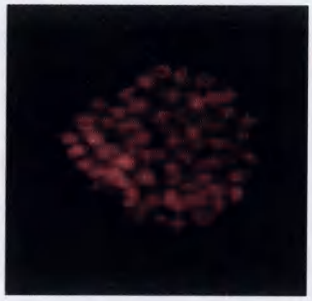


图 12 ES 细胞 OCT-4 染色阳性(×200)

表 1 不同代数间充质干细胞对小鼠 ICM 形成的影响

代数	胚胎数(枚)	胚胎贴壁率	ICM 出现率
4 代以前	68	13/68(19.1%)	9/68(13.2%)
4～8 代	85	37/85(43.5%*)	28/85(32.9%*)
8 代以后	87	18/87(20.7%)	10/87(11.5%)

注:* 与其它两组比较,$P<0.05$,差异有统计学意义

表 2 不同浓度丝裂霉素处理 2 h 对 ES 形成的影响

丝裂霉素浓度(mg/L)	胚胎数	贴壁率	ICM 出现率
5	65	23/65(35.4%)	12/65(18.5%)
10	74	49/74(66.2%*)	42/74(56.8%*)
15	80	29/80(36.3%)	22/80(25%)
20	75	6/75(8%)	3/75(4%)

注:* 与其它两组比较,$P<0.05$,差异有统计学意义

表 3 丝裂霉素(最佳浓度 10 mg/L)处理 MSCs 时间对 ES 形成的影响

处理时间	胚胎数	贴壁率	ICM 出现率
1	55	25/55(45.5%)	17/55(30.9%)
2	57	35/57(61.4%*)	32/57(56.1%*)
3	58	25/58(43.1%)	18/58(31%)

* 与其它两组比较,$P<0.05$,差异有统计学意义

2.5 ES 细胞的 Oct-4 的组织化学染色

见图 12。

3 讨 论

胚胎干细胞在体外培养条件苛刻,ES 细胞培养中的关键点是如何维持其未分化状态即如何保持其多能性而不发生分化。本实验以大鼠间充质干细胞为饲养层观察其能否使昆明小鼠 ES 细胞存活,扩增,并保持不分化。大鼠股骨易取材,且从一只大鼠所得细胞可满足一次实验观察;小鼠股骨易断裂,且所得细胞量少,一次需取数只老鼠,操作繁琐,增加了污染可能。间充质干细胞的制备中我们的经验是:(1)采用在股骨两端打孔的方法,最大程度的保留干骺端,因为骨髓间充质干细胞主要存在于此。(2)我们采用全骨髓培养法,在冲洗出骨髓悬液后我们采用对悬液 800 r/5 min 离心,尽可能的去除脂肪滴等物质的影响,转速不能太快,时间不能太长,否则都会对细胞有损伤。(3)我们采用进口胎牛血清,浓度在 10%~15%,太高容易引起细胞老化和分

化,形态上表现出细胞变宽,铺开。(4)首次换液时间我们控制在 3~4 d 并采用全量换液法。我们得到的骨髓间充质干细胞细胞在形态上呈典型的成纤维样细胞,呈现鱼群样、漩涡状。免疫组化 CD34 阴性,CD44 阳性。这里我们采用多个代数的骨髓间充质干细胞进行实验,最后得出 4~8 代的细胞作为饲养层胚胎的贴壁率和 ICM 的出现率是最高的,可能是 4 代以前的细胞纯度还不高,而 8 代以后的细胞增殖能力有所下降,干细胞在体外有分化的趋势。与我们从光镜下看到的一致,4~8 代的骨髓间充质干细胞细胞形态一致,折光性好,有立体感。8 代以后开始铺开。与 Yoshihiro Katsube [9]研究中观察到的细胞的增殖活力和细胞的厚度间成正相关是一致的。经过摸索我们得出用丝裂霉处理骨髓间充质干细胞的最佳方式是 10 mg/2 h,这样胚胎的贴壁率和 ICM 的出现率都是最高的,浓度太大,时间太长都对细胞有毒害作用,浓度太低,时间太短抑制细胞增殖的力度不够,争夺营养而影响胚胎干细胞的生长。最后我得到的小鼠 ES 有其典型的形态学特征:集落呈鸟巢状,边缘清楚,表面平滑,结构致密,隆起生长,细胞之间界限不清楚;单个细胞体积小、核大;对 ES 细胞碱性磷酸酶进行检测,未分化的 ES 细胞显微镜下为黄褐色,分化的不着色;Oct-4 染色阳性。鼠间充质干细胞为饲养层能使昆明小鼠 ES 细胞存活,扩增,并保持不分化。很多报道在检测到 MSCs 细胞分泌细胞粘附分子,生长因子和细胞因子。比如已经检测出表达 LIF 和 IF-6,LF-11 的 mRNA 和蛋白质[10],有利于 ES 细胞存活,扩增和保持未分化。但是确切的机制以及与鼠胚胎成纤维作为饲养层相比,骨髓间充质干细胞是否更有优势都还不清楚,都有待我们做进一步的研究。有报道[11]指出人 MSCs 细胞在培养体系中或大的动物身上不会产生有效应的 T 淋巴细胞。实际上,最近的实验显示,人 MSCs 细胞可以下调受体的关于供体的自身免疫反应[12]。于是可以假设在病人接受由与其基因不同的人胚胎干细胞分化的组织移植时,人 MSCs 细胞可能有助于诱导免疫耐受和降低同种异体的排斥反应。人间充质干细胞是一种较为理想的饲养细胞。2003 年 linzhao 等[13]人用人骨髓间充质干细胞(MSCs) 作为饲养层细胞成功分离培养了人胚胎干细胞。

4 结 语

本实验对用大鼠间充质干细胞作为饲养层分离培养昆明小鼠 ES 细胞进行了初步探讨。为更好的研究完善间充质干细胞作为人胚胎干细胞的分离培养的机制,能否替代鼠胚胎成纤维细胞作为人胚胎干细胞的饲养层以及优化条件等提供一个模型。为以后人胚胎干细胞更好地用于临床做铺垫。

参 考 文 献

[1] Rathjen P D, Nichols J, Toth S, et al. Developmentally programmed induction of differentiation inhibiting activity and the control of stem cell populations [J]. Genes Dev, 1990, 4(12B): 2308-2318.

[2] Schoonjans L, Albright G M, Li J L, et al. Pluripotential rabbit embryonic stem(ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts[J]. Mol Reprod Dev, 1996, 45(4): 439-443.

[3] Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(17): 7844-7848.

[4] First N L, Sims M M, Park S P, et al. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells[J]. Reprod Fertil Dev, 1994, 6(5): 553-562.

[5] Brenin D, Look J, Bader M, et al. Rat embryonic stem cells: a progress report[J]. Transplant Proc, 1997, 29(3): 1761-1765.

[6] 庄淑波, 刘 毅.大鼠骨髓间充质干细胞体外分离、纯化与培养适宜条件的筛选[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(20): 3886-3891.

[7] 孟国良, 汤富酬, 尚克刚, 等.高效建立 129/ter、C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞系的方法学探讨[J].生物工程学报, 2002, 18(6): 740-743.

[8] Gong W, Luo Z J, Han H, et al. Isolation and differentiation of embryonic stem cells from BALB/c mouse[J]. Neurosci bull, 2006, 22(1): 7-13.

[9] Katsube Y. Correlation between proliferative activity and cellular thickness of human mesenchymal stem cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 368(2): 256 - 260.

[10] Majumdar M K, Thiede M A, Mosca J D, et al. Phenotypic and functional comparison of culture of marrow-derived mesenchymal stem cells(MSCs)and stromal cells[J]. J cell Physiol, 1998, 176(1): 57-66.

[11] Richards M, Fong C Y, Chan W K, et al. Hunan feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell mass and embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(3): 933-936.

[12] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskis M, et al .Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo[J]. Exp Hematol, 2002, 30(1): 42-48.

[13] Cheng L Z, Hammond H, Ye Z H, et al.Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture[J]. Stem cells, 2003, 21(2): 131-142.

(责任编辑:冉明会)