

# 昆明小鼠胚胎干细胞培养体系的优化

任卫青, 张志平, 许晓婷, 邓立新, 李小佳, 吕婧玉, 翟明胜, 王新庄\*

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

**摘要:** 为了更高效地分离昆明小鼠胚胎干细胞, 本研究从饲养层、胚胎发育阶段和培养液方面进行优化。将 3 代以内的小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)用丝裂霉素 C 处理后, 分别按  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  密度接种, 以 H-DMEM+15%KSR+LIF 为培养液, 观察不同密度饲养层对昆明小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)生长的影响, 并研究胚胎发育阶段和培养液中分别添加干细胞生长因子(SCF)、SCF+胰岛素对昆明小鼠 ES 细胞分离克隆的影响。结果显示, 胚胎在密度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的饲养层上, F1 代和 F2 代 ES 细胞克隆形成率均显著高于其他 2 组( $P < 0.05$ )。囊胚的 F2 代 ES 细胞克隆形成率显著高于桑椹胚( $P < 0.05$ ), 培养液中添加 SCF 显著提高昆明小鼠胚胎贴壁率( $P < 0.05$ ), 同时添加 SCF 和胰岛素得到昆明小鼠最高胚胎贴壁率及 F1、F2 代 ES 细胞克隆形成率。所分离的 ES 细胞显示 AKP 染色强阳性, Oct-4、SSEA-1 的免疫荧光检测阳性, 具有 ES 细胞的特点。由此认为, 发育至囊胚的胚胎在 MEF 密度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  上, 培养液中同时添加 SCF 和胰岛素更适合昆明小鼠 ES 细胞的分离培养。

**关键词:** 胚胎干细胞; 饲养层; 培养液; 优化; 小鼠

中图分类号: Q28

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)02-0316-06

## Optimization of Culture System of Embryonic Stem Cells from Kunming Mouse

REN Wei-qing, ZHANG Zhi-ping, XU Xiao-ting, DENG Li-xin, LI Xiao-jia, LV Jing-yu,

ZHAI Ming-sheng, WANG Xin-zhuang\*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University,  
Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to isolate the ES cells from Kunming mouse efficiently, the feeder cells, developmental stage of embryos and culture conditions were optimized in the study. Mouse embryonic fibroblast (MEF) were inoculated at concentrations of  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  as the feeder layers of ES cells after they were treated with Mitomycin C within 3 passages, and cultured in H-DMEM+15%KSR+LIF, the growth of the ES cells were observed. The effects of developmental stages of embryos and added SCF, SCF+insulin in culture medium on growth of Kunming mouse ES cells were investigated. The results showed that the formation rates of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> passage ES cells in  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  MEF were higher than those cultured on the other 2 groups ( $P < 0.05$ ). The 2<sup>nd</sup> passage ES cells colonies formation rate of blastocysts were higher than that of compacted morula ( $P < 0.05$ ). It had improved the attachment rate was significantly enhanced ( $P < 0.05$ ) when the culture medium added with SCF, and the highest attachment rate, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> passage ES cells colonies formation rate were got when the culture medium added with SCF and insulin ( $P < 0.05$ ). The isolated ES cells, which were positive for AKP staining and immunofluorescence against antigens of Oct-4 and SSEA-1, had a series of characters of mice ES cells. These results suggest that the blastocysts on the MEF with a density of  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  and addition with SCF and insulin in the culture medium is more suitable for the isolation and passage of

收稿日期: 2012-02-28

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究计划(092300410081); 国家肉牛、牦牛产业体系(30300324)

作者简介: 任卫青(1986-), 女, 河南林州人, 硕士, 主要从事动物细胞与胚胎工程方面研究, E-mail: guoping6767@126.com

\* 通信作者: 王新庄(1963-), 男, 博士, 教授, E-mail: wangxinzhuang@yahoo.com.cn

Kunming mouse ES cells.

**Key words:** embryonic stem cells; feeder cell; culture medium; optimization; mouse

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES 细胞)是从囊胚内细胞团(ICM)或原始生殖细胞中分离培养而来,具有全能分化能力和无限增殖能力的一群细胞<sup>[1]</sup>。研究证实,ES 细胞在体外可以分化成各种细胞,包括神经细胞、心肌细胞、胰岛细胞和生殖细胞<sup>[2-3]</sup>等,因此引起国内外科学家的密切关注,然而所有这些研究的重要前提是必需具备充足的干细胞来源。ES 细胞体外培养条件要求苛刻,一方面要抑制其分化,另一方面又要促进其分裂增殖,因此,必须在培养基中加入分化抑制因子或将其培养在能分泌分化抑制因子的饲养层细胞上,还要选择合适的培养基促进其分裂增殖。自 1981 年 M. J. Evans 和 M. H. Kaufman 首次分离培养了小鼠的胚胎干细胞<sup>[4]</sup>,至今已建立了数百个小鼠 ES 细胞系。但小鼠细胞系绝大多数来自 129 品系,129 品系小鼠易感染多种疾病,具有高频自发畸胎瘤特性及 ES 细胞容易癌化等缺点,因此该品系小鼠不宜用于免疫学和细胞、组织移植等研究<sup>[5]</sup>。昆明小鼠作为我国应用最多的国产远交系试验小鼠,其 ES 细胞建系的成功率还很低<sup>[6]</sup>。

为提高昆明小鼠的 ES 细胞建系效率,本试验以原代培养小鼠胎儿成纤维细胞(Mouse embryo fibroblast, MEF)为饲养层,探讨了 MEF 作为饲养层的最佳接种密度,并研究了胚胎不同发育阶段和培养液中添加干细胞生长因子(Stem cell factor, SCF)和 SCF+胰岛素对昆明小鼠 ES 细胞体外培养的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 8~12 周龄昆明小鼠由河南省实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 H-DMEM 培养基(含谷氨酰胺, Gibco), 胰蛋白酶(Gibco), KNOCKOUT™ SR (KSR, Gibco),  $\beta$ -巯基乙醇(Amresco), 非必须氨基酸(MEM, Sigma), 白血病抑制因子(LIF, Chemicon), 丝裂霉素 C(Roche), 胰岛素(Insulin, Sigma), 干细胞因子(SCF, Bioworld), 胎牛血清(FBS, 四季青), 明胶(Sigma), 碱性磷酸酶(AKP)染色试剂(南京建成生物工程研究所), 羊抗鼠 Oct-4 抗体(San-

ta), SSEA-1 鼠单抗(R&D Systems); 驴抗羊二抗、羊抗鼠二抗均购自 Jackson 公司。

### 1.2 饲养层的制备

原代小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)取自怀孕 12.5~14.5 d 的孕鼠,用酶消化法获取 MEF。取 3 代以内生长旺盛的 MEF<sup>[7]</sup>,用含  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  丝裂霉素 C 的 H-DMEM 培养液处理 2.0~2.5 h 后,用 0.25% 胰酶消化细胞,以血球计数板计数,按试验设计将不同密度 MEF 接种于 0.1% 明胶包被的 4 孔培养板内,培养液为含 10% FBS 的 H-DMEM 培养液。使用前 2 h 更换为 ES 细胞培养液。

### 1.3 胚胎干细胞培养液

培养液 1: H-DMEM 液 + 15% KSR + 1 000 IU  $\cdot \text{mL}^{-1}$  LIF + 0.1 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$   $\beta$ -巯基乙醇 + 0.01 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  MEM + 100 IU  $\cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素 + 100 IU  $\cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素; 培养液 2: 培养液 1 + 20 ng  $\cdot \text{mL}^{-1}$  SCF, 培养液 3: 培养液 1 + 20 ng  $\cdot \text{mL}^{-1}$  SCF + 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  胰岛素。

### 1.4 昆明小鼠胚胎的获取与培养

见栓后 3.5~4.0 d 的昆明小鼠颈部脱臼处死,收集质量好的胚胎,放于接有饲养层的 4 孔板内,每孔 4~5 枚,37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 饱和湿度培养。每日观察、记录胚胎贴壁数、ICM 集落形成及传代情况。

### 1.5 胚胎干细胞的分离、传代

胚胎在饲养层上培养 5~6 d, ICM 长大呈岛状或鸟巢状,周围滋养层细胞明显展开,此时进行分离 ICM。在体视显微镜下剥去 ICM 周围的滋养层细胞,用自制的巴氏吸管将 ICM 转移到干净平皿内的 0.125% 胰酶-0.04% EDTA 消化液滴中,37  $^{\circ}\text{C}$ , 消化 3~5 min, 之后转移到含 10% FBS 的培养液中终止消化,用吸管轻轻将集落吹打分散成 5~15 个细胞的细胞团,再接种到铺有新饲养层的 4 孔板内继续培养,1 个 ICM 集落的细胞团接种 1 个孔,间隔 2 d 换液,并观察集落形态。分散的 ICM 继续培养 4~6 d, 此时出现的 ES 细胞集落记为 F1, 用离散 ICM 的方法对其分离、传代,重新接种于饲养层上,再出现的 ES 集落记为 F2, 依次类推<sup>[8]</sup>。

### 1.6 小鼠 ES 细胞的鉴定

1.6.1 形态观察 在倒置显微镜下观察昆明小鼠 ICM 集落、ES 细胞的生长行为及形态特征。将

致密、隆起、边界清晰、折光性强的细胞集落判定为 ES 细胞集落。

1.6.2 碱性磷酸酶染色 对得到的第 3 代 ES 细胞进行碱性磷酸酶染色鉴定,按试剂盒提供的方案进行操作。

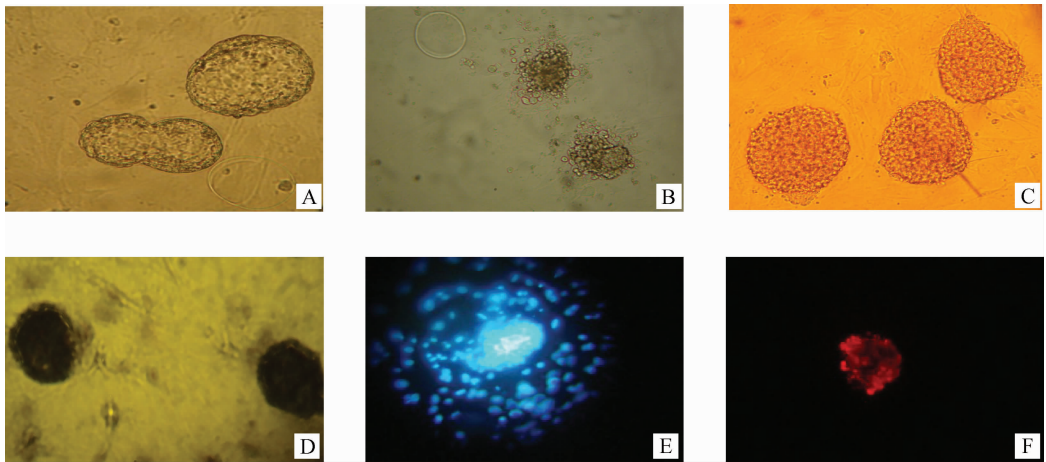
1.6.3 免疫荧光染色 将第 3 代 ES 细胞用 PBS 洗涤后,用 4% 多聚甲醛常温固定 30 min,0.2% 的 tritonx-100 常温破膜 10 min,洗涤。常温下,10% 驴(或山羊)血清封闭 30 min,加入 1:100 稀释的 Oct-4(或 SSEA-1)一抗,4℃ 过夜。洗涤,用 1:100 稀释的荧光标记二抗,37℃ 避光孵育 45 min,洗涤。加入 DAPI 进行核染 5 min,洗涤,加入

荧光衰退抑制剂。置荧光显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 昆明小鼠 ES 细胞的分离与培养

将胚胎接种到饲养层上,培养 24 h 囊胚腔扩大,有的开始脱透明带(图 1A),72 h 后大部分胚胎脱去透明带,贴在饲养层细胞上(图 1B)。贴壁的胚胎开始生长较慢,随后生长速度加快,呈克隆样生长。一般在 5~6 d 将内细胞团离散进行传代。传代后的 ES 细胞集落边界清晰,细胞形态均一(图 1C)。



A. 正孵育的囊胚;B. 贴在饲养层上的 ICM;C. F3 代 ES 细胞;D. AKP 染色的 ES 细胞;E. ES 细胞标志抗体 Oct-4 染色呈阳性;F. ES 细胞标志抗体 SSEA-1 染色呈阳性

A. Hatching blastocyst; B. Adhesion of ICM to Flask; C. The third ES clones of mouse; D. Positive staining for AKP; E. The homogeneity of ES cells was monitored by immunohistochemistry with antigens Oct-4 staining (green); F. ES cells were positive for the expression of ES cells antigen SSEA-1 (red)

图 1 昆明小鼠 ES 细胞的分离培养及生物学特性鉴定 100×

Fig. 1 The isolation, culture and identification for biological characteristics of ES cells of Kunming mouse 100×

### 2.2 不同密度 MEF 对 ES 细胞分离传代的影响

将见栓 3.5~4.0 d 的昆明小鼠胚胎,接种于密度分别为  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  和  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  的饲养层细胞上。胚胎在密度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的饲养层上的贴壁率、ICM 集落形成率及 F1、F2 代 ES 细胞集落形成率均高于其他 2 组。胚胎在密度为  $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$  的饲养层上,贴壁后生长缓慢,且传代后易分化。胚胎接种于密度为  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  的饲养层上,培养液第 2 天颜色变黄,pH 降低,饲养层易发生卷层,无法分离 ES 细胞。接种于饲养层密度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  上的胚胎培养效果最好,且最高传至第 9 代(表 1)。结果表明,饲养层密度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的饲养层有利于昆明小鼠 ES 细胞的分

离和传代。

### 2.3 胚胎发育阶段对 ES 细胞分离传代的影响

试验将桑椹胚和囊胚分别接种于密度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的饲养层细胞上,用培养液 1 进行培养,囊胚的 ICM 形成率和 F2 代 ES 细胞集落形成率均高于桑椹胚,且差异显著,最高传至第 9 代。而桑椹胚仅传至第 4 代(表 2),由此认为,囊胚有利于小鼠 ES 细胞细胞的分离和传代。

### 2.4 不同培养基对昆明小鼠 ES 细胞分离培养的影响

取见栓 4 d 的小鼠胚胎,接种于密度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的饲养层上,分别用 3 种培养液培养,胚胎在培养液 2 和 3 中贴壁时间提前(表 3),且 96 h 贴壁率均显著

高于在培养液 1 中,培养液 3 中的 F1、F2 代 ES 细胞集落形成率均显著高于培养液 1 和 2,表明在培

养液中同时添加 SCF 和胰岛素更有利于昆明小鼠 ES 细胞的分离培养。

表 1 小鼠胚胎干细胞在不同密度饲养层上的生长、传代情况

Table 1 Passages of mice ES cells cultured on different concentrations of feeder cells

MEF 密度/ (个·mL <sup>-1</sup> ) Density of MEF	胚胎数 No. of embryos	贴壁率/% Attachment rate	ICM 集落 形成率/% ICM growing rate	F1 代 ES 细胞 集落形成率/% Formation rates of 1st passage	F2 代 ES 细胞 集落形成率/% Formation rates of 2nd passage	传代数 Passage number
1×10 <sup>4</sup>	27	74.1 (20/27) <sup>a</sup>	66.7 (18/27) <sup>a</sup>	14.8 (4/27) <sup>a</sup>	11.1(3/27) <sup>a</sup>	3
1×10 <sup>5</sup>	36	83.3 (30/36) <sup>b</sup>	75.0 (27/36) <sup>b</sup>	44.4(16/36) <sup>b</sup>	25.0(9/36) <sup>b</sup>	9
1×10 <sup>6</sup>	20	80.0 (16/20) <sup>a</sup>	70.0 (14/20) <sup>a</sup>	20.0(4/20) <sup>a</sup>	10.0(2/20) <sup>a</sup>	2

同一列中不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。下同

Different letters in the same row means significant difference between treatments( $P < 0.05$ ), same letter in the same row means no significant difference between treatments( $P > 0.05$ ). The same as below

表 2 胚胎不同发育阶段对小鼠 ES 细胞分离、克隆的影响

Table 2 The effects of the phase of the embryos on the isolation and cloning of mice ES cells

胚胎发育阶段 Developmental phase of the embryos	胚胎数 No. of embryos	贴壁率/% Attachment rate	ICM 集落形成率/% ICM growing rate	F1 代 ES 细胞 集落形成率/% Formation rates of 1st passage	F2 代 ES 细胞 集落形成率/% Formation rates of 2nd passage	传代数 Passage number
囊胚 Blastocysts	34	82.4 (28/34) <sup>a</sup>	76.5 (26/34) <sup>a</sup>	44.1 (15/34) <sup>a</sup>	26.5(9/34) <sup>a</sup>	9
桑椹胚 Compacted morula	37	73.0(27/37) <sup>a</sup>	64.9 (24/37) <sup>b</sup>	32.4 (12/37) <sup>a</sup>	13.4(5/37) <sup>b</sup>	4

表 3 胚胎在不同培养液中的生长、传代情况

Table 3 Passages of mice ES cells cultured on different medium

培养液 Medium	胚胎数 No. of embryos	贴壁胚胎数 No. of attached embryos				贴壁率/% Attachment rate	ICM 集落 形成率/% ICM growing rate	F1 代 ES 细胞 集落形成率/% Formation rates of 1st passage	F2 代 ES 细胞 集落形成率/% Formation rates of 2nd passage
		24 h	48 h	72 h	96 h				
1	56	2	21	43	44	76.8(43/56) <sup>a</sup>	73.2(41/56) <sup>a</sup>	42.9(24/56) <sup>a</sup>	23.2(13/56) <sup>a</sup>
2	18	5	14	16	17	94.4(17/18) <sup>b</sup>	88.9(16/18) <sup>a</sup>	61.1(11/18) <sup>b</sup>	33.3(6/18) <sup>a</sup>
3	23	4	14	23	23	95.7(22/23) <sup>b</sup>	95.7(22/23) <sup>a</sup>	65.2(15/23) <sup>b</sup>	47.8(11/23) <sup>b</sup>

## 2.5 小鼠 ES 细胞生物学特性的鉴定

将第 3 代小鼠 ES 细胞固定后,进行小鼠 ES 细胞特异性标记的检测。结果显示:AKP 染色,小鼠 ES 细胞呈深棕色,饲养层细胞和分化细胞不着色(图 1D);ES 细胞标志抗体 Oct-4、SSEA-1 染色呈阳性(图 1E、1F)。

## 3 讨论

### 3.1 饲养层对小鼠 ES 细胞分离、克隆的影响

胚胎干细胞在饲养层上的生长对饲养层细胞的密度要求较高。饲养层细胞密度过低,分泌抑制因子不足,ES 细胞易发生分化。饲养层密度过高,在

与 ES 细胞竞争养分的同时,饲养层细胞易老化,并发生卷层现象,将 ES 细胞包裹其中,无法分离。好的饲养层应该是细胞连成一片,无间隙,死亡的细胞和杂细胞极少<sup>[9]</sup>。本试验取 12.5~14.5 d 的胎鼠,以 3 代以内细胞做饲养层,研究饲养层细胞密度分别为  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  和  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  时对小鼠 ES 细胞分离培养的影响,结果表明,饲养层密度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  时,适合小鼠 ES 细胞的分离,可以维持 ES 细胞的克隆和传代。

### 3.2 胚胎不同发育阶段对 ES 细胞的影响

从理论上讲,胎龄越小,分化程度越低,越具有发育全能性。有关胎龄对 ES 细胞培养、分离、克隆、传代和建系的影响,国外已有很多报道。H. R. Eistetter<sup>[10]</sup> 用桑椹胚来源的单个卵裂球建成 ES 系,其成功率高于囊胚,可能是由于桑椹胚处于比囊胚更早的发育阶段,有更多的细胞保持发育的全能性,而且他采用桑椹胚单个卵裂球去除了滋养层的诱导分化作用。而 D. N. Well 等用延迟囊胚建成 ES 细胞系,其建系成功率达 47.7%<sup>[11]</sup>。本试验中,囊胚的 ICM 形成率显著高于桑椹胚,可能是由于桑椹胚胎龄较小,适应力不如囊胚,因而贴壁后,囊胚内细胞团迅速增殖,而部分贴壁的桑椹胚往往不发育,易退化。囊胚的 F2 代 ES 细胞克隆形成率显著高于桑椹胚,且最高传至第 9 代,因此认为,昆明小鼠在无血清培养基中,囊胚较适合进行 ES 细胞的分离培养。

### 3.3 生长因子对小鼠 ES 细胞分离、克隆的影响

血清替代物是一种商品化的人工合成试剂,已用于人和小鼠 ES 细胞的分离培养<sup>[12-13]</sup>, T. Horii 等<sup>[14]</sup>、J. Cheng 等<sup>[15]</sup> 和 B. S. Mallon 等<sup>[12]</sup> 分别报道用 KSR 替代 FBS 更适合小鼠 ES 细胞的分离建系和维持其未分化状态,在添加 KSR 的培养液中小鼠 ES 细胞均保持了多分化潜能性和核型完整。余树民等<sup>[16]</sup> 以昆明系小鼠为材料,在培养液中用 KSR 替代 FBS,结果表明培养液中添加 KSR 更适合维持昆明系小鼠 ES 细胞的未分化状态。本试验在无血清培养基中添加 SCF,可显著提高胚胎贴壁率和 F1 代 ES 细胞集落形成率,可能是由于 LIF 和 SCF 具有相互协调,共同促进细胞增殖,同时能够抑制干细胞分化的作用。培养液中同时添加 SCF 和胰岛素,可显著提高昆明小鼠胚胎贴壁率、F1、F2 代 ES 细胞集落形成率,可能由于胰岛素可以促进 ES 细胞增殖,刺激复制前胚胎 DNA、RNA 及蛋白质合成,

对胚胎保持最佳发育速度有一定作用。T. Tsuchiya 在分类绵羊类 ES 细胞系时,只有加入胰岛素或表皮生长因子才得到了类 ES 细胞克隆,而未加生长因子则不能分离到类 ES 细胞克隆<sup>[17]</sup>。R. M. Strojek 在分离猪 ES 细胞时也证实了这一点<sup>[18]</sup>。Q. L. Ying 等认为添加胰岛素有利于 ES 细胞的长期传代<sup>[19]</sup>。本试验中,无血清培养液中单独添加 SCF 及同时添加 SCF 和胰岛素,均可使胚胎贴壁时间提前,利于 ICM 的增殖和 ES 细胞的传代。因为在进行胚胎培养时,ICM 细胞只有贴壁在饲养层上才能快速增殖,饲养层所产生的成纤维细胞生长因子往往锚定于细胞膜上,只有当 ICM 细胞与饲养层直接接触后,才能接受成纤维细胞生长因子的刺激<sup>[20]</sup>。同时,本试验的胚胎贴壁率和 ICM 形成率高于余树民等<sup>[16]</sup> 研究结果,可能是因为本试验所用胚胎均取自于小鼠自然交配,超排可能会影响小鼠胚胎的质量。而培养液中添加 SCF 的贴壁率和 ICM 形成率均低于董晓等<sup>[21]</sup> 的试验结果,原因是血清中可能含有某种利于胚胎贴壁的成份,但是血清同时也会引起 ES 细胞的分化,不利于传代。

### 3.4 小鼠 ES 细胞的鉴定

表达碱性磷酸酶是未分化 ES 细胞的重要特征之一,而 Oct-4 的表达对维持干细胞的自我更新和多能性也是必要的,最近有研究通过解析维持多能性的转录循环动力学,发现 Oct-4 和 Sox2 这 2 种蛋白能维持 ES 细胞的特性,并调控胚层的选择<sup>[22]</sup>。SSEA-1 表达在前移植期的鼠胚表面(8 细胞期)并且也发现存在于畸胎瘤干细胞表面,但不存在分化的衍生细胞中,是小鼠 ES 细胞保持未分化状态的特异标志,本试验分离得到的昆明系小鼠 ES 细胞 AKP 染色呈强阳性,且以 Oct-4、SSEA-1 为一抗的免疫荧光染色液也显示为阳性,说明所分离细胞具有小鼠 ES 细胞的典型特征。

## 4 结 论

研究在无血清培养体系下,探索了饲养层密度、胚胎发育阶段和培养液中添加不同生长因子对昆明小鼠 ES 细胞分离、培养的影响。结论如下:在无血清培养液中,选取发育至囊胚的胚胎,在饲养层细胞密度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  上,培养液中同时添加  $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  SCF 和  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  胰岛素可显著提高昆明小鼠 ES 细胞的传代效率。本研究为提高昆明系小鼠 ES 细胞建系效率提供了一定的技术方法,

也为人胚胎干细胞的培养提供了一定参考。

### 参考文献:

- [1] 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*, 1998, 95(23):13726-13731.
- [2] GEIJSSEN N, HOROSCHAK M, KIM K, et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2004, 427:148-154.
- [3] HAYASHI K, OHTA H, KURIMOTO K, et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2011, 146(19):519-532.
- [4] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(9):154-156.
- [5] RUTH K, LANA R S. 干细胞研究进展与未来[M]. 陈英, 原林译. 北京:人民卫生出版社, 2003:323-356.
- [6] 徐军, 杨春荣, 高志敏, 等. 小鼠胚胎干细胞的分离与克隆[C]//叶鑫生, 许田, 汤锡芳, 等. 干细胞和发育生物学. 北京:军事医学科学出版社, 2000:185-190.
- [7] 裴雪涛. 干细胞实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2006:54-55.
- [8] 白昌明, 刘丑生, 王志刚, 等. 不同培养体系对绵羊类胚胎干细胞分离、传代的影响[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(7):1268-1273.
- [9] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社, 2001:519.
- [10] EISTETTER H R. Pluripotent embryonal stem cell lines can be established from disaggregated mouse moulrae [J]. *Dev Grow Differ*, 1988, 31(3):275-282.
- [11] WELL D N, MCWHIR J, HOOPER M L, et al. Factors influencing the isolation of murine embryo stem cells [J]. *Theriogenology*, 1991, 35(1):293.
- [12] MALLON B S, PARK K Y, CHEN K G, et al. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(7):1063-1075.
- [13] BRYJA V, BONILLA S, CAJANEK L, et al. An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4):844-849.
- [14] HORII T, NAGAO Y, TOKUNAGA T, et al. Serum-free culture of murine embryonic primordial germ cells and embryonic stem cells [J]. *Theriogenology*, 2003, 59:1257-1264.
- [15] CHENG J, DUTRA A, TAKESONO A, et al. Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media [J]. *Genesis*, 2004, 39:100-104.
- [16] 余树民, 严兴荣, 陈冬梅, 等. 无血清分离昆明系小鼠胚胎干细胞 [J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(3):328-332.
- [17] TSUCHIYA T. Isolation of ICM-derived cell colonies from sheep blastocysts [J]. *Theriogenology*, 1994, 41:321.
- [18] STROJEK R M. A method for culturing morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts [J]. *Theriogenology*, 1990, 33(4):901-913.
- [19] YING Q L, WRAY J, NICHOLS J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal [J]. *Nature*, 2008, 453(22):519-524.
- [20] 郭志林, 王新庄, 张涌, 等. 大鼠心肌细胞条件培养基对兔胚胎干细胞分离培养效果的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2007, 35(4):1-5.
- [21] 董晓, 冯书堂, 郑行. 小鼠胚胎干细胞培养、克隆、分离、传代研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2002, 33(5):433-438.
- [22] THOMSON M, LIU S J, ZOU L N, et al. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers [J]. *Cell*, 2011, 145(6):875-889.

(编辑 郭云雁)