第二军医大学学报
Acad J Sec Mil Med Univ
2005 Mar;26(3)

·论著·

条件培养液改进小鼠胚胎干细胞嵌合体制备效率的观察

何志颖,王新民,李建秀,李文林,胡以平*
(第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的**:探讨如何通过改善小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell,ES)的培养条件来维持其未分化状态,提高嵌合体的制备效率。**方法**:以普通ES细胞培养液为对照,以TX-WES培养液为ES细胞条件培养液分别对15代以上的未工程化ES细胞和糖皮质激素受体(GR)工程化ES细胞进行培养并筛选,通过囊胚注射制作嵌合体来比较2种不同培养液培养ES细胞后嵌合体制备效率的差别。**结果**:未工程化ES细胞以普通培养液培养其嵌合率为25.0%,以TX-WES培养液培养其嵌合率提高到53.8%($P< 0.05$);GR工程化ES细胞以普通培养液培养其嵌合率为15.0%,以TX-WES培养液培养其嵌合率提高到52.3%($P<0.05$)。**结论**:应用TX-WES培养液改善小鼠ES细胞的培养条件可提高嵌合体的制备效率,该方法为基因剔除小鼠研究的顺利开展奠定了良好的基础。

[关键词] 胚胎干细胞;TX-WES培养液;嵌合体
[中图分类号] R-322 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2005)03-0294-04

Conditional medium improving obtainment of mouse embryonic stem cell chimeras

HE Zhi-ying, WANG Xin-min, LI Jian-xiu, LI Wen-lin, HU Yi-ping* (Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[**ABSTRACT**] **Objective**: To increase the efficiency of mouse embryonic stem cell(ES) chimeras production through improving the culture condition to maintain undifferentiated state of ES cells. **Methods**: With traditional ES cells medium being control, TX-WES medium was used as conditional ES cells medium to culture non-targeting and GR targeting ES cell lines, which was passaged over 15 times. Chimeras was produced by blastocyst injection and the chimeras production efficiency between the 2 different media was compared. **Results**: Compared with traditional ES cells medium, Non-targeting ES cells cultured with TX-WES medium had a higher production of chimeras (53.8% *versus* 25.0%, $P < 0.05$); similarly, compared with traditional ES cells medium, GR targeting ES cells cultured with TX-WES medium also had a higher production of chimeras (52.3% *versus* 15.0%, $P < 0.05$). **Conclusion**: The results indicate that the chimeras production efficiency of mouse ES cells can be increased by improving ES cells' culture condition with TX-WES medium.

[**KEY WORDS**] embryonic stem cell; TX-WES medium; chimera
[Acad J Sec Mil Med Univ,2005,26(3):294-297]

基因打靶小鼠的建立是一项艰巨的系统工程,如何维持胚胎干细胞(embryonic stem cell,ES)在体外培养过程中的未分化状态是该技术的核心所在。因为ES细胞的未分化状态关系到嵌合体的制备效率,而嵌合鼠的获得更是实现ES细胞途径的决定步骤[1]。在ES细胞培养过程中面临的问题是,随着ES细胞体外培养代数的增加及培养条件的改变,很容易造成ES细胞的基因突变和染色体畸变。这些变异的细胞通过较短的复制时间或较好的接种效率容易形成生长优势,能很快超过正常的未分化细胞而成为培养环境中的主要细胞,从而导致嵌合体制备的失败。而这部分细胞在形态上并无改变,各种已知检测手段包括全能性标志Oct-4等亦无法将其与未分化ES细胞区分,仅仅是通过囊胚注射制备嵌合体动物时发现其已丧失嵌合能力。Nagy等[2]认为,14代以后ES细胞的嵌合能力及其经生殖系的传递能力会急剧下降或消失。而从国外引进的ES细胞往往处于传代晚期,经过扩大培养及重组处理后其代数更是大为增加。在国内建立的ES细胞系尚不稳定的情况下,如何通过培养条件的改善保持代数较高ES细胞的未分化状态是摆在我们面前的一个棘手问题。为了剔除高代数ES细胞中实际上已分化的ES细胞,提高未分化ES细胞在整个群体中的比例,提高嵌合体制备的效率,本研究尝试将代数较高的ES细胞(15代以上)以TX-WES条件培养液进行筛选培养,并进行囊胚注射制备嵌合体动物,同时与普通培养液进行对比研究,来观察TX-WES条件培养液是否具有改善小鼠ES

[基金项目] 国家高新技术发展规划("863"计划)课题(102-10-04-03).
[作者简介] 何志颖(1976-),男(汉族),博士生,主治医师.
* Corresponding author. E-mail:yphu@smmu.edu.cn

细胞嵌合体制备效率的能力。

1 材料和方法

1.1 材料 TX-WES 培养液从比利时 Thromb-X 公司引进；DMEM、HBSS、LIF、胰酶、非必需氨基酸、青霉素/链霉素购自 Gibco 公司；胎牛血清、HEPES 液购自 Hyclone 公司；M_2培养液、石蜡油购自 Sigma 公司；来自 129/SvJ 小鼠品系的 ES 细胞系购自 Genomesystems 公司，并以该细胞系建立了基于 Cre/loxP 系统的糖皮质激素受体基因(GR)条件基因打靶 ES 细胞系[3~5](以下简称 GR 工程化 ES 细胞)；C57BL/6J、ICR 小鼠由本室 SPF 级动物房提供；显微操作仪、拉针仪及磨针仪等设备为 Nikon 公司产品；CO_2孵箱为 Heraeus 公司产品。

1.2 滋养层细胞培养液和 ES 细胞普通培养液的配制 滋养层细胞培养液按以下配制：在 440 ml DMEM 高糖培养液中依次加入胎牛血清 50 ml、非必需氨基酸 5 ml、青霉素/链霉素 5 ml；ES 细胞普通培养液按以下配制：在 405 ml DMEM 高糖培养液中依次加入胎牛血清 80 ml、非必需氨基酸 5 ml、HEPES 液 3 ml、2-巯基乙醇(100×)0.4 ml、青霉素/链霉素 5 ml。

1.3 滋养层细胞的制备 取孕 12～13 d 的 C57BL/6J 鼠，乙醇消毒后处死，取出胎鼠，剪去头和内脏后剪碎，胰酶消化 30 min 后加入 EF 培养液终止，将细胞悬液平铺在培养瓶中，补足培养液，37 ℃，5% CO_2的条件下培养。培养 2 代后 γ 射线(28 Gy)处理。

1.4 ES 细胞的复苏及 TX-WES 培养液的培养筛选 培养瓶以 0.2 %明胶预处理 30 min 后，将滋养层细胞铺于明胶上，未工程化 ES 细胞和 GR 工程化 ES 细胞解冻后分别以适当数量接种在饲养层上，加入添加 1 000 U/ml LIF 的普通 ES 细胞培养液，37 ℃，5% CO_2的条件下培养。待 ES 细胞克隆长起后分成 2 部分，一部分作为未筛选组(对照组)以 ES 细胞普通培养液培养并进行囊胚注射；另一部分作为筛选组进行 TX-WES 培养液的培养筛选后再进行囊胚注射。方法是先将 ES 细胞在滋养层细胞上以 TX-WES 培养液培养 2 代，2 代后取 1/5～1/3的细胞悬浮液重置于同一培养皿(无滋养层细胞)中继续培养。培养 2 d 后应可观察到出现三维形态的克隆(未分化)和扁平生长的克隆(已分化)，两者之间的差别很明显。只要拍打培养皿，三维形态的克隆(未分化)即可脱落。收集上清，离心并弃去培养液。胰酶消化成单细胞悬液，重新生长在滋养层细胞上。如果仍存在部分分化细胞，可将该培养筛选程序重复 1 次。

1.5 ES 细胞囊胚腔注射[6] 取 3～4 周龄 C57BL/6J 雌鼠，经超排处理(PMSG/HCG)后与雄鼠交配，第 2 天检查有阴栓者记为 0.5 d，3 d 后孕鼠断颈处死，M_2溶液冲洗子宫得囊胚。将 ES 细胞及其滋养层胰酶消化成单细胞悬液，细胞悬液晃匀后放培养箱培养 20 min 选择性去除滋养层细胞，因为滋养层细胞更易贴壁[7]。将消化好的 ES 细胞通过显微注射注入到囊胚腔中，CO_2孵箱孵化 3～4 h 使囊腔恢复后重新植入到 ICR 假孕小鼠子宫中进行培育。

1.6 嵌合体的获得、测交实验及种系嵌合体的确定 制备嵌合体的 ES 细胞源于近交系 129/SvJ，其毛色表型为背面褐色，腹面乳黄色；供体胚胎来自近交系 C57BL/6J，其毛色表型为黑色，且两者毛色为共显性。因此，胚胎经囊胚腔注射后产生的后代可根据是否具有 ES 细胞来源的毛色来确定是否为嵌合体。嵌合体的嵌合程度按 ES 细胞来源毛皮所占比例估计。将成年嵌合体与 C57BL/6J 鼠进行交配，根据后代毛色确定 ES 细胞是否参与嵌合体生殖系嵌合，即确定是否为种系嵌合体。

1.7 统计学处理 以 χ^2 检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 ES 细胞的复苏及 TX-WES 培养液的培养筛选 将未工程化 ES 细胞复苏后(图 1A，克隆之间看不出形态差异，无分化迹象)，一部分作为未筛选组以普通 ES 细胞培养液培养并进行囊胚注射；另一部分作为筛选组先进行 TX-WES 培养液的培养筛选：将 ES 细胞在滋养层细胞上以 TX-WES 培养液培养 2 代后重置于同一培养皿(此时无滋养层细胞)，培养 2 d 后清楚地观察到出现扁平生长的克隆(ES 细胞呈现分化状态，克隆边界模糊，出现伪足样突起，随着培养时间延长，克隆内部细胞也开始出现分化，见图 1B)和三维形态的克隆(未分化 ES 细胞，克隆边界清楚，立体感强，易脱落，见图 1C)，两者之间的差别很明显。拍打培养皿即获得脱落下来的呈三维形态的未分化克隆，重新生长在滋养层细胞上扩大培养，再进行囊胚注射制备嵌合体。GR 工程化 ES 细胞亦进行同样处理，所得结果和未工程化 ES 细胞完全相似。

2.2 未工程化 ES 细胞嵌合体的获得及种系嵌合体的确定 将未筛选和筛选后的未工程化 ES 细胞分别进行囊胚腔注射(细胞代数均为 15 代)，获得嵌合体的情况见表 1。ES 细胞不经筛选其嵌合率为

25.0%，筛选后嵌合率提高到 53.8%，嵌合体制备的效率明显高于未筛选组($P<0.05$)。且由筛选 ES 细胞注射产生 6 只高度嵌合体，其中 3 只达到 85%以上。经测交实验检测，这 3 只产生的后代中全部或部分表现出 ES 细胞来源的毛色特征，即其背面为褐色、腹面为乳黄色，确定为种系嵌合体(图 2A，其中黑鼠为同龄正常 C57BL/6J 鼠对照)，其中 1 只为 100%高效种系传递(图 2B，其中黑鼠为同龄正常 C57BL/6J 鼠对照)。结果表明经 TX-WES 培养液培养及筛选后，具有种系传递或高嵌合能力的 ES 细胞比例大大增加，因而获得经生殖系传递嵌合体的概率也大大增加了。

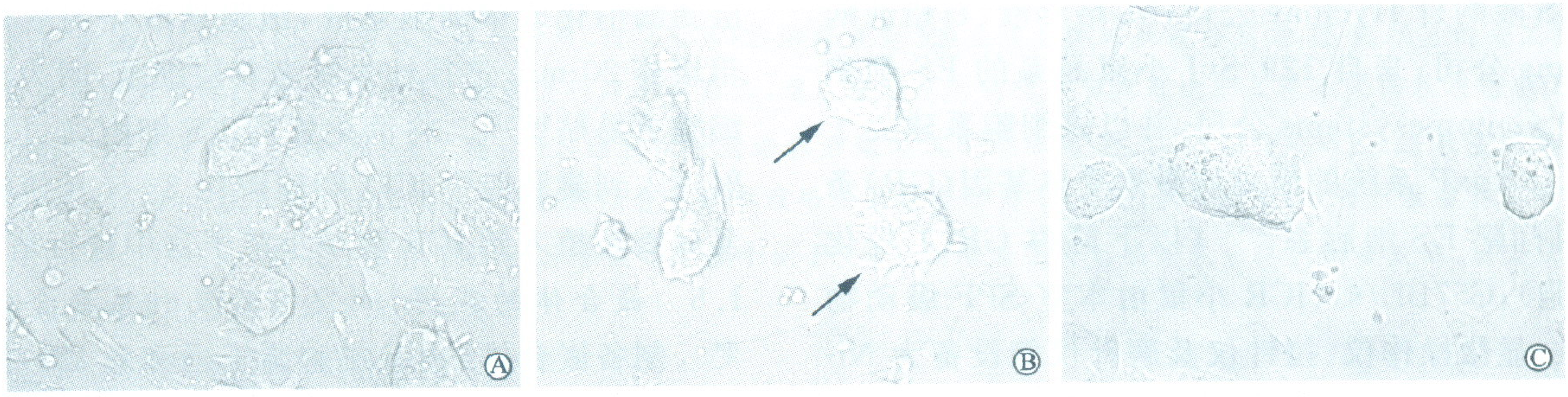

图 1 未工程化 ES 细胞的复苏及 TX-WES 培养液筛选

Fig 1 Non-targeting ES cells' resuscitation and screening with TX-WES medium(×200)

A: No differentiation phenomena in ES cells clones after resuscitation; B: Most ES cells clones differentiated after cultivated with TX-WES medium(arrows indicated such differentiation phenomena as pseudopod shape); C: A few ES cells clones retained the undifferentiated state after cultivated with TX-WES medium

表 1 未工程化 ES 细胞和 GR 工程化 ES 细胞嵌合体的制备

Tab 1 Chimeras production of non-targeting and GR targeting ES cells

Groups	Blastocyst (n)	Pups survival (n)	Chimeras [n (%)]	Chimeric degree		Germline transmitter(n)
				<30%	>50%	
Non-targeting ES cells						
Unsreening	70	20	5 (25.0%)	4	1	0
Screening	70	26	14 (53.8%)*	8	6	3
GR targeting ES cells						
Unscreening	70	20	3 (15.0%)	3	0	
Screening	70	21	11 (52.3%)*	7	4	

* $P<0.05$ *vs* unscreening group

图 2 未工程化和 GR 工程化 ES 细胞嵌合体的获得

Fig 2 Production of chimeras from non-targeting and GR targeting ES cells

A: Chimeras from non-targeting ES cells; B: High germline transmittance frequency of chimeras from non-targeting ES cells; C: Chimeras from GR targeting ES cells

2.3 GR 工程化 ES 细胞嵌合体的获得　将未筛选和筛选后的工程化 ES 细胞分别进行囊胚腔注射(细胞代数均为 18 代)，获得嵌合体的情况见表 1。ES 细胞不经筛选其嵌合率为 15.0%，筛选后嵌合率提高到 52.3%，嵌合体的制备效率明显高于未筛选组($P<0.05$)，说明 TX-WES 培养液也能明显提高经同源重组处理后的 ES 细胞的嵌合体制备效率(图 2C)。筛选后获得高嵌合性小鼠的概率增加，

也提示经 TX-WES 培养液培养及筛选后,具有高嵌合能力的 ES 细胞在群体中的比例大大增加了,其种系传递检测的测交实验还在进行中。

3 讨 论

基因打靶小鼠的建立是一项复杂的系统工程,其中涉及打靶载体的构建、ES 细胞的培养及筛选、嵌合体的制备以及胚胎移植等一系列前后衔接的工作,尤其是如何维持 ES 细胞在体外培养过程中的未分化状态更是该工程的重中之重。因为 ES 细胞的未分化状态关系到嵌合体的制备效率,丧失了全能性的 ES 细胞无法参与早期胚胎的发育,而嵌合鼠的获得更是实现 ES 细胞途径的决定步骤[1]。传统的培养条件是让 ES 细胞生长在用小鼠胚胎成纤维细胞制备的饲养层上,因为胚胎成纤维细胞可以分泌一些能够抑制细胞分化的物质,如白血病抑制因子(LIF)或分化抑制因子(DIA)等。基于近十年 ES 细胞培养的经验,我们认为正是因为随着 ES 细胞体外培养代数的增加,加上 ES 细胞的娇嫩特性(对培养条件要求极为严格,各种因素稍有改变即可造成其发生不可逆的转变),导致群体中已丧失嵌合能力的 ES 细胞比例越来越大,这些变异的细胞通过较短的复制时间或较好的接种效率容易形成生长优势,能很快超过正常的未分化细胞而成为培养环境中的主要细胞,最终使得嵌合体制备的失败。如何将已丧失嵌合能力的 ES 细胞通过促进其分化而淘汰出局,而将比例较低的具有嵌合能力的未分化 ES 细胞富集出来,这样在用于囊胚注射的 ES 细胞群体中,具有嵌合能力的 ES 细胞比例大大增加,因而获得嵌合体的概率也大大增加了,这正是本研究开展的意义所在。

TX-WES 培养液以普通 ES 细胞培养液为基础,添加表达兔 LIF 的永生化兔成纤维细胞分泌物,ELISA 测定 LIF 浓度达到 15 ng/ml 以上,并有 IL-1、IL-11 等因子分泌,其特殊作用是添加了 LIF 并含有新鲜制备的哺乳动物滋养层细胞的普通 ES 细胞培养液无法比拟的[8]。Schoonjans 等[8]报道该 ES 细胞培养液可使来源于近交系小鼠的 ES 细胞更易于建系并保持较好的生殖系嵌合能力,但其确切机制还不明。本室引进该条件培养液并用于 ES 细胞的常规培养,在培养中我们经该培养液培养后,ES 细胞克隆之间出现两级化现象,大部分克隆呈现分化迹象,变得扁平而更易贴壁;而少部分克隆不仅不表现出分化迹象,反而立体感更强,更易脱落,将这部分细胞富集并扩大进行囊胚注射,嵌合体的制备效率大大提高,并提示该培养液具有改善小鼠 ES 细胞高嵌合及种系传递的能力。其原因可认为是经该培养液培养及筛选后,具有种系传递或高嵌合能力的 ES 细胞比例大大增加,因而获得经生殖系传递嵌合体的概率也大大增加了。

本研究结果表明,通过应用 TX-WES 条件培养液改善 ES 细胞的体外培养条件,对代数较高的 ES 细胞(15 代以上)进行培养及筛选,嵌合体的制备效率得到很大的改进,这为基因剔除小鼠研究的顺利开展奠定了良好基础。

[参 考 文 献]

[1] Shimada H, Kaname T, Suzuki M, *et al*. Comparison of ES cell fate in sandwiched aggregates and co-cultured aggregates during blastocyst formation by monitored GFP expression[J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 52 (4): 376-382.

[2] Nagy A, Rossant J, Nagy R, *et al*. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(18): 8424-8428.

[3] 姚玉成,胡以平. 糖皮质激素受体基因片段的克隆和目标载体的构建[J]. 第二军医大学学报,1999,20(10):726-728.

[4] 姚玉成,胡以平. GR 基因片段的克隆和可诱导的目标载体的构建[J]. 癌变.畸变.突变,1999,11(3):113-116.

[5] 何志颖,姚玉成,李建秀,等. 基于 Cre/loxP 系统的 GR 基因条件性打靶嵌合鼠的获得[J]. 第二军医大学学报,2005,26(3):290-293.

[6] Hogan E, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo[M]. *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1986.

[7] Wood SA, Parcoe WS, Schmidt C, *et al*. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 4582-4585.

[8] Schoonjans L, Kreemers V, Danloy S, *et al*. Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains[J]. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 90-97.

[收稿日期] 2005-10-27 [修回日期] 2005-02-10
[本文编辑] 曹 静