

大鼠睾丸曲细精管组织支持细胞/生殖细胞长期共培养与精子发生分析

刘林洪 史小芳 罗奋华 于泊洋 张岩 刘燕 吴应积*

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学和生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要 睾丸体外生殖模型的发展为体外研究睾丸的精子发生分子机制和睾丸毒理学提供了实验工具。很多报道的模型都无法真正地模拟体内复杂的生化分子及功能性相互作用从而导致研究价值有限。该实验拟建立一个体外长期维持睾丸生殖细胞存在,并能持续产生精子细胞的支持细胞/生殖细胞共培养体系。体系中的支持细胞和生殖细胞均由曲细精管组织块迁移到培养皿上,在不添加任何生长因子的情况下维持体外精子发生至圆形精子细胞超过2个月。RT-PCR分析显示,共培养细胞稳定表达*cdh1*、*scp3*、*tmp2*;免疫荧光染色结果显示,CDH1、PLZF、SCP3以及SOX9阳性细胞存在。这些结果例证了体系中同时存在精原干细胞、精母细胞、精子细胞和支持细胞。简单高效的支持细胞/生殖细胞体外共培养体系可用于雄性生殖的分子机制和毒理学研究。

关键词 大鼠; 睾丸生殖细胞; 支持细胞/生殖细胞共培养; 体外精子发生

精原干细胞(spermatogonial stem cell, SSC)作为生殖干细胞,在濒危物种种质资源保存、转基因动物制作、精子发生机理及男性不育症上发挥着不可替代的作用。随着对SSC的迁移、增殖、分化以及凋亡等调节机制的研究及精子发生机理的研究和SSC异体、异种移植技术的发展,都迫切需要找到一种可行的方法开展SSC体外增殖与分化研究^[1]。虽然SSC的分离纯化方法已经在一些物种上获得了成功^[2-4],并且实现了少数动物SSC的长期培养^[2-3]以及SSC体外分化成有功能的精子^[5]。但是,SSC的体外鉴定,尤其是大动物SSC的体外鉴定,一直缺乏特异性的标志;已有的大鼠SSC鉴定标志多为体内SSC鉴定标志,其是否能在睾丸组织长期培养体系中适用也是个未知数。此外,现有的SSC长期培养体系和分化体系不能兼容。这些情况限制了利用体外培养体系模拟体内情况进行精子发生机理研究的范围,也限制了体外生精体系用于辅助生育技术和药物毒理研究^[6]。

为了找到合适的培养体系,科学家建立了多种组织细胞培养方法,包括基于细胞外基质凝胶(extracellular matrix gel)的SGC 2-D^[7]、3-D^[8]培养体系等。不过,这些体系均不能很好地模拟体内睾丸的复杂而又有序的生化分子微环境及细胞间错综的相互作用,而且这些体系均只能维持短期的精子发生。

这些缺陷不利于对生精过程的反复观察和研究,也不利于研究长期药物处理对生精过程的影响。所以,一个能长期维持精子发生的体外培养体系能让我们的研究更接近体内状态。

近几年研究表明,绒山羊与大鼠的睾丸支持细胞与生殖细胞共培养体系原代培养,能够长期维持体外精子发生过程直至产生精子细胞,时间长达4个月^[9-10]。其方法为模拟体内精子发生过程研究提供了组织细胞模型。可是,此组织细胞模型还很不完善,比如只是对不同的生殖细胞进行形态观察和细胞行为特征的描述,没有从分子水平对各级生精细胞进行标记分子特异表达的分析鉴定。

在大鼠睾丸组织体外SGC共培养体系^[6,10]的基础上,本课题根据不同发育阶段的生精细胞表达不同的标记分子的原理,采用反转录PCR(RT-PCR)法和免疫荧光细胞染色法鉴定标记分子的特异表达,对共培养体系中的细胞开展进一步的研究,同时,首次验证了大鼠SSC体内鉴定标志对体外长期培养体系的适用性。研究结果充实和完善了体外大鼠SGC共培养体系,提供了在共培养过程中对支持细胞和

收稿日期: 2011-12-19 接受日期: 2012-03-09

内蒙古自治区自然科学基金(No.2009ZD05)和国家基础科学人才培养基金(No.J0730648)资助项目

*通讯作者。Tel: 0471-4992443, E-mail: yingji_wu@yahoo.com

各级生精细胞的分子水平分析鉴定方法, 将有助于利用大鼠精子发生过程的体外系统开展哺乳动物雄性生殖研究探索, 满足更多相关学科对雄性生殖进行应用研究的需求。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar-Imamichi大鼠由内蒙古大学实验动物中心国家二级清洁型动物房提供。睾丸取自15日龄(出生当日定为第一天)大鼠。

1.1.2 培养基及试剂 DMEM/F12购自Gibco公司, 胎牛血清(fetal bovin serum, FBS)购自天津灏洋生物公司, 维生素A、维生素C、维生素E均购自Sigma公司, β -巯基乙醇购自Amresco公司, Penicillin、Streptomycin购自Wako日本和光纯业工业株式会社, 睾酮(testosterone)、促卵泡激素(FSH)购自宁波第二激素厂, 两性霉素B购自BBI公司。其它试剂均购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 大鼠断颈椎法处死后, 取两侧睾丸, 无菌条件下用眼科镊子撕去脂肪组织、睾丸白膜和血管, 暴露出曲细精管。将曲细精管撕

成1~2 mm³组织块。组织块于12孔板内在37 °C、5% CO₂、饱和湿度下培养。培养液为含10% FBS的DMEM/F12, 分别添加下列物质至终浓度: 青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 μ g/mL)、 β -巯基乙醇(0.1 mmol/L)、维生素A(3 U/mL)、维生素C(8 μ g/mL)、维生素E(0.2 μ g/mL)、FSH(0.1 U/mL)、睾酮(0.1 μ g/mL)、两性霉素B(0.125 μ g/mL)。每周换液3次。

1.2.2 细胞形态观察与鉴定标准 不同类型的生精细胞鉴定标准按文献[9-11]所述: 直径12~14 μ m不动或能搏动的圆形或椭圆形的细胞为精原干细胞, 无附器; 大于16 μ m, 细胞作顺时针或逆时针旋转的为精母细胞, 有附器; 精子细胞直径小于10 μ m, 有的有短鞭毛。

1.2.3 RT-PCR 选取共培养过程的不同时间点(1, 1.5, 2, 2.5个月)的共培养细胞, 提取总RNA后, 经反转录制备cDNA。分别选取*cdh1*^[3,12]、*scp3*^[13-14]、*tnp2*^[15]作为精原干细胞、精母细胞以及圆形精子细胞的标记性基因, 选取*gapdh*作为内参基因, 设计相应引物进行PCR扩增鉴定。使用25日龄的大鼠睾丸cDNA作为阳性对照。PCR反应体系为10 μ L(PCR引物及退火温度见表1)。PCR产物在1%的琼脂糖凝胶中电泳, 0.01%的溴化乙锭染色, 凝胶成像仪成像分析。

表1 RT-PCR引物及退火温度

Table 1 Primers and anneal temperature(Ta) for RT-PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	大小(bp) Size(bp)	退火温度(°C) Ta(°C)
<i>cdh1</i>	F: CTG GAC CGA GAG AGT TAC CCT AC R: GCT GTT CTT CAC ATG CTC CG	681	56
<i>scp3</i>	F: GAA GAT GTG GGA GGT GAA GTA R: GCT TTC ATT CTC TGG CTC TG	332	54
<i>tnp2</i>	F: CCA CCC GCA CAG CTC CTC T R: CCT CCT GAC CGC CTT TCT C	253	58
<i>gapdh</i>	F: TGC TGA GTA TGT CGT GGA GT R: AGT CTT CTG AGT GGC AGT GAT	289	55

1.2.4 细胞的免疫荧光染色鉴定 分别选取CDH1、PLZF^[14,16-17]、SCP3、SOX9^[18]作为精原干细胞、精母细胞以及支持细胞的特异性标记抗体, 对共培养体系细胞进行免疫荧光染色鉴定。细胞在4%多聚甲醛固定液中室温下固定30 min, 细胞胞浆蛋白和核蛋白用0.5%的TritonX-100通透5 min(SCP3和SOX9做此步骤)。已固定的细胞用10%的NGS(正常山羊封闭血清, 博士德)室温下封闭孵育30 min, 然后添加

一抗4 °C孵育过夜, 添加二抗室温孵育1 h, 10 μ g/mL Hoechst33342(C1022, 碧云天)室温孵育8 min; Nikon TE2000-U荧光显微镜观察并拍照。一抗分别为: E-cadherin(CDH1, SC-8426, Santa Cruze) 1:200稀释于PBS中; PLZF(SC-11146, Santa Cruze) 1:200稀释于PBS中; SCP3(SC-33195, Santa Cruze) 1:100稀释于PBS液中; SOX-9(SC-20095, Santa Cruze) 1:300稀释于PBS中。二抗分别为山羊抗小鼠cy3(博士德), 兔抗山羊

FITC(中杉金桥)以及山羊抗兔FITC(SC-2012, Santa Cruze), 均为1:350稀释于PBS中。

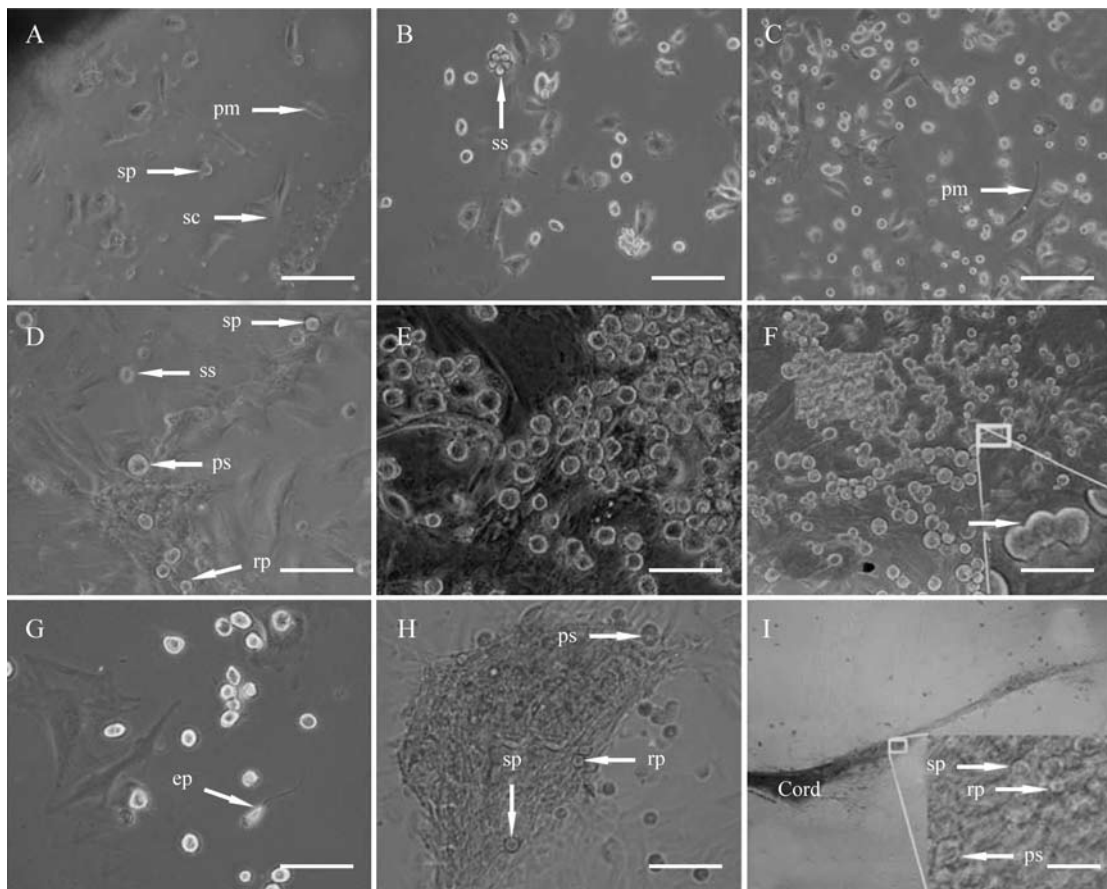
2 结果

2.1 细胞形态观察鉴定

2.1.1 培养初期观察 支持细胞和体细胞先贴壁生长, 4~6 h即可见组织块周围有少量的支持细胞贴壁, 呈圆形或椭圆形。12 h后, 支持细胞拉长, 有明显伪足形成, 细胞呈星状、梭状或三角样, 具有一至多个细胞核, 每个核均有二至多个核仁(图1A)。一周后存活

的圆形、椭圆形细胞(图1B)。体系中还存在少量小管周肌样细胞(peritubular myoid cell), 一般表现为扁平条状(图1A和图1C)。

2.1.2 长期培养细胞形态观察 精母细胞直径较大且数量较多, 初级精母细胞更是大于 $20\ \mu\text{m}$, 明亮的细胞质部分比较大(图1D), 有细胞附器。细胞动态观察显示精母细胞作顺时针或逆时针旋转运动。而圆形精子细胞直径小于 $12\ \mu\text{m}$, 中央深色细胞核(图1D)在不停的转动中发生位移运动, 有的有鞭毛(图1G)。精原干细胞为圆形或椭圆形, 直径介于精母细胞与圆形精子细胞间, 常见存在于支持细胞形成的港湾或附于支持细胞表面(图1D)。其细胞核大,

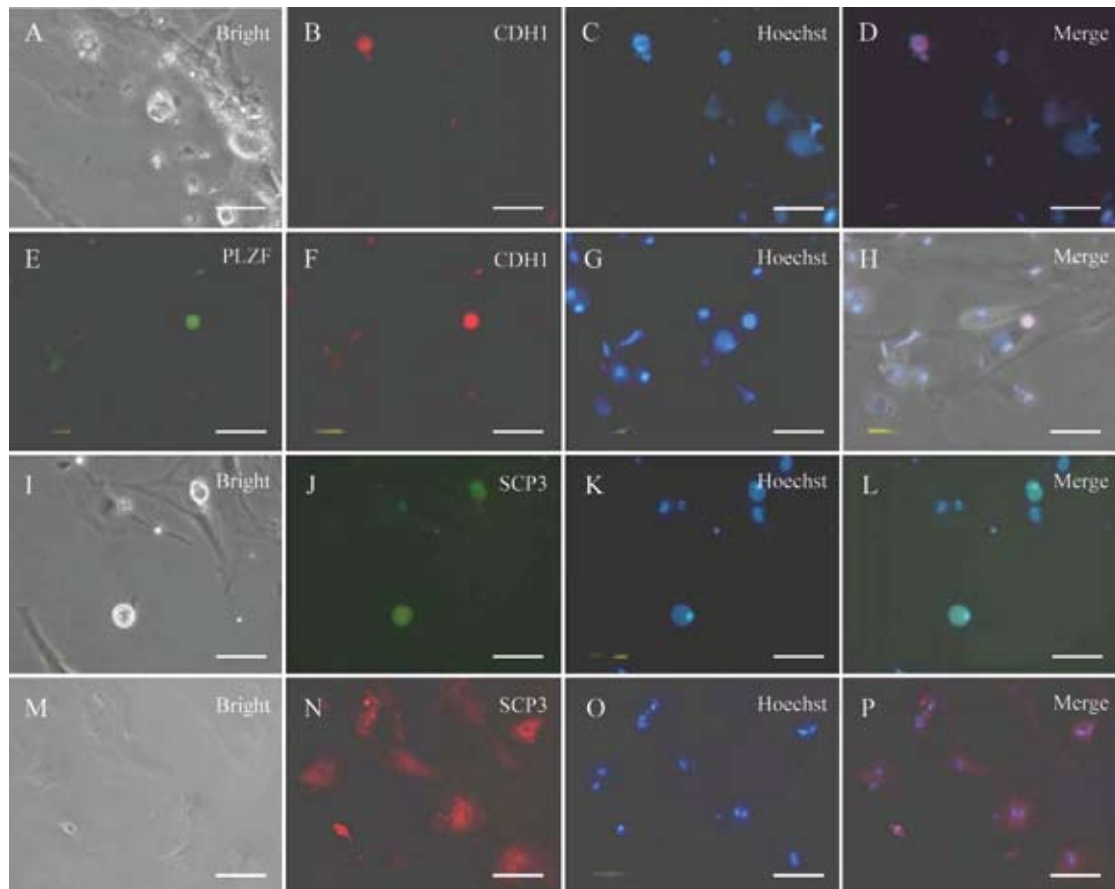


第3天(A)、1周(B)、23天(C)、6周(D)、8周(E)以及12周(F)的支持细胞/生殖细胞体外共培养体系形态学观察。F: 箭头所指为同源群细胞; G: 箭头所指为有鞭毛的长形精子细胞; H: 生殖细胞与体细胞形成鸟巢状细胞克隆; I: 类睾丸细胞索, 睾丸细胞索由体细胞与各级生精细胞混杂而成。ss: 精原干细胞; sc: 支持细胞; ps: 初级精母细胞; sp: 次级精母细胞; rp: 圆形精子细胞; ep: 长形精子细胞; pm: 小管周肌样细胞。标尺=100 μm (A~H); 标尺=400 μm (I)。

The SGC system co-cultured for 3 days (A), 1 week (B), 23 days (C), 6 weeks (D), 8 weeks (E) and 12 weeks (F) *in vitro*. F: arrow points to the attached isogenous spermatid cells; G: arrow points to the elongating spermatid; H: germ cells and somatic cells formed a bird's nest-like colony; I: the testicular-cell-cord-like formation formed *in vitro*. The cells in the testicular-cell-cord-like formation including primary spermatocytes, secondary spermatocytes, round spermatids and somatic cells. ss: spermatogonial stem cell; sc: sertoli cell; ps: primary spermatocyte; sp: second spermatocyte; rp: round spermatid; ep: elongating spermatid; pm: peritubular myoid cell. Bar=100 μm (A~H); bar=400 μm (I).

图1 大鼠生殖细胞体外共培养的精子发生过程观察

Fig.1 Co-culture and spermatogenesis observation of rat testis germ cells *in vitro*

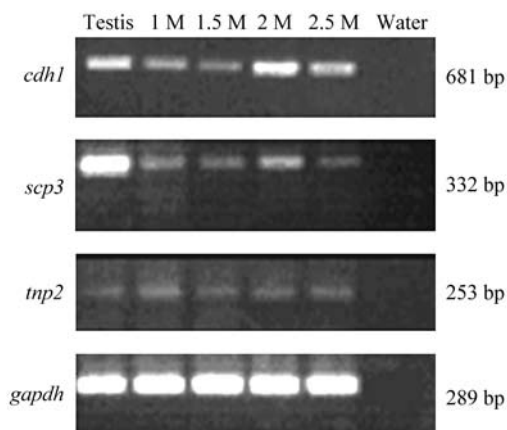


CDH1和PLZF作为SSC特异性分子标记用于大鼠SSC的鉴定(A~H)。分别在2周及1个月的共培养体系中检测到表达CDH1(红色荧光, B、F)的细胞存在, 在1个月的共培养体系中检测到表达PLZF(绿色荧光, E)的细胞的存在, CDH1和PLZF阳性细胞的重叠证明体系中存在SSC。2个月的共培养体系中检测到表达SCP3(绿色荧光, J)的细胞存在, 证明体系中存在初级精母细胞。2个月的共培养体系中检测到表达SOX9(红色荧光, N)的细胞存在, 证明体系中存在支持细胞。A、I、M为明视野细胞形态; C、G、K、O为Hoechst33342染核照片。标尺=40 μm 。

The markers of undifferentiated germ stem cells, CDH1 (red) and PLZF (green), were used to assess status of SSC (A~H). SSC expressed CDH1 in two weeks SGC system (B), one month co-culture (F) and PLZF in one month SGC system (E). Immunofluorescence of spermatocytes stained for SCP3 (green, J) along the two months culture (I~L). SOX9 expression in sertoli cells were detected by immunofluorescence (red, N) at two months of co-culture (M~P). The bright fields of the SGC system were displayed (A, I, M). Cells from SGC system were stained for Hoechst33342 (blue, C, G, K, O) to detect nuclear DNA. Bar=40 μm .

图2 长达2.5个月的SGC体系的免疫荧光染色鉴定CDH1、PLZF、SCP3及SOX9的表达情况

Fig.2 The SGC system was evaluated during 2.5 months of culture, and the expression of the CDH1, PLZF, SCP3 and SOX9 was assessed using immunofluorescence



分别提取培养1, 1.5, 2, 2.5个月的共培养体系细胞总RNA, RT-PCR鉴定精原干细胞特异性分子标志 $cdh1$ 、初级精母细胞特异性分子标志 $scp3$ 及圆形精子细胞特异性分子标志 $tnp2$ 的表达。管家基因 $gapdh$ 作为内参基因; 25天大鼠睾丸总RNA作为阳性对照, 蒸馏水作为阴性对照。M: 月。

RT-PCR analysis was used to detect the SGC system mRNA expression of $cdh1$ gene (specific of spermatogonia stem cell), $scp3$ gene (specific of spermatocyte), $tnp2$ gene (specific of round spermatid) and $gapdh$ gene (housekeeping gene) in 1 to 2.5 months co-culture *in vitro*. 25 days rat testis mRNA expression as the positive control. Water as the negative control. M: month.

图3 RT-PCR鉴定支持细胞/生殖细胞共培养体系中各级生精细胞
Fig.3 RT-PCR analysis was used to identify different cell types present *in vitro* SGC system in comparison within rat testis

胞质少; 细胞边缘比较圆滑, 没有附器, 细胞没有明显的位移和转动, 只看到轻微的搏动。

随着培养时间的延长, 可观察到生精细胞分为两种形态: 一部分生精细胞可观察到明显的成对或短链状细胞, 其中短链状细胞呈链状排列, 呈现比较典型的同源群现象(图1F); 另一部分生精细胞与体细胞相互混杂, 呈现为密集的细胞群, 形成鸟巢状的椭圆形细胞岛, 细胞岛周边散在各级生精细胞(图1H)。一些细胞岛继续募集周边细胞, 最后形成类似文献[7]中报道的睾丸细胞索结构(testicular cells cord), 结构中支持细胞、睾丸间质细胞与小管周肌样细胞形成致密的束状, 生殖细胞夹杂其间(图1I)。而据文献所述, 此结构与睾丸细胞体外异位重构成生精小管有关^[7,24-25]。

2.2 持续的精子发生

约在共培养的第3周也就是第21~24天的时候, 体系中会井喷式出现生精细胞(图1C), 其中大部分都是圆形精子细胞, 结果基本符合体外睾丸组织培养的精子发生规律^[8]。此外, 体系中观察到生精细胞数目会随时间产生周期性变化, 1至4周的培养中生精细胞数目不断增加(图1A~图1C), 但在第4至第6周培养时生精细胞会不断减少(图1D), 直至第8周数目重新增加(图1E), 这种现象在8至12周的培养中重复出现(图1F)。而在两次生精细胞爆发式出现之间, 生精细胞只少量存在(图1D)。说明至少在2.5个月的培养时间内, 体系能维持长期持续的精子发生。但是, 大部分圆形精子细胞发生凋亡, 只有极少数精子细胞进一步发育, 出现一条长鞭毛(图1G)。

2.3 细胞免疫荧光鉴定

免疫荧光染色表明, 支持细胞核区域表现出SOX9阳性(图2N), 表明共培养体系中占据细胞数目优势的细胞为支持细胞(图2M~图2P)。与此同时, 在2个月的共培养体系中检测到了SCP3阳性细胞(图2J), 表明联会复合体的存在, 证明体系中存在有减数分裂(图2I~图2L)。

分别在2周(图2B)、1个月(图2E和图2F)的体系中鉴定到了表达CDH1/PLZF的SSC。CDH1和PLZF作为大鼠SSC标志性分子标记在很多文献中得到证明^[3-4,12,16-17]。当培养时间超过一个月时却很难观察到CDH1/PLZF阳性细胞, 推测可能是支持细胞数目过多, SSC可能被掩盖在支持细胞层之间很难被检测到。

2.4 RT-PCR鉴定

分别提取培养1, 1.5, 2, 2.5个月的共培养体系细胞总RNA, RT-PCR鉴定*cdh1*、*scp3*及*tnp2*, 发现在长达2.5个月的培养期间各时间段均有以上基因的表达, 说明不同时间段体系中均有SSC、初级精母细胞以及圆形精子细胞的存在(图3, 2~4泳道), 说明体系能长期维持精原干细胞存在和分化到圆形精子细胞到至少2.5个月。RT-PCR结果与形态观察以及细胞免疫荧光染色结果相吻合, 说明了本体系直接饲养由大鼠睾丸曲细精管迁移出来的生殖细胞和支持细胞可长期维持SSC的存在与分化。

3 讨论

实验结果显示, 本系统中长期培养的SSC依然对大鼠SSC鉴定标志呈阳性反应, 结果证明利用体内大鼠SSC鉴定标志用于体外SSC长期培养的鉴定有效, 而且本体系确实能在体外维持SSC的存在。

细胞免疫荧光染色和RT-PCR鉴定结果证明, 在长达2.5个月的共培养中, 体系中同时存在SSC、精母细胞、圆形精子细胞以及支持细胞。形态观察还发现, 体系中存在少量开始变形的长鞭毛精子细胞。其维持SSC存在和精子发生的时间超过文献报道的1个月^[19]。

早期实验验证支持细胞在非渗透性材质上只能形成单层细胞且不能支持生殖细胞的维持和分化。只有基于胞外基质凝胶的支持细胞/生殖细胞共培养体系才支持生殖细胞的增殖和分化^[20]。近期研究显示, 体外培养SSC的增殖维持需要生长因子如: GDNF、LIF、bFGF等^[2,21]; 同时SSC的体外分化也需要BMP4、转铁蛋白、胰岛素等分化因子^[9,22]。

但本体系在塑料基质上直接饲养睾丸组织块游离的体细胞和生殖细胞, 只需添加胎牛血清和必要的维生素、激素, 未添加生长因子, 即可维持体系中SSC的存在及持续的减数分裂精子发生。证明不需要基于胞外基质凝胶、不添加生长因子的SGC共培养体系也能支持SSC的体外维持和分化。实验发现, 37 °C比32 °C和34 °C作为组织培养温度能更好地同时维持SSC的增殖与分化, 且更有利于支持细胞等体细胞的增殖生长; 这一结果与文献报导的结果一致^[20]。

胞浆内单精注射技术(ICSI)^[23]的开发和成熟为解决各种男性不育开辟了一条新途径。利用本生殖细胞共培养系统, 将体外共培养得到的圆形精子再

进行ICSI即可解决由减数分裂受阻和单倍体精子细胞成熟受阻引起的男性不育问题;同样在体系中对细胞进行基因操作,结合ICSI与胚胎移植技术可用于转基因动物生产。

近年来,科研发现新生鼠和猪等动物的睾丸消化细胞可以异位重构成生精小管并有精子发生^[24-25]。由50%的支持细胞、20%的小管周肌样细胞、10%的睾丸间质细胞以及5%的生精细胞组成的新生猪睾丸混合细胞在免疫缺陷小鼠皮下数天内产生束状结构,4周后束状结构形成曲细精管样结构且生精细胞排列于管周外围并发生增殖分化产生精子^[25]。这些都是体内混合细胞异位重构成生精小管,而体外培养体系中睾丸混合细胞异位重构成生精小管最早见于Hadley等^[7]的报道。而在本实验中,由曲细精管游离出来的各种混合细胞也形成了束状的类睾丸细胞索结构,证明了SGC体系的支持细胞和其他体细胞也具有参与生精索重构的生理功能。对体外类生精索的形成过程分子机制的研究既有助于对体内生精小管异位重构的器官形态发生及血睾屏障形成的研究,也有助于体外研究环境生殖毒理对体内生殖系统的影响和开发研究直接作用于支持细胞间连接使其失去支持精子发生从而达到避孕目的的新型男性避孕药物。

以上数据表明,该共培养体系既能满足体外SSC的维持又能满足体外SSC周期性分化为各级生精细胞的条件。束状的类睾丸细胞索结构的形成表明体系对体内情况的模拟进一步提高。实验在简单的体系上同时实现了SSC维持与稳定的精子发生,克服了以前SSC增殖维持和分化不能在一个体系中兼容的难题,使得体外能基本模拟体内睾丸组织的复杂有序的生理生化条件,有助于我们在体外研究雄性生殖各项生理活动的分子机制。

本实验建立了体外共培养体系及其初步分析鉴定方法,对精原干细胞的维持及分化机制的研究、药物毒理学的分子机制的研究尤其是长期毒理对生殖影响的分子机制研究、新型避孕药的研究以及用于生精细胞载体转基因动物的研究都有潜在的应用价值;为进一步在体外开展雄性生殖的机理及应用研究奠定了实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Yuan H, Yamashita YM. Germline stem cells: Stems of the next generation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(6): 730-6.
- 2 Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia *in vitro*: Influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction* 2002; 124(6): 791-9.
- 3 Zhang Y, Su H, Luo F, Wu S, Liu L, Liu T, *et al*. E-cadherin can be expressed by a small population of rat undifferentiated spermatogonia *in vivo* and *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011; 47(8): 593-600.
- 4 Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roppers-Gajadien HL, Koruji M, *et al*. Propagation of human spermatogonial stem cells *in vitro*. *JAMA* 2009; 302(19): 2127-34.
- 5 Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, *et al*. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011; 471(7339): 504-7.
- 6 Pineau C, Dupaix A, Jégou B. The co-culture of sertoli cells and germ cells: Applications in toxicology. *Toxicol In Vitro* 1999; 13(4/5): 513-20.
- 7 Hadley MA, Byers SW, Suárez-Quian CA, Kleinman HK, Dym M. Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, sticular cord formation, and germ cell development *in vitro*. *J Cell Biol* 1985; 101(4): 1511-22.
- 8 Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001; 294(5547): 1708-12.
- 9 吴应积, 罗奋华, 薛晓先, 旭日干. 绒山羊曲细精管生殖细胞的长期培养和精子发生过程的观察. *内蒙古大学学报(自然科学版)* 2005; 36(4): 411-6.
- 10 张岩, 罗奋华, 吴应积. 大鼠曲细精管生殖细胞体外共培养和精子发生过程观察. *中国男科学杂志* 2007; 21(12): 7-10.
- 11 Reyes JG, Diaz A, Osses N, Opazo C, Benos DJ. On stage single cell identification of rat spermatogenic cells. *Biol Cell* 1997; 89(1): 53-66.
- 12 Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testis. *Biol Reprod* 2007; 76(1): 130-41.
- 13 Schalk JA, Dietrich AJ, Vink AC, Offenbergh HH, van Aalderen M, Heyting C. Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonema complexes of the rat. *Chromosoma* 1998; 107(8): 540-8.
- 14 Ozaki Y, Saito K, Shinya M, Kawasaki T, Sakai N. Evaluation of Sycp3, Plzf and Cyclin B3 expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish. *Gene Expr Patterns* 2011; 11(5/6): 309-15.
- 15 Ullas KS, Rao MR. Phosphorylation of rat spermatidal protein TP2 by sperm-specific protein kinase A and modulation of its transport into the haploid nucleus. *J Biol Chem* 2003; 278(52): 52673-80.
- 16 Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretto G, Manova K, Sukhwani M, *et al*. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 2004; 36(6): 653-9.
- 17 Borjigin U, Davey R, Hutton K, Herrid M. Expression of promyelocytic leukaemia zinc-finger in ovine testis and its application in evaluating the enrichment efficiency of differential plating. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22(5): 733-42.
- 18 Fröjdman K, Harley VR, Pelliniemi LJ. Sox9 protein in rat Sertoli cells is age and stage dependent. *Histochem Cell Biol* 2000;

- 113(1): 31-6.
- 19 黄东晖, 赵 虎, 熊承良. 大鼠睾丸生精细胞共培养系统的建立. 华中科技大学学报(医学版) 2010; 39(4): 478-82.
- 20 Izadyar F, den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, de Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod* 2003; 68(1): 272-81.
- 21 Ebata KT, Yeh JR, Zhang X, Nagano MC. Soluble growth factors stimulate spermatogonial stem cell divisions that maintain a stem cell pool and produce progenitors *in vitro*. *Exp Cell Res* 2011; 317(10): 1319-29.
- 22 Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RA. Bone Morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2006; 15(6): 831-7.
- 23 Marh J, Tres LL, Yamazaki Y, Yanagimachi R, Kierszenbaum AL. Mouse round spermatids developed *in vitro* from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into *in vivo*-developed mature oocytes. *Biol Reprod* 2003; 69(1): 169-76.
- 24 Kita K, Watanabe T, Ohsaka K, Hayashi H, Kubota Y, Nagashima Y, *et al.* Production of functional spermatids from mouse germ line stem cells in ectopically reconstituted seminiferous tubules. *Biol Reprod* 2007; 76(2): 211-7.
- 25 Honaramooz A, Megee SO, Rathi R, Dobrinski I. Building a testis: Formation of functional testis tissue after transplantation of isolated porcine (*Sus scrofa*) testis cells. *Biol Reprod* 2007; 76(1): 43-7.

Long-term Culture and Spermatogenesis Analysis of Sertoli Cell/Germ Cell Co-culture System from Seminiferous Tubules of Rat Testis

Liu Linhong, Shi Xiaofang, Luo Fenhua, Yu Boyang, Zhang Yan, Liu Yan, Wu Yingji*

(Key Laboratory of China Education Ministry for the Research of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract The development of *in vitro* models of testicular reproductive system may provide important tools for investigating specific mechanisms of spermatogenesis and toxicity in the testis. Although various systems have been reported, their application in reproductive studies has been limited by the poor ability to replicate the complex biochemical, molecular, and functional interactions observed in the testis. In the present study, we evaluated a significantly improved sertoli cell/germ cell co-culture (SGC) system that the proliferation and differentiation of testicle germ cells of the rat could be maintained for long-term *in vitro*, and spermatids produced ceaselessly. The germ cells and sertoli cells came from pieces of the testis seminiferous tubules of the rat. The co-cultured cells survived *in vitro* for over two months without extra growthfactor. Furthermore, RT-PCR analysed cells stabilization of *cdh1*、*scp3*、*tnp2* expression confirmed the integrity of this co-culture system. Immunocytochemistry displayed the CDH1、PLZF、SCP3、SOX9 positive cells were existed in system. All the results proved that the SGC system included the spermatogonial stem cell, spermatocyte, round spermatid and sertoli cell. We concluded that this system would provide investigators with a simple and efficient alternative for the assessment of molecular mechanisms associated with both male reproduction development and reproductive toxicity.

Key words rat; testicle germ cell; sertoli cell/germ cell co-culture (SGC); spermatogenesis *in vitro*

Received: December 19, 2011 Accepted: March 9, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia, China (No.2009ZD05) and the National Training Fund for Talents of Basic Sciences (No.J0730648)

*Corresponding author. Tel: 86-471-4992443, E-mail: yingji_wu@yahoo.com