

## 七日龄小鼠生精小管及睾丸的冷冻保存\*

李莲军, 李卫真, 尹革芬, 龚伟, 何志云  
(云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201)

**摘要:** 在 DMEM 培养液中添加 10% 小牛血清(NBS)及 10% 二甲基亚砷(DMSO)作为冻存液, 慢速降温冷冻, 液氮保存 7 日龄小鼠生精小管及完整睾丸, 37 °C 水浴复苏, 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞, 台盼蓝染色测定细胞复苏率。结果: 生精小管及完整睾丸冷冻复苏后细胞复苏率分别为 87.3% 及 85.0%, 两复苏率之间无显著差异, 与生精小管单细胞对照组相比也无显著差异。冷冻损失率分别为 10.1% 及 12.4%。结果表明, 对于 7 日龄小鼠生精小管及完整睾丸, 以 10% DMSO 为抗冻剂, 慢速降温冷冻, 液氮保存, 37 °C 水浴复苏是一种适宜的冷冻保存方法。

**关键词:** 冷冻保存; 生精小管; 睾丸; 小鼠

中图分类号: S 852.16 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2005)02-0262-03

## Cryopreservation of Seminiferous Tubules and Whole Testes of Seven-day-old Mice

LI Lian-jun, LI Wei-zhen, YIN Ge-fen, GONG Wei, HE Zhi-yun

(College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** Seminiferous tubules and whole testes of 7-day-old mice were slowly frozen in cryopreservative solution composing of 10% dimethylsulphoxide, 10% newborn bull serum and 80% DMEM medium, stored in liquid nitrogen, thawed in a 37 °C water bath, and the recoveries were measured by trypan blue exclusion staining after testicular cells dissociated by 0.25% trypsin. The recoveries of seminiferous tubules and whole testes of 7-day-old mice were 87.3% and 85.0%, respectively. There was no significant difference between the two recoveries, and also showed no significant differences compared with single cell control. The cell loss rates after freezing/thawing were 10.1% and 12.4%, respectively. The results demonstrate that a two-step slowly freezing procedure is a suitable procedure for cryopreservation of 7-day-old mouse seminiferous tubules and whole testes in 10% DMSO freezing solution.

**Key words:** cryopreservation; seminiferous tubule; testis; mouse

家畜精子及胚胎的冷冻保存技术已为畜牧业带来了巨大的经济效益。生殖细胞是动物物种生存、进化和变异的基础, 随着生殖细胞的体外培养、异体移植及遗传操作技术, 以及体外胚胎生产技术等各项技术的进一步发展, 各类生殖细胞的冷冻保存对于动物物种资源的长期保存及开发利用具有重要意义。目前, 除精液冷冻保存研究及应用较为

深入和广泛外, 其余各分化阶段的生殖细胞以及生殖组织、器官的冷冻保存研究报道较少, 资料缺乏。除少数几种动物睾丸单细胞冷冻保存有报道<sup>[1-3]</sup>外, 哺乳动物生精小管及睾丸组织块的冷冻保存在国内外报道极少。本研究在 DMEM/10% NBS 中添加 10% DMSO, 对 7 日龄小鼠生精小管及完整睾丸进行冷冻保存、测定细胞复苏率, 探讨 7 日龄小鼠

收稿日期: 2004-11-25

\* 基金项目: 云南省自然科学基金(2003C0046M)

作者简介: 李莲军(1963-), 女, 湖南永州市人, 博士, 副教授, 从事细胞生物学、动物组织及胚胎学教学与科研。

生精小管及完整睾丸的冷冻保存方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

6~7日龄雄性昆白系仔鼠。

### 1.2 主要试剂

小牛血清(NBS, Gibco), DMEM(Gibco), 胰蛋白酶(Sigma), 二甲基亚砷(DMSO, 天津市化学试剂一厂, 分析纯)。

### 1.3 冻存液配制

在DMEM培养液中添加10% DMSO, 10% NBS及50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  双抗, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.4 生精小管冷冻、复苏及复苏率测定

7日龄雄性仔鼠被处死后, 迅速从其体内无菌取出睾丸, 置预先加有适量PBS (pH 7.4) 的培养皿中, 去白膜后PBS吹打, 清洗3次以去除间质组织; 800 r/min离心3 min收集生精小管; 加入15倍体积冻存液后, 移入1.5 mL冷冻管, 置-70 $^{\circ}\text{C}$  冰箱内过夜, 次日将冷冻管移入液氮, 保存1周至半年。复苏时, 从液氮中取出冷冻管, 空气中停留片刻, 投入37  $^{\circ}\text{C}$  水浴至溶解; 用PBS离心(800 r/min, 3 min) 洗涤生精小管2次; 10倍体积0.25%胰蛋白酶34  $^{\circ}\text{C}$  消化10~15 min, 其间吹打数次; DMEM/10% NBS终止消化, 800 r/min, 3 min离心洗涤细胞2次; 1%台盼蓝染色5 min, 用血细胞计数板在倒置显微

镜下随机取数个视野, 统计死、活细胞数(细胞圆而透明, 台盼蓝拒染者为活细胞, 台盼蓝染色者为死细胞, 每个样统计细胞总数不低于1000个), 计算细胞复苏率。以生精小管单细胞的复苏率为对照(冷冻保存方法见参考文献[4])。

### 1.5 完整睾丸冷冻、复苏及复苏率测定

7日龄雄性仔鼠被处死后, 迅速从其体内无菌取出睾丸, 放入预先加有适量PBS的培养皿中; 将睾丸清洗后移入1.5 mL冷冻管中, 加入15倍体积的冻存液; 将冷冻管置-70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内过夜, 次日移入液氮, 保存1周至半年。复苏时, 从液氮中取出冷冻管投入37  $^{\circ}\text{C}$  水浴至溶解, 用适量PBS洗涤睾丸3次后, 撕去白膜, PBS吹打, 800 r/min, 3 min离心洗涤2次; 随后的消化、染色、计数及计算方法同前。

## 2 结果与分析

新鲜分离的生精小管单细胞的活细胞率为(97.4 $\pm$ 0.6)%。7日龄小鼠生精小管及完整睾丸冷冻保存后的细胞复苏率分别为(87.3 $\pm$ 2.6)%和(85.0 $\pm$ 3.4)%, 两复苏率之间差异不显著( $P > 0.05$ ); 与对照组单细胞复苏率相比, 均差异不显著( $P > 0.05$ ); 7日龄小鼠生精小管及完整睾丸冷冻保存过程中的细胞损失率分别为10.1%和12.4%。

表1 七日龄小鼠生精小管及睾丸冻存后的细胞复苏率

Tab. 1 The cell recoveries of seminiferous tubules and whole testes of 7-day-old mice after cryopreservation

分组	细胞复苏率/%					均值 $\pm$ S
	1	2	3	4	5	
单细胞对照组	88.5	90.7	84.9	86.9	90.1	88.2 $\pm$ 2.4
仔鼠生精小管	82.2	89.7	88.3	83.6	84.9	87.3 $\pm$ 2.6
仔鼠睾丸	85.8	80.6	83.5	86.4	84.6	85.0 $\pm$ 3.4

7日龄小鼠生精小管及完整睾丸冻存后细胞复苏率可达85.0%以上, 此结果显示在慢速冷冻时, DMSO有足够的时间和速度渗入到生精小管的各部, 从而起到保护作用; 对于7日龄小鼠完整睾丸, 由于其体积小(约0.2 cm $\times$ 0.2 cm $\times$ 0.25 cm), 尽管有结缔组织白膜包裹, 但对DMSO的渗透并无较大妨碍, DMSO也能及时渗入到内部而起到保护作用。在复苏时, 因睾丸体积小, 其内部能够及时

复温, 使细胞尽快度过有害温度区以减少细胞死亡。本研究表明, 采用含10% DMSO冻存液, 两步慢速冷冻, 液氮保存, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴复苏是保存7日龄小鼠生精小管和完整睾丸的一种适宜的冷冻保存方法。

## 3 讨论

目前, 生物体成功的低温保存多采用所谓的慢

速冷冻,具体步骤是:先将细胞放入含有抗冻剂的溶液中进行预处理,接着用程序降温仪将上述细胞连同溶液以较慢的速度降温,降到一定的低温时,再快速降温至液氮温度,并长期保存在此温度下。慢速冷冻保存法的研究手段有两种:理论分析法和实验研究法。前者虽未从根本上解决问题,但却给降温程序的制定和实验结果的分析提供有用的指导。实验研究法,针对不同细胞使用不同抗冻剂,采用不同降温、复温程序进行实验,然后根据复温后细胞的存活率来判断这种低温保存程序是否有效<sup>[5]</sup>。根据冷冻效果研究,从 7 日龄小鼠睾丸分离得到的单细胞,在慢速冷冻时,10% DMSO 为效果较佳的抗冻剂浓度,细胞复苏率可达 89.4%<sup>[4]</sup>,据此采用 10% DMSO 冻存液,对 7 日龄小鼠生精小管及完整睾丸进行冷冻保存,测定细胞复苏率。

7~8 日龄小鼠生精小管索的生精上皮中仅含精原细胞(27%)和支持细胞(Sertoli cell,73%),此时的精原细胞比例最高,此后随日龄增长,尽管精原细胞的绝对数量增加,但比例下降<sup>[6,7]</sup>。精原细胞在体内适宜的条件下能进一步发育形成精子细胞,进而成熟为精子。在体外培养条件下,精原细胞同样要求有支持细胞与之形成特定的功能性结构,才能继续发育形成精子细胞<sup>[8]</sup>。生精小管的冷冻保存可以保证精原细胞处于其原有的功能性结构状态,因此,与单细胞冷冻保存相比,生精小管和睾丸的冷冻保存显得更具有其独特的价值。

各种哺乳动物在胎儿及幼龄时期生精小管的结构都经历相似的发育过程,其中的精原细胞在形态和结构方面也非常相似<sup>[2]</sup>,因此,7 日龄仔鼠生

精小管的冷冻保存方法也可以推广应用于其它处于相应发育阶段和具有相似结构特征的哺乳动物的生精小管。本研究结果一方面为哺乳动物精原细胞的保存提供了一种新的冷冻保存方法,另一方面也为其它幼龄哺乳动物生精小管的冷冻保存提供了可行的方法依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] AVARBOCK M R, BRINSTER C J, BRINSTER R L. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells[J]. *Nat Med.*, 1996, 2(6): 693 - 696.
- [2] NAGANO M, AVARBOCK MR, LEONIDA EB, et al.. Culture of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Tissue Cell*, 1998, 30(4): 389 - 397.
- [3] MEACHEM S, VON SCHONFELDT V, SCHLATT S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective [J]. *Reproduction*, 2001, 121(6): 825 - 834.
- [4] 李莲军,李德雪,张学明,等. 七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] 华泽钊,任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京:科学出版社,1994.
- [6] BELLVE A R, CAVICCHIA J C, MILLETTE C F, et al.. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization [J]. *J Cell Biol.*, 1977, 74(1): 68 - 85.
- [7] VERGOUWEN R P, HUISKAMP R, BAS R J, et al.. Postnatal development of testicular cell populations in mice [J]. *J Reprod Fertil.*, 1993, 99(2): 479 - 485.
- [8] STAUB C. A Century of Research on Mammalian Male Germ Cell Meiotic Differentiation In Vitro [J]. *Journal of Andrology*, 2001, 22(6): 911 - 926.