

人、大鼠和猪诱导多能干细胞染色体制备方法的建立和关键影响因素的分析

李辉* 李巧 左振宇 周赞 崔春¹ 肖磊^{1*}

(湘潭市中心医院生殖中心, 湘潭 411100; ¹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, 上海 200031)

摘要 随着诱导多能干细胞技术的建立和发展, 不同物种的诱导多能干细胞被相继报道。诱导多能干细胞的核型鉴定方法对于日常监控染色体突变显得日益重要。本文建立了人、大鼠和猪诱导多能干细胞的核型鉴定方法, 同时分析了秋水仙素浓度、作用时间和低渗处理时间三个关键因素对诱导多能干细胞染色体核型分析成功的影响。结果显示低渗时间和秋水仙素的浓度不是核型分析成功的决定因素, 关键因素是秋水仙素的作用时间, 不同物种的诱导多能干细胞需要不同的处理时间。这为进一步建立其它新物种的诱导多能干细胞核型分析方法打下了基础。

关键词 诱导多能干细胞; 核型分析; 染色体

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES cell)是一种可以自我更新并能分化成不同种类细胞的细胞, 具有自我更新、多向分化潜能, 在特定的条件下, 可以分化成不同的功能细胞, 形成多种组织和器官^[1,2]。1981年鼠胚胎干细胞在体外成功建系后^[3], 学者们开始探索其它物种的胚胎干细胞体外建系的方法。1998年Thomson等^[4]在继1995年建立了非人类灵长类胚胎干细胞系后, 率先成功地建立了人胚胎干细胞系。大鼠的胚胎干细胞系的建立也于最近取得成功^[5]。

胚胎干细胞可广泛应用于医学和生物工程的许多领域, 如克隆动物制作、转基因动物生产、动物医学模型建立、真核细胞基因表达与调控的研究、细胞分化机制的探索以及细胞、组织和器官的修复与移植等领域^[6-8]。以上各个研究领域的前提和工作基础是建立和维持具有多方向分化潜能和正常二倍体核型的胚胎干细胞系。2001年, 美国国立卫生院(NIH)在干细胞科学研究总结报告中明确了胚胎干细胞的统一标准: (1)来源于胚泡或囊胚内细胞团/上胚层; (2)能无限增殖并保持未分化状态(保持完整的、正常的染色体核型); (3)可分化为来源于三个胚层的各种细胞; (4)可与发育期中各种胚胎组织整合(形成嵌合体动物); (5)单一的胚胎干细胞可产生具有相同的遗传特性的细胞(克隆); (6)可分化为卵子和精子; (7)表达转录因子*Oct4*以保持其增殖未分化状态, 可被诱导继续增殖或进入分化; (8)细胞周期中缺少G₁

限制点(checkpoint), 大部分时间处于S期, 不需要任何外界刺激来启动DNA复制; (9)不存在X染色体失活。

因为保持稳定正常的染色体核型是胚胎干细胞的重要特征之一, 所以胚胎干细胞的核型鉴定是干细胞生物学特征中的重要一环。然而, 正常核型的胚胎干细胞系在传代培养过程中也会发生核型改变, 譬如体外培养过程中的温度变化、酶的作用、血清更换、饲养层改变、分化抑制因子的使用与否、传代操作以及冻存复苏等不稳定的环境因素和未知因素都会造成染色体变异和基因突变^[9-13]。在这些因素的作用下, 传代培养的胚胎干细胞不断进行着生存选择, 这就导致正常核型的胚胎干细胞系发生染色体的突变。从第一株胚胎干细胞建系开始, 就不断有报道发现所建立的细胞系中存在染色体异常突变。Rebuzzini等^[11,12]在UPV02、UPV06和UPV08三个鼠胚胎干细胞系的培养中发现染色体异常随着传代的进行有累计的现象, 其中又以等臂染色体异常最为常见。Cowan等^[9]建立的17个胚胎干细胞系中, HUES3和HUES4存在12号染色体三体核型嵌合现象, HUES1存在2号染色体异常核型。Seol等^[10]发现在人胚胎干细胞系培养中最常出现的是12、17号和X染色体的三体异常。这些染色体的突变现象在鼠胚

收稿日期: 2009-03-10 接受日期: 2009-05-18

* 通讯作者。李辉: Tel: 0732-8214797, E-mail: lihui_1973@yahoo.com.cn; 肖磊: Tel: 021-54921386, E-mail: leixiao@sibs.ac.cn

胎干细胞的培养中也常有发现。Baker等^[14]在2007年发现,人类胚胎干细胞的12、17号和X染色体上发生的异常与乳腺癌和睾丸生殖细胞肿瘤的染色体异常相似,这表明这些染色体的特定区域可能含有对于细胞增殖起关键调控作用的基因。而某些抗细胞凋亡的基因,如*BIRC5*;多能性相关基因,如*NANOG*、*DPPA3*和*GDF3*;以及其他的一些肿瘤相关基因,如*TGCT1*、*KRAS*和*SOX5*,也都位于12、17号和X染色体上^[14]。目前有诸多因素将人类胚胎干细胞常发生的染色体异常与肿瘤发生联系起来。尤其对于人类染色体而言,无论是常染色体,还是性染色体,它们都携带着上千个基因,染色体数目异常或微小的结构异常都将引起许多基因的增加或缺失,如果将这种染色体异常的细胞应用于临床,会产生多种畸形或异常的综合征以及肿瘤的可能。因此,人类胚胎干细胞体外长期传代后带来的安全性问题已经引起了人们广泛的关注,这就使胚胎干细胞在体外培养传代过程中保持染色体核型的正常显得尤为必要。

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS cell)具有与胚胎干细胞类似的特点。伴随着不同物种诱导多能干细胞的诞生^[15-19],对不同物种来源的诱导多能干细胞进行准确的核型分析以判定其是否核型正常、是否与来源的亲代细胞同源、是否有其它物种的干细胞污染,都是非常必要和重要的。

为了实现这些目的,需要摸索适合不同物种诱导多能干细胞的制备染色体样本的方法,以提供稳定准确、高质控的核型分析技术支持。

本研究中我们对人、大鼠和猪的诱导多能干细胞进行了核型分析的研究,探讨决定诱导多能干细胞染色体核型分析成功的关键因素,为不同物种的诱导多能干细胞核型分析工作提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

实验中的诱导多能干细胞由本实验室通过对人、大鼠和猪的体细胞进行诱导得到^[17,18]。双目光学显微镜(Nikon, YS100)、台式多管低速离心机(TDZ5-WS,长沙平凡仪器仪表有限公司)、光学显微镜(Olympus, BX251)。

1.2 方法

1.2.1 制片步骤 本实验中我们确定秋水仙素浓度、作用时间和低渗处理时间三个因素为实验对

象。(1)取传代后第3~4天、增殖指数期的细胞,更换新鲜培养液。分别加入20 $\mu\text{g/ml}$ 秋水仙素75、125、200 μl ,培养液总体积5 ml;(2)秋水仙素作用时间分别为2、3、4 h;(3)吸去含秋水仙素的培养液,加入0.05%胰蛋白酶消化3~5 min,最后加入5 ml生理盐水吹打收集细胞;(4)低渗处理:细胞悬液以1 500 r/min离心10 min,沉淀加入8 ml低渗液(0.075 mol/L KCl),吸管吹打混匀后,置37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴3 min。首先低渗时间全部采用3 min,检测出诱导多能干细胞收获的秋水仙素浓度和作用时间,然后分别采用3、5、8、20 min,观察低渗时间对实验的影响;(5)加入固定液(甲醇:乙酸为3:1)1 ml,轻轻吹打混匀后,以1 500 r/min离心10 min,弃上清液,沉淀加入8 ml固定液,轻轻吹打混匀,离心,重复固定1次;(6)弃上清液,沉淀加入0.05~0.1 ml固定液悬浮。将细胞悬液滴至浸在0 $^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水中的干净玻片,室温下晾干,72 $^{\circ}\text{C}$ 烤片2~4 h。

1.2.2 G带染色步骤 (1)0.025%胰蛋白酶(用1/15 mol/L PBS缓冲液配制)在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中预热30 min;(2)将在37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中预处理过2~3 h的标本分片浸入胰蛋白酶液中,处理30~75 s;(3)经混合液处理过的标本在磷酸盐缓冲液(pH 6.8)中漂洗约15 s;(4)立即用1:10 Giemsa染液染色30~40 min;(5)自来水细流冲洗数秒,空气干燥。

1.2.3 双目光学显微镜镜检 在低倍镜下观察中期分裂相细胞。选取一定数量处于中期分裂相的染色体分散好的细胞(通常选50个细胞),计算染色体的数目,以确定其细胞2N的染色体数目。在油镜下观察分析3个分裂相,确定染色体区带是否正常。

2 结果

2.1 人、大鼠和猪的诱导多能干细胞染色体核型分析结果

根据50个分裂好的中期相的观察和3个细胞染色体的分析,结果显示人诱导多能干细胞二倍体染色体的数目为2N=46,XX雌,XY雄(图1)。大鼠诱导多能干细胞染色体二倍体染色体数目为2N=42,XX雌,XY雄。正常大鼠核型2N=42,多为顶端着丝粒染色体。G显带与标准大鼠组型相比吻合性好^[17](图2)。猪诱导多能干细胞染色体二倍体染色体数目为2N=38,XX雌,XY雄(图3)。人、大鼠和猪诱导多能干细胞染色体核型采用Leica CW4000 karyo软件排序分析,结果表明染色体都正常。

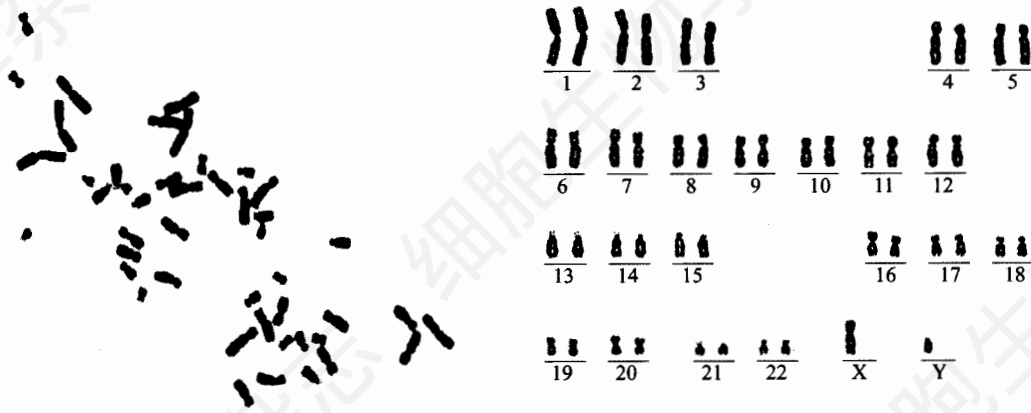


Fig.1 G-banded karyotypes of human iPS cell (normal) (2N=46, XY)

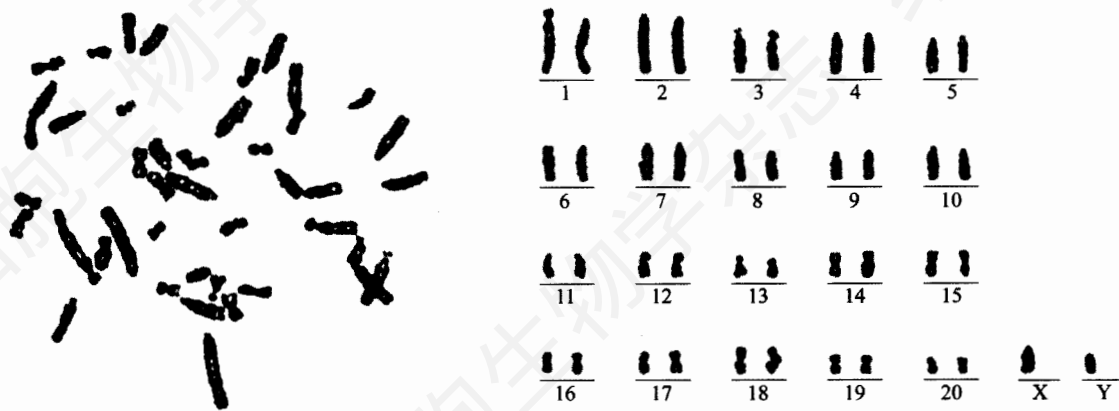


Fig.2 G-banded karyotypes of rat iPS cell (normal) (2N=42, XY)

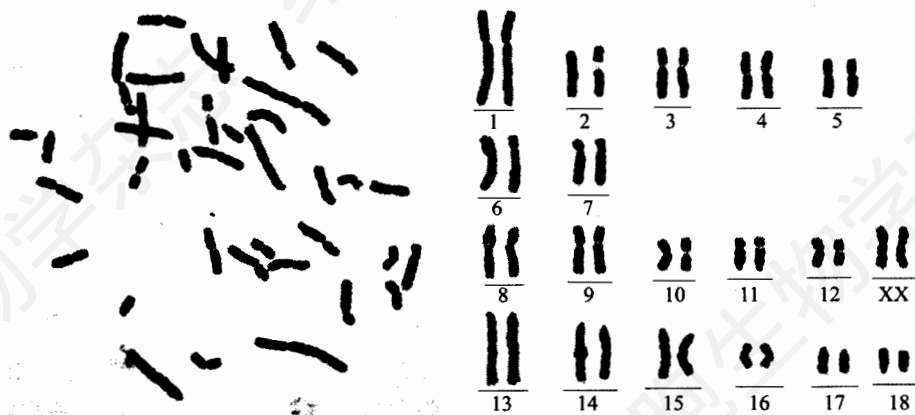


Fig.3 G-banded karyotypes of pig iPS cell (normal) (2N=38, XX)

2.2 不同的秋水仙素浓度和作用时间比较

参照人诱导多能干细胞的低渗作用时间处理,对三个物种的诱导多能干细胞系首先采用的固定低渗作用时间为 3 min, 分别加入秋水仙素 75、125、200 μl , 同时作用时间分为 2、3、4 h 来处理。结果显示, 秋水仙素的浓度对核型分析成败没有大的影响, 只

是使用 75 μl 的情况下, 染色体的长度较长; 秋水仙素的作用时间决定核型分析的成败: 人诱导多能干细胞需要作用 4 h, 大鼠诱导多能干细胞作用 2 h, 而猪的诱导多能干细胞需作用 3 h (表 1)。秋水仙素作用时间缩短将导致诱导干细胞没有分裂相, 而秋水仙素作用时间延长将使染色体成团, 无法进行核型分

Table 1 The effect of colchicine concentration and colchicine action time to karyotype analysis

	Colchicine 2 h			Colchicine 3 h			Colchicine 4 h		
	75 μ l	125 μ l	200 μ l	75 μ l	125 μ l	200 μ l	75 μ l	125 μ l	200 μ l
Human iPS cell	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Rat iPS cell	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Pig iPS cell	-	-	-	+	+	+	-	-	-

+: positive results; -: negative results.

Table 2 The effect of hypotension time to karyotype analysis

	Hypotension time			
	3 min	5 min	8 min	20 min
Human iPS cell	+	++	+	-
Rat iPS cell	+	++	+	-
Pig iPS cell	+	++	+	-

++: perfect results; +: normal results; -: negative results.

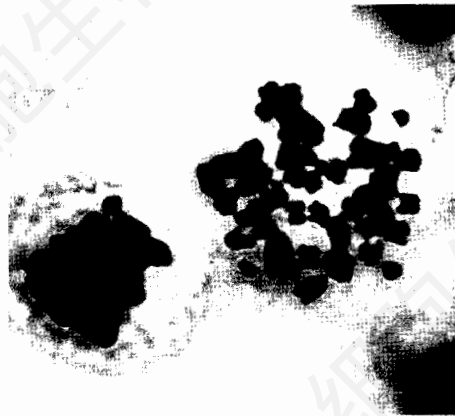


Fig.4 Colchicine action time changes the length and status of chromosome

析(图4)。

2.3 低渗时间对核型分析的影响

本实验根据人诱导多能干细胞低渗处理时间,采用3、5、8、20 min来实验各物种的最佳低渗时间。20 min低渗时间对人、大鼠和猪的诱导多能干细胞来说都超出细胞耐受的时间,无法获得分裂相;3、5、8 min都可以收获好的分裂相,且采用5 min获得的分裂相最佳(表2)。

3 讨论

在染色体核型制备试验中有几个关键的技术和因素影响着实验结果的质量:(1)秋水仙素的作用:核型分析和鉴定通常在细胞的有丝分裂中期进行,秋水仙素能抑制纺锤体的形成,使分裂的细胞停留在细胞中期,在短时间内积累大量的中期分裂相;秋水仙素还可以使染色体收缩和分开,形成清晰的轮廓;(2)低

渗处理的影响:低渗处理可使细胞膨胀,染色体分散便于观察;(3)染色体的显带技术是将染色体进行特别的染料染色,可以使染色体呈现深浅不一的条带。利用显带技术产生的带型可以明确识别每条染色体,并且可以识别每一染色体的不同节段,这样就可以对染色体缺失、倒位、易位等小的结构异常进行准确的识别。

制备好的染色体样本是进行核型鉴定的基础,染色体过于短小或者分散不开将导致该核型无法分析。本研究中,我们针对秋水仙素的浓度、作用时间和低渗处理三个因素来探讨不同物种的诱导多能干细胞染色体核型制备中的关键影响因素,最终得出在这几个因素中,秋水仙素作用时间是影响不同物种间诱导多能干细胞核型分析成功的关键。

在细胞耐受的时间范围之内(20 min),我们发现低渗时间的长短并不决定实验成功与否;秋水仙素的浓度也不影响实验的成败,它仅仅使染色体的长度有一定的差别;对不同物种的诱导多能干细胞来说,决定染色体样本质量的关键是秋水仙素的作用时间,相差1 h将直接导致实验的失败,这是由不同物种诱导多能干细胞的不同传代时间所决定的。我们发现人诱导多能干细胞秋水仙素作用4 h、大鼠诱导多能干细胞2 h、猪诱导多能干细胞3 h可以得到很好的染色体核型图。

诱导多能干细胞染色体核型鉴定实验中的影响因素仍有很多,要想获得好的核型和稳定的成功率,需要在实验的各个环节加以注意。根据本文的探讨,我们认为不同物种诱导多能干细胞染色体制备中除要注意秋水仙素浓度、胰酶作用时间、低渗处理时间、烤片时间等因素外,还要重点掌握秋水仙素的作用时间,要根据不同细胞的传代时间进行调整以达到成功的核型分析。

参考文献(References)

- [1] Schratzenholz A, Klemm M. Neuronal cell culture from human embryonic stem cells as *in vitro* model for neuroprotection, *Altex*, 2007, 24(1): 9-15

- [2] Whitlow S, Burgin H, Clemann N. The embryonic stem cell test for the early selection of pharmaceutical compounds, *Altex*, 2007, 24(1): 3-7
- [3] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156
- [4] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 1998, 282(5391): 1145-1147
- [5] Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts, *Cell*, 2008, 135(7): 1299-1310
- [6] Thomson JA, Odorico JS. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines, *Trends Biotechnol*, 2000, 18(2): 53-57
- [7] Vogel G. Harnessing the power of stem cells, *Science*, 1999, 283(5407): 1432-1434
- [8] Marshall E. A versatile cell line raises scientific hopes, legal questions, *Science*, 1998, 282(5391): 1014-1015
- [9] Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, *et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts, *N Engl J Med*, 2004, 350(13): 1353-1356
- [10] Seol HW, Oh SK, Park YB, *et al.* Separation and maintenance of normal cells from human embryonic stem cells with trisomy 12 mosaicism, *Chromosome Res*, 2008, 16(8): 1075-1084
- [11] Rebuzzini P, Neri T, Mazzini G, *et al.* Karyotype analysis of the euploid cell population of a mouse embryonic stem cell line revealed a high incidence of chromosome abnormalities that varied during culture, *Cytogenet Genome Res*, 2008, 121(1): 18-24
- [12] Rebuzzini P, Neri T, Zuccotti M, *et al.* Chromosome number variation in three mouse embryonic stem cell lines during culture, *Cytotechnology*, 2008, 58(1): 17-23
- [13] Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells, *Stem cells*, 2006, 24(6): 1476-1486
- [14] Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, *et al.* Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*, *Nat Biotechnol*, 2007, 25(2): 207-215
- [15] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 2006, 126(4): 663-676
- [16] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, 2007, 131(5): 861-872
- [17] Liao J, Cui C, Chen S, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells, *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 11-15
- [18] Liao J, Wu Z, Wang Y, *et al.* Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors, *Cell Res*, 2008, 18(5): 600-603
- [19] Liu H, Zhu F, Yong J, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts, *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 587-590

Analysis of Key Factors in the Karyotyping of iPS Cells from Human, Rat and Pig

Hui Li*, Qiao Li, Zhen-Yu Zuo, Zan Zhou, Chun Cui¹, Lei Xiao^{1*}

(Reproductive Center, Xiangtan Central Hospital, Xiangtan 411100, China; ¹Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract After the establishment and development of induced pluripotent stem cell (iPS cell) technique, the iPS cells from various species have been reported. To monitor the mutation of chromosomes in iPS cells, the karyotype analysis became more and more important. We established the protocol to do karyotyping for human, pig and rat iPS cells. We also investigated the factors involved in the quality of the karyotyping including colchicine concentration, duration of colchicine treatment and duration of hypotension. We demonstrated that the key factor in this method is duration of colchicine treatment. Our report should facilitate the establishment and studies of iPS cells of new species.

Key words induced pluripotent stem cell; karyotype analysis; chromosome

Received: March 10, 2009 Accepted: May 18, 2009

*Corresponding author. Hui Li: Tel: 86-732-8214797, E-mail: lihui_1973@yahoo.com.cn; Lei Xiao: Tel: 86-21-54921386, E-mail: leixiao@sibs.ac.cn