

# 原始生殖细胞体外培养及应用研究\*

唐奕, 卢光琇

(中南大学 湘雅医学院 人类生殖工程研究室, 中国湖南 长沙 410078)

**摘要:** 原始生殖细胞是来源于胚胎生殖嵴的一类具有多向分化潜能的干细胞, 其形态、细胞表面标志、分化潜能均与来源于囊胚内细胞团的干细胞相似。在饲养细胞层和多种生长因子的共同作用下, 可保持原始生殖细胞在体外不断增殖而不分化, 最终建立 EG 细胞系。本文就原始生殖细胞体外培养, 建立 EG 细胞系及其应用前景作一综述。

**关键词:** 原始生殖细胞; 细胞因子; EG 细胞

中图分类号: R321.1; R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2002)S1-0177-04

## *In vitro* Culture and Application Research of Primordial Germ Cells

TANG Yi, LU Guang-xiu

(Human Reproductive Engineering Laboratory, Xiangya School of Medicine,  
Central South University, Changsha 410078, Hunan, China)

**Abstract:** Primordial germ cells are derived from embryonic gonadal ridges, and they are pluripotent stem cells. Primordial germ cells are similar with those stem cells derived from inner cell mass of blastocysts in morphology, cell surface marks and pluripotency. When cultured on feeder cells in the presence of many kinds of cytokines, primordial germ cells can proliferate continually and maintain undifferentiated state. EG cells line can be established at last. *In vitro* culture of primordial germ cells, establishment of EG cells line and their application prospect are reviewed.

**Key words:** primordial germ cells; cytokine; EG cells

(*Life Science Research*, 2002, 6(Suppl): 177~ 180)

在体外能持续增殖而不分化, 且具有多向分化潜能的胚胎时期的干细胞有两种来源: 一是来自胚胎早期囊胚内细胞团的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)<sup>[1]</sup>, 我们通常所说的干细胞就是来源于此; 另一种是来自胚胎生殖嵴原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)<sup>[2]</sup>的胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EG 细胞), 其形态、表面标志、分化潜能及体外培养条件均类似于 ES

细胞。

### 1 PGCs 的起源和迁移

PGCs 的起源, 不同种类动物有所不同, 如: 小鼠 PGCs 起源于尾侧卵黄囊内胚层, 由后肠胚层和尿囊基部向胚内迁移, 经背侧肠系膜到达左、右侧生殖嵴。以碱性磷酸酶染色追踪 8.5~13.5 d (交配后天数 days post coitum, 下同) 鼠胚 PGCs 的

\* 收稿日期: 2002-06-14; 修回日期: 2002-10-14

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30030076)

作者简介: 唐奕(1977), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 从事人类胚胎干细胞的研究, E-mail: cstangyi@sina.com; 卢光(1939), 女, 湖北天门人, 教授, 博士生导师, 从事生殖遗传学研究。

迁移<sup>[3]</sup>,发现 8.5 d 鼠胚的大部分 PGCs 位于尿囊蒂和原条尾端的卵黄囊脏层,即后肠开口的边缘并与之结合.9.5 d 少量 PGCs 位于卵黄囊和尿囊底部,大部分细胞埋藏于后肠中.10.5 d 小部分 PGCs 到达生殖嵴,大部分 PGCs 在 11.5 d 到达生殖嵴,而 12~13 d 时,PGCs 开始分化为可以确认的雌性或雄性配子.小鼠 PGCs 迁移大约需 4 d(8~12 d),约 60% 的 PGCs 迁移至生殖嵴,其余的则在肠上皮和副肾处停留,直至第 4 周退化死亡.

人类 PGCs 起源于第 4 周卵黄囊后壁内胚层近尿囊处,同时,随着胚胎体侧褶的形成,间介中胚层向腹侧移动,形成左、右两条纵行的生肾索,第 4 周末,生肾索隆起成尿生殖嵴,尿生殖嵴进一步发育为内侧的生殖嵴和外侧的中肾嵴.42 d 的人胚<sup>[4]</sup>,约有 1 000 个 PGCs,PGCs 的糖原含量高,并具有较强的碱性磷酸酶活性,能做变形运动,于第 6 周借着变形虫样的运动,沿着后肠的背系膜,向生殖嵴部位迁移,约在一周内迁移完成.

另外,最初 PGCs 到达生殖嵴的全部迁移时间,在家兔为交配后 9~16 d,在牛为交配后的 34 d.

## 2 PGCs 体外培养体系

### 2.1 饲养细胞层

早期的 PGCs 的培养研究是从迁移期以后进行分离、取材.在无体细胞的情况下培养,结果仅存活几天,向培养基中加入纤维蛋白,层粘连蛋白和 IV 型胶原蛋白后,细胞的存活力有所改善<sup>[5]</sup>.而饲养细胞的使用使 PGCs 体外存活更久,因为饲养细胞为 PGCs 的生长提供某些必需的生长因子及其他生长信号,如相应的黏附分子等.不同实验室采用不同的细胞作为饲养细胞,包括原代培养的鼠胚成纤维细胞,睾丸支持细胞以及不同来源经过改造的细胞系,如 STO、TM4、SL4-m220 等.经 AKP 染色,SEA-1 抗体检测均呈阳性,与在体 PGCs 一致.但是,在饲养细胞层上培养的 PGCs 的有丝分裂活性及增殖速度远不及在体的 PGCs.因此,PGCs 体外长期培养还需加入多种细胞因子.

### 2.2 细胞因子

PGCs 在移行过程中,能持续分裂增殖,一旦到达生殖嵴则停止增殖而进入减数分裂,几种细胞因子相结合作用改变了 PGCs 发育程序,阻断其向成熟生殖细胞分化,同时刺激 PGCs 大量增殖,得到大量多能干细胞.目前研究最多的是干细

胞生长因子、白血病抑制因子、碱性成纤维生长因子.

#### 2.2.1 干细胞生长因子(stem cell growth factor, SCF)

小鼠 SCF 是由 *s1* 位点编码的产物,也是由 *w* 基因编码的原癌基因 *e-kit* (酪氨酸激酶) 的配体<sup>[6]</sup>,SCF 通过与 *e-kit* 结合产生效应.原位杂交显示 *e-kit*mRNA 在生殖嵴早期 PGCs 中有表达,SCFmRNA 则在早期鼠胚的许多部分,包括 PGCs 移行区域均有表达<sup>[7]</sup>.Yasuhisa Matsui<sup>[8]</sup> 等以单克隆抗体 ACK-2 阻断 *e-kit* 酪氨酸受体与 SCF 结合,发现 ACK-2 对 8.5 d 和 10.5 d 的 PGCs 有抑制作用,而对 11.5 d 的无明显作用,这是因为 *e-kit*mRNA 在 11.5 d 的 PGCs 上无表达.SCF 有膜结合型和分泌型两种存在方式,其主要作用是抑制 PGCs 凋亡,维持其生存.以溴化尿嘧啶标记实验<sup>[7]</sup> 证明 SCF 本身并不是 PGCs 的有丝分裂原,但能增强其作用,并增加 PGCs 的能动性.SCF 促进 PGCs 增殖具有剂量依赖性<sup>[8]</sup>,浓度在 30~40 μg/L 时对 PGCs 的作用最强.其中,分泌型 SCF 对 PGCs 的作用相对较小,*s1* 突变型小鼠(*s1d*) 体内 PGCs 大量减少,因为其体内只产生分泌型 SCF<sup>[9]</sup>.Susanna D<sup>[9]</sup> 将从非洲绿猴肾脏分离的成纤维样细胞 CV-1 作为饲养层,该细胞不能产生膜结合型 SCF,所以不能维持 PGCs 生存,而转染了编码膜结合型 SCF 基因的 CV-1 细胞(CV-1 Wt) 却能促进 PGCs 增殖.

#### 2.2.2 白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)

LIF 是一种多效性细胞因子,能抑制胚胎干细胞分化,维持发育的全能性.LIF 能不依赖饲养细胞,而直接作用于 PGCs<sup>[10]</sup>,通过与细胞表面受体形成复合物后产生信号传导作用,该过程包括两个环节<sup>[11]</sup>: 1) LIF 特异性结合受体(LIF-R); 2) 糖蛋白 gp130.荧光激活细胞分类装置分析显示 LIF-R 存在于 PGCs 表面.gp130 是 LIF 及其相关因子,如制瘤素、睫状神经营养因子和  $\text{IL-11}$  的受体的功能成分,制瘤素和睫状神经营养因子均能促进 PGCs 生长,在有 LIF 的条件下,加入中和 gp130 的抗体能明显破坏 PGCs 存活,说明 gp130 在 PGCs 生长中起重要作用.通过基因打靶产生的无 LIF 的小鼠具有不育性,说明 LIF 对于 PGCs 的生存有重要作用,LIF 能与 SCF 协同促进 PGCs 增殖,并抑制 PGCs 凋亡.

#### 2.2.3 碱性成纤维生长因子(fibroblast growth fac-

tor, bFGF)

SCF 与 LIF 能协同维持 PGCs 生存, 促进 PGCs 增殖, 但其增殖能力有限<sup>[12]</sup>, 如向存在 SCF 和 LIF 的培养基中加入 bFGF, 可使 PGCs 持续增殖, 远远超过 PGCs 在体内的增殖能力. 因此 bFGF 作为一种强有力的有丝分裂原, 在 PGCs 体外培养及建立 EG 细胞系中起着重要作用. James L 等<sup>[13]</sup> 研究发现, 小鼠原始生殖腺发育过程中 FGF 受体 I、II 与 PGCs 的表达相一致, 而且, 体外培养的 PGCs 能结合被放射物标记的 bFGF, 表明 bFGF 能直接作用于 PGCs, 研究表明 bFGF 作用的可能集中机制是<sup>[12]</sup>: 1) PGCs 移行至生殖嵴时即停止分裂, 这与 e-kit 表达下降有关, 而 bFGF, 膜结合型 SCF 和 LIF 能保持 e-kit 水平或整合下调的信号转导过程; 2) bFGF 可能通过刺激表达 FGF 受体 I 的饲养层, 如 s14-m220, 产生另外的生长因子, 这些生长因子继续作用于 PGCs; 3) bFGF 可直接作用于 PGCs, 增加黏附分子的表达或减少能动性受体的表达, 另外使饲养层分泌抑制 PGCs 运动的细胞外基质成分, 或不再产生促进 PGCs 运动的因子, 这样使 PGCs 形成紧密的克隆.

所以, 有研究者认为 SCF、LIF 和 bFGF 是长期培养小鼠 PGCs 不可缺少的, 三者联合作用能使生长于饲养层上的 PGCs 形成长期增殖但不分化的 EG 细胞系. 可能的原因<sup>[14]</sup> 是细胞因子的联合作用使 PGCs 的 e-Kit 保持较高水平. 保证了相关信号传导通路的完整, 并建立受体的自分泌途径.

#### 2.2.4 其它细胞因子

cAMP 可作为有丝分裂原刺激 PGCs 在体外增殖, 腺苷酸环化酶激动剂 Forskolin<sup>[11]</sup> 能提高细胞内 cAMP 水平, 所以能促进 PGCs 增殖, 当培养体系中同时存在 LIF 和 Forskolin 时, 培养 3 d 后 PGCs 数目明显比只存在 LIF 或 Forskolin 的体系中多. 研究发现视黄酸<sup>[15]</sup> (retinoic acid, RA) 亦可获得与 Forskolin 相同的结果. 另外, TNF- $\alpha$ <sup>[16]</sup>、IL-4 等均有促进 PGCs 体外增殖的作用.

### 3 EG 细胞建系

目前, 包括我国<sup>[17]</sup> 在内, 世界上已有多个国家的实验室建立了小鼠 EG 细胞系, 对于小鼠 PGCs 体外长期培养已有深入研究. 由于受到材料来源的限制, 对人 PGCs 体外培养的报导尚不多见. 1998 年, Shamblo<sup>[17]</sup> 从 5~9 周的药物流产胎

儿生殖嵴和肠系膜中分离出 EG 细胞, 以被射线照射过的 STO 成纤维细胞为饲养层, 以 LIF、bFGF 和 Forskolin 建立 PGCs 体外培养体系, 经过传代培养, 以 AKP 染色以及 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 五种常用于检测 ES 和 EG 细胞表面标记的抗体检测, 均获得阳性结果, EG 细胞核型正常且稳定. 在一定条件下形成拟胚体, 免疫组化分析表明其具有分化为 3 个胚层的潜能. 我国常万存等<sup>[18]</sup> 自 2~3.5 月龄人流产胎儿生殖腺或生殖嵴等处取材, 分离得到人 PGCs, 并在体外传代培养.

另外, 已有研究人员从大鼠、猪、羊等哺乳动物中分离 PGCs, 但均处于实验室研究阶段.

## 4 PGCs 应用的理论基础及前景

由于获得囊胚内细胞团来源的 ES 细胞需要破坏具有生命的胚胎, 所以这项研究在许多国家是被禁止或者严格限制的. 于是 EG 细胞系的建立给研究人员带来了新的希望<sup>[19]</sup>. 2001 年, Shamblo<sup>[20]</sup> 等从 EG 细胞来源的拟胚体中分离细胞, 这些细胞和其它细胞一样可被冻存、克隆分离和转染. 在体外, 这些细胞不仅有很强的生命力, 在 70 代以后仍然保持正常的核型, 而且能表达多种基因以及神经、血管/血细胞、肌肉和内胚层谱的相关表面标记, 说明这些拟胚体来源的细胞是相对独立的前体细胞, 因此 PGCs 体外培养的前景将是不可估量的.

### 4.1 动物发育生物学研究

PGCs 是各级生殖母细胞和成熟配子的共同祖先, 研究 PGCs 开辟了人类研究其自身胚胎发育过程, 组织功能以及生殖细胞发育过程中一系列问题的最好途径, 同时能定性甚至定量的研究某些细胞因子, 细胞外基质等因素对生殖细胞的生长和分化的影响, 从而减少甚至避免了整体胚胎研究中各种内源性因素的干扰. 所以 PGCs 为研究诸如出生缺陷、不孕与不育、自然流产等常见事件提供最原始的发育生物学模型. 探索 PGCs 到 EG 的形成过程, 尤其是发育潜能的变化, 有助于解释胚胎生殖系发育调节机制, 为阐明生殖系肿瘤起源提供实验证据<sup>[14]</sup>.

有研究人员提出不能简单的以 EG 细胞代替内细胞团来源的 ES 细胞. Azim Surani<sup>[19]</sup> 将小鼠 EG 细胞植入早期鼠胚, 结果包含该细胞的组织不能正常发育. 这可能是由于 EG 细胞在发育过程

中缺少一定的修饰。从 PGCs 到形成成熟精子或卵子的过程中建立相应的配子印迹, Kato<sup>[21]</sup> 发现配子印迹是胚胎正常发育必不可少的。PGCs 通过甲基化作用选择性灭活父性或母性基因。Patricia A<sup>[22]</sup> 通过实验证明小鼠 EG 细胞中胰岛素样生长因子 II 型受体基因的甲基化状态不同于来源于内细胞团的胚胎干细胞, 这可能代表着两种不同的发育模式。

#### 4.2 移植治疗

当由于不可再生细胞衰竭或功能缺陷而引发的疾病, 如帕金森氏病、糖尿病、心肌梗死等, 可移植提供相应的细胞而缓解甚至治愈疾病。PGCs 同来源于囊胚内细胞团的干细胞一样能被诱导为神经细胞、胰岛细胞、心肌细胞等各类型细胞。但是, 仍有许多要克服的障碍, 诱导分化的结果常常是多种类型细胞的混合, 所以首先需纯化目的细胞, 再将外源细胞整合到宿主组织中, 使其成为功能性整体, 另外, 移植中的常见问题免疫排斥仍然存在。那么, 可以通过建立干细胞库<sup>[23]</sup>, 包含多种组织相容性抗原复合物的等位基因, 用以进行组织配型或通过转基因的方式将受体的 MHC 基因重组, 培育出相应的转基因干细胞解决免疫排斥问题。最后, 细胞移植的安全性问题一直倍受关注。但我们相信, 干细胞为疾病的治疗开辟了一条崭新道路, 终有一天, 人们从冷冻罐中取出一管细胞, 解冻后经过生长因子处理, 使之生长为所需的类型细胞, 用于临床治疗和基础研究。

#### 4.3 基因功能研究

随着人类后基因组时代的到来, 人们将逐步认识人类各基因的功能。由于 EG 细胞具有无限分化增殖能力, 并且可进行基因操作, 借此对比细胞分化前后基因表达的差异, 为研究人类基因的功能提供强有力的工具。

#### 4.4 药理研究

EG 细胞可以被诱导分化为任何组织类型的人类细胞, 从而为新药的开发和筛选提供大量安全有效的标本, 避免了动物实验和临床实验的弊端。

#### 参考文献 (References):

[1] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-156.  
[2] 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): 550-551.

- [3] MASSIMO D F, MAURIZIO P. Immunoaffinity purification of migratory mouse primordial germ cells[J]. Exp Cell res, 1995(216): 277-279.  
[4] 卢惠霖, 卢光磊. 人类生殖与生殖工程[M]. 郑州: 河南科技出版社, 2001. 26.  
[5] ALVAREZ B A. Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration[J]. Exp cell res, 1986, 165(2): 362-368.  
[6] WITTE O. Steel locus defines new multipotent growth factor[J]. Cell, 1990, 639(1): 5-6.  
[7] GODIN J, DEED R, COOKE J, et al. Effect of the steel gene production mouse primordial germ cells in culture[J]. Nature, 1991, 352: 807-811.  
[8] YASUHISA M, DENIZ T, SATOMI N, et al. Effect of Steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture[J]. Nature, 1991, 353: 750-752.  
[9] SUSANNA D, DOUGLAS E W, MARY K, et al. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture[J]. Nature, 1991, 352: 809-811.  
[10] LIN Z C, DAVID P G, LYNN S, et al. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth[J]. Development, 1994, 120: 3145-3153.  
[11] UICHI K, TETSUYA T, MIHO W, et al. Functional requirement of gp130 mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells *in vitro* and activation of embryonic germ[J]. Development, 1996, 122: 1235-1242.  
[12] YASUHISA M, KRISZTINA Z, BRIGID L, et al. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. Cell, 1992, 70(50): 841-847.  
[13] JAMES L, RESNICK M O, JONATHAN R, et al. Role of fibroblast growth factor and their receptors in mouse primordial germ cell growth[J]. Biol Reprod, 1998, 59: 1224-1229.  
[14] 许新, 丛笑倩, 严缘昌. 原始生殖细胞和胚胎生殖细胞发育多能性[J]. 生殖与避孕, 2000(2): 259-262.  
[15] KOSHIMIZU U, WATANABE M, NAKATSUJI N, et al. Retinoic acid is a potent growth activator of primordial germ cells *in vitro*[J]. Dev Biol, 1995, 168: 683-685.  
[16] KAWASE E, YAMAMOTO H, HASHIMOTO K, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells *in vitro*[J]. Dev Biol, 1994, 161: 91-95.  
[17] SHAMBLOTT M J, AXELMAN J, WANG S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Dev Biol, 1998, 95: 13726-13731.  
[18] 常万存, 龚忠英, 马鸿飞, 等. 原始生殖细胞的人类胚胎干细胞克隆[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(6): 105-107.  
[19] 许新, 丛笑倩, 严缘昌. 小鼠原生殖细胞建系过程及其分化特性的研究[J]. 实验生物学报, 1999, 32(3): 251-253.  
[20] SHAMBLOTT M J, AXELMAN J, JOHN W, et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*[J]. PNAS, 2001, 98: 113-118.

(下转第 198 页)

- [7] 钟国强, 吴忠文. 新疆乌苏县首次发现褐家鼠[J]. 干旱区研究, 1991, 8(1): 72.
- [8] 张大铭, 张富春, 马合木提, 等. 新疆的公交发展与褐家鼠的扩散[J]. 内陆干旱区动物学集刊, 1993, 1(1): 90-92.
- [9] 张国强. 乌鲁木齐南山阿克塔什发现褐家鼠[J]. 地方病通报, 1990, 5(2): 70.

(上接第 176 页)

参考文献(References):

- [1] 李延斌. 医用内窥镜的发展与应用[J]. 山东医科大学学报, 1994, 4: 18-20.
- [2] 刘聚卑, 庄天戈. 虚拟内窥镜的发展与应用[J]. 国外医学生物医学工程分册, 1999, 22(6): 321-325.
- [3] VINING D J. Virtual endoscopy: is it reality? [J]. Radiology, 1996, 200: 1-30.
- [4] 王新成. 高级图像处理技术[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001. 209-271.
- [5] 倪明田, 吴良芝. 计算机图形学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999. 140-156.
- [6] 李乃宏, 於文雪, 罗立明. 三维人体虚拟内窥的实验研究[J]. 航天医学与医学工程, 1999, 12(3): 209-213.

(上接第 180 页)

- [21] SABINE S K. Ethical loophole closing up for stem cell researchers [J]. Science, 1999, 286(5437): 31-33.
- [22] PATRICIA A L, DENISE P B, BRIGID M H, *et al.* Mouse embryonic germ(EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor(Igf2r) gene compare with embryonic stem (ES) cell lines[J]. Development, 1994, 120: 3197-3204.
- [23] GEARHART J. New potential for human embryonic stem cells [J]. Science, 1998, 282(5391): 1061-1065.