

源于 129S1 品系的小鼠胚胎干细胞系的建立及其生物学特性分析

杨桦*, 孙霞*, 徐国江, 刘伟, 王龙, 赵旭东, 陆荣华, 费俭, 王铸钢**

(上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要: 从 129S1 小鼠早期胚胎的内细胞团分离、培养类胚胎样细胞, 经反复传代, 成功地建立了 129S1 小鼠胚胎干细胞系, 命名为 NM-2 细胞系。形态学鉴定具有胚胎干细胞的典型形态特征, 正常核型率为 80%; 呈碱性磷酸酶阳性、表达胚胎干细胞特异性转录因子 OCT-4; 体内分化后可形成源于三胚层的组织结构; 经囊胚腔显微注射后所获得的子代个体中 79% 具有毛色嵌合表型; 雄性嵌合个体中 31% 发生生殖腺嵌合; 同时, 通过育种观察到所有生殖腺嵌合体的子代小鼠表型正常。以上结果证实 NM-2 细胞系为一株具高生殖腺嵌合能力的小鼠胚胎干细胞系。

关键词: 129S1 小鼠; ES 细胞系; 生殖腺嵌合

中图分类号: Q2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-285-05

胚胎干细胞(ES 细胞)是一种存在于早期胚胎中并具有发育全能性的细胞, 可分化、发育成个体的任一组织器官, 可以说是个体发育的原基。1981 年, ES 细胞由 Evans 和 Kaufman^[1]首次成功地从延缓着床的小鼠胚胎中分离建系, 随后的研究证实, 经体外培养后的 ES 细胞在导入宿主胚胎后仍可广泛地参与宿主各种组织的分化, 特别是参与成熟生殖细胞的形成。由于 ES 细胞具有的这一独特的生物学特性, 在培养细胞与个体发育之间架起了桥梁, 在体细胞与生殖细胞之间架起了桥梁, 实现了体外细胞水平的精确的遗传操作与整体动物的有效结合, 成为转基因动物研究体系中一个十分活跃的领域, 至今 ES 细胞介导的遗传操作技术已产生了数千种的突变体小鼠, 并已获得许多重要的研究发现^[2-4]。

ES 细胞研究的基础与核心是有效分离并建立具有高生殖腺嵌合能力的胚胎干细胞系。本文报道了一种新的源于小鼠 129S1 品系的小鼠胚胎干细胞系的建立及其生物学特性的分析, 结果表明该细胞系具有良好的增殖能力、可维持于低分化的状态并具有较高的生殖腺嵌合比率, 获得的子代个体的表型正常。

1 材料与方

1.1 动物来源

129S1、C57BL/6J 品系小鼠均由本研究中心繁殖, BALB/c 裸鼠购自中科院实验动物中心。

1.2 制备小鼠胚胎成纤维细胞及饲养层

取 13.5 天的小鼠胚胎, 以胰蛋白酶消化法分离小鼠胚胎原代成纤维细胞, 培养扩增, 在用作饲养层之前需经丝裂霉素 C 处理使其终止分裂。

1.3 小鼠胚胎干细胞的分离、建系

取怀孕 3.5 天的 129S1 小鼠, 冲出囊胚, 转入铺有饲养层细胞的培养皿中培养, 培养液为含有胎牛血清、青链霉素、谷氨酰胺、2-巯基乙醇及白血病抑制因子(LIF)的 DMEM 培养液; 胚龄 8.5 天时挑出内细胞团用胰蛋白酶消化, 离散后的细胞移入铺好饲养层的培养板内继续生长, 待出现明显的细胞集落后, 继续扩增培养。

1.4 性别鉴定

取 1×10^5 细胞裂解提取基因组 DNA, 通过可特异扩增 Y 染色体上的 SRY 基因的 PCR 反应进行性别检测。引物序列为: 上游引物 5' GAGAGCATG-GAGGGCCAT3' 下游引物 5' CCACTCCTCTGTGA-

收稿日期: 2003-07-07; 修回日期: 2003-09-28

国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2001AA216081)、上海市科技发展基金重大项目(STC-1-001)、国家杰出青年科学基金(39925023)资助

* 并列第一作者

** 通讯作者, E-mail: zhugangw@vip.163.com

CACT 3', PCR产物大小应为265bp。

1.5 碱性磷酸酶表达检测分析

在铺有饲养层细胞的培养皿中接种 5×10^5 细胞,培养48h后,以1%甲醛固定,用缓冲液(100mmol/L Tris-HCl pH7.5, 0.9%NaCl)平衡10min,加入显色液[在5ml碱性磷酸酶底物缓冲液(100mmol/L Tris-HCl pH9.5, 100mmol/L NaCl, 5mmol/L $MgCl_2$)中加入33 μ l硝基四氮唑蓝(50mg/ml溶于70% Dimethyl-formamide)、16.5 μ l 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸(50mg/ml溶于Dimethyl-formamide)],避光反应10min, PBS冲洗以终止反应,镜检。

1.6 OCT-4 基因表达检测

取 1×10^5 细胞以TRIzol试剂裂解,抽提细胞总RNA,以RT-PCR方法鉴定。引物序列为:上游引物5'TGTCCGCCGCATACGAGTTCT 3',下游引物5'GCAGGGGCCGCGAGCTTACACAT 3', PCR产物大小应为418bp。

1.7 生长曲线测定

在铺有饲养层细胞的24孔培养板中每孔接种细胞 2×10^4 ,每天取3孔细胞独立计数,计数期间细胞不做换液处理。

1.8 核型分析

在经胶原化处理的培养皿中接种 1×10^6 细胞,当细胞进入对数生长期后,加入秋水仙素(0.06 μ g/ml)处理2h,消化细胞、常规制片,Geimsa染色后镜检。

1.9 多向分化能力鉴定

将细胞扩增培养至 2×10^6 ,离心收集细胞,接种5周龄BALB/c裸鼠腋窝皮下,接种4周后取瘤,石蜡切片、H-E染色后寻找三胚层相关组织。

1.10 嵌合体制备^[5]

常规消化细胞,以囊胚腔显微注射方式将NM-2 ES细胞导入C57BL/6J小鼠囊胚中(约8~10个细胞/胚胎),将注射后的胚泡移回C57BL/6J \times CBA F1代假孕母鼠子宫中,观察产仔及子代繁育情况。

2 结果

2.1 ES细胞系的建立

实验中共收集了3.5天的129S1小鼠囊胚22枚,经体外操作、扩增后4枚囊胚在培养皿中形成细胞集落,克隆形成率为18%。我们将来源于不同囊胚的细胞分别命名为NM-1、NM-2、NM-3、NM-4。在光镜下观察,可见细胞排列紧密呈克隆样生

长,表面折光性强、边缘光滑,呈圆形或椭圆形,与典型的ES细胞有类似的细胞形态(图1)。

2.2 性别、核型鉴定

PCR结果显示NM-1细胞为雌性,NM-2、NM-3、NM-4为雄性(图2)。NM-2细胞的核型图如(图3)所示,核型鉴定与PCR的结果相符合,对核型进行分类统计后表明NM-2细胞的正常核型率为80%。

2.3 分化指标鉴定

分别从细胞水平、基因表达水平检测了NM-2细胞的分化状态。

2.3.1 碱性磷酸酶染色结果 图4显示小鼠胚胎成纤维细胞基本不着色,而表达碱性磷酸酶的NM-2细胞被染成深蓝色,呈强阳性。提示NM-2细胞分化程度较低,但克隆间染色的深浅并不均一;同时形态良好的细胞克隆染色较均匀,而形态差的细胞克隆有部分区域不着色,提示可能发生部分分化。

2.3.2 OCT-4 基因的表达 OCT-4转录因子与小鼠胚胎发育调控密切相关,在囊胚期胚胎细胞中有高表达,而在小鼠所有成体组织细胞中均不表达^[6]。RT-PCR反应证实OCT-4在NM-2细胞中有表达,小鼠胚胎成纤维细胞中检测不到表达(图5)。这一结果与碱性磷酸酶的鉴定结果相符合。

2.4 细胞增殖能力分析

将NM-2细胞与被广泛应用于基因打靶的CJ7 ES细胞(来源于129S1/Sv小鼠)的生长曲线进行比较,结果表明NM-2细胞与建系的ES细胞在细胞分裂能力、增殖速率上无显著差异(图6)。

2.5 体内分化能力鉴定

5只BalB/c裸鼠经皮下接种 2×10^6 个NM-2细胞后均有效形成肿瘤,接种后4周取瘤,经固定切片、H-E染色,在体内分化形成的肿瘤组织中含有源于外胚层的复层鳞状上皮、原始神经管结构;中胚层的平滑肌、淋巴、软骨及骨组织和来自内胚层的呼吸道上皮组织,证实其在体内具有较好的分化能力(图7)。

2.6 嵌合体动物制备

NM-2细胞的嵌合体制备工作及子代的分析如表1所示。经囊胚腔注射后,共获得子代小鼠61只,嵌合个体发生率为79%。其中,73%的嵌合个体毛色嵌合比率在85%以上(图8)。通过对25只高嵌合率的雄性小鼠与雌性C57BL/6J小鼠交配后,经毛色判断有10只为生殖腺嵌合体(40%),其中7只嵌合体

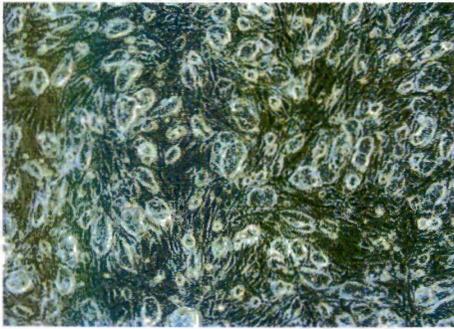


图1 生长于饲养层细胞上的NM-2细胞克隆符合典型ES细胞克隆的形态特征(40×)

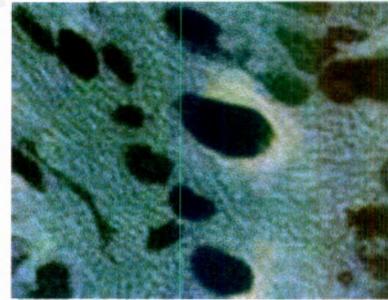


图4 生长于饲养层细胞上的NM-2细胞碱性磷酸酶染色结果(100×)

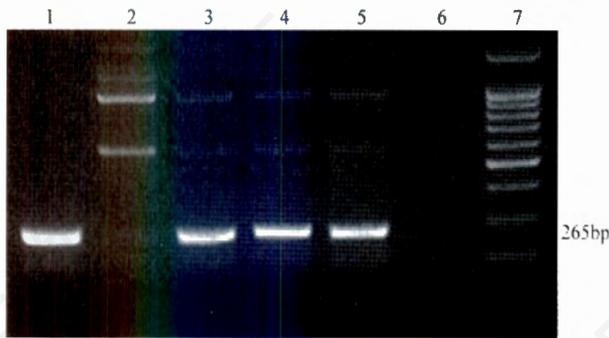


图2 基因组DNA Y染色体SRY基因PCR鉴定结果

1, 雄性小鼠基因组DNA; 2, NM-1细胞; 3, NM-2细胞; 4, NM-3细胞; 5, NM-4细胞; 6, PCR阴性对照; 7, 100bp marker。

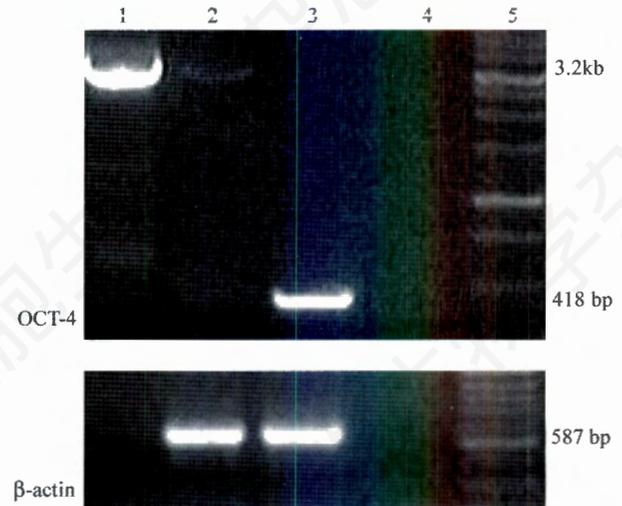


图5 OCT-4 RT-PCR 鉴定结果

1, 鼠尾基因组DNA; 2, 滋养层细胞; 3, NM-2 ES细胞; 4, PCR阴性对照; 5, 1kb marker。

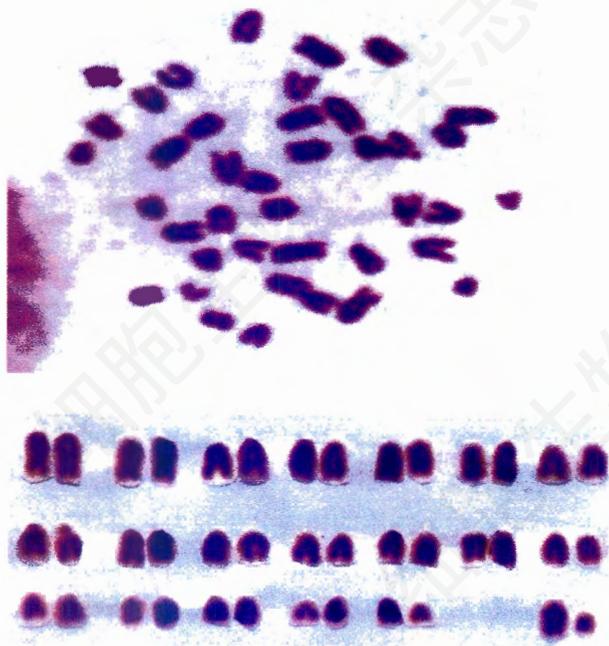


图3 NM-2细胞的核型图

的后代全部是由ES细胞来源的生殖细胞参与发育的子代小鼠，同时，经观察比较，这些子代小鼠与正常小鼠在表型与生理机能上无明显差异。

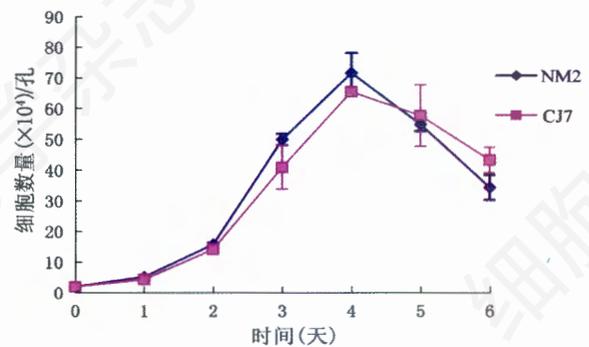


图6 NM-2和CJ7 ES细胞生长曲线的比较

3 讨论

文献报道的ES细胞系的分离、建系方法和条件多种多样，其中最经典和最广为应用的是通过内细胞团的分离和体外培养^[7]。细心的操作和熟练分离ES细胞集落的技术是实验成功的重要条件。实验中我们将囊胚经体外培养5天后(即胚龄8.5天)挑出内细胞团进行消化，根据经验，胰酶处理的时间

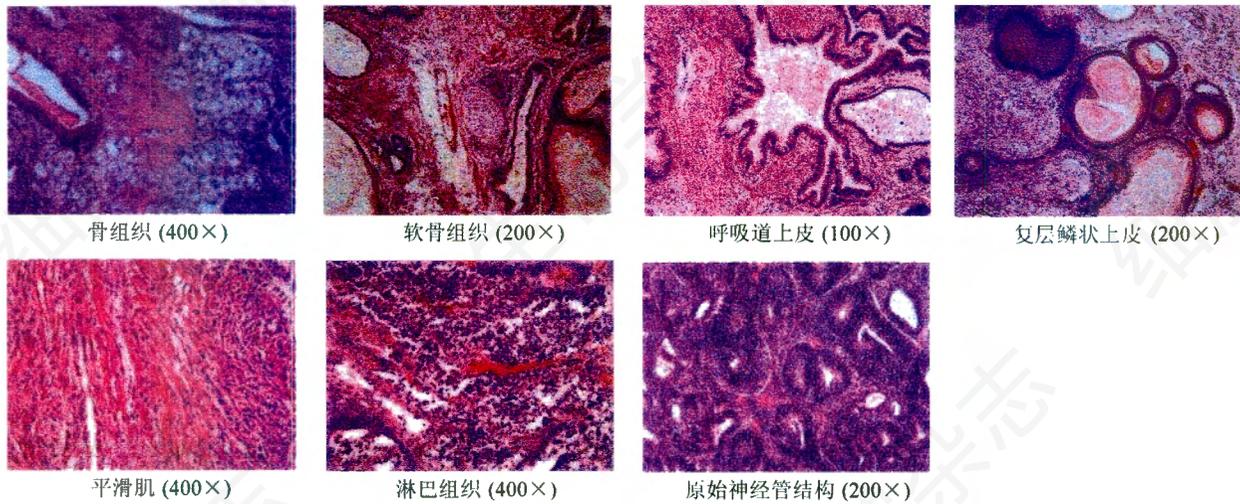


图7 NM-2细胞植入裸鼠皮下形成的畸胎瘤的病理学分析

表1 NM-2细胞显微注射及子代鉴定结果

细胞	注射	受体	怀孕	产仔	性别	毛色比率(G/B)			生殖腺嵌合体
						B	<85%	>85%	
NM-2	183	13	10	61	35 ♂	3	7	25	10
					26 ♀	10	6	10	

非常关键, 将内细胞团离散成较小的细胞团(约3~4个细胞)会提高接种后克隆的形成比率。虽然有报道可在胶原化界面上建立ES细胞系以减轻实验工作量, 但我们在培养过程中, 仍采用原代小鼠胚胎成纤维细胞做为饲养层来支持ES细胞的生长。饲养层细胞的存在更好地模拟了体内生长环境, 有利于ES细胞保持旺盛的增殖能力和维持低分化的状态。同时, 注意培养用试剂的质量、培养器具的纯净度(ES细胞对去垢剂高度敏感, 故尽量使用一次性培养器具)、保持适当的传代密度对ES细胞的体外培养也相当重要。

在体外培养形成细胞克隆后, 需进行进一步的分析鉴定。首先, ES细胞应具备正常二倍体核型, 这是非常重要的属性。一旦核型异常, 将影响ES细胞的生物学性状和多向分化潜能。一些较通用的ES细胞系如R1、D3等, 其正常核型率均在80%以上^[8]。NM-2细胞系所测得的正常核型率为80%, 这是获得机能正常的子代个体的根本保证; 其次, ES细胞的低分化状态是决定其是否具有多向分化潜能和高生殖腺嵌合能力的先决条件。作为从早期胚胎中分离而来的干细胞系, ES细胞同样也具备了胚胎细胞的一系列低分化指标, 除了碱性磷酸酶和OCT-4外, 常用的还有: 干细胞特异性表面抗原(SSEA-1)、早期胚胎细胞的转录活性因子(UTF1)和



图8 NM-2 ES细胞经囊胚腔注射获得的嵌合体小鼠

ES细胞磷酸酶(ESP)等等^[9-11]。我们通过检测碱性磷酸酶的表达情况, 观察到NM-2细胞与小鼠胚胎成纤维细胞之间差别显著, 同时发现细胞群体中各克隆间染色的深浅不一, 这可能与细胞克隆间分化程度的差异有关。

测定胚胎干细胞的体内分化能力是通过制备嵌合体来完成的。能够广泛的参与宿主个体的胚胎发育过程, 特别是参与形成生殖细胞, 是胚胎干细胞能否用于小鼠遗传操作的最重要的特性。为了测试体外培养系统以及NM-2细胞在体外有效维持低分化状态的能力, 我们特别选取了体外培养12代以上的细胞进行了囊胚腔显微注射, 结果嵌合个体中毛色嵌合率在85%以上的“花老鼠”占73%, 文献报道^[12]当毛色嵌合率大于85%时, ES细胞即能嵌合至个体的各种组织器官(尽管它向各类组织细胞分

化的程度是不均等的); 同时当具高嵌合性的雄性 ES 细胞在导入雌性的宿主囊胚后, 会造成宿主的性别逆转, 个体表现出雄性表型, 其成熟的生殖细胞均由外源的 ES 细胞发育形成。实验中有 7 只嵌合体的子代小鼠均有由 ES 细胞来源的生殖细胞参与发育而来, 提示可能是性别逆转嵌合体。上述结果证实 NM-2 细胞经体外培养操作后仍具备高效的体内嵌合能力。

综上所述, 通过对细胞形态、核型、低分化指标、细胞增殖以及体内外分化潜能的综合分析, 表明我们所建立的 NM-2 细胞系符合小鼠胚胎干细胞系的一系列特征, 具有较高的生殖腺嵌合能力, 为进一步利用其制备遗传修饰小鼠打下了基础。

参 考 文 献

- [1] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292** (9): 154 – 156.
- [2] LIU B, SUN Y, JIANG F, ZHANG S, *et al.* Disruption of Smad5 gene leads to enhanced proliferation of high-proliferative potential precursors during embryonic hematopoiesis. *Blood*, 2003, **101**(1): 124 – 133.
- [3] BIGOT-LASSERRE D, CHUZEL F, DEBRUYNE E L, *et al.* Tumorigenic potential of carbaryl in the heterozygous p53 knockout mouse model. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, **41**(1): 99 – 106.
- [4] SHEN X D, KE B, ZHAI Y, *et al.* Stat4 and Stat6 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: HO-1 dependence of Stat4 disruption-mediated cytoprotection. *Hepatology*, 2003, **37**(2): 296 – 303.
- [5] JOYNER A L. ES cell line was isolated and cultured from inner cell mass collected from mouse embryos at early stage, Gene targeting. Alexandra Joyner, Oxford University Press, 1999, 149 – 165.
- [6] YOSHIMIZU T, SUGIYAMA N, DE FELICE M, *et al.* Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Development*, 1996, **122**: 881 – 894.
- [7] BROOK F A, GARDNER R L. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 5709 – 5712.
- [8] NAGY A, ROSSANT J, NAGY R, *et al.* Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 8424 – 8427.
- [9] TIPPETT P, ANDREWS P W, KNOWLES B B, *et al.* Monoclonal antibodies defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**: 4113 – 4117.
- [10] NEMETZ C, HOCHE G M. Transcription factor Stat5 is an early marker of differentiation of murine embryonic stem cells. *Differentiation*, 1998, **62**(5): 213 – 220.
- [11] LEE K, NICHOLS J, SMITH A. Identification of a developmentally regulated protein tyrosine phosphatase in embryonic stem cells that is a marker of pluripotential epiblast and early mesoderm. *Development*, 1996, **59**(2): 153 – 164.
- [12] 吴白燕, 洗美薇, 尚克刚等. ES 细胞(MESPU13)嵌合体小鼠的 GPI 分析. *遗传学报*, 1995, **24**(4): 353 – 355.

Establishment and Biological Characteristic Analysis of a New ES Cell Line Derived from 129S1 Mouse Strain

YANG Hua*, SUN Xia*, XU Guo Jiang, LIU Wei, WANG Long, ZHAO Xu Dong,

LU Rong Hua, FEI Jian, WANG Zhu Gang**

(Shanghai Nan-Fang Research Center of Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract: A new ES cell line was isolated and cultured from inner cell mass collected from 129S1 mouse embryos at early stage, named as NM-2. The biological characteristics of this cell line were observed. It shows the typical morphology of ES cell clone, express embryo stem cell specific markers: alkaline phosphatase and transcription factor OCT-4. The normal karyotype rate was 80%. NM-2 could differentiate into various tissues from all three primary germ layers *in vivo*. Following injection into blastocysts, 79% of newborn mice were chimeras and 31% of male chimera showed germ-line transmission. All mice derived from germ-line chimeras show normal phenotype. The results demonstrated that NM-2 cell line was a mouse ES cell line with high potential for germ-line contribution.

Key words: 129S1 mouse; ES cell line; germ-line contribution

This work is partially supported by National High Technology Research and Development Program (Project No. 2001AA216081), Science and Technology Development Foundation of Shanghai Municipal Government (Project No. STC-1-001) and National Science Foundation for Outstanding Young Scientists (Project No. 39925023).

*Co-first authors

**Corresponding author, E-mail: zhugangw@vip.163.com