

不同年龄小鼠精原干细胞系的建立

周海^{1,2} 伍春莲^{1*} 李劲松^{2*}

(¹西华师范大学生命科学院, 南充 637002; ²中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是雄性动物体内能进行终生自我更新并能将亲代基因遗传给予子代的一类细胞。不同年龄段的小鼠有不同的建系方法。6~7 d幼鼠, 可以用差异贴壁或直接贴壁法; 5~6周成年鼠, 一般采用差异贴壁法; 31周老年鼠, 最好种于饲养层细胞上。通过对精原干细胞系的甲基化和特异基因分析以及睾丸体内移植验证分析, 成功建立了具有功能的不同年龄段的小鼠精原干细胞系。

关键词 精原干细胞; 睾丸; 体外培养

Establishing Spermatogonial Stem Cell Lines of Mice at Different Ages

Zhou Hai^{1,2}, Wu Chunlian^{1*}, Li Jinsong^{2*}

(¹School of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002, China; ²State Key Laboratory of Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Spermatogonial stem cells (SSCs) are a pool of cells which are capable of self-renewal and differentiation in male animals' whole-life. We established several SSC lines of mice at different ages using three methods. The results showed that two methods (difference adherence and direct adherence) could be used to establish SSCs in the 6~7 d little mice, but the SSCs from 5~6 weeks' mice were established only by the difference adherence. However, we did not get the SSCs lines of 31 weeks mice using the methods which were mentioned above other than culture on feeder cells. Finally, the functions of those SSCs were determined through analysis of spermatogonial stem cell lines methylation, specific genes expression and *in vivo* testis transplantation validation.

Key words spermatogonial stem cells (SSCs); testis; *in vitro* culture

在机体内, 干细胞持续产生的分化细胞对维持组织器官的功能至关重要。小鼠睾丸中精原细胞持续分化产生精子这一过程贯穿整个雄性的生命过程。精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是雄性动物体内唯一能进行终生自我更新, 并且遗传亲代基因给予子代的一类二倍体永生细胞群。

精原干细胞主要参与精子发生, 经过减数分裂能发育成单倍体生殖细胞, 也可以进行基因修饰, 再将外源基因转移给后代。精原干细胞是一类具有胚胎干细胞的发育特性又能把遗传信息传递给子代的干细胞, 它不断地自我更新以维持自身数量的恒定, 同时又定向分化为大量生殖细胞, 包括初级精母细

收稿日期: 2014-01-10 接受日期: 2014-03-03

四川省教育厅重大培育项目(批准号: 13CZ0029)和三峡库区生态环境与生物资源省部共建重点实验室开放课题基金项目(批准号: SKL-2011-05)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0817-2583848, E-mail: wcl_xj@163.com; Tel: 021-54921422, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

Received: January 10, 2014 Accepted: March 3, 2014

This work was supported by the Major Training Project of Sichuan Provincial Department of Education (Grant No.13CZ0029) and the State Key Laboratory Breeding Base of Eco-Environments and Bio-resources of the Three Gorges Reservoir Region (Grant No.SK.2011-05)

*Corresponding authors. Tel: +86-817-2583848, E-mail: wcl_xj@163.com; Tel: +86-21-54921422, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2014-05-16 14:59 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0004.html>

胞、次级精母细胞和精细胞,并最终形成有受精能力的单倍体精子^[1]。2003年以前,精原干细胞体外长期培养的研究一直没能取得成功^[2],直到Kanatsu-Shinohara等^[3]首次报道了精原干细胞稳定的长期培养体系,实现了精原干细胞的体外长期培养,进一步推动了精原干细胞相关研究的快速发展。但是,精原干细胞的数量非常有限,在成年小鼠中仅占有生殖细胞的0.03%^[4]。随着年龄的增加和生殖能力的增强,睾丸越长越大,生殖细胞不断进行减数分裂变得越来越多,然而在哺乳动物体内精原干细胞的数量基本维持不变。

本实验通过不同方法建立了不同年龄的小鼠精原干细胞系,通过对比老年的与幼年的小鼠精原干细胞的特定基因表达水平和印迹基因的甲基化状况,进一步证实老年的小鼠精原干细胞与幼年的精原干细胞之间没有明显的差异。不同年龄段小鼠精原干细胞的建系过程和建系方法都很重要,通过实验,我们找到了针对不同年龄段小鼠精原干细胞的具体建系方法,从而进一步为体外研究精原干细胞体内体外的分化能力、自我更新能力以及表面的一些特异性蛋白等方面提供了条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 6~7 d的(eGFP)B6D2F1雄性幼鼠3只,5~6周龄的(eGFP)B6D2F1雄鼠1只,31周龄的BDF1雄鼠1只。5~6周龄的B6D2F1雄鼠若干只,用作外源精原干细胞的受体,提前一个月注射白消安,用于去除内源的生殖细胞(实验用鼠由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所李劲松课题组提供)。

1.1.2 主要试剂 培养液采用StemPro-34 SFM并补充StemPro营养添加物(上海英骏生物技术有限公司);胰岛素和Trizol试剂购自英俊公司;转铁蛋白、孕酮、腐胺、亚硒酸钠、葡萄糖、维生素、生物素、乳糖酸钠等试剂均购自美国Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠精原干细胞的分离 采用颈椎脱臼法处死雄性小鼠,75%的酒精擦拭小鼠全身消毒,在无菌条件下收集两侧睾丸,放入盛有适量DPBS的60 mm培养皿中;用尖头镊子将睾丸放入培养皿盖中,用剪刀将睾丸剪碎;取5 mL四型胶原酶和DNA酶在37 °C消化15~20 min;1 400 r/min离心5 min,弃上清液;加

入4 mL胰蛋白酶,37 °C作用5 min,加入4 mL含15% FBS的基础培养基终止消化反应;用70 μm的滤膜过滤,1 400 r/min离心5 min,轻轻吸去上清液;加入适量MEF培养液,反复轻轻吹打,制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 /mL。MEF的培养液成分包括普通细胞培养基DMEM、非必需氨基酸、链霉素、青霉素以及10%的胎牛血清(上海英骏生物技术有限公司)。

1.2.2 直接贴壁法 提前1 d在细胞培养板中铺上0.1%明胶,然后取制备好的6~7 d的幼鼠睾丸细胞 4×10^5 个,种于6孔板的两孔中,每孔约 4×10^5 细胞,第4 d进行第1次细胞换液。7 d后有明显的精原干细胞克隆,将精原干细胞克隆挑出,用胰蛋白酶消化后种于一个新的铺有饲养层细胞的培养皿中。对于31周的小鼠,取 1×10^6 睾丸细胞悬液,处理方法与6~7 d的幼鼠一致。

1.2.3 差异贴壁法 取 2×10^5 制备好的6~7 d的幼鼠睾丸细胞悬液,种于12孔板的3孔中,每孔约 2×10^5 细胞。2 h后轻轻吹打10次,将上清液转移到一个新的孔中,12 h后再次吹打和转移。第4 d进行第1次换液。7 d后,轻轻吹打3孔的细胞,制备成细胞悬液,全部转移到一个孔中。31周的小鼠,取 5×10^5 制备好的睾丸细胞悬液,种于12孔板的3孔中,处理过程和步骤与6~7 d的幼鼠一致。

1.2.4 RT-PCR检测精原干细胞特异基因的表达

传代剩余的细胞经过1 h的贴壁后,轻轻吹打收集上清,用Trizol法提取总RNA,用ReverTra Ace qPCR RT-Kit(ToYoBo)进行半定量RT-PCR分析。RT-PCR反应条件是:30 °C反应10 min;然后于42 °C反应20 min,99 °C反应5 min,4 °C反应5 min;最后于4 °C保存。引物相关信息如表1所示。

1.2.5 精原干细胞的甲基化分析 用传代3~4次且除去饲养层的精原干细胞,抽提基因组DNA,取800 ng左右用重亚硫酸盐测序方法检测精原干细胞基因组DNA的母源印迹基因*Snrpn*和父源印迹基因*H19*的甲基化水平。

1.2.6 睾丸的曲精小管注射 小鼠用白消安处理一个月后开始移植实验,待受体小鼠深度麻醉后,将小鼠腹部用酒精消毒,用手术剪剪一个小口,拉出脂肪找到睾丸,并用镊子轻轻拉出后用三角小镊子将睾丸固定,找到睾丸向附睾的输出小管,将精原干细胞由输出小管注入受体睾丸中。2个月等待观察精原干细胞的归巢以及发育情况。

2 结果

2.1 不同年龄的小鼠精原干细胞的建系方法不同

对于不同年龄段的小鼠, 建立精原干细胞(SSCs)细胞系的方法是不一样的, 因此本文采用三种方法对

不同年龄段的小鼠睾丸细胞进行处理: 差异贴壁法去除睾丸的体细胞、直接贴壁保留睾丸体细胞以及所有睾丸细胞种子饲养层上(图1)。通过实验, 我们总结了针对不同年龄段的小鼠SSCs细胞系最方便快捷的

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	正义链(5'→3') Sense primer (5'→3')	反义链(5'→3') Antisense primer (5'→3')	退火温度 Tm
<i>Oct4</i>	CTG AGG GCC AGG AGG AGC ACG AG	CTG TAG GGA GGG CTT CGG GCA CTT	62 °C
<i>Nanog</i>	AGG GTC TGC TAC TGA GAT GCT CTG	CAA CCA CTG GTT TTT CTG CCA CCG	59 °C
<i>FGF4</i>	CAG CGA GGC GTG GTG AGC ATC TTC GGA	CTT CTT GGT CCG CCC GTT CTT ACT GAG	58 °C
<i>Sox2</i>	GGG TGC AAA AAG AGG AGA GTA G	GCG CCT AAC GTA CCA CTA GAA C	61 °C
<i>Dazl</i>	GCA CTC AGT CTT CAT CAG CAA C	CTA TCT TCT GCA CAT CCA CGT C	57 °C
<i>piwil2</i>	CTT CCT GTA ACT GGG AAC TTG G	GCA CCA CAA CAC CCT ACT ATG A	58 °C
<i>Mvh</i>	GCT CAA ACA GGG TCT GGG AAG	GGT TGA TCA GTT CTC GAG	59 °C
<i>Rex1</i>	CAC CAT CCG GGA TGA AAG TGA GAT	ACC AGA AAA TGT CGC TTT AGT TTC	60 °C
<i>GFRa1</i>	CAC CAT GAC CCT AGC CAC TCT GT	CTT CTT GGT CCG CCC GTT CTT ACT GAG	61 °C
<i>Klf4</i>	ACT CTG AGG AGG AAC AAG AA	TGGAGACGTGGCACCTCTT	62 °C
<i>GAPDH</i>	TGC CCA GAA CAT CAT CCC T	ATG CCT GCT TCA CCA CCT T	61 °C

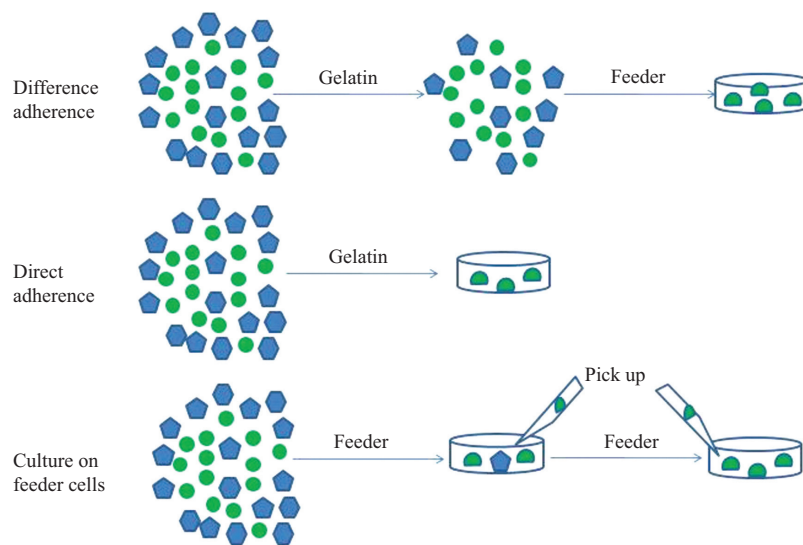


图1 精原干细胞的建系方法模式图

Fig.1 Mode pattern of spermatogonial stem cells in established methods

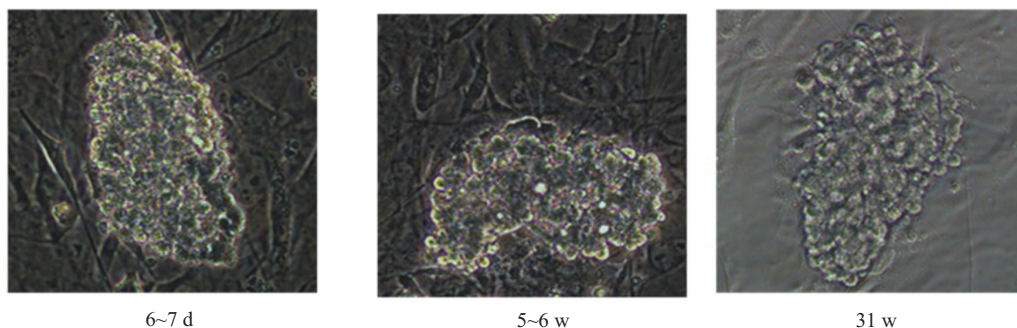


图2 不同年龄段小鼠的精原干细胞

Fig.2 The spermatogonial stem cells of mice at different ages

建立方法: 6~7 d幼鼠, 差异贴壁法和直接贴壁法都可以用于建立精原干细胞系; 对于5~6 w成年鼠, 应该采用差异贴壁法; 然而对于31 w老年鼠, 最好采用种于饲养层上的这种建系方法。通过上述方法我们建立了6~7 d、5~6 w、31 w的小鼠精原干细胞系(图2)。

2.2 不同年龄段精原干细胞RT-PCR

本研究分别对胚胎干细胞(E14)、幼年SSCs(6~7 d)、成年SSCs(5~6 w)和老年SSC(31 w)这些不同年龄段的SSCs进行RT-PCR基因表达水平的分析。通过实验研究发现, 老年SSCs、成年SSCs和幼年

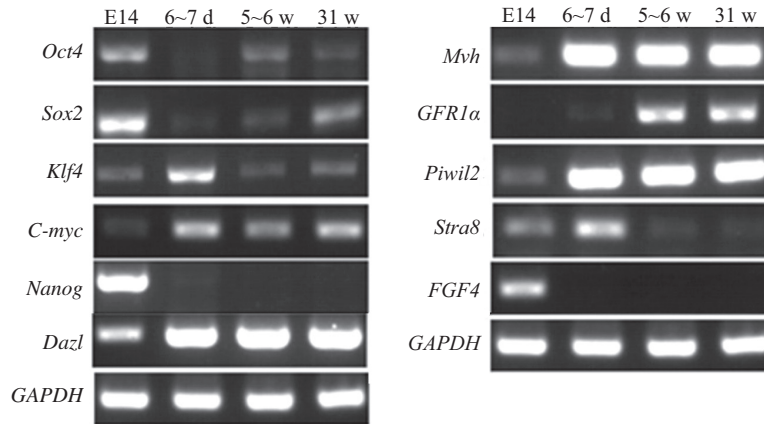


图3 精原干细胞RT-PCR

Fig.3 RT-PCR of spermatogonial stem cells

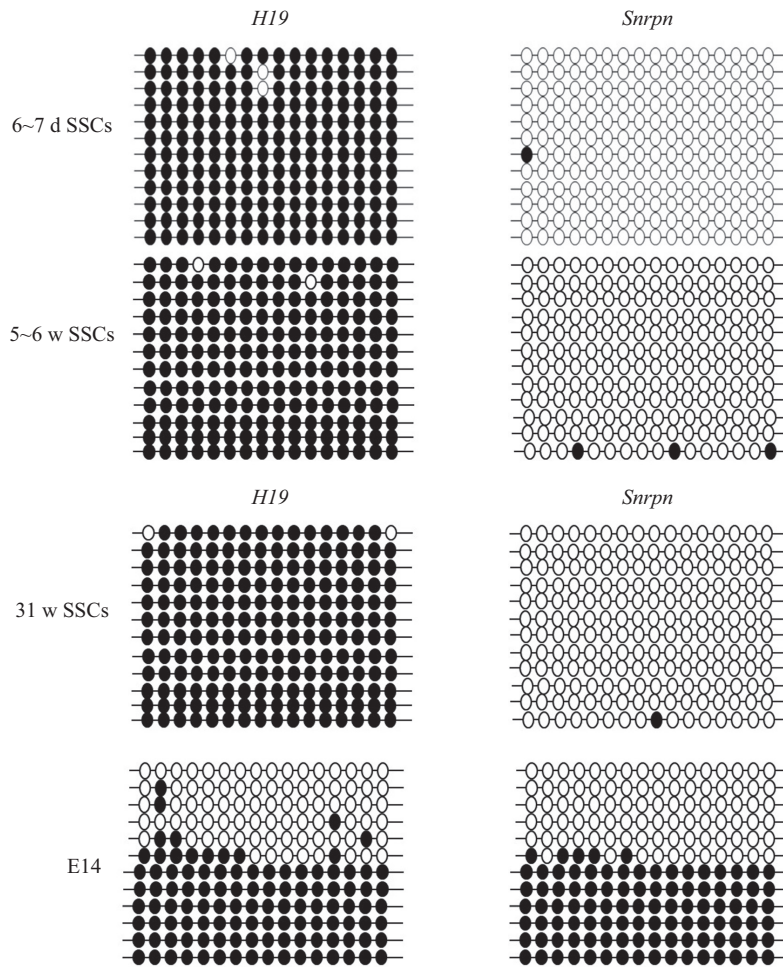


图4 精原干细胞印记基因的甲基化情况

Fig.4 Methylation status of imprinted genes in spermatogonial stem cells

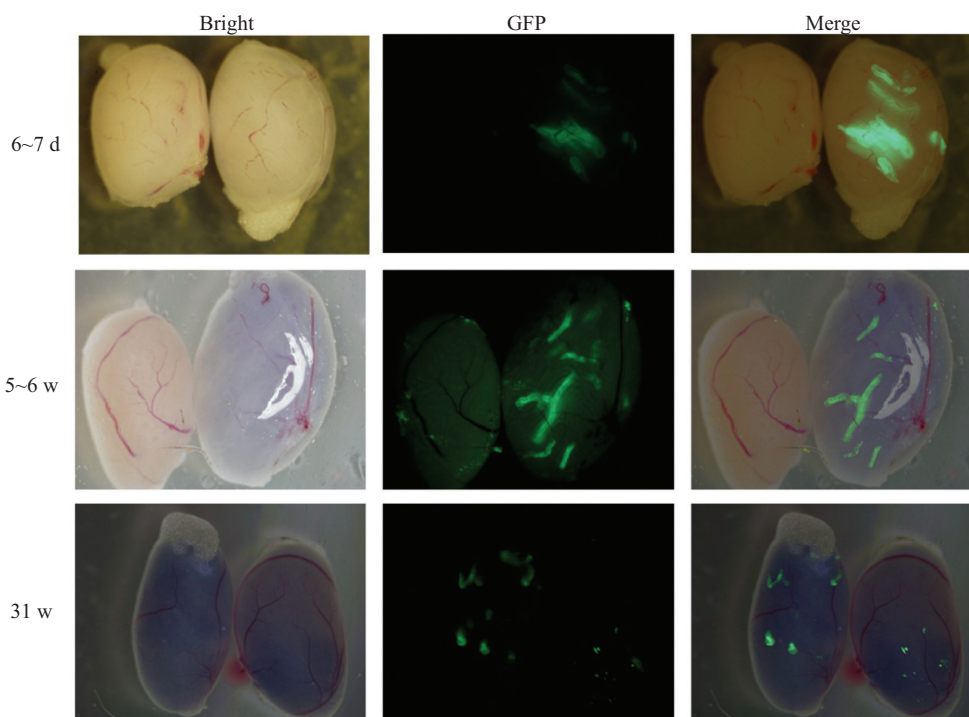


图5 精原干细胞体内移植

Fig.5 Transplantation of spermatogonial stem cells

SSCs之间的基因表达情况没有明显的差异(图3),老年小鼠的SSCs和幼年小鼠的SSCs与E14一样,可以共同表达*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和*C-myc*等多能基因,同时也表达生殖细胞特异性的*GFRa*、*Mvh*等基因。随着年龄的增长,小鼠的SSCs基因表达水平没有发生明显的改变,不同年龄的小鼠SSCs有相同的基因表达水平。

2.3 不同年龄段精原干细胞甲基化检测结果

采用重亚硫酸盐测序方法检测精原干细胞基因组DNA的母源印记基因*Snrpn*和父源印记基因*H19*的甲基化水平。结果发现,通过上述方法建立的老年精原干细胞(SSCs)仍然拥有正常的印记基因甲基化水平(图4)。父源的雄性印记基因*H19*保持很高的甲基化水平,而母源雌性印记基因*Snrpn*继续维持在很低的甲基化水平,父源的*H19*和母源的*Snrpn*在体细胞和胚胎干细胞(E14)中甲基化水平都维持在各自一半的正常水平。通过比较精原干细胞与胚胎干细胞(E14)的印记基因的甲基化水平,可以明确本文建立的精原干细胞保持了正常的雄性生殖细胞应有的印记基因甲基化水平。

2.4 精原干细胞体内移植验证

睾丸输出小管的精原干细胞移植实验是用于验证体外建立及培养的SSCs是否还具有生殖细胞功能

的最严谨的实验。通过体内移植实验证实,本研究所建立的精原干细胞具有正常的生殖细胞功能(图5)。通过精原干细胞的曲精小管注射实验进一步证明,在小鼠睾丸里不同年龄的精原干细胞仍具有迁移到生精小管基底膜的能力,证实了具有正常生殖功能的不同年龄段小鼠精原干细胞系已成功建立。

3 讨论

早在1956年, Oakberg等^[5]根据成体干细胞的相关研究,最先提出了精子发生的动力学机制,推论生殖细胞的分化可能需要一个干细胞群。然而直到1994年, Brinster等^[6]通过精原干细胞移植实验才最终验证了这类干细胞群的存在。进而验证移植的供体生殖细胞中确实存在SSCs,该技术也为人类相关疾病的治疗提供了依据,该实验对于SSCs研究具有里程碑式的意义。研究男性不育的诊断与治疗是男科学领域的一个难题,目前,男性不育的诊疗水平远远不能满足广大不育患者的要求,且不育症的发病率呈现升高的趋势,精原干细胞移植为男性不育症的治疗开启了一扇新的大门^[7]。近年来,随着精原干细胞移植技术的发展,将为这一难题探索出一种新的治疗方法。

精原干细胞具有永生化和多能化潜能,是精子

形成的前体细胞, 在睾丸微环境中具有增殖和分化的能力。之前的研究表明, 随着年龄的增长, 小鼠生殖细胞会变少^[8], 小鼠的睾丸的重量会慢慢变小^[9], 小鼠精原干细胞的自我更新能力会减弱^[10]。然而通过该实验发现, 31周龄小鼠的精原干细胞同幼年的精原干细胞在母源及父源印迹基因、特定基因的表达和归巢能力方面没有什么明显的差异。在高等哺乳动物中老年的精原干细胞与成年以及幼年的精原干细胞是否存在差异, 还有待进一步的研究。

总之, 通过本实验建立了小鼠不同年龄的精原干细胞系, 总结了针对不同年龄段的小鼠精原干细胞的行之有效的建立方法。在一定年龄阶段, 随着小鼠年龄增长, 其精原干细胞的功能和特性并没有发生改变, 这一发现对中老年的不孕不育有着非常重要的指导意义。

参考文献 (References)

- 1 Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24: 263-86.
- 2 Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*. *Biol Reprod* 2003; 68(6): 2207-14.
- 3 Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, *et al*. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 616-31.
- 4 Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; 290(2): 193-200.
- 5 Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 1956; 99(3): 391-413.
- 6 Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 13298-302.
- 7 Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. *Science* 2007; 316(5823): 404-5.
- 8 Zhang X, Ebata KT, Robaire B, Nagano MC. Aging of male germ line stem cells in mice. *Biol Reprod* 2006; 74(1): 119-24.
- 9 Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2006; 24(6): 1505-11.
- 10 Schmidt JA, Abramowitz LK, Kubota H, Wu X, Niu Z, Avarbock MR, *et al*. *In vivo* and *in vitro* aging is detrimental to mouse spermatogonial stem cell function. *Biol Reprod* 2011; 84(4): 698-706.