

用 BRL-3A 条件培养基培养鸡胚胎干细胞的初步研究

孟春花 张传生¹ 杨娜娜² 王子玉³ 曹少先 杜立新^{4*}

(江苏省农业科学院畜牧研究所, 南京 210014; ¹河北科技师范学院动物科学系, 昌黎 066600; ²泰山医学院生命科学研究所以, 泰安 271000; ³南京农业大学动物科技学院, 南京 210095;

⁴中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

摘要 以 CEF 细胞、MEF 细胞和 STO 细胞为饲养层, 用 BRL-3A 条件培养基培养寿光鸡 X 期胚盘细胞, 并对获得的细胞克隆进行了鉴定, 证明其具有 ES 细胞的克隆形态、PAS 染色阳性、AKP 染色阳性、能分化为多种类型的细胞、能参与受体胚胎的发育并形成羽色嵌合体。实验结果表明: BRL-3A 条件培养基能促进鸡 ES 细胞克隆的形成, 用饲养层比不用饲养层更有利于克隆的形成, 且 STO 细胞和 MEF 细胞饲养层的培养效果要好于 CEF 细胞饲养层($P < 0.05$); 挑克隆传代法比全消化法更有利于克隆的形成和未分化状态的维持($P < 0.05$)。

关键词 鸡; 胚盘细胞; 胚胎干细胞; 大鼠肝细胞条件培养基

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)是能进行无限增殖和自我更新的未分化细胞, 具有分化为所有类型的体细胞和生殖系细胞的能力。建立高效、稳定的 ES 细胞系是将其用于转基因动物生产、进行疾病治疗的前提。自 1981 年 Evans 等^[1]从延迟着床的小鼠囊胚成功获得 ES 细胞以来^[1], ES 细胞的研究已在多种动物上获得了突破性进展。由于鸡特殊的生理和解剖学特点, 鸡胚的早期发育在母鸡体内进行, 在鸡蛋排出体外时已经发育到 4~6 万个细胞, 相当于哺乳动物的囊胚阶段。所以, 鸡 ES 细胞大都是通过分离培养 X 期胚盘细胞或孵化 5.5 天鸡胚的原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)获得的^[2,3]。

体外适宜的培养条件对促进 ES 细胞的增殖和维持未分化状态非常重要。培养液中添加白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及干细胞因子(stem cell factor, SCF)等可以有效抑制 ES 细胞的分化和促进其增殖, 但成本较高。巴布罗大鼠肝细胞条件培养基(buffalo rat liver cell conditioned medium, BRL-CM)可以提供分化抑制因子(differentiating inhibitory factor, DIF)抑制 ES 细胞的分化^[2]。Petitte 等^[4]用 BRL-CM 培养了禽类的 ES 细胞, 国内还未见用条件培养基培养鸡 ES 细胞的报道。本研究优化了用 BRL-CM 培养寿光鸡 X 期胚盘细胞的培养条件, 并对获得的细胞克隆进行了 ES 细胞特性鉴定, 为建立可无限增殖的鸡 ES 细胞系打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞 寿光鸡: 购自山东省寿光市慈伦种鸡场, 毛色基因型为 CCOOEE, E 为色素扩散基因, 黑色对显性白羽为隐性, C 为色素基因, O 为氧化酶基因。海兰白种鸡蛋: 购自山东省泰安市东岳种鸡场, 毛色基因型为 IICCOO, I 为色素抑制基因, 可掩盖黑色和浅黄色。昆明白小鼠: 购自山东省泰安市生物制品研究所。巴布罗大鼠肝细胞(buffalo rat liver cell, BRL-3A 细胞): 购自中科院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。STO (a SIM mouse embryo-derived thioguanin and ouabain-resistant fibroblast cell line) 细胞: 中国农科院北京畜牧兽医研究所冯书堂研究员惠赠。

1.1.2 主要试剂 DMEM(高糖)、胎牛血清(FBS, ES cell culture tested)、丙酮酸钠、PBS、胰蛋白酶、鸡血清、 β - 巯基乙醇购自 Gibco 公司; 小鼠白血病抑制因子(mLIF)、bFGF、SCF、丝裂霉素 C (mitomycin C) 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 BRL-CM 的制备 用 DMEM+10% FBS 培养液于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度下培养 BRL-3A 细胞,

收稿日期: 2007-11-06 接受日期: 2008-03-31

北京市自然科学基金重点资助项目(No.05E143)

* 通讯作者。Tel: 010-62819997, Fax: 010-62819997, E-mail:

lxdu@263.net

3 天后收集培养液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。用前用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤, 并调节 pH 至 7.5^[4]。与含有 15% FBS 和 1 000 IU/ml mLIF 的 DMEM (ES 完全培养基) 按照 4:1 的比例混和, 加入以下物质使终浓度为: 2 mmol/L 谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、0.1 mmol/L β - 巯基乙醇、1 mmol/L HEPES、100 IU/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、2% 鸡血清。

1.2.2 成纤维细胞的培养及饲养层的制备 用生长良好的 3~5 代鸡胚成纤维细胞(CEF)、小鼠成纤维细胞(MEF)^[5,6]制备饲养层, PBS 洗两遍后加入含 10 $\mu\text{g/ml}$ 丝裂霉素 C 的培养液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 1.5~2 h。倒出丝裂霉素 C 培养液并用 PBS 洗多次, 完全去除丝裂霉素 C。常规胰蛋白酶消化, 轻轻吹打使其分散成单细胞悬液。调整细胞至合适密度, 接种于明胶包被的 24 孔培养板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度下培养。

1.2.3 鸡胚 X 期胚盘细胞的分离、培养及传代 寿光鸡的新鲜种蛋用 1% 新洁尔灭浸泡消毒 15 min。用纸环法^[7]分离整个胚盘, 置于盛有 PBS 的平皿中, 去除卵黄膜和卵黄颗粒, 只留明区。PBS 漂洗, 100 g 离心 5 min, 收集细胞团, 用消化液(0.25% 胰蛋白酶+0.04% EDTA)消化 2~3 min 后, 再用移液器吹打几下, 离心弃去消化液, 用 PBS 洗 2 遍后加入 ES 细胞培养液, 吹散后移入事先铺有饲养层的培养板中培养, 细胞接种密度为每毫升培养液一枚胚盘, 每 24 h 换液一半。注意观察细胞的生长情况, 用口吸管挑选生长良好、无分化迹象的克隆, 用消化液消化 3~5 min 后, 再用口吸管轻轻吹打, 并借助剥离针将其分散为小细胞团, 置于新制备的饲养层上培养。

1.2.4 鸡 ES 细胞的鉴定 (1)形态学鉴定 每天观察细胞集落的生长情况, 包括克隆形态、克隆数等。(2)PAS 染色鉴定^[8,9] 吸去培养皿中的培养液, 用 PBS 洗两遍后, 用 4% 多聚甲醛 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min, PBS 洗后分别依次加入高碘酸溶液放置 5 min 和希夫氏试剂放置 15 min, 最后用水轻轻冲洗 3 遍, 晾干后中性树胶封片, 在倒置显微镜下观察并拍照。(3)AKP 染色鉴定 取生长状态良好的细胞克隆接种在放有明胶预处理的无菌盖玻片的培养皿中, 培养 24 h。吸去培养液, 用 4% 多聚甲醛 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min。吸去固定液后用蒸馏水洗 2 次, 加入 BCIP/NBT 染色液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育染色 1.5 h。流水轻轻冲洗, 晾干后用中性树胶封片。(4)体外分化实验 挑选生长良好的克隆, 置于无饲养层、无 LIF 的培养液中培养, 观察细胞生长分化状况。(5)嵌合体鸡的制作 挑取生长状态良好的

克隆, PBS 清洗后 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化 40 s, 轻轻吹打并调节密度($10^6\sim 10^7$ 个/ml), 取 2~5 μl 单细胞悬液注入受体种蛋(海兰白)的胚盘下腔, 转入代用蛋壳中, 滴加双抗 1 滴(青霉素浓度: 250 IU/ml, 链霉素浓度: 250 $\mu\text{g/ml}$), 用蛋壳封口, 孵化至出雏。

1.2.5 数据分析 实验数据用 SPSS11.5 的 ANOVA 模块进行分析比较。

2 结果

2.1 CEF 细胞、MEF 细胞、STO 细胞和 BRL-3A 细胞的培养

BRL-3A 细胞贴壁生长, 呈不规则多边形(图 1A)。MEF 细胞(图 1B)和 CEF 细胞(图 1C)均呈长梭形, 接种密度为 5×10^5 个/ml 时, 两天即可铺满。STO 细胞(图 1D)是经过筛选和纯化的小鼠成纤维细胞系, 呈圆形或椭圆形。

2.2 鸡 ES 细胞生长特性及鉴定结果

分离寿光鸡 X 期胚盘明区细胞在饲养层上培养, 第 2 天开始出现小的克隆, 以后克隆逐渐长大, 6 天左右便需要传代, 否则将会分化。克隆具有类似于小鼠 ES 细胞的形态: 细胞界限不清, 克隆边缘整齐, 核大, 核仁明显, 有的呈典型的鸟巢状(图 2A), 有的呈不规则形态。克隆经 PAS 染色呈紫红色, 饲养层细胞不着色(图 2B)。挑取克隆进行 AKP 染色呈蓝紫色(图 2C)。细胞克隆可自发分化为成纤维细胞样细胞、肌肉样细胞等多种类型的细胞(图 2D)。将第 3 代的克隆细胞注入受体胚盘后形成羽色嵌合体, 获得了 3 只孵化 15~19 天的嵌合体鸡胚(图 2E), 颈部、翅部和腹部有白羽嵌合。

2.3 条件培养基与 LIF 对鸡 ES 细胞培养效果的影响

为了研究条件培养基与 LIF 对鸡 ES 细胞培养效果的影响, 用 100% BRL-CM、80% BRL-CM+20% ES 细胞完全培养基和 100% ES 细胞完全培养基, 在 STO 细胞饲养层上培养鸡胚盘细胞, 观察细胞克隆的生成情况。结果表明: 用 80% BRL-CM 的培养效果好于用含 LIF 的 100% ES 细胞完全培养基但差异不显著, 二者比用 100% BRL-CM 的培养效果好 ($P<0.05$) (表 1)。

2.4 不同饲养层对鸡 ES 细胞克隆形成的影响

分别以 CEF 细胞、MEF 细胞、STO 细胞为饲养层, 用 BRL-CM 培养分散的胚盘细胞, 使用饲养层比不用饲养层培养效果好 ($P<0.01$), 用 MEF 细胞、

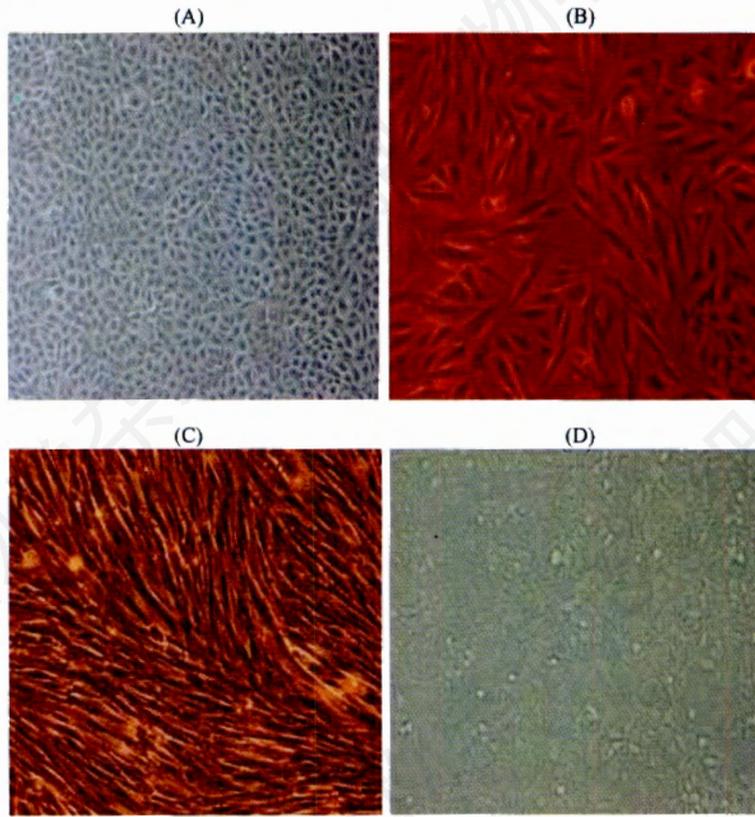


图1 BRL-3A 及饲养层细胞(100×)

A: BRL-3A 细胞; B:MEF 细胞; C: CEF 细胞; D: STO 细胞。

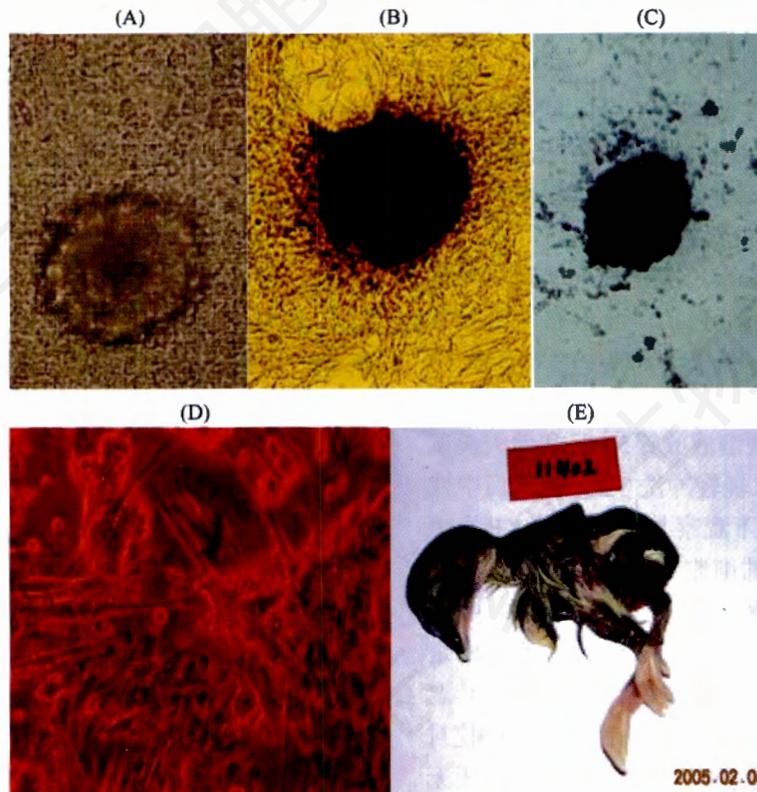


图2 鸡 ES 细胞形态及鉴定结果图

A: 饲养层上生长的鸡 ES 细胞克隆(200×); B: PAS 染色阳性的鸡 ES 细胞克隆(200×); C: AKP 染色阳性的鸡 ES 细胞克隆(200×); D: 鸡 ES 细胞自发分化为多种细胞类型(200×); E: 注入海兰白受体种蛋后形成的羽色嵌合体。

表 1 不同培养液对鸡 ES 细胞分离效果的影响

培养液种类	原代培养	继代培养
	克隆数	克隆数
100% BRL-CM	11.2±7.1 ^a	10.2±1.8 ^a
80% BRL-CM+20% ES 细胞完全培养基	35.0±5.2 ^b	31.1±13.5 ^b
含 LIF 的 100% ES 细胞完全培养基	28.7±2.4 ^b	23.1±3.9 ^b

同列不同上标表示两者差异显著($P<0.05$), 相同上标表示差异不显著。

表 2 饲养层对鸡 ES 细胞克隆形成的影响

饲养层	对照	CEF	MEF	STO
原代培养克隆数	0.3 ^a	3.6 ^b	16.4 ^c	21.3 ^c
继代培养克隆数	1.3 ^a	7.5 ^b	15.4 ^c	13.1 ^c

同列不同上标表示两者差异显著($P<0.05$), 相同上标表示差异不显著。

表 3 传代方法对鸡 ES 细胞克隆形成的影响

传代方法	平均克隆数
挑克隆法	25.0 ^a
全消化法	7.6 ^b

同列不同上标表示两者差异显著($P<0.05$), 相同上标表示差异不显著。

STO 细胞饲养层的培养效果明显好于 CEF 细胞饲养层($P<0.05$), STO 与 MEF 饲养层的培养效果差异不显著($P>0.05$) (表 2)。

2.5 传代方法对鸡 ES 细胞克隆形成的影响

传代过程中, 挑克隆是在体视显微镜下进行的, 小的克隆不能被完全挑出。为克服这一弊端, 本实验尝试了克隆连同饲养层一起消化的方法, 在换液时去除漂浮的原饲养层细胞。结果发现: 全消化法降低了 ES 细胞的纯度, 可能原饲养层细胞干扰了新饲养层的生长, 因此形成的细胞克隆数目少, 体积较小, 且易分化。所以最好采用挑克隆的方法, 只挑取未分化的克隆, 用胰蛋白酶消化辅助机械分离的方法传代(表 3)。

3 讨论

鸡 ES 细胞的来源大多是 X 期鸡胚胚盘细胞或迁移中的 PGCs。Petitte 等^[4]通过不断添加胚盘细胞, 将 ES 细胞培养到 35 代, 胚盘细胞能提供利于 ES 细胞生长的基质, 从而有利于细胞的增殖和克隆的形成。由于禽类特殊的生理和解剖学特点, 选择 X 期的胚盘细胞是不用进行产蛋前诱导的最早最方便的时期, 而且用明区细胞易获得体细胞和生殖细胞的嵌合体, 并容易检测其全能性^[4,5]。

建立鸡 ES 细胞系过程中存在两个关键问题: 一是促进其增殖, 二是抑制其分化。目前, 要达到

以上两个目的主要靠添加 LIF 等细胞因子、使用饲养层和条件培养基。LIF 可通过 LIF-gp130-STAT3 途径激活 Ras、细胞外调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)、JAK^[10,11]。添加外源重组鸡 LIF 可使鸡 ES 细胞在未分化状态下长期培养^[10-13]。LIF 通过与 PGCs 表面受体 LIFR 结合促进小鼠 PGCs 在体外的增殖。多种细胞因子如 LIF、bFGF、IGF-I 和 SCF 联合使用更有利于鸡 ES 细胞的增殖和未分化状态的维持^[3,7], 且 LIF 对鸡 ES 细胞克隆的形成呈剂量依赖性的关系^[6,7,12]。但由于细胞因子价格昂贵, 这一方法增加了建立 ES 细胞系的成本。Smith 等^[14]用 BRL-CM 抑制了无饲养层条件下 ES 细胞的自发分化。邱观婷等^[15]用 BRL-CM 培养小鼠囊胚细胞建立了小鼠的 ES 细胞系。Yang 等^[16]用 CEF 和 LMH-CM (鸡肝癌细胞条件培养基) 组合维持了小鼠 ES 细胞的全能性, 但当用于培养鸡 ES 细胞时, 明区分散的细胞迅速分化为成纤维细胞; 但 STO 和 BRL-CM 组合能将胚盘细胞培养到 20 代以上^[4]。Zhang 等^[17]用 BRL-CM 培养的小鼠 ES 细胞, 在 RA 的诱导下得到了较高纯度的神经前体细胞(neural precursor cells, NPCs), 最后分化为多种神经细胞。用条件培养基培养鸡 ES 细胞减少了购买昂贵的细胞因子的投入, 更适合体外大量培养。本实验结果也证明 BRL-CM 可维持鸡 ES 细胞的未分化状态, 与含有 LIF 的 ES 完全培养基按一定比例配合效果更好。

ES 细胞是饲养层依赖型的, 饲养层细胞一方面可促进 ES 细胞的附着贴壁生长, 另一方面可分泌多种生长因子以抑制 ES 细胞的分化。在无饲养层条件下, ES 细胞很快分化, 失去 ES 细胞的诸多特性^[7,12]。Pain 等^[7]发现用 STO 细胞培养鸡 ES 细胞的效果要好于 CEF 细胞, 可传至第 35 代。MEF 细胞、STO 细胞均为小鼠成纤维细胞系, 由于 STO 细胞能分泌 LIF (含量在 500~1 000 IU/ml), 而且 STO 细胞是已建成的细胞系, 可进行长期体外培养、传代和冻存, 省去了制作原代成纤维细胞时准备怀孕母鼠等繁琐工作, 因而被用作制备饲养层的首选细胞系。

传代时借助胰蛋白酶消化和机械吹打作用将细胞克隆分散成为小细胞团更有利于克隆的形成、有助于发挥细胞间的协同作用、促进传代克隆的增殖; 如果细胞团过大, 则克隆易分化且形成率降低。传代时为了防止自发分化, 接种密度要高, 以保持细胞间的协同作用从而促进细胞的分裂增殖。密度过小或饲养层质量差均可使 ES 细胞生长停滞。用胰蛋

白酶将ES细胞克隆和饲养层一起消化来传代的方法也可以获得较多克隆,但该方法影响了饲养层的质量,不能支持ES细胞的长期传代。

建立鸡ES细胞系是生产转基因鸡生物反应器进行药物开发和生产的一种重要途径,对其他的动物ES细胞的研究也具有重要的借鉴意义。总之,本实验研究了用BRL-CM培养鸡ES细胞的条件,为建立无限增殖的鸡ES细胞系打下了基础。

参考文献(References)

- [1] Evans MJ *et al. Nature*, 1981, **292**: 154
 [2] Eyal-Giladi H *et al. Dev Biol*, 1976, **49**: 321
 [3] Park TS *et al. Mol Reprod Dev*, 2000, **56**: 475
 [4] Petite JN *et al.* 1994, United States Patent, 5,340,740
 [5] 王杏利等. *陕西农业科学*, 1999, (6): 17
 [6] 安 静等. *动物学报*, 2003, **49**: 698
 [7] Pain B *et al. Development*, 1996, **122**: 2339
 [8] Petite JN *et al. Poult Sci*, 1997, **76**: 1084
 [9] Jung JG *et al. Stem Cells*, 2005, **23**: 689
 [10] Niwa H *et al. Genes Dev*, 1998, **12**: 2048
 [11] 赵 明等. *生命科学*, 2005, **17**: 19
 [12] 王 娟等. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**: 69
 [13] Horiuchi H *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 24514
 [14] Smith AG *et al. Dev Biol*, 1987, **121**: 1
 [15] 邱观婷等. *中山医科大学学报*, 2000, **21**: 100
 [16] Yang Z *et al. Poult Sci*, 1994, **73**: 965
 [17] Zhang XZ *et al. ACAD J XJTU*, 2003, **15**: 55

Preliminary Study on Culture of Chicken Embryonic Stem Cells by Buffalo Rat Liver Cells Conditioned Medium

Chun-Hua Meng, Chuan-Sheng Zhang¹, Na-Na Yang², Zi-Yu Wang³, Shao-Xian Cao, Li-Xin Du^{4*}

(*Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; ¹Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600, China; ²Institute of Life Science, Taishan Medicine University, Tai'an 271000, China; ³College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ⁴Institute of Animal, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China*)

Abstract The culture system of chicken embryonic stem (ES) cells by buffalo rat liver cells conditioned medium (BRL-CM) was optimized. Stage X blastoderm cells of Shouguang chicken were cocultured with feeder layers (CEF, MEF and STO) in BRL-CM. The clone was identified by morphology, PAS staining, AKP staining, constructing chimeras and differentiation *in vitro*. Results showed that BRL-CM could stimulate chicken ES cells proliferation. Feeder layers could maintain the proliferation and undifferentiation of chicken ES colonies. Compared with CEF feeder layers, MEF and STO feeder layers were more ideal in culture of chicken ES cells ($P < 0.05$). The passage method of picking colonies was more efficient than trypsin digestion ($P < 0.05$).

Key words chicken; blastoderm cells; embryonic stem cells; BRL-3A conditioned medium

Received: November 6, 2007 Accepted: March 31, 2008

This work was supported by the Major Program of the Natural Science Foundation of Beijing (No.05E143)

*Corresponding author. Tel: 86-10-62819997, Fax: 86-10-62819997, E-mail: lxd@263.net