

牛精原干细胞的分离和纯化及体外培养的一般特性

毕聪明^{1,2}, 张仕强¹, 彭树英¹, 李吉霞¹, 张涌^{1*}

(1. 西北农林科技大学生物工程研究所, 杨凌 712100;

2. 锦州医学院畜牧兽医学院, 锦州 121000)

摘要: 采用两步酶消化法制备 5 月龄的牛生殖细胞悬液, 用 Percoll 不连续密度梯度法分离精原细胞, 接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度培养, 观察培养细胞的生长和形态变化。结果 5 月龄牛的曲细精管主要包含细胞为精原细胞、Sertoli 细胞, 每克睾丸实质收获生精上皮细胞总数平均为 3.18×10^6 个细胞, 精原细胞纯化后纯度达 69.27%, 精原细胞主要分布于 27%~35% 的 Percoll 梯度中。牛精原干细胞体外培养 6~7 d 后开始分裂, 20 d 后精原干细胞形成小集落。结果表明用两步酶消化、Percoll 不连续密度梯度法分离的精原细胞能满足体外培养的需要, 可以存活并发生增殖。

关键词: 精原干细胞; 分离; 体外培养; 牛

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)10-0977-05

Isolation and Purification of Bovine Spermatogonial Stem Cells and General Properties *in vitro*

BI Cong-ming^{1,2}, ZHANG Shi-qiang¹, PENG Shu-ying¹, LI Ji-xia¹, ZHANG Yong^{1*}

(1. Institute of Biotechnology, Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 2. Department of Veterinary Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract: The germ cell suspension was obtained by two-step enzymatic digestion from 5-month-old calves testes. Spermatogonia were isolated and purified using Percoll discontinue density gradient centrifugation. Cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum(FBS) at 37 °C, in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Growth and morphologic changes of cells were observed. Results; seminiferous tubules of 5-month-old calf testis were mainly composed of spermatogonia and Sertoli cells, 3.18×10^6 cells were available per 1.0 gram testis parenchyma. The purity of the spermatogonia was up to 69.27%. Spermatogonia mainly distributed in 27%–35% Percoll gradient. The bovine spermatogonial stem cells began to divide after 6–7days culture and clones were formed after 20 days. Conclusion: The spermatogonia obtained by two-step enzymatic digestion and Percoll discontinue density gradient centrifugation could satisfy the needs of survival and proliferation of bovine spermatogonia *in vitro*.

Key words: spermatogonial stem cells; isolation; culture *in vitro*; bovine

精原干细胞是位于睾丸生精小管的生精上皮内的一群生精干细胞, 是成体内的定向干细胞。精原

干细胞的一些独特优势使其成为动物转基因的理想宿主细胞。精原干细胞的生理生化特性及其分裂增

收稿日期: 2005-09-09

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目(2004AA213072)

作者简介: 毕聪明(1973-), 男, 黑龙江海伦人, 博士生, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。Tel: 029-87086743。毕聪明、张仕强为并列第一作者

* 通讯作者: 张涌, Tel: 029-87092176; E-mail: zhy1956@263.net

殖、分化等多项生命活动的调节机制的深入研究,精子发生机理的进一步阐明以及精原干细胞转染,异体、异种移植技术的实际应用,都迫切需要找到一种可行的方法将其分离纯化,以期得到较高产量和纯度的有活力的精原细胞用于体外培养。Bellve^[1,2]、Meistrich^[3]、张学明^[4]等分别采用自然沉降法、密度梯度离心法、细胞离心淘洗法等对不同月龄的大鼠和小鼠的睾丸组织进行生殖细胞分离。俞作仁等^[5]采用自然沉降法分离了猪的精原细胞。至今已经试验分离了多种动物和人的精原细胞。本研究主要目的是探索一种简单、高效的分离牛的精原细胞的方法,为下一步牛精原干细胞的增殖、分化、转基因及移植打下基础。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 5月龄小公牛由杨陵区养殖场提供。

1.1.2 主要试剂 IV型胶原酶(Col IV)、胰蛋白酶、EDTA、台盼蓝均为Sigma公司产品;D-Hanks(D-H,自制);PBS(自制);DMEM/F12(D/F, Gibco BRL);胎牛血清(FBS)为杭州四季清生物工程材料有限公司产品;AKP检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;青霉素及硫酸链霉素为哈尔滨制药总厂产品;Percoll(Pharmacia公司),其余药品为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 取样 阴囊清洗剃毛消毒后,无菌切开摘取两侧睾丸,其一置D/F液中1h内带回实验室,用D-H冲洗5次后切开白膜取1g睾丸实质;另一侧睾丸置PBS中,带回作组织切片进行HE染色和AKP染色。

1.2.2 细胞分离 去除睾丸组织块周围结缔组织后清洗离散曲细精管,剪碎,十倍体积0.1%胶原酶IV(D/F配制),37℃消化至曲精细管成小段,中间轻晃数次。D-H洗3次,然后用0.25%胰蛋白酶消化20min,200目纱网过滤,成单细胞悬液,用血球计数板计细胞总数,台盼蓝染色计存活细胞数,采用Percoll不连续密度梯度离心^[4]纯化精原细胞。分离细胞接种后,待细胞贴壁大约24h,弃去旧液,用PBS洗2次,加入新鲜培养液倒置显微镜下观察精原细胞(圆形的精原细胞附着在多突起的支持细胞上,呈圆形或椭圆形,散在或成对方式存在)。

1.2.3 原代培养 细胞悬液以及纯化后的细胞各以 1×10^6 /mL接种至含10%FBS的D/F培养皿,37℃、5%CO₂饱和湿度培养,隔日换液。培养24h后,在倒置显微镜下观察圆形或椭圆形精原细胞数,计算精原细胞比率及纯度。培养48h用0.25%胰蛋白酶消化贴壁细胞,完全脱落后计脱落细胞数,计算细胞贴壁率。

1.2.4 传代培养 细胞长满90%皿底时传代,传代前用培养液清洗2次,镜下观察待0.25%胰蛋白酶(D-H配制,含0.02%EDTA)消化60%贴壁细胞脱落时加入新培养液轻吹打5~8次,1:3传代。当有明显细胞集落形成后,每月传代1次,37℃、5%CO₂饱和湿度培养,隔日换液,组织培养倒置显微镜下观察。

1.2.5 精原干细胞鉴定

1.2.5.1 睾丸组织切片及AKP染色:常规方法制作睾丸石蜡切片HE染色,细胞核呈深蓝色。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,AKP)检测^[6],光镜观察,深蓝色或黑色为阳性。

1.2.5.2 培养细胞AKP组织化学染色:按照试剂盒说明书进行,细胞爬片用固定液固定5~10min,滴加新鲜配制的底物液,盖满样品部分,放置湿盒中,37℃作用15min,水洗。复染10min,水洗晾干镜检,蓝色为阳性。

2 结果

2.1 睾丸切片染色

显微观察表明,HE染色5月龄牛曲细精管包含精原细胞、支持细胞(Sertoli cell)以及管周呈梭形的肌样细胞。精原细胞核内染色质呈强嗜碱性,染成深蓝色或蓝紫色,核仁一般不可见;胞质弱嗜碱性,染成淡蓝色。睾丸体细胞的核绝大多数都呈弱嗜碱性,染成淡蓝色,胞质中多见有大小不一的空泡状结构(图A)。睾丸切片AKP染色后精原细胞呈黑色,支持细胞及肌样细胞不着色(图B)。

2.2 生精上皮的消化效果

共进行4组(A、B、C、D)两步酶消化法分离曲精细管细胞,台盼兰拒染法测定细胞存活率,倒置显微镜下观察计算原代培养24h圆形精原细胞比率,培养48h后用胰蛋白酶消化贴壁细胞至完全脱落后计数,与接种细胞总数比较计算细胞贴壁率,结果两步酶消化法平均每200mg睾丸组织可获 6.36×10^5 个细胞,每克睾丸组织可获 3.18×10^6 个细胞,

平均存活率为 89.01%, 精原细胞比率为 21.61%, 细胞贴壁率为 23.34%, 见表 1。

表 1 两步酶消化法效果

Table 1 The effects of two-step enzymatic digestion

组别 Group	细胞总数×10 ⁶ Total number of cells×10 ⁶	细胞存活率/% Livability of cells	精原细胞比率/% Percentage of spermatogonia	细胞贴壁率/% Seeding efficiency of cells
A	3.06±0.46	89.34±2.43	20.46±1.54	23.47±1.76
B	3.22±0.73	88.68±2.25	21.35±1.32	24.69±1.57
C	3.28±0.73	90.12±1.46	23.16±1.45	22.74±1.22
D	3.12±0.75	87.89±2.21	21.48±1.76	22.46±1.49
平均值	3.18	89.01	21.61	23.34

2.3 生精上皮细胞纯化及接种

经过 Percoll 密度梯度离心, 细胞在相临的梯度界面形成细胞带, 从上至下形成 4 条细胞带分别记为 1、2、3、4 带, 见表 2。1 带主要包含一些细胞碎片和死细胞, 分布在 11%~19% 的 Percoll 梯度中; 2 带中细胞较少, 接种后细胞在 6~8 h 贴壁并伸展突起, 主要为支持细胞和管周肌样细胞, 分布在

19%~27% 的 Percoll 梯度中; 3 带中细胞最多, 分布在 27%~35% Percoll 梯度中, 主要为圆形或椭圆形细胞, 培养 4 h 后将悬浮细胞重新接种, 支持细胞和精原细胞 24 h 都已贴壁, 精原细胞纯度为 69.27%, 见表 3; 4 带细胞也较少, 主要为支持细胞和一些细胞团。

表 2 不同细胞在 Percoll 梯度中的分布

Table 2 Distribution of different cells in Percoll gradients

试验次数 No. of experiment	细胞总量×10 ⁶ Total number of germ cells(×10 ⁶)	Percoll 梯度 Percoll gradients			
		1 带(×10 ⁵) Band No. 1(×10 ⁵)	2 带(×10 ⁵) Band No. 2(×10 ⁵)	3 带(×10 ⁶) Band No. 3(×10 ⁵)	4 带(×10 ⁵) Band No. 4(×10 ⁵)
1	3.15	—	2.43	1.87	2.58
2	3.30	—	1.98	2.41	2.28
3	3.20	—	2.56	1.64	2.39
4	3.35	—	2.47	1.78	1.86
平均(Average)	3.25	—	2.36	1.93	2.28

表 3 3 带中精原细胞纯度

Table 3 Purity of spermatogonia in band No. 3

试验次数 No. of experiment	细胞总数 Total number of cells	精原细胞数 Number of spermatogonia	精原细胞所占百分比/% Percentage of spermatogonia
1	418.33±18.45	304.67±7.02	72.97
2	455.67±16.29	303.33±22.50	66.65
3	450.67±57.27	302.33±12.58	68.19
平均 Average	441.56±30.67	303.44±14.04	69.27

2.4 牛精原细胞的培养特性

将生精细胞悬液接种于平皿内, 可见到两类球形细胞, 大小不等。较小的细胞胞质较暗, 在接种 1 h 后开始贴壁, 3 h 后有突起产生, 8~10 h 伸出伪足, 随培养时间延长贴壁支持细胞突起逐渐增多伸长至互相接触交织成网状(图 C), 组织培养倒置显微镜下观察细胞呈多角形或不规则形。较大的细胞

核质比高, 5 h 呈悬浮状态, 随培养时间延长开始贴壁, 18~20 h 完全贴壁, 细胞均为圆形或椭圆形, 大小较为一致, 散在分布, 包含在底层细胞形成的空腔内(图 C), 贴附单层体细胞上。10 d 后精原细胞数量开始增加。开始出现 2 个、4 个聚集在一起的小细胞团, 20 d 左右可见大量增殖的精原干细胞形成一些小集落, 逐渐增大, AKP 染色阳性(图 D)。

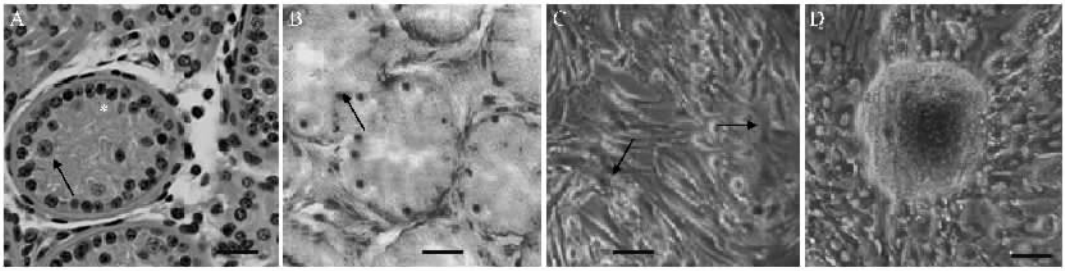


图 A 5 月龄公牛曲细精管组织切片[精原细胞(箭头)和支持细胞(星号)];图 B 曲细精管 AKP 染色精原干细胞[阳性(箭头)];图 C 精原细胞(箭头)与支持细胞(星号)共培养 24 h;图 D 培养 45 d 的精原干细胞集落(箭头)。标尺为 30 μm

Fig. A At histological sections of testes from prepubertal bull aged 5 months, only spermatogonia (arrows) and Sertoli cells (asterisks) were present. Fig. B SSCs in bull seminiferous tubule positively stained with AKP (arrows). Fig. C Spermatogonia (arrows) and Sertoli cells (asterisks) cultured 24 hours. D. Spermatogonia clone (arrows) cultured 45 days. Bar=30 μm

3 讨论

3.1 牛年龄对精原细胞分离的影响

精原干细胞的研究必需有足够数量和较高纯度的细胞,选择牛的年龄是首先应该考虑的,因为随动物日龄的增加,精原细胞开始分化形成各级生殖细胞,其绝对数目及所占生殖细胞的比例都逐渐下降,会给分离纯化增加困难。在成年牛的睾丸中 A 型精原细胞占有所有精原细胞的比例很小,因而用来分离精原细胞的动物的日龄应较小为好,一般牛选 5 月龄^[7]。5 月龄牛的生精上皮内基本只有 A 型精原细胞和支持细胞,其他各级生精细胞尚未发育形成,理论上可获得大量的精原细胞。

3.2 精原干细胞的鉴定

由于在精原干细胞和精子之间存在着许多的可区分的发育段,而且各型精原细胞间的形态结构又极为相似,因而其识别鉴定较为困难,目前精原细胞的鉴定还没有公认的细胞表面标记,其鉴定方法主要为形态结构鉴定;利用 A₁-A₄ 期精原细胞 c-kit 受体高表达,细线期精母细胞低表达而后期精母细胞和精子不表达 c-kit 受体进行鉴定^[8];Shimohara 等发现小鼠精原干细胞表达 β_1/α_6 整合素表面标记,并用其抗体鉴定了小鼠精原干细胞^[9];精原干细胞源于原始生殖细胞,碱性磷酸酶可用来鉴别原始生殖细胞及其集落,有研究发现小鼠精原细胞表达 AKP^[10]。也有人用生殖细胞核抗原 1 (GCNA1)^[11]、单克隆抗体 EE₂^[12] 识别精原细胞。本试验采取 5 月龄的牛睾丸曲细精管分离精原干细胞,其生精上皮内只含有精原细胞和支持细胞,通过

培养细胞和曲细精管细胞形态及 AKP 染色比较鉴别表明,分离到的核质比高的单个较大圆形或椭圆形透亮的贴壁上层细胞,AKP 染色阳性的即为精原干细胞。

3.3 Percoll 的分离效果

Percoll 是一种无毒且与生物膜不发生黏附的物质,常用于细胞的分离。本试验结果表明,牛精原细胞主要分布于 27%~35% Percoll 梯度间,形态及 AKP 染色特性与相同年龄的牛睾丸曲细精管中精原细胞一致,细胞接种后利用选择性贴壁进一步分离,接种后根据形态特征计数,获得精原细胞纯度达到 69.27%,可以满足进一步的培养、基因转染、移植等操作需要。

3.4 牛精原干细胞的培养特性

牛精原干细胞在体外长期存活并增殖的培养体系,目前尚无权威性的报道。李德雪等以 D-MEM+7.5%NCS+7.5%FBS+1%谷氨酰胺+1%非必需氨基酸+1%青、链霉素+1%丙酮酸钠培养小鼠精原细胞,可以使其在体外存活并发生分裂和增殖行为^[13]。本研究用 DMEM/F12 为基础培养液添加 10%FBS,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 饱和湿度下培养牛精原干细胞,可以使其存活 60 d 左右,并且可以增殖形成细胞集落。

参考文献:

- [1] Bellve A R, Millette C F, Bhatnagar Y M, et al. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells [J]. J Histochem Cytochem, 1997, 25(7): 480~494.

- [2] Bellve A R, Cavicchia J C, Millette C F, *et al.* Spermatogenic cells of the prepuberal mouse[J]. *J Cell Biol*, 1977, 74(10):68~85.
- [3] Meistrich M L, Longtin J, Brock W A, *et al.* Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells[J]. *Biol Reprod*, 1981, 25(5):1 065~1 077.
- [4] Zhang X M, Lai L X, Li D X, *et al.* Separation and purification of spermatogonia in mouse[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2000, 31(3):235~238.
- [5] 俞作仁, 孙晓东, 关纪奎, 等. 长白猪精原细胞的分离和纯化[J]. *解剖学报*, 2002, 33(6):662~664.
- [6] 林 C F A 著, 孔庆雷译. 组织病理学与组织化学技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 1982. 319.
- [7] Lzadyar G T, Spierenberg L B, Creemers K, *et al.* Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis[J]. *Reproduction*, 2002, 124:85~94.
- [8] Copeland N G, Gilbert D J, Cho B C, *et al.* Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles [J]. *Cell*, 1990, 63:175~186.
- [9] Shinohara T, Avarbock M R, Brinster R L. Beta1 and alpha 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonia stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (10): 5 504~5 509.
- [10] 李莲军, 何志云, 龚伟, 等. 小鼠生殖细胞培养时碱性磷酸酶特性[J]. *动物医学进展*, 2003, 24:75~77.
- [11] Enders G C. Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice [J]. *Dev Biol*, 1994, 163:331~340.
- [12] Koshimizu U, Nishioka H, Watanabe D, *et al.* Characterization of a novel spermatogenic cell antigen specific for early stages of germ cells in mouse testis [J]. *Mol Reprod*, 1995, 40:221~227.
- [13] 李德雪, 张学明, 李子义, 等. 小鼠精原干细胞体外培养的一般特性[J]. *中国兽医学报*, 2001, 21(2):160~162.

动物疫情速递

摩洛哥流行性出血症

2006年9月14日摩洛哥农业和农村发展部动物生产局 Hamid Benazzou 博士向 OIE 报告了流行性出血症疫情。病原为环状病毒。疫情始于 2006 年 7 月 28 日, 于 9 月 8 日首次确认。Jerada, Oujda Angad, Taza, Taourirt, Figuig 和 Khenifra 省共发生 23 起牛流行性出血症, 128 例疑似动物中确诊 30 例。诊断由位于拉巴特的 Biopharma 公司负责, 手段为 PCR 和 ELISA。感染来源不详。采取的措施: 控制节肢动物、控制野生动物、检疫、消毒、提高兽医与农户的意识和加强疾病的监测。感染动物使用了抗生素、抗炎药物及抗菌剂进行治疗。

加拿大出现蜂巢小甲虫 (*Aethina tumida*) 侵袭

2006年9月14日加拿大食品检验局首席兽医官 Brian Evans 博士向 OIE 报告了蜂巢小甲虫 (*Aethina tumida*) 疫情。疫情始于 2006 年 5 月 24 日, 于 6 月 9 日首次确认。Alberta 省和 Manitoba 省发生 2 起蜂巢小甲虫 (*Aethina tumida*) 侵扰, 但仅在约 1700 群体中的 3 群中发现蜂巢小甲虫成虫样本。诊断在加拿大国家昆虫收藏中心(加拿大农业和农业—食品部)和美国农业部农业研究服务机构蜜蜂研究实验室进行, 手段为昆虫学调查和基因测序。本次暴发未发现幼虫, 表明未出现蜂巢小甲虫的繁殖, 蜂巢小甲虫在加拿大还没有确立。因此推测本次暴发可能与进口活动有关。DNA 结果显示发现于 Alberta 的蜂巢小甲虫与为人所熟知的美国种不同。目前正在进行与其他向加拿大输出蜜蜂国家种的比较。CheckMite 被用来探知和治疗蜂巢中的蜂巢小甲虫。采取的措施: 国内限制移动、检疫和消毒。

北爱尔兰发生马传染性贫血

2006年9月1日英国环境、食品和乡村事务部动物健康福利司首席兽医官 Debby Reynolds 博士向 OIE 报告了马传染性贫血疫情。Magherafelt 发生一起马传染性贫血, 这是该地区首次报道此病。疫情开始于 2006 年 8 月 25 日, 于 2006 年 9 月 1 日证实, 在 13 例疑似动物中确认一例病例。诊断由设在 Belfast 的兽医服务处负责, 手段为琼脂免疫扩散试验。感染来源: 动物合法移动、污染(人、器械及饲料等)。采取的措施: 控制节肢动物、检疫和消毒。