

## Plasmocin 对人多能干细胞支原体感染的消除研究

曹诗颖, 瞿庄茵, 袁方, 刘妍\*

(南京医科大学药学院干细胞与神经再生研究所, 江苏 南京 211166)

**[摘要]** **目的:**探究应用 Plasmocin 消除人多能干细胞支原体感染时的最佳浓度和所需天数,检测消除支原体感染后的人多能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)向神经元的定向分化。**方法:**应用 25.0、12.5、8.5、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  4 种不同浓度的 Plasmocin 进行支原体感染的消除,用 PCR 比较消除结果;对已消除支原体的 hPSC 进行维持培养以及定向分化。**结果:**应用 4 种浓度的 Plasmocin 均能消除支原体的感染,但其中高浓度组(25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )出现细胞毒性反应,消除支原体后存活下来细胞较少,而低浓度组(5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )消除支原体所需给药时间较长,12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组对细胞生长有不利影响,而 8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组对细胞生长影响较小。hPSC 在消除支原体感染后可高效分化至前脑神经元,并且 9 个月后未检测出支原体。**结论:**应用 8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Plasmocin 加药 1 周即可彻底消除 hPSC 中支原体的感染,并且不会对其定向分化能力造成影响。

**[关键词]** 人多能干细胞;支原体消除;Plasmocin

**[中图分类号]** Q813

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)08-905-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160802

## Application of Plasmocin in eliminating mycoplasma infection of human pluripotent stem cell

Cao Shiyong, Qu Zhuangyin, Yuan Fang, Liu Yan\*

(Institute for Stem Cell and Neural Regeneration, School of Pharmacy, NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract]** **Objective:**To investigate the most effective dosage and optimal time window of Plasmocin in eliminating mycoplasma infection, and detect whether the drug exert negative effects on human pluripotent stem cell (hPSC) culture. **Methods:**hPSCs were treated with 25.0, 12.5, 8.5, 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Plasmocin. The efficiency for removing mycoplasma infection was compared by PCR. Directly differentiation of hPSC to forebrain neurons after rescued. **Results:**All of the concentrations for Plasmocin eradicated mycoplasma infection. However, the highest dosage (25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) lead to toxic effects and the lowest dosage (5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) required longer treatment time. The 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group had adverse effects on cell growth but the 8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group contributed to hPSCs maintenance. After mycoplasma elimination, hPSC efficiently differentiated to forebrain neurons. Furthermore, after 9 months post-Plasmocin treatment, mycoplasma was undetected on hPSC. **Conclusion:**One week treatment with 8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Plasmocin completely eradicated mycoplasma contamination without affecting hPSC maintenance and differentiation.

**[Key words]** human pluripotent stem cell; elimination of mycoplasma; Plasmocin

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 905-911]

人多能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)是近年来医学研究热门领域之一,其包括从胚胎时期内细胞团分离出来的人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC)<sup>[1]</sup>和经多能因子转入人类体细胞后重新编程得到的人诱导多能干细胞

(human induced pluripotent stem cells, hiPSC)<sup>[2]</sup>。hPSC 可在体外长期自我更新和维持多能性,且可分化为人体任意一种细胞,如神经元<sup>[3]</sup>、心肌细胞<sup>[4]</sup>、肝细胞<sup>[5]</sup>等。它们不仅可以作为一种再生资源治疗神经退行性疾病,还可以应用于药物筛选、发病机制研究及人类发育生物学研究等<sup>[6]</sup>。

支原体是一种微生物,缺乏细胞壁,能够黏附于细胞表面,甚至进入宿主细胞<sup>[7]</sup>。由于感染支原体后,细胞培养液不会出现浑浊,细胞形态也不会发生明显变化,加上支原体直径仅为 0.15~0.30  $\mu\text{m}$ ,

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81471301);江苏省双创人才基金(KY216R201510);南京医科大学引进人才启动基金(KY109RC011305)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: yanliu@njmu.edu.cn

即使在高倍显微镜下也难以观察到,所以细胞被支原体感染后难以及时发现<sup>[8]</sup>。支原体在自然界中广泛存在于哺乳动物等各种生物体中,而其感染细胞的频率为15%~35%,在一些细胞系中甚至高达65%~80%<sup>[9]</sup>。据文献报道,支原体在细胞培养中会造成很多有害影响,如改变细胞蛋白质水平,影响RNA/DNA的合成,诱导染色体变异,改变细胞膜成分等<sup>[10]</sup>。应用支原体感染的细胞进行科学研究会导致错误的实验结果,甚至会造成珍贵细胞系的死亡。所以在培养细胞的过程中检测并及时消除支原体尤为重要。已有文献报道 Plasmocin 可作为支原体的抑制剂,但是对 Plasmocin 的使用浓度和持续时间并未进行深入探究,也未有文献报道感染支原体后 hPSC 在定向分化至特定谱系神经元中出现的异常情况<sup>[10-11]</sup>。本文对 hPSC 感染支原体后发生的异常情况以及支原体的检测和消除进行详细讨论,探究应用 Plasmocin 消除 hPSC 支原体感染的最佳给药浓度和持续天数,为科研人员消除普遍存在且具有严重危害性的支原体感染提供有效方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

研究所用细胞系为 hESC(H9) 和 hiPSC(DS1、DS2U),均来自美国威斯康星大学 WiCell Bank(该机构专为干细胞的科学研究提供支持)。hPSC 在维持阶段所用培养基为 Essential 8 medium(E8);在分化阶段所用培养基为神经诱导分化液(neural induction medium, NIM),由 490 mL DMEM/F12、5 mL N2 复合物、5 mL NEAA 配制而成。以上试剂和 B27 均购自美国 Gibco 公司。Vitronectin、Dispase、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、TripLE Express Enzyme(Life Technology 公司,美国)。Matrigel(BD Biosciences 公司,美国)。Paraformaldehyde(PFA)、poly-L-ornithine(Sigma-Aldrich 公司,美国)。PBS Tablets(Medicago 公司,美国)。EDTA(Lonza 公司,美国)。封片剂 Fluoromount-G(SouthernBiotech 公司,美国)。2×Taq PCR MasterMix(北京天根生化科技有限公司)。Plasmocin Treatment 试剂盒(InvivoGen 公司,美国)。DNA ladder(大连 TaKaRa 公司)。正置荧光显微镜 80i、倒置荧光显微镜 TS100(Nikon 公司,日本)。RCR Verity-96(Life technology ABI 公司,美国)。自动成像系统(Bio-Red 公司,美国)。

Foxg1 抗体(1:1 000, Rabbit IgG, Abcam 公司,美国), Ki67 抗体(1:500, Rabbit IgG, Life 公司,美国),

Map2 抗体(1:1 000, Mouse IgG, Sigma-Aldrich 公司,美国), Nestin 抗体(1:1 000, Goat IgG, Santa Cruz biotechnology 公司,美国), Otx2 抗体(1:1 000, Goat IgG, R&D Systems 公司,美国), Pax6 抗体(1:1 000, Rabbit IgG, Covance Research Products 公司,美国), Sox2 抗体(1:1 000, Rabbit IgG, R&D Systems 公司,美国), Tuj-1 抗体(1:2 000, Rabbit IgG, Covance Research Products 公司,美国), Tuj-1 抗体(1:2 000, Mouse IgG, Sigma-Aldrich 公司,美国)。Synaptophysin 抗体(1:100, Rabbit IgG, Santa Cruz 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 hPSC 的培养

将 hPSC 培养于用基质胶 Vitronectin 包被过的细胞培养皿上,用 E8 培养基培养。根据细胞密度和形成克隆的大小 5~6 d 进行传代。传代时用 EDTA 消化,置于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 1~2 min。待显微镜下观察到克隆内部结构松散时停止消化,吸出 EDTA,加入 DMEM/F12 轻轻晃动 30 s 后吸出。再加入 E8 培养基进行吹打,将克隆从培养皿上吹下,按照 1:6 的比例进行传代。

#### 1.2.2 hPSC 向神经元定向分化

hPSC 的分化参考文献<sup>[12]</sup>进行。hPSC 在培养皿中可形成边缘光滑,内部致密的克隆。待细胞密度约 80%时,加入 Dispase(1 U/mL),置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 2 min。吸走 Dispase,用 DMEM/F12 清洗 1 遍后吸走。加入新的 DMEM/F12 将克隆吹下,置于离心机中 800 r/min 离心 1 min。吸除上清,将管底的细胞转移至细胞培养瓶,更换培养液为神经诱导培养液 NIM,细胞将于分化第 1 天形成拟胚体(embryoid body, EB)。分化第 7 天将拟胚体吸出,置于直径为 60 mm 的细胞培养皿中,每个培养皿中大约含 50 个。加入与 NIM 体积比为 10% 的 FBS 促进细胞贴壁,10 h 后更换培养基为 NIM。分化第 10 天,细胞出现清晰神经管样结构(Rosettes),标志着神经外胚层的形成。分化第 16 天,将神经管样细胞结构吹下后转移至细胞培养瓶中,培养液为 NIM 并在其中加入体积比为 2% 的 B27 以减少机械吹打对细胞的损伤。分化第 17 天,细胞将形成球状神经外胚层(neuroepithelial spheres, NS)结构。分化第 20 天,用 TrypLE 酶把 NS 消化为单细胞后贴于用 Matrigel 包被过的玻片上,培养基为 NIM 与体积比为 2% 的 B27。

#### 1.2.3 支原体的检测

吸取 1 mL 细胞培养液置于 1.5 mL 离心管中,

短暂离心后取上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。再将离心管置于离心机中离心, 转速 13 300 g, 时间 5 min。离心结束后弃上清, 留沉淀。加入 50  $\mu$ L 无菌超纯水溶解沉淀, 之后将其转移至 200  $\mu$ L 的离心管中。置于 PCR 仪中, 于 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 在此步骤中增加无菌超纯水作为阴性对照, 含支原体的试剂作为阳性对照。吸出 4  $\mu$ L 的样品置于新的 200  $\mu$ L 的离心管中, 然后加入 PCR 反应液: 1  $\mu$ L 正向引物, 1  $\mu$ L 反向引物, 12.5  $\mu$ L 2 $\times$ Tap PCR MasterMix, 6.5  $\mu$ L 无菌超纯水。将样品置于 PCR 仪器中扩增, 退火温度为 55 $^{\circ}$ C。引物序列由同济大学章小清教授实验室提供: 正向引物: 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'; 反向引物: 5'-TGCACCATCTGTCTGTTAACCTC-3'。

#### 1.2.4 细胞免疫荧光染色

用镊子把培养细胞的玻片挑出置于免疫组化所用的培养皿中, 加入 100  $\mu$ L / 片的 4% 多聚甲醛 (PFA) 固定 0.5 h 后吸除; 加入 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入 0.2% Triton 孵育 10 min; 加 10% 驴血清封闭 1 h; 加入用 0.1% Triton 与 5% 驴血清配制的一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 加入二抗, 用 5% 驴血清配制, 室温孵育 30 min; 再用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 最后用封片剂 Fluoromount-G 封片, 在倒置荧光显微镜下观察结果。

## 2 结果

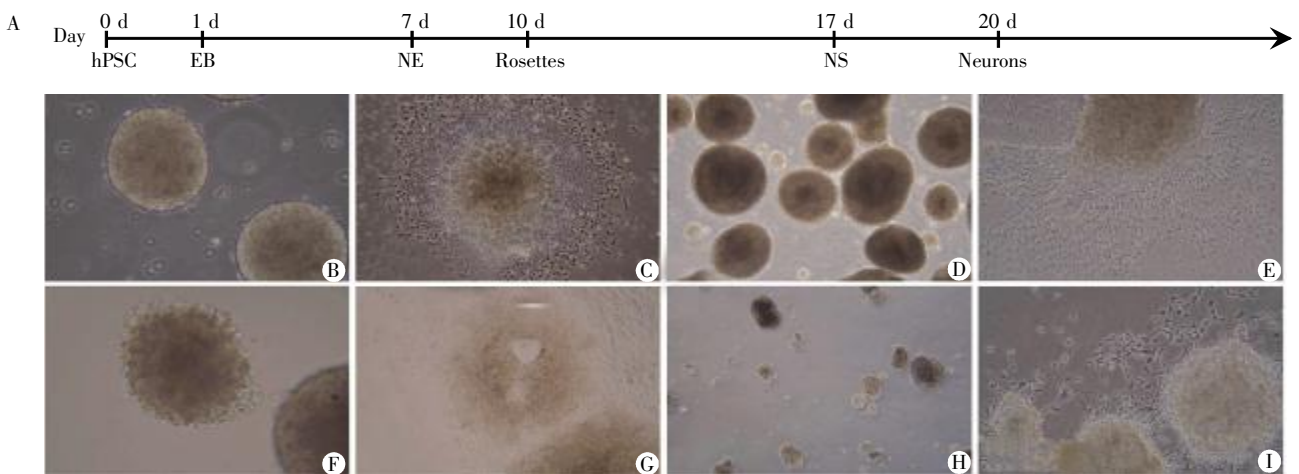
### 2.1 支原体感染导致 hPSC 向神经元定向分化过程

中出现异常

依据已经建立的方法<sup>[12-14]</sup>对 hPSC 进行神经元定向分化(图 1A)。在正常情况下, hPSC 将于分化第 1 天形成光滑的球状结构(图 1B)。然而, 在显微镜观察发现此次拟胚体边缘松散, 并且被大量死细胞黏附(图 1F)。在分化第 7 天将拟胚体贴壁, 正常情况下细胞应在分化第 10 天出现清晰的神经管样结构(图 1C), 但此次细胞未出现或少量出现神经管样结构。分化第 11 天时, 细胞开始大量死亡, 甚至出现片状团块飘起, 在贴壁细胞中间形成很大的空洞(图 1G)。为控制这一贴壁细胞死亡的情况, 在分化第 12 天提前将细胞吹起。次日, 细胞并未形成正常情况下应具有的球状结构的神经前体细胞(图 1D), 而是以松散的块状结构悬浮。接下来细胞持续死亡, 存活细胞数量较少且状态极差(图 1H)。在分化第 20 天时, 将仅存细胞贴壁, 虽有少量神经元爬出, 但是与正常情况下神经元轴突繁密的状态相比(图 1E), 此次爬出神经元轴突极短(图 1I)。值得注意的是, 在整个分化过程中细胞培养液并未见浑浊, 也没有出现白色絮状物沉淀, 可以排除细菌或者真菌感染。

### 2.2 支原体的检测与消除

应用 PCR 检测 hPSC 细胞及分化产物培养液, 发现支原体强阳性条带(图 2A), 确定细胞被支原体感染。为消除支原体感染, 用抗支原体药物 Plasmocin (25.0  $\mu$ g/mL) 连续处理 2 周, 再降低浓度至 5.0  $\mu$ g/mL 处理 1 周(表 1), 经检测支原体条带呈阴



A: 诱导 hPSC 进行神经元定向分化的示意图。B~E: 正常情况下的细胞分化过程光镜图; B: hPSC 于分化第 1 天形成拟胚体(EB)( $\times 100$ ); C: 分化第 10 天形成玫瑰花样的神经管状结构(Rosettes)( $\times 40$ ); D: 分化第 16 天重悬 Rosettes, 形成球状神经前体细胞(NS)( $\times 100$ ); E: NS 贴于玻片后有大量神经元爬出( $\times 100$ )。F~I 为支原体感染后的细胞分化过程光镜图; F: 分化第 1 天形成的 EB 边缘松散, 周围黏附大量死细胞( $\times 200$ ); G: 分化第 10 天未形成 Rosettes 并且有细胞大量死亡( $\times 40$ ); H: Rosettes 少量形成 NS( $\times 40$ ); I: NS 贴壁后仅有少量神经元爬出, 并且突触极短( $\times 100$ )。

图 1 支原体感染导致 hPSC 向神经元定向分化过程中出现异常

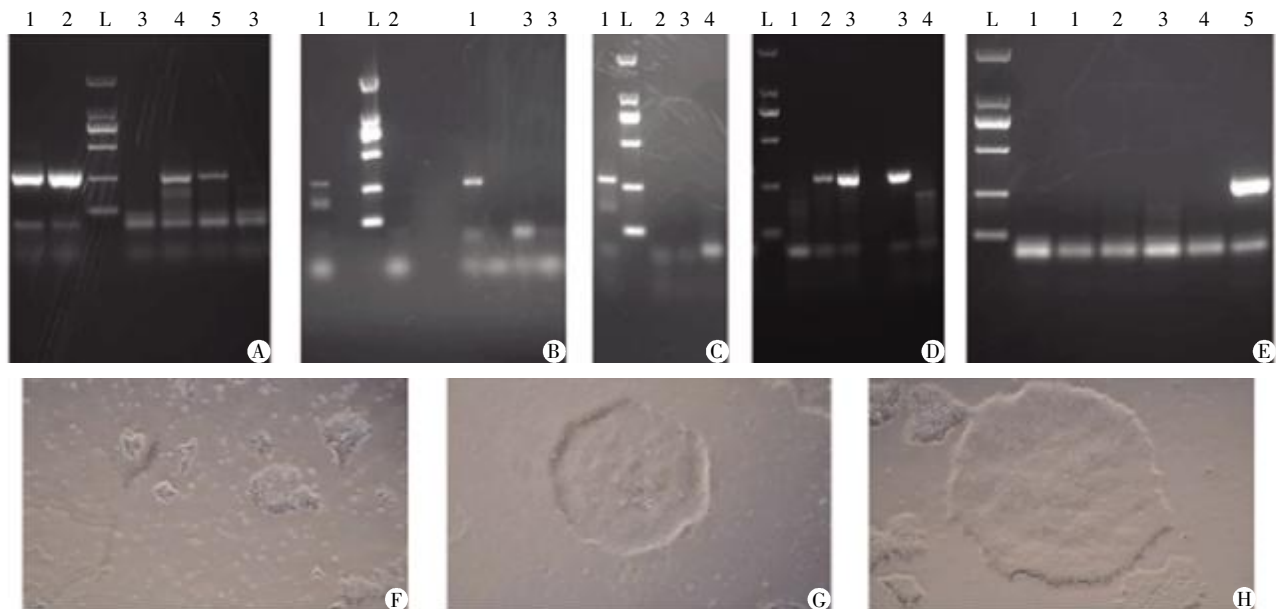
Figure 1 Mycoplasma infection caused abnormal effects during the differentiation process of hPSC to neuron

性(图 2B),说明支原体已经消除。但是在处理的过程中观察到 hPSC 形成克隆数少,死细胞多(图 2F),推测是由于 Plasmocin 浓度过高对 hPSC 产生毒性损伤。为减少药物对细胞造成的伤害,将浓度降至 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理 3 周(表 1),检测后得支原体阴性结果(图 2C),并且 hPSC 死细胞数减少,状态得到改善(图 2G)。为了进一步探究 Plasmocin 消除支原体的最佳浓度和所需天数,分别在细胞培养液中加入 8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2 个浓度的 Plasmocin(表 1),并且在加药物 1 周后,提前对细胞培养液进行检测。结果显示,加入 8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度药物的细胞培养液中,支原体条带已呈现阴性(图 2C),而加入 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的细胞培养液中,支原体阳性条带大幅减弱,但是并未完全消除(图 2D)。继续给低浓度

组 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Plasmocin 1 周,检测后发现支原体阳性条带完全消失(图 2D)。综合上述情况,发现给予 8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的 Plasmocin 处理细胞 1 周,可以有效消除支原体并且不会对细胞自身造成明显影响(图 2H)。更重要的是,用此浓度处理过的 hPSC 在培养 9 个月后未检测出支原体(图 2E),说明支原体被彻底消除。

### 2.3 hPSC 消除支原体后可高效分化至前脑神经元

为了探究应用 Plasmocin 消除支原体感染后的 hPSC 是否可以定向分化,给予其分化至前脑神经元的体外培养条件。随着分化的进行,hPSC 在不同时间点形成拟胚体,神经管样结构,球状神经前体细胞,最后分化至神经元(图 3A)。更重要的是这一过程与未被感染过支原体的 hPSC 分化相比并无



A: 检测细胞分化中出现异常情况的各阶段培养液,发现支原体条带均为强阳性,条带依次为:1:阳性对照;2:hPSC;L:DNA ladder;3:阴性对照;4:神经上皮细胞;5:神经前体细胞。B:应用 Plasmocin(25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )连续处理 2 周再降低浓度至 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理 1 周后,支原体条带呈阴性,条带依次为:1:阳性对照;L:DNA ladder;2:Plasmocin;3:阴性对照。C:应用不同浓度 Plasmocin 和不同加药时间处理后的 PCR 结果,条带依次为:1:阳性对照;L:DNA ladder;2:Plasmocin(12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )连续处理 3 周;3:Plasmocin(8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )连续处理 1 周;4:阴性对照。D:应用不同时间的 Plasmocin(5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理后的 PCR 结果,条带依次为:L:DNA ladder;1:阴性对照;2:Plasmocin 连续处理 1 周;3:阳性对照;4:Plasmocin 连续处理 2 周。E:在消除支原体 9 个月后检测细胞各分化阶段的培养液均未发现支原体感染,条带依次为:L:DNA ladder;1:hPSC;2:神经前体细胞;3:神经元;4:阴性对照;5:阳性对照。F:应用 Plasmocin(25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )连续处理 2 周再降低浓度至 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理 1 周 hPSC 的生长状态( $\times 40$ )。G:应用 Plasmocin(12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )连续处理 3 周 hPSC 的生长状态( $\times 40$ )。H:应用 Plasmocin(8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )连续处理 1 周 hPSC 的生长状态( $\times 40$ )。

图 2 用 Plasmocin 消除 hPSC 支原体的感染

Figure 2 Application of Plasmocin eradicated mycoplasma contamination of hPSC

表 1 应用 Plasmocin 消除 hPSC 支原体感染

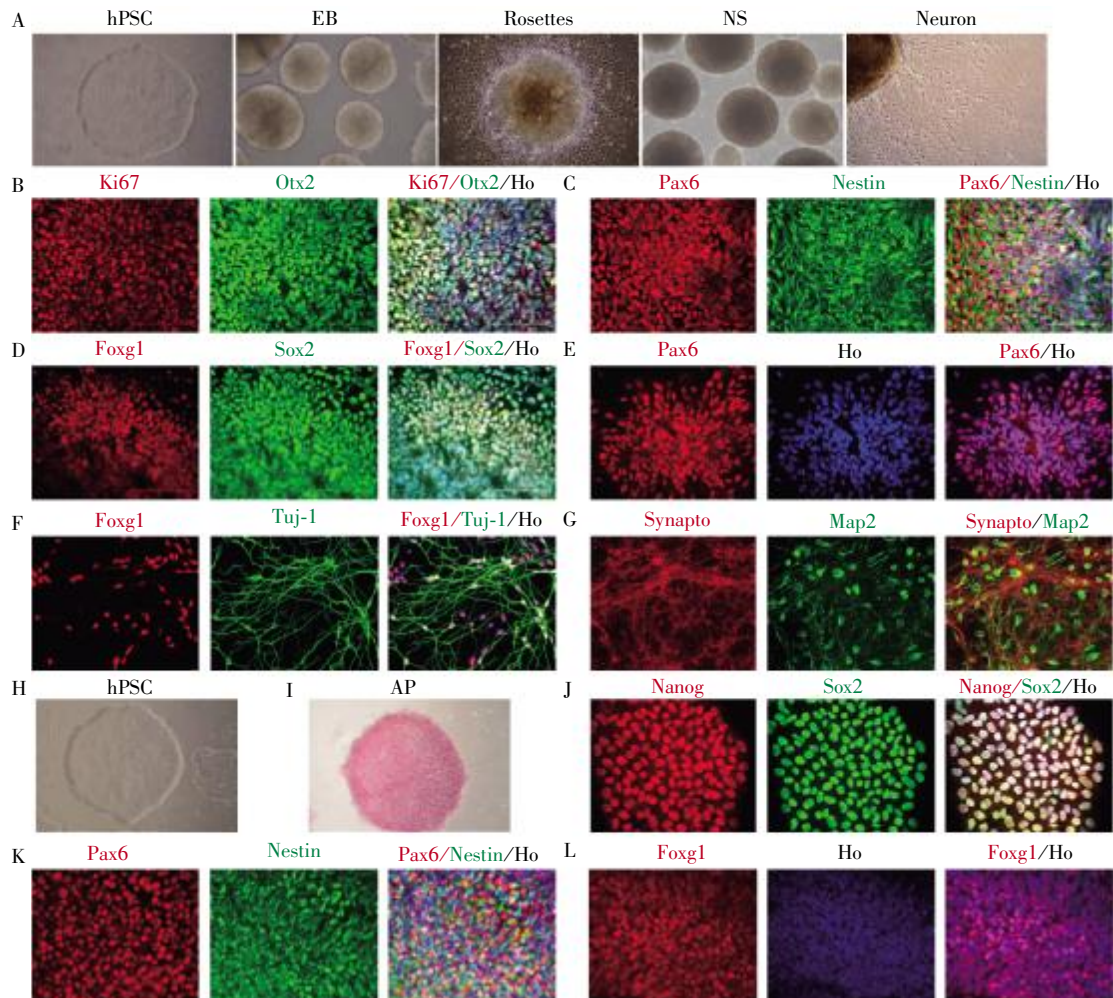
Table 1 Application of different dosages of Plasmocin eradicated mycoplasma contamination of hPSC				
Plasmocin 浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	持续时间(周)	hPSC 状态	支原体消除情况	9 个月后检测
25.0/5.0	2/1	形成克隆数少,死细胞多	支原体阴性	支原体阴性
12.5	3	死细胞数减少	支原体阴性	支原体阴性
8.5	1	细胞边缘光滑,内部致密	支原体阴性	支原体阴性
5.0	2	细胞边缘光滑,内部致密	支原体阴性	支原体阴性

任何差异, 表明经 Plasmocin 处理过的 hPSC 仍然具备正常的分化能力。

进一步细胞荧光染色结果显示, 分化第 10 天 hPSC 表达神经外胚层的标记物 Pax6 和 Sox2<sup>[15-16]</sup>, 并且这些细胞大部分均表达增殖标记物 Ki67 和干细胞标记物 Nestin<sup>[17]</sup>, 表明它们具有正常的有丝分裂能力。而且它们均能被 Foxg1 和 Otx2 标记, 说明它们被赋予了前脑的命运(图 3B~3D)<sup>[16-18]</sup>, 可分化为特定神经谱系。分化第 21 天的大部分细胞表达大脑皮层的标记物 Pax6<sup>[17]</sup>(图 3E)。在分化第 23 天, 高达 80% 以上的细胞表达神经元的标记物 Tuj-1, 并且大部分均为 Foxg1 阳性(图 3F), 说明细胞分化至前脑神经元<sup>[19-20]</sup>。在分化 90 d 之后, >90% 的细胞表达成熟神经元的标记物 Map2<sup>[21-22]</sup>, 并且分泌突触蛋

白小体 Synaptophysin<sup>[15]</sup>(图 3G)。以上结果表明, hPSC 在消除支原体后可自发高效分化至前脑神经元。

在未感染支原体的 hPSC 中加入浓度为 8.5 μg/mL 的 Plasmocin, 观察其对正常 hPSC 多能性以及分化命运的影响。在正常的 hPSC 中连续加药 4 d 后, 在光镜下观察, 结果显示 hPSC 结构致密, 边缘光滑(图 3H)。用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)试剂盒对 hPSC 染色, 结果表明 hPSC 具有多能性(图 3I)。细胞免疫荧光结果显示, hPSC 表达多能性标记物 Sox2 和 Nanog (图 3J)。以上结果表明在未感染支原体的 hPSC 中加入浓度为 8.5 μg/mL 的 Plasmocin 处理后不会对其多能性造成影响。接下来, 把连续加药 4 d 的 hPSC 分化至神经上皮细胞, 免疫荧光结果显示分化第 10 天的细胞表达神经外胚层标记物 Pax6、干细



A: 已消除支原体感染的 hPSC 分化至前脑神经元的过程与正常时相同[hPSC, Rosettes( $\times 40$ ); EB, NS, Neuron( $\times 100$ )]; B: hPSC 分化第 10 天可表达增殖的标记物 Ki67 和前脑的标记物 Otx2( $\times 400$ ); C: NE 的标记物 Pax6 和干细胞的标记物 Nestin( $\times 400$ ); D: 前脑的标记物 Foxg1 和细胞多能性的标记物 Sox2( $\times 400$ ); E: 分化第 21 天的细胞表达室管膜下层细胞标记物 Pax6( $\times 400$ ); F: 分化第 23 天的细胞表达神经元的标记物 Tuj-1 和前脑的标记物 Foxg1( $\times 400$ ); G: 分化第 92 天的细胞表达突触素 Synaptophysin 和成熟细胞的标记物 Map2( $\times 400$ ); H: 在未感染支原体的 hPSC 中连续 8.5 μg/mL 的 Plasmocin 处理 4 d 后光镜图( $\times 40$ ); I: AP 染色图( $\times 40$ ); J: 免疫荧光染色图( $\times 100$ ); K: hPSC 分化第 10 天可表达 NE 的标记物 Pax6 和干细胞的标记物 Nestin( $\times 70$ ); L: 前脑的标记物 Foxg1( $\times 70$ )。

图 3 诱导已消除支原体感染的 hPSC 定向分化至前脑神经元

Figure 3 Directly differentiation of mycoplasma infection-eliminated hPSC to forebrain neurons

胞标记物 Nestin 和前脑标记物 Foxg1。结果表明在未感染支原体的 hPSC 中加入浓度为 8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Plasmocin 处理后不会对其分化至神经外胚层和前脑细胞产生影响。

### 3 讨论

应用 hPSC 定向分化技术进行人类发育生物学的机制探索、药物筛选以及疾病发病机制等诸多方面的研究已经成为当前广泛运用的方法<sup>[23-25]</sup>。然而, hPSC 在培养过程中对外界环境要求较高,若培养环境清洁等级低,或者操作失误,很容易导致细菌、真菌甚至支原体的感染。由于支原体直径很小,在光学显微镜下难以被观察到,以及它不会造成细胞培养液浑浊等特征,给研究者及时发现并消除支原体感染带来很大的困难。应用支原体感染的细胞进行科学研究,不但会增加实验员在操作过程中被支原体感染的风险,而且会对 hPSC 的定向分化造成严重影响。

本研究发现,支原体感染对 hPSC 定向分化至前脑神经元产生严重的影响。首先在分化初期 hPSC 形成的拟胚体边缘松散并且黏附大量的死细胞。其次,细胞贴壁后难以形成清晰神经管样结构,而这正是分化至神经外胚层的关键阶段。更严重的是,细胞在分化 10 d 后不能继续维持贴壁状态,细胞大量死亡甚至有大片团块飘起。即使最后有少量细胞能分化至球状神经前体细胞,但是再次贴壁后很少有神经元爬出,对神经元的分化率及神经元的状态造成极大的影响。所以,当 hPSC 在定向分化过程中出现异常情况时,要立即检查是否感染支原体。一旦 hPSC 感染支原体,应在未分化状态时用 Plasmocin 消除。

本研究应用 25.0、12.5、8.5、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  4 种浓度的 Plasmocin,并探索其有效消除支原体所需的时间。根据试剂盒使用说明书连续应用 25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的 Plasmocin 2 周后降低浓度至 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  连续应用 1 周,虽然能消除支原体,但是会严重影响 hPSC 的生长和增殖状态,消除支原体后存活的细胞很少。而连续应用 8.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的 Plasmocin 1 周即能彻底消除支原体感染,在培养 9 个月后并未检测出支原体,并且该浓度可以让细胞维持良好的生长状态。

本研究还发现,应用 Plasmocin 消除支原体后的 hPSC 仍能高效分化为特定谱系神经元,如前脑神经元。用光学显微镜观察到在 hPSC 定向分化为

神经元的过程中,细胞在不同时间点应形成的细胞形态都与未感染支原体的细胞分化无异。并且分化至神经元后,用免疫荧光进行鉴别发现,消除感染后的 hPSC 来源的细胞大量表达神经元的标记物 Tuj-1。在分化 90 d 后,这些神经元逐渐成熟,表达成熟神经元的标记物 Map2,并且分泌突触素 Synaptophysin。

哺乳动物均携带支原体,为了减少细胞感染支原体的几率,应该保持实验室的清洁,把培养人源细胞和动物细胞的培养液分开使用。在条件允许的情况下,更应在培养人源细胞和动物细胞时应用不同的生物安全柜和培养箱。当然,定期检测支原体是从根本上发现和预防支原体感染的前提,亦是确保细胞培养实验顺利进行的关键。

### [参考文献]

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131(5): 861-872
- [3] Sundberg M, Andersson PH, Akesson E, et al. Markers of pluripotency and differentiation in human neural precursor cells derived from embryonic stem cells and CNS tissue[J]. Cell Transplant, 2011, 20(2): 177-191
- [4] Pal R, Mamidi MK, Das AK, et al. Comparative analysis of cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells under 3-D and 2-D culture conditions[J]. J Biosci Bioeng, 2013, 115(2): 200-206
- [5] Miki T, Ring A, Gerlach J. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2011, 17(5): 557-568
- [6] Desai N, Rambhia P, Gishto A. Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2015, 13: 9
- [7] Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of mycoplasma contamination in cell culture[J]. Cell J, 2012, 13(4): 203-212
- [8] Young L, Sung J, Stacey G, et al. Detection of mycoplasma in cell cultures[J]. Nat Protoc, 2010, 5(5): 929-934
- [9] Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002, 38(2): 79-85
- [10] Molla Kazemiha V, Azari S, Amanzadeh A, et al. Efficient

- cy of plasmocin on various mammalian cell lines infected by mollicutes in comparison with commonly used antibiotics in cell culture;a local experience[J]. *Cytotechnology*,2011,63(6):609-620
- [11] Romorini L,Riva DA,Blüguermann C,et al. Effect of antibiotics against *Mycoplasma* sp. on human embryonic stem cells undifferentiated status, pluripotency, cell viability and growth[J]. *PLoS One*,2013,8(7):e70267
- [12] Yuan F,Fang KH,Cao SY,et al. Efficient generation of region-specific forebrain neurons from human pluripotent stem cells under highly defined condition[J]. *Sci Rep*,2015,5:18550
- [13] Li XJ,Zhang X,Johnson MA,et al. Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells[J]. *Development*,2009,136(23):4055-4063
- [14] Weick JP,Held DL,Bonadurer GF,et al. Deficits in human trisomy 21 iPSCs and neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2013,110(24):9962-9967
- [15] Ma L,Hu B,Liu Y,et al. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice[J]. *Cell Stem Cell*,2012,10(4):455-464
- [16] Espuny-Camacho I,Michelsen KA,Gall D,et al. Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits *in vivo* [J]. *Neuron*,2013,77(3):440-456
- [17] Liu Y,Weick JP,Liu H,et al. Medial ganglionic eminence-like cells derived from human embryonic stem cells correct learning and memory deficits[J]. *Nat Biotechnol*,2013,31(5):440-447
- [18] Maroof AM,Keros S,Tyson JA,et al. Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*,2013,12(5):559-572
- [19] Shi Y,Kirwan P,Smith J,et al. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses [J]. *Nat Neurosci*,2012,15(3):477-486
- [20] Kadoshima T,Sakaguchi H,Nakano T, et al. Self-organization of axial polarity,inside-out layer pattern,and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2013,110(50):20284-20289
- [21] Shi Y,Kirwan P,Livesey FJ. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks [J]. *Nat Protoc*,2012,7(10):1836-1846
- [22] Pasca AM,Sloan SA,Clarke LE,et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture[J]. *Nat Methods*,2015,12(7):671-678
- [23] Tabar V,Studer L. Pluripotent stem cells in regenerative medicine:challenges and recent progress[J]. *Nat Rev Genet*,2014,15(2):82-92
- [24] Yu DX,Di Giorgio FP,Yao J,et al. Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Reports*,2014,2(3):295-310
- [25] Inoue H,Nagata N,Kurokawa H,et al. iPSC cells:a game changer for future medicine[J]. *EMBO J*,2014,33(5):409-417

[收稿日期] 2016-03-17

本刊现已启用网上稿件管理系统,作者登陆  
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
审理情况。