

## 研究简报

## 鸡胚卵巢源类 ES 细胞的培养和鉴定

耿立英<sup>1</sup> 张传生<sup>1\*</sup> 尹春光<sup>2</sup> 杜立新<sup>3\*</sup> 刘铮铸<sup>1</sup> 付志新<sup>1</sup> 颜静蕊<sup>1</sup><sup>1</sup> 河北科技师范学院生命科技学院, 昌黎 066600; <sup>2</sup> 济宁学院生命科学与工程系, 济宁 273155;<sup>3</sup> 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

关键词 鸡; 卵巢性原细胞; 体外培养

来源于原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)的胚胎生殖细胞(Embryonic germ cells, EGCs), 与来自内细胞群的细胞一起统称为胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs), 具有增殖能力强和可分化为机体所有细胞和组织的能力, 在基础研究和转基因动物研制中具有广泛的应用前景。自1996年Pain等<sup>[1]</sup>从鸡X期胚盘细胞中首次分离出能在体外持续增殖且具有多向分化潜能的ES细胞以来, 国内外学者又相继获得鸡EG细胞和类ES细胞特性的精原干细胞(Spermatogonial stem cells, SSCs), 有关鸡干细胞的研究已经成为当前生命科学领域的热点<sup>[2-5]</sup>。

之前的研究显示, 哺乳动物卵巢中存在着雌性生殖干细胞(Female germline stem cells, fGSCs), 其来源于原始生殖细胞(PGCs)<sup>[6]</sup>。2009年, Zou等<sup>[7]</sup>首次由新生小鼠的雌性生殖干细胞获得类ES细胞, 并在体外进行成功传代。这提示我们从鸡卵巢中分离获得ES细胞也是一个可能的途径, 目前有关此类研究还未见报道。本试验参考小鼠fGSCs和鸡ES细胞培养体系, 以18~20日龄的鸡卵巢性原细胞为材料, 探讨由其分离培养类ES细胞的可行性, 以期为ES细胞的来源开辟新的途径。

本试验采用的受精蛋来源于河北科技师范学院实验禽场海兰鸡群, 在38.0℃、相对湿度为60%的条件下孵化。

本试验所用的试剂有: 高糖DMEM(Gibco), 胰蛋白酶(Gibco), FBS(Gibco), 胎牛血清(Sigma), 鸡血清(Gibco), 胶原酶(Sigma), 丝裂霉素-C(Roche), L-谷氨酰胺(Sigma), 丙酮酸钠(Sigma), 非必需氨基酸(Gibco),  $\beta$ -巯基乙醇(Gibco), bFGF(Peprotech), hSCF(Peprotech), hIGF(Peprotech), mLIF(Sigma), GDNF(R&D systems), ES细胞鉴定试剂盒(Millipore), 山羊抗鼠二抗(碧云天公司)。

ES细胞培养液(成分)的配制: DMEM +2 mmol/L

L-谷氨酰胺+0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇+1 mmol/L HEPES+ $1 \times 10^5$  U/L 青霉素+ $1 \times 10^5$   $\mu$ g/L 链霉素+ $1 \times 10^6$  U/L LIF+ $1 \times 10^4$  ng/L SCF+ $1 \times 10^4$  ng/L FGF+ $1 \times 10^4$  ng/L IGF-I+ $4 \times 10^4$  ng/L GDNF+10% 胎牛血清+2% 鸡血清+1% 非必需氨基酸。

卵原细胞的分离: 孵化第18天, 用75%的酒精擦洗消毒种蛋。无菌获取雌性左侧卵巢, 置于PBS溶液中浸洗3次。在体视显微镜下剥离白膜和血管。剪碎, 加入适量的无钙、镁离子的PBS溶液吹打数次, 移入离心管中静置5 min, 弃上清液, 用10倍于组织块体积的1 mg/ml 胶原酶消化, 在37℃下作用30 min, 期间每隔5 min 混匀一次。第一次消化后500 r/min 离心2 min, 弃上清液, 之后用0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 溶液继续消化5 min, 收集细胞悬液, 加含血清的培养基终止消化, 过300目不锈钢滤网, 滤液以1 200 r/min 离心5 min, 弃上清液, 再用ES细胞完全培养基重新悬浮细胞。机械吹打5 min后, 接种于24孔培养板中, 每孔加600  $\mu$ l 细胞液, 于培养箱中连续培养(37℃, 5%CO<sub>2</sub>), 每天半量换液一次。

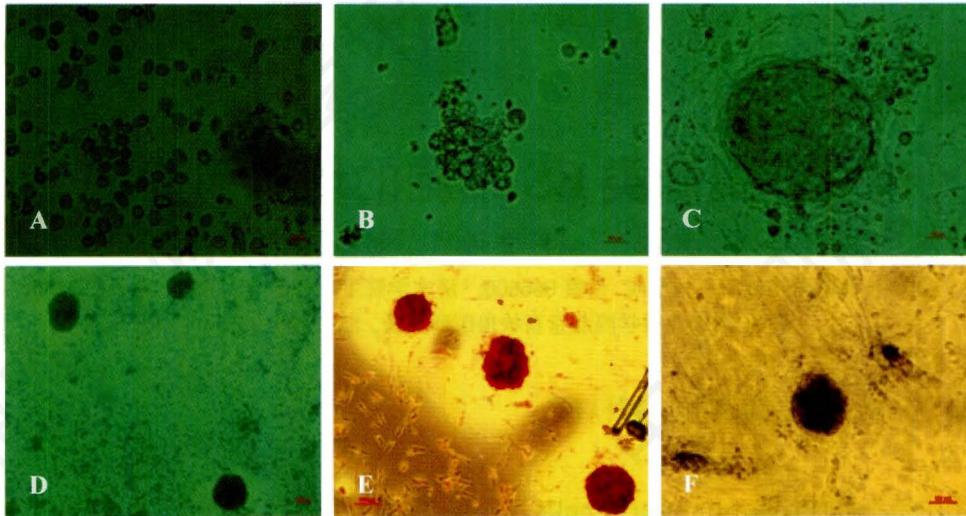
饲养层的制备: 取STO细胞, 弃掉原培养液, 用PBS溶液清洗, 然后加入含有10  $\mu$ g/ml 丝裂霉素-C的DMEM, 37℃孵育2 h左右, 弃去含丝裂霉素-C培养液, 用PBS溶液清洗, 用0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液消化后, 制备单细胞悬液, 并调整细胞浓度为 $5 \times 10^5$  个/ml。在已经吸去明胶的培养皿中加入细胞悬液, 于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养。

细胞继代培养: ES细胞样集落出现4~5天, 其周围开始出现少许分化迹象即应传代。挑取生长良

收稿日期: 2010-07-28 接受日期: 2010-09-15

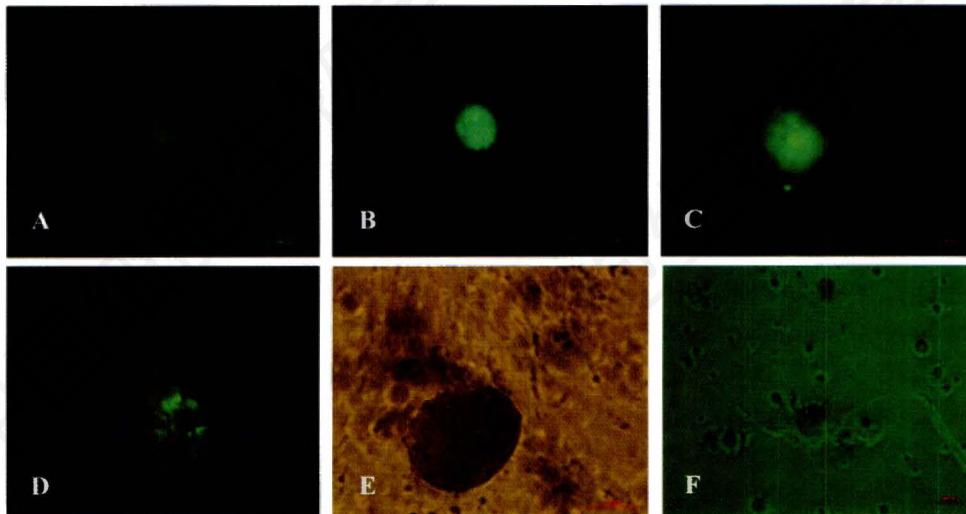
河北省自然科学基金(No.C2008001308)和国家科技支撑计划课题(No.2008BADB2B04-8-4)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0335-2039629, E-mail: cszhang1976@126.com; Tel: 010-62819997, E-mail: lxdu@263.net



**Fig.1 Formation and especial AKP/PAS staining analysis of like-ES cells from chicken embryonic ovarian gonocytes cells on feeder layer of STO**

A: chicken ovarian gonocytes  $\times 300$ ; B: cultured 2~3 d, formation of small clusters  $\times 50$ ; C: the primary ES like cell  $\times 400$ ; D: the 3 passages ES-like cells  $\times 250$ ; E: PAS staining  $\times 250$ ; F: AKP staining  $\times 250$ .



**Fig.2 Especial immunohistochemical analysis and differentiation *in vitro* of like-ES cells from chicken embryonic ovarian gonocytes cells on feeder layer of STO**

A: SSEA-1 light positive  $\times 250$ ; B: SSEA-1 light positive  $\times 250$ ; C: TRA-1-60 light positive  $\times 250$ ; D: TRA-A-81 light positive  $\times 250$ ; E: embryoid bodies formed in suspension after 8 d of culture  $\times 100$ ; F: the 3 passages ES-like cells differentiated into neuron-like cells  $\times 250$ .

好的细胞集落, PBS 溶液冲洗 2~3 次, 滴加 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化液 100  $\mu\text{l}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  消化 40 s 后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中中和, 枪头轻轻吹打细胞集落, 使细胞集落分散为小团块, 然后 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用 ES 细胞完全培养液重悬细胞沉淀, 调整密度为  $5 \times 10^4$  个/ml, 接种于预先制备好的 STO 饲养层上, 于培养箱中连续培养, 每天半量换液一次, 以后同样传代。

**碱性磷酸酶(AKP)活性检测:** 选取 3 代生长良好的 ES 细胞样集落, 参照 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(碧云天公司)说明书进行 AKP 活性检测, 观

察并拍照。

**PAS 染色检测:** 选取 3 代生长良好的 ES 细胞样集落, 参照 PAS 染色试剂盒(碧云天公司)说明书进行 PAS 特异性染色, 观察并拍照。

**免疫细胞化学染色:** 选取培养 5~7 天生长良好的 ES 细胞样克隆进行 SSEA-1、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-A-81 免疫荧光检测。用预冷免疫染色固定液作用, 4 $^{\circ}\text{C}$  固定过夜; 然后用免疫染色洗涤液漂洗 3 次, 每次 3~5 分钟; 免疫染色封闭液封闭 1 h, PBS 溶液漂洗后在 24 孔培养板每孔加入标记的 SSEA-1 抗体稀释液 100  $\mu\text{l}$ , 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, PBS 溶液漂洗 3 次, 每次 5~6 min; 再

加入 FITC 标记的山羊抗鼠二抗 25  $\mu\text{l}$ , 室温作用 1 h, PBS 溶液漂洗 3 次, 每次 5~6 min。最后每孔加抗荧光淬灭封片液 200  $\mu\text{l}$  于荧光显微镜下观察、拍照。

体外分化试验: 将鸡胚卵巢源的 ES 细胞样集落常规传代, 稍微缩短消化时间, 并轻轻吹打, 使其分散为小细胞团块, 转移到培养皿中(35 mm), 培养液中不添加任何生长因子, 每天用吸管吹打, 观察类胚体形成情况。

## 鸡胚卵巢性原细胞的鉴定

在倒置显微镜下观察, 刚分离得到的鸡胚卵巢性原细胞基本上与支持细胞分布均匀, 呈圆形或椭圆形, 但个体明显较体细胞大(图 1A)。培养 24 h 时, 发现有性原细胞组成的小集落, 且已贴壁(图 1B)。

## 鸡胚卵巢源 ES 细胞样克隆传代后的生长行为

原代 ES 细胞样克隆与支持细胞共培养培养至第 3~5 天, 出现典型鸟巢状集落, 边缘清晰, 且多被支持细胞包围(图 1C)。待集落较大, 周边开始分化时, 及时传代(一般 4~5 天)。离散成小团块的细胞克隆, 在 24 h~48 h 内, 就会聚集增殖成集落, 但此时, 集落并不典型。培养至 72 h, 则会有鸟巢状结构的集落出现(图 1D)。传至 3 代 ES 细胞样克隆有开始分化的趋势, 主要表现为细胞团边缘细胞出现纤维状结构。

## PAS 与 AKP 染色

传至 3 代 ES 细胞样克隆 PAS 染成红色(图 1E), AKP 染色呈红棕色, 而 STO 细胞饲养层染成浅黄色或不着色(图 1F)。

## 免疫组化染色

ES 细胞免疫组化染色结果显示, 在荧光显微镜下, 传至第 3 代的 ES 细胞样克隆集落的细胞呈 SSEA-1(图 2A)、SSEA-4(图 2B)、TRA-1-60(图 2C)和 TRA-A-81(图 2D)阳性, 周边部分细胞阴性或弱阳性。

## 体外分化实验

离散的鸡 ES 细胞样克隆在悬滴培养 2 天后重新聚集, 形成拟胚体, 在悬浮培养中拟胚体继续聚集, 体积进一步增大, 5~10 天悬浮培养后, 拟胚体表面光滑, 最外层分化为较大细胞组成的内胚层样结构, 中心为未分化细胞(图 2D)。

将第 3 代生长状态良好的 ES 细胞样克隆置于无饲养层无 LIF 因子的培养液中培养, 1~2 天即可出现分化现象, 分化的 ES 细胞样克隆形态发生明显变化, 克隆边界消失且体积增大, ES 细胞样克隆可以自发分化为成纤维样细胞、神经元样细胞等多种类型细胞(图 2E)。

目前, 鸡 ES 细胞主要由 X 期胚盘细胞和 PGCs 两种途径分离, 但前者获得的 ES 细胞性腺嵌合低, 而后者获得 EG 细胞操作复杂, 均限制了 ES 细胞的培养和应用<sup>[8,9]</sup>。最近, Mitsuru 等<sup>[10]</sup>发现 18~20 日龄鸡胚的性原细胞, 仍具有与 PGCs 类似的迁移和性腺嵌合能力。国内外学者相继从鸡胚和雏鸡睾丸中分离获得类 ES 细胞, 并建立了成体睾丸移植高效制备转基因鸡的新途径<sup>[11,12]</sup>。近期, 小鼠卵巢雌性生殖干细胞的分离成功, 提示鸡胚源卵巢也可能是分离类 ES 细胞的新材料<sup>[7]</sup>。

本研究, 参考小鼠雌性生殖干细胞的培养体系及前期建立的鸡 ES/EG 细胞培养条件<sup>[7,11,12]</sup>, 采取 LIF 等细胞因子联合应用 STO 饲养层的方式得到具有部分 ES 细胞特征的 ES 细胞样克隆。研究发现, 原代培养在不使用饲养层情况下, 卵巢性原细胞与基质细胞共培养时, 即使在不添加生长因子的情况下, 也可以形成 ES 细胞样克隆, 但其很快就向成纤维样细胞分化, 而在添加生长因子情况下, 类 ES 细胞克隆则可以较长时间维持(大约 2 周), 这表明卵巢基质细胞可以分泌维持类 ES 细胞未分化状态的生长因子, 并可以为其提供了一个良好的增殖环境, 而 LIF 等生长因子可以抑制其分化。这与由鸡生殖嵴 PGCs 分离得到的原代 EG 细胞生长特性相似<sup>[11]</sup>。从细胞克隆形态上来看, 原代 ES 细胞样克隆, 边缘十分清晰, 细胞隆起明显, 立体感强, 且多为规则的圆形或椭圆形, 周围被成纤维样细胞紧密包围。鸡卵巢源 ES 细胞类克隆在 STO 细胞饲养层继代培养时, 仍能形成细胞集落, 且其具有与鸡 ES 和 EG 细胞集落部分相同的化学性质(如 PAS、AKP)和细胞表面标志, 即本试验显示 SSEA-1、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-A-81 阳性, 其细胞表面标志与鸡和鸭 EG 细胞的完全相同<sup>[13,14]</sup>, 这意味着所分离得到的细胞可能具有与鸡 EG 细胞相同的特性。这与 Zhu 等<sup>[7]</sup>分离得到雌性生殖干细胞有诸多相似特性。体外分化试验结果表明, ES 细胞样克隆在不添加任何生长因子、无饲养层的情况下可以形成简单的胚体样结构, 当胚体自发分化时可以形成包括神经元样细胞在内的多种类型细胞。

基于多项鉴定实验结果, 本研究获得的鸡胚卵巢

源的ES细胞样克隆具有ES细胞的诸多特性。因此,鸡胚卵巢性原细胞可能作为ES细胞分离的又一方便来源。但本研究采用的培养体系仅获得短期传代的细胞克隆,说明所建立培养体系尚需进一步优化,以进一步延长其体外培养时间。更重要的是,该类型细胞是否具有参与鸡胚性腺嵌合的能力,或其经遗传修饰移植于成体性腺后是否具有产生转基因配子的能力,还有待深入研究。目前,课题组一方面正对所用生长因子的种类、浓度以及饲养层等影响因素进一步的优化,以期建立最佳体外培养体系,另一方面正选用PKH26对3代ES细胞样克隆进行标记示踪,观察其经X期胚盘下腔向生殖嵴迁移及其向PGCs分化的能力。

### 参考文献(References)

- 1 Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, *et al.* Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 1996; 122(8): 2339-48.
- 2 Laval F, Pain B. Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model. *Dev Growth Differ* 2010; 52(1): 101-14.
- 3 Wu Y, Ge C, Zeng W, Zhang C. Induced multilineage differentiation of chicken embryonic germ cells via embryoid body formation. *Stem Cells Dev* 2010; 19(2): 195-202.
- 4 Park TS, Han JY. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol Reprod Dev* 2000; 56(4): 475-82.
- 5 Jung JG, Lee YM, Kim JN, Kim TM, Shin JH, Kim TH, *et al.* The reversible developmental unipotency of germ cells in chicken. *Reproduction* 2010; 139(1): 113-9.
- 6 Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428(6979): 145-50.
- 7 Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, *et al.* Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 11(5): 631-6.
- 8 Laval F, Acloque H, Bachelard E, Nieto MA, Samarut J, Pain B. Ectopic expression of Cvh (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Dev Biol* 2009; 330(1): 73-82.
- 9 van de Lavoie MC, Mather-Love C. Avian embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 2006; 418: 38-64.
- 10 Naito M, Minematsu T, Harumi T, Kuwana T. Testicular and ovarian gonocytes from 20-day incubated chicken embryos contribute to germline lineage after transfer into bloodstream of recipient embryos. *Reproduction* 2007; 134(4): 577-84.
- 11 王娟, 杨娜娜, 杜立新. 从原始生殖细胞分离克隆鸡胚胎生殖细胞的研究. *中国生物工程杂志* 2004; 24(9): 69-73.
- 12 安静, 杜立新. 鸡胚胎干细胞的分离、培养和鉴定. *动物学报* 2003; 49(5): 698-703.
- 13 Wang Y, Hou L, Li C, Guan W, Chen L, Li X, *et al.* Isolation, culture and biological characteristics of primordial germ cells from Beijing fatty chicken. *J Reprod Dev* 2010; 56(3): 303-8.
- 14 Guan W, Wang Y, Hou L, Chen L, Li X, Yue W, *et al.* Derivation and characteristics of pluripotent embryonic germ cells in duck. *Poult Sci* 2010; 89(2): 312-7.

## Culture and Identification of ES-like Cells from Chicken Embryonic Ovarian

Li-Ying Geng<sup>1</sup>, Chuan-Sheng Zhang<sup>1\*</sup>, Chun-Guang Yin<sup>2</sup>, Li-Xin Du<sup>3\*</sup>, Zheng-Zhu Liu<sup>1</sup>, Zhi-Xin Fu<sup>1</sup>, Jing-Rui Yan<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>College of Life Science, Hebei Normal University, Changli 066600, China; <sup>2</sup>Life Sciences and Engineering Department of Jining University, Jining 273155, China; <sup>3</sup>Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100193, China)

**Abstract** This paper attempts to explore the feasibility of isolation and culture the ES cells from chicken embryonic ovarian gonocytes cells. The ES-Like cells were detected when the 18d chicken embryonic ovarian cells of were cultured in high glucose DMEM medium supplemented with LIF, bFGF, SCF, IGF and GDNF for primary culture and subcultured with STO feeder. The colonies had the morphology of nest-like and were positive for periodic acid-Schiff and alkaline phosphatase staining. They expressed the pluripotent markers such as SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-A-81. Furthermore, the ES-Like cells could form embryoid bodies and differentiate to all kinds of cell types *in vitro*. It seems that these cells also maintained characters of pluripotent stem cells.

**Key words** chicken; ovarian gonocytes cells; culture *in vitro*

Received: July 28, 2010

Accepted: September 15, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province(No.C2008001308) and the National Key Technology R&D Program(No.2008BADB2B04-8-4)

\*Corresponding author. Tel: 86-335-2039629, E-mail: cszhang1976@126.com; Tel: 86-10-62819997, E-mail: lxdu@263.net