

第28期鸡胚原始生殖细胞的冷冻保存 与体外培养研究^{*}

肖小璐^{1,2}, 蔡琳琳¹, 秦洁¹, 李碧春¹

(1 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009;

2 湖州师范学院 生命科学学院, 浙江 湖州 313000)

[摘 要] 利用Ficoll密度梯度离心,提取鸡胚第28期(孵化132 h)性腺中的原始生殖细胞(PGCs),用不同的冷冻保护液,对PGCs采用分离后直接冷冻保存和体外培养24 h后冷冻保存2种方法,以筛选合适的冷冻保护体系。结果发现,分离提纯后直接进行冷冻保存的PGCs,存活率最高为(87.07±1.29)%;体外培养24 h后进行冷冻的PGCs,存活率最高为(44.08±1.19)%。对复苏后的PGCs进行体外培养结果发现,分离提纯后直接进行冷冻的PGCs,在体外培养过程中具有形成细胞克隆的能力,且可传代和进行体外分化;而体外培养24 h后进行冷冻的PGCs,复苏后在体外培养过程中不能形成细胞克隆,且在体外培养40 h左右死亡。

[关键词] 鸡; 原始生殖细胞; 冷冻保存; 体外培养

[中图分类号] Q 813.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)02-0039-04

随着世界人口的剧增和环境的污染,及人们对动物资源的不合理开发利用,使动物遗传资源储备急剧减少,因此对动物资源的保护日显其重要性和紧迫性。在哺乳动物中,胚胎的冷冻保存已获得成功,在禽类中对精子的保存也获得成功^[1]。但对禽类精子的保存只是保存了雄性遗传物质,而雌性遗传物质没有得到保存。由于禽类受精卵大,且含有大量卵黄,通过保存受精卵来保存其遗传物质目前还没有报道。禽类原始生殖细胞(primitive germ cells, PGCs)是精子或卵子的祖先细胞,具有发育成精子或卵子的全能性,因此,可通过对PGCs的冷冻保存来保存禽类的遗传物质。

本研究对鸡胚第28期性腺中的PGCs进行冷冻保存。复苏后用台盼蓝染色检测其存活率,并进行体外培养和分化试验,以筛选合适的冷冻保护体系,探索禽类遗传物质保存的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鸡胚的来源与孵化 受精蛋来自中国农业科学院家禽研究所,品种为苏禽黄鸡,孵化温度为

37.5℃,相对湿度为60%。孵化分期按Hamburger等^[2]的方法划分。

1.1.2 主要试剂 高糖DMEM为Gibco公司产品,EDTA-胰酶消化液(胰酶质量浓度为0.5 g/L,EDTA质量浓度为0.25 g/L,EDTA和胰酶均为上海化学试剂公司产品,胰酶活性为1:250),Ficoll-400为Pharmacia公司产品,胎牛血清为杭州四季青公司产品,鸡血清、丝裂霉素-C、碱性成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factor-basic-bFGF)、人白细胞介素(human Interleukin-hIL-11)、人胰岛素样生长因子(human Insulin-like Growth Factor-hIGF)、人干细胞生长因子(human Stem Cell Factor-hSCF)和鼠白血病抑制因子(mouse Leukemia Inhibitory Factor-mLIF)均为Sigma公司产品。

1.2 第28期性腺PGCs的提取

受精蛋孵化到第28期后,获取生殖嵴所在部位,在室温下消化5 min,用小牛血清(NCS)终止消化,0.15 mm网筛过滤后,180 g离心5 min,收集细胞。沉淀用0.1 mL不含NCS的TCM-199培养液重新悬浮,移入含0.9 mL 160 g/L Ficoll液的指形管(规格为2 mL)中,混匀,形成质量浓度为144 g/L的

^{*} [收稿日期] 2004-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30170678)

[作者简介] 肖小璐(1978-),男,江西吉安人,硕士,主要从事动物胚胎工程研究。E-mail: xxjxtl@sina.com

[通讯作者] 李碧春(1963-),女,陕西大荔人,教授,主要从事动物胚胎与遗传工程研究。

Ficoll 与细胞混合液,再在其上缓缓加入0.2 mL 63 g/L Ficoll 液,800 g 离心30 min,PGCs 聚集在144与63 g/L Ficoll 层交界处,吸取交界处富含PGCs 的Ficoll 液0.2 mL 到指形管中。加入1.5 mL 含10%小牛血清的TCM-199 培养液,混匀,180 g 离心5 min,重复此步骤2 次。

表1 6 种冷冻保护液的组成

Table 1 Composition of the freezing media						mL /L
冷冻保护液 Freezing media	二甲亚砜 DM SO	乙二醇 Ethyleneglycol	聚乙二醇 Polyethyleneglycol	小牛血清 NCS	DM EM 培养液 DM EM medium	
I	100	/	/	100	800	
II	/	100	/	100	800	
III	50	50	/	100	800	
IV	/	/	100	100	800	
V	/	50	50	100	800	
VI	50	/	50	100	800	

1.4 复苏后活力的检测

PGCs 复苏方法参考文献[3]。复苏后,将1 份细胞悬液与2 份台盼蓝染色液混匀,2 min 后于倒置显微镜下观察计数。透亮而不着色的为活细胞,染成蓝色的为死细胞。

1.5 PGCs 的培养体系

培养体系 I:向DM EM 培养基中添加10% 胎牛血清,2% 鸡血清,2 mmol/L 谷氨酰胺,1 mmol/L 丙酮酸钠,55 μmol/L 2-巯基乙醇和100 U/mL 硫酸庆大霉素。以鸡胚成纤维细胞作饲养层,制作方法见参考文献[4]。于38.5℃,饱和湿度,体积分数5% CO₂ 条件下在24 孔板中培养。

培养体系 II:向培养体系 I 中再添加5 ng/mL hSCF,10 U/mL mL IF,10 ng/mL bFGF,0.04 ng/mL hIL-11 和10 ng/mL hIGF。于38.5℃,饱和湿度,体积分数5% CO₂ 条件下在24 孔板中培养。

1.6 PGCs 培养24 h 后的冷冻保存

PGCs 在培养体系 II 中培养24 h 后,一些活力不强的PGCs 死亡,悬浮于培养液中。存活的PGCs

1.3 6 种冷冻保护液的组成及平衡方法

6 种冷冻保护液的组成见表1。

平衡方法:细胞悬液在2~4℃平衡45~60 min,-4~-6℃诱发结晶45 min,然后将诱发结晶后的细胞置于液氮表面,利用液氮蒸汽使细胞降温并持续1 h 以上,然后浸入液氮保存。

贴于成纤维细胞上,并开始生长,但贴壁的PGCs 不牢固,用滴管轻轻吹打可使其重新悬浮,这样收集PGCs 比较简单、易行。吹打下来的PGCs 离心(180 g 离心5 min)收集,再进行冷冻保存。

1.7 PGCs 的传代与分化

PGCs 于培养体系 II 中培养6 d 后,用EDTA-胰酶消化液将PGCs 克隆和饲养层细胞一起消化成单个细胞,重新接种到培养体系 II 中培养。PGCs 传至第2 代时,先在培养体系 II 中培养5 d,再更换到培养体系 I 中进行培养,观察其自行分化情况。

1.8 统计方法

用SPSS 10.0 统计软件进行分析,用t 检验进行差异显著性分析,结果以“平均值±标准误”表示。

2 结果与分析

2.1 PGCs 的冷冻保存效果

分离提纯后,PGCs 分别在各种冷冻保护液中进行直接冷冻和在培养体系 II 中培养24 h 后冷冻,其复苏后的存活率见表2。

表2 鸡胚第28 期性腺中获取的PGCs 冷冻保存后的存活率(n=8)

Table 2 Livability of the PGCs isolated at stage 28 post thaw (n=8)							%
冷冻方式 Cryopreservation mode	冷冻保护液 Freezing media						
	I	II	III	IV	V	VI	
直接冷冻 Cryopreserve after isolated	63.93±1.17 A **	65.26±0.91 A **	87.07±1.29 A	62.52±0.79 A **	73.69±1.12 A *	72.92±0.95 A *	
培养24 h 后冷冻 Cryopreserve after cultured	36.34±1.03 B *	38.74±1.23 B *	44.08±1.19 B	39.04±0.97 B *	37.46±0.89 B *	40.28±1.01 B	

注:同行中各数据与本行的最高存活率相比,标不同大写字母表示差异极显著。标“*”表示P<0.05,标“**”表示P<0.01。
Note: In the same row, compared with the highest vitality of the PGCs, in the same column, different capitalization letters indicated significant difference. Mark “*” means P<0.05, mark “**” means P<0.01.

由表2可知,从鸡胚第28期性腺中获取的PGCs直接进行冷冻,不同冷冻保护液的冷冻保护效果不同,以Ⅲ号的冻存保护效果最好,达 $(87.07 \pm 1.29)\%$,且与其他保护液之间存在显著($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$);V和Ⅵ号对细胞的冻存保护效果差异不显著($P > 0.05$),但优于Ⅰ,Ⅱ和Ⅳ号,且差异显著($P < 0.05$);Ⅰ,Ⅱ和Ⅳ号对细胞的冻存效果差异不显著($P > 0.05$)。PGCs在培养体系Ⅱ中培养24 h后进行冷冻保存,仍以冷冻保护液Ⅲ的冻存保护效果最好,为 $(44.08 \pm 1.19)\%$,显著($P < 0.05$)优于Ⅰ,Ⅱ,Ⅳ和Ⅴ号,但与Ⅵ号差异不显著($P > 0.05$);除Ⅲ号外,其余5种冷冻保护液对细胞的冷冻保护效果差异不显著($P > 0.05$)。由表2还可以看出,分离后直接冷冻的细胞,复苏后的存活率极显著($P < 0.01$)高于培养24 h后冷冻的细胞。

2.2 PGCs的体外培养与传代

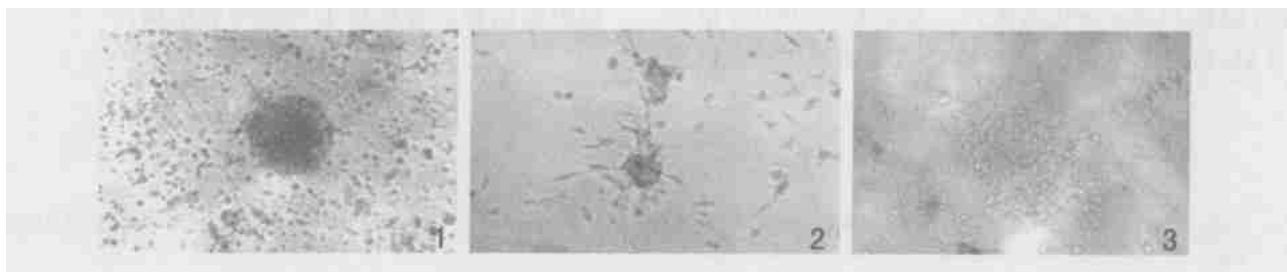
分离后直接冷冻的PGCs复苏后,接种到培养体系Ⅱ中进行培养,24 h后可见PGCs已经贴壁,3 d后可见PGCs形成小的克隆,克隆颜色较浅,细胞之间排列疏松,界线较明显。5 d后可见PGCs克隆明显增大,克隆中细胞排列紧密,很难辨认出单个细胞,且克隆颜色变深(图版1)。在培养第6天进行传代,用EDTA-胰酶消化液把PGCs克隆和饲养层细

胞一起分散成单个细胞,重新接种到培养体系Ⅱ中继续培养,培养2~3 d后可重新聚集增殖形成细胞克隆。

在培养体系Ⅱ中培养24 h后冷冻的PGCs,复苏后再接种到培养体系Ⅱ中进行培养,24 h后观察发现,有65%~75%的PGCs死亡,并出现大量的细胞碎片,在整个培养过程中没有出现PGCs聚集成集落的现象,只有极少数PGCs贴壁,存活的PGCs边缘粗糙,细胞质颜色较深,在培养40 h左右,PGCs细胞全部死亡。

2.3 PGCs的自发分化

PGCs传至第2代,先在培养体系Ⅱ中培养5 d,再更换到培养体系Ⅰ中进行培养。更换培养基的第3天起,饲养层细胞开始从培养板底部脱落,死亡,5 d后可见大部分饲养层细胞死亡,有的PGCs克隆崩解、消失,在培养液中出现大量漂浮的单个死细胞。有的PGCs克隆体积较更换培养体系前明显缩小,但细胞排列仍很紧密,克隆颜色较深(图版2),继续培养后,克隆并不消失,而是悬浮于培养液中,最后死亡。有的PGCs克隆由鸟巢状紧密排列变得疏松,在PGCs克隆周围分化形成颗粒细胞样细胞(图版3)。



图版1~3 PGCs的体外培养和分化

1. PGCs在培养体系Ⅱ中培养5 d后形成的克隆($\times 200$); 2. PGCs在培养体系Ⅰ中培养5 d后形成的克隆($\times 200$);
3. PGCs分化形成类颗粒细胞样细胞($\times 200$)

Plate 1- 3 Culture *in vitro* and colony of PGCs

1. The colony of PGCs when culture five days in culture system Ⅱ ($\times 200$); 2. The colony of the PGCs when it culture five days in culture system Ⅰ ($\times 200$); 3. The colony differentiated into cells like granule ($\times 200$)

3 讨论

冷冻打破了细胞的正常生理过程,势必对细胞造成一定的损害,主要表现为细胞内冰晶的形成和细胞外所产生的溶液效应。在本试验所使用的3种冷冻保护剂中,DM SO和乙二醇属渗透性保护剂,其保护机制是在细胞冷冻悬液完全凝固之前渗透到细胞内,降低细胞内外未结冰溶液中电解质的浓度,从而达到保护细胞的目的。DM SO在常温下对细胞

有较大的毒副作用,操作过程中应尽量缩短细胞悬液在常温下的时间。聚乙二醇属非渗透性保护剂,不能渗透到细胞内,其保护机制是能优先与溶液中的水分子结合,降低溶液中自由水的含量,使溶液冰点降低,减少冰晶损伤;同时可使溶液中电解质浓度降低,从而减少溶质损伤。PGCs是生殖细胞的祖先细胞,有关其冷冻保存方面的报道较少。在禽类研究中,国内目前仅见于血液中PGCs的冷冻保存^[5],但血液中PGCs分离困难,且数目较少。本试验对分离

数量较多,且操作容易的性腺中的PGCs进行冷冻保存,结果发现,分离后直接冷冻的PGCs,其存活率最高为 $(87.07 \pm 1.29)\%$,这一结果介于Naito等^[6]和李赞东等^[5]报道的血液中PGCs冷冻后复苏的存活率之间(存活率分别为94.2%和80%),可能是由于血液中的PGCs和性腺中的PGCs存在组织方面的差异,由此导致其存活率不同。培养24 h后进行冷冻的PGCs,以冷冻保护液Ⅲ中的存活率最高,为 $(44.08 \pm 1.19)\%$,其存活率极显著($P < 0.01$)低于分离提纯后直接冷冻的PGCs。原因可能是:把PGCs从饲养层上吹下来时,对PGCs活力有一定影响;离心收集细胞时,对细胞产生了离心损伤;PGCs在体外培养24 h后,其生理特性相对于分离后不经培养的PGCs发生了一定变化,使得其对超低温冷冻保存的各个处理过程的抵抗力降低,导致存活率极显著低于分离后直接冷冻保存的PGCs。

本试验中,分离后直接进行冷冻的PGCs,复苏后再在培养体系Ⅱ中培养24 h,此时PGCs已贴壁,并开始生长。培养体系Ⅱ中,hSCF等细胞因子具有促进PGCs贴壁、增殖及形成克隆的能力,而mLIF具有抑制PGCs分化的能力。本试验中,PGCs培养3 d后,即可形成克隆,5 d后克隆明显增大。在培养第6天做传代培养,以防饲养层细胞老化,影响PGCs

生长。传代时一同消化下来的饲养层细胞接种后大部分不能存活,少量细胞重新贴壁,通过换液,可把死亡的饲养层细胞清除。PGCs在培养体系Ⅱ中培养时,由于各种因子的作用,使其能进行增殖、克隆。而培养24 h后冷冻的PGCs,在本试验中没有得到克隆结果。

PGCs在无饲养层情况下可自发分化形成神经元样细胞、表皮角质细胞和分泌颗粒的分泌细胞等^[7]。本试验中,当PGCs的培养体系由培养体系Ⅱ更换为培养体系Ⅰ时,PGCs失去了mLIF等因子的作用,虽然此时仍有成纤维细胞饲养层分泌的抑制因子和促生长因子,但其分泌量远不能满足PGCs体外培养所需,且此时成纤维细胞由于长时间培养,已经开始老化、死亡,其分泌因子能力已逐渐降低,甚至完全消失^[8]。PGCs在培养体系Ⅰ中培养4~5 d后,PGCs克隆可能会崩解消失;或克隆体积缩小,最后死亡,但不崩解;或自行分化,形成颗粒细胞样细胞。本试验结果表明,鸡胚第28期性腺中PGCs同血液中的PGCs一样,可进行冷冻保存,复苏后于适宜的培养体系中培养,可分裂增殖形成克隆,并可自发分化形成其他类型的细胞,这为今后对PGCs进行定向诱导分化形成各种组织细胞,用于组织损伤修复等提供了可参考的依据。

[参考文献]

- [1] Lake P E, Stewart J M. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen and improved method[J]. British Poultry Science, 1978, 19: 187-194
- [2] Hamburger V, Hamilton H L. A series of normal stages in the development of the chick embryo[J]. Morph, 1951, 88: 49-92
- [3] 李莲军,李德雪,张学明,等. 7日龄小鼠生殖上皮细胞单细胞冷冻保存[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(1): 94-95
- [4] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 518-519
- [5] 李赞东,刘春海,黄劲松,等. 鸡鸭异种间嵌合体的制备[J]. 动物学报, 2002, 48(4): 543-548
- [6] Naito M, Tajima A, Tagami T, et al. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1994, 102: 321-325
- [7] 傅文玉,路艳蒙,陈英,等. 大鼠原始生殖细胞培养和分化的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2001, 10(3): 252-255
- [8] Rathjen P D, Sara Toth, Anthony Willis, 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

(下转第48页)

energy and main essential amino acids were designed. The other 3 diets were formed by supplementation of 1 g/kg urea (U) in diets of the 3 basal diets. The 6 diets were assigned to 6 groups at random. The results showed: 1. With the increase of CP, feed intake (FI) decreased, FI of 16% CP and 16% CP+U were higher than that of other groups significantly ($P < 0.05$); Weight gain of 16% CP+U and 18% CP were higher than that of other groups significantly ($P < 0.05$); FCR of 16% CP and 18% CP+U were higher than that of other groups significantly ($P < 0.05$); 2. With CP increasing, the abdominal fat decreased. The abdominal fat rate of 20% CP and 20% CP+U were lower than other groups ($P < 0.05$); The breast meat rate of 18% CP was higher than that of 16% CP and 16% CP+U and 20% CP+U ($P < 0.05$). Supplementation urea in diets has the trend of lowering the abdominal fat rate ($P > 0.05$). Diet with 20% CP plus 1 g/kg urea lowered the breast meat rate significantly ($P < 0.05$); 3. CP in diets and supplementation of urea affect BUN and BTP of broilers significantly. The conclusion is: 1. Though the requirement of all essential amino acids can meet the needs of broilers, the moderate content of non-essential amino acid are needed in diet. 2. Under the energy level and amino acid profile of this experiment, the diet with 16% CP will hinder the performance of broilers because of the deficiency of non-essential amino acid, but adding 1 g/kg urea could compensate this deficiency and make broiler achieve better performance.

Key words: protein content; urea; broiler; performance

(上接第42页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)02-0039-EA

Cryopreservation and culture of chicken primordial germ cells at stage 28

XIAO Xiao-jun^{1,2}, CAI Lin-lin¹, QIN Jie¹, LI Bi-chun¹

(1 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China;

2 Department of Life Science, Huzhou Teachers College, Huzhou, Zhejiang 313000, China)

Abstract: In order to investigate the possibility of cryopreservation and differentiation of the chicken primordial germ cells (PGCs) at stage 28, the PGCs from the gonada by Ficoll density-gradient centrifugation were isolated, and cryopreserved right after isolation or after being cultured 24 h *in vitro* in different preservatives. The vitality of the frozen-thawed PGCs was determined by Trypan blue exclusion method. The result showed: the vitality was the highest (87.07 ± 1.29)% when the PGCs cryopreserved right after isolation. The thawed PGCs could form colony when cultured *in vitro*. The vitality of the PGCs reached highest (44.08 ± 1.19)% when it was cultured 24 h *in vitro* before cryopreservation, and the PGCs could not form colony and could only survive about 40 h when culture *in vitro*.

Key words: chicken; primordial germ cells; cryopreservation; culture *in vitro*