

原始生殖细胞的人类胚胎干细胞克隆

常万存¹ 窦忠英¹ 马鸿飞² 杨春荣¹

高志敏¹ 雷安民¹ 樊敬庄¹

(1西北农业大学家畜生殖内分泌与胚胎工程农业部重点开放实验室;

2咸阳市第三人民医院,陕西杨凌 712100)

摘 要 取材于妊娠终止胚胎生殖腺或生殖嵴及其周围组织,用 DMEM+ NCS培养液体外培养,分离由人 PGCs转化成的类 ES细胞,并将其与同源胚胎成纤维细胞一起用胰蛋白酶+ EDTA的无钙镁 PBS液消化传代。在原代培养12 h观察到胞体较大、边缘不整、贴壁分裂增殖的 PGCs样细胞,48 h后观察到26处紧密排列呈鸟巢状的类 ES细胞集落及集落团。第6 d传代成功,第16 d传至第4代。结果表明,体外培养附植后胚胎能够建成人的类 ES细胞系。

关键词 原始生殖细胞,胚胎干细胞,分离,传代,克隆,体外培养,人

分类号 Q28, Q492. 2, S814. 6

原始生殖细胞(PGCs)作为胚胎干(ES)细胞分离与克隆的一种新型材料,最先由 Matusi 于 1992年在小鼠上获得成功^[1]。近年来又在小鼠^[2]、大鼠^[3]、牛^[4]和猪^[5]等动物上取得重要进展。这种来自 PGCs的 ES(也有人称为 EG)细胞,在体外不仅能增殖、传代,而且保持未分化状态,其生殖系嵌合体能产生功能性配子,因而具备囊胚 ES细胞的各种特点。人的类 ES细胞分离与克隆,用囊胚内细胞团^[6]和畸胎瘤^[7]作为材料的只有各1例报道。国内这方面的研究尚未见报道。

本研究从1995年开始,利用妊娠终止的废弃胚胎,经过多次试验,由 PGCs分离培养得到人的类 ES细胞,为生命科学和人类医学研究提供了发育多能性的试验材料。

1 材料和方法

胚胎采集与预处理 在妇产科门诊收取妊娠终止的新鲜胚胎,用添加抗生素的无钙镁 PBS溶液(简称 PBS(-))充分冲洗。其中编号为 9768的胚胎冠臀长 80 mm,体宽 46 mm,胚龄约 106 d。

原代培养 取生殖腺或生殖嵴及其周围组织,剪碎,加入 2.5 g L^{-1} 胰蛋白酶+ 0.4 g L^{-1} EDTA的 PBS(-)消化液,磁力搅拌消化 20~40 min,用孔径 $100 \mu\text{m}$ 的纱网过滤,收集细胞悬液。然后加入等体积的 DMEM+ 100 mL L^{-1} 新生犊牛血清(NCS)培养液终止消化,离心(1000 r/min , 5 min) 2次,弃去上清液后加入培养液,并调整细胞总浓度为 $10^4 \sim 10^5$ 个/ mL ,转移到直径为 7.5 cm 培养皿中,置入 CO_2 培养箱内培养(37°C , $10 \text{ mL L}^{-1} \text{ CO}_2$, 饱和湿度) 12 h及此后每隔 48 h 更换一次培养液。

收稿日期 1997-12-19

课题来源 国家自然科学基金资助项目,39470663

作者简介 常万存,男,1963年生,在读博士

用体视显微镜和倒置显微镜寻找贴壁增殖的 PGCs和类 ES细胞集落,并在培养皿底做出位置标记,以便逐日跟踪观察、拍照。

继代培养 类 ES细胞集落出现 2~ 4 d,周围开始出现分化细胞时再行传代 将观察到的类 ES细胞集落连同贴壁共生的其他细胞一起用消化液处理,用吸管吹打,辅以机械剥离,使细胞离散,加入培养液后离心,重新制成细胞悬液,继续培养

2 试验结果

2.1 原代培养 PGCs的细胞形态学特征

9768号胚胎培养 12 h更换培养液之后观察到大量均匀分布、贴壁生长的成纤维细胞,其间有体积较大、囊泡化并伸出伪足、边缘不整的 PGCs样细胞,有的已经开始分裂 同时观察到 2~ 4个细胞聚集形成的多细胞团 这些结果符合 PGCs的典型特征

2.2 原代培养类 ES细胞形态学特征及细胞集落数目

培养 48 h之后,2号和 3号培养基中首先观察到 16处类 ES细胞集落。其细胞排列紧密,呈鸟巢状,细胞之间界限不清,细胞核大(图 1-a)。随着培养时间的延长,“鸟巢”体积逐渐变大。有的集落细胞相互重叠堆积,形成 3处不规则形集落团(mixed colonies,图 1-b)。所有集落及集落团均明显凸出于成纤维细胞表面。此后集落数在 3个培养基中均有所增加,总共观察到 26处,变化情况见表 1。1号培养基在原代培养第 5 d出现污染。

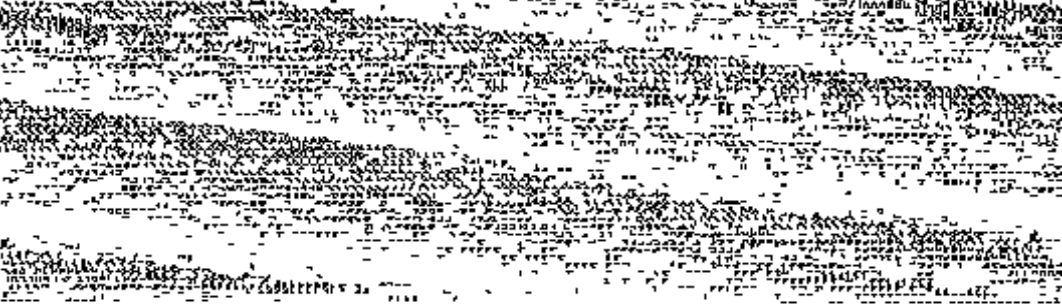


图 1 人类 ES细胞和成纤维细胞集落的显微照片

a. 原代培养的鸟巢状人类 ES细胞集落 80 $\times$; b. 原代培养的 5个类 ES细胞集落相互重叠形成集落团 20 $\times$;
c. 传至第 3代的类 ES细胞集落 80 $\times$; d. 传至第 3代的成纤维细胞集落 80 $\times$

2.3 类 ES细胞的继代培养

2号原代(第 1代)培养至第 6 d传代成功,第 11 d传至第 3代(图 1-c),第 16 d传至第 4代。3次传代后分别观察到 1、3和 2处类 ES细胞集落(表 1)。此后出现污染。3号原代培养在第 8 d首次传代后,没有观察到新的集落出现。

表 1 原代和继代培养类 ES细胞集落数

培养基 编号	原代培养 /d					传代培养 /代		
	2	3	4	5	6	2	3	4
1	0	2	2	2				
2	10	14	14	14	14	1	3	2
3	6	6	8	10	10	0		

2.4 成纤维细胞的原代和继代培养及其形态学特征

原代培养 12 h 后成纤维细胞开始生长,第 3 d 以后大量增殖。传至第 6 代后人为终止试验。此次培养的人胚胎成纤维细胞与小鼠相比稍显粗壮,多呈梭形,纤维伸出较短,细胞轮廓清晰(图 1-d)。

3 讨 论

本研究从人 PGCs 中分离得到具有典型形态特征的类 ES 细胞克隆,并且传至第 4 代,说明体外培养附植后胚胎能够建成人的类 ES 细胞系。这在国际上目前尚未见报道。

从内细胞团分离 ES 细胞的报道未见提及 ES 细胞集落团的存在。本研究集落团至少出现 3 处,为它们来自 PGCs 提供了重要佐证,因为 PGCs 自身具有群集的趋向^[8]。

ES 细胞的分离和克隆方法,一般是先用成纤维细胞制作饲养层,然后把早期胚胎或 PGCs 置于饲养层上共同培养。本研究将 PGCs 形成的类 ES 细胞克隆与共生同源成纤维细胞一起培养传代,从试验结果看是可行的。同时也证明人的 PGCs 在生殖腺中并不是在短期内就全部发育成精(卵)原细胞,少数细胞可持续存在到妊娠 4 个月左右。

ES 细胞的鉴定方法有多种途径,其中形态学特征其他方法的基础和先决条件。本研究实施之时正值高温季节,培养系统受到污染而使试验终止,进一步的试验研究和检测工作有待于在今后进行。

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. *Cell*, 1992, 70(5): 841~ 847
- 2 Stewart C L, Gadi I, Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol*, 1994, 161(2): 626~ 628
- 3 Mitani T, Takahashi N, Kawase E, et al. Proliferation of alkaline phosphatase-positive cells from cultured primordial germ cells in rat. *Theriogenology*, 1994, 41: 336
- 4 Cherny R A, Merez J. Evidence for pluripotency of bovine primordial germ cell derived cell lines initiated in long term culture. *Theriogenology*, 1994, 41: 175
- 5 Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen L R, et al. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cell. *Biol of Reprod*, 1997, 57: 1089~ 1095
- 6 Bongso A, Fong C Y, Ng S C, et al. The growth of inner cell mass from human blastocysts. *Theriogenology*, 1994, 41: 167
- 7 Pera M F, Cooper S. Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cell. *Differentiation*, 1989, 42: 10
- 8 Leitchhammer F, Baunack E, Brem G. Behavior of living primordial germ cells of livestock in vitro. *Theriogenology*, 1990, 33(6): 1221~ 1230

Embryonic Stem Cell-like Colonies from Primordial Germ Cells in Human

Chang Wancun¹ Dou Zhongying¹ Ma Hongfei² Yang Chunrong¹
Gao Zhimin¹ Lei Anmin¹ Fan Jingzhuang¹

(¹ Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology
of Agricultural Ministry of China, Northwestern Agricultural University;
2 No. 3 Hospital of Xianyang, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract Aborted human fetuses were collected to isolate PGCs-derived ES-like cells from genital gland/ridge and the tissue around, with DMEM+ NCS(newborn calf serum) as culture medium. ES-like cells were disaggregated and passaged to gether with homologous embryonic fibroblasts using trypsin+ EDTA in Ca^{2+} and Mg^{2+} free PBS. At 12 h of primary culture PGCs attaching to the bottom of culture dish with large size and blebbling edge were observed. After 48 h arose 26 discrete and mixed ES-like colonies in which cells were densely packed making the colonies nest-like. On day 6 some colonies succeeded in the first passaging, and subcultured to passage 4 on day 16. The result suggested that ES-like cell line in human could be established by culturing post-implantation embryo.

Key words primordial germ cell, embryonic stem cell, isolation, passage, colony, in vitro culture, human