

胚胎干细胞的体外扩增^{*}

张 良¹, 唐仕波¹, 郭芬芬², 黄 冰²

(1. 中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060;

2. 中山大学实验动物中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 探讨了胚胎干细胞在体外大量扩增的方法。将胚胎干细胞复苏后, 选择合适的培养基(含糖和谷氨酰胺的 DMEM, 加入 $\varphi=20\%$ 胎牛血清, 10^5 U/L 青链霉素双抗, 0.1 mmol/L L -谷氨酰胺, 10^3 IU/L 白血病抑制因子, 0.1 mmol/L β -巯基乙醇)进行培养。此外, 使用早代胚胎干细胞; 培养时使用不涂明胶的一次性培养瓶; 掌握好消化、复苏和冻存时机并及时换液; 按照严格步骤进行培养、传代、冻存。对扩增后的 ES 细胞进行染色体和全能性检测。结果表明, 在较短时间内(5 d) 可将胚胎干细胞扩增 16 倍以上。扩增后的 ES 细胞较好地保持了胚胎干细胞的全能性和核型。可见使用合适的培养基, 按照严格步骤操作, 短期内完全可以大量扩增胚胎干细胞。

关键词: 胚胎; 干细胞; 培养; 扩增

中图分类号: Q132.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 05-087-04

胚胎干细胞 (Embryonic Stem cells, ES 细胞) 可以诱导成为神经细胞、胰岛细胞、心肌细胞等体内 200 多种细胞, 在医学实践中具有广泛的应用前景。但在应用中, 首先需要将数量极少的胚胎干细胞进行大量扩增, 扩增当中特别值得注意的是要保持胚胎干细胞的未分化特性及正常的核型。本文将探讨保持胚胎干细胞未分化条件下的大量扩增。

1 材料和方法

1.1 胚胎干细胞的来源

本实验所用胚胎干细胞为中山大学实验动物中心自建 BALB/C 小鼠 ES V 株 (具备 XY 染色体, 10 代左右, 正常核型比例高)^[1]。

1.2 ES 细胞培养基

含糖和谷氨酰胺的 DMEM, 加入 $\varphi=20\%$ 胎牛血清, 10^5 U/L 青链霉素双抗, 0.1 mmol/L L -谷氨酰胺, 10^3 IU/L 白血病抑制因子 (Leukemia inhibitor factor, LIF), 0.1 mmol/L β -巯基乙醇。

ES 细胞消化终止液: 含糖和谷氨酰胺的 DMEM, 加入 $\varphi=15\%$ 新生牛血清, 10^5 U/L 青链霉素双抗, 0.1 mmol/L L -谷氨酰胺。

ES 细胞消化液: $w=0.25\%$ 胰蛋白酶以 1:1 的比例加入 $w=0.02\%$ EDTA 或参照文献 [2]。

ES 细胞冻存液: ES 细胞培养液中加入 $\varphi=$

10% 二甲基亚砜。

1.3 ES 细胞复苏

自液氮中迅速取出所需冻存管, 立即置于 38°C 温水中, 快速摇动。注意勿使管盖浸入水中, 以防细胞受到污染。在 1~2 min 内使冻存管内容物完全融化成悬液。然后将细胞悬液注入含有消化终止液的离心管中, $1\,000$ r/min 离心 5 min。弃上清, 将细胞置于 ES 细胞培养基中。

1.4 ES 细胞培养和传代

将 ES 细胞接种于含有 ES 细胞培养基的一次性塑料培养瓶中, 置于 37°C 、 $\varphi(\text{CO}_2)$ 为 5% 的培养箱中。第 2 天进行换液。同时观察记录细胞的生长状况。细胞生长 2~3 d 后传代: 先用 PBS 轻轻洗涤 1 次, 再用 ES 细胞消化液进行消化。消化时, 在倒置显微镜下观察, 见 ES 细胞克隆逐渐松散, 细胞之间界限变得清楚时, 用吸管反复吹打细胞, 直到成为小、圆、亮单个胚胎干细胞悬液。然后加入消化终止液, 再轻轻吹打。将细胞悬液置于离心管中, $1\,000$ r/min 离心 5 min。弃上清。加入 ES 细胞培养液重悬细胞。重悬后的细胞分瓶培养。

1.5 ES 细胞冻存

消化重悬后的胚胎干细胞悬液中加入二甲基亚砜(DMSO)至 $\varphi=10\%$ 左右, 轻轻吹打均匀, 或直接往细胞沉淀中加入 ES 细胞冻存液, 吹打均匀,

* 收稿日期: 2002-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070803); 国家杰出青年基金资助项目 (30125041)

作者简介: 张良 (1966 年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 唐仕波; E-mail: sbtang@gzsums.edu.cn

使成为冻存悬浮液。最后分装入冻存小管。每个 100 mL 的培养瓶的细胞可分装到两个冻存管内 (冻存的细胞密度约为 $1\times 10^6\sim 5\times 10^6$ 个/mL)。在冻存管上写好标记, 包括注明细胞代号、所传代数、冻存日期。最后将冻存小管放入壁厚为 1~2 cm 泡沫盒内。将泡沫盒封闭好后, 直接置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 过夜, 次日再放入液氮中冻存。

1.6 扩增后 ES 细胞检测

1.6.1 ES 细胞染色体检测 取消化传代后培养 24 h 的 ES 细胞, 加秋水仙素 0.3 mg/L 共培养 3 h, 消化收获细胞。加入低渗 KCl 溶液 (100 mL 双蒸水溶解 0.5 g KCl)。置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\varphi(\text{CO}_2)=5\%$ 培养箱内 20 min。用固定液 (甲醇/冰醋酸, 体积比为 3:1) 反复固定 3 次后滴片。用新鲜配置的 Giemsa 溶液染色 15 min。

流水冲洗, 空气干燥。树胶封片。对铺展完好的中期相统计染色体数目。

1.6.2 ES 细胞体外分化能力测定 将扩增的细胞用除去 LIF 的 ES 细胞培养液悬浮培养。使用无黏附性的培养瓶。每天摇动多次, 尽量使细胞团不贴壁。每天半量换液, 直到胚胎体形成以及贴壁分化。

2 结 果

细胞复苏后置于培养瓶中, 可见细胞小、亮、圆, 边界清晰, 胞浆少, 细胞核大, 核仁明显。细胞生长 1 d 后, 细胞明显呈克隆样贴壁生长, 呈小集落。集落边界清晰、光滑, 细胞排列紧密, 细胞之间界限不清。细胞碎片少 (图 1)。第 3 天, 细胞克隆进一步增大, 进行消化传代。图 2 示正在消化中的胚胎干细胞, 可见克隆内部细胞之间界线变得清楚。按 1:4 分瓶培养。消化后一般 4~6 h 可贴壁。以后按照同样的周期培养、传代。在 5 d 左右可将胚胎干细胞扩增 16 倍以上。根据需要可将扩增的细胞冻存, 也可继续大量扩增。扩增后的 ES 细胞继续保持正常二倍体核型 (图 3), 染色体数 70% 左右为 40XY, 30% 左右为 39XY。

在没有 LIF 的培养基中, 一般在 5 d 左右可形成外层为较大细胞, 内层为较小细胞的简单类胚 (图 4)。如继续培养, 中央逐步出现囊腔, 变为囊状胚, 并进一步贴壁, 先后分化为成纤维样细胞, 神经样细胞, 内皮样细胞以及具有节律性收缩的心肌样细胞等。

3 讨 论

胚胎干细胞在体外能发育成为含外、中、内三

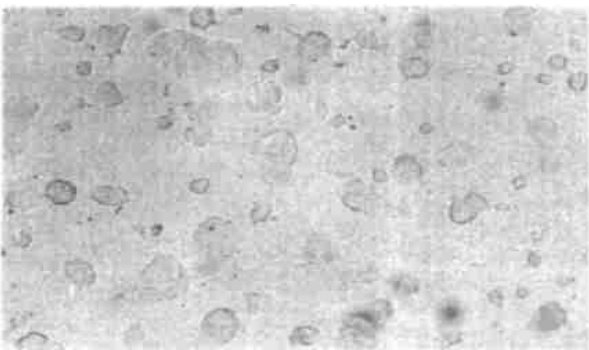


图 1 生长中的胚胎干细胞克隆
Fig 1 ES cells colone in culture

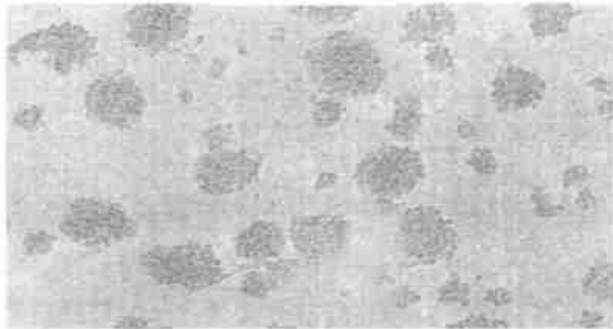


图 2 消化 30 s 的胚胎干细胞克隆
Fig 2 ES cells colonies were treated with trypsin 30 s

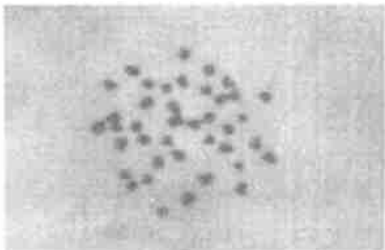


图 3 扩增后胚胎干细胞染色体核型
Fig 3 ES cells chromosome after propagation

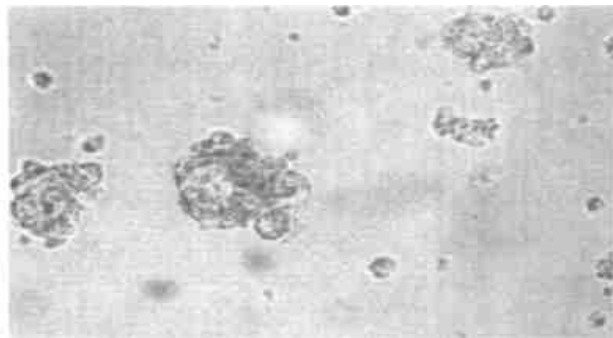


图 4 培养 4 d 的胚体
Fig 4 Four day embryonic bodies

个胚层的胚胎体, 在体内能参与包括生殖系在内的各个器官的发育, 也为研究胚胎的发生发育、细胞

分化以及转基因方面提供了有用的工具, 有较好的应用前景。其具有两个最明显的特征: 可无限地增殖和能向所有胚层细胞分化的全能性, 在培养中我们既要保持其无限增殖的特性, 又要抑制其分化。保持 ES 细胞的无限增殖以及增加其增殖速度, 需要使用含高糖和高谷氨酰胺的 DMEM。高糖可以提高 ES 细胞的增殖速度, 而谷氨酰胺是细胞合成蛋白质与核酸所必需的。培养基中还需要加入 2-巯基乙醇, 它除了对胚胎细胞的分裂增殖有促进作用外, 还可以还原血清中含硫化物, 防止过氧化物对 ES 细胞的损害。在另一方面, 在促进其增殖的同时也要保持其全能性, 应最大限度地抑制其分化。在 ES 细胞的表面有较多的白血病抑制因子 (LIF) 受体 (190~330/细胞), LIF 与 ES 细胞受体的结合是特异性的。而且 LIF 对 ES 细胞的分化抑制是有浓度依从性的^[3,4]。

将 LIF 基因转入 ES 细胞, 可使 ES 细胞不依赖外源性 LIF 而长期不分化增殖, 且不影响 ES 细胞的多向分化潜能^[5]。在有饲养层条件下培养时, 饲养层细胞可以分泌 LIF; 在没有饲养层的条件下, 在培养液中加入足够剂量的 LIF, 同样能有效地抑制 ES 细胞的分化^[6,7]。

此外, 胚胎干细胞对培养的条件要求较高, 除了上述条件满足其在未分化状态下的扩增之外, 尚需要注意以下几个方面: 第一, ES 细胞代数的选择, 尽可能使用传代较少的 ES 细胞株。因为传代越少, 正常核型比例就越高, 形成肿瘤细胞的机会就越少。本文选择 10 代左右的 ES 细胞株, 在应用上具有明显的优越性。第二, ES 细胞培养液的配制, 特别要求的是要使用超纯水 (五蒸水)。使用纯度较差的蒸馏水, 可能会影响细胞的生长, 甚至细胞不长。第三, 培养瓶的使用。在不应用明胶等细胞贴附增强剂的情况下, 可使用一次性塑料培养瓶。这种培养瓶的细胞贴壁性较好, 不需要涂布明胶等胚胎干细胞也能良好贴附生长。但在培养传代 2~3 次后, 细胞贴壁性会下降, 这时应该更换使用新的培养瓶。第四, 细胞复苏时, 从液氮中取出细胞后应尽快地放入 38℃温水中搅动, 让冻结的细胞悬液 1~2 min 内完全融解复温, 使细胞能快速地通过对细胞有损害的一 50℃~0℃ 的温度范围。第五, 在消化时, 加入消化液后, 应在显微镜

下观察克隆的变化情况, 出现细胞之间边界清楚时, 就开始吹打。因细胞间黏附性强, 较难消化吹散, 要反复吹打及在显微镜下观察。当大多数的细胞克隆成为单个的胚胎干细胞时, 加入适量消化终止液。消化时间要掌握得恰当。消化过度则 ES 细胞容易死亡, 克隆不易形成; 消化不够则易形成分化克隆。第六, 胚胎干细胞生长非常迅速, 必须注意及时换液。培养液中的 LIF 消耗较快, 如未及时换液, 可能出现细胞分化。

本文所扩增的 ES 细胞, 能继续保持较高比例的正常二倍体核型 (70%), 在去除了 LIF 的培养基中继续培养可顺利形成简单类胚、囊状胚, 及进一步分化成为三个胚层的多种细胞。说明经扩增后的 ES 细胞, 仍具有较好的全能性。

总之, 胚胎干细胞的培养扩增要求较高, 但如果严格操作, 在短时间内大量扩增是完全可以做到的。

参考文献:

- [1] 黄冰, 陈系古, 邓新燕, 等. BALB/C 小鼠胚胎干细胞系的建立及其嵌合体小鼠的获得[J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23(1): 29—31.
- [2] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] HILTON D J, NICOLA N A, METCALF D, et al. Specific binding of murine leukemia inhibitory factor to normal and leukemic monocytic cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(16): 5971—75.
- [4] ZANDSTRA P W, LE H V, GRIFFITH L G, et al. Leukemia inhibitor factor concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation[J]. Biotechnol Bioeng, 2000, 20: 69(6): 607—17.
- [5] 杜宪兴, 施渭康. 转染 LIF 基因的胚胎干细胞的生长分化研究[J]. 实验生物学报, 1996, 29(4): 413—427.
- [6] SHIRLEY P, LINDSAY W R. Formation of germline chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)[J]. Exp Cell Res, 1990(2), 190: 209—211.
- [7] 邱观婷, 黄冰, 唐仕波, 等. 探讨保持胚胎干细胞全能性的体外培养条件[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 100—103.

(下转第 116 页)

Study on Traversal Time for an Electron Tunneling Through a Potential Barrier

LIU Qiu xiang, ZHANG Jin xiu

(School of Physics Science and Technology, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The interaction time for an electron tunneling through a rectangular barrier is calculated based on the definition of phase time and traversal time. Moreover, a conceptual experiment is designed to study the tunneling time.
Key words: phase time; traversal time; tunneling time

(上接第 89 页)

Propagation of Embryonic Stem Cells *in Vitro*

ZHANG Liang¹, TANG Shi bo¹, GUO Fen fen², HUANG Bing²

(1. Zhongshan Ophthalmologic Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510060, China;
2. Experimental Animal Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: The methods for propagating the embryonic stem cells (ES cells) were studied *in vitro*. First, the suitable medium was selected after the anabiosis of ES cells. DMEM with high glucose and glutamine is ideal. Then, 20% fetal bovine serum, 10⁵ U/L penicillium streptomycin, 0.1 mmol/L L glutamine, 10³ IU/L leukemia inhibitor factor and 0.1 mmol/L β mercaptoethanol were added to the medium. Another operations include using early generation ES cells, disposable culture bottle without gelatin, performing exact digesting, anabiosis, freezing and exchanging culture medium time. Cultivation, transfer of culture and freezing were operated in strict steps. The totipotent and chromosome of the expanded ES cells were also examined. The ES cells were expanded over 16 times in short time (about 5 days) to keep the totipotent and nucleus type. The results showed that a great deal of ES cells can be obtained in short time with proper medium and strict procedure.
Key words: embryonic; stem cell; culture; propagation