

小鼠 p α MHC-EGFP 胚胎干细胞株的构建

于艳秋* 任海琴¹ 张海鹏

(中国医科大学病理生理教研室, 沈阳 110001; ¹沈阳市生殖医学技术研究中心, 沈阳 110005)

摘要 应用电穿孔方法将含有 α 肌球蛋白重链启动子的 p α MHC-EGFP 载体转染到 D₃ 系小鼠胚胎干细胞, 应用 200 μ g/ml 新霉素进行药物选择。采用悬浮培养法, 体外诱导分化心肌细胞。荧光显微镜下, 观察到第 7 天和第 8 天拟胚体中出现“跳动”的心肌细胞并同时有绿色荧光蛋白的表达。同时与 D₃ 系小鼠胚胎干细胞比较心肌细胞分化率的变化无显著差异 ($P>0.05$)。该细胞株在分化心肌细胞的同时, 具有绿色荧光蛋白的标记, 因而利于对心肌细胞的识别和纯化。

关键词 胚胎干细胞; 心肌细胞分化; 转基因

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)是指来自胚胎囊胚的内细胞团(inner cell mass, ICM)的细胞, 具有发育的全能性^[1], 在体外可以分化为机体的各种细胞。因而, ESC 可以作为细胞治疗和生物工程等的种子细胞。但是, 如何识别分化的细胞, 并将其从培养的细胞群中分离出来, 从而获得高纯度的分化细胞一直是胚胎干细胞研究中尚未解决的关键问题。我们应用转基因技术, 将含有心肌细胞的特征性基因 α 肌球蛋白重链(α myosin heavy chain, α MHC)启动子调控的增强型绿色荧光蛋白(enhance green fluorescence protein, EGFP)载体转染给 D₃ 系小鼠胚胎干细胞, 从而对分化的心肌细胞进行了标记, 使其易于被识别和分离。

1 材料与方法

1.1 载体制备

含有 α MHC 启动子的 p α MHC-EGFP 载体由 Dr. E.Kolossov 提供^[2], 该载体中的 α MHC 启动子片段为 5.5 kb, 含有外显子 1、外显子 2(非转录)、部分外显子 3' 以及 5' 端上游调控元件和邻近 β -MHC 基因的 3' 端未翻译区。应用 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切该启动子片段, 钝化后克隆入 pEGFP-1 载体的 *Sma*I 位点上(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA), 构建 p α MHC-EGFP 载体(图 1)。

1.2 胚胎干细胞

选用 D₃ 系小鼠胚胎干细胞(D₃ line embryonic stem cells, ES-D₃), 该细胞来源于 129 小鼠品系 4 天囊胚内细胞层, 具有多向分化的潜能。复苏后以 1×10^6 个/ml 接种于铺有饲养细胞的培养皿中, 培养液为含有 0.1 mmol/L 非必需氨基酸, 2 mmol/L 谷

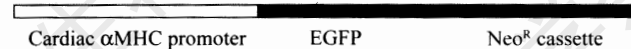


图 1 p α MHC-EGFP 载体结构的模式图^[2]

氨酰胺, 50 μ g/ml 青霉素, 50 μ g/ml 链霉素, 0.1 mmol/L β - 巯基乙醇, 500 u/ml 白血病抑制因子(ESGROTM), 15% 胎牛血清的 DMEM(Invitrogen) 培养液。细胞置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中。当细胞沿培养皿底部生长面积达 80%~90% 时传代, 传代 3 次后用于载体转染。

1.3 载体转染

载体 p α MHC-EGFP 在转染细胞前应用 *Hind*III 酶切线性化, 取 40 μ g 线性化载体冰浴。同时, 准备 10^7 个 ES-D₃ 细胞, 悬浮于 PBS 液中, 并加入载体, 冰浴 25 min, 应用电穿孔仪(Thermo, USA)将载体 p α MHC-EGFP 转染到 ES-D₃ 细胞。

1.4 p α MHC-EGFP 转染细胞克隆的药物选择

载体转染后, 应用上述 15%DMEM 培养液培养, 48 h 后在培养液中加入 200 μ g/ml 新霉素(Sigma), 隔天换液, 加入新霉素的第 2 天, 可见死亡细胞漂浮在培养液中, 药物选择第 5 天出现大量死亡细胞, 并在培养皿底部开始形成细胞克隆, 药物选择第 12 天, 肉眼可见形成的细胞克隆, 在显微镜下收集细胞克隆。

1.5 p α MHC-EGFP 细胞克隆的鉴定

1.5.1 细胞克隆增殖培养 应用上述的 15%DMEM 培养液, 对收集的细胞克隆扩增培养, 隔天换液, 传代 3 次后, 用于分化培养。

收稿日期: 2004-12-02 接受日期: 2005-03-01

* 通讯作者。Tel: 86-24-23256666-5362, Fax: 86-24-23262634, E-mail: yyqyang@yahoo.com.cn

1.5.2 体外诱导分化培养 采用悬浮法, 体外形成拟胚体(embryonic body, EB)。①悬滴培养 取对数生长期的细胞, 经胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞后, 制成 2.5×10^4 个/ml 细胞悬液, 分化培养液为含 0.1 mmol/L 非必需氨基酸, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 0.1 mmol/L β - 巯基乙醇, 20% 胎牛血清的 IMDM(Invitrogen)。细胞悬液以每滴 20 μ l 接种于直径 10 cm 的培养皿盖上, 培养皿中放 10 ml 无菌 PBS, 盖上培养皿盖, 置于 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培养箱中。②悬浮培养 2 天后, 从单个悬滴中吸出形成的 EB, 转入 10 cm 培养皿中悬浮培养, 隔天换液。③贴壁培养 悬浮培养 5 天后, 将这些 7 天的 EB 转移至预先以 0.1% 明胶涂抹的 24 孔细胞培养板中, 每孔 5~7 个 EB。约在 7 天或 8 天 EB 中可出现“跳动”的心肌细胞。

1.5.3 荧光显微镜观察 在细胞分化过程中应用荧光显微镜观察, 以绿色荧光蛋白在“跳动”的细胞中的表达为标准, 确定 p α MHC-EGFP 胚胎干细胞株的建立, 并摄像。

1.6 p α MHC-EGFP 胚胎干细胞向心肌细胞的分化率

取上述确立的 p α MHC-EGFP 胚胎干细胞和 ES-D₃ 细胞, 采用上述的悬浮法分化心肌细胞, 以 EB 中出现跳动的心肌细胞为分化阳性, 并与总的 EB 的

数量相比, 为分化率, 对比 p α MHC-EGFP 转染前后胚胎干细胞向心肌细胞分化率的变化, 所得数值应用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 获得 p α MHC-EGFP 转染胚胎干细胞克隆

电穿孔后, 加入新霉素的第 2 天, 可见死亡细胞出现, 药物选择第 5 天出现大量死亡细胞, 细胞克隆开始形成, 药物选择第 12 天, 肉眼可分辨细胞克隆, 在显微镜下收集细胞克隆(图 2A)。

2.2 p α MHC-EGFP 胚胎干细胞克隆鉴定

在诱导分化培养的第 2 天形成 EB(图 2B), 约在 7 天或 8 天 EB 中可见“跳动”的心肌细胞。荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白在“跳动”的心肌细胞中表达(图 2C、图 2D)。

2.3 p α MHC-EGFP 胚胎干细胞向心肌细胞的分化率变化

EB 在形成的第 7 天或 8 天, 可见“跳动”的心肌细胞, 计数第 10 天 EB 的分化率(表 1)。 χ^2 检验结果显示, $P > 0.05$, 两种胚胎干细胞的心肌细胞分化率的差异无统计学意义。

3 讨论

心血管疾病目前已成为危害人类健康的主要疾

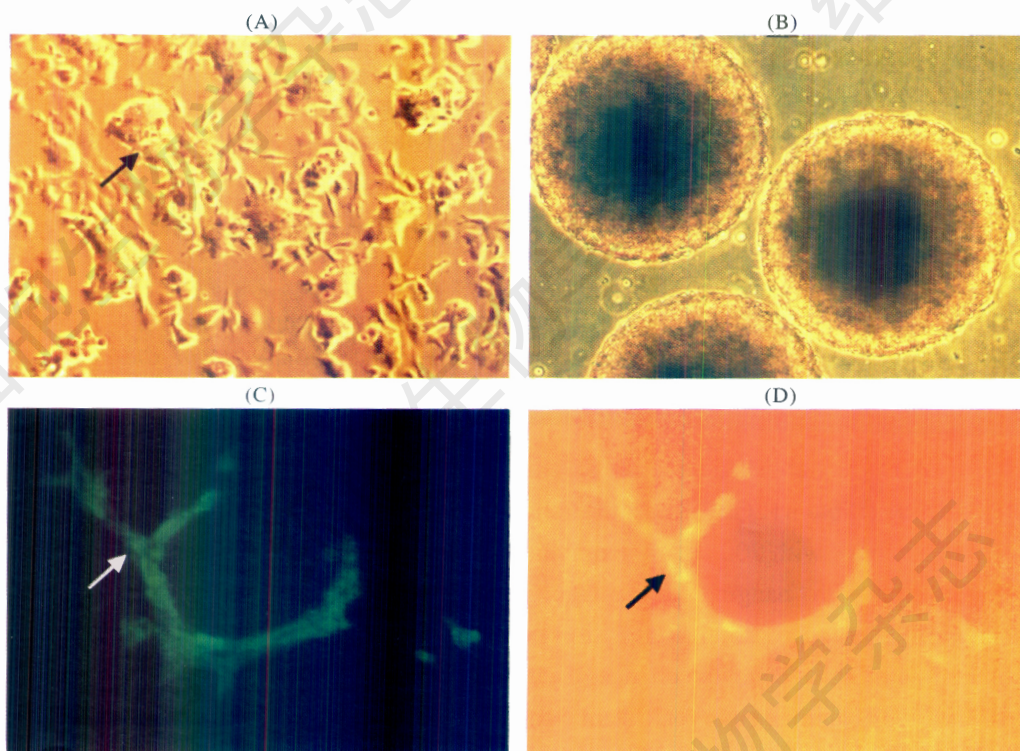


图 2 p α MHC-EGFP 细胞克隆及分化形成的 EB 与心肌细胞($\times 100$)

(A) 箭头所示新霉素选择第 12 天形成的细胞克隆; (B) 第 4 天的 EB; (C)、(D) 箭头所示为“跳动”心肌细胞, C 为荧光, D 为普通透射光。

表1 p α MHC-EGFP转染前后胚胎干细胞向心肌细胞分化率的变化

胚胎干细胞	有“跳动”细胞出现的EB(个)	EB总数(个)	转化率(%)
D ₃ 系小鼠胚胎干细胞	52	148	35.14
p α MHC-EGFP 胚胎干细胞	48	133	36.09

患之一, 随着心血管药物治疗及心脏介入技术的提高, 急性心梗死亡率明显下降, 但心梗后的心功能衰竭的发病率却居高不下, 细胞治疗通过移植心肌细胞, 替代、修复受损心肌组织的生物学功能, 已成为治疗心功能衰竭的一种新的策略^[3,4]。但是, 如果移植的细胞中混有未分化的干细胞, 这些干细胞有可能在移植局部形成畸胎瘤组织^[5]。因此, 如何识别和如何提纯已分化的细胞, 而获得高纯度的心肌细胞, 是细胞治疗安全应用于临床前的一个急需解决的问题。胚胎干细胞的发育全能性, 使其在生命科学的基础研究和临床应用中起着越来越重要的作用。作为种子细胞, 胚胎干细胞体外可以分化为细胞治疗、组织工程、发育生物学、药理学等所需的各种类型的细胞^[6,7]。Kolossoff 等^[8]利用含有人类心肌 α 肌动蛋白为启动子的载体 pCX-EGFP 转染给小鼠胚胎干细胞, 并在体外分化形成了有 EGFP 标记的心肌细胞。这使利用转基因技术, 应用 EGFP 标记分化的细胞成为可能。 α MHC 为心肌细胞的特征性基因, 在胚胎干细胞向心肌分化的早期就开始表达, 因而以 α MHC 为启动子, 构建载体 p α MHC-EGFP 并转染给小鼠 D₃ 胚胎干细胞, 建立 p α MHC-EGFP 胚胎干细胞株, 当该胚胎干细胞向心

肌细胞分化时, 即肌球蛋白合成的同时, 就有荧光蛋白的合成。在我们的实验中, 当 EB 形成的 7 天或 8 天时, 荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白在“跳动”的心肌细胞出现的同时表达, 而没有“跳动”的细胞内未见绿色荧光蛋白的表达。从而可以确定该细胞转入 p α MHC-EGFP 载体, 即 p α MHC-EGFP 胚胎干细胞株建立。同时, 我们观察到 p α MHC-EGFP 载体转染前后对心肌细胞的分化率的影响无统计学意义 ($P > 0.05$), 应用 RT-PCR 方法检测了 p α MHC-EGFP 胚胎干细胞在心肌分化过程中 α MHC 的表达情况, 与 D₃ 系小鼠胚胎干细胞相比较变化无显著差异 ($P > 0.05$, 数据未列出, 另文发表)。由此可见, p α MHC-EGFP 载体的转染对胚胎干细胞 α MHC 的表达和其在体外向心肌细胞的分化率无明显的影响。该细胞株的建立, 使应用该细胞株分化的心肌细胞具有了荧光蛋白的标记, 利于从 EB 中识别和初步分离分化的心肌细胞群, 应用流式细胞仪等方法, 可以进一步纯化心肌细胞, 从而得到纯度较高的、分化的心肌细胞, 应用到细胞治疗, 组织工程, 药物筛选等领域。

参考文献 (References)

- [1] Soonpaa MH *et al.* *Science*, 1994, **264**: 98
- [2] Spitkovsky D *et al.* *FASEB J*, 2004, **18**: 1300
- [3] Marelli D *et al.* *Cell Transplant*, 1992, **1**: 383
- [4] Durocher D *et al.* *Dev Genet*, 1998, **22**: 250
- [5] Ryan HE *et al.* *EMBO J*, 1998, **17**: 3005
- [6] 曾秋棠等. *中国病理生理杂志*, 2001, **17**: 628
- [7] Boheler KR *et al.* *Circ Res*, 2002, **91**: 189
- [8] Kolossoff E *et al.* *J Cell Biol*, 1998, **143**: 2045

Generation of p α MHC-EGFP Murine Embryonic Stem Clones

Yan-Qiu Yu*, Hai-Qin Ren¹, Hai-Peng Zhang

(Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, China;

¹Shenyang Reproductive Medical Technology Research Center, Shenyang 110005, China)

Abstract We have established a murine D₃ embryonic stem cell clone (α MHC-EGFP) with expresses the enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the transcriptional control of the alpha-myosin heavy chain (α MHC) promoter, selected ES clones with 200 μ g/ml neomycin, cardiomyocytes derived from transgenic p α MHC-EGFP embryonic stem (ES) cells with “hanging drop” method *in vitro*. We have confirmed p α MHC-EGFP ES clones by expression of green fluorescence protein (GFP) in seventh day or eighth day under fluorescence microscope. Meantime compared with D₃ ES cells, the change of ratio of cardiomyocytes differentiation is not remarkable ($P > 0.05$). So the p α MHC-EGFP murine embryonic stem clone is of great benefit to identify and purify of cardiomyocytes from undifferentiated ES cells.

Key words embryonic stem cells; cardiomyocytes differentiation; transgenesis

Received: December 2, 2004 Accepted: March 1, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-24-23256666-5362, Fax: 86-24-23262634, E-mail: yyqyang@yahoo.com.cn