

小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞增殖的研究

熊泽宇^{1#} 何文腾^{2#} 陈嘉瑜² 韩之明³ 孙筱放^{1*} 高绍荣^{2*}

(¹广州医科大学附属第三医院, 广东省产科重大疾病重点实验室, 广东普通高校生殖与遗传重点实验室,

广州 510150; ²同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092;

³中国科学院动物研究所, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 孤雄单倍体胚胎干细胞(androgenetic haploid embryonic stem cells, AG-haESCs)是来源于只具有一套精子染色体组的单倍体胚胎。小鼠AG-haESCs在培养中呈现克隆较小、生长缓慢的现象。该研究比较了小鼠AG-haESCs与正常二倍体胚胎干细胞(R1细胞)、二倍化后的AG-haESCs(DAG-haESCs)的生物学特征并探索其中的机制。结果表明, 尽管小鼠AG-haESCs与R1细胞一样成集落样生长、边缘光滑清晰, 但细胞大小与增殖速率均显著小于R1细胞; DAG-haESCs的增殖速率略高于AG-haESCs, 但仍然显著低于R1。更为重要的是, 通过RT-qPCR检测分析表明, AG-haESCs和DAG-haESCs细胞周期调控网络有异常, 因此, 单倍体基因组转录调控的异常是小鼠AG-haESCs增殖缓慢的关键因素, 而不是克隆大小和二倍化。该研究为今后AG-haESCs细胞周期调控方面的进一步研究提供了良好的平台。

关键词 孤雄单倍体; 胚胎干细胞; 增殖速率; 细胞周期调控; 二倍化

Study of Mouse Androgenetic Haploid Embryonic Stem Cells on Proliferation Ability

Xiong Zeyu^{1#}, He Wenteng^{2#}, Chen Jiayu², Han Zhiming³, Sun Xiaofang^{1*}, Gao Shaorong^{2*}

(¹The Third Hospital Affiliated of Guangzhou Medical University, Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Key Laboratory of Reproduction and Genetics of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou 510150, China;

²School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ³State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Androgenetic haploid embryonic stem cells (AG-haESCs), which are derived from mouse haploid embryos with only a set of chromosomes from the spermatozoa, show small colony morphologies and hypoproliferation properties during passages. Here, we compared AG-haESCs with the normal embryonic stem cells (R1) and diploidized AG-haESCs (DAG-haESCs) so as to uncover the mechanism. The result indicated that, although mouse AG-haESCs present colony-like morphologies with smooth and clear edge as normal ESCs, these colonies show smaller sizes as compared to R1. Moreover, the proliferation rates of AG-haESCs are dramatically down-regulated. Meanwhile, DAG-haESCs show a higher proliferation rate comparing to AG-haESCs, but which is still

收稿日期: 2016-05-05 接收日期: 2016-06-16

国家重大科学研究计划(批准号: 2014CB964803)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 020-81292013, E-mail: xiaofangsun@gzhmu.edu.cn; Tel: 021-65982278, E-mail: gaoshaorong@tongji.edu.cn

Received: May 5, 2016 Accepted: June 16, 2016

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2014CB964803)

[#]These two authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-20-81292013, E-mail: xiaofangsun@gzhmu.edu.cn; Tel: +86-21-65982278, E-mail: gaoshaorong@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2016-08-31 16:13:56

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160831.1613.012.html>

lower than R1. Importantly, RT-qPCR analysis demonstrated that both mouse AG-haESCs and DAG-haESCs possess abnormal cell cycle related networks, suggesting that it is the transcriptional disorder by haploid chromosomes, but not the colony size or diploidization, plays a critical role in the proliferation regulation of these cells. Thus, our work provides a unique platform to further analyze the regulation of cell cycle regulation by AG-haESCs.

Keywords androgenetic haploid; embryonic stem cells; proliferation rates; cell cycle regulation; diploidization

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是一种来源于3.5~4.5 d的囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)并具有保持自我更新和多向分化特性的细胞^[1]。Martin Evans和Matthew Kaufman^[2]于1981年成功建立了第一株小鼠ES细胞系。在去分化的培养条件下, ESCs能够在体外无限增殖, 而且它的多能性使其在特定的培养环境中可以分化成为成体任何类型的细胞。目前, 国内外科研工作者已在多种物种中成功建立了ES细胞系, 并运用于生物学实验和医学研究中。

单倍体胚胎是只具有一套配子染色体组的胚胎, 可以通过各种方法得到。早期研究通过分割原核期的合子分别得到孤雌和孤雄的单倍体胚胎^[3]。随着显微操作的发展, 可以通过去除雄原核或者雌原核得到孤雌或者孤雄单倍体胚胎。目前常用去核的MII期胚胎中注入精子头得到孤雄的单倍体胚胎^[4-5]。

单倍体胚胎干细胞(haploid embryonic stem cells, haESCs)是通过分离早期单倍体胚胎的内细胞团而得到的一种特殊类型的ESCs。近年来, 随着荧光流式分选细胞方法(fluorescence-activated cell sorting, FACS)的发展, 多位科学家分别建立了鱼的haESCs^[6]、小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞(parthenogenic haploid embryonic stem cells, PA-haESCs)^[7-8]和孤雄单倍体胚胎干细胞(androgenetic haploid embryonic stem cells, AG-haESCs)^[4-5]。haESCs在进行基因筛选和基因功能研究方面具有重要的意义。更为值得一提的是, AG-haESCs具有替代精子功能使卵母细胞受精的作用^[4-5]。而后, 周琪团队建立的PA-haESCs能够替代卵母细胞核的功能获得正常出生的小鼠^[9]。接着, 李劲松团队^[10]与周琪团队^[11]分别建立了食蟹猴的PA-haESCs与大鼠的AG-haESCs。目前, 大鼠的AG-haESCs已应用于大片段基因捕获、通过CRISPR-Cas9系统及同源重组进行精确打靶, 同时也具有替代精子的功能^[11]。

李劲松团队分别敲除了AG-haESCs与PA-haESCs的印记基因*H19*和*Gtl2*的差异甲基化区域

(differentially DNA methylated regions, DMRs)后, 进行卵胞浆内孤雄单倍体胚胎干细胞显微注射(intra cytoplasmic AG-haESCs injection, ICAI), 制作半克隆小鼠, 小鼠出生率分别提高到了20%^[12]与15%^[13]。这使haESCs能够广泛地用于制作基因编辑的小鼠中。

细胞周期是不断分裂子细胞的过程, 分为间期(G₁、S、G₂期)和分裂期(M期)。它是精密且有序的调控过程, 依靠一系列相关基因相时表达推进细胞周期的前进, 促进细胞增殖。细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK), 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类, 与细胞周期蛋白(cyclin)相互结合启动并推进细胞周期的进行^[14]。细胞周期各个时期都有检查点(checkpoint)的存在, 检测异常的DNA复制、排列以及DNA损伤等, 确保细胞周期正常地进行^[15]。

haESCs与正常二倍体ESCs一样, 已经成为一种十分有用的工具细胞, 但haESCs与正常二倍体ESCs存在着很大的差异。在培养过程中, 小鼠AG-haESCs呈现出克隆较小、生长缓慢的现象, 而且目前尚未有关于haESCs细胞增殖方面的具体研究报告。本研究通过比较小鼠AG-haESCs、正常二倍体ESCs(R1)和二倍化的AG-haESCs(diploid AG-haESCs, DAG-haESCs)在细胞外观形态、细胞增殖曲线和细胞增殖速率方面的不同, 以及分析细胞周期调控基因表达的差异, 解释此现象可能出现的原因, 以为haESCs增殖调控方面提供一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

DBA/2雄鼠、C57BL/6雌鼠和129/SV雄鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验所用的B6D2F1雌鼠(C57BL/6与DBA/2交配)由本实验室在同济大学实验动物中心繁殖。实验所用全部小鼠均为SPF级(Specific Pathogen-Free)。本实验经过同济大学实验动物委员会批准, 饲养流程与动物实验方法严格按照同济大学实验动物操作准则进行。

1.2 试剂与仪器

早期小鼠胚胎的培养使用CZB溶液和Quinn's Advantage Cleavage Medium(Q1, 1026 SAGE *In-vitro*, Fertilization公司)。蛋白酶(PE, P8811)、透明质酸酶(hyaluronidase, H3884)、细胞松弛素B(C6762)以及10mmol/L SrCl₂溶液均购自Sigma公司。孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)均购自宁波三生制药公司。

单倍体ESCs建系使用20% KSR Knockout DMEM培养液: Knockout DMEM(10829-018)、20% Knockout血清替代物(KSR, 10828)、2 mmol/L左旋谷氨酰胺(L-glutamine, 25030-081)、0.1 mmol/L β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol, 21985-023)、50 U/mL青/链霉素(P/S, 15140-122), 以上试剂均购自Gibco公司; 0.1 mmol/L非必需氨基酸(NEAA, TMS-001-C)、胚胎干细胞专用核苷(Nucleosides, ES-008-D)、1 000 U/mL白血病抑制因子(LIF, 13275-029)、1 μmol/L MEK抑制剂(PD0325901)以及3 μmol/L GSK3β抑制剂(CHIR99021)均购自Millipore公司。ESCs培养液(ESM): DMEM(SLM-220-M, Millipore公司), 15% FBS(Hyclone, SH30070.03, Thermo公司), 其余的左旋谷氨酰胺、核苷、非必需氨基酸、β-巯基乙醇、白血病抑制因子等与建系20% KSR Knockout DMEM培养液中的一样。0.05%胰蛋白酶EDTA(TE, 25300-062)与DPBS(c14190500BT)购自Gibco公司。秋水仙素(demecolcine, D1925)、Hoechst 33342(B2261)与verapamil(V4629)购自Sigma公司。柠檬酸钠购自汕头市西陇化工厂有限公司。KCl购自北京益利精细化学品有限公司。甲醇、冰醋酸、氯仿溶液、异丙醇、乙醇均购自国药集团化学试剂有限公司。Trizol(9109)购自TaKaRa公司。5×All-In-One RT MasterMix(G490)购自ABM公司。SYBR® Premix Ex Taq™ II(TliRNaseH Plus)(RR820A)购自TaKaRa公司。

仪器有: 显微操作系统(Narishige公司), PMM 150-FU Piezo Impact Unit(Primetech公司), 倒置显微镜(Nicon公司), 超声波清洗仪(DL-180A, 上海之信仪器有限公司), CO₂细胞培养箱(Thermo公司), 体式显微镜(Olympus公司), 显微操作针(Sutter Instrument公司), 96孔板(Corning公司), 24孔板、12孔板、6孔板(Nest公司), 流式细胞分选仪(Arill II, BD公司), Real-time PCR仪(7500, ABI公司)。

1.3 雌鼠卵母细胞的获取

8~10周龄的B6D2F1雌鼠第1 d下午18:00腹腔注射10 IU PMSG, 46~48 h后腹腔注射10 IU hCG。在注射hCG 14~15 h后, 快速并人道地利用颈椎脱臼法处死小鼠, 剪出输卵管置于滴加了Hepes-CZB的培养皿中。然后, 用镊子拨开壶腹部, 取出卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs), 置于含0.1%透明质酸酶的Hepes-CZB中脱掉颗粒细胞。随后在Hepes-CZB中洗涤3~5次, 再在预先平衡好的CZB中洗涤3~5次后, 放入37 °C、5% CO₂培养箱中备用。

1.4 雄鼠精子采集

3~5月龄具有生育能力的129/SV雄鼠, 在使用之前的3 d正常交配1次。实验当天, 脱臼处死雄鼠, 小心剪出附睾尾, 在膨大部开口, 用镊子挤出浓密的精子团, 加至已37 °C预热的含500 μL Hepes-CZB的1.5 mL EP管中, 超声波清洗仪处理10 s进行精子断尾, 然后置于冰上备用。

1.5 孤雄单倍体胚胎的获得

运用显微操作的方法获得孤雄单倍体的胚胎。首先, 将MII期的成熟卵母细胞置于5 μg/mL的细胞松弛素B中, 旋转纺锤体复合物(spindle complex)至6点钟或12点钟方向后, 从3点钟方向用Piezo进行打孔, 再用10 μm的去核针吸住纺锤体复合物后拉出透明带, 30枚一组, 直至所有完成。然后, 用8 μm的注射针将断尾的精子头注入到已去核的胚胎中, 操作完成后立刻置于CZB中。1 h后用含10 mmol/L SrCl₂的Ca²⁺-free CZB激活4~6 h。激活后的胚胎在CZB中洗涤5~7次后, 再用Q1洗涤3~5次, 放入Q1液滴中, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养4~5 d。

1.6 AG-haESCs的建立与培养

取培养了4.5~5.5 d并且形态良好的孤雄单倍体囊胚, 置于蛋白酶E(PE)中, 于37 °C消化3 min以将透明带去掉, 使用建系培养基洗涤3次后, 在体视显微镜下接种到提前铺好饲养层细胞的96孔板中, 每孔放1个囊胚。置于37 °C、5% CO₂培养箱中, 开始建系。在接种后第4 d开始半量换液, 然后每2 d一次进行全换液。到接种后第8 d, 将出现的outgrowth用TE消化5 min, 培养基中和后接种到提前铺好饲养层细胞的96孔板, 根据细胞的密度再传入48或者24孔板中, 将长满后的24孔板细胞进行首次流式分选建系。建系过程中均使用含20% KSR的Knockout DMEM。

流式分选后的AG-haESCs使用正常的ESM进行培养, 每天更换培养液, 3~4 d传代一次。传代时先用DPBS洗涤1次, TE消化3 min后ESM进行中和, 1 300 r/min离心4 min后再用1 mL ESM重悬, 计数传代, 一个12孔板的孔加入 5×10^4 细胞。

1.7 流式细胞分选

提前1 d配制染液: 4 mL ESM加入60 μ L Hoechst 33342(1 mg/mL)和10 μ L verapamil(20 mmol/L), 4 $^{\circ}$ C避光放置。流式分选前将细胞进行处理, 吸弃培养液, DPBS洗涤1次, 加适量TE, 37 $^{\circ}$ C作用3~5 min后, 用ESM中和、消化, 轻柔吹打成单细胞悬液并转移至流式管内, 1 200 r/min离心4 min后, 弃上清。用染液重悬后于37 $^{\circ}$ C水浴30 min。离心后用ESM重悬并上机。使用BD Arill II流式细胞仪进行单倍体细胞分选, 用Flowjo 7.6.1软件分析结果。

1.8 核型分析

低渗液由0.4%柠檬酸钠与0.4% KCl按1:1配制, 需现配现用; 固定液由甲醇与冰醋酸按3:1配制, 需现配现用。

在细胞生长旺盛的时期加入秋水仙素(工作浓度为0.05 μ g/mL), 4 h终止培养。收获细胞至离心管后, 加低渗液3~4滴, 用吸管轻轻以气泡冲匀, 加至1 mL, 37 $^{\circ}$ C低渗处理5 min; 加固定液7滴进行预固定, 气泡冲匀后以800~1 000 r/min离心5 min; 弃上清加4 mL固定液, 室温固定40 min; 离心后弃上清, 加2 mL固定液, 室温固定20 min; 离心后加3~4滴新鲜的固定

液, 气泡冲匀, 滴2~3张玻片。晾干后, 37 $^{\circ}$ C吉姆萨染色6 min。染色结束后, 自来水冲洗, 晾干后镜检。

1.9 细胞数量与增殖速率的统计

细胞以每孔 5×10^4 接种到铺好饲养层细胞的12孔板中, 分别在24、48、72 h三个时间段进行细胞计数。细胞经TE消化3 min, 培养基中和后, 取10 μ L进行血细胞计数板计数。细胞总数=四个大格细胞数/ $4 \times 10^4 \times$ 总液体量。增殖速率=培养X小时的细胞数量/培养(X-24)小时的细胞数量, X为接种后24、48、72 h三个时间段。

1.10 RNA的提取及荧光定量PCR检测

分别消化离心后, 在1.5 mL Rnase-free的Ep管中收集大于 1×10^6 AG-haESCs、DAG-haESCs和正常二倍体ESCs(R1)。在超净台内使用1 mL Trizol裂解细胞, 涡旋15 s后静置5 min。添加0.2 mL氯仿溶液, 涡旋15 s后静置3 min。4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min离心15 min, 小心将上清转入新的Rnase-free的Ep管中。加入等体积异丙醇, 轻轻混匀, 静置10 min后, 同样方法离心。吸弃上清, 加1 mL 75%乙醇, 涡旋15 s后离心。重复前一步后吸弃乙醇, 晾干5~10 min, 加适量Rnase-free的超纯水溶解沉淀, 取1 μ L溶解液测浓度。

然后取2 μ g提取的RNA, 用5 \times All-In-One RT MasterMix试剂盒配制20 μ L体系, 进行反转录cDNA。再按1:10稀释后备用。在NCBI网站设计细胞周期相关基因mRNA上的引物(表1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用SYBR[®] Premix

表1 细胞周期相关基因荧光定量PCR引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequence of genes related to cell cycle regulation

基因 Gene	引物序列(5'→3')	
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>CDK1</i>	ACA CAC GAG GTA GTG ACGC	TCT GAG TCG CCG TGG AAA AG
<i>CDK2</i>	CTG GGA CTG CCG TGC TC	TTC AGT CTC AGT GTC GAG CC
<i>CDK4</i>	TCG ATA TGA ACC CGT GGC TG	CAC AGA CAT CCA TCA GCC GTA
<i>CDK6</i>	CGC CTA TGG GAA GGT GTT CA	GCA CAC ATC AAA CAA CCT GAC C
<i>Cdc25b</i>	GCC CCT GAC TTG ATG TGT CT	AAT GAG GTT CTC CAT GCC CG
<i>Cdc25c</i>	TGA CGT CTA TAG CCC CAC CT	ATT TTG GGG TTC CTC CCG AC
<i>Cdc20</i>	GCC CAC CAA AAA GGA GCA TC	GAT TTC GGG GGC ATC AAG GA
<i>Cdc45</i>	TCT AAG TAT GCC AGG GTC AGA	CTG ATT GGT TCC TTG TTG CCG
<i>Wee1</i>	ATT GGC TGG CTC TGT TGA TGA	CAG CTA AAC TCC CAC CAT TAC A
<i>E2F5</i>	TCT CAA AGC GGC TGC AGA TA	TTA CAG CCA GCA CCT ACA CC
<i>Ccnd1</i>	TCA AGT GTG ACC CGG ACT G	GCT CCT TCC TCT TTG CGG G
<i>CHEK2</i>	GTC TCA CGC GGT CGG ATA	GCA ACT GAG AAG GAG TGC CT
<i>Ccng2</i>	CGA CAC GAT GAA GGA TTT GGG	AGC CTC CAT CAA GAT CAG CC
<i>Ccnb1</i>	ATA ATC CCT CTC CAA GCC CGA	TAA CTG ACT GCT CTT CCT CCA G
<i>Bub3</i>	CTT AGG CGG ACA GGA GAT GAC	AGT GTG CTG GTA CTT GAG CC
<i>Bub1b</i>	GCA GGC TGT TCA GCA AGA AG	ACT GGA ACC TTT AGA ATC AGG C

Ex Taq™ II(TliRNaseH Plus)试剂盒, 配制20 μ L体系, 通过7500 Fast Real-time PCR System仪器进行RT-qPCR检测细胞周期相关基因的表达情况。

1.11 统计分析

实验结果重复统计3次, 统计结果间差异使用Graphpad Prism 5中One-Way ANOVA方法分析, 结果用均数 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示。P<0.05为差异显著, P<0.01为差异极其显著。

2 结果

2.1 AG-haESCs的建立

利用显微操作仪通过去核注精子头的方法, 获得333枚小鼠孤雄单倍体的胚胎, 经过4.5~5.5 d的培养, 获得了47枚孤雄单倍体的囊胚(图1A), 囊胚率为14.1%。将囊胚进行接种后, 一般6~10 d出现outgrowth(图1B), 传代后成功得到了6株孤雄单倍体ES细胞系, 经过流式细胞术分选富集到3株小鼠AG-haESCs(图1C)。小鼠AG-haESCs与R1一样成集落样生长, 集落边缘光滑清晰。通过Hoechst 33342特异结合DNA, 经过流式细胞术分选G₀/G₁期的AG-haESCs, 以便在长期培养中维持细胞的单倍体性

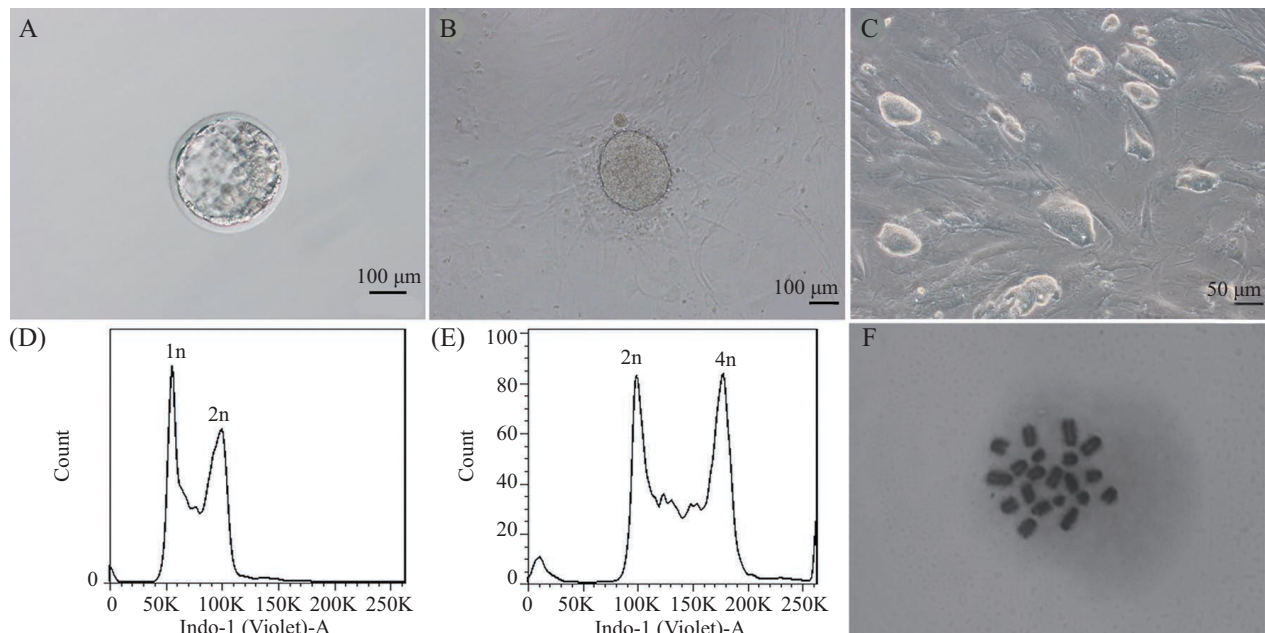
质。结果表明, 单倍体在1n的位置有很高的富集, R1只在2n和4n的位置上有富集(图1D和图1E)。核型分析结果显示, 建立的AG-haESCs细胞系染色体为20条, 证明是haESCs(图1F)。

2.2 AG-haESCs的外观形态

在培养过程中, 小鼠AG-haESCs与正常二倍体ESCs(R1)一样呈集落样生长, 边缘光滑清晰, 内部细胞排列紧密, 核质比高(图2A)。但是, 我们发现接种相同的细胞量后, 在相同的培养时间点, AG-haESCs的克隆显著小于R1的克隆(图2A和图2B)。将细胞消化成单细胞后, 观察到AG-haESCs的直径明显小于R1的细胞(图2C和图2D)。

2.3 AG-haESCs、DAG-haESCs以及R1细胞增殖曲线与增殖速率

我们摸索了细胞接种的密度, 发现12孔板中接种 5×10^4 细胞的起始量对于小鼠AG-haESCs与二倍体ESCs都比较适宜。接种密度过大, ES克隆易分化; 接种密度过小, ES克隆生长太缓慢。随后统计了细胞的增殖曲线, 分别在细胞接种后的24、48、72 h三个时间段, 消化成单细胞, 使用血细胞计数板统计细胞的数量。结果显示, 在各个时间段AG-haESCs



A: 孤雄单倍体囊胚; B: 孤雄单倍体outgrowth; C: 孤雄单倍体胚胎干细胞; D: AG-haESCs的流式细胞分析; E: R1的流式分析; F: AG-haESCs的核型分析。

A: androgenetic haploid blastocyst; B: androgenetic haploid outgrowth; C: AG-haESCs; D: analysis of AG-haESCs by FACS; E: FACS of R1; F: karyotype analysis of AG-haESCs.

图1 孤雄单倍体胚胎干细胞的建系

Fig.1 ESCs derivation of androgenetic haploid embryo

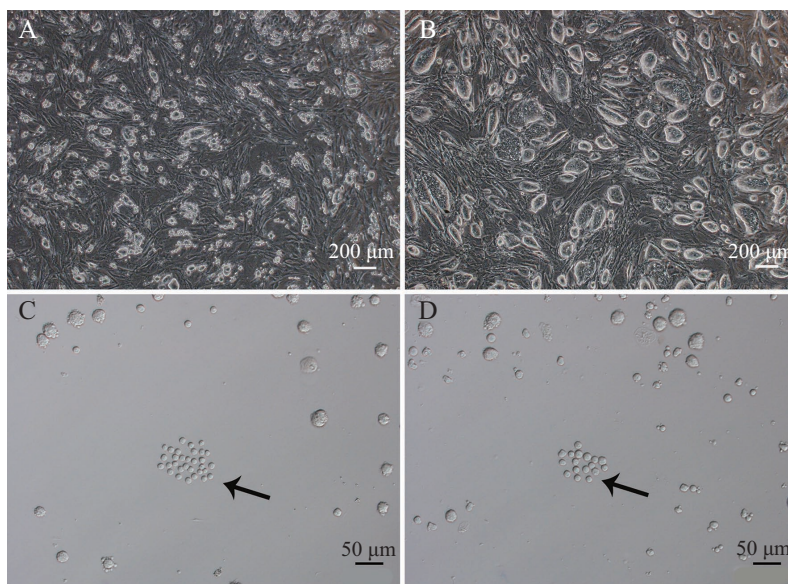
的细胞数量与克隆大小均低于R1(图3和图4A), 并且随着培养时间的增加细胞数量之间差异越来越大。我们进一步分析了细胞增殖速率(图4B), AG-haESCs的增殖速率明显低于R1的增殖速率。随着细胞的培养时间增加, R1在后期出现了增殖速率下降的现象; AG-haESCs反而呈现出增殖速率上升。

我们通过流式细胞分选, 获取了二倍化后的

AG-haESCs, 并连续培养3代后进行统计, 结果发现, DAG-haESCs的增殖曲线与增殖速率都略高于AG-haESCs, 但仍然显著低于R1(图4)。

2.4 细胞周期相关基因的表达分析

以小鼠AG-haESCs、DAG-haESCs以及R1细胞的cDNA为模板, 选择了16个细胞周期相关基因进行实时荧光定量PCR。结果显示, 16个基因中有8个基

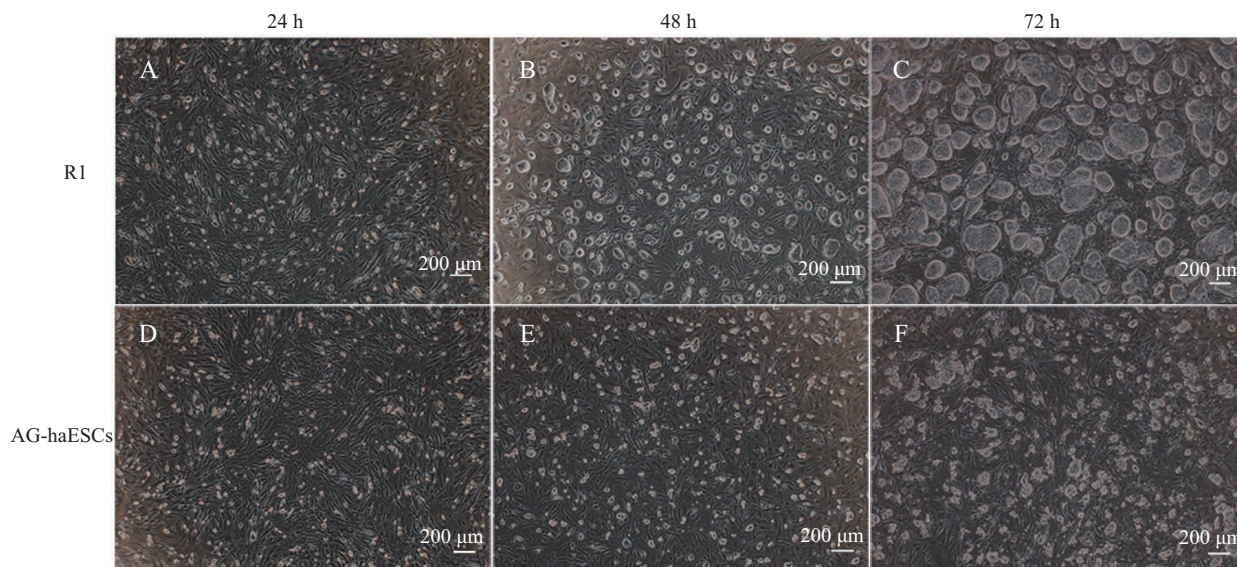


A: AG-haESCs细胞克隆; B: R1细胞克隆; C: 消化成单细胞的AG-haESCs; D: 消化成单细胞的R1。

A: cell clone of AG-haESCs; B: cell clone of R1; C: single cell of AG-haESCs; D: single cell of R1.

图2 AG-haESCs与R1的外观形态

Fig.2 Cell morphology of AG-haESCs and R1

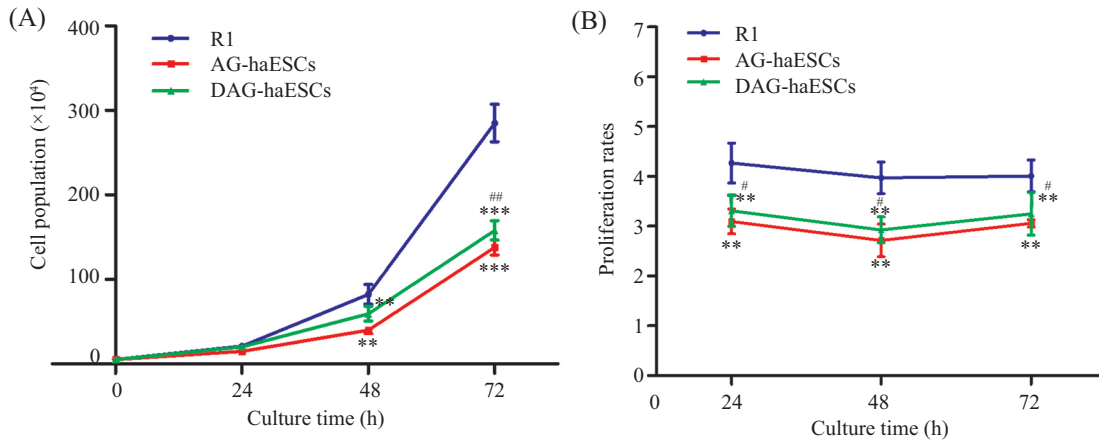


A~C: 分别为接种后24、48、72 h R1细胞的增殖形态; D~F: 分别为接种后24、48、72 h AG-haESCs细胞的增殖形态。

A-C: proliferating morphology of R1 after 24, 48, 72 h; D-F: proliferating morphology of AG-haESCs after 24, 48, 72 h.

图3 AG-haESCs和R1细胞增殖的形态比较

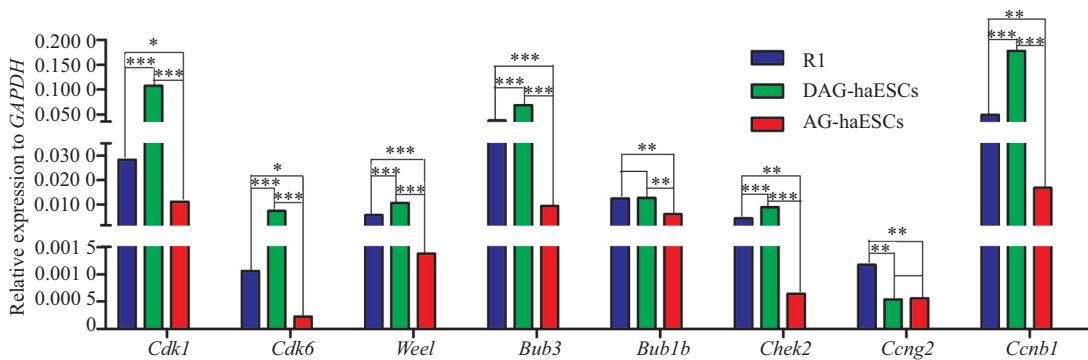
Fig.3 Cell proliferating morphology of AG-haESCs and R1



A: ESCs细胞的增殖曲线; 在培养48 h后, AG-haESCs和DAG-haESCs极显著地低于R1细胞数(** $P < 0.01$); 在培养72 h后, AG-haESCs和DAG-haESCs极显著地低于R1细胞数(** $P < 0.0001$), 同时, DAG-haESCs细胞数显著性地高于AG-haESCs($^{\#}P < 0.05$)。B: ESCs细胞的增殖速率; 在培养24、48、72 h时, AG-haESCs和DAG-haESCs的增殖速率分别极显著地低于R1(** $P < 0.01$); DAG-haESCs增殖速率显著高于AG-haESCs($^{\#}P < 0.05$)。A: proliferation curves of ESCs. After 72 h of cell culture, cell population of AG-haESCs and DAG-haESCs, which were significantly lower than that of R1 when cells were cultured for 48 h (** $P < 0.01$), were decreased more obviously than that of R1 (** $P < 0.0001$) and cell population of DAG-haESCs was higher than that of AG-haESCs ($^{\#}P < 0.05$). B: proliferation rates of ESCs. Proliferation rates of AG-haESCs and DAG-haESCs were reduced more remarkably than those of R1 (** $P < 0.01$) after 24, 48 and 72 h of cell culture respectively, while the proliferation rate of DAG-haESCs was higher than that of AG-haESCs ($^{\#}P < 0.05$).

图4 DAG-haESCs的增殖曲线与增殖速率

Fig.4 Proliferation curve and proliferation rates of DAG-haESCs



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$.

图5 细胞周期调控相关基因的表达分析

Fig.5 Expression level of genes related to cell cycle regulation

因差异明显, AG-haESCs的细胞周期依赖性蛋白激酶基因*Cdk1*、*Cdk6*, 有丝分裂检查点*Wee1*、*Bub3*、*Bub1b*、*Chk2*(cell cycle checkpoint kinase 2)以及细胞周期蛋白*Ccng2*(cyclin G2)、*Ccnb1*(cyclin B1)基因表达量显著低于R1(图5), 其他基因无显著性差异。

细胞发生二倍化后, DAG-haESCs除*Cdk2*、*Cdc45*(cell division cycle 45)、*Ccnd1*(cyclin D1)、*Ccng2*无显著性差异外, 其他细胞周期相关基因相比于AG-haESCs都获得了显著性的升高(图5)。

3 讨论

通过显微操作及胚胎培养可以获得小鼠的单

倍体囊胚, 从而建立小鼠AG-haESCs细胞系。AG-haESCs在基因筛选和基因功能研究方面有独特的优势^[6], 因其只具有一套配子染色体组, 所以在进行基因编辑时能更加准确, 模型也更易展现其表型。此外, AG-haESCs可以随时替代精子而作为受精工具使用, 解决了精子不能进行基因编辑的问题。

在小鼠AG-haESCs的培养过程中, 从细胞外观形态上, 我们观察到, AG-haESCs克隆显著地小于正常二倍体ESCs的克隆。推测可能是细胞增殖能力有差异造成上述现象, 所以本研究通过计数生长过程中的细胞数量, 进行细胞增殖速率以及细胞周期调控基因的分析, 探索可能的原因。

研究中在接种了相同细胞量的前提下, 同一培养时间段AG-haESCs克隆大小与细胞数目还是明显小于正常二倍体ESCs。此外, 将细胞消化成为单细胞后, AG-haESCs个体略小于R1。这是在外观形态上, AG-haESCs克隆小于正常二倍体ESCs的因素之一, 但不是主要原因。

通过分析细胞的增殖曲线与增殖速率, 发现小鼠AG-haESCs的增殖曲线与速率明显低于正常二倍体ESCs, 证实AG-haESCs的增殖能力是低于正常二倍体ESCs的。

二倍化是haESCs在培养过程中发生染色体复制变成二倍体ESCs的现象。早期, 在Kaufman等^[17]的研究中, 孤雌来源的小鼠单倍体胚胎建立的ES细胞系全部是40条染色体。随着细胞分选技术的发展, 使得从早代次ESCs中分选haESCs成为可能。由于haESCs在培养过程中有二倍化的现象, 需要定期通过FACS分选G₀/G₁期的细胞来维持其单倍体克隆的性质。Takahashi等^[18]的报道证明了在AG-haESCs的培养过程中添加Wee1和myt1的抑制剂后可以延缓AG-haESCs的二倍化现象。但是二倍化延缓之后对于细胞增殖有无影响却没有研究过。研究表明, Wee1是G₂/M期转化的检查点^[19]。haESCs的二倍化可能是由多个细胞周期检查点共同作用的结果。

Leeb等^[20]通过实验证明, haESCs二倍化现象是由于细胞自我复制之后不分裂, 而不是细胞之间融合造成的。因此, 我们猜测, 是由于小鼠AG-haESCs二倍化的过程中细胞复制后少分裂一代而造成细胞增殖低于正常二倍体ESCs。于是, 我们分选了二倍化后的AG-haESCs进行培养观察, 结果发现, DAG-haESCs的增殖曲线与速率略高于AG-haESCs, 并没有提高到与R1一样的增殖能力, 仍显著地低于R1, 说明二倍化不是造成增殖缓慢最主要的原因。DAG-haESCs与R1同为二倍体的ESCs, 但增殖曲线与增殖速率差异显著, 说明主要原因是内在的细胞周期调控造成AG-haESCs与DAG-haESCs增殖缓慢。

AG-haESCs只具有一套配子染色体组, 那么细胞周期调控也不同于正常胚胎干细胞。本研究检测了细胞周期相关调控基因的mRNA水平, RT-qPCR的结果显示, 有8个细胞周期相关基因是小鼠AG-haESCs显著性低于R1的。翻译成蛋白后, CDK1和CDK6分别是细胞内促进G₂/M和G₁/S进行的细胞周期蛋白依赖激酶^[14], 当CDK1缺失时细胞不能进入M

期完成有丝分裂, 敲除*Cdk1*的小鼠胚胎不能发育到囊胚阶段^[21]。细胞周期蛋白B1(CCNB1)是有丝分裂期(M期)周期蛋白, 与CDK1相结合形成成熟促进因子(MPF)促进细胞启动有丝分裂^[22]。细胞周期蛋白2(CCNG2)在整个细胞周期中起伏波动, S期晚期达到最高^[23], 是细胞周期调控的负性调节因子, 可引起G₁/S阻滞, 抑制细胞生长^[24]。*Bub1b*编码的BubR1以及Bub3、CDC20是有丝分裂检查点复合物(mitotic check point complex, MCC)的组成部分^[25], 抑制细胞提前进入后期直至完成排列建立正确的微管连接^[15]。细胞周期检测点激酶2(CHEK2)在整个细胞周期中表达, 参与细胞周期G₁、S和G₂/M期的阻滞, 促进细胞对DNA损伤尤其是双链断裂的修复^[26-27]。AG-haESCs的上述细胞周期相关基因表达异常, 证明细胞周期调控不同于正常胚胎干细胞, 从而导致增殖缓慢。

DAG-haESCs是孤雄来源的二倍体细胞, 细胞内染色体是姐妹染色体, 而R1是同源染色体, 两者有差异, 可造成细胞周期调控不同。RT-qPCR结果表明, 二倍化发生后, 大部分的细胞周期调控基因都过表达, 正向调控基因的过表达使得细胞的增殖能力有所提高, 而负向调控基因的过表达又阻碍细胞周期的进行, 促使增殖能力达不到R1的水平。DAG-haESCs增殖能力仍然显著性的低于R1, 且细胞周期相关基因表达异常。

综上所述, 本研究以小鼠AG-haESCs为研究对象, 成功获得了成熟的孤雄单倍体囊胚并建立了AG-haES细胞系, 详细分析了AG-haESCs外观形态、增殖曲线和增殖速率。结果发现, 与正常二倍体ESCs及二倍化后的AG-haESCs在增殖能力上有明显差异, 小鼠AG-haESCs的细胞个体较小和二倍体化引起的停滞不是造成该现象的主要原因, 而主要是AG-haESCs细胞周期调控机制中, 细胞周期依赖性蛋白激酶、细胞周期蛋白以及检查点相关基因的表达异常造成增殖缓慢。本研究为AG-haESCs后续细胞周期以及维持单倍体胚胎干细胞单倍性提供了一定的理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 2 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma

- stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7634-8.
- 3 Tarkowski AK. *In vitro* development of haploid mouse embryos produced by bisection of one-cell fertilized eggs. *J Embryol Exp Morphol* 1977; 38(1): 187-202.
- 4 Li W, Shuai L, Wan H, Dong M, Wang M, Sang L, *et al.* Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature* 2012; 490(7420): 407-11.
- 5 Yang H, Shi L, Wang BA, Liang D, Zhong C, Liu W, *et al.* Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell* 2012; 149(3): 605-17.
- 6 Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science* 2009; 326(5951): 430-3.
- 7 Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature* 2011; 479(7371): 131-4.
- 8 Schimenti J. Haploid embryonic stem cells and the dominance of recessive traits. *Cell Stem Cell* 2011; 9(6): 488-9.
- 9 Wan H, He Z, Dong M, Gu T, Luo GZ, Teng F, *et al.* Parthenogenetic haploid embryonic stem cells produce fertile mice. *Cell Res* 2013; 23(11): 1330-3.
- 10 Yang H, Liu Z, Ma Y, Zhong C, Yin Q, Zhou C, *et al.* Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res* 2013; 23(10): 1187-200.
- 11 Li W, Li X, Li T, Jiang MG, Wan H, Luo GZ, *et al.* Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 404-14.
- 12 Zhong C, Yin Q, Xie Z, Bai M, Dong R, Tang W, *et al.* CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 221-32.
- 13 Zhong C, Xie Z, Yin Q, Dong R, Yang S, Wu Y, *et al.* Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection. *Cell Res* 2016; 26(1): 131-4.
- 14 Enders GH. Mammalian interphase Cdks: Dispensable master regulators of the cell cycle. *Genes Cancer* 2012; 3 (11/12): 614-8.
- 15 Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(5): 379-93.
- 16 Leeb M, Dietmann S, Paramor M, Niwa H, Smith A. Genetic exploration of the exit from self-renewal using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 385-93.
- 17 Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, Evans MJ. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1983; 73(1): 249-61.
- 18 Takahashi S, Lee J, Kohda T, Matsuzawa A, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, *et al.* Induction of the G₂/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells. *Development* 2014; 141(20): 3842-7.
- 19 Masuda H, Fong CS, Ohtsuki C, Haraguchi T, Hiraoka Y. Spatiotemporal regulations of Wee1 at the G₂/M transition. *Mol Biol Cell* 2011; 22(5): 555-69.
- 20 Leeb M, Walker R, Mansfield B, Nichols J, Smith A, Wutz A. Germline potential of parthenogenetic haploid mouse embryonic stem cells. *Development* 2012; 139(18): 3301-5.
- 21 Santamaria D, Barriere C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, *et al.* Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 2007; 448(7155): 811-5.
- 22 Porter LA, Singh G, Lee JM. Abundance of cyclin B1 regulates gamma-radiation-induced apoptosis. *Blood* 2000; 95(8): 2645-50.
- 23 Horne MC, Goolsby GL, Donaldson KL, Tran D, Neubauer M, Wahl AF. Cyclin G₁ and cyclin G₂ comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression. *J Biol Chem* 1996; 271(11): 6050-61.
- 24 Bennin DA, Don AS, Brake T, McKenzie JL, Rosenbaum H, Ortiz L, *et al.* Cyclin G₂ associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G₁/S phase cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2002; 277(30): 27449-67.
- 25 Chao WC, Kulkarni K, Zhang Z, Kong EH, Barford D. Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* 2012; 484(7393): 208-13.
- 26 Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G₁ by stabilizing p53. *Genes Dev* 2000; 14(3): 278-88.
- 27 Cai Z, Chehab NH, Pavletich NP. Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase. *Mol Cell* 2009; 35(6): 818-29.