

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hESCs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 observe 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 $2.5 \times 10^4/cm^2$ 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 b- 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 μ g/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 μ g/ml, 25 μ g/ml, 或37.5 μ g/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 μ l细胞悬液至离心管中,离心去上清,加入50 μ l 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 μ g/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 μ g/ml)、中(25 μ g/ml)、高(37.5 μ g/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 μ g/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 μ g/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)。

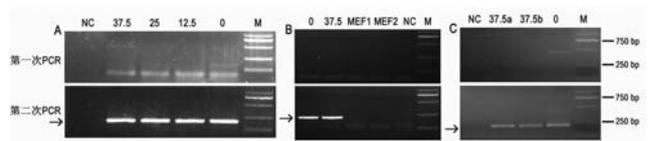


图1 不同浓度Plasmocin处理后hESCs支原体检测

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 μ g/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。

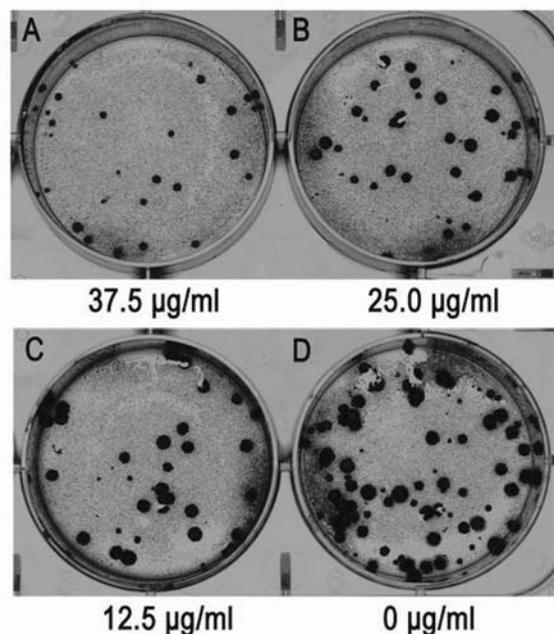
2.2 Plasmocin 对 hESCs 增殖、分化的影响 研究发现,虽然plasmocin未能去除hESCs支原体污染,却能明显抑制hESCs增殖,但抑制作用出现较慢,一般一周后才开始显现。如图2所示,plasmocin对hESCs的生长抑制呈剂量依赖性。显微镜下观察还发现,高浓度plasmocin容易诱导hESCs分化。

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 μ g/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

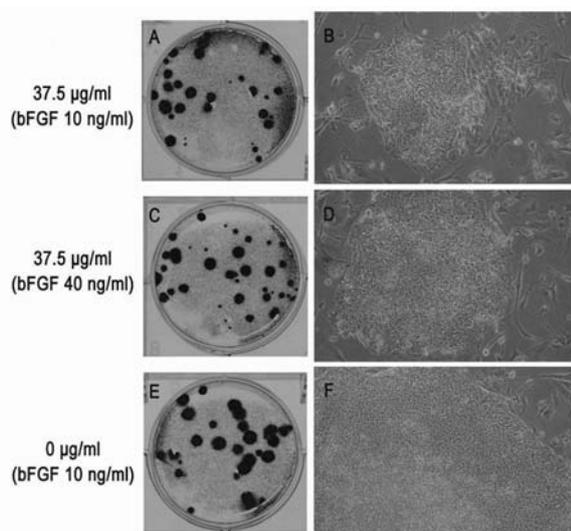


图3 高浓度bFGF抵抗浓度 plasmocin对 hESCs的影响

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, Holzlwimmer 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.