

山羊精原干细胞体外培养分化

杨延飞 张涌*

(西北农林科技大学生物工程研究所, 杨凌 712100)

摘要 探索山羊精原干细胞体外培养体系。收集2月龄关中奶山羊睾丸,一步酶法消化分离曲细精管细胞,台盼兰检测平均存活率82.7%,以 1×10^6 个/ml接种含15%胎牛血清DMEM/F12培养瓶,37℃、5%CO₂和饱和湿度条件下培养,4周后FBS逐渐降至10%。原代培养以多突起和片状的睾丸体细胞铺壁生长为主,10天左右精原干细胞数量增加,可见二联体和四联体,3周左右有鸟巢状和山脉状集落形成,碱性磷酸酶染色阳性,培养30天集落数不断增加,散在分布有贴壁和漂浮精子,换液后精子丢失。挑取单集落重新接种铺壁的曲细精管体细胞饲养层后陆续有精子细胞及精子形成,主要分布于集落周围。

关键词 精原干细胞; 培养; 分化; 精子; 山羊

精原干细胞持续、高产的精子分化进程构成了成年动物体内最大的自我更新系统。每克羊睾丸组织可日产精子2400~2700万,如此高效的生产过程如果能在体外进行,将极大促进哺乳动物精子发生机制研究,开辟精原干细胞为宿主的转基因新途径,还可能从根本上治疗雄性遗传病以及更有效利用保存濒危物种和优良雄性资源。虽然移植技术近几年的发展极大促进了精原干细胞的研究应用,但体外培养系统仍相当滞后。最近报道培养新生牛睾丸组织完成体外精子发生过程^[1,2],为哺乳动物精原干细胞培养研究提供了新思路。本研究实现山羊精原干细胞向精子体外培养分化,为后续的转基因研究提供技术准备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 6只2月龄关中奶山羊公羔,由杨陵区姚南村养殖场提供。

1.1.2 主要试剂、溶液 IV型胶原酶(Col IV)、胰蛋白酶、EDTA、台盼蓝、β-甘油磷酸钠均为Sigma公司产品;D-Hanks(D-H,自配);DMEM/F12(D/F,Gibco BRL);胎牛血清(FBS)为兰州民海公司产品;氨苄青霉素及硫酸链霉素为哈尔滨制药总厂产品;其余药品为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 取材 阴囊清洗剃毛消毒后局部麻醉,无

菌打开切下两侧睾丸,其一分离细胞,D-H冲洗5次后切开白膜取1cm³睾丸实质,置D/F液0.5h内带回;另一侧睾丸置4%多聚甲醛带回作组织切片。

1.2.2 原代细胞分离培养 去除睾丸组织块周围结缔后清洗离散曲细精管,剪碎5min,十倍体积0.1%Col IV(D/F配制)37℃消化60min,中间轻晃10次,200目纱网过滤,计数和存活率检测。以 1×10^6 个/ml接种含15%FBS的D/F的25cm²培养瓶,37℃、5%CO₂饱和湿度培养,隔天换液。

1.2.3 传代培养 细胞长满90%瓶底时传代,第1次传代前用培养液清洗2次,镜下观察,待0.25%胰蛋白酶(D-H配制,含0.02%EDTA)消化60%贴壁细胞脱落时加入新培养液轻敲打5~8次,1:3传代,传代5次后第1个月仅隔天换液,不再传代。第2个月起每月传代1次,隔天换液,每次换液FBS(初始浓度15%)减少1%至终浓度10%,组织培养倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.2.4 饲养层的制备 曲细精管细胞原代培养5~7h后吸除培养液,用新培养液轻轻冲洗3次以去除悬浮及刚贴附的少量精原细胞,继续培养至长满瓶底90%后胰蛋白酶消化至30%左右贴壁细胞脱落时弃掉酶液,从而进一步去除可能贴附的精原细胞,用新鲜培养液冲洗后在含10%FBS的D/F培养瓶中隔天

收稿日期:2004-08-02 接受日期:2004-11-24

国家自然科学基金(No.39830280)和国家高技术研究发展计划(863计划)(No.2001AA213081)资助项目

*通讯作者。Tel:029-87092176;E-mail:Zhangyl@public.xa.sn.cn

换液培养, 1 周后可获得主要由 Sertoli 细胞和极少数肌样细胞铺壁生长构成的睾丸体细胞饲养层。

1.2.5 分化培养 体外培养 4、6、8 周时分别挑取在镜下观察集落边缘没有散在分布的圆形或椭圆形细胞的单集落, 饲养层预先用胰蛋白酶消化至 40% 左右贴壁细胞脱落后加 FBS 中止消化, 之后以每瓶 5 个单集落接种, 培养条件与集落供体始终保持一致, 组织培养倒置显微镜下观察。

1.2.6 精原干细胞的鉴定 (1) 睾丸组织切片及 AKP 染色 常规方法制作睾丸石蜡切片(4 μm)和 H.E. 染色, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)检测^[3], 光镜观察。(2) 培养细胞 AKP 组织化学染色 与 Gomori 法^[3]略有不同, 95% 乙醇固定细胞爬片 10 min, 凉干, 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下在基质液中作用 5 h(避免水份蒸发), 蒸馏水洗后 2% 硝酸钴处理 5 min, 洗去多余硝酸钴, 1% 硫化铵处理 3~5 min, 水洗 3 min, 1% 伊红染色 2 min, 水洗凉干镜检。

2 结果

2.1 曲细精管细胞分离效果

共进行 5 次 Col IV 分离曲细精管细胞, 台盼兰拒染法测定细胞存活率, 倒置显微镜下取培养瓶中心和四角共 5 个视野观察计算原代培养 24~36 h 圆形细胞比率, 培养 48 h 后用胰蛋白酶消化贴壁细胞至完全脱落后计数, 与接种细胞总数比较计算细胞贴壁率, 结果 Col IV 一步酶法消化每克睾丸组织最多可获 3.2×10^6 个细胞, 平均存活率为 82.7%, 圆形细胞比率为 17.3%, 细胞贴壁率为 6.1%。与常规两步法比较^[4,5], 一步 IV 型胶原酶消化分离的山羊曲细精管细胞总数较少, 存活率较低, 但简洁经济, 能满足本试验实际需要。

2.2 精原干细胞与 Sertoli 细胞原代共培养

分离的混合细胞接种 0.5 h 后 Sertoli 细胞开始贴壁, 3 h 伸出突起, 5 h 少数大而圆透亮且核质比高的细胞悬浮, 8 h 贴壁细胞伸出伪足, 15 h 后绝大多数细胞已沉降瓶底, 随培养时间延长贴壁细胞(主要为 Sertoli 细胞)突起逐渐增多伸长至互相接触交织成单层(图 1-1), 组织培养倒置显微镜下观察底层细胞呈多角不规则形和片形, 与体内曲细精管细胞形态比较鉴别观察可区分为 Sertoli 细胞和肌样细胞。上层细胞均为圆形或椭圆形, 大小较为一致, 散在分布, 具有 2 个左右核仁及较高的核质比例, AKP 染色阳性(图 1-2), 贴附单层体细胞上, 少数

未贴附者换液后丢失, 因这些细胞分离自 2 月龄羔羊, 生殖母细胞已分化为基膜定居的圆形及椭圆形精原干细胞, 故通过形态观察比较即可区分。

2.3 精原干细胞的增殖与分化

传代后 Sertoli 细胞急剧增长, 可见伸出的伪足构成一些腔体, 中心常有一个精原干细胞悬挂于空腔内(图 1-3), 在体内精原干细胞位于 Sertoli 细胞构成的小室内被严格调控, 可能体外培养的精原干细胞和 Sertoli 细胞也试图恢复这一构型, 当继续培养而不传代时腔体则逐渐消失。精原干细胞起初培养 3~5 天约 10% 脱落后丢失, 数量逐渐降至 20% 左右, 1 周后数量开始增加。10 天左右出现二联体和四联体。2 周后精原干细胞数成倍增加。3 周左右可见大量增殖的精原干细胞形成一些小集落, 逐渐增大, 有的呈鸟巢状, 中心致密, 可见单个较大透亮细胞, 外围似树根与 Sertoli 细胞交接, AKP 染色阳性(图 1-4); 有的呈山脉状, 互相连接, 边缘不整, 与饲养层界限不清, 部分 AKP 染色阳性。

培养 4 周后鸟巢状集落上突, 更加致密, 周围出现分化精原细胞。第 2 个月集落数不断增加, 消化传代时集落被离散, 但传代培养后又有新的集落形成, 周围贴附有较多单个细胞, 处于有丝分裂和减数分裂期细胞, 精母细胞, 以及圆形精子细胞(图 1-5)。偶可见精子细胞胞质内核旁出现较大亮泡, 椭圆形精子细胞伸出鞭毛, 伴随鞭毛不断延长细胞变扁, 最后形成头部贴附饲养层的精子(图 1-6), 换液后漂浮的精子丢失, 但 2 个月之后仍有新的精子形成。

挑取体外培养 4、6、8 周精原干细胞单集落重新接种 Sertoli 细胞饲养层后在集落边缘及周围均可发现分化的精原细胞、精母细胞、精子细胞以及精子(图 1-7)。

2.4 曲细精管显微结构及 AKP 染色

2 月龄山羊曲细精管显微观察包含定位基膜的圆形或椭圆形精原干细胞、柱形或锥形 Sertoli 细胞及管周排列的梭形肌样细胞(图 1-8)。分离细胞体外培养时可观察到呈多角不规则形的 Sertoli 细胞, 扩展面积较大呈片形的肌样细胞, 两者贴壁生长交织成单层, 以及呈透亮圆形或椭圆形, 核质比高, 单个贴附于底壁体细胞层进行生长增殖与分化的精原干细胞, 以上 3 种细胞类型与组织切片观察所得细胞类型一致, 表明一步酶法消化可以成功分离到所有种类曲细精管细胞。

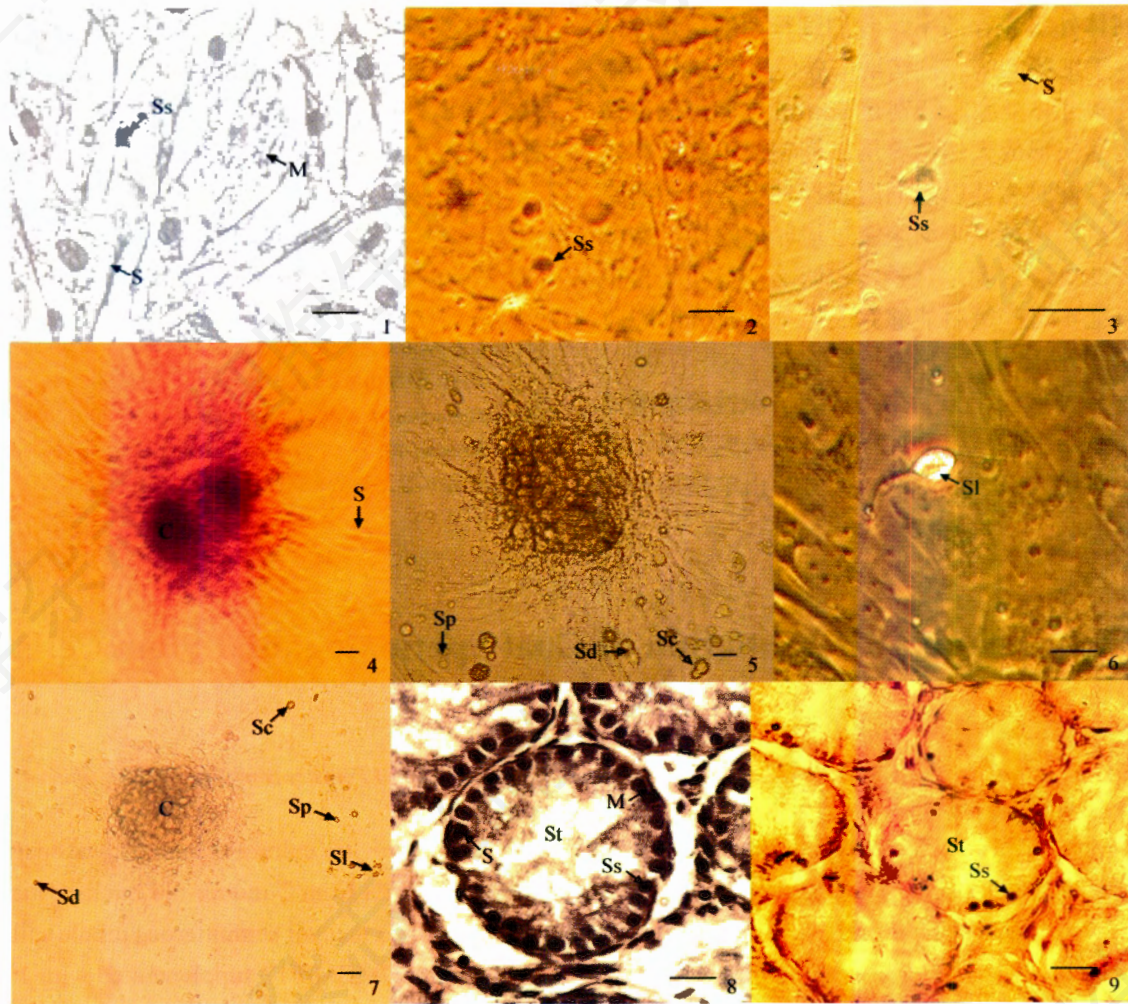


Fig.1 Culture and differentiation of GuanZhong milk goat spermatogonial stem cells (SSCs), histology of testis and alkaline phosphatase (AKP) staining

1: Sertoli cells and myoid cells formed a confluent monolayer. 2: Cultured SSCs positively stained with AKP. 3: Single SSCs suspended in the cavity surrounded by Sertoli cells. 4: Bird-nest-like colony positively stained with AKP. 5: Differentiated colony. 6: Elongate spermatid was developed. 7: Recultured colony differentiated into speratids. 8: Histology of GuanZhong milk goat testis. 9: SSCs in GuanZhong milk goat seminiferous tubule positively stained with AKP. Ss: Spermatogonial stem cells. S: Sertoli cells. M: Myoid cells. Sd: Differentiated SSCs. Sc: Spermatocytes. Sp: Spermatids. Sl: elongate spermatids. St: Seminiferous tubules. C: Colonies. Bars in the figures are all equal to 10 μm .

睾丸切片 AKP 染色后精原干细胞呈黑色(图 1-9), 培养的细胞及鸟巢状集落 AKP 染色亦呈黑色(图 1-2, 图 1-4), 与曲细精管染色结果一致, 表明整个培养过程始终有精原干细胞存在。

3 讨论

目前国内外尚无公认的精原干细胞鉴定标记, 有关山羊精原干细胞体外培养分化研究未见报道。组织切片染色观察表明 2 月龄山羊曲细精管包含精原干细胞、Sertoli 细胞和肌样细胞。为获得较多一致的精原干细胞, 避免繁琐有争议的鉴定环节, 我们选择 60 日龄羔羊进行分离, 此时曲细精管基膜定

居的精原干细胞处于增殖阶段, 得到的细胞主要为精原干细胞和 Sertoli 细胞。培养细胞和曲细精管细胞形态及 AKP 染色比较鉴别表明分离到的核质比高的单个较大圆形或椭圆形透亮的贴壁上层细胞即为精原干细胞。此外, 集落消化传代培养后不断有新的集落生成, 且挑取单集落接种饲养层后周边有精子生成, 体现了精原干细胞的自我增殖与分化特性。

精原干细胞在体内锚定于曲细精管 Sertoli 细胞, 与其紧密接触, 受其严格调控。增加血清浓度可促进 Sertoli 细胞增殖, 睾丸体细胞饲养层(主要为 Sertoli 细胞)对精原干细胞存活增殖至关重要^[2]。

为了提高体外培养存活率, 我们进行曲细精管体细胞与精原干细胞共培养, 初期培养使用 15% 胎牛血清, 这样睾丸体细胞, 特别是 Sertoli 细胞可迅速贴壁增殖而尽快形成天然饲养层, 使精原干细胞得以附植存活, 同时为其以后的增殖提供坚实的体细胞微环境支持, 待精原干细胞渡过培养危险期, 数量倍增后降低血清浓度, 延长传代间隔, 促使其自分化, 结果证实这些策略能够完成山羊精原干细胞向精子的体外分化。

精原干细胞源于原始生殖细胞, 碱性磷酸酶可用来鉴别原始生殖细胞及其集落, 有研究发现小鼠精原细胞表达 AKP^[6]。本试验检测了山羊精原干细

胞及其集落的 AKP 活性, 结果组织切片、培养单细胞、鸟巢状集落及个别山脉状集落均出现染色阳性, 初步表明本试验成功实现山羊精原干细胞的体外培养及向精子的定向分化

参考文献 (References)

- [1] Lee DR *et al. Biol Reprod*, 2001, **65**: 873
- [2] Izadyar F *et al. Biol Reprod*, 2003, **68**: 272
- [3] C.F.A. 卡林著, 孔庆雷译。《组织病理学与组织化学技术手册》, 北京: 科学出版社, 1982, 319
- [4] Honaramooz A *et al. Mol Reprod Dev*, 2003, **64**: 422
- [5] Brinster RL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 11298
- [6] 李莲军等。《动物医学进展》, 2003, **24**: 75

Culture and Differentiation of Goat Spermatogonial Stem Cells

Yan-Fei Yang, Yong Zhang*

(Institute of Biotechnology, Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract The objective of this study was to develop a practical *in vitro* culture system of goat spermatogonial stem cells (SSCs) to facilitate further studies on transgenesis. 12 testis from 2-month-old bucks (GuanZhong milk goat) were decapsulated and dissociated enzymatically by one step to recover seminiferous tubule cells. 1×10^6 cells/ml with a viability 82.7% was cultured in 25 cm² flasks containing DMEM/F12 supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) for first 4 week, less FBS after each medium exchange thereafter with 10% FBS as final concentration at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. During the first two week of culture, the number of SSCs declined then increased, pairs and chains of spermatogonia appeared, in the third and fourth week, bird-nest-like and mountain-like colonies were observed with positive alkaline phosphatase (AKP) staining. During the second month of culture, more and larger colonies were found, there were anchored and free elongate-spermatid-like cells around colonies, selected the colonies and cultured them confluent monolayer of Sertoli cells, spermatid were formed around. For the first time to our knowledge, goat spermatogonial stem cells have been cultured and differentiated into spermatids *in vitro*, this culture system would provide targeted cells for transgenesis, greatly accelerate the research on goat spermatogenesis and utilization of excellent male gene resources.

Key words spermatogonial stem cells; culture; differentiation; spermatids; goat

Received: August 2, 2004 Accepted: November 24, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39830280) and National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2001AA213081)

*Corresponding author. Tel: 86-29-87092176, E-mail: Zhangyl@public.xa.sn.cn