

文章编号:1005-8737(2000)04-0095-04

·综述·

鱼类胚胎干细胞研究进展

Progress of fish embryonic stem cell

陈松林

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

CHEN Song-lin

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

关键词:鱼类;胚胎干细胞

Key words: fish; embryonic stem cell

中图分类号:Q959.4

文献标识码:A

胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ES细胞)是从动物早期发育胚胎内细胞团或原始生殖细胞分离得到的一种未分化的永久性细胞系,它一方面保留了所有的发育潜力,在合适的条件下,能够分化成多种类型的细胞、组织。将ES细胞移植到动物囊胚后,它可以参与宿主胚胎各种组织的构成,形成嵌合体,直至达到种系嵌合,遗传给后代;另一方面,人们可以对ES细胞的基因组进行各种遗传操作,包括随机引入外源基因到ES细胞基因组中,或通过同源重组,定点引入外源基因到ES细胞基因组中或破坏基因组中某一特定的靶基因;通过细胞移植或核移植技术生产嵌合体或转基因动物,又可将细胞水平的定点突变转变为个体水平的定点突变。因而ES细胞成为研究动物早期胚胎发生、细胞组织分化、基因功能和表达调节等发育生物学基础研究的一个非常理想的工具,也是进行动物组织工程、人类疾病防治和制作定点突变转基因动物或缺基因动物的重要途径。鉴于ES细胞的上述特点及其在遗传育种和发育生物学研究中所具有的重要意义,早在80年代初,ES细胞的研究就引起人们的高度重视。

ES细胞分离成功的最早报道是在小鼠上取得的。Evans和Kaufman^[1]及Martin^[2]分别建立了小鼠ES细胞系,开创了胚胎干细胞研究的新领域。随后,ES细胞系建立及应用的研究在鼠科动物上蓬勃开展起来^[3]。目前,小鼠ES细胞分离、建系及基因打靶技术已基本成熟,利用ES细胞借助于同源重组已分析了小鼠多种基因的功能,制作了多种转基因(knock-in)或缺基因(knock-out)小鼠^[4,5]。

收稿日期:2000-08-03

作者简介:陈松林(1960-),男,湖北人,黄海水产研究所研究员,从事鱼类生物技术。E-mail:csf@public.qd.sd.cn

除小鼠外,其它哺乳动物ES细胞的研究起步较晚,目前已在猪、牛、羊、兔等哺乳动物上广泛开展了胚胎干细胞分离与培养的研究,并取得一定进展^[6-11]。不过,尽管这些哺乳动物的ES细胞在形态、碱性磷酸酶染色等许多方面类似于小鼠ES细胞,但尚未获得ES细胞移植产生的嵌合体,而这一点正是鉴定ES细胞的重要指标。

1 鱼类ES细胞研究概况

在鱼类ES细胞培养方面,目前主要以小型实验性鱼类为材料开展了一些研究工作。斑马鱼(*Brachydanio rerio*)和青鳉(*Oryzias latipes*)由于具有个体小(全长仅3cm左右)、世代周期短(2~3个月即可成熟繁殖)、全年均可繁殖,以及通过人工控制光照可使成熟个体每天产卵,卵子较大且透明等特点,因而成为研究鱼类ES细胞培养较理想的实验材料。目前这方面的成功报道也仅限于这2种小型实验性鱼类^[12,13]。

有关鱼类ES细胞分离的最早尝试为Colodi等^[14]在斑马鱼上进行的工作。基本上借鉴小鼠的方法^[15,16]进行斑马鱼胚胎细胞培养。他们对来源于斑马鱼囊胚的细胞进行了40多个群体倍增的连续培养,细胞生长率没有下降,70%的细胞仍保留二倍体核型,细胞的倍增时间约为72h,在培养大约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的小细胞可能为未分化的ES细胞,而其它大多数更大的单层扁平细胞可能为分化的细胞,进一步延长培养未获得ES细胞。

几年后,同一研究组Sun等^[13,17]从5~8小时龄的斑马鱼胚胎分离培养出成纤维细胞,经过传代培养后,获得了斑马鱼胚胎成纤维细胞系(ZEF)。ZEF细胞在培养条件下可以维持6个多月。用丝霉素C处理后,ZEF可作为滋养层细

胞。

Sun 等^[13]又从斑马鱼早期胚胎中分离培养出 ES 样细胞系。他们从斑马鱼早期囊胚中分离出单个细胞进行培养, 培养基为 LDF 基础培养基, 用前添加 0.18 mg/ml 碳酸氢钠, 15 mol/L HEPES (pH7.4), 400 μg/ml 青霉素, 400 μg/ml 链霉素, 50 μg/ml 氨苄青霉素, 10 μg 牛胰岛素, 0.4% 鳟鱼血清和 5% 小牛血清等物质。经过多代传代培养后, 获得了 ES 样细胞系。这些细胞具有鼠类 ES 细胞的形态, 并具有高的碱性磷酸酶活性。

Wakamatsu 等^[18]率先报道了青鳉 ES 细胞建立和鉴定的结果。将青鳉桑椹期胚胎细胞团块离心后, 接种到 6-孔板中, 在 28℃ 培养 1 周后, 通过胰酶处理将碎片分散成更小的细胞团块和单个细胞, 然后接种到含新鲜滋养细胞的 96 孔板中, 经过几天培养, 再扩大到 24 孔板, 最终转移到 3.5 cm 培养皿中进行培养。基础培养基为 DMEM 培养基, 另外添加少量非必需氨基酸、核苷酸、抗菌素和小牛血清等。他们也借鉴鼠类 ES 细胞的培养方法, 采用成纤维细胞作为滋养细胞。成纤维细胞来源于青鳉囊胚和原肠胚碎片的原代培养物, 经过几次传代后, 保存于液氮中待用。成纤维细胞的培养基亦为 DMEM (pH7.3), 另外添加 10% 小牛血清、2% 鲤血清、100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素和 25 mmol/L HEPES。成纤维细胞先用 10 μg/ml 丝裂霉素处理 4 h, 然后接种到塑料培养板上, 细胞接种密度为 $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ 。在 28℃ 培养过夜后, 将培养板置 4℃ 保存待用, 这种制备好的滋养层细胞最长可保存 2 周。采用这种培养系统, 成功地建立了青鳉 ES 样多能细胞系 OLES1。该细胞系在形态、碱性磷酸酶活性及分化能力等许多方面具有 ES 样细胞的特征。细胞小而呈圆形, 细胞核占据细胞体的大部分, 在细胞质中有许多液泡样结构。细胞生长活跃, 形成致密包被集落。传代培养时, OLES1 细胞通常占据由相邻滋养层细胞围隔形成的空隙中, 围绕滋养层细胞生长。这些细胞表现出很强的碱性磷酸酶活性, 而滋养层细胞的碱性磷酸酶活性很弱。所有这些特征充分证明 OLES1 细胞系确实为 ES 样干细胞。

Hong 和 Schartl^[19]也成功地建立了青鳉 ES 样细胞系。他们从青鳉囊胚期胚胎分离出卵裂球, 获得囊胚细胞进行原代培养。囊胚细胞的直径为 50 μm 左右。共获得 10 个原代培养细胞株, 其中 7 个在培养的前 10 d 就广泛分化成各种类型的细胞, 最后死亡。另 3 个原代培养细胞株经诱导形成 3 个独立的 ES 样细胞株, 这些细胞表现出稳定的生长和形态, 在经过 150 d、20 多代的连续培养后, 这些细胞都表现出类似的表型、生长性状和分化能力。对其中一个进行细胞学 (MES1) 重点培养和分析, 该细胞系生长稳定, 在经过 18 个月、100 多代的连续培养后, 没有出现任何生长危机; 该细胞系可以长期冷冻保存, 解冻复苏后又能正常生长。MES1 细胞具有哺乳类 ES 细胞的许多特征, 细胞较大, 直径 10~30 μm, 呈圆形或多边形, 胞质稀少, 也呈现出很强的碱性磷酸酶活性。由此充分证明, 该 MES1 细胞系确实是 ES 样细胞

系。

2 鱼类 ES 细胞的体外分化能力

Sun 等^[13]研究表明, 斑马鱼 ES 样细胞在视黄酸 (PA) 或 BRL-CM 及低浓度血清的诱导下, 可以分化成神经元细胞, 表明该 ES 样细胞具有体外分化能力。

Wakamatsu 等^[18]发现, 当用视黄酸处理时, 大多数 OLES1 细胞很快失去干细胞的形态, 在几天内细胞就长大至普通细胞的规格 (直径 10~50 μm), 形状也变得象上皮细胞或成纤维细胞那样扁平。处理 5~7 d 后, OLES1 细胞分化形成黑色素细胞, 这些细胞呈扁平或多边形, 直径 50~200 μm, 胞质中含有大量的黑色素颗粒。处理 2~3 周后, 有些 OLES1 细胞分化成神经元样细胞具有一个长的轴突。同时, 还有大量相互平行排列的双极细胞出现。

Hong 等^[19,20]研究表明, MES1 细胞表现出很强的体外分化潜力。在正常培养条件下, 绝大多数 MES1 细胞维持在未分化状态, 只有极少部分细胞 (<1%) 自发分化成其它类型细胞, 如色素细胞、成纤维细胞、神经细胞及肌肉细胞等。另外, 在悬浮培养状态和视黄酸诱导下, 经过 1d 的培养, MES1 细胞可以形成细胞集落, 这些集落稳定变大、变密, 最终发展成球形结构, 这些结构非常类似鼠类 ES 细胞形成的胚囊体 (Embryoid body), 而是否能形成胚囊体则是衡量 ES 细胞的重要标准之一。

3 鱼类胚胎细胞移植及嵌合体制作

鱼类 ES 细胞的获得只是建立基因打靶技术的第一步, 随后是建立将 ES 细胞移植到受体囊胚中获得嵌合体动物的技术。有关鱼类嵌合体的研究, 目前只有几篇报道。Lin 等^[21]首先在斑马鱼上进行了囊胚细胞移植制作嵌合体鱼的研究。他们从野生型斑马鱼囊胚胚层深处吸取胚盘细胞注射到处于 1 000 个细胞阶段的受体白化型斑马鱼囊胚中, 每个受体囊胚注射 20~100 个供体细胞。在注射的 418 个胚胎中, 有 70 个嵌合体胚胎存活至性成熟阶段, 其中 23 尾鱼在 4~6 周龄时其躯干部或尾部出现黑色素。不过, 与全黑的野生型斑马鱼不同, 嵌合体鱼的黑色素只出现在从背部到腹部的横带内, 且黑色素模式在不同个体间也不尽相同。在 2~3 月龄时, 将嵌合体与白化型个体进行交配, 在 28 个嵌合体个体中, 有 5 个产生了具有黑色素的子代, 其色素化模式与野生型个体相同; 而另外 23 个嵌合体亲鱼只产生了白化型后代。从而证明移植的野生型囊胚细胞可以参与受体胚胎的生殖系构成, 并可通过生殖传递给后代。这是鱼类通过胚胎细胞移植获得生殖系嵌合体的首次成功报道。随后, Nillson 和 Cloud^[22]对虹鳟进行了囊胚细胞移植制作嵌合体鱼的研究。他们先将异硫氰酸荧光素-葡聚糖注射到受精后 12 h 的虹鳟供体囊胚中, 让供体囊胚细胞获得荧光素标记。在受精后 3 d, 从荧光标记的胚胎上切下胚盘, 制作供体囊胚细胞, 然后将 1 000 个左右的荧光素供体细胞注射至处

于同一发育阶段的虹鳟受体囊胚中。在注射后 2~5 d, 观察受体胚胎中荧光素细胞的情况, 在 114 个接受注射的受体胚胎中, 19 个胚胎含有荧光素细胞, 这些发出荧光的细胞比开始标记时的囊胚细胞小。在不同胚胎中的分布也不尽相同, 有的分布在胚胎前部, 有的在后部。另外, 他们还将二倍体虹鳟的囊胚细胞注射到三倍体虹鳟的囊胚中, 在 6 个接受细胞移植的胚胎中, 5 个胚胎含有二倍体和三倍体细胞, 二倍体细胞在这些胚胎中的比例为 2.0%~12%。而在 6 个三倍体对照组中, 均未发现二倍体细胞。从而表明, 通过囊胚细胞注射, 在虹鳟上制作嵌合体个体也是可行的。不过, 未见这些虹鳟嵌合体能否通过生殖系统传递给后代的后续报道。而后, Wakamatsu 等^[23]通过显微注射将来自野生型青鳉(身上有黑色斑点)的囊胚细胞移植到白化品系青鳉(身上无黑色素)胚胎的胚盘中, 成功地获得了能够通过生殖系统传递的嵌合体个体。他们首先从位于中囊胚期的供体(野生型)胚盘中吸取数百个细胞, 然后显微注射到处于同一发育阶段的受体白化型囊胚的胚盘中, 受体胚胎分去膜和不去膜 2 种。在不去膜情况下, 在注射细胞的 94 个胚胎中, 有 31 个胚胎孵化出膜, 占总数的 33%, 有 26 个达到性成熟, 占 27.7%, 其中 5.3% 的个体上出现来源于供体的黑色素细胞, 从而形成嵌合体。在去膜情况下, 72 个接受细胞注射的受体胚胎中, 48 个孵化出膜, 占总数的 66.7%, 25 个达到性成熟, 占 34.7%, 其中 55.6% 的胚胎产生了白化品系(受体胚胎)所没有的黑色素细胞, 形成了嵌合体。将这些细胞移植所形成的嵌合体与受体(白化品系)进行回交, 产生了具有野生型体色的子一代个体。不同嵌合体个体与白化品系回交后, 后代中产生了 9.5%~60.9% 具有野生型体色的个体, 从而充分证明细胞移植所获得的嵌合体可以通过生殖系统传递给后代。

上述实验均是用囊胚细胞作为供体细胞, 而有关将经过长期培养鱼类 ES 细胞移植后获得嵌合体的研究, 目前仅有 1 篇报道^[21]。Hong 等^[19]将传代培养达 40 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, 从而成功地获得了 ES 样细胞移植的嵌合体青鳉。受体胚胎注射 50~100 个 MES1 细胞, 在注射的 204 个胚胎中, 有 5 个嵌合体胚胎身上出现了 1~4 个黑色素细胞, 黑色素化嵌合体的比例为 4.4%。黑色素细胞出现的部位为头部(2 个嵌合体), 躯干部(1 个嵌合体)和卵黄囊(1 个嵌合体)。在 MES1 细胞注射后所获得的鱼苗中, PCR 检测表明 90% 的个体为嵌合体。另外, 他们还用绿色荧光蛋白(GFP)cDNA 转染 MES1 细胞, 在细胞转染后 2 d, 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囊胚中, 其中的 90% 发育成 GFP 阳性鱼苗。这些嵌合体鱼苗含有 1~50 个 GFP 阳性的 MES1 细胞。这是利用鱼类 ES 样细胞系获得嵌合体的首次成功报道。至于这些 ES 样细胞在受体鱼体内能否分化发育成生殖系细胞以及嵌合体能否通过生殖传递给后代, 目前正在研究中。

4 鱼类 ES 细胞的应用前景与展望

鱼类胚胎干细胞和基因打靶的研究目前在我国乃至国际上尚处于起步阶段, 尽管在斑马鱼和青鳉上已经建立了 ES 样细胞系, 在青鳉上也获得了 ES 细胞移植的嵌合体, 但迄今尚未得到能传递给后代的生殖系嵌合体, 而这对于进行鱼类基因打靶却是至关重要的一步。在基因打靶方面, 目前只是构建青鳉 P53 基因同源重组载体, 并利用 ES 细胞进行了基因打靶实验。尽管开展鱼类基因打靶研究难度很大, 所需的人力、物力和财力投入也很大, 但鉴于基因打靶(同源重组)在进行鱼类基因定点突变, 鱼类基因功能分析, 有害基因敲除以及外源基因的定点整合等方面所具有的巨大潜力和应用价值, 在未来几年, 鱼类基因打靶的研究必将引起人们更大的重视, 也必将取得突破性进展。可以预见, 胚胎干细胞研究和基因打靶技术将在鱼类发育生物学、鱼类基因工程育种及海洋生物技术等方面发挥很大的作用。

参考文献:

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 291:154-156.
- [2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from mouse embryo cultures in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78:7 634-7 638.
- [3] Pascoe W, Kemler R, Wood S A. Gene and functions: trapping and targeting in embryonic stem cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 114:209-221.
- [4] Mansour S L, Tomas K R, Capecchi M R. Disruption of the protooncogene int-2 in mouse embryoderived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes[J]. *Nature*, 1988, 336:348-352.
- [5] Joyner A L. Gene targeting and gene trap screens using embryonic stem cells. New approaches to mammalian development[J]. *BioEssays*, 1991, 13:649-656.
- [6] Raved K H. Derivation of pluripotent embryonic cells from the rabbit[J]. *Trans Assoc Am Physicians*, 1992, 105:197-203.
- [7] Iannaccone P M, Taborn, G W, Garton R L, et al. Pluripotent stem cells from the rat are capable of producing chimera[J]. *Dev Biol*, 1994, 163:288-292.
- [8] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells[J]. *Nature Biotech*, 1998, 16:642-646.
- [9] Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7 844-7 848.
- [10] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282:1 145-1 147.
- [11] Sharnblott, M J, Axelmann J, Wang S P, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:13 726-13 731.

- [12] Hong Y, Winkler C, Scharl M. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*) [J]. *Mech Dev*, 1996, 60:33-34.
- [13] Sun L, Bradford C S, Ghosh C, et al. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995b, 4:193-199.
- [14] Collodi P, Karnei Y, Sharps A, et al. Fish embryo cell culture for derivation of stem cells and transgenic chimeras [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1992, 1(1):257-265.
- [15] Loo D, Fuquay J, Rawson C, et al. Extended culture of mouse embryo cells without senescence; inhibition by serum [J]. *Science*, 1987, 236:200-202.
- [16] Sakai Y, Rawson C, Lindberg K, et al. Serum and transforming growth factor beta regulate glial fibrillary acidic protein in serum free-derived mouse embryo cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 8 378-8 382.
- [17] Sun L, Bradford C S, Barnes D. Feeder cell cultures for zebrafish embryonal in vitro [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995a, 4: 43-50.
- [18] Wakamatsu Y, Ozato K, Sasado T. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3:185-191.
- [19] Hong Y, Scharl M. Establishment and growth responses of early medakafish embryonic cells in feeder layer - free cultures [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1996, 5:93-104.
- [20] Hong Y, Chen S L, Winkler C, et al. Medakafish embryonic stem cells as a model for genetic improvement of aquaculture live-stocks in "New development in marine biotechnology" [M]. New York: Blenum Press. 1998.
- [21] Lin S, Long W, Chen J, et al. Production of gerra line chimearas in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:4 519-4 523.
- [22] Nilsson E E, Cloud J G. Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:9 425-9 428.
- [23] Wakamatsu Y, Ozato K, Hashimoto H, et al. Generation of germ-line chimera in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1993, 2:325-332.

欢迎订阅 2001 年《中国渔业经济》杂志

《中国渔业经济》(原《中国渔业经济研究》)是在杂志理事会的领导下,由中国水产科学研究院等单位主办,国内外公开发行的渔业经济学术刊物。在 21 世纪本刊以更高的经济文化底蕴和丰富的内容,为水产界的行政管理、生产经营、科研教学服务,是管理部门、科研部门、技术推广部门、大专学院以及企事业单位从事渔业指导性研究的重要参考读物和宣传媒体。本刊主要探讨有关我国渔业经济发展的方针、政策,进行学术交流。报道深化改革、持续发展等方面的热点、难点、焦点问题,以及国内外渔业经济技术方面的动态与信息。同时也对水产品市场的现状和前景进行分析和预测。设有专题报道、渔业发展战略、经济体制改革、改革之窗、生态经济、资源经济、技术经济、海洋渔业经济、淡水渔业经济、科技成果转化、明星企业,以及市场信息等栏目。本刊还承办各类渔业产品广告和外商来华广告,欢迎中外企业惠顾。

本刊为双月刊,16 开本,彩封。每期定价 4.00 元,全年收费 24.00 元。邮局发行代号:18-157。各地邮局均可订阅,如需向本编辑部直接订阅者请向编辑部索取订单。书款通过银行或邮局汇至本刊编辑部。开户银行:北京工商银行永定路分理处;帐号:144428-29;收款单位:中国水产科学研究院。

编辑部地址:北京市丰台区永定路南口青塔村 150 号《中国渔业经济》编辑部

邮政编码:100039 联系电话:(010)68673921 联系人:冯康菲