

# 人原始生殖细胞分离培养的初步研究

撒亚莲, 黄锦桃, 李海标

(中山大学中山医学院组织胚胎学教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨分离培养人原始生殖细胞的最佳条件。【方法】用胰蛋白酶消化5~9周人流组织中的人胚生殖嵴, 获取人原始生殖细胞。以小鼠胚胎成纤维细胞作饲养层, 在高糖DMEM培养基中添加10 μmol/L福司克林(forskolin)和5~10 μg/L碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的培养液中培养、传代, 并对子代细胞进行碱性磷酸酶活性检测和体外分化实验。【结果】原代培养时形成许多大小不等, 形态各异的由人原始生殖细胞组成的集落, 约5~7 d传代。传代后, 集落生长, 变大。细胞培养到第七代, 检测碱性磷酸酶染色为强阳性, 体外分化实验有拟胚体形成。【结论】人原始生殖细胞可以用胰蛋白酶消化分离培养。用高糖DMEM培养基, 添加forskolin和bFGF有利于人原始生殖细胞增殖。体外分化实验初步证实人原始生殖细胞具有多向分化潜能。

**关键词:**生殖细胞, 原始; 细胞培养; 细胞分化

**中图分类号:** R329.25

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2003)04-0325-04

## The Preliminary Study on the Isolation and Cultivation of Human Primordial Germ Cells

SA Ya-lian, HUANG Jin-tao, LI Hai-biao

(Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To establish a proper system for the isolation and ideal culture conditions for human primordial germ cells(hPGCs) *in vitro*. 【Methods】hPGCs were isolated from the gonadal ridges of 5~9 weeks old abortion postfertilization human embryonic tissues and digested with trypsin, then cultured in high glucose DMEM (H-DMEM) containing 10 μmol/L forskolin and 5~10 μg/L human recombinant basic fibroblast growth factor(bFGF). Mouse embryonic fibroblast was used as feeder layer. The morphology was observed under light microscopy. The alkaline phosphates (AKP) test and differentiation test *in vitro* were carried out. 【Results】Colonies of hPGCs cells with different sizes and morphology were well formed in primary culture. In passage cultured, colonies grew well and became somewhat bigger than that in primary culture and could be subcultured one generation in 5~7 d. Until 7<sup>th</sup> generation, hPGCs expressed AKP strong positive staining and gave rise to embryoid bodies *in vitro*. 【Conclusion】The results indicate that hPGCs can be isolated and cultured with trypsin. The H-DMEM medium containing forskolin and bFGF can maintain survival and proliferation of hPGCs effectively. Primary experiment *in vitro* shows that the hPGCs have multiple differentiation potential.

**Key words:** germ cell, primordial; cell culture; cell differentiation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4): 325~328]

在胚胎早期, 性别分化之前, 首先与体细胞分离形成的生殖细胞称为原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs), 在体外分离培养、建系成功后改

称为胚胎生殖细胞 (embryonic germ cell, EG 细胞), 是胚胎性干细胞的另一个来源。近年的研究证实 EG 细胞与胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES

收稿日期: 2003-03-05

基金项目: 国家重点基础研究课题(973)基金资助项目(G1999054301-2)

作者简介: 撒亚莲(1971-), 女, 云南开远人, 博士生; 李海标, 教授, 博士生导师, 课题主持人。

细胞)具有相似的多向分化潜力,是研究细胞分化、基因操作、药物筛选、致畸实验、生殖细胞发育、分化和成熟的调节机制及生殖系肿瘤发生等方面的有用工具<sup>[1-4]</sup>。自1998年报道人EG细胞建系成功后<sup>[5]</sup>,相关的研究尚少,主要受制与体外培养体系尚不理想。多家实验室力图重复实验,但尚未见培养建系成功的报道。因此,本文探讨体外分离培养人原始生殖细胞(human primordial germ cells, hPGCs)的条件,为中国人EG细胞系的建立及应用研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胚胎组织来源于某医院妇产科人流室。健康、自愿人工终止妊娠的孕5~9周(受精龄)人流胚胎组织。昆明小鼠来源于中山大学北校区实验动物中心。hPGCs的培养液为高糖DMEM中添加200 mL/L胎牛血清,2 mmol/L谷氨酰胺,0.1 mmol/L非必需氨基酸,10<sup>6</sup> IU/L人白血病抑制因子(human leukemia inhibitory factor, hLIF),0.1 mmol/Lβ巯基乙醇,10 μmol/L福司克林(forskolin),5~10 μg/L碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),以上均为GIBCO/BRL产品。鼠胚成纤维细胞的培养液为高糖DMEM(GIBCO/BRL产品),含100 mL/L新生牛血清(杭州四季青公司产品),100 000 U/L青霉素。

### 1.2 小鼠胚胎成纤维细胞的培养及饲养层制备

取12.5~14.5 d孕鼠(见阴栓为0.5 d),断颈处死,无菌条件下取出胚胎,去除胚胎头部、内脏和四肢,将躯干部转移到另一平皿内,用PBS充分洗涤,弃除红细胞。然后,用眼科剪将鼠胚躯干剪成1 mm<sup>3</sup>以下的碎块,转移到离心管内,加入2.5 g/L胰蛋白酶消化,收集细胞悬液,用含100 mL/L新生牛血清高糖DMEM培养。用3~5代成纤维细胞制备饲养层,当细胞生长为均匀单层细胞片时,加入丝裂霉素C(日本协和发酵工业株式会社生产),终浓度为10 mg/L,继续培养2 h,弃上清,用PBS轻洗5次,加入培养液,在1周内使用。

### 1.3 hPGCs的分离与培养

参照文献[2,3,5]进行。用无菌瓶收集健康、自愿人工终止妊娠,孕5~9周的人流胚胎组织。用PBS轻洗,小心、仔细寻找分离出胚胎下腹部组织,在解剖镜下用眼科剪(镊)取胚胎生殖嵴及周围

组织。剪碎至1 mm<sup>3</sup>大小,加入2.5 g/L胰蛋白酶,37℃作用3~5 min,加入等体积的培养液终止消化,离心弃上清,加入hPGCs培养液悬浮后,转移到饲养层上,放入CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每2 d换液1次,5~7 d传代。传代时,弃培养液,用PBS洗3次,加入2.5 g/L胰蛋白酶,37℃作用3~5 min,用含血清培养液终止消化,轻轻吹打,离心,加入hPGCs培养液悬浮,接种到新的饲养层上培养。

### 1.4 hPGCs的体外分化

在明胶包被的培养皿,无饲养层和hLIF,用含200 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养液培养hPGCs,大约3~10 d有类胚体(embryonic body, EB)形成。

### 1.5 碱性磷酸酶的检测

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)的检测按照1952年Gomori的α-萘基磷酸法。将待测细胞用无水乙醇固定30 min, PBS洗涤3次后,在孵育液中作用15 min;流水冲洗2~3 min;在10 mL/L醋酸水溶液中浸洗1 min;流水冲洗,甘油封盖。对照组在孵育液中不加α-萘酚磷酸钠<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 鼠胚成纤维细胞的生长情况

原代有杂细胞混杂生长,从第2代开始,基本为纯化的梭形成纤维细胞。

### 2.2 hPGCs的生长情况

单个hPGCs体积大,核质比高,有2个以上的核仁,在饲养层上呈集落生长,有些增殖为隆起的多层细胞克隆(图1)。克隆形态差异很大,有扁平状、隆起状、岛屿形、圆形、椭圆形、条状及不规则状等。典型集落初始呈小而圆的隆起,边界清楚,细胞密集、胞界不清。集落逐渐生长呈多层,形成“鸟巢状”集落。在实验中观察到hPGCs自然分化为成纤维细胞、神经元样细胞、上皮样细胞及跳动的心肌细胞。

### 2.3 碱性磷酸酶检测结果

在饲养层上生长的hPGCs克隆AKP染色呈强阳性反应,饲养层细胞和分化的细胞不着色(图2)。

### 2.4 hPGCs的体外分化

在无饲养层,不添加hLIF,仅用含200 mL/L胎牛血清的高糖DMEM的培养液培养hPGCs,3~4 d后自然分化形成类胚体(embryoid body, EB)(图

3), 在外层分化为较大细胞组成的内胚层样结构, 中间为未分化的干细胞。继续培养到 7~10 d, 囊状胚体形成, 在囊腔和早期分化出的内胚层样结构之

间发育成一层类外胚层的上皮样细胞。该结构可维持 3 周左右。

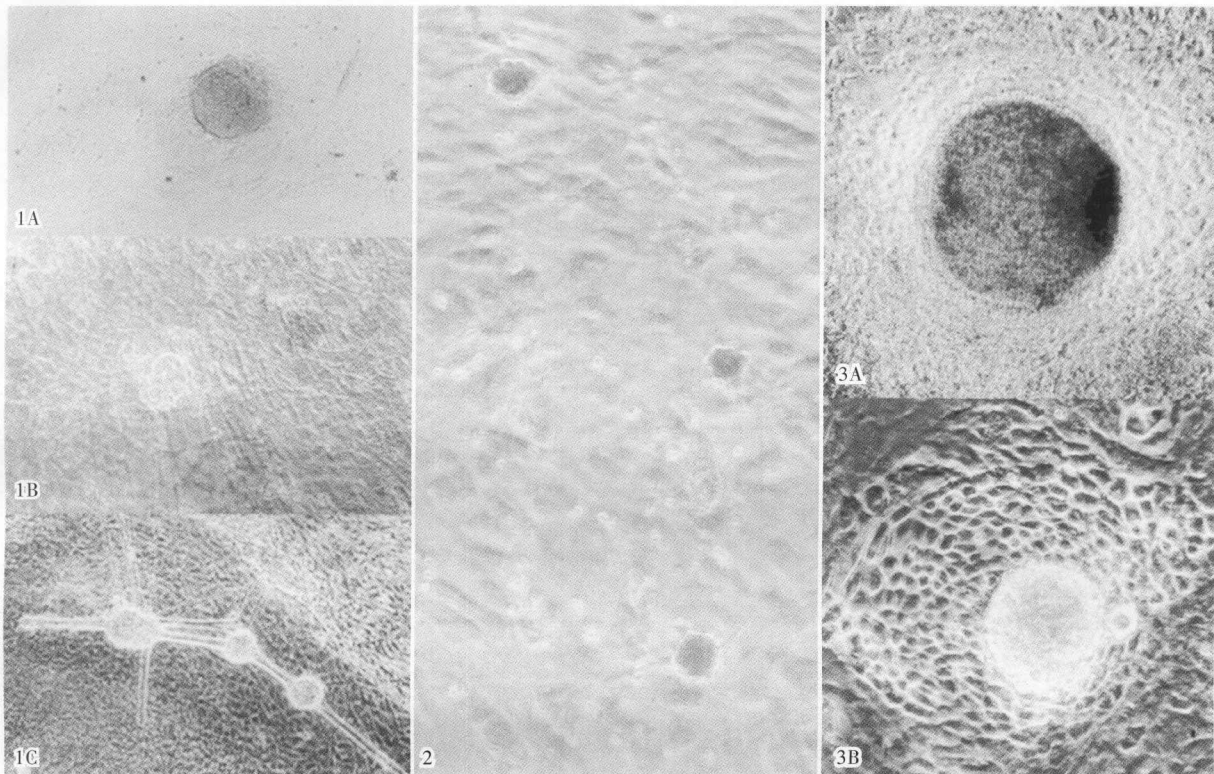


图 1 生长在饲养层上的人原始生殖细胞

图 2 人原始生殖细胞克隆 AKP 染色强阳性

图 3 人原始生殖细胞体外悬浮培养有拟胚体形成

Fig. 1 The hPGCs grew on the feeder layer. ( $\times 100$ )

Fig. 2 The hPGCs strongly positively expressed AKP. ( $\times 100$ )

Fig. 3 The hPGCs formed embryoid body after culturing in suspension.

1A. The third passage hPGCs; 1B. The fifth passage hPGCs; 1C. The migration hPGCs; 3A. 3~4 d later, formed EB ( $\times 100$ ); 3B. 7~9 d later, formed EB ( $\times 200$ )

### 3 讨论

hPGCs 是一种具有多向分化潜能的干细胞。关于 PGCs 的起源, 说法不一, 较公认的观点是来源于胚胎原始外胚层(上胚层)<sup>[7]</sup>。在人胚 3~4 周, hPGCs 出现在尿囊基底部卵黄囊壁上的内胚层细胞之间; 4 周末, 位于后肠上皮; 5~6 周 hPGCs 沿背肠系膜迁移到生殖嵴; 7~8 周完成迁移。大约有 1 700 个 hPGCs 迁移到生殖嵴, 开始增殖分化成精原细胞或卵原细胞<sup>[4]</sup>。因此, 在体外必需通过有效途径来阻止 hPGCs 的自然倾向, 使其再程序化或去分化来维持多能干细胞特性。

目前, 培养 hPGCs 不仅要添加 hLIF, 还需要饲养层才能抑制其自然分化倾向。饲养层的质量关系到 hPGCs 的生死, 饲养层不宜过厚, 呈单层, 均匀

分布为好。丝裂霉素 C 作用时间可依饲养层厚薄稍延长或缩短。如果丝裂霉素 C 作用强度不够, 饲养层细胞在高营养的培养液中会蓬勃生长, 容易出现翻卷, 包裹 hPGCs。丝裂霉素 C 作用过强, 饲养层就易出现沟痕, 裂纹, 细胞衰老崩解。此外, 在培养基中添加 forskolin 和 bFGF 具有促进 hPGCs 存活和增殖的作用, 与 Shambloott 等<sup>[5,8,9]</sup>的报道相似。由于检测 hPGCs 的抗体昂贵且不易获得, 我们仅用 AKP 进行检测。已有的研究表明, ES 细胞和 hPGCs 均呈 AKP 强阳性反应。此外, 本实验将 hPGCs 在无饲养层, 无 hLIF 的培养基中培养, 有类胚体形成, 我们的结果与相关的报道一致<sup>[5,8]</sup>。在实验中, 还观察到 hPGCs 集落有自然分化为成纤维细胞、神经元样细胞、上皮样细胞及跳动的心肌细胞, 表明 hPGCs 具有多向分化的潜能。

hPGCs 的消化传代一直是难点, hPGCs 耐胰蛋

白酶,不易分散。我们在实验中尝试过机械分离、胰蛋白酶、胶原酶及木瓜酶消化传代,但无明显效果。寻找有效的消化传代和扩增方法,有待进一步研究。

从人流组织中寻找、分离 hPGCs 是实验中要特别注意的问题之一。在孕 5~7 周,胚体尚未成人形,而 9 周,hPGCs 开始性分化。通常,由蜕膜、绒毛膜及胚体组成的人流组织中的胚体已碎,极其不容易寻找到完整的胚体,特别是腰骶部组织(含 hPGCs 的生殖嵴)。此外,取人流标本时,要注意在胚胎发育过程中会出现胚胎停止发育或空孕囊妊娠,因此,最好有 B 超检查结果。取到材料后,需尽快分离培养,在 3 h 内完成为好。

#### 参考文献:

- [1] Weissman I L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution[J]. *Cell*, 2000, 100(1): 157.
- [2] Matsui Y, Zsebo K, Hogan B L. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. *Cell*, 1992, 70(5): 841.
- [3] Resnick J L, Bixler L S, Cheng L, *et al.* Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture[J]. *Nature*, 1992, 359(6395): 550.
- [4] Goto T, Adjaye J, Rodeck C H, *et al.* Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis[J]. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(9): 851.
- [5] Shambloot M J, Axelman J, Wang S, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13726.
- [6] 邱观婷,黄冰,唐仕波,等. 探讨保持胚胎干细胞全能性的体外培养条件[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(2): 100.
- [7] Kelly S J. Studies of the developmental potential of 4-and 8-cell stage mouse blastomeres[J]. *J Exp Zoo*, 1977, 200(3): 365.
- [8] 李晓红,丛笑倩,汪铮,等. 人多潜能胚胎生殖细胞的分离和培养[J]. *实验生物学报*, 2002, 35(2): 142.
- [9] De-Felici M, Pesce M. Growth factors in mouse primordial germ cell migration and proliferation[J]. *Prog Growth Factor Res*, 1994, 5(2): 135.

(编辑 张恩健)

(上接第 324 页 from page 324)

- blockage[J]. *Neurosci Lett*, 1995, 191(1-2): 43.
- [3] Sandkuhler J, Liu X G. Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury[J]. *Eur J Neurosci*, 1998, 10(7): 2476.
- [4] Kenshalo D R Jr, Leonard R B, Chung J M, *et al.* Facilitation of the response of primate spinothalamic cells to cold and to tactile stimuli by noxious heating of the skin[J]. *Pain*, 1982, 12(2): 141.
- [5] Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(3): 175.
- [6] Malinow R, Schulman H, Tsien R W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMK II blocks induction but not expression of LTP[J]. *Science*, 1989, 245(4920): 862.
- [7] Feng T P. The involvement of PKC and multifunctional CaM kinase II of the postsynaptic neuron in induction and maintenance of long-term potentiation[J]. *Prog Brain Res*, 1995, 105(1): 55.
- [8] Fang L, Wu J, Lin Q, *et al.* Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(10): 4196.
- [9] Bliss T V, Collingridge G L. A synaptic model of memory: termilong-term potentiation in the hippocampus[J]. *Nature*, 1993, 361(6407): 31.

(编辑 张敏瑞)