

鱼类胚胎干细胞的研究进展*

刘映娴, 安立龙*, 冯 业

(广东海洋大学农学院动物科学系, 广东 湛江 524088)

[摘要] 胚胎干细胞是存在于早期胚胎或原始生殖嵴, 具有发育全能性和无限增殖能力的一类细胞。作为实验材料, 该类细胞已广泛应用于基因的表达与调控、细胞分化的机制、动物克隆及转基因动物生产等研究领域。与其他哺乳动物胚胎干细胞的研究相比, 虽然鱼类胚胎干细胞的研究起步较晚, 但近年来该领域的研究进展迅速。本文综述了鱼类胚胎干细胞的分离培养、生物学特性、体外分化能力及嵌合体形成等方面的研究进展。

[关键词] 胚胎干细胞; 生物学特性; 体外分化; 嵌合体; 鱼

[中图分类号] S811.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-5228(2007)06-0149-04

胚胎干细胞(ES 细胞)是从动物早期内细胞团或原始生殖细胞经体外分化抑制培养分离和克隆出来的一种具有发育全能性、无限增殖和多向分化潜能的细胞。在适合的条件下, ES 细胞能够分化为多种类型的细胞或组织。ES 细胞还具有种系传递功能, 将 ES 细胞移植到宿主囊胚后, 它可参与宿主胚胎各组织器官的生长发育, 并形成生殖细胞。此外, ES 细胞还可通过引入外源基因或同源重组或基因打靶等技术, 将动物基因组的体内和体外的各种遗传操作联系起来。因此, ES 细胞为动物早期发育中细胞分化及组织形成的分子机制、基因调控及基因功能等发育生物学的基础研究提供一个非常理想的工具, 也是提高动物生产性能及疾病防治的重要手段。鉴于 ES 细胞在发育生物学等基础研究以及组织工程、临床医学研究中展示的优势, ES 细胞的研究已引起国内外科学家的高度关注。

1981 年, Evans 和 Kaufman 用延缓着床的胚胎, Martin 用条件培养基分别成功地分离及体外培养了小鼠的 ES 细胞, 这是 ES 细胞分离成功的首次报道, 它开创了胚胎干细胞研究的新领域, 为建立其他动物胚胎干细胞技术奠定了基础。目前, 小鼠 ES 细胞分离、建系及基因打靶技术已趋于完善, 并成功制作了多种转基因或基因敲除小鼠。除小鼠外, 其

他哺乳动物 ES 细胞的研究也取得了一定的成绩, 目前已成功建立了猪、牛、马、鸡、兔、羊、水貂、猕猴等动物的类 ES 细胞系。

1 鱼类胚胎干细胞研究概况

鱼类胚胎干细胞培养研究最早始于 20 世纪 90 年代, 基本上是借鉴小鼠 ES 细胞培养的方法, 但得到的结果却差强人意。目前, 鱼类 ES 细胞的研究主要集中在一些应用模型鱼和经济鱼上, 包括: 青鳉、斑马鱼、大菱鲆、花鲈、金头海鲷, 特别是斑马鱼, 由于它具有个体小, 成体长 3~4cm; 胎间距短, 孵出后约 3 个月可达性成熟; 全年均可繁殖, 通过人工控制光照可使成熟个体每天产卵, 产卵量大, 卵大且透明; 胚胎发育非常迅速(从受精到孵出大约 3d), 且来之于同一母体的胚胎是同步发育的, 易于大量收集特定阶段的同期胚胎材料等特点, 因此成为研究鱼类 ES 细胞及低等脊椎动物发育遗传较为理想的实验模型动物。

有关鱼类 ES 细胞分离最早的报道为 Colloidi P 等在斑马鱼上进行的研究。他们对来源于囊胚期的细胞, 以虹鳉鱼胚胎作为饲养层细胞, 用条件培养基进行培养。在连续培养 2 周后, 斑马鱼胚胎原代培养细胞形成少量细胞集落, 他们推测在细胞集落中

* [收稿日期] 2006-11-24

[作者简介] 刘映娴(1981-), 女, 广东兴宁人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物营养与生殖。

* [通讯作者] 安立龙(1966-), 男, 教授, 硕士生导师。

的小细胞可能为未分化的 ES 细胞。随后, Sun L 等成功获得了斑马鱼胚胎成纤维细胞系(ZEF),并以 ZEF 为饲养层细胞,以 LDF 为基础培养基,用前添加 0.18mg/mL 碳酸氢钠、15mol/L Hepes (pH7.4)、400 μ g/mL 青霉素、400 μ g/mL 链霉素、50 μ g/mL 氨苄青霉素、10 μ g 牛胰岛素、0.4% 虹鳟鱼血清和 5% 小牛血清,此外,还添加了虹鳟鱼胚胎抽提液、硒、胰岛素及白血病抑制因子等因子,并用此培养基对来源于囊胚阶段的细胞进行培养。经过多代传代培养后,获得了 ES 细胞系,这些细胞表现出正常二倍体核型,并具有高的碱性磷酸酶活性。

在青鳉上, Wakamatsu 等建立了饲养层培养 ES 细胞的技术。他们以来源于囊胚期或原肠胚期的青鳉细胞 HNI 系为饲养层细胞,培养基中除添加 bFGF、鲤鱼血清外,其他营养因子与用于小鼠 ES 细胞培养的培养基相同,并成功地从 HNI 系青鳉囊胚中分离培养出 ES 样细胞 OLES1 系。这些细胞能够稳定生长,具有 ES 细胞的形态及高的碱性磷酸酶活性,更为重要的是在视黄酸的作用下能够分化为各种细胞类型。虽然 OLES1 细胞系的全能性未经形成嵌合体的试验所证实,但上述所有特征都充分证明 OLES1 细胞系确实为 ES 样细胞系。由于没有找到合适的细胞作为饲养层细胞, Hong Y 等建立了无饲养层细胞培养技术,并形成了用于中期囊胚细胞原代及维持培养的培养基 ESM1、ESM2、ESM3 及 ESM4。这四种培养都是以 DMEM(高糖)为基础培养基,用前添加一些营养因子。Yunhan Hong 等以 ESM1 作为原代培养基,以 ESM3 作为维持生长的培养基,成功地从 HB32C 系青鳉中期囊胚中分离培养出三个 ES 样细胞系,并以 MES1 系为代表。在经过 18 个月、100 多代的连续培养后, MES1 都表现出稳定的生长和形态,没有出现任何分化危机;该细胞可以长期冷冻保存,解冻复苏后仍可正常生长。MES1 细胞系具有鼠类 ES 细胞的各种特征,包括:稳定生长、细胞小、核大而胞质稀少、细胞圆或多边形、具有高碱性磷酸酶活性及正常二倍体核型。由此充分证明, MES1 细胞系确实是 ES 样细胞系。

Julia Bejar 等采用 Yunhan Hong 等建立的无饲养层细胞培养技术,以 L-15 为基础培养基,用前添加 20mM Hepes、抗生素(青霉素 100U/mL;链霉素 100mg/mL;两性霉素 250ng/mL)、15% 胎牛血清、4mM 谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠、1mM 非必需氨基酸、2nM 亚硒酸钠、50 μ M 2-巯基乙醇、10ng/

mL 人重组碱性成纤维生长因子(bFGF)、1% 鱼血清及胚胎抽提液。采用这种培养系统,以 26 $^{\circ}$ C 为培养温度,也成功地建立了来源于中期囊胚阶段的金头海鲷 SaBE-1 细胞系。该细胞系在经过 9 个月、50 多代的连续培养中,都表现出稳定的生长,细胞形态无明显变化或分化现象,同时具有高的碱性磷酸酶活性。

Song-Lin Chen 等利用完全培养基成功从囊胚中分离培养出了二个花鲈胚胎干细胞并建系(LJES1 细胞系)。完全培养基是以 DMEM 为基础培养基,加 20mM Hepes、抗生素(青霉素 100U/mL;链霉素 100mg/mL)、15% 胎牛血清、1% 的花鲈血清、0.1% 花鲈胚胎抽提液、8nM 亚硒酸钠、5ng/mL bFGF、5ng/mL hLIF、27.5 μ M 2-巯基乙醇、1mM 丙酮酸钠、1mM 非必需氨基酸构成的。其培养的温度为 25 $^{\circ}$ C,在培养 150d、40 多代后,细胞仍保持稳定生长,冷冻保存解冻复苏后细胞存活率为 60%。同年, E Holen 和 K Hamre 也成功地从大菱鲆囊胚中分离培养 ES 样细胞系。这种细胞系在早期培养中表现出典型的 ES 细胞形态,延长培养后,大部分细胞出现分化现象,只有 4~5% 的细胞存活下来,并具有高的碱性磷酸酶活性及表达 Oct-4。

2 鱼类胚胎干细胞的体外分化能力

Sun 等研究表明,斑马鱼 ES 样细胞培养于含 D-赖氨酸和视黄酸的培养基时或培养于 BRL-CM 及低浓度血清的诱导下,可以分化成神经元细胞。当斑马鱼胚胎细胞与 ZEF 和 BRL 饲养层细胞共同短期培养后产生黑色素细胞,而当移去饲养层细胞进行悬浮培养时能够形成类胚体,表明该 ES 样细胞具有体外分化能力。

Yunhan Hong 等研究表明, MES1 具有很强的体外分化能力。在正常培养条件下,大多数都保持未分化状态,只有一小部分(<1%)自发分化为神经细胞、纤维细胞、黑色素细胞等细胞类型。此外,在视黄酸的诱导下,经过 1d 的悬浮培养后形成细胞集落,这些集落稳定变大、变密,甚至发展为球状结构,这种结构与小鼠 ES 细胞的类胚体相似。Julia Bejar 等对 SaBE-1 体外分化能力的研究也得出同样的结果。

在花鲈上, LJES1 在视黄酸的诱导下,能够分化为各种细胞类型。而大菱鲆的 ES 样细胞在培养基中添加视黄酸及去除 LIF 后,类胚体形成的比例增加了。

此外,试验研究还表明,鱼类胚胎干细胞体外分化及分为哪种类型的细胞与培养的时间和培养的时间有关。J Bejar 等的研究表明 ES 样细胞的分化趋势与培养条件特别是与培养时的细胞密度有关:低密度培养容易引起细胞分化。例如 MSE1 在低密度培养,容易分化为神经细胞及纤维细胞,黑色素细胞却只在高密度培养时才出现,而肌肉细胞则需要细胞与细胞紧密相连后更长的一段时间才出现;10~30 代的 LJES1 细胞用视黄酸处理 10~15d 后,在低密度培养下,大部分细胞分化为神经细胞;12~20d 后分化为纤维细胞,而在高密度培养 15~20d 后则分化肌肉细胞。

3 鱼类胚胎干细胞嵌合体的形成

能否形成嵌合体是判断 ES 细胞是否具有全能性的一个重要的标准。目前,有关鱼类嵌合体的研究只有几篇报道,但这些试验均是用囊胚细胞作为供体细胞,而有关将经过长期培养的 ES 细胞移植后形成嵌合体的研究目前也仅在青鳉等鱼类上。

Colloidi P 等首次用质粒转染技术将标记基因引入斑马鱼的 ES 细胞中,并将转染的细胞重新移植到囊胚阶段的胚胎中,结果表明,培养的细胞能够存活下来并有可能参与各种组织器官的发育。

Yunhan Hong 等将传代培养 27~66 代的青鳉 ES 样细胞系(MES1)显微注射到青鳉白化品系的囊胚中。在注射的 551 个胚胎中,有 263 个胚胎存活下来并有 15 个胚胎身上出现了一个或多个野生型黑色素细胞,黑色素嵌合体的比例大约为 6%,这些黑色素细胞主要分布在头部(4 例)、头内部(2 例)、躯干部(2 例)、眼睛(2 例)及卵黄囊(5 例)。在 MES1 细胞通过显微注射到受体胚胎后所获得的鱼苗中,PCR 检测表明每个嵌合体中所含的 MES1 DNA 量为 2%~10%。另外,他们还用绿色荧光蛋白(GFP)转染了 MES1 细胞,大约 7%的 MES1 细胞表达了 GFP 蛋白。然后将携带 GFP 基因的 MES1 细胞显微注射到白化青鳉品系囊胚中,在培育 10d 后,86%~90%发育为 GFP 阳性鱼。这些嵌合体鱼苗含有 1~50 个 GFP 阳性的 MES1 细胞。

Julia Bejar 等将 150 个转染了 EGFP 的 SaBE-1 胚胎注射到 5 个早期囊胚中。在注射的 150 个胚胎中,24h 后存活的有 63 个,存活率为 43%。在存活的 63 个中,有 26 个表达了 EGFP,在培养 48h 后,只有 11 个存活下来。培养 4d 后,只有一个胚胎存活下来并发育到幼虫状。此外,以转染 EGFP 的

细胞数量作为判断嵌合程度的标准时,发现转染 EGFP 的细胞数量从一个细胞增殖到 25~30 个细胞,这些细胞分布在胚胎内及胚胎外的一些结构中。在胚胎内结构中,这些细胞分布于三胚层的不同组织器官中,如血管、耳囊、体节及内脏。

沙珍霞等将表达率为 5%~10%标记 GFP 基因的花鲈 ES 细胞通过显微注射方法移植到花鲈囊胚中,共移植囊胚 478 枚,获得了 20 枚表达 GFP 的合体胚胎,其中的 15 枚胚胎发育成鱼苗,嵌合部位可分布于胚体的 3 个胚层。

值得一提的是,核移植技术虽在脊椎动物上已经成熟,但在早期胚胎发育时,鱼与哺乳动物在一些形态及生理上仍是有区别的,因此,与小鼠相比,鱼胚胎嵌合体的形成率较低。造成低嵌合率的最主要的原因是供体与受体在生理上的不相容,表现在四个方面:(1)在中期囊胚阶段鱼胚胎缺乏合子转录,而体外培养的细胞却表现明显的合子转录,在小鼠上,受体胚胎在 2 细胞阶段就已高度表达合子转录;(2)培养的细胞与受体胚胎在细胞周期时间上相差高达 80 多倍;(3)体外培养的细胞形态上会发生改变,如与受体细胞相比,培养的细胞缩小了近 30 倍同时还失去了伪足;(4)鱼的早期发育是非常快的,要使受体和供体相容则必须在受精后 6h 内进行。此外,嵌合体的形成还与供体和受体的基因背景及培养时间有关。Yunhan Hong 等的试验证实了这一观点,在青鳉上,HB12A、HB32C 及 HNI 三个细胞系与其他细胞系相比,更容易产生黑色素嵌合体,同时,延长体外传代次数会降低嵌合体形成率及嵌合程度,这一观点也为 M. Hyodo 等人所证实。

4 几种因子对鱼类胚胎干细胞的影响

在哺乳动物 ES 细胞的培养中,饲养层细胞具有同化培养液、为胚胎发育提供一些必需因子及除去体外培养环境中的毒素和代谢抑制因子等作用。在斑马鱼上,采用饲养层细胞来培养 ES 细胞的结果并不乐观,因此,有学者认为饲养层细胞可能不适用于鱼或其他低等的脊椎动物。

在小鼠上,hLIF 主要是用来抑制 ES 细胞的自发分化,而对于青鳉、斑马鱼及金头海鲷来说,hLIF 对 ES 细胞的全能性及分化不起作用,但 E Holen 和 K Hamre 报道,LIF 为抑制大菱鲆 ES 样细胞分化所必需;叶寒青等报道,LIF 因子对早期 LJES1 细胞增殖几乎没有作用,其主要作用是维持 LJES1 细胞的未分化状态,但对晚期 LJES1 细胞的增殖有

一定的作用。这些试验结果的不同可能与试验动物及试验条件不同有关。

许多研究表明,bFGF 因子对很多细胞都有促有丝分裂的作用。叶寒青等报道,bFGF 因子对LJ ES1 细胞有强烈的刺激增殖作用,且刺激增殖的作用随浓度的增加而增加,其有效浓度上限为 2ng/mL。此外,bFGF 因子对斑马鱼 ES 细胞分化为黑色素细胞有很好的抑制作用,但对于青鳉来说,bFGF 因子却可能只是一种促分裂因子,而不起抑制分化作用。

此外,鱼类胚胎抽提液(FEE)现已证实为许多鱼类如斑马鱼、青鳉、花鲈 ES 细胞生长所必需的一种促分裂因子,它的促生长作用可能是因为 FEE 中存在细胞生长调节因子,且来源于同种鱼或相近种属鱼的 FEE 促分裂效果最佳。

5 鱼类胚胎干细胞的应用前景与展望

虽然我国鱼类胚胎干细胞及基因打靶的研究尚处于起步阶段,但鉴于基因打靶技术在有害基因的敲除及基因功能分析等方面具有巨大的潜力和应用价值,必然会引起人们的高度重视。可以预见,鱼类胚胎干细胞的研究及基因打靶技术必将在鱼类发育生物学、鱼类基因工程等方面发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] 于学慧,张世栋,张承梅.发育生物学的理想动物模型-斑马鱼[J].中国实验动物学杂志,2001,11(3):172-175.
- [2] 陈松林.鱼类胚胎干细胞研究进展[J].中国水产科学,2001,4:95-97.
- [3] Wakamatsu Y,Ozato K,Sasado T. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo[J]. Mol Mar Biol Biotenchnol,1994,3(4):185-191.
- [4] HONG Yun-Han, GUI Jian-Fang, CHEN Song-Lin, et al. Embryonic stem cells in fish[J]. Acta Zoologica Sinica,2003,49(3):281-294.
- [5] Julia Bejar, Yunhan Hong, M. Carmen Alvarez. An ES-like cell line from the marine fish *Sparus aurata*: Characterization and chimaera production[J]. Transgenic Rsearch,2002,11:279-289.
- [6] Song - Lin Chen, Zhen - Xia Sha, Han - Qing Ye. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos [J]. Aquaculture, 2003, 218: 141-151.
- [7] E Holen and K Hamre. Towards obtaining long term embryonic stem cell like cultures from a marine flatfish, *Scophthalmus maximus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry,2003,29:245-252.
- [8] 沙霞珍,陈松林,刘洋,等.显微注射技术在制备鱼类嵌合体 and 转基因海水鱼上的应用[J].海洋水产研究,2005,26(3):86-90.
- [9] 叶寒青,陈松林,沙霞珍.不同因子对花鲈胚胎干细胞增殖的影响[J].水产学报,2004,28(5):493-498.

Research Progress on Fish Embryonic Stem Cells

LIU Ying-xian, AN Li-long*, FENG Ye

(Department of Animal Science, Agricultural College, Guang Dong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: Embryonic stem cells are located in embryo or primordial genital ridge, which possess totipotency and infinite proliferation. The cells have been applied to study the translation and regulation of genes, the differentiated mechanism of cells, clone animals and produce transgenic animals as experimental materials. Compared with the others mammal embryonic stem cells, the research of embryonic stem cells are later in fish. However, the progress is rapid in recent years. Here, the isolation and culture, biological characteristics, in vitro differentiation and forming chimera on fish embryonic stem cells were reviewed in this article.

Key words: embryonic stem cell; biological characteristics; in vitro differentiation; chimera; fish