

## 小鼠精原干细胞的分离培养及相关标记物检测

郑艳波, 李 毅, 甄永苏

中国医学科学院 北京协和医学院 医药生物技术研究所肿瘤室, 北京 100050

通信作者: 甄永苏 电话: 010-83158065, 电子邮件: zhenys@public.bta.net.cn

**摘要:** **目的** 建立一套简单高效的小鼠精原干细胞 (SSCs) 分离及体外培养体系, 检测相关干细胞标记物的表达, 为将 SSCs 用于抗肿瘤干细胞药物的筛选及鉴定奠定基础。**方法** 采用组织化学法比较 DBA/2 乳鼠 (6~8 天龄) 和成年鼠 (26~28 周龄) 曲细精管解剖结构的特点。选取乳鼠睾丸制备原代细胞, 比较不同消化酶的消化效率。利用差异贴壁法即睾丸体细胞在明胶上贴壁而精原细胞不贴壁的特点, 富集 SSCs。比较以 StemPro34 和  $\alpha$ -MEM 为基础培养基的培养体系及明胶、血清等因素对细胞贴壁及生长性能的影响, 观察不同培养时间的细胞形态, 免疫荧光法鉴定 SSCs 及肿瘤干细胞 (CSCs) 相关标记物的表达。**结果** 乳鼠睾丸中精原细胞含量相对较高, 胰蛋白酶消化后能获得较多数量的原代细胞。在以 StemPro34 为基础培养基, 含 1% 胎牛血清及明胶铺板的条件下体细胞贴壁较充分。分离的精原细胞在以丝裂霉素 C 处理过的体细胞为饲养层的环境中生长良好, 呈现出典型的 SSCs 生长特性, 13 d 左右可形成明显的细胞球。免疫荧光结果显示, SSCs 标记物胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 家族受体  $\alpha 1$  ( $GFR\alpha 1$ ) 及 VASA 蛋白在细胞球中高表达; CSCs 标记物 CD44 在  $A_s$ 、 $A_{pr}$ 、 $A_{ai}$  各期细胞及细胞球的内部细胞中均有表达, 而体细胞中则几乎不表达。**结论** 初步建立了 DBA/2 小鼠 SSCs 的分离及体外培养体系, CD44 在发育早期的精原细胞中表达较强。

**关键词:** 精原干细胞; 分离; 培养; 肿瘤干细胞; CD44

**中图分类号:** Q28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2013)03-0243-06

**DOI:** 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.03.001

## Isolation and Culture of Mouse Spermatogonial Stem Cells and Determination of the Related Markers

ZHENG Yan-bo, LI Yi, ZHEN Yong-su

Department of Oncology, Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS and PUMC,  
Beijing 100050, China

Corresponding author: ZHEN Yong-su Tel: 010-83158065, E-mail: zhenys@public.bta.net.cn

**ABSTRACT: Objective** To establish a simple and highly effective isolation and culture system of mouse spermatogonial stem cells (SSCs) and detect the expression of stem cell-related markers in the isolated cells. **Methods** The structures of seminiferous tubules of neonatal (6-8 days of age) and adult (26-28 weeks) DBA/2 mice were compared using histochemical examination. Testes of neonatal mice were selected for preparing primary cells. The digestive efficiency of different enzymes was compared. SSCs were isolated according to the different binding abilities of testicle somatic cells and SSCs to gelatin matrix. The effects of different base culture media such as StemPro34 and  $\alpha$ -MEM, gelatin, and serum on the SSCs binding activity and growth were stud-

ied. The cell morphology was observed during the culture process. Immunofluorescence was used to detect the expression of SSCs and cancer stem cells (CSCs) -related markers in SSCs. **Results** The content of SSCs in the testes of neonatal mice was relatively higher than that in adult mice. Trypsin showed the highest digestive efficiency. In StemPro34 supplemented with 1% fetal bovine serum and on the gelatin matrix, testicular somatic cells could bind with the plate efficiently. Spermatogonial cells grew well when using mitomycin C-treated testicular somatic cells as feeder cells and showed typical characteristic of SSCs. After 13 days of culture, spermatogonial cells formed cell clusters. Immunofluorescence assay showed that SSCs markers glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family receptor  $\alpha 1$  (GFR $\alpha 1$ ) and VASA protein were highly expressed in the cell clusters. CSCs marker CD44 was expressed in the  $A_s$ ,  $A_{pr}$ ,  $A_{al}$  and the inner cells of the cell clusters, while seldom expressed in the somatic cells. **Conclusions** An isolation and culture system of SSCs derived from DBA/2 mice was established. CD44 is highly expressed in the early stage of spermatogonial cell development.

**Key words:** spermatogonial stem cells; isolation; culture; cancer stem cells; CD44

*Acta Acad Med Sin*, 2013,35(3):243-248

精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs) 是一群具有自我增殖和分化能力的细胞, 是成体内唯一能将遗传信息传递给下一代的干细胞, 而关于肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs), 有研究认为是起源于正常干细胞或祖细胞的突变<sup>[1]</sup>。SSCs 与 CSCs 具有很多相似性, 如都表达干细胞标记物 CD90 (Thy-1)<sup>[2-3]</sup> 和 CD133<sup>[4-5]</sup>。与 CSCs 相比, SSCs 具有典型的形态特征<sup>[6]</sup>, 未分化的精原细胞间以细胞桥连接<sup>[7]</sup>。SSCs 体外培养过程中的关键是防止 SSCs 的分化, 研究显示, 胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 在体内具有抑制 SSCs 分化、促进自我增殖的作用<sup>[8]</sup>, 这一发现促进了 SSCs 的体外培养。虽然近年来已建立了多种小鼠 SSCs 的体外培养体系<sup>[2,9-10]</sup>, 但所用的分离纯化方法及培养策略各不相同且步骤较为繁琐。本研究选用 6~8 天龄的 DBA/2 乳鼠, 采用睾丸体细胞和精原细胞在明胶上贴壁性能的差异分离富集 SSCs, 对常用的几种消化酶、精原细胞的分离条件、培养体系及饲养层细胞等进行了比较, 同时对几种 SSCs 及 CSCs 标记物在培养细胞中的表达情况进行了检测, 以期建立一套简单高效的小鼠 SSCs 分离及体外培养体系, 为将 SSCs 用于抗肿瘤干细胞药物的筛选及鉴定奠定基础。

## 材料和方法

**实验动物** DBA/2 乳鼠 (6~8 天龄) 及成年鼠 (26~28 周龄) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 所有动物实验均经中国医学科学院医药生物技术研究所实验动物伦理委员会审查批准。

**培养基** 以 StemPro34 为基础培养基的成份及其终浓度如下: StemPro34 SFM 基础培养基 (1×), 40× StemPro34 营养添加剂 (1×), 牛血清白蛋白 (5 g/L), D- (+) 葡萄糖 (6 g/L), L-谷氨酰胺 (2 mmol/L), 链霉素 (100 mg/L), 青霉素 (100 U/ml), 两性霉素 B (0.25 mg/L), 50× MEM 维生素 (1×), 50× 非必需氨基酸 (1×), D-生物素 (10 mg/L), 胰岛素 (25 mg/L), 丙酮酸钠 (30 mg/L), 60% DL-乳酸 (0.06%), 抗坏血酸 (100  $\mu$ mol/L), 亚硒酸钠 (30 nmol/L), 腐胺 (60  $\mu$ mol/L), 牛去铁转铁蛋白 (100 mg/L), 2-巯基乙醇 (10  $\mu$ mol/L), 重组鼠表皮生长因子 (20  $\mu$ g/L), 重组人碱性成纤维细胞生长因子 (10  $\mu$ g/L), 重组大鼠胶质细胞源神经营养因子 (10  $\mu$ g/L)。

以  $\alpha$ -MEM 为基础培养基的成份及其终浓度如下:  $\alpha$ -MEM 含 Earle's 平衡盐和 L-谷氨酰胺 (1×), 牛血清白蛋白 (2 g/L), L-谷氨酰胺 (2 mmol/L), 链霉素 (100 mg/L), 青霉素 (100 U/ml), 两性霉素 B (0.25 mg/L), 胰岛素 (5 mg/L), 60% DL-乳酸 (0.06%), 亚硒酸钠 (30 nmol/L), 腐胺 (60  $\mu$ mol/L), 牛去铁转铁蛋白 (10 mg/L), 2-巯基乙醇 (50  $\mu$ mol/L), 重组鼠表皮生长因子 (20  $\mu$ g/L), 重组人碱性成纤维细胞生长因子 (10  $\mu$ g/L), 重组大鼠胶质细胞源神经营养因子 (10  $\mu$ g/L)。

**组织学比较** 分别取 DBA/2 乳鼠和成年鼠睾丸, 10% 中性甲醛溶液固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片 (厚 5  $\mu$ m), HE 染色, Leica 显微成像系统观察、拍照。

**SSCs 的分离及培养** 孔板的预处理: 实验前采用 0.2% 明胶溶液或 20 mg/L 的层黏连蛋白溶液, 37  $^{\circ}$ C 包被孔板至少 30 min 或 4  $^{\circ}$ C 包被过夜, 用前吸掉包被

液, PBS 洗涤 1 次。实验时从 10 只 DBA/2 乳鼠中取出睾丸, 去除白膜, 放入 PBS 中。用镊子疏散睾丸组织, 暴露曲细精管, 将曲细精管剪成小段,  $270 \times g$  离心 5 min, 弃上清液, 收集沉淀。根据每 100 mg 沉淀加入 1 ml 酶液的量, 分别加入预温至室温的 0.25% 的胰蛋白酶 (trypsin)、0.1% 的 IV 型胶原酶 (IV collagenase) 及 0.1% 的分散酶 (dispase),  $37^\circ\text{C}$  温育 30 min, 每隔 5 min 轻柔颠倒试管 4~5 次。加入 5 ml PBS, 吸管反复吹打。细胞悬液依次通过 220 及  $40 \mu\text{m}$  细胞筛, 去除碎片。 $270 \times g$  离心 5 min, 弃上清液。沉淀中加入 2 ml 培养基, 细胞计数, 按  $2 \times 10^5$  细胞/ml 接种 1 ml 至明胶包被的 12 孔板,  $37^\circ\text{C}$  培养 12 h。吸管吹打, 收集悬浮细胞, 再接种于明胶包被的 12 孔板;  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h 后, 按上述方法重新传代 1 次。24 h 后将悬浮细胞传至饲养层细胞上培养。每 3~4 d 更换培养基, 10~13 d 后传代。传代培养时加入适量预温的 0.25% trypsin-EDTA,  $37^\circ\text{C}$  消化, 加入培养基终止消化, 吹打 15~20 次分散细胞球。离心收集细胞, 按  $2.0 \times 10^5$  细胞/ml, 每孔 1 ml 接种于饲养层细胞上, 在  $37^\circ\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。

**饲养层细胞的制备** 上述分离过程中贴壁的睾丸体细胞在含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基中继续传代培养, 用作饲养层细胞。丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 处理细胞: 取对数生长期的睾丸体细胞, 加入终浓度 10 mg/L 的 MMC, 置培养箱中作用 3 h; 吸弃培养液, 用 PBS 洗 5 遍, 加 0.25% trypsin-EDTA 消化; 消化完毕加适量完全培养液终止消化, 细胞悬液  $270 \times g$  离心 5 min; 吸弃上清液, 加适量培养液重悬计数, 以  $3.0 \times 10^4$  细胞/ $\text{cm}^2$  密度均匀接种在明胶处理过的 12 孔板上, 置培养箱中培养。MMC 处理过的睾丸体细胞停止增殖, 但 1~5d 内仍能较好地支持小鼠精原细胞的生长。

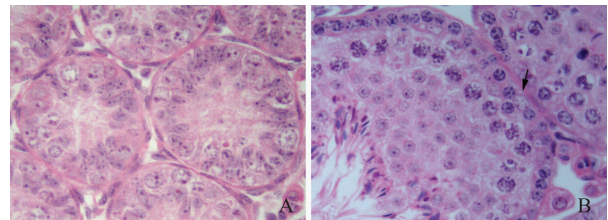
**免疫荧光法** 取培养在 12 孔板上的精原细胞, PBS 洗 3 次, 1% BSA 室温封闭 30 min。加入抗 GDNF 家族受体  $\alpha 1$  (GDNF family receptor  $\alpha 1$ , GFR $\alpha 1$ ) 及 VASA 蛋白 (美国 Santa Cruz 公司) 的一抗 (体积比为 1:50), 室温孵育 2 h, PBS 洗 3 次; 加入 FITC 标记的抗鼠 (GFR $\alpha 1$ ) 或抗兔 (VASA) 二抗 (北京中杉金桥生物公司), 室温孵育 1 h。Hoechst 33342 染核 15 min, PBS 洗 3 次。CD44 为 PE 直标的抗体 (eBioscience),  $4^\circ\text{C}$  与细胞孵育 30 min 后, Hoechst 33342 染核。荧光显微镜 (Nikon camera TE 2000-U) 下拍照。

## 结 果

**乳鼠和成年鼠曲细精管结构的比较** 乳鼠中主要是未分化的精原细胞和支持细胞 (图 1A)。成年鼠中存在精原细胞、精母细胞、精子细胞、精子及支持细胞, 种类较多, 每个曲细精管横切面可见 1~2 个 A 型精原细胞, A 型精原细胞紧贴基底膜, 细胞呈卵圆形, 长轴与基底膜平行, 核染色较淡 (图 1B)。由于乳鼠睾丸中细胞种类较少, SSCs 含量相对较高, 本研究选取 DBA/2 乳鼠睾丸分离 SSCs。

**消化酶的选择** 3 种酶均使用常规酶浓度及剂量,  $37^\circ\text{C}$  消化 30 min。胰蛋白酶、IV 型胶原酶和分散酶消化后, 每个乳鼠睾丸可分别获得约  $(7.48 \pm 0.87) \times 10^5$ 、 $(5.45 \pm 0.29) \times 10^5$  和  $(1.11 \pm 0.24) \times 10^5$  个细胞, 3 者间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。台盼蓝染色结果显示, 3 者消化后的死细胞率分别为 7.14%、7.34% 和 6.76%, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**精原细胞的分离** 根据睾丸体细胞和精原细胞贴壁性质的不同, 分离体细胞和精原细胞。以  $\alpha$ -MEM 为基础培养基时, 分离的原代细胞均不贴壁。以 StemPro34 为基础培养基时, 接种 12 h 后, 在 0.2% 明胶铺板和 1% FBS 存在的条件下, 体细胞贴壁数量最多; 在单用明胶铺板或 1% FBS 存在的条件下细胞也贴壁, 但数目较少; 在无明胶铺板和无 FBS 存在的条件下细胞不贴壁 (图 2)。为此, 本研究优选含 1% FBS 的 StemPro34 培养基及 0.2% 明胶铺板的条件来分离体细胞, 以获得较好的分离效果。原代细胞在上述条件下贴壁 12 h 后, 将不贴壁细胞转移至新的明胶板上继续培养 24 h, 再重复分选 1 次后转至饲养层细胞上培养。



A. DBA/2 乳鼠 (6~8 天龄); B. 成年鼠 (26~28 周龄), 箭头指 A 型精原细胞

A. DBA/2 neonatal mice (6-8 days of age); B. adult mice (26-28 weeks), arrow: type A spermatogonial cell

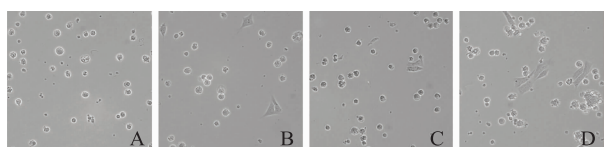
图 1 乳鼠和成年鼠曲细精管解剖结构的比较 (HE,  $\times 200$ )

Fig 1 Comparison of the seminiferous tubules structure between neonatal and adult mice (HE,  $\times 200$ )

**明胶及层黏连蛋白对精原细胞生长的影响** 将上述贴壁分选3次后的精原细胞分别转至层黏连蛋白和明胶铺板的24孔板中培养72h后观察。结果显示,在层黏连蛋白铺板的条件下,细胞形成细胞团,贴壁细胞较少(图3A),但随着培养时间的延长细胞增殖减慢,故层黏连蛋白铺板不适合于精原细胞的长期培养。在明胶铺板的条件下,细胞团较少,贴壁细胞较多且呈梭形(图3B),说明残留的体细胞过度生长。

**饲养层细胞的制备** 选取精原细胞分离后的睾丸体细胞作为SSCs生长时的饲养层细胞,为了防止体细胞的过度生长,首先将体细胞运用MMC处理,再接种精原细胞,结果显示睾丸体细胞在体外生长5代左右后,细胞形态变得扁平,增殖减慢(图4)。故本研究选取传代3~4次左右的体细胞作为饲养层细胞。

**原代细胞的传代培养** 将在明胶上分选3次后的精原细胞接种到MMC处理后的体细胞上生长,以不含FBS的StemPro34为培养基。结果显示,精原细胞在体外培养2~3d后,可见较多串珠样细胞,细胞间有胞质桥相连(图5A);5~7d左右可见小的细胞簇,这些细胞簇形态不规则,有些轮廓不清(图5B);13d左右可见较多圆形或椭圆形的细胞团(图5C、D),



A. 空白板、无血清; B. 空白板、1%血清; C. 0.2%明胶铺板、无血清; D. 0.2%明胶铺板、1%血清

A. blank plate, without serum; B. blank plate, with 1% serum; C. plate coated with 0.2% gelatin, without serum; D. plate coated with 0.2% gelatin, with 1% serum

图2 不同培养条件对原代细胞贴壁性能的影响(×100)

Fig 2 Effects of different culture conditions on the binding ability of primary cells (×100)

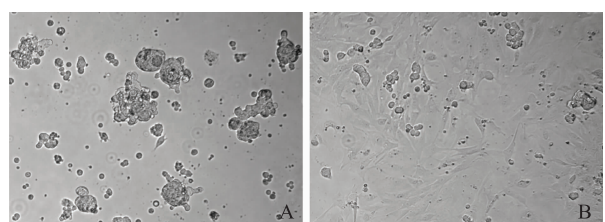
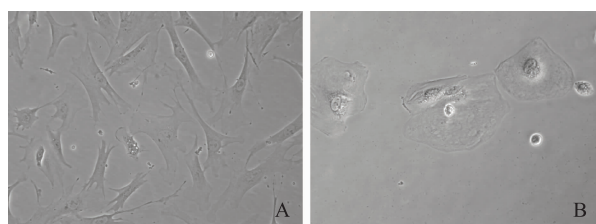


图3 层黏连蛋白(A)及明胶(B)对精原干细胞生长的影响(×100)

Fig 3 Effects of laminin (A) and gelatin (B) on the growth of spermatogonial stem cells (×100)

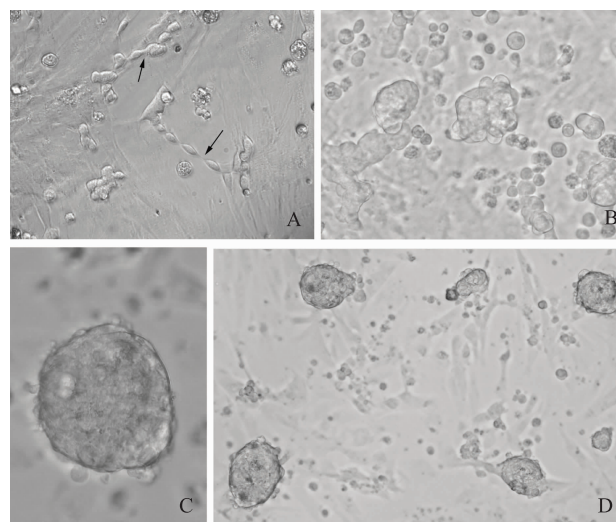


A. 第2代; B. 第5代

A. the 2nd generation; B. the 5th generation

图4 不同培养代数的睾丸体细胞(×200)

Fig 4 Testicular somatic cells of different generations (×200)



A. 培养2d后(箭头:胞质桥,×200); B. 培养6d后(×200); C. 培养13d后(×200); D. 培养13d后(×100)

A. 2 days after culture (arrow; cytoplasmic bridge, ×200); B. 6 days after culture (×200); C. 13 days after culture (×200); D. 13 days after culture (×100)

图5 精原细胞在饲养层细胞上培养不同时间后的细胞形态

Fig 5 Morphology of spermatogonial cells after different culture time on feeder cells

直径在100 μm左右。统计细胞球数量,可作为药物对SSCs杀伤活性的指标。这些克隆运用胰蛋白酶消化成单细胞后,可继续在饲养层细胞上增殖至少1个月。

**免疫荧光检测干细胞相关标记物的表达** 运用免疫荧光法对培养的SSCs进行鉴定,结果显示,在精原细胞形成的细胞球中GFRα1及VASA高表达,而支持细胞中则表达较低(图6)。在A<sub>s</sub>、A<sub>pr</sub>、A<sub>al</sub>(4)及A<sub>al</sub>(8→16)各期细胞中,均有CD44表达(图7A、B);在精原细胞形成的早期细胞球中,大多数细胞均表达CD44(图7C);而在较大的细胞球中,仅中心部位的细胞表达CD44,边缘细胞表达较低(图7D),支持细胞中几乎不表达CD44(图7A)。



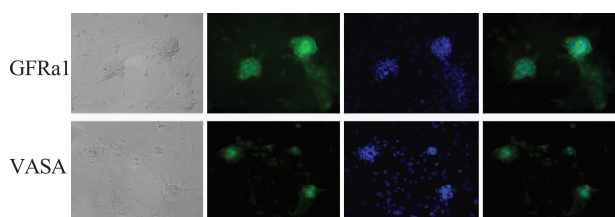
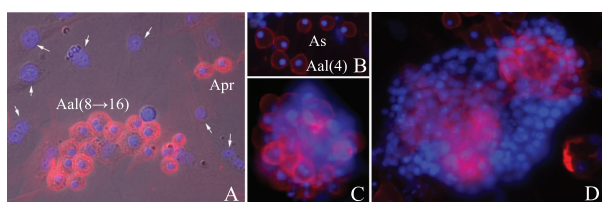


图6 免疫荧光法检测 GFR $\alpha$ 1 及 VASA 在细胞球中的表达, 从左至右依次为相差、抗体染色、Hoechst 33342 染色及抗体和 Hoechst 33342 染色的合并 ( $\times 200$ )

Fig 6 Detection of the expressions of GFR $\alpha$ 1 and VASA in cell clusters using immunofluorescence, from left to right: phase, antibody staining, Hoechst 33342 staining, merged image of antibody and Hoechst 33342 staining ( $\times 200$ )



A. A<sub>pr</sub>、A<sub>al</sub> (8 $\rightarrow$ 16) 及体细胞 (箭头) (相差、Hoechst 33342 及抗体染色); B. A<sub>al</sub> (4) 及 A<sub>s</sub> (Hoechst 33342 和抗体染色); C. 早期细胞球 (Hoechst 33342 和抗体染色); D. 较大细胞球 (Hoechst 33342 和抗体染色)

A. A<sub>pr</sub>, A<sub>al</sub> (8 $\rightarrow$ 16) and somatic cells (arrow) (phase, Hoechst 33342 and antibody staining); B. A<sub>al</sub> (4) and A<sub>s</sub> (Hoechst 33342 and antibody staining); C. early stage of cell cluster (Hoechst 33342 and antibody staining); D. large cell cluster (Hoechst 33342 and antibody staining)

图7 CD44 在不同发育时期的精原细胞中的表达 ( $\times 200$ )

Fig 7 Expression of CD44 on different developmental stage of spermatogonial cells ( $\times 200$ )

## 讨 论

SSCs 与 CSCs 在分子表型上具有很多相似性, 如都表达干细胞标记物 CD90 (Thy-1)<sup>[2-3]</sup> 和 CD133<sup>[4-5]</sup>, 本研究结果也显示 SSCs 表达 CSCs 标记物 CD44。为筛选和研制作用于 CSCs 的新型药物, SSCs 是值得关注的、可利用的模拟生物学模型。SSCs 属于 A 型精原细胞, 在精子生成的各种细胞系列中所占比例很小, 在成年小鼠睾丸的曲细精管中, 一般每个横切细精管中仅见 1~2 个 A 型精原细胞。组织切片曲细精管中所见的 A 型精原细胞中, 包括 A<sub>s</sub> (single)、A<sub>pr</sub> (paired)、A<sub>al</sub> (aligned)、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub> 等多个阶段的细胞<sup>[11]</sup>, 其中属于 A<sub>s</sub> (SSCs) 的数量更少, 因此, 难以直接利用体内的 SSCs 作为模型观察药物的作用。体外培养的

SSCs 会形成克隆, 统计克隆的数目, 可判定药物对 SSCs 的杀伤活性, 这将有助于筛选和研制作用于 CSCs 的新型抗肿瘤药物。同时, 体外培养的 SSCs 还能用于评价药物对生殖细胞的细胞毒活性。

原代精原细胞制备过程中, 消化酶的选择至关重要, 既要保证消化的效率, 又要保证细胞的存活率。不同的研究者采用了不同的消化方法, 分散酶、胰蛋白酶及 IV 型胶原酶是常用的几种消化酶, 有研究单用或将两种或多种酶联合, 运用两步法消化以获得单个精原细胞<sup>[9-10,12]</sup>。本研究结果表明, 在常规酶浓度下, 胰蛋白酶的消化效率最高, 且细胞坏死率与其他两种酶相当, 故选取胰蛋白酶作为本研究的消化酶。

目前常用的 SSCs 富集方法有: 差异贴壁法<sup>[9-10]</sup>、磁激活分选<sup>[2]</sup>、流式细胞分选<sup>[2,13]</sup> 及隐睾手术富集法<sup>[14]</sup>。差异贴壁法具有简单高效的特点, 其分选的关键是要保证睾丸体细胞的充分贴壁而精原细胞不贴壁。由于高浓度的血清会导致 SSCs 的分化<sup>[2,15]</sup>, 无血清的条件下体细胞贴壁不充分, 故本研究在 1% FBS 的条件下分离 SSCs, 而在随后的培养中则去除血清。

SSCs 的体外培养需要饲养细胞层的支持。不同研究者采用不同的饲养层细胞, 如 MEF (mouse embryonic fibroblasts) 细胞<sup>[9-10]</sup>、STO (SIM mouse embryonic derived thioguanine and ouabain resistant) 细胞<sup>[2]</sup> 等。本研究尝试运用 MMC 处理后的睾丸体细胞作为饲养层细胞, 结果显示精原细胞在体细胞上生长良好, 呈现出精原细胞生长的典型特征, 说明 MMC 处理后的睾丸体细胞能够支持 SSCs 的生长。由于分离精原细胞时即可获得睾丸体细胞, 相比 MEF 等常用的饲养层细胞, 睾丸体细胞具有制备简单的特点。

小鼠中 SSCs 的发育顺序为 A<sub>s</sub>-A<sub>pr</sub>-A<sub>al</sub>-A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub>-I-B-Spc<sup>[11]</sup>。A<sub>s</sub> 细胞为 SSCs, A<sub>pr</sub> 及 A<sub>al</sub> 细胞是未分化的精原细胞。A<sub>s</sub> 细胞能够自我更新, 并分裂形成 A<sub>pr</sub> 型精原细胞。A<sub>pr</sub> 细胞有丝分裂产生有明显细胞质间桥连接的 A<sub>al</sub> (4)、A<sub>al</sub> (8) 及 A<sub>al</sub> (16) 型精原细胞, 以后不断分化产生各级生精细胞。本研究显示, 在 A<sub>s</sub>、A<sub>pr</sub> 及 A<sub>al</sub> 细胞中 CD44 均有表达, 而睾丸体细胞中则几乎不表达; 在精原细胞形成的较大的细胞球中, 则只有位于中心部位的细胞表达, 说明精原细胞出现了分化。CD44 也常用作 CSCs 的标记物<sup>[16]</sup>, 本研究进一步说明了 SSCs 与 CSCs 分子特征的相似性。

本研究运用胰蛋白酶为消化酶, 在 0.2% 明胶铺板、以 StemPro34 为基础培养基和含 1% FBS 的条件下, 利用睾丸体细胞和精原细胞贴壁性能的差异分离

精原细胞, 分离的精原细胞在以 MMC 处理后的睾丸体细胞作为饲养层的条件下生长良好, 13d 左右可形成明显的细胞球, 在形成的细胞球中, SSCs 标记物 GFR $\alpha$ 1 及 VASA 特异表达, 初步建立了一套简单高效的小鼠 SSCs 分离培养体系, 并报道了 CSCs 标记物 CD44 在发育早期的精原细胞中的表达。

## 参 考 文 献

- [1] Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, et al. Cancer stem cells: an evolving concept [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(2): 133-143.
- [2] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(3): 722-731.
- [3] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90<sup>+</sup> cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2):153-166.
- [4] Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis [J]. *Nature*, 2008, 456(7220):344-349.
- [5] Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(8):1127-1134.
- [6] 李毅, 陈淑珍, 甄永苏. 六种抗肿瘤药物影响小鼠精子生成过程的定量组织学比较 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2007, 21(1):34-38.
- [7] de Rooij DG. Stem cells in the testis [J]. *Int J Exp Pathol*, 1998, 79(2):67-80.
- [8] Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF [J]. *Science*, 2000, 287(5457):1489-1493.
- [9] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(2):612-616.
- [10] Shen F, Zhang C, Zheng H, et al. Long-term culture and transplantation of spermatogonial stem cells from BALB/c mice [J]. *Cells Tissues Organs*, 2010, 191(5):372-381.
- [11] Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(3):275-282.
- [12] Wu Z, Luby-Phelps K, Bugde A, et al. Capacity for stochastic self-renewal and differentiation in mammalian spermatogonial stem cells [J]. *J Cell Biol*, 2009, 187(4):513-524.
- [13] Lo KC, Brugh VM 3rd, Parker M, et al. Isolation and enrichment of murine spermatogonial stem cells using rhodamine 123 mitochondrial dye [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(3): 767-771.
- [14] Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models [J]. *Dev Biol*, 2000, 220(2):401-411.
- [15] Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(4): 985-991.
- [16] Badve S, Nakshatri H. Breast-cancer stem cells-beyond semantics [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(1):e43-e48.

(收稿日期: 2012-08-15)