LIF 和 IGF-1 对牛胚胎干细胞分离的影响*

杨 奇, 窦忠英
(西北农林科技大学 家畜生殖内分泌与胚胎工程农业部重点开放实验室, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 比较了添加 LIF, IGF-1 和 LIF+ IGF 对牛胚胎干细胞(ES)分离的影响。结果表明: ①添加 10 ng/mL LIF 能提高胚胎贴壁率, 促进内细胞团(ICM)和 ES 细胞的增殖并抑制其分化; ②添加 10 ng/mL IGF-1 既能提高胚胎贴壁率, 又能使 ICM 明显增殖的时间和传代后集落出现的时间提前; ③添加 10 ng/mL LIF+ 10 ng/mL IGF-1, 可以同时发挥两种生长因子的作用效果, 更有利于牛胚胎干细胞的分离。

[关键词] LIF; IGF-1; 胚胎干细胞; 牛胚胎
[中图分类号] S823.3+6 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2782(2002)03-0013-04

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES cells)是由早期胚胎内细胞团或原始生殖细胞经体外分化抑制培养而筛选出的一种多潜能细胞[1,2]。它既保持了早期胚胎正常的二倍体核型特征和分化成包括生殖腺在内的各种组织的分化潜能, 又象其他细胞一样可在体外扩增、筛选、转化和冻存。与体细胞相比, ES 细胞具有低分化优势, 因此, 用于克隆动物效果会更好, 而且可以直接通过胚胎嵌合或利用转基因 ES 细胞进行胚胎嵌合生产所需个体。与胚胎细胞相比, ES 细胞具有数量上的优势, 因此, 可以利用 ES 细胞进行定向分化和基因表达调控的研究以及胚胎毒性检测。同时, ES 又是组织工程所用种子细胞的宝贵材料, 可以用于器官克隆。目前小鼠 ES 细胞的分离克隆体系基本建全, 对其他动物而言, ES 细胞有效分离建系仍然是研究重点[3]。本研究的目的就是为牛 ES 细胞的有效分离建系和利用积累资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄昆白系小鼠, 购自第四军医大学实验动物中心, 饲养观察 1 周后使用。3~7 周岁健康荷斯坦奶牛, 由西北农林科技大学奶牛胚胎移植试验站提供。

1.2 溶 液

牛冲胚液 磷酸盐缓冲液(PBS)+ 体积分数 1% 新生犊牛血清(NBS)。

胚胎培养液 A 液: 高糖 DMEM + 体积分数 15% NBS+ 0.1 mmol/L β-巯基乙醇+ 0.1 μmol/L 亚硒酸钠; B 液: A 液+ 10 ng/mL LIF; C 液: A 液+ 10 ng/mL IGF-1; D 液: B 液+ 10 ng/mL IGF-1。

细胞消化液 质量分数 0.2% 胰蛋白酶+ 质量分数 0.04% EDTA。

细胞有丝分裂抑制剂 10 μg/mL 丝裂霉素-C。

1.3 牛胚采集

选健康经产奶牛, 自然发情或前列烯醇处理后发情, 第 9~12 天直检有周期黄体且子宫弹性良好者经常规超排处理, 第 6~8 天非手术采集胚胎。

1.4 小鼠胎儿成纤维细胞饲养层的制备

选取铺满皿底的原代(或一代)小鼠胎儿成纤维细胞, 吸去培养液, 加入 5 mL 丝裂霉素-C 液, CO_2 培养箱培养 1.5~2 h(38 ℃, 体积分数 5% CO_2, 饱和湿度); 用无钙镁(PBS) 5~10 mL/次清洗 5 次; 加入细胞消化液 5 mL, 38 ℃消化 2~3 min, 轻轻摇动, 见部分细胞脱离皿底时, 用吸管吹打离散成单细胞悬液; 加 5 mL 细胞培养液, 用注射器吹打均匀, 终止消化; 将细胞悬液移入 15 mL 离心管, 低速离心(1 000 r/min, 3 min); 弃上清液, 加 10 mL 细胞培养液, 吹打离散后再次离心; 弃上清液, 加 2 mL 细胞培养液, 吹打制成细胞悬液, 吸 200 μL, 镜下计数, 调整细胞浓度为 3×10^5~3.5×10^5 mL^{-1}; 在明胶处理过的 1 cm 四孔板中, 每孔缓慢加入 0.6 mL 细胞悬液, 静止 1~2 min 后, 轻轻移入培养箱, 用前换液。

* [收稿日期] 2001-06-04
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670359); 国家"九五"攻关项目(96-C01-03)
[作者简介] 杨 奇(1967-), 男, 新疆伊犁人, 在读博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程和毒理学研究。

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

1.5 胚胎培养

将预先制好的饲养层四孔板中的培养液吸去,换入等量胚胎培养液(溶液分组见 1.2),分组放入牛胚(1 枚/孔),置 CO_2 培养箱培养(38 ℃,体积分数 5% CO_2,饱和湿度)。每隔 12 h 观察记录 1 次。每 2 d 换 1 次溶液。

1.6 ES 细胞的分离与克隆

将预先制好的四孔板中的培养液吸去,换入等量相应的胚胎培养液,溶液分组同 1.5。

1.6.1 ICM 的初次传代 选择生长集中,增殖明显,形态上未出现分化迹象的 ICM,用玻璃针将 ICM 挑离饲养层,用吸胚管移入含无钙镁 PBS 的检卵皿中,轻轻吹打清洗 2 次后,转入细胞消化液中,镜下观察消化 2~3 min(其间可用吸胚管轻轻吹打)。ICM 颜色变浅时,转入细胞培养液清洗 2 遍,用玻璃针剥离 ICM,使 ICM 呈单细胞或多细胞小块,用口吸管将其移入四孔板中,每孔 1 个 ICM 分离的细胞,轻轻移置 CO_2 培养箱培养(38 ℃,体积分数 5% CO_2,饱和湿度)。每隔 12 h 观察记录 1 次,每 2 d 换液 1 次。

1.6.2 ES 细胞的继代与扩增 ICM 初次传代一般 24 h 出现 ES 集落,待 ES 集落充分增殖而未出现形态分化时进行继代扩增。具体方法同 1.6.1。ES 细胞连续继代扩增至一定数量时即由四孔板转入 Φ3.5 cm 培养皿,按常规方法建系。

1.7 ES 细胞分化能力的检测

挑选 ES 细胞集落,无钙镁 PBS 清洗 2 次,移入消化液中,镜下观察消化 2~3 min,细胞培养液清洗 2 次,用细玻璃针离散成小团块,移入明胶铺层含细胞培养液的四孔板中(无饲养层),悬浮培养。每隔 12 h 观察记录 1 次。2 d 换液 1 次。

2 结 果

2.1 牛胚胎的发育进程

牛囊胚一般在体外培养 36~60 h 后孵化脱带。在此过程中,滋养层细胞迅速增殖,囊腔增大,透明带变薄,ICM 位于一侧,增殖不明显。随后,透明带上出现一裂孔,胚胎由孔中孵出。孵化胚体积一般为初培养囊胚的 1.5~2 倍,但 ICM 占胚胎的比值变小。孵化胚在溶液中漂浮 48~60 h 后贴壁。

2.2 牛胚胎的贴壁过程

牛胚胎贴壁过程有 2 种。一种是孵化胚 ICM 外层的滋养层细胞层先由一点附着固定于饲养层上,随后,贴壁细胞逐渐增多,附着面积渐增,囊腔破裂,囊腔液外流,胚胎塌陷,最后完全贴附于饲养层上,中央是隆起的 ICM,周围是两层重叠的滋养层细胞。另一种贴壁方式是孵化胚逐渐收缩成暗黑色的球形实体,在溶液中漂浮约 12 h 后,先由一点附着,最后完全贴附于饲养层上,约 12 h 后以胚胎集落为中心,紧贴饲养层表面放射形延伸出网状的饲养层细胞。牛胚胎从开始附着到完全贴壁大约需要 12 h。胚胎贴壁过程伴随着 ICM 的迅速增殖。牛 ICM 色深发黑,中央高,周边渐低,边缘不整齐。牛胚胎贴壁后 12~36 h ICM 增殖至最高峰,此时 ICM 体积最大,为传代的最佳时机,以后周边细胞开始迁移分化,ICM 体积逐渐变小乃至消失,这与滋养层呈现的无限增殖趋势形成强烈反差。在增殖过程中,牛 ICM 直径的增大比高度明显,因而集落隆起程度较低。牛胚胎贴壁后均能分离到 ICM,但胚胎质量不同 ICM 的分离效果也不同。ICM 集中的胚胎,贴壁后增殖的 ICM 呈团块状,细胞数量大,结构紧凑;ICM 松散的胚胎贴壁后增殖的 ICM 呈条状或网状,细胞数量相对较少,而且极易分化、消失。

2.3 不同培养液对胚胎贴壁后 ICM 增殖的影响

在试验中用 4 种不同培养液以原代小鼠胎儿成纤维细胞(PMEF)为饲养层,对所得新鲜囊胚进行培养,结果见表 1。

从表 1 可以看出,LIF,IGF-1 及 LIF+IGF-1 对胚胎的贴壁率都有不同程度的提高。比较明显的是添加 IGF-1 或 LIF+IGF-1 使得 ICM 的增殖高峰期有所提高。

表 1 不同培养液对胚胎贴壁和 ICM 增殖的影响

Table 1 Influence of medium on attachment of embryo and proliferation of ICM

培养液 Medium	胚胎数 Number of embryo	贴壁数 Number of attachment	贴壁率/% Ratio of attachment	ICM 增殖高峰期/h Fastigium of ICM
A (CK)	4	2	50.0	144~168
B	6	5	83.3	144~168
C	6	4	66.7	120~144
D	12	9	75.0	120~144

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

在试验中观察到, 添加 IGF-1 或 LIF+ IGF-1 使 ICM 和滋养层细胞的增殖速度明显加快, 而且孵化贴壁时间均能提前 12～24 h, 贴壁后处于增殖高峰期的 ICM 也相对大于对照组。而单添加 LIF, 虽然胚胎体积的增大没有添加 IGF-1 或 LIF+ IGF-1 明显, 但胚胎贴壁率相对较高。而且处于增殖高峰期的 ICM 体积较大、集落结构紧凑、分化程度较低。

2.4　ES 细胞的分离与克隆

2.4.1　ICM 初次传代后的表现　培养 5～7 d 的 ICM 初次传代后出现了 3 种集落: 第一种是 ES 样细胞集落由小而圆的细胞构成, 细胞结构紧密, 集落隆起明显, 而且与周围饲养层的界限清晰, ES 细胞样集落一般在传代后 24～48 h 出现, 并呈快速增殖趋势; 第二种是滋养层细胞集落, 由首尾相连的滋养层细胞形成一膜状结构, 贴附于饲养层上, 呈无限扩增趋势; 第三种是巨型细胞集落, 由亮而大的巨型细胞组成, 细胞大小不均, 集落中央突起, 但周边结构松散。一般情况下, 团状 ICM 初识传代后主要形成 ES 细胞样集落, 而条状或网状 ICM 主要形成滋养层细胞集落或巨型细胞集落。

2.4.2　ES 细胞的继代培养　ICM 初次传代后 2～3 d, 挑选充分增殖、分化低的 ES 细胞样集落进行继代培养。本试验共培养了 28 枚囊胚, 其中 4 枚以 A 液培养, 6 枚以 B 液培养, 6 枚以 C 液培养, 其余均以 D 液培养, 结果见表 2。

表 2　不同培养液对 ES 细胞克隆的影响

Table 2　Influence of medium on the isolation of ES cells

培养液 Medium	胚胎数 Number of embryo	增殖的 ICM 数 Number of proliferous ICM	形成 ES 细胞的胚胎数 Number of embryo developing into ES cells	ES 细胞最高代数 Highest passage of ES cells
A (CK)	4	2	1	1
B	6	5	3	1
C	6	4	2	1
D	12	9	5	2

从表 2 可见, 添加 LIF, IGF-1 或 LIF+ IGF-1 均能使 ES 细胞的克隆率得到一定程度的提高。

2.5　ES 细胞的分化能力

以 A 液为培养液, 将两枚胚胎形成的 1 代 ES 样细胞集落消化离散后, 分别接种于明胶铺底的四孔板中, 进行了体外分化试验。结果在培养 2 d 后, 用牛类 ES 细胞分化形成了“简单类胚体”, 悬浮于培养液中。有些“简单类胚体”单独存在, 有些 2～3 个连接成串。“简单类胚体”在形态上有些象扩张囊胚, 囊体大, 但没有透明带和典型的 ICM, 只是一边薄而对侧相对较厚。

3　讨　论

ES 细胞分离培养的目的是获取大量未分化的全能性(或多能性)细胞。因此, 在培养过程中既要保证细胞的增殖, 又要抑制其分化。IGF-1 是一种广谱促分裂剂, 可以通过增强细胞中 DNA 和蛋白质的合成促进细胞的分裂增殖, 对滋养层和 ICM 的增殖都有促进作用[4,5]。试验中发现, 添加 IGF-1 能提高胚胎贴壁率, 使牛 ICM 明显增殖的时间和传代后新集落出现的时间提前, 传代能力有所增强。LIF 是饲养层抑制 ICM 和 ES 细胞分化的主要细胞因子, 而且能通过抑制细胞程序性死亡而提高细胞的存活率[6]。在哺乳动物妊娠早期, LIF 有促进胚胎发育和启动胚泡着床的双重作用, 可以提高牛胚胎体外培养的存活率, 绵羊胚胎孵化率以及人体外受精胚胎的发育率[7]。Lavranos[8]通过胚胎移植证明, 体外 LIF 处理也有助于胚胎在体内的存活和发育进程。因此, 添加 LIF 能提高胚胎贴壁率和 ES 细胞的克隆效果。

培养细胞自身的生存能力、培养环境及操作程序直接决定着 ES 细胞的分离效果。本试验最高只分离到第 2 代牛类 ES 细胞。原因可能是, 一方面所获得的牛类 ES 细胞自身的生命力有限, 而所在培养环境又不能有效改变其命运。另一方面, 在传代过程中胰酶和 EDTA 的反复消化所引起的损伤, 可能加快了细胞的分化和死亡。

正常细胞自产生之日起, 其寿命已经确定。如克隆“多利”所用的乳腺细胞, 由于与正胚胎细胞相比端粒短而导致“多利”早衰。与之相反, 经过转化的小鼠成纤维细胞(STO)却能保持无限的增殖能力。所以, 在 ES 细胞的分离过程中, 可以采取一些化学、物理和生物学方法来改变限制其分裂增殖能力的遗传性状, 提高细胞的生命力。

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

[参考文献]

[1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(9): 154- 156.

[2] Cherny R A, Stokes T M, Merei J, et al. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells[J]. Reprod Fertil Dev, 1994, 6: 659- 675.

[3] 李谱华, 杨 奇, 窦忠英. 哺乳动物胚胎干细胞的研究历史和现状[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(1): 118- 121.

[4] Watson A J. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation embryo[J]. Mol Reprod Dev, 1992, 31: 87- 95.

[5] Gandolfi F. Paracine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastcyst[J]. Theriogenology, 1994, 41: 95- 100.

[6] Maurizio P. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primodial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apptosis)[J]. Development, 1993, 118: 1089- 1094.

[7] 张春丽, 段恩奎, 曾国庆. 白血病抑制因子及其在胚胎发育和胚泡着床中的生理功能[J]. 生理科学进展, 1997, 28(3): 240- 242.

[8] Lavranos T C. Trophic effects of myeloid leukemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos[J]. Reprod Fertil, 1995, 105: 331- 338.

Influences of LIF and IGF-1 on the isolation of bovine ES cells

YANG Qi, DOU Zhong-ying

(*Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Agricultural Ministry of China, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: In this paper, we compared the influences of LIF, IGF-1 and LIF+ IGF-1 on the isolation of bovine ES cells. The results showed that: ① Supplementing with 10 ng/mL LIF could enhance the ration of embryo attachment, promote the proliferation of ICM and ES cells and inhibit the differentiation of ICM and ES cells; ② Supplementing with 10 ng/mL IGF-1 could move up the time for the sufficient proliferation of ICM and ES cells. ③ Supplementing with 10 ng/mL LIF+ 10 ng/mL IGF-1, both the effects of LIF and IGF-1 were brought into play.

Key words: LIF; IGF; ES cells; bovine

异种细胞核移植研究取得进展

2001 年 9 月由西北农林科技大学窦忠英教授领导的陕西省干细胞工程技术研究中心在异种细胞核移植研究方面取得进展。该中心以人类胎儿成纤维细胞为核供体, 与去核牛卵母细胞构建核移植胚胎。共组建重构胚胎 113 枚, 经过电融合操作后共有 37 枚胚胎融合, 22 枚分裂, 最终得到 11 枚形态正常的克隆胚胎。这一研究是在大量动物实验的基础上进行的。同期, 该中心利用山羊体细胞与去核牛卵母细胞构建核移植胚胎, 共组建重构胚胎 283 枚, 经过电融合共有 153 枚胚胎融合, 57 枚分裂, 最终得到 22 枚形态正常的桑椹胚, 分别移植到 9 只受体羊体内, 未得到妊娠。

从以上结果看出, 牛卵母细胞质可以诱导人类细胞核重塑, 并重新开始从原核胚发育。这一研究进展为克隆技术在组织工程中的应用展现了美好前景。目前, 该中心正在进行进一步相关研究, 有望在短期内取得更大进展。

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