

山羊原始生殖细胞的分离与培养^{*}

葛秀国, 华进联, 杨继建, 徐小明, 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 杨凌 712100)

[摘要] 从46例山羊胎儿中分离培养原始生殖细胞,发现胎龄在25~38 d的胎儿原代培养时都可获得大量的细胞集落,适合做胚胎生殖细胞的分离培养,最高传至6代。以小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)、山羊胎儿成纤维细胞(GEF)、牛胎儿成纤维细胞(BEF)为饲养层,在不添加细胞因子情况下,都可以培养出原代山羊的胚胎生殖细胞。传代结果表明,MEF的培养效果较好,但与GEF组差异不显著($P > 0.05$),BEF组培养效果较差($P < 0.05$)。以3个不同质量浓度LIF的培养液培养山羊原始生殖细胞(PGC)结果表明,在原代培养时,效果差异不显著($P > 0.05$);而在传代过程中,以含LIF 10 ng/mL组培养效果最好,但与含LIF 5 ng/mL组差异不显著($P > 0.05$),LIF 1 ng/mL组培养效果较差($P < 0.05$)。

[关键词] 山羊; 原始生殖细胞; 胚胎干细胞

[中图分类号] S827.3⁺6; Q813.1⁺1

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2005)02-0027-05

20世纪70年代,人们对原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)的特性就有所认识,但一直未能获得较大突破。1992年,Matsui等^[1]对小鼠原始生殖细胞进行长期培养,建立了胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EG cells)系。利用胚胎生殖细胞可以更有效的生产转基因动物,而利用转基因山羊的乳腺可以生产外源医用蛋白或药物,并可直接应用于临床,因此山羊的胚胎干细胞分离与培养具有重要的实用价值。同时,山羊原始生殖细胞的分离与培养对治疗性克隆、器官移植以及发育生物学和细胞生物学等方面的研究都有重要意义。Lee等^[2]从25 d山羊胎儿中分离出PGC,将细胞传至4代,经碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)染色呈阳性,冷冻解冻后的细胞可以存活。Kuhholzer等^[3]通过对培养的山羊PGC进行鉴定,发现PGC对细胞表面标志抗原-1(stage-specific embryonic antigen-1, SSEA-1) and FMA-1(一种胚胎癌细胞表面的糖蛋白)反应呈阳性。在国内,韩建永等^[4]从44 d山羊胎儿生殖嵴中分离得到EG细胞,传5代。本研究探讨了山羊原始生殖细胞的分离培养方法,并对影响山羊PGC分离与培养的一些因素进行比较,为进一步建立山羊EG细胞系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 培养液

1.1.1 基础培养液 DMEM(高糖)+10% NBS(或FBS)+0.1 mmol/L β -巯基乙醇+2 mmol/L 谷氨酰胺+0.01 mmol/L 非必需氨基酸+100 IU/mL 青霉素+100 IU/mL 链霉素。

1.1.2 EG细胞培养液 基础培养液(含10% FBS)+10 ng/mL LIF。

1.2 小鼠、山羊和牛胎儿成纤维细胞饲养层的制备

1.2.1 小鼠胎儿成纤维细胞的制备 昆白系小鼠由第四军医大学实验动物中心提供。配种后12~14 d,取小鼠胎儿制作胎儿成纤维细胞。将胎儿的四肢、内脏、头、尾除去,取胎儿肌肉组织,用无钙镁PBS清洗以彻底去除血污,眼科剪充分剪碎组织。在剪碎的组织中加入适量细胞消化液,37℃作用10~15 min,用带有12#针头的注射器轻轻吹打数次。用等量细胞培养液中和,以终止消化。离散后的组织悬液用孔径为100 μ m的滤纱过滤,滤液经1 000 r/min离心5 min(10 mL离心管)。弃去离心管中的上清液,用细胞培养液将细胞沉淀制成悬液,统计细胞数,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ mL⁻¹。在直径为9 cm的培养皿中,加入1 mL细胞悬液,再

^{*} [收稿日期] 2004-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30200137); 国家863项目(2002AA216161); 教育部重大项目(03160)

[作者简介] 葛秀国(1977-),男,天津武清人,在读博士,主要从事动物胚胎干细胞工程研究。

[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和干细胞工程研究。

E-mail: Douzhongying@china.com

加入7 mL 培养液,震荡混匀后,在37℃,体积分数5% CO₂和饱和湿度条件下培养。45 min后换液以去除尚未贴壁的杂细胞与死细胞,以后每48 h换液1次。

1.2.2 山羊和牛胎儿成纤维细胞的制备 在屠宰场收集怀孕本地山羊和牛胎儿,无菌条件下,4℃左右,4 h内运回实验室。根据胎儿冠臀长度大致推算胎儿日龄,取合适的山羊和牛胎儿分离成纤维细胞,当原代成纤维细胞铺满培养皿底时,即时传代或制作饲养层。

1.2.3 胎儿成纤维细胞饲养层的制备 小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)、山羊胎儿成纤维细胞(GEF)和牛胎儿成纤维细胞(BEF)饲养层的制备方法基本相同。首先,将四孔板浸入体积分数75%酒精中处理24 h,取出后放在恒温台上凉干,同时紫外灯照射30 min,再往每孔加入0.6 mL 明胶溶液,继续放在恒温台上1~2 h。在铺细胞前30 min吸出明胶。事先挑取刚好铺满皿底、生长旺盛的成纤维细胞,吸去培养液,加入含丝裂霉素-C 5 ng/mL 的培养液,在培养箱中处理2~3 h(MEF处理2 h,GEF处理2.5 h,BEF处理3 h)。吸去含丝裂霉素-C的培养液,并用无钙镁PBS冲洗4~5次,确保丝裂霉素-C完全除去。加入细胞消化液(0.25%胰蛋白酶+0.04% EDTA)4 mL,作用3~5 min后,用等量细胞培养液终止消化,并用吸管吹打成单细胞悬液。将细胞悬液移入10 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min。弃上清,将细胞沉淀用细胞培养液制成悬液,并调整细胞浓度为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。在已经吸去明胶的四孔组织培养板中加入细胞悬液,每孔0.6 mL。在体积分数5% CO₂、饱和湿度、以及适合的温度条件下(MEF 37℃,BEF 38℃,GEF 38℃)培养。

1.3 山羊PGC的收集

在屠宰场收集怀孕本地山羊胎儿,无菌条件下,4℃左右,4 h内运回实验室。无菌取胎儿,测量分离的山羊胎儿冠臀长,无钙镁PBS洗涤。在体视显微镜下剖取生殖嵴及其周围组织,眼科虹膜剪机械剪碎生殖嵴及其周围组织,用0.125%胰蛋白酶+0.02% EDTA 室温条件下消化后,再用与胰蛋白酶等体积的含10% NBS的DMEM终止消化。100 μm滤纱过滤组织液,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加含10% NBS的基础培养液(含10% FBS)悬浮细胞,重复离心1次,再弃上清液,制作细胞悬液,倒置显微镜下检测和计数分离到的PGC,细胞接种浓度为 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,接种于4孔板内。

1.4 山羊EG细胞的传代培养

在PGC增殖为克隆集落后4~6 d,集落变得凸起、较大,其周围开始出现分化细胞,此时即可传代。将观察到的PGC集落用细针挑出,用0.125%胰蛋白酶+0.02% EDTA 室温条件下处理3~5 min,用玻璃细管轻轻吹打,或附以细针机械离散EG细胞集落,使其成为一些小的细胞团块和单个细胞,移入培养液中洗涤后,接种于饲养层上。以后传代周期为4~6 d,方法相同。

1.5 山羊EG细胞的鉴定

1.5.1 形态学鉴定 倒置显微镜下观察集落生长行为和形态特征。

1.5.2 AKP染色 吸出培养液,无钙镁PBS清洗3次,4%戊二醛室温固定15 min,再用无钙镁PBS清洗3次,加入AKP液(0.2 mg/mL α-奈酚磷酸盐,1 mg/mL 坚固蓝RR,0.1 mol/L Tris,调节pH值为8.4),作用15~30 min。无钙镁PBS冲洗3次,倒置显微镜下观察,照相。

1.5.3 体外分化实验 挑取典型的EG细胞集落,消化液消化成单个细胞或小细胞团块,置于衰老的饲养层上,用含10% NBS的基础培养液培养。

2 结果与分析

2.1 山羊PGC原代培养及其生长行为

刚分离的PGC在饲养层上均匀分布,单个PGC体积较体细胞大,核也较大。在24 h内,PGC贴壁、增殖,并出现迁移、相互聚集现象。24~36 h开始克隆出小集落,组成集落的细胞彼此轮廓不清,与周围成纤维细胞饲养层界限明显。经过短期培养,EG细胞集落迅速增殖。4~5 d集落数增多、变大;5~7 d后,出现典型的岛状和山包状集落,集落明显突出饲养层表面;8~9 d后,集落变得更大,但周边出现分化细胞,多为成纤维样或上皮样细胞。

2.2 不同饲养层对山羊PGC培养的影响

取1.9, 1.6, 2.2, 2.7 cm的4例胎龄相近的山羊胎儿分离培养PGC,原代培养所用培养液为基础培养液(含10% FBS),按照每个胎儿接种于四孔板的4个孔,分别培养于4种饲养层上,传代培养所用培养液为EG细胞培养液,比较各种饲养层的培养效果。由表1可见,MEF, GEF, BEF饲养层和无饲养层,在不添加细胞因子情况下,都可以分离培养出原代山羊的胚胎生殖细胞。传代结果表明,以MEF的效果较好,但MEF组与GEF组差异不显著($P > 0.05$);BEF组和无饲养层组培养效果较差。

表1 不同饲养层对原代PGC 培养的影响

Table 1 Effect of different feeder cells on the culture of goat PGC

饲养层 Feeder cells	平均原代集落数 A verage of colonies	平均传代数 A verage of passages
MEF	23±2.4 a	5±0.8 a
GEF	21±2.6 a	4.75±0.25 a
BEF	17±2.4 a	3.50±0.58 b
无饲养层 No feeder cells	19±3.3 a	2.50±0.58 b

注: 同列字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。下表同。
Note: The letters in the same line indicate no distinct difference ($P > 0.05$).

2.3 不同质量浓度LIF 对山羊PGC 培养的影响

取2, 1.2, 0.6, 0.2, 0.1, 0.05和0 ng/mL的4例胎龄相近的山羊胎儿分离培养PGC, 所用培养液为基础培养液(含10% FBS)+ 不同质量浓度的LIF, 按照每个胎儿接种3个孔(每孔采用的培养液不同), 培养于MEF饲养层上, 比较各种质量浓度LIF的培养效果。

表3 胎儿胎龄对山羊EG 分离培养的影响

Table 3 Effect of different embryonic age of the fetus on the isolation and culture of goat EG cells

胚胎日龄/d Embryonic age	胎儿数量 Number of fetus	能分离出集落的胎儿数 Number of fetus able to produce EG colonies	分离出集落的胎儿的原代集落数 A verage of colonies of every fetus in primary culture
< 25	3	1	14
25~ 38	16	14	19
38~ 44	6	3	14
> 45	4	0	0

由表3可以看出, 胎龄25 d以下的胎儿, 生殖嵴复合物获得的PGC克隆集落相当少, 这可能与PGC数目过少有关。但有1例胎龄大约在23~ 25 d的胎儿分离出了PGC, 而且集落数目较多。胎龄在25~ 38 d的胎儿原代培养时可获得大量的细胞集落, 38~ 44 d的胎儿较25~ 38 d的难获得EG细胞集落。胎龄在45 d以上时, 未获得细胞集落。

2.5 山羊EG 细胞的鉴定结果

2.5.1 AKP染色鉴定结果 对培养的PGC集落进行AKP染色, 集落着色明显。但有些集落已发生部分分化, 分化的细胞和其他细胞呈弱阳性或阴性(图1)。

2.5.2 体外分化实验结果 试验观察到山羊EG细胞分化为类胚体、脂肪样细胞、成纤维样细胞、上皮样细胞等(图1)。

3 讨论

3.1 不同饲养层对山羊PGC 培养的影响

目前, 无论建立何种动物的ES细胞系都离不开

由表2可以看出, 在原代培养时, 3个不同质量浓度LIF的培养效果差异不显著($P > 0.05$)。而在传代过程中, 以含LIF 10 ng/mL组效果最好, 但与含LIF 5 ng/mL组差异不显著($P > 0.05$), LIF 1 ng/mL组传代培养效果相对较差($P < 0.05$)。

表2 不同质量浓度LIF 对PGCs 传代培养的影响

Table 2 Effect of different concentration of LIF on the passage of goat PGCs

培养液 Type of medium	原代平均集落数 The average of the clones	平均传代数 The average of the passages
LIF 1 ng/mL	19 a	2.5 a
LIF 5 ng/mL	22 a	4.5 b
LIF 10 ng/mL	23 a	5.25 b

2.4 胎龄大小对山羊PGC 分离培养的影响

以相同的分离和培养(MEF为饲养层, 培养液为EG细胞培养液)方法分离培养山羊胎儿原始生殖细胞, 统计结果见表3。

饲养层, 饲养层细胞对胚胎干细胞的增殖和维持未分化状态具有重要作用。Tillmann等^[5]用胎牛肝成纤维细胞(BFLF)作饲养层分离到绵羊和山羊的类ES细胞, 而用STO、大鼠肝细胞饲养层(BRL)、绵羊输卵管上皮(OTE)、绵羊子宫上皮细胞(OVE)、牛子宫成纤维细胞(BVF)、胎牛睾丸成纤维细胞(BOTF)、胎牛肾成纤维细胞(BKFF)作饲养层, 均未获得ES细胞。本研究结果表明:MEF, GEF, BEF饲养层和无饲养层, 在不添加细胞因子情况下, 均可以分离培养出原代山羊的EG细胞。MEF较GEF好, 但二者差异不显著($P > 0.05$)。传代比较发现, 传代的EG细胞在MEF和GEF上均能进行增殖, 二者差异不显著($P > 0.05$)。BEF组和无饲养层组培养效果相对于MEF和GEF较差($P < 0.05$)。

3.2 不同质量浓度LIF 对山羊PGC 培养的影响

LIF的功能不仅限于抑制多潜能干细胞的分化, 还具有刺激体外培养的PGC增殖的作用。ES、EG、EC细胞表面都表达有LIF受体和gp130受体亚单位^[6]。通过与LIF结合传递信号, 促进PGC的生

存^[7~9]。各种ES细胞系表现出对LIF质量浓度的不同依赖性。Resnick等^[10]认为,LIF对PGC的作用与其剂量有关,Zandstra等^[11]检测了小鼠ES细胞对一系列LIF质量浓度的反应,发现LIF质量浓度增加对ES细胞生长率的影响很小,主要作用是保持ES细胞的多能性和生存活力。本研究采用分别含有1,5和10 ng/mL LIF的培养液培养山羊原始生殖细胞,结果表明,在原代培养时不同质量浓度的LIF培养效果差异不显著($P > 0.05$);而在传代过程中,1 ng/mL LIF显然不能满足需要,5 ng/mL与10 ng/mL LIF组培养效果差异不显著($P > 0.05$)。这可能是PGC细胞本身和饲养层细胞分泌的LIF,在一定程度上补充了培养液中LIF的不足^[8,9]。说明当PGC在活力较好的饲养层上培养时,5~10 ng/mL LIF可以维持山羊EG细胞的生存。

3.3 胎龄大小对山羊PGC分离培养的影响

用PGC分离培养EG细胞的胎儿有其适宜时间。理论上讲,用于EG细胞分离培养的胎儿胎龄越小,分化程度就越低,越具有多能性。但胎龄过小,胎儿所含PGC的数量越少,不易建立EG细胞系。因此,掌握采集PGC胎儿的胎龄尤为重要。Kuhholzer

等^[3]采用怀孕32 d的山羊胎儿,Lee等^[2]采用怀孕25 d的山羊胎儿,韩建永等^[4]从44 d山羊胎儿生殖嵴中分离得到EG细胞,传至5代。本研究采用25~38 d胎儿获得了较多的EG细胞克隆,表明在此期间胎儿生殖嵴存在大量PGC。而从胎龄25 d及以下胎儿取生殖嵴和中肾嵴复合物很难获得PGC克隆集落,这可能与PGC数目过少有关,胎龄25 d的山羊胎儿开始形成生殖嵴,此时原始生殖细胞正处于迁移路径中,尚未完全到达生殖嵴,使分离到的PGC数目较少。但有1例胎龄23~25 d的胎儿可以分离到PGC,而且细胞活力较好,形成的集落数目也较多,这可能由于此时的PGC大部分已经迁移到中肾复合物处,PGC数目也增殖了许多,而且此时中肾组织较容易分离,使试验获得了较多的PGC。38~44 d的胎儿较25~38 d的难获得EG细胞集落,主要是由于组织消化不理想,消化时间过长又影响细胞活力。胎龄在45 d以上时,未获得细胞集落,可能由于此时的生殖嵴已经发育成性腺,由于本试验只用胰蛋白酶+EDTA作为消化液,使得此时组织也比较难消化(消化时间长影响细胞活力),而且PGC部分分化为性原细胞,从而使所获得PGC数目过少。

[参考文献]

- [1] Matsui R, Hogan B L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. Cell, 1992, 70(5): 841- 847.
- [2] Lee C K, Newton G, Scales N, et al. Isolation and genetic transformation of primordial germ cell(PGC) derived cells from cattle, goats, rabbits and rats[J]. Asian-Australian Sci, 2000, 13(5): 587- 594.
- [3] Kuhholzer B, Baguisi A, Overstrom E W. Long-term culture and characterization of goat primordial germ cells[J]. Theriogenology, 2000, 53(5): 1071- 1079.
- [4] 韩建永, 桑润滋, 孙国杰, 等. 山羊PGCs用于分离与克隆类ES细胞[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(4): 344- 348.
- [5] Tillmann S M. Isolation of ES-like cell lines from bovine and caprine preimplantation embryos[J]. J Anim Breed Genet, 1996, 113: 413- 426.
- [6] Uchi Koshin izu, Tetsuya Taga, M iho Watanabe, et al. Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells *in vitro* and derivation of embryonic germ (EG) cells[J]. Development, 1996, 122: 1235- 1242.
- [7] Donald M et al. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor[J]. Stem Cell, 2003, 21(1): 5- 14.
- [8] Cheng L inzhao, David P Gearing, Lynn S White, et al. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth[J]. Development, 1994, 120: 3145- 3153.
- [9] Pesce M, Farrace M G, Piacentini M, et al. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis) [J]. Development, 1993, 118(4): 1089- 1094.
- [10] Resnick J L, Bixler L S, Cheng L, et al. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture[J]. Nature, 1992, 395: 550- 551.
- [11] Zandstra P W, Le H V, Daley G Q, et al. Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 69: 607- 618.

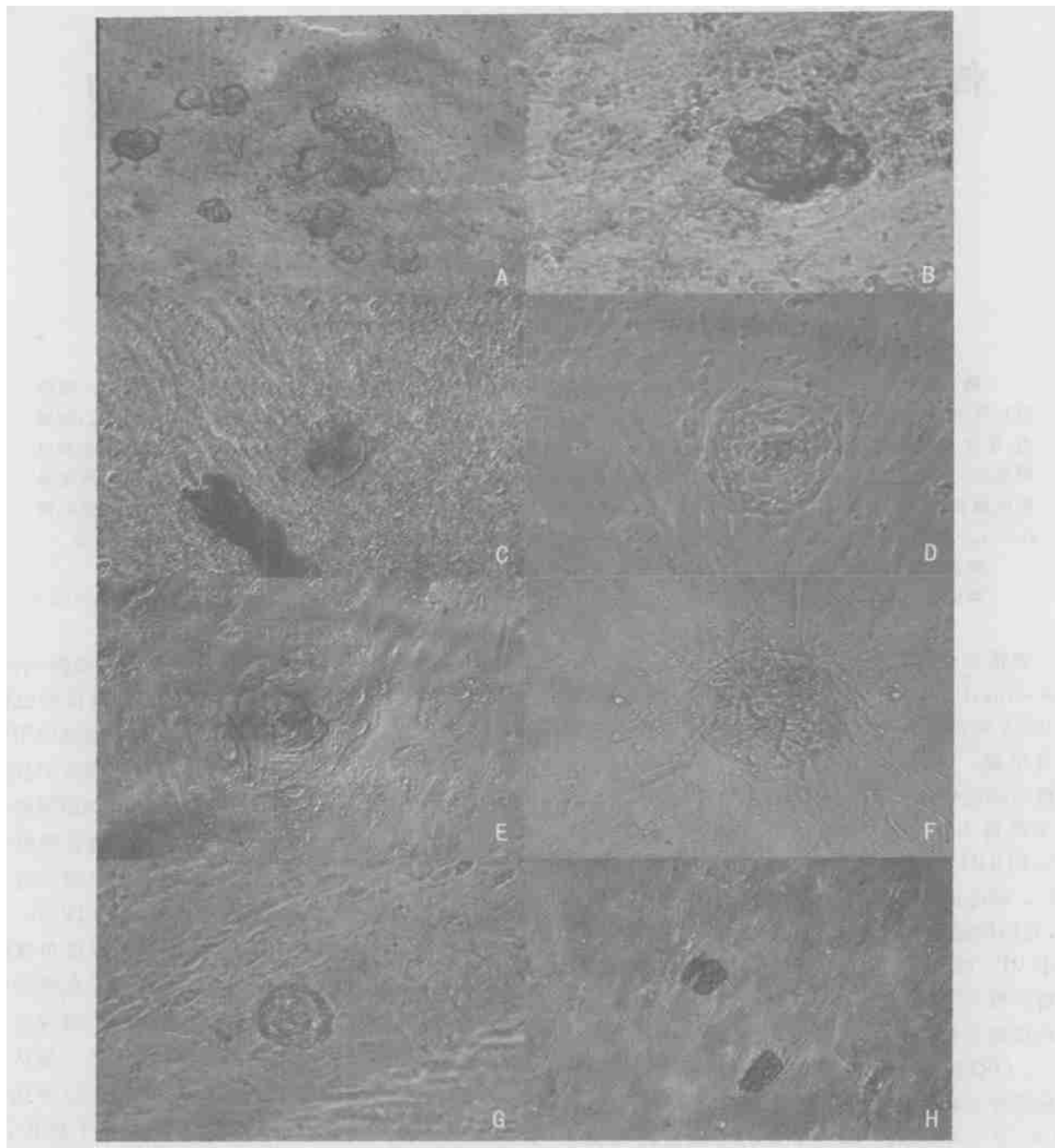


图1 山羊类ES细胞培养与鉴定

A. 原代培养2 d的EG, 集落比较小, $\times 100$; B. 原代培养的较大的EG细胞集落, $\times 100$; C. 原代培养6 d的EG集落, AKP染色, 集落着色明显, $\times 100$; D. 已部分分化为上皮样细胞的原代EG集落, $\times 100$; E. 已发生部分分化的原代EG集落进行AKP染色, 集落呈AKP阳性, $\times 100$; F. EG集落自发分化现象, $\times 100$; G. EG细胞集落分化为类胚体, $\times 100$; H. EG细胞分化为类脂肪细胞, 并进行油红染色, $\times 100$.

Fig 1 The culture and identification of goat like-ES cells

A. The cultured goat EG cells colony on PMEF after two days, and the colony of EG remains small, $\times 100$; B. The bigger goat EG cells colony in primary culture, $\times 100$; C. The colony of EG cells cultured after 6 days was stained for AKP, $\times 100$; D. The colony of EG cells have differentiated into epithelia-like cells, $\times 100$; E. The colony of EG cells was stained for AKP, and some EG cells have differentiated into cells with other morphology, $\times 100$; F. The colony of EG cells differentiated into fibroblast-like cells, $\times 100$; G. The colony of EG cells differentiated into embryoid body, $\times 100$; H. The colony of EG cells differentiated into lipocyte-like cells, $\times 100$.

(下转第38页)

lethal rate more than 70% and incidence rate 100%. The anatomical diagnosis showed that pathologic morphology was similar to field cases, such as hemorrhages in muscle, Glandular stomach and heart, edema as well as "purple grapes bunch-like" facet in Bursa. The serological inspection, the virulent investigation, chicken embryo inoculation molecular biological analysis, and the electron microscopy examination all showed that the isolated was very virulent strain, which suggested that there were very virulent strains, different from ordinary virulent, typical and mutated BDV strains in chickens in Henan Province. The analogy inspection on the amino acid sequence of BDV VP2 gene's hyper-variety section was done, which resulted in a phylogenetic tree, showing that the evolutionary relation between HN01 strain and vvBDV strains of G9201 and UK661 is close; but the evolutionary relation between HN01 strain and HK46, OKYM, D6948, UPM92-04, KS is far.

Key words: infectious bursal disease virus; very virulent strain; isolation and identification; VP2; sequencing; phylogenetic tree

(上接第31页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)02-0027-EA

Isolation and culture of goat embryonic germ cells

GE Xiu-guo, HUA Jin-lan, YANG Ji-jian, XU Xiao-ming, DOU Zhong-yang

(Shaanxi Center of Stem Cell Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The primordial germ cells were isolated from 46 goat fetuses with embryonic age from 25 to 38 days. The research showed there were many colonies in primary culture. One EG cell line maintained undifferentiation for 6 passages. When goat primordial germ cells were cultured on different feeder cells, MEF, GEF and BEF all could sustain goat primary embryonic germ cells, and MEF was finer than others. But there were no significant difference between MEF and GEF ($P > 0.05$). Goat primordial germ cells were cultured with the medium of 3 different concentrations of LIF. There was no difference in primary culture ($P > 0.05$). When passed, the group containing ng/mL LIF was finer than others. But there was no difference with the group containing 5 ng/mL LIF ($P > 0.05$). The group containing 1 ng/mL LIF was the worst.

Key words: goat; embryonic stem cell; primordial germ cell