



兔原始生殖细胞体外培养的研究

吕海森¹, 朱邴豫¹, 彭展¹, 闫琛博¹, 杨德新¹, 胡文举², 丁雪粉¹, 王新庄^{1*}

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 郑州 450000; 2. 河南广播电视大学 农医学院, 郑州 450000)

摘要:旨在探索兔原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)体外分离培养的最佳条件,从而建立成熟稳定的兔 PGCs 体外分离培养方法。本研究首先通过两种不同的体外分离法(胰酶消化法、机械法)和 3 种不同的传代法(胰酶消化法、机械法、连同饲养层消化法)探索第 14~18 天胎兔的 PGCs 体外分离传代的最佳方式,另将培养液分为 A、B、C、D 4 组,以 D 组为对照组,探究不同细胞因子浓度对兔 PGCs 形态变化及集落形成的影响。其次,利用碱性磷酸酶染色(alkaline phosphatase staining, AKP)法对兔 PGCs 进行鉴定染色;实时荧光定量(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)检测转录因子 *Oct4* 的表达。结果表明,机械法分离得到的兔 PGCs 集落数量是酶消化法分离的 2.2 倍,而兔 PGCs 经不同的消化法传代发现,酶消化法、连同饲养层消化法、机械法在兔胚胎成纤维细胞(rabbit embryo fibroblast, REF)饲养层上分别成功传至 P2、P2、P4 代。B 组 PGCs 培养液(基础液+10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) + 2 ng · mL⁻¹ 转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1) + 4 ng · mL⁻¹ 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) + 10 ng · mL⁻¹ 白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF))所获得的集落数量最多,具有较好的集落形态,保持未分化的时间较长。AKP 染色结果显示,PGCs 集落呈红黑色;RT-PCR 结果显示,体外分离培养的兔 PGCs 表达转录因子 *Oct4*。结果显示,兔原代 PGCs 最适采用机械分离法和机械传代法进行体外分离传代,适宜浓度的细胞因子添加至兔 PGCs 培养液中有利于兔 PGCs 在体外保持较多的集落数量和较长时间的未分化状态。本研究通过筛选和优化兔 PGCs 体外培养方法,为进一步建立稳定成熟兔 PGCs 细胞系奠定技术基础。

关键词:兔;原始生殖细胞;分离方法;传代方法;细胞因子

中图分类号:S829.1

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2020)10-2443-10

Study on the Culture of Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) Primordial Germ Cells *in Vitro*

LÜ Haimiao¹, ZHU Hanyu¹, PENG Zhan¹, YAN Chenbo¹,

YANG Dexin¹, HU Wenju², DING Xuefen¹, WANG Xinzhuang^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China; 2. College of Agricultural Medicine, Henan Radio and Television University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: The purpose of the present study was to explore the optimal condition for the isolation and culture of rabbit primordial germ cells(PGCs) *in vitro*, and to establish a mature and stable method for the isolation and culture of rabbit PGCs *in vitro*. Firstly, trypsin digestion and mechanical methods were used to explore the best method for isolating PGCs from 14- to 18-day-old fetal rabbits *in vitro*, and trypsin digestion, mechanical method and digestion with the feeder layer were used to explore the optimal way to passage the isolated PGCs. Then, 4 different

收稿日期:2020-04-30

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0501800);2016 年度河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(2016GGJS-282)

作者简介:吕海森(1995-),河南南乐人,硕士生,主要从事家畜繁殖研究,E-mail: miaomiaoxiyuhuai@hotmail.com

* 通信作者:王新庄,主要从事动物细胞工程研究,E-mail: happywang169@163.com

culture media (A, B, C and D (control)) were used to explore the effect of different concentrations of cytokines on the morphological changes and colony formation of rabbit PGCs. Secondly, rabbit PGCs were identified by alkaline phosphatase staining (AKP), and the expression of transcription factor *Oct-4* was detected by real-time PCR (RT-PCR). The results showed that the number of rabbit PGCs colonies isolated by mechanical method was 2.2 times higher than those isolated by trypsin digestion method. Rabbit embryo fibroblasts (REF) were passaged to the second generation (P2) using trypsin digestion method and digestion with the feeder layer method, and REF were passaged to the fourth generation (P4) using the mechanical method. The largest number of colonies and better colony morphology were observed when PGCs were cultured in medium B (basic medium + 10% fetal bovine serum (FBS) + 2 ng · mL⁻¹ of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) + 4 ng · mL⁻¹ of basic fibroblast growth factor (bFGF) + 10 ng · mL⁻¹ leukemia inhibitory factor (LIF)). Rabbit PGCs remained undifferentiated for a longer time when cultured in medium B. AKP staining showed that the isolated PGCs was positive in red and black, and expression of *Oct-4* gene was also detected in the isolated PGCs by RT-PCR. The results showed that mechanical isolation method and mechanical passage method were the optimal ways to isolate and passage rabbit primary PGCs, respectively. Supplementation with appropriate concentration of cytokines into culture medium was beneficial for rabbit PGCs to maintain a large number of colonies and undifferentiated state for a longer time *in vitro*. In the present study, the culture methods of rabbit PGCs *in vitro* were screened and optimized, which would lay a technical foundation for the further establishment of a stable and mature rabbit PGCs cell line.

Key words: *Oryctolagus cuniculus*; primordial germ cells (PGCs); isolation methods; passage methods; cytokines

* **Corresponding author:** WANG Xinzhuang, E-mail: happywang169@163.com

原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 是哺乳动物精原细胞与卵原细胞的祖细胞, 通过减数分裂形成配子^[1-3]。PGCs 对体外研究胚胎发育、发现新基因、基因组学以及发育生物学和细胞生物学等研究有着重要意义, 因此, PGCs 作为干细胞的研究受到各国学者的广泛关注^[4-7]。Matsui 等^[8]发现, 通过在培养液中加入合适浓度的碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 和干细胞因子 (stemcellfactor, SCF), 同时在饲养层和血清存在的培养条件下, PGCs 可以重编程为胚胎生殖细胞 (embryonic germ cells, EG cells)。EG 细胞与胚胎癌细胞 (embryonal carcinoma cells, EC cells)、胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES cells) 特征相似, 都属于多能性干细胞^[8]。小鼠 PGCs 的特化、迁移、转分化和表观遗传等已经被广泛的研究, 这为小鼠生殖细胞系, 小鼠 ES 起源和其它哺乳动物的生殖细胞系研究奠定了基础^[9-12]。兔作为一个合适的动物模型, 与鼠相比,

其体积大、寿命长, 易于试验操作; 与猪、牛、猴相比, 其体积小, 采样简单, 配种方便, 易于在实验室饲养观察。研究表明, 兔的胚胎和胎儿胎盘发育与人类相似^[13], 啮齿类动物的基因序列进化得更快, 因此, 兔的基因序列比啮齿类动物的基因序列更接近于人类^[14]。目前, 兔已经被广泛地作为动脉粥样硬化^[15-16]、肠道免疫^[17]、生殖^[13]、关节炎^[18]、癌症^[19] 和阿尔茨海默病^[20] 等多种非感染性疾病的实验室模型。对兔 PGCs 的深入理解或许会为其它物种 PGCs 的研究带来启发, 如人类及其它许多濒危物种等。

在兔上, Leichthammer 等^[21] 用穿刺法分离培养兔 PGCs 并观察其体外生长特性。Lee 等^[22] 在培养液中加入细胞因子, 培养兔 PGCs, 观察其形态变化。李义书等^[23] 采用共培养方式分离克隆出了兔类胚胎生殖细胞集落, 并传至 8 代。王亚丹等^[24] 把兔 PGCs 接种于不同密度的鼠成纤维细胞、兔成纤维细胞制成的饲养层上, 探究不同种属、密度的饲养层对兔 PGCs 集落形成的影响。虽已有众多学者对 PGCs 展开研究, 但目前兔 PGCs 体外培养仍存在

效率低下、数量少等问题,兔的 PGCs 在体内分化为配子或体外转分化 EG 细胞同样缺乏系统的研究。兔 PGCs 体外分离培养的影响因素主要是胚胎的日龄、分离方法、饲养层种类、培养基、添加物等。建立成熟的兔 PGCs 体外分离培养技术仍需对其影响因素进行全面深入的探索。

本试验采用常用的两种分离方法、3 种传代方法和含不同浓度细胞因子的培养液探究兔 PGCs 体外培养的最适基本条件,通过形态学观察、AKP 染色、RT-PCR 检测八聚体结合转录因子 4(octamer-binding transcription factor-4, *Oct-4*) 的表达等方法鉴定兔 PGCs,为兔 PGCs 的建系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

家兔(*Oryctolagus Cuniculus*, 6 月龄以上),购于河南省实验动物中心。

1.2 主要试剂与仪器

细胞因子 LIF、bFGF、TGF- β 1 均购自杭州联科生物技术股份有限公司;转录因子 *Oct-4* 和内参基因 *GAPDH* 的引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。胎牛血清(FBS)、H-DMEM 培养基购自 Gibco 公司;胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司。

HF151UV 型 CO₂ 培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司,中国);荧光倒置显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司,中国);Real-time PCR 扩增仪(Eppendorf 公司,德国);电泳凝胶成像分析系统(UVP 公司,美国)。

1.3 REF 的分离培养与饲养层的制备

取妊娠第 14~18 天的胎兔,按照王亚丹等^[24]兔胚胎成纤维细胞(rabbit embryo fibroblast, REF)培养和制备饲养层的方法分离得到 REF,取 P3 代生长旺盛的 REF,丝裂霉素 C 作用 2 h,胰蛋白酶消化离心后重悬细胞,提前将 12 孔板用明胶包被,并将细胞悬液接种其中,完成饲养层的制备。将 PGCs 接种于饲养层前 1~2 h 更换为兔 PGCs 培养液。

1.4 酶消化法和机械法两种不同分离方法对兔 PGCs 的影响

取妊娠第 14~18 天孕兔子宫,PBS 缓冲液冲洗后转入无菌操作台中,进行无菌操作。在解剖镜下用眼科镊分离出生殖嵴,PBS 液冲洗 5 次。分别用两种方法分离兔 PGCs:1)酶消化法:用眼科镊将剥离好的生殖嵴于离心管中磨碎,加入 4 mL 0.25%

胰蛋白酶(含 0.04% EDTA)消化液,37 °C 水浴消化 10 min 左右,5 min 混匀一次。加 4 mL 培养液结束消化,吹打均匀后静置 2 min,200 目滤纱过滤,取滤液,1 600 r·min⁻¹ 离心 8 min,重悬后,接种到 REF 制备的饲养层上。2)机械法:用眼科镊将生殖嵴于离心管中研磨至均匀的粘稠状,加培养液,离心,重悬后,接种至提前制备好的饲养层上培养。最后放入 37 °C,5% 的 CO₂ 培养箱中培养。

1.5 不同传代方法对兔 PGCs 的影响

兔 PGCs 集落分别采用以下 3 种方法传代:1)酶消化法:在解剖镜下,用玻璃细针将生长状态良好的 PGCs 集落挑出,置于 0.25% 胰蛋白酶(含 0.04% EDTA)的消化液中作用 2 min 左右后,加入含有胎牛血清的培养液结束消化,于离心机中 1 500 r·min⁻¹ 离心 6 min,弃上清,加入 1 mL 培养液,重悬,接种到另一新制备的饲养层上传代培养。2)机械法:在无菌室中,于解剖镜下,挑选生长状态良好的兔 PGCs 集落,用玻璃细针轻轻将其从饲养层上剥离,置于新的 10 mL 离心管中,用量程为 1 mL 的移液枪轻轻吹打直至集落离散为小细胞团块和单个细胞,于离心机中 1 500 r·min⁻¹ 离心 6 min,重悬,接种到另一新制备的饲养层上继续培养,完成机械法传代。3)连同饲养层消化法:PBS 缓冲液清洗 2 遍细胞,0.25% 胰蛋白酶(0.04% EDTA)消化液作用 2~3 min,2 mL 培养液结束消化,1 600 r·min⁻¹ 离心 6 min,重悬后,接种到新制备的饲养层上继续培养。

1.6 兔 PGCs 的鉴定

1.6.1 形态学鉴定 将 PGCs 体外分离后,接种于 REF 饲养层上,倒置显微镜下观察,以 12 h 为间隔拍照,记录 PGCs 细胞形态的变化。

1.6.2 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase staining, AKP)染色鉴定 已知 PGCs 在 AKP 的检测中呈阳性(红黑色),已分化的细胞则呈阴性(淡黄色、无颜色)。因此,以饲养层细胞作为阴性对照,弃掉培养液,用 PBS 缓冲液清洗 2 遍细胞。按 AKP 染色试剂盒说明书进行染色鉴定。

1.6.3 RT-PCR 鉴定 用自制玻璃细针挑取未分化的 PGCs 集落,PBS 液清洗 2 遍后,Trizol 法提取总 RNA,反转录成 cDNA,通过 RT-PCR 检测 *Oct-4* 的表达。反应体系:Mix 12.5 μ L,上、下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L,总体积为 25 μ L。所用引物及序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 The primers sequence

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	片段长度/bp Fragment size
<i>Oct-4</i> (AJ251914)	F: GATCAAGCAGTGACTATTCGCA R: AGGCACCTCAGTTTGAATGCATG	231
<i>GAPDH</i>	F: GGAGCCAAACGGGTCATCATCTC R: GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT	233

1.7 细胞因子对兔 PGCs 分离培养的影响

将培养液分为 A、B、C、D 4 组,以 D 组为对照组,探究不同细胞因子浓度对兔 PGCs 的影响,兔 PGCs 基础培养液为:高糖 90% DMEM、1%

NaHCO₃、1% 双抗、1% NEAA、1% L-谷氨酰胺、0.1 mmol·L⁻¹ β-巯乙醇。各组细胞因子浓度见表 2。

表 2 细胞因子浓度

Table 2 Cytokines concentration

试验分组 Test group	基础培养液 Basic medium	胎牛血清/% FBS	白血病抑制因子/ (ng·mL ⁻¹) LIF	碱性成纤维 细胞生长因子/ (ng·mL ⁻¹) bFGF	转化生长因子-β1/ (ng·mL ⁻¹) TGF-β1
A	+	10	5	2	1
B	+	10	10	4	2
C	+	10	15	6	3
D	+	0	0	0	0

1.8 统计学分析

用“平均值±标准差”来表示所得试验数据,运用 SPSS Statistics 19.0 统计学软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),图片绘制处理采用 GraphPad Prism 5。

2 结果

2.1 REF 的生物学特性

刚接种的原代 REF 呈圆形,3 h 后细胞开始逐渐贴壁,贴壁的细胞呈长梭形,16 h 左右细胞开始增殖。P0 代中杂细胞较多,随着传代次数的增多,REF 的纯度增加,同时细胞之间出现揉合状。传代后的细胞贴壁增殖较快,2 d 左右可以长满培养瓶底部。P1~P3 代的 REF 增殖速度较快,且细胞纯度较高。随着代数的增高,细胞活力下降(图 1)。

2.2 兔 PGCs 生长行为观察

在无菌室中,倒置显微镜下每隔 12 h 观察所分

离培养的兔 PGCs。发现在饲养层上培养 24~48 h 后开始出现兔 PGCs 集落,集落由小变大,突出于饲养层生长,PGCs 互相吸引、聚集、分裂增殖,集落呈鸟巢状,集落中细胞排列紧密,集落边缘清晰,立体感强。分化的兔 PGCs 集落呈扁平状铺开,不再突出于饲养层生长,立体感弱,并混有成纤维样、上皮样、神经样等细胞(图 2)。

2.3 AKP 染色鉴定兔 PGCs

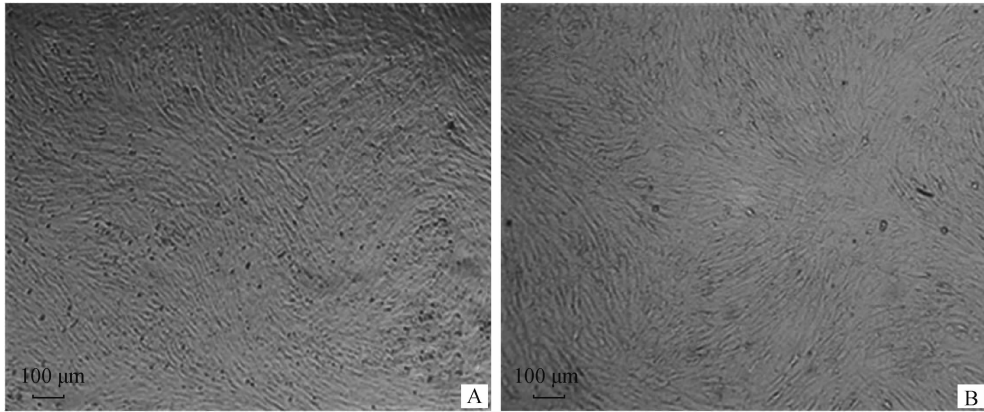
AKP 染色结果提示了胚胎性干细胞的多能性潜能,未分化的细胞胞质内含有活性较高的碱性磷酸酶,而在已分化细胞中活性低。因此,对体外培养未发生分化的 PGCs 集落进行 AKP 染色,为红黑色,呈阳性(图 3),已分化细胞为未着色或淡黄色,呈阴性。

2.4 RT-PCR 检测兔 PGCs 集落中转录因子 *Oct-4* 的表达

转录因子 *Oct-4* 被视为多能性干细胞特异性表

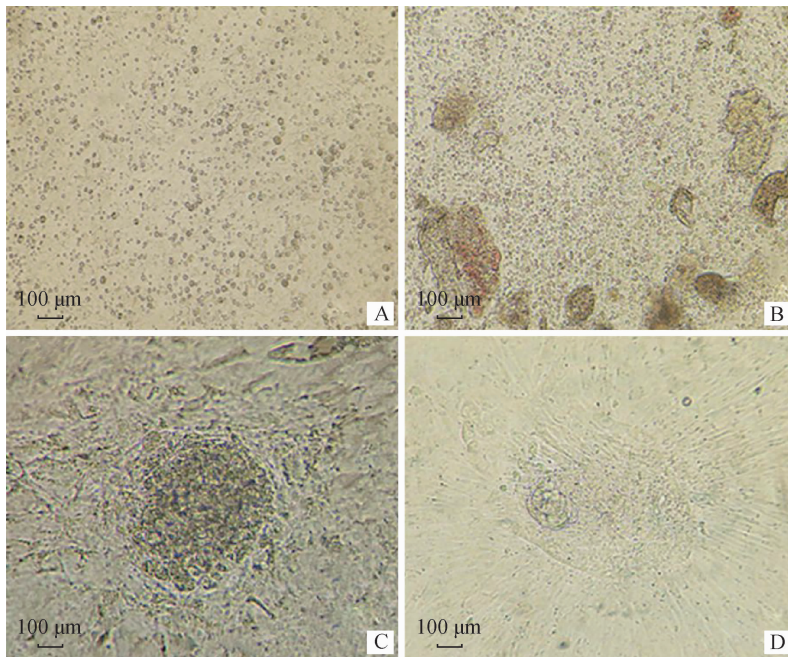
达的多能性标志基因。因此,可通过 RT-PCR 法检测兔 PGCs 集落中转录因子 *Oct-4* 的表达,从而进一步在分子角度对 PGCs 进行鉴定。结果如图 4 所

示,1 号泳道为 *Oct-4* PCR 扩增产物,2 号泳道为阴性对照,3 号泳道为内参基因 *GAPDH* 扩增产物。



A. P1 代兔胚胎成纤维细胞; B. P3 代兔胚胎成纤维细胞
A. P1 REF; B. P3 REF

图 1 兔胚胎成纤维细胞形态
Fig. 1 The morphology of REF



A. 胰酶消化法刚接种 0 h 的兔 PGCs; B. 机械法分离刚接种 0 h 的兔 PGCs; C. 兔 PGCs P0 代集落; D. 传代后将要发生分化的细胞集落

A. PGCs of rabbits inoculated with trypsin digestion for 0 h; B. PGCs of rabbits inoculated with mechanical isolation for 0 h; C. Colonies of PGCs in the initial generation in rabbit; D. The colonies of PGCs that will differentiate after passage

图 2 兔 PGCs 形态观察

Fig. 2 The morphology of rabbit PGCs

2.5 胰酶消化法和机械法两种不同分离方法对兔 PGCs 体外培养的影响

将兔生殖嵴经胰酶消化法和机械法两种不同

分离方法处理后,分别接种至密度为 6×10^4 REF 饲养层上,机械法得到的兔 PGCs 集落数量是胰酶消化法的 2.2 倍,且差异极显著 ($P < 0.01$, 表 3)。

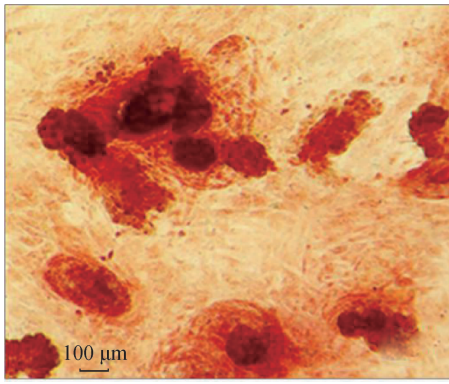


图 3 AKP 染色阳性
Fig. 3 AKP staining positive

2.6 不同传代方法对兔 PGCs 体外培养的影响

P0 代兔 PGCs 集落分别通过胰酶消化法、机械法、连同饲养层消化法进行传代培养比较。结果显示, P1 和 P2 代时机械法得到的 PGCs 集落数量多于其他两种传代方法, 而且机械法可以将 PGCs 传至

表 3 不同分离方法对兔 PGCs 集落个数影响

Table 3 Effects of different isolation methods on the number of rabbit PGCs colonies

分离方法 Isolation method	胰酶消化法 Trypsin digestion	机械法 Mechanical method
生殖嵴数/个 Number of genital warts	60	60
集落数/个(%) Number of colonies	10.33 ± 1.53 (16.67) ^a	22.33 ± 2.08 (36.67) ^b

同行肩标相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 同行肩标不同字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。表 4 同

In the same row, the same letter indicates no significant difference ($P > 0.05$), different letters indicate extremely significant differences ($P < 0.01$). The same as Table 4

表 4 不同传代方法对兔 PGCs 集落数量的影响

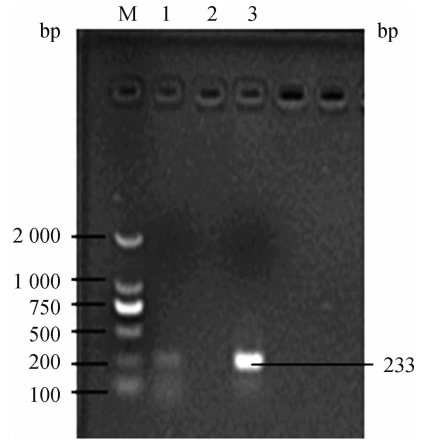
Table 4 Effects of different passage methods on the number of rabbit PGCs colonies

代次 Passage	传代情况/个(%) Passage on different feeder layers		
	胰酶消化法 Trypsin digestion	机械法 Mechanical method	连同饲养层消化法 Digestion with the feeder layer
P0	30	30	30
P1	7.65 ± 1.61 (23.3) ^a	22.12 ± 2.01 (73.3) ^b	16.33 ± 1.28 (53.3) ^c
P2	3.21 ± 1.23 (10.0) ^a	16.17 ± 1.52 (53.3) ^b	2.42 ± 0.47 (7.0) ^c
P3	0 ^a	10.11 ± 1.96 (33.3) ^b	0 ^a
P4	0 ^a	4.01 ± 0.17 (13.3) ^b	0 ^a

P0. 起始代; P1. 第一代; P2. 第二代; P3. 第三代; P4. 第四代

P0. Initial generation; P1. Passage 1; P2. Passage 2; P3. Passage 3; P4. Passage 4

P4 代, 而其它两种方法只能将其传至 P2 代 (表 4)。



M. DNA 相对分子质量标准; 1. *Oct-4* 扩增产物; 2. 阴性对照; 3. *GAPDH* 扩增产物

M. DNA marker DL2000; 1. Fragment of *Oct-4*; 2. Negative control; 3. Fragment of *GAPDH*

图 4 *Oct-4*、*GAPDH* 基因片段 RT-PCR 扩增结果

Fig. 4 RT-PCR amplification results of *Oct-4* and *GAPDH*

2.7 不同浓度细胞因子对兔 PGCs 体外培养的影响

分别用 A、B、C、D 4 组培养液体外培养兔 PGCs, 每组重复 3 个孔。结果显示(表 5), 其中 B 组和 C 组集落的个数差异不显著, B 组的集落个数

显著大于 A 组和 D 组(对照组)。A、B、C 3 组的集落个数都显著大于 D 组。

B 组的集落分化时间为 296 h, 显著大于 A、C、D 3 组, A、B、C 3 组的集落分化时间显著大于 D 组(表 5)。

表 5 不同培养液对兔 PGCs 形成集落的影响

Table 5 Effect of different culture media on rabbit PGCs colonies formation

项目 Item	培养液组 Culture medium group			
	A	B	C	D
生殖嵴数/个 Number of genital warts	24	24	24	24
集落个数/个 Number of colonies	13.22±0.82 ^a	22.96±0.58 ^b	20.03±1.29 ^b	7.33±0.58 ^c
集落分化时间/h Colony differentiation time	224.19±5.66 ^A	296.11±11.31 ^B	276.50±9.80 ^C	200.05±5.66 ^D

同行肩标相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)

In the same row, the same lowercase letter shows no significant difference ($P>0.05$), different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$), different uppercase letters indicate extremely significant differences ($P<0.01$)

3 讨论

PGCs 体外分离培养体系的建立有望实现体外对 PGCs 进行基因编辑, 诱导形成成熟卵子或精子, 这将对生物科学和医学产生深远的影响。PGCs 体外分离方法主要有胰酶消化法和机械法。黄奔等^[25]比较了机械法和胰酶消化法对水牛原始生殖细胞分离培养的影响, 结果表明, 机械法分离更适于水牛 PGCs 的体外分离培养。本试验结果显示, 机械法同样适用于分离兔 PGCs。相关研究表明, 胰酶分离牛 ES 细胞过程中可能导致 ES 细胞的破坏及其自我更新途径改变从而引起 ES 细胞的自我分化^[26-27]。另一种原因可能是, 利用胰酶消化生殖嵴, 虽然可以将组织块消化为均匀的细胞悬液, 但胰酶会降低兔 PGCs 的活力, 延长 PGCs 聚集成多克隆细胞的时间。PGCs 集落的传代方法主要有机械法、胰酶消化法、连同饲养层消化法。郭志林等^[28]比较了传统传代方法(机械法+胰酶消化法)和连同饲养层消化法对小鼠 PGCs 体外培养的影响, 结果表明, 传统传代法更有利于小鼠 PGCs 的聚集和增殖。本研究结果显示, 采用机械法消化兔 PGCs 集落, 可以将 PGCs 传至 P4 代, 而其它两种方法只能

传至 P2 代。可能是由于机械法能避免胰酶对细胞活性的破坏, 减少兔 PGCs 聚集成多克隆细胞的时间, 延长多克隆细胞保持多能性的时间。胰酶消化法虽然能快速地将兔 PGCs 集落消化成均匀的细胞悬液, 但是对细胞活性的破坏也较大, PGCs 聚集成多克隆细胞的时间也将增加, 且细胞容易分化。而连同饲养层消化法, 虽然操作简便, 但 PGCs 集落不纯, 杂细胞含量多, 聚集成多克隆细胞的时间随之增加。陈永珍等^[29]和刘善荣等^[30]通过对比机械法、酶消化法以及机械法结合酶消化法 3 种传代方法对人 EG 细胞分离培养的影响, 发现酶消化法要优于后两种消化方法, 这与本研究结果有所不同。推测原因可能是, 在采用机械消化方法的时候, 本研究用玻璃细针将生长状态良好的兔 PGCs 集落从饲养层上挑出后, 并将 PGCs 移至 10 mL 离心管中, 用量程为 1 mL 移液枪吹打数下, 目的是使 PGCs 集落离散为小细胞团块甚至是更小的单个细胞, 离心、重悬, 接种到新制备的饲养层上继续培养; 而陈永珍等^[29]是将 PGCs 集落挑出后, 直接转移到新制作的饲养层上培养。由于 PGCs 在体外形成的是多细胞克隆, 这可能造成多个细胞仍聚集在一起, 没有完全分散开, 导致增殖速度变慢, 甚至可能会抑制其

生长。

细胞因子作为细胞在生物体内作用的主要中间物质,可调控细胞分化、增殖并指导细胞发挥特异功能^[12]。在培养液中添加特定的细胞因子是为了营造与体内细胞相似的生存环境,同时研究细胞因子联合使用时的量效关系,对优化细胞体外培养条件至关重要。LIF 在维持 PGCs 体外长期培养和抑制其未分化状态方面具有重要作用^[11, 31]。研究发现,PGCs 培养液中的 LIF 发挥作用是直接作用于 PGCs,而不依赖于饲养层细胞^[32-33]。FGF 发挥生物学效应通过自分泌或旁分泌激活酪氨酸激酶成纤维细胞因子受体^[34]。bFGF 通过激活 PI3K/AKT 信号通路可以促进猪和水牛 PGCs 重编程为 EG 细胞^[35-36]。Matsui 等^[8]的研究表明,小鼠 PGCs 体外培养的细胞因子浓度是 $10 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LIF (hLIF) + $10 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ bFGF + $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ SCF 的培养液。Resnick 等^[37]在长期培养小鼠 PGCs,并建立其 ES 细胞系过程中发现,LIF 和 bFGF 的最适添加浓度分别为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)通常抑制正常细胞的增殖并刺激其分化,因此可以起到抑制肿瘤的作用^[38-39]。TGF- β 超家族还参与调控免疫系统、机体胚胎发育、组织再生等众多生理过程^[40-41]。文献报道,TGF- β 1 在鸡 PGCs 体外培养增殖过程中是不可或缺的^[17]。本研究首次在兔 PGCs 培养液中添加 TGF- β 1,探究 LIF、bFGF、TGF- β 1 联合使用时的最佳搭配浓度,为针对 PGCs 更深入的研究奠定基础。本研究中,兔 PGCs 培养液为:基础液 + 10% FBS + $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LIF + $4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ bFGF + $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- β 1 时其聚集成多克隆细胞的数量较多,保持未分化的时间较长。不同的细胞因子间相互影响,不同细胞因子浓度对 PGCs 的体外培养也会产生影响。细胞因子发挥作用是通过与相应的靶细胞膜受体结合。当细胞膜外环境中细胞因子浓度相对较低,能与 PGCs 受体有效结合的细胞因子有限时,胞内与增殖相关的通路不能被激活。相反,当细胞因子浓度相对过高时,相应膜受体结合细胞因子处于饱和状态。当配体与受体完全结合后,细胞因子效能并不会随细胞因子浓度增加而增加。

在接下来的试验中,我们将继续优化兔 PGCs 的体外培养条件,早日建立成熟的兔 PGCs 体外分离技术,为畜牧产业领域中经济动物的优质培育乃至生命科学生殖生育研究奠定基础。

4 结 论

本研究中,在第 14~18 天的胎兔胚胎中均可分离培养出 PGCs;机械法分离原代兔 PGCs 形成的集落数量要多于胰酶消化法,机械法为较合适的兔 PGCs 分离方法;机械法传代兔 PGCs 集落数量要显著大于胰酶消化法和连同饲养层消化法,且代数也高于后两种传代方法,机械法为较合适的兔 PGCs 传代方法;兔 PGCs 在培养液 B(基础液 + 10% FBS + $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LIF + $4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ bFGF + $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- β 1)中形成的集落数量较多,且保持未分化的时间较长,为最佳的兔 PGCs 体外培养环境。

参考文献(References):

- [1] SAITOU M, MIYAUCHI H. Gametogenesis from pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6): 721-735.
- [2] TAN H H, TEE W W. Committing the primordial germ cell; An updated molecular perspective [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2019, 11(1): e1436.
- [3] TANG W W C, KOBAYASHI T, IRIE N, et al. Specification and epigenetic programming of the human germ line [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(10): 585-600.
- [4] BLITZ I L. Primordial germ cell transplantation for CRISPR/Cas9-based leapfrogging in *Xenopus* [J]. *J Vis Exp*, 2018(132): 56035.
- [5] GROSS-THEBING T, YIGIT S, PFEIFFER J, et al. The vertebrate protein dead end maintains primordial germ cell fate by inhibiting somatic differentiation [J]. *Dev Cell*, 2017, 43(6): 704-715. e5.
- [6] OHTA H, KURIMOTO K, OKAMOTO I, et al. *In vitro* expansion of mouse primordial germ cell-like cells recapitulates an epigenetic blank slate [J]. *EMBO J*, 2017, 36(13): 1888-1907.
- [7] JIANG Z Q, WU H Y, TIAN J, et al. Targeting lentiviral vectors to primordial germ cells (PGCs): An efficient strategy for generating transgenic chickens [J]. *Zool Res*, 2020, 41(3): 281-291.
- [8] MATSUI Y, ZSEBO K, HOGAN B L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture [J]. *Cell*, 1992, 70(5): 841-847.

- [9] HYLDIG S M W, OSTRUP O, VEJLSTED M, et al. Changes of DNA methylation level and spatial arrangement of primordial germ cells in embryonic day 15 to embryonic day 28 pig embryos[J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(6):1087-1093.
- [10] TODARO F, CAMPOLO F, BARRIOS F, et al. Regulation of kit expression in early mouse embryos and ES cells[J]. *Stem Cells*, 2019, 37(3):332-344.
- [11] DE FELICI M, DOLCI S, PESCE M. Cellular and molecular aspects of mouse primordial germ cell migration and proliferation in culture[J]. *Int J Dev Biol*, 1992, 36(2):205-213.
- [12] LI C P, LAI W Y, WANG H L. An alternative culture method to maintain genomic hypomethylation of mouse embryonic stem cells using MEK inhibitor PD0325901 and vitamin C[J]. *J Vis Exp*, 2018(136):56391.
- [13] FISCHER B, CHAVATTE-PALMER P, VIEBAHN C, et al. Rabbit as a reproductive model for human health[J]. *Reproduction*, 2012, 144(1):1-10.
- [14] GRAUR D, DURET L, GOUY M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies)[J]. *Nature*, 1996, 379(6563):333-335.
- [15] FAN J L, KITAJIMA S, WATANABE T, et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 146:104-119.
- [16] TIAN J W, HU S N, SUN Y L, et al. A novel model of atherosclerosis in rabbits using injury to arterial walls induced by ferric chloride as evaluated by optical coherence tomography as well as intravascular ultrasound and histology[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012:121867.
- [17] JIMÉNEZ-GARCÍA A, BALONGO-GARCÍA R, ALCONERO F F, et al. Intestinal wall damage in simple ileus in rabbits; immune-modulator role of somatostatin[J]. *Hepatogastroenterology*, 2004, 51(58):1030-1036.
- [18] DESANDO G, CAVALLO C, SARTONI F, et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model[J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(1):R22.
- [19] KANG S J, GROSSNIKLAUS H E. Rabbit model of retinoblastoma [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:394730.
- [20] WOODRUFF-PAK D S, AGELAN A, DEL VALLE L. A rabbit model of Alzheimer's disease; valid at neuropathological, cognitive, and therapeutic levels [J]. *J Alzheimers Dis*, 2007, 11(3):371-383.
- [21] LEICHTHAMMER F, BAUNACK E, BREM G. Behavior of living primordial germ cells of livestock *in vitro*[J]. *Theriogenology*, 1990, 33(6):1221-1230.
- [22] LEE C K, SCALES N, NEWTON G, et al. Isolation and initial characterization of primordial germ cell (PGC)-derived cells from goat, rabbit and rats[J]. *Theriogenology*, 1998, 49(1):388.
- [23] 李义书, 王新庄, 冯勋伟, 等. 不同饲养层对兔原始生殖细胞传代培养的影响[J]. *西北农业学报*, 2008, 17(3):37-41.
- LI Y S, WANG X Z, FENG X W, et al. Effect of different feeder layers on subculture of rabbit primordial germ cells[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2008, 17(3):37-41. (in Chinese)
- [24] 王亚丹, 虎 啸, 丁雪粉, 等. 饲养层种类及密度对体外培养兔原始生殖细胞的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(8):1384-1391.
- WANG Y D, HU X, DING X F, et al. Effects of feeder layer type and density on culturing rabbit (*Leporidae*) primordial germ cells *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2018, 40(8):1384-1391. (in Chinese)
- [25] 黄 奔, 李 童, 石德顺, 等. 不同影响因素对水牛原始生殖细胞分离培养的影响[J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(5):592-595.
- HUANG B, LI T, SHI D S, et al. Influence of different factor on the isolation and culture of the buffalo PGCs [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2008, 28(5):592-595. (in Chinese)
- [26] MITALIPOVA M, BEYHAN Z, FIRST N L. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos [J]. *Cloning*, 2001, 3(2):59-67.
- [27] WANG L, DUAN E K, SUNG L Y, et al. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos[J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(1):149-155.
- [28] 郭志林, 王新庄, 张 涌, 等. 从原始生殖细胞分离昆明小鼠 EG 细胞及其传代培养[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(5):688-691.
- GUO Z L, WANG X Z, ZHANG Y, et al. Isolation of Kunming mice embryonic germ cells derived from primordial germ cells and their passage culture[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(5):

- 688-691. (in Chinese)
- [29] 陈永珍,张 苏,朱 旻,等. 人胚胎生殖细胞的传代培养[J]. 江苏医药,2007,33(4):330-332.
CHEN Y Z, ZHANG S, ZHU M, et al. Passage culture of human embryonic germ cells[J]. *Jiangsu Medical Journal*, 2007, 33(4): 330-332. (in Chinese)
- [30] 刘善荣,刘厚奇,汤淑萍,等. 人胚胎生殖系细胞分离与体外培养的初步研究[J]. 第二军医大学学报, 2003,24(9):941-943.
LIU S R, LIU H Q, TANG S P, et al. Isolation and cultivation of human embryonic germ cells [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*,2003,24(9):941-943. (in Chinese)
- [31] KOSHIMIZU U, TAGA T, WATANABE M, et al. Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells *in vitro* and derivation of embryonic germ (EG) cells[J]. *Development*,1996,122(4):1235-1242.
- [32] MOLYNEAUX K A, SCHAIBLE K, WYLIE C. GP130, the shared receptor for the LIF/IL6 cytokine family in the mouse, is not required for early germ cell differentiation, but is required cell-autonomously in oocytes for ovulation [J]. *Development*, 2003, 130(18):4287-4294.
- [33] SATOH R, BANDO H, SAKAI N, et al. Function of leukaemia inhibitory factor in spermatogenesis of a teleost fish, the medaka *Oryzias latipes* [J]. *Zygote*, 2019,27(6):423-431.
- [34] SZEBENYI G, FALLON J F. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors [J]. *Int Rev Cytol*, 1999,185:45-106.
- [35] ZHANG Y, MA J, LI H, et al. bFGF signaling-mediated reprogramming of porcine primordial germ cells[J]. *Cell Tissue Res*,2016,364(2):429-441.
- [36] WANG C Z, DENG Y F, CHEN F, et al. Basic fibroblast growth factor is critical to reprogramming buffalo (*Bubalus bubalis*) primordial germ cells into embryonic germ stem cell-like cells[J]. *Theriogenology*, 2017, 91:112-120.
- [37] RESNICK J L, BIXLER L S, CHENG L Z, et al. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture [J]. *Nature*, 1992, 359 (6395): 550-551.
- [38] GU S C, FENG X H. TGF- β signaling in cancer[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*,2018,50(10): 941-949.
- [39] MASSAGUÉ J. TGF β signalling in context[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2012,13(10):616-630.
- [40] DAVID C J, MASSAGUÉ J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2018,19(7):419-435.
- [41] LIU C, PENG G D, JING N H. TGF- β signaling pathway in early mouse development and embryonic stem cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018,50(1):68-73.

(编辑 郭云雁)