

鱼类胚胎干细胞培养相关技术

续佳 李世峰 李逸平*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室,
上海市分子男科学重点实验室, 上海 200031)

摘要 胚胎干细胞(ESCs)具有自我更新能力和多向分化潜能, 可作为生物学进程、胚胎发育和再生医学等研究的理想实验模型, 由此人们对不同物种胚胎干细胞的开发产生了浓厚的兴趣, 包括在鱼类、啮齿类和灵长类中建立了胚胎干细胞系。该文重点总结了鱼类中ESCs和ESCs样细胞系的培养技术和应用难点, 讨论了鱼类胚胎细胞系因体外长期培养丢失多能性、染色体数目异常、生殖系传递能力和嵌合体形成效率低等问题, 并探讨了通过核移植、半克隆技术作为代替途径来解决生殖系嵌合问题以及快速制备转基因品系鱼类模型, 希望对优化鱼类ESCs培养技术提供参考。

关键词 ESCs; 单倍体ESCs; 鱼类; 多能性; 核移植; 半克隆

Fish Embryonic Stem Cell Culture and Related Biotechnology

XU Jia, LI Shifeng, LI Yiping*

(Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences,
State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, Shanghai 200031, China)

Abstract ESCs (embryonic stem cells) have self-renewal capacity and multidirectional differentiation potential. It provides an ideal experimental material for generating targeted mutant transgenic animals, studying biological processes and revealing embryonic development and regenerative medicine. This sparked intense interest in exploring ESCs in different species. ESC lines have been established in fish, rodents and primates. This review summarizes the technologies and applicational difficulties of ESCs and ESCs-like cell lines in fish, discusses following issues including long-term culture *in vitro* compromise pluripotency of ESCs-like cell lines isolated from fish embryos, low efficiency of germline transmission due to abnormal chromosome karyotype and asynchronous reprogramming. Nuclear transplantation and semi-clonal techniques are proposed as alternative routes to germline chimerism and rapid preparation of transgenic strains of fish models, in the hope of providing a reference for optimizing fish ESCs culture.

Keywords ESCs; haploid ESCs; fish; pluripotency; nuclear transplantation; semi-clone

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有自我更新能力和多向分化潜能, 在基因功能、细胞分化、表观遗传、疾病模型建立、动物组织工程等方面有长足进展。40年前, 首次分离培养出哺乳

动物小鼠的ESCs^[1]奠定了该研究领域的基础。在鱼类模型中, 斑马鱼(*Danio rerio*, Zebrafish)和青鳉鱼(*Oryzias latipes*, Medaka)的应用较为广泛, 在诱变分析、突变鉴定以及再生发育等领域均有应用。从20

收稿日期: 2023-06-17 接受日期: 2023-08-10

国家重点研发计划专项(批准号: 2019YFA0109900)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921415, E-mail: yipingli@sibcb.ac.cn

Received: June 17, 2023

Accepted: August 10, 2023

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2019YFA0109900)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921415, E-mail: yipingli@sibcb.ac.cn

世纪80年代开始, 鱼类ESCs的探索历程距今亦有40年的历史^[2-3]。COLLODI实验室^[3]和洪云汉实验室^[4]使用斑马鱼和青鳉鱼进行了鱼类模式生物ESCs的研究。在青鳉鱼中, 先后建立了ESCs样^[4-5]和单倍体ESCs^[6], 可作为研究鱼类基因的实验材料, 通过基因编辑和核移植技术重新导入胚胎可构建任意编辑类型的模式青鳉鱼品系, 在斑马鱼和其他海洋鱼类中也有ESCs样细胞系培养报道^[7-8]。一些文献总结探讨了鱼类胚胎来源细胞系的分离和多能性表征^[9-10], 特别是青鳉鱼ESCs的应用, 但是利用鱼类ESCs进行体外编辑和特定基因突变品系的制备, 仍然存在阻碍。为此, 我们将介绍鱼类ESCs培养以及编辑技术在细胞和发育生物学研究中遇到的困难, 探讨可能的解决办法, 为鱼类ESCs的应用提供新思路。

1 鱼类干细胞的培养

鱼类的受精方式是体外受精, 胚胎易获取。鱼类胚胎形态透明, 以便于观察和判断发育时期, 通常囊胚期的胚胎用于干细胞的分离培养。鱼类ESCs可用于鱼类发育生物学的研究, 但已报道的ESCs样细胞系均未能进行具有生殖系传递能力的嵌合体实验来验证其多能性, 且不同品系的鱼类培养条件互不相同, 多能性表征亦有差异。

1.1 培养条件与细胞核型的稳定性

借鉴小鼠ESCs培养基条件, 研究者在鱼类ESCs的培养中也使用了胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)来培养细胞。COLLODI团队^[2-3]从斑马鱼囊胚期胚胎中分离、建立了二倍体细胞系ZEM, 使用基础培养基(LDF, L-15:DMEM:F12=50:35:15)、低浓度FBS、鳉鱼血清、青霉素、链霉素、氨苄西林、胰岛素以及鳉鱼胚胎提取物来培养细胞, ZEM表现出正常的染色体核型^[3-11]。研究表明, 高浓度的FBS会影响ZEM细胞系的增殖, 5% FBS最适合ZEM的生长, 并在此基础上加入了大鼠肝细胞的条件培养基辅助培养, 但随着传代次数的增加, ZEM-2A(后续长期传代的细胞名称)染色体数目变得异常^[12]。此现象在斑马鱼ZF4细胞中也存在, 其培养条件包括DMEM/F12基础培养基、抗生素和10%的FBS^[13]。这些结果表明, 包含FBS的培养基可成功培养斑马鱼胚胎细胞, 但无法维持染色体数目稳定。同时期, 在青鳉鱼ESCs-like细胞系的培养条件中, 同样采用

了高浓度15%的FBS培养细胞, 同时加入了低浓度1%的鳉鱼血清以及胚胎提取物, 青鳉鱼ESCs-like细胞系: MES(medaka ES-like cell lines)具有较大的细胞核, 表现出较高的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)活性, MES中75%的细胞染色体数目正常^[4]。

除了培养基条件组分, 在斑马鱼中使用了滋养层细胞进行了短期培养^[3,7-14], 得到了具有稳定核型、多能性的ESCs。2014年, HO等^[15]提出利用明胶培养斑马鱼ESCs样细胞, 采用高糖培养基和高浓度FBS条件来培养斑马鱼胚胎细胞, 在基础培养基中还添加了低浓度1%的鳉鱼血清、羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液(2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, HEPES)、斑马鱼胚胎提取物、重组人碱性成纤维细胞生长因子(human basic fibroblast growth factor, bFGF)、非必需氨基酸、谷氨酰胺、青霉素链霉素、 β -巯基乙醇和亚硒酸钠等物质, 该ZES1细胞可在体外传代至400多代, 具有一定分化能力, 在视黄酸的诱导下可分化成上胚层细胞、内皮细胞等; 该团队做了生殖系传递嵌合体F1代, 通过免疫荧光的方法鉴定了F1代嵌合体中被绿色荧光蛋白GFP标记的ZES1, 但是文中并未提及是用第几代的ZES1进行细胞移植实验的, 也未表明不同代数的ZES1是否可重复该结果, 且并未在得到的F1后代的性腺位置观察到GFP信号^[15-16]。相比青鳉鱼不需要滋养层就可以稳定培养ESCs, 在青鳉鱼中建立的ESCs培养体系未完全适用于斑马鱼ESCs的培养, 斑马鱼ESCs培养条件还需进一步探索。

小鼠和人ESCs能够以单细胞克隆的方式生长, 但是在鱼类ESCs或者ESCs样细胞的研究中, 还未看到此类报道。2009年, 洪云汉团队^[6]在青鳉鱼中建立了单倍体ESCs-HX, 其中单倍体HX1细胞系可以低密度克隆生长方式增殖, 染色体数目正常且稳定的比例超过70%(73.8%~92.2%)。

值得一提的是, 在青鳉鱼单倍体ESCs的培养初期, 培养条件添加了来自二倍体细胞系MES1的条件培养基ESM2, 以及成鱼卵巢细胞的条件培养基(medaka cell culture derived from adult ovary, MO1)^[17-18], 经过多次挑选低密度细胞克隆进行培养, 得到了核型稳定的单倍体ESCs。作者特别指出, 在体外培养青鳉鱼单倍体ESCs时, 为了能够使细胞系具有染色体数目稳定、多能性等特征, 除了合适的培养条件外, 还可能受到鱼类品系的遗传背景的影响, 无致死

基因的近交品系或许更容易培养出单倍体ESCs^[6]。

在青鲮鱼和其他鱼类ESCs样细胞的分离培养过程中, 科研人员均是将多个胚胎的细胞种植在一起进行培养的, 例如3~10个胚胎分离的细胞放在一个孔中进行培养^[3,4,19], 由此建立的细胞系具有异质性。2022年, 来自韩国的GONG实验室^[20]从海洋青鲮鱼(*Oryzias dancena*)中开发出一种从单个胚胎中建立ESCs样细胞系的方法, 主要是因为使用了表达bFGF的滋养层细胞, 该方法传代次数有限, 研究者还发现在野生型滋养层或者是没有滋养层条件下, 无法建立相应的细胞系。具体上文中提到的鱼类ESCs和ESCs样细胞系的研究结果统计见表1(按发表年份排序)。

1.2 多能性因子的影响

青鲮鱼ESCs以及其他鱼类ESCs样细胞系属于贴壁多边形样^[4,15,23], 在低密度培养条件下会分化成神经样细胞、成纤维细胞、黑色素细胞以及肌肉细胞, 而在高密度条件下细胞保持正常生长^[4]。在所报道的鱼类细胞系的文章中, 未见以单个细胞增殖成一个细胞系的报道, 在青鲮鱼细胞系中是以低密度条件培养的单克隆细胞团(多个细胞)增殖成为一个

细胞系的^[17-31]。

研究者们在其他品系鱼类, 比如金头鲷^[23]、红鲷鱼^[8]、花鲈^[24]以及罗非鱼^[28]中也尝试了胚胎细胞系的研究, 这些细胞系均能在体外培养很长时间, 斑马鱼ESCs样细胞系更是传代长达20年之久^[16], 这些细胞均表现出很高的AP活性。多能性因子在ESCs增殖和分化过程中发挥着举足轻重的作用, 能够调控多能性相关基因的表达, 由多种核心转录因子构成的多能性调控网络调节着ESCs的命运。在小鼠等哺乳类动物的ESCs中, 多能性核心转录调控因子包括Oct4、Nanog、Sox2以及Klf4等。在上述报道的ESCs样细胞系中, 罕见对*nanog*表达水平进行的检测。在罗非鱼细胞系TES1中检测到*pou5f3*的表达^[28], 在2014年斑马鱼的报道中提到ZES1细胞系和斑马鱼肝脏成体细胞系中*nanog*和*pou5f1*的表达水平无明显差异, 并没有和斑马鱼囊胚期胚胎表达的*nanog*和*pou5f1*的表达水平进行比较^[15], 虽然在鱼类中未明确定义多能性标志基因, 但是在青鲮鱼细胞系MES和HX1中均有Nanog和Oct4的表达^[6], 并且在青鲮鱼囊胚中分离培养的原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)也有Nanog的表达, 这些PGCs能够

表1 鱼类胚胎来源的细胞系
Table 1 Cell lines derived from fish embryos

名称 Name	鱼类 Fish type	胚胎时期 Stage	倍性 Ploidy	嵌合体 Chimera	基因编辑 Gene editing	年代 Year	文献 References
ZEM	Zebrafish	Blastula	Diploid	No	No	1992	[3]
ZF4	Zebrafish	1 dpf	Polyplloid	No	Yes	1993	[13]
ZEM-2A	Zebrafish	Blastula	Aneuploid	No	No	1994	[12]
MES1	Medaka	Blastula	Diploid	Yes	Yes	1996	[4,21-22]
SaBE-1c	Gilthead sea bream	Midblastula	Diploid	Yes	No	2002	[23]
SBES1	Red sea bream	Blastula	Diploid	No	No	2003	[8]
LJES1	Sea perch	Blastula	Diploid	No	No	2003	[24]
ZEG	Zebrafish	Gastrula	Diploid	Yes	Yes	2006	[14-25]
ZEB	Zebrafish	Blastula	Diploid	Yes	Yes	2006	[14-25]
ZEB2J	Zebrafish	Blastula	Aneuploid	Yes	No	2008	[26]
HX1	Medaka	Blastula	Haploid	Yes	Yes	2009	[6,17-18]
ZES1	Zebrafish	Blastula	Diploid	Yes	Yes	2014	[15]
Z428	Zebrafish	Blastula	Diploid	Yes	No	2014	[27]
TES1-3	Nile tilapia	Blastula	Diploid	Yes	No	2017	[28]
ZBE3	Zebrafish	Blastula	Diploid	No	Yes	2017	[29]
ziPSCs	Zebrafish	Caudal fin	Diploid	Yes	No	2019	[30]
ESCs-like	Marine medaka	Blastula	Diploid	No	No	2022	[20]

dpf表示受精后天数。
dpf represents day post fertilization.

形成嵌合体并准确迁移至胚胎性腺中,产生具有生殖系转移能力的嵌合体后代。

在哺乳细胞中,体细胞重编程为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)可以在没有Nanog情况的下进行^[32],Oct4在此过程中的作用亦可有可无^[33]。在斑马鱼中*nanog*的缺失反而促进了早期胚胎发育过程中PGCs的增殖,造成PGCs定位异常^[34],影响卵母细胞的发育,导致早期胚胎发育阻滞^[35]。青鳉鱼中Nanog并不影响多能性的基因表达,推测其并不直接影响青鳉鱼生殖细胞分化^[36]。Oct4在青鳉鱼和斑马鱼(直系同源物*pou2*)中的表达模式不同,青鳉鱼中的*Oct4*表达模式类似于哺乳动物,主要表达在早期胚胎和成年性腺中,从斑马鱼和青鳉鱼*Oct4*基因的同源性对比可知,斑马鱼Pou2与小鼠Oct4并不相似,斑马鱼Pou2缺乏多能性表达和活性^[37-40];在斑马鱼中,*pou5f1*在早期胚胎中表达,在原肠腔中晚期达到了最高水平;在体细胞中,*pou5f1*主要分布在神经外胚层的根部和尾巴尖端处^[41],参与尾脊髓的发育生长^[42],并不在PGCs中表达^[43]。2022年,孙永华实验室^[44]通过核移植技术将来自编辑过的鲮鱼(*Gobiocypris rarus*, Gr)精子植入到斑马鱼胚胎中,异种移植产生的精子无法产生后代,但是将*pou5f3*、*chd*分别敲除之后,均可以产生对应基因突变的后代,这两个基因的敲除分别造成了大脑和背侧的发育异常。从进化角度来讲,脊椎动物中*oct4*和*pou2*基因的工作机制不同^[45],使得部分鱼类、青蛙和鸡等物种具有决定性的生殖细胞,而非哺乳动物诱导中胚层形成的生殖细胞^[46],从这一角度理解,在不同鱼类中维持ESCs的多能性因子可能并不相同,能够产生具有生殖系转移能力的嵌合体后代的决定性分子也可能不同。

1.3 诱导多能干细胞

在小鼠中,iPSCs是代替ESCs的干细胞来源途径。2006年,YAMANAKA等^[47]在小鼠ESCs培养条件下,通过介导Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4四个核心因子,从小鼠成纤维细胞中诱导出小鼠多能干细胞。同样在鱼类脊椎动物中,也可通过诱导建立iPSCs。在2013年,ROSSELLO等^[48]通过慢病毒的方法在鸟类和斑马鱼中表达哺乳动物的四个核心因子,在鸟类和斑马鱼的成纤维细胞中产生部分重编程的iPSCs-like细胞群,该iPSCs-like细胞群具有AP活性、集落形态以及诱导基因的标记表达,除了斑

马鱼iPSCs-like细胞外,其他重编程的细胞均能够形成畸胎瘤,鱼类特有的生殖细胞产生方式和迁移特点导致其无法像哺乳动物一样以诱导的形式进行生殖系转移,仅形成了嵌合胚胎。2019年,肖亚梅实验室^[30]在斑马鱼成纤维细胞中过表达四个核心因子,同时利用小分子抑制剂处理,成功将来自斑马鱼的成纤维细胞重编程为斑马鱼诱导多能干细胞样细胞系(zebrafish iPSCs-like cells, ziPSCs),表达Oct4、Nanog和Sox2等蛋白,将ziPSCs植入斑马鱼囊胚期胚胎可形成嵌合体。该研究为摸索斑马鱼ESCs培养体系提供了参考。

CRISPR编辑系统是研究靶基因功能的有效工具,该技术在许多物种中显示出广泛的编辑效率,在培养鱼类细胞中也进行了转染的尝试^[49-51]。2017年,洪云汉团队^[29]在斑马鱼细胞系中使用鱼病毒(红斑石斑鱼神经坏死病毒、草鱼重病毒、新加坡石斑鱼虹膜病毒)对细胞进行感染。2018年,LIU等^[21]使用电穿孔Cas9:tracrRNA:crRNA复合物的方法在青鳉鱼单倍体和二倍体细胞系中实现了高效率的转染,效率分别达到了50.0%和61.5%,鱼类细胞系可被用来研究基因功能表型,为高通量筛选功能基因组开辟前景。

2 ESCs样细胞系的应用难点

鱼类ESCs应用的难点在于普适性的体外培养还不完全成熟,以及基于基因编辑的核移植效率低。一些在青鳉鱼ESCs中开展的研究包括基因功能的鉴定^[52-53]、标记和编辑等^[21-39],而在斑马鱼中进行体内基因的功能验证较多。2022年,王红艳实验室^[54]利用幼年斑马鱼验证了丝/苏氨酸AKT2调节干扰素I-IFN的产生,AKT2缺乏会促进I-IFN的产生,有利于抗病毒反应,同时他们也发现AKT2或许可成为治疗系统性红斑狼疮疾病的靶点。在细胞层面,因斑马鱼ESCs样细胞系未被广泛应用,研究类型一般聚焦于成体细胞系分离培养,比如研究肌肉干细胞生物学的基本遗传和细胞机制^[55]、量化评估心肌收缩力^[56],以及研究肌肉修复的具体机制^[57]、探究Hedgehog信号通路在斑马鱼血液干细胞形成中的作用^[58]、探究神经干细胞以及其他成体干细胞的分子机制等^[59-61]。虽然在多种鱼类中进行了ESCs建系的多种尝试,但未能统一培养体系,多能性鉴定标准不成熟,真正意义上的多能性ESCs仍在探索中。

2.1 核移植效率低

核移植是产生基因突变品系的快速手段, 利用传统的CRISPR编辑体系注射胚胎得到的嵌合体F0代, 杂交得到F1代杂合子, 再经历筛选得到F2代纯合子突变品系。在斑马鱼中, 3个月之后达到成年可交配产卵, 总共要经过至少6个月时间拿到纯合子。半克隆技术(semi-clone technology)可以将细胞核移植到1细胞时期的胚胎直接形成杂合子, 缩短构建基因突变品系的时间, 如果直接移植两个基因编辑的细胞核, 即可得到纯合子。半克隆技术是将单倍体供体细胞注射到未去核的卵母细胞中得到个体的技术, 此过程中遗传物质有一半来自供体单倍体细胞, 另一半来自受体。克隆技术产生的个体, 其遗传物质全部来自供体的二倍体细胞, 无受体遗传物质。鱼类ESCs解决了鱼类卵和胚胎无法冻存的问题, 为核移植提供不受限制的供体细胞。核移植效率较低, 在2%左右^[62], 其效率低的原因可能包括细胞核重编程过程受阻, 移植的供体细胞染色体与受体细胞染色体状态不一致, 导致染色体畸变、DNA甲基化模式不匹配等^[63], 进而导致核移植之后的胚胎发育畸形, 达到成年可育的比例大幅降低^[64]。除去以上生物学层面的原因外, 实验操作技术和设备先进性也是提高核移植成功率的方向, 尽可能优化操作体系, 降低对受体的损伤。

2.2 生殖系传递嵌合体形成效率低

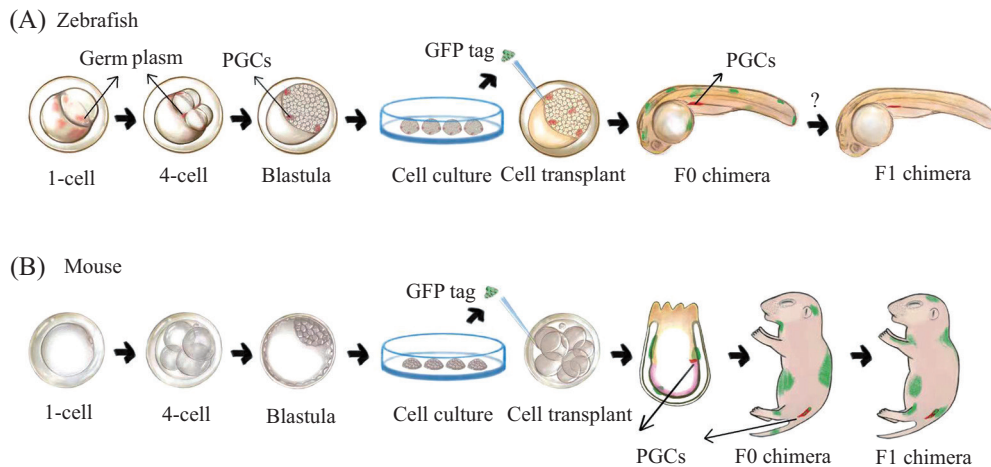
在青鳉鱼中, 利用半克隆技术将GFP标记HX1a(单倍体ESCs)的细胞核注射到白化成鱼成熟的卵子中, 得到的表达野生型色素条纹和GFP蛋白的后代, 是鱼类中第一个使用半克隆技术成功的嵌合体后代^[6]。研究者提到半克隆效率很低, 在注射的667个卵中, 仅有1条鱼成年可育。在研究斑马鱼和青鳉鱼的40年左右时间中, 鱼类细胞嵌合体的形成率并不低, HX1在青鳉鱼中的嵌合体形成率在60%~90%, 在斑马鱼ESCs样细胞系中也能形成嵌合体^[65], 但是没有能够进行生殖系传递的嵌合体。这说明鱼类ESCs、ESCs样细胞系可能经过长期传代之后, 无法保证细胞具有生殖系传递能力, 这是鱼类干细胞培养和鉴定的一大难题。鱼类和小鼠的生殖腺嵌合体不一样, 小鼠的PGCs是由ESCs诱导形成的, 鱼类PGCs的形成是由生殖质决定的^[66]。储存在卵黄中的生殖质, 主要由母源蛋白质和RNA构成, 斑马鱼卵子受精之后, 生殖质开始从卵黄向动物极移

动, 在斑马鱼四细胞时期迁移至细胞间隙, 不属于任何一个细胞, 随着胚胎发育才被分配到特定的细胞当中, 这些细胞就成为PGCs^[67], 将来发育成为配子。图1是斑马鱼和小鼠PGCs的发生时间和过程, 以及分离胚胎细胞建立ESCs的时间点和嵌合体形成过程。故鱼类ESCs细胞若具有生殖系转移能力, 必须含有生殖质, 或者是鱼类ESCs具有异质性, 包含类似PGCs特性的细胞, 移植的这些细胞才能嵌合到性腺中, 得到生殖腺嵌合体后代。体外培养的ESCs若无法获得生殖质, 或无法维持PGCs(样)细胞的存活, 就无法实现生殖系传递, 未来培养鱼类多能性ESCs的重点可能需要参考不同鱼类PGCs的培养, 保持ESCs异质性来维持PGCs(样)细胞的存活。

3 基于生殖细胞系的核移植和半克隆技术

在青鳉鱼中可通过核移植方法将体细胞重编程为个体^[68], 通过体细胞去分化恢复全能性。青鳉鱼ESCs通过半克隆技术得到的个体, 有一半基因组是来自卵子, 也不可排除重编程的贡献, 青鳉鱼ESCs仅提供了遗传物质, 避开了需要PGCs的生殖系传递条件。核移植的效率很低, 其原因可能是重编程效率低, 在经历的染色质结构重构、表观修饰的调整等过程中并不能全部顺利完成。在鱼类中, 通过核移植建立基因突变品系的方式^[69]现已逐渐被CRISPR在体编辑所代替, CRISPR编辑技术能够在F0代获得嵌合体, 但是基因突变纯和品系的获得时间较长, 不利于商业鱼类的繁殖; 精准敲入的效率也有待提高。

在鱼类细胞系中要解决生殖系传递问题的另一种方法, 是寻找建立PGCs细胞系的方法, 或者类精子细胞系进行生殖系传递。体外精子诱导需要复杂的培养条件, 在一些报道中, 从不同的鱼类生殖细胞系中进行了诱导分化成配子的尝试, 将其移植到成年鱼, 例如青鳉鱼^[70]、斑马鱼^[71]等性腺部位进行共培养, 可成功产生精子以及可育后代; 在马口鱼中, 将体外长期培养的精原干细胞系移植到斑马鱼囊胚期胚胎中可形成嵌合体^[72-73]。2020年, 日本YOSHIZAKI实验室^[74]利用体外培养的虹鳉鱼, 使用来自睾丸支持细胞(sertoli cells)作为饲养层, 优化了鳉鱼血清等培养基条件, 实现了体外扩增的A型精原细胞发育成配子的目的, 产生了可育后代。借鉴生殖细胞、精原干细胞的培养条件, 我们可以



A: 图中红色部分代表PGCs(或生殖质, germ plasm)出现的时刻和位置, 1细胞时期形成PGCs的生殖质储存在卵黄中, 随着胚胎发育聚集在4细胞的间隙, 后续分布在囊胚期胚胎的四个位置, 最终迁移到性腺位置形成配子; 斑马鱼卵子受精之后, 从囊胚期(blastula)分离的ESCs在体外进行培养; 将体外培养细胞通过移植到囊胚期的斑马鱼胚胎中形成第一代嵌合体(F0), 但是该嵌合体无法传递到下一代(F1)。B: 小鼠卵子受精之后, 从囊胚期胚胎的内细胞团中分离建立ESCs, 在体外培养, 利用GFP标记之后移植到小鼠4-8细胞的囊胚中形成嵌合体(F0), 产生具有生殖系传递的嵌合体后代(F1)。PGCs在小鼠囊胚期胚胎中并未出现, 最早出现于小鼠胚胎发育的6.5~7.5天。

A: diagram of ESCs derivation from zebrafish. Red dots, PGCs. Germ plasm is contained within oocyte yolk and located between cells cleavage in 4-cell stage. The germ plasm is distributed into four symmetrical parts of zebrafish embryo and form PGCs gradually. B: diagram of ESCs derivation from mouse. No appearance of PGCs in blastula stage in mouse embryo and appear at E6.5-7.5.

图1 斑马鱼和小鼠ESCs分离示意图和PGCs的形成

Fig.1 Diagram of ESCs derivation and PGCs formation from zebrafish and mouse

对鱼类ESCs的培养条件进行优化, 维持PGCs样或PGCs在鱼类ESCs中的比例, 产生具有生殖系传递的嵌合体后代, 通过此途径完善由细胞介导的基因突变品系的建立, 填补鱼类ESCs广泛应用的空缺, 也可商业鱼类和牲畜的养殖提供借鉴。

4 展望

鱼类中开发ESCs的初衷在于研究细胞和发育生物学的基本问题: 探索物种多样性, 揭秘进化中不同物种的变化和联系, 保护濒临灭绝的珍稀鱼类物种等。基因编辑技术的开发和应用在一定程度上便利了鱼类体内基因的功能研究, 该技术能够快速模拟和研究体内的表型变化。自青鳞鱼中实现单倍体ESCs的核移植至今, 在包括斑马鱼在内的其他鱼类中还未实现长久培养的单倍体和二倍体ESCs的建立。核移植效率低可从供体细胞和受体细胞染色体状态以及细胞周期同步等方面进行探索和优化, 系统性探索适合鱼类ESCs体外培养的培养基组分和条件, 鉴于鱼类PGCs特殊的生成方式, 生殖细胞系的体外培养思路和条件或许可成为探索培养鱼类ESCs的攻克方向, 维持生殖细胞的发育潜能, 从细胞层面结合半克隆、核移植技术建立基因突变品系

等或将是未来研究的方向。

首先, 鱼类ESCs细胞系的研究不仅补充了低等脊椎动物的体外培养细胞系的空缺, 而且便利了探索生物进化过程中遗传进化的异同点; 其次, 鱼类ESCs细胞系有助于药物筛选、环境中化学物质和药物的毒理研究; 再次, 基因编辑技术的应用可丰富鱼类品种的研发, 提高鱼类产量, 从而提高鱼类品种的商业利用价值。

参考文献 (References)

- [1] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-6.
- [2] STREISINGER G, WALKER C, DOWER N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291(5813): 293-6.
- [3] COLLODI P, KAMEI Y, FAU-ERNST T, et al. Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues [J]. Cell Biol Toxicol, 1992, 8(1): 43-61.
- [4] HONG Y, WINKLER C, SCHARTL M. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*) [J]. Mech Dev, 1996, 60(1): 33-44.
- [5] WAKAMATSU Y, OZATO K, SASADO T. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3(4): 185-91.

- [6] YI M, HONG N, HONG Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells [J]. *Science*, 2009, 326(5951): 430-3.
- [7] SUN L, BRADFORD C S, GHOSH C, et al. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995, 4(3): 193-9.
- [8] CHEN S L, YE H Q, SHA Z X, et al. Derivation of a pluripotent embryonic cell line from red sea bream blastulas [J]. *J Fish Biol*, 2003, 63(3): 795-805.
- [9] ALVAREZ M C, BÉJAR J, CHEN S L, et al. Fish ES cells and applications to biotechnology [J]. *Mar Biotechnol*, 2006, 9(2): 117-27.
- [10] HONG N, LI Z D, HONG Y H. Fish stem cell cultures [J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(4): 392-402.
- [11] COLLODI P, KAMEI Y, SHARPS A, et al. Fish embryo cell cultures for derivation of stem cells and transgenic chimeras [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1992, 1(4/5): 257-65.
- [12] GHOSH C, COLLODI P. Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) blastula-stage embryos [J]. *Cytotechnology*, 1994, 14(1): 21-6.
- [13] DRIEVER W, RANGINI Z. Characterization of a cell line derived from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1993, 29a(9): 749-54.
- [14] FAN L, COLLODI P. Zebrafish embryonic stem cells [J]. *Methods Enzymol*, 2006, 418: 64-77.
- [15] HO S Y, GOH C W, GAN J Y, et al. Derivation and long-term culture of an embryonic stem cell-like line from zebrafish blastomeres under feeder-free condition [J]. *Zebrafish*, 2014, 11(5): 407-20.
- [16] HONG N, SCHARTL M, HONG Y. Derivation of stable zebrafish ES-like cells in feeder-free culture [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(3): 623-32.
- [17] YI M, HONG N, HONG Y. Derivation and characterization of haploid embryonic stem cell cultures in medaka fish [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(8): 1418-30.
- [18] HONG Y. Medaka haploid embryonic stem cells [J]. *Methods Cell Biol*, 2010, 100: 55-69.
- [19] COLLODI P, KAMEI Y, ERNST T, et al. Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues [J]. *Cell Biol Toxicol*, 1992, 8(1): 43-61.
- [20] SON M J, GONG S A O. Feeder cell-dependent primary culture of single blastula-derived embryonic cell lines from marine medaka (*Oryzias dancena*) [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2022, 58(9): 840-50.
- [21] LIU Q, YUAN Y, ZHU F, et al. Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein approach in cultured Medaka fish cells [J]. *Biol Open*, 2018, 7(8): bio035170.
- [22] HONG N, HE B P, SCHARTL M, et al. Medaka embryonic stem cells are capable of generating entire organs and embryo-like miniatures [J]. *Stem Cell Dev*, 2013, 22(5): 750-7.
- [23] BÉJAR J, HONG Y, ALVAREZ M C. An ES-like cell line from the marine fish *Sparus aurata*: characterization and chimera production [J]. *Transgenic Res*, 2002, 11(3): 279-89.
- [24] CHEN S L, SHA Z X, YE H Q. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos [J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1): 141-51.
- [25] FAN L C, CRODIAN J, COLLODI P. Culture of embryonic stem cell lines from zebrafish [J]. *Methods Cell Biol*, 2004, 76: 151-60.
- [26] XING J G, LEE L E J, FAN L, et al. Initiation of a zebrafish blastula cell line on rainbow trout stromal cells and subsequent development under feeder-free conditions into a cell line, ZEB2J [J]. *Zebrafish*, 2008, 5(1): 49-63.
- [27] HONG N, SCHARTL M, HONG Y N. Derivation of stable zebrafish ES-like cells in feeder-free culture [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(3): 623-32.
- [28] FAN Z, LIU L, HUANG X, et al. Establishment and growth responses of Nile tilapia embryonic stem-like cell lines under feeder-free condition [J]. *Dev Growth Differ*, 2017, 59(2): 83-93.
- [29] JIN Y L, CHEN L M, LE Y, et al. Establishment of a cell line with high transfection efficiency from zebrafish *Danio rerio* embryos and its susceptibility to fish viruses [J]. *J Fish Biol*, 2017, 91(4): 1018-31.
- [30] PENG L, ZHOU Y, XU W, et al. Generation of stable induced pluripotent stem-like cells from adult zebra fish fibroblasts [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(11): 2340-9.
- [31] LEE D, RYU J H, LEE S T, et al. Identification of embryonic stem cell activities in an embryonic cell line derived from marine medaka (*Oryzias dancena*) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2015, 41(6): 1569-76.
- [32] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [33] VELYCHKO S, ADACHI K, KIM K P, et al. Excluding Oct4 from yamanaka cocktail unleashes the developmental potential of iPSCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(6): 737-53.e4.
- [34] WANG H, LIU Y, YE D, et al. Knockdown of zebrafish Nanog increases primordial germ cells during early embryonic development [J]. *Dev Growth Differ*, 2016, 58(4): 355-66.
- [35] HE M, JIAO S, ZHANG R, et al. Translational control by maternal Nanog promotes oogenesis and early embryonic development [J]. *Development*, 2022, 149(24): dev201213.
- [36] CAMP E, SANCHEZ-SANCHEZ A V, GARCIA-ESPANA A, et al. Nanog regulates proliferation during early fish development [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(9): 2081-91.
- [37] SANCHEZ-SANCHEZ A V, CAMP E, GARCIA-ESPANA A, et al. Medaka Oct4 is expressed during early embryo development, and in primordial germ cells and adult gonads [J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(2): 672-9.
- [38] LIU R, LI M Y, LI Z D, et al. Medaka Oct4 is essential for pluripotency in blastula formation and ES cell derivation [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2015, 11(1): 11-23.
- [39] HONG Y H, WINKLER C, LIU T M, et al. Activation of the mouse Oct4 promoter in medaka embryonic stem cells and its use for ablation of spontaneous differentiation [J]. *Mech Dev*, 2004, 121(7/8): 933-43.
- [40] FROSCHAUER A, KHATUN M M, SPROTT D, et al. oct4-EGFP reporter gene expression marks the stem cells in embryonic development and in adult gonads of transgenic medaka [J]. *Mol Rep Dev*, 2013, 80(1): 48-58.
- [41] LIPPOK B, SONG S, DRIEVER W. Pou5f1 protein expression and posttranslational modification during early zebrafish development [J]. *Dev Dyn*, 2014, 243(3): 468-77.
- [42] YUIKAWA T, IKEDA M, TSUDA S A O, et al. Involvement of Oct4-type transcription factor Pou5f3 in posterior spinal cord formation in zebrafish embryos [J]. *Dev Growth Differ*, 2021, 63(6): 306-22.

- [43] ZHANG X Y, LI X T, LI R, et al. Transcriptomic profile of early zebrafish PGCs by single cell sequencing [J]. PLoS One, 2019, 14(8): e0220364.
- [44] ZHANG F H, HAO Y K, LI X M, et al. Surrogate production of genome-edited sperm from a different subfamily by spermatogonial stem cell transplantation [J]. Sci China Life Sci, 2022, 65(5): 969-87.
- [45] TAPIA N, REINHARDT P, DUEMMER A, et al. Reprogramming to pluripotency is an ancient trait of vertebrate Oct4 and Pou2 proteins [J]. Nat Commun, 2012, 3: 1279.
- [46] JOHNSON A D, DRUM M, BACHVAROVA R F, et al. Evolution of predetermined germ cells in vertebrate embryos: implications for macroevolution [J]. Evol Dev, 2003, 5(4): 414-31.
- [47] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126(4): 663-76.
- [48] ROSSELLÓ R A, CHEN C C, DAI R, et al. Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species [J]. eLife, 2013, 2: e00036.
- [49] FAN L, MOON J, CRODIAN J, et al. Homologous recombination in zebrafish ES cells [J]. Transgenic Res, 2006, 15(1): 21-30.
- [50] CHEN J Y, YOU Y K, CHEN J C, et al. Organization and promoter analysis of the zebrafish (*Danio rerio*) interferon gene [J]. DNA Cell Biol, 2005, 24(10): 641-50.
- [51] DEHLER C E, BOUDINOT P, MARTIN S A, et al. Development of an efficient genome editing method by CRISPR/Cas9 in a fish cell line [J]. Mar Biotechnol, 2016, 18(4): 449-52.
- [52] BEJAR J, HONG Y H, SCHARTL M. Mitf expression is sufficient to direct differentiation of medaka blastula derived stem cells to melanocytes [J]. Development, 2003, 130(26): 6545-53.
- [53] SHINDO N, SAKAI A, ARAI D, et al. The ESC-E(Z) complex participates in the hedgehog signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(4): 1179-87.
- [54] ZHENG X, XIAO J, JIANG Q, et al. AKT2 reduces IFN β 1 production to modulate antiviral responses and systemic lupus erythematosus [J]. EMBO J, 2022, 41(6): e108016.
- [55] GANASSI M, ZAMMIT P S, HUGHES S M. Isolation of myofibres and culture of muscle stem cells from adult zebrafish [J]. Bio-protocol, 2021, 11(17): e4149-e.
- [56] VAN MEER B J, SALA L, TERTOOLEN L G J, et al. Quantification of muscle contraction *in vitro* and *in vivo* using musclemotion software: from stem cell-derived cardiomyocytes to zebrafish and human hearts [J]. Curr Protoc Hum Genet, 2018, 99(1): e67.
- [57] PIPALIA T G, KOTH J, ROY S D, et al. Cellular dynamics of regeneration reveals role of two distinct Pax7 stem cell populations in larval zebrafish muscle repair [J]. Dis Model Mech, 2016, 9(6): 671-84.
- [58] GERING M, PATIENT R. Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos [J]. Dev Cell, 2005, 8(3): 389-400.
- [59] ITO Y, TANAKA H, OKAMOTO H, et al. Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum [J]. Dev Biol, 2010, 342(1): 26-38.
- [60] CAO Z, MAO X, LUO L. Germline stem cells drive ovary regeneration in zebrafish [J]. Cell Rep, 2019, 26(7): 1709-17.
- [61] ANGILERI K M, GROSS J M. Dnmt1 function is required to maintain retinal stem cells within the ciliary marginal zone of the zebrafish eye [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 11293.
- [62] WAKAMATSU Y. Novel method for the nuclear transfer of adult somatic cells in medaka fish (*Oryzias latipes*): use of diploidized eggs as recipients [J]. Dev Growth Differ, 2008, 50(6): 427-36.
- [63] DEPINCÉ A, LE BAIL P Y, ROUILLON C, et al. Embryonic fate after somatic cell nuclear transfer in non-enucleated goldfish oocytes is determined by first cleavages and DNA methylation patterns [J]. Sci Rep, 2021, 2021, 11(1): 3945.
- [64] LEE K Y, HUANG H G, JU B SYANG Z, et al. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(8): 795-9.
- [65] FAN L, CRODIAN J, LIU X, et al. Zebrafish embryo cells remain pluripotent and germ-line competent for multiple passages in culture [J]. Zebrafish, 2004, 1(1): 21-6.
- [66] TAO B, HU H, CHEN J, et al. Sin3a-dependent histone deacetylation is essential for primordial germ cell specification [J]. EMBO Rep, 2022, 23(6): e54387.
- [67] RAZ E. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective [J]. Nat Rev Genet, 2003, 4(9):690-700.
- [68] BUBENSHCHIKOVA E, KAFTANOVSKAYA E, MOTOSUGI N, et al. Diploidized eggs reprogram adult somatic cell nuclei to pluripotency in nuclear transfer in medaka fish (*Oryzias latipes*) [J]. Dev Growth Differ, 2007, 49(9): 699-709.
- [69] LEE K Y, HUANG H, JU B, et al. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(8): 795-9.
- [70] HONG Y, LIU T, ZHAO H, et al. Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(21): 8011-6.
- [71] WONG T T, TESFAMICHAEL A, COLLODI P. Production of zebrafish offspring from cultured female germline stem cells [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62660.
- [72] CHEN X, KAN Y, ZHONG Y, et al. Generation of a normal long-term-cultured chinese hook snout carp spermatogonial stem cell line capable of sperm production *in vitro* [J]. Biology, 2022, 11(7): 1069.
- [73] KAN Y, ZHONG Y, JAWAD M, et al. Establishment of a coilia nasus gonadal somatic cell line capable of sperm induction *in vitro* [J]. Biology, 2022, 11(7): 1049.
- [74] IWASAKI-TAKAHASHI Y, SHIKINA S, WATANABE M, et al. Production of functional eggs and sperm from *in vitro*-expanded type A spermatogonia in rainbow trout [J]. Commu Biol, 2020, 3(1): 308.