

高效建立 129/ter、C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞系的方法学探讨

孟国良* 汤富酬 尚克刚 薛友纺

(北京大学生命科学院遗传教研室 北京 100871)

关键词 129/ter 小鼠, C57BL/6J 小鼠, 大鼠心脏细胞条件培养(RH-CM), 胚胎干细胞(ES 细胞), 二倍体核型, 未分化状态

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0740-04

小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)是从小鼠囊胚内细胞团(ICM)分离出来的、在体外培养过程中可维持未分化状态、正常二倍体核型及无限增殖能力,具有多能性或全能性的细胞系^[1-3]。ES 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的研究、细胞分化机制的探索、人及哺乳动物基因功能的研究以及细胞、组织和器官的修复与移植研究。胚胎干细胞的研究和应用已成为生命科学研究的热点和前沿领域之一^[4-8]。

自第一株 129 小鼠 ES 细胞系建立以来,人们在生物学和医学等多个领域进行了广泛深入的研究,取得了引人注目的成就^[9-11]。然而由于其高频自发畸胎瘤特性及其 ES 细胞容易癌化等特点,限制了 129 小鼠 ES 细胞在免疫学和组织移植研究中的应用。C57BL/6J 小鼠具有致癌性不敏感和对鼠痘病毒有良好抗性等优点,在医学、生物学研究中应用十分广泛,该品系小鼠 ES 细胞系的获得,将使其优良的遗传背景在相关科学研究中得到广泛应用。

129 小鼠是比较容易建系的近交系小鼠品系,国外最高建系率可达 30%~40%,国内一直徘徊在 10%左右^[12,13],我们在几个方面对传统的建系方法进行了改进,结果表明改进后的方法大大提高了建系率,建系率高达 33%。

1991 年, Ledermann 等^[14]以人类膀胱癌细胞系(5637)为饲养层,用 5637 细胞的条件培养基培养 3d 的桑葚胚,分离得到了 ES 细胞系;1994 年, Kawase 等^[15]利用 SL10 成纤维细胞饲养层,在添加过量 LIF 培养基中培养 C57BL/6 小鼠的囊胚,也得到了 ES 细胞系。本室柴桂萱等^[16]曾用 235 个胚胎进行建系工作,建立了 3 个分化能力很低的 ES 细胞系,建系率只有 1.2%。1999 年童英^[17]报道了一种新的 C57BL/6J 小鼠 ES 细胞系的建立方法,其建系成功率达 9.6%;本实验进一步改进了建系体系,使建系率提高到 13.3%。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源:129/ter 小鼠,昆明小鼠,由北京大学实验动物中心提供;C57BL/6J 小鼠,由军事医学科学院实验动物中心提供;SD 和 Waster 大鼠,北大医学部实验动物部提供。

1.1.2 小鼠胚胎原代成纤维细胞及饲养层:用 13.5d 左右的昆明小鼠胚胎,采用常温消化法制备小鼠胚胎原代成纤维细胞。5 代之内的小鼠胚胎成纤维细胞可用于制作饲养层。

1.1.3 大鼠心脏细胞条件培养基(RH-CM):用天花板培养法获得大鼠心脏细胞,以 5×10^6 细胞/15mL ES 细胞培养基的密度接种于 80cm² 培养瓶中,经 96h 培养后,收集条件培养基 4000 r/min 离心 20min。同时,细胞以 1:2 传代培养,连续收集 6 代。使用前,用 0.2 μ m 的微孔滤器过滤。

1.1.4 ES 细胞培养基(1)ES 细胞基础培养基:DMEM 培养基(GIBCO, 4500mg/L 葡萄糖,不含丙酮酸钠),补加 20% 国产胎牛血清(经胚胎培养和干细胞培养鉴定适于 ES 细胞培养的国产胎牛血清)4 万 IU/L 庆大霉素,0.1mmol/L β -ME, 0.1mmol/L 非必需氨基酸(2)常规 ES 细胞培养基:1000U mLIF/mL ES 细胞基础培养基(3)改进的 ES 细胞培养基:70% RH-CM + 30% ES 细胞基础培养基。

1.1.5 消化液(1)常规消化液:0.25% Trypsin-0.04% EDTA;(2)常规消化液中加入 1% 的鸡血清。

1.2 方法

1.2.1 囊胚培养:取孕 3.5d 左右的 129/ter、C57BL/6J 小鼠,冲出胚胎,将其转移到铺有 PMEF 饲养层的四孔板培养孔内,5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养。

1.2.2 小鼠胚胎干细胞系的建立:常规建系法:以 PMEF 饲养层、添加 mLIF 的 ES 细胞培养基、0.25% Trypsin-0.04% EDTA 消化液为建系条件,采用“一次消化法”离散增殖 4~6d

收稿日期 2002-05-23, 修回日期 2002-8-10。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30070414)

* 通讯作者。 Tel 86-10-62751858 E-mail: mnggl@263.sina.com

的 129/ter 小鼠和 C57BL/6J 小鼠的内细胞团(ICM)及 ICM 离散后出现的 ES 细胞集落。“一次离散法”是用消化液将 ICM 消化一定时间,然后加入终止液,再用毛细管吹打分散,移入新的培养孔。37℃ 5% CO₂ 条件下培养、观察、比较 ES 集落出现的情况。

改进建系法:以 PMEF 饲养层、70% RH-CM 的 ES 细胞培养基、添加 1% 鸡血清的消化液为建系条件,采用“连续消化法”离散增殖 4~6d 的 129/ter 小鼠和增殖 3~3.5d 的 C57BL/6J 小鼠的 ICM 及 ICM 离散后出现的 ES 细胞集落。“连续离散法”是将 ICM 移入消化液中,稍后即开始用约 1/4 ICM 直径的毛细管缓慢吹打,将 ICM 外围离散下来的单细胞和小细胞团块快速移入 4 孔板培养孔内,然后换用更细的毛细管吹打离散剩余的团块,将第二次离散下的单细胞和小细胞团块快速移入培养孔内,如此反复,直至将 ICM 完全离散,分批将离散下来的单细胞和小细胞团块移入培养孔内。37℃ 5% CO₂ 条件下培养、观察、比较 ES 集落出现的情况。

ES 细胞系的建立:ES 集落离散后转移到有 PMEF 饲养层和不同 ES 细胞培养基的 4 孔板孔内,待孔内长满 ES 集落后,将其扩增培养至直径 35mm 培养板内培养。

1.2.3 ES 细胞鉴定:碱性磷酸酶染色鉴定 ES 细胞经无水乙醇固定 1h,染色液(0.4mg/mL α-磷酸萘酯,1 mg/mL 坚牢红 TR 4 mmol/L MgCl₂ 新鲜配制)染色 10~30 min。

核型分析 取生长旺盛的 ES 细胞,用秋水仙素(终浓度为 0.2μg/mL)处理 1.5h,常规空气干燥法制片,Giemsa 染色。

体外分化能力鉴定 将 ES 细胞消化为小团块,在无饲养层的平皿上培养,培养液为 ES 细胞基本培养基。

体内分化能力鉴定 将约 1 × 10⁷ ES 细胞消化为单细胞悬液,注射到同性别 BALB/c 小鼠腹股沟内,观察畸胎瘤的形成,常规石蜡切片,H.E 或三色染色。

2 结果

2.1 常规法与改进法对 129/ter、C57BL/6J 小鼠 ES 细胞集落形成率和建系率的影响

2.1.1 两种建系法对 129/ter 小鼠 ES 细胞集落形成率和建系率的影响 如表 1 所示,用常规建系法和改进建系法分别离散 17 和 18 枚 129 小鼠增殖的 ICM,将离散后的 ICM 重新接种培养,前者有 7 个(41.2%)培养孔出现了 ES 集落,后者有 13 个培养孔出现了 ES 集落;用两种方法离散、扩增所得到的 ES 集落,分别建成了 2 个(11.8%)和 6 个(33.3%)ES 样细胞系。由此可见,用常规方法和改进后的方法建立 129 小鼠 ES 细胞系,差异十分显著。

2.1.2 两种建系法对 C57BL/6J 小鼠 ES 集落形成率和建系率的影响 如表 2 所示,用常规建系法和改进后的方法分别离散 27 和 30 枚 C57BL/6J 小鼠增殖的 ICM,将离散后的 ICM 重新接种培养,前者有 2 个(7.4%)培养孔出现了 ES 集落,后者有 4 个(13.3%)培养孔出现了 ES 集落;用两种方法离散、扩增所得到的 ES 集落,分别建成了 1 个(3.7%)和 4 个(13.3%)ES 样细胞系。由此可见,用常规方法和改进后的方

法建立 C57BL/6J 小鼠 ES 细胞系,差异十分显著。

表 1 两种方法对 129/ter 小鼠 ES 集落形成率及建系率的影响

Table 1 The effects of two different methods on the percentage of ES clones and the ratio of ES cell lines from 129/ter mice

| Method of establishing ES cell line | Standard method | Improved method |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Number of dissociated ICM | 17 | 18 |
| Number of ICM forming ES colonies | 7(41.2%) | 13(72.2%) |
| Number of ES cell lines | 2(11.8%) | 6(33.3%) |

表 2 两种方法对 C57BL/6J 小鼠 ES 集落形成率及建系率的影响

Table 2 The effects of two different methods on the percentage of ES clones and the ratio of ES cell lines from C57BL/6J mice

| Method of establishing ES cell line | Standard method | Improved method |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Number of dissociated ICM | 27 | 30 |
| Number of ICM forming ES colonies | 2(7.4%) | 4(13.3%) |
| Number of ES cell lines | 1(3.7%) | 4(13.3%) |

2.2 两种条件下建立的 129/ter 和 C57BL/6J 小鼠 ES 细胞系的核型比较

2.2.1 两种条件下建立的 129/ter 小鼠 ES 细胞系的核型比较 分别在第 5 代和第 10 代检查了在两种条件下建立的 129/ter 小鼠 ES 样细胞系的核型,常规方法建立的 2 个 ES 样细胞系中,1 个核型正常;改进方法建立的 6 个 ES 样细胞系中,3 个核型正常,这表明两种培养条件都能很好地维持 ES 细胞的正常二倍体核型。

表 3 两种条件下建立的 ES 细胞系的核型比较

Table 3 The comparison of the karyotype of ES cell lines established under two different conditions

| Method of establishing ES cell line | Standard method | | | | Improved method | | | |
|-------------------------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|-----|
| | A-1 | A-2 | A-3 | A-4 | A-5 | A-6 | A-7 | A-8 |
| ES cell lines | XX | XY | XY | XX | XY | XY | XX | XY |
| Diploid karyotype of passage 5(%) | 83% | 41% | 90% | 55% | 61% | 84% | 82% | 37% |
| Diploid karyotype of passage 10(%) | 77% | 28% | 89% | 44% | 63% | 76% | 76% | 40% |
| Interval between two passages(d) | 1.5 | 2 | 1.5 | 2 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 2 |

表 4 两种条件下建立的 C57BL/6J ES 细胞系的核型比较

Table 4 The comparison of the karyotype of C57BL/6J ES cell lines established under two different conditions

| Method of establishing ES cell line | Standard method | | | Improved method | | |
|-------------------------------------|-----------------|-----|-----|-----------------|-----|--|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | |
| ES cell lines | XX | XY | XX | XY | XY | |
| Diploid karyotype of passage 5(%) | 44% | 87% | 66% | 39% | 80% | |
| Diploid karyotype of passage 10(%) | 37% | 84% | 55% | 33% | 80% | |
| Interval between two passages/d | 2 | 1.5 | 1.5 | 2 | 2 | |

2.2.2 两种条件下建立的 C57BL/6J 小鼠 ES 细胞系的核型比较: 分别在第 5 代和第 10 代检查了在两种条件下建立的 ES 样细胞系的核型, 常规方法建立的 1 个 ES 样细胞系, 核型不正常; 改进方法建立的 4 个 ES 样细胞系中, 2 个核型正常率 > 80%。

2.3 ES 样细胞系的多能性鉴定

2.3.1 细胞及集落形态: 8 个 129/ter 和 5 个 C57BL/6J 小鼠 ES 细胞系都具有胚胎干细胞的典型特征: 细胞核大, 胞质少, 核仁明显, 细胞排列紧密呈集落状生长, 集落立体感强, 呈圆形或椭圆形, 边缘光滑、具有折光性, 光学显微镜下看不清集落内细胞间界限。

2.3.2 增殖生长能力及核型维持: 13 个细胞系在前 10 代的增殖能力见表 2, 常规传代培养情况下, 平均传代时间间隔为 1.5 ~ 2d, 随后, 选择了核型正常的 ES 细胞系 A-1、A-3、A-6、A-7、C-2、C-5 进行进一步传代培养, 6 个细胞系各传代培养 30 代, 细胞及集落形态仍维持典型的干细胞特征, 增殖速度维持不变; 在第 30 代, 正常核型比例分别为 70%、82%、65%、68%、73%、65%。说明改进后的培养系统可以很好维持小鼠 ES 细胞的未分化状态和正常核型。

2.3.3 碱性磷酸酶测定: 以国际上通用的 ES 细胞系 R1 为阳性对照, 以 RA 诱导分化的 R1 细胞为阴性对照, 分别检测了 13 个小鼠 ES 细胞系的第 5 代和第 10 代细胞的碱性磷酸酶活性。这 13 个 ES 细胞系经染色呈强阳性, 表明这些 ES 细胞具有强的碱性磷酸酶活性, 相反, 经诱导分化的 ES 细胞没有着色, 说明在分化的细胞中碱性磷酸酶活性丧失。

2.3.4 体内外分化能力鉴定: ① 体外分化: ES 细胞团块在无饲养层的平皿中悬浮培养 2 ~ 4d, 13 个细胞系的 ES 细胞均能自发形成简单类胚, 继续培养 5 ~ 10d, 部分简单类胚内部层次逐渐增多, 直至出现空腔形成囊状类胚, 随着培养时间的延长, 腔隙不断增大。将类胚用 Trypsin-EDTA 离散重新培养, 会出现各种类型的细胞, 如骨骼肌细胞、上皮细胞、神经细胞、成纤维细胞、内皮样细胞等。② 体内分化: 接种于同性别 129/ter 小鼠腹股沟的 8 个细胞系的 ES 细胞和接种于同性别 C57BL/6J 小鼠腹股沟的 5 个细胞系的 ES 细胞经 3 ~ 6 周都形成了大小不等的畸胎瘤, 切片观察显示, 畸胎瘤中包含了来自 3 个胚层的多种组织和细胞衍生物。虽然 13 个细胞系均可形成畸胎瘤、具有广泛的分化能力, 但核型异常的 ES 细胞系形成的畸胎瘤生长比较快, 分化细胞类型相对较少, 核型正常的 ES 细胞系形成的畸胎瘤生长缓慢, 但有各种组织和细胞的广泛分化。

由此可见, 在所建立的 13 个 129/ter 小鼠 ES 细胞系除 7 个正常核型比例较低外, 其余 6 个正常核型比例高的 ES 细胞系符合小鼠胚胎干细胞的一系列特征。

3 讨 论

以 MEF 为饲养层, 以含 70% RH-CM 的 ES 细胞培养基为培养液, 采用含鸡血清的消化液和“连续消化法”建立了 129/ter、C57BL/6J 小鼠 ES 细胞建系的新方法。MEF 饲养层

和添加一定量 LIF 的 ES 细胞培养基, 是目前小鼠 ES 细胞建系和维持的常用方法, 实验表明, RH-CM 与添加 LIF 的 ES 细胞培养基相比, 不但具有显著抑制小鼠 ES 细胞分化、维持其二倍体核型的作用, 而且具有促进 ES 细胞贴壁生长的作用, 维持了其作为多能性胚胎干细胞的一系列特征。

从不同小鼠品系中建立 ES 细胞系, 需要解决许多具体问题。由于存在品系之间的差异, 适宜于 129 小鼠 ES 细胞系建立的方法和条件, 可能并不适宜于其它品系^[18]。不同品系小鼠原始胚胎外胚层细胞的特异的甲基化状态, 有可能影响到 ES 细胞分离的难易程度。此外, 129 小鼠具高频自发畸胎瘤现象, 从畸胎瘤中可以分离到畸胎瘤干细胞系, 而其它品系的小鼠却不易自发产生畸胎瘤, 这反映了各品系小鼠处于不同的遗传背景中, 这种遗传背景的不同, 使不同品系的小鼠 ES 细胞的分离方法和培养存在一定的差别。

设计了两种不同的离散方法, 即“一次离散法”和“连续离散法”; “一次离散法”也即常规离散方法, 由于不同的 ICM 和 ES 集落对消化液的敏感程度不同, 究竟消化多长时间合适很难确定, 其结果要么是消化过度, 要么是消化程度不够, 前者造成大多细胞受伤致死, 后者往往不能吹打为单个细胞和小细胞团块, 大的细胞团块重新接种后极易分化。“连续离散法”克服了上述缺点, 从 ICM 或 ES 集落置入消化液液滴内, 即开始轻缓吹打, 将吹打下来的小细胞团块和单细胞快速转移到新的培养孔内, 然后重复上述过程, 直至将其完全消化为小细胞团块和单细胞, 这样细胞受消化液作用时间短, 又能均匀受到消化液的作用, 所以在同一消化液浓度下, “连续离散法”有明显的优点。

ICM 离散时机的选择: 对 129/ter 小鼠而言, 由于 ICM 的个体差异, 很难确定统一的离散时间, 离散的标准为: ICM 生长快, 形态典型, 呈圆形或椭圆形、立体感强、边缘滑润、集落内部细胞均匀一致、无环状分层带, 无论 ICM 贴壁后生长几天, 只要达到这一标准就可用于 ES 细胞建系, 一般适宜离散时间为 4 ~ 6d。C57BL/6J 小鼠 ICM 的离散的适宜时机是 3 ~ 3.5d, 用常规方法离散 27 个 4 ~ 6d 的 C57BL/6J 小鼠囊胚, 结果仅仅得到 1 个核型不正常的 ES 细胞系, 而用改进后的方法离散了 30 个增殖 3 ~ 3.5d 左右的 ICM, 结果建立了 4 个 ES 细胞系, 其中 2 个核型在 80% 以上。

在 0.25% Trypsin-0.04% EDTA 消化液中添加一定量的鸡血清可以大大降低其对细胞的伤害程度而不降低其对细胞的解离能力。

从细胞形态、集落形态、增殖生长能力、核型检测、碱性磷酸酶测定以及体内外分化能力表明, 建立的 129/ter、C57BL/6J 小鼠 ES 细胞系符合小鼠胚胎干细胞的一系列特征。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**(9): 154 ~ 156
- [2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.

- Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(12): 7634 ~ 7638
- [3] Piedrahita J A, Anderson G B, Bondurant R H. On the isolation of embryonic stem cell : Comparative behavior of murine, porcine, ovine embryos. *Theriogenology*, 1990, **34**(5): 879 ~ 901
- [4] Marshall E. Versatile cell line raises scientific hops, legal, questions. *Science*, 1998, **282**: 1014 ~ 1015
- [5] Gretchen Vogel. Harnessing the power of stem cells. *Science*, 1999, **283**: 1432 ~ 1434
- [6] Kooy D V D, Weiss S. Why stem cells? *Science*, 2000, **287**: 1439 ~ 1441
- [7] Thomson J A, Odorico J S. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Technical Tips Online*, 2000, **18**: 53 ~ 57
- [8] Watt F M, Hogan B L M. Out of eden: stem cells and their niches. *Science*, 2000, **287**: 1427 ~ 1430
- [9] Wakayama T, Rodriguez I, Perry A C *et al.* Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 14984 ~ 14989
- [10] Wang Z Q, Kiefer F, Urbanek P *et al.* Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech Dev*, 1997, **62**: 137 ~ 145
- [11] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P *et al.* Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*, 2001, **292**: 1389 ~ 1394
- [12] HU X I(胡新立), SHANG K Q(尚克刚). Establishment and characterization of six ES cell lines from mouse 129/ter strain. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*(北京大学学报(自然科学版))1996, **32**(2): 248 ~ 253
- [13] SHANG K Q(尚克刚), LI Z Y(李子玉), WU H I(吴鹤龄). Effects of several primary factors related to establishment of mouse embryo pluripotent stem cell lines(ES cell line). *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 1992, **19**(6): 491 ~ 496
- [14] Ledermann B, Burki K. Establishment of a Germ-line Competent C57/6 Embryonic Stem Cell Line. *Expt Cell Res*, 1991, **197**: 254 ~ 258
- [15] Kawase E, Suemori H, Takahashi N *et al.* Strain difference in establishment of mouse embryonic stem(ES) cell lines. *Int J Dev Bio*. 1994, **38**: 385 ~ 390
- [16] CHAI G X(柴桂萱), HAN R(韩嵘), SHANG K Q(尚克刚). Establishment and characteristics of ES cell lines derived from C57BL/6J mice. *Chinese Journal of Cell Biology*(细胞生物学杂志), 1996, **18**: 121 ~ 126
- [17] TONG Y(童英), HAN R(韩嵘), ZHENG Y I(郑玉兰). Establishment of a high germline competent C57BL/6J ES cell line. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 1999, **26**(5): 468 ~ 473
- [18] Suzuki O, Matsuda N, Takano K *et al.* Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cells. *Exp Anim*, 1999, **48**: 213 ~ 216

Discussion of the Methods for Establishing Embryonic Stem Cell Lines from 129/ter、C57BL/6J Mice with High Efficiency

MENG Guo-Liang* TANG Fu-Chou SHANG Ke-Gang XUE You-Fang

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract A new method for establishing ES cell lines from 129/ter、C57BL/6J mice was set up which was characterized by the murine embryonic fibroblast cell(MEF) feeder, the medium of rat heart cell-conditioned medium(RH-CM) for ES cells, and the consecutive digestion by the digestion liquid containing 1% serum. Every group of improved experiments was done with a control of routine method. The results showed that, compared with routine method, the improved way increased the ratio of ES cell lines of 129/ter mice from 11.8% to 33.3%, and of C57BL/6J from 3.7% to 13.3%. The difference is distinct. The passage culture of ES cells showed that, compared with medium added LIF, RH-CM not only inhibited the differentiation of murine ES cells, maintained its diploid karyotype, but also promote its adherence growth. This kind of culture condition not only maintained the ES cells in an undifferentiated state and their normal diploid karyotype, but also a series of other characteristics of totipotent embryonic stem cells during extended culture period.

Key words 129/ter mice, C57BL/6J mice, rat heart cell-conditioned medium, Embryonic Stem cell, diploid karyotype, undifferentiated state

Received: 05-23-2002

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation(No. 30170456).

* Corresponding author. Tel 86-10-62751858; E-mail menggl@263.sina.com