

凹凸界面对小鼠胚胎干细胞多能性的影响

翟媛媛¹, 孙艳玲^{2,3}, 陈蕴苹^{2,4}, 杜婧^{2,3,4*}, 龚葵^{1,5*}

(1. 北京服装学院 材料科学与工程学院, 北京 100029; 2. 北京航空航天大学 生物与医学工程学院, 生物力学与力生物学教育部重点实验室, 北京 100191; 3. 北京航空航天大学 生物医学工程高精尖创新中心, 北京 102402; 4. 清华大学 航天航空学院, 北京 100084; 5. 塔里木大学 机械电气化工程学院, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要:目的 探究凹凸界面对体外培养的小鼠胚胎干细胞多能性维持的影响。方法 制作凹凸不同的细胞外基质培养小鼠胚胎干细胞, 观察细胞的克隆形态, 并通过免疫荧光和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色, 检测胚胎干细胞的多能性。**结果** 在凹面和凸面基底上, 胚胎干细胞的立体度和圆度均比平面基底高, 但凹面基底更明显。凹面和凸面基底上干细胞的 Oct4-GFP 表达含量和 ALP 染色强度均明显高于平面基底, 其中凹面基底更为显著。**结论** 与平面基底相比, 凹面基底和凸面基底均对胚胎干细胞的多能性维持有积极影响, 能够有助于维持全能性, 但凹面基底效果更好。通过改变细胞外基质曲率, 可以帮助胚胎干细胞体外培养维持多能性。研究结果对胚胎干细胞的研究和临床应用有重要意义。

关键词:小鼠胚胎干细胞; 基底; 凹凸界面; 多能性

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2020.02.010

Effects of Concave and Convex Interface on Pluripotency of Mouse Embryonic Stem Cells

ZHAI Yuanyuan¹, SUN Yanling^{2,3}, CHEN Yunping^{2,4}, DU Jing^{2,3,4*}, GONG Yan^{1,5*}

(1. School of Material Science & Engineering, Beijing Institute of Fashion Technology, Beijing 100029, China; 2. Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China; 3. Beijing Advanced Innovation Centre for Biomedical Engineering, Beihang University, Beijing 102402, China; 4. School of Aerospace, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 5. College of Mechanical and Electronic Engineering, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China)

Abstract: Objective To explore the effect of concave and convex interface on *in vitro* culture of mouse embryonic stem cells. **Methods** Mouse embryonic stem cells were cultured on substrate with concave and convex interface. The biological morphology of cell colony was observed. The pluripotency of embryonic stem cells was detected by immunofluorescence and alkaline phosphatase (ALP) staining. **Results** Embryonic stem cells on concave substrates and convex substrates had higher stereo degree and circularity than those on flat substrates, but it was more obvious on concave substrates. Besides, the expression level of Oct4-GFP and the staining intensity of ALP in embryonic stem cells which were cultured on concave substrates and convex substrates were significantly

收稿日期:2019-01-01; 修回日期:2019-03-05

基金项目:国家重点研发项目(2017YFA0506500)

通信作者:杜婧, 副教授, 博士生导师, E-mail: dujing@buaa.edu.cn; 龚葵, 副教授, 硕士生导师, Email: 2205206742@qq.com

* 为共同通信作者

higher than those on flat basement, especially on concave substrates. **Conclusions** Compared with flat substrates, concave substrates and convex substrates had positive effects on the pluripotency maintenance of embryonic stem cells, which could help to maintain pluripotency, but concave substrates had better effects. Changing the substrate curvature could help to maintain pluripotency of embryonic stem cells cultured *in vitro*. The research findings are of great significance to the study and clinical application of embryonic stem cells.

Key words: mouse embryonic stem cells; substrate; concave and convex interface; pluripotency

胚胎干细胞是拥有多能性并且可以实现自我更新的一类细胞,它具有能够分化成机体几乎所有细胞类型的特性,并且在体外培养时也能保持未分化状态、无限增殖能力以及分化为多种类型细胞的分化潜能。这一特性使得胚胎干细胞在研究哺乳动物细胞分化、组织形成过程以及临床移植治疗的领域得到广泛应用^[1-2]。

在细胞增殖分化的过程中,除了各种生长素这些生物化学因素在起作用外,力学因素也同样在其中扮演着重要的角色。众所周知,体内很多细胞存在于形态各异、力学环境不断变化的组织器官中,细胞可以感受微环境中的物理刺激并作出相应响应^[3-4]。已有实验研究证明,基底的力学性质(如材料表面图案和硬度等)会对细胞生长产生影响^[4-6]。

随着微加工技术的不断进步,近些年很多学者已经不满足于研究单纯的二维黏附形貌约束对细胞产生的影响。作为三维拓扑结构的重要特性,基底曲率对细胞生理行为的影响受到众多关注。Hwang 等^[7]研究发现,成纤维细胞在纤维丝上趋于沿着纤维轴向排列,并且在曲率越大的纤维上,细胞沿轴向排列的一致性越高。Pilia 等^[8]研究了基底曲率对成骨细胞排列方向和基质沉积的影响。刘程林等^[9]研究表明,由于曲率的不同,基底对细胞施加不同的最大剪应力,从而使细胞排列和极化受到影响。但是,目前有关基底曲率对胚胎干细胞生理行为影响的研究还鲜有报道。本文主要研究基底曲率(凹面与凸面)对小鼠胚胎干细胞多能性维持的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

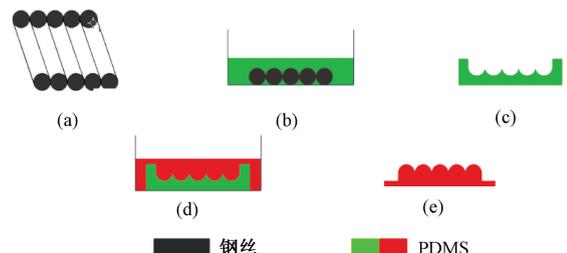
不锈钢钢丝(上海富曦机电国设备有限公司),PDMS 聚二甲基硅氧烷 Dow-coming 184 硅胶(Dow-coming公司,美国),OG2 细胞,小鼠胚胎干细胞,DMEM

培养基,胎牛血清(FBS),0.1%明胶(Millipore 公司,美国),双抗(上海翊圣生物科技有限公司),非必需氨基酸(Corning 公司,美国), β 巯基乙醇(Amresco 公司,美国),鬼笔环肽(Abcom 公司,美国),ALP 显色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),倒置相差显微镜(Leica公司,德国),细胞培养箱、超净工作台(Thermo 公司,美国),激光共聚焦显微镜(Leica 公司,德国),台式离心机(Hermle 公司,德国)、移液枪(Eppendorf公司,德国),培养瓶、培养板、离心管等细胞培养相关耗材(Corning 公司,美国)。

1.2 曲率基底制作

根据小鼠胚胎干细胞的克隆尺寸大小和刘程林等^[9]的经验总结,选择直径为 300 μm 钢丝,以得到直径为 300 μm 凹凸基底。紧密排列钢丝,用二甲基二氯硅烷处理 10 min,再将聚二甲基硅氧烷(PDMS)按照凝胶与固化剂 10:1 的比例充分混合,并浇注到钢丝上,抽真空后放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱固化 8 h,然后揭掉钢丝,即得到凹曲面基底。

将 PDMS 按照凝胶与固化剂 5:1 的比例重复上述过程,得到凸曲面的模具,将模具曲面朝上正放在皿里,按照凝胶与固化剂 10:1 的比例充分混合 PDMS 凝胶,抽真空后 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下固化 1 h,揭掉较硬的 PDMS 模具,即得凸曲面基底^[9-10]。按照同样的比例和处理方法,在没有钢丝和模具的皿里制作平面 PDMS 基底作为对照(见图 1)。



按照步骤(a)~(c)得到凹面基底,按照步骤(a)~(e)得到凸面基底

图1 曲面基底制作示意图

Fig.1 Schematic diagram for producing the curved substrate

1.3 细胞培养

对已获得的PDMS凹面和凸面基底,用小型离子溅射仪处理1~3次,使其表面具有亲水性,有利于后续细胞贴壁。在PBS缓冲液中照紫外灭菌2 h,加入0.1%明胶在37℃条件下孵育30 min,吸掉明胶,接种小鼠胚胎干细胞OG2,加入胚胎干细胞培养基(DMEM、15%血清、双抗、NEAA、 β 巯基乙醇),在37℃、5%CO₂环境中培养4 d,每天换液。

1.4 免疫荧光染色

将贴壁生长于曲面基底上的细胞弃掉培养基,用PBS冲洗3遍,加入4%多聚甲醛固定30 min;PBS洗3次,每次5 min,加入0.2%的Triton破膜10 min;PBS洗3次,每次5 min,加入5% BSA孵育2 h;PBS洗3次,每次5 min,按照鬼笔环肽和PBS 1:40的比例配置染液,在皿底铺上封口膜,滴加染液,将细胞贴壁的曲面基底倒扣在染液上,避光4℃过夜;PBS洗3次,每次5 min,按照DAPI和PBS为1:10 000的比例配置染液,同样用倒扣的方法避光孵育10 min, PBS清洗3次,每次5 min。在激光共聚焦显微镜下观察采集图像。

1.5 ALP染色

将不同曲面基底上的细胞培养液弃掉, PBS冲洗3遍后加4%多聚甲醛室温固定30 min。PBS清洗3次,每次5 min。参照ALP显色试剂盒的说明书,将碱性磷酸酯酶显色缓冲液、BCIP溶液(300 \times)和NBT溶液(150 \times)按照300:1:2比例混合得到工作液,加入至可以覆盖细胞,室温避光孵育30 min。去除染色工作液,用蒸馏水洗涤1~2次即可终止显色反应。在PBS中用显微镜观察采集信息。

1.6 测量立体度和圆度

将在凹面和凸面基质材料上培养的胚胎干细胞用激光共聚焦显微镜进行层扫拍摄,得到细胞平面图像和纵切面图像。将平面图像利用Image J软件进行处理,可直接得到圆度(circularity),其数值取值范围为0~1,数值越接近1,表明图像越接近正圆形。将纵切面图像用激光共聚焦显微镜的图像处理软件分析,得到细胞团纵切面图像在x轴和z轴方向的最边缘4个点的坐标,以此计算细胞团的高与长,从而用高与长的比值表征胚胎干细胞克隆的立体度。

2 结果

2.1 形态学观察

胚胎干细胞在体外培养时贴壁生长,并形成克隆,克隆呈半球状,表面光滑,克隆内部细胞之间联系紧密。而当胚胎干细胞产生分化后,细胞在增殖过程中会呈不规则铺展状生长,细胞之间联系松散。由此,对在不同曲面基底上培养的胚胎干细胞进行立体度和圆度的分析,以此来表征其全能性的维持。本文用胚胎干细胞克隆纵切面高与长的比值来表征细胞克隆的立体度,比值越大,立体度越好,细胞全能性维持越好;反之,细胞全能性降低,细胞分化。圆度的取值范围为0~1,圆度值越接近1,说明形态越趋近于正圆形,细胞全能性维持越好;反之,全能性降低,细胞分化。

通过分析胚胎干细胞克隆的立体度和圆度可知,不同曲面基底上的立体度和圆度差别明显,凹面和凸面基底上的干细胞立体度和圆度均比平面基底高,且凹面基底更明显(见图2)。由此可以得出,基底曲率确实会对胚胎干细胞的全能性产生影

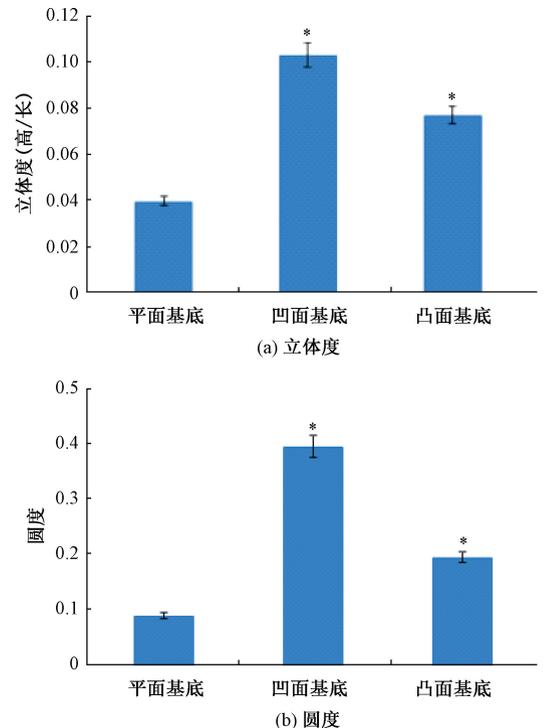


图2 不同曲面基底上胚胎干细胞细胞形态分析(* $P < 0.05$)

Fig.2 Morphological analysis of embryonic stem cells on different curved substrates (a) Stereo degree, (b) Roundness

响。具体表现为:凹面基底有助于胚胎干细胞维持全能性,凸面基底也能在一定程度上有利于全能性的维持,但效果有限。

2.2 免疫荧光结果

胚胎干细胞的多能性可以通过转录因子 Oct4 的表达水平来判断,它是胚胎干细胞细胞多能性的标志,会随着胚胎干细胞的分化而表达下降^[11-12]。使用的胚胎干细胞 OG2 品系携带由 Oct4 基因启动子驱动的 GFP 蛋白 (Oct4-GFP),用激光共聚焦显微镜观察生长在不同曲面基底上胚胎干细胞 OG2 中的 Oct4-GFP 的表达情况。可以看出,凹面基底上的胚胎干细胞的 Oct4-GFP 表达含量明显高于平面基底,凸面基底上的表达量比平面基底高,但低于凹面基底(见图 3)。分析凹面基底能够帮助抑制胚胎干细胞的分化,维持全能性。相比平面基底,凸面基底能一定程度上帮助维持全能性,但也同时会诱导胚胎干细胞发生部分分化。

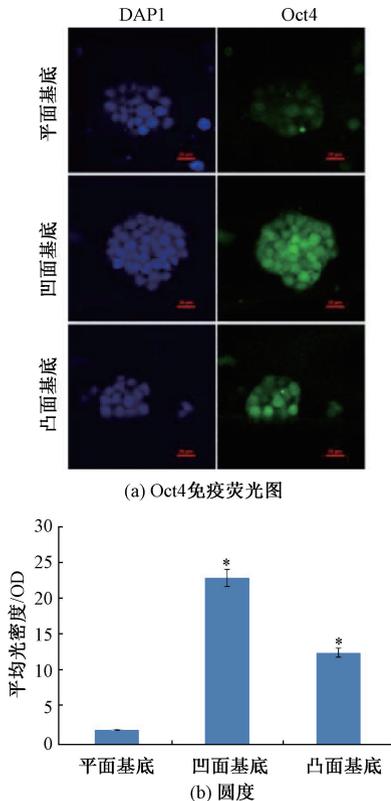


图3 不同曲面基底上胚胎干细胞的全能性标志基因 Oct4 免疫荧光结果(* $P < 0.05$)

Fig.3 Immunofluorescence results of pluripotency marker gene Oct4 of embryonic stem cells on different curved substrates (a) Oct4 immunofluorescence map, (b) Average optical density

2.3 ALP 结果

经过 ALP 染色并在显微镜下观察采集信息发现,平面培养的细胞染色很弱,说明分化较明显;而凹面基底和凸面基底上的小鼠胚胎干细胞均呈阳性结果,具有多能性。但凹面基底上胚胎干细胞克隆强度高于凸面基底细胞,多能性维持效果好,细胞分化程度低(见图 4)。

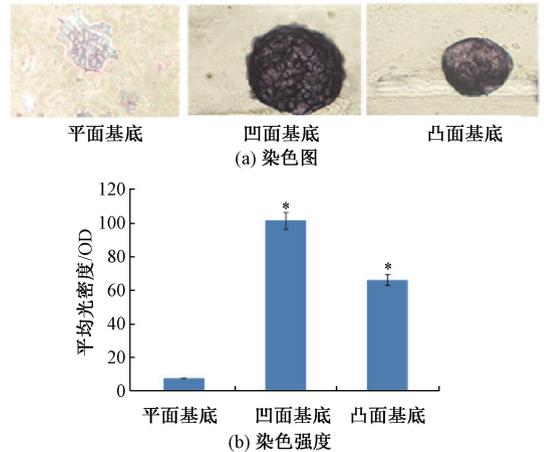


图4 不同曲面基底上小鼠胚胎干细胞 ALP 染色结果(* $P < 0.05$)

Fig.4 ALP staining results of mouse embryonic stem cells on different curved substrates (a) Staining map, (b) Staining intensity

3 讨论与结论

胚胎干细胞的体外培养要遵循两个基本原则:一是要使胚胎干细胞能够永久性分裂增殖;二是在这个过程中使其处于未分化的状态,维持其多能性。前者是在数量上对体外培养提出的要求,后者是在培养过程中对其功能的保证^[13]。为了同时满足这两个条件,选择合适的体外培养体系是关键,这其中涉及包括饲养层、基本培养基、血清及其他培养添加剂等很多因素的作用^[14-15]。本文通过比较凹面基底、凸面基底和平面基底对小鼠胚胎干细胞体外培养的影响,发现凹面基底更有利于胚胎干细胞的体外培养,在不添加白血病细胞抑制因子和抑制分化的药物的情况下,依然能够使胚胎干细胞正常生长,并维持其全能性。该结果有助于将来优化胚胎干细胞的体外培养体系。

小鼠胚胎干细胞具有向多个方向分化的潜能,可以分化为心肌细胞、造血细胞、卵黄囊细胞、骨髓

细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、内皮细胞等^[16]。从实验结果分析,凸面基底会使胚胎干细胞产生一定程度分化,这意味着改变基底曲率可以诱导胚胎干细胞进行分化,有利于胚胎干细胞的临床应用。

本文证明了培养基底对胚胎干细胞的体外培养产生影响,但其具体的作用机制还不清晰,凹面基底能否代替添加物来维持胚胎干细胞的全能性,以及凸面基底会将胚胎干细胞诱导分化成哪一类细胞依然需要后续研究探讨。同时,凹凸基底的不同曲率大小对胚胎干细胞体外培养的影响,也将值得继续研究。

致谢:感谢北京理工大学宇航学院生物力学与仿生材料实验室季葆华老师(现单位为浙江大学)和许佳艺同学对本课题中曲率基底制备方面的支持和帮助。

参考文献:

- [1] WANG Y, CHEN G, SONG T, *et al.* Enhancement of cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(5): 581-589.
- [2] ZHANG XQ, ZHANG SC. Differentiation of neural precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 584: 355-366.
- [3] 徐纪民. 微图形梯度曲率对气道平滑肌细胞生理学和生物力学行为影响的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2011.
- [4] ADIGUZEL Z, SAGNIC SA, AROGUZ AZ. Preparation and characterization of polymers based on PDMS and PEG-DMA as potential scaffold for cell growth [J]. *Mat Sci Eng C Mater*, 2017, 78(78): 942-948.
- [5] STANTON MM, RANKENBERG JM, PARK B, *et al.* Cell behavior on surface modified polydimethylsiloxane (PDMS)[J]. *Macromol Biosci*, 2014, 14(7): 953-964.
- [6] 张荣, 王红兵, 杨本艳姿, 等. 基底硬度对肝细胞和肝癌细胞融合生长的影响[J]. *医用生物力学*, 2013, 28(1): 91-96.
- [7] HWANG CM, PARK Y, PARK JY, *et al.* Controlled cellular orientation on PLGA microfibers with defined diameters [J]. *Biomed Microdevices*, 2009, 11(4): 739-746.
- [8] PILIA M, GUDA T, SHIELS SM, *et al.* Influence of substrate curvature on osteoblast orientation and extracellular matrix deposition [J]. *J Biol Eng*, 2013, 7(1): 23.
- [9] 刘程林. 模式化基底上多细胞力敏感行为的实验研究[D]. 北京: 北京理工大学, 2016.
- [10] 宫元卫, 孙树津, 吕东媛, 等. 基底微拓扑结构对细胞生物学行为的影响[J]. *医用生物力学*, 2013, 28(1): 115-120.
- [11] GONG YW, SUN SJ, LV DY, *et al.* Impacts of surface micro-topography on cellular biological responses [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(1): 115-120.
- [12] 田文霞. 胚胎干细胞体外培养研究进展及设想[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2006, 26(3): 226-229.
- [13] BRIVANLOU AH, GAGE FH, JAENISCH R, *et al.* Setting standards for human embryonic stem cells [J]. *Science*, 2003, 300(5621): 913-916.
- [14] 王国云, 李栋, 张辉, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离、培养及饲养层制备[C]//中国博士后生命科学学术研讨会暨院士论坛. 长沙: 中南大学, 2003.
- [15] KHADEMHOSEINI A, FERREIRA L, BLUMLING J, *et al.* Co-culture of human embryonic stem cells with murine embryonic fibroblasts on microwell-patterned substrates [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(36): 5968-5977.
- [16] 王志强, 梁锐, 陈明清, 等. 胰蛋白酶消化法和组织块法原代培养包皮成纤维细胞的比较[J]. *生命科学研究*, 2012, 16(3): 242-247.
- [17] PETROVIC V, STEFANOVIC V. Dental tissue: New source for stem cells [J]. *Sci World J*, 2009, 9(9): 1167-1177.