山羊胚胎原始生殖细胞的分离与培养*

杨继建, 葛秀国, 窦忠英
(西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西省分中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 选择受精后 30～50 d 的关中奶山羊胎儿为材料, 参照小鼠原始生殖细胞(PGCs)分离得到了山羊的 PGCs, 将其分别培养在 STO 饲养层上, 或与同源山羊成纤维细胞(GEF)及山羊睾丸支持细胞(GSCs)共培养。结果表明, 3 种方法均能获得类 EG 细胞。分离得到的类 EG 细胞在 STO 饲养层上仅传 4 代; 培养在 GEF 上的效果最差, 传至第 3 代时丢失; 而在 GSCs 上培养的效果最好, 可传 6 代。

[关键词] 山羊; 原生殖细胞; 胚胎干细胞
[中图分类号] Q813.1+1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2005)05-0015-04

胚胎干细胞因具有发育多能性而备受关注, 是当今生命科学领域研究的热点。根据其来源又可分为内细胞团(inner cell mass, ICM)来源的 ES 细胞和胚胎原始生殖细胞(primordial germ cell, PGCs)来源的 EG 细胞。EG 细胞与 ES 细胞相比较易获得, 因为 PGCs 的细胞数目比 ICM 的多, 取材过程也相对容易, 因此 EG 细胞成为研究哺乳动物早期细胞分化的重要工具。1992 年, Matsui[1]等对小鼠 PGCs 长期培养并建立了胚胎生殖细胞系。此后, 在大鼠、猪、山羊、牛等动物和人的 PGC 研究上也取得了重要进展。

胚胎干细胞的增殖培养要有相应的饲养层, 目前较为成熟的、常规使用的是用小鼠成纤维细胞制备的饲养层。但小鼠成纤维细胞饲养层的异源性污染影响了胚胎干细胞的进一步研究, 因此人们开始研究用同源细胞作为饲养层来避免这一问题。睾丸支持细胞(sertoli cells, SCs)能分泌多种物质[2], 这些物质对多种细胞和组织有明显的促生长作用, 因此本试验将 SCs 与 PGCs 共培养, 其目的是观察 SCs 对 PGCs 的增殖与生长是否有明显的促进作用, 并与 STO 饲养层法及 PGCs 与山羊胚胎成纤维细胞(GEF)共培养法进行了比较。将 SCs 与 PGCs 共培养, 如能使 PGCs 在体外保持未分化状态, 并迅速大量增殖, 将有助于干细胞建系和定向分化的进一步研究, 为临床应用奠定基础[3～9]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材 料 从西安屠宰场收集受精后约 30～50 d 的关中奶山羊胎儿, 4 ℃运回实验室。STO 细胞由中国科学院上海细胞生物研究所惠赠。

1.1.2 培养液 (1) STO 细胞培养液为含 100 mL/L 新生犊牛血清(NBS)的 DMEM (高糖)。(2) PGC 培养液为含 100 mL/L NBS、0.1 mmol/L 2-巯基乙醇、2 mmol/L 谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM。

1.1.3 丝裂霉素 C 溶液 将 2 mg 丝裂霉素 C 溶于 200 mL STO 细胞培养液中, 0.22 μm 滤膜过滤, 每 10 mL 进行分装, -20 ℃保存备用。

1.1.4 AKP 染色液的配制 称取 2.0 mg α-奈酚磷酸盐, 10.0 mg 坚固蓝 RR, 121.4 mg Tris 盐, 溶于 10 mL 四蒸水中, 混合均匀, 调节 pH 为 8.4, 滤纸过滤使用。现配现用。

1.2 方 法

1.2.1 STO 饲养层的制作 挑选细胞连成一片、刚好铺满皿底且生长旺盛的制作饲养层。用 10 μg/mL 丝裂霉素 C (Sigma) 处理 1.5～3 h, PBS 清洗 3～5 次, 胰酶消化, 并按 1.2×10^5/孔 STO 密度将细胞接种到预先用 1 g/L 明胶处理的四孔板中[10]。

1.2.2 GEF 的制备 取山羊胚胎生殖嵴, 剪碎组织后加含 0.125 g/L 胰酶和 0.02 g/L EDTA 的消

* [收稿日期] 2004-12-16
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30070373)
[作者简介] 杨继建(1979-), 男, 山东泰安人, 在读硕士, 主要从事哺乳动物胚胎干细胞研究。
[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物克隆与胚胎干细胞研究。

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

化液, 于 37 ℃下消化 20 min, 加培养液中止消化并吹打, 细胞悬液经 100 μm 滤网过滤, 将 5×10^4 个细胞接种于 35 mm 平皿, 用 DMEM 完全培养液(DMEM 中添加体积分数 10% 的小牛血清, 10 000 IU 青霉素和 10 000 IU 链霉素)培养。为获得较纯的成纤维细胞, 在 37 ℃培养 30 min 后, 将未贴壁的悬液吸出后再添加DMEM 完全培养液。

1.2.3 GSCs 的提取与培养 无菌取出 2 月龄关中奶山羊睾丸, 剥去白膜, 剪碎生精小管, 加 1 g/mL 胶原酶(Sigma 公司产品)及 1 g/L 胰酶, 31 ℃水浴震荡, 30 min 后加培养液中止消化并吹打, 细胞悬液经 100 μm 滤网过滤后静置 5 min, 弃上层漂浮细胞, 取试管底部细胞, 用完全培养液调整细胞密度, 将 5×10^4 个细胞接种于 35 mm 平皿中, DMEM 完全培养液培养。接种 PGCs 的前一天以 1×10^5/孔密度将细胞接种到用 1 g/L 明胶处理过的四孔板中。

1.2.4 PGCs 的收集 将从屠宰场取回来的羊胎儿, 用含青链霉素的生理盐水冲洗 4～6 次, 在显微镜下无菌剥离生殖嵴。用 PBS 液清洗 2～3 次, 剪碎, 用 0.125 g/L 胰酶+ 0.02 g/L EDTA 2 mL 于 37 ℃处理 10～15 min。用 16# 注射针头轻轻吹打数次, 以等量 ES 细胞基本培养液中和。0.074 mm 纱布过滤, 细胞悬液以 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清液, 加 ES 细胞培养液制作细胞悬液, 记数, 调整细胞浓度为 5×10^4/mL。将细胞悬液接种在 STO 或 MEF 饲养层上, 在 CO_2 培养箱中培养, 2 d 换液 1 次。原代培养 5～9 d 后, 可形成典型的 EG 细胞样集落。

1.3 PGCs 的AKP 染色鉴定

取第 2 代、第 5 代 EG 集落加入多聚甲醛固定 15 min, 然后加入AKP 染液孵育 10 min。镜下观察并照相。

2 结 果

2.1 PGCs 的生长行为观察

PGCs 呈圆形或椭圆形, 比周围的体细胞大, 核大胞质少。5～9 d 后, 可见典型的鸟巢状 PGCs 集落, 细胞集落隆起, 边缘整齐, 细胞排列致密, 看不出明显的细胞结构(图 1), 传至 4 代后集落仍很典型。

2.2 PGCs 在不同饲养层上的培养效果比较

观察结果表明, PGCs 在 STO 上培养及分别与 GEF 或 GSCs 共培养 1～4 d 时, 三者效果无明显差异, 培养至第 7 天, 接种在 GSCs 表面的 PGCs 集落明显多于 GEF 表面和 STO 表面。由表 1 可知, 继续培养至第 3 代时, 未见 GEF 表面有继续生长的 PGCs 集落; 接种在 STO 饲养层上的 PGCs 可传至第 4 代; 而接种在 GSCs 表面的 PGCs 传至第 6 代还可见明显的 PGCs 集落, 但数量显著减少, 传至第 7 代时丢失。分布于 GSCs 表面(图 2)的 PGCs 集落体积也略大于与 GEF 共培养的 PGCs。

表 1 PGCs 细胞与 GEF、GSCs 共培养及在 STO 饲养层上 EG 集落数的比较

Table 1 Contrast of EG clone number on the feeders of GEF、GSCs and STO

代数 Passage	GEF	STO	GSCs
P0	16±2.5	20±7.0	43±20.5
P1	56±2.5	14±5.0	25±5.0
P2	2±1.5	12±3.0	37±6.5
P3	0	7±2.5	47±8.5
P4		2±1.0	27±4.5
P5		0	10±2.5
P6			5±2.0
P7			0

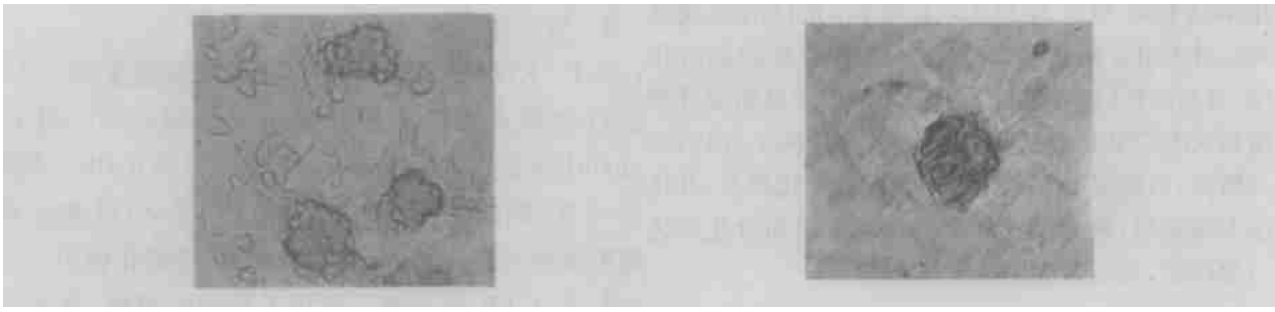

图 1 原代培养 6 d 出现山羊 PGCs 集落(×100)

Fig. 1 The goat PGCs cloning on the sixth day(×100)

图 2 培养在 GSCs 上的第 6 代 PGCs 集落(×100)

Fig. 2 The sixth passage goat PGCs cloning on the GSCs(×100)

2.3 AKP 检测

在 3 种饲养层中生长的集落细胞经AKP 染色后均呈不同程度的阳性反应, 说明集落中生长的细胞是 PGCs, 具备干细胞的特性(图 3)。

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

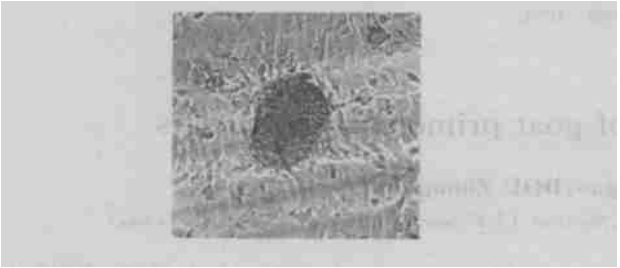

图 3　第 5 代 PGCs 集落 AKP 染色(×100)

Fig. 3　The second passage PGCs cloning, AKP positive (×100)

3　讨　论

PGCs 和 ICM 细胞虽同属于胚胎干细胞, 但 PGCs 是胚胎形成后机体内的干细胞, 与胚泡期的内细胞团相比, 经历了着床的筛选, 而生理状态下有相当数量的胚泡因生长发育不良而不能正常着床, 最终导致自行排出, 因此 PGCs 的健康程度应远远大于 ICM 细胞[11]。干细胞经体外长期培养而获得大量未分化的 ES 或 EG 细胞是定向分化研究的基础。EG 细胞培养的经典方法是培养在 STO 饲养层上, 但 STO 与 PGCs 的异源性影响了胚胎干细胞的进一步研究。因此本试验选择了同源生殖嵴成纤维细胞与山羊睾丸支持细胞为饲养层进行对比研究。试验结果显示, PGCs 与 GSCs 共培养, 其集落数与发育程度均优于经典的 STO 饲养层培养, 而与同源生殖嵴成纤维细胞的共培养效果最差。

原代 PGCs 在生长过程中先附着于饲养层上, 然后部分细胞迁移形成细胞团, 并增殖形成多层细胞克隆, 形状似鸟巢状; 部分单个细胞亦能增殖形成较小克隆[1]。Michael 等[6]在饲养层上观察到了迁移的 PGCs。本试验中也观察到了有些细胞团或克隆是在很短的时间内形成的, 这一结果也证实了 PGCs 的迁移理论。

人们在 PGCs 的培养过程中以 STO 或 MEF 作饲养层, 同时在饲养层中添加各种生长因子(如 LIF, SCF, bFGF, forskolin), 目的是缓解 PGCs 的凋亡, 延长其存活时间[1, 6, 12]。但也有报道认为, STO 作饲养层并非必须添加生长因子和抑制分化因子。近年来, 对于 SCs 的研究[2]揭示 SCs 具有分泌 LIF, SCF 和 bFGF 的功能。因此, SCs 应该在促进其表面接种的 PGCs 大量增殖的同时抑制其分化, 本试验也证明了这一点。本研究对培养到第 5 代的 PGCs 进行了 AKP 的标记检测, 结果呈阳性, 证明了培养至第 5 代的 PGCs 仍具备干细胞的特性。综上所述, 将 PGCs 与 GSCs 共培养可明显促进 PGCs 的贴壁与增生, 抑制体外培养中 PGCs 的分化, 更重要的是减少了异源污染, 为胚胎干细胞的进一步研究提供了一种很好的方法。

[参考文献]

[1] Matsui Y, Zsebo K. Derivation of pruipotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. Cell, 1992, 70(4): 841- 847.

[2] 上官芳芳, 史小林. 睾丸支持细胞的功能及其应用的探讨[J]. 解剖学报, 2002, 33(4): 446- 448.

[3] Piedrahira J A, Moore K, Oitama B, et al. Generation of transgenic procine chimeras using pronordial germ cell derived colonies[J]. Biol Peprod, 1998, 58: 3121- 3129.

[4] Shim H, Gutierrez-Adam A, Chen R, et al. Isolation of pluripotent stem cell from cultured procine primordial germ cell[J]. Biol Peprod, 1997, 57(5): 1089- 1095.

[5] Cherny R A, Merei J. Evidence for pluripotency of bovine primordial germ cell lines maintained long term culture[J]. Theriogernology, 1994, 41: 175.

[6] Michael J, Shamblott J A, Shunping W, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Dev Biol, 1998, 95(23): 13726- 13731.

[7] Lee C K, Scules N, Newton G, et al. Isolation and ination of primordial germ cell (PGC) derived from goat, rabbit and rat[J]. Theriogernology, 1998, 49: 388.

[8] Kuhholze B, Baguisi A, Overstrom EW. Long term cultured and characterization of goat primordial germ cells[J]. Theriogernology, 2000, 53(5): 1071- 1079.

[9] Mitani T, Takahasni N, Kawasel, et al. Proliferation of alka line phosphotase positive cell from cultured primordial germ cell in rat[J]. Theriogernology, 1994, 41: 336.

[10] 徐小明, 华进联, 窦忠英, 等. 牛原始生殖细胞的分离与培养[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(1): 77- 88.

[11] 路　欣, 许　晴, 梁元晶, 等. 培养原始生殖细胞的新方法[J]. 首都医科大学学报, 2004, 25(1): 15- 18.

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

[12] Pesce M, Farrace M G, Piacentini M, et al. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote PGCs survival by suppressing programmed cell death (apoptosis) [J]. Development, 1993, 118(4): 1089- 1094.

The isolation and cultivation of goat primordial germ cells

YANG Ji-jian, GE Xiu-guo, DOU Zhong-ying

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

Abstract: 30- 50 dpc (days postcoitum) Guanzhong goats fetus were selected to isolate the PGCs by isolating the mouse PGCs. Three methods were taken in the experiment: first, PGCs were cultured on the STO feedors; second, PGCs were co-cultured with the GEF; third, PGCs were co-cultured with the GSCs. The results indicated that EG cells were all able to gain in the three ways. And, PGCs co-cultured with GSCs were cultured for 6 passages, PGCs on STO were cultured for 4 passages, but PGCs co-cultured with GEF were lost in the third passage.

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

(上接第 14 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)05-0012-EA

Cloning of 5′ flanking sequence of goat BLG and regulating the expression of GFP in cell

SONG Hong-wei, ZHENG Yue-mao, ZHANG Ming-feng, TANG Shuang, ZHANG Yong

(*Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shannxi 712100, China*)

Abstract: 5′ flanking region of goat BLG was amplified from goat genomic DNA according to the published whole sequence of goat BLG and cloned to pMD-18t vector correspondently. By sequencing, the amplified sequence was the same as 99% as publication, with which replaced previous promoter CMV cloned in pEGFP-c_1 expressional vector and transfected the cultured Mammary cell *in vivo*. Through observation under UV microscope, it showed that GFP had been successfully expressed in Mammary Gland cell. Then, the cloned sequence can be served for the study of mammary gland expression construct.

Key words: goat; β-lactoglobulin gene; green fluorescent protein gene

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