

大鼠心肌细胞条件培养基对兔胚胎干细胞 分离培养效果的影响

郭志林^{1,2}, 王新庄², 张涌¹, 王木^{2,3}, 王轶敏², 胡文举^{1,2}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南省肉牛工程技术研究中心, 河南 郑州 450003;
3 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

[摘要] 采用大鼠心肌细胞条件培养基对兔胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESC)进行分离、传代培养, 研究大鼠心肌细胞条件培养基对兔 ESC 分离培养效果的影响。结果显示, 用 SD 大鼠心肌细胞条件培养基培养的兔 ESC 集落呈岛屿状生长, 碱性磷酸酶染色呈强阳性, 体外分化可形成类胚体状结构, 贴壁类胚体周边会出现许多分化的上皮样细胞或单个散在的细胞; 常规冻存后再传代的兔 ESC 集落具有较为一致的生长特征, 并呈现胚胎干细胞集落所特有的岛屿状生长形态; 传至第 5 代的兔 ESC 集落核型正常率 > 75%。表明 SD 大鼠心肌细胞条件培养基可用于兔胚胎干细胞分离培养。

[关键词] 兔; 细胞培养; 大鼠心肌细胞条件培养基; 类胚胎干细胞

[中图分类号] Q813.1¹

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)04-0001-05

Effect on isolation and culture of rabbit embryonic stem cells with rat cardiomyocyte conditioned medium

GUO Zhi-lin^{1,2}, WANG Xin-Zhuang², ZHANG Yong¹, WANG Mu^{2,3},
WANG Yi-Min², HU Wen-Ju^{1,2}

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 The Research Center of Cattle Engineering Technology in He'nan, Zhengzhou, He'nan 450003, China;

3 The College of Animal Science and Veterinary, He'nan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002, China)

Abstract: Effect on isolation and culture of rabbit embryonic stem (ES) cells with rat cardiomyocyte conditioned medium was studied. Results showed that isolated rabbit ES-like cells clusters cultured by SD rat cardiomyocyte conditioned medium were island-like; alkaline phosphatase staining of rabbit ES-like cell was strongly positive; rabbit ES-like cells could become embryonic bodies-like structures *in vitro*, and embryonic bodies which stuck to plates could be differentiated into epithelial-like cells or scattered single cell; rabbit ES cells cluster were identical island-like image and grew coincidentally by culture after routine freeze; karyotype analysis of the 5th passage rabbit ES cells was researched, and the karyotype normal rate was over 75%. The essay showed SD rat cardiomyocyte conditioned medium can be used to isolation and culture of rabbit ES-like cell.

Key words: rabbit; cells culture; rat cardiomyocytes conditioned medium; embryonic stem-like cells

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESC)是从 早期胚胎内细胞团(Inner cell mass, ICM)分离出

[收稿日期] 2006-10-30

[基金项目] 河南省杰出人才创新基金项目(0421002100)

[作者简介] 郭志林(1975-), 男, 内蒙古呼和浩特市人, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程研究。E-mail: gzl7511@yahoo.com.cn

[通讯作者] 王新庄(1963-), 男, 研究员, 主要从事动物胚胎工程与发育生物学研究。E-mail: happywang169@sohu.com

来的可在体外连续增殖而不分化,并具备全能性的细胞^[1-3]。由于 ESC 系具有全能性,将其与基因工程技术、胚胎工程技术相结合,在动物细胞与个体之间架起了一座桥梁,可用来生产转基因动物,药用蛋白,研究动物发育和细胞分化及基因调控,而且胚胎干细胞与治疗性克隆的联系也越来越紧密^[4-6]。因此,ESC 的研究一直非常活跃,各国科学家都积极投身于这一研究领域,期望能分离建立 ESC 系。

目前虽然已有成功建立 ESC 系的报道,但也仅限于几个有限品种^[7],其他动物 ESC 建系方法还不成熟,这可能与其 ESC 的生长特性不同有关。研究人员常以小鼠 ESC 建系方法为参考,探索其他物种 ESC 的建系方法。就兔而言,Graves 等^[8]首先建立了第一株兔 ESC 系;DU 等^[9]报道兔 ESC 经核移植可发育至囊胚;Luc 等^[10]用兔 ESC 成功制作皮毛嵌合体。但兔 ESC 建系效率低,传代时 ESC 易分化。为了寻求适合兔 ESC 的培养体系,提高其建系效率,本试验探讨了大鼠心肌细胞条件培养液对兔 ESC 分离培养效果的影响,以期完善兔 ESC 的分离培养体系,为兔 ESC 系的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 日本大耳兔,由河南省实验动物生产中心提供,质量 2.5 kg 以上,健康;SD 大鼠由河南省医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 PMSG(宁波激素制品有限公司生产,批号:040604),HCG(杭州市动物药品厂生产,批号:030210),DMEM 培养液(低糖,无丙酮酸钠,GIBCO 公司产品,批号:10566-016),2.5 g/L 胰酶-0.4 g/L EDTA 混和液(GIBCO 公司产品,批号:25200-072),丝裂霉素 C(Mitomycine, Sigma 公司产品,批号:0403),国产胎牛血清(FCS,杭州四季青生物公司生产,批号:040203),进口胎牛血清(Hyclone 公司产品,批号:CH30160.03),人重组白血病抑制因子(LIF, CYTOLAB 公司产品,批号:300-05),明胶(华美生物公司产品,批号:0304), β -巯基乙醇(β -ME, AMRESCO 公司产品,批号:311855)。兔 ESC 培养液为低糖 DMEM+体积分数 15%胎牛血清+0.1 mmol/L β -巯基乙醇+0.1 mmol/L 非必需氨基酸+1 000 U/mL LIF+100 U/mL 青霉素+100 U/mL 链霉素。大鼠心肌细胞条件培养基制备参考曹鸿国等^[11]报道的方法。

1.2 兔胚胎的获取及培养

选择阴道粘膜呈淡粉红色的母兔,肌肉注射 PMSG 100 U/只,48 h 后观察发情情况。将发情症状明显的母兔与公兔合笼,自然交配。交配后耳静脉注射 HCG 100 U/只,96 h 后手术从子宫收获囊胚,冲卵液为无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS+体积分数 5% FCS。将兔胚胎培养于 DMEM+体积分数 10% FCS 微滴中,培养条件为:37 °C,体积分数 5% CO_2 ,饱和湿度。

1.3 兔 ESC 饲养层的制备

取胚龄为 14 d 的鼠胚或 12 d 的兔胚,去除头、四肢及内脏,将躯干部分剪碎,用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 洗涤,于 2.5 g/L 胰酶-0.4 g/L EDTA 中消化,过孔径 100 μm 滤纱,于培养瓶中培养。选择生长良好的 1~5 代胎儿成纤维细胞作为饲养层,用前以 0.01 g/L 丝裂霉素 C 处理 1 h,再用 2.5 g/L 胰酶-0.4 g/L EDTA 消化,1 000 r/min 离心 5 min,沉淀重悬,以 $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 1 g/L 明胶水溶液处理过的四孔培养板,待用。

1.4 兔胚胎的分割

将兔扩张囊胚用 5 g/L 蛋白酶 K 作用 1~2 min,去掉胶膜和部分透明带,在体视显微镜下用刀片和玻璃针去除剩余透明带,后转入培养皿小液滴中,用精细控制的玻璃针小心切除滋养层细胞,挑出内细胞团,移至加 ESC 培养液的四孔培养板中。37 °C、体积分数 5% CO_2 、饱和湿度条件下培养,每日观察、记录 ICM 贴壁及 ICM 集落出现的时间。

1.5 兔 ICM 集落的分离

待兔 ICM 集落,出现岛屿状隆起时,对其进行分离。在体视显微镜下,用精细控制的巴氏管将 ICM 切下,转入 PBS 液滴中洗 2 次,再转入上层覆盖石蜡油的 2.5 g/L 胰酶-0.4 g/L EDTA 消化液滴中,在 CO_2 培养箱中作用 5~8 min。用另一支吸有含血清培养液的口径小于 ICM 细胞团的巴氏管,轻轻将细胞团离散为 3~4 细胞的小团块,将离散后的微滴内容物转入新制作的饲养层四孔培养板内继续培养,每日观察,每 2 d 更换 1 次培养液。

1.6 兔 ESC 集落的分离及传代培养

分散后的兔 ICM 继续培养 3~7 d,此时出现的 ESC 集落记为 F_1 。用分离及离散 ICM 的方法对 F_1 进行分离、传代后,重新接种于饲养层上,再次出现的 ESC 集落记为 F_2 ,依此法进行分离、传代,直到获得足够的兔 ESC,分批冻存。

1.7 兔 ESC 的鉴定

1.7.1 形态观察 在相差显微镜下观察兔 ICM 和 ESC 的形态,并对 ES 细胞进行伊红染色,观察其形态特征。

1.7.2 碱性磷酸酶(AKP)染色 兔 ESC 团经体积分数 4%多聚甲醛固定,PBS 洗涤,平衡,加入新配制 NBT(0.35 g/L)/BCIP(0.18 g/L)混和液,37 °C 避光反应 30 min,去离子水洗涤,显微镜下观察。

1.7.3 核型分析 取第 5 代生长旺盛的兔 ESC,用 0.2 mg/L 秋水仙素处理 1.5 h,涂片,空气干燥,Giemsa 染色,油镜下观察核型,重复 4 次。

1.7.4 体外分化能力鉴定 将兔 ESC 集落消化为小团块,接种在 1 g/L 明胶水溶液处理的平皿中培养,每日振摇 3~4 次,培养液为不添加 LIF 的 ESC 培养液。

1.8 兔 ESC 的冷冻与解冻

冷冻保护液为 DMEM+体积分数 20%FCS+体积分数 20%DMSO。用胰酶消化兔 ESC,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入冷冻保护液重悬,调整细胞密度为 $(0.6\sim 1.0)\times 10^7\text{ mL}^{-1}/\text{V}$,以每管 1 mL 分装于冻存管,4 °C 平衡 2 h 后,再于液氮蒸气

中平衡 30 min,投入液氮保存。将冷冻兔 ESC 在 37 °C 温水中解冻后,迅速用 9 倍体积培养液重悬,以 1 000 r/min 离心 5 min 后再重悬,快速去除 DMSO),进行计数,培养。取 1 mL 细胞悬液,加 10 μL 1 g/L 台盼兰溶液(台盼兰 0.1 g,磷酸二氢钾 0.6 g,氯化钠 0.81 g,蒸馏水 100 mL),混合均匀,静置 10 min,吸取混和液,镜下观察,计算细胞活力。

以上试验均设大鼠心肌条件培养液试验组及 ESC 培养液对照组。

2 结果与分析

2.1 兔 ES 细胞的分离

交配后 96 h 收集的兔胚胎多数是囊胚,但也有一定数量的桑椹胚。兔囊胚外覆一层很厚的胶膜,内细胞团相对较小。兔扩张囊胚难以在兔胚胎成纤维细胞饲养层上附着生长(附着率为 10%),在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上培养也较难附着,但附着率(36%)比兔成纤维细胞饲养层高。兔囊胚不经处理直接培养于小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上,7~8 d 后才有少数胚胎 ICM 贴壁,ICM 贴壁率极低(8.8%),而且贴壁后生长非常缓慢。

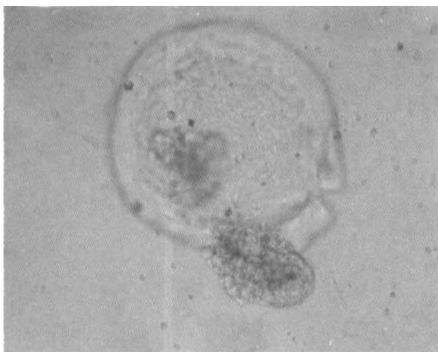


图 1 切割后的兔胚胎($\times 100$)

Fig.1 Rabbit embryo after dissect ($\times 100$)

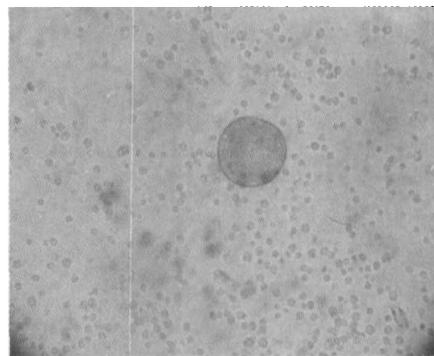


图 2 贴壁 48 h 兔 ICM 集落($\times 100$)

Fig.2 Rabbit ICM cluster attached after 48 h

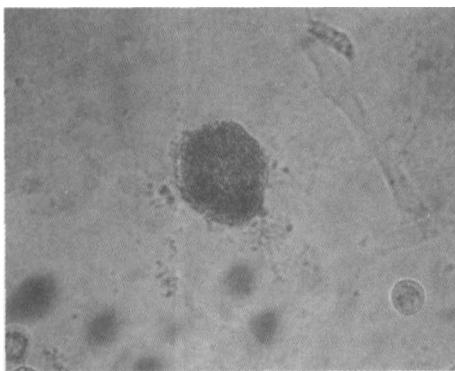


图 3 传代后的兔 ESC 集落($\times 100$)

Fig.3 Rabbit ES cells cluster after passage

兔胚胎经切割后(图 1),其 ICM 可在 48 h 内贴壁,能保持较快的增殖速度,贴壁率提高,达 60%。兔胚胎切割后 48 h,ICM 集落呈扁平圆形单层集落,细胞之间界限不清(图 2)。用胰酶消化传代后,ES 集落较小,呈微隆起椭圆形集落,颜色较暗(图 3)。用胰酶消化传代时,第 1,2,3 代兔 ESC 能稳定增殖,但从第 4 代开始细胞集落数逐渐减少,第 6 代以后丢失。第 2,3 代兔 ESC 经冷冻保存再解冻后,90%以上的细胞具有 ESC 的典型形态,在原来的培养条件下仍可传代,活力不减,生长行为较一致。

2.2 大鼠心肌细胞条件培养基对兔 ESC 分离、培养效果的影响

表 1 表明,大鼠心肌细胞条件培养液组兔 ICM 贴壁率为 59%,显著高于对照组($P < 0.05$),而且 ESC 增殖速度明显加快;大鼠心肌条件培养液组兔 ESC 集落出现的时间为传代后 24 h,而对照组(ESC 培养液,添加 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛胰岛素)需 48 h 以上,而且大鼠心肌细胞条件培养液组兔 ESC 的连续传代能力较对照组强(表 1)。

表 1 不同 ESC 培养基对兔 ICM 贴壁率和 ESC 最高传代数的影响

Table 1 Effect on rate of attaching ICM and maximum number of passages of rabbit ES cells with different ES cells media

| 分组 Group | 胚胎数 Embryos number | ICM 贴壁率/% Rate of attaching ICM | 最高传代数 Maximum number of passages |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--|
| 大鼠心肌细胞条件液 Rat cardiomyocyte conditioned medium | 32 | 59* (19/32) | 6 |
| 对照组 Control group | 28 | 25 (7/28) | 3 |

注: * 表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

Note: * indicates significant difference($P < 0.05$) between control groups and testing groups.

2.3 兔 ESC 的鉴定结果

兔 ESC 体积较小,圆形,核质比高,有一个或多个核仁。兔 ESC 集落一般呈典型的岛屿状、条状或网状。1,3 和 5 代兔 ESC 集落,AKP 染色均呈强阳性。对第 5 代兔 ESC 集落随机取样,4 个样本的二倍体核型正常率分别是 78%,81%,76% 和 85%,平均为 80%,二倍体核型正常率大于 75%,3 个样本为 XY 型,1 个为 XX 型。离散的 ESC 小团块经 5~10 d 悬浮培养后形成类胚体,将类胚体离散,再移至新的培养皿,长期培养后可观察到成纤维细胞、神经细胞等多种分化细胞。

3 讨论

3.1 胚龄和饲养层对 ESC 分离培养效果的影响

胚龄和饲养层对 ESC 的分离和培养有着重要的影响。从理论上讲,胚龄越小,分化程度越低,越具有发育全能性。有研究报道,用小鼠 16~22 细胞的桑椹胚分离 ESC 的成功率比用囊胚高得多^[12]。本试验用 4 日龄兔囊胚也分离到兔 ESC,表明 4 日龄兔胚可作为 ESC 的分离材料。Piedrahita 等^[13]在分离猪 ESC 时,对猪胚胎成纤维细胞、MEF、STO 及 Buffalo 大鼠肝细胞(Buffalo rat liver, BRL)条件

培养基进行了比较,结果发现猪 ESC 只在 STO 细胞饲养层上增殖。本试验比较了兔 ESC 在兔成纤维细胞饲养层和 MEF 上的增殖行为,结果发现兔 ESC 在兔成纤维细胞饲养层上难以附着生长,在 MEF 饲养层上相对较容易附着生长,表明在分离培养 ESC 时,不同动物 ESC 要求的饲养层种类不同。

3.2 胚胎处理方式对 ESC 分离效果的影响

在进行 ESC 分离培养时,胚胎的处理方式直接影响着 ESC 的分离效果。在进行胚胎培养时,ICM 细胞只有与饲养层贴壁后才能快速增殖,因为饲养层所产生的成纤维细胞生长因子往往锚定于细胞膜上,当 ICM 细胞与饲养层直接接触后才能接受成纤维细胞生长因子的刺激。小鼠囊胚透明带薄,容易在培养液中下沉贴壁;而兔胚透明带厚且外覆一层很厚的胶膜,体积较大,ICM 较小,在培养基中浮力大,下沉较困难,所以孵化和贴壁较慢。本试验采用蛋白酶消化去除兔胚胎胶膜和部分透明带,再辅以胚胎切割,显著提高了 ICM 贴壁率,促进了 ICM 的增殖,有利于兔 ESC 传代,这一结果与赖良学等^[14]的研究结果一致。

3.3 培养基对 ESC 分离培养效果的影响

合适的培养基是维持 ESC 正常生长和保持未分化状态的关键因素。胰岛素能促进早期胚胎卵裂,也能促进胚胎细胞的有丝分裂和减少细胞死亡,从而使囊胚细胞数目增加^[15]。本试验在培养基中添加 0.01 g/L 胰岛素,结果发现 ICM 细胞增殖速度加快,贴壁率提高,可见在分离兔 ESC 过程中,添加胰岛素是有一定促进作用的。在抑制分化方面,本试验以小鼠胚胎成纤维细胞饲养层作为分化抑制物的同时,在培养基中还添加了 1 000 U/mL LIF,取得了较好地抑制兔 ESC 分化的效果,但由于某些未知的原因,所获得的 ESC 仅传至 3 代就丢失了。相比之下,大鼠心肌细胞条件培养液促进了 ICM 的贴壁,增强了 ESC 的传代能力,最高可传至 6 代。Meng 等^[16]以大鼠心肌条件培养液为培养基,采用添加鸡血清的消化液分离小鼠胚胎干细胞,获得了较高的建系效率。Ancy 等^[17]研究发现,原代培养的人心肌细胞可以分泌 LIF、IL-6 和 IL-11 等多种细胞因子。LIF 的一个特殊膜受体是 gp190(又叫 LIFR β),另一个是 gp130, gp130 受体对 IL-6 家族的所有成员是通用的,这可以解释这些细胞因子之间的交叉效应。由此可见,在心肌条件培养液中 LIF、IL-6 和 IL-11 连同其他一些至今还不清楚的细胞因子,在 ESC 分离培养过程中共同作用,从而提

高了 ESC 的分离培养效果。

综上所述,在分离培养兔 ESC 时,应先对兔胚进行蛋白酶消化以去除透明带,再对所获囊胚进行胚胎切割,以 MEF 作为饲养层,用大鼠心肌细胞条件培养液进行培养。该法可提高 ESC 分离培养效果。

[参考文献]

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292: 154-156.
- [2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cell[J]. *Proceeding of National Academic Science of USA*, 1981, 78: 7634-7638.
- [3] Stephen A, Wood W S, Pascoe C S. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by co-culture[J]. *Proceeding of National Academic Science of USA*, 1993, 90: 4582-4585.
- [4] Shulamit L, Ngan F H, Erin L. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds [J]. *PNAS*, 2003, 100: 12741-12746.
- [5] Junji F, Eiji Y, Shigenobu Y, et al. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors [J]. *Genes & Development*, 2002, 16: 784-789.
- [6] Lars M B, Rosario S P, Sangmi C, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model[J]. *PNAS*, 2002, 99: 2344-2349.
- [7] He W, Gao J G, Liu X, et al. Establishment of embryonic stem cell lines derived from outbred mouse embryos and production of chimeras [J]. *Developmental and Reproductive Biology*, 1986, 5: 21-24.
- [8] Graves K H, Moredith. Derivation and characterization of putative pluripotent stem cell from preimplantation rabbit embryos[J]. *Molecular Reproduction Development*, 1993, 36: 424-433.
- [9] Du F, Giles J R, Foote R H, et al. Nuclear transfer of putative rabbit embryonic stem cell leads to normal blastocyst development[J]. *Reproduction and Fertilization*, 1995, 104: 219-223.
- [10] Luc S, Geor G, Albright, et al. Pluripotent rabbit embryonic stem cells are capable of forming overt coat col2 or chimeras following injection into blastocysts[J]. *Molecular Reproduction Development*, 1996, 45: 439-443.
- [11] 曹鸿国, 张涌. 小鼠体细胞核移植及 ES 细胞样集落分离[J]. *自然科学进展*, 2005, 15(4): 481-485.
- [12] Eistetter H R. Pluripotent embryonic stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae [J]. *Dev Growth and Different*, 1988, 31: 275.
- [13] Piedrahita J A, Anderson G B, Bondurant R H. On the isolation of embryonic stem cell; comparative behavior of murine, porcine, ovine embryos [J]. *Theriogenology*, 1990, 34: 879-901.
- [14] 赖良学, 郑瑞珍, 秦鹏春, 等. 影响体外培养兔胚发育和兔类 ES 细胞分离的若干因素[J]. *中国兽医学报*, 1996, 16(1): 16-21.
- [15] 赖良学, 郑瑞珍, 孙方臻, 等. 胚胎干细胞分离培养的影响因素[J]. *解剖科学进展*, 1995, 1(3): 203-208.
- [16] Meng G L, Tang F C, Shang K G, et al. Comparison of the method establishing embryonic stem cell lines from five different mouse strains[J]. *Acta genetica sinica*, 2003, 30: 933-942.
- [17] Ancey C, Corbi P, Froger J, et al. Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture[J]. *Cytokine*, 2002, 18: 199-205.