

技术与方法

大鼠精原干细胞的微滴培养法

霍 龙¹ 罗奋华² 张 岩^{1,3} 全祺玮¹ 吴应积^{1,2*}

(¹内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021; ²内蒙古大学哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021; ³内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010010)

摘要 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)作为成体干细胞的一类,既具有自我更新和分化的潜能,又可向子代传递遗传信息。阐明其增殖过程及分化特性对SSCs的进一步应用具有重要意义。小鼠SSCs的微滴培养研究显示,微滴培养技术与常规培养方法相比具有独特的优势。然而其他物种的SSCs能否实现微滴培养尚有待证实。该研究旨在利用微滴培养法建立大鼠SSCs体外培养技术。5、8、10、20、40个大鼠SSCs分别置于20 μL微滴中培养,用丝裂霉素处理的STO细胞作为滋养层。倒置显微镜观察记录大鼠SSCs的增殖状态。一个月后,对微滴培养的SSCs进行免疫荧光双标记染色鉴定。结果显示,一个微滴内接种5个SSCs就能实现扩增培养;培养一个月后,SSC仍然表达其特异的标记基因分子如CDH1、OCT4、PLZF、Thy1和Gfra1。体外诱导分析显示,微滴培养的大鼠SSCs具有分化为精母细胞的能力。大鼠SSCs微滴培养法的建立,为其他物种SSCs的培养提供了借鉴,也为再生医学和生命科学相关领域的研究提供了技术平台。

关键词 精原干细胞; 微滴培养技术; 免疫荧光染色; 体外分化

Microdrop Culture of Rat Spermatogonial Stem Cells

Huo Long¹, Luo Fenhua², Zhang Yan^{1,3}, Quan Qiwei¹, Wu Yingji^{1,2*}

(¹College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; ²Key Laboratory of China Education Ministry for the Research of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China;

³School of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China)

Abstract Spermatogonial stem cells (SSCs) not only possess the capacity for self-renewal and differentiation, but also can pass on genetic information to offspring. It has great significance to verify proliferation and differentiation of SSCs for further application. Research on microdrop culture of mouse SSCs showed that it had unique advantages compared to conventional culture methods. However, feasibility of the microdrop culture in other species remains to be confirmed. The purpose of this study was to establish rat SSCs culture system *in vitro* by the microdrop culture method. We transferred 5, 8, 10, 20, 40 rat SSCs into microdrops containing 20 μL medium, respectively, in which STO cells treated with mitomycin were used as the feeder layer. The proliferation status of the rat SSCs were observed and recorded using microscopy. After cultured for one month, immunofluorescence double-label staining and induction of differentiation *in vitro* were performed for analysis of the cultured SSCs. The results

收稿日期: 2013-09-29 接受日期: 2014-01-24

国家大学生创新性实验计划(批准号: 101012610)和高等学校博士学科点专项科研基金博导类项目(批准号: 20101501110001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4992443, E-mail: wuyj1211@163.com

Received: September 29, 2013 Accepted: January 24, 2014

This work was supported by the National University Student Innovation Test Plan (Grant No.101012610) and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No.20101501110001)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4992443, E-mail: wuyj1211@163.com

网络出版时间: 2014-04-29 15:27 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0318.html>

showed that inoculating at least five SSCs in a microdrop was able to achieve the SSC proliferation. After cultured in microdrop for one month, the rat SSCs still expressed the marker molecules such as CDH1, OCT4, PLZF, Thy1 and Gfra1. And they also possessed the ability to differentiate into spermatocytes *in vitro*. The microdrop culture technique for proliferation of rat SSCs had been established. It offers reference for cultivation of SSCs in other species, and provides a technology platform for related research field in regenerative medicine and life science.

Key words spermatogonial stem cells; microdrop culture; immunofluorescence staining; differentiation *in vitro*

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是精子发生的前体细胞,也是雄性个体体内唯一可以终生保持自我更新和增殖并将遗传信息纵向传递给后代的特殊干细胞群体。多年来,SSCs在细胞生物学、内分泌学和生殖医学的极大发展前景一直被人们所重视^[1]。深入研究SSCs的相关生物学特性有助于阐明精子发生的机制,对SSCs的进一步应用研究也具有重要意义。因此,SSCs的体外培养也成为了当今生物科学研究的热点问题。

1994年,Brinster等^[2-3]建立了SSCs移植技术,此后SSCs的研究便得到了空前的发展。近年来,又建立了小鼠SSCs的体外长期培养和增殖方法^[4-5]。随后,科学家们又建立了大鼠SSCs的体外培养和增殖方法。然而,在培养过程中对SSCs的生长过程却并不完全了解。能否建立一种方法可以对SSCs进行少量细胞的培养并保证较高的成活率,直接得到SSCs的细胞簇。在探讨此问题的过程中,用微滴培养技术培养SSCs引起了我们的兴趣^[6]。

微滴培养技术最早始于Brinster^[7]在1963年所创建的液体石蜡覆盖微滴培养法,其最早应用于卵子和胚胎的培养,这种用石蜡油覆盖的小滴培养对卵子和胚胎细胞的观察以及收集定量性的数据是特别有帮助的。同时,在单位体积中培养适当数量的细胞,能够保证细胞正常生长,维持培养液滴正常的渗透压。微滴法从此开始被许多研究者采用,现在也成为许多体外受精项目中的标准操作^[8]。最近,日本研究组将微滴培养技术成功应用于小鼠SSCs的体外增殖培养^[9]。研究人员使用小鼠胚胎成纤维细胞作为滋养层细胞,利用显微操作技术将SSCs转移到微滴中进行培养,获得了成功。研究指出,在SSCs的体外培养过程中,微滴培养技术的进一步成熟会使我们更深刻地了解SSCs的体外生长机理和自我更新及分化的条件。

大鼠是实验室中研究得较多的一种实验动物,

在医药以及生物学领域已有超过百万篇科研文献是以大鼠为实验动物的。然而,目前还没有较好的方法建立转基因大鼠,从而限制了大鼠的应用^[10]。小鼠研究已经显示,将转基因的SSCs移植到受体鼠睾丸,能传递供体的遗传信息,产生转基因的后代^[11]。将小鼠SSCs操作技术应用于大鼠研究,已经繁育出转基因大鼠^[12]。但是,大鼠SSCs操作技术的核心部分之一,即SSCs的长期培养,仍然存在技术难点。本研究对大鼠SSCs微滴培养技术进行探索,用少量数目明确的大鼠SSCs进行体外培养,实现了大鼠SSCs的扩增。免疫荧光双标记染色和体外诱导分化分析鉴定显示,微滴培养技术能维持大鼠SSCs的标记分子表达特性和分化能力,适用于少量大鼠SSCs的增殖培养。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar-Iamichi大鼠由内蒙古大学动物实验中心国家二级清洁型动物房繁育。本研究的大鼠SSCs由本实验室提供^[13]。实验中采用了 β -巯基乙醇(SERVA公司)、Amphotericin B(BBI公司)、链霉素(BBI公司)、青霉素(日本和光株式会社)、MEMa(GIBCO公司)、DMEM/F12(GIBCO公司)、丝裂霉素(浙江海正药业)、丙酮酸钠(日本和光株式会社)、石蜡油(Sigma公司)、EDTA(上海生工生物工程有限公司)、Trpsin(AMRESCO公司)、胎牛血清(FBS,天津灏洋生物)、BSA(Sigma公司)、正常山羊血清封闭液(BOSTER)、Hoechst(SIGMA公司)、Triton-X100(SIGMA公司)、卵泡刺激素(FSH,宁波第二激素厂)、睾酮(宁波第二激素厂)、60 mm培养皿(CORNING公司)、12孔板(CORNING公司)、无血清细胞冻存液(Sigma公司)、细胞生长因子GDNF(PROSPEC公司)、Gfra1(R&D SYSTEMS公

司)、bFGF(PROSPEC公司),其他化学试剂均为国产分析纯。

大鼠SSCs染色实验所用的一抗:抗CDH1抗体(Santa Cruze)、抗OCT4抗体(Abcam)、抗PLZF抗体(Santa Cruze)、抗Thy1抗体(Santa Cruze)、抗GFR α 1抗体(Santa Cruze);二抗:CY3偶联的山羊抗小鼠IgG(碧云天生物技术有限公司)、FITC偶联的山羊抗兔IgG(碧云天生物技术有限公司)。SSCs分化后染色所用一抗:抗Scp3抗体(Santa Cruze);二抗:CY3偶联的山羊抗兔IgG(碧云天生物技术有限公司)。细胞核染料Hoechst33342(Sigma)。

1.2 大鼠精原干细胞的分离纯化及鉴定

用22~24 d的大鼠,按Zhang等^[14]的方法分离纯化制备大鼠SSCs。大鼠精原干细胞的体外培养参照Kubota等^[15]的方法进行,用丝裂霉素处理的STO细胞做为滋养层,用无血清培养液进行精原干细胞培养。

1.3 微滴的制备

采用60 mm培养皿作为微滴承载器皿,每培养皿12个微滴,每个微滴含有20 μ L SSC培养液^[14-16]。每个微滴内接种丝裂霉素C处理的STO细胞(1~2) $\times 10^6$ /mL作为滋养层细胞^[17],在液滴表面覆盖3 mL石蜡油。用同样方法制作6个微滴培养皿。在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的饱和湿度细胞培养箱(BINDER)中过夜培养后,按文献[13]的方法利用显微操作技术将大鼠SSCs定量转移至培养皿的微滴中进行微滴培养。

1.4 大鼠SSCs的微滴培养

将确定数目的大鼠SSCs转移至微滴中进行培养:利用显微操作技术将0、5、8、10、20、40个SSCs分别转移至6个60 mm培养皿的72个微滴中,每个培养皿的微滴内只接种相同数目的细胞,每组有12个重复数据。加入细胞后,在微滴内连续吹吸8次从而使微滴内的SSCs均匀接触滋养层细胞。将培养皿置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的细胞培养箱进行细胞培养。每隔2 d更换SSCs培养液。必要时补充适量的滋养层细胞。

定时对微滴内的细胞进行观察并照相:每次换液时用Nikon TE2000-U倒置显微镜对培养的SSCs进行观察照相。培养至一个月时,一部分微滴中的SSCs用于细胞固定和免疫荧光染色鉴定,其余微滴中的SSCs收集起来用于体外诱导分化实验。

1.5 免疫荧光双标染色鉴定

张岩等^[16]证实,CDH1也可以作为大鼠SSCs的

标记分子,可以用于大鼠SSCs的鉴定。因此,本实验用CDH1作为主抗体,与其他四种抗体(OCT4^[18]、PLZF^[19]、Thy1^[20]、Gfra1^[21])组合成为四组进行免疫荧光双标染色鉴定,即OCT4-CDH1、PLZF-CDH1、THY1-CDH1、Gfra1-CDH1。取在微滴连续培养一个月的SSCs,小心吸去微滴内的培养液,用4%多聚甲醛对微滴内的细胞室温固定1 h,DPBS洗涤5次,随后用正常山羊血清对细胞进行室温封闭处理30 min。封闭后向四个微滴中加入第一种一抗(CDH1)(1:80稀释),4 $^{\circ}$ C过夜。吸去一抗,用DPBS洗涤5次以除去未结合的IgG,再向4个微滴中加入Cy3偶联的二抗(1:100稀释)(Goat-anti-mouse),室温孵育30 min,用DPBS洗涤5次以除去未结合的二抗IgG。第二种一抗如果其抗原是胞内蛋白就要进行通透处理。随后向4个滴内分别对应加入OCT4、PLZF、Thy1、Gfra1四种一抗,4 $^{\circ}$ C过夜,用DPBS洗涤5次以除去未结合的IgG,加入FITC偶联的二抗(1:100稀释)(goat-anti-rabbit)共孵育30 min,使用DPBS洗涤5次,再对4个滴进行Hoechst33342(1:1 000稀释)染色,DPBS洗涤5次后加入新鲜的DPBS,用Nikon TE2000-U倒置荧光显微镜进行观察照相。

1.6 SSCs的体外诱导分化

首先,将12孔板的两个孔标记为A、B,用0.2% gelatin处理,培养板置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱1 h,然后吸去gelatin处理液,用PBS洗3遍。在A、B两孔中分别加入山羊睾丸支持细胞1 $\times 10^6$ /mL(Sertoli cells,由本实验室提供^[22]),在含10% FBS的DMEM/F12培养液中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养过夜。缓慢吸出支持细胞培养液,向A孔中加入微滴培养法所获得的大鼠SSCs,B孔作为对照组只有支持细胞。将12孔板进行整板离心,用水平离心转头3 000 r/min,使SSCs贴在底部的支持细胞上。温和地吸干培养液,每孔加入含0.3%低熔点琼脂糖的分化诱导液(DMEM/F12,10% FBS)、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 μ g/mL)、 β -巯基乙醇(0.1 mmol/L)、两性霉素B(0.125 μ g/mL、SCF 100 ng/mL) 500 μ L^[23],斜置于10 $^{\circ}$ C水浴中15 min使琼脂糖凝固。凝固后再每孔添加500 μ L分化诱导液,放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的恒温培养箱中培养。每隔2~3 d换一次培养液,并每天进行观察。

对分化培养10 d的细胞进行Scp3免疫荧光染色分析。吸去培养皿中的培养液,使用4%多聚甲醛对两组细胞室温固定1 h,DPBS洗涤3次,使用Triton-

X100对A、B两孔细胞进行通透处理后,加正常山羊血清封闭液室温处理30 min,封闭后向两孔中加入一抗(Scp3)(1:50稀释),4 °C过夜。吸去一抗,使用DPBS洗涤3次以除去未结合的IgG,再向两孔中加入Cy3偶联的二抗(1:200稀释)(Goat-anti-rabbit),室温与细胞共孵育30 min,使用DPBS洗涤3次,再对两个孔进行Hoechst33342核染色,DPBS洗涤3次后加入新鲜的DPBS,用Nikon TE2000-U荧光倒置显微镜进行观察照相。

2 结果

2.1 大鼠SSCs分离纯化培养结果

大鼠SSCs经过单细胞悬液制备、差别贴壁纯化,纯度达到90%以上。用丝裂霉素C处理的STO细胞作为滋养层,用已知成分的无血清培养液对大鼠SSCs进行继代培养一年以上,传代达30代以上。

2.2 连续一个月微滴培养大鼠SSCs的增殖状况

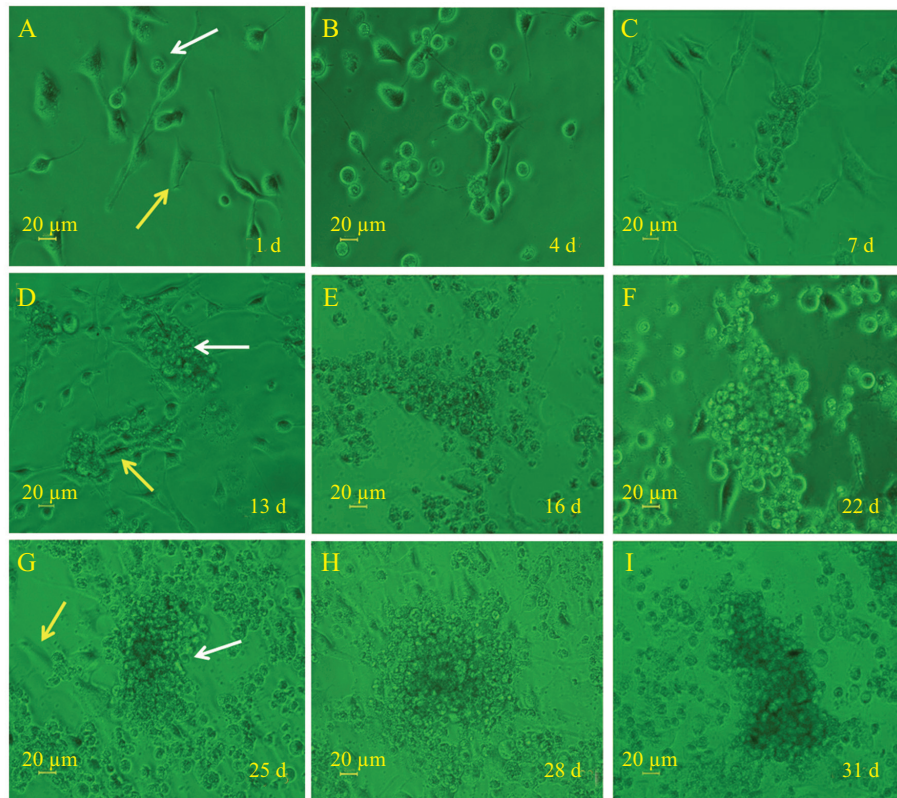
用30代以上的大鼠SSCs进行大鼠微滴培养研

究。通过微滴换液培养、观察、照相等实验操作,对微滴培养的大鼠SSCs进行观察记录。其中不同接种数目的全部微滴内的SSCs均实现扩增,尤其是数量最少的5个细胞的微滴同样实现SSCs扩增,并均能在微滴内的增殖培养达一个月,通过观察记录了微滴内SSCs连续增殖的状况(图1),证明该方法所培养的SSCs可以实现正常增殖。

2.3 免疫荧光双标染色鉴定

采用四组免疫荧光染色对在微滴内培养一个月的大鼠SSCs进行免疫荧光双标记染色。所用抗体组合为CDH1-OCT4、CDH1-PLZF、CDH1-Thy1、CDH1-Gfra1。染色表明,采用微滴培养的大鼠SSCs表达其特异的标记分子CDH1、OCT4、PLZF、Thy1和Gfra1。滋养层细胞(黄色箭头)的染色结果为阴性(图2),说明大鼠SSCs经过微滴培养一个月后仍然保留SSCs标记分子。

由微滴内成功实现SSCs的细胞簇的生长和分化,我们可以发现微滴确实可以为细胞生长提供较

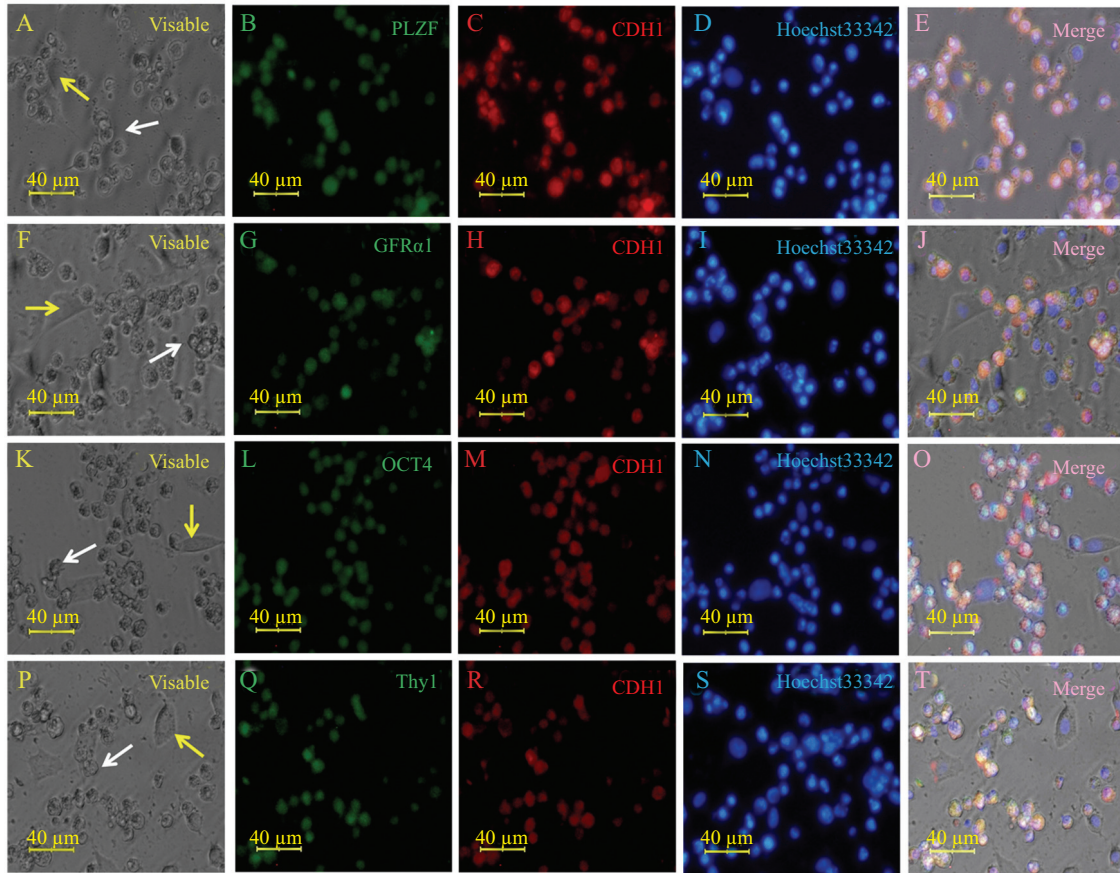


接种10个SSCs(A、D、G中白色箭头指示的细胞)的微滴在培养1 d(A)、4 d(B)、7 d(C)、13 d(D)、16 d(E)、22 d(F)、25 d(G)、28 d(H)及31 d(I)的照片,其中滋养层细胞在A、D、G中由黄色箭头指示。

Photos were captured at day 1 (A), 4 (B), 7 (C), 13 (D), 16 (E), 22 (F), 25 (G), 28 (H) and 31 (I), respectively. And the microdrop the original number of SSCs (white arrow pointed cells in A, D and G) is 10. The SSCs and the feeder cells (yellow arrow pointed cells in A, D and G) had been marked.

图1 微滴方法培养的大鼠SSCs(200×)

Fig.1 Rat SSCs cultured by microdrop technique (200×)

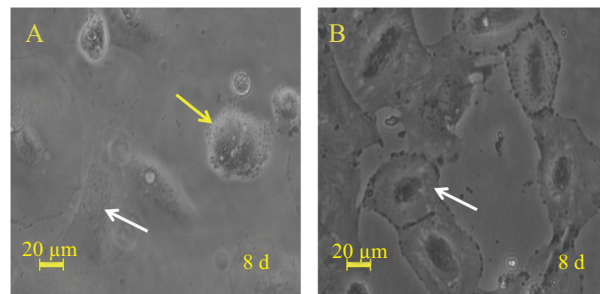


A~E: 抗体组合为CDH1-PLZF; F~J: 抗体组合为CDH1-Gfra1; K~O: 抗体组合为CDH1-OCT4; P~T: 抗体组合为CDH1-Thy1。其中, CDH1将细胞染成红色荧光(C、H、M、R), PLZF、Gfra1、OCT4、Thy1将细胞染成绿色荧光(B、G、L、Q)。图片合并后, 观察到两种抗体染色的细胞重叠(E、G、O、T)。SSCs(A、F、K、P中白色箭头指示的细胞)都被标记分子染色, 而滋养层细胞(A、F、K、P中黄色箭头指示的细胞)均为阴性。细胞核被Hoechst33342染成蓝色(D、I、N、S)。

A~E: stained with CDH1 and PLZF; F~I: stained with CDH1 and Gfra1; K~O: stained with CDH1 and OCT4; P~T: among them, CDH1 positive cells were labeled as red colour (C, H, M, R); PLZF, Gfra1, OCT4 and Thy1 positive cells were stained as green colour, respectively (B, G, L, Q). After merged, red colour and green colour were overlapped (E, G, O, T). SSCs (white arrow pointed cells in A, F, K, and P) were stained with fluorescence, and the feeder layer cells (yellow arrow pointed cells in A, F, K, and P) were negative. Cells were stained with Hoechst33342 to detect nuclear DNA (blue colour in D, I, N, S).

图2 微滴内培养一个月的大鼠SSCs免疫荧光双标记染色

Fig.2 Double-label immunofluorescence staining of rat SSCs cultured in the microdrops for one month

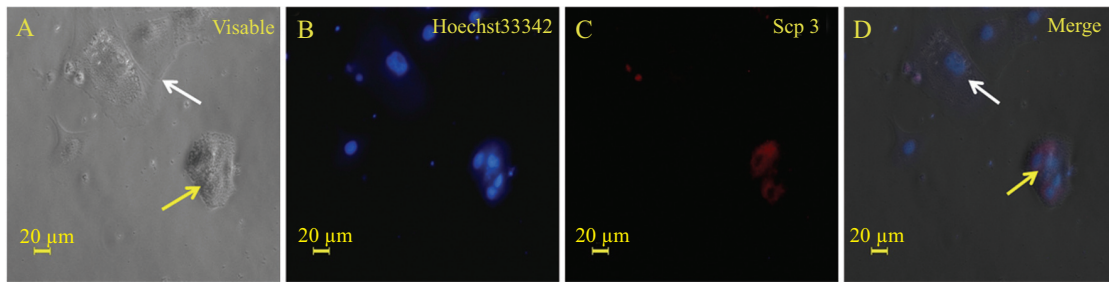


A: 微滴培养法获得的SSCs进行诱导分化培养, 8 d后观察到的精母细胞(黄色箭头)形成, 白色箭头指示山羊睾丸支持细胞; B: 对照实验组内未加入SSCs, 山羊睾丸支持细胞(白色箭头)8 d后状态良好。

A: spermatocytes (yellow arrow pointed) were formed after the SSCs cultured in inducing differentiation condition for 8 days; B: there were no SSCs in the control sample. The goat Sertoli cells (white arrow pointed) were possessed of normal morphology after cultured in inducing differentiation condition for 8 days.

图3 大鼠SSCs的体外诱导分化

Fig.3 Inducing differentiation of rat SSCs in vitro



A: 可见光; B: Hoechst33342染色; C: Scp3染色; D: 前三张的合并图。黄色箭头指示精母细胞, 白色箭头指示山羊睾丸支持细胞。

A: visible; B: Hoechst33342 staining; C: Scp3 staining; D: merge of previous 3 pictures. The yellow arrow indicated spermatocyte, and the white arrow indicated goat Sertoli cell.

图4 诱导分化培养10 d后观察到大鼠精母细胞形成

Fig.4 Spermatoocyte formation was observed after cultured by inducing differentiation for 10 d

理想的生长环境, 并且石蜡油的覆盖也明显防止了液体蒸发。

2.4 微滴内大鼠SSCs的体外分化

为了确认微滴培养法所获得的大鼠SSCs是否可以在体外进行分化, 本实验将体外分离纯化的山羊睾丸支持细胞和微滴培养法获得的大鼠SSCs进行共培养, 并定时进行观察比较。在睾丸支持细胞完全贴壁后加入大鼠SSCs, 在加入SSCs的24 h内贴在皿底精原细胞的数量逐渐减少。培养24 h后, 精原细胞数量基本稳定, 之后每隔2~3 d置换一次培养液。培养3~4 d时, 较少看到SSCs。培养至8 d观察到有较多精母细胞成批出现(图3)。由于精母细胞体积较大, 往往大于15 μm , 其中初级精母细胞多大于20 μm , 所以很容易辨认(图3)。利用定时多次拍照技术可以对比发现, 精母细胞有较明亮的细胞质, 有的有细胞附器, 能做顺时针或逆时针旋转, 但没有或少有位移。这个细胞形态及运动行为与睾丸组织块共培养体系的精母细胞观察结果相一致^[24-25]。

SCP3为精原干细胞减数分裂的标记蛋白。使用SCP3抗体对已分化的细胞进行免疫荧光染色鉴定, 证明微滴培养法所获得的SSCs经过体外诱导分化能够转变为精母细胞(图4)。

3 讨论

在整个精子发生过程中, 精子的产生是一个高度复杂的细胞分化过程, 需要整个睾丸内的各种细胞的精确调控。这个复杂的过程就始于睾丸基底膜上的一群数量很少的SSCs。在成年小鼠睾丸内的全部生殖细胞中, 仅有0.03%是SSCs^[26]。因此, 对SSCs进行培养是从体外研究SSCs及精子发生过程

调控的关键一步。

Brinster^[7]于1963年用液体石蜡覆盖微滴培养法培养卵子和胚胎取得成功。本实验中使用的微滴培养法, 实现了较少接种数目的大鼠SSCs的增殖, 尤其是数量少至5个细胞的微滴内同样可以实现大鼠SSCs扩增。这足够说明微滴培养体系对于大鼠SSCs的体外培养是可行的, 而较少接种数目的大鼠SSCs在常规的培养方法中却难以实现扩增。这种在微滴中接种较少数目的细胞就可实现该细胞的增殖将会为SSCs的进一步研究提供新的技术支撑, 同时也为其他物种SSC的培养提供新的选择。

E-cadherin(CDH1)^[16]、OCT4^[18]、PLZF^[19]、Thy1^[20]、Gfra1^[21]作为大鼠SSCs标志分子已被报道, 本实验使用CDH1作为大鼠SSCs的特异性检测主抗体, 其在体内和体外都实现了特异性表达^[16]。最近报道证实, CDH1(也被称作E-cadherin)是小鼠SSCs的特异表面标记基因^[27]。CDH1是一个特异的在上皮组织中表达的跨膜糖蛋白, 被证实胚胎形成、通过细胞间连接复合物形成组织结构和产生细胞极性中起作用^[28]。本课题组张岩等^[16]也通过大量的实验阐明CDH1可以作为大鼠SSCs的标记分子, 用于大鼠SSCs的鉴定。本研究用这些标记分子对培养长达一个月的SSCs进行双标免疫荧光染色鉴定, 而这些SSCs特异标记蛋白在滋养层细胞内却恰好不会表达。结果证明, 微滴培养法对大鼠SSCs的标记分子表达特性不会产生负面影响, 培养31 d后, 大鼠SSCs仍维持表达精原干细胞标记分子。

为了证实微滴培养所得的大鼠SSCs仍具备分化潜能, 将体外分离纯化的山羊睾丸支持细胞和微滴培养法获得的大鼠SSCs进行共培养。开始观察的3~4 d大鼠SSCs数量减少很快。这与之前的研究结

果很类似,可能是由于细胞凋亡导致的^[29],另外造成这种情况的原因也可能是有SSCs进入分化阶段便与支持细胞脱离而漂浮进入培养液里,导致因更换培养液而流失。还有,该体外诱导分化体系不能提供接下来的精子形成所需的其他激素和微环境,所以分化后的精母细胞数量随着时间的延长而减少。在培养10 d后对分化为精母细胞的大鼠SSCs的成功染色证明了微滴培养法所获得的SSCs仍具有原本的分化潜能,能够分化为精母细胞。在精母细胞SCP3染色中,SCP3的高表达不出现在细胞核中,在其他物种如山羊的实验中也发现有类似情况。这可能是由于SCP3在内质网合成后,还没有大量转运到细胞核;或者可能是在现有的体外培养条件下,SCP3转运到细胞核存在某些障碍,尚需要做进一步的研究。

通过实验发现,微滴培养法对大鼠SSCs的体外培养过程实现了定期观察,便于研究SSCs在液体微滴内的相对适宜培养条件。采用常规的培养皿培养系统虽可对SSCs进行体外较多数量的培养,但是这种方法难以观察SSCs的个体生长过程。此外,随着研究的深入,相信追踪到单个SSCs的详细生长过程在下一步工作中也会实现。同时,微滴培养法可以大量节省实验用细胞和生长因子等实验耗材,不仅可以减少大量的实验成本,而且可以广泛被其他相关试验借鉴。

在实验研究过程中我们体会到,微滴培养体系具有一定的优点:覆盖的石蜡油不仅可避免细胞染和培养液蒸发的损失,还起到了稳定pH的作用。研究表明,覆盖油层还可以起到对有毒物质洗涤的作用^[30]。同时,国内外专家已经开始研究如何更好地控制SSCs体外的培养条件,如水分蒸发、温度、pH控制、有毒物质排除等一系列问题,微滴培养技术可以为SSCs生长创造更好的条件。

综上所述,本实验利用微滴培养法建立了大鼠SSCs的体外培养体系。在微滴内接种较少数量的SSCs(本实验中最小接种数为5)也可以实现扩增,从而为今后SSCs的培养及扩增提供了新的途径,为以后SSCs特性的研究提供更加准确和便利的条件。对SSCs免疫荧光双标染色和成功诱导体外分化为精母细胞,证明该方法不会改变SSCs的标记分子表达特性,可以获得具有分化潜能的大鼠SSCs。这一培养方法的建立不但为其他物种SSCs的培养提供了借鉴,所获得的SSCs也将为再生医学和生物学相关

领域的研究提供了技术平台。

参考文献 (References)

- 1 吴应积, 罗奋华, 旭日干. 用精原干细胞移植技术制作转基因动物的研究前景. 科学通报(Wu Yingji, Luo Fenhua, Bou Shorgan. Prospect of the establishment of transgenic animals by primitive spermatogonium transplantation. Chinese Science Bulletin) 2005; 50(19): 2061-8.
- 2 Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(24): 11303-7.
- 3 Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(24): 11298-302.
- 4 Kanatsu-shinohara M, Muneto T, Lee JY, Takenaka M, Chuma S, Nakatsuji N, *et al.* Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. Biol Reprod 2008; 78(2): 611-8.
- 5 Kanatsu-shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee JY, Kazuki Y, Inoue K, *et al.* Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long term culture. Development 2005; 132(18): 4155-63.
- 6 霍 龙, 张 岩, 吴应积. 微滴培养技术的新应用. 生物技术通报 (Huo Long, Zhang Yan, Wu Yingji. The new applications of micro-drop culture technique. Biotechnology Bulletin) 2011; 2011(9): 59-62.
- 7 Brinster RL. A Method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp Cell Res 1963; 32(1): 205-8.
- 8 Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development *in vitro*. Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(12): 4756-60.
- 9 Araki Y, Sato T, Katagiri K, Kubota Y, Araki Y, Ogawa T, *et al.* Proliferation of mouse spermatogonial stem cells in microdrop culture. Biol Reprod 2010; 83(6): 951-7.
- 10 Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hamme RE, Gargers DL. Self-renew expansion and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(48): 17430-5.
- 11 Hamra FK, Gatlin J, Chapman MK, Grellhesl DM, Garcia JV, Hammer RE, *et al.* Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(23): 14931-6.
- 12 Owig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Retrovirus-mediated modification of male germline stem cells in rats. Biol Reprod 2002; 67(3): 874-9.
- 13 张 岩, 罗奋华, 刘林洪, 萨初拉, 于泊洋, 吴应积. 大鼠精原干细胞的高效分离和纯化方法. 中国细胞生物学学报(Zhang Yan, Luo Fenhua, Liu Linhong, Wu Sachula, Yu Boyang, Wu Yingji. Efficient separation and purification of rat spermatogonial stem cells. Chinese Journal of Cell Biology) 2011; 33(5): 543-7.
- 14 Zhang Y, Su HM, Luo FH, Wu SC, Liu LH, Liu TD, *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.
- 15 Kubota H, Brinster RL. Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cell of the postnatal animal. Methods Cell Biol 2008; 86: 59-84.
- 16 Wu ZR, Falciatori I, Molyneux LA, Richardson TE, Chapman

- KM, Hamra FK, *et al.* Spermatogonial culture medium: An effective and efficient nutrient mixture for culturing rat spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2009; 81(1): 77-86.
- 17 刘海超, 张 岩, 于泊洋, 吴应积. 制备精原干细胞滋养层细胞条件的优化. *现代生物医学进展*(Liu Haichao, Zhang yan, Yu Boyang, Wu Yingji. Optimization of preparing feeder layer cells of spermatogonial stem cells. *Progress in Modern Biomedicine*) 2012; 12(4): 626-30.
- 18 Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech* 1998; 71(1): 89-98.
- 19 Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, *et al.* Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 2004; 36(6): 653-9.
- 20 李彦锋, 郭应禄, 李晓红, 靳凤烁, 孙中义, 张克勤. 人精原干细胞特异性标志的初步筛选. *中华男科学杂志*(Li Yanfeng, Guo Yinglu, Li Xiaohong, Jin Fengshuo, Sun Zhongyi, Zhang Keqin. Preliminary screening of specific surface markers of human spermatogonial stem cells. *National Journal of Andrology*) 2005; 11(7): 486-9.
- 21 Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296(5576): 2174-6.
- 22 Su HM, Luo FH, Bao JJ, Wu SC, Zhang XM, Zhang Y, *et al.* Long-term culture and analysis of cashmere goat sertoli cells. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 2014; in press.
- 23 Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, *et al.* Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 2002; 297(5580): 392-5.
- 24 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的观察. *中国男科学杂志*(Zhang Yan, Luo Fenhua, Wu Yingji. Co-culture and spermatogenesis observation of germ cells from rat seminiferous tubules. *Chinese Journal of Andrology*) 2007; 21(12): 7-10.
- 25 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)*(Wu Yingji, Luo Fenhua, Xue Xiaoxian, Bou Shorgan. Long-term culture and spermatogenesis observation of germ cells from sminiferous tubules of cashmere goat. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis NeiMongol*) 2005; 36(4): 411-6.
- 26 Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296(5576): 2174-6.
- 27 Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod* 2007; 76(1): 130-41.
- 28 Lee JO, Kwun HJ, Jung JK, Chio KH, Min DS, Jang KL. Hepatitis B virus X protein represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1. *Oncogene* 2005; 24(44): 6617-25.
- 29 Stukenborg JB, Wistuba J, Luetjens CM, Elhija MA, Huleihel M, Lunenfeld E, *et al.* Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-ager-culture-system. *J Androl* 2008; 29(3): 312-29.
- 30 Miller KF, Goldberg JM, Collins RL. Covering embryo cultures with mineral oil alters embryo growth by acting as a sink for an embryotoxic substance. *Assist Reprod Genet* 1994; 11(7): 342-5.