DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.008
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
1346 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)15-1346-04

猕猴胚胎干细胞的分离培养和鉴定

马 岚,郑 萍,季维智 (中国科学院昆明动物研究所动物生殖生物学重点实验室,昆明 650223)

提 要:目的 从体外培养成熟囊胚中分离并鉴定猕猴胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES cell)。方法 猕猴卵母细胞经体外成熟培养、体外受精和早期胚胎体外成熟培养后,获得猕猴囊胚。当囊胚由透明带自然孵出后,用细玻璃针剥离囊胚中的内细胞团(inner cell mass, ICM)并与饲养细胞进行共培养。由ICM分离,培养并鉴定胚胎干细胞集落。结果 由4只FSH超排猕猴中共取得92个处于GV期的猕猴卵母细胞,选取其中的22个用HECM-10培养基培养后,获得6个高质量的囊胚,由此6个囊胚中分离得到3个内细胞团,并由此最终获得1株猕猴ES细胞,即RS5细胞。RS5细胞具高比例核/质比,核仁多,其细胞集落边缘平整,其内各单个细胞清晰。经约5个月的连续传代后,仍保持了正常二倍体的核型,其染色体数目为42条。碱性磷酸酶细胞组织化学染色为阳性,说明RS5细胞为未分化态的胚胎干细胞。经高密度和长时间培养后,RS5细胞可进一步分化为多种类型细胞。结论 RS5细胞株具有自我更新能力和多分化潜能,属于胚胎干细胞。

关键词:胚胎干细胞;内细胞团;囊胚;鼠胚成纤维细胞;猕猴
中图法分类号:R329.2;R446.5 文献标识码:A

Isolation, cultivation, and identification of embryonic stem cells of rhesus monkey

MA Lan, ZHENG Ping, JI Wei-zhi (Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100871, China)

Abstract: Objective To isolate and identify embryonic stem (ES) cells of rhesus monkey from mature blastocysts cultured *in vitro*. Methods Rhesus monkey blastocysts were obtained after *in vitro* maturation of oocytes, fertilization and maturation of early embryos. After the blastocysts were hatched naturally from the zone pellucida, the inner cell mass (ICM) was dislodged from blastocysts using the sealed end of a finely drawn Pasteur pipette and co-cultured with the feeder cells. The ICM, resembling embryonic stem cell colony, was isolated, cultured, and identified. Results A total of 92 normal GV oocytes were obtained from 4 FSH-prime rhesus monkeys. Six blastocysts with high quality were selected from 22 oocytes after culture in HECM-10 medium. One of the rhesus monkey ES cell lines, i.e. RS5 cell line, was finally isolated from 3 of the inner cell mass isolated from the 6 blastocysts. The RS5 cells presented a high nucleus/cytoplasm ratio, prominent nucleoli, and flatter colonies with individual and distinct cells. After successive passages for 5 months passage, the RS5 cells remained a normal karyotype, i.e. 42 of chromosomes and alkaline phosphatase (AP) positive, which meant the RS5 ES cell colony remained undifferentiated. After high density culture for a longer time, the ES cell could differentiate into multi-types of cells. Conclusion The RS5 cell line has the ability to self-renew and potential to differentiate. Thus, RS5 cell line belongs to embryonic stem cells.

Key words: embryonic stem cell; inner cell mass; blastocyst; primary mouse embryonic fibroblasts; rhesus monkey

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES cell)是由囊胚中的内细胞团(inner cell mass, ICM)而来的、具多潜能的、可以发育成为多种细胞的,同时又可以保持不分化状态持续生长的一类干细胞体系。自1981年Evans等[1]和Martin[2]报道由小鼠中分离得到鼠的胚胎干细胞以来,至今已分离得到多种物种的胚胎干细胞包括猕猴[3]、绒猴[4]及人[5,6]的等。胚胎干细胞主要用于嵌合体、转基因及克隆动物等方面的研究[7]。目前,随着如猕猴及人等的胚胎干细胞的分离及继代培养成功,使得胚胎干细胞有了更广泛的应用前景,如可以用于器官移植,药物筛选模型及发育和生殖生物学基础研究等方面[8~10]。

目前由小鼠中分离培养,建成ES细胞系的技术已

基金项目:国家自然科学基金预攀登项目(980174)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (980174)
作者简介:马 岚(1965-),女,云南省昆明市人,副教授,主要从事免疫学及发育生物学方面的研究,现在云南大学生命科学学院单克隆抗体工程技术中心,昆明 650091。电话:(0871)5033160
通信作者:季维智,电话:(0871)5139413;E-mail:wji@mail.kiz.ac.cn
收稿日期:2003-04-04;修回日期:2003-10-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

较为成熟, 但从其它物种, 尤其是人类和灵长类动物建立 ES 细胞系则普遍存在着建系率低的问题, 究其原因, 与囊胚的质量好坏、收集方法, 分离 ICM 的方法与时机, 培养条件等诸多因素有关。以往分离 ES 细胞多采用直接由动物体内获取囊胚再分离 ICM 的方法[3,4], 这一方法成本较高, 所得囊胚的 ICM 的质量无法确定, 导致分离 ES 细胞的效率不高; 并且, 对于人类及濒危动物而言, 直接由体内获得囊胚也是不可能的。本研究通过体外培养及自然孵化去透明带的方法来获得高质量的囊胚, 并就 ICM 的分离方法及 ES 细胞的培养条件等要素进行研究。期望能藉此摸索出一些 ES 细胞建系的经验和方法, 为建立动物包括人的 ES 细胞系提供参考。

1　材料与方法

1.1　猕猴囊胚的获得

成年猕猴经滤泡刺激素(follicular stimuating hormone, FSH), (Neo-Fertinorm, serono, France)超排后, 至滤泡体积≥3 mm 时经手术取卵。选取形态正常的、具有致密核膜和至少两层以上颗粒细胞所包裹的卵母细胞, 于加有 20% 新生牛血清(BCS)、5 μg/ml oFSH (ovine FSH, USDA-oFSH-18)、10 ng/ml oLH (ovine LH, NIANDD)的 HECM-10 培养液中, 并于37 ℃、5%CO_2 中进行 36~40 h 的体外成熟培养(*in vitro* maturation, IVM)后, 与事先准备好的已获能的精子进行体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)。在 IVF 12~16 h 后, 进行镜检, 选取具有双原核的受精卵进一步培养。至 8 细胞期时移入含 20% BCS 的 CMRL-1066 培养基, 于 37 ℃、5% CO_2, 5% O_2 和平衡 N_2 中持续培养 10.7 d 至获得囊胚为止。

1.2　鼠胚成纤维细胞的制备及培养

选用怀孕后 13~14 d 的纯系 BALB/c 小白鼠来制备鼠胚饲养细胞(primary mouse embryonic fibroblasts, PMEFs)。所取得的 PMEFs 经10%NCS-DMEM 培养体系可持续培养、传代及冻存。

1.3　猕猴胚胎干细胞的分离及培养

选取上述制取的发育成熟的囊胚, 并待其从透明带自然孵出后, 将无透明带的囊胚移入经 γ-射线辐照处理的 BALB/c 鼠的 PMEFs 中并用 ES 细胞培养液(20% FCS、1% 非必需氨基酸、1 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L 2-巯基乙醇的 DMEM)进行培养, 3~5 d 待其贴壁后, 用玻璃针将其中的 ICM 从 PMEFs 剥离并移入新的 PMEFs 中进行培养, 2 周后至有多个集落长出后, 选择形态与 ES 类似的集落, 用玻璃针挑取中间的细胞团并用胰酶消化成若干小细胞团后再移入新的 PMEFs 进行持续培养, 连续培养几代并冻存后, 再用单克隆法筛选、扩大并鉴定建株 ES 的特性。

1.4　猕猴胚胎干细胞核型的鉴定

于生长状况良好的猕猴 ES 细胞中加入 1 μl/ml 秋水仙碱(10 μg/ml), 于 37 ℃培养箱培养 3 h 后, 用胰酶消化。之后用 2 ml 0.075 mol/L KCl 和 8% 柠檬酸钠(3∶1)溶液于室温下低渗 15 min, 并于 1 ml 甲醇-醋酸(3∶1)中固定, 之后再进行相应的染色和滴片封片。

1.5　猕猴胚胎干细胞未分化特性-碱性磷酸酶活性的鉴定

将生长于载玻片上的猕猴 ES 细胞用乙醇固定后, 选用 "Vector red" (Vector Laboratories)进行组织化学染色。

1.6　猕猴胚胎干细胞多能性分化的初步分析

将猕猴 ES 于 PMEFs 上生长至对数期后, 不进行传代, 而是再让其以高密度持续生长约 4 周左右, 之后来观察细胞的生长分化情况。

1.7　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 统计软件, 行方差分析。

2　结果

2.1　猕猴囊胚的获得

由 4 只超排的成年雌性猕猴中共取得 92 个处于 GV 期的猕猴卵母细胞(图 1), 分为 4 组, 分别用 CMRL-1066、CMRL-1066+20% BCS、HECM-10、HECM-10+20% BCS 4 种培养体系经体外成熟培养后, 得到处于 MII 期(具有第一极体)的卵母细胞; 体外受精后, 选取具有双原核的受精卵进一步培养, 至 8 细胞期时, 4 组均换为用 CMRL-1066+20% BCS 培养体系进行培养, 至获得囊胚为止。其结果总结见表 1。由 4 种培养体系所得的 MII 期的卵母细胞、受精卵、桑椹胚均无显著性差异($P>0.05$), 这说明高质量的卵母细胞在化学成分特定的培养基及无血清培养基中培养时, 是有可能进一步发育成为高比率的桑椹胚甚至囊胚的。并且, 与对照组(CMRL-1066+20% BCS)相比, HECM-10+20%BCS 培养体系所获得的囊胚率是最高的, 光镜观察结果也表明这些囊胚的形态及其生长状况也很好(图 2)。

表 1　4 种培养体系对卵母细胞体外成熟、受精卵形成及体外发育能力的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　*In vitro* maturation, fertilization, and embryo development of oocytes cultured in four media (%, $\bar{x}\pm s$)

Treatment	No.	MII	Fertilized	Developmental stage			
				>2 cells	>8 cells	>morula	Blastocyst
CMRL-1066+20%BCS	23	82.1±5.37	79.0±12.39	70.1±13.41	55.3±12.37	55.3±12.37	11.4±5.94
CMRL-1066	24	70.1±11.24	89.2±5.83	76.7±14.5	68.3±9.28	55.8±12.61	19.2±3.63
HECM-10+20%BCS	22	69.1±10.37	91.7±8.3	91.7±8.3	76.7±14.53	76.7±14.53	30.0±15.27
HECM-10	23	60.7±7.44	86.1±7.35	86.1±7.35	75.0±14.43	58.3±12.74	16.7±9.61

2.2　猕猴胚胎干细胞的分离和持续培养

由 4 只超排的成年猕猴中共取得 92 个处于 GV 期的猕猴卵母细胞, 选取其中的 22 个用 HECM-10 培养体系培养后, 获得了 6 个高质量的猕猴囊胚, 将这些囊胚移入铺有经 γ-射线处理过的 PMEFs 的 6 孔板中, 并选用 ES 培养液进行培养, 使囊胚自然孵化(图 3)去除透明带, 保证了囊胚的质量。得到去透明带的囊胚后, 立即分别将其移入铺有经 γ-射线处理过的 PMEFs 的 6 孔板中, 依次编号为 RS1、RS2、RS3、RS4、RS5 和 RS6, 并选用 ES

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

培养液进行培养,以使这些囊胚贴附于其上生长,约5 d后,可见到囊胚在PMEFs上延展开来,其外的为滋养外胚层细胞,其内的则为内细胞团即ICMs。将这些ICMs挑至新的PMEFs中进行生长,约2周后,由此6个ICMs生长起来的细胞集落中,RS3、RS4和RS6已发生分化,RS1、RS2和RS5则为形态较大的、类似于ES细胞的集落(图4)。将RS1、RS2和RS5细胞集落分别用胰酶消化后再移入新的PMEFs中继续培养。在培养至2个月时,RS2发生分化,培养至3.5个月时,RS1被细菌污染,最终,在培养至5个月时,只有RS5细胞集落始终保持了与ES细胞类似的形态特征及生长特性。

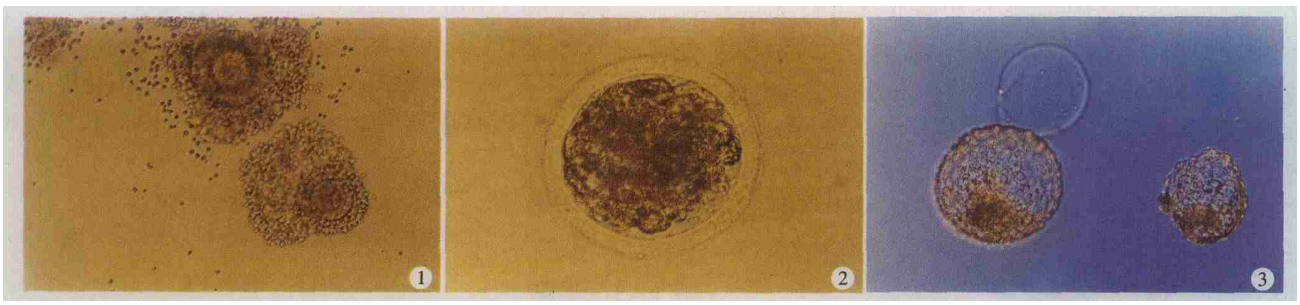


图1 形态正常的、处于GV期并带有多层颗粒细胞的卵母细胞 (倒置显微镜×100)

Fig 1 GV oocytes which appeared normal and were enclosed by at least two layers of tightly condensed cumulus cells (Inverted microscope× 100)

图2 发育至囊胚期但还未脱去透明带的囊胚 (倒置显微镜×200)

Fig 2 *In vitro* maturation of embryos blastocyst with the zona pellucida (Inverted microscope× 200)

图3 刚刚孵出的、脱了透明带的囊胚 (倒置显微镜×100)

Fig 3 *In vitro* maturation of embryos hatched blastocyst (Inverted microscope× 100)

2.2.1 RS5细胞的形态特征观察 经倒置显微镜观察,RS5经过约5个月的连续传代后,由其形成的细胞集落均有较光滑的边缘,其内的细胞小,排列致密,细胞边界不易分清,单个细胞均有显著的细胞核,其内常有数个核仁(图5)。从这些特点来看,我们所获得的RS5细胞是具有类似于ES细胞的形态特征的。

2.2.2 RS5细胞的生长特征观察 经约5个月的连续传代,RS5细胞能保持旺盛的生长能力连续传代培养。若以1∶3的比例传代,约3~4 d可至对数生长期;若以1∶6的比例传代,则约1周后可至对数生长期(图6)。

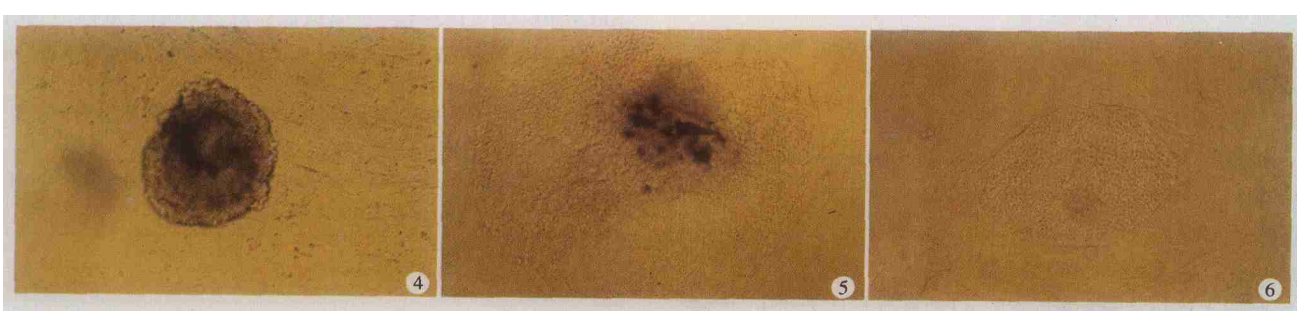


图4 内细胞团-ES类似细胞集落 (倒置显微镜×100)

Fig 4 The ICM which resembled ES colony (Inverted microscope× 100)

图5 RS5细胞集落特征 (倒置显微镜×100)

Fig 5 The morphology of RS5 ES colony (Inverted microscope× 100)

图6 培养1周后的RS5细胞集落 (倒置显微镜×100)

Fig 6 The RS5 ES colony after 1 week of culture (Inverted microscope× 100)

2.3 RS5细胞核型的鉴定

取经5个月连续传代后的RS5细胞做相应的核型分析,结果表明其核型为正常二倍体,其染色体数目与正常猕猴的一样,均为42条。

2.4 胚胎干细胞未分化特性-碱性磷酸酶活性的鉴定

取经5个月连续传代后的RS5细胞做相应的碱性磷酸酶组织化学染色,结果表明为阳性。

2.5 RS5细胞多能性分化的初步分析

将RS5细胞于PMEFs上生长至对数期后,再让其以高密度持续生长,2周时可见大的细胞集落,其中的细胞大量堆积;2~3周时可见集落边缘有上皮样的分化细胞出现,中间密集的细胞则逐渐向形成胚样体的方向发展。将胚样体进一步培养后,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

可观察到在细胞的分化过程中, 神经细胞是最易得到的细胞, 此外上皮样及成纤维样细胞也是较为多见的分化细胞。这说明 RS5 细胞具多潜能性, 可分化成多种类型的细胞。在将 RS5 细胞制成细胞悬液注射入 SCID 小鼠皮下, 以分析该 RS5 细胞能否形成组织瘤, 进而形成内、中和外胚层的实验中, 两次均由于注射细胞后小鼠死亡而造成实验无法进行下去。其原因在于现有实验条件无法满足 SCID 小鼠无菌养殖之需要, 故还有待于进一步作 SCID 成瘤实验。

3　讨论

饲养层是建立和维持 ES 细胞系的必要条件。对非人灵长类动物和人的 ES 细胞而言, 迄今为止的研究均表明小鼠原代成纤维细胞(PMEFs)对维持这些 ES 细胞的持续生长及保持未分化态均是必要的。在本实验中, 考虑到 BALB/c 小鼠为纯系小鼠, 由其获得的 PMEFs 可保证我们拟建立的猕猴胚胎干细胞 RS366.4 培养体系的稳定性。据此, 选用 BALB/c 小鼠来获得 PMEFs。由于 BALB/c 小鼠为纯系鼠, 不象昆明小鼠容易配上, 因此在交配 BALB/c 小鼠时, 发现选取 6 周龄以上, 未生育过的健康雌鼠与已交配过 1 次的健康雄鼠, 雌∶雄按 3∶1 合笼最好。

PMEFs 可支持 ES 细胞的生长繁殖, 同时还起着抑制 ES 细胞分化的重要作用。对小鼠 ES 细胞的研究表明其它因素如白血病抑制因子(LIF)也可起到抑制小鼠 ES 体外分化的作用[11~12], 但由 Thomson[3] 的研究则表明单独的 LIF 对猕猴 ES 细胞并无分化抑制作用。因而在体外大量培养猕猴 ES 细胞时, 选用生长状况良好的 PMEFs 细胞来支持猕猴 ES 细胞的大量繁殖同时又抑制其发生体外分化是获得猕猴 ES 细胞系的关键。用于 ES 细胞培养的 PMEFs 须保持持续存活但又不增殖的特性, 通常的方法可用丝裂霉素 C 或是 γ-射线辐照来进行处理。我们曾对 PMEFs 中加入不同剂量的丝裂霉素 C 并经不同时间处理后再接种猕猴 ES 进行培养作过系列比较研究, 结果显示经丝裂霉素 C 处理后的 PMEFs 均或多或少地对猕猴 ES 细胞的生长有一定的毒性影响, 尤其是对刚刚复苏的猕猴 ES 细胞有影响: 即这些猕猴 ES 细胞根本无法存活。如此也就更不利于从 ICM 中分离新的 ES 细胞系了。我们的研究结果表明选用 3 500 rad 的 γ-射线对 PMEFs 进行 13 min 的辐照处理后, 其对猕猴 ES 细胞的支持效果最好, 经辐照处理过的 PMEFs 细胞还可保存于液氮中, 这样可节省工作量。

建立稳定的胚胎干细胞系涉及到囊胚的质量、培养基成分、培养条件及分离培养操作技术等要素。本实验通过已建立的猕猴卵母细胞体外成熟培养、体外受精和早期胚胎体外培养体系, 可挑选出质量较高的囊胚, 并且可在体外较好的培养体系下使体外培养囊胚能自行脱去其外的透明带, 从而避免了用链霉蛋白酶(Pronase)消化透明带可能带来的对其内细胞团(ICMs)的损害, 保证了体外发育能力高的 ICMs 的获得。在分离 ICMs 与其外的滋养外胚层的过程中, 由于受到没有抗猕猴抗体的限制, 只能采用机械法分离 ICMs, 而用机械法往往不容易彻底去除滋养外胚层, 其结果使得混杂了滋养外胚层的 RS2 发生后续分化而无法建株, 看来用免疫手术法分离 ICMs 更为可取。另外, 先于 RS2 的 RS3、RS4、RS6 的分化, 除了有机械法分离污染滋养外胚层的原因外, 可能也与分离 ICMs 的时间偏晚有关。因此, 准确把握分离 ICMs 与滋养外胚层的确切时间也是很重要的。

参考文献:

[1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5819): 154—156.

[2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(12): 7634—7638.

[3] Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, *et al*. Isolation of a primate embryonic stem cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(17): 7844—7848.

[4] Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, *et al*. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (Callithrix jacchus) blastocysts[J]. Biol Reprod, 1996, 55(2): 254—259.

[5] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145—1147.

[6] 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): 13726—13731.

[7] Prelle K, Vassiliev I M, Vassilieva S G, *et al*. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species-present status and future prospects[J]. Cells Tissues Organs, 1999, 165(3-4): 220—236.

[8] Rathjen P D, Lake J, Whyatt L M, *et al*. Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy[J]. Reprod Fertil Dev, 1998, 10(1): 31—47.

[9] Heberle-Bors E. Isolation and uses of human stem cells[J]. Gynakol Geburtshilfliche Rundsch, 1999, 39(4): 213—216.

[10] Thomson J A, Odorico J S. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines[J]. Trends Biotechnol, 2000, 18(2): 53—57.

[11] Williams R L, Hilton D J, Pease S, *et al*. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells[J]. Nature, 1988, 336(6200): 684—687.

[12] Zandstra P W, Le H V, Daley G Q, *et al*. Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation[J]. Biotechnol Bioeng, 2000, 69(6): 607—617.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net