人胚胎干细胞培养体系的研究进展

陈厚良 综述 陈宇 审校

摘要 人胚胎干细胞(hESC)具有显著的增殖能力和分化潜能,已经成为研究再生医学、药理学、药理毒理学、人胚胎发育学和功能基因组学的种子细胞库。hESC在长期维持培养中保持增殖潜能和未分化状态需要饲养层细胞或基质蛋白、血清或基因敲除血清(KSR)以及碱性成纤维生长因子、骨形态蛋白、转化生长因子、激活素A等生长因子。本文就hESC培养体系的传统小鼠胚胎成纤维细胞饲养层、人源性饲养层、Matrigel胶、KSR取代血清、在基质中加入明确的不同的细胞因子等培养方案和hESC的组织工程学应用的研究现状及进展作一综述。

关键词 人胚胎干细胞; 饲养层细胞; 成分确定培养基; 三维支架

中图分类号 R 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1834-04

人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)是来源于囊胚期胚胎的内细胞团的一类细胞,具有无限增殖、自我更新和多向分化等特性,在体外可分化为三胚层,在体内形成畸胎瘤。传统的hESC培养扩增方法应用含动物血清培养基,并依赖饲养层细胞培养,但异源动物血清介入增加了病原污染及免疫排斥的发生概率;血清中含有成分不明的促进胚胎干细胞分化的诱导因子,限制了hESC

的增殖和自我更新;同时依赖饲养层细胞制约了干细胞的规模培养,hESC培养的质量也无法得到充分保证。

1 建立无血清的培养条件

为了最大限度的减少病原体污染和血清中未知成分的干扰,使用基因敲除血清(knock-out serum replacement, KSR)取代血清。使用完全无动物源性的培养基-RegES,其保持hESC和诱导多能干细胞传代培养超过80代,仍保持正常细胞特点^[1]。

2 人源性饲养层细胞作为饲养层细胞培养hESC的建立

为了减少异源性污染和免疫排斥反应,探索使用人脐带间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、人成纤维细胞、包皮成纤维细胞、皮肤成纤维细胞、胎盘纤维母细胞、胎儿肺成纤维细胞等人源性细胞替代传统人胚胎成纤维细胞制备饲养层并成功支持hESC的生长和建立新的品系。

2.1 人脐带MSCs 来源于人胚胎干细胞的间充质干细胞(hESC-MSCs)可以作为饲养层支持hESC自身的生长。人胚胎细胞系SNUhES3培养在hESC-MSCs,维持了良好的hESC的形态和相关因子表达,传代到30代时未见异常核型^[2]。Ding et al^[3]利用脐带MSCs支持hESC生长40代后,hESC表达正常的核型并保持多项分化潜能。

2.2 人包皮成纤维细胞 生长在不同来源的成纤维细胞作为饲养层上的hESC,其形态及增长速度

2014-06-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81370238)

作者单位:中国人民解放军海军总医院心脏中心,北京 100048

作者简介:陈厚良,男,硕士研究生;

陈宇,女,副教授,研究生导师,责任作者,E-mail: yuchenq11@hotmail.com

[24] Kong D, Wang Z, Sarkar S H, et al. Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(6): 1425-35.

[25] Kong D, Li Y, Wang Z, et al. miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(8): 1712-21.

[26] Unno J, Satoh K, Hirota M, et al. LIV-1 enhances the aggressive phenotype through the induction of epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells [J]. *Int J Oncol* 2009, 35(4): 813-21.

[27] Lue H W, Yang X, Wang R, et al. LIV-1 promotes prostate cancer

epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis through HB-EGF shedding and EGFR-mediated ERK signaling [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27720.

[28] Cai H, Babic I, Wei X, et al. Invasive prostate carcinoma driven by c-Src and androgen receptor synergy [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3): 862-72.

[29] Hara T, Miyazaki H, Lee A, et al. Androgen receptor and invasion in prostate cancer [J]. *Cancer Res* 2008, 68(4): 1128-35.

[30] Zhu M L, Kyprianou N. Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells [J]. *FASEB J*, 2010, 24(3): 769-77.

有较大的差异。Hongisto et al^[4]发现此种饲养层细胞通过产生层黏连蛋白-511 和表达层黏连蛋白 $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 7\beta 1$ 之间的整合素而起作用。

2.3 来自拟胚体 (human embryonic bodies, hEB) 的特殊基质作为饲养层 Fu et al^[5]运用一种来自于拟胚体分泌的细胞外基质培养未分化的 hESC 细胞。这种细胞外基质由 4 型胶原酶、层黏连蛋白、纤连蛋白构成,其外基质和无动物源性的 TeSRTM2 培养基共同维持 H1、H9 的生长。检测后胚胎干细胞的表达特异标记: OCT4、SSEA-4 和 Tra-1-60,核型分析表达 SSEA-3/4,在体外实验可以形成拟胚体,体内试验成功进行畸胎瘤实验。

人类支持性细胞系培养方法对饲养层细胞的依赖限制了 hESC 的大规模培养,同时饲养层细胞存在批次间的差异,无法在保证质量的前提下可重复、大规模生产。饲养层的存在,限制了部分基因技术操作,且无法保证饲养层细胞从 hESC 完全分离,阻碍了其临床应用。为克服这些障碍,需要建立一个无饲养层的培养系统。

3 无饲养层培养系统的改良

建立无饲养层基质-Matrigel 胶,这种基质是一种从小鼠恶性肿瘤基膜分离的再生基膜,主要成分是层黏蛋白、IV 型胶原和蛋白糖苷肝素硫酸盐,还包含了生长因子、基质金属蛋白酶等。层黏蛋白或纤连蛋白等可以介导细胞与细胞外基质的黏附、能激活细胞增殖、凋亡、细胞运动、基因表达和细胞分化的信号转导通路。

Hughes et al^[6]运用蛋白组学分析了 5 种未完全明确特性的培养方案,发现纤连蛋白是这些培养方案中主要的促 hESC 生长的支持基质,纤连蛋白亦可使 H9 和 CA1 品系 hESC 保持分化潜能。

4 建立成份确定的促进 hESC 培养体系

Ludwig et al^[7]利用 TeSR1 和 mTeSR1 培养基成功的培养了 hESC,其中 TeSR1 培养基是一种化学成分确定的培养基。在 Matrigel 基质上,TeSR1 可用于未分化状态 hESC 的维持和扩增,而不必添加其他生长因子。Liberski et al^[8]利用成分明确的 mTeSR1 培养方案,结合稳定蛋白标记技术研究 hESC 分化和自我更新机制。Hannoun et al^[9]使用 mTeSR 培养基 hESC 维持培养超过 30 代,与在鼠胚胎成纤维细胞条件培养基 (MEF-CM) 环境下培养的 hESC 产生同等的人肝内皮细胞。无异源性的 hESC

培养基与传统血清替代培养基比较: hESC 在无异性培养基中可以保持多项分化潜能并表达 hESC 的维持稳定的核型、形成拟胚体,分化形成三胚层-内胚层、中胚层、外胚层,但 hESC 的分化、扩增能力下降。

使用筛选出来的生长因子,在无血清无饲养层条件下长期培养 hESC。现在已经确定了数种维持 hESC 生长的生长因子: 主要是成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、骨形态蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)、激活素 A (Activin A)、Noggin、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)、胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 等细胞因子。

4.1 bFGF bFGF 是维持 hESC 自我更新必需。高浓度的 bFGF 能够长时间的维持 hESC 在缺乏纤维母细胞层时的生长。过表达 bFGF 的人胎肝基质细胞支持 hESC 的生长和保持未分化潜能^[10]。

Liu et al^[11]在以人包皮成纤维细胞为饲养层,无异源性无血清培养体系中未添加外源性的 bFGF,连续培养 hESC 超过 10 个月, hESC 保持正常的核型和表面标志物,体外实验能形成低质量的拟胚体,但进一步研究人包皮成纤维细胞可分泌少量 bFGF,说明 bFGF 对于 hESC 的自我更新、生长、分化是必不可少的。bFGF 可以保持 hESC 未分化状态, bFGF 调控 hESC 多能性表面标志物 OCT3/4 的表达, FGF-2 通过介导 PI3-K 信号直接参与调节 Wnt 通路下游信号而维持 hESC 的未分化状态^[12]。

4.2 BMP BMP 是 hESC 的促生长因子,可与其他生长因子协同作用,诱导 hESC 的分化^[13]。Noggin 是 BMP 的拮抗剂,能与 bFGF 协同促进 hESC 保持未分化状态。BMP4 通过 SLUG 和 MSX2 促进 hESC 原肠胚和中胚层的形成。SLUG 和 MSX2 是 BMP4 诱导 hESC 分化的重要转录因子。BMP4 诱导的 MSX2 表达可以促进 hESC 向心血管分化^[14]。BMP-11 和肌生成抑制蛋白支持 hESC 在无饲养层培养体系中保持未分化状态并促进 hESC 的自我更新,无血清培养基条件下补充肌生成抑制蛋白和 BMP-11 可维持未分化 hESC 的克隆和 POU5f1、NANOG、TRA-1-60、SSEA4 的表达,增加 SMAD2/3 的磷酸化^[15]。

4.3 activin/nodal 信号阻断剂 activin/nodal 信号阻断剂在 hESC 无饲养层细胞培养可导致多能性表面标准 OCT4 的缺失。TGF- β 和 activin、nodal 已经

证明对维持 hESC 多能性是必要的,已经被证明对维持 hESC 的多项分化潜能有重要作用。阻断 activin/nodal 信号影响 hESC 中 miRNA 子集-miR-373 的表达,适当水平的 miR-373 对于维持 hESC 多项分化潜能起关键作用,其过表达引起 hESC 向中胚层分化,因 miR-373 参与 TGF 信号的传导^[16]。

4.4 TGF- β 和 IGF-II TGF- β 、IGF-II 协同 FGF 可以维持 hESC 在无饲养层培养状态下的细胞内平衡。把 hESC 培养在人 MSCs 来源的培养基中,在缺乏 IGF-II 的情况下,hESC 一样可以保持多项分化潜能和自身的稳态^[17]。

4.5 LIF LIF 是一种由 179 个氨基酸残基组成的多肽生长因子。在体内由成纤维细胞、T 细胞和巨噬细胞释放,对原初生殖细胞和胚胎干细胞的生长和分化起调节作用。无小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的小鼠胚胎干细胞培养基中 LIF 维持其干细胞特征和未分化状态。LIF 却不能支持无饲养层的 hESC 培养物,其在 hESC 蛋白质翻译过程中不活跃或者缺如。但是在一个已经证实了保持多项分化潜能的传代超过 100 代的 hESC 的多种培养基方案中包含有 LIF^[18]。

4.6 FGF/MEK/Erk 和 GSK3 β 通路的阻断剂 其可以调节人卵裂球多项分化潜能的信号通路。在加入阻断剂的胚胎细胞中高表达 OCT3/4 和 NANOG、NANOG 和 OCT3/4 是干细胞多潜能分化最重要的标志^[19]。其中 OCT4 包含 3 个亚型和 6 个表达基因,高表达的 OCT4A 可使 hESC 克隆形成效率明显提高且不引起分化^[20]。

4.7 Activin A Activin A 是 hESC 保持未分化和自我复制的关键调控因子之一,不同浓度的 Activin A 通过不同的方式影响 hESC 的“干”性。高浓度 Activin A 有利于 hESC 原肠胚的形成,在 hESC 培养中添加 Activin A 使其倾向于形成内胚层细胞^[21]。此外,蛋白精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyltransferase 5,PRMT5)可以维持 hESC 的自我更新,多对于 hESC 的多向分化无明显作用;PRMT5 的消耗对于 OCT4、NANOG、SOX2 的表达无明显影响,体内不能阻止拟胚体形成;其通过提高 G1 期细胞阻断物 P57 的表达起作用^[22]。

完全无动物源物质成份确定的培养系统不仅利于 hESC 的临床应用和基础研究,也利于提高培养系统的可重复性和标准化;建立这种系统可广泛用于药物、新型临床治疗方式研究。

5 hESC 的组织工程学应用

目前研究热点多集中在使用聚合物、蛋白质、多肽聚合物等涂层在三维支架为 hESC 生长提供理想的微观环境,供 hESC 附着、迁移、生长、分化。同时满足细胞对营养和生理的需求。这些生物材料在成本上相对传统的胶原酶、纤连蛋白、层黏连蛋白具有优势并且易大规模生产,性能稳定。

一定孔径密度的聚对苯二甲酸乙二醇酯膜有助于 hESC 的黏附、更新、保持未分化状态^[23]。对比二维、三维微环境培养状态下培养 hESC 的生长和代谢,三维培养减少 hESC 的生长周期和分化能力,延长 G₁ 期、缩短 G₂/M 细胞周期,在葡萄糖和乳酸代谢中两者相识^[24]。在三维动态培养状态下可以促进 hESC 向肝细胞分化,诱导胎儿肝细胞成熟,延长成人肝细胞功能^[25]。三维培养系统提供真实的 hCMC 细胞的黏附和生长环境,Jahnke et al^[26]整合微阵列和 API 定量检测阿霉素、去甲肾上腺素等在三维条件下对 hESC 诱导的心肌细胞的影响。三维培养可以提高 hESC 向内皮细胞的有效分化表达和人脐静脉内皮细胞相同的生物标志物。内皮分化效率提高到 18%^[27]。三维支架扩展了 hESC 的应用空间,为更好的理解细胞结构、功能以及细胞-组织-器官间的相互关系提供了有力的实验平台。

6 展望

目前 hESC 主要的发展方向是建立一种无源性、成分明确的适宜 hESC 增殖、保持未分化状态的培养基。阐明 hESC 增殖、分化的内部机制,使其适应临床要求;如标记胚胎干细胞分化的成血管细胞,为胚胎干细胞体外造血分化的分子机制研究奠定基础^[28];将 hESC-MPs 移植到顺铂诱导的急性肾损伤小鼠中,可显著改善了受损小鼠的肾功能,促进了肾组织修复^[29]。

另外建立严格的培养基生产的 ISO 体系,定期评估新建立的 hESC 品系,广泛利用组织工程学三维支架技术也是必不可少的。这些不仅有利用提高培养系统的可重复性和标准化,也有利于 hESC 的临床应用和基础研究。

参考文献

- [1] Rajala K, Lindroos B, Hussein S M, et al. A defined and xeno-free culture method enabling the establishment of clinical-grade human embryonic, induced pluripotent and adipose stem cells [J].

- PLoS One 2010 5(4): e10246.
- [2] Wang Q, Mou X, Cao H, et al. A novel xeno-free and feeder-cell-free system for human pluripotent stem cell culture [J]. *Protein Cell* 2012 3(1): 51–9.
- [3] Ding D C, Shyu W C, Lin S Z, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells support nontumorigenic expansion of human embryonic stem cells [J]. *Cell Transplantat*, 2012, 21(7): 1515–27.
- [4] Hongisto H, Vuoristo S, Mikhailova A, et al. Laminin-511 expression is associated with the functionality of feeder cells in human embryonic stem cell culture [J]. *Stem Cell Res*, 2012, 8(1): 97–108.
- [5] Fu X, Toh W S, Liu H, et al. Establishment of clinically compliant human embryonic stem cells in an autologous feeder-free system [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(9): 927–37.
- [6] Hughes C S, Radan L, Betts D, et al. Proteomic analysis of extracellular matrices used in stem cell culture [J]. *Proteomics*, 2011, 11(20): 3983–91.
- [7] Ludwig T E, Levenstein M E, Jones J M, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(2): 185–7.
- [8] Liberski A R, Al-Noubi M N, Rahman Z H, et al. Adaptation of a commonly used, chemically defined medium for human embryonic stem cells to stable isotope labeling with amino acids in cell culture [J]. *J Proteome Res* 2013 12(7): 3233–45.
- [9] Hannoun Z, Fletcher J, Greenhough S, et al. The comparison between conditioned media and serum-free media in human embryonic stem cell culture and differentiation [J]. *Cell Reprogram* 2010, 12(2): 133–40.
- [10] Xi J, Wang Y, Zhang P, et al. Human fetal liver stromal cells that overexpress bFGF support growth and maintenance of human embryonic stem cells [J]. *PLoS One* 2010 5(12): e14457.
- [11] Liu C X, Zhang R L, Gao J, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines without any exogenous growth factors [J]. *Mol Reprod Dev* 2014 81(5): 470–9.
- [12] Ding V M, Ling L, Natarajan S, et al. FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3beta signaling [J]. *J Cell Physiol* 2010 225(2): 417–28.
- [13] Sudheer S, Bhushan R, Fauler B, et al. FGF inhibition directs BMP4-mediated differentiation of human embryonic stem cells to syncytiotrophoblast [J]. *Stem Cells Dev* 2012 21(16): 2987–3000.
- [14] Richter A, Valdimarsdottir L, Hrafinkelsdottir H E, et al. BMP4 promotes EMT and mesodermal commitment in human embryonic stem cells *via* SLUG and MSX2 [J]. *Stem Cells* 2014 32(3): 636–48.
- [15] Hannan N R, Jamshidi P, Pera M F, et al. BMP-4 and myostatin support undifferentiated growth of human embryonic stem cells in feeder-free cultures [J]. *Cloning Stem Cells* 2009 11(3): 427–35.
- [16] Rosa A, Papaioannou M D, Krzyspiak J E, et al. miR-373 is regulated by TGFbeta signaling and promotes mesendoderm differentiation in human embryonic stem cells [J]. *Dev Biol*, 2014, 391(1): 81–8.
- [17] Montes R, Liger G, Sanchez L, et al. Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF-beta and IGF-II [J]. *Cell Res* 2009 19(6): 698–9.
- [18] Inamdar M S, Venu P, Srinivas M S, et al. Derivation and characterization of two sibling human embryonic stem cell lines from discarded grade III embryos [J]. *Stem Cells Dev* 2009 18(3): 423–33.
- [19] Van der Jeught M, O'Leary T, Ghimire S, et al. The combination of inhibitors of FGF/MEK/Erk and GSK3beta signaling increases the number of OCT3/4- and NANOG-positive cells in the human inner cell mass, but does not improve stem cell derivation [J]. *Stem Cells Dev* 2013 22(2): 296–306.
- [20] Tsai S C, Chang D F, Hong C M, et al. Induced overexpression of OCT4A in human embryonic stem cells increases cloning efficiency [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014 306(12): C1108–18.
- [21] Guo S, Mao X, He F, et al. Activin A supplement in the hESCs culture enhances the endoderm differentiation efficiency [J]. *Cell Biol Int* 2014 38(7): 849–56.
- [22] Gkoutela S, Li Z, Chin C J, et al. PRMT5 is required for human embryonic stem cell proliferation but not pluripotency [J]. *Stem Cell Rev* 2014 10(2): 230–9.
- [23] Lee S, Kim J, Park T J, et al. The effects of the physical properties of culture substrates on the growth and differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Biomaterials* 2011 32(34): 8816–29.
- [24] Azarin S M, Larson E A, Almodovar-Cruz J M, et al. Effects of 3D microwell culture on growth kinetics and metabolism of human embryonic stem cells [J]. *Biotechnol Appl Biochem* 2012 59(2): 88–96.
- [25] Sivertsson L, Synnergren J, Jensen J, et al. Hepatic differentiation and maturation of human embryonic stem cells cultured in a perfused three-dimensional bioreactor [J]. *Stem Cells Dev* 2013, 22(4): 581–94.
- [26] Jahnke H G, Steel D, Fleischer S, et al. A novel 3D label-free monitoring system of hES-derived cardiomyocyte clusters: a step forward to *in vitro* cardiotoxicity testing [J]. *PLoS One* 2013 8(7): e68971.
- [27] 苏位君, 王玉玉, 宋祥和, 等. 改良三维条件下人胚胎干细胞向内皮细胞的分化及功能 [J]. *中国医学科学院学报* 2012 34(6): 539–44.
- [28] 李春, 周诗君, 翟志敏, 等. 特异性标记胚胎干细胞分化的成血管细胞 [J]. *安徽医科大学学报* 2013 48(5): 545–9.
- [29] 骆靖峰. Kidins220 在胚胎干细胞中的功能及人胚胎干细胞来源间质祖细胞治疗小鼠急性肾损伤研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.