

研究论文

双三体胚胎干细胞的增殖与分化特征分析

张美丽* 肖蓉 贾玉艳 黄粤*

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要 该文旨在研究双三体胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)在细胞增殖、分化以及畸胎瘤形成等方面的特征, 揭示非整倍体与肿瘤发生之间的关系。首先建立了两株常染色体双三体的小鼠ESC株系, 通过微阵列比较基因组杂交(array comparative genomic hybridization, array CGH)和荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)实验对双三体ESC株系进行了染色体拷贝数分析和核型鉴定; 通过绘制细胞生长曲线检测了双三体ESC的增殖能力; 通过流式细胞术检测了双三体ESC的细胞周期和细胞凋亡情况; 采用细胞克隆形成实验分析了双三体ESC的克隆形成效率; 通过实时荧光定量PCR和免疫荧光染色实验检测了双三体ESC中多能干细胞标志物的表达; 通过撤掉培养体系中的白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)诱导分化和进行拟胚体(embryoid body, EB)形成实验检测了双三体ESC的分化能力; 通过重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠皮下接种细胞实验分析了双三体ESC的畸胎瘤形成能力和体内分化能力。结果显示, 这两株双三体细胞分别是3号与6号染色体双三体并伴有Y染色体丢失的ESCs(DTs-3+6), 以及6号与8号染色体双三体的ESCs(DTs-6+8)。双三体ESC表现出相对于野生型细胞较强的生长增殖能力和OCT4、SOX2、NANOG等多能干细胞标志物的高表达。当培养液中不添加LIF时, 野生型细胞基本完全走向分化, 而双三体细胞形成许多未分化或部分分化的克隆, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染色阳性。在EB分化早期, 双三体细胞中*Fgf5*、*T*、*Foxa2*等三胚层标志物的表达水平较野生型细胞明显降低, 分化滞后。当被接种到SCID小鼠皮下后, 双三体ESC形成畸胎瘤的能力较野生型细胞增强, 畸胎瘤中包含大量未分化区域。因此, 双三体ESC的生长增殖能力增强, 它通过限制细胞分化能力而促进畸胎瘤形成。双三体ESC是研究非整倍体在肿瘤发生发展过程中作用的重要模型。

关键词 非整倍体; 双三体; 胚胎干细胞; 增殖; 分化; 畸胎瘤

Proliferation and Differentiation Characteristics of Double-Trisomic Embryonic Stem Cells

ZHANG Meili*, XIAO Rong, JIA Yuyan, HUANG Yue*

(State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

收稿日期: 2020-12-27 接受日期: 2021-03-01

中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(批准号: 2016-I2M-3-002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-69156462, E-mail: zhangmeili@ibms.cams.cn; Tel: 010-65105068, E-mail: huangyue@pumc.edu.cn

Received: December 27, 2020 Accepted: March 1, 2021

This work was supported by the Chinese Academy of Medical Sciences Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2016-I2M-3-002)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-69156462, E-mail: zhangmeili@ibms.cams.cn; Tel: +86-10-65105068, E-mail: huangyue@pumc.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5525>

Abstract This study aims to investigate the proliferation, differentiation, and teratoma formation characteristics of double-trisomic ESCs (embryonic stem cells), and discover the relationships between aneuploidy and tumorigenesis. Two lines of autosomal double-trisomic mouse ESCs were established. Array CGH (array comparative genomic hybridization) and FISH (fluorescence *in situ* hybridization) were used to determine the chromosome copy number variations and the karyotyping of the two double-trisomic ESC lines. Cell growth curves were made to evaluate the proliferation abilities of the double-trisomic ESCs. Flow cytometry was used to detect the cell cycle distributions and the levels of apoptosis in double-trisomic ESCs. Colony-forming assays were performed to evaluate the colony formation efficiencies of double-trisomic ESCs. qRT-PCR and immunofluorescence analyses were conducted to determine whether the pluripotency markers were normally expressed in double-trisomic ESCs. Moreover, LIF (leukemia inhibitory factor) withdrawal and EB (embryoid body) formation assays were performed to evaluate the *in vitro* differentiation status of these double-trisomic ESCs. Teratoma assays were conducted by using SCID (severe combined immunodeficiency) mice to determine the effects of double-trisomies on teratoma formation and the differentiation capacities *in vivo*. Array CGH and FISH experiments showed that one cell line gained extra chromosome 3 and chromosome 6 but lost chromosome Y, which was named as DTs-3+6. Another cell line had extra chromosomes of 6 and 8, which was named as DTs-6+8. Double-trisomic ESCs exhibited rapid proliferation characteristics when compared with wild-type ESCs. They expressed stem cell markers OCT4, SOX2 and NANOG when cultured under normal ESC culture conditions. Upon LIF withdrawal, wild-type ESCs mostly went to total differentiation, while double-trisomic ESCs formed many partially differentiated or undifferentiated clones, which were positive for AP (alkaline phosphatase) staining. In the early stage of EB differentiation, the expression of genes related to three-germ layers such as *Fgf5*, *T*, and *Foxa2* in double-trisomic EBs were significantly lower than those in wild-type EBs, indicative of delayed differentiation of double-trisomic ESCs. Once injected into SCID mice subcutaneously, double-trisomic ESCs showed enhanced teratoma formation efficiencies compared with wild-type ESCs. Teratomas derived from double-trisomic ESCs were comprised of many undifferentiated regions. Thus, double-trisomic ESCs had increased proliferation capacities and promoted teratoma formation by impairing cellular differentiation. Double-trisomic ESCs are important models for investigating the roles of aneuploidy in tumorigenesis.

Keywords aneuploidy; double-trisomies; embryonic stem cells; proliferation; differentiation; teratoma

双三体(double-trisomies, DTs, $2n+1+1$)是指同一个细胞或者同一个个体同时获得两条不同的额外染色体。双三体在人类常见于自然流产的胎儿, 多有常染色体三体 and 性染色体三体同时出现^[1-2]。双三体是非整倍体(aneuploidy)的一种, 而非整倍体是肿瘤细胞的重要特征之一, 最新的大规模肿瘤细胞基因组学显示, 大约88%的癌症是非整倍性的^[3]。单条染色体获得多出现在肿瘤早期阶段, 多条染色体获得则易在晚期癌症细胞中出现^[4], 这也符合肿瘤细胞基因组不稳定性持续增加的特性。由于临床肿瘤样本来源的细胞往往存在较为复杂的核型变异, 包括染色体易位、缺失、扩增、染色体数目的增加或减少^[5], 以及多种基因突变^[6], 用这些细胞研究非整倍体产生的生物学效应不能排除其他变异的影响。肿

瘤细胞并非研究非整倍体与肿瘤之间关系的理想模型。此外, 目前关于非整倍体在肿瘤发生发展中的作用尚存争议^[7]。

我们前期使用遗传操作的方法建立了5株单三体小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)系, 发现这些三体细胞与对应的二倍体细胞相比, 表现出生长增殖速度加快、分化能力下降、体内形成畸胎瘤的能力增强等共同特点^[8]。这表明某一条染色体的三体可以在一定程度上限制干细胞的分化能力, 促进肿瘤形成。考虑到肿瘤细胞往往存在多条染色体的核型变异, 在本研究中, 我们系统分析了双三体小鼠ESC株系(DTs-3+6、DTs-6+8)在细胞增殖、分化以及畸胎瘤形成等方面的特征, 它们是研究非整倍体在肿瘤发生发展过程中的作用的宝贵细胞资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 野生型小鼠ESC株系AB1由英国剑桥大学ALLAN BRADLEY教授惠赠,其遗传背景是近交系小鼠129S7/SvEvBrd。双三体小鼠ESC株系(DTs-3+6、DTs-6+8)为本实验室从AB1 ESCs中分离建立,其遗传背景与AB1 ESCs相同。小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)为饲养层细胞,由本实验室制备。

1.1.2 实验动物 SPF级SCID-Beige小鼠,雄性,4~6周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物实验在SPF级环境下进行,所有相关操作符合中国医学科学院基础医学研究所实验动物管理委员会的伦理审查要求。

1.1.3 主要试剂 高糖DMEM、Knockout DMEM培养基、Trizol、羊抗鼠Alexa Fluor 488标记二抗、羊抗兔Alexa Fluor 594标记二抗、染色体探针标记试剂盒购自Thermo Fisher Scientific公司;胎牛血清、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自Sigma公司;白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)购自Millipore公司;一链cDNA合成试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ II购自TaKaRa公司;OCT4、SOX2抗体购自Santa Cruz公司;NANOG抗体购自Millipore公司;4%多聚甲醛、苏木素伊红染液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Annexin V凋亡检测试剂盒购自BD公司;EpiTect Bisulphite试剂盒购自QIAGEN公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠ESC的培养 将小鼠ESC培养在含Knockout DMEM和15% FBS的培养基中,添加1 000 U/mL的LIF。细胞生长在经丝裂霉素C(mitomycin C, MMC)处理的饲养层细胞MEF上。每隔1天传代1次。

1.2.2 双三体小鼠ESC株系的建立 本文所使用的双三体小鼠ESC株系(DTs-3+6、DTs-6+8)分别是在分离建立3号、8号染色体单三体的ESC株系时获得的。单三体小鼠ESC株系是使用PB(piggyBac)转座子介导的基因组随机插入方法,将带有双元药物筛选元件的转座子载体导入AB1 ESCs基因组中,然后结合Cre-loxP重组技术,进行Blasticidin和Puromycin双药筛选分离建立的^[8]。

1.2.3 中期染色体的制备与荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)实验 待细胞生长至对数期,用秋水仙素(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞2 h后,将其消化成单细胞悬液。用0.5% KCl于37 $^{\circ}\text{C}$ 低渗处理细胞15 min后,使用新鲜配制的甲醇/冰醋酸混合液(3:1)室温固定细胞20 min。固定好的细胞悬液滴片后可以进行Giemsa染色观察中期分裂相,也可以使用染色体涂染探针(本实验室制备^[9])进行FISH实验。

1.2.4 微阵列比较基因组杂交(array comparative genomic hybridization, array CGH) 将DTs-6+8 ESCs基因组DNA及参照样品WT ESCs基因组DNA分别进行Cy5与Cy3荧光标记,然后将2个样品共同杂交在NimbleGen 3 \times 720 K mouse whole-genome tiling arrays芯片上,使用NimbleScan 2.6软件进行数据分析,根据实验样品与参照样品的信号比值来判断DNA片段的拷贝数变异情况。由于DTs-3+6分离获得较DTs-6+8晚一些,以及NimbleGen芯片停产问题,DTs-3+6基因组DNA采用Agilent SurePrint G3 Mouse CGH Microarray Kit进行杂交实验。采用Agilent FE软件进行CGH数据提取与分析,红色代表扩增的区域,绿色代表缺失的区域。

1.2.5 流式细胞术 本研究主要使用流式细胞术分析细胞周期各时相的变化规律。将处于对数生长期的细胞消化成单细胞悬液后,使用75%的乙醇于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞过夜,去除RNA酶,用碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色30 min后,进行流式细胞仪检测与分析。使用Annexin V细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡,将细胞进行Annexin V与PI共染后使用流式细胞仪检测。

1.2.6 克隆形成实验 将双三体、单三体(Ts6)与野生型ESC以500个/孔的密度接种到经MMC处理的MEF上,8天后计数克隆数目。克隆形成效率=某一株细胞实际形成的克隆数目/该株细胞接种时的细胞数目 \times 100%。

1.2.7 RNA提取、反转录与qRT-PCR 待ESC生长至对数期时,将其消化成单细胞并差速贴壁去除MEF,然后使用Trizol裂解细胞,并按说明书方法提取总RNA,使用Implen超微量分光光度测定RNA浓度。使用反转录试剂盒对2 μg 总RNA进行反转录合成cDNA,并以cDNA为模板进行qRT-PCR扩增。反应体系:5 μL 2 \times TB Green® Premix Ex Taq™ II, 0.5 μL

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
Oct4-F	GTG GAG GAA GCC GAC AAC AAT GA
Oct4-R	CAA GCT GAT TGG CGA TGT GAG
Nanog-F	TGG TCC CCA CAG TTT GCC TAG TTC
Nanog-R	CAG GTC TTC AGA GGA AGG GCG A
Rex1-F	CAG TCC AGA ATA CCA GAG TGG AA
Rex1-R	ACT CTA GGT ATC CGT CAG GGA AG
Fgf5-F	CTG TAT GGA CCC ACA GGG AGT AAC
Fgf5-R	ATT AAG CTC CTG GGT CGC AAG
T-F	GCT TCA AGG AGC TAA CTA ACG AG
T-R	CCA GCA AGA AAG AGT ACA TGG C
Foxa2-F	CCC TAC GCC AAC ATG AAC TCG
Foxa2-R	GTT CTG CCG GTA GAA AGG GA
Actb-F	ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAG
Actb-R	TAC GAC CAG AGG CAT ACA GGG ACA

正、反向引物, 5 ng cDNA, RNase-free ddH₂O补足至10 μL。反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40个循环。在Roche LightCycler® 480实时定量PCR仪上进行qRT-PCR实验。以*Actb*为内参基因, 采用2^{-ΔΔC_t}法计算基因相对表达量。引物序列见表1。

1.2.8 免疫荧光 用4%多聚甲醛固定爬片上的细胞, 经0.5% Triton X-100透膜后, 用3% BSA在室温下进行封闭, 然后加入一抗(稀释比例为1:500), 于4 °C杂交过夜。洗涤后, 加入二抗(稀释比例为1:2 000), 室温避光孵育1 h。DAPI染核后封片, 在ZEISS正置荧光显微镜下观察。

1.2.9 启动子甲基化分析 使用重硫酸盐测序的方法分析*Oct4*基因启动子区的甲基化情况。首先使用EpiTect Bisulphite试剂盒处理基因组DNA, 再通过PCR、连接T载体和测序的方法测定未甲基化的碱基C到T的转化。

1.2.10 ESCs分化实验 本研究使用了两种体外分化实验。一是完全撤掉ESCs培养体系中的LIF进行分化实验。至分化第5天, 可以通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染色分析细胞的分化程度。不分化的细胞被染成红色, 完全分化的细胞不着色, 部分分化的细胞介于两者之间。二是使用悬浮培养的方法进行拟胚体(embryoid body, EB)实验。消化成单细胞悬液后, 将ESCs以每15 mL培养基1×10⁶个细胞的密度接种到10 cm低吸附培养皿中培养8~10天。

1.2.11 畸胎瘤实验 将处于对数生长期的ESCs消

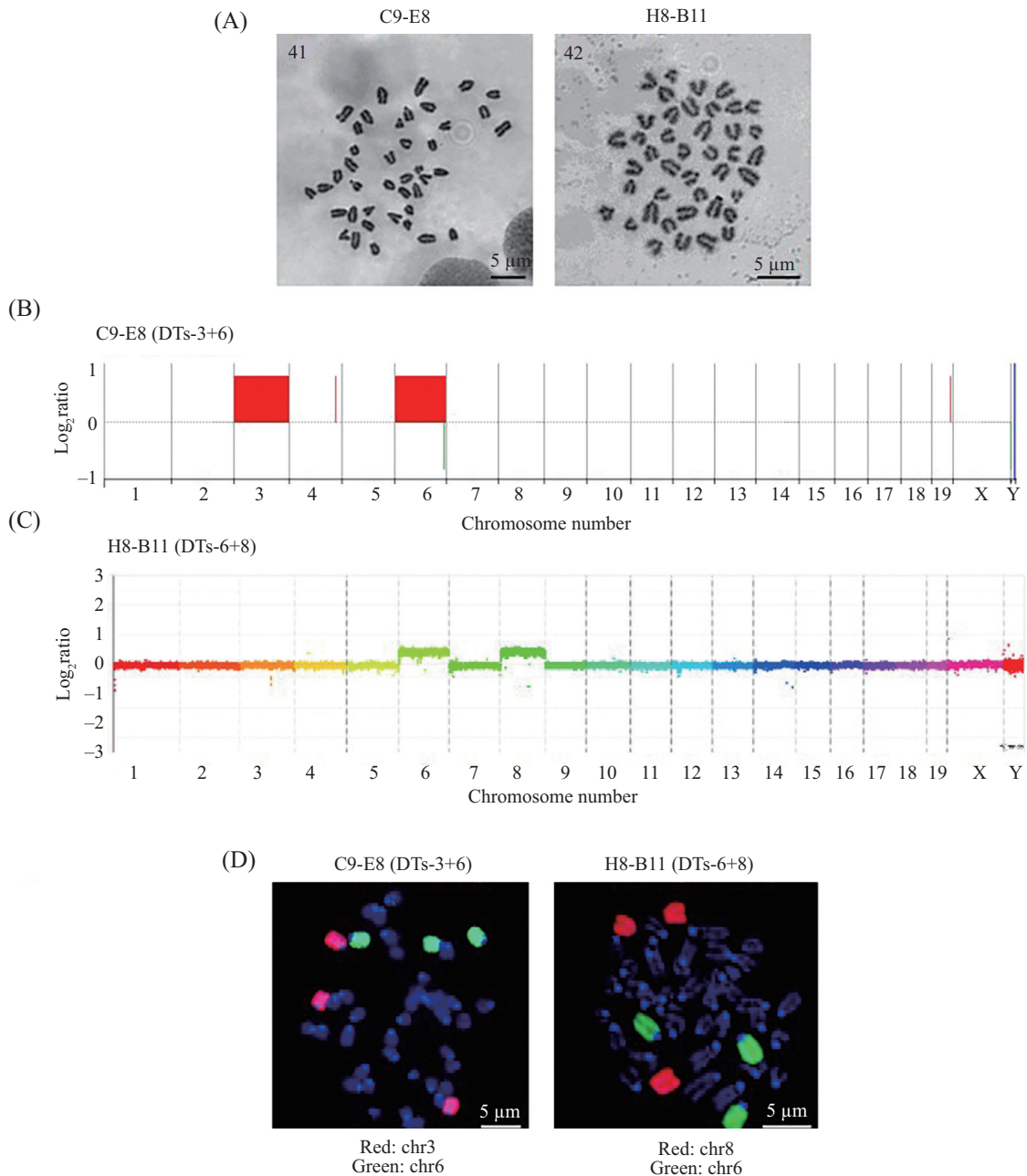
化成单细胞后, 进行细胞计数, 以5×10⁶个/mL的密度接种在SCID-Beige小鼠背部皮下, 每只小鼠接种2个位点, 每个位点接种100 μL。待皮下肿瘤可测量时, 使用游标卡尺量取肿瘤的长径(*l_a*)和短径(*l_b*), 计算肿瘤体积(*l_al_b²/2*), 绘制成瘤曲线。

1.2.12 统计学分析 实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。使用Graphpad Prism 8.0软件进行实验数据的分析和作图, 两样本均数间比较采用*t*检验, *P*<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 双三体小鼠ESC株系的获得与鉴定

我们在使用分子遗传学方法^[10]建立单三体的小鼠ESC株系时, 意外发现C9-E8和H8-B11这两株细胞的生长增殖速度明显加快, 之后对这两株细胞分别制备了染色体中期分裂相, 计数了细胞内的染色体数目(图1A)。我们通过微阵列比较基因组杂交(array CGH)的方法对这两株细胞的全基因组拷贝数进行了分析, 发现C9-E8额外获得了3号和6号染色体, 并且丢失了Y染色体(Y染色体丢失在雄性小鼠ESCs正常培养时经常发生^[11-12]); 而H8-B11同时获得了额外的6号和8号染色体。两株细胞中其他染色体均不存在染色体数目变异的现象(图1B和图1C)。我们分别用小鼠3号、6号、8号染色体的涂染探针进行了FISH实验, 进一步确认了C9-E8获得了额外的3号和6号染色体, 将其命名为DTs-3+6,



A: 双三体ESCs的代表性染色体分裂相。B: 使用安捷伦SurePrint G3小鼠CGH检测试剂盒分析C9-E8 ESCs的基因拷贝数变化, 红色代表扩增, 绿色代表缺失。C: 使用NimbleGen 3 \times 720 K小鼠CGH检测试剂盒分析H8-B11 ESCs的基因拷贝数变化。上移代表扩增, 下移代表缺失。D: 使用小鼠3号、6号、8号染色体的涂染探针进行FISH实验。C9-E8: 红色探针代表3号染色体, 绿色探针代表6号染色体; H8-B11: 红色探针代表8号染色体, 绿色探针代表6号染色体。

A: representative chromosome spreads of double-trisomic ESC lines. B: array CGH of DTs-3+6 ESC lines detected by Agilent SurePrint G3 Mouse CGH Microarray Kit. Red indicates amplification and green indicates deletion. C: array CGH of DTs-6+8 ESC lines detected by NimbleGen 3 \times 720 K mouse whole-genome tiling arrays. Up represents amplification, and down represents deletion. D: chromosome painting of double-trisomic ESC lines. For C9-E8, red signals indicate chromosome 3, and green signals indicate chromosome 6; for H8-B11, red signals indicate chromosome 8, and green signals indicate chromosome 6.

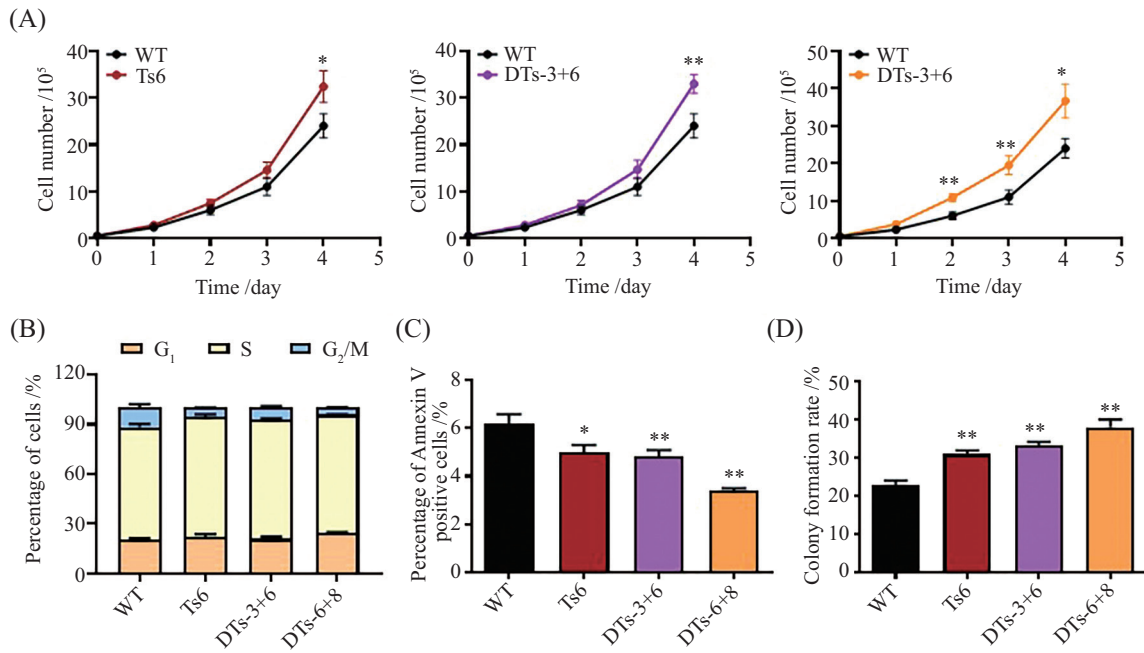
图1 双三体ESC株系的鉴定

Fig.1 Identification of the double-trisomic ESC lines

核型是41, XO, +3, +6; H8-B11获得了额外的6号和8号染色体, 将其命名为DTs-6+8, 核型是42, XY, +6, +8(图1D)。

2.2 双三体ESCs的增殖特征分析

由于两株双三体ESCs(DTs-3+6、DTs-6+8)均包含6号染色体三体, 我们进行细胞增殖实验时也



A: 细胞生长曲线。分别将WT ESCs、Ts6 ESCs、DTs-3+6 ESCs和DTs-6+8 ESCs以 5×10^4 个/孔接种在24孔细胞培养板上,连续培养4天,每天进行细胞计数,绘制生长曲线。B: 流式细胞术检测WT ESCs、Ts6 ESCs、DTs-3+6 ESCs和DTs-6+8 ESCs的细胞周期变化。C: 流式细胞术检测WT ESCs、Ts6 ESCs、DTs-3+6 ESCs和DTs-6+8 ESCs早期凋亡(Annexin V⁺)的细胞比例。D: 克隆形成实验。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与正常对照组相比。

A: cell proliferation curves. WT ESCs, Ts6 ESCs, DTs-3+6 ESCs and DTs-6+8 ESCs were plated into 24-well plates at a density of 5×10^4 cells/well and were cultured for four days. The cell number was counted at the indicated time points, and the cell growth curves were drawn. B: cell cycle distribution of WT ESCs, Ts6 ESCs, DTs-3+6 ESCs and DTs-6+8 ESCs was detected by flow cytometry. C: cell apoptosis of WT ESCs, Ts6 ESCs, DTs-3+6 ESCs and DTs-6+8 ESCs was detected by flow cytometry. D: colony formation assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with normal control group.

图2 双三体ESC的增殖特征分析

Fig.2 Proliferation characteristics of the double-trisomic ESCs

同时检测了6号染色体单三体(Ts6) ESCs的增殖特征。我们将双三体、Ts6以及野生型ESC连续培养4天并进行细胞计数,绘制生长曲线,发现双三体ESC表现出与Ts6 ESCs类似的增殖能力,生长增殖速度较野生型ESC显著加快(图2A)。利用流式细胞术检测细胞周期发现,与野生型ESC相比,双三体ESC与Ts6 ESCs的细胞周期S期增长,G₂/M期缩短(图2B)。利用流式细胞术检测细胞凋亡发现,双三体ESC与Ts6 ESCs细胞群体中Annexin V⁺的细胞比例较野生型ESC显著下降,表明三体细胞早期凋亡水平下降(图2C)。克隆形成实验显示,双三体ESC与Ts6 ESCs的克隆形成能力均较野生型ESC显著增强(图2D)。这些结果表明,双三体ESC表现出类似单三体ESC的快速生长增殖能力,这可能是由其凋亡水平下降和克隆形成能力增强引起的。

2.3 双三体ESC的自我更新特征分析

qRT-PCR实验表明,双三体ESC高表达*Oct4*,

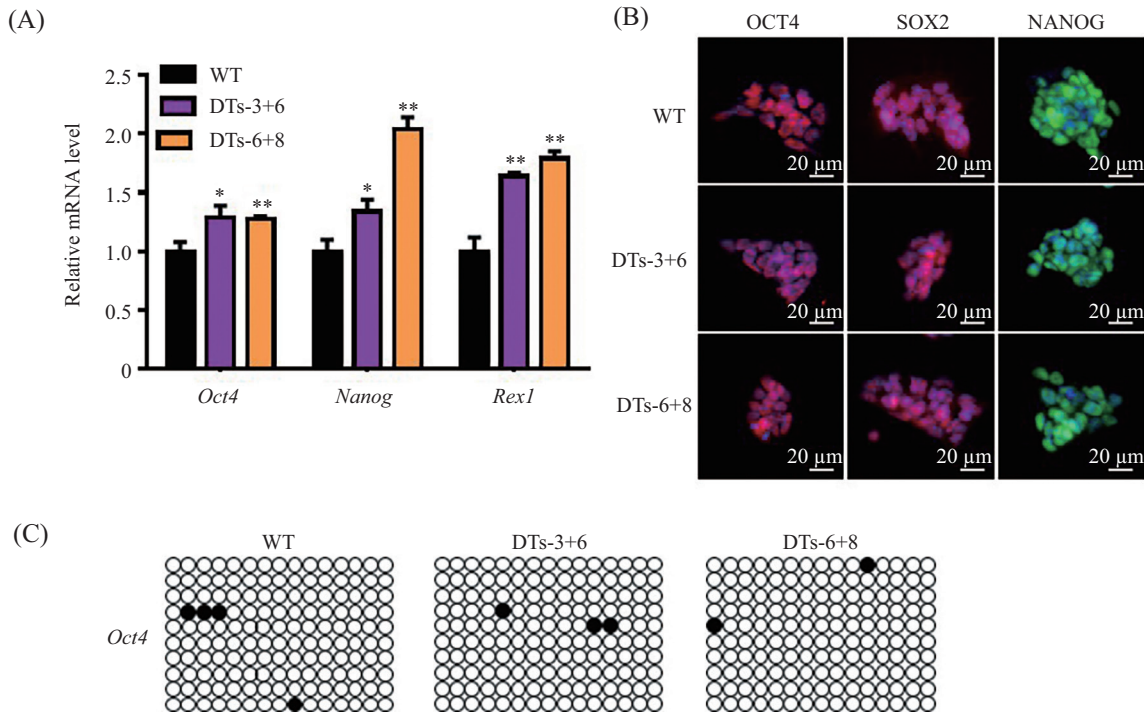
*Nanog*和*Rex1*等多能干细胞标志基因(图3A);免疫荧光实验在蛋白水平验证了双三体ESC高表达多能干细胞标志因子OCT4、SOX2和NANOG(图3B)。我们还分析了双三体ESC中*Oct4*基因启动子区域的DNA甲基化情况,发现双三体细胞中该区域呈现低甲基化,甲基化程度与野生型ESC相当(图3C)。这些结果表明,双三体ESC具有较强的自我更新能力。

2.4 双三体ESC对生长因子LIF的依赖性降低

LIF是多能干细胞维持自我更新所必需的因子。当培养体系中不添加LIF时,干细胞通常会走向自发性分化。我们发现在不添加LIF培养5天后,野生型ESC大多走向完全分化,AP染色基本呈现阴性。而双三体细胞仍维持较高比例未分化或部分分化,它们的AP染色大多呈现阳性(图4)。

2.5 双三体ESC的三胚层不定向分化能力下降

我们通过EB形成实验检测了双三体ESC向外、中、内三胚层的分化能力,发现双三体ESC可以分化形成EB样结构(图5A),但在EB分化早期,双



A: qRT-PCR检测双三体ESCs中*Oct4*、*Nanog*和*Rex1*基因的表达。n=3, *P<0.05, **P<0.01, 与正常对照组相比。B: 免疫荧光实验检测双三体ESCs中OCT4、SOX2和NANOG的表达。C: *Oct4*基因启动子区域甲基化分析。白色圆圈代表未甲基化的CpG位点, 黑色圆圈代表甲基化的CpG位点。

A: the expression of *Oct4*, *Nanog* and *Rex1* was detected by qRT-PCR. n=3, *P<0.05, **P<0.01 compared with normal control group. B: the expression of OCT4, SOX2 and NANOG detected by immunofluorescence. C: the methylation status of *Oct4* promoter region. White circles indicate unmethylated CpG sites, and black circles indicate methylated CpG sites.

图3 双三体ESCs的自我更新特征分析

Fig.3 Self-renewal characteristics of the double-trisomic ESCs

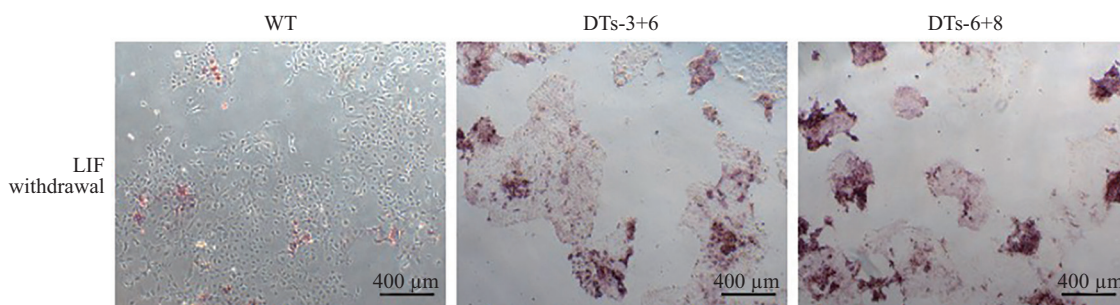


图4 AP染色检测不添加LIF培养5天后双三体ESCs的分化能力

Fig.4 Detection of the differentiation abilities of double-trisomic ESCs upon LIF withdrawal for five days by AP staining

表2 畸胎瘤形成效率统计

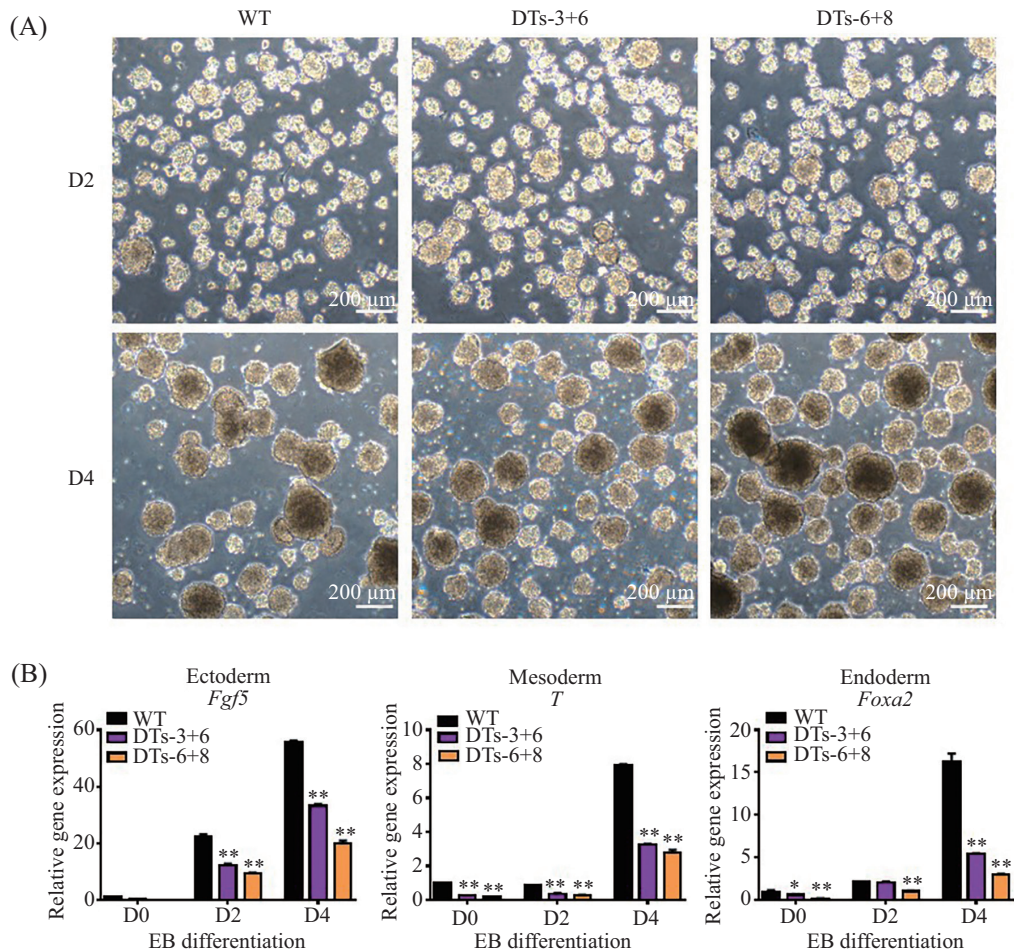
Table 2 The frequency of teratoma formation

细胞数目 Cell number	畸胎瘤形成效率 The frequency of teratoma formation		
	WT	DTs-3+6	DTs-6+8
5×10 ⁵	60% (6/10)	80% (8/10)	90% (9/10)

三体细胞外胚层标志基因*Fgf5*、中胚层标志基因*T(Brachyury)*以及内胚层标志基因*Foxa2*的表达较野生型EB上升缓慢, 分化滞后(图5B)。

2.6 双三体ESCs形成畸胎瘤的能力增强

当将野生型与双三体ESCs分别接种到SCID-Beige小鼠皮下后, 双三体细胞出现畸胎瘤的时间



A: 双三体与野生型ESCs悬浮培养形成EB第2天、第4天的形态学图片。B: qRT-PCR检测双三体与野生型ESCs形成EB过程中中胚层标志基因 *Fgf5*、*T*和*Foxa2*的表达。n=3, *P<0.05, **P<0.01, 与正常对照组相比。

A: morphologies of double-trisomic and wild-type ESC-derived EBs at day 2 and day 4. B: qRT-PCR analysis of three germ layer marker genes *Fgf5*, *T* and *Foxa2* in double-trisomic and wild-type ESC-derived EBs. n=3, *P<0.05, **P<0.01 compared with normal control group.

图5 双三体ESCs的不定向分化能力下降

Fig.5 Double-trisomic ESCs showed decreased EB formation capacities

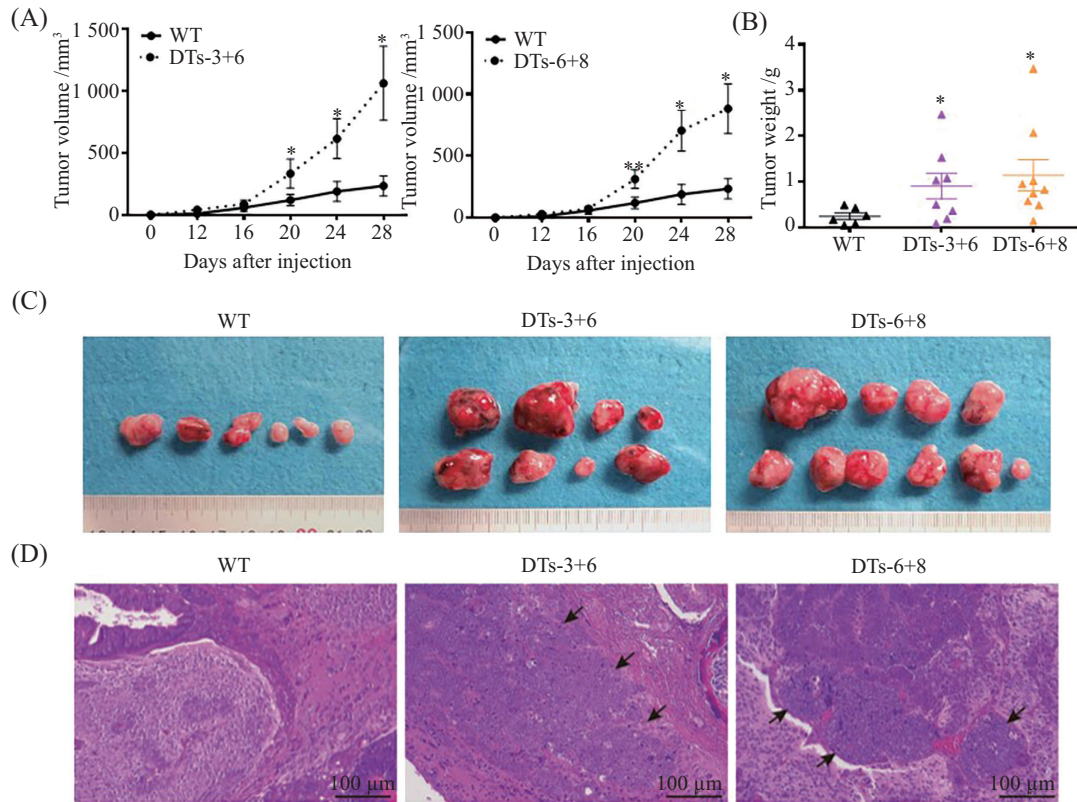
较野生型细胞更早, 形成畸胎瘤的效率提高(表2), 肿瘤生长增殖速度显著加快(图6A), 瘤重增加(图6B), 肿瘤体积增大(图6A和图6C)。HE染色显示, 双三体ESCs形成的畸胎瘤出现许多未分化的区域(图6D), 表明双三体ESCs在一定程度上发生了恶性转化。

3 讨论

近年来, 科研人员已经建立了酵母、小鼠或人特定染色体三体的细胞系, 并使用这些细胞模型系统地研究了非整倍体产生的生物学效应^[8,13-15]。这些细胞系都是某一条染色体为三体状态, 我们尚不清楚如果细胞内存在额外两条不同染色体, 细胞是否会产生类似的生物学表型。以往对染色体双三体的

研究多集中在观察其对个体生长发育的影响^[16], 未见到使用双三体的细胞系研究非整倍体对肿瘤产生影响的相关研究报道。

本研究是在单三体ESC株系的基础上进行的进一步研究, 我们发现双三体ESCs表现出与单三体ESCs类似的变化, 即生长增殖速度加快、细胞分化能力下降和畸胎瘤形成能力增强的特点。双三体ESCs的研究结果加强了非整倍体与肿瘤形成之间的联系。系统性建立的特定染色体三体的ESCs是研究非整倍体与肿瘤之间关系的可靠模型。这些细胞系与野生型细胞的遗传背景相同, 非整倍体的发生时间比较明确, 是一种除了非整倍体以外无其他干扰因素的细胞系。相比于肿瘤细胞累积的基因突变和复杂的染色体结构和数目的变异, 这些单三体和双



A: 畸胎瘤生长曲线。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与WT组相比。B: 取下的畸胎瘤的瘤重。* $P < 0.05$, 与WT组相比。C: 畸胎瘤的图像。D: 畸胎瘤切片的HE染色结果, 箭头所示为未分化的区域。

A: teratoma growth curves. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT group. B: teratoma weights at the days of dissection. * $P < 0.05$ compared with WT group. C: images of teratomas. D: HE staining of teratoma sections. Arrows, undifferentiated regions.

图6 双三体ESCs形成畸胎瘤的能力增强

Fig.6 Double-trisomic ESCs showed increased teratoma formation capacities

三体ESC细胞株系是研究非整倍体在肿瘤发生发展中作用的宝贵资源。与非整倍体MEF或病人来源的细胞相比,上述非整倍体ESCs具有较快的生长增殖速度,培养时呈巢状生长,其代谢方式为与肿瘤细胞类似的有氧糖酵解^[17]。研究表明,ESC样基因的富集与肿瘤的恶性程度直接相关^[18-19]。改变干细胞的自我更新或分化能力可以使其癌化^[15]。因此,以非整倍体ESCs为研究模型更易于揭示非整倍体在肿瘤发生发展中的作用。

综上,虽然非整倍体在肿瘤形成过程中的作用尚存争议,但是近年来建立的一系列非整倍体的研究模型在很大程度上推动了这一领域的发展。肿瘤细胞与非整倍体ESCs的相似性提示,肿瘤细胞表现出的一些表型可能是由其非整倍体状态引起的。非整倍体细胞的一些共有特征有可能成为未来治疗肿瘤的重要切入点。本研究将为了解非整倍体在肿瘤中大量存在的机制以及非整倍体在肿瘤发生发展过

程中的作用提供思路。

参考文献 (References)

- [1] BALWAN W K, KUMAR P, RAINA T R, et al. Double trisomy with 48, XXX+21 karyotype in a Down's syndrome child from Jammu and Kashmir, India [J]. *J Genet*, 2008, 87(3): 257-9.
- [2] 王萍燕, 张欣, 郑海燕, 等. 荧光原位杂交技术检测176例稽留流产绒毛组织染色体数目异常[J]. *中华医学遗传学杂志* (WANG P Y, ZHANG X, ZHENG H Y, et al. Detection of chromosome number variations in 176 aborted villi using fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Chin J Med Genet*), 2013, 30(4): 484-6.
- [3] TAYLOR A M, SHIH J, HA G, et al. Genomic and functional approaches to understanding cancer aneuploidy [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(4): 676-89, e3.
- [4] BALABAN G B, HERLYN M, CLARK W H, JR, et al. Karyotypic evolution in human malignant melanoma [J]. *Cancer Genet Cytogen*, 1986, 19(1/2): 113-22.
- [5] MITELMAN F. Recurrent chromosome aberrations in cancer [J]. *Mutat Res*, 2000, 462(2/3): 247-53.
- [6] CHANOCK S J. The paradox of mutations and cancer [J]. *Science*, 2018, 362(6417): 893-4.

- [7] BEN-DAVID U, AMON A. Context is everything: aneuploidy in cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(1): 44-62.
- [8] ZHANG M, CHENG L, JIA Y, et al. Aneuploid embryonic stem cells exhibit impaired differentiation and increased neoplastic potential [J]. *EMBO J*, 2016, 35(21): 2285-300.
- [9] JIA Y Y, WU H N, FANG L, et al. Sorting of chromosomes on FACSaria(TM) SORP for the preparation of painting probes [J]. *Cytometry A*, 2016, 89(9): 844-51.
- [10] HUANG Y, PETTITT S J, GUO G, et al. Isolation of homozygous mutant mouse embryonic stem cells using a dual selection system [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(3): e21.
- [11] LIANG Q, CONTE N, SKARNES W C, et al. Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(45): 17453-6.
- [12] EGGAN K, RODE A, JENTSCH I, et al. Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 455-9.
- [13] TORRES E M, SOKOLSKY T, TUCKER C M, et al. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast [J]. *Science*, 2007, 317(5840): 916-24.
- [14] WILLIAMS B R, PRABHU V R, HUNTER K E, et al. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells [J]. *Science*, 2008, 322(5902): 703-9.
- [15] WERBOWETSKI-OGILVIE T E, BOSSE M, STEWART M, et al. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(1): 91-7.
- [16] REDDY K S. Double trisomy in spontaneous abortions [J]. *Hum Genet*, 1997, 101(3): 339-45.
- [17] ZHANG J, NUEBEL E, DALEY G Q, et al. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(5): 589-95.
- [18] BEN-PORATH I, THOMSON M W, CAREY V J, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(5): 499-507.
- [19] TERADA Y, JO N, ARAKAWA Y, et al. Human pluripotent stem cell-derived tumor model uncovers the embryonic stem cell signature as a key driver in atypical teratoid/rhabdoid tumor [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(10): 2608-21.e6.