

# 昆明白小鼠胚胎干细胞分离与体外培养

李煜\* 梁琳 王振飞 贾瑞贞 戴宝贞 李瑶

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

**摘要** 为探索昆明白小鼠胚胎干细胞建系方法, 将受孕4.5天的昆明白小鼠囊胚用免疫手术法去除滋养层, 然后将内细胞团(ICM)接种于胎鼠成纤维细胞饲养层上培养, 形成的胚胎干细胞样集落用胰蛋白酶-EDTA消化法传代, 培养后进行相差显微镜观察及碱性磷酸酶染色。结果饲养层上生长的ICM细胞呈典型的ES样细胞集落, 传至第8代碱性磷酸酶染色呈强阳性。实验表明免疫手术法适用于昆明白小鼠ES细胞建系, 获得的细胞集落具有ES细胞的主要生物学性状。

**关键词** 小鼠; 胚胎干细胞; 免疫手术; 内细胞团

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)可由早期胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)经体外培养选出, 具有多潜能及体外增殖能力, 是目前胚胎工程技术研究的热点。自1981年Evans等<sup>[1]</sup>由小鼠胚胎中分离出胚胎干细胞并进行体外培养后, 小鼠胚胎干细胞的研究蓬勃兴起。研究的焦点主要集中在胚胎干细胞建系方法、胚胎干细胞体外培养和传代方法、胚胎干细胞抑制分化和定向分化诱导、胚胎干细胞生物学特性测定等几个方面。在干细胞技术的发展过程中, 饲养层细胞共培养(如胎鼠成纤维细胞、STO细胞<sup>[2]</sup>)、培养液中添加白血病抑制因子(LIF)、使用条件培养基(如大鼠肝细胞<sup>[3]</sup>、大鼠心肌细胞<sup>[4]</sup>条件培养基)等方法的相继使用, 有效地改善了干细胞的生存条件, 从而在培养过程中能更好保持干细胞的增殖能力和多向分化能力。

动物种类或品系不同, 胚胎干细胞建系的条件亦有较大差别。昆明白小鼠ES细胞建系成功率低是当前研究工作遇到的一个突出问题。用囊胚期胚胎进行干细胞建系, 确保细胞源于ICM, 是保证细胞系具有全能性的重要条件之一。为此本实验应用免疫手术法从受孕4.5天的昆明白小鼠囊胚分离内细胞团培养小鼠ES细胞, 目的是从中探讨昆明白小鼠胚胎干细胞建系的一些基本方法及特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取8周龄后昆明白雌鼠, 于晚8:00腹腔注射孕马血清促性腺激素(PMSG)10 U/只, 48 h后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)10 U/只, 雌雄1:1合

笼, 次日上午8:00之前检查, 若母鼠有阴道栓, 确认其交配受精。

### 1.2 兔抗鼠脾细胞免疫血清制备及效价测定

将无菌摘取的昆明白小鼠脾脏剪碎、匀浆, 产物用无菌纱布过滤, 滤液1 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 加入生理盐水, 混匀后1 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 管底余下大约2 ml盐水, 吹散沉降的细胞, 加入高压灭菌的四蒸水至10 ml, 吹打均匀后, 1 000 r/min离心5 min, 弃去上层红色悬液, 加入生理盐水, 制成2 ml细胞悬液, 并进行细胞计数。每隔一周对家兔耳静脉注射新鲜的鼠脾白细胞悬液(每只兔 $10^7$ 个细胞), 连续5周。最后一次注射10天后颈动脉插管法采血。待血浆自然凝固后收集血清。

取3~4滴小鼠新鲜血液加到有5 ml生理盐水的试管中, 稀释均匀。取8支试管, 1号试管中加入0.2 ml免疫血清, 1~7管的血清由1号管倍比稀释而得, 即稀释倍数依次为: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128。向血清中依次加入0.1 ml小鼠红细胞稀释液, 室温静置2 h, 观察溶血反应。将血清用培养液CZB(Chatot-Ziomek-Bavister medium)分别1:2、1:4、1:8稀释后做微滴, 放入去透明带的小鼠囊胚, 显微镜下观察囊胚腔消失及滋养层细胞破坏情况, 并记录细胞破坏所需时间。

### 1.3 饲养层细胞的制备

受孕14.5天的小鼠胎儿, 去头、内脏及四肢洗

收稿日期: 2007-05-18 接受日期: 2007-08-28

国家自然科学基金(No.30460054)和内蒙古自治区自然科学基金(No.200408020405)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0471-4995867-8017, E-mail: liyu\_cn@hotmail.com

涂后剪切,胰蛋白酶消化,上清液离心后接种于50 cm<sup>2</sup>玻璃培养瓶中,加入含10%新生牛血清(四季青公司)的DMEM低糖培养基。37℃、5%CO<sub>2</sub>、100%湿度条件下培养。传至第3代的成纤维细胞用10 μg/ml 丝裂霉素C处理2 h抑制其有丝分裂活性。常规胰蛋白酶消化后接种于0.1%明胶(Sigma)包被的35 mm培养皿中,饲养层制备12 h后使用。

#### 1.4 小鼠 ICM 细胞的分离

手术摘取受孕4.5天的小鼠子宫,用含双抗的PBS洗涤,用注射器从宫颈一侧注入CZB冲洗,用凹皿收集质量好的囊胚移至CZB微滴。用0.5%链霉蛋白酶(Pronase)消化约5 min去除透明带。将无透明带的囊胚用免疫手术法(immunosurgery)去除滋养层细胞:胚胎移入1:2稀释的兔抗鼠脾细胞免疫血清中,液滴里温育15 min左右,待囊胚腔收缩变小直至消失时移入DMEM液滴中洗3~5次,经体外培养后吹打去除内细胞团外的滋养层细胞碎片<sup>[5]</sup>。

#### 1.5 鼠 ES 样细胞的体外培养

收集内细胞团,用培养液洗涤后移入饲养层上,改换DMEM高糖培养液(含2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、5 ng/ml LIF、15%胎牛血清、1% 100×非必需氨基酸(Sigma M7145)。待贴壁生长的ICM呈现克隆状增殖,并形成较大细胞集落时,进行传代培养。

将典型集落刮下后放入0.25%胰蛋白酶-0.04% EDTA微滴中消化5~7 min,待集落变得松散时,用吸管转移到洗涤液中,吸管吹打,将打散的单细胞和小细胞团接种到新的饲养层细胞上,每2~3天半量更换培养液。次级传代时采用酶消化结合机械分离的方法进行。

#### 1.6 碱性磷酸酶组织化学染色

用含7.5%蔗糖的1%多聚甲醛固定细胞1 h; pH 9.5的100 mmol/L Tris-HCl中加入500 mmol/L NaCl、50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1% Tween-20做缓冲液(新鲜配制)平衡30 min; 75 mg/ml 硝基四氮唑蓝(NBT)和50 mg/ml 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP)染色液染色1 h<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 兔抗鼠脾细胞免疫血清制备及效价测定

制备的小鼠脾脏白细胞,部分表面抗原与红细胞相同。因此在补体存在的条件下,可导致红细胞溶血。依据本实验方法进行免疫后,3只家兔的免疫血清溶血效果均很明显,在128倍稀释下仍有一定溶血现象(图1),说明血清中含有足量的抗脾细胞抗体。用抗血清作用于去透明带小鼠囊胚的实验证实,抗血清中存在针对小鼠滋养层细胞表面抗原的抗体,能有效去除滋养层细胞。

### 2.2 ICM 细胞的分离和培养

用兔抗鼠脾细胞抗体免疫血清处理去透明带小鼠囊胚,体外培养2 h后,可见滋养层细胞破损,形成环绕在ICM周围的细胞碎片(图2)。一段时间后用吸管吹打,除去滋养层碎片,可得到完好的ICM(图3)。将ICM接种于饲养层上培养,3~4天后,贴壁生长的ICM细胞呈集落生长,6天左右增殖到可以传代的集落。形成的集落细胞较致密,细胞界线不可见,多数呈岛状或巢状,细胞集落和周围饲养层细胞存在明显界限。相差显微镜下观察集落细胞较饲养层细胞有较强的折光性。用本实验方法分离的ICM共计61枚,接种于小鼠成纤维细胞饲养层72 h后,形成干细胞样集落的比率为60.66%(表1)。

### 2.3 小鼠 ES 样细胞的体外培养

待饲养层上生长的ICM形成较大细胞集落时,将单个集落刮下后分别放入0.25%胰蛋白酶-0.04% EDTA微滴中消化。待集落细胞群变得松散时,用吸管转移到洗涤液中,吸管吹打,将打散的单细胞和

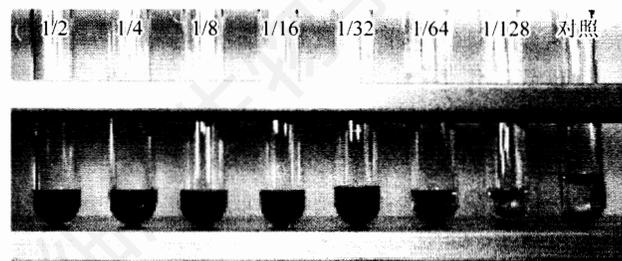


图1 兔抗鼠脾细胞免疫血清效价测定

表1 昆明白小鼠 ICM 在饲养层上的集落形成率

实验组	ICM 数目	培养 48 h 细胞集落数	集落形成率	培养 72 h 细胞集落数	集落形成率
1	12	3	25.00%	9	75.00%
2	25	7	28.00%	15	60.00%
3	24	5	20.83%	13	54.17%
合计	61	15	24.59%	37	60.66%

小细胞团接种到新的饲养层细胞上, 每 2~3 天半量更换培养液。经过一周左右的体外培养, 可见重新形成的 ES 样细胞集落。



图 2 抗血清处理后的 ICM 与滋养层碎片(200×)

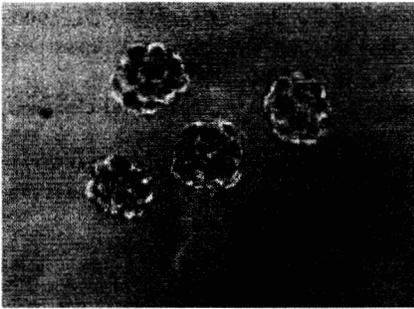


图 3 去除滋养层碎片后的 ICM(400×)

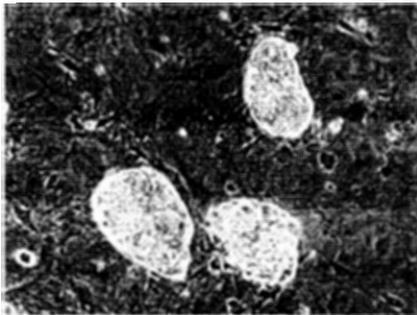


图 4 第 7 次传代后形成的细胞集落(100×)

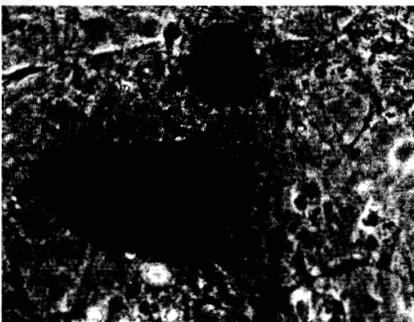


图 5 第 8 次传代后碱性磷酸酶染色呈强阳性的细胞集落(100×)

将 11 个单一胚胎来源的细胞集落分别单独进行一次级传代, 其中 8 个细胞系在第 5 代之前产生分化、不贴壁或死亡; 两个细胞系在第 7 代进行了冻存(图 4); 一个细胞系在第 8 代进行了冻存和组化分析。

## 2.4 组织化学染色

ES 样细胞集落传至第 8 代碱性磷酸酶染色呈强阳性。据此现象及细胞集落的形态特征, 初步证实细胞集落呈现 ES 细胞特性(图 5)。

## 3 讨论

从着床前的胚泡中分离内细胞团, 是从早期胚胎建立 ES 细胞系的先决条件。免疫手术法根据免疫学原理去除滋养层细胞, 保留 ICM 细胞进行培养, 是获取 ICM 的有效方法。这种方法的优点是去除滋养层细胞比较完全, 且能一次获得大量 ICM, 从而提高胚胎干细胞原代培养的效率。本实验结果证实免疫手术法适用于昆明白小鼠 ES 细胞建系。

丝裂霉素 C 的处理浓度及时间对饲养层的制备有着重要影响。丝裂霉素 C 浓度过低时不能很好抑制细胞分裂; 丝裂霉素 C 浓度过高则对细胞贴壁后的形态发生影响, 细胞明显萎缩, 胞体周围的多角形突起变细回缩。本实验发现 10  $\mu\text{g/ml}$  的丝裂霉素处理 2~4 h 或 20  $\mu\text{g/ml}$  丝裂霉素处理 1~2 h 细胞生长稳定, 不影响饲养层细胞活力, 经这样处理的饲养层对 ES 细胞的生长增殖比较有利。

使用胎鼠成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)作为饲养层或者在培养液中添加 LIF 是促进 ES 细胞增殖、抑制分化的基本方法。相比而言, 使用饲养层的效果明显好于只添加 LIF, 可能的原因是 MEF 不仅能够分泌 LIF, 还能提供促进胚胎干细胞体外存活、增殖所需的其他生长因子及 ES 细胞的生长增殖环境。本实验也尝试使用添加 LIF 的高糖培养液在无饲养层条件下培养 F6 代 ES 细胞, 结果很不理想, 说明饲养层所提供的干细胞生长环境还很重要。

在胚胎多潜能干细胞分离培养过程中, 既要促进 ICM 细胞的增殖又要抑制 ICM 细胞分化。这就要求适宜的培养系统、胚胎的胚龄和适宜的分化抑制物。条件培养基的使用是抑制胚胎干细胞分化的一个途径。可以产生条件培养基的细胞有许多, 如大鼠肝细胞<sup>[3]</sup>、大鼠心肌细胞<sup>[4]</sup>等。本实验曾尝试利用自制的大鼠心肌细胞条件培养基进行小鼠 ES 细胞的培养, 去透明带小鼠胚胎贴壁效果较好, 但是周围的滋养层细胞在明胶上的增殖速度快于 ICM, 且其

ICM 传代效果不佳。

在 ES 细胞传代时, 最好将 ES 细胞集落分散为 3~4 个细胞在一起的小团块, 这样易于重新形成 ES 细胞集落, 若是离散为单个细胞则较难生长和形成 ES 细胞集落<sup>[7]</sup>。本实验将其离散成单细胞后, 2 天后开始增殖, 增殖速度慢于细胞团块, 与文献报道一致。ES 细胞集落的消化与离散是分离和克隆 ES 细胞的关键环节。消化时间过长, 消化液浓度过大会损伤细胞, 使 ES 细胞死亡; 消化液浓度过低, 作用时间不足, 细胞难以离散, 需在实践中准确把握离散克隆的最佳时机。有的文献报道, 胰蛋白酶辅以胶原酶可以用于人类胚胎干细胞传代<sup>[8]</sup>, 但其对小鼠胚胎干细胞的分离效果有待进一步探讨。

昆明小鼠 ES 细胞建系培养成功率较低, 这可能由其种属特异性所决定<sup>[9]</sup>。本实验用免疫手术法分离培养了小鼠 ES 样细胞集落, 在体外传代 7~8 次后冻存。该细胞从集落形态、生长特性、组织化学分析, 证实其具有典型的 ES 细胞特性, 但确定冻存细胞的全能性, 还需进行嵌合体或核移植等进一步

实验。用免疫手术分离小鼠 ICM 的方法最早出现于 1975 年<sup>[10]</sup>, 本实验室也曾用于小鼠嵌合体的制备, 并得到了性成熟且产生后代的嵌合体小鼠<sup>[9]</sup>, 但未曾看到用于昆明小鼠胚胎干细胞建系的详细报道。目前文献中 ES 细胞的原代培养多采用整胚接种或机械分离 ICM 的方法, 然后进行克隆筛选, 原代培养物中存在的已分化的滋养层细胞可能会影响到建系的效率, 因此本研究对今后昆明小鼠及其他哺乳动物 ES 细胞建系有一定借鉴。

### 参考文献(References)

- [1] Evans MJ *et al.* *Nature*, 1981, **292**: 154
- [2] Martin GR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 7634
- [3] Smith AG *et al.* *Dev Biol*, 1987, **121**: 1
- [4] 童 英等. *北京大学学报(自然科学版)*, 2000, **36**: 472
- [5] 张肇英等. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 1990, **21**: 438
- [6] 董 晓等. *畜牧兽医学报*, 2002, **33**: 433
- [7] 孟国良等. *遗传*, 2001, **23**: 292
- [8] Suemori H *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **345**: 926
- [9] 秦茂林等. *第三军医大学学报*, 2001, **23**: 1071
- [10] Solter D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72**: 5099

## Isolation and Culture of Mouse Embryonic Stem Cells of Kunming Species *in Vitro*

Yu Li\*, Lin Liang, Zhen-Fei Wang, Rui-Zhen Jia, Bao-Zhen Dai, Yao Li

(Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

**Abstract** To investigate the method of establishing embryonic stem (ES) cell line from Kunming species mouse, inner cell masses (ICMs) isolated by immunosurgery from 4.5 d blastocysts of Kunming species mouse were cultured on the fetal mouse fibroblast cell feeder layers. The ES cell-like colonies were passaged by trypsin-EDTA digest method to 8th generation. Identified by phasecontrast microscope observation and AKP staining, the obtained ES-like cells proved to be AKP intensively positive and able to form typical ES-like colonies. This research confirmed that immunosurgery is suitable for establishing ES cell lines from Kunming species mouse and the cells obtained still maintain the main characteristics of ES cell.

**Key words** mouse; embryonic stem cells; immunosurgery; inner cell mass

Received: May 18, 2007 Accepted: August 28, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30460054) and the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Municipality (No.200408020405)

\*Corresponding author. Tel: 86-471-4995867-8017, E-mail: liyu\_cn@hotmail.com