

昆明小鼠原始生殖细胞无血清培养基的筛选

董书伟^{1,2,3}, 冯秀亮², 段艳萍², 杨春荣¹, 杨学义¹, 窦忠英¹

(1 西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 陕西 杨凌 712100;

2 第四军医大学 西京医院实验外科, 陕西 西安 710032;

3 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] **【目的】**筛选体外培养昆明小鼠原始生殖细胞(PGCs)的最佳无血清培养基,为昆明小鼠胚胎生殖细胞(EGCs)建系奠定基础。**【方法】**以妊娠 8.5~12.5 d 昆明小鼠 PGCs 为材料,采用无血清培养基,在培养基中添加不同组分,组成 A、B、C、D、E、F、G 7 种培养基,对昆明小鼠 PGCs 进行体外培养,分离培养胚胎原始生殖细胞,以筛选出其最佳培养基。**【结果】**D、E、F 组均能得到较多的小鼠 PGCs 阳性集落。MEF-CM 和 GR-CM 组的效果与细胞因子组相比差异不显著,但降低了培养基的成本。**【结论】**在无血清培养基中添加 0.1 mmol/L RA 或使用条件培养基 MEF-CM 和 GR-CM,均有利于小鼠 PGCs 增殖。经过 EGCs 鉴定,本试验得到的细胞是 PGCs,并且在各组培养基中均能够形成 EGCs 集落。

[关键词] 原始生殖细胞;胚胎生殖细胞;无血清培养基;昆明小鼠

[中图分类号] Q813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)04-0027-05

Selection of serum-free medium for culturing primordial germ cells of Kunming mice

DONG Shu-wei^{1,2,3}, FENG Xiu-liang², DUAN Yan-ping²,

YANG Chun-rong¹, YANG Xue-yi¹, DOU Zhong-ying¹

(1 Shaanxi Branch of National Stem Cells Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Experimental Surgery Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China;

3 Lanzhou Institute of Animal Sciences & Veterinary Pharmaceutics of CAAS, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to choose the best serum-free medium for culturing Kunming mice PGCs *in vitro*. **【Method】** Groups of mediums, A, B, C, D, E, F and G with different components were used to separate and culture PGCs from 8.5—12.5 days' fetuses. **【Result】** D, E and F groups could culture more positive PGCs colonies. Comparison between groups of MEF-CM and GR-CM with group of cell factors didn't show dignificant differences, but they decreased the cost of mediums. **【Conclusion】** The mediums with 0.1 mmol/L RA or MEF-CM and GR-CM were helpful for proliferation of mouse PGCs. After EGCs were characterized, the cells were proved to be PGCs, and EGCs colonies were obtained in each group of medium.

Key words: primordial germ cell; embryonic germ cell; serum-free medium; Kunming mouse

* [收稿日期] 2007-04-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30671067); 陕西省重大项目(2006K205-G1)

[作者简介] 董书伟(1980—), 男, 河南漯河人, 硕士, 主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞研究。

E-mail: dongshuwei2005@126.com

[通讯作者] 冯秀亮(1970—), 男, 山西长治人, 博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞研究。E-mail: xlfeng@fmmu.edu.cn

原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs)是动物各级生殖细胞的祖细胞,在体外适当的培养条件下可以转变为胚胎生殖细胞(Embryonic germ cells,EGCs)。EGCs 与来源于内细胞团(Inner cell mass,ICM)的胚胎干细胞(Embryonic Stem Cells,ESCs)一样,因具有自我复制和发育多潜能性而备受关注。PGCs 的细胞数量较 ICM 多,取材过程也相对容易,因此,EGCs 较 ESCs 易获得。自从 1992 年 Matsui 等^[1]和 Resnick 等^[2]对小鼠 PGCs 分离克隆并建立 EGCs 系后,国内外许多实验室都相继开展了 PGCs 方面的研究。近年来,在大鼠、山羊、猪、牛等动物和人的 PGCs 研究上都取得了很大进展。但目前建立的小鼠 EGCs 系多来源于 129 品系小鼠,而昆明系小鼠的 EGCs 建系至今未见报道。昆明小鼠作为我国自然科学研究的主要小型实验动物之一,建立其 EGCs 系对于丰富 EGCs 系资源,提供更普遍的试验材料具有很大的实用价值。

培养基作为 EGCs 体外培养的生长环境,对 EGCs 的成功建系具有至关重要的作用。血清是细胞培养基的关键组分,但是各批次血清间存在差异,这是细胞培养不稳定的主要因素,而无血清培养基可避免此问题,但目前无血清培养昆明小鼠 PGCs 并建系尚未见报道。本研究以昆明小鼠 PGCs 为材料,采用无血清培养基,并添加不同组分,对昆明小鼠 PGCs 进行体外培养,以期筛选出其最佳培养基,为昆明小鼠 EGCs 建系奠定基础,同时也为无血清培养人类 EGCs 提供参考,避免动物血清在人类 EGCs 临床应用中产生异源蛋白污染的隐患。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 性成熟的昆明品系健康雌性小鼠,体重 25~30 g,购于中国人民解放军第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 高糖 DMEM,Knock-out DMEM,血清替代物(Knock-out Serum Replacement,KSR);新生牛血清(NBS),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)均购自 GIBCO 公司;2-巯基乙醇(2-Me)、非必需氨基酸(Non-amino acids,NEAA)、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、胰蛋白酶、EDTA、丝裂霉素 C、维甲酸(RA)和明胶等常规试剂,均购自 Sigma 公司;LIF 和 ES 细胞鉴定试剂盒(SCR001),均购自 Chemicon 公司;胎牛血清(FBS)购自天津 TBD 公司;DAB 显色试剂盒、碱性磷酸酶(AP)染色试剂

盒,均购自武汉博士德公司。

1.2 小鼠 PGCs 饲养层的制备

小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的分离培养参考华进联^[3]的方法。

取生长良好的 2~5 代小鼠胚胎成纤维细胞,吸出培养基,加入含 10 $\mu\text{g/mL}$ 丝裂霉素 C 的细胞培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 2~2.5 h;弃去培养基,用 PBS 冲洗 3~5 次,尽可能去除丝裂霉素 C。然后用 0.25 g/L 胰蛋白酶消化 1~2 min,待细胞收缩变圆时终止消化;吹打成细胞悬液,收集于离心管中,1 000 r/min 离心 7 min;弃去上清液,加入 MEF 培养基,再次吹打成细胞悬液,用细胞计数板计数,以 $1\times 10^5\sim 2\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 密度接种 0.2 mL 悬液至明胶处理过的 24 孔或 4 孔培养板各孔,补加 0.4 mL 培养基,放至培养箱中培养备用。

1.3 不同培养基的配制

MEF 饲养层细胞培养基:高糖 DMEM+10% NBS+0.1 mmol/L 2-Me。

小鼠 PGCs 培养基有以下几种。

A 组(含血清基础培养基组):高糖 DMEM+15% FBS+0.1 mmol/L 2-Me+0.1 mmol/L NEAA+2 mmol/L L-谷氨酰胺+100 U/mL 青霉素+100 U/mL 链霉素。

B 组(无血清基础培养基组):Knock-out DMEM+15% KSR+0.1 mmol/L 2-Me+0.1 mmol/L NEAA+2 mmol/L L-谷氨酰胺+100 U/mL 青霉素+100 U/mL 链霉素。

C 组(细胞因子培养基组):在无血清基础培养基组中加入 5 ng/mL LIF 和 10 ng/mL bFGF。

D 组(RA 组):在细胞因子培养基组中再加入 0.1 mmol/L RA。

E 组(MEF 条件培养基组):取生长好的饲养层细胞,每天收集培养基 1 次,1 000 r/min 离心 5 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤后,与无血清基础培养基按照 3:2 的体积比混匀,并补加 10% KSR,制成 MEF-CM。

F 组(生殖嵴及其周围组织的条件培养基组):每天收集培养小鼠 PGCs 的无血清基础培养基,方法同 MEF-CM,制成 GR-CM。

G 组(无饲养层培养基组):在 1 g/L 明胶铺被的 4 孔培养板上,添加细胞因子培养基组培养小鼠 PGCs。

1.4 小鼠 PGCs 的分离培养

无菌采集妊娠 8.5~12.5 d 小鼠胚胎,其中 8.5~10.5 d 胚胎取后 1/3 部位组织,11.5~12.5 d 胚胎取其两侧生殖嵴及周围组织(中肾和背肠系膜)。将所取的胚胎组织用含高浓度双抗的 PBS 液清洗 3~5 次,剪碎成 1 mm³ 的小组织块,37 ℃ 条件下用 0.125 g/L 胰蛋白酶和 0.02 g/L EDTA 的混合液消化 10~20 min,加入等量含血清培养基终止消化,吹打离散,经 165 μm 孔径的滤纱过滤,1 000 r/min 离心 8 min,弃上清液。加入 PGCs 培养基,调整细胞密度为 2×10⁵ mL⁻¹,将 0.1 mL 细胞悬液添加到有新鲜饲养层的 24 孔培养板上,分别补加 0.5 mL 不同的 EGCs 细胞培养基,37 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养,24 h 后换液,以后每 2 d 半量换液 1 次。

1.5 不同培养基对小鼠 PGCs 原代培养效果

分别在小鼠 PGCs 原代培养的第 4 天和第 6 天时,检测非特异性碱性磷酸酶(AP)表达。按照碱性磷酸酶(AP)染色试剂盒说明进行小鼠 PGCs 的 AP 染色,计算 A~G 组的阳性细胞集落数,并对所得数据采用方差分析进行统计。

1.6 小鼠 PGCs 的免疫组织化学鉴定

在原代小鼠 PGCs 培养的第 7 天,挑选生长状况好、集落典型的细胞,检测 SSEA-1 和 Oct-4 的表达。具体方法如下:吸去培养孔内的液体,加入 4% 多聚甲醛,固定 30 min,PBS 液冲洗 3 遍。3%

H₂O₂ 孵育 30 min,滴加 4% 正常山羊血清封闭非特异性抗原,室温孵育 30 min 后滴加稀释度为 1:50 的一抗,以 PBS 液代替一抗作为阴性对照,室温孵育 1~2 h 或 4 ℃ 过夜。用 PBS 冲洗 3 遍,滴加生物素化二抗工作液,37 ℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗 3 遍,DAB 显色,显微镜下观察并照相,或用 FITC 标记的二抗作用,在荧光显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 小鼠原代 PGCs 的形态学观察

体外培养的原代小鼠 PGCs 呈圆形或椭圆形,散在分布,较体细胞大,直径 15~20 μm,核大胞质少。培养 3~4 d 时,可见大量由 PGCs 组成的小集落,有时会观察到 PGCs 迁移形成条索状,少数 PGCs 胞体可见有伪足,呈不规则形。培养 5~10 d 时,大多数单个 PGCs 相继死亡,表现为细胞固缩碎裂,而 PGCs 形成的集落不断增大,呈典型的岛屿状或鸟巢状 EGCs 集落(图 1 和图 2),细胞紧密堆积成多层隆起集落,细胞间界限不清。加有细胞因子的 C 组和 D 组中,EGCs 集落较其他处理组的集落形态典型,且数目普遍较多。培养 7~10 d 时,集落周边细胞开始出现分化,其中 D 组和 F 组分化最早,其次是 G 和 E 组。多数情况下,集落分化为成纤维细胞样细胞和上皮细胞样细胞(图 3)。待集落增多,且集落周边未见明显分化时,手工挑取集落进行传代。

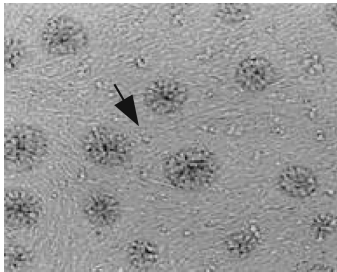


图 1 小鼠体外培养第 4 天 D 组 PGCs 多集落(×100)

Fig 1 Primary culture colonies of PGCs on the 4th day in D group(×100)

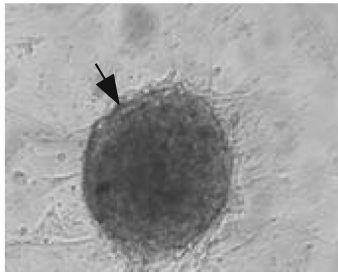


图 2 小鼠体外培养第 6 天原代 PGCs 单集落(×200)

Fig 2 Primary culture colonies of PGCs on the 6th day(×200)



图 3 小鼠体外培养第 8 天 PGCs 集落分化(×100)

Fig. 3 Differentiation of PGCs colonies on the 8th day(×100)

2.2 不同培养基对小鼠 PGCs 原代培养效果的影响

由表 1 可知,A 组第 4、6 天阳性集落数分别与 B、G 组间差异显著($P<0.05$),与 C、D、E 和 F 组差

异极显著($P<0.01$),B 组分别与 C、D、E、F 组间差异显著($P<0.05$),B、G 组间及 C、D、E、F 组间差异不显著($P>0.05$)。由此可见,C、D、E、F 组培养基均可用于小鼠 PGCs 原代培养,且效果优于 B、G

组,A 组效果最差。从阳性集落数看,D 组即 RA 组效果最好。E 和 F 组使用条件培养基替代了昂贵的细胞因子,其效果也与细胞因子组差异不显著。所以,MEF-CM 和 GR-CM 都可替代细胞因子组合 LIF 和 bFGF,用于小鼠 PGCs 体外分离培养,且 GR-CM 效果优于 MEF-CM。

2.3 小鼠 PGCs 的生物学鉴定

2.3.1 AP 染色 对培养第 4 天和第 6 天的 小鼠 PGCs 进行 AP 染色后观察发现,已分化的 EGCs 和饲养层细胞表现阴性;未分化的 EGCs 集落呈棕红色团状(图 4A)或散在单个分布,表现阳性。

2.3.2 免疫细胞化学鉴定 免疫细胞化学检测显示,培养第 7 天的 小鼠 EGCs 集落呈 SSEA-1 和 Oct-4 强阳性,被染成棕黄色(图 4B,C),其下层的饲养层细胞染色为阴性,两者之间的区别很明显。

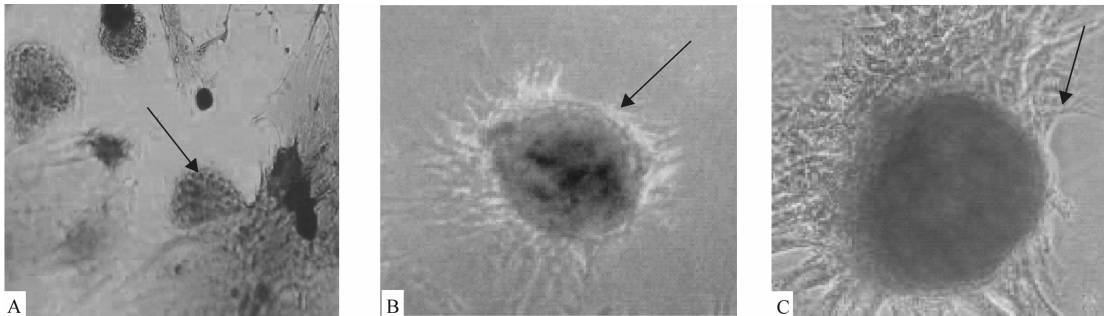


图 4 小鼠 PGCs 的染色结果
A. AP 染色阳性(×100);B. SSEA-1 染色阳性(×200);C. Oct-4 染色阳性(×200)

Fig. 4 Positive stain of PGCs

A. Positive stain of AP(×100);B. Positive stain of SSEA-1(×200);C. Positive stain of Oct-4(×200)

3 讨 论

培养基是细胞赖以生存的主要环境,对体外培养细胞至关重要,PGCs 对体外培养的条件极为苛刻。PGCs 是动物各级生殖细胞的祖细胞,在胚胎正常发育过程中,随 PGCs 迁移至生殖嵴后,PGCs 在不断增殖的同时,将发生性别分化。所以在体外培养 PGCs 时必须同时解决 2 个问题:促进增殖和抑制分化。本试验中,向培养基添加定量的细胞因子 LIF 和 bFGF,通过 B、C 组的对比可以看出,LIF 和 bFGF 在 PGCs 培养中有协同作用,阻断 PGCs 成熟分化,改变了 PGCs 的发育程序,并且在抑制分化的同时又刺激其增殖,满足了体外培养 PGCs 的条件。但细胞因子价格昂贵,而 MEF、STO 等一些细胞培养液中有一定浓度的 LIF 和 bFGF,所以很多学者尝试使用 MEF、STO、大鼠肝细胞、大鼠心肌细胞的培养液制成条件培养基来代替细胞因子。本

表 1 不同培养基对小鼠 PGCs 原代培养效果的影响

Table 1 Effect of different mediums on primary culture of Kunming mice PGCs

组别 Group	阳性细胞集落数 Number of positive colonies	
	第 4 天 4th day	第 6 天 6th day
A	6.5±1.29 aA	8.5±1.30 aA
B	11.25±2.87 bAB	13.25±3.31 bAB
C	14.75±2.22 cB	20.75±3.50 cB
D	15.25±2.53 cB	21.25±2.52 cB
E	13.75±3.30 cB	19.50±2.65 cB
F	14.50±2.08 cB	20.25±4.27 cB
G	9.75±1.48 bA	12.75±2.21 bA

注:组间不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。

Note:The different small letters show significant difference($P<0.05$),the different capital letters show the most significant difference($P<0.01$).

试验将生殖嵴及其周围组织共培养所得的培养液和 MEF 培养液分别制成条件培养基 GR-CM 和 MEF-CM,并补加 10% KSR 培养昆明小鼠 PGCs,所得 GR-CM 组与细胞因子组、MEF-CM 组间差异都不显著($P>0.05$),但 GR-CM 组的阳性细胞集落数较 MEF-CM 组多,可见 GR-CM 较 MEF-CM 更有利于 PGCs 的体外培养增殖。因此,在体外培养 PGCs 时,GR-CM 和 MEF-CM 都可以替代昂贵的细胞因子组合 LIF 和 bFGF,从而极大地降低了培养费用。另外,本试验还发现,昆明小鼠 PGCs 集落在 GR-CM 的培养基中分化时间较早,一般在培养的第 4~7 天,集落周边便开始出现分化,而其他处理组的 PGCs 集落一般在 6~8 d 才开始分化。这可能是 GR-CM 中含有刺激 PGCs 迁移增殖的某种趋化因子,能够加快 PGCs 的迁移形成集落,但也可能含有促使 PGCs 分化的因子,诱导 PGCs 成熟分化。

培养基中的血清为维持细胞增殖提供重要的生

长因子,但血清批次间质量存在差异,造成培养体系不稳定,并且血清中含异源蛋白和多种未知因子,无法确定培养基具体成分,为以后的细胞分化调控或定量分析等工作带来不便。因此,GIBCO公司针对ES细胞培养推出了Knock-out DMEM和血清替代物(KSR),其均为人工合成,成分已知,性质稳定,并且经多个学者试验证明,KSR较FBS更有利于EGCs增殖和形成集落^[4],且KSR与Knock-out DMEM配合使用效果更好^[5]。本试验设计的B、C、D、E、F、G组培养基的效果显著优于A组培养基,也再次验证了这一观点。KSR在细胞培养中的优势将会使KSR应用更加普遍,无血清培养体系也会用到更多种细胞的体外培养中。

胚胎干细胞的增殖培养需要有相应的饲养层,自从1981年ESCs细胞首次分离成功^[6]后,饲养层就一直被用在ES细胞的培养中来抑制ES的分化。饲养层细胞还能提供PGCs附着、支持的基质,并能分泌PGCs体外存活和增殖必需的某些生长因子。但不同类型饲养层细胞分泌的生长因子有一定差别。目前,经常使用的是成纤维细胞制备的饲养层。Matsui等^[1]和Labosky等^[7]用STO、MEF作饲养层分离并建立了ES细胞系,但饲养层细胞的存在给培养基带来了许多未知因素,也给培养基成分研究带来诸多困难,因此,很多学者尝试不用饲养层来培养ES细胞^[8],Williams等^[9]认为LIF可以代替饲养层维持ES细胞的自我更新,但Levenstein等^[10]认为饲养层对人ES细胞的培养是必不可少的。本试验中G组采用无饲养层培养基培养昆明小鼠PGCs,其阳性集落数与B组(无血清基础培养基组)差异不显著,这说明小鼠PGCs源的ES细胞也可在无饲养层的培养基中生长,但需要细胞因子LIF和bFGF作用才能获得较好的效果。无饲养层无异源蛋白^[11]的培养体系,将可能是胚胎干细胞体外培养的主要研究方向。

RA常用来诱导类胚体(Embryonic Body,EB)向功能细胞的分化,但在本试验中,在培养基中加入RA后,阳性集落数多于C组(细胞因子组),这可能是RA促进了PGCs的自我更新和增殖。这也与Koshimizu等^[12]和Niels等^[13]所得结论一致。至于

RA是通过何种信号通路刺激PGCs增殖的,机理尚不清楚,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Matsui Y,Zsebo K,Hogan B L M. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture [J]. Cell,1992,70:841-847.
- [2] Resnick J L,Bixler L S,Cheng L,et al. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture [J]. Nature,1992,359:552-553.
- [3] 华进联. 人类胚胎生殖细胞的分离克隆及生物学特性研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2005.
Hua J L. Isolation and culture of human embryonic germ cells and their biological characteristics [D]. Shaanxi Yangling: Northwest A&F University,2005. (in Chinese)
- [4] Turnpenny L,Brickwood S,Spalluto C M,et al. Derivation of Human Embryonic Germ Cells: An alternative source of pluripotent stem cells [J]. Stem Cells,2003,21:598-609.
- [5] Cheng J,Dutra A,Takesono A,et al. Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media [J]. Genesis,2004,39(2):100-104.
- [6] Evans M,Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. Nature,1981,292(5819):154-156.
- [7] Labosky P A,Hogan B L. Mouse primordial germ cells Isolation and *in vitro* culture[J]. Methods Mol Biol,1999,97:201-212.
- [8] Klimanskaya I,Chung Y,Meisner L,et al. Human embryonic stem cells derived without feeder cells[J]. Lancet,2005,365(9471):1636-1641.
- [9] Williams R L,Hilton D J,Pease S,et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells [J]. Nature,1988,336(6200):684-687.
- [10] Levenstein M E,Ludwig T E,Xu R H,et al. Basic FGF support of human embryonic stem cell self-renewal [J]. Stem Cells,2006,24(3):568-574.
- [11] Ludwig T E,Levenstein M E,Jones J M,et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions[J]. Nat Biotechnol,2006,24(2):185-187.
- [12] Koshimizu M,Watanabe M,Nakatsuji N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro* [J]. Developmental Biology,1994,168:683-685.
- [13] Niels G,Melissa H,Kitai K,et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells [J]. Nature,2004,427(6970):148-153.