

山羊胚胎干细胞的分离与培养

闫龙, 雷蕾, 杨春荣, 高志敏, 雷安民, 马晓玲, 窦忠英

西北农林科技大学 陕西省干细胞工程技术研究中心 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

摘要: 对关中奶山羊配种后 6~7 天的桑椹胚和囊胚, 分别采用全胚培养法、酶消化法和免疫外科法进行处理。将处理后的胚胎培养于小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)饲养层上, 分离培养山羊胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ESC)。对分离传代的山羊 ESCs 分别进行免疫组化染色, RT-PCR 检测和体外诱导分化试验。结果表明, 全胚培养法易于胚胎贴壁形成原代集落, 采用全胚培养法获得的 ESCs 有一株目前已传至 18 代。山羊 ESCs *Nanog*、*Oct4*、*SSEA-3* 免疫组化染色呈阳性, *SSEA-1* 免疫组化染色呈弱阳性, *SSEA-4* 免疫组化染色呈阴性, RT-PCR 检测显示其表达 *Nanog*、*Oct4*、端粒酶、*CD117*。山羊 ESCs 经 DMSO 体外诱导可以向心肌细胞分化, 这些试验均表明该细胞具有 ESCs 的生物学特性。

关键词: 山羊, 胚胎干细胞, 内细胞团, 免疫外科

Isolation and Cultivation of Goat Embryo Stem Cells

Long Yan, Lei Lei, Chunrong Yang, Zhimin Gao, Anmin Lei, Xiaoling Ma, and Zhongying Dou

Shaanxi Key Laboratory for Molecular Biology of Agriculture, Shaanxi Center of Stem Cell Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: Morulae and blastocysts obtained from Guanzhong dairy goats 6~7 days after mating were treated with whole embryo cultivation, enzymatic digestion and immunosurgery separately. The goat embryonic stem cells (ESC) were isolated and cultured on a feeder layer of mitomycin-inactivated mouse embryo fibroblasts (MEF). The characteristics of goat ESCs were analyzed by immunohistochemistry, RT-PCR and inducing differentiation *in vitro*. The results indicated that the embryos were easier to attach the culture dish and form primary colonies with whole embryo method. There were colonies that maintained undifferentiated for 18 passages. The ESCs expressed the protein of *Nanog*, *Oct4* and *SSEA-3*, whereas the protein of *SSEA-4* was absent and the protein of *SSEA-1* was weakly expressed. In addition, the genes of *Nanog*, *Oct4*, *TERT* and *CD117* were expressed in goat ESCs. The cells also could differentiate to myocardial cells when induced *in vitro* by DMSO. These results suggest that the goat ESCs have characteristics of ESCs.

Keywords: goat, ESCs(embryonic stem cell), ICM(inner mass cell), immunosurgery

胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ESC)是指从附植前囊胚内细胞团或桑椹胚分离的多潜能细胞, 具有自我更新、无限增殖和多向分化的潜能。ESCs 在体内外都可以被诱导分化为机体几乎所有的细胞

类型。自 1981 年 Evans 和 Kaufman 首次成功分离得到小鼠 ESCs 并建立稳定增殖的 ESCs 系以后^[1], 国内外研究人员先后在牛^[2]、猪^[3]、仓鼠^[4]、大鼠^[5]、兔^[6]、水貂^[7]、恒河猴^[8]、美洲长尾猴^[9]以及人类^[10]

Received: January 10, 2008; **Accepted:** April 23, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No.30671067).

Corresponding author: Zhongying Dou. E-mail: douzhongying@china.com

国家自然科学基金项目(No. 30671067)资助。

等物种上建立了类 ESCs 系, 但至今没有山羊成功建系的报道。

Udy 等^[11]用大鼠肝脏细胞条件培养液培养山羊内细胞团(Inner cell mass, ICM), 结果发现低氧浓度有助于山羊类 ESCs 的存活, 但最多只能传 3 代。Tian 等^[12]发现, 山羊囊胚全胚在小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)饲养层上培养时不能形成类 ESCs 集落, 而 ICM 适宜于分离山羊类 ESCs, 小鼠 ESCs 条件培养液可以促进山羊类 ESCs 自我更新, 最高传至 8 代。1996 年 Meinecke-Tillmann 等^[13]分别从绵羊和山羊胚胎中分离培养类 ESCs, 发现在山羊, 7~8 d ICM, 仅原代形成集落; 7~8 d 囊胚全胚, 最高传至 7 代; 10d 胚盘(Embryonic discs), 最高传至 9 代; 11 d 胚盘, 最高传至 28 代, 但无后续报道。桑润滋等^[14]将山羊桑椹胚和囊胚分别培养于 MEF 饲养层或同源胎儿成纤维细胞饲养层, 结果发现后者更有利于山羊类 ESCs 培养, 最高传至 5 代。葛秀国等以 MEF 为饲养层, 采用机械分割的传代方法, 将山羊 ESCs 最高传至 10 代。可见, 目前对山羊 ESCs 稳定增殖所需的微环境还不够清楚, 缺乏有效的传代方法, 导致山羊 ESCs 在体外培养过程中不能稳定传代, 过早分化或死亡。

本试验以山羊 6~7 d 的桑椹胚和囊胚为材料, 参照人和小鼠 ESCs 培养体系, 探索了适宜于山羊 ESCs 生长和传代的条件, 对其在体外培养时的生长行为、增殖能力、分化潜能以及影响因素进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

胚胎供体为非泌乳期成年关中奶山羊, 由西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心动物试验场提供, 健康状况良好。

成年新西兰白公兔, 2 只, 由西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心动物试验场提供。

昆白系小鼠, 6~8 周龄, 购自第四军医大学实验动物中心。

高糖 DMEM(Gibco), 胎牛血清(FBS, Gibco), 人 bFGF(Chemicon), LIF(Chemicon), β -巯基乙醇(β -Me, Gibco), 谷氨酰胺(L-glutamine, Gibico), 非必需氨基酸(NEAA, Gibico), 豚鼠血清(北京鼎国), 新生牛血清(NBS, 银香国际), 丝裂霉素 C(浙江海正药业), 卵泡刺激素(FSH)(宁波市激素制品有限公

司), 氯前列烯醇(PG, 上海市计划生育科学研究所), 孕酮栓(CDR-G, 新西兰生产), 免疫组化试剂盒(Invitrogen), 免疫组化染色所用抗体(*Nanog*、*Oct-4*、*SSEA-1*、*SSEA-3* 和 *SSEA-4*)(Chemicon), 反转录试剂盒(Fermental)。

MEF 培养液为: 含体积分数 10% NBS、100 IU/mL 青霉素钠和 0.1 mg/mL 硫酸链霉素的高糖 DMEM。

山羊 ESCs 培养液为: 含体积分数 15% FBS、100 IU/mL 青霉素钠和 0.1 mg/mL 硫酸链霉素、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、1000 IU/mL LIF、10 ng/mL bFGF 的高糖 DMEM。

1.2 山羊超数排卵及胚胎采集

关中奶山羊在放入孕酮栓后第 10 天(放栓第 7 天换栓)早上开始肌注 FSH, 连续注射 4 d(剂量分别是 60 IU, 40 IU, 30 IU, 20 IU/次), 每天早晚各 1 次(间隔 12 h), 并在第 12 天晚和第 13 天早肌注 FSH 的同时, 肌注氯前列烯醇各 0.2 mg, 第 13 天中午去栓。去栓后观察发情, 并及时配种(发情后配种, 每次间隔 6 h, 连配 2~3 次)。配种后 6~7 d, 腹中线手术法采胚, 体视镜下检胚。

1.3 小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)饲养层的制备

MEF 分离自怀孕 13.5 d 的昆白鼠胎儿, 选择 1~5 代的 MEF 细胞, 用 10 μ g/mL 丝裂霉素 C 处理 2 h 后, PBS 洗 4~6 次以除去可能残留的丝裂霉素 C, 并按 $0.8 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 个/mL 的细胞密度接种到预先用 1 g/L 明胶处理过的四孔板, 或者制作成 100 μ L 的滴, 38.0°C、5% CO₂ 和饱和湿度条件下培养 3~24 h 待用。培养液为 MEF 培养液。

1.4 兔抗山羊血清的制备

无菌取屠宰的成年关中奶山羊脾脏, 用生理盐水冲洗后, 去掉脾脏被膜, 充分剪碎, 匀浆, 加生理盐水悬浮细胞, 800 目滤纱过滤, 1000 r/min 离心 10 min。用生理盐水重悬细胞, 调节细胞浓度为 1×10^7 个/mL, 于 -196°C 冷冻保存。选择健康新西兰公兔 2 只, 腹腔注射解冻后的脾脏细胞, 每次注射量为 4×10^8 个细胞。连续注射 4 次, 每次间隔 10 d, 最后一次注射 10 d 后心脏采血, 血液分装于 250 mL 玻璃瓶中制成斜面, 静置过夜使血清析出。吸取上层血清, 4000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 56°C 灭活 30 min。0.22 μ m 滤膜过滤后, 无菌分装, -20°C 保存。

1.5 山羊 ESCs 的原代培养

1.5.1 全胚培养法

将超排得到的山羊囊胚和桑椹胚, 不经脱带处理, 直接培养 MEF 饲养层上, 38.0°C、5% CO₂、饱和湿度培养, 由其自然孵化并贴壁增殖。培养液为山羊 ESCs 培养液。

1.5.2 酶消化法分离囊胚 ICM

参照杨炜峰等^[15]报道的方法。在室温下, 将囊胚用链蛋白酶脱带处理后, 用含 0.25% 胰蛋白酶、0.04% EDTA 消化 5 min, 于解剖镜下观察, 若发现滋养层细胞开始脱落, 迅速将其移入操作液中, 在解剖镜下借助细玻璃针分离出山羊 ICM。操作液为 MEF 培养液。

1.5.3 免疫外科法分离囊胚 ICM

将除去透明带的山羊囊胚, 在无钙镁 PBS 中洗 3 遍。然后将其移入 1:10 稀释的兔抗山羊血清中作用 30 min。再在 PBS 中洗 3 遍, 以除去可能残留的抗体, 之后移入豚鼠血清中, 作用 30 min。然后用吸尿管将胚胎转移到操作液中, 轻轻吹打, 除去滋养层细胞, 即可得到 ICM。操作液为 MEF 培养液。

1.6 山羊 ESCs 的传代培养

机械切割法: 将 ESCs 集落用玻璃针挑出置于操作液, 用胚胎切割刀将 ESCs 集落分割成 4~20 个细胞的小块, 用吸尿管转移于新的饲养层培养。

酶消化法: 将 ESCs 集落挑出后, 放于 0.1% IV 胶原酶中, 38.0°C 消化 30~40 min, 期间, 辅以轻柔的吹打, 之后用 MEF 培养液中和。最后, 将分离开的细胞团块移至新的饲养层培养。

1.7 山羊 ESCs 的鉴定

1.7.1 形态学鉴定

在倒置显微镜下观察山羊 ESCs 的生长行为,

并记录其形态特征。

1.7.2 免疫组化染色

对山羊第 9 代 ESCs 表面标志抗原 *Nanog*、*Oct4*、*SSEA-1*、*SSEA-3* 和 *SSEA-4*, 采用免疫组化染色进行鉴定, 具体操作按照试剂盒说明书进行。倒置显微镜下观察, 阳性细胞为棕红色, 阴性细胞和对照组细胞不着色。

1.7.3 RT-PCR 检测

收集第 9 代山羊 ESCs, 用 TRIzol 一步法提取总 RNA, 测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 之间, 用反转录试剂盒将 RNA 反转录, 得到山羊 cDNA。对照组为山羊 ESCs 的饲养层细胞(MEF), 采用相同的方法提取 RNA, 之后用相同量的 RNA 进行反转录, 得到 MEF cDNA。应用 PCR 法检测 *Nanog*、*Oct4*、*CD117*、端粒酶基因的表达。检测过程中所使用的引物序列见表 1, 其中 *Nanog*、*β-actin* 以及 *GAPDH* 基因的引物由作者根据 NCBI 中的基因序列(序列号见表 1)自行设计, 其余引物则参考他人文献。

1.8 山羊 ESCs 向心肌细胞诱导分化

离心收集第 13 代山羊 ESCs, 用诱导培养液(无 LIF 的 ESCs 培养液+1% DMSO)做成 20 μL(1.5×10⁴ 个/mL)的悬滴培养 2 d 后, 形成的类胚体转移至铺有琼脂的培养皿悬浮培养 5 d(隔天部分换液, 培养液为诱导培养液), 最后将类胚体转移至明胶处理过的 48 孔板, 每孔接种一个类胚体, 使其向心肌细胞分化, 隔天换液(培养液为无 LIF 的 ESCs 培养液)。7 d 后用心肌特异性抗体 *α-actin* 对其进行免疫组化染色, 对照组没有经过 DMSO 诱导, 培养液为无 LIF 的 ESCs 培养液, 具体操作按照试剂盒说明书进行。

表 1 RT-PCR 中所用的检测引物
Table 1 Primers for determining in RT-PCR

Gene	Primer sequence(5'→3')	Size	Annealing temp	References
Oct-4	cgtgaagctggagaaggagaagctcaaggccgcagcttacacatgtt	247bp	57°C	[16]
Nanog	ccgctcgagatgagtggtggcccagctgtgccaaagcttacaatcttcaggctgtatgttg	903bp	64°C	AY 786437
hTERT	gtgtgctgcagctcccattcgtcgtctggctgtcc	264bp	61°C	[17]
β-actin	cacggtgcccatctacgacttgatgtcacggacgattt	157bp	60°C	AF 481159
CD117	ggcagccagaaatctccttactaccacggccttctctcggttg	423bp	60°C	[18]
GAPDH	attcaacggcacagtcagg cagtgtagcccaagatgcctt	665bp	56°C	XM 001473623

2 结果

2.1 山羊胚胎采集结果

本试验对超排处理的 4 只关中奶山羊采胚, 共采集胚胎 42 枚, 可用胚 39 枚, 胚胎可用率为 92.9%(39/42), 其中桑椹胚 5 枚, 囊胚 28 枚, 孵化囊胚 6 枚(图 1A)。

2.2 不同处理方法对山羊 ESCs 原代集落的影响和 ESCs 的传代培养

原代培养时对采集到的 39 枚胚胎使用不同的方法进行处理, 其中 22 枚用全胚法培养(图 1A), 8 枚胚胎用酶消化法处理(见图 1B, 一枚胚胎已脱去透明带, 并有部分滋养层细胞脱落, 另一枚胚胎正在脱去透明带), 9 枚胚胎用免疫外科法处理(图 1C, 正在用免疫外科法处理的胚胎, 大量的滋养层细胞已脱落)。由表 2 可知, 用酶消化法和免疫外科法处理胚胎后得到的 ICM 贴壁率较低, 全胚培养法易于胚胎孵化后贴壁并形成原代集落(t 检验 $P < 0.05$, 差异显著), 而且更适于传代培养(t 检验 $P < 0.05$, 差异显著)。由表 3 可知, 不同发育阶段的胚胎采用全胚

法培养时, 孵化囊胚的贴壁率高于桑椹胚和囊胚(t 检验 $P > 0.05$, 差异不显著), 但囊胚贴壁后更适于传代培养(t 检验 $P < 0.05$, 差异显著)。

原代培养时分别将没有经过处理的胚胎, 以及用酶消化法和免疫外科法处理胚胎后得到的 ICM, 置于四孔板和微滴做成的饲养层上进行培养。本实验中, 6 代以前的 ESCs, 采用机械切割法传代, 6 代之后的 ESCs 采用酶消化法传代。其中开始用酶消化法处理过滋养层的胚胎得到的 ESCs 最高传至 6 代(图 1D), 用免疫外科法处理过滋养层的胚胎得到的 ESCs 最高传至 10 代(图 1E 为第 8 代的 ESCs 集落), 而全胚法培养胚胎得到的 ESCs 有一株目前已传至 18 代(图 1F 为第 14 代的 ESCs 集落)。

2.3 山羊 ESCs 的生长行为及形态学特征

山羊全胚胎或 ICM 接种后, 2~5 d 内贴壁, 卵裂球开始增殖, 中央细胞呈小圆形, 周围也会出现扁平的空泡样细胞, 形成一个具有核心的结构。5~7 d 后, 中央核心部分的小圆形细胞逐渐增殖为集落, 这些集落呈不同的形态, 大致包括以下几种: (1) 有 8

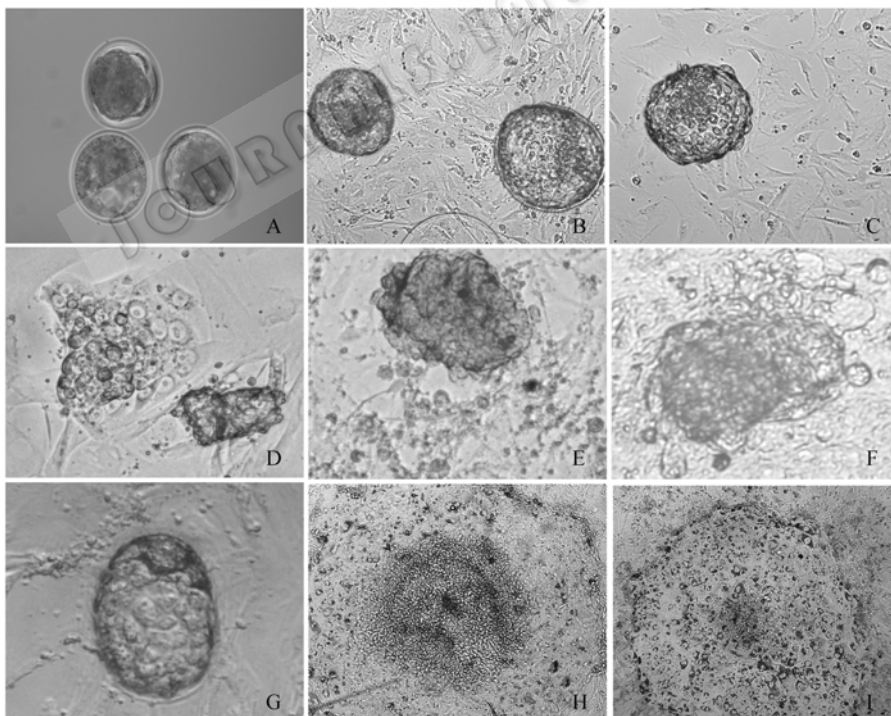


图 1 山羊胚胎和 ESCs 集落特征

Fig. 1 Characterization of goat embryos and derived ESCs colonies

A: goat morulae and blastocysts ($\times 100$); B: goat embryos dealed by enzymatic digestion ($\times 100$); C: goat embryos treated by immunosurgery ($\times 100$); D: passage 5 goat ESCs colonies ($\times 100$); E: passage 8 goat ESCs colonies ($\times 100$); F: passage 14 goat ESCs colonies ($\times 100$); G: bird's nest-like colony was formed after the goat embryo adhered ($\times 100$); H: fried eggs-like colony was formed after the goat embryo adhered ($\times 50$); I: the goat ESCs all differentiated to vacuole-like cells ($\times 50$)

表 2 不同处理方法山羊胚胎的贴壁率及传代培养

Table 2 The adherence rate of goat embryos and subculture of ESCs by different methods

Different disposal	The adherence rate of goat embryos (%)	The number of cell lines obtained of 6 passages	The highest passages of ES cells
The whole embryos	86.4 (19/22)	14	18~
Enzymatic digestion	50 (4/8)	2	6
Immunosurgery	66.7 (6/9)	4	10

表 3 不同种类的胚胎采用全胚法培养时的贴壁率及传代培养

Table 3 The adherence rate of different embryos by whole embryos method and subculture of ESCs

The kinds of embryos	The adherence rate of embryos (%)	The number of cell lines obtained of 6 passages	The highest passages of ES cells
Morulaes	80 (4/5)	2	8
Blastocysts	81.8 (9/11)	8	18~
Hatched blastocysts	100 (6/6)	4	13

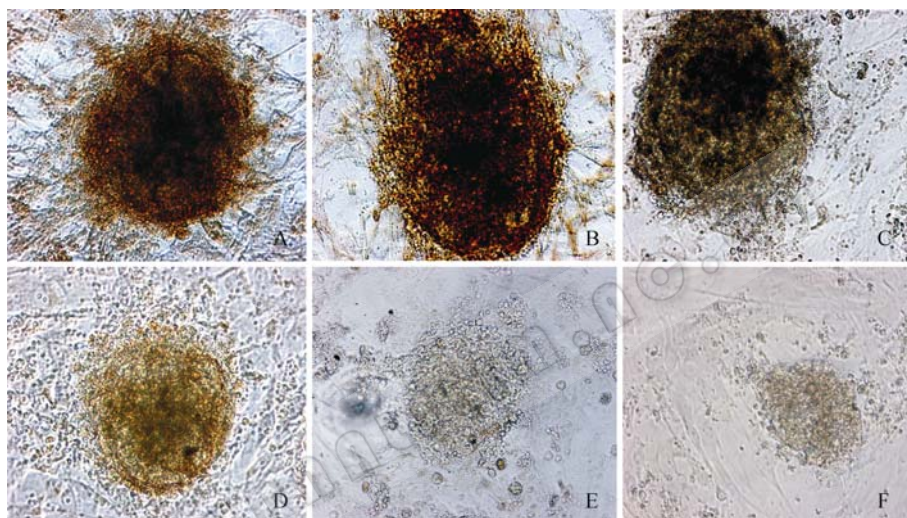


图 2 山羊 ESCs 免疫组化染色

Fig. 2 The immunohistochemistry of goat ESCs

A: the goat ESCs showed positive staining for *Nanog* in the immunohistochemistry ($\times 200$); B: positive staining for *Oct4* ($\times 200$); C: weak positive staining for *SSEA-1* ($\times 200$); D: positive staining for *SSEA-3* ($\times 200$); E: negative staining for *SSEA-4* ($\times 200$); F: negative control was not stained ($\times 200$)

枚囊胚、1枚桑椹胚和1枚孵化胚贴壁培养后形成的集落呈鸟巢状,周围很少有分化的细胞(图1G);(2)有6枚囊胚、1枚桑椹胚和3枚孵化胚贴壁培养后形成煎蛋样集落,周围存在大量的空泡样细胞,中间为ICM贴壁后增殖形成的集落(图1H);(3)还有部分胚胎贴壁培养后全部分化为空泡样细胞,没有典型的集落形态(图1I)。将ESC集落进行机械法传代,小圆形细胞迅速增殖,重新形成集落结构,同时空泡样的分化细胞也不断增加。采用酶消化法传代后,ESC增殖变慢,集落变少,但形态规则,同时空泡样细胞也明显减少。研究发现,原代培养时具有鸟巢状集落的克隆活力较好,传代培养时出现的分化

细胞也较少。

2.4 山羊 ESCs 免疫组化染色分析

对第9代山羊ESC进行免疫组化染色,结果显示,山羊ESC *Nanog*、*Oct4*、*SSEA-3* 免疫组化染色呈阳性,*SSEA-1*呈弱阳性,*SSEA-4*呈阴性,对照组细胞不着色(图2)。

2.5 山羊 ESCs 多能性因子检测

对山羊ESC的多能性因子进行RT-PCR检测,结果显示,山羊ESC表达 *Nanog*(903 bp)、端粒酶(264 bp)、*CD117*(423 bp)、*Oct4*(247 bp)、山羊 β -*actin* (157 bp) 基因(图3A)。阴性对照组为饲养层细胞(MEF),只表达端粒酶(264 bp)和小鼠 *GADPH* (665 bp) (图3B)。

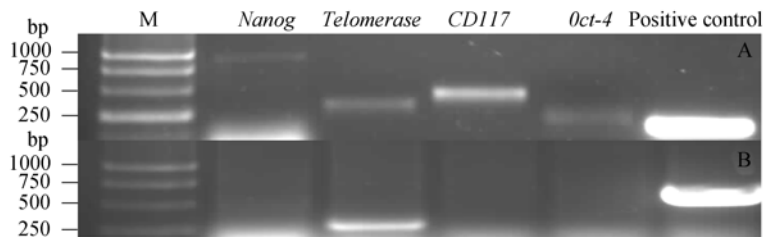


图 3 山羊 ESCs RT-PCR 检测

Fig. 3 The RT-PCR detection of goat ESCs

A: RT-PCR result of goat ESCs; M: marker DL 2,000; Positive control: goat β -actin; B: RT-PCR result of MEF; M: marker DL 2,000; Positive control: mouse *GADPH*

2.6 山羊 ESCs 体外诱导分化

用诱导培养液将 13 代的山羊 ESCs 进行悬滴和悬浮培养, 形成类胚体 (Embryonic body, EB) (图 4A)。EB 贴壁培养后, 由边缘开始向心肌样细胞分化, 逐渐形成生长晕, 培养约 2 d 可见梭形细胞平行排列伸出, 细胞间彼此纵向相连 (图 4B)。用心肌特异性抗体 α -actin 进行免疫组化染色, 结果显示诱导后的细胞呈阳性 (图 4C), 对照组细胞不着色 (图 4D)。

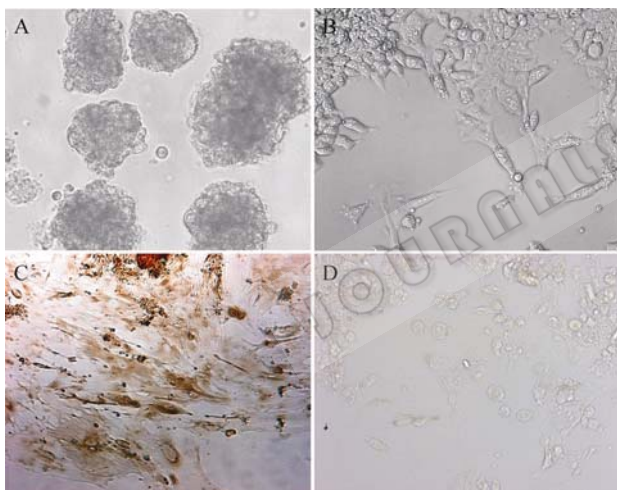


图 4 山羊 ESCs 体外诱导分化

Fig. 4 The induced differentiation of goat ESCs *in vitro*

A: the embryonic body induced for 2 d ($\times 200$); B: the embryonic body attach to dish for 5 d ($\times 200$); C: α -actin immunohistochemistry of embryonic body after induced for 7 d ($\times 200$); D: negative control ($\times 200$)

3 讨论

本试验以山羊桑椹胚和囊胚为材料, 原代培养时分别采用全胚培养法、酶消化法和免疫外科法, 分离得到山羊 ESCs。山羊 ESCs 体积小, 不规则, 细胞核大, 原代培养时具有鸟巢状、煎蛋样和山包样

集落, 其中具有典型鸟巢状结构的集落较易于进行传代培养。传代培养时, 6 代以前的山羊 ESCs 采用机械分割法, 6 代以后的山羊 ESCs 采用酶消化法, 目前一株原代培养时采用全胚法培养的山羊 ESCs 已传至 18 代。山羊 ESCs *Nanog*、*Oct4* 和 *SSEA-3* 免疫组化染色呈阳性, *SSEA-1* 免疫组化染色呈弱阳性, *SSEA-4* 免疫组化染色呈阴性; RT-PCR 检测发现, 山羊 ESCs 表达 *Nanog*、*Oct4*、*CD117*、端粒酶基因。诱导分化试验细胞 α -actin 免疫组化染色呈阳性, 说明山羊 ESCs 经体外诱导可向心肌样细胞分化。这些均表明山羊 ESCs 具有多能性。

Rossant 等^[19]研究发现, 小鼠 ICM 为混合细胞群体。本研究中也发现, 在山羊 ICM 细胞增殖后出现上皮样、空泡样等不同类型的细胞, 因此推测山羊 ICM 同样为混合的细胞群体。试验中还发现, 山羊 ESCs 在体外增殖时会出现一些小圆形细胞, 呈集落样生长, 同杨炜峰等^[15]的研究结论一致。

本研究中, 山羊胚胎原代培养时分别采取全胚法、酶消化法和免疫外科法 3 种方法, 发现全胚培养法更有利于胚胎贴壁并形成原代集落, 其中孵化囊胚的贴壁率略高于桑椹胚和囊胚, 但是从囊胚得到的山羊 ESCs 增殖较稳定, 有一株已传至 18 代。由此可见, 使用 MEF 饲养层, 并参照小鼠和人 ESCs 培养液 (添加 LIF、bFGF), 原代培养时采用全胚培养法, 更有利于得到可稳定传代的山羊 ESCs, 而用酶消化法和免疫外科法处理胚胎得到的 ICM 贴壁生长后, 传代时 ESCs 生长状态不稳定, 分化细胞较多, 最高分别传至 6 代和 10 代, 主要原因可能是应用酶消化法和免疫外科法对胚胎进行处理时, 产生的损伤太大, 不利于 ESCs 的稳定增殖。在预试验传代培养时发现, 早期培养采用机械法传代更有利于山羊

ESCs 达到稳定的增殖状态并形成新的集落,但随着传代数的增加,至第6代左右,ESCs活力下降,机械切割对 ESCs 集落产生的损伤愈加明显,导致大量 ESCs 死亡,集落变黑,分化细胞也增多,这时换用酶消化法传代可以有效地减少 ESCs 的死亡和分化。所以,正式试验时,第6代以前细胞采用机械切割法传代,而6代以后细胞采用酶消化法传代。

此外,在试验中还发现,随着传代数的增加,较多的山羊 ESCs 集落4代以后便不再具有致密的结构,而是变得较为松散,说明分化细胞增多,ESCs活力开始下降。

目前,虽然关于人和小鼠 ESCs 建系的方法已被详细报道,然而依其为参照,在山羊上国内外仍无建系的报道。在本研究中,虽然有一株细胞目前已传至18代,但具有典型形态的集落随着代数的增加不断减少,而且这时的集落也变得比较松散,没有致密的结构,这说明山羊 ESCs 传代时仍存在很大程度的细胞分化和死亡。所以,目前在山羊 ESCs 培养过程中,如何提供稳定的、适宜的培养条件和有效的传代方法,仍然是亟待解决的问题。

REFERENCES

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**(5819): 154–156.
- [2] Wang L, Duan E, Sung L, *et al.* Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol Reprod*, 2005, **73**(1): 149–155.
- [3] 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.
- [4] Doetschman T, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem(ES) cells. *Dev Biol*, 1988, **127**(1): 224–227.
- [5] Iannaccone PM, Taborn GU, Garton RL, *et al.* Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol*, 1994, **163**(1): 288–292.
- [6] Graves KH, Moreadith RW. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev*, 1993, **36**(4): 424–433.
- [7] Sukoyan MA, Vatolin SY, Golubitsa AN, *et al.* Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev*, 1993, **36**(2): 148–158.
- [8] Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, *et al.* Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Biol Reprod*, 1996, **55**: 254–259.
- [9] Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, *et al.* Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 1996, **55**(2): 254–259.
- [10] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282**(5391): 1145–1147.
- [11] Udy GB, Wells DN. Low oxygen atmosphere initially increases the survival and multiplication of putative goat embryonic stem cells. *Theriogenology*, 1996, **45**: 237.
- [12] Tian H, Wang H, Sha H, *et al.* Factors derived from mouse embryonic stem cells promote self-renewal of goat embryonic stem-like cells. *Cell Biol Int*, 2006, **30**(5): 452–458.
- [13] Meinecke-Tillmann S, Meinecke B. Isolation of ES-like cell lines from bovine and caprine preimplantation embryos. *Anim Breed Genet*, 1996, **113**: 413–421.
- [14] Sang RZ, Han JY, Sun GJ. The isolation and colony of goat ES-like cells. *Chin J Veter Sci*, 2003, **23**(4): 403–407. 桑润滋, 韩建永, 孙国杰. 山羊类 ES 细胞的分离与克隆. *中国兽医学报*, 2003, **23**(4): 403–407.
- [15] Yang WF, Ge XG, Yang CR, *et al.* The study of serum-free culture of goat inner cell mass. *J Northwest A & F Univer*, 2007, **35**(2): 1–5. 杨炜峰, 葛秀国, 杨春荣, 窦忠英. 无血清培养山羊内细胞团的研究. *西北农林科技大学学报*, 2007, **35**(2): 1–5.
- [16] Tsai MS, Hwang SM, Chang YJ, *et al.* Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod*, 2006, **74**(3): 545–551.
- [17] Turnpenny L, Brickwood S, Spalluto CM, *et al.* Derivation of Human Embryonic Germ Cells: An alternative source of pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2003, **21**: 598–609.
- [18] Xiang Zh F, Frederike K, Jennifer C, *et al.* Neoplasia driven by mutant c-kit is mediated by intracellular, not plasma membrane, receptor signaling. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(1): 267–282.
- [19] Rossant J, Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, **358**: 1341–1349.