

· 标准与规范 ·

人胚胎干细胞向成纤维细胞分化方法的专家共识

傅歆 邓旭亮 李盛林 刘鹤 欧阳宏伟 彭双清
肖苒 邹晓晖 俞光岩 曹彤

人胚胎干细胞(ESC)是一类从囊胚期的人胚胎内细胞团中分离所得的,具有体外自我更新稳定性并维持正常核型和发育多能性,甚至参与整个个体发育的高度未分化干细胞^[1]。利用人 ESC 或其分化而成的人体细胞、组织或器官来测试各种生物医用材料、食品及药物对人体的毒理特性或药效,较运用动物或永生化细胞更能反映人体真实的状况。因此,人 ESC 及其分化的细胞有望发展成为一种崭新的生物安全性检测和药物筛选模型^[2]。目前多数研究仍用永生化细胞系或原代培养细胞进行生物材料的安全性评价^[3,4],分别存在核型异常或批次差异大等缺点。人 ESC 来源的成纤维细胞(ES-F)具有来源稳定,核型正常以及容易标准化等优点^[5,6],有望成为生物安全性评价体系的新模型^[7]。规范人 ESC 向成纤维细胞分化方法是保证生物安全性检测评价模型可靠性的关键。为此,科技部国际科技合作重点项目“创建基于人胚干细胞的预测健康安全新体系”的项目组专家经反复讨论,制定了“人胚胎干细胞向成纤维细胞分化方法的专家共识”(以下简称“共识”),旨在规范人 ES-F 的分化方法,提高人 ES-F 的纯度,保证分化方法的可重复性,使其更系统、规范和有效地应用于临床和生物安全性评价体系中。

一、人 ESC 的生物学特性概述

1. 细胞形态:细胞体积小,胞核显著,核质比高,体外培养时细胞紧密聚集呈集落状生长,细胞克隆形态多为岛状或巢状,边界清晰。

2. 染色体核型:具有正常(二倍体)及稳定的染

色体核型。

3. 细胞周期:缺乏细胞周期中 G1 期的限制点, G1/G2 期很短,大部分时间处于细胞周期的 S 期,进行 DNA 合成。

4. 特异性标志分子:高表达转录因子八聚体结合转录因子(OCT4)、同源结构域蛋白(NANOG)、性别决定区 Y 框蛋白 2(SOX2);表达阶段特异性胚胎抗原(SSEA)-3/4 和肿瘤排斥抗原(TRA)-1-60、TRA-1-81 及 TRA-2-54 等。

5. 生化特性:具有高度的端粒酶活性和碱性磷酸酶活性。

6. 多潜能分化能力:在体外缺乏分化抑制剂的悬浮培养条件下能形成拟胚体;注射入免疫缺陷小鼠皮下或肾囊中可在体内形成畸胎瘤。

二、人 ESC 的体外培养方法

人 ESC 的培养方法包括小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)滋养层培养法和无滋养层 Matrigel 基质胶培养法两种。

(一)MEF 滋养层培养法

1. MEF 的制备:取胎龄 13.5 d 的 CF-1 小鼠胚胎,去除头部及内脏后剪成肉泥状,0.25% 胰酶 37 °C 消化 10 min 后取出吹打均匀,重复处理 3 次后离心,用 MEF 培养液(含 10% 胎牛血清的高糖培养液 DMEM)重悬细胞后接种于培养瓶中,置于 5% CO₂, 37 °C, 90% 湿度的培养箱中培养,贴壁细胞标记为 P0 代。P1 代 MEF 经 10 μg/ml 丝裂霉素 C 灭活处理 2.5 h 后胰酶消化,收集细胞储存于液氮中。人 ESC 接种前一天复苏 MEF,按 2 × 10⁵/孔的密度接种于 0.1% 明胶包被的六孔板上。

2. 人 ESC 的复苏:从液氮罐中取出装有人 ESC 的冻存管,浸入 37 °C 水浴至管内剩余小部分冰块时取出。将人 ESC 悬液转移到离心管内,加入 9 倍体积的人 ESC 培养液(含 80% DMEM/F-12, 20% 血清替代品, 1 mmol/L 谷氨酰胺, 0.1 mmol/L β-巯基乙醇, 0.1 mmol/L 非必需氨基酸, 4 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子), 200 g 离心 5 min 后吸去上清,加入

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2014.40.004

基金项目:科技部国际科技合作与交流专项(2011DFA32190)

作者单位:100144 北京,中国医学科学院整形外科医院研究中心(傅歆、肖苒);北京大学口腔医学院特诊科(邓旭亮),中心实验室(李盛林),儿童口腔科(刘鹤),口腔颌面外科(俞光岩);浙江大学医学院组织工程中心(欧阳宏伟);浙江大学医学院附属第一医院中心实验室(邹晓晖);军事医学科学院疾病预防控制研究所(彭双清);新加坡国立大学口腔医学院口腔科学系干细胞实验室(曹彤)

通信作者:曹彤,119083(新加坡),Email:tong_cao@nuhs.edu.sg

适量 ESC 培养液重悬。

3. 人 ESC 的接种:将步骤 2 中准备好的人 ESC 悬液加到已接种灭活 MEF 的六孔板中,培养箱中培养过夜。次日观察人 ESC 贴壁情况,第 3 天起每天更换 ESC 培养液。

4. 人 ESC 的传代:当人 ESC 团即将汇合时,吸去培养液,每孔加入 1 ml IV 型胶原酶(1 mg/ml),37 °C 孵育 3 min,吸去胶原酶溶液,加入 2 ml/孔 ESC 培养液,用 5 ml 移液管的尖头刮下细胞,200 g 离心 5 min。吸除上清后用人 ESC 培养液重悬细胞,按 1:6 比例接种到已接种灭活 MEF 的六孔板中。次日观察人 ESC 贴壁情况,第 3 天起每天更换 ESC 培养液。

5. 人 ESC 的冻存:按步骤 4 刮下 ESC 后,将细胞重悬于相当于最终冻存体积半量的 ESC 培养液(最终冻存体积 = 冻存管数 × 1 ml),加入等体积的冻存液(60% DMEM/F-12, 20% 血清替代品,20% 二甲基亚砷),混匀后每个冻存管加入 1 ml 细胞悬液,在梯度降温冻存盒内 -80 °C 冻存过夜,第 2 天转移到液氮罐中长期保存。一般按 1:2 比例冻存。

(二)无滋养层 Matrigel 基质胶培养法

1. 包被 Matrigel 基质胶:以美国碧迪医疗公司生产的 Matrigel 基质胶为例,按其说明书分装包被一个六孔板所需的 Matrigel 量(一般为 70 ~ 80 μ l), -20 °C 储存备用。人 ESC 传代当天,将分装的 Matrigel 基质胶置于冰上融化,再加入 6 ml 预冷的 DMEM/F-12 混匀,1 ml/孔加入六孔板中,置于室温包被 1 h 待用。

2. Matrigel 基质胶培养人 ESC 的传代:取培养人 ESC 的六孔板,吸去 ESC 培养液,每孔加入 1 ml 中性蛋白酶溶液(1 mg/ml)37 °C 孵育 2 ~ 4 min。吸去蛋白酶溶液,DMEM/F-12 润洗 2 遍后加入 2 ml 的 mTeSRTM1 培养液,刮下细胞团,200 g 离心 5 min,去上清后将细胞重悬于 mTeSRTM1 培养液中,按 1:6

比例接种于 Matrigel 基质胶包被好的六孔板上,培养箱中培养过夜。隔天观察细胞贴壁情况并换液,之后每天更换 mTeSRTM1 培养液。

(三)人 ESC 的质量控制

1. 细胞形态:保持未分化状态的人 ESC 呈克隆生长,克隆呈巢状隆起,表面光滑,边界清晰,结构致密,细胞体积较小(图 1)。

若发现人 ESC 细胞克隆中央变黄或塌陷(图 2),提示细胞发生分化。

培养过程中分化的细胞克隆比例,可采取表 1 所示方法处理^[8]。

表 1 分化的细胞克隆处理方法^[8]

分化的细胞克隆比例	处理方法
<10%	常规培养
10% ~ <20%	用负压抽吸方法将分化的细胞克隆吸除
20% ~ <50%	用排枪枪头将分化的细胞克隆剔去
≥50%	用排枪枪头将未分化细胞克隆转移到新的培养皿中

2. 标志物基因的表达:Trizol 法提取人 ESC 总 RNA 用于反转录-PCR 检测。保持未分化状态的人 ESC 高表达人 ESC 干性关键转录因子 OCT4、NANOG 和 SOX2 基因^[1,9-11];不表达三胚层的特定标志物神经元分化因子 1 (NEUROD1) 基因、鼠短尾突变体表型 (Bra) 基因和甲胎蛋白 (AFP) 基因(图 3)^[9]。在人 ESC 传代过程中,可能会有少量人 ESC 发生自发分化的现象,故会检测到 NEUROD1 基因的弱表达。此时需观察细胞克隆的形态。如果细胞克隆 90% 以上形态仍保持未分化状态,则可认为此批人 ESC 未分化。

3. 表面标志物的表达:4% 多聚甲醛固定人 ESC 后做免疫荧光染色和流式细胞术分析。保持未分化状态的人 ESC 高表达 OCT4 蛋白及人 ESC 表面标志物蛋白 SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81。流

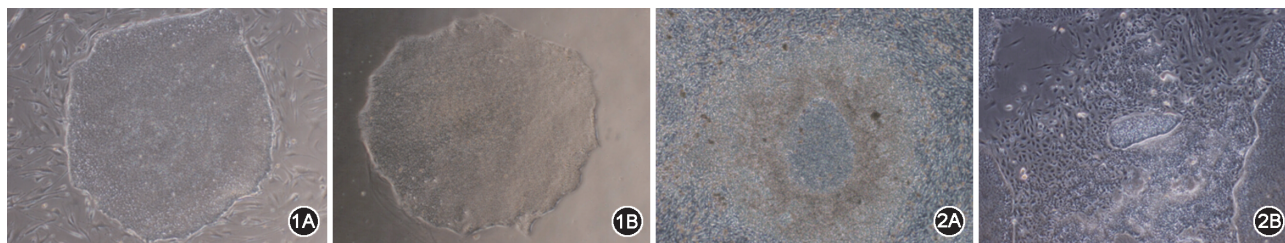


图 1 未分化的人胚胎干细胞(ESC)克隆形态(倒置像差显微镜观察 $\times 100$):保持未分化状态的人 ESC 在 MEF 滋养层上(1A)和 Matrigel 基质胶上(1B)均呈克隆生长,表面光滑,边界清晰,结构致密 图 2 分化的人 ESC 克隆形态(倒置像差显微镜观察 $\times 100$):MEF 滋养层上培养的人 ESC 细胞发生分化,克隆中央变黄,发生塌陷(2A);Matrigel 基质胶上的人 ESC 发生分化,有多种形态的细胞出现(2B)

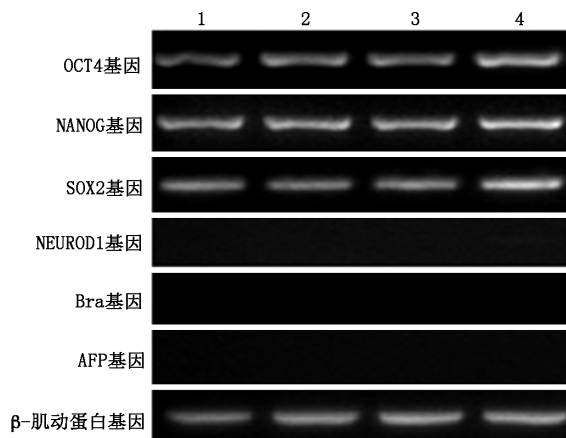


图3 人胚胎干细胞(ESC)标志物基因表达^[9]:人 ESC 高表达人 ESC 关键转录因子八聚体结合转录因子(OCT4)基因、同源结构域蛋白(NANOG)基因和性别决定区 Y 框蛋白 2(SOX2)基因,不表达三胚层的特定标志物神经元分化因子 1(NEUROD1)基因,鼠短尾突变体表型(Bra)基因和甲胎蛋白(AFP)基因;β-肌动蛋白基因为内参;条带 1、2 分别为人 ESC 细胞系 H1 的第 10、20 代,条带 3、4 分别为人 ESC 细胞系 H9 的第 10、20 代

式细胞术分析结果应显示人 ESC 表达 OCT4、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81 的比例不 <90%(图 4)^[9]。

4. 核型分析:秋水仙素处理处于对数生长期的人 ESC(一般为传代后 3~4 d),利用低渗技术提取染色体,滴片后 Gimsa 染色。将玻片置于高倍显微

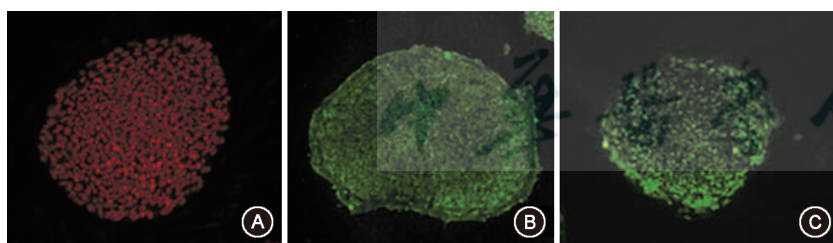


图4 人胚胎干细胞(ESC)表面标志物的表达(倒置像差荧光显微镜观察,免疫荧光染色 ×200)^[9]:未分化的人 ESC 高表达八聚体结合转录因子(OCT4)蛋白(A)、ESC 表面标志物蛋白阶段特异性胚胎抗原(SSEA)-4(B)和肿瘤排斥抗原(TRA)-1-60(C)

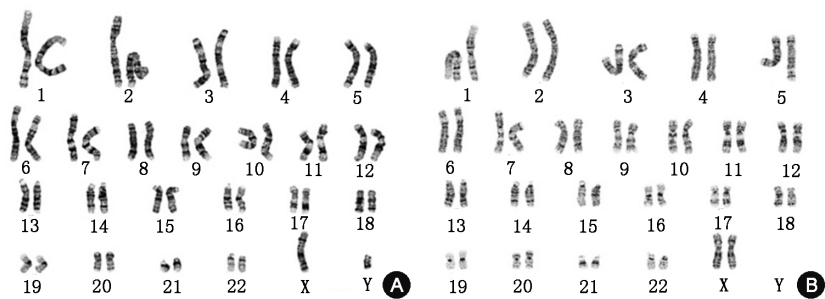


图5 人胚胎干细胞(ESC)的核型^[9]:A. 人 ESC 细胞系 H1,男性,46, XY;B. 人 ESC 细胞系 H9,女性,46, XX

镜下观察细胞核型。人 ESC 应表现为正常 2 倍体核型:46,XY(男性)或 46,XX(女性)(图 5)^[9]。在获得人 ESC 系初期需做核型鉴定,以确保来源细胞的核型正常。在培养过程中定期(如每 5~10 代)做染色体核型分析,保证人 ESC 在培养过程中的基因组稳定性。常规的核型分析可采用 G 显带方法,至少计数 20 个中期分裂象并对其中 8 个进行染色体带型分析,染色体 G 显带分辨水平应高于以人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN)为标准的 400~500 条带水平,异常核型比率应 <5%^[12]。如果发现异常核型,应重复至少 30 个中期分裂象进行验证并使用染色体荧光原位杂交(FISH)技术对染色体异常情况进行详细分析^[12]。

5. 多潜能分化能力鉴定:将人 ESC 注射至联合免疫缺陷小鼠的下腹腔或大腿肌肉处,观察 4~10 周。保持未分化状态的人 ESC 在注射后 5~6 周即可形成肉眼可见的畸胎瘤。畸胎瘤经石蜡包埋后切片做 HE 染色应可观察到 3 个胚层来源的组织,例如神经花环结构(外胚层)、软骨和平滑肌(中胚层)和管腔上皮组织(内胚层)等(图 6)^[10]。

6. 微生物及内毒素测定:依据现行版《中华人民共和国药典》中的生物制品无菌试验和支原体检测规程,对细菌、真菌及支原体污染进行检测^[13]。细胞内外源致病因子的检测应结合体内和体外方法,

根据每一细胞制剂的特性进行人源及动物源性特定致病因子的检测。人源特定病毒包括人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类疱疹病毒、巨细胞病毒等;如使用 MEF 滋养层培养法培养人 ESC,则需进行小鼠源性病毒的全面检测。此外,应依据现行版《中华人民共和国药典》中的内毒素检测规程,对内毒素进行检测^[14]。

三、人 ESC 向 ES-F 的体外诱导和培养方法

(一)人 ESC 向 ES-F 的分化方法

1. 人 ESC 向拟胚体分化:刮下人 ESC 离心去上清,加入拟胚体培养液(80% DMEM/F-12, 20% knockout 血清替代品, 1 mmol/L 谷氨酰胺, 0.1 mmol/L β-巯基乙醇,

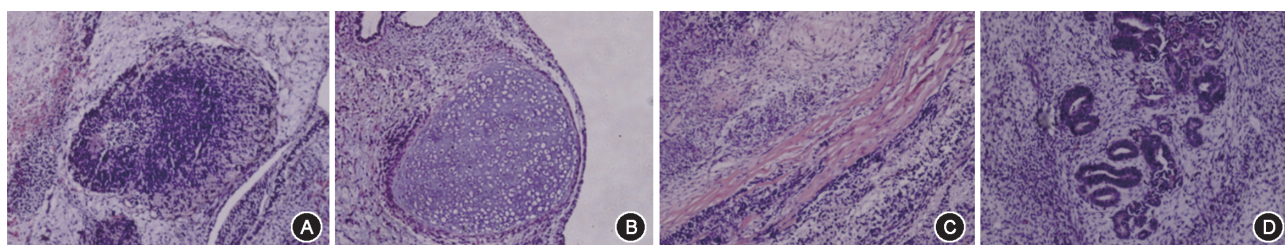


图6 人胚胎干细胞(ESC)在联合免疫缺陷小鼠体内形成的畸胎瘤(倒置像差显微镜明场下观察 $\times 100$)^[10]: A. 神经花环结构; B. 软骨组织; C. 平滑肌; D. 管腔上皮

0.1 mmol/L 必需氨基酸)重悬,按 1:1 的接种密度将细胞转入低吸附六孔板中悬浮培养,每 2 天换液 1 次。

2. 人 ESC 向 ES-F 分化:悬浮培养 5 d 后,将拟胚体悬液转入移液管中静置 5 ~ 10 min,去除上清,MEF 培养液重悬拟胚体,按每 2 孔拟胚体转移入一个 T75 培养瓶的接种密度接种到 0.1% 明胶包被的培养瓶中,每 3 天换液 1 次。在接种后 24 h 内即可观察到拟胚体贴壁,48 h 内即可观察到有细胞从拟胚体边缘爬出。持续培养一周后细胞可占瓶底面积 90% 以上。使细胞在高密度状态下继续培养两周,可观察到培养瓶中含多种不同形态的细胞混合生长,命名该细胞为 ES-F,标记为 P0 代。胰酶消化 ES-F,1:3 比例传代,传代后贴壁的细胞标记为 P1 代,每 2 天换液 1 次。待细胞即将汇合时再用胰酶传代,一般 3 ~ 5 d 可传代 1 次,ES-F 可稳定传代 20 代以上。

(二)人 ES-F 的质量控制

1. 细胞形态:当 ES-F 传至 P2 代时,细胞形态应均一,呈长梭形(图 7)。

2. 标志物基因的表达:Trizol 法提取人 ES-F 总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 用于反转录-PCR 检测。待 ES-F 传至 P2 代时,应高表达成纤维细胞标志物波形蛋白(Vim)基因和脯氨酰-4-羟基化酶 β (P4 β) 基因,不表达人 ESC 干性关键转录因子 OCT4、NANOG 基因;不表达三胚层的特定代表标志物 NEUROD1、Bra、AFP 基因和上皮标志细胞角蛋白 4 (CK-4) 基因(图 8)^[10]。

3. 标志物的表达:将人 ES-F 用 4% 多聚甲醇固定后做免疫荧光

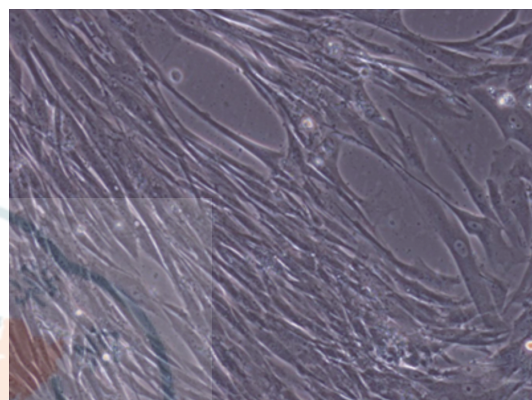


图7 人胚胎干细胞(ESC)来源的成纤维细胞(ES-F)的形态(倒置像差显微镜观察 $\times 100$): ES-F 呈长梭形,细胞形态均一

染色和流式细胞术分析。已知正常人来源的皮肤成纤维细胞不表达 OCT4、NANOG^[11] 和造血细胞标志物 CD45 及 CD34^[15],高表达成纤维细胞标志物 Vim

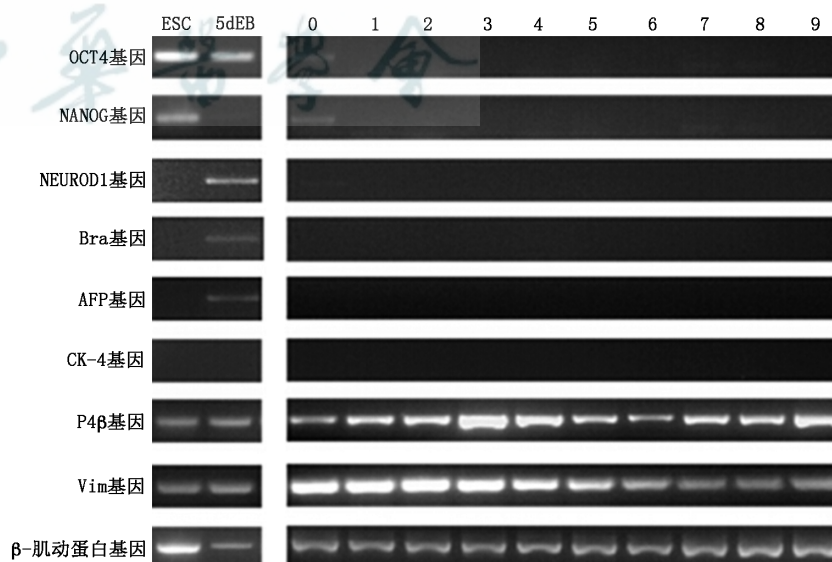


图8 人胚胎干细胞(ESC)来源的成纤维细胞(ES-F)标志物基因表达^[10]: ES-F 高表达成纤维细胞标志物波形蛋白(Vim)基因和脯氨酰-4-羟基化酶 β (P4 β) 基因,不表达人 ESC 干性关键转录因子 OCT4、NANOG 基因,不表达三胚层的特定代表标志物 NEUROD1、Bra、AFP 基因和上皮标志细胞角蛋白 4 (CK-4) 基因; β -肌动蛋白基因为内参;条带 0 ~ 9 为 ES-F 传代数;5dEB 为培养 5 d 的拟胚体

和间充质标志物 CD44, CD73, CD105^[15]。与人皮肤成纤维细胞类似,人 ES-F 应不表达 OCT4, NANOG^[11], CD45 及 CD34^[16], 高表达 Vim, CD44, CD73, CD105, CD13 和 CD106^[10,16]。

4. 核型分析:采用 G 显带或 FISH 方法鉴定人 ES-F 核型。在培养过程中定期(如每 10 代)做染色体核型分析,保证人 ES-F 在培养过程中的基因组稳定性。人 ES-F 应表现为正常 2 倍体核型:46,XY(男性)或 46,XX(女性)(图 9)^[10],对核型分析的详细要求与对人 ESC 的要求相同。

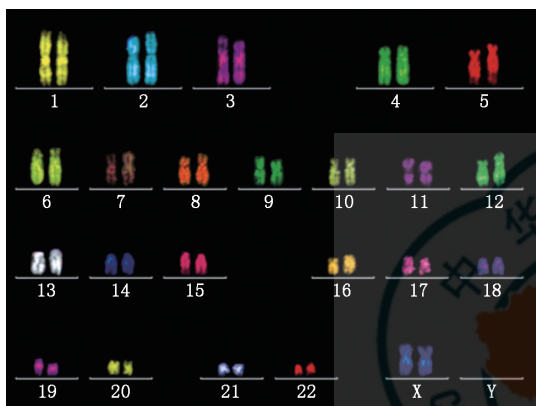


图 9 人胚胎干细胞系 H9(女性)来源的成纤维细胞核型分析(多彩色染色体荧光原位杂交法)^[10]

5. 微生物及内毒素测定:方法同人 ESC 测定方法。此外,如 ES-F 来源于使用 MEF 滋养层培养法培养的人 ESC,则需进行小鼠源性病毒的全面检测;细胞培养过程中如使用胎牛血清,须进行牛源特定病毒的检测;传代过程中如使用胰酶等猪源材料,应至少检测猪源细小病毒。

志谢 感谢以下专家在本共识撰写中给予的宝贵意见:施松涛(美国南加州大学奥斯特鲁夫牙科学院颌颌面分子生物学中心),徐洋(美国加州大学圣地亚哥分校生物科学部分子生物学系)

参 考 文 献

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282: 1145-1147.
- [2] Stummann TC, Bremer S. The possible impact of human embryonic stem cells on safety pharmacological and toxicological assessments in drug discovery and drug development [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2008, 3: 118-131.

- [3] Environment Directorate, Joint Meeting Of The Chemicals Committee, The Working Party On Chemicals, Pesticides And Biotechnology. Oecd Series On Testing And Assessment Number 34, Guidance Document On The Validation And International Acceptance Of New Or Updated Test Methods For Hazard Assessment [EB/OL]. (2005-08-18) [2014-06-16]. <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd-gd34.pdf>.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 16886. 5--2003/ISO-10993-5: 1999 医疗器械的生物学评价 第 5 部分: 体外细胞毒性试验[S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2003.
- [5] Wang X, Li S, Cao T, et al. Evaluating biotoxicity with fibroblasts derived from human embryonic stem cells[J]. Toxicol In Vitro, 2012, 26: 1056-1063.
- [6] Cao T, Lu K, Fu X, et al. Differentiated fibroblastic progenies of human embryonic stem cells for toxicology screening[J]. Cloning Stem Cells, 2008, 10: 1-10.
- [7] 战园, 王晓颖, 李盛林, 等. 两种牙科材料对人胚胎干细胞来源成纤维细胞的细胞毒性研究[J]. 北京大学学报: 医学版, 2012, 44: 1-5.
- [8] WiCell Research Institute. WiCell Feeder Based (MEF) Pluripotent Stem Cell Protocols[EB/OL]. (2013-08-08) [2014-06-16]. <http://www.wicell.org/media.acux/91bcd60-0ba8-4b48-be71-13ffc71b7aea>.
- [9] Fu X, Toh WS, Liu H, et al. Establishment of clinically compliant human embryonic stem cells in an autologous feeder-free system[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2011, 17: 927-937.
- [10] Fu X, Toh WS, Liu H, et al. Autologous feeder cells from embryoid body outgrowth support the long-term growth of human embryonic stem cells more effectively than those from direct differentiation[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16: 719-733.
- [11] 傅歆, 孙雪健, 曹蕊, 等. OCT4 异构体在人胚胎干细胞和间充质干细胞中的表达[J]. 基础医学与临床, 2014, 34: 41-46.
- [12] International Stem Cell Banking Initiative. Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes[J]. Stem Cell Rev, 2009, 5: 301-314.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2010 年版 三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [14] 国家食品药品监督管理总局. 人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则[EB/OL]. (2003-03-2) [2014-06-16]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0237/15709.html>.
- [15] Alt E, Yan Y, Gehmert S, et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential[J]. Biol Cell, 2011, 103: 197-208.
- [16] Shamis Y, Hewitt KJ, Carlson MW, et al. Fibroblasts derived from human embryonic stem cells direct development and repair of 3D human skin equivalents [J]. Stem Cell Res Ther, 2011, 2: 10.

(收稿日期:2014-06-18)

(本文编辑:宋国营)