

## 第 28 期鸡胚原始生殖细胞的分离培养

丁志丽, 采克俊, 刘莉<sup>\*</sup>, 张易祥, 张念慈 (湖州师范学院生命科学学院, 浙江湖州 313000)

**摘要** [目的] 进一步优化生殖细胞(PGCs)细胞体外培养条件。[方法] 从第 28 期(5.5 d)鸡胚生殖嵴分离 PGCs, 将 PGCs 与性腺基质细胞共培养进行原代培养, 比较 2 种培养温度和 3 种培养浓度对 PGCs 原代培养的影响, 以及 2 种饲养层细胞对 PGCs 传代培养的影响, 并通过倒置显微镜下形态学观察、碱性磷酸酶(AKP)和过碘酸希夫反应(PAS)染色方法鉴定 PGCs。[结果] 培养浓度为  $2.5 \times 10^5$  个/ml 和培养温度为 37 °C 时 PGCs 增殖较多, 不易分化, 存活能力较强, 以第 2 代鸡胚成纤维细胞作饲养层时传代培养效果较好, 获得了 PGCs 增殖的未分化集落, 为后期的细胞标记及移植研究提供了较多数量和较高活力的 PGCs。[结论] 获得了 PGCs 原代与传代培养较好的培养体系, 为禽类 EG 细胞系的建立和转基因研究奠定了基础。

**关键词** 鸡胚; 原始生殖细胞; 培养

**中图分类号** S831.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)02-00519-03

### Isolation and Culture of Primordial Germ Cells of Chicken Embryo at 28th Stage

DING Zhi-li et al (School of Life Science, Huzhou Teachers College, Huzhou, Zhejiang 313000)

**Abstract** [Objective] The study aimed to optimize the conditions for culture *in vitro* of primordial germ cells (PGCs). [Method] PGCs were isolated from the genital ridges of chicken embryos at the 28th stage (5.5 d), then they were co-cultured with gonad stroma cells for primary culture. The effect of 2 kinds of culture temperatures and 3 kinds of culture concn. on PGCs primary culture and that of 2 kinds of feeder layer cells on PGCs subculture were compared. PGCs were identified by morphologic observation under inverted microscope and staining of alkaline phosphatase (AKP) and periodic acid-schiff reagent (PAS). [Result] PGCs could proliferate, maintain undifferentiated situation, and had stronger viability when the cell culture concn. was  $2.5 \times 10^5$ /ml and the culture temperature was 37 °C. The second passage of chicken embryo fibroblast (CEF) as the feeder layer was more suitable for PGCs subculture and got the undifferentiated colony of PGCs proliferation, which afforded the ample PGCs with high viability for the subsequent experiment of PGCs labeling and transplantation. [Conclusion] The culture system with better primary culture and subculture for PGCs was obtained, which laid the foundation for establishment of avian cell line and its transgenic research.

**Key words** Chicken embryo; Primordial germ cells; Culture

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是一种具有发育全能性的多能干细胞, 在胚胎发育研究、新基因发现、基因组学研究以及药物筛选等方面有着广阔的应用前景。但到目前为止, 人们一般通过直接获取新鲜的 PGCs 细胞, 进行体外操作。其缺点是细胞来源非常有限, 而且还要消耗大量的人力、物力, 过程极其繁琐。如果能够建立 PGCs 的稳定的体外培养系统, 大量扩增 PGCs, 无疑会大大促进 PGCs 发育分化等基础性研究和应用性研究。因而, 体外培养 PGCs 的研究日益成为转基因禽类研究中的一个热点。

在培养体系方面, 以往很多研究者都将原代鸡胚 PGCs 分离提纯, 然后使用饲养层分离培养<sup>[1-2]</sup>。笔者拟采取 PGCs 与性腺基质细胞共培养方式研究鸡胚 PGCs 体外培养和增殖情况, 同时比较了不同培养温度、培养浓度对 PGCs 原代培养的影响, 以及不同饲养层对 PGCs 传代的影响, 以进一步优化 PGCs 细胞体外培养条件, 为转基因禽类的研究和应用提供参考依据。

### 1 材料与与方法

**1.1 鸡胚的来源与孵化** 受精蛋来源于广州温氏青山种鸡场, 品种为广西土鸡, 孵化温度为 37.5 °C, 相对湿度为 60%, 自动翻蛋。

**1.2 主要试剂** 高糖 DMEM (Gibco); 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青); 牛胰蛋白酶 (1:250)、Fibroblast Growth Factor-basic-bFGF、human Insulin-Like Growth Factor-hIGF、human Stem Cell

Factor-hSCF、mouse Leukemia Inhibitory Factor-mLIF、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、 $\beta$ -巯基乙醇和丝裂霉素-C 都为 Sigma 产品; 碱性磷酸酶(AKP)试剂盒(华美生物工程有限公司)、高碘酸-希夫(PAS)染色试剂盒(上海太阳生物技术有限公司); 青霉素和链霉素(哈药集团制药总厂)。

消化液: 0.25% 的牛胰蛋白酶与 0.025% 的 EDTA 混合液; PGCs 完全培养液: DMEM 高糖培养基 + 2 mmol/L L-谷氨酰胺 +  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/L  $\beta$ -巯基乙醇 + 1 mmol/L 丙酮酸钠 + 100  $\mu$ g/ml 青霉素 + 100  $\mu$ g/ml 链霉素 + 10 IU/ml mLIF + 5 ng/ml hSCF + 10 ng/ml bFGF + 10 ng/ml IGF + 10% FBS + 2% 鸡血清。

### 1.3 饲养层细胞的制备

**1.3.1 鸡胚成纤维细胞(CEF)饲养层的制备** 选取生长良好、传至第 2 代的成纤维细胞, 用含有 10  $\mu$ g/ml 丝裂霉素-C 的培养液作用 2.0 ~ 2.5 h, PBS 洗涤 7 ~ 8 次, 胰酶消化, 以  $1 \times 10^6$  个/ml 密度接种到铺有 0.1% 的明胶培养板中培养, 观察饲养层铺展情况, 铺满后可接种 PGCs。

**1.3.2 STO 饲养层的制备** STO 细胞(中国农大惠赠)铺板, 取对数生长期 STO 细胞, 用终浓度为 10  $\mu$ g/ml 丝裂霉素-C 按上述方法处理备用。

**1.4 鸡胚 PGCs 的分离与原代培养** 采用酶解法分离 28 期鸡胚生殖腺, 即受精蛋孵化到第 28 期后, 在解剖镜下用玻璃针挑取生殖腺, PBS 浸洗 3 次, 5 ~ 10 ml 消化液室温下消化 5 min, 消化时辅以硅化的玻璃吸管轻轻吹打使分散。用含小牛血清的消化液终止消化, 300 目网筛过滤。1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清, 用含细胞因子的培养液重悬沉淀。

培养体系: 采用完全培养液、不同培养温度(37 和 38.5 °C)、不同培养密度( $2.5 \times 10^5$  个/ml、 $5 \times 10^5$  个/ml 和  $1 \times 10^6$

**基金项目** 国家自然科学基金(30500270); 浙江省自然科学基金项目(Y304194); 湖州师范学院校级课题(KX23027); 浙江省教育厅科研项目(20070479)。

**作者简介** 丁志丽(1979-), 女, 江苏如皋人, 硕士, 讲师, 从事动物胚胎工程研究。<sup>\*</sup>通讯作者。

**收稿日期** 2008-10-20

个/ml)、5% CO<sub>2</sub> 浓度下 PGCs 与性腺基质细胞在培养箱中共培养。24 h 后换液以去除死细胞,以后每天观察、换液。

**1.5 鸡胚 PGCs 的传代培养** 传代时,先用 PBS 清洗去除死细胞,再加 0.5 ml 消化液,约 1 min 后加入 1 ml 培养液轻柔吹打,将基质细胞上贴附的部分单细胞和小细胞团先离散下来,吸出第一次离散出的细胞悬液;再加入新鲜消化液作用 1.5 min,轻轻晃动培养瓶,待瓶壁上的细胞开始脱落时,加入培养液轻柔吹打后,与第一次消化下来的细胞悬液一起移入经 0.1% 明胶处理过的培养瓶中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 1 h 后,再吸取不含组织碎片的上层细胞悬液移入新的 CEF 和 STO 饲养层上继续培养。

**1.6 PGCs 鉴定** 在倒置相差显微镜下,对刚分离的 PGCs 进行形态学观察,培养过程中观察细胞贴壁状况及细胞的生长、增殖和死亡等形态学变化并拍照。

使用 AKP 和 PAS 染色方法对刚分离的 PGCs 细胞和培养后集落进行鉴定,染色方法参照试剂盒说明书进行,染色后在倒置显微镜下观察、拍照。

## 2 结果与分析

**2.1 PGCs 分离结果** 在倒置显微镜下观察,刚分离得到的单个 PGCs 较体细胞大,细胞核大而圆,且处在偏中央的位置。平均每个性腺中所获细胞总数为  $7.99 \times 10^4$  个,平均每个性腺中 PGCs 数为 493 个。此外,在细胞悬液中还存在大量呈椭圆形的红细胞,换液之后会渐渐消除。

### 2.2 PGCs 的原代培养

**2.2.1 不同培养温度对 PGCs 增殖的影响。** 分离的 PGCs 接种于培养体系中培养 1 d 后,两种温度下 PGCs 和性腺基质细胞大都已贴壁,性腺基质细胞呈梭状或三角形铺于下层,PGCs 呈圆形紧贴基质细胞,可见 2~3 个成串细胞;2 d 之后,增殖的 PGCs 明显增多,出现 4~5 个成串细胞,38.5 比 37 °C 培养温度下成串细胞多;培养 4~7 d 开始出现 PGCs 集落,集落由小而圆的细胞构成,边缘较光滑,呈鸟巢状或山包状,但 38.5 °C 下基质细胞增殖速度高于 37 °C,培养液营养消耗很快,集落维持很短时间即开始脱落凋亡。

**2.2.2 不同培养浓度对 PGCs 增殖的影响。** 将用酶解法分离得到的 PGCs 分别稀释至 3 种浓度,培养结果表明:以  $2.5 \times 10^5$  个/ml 密度培养,1 d 时细胞大多贴壁,少量悬浮,有 2~3 个成串细胞;2~4 d 时,主要是成串细胞增加,基质细胞增殖;5~6 d 时,基质出现脱落现象,未见典型 PGCs 集落。以  $5 \times 10^5$  个/ml 密度培养,1~4 d 细胞特点与  $2.5 \times 10^5$  个/ml 密度培养下基本一致;5 d 时,基质细胞长满;6~7 d 时,突然出现鸟巢状的集落(图 1);8 d 时,仍有集落,且没有分化现象,但根据基质细胞铺满情况以及集落特征,此时需要传代。以  $1 \times 10^6$  个/ml 密度培养,1~4 d 细胞特点与  $2.5 \times 10^5$  个/ml 密度培养下基本一致;5~6 d 时,出现较大集落;7 d 时,集落出现拉丝现象。

**2.3 PGCs 的传代培养** 选择培养浓度为  $5 \times 10^5$  个/ml 的 PGCs 典型集落进行传代培养。在 CEF 饲养层上,传代的 PGCs 培养 2~3 d 后可重新聚集增殖形成细胞集落(图 2)。集落颜色较浅,细胞之间排列疏松、界线较明显;在 STO 饲养层上,刚接种时很难辨认单个 PGCs 与 STO 细胞,因为随着

培养时间的延长,有一部分 STO 细胞出现发暗和空泡化等凋亡现象,STO 空泡细胞与 PGCs 大小基本一致,传代培养 2~3 d 后尽管也能观察到集落,但饲养层上空泡细胞干扰 PGCs 的形态观察。

**2.4 PGCs 的染色鉴定** 刚分离性腺混合细胞中 PGCs 经 AKP 染色后呈淡黑色,阳性较弱,而其他基质细胞及红细胞不着色(图 3);经 PAS 染色后,除了细胞核外,整个细胞质有许多深染的区域,被染成紫红色,呈 PAS 阳性,其他基质细胞及红细胞不着色(图 4)。

将原代培养的以及传一代 PGCs 集落进行 AKP 染色呈淡黑色,阳性较弱,而已分化的 PGCs 及基质细胞饲养层呈黄色或不着色(图 5);经 PAS 染色后集落呈红色,为阳性(图 6)。



图 1 原代 PGCs 集落 (200 ×)

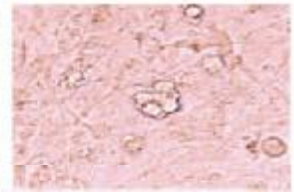


图 2 传代 PGCs 集落 (200 ×)

Fig. 1 Primary PGCs colony

Fig. 2 The passage of PGCs

(200 ×)

colony (200 ×)



图 3 刚分离 PGCs AKP 染色

(200 ×)

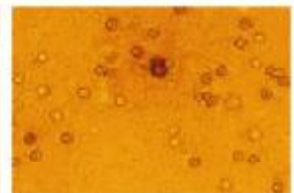


图 4 刚分离 PGCs PAS 染色

(200 ×)

Fig. 3 PGCs stained by AKP

Fig. 4 PGCs stained by PAS

(200 ×)

(200 ×)

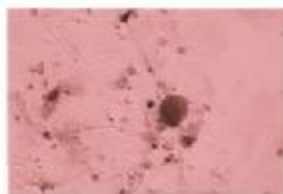


图 5 PGCs 集落 AKP 染色

(200 ×)

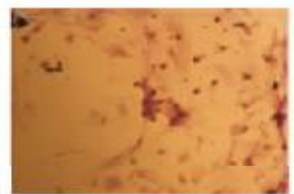


图 6 PGCs 集落 PAS 染色

(200 ×)

Fig. 5 PGCs colony stained by

Fig. 6 PGCs colony stained by

AKP (200 ×)

PAS (200 ×)

## 3 讨论

**3.1 培养方式对 PGCs 体外增殖的影响** PGCs 培养的关键是保持 PGCs 的未分化状态及有丝分裂的能力。该研究将 PGCs 与性腺基质细胞在有细胞因子的培养液中一起培养,可维持 PGCs 原代培养的不断增殖和集落的形成。刚分离的 PGCs 中混合有大量性腺基质细胞,这些细胞在培养 1 h 左右分化为成纤维细胞,一方面成纤维细胞虽然可与 PGCs 协同

竞争生存,但另一方面可分泌大量生长因子,如 IGF、FGF,有利于 PGCs 的存活增殖;同时也释放相当的分化抑制因子,如 LIF 可抑制 PGCs 分化、死亡<sup>[3]</sup>。Han 等从 5.5 d 白莱亨鸡胚生殖腺分离到 PGCs,令其与性腺基质细胞共培养,在不更换饲养层和不进行亚培养的情况下,PGCs 可持续 2 个月维持未分化状态<sup>[4]</sup>。肖小璐等在无基质细胞和生长因子存在的条件下,体外培养不同时期来源的 PGCs 细胞,最久的存活不超过 4 d<sup>[5]</sup>。这些研究表明:经分离纯化的 PGCs 细胞在某些基质细胞的支持下,通过在培养液中添加一些细胞因子,可控制 PGCs 的分化方向。该研究前期工作中,尝试共培养情况下不添加任何生长因子,未得到 PGCs 集落,这说明鸡 PGCs 在体外的存活和增殖需要充足的生长和抑制因子,尽管基质细胞能分泌一些因子,但分泌量还不能完全维持 PGCs 的增殖,需要添加一些因子。

**3.2 培养密度对 PGCs 体外增殖的影响** PGCs 与基质混合细胞的浓度对维持 PGCs 的增殖至关重要。如果浓度过低,基质细胞较少,不足以维持 PGCs 的生长,浓度过高,又与 PGCs 竞争营养,导致生成的 PGCs 集落很容易分化。该研究比较了 3 种培养浓度,发现  $5 \times 10^5$  个/ml 细胞浓度更适合于鸡 PGCs 的生长。在此浓度下,基质细胞在 5 d 左右基本铺满培养板底,连成片状,而 PGCs 集落会在 7 d 左右形成,在这种共培养方式下 PGCs 增殖特点与 Park 等<sup>[6]</sup>报道的结果基本一致。

**3.3 培养温度对 PGCs 体外增殖的影响** 体外培养的细胞需要在一定恒温的环境中才能生长,培养温度如不适当,将会影响细胞的生长与代谢,甚至会导致其发生死亡。笔者比较了不同的培养温度 (37 °C 和 38.5 °C) 对 PGCs 增殖的影响,结果表明,37 °C 和 38.5 °C 的温度下,鸡 PGCs 都能增殖生长,但 38.5 °C 下培养的鸡 PGCs 要比 37 °C 下的增殖快,温度高不仅利于 PGCs 的生长,也利于其他细胞的生长,而其他细胞的过快生长对 PGCs 的生长会产生抑制作用,38.5 °C 下细胞集落很快脱落凋亡。所以,37 °C 更适于鸡胚 PGCs 的培养。

**3.4 饲养层对 PGCs 传代培养的影响** PGCs 传代培养过程笔者采用了饲养层。饲养层细胞一方面可促进 PGCs 的附着,另一方面可分泌抑制 PGCs 分化的因子。Stroiek 等<sup>[7]</sup>和 Matsui 等<sup>[8]</sup>研究认为,同源胚胎的成纤维细胞所模拟的体外培养体系与 PGCs 的体内生长环境最为接近。同源胚胎成纤维细胞分泌的生长因子和分化抑制因子为 PGCs 的增殖和未分化状态提供了所需的环境。笔者选用 CEF 和 STO 作为饲养层,结果表明,CEF 作为饲养层的效果比较好,传代的 PGCs 贴附在 CEF 饲养层上生长,速度快、克隆形成率高,在传代培养的第 2 天就可看到多个小型的 PGCs 集落,说明 CEF 饲养层对鸡 PGCs 的生长具有促进作用。De Felice 等<sup>[9]</sup>研究表明 CEF 可提供 PGC 生长增殖所需要的 LIF、bFGF 及其他一些细胞外基质成分。这可能是 CEF 显著促进鸡胚

PGC 增殖的主要原因。STO 细胞属于鼠源的成纤维细胞系,经过反复冻融、复苏和传代次数增加,可能对其生长特性和形态产生一些影响,该试验中随着培养时间的延长,STO 细胞出现空泡化现象,可能是其受到影响的一个标志。

**3.5 PGCs 的鉴定** AKP 活性是人和鼠 ES 和 EG 细胞的特异性标志<sup>[10]</sup>。而在鸡上,各实验室报道不一致,这可能与鸡的品种和各实验室染色方法有关。该实验室得出刚分离鸡胚 PGCs 和 PGCs 克隆集落呈 AKP 弱阳性。有的实验室报道 PGCs 具有很强的 AKP 活性,但也有阴性的报道, Park 等<sup>[11]</sup>认为鸡的 PGCs 与 EG 细胞不表现 AKP 活性。刚分离的 PGCs 和 PGCs 集落呈现 PAS 阳性,这是因为禽类 PGCs 细胞质含大量糖原,可与过碘酸发生特异性染色反应,这与其他研究者报道一致<sup>[12]</sup>。

总之,该研究中获得了 PGCs 原代与传代培养较好的培养体系,为下一步禽类 EG 细胞系的建立和转基因研究奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 肖小璐,蔡琳琳,秦洁,等.第 28 期鸡胚原始生殖细胞的冷冻保存与体外培养研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(2):39-42.
- [2] CHANG I,TAJIMA A,CHIKAMUNE T,et al. Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinal ridge[J]. Cell Biol Int,1995,19:143-149.
- [3] ALVAREZ-BUYLLA A,MERCHANT-LARIOS H. Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration[J]. Exp Cell Res,1986,165:362.
- [4] HAN J Y,PARK T S,HONG Y H,et al. Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained in vitro for an extended period[J]. Theriogenology, 2002,58(8):1531-1539.
- [5] 肖小璐,秦洁,李碧春.不同时期鸡胚原始生殖细胞的分离及存活时间的研究[J].畜牧兽医学报,2003,34(6):623-624.
- [6] PARK T S,JEONG D K,KIM J N,et al. Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos[J]. Biol Reprod,2003,68:1657-1662.
- [7] STROJEK R M,REED M A,HOOVER J L. A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts[J]. Theriogenology,1990,33:901-913.
- [8] MATSUI Y,TOKSOZ D,NISHIKAWA S,et al. Effect of steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture[J]. Nature,1991,353:750-752.
- [9] DE FELICE M,SCALDAFERRI M L,FARINI D. Adhesion molecules for mouse primordial germ cells[J]. Front Biosci,2005,10:542-551.
- [10] JUNG J G,LEE Y M,PARK T S,et al. Identification, culture, and characterization of germline stem cell-like cells in chicken testes[J]. Biol Reprod,2007,76:173-182.
- [11] PARK T S,HAN J Y. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken[J]. Mol Reprod Dev,2000,56:475-482.
- [12] JUNG J G,KIM D K,PARK T S,et al. Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells[J]. Stem Cells,2005,23:689-698.
- [13] 王娟,孔祥华,杜立新.鸡胚胎生殖细胞在鼠胚成纤维细胞饲养层上的生长[J].生物技术通讯,2007,18(1):54-56.
- [14] LIU F J,ZHANG Y L,YANG Z J,et al. Effect of Insulin-Transferrin-Selenium on goat oocytes maturation and embryo development[J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(3):107-110.
- [15] 秦洁,蔡琳琳,李碧春,等.鸡胚胎原始生殖细胞的体外培养[J].中国兽医学报,2006,26(4):444-447.