

鸡胚精原干细胞体外保存能力的研究

李碧春^{1,2}, 周冠月², 陈国宏², 孙国波²,

孙鹏翔², 徐琪², 刘铁铮^{1*}

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 南京 210014;

2. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: 采用二酶 3 步法获取孵化第 19 d 的鸡胚精原干细胞(SSCs), 比较在快速冷冻条件下 3 种冷冻保护剂(DMSO、乙二醇、甘油)在 3 个浓度 5%、10%、15% 条件下对鸡胚精原干细胞的冷冻保存效果进行研究。结果显示:(1)当 DMSO 的浓度为 5%、10% 及 15% 时, 复苏后细胞存活率分别为 73.1%、88.6% 和 74.8%, 三者差异显著($P < 0.05$); 而 10% DMSO 保存精原干细胞的存活率、复苏后培养细胞生长和集落形成均显著高于其它 2 个浓度; 当乙二醇浓度为 5%、10% 和 15% 时, 复苏后细胞存活率分别为 69.4%、83.1% 和 65.2%, 三者差异显著($P < 0.05$); 复苏后无论饲养层存在与否, SSCs 均能增殖, 但未有 AKP 阳性集落生成; 当甘油浓度为 5%、10%、15% 时, 复苏后细胞存活率均小于 15%, 三者差异不显著($P > 0.05$); 复苏后细胞存活时间极短, 仅存活 12 h 左右;(2) 当在 10% DMSO 浓度条件, 复苏后 SSCs 在有饲养细胞层的条件下, 培养 5 d 形成集落, 表明 10% DMSO 是鸡胚精原干细胞适宜的冷冻保护剂。

关键词: 鸡; 精原干细胞; 冷冻保存

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)07-0657-06

Cryopreservation Capacity of Chicken Spermatogonial Stem Cells

LI Bi-chun^{1,2}, ZHOU Guan-yue², CHEN Guo-hong², SUN Guo-bo²,

SUN Peng-xiang², XU Qi², LIU Tie-zheng^{1*}

(1. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*; 2. *College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China*)

Abstract: To isolate spermatogonia using two combinatorial enzyme three step wise digest the testicular tissues from 19 d-old-embryo after hatching, the cryopreserve effect of dimethylsulphoxide (DMSO), glycerol (GLY) and ethylene glycol (EG) cryoprotectants, each at (5%, 10%, and 15%) concentration on the 19 d chicken embryonic SSCs was compared with fast freeze method. The results indicated that: (1) When SSCs frozen in 5%, 10% and 15% DMSO medium, the viability rate of after thawed SSCs were 73.1%, 88.6% and 74.8% respectively, the difference of three concentration were significant ($P < 0.05$). When SSCs frozen in 5%, 10% and 15% EG medium, the viability rate of after thawed SSCs were 69.4%, 83.1% and 65.2% respectively, and the difference of three concentration were significant ($P < 0.05$). When SSCs frozen in 5%, 10% and 15% glycerin medium, the viability rate were less than 15%, and difference of three concentration were not significant ($P > 0.05$); (2) The SSCs were cryopreserved in 10% DMSO for 1-2 weeks, then thawed and seeded on the feed cells to culturing, the chicken embryonic fibroblast cells as feed cells. The results found that the SSCs had formed the colonies which

收稿日期: 2006-07-20

基金项目: 博士后基金项目; 国家自然科学基金(30371031)

作者简介: 李碧春(1963-), 女, 陕西大荔人, 博士, 教授, 主要从事动物胚胎与遗传工程研究, E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

* 通讯作者: 刘铁铮, 研究员, 主要从事动物繁育研究, E-mail: tzliu@263.net

were positive after AKP staining. On the contrary, when the SSCs were cultured without feed cells, the colonies couldn't form. The results showed that the 10% DMSO was suitable freezing media for the 19 d SSCs from chicken embryo.

Key words: chicken; spermatogonial stem cells(SSCs); cryopreservation

精原干细胞(Spermatogonial stem cells, SSCs)的前体是原始生殖细胞,在雄性,原始生殖细胞随着胚胎的发育分化为精原干细胞^[1]。SSCs位于曲细精管生精上皮基膜上,是雄性生殖系干细胞。Brinster等^[2]研究报道将携带有Zf lac-Z基因的小鼠睾丸细胞冷冻保存4~156 d后,解冻移入白消安处理后的受体小鼠睾丸内,结果发现73%的受体小鼠睾丸内出现了生精过程,最终能形成正常的精子细胞。李莲军^[3,4]等人报道了慢速冷冻保存小鼠SSCs的方法。Oatley等^[5]研究了牛SSCs冷冻后保持生物活性的能力。Frederickx等^[6]研究了移植冷冻后SSCs的恢复、活力和功能,Fariborz等^[7]研究了牛SSCs冷冻后再移植,发现50%以上的SSCs存活并在移植后2~3个月能形成克隆,Kanatsu等^[8]将冷冻后小鼠SSCs移植入不育小鼠睾丸,结果不育小鼠产生了后代。但目前国内外有关鸡的SSCs冷冻保存的报道尚未见报道。鸡SSCs的适宜冷冻条件和冷冻保护剂均不清楚,在进行SSCs的应用研究中,同样也需要大量地冷冻保存SSCs来满足其量的积累。所以本研究拟将在快速冷冻条件下比较3种冷冻保护剂对鸡胚SSCs的保护效果以及冷冻后SSCs的存活和体外增殖能力,为实现SSCs量的积累和禽类资源保存提供试验素材以及参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

受精蛋来自中国农业科学院家禽研究所实验禽场白莱航鸡群,受精蛋在37.5℃,相对湿度为60%的条件下孵化。

1.2 主要试剂

高糖DMEM(Gibico); Ficoll-400(Pharmacia);胎牛血清(杭州四季青);鸡血清(Sigma);丝裂霉素-C(Pharmacia); Fibroblast Growth Factor-basic-bFGF(Sigma); Human Intorleukin-hIL-11(Sigma); Human Insulin-Like Growth Factor-hIGF(Sigma); Human Stem Cell Factor-hSCF(Sigma); Mouse Leukemia Inhibitory Factor-mLIF(Sigma)。

1.3 方法

1.3.1 饲养层细胞的制备 选择生长良好、传至第2代的成纤维细胞,用含有10 μg/mL丝裂霉素-C的培养液,在37℃条件下作用2 h,弃去培养液,用PBS洗7次。加入0.2 mL 0.25%的胰蛋白酶进行消化,一般以细胞突起缩回、细胞间隙增大为标志终止。用含有血清的培养液终止消化,并反复轻轻敲打培养瓶底部,使成纤维细胞分散为单个细胞,1 000 r/min离心5 min去上清收集细胞。用培养液重新悬浮细胞并计算细胞活力和密度,以 5×10^5 /mL接种到用明胶包被的6孔培养板中,于37℃、5% CO₂浓度、饱和湿度条件下培养,一般情况下24 h成纤维细胞即可铺满,此时即可接种SSCs进行培养。

1.3.2 鸡精原干细胞的分离提取 取孵化19 d鸡胚,无菌收集两侧睾丸,置于盛有事先预热的无Ca²⁺、Mg²⁺的PBS培养皿中,在解剖显微镜下用尖头镊子去除睾丸的附睾,脂肪垫及其白膜等附属组织后,将睾丸组织分成1 mm³左右的小块,在PBS中轻轻敲打3 min,静置5 min后去上清液。沉淀加入10倍体积的1 mg/mL胶原酶I在37℃条件下作用10~15 min,静置2 min后弃上清液,沉淀用胰蛋白酶工作液2 mL在同样条件下作用3~5 min,移上清液于10 mL试管中并加小牛血清0.3~0.5 mL(或与消化液相同体积,含有10%小牛血清的DMEM培养液)终止消化。剩余的组织块再加适量胰蛋白酶重复消化一次,倒置显微镜下见有单细胞和细胞团出现即可用小牛血清终止消化,悬液用350目过滤筛过滤,滤液移入10 mL离心管中,1 000 r/min离心8 min后吸去上清液。

1.3.3 精原干细胞冷冻保护液的组成类型 主要比较了DMSO、乙二醇、甘油3种细胞冷冻保护剂的不同浓度对精原干细胞存活率的影响。

冷冻保护液 I : 5% DMSO + 10% 小牛血清 + 85% DMEM;

冷冻保护液 II : 10% DMSO + 10% 小牛血清 + 80% DMEM;

冷冻保护液 III : 15% DMSO + 10% 小牛血清 + 75% DMEM;

冷冻保护液Ⅳ:5%甘油+10%小牛血清+85%DMEM;

冷冻保护液Ⅴ:10%甘油+10%小牛血清+80%DMEM;

冷冻保护液Ⅵ:15%甘油+10%小牛血清+75%DMEM;

冷冻保护液Ⅶ:5%乙二醇+10%小牛血清+85%DMEM;

冷冻保护液Ⅷ:10%乙二醇+10%小牛血清+80%DMEM;

冷冻保护液Ⅸ:15%乙二醇+10%小牛血清+75%DMEM;

对照:10%小牛血清+90%DMEM基础培养液。

1.3.4 精原干细胞冷冻过程 分离后的 SSCs,用冷冻保护液将其制成细胞悬液,调整细胞密度为 $(1\sim5)\times 10^7/\text{mL}$,台盼蓝染色检测 SSCs 活力。移入冷冻管中(塑料管,规格为 2 mL,管壁厚 0.4 mm)。快速冷冻:含 SSCs 的冷冻保护液于 4~6℃下平衡 45~60 min,然后脱脂棉包裹冷冻管,悬挂液氮罐口过夜,之后去除棉花,投入液氮中冷冻保存。

1.3.5 精原干细胞复苏过程 液氮中冻存 1 周后,取出冷冻管,立即投入 37℃水浴中,并迅速在水浴中晃动,约 2/3 融解时即可从水浴中取出,并继续晃动使其完全融解,解冻过程要在 1~2 min 内完成。细胞液移入离心管中,逐滴缓慢加入 9~10 倍于细胞液体积的已预热的培养液,并不断摇晃使其混合均匀,用 DMEM 洗涤细胞沉淀 1 次,1 000 r/min 离心 5 min,去上清,收集细胞,用 DMEM 悬浮细胞沉淀,检测细胞存活率,并调整细胞密度为 $1\times 10^6/\text{mL}$,接种到饲养层中培养。复苏后存活率的检测:采用 0.5%的台盼兰染色液,将 1 份细胞悬液与 2 份台盼兰染色液混匀,2 min 后于倒置显微镜下观察计数。透亮而不着色的为活细胞,染成蓝色的为死细胞。

1.3.6 精原干细胞的培养体系和复苏后原代培养

培养体系:DMEM 培养基,添加 10%的胎牛血清、2%的鸡血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、 5.5×10^{-5} mol/L β -巯基乙醇、5 ng/mL hSCF、10 IU/mL mLIF、10 ng/mL bFGF、0.04 ng/mL hIL-11、10 ng/mL IGF 和 100 U/mL 硫酸庆大霉素。以鸡胚胎成纤维细胞作饲养层。复苏后的精原干细胞接种到饲养层上,在上述培养体系中培养观察。温度 37.5℃,饱和湿度,5%

的 CO₂ 浓度。

1.3.7 精原干细胞的鉴定方法

1.3.7.1 吉姆萨染色鉴定:采用常规吉姆萨染色方法。

1.3.7.2 油红 O 染色鉴定支持细胞(逆向法鉴定精原干细胞):细胞用 70%酒精固定 15 min,滴片自然晾干,油红 O 染液作用 15 min,水洗,滴片晾干,镜检,支持细胞整体着色,而精原干细胞仅仅细胞核被染成蓝色,细胞质不着色。

1.3.7.3 间质细胞特异性染色逆向鉴定精原干细胞:吸取 10 μL 细胞悬液,制成涂片,室温晾干,将涂片用底物作用液封满,22℃作用 90 min,用去离子水洗去作用液,晾干,镜检,间质细胞含有暗蓝色沉淀颗粒,而精原干细胞不被染色。

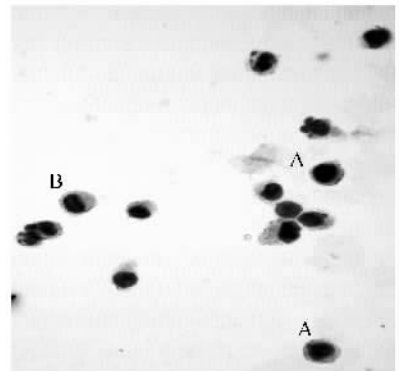
1.3.7.4 AKP 染色鉴定:将培养 6 d 已有集落的形成的 SSCs 用 PBS 清洗 3 遍,2.5%戊二醛固定 30 min,染色液作用 20 min,双蒸水洗 3 遍,显微镜下观察,红棕色为精原干细胞集落。

1.3.8 数据处理 所得数据采用 Spss11.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 精原干细胞的形态特征

精原干细胞呈圆形或椭圆形,体积较支持细胞及其它体细胞大,细胞核较大且圆,处于细胞中央或近中央位置。在光学倒置显微镜下,根据其形态大小可与其它细胞区分开来(图 1)。油红 O 染色,因为支持细胞中含较多的脂滴,所以支持细胞呈红色,其它细胞着色较浅或不着色(图 2)。间质细胞特异

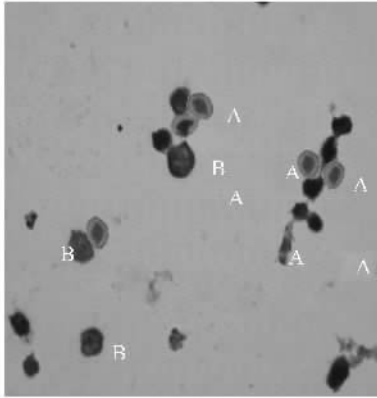


A. 精原干细胞;B. 其它细胞
A. Spermatogonia;B. Other cell

图 1 吉姆萨染色

Fig. 1 Giemsa stain

性染色,观察到含有暗蓝色沉淀颗粒的细胞为间质细胞。



A. 精原干细胞;B. 支持细胞
A. Spermatogonia;B. Sertoli cell

图2 油红O染色;
Fig. 2 Oil red stain

2.2 精原干细胞冷冻保存效果

3种冷冻保护液3种浓度对精原干细胞的冷冻保护效果见表1。

表1 不同的冷冻保护液条件下精原干细胞的存活率 (n=8)

冷冻剂 Freezing media	不同浓度保护剂的存活率 Vitality in different freezing media concentration		
	5%	10%	15%
	DMSO	73.1±1.3 ^b	88.6±2.1 ^c
Gly	11.3 ^a	11.6 ^a	11.5 ^a
EG	69.4±1.9 ^c	83.1±3.0 ^d	65.2±2.4 ^b

同列肩注中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

In the same columns, differences among numbers containing the different letters in the superscripts are significant ($P < 0.05$)

由表1可知:当DMSO的浓度为5%、10%、15%时,细胞的复苏率分别为73.1%、88.6%、74.8%,三者差异显著 ($P < 0.05$);当甘油浓度为5%、10%、15%时细胞的复苏率均小于15%,三者差异不显著 ($P > 0.05$);当EG浓度为5%、10%、15%时,细胞的复苏率分别为69.4%、83.1%、65.2%,三者差异显著 ($P < 0.05$);当3种冷冻保护剂在浓度(10%)相同的条件下,DMSO作为冷冻保护剂的细胞复苏率最高,EG次之,甘油最低,三者

差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 精原干细胞复苏后原代培养

精原干细胞复苏后接种在无饲养细胞层和有饲养细胞层不同条件下进行原代培养,观察结果如下:

10% DMSO作为冷冻保护剂,复苏后细胞接种在无饲养细胞层的条件下,SSCs贴壁较冷冻前延迟了4~5 h,培养12 h后观察发现,游离在培养液中的细胞较多,培养17 h后观察发现贴壁的细胞增多,培养24 h换液,取培养液中的细胞用台盼兰染色,发现90%以上为死细胞。培养36 h,出现少数2个一串的精原细胞,说明SSCs开始生长分裂,培养48 h,2个一串的精原细胞增多,还有极少数4个一串的精原细胞,培养72 h,贴壁的的细胞达到最多,以2个一串的精原细胞和单个的精原干细胞为主,但是同时,悬浮在培养液中的精原细胞也增多,贴壁的精原细胞逐渐减少,在培养10 d后,体系中的细胞大多数已随着换液丢失,在此过程中,一直未观察到有集落形成。

10% DMSO为冷冻保护剂,复苏后细胞在有饲养细胞层的条件下,SSCs贴壁时间较冷冻前未出现较大变化。培养6~7 h,大多数未被纯化除掉的体细胞已贴附于饲养层上,精原干细胞开始贴壁;培养24 h,精原干细胞均已贴附。倒置显微镜下观察,大多数体细胞已经铺展呈梭形和三角形等不规则形状,而精原干细胞仍保持圆形镶嵌在体细胞层上;培养48 h,体细胞已全部铺展为面积较大的不规则形,精原干细胞仍贴于饲养层细胞上,大多为单个细胞,出现少数两个一串的精原细胞;培养72 h,精原干细胞生长分裂,已出现2个或4个一串的精原细胞;培养96 h,多个连成一串的精原细胞增加(图3);培养5 d,精原细胞形成集落(图4),AKP染色呈阳性(图5);培养6 d,细胞集落开始增多,但同时培养液中游离的细胞也开始增加;培养8 d以后随着饲养层细胞的凋亡,精原干细胞脱离瓶壁的程度也开始加剧,在不传代的情况下,培养15 d,仍可见瓶壁上有少量SSCs集落存在,但已开始分化(图6)。

3 讨论

本研究首次在鸡胚精原干细胞上开展冷冻保存工作,在慢速冷冻程序上对常规的细胞冷冻程序加以改进,增添了细胞预冷和棉花包裹冷冻管两个步骤。细胞预冷可降低冷冻保护剂加入时产生的热量

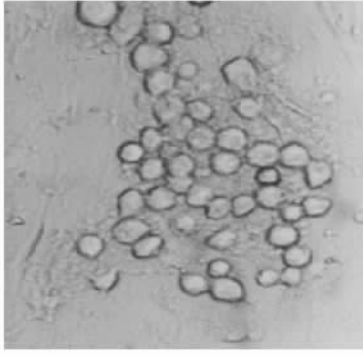


图3 复苏后培养 4 d SSCs 细胞, $\times 400$
Fig.3 The SSCs culture 4 d *in vitro* after thaw, $\times 400$

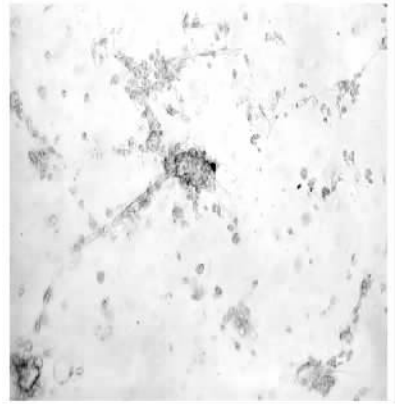


图6 复苏后培养 15 d SSCs 集落, $\times 200$
Fig.6 The colony of SSCs culture 15 d *in vitro* after thaw, $\times 200$

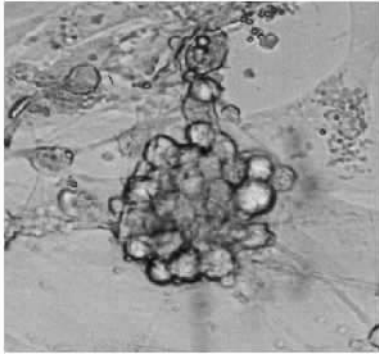


图4 复苏后培养 5 d SSCs 集落, $\times 400$
Fig.4 The colony of SSCs culture 5 d *in vitro* after thaw, $\times 400$

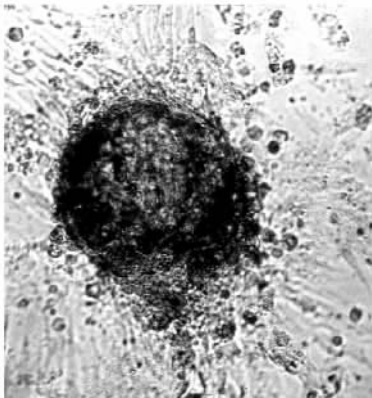


图5 复苏后培养 5 d SSCs AKP 染色图片, $\times 400$
Fig.5 The AKP stained of SSCs culture 5 d *in vitro* after thaw, $\times 400$

冷休克及“过冷现象”对细胞的影响,提高细胞的复苏率。

3.1 冷冻保护剂的作用

为了探寻在简单的冷冻保护剂保护下,鸡胚 SSCs 的适宜冷冻条件以及冷冻后保持较高存活率的能力,本研究采用单独使用冷冻保护剂的方式,结果表明:甘油单独作为冷冻保护剂不适用于鸡胚精原干细胞的冷冻保存,3 种浓度情况下细胞的复苏率均小于 15%,这可能是鸡胚精原干细胞对甘油具有比较敏感的毒性,或者是甘油的分子大,在固定的时间内不能及时地渗透进细胞内,造成细胞内外渗透压的不平衡。而在单独使用 DMSO 和 EG 作为冷冻保护剂时,10% 的浓度对鸡胚精原干细胞冷冻均具有较好的冷冻保护效果,15% 的效果次之,5% 最差,说明 10% 浓度下这两种冷冻保护剂效果较好,过高或过低的浓度均不适合 SSCs 的冷冻保存。这一结果与李莲军冷冻小鼠的 SSCs^[4] 等所得结果相一致。使用相同的冷冻保护剂时,细胞的复苏率与李莲军^[4] 等所得的复苏率相比略低,可能是由于冷冻程序不同(本研究冷冻程序为 4℃ 平衡 45~60 min,棉花包裹,液氮口过夜,去除棉花,投入液氮,而李莲军等则是 -70℃ 冰箱过夜后投入液氮)而导致复苏率略有差异。李莲军等在分离 SSCs 时,用胶原酶及胰酶各消化一次,而本研究中采用胶原酶消化一次,胰酶消化两次的方法,在消化过程中,酶可能对细胞造成了一定的影响,导致复苏率略有差异。

3.2 精原干细胞冷冻后生长增值

本研究中 10% DMSO 与 10% EG 作为冷冻保

对细胞的损伤,棉花隔热性能使得细胞在液氮面上有个缓慢的降温过程,从而减少了温度骤降引起的

护剂,细胞复苏率均在 80%以上,但以 10%EG 作为冷冻保护剂,复苏后的 SSCs 在培养过程中未有集落生成。而以 10%DMSO 作为冷冻保护剂,复苏后的 SSCs,在无饲养层的情况下培养 10 d 后随着换液丢失了,在此期间未见有集落形成。接种在鸡胚成纤维细胞饲养层上的 SSCs,培养 5 d 时出现了集落,在不传代的情况下,15 d 仍然存活。可见 SSCs 的生长是饲养层依赖型细胞。饲养层细胞一方面可促进 SSCs 的附着,另一方面可分泌抑制 SSCs 分化的因子。Stroiek 等^[9]和 Matsui 等^[10]研究认为,同源胚胎的成纤维细胞所模拟的体外培养体系与 PGCs 的体内生长环境最为接近。同源胚胎成纤维细胞分泌的生长和分化抑制因子为 SSCs 的增殖和未分化状态提供了所需的环境。本研究中,复苏后 SSCs 接种到同源胚胎成纤维饲养层上,培养 5~6 d 后可见有明显的集落出现,但是李莲军以 BRL 作为饲养层,在未添加细胞因子的培养液中培养,未能形成 SSCs 集落。而可能与物种以及饲养层和培养体系不同有关。

参考文献:

- [1] 李碧春,周冠月,孙思宇,等. 鸡早期胚胎精原干细胞和睾丸发生发育关系的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005,36(7):680~685.
- [2] Brinster R L, Nagano M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture[J]. *Semin Cell & Developmental Biology*, 1998, 9(4):401~409.
- [3] 李莲军,陆峻波,施江滨,等. 温度对冻存小鼠精原干细胞的复苏效果[J]. 云南农业大学学报, 2001, 16(2):105~106.
- [4] 李莲军,李德雪,张学明,等. 7 日龄小鼠生精上皮单细胞冷冻保存[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(1):94~95.
- [5] Oatley J M, Reeves J J, McLean D J. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during *in vitro* culture[J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(3): 942~947.
- [6] Frederickx V, Michiels A, Goossens E, *et al.* Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(4): 948~953.
- [7] Izadyar F, Matthijs-Rijnsenbilt J J, Den Ouden K, *et al.* Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia[J]. *Journal of Andrology*, 2002, 23(4):537~545.
- [8] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, *et al.* Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreservation male germline stem cells [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(12):2 660~2 667.
- [9] Stroiek R M, Reed M A, Hoover J L. A method for culturing morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts [J]. *Teriogenology*, 1990, 33:901~913.
- [10] Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, *et al.* Effect of steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture [J]. *Nature*, 1991, 353:732~752.