维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0077-05

小鼠胚胎干细胞饲养层制备条件的研究

王 璐,王亚平

(重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立稳定高效的小鼠胚胎成纤维细胞饲养层培养体系,用于分离克隆胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ES 细胞)。方法:取妊娠 13.5~14.5d 的胎鼠,采用组织消化法结合组织块培养法分离、培养小鼠成纤维细胞;MTT 法测定细胞生长曲线,结合倒置显微镜观察筛选小鼠成纤维细胞饲养层的最佳种植密度;MTT 法筛选丝裂霉素 C 作用的最佳浓度和时间。取妊娠 3.5d 的小鼠囊胚在经丝裂霉素 C 处理的饲养层上培养,观察胚胎干细胞生长情况。结果:组织消化法结合组织块培养法是分离培养小鼠成纤维细胞的较好的方法;1×10^5~2×10^5 个 /ml 种植密度适于饲养层铺板;丝裂霉素 C 10μg/ml 作用 3.5h 或 20μg/ml 作用 2.5h 能抑制成纤维细胞增殖,细胞至少在 7d 内维持稳定的水平;妊娠 3.5d 小鼠囊胚在饲养层上培养能形成 ES 集落。结论:制备的胎鼠成纤维细胞饲养层能有效地支持小鼠胚胎干细胞的生长。

【关键词】胚胎干细胞;饲养层;胚胎成纤维细胞;小鼠

【中国图书分类法分类号】Q954.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-17

Study on the preparation of mouse embryonic stem cell feeder layer

WANG Lu, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a stable and effective system of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) feeder layer in order to separate and culture mouse embryonic stem cells(ESC) in vitro. *Methods*: the MEFs were isolated from the mouse embryos at 13.5~14.5dpc(days post-coitus) through primary tissue digestion and tissue piece culture. The optional planting density of cell was determined according to the cellular growth curve detected by MTT and the morphology in the culture dish under inverted microscope. The optional concentration of mitomycin C and the time treating with mitomycin on MEFs were determined by MTT assay. Murine blastcysts(3.5dpc) were cultured on the feeder layer treated by mitomycin C and ESC growth was observed. *Result*: The method of tissue digestion and tissue piece culture is an efficient way to obtain primary MEFs; 1×10^5~2×10^5/ml cells is an optional planting density; MEFs proliferation could be effeciently repressed after being treated with mitomycin C 10μg/ml for 3.5 hours or 20μg/ml for 2.5 hours, and the quantity of MEFs could maintain at least for 7 days. ES clone could be obtained from the mouse blastcysts(3.5dpc) after being cultured on the feeder layer. *Conclusion*: MEFs feeder layer could effectively support mouse embryonic stem cells to grow.

【Key words】 Embryonic stem cell; Feeder layer; Embryonic fibroblast; Mouse

胚胎干细胞(Embryonic stem cell,ES 细胞)来源于早期哺乳动物胚胎或原始生殖细胞,是具有发育全能性的细胞[1~4]。ES 细胞在体外培养的关键在于分化抑制,即在培养体系中要加入分化抑制物(包括分化抑制因子或条件培养基)或将其培养在能分泌分化抑制因子的饲养层细胞上。鉴于材料来源方便、价廉、生物活性高等优点,目前小鼠胚胎成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblasts,MEFs)仍是小鼠胚胎干细胞饲养层的首选,并广泛作为啮齿类、家禽类动物以及人的 ES 细胞饲养层[3~6]。本文拟从优化实验条件的角度出发,探讨小鼠成纤维细胞分离培养的最适条件,作为饲养层铺板的最佳种植浓度,丝裂霉素 C(Mytomycin C)处理饲养层的适宜条件,旨在为分离克隆胚胎干细胞以及胚胎干细胞的培养提供更为可靠的保证。

作者介绍:王 璐(1974-),女,讲师,博士,主要研究方向:造血干细胞、胚胎干细胞生物学。

通讯作者:王亚平,男,教授,E-mail:ypwang@public.cta.cq.cn。

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(0631004)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级昆明小鼠，8~10 周龄，由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.2 主要试剂

高糖 DMEM 培养基、knockout DMEM 培养基（Gibco 公司），胎牛血清（FBS，杭州四季清公司），knockoutTM 血清，白血病抑制因子（LIF）、核苷酸（Chemicon 公司），L- 谷氨酸、青链霉素、非必需氨基酸（Hyclone 公司），β - 巯基乙醇（Sigma 公司），丝裂霉素 C（Kyowa Hakko Kgyo 公司），噻唑蓝（MTT）、胰蛋白酶、EDTA（Amresco 公司）。

1.3 小鼠胚胎成纤维细胞（Murine embryonic fibroblast，MEF）分离培养

1.3.1 原代小鼠胚胎成纤维细胞（Primary mouse embryonic fibroblast，PMEFs）分离培养[7] 雌雄鼠 2∶1 合笼，次晨和下午分别查阴栓 1 次，见阴栓者计为妊娠 0.5d。取妊娠 13.5~14.5d 孕鼠，无菌取出胎鼠。去除胎鼠头尾四肢内脏，D-PBS 洗涤后，将胎体剪碎成小于 1mm³ 的组织块。组织消化法：加入 0.25%胰酶 -0.02%EDTA 2~3ml 浸泡组织块，常温消化约 1~2min，倒置显微镜下观察，待较多细胞消化溢出后，加入等量含 10% FBS 的高糖 DMEM 终止消化，轻微吹打，吸取上清液通过 100 目细胞筛后离心获取细胞。再重复消化 2 次。调整细胞浓度约 2×10^5 个 /ml，含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养细胞。组织块培养法：组织消化后的残余组织块经含 10%FBS 的 DMEM 洗涤两次后分散置于培养瓶底部，每个组织块间距约 5mm，小心翻转培养瓶，加入培养基，培养箱中培养 4h 后再轻柔翻转培养瓶，将组织块浸泡于培养基中。

1.3.2 继代培养 组织消化法待原代细胞贴满瓶底达到 90%融合，加入 0.25%胰酶 -0.02%EDTA，倒置显微镜下观察细胞收缩变圆后，加入等量含 10% FBS 的高糖 DMEM 终止消化，1∶3 传代培养，4h 后弃去尚未贴壁细胞。组织块培养的细胞在消化前先取出剩余组织块，再次按组织块培养法继续培养，其余同组织消化法。

1.4 MTT 法检测细胞存活和生长

消化培养细胞，用含 10%FBS 的高糖 DMEM 调整细胞浓度，每孔 200μl 接种于 96 孔板中，37℃、5%CO_2 培养。检测前每孔加入 MTT 溶液（5mg/ml）20μl，继续孵育 4h，终止培养，吸弃孔内培养上清液，每孔加入 150μl DMSO，振荡 10min，酶标仪 520nm 波长比色测定 OD 值。

1.5 MEF 生长曲线测定

将培养 MEF 消化后以含 10%FCS 的高糖 DMEM 液重悬，调整细胞浓度为 5×10^5 个 /ml、2.5×10^5 个 /ml、1×10^5 个 /ml、5×10^4 个 /ml、2.5×10^4 个 /ml、1×10^4 个 /ml、5×10^3 个 /ml、1×10^3 个 /ml、5×10^2 个 /ml 共 9 个浓度，各浓度分别种植 6 个复孔，共 4 块培养板，分别培养 1d、3d、5d、7d，倒置显微镜下观察细胞形态，MTT 法测定 OD 值并绘制生长曲线。

1.6 丝裂霉素 C 作用 MEF 条件的筛选

以终浓度为 5μg/ml、10μg/ml、20μg/ml 的丝裂霉素 C 分别处理 MEF1.5h、2.5h、3.5h，共 9 个条件组。处理后 D-PBS 充分洗涤 MEF 4 次，0.25%胰酶 -0.02%EDTA 消化细胞，离心调整细胞浓度为 2.5×10^4 个 /ml，各组分别种植 6 个复孔，共 4 块培养板，分别培养 1d、3d、5d、7d，倒置显微镜下观察细胞形态，MTT 法测定 OD 值。对照组细胞浓度同样为 2.5×10^4 个 /ml，但未经丝裂霉素 C 处理。

1.7 小鼠胚胎干细胞饲养层的制备

取 3 代内对数生长期 MEF，终浓度 10μg/ml 丝裂霉素 C 处理 3.5h，D-PBS 充分洗涤，消化细胞调整细胞浓度为 1×10^5 个 /ml，种植在经 0.1%明胶包被的 4 孔培养板中，置 37℃、5%CO_2 培养箱培养待用，用前更换成胚胎干细胞培养基。

1.8 小鼠胚胎干细胞在饲养层上的生长

无菌取出妊娠 3.5d 小鼠子宫，4 号针头冲胚，解剖显微镜下收集囊胚，置于饲养层上培养。4~5d 后毛细针挑取 ICM（Inner cell mass，内细胞群），0.25%胰酶 -0.02%EDTA 进行微滴消化离散，再接种于新的饲养层铺板的 4 孔板中。3~5d 后挑取单个 ES 集落微滴消化离散，接种于新的饲养层上。

1.9 实验数据的统计学处理

经 SPSS12.0 软件进行方差分析和 Dunnett t 检验。

2 结 果

2.1 MEF 的分离培养

小于 13.5d 的孕鼠，胎鼠体积小，组织含水量多，脆性大，不易操作；且胚胎细胞对消化液的耐受性差，实验获得的细胞数量少。大于 14.5d 的孕鼠，虽然易操作，但因骨骼等系统的发育，获得 MEF 中含有较多的杂质细胞。13.5~14.5d 孕鼠实验效果好。组织消化法采用 0.02%EDTA 配合 0.25%胰酶消化时间相对缩短，对细胞的破坏小，能获得数量较多的 PMEF。通常第 1 次消化所得的细胞最多，但含有较多的红细胞，后 2 次消化得到的细胞相对较纯，活力较高。以（2~5）$\times10^5$ 个 /ml 密度种植于 75ml 培养瓶，1d 左右细胞贴壁，2~3d 铺满瓶底。细胞多有长短不等的数个突起，呈梭形、不规则三角形或扇形，核为卵圆形，位居胞质中央；其间混杂有扁平多角形，紧密相靠的上皮样细胞（图 1）。经传代后上皮样细胞减少，细胞排列为旋涡状或栅栏状（图 2）。组织块培养法 2~3d 后可观察到大量细胞从组织块边缘游出，游出的细胞大多呈梭形，围绕组织块呈放射状排列，细胞折光性强，胞浆内颗粒少，立体感强（图 3）。3~5d 后游出的细胞连接成片可传代培养。

维普资讯 http://www.cqvip.com

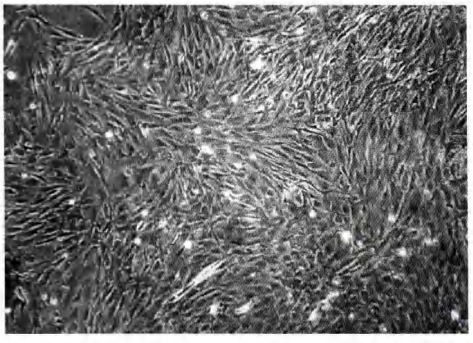


图 1 原代胎鼠成纤维细胞(×100)

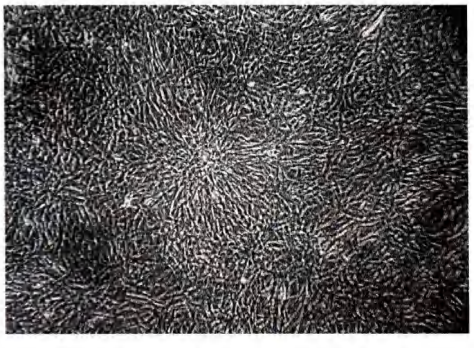


图 2 第 3 代胎鼠成纤维细胞(×40)

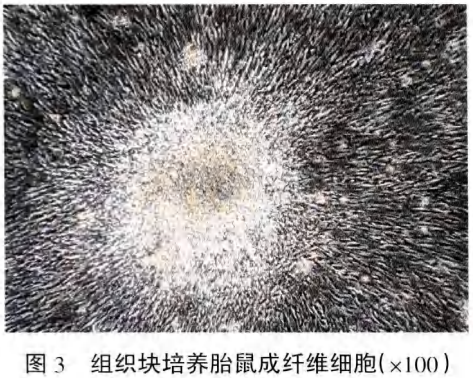


图 3 组织块培养胎鼠成纤维细胞(×100)

组织块重复培养，仍有大量细胞游出，细胞形态好，待连接成片后同样可传代培养。

2.2 MEF 体外生长

实验表明接种浓度不同细胞生长速度有差异。9 种浓度种植 96 孔板，过夜观察所有浓度种植的细胞均贴壁生长。其中 1×10^5 个 /ml 种植孔内细胞铺满整个孔，排列紧密，相互接触，呈短粗形；2.5×10^5 个 /ml、5×10^5 个 /ml 种植孔内细胞有重叠现象；$<1\times10^4$ 个 /ml 种植孔内细胞密度低，细胞大多伸展呈长梭形。生长曲线显示（图 4）96 孔板内 1×10^5~5×10^3 个 /ml 浓度范围内 MEF 3d 内均迅速增长，3d 后逐渐达到生长平台期增殖缓慢。$>1\times10^5$ 个 /ml 细胞密度过大，生长开始受到制约；$<1\times10^3$ 个 /ml 细胞密度过小，生长缓慢。所有浓度组 7d 内细胞数量无明显下降趋势。

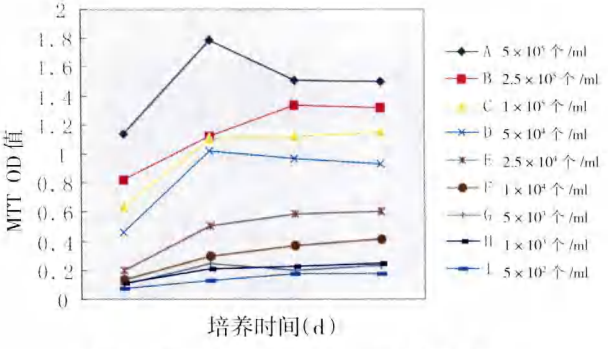


图 4 不同种植浓度下 MEF 的生长曲线

2.3 丝裂霉素 C 作用 MEF 浓度、时间筛选

实验表明不同浓度丝裂霉素 C 作用不同时间对 MEF 生长抑制效果不同。MEF 培养 1d、3d、5d、

表 1 不同浓度丝裂霉素 C 作用不同时间对 MEF 生长的影响(A 值，$\bar{x}\pm s$)

丝裂霉素 C 浓度(μg/ml)	作用时间(h)	培养时间			
		1d	3d	5d	7d
对照组		0.459 ± 0.018	1.014 ± 0.019	1.026 ± 0.013	0.960 ± 0.010
5	1.5	0.462 ± 0.021	0.878 ± 0.015	0.902 ± 0.023	0.895 ± 0.017
	2.5	0.507 ± 0.016	0.764 ± 0.020	0.768 ± 0.015	0.802 ± 0.021
	3.5	0.434 ± 0.019	0.682 ± 0.014	0.749 ± 0.026	0.756 ± 0.020
10	1.5	0.476 ± 0.015	0.769 ± 0.020	0.834 ± 0.014	0.842 ± 0.016
	2.5	0.472 ± 0.017	0.573 ± 0.018	0.646 ± 0.013	0.618 ± 0.020
	3.5	0.415 ± 0.012	0.486 ± 0.017	0.523 ± 0.015	0.514 ± 0.019*
20	1.5	0.508 ± 0.014	0.558 ± 0.018	0.663 ± 0.021	0.562 ± 0.017
	2.5	0.390 ± 0.010	0.424 ± 0.013	0.504 ± 0.016	0.457 ± 0.011*
	3.5	0.355 ± 0.011	0.325 ± 0.016	0.314 ± 0.014	0.412 ± 0.023

* 与对照组 1d 比较，$P>0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

7d，520nm 波长测 OD 值结果见表 1。由表 1 可知丝裂霉素 C 5μg/ml 作用 MEF 1.5h 即可产生一定的抑制作用，一定范围内随着作用浓度增加或时间延长抑制作用虽增强，但细胞仍有较明显的增殖，与对照组相比有显著性差异。丝裂霉素 C 10μg/ml 作用 MEF 3.5h 以及丝裂霉素 C 20μg/ml 作用 2.5h 对 MEF 抑制作用最好，与对照组 1d 相比无显著性差异，提示细胞既无明显增殖又无死亡。20μg/ml作用 MEF3.5h 细胞数量下降较对照组有显著性差异，提示细胞开始出现死亡。

2.4 小鼠胚胎干细胞在饲养层上的生长

小鼠囊胚（图 5）在饲养层上培养 2d 左右透明带先后脱落囊胚贴壁，滋养层细胞推开饲养层扩展生长，ICM 逐渐增大。由 ICM 离散得到的 ES 集落（图 6）呈典型的鸟巢状或鹅卵石状，集落有很强的立体感和边缘折光性。ES 细胞核大，核质比例高，细胞间结合紧密，边界不清。

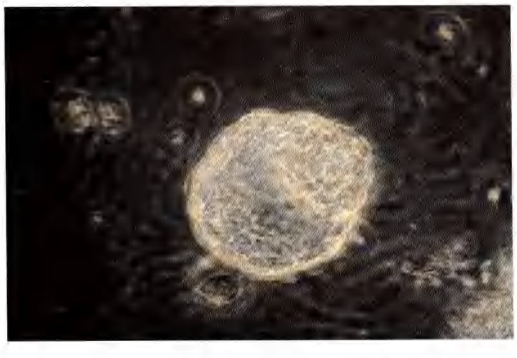


图 5 接种于饲养层上的小鼠囊胚（×200）

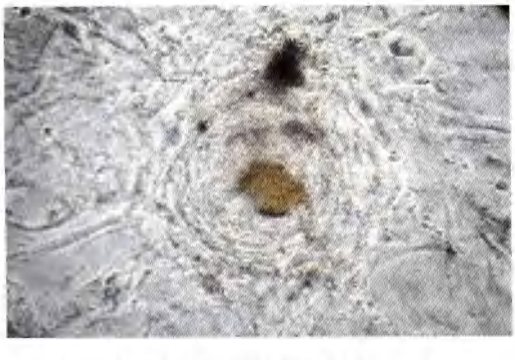


图 6 第 2 代小鼠胚胎干细胞集落（×400）

3 讨 论

由于胚胎干细胞能广泛地分化为各种组织并能参与包括生殖系嵌合体的形成，故胚胎干细胞广泛应用于克隆动物制作、转基因动物生产、动物医学模型建立、真核细胞基因表达与调控研究、细胞分化机制探索等科研领域，同时在临床各种器官的修复与移植领域也具有广阔的研究前景。饲养层对 ES 细胞分离克隆起着举足轻重的作用，其机制主要表现为促进细胞的增殖和抑制其分化。前者主要通过饲养层细胞分泌成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子等多种促有丝分裂因子发挥作用；后者主要通过饲养层分泌白血病抑制因子（LIF）等细胞分化抑制因子发挥作用。饲养层的质量是决定 ES 细胞有效克隆的重要因素之一，而饲养层的质量直接取决于细胞的活性、浓度、纯度以及丝裂霉素 C 处理后细胞增殖抑制的程度。

如何获得最大量、活性高、纯度大的成纤维细胞是原代胎鼠成纤维细胞饲养层制作需要解决的关键问题。目前原代胎鼠成纤维细胞饲养层制作的方法仍然是多采用单纯的组织消化法，包括 37℃热消化法和冷胰酶法。然而，重复实验表明，这些方法仍存在许多不足之处。37℃虽是胰蛋白酶的最适作用温度，但由于胚胎细胞十分娇嫩，对酶相当敏感，在此温度下消化组织块，细胞易受损伤，死细胞比例较大；冷胰酶法通常要求搅拌器等器械，操作时间较长。本实验采用组织消化和组织块培养相结合的方法，既能保证短时间得到一定量的活细胞，又能保证在以后的一段较长时间内相继获得活性高的原代成纤维细胞。经实践表明，经过组织消化后，剩余组织块内的细胞能很快从组织周边爬出，与组织消化法得到的细胞比较，细胞折光性立体感更强，胞内的颗粒更少，形态上表明细胞更新鲜。而且待细胞爬满瓶底后，可取出剩余的组织块再次进行组织块培养，这样能大大提高原代细胞培养获得的细胞数量，同时延长重新制作新鲜饲养层的周期，减轻胚胎干细胞培养的工作量。

实验中通过比较还发现 EDTA 与胰酶联用，能显著提高消化效率。因为 EDTA 是一种 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的螯合剂，能破坏细胞间桥，使细胞离散，但对细胞本身的毒性小，能弥补胰酶不能破坏细胞间基质中的胶原，对纤维性结缔组织无消化作用的缺陷。这样在组织消化时消化时间缩短，对细胞的破坏减少，消化效率显著提高。实验表明用含血清的培养液终止消化反应后，再洗涤 1 次细胞，完全可以消除 EDTA 对细胞贴壁的影响。

实验中生长曲线显示细胞密度与细胞的增殖老化有关系。胚胎干细胞在饲养层上的生长对饲养

维普资讯 http://www.cqvip.com

层细胞的密度要求较高。饲养层细胞密度过高,在与胚胎干细胞竞争养分的同时细胞本身易老化,易发生卷层现象,将胚胎干细胞包裹其中,无法分离。饲养层细胞密度过低,分泌分化抑制因子不足,胚胎干细胞易发生分化。由于种植的饲养层是经过丝裂霉素 C 处理后生长抑制的饲养层,所以饲养层的种植密度显得格外重要。实验证实 4 孔板或 24 孔板内 1×10^5~2×10^5 个 / 孔种植密度适中。

有关丝裂霉素 C 处理饲养层的研究报道较多,但结果差异较大[8,9],可能与丝裂霉素 C 的产地不同、各实验者操作具体方法不同有关。本实验为了建立可靠的胚胎干细胞培养平台,对实验所用丝裂霉素 C 的作用浓度、时间作了较为详细的筛选。实验表明丝裂霉素 C 抑制胎鼠成纤维细胞生长与作用浓度和时间均相关。浓度太小或时间太短对 MEF 抑制不够,浓度太大或时间太长会造成 MEF 死亡。一定范围内,低浓度丝裂霉素 C 延长作用时间与高浓度短时间作用效果相近。在我们的实验中丝裂霉素 C10μg/ml 作用 2.5~3.5h、20μg/ml 作用1.5~2.5h 抑制效果较好。结合胎鼠成纤维细胞对照组与丝裂霉素 C 处理组 1~7d 的生长曲线可看出实验制备的饲养层在 7d 内完全能维持在稳定水平,支持胚胎干细胞生长。

本实验探讨了饲养层制备的最适宜实验条件,成功分离克隆了从小鼠囊胚 ICM 来源的 ES 细胞,为本课题组成功搭建了胚胎干细胞实验操作平台。

参 考 文 献

[1] Evans M J,Kanfman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature,1981;292(5 819):154-156.

[2] Mataui Y,Zsebo K,Hogan BLM. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. Cell,1992;70(5):841-847.

[3] Thomson JA,Itskovitz-Eldor J,Shapiro SS,et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science,1998;282(5 391):1 145-1 147.

[4] Shamblott M J,Axelman J,Wang S,et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998;95(23):13 726-13 731.

[5] Piedrahita JA,Anderson GB,BonDurant RH. Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines[J]. Theriogenology,1990;34(5):865-877.

[6] 叶鑫生,许 田,汤锡芳,等.干细胞与发育生物学[M]. 北京:军事医学科学出版社,2000.185-190.

[7] 司徒镇强, 吴正军. 细胞培养 [M]. 西安: 兴界图书出版公司,2004.68-71.

[8] 熊吉信,刘小春,杨春江,等.小鼠胚胎干细胞饲养层的制备及两种不同饲养层的比较[J]. 江西医学院学报,2006;46(4):5-9.

[9] 时伟红,安志兴,董婉维.由体外受精囊胚获得 ICR 小鼠 ES 细胞[J]. 动物医学进展,2002;23(4):97-99.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 76 页)

验短[7],而在本研究中,由于接种的细胞浓度低,进行细胞培养的时间明显缩短,实验所花费的成本也得到明显降低,节约了科研成本。

当然,如能直接将胶质瘤组织移植到裸鼠颅内可能与基础及临床研究更为密切。但是,裸鼠颅内肿瘤不便于观察、测量,同时,也由于肿瘤组织生长迅速,较早产生颅内高压,使实验动物较早死亡。所以,裸鼠皮下移植瘤也不失为研究胶质瘤的生物学特性及其药物治疗等的重要实验模型,它可用于研究胶质瘤在体内的生物学行为,探讨肿瘤的发生机制以及胶质瘤的药物治疗、放射治疗,以及应用于基因治疗的相关研究。我们可以推断,利用裸鼠皮下肿瘤组织块移植法能够建立胶质瘤的动物模型,也可以利用相同的方法建立其他颅内肿瘤的实验动物模型,并能保证其肿瘤细胞的生物学特性不变,由此可以缩短肿瘤研究过程中用于建立动物模型的时间,降低建立动物模型的经济成本。

参 考 文 献

[1] Rygaard J,Povlsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice[J]. Acta Pathol Microbiol Scand,1969;77(4):758-760.

[2] 杜子威.人脑胶质瘤的研究[M]. 北京:原子能出版社,1992.1-10.

[3] 黄 强.脑肿瘤分子外科学[M]. 北京:中国科学技术出版社,1998.203-217.

[4] Peterson DL,Sheoilam PL,Brown WE. Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions[J]. J Neurosurg,1994;80(5):865-876.

[5] Tedeschi-Blok N,Lee M,SiSon JD, et al. Inverse association of antioxidant and phytoestrogen nutrient intake with adult glioma in the San Francisco Bay Area: a case-control study[J]. BMC Cancer,2006;6:148.

[6] Mhyre AJ,Shapiro RA,Dorsa DM. Estradiol reduces nonclassical transcription at cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response elements in glioma cells expressing estrogen receptor alpha. Endocrinology[J]. 2006;147(4):1 796-1 804.

[7] 牛朝诗,徐纪文,罗其中.裸鼠胶质瘤模型的建立及其病理[J]. 安徽医科大学学报,2000;35(2):98-100.

(责任编辑:冉明会)