

## 技术与方法

## 饲养层种类及密度对体外培养兔原始生殖细胞的影响

王亚丹 虎啸 丁雪粉 朱邯豫 赵玉玺 吕海森 彭展 王新庄\*

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

**摘要** 该研究以14~18天胎兔为试验对象, 体外分离培养扩增原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs), 观察其形态变化及集落形成过程。用 AKP 染色(alkaline phosphatase staining)及分子生物学等方法鉴定兔PGCs, 结果均为阳性, 将兔PGCs分别接种于鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblast, MEF)、兔胚胎成纤维细胞(rabbit embryo fibroblast, REF)制成的不同密度饲养层来确定种属跟密度对体外培养兔PGCs的影响。结果显示, 兔PGCs接种于用同源胚胎成纤维细胞所制成的密度为 $6 \times 10^4$ 的饲养层上所得到的集落个数最多, 集落形态最好, 分化速度较慢。

**关键词** 兔; 小鼠; 胚胎成纤维细胞; 饲养层; 原始生殖细胞

## Effects of Feeder Layer Type and Density on Culturing Rabbit (*Leporidae*) Primordial Germ Cells *In Vitro*

Wang Yadan, Hu Xiao, Ding Xuefen, Zhu Hanyu, Zhao Yuxi, Lü Haimiao, Peng Zhan, Wang Xin Zhuang\*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract** The subject in the experiment was 14-18 d fetal rabbits. The primordial germ cells (PGCs) were isolated and cultured *in vitro*. After observing the morphological changes of PGCs and colony forming process, we used the AKP staining (alkaline phosphatase staining) and molecular biological methods to identify rabbit PGCs. Inoculate PGCs to mouse, rabbit embryo fibroblast feeder layer made of different density to determine the effects of the species and density on the culture of rabbit primordial germ cells *in vitro*. The results showed that rabbit PGCs were inoculated on feeder layers with a density of  $6 \times 10^4$  made from homologous embryonic fibroblasts to obtain the largest number of colonies, the best colony morphology and slower differentiation.

**Keywords** rabbit; mouse; embryonic fibroblast; feeder layer; primordial germ cell

原始生殖细胞是哺乳动物各级生殖细胞的祖细胞, 其在胚胎发育的早期, 短时间的分布于胚胎中。我们可将原始生殖细胞分离出来后, 体外接种到饲养层上进行培养并使之转变成胚胎生殖细胞(embryonic germ cell, EG)。它是一种多潜能细胞, 具有无限增殖、自我更新以及分化成代表3个胚层组织细胞的能力。并且, 对该细胞进行遗传操作、

选择和冻存<sup>[1-2]</sup>而不失其多能性, 正因如此, 一直以来专家们都在进行着相关的研究。Matsui等<sup>[3]</sup>从小鼠的PGCs分离得到EG细胞, 建立了小鼠的EG细胞系, 并能形成生殖系嵌合体后代。Shamblott等<sup>[4]</sup>从5~9周龄人胎儿肠系膜与生殖嵴中分离克隆出5个多能干细胞系。李松等<sup>[5]</sup>用牛同源成纤维细胞共培养方法分离得到类EG细胞。杨继建等<sup>[6]</sup>选取受精

收稿日期: 2018-02-05

接受日期: 2018-05-14

河南省基础与前沿技术研究计划基金(批准号: 092300410081)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13607667013, E-mail: happywang169@163.com

Received: February 5, 2018

Accepted: May 14, 2018

This work was supported by the Foundation and Advanced Technology Research Program of Henan Province of China (Grant No.092300410081)

\*Corresponding author. Tel: +86-13607667013, E-mail: happywang169@163.com

网络出版时间: 2018-07-16 11:01:13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180716.1101.008.html>

后30~50天的关中奶山羊胎儿为材料, 将分离得到的PGCs分别培养在STO饲养层, 或与同源山羊成纤维细胞及山羊睾丸支持细胞共培养, 均获得类EG细胞。丛义梅<sup>[7]</sup>通过组织切片技术对发育22~30天的猪胚胎生殖嵴形态及PGCs在体内的迁移进行了跟踪并通过对不同胎龄、不同饲养层、不同的传代方法的比较对类EG细胞的培养条件进行了优化, 最终获得稳定传代的猪EG细胞系。张晓芳等<sup>[8]</sup>优化了粤黄鸡(*Gallus gallus*)PGCs体外培养的条件, 建立了无饲养层无血清培养体系。

在兔上, Leichthammer等<sup>[9]</sup>报道了穿刺法获得兔PGCs并短期培养观察了其生长特性。Lee等<sup>[10]</sup>在培养液中添加细胞因子, 培养出了兔PGCs。李义书等<sup>[11]</sup>从兔胎儿生殖嵴中分离得到PGCs, 采用共培养方式分离克隆出了兔类胚胎生殖细胞集落, 并传至8代。但对于培养兔PGCs的条件优化的实验还较少。

本试验拟采用酶组织化学检测碱性磷酸酶活性、RT-PCR检测Oct-4(octamer-binding transcription factor-4)的表达等方法研究14~16天胎龄兔胚生殖嵴中PGCs的形态学特征及变化, 并对兔PGCs进行分离、培养, 接种兔PGCs于MEF、REF不同密度制成的饲养层上以探究不同种属、密度饲养层对其集落形成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

本实验所用实验动物为: 昆明白近交系小鼠(*Mus musculus*)(6周龄)、家兔(*Oryctolagus cuniculus*)(6月龄以上)。两种实验动物均购自河南省实验动物中心。

### 1.2 主要试剂与仪器

H-DMEM干粉培养基、双抗、非必需氨基酸、明胶均购自Gibco公司。L-谷氨酰胺、 $\beta$ -巯基乙醇、PBS干粉、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸二钠、二甲基亚砷、丝裂霉素-C均购自北京索莱宝科技有限公司。Trizol试剂、反转录试剂盒均购自Thermo公司。Mix、双蒸水均购自上海莱枫生物科技有限公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。AKP染色试剂盒购自南京建成科技有限公司。DNA Marker购自TaKaRa公司。

本实验所用仪器有: 荧光倒置显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司)、超净工作台(日本空气技

术株式会社)、HF151UV型CO<sub>2</sub>培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司)、PCR仪(美国莱伯特公司)、电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)、电泳凝胶成像分析系统(美国UVP公司)、Real time PCR扩增仪(德国艾本德股份公司)。

### 1.3 MEF、REF的分离培养与传代培养

取妊娠13~15天的母鼠子宫, 在PBS液中洗涤, 后转入无菌室中操作。取出胎鼠, 剪去胎鼠头、尾、四肢、内脏, 再用PBS液洗涤, 用手术剪将组织剪碎至1 mm<sup>3</sup>, 转移至离心管中。滴加3~5倍体积的消化液, 37 °C水浴消化15 min, 滴加等体积培养液以中止反应。用移液枪混匀后静置2 min, 用200目滤纱过滤, 并将滤液转移至另一离心管中, 1 500 r/min离心7 min后重悬。接种到25 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 记为P0, 24 h后全量换液, 之后隔天换液。

取妊娠18~21天的母兔子宫, 在PBS液中洗涤, 后转入无菌室中操作, 之后操作与上述相同。

培养3~4天后, 当P0代细胞长满培养瓶且有80%汇合时, 滴加PBS液洗涤2次, 滴加适量消化液, 当细胞变圆且出现缝隙时, 加入等体积培养液以中止反应, 吹打均匀后将液体移入离心管中离心后重悬。按1:2或1:3传代, 记为P1, 每隔24 h半量换液, 2~3天即可再次传代。分别制作MEF、REF的P1、P3、P7代生长曲线。

### 1.4 饲养层的制备

挑选生长旺盛的MEF和REF, 用丝裂霉素C处理2~3 h, 弃去处理液, 用PBS液洗涤8~10次。滴加适量消化液处理, 当细胞开始变圆且出现缝隙时, 加入等体积培养液以中止反应, 吹打均匀后将液体移入离心管中离心后重悬。吸取适量0.1%明胶滴加到12孔板中, 原则上, 只要孔中所有部位都被明胶浸湿过就可以, 将包被过的12孔板置于超净台上0.5~1 h, 使用前打开盖, 在超净台上吹干或吸去多余的明胶, 将细胞悬液接种到已被明胶包被好的12孔板中培养, 使用前1~2 h换成PGCs培养液即可。

### 1.5 兔PGCs的分离培养

取妊娠14~18天的孕兔的子宫, 在PBS液中冲洗2次后转入无菌室中, 无菌剥离胎兔生殖嵴, PBS液清洗2次, 用手术剪将之剪碎成1 mm<sup>3</sup>的小块。移入离心管中, 滴加3~5倍体积的消化液, 37 °C水浴消化15 min, 滴加等体积培养液以中止反应, 移液枪混匀后静置2 min, 用200目滤纱过滤, 并将滤液转移

至另一离心管中。1 500 r/min离心7 min后重悬, 进行细胞计数, 以 $(3\sim 5)\times 10^5$ 个/mL的密度于饲养层上培养, 24 h后全量换液, 之后隔天换液。

### 1.6 兔PGCs的传代培养

原代培养形成集落后, 在集落分化前用自制玻璃针小心将形态较好的集落挑出并转移至有消化液的培养皿中。机械分离并用枪头将之吹散开, 后加入培养液混匀以停止反应, 将液体转移至新的离心管中, 1 500 r/min离心7 min后重悬, 并接种到新的饲养层上。

### 1.7 兔PGCs的鉴定

1.7.1 形态学鉴定 PGCs接种到饲养层后, 每隔12 h于显微镜下观察其形态的变化, 记下相关数据。

1.7.2 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase staining, AKP)染色 弃去原有液体, 用PBS液洗涤2次, 后按所买试剂盒所写步骤进行, 以饲养层细胞作为阴性对照, 若染色后呈红黑色则为阳性, 浅粉或无颜色则为阴性。

1.7.3 RT-PCR检测 收集未分化的细胞集落, 提取总RNA, 逆转录成cDNA, 采用RT-PCR检测Oct-4的表达。反应体系为: Mix 12.5  $\mu$ L、上下游引物( $1\times 10^{-5}$  mol/L)各1  $\mu$ L、cDNA模板1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L, 总体积为25  $\mu$ L。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C预变性5 min; 95  $^{\circ}$ C变性1 min, 57  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸1 min, 共35个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸10 min; 4  $^{\circ}$ C保温。所用引物及序列见表1。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.8 MEF、REF制作的密度的饲养层对兔PGCs的影响

把经过处理的P3代MEF、REF分别以 $2\times 10^4$ 、 $4\times 10^4$ 、 $6\times 10^4$ 、 $8\times 10^4$ 的密度接种到用明胶包被过的24孔板上, 共进行a、b、c三组实验, 每组实验每个密度重复9孔。将PGCs接种到该饲养层上, 24 h后全量换液, 之后隔天换液, 每12 h于倒置显微镜下观察并记录PGCs生长情况。

### 1.9 统计学分析

所得数据以“平均数 $\pm$ 标准差”表示, 应用SPSS 19.0统计学软件进行处理, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 用Microsoft Excel软件作图。

## 2 结果

### 2.1 MEF、REF的生物学特性

MEF、REF细胞贴壁较快, 接种后3 h即有细胞开始贴壁, 6~12 h绝大多数细胞贴壁, 16 h开始增殖。在显微镜下观察, P0代中杂细胞较多, 24 h全量换液后可去除一些杂细胞或活性较差的细胞, 贴壁细胞呈现出长条形。培养5天左右, 细胞数量增多并长满培养瓶底部, 呈现出揉合状(图1A和图1B)。

传代后的细胞贴壁增殖均较快, 约3天就能长满培养瓶底部且呈揉合状。P1-P3代的增殖速度最快, 且细胞纯度高(图1C和图1D), 传至P7代细胞开始衰老, 形态开始改变。将P1、P3、P7代MEF和REF制成生长曲线可看出都呈现“S”形生长特点, 即1~2天为细胞生长的潜伏期, 3~6天为细胞生长的对数生长期, 7~8天为细胞生长的平台期(图2A和图2B)。P1、P3代MEF和REF比P7代生长情况更好, 数量更多, 而P3代比P1代杂细胞更少, 所以一般选用P3代细胞来制作饲养层。

### 2.2 兔PGCs生长行为的观察

在倒置显微镜下观察, 集落呈现出近圆形桑葚状。PGCs经过一定时间的体外培养, 细胞聚集成团状, 最初只形成小细胞团, 大多为PGCs相互迁移、吸引而聚集成团, 细胞团的出现是细胞活力的直接标志。再培养一定时间后, PGCs开始分裂增殖, 进而形成大的细胞团, 细胞团界限不清, 突出于饲养层生长(图3A)。

挑出形态较好的集落并将之接种在新的饲养层上进行传代, 只将细胞集落成功传了一代(图3B), 传代后的集落小, 且不再有原代集落的形态, 细胞间

表1 引物序列

Table 1 The primer sequence

引物名称 Primer	引物序列 Sequence of primer	扩增长度(bp) Amplified length (bp)
Oct-4 (AJ251914)	Forward primer: 5'-GAT CAA GCA GTG ACT ATT CGC A-3' Forward primer: 5'-AGG CAC CTC AGT TTG AAT GCA TG-3'	231
GAPDH	Forward primer: 5'-GGA GCC AAA CGG GTC ATC ATC TC-3' Forward primer: 5'-GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC T-3'	233



界限较为明显, 边缘较为模糊, 且传代后的细胞集落极易分化。

### 2.3 碱性磷酸酶(AKP)染色结果

将集落进行AKP染色鉴定。染色结果呈阳性, 集落被染成红黑色, 饲养层呈淡黄色或淡粉色(图4)。

### 2.4 RT-PCR检测结果

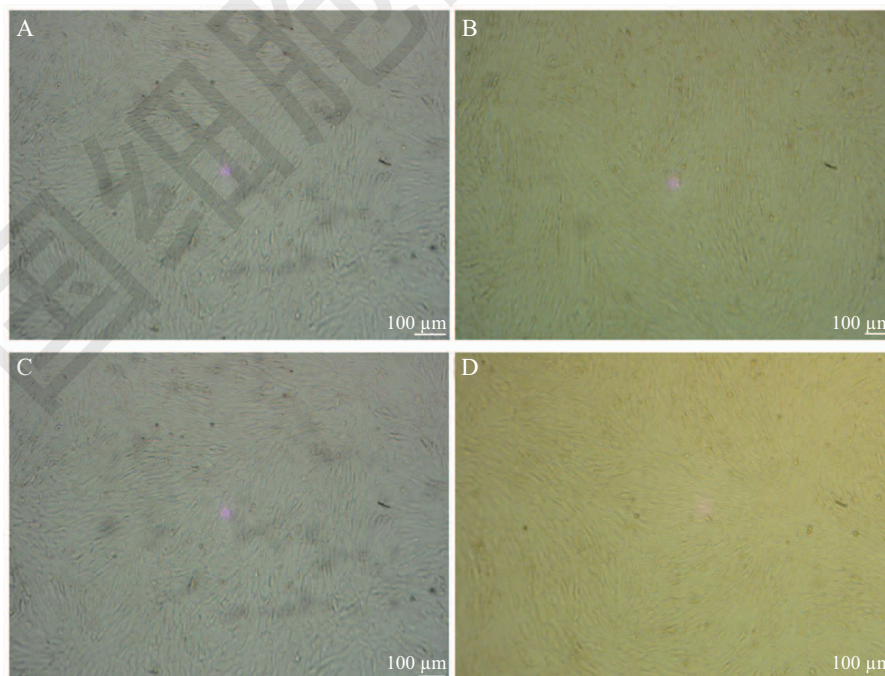
采用RT-PCR检测了未分化的细胞集落*Oct-4*基因的表达情况, 结果显示, 扩增后检测到*Oct-4*基因和内参基因均表达(图5)。

### 2.5 MEF、REF制作的不同密度的饲养层对兔PGCs的影响

兔PGCs分别接种于小鼠、兔胚胎成纤维细胞以 $2 \times 10^4$ 、 $4 \times 10^4$ 、 $6 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^4$ 的密度制成的饲养层上, 共进行a、b、c三组试验, 每组实验每个密度重复9孔。每24 h观察PGCs生长情况并记录下所形成集落的时间、个数、状态等情况。培养96 h, 密度为 $2 \times 10^4$ 的MEF饲养层上的集落开始有分化迹象; 培养120 h, 密度为 $2 \times 10^4$ 和 $4 \times 10^4$ 的MEF饲养层上的集落开始分化, 密度为 $2 \times 10^4$ 和 $4 \times 10^4$ 的REF饲养层上集落有分化迹象。培养144 h, MEF饲养层上的集落全部开始分化, 密度为 $6 \times 10^4$ 和 $8 \times 10^4$ 的REF饲养层上的集落也开始分化, 密度为 $8 \times 10^4$ 的REF饲养层上的

集落分化的更为明显。

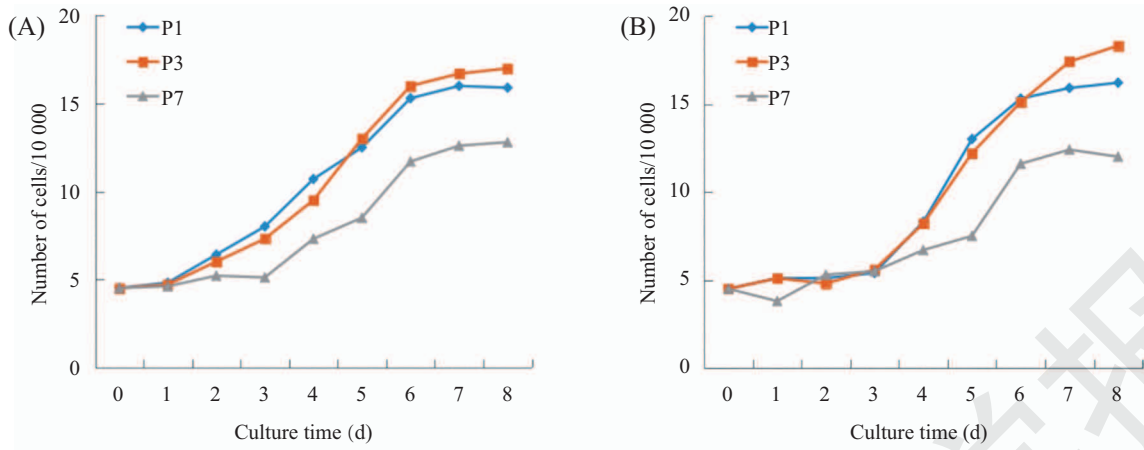
同种饲养层、同一培养时间、不同密度下的集落个数见表2、表3。在MEF上培养24 h时, 培养在各密度上的集落个数差异均不明显。培养48 h时, 培养在密度为 $2 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在其他三个密度上的集落个数差异显著。培养72 h时, 培养在密度为 $2 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在密度为 $4 \times 10^4$ 上的集落个数差异不显著, 培养在密度为 $6 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在密度为 $8 \times 10^4$ 上的集落个数差异不显著, 培养在密度为 $4 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在密度为 $6 \times 10^4$ 上的集落个数差异显著。培养96 h时, 培养在密度为 $6 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在其他三个密度上的集落个数差异显著。培养120 h时, 培养在密度为 $6 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在其他三个密度上的集落个数差异显著。在REF上培养24 h时, 培养在密度为 $2 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在其他三个密度上的集落个数差异显著。培养48 h时, 培养在密度为 $2 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在密度为 $4 \times 10^4$ 上的集落个数差异不显著, 培养在密度为 $6 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在密度为 $8 \times 10^4$ 上的集落个数差异不显著, 培养在密度为 $4 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在密度为 $6 \times 10^4$ 上的集落个数差异显著。培养72 h时, 培



A: 培养5天的鼠胚胎成纤维细胞; B: 培养5天的兔胚胎成纤维细胞; C: P3代鼠胚胎成纤维细胞; D: P3代兔胚胎成纤维细胞。  
A: the MEF cultured for five days; B: the REF cultured for five days; C: the third generation of MEF; D: the third generation of REF.

图1 小鼠、兔胚胎成纤维细胞形态

Fig.1 The morphology of MEF and REF

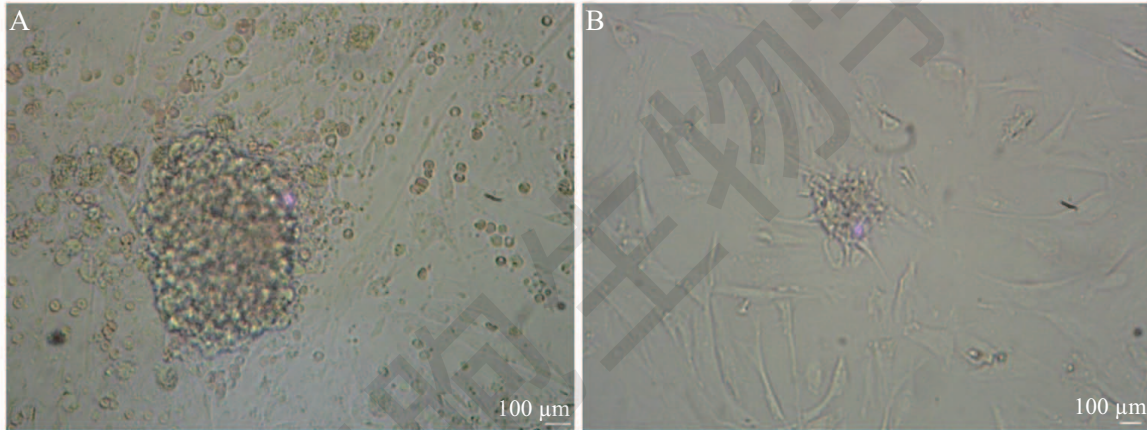


A: P1、P3、P7代鼠胚胎成纤维细胞生长曲线; B: P1、P3、P7代兔胚胎成纤维细胞生长曲线。

A: growth curves of P1、P3、P7 MEF; B: growth curves of P1、P3、P7 REF.

图2 小鼠、兔各代胚胎成纤维细胞生长曲线

Fig.2 Growth curves of P1, P3, P7 MEF and REF



A: 原代细胞集落; B: 传代后的细胞集落。

A: primary cell colony; B: the larger cell colony.

图3 细胞集落形态

Fig.3 The morphology of cell colony

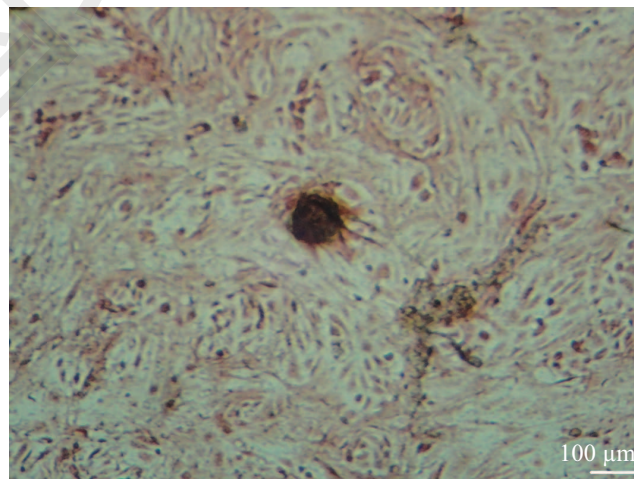
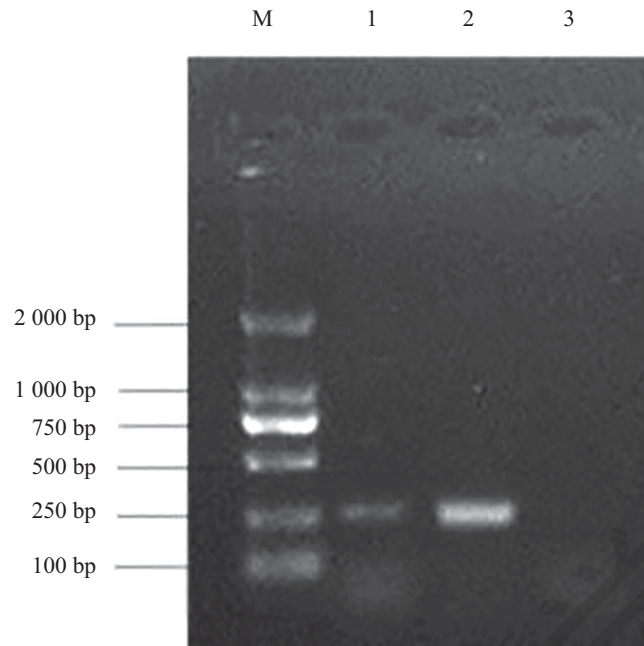


图4 AKP染色阳性

Fig.4 AKP staining positive



M: DNA Maker DL 2000; 1: *Oct-4*扩增产物; 2: *GAPDH*扩增产物; 3: 阴性对照。

M: DNA Maker DL 2000; 1: fragment of *Oct-4*; 2: fragment of *GAPDH*; 3: negative control.

图5 *Oct-4*、*GAPDH*基因片段PCR扩增结果  
Fig.5 PCR amplification results of *Oct-4*, *GAPDH*

表2 PGCs培养于不同密度饲养层所形成的集落个数与标准差(MEF)

Table 2 The number of PGCs colonies that culture with different densities and the standard deviation (MEF)

培养时间(h) Incubation time (h)	平均集落个数 The average number of colony			
	2×10 <sup>4</sup>	4×10 <sup>4</sup>	6×10 <sup>4</sup>	8×10 <sup>4</sup>
24	0±0 <sup>a</sup>	0.074±0.262 <sup>a</sup>	0.037±0.189 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
48	0.333±0.471 <sup>b</sup>	0.630±0.777 <sup>a</sup>	0.926±0.539 <sup>a</sup>	0.704±0.808 <sup>a</sup>
72	0.630±0.618 <sup>b</sup>	0.963±0.693 <sup>b</sup>	1.481±0.569 <sup>a</sup>	1.148±0.705 <sup>a</sup>
96	0.704±0.597 <sup>c</sup>	1.037±0.637 <sup>b</sup>	1.741±0.438 <sup>a</sup>	1.259±0.583 <sup>b</sup>
120	0.704±0.597 <sup>c</sup>	1.037±0.637 <sup>b</sup>	1.741±0.438 <sup>a</sup>	1.259±0.583 <sup>b</sup>

每行数据后相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

The same letter in the same row means no significant differences ( $P>0.05$ ), different letter in the same row means significant differences ( $P<0.05$ ).

表3 PGCs培养于不同密度饲养层所形成的集落个数与标准差(REF)

Table 3 The number of PGCs colonies that culture with different densities and the standard deviation (REF)

培养时间(h) Incubation time (h)	平均集落个数 The average number of colony			
	2×10 <sup>4</sup>	4×10 <sup>4</sup>	6×10 <sup>4</sup>	8×10 <sup>4</sup>
24	0±0 <sup>b</sup>	0.037±0.189 <sup>a</sup>	0.148±0.355 <sup>a</sup>	0.111±0.314 <sup>a</sup>
48	0.333±0.471 <sup>b</sup>	0.704±0.597 <sup>b</sup>	1.148±0.590 <sup>a</sup>	0.889±0.628 <sup>a</sup>
72	0.667±0.471 <sup>d</sup>	1.074±0.539 <sup>c</sup>	1.815±0.669 <sup>a</sup>	1.407±0.562 <sup>b</sup>
96	0.815±0.388 <sup>c</sup>	1.370±0.483 <sup>b</sup>	2.407±0.624 <sup>a</sup>	1.556±0.567 <sup>b</sup>
120	0.815±0.388 <sup>c</sup>	1.370±0.483 <sup>b</sup>	2.481±0.631 <sup>a</sup>	1.593±0.491 <sup>b</sup>

每行数据后相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

The same letter in the same row means no significant differences ( $P>0.05$ ), different letter in the same row means significant differences ( $P<0.05$ ).



表4 培养于MEF与REF所形成的的集落个数的对比

Table 4 The comparison of the number of PGCs colonies that culture on MEF and REF

培养时间(h) Incubation time (h)	饲养层种类 Feeder layer type	平均集落个数 The average number of colony			
		$2 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	$6 \times 10^4$	$8 \times 10^4$
24	MEF	0±0	0.074±0.262 <sup>a</sup>	0.037±0.189 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
	REF	0±0	0.037±0.189 <sup>a</sup>	0.148±0.355 <sup>a</sup>	0.111±0.314 <sup>a</sup>
48	MEF	0.333±0.471 <sup>a</sup>	0.630±0.777 <sup>a</sup>	0.926±0.539 <sup>a</sup>	0.704±0.808 <sup>a</sup>
	REF	0.333±0.471 <sup>a</sup>	0.704±0.597 <sup>a</sup>	1.148±0.590 <sup>a</sup>	0.889±0.628 <sup>a</sup>
72	MEF	0.630±0.618 <sup>a</sup>	0.963±0.693 <sup>a</sup>	1.481±0.569 <sup>a</sup>	1.148±0.705 <sup>a</sup>
	REF	0.667±0.471 <sup>a</sup>	1.074±0.539 <sup>a</sup>	1.815±0.669 <sup>a</sup>	1.407±0.562 <sup>a</sup>
96	MEF	0.704±0.597 <sup>a</sup>	1.037±0.637 <sup>b</sup>	1.741±0.438 <sup>b</sup>	1.259±0.583 <sup>a</sup>
	REF	0.815±0.388 <sup>a</sup>	1.370±0.483 <sup>a</sup>	2.407±0.624 <sup>a</sup>	1.556±0.567 <sup>a</sup>
120	MEF	0.704±0.597 <sup>a</sup>	1.037±0.637 <sup>b</sup>	1.741±0.438 <sup>b</sup>	1.259±0.583 <sup>b</sup>
	REF	0.815±0.388 <sup>a</sup>	1.370±0.483 <sup>a</sup>	2.481±0.631 <sup>a</sup>	1.593±0.491 <sup>a</sup>

同一培养时间每列数据后相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

The same letter in the same row means no significant differences in same culture time ( $P>0.05$ ), different letter in the same row means significant differences ( $P<0.05$ ).

养在各密度上的集落个数差异均显著。培养96 h时, 培养在密度为 $6 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在其他三个密度上的集落个数差异显著。培养120 h时, 培养在密度为 $6 \times 10^4$ 上的集落个数与培养在其他三个密度上的集落个数差异显著。

将培养于MEF和REF上所得的集落个数作对比可得表4, 培养于密度为 $2 \times 10^4$ 上的两组集落个数差异均不显著。当培养时间为96 h、120 h时, 培养于密度为 $4 \times 10^4$ 上的两组集落个数差异显著。当培养时间为96 h、120 h时, 培养于密度为 $6 \times 10^4$ 上的两组集落个数差异显著。当培养时间为120 h时, 培养于密度为 $8 \times 10^4$ 上的两组集落个数差异显著。

### 3 讨论

目前使用最广的饲养层是MEF, 因其取材方便、易于制备而成为干细胞培养首选且最常用的饲养层细胞<sup>[12]</sup>。Stojkovic等<sup>[13]</sup>和Lai等<sup>[19]</sup>尝试使用各种饲养层细胞并对其生物学特性以及对干细胞生长的支持作用进行深入探索。Matsui等<sup>[3]</sup>研究表明, 同源同龄胎儿成纤维细胞所模拟的体外培养条件与PGCs在体内生长的环境最为接近。本研究结果显示, 兔PGCs接种在用REF制成的饲养层上时, 其集落数量、生长状况及保持未分化状态时间, 均优于接种于MEF的效果, 这可能正是因为同源饲养层所形成的环境与PGCs在体内发育的环境相似所致。

PGCs集落的传代, 一般分为手工传代和连同成纤维细胞一起消化传代两种, 相比较而言, 手工传代的方式更好<sup>[20]</sup>。本实验采取了手工传代, 即机械+消化液的方式, 而集落在经过消化液的消化和机械分离吹打的过程中, 会在一定程度上对其造成损伤, 导致其活力下降甚至死亡, 而无法再次形成集落。PGCs集落生长在饲养层上, 在挑取集落的过程中, 不可避免的会同时挑取到一部分饲养层以及包被的明胶, 而饲养层经过丝裂霉素C的处理, 仍然保留了一定的毒性, 也可能对集落的形成造成负面的影响, 使集落传代失败或者传代效果差。

饲养层密度对PGCs的生长繁殖有一定的影响, 当饲养层密度过小时, 细胞不能形成饲养层单层, 饲养层无法分泌足量的生长因子以供PGCs增殖及未分化状态的维持。当饲养层密度过大时, 易产生正常细胞接触抑制现象, 会降低饲养层活力<sup>[21]</sup>, 且其在生长过程中产生的代谢产物也会影响PGCs的生长。本研究结果显示, 接种在密度为 $2 \times 10^4$ 和 $4 \times 10^4$ 饲养层上的PGCs比接种在 $6 \times 10^4$ 和 $8 \times 10^4$ 上所形成的集落数要少, 分化要早, 而接种在 $6 \times 10^4$ 和 $8 \times 10^4$ 上的集落数量虽然相差不大, 但 $8 \times 10^4$ 上的集落分化的比 $6 \times 10^4$ 上的早。

本研究探讨了不同种属、密度饲养层对PGCs集落形成的影响。通过细胞形态学观察、AKP染色、RT-PCR检测、接种PGCs于MEF、REF所制不同密度饲养层, 得出以下结论: (1)在14~18天的兔胚胎当

中均可分离培养出PGCs; (2)兔PGCs接种于密度为 $6 \times 10^4$ 的饲养层上时集落个数、集落形态最好,且不易分化,为理想的饲养层密度; (3)兔PGCs接种于密度为 $6 \times 10^4$ 的REF同源饲养层上比接种于密度同为 $6 \times 10^4$ 的MEF饲养层上所形成的集落个数更多,形态更好,且更不易于分化。

### 参考文献 (References)

- 1 Sawicka D, Chojnackapuchta L, Zielinski M, Plucienniczak G, Plucienniczak A, Bednarczyk M. Flow cytometric analysis of apoptosis in cryoconserved chicken primordial germ cells. *Cell Mol Biol Lett* 2015; 20(1): 143-59.
- 2 Tonus C, Connan D, Waroux O, Vandenhove B, Wayet J, Gillet L, *et al.* Cryopreservation of chicken primordial germ cells by vitrification and slow freezing: A comparative study. *Theriogenology* 2017; 88: 197-206.
- 3 Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; 70(5): 841-7.
- 4 Shambloot MJ, Axelman J, wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13726-31.
- 5 李松, 窦忠英, 华进联, 李相运, 宋文刚, 曲迅. 影响牛胚胎于细胞分离克隆因素的研究. *生物技术通报*(Li Song, Dou Zhongying, Hua Jinlian, Li Xiangyun, Song Wengang, Qu Xun. Influences on isolation and cloning of embryonic stem cells from bovine primordial germ cells. *Biotechnology Bulletin* 2002; (3): 35-9.
- 6 杨继建, 葛秀国, 窦忠英. 山羊胚胎原始生殖细胞的分离与培养. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*[Yang Jijian, Ge Xiuguo, Dou Zhongying. The isolation and cultivation of goat primordial germ cells. *Journal of Northwest A&F University (Social Science Edition)* 2005; 33(5): 15-8.
- 7 丛义梅. 猪原始生殖细胞体内跟踪、体外培养及遗传印记的研究. *东北农业大学*(Cong Yimei. Studies on the tracking *in vivo*, culture *in vitro* and genetic imprint of porcine primordial germ cells. Northeast Agricultural University), 2013.
- 8 张晓芳, 赵姝灿, 张豫, 郑桂纯, 李京华, 王丙云, 等. 粤黄鸡PGCs无饲养层培养体系的建立. *农业生物技术学报*(Zhang Xiaofang, Zhao Shucan, Zhang Yu, Zheng Guichun, Li Jinghua, Wang Bingyun. Establishment of feeder-free culture system for PGCs of Yuehuang chicken. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2017; 25(8): 1366-73.
- 9 Leiehammer F, Baunack E, Brem G. Behavior of living primordial germ cells of livestock *in vitro*. *Theriogenology* 1990; 33(6): 1221-30.
- 10 Lee CK, Scales N, Newton G, Piedrahita JA. Isolation and initial characterization of primordial germ cell (PGC)-derived cells from goats, rabbits and rats. *Theriogenology* 1998; 49(1): 388.
- 11 李义书, 王新庄, 冯勋伟, 王轶敏, 李金辉. 不同饲养层对兔原始生殖细胞传代培养的影响. *西北农业学报*(Li Yishu, Wang Xinzhuang, Feng Xunwei, Wang Yimin, Li Jinhui. Effect of different feeder layers on subculture of rabbit primordial germ cells. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica* 2008; 17(3): 37-41.
- 12 胡嘉波, 麻全慧, 胡三强, 周中卫, 王晓慧, 钱晖, 等. 人胚胎干细胞饲养层的制备及生物学活性. *中国组织工程研究与临床康复*(Hu Jiabo, Ma Quanhui, Hu Sanqiang, Zhou Zhongwei, Wang xiaohui, Qian hui, *et al.* Preparation and biological characteristics of feeder cells for human embryonic stem cells. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research* 2011; 15(23): 4233-6.
- 13 Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, *et al.* An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23(3): 306-14.
- 14 Lin S, Talbot P. Methods for culturing mouse and human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 2011; 690: 31-56.
- 15 Lee JB, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kim MK, Roh SI, *et al.* Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol Reprod* 2005; 72(1): 42-9.
- 16 Liu T, Cheng W, Liu T, Guo L, Huang Q, Jiang L, *et al.* Human amniotic epithelial cell feeder layers maintain mouse embryonic stem cell pluripotency via epigenetic regulation of the c-Myc promoter. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2010; 42(2): 109-15.
- 17 Xi J, Wang Y, Zhang P, He L, Nan X, Yue W, *et al.* Human fetal liver stromal cells that overexpress bFGF support growth and maintenance of human embryonic stem cells. *PLoS One* 2010; 5(12): e14457.
- 18 Zhang K, Cai Z, Li Y, Shu J, Pan L, Wan F, *et al.* Utilization of human amniotic mesenchymal cells as feeder layers to sustain propagation of human embryonic stem cells in the undifferentiated state. *Cell Reprogram* 2011; 13(4): 281-8.
- 19 Lai D, Cheng W, Liu T, Jiang L, Huang Q, Liu T. Use of human amnion epithelial cells as a feeder layer to support undifferentiated growth of mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2009; 11(2): 331-40.
- 20 郭志林, 王新庄, 张涌, 王木, 王轶敏, 胡文举. 从原始生殖细胞分离昆明小鼠EG细胞及其传代培养. *农业生物技术学报*(Guo Zhilin, Wang Xinzhuang, Zhang Yong, Wang Mu, Wang Yimin, Hu Wenju. Isolation of kunming mice embryonic germ cells derived from primordial germ cells and their passage culture. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2006; 14(5): 688-91.
- 21 张秋婷, 苗向阳, 安铁洙. 饲养层及细胞因子对鸡PGCs体外培养的影响. *生物技术通报*(Zhang Qiuting, Miao Xiangyang, An Tiezhu. Effect of feeder layers and exogenous cell factors on *in vitro* culture of chicken primordial germ cells. *Biotechnology Bulletin* 2009; (6): 55-8.