

不同时期鸡胚原始生殖细胞分离的研究*

秦洁 肖小璐 李碧春*

(扬州大学畜牧兽医学院 江苏扬州 225009)

摘要 采用 Ficoll 密度梯度离心, 酶解离两种方法在鸡胚孵化的第 14 期、19 期、28 期, 分离、培养鸡胚中的原始生殖细胞(PGCs)。探索 PGCs 分离、培养的适宜时期及方法, 以期获得较多数量, 较高活力的 PGCs 作介导生产转基因鸡。结果表明: 1. 提取、分离 PGCs 的最佳时期依次为 19 期、28 期。2. 两种分离方法均能分离到一定数量的 PGCs 细胞。但在 19 期和 28 期, 酶解离法分离到的 PGCs 的相对数量较多, 存活时间较长, 是一种较适宜的分离方法。

关键词: 鸡胚 原始生殖细胞 分离

原始生殖细胞(Primordial Germ Cells, PGCs)是指能够发育为性细胞的前体细胞, 对物种延续至关重要。在雄性动物, PGCs 分裂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; 在雌性动物, PGCs 分裂形成卵母细胞。对体外培养的 PGCs 进行研究, 有助于揭示体内一些多潜能干细胞的生理生化及生物学特性, 从而为解决发育生物学、细胞生物学等方面的理论问题以及转基因动物的生产、嵌合体制作等方面的实际问题提供新的思路、方法, 具有重要的理论意义及生产实践价值。但由于胚胎发育中 PGCs 数量较少, 常与体细胞混合^[1], 故培养时很难大量收集和纯化; 此外, 与哺乳动物相比, 禽类的受精卵含有大量的卵黄, 给 PGCs 的分离、纯化带来了较大的困难。目前, 这方面的研究工作仅在小鼠^[2]、猪^[3]、牛^[4]的报道材料较多。本实验根据鸡 PGCs 的迁移、聚集规律^[5], 分别在第 14 期、19 期、28 期这 3 个聚集高峰期对 PGCs 的体外分离、培养进行系统研究, 为人工分离鸡 PGCs 提供了坚实的实验依据, 为建立鸡 PGCs 细胞系乃至转基因鸡生产奠定了基础。

材料与方 法

1. 种蛋的来源和孵化

种蛋为中国农业科学院家禽所提供的白来杭鸡种蛋。经消毒后, 在 38℃, 60% - 70% 湿度下孵化。孵化期按 Hamburger 和 Hamilton 建立的标准进行划分^[6]。

2. 试剂、溶液及配制

TCM-199: GIBCO(分装产品)

小牛血清: 杭州四季青(瓶装产品)

Ficoll-400: Pharmacia(瓶装产品)

TCM-199: 配制时溶解 TCM-199 粉末 9.85g, NaHCO₃ 1.55g, 加庆大霉素, 调 pH 至 7.2, 定容至 1000ml, 过滤除菌。

Trypsin-EDTA 细胞消化液: 配制时溶解 NaCl 8.5g、KCl 0.4g、NaHCO₃ 0.35g、D-葡萄糖 1g、胰蛋白酶 0.5g、EDTA 0.25g。加庆大霉素, 定容至 1000ml。

6.3% 和 16% 的 Ficoll: 按需要量取粉剂 Ficoll-400 溶于添加 10% FCS 的 TCM-199 溶液中即可。

3. 第 14 期血液中 PGCs 的提取

受精蛋孵化至第 14 期(孵化 50 - 53h), 提取鸡胚血液^[7]。

PGCs 的分离 将收集到的血液 1500 r/min 离心 5min, 沉淀用 0.1ml 不含小牛血清的 TCM-199 培养液重悬, 与 0.9ml 浓度为 16% 的 Ficoll 混匀, 其上覆盖 6.3% Ficoll 至界面清晰。3500/min 离心 30min。缓缓吸取界面处 200 - 500μl 液体, 加入 TCM-199 至 1ml。1500r/min 离心 5min, 重复两次, 洗去 Ficoll。沉淀最终溶于 1.5ml 添加 10% FCS 的 TCM-199 中。置 38℃, 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

4. 第 19 期生殖嵴 PGCs 的提取

受精蛋孵化至第 19 期(孵化 68 - 72h), 获取鸡胚生殖嵴。

生殖嵴部位的获得 无菌采取鸡胚, 用无钙镁的 PBS 浸洗 3 次, 在解剖显微镜下去其头、尾、心凸及肝突。取后肠前 1/3 的背外侧组织部位(生殖嵴部)。19 期的外渗区集中于尾侧到卵黄动脉间(如示意图 1)。

PGCs 的分离: 胰酶法分离 PGCs 将取下的生殖嵴部位用 PBS 浸洗 3 次, 5 - 10ml Trypsin-EDTA 细胞消化液室温下消化 5min, 消化时辅以硅化的玻璃吸管轻轻吹打使分散。以消化液用量 5% 的 FCS 终止消化。800 - 1000r/min 离心 8min, 弃上清, 调整细胞浓度至 10⁴ml⁻¹。置 38℃, 5% CO₂ 培养。24h 换液, 以后每 48h 换液 1 次。

本文 2003 年 4 月 7 日收到, 7 月 13 日接受。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助(30170678)。

** 通讯作者。E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

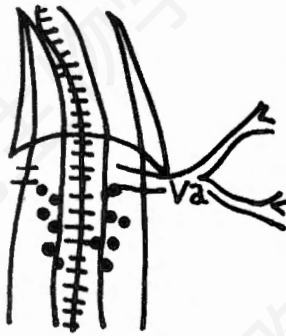


图1 鸡胚19期生殖嵴部位示意图

Va 表示卵黄动脉; 圆点表示 PGCs。

Ficoll 密度梯度法分离 PGCs 将取下的生殖嵴部用无钙镁的 PBS 浸洗 3 次, 同酶消化法将其消化。离心后收集细胞沉淀, 以后步骤同 3 进行 Ficoll 密度梯度提取 PGCs。

5. 第 28 期性腺 PGCs 的提取

受精蛋孵化至第 28 期(孵化约 5.5d), 获取鸡胚性腺。

鸡胚性腺的获取: 无菌采取鸡胚, 用无钙镁的 PBS 浸洗 3 次, 在解剖显微镜下去其头部, 腹面朝上, 在肾脏内侧可见两条对称的月牙形白色条带, 小心取下。此后步骤同 4 中采用胰酶分离法及 Ficoll 密度梯度法分离 PGCs。

6. Trypan Blue(台盼蓝)染色

采用 0.4% 的台盼蓝染色 2min, 死细胞被染成蓝色, 活细胞不着色。

7. PAS(Periodic acid-schiff, PAS)特异性染色

参照 Meyer 的 PAS 染色程序进行染色^[8]。

结 果

1. PGCs 的形态特点

在倒置相差显微镜下观察, 刚分离到的单个 PGCs 较体细胞大, 细胞周围有明显的光环。核大, 偏中央, 有的 PGCs 具伪足。红细胞则无明显的光环, 直径明显小于 PGCs。由于 PGCs 的细胞质中含有大量的糖原颗粒沉积, 而体细胞中糖原颗粒相对

较少, 因此 PGCs 能被组化的 PAS(Periodic acid-schiff, PAS)染色法染色而与周围的体细胞区分开来。PGCs 的染色特征是: 细胞核不着色, 细胞质呈红色^[13]。经 PAS 染色后, PGCs 除细胞核外, 整个细胞质由许多深染的区域, 细胞形状由圆变长, 有的变为椭圆形, 还有个别仍保持圆形, 有的还在顶端伸出伪足(如图 2)。

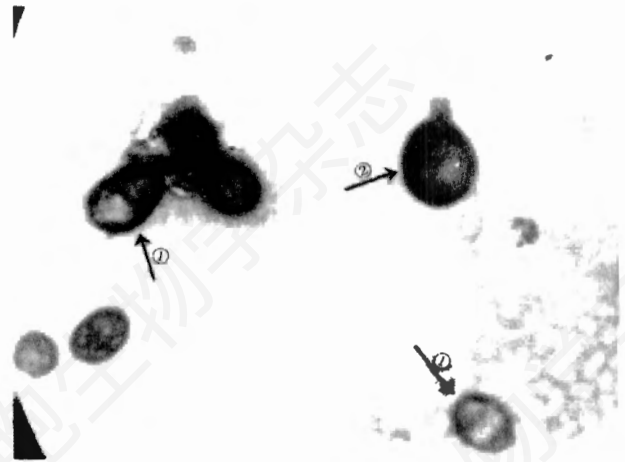


图2 PGCs 经 PAS 染色后的各种形态 10×100(箭头所示)

注: ①椭圆形的 PGCs, ②有伪足的 PGCs。

2. 不同方法分离 PGCs 的结果

对分离到的 PGCs 在体外培养条件下观察, 约 1h 体细胞已贴附在培养瓶底, 呈成纤维样分布, 铺展, PGCs 悬浮在培养液中, 有伸缩的伪足便于游动。培养 24h 进行观察, 发现 3 个时期分离到的 PGCs 均趋于细胞集落状, 通常可见 10 个左右 PGCs 组成的小集落。这可能是由于生命力旺盛的 PGCs 多以集落形式存在^[9]。随着培养时间的延长, PGCs 逐渐死亡: 细胞质颜色开始变深, 细胞轮廓不清, 形态皱缩。3 个时期的 PGCs 体外培养存活情况见表 1。

表 1 3 个时期的 PGCs 在体外培养存活情况

时期	PGCs 存活率(%)						
	刚提取时	24h 后	48h 后	60h 后	72h 后	80h 后	88h 后
14 期	85.6±4.9	40.7±2.3	23.6±2.8	9.4±3.4	/	/	/
19 期	85.7±5.6	50.4±2.7	33.5±2.1	21.3±1.7	10.3±0.7	3.9±0.3	/
28 期	80.5±4.4	45.5±3.1	31.7±1.3	19.3±1.2	7.9±0.6	/	/

表 1 显示: 第 14 期提取的 PGCs 存活时间最短, 在 60-72h。第 19 期的最长, 在 80-88h。第 28 期的介于两者之间, 存活时间为 72-80h。这 3 个时期所提取的 PGCs 经体外培养 24h 后, 存活率

均出现大幅度下降。可能是由于 PGCs 脱离了机体的内环境和营养供给体系, 进入一个新的生长环境后, 使得低活力的 PGCs 在短期内死亡。此外, 也可能是由于培养液中仅添加少量的小牛血清, 没有外

加可溶性生长因子,不能长时间维持 PGCs 的生长。

分别采用 EDTA-胰酶解离法和 Ficoll 密度梯度离心分离第 19 期、28 期鸡胚 PGCs,结果见表 2。

表 2 显示,采用 EDTA-胰酶法分离到的细胞总数,PGCs 数,体细胞存活率以及 PGCs 存活率都高于采用 Ficoll 密度梯度离心的分离结果。

表 2 不同方法分离鸡胚胎中 PGCs 的结果比较

时期	分离法	细胞数/ 1 个胚胎	体细胞存活率 (%)	PGCs 数/ 1 个胚胎	PGCs 存活率 (%)	PGCs 浓度 (%)
19 期	酶解离法	$2.71 \times 10^4 \pm 0.32 \times 10^4$ [150]	>90	72 ± 6 [150]	90	3.3
	梯度离心法	$1.73 \times 10^4 \pm 0.11 \times 10^4$ [150]	90	40 ± 6 [150]	85	7.2
28 期	酶解离法	$3.12 \times 10^4 \pm 0.30 \times 10^4$ [150]	90	78 ± 6 [150]	90	2.6
	梯度离心法	$1.94 \times 10^4 \pm 0.22 \times 10^4$ [150]	90	48 ± 6 [150]	85	6.7

注: 1. 括号中的数字为实验中所用的胚胎数。

2. 活细胞通过台盼蓝染色识别,PGCs 只通过其形态标准识别。

3. PGCs 通过 PAS 特异性反应鉴别。

讨 论

1. PGCs 体外培养时存活时间上存在的差别

本实验中,来自第 14 期的血液 PGCs 的存活时间最短,而来自第 19 期的生殖嵴、第 28 期的性腺 PGCs 存活时间相对较长,可能是由于在这两个时期的 PGCs 提纯后仍混由大量的基质细胞,这些基质细胞分泌的一些促生长因子,使得 PGCs 在体外培养过程中存活时间延长^[11]。血液中不存在这种基质细胞,因此,来自血液中的 PGCs 在相同的体外培养条件下存活时间较短。从第 19 期生殖嵴与第 28 期性腺中分离的 PGCs 在存活时间上的差别,可能是由于来自第 28 期性腺的 PGCs 已完全定位于性腺,PGCs 与性腺基质细胞之间已建立起紧密的联系。而第 19 期的 PGCs 则刚迁移到性腺区,PGCs 与性腺基质细胞之间的联系比较薄弱。将 PGCs 分离出来后,PGCs 与基质细胞之间的联系被中断,相比较而言,这种中断关系产生的不利作用对第 28 期性腺中的 PGCs 影响较大,导致在相同的体外培养条件下,从第 28 期鸡胚分离的 PGCs 存活时间比从第 19 期鸡胚分离的 PGCs 存活时间的短。

2. PGCs 分离的最适时期

PAS 染色是鉴定 PGCs 的重要标志方法。由于 PGCs 的细胞质中含有大量的糖原颗粒沉积,而体细胞中糖原颗粒相对较少,因此 PGCs 能被组化的 PAS 染色法染色而与周围的体细胞区分开来。本实验证实,在鸡胚发育的第 14 期、19 期以及 28 期,鸡胚 PGCs 细胞质糖原含量比较稳定^[7],这 3 个时

期分离到的 PGCs 经 PAS 染色后均能呈现较明显的染色特征。

本实验中,第 14 期血液获取的 PGCs 在相同的体外培养条件下的存活时间最短,从每个鸡胚中能获得的 PGCs 数目少,而且其分离和纯化操作很复杂^[12],也不易得到大量的 PGCs。本实验结果显示:从第 19 期生殖嵴分离的 PGCs 在存活时间上最长,分离后的纯度也比较高,根据其迁移规律,此时虽仍有极少的 PGCs 处于迁移状态,但绝大部分已迁移到了生殖嵴处^[13]。因此,在第 19 期分离 PGCs 在数量上有一定的优势,在操作上较为简便,可以避免上、下胚层及卵黄污染。在第 28 期每个鸡胚能获得的 PGCs 数比第 19 期获得的 PGCs 数稍多,但分离的 PGCs 在体外培养的存活时间比第 19 期的存活时间要短,提纯后的浓度要低;而且此期的 PGCs 接近分化期(分化在第 30 期开始)其全能性可能会受到影响。由上述分析比较,可得出在第 19 期鸡胚分离 PGCs 比较合适。

3. 分离 PGCs 的适宜方法

在不同的发育阶段,PGCs 的形态、大小及细胞内容物有所不同,为了从 19 期、28 期的鸡胚中获取大量的 PGCs 活细胞,我们分别采取了两种分离方法。经多次验证,本实验结果认为,采用 EDTA-胰酶分离是一种较可行的方法,主要原因有两个方面:(1)分离到的 PGCs 数量较 Ficoll 密度梯度离心法多。与酶解法不同,Ficoll 密度梯度离心是将酶解离后的细胞再经不同的 Ficoll 密度梯度进行提纯,得到的 PGCs 虽然纯度稍高,但经过多次洗涤细胞等步骤会使 PGCs 有所损失;此外,进行酶解消化

时,必然有部分组织块不能完全解离,夹杂其中的PGCs会随细胞团及组织块在高速离心时沉降于离心管底,而我们采用的密度梯度分层分离只吸取离心管上部细胞悬液,这也可能会损失部分PGCs。(2)分离到的PGCs活力较强,存活时间也较长。在Ficoll密度梯度分离的过程中,经高速离心及机械吹打等步骤会在一定程度上使细胞活力受损,使PGCs活细胞数减少。实验观察发现,酶解法分离到的PGCs存活时间也较长。原因可能是Ficoll密度梯度离心分离到的PGCs在缺乏体细胞的情况下培养,难以长时间存活^[14]。用酶解法分离到的PGCs中混有大量体细胞,这些体细胞在培养1h左右分化为成纤维细胞,一方面成纤维细胞可与PGCs协同竞争生存,另一方面可分泌大量生长因子,如IGF、EGF,有利于PGCs的存活增殖;同时也释放相当的分化抑制因子,如LIF,抑制PGCs分化。当成纤维细胞分裂至一定程度,会出现老化,分泌的细胞因子不足以维持PGCs增殖和抑制其分化,最后导致死亡。这也是本实验中基础培养基中没有添加任何因子,PGCs仅能存活3-4d的主要原因。

本实验尝试采用鸡胚PGCs与性腺类似物成纤维细胞共培养的方法,初步证实了鸡胚成纤维细胞可能会为PGCs短期的存活和增殖提供所必须的细胞因子;对于PGCs的长期培养、传代至建系中应用鸡胚原代成纤维细胞(PCEF)或小鼠胚胎原代成纤

维细胞(PMEF)作饲养层并添加各类细胞因子,本实验正在进一步研究中。

参 考 文 献

- [1] Nathalie Allioli. et al., 1994, *Dev. Bio.*, **165**:30-36.
- [2] Resnick J L, Ortiz M, Keller J R., 1998, *Biol. Reprod.*, **59**: 1224-1229.
- [3] Cherny R A, Merein J., 1994, *Theriogenology*, **41**: 175.
- [4] Piedrahita J A, Moor K, Oetama B, et al., 1998, *Biology of reproduction*, **58**: 1321-1329.
- [5] Ando, Y., and Fujimoto, T., 1983, *Dev. Growth Differ.*, **25**: 345-352.
- [6] Hamburger V, Hamilton HL., 1951, *Journal of morphology.*, **88**: 49-60.
- [7] 李碧春、陈国宏, 2002, 扬州大学学报(农业与生命科学版), **2**(23):19-22.
- [8] Meyer, D., 1964, *Dev. Biol.*, **10**: 154-159.
- [9] Leitchhammer F, Baunack E, Brem G., 1990, *Theriogenology* **33**(6):121-1230.
- [10] 郑瑞珍、辛俭, 1994, 发育生物学进展[M], 北京: 高等教育出版社 172-180.
- [11] 李碧春、陈国宏、赵东伟, 2001, 中国兽医学报, **21**(4): 370-372.
- [12] Il-Kuk Chang., et al., 1995a, *Cell Biology International.* **19**: 143-149.
- [13] Alvarez Buylla A. Merchant-Larios H., 1986, *Exp. Cell Res.* **165**(2): 362.

ISOLATION AND CULTURE OF PRIMORDIAL GERM CELLS FROM CHICKEN EMBRYOS*

QIN Jie XIAO Xiao Jun LI Bi Chun*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

ABSTRACT Along with two methods of Ficoll density-gradient centrifugation and EDTA-Trypsin collection of isolating primordial germ cells (PGCs) from chicken embryos at three different stages: from blood at stage 14, from genital ridge at stage 19 and gonadal at stage 28. PGCs were then cultured in the TCM-199 medium containing 10% FCS *in vitro*. The number of viable cells were determined by using the Trypan Blue test; PGCs were identified using PAS reaction. The result showed that, EDTA-Trypsin collection was more preferable to PGCs collection at stage 19 and stage 28, and these two stages were suitable for collection of PGCs from early chicken embryos.

Key words: Chicken embryo Primordial germ cells (PGCs) Isolation

* This research was supported by National Nature Scientific Fund of China. (30170678).
Corresponding author. E-mail: ghchen@mail. yzu. edu. cn