

四种胞外基质支持人胚胎干细胞的生长：效果有差异吗？***◆

胡智兴^{1,2}, 罗敏^{2,3}, 周轶平^{2,3}, 梁道明⁴

Four kinds of extracellular matrixes support the growth of human embryonic stem cells: Effect differences

Hu Zhi-xing^{1,2}, Luo Min^{2,3}, Zhou Yi-ping^{2,3}, Liang Dao-ming⁴

Abstract

BACKGROUND: Extracellular matrixes play important roles in the maintenance of undifferentiated state and self-renewal of human embryonic stem cells (hESCs). Establishment of a defined serum- and feeder-free culture system is a prerequisite for the application of hESCs in cell-replacement therapy.

OBJECTIVE: The present study was designed to compare the effects of four kinds of extracellular matrixes on the support the growth of hESCs.

METHODS: We set four groups using conventionally recovered hESCs BGO2. BGO2 was cultured on Matrigel-, laminin-, fibronectin-, or collagen-coated plates in serum-free medium containing basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor beta 1 (TGFβ1), Insulin-Transferrin-Selenium (ITS). The attachment rate and differentiated rate of BGO2 clumps in various conditions were measured. The proportions of Oct-4 and Nanog positive cells in various groups were assessed by flow cytometry. The extracellular matrix receptor expression was analyzed by RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: The attachment rates of BGO2 cell clumps in Matrigel and laminin groups were significantly higher than that of fibronectin and collagen groups ($P < 0.05$), but differentiated rate was significantly reduced ($P < 0.05$). The percentage of Oct-4⁺ and Nanog⁺ BGO2 cells in Matrigel and laminin groups were higher than that of fibronectin and collagen groups ($P < 0.05$). No significant difference in each index was determined between the fibronectin and collagen groups ($P > 0.05$). BGO2 cells in Matrigel and laminin groups expressed higher levels of integrin α5, integrin α6 and integrin β1 mRNA than that in fibronectin and collagen groups. Above-mentioned results indicated that Matrigel and laminin could support the proliferation of BGO2 cells well, while fibronectin and collagen could not support the proliferation of BGO2 cells. These variations might be attributed to the activation of integrin subunits in BGO2 cells.

Hu ZX, Luo M, Zhou YP, Liang DM. Four kinds of extracellular matrixes support the growth of human embryonic stem cells: Effect differences. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6): 1027-1030.

[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景：胞外基质在维持人胚胎干细胞的自我更新和未分化状态方面具有重要作用，建立无血清无饲养层、成分明确的人胚胎干细胞培养系统是胚胎干细胞用于临床移植研究的前提。

目的：比较4种胞外基质对于维持人胚胎干细胞生长的效果差异。

方法：常规复苏人胚胎干细胞株BGO2，设立4组，分别将人胚胎干细胞转至预铺有纤粘连蛋白、IV型胶原、Matrigel、层粘连蛋白的培养板上，均在含bFGF、TGFβ及ITS无血清培养基中培养。测定细胞集落贴壁率及分化率，流式细胞仪检测人胚胎干细胞特异性分子标志Oct-4及Nanog的表达，RT-PCR检测胞外基质受体的表达。

结果与结论：与纤粘连蛋白组、IV型胶原组比较，Matrigel组和层粘连蛋白组人胚胎干细胞集落的贴壁率均明显增加($P < 0.05$)，分化率均明显降低($P < 0.05$)，Oct-4、Nanog阳性率均明显升高($P < 0.05$)，后2组各项指标比较无明显差异($P > 0.05$)。

Matrigel组、层粘连蛋白组人胚胎干细胞高表达整合素受体integrinα5, integrinα6和integrinβ1；而纤粘连蛋白组、IV型胶原组3种整合素受体的表达均明显降低。提示Matrigel和层粘连蛋白可以较好支持人胚胎干细胞在无饲养层体系生长，而纤粘连蛋白和IV型胶原无法维持人胚胎干细胞的未分化状态；人胚胎干细胞integrin受体家族激活状态的不同，可能是不同胞外基质对于维持人胚胎干细胞自我更新产生差异的原因之一。

关键词：胞外基质；自我更新；生长；整合素；人胚胎干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.06.016

胡智兴, 罗敏, 周轶平, 梁道明. 四种胞外基质支持人胚胎干细胞的生长：效果有差异吗？[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6):1027-1030. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

现已明确胞外基质在维持人胚胎干细胞的自我更新和未分化状态方面具有重要作用，其中Matrigel、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、胶原等已运用于人胚胎干细胞的无饲养层无血

清培养^[1-3]。但是生长在不同培养基质上的人胚胎干细胞是否具有相同的生物学特性，以及对于特定的人胚胎干细胞株，何种胞外基质最适宜等问题均有待于研究对比和筛选。

实验通过对比人胚胎干细胞系BGO2在4种胞外基质的生长特点，旨在建立人胚胎干细胞的无饲养层无血清培养体系，为深入研究胞外基质

¹Department of Pharmacology, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China; ²Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China; ³Yunnan Provincial Pharmacological Key Laboratory of Natural Drug, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China; ⁴Second Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Hu Zhi-xing*, Doctor, Lecturer, Department of Pharmacology, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China; Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China xingzhihu@163.com

Correspondence to: Liang Dao-ming, Doctor, Associate chief physician, Second Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China liangdaoming@yahoo.com.cn

Supported by: Special Research Foundation of Department of Science and Technology of Yunnan Province-Kunming Medical University, No.2007C0012R, 2007C0044R**, Natural Science Foundation of Yunnan Province, No.2005C0013R*

Received: 2009-10-05 Accepted: 2010-01-13

¹ 昆明医学院药理学教研室, 云南省昆明市 650031; ² 昆明医学院云南省生物医学工程中心, 云南省昆明市 650031; ³ 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南省昆明市 650031; ⁴ 昆明医学院第二附属医院, 云南省昆明市 650031

胡智兴☆, 男, 1970年生, 浙江省永康市人, 汉族, 2007年中国科学院昆明动物研究所毕业, 博士, 讲师, 主要从事干细胞方面的研究。
xingzhihu@163.com

通讯作者: 梁道明, 博士, 副主任医师, 昆明医学院第二附属医院, 云南省昆明市 650031
liangdaoming@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)06-01027-04

收稿日期: 2009-10-05
修回日期: 2010-01-13
(20091005001/ZS-Q)

对维持人胚胎干细胞自我更新和未分化状态的作用以及相关信号分子机制提供实验基础。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对照观察。

时间及地点: 于2007-12/2009-05在中国科学院昆明动物研究所完成。

材料:

细胞、试剂与仪器	来源
人胚胎干细胞株BG02	美国BresaGen公司
DMEM/F12培养基、KSR、新生牛血清、dispase酶、ITS、非必需氨基酸	Gibco公司
青霉素、链霉素、谷氨酰胺、β-巯基乙醇	Sigma公司
Matrigel、IV型胶原	BD公司
层粘连蛋白	invitrogen公司
纤粘连蛋白、TGF-β1, bFGF	Chemicon公司
Thermo Scientific MSC二级生物安全柜、CO ₂ 培养箱	Thermo公司
倒置相差显微镜	Olympus公司
激光共聚焦显微镜	Zeiss, LSM 510 META

实验方法:

人胚胎干细胞的复苏和培养^[4]: 常规复苏人胚胎干细胞株BG02(P40代), 转移至装有10 mL DMEM/F12的离心管, 500 g离心5 min, 重悬细胞, 铺到小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上, 五六天传代。加入5 g/L dispase酶, 37 °C消化5 min, 离心洗涤2次, 重悬于胚胎干细胞培养基中, 接种到新铺的饲养层上连续培养。

人胚胎干细胞在4种胞外基质上的无饲养层培养^[5]: 设立4组: 分别将Matrigel、纤粘连蛋白、层粘连蛋白、IV型胶原置于4 °C冰箱, 待其完全融化后, 稀释于冷DMEM/F12。各取1 mL均匀铺于4孔板, 37 °C孵育1.0~2.0 h, 然后吸出, DMEM/F12清洗1遍, 待用。生长五六天后的人胚胎干细胞(P41代)dispase酶消化后, 重悬于无血清无饲养层培养基(含80% DMEM/F12、20% KSR、2 mmol/L 谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、ITS(×1)、10⁴ U/L青霉素、100 mg/L链霉素、4 μg/L bFGF和0.12 μg/L TGFβ1), 接种到预铺胞外基质的4孔板, 于37 °C、体积分数为5%的CO₂培养箱中培养。5~7 d后加入dispase酶消化, 按1:3比例重新接种预铺胞外基质后的4孔板。

人胚胎干细胞集落贴壁率检测: 人胚胎干细胞生长4~6 d后, 机械法传代, 重新接种到胞外基

质包被的培养板上, 每孔接种50个小团块, 分别于8, 12, 24, 48, 72 h镜下检测贴壁的集落个数, 计算集落贴壁率。集落贴壁率(%)=贴壁的集落个数/接种集落个数×100%。

人胚胎干细胞集落分化率检测: 观察各组细胞集落生长约4 d的形态, 对胚胎干细胞克隆的分化进行分级。分化细胞占集落细胞总数<30%为未分化集落, 分化细胞占集落细胞总数30%~70%为部分分化集落, 分化细胞>70%为完全分化集落。每次随机检测80~100个人胚胎干细胞集落, 计算人胚胎干细胞细胞集落分化率。试验重复6次。

$$\text{集落完全(部分)分化率(\%)} = \frac{\text{完全(部分)分化集落}}{\text{总集落}} \times 100\%$$

人胚胎干细胞胞外基质相关受体的表达 RT-PCR 检测: 细胞总RNA提取参照TRIZOL RNA试剂盒说明书进行。ntergrin α5: Sense: 5'-CAG CCC TAC ATT ATC AGA GCA AG-3', Antisense: 5'-GTT CAC GGC AAA GTA GTC ACAG-3', 299 bp。Intergrin α6: Sense: 5'-CAA GAT GGC TAC CCA GAT AT-3', Antisense: 5'-CTG AAT CTG AGA GGG AAC CA-3', 210 bp。Intergrin β1: Sense: 5'-GTT ACA CGG CTG CTG GTG TT-3', Antisense: 5'-CTA CTG CTG ACT TAG GGA TC-3', 264 bp。GAPDH: Sense: 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GA-3', Antisense: 5'-TGG TGC AGG AGG CAT TGC TG-3', 449 bp。

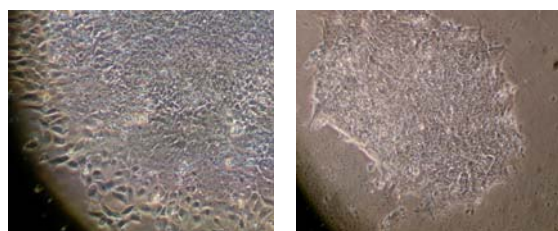
设计、实施、评估者: 设计与评估为第一作者, 资料收集为第二、三作者, 实施为文章所有作者, 均经过专业培训, 非盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 10.0软件进行统计处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料采用两样本t检验, 计量资料行完全随机设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

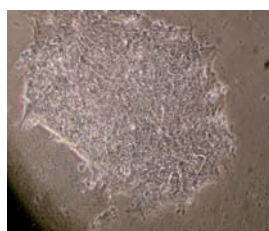
2 结果

2.1 人胚胎干细胞在4种胞外基质上的形态 Matrigel组、层粘连蛋白组人胚胎干细胞生长良好, 形态呈集落状, 细胞较小, 胞间有清楚的界限, 核质比较大, 有1个或多个核仁, 周围有少量分化细胞, 可连续传代(>20代), 并保持未分化状态, 见图1a, b。纤粘连蛋白组、IV型胶原组细胞集落形态不规则, 细胞较大, 连接松散, 核仁不突出, 体外传五六代后基本

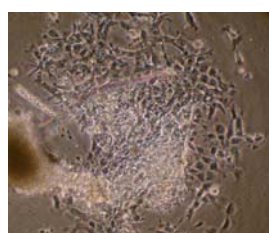
分化, 见图1c, d。提示Matrigel和层粘连蛋白可以较好支持人胚胎干细胞在无饲养层体系的生长; 而纤粘连蛋白和IV型胶原无法维持人胚胎干细胞的未分化状态。



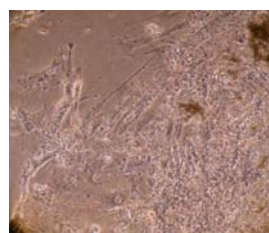
a: Morphology of BG02 cells cultured on Matrigel



b: Morphology of BG02 cells cultured on laminin



c: Morphology of BG02 cells cultured on fibronectin



d: Morphology of BG02 cells cultured on collagen IV

Figure 1 Morphology of BG02 cells on four kinds of extracellular matrixes

图1 人胚胎干细胞在4种胞外基质上的形态观察

2.2 人胚胎干细胞在4种胞外基质上的贴壁率 体外培养不同时间点与纤粘连蛋白组、IV型胶原组比较, Matrigel组和层粘连蛋白组人胚胎干细胞集落的贴壁率均明显增加($P < 0.05$), 后2组人胚胎干细胞集落贴壁率差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图2。

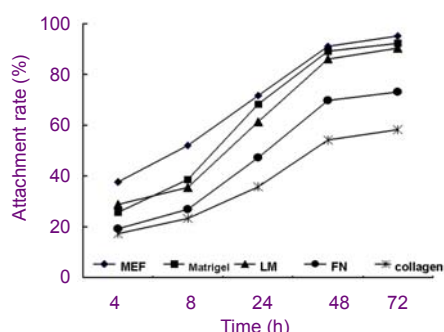


Figure 2 Attachment rate of BG02 colonies on the four kinds of extracellular matrixes at various time points

图2 不同时间点各组人胚胎干细胞集落贴壁率的比较

2.3 人胚胎干细胞在4种胞外基质上的分化率 与纤粘连蛋白组、IV型胶原组比较, Matrigel组和层粘连蛋白组人胚胎干细胞集落分化率均明显降低($P < 0.05$), 后2组人胚胎干细胞集落分化率无明显差异($P > 0.05$), 见表1。

表1 人胚胎干细胞在4种胞外基质上的分化率比较
Table 1 Differentiation rate of BG02 colonies on the four kinds of extracellular matrixes ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, %)

Group	Undifferentiated colony	Partially differentiated colony	Full differentiated colony
Fibronectin	33.2±6.9	39.7±8.9	28.0±9.7
Collagen IV	20.5±11.3	40.3±12.1	38.4±8.4
Matrigel	80.3±6.6 ^a	12.9±5.7 ^a	6.8±3.7 ^a
Laminin	80.1±8.4 ^a	14.4±3.5 ^a	4.9±1.8 ^a

^a $P < 0.05$, vs. fibronectin group and collagen IV group

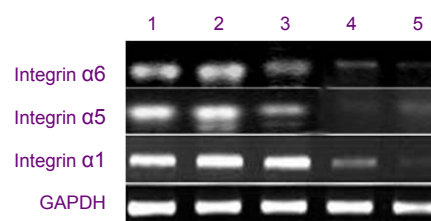
2.4 人胚胎干细胞在4种胞外基质上的Oct-4, Nanog阳性率 与纤粘连蛋白组、IV型胶原组比较, Matrigel组和层粘连蛋白组人胚胎干细胞Oct-4, Nanog阳性率均明显升高($P < 0.05$), 后2组人胚胎干细胞Oct-4, Nanog阳性率差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表2。

表2 人胚胎干细胞在4种胞外基质上的Oct-4及Nanog阳性率比较
Table 2 Proportion of Oct-4⁺ and Nanog⁺ cells on the four kinds of extracellular matrixes ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, %)

Group	Oct-4 ⁺	Nanog ⁺
Fibronectin	41.6±10.2	37.1±8.0
Collagen IV	28.5±9.7	36.0±9.3
Matrigel	83.6±7.7 ^a	87.5±9.2 ^a
Laminin	85.7±5.5 ^a	84.9±7.2 ^a

^a $P < 0.05$, vs. fibronectin group and collagen IV group

2.5 人胚胎干细胞在4种胞外基质上相关受体的表达 RT-PCR检测结果显示, Matrigel组、层粘连蛋白组人胚胎干细胞高表达整合素受体integrin α 5, integrin α 6和integrin β 1; 而纤粘连蛋白组、IV型胶原组3种整合素受体的表达均明显降低, 见图3。



Lane 1: control group; lane 2: Matrigel group; lane 3: laminin group; lane 4: fibronectin group; lane 5: collagen group

Figure 3 Expression of integrin α 5, integrin α 6 and integrin β 1 genes in BG02 cells cultured on four kinds of extracellular matrixes detected by RT-PCR

图3 RT-PCR 检测人胚胎干细胞 integrin α 5, integrin α 6 和 integrin β 1 基因的表达

这与以往研究结果相符^[17], 提示integrin受体家族激活状态的不同, 可能是不同胞外基质对于维持人胚胎干细胞自我更新产生差异的原因之一。

3 讨论

细胞微环境对于维持人胚胎干细胞自我更新以及细胞命运的决定极为重要, 其中细胞外基质是重要组成部分^[6]。适当的胞外基质对于有效的维持人胚胎干细胞的未分化状态及全能性具有重要的作用^[7]。实验中比较了4种胞外基质对人胚胎干细胞株BG02生长的支持作用, 结果显示Matrigel和层粘连蛋白可以支持人胚胎干细胞在无血清无饲养层培养体系的增殖(>20代), 并保持其未分化状态, 而用纤粘连蛋白、IV型胶原作为胞外基质, 人胚胎干细胞贴壁能力差, 分化率高, 不能支持其在无血清无饲养层培养体系的生长。

许多研究者使用Matrigel作为胞外基质来分离、培养人胚胎干细胞并获得成功^[2, 8]。不同的胞外基质在维持人胚胎干细胞自我更新的作用并不相同, Xu等^[9]发现层粘连蛋白支持人胚胎干细胞不分化效果比纤粘连蛋白好。实验结果进一步表明, Matrigel和层粘连蛋白对于维持人胚胎干细胞自我更新的作用, 优于纤粘连蛋白和IV型胶原。然而, Hayashi等^[10]研究发现, 胶原(I~VI型)可维持小鼠胚胎干细胞的自我更新; 层粘连蛋白无法有效支持人胚胎干细胞株HUES1的增殖和自我更新^[11]。这些研究结果的差异可能与所采用的培养体系和细胞种属差别有关, 也从另一方面提示不同来源胚胎干细胞对于胞外基质的反应性可能不同, 还需要进行有针对性的筛选。

integrin α 5, integrin α 6和integrin β 1是介导胚胎内细胞团发育^[12]、胚胎干细胞自我更新的主要分子^[13]。实验发现Matrigel组和层粘连蛋白组人胚胎干细胞高表达integrin α 5, integrin α 6和integrin β 1; 而纤粘连蛋白组、IV型胶原组3种整合素受体的表达均明显降低。这与以往研究结果相符^[14], 提示integrin受体家族激活状态的不同, 可能是不同胞外基质对于维持人胚胎干细胞自我更新产生差异的原因之一, 胞外基质维持胚胎干细胞自我更新的机制还有待于深入分析。

4 参考文献

- [1] Amit M, Shariki C, Margulets V, et al. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. Biol Reprod. 2004;70(3):837-845.

- [2] Chaturvedi G, Simone PD, Ain R, et al. Noggin maintains pluripotency of human embryonic stem cells grown on Matrigel. Cell Prolif. 2009;42(4):425-433.
- [3] Braam SR, Denning C, Matsa E, et al. Feeder-free culture of human embryonic stem cells in conditioned medium for efficient genetic modification. Nat Protoc. 2008;3(9):1435-1443.
- [4] Hu Z, Li T, Zhang X, et al. Hepatocyte growth factor enhances the generation of high-purity oligodendrocytes from human embryonic stem cells. Differentiation. 2009;78(2-3):177-184.
- [5] Zhang X, Wang S, Yang S, et al. Feeder layer- and serum-free culture of rhesus monkey embryonic stem cells. Reprod Biomed Online. 2006;13(3):412-420.
- [6] Tanentzapf G, Devenport D, Godt D, et al. Integrin-dependent anchoring of a stem-cell niche. Nat Cell Biol. 2007;9(12):1413-1418.
- [7] Ma W, Tavakoli T, Derby E, et al. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. BMC Dev Biol. 2008; 8:90.
- [8] Salli U, Fox TE, Carkaci-Salli N, et al. Propagation of undifferentiated human embryonic stem cells with nano-liposomal ceramide. Stem Cells Dev. 2008;Epub ahead of print]
- [9] Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2001; 19(10):971-974.
- [10] Hayashi Y, Furue MK, Okamoto T, et al. Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. Stem Cells. 2007;25(12):3005-3015.
- [11] Braam SR, Zeinstra L, Litjens S, et al. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. Stem Cells. 2008; 26(9):2257-2265.
- [12] Fassler R, Meyer M. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. Genes Dev. 1995;9(15):1896-1908.
- [13] Prowse AB, McQuade LR, Bryant KJ, et al. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. J Proteome Res. 2007; 6(9):3796-3807.
- [14] Vuorio S, Virtanen I, Takkunen M, et al. Laminin isoforms in human embryonic stem cells: Synthesis, receptor usage and growth support. J Cell Mol Med. 2008; doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00643.x.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 云南省科技厅-昆明医学院应用基础研究联合专项基金资助项目(2007C0012R, 2007C0044R); 云南省自然科学基金(2005C0013R)。

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 尽管 Matrigel、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、胶原等胞外基质已运用于人胚胎干细胞的无饲养层无血清培养, 但是生长在不同培养基上的人胚胎干细胞是否具有相同的生物学特性, 以及对于特定的人胚胎干细胞株, 何种胞外基质最适宜等问题尚无统一论。

课题评估的“金标准”: 课题通过对胚胎干细胞多能性标志物表达、细胞倍增时间、体内外分化能力以及核型分析, 评价培养体系对于胚胎干细胞维持自我更新的作用, 检测指标全面。

课题的偏倚与不足: 尽管实验发现不同胞外基质上胚胎干细胞的生物学特性有差异, 但不同培养体系对于胚胎干细胞维持自我更新的作用和机制目前还不清楚。

提供临床借鉴的价值: 实验结果为下一步建立高效、安全、标准化“临床级”的人胚胎干细胞培养体系奠定了基础。