

# 一种利用 STO 饲养层细胞制备拟胚体的新方法

胡若真 周庆军 邵健忠\* 项黎新 张 铭 张念慈

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

陆永良 姚 行 戴利成

(湖州市中心医院, 湖州 313100)

**摘要** 建立了一种利用 STO 饲养层细胞制备拟胚体的新方法。该方法选用生长至 80% 饱和密度的 STO 细胞, 经丝裂霉素 C (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 处理 4 h 后以  $8 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$  的密度接种培养 12 h, 制备饲养层, 再将 ES-D3 细胞以  $1 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$  的密度接种其上, 首先用含 mLIF 的 DMEM 培养液培养 24 h, 再更换拟胚体诱导培养液, 5~9 天后获得了各成熟阶段的拟胚体。形态结构和分化潜能等研究表明, 该方法制备的拟胚体结构典型, 具有产生 3 个胚层谱系来源的功能细胞的潜能。与传统拟胚体制作方法如悬滴培养法相比, 具有操作简便, 拟胚体形成率高, 重复性好等优点, 是开展哺乳动物早期胚胎发育和干细胞分化研究的理想工具。

**关键词** 胚胎干细胞; STO 饲养层; 拟胚体; 形态结构; 分化潜能

拟胚体(embryoid body, EB)是体外培养的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)在一定条件下[如去除白血病抑制因子(leukemia inhibition factor, LIF)等]自发形成的类似早期发育胚胎的球体结构。拟胚体的形成一般可以分为两个阶段, 首先干细胞聚集, 黏附成团, 形成简单拟胚体(simple embryoid body), 简单拟胚体继续培养, 经过一段时间的成熟, 中央出现空腔, 形成囊状拟胚体(cystic embryoid body), 囊状拟胚体具备了类似胚胎发育中典型的三胚层结构, 基本模拟了体内组织分化发育过程, 可以作为研究哺乳动物胚胎发育尤其是早期谱系决定、胚层相互诱导等现象的理想体外模型<sup>[1]</sup>。同时拟胚体可产生 3 个胚层谱系来源的多种功能细胞, 因此, ES 细胞体外分化研究一般都通过对拟胚体的诱导来进行, 拟胚体的制作已成为开展 ES 细胞体外分化研究的重要步骤, 建立简易、高效和稳定的拟胚体制作技术一直是研究者关注的课题<sup>[2]</sup>。近年来, 我们以小鼠 ES-D3 细胞系为材料, 利用 SIM 小鼠来源的 STO 成纤维细胞系, 建立了一种饲养层细胞介导的拟胚体形成新技术, 并对所获拟胚体的显微结构和分化潜能进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

小鼠胚胎干细胞(ES-D3 细胞系)购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所; 小鼠 STO 成纤维细胞系购自中国科学院北京遗传与发育生物学研究所; 小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)由本实验室培养。

### 1.2 培养试剂

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone 公司; 新生牛血清(new-born bovine serum, NBS)购自杭州市四季青生物工程材料研究所; 高糖 DMEM 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, high glucose, DMEM)、L- 谷氨酰胺(L-glutamine, L-Gln)、 $\beta$ - 巯基乙醇( $\beta$ -mercaptoethanol,  $\beta$ -ME)均为 Gibco BRL 产品; 小鼠 LIF(mLIF)购自 Chemicon 公司; 维甲酸(retinoic acid, RA)、青霉素、链霉素、胰蛋白酶、丁酸钠(sodium butyrate, NaB)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、丝裂霉素 C 购自 Sigma 公司。

### 1.3 MEF 细胞培养与饲养层制备

从怀孕 13.5 天的 ICR 小鼠取胚胎, 除去头和内脏, 剪碎, 加 2.5 g/L 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消

收稿日期: 2004-07-29 接受日期: 2004-09-18

浙江省“十五”重大科技项目资助(No.J 20020579-30116)

\* 通讯作者。 Tel: 0571-88273287, Fax :0571-88273287, E-mail:

shaojz@zju.edu.cn

化成单个细胞,离心洗涤,加DMEM(含15% NBS、2 mmol/L L-Gln、0.1 mmol/L  $\beta$ -ME、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素)培养液培养,待细胞生长至80%汇合度时,以终浓度为10  $\mu$ g/ml的丝裂霉素C处理2 h, PBS洗3次,胰蛋白酶消化后接种培养瓶,5% CO<sub>2</sub>, 37 °C培养12 h后备用<sup>[3,4]</sup>。

#### 1.4 STO 细胞培养

贴壁生长的STO细胞,待生长至单层饱和密度后,加2.5 g/L胰蛋白酶消化,用DMEM(含15% NBS、2 mmol/L L-Gln、0.1 mmol/L  $\beta$ -ME、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素)培养液重悬后置5% CO<sub>2</sub>, 37 °C培养。

#### 1.5 ES-D3 细胞培养

呈集落样生长的ES-D3细胞,用2.5 g/L胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化,加DMEM(含15% FBS、2 mmol/L L-Gln、0.1 mmol/L  $\beta$ -ME)培养液吹打成单个细胞悬液,以1:3的传代比例接种于MEF饲养层上,置37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每天更换培养液<sup>[1]</sup>。

#### 1.6 拟胚体的制作

取生长至80%饱和密度的STO细胞,加终浓度为10  $\mu$ g/ml的丝裂霉素C处理4 h, PBS清洗3次后,用2.5 g/L胰蛋白酶消化成单个细胞,加DMEM(含15% NBS、2 mmol/L L-Gln、0.1 mmol/L  $\beta$ -ME、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素)培养液,以 $8 \times 10^4$  cm<sup>-2</sup>的密度接种至培养瓶中,培养12 h,然后将ES-D3细胞以 $1 \times 10^4$  cm<sup>-2</sup>的密度接种于STO细胞上,第一天采用含1000 U/L mLIF的DMEM(含15% FBS、2 mmol/L L-Gln、0.1 mmol/L  $\beta$ -ME)培养液,置37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,24 h后更换为拟胚体诱导培养液(含5% FBS、5% NBS、2 mmol/L L-Gln、0.1 mmol/L  $\beta$ -ME的DMEM),视培养液的消耗程度,每天半量或全量换液,大约在3天开始形成拟胚体,5~9天达到高峰,此时收集悬浮于培养液中的拟胚体或轻轻吹打贴附于饲养层上的拟胚体,置离心管中,静置沉淀,收集拟胚体,用含10% FBS的DMEM培养液悬浮于非黏附性培养皿中进一步培养1~4天。

#### 1.7 拟胚体的显微形态观察

拟胚体用4%中性甲醛室温固定4 h,按常规方法制备石蜡切片,苏木精-伊红(H.E)或甲苯胺蓝染色,拍照分析。

#### 1.8 拟胚体的亚显微结构观察

拟胚体用2.5%戊二醛固定2 h,1% OsO<sub>4</sub>固定1 h,丙酮系列脱水,Epon812包埋,切片厚度为30~40 nm,醋酸双氧铀染色15 min,柠檬酸铅染色5 min, HITACHI-600 电镜观察。

#### 1.9 拟胚体的分化潜能试验

1.9.1 神经细胞分化 将拟胚体转移至细胞培养皿,用含 $5 \times 10^{-7}$  mol/L RA的分化培养液(DMEM + 10% FBS +  $5 \times 10^{-7}$  mol/L RA)诱导<sup>[5]</sup>,处理4天后,更换不含RA的培养液,继续培养4天。Nestin免疫组化分析采用Chemicon公司小鼠抗Nestin单克隆抗体和羊抗鼠罗丹明标记二抗进行。

1.9.2 心肌细胞分化 将拟胚体转移至96孔培养板中,每孔一个拟胚体,每天用含10% FBS的培养液换液,观察出现节律性跳动的细胞团,取部分用4%多聚甲醛固定,进行肌动蛋白免疫组化分析,采用Dako公司小鼠抗人肌动蛋白单克隆抗体和华美生物工程有限公司ABC免疫组化试剂盒进行。

1.9.3 肝细胞分化 参照Rambhatla等方法<sup>[6]</sup>,将拟胚体转移至48孔板培养,用含5 mmol/L NaB的分化培养液(DMEM + 10% FBS + 5 mmol/L NaB)诱导,4天后更换不含NaB的培养液培养,8天后按Yamada等<sup>[7]</sup>方法进行吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)和PAS(periodic acid-Schiff reaction)反应检测。

## 2 结果

### 2.1 拟胚体的形成

ES-D3细胞在MEF饲养层上呈典型的集落状增殖,细胞团致密,细胞间界限不清晰,细胞始终保持未分化状态(图1-1)。当ES-D3细胞接入STO饲养层,并在拟胚体诱导培养条件下,干细胞经历了两个阶段的变化,第一是干细胞的增殖阶段(接种3天内),细胞逐渐由单个分散状态长成致密的集落状态;第二是集落的分化阶段(接种5天后),原来致密的干细胞团逐渐分层,中间出现一层暗色的基膜结构,形成典型的简单拟胚体形态(图1-2, 1-3)。其中部分拟胚体会自动脱离饲养层,从培养瓶底悬浮至培养液中(图1-4),部分拟胚体则稍黏附于饲养层上,用吸管轻轻吹打,也能悬浮至培养液中,将这些拟胚体收集并转移至非黏附性的培养皿中继续培养,则能进一步分化成熟,中央出现空腔,形成典型的囊状拟胚体(图1-5)。

### 2.2 拟胚体的形态结构

拟胚体的光镜和电镜观察结果表明,早期形成

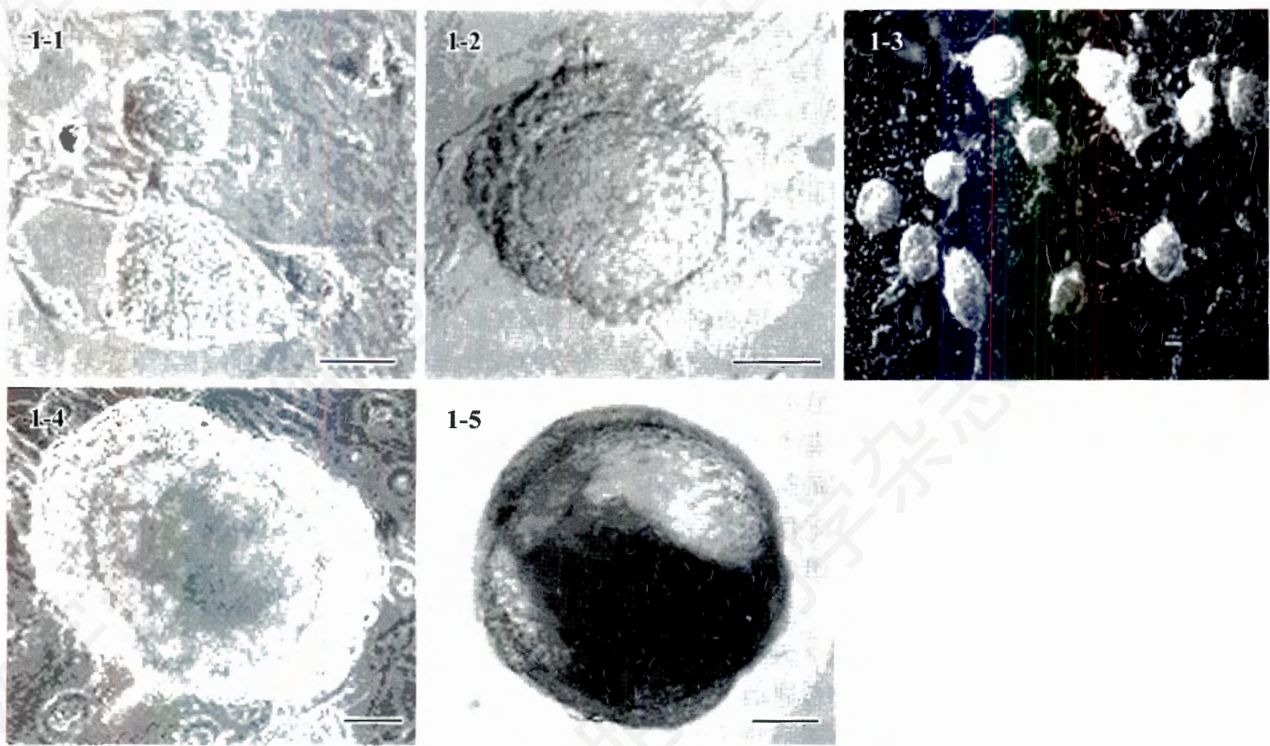


图 1 拟胚体形成过程

(1-1) 培养在小鼠 MEF 饲养层上的未分化 ES 集落; (1-2) 在 STO 饲养层上分化形成的拟胚体; (1-3) 在 STO 饲养层上形成的大量拟胚体; (1-4) 脱离 STO 饲养层后悬浮于培养液中的拟胚体; (1-5) 悬浮于非黏附性培养皿中的成熟囊状拟胚体。标尺: 100  $\mu\text{m}$ 。

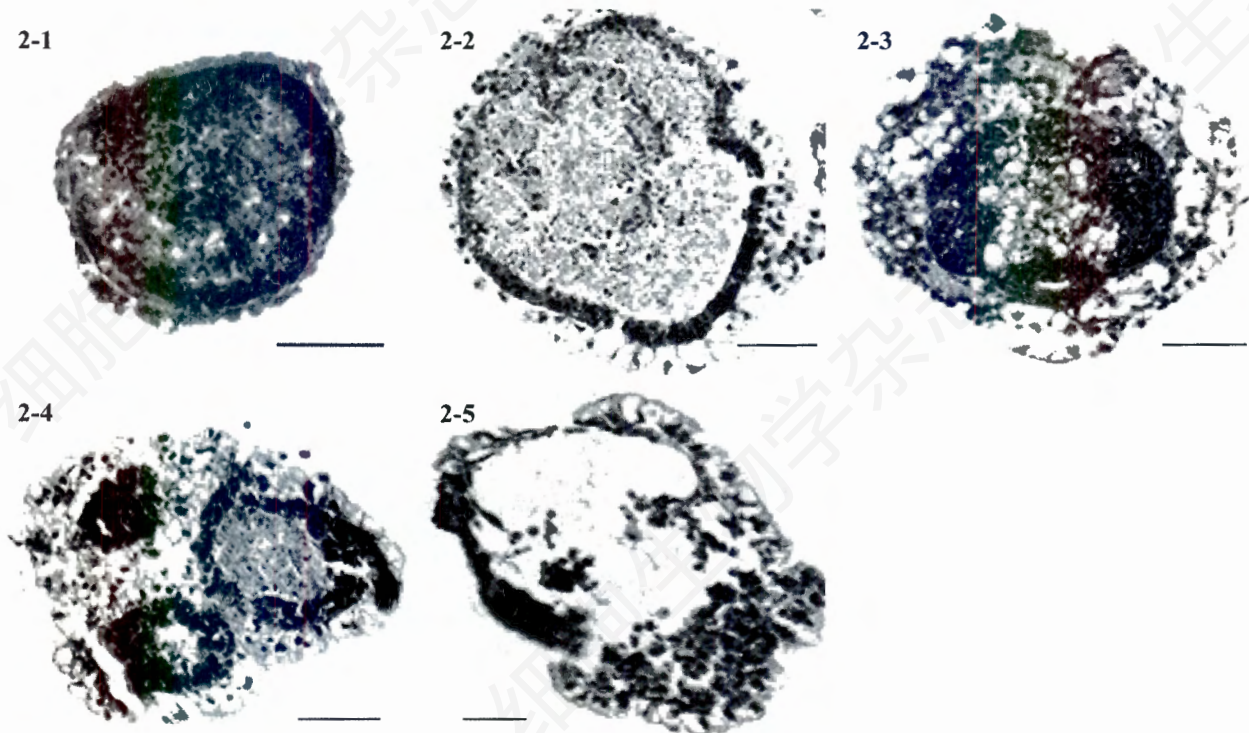


图 2 不同发育阶段拟胚体的光镜切片观察(HE 染色)

(2-1) 早期形成的细胞团样简单拟胚体; (2-2) 简单拟胚体内层分化形成柱状上皮样细胞; (2-3) 和(2-4) 拟胚体内部分化, 形成细胞团或小管腔结构; (2-5) 拟胚体发育后期, 内部细胞解体, 形成空腔。标尺 100  $\mu\text{m}$ 。



的拟胚体多为细胞团样的简单拟胚体，其外周一般由单层上皮样细胞组成(图 2-1, 图 3-1)，中间是一层类似 reichert 氏膜的基膜结构(图 3-1, 3-2)，基膜内部的细胞体积较小，排列紧密(图 2-1)，与未分化的胚胎干细胞形态相似。简单拟胚体在随后的培养过程中，内部细胞开始分化，在靠近基膜的一侧，首先形成一层到多层排列的柱状上皮样细胞(图 2-2)，有些上皮细胞层向内部卷曲、聚集，形成一些致密细胞团或小管腔结构(图 2-3、2-4)，随着培养时间的延长，细胞团内部细胞出现解体现象，拟胚体中央出现大的空腔，形成囊状拟胚体(图 2-5, 图 3-4)。囊状拟胚体为成熟的拟胚体，外周细胞体积较大，排列较疏松，表面有大量微绒毛，细胞质内有很多分泌泡样结构(图 3-3)。

### 2.3 拟胚体的分化潜能

拟胚体在培养过程中，部分从第 3 天开始就会自发分化出心肌细胞，从而出现节律性搏动，搏动频率可以达到每分钟 65~130 次，13 天后统计约有 57% 的拟胚体出现搏动，显微形态观察发现，拟胚体中搏动部位出现了典型的肌纤维样形态(图 4-1)，

免疫组化分析显示其  $\alpha$  肌动蛋白呈阳性(图 4-2)。拟胚体经 RA 诱导后，从第 8 天开始分化出现神经样细胞，这些细胞能从拟胚体中游离出来，贴壁伸展(图 5-1、5-2)，免疫组化分析显示其 Nestin 反应呈阳性。拟胚体用 NaB 诱导 4 天，再换用正常培养液培养 8 天，直接或分散成单个细胞后进行 ICG 和 PAS 反应检测，结果显示拟胚体及周缘游离出来的细胞可以被 ICG 染成绿色，PAS 反应呈阳性，说明拟胚体中的部分细胞已分化为肝样细胞(图 6-1、6-2)。

## 3 讨论

目前，有关拟胚体的制作大多数学者采用悬滴(hanging drops)培养法，此外，还有半固体培养(semisolid culture)和反应器培养(bioreactor culture)等方法<sup>[8,9]</sup>。悬滴法是将含一定数量 ES 细胞的微滴倒悬于培养皿中，依靠重力作用使干细胞聚集成团，自发分化形成简单拟胚体，然后转入非黏附性培养皿中继续培养，得到囊状拟胚体，该方法得到的拟胚体虽然形态和分化状态较均一，但存在操作较繁琐、易污染、悬滴微环境易受外界因素影响而使实

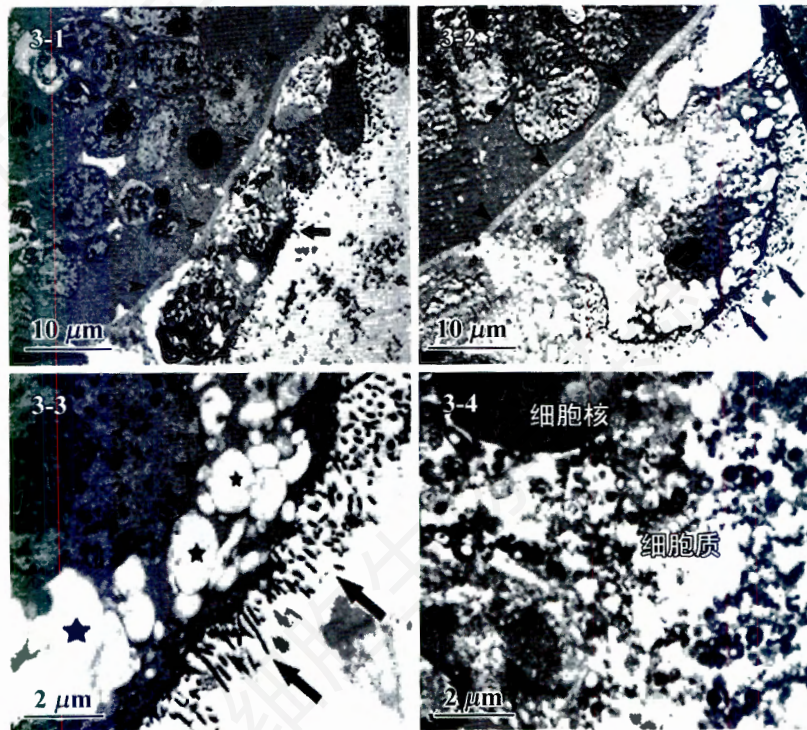


图 3 电镜下观察的拟胚体亚显微结构

(3-1) 拟胚体中不同类型的细胞观察， $\uparrow$  所示为外层上皮样细胞，内部为致密细胞团， $\blacktriangle$  所示为基膜结构；(3-2) 拟胚体外层上皮样细胞和基膜结构观察， $\uparrow$  所示为外层上皮样细胞表面的微绒毛结构， $\blacktriangle$  所示为基膜结构；(3-3) 上皮样细胞结构观察， $\uparrow$  所示为微绒毛结构， $\star$  所示为细胞质内的分泌泡样结构；(3-4) 发育后期拟胚体内部细胞解体，形成空腔。



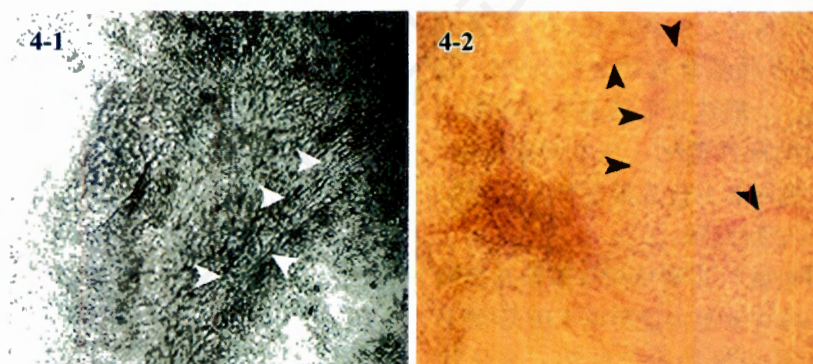


图4 拟胚体自发分化形成心肌样细胞

(4-1) 拟胚体中搏动部位出现的典型的肌纤维样形态(箭头所示), 200 ×; (4-2) 免疫组化检测, 拟胚体中着色为红色的部分显示 α 肌动蛋白阳性, 箭头所示为肌纤维样形态, 100 ×。

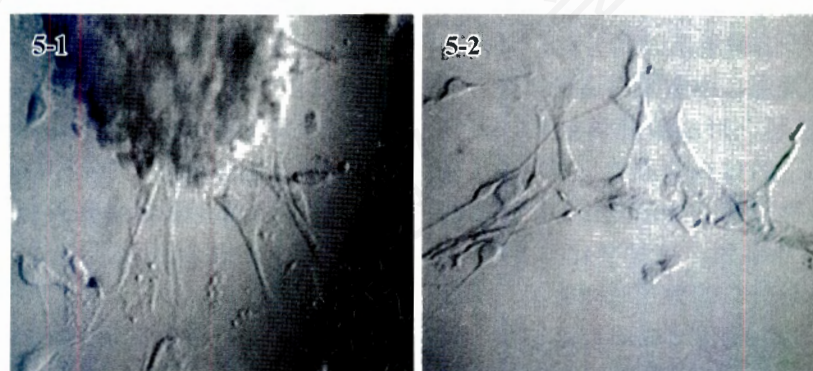


图5 拟胚体自发分化形成神经样细胞

(5-1) 拟胚体经 RA 诱导后, 分化出现神经样细胞, 200 ×; (5-2) 神经样细胞能从拟胚体中游离出来, 贴壁伸展, 100 ×。

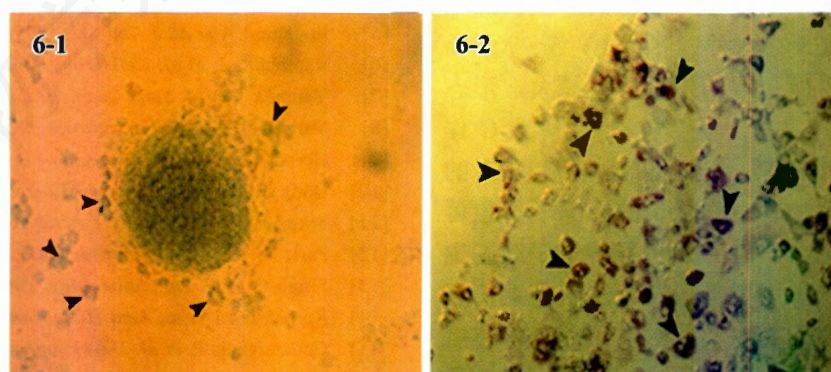


图6 拟胚体经 NaB 诱导后分化形成肝样细胞(100 ×)

(6-1) ICG 染色, 箭头所示为染色阳性的细胞; (6-2) PAS 反应呈阳性, 图中箭头所示为阳性细胞。

验结果不稳定等问题; 半固体培养和反应器培养法, 则分别采用甲基纤维素、琼脂糖等作为基质, 在特定的反应器内进行培养, 这些方法得到的拟胚体形态和分化状态不均一, 实际应用并不广泛<sup>[1,9-11]</sup>。与上述传统方法不同的是, 本实验所建立的基于 STO 饲养层的拟胚体形成方法起始于干细胞

的贴壁培养, 从干细胞的接种培养到拟胚体的形成一步完成, 特别是拟胚体的形成量大, 操作简便, 实验体系和结果稳定, 重复性好, 得到的拟胚体 70% 左右可以发展为成熟的囊状拟胚体, 少数为简单拟胚体, 各个发育阶段的拟胚体都会存在, 因此为研究拟胚体的发育过程和诱导分化提供了有利的

条件,无论在操作的简易性、实验的稳定性还是拟胚体的产量和质量等方面都具有明显的优势。此外,在以前的研究中,一般认为干细胞只有在悬浮状态下才能分化成为拟胚体结构,但本实验表明,干细胞在贴壁状态下也可以分化为拟胚体,这是拟胚体形成方式上的一个新发现。

STO细胞是一种抗硫代鸟嘌呤和乌本苷的SIM小鼠成纤维细胞系,这种细胞因能分泌LIF等因子而常被用作饲养层以维持胚胎干细胞的未分化状态,并促进其增殖<sup>[12]</sup>。我们在实验中发现,当ES接入STO饲养层的早期(3天内),ES能迅速增殖并维持其未分化的形态特征,表明STO饲养层发挥了促进干细胞增殖并抑制分化的功能,但随着培养时间的延长(5天后),干细胞集落开始分化,其致密度逐渐降低,立体感增强,细胞团内逐渐出现分层现象,最终脱离饲养层,形成拟胚体结构,表明在培养后期(5~8天),STO饲养层的作用发生了变化,由原来促细胞增殖和抑制分化转变为促进拟胚体的形成。实验中还观察到,这种变化与STO饲养层制备过程中丝裂霉素C的处理时间有关,若按常规方法处理2h,则拟胚体形成的数量很少,形成的时间推迟3天左右(8~10天出现),而且拟胚体直径小,形态不典型。如果将处理时间延长至4h,虽然这种“过度处理”的细胞在消化后重新贴壁的过程中会有部分不贴壁,但贴壁的细胞仍然可以存活10天以上。ES在这种饲养层上,5~7天即可形成拟胚体,而且所形成的拟胚体直径大,形态典型,结构丰富。有文献认为<sup>[13]</sup>,丝裂霉素C作为饲养层处理的常用试剂,一般只抑制细胞DNA的复制,但在高浓度和处理时间延长的情况下,也可抑制蛋白质的合成。由于STO饲养层促进干细胞生长和维持其未分化状态主要是通过分泌某些生长因子和分泌型或膜结合型LIF实现的,因此,培养后期STO饲养层所发生的促进拟胚体形成的变化是否

与LIF等的表达下降有关还需要作深入的研究。实验中还尝试用其他饲养层细胞如MEF来进行拟胚体的诱导,结果在各种条件下都未获得成功,提示STO细胞可能存在某种区别于其他饲养层细胞的特殊机制来促进拟胚体的形成。

为了研究拟胚体的发育过程,我们对各发育阶段的拟胚体进行了光镜和电镜切片观察,结果显示,所制备的拟胚体在原始内胚层、柱状上皮、基膜、腺上皮样的外胚层结构以及空腔形成等方面均与已报道的拟胚体相一致<sup>[8,14,15]</sup>,从均一细胞组成的简单拟胚体到胚层分化完整的囊状拟胚体,其形态特征和发育过程基本重演了体内桑椹胚到原肠胚的发育过程,其分化过程也基本重演了胚胎发育中胚层相互诱导的现象<sup>[16]</sup>,因此,以拟胚体作为胚胎发育早期的体外研究模型是可行的。此外,分化潜能研究结果表明,拟胚体具有分化为神经细胞、心肌细胞和肝脏细胞等三胚层来源细胞的能力,因此,本实验所制备的拟胚体还可以作为各胚层来源细胞分化研究的有力工具。

#### 参考文献 (References)

- [1] Doetschman TC *et al.* *J Embryol Exp Morphol*, 1985, **87**: 27
- [2] Desbaillets I *et al.* *Exp Physiol*, 2000, **85**: 645
- [3] Turksen K. *Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols*, New Jersey: Humana Press, 2002, 3
- [4] Evans MJ *et al.* *Nature*, 1981, **292**: 154
- [5] Fraichard A *et al.* *J Cell Sci*, 1995, **108**: 3181
- [6] Rambhatla L *et al.* *Cell Transplant*, 2003, **12**: 1
- [7] Yamada T *et al.* *Stem Cells*, 2002, **20**: 146
- [8] Murray P *et al.* *Differentiation*, 2001, **68**: 227
- [9] Gerecht-Nir S *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 2004, **86**: 493
- [10] Dang SM *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 2002, **78**: 442
- [11] Magyar JP *et al.* *Ann N Y Acad Sci*, 2001, **944**: 135
- [12] Park JH *et al.* *Biol Reprod*, 2003, **69**: 2007
- [13] Singh G *et al.* *Ophthalmology*, 1988, **95**: 813
- [14] Karbanova J *et al.* *Acta Histochem*, 2002, **104**: 361
- [15] Coucouvanis E *et al.* *Development*, 1999, **126**: 535
- [16] Leahy A *et al.* *J Exp Zool*, 1999, **284**: 67

## A Novel Method to form Embryoid Bodies Using STO Cells as Feeder Layers

Ruo-Zhen Hu, Qing-Jun Zhou, Jian-Zhong Shao\*, Li-Xin Xiang, Ming Zhang, Nian-Ci Zhang

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Yong-Liang Lu, Xing Yao, Li-Cheng Dai

(Huzhou Central Hospital, Huzhou 313100, China)

**Abstract** Embryoid bodies, which are similar to post-implantation embryonic tissues, provide a model for the study of embryo development and stem cell differentiation. We describe here a novel method to form embryoid bodies using STO cells as feeder layers. When approx 80% confluent, STO cells are treated with mitomycin C (10  $\mu\text{g/ml}$  in DMEM) for 4 h and cultured in the concentration of  $8 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$  for another 12 h before use. Embryonic stem cells are suspended in the ES medium consisting of mLIF and seeded on the previously prepared inactivated STO feeder layers in the concentration of  $1 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ . After 24 h, replace the medium with ES medium without mLIF. Various embryoid bodies are formed after 5–9 days. Studies of the morphology and differentiating potential of these embryoid bodies suggest that they are typical in structure and they can generate derivatives of all three embryonic germ layers. Compared with the traditional embryoid body forming method such as the hanging drops culture, our method has a prominent advantage of performing conveniently. Moreover, the efficiency of embryoid body formation is greater than traditional methods. Thus, this new method of forming embryoid bodies provides an appropriate tool for the study of mammal embryo development and embryonic stem cell differentiation.

**Key words** embryonic stem cell; STO feeder layers; embryoid body formation; morphology; differentiating potential

Received: July 29, 2004      Accepted: September 18, 2004

This work is supported by the Key Science and Technology Foundation of Zhejiang Province during the 10th Five-Year Plan Period (No. J20020579-30116)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-88273287, Fax: 86-571-88273287, E-mail: shaojz@zju.edu.cn