大鼠心肌条件培养基在昆明白小鼠胚胎干细胞分离培养中的效果*

刘俊平[1,2], 曹鸿国[1], 郑月茂[1], 赵慧英[1], 温叶飞[1], 张 涌[1]
(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100;
2 内蒙古农业大学 动物科技学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

[摘 要] 采用大鼠心肌条件培养基对昆明白小鼠胚胎干细胞进行分离、消化传代、培养鉴定等, 研究大鼠心肌条件培养基在昆明白小鼠胚胎干细胞分离培养中的作用效果。结果显示, SD大鼠心肌条件培养基在昆明白小鼠3.5 d囊胚胚胎干细胞集落分离中, 所分离的昆明白小鼠胚胎干细胞集落具有岛屿状生长, 隆起于饲养层上; 碱性磷酸酶染色为强阳性; 体外分化可形成类胚体状结构, 贴壁的类胚体周边会出现许多分化的上皮样细胞或单个散在的细胞; 经过常规冻存传代的胚胎干细胞集落具有较为一致的生长形态, 并呈现胚胎干细胞集落所特有的岛屿状生长形态; 对传至第5代的小鼠胚胎干细胞集落进行核型分析, 小鼠胚胎干细胞核型正常率大于75%。试验证实, SD大鼠心肌条件培养基在昆明白小鼠胚胎干细胞分离培养过程中效果较好。

[关键词] SD大鼠; 心肌条件培养基; 昆明白小鼠; 胚胎干细胞
[中图分类号] S865.1+3; Q813.7 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2005)02-0001-05

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)是从哺乳类动物的囊胚内细胞群(inner cell mass, ICM)或原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)中分离的一群细胞。ES细胞在适当的环境条件下, 能够分化为机体各种前体细胞, 最终形成机体组成细胞, 能够克服机体组织短缺和免疫排斥等问题, 为再生医学和生物医学提供了广阔的应用前景[1~3]。1981年, 英国剑桥大学的Evans和Kaufman[4]用延缓着床的胚泡在成纤维细胞无限系(STO)饲养层上, 美国加州大学旧金山分校的Martin[5]用小鼠的畸胎瘤细胞条件培养基, 分别成功地分离建立了小鼠的ES细胞系。目前, 国际上大多数小鼠的ES细胞系来源于129, C57BL/6J和BALB/c品系的小鼠[6~8]。由于129品系小鼠具有高频自发畸胎瘤特性及其ES细胞容易癌化等缺点, 限制了129品系小鼠ES细胞在免疫学和组织移植研究中的应用。在国内, 韩嵘等[9]在1997年较早地利用大鼠心肌条件培养基从C57BL/6J品系小鼠中分离ES细胞, 2002年孟国良等[10]利用大鼠心肌条件培养基从BALB/c品系小鼠中分离并建立了ES细胞系。昆明白小鼠作为我国应用最多的实验小鼠, 其ES细胞建系的成功率很低, 建株的报道也很少[7,8], 有关其ES细胞的分离培养是利用白血病抑制因子(leukemia inhibitor factor, LIF)条件培养基完成的, 但到目前为止, 采用大鼠心肌条件培养基成功分离培养传代昆明白小鼠ES细胞集落, 在国内还未见报道。本研究利用SD(Sprague-Dawley, SD)大鼠的心肌条件培养基, 作为昆明白小鼠ES细胞分离培养液, 以小鼠胎儿成纤维细胞为饲养层, 分离培养昆明白小鼠ES细胞, 并对分离的ES细胞进行培养鉴定, 掌握其生物学特性, 为昆明白小鼠ES细胞建系和深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

昆明白小鼠和Sprague-Dawley(SD)大鼠均购自第四军医大学实验动物中心; DMEM培养基为Gibco公司产品; 孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(HCG)购自宁波激素制品有限公司; 胎牛血清购自北京鼎国生物技术发展中心;

* [收稿日期] 2004-02-13
[基金项目] 国家"863"高技术项目(2001AA213081)
[作者简介] 刘俊平(1963-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程和发育生物学研究。
[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。 E-mail: zhangy1@public.xa.sn.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

丝裂霉素C 购自Sigma 公司; 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠心肌条件培养基的制备 取2～3周龄大鼠, 断颈处死, 立即无菌采取心脏, PBS 缓冲液洗除血迹后, 剪除心房部分, 将心室部分剪成1～2 mm^3的组织块。将组织块摆放在培养皿中, 在37 ℃, 体积分数5% CO_2饱和湿度培养箱中培养。组织块贴附2 h 后, 加入DMEM 培养基继续培养。

当心肌细胞长满培养皿时, 取1～5代心肌细胞的培养液用于条件培养基的制备。将心肌细胞培养液1 000 r/min 离心5 min, 弃去细胞碎片, 用0.22 μm 滤膜过滤, 分装冷冻保存备用, 此为大鼠心肌培养基原液。使用前以6份上述大鼠心肌培养基原液加3份新鲜胚胎干细胞培养液和1份胎牛血清, 共同组合成大鼠心肌条件培养基。

1.2.2 小鼠胎儿成纤维细胞饲养层的制备 将成熟母小鼠于下午5:00～6:00腹腔注射孕马血清促性腺激素, 每只10 IU。48 h 后, 腹腔注射人绒毛膜促性腺激素, 每只10 IU, 并按公母鼠1∶1比例合笼。次日上午8:00前观察母小鼠阴道栓, 见栓当天上午定为怀孕0.5 d。取怀孕12.5～14.5 d 母鼠, 断颈处死, 无菌条件下取出整个子宫, 在无菌滤纸上吸干血迹。PBS 洗涤3次, 沿子宫系膜侧剪开子宫, 取出胚胎, 去除胎儿的头、四肢、内脏及尾部。用小剪刀将胚体充分剪碎, PBS 充分洗涤, 室温静止后, 去上清液, 加入消化液, 消化至组织呈粘絮状。5～10 min 后, 加入等体积含血清培养液终止消化, 吹打, 过滤, 1 000 r/min 离心5 min, 细胞记数, 调整细胞浓度为(1～5)×10^6 mL^{-1}, 接种培养。在37 ℃、体积分数5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养。采用3～5代小鼠胎儿成纤维细胞作为饲养层细胞。当小鼠胎儿成纤维细胞铺满培养皿时, 换成含10 μg/mL 丝裂霉素C 培养液, 在培养箱中培养2～4 h。弃去含丝裂霉素C 的培养液, PBS 洗涤, 消化细胞层, 以3×10^5 mL^{-1}接种到事先用明胶包被的培养皿中, 在37 ℃、体积分数5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养。

1.2.3 小鼠胚胎的获取和培养 于下午5:00～6:00, 给成熟的母小鼠腹腔注射PMSG, 每只小鼠10 IU。48 h 后, 腹腔注射HCG, 每只10 IU, 同时公母鼠以1∶1比例合笼。次日上午8:00前观察母小鼠阴道栓, 见栓当天上午定为怀孕0.5 d, 见栓的第4天为怀孕3.5 d。断颈处死怀孕3.5 d 的母小鼠, 在无菌条件下打开腹腔, 暴露子宫。镊住近子宫颈端并剪断, 分离子宫系膜, 在输卵管端剪断子宫角。取出子宫角, 在无菌滤纸上吸干血迹, 置入无菌培养皿内, 用1 mL 无菌注射器吸入含5% FBS 的PBS。从子宫角端进针, 保证针头进入子宫腔内, 快速推入子宫腔, 每侧子宫注入0.2～0.5 mL, 将胚胎冲出。将盛有胚胎和含5% FBS 的PBS 培养皿置于体视显微镜下用吸卵针收集胚胎。

1.2.4 小鼠胚胎干细胞的分离 将取出的小鼠胚胎(多为囊胚)移植到事先制备好的小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上, 换成胚胎干细胞专用的大鼠心肌条件培养基, 对孵出的ICM 消化传代, 并继续培养, 对孵出的ES 细胞集落进行常规的冻存复苏传代培养, 每2 d 半量换液1次。

1.2.5 小鼠ES 细胞的鉴定 (1)小鼠ES 细胞形态学鉴定。观察分离的小鼠ES 细胞的形态学特征。(2)小鼠ES 细胞碱性磷酸酶鉴定。将胚胎干细胞种植在事先放置有盖玻片的培养皿内培养24 h。取出已生长有胚胎干细胞克隆的盖玻片, 按照碱性磷酸酶检测试剂盒的操作说明进行检测。(3)小鼠ES 体外分化能力观察。待单个胚胎干细胞长成克隆后, 弃培养液。用PBS 洗1次, 加入消化液, 在室温下作用约30 s, 弃消化液。加入ES 细胞基础培养液, 轻轻吹打, 不吹成单细胞而让其保持团状。将团状的胚胎干细胞克隆移入培养皿内, 加入ES 细胞基础培养液, 37 ℃、体积分数5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养。(4)小鼠ES 细胞核型分析。取处于对数生长期的第5代小鼠的ES 细胞集落, 加秋水仙素使其终质量浓度为0.15 μg/mL, 作用6 h 后, 在0.075 mol/L KCl 溶液中37 ℃低渗30 min。固定(冰醋酸∶甲醇=1∶3) 10 min。取30 μL 细胞悬液滴于-20 ℃的载玻片上, 在酒精灯火焰上烤干。吉姆萨染色10 min 后, 自来水冲洗掉染液, 空气中自然干燥, 在1 000倍油镜下统计正常核型率。

2 结果与分析

2.1 心肌细胞形态学特征

组织块周围的原代心肌细胞呈现不规则的圆形、三角形, 细胞间紧密连接。整体形如铺路石样, 一般心肌细胞核内有1个或多个核仁。传代的心肌细胞一般铺展状况明显, 常伸出伪足, 形成不规则的星形(图1)。随着细胞生长密度不断增加, 细胞间伸出的伪足会交织成网状。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

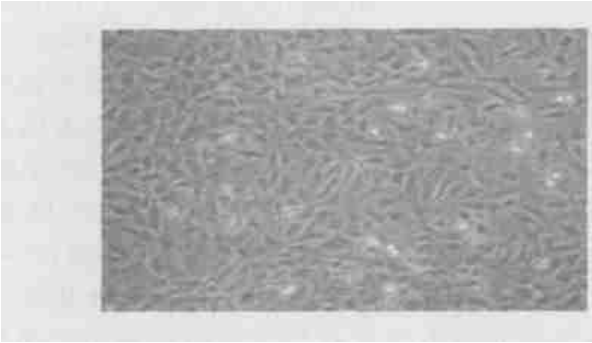

图1　SD 大鼠传代的心肌细胞(×100)

Fig. 1　Passaged cardiomyocytes of SD rat (×100)

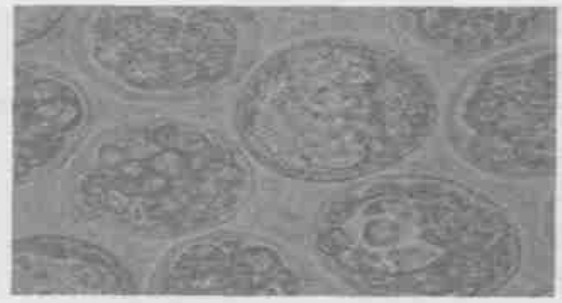

图2　3.5 d 小鼠的桑葚胚和囊胚(×200)

Fig. 2　Mouse morula and blastocyst of 3.5 d(×200)

2.2　3.5 d 小鼠胚胎形态学特征

3.5 d 小鼠胚胎在不同小鼠体内或同一小鼠体内发育的整齐性存在着一定差异。取出的胚胎为处于不同发育阶段的桑葚胚和囊胚(图2)。

2.3　小鼠ES 细胞集落的分离

对68 个3.5 d 昆明白小鼠囊胚, 利用SD 大鼠心肌条件培养基进行培养, 96 h 后有51 个囊胚中分离出ICM, 分离率为75 % (51/68)。对ICM 分离消化传代培养, 27 个ICM 中分离出ES 细胞集落, 分离率为39.71 % (27/68) (表1)。小鼠ES 细胞集落呈鸟巢状突起在饲养层细胞上, 多层密集堆积, 边缘清楚, 表面平滑, 结构致密, 细胞团内界线不清楚, 细胞团集落同饲养层的界线清晰。胰酶消化后的单个细胞小而圆, 核大, 胞浆小。有时在边缘可见少量已分化的细胞, 形态为扁平上皮细胞样或梭形, 单个零星分布(图3)。经常规冻存复苏的ES 细胞集落呈岛屿状生长, 并能够稳定传代。

2.4　小鼠ES 细胞碱性磷酸酶鉴定

碱性磷酸酶检测试剂盒检测显示, 分离培养的小鼠ES 细胞团呈强阳性, 颜色为紫红色, 整个ES 细胞团深染, 饲养层小鼠胎儿成纤维细胞不着色, 两者可以形成明显反差(图4)。

表1　大鼠心肌条件培养基对小鼠ES 细胞集落的分离

Table 1　Isolation of mouse ES cell colonies with media conditioned

分组 Group	囊胚数 No. of blastocysts	孵出ICM 胚数 No. of embryos with ICM	孵出ES 细胞集落胚数 No. of embryos with ES cell colony
1	21	14	7
2	13	10	6
3	12	10	5
4	10	9	4
5	12	8	5

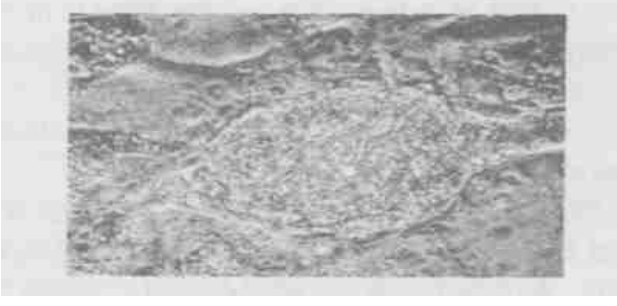

图3　小鼠ES 细胞(×400)

Fig. 3　Mouse ES cells (×400)

图4　小鼠ES 细胞碱性磷酸酶染色(×200)

Fig. 4　Alkaline phosphatase staining of mouse ES(×200)

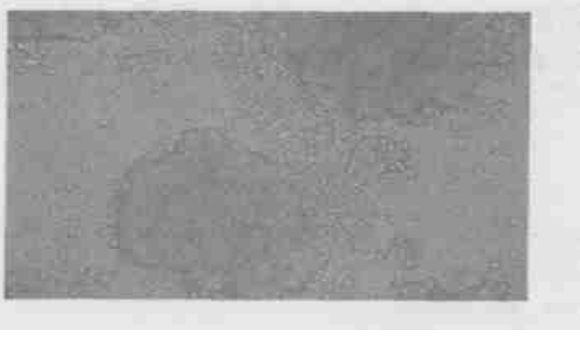

图5　体外分化的小鼠ES 细胞(×200)

Fig. 5　Mouse ES cell differentiated *in vitro*(×200)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.5 小鼠ES细胞的体外分化

小鼠ES细胞团在体外经过一段时间培养,其周围会出现许多分化的上皮样细胞或单个散在分布的血液中单核细胞样细胞,分化的细胞有的相互连成一片,有的单个散在零星分布,ES细胞团中常可以见到同心圆的类胚体结构(图5)。

2.6 小鼠ES细胞的核型分析

对稳定传代的第5代小鼠ES细胞集落随机取材,5个样本的二倍体核型检测结果分别是83%,79%,77%,74%,80%,平均值为78.6%,其核型正常率大于75%。

3 讨 论

本研究利用SD大鼠心肌条件培养基成功分离培养出昆明白小鼠ES细胞集落,并能够稳定传代,说明SD大鼠心肌条件培养基适合于昆明白小鼠ES细胞集落的分离培养。目前,国际上已建立的数百个小鼠ES细胞系中,大多数来源于129,C57BL/6J和BALB/c品系小鼠。来源于129品系小鼠的ES细胞比较容易分离培养和建系,但是由于该品系小鼠具有高频自发畸胎瘤及其ES细胞容易发生癌化等缺点,降低了该品系小鼠的适用范围[6]。昆明白小鼠作为我国在动物试验中广泛应用的小鼠品系,由于该品系种属特异性问题,其ES细胞集落分离培养传代过程中存在许多困难[8]。目前,关于昆明白小鼠ES细胞能够稳定培养传代的报道很少[7,8],因此寻找一种合适的培养体系,对于昆明白小鼠胚胎干细胞的分离培养和深入研究非常重要。

目前,国内研究昆明白小鼠ES细胞的很多,利用添加LIF的ES细胞培养基进行分离培养成为首选方法。本试验中发现,在昆明白小鼠ES细胞分离培养中,SD大鼠心肌条件培养基比添加LIF的ES细胞培养基具有明显的优势,对68个3.5 d昆明白小鼠囊胚利用SD大鼠心肌条件培养基进行培养,96 h后有51个囊胚中分离出ICM,分离率为75%(51/68)。对ICM分离消化传代培养,27个ICM中分离出ES细胞集落,分离率为39.71%(27/68)。这个结果高于秦茂林等[8]利用LIF条件培养基在昆明白小鼠ES细胞集落分离时的结果,低于孟国良等[10]利用大鼠心肌条件培养基在BALB/c小鼠ES细胞分离时的结果。昆明白小鼠比BALB/c小鼠ES细胞集落更难分离成功。韩嵘等[9]研究发现,2~3周龄大鼠心肌细胞能分泌抑制ES细胞分化的因子,其条件培养基不仅具有与白血病抑制因子条件培养基相同的作用,还能显著促进ES细胞的贴壁和生长,这一作用是白血病抑制因子条件培养基所不具备的。Ancey等[11]研究发现,原代培养的人心肌细胞可以分泌LIF,IL-6,IL-11等多种细胞因子。人和鼠的LIF基因有78%~94%的同源性[12]。LIF作为一个具有多种效应的细胞因子,同睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor)、制瘤素M(oncostatin M)、心肌营养因子-1(cardiotrophin-1)、IL-11等共同构成白细胞介素6(interleukin 6,IL-6)家族。它们由各种类型的细胞分泌,介导不同的作用,是否被调控细胞增殖与分化,主要依赖于这些细胞的类型和其所处的分化阶段[13]。LIF的一个特殊膜受体gp190又叫LIFRβ[14],LIF受体的另一个组成成分是gp130,gp130受体对IL-6家族的所有成员是通用的,这可以解释这些细胞因子之间的交叉效应[15]。分析认为,LIF,IL-6和IL-11作为同一个家族成员在心肌条件液中,连同其他一些至今还不清楚的细胞因子,在昆明白小鼠ES细胞分离培养过程中相互协调,共同作用,取长补短,在培养液中的协同作用强于LIF单一成分,使其在昆明白小鼠ES细胞分离培养过程中效果较好。

通过对大鼠心肌条件培养基在昆明白小鼠ES细胞分离培养中的一系列研究,可以证实SD大鼠心肌条件培养基在昆明白小鼠ES细胞分离培养过程中效果较好。

[参考文献]

[1] Bishop A E, Lee D K, Julia M P. Embryonic stem cells[J]. J Pathol, 2002, 197: 424-429.

[2] Bradley A, Evans M, Kaufman M H, et al. Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines[J]. Nature, 1984, 309: 255-256.

[3] Nagy A, Gocza E, Merentes D E, et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse[J]. Development, 1990, 110: 815-821.

[4] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292: 154-156.

[5] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cells[J]. Proc Natl Acad Sci U SA, 1981, 78(12): 7634- 7638.

[6] Stewart C L. Production of chimeras between embryonic stem cells and embryos[J]. Methods in Enzymology, 1993, 225: 824- 855.

[7] 徐　军, 杨春荣, 高志敏, 等. 小鼠胚胎干细胞的分离与克隆[A]. 叶　生, 许　田, 汤锡芳, 等. 干细胞和发育生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 185- 190.

[8] 秦茂林, 蔡文琴, 姚忠祥. 昆明种系小鼠胚胎干细胞的分离培养及特性鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1071- 1073.

[9] 韩　嵘, 柴桂萱, 尚克刚. 大鼠心肌细胞条件培养基对形成小鼠胚胎干细胞集落的影响[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1997, 33(2): 185- 188.

[10] 孟国良, 滕　路, 薛友纺, 等. BALB/c 小鼠胚胎干细胞系建立的方法学探讨[J]. 遗传学报, 2002, 29(7): 581- 588.

[11] Ancey C, Corbi P, Froger J, et al. Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture[J]. Cytokine, 2002, 18(4): 199- 205.

[12] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 517- 525.

[13] Boeuf H, Merienne K, Jacquot S, et al. The ribosomal S6 kinases, cAMP-responsive element-binding, and STAT3 proteins are regulated by different leukemia inhibitory factor signaling pathways in mouse embryonic stem cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(49): 46204- 46211.

[14] Tofaris G K, Patterson P H, Jessen K R, et al. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130[J]. EMBO J, 1991, 10: 2839- 2848.

[15] Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system[J]. J Mol Med, 1996, 74: 1.

Effect on isolation and culture of Kunming white mouse ES cells with media conditioned of rat cardiomyocyte

LIU Jun-ping[1,2], **CAO Hong-guo**[1], **ZHENG Yue-mao**[1], **ZHAO Hui-ying**[1], **WEN Ye-fei**[1], **ZHANG Yong**[1]

(1 *Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2 *College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, Inner Mongolia* 010018, *China*)

Abstract: Effect on isolation and culture of Kunming white mouse embryonic stem cells with media conditioned of rat cardiomyocyte was studied in this paper by isolation, digestion, passage, culture, identification and other ways. Results show that mouse embryonic stem cell clusters isolated were island-like on feeder layers of mouse embryonic fibroblast; Alkaline phosphatase staining of mouse embryonic stem cell was strongly positive; Mouse embryonic stem cells could become embyonic bodies-like structures in vitro, and embryonic bodies which stuck to plates could be differentiated into epithelial-like cells and scattered single cell; Embryonic stem cells were identical and island-like image by route freeze and culture; Karyotype analysis to the 5th passage embryonic stem cells was researched, and the normal rate was over 75%. It indicated that the effect of media conditioned of SD rat cardiomyocyte to isolation and culture of Kunming white mouse embryonic stem cell was very good.

Key words: SD rat; media conditioned of cardiomyocytes; Kunming white mouse; ES cell

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net