

卵泡刺激素和表皮生长因子对小鼠精原细胞增殖的影响

张大雷 米玉玲 王凯明 曾卫东 张才乔*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘要 利用生殖细胞-体细胞体外无血清共培养模型研究了卵泡刺激素(FSH)和表皮生长因子(EGF)对小鼠A型精原细胞增殖的影响。精原细胞在ITS培养液(添加胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸钠的DMEM)中培养24 h后进行*c-kit*免疫细胞化学鉴定和EGF及其受体(EGFR)免疫细胞化学检测,72 h后测定其形成集落数的情况。结果表明:ITS培养液能维持生殖细胞的活性,增殖细胞核抗原(PCNA)的表达增高。A型精原细胞呈*c-kit*阳性,EGF和EGFR主要表达于精原细胞。单独的FSH(1~100 ng/ml)或EGF(1~10 ng/ml)显著促进精原细胞集落数的增加。此外,EGF(0.1 ng/ml)联合FSH(10 ng/ml)具有加性效应,但更高剂量的EGF(1~10 ng/ml)则降低了FSH的刺激作用。结果说明FSH可联合适量的EGF促进精原细胞的增殖。

关键词 精原细胞; 卵泡刺激素; 表皮生长因子; 细胞增殖

精子发生是十分复杂的生殖细胞增殖和分化的过程,受到多种激素、生长因子和细胞因子的精确调控。下丘脑和腺垂体分泌的促性腺激素释放激素和促性腺激素以及睾丸内细胞间的联系在精子发生过程中发挥重要的调节作用,其中卵泡刺激素(FSH)对于维持精子生成是必需的^[1]。FSH能够刺激精原细胞和Sertoli细胞的增殖,并促进减数分裂中生殖细胞的发育^[2,3]。表皮生长因子(EGF)是精子发生过程中重要的旁分泌调控因子,但EGF在雄性生殖细胞发育的不同阶段的确切功能和作用方式还不是很清楚。有研究表明,EGF能够刺激精原细胞DNA的合成,促进精原细胞的有丝分裂^[4]和精原细胞集落的形成^[5]。也有报道表明EGF能抑制FSH刺激的A型精原细胞的增殖,并抑制A型精原细胞的分化^[6]。本试验利用小鼠生殖细胞-体细胞无血清共培养模型研究FSH和EGF对小鼠A型精原细胞体外增殖的影响,以揭示这两种重要的调控因子对A型精原细胞发育的作用。

1 材料与方法

1.1 生殖细胞分离和培养

ICR乳鼠由浙江省医学科学院实验动物中心提供。颈椎脱臼法处死出生后6天的小鼠,取出两侧睾丸,除去被膜,经过磷酸盐缓冲液(PBS)和培养液清洗,剪碎形成小的组织块后用1 mg/ml胶原酶(Gibco

BRL)在37℃消化2次,第一次10 min,第二次5 min,经150 μm滤网过滤,滤液1 000 r/min离心10 min,再用新鲜培养液洗涤3次后经台盼蓝染料排除法计算细胞活率。基础培养液为高糖DMEM培养液(Sigma),其中添加1.75 mmol/L HEPES、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 IU/ml青霉素和100 μg/ml链霉素。在基础培养液中添加10 μg/ml胰岛素、5 μg/ml转铁蛋白和 3×10^{-8} mol/L亚硒酸钠作为完全培养液(ITS培养液)。细胞按 5×10^4 个/孔的密度接种到96孔细胞培养板(Nunc),置37℃,含5%CO₂的培养箱中培养。

1.2 药物处理

在生殖细胞培养的同时加入FSH(1~100 ng/ml, OVAGEN™)和EGF(0.1~100 ng/ml, Cytolab Ltd.)单独或联合进行处理。对照组仅添加ITS培养液。每个处理4孔,实验重复3次。

1.3 细胞形态观察

在倒置相差显微镜下观察细胞贴壁状况以及细胞形态和集落形成的变化。细胞培养72 h后,每孔随机选4个视野用显微数字成像系统(Pixera Pro 150ES)拍照,用图象分析软件Simple PCI(Compix, Inc.)统计贴壁的A型精原细胞集落的数目。

1.4 精原细胞的*c-kit*、EGFR、EGF和PCNA免

收稿日期: 2007-01-11 接受日期: 2007-04-17
教育部(NECT-05-0514)和浙江省科技厅(No.2003C12005)资助项目
*通讯作者。Tel/Fax: 0571-86971976, E-mail: cqzhang@zju.edu.cn

免疫细胞化学

细胞培养 24 h 后用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 3% H₂O₂ 温育 10 min 灭活内源性过氧化物酶。室温下用山羊血清封闭 20 min 后加入兔抗人 *c-kit*、EGFR 或 EGF 抗体, 4 °C 过夜后滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 37 °C 温育 20 min, 用 DAB 显色试剂盒, 室温显色。细胞培养 72 h 后进行增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 染色, 阳性细胞呈棕红色。

1.5 数据分析

所得数据采用 SAS (6.12 版本) 软件中 GLM 过程进行方差分析及 Duncan's 多重分析比较, 检验误差为 5% 和 1% 水平。

2 结果

2.1 精原细胞培养模型的建立

刚分离的睾丸细胞包含生殖细胞和体细胞(主要

是 Sertoli 细胞), 生殖细胞比体细胞大, 直径为 10~12 μm。在无血清的 ITS 培养体系中培养 5 h 后, Sertoli 细胞呈梭状贴在培养板底部, 生殖细胞呈圆形生长。培养 72 h 后 Sertoli 细胞形成平滑的单层平铺在培养板底部, A 型精原细胞形成集落状紧贴在 Sertoli 细胞单层上生长。在不含添加因子的普通培养液中, 生殖细胞很难存活, 而在无血清的 ITS 培养液中 A 型精原细胞呈现较高的增殖活性。与无添加因子组相比, ITS 培养液显著促进 A 型精原细胞增殖, 精原细胞集落数明显增加, 而且呈 PCNA 阳性(图 1)。

2.2 免疫细胞化学检测

细胞培养 24 h 后进行 *c-kit* 的免疫细胞化学鉴定。结果表明, 精原细胞呈 *c-kit* 阳性, Sertoli 细胞不着色或浅着色, 阴性对照生殖细胞和体细胞均不着色。EGFR 和 EGF 免疫细胞化学结果表明, EGFR 和 EGF 主要表达在 A 型精原细胞上, 细胞呈棕红色,

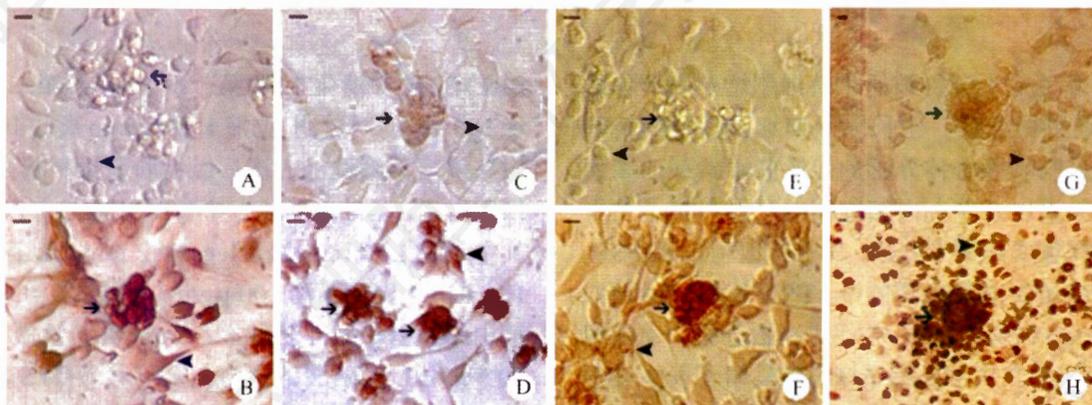


图 1 精原细胞的 *c-kit*、EGFR、EGF 和 PCNA 免疫细胞化学染色

A: *c-kit* 阴性; B: *c-kit* 阳性; C: EGFR 阴性; D: EGFR 阳性; E: EGFR 阴性; F: EGFR 阳性(400 ×, 标尺 10 μm); G: PCNA 阴性; H: PCNA 阳性(200 ×, 标尺 10 μm)。→ 表示 A 型精原细胞; ▶ 表示体细胞。

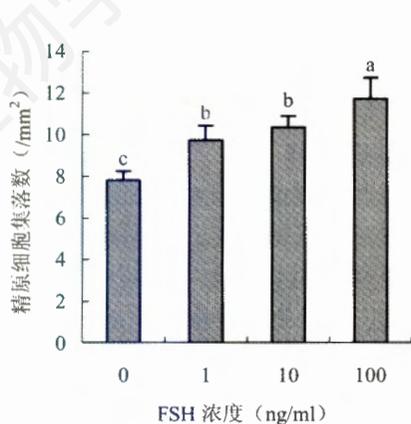


图 2 FSH 对精原细胞集落数的影响

各组数据均为平均数 ± 标准差 (n=4), 不同字母表示差异显著 (P<0.05)。

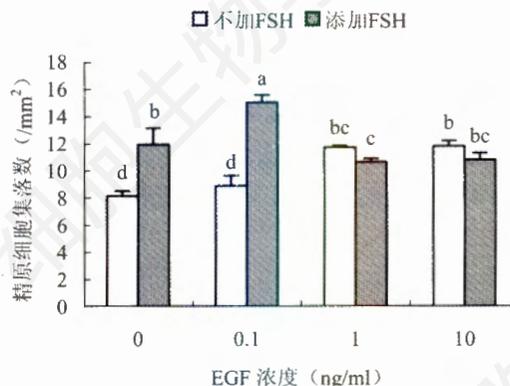


图 3 EGF 单独或联合 FSH(10 ng/ml) 处理对精原细胞集落数的影响

各组数据均为平均数 ± 标准差 (n=4), 不同字母表示差异显著 (P<0.05)。

Sertoli 细胞浅着色(图 1)。

2.3 FSH 和 EGF 对精原细胞集落数的影响

细胞培养 72 h 后, 与对照组相比, FSH(1~100 ng/ml)显著增加精原细胞集落数($P<0.05$), 以 100 ng/ml 组最为明显(图 2)。EGF(1~10 ng/ml)显著促进精原细胞增殖($P<0.05$), 但 0.1 ng/ml 组作用不明显。此外, FSH(10 ng/ml)联合 EGF (0.1 ng/ml)处理呈加性效应, 细胞集落数显著高于 FSH 或 EGF 单独处理组。然而 FSH 联合更高剂量的 EGF(1~10 ng/ml) 处理却降低了 FSH 的作用, 细胞集落数低于 FSH 单独处理组(图 3)。

3 讨论

6 日龄的小鼠生精上皮只包含 A 型精原细胞和 Sertoli 细胞^[7]。c-kit 的表达可以作为 A 型精原细胞的标记^[8]。本试验利用 c-kit 免疫细胞化学结果表明 c-kit 表达在生殖细胞上, 从而证实了所分离和培养的 A 型精原细胞。在体外培养过程中, 普通的培养基不能完全满足生殖细胞生长的需要, 还需要加入一些支持其存活和增殖的添加剂。血清中的一些未知生长因子对生殖细胞的存活、增殖和分化具有良好作用, 但血清的成分复杂, 难以评价外源性物质对生殖细胞的真实作用。因此, 本实验在培养液中添加胰岛素、亚硒酸钠和转铁蛋白。胰岛素能促进 DNA 合成、诱导细胞的增殖、促进细胞贴壁; 转铁蛋白能够促进生殖细胞的存活和增殖; 亚硒酸钠为生殖细胞发育提供微量元素。结果表明这些生长因子能够较好地维持精原细胞的体外存活, 并促进其增殖。

FSH 对于启动和维持精子发生具有重要的作用。FSH 作用于 Sertoli 细胞, 间接调控精子的发生。FSH 能启动性未成熟动物睾丸生长和精子生成, 使支持细胞和 Ap 型精原细胞的数目明显增加^[9], FSH 受体基因剔除的小鼠睾丸重量和睾酮水平均降低^[10]。Mi 等^[11]研究也表明, FSH 能促进鸡胚睾丸生殖细胞的增

殖, 其作用可能是通过支持细胞的旁分泌作用上调 c-kit 的表达实现的。c-kit 属于酪氨酸激酶受体, 其配体干细胞因子(SCF)由 Sertoli 细胞分泌, 能够调控 A 型精原细胞的存活或增殖^[12]。

EGF 是一种促细胞分裂因子, 对于细胞周期调控、能量代谢、生物合成以及胚胎发育等具有广泛的生物学作用^[13]。EGF 通过与其受体(EGFR)结合, 使受体激活, 从而引起多种细胞的增殖。以前的研究表明, EGF 表达在 Sertoli 细胞和生殖细胞上, EGF 受体也分布于这两类细胞^[14]。本实验的结果表明, EGF 和 EGFR 主要表达在 A 型精原细胞上, 从而说明 EGF 可直接作用于生殖细胞来调控 A 型精原细胞的增殖, 这可能是由于动物品种以及生殖细胞发育的阶段不同而产生的差异。在本试验中, EGF(1~10 ng/ml)显著促进 A 型精原细胞集落数的增加, FSH(10 ng/ml)联合 EGF (0.1 ng/ml) 具有协同作用。但 FSH(10 ng/ml)联合更高剂量的 EGF(1~10 ng/ml)却反而降低了 FSH 的刺激作用。有研究表明, EGF 在睾丸中的过度表达能够减少精子细胞的产生^[15], 这说明适量的 EGF 对于精子发生是非常重要的。

参考文献(References)

- [1] McLachlan RI *et al. Recent Prog Horm Res*, 2002, **57**: 149
- [2] Allan CM *et al. Endocrinology*, 2004, **145**: 1587
- [3] Meachem SJ *et al. Biol Reprod*, 2005, **72**: 1187
- [4] Wahab-Wahlgren A *et al. Mol Cell Endocrinol*, 2003, **201**: 39
- [5] Anjamrooz SH *et al. Reprod Fertil Dev*, 2006, **18**: 709
- [6] Haneji T *et al. J Endocrinol*, 1991, **128**: 383
- [7] Bellve AR *et al. J Cell Biol*, 1977, **74**: 68
- [8] Schrans-Stassen BHGJ *et al. Endocrinology*, 1999, **140**: 5894
- [9] Arslan M *et al. J Endocrinol*, 1993, **136**: 235
- [10] Krishnamurthy H *et al. Biol Reprod*, 2000, **62**: 1146
- [11] Mi Y *et al. Gen Comp Endocrinol*, 2004, **138**: 237
- [12] Dirami G *et al. Biol Reprod*, 1999, **61**: 225
- [13] 马宏等. *细胞生物学杂志*, 2002, **24**: 313
- [14] Caussanel V *et al. Mol Cell Endocrinol*, 1996, **123**: 61
- [15] Wong RW *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 18297

Effects of Follicle-stimulating Hormone and Epidermal Growth Factor on Proliferation of Mouse Spermatogonial Cells

Da-Lei Zhang, Yu-Ling Mi, Kai-Ming Wang, Wei-Dong Zeng, Cai-Qiao Zhang*

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract A serum-free germ-somatic cell coculture model was established to evaluate the effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and epidermal growth factor (EGF) on proliferation of mouse type A spermatogonial cells. Immunocytochemical staining for *c-kit*, EGF and EGF receptor (EGFR) were performed after 24 h culture and cell proliferation was assessed after 72 h culture. Results showed that ITS medium supplemented with insulin, transferrin and selenite could maintain spermatogonial cell survival, with increased expression of proliferating cell nuclear antigen. Type A spermatogonial cells manifested positive *c-kit* staining, and both EGF and EGFR were mainly expressed in spermatogonial cells. FSH (1–100 ng/ml) or EGF (1–10 ng/ml) treatment significantly increased spermatogonial colony number. Furthermore, EGF (0.1 ng/ml) could synergize with 10 ng/ml FSH to increase the colony number, but inhibited FSH-stimulated effect at 1–10 ng/ml. The above results indicated that EGF could synergize with FSH to promote proliferation of spermatogonial cells.

Key words spermatogonial cell; follicle-stimulating hormone; epidermal growth factor; cell proliferation

Received: January 11, 2007 Accepted: April 17, 2007

This work was supported by the Ministry of Education (NECT-05-0514) and Zhejiang Bureau of Science and Technology (No. 2003C12005)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971976, E-mail: cqzhang@zju.edu.cn