

鸡胚睾丸支持细胞的分离、纯化与鉴定

采克俊 刘 莉* 丁海雷¹ 张易祥 丁志丽 张念慈(湖州师范学院生命科学学院, 湖州 313000; ¹扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要 以 18 天鸡胚睾丸为实验材料, 经胶原酶和胰蛋白酶两步酶消化法得到生精上皮细胞悬液。在原代培养过程中经差异贴壁和低渗处理后, 获得了纯度约为 90% 的单层支持细胞。对纯化的培养物染色鉴定, 结果显示支持细胞为碱性磷酸酶(AKP)阴性, 而混杂在其中的另一种体细胞管周细胞为 AKP 阳性; 油红 O 染色显示, 支持细胞胞质内含有大量的脂肪滴, 核内见双极小体; 吖啶橙染色证实支持细胞富含 RNA; 罗丹明 123 染色显示支持细胞富含线粒体; Hoechst 33342 染色显示支持细胞细胞核呈长卵圆形, 核的长轴与细胞长轴平行; 免疫荧光染色显示支持细胞胞质中表达波形蛋白。建立了一套简单、易行的鸡胚睾丸支持细胞分离纯化与鉴定方法。

关键词 鸡胚; 睾丸; 支持细胞; 纯化; 鉴定

支持细胞(sertoli cells)是睾丸生精上皮内一种外形极不规则的高柱状细胞, 从管周肌样细胞所处的基底膜延伸出去, 直到曲细精管的管腔。支持细胞能分泌多种营养因子, 主要作用是支持、营养和保护生精细胞, 对精子的生成具有重要的调节作用^[1]。因此, 支持细胞的分离培养是进行精子发生机制和生殖毒理学研究的一条有效途径。此外, 近年来研究发现, 支持细胞作为饲养层能促进共培养细胞的生长; 支持细胞还能分泌免疫保护因子, 降低移植物的免疫排斥反应^[2,3]。因此, 支持细胞体外培养研究具有重要的理论意义与应用价值, 成为新的研究热点。

目前已建立多种哺乳动物如小鼠、大鼠、犬、猕猴支持细胞分离培养的方法, 并已建立永生细胞株^[4-9]。但是, 有关禽类睾丸支持细胞的分离纯化和体外培养至今未见正式报道, 对其特征也知之甚少。本文以 18 天鸡胚睾丸为实验材料, 探讨禽类支持细胞的分离纯化和鉴定方法, 为禽类支持细胞的体外培养及应用研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

广西土鸡(Guangxi native broilers)受精种蛋购自湖州广东温氏畜牧有限公司, 种蛋置于自动孵化箱(德国 Grumbach)中, 在 37.5 °C, 相对湿度为 55% 的条件下孵化, 每天翻蛋 4 次。

1.2 主要试剂

高糖 DMEM 培养基、胎牛血清购于 Gibco 试剂公司; AKP 试剂盒购于华美生物工程有限公司; 波形

蛋白免疫荧光染色试剂盒购于武汉博十德生物工程有限公司。其他试剂, 包括 Hoechst 33342、碘化丙啶、胶原酶 IV、胰蛋白酶(0.25%)、青霉素、链霉素、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、罗丹明 123、吖啶橙、油红 O, 均购于美国 Sigma 公司。

完全培养基为含 1 mmol/L 丙酮酸钠、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸的高糖 DMEM 培养液中添加 10% 胎牛血清。

1.3 支持细胞的分离

孵化第 18 天种蛋用 75% 的酒精擦洗消毒。无菌获取两侧睾丸(雌性右侧卵巢退化, 有两个白色性腺者为雄性), 置于含双抗的 PBS 中浸洗 3 次。在体视显微镜下仔细剥离白膜和血管。剪碎, 加入适量的无钙镁离子 PBS 吹打数次, 移入离心管中静置 5 min, 弃上清液, 用 10 倍于组织块体积的 1 mg/ml 胶原酶消化, 在 37 °C 下作用 30 min, 期间每隔 5 min 混匀一次。第一次酶解后 500 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 之后用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化 5 min, 收集细胞悬液, 加含血清的培养基终止消化, 300 目不锈钢网筛过滤。过滤液以 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 再用完全培养基重新悬浮细胞, 取少量细胞进行活率检测和 AKP 染色, 剩余细胞用于原代培养。

1.4 石蜡切片

取 4 对睾丸 Bouin 氏液固定 2 天后, 进行常规石

收稿日期: 2008-06-11 接受日期: 2008-08-21

国家自然科学基金(No.30500270)、浙江省科技攻关重点计划(No.2005C22052)、湖州市自然科学基金(No.2006YZ08)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0572-2322053, E-mail: liuli6655@hutc.zj.cn

蜡切片和 HE 染色, 切片厚度为 5 μm 。制好的切片用光学显微镜(Motic BA400)进行观察拍照。

1.5 细胞活率检测

1 ml 细胞悬液或培养液中, 加入 6 μl Hoechst 33342, 8 μl 碘化丙锭。轻轻混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 15 min。荧光显微镜下观察, 死细胞呈红色, 活细胞呈蓝色^[10]。

1.6 支持细胞的纯化

1.6.1 差异贴壁 细胞浓度调整为 5×10^5 个/ml, 接种在 6 孔培养板上, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。随后定时(15 min、30 min、1 h、2 h 和 4 h)观察细胞贴壁情况, 按不同时间段将未贴壁的细胞悬液吸出, 进行细胞记数, 计算贴壁细胞所占比例。培养板中贴壁细胞再用预热的 PBS 洗一次, 然后换成完全培养基继续培养 24 h 后, 统计支持细胞(梭形体细胞)所占比例。

1.6.2 低渗处理 培养 48 h 后, 经过 0.5 h 差异贴壁的单层支持细胞, 弃去原培养液, 先用 PBS 洗两次, 再使用不同渗透压的 PBS 溶液(PBS 和纯水分别以 1:0, 1:1, 1:2, 1:5, 0:1 的比例混合, PBS 渗透压大约是 300 mOsm/kg, 纯水渗透压为 0 mOsm/kg)对细胞进行低渗处理 2 min, 中途观察细胞形态变化, 然后弃去渗透液, 再加等渗 PBS 洗一次, 最后换成新的完全培养基, 检测培养板中的细胞活率。继续培养 24 h 后, 统计支持细胞(梭形体细胞)所占比例, 定时观察细胞的生长情况。

1.7 支持细胞的特征鉴定

1.7.1 AKP 活性检测 细胞悬液涂片或体外培养的支持细胞单层, 用固定液固定 15 min; 再用 PBS 清洗 3 次去除固定液, 加入新鲜配置的 BCIP/NBT 染色液避光染色 20 min, PBS 清洗后, 倒置显微镜下观察、拍照。

1.7.2 油红 O 染色 100 ml 异丙醇中加入 0.5 g 油红 O, 充分溶解后作为贮存液。使用时取贮存液 6 ml, 加 4 ml 蒸馏水稀释, 静置 10 min 后过滤。细胞体外培养一段时间后, 弃去培养液, 加入 PBS 缓冲的 4% 多聚甲醛, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 1 h, PBS 洗 2 次, 将油红 O 滤液加入培养板, 室温下染色 20 min。弃去染液, 60% 的乙醇分色 3~5 s, 水洗。苏木精复染 30 s, 水洗至变蓝色, 立即观察。

1.7.3 吖啶橙染色 培养板经 PBS 洗 3 次, 晾干, 甲醇固定 10~15 min。用新鲜配制的 0.02% 吖啶橙染液染色 5 min。PBS 清洗 3 次, 最后加少量 PBS,

荧光显微镜观察。

1.7.4 罗丹明 123 染色 1 ml 细胞培养液中加入 10 μl 10 $\mu\text{g/ml}$ 罗丹明 123 染液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 20 min 后立即观察。

1.7.5 Hoechst 33342 染色 1 ml 培养液中, 加入 6 μl Hoechst 33342, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 15 min, 荧光显微镜下观察细胞核形态^[10]。

1.7.6 波形蛋白表达检测 采用免疫荧光染色法检测支持细胞波形蛋白表达, 操作步骤参照试剂盒说明, 二抗标记完成后添加 10 $\mu\text{g/ml}$ 碘化丙锭复染细胞核, 室温温育 5 min, 荧光显微镜检测拍照。

1.8 统计分析

实验重复 4 次, 实验数据用平均值 \pm 标准差表示, 组间资料应用单因素方差(One way ANOVA)分析, $P < 0.05$ 视为有显著性差异, 各项统计均用 SPSS 13.0 软件在计算机上完成。

2 结果

2.1 支持细胞的分离

石蜡切片显示(图 1), 孵化第 18 天鸡胚睾丸曲细精管已经形成, 部分区域管腔结构清晰可见。性原细胞较大而圆, 位于曲细精管管腔当中; 支持细胞核长卵圆形, 有规律地排列在曲细精管的基底膜上。共取出 200 个睾丸, 经两步酶消化, 平均每个睾丸得到生精上皮细胞 $(1.01 \pm 0.26) \times 10^6$ 个。细胞悬液经 Hoechst 33342/ 碘化丙锭双重荧光染色, 死细胞呈红色, 活细胞呈蓝色(图 2A), 平均活率为 $(96.16 \pm 0.84)\%$ 。AKP 染色可以识别出细胞悬液中的各种细胞。其中, 大圆形细胞为性原细胞, 占整个细胞悬液的 $(8.00 \pm 2.36)\%$, 性原细胞中 AKP 阳性率占整个细胞悬液的 $(3.71 \pm 1.12)\%$; 管周细胞为 AKP 阳性, 占整个细胞悬液的 $(36.18 \pm 6.53)\%$; 支持细胞为 AKP 阴性, 占整个细胞悬液的 $(47.67 \pm 8.88)\%$ (图 2B)。此外, 细胞悬液中还含有 $(8.14 \pm 1.82)\%$ 红细胞。

2.2 支持细胞分离纯化

2.2.1 差异贴壁 在原代培养过程中, 刚接种细胞为圆形, 体积较小, 以均一的单细胞状态存在。0.25 h 后约有一半的细胞开始贴壁, 但此时还贴壁不牢, 轻轻晃动易漂浮; 之后贴壁细胞逐渐增多, 0.5 h 后贴壁细胞增加至 74% 左右, 细胞开始伸展, 有突起贴壁长出, 至 4 h 后, 除红细胞外, 全部细胞都已贴壁, 且贴壁较牢(图 3)。培养 24 h 后, 支持细胞胞体呈梭状或不规则状, 细胞体积增大, 两侧有多个突起。以

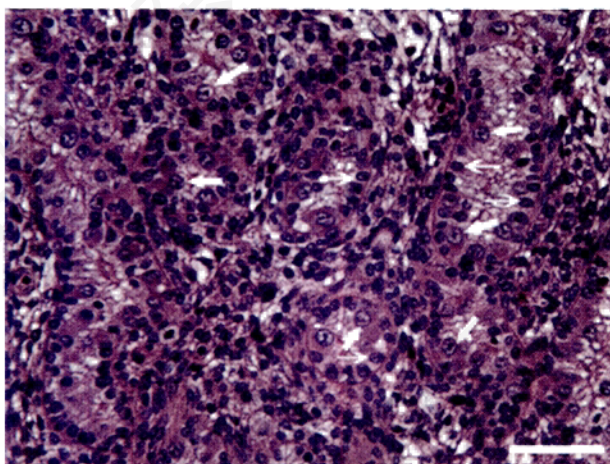


图1 18天鸡胚睾丸组织石蜡切片

可见曲细精管结构已经形成, 粗箭头所示为性原细胞, 位于曲细精管管腔中; 细箭头所示为支持细胞, 位于排列在曲细精管的基底膜上。标尺: 40 μm 。

梭形体细胞代表支持细胞, 发现随着贴壁时间的延长, 支持细胞所占比例逐渐下降, 但在0.25 h、0.5 h和1 h没有显著差异(图3)。综合考虑不同时间差异贴

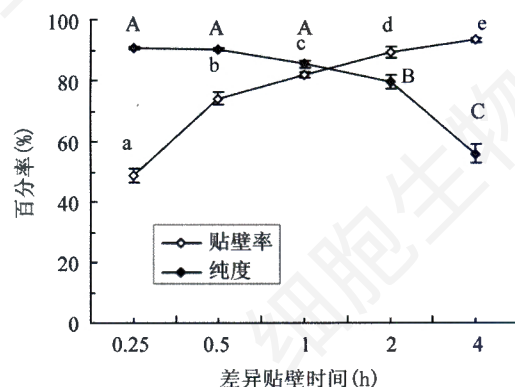


图3 不同时间差异贴壁对贴壁率和细胞纯度的影响
数据上标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

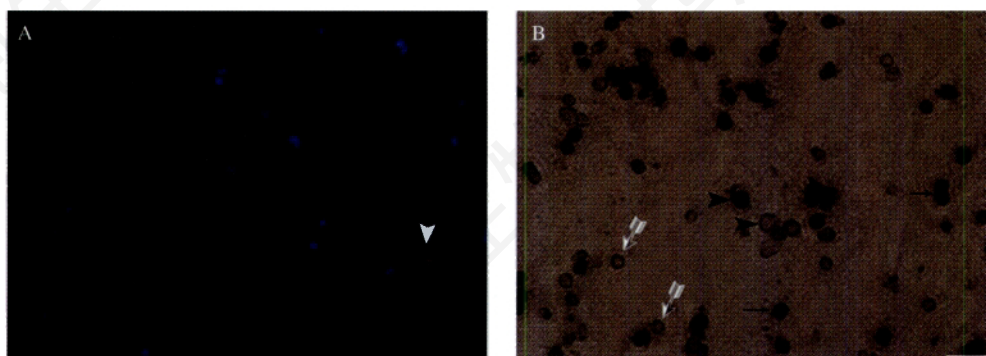


图2 18天鸡胚睾丸细胞悬液的检测

A: 细胞活率检测, 箭头所示为死细胞; B: AKP 活性检测, 白色箭头所示为支持细胞, 黑色粗箭头所示为性原细胞, 黑色细箭头所示为管周细胞。标尺: 40 μm 。

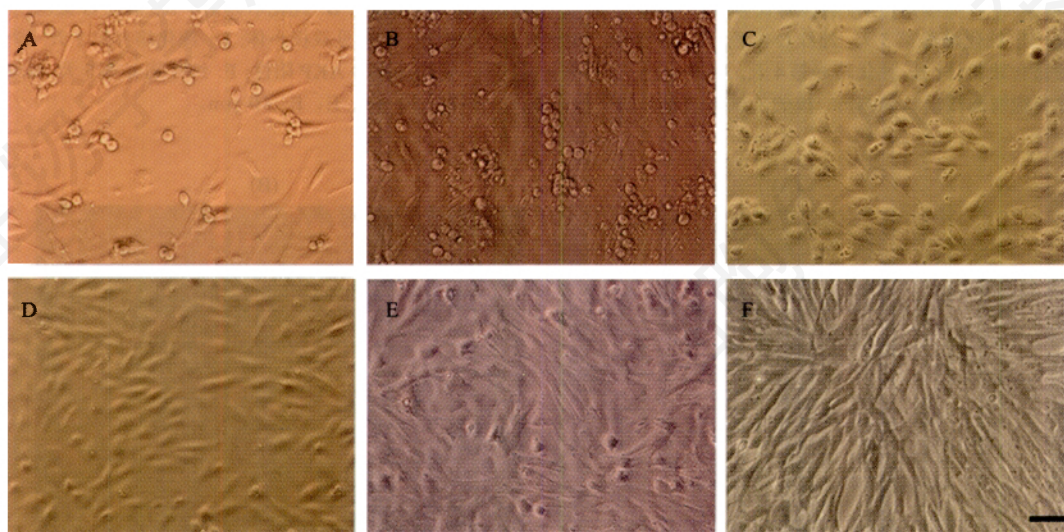


图4 18天鸡胚睾丸支持细胞体外培养的形态特征

A: 混合培养2天, 圆形的性原细胞; B: 混合培养5天, 见性原细胞集落; C: 支持细胞差异贴壁培养2天后低渗处理; D: 支持细胞差异贴壁培养2天后低渗处理恢复; E: 支持细胞差异贴壁结合低渗处理, 继续培养2天; F: 支持细胞差异贴壁结合低渗处理, 继续培养5天。标尺: 50 μm 。

壁对贴壁率和细胞纯度的影响, 0.5 h 和 1 h 两个时间段较合适, 在下面的实验中选用 0.5 h。虽然性原细胞贴壁速度较慢, 但若不差异贴壁, 性原细胞也会贴壁增殖, 贴壁后仍然为圆形, 贴附在支持细胞上。混合培养 2 天后, 性原细胞聚集增殖, 多为 2、3 个细胞相连, 部分性原细胞仍呈单个存在(图 4A); 混合培养 4~5 天后, 形成典型的葡萄串状集落(图 4B)。经过纯化培养的孔板中性原细胞残留很少, 未见集落形成。

2.2.2 低渗处理 培养 48 h 后单层支持细胞利用低渗 PBS 处理后圆形细胞的数量明显减少, 梭型的细胞比例大大提高, 但是, 渗透压降低到 50 mOsm/kg

后, 细胞活率明显下降, 所以, 综合考虑, 纯度和细胞活率, 100 mOsm/kg 低渗 PBS 处理效果最佳(表 1)。在低渗处理过程中, 观察到圆形细胞脱落, 而支持细

表 1 不同渗透压的 PBS 溶液低渗处理对体外培养支持细胞活率和纯度的影响

PBS/ 纯水 (V/V)	渗透压近似值 (mOsm/kg)	细胞活率 (%)	体细胞纯度 (%)
1 : 0	300	98.97±0.76 ^a	89.93±1.74 ^a
1 : 1	150	98.15±0.40 ^a	91.62±1.25 ^a
1 : 2	100	98.05±0.81 ^a	95.01±1.42 ^b
1 : 5	50	89.60±1.00 ^b	96.45±2.34 ^b
0 : 1	0	79.65±2.52 ^c	97.48±1.62 ^b

同列数据上标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

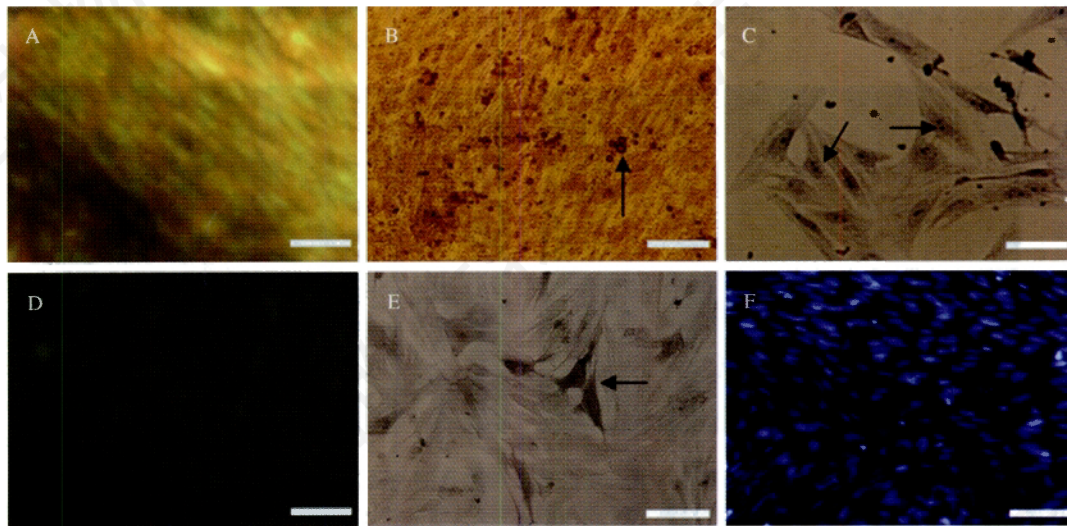


图 5 体外培养的 18 天鸡胚睾丸支持细胞染色鉴定

A: 纯化培养第 5 天, 吖啶橙染色, 细胞核为长卵圆形, 呈绿色荧光, 细胞质呈桔黄色荧光; B: 纯化培养第 7 天, 油红 O 染色, 苏丹精复染, 胞质内见脂肪滴; C: 纯化培养第 3 天, 油红 O 染色, 苏丹精复染, 细胞核为长卵圆形, 核内见双极小体; D: 纯化培养第 3 天, 罗丹明 123 染色, 显示支持细胞富含线粒体; E: 纯化培养第 4 天, AKP 染色, 支持细胞为阴性, 管周细胞为 AKP 阳性; F: 纯化培养第 5 天, Hoechst 33342 染色, 显示支持细胞细胞核呈长卵圆形, 核的长轴与细胞长轴平行。标尺: A~D: 20 μm ; E、F: 40 μm 。

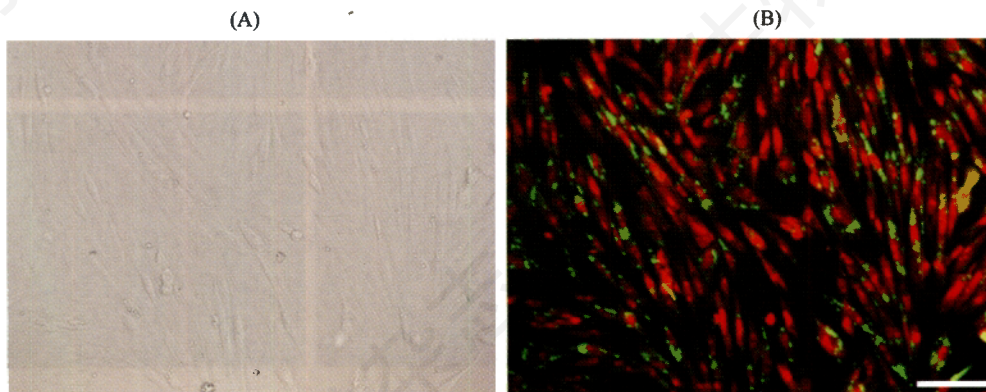


图 6 18 天鸡胚睾丸支持细胞纯化培养物波形蛋白免疫荧光染色

A: 明视野; B: 荧光视野下见支持细胞胞质中表达波形蛋白, 呈绿色荧光, 细胞核被碘化丙啶染成红色。标尺: 40 μm 。

胞发生肿胀,由梭形变成椭圆形,(图4C),恢复到等渗后,支持细胞体积又恢复正常,形态又变成梭形(图4D)。

2.3 支持细胞的特征鉴定

支持细胞和性原细胞贴壁后形态不同。支持细胞贴壁速度较快,贴壁后形状不规则,主要为梭形,呈成纤维细胞样,铺展面积较大,两侧有两个突起胞体;培养48 h后,支持细胞胞体进一步增大,呈膜状铺在培养板上(图4A)。支持细胞在体外培养增殖旺盛,经过差异贴壁和低渗处理,继续培养2天,支持细胞达到80%汇合(图4E);再继续培养3天达到完全汇合(图4F);之后隔日换液,继续培养一周仍存活良好。

体外纯化培养的支持细胞经吖啶橙染色鉴定,发现细胞核呈绿色荧光,细胞质呈橘黄色荧光,证明支持细胞含有丰富的RNA(图5A)。支持细胞含有脂肪滴,随着培养时间的延长,脂肪滴逐渐最大明显,经油红O染色,脂肪滴被染成红色(图5B);苏木精复染,细胞核呈椭圆形,被染成淡蓝色,核内见典型的双极小体结构(图5C)。AKP染色鉴定,发现支持细胞不着色,为AKP阴性,而混杂其中的管周细胞被染成深褐色,为AKP阳性(图5E)。统计表明,纯化培养的支持细胞单层中,还残留有9.45%的管周细胞。管周细胞形状不规则,多呈三角形,有多个突起胞体。罗丹明123染色显示,支持细胞质中含有丰富的线粒体,发绿色荧光(图5D)。Hoechst 33342染色,显示支持细胞细胞核呈长卵圆形,核的长轴与细胞长轴平行(图5F)。免疫荧光染色显示波形蛋白特异表达于支持细胞胞质中(图6)。

3 讨论

选择18天鸡胚睾丸作为实验材料,不仅取材方便,易于无菌操作,而且此时已分化出数量较多的支持细胞,而精子发生也还未启动,生精上皮中的唯一的生殖细胞是性原细胞^[11],因此容易获得较高纯度的支持细胞。本文通过组织切片观察及分离纯化实验也证明了这一点。此外,在18天鸡胚中,支持细胞已经稳定表达胶质细胞源神经营养因子等细胞因子(未发表资料)。但这并不意味着取材时期越早越好,因为在更早阶段,比如孵化第9~11天,虽然已分化出支持细胞,但数量不多,形态不易分辨^[11]。哺乳动物支持细胞的取材时期多选择在刚出生到青春期前,这一时期不仅在生精上皮中支持细胞比例较高,而且支持细胞在体外增殖能力强。进入青春期后,各级生

精细胞陆续出现,支持细胞占总细胞的比例迅速下降,支持细胞的增殖能力也会降低^[6,8]。最近,Bozkurt等^[12]对鸡出壳后支持细胞在体内的增殖情况进行了系统研究,发现大约到第8周后,支持细胞即停止分裂。这提示,如果进行鸡支持细胞的体外培养研究,最好在第8周之前取材。

生精上皮细胞的分离多采用消化酶,包括胶原酶、胰蛋白酶、透明质酸酶等依次消化^[5,8]。本文采用胶原酶和胰蛋白酶两步酶消化法,可以将生精上皮充分消化,从每个18天鸡胚睾丸得到 1×10^6 个细胞,活率也较高,取得了较好的分离效果。并且,经过第一步消化和低速离心等措施已去除了睾丸间质细胞的干扰。不过,在刚分离的细胞悬液中,除了混有性原细胞和红细胞外,还含有比例高达36.18%的管周细胞,支持细胞仅占47.67%。红细胞不能在体外贴壁增殖,很容易通过换液去除。性原细胞和其他生精细胞一样,与支持细胞相比,贴壁较慢,且不耐受低渗透压打击^[13],所以可以通过差异贴壁和低渗处理去除。本研究证实该纯化策略对鸡支持细胞也是适用的。在原代培养过程中,差异贴壁0.5 h或1 h,再用100 mOsm/kg低渗PBS处理效果最佳,梭形体细胞的纯度高达95%。纯化后继续至第7天,经过中途的洗涤换液处理,培养板中几乎没有圆形的性原细胞,但还残留有另一种体细胞——管周细胞。不过,管周细胞的比例由接种时的36.18%降低到9.45%。之所以管周细胞的比例大大降低,可能是因为管周细胞的贴壁能力,或者抗低渗打击的能力较支持细胞差,也可能是由于管周细胞在体外的增殖速度比支持细胞慢,具体原因还有待于进一步研究。为了降低管周细胞的污染,可在曲细精管消化时,提高胶原酶的浓度,延长作用时间,但不能过度消化,影响细胞活率^[5]。Scarpino等^[4]采用DSA凝集素特异黏附,可以快速高效富集大鼠支持细胞,减少了管周细胞的污染。

细胞培养应考虑其生理状态下的温度,鸡的基础体温大约为41~43℃,但鸡细胞培养的温度一般都是37℃或者38℃。在预实验中,我们比较了41℃、38.5℃和37℃下鸡胚睾丸细胞的培养情况。结果表明,41℃细胞容易脱落,不适合培养;37℃和38.5℃下,鸡睾丸细胞都能增殖,但38.5℃下生长略为迅速,其他无明显差异,而实验室培养的其他类型细胞都选用37℃。因此,我们也选用37℃作为鸡睾丸支持细胞的培养温度。并且证明在37℃条件下,鸡

支持细胞生长良好。

鉴定体外培养的支持细胞常用方法是形态学观察和染色鉴定。本文发现 18 天鸡胚睾丸支持细胞形态特征与哺乳动物的相似, 主要为梭形, 呈成纤维细胞样, 铺展面积较大, 两侧有两个突起胞体^[4~9]。不过, 仅凭形态学特征不易识别出混杂其中的管周细胞。由于鸡的管周细胞与哺乳动物的一样, 都为 AKP 阳性, 而支持细胞为 AKP 阴性^[6,14,15], 本文采用 AKP 染色清楚地将两者区别开来。在以前的支持细胞纯化培养研究中, 一般都将梭形成纤维细胞样的体细胞作为支持细胞, 而没有将其与管周细胞区别开, 这会高估了支持细胞的比例^[5,16]。

此外, 本文还采用多种其他染色方法, 较完整地鉴定了鸡支持细胞的特征, 进一步证实鸡支持细胞与哺乳动物的相似。其中, 吖啶橙染色、苏木精染色, 以及 Hoechst 33342 染色, 都显示支持细胞细胞核呈长卵圆形。DNA 荧光染料 Hoechst 33342 作为一种活体荧光染料, 可以直接对培养中的活细胞染色, 不改变细胞的形态特征和增殖能力, 对细胞核结构的检测最为可靠^[10]。吖啶橙染色还证实支持细胞的细胞质富含 RNA, 罗丹明 123 染色显示支持细胞富含线粒体, 这说明体外培养的支持细胞仍然具有很强的分泌功能。细胞质中含有脂肪滴, 以及核内有双极小体结构, 是支持细胞所特有的细胞结构^[16]。本实验用油红 O 染色, 苏木精复染, 也观察到了这一特征, 取得了满意的效果。支持细胞胞质中的大量脂滴, 可能与其吞噬和分泌功能有关。本文还发现, 随着培养时间的延长, 支持细胞的脂肪滴逐渐增大明显。在睾丸曲细精管中, 波形蛋白特异地表达于支持细胞^[5]。本文通过免疫荧光染色, 检测到体外纯化培养

的支持细胞胞质中表达波形蛋白, 进一步确认所获得的纯化培养物主要是支持细胞。

除了本文使用的鉴定方法外, 研究人员还采用富尔根染色或甲基绿-派洛宁染色, 或者通过电镜, 清楚观察到细胞核核仁周围的卫星核小体这一支持细胞所特有的细胞结构^[5,16]; 或者检测支持细胞特异表达的 WT1、FasL、雄激素结合蛋白、转铁蛋白、抑制素、生长因子等^[5,16]。这些方法也可以反应支持细胞的特征, 关于禽类支持细胞这些特征的检测鉴定还有待于进一步研究。

综上所述, 本文以 18 天鸡胚睾丸为实验材料, 经胶原酶和胰蛋白酶两步酶消化法、差异贴壁和低渗处理, 以及多种染色鉴定, 建立了一套简单、易行的鸡胚睾丸支持细胞分离纯化与鉴定方法, 为鸡支持细胞的体外培养与应用研究打下了基础。

参考文献(References)

- [1] 汪旭莹. 细胞生物学杂志, 2002, 24: 325
- [2] 麦秋萍等. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 43: 8761
- [3] Halberstadt C *et al.* *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 6: 813
- [4] Scarpino S *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 146: 121
- [5] 黄东晖等. 解剖学报, 2007, 38: 246
- [6] Buzzard JJ *et al.* *Reproduction*, 2002, 124: 633
- [7] Davidson AG, *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2007, 43: 324
- [8] Majumdar SS *et al.* *Biol Reprod*, 1998, 58: 633
- [9] Hofmann MC *et al.* *J Androl*, 2003, 24: 120
- [10] Cai K *et al.* *Arch Androl*, 2005, 51: 371
- [11] 李碧春等. 畜牧兽医学报, 2005, 36: 680
- [12] Bozkurt HH *et al.* *J Vet Sci*, 2007, 8: 219
- [13] Wagle JR *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol*, 1986, 22: 325
- [14] Gunawardana VK. *J Anat*, 1985, 140: 711
- [15] Chapin RE *et al.* *J Androl*, 1987, 8: 155
- [16] 韩晓冬等. 解剖学报, 2005, 36: 682

Isolation, Purification and Characterization of Sertoli Cells from Embryonic Chickens

Ke-Jun Cai, Li Liu*, Hai-Lei Ding¹, Yi-Xiang Zhang, Zhi-Li Ding, Nian-Ci Zhang

(School of Life Sciences, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, China; ¹College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract Testes from 18-day-old embryonic chickens were used to isolate seminiferous epithelial cells by sequential two-step enzyme digestion with collagenase and trypsin. During primary culture, highly purified monolayers containing about 90% sertoli cells can be successfully achieved by differential plating and hypotonic treatment. The sertoli cell-enriched cultures were then characterized by staining. The results showed that, no alkaline phos-

phatase (AKP) staining were found in sertoli cells itself, while another somatic cells, peritubular myoid cells were AKP positive. lipid droplet formation in the cytoplasm and bipolar corpuscula in nucleus were clearly detected after oil red O staining. Acridine orange staining demonstrated that sertoli cells were rich in RNA. Rhodamine 123 staining showed that sertoli cells were rich in mitochondria. Hoechst 33342 staining showed that sertoli cells had a long elliptical shaped nucleus and the long axis of nucleus oriented parallel to the long axis of the cell. Immunofluorescent staining showed that vimentin was expressed in sertoli cell cytoplasm. A simple and reliable method for isolation, purification and characterization of sertoli cells from embryonic chickens has been established.

Key words embryonic chicken; testis; sertoli cells; purification; characterization

Received: June 11, 2008 Accepted: August 21, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30500270), the Zhejiang Provincial Key Science and Technology Program (No.2005C22052) and the Huzhou Municipal Natural Science Foundation (No.2006YZ08)

*Corresponding author. Tel: 86-572-2322053, E-mail: liuli6655@hutc.zj.cn