

# 猪多能干细胞的分离、鉴定与应用前景

芮荣

(南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

**摘要:** 多能干细胞来源于着床前的囊胚内细胞团或早期胎儿的原生殖细胞, 具有分化为多种特定细胞类型的能力; 可在体外适宜培养条件下无限增殖并保持未分化状态, 并且具有正常的核型。本文重点讨论猪多能干细胞分离建系的研究现状及其应用前景, 并对嵌合体形成及生殖系传递能力的实验进展情况进行了分析。

**关键词:** 多能干细胞; 分离; 嵌合体; 生殖系传递; 猪

多能干细胞 (pluripotent stem cells) 包括胚胎干细胞 (ES) 和胚胎生殖细胞 (EG) 两类, 分别由囊胚内细胞团 (ICM) 和原生殖细胞 (PGC) 分离获得。两者除来源不同外, 在形态学、生物化学、免疫学和发育潜能等方面都具有相似的特征, 包括其多能性及形成嵌合体的能力<sup>[1, 2]</sup>。ES细胞具有分化为多种特定细胞类型的能力, 可在体外适宜培养条件下无限增殖并保持未分化状态, 并且具有正常的核型; ES细胞表面含有丰富的碱性磷酸酶 (AP) 和阶段特异性胚胎抗原 (SSEA), SSEA是一类寡糖和蛋白质或脂类相结合形成的糖蛋白或糖脂, 存在于细胞的表面, 与细胞间粘连、相互识别及细胞迁移等功能有关。SSEA已发现有SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4等多种, SSEA-1在猪多能干细胞的表达已被确认, 但SSEA-3和SSEA-4的表达可能存在种间或品种间差异。ES细胞还具有高度表达的Oct-4基因和高活性端粒酶的存在。这些特征都是用来鉴定干细胞多能性的标志。在猪上, ES细胞建系的难度较大、成功率较低。1997年, Shim等首次成功建立了猪EG细胞系<sup>[3]</sup>, 引起了科学工作者的重视。猪多能干细胞的分离建系不仅为猪的基因改造, 也为进一步开展多能干细胞发育及分化机理的研究提供了有力的手段, 在组织器官的修复及干细胞治疗等方面具有潜在的应用价值。

## 1 国内外研究进展

ES细胞是从附植前的胚胎分离的未分化多能细胞。这些细胞最先由Evans和Kaufman及Martin分别从小鼠上成功分离, 此后, 用培养小鼠ES细胞的方法, 在多种哺乳类和人类相继分离出或多或少具有多能细胞典型特征的细胞<sup>[4]</sup>。但总体上说, 在小鼠以外的其他动物, ES细胞建系进展缓慢。1992年, Matsui等和Resnick等添加生长因子 (如LIF、SCF和bFGF) 培养小鼠PGC, 各自分离到多能干细胞, 即EG细胞<sup>[5, 6]</sup>, 其多能性及生殖系嵌合能力后来又被Stewart等和Labosky等所证明<sup>[1, 2]</sup>。1994年, Cherny和Merei报道了牛EG细胞的分离<sup>[7]</sup>。Shim等通过对猪PGC的长期培养, 成功分离出猪EG细胞<sup>[3]</sup>。由于PGC的数量优势 (1只25日龄猪胚可获得约15,000个PGC), 对PGC的分离培养, 大大提高了多能干细胞的建系效率<sup>[8]</sup>。

1.1 猪ES细胞分离 1994年, Wheeler报道从猪囊胚分离出ES细胞<sup>[9]</sup>。他所用的培养方法与小鼠ES细胞相同, 得到的猪ES细胞可形成囊状胚体, 含有外胚层、内胚层和中胚层细胞类型。用维甲酸 (RA) 或二甲亚砜 (DMSO) 处理后, 猪ES细胞分化为成纤维细胞、脂肪细胞、表皮细胞、神经元和肌细胞。此外, 将猪ES细胞注入桑椹胚或囊胚后, 获得嵌合体仔猪。梅山猪 (黑毛) ES细胞注入杜洛克 (红毛) 胚胎后, 嵌合体仔猪生出黑毛。在此后的数年中, 猪ES细胞的研究进展不大。直到1999年, Chen等用猪ES细胞作供体核, 产生的克隆重构胚发育至囊胚<sup>[10]</sup>, 但迄今为止尚未见其后续报道。在国内, Li等报道, 猪ES细胞的分离不仅可用小鼠胚胎成纤维细胞, 也可用猪胚胎成纤维细胞作饲养层, 所分离的类ES细胞具有多能性

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30270958) 和江苏省自然科学基金 (BK2002108) 提供资助。

**作者简介:** 芮荣, 教授、博士, 研究方向为动物生殖生物学与生殖疾病控制; E-mail: rrui@njau.edu.cn。

[11]。

1.2 猪EG细胞分离 PGC最早于原条尾部形成，后随原条细胞内卷而到达尿囊附近的卵黄囊背侧内胚层，接着PGC以阿米巴运动，沿胚胎后肠和肠系膜迁移到中肾腹侧的生殖嵴内，并最终在此形成配子。以AP染色检查细胞的AP活性，可对PGC进行鉴定。将PGC源性细胞注入囊胚腔内，这些细胞可掺入到囊胚ICM。由于EG细胞特性与ES细胞高度相似，PGC为多能干细胞的分离提供了一个替代来源。自Shim等成功分离猪EG细胞以来，猪EG细胞的分离培养及用于转基因和嵌合体生产的报道较多<sup>[3, 4, 8, 12-15]</sup>。猪EG细胞的研究虽起步比ES细胞晚，但大有后来居上之势。

## 2 猪多能干细胞建系技术简述

猪多能干细胞建系的要点主要包括原代细胞的分离培养、继代培养和细胞鉴定等环节。

2.1 原代培养 对ES细胞来说，可用两种方法获得ICM。一是机械法，用细针在显微镜下对猪扩张囊胚进行解剖分离；二是免疫手术法，将扩张囊胚洗2~3次后置于1:8稀释的兔抗猪脾细胞抗血清中（用前56℃灭活30min），37℃条件下孵育45min，洗2~3次后再放入1:8稀释的新鲜豚鼠血清内孵育30min，轻轻吹打经过处理的囊胚即可去除裂解的滋养层细胞，得到ICM。

对EG细胞来说，猪PGC是从妊娠24、25d左右的猪胚分离获得的。此期的PGC已迁移至生殖嵴定居，其生殖嵴位于中肾腹侧。分离的生殖嵴用PBS洗1~2次后，移入0.02%EDTA溶液中于室温下放置20min；撕开生殖嵴，使PGC释出，回收PGC用于原代培养。作者已报道采集22~28d猪胚生殖嵴分离EG细胞均获成功<sup>[4]</sup>。

就培养方法而论，无论是ES细胞还是EG细胞，原代培养的方法大体相同。一般在96孔板上进行，其上预先铺有用10 $\mu$ M丝裂霉素C在37℃失活2h的小鼠胎儿成纤维细胞（STO细胞）。经失活处理的STO细胞按5 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞/孔做成饲养层后，本身已失去增殖能力，但可支持干细胞在其上的生长发育。猪ES和EG细胞培养基均可用含15%胎牛血清（FBS）的DMEM（Dubbecco's Modified Eagle's Medium），内添加1mM谷氨酰胺、0.1mM MEM非必需氨基酸、10 $\mu$ M  $\beta$ -巯基乙醇和青霉素（100IU/ml）、链霉素（0.5mg/ml）。作者也曾在此培养基的基础上，另添加白血病抑制因子（LIF）、干细胞因子（SCF）和碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）等，以期改良干细胞培养环境，但并未获得预期的效果。Shim等认为，培养在STO饲养层上的猪PGC，不必额外添加这些因子也能存活并增殖<sup>[8]</sup>。可见在维持猪多能干细胞生长、抑制其生长过程中发生分化的培养环境及作用机理等方面，尚有许多不明之处。ICM或PGC细胞接种于上述饲养层后，在39℃、5%CO<sub>2</sub>和饱和湿度条件下培养7~10d。形成的干细胞集落用作继代培养。

2.2 继代培养 可用多种规格的平底培养板（皿）来做继代培养，可以整孔细胞经0.25%胰蛋白酶EDTA溶液消化后传至新准备的饲养层中（整传法，masspass）；也可以挑出细胞集落经酶消化后传至新的饲养层继续培养（挑传法，pickpass）。5~7d后再行传代，如此一代代传下去，直至建系成功。两种传代方法可酌情采用一种或交替使用。传代所用的培养基和培养条件均与原代培养相同。当然，在细胞集落较多的情况下，传代过程中也可冻存一部分或大部分细胞，供以后使用。多能干细胞的冻存一般用10%DMSO冷冻液，方法与其他细胞的冻存基本相同，已有很多报道，在此不另赘述。

2.3 细胞鉴定 细胞鉴定的意义是为了弄清所分离的细胞是否是想要得到的细胞。细胞鉴定的依据是胚胎干细胞的特征性生物学标志，包括前面提及的形态学、生物化学、免疫学和发育潜能等特性。譬如说，通过对分离的多能干细胞集落形态、细胞形态的认识及核型分析；通过延长连续培养时间，对细胞体外分化能力的试验；通过悬浮培养，对细胞形成简单胚体能力的了解；通过对特异性细胞表面抗原及特征性基因表达的检测；最后，还要通过嵌

合体生产,对细胞嵌合能力乃至生殖系传递能力的认识等等,即可对分离细胞做出严格的鉴定。由于细胞鉴定的依据来自于对细胞生物学特性的了解,因此,鉴定细胞的工作也是不断发展着的。

### 3 嵌合体和种系传递实验

对猪多能干细胞来说,嵌合体和种系传递实验是非常重要的。现有的结果表明,猪多能干细胞参与嵌合体的比率仍然偏低。这可能反映出猪ES细胞和EG细胞,或许存在某种发育缺陷,或许仅仅是因为这些细胞参与形成嵌合体体细胞的程度低。这种情况还不仅存在于猪多能干细胞上,事实上在除小鼠以外的哺乳类,同样存在这一问题。

#### 3.1 嵌合体实验技术简述

生产嵌合体的方法较多,但大体上可归结为两类:注射法<sup>[16]</sup>和凝聚法<sup>[17]</sup>。注射法最常用,即把干细胞注入囊胚腔中。在猪上,仅有注射嵌合体的报道。将新鲜ICM细胞注入囊胚可产生10%~11%的嵌合体,但总产仔数相对较少<sup>[18, 19]</sup>。Prather等将荧光染料标记的猪ICM细胞注入4-细胞期四倍体胚。结果在17枚注射胚胎中,有12枚发育成囊胚,其中8枚宿主胚胎ICM含有标记细胞<sup>[20]</sup>。

在Shim等的实验中,猪EG细胞注入囊胚腔内,生产嵌合体的效率偏低<sup>[3]</sup>。作者用注射法将猪EG细胞分别注入卵裂期和桑椹胚期卵周隙及囊胚腔,但并未提高嵌合率<sup>[4]</sup>。卵周隙注入法是一种类似凝聚法的方法,传统的凝聚法操作是将裸胚与干细胞联合培养,但制作裸胚的方法对猪胚成活率影响太大,直接影响了传统凝聚法在猪上的应用。小鼠和家畜品种间在早期胚胎发育上的差异,可能会对EG细胞掺入ICM造成影响。在小鼠,圆形胚胎外胚层由简单上皮细胞构成,但家畜的胚胎外胚层是铁饼状的、表层上皮细胞已极化。早期分化的内胚层细胞被极化成为上皮被膜,猪ICM至少存在两层内胚层细胞<sup>[21]</sup>。猪囊胚的内胚层分化可能会降低EG细胞掺入ICM的效率。

#### 3.2 猪种系传递实验现状

随着人们对猪、猴等动物及人类胚胎干细胞研究与认识的日益增加,最初从小鼠胚胎干细胞建立的细胞鉴定方法受到了考验。迄今为止,在除小鼠以外的动物,尚未得到干细胞的生殖系嵌合。Takagi等在猪PGC上也未发现SSEA-3、SSEA-4的表达,但这两种抗原在中国小型猪EG细胞上均有表达<sup>[15]</sup>。这些在动物的种间或品种间的差别,究竟在多大程度上代表着干细胞特性的差别尚不得而知。由于前面提及的原因,猪种系传递实验尚未成功。怎样达成这一目标,是科学家必须面对的问题。在怀孕期较长的大动物,多能干细胞核移植(NT)在检测生殖系传递方面可能较嵌合体生产更具优势,NT法至少可减少一代即可达成同样的目标。猪体细胞核移植方面的进展,已把这一巨大的可能性展示在我们的面前。

在小鼠,嵌合体形成的效率和生殖系传递比率随分离ES细胞所用的小鼠品系的不同而有很大的差别。小鼠EG细胞的嵌合率也随细胞系的不同而不同。生产猪嵌合体的效率在不同的报道中差别很大,猪EG细胞注入囊胚所生嵌合体仔猪约占产仔数的2.4%<sup>[3]</sup>。Piedrahia等和Mueller等用转基因猪PGC源性细胞进行囊胚注射,嵌合体胎儿或仔猪的比例分别占注射胚的4.5%和移植胚的14.4%<sup>[12, 13]</sup>。嵌合率低通常表现在其毛皮嵌合率及组织嵌合率均较低下。Rui等将猪EG细胞分别注入体内囊胚和体外培养囊胚,结果表明尽管两者注射后的产仔率相似(16.6%对18.7%),但嵌合率无明显差别,说明猪体外培养囊胚并不能匹配培养的EG细胞的发育<sup>[4]</sup>。改善嵌合率的方法似乎仍需要从改善EG细胞的培养入手。

### 4 应用前景

多能干细胞的应用范围很广,不仅可直接应用于动物繁育、遗传资源保护和动物克隆生产,对于ES细胞在诱导分化研究方面的突破,也可为干细胞治疗提供依据。由于在人类

直接进行试验的条件尚不具备,动物模型将是一个较好的选择。诚然,猪多能干细胞经基因改造后,直接用于组织器官修复及医学治疗,尚有很远的路要走,但作为动物模型,仍具有重要的研究意义和应用价值。

#### 4.1 胚胎干细胞定向分化及其在医学治疗中的应用

在适宜条件下,可以对ES细胞进行定向分化。现有的资料表明,ES细胞在体外可以定向分化为神经元、胰岛细胞、心肌细胞、横纹肌细胞、平滑肌细胞、软骨细胞、内皮细胞、脂肪细胞及各类血细胞等。在小鼠,已有将ES细胞定向分化后用于修复受损部位的报道。

Soria等将含有人Ins/ $\beta$ geo基因及PGK-hygro基因的DNA转入到小鼠ES细胞中,用潮霉素或新霉素筛选并在低糖浓度下将这种细胞诱导分化为胰岛分泌细胞。将其植入链脲佐菌STZ诱导的糖尿病小鼠脾内,可使小鼠血糖恢复正常<sup>[22]</sup>。Kim等报道首次用ES细胞分化产生的多巴胺神经元移植到纹状体治疗帕金森大鼠模型获得成功<sup>[23]</sup>。Min等报道,将带有绿色荧光蛋白标记的ES细胞注入由于心肌梗死造成的损伤心肌,植入的ES细胞能够进行分化而且存活,并且从细胞移植后的心脏分离到绿色荧光阳性心肌细胞<sup>[24]</sup>。Yamamoto等将ES细胞分化得到的肝细胞移植到经四氯化碳致损的小鼠肝脏,发现带有绿色荧光标记的细胞能够融合到肝脏组织,并且缓解了小鼠的肝损伤<sup>[25]</sup>。

#### 4.2 前景展望

目前,在小鼠以外的动物,胚胎干细胞分离、建系及应用方面尚存在很多问题。猪ES细胞在体外极易分化,如何使之保持增殖并维持未分化状态,仍是猪干细胞研究的难点问题。此外,仍有许多问题需要进一步探索,如多能干细胞保持正常增殖的最适培养环境、维持未分化状态的内在调控机制、影响ES/EG细胞掺入嵌合体组织的机理等。细胞分化是生命起源的基本问题之一,多能干细胞是研究这一问题的绝佳材料,如何充分利用现有的研究成果,是值得科学家认真思考和严肃对待的问题。在这些方面,猪多能干细胞研究有许多优势尚待发挥。多能干细胞研究正处于一个快速发展的阶段。人们对于其未来的发展方向存有疑虑是可以理解的,但以科学发展史的观点来看待这一问题,不难得出这样的结论:人类既然有能力从技术上解决各种难题,应当有智慧将新技术用来造福人类自身的健康事业。

#### 参考文献:

1. Labosky PA, Barlow DP, Hogan BLM. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* 1994; 120:3197-3204
2. Stewart CL, Gadi I, Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol* 1994; 161:626-628
3. Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen LR, et al. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod* 1997; 57:1089-1095
4. Rui R, Shim H, Moyer AL, et al: Attempts to enhance production of porcine chimeras from embryonic germ cells and preimplantation embryos. *Theriogenology*. 2004; 61(7-8):1225-1235
5. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; 70:841
6. Resnick JL, Bixter LS, Cheng L, et al. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992; 359:550
7. Cherny RA, Merein J. Evidence for pluripotency of bovine primordial germ cell-derived cell

- lines maintained in long-term culture. *Theriogenology* 1994; 41:175
8. Shim H, Anderson GB. In vitro survival and proliferation of porcine primordial germ cells. *Theriogenology* 1998; 49:521-528
  9. Wheeler MB. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6:1-6
  10. Chen LR, Shiue YL, Bertolini L, et al. Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. *Theriogenology* 1999; 52:195-212
  11. Li M, Ma W, Hou Y, et al. Improved isolation and culture of embryonic stem cells from Chinese miniature pig. *J Reprod Dev* 2004; 50(2):237-244
  12. Piedrahita JA, Moore K, Oetama B, et al. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. *Biol Reprod* 1998; 58:1321-1329
  13. Mueller S, Prella K, Rieger N, et al. Chimeric pigs following blastocyst injection of transgenic porcine primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 1999; 54:244-254
  14. Lee CK, Weeks RL, Johnson GA, et al. Effects of protease inhibitors and antioxidants on in vitro survival of porcine primordial germ cells. *Biol Reprod* 2000; 63:887-897
  15. Tsung HC, Du ZW, Rui R, et al. The culture and establishment of embryonic germ (EG) cell lines from Chinese mini swine. *Cell Res* 2003; 13(3):195-202
  16. Gossler A, Doetschman T, Korn R, et al. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:9065-9069
  17. Nagy A, Gocza E, Diaz EM, et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 1990; 110:815-821
  18. Anderson GB, Choi SJ, BonDurant RH. Survival of porcine inner cell masses in culture and after injection into blastocysts. *Theriogenology* 1994; 42:204-212
  19. Onishi A, Takeda K, Komatsu M, et al. Production of chimeric pigs and the analysis of chimerism using mitochondrial deoxyribonucleic acid as a cell marker. *Biol Reprod* 1994; 51:1069-1075
  20. Prather RS, Hoffman KE, Schoenbeck RA, et al. Characterization of DNA synthesis during the 2-cell stage and the production of tetraploid chimeric pig embryos. *Mol Reprod Dev* 1996; 45:38
  21. Talbot NC, Rexroad CE, Purcel VG, et al. Culturing the epiblast cells of the pig blastocyst. *In Vitro Cell Dev Biol* 1993; 29:543-554
  22. Soria B, Roche E, Berna G, et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49:157-162
  23. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez Gomez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418: 50-56
  24. Min JY, Yang YK, Converse KL, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 2002; 92(1): 28-296
  25. Yamamoto H, Quinn G, Asari A, et al. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological function and therapeutic application. *Hepatology* 2003; 37(5): 983-993

## Isolation, Characterization and Application of Porcine

## Pluripotent Stem Cells

RUI Rong

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Jiangsu 210095)

### Abstract

Pluripotent stem cells are derived from inner cell mass of preimplantation blastocyst or primordial germ cells of early stage fetus and are capable of differentiating in vivo into various phenotypes. Pluripotent stem cells can proliferate unlimitedly in vitro under feasible culture conditions and keep undifferentiated status together with normal karyotype. Current status and application prospect for the isolation of porcine pluripotent stem cells are emphasized, and the ability of chimeric formation and germ-line transmission are also discussed in this review.

**KeyWords:** pluripotent stem cells; isolation; chimera; germ-line transmission; swine