

鸡 ES 细胞体外定向诱导分化特性的研究

李碧春¹, 陈香凝¹, 裴敬帅², 施青青¹, 傅德智¹, 阴彦辉¹, 张振韬¹, 窦套存³, 王克华^{3*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 金日成综合大学生命科学院生物工程研究所, 朝鲜平壤; 3. 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225125)

摘要: 旨在探索鸡胚胎干细胞(ES 细胞)体外定向诱导的多向分化潜能。分离鸡 X 期胚盘细胞, 体外培养传代, 经鉴定后, 采用地塞米松(DEX)、 β -甘油磷酸钠(β -GP)和维生素 C(VitC) 诱导 ES 细胞向成骨细胞分化; 采用维甲酸(RA)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)诱导 ES 细胞向神经元样细胞分化; 采用 DEX、胰岛素、IBMx 诱导 ES 细胞向脂肪细胞分化, 比较不同浓度组合诱导剂的诱导效果, 分别用 Von Kossa's 染色法、甲苯胺蓝染色法、免疫组化法、油红 O 染色法和 RT-PCR 鉴定诱导产生的细胞。结果显示, ES 细胞被诱导 3~21 d 后, 分化为成骨细胞, 诱导率为 40%~72%; 被诱导 4~7 d 后, 分化为神经元样细胞, 诱导率为 71%~84%; 被诱导 2~21 d 后, 分化为脂肪细胞, 油红 O 染色阳性, 并表达 PPAR γ 基因。结果表明, 在体外条件下, ES 细胞可被特异的化学物质定向诱导分化为成骨细胞、神经元样细胞和脂肪细胞, 具有多向分化潜能。

关键词: 鸡; 胚胎干细胞; 体外培养; 诱导分化

中图分类号: S831.2; Q254

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)07-0905-08

Research on the Differentiation Characteristics of Chicken Embryonic Stem Cells *in vitro*

LI Bi-chun¹, CHEN Xiang-ning¹, PEI Jing-shuai², SHI Qing-qing¹, FU De-zhi¹,

YIN Yan-hui¹, ZHANG Zhen-tao¹, DOU Tao-cun³, WANG Ke-hua^{3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Institute of Biological Engineering, College of Life Sciences in Kim Il-sung University,

Pyeongyang, North Korea; 3. Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225125, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the differentiation potential of chicken embryonic stem cells (ES cells) under different experimental conditions *in vitro*. The ES cells isolated from embryos of chicken at the stage X were cultured and subcultured *in vitro*. After identification, ES cells were induced into osteoblasts in the medium containing desamethason (DEX), glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate (β -GP) and vitamin C (VitC), and were examined with Immunohistochemical and Von Kossa's staining; ES cells were induced into neuron-like cells by retinoic acid (RA) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMx), and were identified by Toluidine Blue and Immunohistochemical staining; ES cells were cultured in DMEM medium plus DEX, insulin and IBMx. The derived cells were determined by Oil Red-O staining, and Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) gene transcription was detected by Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Osteoblasts were differentiated from ES cells after 3-21 days of induction and with 40%-72% of positive cells efficiency. About 4-7 d after being induced about 71%-84% cells exhibited typical neuron-like cells phenotype. Oil Red-O posi-

收稿日期: 2010-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(30871791); 江苏省高校自然科学重大基础研究项目(08KJA230001); 国家高新技术 863 项目(2007AA100504); 江苏省六大人才高峰资助项目

作者简介: 李碧春(1963-), 女, 陕西大荔人, 教授, 博导, 主要从事动物胚胎工程及遗传工程研究, E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

* 通讯作者: 王克华(1962-), 研究员, E-mail: sqbreeding@126.com

tive cells formed after 2-21 days of culture in the induction for adipocyte differentiation and confirmed by RT-PCR for *PPAR γ* gene transcription. The result indicate that chicken ES cells can differentiate into osteoblasts, neuron-like cells and adipocytes, showing the capability of multipotential differentiation *in vitro*.

Key words: chicken; embryonic stem cells; cultivation *in vitro*; differentiation

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES 细胞)是由动物附植前胚胎的内细胞团(Inner cell mass, ICM)或原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)经体外分离培养而建立的克隆细胞系^[1]。由于具有发育多潜能性,ES 细胞自 1981 年首次分离以来,就受到各领域的关注,近年来,其定向诱导分化更成为研究热点。目前,干细胞定向分化研究多见于骨髓间充质干细胞、大鼠、小鼠以及人类 ES 细胞等方面。Sottile 等^[2]将 hESCs 诱导分化为成骨细胞,董晓先等^[3]用天麻素诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞,郭雨霁等^[4]用 RA、 β -巯基乙醇和大脑皮层细胞条件培养液联合诱导 ES 细胞,70%以上分化为 NSE 免疫阳性的细胞,Naruse 等^[5]成功将大鼠骨髓间质干细胞诱导为脂肪细胞,Yagami 等^[6]对人软骨分离的间叶干细胞进行诱导,结果间叶干细胞分化为脂肪细胞。作为一种重要的胚胎源性干细胞,鸡 ES 细胞体外定向诱导分化特性的相关研究报道很少。通过对不同体外诱导条件下鸡 ES 细胞分化为成骨细胞、神经元样细胞、脂肪细胞能力的研究,本试验进一步证实其多潜能性,为干细胞研究提供可靠的试验数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

受精蛋来自中国农业科学院家禽研究所实验禽场苏禽 96 鸡群,38.0 °C,相对湿度 60%的条件下孵化。孵化分期按 Hamburger^[7]和 Li^[8]等建立的方法划分。

1.2 主要试剂

高糖 DMEM、胎牛血清、 β -巯基乙醇、丝裂霉素-C;鸡血清、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、鼠白血病抑制因子(Mouse leukemia inhibitory factor, mLIF)、人干细胞因子(Human stem cell factor, hSCF)、碱性成纤维生长因子(Fibroblast growth factor-basic, bFGF)、人白细胞介素-11(Human interleukin 11, hIL-11)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤-IBMX 和维甲酸;人胰

岛素样生长因子(Human insulin-like growth factor, hIGF)、地塞米松-Dex、胰岛素-Ins、油红 O、鼠抗人神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体-NSE、鼠抗人神经纤维细丝蛋白单克隆抗体-NF、鼠抗人胶质纤维酸性蛋白单克隆抗体-GFAP;SP 超敏试剂盒、DAB 显色剂;即用型 SABC 免疫组化试剂盒、I 型胶原单克隆抗体-COLI;RNA 提取试剂盒 TRI reagent、反转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit。

1.3 试验方法

1.3.1 ES 细胞培养体系 以 DMEM 培养基为基础,添加 10%胎牛血清、2%鸡血清、2 mmol · L⁻¹ L-谷氨酰胺、1 mmol · L⁻¹ 丙酮酸钠、5.5 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ β -巯基乙醇、5 ng · mL⁻¹ hSCF、10 IU · mL⁻¹ mLIF、10 ng · mL⁻¹ bFGF、0.04 ng · mL⁻¹ hIL-11、100 U · mL⁻¹ 硫酸庆大霉素。以鸡胚第 2 代成纤维细胞作饲养层,制作方法见参考文献[9]。

1.3.2 鸡 ES 细胞的分离、培养传代和鉴定 采用药勺获取法,分离鸡 ES 细胞,体外培养传代,分别进行碱性磷酸酶(AKP)活性,Hoechst33342 免疫荧光染色鉴定。ES 细胞分离、体外培养传代及鉴定方法参照吴信生等^[10]人的方法操作。

1.3.3 成骨细胞诱导及鉴定 第 3 代生长良好的 ES 细胞,培养 48 h,分别加入诱导分化剂 I、II、III 和 IV,对照组为普通培养基。3 d 换 1 次液,每 24 h 观察 1 次,诱导 21 d,倒置显微镜下观察并检测。

诱导 21 d 后,固定液固定 1 h,分别进行 Von Kossa's 染色和免疫组化鉴定(即 SABC 免疫组化),于倒置显微镜下观察、拍照,具体方法参见魏彩霞等^[11]的操作。

1.3.4 神经元样细胞诱导及鉴定 第 3 代生长良好 ES 细胞,培养 48 h,原培养液分别换为神经细胞诱导液 I、II 和 III,对照组为普通培养基。3 d 换 1 次液,每 24 h 观察 1 次。诱导 4 d,倒置显微镜下观察并检测。

表 1 体外分化为成骨细胞的诱导分化剂组成

Table 1 The composition of the induction media in orientation of osteoblasts

诱导分化剂 Induction media	DMEM/%	FBS/%	β -ME/(mol · L ⁻¹)	DEX/(mol · L ⁻¹)	β -GP/(mol · L ⁻¹)	VitC/(g · L ⁻¹)
I	90	10	5.5×10^{-5}	1×10^{-7}	0.01	0.05
II	90	10	5.5×10^{-5}	1×10^{-7}	1×10^{-4}	0.05
III	90	10	5.5×10^{-5}	1×10^{-8}	1×10^{-4}	0.05
IV	90	10	5.5×10^{-5}	1×10^{-8}	0.01	0.08
对照组 Control	90	10	5.5×10^{-5}	—	—	—

表 2 体外分化为神经元样细胞的诱导分化剂组成

Table 2 The composition of the induction media in orientation of neuron-like cells

诱导分化剂 Induction media	DMEM/%	FBS/%	β -ME/(mol · L ⁻¹)	RA/(mol · L ⁻¹)	IBMX/(mol · L ⁻¹)
I	90	10	5.5×10^{-5}	2×10^{-6}	—
II	90	10	5.5×10^{-5}	—	5×10^{-3}
III	90	10	5.5×10^{-5}	2×10^{-6}	5×10^{-3}
对照组 Control	90	10	5.5×10^{-5}	—	—

表 3 不同诱导液对 ES 细胞诱导分化为成骨细胞的效果

Table 3 The differentiation rates of induction of osteoblast

诱导分化剂 Induction medium	ES 细胞数/(个 · 视野 ⁻¹) Number of ES cells	成骨细胞数/(个 · 视野 ⁻¹) Number of osteoblasts	分化率 Differentiation rate
I	33.90 ± 4.12	24.50 ± 3.75	0.72 ± 0.06^A
II	37.80 ± 7.23	26.40 ± 6.60	0.69 ± 0.06^A
III	34.90 ± 5.53	14.20 ± 3.91	0.40 ± 0.07^B
IV	35.10 ± 5.63	20.10 ± 2.56	0.58 ± 0.08^C
对照组 Control	35.00 ± 8.01	0.50 ± 0.53	0.01 ± 0.01^D

同列肩注中不同字母表示差异极显著($P < 0.01$),所标字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。下同

In the same column, the numbers with different superscripts are significantly different between treatments ($P < 0.01$), the numbers with the same superscript are not significantly different between treatments ($P > 0.05$). The same as below

诱导后,进行甲苯胺蓝染色和免疫组化检测 NSE、NF、GFAP^[12]。

1.3.5 脂肪细胞诱导及鉴定 第 3 代生长良好的 ES 细胞加入脂肪诱导液(以 DMEM 为基础,添加 10% FBS、 5.5×10^{-5} mol · L⁻¹ β -ME、 1×10^{-6} mol · L⁻¹ DEX、10 mg · L⁻¹ 胰岛素、 5×10^{-4} mol · L⁻¹ IBMX)。3 d 后,换为循环液(以 DMEM 为基础,添加 10% FBS、 5.5×10^{-5} mol · L⁻¹ β -ME、10 mg · L⁻¹ 胰岛素),处理 1 d,再换为诱导液继续处理,如此循环 3 次。每 24 h 观察 1 次。诱导 21 d,进行检测。

诱导 21 d 后,油红 O 染色,显微镜检,并提取总

RNA,RT-PCR 检测脂肪细胞中 PPAR γ 表达,具体参见余飞等^[13]的操作。

1.4 诱导分化率

鸡 ES 细胞诱导率的计算:随机抽取 10 个非重叠视野($\times 100$),计算分化细胞占总细胞数的比例。

1.5 数据处理

采用 SPSS11.5 统计软件,显著性分析采用 t 检验,结果以“平均值 \pm 标准误”表示。

2 结果

2.1 鸡 ES 细胞的一般特性

单个 ES 细胞体积较小,核大,具有一个或多个

核仁。置于饲养层培养 24 h 出现小的细胞集落。48 h 后集落明显增多,生长明显,隆起增大,呈典型 ES 细胞所特有的鸟巢状形态(图 1)。随时间延长,集落进一步增大,边缘更清晰,此时传代。传代 24 h,细胞开始聚集,形成集落,但形状并不典型,随后开始增殖,形成克隆。48~96 h 细胞生长速度较快,细胞开始沿瓶底铺展,当细胞铺满瓶底便需再次传代,传至第 5 代进行相关检测。

2.2 鸡 ES 细胞的鉴定

2.2.1 AKP 染色鉴定 经 AKP 染色,ES 细胞集落和未分化 ES 细胞呈红棕色,为 AKP 阳性(图 2);而已分化 ES 细胞和饲养层细胞不着色或呈黄色。

2.2.2 免疫荧光染色鉴定(即 Hoechst33342 染色鉴定) Hoechst33342 染色结果显示:ES 细胞显示核荧光标记,荧光下呈蓝色(图 3)。

由表 3 可知,第 3 代 ES 细胞培养 48 h,在不同浓度组合的诱导分化剂作用下,均能诱导产生成骨细胞,诱导率为 40%~72%。其中,诱导剂 I 和 II 诱导效果最好,且无显著差异($P>0.05$)。诱导剂 I、II 与诱导剂 III、IV 之间差异极显著($P<0.01$),诱导剂 III 和 IV 之间也存在极显著差异($P<0.01$)。

表 4 不同诱导液对 ES 细胞诱导分化为神经元样细胞的效果

Table 4 The differentiation rates of induction of neuron-like cells

诱导分化剂 Induction medium	ES 细胞数/(个·视野 ⁻¹) Number of ES cells	神经元样细胞数/(个·视野 ⁻¹) Number of neuron-like cells	分化率 Differentiation rate
I	36.10±4.68	30.30±3.37	0.84±0.05 ^A
II	35.90±4.70	29.00±3.33	0.81±0.05 ^A
III	35.80±4.08	25.30±3.23	0.71±0.06 ^B
对照组 Control	36.40±5.42	0.80±0.42	0.02±0.01 ^C

由表 4 可知,不同浓度组合的诱导分化剂均能诱导产生神经元样细胞,诱导率为 71%~84%。其中,诱导剂 I 和 II 诱导分化效果最好,且无显著差异($P>0.05$),但诱导剂 I、II 与诱导剂 III 之间差异极显著($P<0.01$)。由此可得,RA、IBMX 单独使用诱导率极显著($P<0.01$)高于二者联合使用。

2.4 不同诱导液对 ES 细胞诱导分化为神经细胞的影响

2.4.1 诱导分化为神经细胞的观察 诱导 1 d 后,90%以上细胞集落状生长,呈圆形,可见个别单个小的神经元样细胞出现。48 h 后,ES 细胞伸出突起,形成单一的多突起细胞;细胞集落变松散,边

缘伸出突起,突起连接成较紧密的网状。4 d 后,70%左右 ES 细胞分化成神经元样细胞,单个神经元样细胞呈树枝状突起,突起细长。甲苯胺蓝染色,可见胞质中存在蓝紫色块状或颗粒状的尼氏体。诱导产生的神经元样细胞 7~8 d 后逐渐凋亡。对照组未见典型的神经元样细胞。

2.3 不同诱导液对 ES 细胞诱导分化为成骨细胞的影响

2.3.1 诱导分化为成骨细胞的观察 诱导 1 d 后,90%以上 ES 细胞无变化,呈圆形,集落状生长。3~6 d,少量细胞由圆形变梭形,呈成纤维细胞样生长。9~10 d,大多数 ES 细胞呈梭形、三角形、多角形或不规则形,突起数目及形态各不相同,胞体较大,互相连接,核大且偏于细胞一侧。15~21 d,细胞出现散在分布、大小形态各异的致密颗粒矿化结节,逐渐增大,最终形成白色钙化结节。ALP 染色鉴定,大多数胞浆内存在黑色颗粒,呈强阳性。对照组分化不明显。

2.3.2 诱导分化为成骨细胞的鉴定

2.3.2.1 Von Kossa's 染色鉴定:试验组细胞外基质中可见棕黑色沉着物,为棕黑色矿化结节(图 4)。

2.3.2.2 免疫组化鉴定:SABC 法染色,试验组为棕褐色,呈阳性(图 5),分泌 I 型胶原。

2.4.2 诱导分化为神经细胞的鉴定 诱导后的细胞 NSE、NF 反应为阳性(图 6、图 7),呈棕黄色,大多数细胞的胞体与突起呈强阳性,少数细胞只有胞体呈强阳性,突起的部分免疫反应较弱。GFAP 反应为阴性(图 8)。

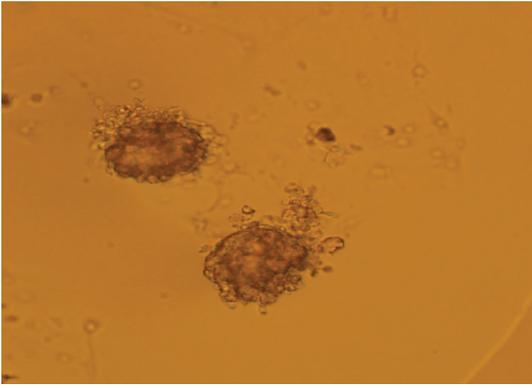


图 1 鸡 ES 细胞的克隆(200×)
Fig. 1 The clones of chicken ES cells(200×)



图 4 鸡 ES 细胞加入成骨细胞诱导剂 21 d 后进行钙结节 Von Kossa's 染色(200×)
Fig. 4 Chicken ES cells are positive for Von Kossa's staining on day 21 after induction (200×)

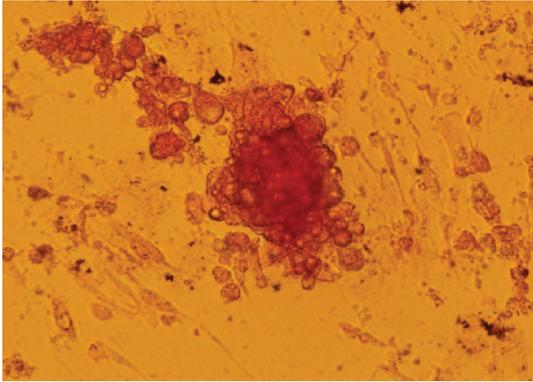


图 2 培养 5 d 的第 5 代 ES 细胞的 AKP 染色鉴定(400×)
Fig. 2 The 5th generation ES cells cultured for 5 days is stained by AKP staining (400×)

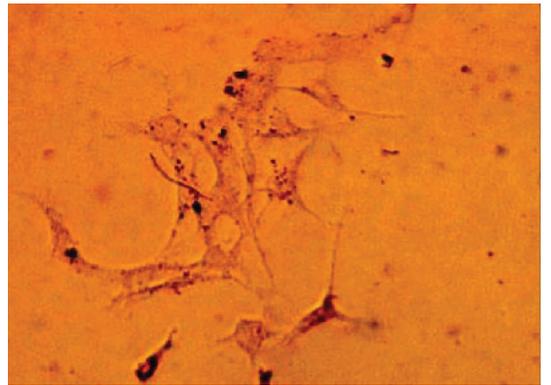


图 5 鸡 ES 细胞加入成骨细胞诱导剂 21 d 后进行免疫组化鉴定,呈阳性反应(200×)
Fig. 5 Chicken ES cells are positive for collagen I staining on day 21 after induction (200×)

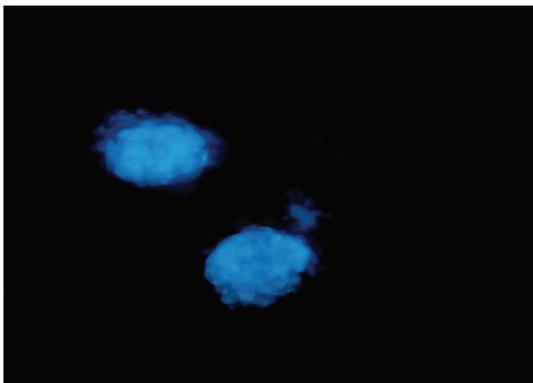


图 3 Hoechst 染色的鸡 ES 细胞克隆(200×)
Fig. 3 The clones of chicken ES cells stained by Hoechst staining (200×)

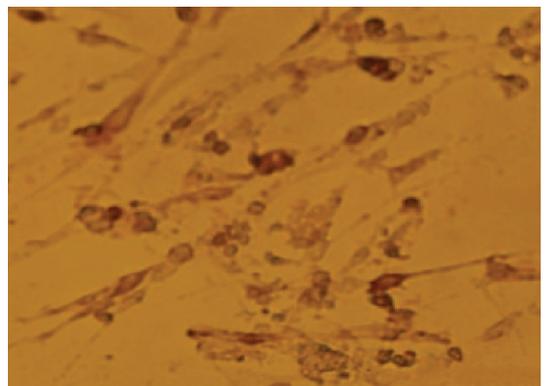


图 6 鸡 ES 细胞诱导后产生的神经元样细胞进行免疫组化检测,呈 NSE 阳性(400×)
Fig. 6 Chicken ES cells are positive for NSE staining after induction (400×)



图 7 鸡 ES 细胞诱导后产生的神经元样细胞进行免疫组化检测,呈 NF 阳性(400×)

Fig. 7 Chicken ES cells are positive for NF staining after induction (400×)

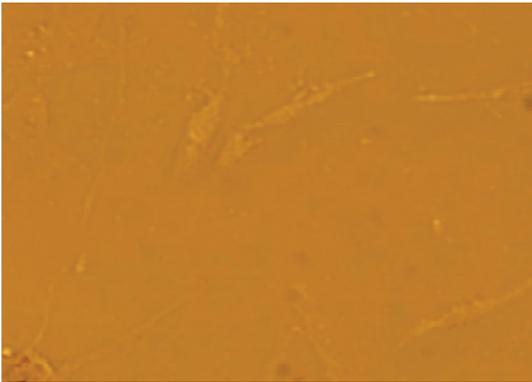


图 8 鸡 ES 细胞诱导后产生的神经元样细胞进行免疫组化检测,呈 GFAP 阴性(400×)

Fig. 8 Chicken ES cells are negative for GFAP staining after induction (400×)

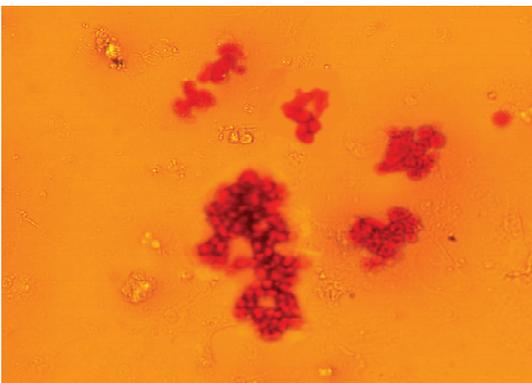


图 9 鸡 ES 细胞诱导 21 d 后进行脂肪细胞油红 O 染色脂滴为橙红色(200×)

Fig. 9 Chicken ES cells are positive for Oil red-O staining (200×)

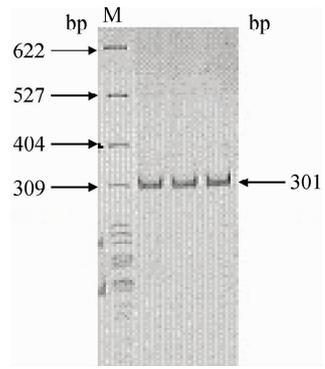


图 10 RT-PCR 扩增的脂肪细胞中 *PPARγ* cDNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig. 10 *PPARγ* cDNA in adipocytes amplified by RT-PCR is analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis

2.5 诱导分化为脂肪细胞的观察与鉴定

2.5.1 诱导分化为脂肪细胞的观察 诱导 1 d 后,90%以上 ES 细胞集落状生长,细胞为圆形。2~3 d 后,少数细胞出现小脂滴,主要集中于核周围。9~10 d 后,大多数细胞中出现脂滴,并有相互聚集的趋势。11~21 d 后,细胞中脂滴数明显增多,小脂滴聚集为大脂泡,最终形成典型的戒环样结构。

2.5.2 诱导分化为脂肪细胞的鉴定

2.5.2.1 油红 O 染色鉴定:油红 O 染色后,显微镜下观察,脂滴为橙红色(图 9)。

2.5.2.2 RT-PCR 检测脂肪细胞中 *PPARγ* 表达:提取的脂肪细胞总 RNA 电泳显示,28S、18S RNA 条带清晰,浓度比约为 2 : 1。分光光度计检测 RNA 纯度和含量: $A_{260}/A_{280} = 1.9$,说明提取总 RNA 的完整性良好。经 32 个循环的 PCR 扩增后,取 10 μ L PCR 扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,凝胶上分别出现大小约为 301 bp 左右的单一条带(图 10),与预计结果相符。

3 讨论

ES 细胞源于动物胚胎内细胞团或原始生殖细胞,具有长期自我更新能力和发育多潜能性,理论上能分化为多种类型的细胞,如神经细胞、心肌细胞、内皮细胞,甚至生殖细胞、精子,可作为细胞替代疗法、胚系分化模型良好的试验材料。本研究证明了鸡 ES 细胞的多向分化潜能,为其体外操作提供了前提条件,为干细胞研究、药物开发和器官移植等领域提供了必要的试验依据。

目前实现 ES 细胞诱导分化的方法主要包括:外源性生长因子、转基因诱导、与其他细胞共培养等。ES 细胞定向诱导分化研究的一个重要目标是控制其分化方向。本研究利用 DEX、IBMX、胰岛素、RA 等化学物质实现了 ES 细胞向成骨、神经元样和脂肪细胞的定向分化。结果表明:加入诱导剂的 ES 细胞没有经过类胚体阶段直接分化,不仅诱导分化效率较高、方法简单、易重复,而且诱导分化的时间较短。在研究中,不同浓度组合的诱导分化剂的分化率不同,可能是不同分化阶段所需的细胞因子种类、最适浓度或组成不同。因而本研究根据相关研究采用不同浓度组合的诱导分化剂,获得了较高的诱导分化率。

3.1 ES 细胞向成骨细胞的定向诱导分化

DEX 对 ES 细胞向成骨细胞分化有促进作用,同时可抑制 ES 细胞增殖,提高碱性磷酸酶(ALP)活性,诱导表达骨钙素,增加 I 型胶原 mRNA,促进细胞外基质胶原合成。 β -GP 提供磷酸离子作为合成 ALP 的底物,促进有机磷向无机磷转化,加速钙盐沉着;而且破坏钙化抑制剂,从而启动钙化^[14]。VitC 是胶原中脯氨酸和赖氨酸末端羟基化的共同影响因子,通过诱导特异性分化蛋白基因的表达来诱导 ALP 活性的增加,刺激 I 型胶原合成,同时能增加钙盐的沉积和促进钙化结节的形成^[15]。

目前,研究者大多联合使用地塞米松(DEX)、 β -甘油磷酸钠(β -GP)和维生素 C(VitC)以达到诱导效果,但由于 3 者的浓度配比及组合方式不同,诱导效果存在差异。本研究设计了 3 种诱导剂,结果发现,各浓度组合的诱导分化剂均能诱导 ES 细胞生成骨细胞,诱导剂 I (1×10^{-7} mol \cdot L⁻¹ DEX、0.01 mol \cdot L⁻¹ β -GP 和 0.05 g \cdot L⁻¹ VitC)的诱导分化率高于其他组,达 72%。诱导剂 I、II 与诱导剂 III、IV 之间差异极显著($P < 0.01$),表明 DEX 在诱导骨向分化过程中,起主要作用,显著促进成骨细胞的增殖与分化。

诱导 21 d 后,SABC 免疫组化法检测 I 型胶原,试验组细胞呈阳性,而 I 型胶原是成骨细胞增殖和分化过程中增加最多的生物大分子,这进一步说明诱导产生的是成骨细胞,从而证明 ES 细胞在体外一定诱导条件下具有向成骨细胞分化的能力。

3.2 ES 细胞向神经元样细胞的定向诱导分化

RA 是一种强细胞分化诱导剂,作为 VitA 在体内的活性衍生物,对胚胎发育尤其是神经系统发育

起重要作用,可诱导拟胚体分化成多种细胞类型,如神经细胞、肌细胞等,其分化方向取决于 RA 的作用阶段以及作用剂量。因此,RA 在 ES 细胞向神经细胞的诱导分化中起重要作用。Wouter 等^[16]证实单纯用生物化学信号 RA 诱导就可使 ES 细胞产生有功能的神经元。IBMX 是一种磷酸二酯酶抑制剂,能提高细胞内 cAMP 的水平,诱导人前列腺癌细胞出现神经元形态^[17]。

本研究采用 RA 和 IBMX 分别单独和联合诱导,结果显示:诱导剂 I (2×10^{-6} mol \cdot L⁻¹ RA)的诱导率达 84%,诱导剂 I、II 效果间无显著差异($P > 0.05$),诱导剂 III 效果极显著低于 I 和 II ($P < 0.01$)。这证明在体外,RA 和 IBMX 均能诱导 ES 细胞分化为神经元样细胞,但联合使用效果显著低于单独使用效果,可能是二者在诱导鸡 ES 细胞向神经元细胞分化方面无协同作用。

诱导后的神经元样细胞经甲苯胺蓝染色显示存在尼氏体结构。免疫组化鉴定显示,诱导后,大多数神经元样细胞的胞体与突起呈 NSE、NF 强阳性,而少数细胞只有胞体呈阳性,可能原因是该细胞尚处于神经元前体细胞阶段。而 GFAP 免疫组化反应为阴性,说明本研究诱导产生的是神经元样细胞而非星形胶质细胞。

3.3 ES 细胞向脂肪细胞的定向诱导分化

本试验采用含 1×10^{-6} mol \cdot L⁻¹ DEX、 5×10^{-4} mol \cdot L⁻¹ IBMX 和 10 mg \cdot L⁻¹ 胰岛素的诱导液和含 10 mg \cdot L⁻¹ 胰岛素的循环液对 ES 细胞定向诱导,油红 O 染色及 PPAR γ 的 RT-PCR 检测表明 ES 细胞可定向分化为脂肪细胞。

研究表明,DEX 可激活细胞表面的核激素受体超家族成员糖皮质激素受体,使其向脂肪细胞分化^[18]。IBMX 是磷酸二酯酶的特异性抑制剂,可通过抑制 cAMP 的降解而提高其在细胞内的水平。cAMP 可通过激活结合蛋白(CREB)调控 C/EBP α 和 C/EBP β 的表达,促进脂肪细胞的产生^[19]。胰岛素的存在使细胞内敏感性脂肪酶的活性提高,促进脂肪细胞的形成^[20]。本研究中,诱导后的细胞中脂滴逐渐增加并聚集成大脂泡,表现出与脂肪细胞相似的生长特点,油红 O 染色结果显示脂滴为橙红色,从而排除了由于细胞提取方法和自身特性而出现的脂肪滴干扰,证实 ES 细胞向脂肪细胞的定向诱导。

过氧化物酶增殖物活化受体家族(CPPAR α 、PPAR δ 和 PPAR γ)调控脂肪细胞的分化。PPAR γ

亚型的表达呈脂肪组织特异性,是 PPARs 家族与脂肪细胞分化最密切的组分,于大多数脂肪细胞特异性基因尚未表达前已表达^[21]。本研究提取诱导后细胞的总 RNA,经 RT-PCR,凝胶上出现大小约 301 bp 的单一一条带,说明诱导后细胞中有 PPAR γ 表达,进一步证明 ES 细胞在体外具有的向脂肪细胞分化的能力。

4 结 论

本研究证实了 ES 细胞的多向分化潜能,初步确定向成骨细胞、神经元样细胞和脂肪细胞分化的诱导剂中较理想的浓度配比和组合方式,为其在组织工程、细胞移植、基因治疗等领域的运用提供了研究基础,为最终实现组织器官的再生和替换提供了可能。

参 考 文 献:

- [1] 效 梅,安立龙,窦忠英,等. 动物胚胎干细胞的概念及特征 [J]. 黄牛杂志,2000,26(1):56-58.
- [2] SOTTILE V, THOMSON A, MCWHIR J. *In vitro* osteogenic differentiation of human ES cells [J]. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5(2):149-155.
- [3] 董晓先,刘金保,董燕湘,等. 天麻诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志,2004,24(1):51-54.
- [4] 郭雨霁,高英茂,邴鲁军,等. 胚胎干细胞向神经细胞定向诱导分化的研究 [J]. 解剖学报,2003,34(2):168-171.
- [5] NARUSE K, URABE K, MUKAIDA T, et al. Spontaneous differentiation of mesenchymal stem cells obtained from fetal rat circulation [J]. *Bone*, 2004, 35(4):850-858.
- [6] YAGAMI K, UYAMA Y, YOSHIZAWA Y, et al. A human chondrogenic cell line retains multipotency that differentiates into osteoblast and adipocytes [J]. *Bone*, 2004, 34:648-655.
- [7] HAMBURGER V, HAMILTON H L. A series of normal stages in the development of the chick embryo [J]. *J Morphol*, 1951, 88(8):49-92.
- [8] LI B C, CHEN G H, QIN J, et al. A timetable of the development stage of silkies embryo [J]. *Asian-Aust J Anim*, 2003, 16(6):800-805.
- [9] QIN J, LI B C, CHEN G H, et al. Cultivation and passage of chicken primordial germ cells [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(4):723-731.
- [10] 吴信生,何先红,田智泉,等. 鸡胚胎干细胞分离培养和单细胞克隆的制备 [J]. 中国家禽,2008,30(22):30-34.
- [11] 魏彩霞,孙国波,葛剑辉,等. 诱导鸡胚精原干细胞向成骨细胞分化的研究 [J]. 畜牧与兽医,2007,39(12):7-12.
- [12] 秦 洁. 鸡胚胎原始生殖细胞建系能力的研究 [D]. 扬州:扬州大学,2006.
- [13] 余 飞,葛剑辉,倪黎纲,等. 鸡胚精原干细胞定向诱导分化为脂肪细胞 [J]. 农业生物技术学报,2008,16(3):450-455.
- [14] COELHO M J, FERNANDES M H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(11):1095-1102.
- [15] OTSUKA E, YAMAGUCHI A, HIROSE S, et al. Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(1 Pt 1):C132-138.
- [16] WOUTER C, VAN MAIKEL P P, MAIRA W M. Neuronal differentiation of embryonic stem cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1312(1):21226.
- [17] BANG Y J, PIRNIA F, FANG W G, et al. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:5330-5334.
- [18] YAMAGUCHI T, CHATTOPADHYAY N, KIFORO O. Extracellular calcium (Ca²⁺ (o))-sensing receptor in a murine bone marrow-derived stromal cell line (ST2): Potential mediator of the action of Ca²⁺ (o) on the function of ST2 lines [J]. *Endocrinology*, 1998, 139:3561-3568.
- [19] TANG Q Q, JIANG M S, LANE M D. Repressive effect of Sp1 on the C/EBP α gene promoter: role in adipocyte differentiation [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19:4855-4865.
- [20] 刘 军,陈 影,刘 芳,等. 肝脏脂肪浸润程度与胰岛素抵抗的相关性研究 [J]. 临床内科杂志,2004,21(2):120-122.
- [21] SALADIN R, FAJAS L, DANA S, et al. Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma 1 (PPAR gamma 1) and PPAR gamma 2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis [J]. *Cell Growth Differ*, 1999, 10:43-48.