

无血清条件下 LIF 对小鼠胚胎干细胞增殖及多能性的影响

李恩书¹, 彭新荣², 钱其军^{1,2}

(1. 浙江理工大学新元医学与生物技术研究, 杭州 310018; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒治疗实验室, 上海 200438)

摘要: 在无血清条件下培养 KES 小鼠胚胎干细胞, 研究 LIF 在无血清条件下对小鼠胚胎干细胞增殖及多能性维持的影响。联合使用小分子物质 SU5402、PD184352 和 CHIR99021 或单独使用 LIF 培养小鼠胚胎干细胞, 检测无血清条件下 LIF 对小鼠胚胎干细胞自我更新能力和全能性的影响。结合使用极限稀释法培养 KES 细胞单克隆, 统计不同培养体系下单克隆的形成率。结果显示: 无血清条件下, 单独使用 LIF, 不能维持小鼠胚胎干细胞的自我更新能力和全能性; 使用含有 3 种小分子药物 SU5402, PD184352 和 CHIR99021(3i) 的无血清培养液可以维持小鼠胚胎干细胞的自我更新, 传代 60 代以上仍可保持全能性; 添加 LIF 的 3i 培养系统显著提高了小鼠胚胎干细胞的单克隆形成率。表明在无血清条件下, LIF 不能单独维持小鼠胚胎干细胞的多能性。3i 培养体系可以维持胚胎干细胞的全能性而不需要 LIF; 3i 条件下, LIF 可以显著促进胚胎干细胞体外增殖和单克隆形成。

关键词: 无血清培养; 小分子药物; LIF; 胚胎干细胞

中图分类号: Q813.11 **文献标识码:** A

自 1981 年小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)被发现^[1]的近 30 年来, 人们利用多种培养方法来维持 ES 细胞的自我复制, 包括向培养基中加入滋养细胞、细胞因子、生长因子、激素、胎牛血清或血清抽提物等^[2-5]。最经典的培养方法是利用血清和白白血病抑制因子(Leukemia Inhibitory Factor, LIF)共培养^[6]。人们发现, 在不存在 LIF 或产生 LIF 的滋养细胞时, ES 细胞即使在含有血清的培养基中, 也会向非神经细胞类型分化, 而如果没有血清, 即使存在 LIF, ES 细胞也不能增殖和自我更新^[7-8]。根据这一结果, 干细胞领域的传统观点认为必须存在外源细胞因子(如 LIF、BMP 等), ES 细胞才能自我复制, 否则 ES 细胞会自发分化。最新研究成果表明, 只需利用一些含有特定激酶的小分子化学抑制剂和无任何生长因子的基础培养基就可很好地维持鼠 ES 细胞的不分化状态、自我复制能力和全能性^[9]。利用一系列基因敲除小鼠建立胚胎干细胞的实验发现, 联合使用 FGF 受体酪氨酸激酶抑制剂 SU5402, MEK1/2 抑制剂 PD184352^[10-12] 和 GSK3^[13](glycogen synthase kinase 3)抑制剂 CHIR99021(3i), 可以很好地维持 ES 细胞的自我复制和全能性。本研究运用昆明小鼠胚胎干细胞(Kunming mouse embryonic stem cell, KES)检测了无血清条件下 LIF 对胚胎干细胞的影响。实验结果表明, 在无血清条件下, 单独使用 LIF 是不能维持胚胎干细胞的全能性的; 在含有 3 种小分子药物 SU5402, PD184352 和 CHIR99021(3i) 的无血清培养条件下, 不需要 LIF 就完全可以维持胚胎干细胞的全能性; 而在含有 3i 的无血清培养条件下, 添加 LIF 可以显著促进胚胎干细胞单克隆形成率。

1 材料和方法

1.1 实验材料

KES 小鼠胚胎干细胞株及 mOct4-EGFP 小鼠胚胎干细胞由第二军医大学东方肝胆医院病毒治疗实验室彭新荣博士提供。主要试剂包括 TrypLE™Express Stable Trypsin Replacement Enzyme, Trypsin Inhibitor, DMEM/F12, Neurobasal Medium, L-谷氨酰胺, β-巯基乙醇, 非必须氨基酸(NEAA), N2, B27, LIF 购于 Invitrogen 公司; CHIR99021 (10 mmol/L), PD184352 (10 mmol/L) 购于 Stemgent 公司; SU5402 (5 mmol/L) 购于 Merck 公司。

1.2 培养体系

分别用 3 种不同的培养体系对 KES 小鼠胚胎干细胞进行培养。
a) 基础培养液: N2B27 基础培养液配制方法参考相关文献^[14-15]。b) N2B27+LIF 培养体系: 在 N2B27 基础培养液中加入 1% LIF。c) N2B27+3i 培养体系: 在 N2B27 基础培养液中加入 CHIR99021 (10 mmol/L) 30 μL, PD184352 (10 mmol/L) 8 μL, SU5402 (5 mmol/L) 40 μL。d) N2B27+3i+LIF 培养体系: 在 N2B27 基础培养液中加入 CHIR99021 (10 mmol/L) 30 μL, PD184352 (10 mmol/L) 8 μL, SU5402 (5 mmol/L) 40 μL 及 1% LIF。

1.3 细胞培养

分别用上述 4 种培养液培养 KES 细胞, 小鼠胚胎干细胞 KES。多次传代后, 分别对不同培养液培养的细胞进行全能性标志检测, 主要方法为碱性磷酸酶检测、免疫荧光检测、Real-Time qPCR 检测。

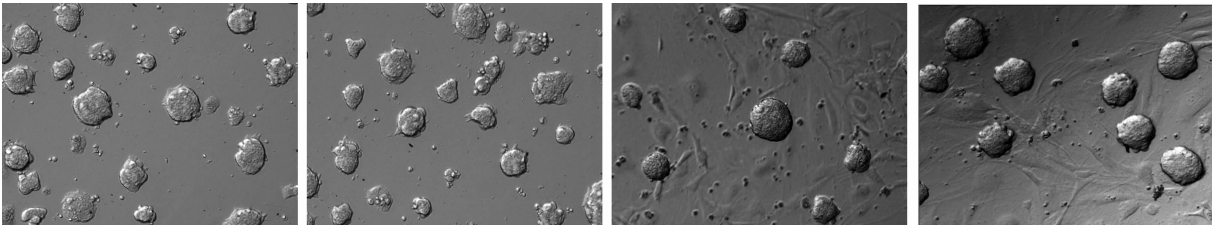
1.4 极限稀释法获得单克隆

取 1×10^3 KES 细胞, 用 N2B27+3i 培养液按对数比例依次稀释 6 次, 取各个稀释度的稀释液, 每孔 100 μL, 每个稀释度 2 孔, 置于预铺明胶的 96 孔培养板中, 在体积分数为 5% 的 CO₂ 及 37℃ 条件下培养。隔天换液。将生长良好的克隆消化转入 24 孔板继续培养, 计算单克隆形成率。

2 结果

2.1 利用无血清无饲养层培养 KES 小鼠胚胎干细胞

在无血清条件下, 利用各种不同的培养体系培养, 用基础培养液 N2B27 或 N2B27+LIF 培养胚胎干细胞, KES 在有饲养层或无饲养层条件下均发生自发分化。而添加 3i 的培养体系 KES 细胞在没有 LIF 存在的条件下仍生长较好(图 1)。结果表明, 无血清条件下, LIF 无法维持胚胎干细胞多能性。



(a) 无血清无饲养层条件下, 在 N2B27+3i 培养液中培养 (b) 无血清无饲养层条件下, 在 N2B27+3i+LIF 培养液中培养 (c) 无血清有饲养层条件下, 在 N2B27+3i 培养液中培养 (d) 无血清有饲养层条件下, 在 N2B27+3i+LIF 培养液中培养

图 1 KES 小鼠胚胎干细胞无血清培养

2.2 KES 小鼠胚胎干细胞多能性检测

2.2.1 碱性磷酸酶检测

对没有 LIF 存在的条件下, 3i 能完全维持胚胎干细胞多能性, KES 碱性磷酸酶染色结果呈阳性(图 2)。

2.2.2 免疫荧光检测

在没有 LIF 存在的条件下, 3i 能完全维持胚胎干细胞 KES 的多能性, KES 免疫荧光检测, Oct4, Sox2, Nanog 均呈阳性反应(图 3)。

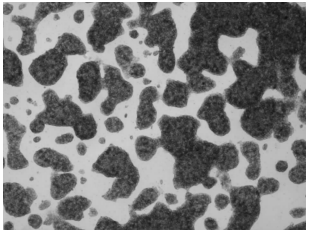


图 2 KES 碱性磷酸酶染色阳性

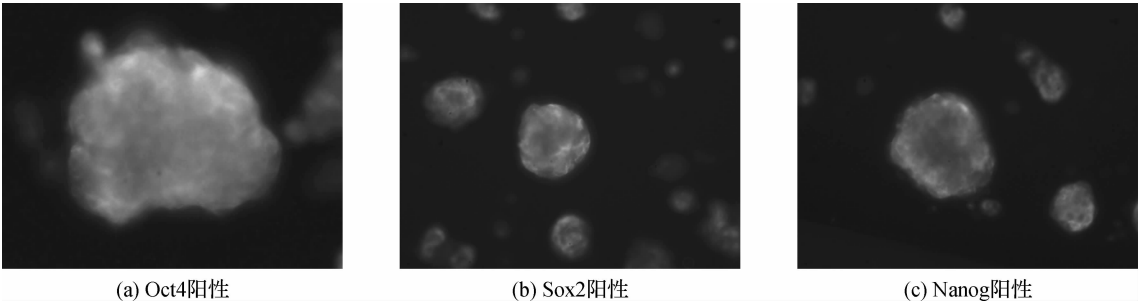


图3 KES免疫荧光检测

2.2.3 Real-Time qPCR 检测

根据文献报道合成引物,分别检测 Oct4、Sox2、Klf4,获得结果 KES 表达量与作为阳性对照的 mOct4-EGFP 相近,与阴性对照 MEF 有明显差异。结果表明:在无血清条件下,有无 LIF 的添加,单独使用 3i 可以完全维持胚胎干细胞 KES 的多能性(图 4)。

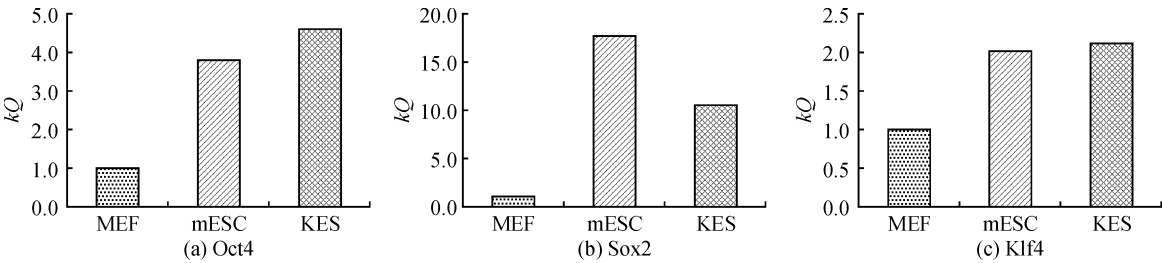


图4 Real-Time qPCR 检测 Oct4, Sox2, Klf4 内源表达

2.3 培养体系中 LIF 对小鼠胚胎干细胞增殖能力的影响

使用 3 种培养体系分别培养 KES 小鼠胚胎干细胞,在无血清条件下,单独使用 N2B27 + LIF 时,无法维持小鼠胚胎干细胞的多能标记,胚胎干细胞自发分化为神经细胞;在无血清条件下,使用 N2B27 + 3i 时,可有效维持胚胎干细胞多能性,KES 小鼠胚胎干细胞传至 60 代以上,仍保持全能性,但是单克隆容易死亡;在无血清条件下,使用 N2B27 + 3i + LIF 时,可以促进胚胎干细胞的细胞增殖,明显提高了单克隆形成率(表 1)。

表 1 不同培养体系单克隆形成率

培养条件		单克隆 接种数/个	单克隆 形成数/个	单克隆 形成率/%
N2B27 + 3i	1 号板	14	2	14
	2 号板	16	4	25
	3 号板	17	3	17
	4 号板	18	4	22
	5 号板	20	4	20
	总数	85	17	20
N2B27 + 3i + LIF	1 号板	15	8	53
	2 号板	16	8	50
	3 号板	17	11	65
	4 号板	19	10	53
	5 号板	21	13	62
	总数	88	50	57

3 讨 论

胚胎干细胞在培养中容易分化,传统观点认为要维持它的多潜能水平就要诱导激活信号途径。然而,最近有研究者用可溶性的小分子(3i)抑制了胚胎干细胞早期分化信号,使得胚胎显示出自我更新的能力^[9]。该研究成果为小鼠胚胎干细胞的无血清无饲养层培养体系的建立提供了新的思路。

小鼠胚胎干细胞的常规培养通常都要添加抗分化的细胞因子白细胞抑制因子(LIF, Leukemia Inhibitory Factor)和胎牛血清(FBS, Fetal Blood Serum)^[16]。随着不断研究探索,在几年前,血清的有效成分被确定为骨形成蛋白生长因子(BMP)^[17]。之后,在用无血清、化学成分确定的培养基培养胚胎干细胞时(例如 N2B27),只要加入重组 LIF 和 BMP4 共同维持 ESC 的自我更新和多潜能性而不需要血清。已经有多篇文献报道使用这种方法培养的胚胎干细胞可以产生嵌合体并且能过生殖系,达到多潜能性的金标准。这些研究都表明 LIF 和 BMP 这两个外源的信号的刺激使得胚胎干细胞维持不分化状态并可以不断自我更新^[17]。

FGF4 是一种被 LIF 和 BMP4 阻断的分化信号。FGF4 是一种有效的神经分化因子,它的细胞内效应

器胞外调节信号激酶在小鼠胚胎干细胞中的丰度高^[10, 18]。有研究发现,在成分确定的 N2B27 培养液培养时,利用一些抑制剂阻断 FGF 信号途径可以去除胚胎干细胞对 BMP4 的依赖。但胚胎干细胞对 LIF 仍然十分敏感,并且在培养中有明显的生长减慢及成活率下降现象。

CHIR99021 是一种 GSK3(glycogen synthase kinase 3)小分子抑制剂,添加 CHIR99021 可以提高胚胎干细胞的成活率,而将其与两个 FGF 途径的抑制剂(SU5402 和 PD184352)和 CHIR99021 的联合使用(3i)使得胚胎干细胞维持不分化状态并且高效表达 Oct4 和 Nanog^[9]。有研究表明,当单独培养细胞时,3i 培养的细胞能比添加 LIF 和 BMP4 培养的细胞出现更多 Oct4 阳性克隆^[9]。

胚胎干细胞的标志是作为未分化细胞具有自我更新能力并且保持多分化潜能(具有可以产生身体所有组织的能力)。传统研究把这些主要性质看做是由信号途径和基因网络控制的结果^[19]。而随着研究的深入,科学家们用新的思路阐释了胚胎干细胞自我更新的机制。使用小分子抑制剂的好处首先在于简化了实验步骤,无需制备饲养层细胞;另一个好处在于可以避免动物源性,使得培养体系的组分更加确定。

本实验结合了传统方法与最新的小分子无血清无饲养层培养体系(3i 培养体系),研究 LIF 在维持胚胎干细胞增殖及多能性方面的作用。由实验结果可见:无论有没有滋养层,LIF 的单独使用不足以维持小鼠胚胎干细胞的多能性,小鼠胚胎干细胞将发生自发的分化现象;而不使用 LIF,仅使用 N2B27+3i 进行无血清无滋养层培养时,小鼠胚胎干细胞可以持续增殖,并且很好地维持其多能性;但是,如果在此条件下再添加 LIF,可以使得小鼠胚胎干细胞在维持其自身多能性的同时增殖能力更加旺盛,其单克隆形成率较前者有显著的提高。由此可以得出结论,虽然 LIF 在无血清无饲养层培养条件下不是必需的,但是它对小鼠胚胎干细胞的自我更新是有明显促进作用的。在实际的科学研究中,可以根据不同的实验要求选择合适的培养体系。若要严格地无动物源性,则可选择添加 LIF 的培养体系;若对动物源性无特别要求,而想要提高小鼠胚胎干细胞的增殖能力,则可适当添加 LIF,以达到促进其自我更新的目的。

参考文献:

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292: 154-156.
- [2] Bhatt H, Brunet L J, Stewart C L. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(24): 11408-11412.
- [3] Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, et al. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta[J]. *Biol Reprod*, 1994, 50(4): 882-887.
- [4] Laird S M, Tuckerman E M, Dalton C F, et al. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture[J]. *Hum Reprod*, 1997, 12(3): 569-574.
- [5] Odorico J S, Kaufman D S, Thomson J A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(3): 193-204.
- [6] 韩 甫,叶 荣,鲍柳君,等. 无血清无饲养层条件下培养小鼠胚胎干细胞[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(4): 254-257.
- [7] Cartwright P, McLean C, Sheppard A, et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism[J]. *Development*, 2005, 132(5): 885-896.
- [8] Yamane T, Dylla S J, Muijtens M, et al. Enforced Bcl-2 expression overrides serum and feeder cell requirements for mouse embryonic stem cell self-renewal[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(9): 3312-3317.
- [9] Ying Q L, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal[J]. *Nature*, 2008, 453: 519-523.
- [10] Kunath T, Saba-El-Leil M K, Almousaileakh M, et al. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment[J]. *Development*, 2007, 134(16): 2895-2902.
- [11] Stavridis M P, Lunn J S, Collins B J, et al. A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification[J]. *Development*, 2007, 134(16): 2889-2894.
- [12] Mohammadi M, Froum S, Hamby J M, et al. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor

- tyrosine kinase domain[J]. *Embo J*, 1998, 17(20): 5896-5904.
- [13] Doble B W, Patel S, Wood G A, et al. Functional redundancy of GSK-3 α and GSK-3 β in Wnt/ β -catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines[J]. *Dev Cell*, 2007, 12(6): 957-971.
- [14] Brewer G J, Torricelli J R, Evege E K, et al. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination[J]. *J Neurosci Res*, 1993, 35(5): 567-76.
- [15] Ying Q L, Smith A G. Defined conditions for neural commitment and differentiation[J]. *Methods Enzymol*, 2003, 365: 327-341.
- [16] Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7150-7160.
- [17] Ying Q L, Nichols J, Chambers I, et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3[J]. *Cell*, 2003, 115(3): 281-292.
- [18] Wilder P J, Kelly D, Brigman K, et al. Inactivation of the FGF-4 gene in embryonic stem cells alters the growth and/or the survival of their early differentiated progeny[J]. *Dev Biol*, 1997, 192(2): 614-629.
- [19] Niwa H, Burdon T, Chambers I, et al. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(13): 2048-2060.

Effect of LIF on the Mouse Embryo Stem Cells under Serum-Free Condition

LI En-shu¹, PENG Xin-rong², QIAN Qi-jun^{1,2}

(1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Eastern Hepatobiliary Hospital Virus-Gene Therapy Laboratories, The Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: This paper studied the effect of LIF for mouse embryonic stem cell proliferation and the maintenance of pluripotency under serum-free conditions by a combination of two FGF4 pathway inhibitors SU5402, PD184352, and GSK3 pathway inhibitors CHIR99021, cultures KES mouse embryonic stem cells under serum-free conditions. Respectively, the research uses three different serum-free culture systems to culture mouse embryonic stem cells and to detect the cardinal markers of pluripotency under serum-free conditions. By limiting dilution to obtain monoclonal, the authors count the monoclonal formation rates of using the different culture systems. Under serum-free conditions, the single using of LIF makes the mouse embryonic stem cell differentiation. The serum-free culture medium containing three kinds of small molecule drugs SU5402, PD184352, and CHIR99021(3i) can maintain mouse embryonic stem cells self-renewal, and still can maintain the pluripotency after passage 60. It significantly increases the monoclonal formation rate of mouse embryonic stem cell when containing LIF in 3i culture system. In serum-free conditions, LIF can not maintain the pluripotency of embryonic stem cells alone. 3i culture system can maintain the pluripotency of embryonic stem cells without LIF. In 3i system, LIF can significantly promote the proliferation and monoclonal formation of embryonic stem cells.

Key words: serum-free conditions; small molecule drugs; LIF; embryonic stem cells

(责任编辑: 许惠儿)