

胚胎干细胞的分离克隆^{*}

杨 奇, 安立龙, 窦忠英

(西北农林科技大学 家畜生殖内分泌与胚胎工程农业部重点开放性实验室, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 从全能性或多能性细胞获取、分化抑制物选择、培养基、分离方法、鉴定、保存等6个方面, 对胚胎干细胞的分离培养体系的建立进行了系统综述。

[关键词] 胚胎干细胞; 分离; 克隆

[中图分类号] Q813.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)03-120-05

胚胎干细胞(Embryonic Stem Cells, ES Cells)是由早期胚胎内细胞团(Inner cell mass, ICM)^[1]或原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)^[2]经体外分化抑制培养筛选出的一种多潜能细胞。与胚胎细胞相比, ES细胞具有数量上的优势, 与体细胞相比, ES细胞具有低分化优势。因而, 可以有效应用于动物克隆、转基因动物的生产、细胞分化与胚胎发育机理的研究, 以及基因表达调控的研究^[3,4]。胚胎干细胞分离培养的前提条件是选择具有发育全能性(totipotency)或多能性(Pluripotency 或 multipotentiality)的细胞, 建立分化抑制培养体系, 以保持其全能性(或多能性)和有效增殖。同时, 还包括对所得ES细胞的鉴定和保存等问题。

1 发育全能性或多能性细胞的获取

1.1 早期胚胎细胞

不同动物甚至同种动物不同品系间的胚胎, 在发育速度等方面存在着差异。因而, 不同动物分离ES细胞用不同发育阶段的胚胎效果不同。一般标准是细胞要具有全能性, 同时要保证一定的数量。从以往的经验看, 各种动物的最佳时间是: 小鼠取3.5 d囊胚^[1,5]; 猪取9~10 d囊胚^[6]; 羊取7~8 d囊胚^[7,8]; 牛取6~7 d桑椹胚或早期囊胚^[5,9]; 人用7~10 d的囊胚^[10]。同时, 对所取的早期胚胎细胞采取不同的处理方式, 可获得不同的分离效果。目前, 常用的处理方法有:

①延缓胚胎着床。在胚胎早期(小鼠为受精后2.5 d), 通过切除卵巢, 并辅以激素处理, 影响子宫

内环境和胚胎正常发育而使其着床延迟。这种方法始创于Evans和Kaufman^[1]。目的是增加内细胞团(ICM)的细胞数。

②分离ICM。即通过免疫外科手术法、组织培养法或机械剥离法, 剔除滋养层细胞^[5], 获取具有全能性的ICM。主要是为了避免滋养层细胞对ICM的竞争性抑制和诱导分化的作用。免疫外科手术法较为通用。具体过程: 用酸性台氏液处理完整胚胎, 去除透明带, 用Hank's液冲洗后, 将裸胚移入JCR小鼠脾细胞抗血清, 作用一定时间后再移入含新鲜豚鼠血清的Hank's液中, 这样滋养层细胞即被破坏, 去除死去的滋养层细胞即得到ICM。

③脱带处理。通过胰酶或透明质酸酶等处理或机械切割的方式将透明带脱去, 获得裸胚(桑椹胚或囊胚)进行培养^[11,12]。

④离散卵裂球。将桑椹胚或囊胚ICM, 经胰酶消化并辅以机械手法, 离散成卵裂球, 再将卵裂球接种培养^[13]。

⑤热休克处理。此法只在小鼠上有报道^[14,15]。具体方法是, 将所收集的2-细胞至桑椹胚期的胚胎体外37℃培养2h后, 置于41℃持续培养1~2h。然后用于ES细胞的分离培养。目的是阻滞胚胎的分化, 增加ICM的细胞数。

1.2 原始生殖细胞

Robert^[2]用牛的原始生殖细胞分离到了牛类ES细胞, 开创了一种新的分离ES细胞的材料。PGCs随着早期胚胎的发育而发生迁移。所以, 不同动物分离PGCs所取的组织不同, 小鼠取12.5 d胎

* [收稿日期] 2000-09-23

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670359); 国家攻关资助项目(96-C01-03)

[作者简介] 杨 奇(1967—), 男, 新疆伊犁人, 在读博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程和胚胎毒理学研究。

儿生殖嵴^[16];牛取 29~35 d 胎儿生殖嵴^[2];大鼠可取 10.5 d 尿囊、中胚层组织块,12.5 d 背肠系膜或 13.5~14.5 d 生殖嵴^[17];人取 35~63 d 的生殖嵴^[18]。

2 分化抑制物的选择

目前常用的分化抑制物有 3 种:饲养层 (Feeder layer)、条件培养基 (Conditioned medium, CM) 和分化抑制因子 (Differentiation inhibitory activity, DIA)。

2.1 饲养层

饲养层是用特定的细胞(如成纤维细胞、输卵管上皮细胞、子宫上皮细胞、胎儿睾丸细胞等)经丝裂霉素-C 阻断有丝分裂处理后制成的细胞单层。常用的饲养层细胞有 3 种,即 STO(一种成系的小鼠胎儿成纤维细胞),PMEF(原代小鼠胎儿成纤维细胞)和 HEF (Homeologous Embryonic Fibroblast, 同源胎儿成纤维细胞)。饲养层在 ES 细胞的分离过程中有两方面的作用:促进全能性(或多能性)细胞的增殖和抑制其分化。促增殖作用主要是由于饲养层细胞能分泌成纤维细胞生长因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF) 等促有丝分裂因子,同时贴壁过程相当于胚胎在体内的附植过程,是 ICM 快速增殖的启动信号。分化抑制作用则是由于饲养层细胞能分泌白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor, LIF) 等细胞分化抑制因子。

2.2 条件培养基

最早 Martin^[19]应用 PSA-1 条件培养基分离小鼠 ES 细胞成功。使用 CM 具有消除饲养层细胞干扰、免受致癌剂丝裂霉素-C 影响、操作简便等优点,可以进一步分析 ES 细胞分化的启动和关闭机制。常见的用于制备条件培养基的细胞有 BRL, HBC (人膀胱癌细胞株 5637), PSA-1 (一种小鼠 EC 细胞), PC10-6R (LIF 转染的 COS 细胞) 以及 T₃ 细胞 (一种小鼠 EC 细胞)。除 T₃ 的 CM 中富含 β -TGF (转移生长因子) 外,其他细胞的 CM 中均含有约 500~5 000 $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 的 LIF。但是,单独应用 CM 只能在短期传代中维持 ES 细胞的全能性和正常核型^[20]。

2.3 外源性分化抑制因子

ES 细胞的分化抑制肯定是多种因子共同作用的结果。其中起主导作用,也是目前研究最多、使用最广泛的是白血病抑制因子 (LIF/DIA)。LIF 是一种天然的细胞因子,因其能诱导小鼠白血病细胞分

化而得此名,具有广泛的生物学活性。LIF 的使用质量浓度一般为 10~20 ng/mL,但是 LIF 对 ES 细胞的分化抑制作用存在物种差异。

3 培养基

ES 细胞的分离培养,最终目的是获取大量全能性(或多能性)的细胞。这就涉及到能保证全能细胞有效生长、增殖的培养基(包括基础培养基和添加物)的设计与筛选。

3.1 基础培养基的选择

培养 ES 细胞常用的基础培养基有 MEM- α , DMEM, TCM-199 和 F-12, 它们均属于合成培养基。基础培养基的选用可根据实验动物种类和各实验室条件而定。基础培养基只能满足细胞培养的基本生长要求,要保证 ES 细胞的有效生长、增殖就必须添加其他成分。

3.2 添加物的选择

除 LIF 等分化抑制因子外,常用的添加物有血清、 β -巯基乙醇、非必需氨基酸、核苷酸、亚硒酸钠、丙酮酸钠、柠檬酸钠和各种生长因子等。

①血清。血清属于天然培养基,除了供给细胞营养外,还能促进细胞 DNA 的合成,对细胞的增殖有很大的促进作用。在一定范围内,提高培养基中血清的浓度,细胞的最大密度也随之增加,但血清的质量直接影响着培养效果。ES 细胞培养中,一般加体积分数为 10% 小牛血清和体积分数为 10% 胎牛血清。也有人只加体积分数为 15% 胎牛血清或体积分数 15% 小牛血清。

②生长因子的应用。ES 细胞的培养中常用的外源性生长因子是表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF) 和胰岛素样生长因子-1 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1)。EGF 是一种广谱促分裂剂,能促进细胞 DNA 的合成和 mRNA 的转录,并使细胞 S 期提前,从而缩短细胞周期^[21],对 ES 细胞的增殖有促进作用。胰岛素样生长因子可以增强胚胎细胞中 DNA 和蛋白质的合成,促进细胞分裂,增加胚胎细胞数,对滋养层和 ICM 的增殖均有促进作用,能有效提高 ES 细胞的分离。胰岛素与胰岛素样生长因子-1 在结构和功能上均相近,因此在 ES 细胞培养中二者可以相互替代。

此外,干细胞因子 (SCF) 作为干细胞生长的唯一调控因子,能诱导干细胞进入细胞周期,提高转基因效率,对干细胞有显著的促分裂作用^[22]。而且,SCF 和 LIF 均能通过抑制程序性细胞死亡而促进

PGCs 的生存^[23]。这些都显示 SCF 在 ES 细胞的克隆中具有巨大的应用潜力。

③其他添加物。添加非必需氨基酸、柠檬酸钠、丙酮酸钠、核苷酸、谷氨酰胺等主要提供蛋白质合成材料或能量。 β -巯基乙醇是一种强还原剂,能使血清中的含硫化合物还原成谷胱甘肽,防止过氧化物对培养细胞的损害。同时,具有促进 DNA 合成,诱导细胞增殖和促进胚胎贴壁的作用。另外,Polejaeva^[20]证明催乳素能诱导终止水貂囊胚体外培养的特异性滞育,进而提高 ES 样细胞系的建立。

4 ES 细胞的分离方法

目前 ES 细胞的分离基本上延用 Evans 和 Kaufman^[1]的方法,或对其略作改进。从所培养的全能(或多能)细胞的类型上可分为早期胚胎培养法和 PGCs 培养法。

4.1 早期胚胎培养法

根据动物种类确定培养基(基础培养基和添加物)以及采胚时间和胚胎处理方法。然后将胚胎(或 ICM、分裂球)接种于饲养层上,一般提前 1 d 准备好饲养层,用时先换液,待 ICM 充分增殖且未出现分化时,挑取并经胰酶消化后离散,再接种到新的饲养层上。此时,一般多出现 4 种集落:上皮样细胞集落、成纤维细胞集落、滋养层细胞集落和 ES 细胞集落。待 ES 细胞充分增殖后,即挑取再消化离散接种到新的饲养层,经过几次传代筛选后就可得到一定量较纯的 ES 细胞。然后经消化离散、接种即可得到大量纯化的 ES 细胞,再经继代、增殖后即可建系。

4.2 PGCs 培养法^[2]

根据不同物种,采集胎儿的特定组织,经消化离心等过程制备含 PGCs 的悬浮液并接种于新制备的饲养层上。PGCs 有相互聚集的趋势,在成纤维饲养层上,呈集落状生长,形态似小鼠 ES 集落。待其充分增殖后,挑取、消化离散并接种于新的饲养层上。经反复筛选后即可获得 ES 细胞,进而建系。

另外,Simes 等^[24]将牛囊胚 ICM 进行体外悬浮培养,获得了大量扩增的 ICM 并有核移植后代产生。虽然对这种培养增殖的 ICM 细胞是否为 ES 细胞尚无定论,但这无疑给 ES 细胞的分离克隆提供了一个新的思路。

5 ES 细胞的鉴定

ES 细胞的鉴定伴随着 ES 细胞的分离和其他生物技术的发展而不断完善。主要围绕着 ES 细胞

的形态、核型和分化潜能(全能性或多能性)等方面进行。

5.1 形态鉴定

ES 细胞具有与早期胚胎细胞相似的形态特征,细胞体积小,核质比大(核大质少),有 1~2 个核仁。细胞紧密聚集、界限不清,呈集落状生长,形似鸟巢,集落周边整齐,与饲养层界限分明且色泽深亮。有时,集落周围也可见单个 ES 细胞^[25]。

5.2 核型分析

正常的二倍体核型特征是 ES 细胞全能性(或多能性)的基础。核型分析的具体过程是以 2.5 g/L 胰酶+0.4 g/L EDTA,消化处理 ES 细胞(最好是传代后 2 d 呈指数分裂时的细胞),加入等量含体积分数 10%小牛血清的培养液终止消化,离心收集 ES 细胞并制成细胞悬液。再加终质量浓度为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 秋水仙素培养 1 h,离心(1 000 r/min, 5 min),用 50 g/L KCl 低渗处理 10 min,低速离心(500 r/min, 5 min),以固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)制悬液,再反复低速离心 3 次,最后,将悬液滴于载玻片上凉干,固定制片,进行观察、分析^[12]。

5.3 分化潜能检测

这是目前全能(或多能)细胞比较特异和有效的方法,包括分化实验和嵌合体制备。

5.3.1 体外分化实验 将 ES 细胞消化离散制成悬液(10^6 mL^{-1})培养在铺有明胶的培养皿中(一般用四孔板),每 2 d 换 1 次液,最终将产生两种结果:一部分细胞聚集,贴壁生长最后分化成神经、肌肉、软骨等不同类型的细胞(10 d 以后);还有一部分细胞则悬浮聚集分化,形成简单类胚体(4 d),继续培养会形成腔内充满液体、外壁为外胚层样结构的囊状胚体(一般培养 10 d 以后)。

5.3.2 体内分化实验 将 ES 细胞离散制成悬液,以适当剂量(小鼠 $10^6 \sim 10^7$ 个/只)注射到同源动物的皮下,经过一段时间即可形成混合组织瘤,手术取瘤,常规方法制组织切片、染色并观察分化结果。分化潜能高的细胞肿瘤形成迅速,分化细胞类型多,且干细胞巢丰富^[26]。

5.3.3 嵌合体实验 通过聚合法或显微注射法,使 ES 细胞与宿主胚胎细胞共同发育并产生个体。然后,通过检测 ES 细胞在嵌合体中的表达,确定其全能性或多能性。

常用于检测 ES 细胞在嵌合体中表达程度的遗传标记是皮毛色泽和磷酸葡萄糖异构酶(GPI)。皮毛嵌合容易判定,但无法确定其他组织器官的嵌合

情况。GPI 同工酶主要催化 6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖的互变反应,广泛存在于动物体内的所有组织细胞内,通过电泳分析 GPI 同工酶带谱,即可确定 ES 细胞在各组织器官(包括生殖腺)中的嵌合情况^[15],如果 ES 细胞在该组织内嵌合就有 2 条 GPI 同工酶带。但要确定 ES 细胞是否参与配子的形成,则要通过特定的基因标记对其子代进行检测。

5.4 特异性染色

比较通用的是碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)染色和胚胎阶段异性抗原-1(Stage-Specific embryonic antigen-1, SSEA-1)免疫荧光标记。ES 细胞和早期胚胎细胞等未分化的细胞表面含有丰富的 AKP 和 SSEA-1,用特异性染色或免疫荧光标记,即可进行检测。

AKP 染色方法有 3 种。①将贴壁生长的 ES 细胞用 Dulbecco 氏磷酸缓冲液清洗 3 遍,再用体积分数 2.5% 戊二醛固定(4℃冰箱保存),染色液(Fast Blue B 盐 5 mg,双蒸水 0.08 mL,体积分数 36% HCl 0.04 mL,0.04 g/mL NaNO₂ 0.1 mL,萘酚 AS-TR 磷酸钠 10 mg, DMSO 0.5 mL, PBS (pH 8.6) 5 mL,0.1 g/mL MgCl₂ 0.05 mL,以 1 mol/L NaOH 将 pH 值调至 8.4,现用现配)作用 20 min,双蒸水洗 3 次,甘油 PBS 封片,阳性反应呈棕红色^[11]。②贴壁过夜的 ES 细胞经含 75 g/L 蔗糖的体积分数 1% 多聚甲醛(paraformaldehyde)固定,用底物缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 9.5, 50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl₂ 和体积分数 0.1% Tween-20)平衡,室温避光置入染色液[75 g/L NBT (Nitroblue tetrazolium salt)溶于体积分数 70% DMF (Dimethylformamide), 50 g/L BCIP (5-bromo * 4-chloro-3-indolyl phosphate,

toluidinium salt)溶于 100% DMF,染色前分别取 45 和 35 μ L 稀释于 10 mL 底物缓冲液,新鲜配置]作用 15~20 min。阳性反应为深蓝紫色^[27]。③取培养的细胞,无水乙醇固定,经染色液[25 mmol/L Tris-顺丁烯二酸缓冲液 pH 9.0, α -磷酸萘酯 0.4 g/L, 坚固红 TK 1 g/L, 氟化镁 0.8 g/L]染色 15~20 min^[28]。

SSEA-1 荧光染色主要以鼠抗 F₁ 细胞单抗为第一抗体、羊抗鼠-Rhodamine 为第二抗体,羊抗兔 IgG 为封闭液,分步染色,荧光显微镜下观察分析。具体过程是:将贴壁生长的 ES 细胞用 Dulbecco 氏磷酸缓冲液清洗 3 遍,再用体积分数 2.5% 戊二醛固定(4℃冰箱保存),Dulbecco 氏 PBS 洗 3 遍,质量分数 2% Triton 20 min, Dulbecco 氏 PBS 洗 3 遍,封闭液 20 min, Dulbecco 氏 PBS 洗 3 遍,第一抗体 4℃冰箱中过夜, Dulbecco 氏 PBS 洗 3 遍,第二抗体 30℃温箱中 30 min, Dulbecco 氏 PBS 洗 3 遍,甘油 PBS 封片^[11]。

6 ES 细胞的冷冻保存

ES 细胞一旦建系,便急剧扩增,每 7~8 h 就能增殖 1 次。因此,要定时传代培养。但与其他种类的细胞一样,经长期培养 ES 细胞会出现变异。因此,ES 细胞要在传代的早期不断冻存。具体方法是:用 2.5 mg/L 胰酶+0.4 mg/L EDTA 消化离散 ES 细胞集落,等量 DMEM+体积分数 15% 小牛血清中止消化,离心(1 000 r/min, 5 min),弃上清液,加入保护液(DMEM+体积分数 20% DMSO+体积分数 20% 小牛血清)制成细胞悬液($6 \times 10^6 \sim 6 \times 10^7$ mL⁻¹),装入冷冻细管,投入液氮或-70℃保存^[12]。

[参考文献]

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(9): 154-156.
- [2] Robert A. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells[J]. Reprod Fertil Dev, 1994, 6: 569-575.
- [3] Ron M. Stem cells-hype and hope[J]. Nature, 2000, 406: 361-364.
- [4] Brustle O, Jones K N, Learish R D, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors, A source of myelinating transplants[J]. Science, 1999, 285: 754-756.
- [5] Saito S. Bovine embryonic stem cell-like culture over several passages[J]. Dev Biol, 1992, 20(3): 134-141.
- [6] Evans M J. Derivation and preliminary characterization of putative pluripotent cell lines from porcine and bovine embryos[J]. Theriogenology, 1990, 33: 125-128.
- [7] Tillmann, Meinecke. Isolation of ES-like cell lines from bovine and caprine preimplantation embryos[J]. J Anim Breed Genet, 1996, 113: 413-426.
- [8] Campbell K H S. Sheep cloned by nuclear transfer from cultured cell line[J]. Nature, 1996, 380(7): 64-66.

- [9] Stice S. Bovine embryonic pluripotent cell lines derived from morula stage embryos[J]. *Theriogenology*, 1994, 41: 304.
- [10] Thomson J A, Eldor J I, Shapiro S S. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282(6): 1145—1147.
- [11] 赖良学. 家兔胚胎干细胞的分离培养[D]. 长春: 东北农业大学, 1995.
- [12] 钱永胜, 宴忠英. 牛和猪胚胎干细胞的分离与克隆[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 1996, (专辑): 142—147.
- [13] Eistetter H R. Pluripotent embryonic stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae[J]. *Dev Biol*, 1981, 31(3): 275—282.
- [14] Wells D N. Factors influencing the isolation of murine embryonic stem cells[J]. *Theriogenology*, 1991, 31(1): 293.
- [15] Arechiga C F, Hansen P J. Response of preimplantation murine embryos to heat shock as modified by developmental stage and glutathione status[J]. *Dev Biol*, 1998, 34: 655—659.
- [16] Tsunoda Y. Nuclear transplantation of the male primordial germ cells in the mouse[J]. *Dev Biol*, 1989, 107: 407—411.
- [17] Mitani T. Proliferation of alkaline phosphatase positive cells from culture primordial germ cells in rats[J]. *Theriogenology*, 1994, 41: 258.
- [18] Shambloot M J, Axelman J, Shunping Wang. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. *Dev Biol*, 1998, 95: 13726—13731.
- [19] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell lines from early mouse embryos Cultured in medium Conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. *Dev Biol*, 1981, 78(2): 7634—7638.
- [20] Polejaeva I A. Prolactin induced termination of obligate diapause of mink (*Mustela vison*) blastocysts in vitro and subsequent establishment of embryonic stem-like cells[J]. *J Reprod Fert*, 1997, 109(2): 229—236.
- [21] 李文辉. 表皮生长因子研究进展[J]. *生命的化学*, 1992, 12(1): 5—9.
- [22] 奚永志. 干细胞因子, 一个新的多功能协同因子[J]. *生理科学进展*, 1993, 24(4): 354—357.
- [23] Maurizio P. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis)[J]. *Dev Biol*, 1993, 118: 1089—1094.
- [24] Sims M, First N L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells[J]. *Dev Biol*, 1994, 90: 6143—6147.
- [25] Shen S B. Developmental potential of mouse primitive ectoderm cells following blaslocysts infection[J]. *Science*, 1988, 21: 189—199.
- [26] Wobus A M. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo[J]. *Exp cell Res*, 1984, 152: 212—219.
- [27] 杜亮兴, 施渭康. LIF 基因转染的 ES 细胞生长与分化特性的研究[J]. *实验生物学报*, 1996, 29(4): 413—422.
- [28] 些桂萱, 韩 嵘, 尚克刚. C₅₇BL/6J 小鼠 ES 细胞系的建立及其特性分析[J]. *细胞生物学杂志*, 1996, 18(3): 121—125.

Isolation and cloning of embryonic stem cells (ES cells)

YANG Qi, AN Li-long, DOU Zhong-ying

(Key laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Agricultural Ministry of China,
Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this paper, we reviewed the establishment of ES cells culture system in following aspects: obtaining of totipotent (or pluripotent) cells, selection of inhibitory substances, media, isolation methods, examination and freeze preservation.

Key words: ES cells; isolation; cloning