

- [11] Roustan, J. P., et al., 1989, *Plant cell Rep.*, **8**: 182 - 185.
- [12] Pua, E. C., Sim, G. E., Chi G. L., et al., 1996, *Plant cell Rep.*, **15**(9): 685 - 690.
- [13] Robinson, K. E. P. and Adams, D. O., 1987, *Physiol. Plant.*, **71**: 151 - 156.
- [14] Huxter, T. J., Thorpe, T. A. and Reid, D. M., 1981, *Physiol. Plant.*, **53**: 319 - 326.
- [15] Khalid, M. and Chraibi, B., 1991, *Plant Cell Rep.*, **10**: 204 - 207.
- [16] Power, C. J., 1987, *Am. J. Bot.*, **74**(4): 497 - 503.
- [17] Cornejo-Martin, M. J., Mingo-Castel, A. M. and Primo-Millo, E., 1979, *Z. pflan.*, **94**: 117 - 123.
- [18] Thorpe, T. A., InRodriguez, R., et al., (eds). 1990, *Plant Aging: Basic and Applied Approached*, 191, Plenum Press, New York.
- [19] Lakshmanan, P., Ng, S. K., Loh C. S., 1997, *Plant cell Physiol.*, **38**(1): 59 - 64.
- [20] 黄学林、李筱菊, 1995, 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控, 科学出版社, 北京.
- [21] Biondi, S., Diaz, T., Iglesias, L., et al., 1990, *Physiol. Plant.*, **78**: 474 - 483.
- [22] Ma, J. H., Yao, J. L. and Cohen, D., 1998, *Plant Cell Rep.*, **17**(3): 211 - 219.
- [23] Purnhauser, L. and Gyulai, G., 1993, *Plant cell, tissue and organ culture*, **35**: 131 - 139.
- [24] Guyader, L., 1987, HCR, Acad. Sci. Parist 305, Serie III, 591.
- [25] Gonzalez, A., Rodriguez, R. and Tames R. S., 1991, *Physiol. Plant.*, **81**: 227 - 233.
- [26] Aloni R., Wolf A., Feigenbaum P., et al, 1998, *Plant Physiology*, **117**: 841 - 849.
- [27] Perez-Bermudez, P., Cornejo, M. J., Segura, J., et al., 1985, *Plant Cell Rep.*, **4**(4): 188 - 190.
- [28] Liu, J. H., Mukherjee, I. and Reid, D. M., 1990, *Physiol. Plant.*, **78**: 268 - 276.
- [29] Bouriquet, R., 1972, C, R, Acad. Sci. (Pris) Ser. D., **275**: 33 - 34.
- [30] Smulders, M. J. M., Kemp, A. and Barendse, G. W. M., 1990, *Physiol. Plant.*, **78**: 167 - 172.
- [31] Van Aartrijk, J., Blom-Barnhoorn, G. J. and Bruinsma, J. 1985, *J. Plant Physiol.*, **117**: 401 - 410.
- [32] Pirson, A. and Seide, I. F., 1950, *Planta*, **38**: 431.
- [33] Mussell, H., Earle, E., Campbell, L., et al., 1986, *Plant Sci.*, **47**: 207.
- [34] Rethmeier, N. O. M., Jansen, C. E. and Snel, E. A. M., 1991, *Plant Cell Rep.*, **9**: 539 - 543.
- [35] Perl, A., Aviv, D. and Galun, E., 1988, *Plant Cell Rep.*, **7**: 403 - 406.
- [36] Taylor, P. W. J., 1994, *J. Exp. Bot.*, **277**(45): 1163 - 1168.
- [37] Ishii, S., 1988, *Plant Physiol.*, **88**: 26 - 19.
- [38] Reynolds, T. L., 1989, *Plant Sci.*, **61**: 131 - 136.
- [39] Pua, E. C. and Lee, J. E. E., 1995, *Planta*, **196**: 69 - 76.
- [40] 马庆虎, 宋艳茹, 1997, 植物学报, **39**(11): 1047 - 1052.

研究工作

BALB/c 小鼠胚胎干细胞系的建立及其嵌合体小鼠的获得*

黄冰 陈系古** 邓新燕 林以理 陈颖青 黄春浓*** 梁英杰****

(中山医科大学实验动物中心 广州 510089)

小鼠胚胎干细胞(ES细胞)嵌合体的构建是一项十分复杂的技术^[1]。除了保持ES细胞体外扩增、未分化性及全能性的特点外,受体胚胎品系来源、注射方式的选择以及许多具体操作的技术性与非技术性等因素都将对嵌合体的形成造成深刻的影响。目前国内极少有基因剔除动物产生的报道,主要原因可能在于胚胎干

细胞分离培养和建系的技术未能真正过关,加

本文 2000 年 4 月 4 日收到, 11 月 13 日接受。

* 本研究得到广东省科技创新百项工程项目(99B07801Q)以及国家科技部“九五”攻关课题(96-A23-06-02)资助。

** 课题负责人。

*** 中山医科大学医学遗传教研室。

**** 中山医科大学病理教研室。

之嵌合体小鼠产生的难度,造成基因剔除动物成功率微乎其微^[2]。

1987年上海细胞生物研究所丛笑倩等在国内首先报道建立129小鼠胚胎干细胞系ES-8501^[3],并获得嵌合体小鼠^[4]。1996年北京大学生命科学院尚克刚等从C₅₇BL/6J小鼠建立胚胎干细胞系,也进行了嵌合能力的检查^[5]。1999年尚克刚等又报道了国内首例种系嵌合体(来源于129小鼠胚胎干细胞)的产生^[1,6]。本研究小组从近交系动物BALB/c小鼠囊胚腔内分离出内细胞团块的细胞,体外培养5个月,间断传代26代,并对其未分化性、全能性、核型及嵌合体小鼠形成能力进行了分析。结果是:建立的细胞系除了具备胚胎干细胞的各种特点外,并已产生5只嵌合体小鼠。但是否能发生生殖系的嵌合,还须2-3个月时间的进一步观察研究。BALB/c小鼠胚胎干细胞从其体外维持的稳定性、嵌合体鼠毛色的辨认以及体内诱导分化的受体鼠来源易得性等方面都有其优越性。现将建系过程及结果报道如下。

材料与amp;方法

1. 胚胎收集与培养

BALB/c小鼠由本中心提供(合格证号:粤检证字99A012)。从怀孕3.5天的BALB/c母鼠子宫内收集囊胚期胚胎。用小鼠12.5天的胚胎纤维母细胞(MEF)作为饲养层细胞。培养液为ES细胞培养液:葡萄糖含量4500mg/L的DMEM(GIBCO)添加15%FCS(Hyclone)、0.1mmol/Lβ-巯基乙醇、1000IU/ml mLIF、青霉素100IU/ml以及链霉素100IU/ml。于37℃ 5%CO₂培养箱内进行培养^[7]。

2. 胚胎干细胞的分离及传代培养

胚胎经培养4-5天后,其内细胞团块充分增殖。在显微操作仪下分离内细胞团块,置入胰酶-EDTA消化液滴中消化成3-5个细胞的小团块,并将其移入新的单层MEF上继续培养。2天后见有典型的ES细胞集落出现,3-4天后集落明显增大。分离单克隆,进行消化传代。此后,每次传代都要吹打成单细胞悬浮液,以1:3比例接种到新的MEF上进行培养;或接种到加有小鼠白血病抑制因子(mLIF)的条件培养基中,进行

无饲养层培养。mLIF的浓度是1000IU/ml。每3天传代一次,每隔1-2天换液。细胞饲养在一次性塑料培养瓶内。培养瓶不需要用明胶处理,使用1-3代后更换新的培养瓶。

3. 胚胎干细胞的鉴定

(1) 克隆及细胞形态观察 传代培养过程中,仔细观察克隆形态。另将细胞悬浮液进行离心、去上清,沉淀物涂片,HE染色,普通光学显微镜下观察单细胞形态。

(2) 碱性磷酸酶染色 将ES单细胞悬浮液,种植到预先放置有盖玻片的小平皿内。经24hr培养后,弃上清。用PBS轻轻洗涤1-2次。再用4-8℃冷丙酮固定15分钟,弃冷丙酮固定液。用PBS轻轻洗涤1次。立即送检或放置-30℃下保存待检。检测方法按参考文献^[8]的方法进行。采用鼠肾小管作阳性对照,饲养层细胞作阴性对照。

(3) 核型分析 ES细胞经培养24hr,消化成单细胞悬浮液。加秋水仙素处理(最终浓度0.08μg/ml)2小时,离心去上清。0.075mol/L氯化钾(37℃)低渗处理15分钟。经甲醇3:1冰醋酸固定三次后,滴片。75℃ 2hr烤片。0.0125%胰蛋白酶消化50秒。5%Giemsa染色5分钟。油镜下观察,分析100个细胞染色体,观察整倍体数目,计算出整倍体百分率。同时用图像分析仪进行染色体扫描,并放大配对,按编号排好。

(4) 胚胎干细胞体外分化试验 将ES细胞悬浮液进行离心,弃上清。用PBS洗涤1次。改用葡萄糖含量为4500mg/L的DMEM(GIBCO)添加15%胎牛血清进行培养。将ES细胞悬浮液接种于未经明胶处理的玻璃培养瓶内,连续培养2周。每2-3天换液1次。每天摇晃培养瓶3-4次,防止细胞和克隆贴壁。

(5) 胚胎干细胞体内分化试验 将ES细胞悬浮液进行离心,弃上清。用少量培养液重新悬浮细胞,制备成1×10⁷个/ml细胞高浓度的细胞悬液,然后接种于BALB/c普通小鼠和BALB/c裸小鼠腹股沟皮下。每只小鼠接种量分别是1×10⁷个/ml细胞(普通小鼠)及5×10⁶个/ml细胞左右(裸小鼠)。将接种细胞后的小鼠放回笼内饲养。隔3-4天观察小鼠成瘤情况。待肿瘤长至1cm³左右大小(1.5个月左右),处死小鼠。取出肿块,10%福尔马林固定,石蜡包埋、切片、HE染色,光镜检查细胞分化情况。

(6) 嵌合能力的鉴定 选用C₅₇BL/6J小鼠(本中心提供,合格证号:粤检证字99A013)囊胚作为受体

胚胎。在显微操作仪下,每个囊胚注射入第12-20代VI号克隆株的ES细胞6-10个。注射后,立刻将囊胚转入DMEM(含葡萄糖4500mg/L)添加15%胎牛血清的培养液中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养3-4小时。选用形态恢复良好的胚胎移植入假孕母鼠子宫腔内。小鼠出生后经毛色鉴定是否有嵌合。

结 果

1. 胚胎干细胞系的建立

从怀孕3.5天的BALB/c小鼠子宫内获得12个囊胚。经培养后有10个内细胞团块增殖(图A)。消化传代后,目前分离出6个克隆,建立6个细胞株。6个细胞株都具有典型的克隆形态(图B,C):集落状生长,边缘清楚,结构致密,表面光滑,细胞间界线不清。在加mLIF的无饲养层培养基中进行培养,克隆形态更加明显(图C)。HE染色细胞呈圆形或椭圆形,核大胞浆少,核仁椭圆形,嗜红染色,细胞学形态与恶性未分化肿瘤细胞相似。

2. 碱性磷酸酶检查

第10、19、26代细胞碱性磷酸酶细胞化学染色均显示强阳性(图D)。

3. 体外分化试验

单细胞悬浮液经连续培养2周,在第7-8天时形成简单类胚,在第10-13天时形成典型囊状胚胎小体(图E)。克隆株之间胚胎体形成的时间相差1-3天。

4. 体内分化试验

接种BALB/c裸小鼠及普通BALB/c小鼠各5只,均长出畸胎瘤。将畸胎瘤进行切片,HE染色显示有三个胚层组织分化(图G,H),有神经组织、皮肤组织(外胚层)、腺上皮(内胚层)、肌肉组织及软骨(中胚层)。

5. 核型检查

6个克隆株中,3株在第10代进行了核型检查。2株为XY型,10代时的整倍体数在80%以上;1株为XX型,10代时整倍体数占30%左右。XY型VI号克隆株染色体见图I。

6. 嵌合体小鼠的构建

受体胚胎供体鼠为C₅₇BL/6J小鼠,毛色为

黑色,尾尖有点白色,符合标准C₅₇BL/6J小鼠的性状。共注射65个胚胎。移植5只假孕鼠。产下小鼠12只,3只为死胎,4只经剖腹产出生后被代养母食掉,无法辨认毛色是否嵌合。存活5只小鼠,2只雄,3只雌,均为嵌合体。嵌合体形成率为100%。毛色嵌合率在50%以上,以腹部、头部嵌合为主,形成浅肉色和黑色或黑灰色毛色斑块互相嵌合(图F)。

讨 论

英国的Evans和Kaufman最早于1981年首次建立胚胎干细胞以来^[9],显示胚胎干细胞在现代生命科学,包括分子生物学、遗传学、免疫学、发育生物学、肿瘤学乃至物种的改良,以及生物药物的生产发展上起着越来越重要的作用。早在1994年就有人预言^[10]二十一世纪是生命科学的世纪。如果说ES细胞不是潮头的话,那也是二十一世纪生命科学的强大推动力。国内对于ES细胞的培养和建系方面未取得关键性突破,所以该技术一直未得到深入的应用^[6],这也可能是我国基因定点整合转基因动物发展缓慢的根本原因^[2]。

自从美国Wisconsin大学James Thomson建立人ES细胞系以来^[11],各国科学家已把注意力集中在将人胚胎干细胞诱导成治疗用的组织器官上,我国也毫不例外地跟踪国际生命科学研究的前沿。由于人胚胎时期是一个由多潜能胚胎干细胞发育成成熟组织器官的复杂过程,是由单细胞生物进化为最高级灵长类的一个重演,所以绝不是简单的几个条件就可以将ES细胞变成病人可用的治疗性细胞。在ES细胞应用于医学治疗之前,大量的动物实验等基础资料的积累是必须的。因此建立动物胚胎干细胞系,掌握ES细胞的分离培养技术显得十分的重要。ES细胞体外诱导必须以ES细胞分离培养建系为基础,而人的ES细胞分离培养建系技术必须以动物ES细胞技术为基础。在没有确定人类ES细胞安全稳定之前是不可能直接用于病人的。这些资料的积累还有赖于大

量动物实验。故我们认为,人类胚胎干细胞的诱导组织工程的发展,必须以动物实验为基础,才有可能稳步迅速地发展。

本研究小组在国内首次报道建立 BALB/c 小鼠胚胎干细胞系。目前绝大部分用于基因操作的 ES 细胞来源于 129/sv 小鼠品系,只有极少数 ES 细胞系来自 BALB/c 小鼠。由于 129 小鼠是畸胎瘤高发小鼠,其自发率高达 30%^[12],所以来源于 129 小鼠的 ES 细胞有一缺陷,即容易转变为胚胎瘤细胞,体外维持稳定性不够,而 BALB/c 小鼠 ES 细胞则没有这一缺陷,体外培养稳定性相对较好。BALB/c 小鼠是白化体小鼠,用 BALB/c 小鼠 ES 细胞和 C₅₇-BL/6J 小鼠一齐构建嵌合体小鼠,皮肤毛色往往是浅肉色和黑色或黑灰色相嵌合,极易辨认。嵌合体小鼠毛色往往不是纯白色和黑色嵌合,可能是由于来源于 ES 细胞的皮肤斑块中存在少量受体胚胎(C₅₇BL/6J 小鼠)来源的细胞,从而产生不是纯白色而是浅肉色皮毛;而来源于受体胚胎细胞的皮肤斑块中如果存在少量 ES 细胞来源的细胞,则可能产生黑灰色而不是纯黑色的毛皮。不同品系小鼠建立 ES 细胞系的难度不一,如 BXSB 品系小鼠 ES 细胞极易受胰酶消化损伤而不易建系^[13]。由于 BALB/c 小鼠是最常用的近交系小鼠,因此便于今后采用该细胞制作转基因动物和基因剔除动物等。该细胞系体外体内诱导为各种组织细胞,接种回 BALB/c 小鼠将不发生异体排斥反应。尤其是在免疫分子生物学上的研究更显示其独特优点^[14]。该细胞系的建立还须证实是否有生殖系嵌合后再作建系技术以及应用上的一些讨论。

摘 要

目的:建立 BALB/c 小鼠胚胎干细胞系,并用于制作嵌合体小鼠。方法:从 BALB/c 小鼠

囊胚内分离培养内细胞团块。建系后,进行 C₅₇BL/6J 小鼠受体囊胚腔注射,制作嵌合体小鼠。结果:建立了我国第一株 BALB/c 小鼠胚胎干细胞系。该细胞系具有典型的 ES 细胞形态,碱性磷酸酶强阳性,核型正常以及具有分化为三种胚层组织的能力,并已产生 5 只嵌合体小鼠。结论:建立的 BALB/c 小鼠胚胎干细胞系具有胚胎干细胞的各种特点,可用于体内外诱导分化研究。在进一步观察生殖系嵌合情况后,决定是否可应用于基因打靶等转基因动物的制作。

关键词: BALB/c 小鼠 ES 细胞 嵌合体小鼠 分离培养

参 考 文 献

- [1] 陈伟胜等,1999,遗传学报,26(2):126-34.
- [2] 陈系古、黄冰,2000,中山医科大学学报,21(2):封二.
- [3] 丛笑倩、姚鑫,1987,实验生物学报,20(2):237-42.
- [4] Cong X. Q. et al., 1990, *Cell Research*, 1:35-51.
- [5] 柴桂萱等,1996,细胞生物学杂志,18(3):121-26.
- [6] 韩嵘等,1999,遗传学报,26(3):208-12.
- [7] 田小利等,1994,转基因动物原理、技术与应用,长春,吉林科技出版社,P26-32.
- [8] 凌启波,1989,实用病理特殊染色和组化技术,广州,广东高等教育出版社,P250-53.
- [9] Evans M. J. et al., 1981, *Nature*, 293:154-56.
- [10] 郑瑞珍,1994,生物工程进展,14(2):18-27.
- [11] Thomson J. A. et al., 1998, *Science*, 282:1145-47.
- [12] 杨桦等,1998,国外医学遗传学分册,21(1):16-17.
- [13] Kawase E. et al., 1994, *Int-J-Dev-Biol*, 38(2):385-90.
- [14] Noben T. N. et al., 1996, *Transgenic-Res*, 5(6):487-91.

ESTABLISHMENT OF ES CELL LINE DERIVED FROM BALB/c MICE AND SUCCESS OF MAKING UP CHIMAERIC MICE

HUANG Bing CHEN Xi Gu DENG Xin Yan

LIN Yi Li CHEN Ying Qing HUANG Chun Nong LIANG Ying Jie

(*Experimental Animal Center of Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510089*)

ABSTRACT

Purpose: To establish an embryonic stem(ES) cell line derived from BALB/c mice and make chimaeric mice. **Method:** Isolation and culture inner cell mass(ICM) from BALB/c mice blastocysts. After stable proliferation and propagation, we create chimaeric mice by injecting ES cells into blastocysts of C₅₇BL/6J mice. **Results:** We have established the first embryonic stem cell line derived from BALB/c mouse in China. It has stably maintained in an undifferentiated state with a typical morphology of ES cell clone, expressing the embryonic stem cell marker alkaline phosphatase, and displaying a normal diploid karyotype. Five chimaeric mice have been obtained. **Conclusion:** The established embryonic stem cell line express all characteristics of the ES cells. It can be used on differential research in vivo and in vitro. After further observation of its germline transmission, we'll decide whether it can be applied to make-up transgenic and knock out animal.

Key words: BALB/c mice ES cell Chimaeric mice Isolation culture

APP17 肽对 β -淀粉样肽及有关蛋白质表达的影响

孟艳 王蓉 艾厚喜 张景艳 阮燕* 姬志娟 张岱* 盛树力

(首都医科大学宣武医院 北京脑老化研究实验室 北京 100053)

(*北京医科大学精神卫生研究所 北京 100083)

老年性痴呆(Alzheimer's Disease, 简称AD)是一种中枢神经系统退行性疾病,其主要病理特征是老年斑和神经元纤维缠结。 β -淀粉样肽(β -amyloid peptide, 简称A β)是构成老年斑的核心成分,也是AD脑神经元纤维缠结以及血管淀粉样变性的生化基础^[1,2]。A β 是其前体蛋白(β -amyloid protein precursor, 简称APP)的水解产物,分子量约为4.2KDa。APP是一种具有受体样结构的跨膜糖蛋白,分子量约110-130KDa,由位于细胞外的N末端长片段、跨膜区和膜内C末端构成,A β 的部分结构位于跨膜区^[3]。APP翻译后加工分两条途径,这两条途径由三种分泌酶(α 、 β 、 γ)裂解APP完成:(1) α -分泌酶在A β 结构内水解APP,生成分

泌性APP(secretory APP,简称sAPP α),此途径破坏了A β 的完整结构,所以称非A β 生成途径。(2) β -分泌酶在A β 的N端水解APP,生成sAPP β 和11KDa含有A β 完整结构的C端片段(A4CT)。A4CT再经一次酶解过程(γ -分泌酶在A β 的C端水解A4CT)使A β 生成并释放到细胞外环境,这一代谢过程称A β 生成途径。因此,A4CT可能是A β 的直接前体。

以往很多研究表明APP促进神经细胞生长、分化和维持脑内神经网络的稳定性的功能区定位在APP695的319-335肽段(以下简称

本文1999年12月13日收到,2000年8月15日接受。