

技术与方法

大鼠精原干细胞的高效分离和纯化方法

张 岩 罗奋华 刘林洪 萨初拉 于泊洋 吴应积*

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要 精原干细胞是精子发生的基础, 是永久分化成精子的克隆源, 它既可以自我更新维持体内干细胞的数量, 又可以增殖分化形成各阶段的生精细胞直至成熟精子。本文以22~25日龄Wistar-Iamichi大鼠为研究对象, 利用两步酶消化法分离得到睾丸曲细精管细胞悬液, 根据精原干细胞与曲细精管细胞悬液中体细胞(支持细胞及少量的管周细胞)及各级分化的生精细胞贴壁能力及对细胞外基质粘附力的不同, 将大鼠精原干细胞进行纯化。经纯化后, 5只大鼠的睾丸可以得到约 3×10^5 个精原干细胞, 该精原干细胞在体外培养可形成克隆, 并且该克隆可表达精原干细胞特异的标记基因*GFR α 1*和*CDH1*。本文所介绍的高效分离和纯化大鼠精原干细胞的方法, 操作简便, 且得到的精原干细胞具有很高的活力和增殖能力, 该方法为今后大鼠精原干细胞的长期培养及操作研究奠定了基础。

关键词 大鼠; 睾丸; 精原干细胞; 分离和纯化

哺乳动物的精子发生可以分为三个阶段: 精原细胞的有丝分裂增殖阶段, 精母细胞的减数分裂阶段和精子细胞的成熟变态阶段。这个复杂的过程源于位于睾丸基底膜上一群数量很少的细胞——精原干细胞^[1]。精原干细胞既可以自我更新维持其体内的数量, 又可以分化产生大量的子代细胞直到成熟精子, 该过程可以贯穿整个雄性动物的一生, 为其源源不断地产生大量的成熟精子^[2]。自1994年Brinster等^[3]创建精原干细胞移植技术以来, 精原干细胞的研究得到了迅速发展, 近年来, 又建立了精原干细胞的体外长期培养和增殖方法^[4-6], 而这些科研成果又促成了新的发现。最近报道称, 可以从初生小鼠、成年小鼠以及人的睾丸组织中得到多能干细胞, 称为多能生殖干细胞(multipotent germ-line stem cells)。这些多能生殖干细胞可在体外被诱导形成多个细胞系, 经注射免疫缺陷鼠后可形成畸胎瘤^[7-9]。然而, 所有这些关于精原干细胞的操作的最基本步骤还是精原干细胞的分离和纯化, 因为精原干细胞在睾丸中的数量很少, 在成年小鼠睾丸中大约每3 000~4 000个睾丸细胞中才有1个干细胞^[10]。目前, 已报道了很多种富集精原干细胞的方法。初期利用Percoll密度梯度离心法分离新生小鼠精原细胞^[11], 但由于曲细精管细胞悬液的复杂性, 使用该种方法会使得分层不太清

晰, 而且操作过程繁琐, 纯化程度不高。目前较常使用的还有免疫磁珠分离技术和流式细胞分选技术。如果能选择一个特异性很强的膜表面蛋白抗原与抗体特异结合, 那么利用这两种方法都能得到纯度较高的精原干细胞。Brinster实验组^[12]最先以整合素 $\alpha 6$ 为表面抗原进行免疫磁珠分离, 分选细胞的效率提高了8.4倍。Kubota等^[13]以Thy-1为表面标志, 应用免疫磁珠技术从成年隐睾小鼠、成年小鼠、幼年小鼠以及新生小鼠睾丸中分别获得了富集6倍、30倍、4倍和5倍的精原干细胞。这一实验小组^[14]还以c-Kit、MHC-1阴性和Thy-1阳性三个参数结合得到了富集25倍的精原干细胞。采用免疫磁珠技术和流式细胞分选技术进行精原干细胞的分离纯化不仅能够富集大量的精原干细胞, 还可以保持其活力和增殖能力, 可用于精原干细胞的体外长期培养和增殖。但是该方法需要专门的设备, 而且购买一次性分离柱和抗体标记的磁珠, 成本昂贵。

大鼠是实验室中研究较为广泛的一种实验动物。由于大鼠具有体型大、繁殖力强、易于手术处理、

收稿日期: 2010-11-23 接受日期: 2011-01-24

教育部春晖计划(No.Z2007-1-01036)和内蒙古自治区自然科学基金(No.2009ZD05)资助项目

*通讯作者。Tel: 0471-4992443, Fax: 0471-4995071, E-mail: yingji_wu@yahoo.com

便于取样和实验操作方面的优势,在医药以及生物学领域已有超过百万篇科研文献是以大鼠为实验动物的。然而目前还没有较好的方法建立转基因大鼠,限制了大鼠的应用^[15]。所以,本文以内蒙古大学国家二级清洁型动物房繁育的Wistar-Iamichi大鼠为研究对象,根据精原干细胞与曲细精管细胞悬液中体细胞(支持细胞及少量的管周细胞)及各级分化的生精细胞在贴壁能力及对细胞外基质粘附力方面的不同,详细介绍大鼠精原干细胞的分离与纯化过程,为日后应用精原干细胞操作技术进行转基因大鼠的制作奠定坚实的基础。此外,该方法也为日后对大动物及人类的精原干细胞的分离和纯化提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar-Iamichi大鼠由本实验中心国家二级清洁型动物房繁育。实验中采用了β巯基乙醇(SERVA)、Amphotericin B (BBI AD0030P)、链霉素(BBI)、青霉素(日本和光株式会社)、MEMα(GIBCO)、DMEM(GIBCO)、Collagenase IV(Worthington)、EDTA(上海生工)、Trypsin(Amresco)、DNase I(上海生工)、胎牛血清(FBS,天津灏洋生物)、马血清(Sigma)、BSA(Sigma),其他化学试剂均为国产分析纯。DPBS配方为:200 mg/L KCl, 200 mg/L KH₂PO₄, 8 g/L NaCl和1.15 g/L Na₂HPO₄。

1.2 方法

1.2.1 大鼠睾丸单细胞悬液的制备 将5只22~25日龄的大鼠用颈椎脱臼法处死,无菌取出睾丸,首先,将睾丸表面的白膜去掉暴露出曲细精管,然后,将全部睾丸放入事先准备好的装有DMEM/F12培养液的小瓶中,并加入Collagenase IV和DNase I至终浓度分别为1 mg/ml和200 μg/ml,在37℃水浴摇床中孵育15 min。将消化后的曲细精管用DPBS洗两次,然后加入0.25% Trypsin/(1 mmol/L) EDTA溶液,在37℃水浴摇床中孵育5 min,并用5 ml移液器反复吹打,使其形成单细胞悬液。当大多数细胞已吹散时,立刻加入含10% FBS的培养液终止反应。经过酶消化反应后去掉任何肉眼可见的大的组织团块,通过200目尼龙膜过滤,再通过300目的尼龙膜过滤得到单细胞悬液。将细胞滤液以2 000 r/min离心5 min,用加有FBS和马血清的DMEM培养液重悬细胞,血球计数板计数。将得到的细胞悬液以2×10⁶个/ml的浓度接种在

4~6个明胶处理的100 mm细胞培养皿中,在32.5℃, 5.5% CO₂的细胞培养箱中培养65 h。

1.2.2 大鼠精原细胞的分离 65 h后,将4~6个100 mm培养皿从培养箱中取出,吸去培养液,用DMEM培养液洗一次。向每个培养皿中加入8 ml DMEM培养液,用5 ml移液器在培养皿表面温和地反复吹打,收集已经悬浮的生殖细胞,而体细胞仍然贴壁在培养皿底部。为了尽可能地收集生殖细胞,重复该步骤两次,注意不要将贴壁的体细胞吹起。将所有的100 mm培养皿中的细胞全部处理后,将收集到的生殖细胞悬液转移到50 ml离心管中,2 000 r/min离心5 min。用加有FBS和马血清的DMEM培养液重悬细胞,用5 ml移液器反复吹打,然后将细胞悬液加到两个事先用大鼠尾胶原包被过的培养皿中,32.5℃, 5.5% CO₂培养4 h。实验所用大鼠尾胶原为本实验室自己制备^[16]。

1.2.3 大鼠精原干细胞的纯化 4 h后将培养皿从培养箱中取出,用5 ml移液器温和地反复吹打培养皿表面几次。将没有贴壁的细胞收集到一个50 ml离心管,2 000 r/min离心5 min,去掉上清,用10% FBS的DMEM培养液重悬细胞,并立刻将细胞悬液接种到事先准备好的铺有Laminin的12孔板中,置于32.5℃, 5.5% CO₂的培养箱中45 min。将12孔板从培养箱中取出,将Laminin未粘着的悬浮细胞及培养液去掉。加入PBS-BSA溶液使Laminin粘着细胞脱壁。将所有浮起的Laminin粘着细胞转移到一个50 ml离心管中,2 000 r/min离心5 min,去掉上清,用精原干细胞培养液重悬细胞并计数。此时得到的细胞即为纯化后的大鼠精原干细胞,可以直接用来进行下一步实验。

1.2.4 大鼠精原干细胞的免疫荧光染色鉴定 大鼠精原干细胞的体外培养参照Kubota等^[17]的方法进行。用丝裂霉素处理的STO细胞做为滋养层,用无血清培养液进行精原干细胞培养。将培养的精原干细胞用DPBS洗两次,4%多聚甲醛固定30 min, DPBS洗3次,并用含有山羊血清的封闭液封闭半小时,封闭后直接加入一抗,4℃过夜, DPBS洗3次,将细胞与二抗共孵育30 min, DPBS洗3次,加入5 μg/ml Hoechst 33342孵育8 min, DPBS洗3次,最后加入新鲜的DPBS,用Nikon TE2000-U光学显微镜对细胞进行观察照片。实验所用的一抗有:抗GFRα1抗体(1:100稀释),抗CDH1抗体(1:100稀释)(SANTA CRUZE)。二抗有:CY3标记山羊抗小鼠IgG(1:300稀释), FITC标记山羊

抗兔IgG(1:350稀释)(武汉博士德生物工程有限公司)。

2 结果

2.1 大鼠精原干细胞的分离

利用两步酶消化法, 5只大鼠的睾丸经处理后可得到 2×10^7 个($n=5, \pm 0.1 \times 10^7$)细胞, 即曲细精管单细胞悬液。在该悬液中主要由未分化的精原细胞和体细胞(支持细胞及少量的管周细胞)及各级分化的生精细胞组成。先将细胞接种在明胶处理过的培养皿中, 因为体细胞贴壁的速度远远超过精原细胞, 大部分体细胞短时间即可贴壁。过夜培养后, 体细胞大多完成贴壁, 而精原细胞尚未贴壁或者贴壁不牢, 轻

轻吹打即可脱落。所以, 经过65 h的培养后, 绝大多数的体细胞已完全贴壁(图1A), 收集未贴壁的精原细胞(图1B)进行下一步的纯化实验。

2.2 大鼠精原干细胞的纯化

收集到的未贴壁细胞主要由未分化的精原细胞及其它各级分化的精原细胞组成。因为精原干细胞优先粘附于细胞外基质蛋白Laminin上, 而分化的精原细胞优先与大鼠尾胶原粘着^[12], 所以我们利用两次差异贴壁的方法能够纯化大鼠精原干细胞。首先, 用大鼠尾胶原包被培养皿, 经过4 h孵育后, 收集未贴壁的精原干细胞(图1C), 接种到Laminin包被的培养皿中。经过40 min的孵育后, 仅精原干细胞可以贴壁(图1D)。经纯化后5只大鼠的睾丸细胞经纯化后约可以得到 3×10^5 个($n=5, \pm 0.4 \times 10^5$)精原细胞。

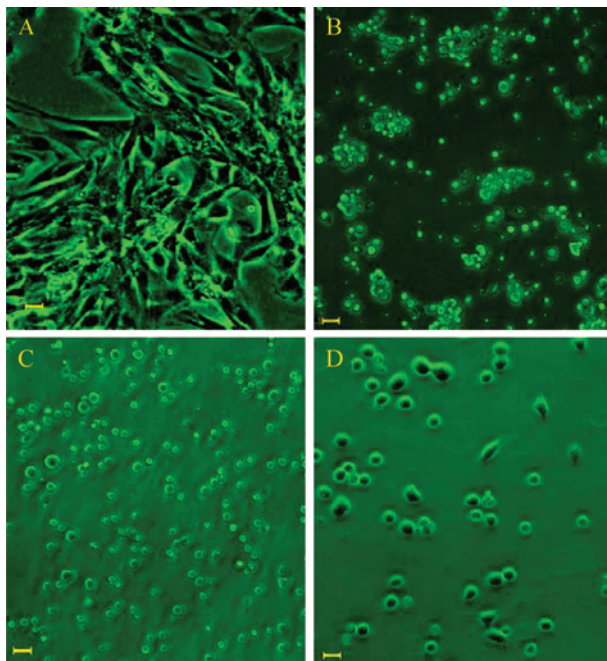


图1 分离纯化后的大鼠精原细胞

A: 经过65 h的贴壁培养后, 睾丸体细胞(主要是支持细胞和睾丸间质细胞)大多已完全贴壁; B: 经过65 h的贴壁培养后, 收集未贴壁细胞, 主要由未分化和分化的精原细胞组成; C: 经大鼠尾胶原包被的培养皿纯化后, 未贴壁细胞主要由精原干细胞组成; D: 精原干细胞贴壁在Laminin包被的的培养皿上; 标尺为20 μm 。

Fig.1 Rat spermatogonia obtained after isolation and purification

A: the testis somatic cells (mainly Sertoli cells and Leydig cells) on plastic after removal of spermatogenic cells from a culture of testis cells; B: a spermatogenic cell-enriched population that does not bind to plastic, containing undifferentiated spermatogonia and differentiated spermatogonial cells; C: a spermatogenic cell-enriched population that does not bind to collagen, mainly containing undifferentiated spermatogonia; D: a spermatogenic cell-enriched population that bind to laminin, mainly containing spermatogonial stem cells; the scale bar is 20 μm .

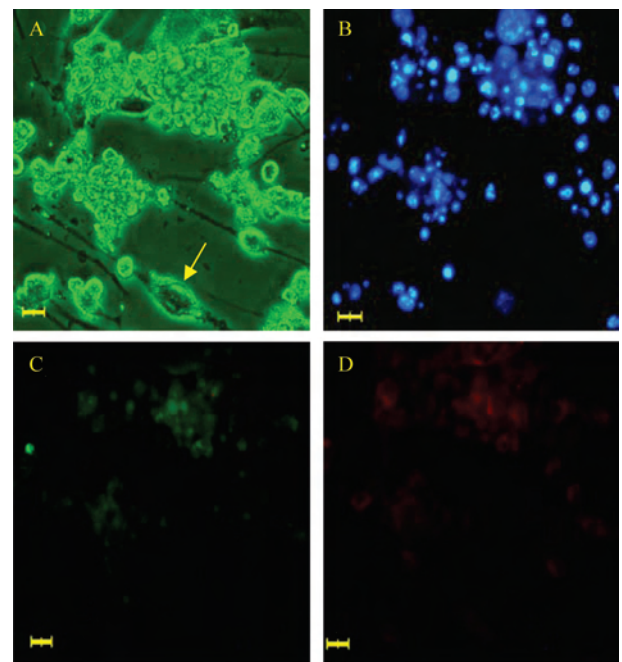


图2 GFR α 1和CDH1对体外培养的大鼠精原干细胞克隆的双免疫荧光染色

A: 大鼠精原干细胞在体外培养过程中形成的克隆团; B: 用Hoechst 33342对细胞核进行标记; 这些克隆可同时被GFR α 1(C)和CDH1(D)免疫染色, 而滋养层细胞(A中箭头所示)则不被染色; 标尺为20 μm 。

Fig.2 Double immunostaining of GFR α 1 and CDH1 of spermatogonial stem cell colonies during *in vitro* culture period

A: *in vitro* expansion of spermatogonial stem cells can form germ cell clumps; B: the cell nuclei can be stained by Hoechst 33342; these clumps are positive for both GFR α 1 (C) and CDH1 (D), and the feeder cells can not be stained (see the arrow in A); the scale bar is 20 μm .

2.3 大鼠精原干细胞的鉴定

利用该方法可以分离纯化得到大量的精原干细胞, 该精原干细胞在体外培养可形成克隆(图2A)。经免疫荧光分析, 该克隆可同时表达未分化的精原干细胞特异的标记基因*GFR α 1*(图2C)和*CDH1*(图2D), 同时用Hoechst 33342对细胞核进行标记(图2B)。

3 讨论

精原干细胞是精子发生的基础, 是永久分化成精子的克隆源, 它既可以自我更新维持体内干细胞的数量, 又可以增殖分化形成各阶段的生精细胞直至成熟精子。在整个精子发生过程中, 精子的产生是一个高度复杂的细胞分化过程, 需要整个睾丸内的各种细胞的精确调控, 而这个复杂的过程就开始于位于睾丸基底膜上的一群数量很少的精原干细胞^[18]。在成年小鼠睾丸内的全部生殖细胞中, 仅有0.03%是干细胞^[12], 因此, 对精原干细胞进行分离和纯化是研究精原干细胞的关键一步。根据精原干细胞与曲细精管细胞悬液中体细胞(支持细胞及少量的管周细胞)及其他各级分化的生精细胞在贴壁能力、比重、表面标志以及生长特性等方面的差异, 目前较常用的精原干细胞的纯化方法有: 基于细胞形态的筛选法、差异贴壁法、流式细胞分选法、免疫磁珠分离法。利用免疫磁珠分离技术也能分离纯化得到未分化的精原干细胞, 用于后续试验^[19], 但是利用该方法进行分离纯化需要选择特异性高的表面抗原, 而且需要专门的设备, 并购买一次性的分离柱和抗体标记的磁珠, 成本昂贵。由于还没有确定唯一在精原干细胞特异表达的表面标志, 所以目前大多实验组都利用综合参数进行流式细胞分选^[20]。利用多参数流式细胞技术分离纯化精原干细胞方便、快捷, 而且可以获得大量较纯的精原干细胞, 但是需要购买专门的设备流式细胞仪, 成本昂贵。Hasenfuss实验组^[8]在培养精原干细胞向多能干细胞诱导的实验中, 应用了一种新的精原干细胞纯化方法。在该方法中, 首先将分离到的曲细精管细胞悬液铺到明胶处理过的培养皿中, 使用添加GDNF的培养液。一周后有松散的克隆出现。收集克隆细胞接种到滋养层上, 即可得到较纯的精原干细胞, 并且细胞还能保持较高的活力和增殖能力以用于后续实验。该方法在培养初期由于精原干细胞的生长速度远远落后于其他细胞类型, 很容易被其他细胞占据生长

优势, 因此, 对技术人员的熟练程度要求较高。本实验所采用的差异贴壁法是利用精原干细胞与体细胞(支持细胞和睾丸间质细胞)及各级分化的生精细胞在贴壁能力、比重等差异进行分离的。首先将新鲜消化得到的曲细精管悬液接种在明胶处理的培养皿中, 体细胞贴壁的速度远远超过精原干细胞, 大部分体细胞短时间即可贴壁, 过夜培养后, 体细胞大多完成贴壁(图1A), 而精原细胞尚未贴壁或贴壁不牢, 轻轻吹打即脱落(图1B)。将其收集并转移到鼠尾胶原处理的培养皿中。由于分化的精原细胞比未分化的精原细胞更容易粘附在鼠尾胶原上, 经过4 h的贴壁处理后, 收集未贴壁的细胞(图1C)转移到Laminin处理的培养皿中。Laminin是生精小管基底膜细胞外基质主要成分之一, 所以精原干细胞首先贴壁(图1D), 去掉未贴壁细胞, 将贴壁细胞收集即可得到大量纯化的精原干细胞。将得到的精原干细胞在含滋养层、GDNF和无血清培养系统中培养, 可形成典型的精原干细胞克隆(图2A)。并经免疫荧光染色鉴定, 该克隆可同时表达精原干细胞特异的标记基因*GFR α 1*和*CDH1*, 而滋养层细胞则不被染色(图2C和图2D)。

综上所述, 利用差异贴壁法可以高效的分离纯化大鼠精原干细胞, 操作简便, 又不需要专门的仪器设备, 省时省力。我们正在对差异贴壁法纯化的大鼠精原干细胞进行增殖能力和分化能力的分析。预期这种方法纯化的精原干细胞可在体外长期培养, 依旧保持干细胞活性, 可在日后用于转基因操作或者睾丸移植实验。

参考文献(References)

- 1 Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. Genetic selection of mouse male germline stem cells *in vitro*: offspring from single stem cells. *Biol Reprod* 2005; 72(1): 236-40.
- 2 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2004; 71(3): 722-31.
- 3 Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11303-7.
- 4 Kanatsu-Shinohara M, Muneto T, Lee J, Takenaka M, Chuma S, Nakatsuji N, *et al.* Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol Reprod* 2008; 78(2): 611-7.
- 5 Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, *et al.* Genetic and epigenetic properties of mouse male

- germline stem cells during long-term culture. *Development* 2005; 132(18): 4155-63.
- 6 Kubota H, Brinster RL. Technology insight: *in vitro* culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2(2): 99-108.
- 7 Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, *et al*. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119(7): 1001-12.
- 8 Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, *et al*. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440(7088): 1199-203.
- 9 Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, *et al*. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456(7220): 344-9.
- 10 Teegenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; 290(2): 193-200.
- 11 张晓丽, 高英茂, 赵舒武, 邢鲁军. 新生小鼠精原干细胞分离和纯化的实验研究. *山东大学学报(医学版)* 2005; 43(8): 674-7.
- 12 Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. β 1- and α 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(10): 5504-9.
- 13 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(47): 16489-94.
- 14 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(11): 6487-92.
- 15 Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hamme RE, Gargers DL. Self-renew, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(48): 17430-5.
- 16 多曙光, 吴应积, 罗奋华, 旭日干. 牛乳腺上皮细胞的分离培养及其生物学特征. *动物学研究* 2006; 27(3): 299-305.
- 17 Kubota H, Brinster RL. Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. *Methods Cell Biol* 2008; 86: 59-84.
- 18 Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Culture and genetic modification of mouse germline stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1120: 59-71.
- 19 Gasse K, Ehmcke J, Schlatt S. Efficient enrichment of undifferentiated GFR α 1+ spermatogonia from immature rat testis by magnetic activated cell sorting. *Cell Tissue Res* 2009; 337(1): 177-83.
- 20 Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. *Dev Biol* 2004; 274(1): 158-70.

Efficient Separation and Purification of Rat Spermatogonial Stem Cells

Yan Zhang, Fen-Hua Luo, Lin-Hong Liu, Sachula Wu, Bo-Yang Yu, Ying-Ji Wu*

(Key Laboratory of China Education Ministry for the Research of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract Spermatogonial stem cells (SSCs) are the foundation of spermatogenesis, and the cloning of a permanent source of differentiation into sperm, they can either self-renew to maintain the number of stem cells *in vivo*, or differentiate into various stages of spermatogonia until the mature sperm. In this paper, we used 22~25 day-old Wistar-Iamichi rats. First, we obtained testicular cell suspension by two-step enzymatic digestion, then, according to the different adherence capabilities of SSCs and somatic cells (mainly setoli cells) and other differentiated spermatogonia, we purified the rat spermatogonial stem cells. We obtained 3×10^5 stem cells from five male rats. The SSCs can form clones during *in vitro* culture, and the clonings can express specific marker genes of SSCs, such as GFR α 1 and CDH1. Therefore, this paper describes the efficient method of separation and purification of rat SSCs, this method is simple and the purified SSCs are with high viability and proliferating capacity. The method also opened up a new road for the isolation and purification of large animal and human SSCs in the near future.

Key words rat; testis; spermatogonial stem cells (SSCs); isolation and purification

Received: November 23, 2010 Accepted: January 24, 2011

This work was supported by the "Chunhui Plan" Cooperative Research Projects of China Ministry of Education (No.Z2007-1-01036) and the Natural Science Foundation of Inner Mongolia, China (No.2009ZD05)

*Corresponding author. Tel: 86-471-4992443, Fax: 86-471-4995071, E-mail: yingji_wu@yahoo.com