

由猪囊胚内细胞团分离胚胎干细胞的研究^{*}

冯秀亮, 高志敏, 杨春荣, 雷安民, 樊敬庄, 窦忠英

(西北农林科技大学 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 以 PMEF 为饲养层培养猪 7~9 日龄囊胚分离 ES 细胞, ICM 初次传代时间为 4~7 d, ES 细胞传代时间为 4~5 d, ES 细胞传至 1~5 代的胚胎数分别为 12(18.8%), 8(12.5%), 5(7.8%), 3(4.7%), 2(3.1%), 并进行体外分化和 AKP 染色鉴定。对影响猪 ES 细胞分离与克隆的因素进行比较, 结果表明: (1) 9 和 14 日龄小鼠胎儿 PMEF 饲养层培养 9 日龄猪囊胚, 贴壁率(83.3%, 88.9%), ICM 形成率(75.0%, 77.8%)和 1 代 ES 细胞克隆率(25.0%, 22.2%)无显著性差异($P > 0.05$)。 (2) 7, 8 和 9 日龄胚胎随胚龄增加, 胚胎贴壁率(5.9%, 57.1%, 87.9%)和 ICM 形成率(0.0%, 28.6%, 81.8%)升高, 差异显著($P < 0.01$)。 (3) 9 日龄囊胚直径 0.8~1.2 mm 培养 36~48 h 贴壁, 贴壁率 100%, ICM 形成率 100%; 直径 > 1.2 mm 囊胚贴壁时间为 48~72 h, 贴壁率 57.1%, ICM 形成率 57.1%, 差异显著($P < 0.05$)。去除直径 > 1.2 mm 囊胚部分滋养层细胞培养 36~48 h, 贴壁率 91.7%, ICM 形成率 83.3%; (4) 添加外源 LIF 没有提高贴壁率(86.4%, 90.9%; $P > 0.05$)和 ICM 形成率(81.8%, 81.8%; $P > 0.05$)。

[关键词] 胚胎干细胞; 内细胞团; 囊胚; 分离; 猪

[中图分类号] Q 813.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0005-06

Evans 和 Kaufmann^[1]最早报道由延迟着床的小鼠囊胚内细胞团(Inner cell mass, ICM)分离得到胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES 细胞)。之后, 经过许多学者多年的研究, 小鼠 ES 细胞分离克隆的方法基本成熟。沿用小鼠 ES 细胞分离的方法, 对猪、牛、绵羊、山羊等多种动物 ES 细胞的分离研究也取得了进展^[2~13]。由于猪与人类生理特征的相似性, 使其在建立人类疾病动物模型、临床器官移植或器官组织修复等方面具有潜在的科研与临床应用价值, 有关猪 ES 细胞的研究也更为研究人员所重视。本研究以猪胚胎为研究对象, 于 1997~1999 年用原代小鼠胎儿成纤维细胞作为饲养层进行了猪 ES 细胞的分离与克隆, 并就胚胎日龄、培养基添加成分、胚胎处理方法等因素对猪 ES 细胞分离的影响进行比较, 为猪 ES 细胞系的建立提供资料并积累经验。

1 材料与方法

1.1 试验动物

小鼠 昆明品系小鼠, 6~8 周龄, 购自中国人民解放军第四军医大学实验动物中心, 购回后饲养

观察 2 周应用。

猪 关中黑猪和长白杂种猪, 10~24 月龄, 购自附近农村, 购回后饲养观察 1 月以上应用。

1.2 小鼠胎儿成纤维细胞的分离与饲养层的制备

1.2.1 小鼠胎儿成纤维细胞的分离 将妊娠 9~14 d 的小鼠断颈处死, 无菌取出胎儿, 去除其头部、四肢和内脏, 用 PBS 洗 2~3 次后充分剪碎, 加入细胞消化液(含 2.5 g/L 胰酶和 0.4 g/L EDTA 的 PBS 液), 室温下磁力搅拌消化 10~15 min, 再加入细胞培养液(DMEM + 150 mL/L 犊牛血清)中止消化。经 100 μ m 孔径滤纱过滤, 低速离心(1 000 r/min, 3~5 min)后重新制成细胞悬液($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /mL), 取 2~3 mL 移入直径 7 cm 培养皿中并加入 4 mL 培养液, 于培养箱中培养 30 min (37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO₂, 饱和湿度), 更换培养液培养。一般 3~4 d 后见细胞连生铺满皿底, 可用于制备饲养层或继代培养^[14]。

1.2.2 饲养层的制备 取细胞连生铺满皿底的培养皿吸去培养液, 加入 4 mL 含 10 μ g/mL 丝裂霉素 C 的培养液培养 2~3 h, 吸去丝裂霉素 C 液, 用 PBS

^{*} [收稿日期] 2002-12-23

[基金项目] 农业部生物技术项目(攻关)(85-11-02-1)

[作者简介] 冯秀亮(1970-), 男, 山西长治人, 在读博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。现在第四军医大学西京医院工作。E-mail: fx1700610@yahoo.com.cn

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

洗 5 次, 加入 4 mL 消化液消化 2~3 min, 再用培养液中中止消化并充分吹打成单细胞悬液, 离心后重新制成细胞悬液 ($4 \times 10^5/\text{mL}$), 以 0.6 mL/孔加入四孔板中, 最后将四孔板置于培养箱。一般饲养层在使用前一天制备^[14]。

1.3 猪胚胎的获取

自然发情母猪与公猪自然交配 3~5 次(每次间隔 10~12 h), 于配种后第 7~9 天用手术法子宫冲胚。冲胚液选用添加 10 mL/L 犊牛血清的无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 液。

1.4 胚胎体外培养

吸去前一天预先制备的饲养层中的溶液, 加入相同量的培养基(DMEM + 150 mL/L 犊牛血清 + 0.2 mmol/L 2-巯基乙醇 + 0.1 mmol/L NaSeO_3 + 0.20 $\mu\text{g/L}$ IGF-1), 分为添加 LIF 组(含 LIF 20 ng) 和不添加 LIF 组, 将冲取的猪胚胎(切割或不切割)置于饲养层上, 每孔 1 枚。最后将四孔板置于 CO_2 培养箱中培养(38.5 °C, 体积分数 5% CO_2 , 饱和湿度)。

1.5 胚胎干细胞的分离与克隆

培养胚胎的 ICM 细胞增殖到一定程度后, 选择生长集中, 细胞团隆起明显, 形态仍未表现出分化的 ICM 集落进行初次传代。传代方法是用玻璃针剥离 ICM 与周围的滋养层细胞后分离挑取 ICM, 于无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 液中洗 1 次后移入细胞消化液(含 2.5 g/L 胰酶和 0.4 g/L EDTA 的 PBS 液)中作用 3~5 min, 再移入含血清的培养液中用毛细管吹打并辅以玻璃针分离, 制成由 8~10 个细胞组成的细胞块悬液后, 移入新的饲养层继续培养。培养过程中观察新集落出现的时间和数量, 每 2 d 半量更换 1 次培养液。

根据新集落的生长状况, 再用玻璃针挑取不同类型集落, 按 ICM 传代程序进行传代, 观察各代细胞集落出现的时间、数量和类型以及各种类型的分化细胞。

1.6 胚胎干细胞的检测

1.6.1 分化检测 采用悬浮培养法检测 ES 细胞的分化能力, 观察类胚体及不同类型分化细胞的出现。

1.6.2 碱性磷酸酶染色 (1)作用液配制。快蓝 B 盐(fast blue B) 5 mg, 双蒸水 0.08 mL, HCl(体积分数 36%) 0.02 mL, 40 g/L NaNO_2 0.1 mL, 萘酚 AS-TR 磷酸钠 10 mg, DM SO 0.5 mL, PBS (pH 8.6) 5 mL, 100 g/L MgCl_2 0.05 mL, 以 1 mol/L NaOH 将 pH 值调至 8.4。 (2)染色步骤。用作用液处理 20 min, 双蒸水洗 3 次, 再用甘油 PBS 封片。 (3)结果判定。阳性集落染成红棕色^[15]。

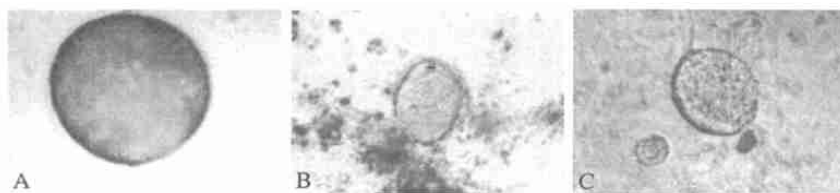
1.7 统计方法

试验数据用 χ^2 检验法进行差异显著性检验。

2 结 果

2.1 猪 ES 细胞的分离与克隆

培养 7~9 日龄猪胚胎(图 A) 4~7 d 后可获得增殖的 ICM (图 B)。初次传代后, 一般在 48 h, 最快在 24 h 内就会出现新的集落, 常有 3 种: (1)ES 细胞样集落, 呈鸟巢状, 有的 ES 细胞一出现, 隆起就非常明显, 有的开始扁平, 随培养时间延长, 细胞数量增多而逐渐隆起(图 C); (2)滋养层细胞集落, 细胞间连接紧密, 界限不清, 彼此连接成透明膜状, 集落边缘有椭圆形细胞形成一圈; (3)上皮细胞样集落, 其从出现到后继培养过程中一直为扁平状, 轮廓不清, 细胞胞体大, 界限清晰。



图版说明: A. 置于饲养层上的猪孵化囊胚(100 $\times$); B. 增殖的 ICM (100 $\times$); C. 猪 ES 细胞克隆(400 $\times$)

Explanation of plates: A. Hatched blastocyst cultured on feeder layer; B. Proliferated ICM derived from porcine blastocysts; C. ES cell clone derived from porcine ICM

挑选 ES 细胞集落传代, 大约 4~5 d 传代 1 次。培养的 64 枚胚胎中, 形成 1~5 代 ES 细胞的胚胎数分别为 12, 8, 5, 3 和 2。由 2 枚胚胎分离的 5 代 ES 细胞集落传至第 6 代时丢失。

2.2 胚胎日龄对猪 ES 细胞分离的影响

比较 7~9 日龄猪胚胎分离 ES 细胞的差异, 结果见表 1。

表 1 胚胎日龄对猪 ES 细胞分离的影响

Table 1 Effect of embryonic age on the isolation of porcine ES cells

胚龄/d Age of embryos	胚数 Embryo number	贴壁率/% Attachment rate	ICM 形成率/% ICM formation rate	各代 ES 细胞克隆率/% Clone rate of each passage ES cells				
				1	2	3	4	5
7	17	5.9(1/17) a	0.0(0/17)					
8	14	57.1(8/14) b	28.6(4/14) a	14.3(2/14) a	7.1(1/14) a	7.1(1/14) a		
9	33	87.9(29/33) c	81.8(27/33) b	33.3(10/33) a	21.2(7/33) a	12.1(4/33) a	9.1(3/33)	6.7(2/33)

注: 同列标不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。下表同。

Note: Different small letters in same column indicate significant difference ($P < 0.05$). The same is to the following tables

2.3 饲养层对 9 日龄猪胚胎克隆 ES 细胞的影响 胎贴壁率、ICM 形成率和 ES 细胞克隆形成率比较
分别选择 9 日龄和 14 日龄小鼠胎儿成纤维细 二者的差异, 结果见表 2。
胞制作饲养层, 对 9 日龄猪孵化囊胚进行培养, 从胚

表 2 不同日龄小鼠胎儿成纤维细胞饲养层对 9 日龄猪胚胎克隆 ES 细胞的影响

Table 2 Effect of different PMEF feeder layer on the clone of ES cells from day 9 porcine blastocysts

成纤维细胞来源 Sources of PMEF	培养胚胎数 Number of cultured embryos	胚胎贴壁率/% Attachment rate of embryos	ICM 形成率/% ICM formation rate	1 代 ES 细胞克隆率/% Clone rate of passage 1 ES cells
9 日龄胎儿 Fetus of day 9	12	83.3 (10/12) a	75.0 (9/12) a	25.0 (3/12) a
14 日龄胎儿 Fetus of day 14	9	88.9 (8/9) a	77.8 (7/9) a	22.2 (2/9) a

2.4 9 日龄猪胚胎直径对贴壁的影响 $< 0.8\text{ mm}$ 的 2 枚胚胎形态与小鼠孵化胚相似, 而
对 21 枚 9 日龄猪胚胎依直径大小分为 $< 0.8\text{ mm}$, $0.8\sim 1.2\text{ mm}$, $> 1.2\text{ mm}$ 3 组, 对贴壁时间、贴 与其他猪胚胎明显不同, 认为可能是发育异常或滞
壁率、ICM 形成率进行比较, 结果见表 3。其中直径 后的胚胎, 未做统计学分析。

表 3 9 日龄猪胚胎直径对贴壁的影响

Table 3 Effect of day 9 embryonic diameter on the attachment

胚胎直径/mm Diameter of embryos	胚胎数 Number of cultured embryos	贴壁时间/h Attachment time	贴壁率/% Attachment rate	ICM 形成率/% ICM formation rate
< 0.8	2	24~ 36	100(2/2)	0.0(0/2)
$0.8\sim 1.2$	12	36~ 48	100(12/12) a	100(12/12) a
> 1.2	7	48~ 72	57.1(4/7) b	57.1(4/7) b

2.5 切割处理对 9 日龄猪胚胎贴壁的影响 璃针进行切割, 去除部分滋养层细胞, 比较贴壁时
对 12 枚直径 $> 1.2\text{ mm}$ 的 9 日龄猪胚胎用玻 间、贴壁率和 ICM 形成率, 结果见表 4。

表 4 切割处理对 9 日龄猪胚胎贴壁的影响

Table 4 Effect of cutting the day 9 porcine blastocysts on the attachment

组别 Groups	胚胎数 Number of cultured embryos	贴壁时间/h Attachment time	贴壁率/% Attachment rate	ICM 形成率/% ICM formation rate
对照 Control	7	48~ 72	57.1(4/7) a	57.1(4/7) a
切割处理 Cutting	12	36~ 48	91.7(11/12) a	83.3(10/12) a

2.6 添加 LIF 对猪 ES 细胞分离的影响 加 LIF 2 组, 观察对贴壁率、ICM 形成率和 ES 细胞
以 9 日龄猪胚胎为培养对象, 分为添加和不添 克隆形成率的影响, 结果见表 5。

表 5 LIF 对猪 ES 细胞分离的影响

Table 5 Effect of LIF on the isolation of porcine ES cells

组别 Groups	胚数 Number of cultured embryos	贴壁率/% Attachment rate	ICM 形成率/% ICM formation rate	各代 ES 细胞克隆率/% Clone rate of each passage ES cells				
				1	2	3	4	5
LIF	22	86.4(19/22) a	81.8(18/22) a	18.7(4/22) a	13.6(3/22) a	13.6(3/22) a	9.1(2/22) a	9.1(2/22)
对照 Control	11	90.9(10/11) a	81.8(9/11) a	54.5(6/11) b	36.4(4/11) a	9.1(1/11) a	9.1(1/11) a	

2.7 猪 ES 细胞的鉴定

用于传代的 ICM 和 ES 细胞集落在传代 2 d 之后, 出现囊状胚体样结构(传代失败, 未有新的 ES 细胞集落出现), 继续培养可见有上皮样细胞集落

(图 D)。ES 细胞经悬浮培养, 出现囊状胚体样结构(图 E)。对分离到的猪 ES 细胞进行 AKP 染色, 结果呈阳性(图 F)。



图版说明: D. ES 细胞传代后出现的上皮细胞样集落(100 ×); E. ES 细胞悬浮培养得到的胚体样结构(400 ×); F. AKP 染色呈阳性的 ES 细胞集落

Explanation of plate: D. Epithelia-like cells differentiated from passaged porcine ES cells; E. Blastocyst-like embryonic body derived from porcine ES cells after suspended culture; F. Positive ES cell clone after AKP staining

3 讨 论

3.1 猪 ES 细胞的分离

ES 细胞在体外分化抑制培养中呈克隆状生长, 细胞紧密堆积在一起, 形似鸟巢, 细胞间界限不清, 此特征常用作 ES 细胞初步鉴定, 并判定可传代集落。本试验所获得的猪类 ES 细胞具有此生长特征, 利用分化试验和 AKP 染色进行了验证。试验中类 ES 细胞集落在传代过程中前几代增殖较快, 一般于传代后 24 h 即可有新集落出现, 但随着代次增加, 新集落出现时间逐渐延长, 数目逐渐减少。传至 5 代的 2 个细胞系于传 6 代时分化丢失, 原因可能与所选择的操作方法和培养系统不完善有关。一般认为, 细胞传代后的存活率和细胞周期的长短与生长环境关系密切。任何原代细胞要建系都要对体外生长环境有一个适应过程, 只有度过这一适应期, 才有可能建系。良好的生长环境有利于传代细胞存活率的提高并缩短这一适应期。进一步研究中需要进行大量探索, 建立一个完善的培养体系, 为 ES 细胞生长创造良好环境。

Robertson^[14]所述小鼠 ES 细胞分离方法是将增殖 ICM 或最初分离到的 ES 细胞集落, 用消化液消化后辅以机械方法, 将其离散成小细胞块进行抑制分化培养, 并且此过程需减少单个细胞的形成。经过几次传代筛选, 至出现大量增殖 ES 细胞后, 再将细胞消化成单个细胞传代。本试验分离 ES 细胞效果不理想, 也可能与消化时间长, 离散后单个细胞过多有关。

3.2 影响猪 ES 细胞分离的因素

3.2.1 饲养层 制作猪 ES 细胞分离培养饲养层

的细胞有小鼠胎儿成纤维细胞、猪胎儿成纤维细胞、猪子宫成纤维细胞、猪子宫上皮细胞等。其中小鼠胎儿成纤维细胞由于易于取材应用较多。Piedrahita 等^[2]比较不同来源细胞饲养层对猪 ES 细胞分离的作用, 发现猪胚胎 ICM 在 STO (一种已建系的小鼠胎儿成纤维细胞) 或 PMEF (Primary embryonic fibroblast, 原代小鼠胎儿成纤维细胞) 上可附着增殖, 在猪胎儿成纤维细胞上可附着但增殖甚微。Notarianni 等^[3]和 Evans 等^[4]分别报道用 STO 饲养层分离到猪 ES 细胞, 而 Strojek 等^[5]认为猪胚胎早期培养使用猪子宫成纤维细胞饲养层, 可促进胚胎贴壁和 ICM 形成, STO 饲养层可使胚胎附着但不能增殖。制作 PMEF 一般选择 9~15 日龄小鼠胎儿, 本试验结果显示 PMEF 可用于猪 ES 细胞分离, 比较 9 日龄和 14 日龄小鼠 PMEF 饲养层对 ES 细胞分离的影响结果无显著性差异。但是试验中观察到, 较大日龄胎儿获得的 PMEF 杂细胞较多, 在 ES 细胞分离过程中影响结果的观察。可以利用成纤维细胞与上皮细胞在消化时间、贴壁快慢等方面的差异得到纯度较高的 PMEF^[16]。

3.2.2 胚胎日龄 理论上讲, 用于 ES 细胞分离的胚胎日龄越小, 分化程度越低, 越具有全能性。但把发育较早时期的胚胎培养在体外建系成功率很低, 原因可能与应用的培养系统尤其是培养基配方不完善有关。在小鼠多选用囊胚期胚胎分离 ES 细胞, 但在小鼠以外的其他动物对分离 ES 细胞所选用胚胎日龄结果差异很大。

猪 ES 细胞分离一般认为取 6~7 日龄胚胎最好, 但分离成功的报道中多采用较晚一些日龄的胚胎。Strojek 等^[5]的试验结果显示, 分离猪 ES 细胞的

最适胚胎为 10 日龄, 即使 9 日龄效果也不理想。Anderson 等^[6]对 6~10 日龄胚胎分离猪 ES 细胞进行比较, 表明 6~7 日龄胚胎在培养中容易死亡, ICM 形成率极低, 7~10 日龄胚胎胚龄越大, 越易分离到 ES 细胞, 但细胞也更易于分化。本试验结果与 Anderson 的结果基本一致(未做 10 日龄), 以 9 日龄结果最佳。用 8 日龄胚尽管也分离到传 3 代的 ES 细胞, 但从贴壁率、ICM 形成率以及集落形态等方面分析并不理想。

3.2.3 胚胎直径 由 ICM 分离 ES 细胞的前提是促使胚胎贴壁并获得增殖的 ICM。ICM 细胞的快速增殖需要贴壁后才能启动, 推迟附植可无限期地延迟快速增殖的启动。体外培养胚胎在饲养层上贴壁模拟了体内附植过程, 贴壁就成为 ICM 增殖的必要启动信号。如果胚胎在 48 h 内不贴壁, 往往生长不好, ICM 形成率较低。

9 日龄猪胚胎直径最大 2 mm, 贴壁相对较慢, 并且与饲养层接触面较小, 贴附不牢固, 移动培养板容易由饲养层脱落而不易得到增殖 ICM。因此, 参

照赖良学等^[17]的方法, 用玻璃针对直径大于 1.2 mm 的胚胎进行切割, 去除部分滋养层后培养, 结果贴壁提前, 贴壁率和 ICM 形成率提高。

3.2.4 外源 LIF 对 ES 细胞分化抑制起主导作用的是 LIF。为进一步抑制 ICM 和 ES 细胞分化, 试验时在培养基中添加 LIF, 从结果看外源 LIF 并非必须, 此结果与 Shin 等^[8]对猪原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)的分离结果一致, 他认为饲养层或 PGCs 本身产生的生长因子足以支持猪 PGCs 的存活增殖并抑制分化。但 Hills 等^[18]认为外源 LIF 对猪 PGCs 培养极为重要。

LIF 是一种天然生长因子, 其基因为单拷贝, 有 2 个转录位点, 经不同剪接过程产生 2 种 mRNA 分子, 并形成 2 个带有不同信号肽的 LIF 蛋白。此信号肽的差异决定了两种分子的不同命运, 一种为可溶形式, 另一种附着在胞外基质上。有报道^[19]认为, 饲养层细胞对 ES 细胞的分化抑制作用主要通过后者实现。本试验添加 LIF 结果可能与此有关。

[参考文献]

- [1] Evans M J, Kaufmann M H. Establishment in culture of pluripotent cell from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292: 154- 156
- [2] Piedrahita J A, Anderson G B, BonDurant R H. Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryos-derived cell lines[J]. Theriogenology, 1990, 34: 865- 877.
- [3] Notarianni E, Laurie S, Moor R M, et al Maintenance and differentiation in culture of pluripotent embryonic cell lines from pig blastocysts[J]. J Reprod Fertil, 1990, 41(suppl): 51- 56
- [4] Evans M J, Notarianni E, Laurie S, et al Derivation and preliminary characterization of putative pluripotent cell lines from porcine and bovine embryos[J]. Theriogenology, 1990, 33: 125- 128
- [5] Strojek R M, Reed M A, Hoover J L, et al A method for cultivating morphologically and undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts[J]. Theriogenology, 1990, 33: 901- 913
- [6] Anderson G B, Choi S J, BonDurant R H. Survival of porcine inner cell masses in culture and after injection into blastocysts[J]. Theriogenology, 1994, 42: 204- 212
- [7] Piedrahita J A, Moore K, Oetama B, et al Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived clones[J]. Biology of Reproduction, 1998, 58: 1321- 1329
- [8] Shin H, Anderson G B. In vitro survival and proliferation of porcine primordial germ cells[J]. Theriogenology, 1998, 49: 521- 528
- [9] Cibelli J B, Stice S L, Kane J J, et al Production of germ line chimeric bovine fetuses from transgenic embryonic stem cells[J]. Theriogenology, 1997, 47: 241
- [10] Tillmann S M, Meinecke B. Isolation of ES-like cell lines from bovine and caprine preimplantation embryos[J]. J Anim Breed Genet, 1996, 113: 413- 426
- [11] Nien H, Strelchenko N. Isolation and maintenance of rabbit embryonic stem (ES) cell lines[J]. Theriogenology, 1994, 41: 265
- [12] Thomson J A, Eldor J I, Sander S, et al Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282: 1145- 1147
- [13] Shamblott M J, Axelman J, Wang S, et al Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13726- 13731
- [14] Robertson E J. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach[M]. London: IRL Press, 1997. 71- 112
- [15] 严云勤, 李光鹏, 郑小民. 发育生物学原理与胚胎工程[M]. 黑龙江: 黑龙江科学出版社, 1995. 298- 321
- [16] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 1996. 5- 17
- [17] 赖良学, 郑瑞珍, 辛 俭, 等. 家兔囊胚在饲养层上的生长行为[J]. 动物学报, 1998, 44(3): 335- 340

- [18] Hills G D, Prella K, Muller S, et al Short-term culture of porcine primordial germ cells[J]. Theriogenology, 1998, 49: 237.
- [19] Rathjen P D, Toth S O, Wills A, et al Differentiation inhibiting activity is produced in matrix associated and diffusible forms that are generated by alternate promoter usage[J]. Cell, 1990, 62: 1105- 1114

Isolation of embryonic stem cells from inner cell mass of porcine blastocysts

FENG Xiu-liang, GAO Zhi-min, YANG Chun-rong, LEI An-min,
FAN Jing-zhuang, DOU Zhong-yang

(Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Shaanxi Center of Stem Cell Engineering and Technology, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract Day 7 to day 9 porcine blastocysts were cultured on primary embryonic fibroblast (PM EF) feeder layer to isolate the embryonic stem (ES) cells. The optimum passage time of porcine inner cell mass (ICM) and ES cells was from day 4 to day 7 and day 4 to day 5, respectively. The number of embryos from which the ES cells were derived was 12 (18.8%), 8 (12.5%), 5 (7.8%), 3 (4.7%) and 2 (3.1%) from passage 1 to passage 5, respectively. The effect of the feeder layer, the embryonic age, diameter, and supplied LIF on the isolation of porcine ES cells was studied. The results were as follows: 1) When day 9 porcine blastocysts were cultured with feeder layer of PM EF from day 9 and day 14 fetuses, there was no significant difference between the attachment rate (83.3%, 88.9%), ICM formation rate (75.0%, 77.8%) and passage 1 ES cells clone rate (25.0%, 22.2%). 2) The attachment rate and ICM formation rate from day 7 to day 9 blastocysts were 5.9%, 0.0%; 57.1%, 28.6%; 87.9%, 81.8% ($P < 0.01$). 3) When the diameter of day 9 blastocysts was from 0.8 to 1.2 mm, the attachment time was 36-48 h, attachment rate 100.0%, ICM formation rate 100.0%; diameter higher than 1.2 mm, 48-72 h, 57.1% and 57.1%, respectively ($P < 0.01$). After cutting the blastocysts (day 9, diameter higher than 1.2 mm) and removing part of the trophoblasts cells, the attachment time was 36-48 h, attachment rate 91.7%, ICM formation rate 83.3%. 4) The medium supplied with LIF did not increase the attachment rate (86.4%, 90.9%; $P > 0.05$) and ICM formation rate (81.8%, 81.8%; $P > 0.05$).

Key words: embryonic stem cells; inner cell mass; blastocysts; isolation; porcine