

# 高纯度分离睾丸支持细胞的简便方法

唐丽娟 王庆忠<sup>1\*</sup> 徐承水(曲阜师范大学生命科学院, 曲阜 273165; <sup>1</sup>潍坊学院生命工程学院, 潍坊 261061)

**摘要** 为寻求简便经济的方法分离培养小鼠睾丸支持细胞, 用改良的两种消化液依次消化 2~7 天的乳鼠睾丸获得细胞悬液, 采用反复离心和反复贴壁的方法除去生精细胞, 从而获得高纯度的小鼠睾丸支持细胞。

**关键词** 小鼠; 支持细胞; 分离; 培养

睾丸支持细胞是曲细精管生精上皮中唯一的体细胞, 它为生殖细胞的发育提供专门的微环境。支持细胞的体外分离和培养有助于更好地研究其功能。本研究在已报道的方法基础上进行了合理的改良<sup>[1-4]</sup>, 简化了实验步骤, 得到了高度纯化的支持细胞, 为相关的研究奠定了细胞来源基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

出生后 2~7 天的 ICR 雄性乳鼠(出生日记为出生后 0 天)购自潍坊医学院实验动物中心。胶原酶 V、DNase、胎牛血清、谷氨酰胺、DMEM/F12 购自 Sigma 公司。无血清 DMEM 购自 Invitrogen 公司。透明质酸酶购自 Calbiochem 公司。CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国 NuAire 公司。低温高速离心机购自中国 AnKe 公司。倒置显微镜购自日本 Nikon 公司。

### 1.2 方法

取 2~7 天的 ICR 雄性乳鼠 10~15 只, 脱颈法处死, 75% 酒精洗涤; 在超净台上取出睾丸, 用 PBS 洗涤 2~3 次, 除去血污; 剥离睾丸白膜, 用 PBS 反复冲洗, 将睾丸组织转移到 15 ml 离心管中; 加入 10 倍体积的 PBS, 用吸管轻轻吹打, 然后静置, 待睾丸组织沉到离心管底后, 弃掉上清液, 如此反复洗涤 2~3 次。然后加入消化液 I (D-PBS、2 mg/ml 胶原酶 V、200 μg/ml DNase), 约是组织的 10 倍, 用吸管轻轻吹打, 在室温下作用 3~5 min, 至曲细精管彼此分散时; 加入 5~10 ml PBS, 用吸管吹匀后, 170 g 离心 2 min, 弃去上清液, 重复 2~3 次, 以除去睾丸间质细胞。之后, 在离心沉淀物中加入 5 倍体积的消化液 II (无血清 DMEM、2 mg/ml 胶原酶 V、200 μg/ml DNase 和 2 mg/ml 透明质酸酶), 并用吸管轻轻吹打, 在室温

下消化 2~5 min, 消化时间的长短据消化程度而定, 以观察不到微小的组织块为宜。最后加入 5~10 ml PBS 或 DMEM/F12 培养液(DMEM/F12、NaHCO<sub>3</sub>、2 mmol/L 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素)终止消化, 250 g 离心 5 min, 弃去上清液。离心后沉淀中加入 10 ml PBS 重悬细胞, 用 60 μm 孔径的筛网过滤细胞悬液, 除去未消化的组织块, 滤出液于 200 g 离心 5 min, 弃上清液。如此重复 2 次后, 加入适量 DMEM/F12 培养液, 吹打数次, 制成单细胞悬液。调整细胞密度为 2×10<sup>5</sup> 个/ml, 接种到 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶或者 6 孔板中(用 2% 明胶预包被), 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

培养 4~6 h 后, 更换培养液以除去未贴壁的生精细胞。继续培养 24 h 后, 轻轻晃动培养瓶, 悬起未贴壁的生精细胞, 再一次更换培养液, 进一步除去生精细胞。

通过以上操作, 可获得高纯度的睾丸支持细胞培养物。若培养物中仍残留有生精细胞, 可以重复更换培养液, 或者直接用于相关的研究, 残留的生精细胞将随着更换培养液而消失。

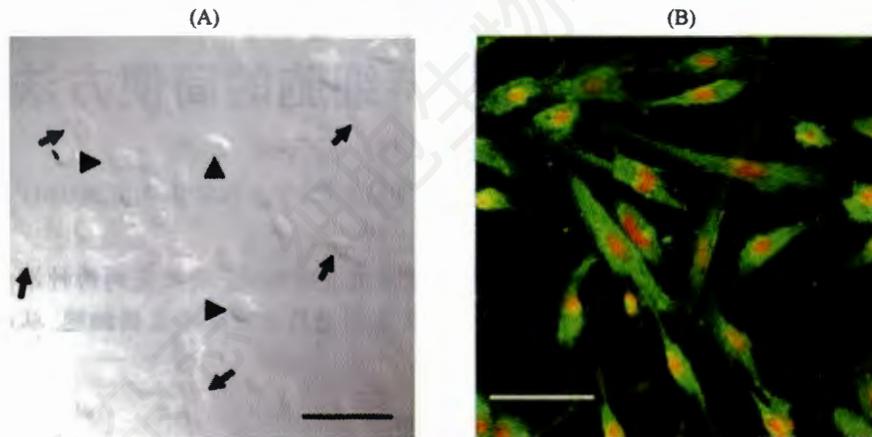
## 2 结果

在上述处理中, 支持细胞在 4 h 后开始贴壁, 24 h 后已经完全贴壁。倒置相差显微镜下观察, 细胞变成扁平状, 梭形或纺锤形(图 1A)。波形蛋白(vimentin)是曲细精管中支持细胞的特异性标志蛋白。应用羊抗人波形蛋白多克隆抗体作为一抗、

收稿日期: 2008-10-21 接受日期: 2008-12-03

山东省自然科学基金(No. Y2007079)和潍坊市科技发展计划项目(No. 2007028)资助

\* 通讯作者。Tel: 0536-8785288, E-mail: waqizh@163.com



**Fig.1 Morphological and immunocytochemical analysis of cultured Sertoli cells**

A: phase contrast microscopic image of cultured Sertoli cells, noting that the Sertoli cells were spindle-shaped (arrow) or elliptic (arrowhead); B: immunofluorescent staining of cultured Sertoli cells. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

FITC 偶联的小鼠抗羊 IgG 作为二抗对波形蛋白进行免疫细胞化学染色分析, 细胞核由碘化丙锭 (propidium iodide) 复染。结果表明, 用上述方法获得的支持细胞培养物中支持细胞的纯度达 99% 以上(图 1B)。

### 3 讨论

出生后 2~7 天的 ICR 雄性乳鼠睾丸曲细精管的生精上皮中主要是生精细胞和支持细胞, 但睾丸间质中含有间质细胞, 曲细精管壁外有平滑肌细胞等。本研究中采用的分级离心可以有效地除去睾丸间质细胞。根据支持细胞贴壁快而生精细胞和肌细胞贴壁慢的特

点, 又采用反复贴壁分选的方法有效地除去生精细胞等。因此, 我们能够获得高度纯化的支持细胞。

### 参考文献(References)

- [1] Shi YQ, Wang QZ, Liao SY, *et al.* *In vitro* propagation of spermatogonial stem cells from KM mice, *Front Biosci*, 2006, 11: 2614-2622
- [2] 王庆忠, 韩春生. Knockout™ 无血清培养基支持小鼠精原干细胞的短期存活, *分子细胞生物学报*, 2008, 41(2): 162-166
- [3] 王庆忠, 刘慧莲. 昆明白小鼠精原干细胞的体外培养, *潍坊学院学报*, 2007, 7(6): 56-61
- [4] 王庆忠, 石玉强, 刘慧莲. 富集的精原干细胞异体移植和后代小鼠的产生, *中国生物工程杂志*, 2008, 28 (6s): 11-15

## A Simple Method for Isolating Highly Purified Mouse Sertoli Cells

Li-Juan Tang, Qing-Zhong Wang<sup>1\*</sup>, Cheng-Shui Xu

(College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; <sup>1</sup>College of Bio-engineering, Weifang University, Weifang 261061, China)

**Abstract** To isolate and culture the Sertoli cells from 2–7 days pup mouse, the testis cell suspension was prepared by using two types of digestion solutions called Digestion I and Digestion II. Repeated centrifugation and repeated adherence selection were used to remove germ cells. Finally, highly purified mouse Sertoli cells were obtained.

**Key words** mouse; Sertoli cell; isolation; culture

Received: October 21, 2008 Accepted: December 3, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of Shandong Province (No.Y2007079) and Science and Technology Development Project of Weifang City (No.2007028)

\*Corresponding author. Tel: 86-536-8785288, E-mail: waqizh@163.com