

鸡胚胎原始生殖细胞体外培养

谢蓓^{1,2} 黄海^{1,2} 胡小芬^{2,4} 曹祥荣¹ 黄启忠² 李震^{2,3*}

(¹南京师范大学生命科学学院, 南京 210097; ²上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106;

³上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106;

⁴江西农业大学江西省动物生物技术重点开放实验室, 南昌 330045)

摘要 以 14~15 期鸡胚血液为材料, 采用 Ficoll 密度梯度离心方法, 提取鸡胚胎原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs), 在无基质细胞和基质细胞上分别进行体外培养。从实验结果可以看出: 在含有胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、鸡血清(chicken serum, CS)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、人胰岛素样生长因子(hIGF-1)、小鼠白血病抑制因子(mLIF)和青、链霉素双抗的 M199 培养液中培养时, 鸡 PGCs 最多能够存活 4 天; 当采用细胞因子和 5 天鸡胚胎性腺基质细胞共培养时能存活 23 代且每代细胞增殖可达近 10 倍。提纯后的 PGCs 细胞冻存复苏后, 经台盼蓝染色鉴定存活率可达 80% 左右。

关键词 原始生殖细胞; 体外培养; 冻存和复苏

转基因动物研究是生命科学研究的热点之一。通常, 转基因动物宿主细胞为受精卵。但在禽类, 受精卵中含有大量卵黄, 遗传操作比较困难^[1]。人们寻找到了另一种转基因宿主细胞——原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)。

禽类胚胎原始生殖细胞起源于 X 期的胚盘上胚层, 4 期时经下胚层移到原条期的生殖新月部位, 10 期时进入刚刚形成的胚胎血管系统, 随着血液循环至生殖原基附近, 穿过毛细血管壁到达生殖原基定居^[2,3]。在雄性, PGCs 形成精原干细胞的前体——性原细胞, 而后附着在生精细胞上皮进入精子发生过程; 在雌性, PGCs 分裂形成卵母细胞^[4]。可根据此特殊迁移途径收集 PGCs 细胞, 经过体外遗传操作, 改变其基因型, 产生转基因禽类或嵌合体禽类。但到目前为止, 人们一般通过直接获取新鲜的 PGCs 细胞, 进行体外操作。其缺点是细胞来源非常有限, 而且还要消耗大量的人力、物力, 过程极其繁琐。因而, 体外培养 PGCs 细胞的研究日益成为转基因禽类研究中的一个热点。

本研究旨在通过 Ficoll 密度梯度离心法纯化 14~15 期鸡胚胎血液中 PGCs 细胞^[5], 进行体外培养, 以探讨 PGCs 细胞体外培养的最佳条件, 可为转基因禽类的研究和应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 种蛋的来源与孵化

种蛋类型为广东石岐杂和荷兰 H 系, 均由上海农科院畜牧兽医研究所种鸡场提供。孵化温度为 37.8 °C, 湿度为 60%。孵化期按 Hamburger 等标准划分。

1.2 主要试剂

TCM-199(Earls 平衡及 Hanks 平衡)购自上海普飞生物技术有限公司; 胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司; Ficoll(聚蔗糖)-400 为 Pharmacia 公司产品; 鸡血清(chicken serum, CS)为 Invitrogen 公司产品; 人胰岛素样生长因子(human IGF-1)购自上海申能博彩公司; 牛碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自上海申能博彩公司; 小鼠白血病抑制因子(murine LIF)购自上海鼎国生物公司; 高碘酸、希夫试剂购自上海博鑫公司。

1.3 试剂配制

6.3%和16%的Ficoll按剂量分别溶于含10%FBS和100 U/ml的青、链霉素双抗的Hanks平衡的M199中; 细胞培养液: Earls平衡的M199(含10% FBS, 100 U/ml双抗, 2%CS, 10 ng/ml IGF-1, 10 ng/ml bFGF, 10 U/ml mLIF), 胰蛋白酶-EDTA消化液。

收稿日期: 2004-09-23 接受日期: 2004-11-10

上海市农业科学院中青年学术技术带头人培养基金

* 通讯作者。Tel: 021-62200389; E-mail: zhenli60@public3.sta.

1.4 14~15 期鸡胚血液中 PGCs 的提取

收集孵化至 14~15 期的鸡胚血液于 1 ml 的 Hanks 平衡的 M199 培养液中(含 10%FBS+100 U/ml 双抗), 200 g 室温离心 3 min, 空干, 加入 0.1 ml 无 FBS 的 M199, 吹打混匀后加入 0.9 ml 16%Ficoll 溶液, 混匀, 再轻缓地在液面上加入 0.2 ml 6.3%Ficoll 溶液, 800 g 室温离心 30 min。收集中间富含 PGCs 细胞的片层, 加入 1.5 倍体积的 M199 培养液, 400 g 离心 3 min, 去上清液, 再用 1 ml M199 培养液清洗一遍, 最后用 0.1 ml 含 FBS 及各种生长因子的 Earls 平衡的 M199 培养液悬浮细胞。镜检计数 PGCs 细胞, 确定提取纯度。

1.5 5 天鸡胚性腺基质细胞的制备^[6]

取孵化约 5 天的鸡胚蛋, 用镊子在其钝端开一约 2 cm 的口, 取出悬浮胚胎置于平皿内, 用 PBS 清洗表面去除卵黄等杂质, 再将胚胎移至另一洁净的平皿内, 去除胚胎表面包被的羊膜及头部, 其余部分移至解剖镜下, 腹面朝上, 取出性腺, 放置于 Eppendorf 管中, 加入 0.6 ml 1 × 胰蛋白酶-EDTA 消化液, 消化组织约 5 min 后, 加入等体积的培养液终止消化, 静置数分钟, 吸取上层单细胞悬液, 剩余液体离心, 弃上清液, 再加入适量的胰蛋白酶-EDTA 消化液继续消化, 直至完全无组织块。将收集到的所有上层细胞悬液 200 g 4 °C 离心 3 min, 收集细胞, 用培养液清洗 1~2 次后, 适量的培养液(含 FBS, 各种生长因子及双抗)悬浮, 调整细胞浓度达 10^4 个/ml, 放至 96 孔板内, 每孔约 150 μ l, 37 °C 5%CO₂ 培养箱培养。由于成纤维细胞等杂细胞其生长速度明显快于基质细胞, 所以数小时后, 在 96 孔板底部就可见已贴壁的长梭形成纤维细胞等杂细胞和悬浮的基质细胞, 轻微吸打数次, 将悬液移至新的孔中, 添加部分新鲜的培养液, 即可去除杂细胞污染。继续培养, 直至孔中细胞明显由悬浮圆形变为贴壁长梭形, 而且比较平滑, 铺满整个孔板底为止。此时更换新鲜培养液, 即可作为 PGCs 细胞体外培养的饲养层, 提供细胞生长需要的部分因子。

1.6 PGCs 的原代培养及继代培养

取分离纯化后一定数量的 PGCs 细胞, 放至基质细胞上, 37 °C 5%CO₂ 培养箱培养。两天更换一次培养液, 定期镜检统计 PGCs 细胞数量。培养数天后, 收集细胞悬液, 再次经 Ficoll 密度梯度离心纯化细胞, 一部分细胞经高碘酸-希夫反应(PAS)

染色鉴别是否仍保持原始生殖特性, 一部分细胞经台盼蓝染色鉴别存活率, 其余重新放入新的基质细胞中继续培养或直接将细胞冻存。

1.7 PGCs 的冻存及复苏

经 Ficoll 密度梯度离心纯化后的 PGCs 细胞, 用培养液悬浮后, 移入冻存管内, 加入 10% 二甲基亚砷(DMSO), 先 4 °C 平衡 1 h, 再 -20 °C 平衡 2 h, -70 °C 过夜后, 第二天投入液氮。-70 °C 短期保存或 4~5 个月长期保存。

从液氮中取出冻存的 PGCs 细胞, 37 °C 快速溶解, 加入 1 ml 的培养液悬浮混匀, 200 g 离心 3 min。去上清液, 用完全培养液悬浮, 计算存活率。

1.8 PAS 染色^[7]

PGCs 细胞因其胞质内含有大量的糖原颗粒, 经特异性的 PAS 染色后, 可明显地区别于其他的细胞。取少量含 PGCs 的细胞悬液滴于载玻片上, 静置风干约 0.5 h, 用甲醛/无水乙醇(1:9)固定 1 min, 迅速倾去固定液, 用细流的双蒸水洗片, 晾干; 滴加 0.5% 高碘酸溶液, 静置氧化 5 min, 用细流的双蒸水洗净, 晾干; 滴加希夫试剂, 染色 15 min, 用轻水流洗净, 晾干; 最后用亚硫酸水迅速漂洗, 在片未干前镜检观察。

2 结果

2.1 血液中 PGCs 的形态特征

在相差显微镜下可清晰地观察到: 原始生殖细胞体积比较大(12~20 μ m), 约是红细胞体积的两倍, 呈圆形, 细胞核也比较大, 偏离细胞的一侧, 细胞周围有明显的光环(图 1), 经 PAS 染色分析, 此期的 PGCs 胞质内含有大量的糖原颗粒(图 2)。经过体外短期培养后, 细胞仍为圆形, 体积较刚提取后的大, 胞内颗粒性物质增多。与文献报道的结果一致^[8]。

2.2 不同培养条件下 PGCs 的存活情况

经台盼蓝染色鉴定(台盼蓝染色后, 存活细胞形态为圆形透明; 而死亡细胞形态不规则, 不透明且为蓝色)发现, 不同培养条件影响 PGCs 的存活率。结果见表 1。

2.3 PGCs 的增殖

PGCs 细胞和基质细胞共同培养的形态图见图 3。PGCs 细胞培养至 2~3 天时即贴附于基质细胞表面并开始增殖, 它们或者以单个细胞状态存在, 或者以簇状细胞团状态存在。培养至 6~7 天时细胞增

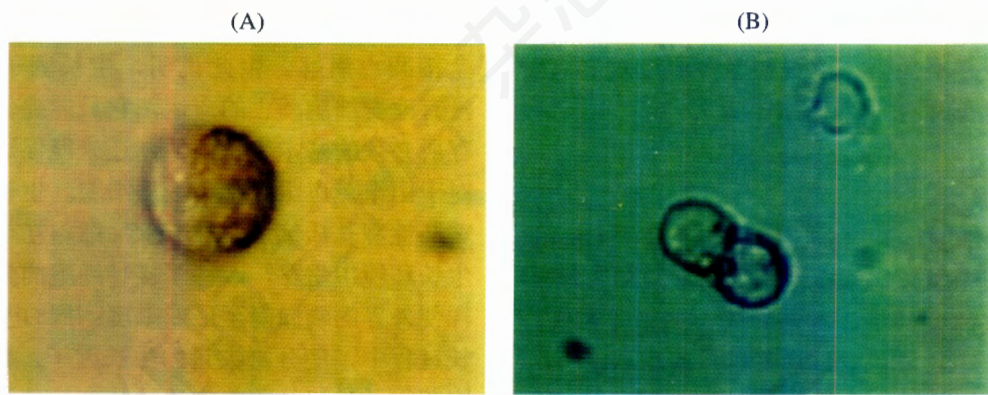


Fig. 1 PGCs acquired by Ficoll density centrifugation

A: a separate cell (400 ×); B: PGCs in telophase(200 ×).

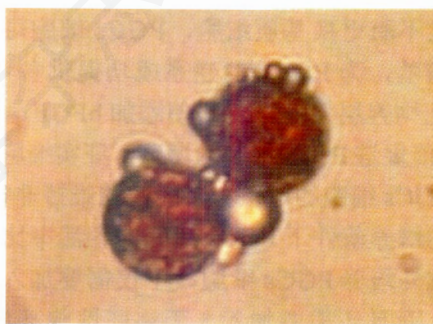


Fig.2 PGCs stained with PAS (400 ×)

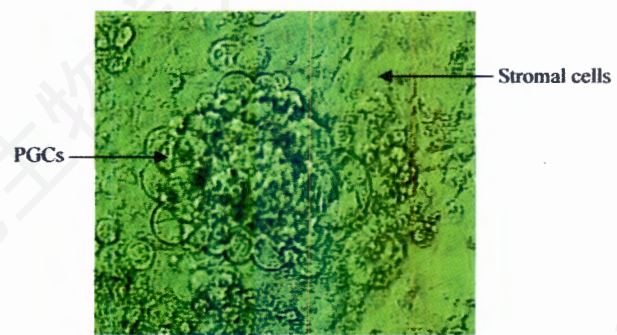


Fig.3 PGCs cultured on stromal cells (200 ×)

Table 1 Influence of different culture conditions on viability rate of PGCs

Viability rate of PGCs	Culture conditions			
	Group I basic medium	Group II basic medium + 2%CS	Group III basic medium + 2%CS + growth factor	Group IV basic medium + stoma cells +2%CS + growth factor
1 day	100%	100%	100%	100%
2 days	47% ± 0.043	89% ± 0.021	98% ± 0.009	98% ± 0.005
3 days	0	37% ± 0.052	62% ± 0.036	91% ± 0.012
4 days	0	0	24% ± 0.067	94% ± 0.008
5 days	0	0	0	95% ± 0.013
6 days	0	0	0	91% ± 0.018
7 days	0	0	0	83% ± 0.021
8 days	0	0	0	86% ± 0.042
9 days	0	0	0	87% ± 0.032
10 days	0	0	0	86% ± 0.039

Basic medium: Earl's balanced M199 + 10% FBS + streptomycin /penicillin (100 U/ml). Growth factor: 10 ng/ml IGF-1 + 10 ng/ml bFGF + 10 U/ml mLIF

Table 2 The effect of different thawing temperatures on viability rate of PGCs

Thawing temperature	4 °C ⁽⁹⁾	37 °C	42 °C
Rate of viability	80% ± 0.044	77.4% ± 0.024	75% ± 0.037

殖达最大。从第 6 天开始，基质细胞开始死亡，PGCs 细胞不再显著增殖。此时收集细胞悬液，离心纯化后(经过 Ficoll 密度梯度离心法离心纯化后，

纯度一般为 90%~95%。将细胞移入新的基质细胞上进行传代培养，细胞最长可培养 23 代。其中，每代细胞增殖可达近 10 倍。且每代细胞经过 PAS 染色鉴定后，均呈现阳性的桃红色(图 2)，即仍保持原始的细胞生殖状态，并未分化。

2.4 PGCs 的冻存复苏

不同的冻存及复苏条件 PGCs 的存活率比较结果显示 (表 2): 相同的冻存条件下，4 °C、37 °C、

42℃分别复苏细胞,细胞冻存复苏后的存活率有一定差异,但差异不显著。这说明复苏温度对PGCs细胞的冻存复苏后存活率影响不大。

3 讨论

对PGCs细胞体外培养比较成功的是:Chang等^[10]1995年使PGCs细胞在性腺基质细胞和各种生长因子均存在的条件下,存活4天,增殖4.8倍;安静等^[11]人于2003年以鸡胚成纤维细胞和小鼠胎儿成纤维细胞为基质细胞,培养ES细胞,存活4代,并使细胞增殖;秦洁等^[12]人于2003年在无基质细胞和生长因子存在的条件下,体外培养不同时期来源的PGCs细胞,最久的存活不超过四天。这些研究表明:经分离纯化的PGCs细胞在某些基质细胞的支持下,通过在培养液中添加一些细胞因子,如bFGF、TGF α 、LIF等,可控制PGCs的分化方向,使之重新回复胚胎期的多潜能状态,形成具有ES性质的细胞株^[13]。目前,国外在小鼠和牛上均有利用PGCs产生ES细胞系的报道^[14,15]。同时,随着核移植技术的深入研究,它还可以被用作核供体,产生克隆动物。因为PGCs所经历的是一个特殊的发育分化过程,它具有很明显的干细胞性质,所有这些工作的开展必须是建立在已获得PGCs的基础之上。

基于前人实验结果,本实验室在国内长期培养存活鸡胚PGCs细胞,并大量增殖。同时通过不同培养条件的比较,验证了PGCs细胞的最佳体外培养条件是不仅需要添加多种生长因子,还需要加入基质细胞。I组、II组实验结果比较显示:CS能供给细胞营养物质,促进细胞DNA的合成,对细胞的增殖有很大的促进作用,它的加入提供给PGCs细胞相对较多的营养物质,延长了其体外存活时间。但最终,体外培养的PGCs细胞因缺乏某些必需的生长因子而逐渐崩解死亡。III组中,除了加入了CS,还加入了3种生长因子:bFGF、IGF-1、LIF。其中bFGF、IGF-1能不同程度的促进PGCs细胞增殖,LIF则主要起到抑制细胞分化的作用。这几种细胞因子的结合作用改变了PGCs的发育程序,阻断其向成熟生殖细胞的分化,同时刺激PGCs大量增殖,得到大量多能干细胞。但本实验结果显示,细胞并未发生增殖,也未分化,只是

相对延长细胞存活的时间,到第4天时,细胞几乎全部凋亡崩解。由此说明,生长因子的加入,并没有改变细胞凋亡的命运,它只能提供细胞短期生存所必需的基本生长条件,还未能促进其增殖。相对于III组,IV组添加了基质细胞。生长到4~5天的鸡胚性腺基质细胞,使PGCs细胞在与体内相似的生长环境中生存,改善了接种细胞的生长环境,这样使外界的刺激降至最低限度;同时基质细胞在生长过程中,能分泌大量的生长因子,使得PGCs细胞获得了足够的营养物质,能在体外长期存活,而且还能不断的增殖并抑制细胞分化。实验结果同样显示:随着基质细胞的老化,PGCs细胞也开始降解,通过不断更换基质细胞,PGCs细胞可以不断传代和增殖,为PGCs的建系成功提供参考依据。

在无饲养层条件下,即使添加bFGF、IGF-1、LIF也不能促进PGCs细胞的增殖,证实细胞单层的接触对PGCs细胞的增殖和多能性的维持非常重要。通过不同培养条件下PGCs细胞的存活率比较,明显看出体外培养PGCs细胞,不仅需要加入大量生长因子,而且还需要加入5天鸡胚性腺基质细胞。多种生长因子和基质细胞的结合作用,为PGCs增殖提供良好的微环境,改变了PGCs发育程序,阻断其向成熟生殖细胞分化,同时刺激其大量增殖^[16]。本实验结合原代培养、继代培养及细胞的冻存复苏可提供大量的PGCs细胞,为转基因的顺利进行提供足够的载体来源,同时也为家禽的遗传保种提供了方便。

参考文献 (References)

- [1] Palmiter RD *et al.* *Nature*, 1982, **300**: 611
- [2] Chang IK *et al.* *Cell Biol Int*, 1997, **21**: 495
- [3] 李赞东等. *动物学报*, 2003, **49**: 868
- [4] 秦洁等. *细胞生物学杂志*, 2003, **25**: 316
- [5] Chang IK *et al.* *Cell Biol Int Rep*, 1992, **16**: 853
- [6] Chang IK *et al.* *Cell Biol Int*, 1995, **19**: 569
- [7] David B M *et al.* *Stain Technol*, 1960, **35**: 83
- [8] 李碧春等. *国外畜牧科技*, 2001, **28**: 26
- [9] Naito M *et al.* *J Reprod Fertil*, 1994, **102**: 321
- [10] Chang IK *et al.* *Cell Biol Int*, 1995, **19**: 143
- [11] 安静等. *动物学报*, 2003, **49**: 698
- [12] 秦洁等. *解剖学研究*, 2003, **25**: 181
- [13] 张锁链等. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 1998, **29**: 240
- [14] Matsui Y *et al.* *Cell*, 1992, **70**: 841
- [15] 韩建永等. *黄牛杂志*, 2001, **27**: 43
- [16] 唐奕等. *湖南医科大学学报*, 2003, **28**: 473

Culture of Chicken Embryonic Primordial Germ Cells *in Vitro*

Bei Xie^{1,2}, Hai Huang^{1,2}, Xiao-Fen Hu^{2,4}, Xiang-Rong Cao¹, Qi-Zhong Huang², Zhen Li^{2,3*}

(¹ School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjin 210097, China; ² Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-genetics and Breeding, Shanghai 201106, China;

³ Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;

⁴ Jiangxi Provincial Key Laboratory for Animal Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchan 330045, China)

Abstract Primordial germ cells (PGCs) were isolated from the blood of stage 14–15 chick embryos by using Ficoll density centrifugation. After isolated, primordial germ cells were cultured with or without stroma cells. The PGCs could survive 4 days when cultured in Medium 199 supplemented with FBS, chicken serum, bFGF, human IGF-1 and murine LIF, while they could be cultured for twenty-three generations when cultured on different growth factors and stromal cells derived from 5-day-old chicken germinal ridge. The PGCs could maintain a viability rate of 80% after being frozen and thawed .

Key words primordial germ cells; *in vitro* culture; freezing and thawing

Received: September 23, 2004 Accepted: November 10, 2004

This work was supported by the Academic Trains Funds of the Young and Middle-aged Technological Leader from Shanghai Academy of Agricultural Sciences

* Corresponding author. Tel: 86-21-62200389; Fax: 86-21-62207858; E-mail: zhenli60@public3.sta.net.cn