

## 利用精原干细胞建立转基因动物的研究进展

张鑫<sup>1,2</sup>, 苗向阳<sup>1</sup>, 尹逊河<sup>2</sup>, 马艳芳<sup>2</sup>, 曲朝杰<sup>1,2</sup>, 张秋婷<sup>1,3</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018;  
3. 东北林业大学生命科学院, 哈尔滨 150040)

**摘要:**精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是雄性哺乳动物体内的一种成体干细胞,在睾丸微环境中既具有自我更新潜能,又具有定向分化潜能,是自然状态下出生后,动物体内在整个生命期间进行自我更新并能将基因传递至子代的唯一成体干细胞。精原干细胞在建立转基因动物中具有重要的应用价值,现已成为转基因研究领域的热点之一。介绍了精原干细胞的来源、形成、类型及分化,同时对其在转基因动物研究中的应用做一综述。

**关键词:**精原干细胞;转基因;动物

中图分类号:S814.8 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2009)01-0040-05

## Research Progress in the Production of Transgenic Animals Using Spermatogonial Stem Cells

ZHANG Xin<sup>1,2</sup>, MIAO Xiang-yang<sup>1</sup>, YIN Xun-he<sup>2</sup>, MA Yan-fang<sup>2</sup>,  
QU Zhao-jie<sup>1,2</sup>, ZHANG Qiu-ting<sup>1,3</sup>

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193;  
2. Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Shandong Tai'an 271018;  
3. College of Life Science, Northeast University of Forestry, Harbin 150040, China)

**Abstract:**Spermatogonial stem cells (SSCs) are kinds of adult stem cells in male mammalia. They are not only the ones capable of self-renewing and differentiating in testis niche, but also the only ones in normal postnatal body that undergo self-renewal throughout life and transmit gene to offspring. SSCs have significant value in producing transgenic animals. The origin, formation, type and differentiation of SSCs were reviewed. The application of SSCs in transgenic animals was also summarized.

**Key words:**spermatogonial stem cells; transgene; animal

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是哺乳动物的睾丸内一群像胚胎干细胞(embryonic stem cells)一样具有高度自我更新能力和分化潜能的细胞,它能向子代传递遗传信息,是雄性成体内唯一可复制的二倍体永生细胞<sup>[1]</sup>。近年来,随着对精原干细胞研究的不断深入,人们发现其具有特殊的生物学性质,在建立转基因动物方面具有巨大的应用潜力和优势。自1994年Brinster等<sup>[2]</sup>率先通过精原干细胞方法进行转基因动物的研究以来,利用精原干细胞进行外源基因的

转导已成为目前转基因动物研究领域的热点之一。

### 1 精原干细胞的来源及形成

精原干细胞属于成体干细胞,起源于动物的原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)。在胚胎发育后期,雌性动物中PGCs经减数分裂成为卵母细胞并随之失去干细胞潜能;而雄性中的PGCs则进入胎儿睾丸的曲细精管,被支持细胞包

收稿日期:2008-10-13;修回日期:2008-11-17

基金项目:国家自然科学基金项目(30571339);国家863计划项目(2008AA10Z140);中国农业科学院创新基金项目(2004-院-1);中国农业科学院优秀科技创新团队项目(ywf-td-1)资助。

作者简介:张鑫,硕士研究生,从事动物解剖学及转基因动物研究。Tel: 010-62895663; E-mail: sanjin1983@yahoo.com.cn。通讯作者:苗向阳,副研究员,从事基因工程与功能基因组学及转基因动物研究。Tel: 010-62895663; E-mail: mxy32@sohu.com

绕后变为生精母细胞 (gonocyte), 后者分裂几天后停滞于  $G_0/G_1$  期, 直到出生后数日 (小鼠为 3 d 左右)。之后 (小鼠在第 6 d 左右), 一部分具有伪足的生精母细胞获得迁移功能, 向基底膜移动, 最终定居在曲细精管基膜内, 埋嵌在支持细胞之间, 分化为精原干细胞; 另一部分无伪足的生精母细胞则发生凋亡<sup>[3]</sup>。在动物的性成熟过程中, 精原干细胞的数量呈渐进性增长。如小鼠从新生到 5~12 d 幼崽, 精原干细胞数量增加了 6.4 倍, 到成年时共增加了 39 倍<sup>[4]</sup>。然而, 虽然精原干细胞在数量上有所增加, 但其同时又分化为大量不同发育阶段的生精细胞, 并最终演变成精子, 致使精原干细胞所占生精上皮细胞中的比例也随之下落。成年动物的生精小管中, 大部分生殖细胞为有丝分裂的精原细胞、正在进行减数分裂的精母细胞和高度特化时期的精子细胞。在新生小鼠睾丸中精原干细胞的比例可达到 1.41% 左右, 而在成年小鼠睾丸中仅占 0.03%<sup>[3]</sup>。

## 2 精原干细胞的类型及分化

精原干细胞是形成精子的前体细胞, 也是在自然状态下成体内唯一能将遗传信息传递给后代的干细胞。精原干细胞可分为 A、B 两型, A 型精原干细胞根据曲细精管基膜上的局部排列特征, 又可分为 A-single ( $A_s$ )、A-paired ( $A_{pr}$ ) 及 A-aligned ( $A_{al}$ ) 3 种类型。目前认为<sup>[5]</sup>,  $A_s$  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  $A_{pr}$  细胞。正常情况下, 大约一半的  $A_s$  细胞分裂形成  $A_{pr}$  细胞, 而另一半则以自我增殖的方式来保持干细胞数量;  $A_{pr}$  细胞由细胞间桥连接, 进一步分裂形成 4 个、8 个或 16 个  $A_{al}$  细胞;  $A_{al}$  细胞再分裂、分化, 形成  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  和  $A_4$  中间型细胞, 并最终分化为 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, 然后再经过减数分裂, 最终形成精子。在此分化过程中, 以  $A_{al}$  精原细胞分化为  $A_1$  型精原细胞为起始标志, 精原细胞的发育开始进入不可逆的分化过程, 直到成为成熟的精子。

精子的形成是一个循环往复的过程, 其生成周期即精原干细胞发育到成熟精子所需要的时间, 各物种间并不相同。如小鼠的生精周期为

35 d, 而大鼠则为 52~53 d。研究表明, 通过将大鼠精原干细胞移植入小鼠睾丸内, 其生精细胞在小鼠体内以特征性的 52~53 d 的速率进行发育; 而同一睾丸内的小鼠精子则以特征性的 35 d 的速度发育。表明精子发生的速度由精原干细胞控制, 且同一个睾丸可同时以 2 种不同的速度维持精子发生<sup>[6]</sup>。

## 3 精原干细胞在转基因动物研究中的应用

精原干细胞的分裂增殖能力很强。理论上, 大鼠起始于一个精原干细胞的分化增殖能产生 4 096 个精子, 尽管实际上有 75%~90% 的细胞在分化过程中死于凋亡<sup>[7]</sup>, 但一个精原干细胞仍然能够产生 400~1 000 个精子, 可见精原干细胞分化产生精子的效率很高。因此, 若将外源 DNA 整合入精原干细胞染色体中, 由精原干细胞分化出的大量精子就有可能携带外源基因, 带有外源基因的精子与卵子结合受精, 产生的子代即为携带有外源基因的转基因动物。同时外源基因也会随精原干细胞增殖而复制, 并在干细胞中得到长期保留。精原干细胞的这一分化增殖特点, 在转基因动物的研究中是其他方法不可比拟的。因此, 精原干细胞已引起许多转基因动物研究者的关注。虽然该方法相对于其他转基因方法的研究起步较晚, 但是通过十多年的研究表明该方法已显示出巨大的潜力。目前, 通过精原干细胞介导的转基因动物研究主要有两种方法: 曲细精管注射法和精原干细胞移植法。

### 3.1 曲细精管注射法

精原干细胞紧贴曲细精管的基膜分布, 因此可以通过曲细精管显微注射法或睾丸打点法将外源基因转染曲细精管内的精原干细胞, 使其整合到精原干细胞的染色体中。这样, 由精原干细胞分化产生的精子就能长期携带外源基因, 并通过与卵子的结合, 产生携带有外源基因的子代。Kim 等<sup>[8]</sup>分别向鼠和猪睾丸的曲细精管中注射脂质体/细菌 *lacZ* 基因复合物, 对精原干细胞进行转染, 通过 PCR 证实, 在小鼠中有 8.0%~14.8% 的睾丸精子表达 *lacZ* 基因, 7%~13% 的附睾精子携带外源 DNA。由于猪的曲细精管被厚而不透明的白膜所包围, 无法准确地把脂质体/DNA

复合物注射进曲细精管,所以只能把脂质体/DNA复合物以随机打点的方式注入睾丸,经原位杂交结果证明有 15.3% ~ 25.1% 的曲细精管中有外源基因的表达,比体外孵育及电穿孔等方法的转染率高。随后,Chang 等<sup>[9]</sup>将 *MT/hGHR* 基因片段与脂质体孵育后,注射到小鼠的两侧睾丸中,成功地获得了转基因小鼠,并且外源基因可遗传到 F4 代以后,这表明外源基因通过睾丸注射对体内精原干细胞进行转染可以稳定整合在生殖系中。

目前该方法已在多种动物中取得了成功。曹阳等<sup>[10]</sup>通过睾丸打点法将脂质体包裹的含人乳铁蛋白基因重组质粒 pLNCXHLF 注入兔的睾丸中,对精原干细胞进行体内转染,一个月后与正常雌兔交配,对新生仔兔进行 PCR 和 Southern 检测,结果显示转基因阳性率高达 35%。最近,Li 等<sup>[11]</sup>将含有绿色荧光蛋白的重组载体 pEGFP-N1 和阳离子脂质体的混合物通过睾丸注射也成功地得到了绿色荧光蛋白转基因鸡,分别对 F1 和 F2 代转基因鸡的心、肝、肾和肌肉制成的冰冻切片进行观察,发现绿色荧光阳性率分别为 50.0% 和 66.7%。曲细精管注射法操作简单,不需要复杂昂贵的仪器,因此受到许多转基因动物研究人员的青睐,现已经成为一种制作转基因动物的常规方法。

当进行曲细精管显微注射或睾丸打点注射时,难免会对被注射睾丸的间质细胞造成一定的机械损伤,可能会影响睾丸中睾酮的分泌和精原干细胞的生长,从而降低雄性动物的性欲和繁殖能力。为此,乔贵林等<sup>[12]</sup>在建立人白细胞抗原 B27 (HLA-B27) 转基因鼠的研究中对该方法进行了改进,仅注射一侧睾丸,另一侧睾丸不注射,以保留其完整性,并将其输精管结扎,以改进方法对精原干细胞进行体内转染,可减少对睾丸组织的损伤。此后,沈新民等<sup>[13]</sup>、王凤阳等<sup>[14]</sup>在各自的试验中也均采取了此种方法。从目前结果看,单侧睾丸注射和双侧睾丸注射在转基因动物的生殖力和后代的阳性率上均未有明显差别。另外,试验通常采用腹腔手术的方法打开腹腔以暴露出睾丸进行注射操作,He 等<sup>[15]</sup>则建立了一种更为简便、高效的方法,即无需进行手术,直接用注射器针头穿透阴囊刺入睾丸中,将含有绿色荧光蛋白的重组质粒分多次多点注射到雄性小鼠的睾丸内,此法大大降低了由于手术操作对小鼠造成的

巨大应激,而且经检测,F1 代小鼠转基因阳性率可高达 41%,这种方法很适用于大规模制备转基因动物,特别适用于一些大型家畜。

### 3.2 精原干细胞移植法

精原干细胞移植技术是近年发展起来的一项新技术。Brinster 等<sup>[16]</sup>建立了该项技术,并实现了供体小鼠的精原干细胞在受体中进行精子发生和单倍体的生殖遗传,该研究成果是雄性生殖研究领域中的一项突破性进展。精原干细胞移植法不仅为精子发生过程的研究提供了有力的工具,而且也能为转基因动物的制作提供了一个极佳的思路。在转基因动物的研究中精原干细胞可以在移植前体外原代培养的时间里反复运用 DNA 转染技术,而且也能对转染外源基因的阳性细胞进行筛选,从而使转染效率大为提高。研究人员正是基于这一特点进行试验设计,并且已取得了一定的成功,引起了科学界的广泛关注。

由于通过精原干细胞移植技术进行转基因动物的研究对于精原干细胞的分离纯化、体外保存和体外培养等均有较高要求,目前国外在该领域的研究相对较多。Brinster 等<sup>[16]</sup>首先将携带有 *lacZ* 外源基因的供体小鼠的睾丸混合悬浮液,注射入另一只不育受体小鼠的曲精细管内,结果发现,在受体小鼠的睾丸内发生了供体精原干细胞的生精过程,而且能产生形态特征正常的携带 *lacZ* 基因的成熟精子细胞。Harmra 等<sup>[17]</sup>则用慢病毒作为载体将绿色荧光蛋白 GFP 报告基因导入供体大鼠精原干细胞中,然后将其移植到白消安 (busulfan) 处理过的受体 WT 大鼠中,再与雌鼠交配,在得到的 44 只 F1 代中有 13 只携带有报告基因,这些基因整合位点各不相同,并且能够传递给 F2 代,F2 代中外源基因携带率约为 50%。白消安是一种烷化剂,是精原干细胞移植中制作受体动物的一种常用药物,它可以消除受体动物睾丸内绝大部分的生精细胞,但支持细胞仍然存活,残留的少量内源性干细胞能重新启动精子发生,这种情况下用携带遗传标记的供体生精细胞有助于区分内、外源性的精子发生<sup>[18]</sup>,而且即使受体睾丸内源的精原干细胞没有完全除去也能取得一定的结果<sup>[19]</sup>。

精原干细胞移植的另一种形式就是异种移植,即将一种动物的精原干细胞移植到不同种动

物体内。Ogawa 等<sup>[20]</sup>将携带 *lacZ* 报告基因的小鼠精原干细胞移植入用白消安处理的受体 SD 大鼠曲细精管内,结果在 55% 的大鼠睾丸内观察到小鼠精原干细胞克隆,并可见到小鼠来源的精子发生。最近,Kanatsu-shinohara 等<sup>[21]</sup>尝试将携带有增强型绿色荧光蛋白基因(*EGFP*)的慢病毒载体与体外培养的大鼠精原干细胞混合,然后将其移植到免疫缺陷的小鼠睾丸中,移植后的大鼠精原干细胞在小鼠睾丸内产生了表达 *EGFP* 的生精细胞,并生成精子,最终稳定的将外源基因传递给后代,生产出转基因大鼠。这说明精原干细胞的异种移植也是研究制作转基因动物的一种可行的方法。

一直以来利用精原干细胞移植法进行转基因动物的研究还多在啮齿类动物中展开,在非啮齿类动物中研究较少。不过随着该方法的不断成熟,最近几年研究人员已经开始利用该方法进行转基因家禽和家畜的研究。Kalina 等<sup>[22]</sup>通过将携带有增强型绿色荧光蛋白基因(*EGFP*)的逆转录病毒与体外培养的鸡精原干细胞进行短暂培养后移植,发现 9 周内这些感染过逆转录病毒的精原干细胞在受体公鸡睾丸中已开始正常分裂增殖产生精子,同时也检测出了受体公鸡产生的可表达绿色荧光蛋白的精子,虽然该试验最终未得到转基因鸡,但这说明同大鼠和小鼠一样,通过精原干细胞移植进行转基因鸡的研究也是有效的一种方法。最近,Li 等<sup>[11]</sup>将体外培养的鸡精原干细胞转染 *EGFP* 后移植入已去除内源性精原干细胞的受体公鸡的睾丸内,采集受体公鸡产生的精子进行人工授精,结果有 12.5% 的鸡胚和 11.1% 的雏鸡有绿色荧光表达,成功地获得了转基因鸡。随后,该法在家畜研究中也取得了突破,Honaramooz 等<sup>[23]</sup>通过腺病毒伴随病毒(deno-associated virus, AAV)携带 *GFP* 报告基因转染山羊的精原干细胞,然后将其移植到射线照射处理过睾丸的受体山羊睾丸内,转染后的精原干细胞在受体山羊睾丸内定植并产生转基因精子,采精后进行体外受精,结果发现有 10% 是转基因阳性胚胎。这是第一个成功通过精原干细胞移植的方法进行大家畜转基因研究的报道,为今后通过精原干细胞移植方法建立转基因大动物模型带来了希望。

精原干细胞移植法之所以受到广泛关注,除了其转基因效率较高以外,另一个主要原因就是其在转染后,携带外源基因能力可能具有的稳定性和长期性。为了研究移植后携带有外源基因的精原干细胞在受体睾丸内活性能持续多长时间,Takehiko 等<sup>[24]</sup>将携带有绿色荧光蛋白基因小鼠的精原干细胞用一年多的时间连续移植了 4 代,结果发现其细胞活性并未发生消退,由此可以推测精原干细胞的同一克隆可以被连续移植且保持其干细胞的活性。不过将携带外源基因的精原干细胞移植后转基因后代阳性率究竟能持续多长时间,是否能稳定的保持在较高水平,这些都有待于继续深入的研究。目前,通过精原干细胞移植技术进行转基因动物的研究与其他转基因方法相比还相对较少,但通过以上研究可以看出,该方法已显示出巨大的潜力和优势。

#### 4 问题与展望

精原干细胞正在以其独有的特性吸引着人们越来越多的关注,与传统的显微注射法、胚胎干细胞法和精子载体法等相比,通过精原干细胞介导转基因动物的研究避免了对特殊仪器和熟练操作人员的需求且简便易行,同时由于一个精原干细胞能分化成许多精子,通过这种放大作用可以获得更多的转基因后代,具有巨大的优势。但是,由于对该方法的研究起步较晚,目前还存在许多的不足和问题。曲细精管注射法制作转基因动物虽然成本低,操作简单,但是外源基因进入睾丸后的命运如何、有哪些因素会影响外源基因在体内转染精原干细胞的效率等问题还有待于进一步研究。精原干细胞移植法较其他方法效率高,但是精原干细胞的移植需要经过以下几个步骤:精原干细胞的分离和纯化;对精原干细胞进行冻存;选择转染细胞将精原干细胞进行长期培养;受体睾丸中精原干细胞的处理等<sup>[25]</sup>,这些技术目前都还不是十分成熟,仍在完善之中。同时通过精原干细胞移植制作转基因动物,目前也只在有限的种属中获得成功。

总之,通过精原干细胞进行转基因动物的研究现在已经成为了一种新的生物技术,该技术的

建立将加速建立转基因动物的步伐。今后随着对精原干细胞研究的不断深入,相信目前存在的问题终会得到很好的解决,通过精原干细胞建立转基因动物将有不可估量的应用价值。

### 参 考 文 献

- [1] Schlatt S. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation[J]. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2002, 187(1-2):107-111.
- [2] Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91(24):11298-11302.
- [3] Orwig K E, Ryu B Y, Avarbock M R, *et al.*. Male germ-line stem cell potential is predicted by morphology of cells in neonatal rat testes[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99(18):11706-11711.
- [4] Shinohara T, Orwig K E, Avarbock M R, *et al.*. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98(11):6186-6191.
- [5] Wrobel K H. Prespermatogenesis and spermatogoniogenesis in the bovine testis[J]. *Anat. Embryo.*, 2000, 202:209-222.
- [6] Brinster R L. Germline stem cell transplantation and transgenesis[J]. *Science*, 2002, 296(5576):2174-2176.
- [7] Tegelenbosch R A, de Rooij D G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse[J]. *Mutat. Res.*, 1993, 290(2):193-200.
- [8] Kim J H, Jung-Ha H S, Lee H T, *et al.*. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig[J]. *Mol. Reprod. Dev.*, 1997, 46(4):515-526.
- [9] Chang K T, Keda A, Hayashi K. Possible mechanisms for testis-mediated gene transfer as a new method for producing transgenic animals[J]. *Reprod. Dev.*, 1999, 45(1):37-42.
- [10] 曹 阳,高庆颖,李庆伟,等. 精子干细胞转染法制备转基因兔的研究[J]. *高技术通讯*, 2001, 10:17-21.
- [11] Li B C, Sun G B, Sun H C, *et al.*. Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells *in vivo* and *ex vivo* transfection[J]. *Science in China Series C. Life Scienc.*, 2008, 51(8):734-742.
- [12] 乔贵林,周轶林,赵 君,等. 应用曲细精管注射法建立人白细胞抗原 B27 (HLA-B27) 转基因鼠[J]. *中国兽医学报*, 1999, 19(2):91.
- [13] 沈新民,乔贵林,张 玲,等. 用曲细精管微注射法建立绿色荧光蛋白转基因小鼠[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(3):250-253.
- [14] 王凤阳,张守峰,赵 君,等. 重组逆转录病毒介导的 *neo<sup>R</sup>* 基因在公鼠生殖系细胞的转移[J]. *中国兽医学报*, 2001, 21(6):573-575.
- [15] He X, Qi B, Liu G S, *et al.*. A novel method to transfer gene *in vivo* system[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 33(7):685-690.
- [16] Brinster R L, Ararbock M R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91(24):11303-11307.
- [17] Hamra F K, Gatlin J, Chapman K M, *et al.*. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99(23):14931-14936.
- [18] Brinster R L. Germline stem cell transplantation and transgenesis[J]. *Science*, 2002, 296(5576):2174-2176.
- [19] Honaramooz A, Behboodi E, Megee S O, *et al.*. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats[J]. *Biol. Reprod.*, 2003, 69(4):1260-1264.
- [20] Ogawa T, Dobrinski I, Brinster R L. Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat[J]. *Tissue Cell*, 1999, 31(5):461-472.
- [21] Kanatsu-Shinohara M, Kato M, Takehashi M, *et al.*. Production of transgenic rats via lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells[J]. *Biol. Reprod.*, 2008, 79(6):1121-1128.
- [22] Kalina J, Senigl F, Micóková A, *et al.*. Retrovirus-mediated *in vitro* gene transfer into chicken male germ line cells[J]. *Reproduction*, 2007, 134(3):445-453.
- [23] Honaramooz A, Megee S, Zeng W X, *et al.*. Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation[J]. *FASEB*, 2008, 22(2):374-382.
- [24] Ogawa T, Ohmura M, Yumura Y, *et al.*. Expansion of murine spermatogonial stem cells through serial transplantation[J]. *Biol. Reprod.*, 2003, 68(1):316-322.
- [25] Izadyar F, Creemers L B, Van Dissel-Emiliani F M, *et al.*. Spermatogonial stem cell transplantation[J]. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2000, 169(122):21-26