

哺乳动物精原干细胞技术的研究进展

周燕 吴绍华

【摘要】 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)具有高度的自我更新能力和分化潜能。其体外培养以及近年来兴起的移植、基因转染的深入研究,为探讨精子的发生机制、重建不育个体的精子发生、生产转基因动物提供了新的途径。本文对 SSCs 技术的研究进展作一综述。

【关键词】 精原干细胞; 实验研究; 移植; 转基因

Advances of the Technology of the Mammalian Spermatogonial Stem Cells ZHOU Yan, WU Shao-hua.

(Department of Histology and Embryology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, P. R. China)

Corresponding author: WU Shao-hua. E-mail: johnoowuji@yahoo.com.cn

【Abstract】 There are active self-renewal and differentiated capacities in spermatogonial stem cells. The continuous research in recent years about them such as culture in vitro, transplantation and transgenic modification technology has presented a new method to study the spermatogenesis mechanism, rebuilding spermiogenesis in infertile individual and producing transgenic animals. This review focuses on the advancement of the technology of the spermatogonial stem cells.

【Key words】 Spermatogonial stem cells; Experiment research; Transplantation; Transgene

在哺乳动物的睾丸内,精原干细胞(SSCs)是一群具有高度自我更新能力和分化潜能的细胞,它向子代传递遗传信息,是雄性成体内惟一可复制的二倍体的永生细胞^[1]。精子的发生除依赖于生精细胞与睾丸支持细胞间的密切联系,还有赖于曲精小管生精上皮基底处 SSCs 的正常自我增殖和分化。长期以来,生精上皮的复杂性、SSCs 鉴定的困难使其研究一度停滞不前。近年来发展起来的新技术,如 SSCs 移植、SSCs 转染建立转基因动物将 SSCs 的研究推上了一个新的高度,从而为体外研究精子的发生、男性不育症的治疗以及珍稀动物物种的保存开辟了新的思路。

1 SSCs 的增殖和分化

SSCs 紧贴曲细精管的基膜分布,呈圆形或卵圆形,核大,胞质除核糖体外,细胞器不发达。它可分为 A、B 两型,A 型 SSCs 根据曲细精管基膜上局部排列特征,又可分为 Asingle(As)、Apaired(Apr)及 Aaligned(Aal)3 型。目前认为^[2],As 细胞是精子发生的干细胞,它可通过有丝分裂形成两个新的干细

胞,或者定向分化形成胞质不完全分裂的 Apr 细胞, Apr 细胞由细胞间桥连接,进一步分裂形成 4 个、8 个或 16 个 Aal 细胞,Aal 细胞再分裂、分化形成 A1、A2、A3、A4 中间型细胞,最终分化为 B 型细胞,B 型细胞经过数次分裂后,体积增大,分化为初级精母细胞,再经过减数分裂,最终形成精子。

精子的形成是一个循环往复的过程,在其发育过程中有两步重要的分化过程,第一步是 As 细胞不完全分裂为以胞质间桥相连的 Apr 细胞;第二步是 Aal 细胞分化成 A1 精原细胞,这是精子形成过程中不可逆的关键点,在细胞行为方面发生了显著的变化,细胞周期开始缩短,细胞增殖的方式也发生了改变。许多病理情况,如,塞尔托利细胞中毒、辐射损伤、维生素缺乏以及睾丸温度升高等均可作用于这一环节导致 SSCs 分化的停止。

2 SSCs 的分离、纯化

各种组织中的成体干细胞数量都非常低,SSCs 也不例外,据估计每侧睾丸中每 10⁴ 个细胞中约有 2 个干细胞^[3]。并且随着动物日龄的增加,SSCs 逐渐分化成各级生精细胞,其绝对数目以及占生殖细胞的比例都会下降,给分离纯化造成更大困难。因此,通常选用日龄较小动物的睾丸组织进行分离。文献报道,一般小鼠选用出生后 7~8 天,大鼠选用 9~10 天^[3],兔选用 1 个月以内,而狗和牛则选用 3 个月左

基金项目:四川省教育厅自然科学科研重点项目(No. 川教计 2003A055)

作者单位:646000 泸州医学院组胚教研室

通讯作者:吴绍华(E-mail: johnoowuji@yahoo.com.cn)

右为宜^[4]。

SSCs 分离的基本依据是曲细精管中各种细胞组分的比重、大小、贴壁速度和表面标记的不同。目前多采用二步酶消化法,首先获取单细胞悬液,方法为先取下动物的睾丸组织,除去附睾、白膜后,将睾丸组织剪成 1mm³ 的碎块,采用两次短时间的胶原酶消化,能将未消散的睾丸间质消散并释放大部分的管周肌样细胞,最大程度的减少了间质组织以及管周肌样细胞的污染,最后采用胰蛋白酶、DNase 消化,释放支持细胞和精原细胞。双步酶消化法能有效地分离并制备出高产量和存活率高的单细胞悬液。

在获取了单细胞悬液后,对 SSCs 的进一步分离,国内外学者有不同的报道。国外学者曾用自然沉降法、密度梯度离心法、细胞离心淘洗法等对生殖细胞分离,所运用的分离介质有 Percoll、Ficoll、BSA、CsCl₂ 等,细胞纯度可达 80% 左右。国内张学明等^[5] 采用 Percoll 不连续密度梯度离心法分离小鼠的精原细胞,纯度达 68.76%,俞作仁等^[6] 以 2%~4% 牛血清白蛋白(BSA)连续梯度作为分离介质,采用重力沉降法结合细胞贴壁培养的方法分离精原细胞,纯度达 91%。

由于 SSCs 的标记不足,使其纯化和鉴定一度成为阻碍其研究的关键。20 世纪 90 年代国外研究报道了小鼠睾丸中 c-kit 受体的表达在 A1~A4 精原细胞中为高水平,在 In 型、B 型及早期的前细线期精母细胞中为低水平,在后期的精母细胞及精子中不表达。因而, c-kit 受体可作为 A1~A4 型精原细胞的标记物。这一发现为 SSCs 的分离纯化提供了新的思路。近来,国外学者 Shinohara 等^[7] 通过研究发现 α_6 和 β_1 整合素是鉴定 SSCs 的新标记,与其他的睾丸细胞群相比,SSCs 具有在流式细胞分选下低侧向散射、表达 α_6 、 β_1 整合素,低表达 c-kit 和 α_V 整合素的特性。根据这一特性,其实验小组采用低光散射、 α_6 整合素阳性、 α_V 整合素阴性多参数筛选策略分离 SSCs,获得了 152~166 倍的富集。而在最新的报道中^[8],实验发现在 SSCs 表面普遍表达一种新的抗体——CD9 分子,在大鼠和小鼠的睾丸组织中应用抗 CD9 分子抗体可得到比一般高 5~7 倍的 SSCs 富集。总之,多参数筛选策略的应用可使 SSCs 的纯化进一步提高,为将来的研究奠定基础。

3 SSCs 的冻存

SSCs 的低温冻存对 SSCs 移植技术及其应用有重要的意义。Ogawa 等^[9] 指出,小鼠和大鼠 SSCs 悬

液在低温冻存后同样可以进行精子的发生。Dobrin-ski 等^[4] 用 FBS、DMEM、DMOS 以 1:3:1 的比例缓慢加入等体积细胞悬液,混合,放入 -70℃ 冰箱至少 12 小时后,贮藏于 -196℃ 液氮中,解冻后细胞的存活率达 63%~82%。Izadyar 等^[10] 进行的针对 5~7 个月小牛睾丸 A 型精原细胞低温保存的研究显示控制性缓慢降温(1℃/min)的活细胞比率显著高于快速降温(5℃/min),而非控制性同样缓慢速度降温比控制性缓慢降温效果更好,应用含有 10% FCS, 10% DMSO 和 0.07M 的蔗糖的 MEM 培养基,以非控制性缓慢降温的方案冻存 A 型精原细胞最为有效,可获得接近 70% 的活细胞。

Frederickx 等^[11] 的研究发现,用睾丸生殖细胞技术(TGCT),比较新鲜 SSCs 悬液与冷冻的细胞悬液进行睾丸移植的效果,将前者注射入睾丸,90% 出现了精子细胞,而控制性快速降温中,冷冻液为丙三醇的精子细胞的形成率达 12.5%,而 DMSO 的形成率为 22.7%。这一结果同样显示运用冷冻的精原细胞悬液对于精子的产生是可行的,但冷冻技术仍有待进一步的完善。

4 SSCs 的体外培养

哺乳类精原细胞的体外培养早在 20 世纪 60 年代就开始了,随着对 SSCs 分离纯化技术的不断改进,以及一些激素、生长因子、维生素等对 SSCs 作用的不断深入了解,体外培养技术取得了很大进展。1998 年, Nagano 等^[12] 报道,在 SIM 小鼠成纤维细胞耐硫代鸟嘌呤和耐鸟苯苷亚系(STO)饲养层细胞上,可将小鼠的 SSCs 维持培养 3 个月,也有人使用小鼠成纤维细胞(MEF)作为饲养层细胞,经丝裂霉素或 γ 射线处理终止其分裂后制备成饲养单层,SSCs 能在饲养层上维持其二倍体状态不断增殖但不分化。研究发现 MEF 和 STO 均能分泌促进 SSCs 增生和抑制其分化的因子-白血病抑制因子(LIF)。目前对哺乳动物 SSCs 体外培养的研究指出,采用 DMEM 作为培养基,加入乳酸盐和丙酮酸盐以及非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、转铁蛋白等添加剂培养效果较为理想,一些激素,如,活性素、胰岛素、卵泡刺激素以及维生素 A、C、E 等对 SSCs 的体外存活和增殖也有重要作用。除此以外,干细胞生长因子(SCF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等对 SSCs 的体外存活都有重要作用。

Kubota 等^[13] 研究发现:通过将 Thy-1 作为表面标记对隐睾鼠的 SSCs 进行分离,得到的 SSCs 在无血清培养基的 STO 饲养层上培养其活性能维持一

周结合 SSCs 移植技术对生长因子的作用进行研究,发现 bFGF、LIF 对 SSCs 的分化起抑制作用,而 GDNF 则起到了促进作用。

近来,我实验室应用原代培养的小鼠骨髓基质细胞作为饲养层培养 SSCs,SSCs 呈现大量非分化增殖现象,活性维持达 22 天。

目前来看,虽然 SSCs 的体外培养技术已有了很大的提高,但因缺乏特异性的评价体系,故更加高效、经济的培养方法有待进一步的研究和开发。

5 SSCs 的移植

SSCs 移植技术是近年来发展起来的一项新技术,包括同源移植和异源移植。前者是将一种动物睾丸中 SSCs 移植到与它同种的另一个体中,这一技术首始于 1994 年 Brinster 等^[14]用转细菌 *LacZ* 基因的小鼠作为供体进行同种 SSCs 移植,结果发现被移植细胞中作为标记的 *LacZ* 基因可通过精子进入子代中,随后人们又成功的进行了大鼠间的同源移植。自此,SSCs 移植技术成为干细胞技术研究热点之一。

在小鼠的 SSCs 移植中,通常首先采用白消安 (busulfan) 处理小鼠,杀死大部分内源性 SSCs,或用射线照射,也可采用无内源性精子发生的动物,如, W/W^s 突变鼠作为受体,该突变体纯合子的睾丸内,曲细精管中没有生精细胞,且几乎不含精原细胞。选好受体小鼠后,选用带有一定标记,如,绿色荧光蛋白 (GFP) 或携带 *LacZ* 基因动物的生精细胞作为供体细胞,用容量为 50 ~ 100 μ L 的显微注射设备将含有 SSCs 的供体混合生精细胞注入受体的曲细精管。一般在被注的细胞悬液中加入台盼兰以方便鉴定和分析注射后供体细胞的生长情况。移植后对睾丸进行组织学检查以评价供体干细胞的增长情况。

以上的方法适合于小鼠和大鼠之间的 SSCs 移植,对牛、猴等大型哺乳动物,多采用超声波引导的睾丸网注射方法进行注射。

国内学者^[15]最新研究报道了选用 5 天 Balb/c 小鼠睾丸移植于 4 周龄小鼠皮下,分别选用 20 只雌性和 20 只雄性的 Balb/c 小鼠作为受体,每只小鼠接受 4 次移植,受体小鼠在移植后 1、2、3、5、7、9、12 和 15 周被处死。通过组织学检查评价 SSCs 的发育情况。结果发现移植在雄鼠体内的睾丸组织 70.3% 存活,而雌鼠体内仅 67.2% 存活。所有移植的精原细胞数量均有增加,有的细胞数目增加达 30 倍。移植后 15 周发现较多的圆形的精子细胞,尚未发现成熟的精子。这一结果显示了应用同源移植进行研究

精子发生的可行性。

SSCs 的异源移植是指将一种动物的 SSCs 移植到不同种动物体内。1996 年 Clonther 等^[16]将大鼠生精细胞导入免疫缺陷小鼠的曲细精管中,结果在小鼠睾丸中产生了大鼠的精子,取得了跨物种产生精子的重大突破。Dodrinski 等^[4]为了研究物种起源差异对 SSCs 移植的影响,将兔和狗的精原细胞分别移植于鼠的睾丸中,在移植后的 12 个月中观察发现,兔的精原细胞可增殖为有细胞间桥连接的链状细胞或成网状的细微结构,但却不能进行进一步的分化。狗的精原细胞移植到鼠体内也可看见呈现成对、短链状细胞或细小网状结构,但同样未见到精子发生过程中的进一步分化。而将 Hamster 大鼠的 SSCs 移植入小鼠却可在小鼠体内见到 Hamster 大鼠的精子细胞和精子。这一结果说明了在种系发生上受体与供体差异越远,移植的精原细胞与受体曲细精管内的微环境越不相容。

6 SSCs 转染法建立转基因动物

所谓的转基因动物是通过实验手段,将特定的外源基因导入动物早期胚胎细胞,使外源基因整合在细胞染色体上,再将这些转化细胞经短期培养,植入受体动物体内,新生动物即表现出新的遗传性状,这些新性状可通过被整合动物的生殖细胞遗传给子代。

20 世纪 80 年代初 Gordan 通过显微注射法建立了第一批转基因小鼠模型。1989 年, Laxitrano 等利用小鼠精子与 DNA 温浴的方法得到转基因小鼠。国内学者于 1997 年首次提出利用外源性基因在体内转染 SSCs 建立转基因动物模型具有可能性。随后这一方面的研究在国内外得以广泛开展。

目前,制备转基因动物的主要方法是将外源性 DNA 导入早期胚胎。主要方法包括显微注射法,逆转录病毒感染法,胚胎干细胞介导法和精子介导法。从原则上讲,转染 SSCs 建立转基因动物技术比转染和筛选胚胎干细胞更容易,因为可被转染的胚胎干细胞只能从很少的小鼠株型中获得,而转基因后代却可以通过 SSCs 移植手段从更多的物种获得。

近年来国内外学者利用 SSCs 转染法建立转基因动物的研究不断深入。Shinohara 等^[17]用显微注射法将逆转录病毒注入未成熟小鼠曲细精管内转染 SSCs,转染的雄性小鼠与雌性小鼠交配后产生转基因后代,其阳性率达 2.8%,并且其外源基因可稳定地表达于子代中。Oatley 等^[18]用电穿孔技术将 β -半乳糖苷酶基因转染新生小牛 SSCs,然后移植到切除

辜丸的裸鼠背上,移植后一周观察到曲细精管内的精母细胞完全转移到基膜,移植后 24 周可观察到分化中的生殖细胞,并且在辜丸组织内可见到 β -半乳糖苷酶的转基因表达。组织学分析提示在塞尔托利细胞和分化的精原细胞中表达这一基因。国内刘光泽等^[19]以 HBV(adr)型为目的基因,将全基因克隆到 PBR322 质粒中,与脂质体按一定的比例混合,转染 KM 小鼠 SSCs,结果在实验的 2 只 KM 雄性小鼠第一月繁殖的 62 只仔鼠中,巢式 PCR 检测 14 只阳性,平均总阳性率为 22.6%(14/62)。表明已获得有表达的 HBV 转基因小鼠。赵君等^[20]将 BCL-2cDNA 与小鼠乳清酸蛋白(WAP)5'上游调控序列融合后,与脂质体按一定比例混合,再加适量台盼兰制成转染液注入小鼠辜丸曲细精管中,共注射了 3 只小鼠,4 天后将公鼠与母鼠合笼,生仔鼠 20 只。Western 印迹证实,1 只母鼠的乳腺组织表达了 Bcl-2 蛋白,其 F₁代的 1 只小鼠中,7 只 PCR 阳性。说明以脂质体形式注射到小鼠曲细精管的外源基因,可以通过精子转移到成熟的卵子中,且还可遗传给后代。

国内外的研究结果表明,体内 SSCs 转染建立转基因动物是可行的,其研究为转基因动物的建立提供了一条新的途径。

7 SSCs 技术的应用前景

干细胞研究是 21 世纪生命科学领域的一大热门课题,而 SSCs 的研究成为其中的热点之一。SSCs 技术的发展使体外详尽地研究精子发生的过程和机制成为可能,为雄性不育症的治疗提供了新的方法,也为青年肿瘤患者因放疗和化疗带来的精原细胞损伤的治疗带来新的曙光,通过 SSCs 转染法建立转基因动物为濒临灭绝动物的保护开辟了新的思路;同时,这一技术的发展不仅对医学内分泌学、生殖医学的发展具有强大的推动作用,而且在物种保护和畜牧业领域也具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Schlatt S. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation. *Mol Cell Endocrine*, 2002, 187: 107 - 111.
- 2 Wrobel KH. Prespermatogenesis and spermatogoniogenesis in the bovine testis. *Anat Embryol*, 2000, 202: 209 - 222.
- 3 Desjardins C, Lleds E. Cell and molecular biology of the testis. Oxford: Oxford University Press, 1993: 266 - 295.
- 4 Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL, et al. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod*, 1999, 61: 1331 - 1339.
- 5 Zhang XM, Lai LX, Li DX, et al. Separation and purification of spermatogonia in mouse. *Acta Anatomica Sinica*, 2000, 31: 235 - 238.

- [张学明, 赖良学, 李德雪, 等. 小鼠精原细胞的分离和纯化. *解剖学报*, 2000, 31: 235 - 238.]
- 6 Yu ZR, Shun XD, Guan JK, et al. Separation and purification of spermatogonia from Chang-bai boar testis. *Acta Anatomica Sinica*, 2002, 33: 662 - 664.
- [俞作仁, 孙晓冬, 关纪奎, 等. 长白猪精原干细胞的分离和纯化. *解剖学报*, 2002, 33(6): 662 - 664.]
- 7 Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Beta1-and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 5504 - 5509.
- 8 Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. CD9 is a surface marker on mouse and male germline stem cell. *Biol Reprod*, 2004, 70: 70 - 75.
- 9 Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, et al. Xenogeneic Spermatogenesis following transplantation of Hamstergerm cells to mouse testes. *Biol Reprod*, 1999, 60: 515 - 521.
- 10 Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, den Ouden K, et al. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J Androl*, 2002, 3: 537 - 545.
- 11 Frederickx V, Michiels A, Goossens E, et al. Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen thawed mouse germ cells. *Human Reprod*, 2004, 19: 948 - 953.
- 12 Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, et al. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell*, 1998, 30: 389 - 397.
- 13 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factor affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*, 2004, 71: 722 - 731.
- 14 Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 11303 - 11307.
- 15 Ma P, Ge Y, Wang S, et al. Spermatogenesis following syngeneic testicular transplantation in Balb/c mice. *Reproduction*, 2004, 128: 163 - 170.
- 16 Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, et al. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*, 1996, 381: 418 - 421.
- 17 Shinohara MK, Toyokuni S, Shinohara T. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ line stem cells in vivo. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1202 - 1207.
- 18 Oatley JM, de Avila DM, Reeves JJ, et al. Spermatogenesis and germ cell transgene expression in xenografted bovine testicular tissue. *Biol Reprod*, 2004, 71: 494 - 501.
- 19 Liu GZ, Jia YZ, Dong MH, et al. Production of HBV (subtype adr) transgenic mice by spermatogonia-mediated gene transfer. *Shanghai Laboratory Animal Science*, 2000, 220: 5.
- [刘光泽, 贾彦征, 佟明华, 等. 应用精原干细胞转染法建立 HBV (adr)型转基因小鼠. *上海实验动物科学*, 2000, 20: 5.]
- 20 Zhao J, Liu B, Ren WZ, et al. Production of transgenic mice by in vivo spermatogonia-mediated gene transfer. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 2003, 36: 197 - 200.
- [赵君, 刘彬, 张守峰, 等. 体内精原干细胞转染法建立转基因小鼠. *实验生物学报*, 2003, 36: 197 - 200.]

(收稿日期 2005-03-02)

(本文编辑:王璐)