

## 国产丝裂霉素处理的胎儿成纤维细胞支持具有生殖系转化能力的小鼠胚胎干细胞的分离

魏著英, 邵华\*, 刘东军, 旭日干

(内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

**摘要:** 应用于胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES 细胞) 培养的国产药物可以降低 ES 细胞的实验成本。研究中以浙江海正药业生产的丝裂霉素 (mitomycin, 国药准字 H33020786) 处理小鼠胎儿成纤维细胞, 用于胚胎干细胞建系。并制备饲养层, 将小鼠囊胚种植在该饲养层上。4—6 天后, 挑选形态良好的内细胞团 (inner cell mass) 来源的克隆在胰酶中进行消化, 将消化下来的细胞团块传至新鲜的饲养层上。之后, 每 2—3 天传代一次。结果表明, 经该丝裂霉素处理的胎儿成纤维细胞支持具有生殖系嵌合能力的胚胎干细胞的分离。

**关键词:** 国产丝裂霉素; 小鼠胚胎成纤维细胞; 小鼠胚胎干细胞

**中图分类号:** Q593<sup>+</sup>.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853 (2007) 06-0654-05

## Mytomycin Made in China Can Be Used to Isolate Embryonic Stem Cells with Ability in Contributing to Germ Lines

WEI Zhu-ying, SHAO Hua\*, LIU Dong-jun, BOU Shor-gan

(The key laboratory for mammalian reproductive biology and biotechnology, ministry of education. Hohhot 010021, China)

**Abstract:** Application of drugs made in China on culture of embryonic stem cells could decrease the cost of ES cell research. In our experiment, mytomycin made in China (Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd, authorized H33020786) was used to process feeder cells, from which mouse embryonic stem cells have been isolated and cultured in vitro. When the blastocysts were cultured directly on treated feeder cell layer, the inner cell masses were growing. After 4-6 days culture, ICM-derived outgrowths were separated into clumps, and placed on mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblasts feeder layer. Every 2-3 days, passage were made ever since. These ES cells have been proven to have a potential for germ-line contribution.

**Key words:** Mytomycin made in China; Mouse Embryonic fibroblasts (MEF); Mouse embryonic stem cells

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES 细胞) 来源于着床前胚胎的内细胞团 (inner cell masses, ICM), 具有自我更新和多向分化潜能。Evans et al (1981) 首次从延迟着床的小鼠囊胚的内细胞团中成功分离出胚胎干细胞。胚胎干细胞以其独特的遗传特点为生命科学研究提供了一个有力的实验工具, 如: 在培养液中添加不同的诱导因子, 就可以使胚胎干细胞在体外分化成为心肌细胞 (Jose et al, 1992)、神经细胞 (Wecler et al, 2002; Pagano et al, 2000) 等各种特定的组织细胞类型, 直接用于移植

治疗或体外构建组织、器官; 也可以对其进行基因打靶, 制造人类疾病动物模型, 用于研究基因的功能。胚胎干细胞在体外的培养需要饲养层细胞 (feeder cells) 或其他分化抑制物, 否则, 就会发生分化。饲养层的品质直接影响胚胎干细胞的生长、增殖、分化等过程 (Yang et al, 2001)。我们以前的研究证实当浙江海正药业生产的丝裂霉素 (国药准字 H33020786) 的浓度为 20 $\mu$ g/mL 作用 4 h 或 30 $\mu$ g/mL 作用 2、4 h 时, 均可有效抑制小鼠胎儿成纤维细胞的分裂而不影响其活力 (Wang et

收稿日期: 2007-05-23; 接受日期: 2007-08-17

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2002AA242061)

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: hua\_shao@hotmail.com

第一作者简介: 魏著英 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为干细胞与发育生物学

al, 2007)。本研究使用来源于雄性 EGFP 转基因小鼠(来自近交系小鼠 C57BL/6J)和雌性昆明小鼠(远交系)的杂种囊胚进行胚胎干细胞的分离, 目的是考察经该丝裂霉素处理的胎儿成纤维细胞是否支持胚胎干细胞的分离, 特别是是否支持具有生殖系转化能力的胚胎干细胞的获得。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

怀孕 13.5 d 的昆明小鼠(由内蒙古大学国家清洁级标准化实验动物繁育室提供)。分离胚胎干细胞用囊胚由雌性昆明小鼠(由内蒙古大学国家清洁级标准化实验动物繁育室提供)和 EGFP 转基因雄性小鼠(来自 C57BL/6J, 购自南京大学模式动物研究所)杂交获得。重度免疫缺陷小鼠(severe combined immunodeficient, SCID)购自中国科学院上海实验动物中心。

### 1.2 实验试剂与仪器

胎儿成纤维细胞培养基: 高糖型 DMEM+10% 标准胎牛血清(天津 TBD)+1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen)。ES 细胞培养基组成: DMEM (High Glucose, Invitrogen), 2mmol/L 谷氨酰胺 (Invitrogen), 0.1 mmol/L 非必需氨基酸 (Invitrogen), 0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇 (SIGMA), 1 mmol/L 丙酮酸钠 (Invitrogen), 1% 青霉素、链霉素混合液 (Invitrogen), 15% 胎牛血清 (Hyclone), 1000 units/mL LIF (Chemicon)。配制 M2 培养液所使用的药品均购自日本和光工业株式会社; 立体解剖显微镜为 NIKON SMZ800。相差显微镜为 OLYMPUS CK41。

## 2 实验方法

### 2.1 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层的制备

取怀孕 13.5 d 的昆明小白鼠, 颈椎脱臼处死, 取出子宫, 剥离胎儿, 剪去头尾及四肢后, 将躯干剪碎成糊状(组织块约  $1\text{mm}^3$  大小), 加入 1—2 mL 0.05% trypsin-EDTA 消化, 4—6 min 后加培养液终止消化, 同时吹打均匀, 以 3 个胎儿/10 cm 培养皿, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中培养过夜。当细胞生长到 90% 汇合时, 以 0.05% trypsin-EDTA 消化, 加 DMEM 培养液终止后, 将液体全部转移到 50 mL 离心管中, 待组织块沉到离心管底部时, 吸出上层

细胞悬液, 调整细胞浓度, 冻存。

### 2.2 小鼠胚胎干细胞(ESCs)的分离

2.2.1 胚胎的收集 取性成熟的雌性昆明小鼠(6—8 周)3 只, 于第 1 天 18:00 腹腔注射 PMSG (5 IU/只), 48 h 后腹腔注射 HCG (5 IU/只), 同时与 EGFP 转基因雄性小鼠 1:1 合笼。第二天早上检查昆明小白鼠的阴道栓, 见栓的小鼠记为 0.5d, 3.5d 时, 进行子宫冲胚, 镜下收集囊胚。

2.2.2 饲养层细胞的准备 解冻一只冻存的 MEF 细胞, 当细胞传到第二代时, 用丝裂霉素 C 处理: 选取处于对数生长期的 MEF 细胞, 更换新鲜的培养液, 同时加入浙江海正药业生产的终浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的丝裂霉素(国药准字 H33020786), 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 2h。2h 后取出, PBS 洗 5 遍, 消化, 制备单细胞悬液。调整单细胞悬液至合适浓度, 制备 150  $\mu\text{L}$  小滴, 上覆矿物油。分别挑选 7 枚形态良好的囊胚种植在铺满 MEFs 的饲养层上, 每个小滴培养 1 枚囊胚。

### 2.3 ES 细胞的分离

囊胚在饲养层上培养时, 其内细胞团(ICM)逐渐长大, 凸出。4—6d 后, 分离形态良好的 ICM, 并逐个放在胰酶中消化同时用口吸管吹打, 将消化下来的细胞团块传代至新鲜的饲养层上。之后每 2—3d 传代一次。第 5 代后传代的同时冻存一部分细胞。

### 2.4 ES 细胞的鉴定

2.4.1 碱性磷酸酶染色 将贴壁生长于圆玻片上的细胞用 PBS 洗 3 次后, 用 4% PFA 于室温固定 10 min, 接着再用 PBS 洗 3 次, 加入底物 NBT/BCIP 作用 10—20 min, 显微镜下观察, 待显色适当时, 流水中止反应。表达碱性磷酸酶活性的细胞将被染成深蓝色。

2.4.2 OCT-4 染色 ES 细胞标记物的检测试剂盒购自 Chemicon 公司, 采用免疫荧光染色技术。操作程序依据生产商的说明书进行。于室温用正常驴血清(用 PBS 按 1:10 稀释)封闭非特异性抗体吸附 30 min, 加入 OCT4 抗体(用 PBS 按 1:500 稀释)于  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 次日, 以 PBS 洗 3 次, 加入荧光标记的驴抗羊二抗于室温孵育 1h, 再用 PBS 洗 3 次, 50%甘油封片。

2.4.3 SSEA-1 染色 用 2% 双氧水(甲醇稀释)于室温封闭内源性过氧化物酶 30min, PBS 洗 3 次,

用 3%BSA 于室温封闭非特异性抗体吸附 30 min, 加入鼠抗 SSEA-1 抗体 (Chemicon ES CELL MARKER SAMPLE KIT 用 3% BSA 按 1:5 稀释) 于 4℃ 孵育过夜, 次日, 以 PBS 洗 3 次后, 加入生物素标记的羊抗小鼠 IgG + IgM (用 PBS 按 1:200 稀释) 于室温孵育 1h, 用 PBS 洗 3 次, 加入 SABC, 于室温孵育 0.5h, 再用 PBS 洗 3 次, DAB 显色约 10 min。

**2.4.4 核型分析** 将传至第 10 代的胚胎干细胞消化形成单细胞悬液, 通过多次贴壁去除饲养层细胞。使用浓度为 0.05 μg/mL 的秋水仙素 (SIGMA) 作用于胚胎干细胞 2h。胰酶消化, 制造单细胞悬液。离心弃上清。加入浓度为 0.075 mol/L 的 KCl 轻轻重新悬浮细胞并且在 37℃ 作用 30 min。离心弃上清。轻轻加入固定液 (methanol: acetic acid, 3:1) 同时悬浮细胞, 室温作用 10 min。滴加固定后的细胞悬液至预冷的载玻片上。吉姆萨染色, 镜下观察并拍照。

**2.4.5 畸胎瘤的形成** 将培养至第 10 代的 ES 细胞克隆消化成单细胞悬液, 并调整浓度至  $1 \times 10^6$  个细胞/mL。将 0.5 mL 细胞悬液注射到成年 SCID 小鼠的腹腔内。于 3 周后处死小鼠并取出畸胎瘤。对畸胎瘤进行冰冻切片, HE 染色, 行组织学观察。

**2.4.6 类胚体形成实验** 将培养至第 10 代的 ES 细胞克隆消化成单细胞悬液。离心去除上清, 添加不含有 LIF 的成纤维细胞培养液。悬浮细胞, 并转移至不含有饲养层的细菌培养皿内培养。7—10 d 后, 有中空的球状体形成即为类胚体。

**2.4.7 嵌合体制作** 囊胚注射方法依据以前的文献报道。简言之, ES 细胞克隆首先被消化成单细胞悬液。将 10 到 15 个 ES 细胞注射到昆明鼠的囊胚腔内, 1h 后, 选择重新形成的囊胚移植到假孕 2.5d 的昆明白雌鼠子宫腔内。19.5d 后观察孕鼠出生情况。两周后观察毛色嵌合情况。

## 3 结果

### 3.1 ES 细胞的分离

本研究共选取 7 个形态良好的受精囊胚分别种植在铺有经国产丝裂霉素处理过的小鼠胎儿成纤维细胞的饲养层上。第 2 天观察发现, 所有 7 个囊胚全部孵化并附植在饲养层上。第 6 天后, 共出现 6 个典型的鸟巢状克隆。分别挑取每个 ICM 克隆置

于 0.05% 的胰酶消化液中进行消化, 其间辅助口吸管吹打。将细胞团块 (约 6—10 个细胞) 及时转移到 ES 细胞培养小滴内继续培养。4—6 d 后, 共有 5 个小滴内分别出现 3—5 个 ES 细胞样克隆。对这 5 个小滴进行常规消化并传代到铺有饲养层的 35 mm 培养皿内进行培养。当传至第 5 代时 ES 细胞生长稳定。这样从 7 个囊胚分离得到了 5 个 ES 细胞株 (图 1)。

### 3.2 ES 细胞的鉴定和核型分析

对所有 5 个细胞株进行碱性磷酸酶染色和免疫组化分析。结果显示, 所有 ES 细胞株表达碱性磷酸酶活性 (图 2A), SSEA-1 阳性 (图 2B) 和 Oct-4 (图 2C), 保持正常的核型 (40 条; 图 4C)。

### 3.3 畸胎瘤分析

畸胎瘤组化染色显示我们得到的胚胎干细胞具有形成 3 个胚层的能力, 可以分化成为神经管样结构 (外胚层, 图 3A), 横纹肌 (中胚层, 图 3B) 和呼吸性上皮 (内胚层, 图 3C)。

### 3.4 类胚体形成

使用胰酶消化 ES 细胞克隆成单细胞。采用无 LIF 细胞培养基在无饲养层的细菌培养皿上培养 10 天后有大量的类胚体形成 (图 4A)。在紫外线激发下, 所有的类胚体都发出绿色荧光 (图 4B)。

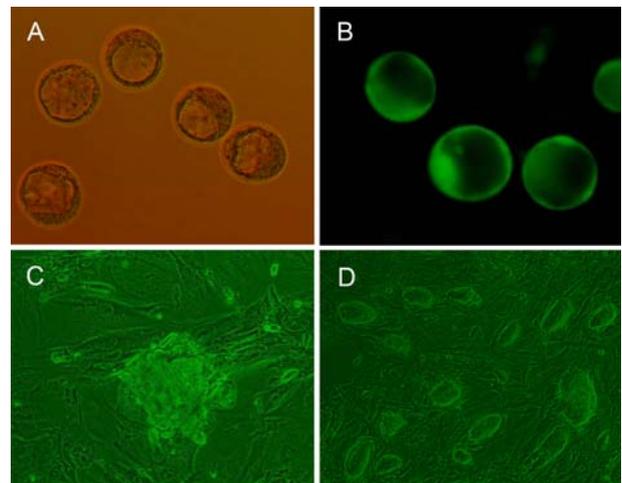


图 1 受精胚来源的杂种胚胎干细胞的分离  
Fig. 1 Isolation of hybrid ES cells derived from fertilized blastocysts

A: EGFP 转基因雄鼠和昆明雌鼠杂交得到的囊胚 (Hybrid blastocysts derived from female Kunming mouse and male EGFP-transgenic mouse); B: 荧光显微镜下, 杂种囊胚发出绿色荧光 (Hybrid blastocysts under UV); C: 来自杂种囊胚内细胞团的鸟巢状结构 (ICM derived from hybrid blastocysts); D: 分离自杂种囊胚内细胞团的胚胎干细胞 (ES cells derived from hybrid blastocysts)。

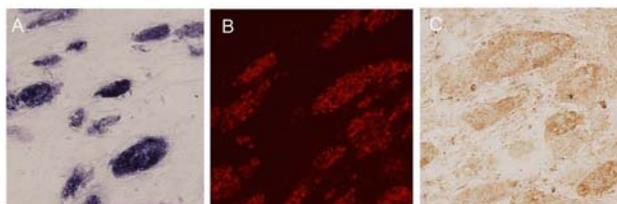


图 2 受精胚来源的杂种胚胎干细胞的鉴定  
Fig. 2 Characterization of ES cells derived from hybrid blastocysts

A: 碱性磷酸酶阳性 (ES cell colony stained positive for alkaline phosphatase,  $\times 200$ ); B: SSEA-1 阳性 (ES cells stained positive for SSEA-1,  $\times 200$ ); C: Oct-4 阳性 (ES cells stained positive for Oct-4,  $\times 200$ )。

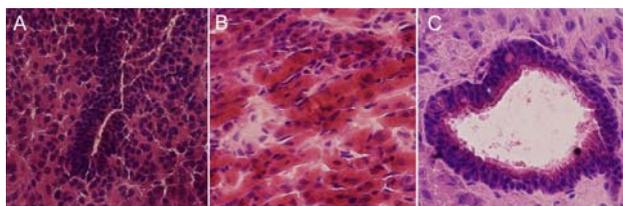


图 3 由杂种胚胎干细胞得到的畸胎瘤组织

Fig. 3 Histological analysis of teratomas derived from hybrid ES cells

A: 神经上皮样组织 (外胚层) (Neural epithelium,  $\times 400$ ); B: 横纹肌 (中胚层) (Striated muscle,  $\times 400$ ); C: 呼吸上皮样组织 (内胚层) (Respiratory epithelium,  $\times 400$ )。

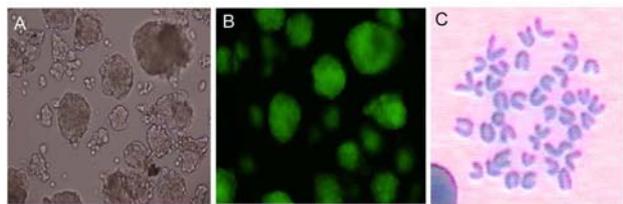


图 4 杂种胚胎干细胞在体外形成类胚体

Fig. 4 Embryoid bodies derived from hybrid ES cells

A: 典型的类胚体形态 (Embryoid body,  $\times 40$ ); B: 在紫外激发下, 类胚体发出绿色荧光 (Embryoid body under UV,  $\times 40$ ); C: 杂种胚胎干细胞的核型 (Representative karyotype of hybrid ES cells,  $\times 1000$ )。

### 3.5 嵌合体鼠的制备及生殖系嵌合检验

共移植 84 枚经杂种 ES 细胞注射的昆明白囊胚, 得到 9 只毛色嵌合体鼠, 其中 8 只雄鼠和 1 只雌鼠。毛色高度嵌合的有 5 只, 中度嵌合和低度嵌合的分别为 2 只。遗传试验证实有 2 只 (分别标识为 1#和 2#) 雄性嵌合鼠具有生殖系嵌合能力 (图 5)。

1#嵌合鼠与一只雌性昆明小鼠交配后产仔 13 只, 其中除白色之外其它毛色小鼠 (杂种 ES 来源的小鼠) 有 8 只 (4♂、4♀); 2#嵌合鼠与一只雌性昆明小鼠交配后产仔 13 只, 其中除白色之外其它毛

色小鼠有 8 只 (5♂、3♀), 见 (表 1)。由于出现 ES 细胞来源的雄性后代, 所以确定该杂种 ES 细胞的核型为 XY。

表 1 杂种 ES 细胞来源的嵌合小鼠后代性别分布  
Tab. 1 Sexual distribution of chimeric mouse offspring from hybrid ES cell

具生殖系转化能力的嵌合小鼠		
Chimeric mouse with germ-line transmission ability	♀	♂
1#	4	4
2#	3	5

## 4 讨论与结论

ES 细胞具有多向分化的潜能, 只要培养条件稍有不适, 就会导致 ES 细胞的分化。因此, 培养时维持其不分化的状态, 同时又能保证其正常的增殖就是一个很关键的环节。小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 可以分泌多种细胞因子 (Williams et al, 1988), 其中, 白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 是 ES 细胞生长所必须的, 这些因子有助于 ES 细胞增殖而又能抑制细胞凋亡和分化; 由于 MEF 取材方便, 成本低廉, 因而在 ES 细胞的培养中被广泛使用。在处理 MEF 细胞作饲养层时, 有两种方法: 一种是用  $\gamma$  射线照射 (Mindy & Mary, 1998), 但该方法要求的设备较为复杂, 多数学者采用另一种丝裂霉素的处理方法。丝裂霉素是细胞周期非特异性药物, 对细胞周期的 G1 期, 特别是晚 G1 期及早 S 期最为敏感, 在组织中经酶活化后, 通过烷化作用与细胞 DNA 交联, 使其双链解聚, 可抑制细胞的 DNA 合成, 从而抑制细胞分裂 (Geng & Wang, 1996)。

在饲养层的制备时, 人们大多使用的是国外进口的丝裂霉素。丝裂霉素在我国属于管制药品, 其进口申请程序复杂, 审核周期较长, 而且药品本身的价格昂贵。与其相比, 国产丝裂霉素不仅购买方便而且价格低廉, 但目前未见有研究报告系统评价国产丝裂霉素在胚胎干细胞分离与培养中的效果。本研究结果证实经浙江海正药业生产的丝裂霉素处理的小鼠胚胎成纤维细胞支持具有生殖系转化能力的 ES 细胞的分离与培养。我们相信, 随着科学的进步, 质量观念的更新, 将会有更多的国产药品在胚胎干细胞研究中得到更广泛的应用。



图 5 雄性嵌合小鼠和雌性昆明小鼠杂交产下的后代

Fig. 5 The offspring born from mating between male chimera and female KM mouse

#### 参考文献:

- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse [J]. *Nature*, **292**: 154-156.
- Geng HY, Wang SH. 1996. Practical therapy Pharmacy BeiJing :People's Medical Publishing House,247-248. [耿洪业, 王少华. 1996. 实用治疗药理学. 北京: 人民卫生出版社, 247-248.]
- Jose C, Cutierre Z, Round P. 1992. *In vitro* differentiation of embryonic stem cell in to lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocyte *in vitro*. Proc [J]. *Natl Acad Sci, USA*, **89**: 915-917.
- Mindy DG, Mary LT. 1998. Serum-free culture of murine embryonic stem (ES) cells [J]. *Focus*, **20** (1) : 8-10.
- Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA. 2000. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb [J]. *Stem Cells*, **18** (4):295-300.
- Wang LL, Shao H, Bou S. 2007. Application of homemade Mytomycin on preparation of embryonic stem cells feeder layer [J]. *Chin J Pharm Anal (Accepted)*. [王玲玲, 邵华, 旭日干. 2007. 国产丝裂霉素在胚胎干细胞饲养层制备中的应用. 药物分析杂志, (已录用)]
- Wecler E, Palmer T. 2002. Where, oh where, have my stem cells gone [J]. *Trends Neurosci*, **25** (5) :225-227.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells [J]. *Nature*, **336** (6200) : 684-687.
- Yang Q, An LL. 2001. Isolation and cloning of embryonic stem cells (ES cells) [J]. *Northwest Sci-Tech Univ*, **29** (3) : 120-124.[杨奇, 安立龙. 2001. 胚胎干细胞的分离克隆. 西北农林科技大学学报(自然科学版), **29** (3) : 120-124.]