

鸡胚不同发育时期原始生殖细胞的分离方法*

李碧春 秦洁 肖小璜 陈国宏** 吴信生 吴圣龙

(扬州大学畜牧兽医学院, 江苏 扬州 225009)

摘要 采用 Ficoll 密度梯度离心法和 EDTA-胰酶酶解法两种方法, 分别提取第 14 期 (孵化 53 h) 血液、第 19 期 (孵化 72 h) 和第 28 期 (孵化 132 h) 生殖腺中的 PGCs, 以比较两种分离方法对 3 个发育时期的鸡胚原始生殖细胞在相同体外培养条件下存活时间的差异。结果发现, 两种分离方法均能分离到一定数量的原始生殖细胞, 但是酶解法分离到的原始生殖细胞的相对数量较 Ficoll 密度梯度离心法的多, 存活时间较长, 是一种适宜的分离方法; 对鸡胚发育第 14、19、28 期 3 个时期提取的原始生殖细胞进行体外培养, 存活时间分别为: 72 h、88 h 和 80 h, 三者之间差异显著。结果表明: 在鸡胚孵化的第 19 期, 因原始生殖细胞大量聚集在肢体后端的生殖嵴原基处, 因而较容易收集, 体外培养较为适宜, 具有较强的可操作性 [动物学报 49 (6): 835~842, 2003]。

关键词 鸡 原始生殖细胞 分离 存活时间

A method for isolation of primordial germ cells in different stages of the chicken embryo*

LI Bi-Chun QIN Jie XIAO Xiao-Jun CHEN Guo-Hong** WU Xin-Sheng WU Sheng-Long

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Yangzhou Univ., Yangzhou 225009, China)

Abstract We compared both Ficoll density-gradient centrifugation and EDTA-trypsin collection methods for isolating primordial germ cells (PGCs) from chicken embryos at stage 14, 19 and 28, cultured the PGCs in TCM-199 medium containing 10% FCS without any growth factor under 38.5 °C, 5% CO₂ and saturation moisture to compare the survival time *in vitro*. The results showed that the survival duration of the PGCs at stage 14 was 72 h, stage 19 was 88 h, and stage 28 was 80 h. The number of PGCs, and the viable PGCs with the EDTA-trypsin treatment were more (2.71×10^4 , 65.12%) than that of Ficoll density-gradient centrifugation (1.78×10^4 , 45.24%) at stages 19 and 28. Comparison of results of culture of PGCs *in vitro* at those three development stages indicated that a large amount of PGCs had aggregated in the genital ridge at stage 19 made it convenient for isolation. This stage was suitable for isolation of PGCs from early chicken embryos using EDTA-trypsin treatment [Acta Zoologica Sinica 49 (6): 835 - 842, 2003].

Key words Chicken, Primordial germ cells (PGCs), Isolation, Survival duration

家禽的胚胎发育与哺乳动物有着很大的不同, 由于胚胎发育的特殊性, 使得家禽不易获得单细胞受精卵和早期胚胎。因此, 借助于胚胎干细胞技术平台生产转基因家禽的研究具有重要的实际价值和社会意义。而原始生殖细胞 (Primordial germ cells, PGCs) 作为配子最初可识别的祖先细胞, 在鸡胚胎的早期发育过程中有其独特的迁移规律 (Meyer, 1964; 李碧春等, 2000), 从而能被分离提取, 并可移植到同种胚胎中 (Tajima *et al.*, 1993), 发育成有功能的配子, 是建立胚胎干细胞

系很理想的细胞源。此外, 作为一种具有发育全能性的多能干细胞 (Chang *et al.*, 1995), PGCs 细胞对体外研究胚胎发育、发现新基因、基因组研究和药物筛选等有重要意义。前人已经报道了不少有关 PGCs 的分离纯化方法 (Chang *et al.*, 1992; 韩毅冰等, 1996; 李赞东等, 2001; 李碧春等, 2001; Zhao *et al.*, 2003), 但大多数是用梯度离心法从血液中提取 (Naito *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1992; 韩毅冰等, 1996; 李赞东等, 2001; 李碧春等, 2001), 所提取的 PGCs 的绝对数量较

2003-08-08 收稿, 2003-09-02 修回

* 国家自然科学基金资助 (30170678) [This research was funded by a grant from National Natural Science Foundation of China (No. 30170678)]

** 通讯作者 (Corresponding author) E-mail: ghchen@mail.yzu.edu.cn

第一作者简介 李碧春, 女, 40 岁。博士, 副教授。研究方向: 动物胚胎工程及遗传工程。

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

少,远不够体外操作的需要。而根据鸡胚 PGCs 迁移规律可知,鸡胚原始生殖腺中 PGCs 相对集中,且有大量增殖(李碧春等,2002),是供体外培养 PGCs 很好的来源。然而这些不同方法、不同时期提取 PGCs 效果如何?除了李赞东(2001)比较了 Ficoll 梯度离心法、MiniMACS 磁气分离法、微孔膜滤过法之外,目前未见将不同时期的鸡胚 PGCs 用不同的方法分离进行的比较。

本研究旨在利用两种方法对鸡胚发育的第 14 期血液中、第 19 期和第 28 期的生殖腺中提取 PGCs,进行体外培养,以探讨分离、培养 PGCs 的适宜时期和方法,为鸡胚胎干细胞研究和应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 鸡胚的来源与孵化

受精蛋来源于中国农业科学院家禽研究所,品种为白莱航鸡,孵化温度为 37.5℃,相对湿度为 60%。孵化分期按 Hamburger *et al.* (1951) 标准划分。

1.2 PGCs 的培养条件

温度 38.5℃,饱和湿度,5%的 CO₂ 浓度下培养。

1.3 试剂的配制

TCM-199,美国 GIBCO 公司;新生牛血清(NCS),杭州四季青血清厂(瓶装产品);Ficoll-400,Pharmacia(上海华美生物工程公司分装,BI0321/10 g);胰蛋白酶,美国 AMRESCO 公司,Cat. No. SH30324-01;TCM-199,配制时溶解 TCM-199 粉末 9.85 g,NaHCO₃ 1.55 g,加庆大霉素(100 u/ml),调 pH 至 7.2,定容至 1 000 ml,过滤除菌;Trypsin-EDTA 细胞消化液,配制时溶解 NaCl 8.5 g、KCl 0.4 g、NaHCO₃ 0.35 g、D-葡萄糖 1 g、胰酶 0.5 g、EDTA 0.25 g,加庆大霉素,定容至 1 000 ml。6.3%和 16%的 Ficoll,按需要量取粉剂 Ficoll-400 溶于添加 10%FCS 的 TCM-199 溶液中即可。

1.4 第 14 期血液中 PGCs 的提取

使用 Ficoll 密度梯度法分离 PGCs,在 Chang *et al.* (1992) 建立的方法上加以改进,收集的血液离心(半径 10 cm,1 000 r/min) 5 min,沉淀用 0.1 ml 不含小牛血清的 TCM-199 培养液重新悬浮,移入含 0.9 ml 浓度为 16% Ficoll 液的指形管(规格为 2 ml)中,混匀,形成浓度为 14.4%的

Ficoll 与细胞混合液,再在其上缓缓加入 0.2 ml 浓度为 6.3%的 Ficoll 液,离心(半径 10 cm,2 500 r/min) 30 min,PGCs 聚集在 14.4%与 6.3% Ficoll 层的交界处,吸取交界处富含 PGCs 的 Ficoll 液 0.2 ml 到指形管中。加入 1.5 ml 含 10%小牛血清的 TCM-199 培养液,混匀,离心(半径 10 cm,1 000 r/min) 5 min,重复此步骤两次。分离的 PGCs 移入培养瓶后进行培养观察。

1.5 第 19 期生殖腺 PGCs 的提取

使用胰酶法分离 PGCs。受精蛋孵化到第 19 期后,将取下的生殖腺发生部位用 PBS 浸洗三次,5~10 ml Trypsin-EDTA 细胞消化液室温下消化 5 min,消化时辅以硅化的玻璃吸管轻轻吹打使分散。以消化液用量 5%的 FCS 终止消化。800~1 000 r/min 离心 8 min,弃上清,调整细胞浓度至 10⁴/ml。置 38℃、5%CO₂ 培养。24 h 换液,以后每 48 h 换液一次。

Ficoll 密度梯度法分离 PGCs 与 1.4 中相同。

1.6 第 28 期生殖腺 PGCs 的提取

受精蛋孵化第 28 期,获取生殖腺,分离 PGCs 的两种方法与 1.5 中的相同。

1.7 PGCs 纯度计算方法

$$\text{PGCs 的百分比} = \frac{\text{PGCs 数目}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

1.8 Trypan Blue (台盼兰) 染色

采用 0.4%的台盼兰染色 2 min,被染成蓝色的为死细胞,不着色的为活细胞。

1.9 过碘酸希夫试剂 (Periodic acid-schiff, PAS) 特异性染色

固定液固定细胞悬液 30 min,然后滴加悬液于载玻片上,滴好后空气干燥,干燥固定的载玻片放入过碘酸中氧化 15 min,取出后经 70%酒精清洗片刻、蒸馏水洗 1 min,放入 Schiff 试剂反应 30 min,亚硫酸水分 3 缸洗 3 次除去染色杂质、晾干、镜检。

1.10 实验数据处理

实验所得数据采用 SPSS 11.0 统计软件的独立样本 *t* 检验和 LSD 多重比较两种方法进行分析。

2 结 果

2.1 PGCs 的形态特点

血液和性腺中的 PGCs 的形态特点均表现为体积大(直径 12~18 μm)、呈圆形,其细胞核大而圆(直径 9 μm),且处在偏中央的位置。PAS 特异

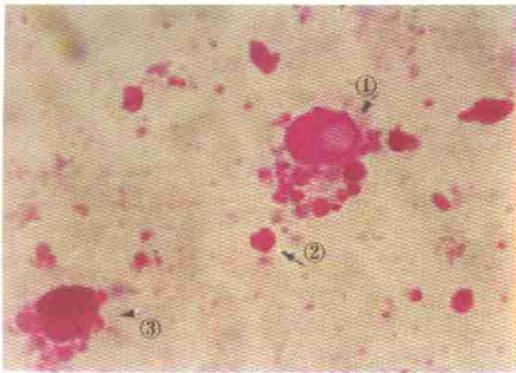


图 1 过碘酸希夫试剂 (PAS)

染色后的原始生殖细胞 (PGCs) ×1 000

Fig. 1 Primordial germ cells (PGCs) stained by Periodic acid schiff (PAS) ×1 000

原始生殖细胞 (Primordial germ cells) 脂肪颗粒 (Fatty granule) 杂质颗粒 (Impurity granule)

性染色后，其染色特征是：细胞大，细胞核透亮不着色，而细胞质呈紫红色。在光学显微镜下，与其它细胞存在明显的区别（图 1），很容易识别。随着 PGCs 的迁移和存在的部位不同，胞质中的糖元颗粒从均匀分布转化为极性分布，有些已经崩解，但在第 30 ~ 31 期 PGCs 中的糖元颗粒仍然存在（图 2）。性腺中提取的 PGCs，细胞形状由圆变长，有的变为椭圆形，还有个个别仍保持圆形，有的还有伪足（图 3）。不染色的情况下，在倒置显微镜下观察，刚分离到的单个 PGCs 较体细胞大，细胞周围有明显的光环，红细胞则无明显的光环，直径明显小于 PGCs。在本研究中，由酶解法分离得到的 PGCs 通常混合有部分体细胞及红细胞；而由 Ficoll

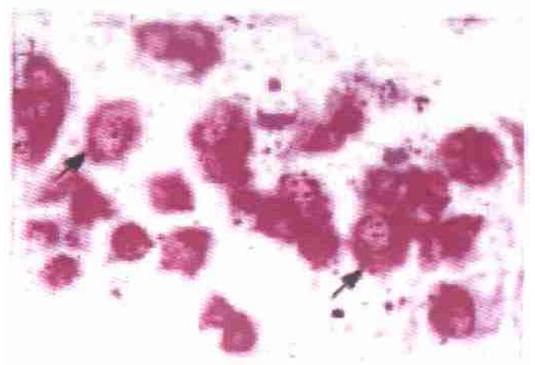


图 2 生殖嵴原始生殖细胞胞质糖原颗粒分布

Fig. 2 Distribution of cytoplasmic glycogen of PGCs in genital gidge

PAS 染色 (Stained by PAS, ×1 000)

密度梯度离心法分离得到的 PGCs 混合的体细胞较酶解法少得多。

2.2 PGCs 分离结果

2.2.1 不同方法分离生殖腺中 PGCs 的结果 为了比较在同一时期两种方法的效果，分别采用 Ficoll 密度梯度离心法和 EDTA-胰酶酶解法分离第 19 期鸡胚生殖嵴中的 PGCs，结果见表 1。

由表 1 可见，采用 EDTA-胰酶法分离到的细胞总数，每个胚胎获取的 PGCs 数量极显著高于采用 Ficoll 密度梯度离心法的分离结果 ($P < 0.01$)，虽然分离后的体细胞活力以及 PGCs 活力在两种分离法之间差异不显著，但 EDTA-胰酶法分离到的体细胞活力以及 PGCs 活力均较 Ficoll 密度梯度离心法的分离效果要好，这可能是由于 EDTA-胰酶法分离 PGCs 时，没有过多的类似于 Ficoll 密度离心法的离心过程，从而使得 PGCs 细胞受到的损伤较小，丢失亦少的缘故。

2.2.2 鸡胚发育不同时期 PGCs 分离的结果 因为对第 14 期鸡胚 PGCs 使用 EDTA-胰酶法分离 PGCs 不适合，为了比较在相同条件下分离培养 PGCs 的效果，所以对第 14、19、28 期三个不同时期的 PGCs 进行分离提纯均采用 Ficoll 密度梯度离心法，其分离结果见表 2。

表 2 中结果显示：分离前鸡胚 PGCs 浓度在第 14 期、19 期、28 期有显著差异 ($P < 0.01$)，第 14 期血液中 PGCs 分离前浓度显著高于第 19、28 期性腺中的 PGCs。原因是：根据 PGCs 迁移规律可知，在第 14 期，PGCs 大量迁移到血液中，这时

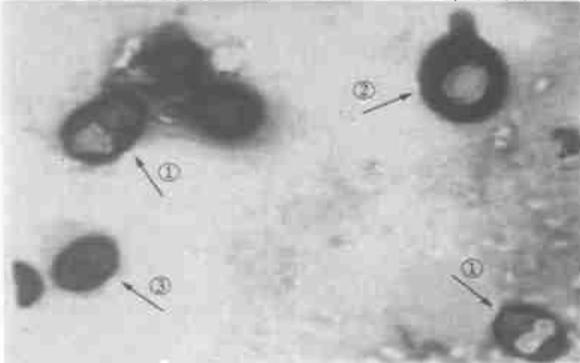


图 3 性腺中提取的各种形态的 PGCs (箭头所示)

Fig. 3 PGCs derived from chicken embryos in various features stained with PAS (indicated with arrows)

椭圆形 PGCs (PGCs were oval) 具有伪足的 PGCs (PGCs showed evident pseudopodium) 其它类型细胞 (The other PGCs) PAS 染色 (Stained by PAS ×1 000)

表 1 不同方法分离生殖腺中 PGCs 的结果比较
Table 1 Comparison of two different methods of PGCs collection of chicken embryo

分离方法 Methods for isolation	每个胚胎中的细胞数 Number of cells per embryo	体细胞活力 Viability of somatic cells(%)	PGCs 活力 Viability of PGCs(%)	每个胚胎中 PGCs 数 Number of PGCs per embryo	PGCs/ml 细胞悬液 PGCs/ml in cell suspension
EDTA-胰酶(EDTA-trypsin)	$(2.71 \times \pm 0.12) \times 10^4(150)^a$	92.41 ± 3.12	65.12 ± 5.09(150) ^a	89.50 ± 3.60	3.22 ± 0.495 ^a
Ficoll 梯度(Ficoll density-gradient)	$(1.78 \times \pm 0.14) \times 10^4(150)^b$	90.85 ± 3.81	45.24 ± 4.64(150) ^b	87.47 ± 3.15	7.24 ± 0.377 ^b

括号中的数字为实验中使用的胚胎数(Numbers in brackets indicate the number of embryos used in this study)
活细胞通过台盼蓝染色识别(Number of viable cells was determined by using the Trypan blue test) 同一列中不同上标示数值间差异极显著(Different superscripts in each column indicates significant different among the groups, $P < 0.01$)

表 3 三个时期的 PGCs 在体外培养存活情况
Table 3 Results of culture after PGCs isolation in different stages

时期 Stage	重复数 Repeating times	刚提取的存活率 Viable rate of the fresh isolated(%)	24 h 后存活率 Viable rate at 24 h(%)	48 h 后存活率 Viable rate at 48 h(%)	60 h 后存活率 (Viable rate at 60 h(%)	72 h 后存活率 Viable rate at 72 h(%)	80 h 后存活率 Viable rate at 80 h(%)	88h 后存活率 Viable rate at 88 h(%)
第 14 期 (Stage 14)	20	85.6 ± 4.9 ^a	40.7 ± 2.3	23.6 ± 2.8	9.4 ± 3.4 ^a	/	/	/
第 19 期 (Stage 19)	25	85.7 ± 5.6 ^{ab}	50.4 ± 2.7	33.5 ± 2.1	21.3 ± 1.7 ^b	10.3 ± 0.7	3.9 ± 0.3	/
第 28 期 (Stage 28)	20	80.5 ± 4.4 ^c	45.5 ± 3.1	31.7 ± 1.3	18.3 ± 1.2 ^c	7.9 ± 0.6	/	/

同一列中不同上标示数值间差异显著(Different superscripts in each column indicates significant different among the groups, $P < 0.05$)

表 2 三个不同时期 PGCs 提纯后的浓度
Table 2 Content after PGCs isolation in different stages of chicken embryo

时期 Stage	重复数 Repeat times	每次活胚数 (个) Number of embryo	分离前 PGCs 浓度 (%) Content of PGCs before isolation	分离后 After isolation Number of PGCs	分离后 After isolation Content of PGCs (%)
第 14 期 (Stage 14)	20	25	0.0113 ±0.0011 ^a	526 ±53 ^a	3.3 ±0.3 ^a
第 19 期 (Stage 19)	25	20	0.0017 ±0.0005 ^b	1 120 ±130 ^b	3.1 ±0.23 ^{ab}
第 28 期 (Stage 28)	20	15	0.0013 ±0.0003 ^c	943 ±105 ^c	2.4 ±0.19 ^c

同一列中不同上标示数值间差异显著 (Different superscripts in each column indicates significant different among the groups, $P < 0.05$)

提取一定量的血液样本中, 血细胞数量少, 计算 PGCs 的分母相对小, 结果 PGCs 的相对浓度较高; 在 19、28 期采样时, 采取的性腺部位区域较大, 体细胞数量相对多, 计算 PGCs 的分母相对大, 因此 PGCs 的相对浓度就低于第 14 期。第 19 期中 PGCs 分离前浓度、分离后 PGCs 个数、PGCs 分离后浓度显著高于第 28 期性腺中 PGCs 分离前后的浓度。从表 2 中我们可以看出: 第 14 期血液中 PGCs 分离后的浓度是分离前的 292 倍, 第 19 期分离后的浓度是分离前的 1 823 倍, 第 28 期分离后的浓度是分离前的 1 846 倍。

2.2.3 两种分离方法分离生殖腺中 PGCs 体外培养的存活结果 对两种分离方法提纯的 PGCs 在体外培养条件下观察, 约 1 h 体细胞已贴附在培养瓶底, 呈成纤维样分布, 铺展; PGCs 悬浮在培养液中, 培养 24 h 进行观察, 发现两种方法分离到的 PGCs 均趋于细胞集落状, 通常可见 10 个左右 PGCs 组成的小集落。培养 48 h 后, 由酶解法得到的 PGCs 与成纤维细胞的连接由紧密变松散, 周边分化细胞增多, 分化细胞多为树枝状、栅栏状的上皮细胞和成纤维细胞。培养至 72 h, Ficoll 密度梯度离心法分离到的 PGCs 成活率为 10.3% (711/6 900), 酶解法为 29.7% (2 762/9 300); 培养至 84 h, Ficoll 密度梯度离心法分离到的 PGCs 成活率为 6.2% (428/6 900), 酶解法为 20.5% (1 907/9 300)。随着培养时间的延长, PGCs 逐渐死亡: 细胞质颜色开始变深, 细胞轮廓不清, 形态皱缩。

2.2.4 对不同时期 PGCs 体外培养的存活结果 对 3 个不同时期分离提纯获取的 PGCs 进行体外培养 24 h 后, 于倒置显微镜下观察, 发现所提取的 PGCs 经培养后都出现不同程度的聚集成集落的现象, 这些 PGCs 集落贴于培养瓶壁, 但不牢固, 用滴管可将其从瓶壁上悬浮起来。第 14 期血液中提

取的 PGCs 培养后出现的集落数少, 每个集落的细胞数大多为 4、5 个。同血液中相比, 生殖腺中提取的 PGCs 经培养后出现的集落数多, 每个集落的细胞数大多为 8、9 个。所以从血液中提取的 PGCs 其聚集程度不如生殖腺中提取的 PGCs。PGCs 集落数量最多的时间出现在经体外培养 24 h 左右。随着培养时间的延长, PGCs 集落数逐渐减少, 最后完全消失, 这可能是由于 PGCs 在体外培养过程中死亡、崩解造成的。有些没有消失的 PGCs 集落, 其细胞则呈现出萎缩状且不贴于瓶底, 而是悬浮于培养液中, 经台盼蓝染色, 可确定其已死亡。三个时期的 PGCs 体外培养存活情况见表 3。

表 3 中结果显示: 第 14 期提取的 PGCs 存活时间最短, 第 19 期的最长, 第 28 期的介于两者之间。这三个时期所提取的 PGCs 经体外培养 24 h 后, 存活率均出现大幅度下降, 可能是由于 PGCs 脱离了机体的内环境和营养供给体系, 进入一个新的生长环境后, 使得低活力的 PGCs 在短期内死亡。经体外培养 60 h 后, 3 个时期所提取的 PGCs 存活率差异显著 ($P < 0.01$), 在第 19 期和第 28 期生殖腺提取的 PGCs 存活率明显高于第 14 期。

3 讨论

3.1 分离 PGCs 的适宜方法

目前已经报道的不少有关鸡胚 PGCs 的分离纯化方法 (Chang *et al.*, 1992; 韩毅冰等, 1996; 李赞东等, 2001; 李碧春等, 2001; Zhao *et al.*, 2003), 但是大多数是用 Ficoll 和其它方法如磁珠标记的二抗法、Nycodenz、微孔膜滤过法及显微镜直接挑选法等从血液中提取, 而用 EDTA-胰酶法分离鸡胚性腺中 PGCs 的报道较少 (Chang *et al.*, 1997; Petitte *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2000)。为了今后研究的需要和为其他研究者提供参考依

据, 本试验就目前进行以 PGCs 长期体外培养简单且实用的两种方法进行了 PGCs 分离效果的比较。经多次试验, 结果显示: 采用 EDTA-胰酶法分离 PGCs 是一种较适宜的方法。主要原因有三个: (1) 分离到的 PGCs 数量较 Ficoll 密度梯度离心法多。与酶解法不同, Ficoll 密度梯度离心是将酶解后的细胞再经不同的 Ficoll 密度梯度进行提纯, 得到的 PGCs 虽然纯度稍高, 但经过多次离心、纯化等步骤后, 会使 PGCs 有所损失和丢失。此外, 进行酶解消化时, 必然有部分组织块不能完全解离, 夹杂其中的 PGCs 会随细胞团及组织块在高速离心时沉降于离心管底, 而我们采用的密度梯度分层分离只吸取离心管上部细胞悬液, 这也可能会损失部分 PGCs。(2) 对两种分离方法提纯的 PGCs 在体外培养条件下观察, 培养 72 h, Ficoll 密度梯度离心法分离到的 PGCs 成活率为 10.3% (711/6900), 酶解法为 29.7% (2762/9300); 培养 84 h, Ficoll 密度梯度离心法分离到的 PGCs 成活率为 6.2% (428/6900), 酶解法为 20.5% (1907/9300)。结果说明酶解法分离到的 PGCs 活力较强, 存活时间也较长。而在 Ficoll 密度梯度分离的过程中, 经高速离心及机械吹打等步骤会在一定程度上使细胞活力受损, 使 PGCs 活细胞数减少。(3) 本实验观察还发现, PGCs 培养 24 h, 两种方法分离到的 PGCs 均出现了细胞集落, 通常可见 10 个左右 PGCs 组成的小集落。这可能是由于生命力旺盛的 PGCs 多以集落形式存在 (Wentworth *et al.*, 1989)。但是酶解法分离到的 PGCs 存活时间较长, 可能是 Ficoll 密度梯度离心分离到的 PGCs 在缺乏性腺基质细胞的情况下培养, 难以长时间存活, 这一观点与 Chang *et al.* (1997) 的一致, 而且我们正在进行的另一个试验也验证了这一现象。用酶解法分离到的 PGCs 中混合有大量性腺基质细胞, 这些性腺基质细胞在培养 1 h 左右分化为成纤维细胞, 一方面成纤维细胞虽然可与 PGCs 协同竞争生存, 但另一方面可分泌大量生长因子, 如 IGF (人类胰岛素样生长因子)、EGF (表皮生长因子), 有利于 PGCs 的存活增殖 (Jiang, 1997); 同时也释放相当的分化抑制因子, 如 LIF (鼠白血病抑制因子), 抑制 PGCs 分化 (安静等, 2003)。由此试验结果我们推理, 虽然 Nycodenz 法 (Zhao *et al.*, 2003; 李赞东等, 2003) 分离鸡胚 PGCs 的纯度更高 (99%), 但是分离后培养的效果与 Ficoll 法的一样, 因为他们均属于梯度离心的范畴, 而目前尚

未见有从血液中提取 PGCs 用于体外长期培养的研究报道。

3.2 PGCs 提取的适宜时期

对鸡胚 PGCs 提取时期的报道大多数是从第 14 期血液中提取。而从鸡胚发育的第 28、30 期性腺中提取 PGCs 的报道仅见 Chang *et al.* (1997)、Pettitte *et al.* (2001)、Park *et al.* (2000)。多数研究者的目的是进行同种、异种之间细胞移植的研究而采用第 14 期血液中 PGCs, 提取此期 PGCs 的原因可能是: 此期的 PGCs 处于游离状态, 且此期是 PGCs 的第二个聚集高峰, 容易收集。而目前多数研究者的目的在于通过体外培养 PGCs 建立胚胎干细胞系。根据这一需要, 人们又尝试了从鸡胚发育的 29、30 期性腺中获取 PGCs。

本实验对鸡胚发育不同时期提取 PGCs 的效果进行了系统比较。结果表明, 从第 14 期血液中获取的 PGCs 在相同的体外培养条件下的存活时间最短, 提纯后的浓度 (为 3.3%) 虽比 19 期、28 期性腺中的高, 但是从表 2 中可以看出, 第 19 期和第 14 期之间的差异不显著 ($P > 0.05$), 而与第 28 期之间的差异显著 ($P < 0.05$)。所以综合本试验分离方法和体外培养结果显示: (1) 从第 19 期生殖腺中每个鸡胚能获得的 PGCs 数为 56 个, 比第 14 期血液中每个鸡胚能获得的 PGCs 数 (21 个) 多 35 个; (2) 从第 19 期生殖腺中提取的 PGCs 在存活时间上最长, 为 80~88 h, 分离后的纯度也比较高, 为 3.1%; (3) 根据其迁移规律, 此时虽仍有极少的 PGCs 处于迁移状态, 但绝大部分已迁移到了生殖嵴处。根据鸡胚 PGCs 的迁移规律可知, 在 19 期, 大约 80% 的 PGCs 已经分布于未来的性腺区域, 而 28 期接近于分化期, 部分 PGCs 已经开始分化。因此, 在第 19 期生殖腺中提取 PGCs 在数量上有一定的优势, 且由于第 19 期的 PGCs 刚迁移到生殖腺区域, 其全能性与第 14 期的 PGCs 差异不大 (李碧春等, 2002), 而第 28 期生殖腺中每个鸡胚虽然能获得 63 个 PGCs, 比第 19 期生殖腺中每个鸡胚能获得的 PGCs 数多 7 个, 但从第 28 期生殖腺提取的 PGCs 在体外培养的存活时间为 72~80 h, 比第 19 期的存活时间较短; 28 期生殖腺提取的 PGCs 提纯后的浓度为 2.4%, 比第 19 期提纯后的浓度较低; 而且 28 期接近于分化期 (第 30 期) (Chang *et al.*, 1992; 李碧春等, 2001; Hardisty, 1967), 部分 PGCs 已经开始分化, 其全能性可能会受到影响, 数量上也有所减少。但是前

人报道的大多是从第 27 ~ 30 期获取 PGCs 的 (Chang *et al.*, 1997; Petite *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2000), 这一点与本试验结果有差异, 原因是: 在我们查阅这些前人的文章中, 均未查到从 19 期提取 PGCs 的试验, 直接从 27 期或 30 期获取 PGCs 的报道较多; 可能是在 27 ~ 30 期时性腺已经分化出来, 此时获取性腺比较容易。但本实验的结果分析比较, 可得出在第 19 期生殖腺中提取 PGCs 比较适宜。

3.3 PGCs 体外培养存活时间上差别的原因

表 3 中的数据显示: 刚提取的 PGCs 的存活率都比较高, 经过 24 h 体外培养后均出现大幅度的下降。原因可能是在提取过程中对 PGCs 产生了损伤, 加之体外培养, 所以一些活力较弱的细胞经培养后不久即死亡。Chang *et al.* (1997) 报道用鸡胚的生殖腺基质细胞作为饲养层细胞, 可使 PGCs 成活 5 天以上。在本实验中, 从第 19 期生殖腺提取的 PGCs 浓度由提纯前的 0.0017 % 提高到提纯后的 3.1 %; 从第 28 期生殖腺提取的 PGCs 浓度由提纯前的 0.0013 % 提高到提纯后的 2.4 %。虽然第 19 期和第 28 期生殖腺的 PGCs 提纯后的浓度都比提纯前高很多倍, 但仍然混合有大量的生殖腺基质细胞, 可能是由于这些基质细胞的存在, 在体外培养过程中, 其分泌的一些促生长因子使得 PGCs 存活时间延长, 这一结论亦被我们正在进行的另一个 PGCs 体外培养试验结果所验证。相反, 14 期血液中不存在这种基质细胞, 所以来自血液中的 PGCs 在相同的体外培养条件下存活时间比生殖腺的短。从第 19 期与第 28 期生殖腺中提取的 PGCs 在存活时间上的差别, 可能是由于来自第 28 期生殖腺的 PGCs 已完全定位于生殖腺, PGCs 与生殖腺基质细胞之间已建立起紧密的联系, 而第 19 期的 PGCs 则刚迁移到生殖腺区, PGCs 与生殖腺基质细胞之间的联系没有第 28 期的紧密。当把 PGCs 从生殖腺中提取出来后, PGCs 与生殖腺基质细胞之间的联系被打破, 相比较而言, 这种破坏关系对第 28 期生殖腺中的 PGCs 产生的不利影响要比第 19 期的大, 由此导致在相同的体外培养条件下, 从第 28 期生殖腺提取的 PGCs 存活时间比第 19 期的短, 其结果说明, 用于体外培养时, 采集分离第 19 期的 PGCs 比较适宜。

参考文献 (References)

An, J. and L. X. Du 2003 A preliminary study on the isolation,

cultivation and identification of chicken embryonic stem cells. *Acta Zool. Sin.* **49** (5): 698 ~ 703. [安静, 杜立新 2003 鸡胚胎干细胞分离、培养和鉴定. *动物学报* **49** (5): 698 ~ 703.]

Chang, I. K., A. Tajima, Y. Yasuda, T. Chikamune and T. Ohno 1992 Simple method for isolation of primordial germ cells from chick embryos. *Cell Biol. Int. Reports* **16** (9): 853 ~ 857.

Chang, I. K., A. Tajima, T. Chikamune and T. Ohno 1995 Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinao ridge. *Cell Biol. Int.* **19**: 143 ~ 149.

Chang, I. K., D. K. Jeong, Y. H. Hong, T. S. Park, Y. K. Moon, T. Ohno and J. Y. Han 1997 Production of germline chimeric chicken by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol. Int.* **21** (8): 495 ~ 499.

Hamburger, V. and H. L. Hamilton 1951 A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**: 49 ~ 92.

Han, Y. B., K. Z. Yu, Q. Zhou and P. C. Qin 1996 Studies on the cultural and isolation of primordial germ cells from blood of chick embryos. *Biol. Technol.* **6** (2): 11 ~ 13. [韩毅冰, 于康震, 周琦, 秦鹏春 1996 鸡胚胎血液中原始生殖细胞的分离及其培养的研究. *生物技术* **6** (2): 11 ~ 13.]

Hardisty, M. W. 1967 The number of vertebrate primordial germ cells. *Biol. Rev.* **42**: 265 ~ 287.

Jiang, F. X., J. Clark and M. B. Renfree 1997 Ultrastructural characteristics of primordial germ cells and their movement to the gonadal ridges in the tammmer wallaby. *Anat. Embryol. Berl.* **195** (5): 473.

Li, Z. D., C. H. Liu, J. S. Huang, J. Sha, H. Wei, C. Zhao and M. J. Sun 2001 Production of chicken/duck chimera by isolating and transferring chicken circulating primordial germ cells into duck embryos. *Biotechnology* **11** (6): 1 ~ 4. [李赞东, 刘春海, 黄劲松, 沙金, 危华, 赵辰, 孙明军 2001 鸡胚原始生殖细胞的分离和鸡鸭嵌合体的制备. *生物技术* **11** (6): 1 ~ 4.]

Li, Z. D., X. Z. Li, D. F. Zhao and T. Kuwana 2003 Migration of avian primordial germ cells. *Acta Zool. Sin.* **49** (6): 868 ~ 872. [李赞东, 李相芝, 赵东风, Kuwana, T. 2003 禽类原始生殖细胞迁移的能力. *动物学报* **49** (6): 868 ~ 872.]

Li, B. C., G. H. Chen, H. D. Li and Z. L. Dai 2000 Migration and accumulation of primordial germ cells in the chicken embryo. *Jiangsu Agric. Res.* **21** (2): 1 ~ 6. [李碧春, 陈国宏, 李厚达, 戴子亮 2000 鸡原始生殖细胞迁移和聚集规律的研究. *江苏农业研究* **21** (2): 1 ~ 6.]

Li, B. C., G. H. Chen, D. W. Zhao, K. H. Wang and J. F. Qian 2002 Relationship between migrated PGCs and gonad development in the early chicken embryo. *Journal of Yangzhou University (Edition of Agriculture and Life Science)* **2** (23): 19 ~ 22. [李碧春, 陈国宏, 赵东伟, 王克华, 钱菊汾 2002 鸡胚 PGCs 迁移与性腺发育关系的研究. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)* **19** (1): 18 ~ 22.]

Li, B. C., G. H. Chen, D. W. Zhao and J. F. Qian 2001 Isola

- tion and culture of primordial germ cells from chick embryos. *Chinese Journal of Veterinary Science* **21** (4): 370 ~ 372. [李碧春, 陈国宏, 赵东伟, 钱菊汾 2001 鸡胚血液中 PGCs 的分离及原代培养. *中国兽医学报* **21** (4): 370 ~ 372.]
- Meyer, D. B. 1964 The migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Dve. Biol.* **10**: 154 ~ 190.
- Naito, M., A. Tajima, Y. Yasuda and T. Kuwana 1994 Production of germline chimeric chickens with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cell. *Mol. Reprod. Dev.* **39**: 153 ~ 161.
- Park, T. S. and J. Y. Han 2000 Producing an undifferentiated avian cell culture using avian primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* **56**: 475.
- Petitte, J. N., N. James and I. K. Chang 2001 Method of producing an undifferentiated avian cell culture using avian primordial germ cells. *United States Patent* **6 333**: 192.
- Tajima, A., M. Naito, Y. Yasuda and T. Kuwana 1993 Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cell in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* **40**: 509 ~ 519.
- Zhao, D. F. and T. Kuwana 2003 Purification of avian circulating primordial germ cells by nyodenz density gradient centrifugation. *Brit. Poult. Sci.* **44**: 1 ~ 6.