

## 温度及BRL饲养细胞对体外 小鼠精原干细胞的影响\*

李莲军<sup>1,2</sup>, 苗永旺<sup>1</sup>, 程美玲<sup>1</sup>, 李卫真<sup>1</sup>, 卢克焕<sup>2</sup>

( 1. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201;

2 广西大学动物繁殖研究所, 广西 南宁 530005 )

**摘要:** 将6日龄小鼠生精上皮单细胞分别接种于BRL和STO饲养层上,于32℃或37℃培养,研究其对精原干细胞的影响。结果:在培养的第1周内,2个及4个相连的精原细胞合胞体明显增多。培养1周后,多数精原细胞经短暂的存活及分裂活动后退化消失,培养体系中仅保留少量单个及由细胞间桥相连的双个及4个成串或成团的A型精原细胞。这些细胞在随后的培养过程中,不表现明显的分裂活动,呈碱性磷酸酶阳性反应。根据精原干细胞生物学特性,它们极有可能就是精原干细胞及其子代细胞。不同条件培养体系中的精原干细胞的生物学行为无明显不同,培养60d时均仅有少量精原干细胞存活。结论: BRL细胞能用作饲养层促进精原干细胞存活,但对其更新性增殖没有明显作用;32~37℃对精原干细胞的生物学行为无明显影响,均可用于培养精原干细胞。

**关键词:** 精原干细胞; BRL饲养层; 温度; 体外培养; 小鼠

**中图分类号:** Q 954.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2004)05-0580-04

## The Effects of Temperature and BRL Feeders on Mouse Spermatogonial Stem Cells in Vitro

LI Lian-jun<sup>1,2</sup>, MIAO Yong-wang<sup>1</sup>, CHENG Mei-ling<sup>1</sup>, LI Wei-zhen<sup>1</sup>, LU Ke-huan<sup>2</sup>

( 1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Institute of Animal Reproduction, Guangxi University, Nanning 530004, China )

**Abstract:** The seminiferous epithelial cells dissociated from 6 days postpartum mice were cultured on buffalo rat liver (BRL) cell feeders or on STO feeders at 32 °C or at 37 °C respectively to study the effects of BRL feeders and different temperatures on culture of mouse spermatogonial stem cells. During the first week of culture, the spermatogonial syncytia of 2- and 4-cell increased obviously. After a week of culture only some single, paired, aligned or clustered spermatogonia maintained. They showed no obvious proliferation or differentiation in subsequent culture. These cells were spherical and expressed AP activity. They were most likely spermatogonial stem cells and their first several progenies according to the biological characteristics of spermatogonial stem cells. Under different culture conditions mentioned above, the biological behaviors of spermatogonial stem cells showed no obvious difference and only small number of spermatogonial stem cells remained when they were cultured for 60 days. It is concluded that BRL cells can be used as feeders to promote survival but not renewal of spermatogonial stem cells. The temperatures from 32 °C to 37 °C have on special effects on spermatogonial stem cells and can be used for culture of them.

\* 收稿日期: 2004-04-26

基金项目: 云南省自然科学基金(2003C0046M); 广西自然科学基金(桂科自 0339005)。

作者简介: 李莲军(1963-), 女, 湖南永州市人, 副教授, 博士, 主要从事动物细胞学、组织学及胚胎学研究。

**Key words:** spermatogonial stem cell; BRL feeders; temperature; culture; mouse

新近的研究显示,精原干细胞可以冷冻保存、体外培养、基因操作及移植<sup>[1,2]</sup>,因而在医学、生物学及动物科学上具有广阔应用前景。精原干细胞是生精上皮中没有细胞间桥(胞质间桥)相连的单个A<sub>s</sub>型精原细胞,其更新产生两个A<sub>s</sub>型精原干细胞,或者分化产生两个由细胞间桥相连的A<sub>pr</sub>型精原细胞,A<sub>pr</sub>型精原细胞进一步分化产生4~16个细胞连成串的A<sub>ai</sub>型精原细胞,A<sub>ai</sub>型可继续分化为A<sub>1</sub>型、A<sub>2</sub>型、A<sub>3</sub>型、A<sub>4</sub>型、B型精原细胞、精母细胞,最终形成精子<sup>[3,4]</sup>。精原干细胞是一种可以在细胞水平上进行识别的干细胞<sup>[4,5]</sup>,故是研究成体干细胞生物学特性的理想模型。根据功能鉴定法(雄性生殖细胞移植鉴定法),有很少量的精原干细胞能在STO(一种已建系的小鼠胚胎成纤维细胞)饲养层上至少存活4个月<sup>[5]</sup>。目前除功能鉴定法外,尚无其他更好的方法检测培养体系中的精原干细胞。因而,人们对于体外培养的精原细胞的生物学行为了解甚少。碱性磷酸酶(AP)既表达于管周肌样细胞,也表达于小鼠精原细胞,但两种细胞在形态上明显不同,据此可以区别两者<sup>[6]</sup>。本研究对6日龄小鼠生精上皮细胞进行不同条件的体外培养,并利用AP活性及细胞形态检测其中的精原细胞,探讨饲养层及培养温度对体外精原干细胞生物学行为的影响,为建立精原干细胞长期存活并增殖的培养体系提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

DMEM培养基(Gibco);胎牛血清(FCS,鼎国生物技术公司);胶原酶IV(Sigma);胰蛋白酶(Sigma);丝裂霉素C(Boehringer Mannheim)。

### 1.2 生精上皮细胞的收集和培养

每次试验取6日龄昆白系雄性小鼠12~16只,颈椎脱臼处死后,无菌取出睾丸,置预先加有适量PBS的Φ35 mm培养皿中。撕去睾丸白膜,反复吹打,并用PBS清洗生精小管3次,以除去间质组织。加入10倍体积1 g/L胶原酶,室温消化8~10 min,用适量PBS清洗3次,以除去管周细胞。加入10倍体积0.25%胰蛋白酶,室温消化10 min,其间吹打数次,待生精小管段成为单细胞时,加入等体积培养液(DMEM + 10% FCS + 4 mmol/L 谷氨酰胺

+ 双抗)终止消化。将细胞悬液移入10 mL离心管中,600 r/min离心3 min,收集细胞(精原细胞和幼稚型支持细胞)。用适量培养液悬浮细胞,将细胞悬液等分为6~8份,分别接种于含有丝裂霉素C处理过的BRL(buffalo rat liver cell)饲养层及STO饲养层的Φ35 mm培养皿内,于32℃或37℃,5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度条件下培养。试验重复3次,STO饲养层为对照。

### 1.3 AP细胞化学染色

在培养皿中加入4%多聚甲醛/PBS液2 mL,室温固定细胞10 min,用蒸馏水(d H<sub>2</sub>O)洗净。加入AP作用液(2%巴比妥钠1 mL,3%β-磷酸甘油钠1 mL,2%无水氯化钙2 mL,2%硫酸镁0.1 mL,蒸馏水0.5 mL,pH 9.4),37℃孵育2 h,用d H<sub>2</sub>O洗净。加入2%硝酸钴溶液,作用5 min,用d H<sub>2</sub>O洗净。加入0.1%硫化铵溶液,作用1 min,用d H<sub>2</sub>O洗净。用明胶甘油封片,及时观察并拍照。酶活性部位呈棕色至黑色。以d H<sub>2</sub>O代替作用液作为阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 BRL饲养层及37℃时精原细胞的生物学行为

37℃时,6日龄小鼠生精上皮单细胞接种BRL饲养层上数小时,细胞已经贴壁。培养24~48 h,支持细胞铺展后,相互之间及与饲养层细胞之间界限模糊不清,圆形精原细胞单个、双个,或者3个、多个相连成团,散在于饲养层细胞和支持细胞之上,细胞大小不一。培养3~5 d,体系中双个及4个1串、甚至8个1串的精原细胞合胞体明显增多,随机散在于不规则细胞层之上(图1)。在精原细胞分裂增殖的同时,一部分精原细胞发生退化,随换液消失。培养1周后,体系中的精原细胞数量明显下降,随后渐趋恒定。培养15~30 d,一些单个、双个及4个成串、或多个成团的精原细胞散在于支持细胞之间及支持细胞之上(此时的饲养层细胞已衰老并随换液消失),呈AP<sup>+</sup>反应。培养体系中还可见少量AP<sup>+</sup>反应的管周肌样细胞,它们覆盖在支持细胞之上,铺展面积较大,形态不规则。

培养体系若不进行传代,动态平衡可以维持60 d以上,其中含有少量的AP<sup>+</sup>反应精原细胞。在培养30 d或60 d时,分别进行首次或第2次继代

培养,或进行冷冻保存后(液氮中保存数天至一年)继续培养 15 d,细胞均能在无饲养层的条件下良好地贴壁、生长及增殖,但饲养层有利于精原细胞的存活,体系中可检测到少量的精原细胞(图 2)。

## 2.2 BRL 饲养层及 32 ℃ 时精原细胞的生物学行为

6 日龄小鼠生精上皮细胞在 32 ℃,BRL 饲养层上培养时,与 37 ℃ 相比,生精上皮细胞贴壁时间无明显差异,精原细胞开始增殖的时间约延迟 0.5 ~ 1 d,精原细胞出现退化的时间无明显差异,均在培养 2 ~ 3 d 开始。在随后的培养过程中,精原细胞的形态、增殖行为也没有明显不同。精原细胞均能

维持存活到 60 d 以上。精原细胞同样能冷冻保存或传代培养。

## 2.3 BRL 饲养层与 STO 饲养层相比

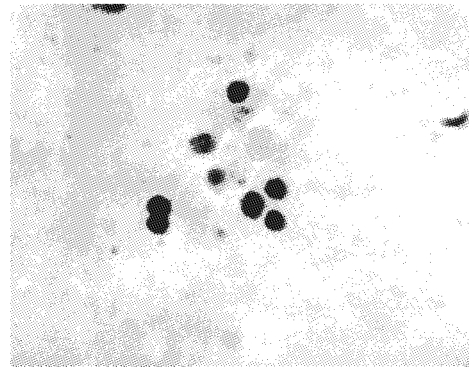
当培养温度相同时,BRL 饲养层与 STO 饲养层(对照组)相比,生精上皮细胞在形态,细胞贴壁时间、细胞增殖行为方面均无明显不同;其中的精原细胞在形态、细胞贴壁、及增殖行为方面也没有明显不同,培养体系中均有少量 AP<sup>+</sup> 反应的精原细胞能维持存活到 60 d 以上。精原细胞同样能冷冻保存或传代培养。精原细胞在两种饲养层上的生物学行为无明显不同。



BRL 饲养层,37℃, × 250

图 1 培养 5 d 的精原细胞

Fig. 1 Spermatogonia cultured for 5 day



BRL 饲养层,37℃,AP 染色, × 250

图 2 冻存后再传代培养 15 d 的精原细胞

Fig. 2 Spermatogonia subcultured for 15 day after cryopreservation

## 3 讨论与结论

精原干细胞是数量很少并具有较长而又不确定细胞周期的一类精原细胞,它们根据来自环境的信息缓慢地更新或分化,对不利环境有较强的抵抗力。由于没有合适的方法检测体外培养的精原干细胞,人们一直认为精原干细胞仅能在体外培养 1 ~ 2 周。自从 BRINSTER 研究小组采用雄性生殖细胞移植方法,证实了小鼠精原干细胞在体外至少能存活 4 个月<sup>[5]</sup>,人们才意识到精原干细胞能在合适的体外条件下长期存活。但这种功能检测法仅能确定培养体系中存在有精原干细胞,而不能识别出其中的精原干细胞。在以前的体外培养研究中,本文作者已经证实精原细胞呈圆球形并表达 AP 活性,可利用 AP 活性结合细胞形态检测精原细胞<sup>[6]</sup>。在本研究中,采用 AP 活性检测到培养体系中存活 60 d 以上的精原细胞,它们呈圆球形或近似圆球形,以单个、双个以及 4 个一串的形式存在,

不表现明显的增殖和分化活动。根据精原干细胞的生物学特性,这些精原细胞极有可能就是精原干细胞及其最初几代分化细胞。这表明体外培养时,精原干细胞的分化行为与体内的一致。研究结果同时也表明培养体系中长期存活精原干细胞仍表达 AP 活性,可利用 AP 活性及细胞形态检测其中的精原干细胞。

到目前为止,人们尚未建立起精原干细胞长期存活又能更新性增殖的体外培养体系。功能检测法显示,体外培养时,小鼠精原干细胞数量呈时间依赖性递减,培养 7 d 时,约有 3/4 的精原干细胞丢失<sup>[7]</sup>。本试验中,精原细胞在培养 1 周后,大部分均从培养体系中消失,仅保留下量的精原干细胞及其最初几代分化细胞。试验结果与前人的报道类似。

STO 细胞主要分泌白血病抑制因子(LIF),也分泌干细胞因子(SCF);BRL 细胞主要分泌 SCF。虽然人们许多年来一直采用小鼠胚胎成纤维细胞

作饲养层,如 STO 细胞,维持小鼠胚胎干细胞(ES)和其他类型细胞,但仍不能确切知道在分子水平上,这些饲养细胞为它们的顾主究竟提供了什么。Brinster 研究小组在培养小鼠精原细胞时,发现 STO 细胞对精原干细胞的维持具有重要作用<sup>[3]</sup>。本研究中采用 STO 细胞作为对照,对 6 日龄小鼠生精上皮细胞进行培养,结果发现,精原细胞在 BRL 及 STO 两种饲养层上的生物学行为非常相似,均有少量 AP<sup>+</sup> 反应的精原细胞能维持存活到 60 d 以上。培养 1 周后,培养体系中都仅保留下少量的精原干细胞及其最初几代分化细胞,这些细胞都没有明显的、进一步的增殖或分化活动。显而易见,两种饲养层对精原干细胞的更新性增殖和分化性增殖均没有明显的作用。BRL 细胞作为精原细胞的饲养层,并没有表现出比 STO 细胞更大的优越性。由于 SCF 目前已经被证明是一种细胞促存活因子<sup>[8]</sup>,因而 BRL 细胞和 STO 细胞很有可能为精原细胞提供的是促存活因子,起到促存活作用。以上实验结果也表明,SCF 与 LIF 对精原干细胞的更新性增殖和分化性增殖均没有明显的促进作用。

高等哺乳动物均为恒温动物,细胞体外培养一般采用接近体温的温度,而生殖细胞则需低于体温的温度才能发育至成熟精子,故多数学者均采用低于体温的温度,如 30 ~ 34 °C,培养精原细胞。然而,小鼠精原细胞在 6 日龄时就已经形成,而此时小鼠睾丸仍位于体腔内。对实验性隐睾的研究证实,体腔温度并没有影响精原干细胞的生物学功能,同时又能消除精母细胞及分化程度更高的生殖细胞<sup>[9]</sup>。本研究采用 37 °C 对小鼠精原细胞进行体外培养,证实了 37 °C 可以用于培养精原干细胞。采用 32 °C 对精原细胞进行培养发现,此温度下精

原细胞的生物学活动规律与 37 °C 相比很相似,几乎无明显差异。由此可见,大多数精原细胞在培养 1 周内的丢失主要不是由温度造成,可能是由于培养环境不适宜已经定向分化的精原细胞的存活及其进一步分化等因素引起。

#### [参 考 文 献]

- [1] BRINSTER RL, NAGANO M. Spermatogonial stem cell transplantation cryopreservation and culture[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1998,9: 401 - 419.
- [2] NAGANO M, SHINOHARA T, AVARBOCK MR, et al. Retrovirus-mediated gene delivery into male germ line stem cells[J]. *FEBS Lett*, 2000,475:7 - 10.
- [3] MEACHEM S, VON SCHONFELDT V, SCHLATT S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective[J]. *Reproduction*, 2001,121:825 - 834.
- [4] DE ROOIJ DG, RUSSELL LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask[J]. *J Androl*, 2000,21:776 - 798.
- [5] NAGANO M, AVARBOCK MR, LEONIDA EB, et al.. Culture of mouse spermatogonial stem cells[J]. *Tissue Cell*, 1998,30:389 - 397.
- [6] 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.
- [7] NAGANO M, RYU BY, BRINSTER CJ, et al.. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro[J]. *Biol Reprod*, 2003,68: 2 207 - 2 214.
- [8] YAN W, SUOMINEN J, TOPPARI J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro[J]. *J Cell Sci*, 2000,113:161 - 168.
- [9] SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models[J]. *Dev Biol*, 2000,220:401 - 411.