



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104531610 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201410720584. X

(22) 申请日 2007. 08. 01

(30) 优先权数据

0615327. 4 2006. 08. 01 GB

0700479. 9 2007. 01. 10 GB

(62) 分案原申请数据

200780036720. 1 2007. 08. 01

(71) 申请人 爱丁堡大学管理处

地址 英国爱丁堡

(72) 发明人 应其龙 A·G·史密斯

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有

限公司 44205

代理人 江侧燕

(51) Int. Cl.

C12N 5/0735(2010. 01)

权利要求书2页 说明书41页 附图25页

(54) 发明名称

源于大鼠及其它动物的多潜能细胞

(57) 摘要

本发明涉及源于大鼠及其它动物的多潜能细胞,特别涉及维持多功能细胞的自我更新能力,在含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂的无血清培养基中获得多功能细胞,并在其中保持其自我更新状态。

1. 一种大鼠多潜能细胞,特征在于其表达 Nanog、Oct4、FGF4 和 Sox-2 中两个或多个基因。
2. 根据权利要求 1 所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其表达 Nanog、Oct4 和 Sox-2。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其还表达碱性磷酸酶。
4. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其表达 Rex 1、Stella、FGF4 和 Sox-2。
5. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其不表达 FGF5。
6. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其在培养基中形态学上未分化。
7. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其可在培养基中被维持约两星期或更长。
8. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其可在培养基中被维持约 6 个月或更长。
9. 根据权利要求 7 或 8 所述的大鼠多潜能细胞,特征在于在其被培养后,其后代细胞保留原始大鼠多潜能细胞的特性。
10. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其可形成嵌合体。
11. 根据权利要求 10 所述的大鼠多潜能细胞,特征在于所述嵌合体中的所有细胞均是大鼠细胞。
12. 根据权利要求 10 或 11 所述大鼠多潜能细胞,特征在于其可形成嵌合体种系。
13. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其可形成畸胎瘤或畸胎癌,且形成的畸胎瘤或畸胎癌中含有源于所有三个胚层的分化细胞。
14. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其在培养基中可作为单个细胞生长和 / 或增殖。
15. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于在激活素和 / 或 FGF 存在时,其被诱导分化或停止生长。
16. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于其分化不是由激活素受体被封闭所诱导的。
17. 根据上述任一权利要求所述的大鼠多潜能细胞,特征在于特征在于其生长和 / 或分化由一种 MEK 抑制剂和一种 GSK3 抑制剂支持,该抑制剂中可选择还含有 FGF 受体拮抗剂。
18. 一种大鼠多潜能细胞培养物,包含大鼠多潜能细胞和一种含有 MEK 抑制剂的培养基。
19. 根据权利要求 18 所述的培养物,特征在于培养基还含有一种 GSK3 抑制剂和 / 或一种 FGF 受体拮抗剂。
20. 从胚胎中获得大鼠多潜能细胞的方法,包括以下步骤:
 - (1) 取胚胎;
 - (2) 在含有一种 MEK 抑制剂和一种 GSK3 抑制剂的培养基中培养胚胎,以得到内细胞团;
 - (3) 分离并解离内细胞团中的原代扩展物;

(4) 从内细胞团的原代扩展物的解离物中分选单个或许多细胞 ;和

(5) 在含有一种 MEK 抑制剂、一种 GSK3 抑制剂和一种 FGF 受体拮抗剂的培养基中培养分选的单个或许多细胞。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,特征在于所述多潜能细胞表达 Nanog、Oct4、FGF4、Sox-2 和碱性磷酸酶中的一个或多个。

22. 根据权利要求 20-21 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞表达 Nanog、Oct4、FGF4、Sox-2 和碱性磷酸酶中的任意两个或多个。

23. 根据权利要求 20-22 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞表达 Nanog、Oct4 和 Sox-2。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,特征在于其多潜能细胞还表达碱性磷酸酶。

25. 根据权利要求 20-24 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞表达 Rex 1、Stella、FGF4 和 Sox-2。

26. 根据权利要求 20-25 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞不表达 FGF5。

27. 根据权利要求 20-26 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞在培养基中形态学上未分化。

28. 根据权利要求 20-27 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞可在培养基中被维持约两星期或更长。

29. 根据权利要求 20-28 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞可在培养基中被维持约 6 个月或更长。

30. 根据权利要求 28 或 29 所述的方法,特征在于在被培养后,哺乳动物多潜能细胞的后代细胞保留原始哺乳动物多潜能细胞的特性。

31. 根据权利要求 20-30 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞可形成嵌合体。

32. 根据权利要求 31 所述的方法,特征在于嵌合体中的所有细胞与所述哺乳动物多潜能细胞源于同一亲本。

33. 根据权利要求 31 或 32 所述的方法,特征在于所述多潜能细胞可形成嵌合体种系。

34. 根据权利要求 20-33 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞可形成畸胎瘤或畸胎癌,且形成的畸胎瘤或畸胎癌中含有源于所有三个胚层的分化细胞。

35. 根据权利要求 20-34 中任一项所述的方法,特征在于所述多潜能细胞在培养基中可作为单个细胞生长和 / 或增殖。

36. 根据权利要求 20-35 中任一项所述的方法,特征在于在激活素和 / 或 FGF 存在时,所述多潜能细胞被诱导分化或停止生长。

37. 根据权利要求 20-36 中任一项所述的方法,特征在于所述哺乳动物多潜能细胞的分化不是由激活素受体被封闭所诱导的。

38. 根据权利要求 20-37 中任一项所述的方法,特征在于所述哺乳动物多潜能细胞的生长和 / 或增殖由一种 MEK 抑制剂和一种 GSK3 抑制剂支持,该抑制剂可选择地含有 FGF 受体拮抗剂。

源于大鼠及其它动物的多潜能细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及维持多潜能细胞的自我更新能力。本发明提供的方法和组合物适于培养及分离多潜能细胞如胚胎干细胞 (ES), 尤其是哺乳动物的胚胎干细胞, 哺乳动物的包括大鼠、小鼠、牛、绵羊、猪以及人。本发明尤其涉及大鼠、小鼠和人的多潜能细胞的自我更新培养以及与之相关的方法及组合物。

背景技术

[0002] 目前已广为人知的是: 在体外起始及维持多潜能干细胞均是在含有血清和白血病抑制因子 (LIF) 的培养基中进行的 (Smith et al. (1988) Nature 336:688-90)。这类方法已被用来维持源于“许可的” (permissive) 小鼠的多潜能胚胎干细胞 (ES) 传代 (passage) 很多次。维持多潜能干细胞的自我更新还可以通过其它方式来完成, 如将干细胞培养在含有饲养细胞或其提取物的培养基中, 通常用小鼠成纤维细胞作为饲养细胞。这些条件使得在培养基中多次传代人类胚胎干细胞的同时维持其多潜能性状成为可能。

[0003] 许多情况下, ES 细胞仅能在含有以下成分的培养基中被维持或最好地维持, 如含有血清或血清提取物的培养基 (因此这些培养基的成分是不明确的); 或者含有其它细胞的培养基, 如利用成纤维细胞作为饲养细胞的培养基。但是, 任何不明确的成分, 不管是本已存在于培养基中的还是例如由饲养细胞产生的, 均可能干扰或阻碍对 ES 细胞繁殖和分化的研究。这阻碍了 ES 细胞及其子细胞在治疗学或其它应用方面的生产实践发展。目前已有一些成分明确的 ES 细胞培养基, 然而仍需要可供选择的、最好是改良的成分明确的 ES 细胞培养基。

[0004] 在本发明的申请人之前的公开号为 WO 03/095628 的国际申请, 及之后还未公开的一申请中, 以下的无血清培养基被用来培养多潜能干细胞如 ES 细胞并促使其进行多代自我更新, 所用的无血清培养基中含有 (1) gp130 激活剂 (如 LIF) 和 (2) TGF- β 家族或 Id 信号传导途径的激活剂 (如 BMP4)。意外地发现, 在 gp130 信号传导途径畅通的情况下, TGF- β 家族或 Id 信号传导途径的激活剂可刺激多潜能干细胞自我更新而非向其传递分化前信号。然而, 还需要提高维持多潜能细胞自我复制性状的效率, 以及改良一些培养基, 这些培养基用于将多潜能细胞从饲养细胞或含有饲养成分的培养基中转移。

[0005] Sato N 等 (Nat. Med. 2004, Jan 10(1) pp55-63) 描述了糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 抑制剂、6-溴靛玉红-3-肟 (6-bromoindirubin-3'-oxime) 对培养在含血清培养基中的小鼠和人 ES 细胞的影响。然而, 仅在很短的时间段内观察了这些影响, 这些观察是如此短暂以致不能得出稳定的结论, 并且研究中所用的成分不明确培养基中的未知因子的影响也可能较显著。本发明的发明人曾经尝试过那个实验, 但是不能重复获取所述实验结果, 实际上观察到了与所述结果相反的影响。

[0006] 在配制 ES 细胞培养基时, 人们希望能得到尽可能纯的单独培养基成分。然而, 大部分培养基成分是细胞因子, 由于需要在细胞中生产它们继而去除所得产物中潜在的污染物, 这些细胞因子的纯度难以保证。一些细胞因子的另一个问题是: 它们仅在很窄的浓度范

围内是有效且无毒的。有较宽浓度范围和 / 或在较高浓度下具有较小毒性的培养基成分会很有用。细胞因子的储存稳定性有限,人们也在寻找更稳定的培养基成分。

[0007] 本发明的一个目的是克服或至少改善现有技术中存在的问题,希望提供可供选择的最好是改善的培养多潜能干细胞的方法和培养基,这些培养基和培养方法能够支持所述干细胞进行多代自我更新。本发明的另一个目的是提供一种可供选择的培养体系以能够在体外培养多潜能干细胞并维持其性状直至以可控方式诱导这些干细胞的分化。本发明的一个更进一步的目的是为改善多潜能干细胞的获得和分离提供方法和组合物,方便从难处理器官及尚未分离出多潜能干细胞的器官中获取并分离出多潜能干细胞。本发明一个更进一步的目的是从这些器官中得到多潜能干细胞。

发明内容

[0008] 根据本发明的一方面,通过抑制多潜能细胞中的 GSK3、MEK 和 FGF 受体可以促进多潜能细胞的自我更新。

[0009] 根据本发明,多潜能干细胞如 ES 细胞,被培养在含有一种 MEK 抑制因子、一种 GSK3 抑制因子和一种 FGF 受体拮抗剂(例如一种小分子 GSK3 抑制因子、一种小分子 MEK 抑制因子和一种小分子 FGFR 拮抗剂)的培养基中,优选使用无血清培养基,从而促进干细胞进行多代的自我更新。因此,抑制多潜能细胞中的 GSK3、MEK 和 FGF 受体传导途径刺激了这些细胞的自我更新。

[0010] 本发明有几方面的应用。可分别通过以下几种组合的抑制来培养多潜能细胞尤其 ES 细胞,并使它们适应在无饲养细胞或饲养细胞层(常被称为饲养者或饲养细胞)的培养基中生长,所述细胞最初起源或被接种于饲养细胞,所述组合是:GSK3 和 MEK、MEK 和 FGFR 或 GSK3、或 MEK 和 FGFR。在培养基中扩增干细胞的一种方法包括在以下培养基中培养干细胞,所述培养基含有一种 GSK3 抑制因子和一种 MEK 抑制因子,一种 MEK 抑制因子和一种 FGF 受体拮抗剂,或优选同时含有一种 GSK3 抑制因子、一种 MEK 抑制因子和一种 FGF 受体拮抗剂。所用的培养基可以含有一或多种 GSK3 抑制因子和 MEK 抑制因子,一或多种 MEK 抑制因子和 FGFR 拮抗剂,或者一或多种 MEK 抑制因子、GSK3 抑制因子和 FGFR 拮抗剂。可利用 GSK3 抑制因子和 MEK 抑制因子,MEK 抑制因子和 FGFR 拮抗剂,或 GSK3 抑制因子、MEK 抑制因子和 FGFR 拮抗剂制备 ES 细胞,包括那些源于某些器官的 ES 细胞,迄今为止尚未从这些器官中分离得到过 ES 细胞。

[0011] 本发明涉及的多潜能细胞包括但不限于 ES 细胞。多潜能细胞(包括 ES 细胞)的特性包括表达多种与多潜能发育阶段相关的基因,能分化为同一主体动物中的任意及所有组织的典型细胞的能力,助于形成嵌合体的能力,尤其助于形成嵌合种系的能力。真正的多潜能细胞,例如 ES 细胞,即使不表达所有,也应该可以表达很多种与多潜能相关的基因,如 Nanog、Oct4、FGF4、Sox-2 和碱性磷酸酶。特别地,Nanog、Oct4 和 Sox-2 的表达被广泛认为是确定一细胞为 ES 细胞的决定性最初表征。嵌合体的种系传递以及可从三个原胚层(如内胚层、中胚层和外胚层)产生含有分化细胞的畸胎瘤的能力也被广泛认为是确定一细胞为 ES 细胞的决定性指征。

[0012] 所述的 GSK3 抑制因子指的是抑制一或多个 GSK3 酶的抑制因子。因此,一个 GSK3 抑制因子可以抑制一个、几个或所有 GSK3 酶家族成员。GSK3 酶家族广为人知,其包括但

不限于 GSK3- α 和 GSK3- β 。已经发现了几种变体(参见 Schaffer et al.; Gene 2003; 302(1-2):73-81)。在一些实施例中抑制的是 GSK3- β , GSK3- α 抑制因子也是合适的,总体上本发明采用的抑制因子可抑制此两种酶。已经知道很多种 GSK3 抑制因子,例如 CHIR 98014、CHIR 99021、AR-A0144-18、TDZD-8、SB216763 和 SB415286。其它已知的抑制因子在本发明中也是有益的。此外,GSK3- β 活性位点的结构已被表征,与特异和非特异抑制因子结合的重要残基也已确定(Bertrand et al.; J Mol Biol. 2003; 333(2):393-407)。这种结构的表征使得人们容易发现更多的 GSK 抑制因子。

[0013] 一些实施例中的抑制因子特异针对 GSK3- β 和 GSK3- α ,实质上并不抑制 erk2 和 cdc2。通过 IC_{50} 的比率判断,这些抑制因子对人 GSK3 的抑制活性比小鼠 erk2 和 / 或人 cdc2 的抑制活性要高,优选至少高 100 倍,更优选至少高 200 倍,最优选至少高 400 倍。此处,GSK3 IC_{50} 值指的是人 GSK3- β 和 GSK3- α 的平均值。已在特异针对 GSK3 的 CHIR 99021 和 CHIR 98014 中得到了一些好的结果。Bennett C 等(J. Biol. Chem., vol. 277, no. 34, August 23 2002, pp30998-31004) 和 Ring DB 等(Diabetes, vol. 52, March 2003, pp588-595) 已描述了一些 GSK3 抑制因子的例子。CHIR 99021 的合适浓度是 0.01-100 μ M, 优选 0.1-20 μ M, 更优选 0.3-10 μ M。

[0014] 还可以利用 RNA 介导的干扰技术(RNAi) 方便地抑制 GSK3 活性。通常,一种全部或部分与 GSK3 基因互补的双链 RNA 分子被引入多潜能细胞,从而促进编码 GSK3 的 mRNA 分子的特异降解。这种转录后机制可使目的 GSK3 基因的表达被削弱或丧失。现已有一些利用 RNAi 抑制 GSK3 的合适技术和操作规程。

[0015] 此处的 MEK 抑制因子是指一般的 MEK 抑制因子。因此,所述的 MEK 抑制因子是指抑制 MEK 蛋白激酶家族包括 MEK1、MEK2 和 MEK3 的任一成员的任意抑制因子,也指 MEK1、MEK2 和 MEK3 三者的抑制因子。一种 MEK 抑制因子可抑制一个、几个或所有 MEK 激酶家族成员。现有技术已知的合适的 MEK 抑制因子的例子包括但不限于 MEK1 抑制因子 PD184352 和 PD98059、MEK1 和 MEK2 的抑制因子 U0126 和 SL327、以及那些 Davies 等(2000) (Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem J. 351, 95-105) 所描述的抑制因子。特别是,与其它已知的 MEK 抑制因子相比,PD184352 特异性强、效力高。Zhang 等(2000) (Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters; 10:2825-2828) 描述了其它 MEK 及 MEK 类的抑制因子。已发现炭疽病的致死因子也具有与 PD098059 类似的抑制 MAPKK 的活性(Duesbery et al, 1999)。其它合适的 MEK 抑制因子包括 PD032509、U0126、SL327 和 CI-1055。

[0016] 也可以利用 RNA 介导的干扰(RNAi) 方便地抑制 MEK 激酶活性。通常,一种全部或部分与 MEK 基因互补的双链 RNA 分子被引入多潜能细胞,从而促进编码 MEK 的 mRNA 分子的特异降解。这种转录后机制导致目的 MEK 基因的表达被削弱或丧失。现有一些利用 RNAi 抑制 MEK 的技术和操作规程。

[0017] 其它抑制 MEK 的方法包括利用一种能抑制或削弱 ras/MAPK 级联反应中一种成分活性的化合物。此化合物抑制一或多个有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK) 如 ERK1 和 ERK2。任选地,此化合物通过抑制 SHP-2 也可达到类似的效果,例如抑制此酶与 gp130 的结合。在一个进一步的实施例中,抑制因子抑制 MEK 的活性。

[0018] 另外也可通过负调节 ras/MAPK 级联反应中的一种成分来抑制 MEK。MKP-3 是一种 MAP 磷酸激酶,也是一种已知的 ERKs 负调节因子,已通过转基因技术将 MKP-3 引入 ES 细胞。

[0019] 已知一些识别激酶抑制剂包括 GSK3 抑制剂和 MEK 抑制剂的检测法。例如,在 Davies 等 (2000) 描述的激酶检测法中,将激酶与肽链底物和放射性标记的 ATP 一起温育。激酶通过将底物磷酸化将放射性标记引入底物中。每份反应液都被固定到磷酸纤维素纸上并用磷酸冲洗以去除多余的 ATP。然后检测温育后底物的活性,并由此得出激酶活性。在含有和不含有待测激酶抑制剂的情况下,可利用这种方法容易地确定相应激酶的活性。Downey 等 ((1996) J Biol Chem. ;271(35):21005-21011) 也描述了检测激酶活性的方法,可以识别激酶抑制剂。

[0020] 成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体 (FGFR) 拮抗剂指能拮抗 FGF 受体的多肽、小分子或其它拮抗剂,通常抑制 FGFR1 和 / 或 FGFR2。因此,FGF 受体拮抗剂可以是 FGF 受体家族的一个、几个或所有成员的拮抗剂,这些 FGF 受体家族成员包括但不限于 FGFR1、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4。FGF 受体家族成员通常具有三个免疫球蛋白类的结构域和一个酸性氨基酸域 (也即酸盒子),这一酸性氨基酸域参与 FGF 家族成员与 FGF 受体的结合。在一些例子中,仅含有两个免疫球蛋白类结构域分子也具有 FGF 受体的功能。已知多种 FGFR 拮抗剂,包括但不限于 SU5402 和 PD173074。SU5402 的适宜浓度在微摩尔级,如 0.1-20 μ M,优选 0.5-10 μ M,特别优选 1-5 μ M。我们发现 PD173074 可代替 SU5402,与它对 FGF 受体更高的亲和性一致,PD173074 在浓度低 100 倍时完全有效。因此,PD173074 合适的浓度是 1-200nM,优选 5-100nM,特别优选 10-50nM。已知也可通过转基因 FGF 受体的显性失活突变体来抑制 FGF 受体的信号传导途径。然而在本发明的实施例中,倾向于用小分子拮抗剂而不是基于转基因的拮抗机制。

[0021] 现有技术已有识别 FGF 受体拮抗剂的合适方法。例如,在细胞中通过 FGF 受体途径激活某报告基因的表达,并据此判断潜在拮抗剂的活性。

[0022] 已经有利地发现同时使用 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂可增强 ES 细胞的传代。

[0023] 在优选的实施例中使用了约 0.1 μ M 到约 25 μ M 的 MEK 抑制剂。进一步优选,使用了约 0.1 μ M 到约 5 μ M 的 MEK 抑制剂,更进一步优选,使用了约 0.2 μ M 到 2 μ M。

[0024] 本发明尤其优选的是含有 0.8 μ M PD184352、3 μ M CHIR99021 和 / 或 3 μ M SU5402 的培养基。一种尤其优选的是含有 0.8 μ M PD184352、3 μ M CHIR99021 和 3 μ M SU5402 的培养基,优选 N2B27 培养基。可优化 SU5402 的浓度以适应不同的多潜能细胞系,通常是位于 1-5 μ M (例如 2 μ M)。

[0025] 在下面的例子中,我们在同时含有 GSK3 和 MEK 抑制剂,在一个具体的例子中还含有 FGF 受体拮抗剂的培养基中培养小鼠 ES 细胞以促进其自我更新。在其它具体例子中,促进小鼠多潜能细胞自我更新的方法是采用含有 GSK3 和 MEK 抑制剂,或含有 GSK3、MEK 和 FGF 受体抑制剂的培养基。

[0026] 任意地,也可利用激活 gp130 的下游信号途径的方式来进一步增强通过抑制 GSK3 和 MEK 促进的多潜能细胞的自我更新。激活 gp130 下游信号途径的分子有时被称为 gp130 激活剂或 gp130 激动剂。可利用通过 gp130 起作用的细胞因子来激活一或多个 gp130 下游信号途径,例如可以是 LIF 受体的细胞因子或其它激动剂。通过 gp130 起作用并进而激活

gp130 信号传导的细胞因子包括但不限于 LIF、睫状神经生长因子 (CNTF)、心肌营养因子、制瘤素 M、IL-6 和 sIL-6 受体、超级白细胞介素 6(hyper IL-6) 和 IL-11。合适的细胞因子包括可结合 gp130 和 / 或通过 gp130 激活信号途径的模拟物、融合蛋白或嵌合体。在有血清时细胞因子可通过 gp130 起作用,这一点已经很明确了;然而在无血清时,这些细胞因子维持多潜能细胞未分化状态的能力是有限的。

[0027] 本发明的一个好处是在有 GSK3 抑制剂、MEK 抑制剂,和可选的 FGF 受体拮抗剂存在时,可以在成分确定的培养基中培养多潜能细胞。同时使用 GSK3 抑制剂、MEK 抑制剂、和 FGF 受体拮抗剂一个特别的好处是不必在培养基中添加其它的生长因子,如胰岛素、N2B27,或 gp130 激活剂(如 LIF)。因此,本发明提供了可选的和 / 或改良的、无血清、血清提取物、饲养细胞和饲养细胞提取物的 ES 细胞培养基。

[0028] 已经报道多种哺乳动物中含有所谓的 ES 细胞,如小鼠 (Bradley et al(1984) Nature 309:255-56)、美国水貂 (Mol Reprod Dev(1992)Dec ;33(4):418-31)、猪和绵羊 (J Reprod Fertil Suppl(1991);43:255-60)、仓鼠 (Dev Biol(1988)May ;127(1):224-7) 和奶牛 (Roux Arch Dev Biol(1992);201:134-141)。然而应当注意,有时在缺乏完整表征的情况下,多潜能细胞被称为“ES 细胞”或“ES 样的细胞”。某些情况下通过以下特征标识 ES 细胞,通过细胞形态、培养过程中能观察到一些自发的细胞分化、形成囊状胚体、或表达与多潜能发育阶段有关的基因。然而,针对所谓的 ES 细胞,仍需要更严谨的表征以确定所描述的细胞到底是不是真正的 ES 细胞。美国专利 US6271436 也明确了这一点,它指出前人所做的很多试图获得 ES 细胞如猪 ES 细胞的尝试都未能确定其所报道的细胞是多潜能 ES 细胞。

[0029] ES 细胞的典型特征包括表达与多潜能发育阶段相关的多个基因、分化为能代表亲本任一和所有组织类型的细胞的能力、助于形成嵌合体尤其嵌合体种系的能力。真正的 ES 细胞能表达许多(即使不是所有的)与多潜能相关的基因,如 Nanog、Oct4、FGF4、Sox-2 和碱性磷酸酶。特别是,广泛认为 Nanog、Oct4 和 Sox-2 的表达提供了确定一细胞是 ES 细胞的决定性最初指征。嵌合体中的种系遗传和能形成含有源于所有三个原胚层(如内胚层、中胚层和外胚层)的分化细胞的畸胎瘤或畸胎癌的能力也被广泛认为提供了确定一细胞是 ES 细胞的决定性指征。

[0030] 本申请的个别例子用到小鼠和人的 ES 细胞,以及大鼠原代扩展的细胞。最好将本发明的方法和组合物进行调整并用于培养其它哺乳动物或鸟类的多潜能细胞,包括灵长类尤其人、啮齿类尤其小鼠和大鼠以及牛、绵羊和猪的多潜能干细胞,尤其 ES 细胞。在其它例子中,本发明的方法和组合物可被用来培养源于牛、绵羊和猪胚胎的原代扩展的细胞。

[0031] 本发明的方法和组合物尤其适于培养下述的多潜能包括 ES 细胞,这些细胞表达 Nanog、Oct4、FGF4、Sox-2 和碱性磷酸酶中的一或多个,尤其任两个或多个。在优选实施例中,多潜能细胞表达 Nanog、Oct4 和 Sox-2。通常,这些多潜能细胞形态上未分化,可在培养基中维持一个较长的时间,至少传代 10、20 或 50 次而无明显分化、失活或失去多潜能细胞的特征。假设分离、培养的或利用本发明方法得到的多潜能细胞将可以在培养基中维持两周或更长。例如,这些细胞或许可以在培养基中待 4、6、8、10、12 或更多星期而依然保留它们的最初特征,包括此处描述的多潜能细胞的特殊特点。作为实例,通过本申请描述步骤分离的多潜能细胞已被连续培养 6 个月,增殖速率没有变慢也没有显著的分化。

[0032] 这种特点包括促进形成嵌合体包括嵌合体种系的能力。例如,当被注入小鼠胚泡

时,小鼠 ES 细胞助于能帮助形成嵌合体。简单来讲,此处第一次提供的大鼠多潜能和 ES 细胞可助于形成所有细胞都是大鼠细胞的嵌合体。源于其它上述哺乳动物的 ES 细胞也能有助于形成嵌合体。例如当将 ES 细胞注入免疫缺陷型小鼠后,ES 细胞也能形成畸胎瘤。通常,畸胎瘤由三胚层细胞分化而来的细胞组成,尽管有时仅能看到源于一或两个胚层的细胞。

[0033] 本发明的第二个方面提供一种培养多潜能尤其 ES 细胞的方法,以促进它们的自我更新,此方法包括将细胞培养在含有下述成分的培养基中:

[0034] (1)GSK3 抑制剂;

[0035] (2)MEK 抑制剂;以及可选的

[0036] (3)FGF 受体拮抗剂。

[0037] 本发明的方法通常能用于在无血清和血清提取物的培养基中培养多潜能包括 ES 细胞,这些细胞曾经在有血清或血清提取物的培养基中传代。优选的,也在无饲养细胞和/饲养细胞提取物的情况下使用这些方法。例如,可通过下述操作培养 ES 细胞:

[0038] 一将 ES 细胞在培养基中维持在多潜能状态,可以是生长在饲养细胞上;

[0039] 一使 ES 细胞传代至少一次;

[0040] 一从培养基中吸走血清或血清提取物并撤走饲养细胞(假如有的话),这样培养基中就没有饲养细胞、血清和血清提取物;并且

[0041] 一接下来在含有 GSK3 抑制剂和 MEK 抑制剂,或者还含有 FGFR 拮抗剂的情况下将 ES 细胞维持在多潜能状态。

[0042] 本发明也提供了一种获得被转染的 ES 细胞的方法,包括:

[0043] 一用编码筛选标记的构建体转染 ES 细胞;

[0044] 一将转染的细胞铺板;

[0045] 一在含有 MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂,或者还含有 FGFR 拮抗剂的情况

[0046] 下培养 ES 细胞;以及

[0047] 一筛选出表达筛选标记的细胞。

[0048] 更进一步任选地,这些细胞被培养在同时含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 gp130 下游信号途径激动剂的培养基中。

[0049] 所用的筛选标记可以编码抗生素耐受性、细胞表面标记或欧洲专利 EP-A-0695351 中所述的另一种筛选标记,优选在构建体中含有编码筛选标记的核苷酸序列,该序列与一个启动子相连,该启动子在所需要的细胞中优先表达筛选标记基因。

[0050] 在一个更进一步的实施例中,提供了一种培养多潜能尤其 ES 细胞的方法,包括下述步骤:将一个单独的细胞移入一个培养容器,例如培养板的一个小池中;在含有 GSK3 抑制剂和 MEK 抑制剂,或者还含有 FGFR 拮抗剂的情况下培养 ES 细胞,以得到多潜能尤其 ES 细胞的一个克隆细胞株,此克隆中的所有细胞均源于一个细胞。任选地,这些细胞也可以被培养在含有 gp130 下游信号途径激动剂的培养基中。

[0051] 一旦得到了稳定、均一的 ES 细胞株,可改变培养条件引导细胞分化为外胚层、中胚层或内胚层中的一或多种细胞类型。添加或去除细胞因子和信号因子可更高效地诱导出特异类型的分化细胞。下述操作可避免 ES 细胞分化为神经外胚层:将 ES 细胞培养在含有通过 gp130 起作用的细胞因子、MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂的培养基中,然后去掉所述细胞

因子但依然保留 MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂,和 / 或加入另一种可引导分化的信号分子。

[0052] 任选地,细胞也可以被培养在含有 MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂的培养基中,然后通过去掉一或两种抑制剂和 / 或加入一种能引导分化的信号分子来引导分化。上述方法均任意地包含收获和 / 或分离产品——分化细胞的步骤。

[0053] 本发明的另一方面提供细胞培养基。一种培养基用于多潜能尤其 ES 细胞的自我更新,此种培养基含有一种 GSK3 抑制剂、一种 MEK 抑制剂和一种 FGFR 拮抗剂。此培养基还可以任意地含有一种 gp130 下游信号途径激动剂。本发明的另一种培养基是一种干细胞培养基,它含有一种 GSK3 抑制剂、一种 MEK 抑制剂和一种 FGFR 拮抗剂。所有的培养基都优选进一步含有基础培养基。此外,所有培养基优选不含 gp130 激活剂,因此优选不含 LIF。

[0054] 本发明提供无血清和血清提取物的培养基。其中一种培养基含有:

[0055] 一基础培养基;

[0056] 一种 MEK 抑制剂;

[0057] 一种 GSK3 抑制剂;以及

[0058] 一种铁转运蛋白;所述培养基优选无血清和血清提取物。

[0059] 所述培养基优选还含有一种 FGFR 拮抗剂。此培养基还可任意地含有一种 gp130 下游信号途径激动剂。

[0060] 针对多潜能干细胞,尤其大鼠或小鼠多潜能干细胞的首选培养基最好不含血清和 gp130 激活剂,但应该含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂。可采用下面描述的培养基成分替代品。

[0061] 基础培养基是为细胞提供碳和 / 或维生素和 / 或矿物质等基本来源的培养基。基础培养基通常不含蛋白质,其单独不能支持细胞自我更新。铁转运蛋白提供铁源或能从培养基中吸取铁。合适的铁转运蛋白包括转铁蛋白和脱铁运铁蛋白。培养基优选进一步含有一或多种胰岛素或胰岛素样的生长因子和白蛋白(优选重组白蛋白)或白蛋白替代品,并且没有饲养细胞和饲养细胞提取物。培养基还可含有细胞凋亡抑制剂或任何其它促进维持多潜能细胞培养状态的成分。例如,培养基可以含有 ROCK 抑制剂,如 Y-27632(Watanabe et al., Nature Biotechnology (2007) 25(6):681-686)。

[0062] 本发明一种具体的培养基含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂、胰岛素、白蛋白和转铁蛋白,含或不含额外的基础培养基。此培养基中可任选地含有 LIF,也可用其它 gp130 信号途径激动剂代替 LIF,尽管优选含有 gp130 受体结合因子——LIF,且其合适的浓度一般是 10U/ml-1000U/ml,优选 50U/ml-500U/ml,更优选是 100U/ml。正像在此处更详细描述,培养基中最好含有 GSK3 和 MEK 抑制剂。

[0063] 本发明进一步提供一种从胚泡中获得多潜能细胞的方法,包括:

[0064] (1) 取胚泡;

[0065] (2) 在含有 MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂,和任选的 FGF 受体拮抗剂的培养基中培养胚泡,以得到内细胞团;

[0066] (3) 解离内细胞团;

[0067] (4) 从解离的内细胞团中分离单个或许多细胞;以及

[0068] (5) 在含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂、和 FGF 受体拮抗剂的培养基中培养分离的单个或许多细胞。

[0069] 任意地,分离的单个或许多细胞也可以培养在含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂、和 gp130 下游信号途径激动剂的培养基中。此外,也可以含有 FGF 受体拮抗剂。

[0070] 优选在含有 LIF 的培养基中培养胚胎,更优选培养 2-4 天。优选在无血清培养基中培养分离的单个或许多细胞。一般接种团块状细胞。也优选在无血清培养基中培养胚胎,或者不含 BMP 受体激活剂。

[0071] 根据本发明,更进一步优选贴壁培养所述细胞,在培养基质上添加细胞粘附蛋白可助于完成此功能。根据本发明,优选培养单层的多潜能细胞,尽管也可悬浮培养或以预成细胞团的形式培养;也可在小珠或其它合适的支架如膜或其它三维结构上培养细胞。

[0072] 意外发现,本发明的组合物和方法尤其适于从大鼠中获得多潜能细胞和 ES 细胞。尽管一些文献报道已得到大鼠多潜能细胞 (Vassilieva et al. (2000) Exp Cell Res 258(2):pp 361-373;Schultze et al. (2006) Methods Mol Biol 329:pp45-58),据其所提供的证据还远不能得出结论。Schultze 等承认大部分试图得到并保持大鼠 ES 细胞系的尝试都失败了,科研人员已被迫放弃了此类研究。与此类似,Vassilieva 等也发现以前试图得到大鼠 ES 细胞的尝试均失败了,因为所述的 ES 细胞仅能在培养基中维持很短的时间,或者实验不可重复。此外,现有技术中描述的细胞系已被证实不是所谓的 ES 细胞。他们所谓“ES 细胞”指那些在培养基中有限分化、能形成胚状体、或能表达非整套(通常仅一个)多潜能相关标记基因的细胞。然而,这些迹象并不能提供识别 ES 细胞的明确标识,或许仅表明分离到了能产生多种效果的(multipotent)细胞而非多潜能细胞(pluripotent)。许多多潜能细胞的关键标识还没有被发现,因此对于人们是否已分离得到大鼠 ES 细胞尚有相当大的疑问。尤其,尚无报道发现具有下述功能的大鼠细胞系:(i) 能形成含有源于所有三个胚层的组织的畸胎瘤;(ii) 能克隆嵌合体种系;或(iii) 协同表达多个与多潜能相关的基因,尤其协同表达 Nanog、Oct4 和 Sox-2。

[0073] 在下面将要详细描述的一个比较例中,未能成功重复获得一种曾经在报道中所称的 ES 细胞。

[0074] 然而,本发明的方法已被证明适合获得大鼠多潜能和 ES 细胞,这些细胞源于解离的大鼠胚胎内细胞团原代扩展培养物。从而,本发明提供了一种从胚胎中获得大鼠多潜能细胞的方法,包括如下步骤:

[0075] (1) 取胚胎;

[0076] (2) 在含有 MEK 和 GSK3 抑制剂的情况下培养胚胎,以得到内细胞团;

[0077] (3) 分离并解离内细胞团的原代扩展培养物;

[0078] (4) 从解离的内细胞团原代扩展培养物中分离单个或许多细胞;和

[0079] (5) 在含有 MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂,任意的还含有 FGF 受体拮抗剂的培养基中培养分离的单个或许多细胞。

[0080] 一般需要将大鼠胚胎培养 2-4 天,例如 3 天。也可以将胚胎培养在含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂的培养基中。分离的大鼠多潜能细胞一般都具有此处描述的多潜能细胞和 ES 细胞的特征。

[0081] 在某些实施例中,对上述步骤稍做了些修饰,通过切除滋养外胚层的方式从胚胎中分离内细胞团,并将内细胞团培养在含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂的培养基中。

[0082] 此处描述的方法也适于从其它动物中获得多潜能细胞。例如此处描述的步骤曾被用于牛和绵羊的胚泡,因此也从牛和绵羊胚泡的原代扩展培养物中得到了多潜能细胞。此处描述的方法也曾被用来从人胚泡中获得人多潜能细胞。这些方法也可被用于从猪胚泡原代扩展培养物获得多潜能细胞。

[0083] 此处描述的方法也被用来从多潜能细胞缺陷型小鼠(无法从此种小鼠中获得多潜能细胞,类似针对某些病毒的复制缺陷型细胞)获得多潜能细胞。因此,本发明也提供了源于此前认为的多潜能细胞缺陷型小鼠的多潜能细胞。

[0084] 另一方面,本发明提供了利用本发明所述方法获得的大鼠多潜能细胞。本发明还提供了能表达 Nanog、Oct4、FGF4 和 Sox-2 中的两个或多个基因的大鼠多潜能细胞。优选,所述大鼠多潜能细胞表达 Nanog、Oct4 和 Sox-2。所述大鼠多潜能细胞可能表达碱性磷酸酶,也可能具有任何此处描述的多潜能和 ES 细胞所具有的特性,如能克隆嵌合体种系的能力,以及能形成同时含有源于内胚层、中胚层和外胚层的分化组织的畸胎瘤的能力。

[0085] 相应地,本发明提供了一种表达 Rex1、Stella(Dppa3)、FGF4 和 Sox-2 的大鼠多潜能细胞。本发明中的大鼠多潜能细胞也可能表达一或多个另外的多潜能状态标记以及与内细胞团相关的标记,包括 Err β 、Pecam 1、Tbx3 和 Gbx2。所述的大鼠多潜能细胞不表达 FGF5。另外,本发明中的大鼠多潜能细胞不表达,或不大量表达与外胚层和早期胚层相关的基因,如 Otx2、Eomes、Foxa2、brachyury、Gata6、Sox17 和 Cer1。通过分析本发明的大鼠多潜能细胞,发现没有确定的内胚层标记基因 Gata6 和 Sox17、中胚层标记基因 brachyury 和 Flk1、以及神经外胚层标记基因 Pax6 和巢蛋白(nestin)的表达。本发明的其它哺乳动物多潜能细胞也表现出大鼠多潜能细胞的这些以及其它特征。

[0086] 因此,本发明的多潜能细胞可以与最近从着床后卵圆筒阶段外胚层(Tesar P. J. et al. Nature (2007) 448:196-9; Brons I. G. M. et al. Nature (2007) 448:191-5)分离的干细胞(被称为 EpiSCs)相区别,那些干细胞仅能勉强或不能再并入着床前胚胎及助于形成嵌合体。与本发明多潜能细胞相比,EpiSCs 在解离成单细胞后不容易增殖,不表达 ES 细胞或早期外胚层的标记,且需要被维持在含有 FGF2 和激活素的培养基中,而在此种培养基中,本发明的多潜能细胞被诱导分化。

[0087] 本发明的多潜能细胞,包括大鼠、绵羊、牛和猪的多潜能细胞,在培养基中形态上均处于未分化状态。本发明的多潜能细胞可以被维持在培养基中 2 周或更长。优选的,这些多潜能细胞可以被维持在培养基中 4、6、8、10、12 周或更长,更优选约 3、6、9、12 个月或更长。在培养基中被培养后,这些多潜能细胞的后代依然保留最初多潜能细胞所具有的一或多个,优选所有的表征。

[0088] 本发明的多潜能细胞可助于形成嵌合体。它们尤其可助于形成所有细胞均与多潜能细胞同源的嵌合体。例如,假如采用大鼠多潜能细胞制备嵌合体,则嵌合体中所有的细胞都是大鼠细胞。本发明多潜能细胞尤其可助于形成嵌合体种系。

[0089] 本发明的多潜能细胞能形成畸胎瘤,其中具有源于所有三个胚层如内胚层、中胚层和外胚层的分化细胞。

[0090] 本发明的多潜能细胞优选具有正常的染色体组型,如具有源于同一亲本的细胞的正常染色体组型。

[0091] 本发明的多潜能细胞,包括大鼠、绵羊、牛和猪的多潜能细胞,通常具有 1 或多个,

优选 2、3、4 或 5 个,最优选具有所有下述的特性:

- [0092] a) 形成嵌合体的能力;
- [0093] b) 可在培养基中作为一个细胞生长和 / 或增殖;
- [0094] c) 表达 Rex1、Stella、FGF4 和 Sox-2;
- [0095] d) 激活素 (activin) 和 / 或 FGF 可诱导其分化或停止生长;
- [0096] e) 封闭激活素 (activin) 受体不能诱导其分化或死亡;和
- [0097] f) MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂,或者任选的还有 FGF 受体拮抗剂可维持这些多潜能细胞的生长和 / 或增殖。

[0098] 不希望受任何理论的束缚,我们相信 MEK 抑制剂对维持多潜能表型尤其重要。因此,本发明也提供被维持在含有 MEK 抑制剂培养基中的多潜能干细胞及其群体。优选的,将多潜能细胞及其群体维持在含有 MEK 抑制剂和一或多个其它适于维持多潜能状态的因子(包括但不限于 GSK3 抑制剂、FGF 受体拮抗剂和通过 gp130 起作用的细胞因子)的环境中。

[0099] 本发明也提供了一类所述的大鼠多潜能细胞。根据上述特性判断,发现根据本发明方法制备的也即本发明提供的多潜能细胞高度均一,含有至少 85%,优选至少 90%,更优选至少 95%的多潜能细胞。在本发明一个具体的实施例中得到了具有 98%纯度及更高纯度的大鼠多潜能细胞。例如,本发明提供了一些大鼠多潜能细胞,其中至少 95%具有多潜能细胞的特性。优选至少 95%的细胞表达 Nanog 和 / 或 Oct4。

[0100] 另一方面,本发明提供了一种大鼠多潜能细胞培养物,其包含大鼠多潜能细胞和含有 MEK 抑制剂的培养基。优选培养基进一步含有 GSK3 抑制剂和 / 或 FGF 受体拮抗剂。可选择地,培养基还含有一或多个另外的适于支持多潜能细胞生长的成分,如一或多个本文描述的成分。

[0101] 本发明还提供通过本发明方法制备的源于本文所描述的其它动物如牛、绵羊和猪的多潜能细胞。根据本发明,这些细胞具有本文所描述的多潜能细胞的一或多个特性。

[0102] 因而,除了提供能表达 Nanog、Oct4、FGF4 和 Sox-2 中两或多个基因的小鼠多潜能细胞外,本发明还提供其它哺乳动物多潜能细胞。优选这些多潜能细胞表达 Nanog、Oct4 和 Sox-2。更优选,这些多潜能细胞进一步表达碱性磷酸酶。在一个优选实施例中,所述多潜能细胞表达 Rex1、Stella、FGF4 和 Sox-2。这些多潜能细胞一般不表达 FGF5。本发明的多潜能细胞也可能表达一或多个多潜能状态的标记和 / 或与内细胞团相关的标记,包括 Err β 、Pecam 1、Tbx3 和 Gbx2。此外,本发明的多潜能细胞不表达或不大量表达与外胚层及早期胚层相关的基因,如 Otx2、Eomes、Foxa2、brachyury、Gata6、Sox17 和 Cer1。

[0103] 本发明还提供本文所述的多种多潜能细胞系,包括牛、绵羊和猪的多潜能细胞。根据上述多潜能细胞的表征,通过本发明的特殊方法得到也即本发明提供的多潜能细胞系至少含有 85%,优选至少 90%,更优选至少含有 95%的多潜能细胞。在一些具体的实施例中,本发明提供了含有 98%及更多多潜能细胞的细胞群。例如,本发明提供了一群多潜能细胞,其中至少 95%具有多潜能细胞的特性。优选至少 95%的细胞表达 Nanog 和 / 或 Oct4。

[0104] 通过针对与多潜能相关标记如 Nanog 或 Oct4 的免疫染色分析发现:与传统培养基培养的 ES 细胞相比,利用本发明所述培养基,尤其含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂的培养基培养的多潜能 ES 细胞明显更均质。利用本发明培养基维持多潜能形状的特殊优势在于:高度均一的多潜能细胞可以被维持在培养基中更长时间而无明显的细胞

分化,也无需定期筛选以选出多潜能细胞,去除分化细胞。

[0105] 另一方面,本发明提供多潜能细胞培养物,包括多潜能细胞及含有 MEK 抑制剂的培养基。所述培养基优选进一步含有 GSK3 抑制剂和 / 或 FGF 受体拮抗剂。任选地,培养基含有一或多个其它适于支持多潜能细胞生长的成分,如本发明描述的一或多个成分。

[0106] 本发明实施例中所用的培养基优选也含有血清白蛋白。可以采用纯化的或重组的白蛋白,假如使用重组白蛋白则可以避免一些因素、细胞因子等的污染。培养基中不需血清白蛋白,可省略此成分,或利用另一种主体蛋白或 Wiles 等描述的合成聚合物(聚乙烯醇)代替。

[0107] 本发明尤其优选的培养基是一种成分完全确定的培养基。这种培养基不含任何不明确的成分,也即不含那些组成成分不清楚、或具有未阐明的不确定或可变因子的成分。使用成分完全明确培养基的优点在于可得到高效、一致的针对多潜能细胞的培养及随后操作。此外还发现,利用成分明确的培养基维持细胞的多潜能状态更高效且重复性更高,与利用成分不明确的培养基相比,多潜能细胞对分化信号的反应也更均一。

[0108] 本发明的方法还包括获得分化细胞的方法,此方法包括上述培养多潜能细胞、允许或诱导细胞分化的步骤,该细胞中含有一个在希望分化的细胞和其它细胞(包括多潜能干细胞)中差异表达的筛选标记,这些筛选标记的差异表达使得可以优先分离、和 / 或存活、和 / 或分开需要的分化细胞。筛选标记可能在仅希望的分化细胞中而不在其它细胞类型中表达,或其表达水平在希望分化的细胞和其它细胞中差别很大,因而可以据筛选标记的表达来筛选细胞。分化细胞可以是组织干细胞或祖细胞,包括多能性或单能性的干细胞或祖细胞,也可能是终末分化细胞。本发明还提供根据所述方法制备的分化细胞及其细胞群。

[0109] 根据本发明可得的分化细胞的例子有生殖干细胞、体细胞干细胞或祖细胞、造血干细胞、表皮干细胞和神经干细胞。在一个实施例中,分化细胞是神经细胞。很显然也可通过此方法获得其它类型的分化细胞及其群体。

[0110] 通常,本发明包括由以下方法制得的细胞。本发明的细胞可被用于药物开发分析。本发明的细胞也可被用于细胞治疗,因此本发明的一个方法包括利用 MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂、或者还有 FGF 信号途径拮抗剂的组合来获得和 / 或维持多潜能细胞,由此得到细胞治疗用细胞并用于细胞治疗。任选地,上述组合中不含 gp130 下游信号途径激动剂。本发明进一步提供了从下述动物获得多潜能细胞的另一个方法,如大鼠、绵羊、牛、猪,以及曾被认为是 ES 细胞缺陷型的小鼠。

[0111] 因此,本发明提供了一种从囊胚获得大鼠多潜能细胞的方法,包括:

[0112] (1) 取囊胚;

[0113] (2) 在含有 MEK 和 GSK3 抑制剂的情况下培养囊胚,以获得内细胞团;

[0114] (3) 分离并解离内细胞团原代扩展培养物;

[0115] (4) 从解离的内细胞团原代扩展培养物中分离单个或许多细胞;和

[0116] (5) 在含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂的情况下培养分离的单个或许多细胞。

[0117] 另一方面,本发明提供一种从囊胚获得多潜能哺乳动物细胞的方法,包括:

[0118] (1) 取囊胚;

[0119] (2) 培养囊胚以获得内细胞团；

[0120] (3) 解离内细胞团；

[0121] (4) 从解离的内细胞团分离单个或许多细胞；和

[0122] (5) 在含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂的环境下培养分离的单个或许多细胞。

[0123] 任选地，本方法培养囊胚的培养基中含有 LIF。在优选的实施例中，囊胚被培养在含有 MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂，或者还含有 FGF 受体拮抗剂的培养基中。

[0124] 在一些实施例中，囊胚源于大鼠、牛、绵羊、猪、或 ES 细胞缺陷型小鼠。

[0125] 在一些实施例中，上述第 (4) 步中的单个或许多细胞是从解离的内细胞团原代扩展培养物中分离的。

[0126] 本发明获得多潜能细胞的方法优选提供能表达 Nanog、Oct4、FGF4、Sox-2 和碱性磷酸酶中的一或多个，更优选表达其中的任意两个或多个的多潜能细胞。在一个优选实施例中，多潜能细胞表达 Nanog、Oct4 和 Sox-2，更优选还表达碱性磷酸酶。在一个特别优选的实施例中，多潜能细胞表达 Rex 1、Stella、FGF4 和 Sox-2。优选所述多潜能细胞不表达 FGF5。

[0127] 本发明的方法提供在培养基中形态上未分化的多潜能细胞。通常，如本申请所述，多潜能细胞可在培养基中维持更长的时间。例如，可将多潜能细胞在培养基中维持约两周或更长。优选，可维持 6 个月或更长。一般来说，在培养基中培养后，哺乳动物原始多潜能细胞的子细胞依然保留其特性。

[0128] 本发明的方法提供的多潜能细胞有助于形成嵌合体。特别是，它们助于形成所有细胞都与起始细胞同一亲本的嵌合体。优选的，多潜能细胞助于形成嵌合体种系。

[0129] 本发明方法制备的多潜能细胞还能形成畸胎瘤，其中含有源于所有三个胚层的分化细胞。这些多潜能细胞在培养基中可作为单个细胞生长和 / 或增殖，在含有激活素和 / 或 FGF 的情况下被诱导分化或停止生长，封闭激活素受体后不被诱导分化。含有 MEK 抑制剂和 GSK3 抑制剂，或者任选地还有 FGF 受体拮抗剂的条件可支持哺乳动物多潜能细胞的生长和 / 或增殖。

[0130] 此外，本发明还提供了源于下列动物的多潜能细胞，如大鼠、绵羊、牛、猪和多潜能细胞缺陷型小鼠。本发明还提供了根据本发明方法所获多潜能细胞的增殖群体。

[0131] 在本发明所有优选的实施例中，多潜能细胞或细胞是 ES 细胞。

[0132] 本发明进一步提供了一种获得基因改造大鼠的方法，包括基因修饰大鼠多潜能细胞、将此细胞引入大鼠胚胎以得到基因修饰的大鼠。

[0133] 本发明更进一步提供了一种获得基因修饰的除小鼠外的非人类哺乳动物的方法，包括基因修饰哺乳动物多潜能细胞、将此细胞引入非人类哺乳动物胚胎以得到基因修饰的哺乳动物。

[0134] 此基因修饰的哺乳动物可以是任何非人类的哺乳动物，包括大鼠、牛、绵羊或猪。在一个优选实施例中，基因修饰的哺乳动物是目的基因突变纯合子。在另一个实施例中，基因修饰包括用人的相应基因替换大鼠或非人类哺乳动物中的基因。在进一步的实施例中，基因修饰包括敲除一或多个目的基因或插入目的基因。这种基因操作可通过本领域技术人员已知的技术完成。

[0135] 除通过本发明方法所得的基因改造小鼠外,本发明还提供基因改造大鼠及其它基因改造的非人类哺乳动物。这类基因改造哺乳动物可用于多种用途,如检测一或多种目的基因的生理功能。基因改造大鼠或非人类哺乳动物的另一个作用是用于药物开发和/或检测。在一些实施例中,这可能包括毒性研究,如评估一种潜在药物可能的副作用。在进一步的实施例中,本发明的基因改造大鼠或非人类哺乳动物被用作研究人或动物疾病的模型。

[0136] 本发明的基因修饰大鼠可能非常有益,因为大鼠是许多生物医药研究领域中的优选动物模型。例如,大鼠中行为恢复和认知修复的评估比小鼠中要复杂的多。

[0137] 本发明的许多优点已在上面对描述或是很显然的。可以鉴别那些相对非毒性和能渗透细胞的培养基成分。本发明一些具体实施例中所用的 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGFR 拮抗剂可以被很容易地纯化,尤其与纯化蛋白细胞因子相比。制备重组蛋白的成本较高,而小分子培养基成分则相对成本较低、储存更稳定、有效浓度范围也更宽。此外,MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和/或 FGFR 拮抗剂的使用使得人们可以获得并维持一些以前不可能得到的哺乳动物多潜能细胞株。

[0138] 下述的具体实施例使用了含有 CHIR 99021、PD184352 和 SU5402 的无血清、成分明确的培养基,改善了小鼠 ES 细胞的自我更新,仅很少细胞出现了分化。偶有报道说当在含有 BMP 的培养基中培养 ES 细胞时出现了神经发生。本发明实施例中观察到这种现象。

附图说明

[0139] 现通过具体实施例进一步详细地描述本发明,用下面的图解举例说明:

[0140] 图 1 显示本发明所得并维持的小鼠 ES 细胞,表明这些 ES 细胞具有很强的促嵌合体形成能力;

[0141] a. 所得 ES 细胞构成嵌合体的高效性,其中黑色箭头所示为 100%嵌合体;

[0142] b. 用添加三种抑制剂(无血清、饲养细胞,从开始既无 LIF)的 N2B27 培养基获取并维持的 ES 细胞;

[0143] 图 2 显示用添加了 3uM CHIR99021、1uM PD184352 和 2.5uM SU5402 的 N2B27 培养基培养的敲除单种 LIF 受体的小鼠 ES 细胞所得的第 4 代 ES 细胞;

[0144] 图 3 显示单种 Oct4GFP ES 细胞在 29 天内传代的第 5 代细胞。所用培养基为添加了 3uM CHIR99021、1uM PD184352 和 2.5uM SU5402 的 N2B27 培养基。GFP 由 Oct4 启动子启动,所以 GFP 阳性细胞也就是 Oct4 阳性细胞。

[0145] 图 4 显示根据本发明方法分离的一个大鼠 ES 细胞克隆;

[0146] 图 5、图 6、图 7 和图 8 分别显示用本发明方法分离的大鼠 ES 细胞分别是 Nanog、Oct4、Cdx-2 和碱性磷酸酶阳性的;

[0147] 图 9 显示根据本发明方法分离的大鼠 4 个 ES 细胞株的 RT-PCR 表达分析,其中 mESC 指小鼠 ES 细胞, Nanog 的 RT-PCR 分析所用的引物为 Nanog 特异性,不扩增小鼠序列;

[0148] 图 10 显示根据本发明方法分离的大鼠 ES 细胞所形成畸胎瘤的成熟分化组织的切片,其中 a 表示表皮组织、b 表示横纹肌组织, c 表示肠上皮组织;

[0149] 图 11 显示在 3i 培养基中,大鼠 ICM(内细胞团)扩展培养物和原代克隆依然表达 Oct4 和 Nanog;

[0150] a. 在含有血清和 LIF 的培养基,或 3i 培养基中培养 3 天后,针对 Oct4 和 Cdx2 的

ICMs 免疫荧光染色；

[0151] b. 培养的大鼠 ICMs 中 Oct4 和 Cdx2 免疫阳性的细胞数目；

[0152] c. 在 3i 培养基中培养 4 天后针对 Oct4 和 Nanog 的 ICMs 免疫染色；

[0153] d. 解离 ICM 扩展培养物后再在 3i 培养基中培养 4 天后所得的原代克隆；

[0154] 图 12 显示在 3i 培养基中增殖的源于大鼠胚胎的细胞的形态、克隆增殖和染色体组；

[0155] a. 含有饲养细胞的 3i 培养基中传代细胞的代表性克隆；

[0156] b. 在纤连蛋白上无饲养细胞的 3i 培养基中传代的细胞；

[0157] c. 针对 3i 克隆 Oct4 和 Nanog 的免疫荧光染色；

[0158] d. 与 E14Tg2a 小鼠 ES 细胞 (mES)、大鼠 ExS 细胞 (rExS, 大鼠胚外干细胞)、和能表达小鼠 Oct 和 Nanog 转基因的大鼠 ExS 细胞相比, 源于大鼠胚胎的 3i 细胞中筛选标记基因表达的 RT-PCR 分析；

[0159] e. 3i 大鼠 ES 细胞 (line C) 的中期染色体；

[0160] 图 13 显示体外培养的大鼠 3i 细胞的分化情况；

[0161] a. 生长在含血清、LIF 及饲养细胞的培养基中细胞的相差及免疫荧光图像；

[0162] b. 在含明胶、不含 3i 的无血清培养基中培养 8 天后的分化细胞；

[0163] c. XX 大鼠 ES 细胞中 X 染色体状态的表征。未分化和分化 6 天的 XX 大鼠 3i 细胞、以及 XX 大鼠神经干细胞 (NS) 中 H3K27me3 的免疫荧光染色 (绿)。未分化的细胞显示弥漫性着色 (缺乏处于静止期的 X 染色体), 分化细胞和体细胞干细胞则显示具有 H3K27me3 核小体 (静止期的 X 染色体)。上述细胞均用 Dapi 复染色 (绿)。

[0164] 图 14 显示畸胎瘤的形成及助于形成嵌合体

[0165] a. 畸胎瘤的组织切片。角化的上皮细胞 (C 系细胞), 横纹肌 (B 系细胞), 肠上皮细胞 (C 系细胞)

[0166] b. 由表达 GFP 的 D 3i 细胞系产生的完整胚胎照片, 及 E10.5 嵌合体从头到脚的横切面 (i-x)。GFP 染色是绿色的, DAPI 核染色是蓝色的。

[0167] c. 从 C 系细胞获得的毛色嵌合体。白化吻源于受体 Fischer 种 (盃状白化), 身体的色素沉着源于引入的 DA 细胞株。

[0168] d. 成年毛色嵌合体的基因组 DNA 微卫星分析。取尾部、耳朵和血液中的基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 D1Rat122 和 D3Rat17 的多态微卫星区域, 并通过琼脂糖凝胶电泳和荧光法分析。

[0169] 图 15 显示一个典型的绵羊 ES 细胞株的体外未分化和分化状态 (7a, 第 5 代或更后)；

[0170] 图 16 显示一个典型未分化绵羊 ES 细胞株的 RT-PCR 分析 (7a, 第 5 代)；

[0171] 图 17 显示用第 1-4 号培养基培养的胚胎中, 形成胚胎扩展物并被传代到第 1 代的牛胚胎的百分数比较。扩展物百分数: $x^2_3 = 12.49$, $p = 0.0059$; 被传代的百分数: $x^2_3 = 9.96$, $p = 0.0189$ 。a. 在观察到的结果 (如扩展物百分比、被传代的百分比) 和所做的处理之间有正相关。b. 在观察到的结果和所做的处理之间有负相关；

[0172] 图 18 显示用第 1-4 号培养基培养的胚胎中, 形成第 3 代 (P_3) 或第 6 代 (P_6) 胚胎干细胞系的胚胎的比率比较。 P_3 : $x^2_3 = 12.02$, $p = 0.0073$; P_6 : $x^2_3 = 13.81$, $p = 0.0032$ 。

a. 在观察到的结果（如位于 P_3 或 P_6 的细胞系百分比）和所做的处理之间有正相关。b. 在观察到的结果和所做的处理之间有负相关；

[0173] 图 19 显示用 1-4 培养基培养的胚胎产生的原代牛胚胎干细胞克隆的扩增情况比较；

[0174] 图 20 显示用 1-4 培养基培养的已建立的牛 ES 细胞株 BES-4 第 1 代细胞 (i. e. P_{23+1}) 的克隆扩增情况比较；

[0175] 图 21 显示分别用对照培养基 (a, b)、培养基 2 (c, d)、培养基 3 (e, f)、或培养基 4 (g, h) 培养 37 天 (a, c, e, g) 或 57 天 (b, d, f, h) 后, 所得牛胚胎干细胞克隆的形态学比较。所示细胞是第 4、第 5 或第 6 代细胞；

[0176] 图 22 显示分别用对照培养基 (a)、培养基 2 (b)、培养基 3 (c) 或培养基 4 (d) 培养已建立的牛 ES 细胞株 BES-1 十天后, 所得牛胚胎干细胞克隆的形态学比较。所示细胞是 P_{19+1} 。比例尺 = 2mm；

[0177] 图 23 显示用对照培养基 (a)、培养基 2 (b)、培养基 3 (c) 或培养基 4 (d) 分离的克隆形成的牛胚胎干细胞的形态学比较。所示细胞是第 5 代 (P_5) 或第 7 代 (P_7) 细胞。

[0178] 图 24 显示分别用对照培养基 (a)、培养基 2 (b)、培养基 3 (c) 或培养基 4 (d) 培养已建立的牛 ES 细胞株 BES-1, 所得牛胚胎干细胞的形态学比较。所示细胞是 P_{18+1} ；

[0179] 图 25 显示用 1-4 培养基分离的 ES 细胞株培养过程中的多潜能状态基因表达谱比较。对照组（培养基 1）的细胞在 P_1 、 P_3 、 P_7 ；培养基 2 组的细胞在 P_1 、 P_3 、 P_4 ；培养基 3 组的细胞在 P_2 、 P_3 、 P_6 ；培养基 4 组的细胞在 P_1 、 P_3 、 P_6 。所有电泳图中从左到右的基因顺序是： β -actin、Oct4、Rex1、Sox2、SSEA1、碱性磷酸酶和 Nanog；

[0180] 图 26 显示用 1-4 培养基分离的 ES 细胞株所得的牛 ES 细胞的多潜能状态基因表达谱比较, 表明在第 1 代 (a) 和以后代数 (b) 的细胞间有些变化, 其中对照样品是 P_4 和 P_7 , 培养基 2 样品是 P_4 和 P_6 , 培养基 3 样品是 P_5 和 P_6 , 培养基 4 样品是 P_4 和 P_6 。所有电泳图中从左到右的基因顺序是： β -actin、Oct4、Rex1、Sox2、SSEA1、碱性磷酸酶和 Nanog；

[0181] 图 27 显示从 1-4 培养基培养已建立的 ES 细胞株 BES-4, 传代 1、4 或 5 代所得牛 ES 细胞的多潜能状态基因表达谱比较。所有电泳图中从左到右的基因顺序是： β -actin、Oct4、Rex1、Sox2、SSEA1、碱性磷酸酶和 Nanog；

[0182] 图 28 显示当位于促进体外分化的环境中, 由一种已建立的牛 ES 细胞株所得的外植体的反应比较。(a) 表示用培养基 2 培养的外植体形成的拟胚体。(b) 表示用培养基 3 培养的外植体形成的拟胚体。(c) 和 (d) 表示用培养基 4 培养的外植体的细胞已经与培养容器粘连, 并开始分化。

[0183] 在实施例中, 术语 2i 培养基或 2i 指含有 MEK 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂的培养基。术语 3i 培养基或 3i 指含有 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂的培养基。

具体实施方式

[0184] 实施例 1

[0185] 小鼠 ES 细胞被培养在含有 CHIR99021、PD184352 和 SU5402 的培养基中, 具体准备步骤如下：

[0186] 三种抑制剂 / 拮抗剂的浓度如下：

[0187]

化合物	初始浓度	稀释	加入培养基后的终浓度
CHIR99021	10mM 在-20℃下可保存 超过 1 年	将浓缩液分成 20 μ l 的等份。 第一次用 N2B27 培养基稀释 10 倍至 1mM。保存在 4℃。将上述稀释的溶液加入培养基中稀释 333 倍至终浓度为 3 μ M。	3 μ M 所有细胞株均采用这一浓度。
PD184352	10mM 在-20℃下可保存 超过 1 年	将浓缩液分成 10 μ l 的等份。 第一次用 N2B27 培养基稀释 100 倍得 1ml、100 μ M，保存在 4℃。加入培养基中稀释 125 倍至终浓度为 0.8 μ M。	0.8 μ M 有些细胞株被培养时采用的浓度在 0.5 – 1 μ M 之间变化
SU5402	5mM 在-20℃下可保存 超过 1 年	第一次用 N2B27 培养基稀释 10 倍至 0.5mM。 加入培养基中稀释 250 倍至终浓度为 2 μ M。	2 μ M 有些细胞株可能需要在 1 – 5 μ M 之间调整

[0188] 准备培养基：

[0189] 准备 DMEM/F12-N2 培养基

[0190] 向 100ml DMEM/F12(Gibco 42400-010) 中加 1ml N2100x 浓缩液。DMEM/F12 培养基中每一种 N2 成分的终浓度是：

[0191] 胰岛素 25 μ g/ml 腐胺 16 μ g/ml 转铁蛋白 100 μ g/ml[0192] 亚硒酸钠 30nM 黄体酮 6ng/ml BSA(牛血清白蛋白) 50 μ g/ml

[0193] 准备神经基质/B27 (Neurobasal/B27) 培养基：

[0194] 向 100ml 神经基质培养基 (Gibco 21103-049) 中加入 2ml B27 (Gibco 17504-044) 和 1-2M 的 L-谷氨酰胺 (细胞培养贮存液 1:100)。

[0195] 准备 N2B27 培养基：

[0196] 以 1:1 的比例混合 DMEM/F12-N2 和 Neurobasal/B27 培养基。

[0197] 用此培养基稀释所有的化合物并培养细胞。

[0198] 此培养基用于获取并维持源于 129 系小鼠的 ES 细胞，也用于从 ES 细胞缺陷型 CBA 小鼠和部分非缺陷型 C57BL/6 小鼠中获取 ES 细胞。此培养基用于维持大鼠胚胎原代扩展物的细胞，表明可用此培养基维持大鼠多潜能细胞。

[0199] 因而，ES 细胞被维持在含有 GSK3 抑制剂、MEK 抑制剂和 FGF 受体拮抗剂的培养基中，本发明也为此提供了培养基和培养方法。

[0200] 实施例 2

[0201] 取 4.5dpc (E4.5) 的大鼠胚胎，用酸性台式液去掉透明带，通过免疫外科手术 (immunosurgery) 去掉滋养外胚层。在含有下述培养基 (3I medium)、及 γ 射线照射过的 DIA-M 饲养细胞层 (参见 Buehr et al. 2003) 的 4-孔培养板中培养内细胞团：

[0202] 3 μ M Chiron 99021(一种 GSK 抑制剂)

[0203] 0.8 μ M PD184352(一种 MEK 抑制剂)

[0204] 2 μ M SU5402(一种 FGF 受体拮抗剂)

[0205] 在 N2B27 中。若需要可以加入青霉素和链霉素。

[0206] 若愿意,可以用原代培养的小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)代替 DIA-M 细胞作为饲养细胞。

[0207] 连续培养 3 天,然后人工分解小的扩展物,将小细胞团移到同样培养基中的新鲜 DIA-M 饲养细胞上。

[0208] 连续培养 2 周,每 2-3 天换一次培养基并定期观察。如果出现小的、清晰的克隆,就将这些克隆在类似的条件下转移,若克隆足够大则分离它们。

[0209] 培养 2 周后,在某些培养物中可看到未分化的细胞克隆。一些克隆粘附于饲养细胞上,但更常见的是它们聚集成团并脱离基质细胞悬浮起来。用胰蛋白酶-EDTA 或人工解离所述克隆进行传代(将一个克隆吸入小的移液管,然后将细胞团排放入一个新培养孔中)。这期间细胞一直都被维持在含有 DIA-M 饲养细胞的 3I 培养基中。

[0210] 用这种方法获得并培养的细胞形态学上未分化(图 4),且表达多潜能相关基因 Nanog(图 5 和 9)、Oct4(图 6 和 9)和 FGF4、Sox-2(图 9)以及碱性磷酸酶(图 8)。所述大鼠细胞还表达滋养外胚层标记 Cdx2(图 7 和 9)。

[0211] 参考文献:Buehr, M., Nichols, J., Stenhouse, F., Mountford, P., Greenhalgh, C. J., Kantachuvesiri, S., Brooker, G., Mullins, J. M., Smith, A. G. (2003). Rapid loss of oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines. Biol Reprod 68:222-229.

[0212] 实施例 3

[0213] 以实施例 2 所述的方法分离大鼠 148C ES 细胞株的细胞,采用标准方法将其制成畸胎瘤。简单说,大鼠 ES 细胞被注入免疫缺陷型 SCID 小鼠的肾包膜下。图 10 显示这样所得一个畸胎瘤的组织切片,在所述动物中长出了一个大大肿瘤并在注射后 33 天被处死。

[0214] 在组织切片中可以很清楚地看到成熟的分化组织,特别是表皮、横纹肌和肠上皮。这些组织分别起源于外胚层、中胚层和内胚层。所述组织中含有分别源于三个原胚层的分化细胞表明大鼠 148C ES 细胞是多潜能的。

[0215] 实施例 4

[0216] 从大鼠胚泡中获得多潜能干细胞

[0217] 尽管自 1981^{1,2}年起,人们已从近交系小鼠中得到了胚胎干细胞(ES),但在其它物种中一直没能证实这一点。人们从其它啮齿类动物获得 ES 细胞系时一再失败,以及有证据显示灵长类胚胎起源的细胞在关键特征上与小鼠 ES 细胞不同³,使人们质疑培养的干细胞与胚胎多潜能细胞间的关系⁴⁻⁷。本实施例中我们设计了一种培养环境来培养大鼠胚胎,此环境可保护早期外胚层的多潜能状态使其免受诱导分化信号的影响。这使得可重复建立能表达多潜能标记 Oct4⁸和 Nanog⁹的细胞的培养。这些细胞形态学上未分化且可长期稳定扩增。它们与小鼠 ES 细胞具有共同的分子标记,可在体外被诱导分化并在免疫低下的成年小鼠中形成多分化的畸胎瘤。它们在表型及机能上均与最近报道的源于卵圆筒的 EpiSCs^{3,10}细胞截然不同。最重要的是,注入大鼠胚泡后它们对形成嵌合体作用巨大。我们断定可从

大鼠胚胎中分离具有 ES 细胞特性的多潜能细胞。我们建议可以在非诱导性培养基中从原态外胚层细胞获得 ES 细胞,并将其作为一种常用手段。

[0218] ES 细胞源于合成培养基培养的小鼠多潜能外胚层细胞^{4,6}。人们不清楚到底 ES 细胞是此人造环境的产物,还是代表培养的个体发生中的一个特异相¹¹。以往的经验是可利用成纤维饲养细胞和/或白血病抑制因子(LIF),连同选择的胎牛血清或骨形成蛋白(一种生长因子)从某小鼠近交系中重复获得 ES 细胞^{4,12}。然而,利用同样的条件不能从所有小鼠种系更不能从大鼠中获得 ES 细胞^{13,14}。我们⁷及其他学者^{15,16}报道过从大鼠胚胎中获得一些细胞,这些细胞与 ES 细胞的表面形态类似,但不能表达足够量的能识别 ES 细胞的关键转录因子 Oct4 和 Nanog¹⁷,也不能在肿瘤或嵌合体中确定体外的胚层分化。就我们所掌握的资料,这些细胞仅生成胚外外胚层和内胚层系,我们称它们为胚外干细胞(ExS)⁷。试图从大鼠胚胎中获得 ES 细胞的一再失败可能表明小鼠多潜能外胚层和大鼠胚胎有根本性区别¹⁸。或者这种培养基构成可能不适于维持多潜能状态,除非针对通过实验室小鼠的大量近交而产生的修饰的遗传背景。

[0219] 我们描述了一种三小分子抑制剂(3i)的组合,以消除小鼠 ES 细胞培养过程中的诱导分化刺激(Ying et al,已提交)。无论是已建立的细胞株还是从新从小鼠胚胎中获取多潜能细胞,3i 都为其提供了有效的多潜能性的保持。

[0220] 为确定此原理是仅限于小鼠还是可被更广泛应用,我们检测了 3i 对大鼠胚胎细胞的影响。可利用决定转录的 Oct4 的表达与否作为替代的分析方式以确定原代扩展培养物中是否存在未分化细胞⁷。用含血清^{6,7}或无血清培养基培养的 ICMs 中 Oct4 很快消失。通过免疫外科术从 E4.5 的大鼠胚泡中分离内细胞团(ICMs),并将其铺在饲养细胞上以促进粘附,同时饲养细胞也可提供白血病抑制因子(LIF)⁷。培养 3-4 天后固定细胞,并进行免疫染色分析(图 11a-c)。与前述 Oct4 的消失一致,我们观察到了滋养外胚层决定因子和 Oct4 拮抗剂 -Cdx2 被上调¹⁹。饲养细胞、可溶性的 LIF、或无抑制剂的无血清培养基均不能阻止这种变化。与此相反,在含有 3i 时,我们发现大部分扩展培养物的细胞依然表达 Oct4 蛋白,Cdx2 的表达被抑制。此外,当将 ICMs 培养在含有 3i 的无血清培养基中时,与 Oct4 类似,第二个多潜能状态的关键标记 -Nanog⁹的表达也被下调。我们将在 3i 培养基中培养 3 天的 ICMs 解离为小细胞团,将其在同样的条件下铺板。4 天后这些细胞依然存活并开始增殖,形成形态学上未分化的细胞克隆,并持续表达 Oct4 和 Nanog⁴(图 1d)。

[0221] 根据这些 3i 能维持原代培养物的自由状态的指征,我们研究了它的长期效应。从两种大鼠 DA 和 Fischer 344 的胚胎中分离了共 35 个 ICMs,并将其培养在含有饲养细胞的 3i 培养基中。3 天后,11 个 ICMs 粘附并增殖,因此可人为将它们分为小细胞团并铺在新的细胞培养孔中。4 个这样重铺的 ICMs 又发展成为形态上未分化的小克隆。10 天后将每个这种克隆完好的转入新的细胞培养孔。4 天后它们都长大了一些。然后人为解离这些克隆并重铺。所有的细胞又都长出了未分化克隆。我们发现这些细胞可以被反复传代,直至建立了 4 个细胞系,其中 2 个源于 Fischer 胚胎,2 个源于 DA 胚胎。这 4 个细胞系具有相似的形态和生长特性。如同典型的在 3i 培养基中的 ES 细胞(Ying et al.,已提交),它们增殖为三维紧密堆积的细胞聚集体(图 12a)。每个细胞都具有高的核质比和明显的 ES 细胞核的特征。它们是非极性的,没有突起、细胞构筑、或其它特化的迹象。一般 3-4 天当克隆达到中等大小时传代细胞,因为假如克隆太大,它们可能脱离饲养细胞层。我们发现很难利用

3i 培养基在涂有明胶的塑料培养板中维持未分化的细胞。当没有饲养细胞时,细胞较难粘附、也易于聚集并脱离基底。然而,在涂有纤连蛋白的培养板中细胞粘附增强,足以维持未分化细胞的增殖(图 12b),这表明饲养细胞的主要功能是帮助细胞粘附而非提供细胞自我更新的特殊信号。用移液管上下抽吸或用 Accutase 酶解法很容易地人为解离克隆。解离后,用微吸管分离的单个细胞可很容易地产生未分化的克隆,并在此基础上连续传代(图 12b)。可冷冻保存细胞并用常规方式复苏。已连续 6 个月传代上述细胞,没有发现细胞生长变慢,仅发现很少或没有发现明显的细胞分化。

[0222] 为评估这些大鼠细胞的多潜能特性,我们检测了与多潜能相关并决定种系的关键标记因子的表达。通过免疫荧光染色发现,这些细胞的细胞核中有 Oct-4 和 Nanog 的表达(图 12c)。RT-PCR 分析进一步验证了这些基因与 Rex-1、Err β 、Sox2、Stella,以及 Oct4/Sox2 的靶基因 Fgf4 的表达(图 12d)。没有发现确定的内胚层标记基因 Gata6 和 Sox17、中胚层标记基因 brachyury 和 Flk1、或者神经外胚层标记基因 Pax6 和巢蛋白的转录产物。针对大鼠 Nanog 基因设计了扩增引物。通过这些引物总可以从大鼠细胞中获得预期大小的扩增产物,在小鼠的 ES 细胞中却得不到。反过来也如此,利用针对小鼠基因的引物也不能从大鼠细胞中得到扩增产物。分裂中期染色体扩展(preparation of metaphase spreads)进一步验证了所述细胞是大鼠细胞(图 12e)。与小鼠不同,所有四个细胞系都含有大鼠特有的中着丝粒和近端着丝粒染色体,小鼠则仅有端着丝粒染色体。

[0223] 在两个重复实验中,在 3i 培养基中培养了另外 41 个 ICMs。其中 13 个粘附并形成了细胞团。3 天后解离这些细胞团,随后在 6 个培养孔中出现了原代未分化克隆。所有这 6 个孔中的培养物均产生了可连续扩增的未分化细胞。这些培养物在形态上与最初的 4 个细胞系相同,且都表达 Oct4 和 Nanog。后来我们又从 18 个解离的 ICMs 中得到了另外的 4 个细胞系。由此我们断定所述获得多潜能细胞的方法是可重复且稳定的。

[0224] 我们研究了改变维持未分化状态培养基的条件对细胞的影响。发现最初采用的产生 LIF 的 DIA-M 饲养细胞⁷可被标准的小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)替代而无可见的影 响。与 3i 足以维持小鼠 ES 细胞一致,培养基中也不含 LIF。将大鼠细胞从 3i 培养基转移到含有血清和 LIF 或 BMP 和 LIF 的培养基中,所述大鼠细胞分化为多种形态且不再表达 Oct4 和 Nanog(图 13a)。这些发现表明:与小鼠 ES 细胞相比,3i 大鼠细胞对 gp130/Stat3 信号途径的反应更弱一些^{20,21}。这可能是以前未能得到大鼠 ES 细胞的一个关键因素。

[0225] 在无抑制剂的培养基中细胞分化为多种形态(图 13b)。与在小鼠 ES 细胞中看到的一样,无 GSK3 抑制剂,仅含有 Fgfr 抑制剂和 Mek 抑制剂(2i)的培养基足以维持大鼠细胞群的未分化状态。这些发现与曾经猜测的一致,即封闭 FGF/Erk 信号途径对维持原态多潜能状态至关重要(Ying et al., 已提交)。

[0226] 未分化的雌性 ES 细胞和原态外胚层的一个特点是两个 X 染色体都是活跃的,而分化后一条变为不活跃²²⁻²⁴。我们用一种针对三甲基化 H3K27(H3 组蛋白的第 27 位赖氨酸)的抗体对 XX 3i 大鼠细胞染色,三甲基化 H3K27 是一种后生的沉寂标记,通过它可辨别处于细胞间期核的不活跃 X 染色体²⁵。培养在 3i 培养基中的细胞仅有弥散的免疫活性,而暴露于含血清培养基 6 天后分化的细胞则显示了很明显的核小体,表明有不活跃的 X 染色体(图 13c)。这些数据表明在未分化的 XX 3i 大鼠细胞中,两个 X 染色体是活跃的,在分化过程中其中一个 X 染色体变为不活跃。因此 3i 大鼠细胞显示了早期外胚层和 ES 细胞所具有

的适当的表观遗传状态。

[0227] 当在无血清无 3i 的培养基中悬浮培养时细胞不能存活。然而当加入血清或 Matrigel 后,细胞聚集成胚胎小体样的结构(图 13d)。通过 RT-PCR 分析这些结构发现 Oct4 和 Nanog 的表达降低,并出现内胚层和中胚层的标记(图 13e)。为进一步研究 3i 大鼠细胞的分化能力,我们将 DA 和 Fischer 起源的细胞均注入 11 个免疫缺陷 SCID 小鼠的肾包膜下。30-55 天后,杀死动物。其中 7 只小鼠在注射位点出现了肉眼可见的组织块,它们大小不一,从不足 1 克到超过 4 克的都有。测试的两种细胞系都长出了组织块。组织学分析其中的两只动物,每种细胞系一只,发现了畸胎瘤的典型特征,具有多种分化细胞和结构,包括横纹肌、骨、软骨、角化的上皮、肠分泌上皮和许多其他结构(图 14a)。我们推断 3i 大鼠细胞系可产生畸胎瘤并具有成熟的多能分化能力。

[0228] 真正 ES 细胞的确定的特征是它们能形成亲代胚胎克隆,并形成畸胎瘤的所有三胚层的分化细胞。借助于脂质体并用嘌呤霉素筛选,我们利用一个含有 GFP 基因的质粒得到了一些表达绿色荧光蛋白(GFP)的细胞。将这些细胞注入胚泡中以跟踪其形成胚胎的能力。在 E10.5 时收获了 8 个胚胎,其中 2 个显示了广泛分布的 GFP 标记的细胞(图 14b)。切片分析的结果证实了这些细胞整合入所有三个胚层的组织中。

[0229] 我们也将未处理的 3i 大鼠细胞注入胚泡以研究它们形成出生后嵌合体的潜能。采用刺豚鼠 DA 和白化病 Fischer 两种动物为模型,当将源于一种鼠的细胞引入另一种鼠的胚胎时,它们遗传决定的毛色的不同为识别嵌合体提供了方便。在 15 只由转移的胚胎获得的幼鼠中,2 只的毛色表明其是将 DA 引入 Fischer 宿主胚胎中所得的(图 14b)。这些鼠有很重的颜色表明 DA 细胞发挥了作用。白化病宿主的贡献仅在头部可以看出,这是 Fischer 鼠的盃状等位基因表达的结果。这种图案是由盃状白化和完全有颜色²⁶的大鼠所得的大鼠嵌合体的特征。为证实并量化这些鼠的嵌合特性,我们利用尾活体组织进行了微卫星分析。结果表明两种基因型的细胞都存在,在这两只鼠中 DA:Fischer 的比例分别是 25:75 和 75:25(图 14d)。这两只嵌合体已发育为健康且具有生育能力的成鼠。然而,两只都是雄鼠,因而不能从引入的细胞获得能相互受精的生殖细胞(精子和卵子),也即得不到前面描述的 XX 细胞。

[0230] 最近有报道从小鼠和大鼠着床后卵圆筒阶段外胚层分选到了几种细胞系^{3,10}。这些所谓的 EpiSCs 在体外具有多能分化潜能但与真正的 ES 相比,在表型、分子和发育上还有一定区别。最明显的是它们仅能勉强或不能再并入着床前胚胎及形成嵌合体。相反的,3i 大鼠细胞可以形成嵌合体。它们还表达 EpiSCs 细胞所没有的 Rex1、Stella(Dppa3)、碱性磷酸酶、ES 细胞的标记和早期外胚层。此外,3i 大鼠细胞在解离为单细胞后很容易增殖,而保持细胞间的接触似乎对 EpiSCs 细胞很重要。我们检测了是否可以用维持 EpiSCs 细胞所需的特殊条件——FGF2 和激活素来维持 3i 大鼠细胞。我们发现与小鼠 ES 细胞类似,当将 3i 换为激活素和 FGF2 时,不管有没有饲养细胞或是否涂覆有纤链蛋白,这些大鼠细胞均发生分化。此外,能诱导 EpiSCs 而非小鼠 ES 细胞分化¹⁰的激活素受体抑制剂 SB431452 不能阻止未分化的 3i 大鼠细胞的增殖。3i 细胞与 EpiSCs 细胞的最后一个区别是:EpiSCs 源于着床后胚胎而非胚泡。我们也测试了是否能用 3i 维持源于胚泡的 ExS 细胞⁷,发现它们不能存活。因此,3i 大鼠细胞与其他源于培养的大鼠胚胎的细胞系截然不同。

[0231] 所有这些发现表明,3i 的应用使得我们可以得到具有 ES 细胞关键特征的大鼠细

胞,这些特征包括可长期自我复制、多潜能以及能整合入发育的胚胎中的能力。它们也表达 ES 细胞状态关键的分子标记 :Nanog、Oct4、Sox2 和 Rex1。大鼠 ES 细胞的可用性打开了通向生物医药研究领域选择物种时的基因靶向及相关的基因工程技术的大门。3i 大鼠细胞的可用性很快为使用更先进的体内模型用来测试体外干细胞的分化能力创造了机会,这种分化目的是产生能融入成年组织并发挥作用的细胞。例如,大鼠中认知修复的评估比小鼠中要复杂的多。

[0232] 利用抑制性的 3i 培养基足以保存大鼠胚胎细胞的多潜能性表明,ES 细胞的获得或许真正表示捕获了驻留胚胎细胞而非组织培养物。因此分选 ES 细胞或许不需要大量的转录或表观遗传重组^{5,6,27}。更确切地说,ES 细胞也可能代表一种简单的延续,即没有诱导信号时,细胞就省略了早期胚泡增殖阶段(Ying et al, 已提交)。这提高了下述操作的可能性,即基于 3i 原理的培养基可能足以从其它哺乳动物包括家畜中获得 ES 细胞。

[0233] 方法

[0234] 在附加的资料中提供了 RT-PCR、微卫星分析、产生畸胎瘤和抗体的详细信息。

[0235] 免疫外科手术. 用酸性台式液将 41/2dpc 大鼠胚泡的透明带移走,将胚泡在 20% 抗大鼠全血清 (Sigma) 中在 37℃ 温育 3 小时。冲洗胚泡,将其在大鼠血清中温育 20 分钟作为补偿,然后通过用移液管上下抽吸去除溶解的滋养外胚层。

[0236] 细胞培养步骤,将 γ -射线照射过的小鼠成纤维细胞⁷以 1.5×10^4 个细胞 / 孔铺在含有明胶的 4 孔培养板中制备饲养细胞。将分离的 ICMs 和传代的细胞铺在 N2B27 培养基²⁸中的上述饲养细胞上,培养基中含有 $2 \mu\text{M}$ FGF 受体拮抗剂 SU5402、 $0.8 \mu\text{M}$ Mek1/2 活化的抑制剂 PD184352、和 $3 \mu\text{M}$ GSK3 抑制剂 CHIR99021 (3i;Ying et al., 已提交)。用小的移液管将细胞克隆吸出、解离成单细胞或小细胞团,然后将其平铺在新培养板中,通过这种方式对 3i 细胞常规传代。将约 200 个解离的细胞转入 $10 \mu\text{l}$ 悬滴液以形成拟胚体。培养 2 天后,收集聚集的细胞并将其转入细菌培养板继续培养 5 天。

[0237] 转染步骤,用 Accutase (Sigma) 解离细胞克隆,加入含有 10% FCS 的 GMEM 培养基,离心处理,用 $400 \mu\text{l}$ 无血清的 3i 培养基重悬细胞并铺板。加入含有 $0.25 \mu\text{g}$ ScaI-线性化的 pPyCAGgfpIP 质粒²⁹ DNA、 $0.25 \mu\text{l}$ PLUS 试剂、和 $0.625 \mu\text{l}$ Lipofectamine LTX (Invitrogen Corporation) 的混合物,温育过夜。18 小时后移去转染试剂,换为新鲜的无血清 3i 培养基。转染 48 小时后用 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素筛选稳定的转染子。连续用嘌呤霉素筛选,混合几个抗性克隆得到多克隆细胞株。

[0238] 嵌合体的产生,注入细胞的当天中午收集 4.5dpc 的大鼠胚胎,在 KSOM 培养基中继续培养 2-3 小时以最大程度空腔化。用 Accutase 解离细胞,将 10-12 个细胞注入受体胚胎的囊胚腔。

[0239] 将被注射的胚胎移入 3.5dpc 受精大鼠的子宫中。由于没有切除输精管的雄性大鼠,不得不采用自然交配的受体,而这确实减小了被转移胚胎的着床率。

[0240] 振动切片机切片,将荧光胚胎植入含有等体积 20% 明胶和 20% 白蛋白的 PBS 中,在 40℃、4% 多聚甲醛中固定过夜。将上述明胶块植入含有 10% 戊二醛的“安置溶液”(setting solution) 中,4℃ 过夜。用 Series 1000 振动切片机切出 $100 \mu\text{m}$ 的横切面切片,用含有 0.1% 吐温 20 的 PBS 处理 10 分钟,放置在含有 DAPI 核荧光染料的 Vectashield (Vector Laboratories) 中,盖上盖玻片。24 小时内用共聚焦显微镜观察切片。

[0241] 微卫星基因型检测,利用荧光标记的寡核苷酸扩增取自大鼠尾部、耳朵和血液的基因组 DNA 的大鼠微卫星区域 D1Rat122(正向引物:

[0242] 6-FAM-CTGCTCCACCTGCCTGTATT,反向引物:

[0243] TCCCTTTGCAATAGACAATGG)和 D3Rat17(正向引物:

[0244] VIC-TCATTTTCCTTCCTCTCTCTCA,反向引物:

[0245] AAGACAAAATGCTGGAGGGA)。在 PTC-200 温度循环器 (PCR 仪) (MJ Research) 中,利用 GoTaq Flexi DNA 聚合酶 (Promega Corporation, #M8305) 在下述条件下进行 PCR 扩增反应:95℃ 2 分钟,94℃ 30 秒进行 35 个循环,56℃或 62℃ 30 秒,72℃ 30 秒,72℃ 5 分钟最后延伸。D1Rat122 和 D3Rat17 的退火温度分别是 56℃和 62℃。以 1:100 的比例用无菌蒸馏水稀释 PCR 产物。取 1 μl 这样的稀释产物,用含有 LIZ-500 内部界定标准 (Applied Biosystems, #4322682) 的 9 μl Hi-Di 甲酰胺 (Applied Biosystems, #4311320) 进一步稀释。将得到的稀释物在 ABI 毛细管 3730DNA 分析仪上检测,并在 4%琼脂糖凝胶上显示。DA 和 Fischer 大鼠的 D1Rat122 等位基因分别是 230bp 和 255bp。DA 和 Fischer 大鼠的 D3Rat17 等位基因分别是 140bp 和 178bp。

[0246] 畸胎瘤的形成,将约 200-400 个细胞注入 SCID 小鼠 (BALB/c JHan Hsd-Prkdc scid) 的肾包膜下。在不同时间点收集肿瘤,通过称重肿瘤和肾的重量并减去另一侧未被注射的肾的重量来确定肿瘤的重量。将肿瘤置入固体石蜡中,切片并用 Masson 三色染色。

[0247] 抗体,用含有 4% PFA 的 PBS 固定长在培养板中的细胞,用 PBST(含有 0.3% 曲拉通 (Triton) 的 PBS) 使其具渗透性,用含有 1% BSA 和 10% 山羊血清的 PBST 在室温封闭 2 小时。将第一抗体留在板中 4℃过夜,所用的第一抗体是抗 oct-4(Cruz Biotechnology, 1:200)、抗 nanog (Abcam, 1:200) 和抗 cdx2 (Abcam, 1:80)。第二抗体是山羊抗小鼠 Alexa 488IgG2b(oct-4)、山羊抗兔 Alexa 568IgG(nanog)、和山羊抗小鼠 Alexa 568IgG1(cdx2),这些第二抗体的浓度均是 1:1000,将其在板中室温温育 2 小时。用 DAPI 对培养板复染。省略第一抗体导致没有荧光 (nanog, cdx2) 或背景较模糊 (oct-4)。为对 X 染色体进行免疫染色,将细胞置在显微镜玻片 (SuperFrost Plus, VWR international) 上,保温约 3 小时。然后将细胞在 4%多聚甲醛中室温固定 15 分钟,用 0.5% Triton X 处理 10 分钟使其渗透。抗血清采用 1:500 的抗 H3K27me3(是 Thomas Jenuwein 的贡献)。

[0248] RT-PCR,用 RNeasy 袖珍试剂盒 (Qiagen, #74104) 纯化源于约 50 个克隆的 RNA。随后用 Oligo-dT 引物及 SuperScript 第一链合成系统 (Invitrogen Corporation, #11904-018) 合成 cDNA。通常将十分之一的 cDNA 用 PTC-200PCR 仪 (MJ Research) 及 GoTaq Flexi DNA 聚合酶 (Promega Corporation, #M8305) 在下述条件下通过 PCR 扩增:94℃ 2 分钟,94℃ 20 秒进行 30 个循环,50℃ 20 秒和 72℃ 1 分钟,72℃ 最后延伸 5 分钟。下面列出所用的引物序列和产物的大小。

[0249]

大鼠 mRNA	大鼠引物序列	产物大小
β-Actin	正向- CACTGGCATTGTGATGGACT	427bp
	反向- ACGGATGTCAACGTCACACT	
Brachyury	正向- AACTGCGAGTGGGTCTGGAAG	451bp

[0250]

	反向- TGGGTCTCGGGAAGCAGTG	
Cdx2	正向- CCGAATACCACGCACACCATC	394bp
	反向- CTTTCCTTGGCTCTGCGGTTC	
Eras	正向- CGAGCGGTGTGGGTAAAAGTG	501bp
	反向- GGTGTCGGGTCTTCTTGCTTG	
ErrB	正向- TGTGCGGGGACATTGCTTCTG	436bp
	反向- TCCCGATCTGCCAAGTCACAG	
FGF4	正向- CGGGGTGTGGTGAGCATCTTC	202bp
	反向- CCTTCTTGGTCCGCCCGTTC	
GATA-6	正向- TCATCACGACGGCTTGGACTG	467bp
	反向- GCCAGAGCACACCAAGAATCC	
Kdr	正向- ATACACCTGCACAGCGTACAG	271bp
	反向- TCCCGCATCTCTTTCACCTCAC	
Nanog	正向- GCCCTGAGAAGAAAGAAGAG	356bp
	反向- CTGACTGCCCCATACTGGAA	
Nestin	正向- AGAGAAGCGCTGGAACAGAG	234bp
	反向- AGGTGTCTGCAACCGAGAGT	
Oct-4	正向- GGGATGGCATACTGTGGAC	412bp
	反向- CTTCTCCACCCACTTCTC	
Pax6	正向- GAGACTGGCTCCATCAGACC	212bp
	反向- CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC	
Rex-1	正向- TTCTTGCCAGGTTCTGGAAGC	277bp
	反向- TTTCCCACTCTGCACACAC	
Sox2	正向- GGCGGCAACCAGAAGAACAG	414bp
	反向- GTTGCTCCAGCCGTTTCATGTG	
Sox17	正向- AGGAGAGGTGGTGGCGAGTAG	268bp
	反向- GTTGGGATGGTCCTGCATGTG	
Stella	正向- TCCTACAACCAGAAACACTAG	304bp

[0251]

反向- GTGCAGAGACATCTGAATGG

- | | | | |
|--------|---------|------------------------------|-------|
| [0252] | 小鼠 mRNA | 小鼠引物序列 | 产物大小 |
| [0253] | Nanog | 正向 -ATGAAGTGCAAGCGGTGGCAGAAA | 464bp |
| [0254] | | 反向 -CCTGGTGGAGTCACAGAGTAGTTC | |
| [0255] | 参考文献 | | |
- [0256] 1. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6. (1981).
- [0257] 2. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7634-7638 (1981).
- [0258] 3. Tesar, P. J. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* (2007).
- [0259] 4. Gardner, R. L. & Brook, F. A. Reflections on the biology of embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 41, 235-243 (1997).
- [0260] 5. Zwaka, T. P. & Thomson, J. A. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* 132, 227-33 (2005).
- [0261] 6. Buehr, M. & Smith, A. Genesis of embryonic stem cells. *Phil. Trans. R. Soc., B* 358, 1397-1402 (2003).
- [0262] 7. Buehr, M. et al. Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines. *Biol Reprod* 68, 222-9 (2003).
- [0263] 8. Nichols, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-91. (1998).
- [0264] 9. Mitsui, K. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642 (2003).
- [0265] 10. Brons, I. G. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* (2007).
- [0266] 11. Smith, A. in *Stem Cell Biology* (ed. Marshak, D. R., Gardner, R. L., Gottlieb, D.) 205-230 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001).
- [0267] 12. Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-92 (2003).
- [0268] 13. Prell, K., Vassiliev, I. M., Vassilieva, S. G., Wolf, E. & Wobus, A. M. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species—present status and future prospects. *Cells Tissues Organs* 165, 220-36 (1999).
- [0269] 14. Brenin, D. et al. Rat embryonic stem cells: a progress report. *Transplant. Proc.* 29, 1761-1765 (1997).
- [0270] 15. Vassilieva, S., Guan, K., Pich, U. & Wobus, A. M. Establishment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *Exp Cell Res* 258, 361-73. (2000).

- [0271] 16. Fandrich, F. et al. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 8, 171-8 (2002).
- [0272] 17. Niwa, H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134, 635-46 (2007).
- [0273] 18. Nichols, J., Smith, A. & Buehr, M. Rat and mouse epiblasts differ in their capacity to generate extraembryonic endoderm. *Reprod Fertil Dev* 10, 517-25 (1998).
- [0274] 19. Niwa, H. et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123, 917-929 (2005).
- [0275] 20. Matsuda, T. et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* 18, 4261-4269 (1999).
- [0276] 21. Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. & Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 12, 2048-60. (1998).
- [0277] 22. Okamoto, I., Otte, A. P., Allis, C. D., Reinberg, D. & Heard, E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303, 644-9 (2004).
- [0278] 23. Mak, W. et al. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 303, 666-9 (2004).
- [0279] 24. Rastan, S. & Robertson, E. J. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J Embryol Exp Morphol* 90, 379-88 (1985).
- [0280] 25. Silva, J. et al. Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell* 4, 481-95 (2003).
- [0281] 26. Yamamura, K. & Markert, C. L. The production of chimaeric rats and their use in the analysis of the hooded pigmentation pattern. *Dev Genet* 2, 131-146 (1981).
- [0282] 27. Smith, A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 435-462 (2001).
- [0283] 28. Ying, Q. L. & Smith, A. G. Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol* 365, 327-41 (2003).
- [0284] 29. Chambers, I. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655 (2003).
- [0285] 比较例 1 (Comparative example 1)
- [0286] 发明人为 Teratani 和 Ochiya 的欧洲专利 EP1726640 描述供应一种大鼠胚胎干细胞。然而,在下述实验中,本申请表明 Teratani 和 Ochiya 所述的培养条件不支持分离的大

鼠 ICMs 的存活或增殖,因此这些条件不足以产生或维持大鼠 ES 细胞。

[0287] I. 据 Teratani 和 Ochiya 所述的已建立的大鼠 ES 细胞(源于 3i 培养基)的培养

[0288] A. 据 Teratani 和 Ochiya 所述的方法配制培养基(即:将欧洲专利 EP1726640 所述的 rLIF、KSR 和其它成分按照所述浓度配制在 DMEM 中)。

[0289] B. 用 γ 射线照射过的 MEFs(小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养物,第 3 代)作为饲养层。

[0290] C. 将源于已建立的大鼠 ES 细胞系(按照实施例 4 所述方法获得的,oct-41 细胞(第 12 代)、DA 2 细胞(约第 10 代)、C 细胞(第 22 代)、D 细胞(第 20 代))的克隆解离,转入 4 孔板中,用 A 步骤所述培养基以及 B 步骤所述饲养细胞。将此培养板标记为第 253 号板。同时也将同样的细胞平行维持在 3i 培养基中。

[0291] D. 实验结果

[0292] 第二天、oct-41 和 DA 2:较差,在克隆表面有圆形的细胞。C 和 D 系细胞:看起来还未分化

[0293] 第六天、所有细胞都较差。很多细胞死亡,很多细胞在培养板底部分化为鹅卵石状细胞,也有些正脱离底部的圆细胞。似乎细胞并没有增殖。换培养基。

[0294] 第八天、所有细胞都分化或死亡。培养物中含有大的不透明棕色物质,培养孔底部有许多细胞扩展生长物。

[0295] 对照培养物(在 3i 培养基中)显示未分化,并已大量增殖。

[0296] E. 结论:所有用 Teratani 和 Ochiya 所述条件培养的细胞在 8 天内都死亡或分化了。因此这种条件不能将大鼠 ES 细胞维持在存活、未分化和增殖的状态。

[0297] II. 用 Teratani 和 Ochiya 所述条件获得大鼠 ES 细胞系的尝试

[0298] A. 培养基和饲养层同上面 IA and B 所述。

[0299] B. 收集大鼠胚泡(4.5dpc)进行免疫外科手术。

[0300] C. 将分离的 7 个内细胞团(ICMs)转入 Teratani 和 Ochiya 所述的培养基中(含 rLIF 和 KSR 等)(第 258B 号板)。

[0301] D. 作为对照,将 6 个分离的 ICMs 转入 3i 培养基(第 258A 号板)。

[0302] E. 在对照孔(A)中可见几个扩展培养物,但在 Teratani 和 Ochiya 条件的孔(B)中却一个也没有。将培养物固定。

[0303] F. DAPI 染色后,3i 对照组中 5/6 的 ICM 被确定。所有的细胞均大量增殖。

[0304] G. Teratani/Ochiya 组中 1/7 的扩展培养物可被确定。它极小,且仅在 DAPI 染色后才能被确定是扩展培养物。

[0305] H. 结论. Teratani 和 Ochiya 的方法不支持分离的大鼠 ICMs 的存活或增殖。没有证据支持可通过此方法获得大鼠 ES 细胞的断言。

[0306] 实施例 5

[0307] 绵羊多潜能细胞的获得及其表征

[0308] 下述实施例描述了获得通过常规方法无法得到的绵羊胚胎干细胞(ES)。已通过下述(A)-(D)步骤、利用一种新的无血清培养体系建立并生产了绵羊 ES 细胞:

[0309] (A) 解离由绵羊胚泡形成的内细胞团,依然保持在细胞聚集体的状态;

[0310] (B) 培养源于解离的内细胞培养物的原代胚胎干细胞,直至可以被转移或传代;

[0311] (C) 解离上述已可以被转移或传代的原代胚胎干细胞, 依然保持在细胞聚集体的状态, 然后传代并在同样条件下继续培养; 以及

[0312] (D) 进一步转移或传代, 并培养细胞以建立胚胎干细胞系。

[0313] 用下述方法建立、表征和接种绵羊 ES 细胞:

[0314] 1、绵羊

[0315] 本方法适于从任何品种的绵羊中获得 ES 细胞。如可从 Merino 及类似绵羊种中获得 ES 细胞。

[0316] 2、饲养细胞

[0317] 在绵羊 ES 细胞的建立、随后的培养和转移中最好都使用饲养细胞。饲养细胞可以源于任何种系, 最好是正常的成纤维细胞, 而非已建立的和 / 或不死的、含有或没有基于遗传的筛选标记的饲养细胞系 (如 DIAMs (C3H10T1); Rathjen PD, Toth S, Willis A, Heath JK, Smith AG. Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by alternative promoter usage. Cell 1990;62:1105-1114), 但也不完全排除; 具体的, 可以是正常小鼠胚胎成纤维细胞, 但也不排除新生或成体的成纤维细胞。更具体的, 可采用怀孕第 12 和 16 天的正常小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养细胞。例如, 可用怀孕第 12.5 天 129sv 胎鼠的正常成纤维细胞作为正常成纤维细胞的例子。可通过常规方法准备饲养细胞, 也可购买成品 (小鼠胚胎成纤维细胞, ATCC)。最好用没有经丝裂霉素 C、 γ -射线照射及类似方法处理失活的饲养细胞。另外最好用例如明胶、纤连蛋白、层粘连蛋白及类似基质 (但不排除其它的基质) 预先涂覆将用到的培养容器。

[0318] 3、培养基

[0319] 为产生、建立及培养绵羊 ES 细胞, 使用了一种完全无血清培养基。下面详细列出了所使用培养基的具体成分:

[0320] a) 建立绵羊 ES 细胞的培养基

[0321] 从胚泡到形成内细胞团步骤所用的培养基被称为“建立绵羊 ES 细胞的培养基”。这种培养基组成的一个例子如 Dattena M 等所述 (Dattena M, Mara L, Bin T AA, Cappai P. Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan. Mol Reprod Dev. 2007 Jan; 74(1):42-7)。

[0322] b) 培养绵羊 ES 细胞的培养基

[0323] 形成内细胞团后 (包括已建立的绵羊 ES 细胞的培养) 的培养过程中所用的培养基被称为“绵羊 ES 细胞的培养基”或此后的“N2B27+3i”。一个培养基组成的具体例子: 含有 5mM 力肽 (L-alanyl-glutamine, L-丙氨酰-谷氨酰胺) 或 2mM L-谷氨酰胺 (Invitrogen/Gibco) (表 II) 的 100mL DMEM/F12, 将 1mL 100x N2 补充物 (表 II: 25 μ g/mL 胰岛素、16 μ g/mL 腐胺、100 μ g/mL 转铁蛋白、30nM 亚硒酸钠、6ng/mL 孕酮、以及 50 μ g/mL 牛或人血清白蛋白, 均为终浓度) 加入 100mL (1:1v/v) 神经基质培养基 (Invitrogen/Gibco) (表 II), 2mL 50x B27 补充物 (表 II: 2mg/L L-丙氨酸、3.7mg/L L-谷氨酸、441mg/L L-谷氨酰胺、7.76mg/L L-脯氨酸、0.10mg/L 生物素、0.34mg/L 维生素 B12、0.02mg/L 肾上腺酮、0.0063mg/L 孕酮、0.1mg/L 维生素 A、0.1mg/L 醋酸视黄酯、4mg/L 胰岛素、0.002mg/L 三碘-L-甲腺原氨酸、25mg/L 丙酮酸钠、0.047mg/L 硫辛酸、1mg/L 维生素 E、1mg/mL D、

L- α -醋酸生育酚、2.5mg/L 过氧化氢酶、1mg/L 还原型谷胱甘肽、2.5mg/L 过氧化物歧化酶、2mg/L L-肉碱、1mg/L 乙醇胺、15mg/L D(+)-半乳糖、2600mg/L HEPES、16.1mg/L 腐胺、0.016mg/L 亚硒酸钠、0.194mg/L 硫酸锌、1mg/L 亚油酸、1mg/L 亚麻酸、2500mg/L 牛或人血清白蛋白以及 5mg/L 转铁蛋白，均为终浓度）、3 μ M CHIR99021、0.8 μ M PD184352、2 μ M SU5402[抗生素 - 杀真菌药溶液（可选）]。

[0324] 4、培养条件

[0325] 产生、建立和培养绵羊 ES 细胞时的温度为 35℃ -37.5℃，优选 37℃。在培养常规细胞的含 5% CO₂ 的湿度细胞培养箱中培养。

[0326] 5、建立绵羊 ES 细胞的方法

[0327] 下述是建立绵羊 ES 细胞方法的一个具体的例子：

[0328] a) 收集卵母细胞（胚泡阶段的胚胎）

[0329] 选取一个可收集卵母细胞的绵羊。采用 Dattena M 等描述的传统方法 (Dattena M, Mara L, Bin T AA, Cappai P. Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan. Mol Reprod Dev. 2007 Jan ;74(1):42-7) 收集卵母细胞，尽管也可采用其它收集卵母细胞的传统方法。具体的，自然交配绵羊，阴道栓检测后杀死用于收集卵母细胞的母绵羊以摘取子宫。向子宫中灌注合适的培养基以恢复受精的卵母细胞（胚胎）。从受精卵（胚胎）经桑椹胚发育或成熟到胚泡（处于胚泡阶段的胚胎），并由显微镜观察证实了发育进行到胚泡阶段。优选，发育进行到晚期胚泡阶段，具有可见的内细胞团。

[0330] b) 内细胞团的形成和分离

[0331] 显微观察证实了上述 5a) 中得到的胚泡，用酸性台式液 (pH 2.5)、透明质酸酶或链霉蛋白酶去除透明带。然后，将经丝裂霉素 C 处理过的饲养细胞接种在 0.1% 明胶 /PBS 预处理的细胞培养板中，将 5-10 个去除了透明带的绵羊胚泡转移到培养板中，采用前述的建立绵羊 ES 细胞的“N2B27+3i”培养基起始细胞培养。

[0332] 在第 1-8 天中，被移去透明带的绵羊胚泡（晚期）粘附于饲养细胞上。粘附 5-10 天后，用一个锥形的玻璃巴斯德移液管或类似器具机械解离源于胚泡的内细胞团。将约 5-20 个细胞组成的内细胞团碎片或聚集体转入类似的含有前述的建立绵羊 ES 细胞的“N2B27+3i”培养基的培养板。此时，不用胰蛋白酶 -EDTA 或类似的蛋白酶而用上述的机械方式解离内细胞团。

[0333] c) 绵羊 ES 细胞的建立

[0334] 在 0.1% 明胶 /PBS 预处理过的接种有饲养细胞的细胞培养板中，将按上述方式解离的内细胞团细胞培养在用于绵羊 ES 细胞的“N2B27+3i”培养基中。培养 4-10 天时出现 ES 细胞的原代克隆。通过显微观察证实了原代 ES 细胞克隆的出现，将观察到的 ES 细胞称为“原代 ES 细胞”。此后继续培养 5-10 天，可将原代 ES 细胞克隆进一步转移或传代。此处“可被传代的阶段”是指原代 ES 细胞克隆所形成的细胞已达约 200-600 个。当通过显微镜证实所述 ES 细胞克隆具有这种形态时，用锥形玻璃巴斯德移液管分离所述 ES 细胞克隆。将分离的 ES 细胞克隆转入含有培养绵羊 ES 细胞培养基的无菌中间培养容器中，优选在含有凋亡抑制剂的情况下用蛋白酶如胰蛋白酶 -EDTA 解离细胞至单细胞 (e. x., Y-27632; Watanabe K et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem

cells. Nature May 27 (2007)), 或通过机械方式将细胞解离为含有约 5-20 个细胞的细胞聚集体。解离的 ES 细胞克隆位于原代细胞之后 (是第 1 代细胞), 被培养在 0.1% 明胶 / PBS 预处理过的、接种有饲养细胞的、含有用于绵羊 ES 细胞的培养基的细胞培养板中。2-4 天后出现了一个 ES 细胞克隆, 自开始培养起约 5-10 天后此 ES 细胞克隆达到可被传代的阶段。此后的细胞传代均按前述方式操作。

[0335] 6、绵羊 ES 细胞的介绍

[0336] 期待所述绵羊 ES 细胞具有一些或所有下述 (a)-(m) 的特征, 其中许多已经通过实验证实:

[0337] (a) 所述 ES 细胞克隆是紧凑的, 近乎同源;

[0338] (b) 表达 Oct3/4、Sox2、Stella、Rex1、FGF4、和 Nanog 基因;

[0339] (c) 具有碱性磷酸酶活性;

[0340] (d) 能形成拟胚体;

[0341] (e) 差异表达 SSEA (阶段特异性胚胎抗原 Stage-Specific Embryonic Antigen)-1、-3 和 -4;

[0342] (f) 表达 TRA (肿瘤排斥抗原, Tumour Rejection Antigen)-1-60 和 -1-81;

[0343] (g) 与正常绵羊细胞具有相同数量的染色体;

[0344] (h) 可以被传代培养并维持未分化状态;

[0345] (i) 在体外具有多潜能状态;

[0346] (j) 具有分化为三胚层细胞系的潜能;

[0347] (k) 可在体外形成畸胎瘤;

[0348] (l) 可形成绵羊嵌合体; 以及

[0349] (m) 可形成绵羊种系。

[0350] 本发明首次提供具有前述 ES 细胞的 (a)-(m) 所有特征的绵羊 ES 细胞。可通过下述方法分析前述 (a)-(m) 的特征, 通过这些方法已建立的绵羊 ES 细胞保留其作为 ES 细胞的特征, 也即 ES 细胞维持未分化状态的特征。

[0351] 6.1) 形态学

[0352] 通过显微镜观察, 所得的绵羊 ES 细胞维持紧凑的、近乎同源的克隆。(图 15A-D)

[0353] 6.2) 未分化状态标记基因的表达

[0354] 通常未分化状态标记基因如 Oct3/4、Nanog、Stella、FGF4、Sox2 和 Rex-1 的表达与否可定性 ES 细胞。通过逆转录酶链反应 (RT-PCR) 检测未分化状态标记基因的表达来分析绵羊 ES 细胞 (表 I)。也检测了管家基因 β -Actin 以检测 cDNA 的完整性。根据说明书的描述, 采用买的试剂盒从样品中提取 mRNA, 通过 RT-PCR 合成 cDNA (TRIzol reagent and SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen)。简单来说, 在含有 4 μ L 5x 第一链缓冲液、1 μ L DTT (0.1M)、1 μ L dNTP's (10mM)、1 μ L 随意引物 (10 μ M)、1 μ L RNA 抑制剂、1 μ L Superscript III、7.5 μ L H₂O 和 3 μ L mRNA 样品的 20 μ L 反应体系中, 用 SuperScript III 将利用 TRIzol 提取的 mRNA 转化为 cDNA。同时也准备了一个不含 Superscript III 的相应阴性对照, 以判断是否有基因组污染。反应在热循环仪 (Perkin Elmer) 中进行, 反应的循环参数如下: 50°C 反应 60 分钟, 然后 70°C 反应 15 分钟。然后用所得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 以未分化状态标记基因的引物为引物 (表 I)。

采用标准的 25 μ L PCR 反应体积,其中含有 2.5 μ L 10x PCR 缓冲液、1.5 μ L $MgCl_2$ (25mM)、0.5 μ L dNTPs (10mM)、1 μ L 正向引物 (10 μ M), 1 μ L 反向引物 (10 μ M), 0.2 μ L 重组 Taq DNA 聚合酶, 17.3 μ L H_2O 和 1 μ L 反应模板。然后通过下述参数进行反应: 94°C 加热 5 分钟, 35 个循环 (94°C, 45 秒; 55°C, 45 秒; 72°C, 45 秒), 然后 72°C 加热 5 分钟。通过小体积的上述反应扩增、2.5% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色、并在紫外灯下拍照检测到了 Oct3/4、Nanog 和 Sox2 的表达 (图 16)。

[0355] 6.3) 碱性磷酸酶活性

[0356] 已发现未分化的绵羊 ES 细胞大量表达碱性磷酸酶。可用多种能买到的碱性磷酸酶检测试剂盒很容易地确定碱性磷酸酶的表达。在本实施例中用了 ALP 组织染色试剂盒 (Sigma), 参照其所附的说明书进行操作。(图 15B)。

[0357] 6.4) 形成拟胚体的能力

[0358] 通过未涂覆、无饲养细胞的培养板中培养 ES 细胞和 / 或聚集体以形成拟胚体。通过显微观察证实了拟胚体的形成, 因为将绵羊 ES 细胞培养在含有针对绵羊 ES 细胞然而无 3 μ M CHIR99021、0.8 μ M PD184352、2 μ M SU5402 (‘3i’) 的培养基、未涂覆的培养板中约 2-14 天后, 细胞聚集体形成了规则或不规则的球样小体 (图 15E 和 15F)。

[0359] 6.5) 细胞核或细胞表面抗原的表达

[0360] 识别未分化状态干细胞包括 ES 细胞的一种方法是检测核 Oct3/4 和 Nanog、以及细胞表面抗原 (SSEA (阶段特异性胚胎抗原) -1、-3、-4; TRA (肿瘤排斥抗原) -1-60, -1-81) 的表达, 这些抗原的表达量随细胞分化而发生特异变化。根据 ES 细胞识别试剂盒 (Millipore) 的操作说明书, 用此试剂盒对细胞进行免疫染色来检测这些细胞表面标记的表达 (未显示结果)。

[0361] 6.5) 染色体数

[0362] 一般来说, 可通过 G 显带分析染色体个数法 (e. x., Sumner, A. T., Cancer Genet Cytogenet. 6:59-87 (1982)) 证实绵羊二倍体细胞的染色体个数, 已建立的绵羊 ES 细胞是具有亲本绵羊染色体数 ($2n = 54$) 的正常 ES 细胞。

[0363] 6.6) 维持未分化状态

[0364] 已建立的 ES 细胞可被次培养而维持未分化状态, 特别地, 它可被继培养直至传代至少 30 次。可通过前述传代绵羊 ES 细胞的方法传代细胞 (前述的 3)、及确定前面 (6) 所述绵羊 ES 细胞的特征证实其是否维持未分化状态。

[0365] 6.7) 多潜能性

[0366] 在没有饲养细胞的条件下培养, ES 细胞本能地分化为多种细胞直至形成拟胚体。可通过前述 6.4) 中的方法形成拟胚体, 然后将拟胚体转入涂覆有明胶的培养板中培养约 7-14 天来观察 ES 细胞的这种特性。可通过分析每一个细胞的形态证实出现了神经元样、脂肪样、表皮样或类似的细胞。

[0367] 6.8) 在含血清的培养基中的体外分化

[0368] 此外, 所述的 ES 细胞在含有 20% 血清的培养基中发生分化。优选的, 所述绵羊 ES 细胞在含有 2-20% 血清的培养基中发生分化。可通过碱性磷酸酶活性的丧失、ES 细胞未分化状态标记基因如 Oct3/4、Nanog 及类似基因 (前述 6(a)-(f)) 表达的丧失证实绵羊 ES 细胞的体外分化。

[0369] 6.9) 分化为三胚层种系的潜能

[0370] ES 细胞具有分化为三胚层细胞系（内胚层、中胚层、外胚层）的潜能。可通过从拟胚体（前述 6.4）中提取 RNA，然后进行 RT-PCR 分析外胚层细胞（如神经元）、中胚层细胞（如心肌细胞）和内胚层细胞（如肝细胞）的每个标记基因的表达证实 ES 细胞的这一特性。

[0371] 6.10) 形成畸胎瘤的能力

[0372] 将 ES 细胞移植入同源或先天免疫缺陷的杂合动物中可导致形成畸胎瘤。畸胎瘤是混合肿瘤的代名词，在畸胎瘤中源于三胚层—内胚层、中胚层和外胚层的多种组织随意分布在肿瘤中。可将绵羊 ES 细胞移植到同源动物、或具有先天免疫缺陷的杂合动物的真皮下及类似地方，几个月后肉眼可见长出一球根状物质来证实畸胎瘤的形成。可通过将畸胎瘤取出、切片、用苏木精 / 曙红染色、然后在显微镜下观察组织和细胞的形态证实形成的畸胎瘤具有三胚层细胞的结构。

[0373] 6.11) 产生嵌合绵羊的能力

[0374] 可通过将 ES 细胞引入同源或异源绵羊中产生嵌合绵羊。例如可通过下述方法产生嵌合绵羊。为帮助证实嵌合绵羊的产生，可预先向绵羊 ES 细胞中引入一个标记基因（如 GFP、X-gal、荧光素酶等）。具体地，通过电穿孔或类似方法将含有这种标记基因的载体整合入绵羊 ES 细胞的染色体中，然后在含有某种药的培养基中筛选，以得到在染色体中含有这种标记基因的重组绵羊 ES 细胞。例如，可通过显微操作将所述重组绵羊 ES 细胞移植入绵羊胚胎的囊胚腔、桑椹胚、或 16 细胞期胚胎中，然后与内细胞团一起、或作为内细胞团的一部分发育（microinjection method: Gordon J. W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77:7380-7384(1980)）。任选地，将两个 8 细胞胚胎的透明带去除，然后将其与前述的重组绵羊 ES 细胞一起培养直至形成聚集体。培养所述聚集体即可得到胚泡（cell aggregate method: Dvorak P. et al., Int. J. Dev. Biol., 39:645-652(1995)）。使一只输精管结扎的公绵羊与一母绵羊自然交配，然后将上述得到的胚胎（也就是即将移植的卵）移植到此假怀孕的母绵羊的子宫中，即可得到一嵌合绵羊。

[0375] 例如，可通过利用从嵌合绵羊不同组织中提取的基因组 DNA 作为模板、标记基因（引入 ES 细胞的标记基因）特异的引物进行基因组 PCR，来证实所得的嵌合绵羊具有源于 ES 细胞的细胞和组织、或者已建立的大鼠 ES 细胞具有产生嵌合绵羊的能力。此外，例如可通过将嵌合绵羊的每种组织切片、然后基于采用的标记蛋白的特性来检测标记基因表达产物（标记蛋白）的存在与否，进而证实 ES 细胞分化成每种组织的细胞。

[0376] 表 I. 绵羊引物序列

[0377]

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	预期产物大小 (碱基对)
β-肌动蛋白	ggcaccagcacaatgaaga	cgactgctgtcaccttcaccg	340
Oct4	agtgagaggcaacctggagag	gacagacaccgagggaaagac	331
Sox2	catccacagcaaatgacagc	tttctgcaaagctectaccg	251
NANOG	agccccagagtgaaccactgtc	gtgttctcacagaccagctg	164

[0378] 表 11.

[0379]

Type 种类	DMEMF12	Neurobasal 神经基质	N2	B27
浓度 (Concentration)	1x	1x	1x	1x
组分浓度 (Constituent concentration)	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
无机盐、金属 (INORGANIC SALTS, METALS)				
CaCl ₂ (无水)	116.6	200.0		

[0380]

胆矾 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.0013			
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (三价铁)	0.05	0.1		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.417			
KCl	311.8	400		
MgCl_2 (无水)	28.64	77.3		
MgSO_4 (无水)	48.84			
NaCl	6995.5	3000		
NaHCO_3	2438	2200		
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	62.5	125		
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	71.02			
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.432			
其它成分				
D-(+)-Galactose D-(+)-半乳糖				15
D-(+)-Glucose (Dextrose) D-(+)-葡萄糖 (右旋糖)	3151	4500		
酚红 (Phenol Red)	8.1	8.1		
HEPES		2600		2600
次黄嘌呤钠 (Hypoxanthine.Na)	2.39			
亚麻酸 (Linolenic acid)				1
亚油酸 (Linoleic acid)	0.042			1
硫辛酸 (Lipoic acid)	0.105			0.047
腐胺钠.2HCl (Sodium Putrescine.2HCl)	0.081		16.11	16.11
亚硒酸钠 ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$)			0.0052	0.016
丙酮酸钠 (Sodium Pyruvate)	55			25
氨基酸 (AMINO ACIDS)				
L-丙氨酸 (L-Alanine)	4.45			2
丙谷二肽 (L-丙氨酰-谷氨酰胺) (L-alanyl-L-glutamine)	542			
L-精氨酸.HCl (L-Arginine.HCl)	147.5			
L-天冬酰胺. H_2O (L-Asparagine. H_2O)	7.5			
L-天冬氨酸 (L-Aspartic acid)	6.65			
L-半胱氨酸. H_2O (L-Cysteine. H_2O)	17.56			
L-胱氨酸.2HCl (L-Cystine.2HCl)	31.29			
L-谷氨酸 (L-Glutamic acid)	7.35			3.7

[0381]

L-谷氨酰胺 (L-Glutamine)				441
L-甘氨酸 (L-Glycine)	18.75			
L-组氨酸.HCl.H ₂ O (L-Histidine.HCl.H ₂ O)	31.48			
L-异亮氨酸 (L-Isoleucine)	54.47			
L-亮氨酸 (L-Leucine)	59.05			
L-赖氨酸.HCl (L-Lysine.HCl)	91.25			
L-蛋氨酸 (L-Methionine)	17.24			
L-苯丙氨酸 (L-Phenylalanine)	35.48			
L-脯氨酸 (L-Proline)	17.25			7.76
L-丝氨酸 (L-Serine)	26.25			
L-苏氨酸 (L-Threonine)	53.45			
L-色氨酸 (L-Tryptophan)	9.02			
L-酪氨酸.2Na.2H ₂ O (L-Tyrosine.2Na.2H ₂ O)	55.79			
L-缬氨酸 (L-Valine)	52.85			
维生素 (VITAMINS)				
D,L-α-生育酚 (Vit E) (D,L-α-tocopherol (Vit E))				1
D,L-α-醋酸生育酚(Vit E) (D,L-α-tocopherol acetate (Vit E))				1
生物素(Vit B27/H) (Biotin (Vit B27/H))	0.0035			0.1
L-肉碱.HCl (Vit Bt) (L-Carnitine.HCl (Vit Bt))				2
D-泛酸钙(Vit B5) (D-Ca panthenate (Vit B5))	2.24	4		
叶酸(Vit M) (Folic acid (Vit M))	2.65	4		
肌醇(Vit Bh) ((myo) i-Inositol (Vit Bh))	12.6	7.2		
烟酰胺 (Vit B3) (Niacinamide (Vit B3))	2.02	4		
维生素B6.HCl (Vit B6) (Pyridoxine.HCl (Vit B6))	2.031	4		
全反式视黄醇 (all trans Retinol)				0.1

[0382]

维生素A(Retinol, Vit A) (Retinyl acetate (Retinol, Vit A))				0.1
维生素B2(Vit B2) (Riboflavine (Vit B2))	0.219	0.4		
硫胺.HCl (Vit B1) (Thiamine.HCl (Vit B1))	2.17	4		
脱氧胸腺嘧啶核苷 (Thymidine (deoxy ribonucleoside))	0.365			
维生素B12 (Vitamin B12 (Cobalamin))	0.68	0.34		0.34
蛋白质				
白蛋白 (人或牛血清) (Albumin)			50	2500
可的松 (Cortisone)				0.02
胰岛素 (全长) (Insulin (Full Chain))			5, 25	4
转铁蛋白 (Transferrin)			100	5
孕酮 (Progesterone)			0.0063	0.0063
T3 (三碘甲状腺氨酸) (T3 (Triiodothyronine))				0.002
其它				
过氧化氢酶 (Catalase)				2.5
氯化胆碱 (Choline chloride)	8.98	4		
氨基乙醇.HCl (Ethanolamine.HCl)				1
L-谷胱甘肽 (还原型) (L-Glutathione (reduced))				1
过氧化物歧化酶 (SOD) (Superoxide dismutase)				2.5
pH值	7.0 - 7.4	ND	ND	ND
渗透压(mOsm/kg H₂O) (Osmolarity)	290 - 330	ND	ND	ND

[0383] 实施例 6

[0384] 牛多潜能细胞的获得和定性

[0385] 目的 : 评定 3i 培养基分选牛 ES 细胞及维持牛 ES 细胞系的作用。

[0386] 材料与amp;方法

[0387] 实验设计

[0388] 为评定 ES 细胞的分选,将体外产生的第 7 或 8 天的胚胎 ($n = 105$) 随意分成四组:

[0389] 1. 对照组 (N2B27)

[0390] 2. 3i 培养基 (有 hLIF)

[0391] 3. 3i 培养基 (没有 hLIF)

[0392] 4. 完全 Millipore-Chemicon ESGRO 培养基

[0393] 将假定的 ES 细胞传代以扩增,然后收集样品并分析其基因表达。培养 30 天后,评估 ES 细胞培养物和所做的处理,终止那些没有产生 ES 细胞系的处理。进一步培养 ES 细胞 60 天,总共培养 90 天。利用每一种处理中形成胚胎扩展物并被传代 1、3 和 6 次的胚胎的比例来比较各种处理。也在形态和多潜能基因 (如 oct4、rex、sox2、ssea1、碱性磷酸酶、nanog) 表达上比较经不同处理的牛 ES 细胞。除 Nanog 外,所有引物均在培养的牛 ES 细胞中得到了扩增带,至今仅在胚胎中得到过 Nanog 的扩增带。

[0394] 为评估对已建立牛 ES 细胞系的维持作用,用 ES 细胞分选实验中同样的条件 (如上述的第 1-4 培养条件) 处理已建立的细胞系 ($n = 3$)。将这些已建立的细胞系传代 6 次 (~ 60 天)。利用形态和多潜能基因 (如 oct4、rex1、nanog、ssea1) 的表达比较经不同培养处理的已建立的牛 ES 细胞系。

[0395] 胚胎的体外产物

[0396] 连续 4 周,每周收集一次卵母细胞以在体外产生胚胎。在屠宰场的牛卵巢中收集卵丘复合体 (Cumulus-oocyte-complexes, COCs),用前述方法在体外产生牛胚胎 (1, 2)。简单来说,将从卵巢中收集的 COCs 在含有 β -雌二醇、黄体生成素和胎牛血清的 TCM-199 培养基中培养 24 小时以引发卵母细胞成熟。推测具有延伸丘群的 COCs 含有成熟的卵母细胞,将其与牛精子在含有肝磷脂、青霉素、肾上腺素和氨乙基亚磺酸的 IVF-TALP 培养基中共培养 24 小时。将假定的受精卵在含有必需和非必需氨基酸、无水柠檬酸三钠、肌醇和牛血清白蛋白的 SOF 培养基 (3) 中培养 6-7 天。将受精卵培养在 39°C 、含有 5% CO_2 的潮湿空气中;将胚胎培养在 39°C 、含有 5% CO_2 /5% O_2 /90% N_2 的潮湿气体中。在所有的胚胎中,一些胚胎 ($n = 15$) 用于定性 (用作 RT-PCR 的阳性对照),剩余的 ($n = 105$) 则用于 ES 细胞的分选。

[0397] ES 细胞的分选和培养

[0398] 通过机械方式去除胚胎的透明带,将所述胚胎接种到经丝裂霉素失活处理过的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 饲养层上。在研究过程中用了不同批次的 MEF 饲养细胞,但每一批次都经过了所有的处理。将在 MEFs 上的接种的胚胎培养在含有血清、非必需氨基酸和生长因子 (人 LIF、 β FGF、EGF) 的复合培养基 (α -MEM) 中,且放置在 39°C 、含有 5% CO_2 的潮湿空气中。7-9 天后,胚胎形成含有假定的牛 ES 细胞的胚胎扩展物,将这些假定的牛 ES 细胞从原代培养物 (第 0 代) 中切下并接种到新鲜的饲养层上 (第 1 代)。当假定的 ES 细胞增殖后 (约 6-26 天),将它们传代到新鲜的饲养层上。传代时,将假定的 ES 细胞样品放在细胞溶解液 (500 μl 细胞溶解液:458.5 μl DEPC 水、25 μl 0.1M DTT、4 μl IPEGAL 和 12.5 μl RNA 抑制剂) 中,保存在 -80°C 用于随后的多潜能基因转录物的分析。在培养过程中每 2-3 天换一次培养基。用 P_x 表示此研究中分选的细胞的代数,其中 x 是本研究中的细胞代数。

[0399] 用四种不同的培养基处理已建立的牛 ES 细胞系 (BES-1:P₁₉, 183 天 ;BES-3:P₁₈, 206 天 ;BES-4:P₂₃, 210 天)。按照上述方式培养这些已建立的细胞系。用 P_{x+y} 表示已建立的细胞系在用于本研究后的代数, 其中 x 指用于本研究之前的代数, y 指在本研究中的代数。

[0400] 基因表达的 RT-PCR 分析

[0401] 用逆转录酶链反应 (RT-PCR) 分析源于最近分选的或已建立的牛 ES 细胞系的胚胎 (阳性对照) 和假定的牛 ES 细胞中多潜能基因 oct4、rex1、sox2、ssea1、碱性磷酸酶 (AP) 和 nanog 的表达。用管家基因 β -肌动蛋白检测 cDNA 的质量。用买的试剂盒从样品中提取 mRNA (Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit, Invitrogen)。按照厂家建议的标准说明书提取 mRNA。简单来说, 通过逆转录酶将 mRNA 转化为 cDNA。采用 20 μ l 反应体系: 4 μ l 5X 第一链缓冲液、1 μ l DTT (0.1M)、1 μ l dNTP 混合物 (10mM)、1 μ l 随意引物 (10 μ M)、1 μ l RNA 抑制剂、1 μ l Superscript III、7.5 μ l H₂O 和 3 μ l 样品。也准备了一个不含 Superscript III 的相应阴性对照以检测基因组污染。所有试剂都买自 Invitrogen。将配制好的反应溶液置于 Mycycler 热循环仪 (Bio-rad) 中, 反应参数如下: 50°C 60 分钟, 和 70°C 15 分钟。用 β -肌动蛋白引物通过 PCR 检测 cDNA 的质量。经检测合格的 cDNA 被用于 PCR 反应, 采用多潜能标记基因的引物。采用标准的 25 μ l PCR 体系: 2.5 μ l 10X PCR 缓冲液、1.5 μ l MgCl₂ (25mM)、0.5 μ l dNTP 混合物 (10mM)、1 μ l 正向引物 (10 μ M)、1 μ l 反向引物 (10 μ M)、0.2 μ l Taq DNA 聚合酶 (重组的)、17.3 μ l H₂O 和 1 μ l 样品。所有试剂均从 Fisher Biotec 购买。将配制好的反应溶液置于 Mycycler 热循环仪 (Bio-rad) 中, 反应参数如下: 94°C 5 分钟, 35 个循环 (94°C 45 秒, 55°C 45 秒和 72°C 45 秒)、72°C 5 分钟。

[0402] 已通过测序证实了 OCT4 和 Rex1 的 PCR 产物。SSEA1、Sox2、碱性磷酸酶和 Nanog 的 PCR 产物还没有测序, 但产物的大小与靶基因的大小相同。

[0403] 本研究采用的引物如下:

[0404]

标记基因	正向引物 (Primer F)	反向引物 (Primer R)	大小
β -肌动蛋白	ggcaccagcacaatgaaga	cgactgctgtcaccttcaccg	340
Oct4	agtgaaggcaacctggagag	gacagacaccgagggaagac	331
Rex1	gcagaatgtgggaaagcct	gactgaataaacttcttgc	220
SSEA1	gagtcaatacgtgaccgtggac	ctgaagtagccgcgatagacag	330
SOX2	catccacagcaaatgacagc	tttctgcaaagtcctaccg	251
NANOG	tgtgetcaatgacagatttcag	tagaagcctgggtattctgc	210
AP	ggaccaggaaccaaagtc	gaatgaggagtgagcaaacc	378

[0405] 体外分化

[0406] 将从牛 ES 细胞克隆中切下的外植体置于促进随意分化的条件 (如低粘附培养容

器,无饲养层,无 LIF,无生长因子)中,在 39℃培养在含有 5% CO₂的潮湿空气中。培养过程中每 3-4 天更换一次培养基。

[0407] 数据分析

[0408] 采用算术平均值 ± 平均值的标准方差 (S. E. M.) 报告连续的数据 (以培养的天数计)。这些数据很有限,因此没有进行统计分析。通过相依表的卡方检验分析了分组数据 (4、5)。基于零假设,如果数据集显示有显著差异 (如 $p \leq 0.05$),则用标准化残差和百分偏差确定哪些卡方频率与预期频率差异最大 (5)。认为这些差异是观察结果和经过的处理之间的正相关或负相关。

[0409] 结论

[0410] 培养基中的生长

[0411] 牛 ES 细胞的分选和传代

[0412] 经不同处理之间形成胚胎扩展物的胚胎比例差异很大 ($\chi^2_3 = 12.49, p = 0.0059$),第 2-4 号培养基培养的胚胎中,80%或更多形成了扩展培养物 (图 17)。扩展培养物的百分比和对照组之间有负相关,因此用对照培养基时很少有胚胎形成。在不同处理之间被传代的胚胎扩展物的比率差异很大 ($\chi^2_3 = 9.96, p = 0.0189$),在含有 SCS1 或 SCS2 的培养基培养的胚胎中,65%或更多被传代了 (图 17)。被传代的百分比和第 2 号培养基 (3i 外加 hLIF) 之间有正相关,被传代的百分比和对照组之间有负相关。不同处理组之间位于第 3 代 ($\chi^2_3 = 12.02, p = 0.0073$) 和第 6 代 ($\chi^2_3 = 13.81, p = 0.0032$) 的牛 ES 细胞系的比例差异显著 (图 18)。用第 2 号和第 3 号培养基 (3i 含或不含 hLIF) 培养的胚胎中超过 60%的胚胎被传到第 3 代,且第 3 代的细胞系百分比与对照组之间有负相关。用第 2 号和第 3 号培养基培养的胚胎中超过 40%的胚胎被传到第 6 代,且第 6 代的细胞系百分比与第 2 和第 3 培养基组之间有正相关,第 6 代的细胞系百分比与第 4 培养基组和对照组之间有负相关。在分选第 0 代时,用这四种培养基中的任一种培养,ES 细胞克隆均以相似速率增殖 (图 3)。培养 50 天后,用第 2 号 (52.8 ± 0.56 天) 或第 3 号 (54.0 ± 1.13 天) 培养基分选的所有细胞系均被传到第 6 代甚至更多,然而用对照培养基 ($n = 2$) 或第 4 号培养基 ($n = 3$) 分选的某些细胞系尚没被传到第 6 代 (如还处于第 5 代)。

[0413] 已建立的牛 ES 细胞系的培养

[0414] 用未被完全失活的 MEF 饲养层延缓已建立的牛 ES 细胞系 BES-1 的生长 (见结果部分:培养中的一般形态学)。仅将此细胞系在培养基中处理了 3 代,尚未分析数据,但是检测了源于 BES-1 的外植体在经培养处理后的体外分化潜能 (见下)。将另外两种已建立的牛 ES 细胞系 BES-3 和 BES-4 分别用四种培养基培养了 8 代。不同细胞系或不同处理之间的外植体存活、支持的代数、或传完第 8 代时在培养基中的天数没有明显差异 (表 3)。在用第 1-4 号培养基中的每一种培养时,源于已建立的牛 ES 细胞系的 ES 细胞克隆以相似的速率增殖 (图 20)。

[0415] 表 3:用第 1-4 号培养基培养时,已建立的牛 ES 细胞系 BES-3 和 BES-4 的外植体存活、所传的代数、和传完第 8 代时在培养基中的天数的比较。

[0416]

	BES-3				BES-4			
培养基	1	2	3	4	1	2	3	4
外植体存活	36/37	23/23	12/12	13/13	25/27	31/31	31/31	18/18
所传的代数	8	8	8	8	8	8	8	8
传完第 8 代时在培养基中的天数	74	80	80	80	81	76	76	76

[0417] 培养中的一般形态学

[0418] 新分选的牛 ES 细胞和源于已建立细胞系的细胞的克隆形态上没有明显差异。对照培养基培养的牛 ES 细胞形状上成为椭圆形,具有波浪形边界(图 21a, 21b, 22a)。大部分克隆是扁平的(例如是二维的),具有少量垂直波浪形边界。推定的干细胞主要集中在克隆的中心区域,克隆的周边没有明显的 ES 细胞。在某些区域,ES 细胞和饲养层之间聚集了一些液体,这些液体将 ES 细胞层浮起形成圆屋顶状和球形结构。用第 2 号培养基(外加 hLIF 的 3i)(图 21c、21d、22b)或第 3 号培养基(不含 hLIF 的 3i)(图 21e、21f、22c)培养的 ES 细胞克隆变为椭圆形,具有很清晰的波浪形边界。与对照培养基培养的克隆相比,这些克隆在形态上更三维化,具有一个密集的中心区域,从中心向外发散有很多垂直的波浪线。某些克隆下面已聚积有液体所以它们表面弯曲如球的外侧。这些克隆从中心向外发散有密集的、凸起的线状结构。推定的 ES 细胞集中在这些线状结构的基部,并在此处浮起。假定 ES 细胞较不密集的区域离这些线状结构较远,大部分离克隆的中心较近,一些位于克隆的边缘。培养 10 多天后,在凸起的线状结构附近形成了球形的、充满液体的、类似拟胚体的结构。与对照培养基培养的克隆类似,用第 4 号培养基培养的 ES 细胞克隆形状不规则,具有清晰的波浪状边界(图 21g、21h、22d)。这些克隆是三维的,克隆中细胞密集区域形成无规则模式的纤维性波浪网。在某些区域,ES 细胞和饲养层之间聚积有液体,形成圆屋顶形和球形结构。虽然克隆中的细胞是弥漫性、斑片状的,克隆的中心细胞密集且凸起。单个细胞很清晰,假定的 ES 细胞呈斑片状遍布整个克隆,但靠近克隆边缘处不明显。尽管不同的处理导致了克隆形态的不同,它们似乎不能改变假定的 ES 细胞的形态(图 23、24)。

[0419] 对照培养基中一些批次的 MEF 饲养层具有通常形态,它们在容器上形成均一层,在本代过程中保持相对稳定。当用第 2-4 号培养基中的任一种培养时,在培养到本代的第三天时,饲养细胞开始变圆并脱离饲养层,用第 4 号培养基时这种反应更明显。对照培养基其它批次的 MEF 饲养层表现不典型,饲养层中出现云状区域,似乎细胞持续生长。当培养到本代的大约第 12 天时,这些 MEF 饲养层从培养容器剥离。当用第 2 或 3 号培养基时,这些批次的 MEFs 看起来很健康,具有用对照培养基时同样的通常饲养细胞形态。当用第 4 号培养基时,在培养到本代的第 6-8 天时,这些批次 MEF 的饲养细胞变圆并脱离饲养层。

[0420] 传代过程中的表型和特性

[0421] 可用 29G 的针头通过机械方式较容易地从对照培养基培养的克隆中切除牛 ES 细胞的薄片(外植体)。在机械传代过程中整个牛 ES 细胞克隆很少移动。切除外植体后,ES 细胞克隆看起来象是长在 MEF 饲养层上的单细胞层。用第 2 或第 3 号培养基培养的 ES 细胞克隆的外植体较难切除,因为这样的 ES 细胞克隆好像更密集、更多孔而有弹性且更柔软。

当用针头刺穿细胞薄片时克隆的大部分发生位移。一般来讲,用第 2 或第 3 号培养基培养的外植体比用对照培养基培养的外植体在传代时更易粘附于新鲜的 MEF 饲养层上。在传代时,与用第 2 号或第 3 号培养基培养的克隆类似,用第 4 号培养基培养的 ES 细胞克隆移动很明显。用第 4 号培养基培养的克隆中心处的推定的牛 ES 细胞传代时很容易碎,易分散为较小的细胞团,这使得较难切除外植体进行传代。第 4 号培养基中的外植体看起来有折射力。

[0422] 多潜能基因的表达

[0423] 利用上述四种培养基中任一种分选的牛 ES 细胞一般都频繁表达 Oct4,当 oct4 基因不表达时,其它基因均不表达(图 25 和 26)。利用上述四种培养基中任一种分选的牛 ES 细胞也经常表达 Rex1 和 ssea1 基因,而且经常同时表达。有时,仅表达 rex1 而不表达 ssea1(图 25 和 26:未显示对照培养基和第 3 号培养基),但从来没有仅表达 ssea1 而不表达 rex1。Sox2 和 AP 较少表达,即使表达也一般与 oct4、rex1 和 ssea1 一起被表达。利用上述四种培养基中任一种分选的牛 ES 细胞均表达 Sox2 和 AP,但在较早的代数和用 3i 培养基(第 2 或第 3 号培养基)分选的牛 ES 细胞中的表达更常见。Nanog 很少被表达,在两种条件(图 26:对照培养基和第 3 号培养基 3)下,它均与 oct4、rex1 和 ssea1 一起被表达。在所分析的细胞群中,唯一表达所有六种多潜能基因的的细胞群是用第 3 号培养基(无 hLIF 的 3i)分选的第 1 代牛 ES 细胞(图 26)。

[0424] 用上述四种培养基中任一种培养的源于已建立的 ES 细胞系的牛 ES 细胞中的基因表达有两方面的区别(图 27)。首先,不表达 oct4 时,表达了 rex1 和 ssea1;其次,最经常表达的基因是 rex1 和 ssea1,而非 oct4。用第 2-4 号培养基将已建立的细胞系培养几代后,其中有更多基因被表达,包括 oct4,尽管 oct4 在较早代数的细胞中没被表达。

[0425] 体外分化能力

[0426] 当被转入促进体外分化的条件中时,从用第 2 号或第 3 号培养基培养的已建立细胞系(BES-1)上切下的外植体在 3 天内形成了充满液体的球形结构,且细胞聚集成通常拟胚体(EBs)(图 28a、28b)。这些 Ebs 在形态上与从对照培养基培养的那些克隆切下的外植体相似。第 2 号培养基培养的一个外植体已粘附到培养板上。从第 4 号培养基培养的克隆上切下的外植体在 3 天内粘附到培养板上。由于它们具有大量从主细胞体伸出的长突,单个细胞也粘附到了细胞培养容器上并开始分化(图 28c、28d)。一个外植体已形成具有粘附泡的细胞聚集体。在培养 10 天后,源于 BES-1 的 EB 培养物被细菌感染,随即被丢弃。当将源于本研究分离的克隆的外植体置于促进体外分化的条件中时,它们也形成了 Ebs 和粘附克隆。

[0427] 讨论

[0428] 显微观察和传代时的特性表明,不同培养基诱导不同的克隆形态、细胞发生联系并粘附与饲养层上。对照培养基培养的牛 ES 细胞克隆在机械传代时几乎不移动,表明牛 ES 细胞粘附于饲养层或培养容器上。与人或小鼠 ES 细胞克隆不同,牛 ES 细胞克隆长在饲养层上部。用 3i 培养基培养的牛 ES 细胞克隆显得密集、多孔而有弹性且柔软,这表明这些克隆可能含有多层细胞。用第 2-4 号培养基培养的牛 ES 细胞克隆在机械传代时移动显著,表明这些细胞与 MEFs 或培养容器几乎没有连接。这并不奇怪,因为这三种培养基对 MEF 饲养细胞有副作用,使它们变圆并从饲养层脱离。第 4 号培养基培养的克隆中的推定的牛 ES 细

胞区域的单个细胞很明显,可能表明细胞间联系更少。虽然不同培养基培养的克隆形态差异很大,相比较来说,细胞间形态差异较不明显。新分选的牛 ES 细胞和已建立的细胞系形成的克隆传代时的形态和特性相似。

[0429] 在分选牛 ES 细胞时 3i 培养基(即第 2 号和第 3 号培养基)更有效,因为更多胚胎形成了胚胎扩展物并被传至第 1 代。这两种培养基对牛 ES 细胞的增殖和维持也更好,因为有更多细胞传至第 3 代和第 6 代。本研究结束时,3i 培养基(第 2 号和第 3 号培养基)培养的所有细胞均被传至第 6 代或以后,而第 4 号和对照培养基培养的一些细胞系在第 5 代时即发生变化。这表明牛 ES 细胞在 3i 培养基中生长和发育得更快。在本研究中,对照培养基在对牛 ES 细胞的分选及随后的维持中效率最低,因为在其中很少有胚胎形成扩展物并被传代,也很少有细胞达到第 3 代和第 6 代(根据所有分析的参数判断)。

[0430] 本研究中用到的一些 MEF 饲养层有问题,它们持续生长,可能没有完全被丝裂霉素 C 失活。这可能选择性的对对照组不利,因为第 2-4 号培养基似乎对 MEF 饲养层有害并减慢任何未失活饲养细胞的生长,而对照培养基对这些饲养细胞的生长没影响。然而,本研究中四组培养基均使用同一批次的 MEF 饲养细胞,因此不同处理之间的比较还是有效的。已建立的牛 ES 细胞系在四种培养基中的生长和发育差异不明显。

[0431] OCT4、Rex1 和 SSEA1 是牛 ES 细胞中较强且活跃的多潜能标记,在最近分选的 ES 细胞和已建立的牛 ES 细胞系中也是如此。牛 ES 细胞通常都表达 Oct4、Rex1 和 ssea1,本研究中,在上述三个基因不表达时,其它多潜能基因均不表达。在新分选的牛 ES 细胞中,rex1 和 ssea1 的表达依赖与 oct4 的表达,ssea1 的表达依赖于 rex1 的表达。这三种基因的表达与使用的培养基无关。其它多潜能基因的表达则是零星无规律的、且与培养基有关,用 3i 培养基培养可诱导其它多潜能基因的表达。本研究中,较早代数的已建立的牛 ES 细胞系中很少表达 oct4,却表达 rex1 和 ssea1。有趣的是,尽管已建立的 ES 细胞系在早期时不表达 oct4,但在第 2-4 号培养基中培养后却开始表达 oct4。这表明与新分选的 ES 细胞相似,第 2-4 号培养基诱导其它多潜能基因的表达。本研究中使用的 OCT4 引物在胚胎和体内胚胎中产生了一条清晰的扩增带,但在体外分选的 ES 细胞中却产生了两条带。测序了较小的那条带证实其是 OCT4,而另一条较大的条带并不是基因组 DNA,因为阴性对照组中没有显示此条带。我们的体外培养体系可能诱导产生了一个 oct4 的假基因或其异构体的表达,为证实这一点,我们对第二条带进行了测序。

[0432] 用第 2 或第 3 号培养基(3i 培养基)培养的牛 ES 细胞没有显著差异,仅当第 2 号培养基中含有 hLIF 时才稍有变化。这表明 hLIF 对牛 ES 细胞有少量其它效应。

[0433] 结论

[0434] 在测试的四种培养基中,两种 3i 培养基对分选的牛 ES 细胞最有效。在这两种培养基中牛 ES 细胞的生长和发育以及多潜能基因的表达都更好。此外,用 3i 培养基分选的牛 ES 细胞表现出体外分化潜能。在已建立的牛 ES 细胞系中没看到如此显著的生长和发育差异。然而,在 3i 培养基中培养后有更多的多潜能基因被表达,因此这些培养基似乎增强牛 ES 细胞系的多潜能成分。

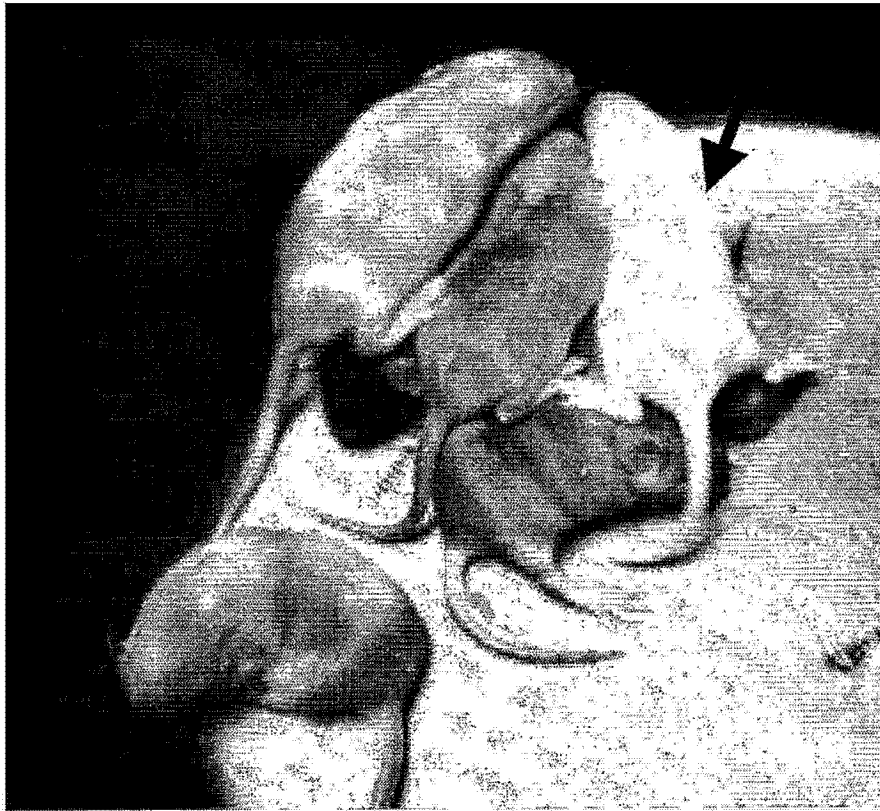


图1. a

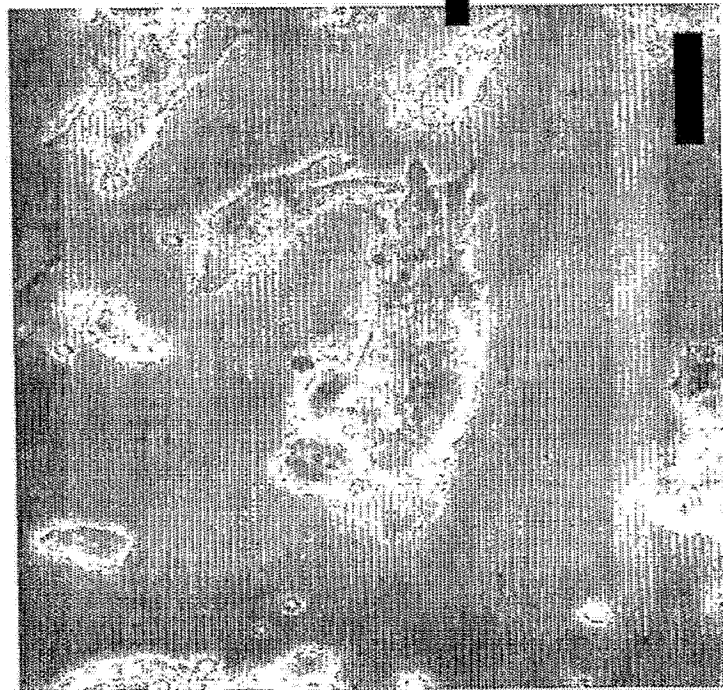


图1. b

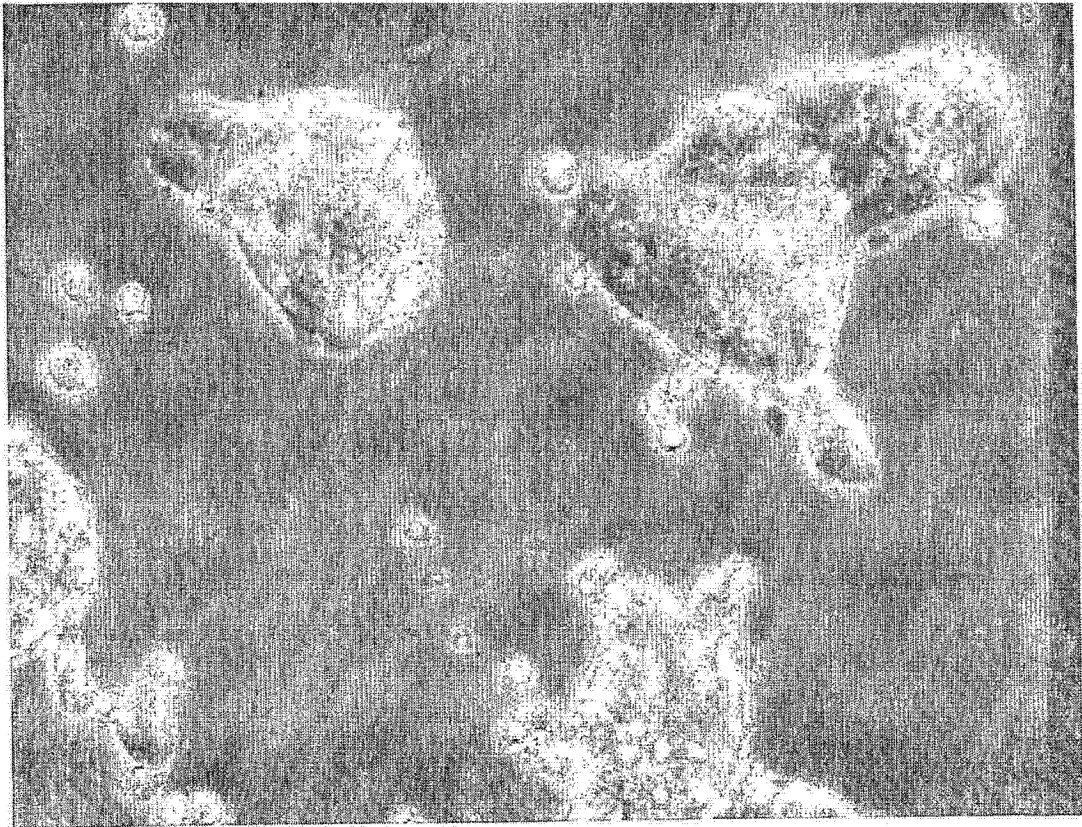


图 2

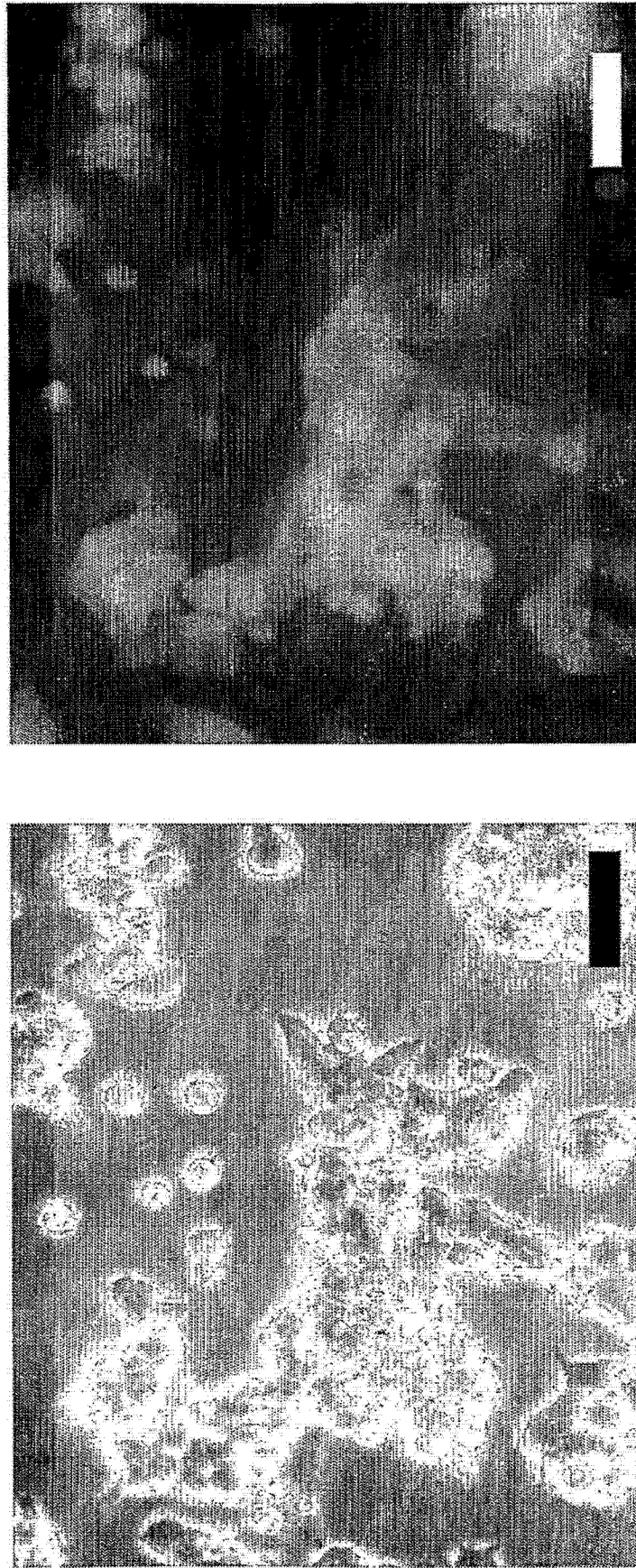


图 3

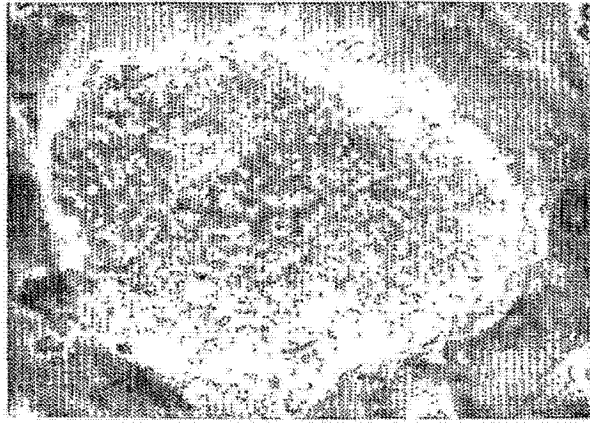


图4

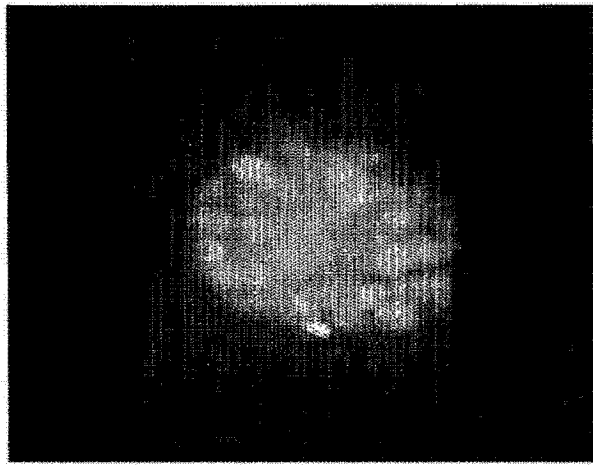


图5

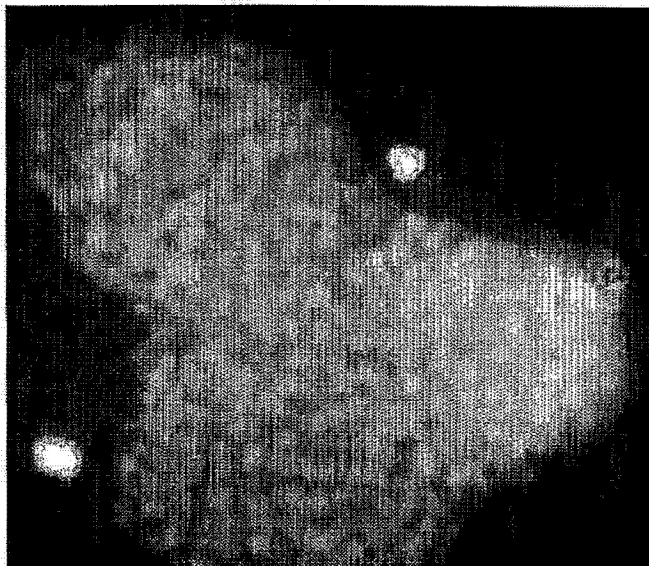


图6

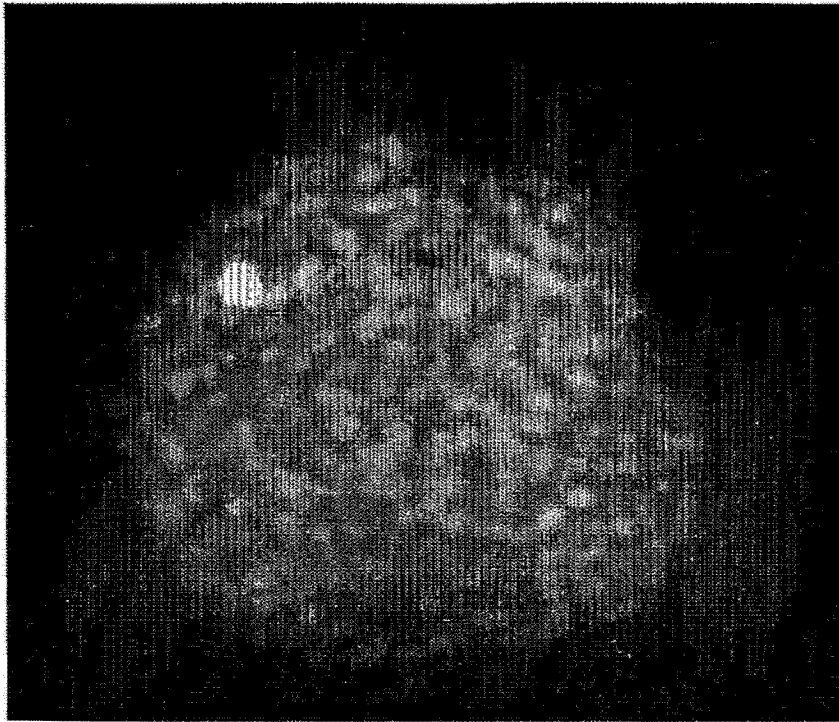


图7

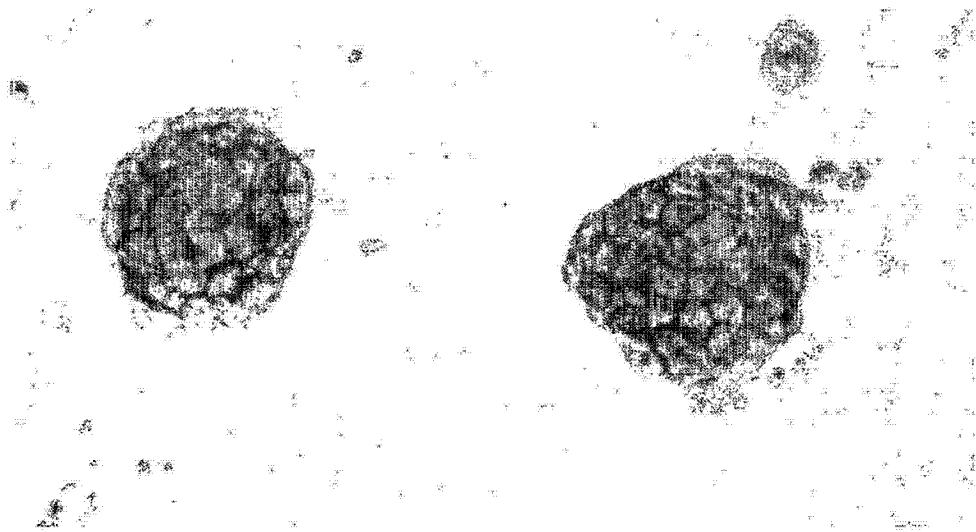


图8

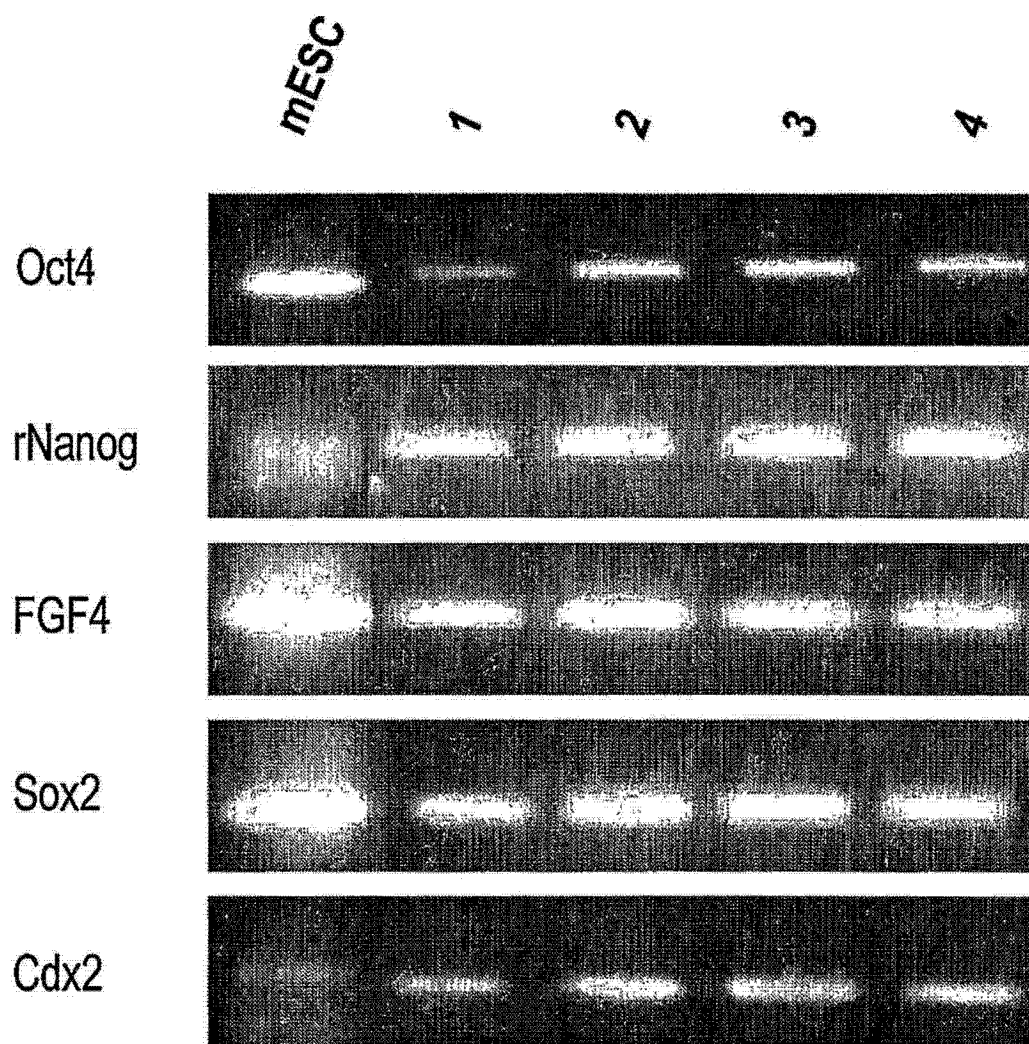


图 9



图10. a

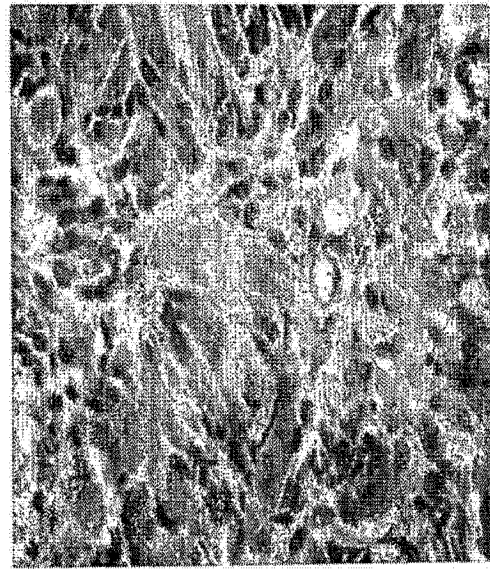


图10. b

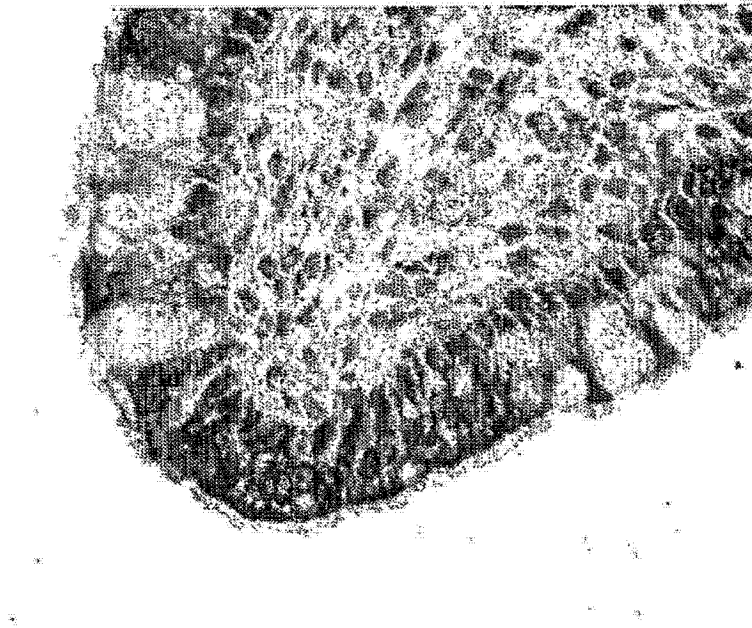


图10. c

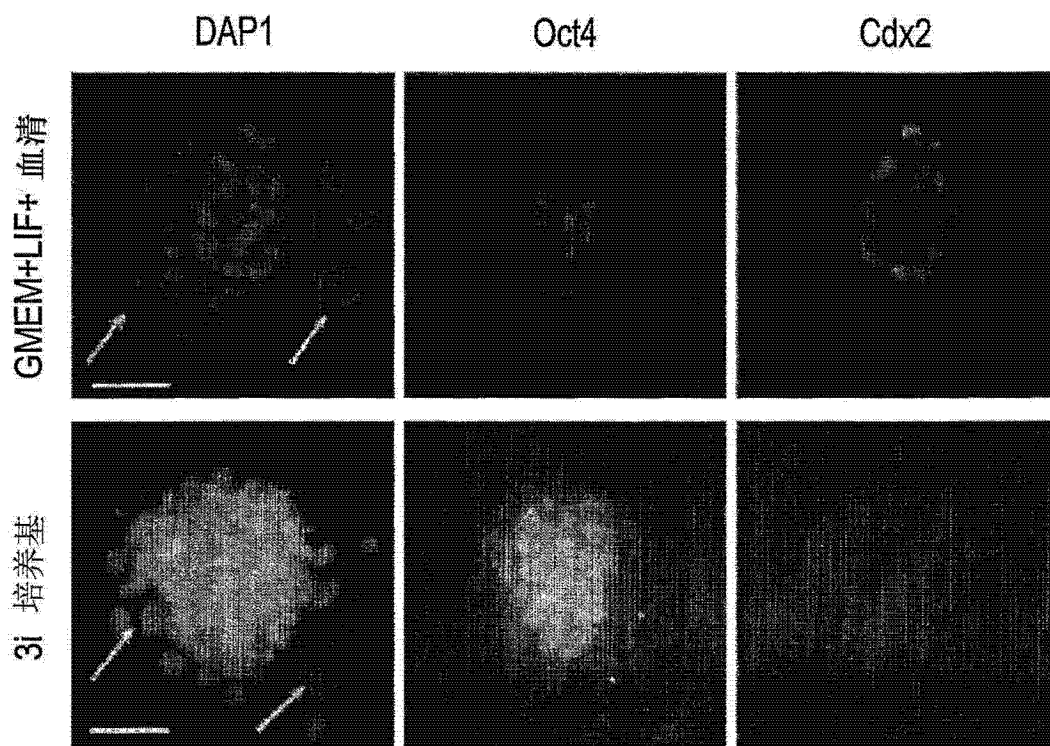


图11. a

培养基	培养天数	oct4阳性细胞 平均数	cdx2阳性细胞 平均数
GMEM+ 血清 +LIF	1天	9.25 (n=6)	<1 (n=6)
3i	1天	9.35 (n=14)	<1 (n=14)
GMEM+ 血清 +LIF	3天	7.8 (n=26)	14.0 (n=26)
3i	3天	42.2 (n=23)	<1 (n=23)

图11. b

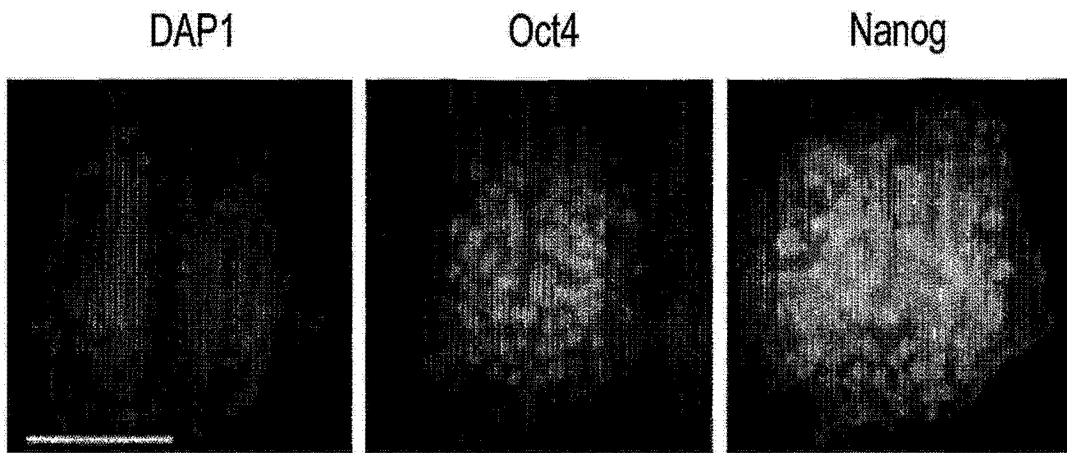


图11. c

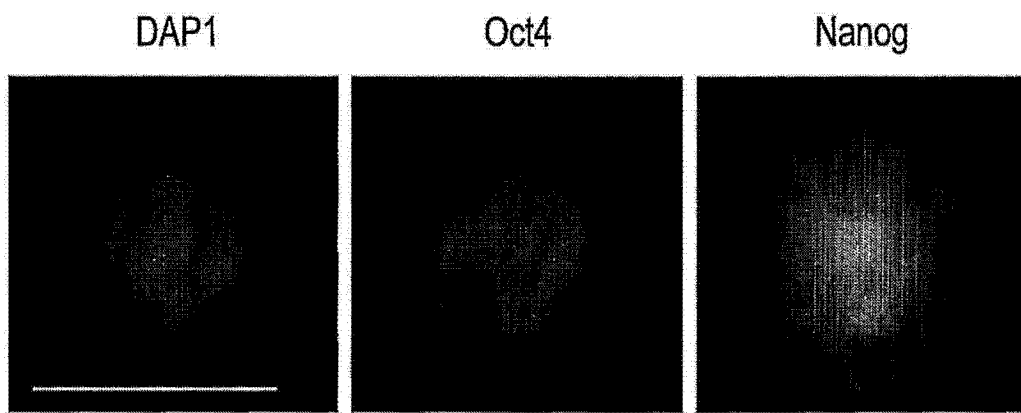


图11. d

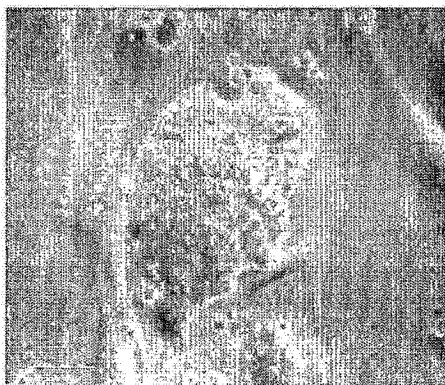


图12. a

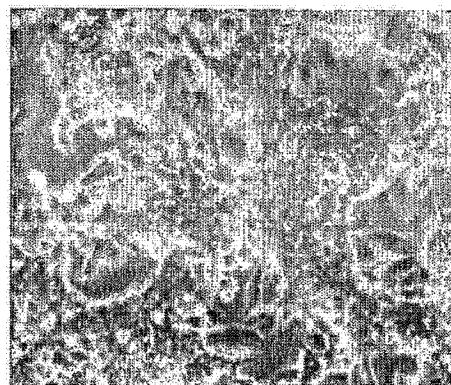


图12. b

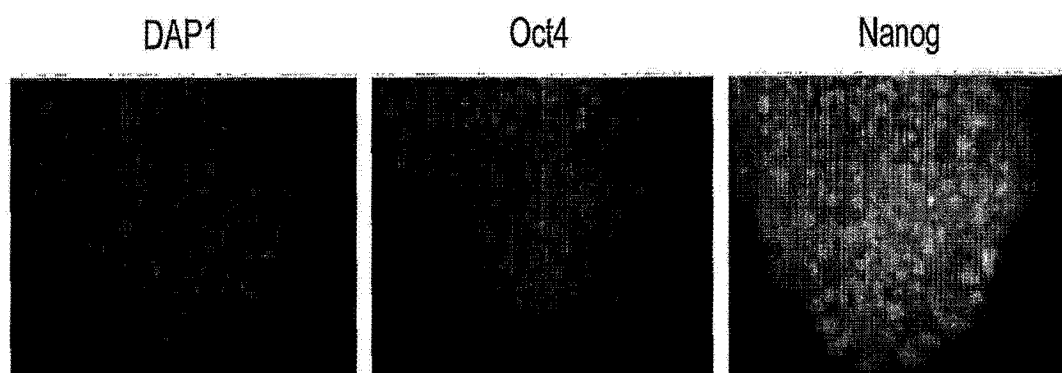


图12. c

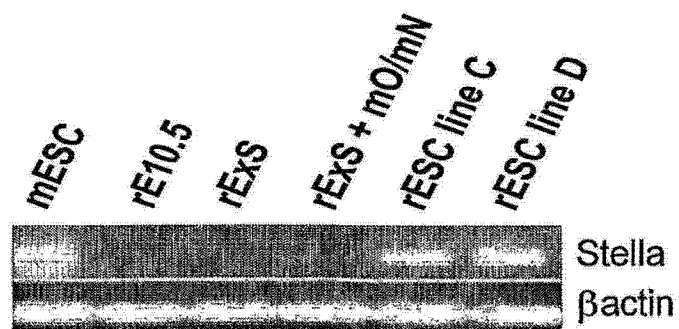
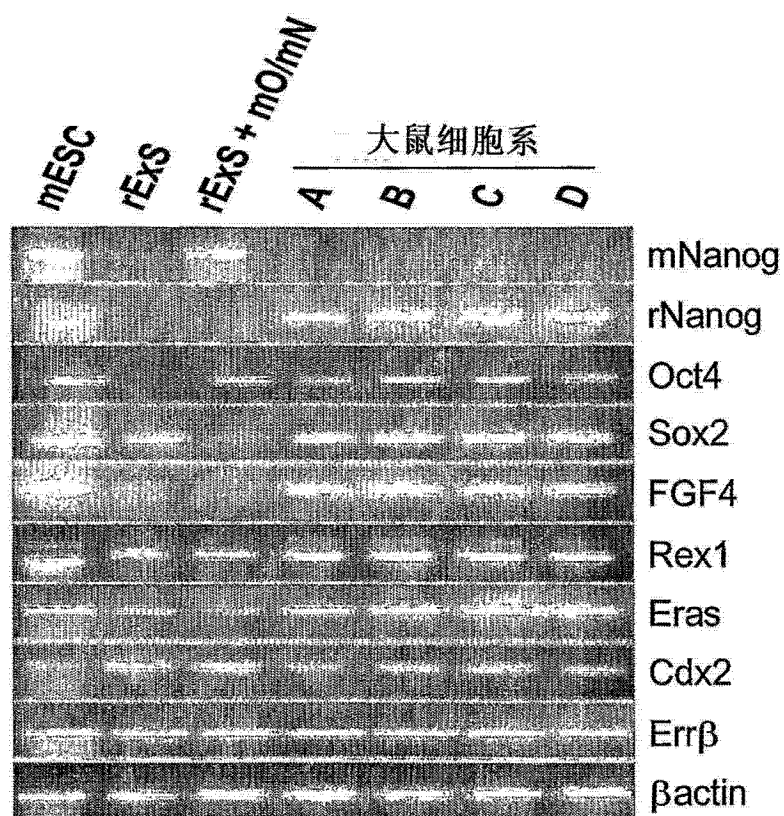


图12. d

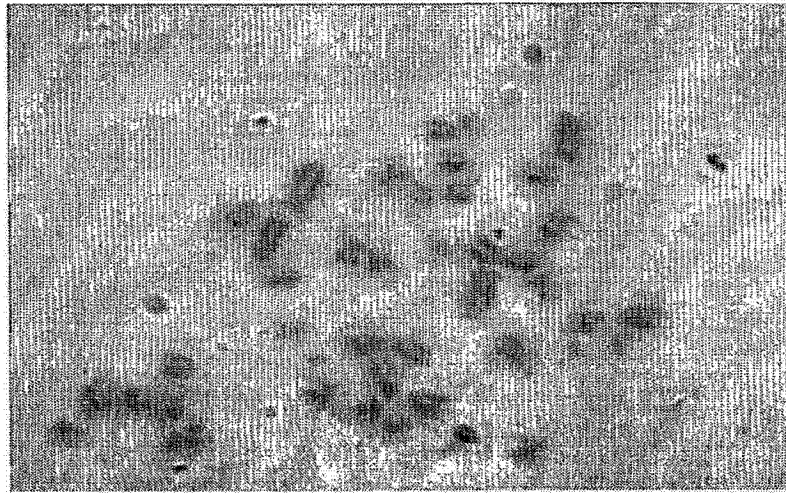
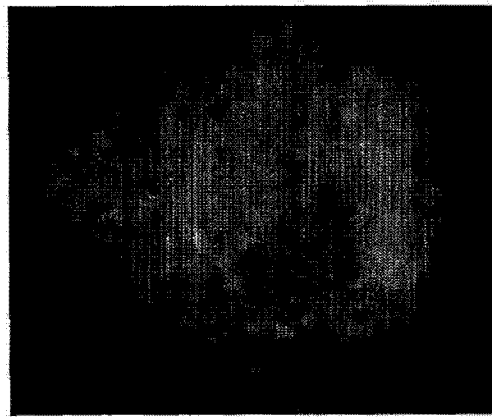
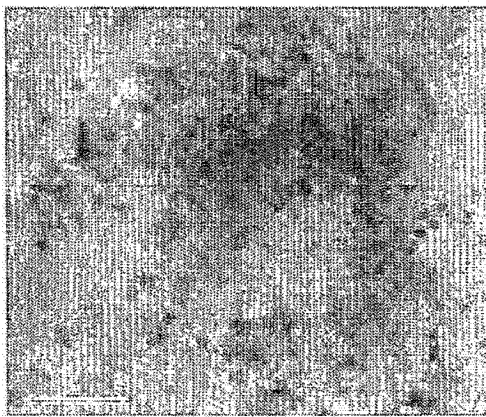
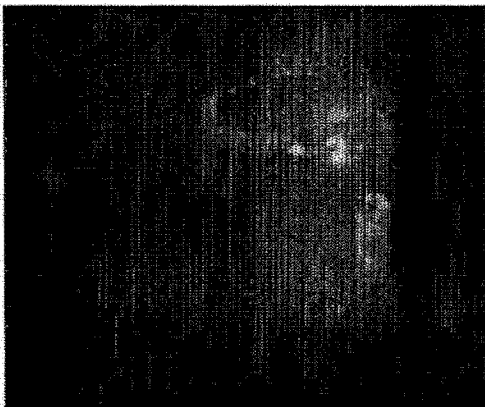


图12. e

DAP1



Oct4



Nanog

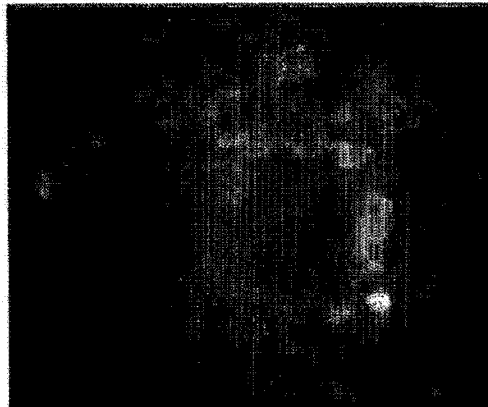


图13. a

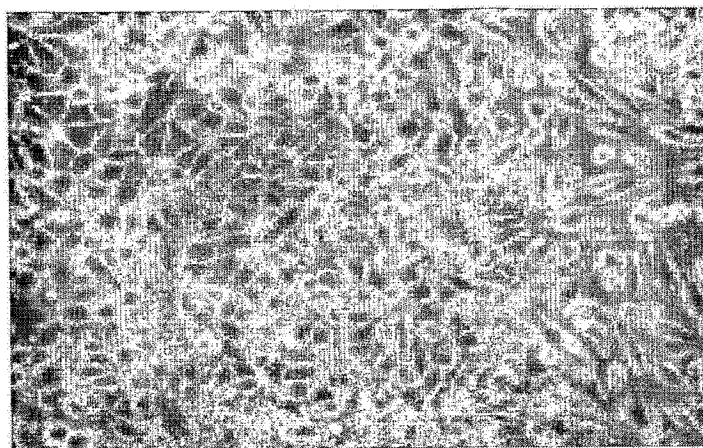


图13. b

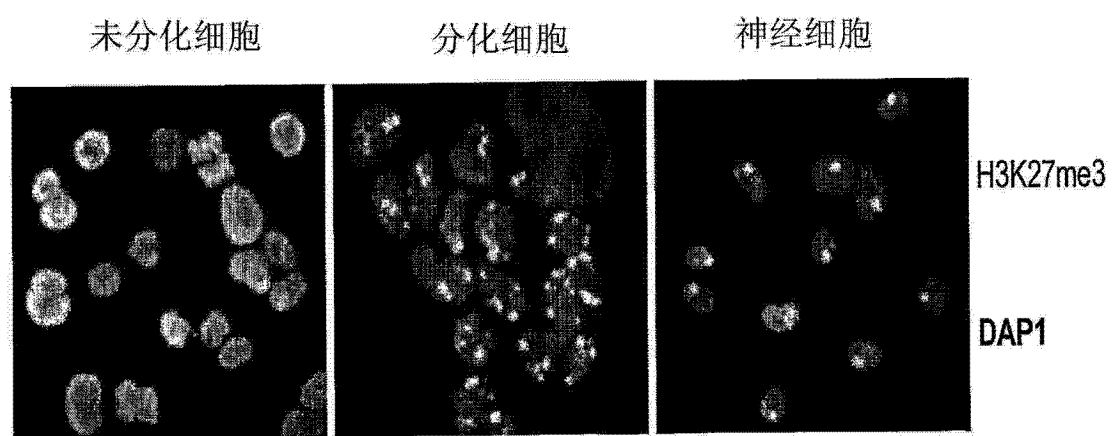


图13. c

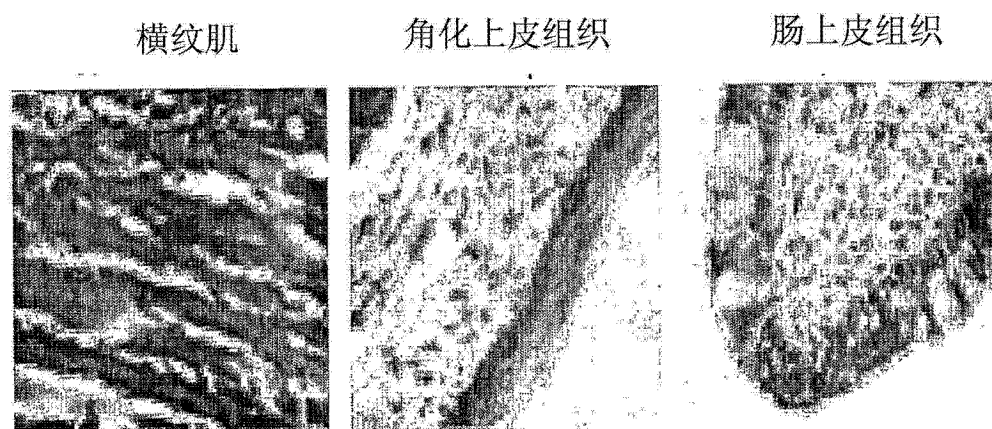


图14. a

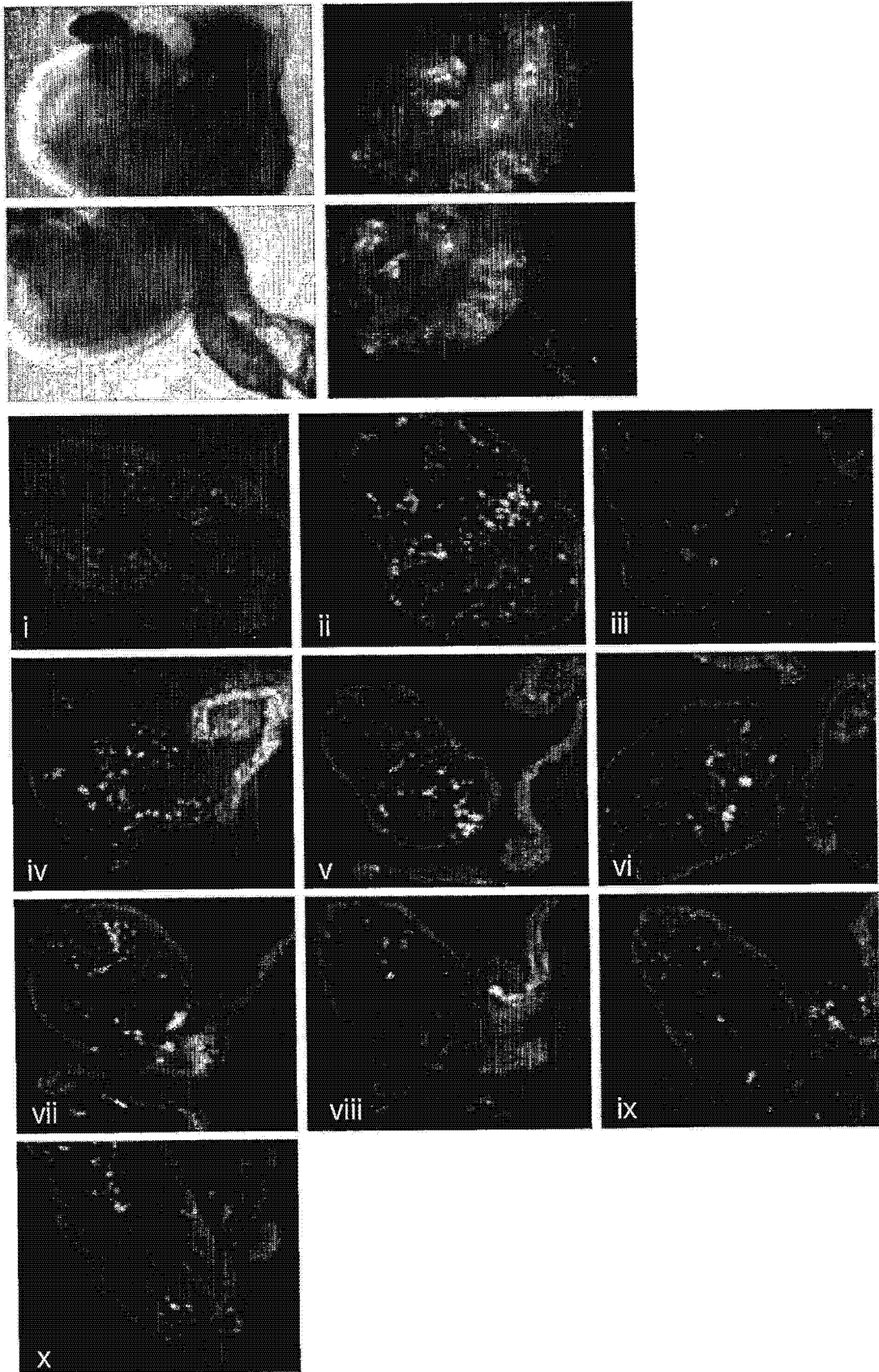


图 14. b

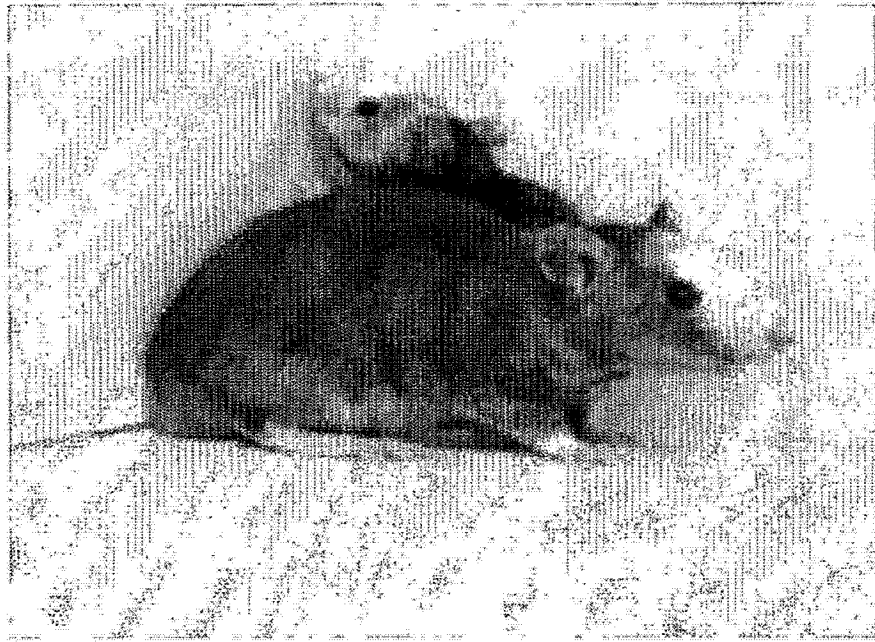


图14. c

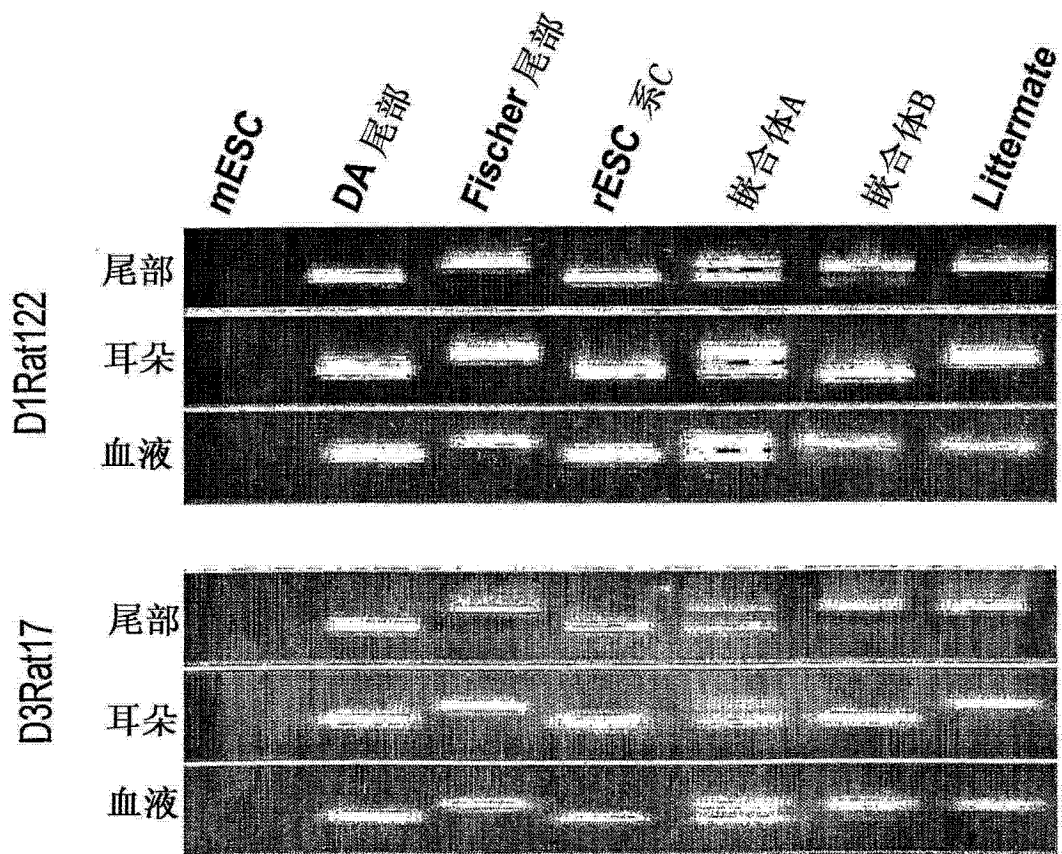
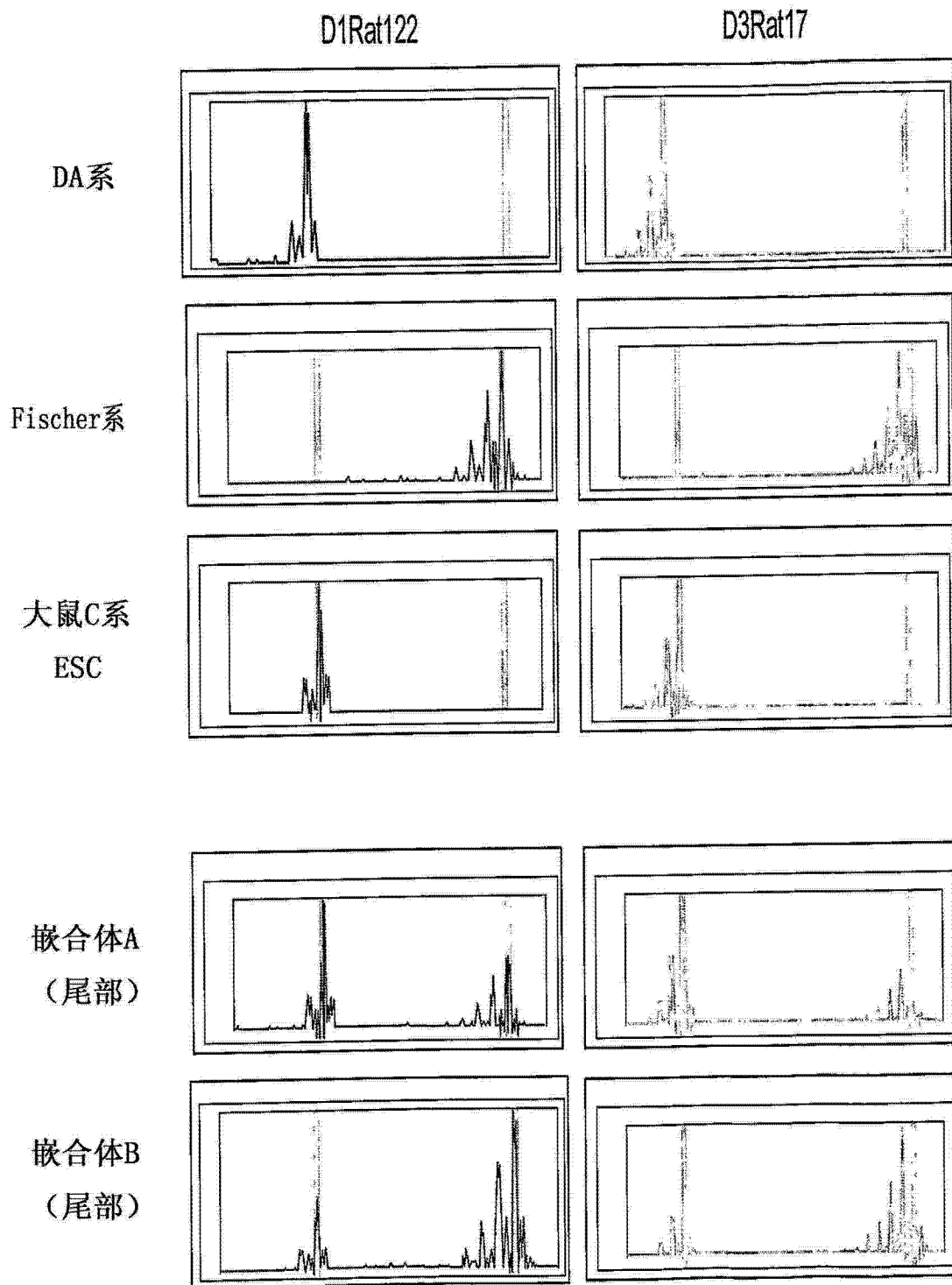


图14. d



接下页

图 14. d 上

接上页

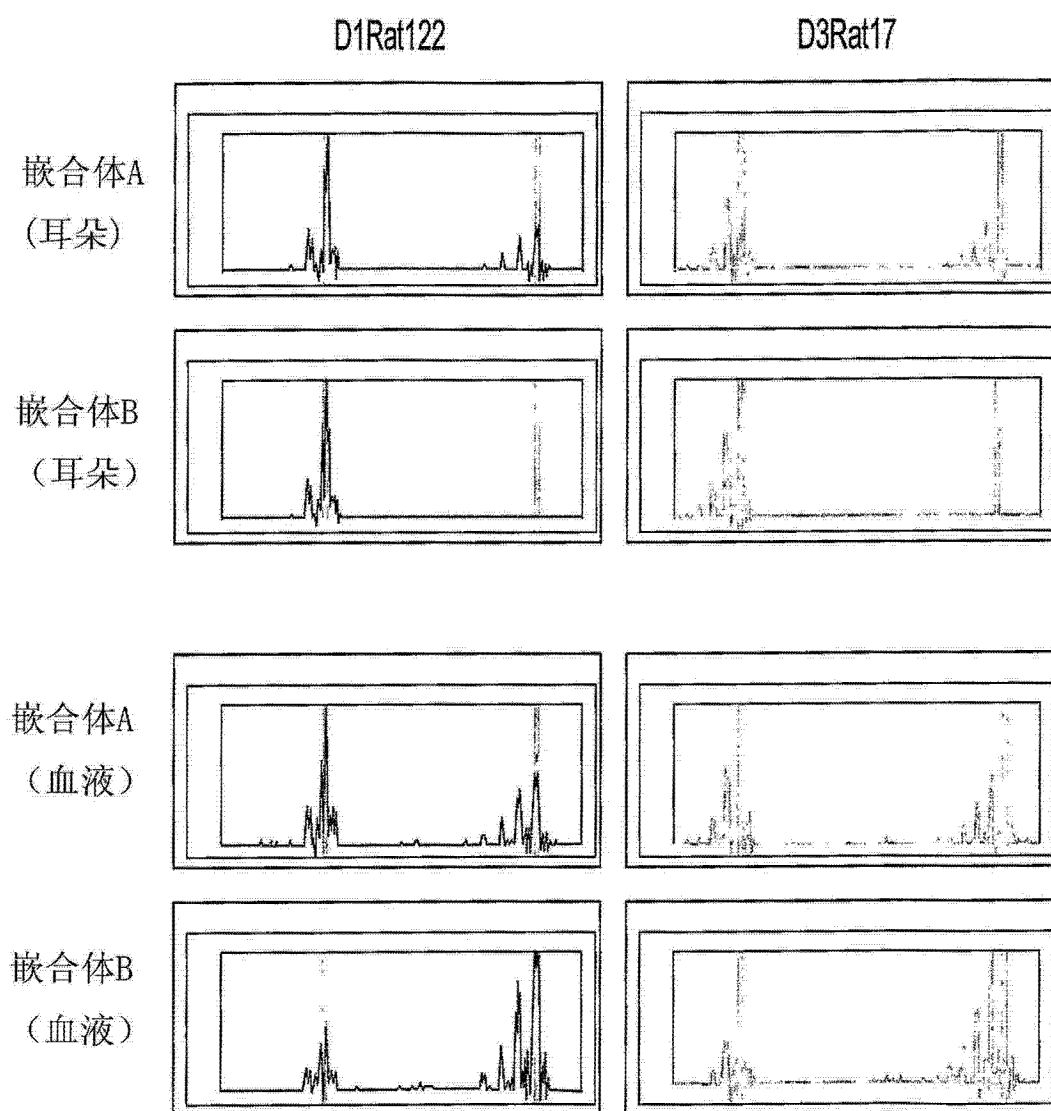


图 14. d 下

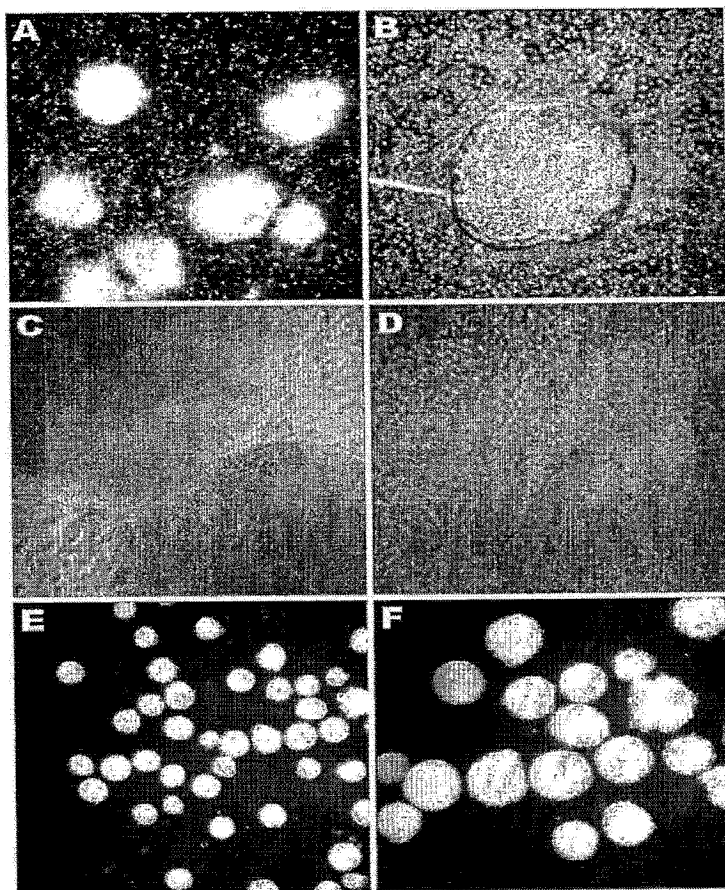


图15

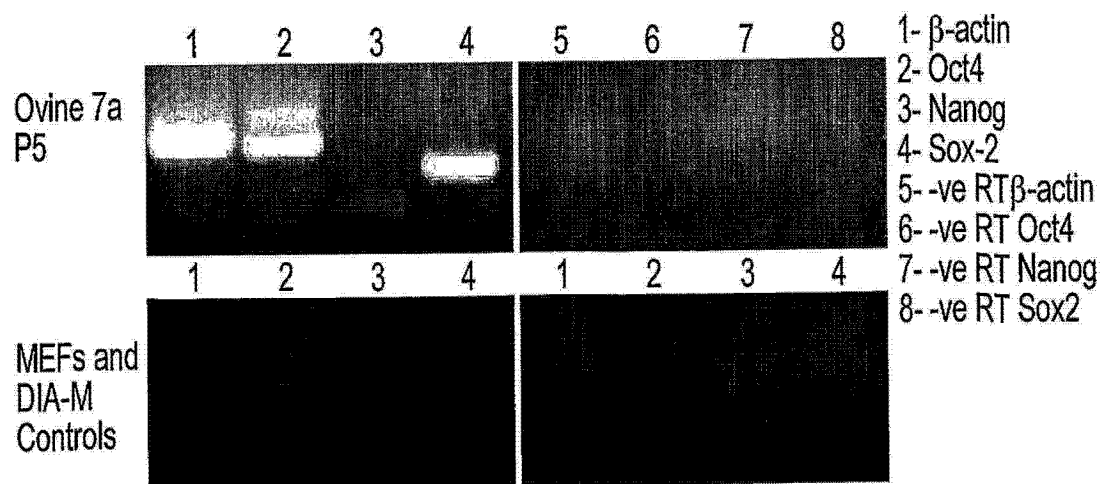


图16

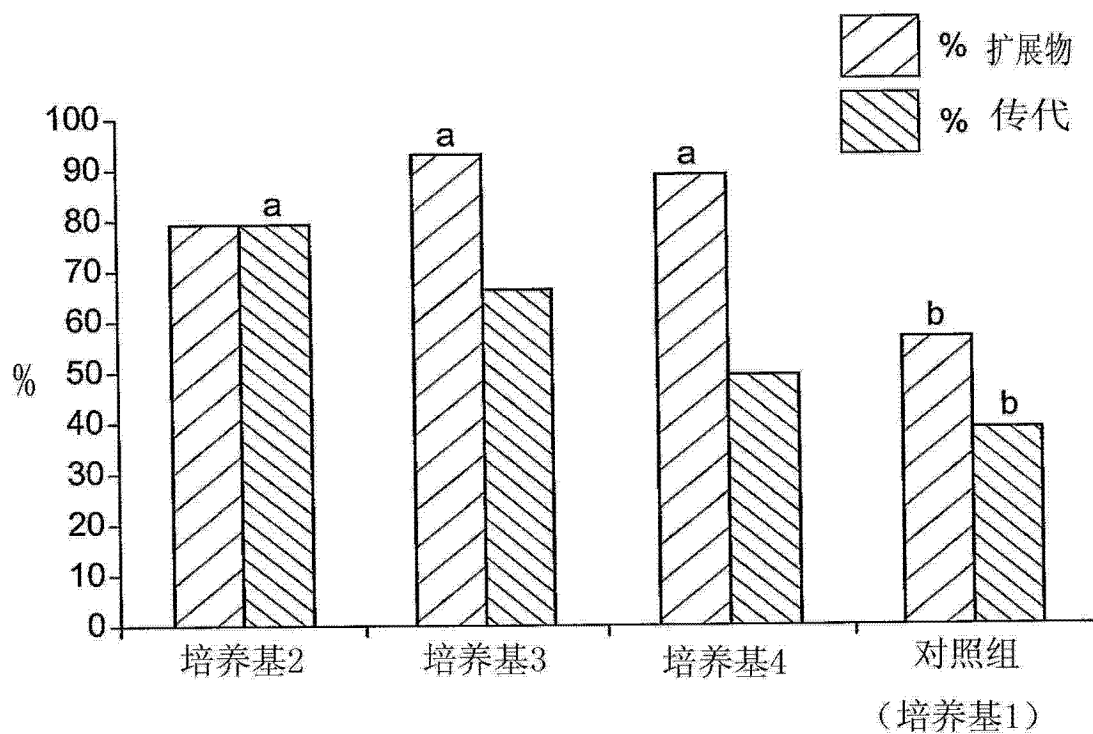


图17

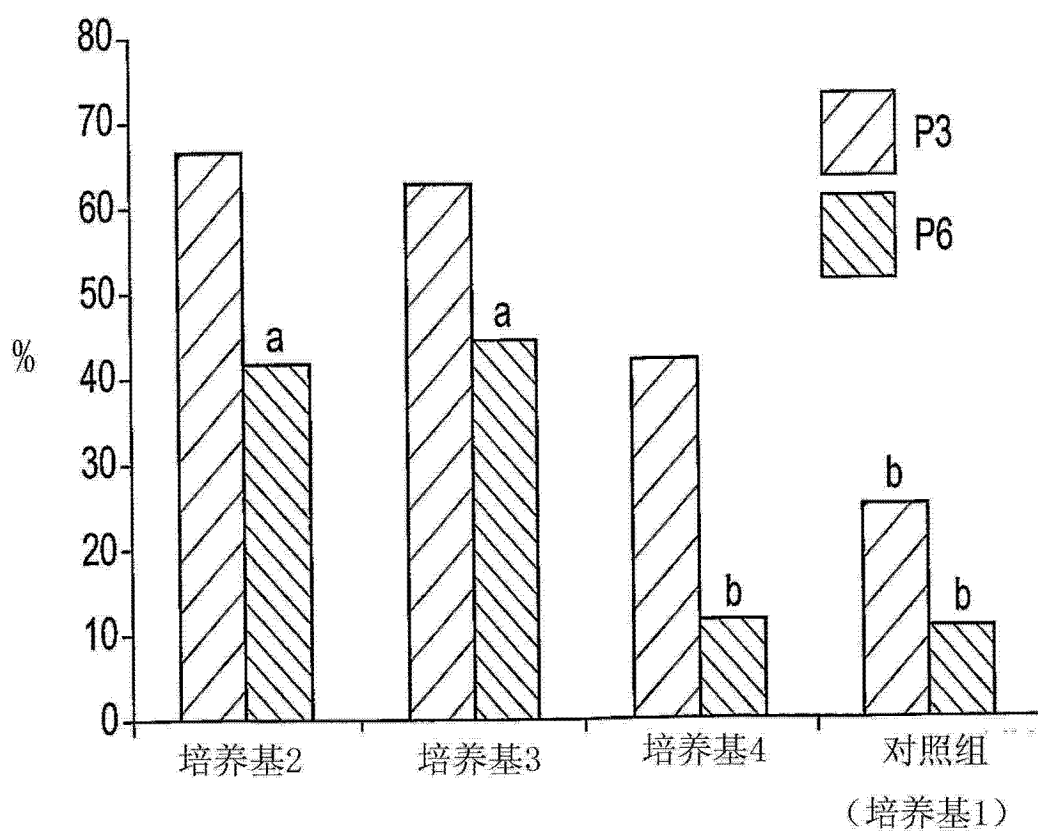


图18

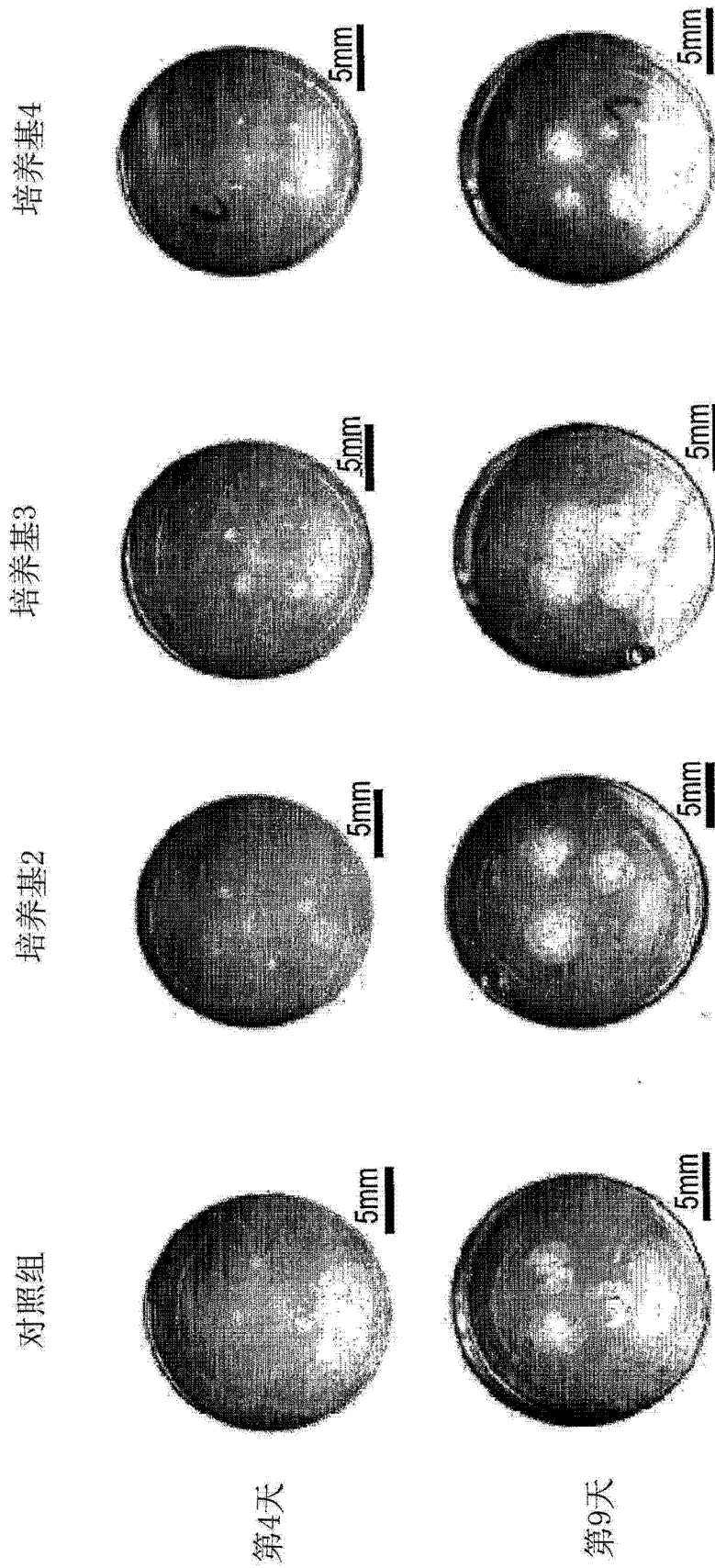


图 19

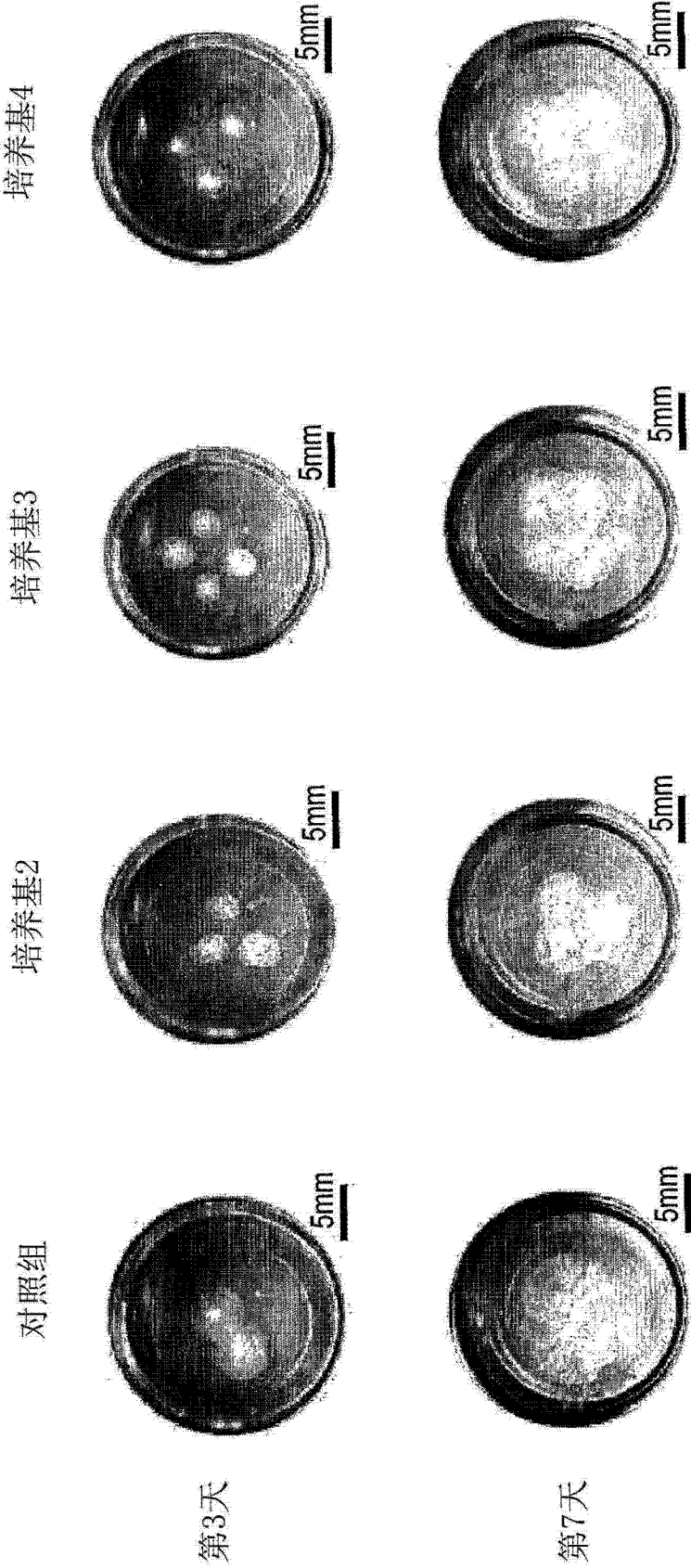


图 20

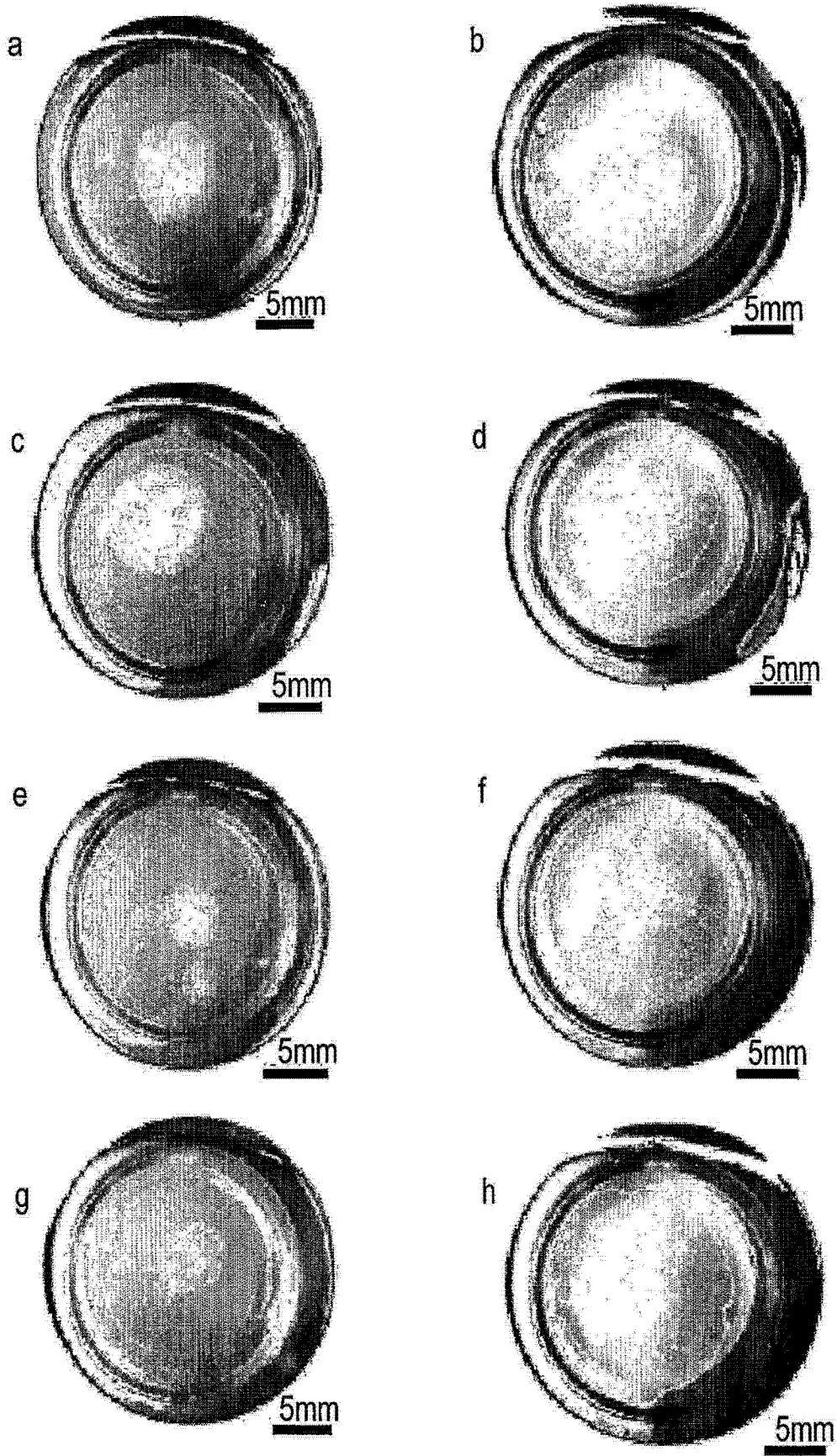


图 21

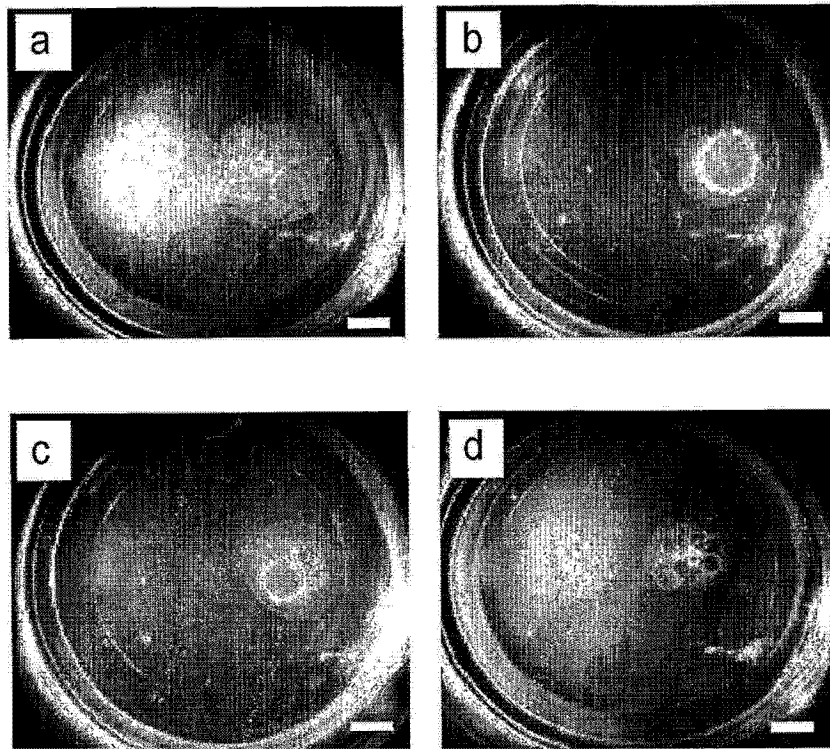


图22

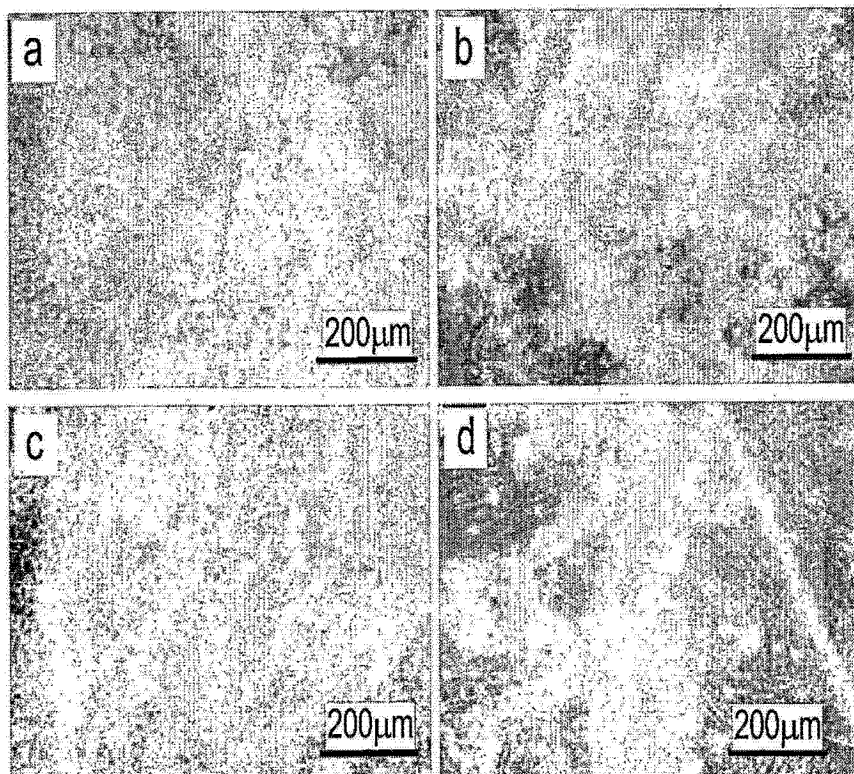


图23

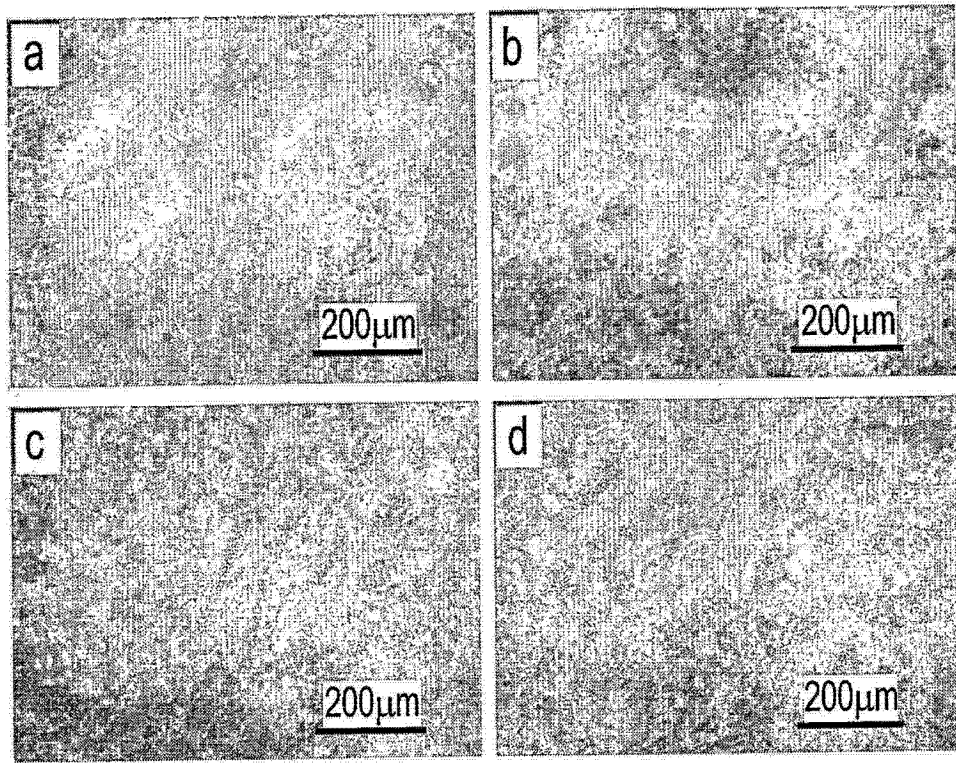


图24

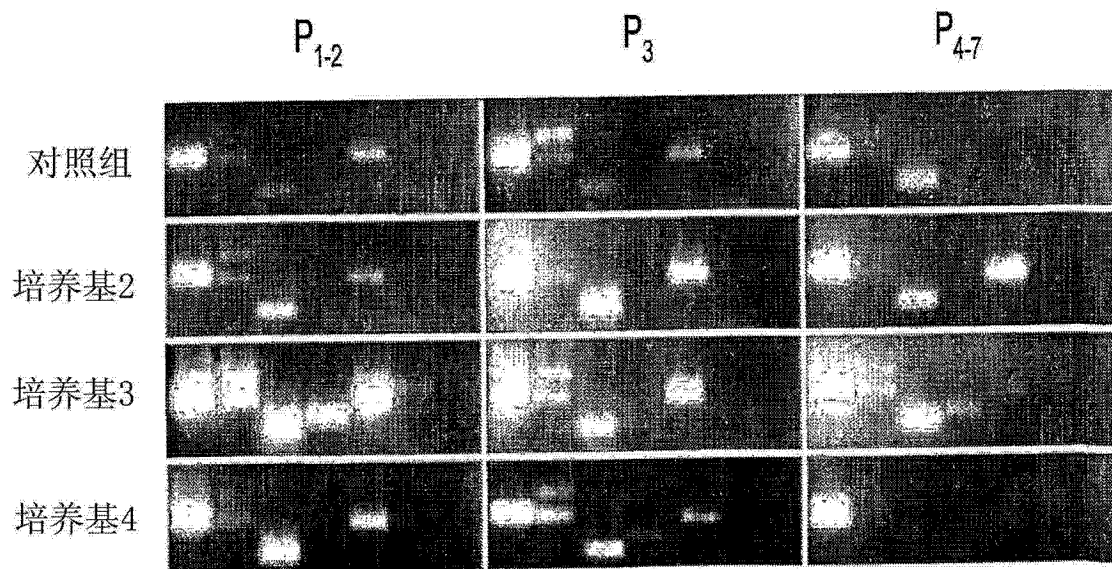


图25

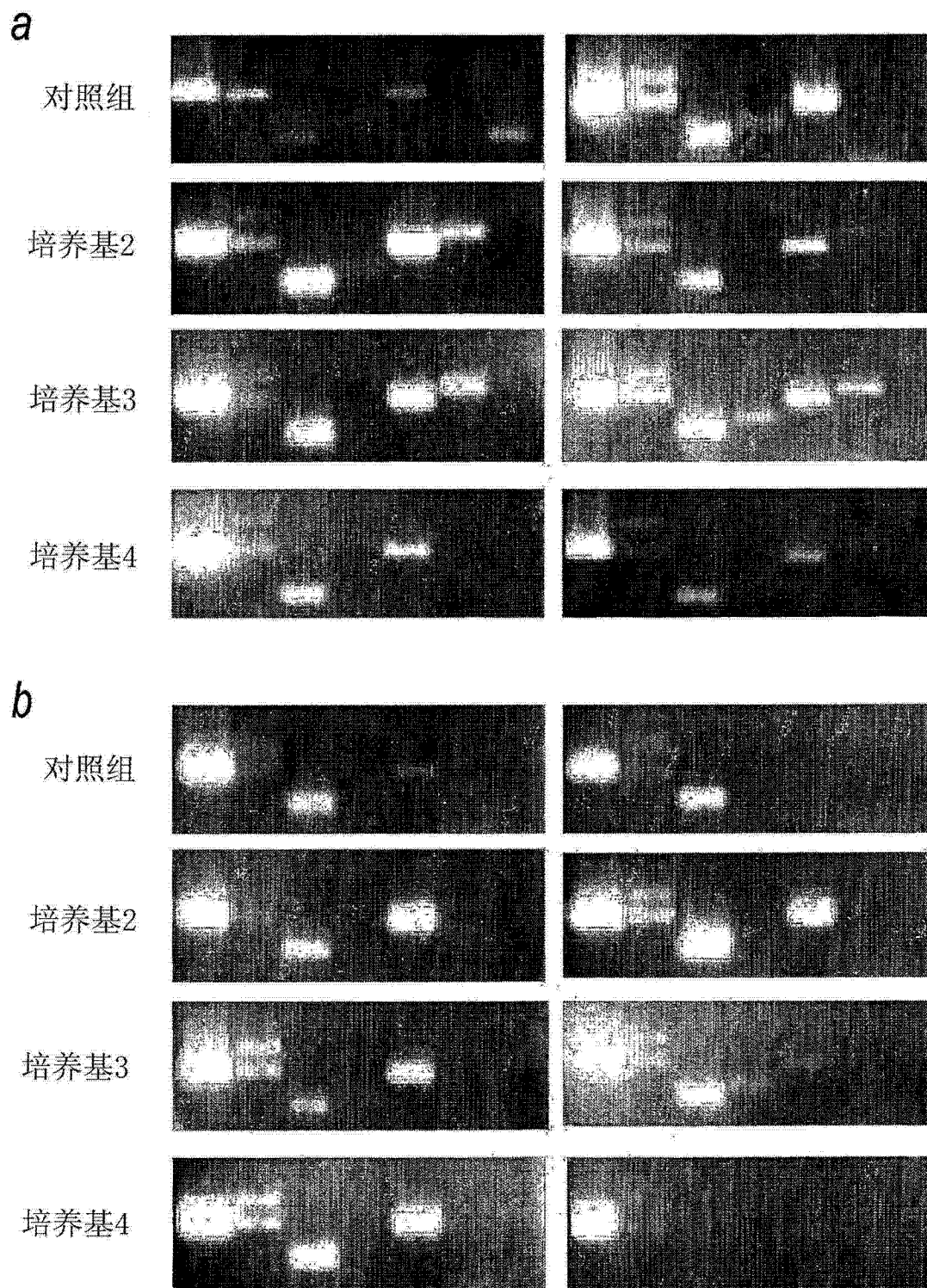


图 26

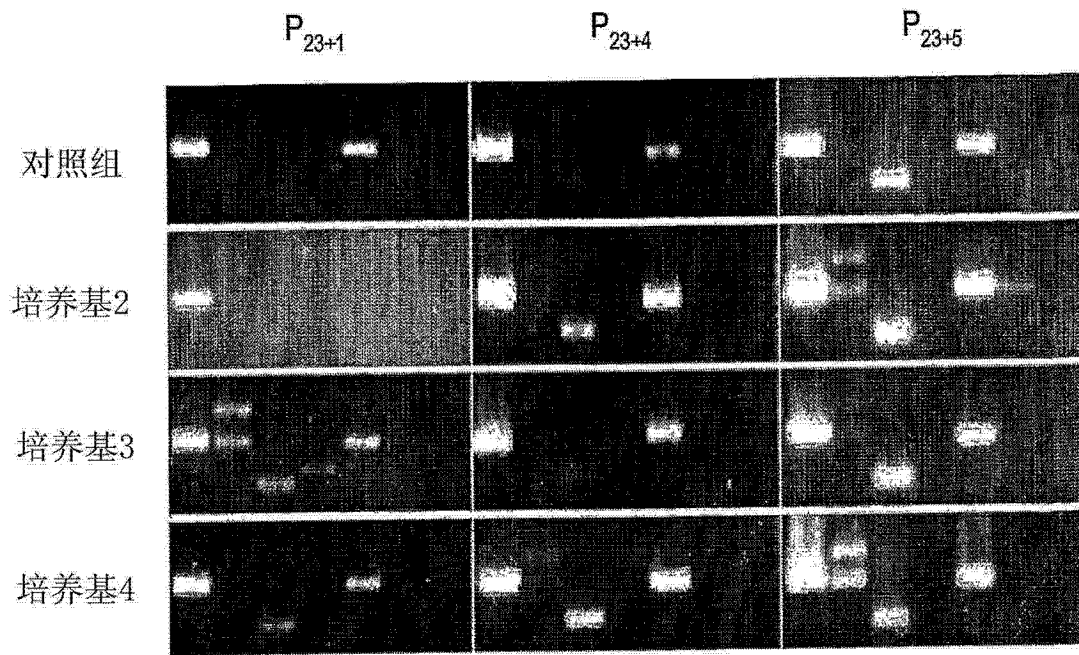


图27

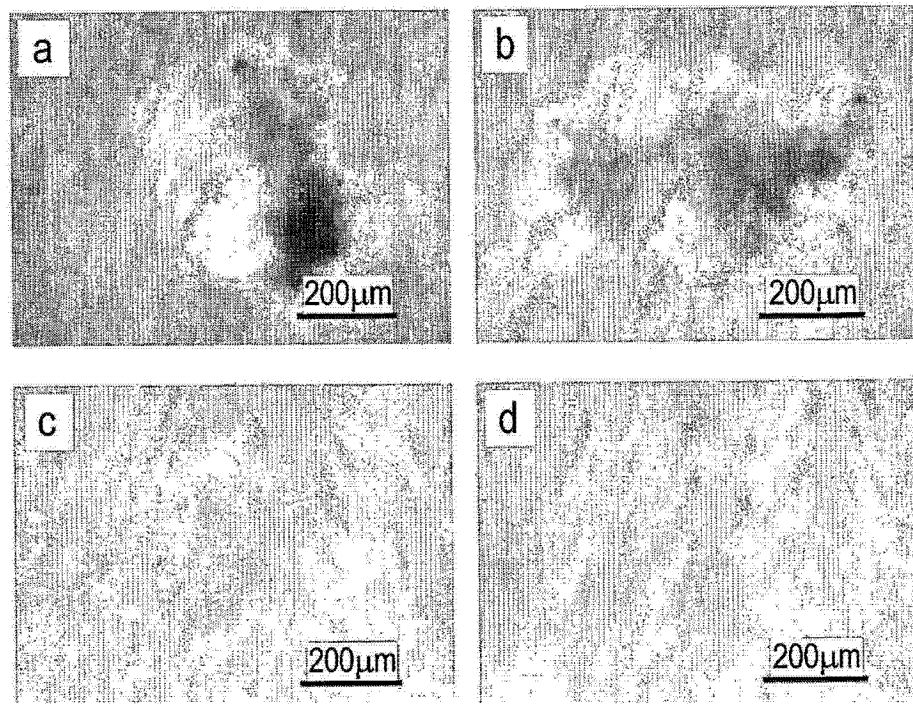


图28