

精原干细胞途径制作转基因动物

王璞 陈建泉 成国祥*

(同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; 上海转基因研究中心, 上海 201203)

摘要 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)具自我更新并分化出大量精子的能力。通过其建立转基因动物模型, 对研究精子的发生机制、生产转基因动物、重建不育个体的生精功能等都有着显著的推动作用。从研究意义着手, 分述了精原干细胞途径制作转基因动物各技术步骤的研究情况, 并提出了运用克隆技术丰富该途径的新思路。

关键词 精原干细胞; 转基因; 移植; 克隆

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是精子的前体细胞, 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的特殊细胞群体。

1 精原干细胞研究意义

1.1 深刻认识精子发生过程

在哺乳动物体内, 原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)源于胚胎上胚层, 其迁移定位于睾丸原基生殖嵴, 经支持细胞前体细胞、生精小管肌样细胞等包裹形成性索, 出生后恢复分裂增殖能力形成精原细胞。精原细胞依据所处生精上皮基膜的位置、形态和核染色特性被分为 A dark 型、A pale 型及 B 型三类, 其中 A 型精原细胞核中无异染色质, 是真正意义上的干细胞^[1], 其在曲精细管基膜处依次经过 A single (A_s)、A paired (A_p)和 A aligned (A_a)几个时期后产生 B 型精原细胞, 由后者经有丝分裂分化成为初级精母细胞, 再经减数分裂产生次级精母细胞和精子细胞, 最后变态形成精子^[2]。精原干细胞在精子发生过程中扮演着极为重要的角色, 对它的研究有以点带面的效用。

1.2 制作转基因动物的新途径

Gordon 等^[3]首先运用显微注射法成功获得了转基因小鼠。在随后的二十多年里, 先后发展起了脂质体转染法, 电脉冲介导法, 反转录病毒侵染法和胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)介导法等多项转基因技术, 这些技术各有优缺点。近年来, 人们更倾向于通过生殖腺/生殖细胞来建立转基因动物模型。一个精原干细胞经 10 次有丝分裂和 2 次减数分裂可产生数千个精子, 若能对如此数量巨大的单细胞群体成功实现转基因, 再结合单精子授精技术, 后代

的转基因效率理论上可达 100%。现有技术主要是把外源基因直接整合进精原干细胞, 在细胞水平上筛选, 继而自体或异体移植, 借助受体曲精细管的生精环境产生转基因精子, 通过自然交配生成大量转基因后代。这一技术供体来源广泛, 实验成本低廉, 且生产周期短, 应用前景广阔。

笔者实验室具备成熟的克隆羊制作技术, 在此基础上, 亦可通过克隆技术转基因, 后筛选阳性后代, 分离培养精原干细胞, 建立转基因动物模型。在现有克隆效率为 10.8%^[4]的情况下, 该技术路线较显微注射(效率<1%)优势明显。

1.3 重建不育个体的精子发生过程

精原干细胞移植技术具重要临床应用价值, 可用于治疗男性因患隐睾症等生殖疾病导致的不育。Avarbock 等^[5]研究表明, 从幼年或成年患隐睾症小鼠的睾丸分离来的精原干细胞经过移植, 能在健康受体睾丸的生精环境中重建精子发生过程, 这意味着采用常规的细胞冻存技术就可将珍稀或有价值物种的精原干细胞保存至有合适受体时重建其生殖细胞系。临床上, 化疗、放疗使得许多患者的精子数量处于一个不可逆的低水平, 可在术前活体采集精原细胞冻存, 以备后用。

到目前为止, 科研人员已成功实现了小鼠^[6]、大鼠、公牛、猴子、人^[7]、山羊^[8]、猪^[9]等物种精原细胞的种内移植, 并在大鼠^[10]、仓鼠^[11]、兔、狗^[12]与小鼠的种间移植方面也进行了许多尝试。2000年, Reis 等^[13]将无精子症病人经治疗后新生的精

收稿日期: 2007-12-26 接受日期: 2008-04-01

* 通讯作者。Tel: 021-58552343, Fax: 021-58951012, E-mail: chengx@cngenon.com

原细胞移植到Kit基因突变并伴有重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficient, SCID)的小鼠睾丸内,发现术后150天供体细胞已完全消失,推测可能是因为没有相匹配的细胞互作及受体残余种间排斥作用所致,该实验虽未将供体精原细胞成功定植于异种受体,但研究者在利用人类精原干细胞治疗雄性不育领域迈进了一步。

2 精原干细胞的分离和培养

2.1 精原干细胞的分离

精原干细胞具自我更新和分化的能力,理论上可在各年龄段进行分离,但考虑到每 10^8 个成体小鼠睾丸细胞中仅有 2×10^4 个干细胞^[14],且随着年龄增大,原始生殖细胞的分化能力逐步减弱,因此,通常选用出生后0.5~1.5天的新生小鼠和4.5~5.5日龄的幼鼠作为干细胞供体。

当前,转基因品系B6.129S7-Gtrosa26杂交后代被广泛用作供体,该种小鼠在各类细胞形态中均表达大肠杆菌lacZ基因,基因产物gal蛋白可存在于精子发生全部阶段,并能被X-gal染色以区别供体和受体细胞^[15]。另外,带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的小鼠也常被用来分离具有荧光标记的干细胞。

在一些报道中,研究者采用Percoll梯度离心法分离和富集精原干细胞,纯度达到60%以上^[16]。Kubota等^[17]通过实验证明,Thy-1(CD90)是各年龄段小鼠精原干细胞的特异表面抗原,因此,可采用荧光激活细胞分离法(fluorescence activated cell sorting, FACS)富集携带有Thy-1标签的细胞群,经二抗显色后再用磁激活细胞分选术(magnetic activated cell sorting, MACS)对Thy-1⁺细胞作进一步筛选,结果准确可靠,已成为当前各大实验室的首选。

2.2 精原干细胞的培养

精原干细胞存在于一个由睾丸间质和血睾屏障憩室、曲精细管、睾丸组成的三级环境中。体外培养精原干细胞,早期主要采用模拟体内生境的方式来完成。在滋养层细胞的选择上,STO(SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant)细胞应用比较广泛,对所培养细胞的支持效果也最好^[18],小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)常作为备用^[19],也有实验室选用体内生精环境中本身存在的支持细胞(sertoli cell)作为饲养层^[20]。它们均能提供精原干细胞增殖和自我更新所需要的

部分关键因子,维持细胞的生理结构和功能。近几年,Kubota等^[21]在体外利用无血清体系培养精原干细胞时发现,胶质细胞系衍生神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)及其家族受体 $\alpha 1$ 对延长细胞寿命、保持细胞活性起关键作用。此外,在培养ES细胞时可替代STO细胞饲养层的白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)^[22,23]和对PGCs培养有正面作用的碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(10 ng/ml)^[24],对体外培养精原干细胞反有一定负作用,胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)作用不明显,唯在浓度为100 ng/ml时,EGF的抑制作用占主导,只有干细胞因子(stem cell factor, SCF)表现出了微弱的促进效应^[25]。

3 外源基因导入精原干细胞

精原干细胞定居在曲精细管基膜上,由支持细胞形成的小室将其隔开,外源DNA必须穿透维持小室内环境稳定的血睾屏障才能进入精原干细胞,这就加大了体内转基因的难度。

3.1 体内转染法

早期的精原干细胞体内转染法主要有外源DNA注入曲精细管和睾丸间质两种。Kim等^[26]首次采用脂质体转染法将lacZ报告基因注入经白消安(busulfan)处理过的小鼠曲精细管,结果在8%~14.8%的受体曲精细管组织细胞中检测到了该基因的表达,但未证明是否成功转染了精原细胞。Yamazaki等^[27]用电击法将报告基因导入小鼠曲精细管中的精原细胞,两个月后仍能观察到阳性克隆。Kanatsu-Shinohara等^[28]用显微注射法将表达lacZ的逆转录病毒导入未成熟小鼠的曲精细管内,实现了精原干细胞的原位转染,且受体与母鼠自然交配产生了2.8%稳定遗传的转基因后代。Blanchard等^[29]曾尝试将带有lacZ标记和核定位信号的腺病毒载体导入成年大鼠睾丸间质,结果发现精原细胞几乎不能被转染,估计这与血睾屏障的阻碍作用有关。

3.2 体外转染法

随着精原干细胞离体培养技术的发展,不少研究者比较了不同方法对精原细胞体外转染效率的影响。研究发现,原生质融合法和磷酸钙沉淀法效率最高^[30,31]。近几年,逆转录病毒载体被广泛运用。Maria等^[32]摸索不同转染系统后发现,鼠白血病病毒

(murine leukemia virus, MLV)、鼠干细胞病毒(murine stem cell virus, MSCV)、禽白血病病毒(avian leukosis virus, ALV)等多种逆转录病毒均能高效转染精原干细胞。Hofmann 等^[33]用带 SV40 LT 抗原基因的逆转录病毒载体转染 A 型精原干细胞成功建立了体外永生精原干细胞系 C18-4。随后, He 等^[34]基于该法在分子水平上研究了调控小鼠精原干细胞增殖的信号通路。这表明, 利用病毒载体体外转染精原干细胞技术已趋成熟。

4 精原干细胞的移植与检测

精原干细胞移植, 可分为同源移植和异源移植两类。前者包括自体移植和种内移植, 后者主要指种间移植。常用方法有曲精细管注入法、睾丸网注入法和睾丸输出管注入法等 3 种。通常在移植前, 受体会经白消安处理以消除内源性精原细胞来提高移植效率^[35]。也有学者采用 X 射线照射或直接选用 W/W^v 突变无生精能力的小鼠作为“空釜”。Brinster 等^[36]首先使用曲精细管注入法, 在显微镜下用玻璃针将短期培养富集来的精原干细胞注入受体曲精细管内, 80% 的后代源于供体精子, 一半表达了报告基因。这一方法后来被广泛应用在小鼠、大鼠的种内和种间移植上, 但因为需将 80% 以上的曲精细管注满精原细胞才能保证成功率, 故比较费时, 不适用于大型动物。大型动物主要采用睾丸网注入法, 但牛、羊、猪、猴等的睾丸网深埋于睾丸内部, 操作困难。Izadyar 等^[37]将超声波成像系统引入牛精原干细胞睾丸网移植实验, 实现了实时定位和跟踪, 并将移植效率提高至 80% 以上。睾丸输出管注入法方便可靠, 但由于需对实验动物进行全身麻醉且对睾丸组织损伤较大, 故现今成为一种大、小型动物均适用的备选方案。

对于外源精原干细胞本身带有遗传标记或报告基因的, 在受体及其后代中可直接利用其表征或特性加以鉴定。对于转入了特定基因的供体干细胞, 可借助分子生物学手段, 如 PCR、Southern 印迹法、Western 印迹法等检测受体基因组, 在分子水平上确认转基因模型建立的成败与效率。

5 展望

精原干细胞移植, 在理论研究层面, 可加深对精子发生过程的认识; 在临床应用上, 有望为治疗男性不育提供新的途径。科学家们借助该技术, 将生精细

胞与支持细胞的不同突变体联合培养, 可有效区别体细胞和生殖细胞。动物学家们利用这一手段, 可保存具有经济价值、年老失去自然繁育能力、濒临灭绝的特殊种群的生殖细胞系。此外, 精原干细胞移植技术为干细胞生物学研究提供了一个可实现延续性研究的独特系统。

以体细胞作为转基因受体的克隆技术在细胞来源、选择转化方法、筛选阳性克隆等方面都优于以干细胞作为受体细胞的转基因技术。并且, 现今比较成熟的哺乳动物克隆技术已能有效控制转基因后代的遗传特性, 实现基因的定点整合和剔除^[38], 其与精原干细胞移植技术联合制作转基因动物前景广阔。

参考文献(References)

- [1] Clermont Y. *Am J Anat*, 1966, **118**: 509
- [2] De Rooij DG. *Int J Exp Path*, 1998, **79**: 67
- [3] Gordon JW *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**: 7380
- [4] Chen JQ *et al. Mol Reprod Dev*, 2007, **74**: 568
- [5] Avarbock MR *et al. Nat Med*, 1996, **2**: 693
- [6] Brinster RL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 11298
- [7] Schlatt S *et al. Human Reprod*, 1999, **14**: 144
- [8] Honaramooz A *et al. Mol Reprod Dev*, 2003, **64**: 422
- [9] Honaramooz A *et al. Biol Reprod*, 2002, **66**: 21
- [10] Clouthier DE *et al. Nature*, 1996, **381**: 418
- [11] Ogawa T *et al. Biol Reprod*, 1999, **60**: 515
- [12] Dobrinski I *et al. Biol Reprod*, 1999, **61**: 1331
- [13] Reis MM *et al. Zygote*, 2000, **8**: 97
- [14] Desjardins C *et al. Cell and Molecular Biology of the Testis*, New York: Oxford University Press, 1993, 166
- [15] Nagano M *et al. APMIS*, 1998, **106**: 47
- [16] 李恩中等. *动物学报*, 2006, **52**: 774
- [17] Kubota H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 6487
- [18] Dym M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 11287
- [19] Wu H *et al. Chin Vet Med*, 2007, **43**: 11
- [20] van der Wee KS *et al. J Androl*, 2001, **22**: 696
- [21] Kubota H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 16489
- [22] Smith AG *et al. Nature*, 1988, **336**: 688
- [23] Williams RL *et al. Nature*, 1988, **336**: 684
- [24] Matsui Y *et al. Cell*, 1992, **70**: 841
- [25] Kubota H *et al. Biol Reprod*, 2004, **71**: 722
- [26] Kim JH *et al. Mol Reprod Dev*, 1997, **46**: 515
- [27] Yamazaki Y *et al. Biol Reprod*, 1998, **59**: 1439
- [28] Kanatsu-Shinohara M *et al. Biol Reprod*, 2004, **71**: 1202
- [29] Blanchard KT *et al. Biol Reprod*, 1997, **56**: 495
- [30] Jimbo M *et al. J Biochem*, 1995, **117**: 321
- [31] Watanabe M *et al. Exp Cell Res*, 1997, **230**: 76
- [32] De Miguel MP *et al. Biol Reprod*, 2003, **68**: 860
- [33] Hofmann MC *et al. Stem Cells*, 2005, **23**: 200
- [34] He Z *et al. Stem Cells*, 2008, **26**: 266
- [35] Nagano M *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 13090
- [36] Brinster RL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 11303
- [37] Izadyar F *et al. Reproduction*, 2003, **126**: 765
- [38] Yu G *et al. J Gen Virol*, 2006, **87**: 1019

Producing Transgenic Animals by Use of Spermatogonial Stem Cells

Pu Wang, Jian-Quan Chen, Guo-Xiang Cheng*

(School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China;
Shanghai Transgenic Research Center, Shanghai 201203, China)

Abstract Spermatogonial stem cells (SSCs) can renew themselves and commit to differentiate into spermatozoa. Using SSCs to prepare transgenic animal models have key roles in understanding the mechanism of spermatogenesis, producing transgenic animals, and rebuilding spermatogenic function of infertile individual. We reviewed the method of preparing transgenic animals by SSCs, and put forward some new ideas like cloning technique to enrich this method.

Key words spermatogonial stem cells; transgene; transplantation; clone

Received: December 26, 2007 Accepted: April 1, 2008

*Corresponding author. Tel: 86-21-58552343, Fax: 86-21-58951012, E-mail: chenggx@cngenon.com