

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)18-1704-04

以 STO 细胞和 hELF 作为胚胎生殖细胞培养饲养层的比较

刘永刚, 李芳菲, 陈地龙, 王莎莉, 王亚平 (重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室, 重庆 400016)

Comparison between STO cells and hELF used as feeder layers of embryonic germ cells

LIU Yong-Gang, LI Fang-Fei, CHEN Di-Long, WANG Sha-Li, WANG Ya-Ping

Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

【Abstract】 AIM: To compare the influence on the growth of human embryonic germ (EG) cells by SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant (STO) cells and human embryonic lung fibroblasts (hELF) respectively as feeder layers and the changes of the two kinds of the feeder layers themselves processed with mitomycin C. **METHODS:** We isolated and cultured hELF of 3-4 month embryos. The changes of the two kinds of the feeder layers themselves treated with mitomycin C were observed. STO and hELFs served as feeder layer to cultivate human EG cells. The formation rate of embryonic germ cell colony and the expression of EG cell surface markers (SSEA-1, SSEA-4) expression were detected. to discuss the influence on human EG cell growth. **RESULTS:** HELF treated by mitomycin C survived longer than STO cells treated by mitomycin C did. There was no obvious difference between the two kinds of feeder layers in the formation rate and immunologic markers (SSEA-1, SSEA-4) of EG cell colony. **CONCLUSION:** HELF as feeder layers is better than STO cells in culturing EG cells.

【Keywords】 STO cells; embryonic lung fibroblasts; embryonic germ cells; humans

【摘要】 目的: 比较以 STO 细胞和人胚胎肺成纤维细胞 (hELF) 作为饲养层对人胚胎生殖细胞 (EG) 生长的影响以及经丝裂酶素 C 处理后的两种饲养层的变化。方法: 分离、培养 3~4 mo hELF, 观察经丝裂酶素 C 处理 STO 细胞和 hELF

收稿日期 2005-11-15; 接受日期 2005-12-19

基金项目 国家教育部重点科技资助项目(01109); 重庆医科大学科研创新基金项目(cx200102)

通讯作者 王亚平. Tel: (023) 68485968 Email: ypwang@public.cta.cq.cn

作者简介 刘永刚, 博士, 讲师. Tel: (023) 66659058 Email: alexlyglyg@sohu.com.cn

后形态学变化, 以 STO 细胞和 hELF 作为饲养层培养人 EG 细胞, 计数 EG 细胞集落的形成率以及免疫组化检测 EG 细胞表面标志物抗阶段特异性胚胎抗原-1 (SSEA-1) 和抗阶段特异性胚胎抗原-4 (SSEA-4)。结果: 经丝裂酶素 C 处理后 hELF 较 STO 细胞生存时间明显长, 形态维持更好; 以 hELF 和 STO 细胞作为饲养层培养人 EG 细胞, 集落形成率没有明显差异; 两种饲养层上形成的集落免疫学特征无明显差异。结论: 在培养人 EG 细胞时, hELF 饲养层较 STO 细胞饲养层更有优势。

【关键词】 STO 细胞; 胚胎肺成纤维细胞; 胚胎生殖细胞; 人类
【中图分类号】 R321.1; R329.1 **【文献标识码】** A

0 引言

自 1998 年 Thomason 等^[1]首次建立人胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 系和 Shamblott 等^[2]建立人胚胎生殖细胞 (embryonic germ cell, EG) 系以来, 胚胎性干细胞研究已成为当今生命科学领域内的热门课题。胚胎性干细胞作为组织工程的种子细胞, 将为细胞、组织甚至器官替代治疗提供无限细胞来源, 也将为临床治疗模式带来革命性变革^[3]。谢松涛等^[4]也对人胚胎生殖细胞来源的人 EG 细胞进行了培养, 但迄今为止, 来源于人胚胎生殖细胞的 EG 细胞系仅有一例报道。有学者认为 STO 细胞在建立人 EG 细胞系过程中具有不可替代的作用。由于 STO 细胞是来源于鼠的成纤维细胞系, 用 STO 细胞作为饲养层将会给临床应用带来潜在的危险。我们用 STO 细胞和人胚胎肺成纤维细胞 (human embryonic lung fibroblast, hELF) 作为饲养层培养人 EG 细胞, 旨在探讨两种饲养层经丝裂酶素 C 处理后的变化和对 EG 细胞生长的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 高糖 DMEM 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 购自 GIBICO 公司; 无钙镁磷酸缓冲液 (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)、非必需氨基酸、二甲基亚砷、优质胎牛血清购自 Hyclone 公司; 胰蛋白酶、 β -巯基乙醇、毛喉素 (Forskolin) 购自 Sigma 公司; 丝裂酶素 C 购自 Kyowa Hakko Kogyo 公司; 胶原酶购自上海桥源生物制药公司; DNA 酶 I 购自 Roche 公司; 人重组碱性成纤维细胞

生长因子 (human recombinant basic fibroblast growth factor, hrbFGF) 购自 Pepro Tech EC 公司; 人重组白血病抑制因子 (human recombinant leukemia inhibitory factor, hrLIF) 购自 CHEMICON 公司; 抗阶段特异性胚胎抗原-1 (SSEA-1) mAb 和抗阶段特异性胚胎抗原-4 (SSEA-4) mAb 由美国芝加哥大学 Dr. Bruce Lahn 提供; UltrascintTM S-P 试剂盒购自迈新公司; DAB 显色试剂盒购自中山公司; 6~11 wk 人工流产胚胎 (重庆医科大学第二临床学院人流室同意提供) 用于分离人 EG 细胞; 3~4 mo 胚胎用于制备 hELF; STO 细胞由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 hELF 分离、培养及铺板 无菌条件下取 3~4 mo 人工流产胚胎肺组织, 按照薛庆善等的方法分离获取 hELF, 常规方法培养传代, 经反复传代获得纯化的 hELF。取对数生长期 hELF, 用终浓度为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丝裂霉素 C 处理 2.5~3 h, DPBS 洗 3 次; 2.5 g/L 胰酶消化 2 min, DPBS 洗 3 次; 以细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 种植在 1 g/L 明胶处理后的 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 95% 湿度和 50 mL/L CO_2 恒温细胞培养箱中培养 4 h 后吸去培养液和尚未贴壁的细胞, 换入等量培养液, 置培养箱中备用, 1 wk 内均可使用。

1.2.2 STO 细胞铺板 取对数生长期 STO 细胞, 用终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丝裂霉素 C 按上述方法处理备用。

1.2.3 人胚胎生殖嵴细胞的分离和培养 无菌条件下取得的 6~11 wk 胚胎生殖嵴用 DPBS 冲洗 3 次; 400 U/mL 的胶原酶 0.5 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 45 min; 灭菌加样枪反复吹吸, 将生殖嵴离散为小细胞团, 1 g/L 的胰蛋白酶和 0.2 g/L EDTA 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 5 min, 加入等体积含 100 mL/L 胎牛血清的培养液终止反应, 加入 200 U 的 Dnase I 作用 10 min, 轻柔吹打使细胞分离, 胚胎干细胞培养液重悬后以 1×10^5 , 1×10^4 , $1 \times 10^3/\text{mL}$ 三种浓度种植于 STO 细胞和 hELF 细胞饲养层, 胚胎干细胞培养液包含 800 mL/L 高糖 DMEM, 200 mL/L 胎牛血清, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.1 mmol/L 非必需氨基酸, 0.1 mmol/L 2-巯基乙醇, 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Forskolin, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hrbFGF, LIF 10×10^5 IU/L, 10×10^4 IU/L 青霉素和 10×10^4 IU/L 链霉素。置 50 mL/L CO_2 , 95% 湿度, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温细胞培养箱中培养, 每天更换培养基。

1.2.4 形态学观察 用胚胎干细胞生长培养液培养经丝裂霉素 C 处理后的 STO 细胞饲养层和 hELF 饲养层 14 d, 在倒置相差显微镜下观察两种饲养层细胞的形态变化。倒置相差显微镜下观察在 STO 细胞饲养层和 hELF 饲养层上人 EG 细胞集落形态。

1.2.5 在 STO 细胞和 hELF 饲养层上 EG 细胞集落形成率 用胚胎干细胞生长培养液将消化后的人胚胎生殖嵴细胞稀释成 1×10^5 , 1×10^4 , $1 \times 10^3/\text{mL}$ 的细胞悬液, 分别种植于 STO 细胞和 hELF 饲养层上, 每种细胞浓度种植 4 个复孔。置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 饱和湿度恒温细胞培养箱中培养, 每天更换培养基。计算集落形成率, 即 4 个复孔形成集落总数与种植细胞总数之比。

1.2.6 免疫细胞化学检测 取两种饲养层细胞上形成的集落, 40 g/L 多聚甲醛固定 15~20 min, 经 PBS 洗 3 次; 按免疫组化 SABC 法检测细胞表面抗原 SSEA-1 和 SSEA-4 (一抗工作浓度为 1:50)。设不加一抗组为阴性对照组。

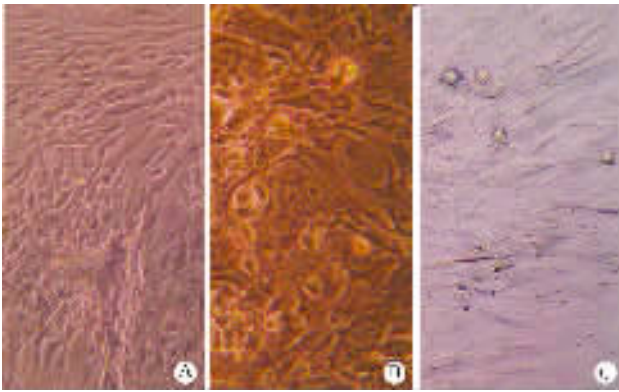
统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 进行方差分析 F 检验。显著性水平 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 hELF 体外生长与传代 原代培养时所得细胞, 细胞形状多种多样。传代细胞至第 3~5 代时细胞形态基本一致, 以长梭形或纤维样细胞为主, 细胞排列成为放射状、漩涡状或栅栏状 (图 1A)。将其反复传至第 45 代, 在第 5~30 代时生长最旺盛, 平均 3~4 d 达到汇合; 第 31~45 代时平均 5~6 d 达到汇合, 形态无显著变化。

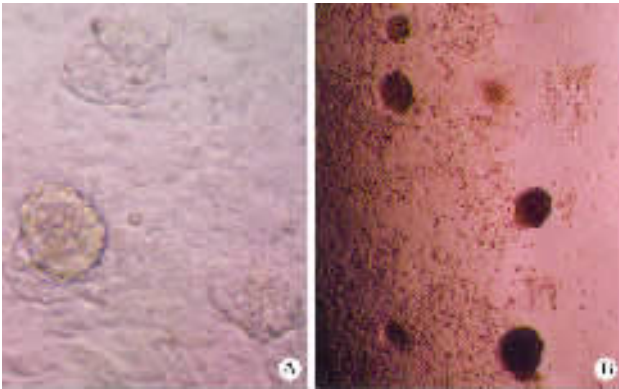
2.2 丝裂霉素 C 处理后 STO 细胞和 hELF 形态变化 用人 ES 生长培养液培养 STO 细胞和 hELF 饲养层, 培养 48 h 观察, STO 细胞的培养液变黄, 而人 hELF 的培养液颜色没有明显改变。不更换培养液, 培养 72 h 后, 少部分 STO 细胞浮起, 细胞内可见颗粒状物形成; 培养超过 6 d, 大部分细胞浮起。每 3 d 更换一次培养液, STO 细胞培养 5 d 后有部分细胞浮起, 细胞内出现颗粒状物 (图 1B)。而人 hELF 培养 7 d 未见细胞浮起, 细胞形态未见明显改变, 并可维持 14 d (图 1C)。

2.3 两种饲养层细胞对胚胎生殖细胞集落形成的影响 人胚胎生殖嵴细胞以 1×10^5 , 1×10^4 , $1 \times 10^3/\text{mL}$ 三种浓度种植于 STO 细胞和 hELF 饲养层上, 培养 7 d 后观察计数。结果显示: 以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 组, 集落形成最多, 集落形态典型 (图 2A, B); $1 \times 10^3/\text{mL}$ 组, 集落形成数量最少; $1 \times 10^5/\text{mL}$ 组, 可见较多集落分化, 集落细胞质中有颗粒样物出现, 饲养层细胞和胚胎生殖细胞容易卷折。以相同浓度种植胚胎生殖嵴细胞, 两种饲养层细胞对人 EG 细胞集落形成率没有显著性差异。



A: 丝裂霉素 C 处理前 hELF; B: 丝裂霉素 C 处理 STO 细胞后培养 7 d; C: 丝裂霉素 C 处理 hELF 后培养 7 d.

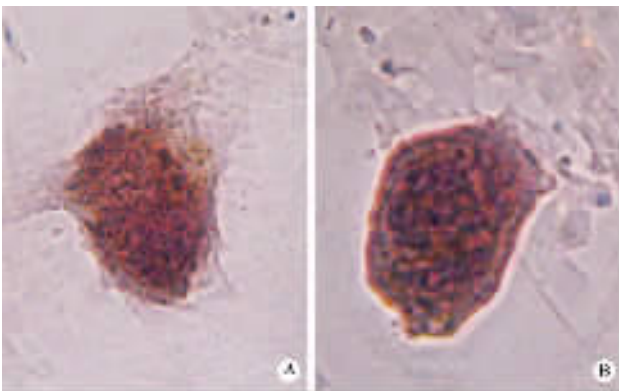
图 1 丝裂霉素 C 处理前后 hELF 和 STO 细胞 ×400



A: hELF 饲养层上 EG 细胞集落; B: STO 细胞饲养层上 EG 细胞集落.

图 2 STO 细胞和 hELF 饲养层上的 EG 细胞集落 ×400

2.4 人胚胎生殖细胞集落免疫学特征 经检测集落表面抗原 SSEA-1 和 SSEA-4, 显示两种饲养层细胞上培养的人胚胎生殖细胞集落均表达 SSEA-1 和 SSEA-4 (图 3A, B).



A: hELF 饲养层上表达 SSEA-1 集落; B: STO 细胞饲养层上表达 SSEA-4 集落.

图 3 胚胎生殖细胞集落表达 SSEA-1 和 SSEA-4 ×400

3 讨论

饲养层是建立和维持人胚胎性干细胞系未分化状态的必要条件. 迄今为止, 已分离得到的非人灵长类和人胚胎性干细胞系无一不是在有饲养层条件下建立和维持的, 在无饲养层的情况下, 人 ES, EG 细胞毫无例外地分化为多种细胞类型. 目前已建立的人胚胎性干细胞系都以鼠源性胚胎成纤维细胞为饲养层^[5]. 有报道称用人源性饲养层, 如人胚胎皮肤和肌肉细胞、输卵管细胞和人骨髓基质细胞, 也能维持人 ES 细胞体外增殖和保持其未分化状态, 由于上述饲养层存在来源、体外增殖能力低等问题而在应用中受限^[6-8]. 而在仅有的一例关于人 EG 细胞系的建系报道中, 用 MEF 作为饲养层却是不成功的, 因而有学者认为 STO 细胞饲养层在人 EG 细胞建系中具有不可替代的作用. 这一结论是很难解释的, 因为仅有一例报道, 尚不能确定其他饲养层在人 EG 细胞建系中的确切作用, 尤其是人胚胎成纤维细胞饲养层.

我们的研究结果显示: 1×10^4 /mL 接种的生殖嵴细胞在两种饲养层上形成的人 EG 集落最多, 且经过对集落的表面标志物 SSEA-1 和 SSEA-4 的检测证实所形成的集落为人 EG 细胞集落. 但是以 STO 细胞作为饲养层和以 hELF 作为饲养层之间对 EG 集落形成率并无显著性差异. 提示两种饲养层都能较好地支持人 EG 细胞的生长和克隆的形成. 以 1×10^5 /mL 和 1×10^3 /mL 接种的生殖嵴细胞形成的 EG 集落数量较少, 而两种饲养层之间 EG 集落形成率没有显著性差异, 提示以 1×10^5 /mL 浓度种植的胚胎生殖嵴细胞浓度大, 细胞生长过快, 尤其是胚胎生殖嵴中的其它细胞生长快, 容易和饲养层细胞一起卷折, 不利于胚胎生殖细胞集落的形成. 还由于胚胎生殖细胞集落培养体系的营养供给不足, 造成部分集落分化. 而种植浓度太低, 也不利于集落的形成. 因此以 1×10^4 /mL 作为最佳的种植浓度, 且最有利集落的形成.

以 STO 细胞和 hELF 细胞作为饲养层分离、培养人 EG 细胞, hELF 饲养层有以下优点: ① hELF 与人 EG 细胞相同种属, 不会引入异种蛋白和动物源性病原微生物, 更利今后临床应用; ② 经过丝裂霉素 C 处理后, 能在体外培养达 14 d 依然维持较好的生长状态. ③ hELF 能体外连续传代 50 代以上, 较鼠胚胎成纤维细胞、成人骨髓基质细胞等明显长, 且经过多次传代后细胞均一, 同质性高, 有利于对其培养体系的精确分析. 不足的是, 迄今为止, 没有利用 hELF 细胞饲养层建立人 EG 细胞系的报道.

【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] Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13726-13731.
- [3] Pera MF, Reubinoff BF, Trounson A, et al. Human embryonic stem cells [J]. Cell Sci, 2000, 113: 5-10.
- [4] 谢松涛, 朱德生, 杨贵忠, 等. 人胚胎生殖细胞中胚胎干细胞的分离培养 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(10): 905-907.
- [5] Thomson JA, Odorico JS. Human embryonic stem cell and embryonic

germ cell lines [J]. Trends Biotechnol, 2000, 18: 53-57.

- [6] Richards M, Tan S, Fong CY, et al. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2003, 21(5): 546-556.
- [7] Richards M, Fong CY, Chan WK, et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(9): 933-936.
- [8] Cheng L, Hammond H, Ye Z, et al. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture [J]. Stem Cells, 2003, 21(2): 131-142.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2796(2006)18-1707-01

雷公藤多甙片致重症全血细胞减少 1 例

林为民, 张颖

(解放军第 451 医院肾病科, 陕西 西安 710054)

【关键词】雷公藤, 全血细胞减少

【中图分类号】R692.9 【文献标识码】B

1 病例报告 男, 20 岁。间断浮肿 8 mo, 加重 2 wk, 于 2004-11-09 入院。缘于 2004-02 劳累后出现颜面及双下肢浮肿, 伴乏力, 渐加重, 化验尿蛋白 ++, RBC +, 血红蛋白 30 g/L, 球蛋白 22 g/L。诊断急性肾小球肾炎。住院用激素等药物治疗 1+ mo, 浮肿消退, 尿蛋白减少出院。出院后未坚持治疗, 尿蛋白 + ~ ++, RBC +。近 2 wk 来浮肿反复来我院。既往无药物过敏史。查体: 血压 120/80 mmHg (16/10.7 kPa), 发育正常, 营养中等, 双睑及双下肢轻度浮肿, 下肢浮肿可压陷, 心肺腹未见异常。尿蛋白 ++, BID ++, RBC 6 ~ 8/HP, 24 h 尿蛋白 4.28 g; 血 Hb 118 g/L, RBC $4.1 \times 10^{12}/L$, WBC $2.8 \times 10^9/L$, PLT $153 \times 10^9/L$; B 超示双肾实质弥漫性损害。诊断原发肾病综合征。因患者拒用激素, 即使用雷公藤多甙片 (湖南株洲制药三厂制) 40 mg, 口服 3 次/d, 大剂量黄芪注射液、葛根素、潘生丁、瑞泰等治疗, 约 10 d 出现不规则腹痛、腹泻, 雷公藤减量, 症状无明显改善, 并出现发热, T 38.6℃, 鼻衄。PLT, WBC 先后出现进行性急剧下降, 住院 18 d 停雷公藤, PLT 105 → 25 → 18 × 10⁹/L, WBC 3.7 → 2.4 → 0.7 × 10⁹/L; Hb 114 → 88 → 84 g/L。住院 20, 22, 25 d, PLT, WBC, Hb 降至最低点。骨穿: 骨髓增生欠活跃, 粒细统占 0.244, 增生受抑, 红系占 0.268, 晚幼红比例减低 7.2%, 全片见巨核细胞 145 个, 其中幼稚型 20:1, 余均为颗粒型, PLT 散在或三五成丛少见, 淋巴细胞比例增高 39.6%。诊

断全血细胞减少症。输注 PLT, WBC, 注射 WBC 集落刺激生长因子、血浆、抗生素、激素, 口服鲨肝醇、维生素 B4 等 1 wk 血细胞各项指标开始恢复。复查骨穿示: 骨髓增生活跃, 粒细统占 0.584, 早幼粒细胞比例增高 26.4%, 红系占 0.20, 中幼红比例略低 4.8%, 淋巴细胞比例正常, 全片见巨核细胞 149 个, 分类 20 个, 颗粒型 17 个, 产板型 3 个, PLT 散在或三五成丛可见。住院 28 d PLT 先恢复正常, 随后 2 d WBC 恢复, Hb 恢复较慢至出院时仍 10⁵ g/L。PLT, WBC 恢复后尿检无改善, 24 h 尿蛋白定量多时 6.24 g。入院 50 d 时采用标准连续甲强龙冲击治疗 3 次, 冲击后维持服用强的松 60 mg/d, 晨顿服, 并服用瑞泰、中药等, 病情稳定, 尿蛋白 ± ~ +, RBC 1 ~ 2/HP; 24 h 尿蛋白定量 1.06 g。共住院 69 d。出院 3 mo 仍服用激素 20 mg/d, 尿蛋白 ± ~ +, 余均正常。

2 讨论 雷公藤具有祛风除湿、活血通络、消肿止痛等功效, 1970 年代后期用于治疗肾脏病^[1], 目前除用药范围有扩大外, 用药剂量亦有增大趋势, 通常剂量小于 20 mg 3 次/d, 口服, 多不引起明显毒副作用。本例双倍剂量雷公藤仅服用 2 wk 即造成严重副作用, 通过停药观察及日后随访可以确定系雷公藤所致。查阅文献有不随雷公藤剂量相关致再生障碍性贫血报告^[2], 相反也有用于治疗急性再生障碍性贫血并取得良好疗效者^[3], 出现骨髓抑制可能与个体体质因素药物过敏反应造血干细胞损伤或分化停滞有关, 临床使用尤其剂量加大时应加以注意。

【参考文献】

- [1] 黎磊石, 刘志红. 应用雷公藤治疗肾炎二十五载的体会 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12(3): 246-247.
- [2] 冯国安, 郭农建, 董学斌, 等. 雷公藤多甙致再生障碍性贫血 3 例报告并文献复习 [J]. 临床血液学杂志, 2005, 18(1): 42-44.
- [3] 李玉峰, 王春玲, 丁帮和, 等. 雷公藤多甙治疗急性再生障碍性贫血的疗效及其对 CD34+ 细胞增殖能力的影响 [J]. 临床血液学杂志, 2004, 17(4): 230-231.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2005-10-25; 接受日期 2005-11-30

作者简介 林为民, 学士, 副主任医师, 科主任. Tel: (029) 85434563

Email: fzb06@crfeb.com.cn