

Plasmocin 对人胚胎干细胞支原体污染的杀灭效果

孙雪荣^{1,2}, 王卫鸿³, 陈嘉³, 邓韵婷^{1,2}, 周家宝³, 钟平⁴, 全湛柔³, 刘新光^{1,2,5*}

摘要:目的 人胚胎干细胞(hESCs, human embryonic stem cells)应用广泛,但来源有限。前期检测发现本室培养的H9 hESCs有支原体污染。本研究拟探讨高效支原体杀灭剂plasmocin去除hESCs支原体污染的可能性,及其对hES增殖、分化的影响。方法 常规培养hESCs细胞,用切割法进行传代。分别用低(12.5 μg/ml)、中(25 μg/ml)、高(37.5 μg/ml)浓度plasmocin处理hESCs 2~3周,用PCR法检测支原体,用结晶紫染色观察hESCs克隆大小,显微镜下观察hESCs分化状况。结果 低、中、高浓度plasmocin处理2周均不能杀灭hESCs的支原体,延长高浓度plasmocin处理时间至3周,亦未能杀灭支原体。实验发现,plasmocin呈剂量依赖性抑制hESCs增殖,且高浓度plasmocin可诱导hESCs分化,而高浓度bFGF(40 ng/ml)则能部分阻断plasmocin抑制增殖和诱导分化的作用。结论 plasmocin未能去除hESCs的支原体污染,可能与支原体产生抗药性及hESCs的克隆生长特性有关。

关键词:胚胎干细胞;支原体;Plasmocin;bFGF;增殖

中图分类号:R375 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2013)7-783-03

Effect of plasmocin in killing Mycoplasma on human embryonic stem cells.SUN Xue-rong, WANG Wei-hong, CHEN Jia, et al.(1 Guangdong Provincial Key Laboratory for Medical Molecular Diagnostics, Dongguan 523808; 2 Institute of Aging Research, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, Guangdong, P.R.China)

Abstract: Objective To observed the effect of plasmocin killing Mycoplasma on human embryonic stem cells (H9 hESCs) in our previous cell culture. **Methods** hESCs were cultured as usual and subculture of hESCs was performed by mechanical dissection. Plasmocin in various concentrations (12.5 mg/ml, 25 mg/ml and 37.5 mg/ml) was added into hESCs culture medium for 2-3 weeks. Mycoplasma was detected by PCR. The clone size of hESCs was detected by crystal violet staining. Differentiation of hESCs was observed under microscope. **Results** Plasmocin at various concentrations (12.5 mg/ml, 25 mg/ml and 37.5 mg/ml) could not kill mycoplasma contaminants after 2-week treatment. The mycoplasma still could not be eliminated 3 weeks after treatment by plasmocin in high concentration. Unexpectedly, plasmocin inhibited hESCs proliferation in a concentration - dependent manner and plasmocin in high concentration induced hESCs differentiation. Basic fibroblast growth factor (bFGF) at 40 ng/ml could prevent these side effects of plasmocin on hESCs. **Conclusions** Plasmocin could not kill the mycoplasma on hESCs, that might be due to drug resistance and the manner of clone growth of hESCs.

Key words: Embryonic stem cells; Mycoplasma; Plasmocin; Basic fibroblast growth factor; Proliferation

干细胞组织工程近年来发展迅速,细胞替代治疗为很多疾病,如糖尿病、神经退行性疾病及骨关节疾病等的治疗带来了新希望。人胚胎干细胞(hESCs, human embryonic stem cells)具有无限增殖能力和多向分化潜能,是最有应用价值的种子细胞之一,也是研究干细胞功能和分子机制的常用工具^[1,2]。然而,由于受到伦理学的限制,hESCs体外培养直到1998年才开始出现^[3],比小鼠胚胎干细胞晚了17年。

目前建系的hESCs有上百种,但得到公认和NIH批准的只有几十种。由于hESCs在干细胞研究中的重要地位,及其所受伦理学的限制,hESCs供应量明显满足不了需求。目前国内尚没有生物公司能提供

hESCs细胞系,即使是著名的ATCC细胞库,目前也只是一株核型异常的hESCs细胞系(<http://www.atcc.org/Products/All/SCRC-2002.aspx#85786B46AA23451B94BC5D45200673F7>)。因此,充分利用已有的hESCs细胞就显得非常重要。

支原体污染是实验室常见的污染之一,感染率约在5~30%之间^[4]。支原体污染概率与细胞传代次数正相关,传代越多,被污染的可能性越大。我们前期检测所培养H9 hESCs,发现有支原体污染。Plasmocin是美国InvivoGen公司生产的抗支原体试剂,杀灭支原体效率高达84%^[4]。为此,我们拟用plasmocin处理hESCs,以试图杀灭其中的支原体,使之能重新应

基金项目:国家自然科学基金(81170327);广东省医学科研基金项目(A2012420);广东医学院科技创新基金(STIF201102),广东医学院博士启动基金(B2011005)资助。

作者单位:1.广东省医学分子诊断重点实验室,广东 东莞 523808; 2.广东医学院衰老研究所,广东 东莞 523808; 3.广东医学院医学检验专业本科,广东 东莞 523808; 4.广东医学院生理科学实验室,广东 东莞 523808; 5.广东医学院生物化学与分子生物学研究所,广东 湛江 524023

作者简介:孙雪荣(1974~),男,博士,讲师,研究方向:干细胞衰老。

***通讯作者:** E-mail: xgliu64@126.com

用于科学研究。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF, mice embryonic fibroblast)作为培养hESCs的饲养细胞层,取自孕龄13.5天野生型C57小鼠,经胰酶消化,吹打后,用含10%胎牛血清的DMEM生长液常规培养,胰酶消化传代。取第二代MEF细胞,经丝裂霉素处理后,以 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 传代备用。

H9 hESCs细胞系来自美国Wicell公司。培养方法参考我们以前的报道^[5],生长液为DMEM/F12基础液(11320-033, Invitrogen),其中含20% knockout serum (N10828028, Invitrogen)、0.1mM L-巯基乙醇(31350-010, Invitrogen)、1%非必需氨基酸(11140-050, Invitrogen)、1% GlutaMax(35050-061, Invitrogen)及预防浓度plasmocin($5 \mu\text{g}/\text{ml}$), bFGF(PHG0264, Invitrogen)新鲜添加至终浓度10 ng/ml。当进行支原体杀灭实验时,预防浓度plasmocin被去除。hESCs传代采用玻璃拉针切割法。

1.2 Plasmocin 处理 hESCs 细胞 Plasmocin 储存液(ant-mpt)购自 Invivogen 公司。将hESCs种于铺有MEF的6孔板中,加入2 ml生长液,并加bFGF至终浓度10 ng/ml。在个别实验中,bFGF加至40 ng/ml。根据实验要求,加入不同量plasmocin至终浓度 $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$, 或 $37.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。hESCs生长液每天更新一次,plasmocin亦重新补充,连续处理2~3周。

1.3 支原体检测 支原体检测采用凯基生物的PCR检测试剂盒(KGY012),该试剂盒采用两对引物,通过两次PCR可以检测至少11种支原体。第一次PCR阳性产物为350~700 bp,第二次PCR阳性产物为150~250 bp。详细步骤参照说明书,方法简述如下,用细胞刮刮取细胞,取200 μl 细胞悬液至离心管中,离心去上清,加入50 μl DNA溶解液重悬沉淀,沸水浴5 min, 12000 rpm离心5~10 min后,取上清液作为PCR反应模板,两次PCR结束后,用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 结晶紫染色 将培养在6孔板中的hESCs用PBS洗2次,甲醇固定10 min,加结晶紫染液室温孵育10 min,用PBS洗2次,然后在背光板上拍照。

2 结果

2.1 Plasmocin 未能杀灭 hESCs 支原体污染 Plasmocin说明书推荐杀灭支原体的浓度为 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$,时间2周。为了有效杀灭hESCs中的支原体,我们尝试了不同的浓度和时间。实验进行了三次。

第一次采用低($12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)、中($25 \mu\text{g}/\text{ml}$)、高($37.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)三种浓度plasmocin进行处理,2周后PCR

检测发现,三种浓度plasmocin均不能去除支原体(图1A),提示该支原体对plasmocin不敏感。

文献报道,冻存复苏的hESCs可能会对plasmocin重新产生敏感性,从而被杀灭^[4]。为此,我们重新复苏hESCs,并在复苏后第5天开始使用高浓度plasmocin($37.5 \mu\text{g}/\text{ml}$),2周后检测发现支原体仍然存在,而同时做为饲养层的MEF,却无支原体(图1B),说明支原体来源于hESCs。

第三次尝试,我们延长了高浓度plasmocin($37.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)的处理时间,同时为了对抗其对hESCs生长的抑制(见下文),培养液中添加了常规浓度(10 ng/ml)或高浓度(40 ng/ml)bFGF,3周后检测发现,支原体依然未被去除(图1C)。

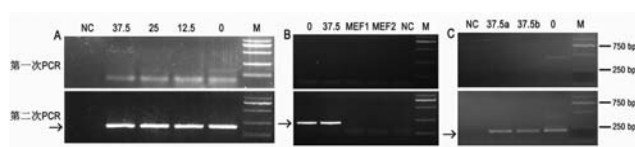


图1 不同浓度Plasmocin处理后hESCs支原体检测

Fig 1 Detection of mycobacterium on hESCs after treated with plasmocin with various concentrations

通过两次PCR进行支原体检测,图中数字为plasmocin浓度,单位为 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。A代表高(37.5)、中(25)、低(12.5)三种浓度plasmocin处理2周的结果。B为新复苏hESCs用高浓度plasmocin处理2周,MEF1和MEF2为两个小鼠胚胎成纤维细胞样本。C为高浓度plasmocin处理3周的结果,其中a样本bFGF浓度为10 ng/ml,b样本bFGF浓度40 ng/ml。NC为阴性对照DNA模板,箭头指向阳性条带。

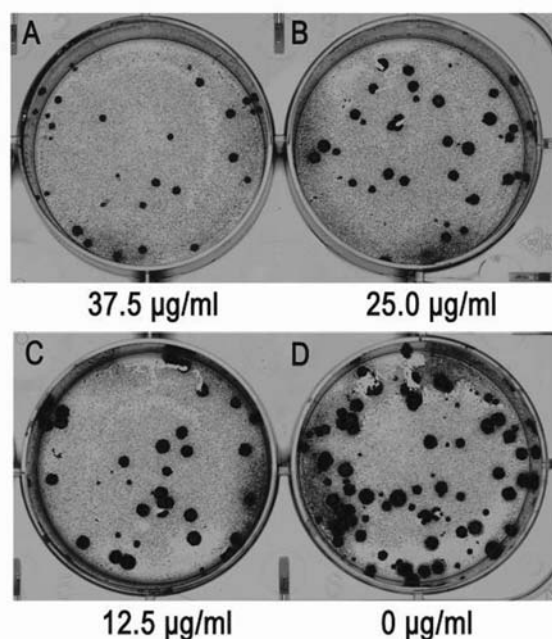
2.2 Plasmocin 对 hESCs 增殖、分化的影响 研究发现,虽然plasmocin未能去除hESCs支原体污染,却能明显抑制hESCs增殖,但抑制作用出现较慢,一般一周后才开始显现。如图2所示,plasmocin对hESCs的生长抑制呈剂量依赖性。显微镜下观察还发现,高浓度plasmocin容易诱导hESCs分化。

2.3 bFGF 抵抗高浓度 plasmocin 对 hESCs 的影响 尽管本研究中,plasmocin不能根除支原体,但其仍可能其他hESCs的支原体污染中有治疗效果。然而plasmocin对hESCs的增殖抑制及诱导分化作用,可能会限制其应用。

为了减少plasmocin对hESCs增殖、分化的不利影响,我们尝试在plasmocin处理同时,增加bFGF的浓度。结果显示,40 ng/ml bFGF能在一定程度上对抗高浓度plasmocin的诱导分化及增殖抑制作用(图3)。

在 $37.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ plasmocin处理条件下,增加生长液中bFGF浓度能在一定程度上对抗plasmocin的增殖抑制和诱导分化作用。A、B为常规bFGF浓度(10 ng/

ml), C、D 为高 bFGF 浓度 (40 ng/ml), E、F 为无 plasmocin 正常对照组 (100×)。



(hESCs 传代培养 4 天后, 用结晶紫染色检测)

图 2 不同浓度 plasmocin 对 hESCs 的生长抑制作用

Fig 2 Inhibition of plasmocin on growth of hESCs after treated with plasmocin with various concentrations

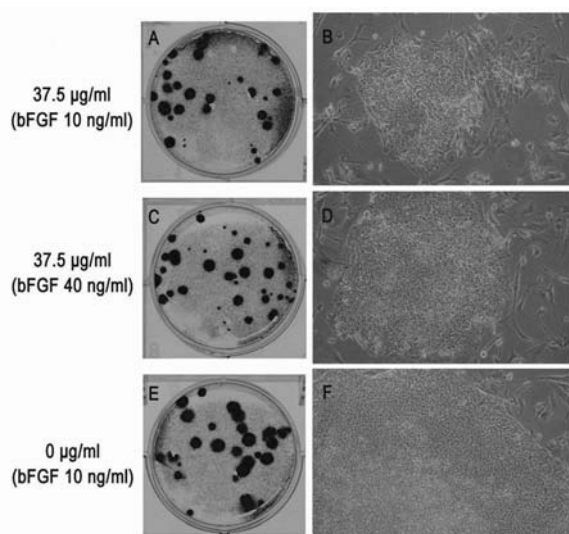


图 3 高浓度 bFGF 抵抗浓度 plasmocin 对 hESCs 的影响

Fig 3 effect of plasmocin at high concentration bFGF on hESCs

3 讨论

细胞培养过程中, 支原体污染比较隐蔽, 难以通过肉眼或显微镜观察发觉, 但其可对细胞生长状态、基因表达、蛋白合成及膜抗原等诸多方面产生干扰, 从而影响实验结果^[6]。

传统经典的支原体检测方法是琼脂培养, 根据其生长特征进行判断^[7], 但该方法耗时较长。其他检测方法还有荧光染色法、电镜检测、双酶分析法等, 但存

在灵敏度较低, 步骤复杂等限制。PCR 法是近年兴起的新检测方法, 该方法使用简单, 并通过设立阴性模板对照, 使之既有高灵敏性, 又能较好地排除假阳性, 目前越来越广泛应用。本研究用 PCR 法检测发现, hESCs 培养皿中有阳性扩增条带, 而作为饲养层的 MEF 则没有, 说明支原体来源于 hESCs。

Plasmocin 含有两种不同的抗生素, 分别作用于支原体的蛋白合成及 DNA 复制过程, 而对真核细胞的这些过程无影响。但本研究发现, 至少在 hESCs 细胞, plasmocin 呈剂量依赖性抑制细胞生长, 并且高浓度 plasmocin 有诱导 hESCs 分化的作用。据说明书介绍, plasmocin 抑制细胞生长可能与抑制线粒体呼吸功能有关。高浓度 bFGF (40 ng/ml) 能在一定程度上对抗 plasmocin 对 hESCs 的不利影响, 但效果有限。

尽管文献报道 plasmocin 可去除多种细胞的支原体污染, 但本研究中却未见明显效果。可能的原因有两个, 一是支原体对 plasmocin 产生了抗药性, 二是 hESCs 与其他类型细胞不同, 其呈紧密的克隆样生长, 即使传代时也不能被吹打成单细胞悬液 (否则细胞不能贴壁存活), 从而使细胞之间的支原体不能被杀灭。

总之, 本研究发现 plasmocin 未能有效去除 hESCs 的支原体污染, 并且高浓度 plasmocin 有抑制 hESCs 增殖和诱导分化的作用, 而高浓度 bFGF 对此有一定对抗作用。

参考文献:

- [1] Lin HT, Otsu M, Nakauchi H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368 (1609):1-6.
- [2] Mengarelli I, Barberi T. Derivation of multiple cranial tissues and isolation of lens epithelium-like cells from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2(2):94-106.
- [3] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-1147.
- [4] Uphoff CC, Denkmann SA, Drexler HG. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012:1-8.
- [5] Deng F, Hu H, Chen M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human Tenon's capsule fibroblasts [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 2871-2881.
- [6] Markoullis K, Bulian D, Holzlzimmer G, et al. Mycoplasma contamination of murine embryonic stem cells affects cell parameters, germline transmission and chimeric progeny [J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(1): 71-87.
- [7] Hayflick L, Chanock RM. Mycoplasma Species of Man [J]. *Bacteriol Rev*, 1965, 29:185-221.

收稿日期: 2013-05-17 编辑: 吴中非