

4 个品系小鼠胚胎干细胞系的建立

蒋永华 孙筱放* 郑育红 张文红 银益飞 廖宝平

(广州医学院第三附属医院, 广州市生殖与遗传重点实验室, 广州 510150)

摘要 探索高效的品系小鼠胚胎干细胞的建系方法。B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2)、129/SV × DBA/2、C57BL/6、BALB/C 等 4 个不同品系小鼠, 孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG)+ 人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)促排, 3.5 天交配后(days post coitus, dpc)冲洗子宫取囊胚, 或者 2.5 dpc 冲洗输卵管, 卵裂球体外培养获取囊胚。囊胚种植到小鼠成纤维细胞饲养层上干细胞培养液培养, 4~5 天内细胞团扩增后玻璃毛细管挑出, 种植到新的饲养层上过夜再行胰蛋白酶消化, 3~4 天传代一次。对所建立的小鼠 ES 细胞系进行形态学、染色体核型、AKP 染色、体内外分化能力, 干细胞分子标记物荧光免疫染色等鉴定。获得 10 株小鼠胚胎干细胞, 具有典型的胚胎干细胞生长特性, 符合 ES 细胞的鉴定标准。结果表明成功的建立了来自 B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2)、129/SV × DBA/2、C57BL/6、BALB/C 等 4 个不同品系小鼠的 10 株 ES 细胞系。内细胞团挑出过夜增殖后消化的培养方法可能有助于提高 ES 细胞的建系率。

关键词 小鼠品系; 胚胎干细胞系; 内细胞团; 体外培养

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)是由囊胚的内细胞团(inner cell mass, ICM)分离培养的, 具有全能分化特性的细胞^[1,2], ES 细胞不仅可以作为体外研究细胞分化和发育调控机制的模型, 还对移植治疗、药物发现及筛选、细胞及基因治疗和生物发育等基础研究等带来深远的影响。目前小鼠 ES 细胞多来源于 129 品系, 但是 129 品系小鼠具有高频的自发畸胎瘤现象, 而且由国外购买的 ES 细胞一般传代在 15 代以上, 不适用于嵌合体等操作, 转基因操作成功率低, 因此探索高效的小鼠 ES 细胞的分离方法和培养条件, 建立不同遗传背景的小鼠胚胎干细胞是十分必要的。

本研究拟从小鼠囊胚的获取、ICM 传代时间及方式等方面进行的改进, 探索高效的小鼠胚胎干细胞建系方法。

1 材料与方 法

1.1 实验动物、培养液和仪器

C57BL/6 小鼠由南方医科大学实验动物中心提供; BALB/C、129/SV、DBA/2 小鼠由中山大学实验动物中心提供; KM、BALB/C 小鼠由广东省实验动物中心提供, 杂交一代由本实验室购买动物进行交配繁殖。DMEM、PBS、胰蛋白酶、非必需氨基酸、青霉素/链霉素购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司、白血病抑制因子购自 Chemcon 公司;

2-巯基乙醇、石蜡油购自 Sigma 公司; CO₂ 培养箱为 She Lab 公司产品, 相差显微镜为 Nikon E2000。

1.2 饲养层细胞的制备

制作方法参考文献^[3], 孕 12.5~13.5 天的 KM 鼠, 脊椎脱臼法处死, 取出胎鼠, 胰蛋白酶消化, 37 °C, 5%CO₂ 的条件下培养。取 1~3 代成纤维细胞制作饲养层, 10 μg/ml 丝裂霉素 C 作用 2~3 h, PBS 冲洗 3 次, 0.25% 胰蛋白酶消化, 4 × 10⁵ 个/cm² 接种, 8 h 后细胞贴壁可用。

1.3 囊胚的分离与体外培养

选取处在间情期的 8~10 周龄的 C57BL/6、129/SV、C57BL/6、BALB/C 等 4 个不同品系母鼠, 于 18:00 腹腔注射孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG) 10 U/只, 48 h 后腹腔注射绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG 人) 10 U/只, 与 10~12 周龄对应公鼠 1:1 合笼, 交配方案: ♀ C57BL/6 × ♂ DBA/2, ♀ 129/SV × ♂ DBA/2, ♀ C57BL/6 × ♂ C57BL/6, ♀ BALB/C × ♂ BALB/C, 次日早晨 8 点检查阴道栓, 记为 0.5 天。随机分为两组方法获取囊胚。

第一组: 3.5 天交配后(days post coitus, dpc)冲洗

收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2007-03-14

广东省科技厅重大攻关课题(No.B30202), 广州市科技局科技攻关计划重大项目(No.200621-E0021)资助

* 通讯作者。Tel: 020-81292202, Fax: 020-81292013, E-mail: xiaofangsun@hotmail.com

子宫取囊胚。

3.5dpc, 脊椎脱臼法处死, M2 冲洗子宫收集囊胚, 将收集的囊胚转移到饲养层进行干细胞原代培养, 分别记录生长情况。

第二组: 2.5dpc 冲洗输卵管, 获取卵裂球, 体外培养发育到囊胚。

2.5dpc, 脊椎脱臼法处死, M2 冲洗输卵管组, 收集的卵裂球转移入 MEM- α 微滴培养。24~48 h 观察, 将囊胚转移到饲养层上进行干细胞原代培养, 方法同前。

ES 细胞培养液(高糖 DMEM, 20% 胎牛血清, 0.1 mol/L 2- 巯基乙醇, 1 mol/L 谷氨酰胺, 1 mol/L 丙酮酸钠, 0.1 mol/L 非必须氨基酸, 100 u 青霉素 - 链霉素或 100 mg/ml、1 000 mg/ml 白血病抑制因子)。

1.4 ICM 培养的首次传代分离

ICM 饲养层上培养 4~5 天, 玻璃毛细管挑出, 种植到新的饲养层上让 ICM 进一步扩增, 24 h 后, 0.05% 胰蛋白酶消化, 加入培养终止消化, 收集细胞悬液离心, 1 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 沉淀混悬后接种到新的饲养层上。

1.5 ES 细胞的鉴定

1.5.1 细胞形态学 相差显微镜观察 ES 细胞的生长行为及形态特征。

1.5.2 AKP 染色 Chemicon 公司 ES 细胞标记分析试剂盒, ES 细胞的低密度传代培养 4 天, 弃培养液, 90% 乙醇固定, 室温避光染色 15 min, 镜下观察。

1.5.3 ES 细胞分子标记物(SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81)免疫荧光染色 Chemicon 公司 ES 细胞标记分析试剂盒, 含 SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 抗体。选用二抗 FITC-goat anti-mouse Ig-M(Santa Cruz), FITC-goat anti-mouse Ig-G(博士德)。4% 多聚甲醛固定, 4% 羊血清 PBS 液封闭, 一抗温育 1 h, 加 FITC 标记的二抗, 温育 1 h, 荧光显微镜观察。

1.5.4 细胞分化能力的检测 体外分化 - 拟胚体

的形成。ES 细胞常规消化传代, 调整细胞密度 1×10^5 个, 35 μ l 悬滴培养, 每天观察。体内分化。将 ES 细胞消化为单细胞, 混悬后取 2×10^6 个细胞注入 SCID 小鼠腹股沟皮下。

1.5.5 染色体核型鉴定 取生长旺盛的 ES 细胞, 0.2 μ g/ml 秋水仙素作用 4 h, 常规空气干燥制片, 吉姆萨(Giemsa)染色, 分析 20 个分裂相, G 带染色核型分析参考 Nesbitt 等^[4]小鼠染色体标准模式图。

2 结果

2.1 3.5dpc 冲洗子宫取囊胚与 2.5dpc 冲洗输卵管获得囊胚数量对比

不同品系来源的小鼠来源及囊胚获取数量具体见表 1。

2.2 ICM 培养的首次传代分离

ICM 饲养层上培养 4~5 天后玻璃毛细管挑出, 种植到新的饲养层上过夜, 可以发现 ICM 的形态更加典型, 突起明显, 周围的外滋养层及分化细胞较原代培养时减少, 约 24 h 后用胰蛋白酶消化, 收集细胞悬液离心, 1 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 细胞沉淀混悬后接种到新的饲养层上, 1~2 天后可以发现明显的 ES 细胞克隆生长。

2.3 小鼠胚胎干细胞系的建立

获得了来自 BALB/C、C57BL/6、B6D2F1 (C57BL/6 \times DBA/2)、C57BL/6 \times 129/SV 不同品系小鼠 10 个株 ES 细胞(表 2)。根据其小鼠品系的不同来源分别命名为 mES-BALB/C-1, mES-BALB/C-2, mES-C57BL/6-1, mES-C57BL/6-2, mES-C57BL/6-3, mES-B6D2F1-1, mES-B6D2F1-2, mES-B6D2F1-3, mES-B6D2F1-4, mES-129/SV \times DBA/1。

2.4 ES 细胞的鉴定

10 株 ES 细胞均经过以下检测 ES 细胞的相关检测。

Table 1 No. of blastocysts harvested from 3.5dpc or 2.5dpc gestation group

Groups	No. blastocysts (/mouse)	BALB/C		C57BL/6		129/SV \times DBA/2		C57BL/6 \times DBA/2	
		No. mouse	No. blastocysts	No. mouse	No. blastocysts	No. mouse	No. blastocysts	No. mouse	No. blastocysts
d3.5 gestation	4(3.5)	1	4	1	5	1	1	1	4
d2.5 gestation	5(7.4)	1	6	1	10	1	6	2	15

Table 2 Blastocysts adherence and establishing ES cell lines derived from various mouse strains

	BALB/C	C57BL/6	129/SV \times DBA/2	C57BL/6 \times DBA/2
No. blastocysts	10	15	7	19
ICM attached feeder (%)	8(80%)	11(73.3%)	4(57.14%)	15(79.80%)
ES cell lines (%)	2(20%)	3(20%)	1(14.28%)	4(26.30%)

2.4.1 形态学特征 不同品系来源的胚胎干细胞在形态上及传代时间上无明显区别, 呈集落样生长, 集落边缘光滑清晰, 有的集落边缘可见小的散在的 ES 细胞, 细胞呈团状排列, 每个细胞呈圆形, 体积小、核大、胞浆少, 细胞之间边界不清(图 1-1)。

所有 mES 细胞系传代均超过 25 代, 均能冷冻复苏, 复苏率 30%~45%。

2.4.2 AKP 染色 10 株 ES 细胞均呈阳性反应, 在胞浆内见棕黑色颗粒沉淀(图 1-2)。

2.4.3 ES 细胞分子标记物(SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81)免疫荧光染色 10 株 ES 细胞系在未分化的 ES 细胞 SSEA-1 阳性(图 1-3), SSEA-4, TRA-

1-60, TRA-1-81 阴性, 符合小鼠 ES 细胞系的 ES 细胞分子标记物的表达特性。

2.4.4 细胞分化能力的检测 体外分化 - 拟胚体的形成。10 株 ES 细胞均能形成拟胚体(图 2-1), 组织切片染色, 可见到 3 个胚层的原始结构。

体内分化。将 ES 细胞注入 SCID 小鼠腹股沟皮下。2 周后注射局部可以触及肿块, 6 周后处死小鼠, 取出瘤体, 10% 福尔马林固定, 常规石蜡包埋病理切片, 病理报告可见来自 3 个胚层的组织(图 2-2, 图 2-3, 图 2-4)。

2.4.5 染色体核型鉴定 10 株 mES 细胞系传代均超过 25 代, 每 8~10 代检测一次核型, 每次检测分析

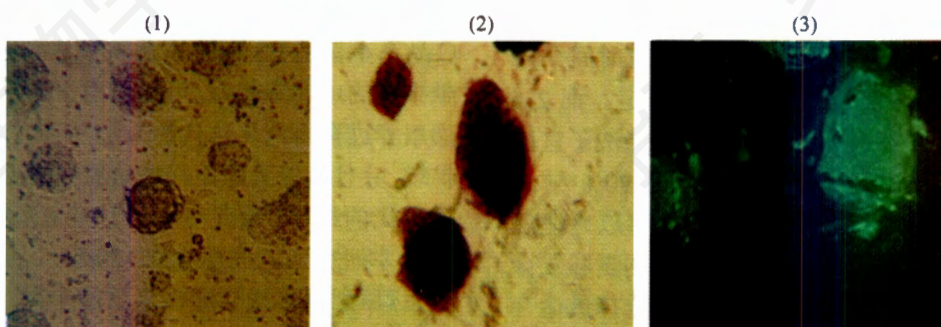


Fig.1 ES-C57BL/6-2 ES cell line

1: ES cell on fibroblast cell feeder layer; 2: KP dyeing; 3: SSEA-1 immunofluorescence stain.

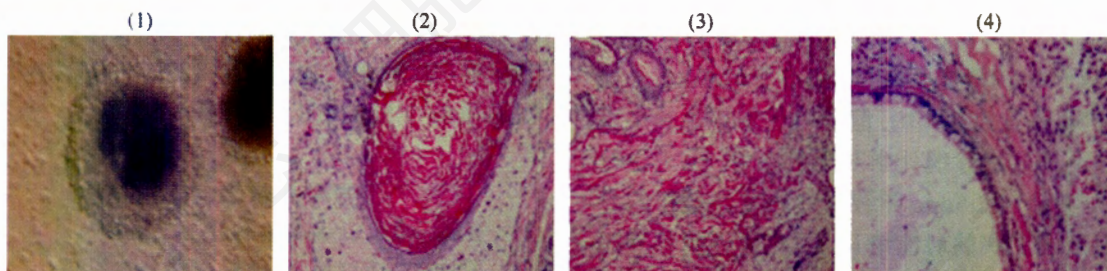


Fig.2 mES-B6D2F1-3 ES cell line

1: embryoid body; 2: slice of teratocarcinoma, squamous epithelium (ectoderm); 3: muscular tissue (mesoblastema); 4: crypts of lieberkuhn (entoderm).

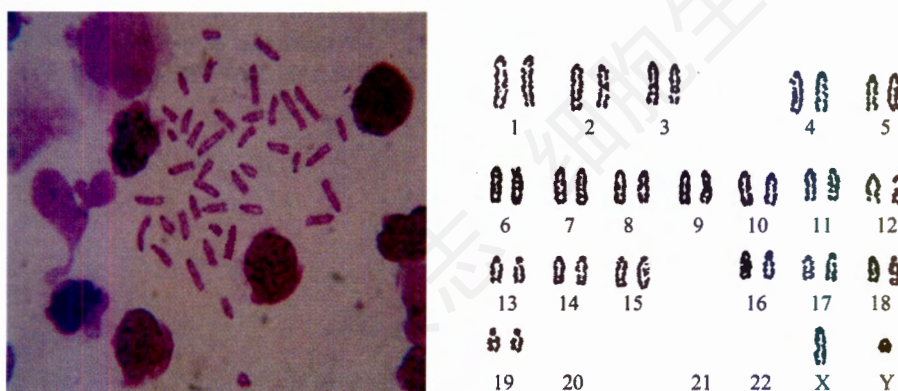


Fig.3 karyotypes of mES-B6D2F1-3, passage 25, 40, XY

20个分裂相(图3)。10个细胞系均为正常2倍体核型, mES-B6D2F1-4细胞株核型为40, XX, 其余9个细胞株均为40, XY。

3 讨论

3.1 小鼠囊胚的获取

Kim等^[5]和Lemckert等^[6]的试验提示, 3.5dpc冲洗小鼠子宫, 获得扩张的囊胚数量较少, 而2.5dpc冲洗输卵管获取卵裂球进行体外培养可以获得更多的囊胚。我们在实验中也发现, 由于胚胎发育的不同步, 3.5dpc冲洗子宫获取的胚胎可以出现桑葚胚、囊胚、已孵出囊胚等不同发育阶段的胚胎, 或者是由于部分囊胚已经着床, 不能冲洗出来, 能收集的囊胚数量较少, 并且不同品系的小鼠胚胎发育时间个体存在差异, 冲洗子宫的时间不能完全固定。而2.5dpc冲洗输卵管获得卵裂球的个数明显较冲洗子宫增加, 体外培养卵裂球的囊胚形成率能到达90%左右, 因此更容易获得囊胚。卵裂球体外培养可以方便观察囊胚的发育及扩张情况, 虽然体外培养的囊胚发育较体内发育的囊胚稍慢, 但是经过挑选, 选择最适合时期接种到饲养层的囊胚, 可能有助于提供ES细胞的建系率。

本试验直观对比可以发现2.5dpc冲洗输卵管加体外培养较3.5dpc冲洗子宫有利用获取更多的囊胚(3.5dpc小鼠平均获得囊胚数量为3.5个, 2.5dpc小鼠平均获得囊胚数量为7.4个), 但是用于本实验的小鼠数量较少, 不具备进行统计学对比的条件, 也未进行3.5dpc获得囊胚与2.5dpc卵裂球体外培养获得的囊胚ES细胞系建立率的对比统计, 因此体外培养获得囊胚是否与体内发育获得的囊胚在ES细胞系的建立潜能一致尚有待进一步探讨。

3.2 不同品系来源的小鼠ES细胞系的建立

ES细胞系的建立为更深入地研究基因结构与功能、胚胎发育、癌症以及各种遗传病的机制提供了良好的研究平台, 优良的ES细胞系是ES细胞相关研

究的基础。从国外购买的ES细胞系由于远距离的运输、培养条件的改变以及传代次数的增加, 很容易造成ES细胞的基因突变和染色体畸变, 往往导致细胞出现生长滞留并丧失多能性, 从而失去作为重要研究材料的意义。因此, 不断建立新的、可供国内使用的ES细胞系是十分必要的。

BALB/C品系小鼠的ES细胞建系成功较晚, 是一种普遍认为较难成功建系的小鼠品系, 有文章报道, 在ICM的原代培养过程中添加高浓度的白血病抑制因子(5 000 u/ml)^[7]及ICM的亚克隆分离法^[8]有助于该品系小鼠ES细胞的建系。本研究在不增加LIF浓度的条件下, 通过ICM挑出饲养层培养过夜再消化传代的方法可以获得该品系的ES细胞。本文的BALB/C品系小鼠的ES细胞系建系率达到20%, 与前面文献报道的成功率相似, 可能是由于通过ICM挑出饲养层培养过夜再消化传代的方法, 有助于ICM的进一步扩增, 并且可以去除原代ICM周围的滋养层细胞及部分分化的细胞, 因此有助于建立ES细胞系。

本研究未能成功建立129/SV品系小鼠的ES细胞系, 原因为多次交配该品系的小鼠, 即使0.5dpc可以见到明显的阴栓, 冲洗子宫或者输卵管均不能获取受精卵, 仅见未受精的溶解卵子, 也可能该品系的小鼠对饲养的环境要求较高, 在本实验室的普通动物饲养条件下不能交配受精, 因此未能成功建立129品系的小鼠ES细胞系, 仅建立了129/SV×DBA/2杂交一代品系的小鼠的ES细胞系。

参考文献(Reference)

- [1] Evans MJ *et al.* *Nature*, 1981, **292**: 154
- [2] Thomson JA *et al.* *Science*, 1998, **282**: 1145
- [3] Hogan B *et al.* *Manipulation the Mouse Embryo*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 258
- [4] Nesbitt MN *et al.* *Chromosoma*, 1973, **41**: 145
- [5] Kim SU *et al.* *Exp Anim*, 2004, **53**: 475
- [6] Lemckert FA *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 917
- [7] Baharvand H *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2004, **40**: 76
- [8] 孟国良等. *遗传学报*, 2001, **28**: 911

Isolation and Cultivation of Embryonic Stem Cell Lines Derived from Pre-implantation Mouse Embryos of Four Different Strains

Yong-Hua Jiang, Xiao-Fang Sun*, Yu-Hong Zheng, Wen-Hong Zhang, Yi-Fei Yin, Bao-Ping Liao

(The Key Laboratory of Reproduction and Genetics of Guangzhou, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510150, China)

Abstract To increase the efficiency of establishing mouse embryonic stem (ES) cell lines derived from various mouse strains. B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2), 129/SV × DBA/2, C57BL/6, BALB/C mouse were used in this report, blastocysts were obtained from 3.5 dpc (days post-coition) super ovulated mouse, or harvested morula from 2.5 dpc super ovulated mouse, cultured to blastocysts stage *in vitro*. Blastocysts transferred into ES culture medium with feeder cells, after 4–5 days of culture, inner cell mass (ICM) were picked up and transferred to the new culture dish with feeder cells, dissociate ICM by 0.05% trypsin after overnight culture, ES cells were passaged every 3–4 days. ES cell lines were established with observation of phase contrast microscope and identified by karyotype, AKP staining, differentiation ability, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 immunostaining. 10 ES cell lines were established, each cell line exhibited typical mouse ES cell characteristics. 10 ES cell lines derived from B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2), 129/SV × DBA/2, C57BL/6, BALB/C mouse strains were established. Dissociating of ICM after overnight culture might be beneficial for establishment of mouse ES cell lines.

Key words mouse stains; embryonic stem cell line; inner cell mass; *in vitro* culture

Received: November 22, 2006 Accepted: March 14, 2007

This work was supported by the Key Program of Guangdong Science and Technology Department (No.B30202) and The Key Project of Guangzhou Science and Technology Administration (No.200621-E0021)

*Corresponding author. Tel: 86-20-81292202, Fax: 86- 20-812920136; E-mail: xiaofangsun@hotmail.com