

人类胚胎干细胞与小鼠囊胚嵌合的探讨

徐小明^{a,b}, 杜丽丽^a, 林 戈^{a,b}, 段 馨^a, 卢光琇^{a,b}

(中南大学^a生殖与干细胞工程研究所, ^b人类干细胞国家工程研究中心, 湖南 长沙 410008)

【摘 要】 **【目的】**探讨人类胚胎干细胞(Human embryonic stem cells, hESCs)能否在小鼠胚胎环境中生存并参与其各个组织器官的分化,为 hESCs 与小鼠囊胚嵌合的可行性研究提供依据。**【方法】**将 154 枚受精后 3.5 d(3.5 days postcoitum, 3.5 dpc)ICR 品系小鼠囊胚随机分为 3 组:试验组(注射 hESCs)、模拟注射组(注射针仅刺破透明带及滋养层细胞,但不注射细胞和溶液)及对照组(未注射),于注射后培养 24 h 统计囊胚完全孵化率。将稳定转染增强绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)的含有 9~15 个 hESCs 的小细胞团块,显微注射入 3.5 dpc ICR 品系小鼠囊胚腔内,注射后分别于 3, 24, 48, 69, 77, 94 和 116 h,在普通荧光显微镜下观察 EGFP 阳性细胞的定位与动态分布情况,并将嵌合体胚胎移植入假孕母鼠子宫内,分别于移植后第 4 天和第 6 天处死孕鼠,普通荧光显微镜下观察 EGFP 阳性细胞在整个小鼠胚胎中的分布情况。**【结果】**注射后 24 h,试验组和模拟注射组的囊胚完全孵化率分别为 73.6% 和 77.1%,均极显著高于对照组(38.3%)($P < 0.01$),有 88.9%(32/36)的胚胎中的 hESCs 迁移并定位在小鼠内细胞团(ICM)及其临近的滋养层细胞上;体外培养 48 h 后,EGFP 阳性细胞数进一步减少;116 h 后,只有 1 枚胚胎仍残留 3~4 个 EGFP 阳性细胞,且散在分布于 ICM 克隆之外。体内发育试验结果显示,将 43 枚注射后的嵌合体囊胚移植入 6 只代孕母鼠子宫内,获得了 22 枚脱膜,有 17 枚脱膜中含有胚胎,其中形态正常胎儿 14 枚,没有胚胎含有 EGFP 阳性细胞。**【结论】**hESCs 很难与小鼠囊胚正常嵌合。

【关键词】 人类胚胎干细胞;囊胚;小鼠;嵌合体

【中图分类号】 Q813.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)02-0042-05

Investigation of chimeras of human embryonic stem cells to mouse blastocysts

XU Xiao-ming^{a,b}, DU Li-li^a, LIN Ge^{a,b}, DUAN Xin^a, LU Guang-xiu^{a,b}

(^a Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, ^b National Engineering and Research Center of Human Stem Cells,
Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to explore whether hESCs can survive and contribute to different tissues in the mouse embryos, which will provide the basis for the feasibility study of interspecific chimeras using injection of hESCs into mouse blastocysts. **【Method】** 154 mouse blastocysts of 3.5 days postcoitum (dpc) were randomly divided into 3 groups: experiment group (injection of hESCs), sham group (needle only pierced the zona pellucida and trophoblast cells, but not injected hESCs and solutions) and control (not injection). The rate of hatched blastocyst was calculated after embryo cultured 24 h *in vitro*. 3.5 dpc ICR mouse blastocysts were injected with EGFP-hESCs and allowed to culture 3, 24, 48, 69, 77, 94 and 116 h *in vitro*, or were transferred to the uterine horns of pseudopregnant recipient mice. By fluorescence microscope observation, the EGFP-hESCs contribution pattern of survival, migration, proliferation, and differentiation was investigated. **【Result】** 24 h after injection, the blastocyst hatched rate of the experiment group

* [收稿日期] 2010-07-16

[基金项目] 国家“973”重点基础研究发展计划(2005CB522705);国家自然科学基金项目(30800650);湖南省自然科学基金项目(09JJ4010)

[作者简介] 徐小明(1976—),男,湖南邵阳人,博士,主要从事干细胞与核移植研究。E-mail: xiaomingxu613@126.com

and the sham group were 73.6% and 77.1%, respectively, which was significantly greater than that of the control (38.3%) ($P < 0.01$). At this stage, engrafted cells were localized to the ICM or around ICM of 88.9% (32/36) embryonic chimeras. 48 h after culture *in vitro*, the positive EGFP cells were further decreased. Only 3 to 4 EGFP positive cells scattered out of the ICM in one embryo 116 h after culture *in vitro*. For chimeric embryos development *in vivo*, 43 hESCs-injected blastocysts were implanted into the uterus of 6 pseudopregnant foster mice and harvested 22 formed deciduaes, of which 17 contained embryos. 14 of these embryos were morphous normal and did not contain any EGFP-positive hESCs-137 derivatives.

【Conclusion】 It is very difficult for hESCs to chimeras with mouse blastocysts.

Key words: human embryonic stem cells; blastocysts; mouse; chimeras

嵌合体研究是当前干细胞研究前沿的一个重要方面,涉及一个机体拥有2种不同物种的细胞或组织。检测胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs)的一个重要标准,是将分离所得的ESCs注射到同物种的囊胚内制作嵌合体,并能形成生殖系传递。目前,只有小鼠和大鼠ESCs系才能称作为真正的ESCs系^[1]。

由于伦理、法规上的原因,人类胚胎干细胞(hESCs)不可能与人类胚胎产生嵌合体,如果将hESCs移植于动物胚胎环境,就可以更好地研究其生长分化规律。另外,人-动物嵌合体动物模型的制作也可以为人类重大疾病,如艾滋病、肿瘤和新发传染病的治疗提供新的途径。前人的移植试验结果显示,人类成体干细胞可以在动物体内存活、增殖及分化^[2-5]。在人类胚胎干细胞移植的研究中, Park等^[6]将hESCs移植于Parkinson's大鼠大脑中,发现其可以在纹状体中存活; Muotri等^[7]将hESCs移植于14 d胎鼠脑中,结果并没有形成肿瘤,且能迁移分化为神经元和神经胶质细胞;此外, James等^[8]对hESCs与小鼠囊胚嵌合进行研究,结果表明,大部分嵌合胚胎的嵌合能力差且形态表现异常,不能产生存活的嵌合体。因此, hESCs能否与小鼠早期胚胎正常嵌合还需要进一步试验来证实。基于此,本试验拟将带有增强的绿色荧光蛋白(EGFP)的hESCs(EGFP-hESCs)注入小鼠囊胚腔,通过体外培养和移植假孕母体子宫内来探讨hESCs在小鼠胚胎内能否存活、迁移、增殖及分化,以期为hESCs与小鼠囊胚嵌合的可行性研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及细胞系 囊胚来源于正常受精的ICR品系小鼠,结扎公鼠及代孕母鼠均为昆明白

小鼠。人类胚胎干细胞(hESCs-137)系^[9]来自人类干细胞国家工程研究中心,293FT细胞系购自Invitrogen公司。

本研究征得了中信湘雅生殖与遗传专科医院伦理委员会同意,并接受其定期检查和监督。

1.1.2 试剂 除非特别注明,所有试剂均购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 EGFP-hESCs-137细胞系的建立与培养

(1)慢病毒颗粒的包装。以pSin-EF2-Oct4-Pur质粒(Addgene)为骨架,采用酶切连接的方式将Oct4片段替换为EGFP,获得pSin-EF2-EGFP-Pur慢病毒载体。使用DMEM(Hyclone)+体积分数10% FBS(Gibco)培养液,于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中培养293FT细胞。待293FT细胞融合度达到70%~90%时,用Lipofectamine2000将lentivector、pMDG、pCMV△R8.91 3种质粒共转染293FT细胞(具体方法见Lipofectamine2000说明书),37℃下孵育过夜后,更换为DMEM完全培养基(含1 mmol/L丙酮酸钠)。分别于转染后48和72 h收集含病毒的上清液,置入15 mL Falcon锥形管中,4℃、3 000 r/min离心10 min备用。

(2)慢病毒感染hESCs-137细胞。将第10代的hESCs-137细胞移到FBS铺皿的一孔板中培养,采用hEF-CM+4 ng/mL bFGF培养3 d。待hESCs处于对数生长期时,加入含pSin-EF2-EGFP-Pur慢病毒颗粒的病毒上清液以感染hESCs-137细胞,24 h后更换为DMEM/F12(体积比1:1, Gibco)+体积分数15% KSR(Invitrogen)+4 ng/mL bFGF+10.1 mmol/L β-巯基乙醇+0.1 mmol/L 非必需氨基酸(NEAA, Gibco)+2 mmol/L 谷氨酰胺(Invitrogen)hESCs培养液,从中挑取荧光克隆传代至人类胎儿成纤维细胞饲养层上培养。

1.2.2 EGFP-hESCs细胞团块的选择 挑选培养

5 或 7 d、具有典型 ESCs 克隆形态的 EGFP-hESCs,机械切割成小细胞团块,用 DPBS 清洗 1 遍后,转入 500 μ L HBSS 中孵育 5~10 min,轻轻吹打,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 50 μ L ESCs 培养液重悬,置于冰上等待囊胚注射。选择大小相当的小细胞团块,用 0.5 g/L 胰酶+0.2 g/L EDTA 于 37 $^{\circ}$ C 消化 15~20 min,之后用口径适当(内径 25~30 μ m)的玻璃管(自制)轻轻吹打成单个细胞,于荧光显微镜下观察、计数。

1.2.3 囊胚注射及体外培养 取 5~8 周龄 ICR 母鼠与同品系公鼠合笼,次日早晨 08:00—09:00 检栓,见栓 3.5 d 后,用 DMEM+体积分数 5%FBS+20 mol/L HEPES 操作液从子宫冲出并收集囊胚。将形态正常、完全扩张的囊胚置于操作液中等待注射。

用固定针(自制,外径 100~120 μ m)调整囊胚内细胞团,使其处于 6 点左右的位置,用注射针(自制,内径 22~25 μ m)吸取形态好、折光性强且含有 9~15 个细胞的小细胞团块,从 3 点左右的位置在 2 个滋养层细胞相连接处进入,将 hESCs 细胞团块注射入受精后 3.5 d(3.5 days postcoitum, 3.5 dpc)小鼠囊胚腔内,当囊胚腔逐渐变小时慢慢抽回注射针。将注射后的囊胚放在 DMEM/F12+体积分数 10%FBS+0.1 mmol/L NEAA+0.1 mmol/L β -巯基乙醇+2 mmol/L 谷氨酰胺的培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养。体外培养 3~116 h 后,于普通荧光显微镜下观察、成像。

为了评估注射后囊胚的发育能力,使用注射后 24 h 囊胚全部从透明带中孵化(完全孵化囊胚)作为评估标准,囊胚完全孵化率=完全孵化的囊胚数/培养的囊胚总数 $\times 100\%$ 。本试验将 154 枚 3.5 dpc 小鼠囊胚随机分为 3 组:试验组(注射 hESCs 组)、模拟注射组(注射针仅刺破透明带及滋养层细胞,但不注射细胞和溶液)及对照组(未注射)。

1.2.4 体内发育 细胞注射后于体外培养 3~4 h,选择重新形成囊胚腔并且 EGFP-hESCs 在囊胚腔内的胚胎,移植于 2.5 d 假孕母鼠子宫内,同时选择未注射的囊胚进行移植(对照)。分别于移植后 4 和 6 d 处死孕鼠,分离胚胎,荧光显微镜下观察小鼠胚胎内 EGFP 阳性细胞的分布情况。

1.2.5 统计学分析 囊胚完全孵化率使用 χ^2 检测,试验重复 4 次, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 稳定表达 EGFP 报告基因的 hESCs 细胞系的建立

为了便于跟踪 hESCs 在小鼠胚胎发育过程的定位、增殖及分化,本试验使用含 pSin-EF2-EGFP-Pur 慢病毒颗粒感染第 10 代的 hESCs-137,挑取强表达 EGFP 的克隆进行传代,连续扩增 4 代,再用 TrypLE(Gibco)消化荧光克隆,进行单细胞培养,挑取单克隆,获得了稳定表达 EGFP 的 hESCs 细胞系。

2.2 EGFP-hESCs 小细胞团块的选择

由于 hESCs 离散成单个细胞后很难生长,因此本试验选择小的 hESCs 团块进行注射。为了确定所注射 hESCs 小团块的具体细胞数,随机选择机械切割后大小相当的细胞团块 20 个,用 0.5 g/L 胰酶+0.2 g/L EDTA 37 $^{\circ}$ C 消化 15~20 min,经口径适当的玻璃管(自制)轻轻吹打成单个细胞,于荧光显微镜下观察计数,结果表明,平均每个小细胞团块含有细胞(12 $\pm$ 3.5)个,之后每个囊胚注射的细胞团块大小基本以此为标准进行选择。

2.3 注射后 24 h 囊胚的孵化情况

注射后 24 h 于倒置显微镜下观察胚胎的发育情况,结果(表 1)表明,试验组和模拟注射组囊胚完全孵化率分别为 73.6%和 77.1%,均极显著高于对照组($P<0.01$)。

表 1 hESCs 注射后 24 h 小鼠囊胚完全孵化率的比较

Table 1 Comparison of hatched blastocysts rate in each experimental group 24 h after injection

组别 Group	囊胚数 No. of blastocysts	囊胚完全孵化率/% Hatched blastocysts rate
试验组 Experiment group	72	73.6(53)a
模拟注射组 Sham group	35	77.1(27)a
对照组 Control	47	38.3(18)b

注:同列数据后标不同字母者表示差异极显著($P<0.01$)。

Note: Different superscripts after the data in the same line indicate significant differences ($P<0.01$).

2.4 体外培养不同时间 EGFP-hESCs 及其衍生物在小鼠胚胎内的定位及分布

在荧光显微镜下观察体外培养 3~116 h 的 EGFP-hESCs 及其衍生物在小鼠胚胎内的定位和分布情况,发现注射后的小鼠囊胚腔逐渐塌陷,并将 EGFP-hESCs 团包裹在里面(图 1)。

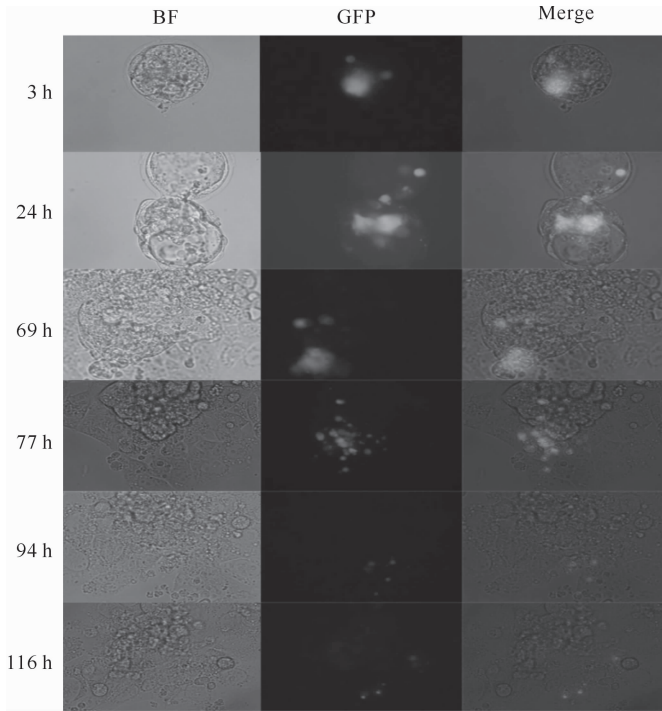


图 1 体外培养 3~116 h EGFP 阳性细胞在小鼠胚胎内的定位及分布(400×)
BF. 明场;GFP. 绿色荧光;Merge. 明场和绿色荧光叠加

Fig. 1 Contribution of positive cells of EGFP to mouse blastocysts 3—116 h after culture *in vitro* (400×)
BF, Bright field;GFP, Green fluorescent protein;Merge, BF and GFP overlayed

由图 1 可以看出,体外培养 3~6 h 后,囊胚腔重新形成,囊胚腔内可见绿色荧光较强的细胞团块,此时,细胞团在囊胚腔内有分布但并无规律性;体外培养 24 h 后,97.2%(35/36)的小鼠胚胎正在孵化或全部从透明带中孵出,小鼠胚胎细胞数增多,荧光强度与注射后 3 h 相比有所减弱,在 88.9%(32/36)的胚胎中,EGFP-hESCs 处在内细胞团(ICM)或其附近的位置,在极少数的胚胎中,EGFP-hESCs 附着在滋养层上;48 h 后,小鼠囊胚腔塌陷并贴壁生长,细胞进一步增殖,84.6%(22/26)的胚胎内存留着 1~3 个 EGFP 阳性细胞,有 15.4%(4/26)胚胎仍保留着较强的荧光强度;69 h 后,大多数胚胎 EGFP 阳性细胞消失或被排出在小鼠 ICM 隆起的克隆之外;116 h 后,只有 1 枚胚胎仍残留有 3~4 个 EGFP 阳性细胞,且散在于克隆之外。以上结果显示,hESCs 不能很好地与小鼠胚胎嵌合,也不能参与其发育与分化。

2.5 嵌合体胚胎在移植小鼠体内的发育情况

将 43 枚注射后的嵌合体囊胚移植入 6 只代孕母鼠子宫内,结果有 5 只妊娠(83.3%)成功,分别于移植 4 和 6 d 处死孕鼠,取出 22 枚脱膜,有 17 枚脱膜中含有胚胎,其中正常胎儿 14 枚,荧光显微镜下

观察发现,没有胚胎含有 EGFP 阳性细胞(图 2)。

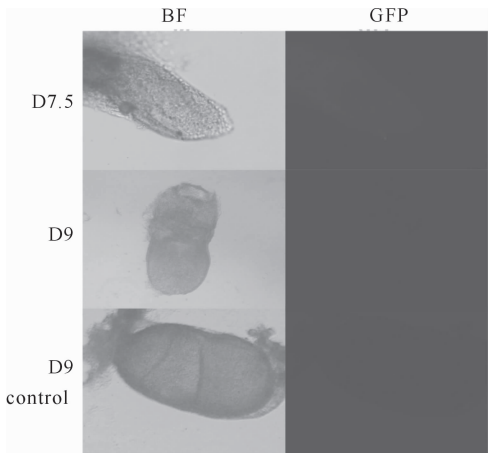


图 2 嵌合体胚胎在移植小鼠体内发育 4~6 d 后的情况(100×)
BF. 明场;GFP. 绿色荧光;D7. 5. 移植 4 d 后的胚胎;

D9. 移植 6 d 后的胚胎;D9 control. 体内正常发育第 9 天的胚胎
Fig. 2 Embryonic chimeras following implantation

4—6 d *in vivo* (100×)
BF, Bright field;GFP, Green fluorescent protein;
D7. 5 and D9. Chimeric embryos transferred into uterus for 4 and 6 d;
D9 control. Embryo normal development *in vivo* at 9 day

3 讨 论

自 1981 年 Evans 等^[10]首次分离建立小鼠 ESCs 系后,Bradley 等^[11]通过囊胚注射法首次获得了 ESCs 嵌合体小鼠,并能形成生殖系嵌合。由于嵌合体能携带适当的遗传标记并能在个体发育中表现出来,因而成为研究动物个体发育最为理想的试验材料和遗传研究模型。基于此,人们设想将 hESCs 移植于动物胚胎环境,以期能更好地研究其表型、分化特点及生长发育规律。

本研究结果表明,注射后 24 h 试验组和模拟注射组的囊胚完全孵化率分别为 73.6% 和 77.1%,均极显著高于对照组($P < 0.01$)。该结果显示,注射细胞及其显微操作过程并未对小鼠胚胎发育能力产生不利影响,相反,由于透明带破损反而增大了囊胚孵化速度。本试验发现,EGFP-hESCs 注入小鼠囊胚腔内 24 h 后,88.9% 的胚胎中 hESCs 迁移并定位在小鼠 ICM 及其附近位置,这可能是由于 hESCs 来源于人类囊胚 ICM,其与小鼠 ICM 存在某种生物相似性,或小鼠 ICM 及其周围的环境适合于 hESCs 定居,从而使其相互吸引并聚集。随着体外发育的进行,体外培养 48 h 后,EGFP 阳性细胞数进一步减少,其可能的原因有以下 2 个:一是小鼠胚胎本身存在一种清除机制,对异己的细胞进行识别并启动清除程序;二是小鼠细胞与人类细胞分裂周期存在差异,小鼠细胞分裂速度明显比人类细胞快,人类细胞相对处于劣势地位。

本研究结果还表明,将嵌合体胚胎移植入代孕母鼠子宫 4~6 d 后,经荧光显微镜观察,并未发现 EGFP-hESCs 来源的细胞存在。一般认为,亲缘关系越远的物种之间获得成活嵌合体的可能性越小^[8]。人类(灵长目)与小鼠(啮齿目)的生物进化亲缘关系甚远,二者 DNA 序列之间差异达 45%^[12]。另外,最近的研究还表明,来自小鼠上胚层(Epi-blast)的多能性干细胞(mEpiSCs)不能形成嵌合体,早期胚胎聚合能力也较差,hESCs 在克隆生长形态、信号通路、基因表达、X 染色体失活等方面具有 mEpiSCs 的诸多特性^[13]。因此,结合前人的研究和本试验结果,可以否定 hESCs 与小鼠胚胎嵌合的可行性。

[参考文献]

- [1] Nichols J, Smith A. Naïve and primed pluripotent states [J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(6): 487-492.
- [2] Ourednik V, Ourednik J, Flax J D, et al. Segregation of human neural stem cells in the developing primate forebrain [J]. Science, 2001, 293: 1820-1824.
- [3] Yokoo T, Ohashi T, Shen J S, et al. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(9): 3296-3300.
- [4] Zeng F Y, Chen M J, Baldwin D A, et al. Multiorgan engraftment and differentiation of human cord blood CD34⁺ Lin-cells in goats assessed by gene expression profiling [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(20): 7801-7806.
- [5] Jiang R, Huang B, Jin C, et al. A potential model for studying the plasticity and reprogramming of human epidermal stem cells through preimplantation blastocysts microinjection [J]. Cell Biol Int, 2008, 32(12): 1567-1573.
- [6] Park S, Kim E Y, Ghil G S, et al. Genetically modified human embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of Parkinson's disease [J]. Neurosci Lett, 2003, 353(2): 91-94.
- [7] Muotri A R, Nakashima K, Toni N, et al. Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(51): 18644-18648.
- [8] James D, Noggle S A, Swigut T, et al. Contribution of human embryonic stem cells to mouse blastocysts [J]. Development Biology, 2006, 295: 90-102.
- [9] Lin G, Xie Y B, Ouyang Q, et al. HLA-matching potential of an established human embryonic stem cell bank in China [J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(5): 461-465.
- [10] Evans M, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. Nature, 1981, 292: 154-155.
- [11] Bradley A, Evans M, Kaufman M H, et al. Formation of germ line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines [J]. Nature, 1984, 309: 255-256.
- [12] Xiang A P, Mao F F, Li W Q, et al. Extensive contribution of embryonic stem cells to the development of an evolutionarily divergent host [J]. Human Molecular Genetics, 2008, 17(1): 27-37.
- [13] Tesar P J, Chenoweth J G, Brook F A, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells [J]. Nature, 2007, 448(7150): 196-199.