

基础培养液和小分子对猪类胚胎干细胞 建系效率的影响

李 妍[#] 薛冰华[#] 张 雪 赫义龙 伟人悦 刘忠华^{*}

(东北农业大学胚胎工程实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 猪是人类疾病模型的重要候选动物之一, 建立真正的猪胚胎干细胞系将极大地推动该领域的进展。培养液和细胞信号通路是目前限制猪胚胎干细胞系建立的两个主要影响因素。该研究探索了基础培养液(KO-DMEM和DMEM/F12)和小分子(PD0325901和CHIR99021, 简称2i)对猪类胚胎干细胞建系效率的影响。实验结果显示, 发育至6 d的体外受精胚胎在KO-DMEM培养液中贴壁率和原代克隆形成率显著高于DMEM/F12培养液; 添加2i后, 两种培养液中的胚胎贴壁率和原代克隆形成率均下降。在KO-DMEM培养液中可获得稳定传代的细胞系, 获得的细胞系呈碱性磷酸酶阳性, 核型正常, 表达Oct4、Sox2和Nanog, 不表达Cdx2。细胞系可成功进行转基因操作。结果表明, 以KO-DMEM为基础培养液的培养体系可以获得猪类胚胎干细胞, 2i不利于胚胎贴壁和原代克隆形成。该研究为猪胚胎干细胞建系培养体系的选择及推断猪胚胎干细胞多能性细胞信号调控通路提供了重要的实验依据。

关键词 猪; 类胚胎干细胞; 基础培养液; 小分子抑制剂

The Effects of Basal Medium and Small Molecules on the Efficiency of Porcine Embryonic Stem Cell-like Cell Lines Establishment

Li Yan[#], Xue Binghua[#], Zhang Xue, He Yilong, Wei Renyue, Liu Zhonghua^{*}

(Laboratory of Embryo Biotechnology, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract Swine is considered as one of the most important candidates for human disease models, and establishment of bona fide porcine embryonic stem cells (pESC) will facilitate making disease models. Culture medium and signalling pathway are two main factors that affect the establishment of porcine embryonic stem cells. In this study, we investigated the effects of basal medium (KO-DMEM and DMEM/F12) and small molecular inhibitors (PD0325901 and CHIR99021, 2i) on the efficiency of pESC establishment. The results showed that the rates of attached embryos and primary colonies in KO-DMEM basal medium were significantly higher than those in DMEM/F12 basal medium when IVF embryos of 6 days were seeded, and the rates were significantly decreased when embryos seeded in both of the two medium with addition of 2i. pESC-like cell lines were derived from KO-DMEM basal medium. These cells were alkaline phosphatase (AP) positive and had normal karyotypes, expressed

收稿日期: 2015-01-13 接受日期: 2015-02-26

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2011CBA01000)和国家自然科学基金(批准号: J1210069)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 0451-55101729, E-mail: liu086@126.com

Received: January 13, 2015 Accepted: February 26, 2015

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2011CBA01000) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.J1210069)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-451-55101729, E-mail: liu086@126.com

网络出版时间: 2015-05-04 18:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150504.1816.007.html>

pluripotent markers of Oct4, Sox2 and Nanog, but did not express Cdx2. The cell lines could be genetically modified without losing of the pluripotency. These results indicated that KO-DMEM basal medium could support pESC-like cells derivation and 2i had negative effects on embryos attachment and primary colonies formation. This study provided important evidence for selection of basal medium and predicting of pluripotency related cell signalling in pESC establishment.

Keywords swine; embryonic stem cell-like cells; basal medium; small molecule inhibitors

胚胎干细胞来源于哺乳动物胚胎内细胞团,是一类能够分化为机体内各种细胞类型的多潜能细胞系,它的出现推动了基因功能研究、信号通路研究、疾病模型建立和再生医学等领域的发展。自1981年Evans等^[1]和Martin^[2]首次建立小鼠胚胎干细胞系以来,研究者们已成功分离培养得到了仓鼠^[3]、人^[4]、非肥胖型糖尿病(non-obese diabetic, NOD)鼠^[5]、大鼠^[6-8]和恒河猴^[9-10]等物种的胚胎干细胞系。猪在免疫学、形态学和生理结构上与人有着诸多类似的特点,因此被作为动物疾病模型广泛地应用于人类疾病的临床研究中,这使得建立真正的猪胚胎干细胞系更为重要^[11-14]。然而,在诸多影响猪胚胎干细胞建系的因素中,能够维持猪胚胎干细胞多能性状态的培养液和细胞信号通路是两个主要的因素。

猪类胚胎干细胞建系的早期研究结果中,各实验室使用的细胞培养液均起源于小鼠胚胎干细胞培养液和人胚胎干细胞培养液,主要成分包括:各种基础培养液、牛血清、血清替代物(knockout serum replacement, KOSR)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)和碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)^[15-23]等。血清成分极其复杂,含有各类促进干细胞分化的因子,因此,血清在干细胞研究中逐渐被KOSR所替代^[24]。随着对人胚胎干细胞研究的深入,研究者发现了一种化学成分确定、可作为KOSR替代物的无血清添加剂——N2B27^[25]。有研究报道,N2B27添加2i(CHIR99021和PD0325901)的培养体系对大鼠和NOD小鼠胚胎干细胞建系的成功起到了决定性作用^[5-8]。

N2B27添加2i培养体系的成功使得N2B27和2i在猪类胚胎干细胞的研究中得到了广泛的应用。然而,如果将这一体系直接应用在猪类胚胎干细胞的建系上却存在着两个问题:第一,该体系下的基础培养液(DMEM/F12:Neurobasal=1:1)并不适合猪胚胎干细胞系的培养;第二,2i的作用效果在不同实验组

有着截然相反的实验结果。Telugu等^[22]和Haraguchi等^[23]通过在细胞培养过程中添加小分子成功获得了具有部分多能性的、小鼠胚胎干细胞样的猪类胚胎干细胞;而Petkov等^[26]的文章指出,在培养猪诱导多能性干细胞的过程中添加2i会降低Oct4等多能性转录因子的表达水平。据此,本研究比较了不同基础培养液(KO-DMEM和DMEM/F12)在N2B27这一体系下对猪类胚胎干细胞建系效率和多能性维持的影响,同时探索了在现有体系下2i对猪多能性细胞的建系与维持是否起到促进作用,以期最终获得成分确定的、适合猪类胚胎干细胞分离培养的干细胞培养液,为真正的猪胚胎干细胞建系提供实验依据和理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

猪卵巢主要来源于哈尔滨信诚食品有限公司,猪精液由东北农业大学胚胎工程实验室实验猪基地提供。本研究所涉及的实验动物使用和实验流程均严格依照《东北农业大学动物福利条例和伦理规定》执行。

1.2 试剂及仪器

实验中所使用的耗材和仪器主要来自以下公司:4孔细胞培养板来自NUNC,12孔和24孔细胞培养板来自于Costar,其余耗材均来自于Corning;仪器主要为:二氧化碳培养箱(Thermo-FORMA)、倒置显微镜(Olympus cx21)和Real-time PCR仪(ABI 7500)。

猪类胚胎干细胞培养液:76% KO-DMEM(Gibco)/DMEM/F12(Gibco)、2 mmol/L L-谷氨酰胺(L-glutamine, Gibco)、0.1 mmol/L β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, Gibco)、1%非必需氨基酸(non-essential amino acid, NEAA, Gibco)、1%青霉素和链霉素(penicillin-streptomycin, Gibco)、1 000 U/mL hLIF(human leukemia inhibitory factor, Millipore)、16 ng/mL bFGF(R&D)、40 μ g/mL抗坏血酸(vitamin

C, Vc, Sigma)、0.5% N2(Gibco)、1% B27(Gibco)和0.5 mg/mL牛血清白蛋白(bull serum albumin, BSA, Sigma)。

饲养层细胞培养液组分: 86% DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)、15%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Bioind)、1% NEAA、2 mmol/L L-谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素。

1.3 胚胎收集和细胞培养

1.3.1 卵母细胞体外成熟培养 从哈尔滨信诚食品有限公司收集的猪卵巢放在含有青霉素和链霉素的生理盐水中运回实验室。用生理盐水冲取卵巢, 挑选猪卵巢表面3~8 mm的卵泡, 用10 mL注射器抽取卵泡液(包含卵丘卵母细胞复合体、颗粒细胞和卵泡液), 置于离心管中。待卵泡液沉降后, 用台式缓冲液(TL-HEPES)洗3次, 在体式显微镜下挑选形态良好的卵丘-卵母细胞复合体放入含有成熟培养液[TCM-199(Gibco)+1% FSH(follicle-stimulating hormone, Sigma)+1% LH(luteinizing hormone, Sigma)+1% EGF(epidermal growth factor, Sigma)+10% pFF(porcine follicular fluid)]的24孔板中, 于39 °C培养箱中培养。体外成熟培养42 h后, 用1 mmol/L透明质酸消化以去除卵丘-卵母细胞复合体上的颗粒细胞, 然后挑选已经排出第一极体的MII期卵母细胞置于预先准备好的受精滴[mTBM(modified Tris-buffered medium)+1 mmol/L caffeine(Sigma)+0.1% BSA]中。

1.3.2 卵母细胞体外受精及胚胎培养 (1)从17 °C中取出预先稀释的1 mL新鲜精液至于1.5 mL离心管中, 39 °C预热20 min, 混匀后对活精子进行计数; (2)1.5 mL离心管3 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入预热的DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered salines, Sigma)清洗2次; (3)用预先平衡的mTBM精子稀释液重悬精子, 检测精子密度; (4)计算精子密度后, 取适量精子加入到受精液中进行稀释, 使精卵比最好达到400:1; (5)取最终稀释好的精液加到受精滴中; (6)39 °C培养箱中放置5 h受精, 将受精卵移入到含猪胚胎培养液(PZM-3)的4孔板中进行培养。

1.3.3 囊胚接种 选择培养至6 d的直径 $\geq 200 \mu\text{m}$ 的体外受精囊胚进行接种。将符合标准的囊胚移至含有0.3% BSA的DPBS中, 机械法去除透明带, 用细胞培养液清洗2次, 将其接种到预先铺有饲养层细胞的4孔板中。

1.3.4 猪类胚胎干细胞分离与培养 接种后的囊胚置于39 °C、5% CO₂及5% O₂的培养箱中进行培养, 细胞需要每天换液1次; 7~15 d会有原代克隆形成; 机械法挑取原代克隆置于TrypLE™ Express(Invitrogen)消化1 min, 将消化得到的微小克隆团块接种到铺有饲养层细胞的24孔板中继续培养; 传代培养过程和以上操作相同, 细胞每次传代接种后需添加10 $\mu\text{mol/L}$ 的Y27632(Millipore)。

1.4 猪类胚胎干细胞系多能性鉴定

1.4.1 碱性磷酸酶染色 将培养中的猪类胚胎干细胞弃去培养液, 加入4%多聚甲醛固定30 s; 吸出固定液, 清洗液清洗3次; 按照BCIP/NBT碱性磷酸酶染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司)的说明书进行染色操作; 最后吸出反应液, 清洗液清洗3次, 镜下观察着色情况。

1.4.2 核型分析 (1)用0.1 mg/mL的秋水仙素过夜处理猪类胚胎干细胞; (2)用TrypLE™ Express将克隆消化为单细胞, 将细胞置于0.1%明胶上贴壁8 min, 去除饲养层细胞; (3)离心后加入低渗液(12 mL去离子水+2 mL FBS+14 μL 0.2 mg/mL EDTA), 于37 °C处理15 min; (4)离心弃上清; (5)用预冷的固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)冰上处理40 min, 离心弃上清, 重复此步骤2次; (6)用200 μL 固定液重悬细胞, 滴片; (7)吉姆萨染色7 min, 镜下观察染色体形态。

1.4.3 免疫荧光鉴定 (1)传代接种猪类胚胎干细胞, 待克隆长大后用DPBS清洗2~3次; (2)预冷的4%多聚甲醛室温固定30 min; (3)透膜液17 °C恒温过夜孵育; (4)封闭液37 °C封闭1 h; (5)加相应检测一抗Oct4(Santa Cruz, Sc-8628, 1:50稀释)、Sox2(Santa Cruz, sc-17320, 1:50稀释)、Nanog(Pepro Tech, 500-P236, 1:250稀释)和Cdx2(Biogenex, MU392A-UC, 1:50稀释), 于4 °C孵育过夜; (6)滴加清洗液, 置摇床上清洗5 min, 弃掉清洗液, 重复此步骤2次; (7)滴加相应二抗(驴抗羊、驴抗鼠和驴抗兔, 稀释比例均为1:500), 于37 °C避光孵育1 h; (8)滴加清洗液避光清洗, 方法同(6); (9)Hoechst 33342(Sigma)染核10 min, 滴加清洗液避光清洗, 方法同(6); (10)夹取盖玻片至涂有防猝灭剂的载玻片上, 荧光显微镜下观察。

1.5 其他实验方法

1.5.1 检测单克隆形成率 用TrypLE™ Express将克隆消化为单细胞, 将细胞置于0.1%明胶上贴壁15 min, 去除饲养层细胞; 收集细胞悬液进行离心;

表1 PCR引物序列
Table 1 Primer sequence for PCR

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer sequence	下游引物 Reverse primer sequence
<i>Oct4</i>	5'-CAA ACT GAG GTG CCT GCC CTT C-3'	5'-ATT GAA CTT CAC CTT CCC TCC AAC C-3'
<i>Sox2</i>	5'-CAT CAA CGG TAC ACT GCC TCT C-3'	5'-ACT CTC CTC CCA TTT CCC TCT TT-3'
<i>Nanog</i>	5'-AAT GAT CGT CAC ATA TCT TCA GGC TGT A-3'	5'-GTT CCA TGG GCT CAG TGG TCA AG-3'
<i>Fgf4</i>	5'-TTC TTC GTG GCC ATG AGC AG-3'	5'-AGT GGG TGA CCT TAT TGG TG-3'
<i>Lif</i>	5'-CAC TGG AAA CAC GGG GCA-3'	5'-AGG GCG GGA AGT TGG TCA-3'
<i>Lifr</i>	5'-CTC ATC CCA GTG GCA GTG-3'	5'-CCA GAA CCT CAA CAT TAT-3'
<i>Stat3</i>	5'-TTG CCA GTT GTG GTG ATC-3'	5'-AGA CCC AGA AGG AGC CGC-3'
<i>bFgf</i>	5'-GCG ACC CTC ACA TCA AAC T-3'	5'-CAG TGC CAC ATA CCA ACT-3'
<i>Fgfr1</i>	5'-ACT GCT GGA GTT AAT ACC ACC G-3'	5'-GCA GAG TGA TGG GAG AGT CC-3'
<i>Fgfr2</i>	5'-TGA TGA TGA GAG ACT GTT GGC ATG C-3'	5'-TCC AAG TAG TCC TCA TTG GTC GTG-3'
<i>Smad4</i>	5'-GGC TTC AGG TGG CTG GTC GGA-3'	5'-ACC TGA TGG AGC ATT ACT-3'
<i>Gapdh</i>	5'-GCA AAG TGG ACA TTG TCG CCA TCA-3'	5'-TCC TGG AAG ATG GTG ATG GCC TTT-3'

用干细胞培养液重悬细胞, 用口吸管吸取单个细胞接种在预先铺有饲养层的96孔板中, 保证每孔只有1个细胞; 7 d后, 镜下观察每孔是否有新克隆产生, 计算单克隆形成率。

1.5.2 反转录PCR和荧光定量PCR 用TRIzol提取总得RNA; 按照High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits(Biosystems, 4368814)说明书将提取得到的RNA反转为cDNA; 按照SYBR Prime Script™ Kit(TaKaRa)说明书建立反应体系; 采用7300 Real-time PCR系统(Biosystems)检测多能性基因和信号通路相关基因的表达水平, *Gapdh*作为内参, 引物序列如表1所示。

1.5.3 猪类胚胎干细胞转基因操作 猪类胚胎干细胞接种3~4 d后, 将感染复数为5的表达绿色荧光蛋白的慢病毒添加到细胞培养液中, 同时需添加8 mg/mL polybrene(Sigma); 细胞感染24 h后换液, 72 h后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。表达绿色荧光蛋白的细胞将会被继续培养直至细胞传代。

1.5.4 数据统计 采用SPSS软件包(10.0.1)进行数据处理, 显著性分析采用Student's *t*检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 基础培养液对猪类胚胎干细胞建系效率的影响

在实验室现有卵母细胞培养和体外受精胚胎培养体系下, 实验中所使用胚胎的卵母细胞体外成熟率为(72.71±4.09)%, 体外受精胚胎的卵裂率为(75.61±4.44)%, 体外受精胚胎的囊胚率为

(13.80±2.69)%, 在所有囊胚中直径≥200 μm的囊胚所占的比率为(44.90±7.39)%, 说明在每次重复实验中所使用的体外受精胚胎的质量比较均一, 而且高质量胚胎所占的比例较大。

选取培养至6 d的直径≥200 μm的体外受精胚胎进行接种(图1A), 去除透明带的胚胎接种在以KO-DMEM和DMEM/F12为基础培养液的干细胞培养基中, 分别命名为KO组和F12组, 实验重复7次, 每次每组接种10~20枚胚胎。7~15 d后, KO组出的原代克隆数形成率显著高于F12组(分别是7.3%和0.9%), 同时, 只有KO组可以获得4个稳定传代的猪类胚胎干细胞系, 建系效率57.1%(表2)。由此表明, 在现有实验体系下, KO-DMEM比DMEM/F12更适合作为猪类胚胎干细胞分离培养的基础培养基。

2.2 小分子抑制剂对猪类胚胎干细胞建系效率的影响

胚胎接种0 d开始, KO组和F12组均加入小分子抑制剂[3 μmol/L PD0325901(Stemgent)和5 μmol/L CHIR99021(Stemgent)], 分别命名为KO+2i组和F12+2i组, 实验重复7次。培养2 d后发现, KO+2i组有少量胚胎贴壁(3.0%), 但15 d后无原代克隆衍生, F12+2i无胚胎贴壁(表2), 这一结果与和KO组及F12组相比存在显著差异。结果表明, 添加小分子抑制剂2i并不能够提高猪类胚胎干细胞的建系效率, 反而会降低胚胎的贴壁比率、原代克隆形成率以及猪类胚胎干细胞的建系效率。

2.3 猪类胚胎干细胞系的形态特征

将KO组获得的原代克隆挑取后用TrypLE™

表2 基础培养液及小分子抑制剂对猪类胚胎干细胞建系效率的影响

Table 2 The effect of basal medium and small molecule inhibitors on the efficiency of porcine embryonic stem cell-like cell lines establishment

组别 Group	胚胎数 No. of total embryos	贴壁胚胎数(%±S.D.) No. of attached embryos (%±S.D.)	原代克隆形成数(%±S.D.) No. of primary colonies (%±S.D.)	稳定传代数(%±S.D.) No. of stable passage (%±S.D.)
KO	110	9(8.1±6.3) ^a	8(7.3±6.8) ^a	4(57.1±3.5) ^a
KO+2i	100	3(3.0±3.8) ^b	0 ^b	0 ^b
F12	110	2(1.8±3.7) ^b	1(0.9±3.5) ^c	0 ^b
F12+2i	100	0 ^c	0 ^b	0 ^b

同列数据上标不含有相同字母者表示差异显著($P<0.05$), $n=7$ 。

The value in the same column with different superscripts represented a significant difference ($P<0.05$), $n=7$.

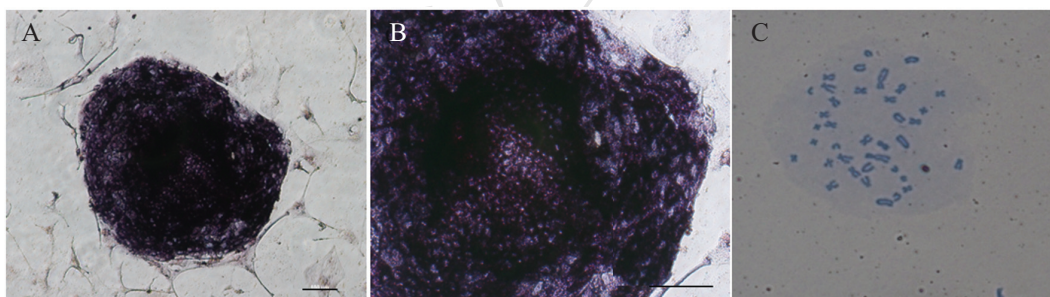


A: 6 d体外受精胚胎; B: KO细胞系原代克隆; C: P5代KO细胞系克隆。标尺=100 μm 。

A: IVF embryo of 6 days; B: primary colonies of KO; C: KO colonies of passage five. Bars=100 μm .

图1 体外受精胚胎和猪类胚胎干细胞表型

Fig.1 Morphology of IVF embryo and pESC-like cells



A: KO细胞系碱性磷酸酶染色; B: 对A的局部放大; C: KO细胞系核型分析, $2n=38$ 。标尺=100 μm 。

A: alkaline phosphatase staining of KO; B: magnification of A; C: karyotype analysis of KO, $2n=38$. Bars=100 μm .

图2 猪类胚胎干细胞碱性磷酸酶检测和核型分析

Fig.2 Alkaline phosphatase staining and karyotype analysis of pESC-like cells

Express消化传代, 每5~6 d传一代, 现已获得4个稳定传代的细胞系, 选取其中一个细胞系KO0919(简称KO)进行后期多能性鉴定。KO细胞系生长特性与人胚胎干细胞相近, 形态扁平, 二维平铺生长, 细胞排列紧密, 核质比大(图1B和1C), 该细胞系目前已传至11代。

2.4 猪类胚胎干细胞系碱性磷酸酶检测和核型分析结果

对KO进行碱性磷酸酶和核型检测, 如图2A和

图2B所示, 获得的猪类胚胎干细胞碱性磷酸酶呈阳性, 细胞显示具有一定多能性。对传至第5代的KO细胞系进行核型分析, 光镜下观察结果显示, 在可以清晰观察到的核型中, 86.76%(59/68)核型正常, 这说明KO细胞系的染色体数目(38条)和形态并未发生异常和改变(图2C)。

2.5 猪类胚胎干细胞系多能性基因表达分析

以猪胎儿成纤维细胞(porcine embryonic fibroblasts, PEF)和实验室早期获得的猪类胚胎干细胞系

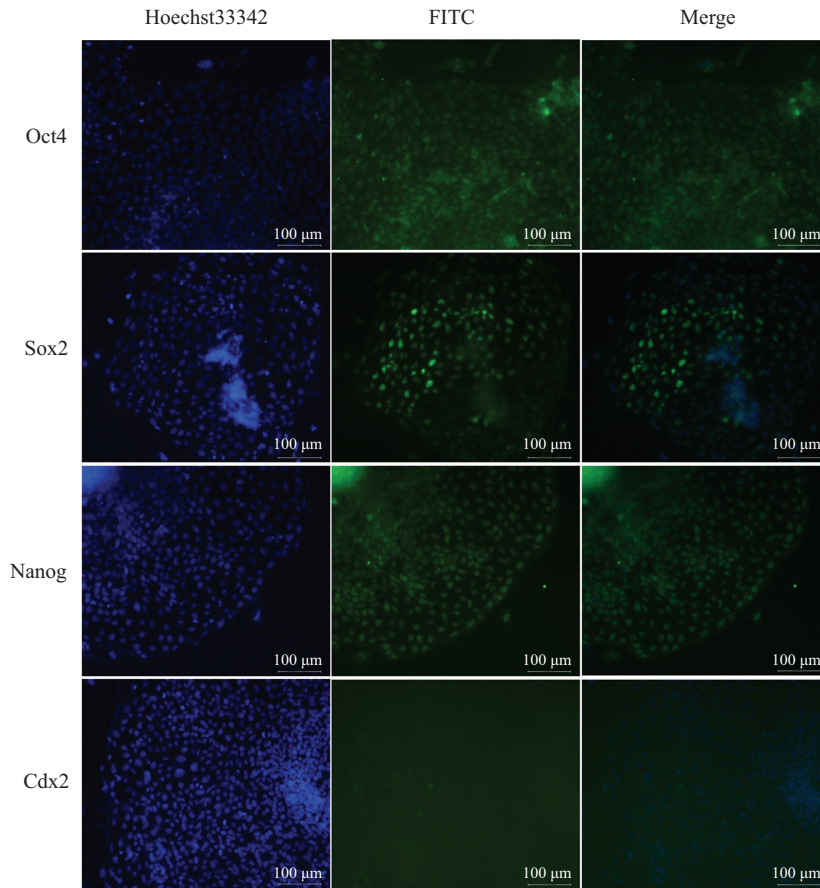
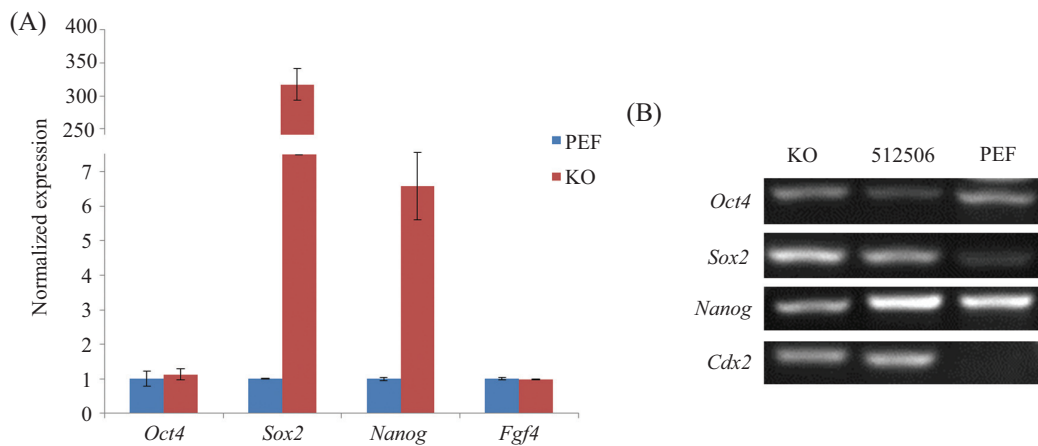


图3 免疫荧光检测猪类胚胎干细胞多能性基因

Fig.3 Immunofluorescence assay for pluripotency markers of pESC-like cells



A: 定量PCR检测多能性相关基因(以*Gapdh*为内参); B: PCR检测多能性基因, 第一列为KO细胞系, 第二列和第三列分别为512506和PEF, 作为对照细胞系。

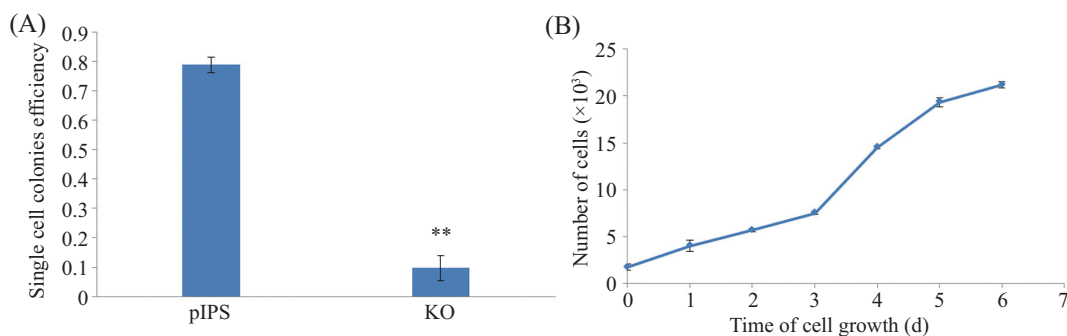
A: quantitative PCR for pluripotency markers (the expressions of these genes were relative to the expression of *Gapdh*); B: PCR for pluripotency markers. The first column was KO, the second and the third columns were 512505 and PEF, as control cell lines.

图4 定量PCR检测猪类胚胎干细胞多能性基因

Fig.4 Quantitative RT-PCR for pluripotency markers of pESC-like cells

(512506)作为对照组, 对KO细胞系进行多能性检测。从免疫荧光结果可以发现, 该细胞表达Oct4、Sox和Nanog, 不表达Cdx2(图3)。同时, 定量PCR的结果显示, KO细胞系中*Fgf4*表达量极低(图4A)。以上证明,

KO细胞系来源于胚胎内细胞团, 而非滋养层和上胚层。PCR检测结果显示, KO细胞系有部分*Cdx2*基因表达(图4B), 与对照组(512506)结果相同, 这可能是由细胞本底表达量导致的。



A: KO细胞系单克隆形成率, $**P < 0.01$, 与pIPS组相比较; B: KO细胞系生长曲线, 倍增时间= $t[\lg 2/(\lg N_t - \lg N_0)] = 45.2$ h。
A: single-cell cloning efficiency of KO, $**P < 0.01$ vs pIPS group; B: growth curve of KO, double time= $t[\lg 2/(\lg N_t - \lg N_0)] = 45.2$ h.

图5 猪类胚胎干细胞系的生长特性

Fig.5 Growth character of pESC-like cells

2.6 猪类胚胎干细胞系的生长特性

以实验室早期获得的猪诱导多能性干细胞系(pIPS)作为对照组,对KO细胞进行单细胞形成率的检测。将P5代的KO细胞用TrypLE™ Express滴消化成单细胞并接种到96孔板中,7 d后测定单细胞形成率为 0.97 ± 0.43 。结果表明,该细胞系不支持单细胞传代(图5A)。对KO细胞进行生长曲线的绘制,传代细胞接种后5 d进入生长平台期,增殖速度下降(图5B)。经过计算,其倍增时间为45.2 h,与人胚胎干细胞相近。

2.7 猪类胚胎干细胞系所依赖的信号通路检测结果

通过定量RT-PCR检测KO细胞系信号通路相关

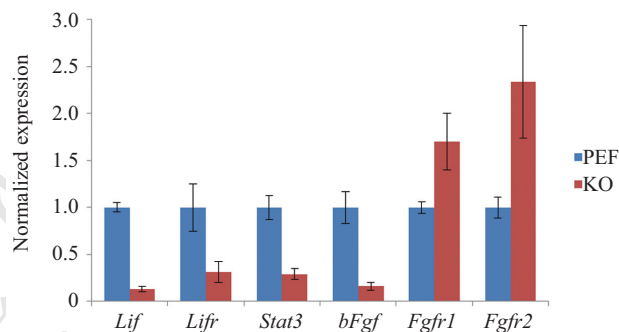
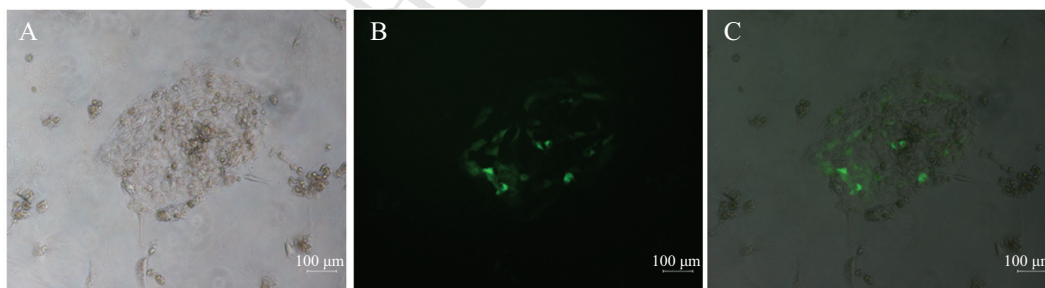


图6 定量PCR检测信号通路相关基因(以*Gapdh*为内参)
Fig.6 Quantitative PCR for signalling pathway genes (the expressions of these genes were relative to the expression of *Gapdh*)



A: 光镜下KO克隆; B: KO克隆表达EGFP; C: 合成图片。

A: phase of KO; B: EGFP expression of KO; C: merged image.

图7 猪类胚胎干细胞系转基因

Fig.7 Transgenes of pESC-like cells

基因的表达情况,从结果分析可知,KO细胞系比较倾向bFGF这条信号通路(图6)。

2.8 猪类胚胎干细胞系转基因操作

利用Fuv-EGFP慢病毒感染培养至3~4 d的KO细胞系,可以得到转基因的细胞系,该细胞系目前已传至第3代。荧光镜下观察发现,其主要呈现嵌合式

的绿色荧光蛋白表达模式(图7)。

3 讨论

虽然猪与人在免疫学、形态学和生理结构等方面有着诸多类似的特点,但猪胚胎干细胞的研究进程远落后于人胚胎干细胞,猪胚胎干细胞培养的最

适培养液也一直未被确定。本实验选择了两种常用于naïve状态的干细胞或人胚胎干细胞的建系和培养的基础培养液, 它们分别是KO-DMEM和DMEM/F12。KO-DMEM是一种DMEM的优化培养基, 它的成分中去除了许多引起细胞分化的因子; DMEM/F12是一种富含矿物质和维生素的高糖培养液, 常被用于无血清培养体系人类胚胎干细胞的培养。实验结果表明, KO-DMEM更适于在现有实验体系下对猪类胚胎干细胞的建系培养。在KO-DMEM培养液中, 胚胎贴壁率和原代克隆形成率均远大于DMEM/F12培养液(分别是8.1%>1.8%和7.3%>0.9%), 同时, 在KO-DMEM培养液中获得了4个稳定传代的细胞系。

KOSR和FBS中含有许多易引起胚胎干细胞分化的因子, N2B27是一种无血清添加剂, 组分确定, 可以替代干细胞培养液中的KOSR和FBS。在大鼠和NOD鼠建系过程中都曾使用这种血清替代物^[5-8]。在人胚胎干细胞的研究中, N2B27常被用于将干细胞由primed状态向naïve状态转化的研究过程中, 在该条件下所培养的干细胞需要添加小分子抑制剂, 培养液组分较为明确。组分明确的培养液可以帮助研究者排除细胞培养过程中不明物质对细胞状态的影响, 也更有利于研究者对细胞所依赖的信号通路的研究^[27-30]。由此可见, 一个真正意义上的组分明确的培养液对于胚胎干细胞的研究具有重要意义。

本研究所使用的是一种组分明确的培养液。在该培养体系下, 我们可以分离培养获得具有一定多能性的猪类胚胎干细胞系, 所获得的细胞系可长期传代, 碱性磷酸酶呈阳性, 表达Oct4、Sox2和Nanog。Oct4等多能性基因有表达、Fgf4表达量极低和Cdx2不表达都说明所获得的细胞系来自于内细胞团而非上胚层和滋养层^[31]。该细胞系生长特性与人胚胎干细胞相近, 形态扁平, 二维片状生长, 不支持单细胞传代, 细胞倍增时间也与人胚胎干细胞相近^[32]。

针对2i应用在猪多能性干细胞上所出现的对立结果, 本实验也对其是否影响猪类胚胎干细胞的建系进行了研究。Telugu等^[22]和Haraguchi等^[23]的研究结果显示, 添加小分子可以将primed状态的猪类胚胎干细胞转化为更贴近naïve状态的细胞系。Petkov等^[26]的研究结果显示, 添加2i会降低猪诱导多能性干细胞的多能性基因以及标记的表达。本次研究结果显示, 添加2i不能提高猪类胚胎干细胞的建系效

率, 反而会降低胚胎贴壁率、原代克隆形成率以及胚胎干细胞的建系效率, 这一结果验证了Petkov等的实验结果。

综上所述, 本研究以猪类胚胎干细胞为研究对象, 比较了不同基础培养液对猪类胚胎干细胞建系的影响, 并探讨了小分子抑制剂在该体系下的作用。实验证实, 在KO-DMEM这一成分明确的猪类胚胎干细胞培养体系下, 2i并不利于猪类胚胎干细胞的建系, 这为研究猪类胚胎干细胞建系提供了有效的实验依据和理论参考。然而, 该培养体系所依赖的信号通路仍然未知, 具体的调控机制还有待于进一步的研究。

参考文献 (References)

- 1 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 2 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7634-8.
- 3 Doetschman T, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 1988; 127(1): 224-7.
- 4 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 5 Hanna J, Markoulaki S, Mitalipova M, Cheng AW, Cassidy JP, Staerk J, *et al.* Metastable pluripotent states in NOD mouse derived ES cells. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 513-24.
- 6 Ueda S, Kawamata M, Teratani T, Shimizu T, Tamai Y, Ogawa H, *et al.* Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats. *PLoS One* 2008; 3(7): e2800.
- 7 Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1299-310.
- 8 Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1287-98.
- 9 Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(17): 7844-8.
- 10 Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, *et al.* Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 2002; 295(5556): 819.
- 11 Yang YG, Chen AM, Garrett LJ, Sergio JJ, Theodore P, Awwad M, *et al.* Development and analysis of transgenic mice expressing porcine hematopoietic cytokines: A model for achieving durable porcine hematopoietic chimerism across an extensive xenogeneic barrier. *Xenotransplantation* 2000; 7(1): 58-64.
- 12 Aleem Khan A, Parveen N, Habeeb MA, Habibullah CM. Journey from hepatocyte transplantation to hepatic stem cells: A novel treatment strategy for liver diseases. *Indian J Med Res* 2006; 123(5): 601-14.

- 13 Brevini TA, Tosetti V, Crestan M, Antonini S, Gandolfi F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origins. *Theriogenology* 2007; 67(1): 54-63.
- 14 Keefer CL, Pant D, Blomberg L, Talbot NC. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci* 2007; 98(1/2): 147-68.
- 15 Chen LR, Shiue YL, Bertolini L, Medrano JF, BonDurant RH, Anderson GB. Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. *Theriogenology* 1999; 52(2): 195-212.
- 16 Li M, Li YH, Hou Y, Sun XF, Sun Q, Wang WH. Isolation and culture of pluripotent cells from *in vitro* produced porcine embryos. *Zygote* 2004; 12(1): 43-8.
- 17 Kim HS, Son HY, Kim S, Lee GS, Park CH, Kang SK, *et al.* Isolation and initial culture of porcine inner cell masses derived from *in vitro*-produced blastocysts. *Zygote* 2007; 15(1): 55-63.
- 18 Gupta MK, Uhm SJ, Lee SH, Lee HT. Role of nonessential amino acids on porcine embryos produced by parthenogenesis or somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 2008; 75(4): 588-97.
- 19 Son HY, Kim JE, Lee SG, Kim HS, Eugene, Park LJK, *et al.* Efficient derivation and long term maintenance of pluripotent porcine embryonic stem-like cells. *Asian Australas J Anim Sci* 2009; 22(1): 26-34.
- 20 Brevini TA, Pennarossa G, Attanasio L, Vanelli A, Gasparrini B, Gandolfi F. Culture conditions and signalling networks promoting the establishment of cell lines from parthenogenetic and biparental pig embryos. *Stem Cell Rev* 2010; 6(3): 484-95.
- 21 Vassiliev I, Vassilieva S, Beebe LF, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Nottle MB. *In vitro* and *in vivo* characterization of putative porcine embryonic stem cells. *Cell Reprogram* 2010; 12(2): 223-30.
- 22 Telugu BP, Ezashi T, Sinha S, Alexenko AP, Spate L, Prather RS, *et al.* Leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent, pluripotent stem cells established from inner cell mass of porcine embryos. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 28948-53.
- 23 Haraguchi S, Kikuchi K, Nakai M, Tokunaga T. Establishment of self-renewing porcine embryonic stem cell-like cells by signal inhibition. *J Reprod Dev* 2012 58(6): 707-16.
- 24 Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227(2): 271-8.
- 25 Liu Y, Song Z, Zhao Y, Qin H, Cai J, Zhang H, *et al.* A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346(1): 131-9.
- 26 Petkov S, Hyttel P, Niemann H. The small molecule inhibitors PD0325091 and CHIR99021 reduce expression of pluripotency-related genes in putative porcine induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram* 2014; 16(4): 235-40.
- 27 Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(20): 9222-7.
- 28 Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, *et al.* Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 2013; 504(7479): 282-6.
- 29 Gu Q, Hao J, Hai T, Wang J, Jia Y, Kong Q, *et al.* Efficient generation of mouse ESCs-like pig induced pluripotent stem cells. *Protein Cell* 2014; 5(5): 338-42.
- 30 Gu Q, Hao J, Zhao XY, Li W, Liu L, Wang L, *et al.* Rapid conversion of human ESCs into mouse ESC-like pluripotent state by optimizing culture conditions. *Protein Cell* 2012; 3(1): 71-9.
- 31 Kubaczka C, Sennner C, Arauzo-Bravo MJ, Sharma N, Kuckenberger P, Becker A, *et al.* Derivation and maintenance of murine trophoblast stem cells under defined conditions. *Stem Cell Reports* 2014; 2(2): 232-42.
- 32 Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. *Restor Neurol Neurosci* 2010; 28(4): 589-603.