

研究简报

不同性别胎鼠生殖嵴表观特征差异性研究

邓玉金 肖 雄 沈心怡 宋 坤 杨利珊 李跃民*

(重庆市牧草与草食家畜重点实验室, 西南大学动物科技学院, 重庆 400715)

摘要 在应用小鼠胚胎干细胞(ESCs)裂解液诱导异性小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)为诱导性多能干细胞(iPSCs)的过程中, 通过性别鉴定的方法筛选特定性别的被诱导的MEFs, 能够快速简便的鉴定出iPSCs的生成材料是否来源于被诱导的体细胞。利用妊娠13.5天雄性和雌性胎鼠生殖嵴在形态学上存在明显差异的特性, 识别出不同性别昆明系小鼠13.5天的胚胎, 并从中分离培养出大量不同性别的MEFs, 用于iPSCs的实验研究。根据雄性小鼠特异性的Y染色体性别决定区(*SRY*基因)的核心序列, 设计一对引物, 并对获得的不同性别MEFs的DNA样本进行PCR扩增, 验证不同性别胎鼠生殖嵴在形态学上存在的差异。结果表明, PCR性别鉴定结果与MEFs来源胚胎的性别一致。不同性别的MEFs均具有典型的成纤维细胞特性, 两者在形态学上并没有差异。因此, 利用雄性与雌性胚胎在生殖嵴形态学上的差异可以快速分离获得大量不同性别的MEFs。

关键词 小鼠胚胎成纤维细胞; 生殖嵴; 性别鉴定; PCR; Y染色体性别决定区

Variations of Epigenetic Characteristics of Germinal Ridge between Male Embryos and Female Embryos

Deng Yujin, Xiao Xiong, Shen Xinyi, Song Kun, Yang Lishan, Li Yuemin*

(Chongqing Key Lab of Forage & Herbivore, College of Animal Science and Technology,

Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract When mouse embryonic fibroblasts (MEFs) co-incubated with extracts of embryonic stem cells (ESCs) to reprogram into the induced pluripotent stem cells (iPSCs), the origin of iPSCs could be rapidly and easily identified based on the different gender of MEFs and embryonic stem cells. Different sexual MEFs were isolated from different sexual Kunming mouse embryos at 13.5 dpc (days post coitum) which were identified according to the morphological differences between the male germinal ridge and the female germinal ridge. A pair of primers were designed according to the core gene sequence of special sex-determining region of Y-chromosome (*SRY* gene) of male mouse, and DNA samples obtained from different sexual MEFs were amplified by PCR to test and verify the differences in morphology between the different sexual germinal ridge. The results indicated that the gender

收稿日期: 2013-01-23 接受日期: 2013-04-15

重庆市自然科学基金(批准号: CSTC2009BB5301)、中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: XDJK2009C163)、西南大学博士基金、西南大学动物科技学院青年教师基金和西南大学“国家级大学生创新训练计划”资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68251196, E-mail: lymswu@126.com

Received: January 23, 2013 Accepted: April 15, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing Province (Grant No.CSTC2009BB5301), the Central University Basic Scientific Research Business Expenses Special Funds (Grant No.XDJK2009C163), the Dr Fund of Southwest University, the Southwest University College of Animal Science and Technology Foundation for Young Teachers and the “National College Students Innovation Training Plans” Supported by Southwest University

*Corresponding author. Tel: +86-23-68251196, E-mail: lymswu@126.com

网络出版时间: 2013-08-26 15:19 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130826.1519.006.html>

of MEFs which were identified with sex identification with PCR was consistent with that of mouse embryos at 13.5 dpc. Different sexual MEFs manifested the typical characteristics of fibroblasts, and there were no difference in morphology between the male MEFs and the female MEFs. Therefore, a large number of different sexual MEFs could be isolated from different sexual mouse embryos at 13.5 dpc which were identified according to the morphological difference between the male germinal ridge and the female germinal ridge.

Key words mouse embryonic fibroblasts; germinal ridge; sex identification; PCR; sex-determining region of Y-chromosome

成纤维细胞是指成熟的已分化纤维细胞的增殖前体细胞,呈梭形或星型,中央有圆形核,细胞质向外伸出2-3个长短不一的突起^[1]。小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)具有数目多、胞体大、来源广、易培养和增殖快等优势,被广泛应用于实验研究及医学治疗^[2]。然而,在使用MEFs进行各方面的研究时,MEFs的性别往往被忽略。如果可以采用简单、快速的方法获得确定性别的MEFs,就可以将其用于哺乳动物性别差异性方面的细胞学研究,例如制备不同性别的MEFs饲养层用于诱导性多能干细胞的来源鉴定与分离培养,药物对细胞作用的性别差异性研究^[3]等,这将扩大MEFs在试验研究以及医学治疗方面的应用范围。本研究首先根据不同性别生殖嵴在形态学上的差异鉴别出雄性和雌性的胚胎,分离获得不同性别的MEFs,并通过PCR性别鉴定的方法对其进行验证,探讨建立简单、快速地筛选及分离培养不同性别MEFs的方法。

实验动物: 6-8周龄清洁级昆明系小鼠,体重28~32 g,购自重庆市中药研究所。

13.5天小鼠胚胎的选取: 取6-8周龄的雌性昆明小白鼠,于下午17:00腹腔注射孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 10 U/只,48 h后,腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG) 10 U/只,按照1:1的比例与公鼠合笼,次日早上8:00检查雌鼠是否有阴道栓,有白色阴道栓者计为妊娠0.5天。取妊娠13.5天的小鼠,颈椎脱臼法处死,于70%酒精溶液中浸泡10~20 min。无菌条件下取出整个子宫,放入无Ca²⁺、Mg²⁺的PBS中,清洗3-4遍后,取出胚胎,移入装有PBS的无菌的培养皿(规格为 \varnothing 10 mm)中。于体视显微镜下,选取后肢芽呈棱形角状轮廓或指轮廓的胚胎,剖开腹腔,分离出位于体腔壁上的生殖嵴和盾形中肾。利用雄性和雌性生殖嵴在形态学上的差异,

获得雄性胚胎和雌性胚胎。

MEFs的分离培养: 将不同性别的胚胎,分别去除头部、四肢、尾、内脏和血迹,只保留背部皮肤组织,经无Ca²⁺、Mg²⁺的PBS冲洗2-3遍后,移入无菌青霉素小瓶中,采用眼科剪将其剪至匀浆状,加入2 mL的0.25%胰酶蛋白酶+0.04% EDTA的消化液,移液枪反复吹打1~2 min,再将其放入37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中消化10 min。待消化完全后,加入等量的含有15%胎牛血清的DMEM培养液终止胰酶蛋白酶的消化,分别用200目和400目的细胞筛过滤,将过滤液放入10 mL离心管中进行离心。1 000 r/min离心5 min,弃上清液后,加入4 mL PBS,用移液枪轻轻吹打,悬浮细胞,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入1 mL DMEM培养液重新悬浮细胞,调整细胞浓度为 5×10^5 /mL,向25 mL的细胞培养瓶中加入2 mL细胞悬液,放入37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,并计为原代。每隔24 h换液,待细胞长满瓶底70%~80%,即可进行传代培养。

细胞DNA的提取: 按照离心柱型动物基因组DNA提取试剂盒厂家说明书的步骤,分别提取获得不同性别MEFs的基因组DNA,提取成年雄性、雌性小鼠肝脏基因组DNA分别作为PCR性别鉴定的阳性、阴性对照。

PCR反应的引物序列及反应体系: 参照Genebank中小鼠SRY基因合成一对引物: SRY U: 5'-CTT TTT CCA GGA GGC ACA GA-3'; SRY L: 5'-GAC AGG CTG CCA ATA AAA GC-3',预期产物为250 bp。采用30 μ L PCR扩增体系: 10 \times Buffer 3 μ L、Mg²⁺ 2 μ L、10 \times Taq Buffer 3 μ L、dNTP 3 μ L、引物P1 1 μ L、引物P2 1 μ L、DNA模板4 μ L、Taq酶1.5 μ L和ddH₂O 12.5 μ L。PCR扩增条件: 预变性94 °C, 5 min; 变性94 °C, 30 s; 退火60 °C, 35 s; 延伸72 °C, 40 s,共30个循环; 72 °C, 10 min, 4 °C保存。采用2%琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测。

不同性别胚胎生殖嵴的差异

分离得到的生殖嵴与中肾并排相连, 外形如米粒。雄性生殖嵴可见有横向条纹, 而且大于同期的雌性生殖嵴(图1A); 雌性生殖嵴不具有横向条纹, 分布有若干小点(图1B)。通过雌、雄胚胎生殖嵴的形态学差异可以获得不同性别胚胎。

MEFs性别的PCR验证

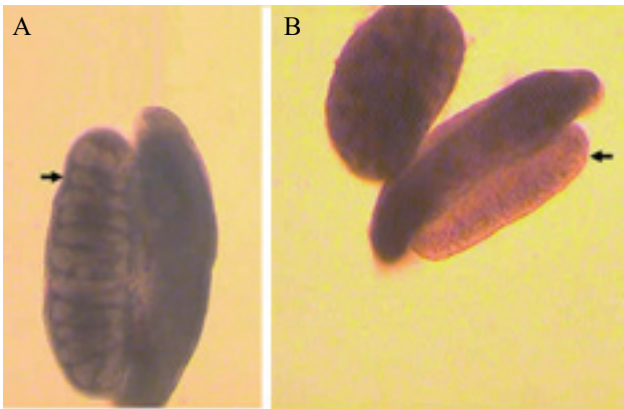
如图2所示, 雄性小鼠肝脏细胞阳性对照组扩增出约250 bp的SRY基因条带, 而雌性小鼠肝脏细胞阴性对照组没有该条带; 分离得到的雄性MEFs基因组DNA经PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳后呈现出250 bp的SRY基因条带, 而雌性MEFs处理组则未见该条带, 这一结果与按照生殖嵴差异区分所得胚胎性别结果

完全一致。

不同性别MEFs的生长情况

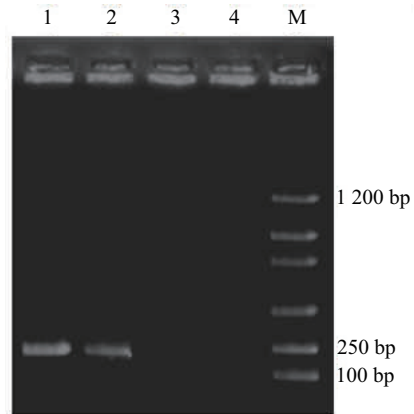
原代MEFs培养1天后可见细胞贴壁生长, 呈梭形, 向周围呈放射状生长, 具有少量呈圆形或不规则形态的上皮细胞, 也有少量漂浮的细胞。经换液和传代培养后可以得到更纯的MEFs, 第三代MEFs呈放射状铺开, 连片或漩涡状生长, 具有典型的成纤维细胞的特征。雄性MEFs(图3A)和雌性MEFs(图3B)的形态学特征和生长情况无明显差异。

采用多能细胞裂解液能够诱导已分化体细胞发生重编程, 逆转化成为诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 由于该方法具有未引入外源性遗传物质而极大地提高了iPSCs应用的安



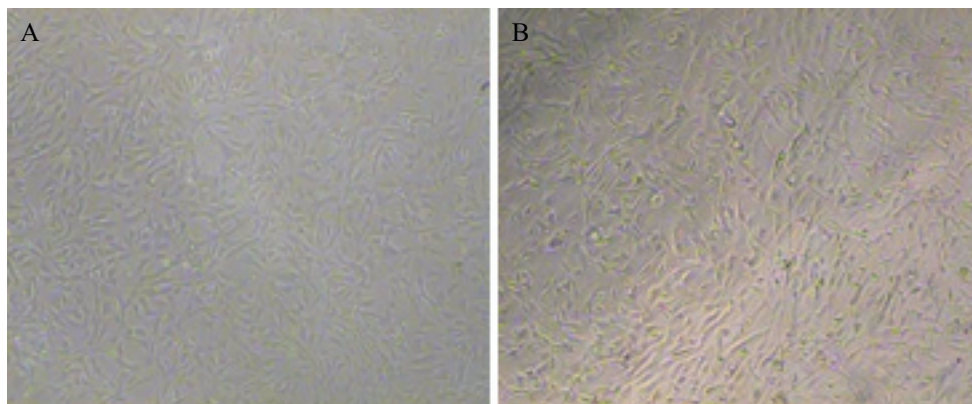
A: 雄性生殖嵴; B: 雌性生殖嵴。
A: male germinal ridge; B: female germinal ridge.

图1 13.5天小鼠胚胎生殖嵴(40×)
Fig.1 The germinal ridge from mouse embryo at 13.5 dpc (40×)



1: 阳性对照; 2: 雄性MEFs; 3: 阴性对照; 4: 雌性MEFs; M: DNA maker。
1: positive control; 2: male MEFs; 3: negative control; 4: female MEFs; M: DNA maker.

图2 PCR性别鉴定结果
Fig.2 Results from sex identification with PCR



A: 第3代雄性MEFs; B: 第3代雌性MEFs。
A: male MEFs at the third passage; B: female MEFs at the third passage.

图3 第3代MEFs形态图(100×)
Fig.3 MEFs at the third passage (100×)

全性、利用裂解液中多种促使已分化体细胞发生重编程的物质的综合作用提高iPSCs生成效率、利用患者自身细胞作为受体细胞从而避免移植iPSCs后的免疫排斥反应等优点,在再生医学上具有广阔的应用前景。由于该方法中有多能细胞的参与,因此,重编程所得iPSCs的来源问题备受关注。如果制备裂解液的多能细胞(供体细胞)和被重编程的已分化体细胞(受体细胞)属于不同的性别,通过iPSCs的性别鉴定,能够快速、简易的鉴定出iPSCs是否来源于被诱导的体细胞,为细胞裂解液介导体细胞发生重编程逆转化为iPSCs的可靠性提供了一种新的鉴定途径。此外,利用不同性别的MEFs,还有助于探讨不同药物对细胞作用的性别差异性等,因此,通过获得不同性别的MEFs,将扩大其在试验研究以及医学治疗方面的应用范围。

对于大型哺乳动物胚胎成纤维细胞的制备而言,由于适龄胚胎的个体较大,选取单个胚胎就可以获得大量的成纤维细胞,再经细胞性别鉴定即可以得到已知性别的成纤维细胞^[4]。为了获得不同性别的MEFs,如果采取先得到细胞,后鉴定细胞性别的策略,会因为小鼠胚胎太小,选取单个适龄胚胎得到成纤维细胞量较少,而难以达到培养所需细胞密度,使实验操作过程变得更为复杂。如果采取先鉴定小鼠胚胎性别,从多个不同性别的胚胎中分离培养MEFs,就可以简化不同性别MEFs的分离、培养过程,提高其获取效率。本研究选取13.5天的胚胎进行后肢芽和生殖嵴的观察,结果表明后肢芽都呈棱形角状轮廓,生殖嵴性别差异明显,雄性生殖嵴表面有横向条纹,雌性生殖嵴有若干小点。有时来自一个孕鼠的胚胎,它们的发育时期也会存在差异,所以,要根据后肢芽的形态先进行胚胎发育时期分类。后肢芽的形态特征与生殖嵴的分化状态密切相关,当小鼠胚胎发育至约12.5天时,后肢芽呈棱形角状轮廓,此时雄性和雌性生殖嵴在形态学上出现明显差异^[5]。由于分离MEFs的最佳材料是13.5天的胚胎^[6],因此为了获得不同性别的MEFs,最快速方便的方法是利用这时期雄性和雌性胚胎生殖嵴在形态学上的差异进行胚胎性别鉴定,再分离培养不同性别的MEFs。

现已报道有多种方法可以进行小鼠胚胎的性别鉴定^[7],其中,使用小鼠雄性特异性SRY基因进行PCR扩增是一种常用和可靠的方法,其准确率高达

100%^[8]。SRY基因位于雄性Y染色体性别决定区上,具有高度保守性^[9]。SRY基因的表达决定了胚胎向雄性方向分化,因此可以通过SRY基因的核心序列进行PCR扩增来对胚胎或细胞进行性别鉴定。因此,本研究使用SRY基因PCR扩增来验证所得细胞性别,结果表明,MEFs的PCR性别鉴定结果与按照生殖嵴差异鉴别所得胚胎性别结果完全一致。本研究发现,不同性别的MEFs在形态学上具有典型成纤维细胞的基本特性,两者在细胞形态和生长状态上并没有区别。

利用雄性和雌性胚胎在生殖嵴形态学上的差异,可以批量化获得不同性别的MEFs。

参考文献 (References)

- 1 Gansen PV, Lerberghe NV. Potential and limitations of cultivated fibroblasts in the study of senescence in animals: A review of the marine skin fibroblast system. *Arch Gerontol Geriat* 1988; 7(1): 31-74.
- 2 Garfield AS. Derivation of primary mouse embryonic fibroblast (PMEF) cultures. *Mouse Cell Culture* 2010; 633(2): 19-27.
- 3 张松波, 同宏灏. 药物代谢性别差异与核受体的关系. *中国药理学通报*(Zhang Songbo, Zhou Honghao. Gender difference of drug metabolism and its mechanism. *Chinese Pharmacological Bulletin*) 2007; 23(3): 292-4.
- 4 陈华涛, 胡林勇, 杨 艳, 李 倩, 靳亚平. 奶山羊胎儿成纤维细胞的分离培养及SRY基因性别鉴定. *动物医学进展*(Chen Huatao, Hu Linyong, Yang Yan, Li Qian, Jin Yaping. Isolation and culture of dairy goat fetal fibroblasts and sex identification by SRY gene. *Progress in Veterinary Medicine*) 2010; 31(8): 1-7.
- 5 安德拉·纳吉, 玛丽娜·格特森斯坦. 小鼠胚胎操作实验手册, 原著第三版. 北京: 化学工业出版社(Nagy A, Gertsenstein M. *Manipulating the Mouse Embryo, The original 3rd*. Beijing: Chemical Industry Press), 2005, 170-80.
- 6 白莹敏, 李跃民, 陈 恺. 昆明系小鼠饲养层制备条件的优化. *动物医学进展*(Bai Yingmin, Li Yuesmin, Chen Kai. Optimization of preparation conditions for feeder layer cells of Kunming mice. *Progress in Veterinary Medicine*) 2009; 30(6): 54-8.
- 7 袁兴敏. 家畜早期胚胎性别鉴定的方法. 养殖技术顾问(Yuan Xingmin. Sex identification methods for embryo of domestic animal. *Cultivation Technology Consultant*) 2012; (4): 74.
- 8 曾溢滔, 张美兰, 陈美珏, 周霞娣, 黄 英, 任兆瑞, 等. 应用PCR扩增牛SRY序列进行奶牛胚胎性别的鉴定. *中国科学: B辑*[Zeng Yitao, Zhang Meilan, Chen Meiyu, Zhou Xiati, Huang Ying, Ren Zhaorui, et al. Dairy cattle embryo sex identification by PCR amplify bovine SRY sequence. *Science in China(Series B)*] 1993; 23(4): 371-4.
- 9 Gubby J, Collignon J, Koopman R, Capel B, Economou A, Münsterberg A, et al. A gene mapping to the sex-determining region Y gene chromosome is a member of a novel family of embryonic ally expressed genes. *Nature* 1990; 346(6281): 245-50.