DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.032
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1071-03

论著

昆明种系小鼠胚胎干细胞的分离培养及特性鉴定

秦茂林,蔡文琴,姚忠祥 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 提高昆明小鼠胚胎干细胞(ES细胞)建株的成功率。方法 收集小鼠3.5 d的囊胚培养,用小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层,形成的ES细胞样集落,经两次亚克隆分离培养ES细胞;进行相差显微镜观察、碱性磷酸酶染色和体内外分化能力鉴定。结果 获得两个稳定ES细胞集落,传至第11代。ES细胞呈集落样生长,碱性磷酸酶染色强阳性,体外分化的细胞沿拟胚体外向性生长,形态多样,在体分化可形成来源于3个胚层的组织。结论 两次亚克隆法获得的细胞具有ES细胞主要的生物学性状,有助于提高昆明小鼠ES细胞建株的能力。

关键词:小鼠;胚胎干细胞;ES细胞系
中图法分类号:R-332;R329.2 文献标识码:A

Isolation, culture and identification of murine embryonic stem cells of Kunming species

QIN Mao-lin, CAI Wen-qin, YAO Zhong-xiang (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To increase the efficiency of establishment of embryonic stem (ES) cell lines from Kunming species mouse. Methods The blastocysts of 3.5 d from Kunming species mouse were collected, cultured on the fibroblast cell feeder layers. The ES cell-like colonies were sub-clonal cultured twice and cells were observed by phase contrast microscope and identified by AKP staining. The ability of differentiation were examined both *in vivo* and *in vitro*. Results Two stable ESC clones were obtained and were passaged to 11th generation. ES cells were colony-like, AKP positive. The differentiation of ES cells are outgrowth from embryonic bodies *in vitro*, while three embryonic derms were formed from ES cells *in vivo*. Conclusion The cells obtained through twice sub-clonal cultures still maintain the main characteristics of ES cell and are helpful to improve the capacity of establishment of ES cell lines.

Key words: mouse; embryonic stem cells

1981年Martin等[1]首次分离培养了小鼠的胚胎干细胞(Embyonic stem cells, ES cells),至今已经建立了数百个小鼠的ES细胞系。这些细胞系大多数来源于129、C57BL/6J和BALB/C品系的小鼠,而昆明株小鼠的ES细胞建系的成功率很低[2]。本实验采用小鼠3.5 d的囊胚,饲养层共培养分离昆明株小鼠ES细胞,并通过核型检测,组织化学染色和相差显微镜对其生物学性状进行观察,从中探讨昆明株小鼠胚胎干细的一些特性,为建立该品系小鼠的ES细胞株打下一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

发情期昆明株小鼠雌性18只,雄性6只,购自第三军医大学实验动物中心;3∶1同笼交配,阴栓检出日记为受孕1 d。

1.2 饲养层细胞的制备

孕13~16 d的小鼠胚胎,去头,胸腹腔脏器及四肢后,胰酶消化,机械吹打后种植于25 cm^2玻璃培养瓶中,加入含10%小牛血清(天津TDB生物公司),2×10^{-4} mol/l的谷氨酰胺,50 U/ml青霉素,1×非必需氨基酸(Gibco公司)的DMEM培养基(Gibco公司)。于37 ℃,5%CO_2培养箱中培养24 h,更换培养基后培养72~96 h至细胞融合,常规传代。将融合的鼠胚成纤维细胞加入含10 μg/ml丝裂霉素-C的上述培养基中培养2~3 h后,常规胰酶消化,单细胞悬液按密度1×10^6/ml种植于24孔板或是6 cm塑料培养皿中,细胞贴壁伸展后(约2 h),饲养层细胞制备完毕。

1.3 小鼠ES细胞集落的获得

剪开孕3.5~4 d的小鼠子宫,注射器从一侧注入冲胚液(含1%小牛血清的PBS)冲洗子宫壁,用凹皿收集囊胚后移至饲种植了饲养层细胞的培养皿中。含20%胎牛血清的DMEM培养基中培养5 d,内细胞群(Inner cell mass, ICM)呈明显的柱状,毛细针挑出ICM,胰酶消化、离散,接种于24孔培养皿中。3~5 d后挑取单个ES细胞样集落,离散集落后,再重复上述过程2次,观察这些集落能否稳定传代。与饲养层细胞制备不同的是在培养基中补加1×10^3 U/ml的白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor; LIF, Gibco公司),15%的混合血清(10%的小牛血清和5%的胎牛血清,后者购自Gibco公司)和0.1 mmol/L的β巯基乙醇。

1.4 核型的鉴定

传代后24~40 h的ES细胞用秋水仙素(终浓度为0.2 μg/ml)处理1 h左右,消化成单细胞悬液,滴片在空气中干燥后,Giemsa染色。

1.5 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)组织化学染色

方法参见文献[3]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000172);第三军医大学科研基金资助项目
作者简介:秦茂林(1970-),男,河南省洛阳市人,硕士研究生,助教,主要从事胚胎干细胞方面的研究。电话:(023)68752229
收稿日期:2001-04-11;修回日期:2001-06-07

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

1.6 体内外分化能力的检测

1.6.1 体外分化 胰酶消化 ES 细胞集落，吹打成小的细胞团(3~4 个细胞)，无饲养层且不含 LIF 的培养基中悬浮培养 2~4 d，观察分化细胞的形态。

1.6.2 体内分化 将约 1×10^7 个 ES 细胞注入常规剂量地塞米松[4]抑制免疫的雄性昆明白鼠的腹股沟皮下，4 周后处死小鼠，取出肿瘤，常规石蜡切片，HE 染色鉴定。

2 结果

2.1 分离培养过程

共培养了 65 个昆明小鼠的囊胚，42 个囊胚(64.4%)的 ICM 增殖到能够离散的程度，见图 1。ICM 离散后有 10 例出现了类 ES 细胞样集落(23.9%)。这 10 例经过两次亚克隆纯化后，获得能够稳定传代的 ES 细胞集落两个，成功分离比例为 3.1%，见表 1。这两个细胞集落至今传代到第 11 代。将之分别命名为 KMMES1 和 KMMES2。

表 1 两次亚克隆法分离 ES 集落

Tab 1 Isolation ES clones with twice sub-clonal culture

	Sequence of clone									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amount of first sub-clonal culture	4	6	4	3	2	1	0	0	3	7
Amount of second sub-clonal culture	3	2	2	0	1	0	0	0	0	2
Stable ES cell clones	0	0	KMMES1	0	0	0	0	0	0	KMMES2

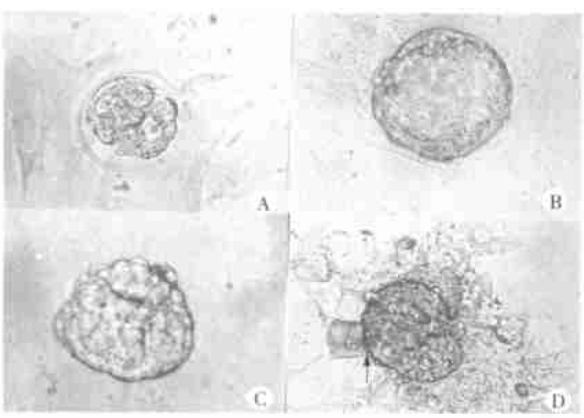


图 1 从囊胚到 ICM 柱状生长的过程 (相差显微镜× 100)

A：孕 3.5 d 小鼠囊胚，未贴壁；B：贴壁后 1 天的囊胚；C：贴壁后 3 d 的囊胚；D：贴壁后 5 d，明显的 ICM 柱状生长(↑)

Fig 1 Development process from blastocyst to ICM, columnar in shape (Phase contrast microscope× 100)

A: 3.5 d blastocyst, suspended; B: 1 d after attachment; C: 3 d after attachment; D: 5 d after attachment, prominent ICM column could be seen(↑)

2.2 生长状况

这两个 ES 细胞集落形态类似，都具有 ES 细胞的形态学特征[5]：细胞体积较小，细胞核大，成集落生长，且相差显微镜下折光性强，见图 2。但这两个 ES 细胞集落的生长速度有所不同，KMMES1 以 1∶2 每隔 3 d 传代 1 次，KMMES2 以 1∶2 每隔 4 d 传代 1 次。

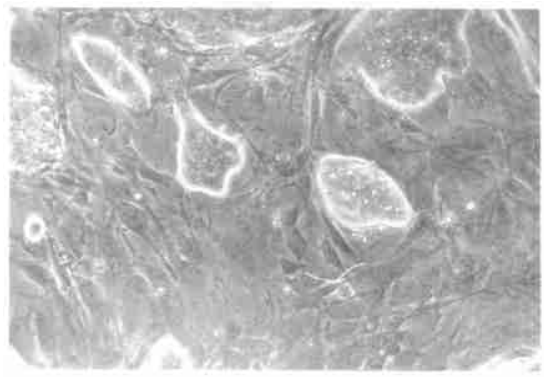


图 2 培养的 KMMES1 细胞集落 (相差显微镜× 100)

Fig 2 ES cell clones of KMMES1 mouse (Phase contrast microscope× 100)

2.3 核型分析

两个能够正常传代的 ES 细胞集落染色体均为 XX 型。每个样品计数 50 个油镜视野，统计正常核型的比例(以计数到 40 条染色体为正常)。KMMES1 正常的二倍体细胞数为 75% 以上，KMMES2 中正常二倍体细胞占总数的 50% 左右。其余未稳定传代的 ES 细胞集落，也做了核型鉴定，其核型多不正常，染色体众数为 39 或 41，或为 4 倍体细胞。

2.4 AKP 组织化学染色

观察发现 ES 细胞集落内存在高浓度的 AKP，由于 ES 细胞的核相对较大则胞浆染色成环状；而饲养层的鼠胚成纤维细胞不着色或着色很浅，见图 3。



图 3 ES 细胞的 AKP 染色 (× 200)

Fig 3 AKP staining of ES cells (× 200)

2.5 体内外分化能力的鉴定

体外悬浮培养时，这两个 ES 细胞集落均能够形成简单拟胚体(Embryonic bodies, EBs)或是囊状拟胚体，形成拟胚体的时间相近。再贴壁培养后，发现 EBs 外向性生长，周围分化的细胞形态成多样性。

经过体内注射形成的畸胎瘤，切片染色观察，发现肿瘤中都包含了来自 3 个胚层分化的衍生物。观察到 KMMES1 细胞形成的畸胎瘤含有丰富的内胚层来源的组织，KMMES2 细胞形成的畸胎瘤组织中胚层来源的组织丰富，畸胎瘤组织中存在腺体、结缔组织、上皮组织，脂肪组织等，见图 4。

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

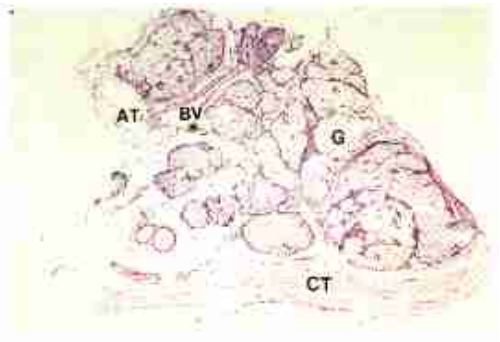


图 4　显示 ES 细胞在体分化形成的畸胎瘤组织　G(腺体), CT(结缔组织), AT(脂肪组织), BV(血管)　(HE×100)

Fig 4　Teratoma tissue differentiated from ES cell *in vivo*

G(gland), CT(connective tissue), AT(adipose tissue), BV(blood vessel) (HE×100)

3　讨论

3.1　ES 细胞分离培养条件的探讨

ES 细胞易受外界因素的影响, 对生长条件要求非常苛刻, 如必须使用原代的鼠胚成纤维细胞做饲养层或是在 DMEM 培养基内添加 LIF 而不加任何抗生素[6]。本实验分离 ES 细胞依据国内现有的条件, 在培养基内加入混合血清, 并在培养基内加入一定含量的抗生素; 我们还发现传 7 代以内的鼠胚成纤维细胞具有同样让囊胚贴壁和 ES 集落生长的能力, 在这样的实验条件下也能分离培养昆明小鼠的 ES 细胞。分离的两个 ES 细胞集落都具有典型的 ES 细胞形态、AKP 反应强阳性和全能性, 然而生长速度、体外分化组织的类型有一定差别, 提示 ES 细胞对遗传和变异的选择接受不同。

3.2　亚克隆纯化 ES 细胞集落的意义

来源于囊胚分离的 ES 细胞集落, 生长状态及生物学特性稳定, 适于 ES 细胞株的建立。然而在分离囊胚的过程中有时会存在 ICM 以外的胚胎滋养层细胞形成的集落。这些集落形态上和 ES 细胞有一定的差别, 随着 ES 细胞的传代, 这些细胞随之增殖, 使分离得来的 ES 细胞不纯[7]。本实验共进行了两次 ES 细胞样集落的亚克隆, 使得 ES 细胞样集落纯化为生物学及形态学性状均一的 ES 细胞集落。徐军等[2]虽然报道分离了昆明小鼠的 ES 细胞, 然而只传了 5 代; 本实验所分离的 ES 细胞至今已经传至第 11 代, 能够维持细胞的生物学活性和特征形态, 成功获得 ES 细胞集落的比例较前者略高。分离过程中采用 2 次亚克隆法筛选纯化 ES 细胞集落, 使得昆明小鼠的 ES 集落获得稳定的传代能力, 表明在分离纯化 ES 细胞的过程中, 适当地进行 ES 集落亚克隆是必要的。

3.3　成功建立昆明小鼠 ES 细胞系的途径

在已经建立了数百个小鼠的 ES 细胞系中, 大多数来源于 129、C57BL/6J 和 BALB/c 品系的小鼠, 昆明小鼠 ES 细胞建株的报道很少。某些种属的 ES 细胞分离难度很大, 昆明小鼠 ES 细胞分离培养中遇到的困难是不能够稳定地传代和成功获得 ES 细胞集落的比例比较低, 这可能由其种属特异性所决定。另外也可能与实验条件的控制存在一定的相关性, 比如分离 ICM 的时机, 以 ICM 柱状生长时离散最为恰当。早期分离则形成 ES 细胞数目太少, 而稍后分离可能使细胞的全能性受到影响[8]。ES 细胞核型的稳定程度对用 ES 细胞是否具有低的肿瘤发生率, 是否具有较高的种系嵌合能力及成功进行转基因动物的建立有密切的关系[9]。本实验中虽然成功分离了昆明小鼠的 ES 细胞集落, 然而获得的 ES 细胞的正常核型比例不高, 不利于转基因动物的建立。这些证据提示昆明小鼠 ES 细胞稳定地进行种系嵌合可能存在相当程度的困难, 其嵌合能力的高低还有待于进一步的实验验证。

昆明小鼠是我国应用最多的实验小鼠, 建立昆明小鼠的 ES 细胞系有利于其转基因动物的获得, 能够为我国的科研工作更好地服务。本实验对昆明小鼠的 ES 细胞建系工作做了初步探索, 为 ES 细胞多种属广泛建系的研究打下一定的基础。

参考文献:

[1] 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): 7 634－7 638.

[2] 徐　军, 杨春荣, 高志敏, 等. 小鼠胚胎干细胞的分离与克隆[A]. 见: 叶鑫生, 许　田, 汤锡芳, 等 主编. 干细胞和发育生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 185－190.

[3] 陈德英, 王海燕, 刘建军. 利用内源性碱性磷酸酶显示胆小管[J]. 解剖科学进展, 1998, 204(3): 256.

[4] 曲莉芝, 顾为望, 李晋红, 等. 免疫抑制诱发大鼠结肠小袋纤毛虫病的研究[J]. 上海实验动物科学, 1999, 19(1): 41－42.

[5] 胡新立, 尚克刚. 6 个小鼠 ES 细胞系的建立和鉴定[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1996, 32(2): 248－253.

[6] Nichols J, Evans E P, Smith A G. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity[J]. Development. 1990, 110(4): 1 341－1 348.

[7] Pease S, Braghetta P, Gearing D, *et al*. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)[J]. Dev Biol, 1990, 141(2): 344－352.

[8] Sukoyan M A, Golubitsa A N, Zhelezova A I, *et al*. Isolation and cultivation of blastocyst-derived stem cell lines from American mink (Mustela vison)[J]. Mol Reprod Dev, 1992, 33(4): 418－431.

[9] Bernstein A, Breitman M. Genetic ablation in transgenic mice[J]. Mol Biol Med, 1989, 6(6): 523－530.

（编辑　潘式文）

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