

品系对小鼠胚胎干细胞分离效率的影响

李相运^{1,*}, 邸科前¹, 魏巍²

(1. 河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071001; 2. 北京大学 生命科学学院, 北京 100871)

摘要: 为了充分利用小鼠胚胎干 (ES) 细胞, 就必须从众多小鼠品系中分离 ES 细胞系。本研究通过传统的成纤维细胞饲养层法, 从 CD-1、129/Sv、C57BL/6J 和 129/Sv × C57BL/6J 四种不同遗传背景的小鼠中分离得到 12 个 ES 细胞系, 而从 KM 小鼠没有得到 ES 细胞系。所有的 ES 细胞系都具有典型的 ES 细胞特征, AKP 染色呈阳性。从四种不同遗传背景的 ES 细胞系得到了包含多种组织的畸胎瘤; 与桑椹胚聚合后, 都得到了生殖系嵌合体。结果表明: 品系对小鼠 ES 细胞的分离有显著影响, 利用 129 小鼠以及包含 129 小鼠遗传背景的杂交小鼠都较容易分离 ES 细胞, 由 ES 细胞得到生殖系嵌合体的效率在不同品系间有显著差异, 从杂交 ES 细胞比近交 ES 细胞中更容易得到生殖系嵌合体。

关键词: 小鼠; 品系; 胚胎干细胞; 嵌合体

中图分类号: Q813; Q95 - 33 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 5853 (2005) 03 - 0250 - 05

Effects of Genetic Background on Establishment of Mouse Embryonic Stem Cells

LI Xiang-yun^{1,*}, DI Ke-qian¹, WEI Wei²

(1. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: For utilization of the mouse embryonic stem (ES) cells for various purposes, it is desirable that the cell lines are established from various sources such as inbred and outbred mouse strains. So far, however, most ES cell lines used in genetic manipulation have been derived from the 129/Sv strain. In this paper, we have established ES cell lines from blastocysts of the CD-1, C57BL/6J and 129/Sv × C57BL/6J mice besides 129/Sv mouse with a fibroblast cell as feeder cells, and supplemented with 1,000 unit/mL LIF in the culture medium. Twelve ES cell lines were obtained from CD-1, 129/Sv, C57BL/6J and 129/Sv × C57BL/6J mouse blastocysts. No ES cell line from KM embryos suggests that KM strain might have inhibitory genetic factor(s) for the ES cell formation. Some ES cell lines could be obtained from hybrids at high efficiency suggested a heterosis effect can be expected for establishing ES cell lines in mice. These ES cell lines produced chimeric mice and contributed to the germ-line. The results indicate that genetic background is an important factor in isolating ES cells.

Key words: Mouse; Strain; Embryonic stem cell; Chimera

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES) 是从囊胚内细胞团 (inner cell mass, ICM) 分离而来的一种多能性细胞 (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981), 在体外培养过程中可维持干细胞的未分化状态、正常二倍体核型和无限增殖能力, 具有体内外分化能力和种系嵌合能力 (Nagy et al, 1990;

Eggan et al, 2001), 并可对 ES 细胞在体外进行遗传操作、选择和冻存而不失其多能性。小鼠 ES 细胞不仅可以作为体外研究细胞分化和发育调控机制的模型, 而且还可以作为一种载体, 将通过同源重组产生的小鼠基因组的定点突变导入小鼠胚胎, 得到转基因小鼠, 实现在个体水平上的基因剔除, 为

* 收稿日期: 2004 - 12 - 03; 接受日期: 2005 - 03 - 08

基金项目: 河北农业大学校长基金资助

* 通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0312 - 7528360, E-mail: lixiangyun35@yahoo.com.cn

更深入地研究基因结构与功能、胚胎发育、癌症以及各种遗传病的机理开辟了新途径。小鼠 ES 细胞的建系工作是实现小鼠 ES 细胞途径的基础。

不同小鼠品系来源的 ES 细胞有不同的特性，如国际上通用的 ES 细胞系大多是从 129 品系小鼠中获得的，但 129 品系小鼠不宜用于免疫学和细胞组织移植研究；来自 BALB/c 小鼠的 ES 细胞克服了 129 小鼠 ES 细胞的这些缺点，体外培养生长速度快、稳定性好，该细胞系的细胞及其分化产物在接种到同种小鼠体内，不发生异体排斥反应，在医学免疫学研究中显示了其独特的优点；C57BL/6 小鼠在动物行为研究中得到广泛应用，并且易于饲养和管理，克服了 129 小鼠自身存在的诸多缺点，具有致癌性不敏感和对鼠痘病毒有良好的抗性等优点；远交群 KM 品系和 ICR 品系，具有较强的生命力和抗病能力。由此可见，为了各种不同的研究和应用目的，最好能有不同品系来源的 ES 细胞系。许多实验室的工作都已证明用于种系嵌合的 ES 细胞应尽可能处于传代早期的细胞，且不同小鼠品系来源的 ES 细胞的种系嵌合能力有显著差异，因此，从事 ES 细胞研究的实验室应当不断建立各种遗传背景的新的 ES 细胞系。本实验以 5 种不同遗传背景的小鼠为材料，探讨了品系对分离小鼠 ES 细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 溶液配制

无钙镁 PBS 缓冲液、胰蛋白酶消化液、DMEM 培养液、ES 细胞培养液、丝裂霉素 C 溶液以及 M2 胚胎操作液的配制见 Erbach et al (1994) 和 Nagy et al (2003)。

1.2 小鼠胎儿成纤维细胞的分离培养

取妊娠 14 d 的 CD-1 小鼠，脱颈处死，取出胎鼠，用 PBS 洗掉身上残留的粘液。去掉胎儿的头、内脏、四肢、尾，用 PBS 洗 2 次。用眼科剪剪至 1 mm³ 组织块大小，向组织块中加入适量消化液，消化 15 min。加 DMEM 培养液终止消化，并用 100 μm 滤纱过滤于 10 mL 离心管中，1 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入 5 mL DMEM 培养液并吹打，使细胞悬浮。二次离心、弃上清液，加入 3 mL 培养液，吹打制成细胞悬液。移入直径 9 cm 培养皿并补加 8 mL 培养液，置入含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养（饱和湿度），30 min 后更换培养液，

以后每隔 2 d 换一次培养液。

1.3 成纤维细胞饲养层制备

将铺满成纤维细胞（5 代以内）的培养皿中的培养液移去，加入丝裂霉素 C 溶液 5 mL，置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 4 h。移去丝裂霉素 C 溶液，用 PBS 液洗涤 3 次，加入 5 mL 消化液消化 2 min，使细胞离散，再加入等体积培养液终止消化，制成细胞悬液。然后于四孔板每孔中加入 0.15 mL 成纤维细胞悬液，再补加 0.7 mL 培养液，用移液枪充分吹打，以确保成纤维细胞能够均匀沉降于孔底。置培养箱中培养 24 h 后待用，用前换液。

1.4 小鼠胚胎的采集

实验用 5 种小鼠由北京大学医学部实验动物部提供。鼠房温度 22 ~ 25 °C，湿度 40% ~ 70%；光照周期采用 12L:12D，每日 7:00—19:00 光照。选取处在间情期的 4 周龄母鼠于 14:00 腹腔注射 PMSG（天津市激素制品厂）10 U/只，48 h 后腹腔注射 HCG 10 U/只。注射后与公鼠 1:1 合笼，次日早晨检查阴道栓。见栓母鼠于 3 d 后取囊胚。在实体显微镜下先将变性或不正常的胚胎剔除掉，然后再将正常的囊胚和桑椹胚转移到饲养层上，置培养箱培养。

1.5 ES 细胞的分离与培养

小鼠胚胎贴壁和内细胞团（ICM）增殖后，用消化液将 ICM 离散成小块后移入新的含有饲养层细胞的四孔板中。4 ~ 5 d 后分离 ES 细胞样集落，经数次分离纯化后，ES 细胞逐渐扩增并转入 3.5 cm 的培养皿中，常规维持与传代。

1.6 ES 细胞的鉴定

1.6.1 形态学 观察 ES 细胞的生长行为及形态特征。

1.6.2 AKP 染色 取出生长有 ES 细胞集落的培养皿，无水乙醇固定 15 min；流水冲洗；孵育液 [α-磷酸萘酚钠 35 mg，固蓝 B 35 mg，0.1 mol/L Tris 缓冲液（pH 9.0）35 mL，混合均匀，滤纸过滤使用] 作用 10 min；流水冲洗 10 min；2% 甲基绿溶液染色 10 min；流水冲洗，镜下观察。

1.6.3 体内分化 将 ES 细胞消化为单细胞悬液后注入小鼠腹股沟内，4 周后观察畸胎瘤的形成。

1.6.4 嵌合体制备 将 ES 细胞（10 代以内）与 CD-1 小鼠桑椹胚（CD-1 小鼠 ES 细胞与 C57BL/6J 小鼠桑椹胚聚合）聚合后单侧移植假孕 2.5 d 的

CD-1 母鼠子宫内, 每只母鼠移植 16 枚聚合胚胎 (Maatman et al, 2003; Stewart, 1993)。

1.7 数据处理

采用 χ^2 检验中的独立性检验对实验数据进行统计检验, 揭示 ES 细胞的分离和嵌合体的制备与小鼠品系之间的关系。

2 结果与分析

2.1 ES 细胞的分离

囊胚在饲养层上培养 24 h 后, 透明带开始脱落。60 h 后, 大部分胚胎贴壁。96 h 后, 贴壁的 ICM 增长成为柱状结构, 将增殖为柱状结构的 ICM 机械剥离, 并用消化液离散成小块细胞团, 接种在新鲜饲养层上, 培养 4~5 d 后共得到 18 个 ES 细胞集落, 该集落边缘清楚, 表面光滑, 结构致密, 细胞之间界线不清楚, 隆起生长, 呈鸟巢状; 待单个 ES 细胞集落扩增传至 3.5 cm 培养皿时, 记作第 1 代, 共得到 12 个 ES 细胞系, 冻存 (表 1)。没有

从 KM 小鼠分离到 ES 细胞, 从 CD-1 和 C57BL/6J 小鼠囊胚分离 ES 细胞的效率很低, 而从 129/Sv 和 129/Sv × C57BL/6J 小鼠囊胚分离 ES 细胞的效率 (11.4%) 显著高于其他品系 ($\chi^2 = 13.28$, $df = 4$, $P < 0.01$) (表 1)。这些结果表明: 品系对小鼠 ES 细胞的分离有重要影响, 利用 129 小鼠以及包含 129 小鼠遗传背景的杂交小鼠都较容易分离 ES 细胞。

2.2 ES 细胞的 AKP 检测与体内分化

ES 细胞除具有典型的克隆形态外, 表面标记 AKP 呈强阳性, 染色呈紫红色, 饲养层细胞不着色或呈浅黄色。利用 4 种不同遗传背景的 12 个 ES 细胞系进行体内分化实验和嵌合体制作, 都得到了包含不同组织的畸胎瘤, 其中 11 个 ES 细胞系得到了皮毛嵌合体 (全为雄性, 表 2)。所有嵌合体与亲本回交得到的后代都出现了毛色分离, 说明这 11 个 ES 细胞系都参与了生殖系嵌合。从 1 042 个聚合胚胎中共得到了 223 只仔鼠, 其中 69 只为生殖系嵌合

表 1 小鼠胚胎干细胞的分离

Tab. 1 Isolation of mouse ES cells

遗传背景 Genetic background	囊胚数 No. of blastocysts	出现 ES 细胞集落数 No. of ES clusters	ES 细胞系 (% 囊胚) No. of ES cell line (% Blastocysts)
KM	59	0	0 (0)
CD-1	52	1	1 (1.9)
129/Sv	35	6	4 (11.4)
C57BL/6J	48	2	1 (2.1)
129/Sv × C57BL/6J	47	9	6 (12.8)
Total	241	18	12 (5.0)

表 2 小鼠 ES 细胞与桑椹胚的聚合

Tab. 2 Aggregation of mouse ES cell and morula

遗传背景 Genetic background	ES 细胞系 ES cell line	聚合胚胎 Aggregated embryo	产仔数 (% 聚合胚) Live pup (% Aggregated)	生殖系嵌合体 (% 聚合胚) Germline chimera (% Aggregated)
CD-1	# 1	135	28 (20.7)	0 (0)
129/Sv	# 1	152	43 (28.3)	6 (3.9)
	# 2	86	13 (15.1)	2 (2.3)
	# 3	73	7 (9.6)	1 (1.4)
	# 4	65	10 (15.4)	2 (3.1)
C57BL/6J	# 1	84	21 (25.0)	4 (4.8)
129/Sv × C57BL/6J	# 1	178	48 (27.0)	19 (10.7)
	# 2	52	12 (23.1)	9 (17.3)
	# 3	41	5 (12.2)	3 (7.3)
	# 4	32	4 (12.5)	2 (6.3)
	# 5	48	11 (23.0)	6 (12.5)
	# 6	96	21 (21.9)	15 (15.6)
Total	—	1 042	223 (21.4)	69 (6.6)

体。得到仔鼠的效率在不同品系间没有差异 ($\chi^2 = 1.95$, $df = 3$, $P > 0.5$), 但得到生殖系嵌合体的效率在不同品系间有显著差异。由 129/Sv \times C57BL/6J 的 6 个 ES 细胞系得到生殖系嵌合体的效率为 6.3% ~ 15.6%, 显著高于其他 ES 细胞系 ($\chi^2 = 39.89$, $df = 3$, $P < 0.005$); 没有从 CD-1 ES 细胞中

得到生殖系嵌合体; 从 129/Sv 和 C57BL/6J ES 细胞中得到生殖系嵌合体的比例也比较低, 分别为 1.4% ~ 3.9% 和 4.8% (表 2)。上述结果暗示, 从具杂交遗传背景的 ES 细胞中更容易得到生殖系嵌合体。图 1 为 129/Sv \times C57BL/6J #1 ES 细胞集落、AKP 染色、畸胎瘤切片和生殖系嵌合体。

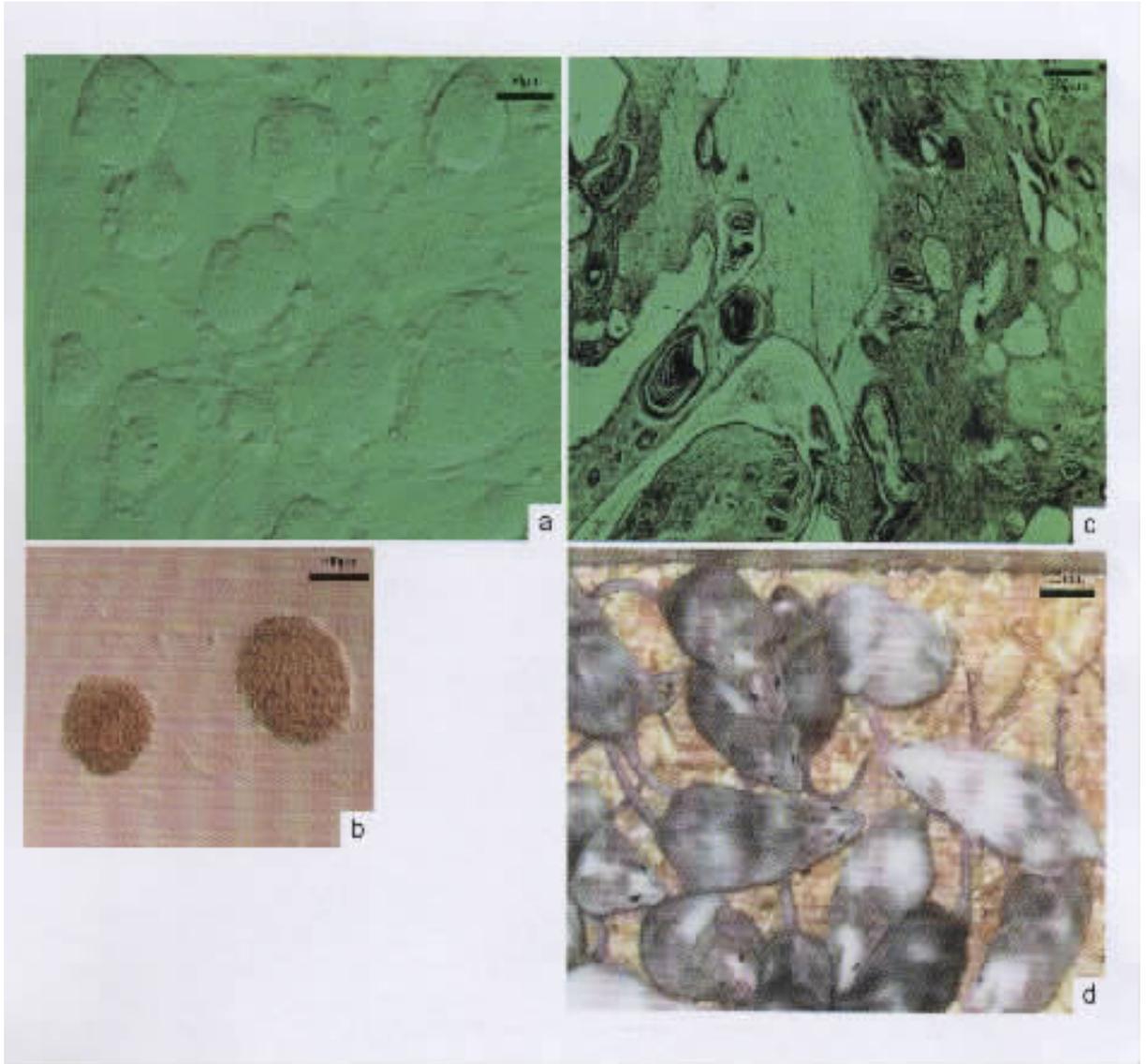


图 1 小鼠 129/Sv \times C57BL/6J #1 ES 细胞集落 (a) AKP 染色 (b) 畸胎瘤切片 (c) 和生殖系嵌合体 (d)

Fig. 1 Embryonic stem clusters (a), AKP dyeing (b), slice of teratocarcinoma (c) and germline chimera (d) in 129/Sv \times C57BL/6J #1 mice

3 讨论

ES 细胞技术的关键是获得性状优良的 ES 细胞系。从国外购买的 ES 细胞系由于长距离的运输、培养条件的改变以及传代次数的增加, 很容易造成

ES 细胞的基因突变和染色体畸变, 往往导致细胞出现生长滞留并丧失多能性, 从而失去作为重要研究材料的意义。因此, 不断建立新的、可供国内使用的 ES 细胞系是十分必要的。

目前, 建立和维持小鼠 ES 细胞系最常用的方

法是饲养层法,即以丝裂霉素 C 或 γ 射线处理的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 作饲养层,并在培养基中添加分化抑制因子 LIF,即白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor)。本实验以第 2—5 代经丝裂霉素 C 处理 2 h 的 MEF 作为饲养层细胞,利用高糖 DMEM 作为基础培养基,添加 15% 的新生犊牛血清、0.1 mmol/L 的 2-巯基乙醇、1% 的非必需氨基酸、2 mmol/L 的谷氨酰胺、青霉素和链霉素各 50 U/mL 以及 LIF 1 000 U/mL,可从小鼠囊胚内细胞团有效分离获得 ES 细胞。最佳的 ICM 离散时机是分离 ES 细胞的关键,ICM 离散的时间一般为囊胚体外培养 4~5 d,理想的 ICM 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、无环状或半环状分层带。ES 细胞集落边缘清楚,表面光滑,结构致密,细胞之间界线不清楚,隆起生长,呈鸟巢状, AKP 染色呈阳性,体内可形成畸胎瘤,与桑椹胚聚合可得到生殖系嵌合体。

品系是影响小鼠 ES 细胞分离的一个重要因素 (Suzuki et al, 1999; Simpson et al, 1997; Eggan et al, 2001), 目前国际上通用的 ES 细胞绝大多数都是来源于 129 品系小鼠,分离 ES 细胞的传统方法也是在 129 小鼠上建立起来的,这说明适宜于 129 小鼠 ES 细胞系建立的方法和培养条件,可能并不适宜于其他品系的小鼠。129 小鼠具有高频的自发畸胎瘤现象,从畸胎瘤中可以分离到畸胎瘤干细胞

系,而其他品系的小鼠却不易自发产生畸胎瘤,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条件存在一定的差别。在本实验中,从 36 个 CD-1 小鼠 ICM 和 26 个 C57BL/6J 小鼠 ICM 分别只得到了 1 个 ES 细胞系,而从 22 个 129/Sv 小鼠 ICM 和 31 个 129/Sv \times C57BL/6J 小鼠 ICM 分别得到了 4 个和 6 个 ES 细胞系。这似乎说明从 129 小鼠以及包含 129 小鼠遗传背景的杂交鼠都能容易分离 ES 细胞。此外,从 129/Sv \times C57BL/6JES 细胞获得嵌合体的效率最高,这暗示 ES 细胞的遗传背景的杂合度是影响嵌合体生存能力的重要因素 (Eggan et al, 2001)。Suzuki et al (1999) 从 540 枚各种类型小鼠胚胎中建立了 13 个 ES 细胞系,其中 10 个细胞系来自 129/Sv-ter 小鼠胚胎,1 个来自 C57BL/6CrSlc 胚胎,1 个来自 B6D2F1 \times C57BL/6CrSlc 杂交胚胎,1 个来自 Yok ddy \times Slc \times ICR 杂交胚胎;而从其他 6 种遗传背景不同的小鼠胚胎中没有得到 ES 细胞系,可能是因为它们中含有抑制 ES 细胞形成的遗传因子。有时从杂交胚胎中能得到 ES 细胞系,但从其双亲胚胎中却得不到 ES 细胞系,这一现象说明:高遗传杂合度有利于 ES 细胞的分离。Kawase et al (1994) 也证明小鼠 ES 细胞的分离存在品系差异,不同的小鼠品系,不但分离 ES 细胞的方法稍有不同,且 ES 细胞的特征也不相同,例如从 BALB/c 小鼠很难得到 ES 细胞。

参考文献:

- Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout 3rd WM, Yanagimachi R, Jaenisch R. 2001. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 6209-6214.
- Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD. 1994. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media [J]. *Biol. Reprod.*, **50**: 1027-1033.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. *Nature*, **292**: 154-156.
- Kawase E, Suemori H, Takahashi N. 1994. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines [J]. *Int. J. Dev. Biol.*, **38** (2): 385-390.
- Maatman R, Gertsenstein M, Meijer E, Nagy A, Vintersten K. 2003. Aggregation of embryos and embryonic stem cells [J]. *Methods Mol. Biol.*, **209**: 201-230.
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** (12): 7634-7638.
- Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux V, Ivčnyí E, Markkula M, Rossant J. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse [J]. *Development*, **110**: 815-821.
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. 2003. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd ed. [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 359-398.
- Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ. 1997. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice [J]. *Nat. Genet.*, **16** (1): 19-27.
- Stewart CL. 1993. Production of chimeras between embryonic stem cells and embryos [J]. *Methods Enzymol.*, **225**: 823-855.
- Suzuki O, Matsuda J, Takano K. 1999. Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cells [J]. *Exp. Anim.*, **48** (3): 213-216.