

# 类胚体诱导脐带间充质干细胞向生殖细胞的分化

吕品, 何玲, 柴惠霞

## Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ cells induced by embryoid bodies

Lü Pin, He Ling, Chai Hui-xia

### Abstract

**BACKGROUND:** Whether umbilical mesenchymal stem cells (UC-MSCs) can be induced into oocytes under *in vitro* and *in vivo* microenvironment is very important for female reproductive maintenance and oocyte regeneration.

**OBJECTIVE:** To further testify the effects of embryonic bodies (EB) under *in vitro* microenvironment on the differentiation of UC-MSCs into germ cells.

**METHODS:** UC-MSCs were cultured in hanging drop to form EB, which were co-cultured with human ovarian granulosa cells or mouse ovarian granulosa cells, or were cultured in follicular fluid to induce differentiation of UC-MSCs into primary germ cells *in vitro*.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The EB were successfully prepared when UC-MSCs were cultured in hanging drop. Flow cytometry results: SSEA-1<sup>+</sup> cells accounted for 15.61% after 5 days of EB formation. The results of immunohistochemistry: EB of 5 days were co-cultured with human ovarian granulosa cells or mouse ovarian granulosa cells for 10 days, germ-line markers of synaptonemal complex protein-3 and growth differentiation factor-9 positively expressed, while these two markers did not express in granule cells or EB cultured in follicular fluid. EB can be formed when UC-MSCs are cultured in hanging drop *in vitro*. Germ-line markers will express in EB when they are co-cultured with human ovarian granulosa cells or mouse ovarian granulosa cells.

Department of Obstetrics and Gynecology, Central Hospital of Liaohe Oilfield, Panjin 124000, Liaoning Province, China

Lü Pin, Attending physician, Department of Obstetrics and Gynecology, Central Hospital of Liaohe Oilfield, Panjin 124000, Liaoning Province, China  
lvpin1967@qq.com

Received: 2011-10-03  
Accepted: 2011-11-28

Lü P, He L, Chai HX. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ cells induced by embryoid bodies. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(23): 4217-4221.

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

### 摘要

**背景:** 脐带间充质干细胞能否在体外和体内微环境条件下衍生为卵母细胞, 对女性生殖的维持及卵母细胞的再生均具有十分重要的意义。

**目的:** 进一步验证体外微环境类胚体对脐带间充质干细胞向生殖细胞分化的影响。

**方法:** 将脐带间充质干细胞进行悬滴培养, 使其形成类胚体, 进而采用将类胚体与人或小鼠卵巢颗粒细胞共培养、卵泡液条件培养基培养等方法, 体外诱导脐带间充质干细胞向早期生殖细胞分化。

**结果与结论:** ①将脐带间充质干细胞进行悬滴培养, 其能够形成类胚体。②流式细胞仪检测结果: 类胚体形成 5 d 后, 其中 SSEA-1 阳性细胞占 15.61%。③免疫组织化学检测结果: 形成 5 d 的类胚体与人或小鼠的卵巢颗粒细胞共培养, 10 d 后生殖系标记物 SCP3、生长分化因子 9 阳性表达, 而颗粒细胞及采用卵泡液培养类胚体均无表达。结果表明, 脐带间充质干细胞体外悬滴培养可形成类胚体, 与人或小鼠卵巢颗粒细胞共培养后均表达生殖系特异性标记物。

辽河油田中心医院妇产科, 辽宁省盘锦市 124000

吕品, 女, 1967 年生, 辽宁省盘锦市人, 1990 年辽宁医学院毕业, 主治医师, 主要从事妇科肌腺瘤诊断与治疗的研究。  
lvpin1967@qq.com

**关键词:** 类胚体; 生殖细胞; 脐带间充质干细胞; 诱导; SCP3; 生长分化因子 9; 阶段特异性胚胎抗原

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.23.008

**缩略语:** SEEA: stage-specific embryonic antigens, 阶段特异性胚胎抗原

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225  
(2012)23-04217-05

吕品, 何玲, 柴惠霞. 类胚体诱导脐带间充质干细胞向生殖细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(23): 4217-4221. [<http://www.crter.org> <http://cn.zglckf.com>]

收稿日期: 2011-10-03  
修回日期: 2011-11-28  
(20110803002/W · L)

## 0 引言

近年来的研究表明, 胚胎干细胞和成体干细胞均具有分化为生殖细胞的潜能。由于胚胎癌细胞是一种癌细胞, 用其诱导分化的生殖细胞存在很大缺陷, 并且虽然其印记基因与生殖细胞形似, 但是其低甲基化状态导致不能用来诱导分化生殖细胞。诱导性多功能干细胞(induced human pluripotent stem, IPS)由于导入了外源基因, 可能会出现不同程度的细胞生物学和分子生物学的变化, 影响后续的诱导分化。研究脐带间充质干细胞能否在体外和体内微环境条件下衍生为卵母细胞或能否促进卵巢功能的恢复及其作用机制, 对女性生殖的维持及卵母细胞的再生均具有十分重要的意义。因此作者拟对脐带间充质干细胞进行分离培养, 采用类胚体诱导体外其向早期生殖细胞分化, 观察不同微环境对脐带间充质干细胞分化的影响。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察。

**时间及地点:** 实验于2010-11/2011-07在辽宁医学院解剖学教研室完成。

**材料:**

**实验动物:** 3周龄健康雌性昆明小白鼠, 体质量15~18 g, 由辽宁医学院实验动物中心提供, 许可证号SYXK(辽)2003-0011。实验过程对动物的处置符合医学伦理学标准。

**试剂:**

试剂	来源
胰蛋白酶	美国 SIGMA 公司
羊抗人 vasa 单克隆抗体、兔抗人生长分化因子 9 单克隆抗体	武汉博士德
人卵巢颗粒细胞、卵泡液	为妇产科生殖中心体外受精-胚胎移植(IVF-ET)过程中舍弃的颗粒细胞和卵泡液

**实验方法:**

**干细胞分离、原代培养、纯化、鉴定:** 干细胞由天大科技园国家干细胞中心提供(编号为G1161), 分离、原代培养、纯化及鉴定参考文献[1]进行。原代细胞生长对数期进行传代, 2.5 g/L胰蛋白酶(含0.02%EDTA)进行消化, 1:2分装(25 cm<sup>2</sup>)培养。传至第3代备用。

**类胚体的培养:** ①培养第3代的脐带间充质干细胞, 用2.5 g/L胰蛋白酶将其消化成为单细胞悬液。②用类胚体形成培养基, 将细胞稀释成 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ , 以50  $\mu\text{L}$ /滴种植于培养皿盖上, 翻转培养皿盖, 进行悬滴培养。③置体积分数5%CO<sub>2</sub>、95%湿度、37 °C恒温细胞培养箱中培养, 两三天后显微镜下观察每个悬滴中均有类胚体形成后, 用吸管将培养皿盖上的悬滴轻轻吹打下来, 转移到类胚体分化培养基进行悬浮培养。

**人卵巢颗粒细胞培养:** ①显微镜下捡取卵子周围颗粒细胞以及卵泡液中松散的颗粒细胞团块, 反复冲洗尽量去除红细胞。②以100 U/mL透明质酸酶消化1.0~2.0 min后, 1 000 r/min, 离心3 min。③将细胞沉淀用含10%胎牛血清的DMEM培养基重新悬浮后, 接种于细胞培养皿中培养。

**小鼠卵巢颗粒细胞的培养:** ①每只小鼠腹腔注射PMSG 5 U。②48 h后将小鼠颈椎脱臼处死, 无菌条件下迅速取出双侧卵巢, 去除周围脂肪和被膜, 将其放入盛有低糖DMEM培养基的细胞培养皿内, 在体视显微镜下用1 mL注射器针头刺破卵泡, 使卵母细胞和颗粒细胞释放出来。③将卵巢组织转移到管中, 反复吹打1.0~2.0 min, 200目筛网过滤, 收集滤液, 1 000 r/min, 离心5 min, 弃上清液, 用低糖DMEM+体积分数10%胎牛血清重新悬浮细胞沉淀, 接种到细胞培养皿中。

**卵泡液处理:** ①收集HIV、梅毒螺旋体、丙型肝炎病毒、肝、肾功能、乙肝两对半等各项生化指标均正常的IVF患者舍弃的卵泡液。②将卵泡液以2 000 r/min, 离心10 min, 取上清。③上清液经22  $\mu\text{m}$ 过滤器过滤, -20 °C储存备用。

**流式细胞仪检测类胚体中阶段特异性胚胎抗原(stage-specific embryonic antigens, SSEA) 1阳性细胞表达:** ①将类胚体去掉培养液, PBS洗2遍后用DNA酶I、透明质酸酶和胶原酶IV混合酶消化, 用含3%BSA的PBS洗涤, 制成浓度为 $1.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的单细胞悬液, 加入Eppendorf(EP)管中。②EP管加入FITC标记的抗人SSEA-1单克隆抗体。③设定1管同型对照, 加入5  $\mu\text{L}$  IgG1-FITC单克隆抗体。④室温孵育30 min, PBS洗涤细胞2次, 重悬于200  $\mu\text{L}$  PBS中, 用流式细胞仪检测细胞免疫表型。

**类胚体继续诱导分化:** 诱导组: 将形成后5 d的类胚体分别移入人卵巢颗粒细胞培养皿、小鼠卵巢颗粒细胞培养皿中, 采用去除LIF的类胚体分化培养基培养。对照组: 将形成后5 d的类胚体采用添加体积分数10%胎牛血清和5%卵泡液的DMEM培养基培养。

**免疫组织化学方法检测特异基因SCP3、生长分化因子9的表达:** 将培养基倾去, 0.01 mol/L PBS洗涤2次; 40 g/L多聚甲醛固定30 min; 0.01 mol/L PBS漂洗3次, 5 min/次; 0.5% Triton-100穿孔15 min; 0.01 mol/L PBS漂洗3次, 5 min/次; 5% BSA封闭30 min; 将封闭液倾掉后, 加入适当稀释的一抗(稀释比例按照说明书的要求), 4 °C孵育过夜; 0.01 mol/L PBS漂洗3次, 5 min/次; 加入适当稀释的二抗(具体按照说明书的要求), 于37 °C杂交孵育2 h; 0.01 mol/L PBS漂洗3次, 5 min/次; 5 mg/L DAPI染色2 min。

**主要观察指标:** ①流式细胞仪检测类胚体中SSEA-1阳性细胞表达。②免疫组织化学方法检测特异基因SCP3、生长分化因子9的表达。

## 2 结果

**2.1 细胞形态学及生长特点** 类胚体形成将脐带间充质干细胞进行悬滴培养, 培养两三天后观察, 发现每个悬滴中均有类胚体形成; 将类胚体进行悬浮培养后, 类胚体的体积逐渐增大, 其中细胞形态轮廓不清, 见图1, 2。

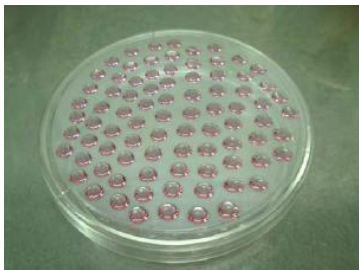


Figure 1 Hanging drop culture of umbilical cord mesenchymal stem cells  
图1 将脐带间充质干细胞进行悬滴培养

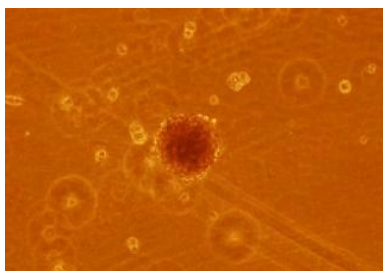


Figure 2 Morphological observation of the embryoid bodies (x200)  
图2 类胚体形态观察(x200)

**2.2 卵巢颗粒细胞形态** 倒置相差显微镜下观察, 刚接种时颗粒细胞呈球形, 24 h后贴壁生长, 细胞形态不规则, 呈星形或梭形, 细胞间有延长的伪足相互连接, 细胞核大、圆, 胞质透光性好, 有聚集生长现象, 人卵巢颗粒细胞和小鼠卵巢颗粒细胞形态相似, 见图3, 4。

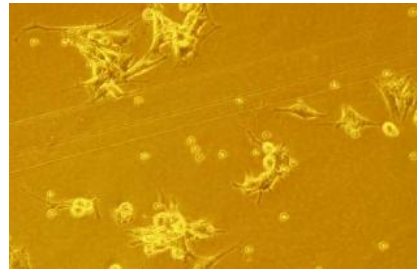


Figure 3 Human ovarian granulosa cells after culture for 24 h (x200)  
图3 人卵巢颗粒细胞培养 24 h 形态(x200)

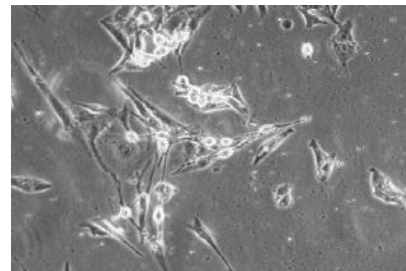


Figure 4 Mouse ovarian granulosa cells after culture for 24 h (x200)  
图4 小鼠卵巢颗粒细胞培养 24 h 形态(x200)

**2.3 流式细胞仪检测结果** 流式细胞仪分析发现: 类胚体形成后5 d, SSEA-1阳性细胞占15.61%, 见图5, 6。

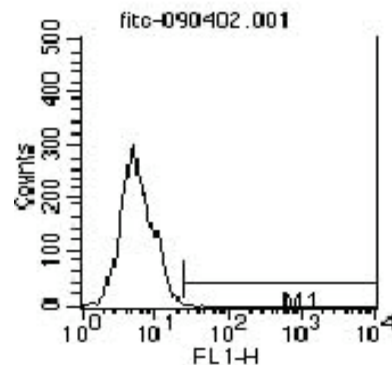


Figure 5 Number of SSEA-1<sup>+</sup> cells in embryoid bodies detected by flow cytometry (control group)  
图5 流式细胞术检测类胚体中 SSEA-1 阳性细胞数量(对照组)

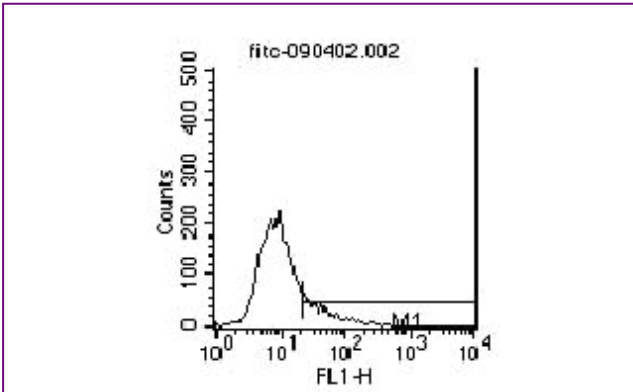


Figure 6 Number of SSEA-1<sup>+</sup> cells in embryoid bodies detected by flow cytometry (experimental group)  
图6 流式细胞术检测类胚体中 SSEA-1 阳性细胞数量(实验组)

2.4 免疫细胞化学染色结果 形成后5 d的类胚体分别与人卵巢颗粒细胞和小鼠卵巢颗粒细胞共培养10 d后, 免疫组织化学检测, SCP3、GDF-9均阳性表达。对照组及颗粒细胞表达阴性。见图7。

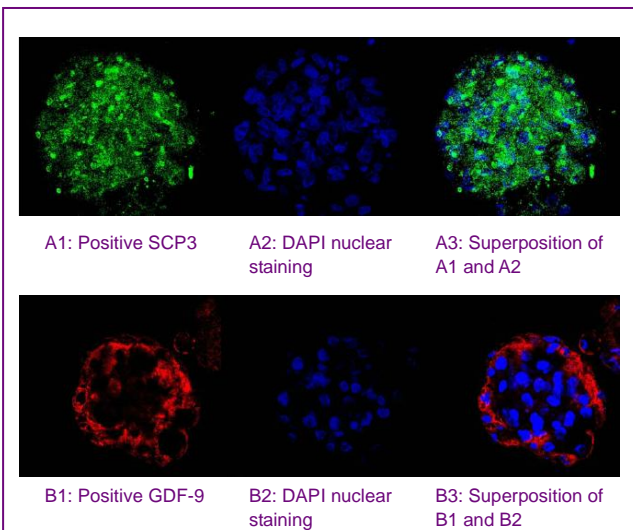


Figure 7 Synaptonemal complex protein-3 (SCP3) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) positively expressed in embryoid bodies after they were co-cultured with human ovarian granulosa cells or mouse ovarian granulosa cells for 10 d (x200)  
图7 类胚体与人卵巢颗粒细胞共培养后10 d SCP3、生长分化因子9均阳性表达(x200)

### 3 讨论

近来很多学者研究发现成体干细胞在体外诱导后能够分化为雄性或雌性生殖细胞<sup>[1-3]</sup>。间充质干细胞、胚胎癌细胞、iPS细胞均可以分化为3个胚层的所有细胞类型<sup>[4-6]</sup>, 是目前用来诱导分化生殖细胞的研究热点。

胚胎癌细胞来自于畸胎瘤和胚胎干细胞类似, 是一

种多能干细胞, 在体外能够形成类胚体并分化为生殖细胞。Nayernia等<sup>[7]</sup>将胚胎癌细胞诱导分化形成的雄性生殖细胞移植到不育的小鼠体内, 发现其能够进行减数分裂并形成精子, 但是发现精液中的精子数量少, 并且畸形率达到43%(正常为8%), 体外进行精子卵浆内注射后发现, 受精卵在6-8细胞期停止发育。这说明胚胎癌细胞诱导分化后的生殖细胞存在很大缺陷。Okamoto等<sup>[8]</sup>研究发现胚胎癌细胞的染色质总体处于低甲基化状态, 并且印记基因, 如H19的启动子处于未甲基化状态。因此虽然胚胎癌细胞的印记基因与生殖细胞形似, 但是其低甲基化状态导致不能用来诱导分化生殖细胞。

研究发现, 含有Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4基因的反转录病毒转染进成纤维细胞后可以将其转变为胚胎样干细胞, 称为iPS细胞<sup>[9-12]</sup>。该细胞具有胚胎干细胞基因表达谱的特征、自我更新能力及多潜能性, 并且能形成畸胎瘤和嵌合体小鼠, 可以用来诱导分化生殖细胞。但是由于细胞转入了外源基因, 其可能会出现不同程度的细胞生物学和分子生物学的变化, 影响后续的诱导分化。此外, 细胞中导入了反转录病毒, 在临床应用方面显著增加了导致肿瘤发生的危险因素。

相比以上两种细胞, 间充质干细胞具有很大优势, 已有研究报道骨髓间充质干细胞、猪皮肤干细胞、大鼠胰腺干细胞等均可衍生出卵母细胞样细胞<sup>[13-16]</sup>。作者在前期研究中已经证实脐带间充质干细胞是一种多分化潜能成体干细胞, 不仅具有分离简单、来源丰富、伦理争议小等特点, 而且免疫状态幼稚, 是理想的成体干细胞来源。

生长分化因子9由卵母细胞分泌, 通过旁分泌的方式与卵母细胞周围的颗粒细胞相互作用, 是原始卵泡形成所必需的<sup>[17-18]</sup>。生长分化因子9<sup>-/-</sup>小鼠的卵泡在初级卵泡阶段停止发育, 周围仅围绕单层颗粒细胞, 缺乏膜细胞层的围绕<sup>[19-20]</sup>。SCP3(synaptonemal complex protein 3)是一种联会丝复合体蛋白, 在减数分裂过程中特异性表达。

SSEA是一种糖蛋白, 它常表达于胚胎发育早期, 故此它常作为胚胎性干细胞的标志分子之一。人类及某些非人灵长类胚胎干细胞、胚胎癌细胞, 表达SSEA-3及SSEA-4, 不表达SSEA-1, 但是EG细胞中SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4均为阳性表达。

本实验脐带间充质干细胞经悬滴培养后形成类胚体后5 d, 流式细胞术检测到SSEA-1阳性细胞占15.61%, 提示有早期生殖细胞出现, 表明该诱导方法是有效的。将类胚体继续与卵巢颗粒细胞共培养10 d后, 免疫组织化学方法检测到生殖系特异性标记物



SCP3、生长分化因子9阳性表达,与Qing等<sup>[21]</sup>所研究的结果类似。表明通过模拟卵母细胞形成的微环境,采用类胚体培养以及与颗粒细胞共培养的方法,对诱导生殖细胞的生成是有效的,与人或小鼠卵巢颗粒细胞共培养,对生殖细胞的诱导分化效果未见明显差异。

#### 4 参考文献

- [1] Li H, Gu J, Lin CM, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(36):6701-6704.  
李慧, 顾健, 林传明, 等. 脐带间充质干细胞对CIA大鼠炎症因子的干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36):6701-6704.
- [2] Dias FF, Chiarini-Garcia H, Parreira GG, et al. Mice spermatogonial stem cells transplantation induces macrophage migration into the seminiferous epithelium and lipid body formation: high-resolution light microscopy and ultrastructural studies. Microsc Microanal. 2011;17(6):1002-1014.
- [3] Suzuki N, Ando S, Sumida K, et al. Analysis of altered gene expression specific to embryotoxic chemical treatment during embryonic stem cell differentiation into myocardial and neural cells. J Toxicol Sci. 2011;36(5):569-585.
- [4] Miranda-Sayago JM, Fernández-Arcas N, Benito C, et al. Lifespan of human amniotic fluid-derived multipotent mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 2011;13(5):572-581.
- [5] Agashi K, Chau DY, Shakesheff KM. The effect of delivery via narrow-bore needles on mesenchymal cells. Regen Med. 2009;4(1):49-64.
- [6] Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. Nat Rev Genet. 2006;7:319-327.
- [7] Nayernia K, Li M, Jaroszynski L, et al. Stem cell based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. Hum Mol Genet. 2004;13:1451-1460.
- [8] Okamoto K, Kawakami T. Epigenetic profile of testicular germ cell tumours. Int J Androl. 2007;30:385-392.
- [9] Okada M, Oka M, Yoneda Y. Effective culture conditions for the induction of pluripotent stem cells. Biochim Biophys Acta. 2010;1800(9):956-963.
- [10] Hamanaka S, Yamaguchi T, Kobayashi T, et al. Generation of germline-competent rat induced pluripotent stem cells. LoS One. 2011;6(7):e22008.
- [11] Do JT, Joo JY, Han DW, et al. Generation of parthenogenetic induced pluripotent stem cells from parthenogenetic neural stem cells. Stem Cells. 2009;27(12):2962-2968.
- [12] Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. Cell. 2011;146(4):519-532.
- [13] Oktem O, Oktay K. Current knowledge in the renewal capability of germ cells in the adult ovary. Birth Defects Res C Embryo Today. 2009;87(1):90-95.
- [14] Dyce PW, Liu J, Tayade C, et al. In vitro and in vivo germ line potential of stem cells derived from newborn mouse skin. PLoS One. 2011;6(5):e20339.
- [15] Huo N, Tang L, Yang Z, et al. Differentiation of dermal multipotent cells into odontogenic lineage induced by embryonic and neonatal tooth germ cell-conditioned medium. Stem Cells Dev. 2010;19(1):93-104.
- [16] Danner S, Kajahn J, Geismann C, et al. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. Mol Hum Reprod. 2007;13(1):11-20.
- [17] Mazerbourg S, Klein C, Roh J, et al. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. Mol Endocrinol. 2004;18(3):653-665.
- [18] Kaivo-Oja N, Mottershead DG, Mazerbourg S, et al. Adenoviral gene transfer allows Smad-responsive gene promoter analyses and delineation of type I receptor usage of transforming growth factor-beta family ligands in cultured human granulosa luteal cells. Clin Endocrinol Metab. 2005;90(1):271-278.
- [19] Hua J, Pan S, Yang C, et al. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. Reprod Biomed Online. 2009;19(1):99-105.
- [20] Yuan L, Liu JG, Zhao J, et al. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. Mol Cell. 2000;5(1):73-83.
- [21] Qing T, Shi Y, Ye X, et al. Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. Differentiation. 2007;75:902-911.

#### 来自本文课题的更多信息--

**作者贡献:** 实验设计为第一作者, 实施为第三作者, 评估为第二作者。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。