



小鼠精原干细胞体外培养体系建立及功能鉴定

张仙玉^{1,2}, 赵鑫², 李国玲², 邢萍萍², 李紫聪², 杨化强², 吴珍芳^{2*}, 陈斌^{1*}

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128;

2. 华南农业大学动物科学学院, 国家生猪种业工程技术研究中心, 广州 510642)

摘要:旨在通过探索 ICR 品系小鼠精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)的体外稳定培养,为别的品系小鼠和大动物的 SSCs 体外培养提供参考。本研究采集 6~8 日龄 ICR 乳鼠的睾丸,用两步酶消化法(胶原酶和胰蛋白酶)和差速贴壁法来纯化 SSC 细胞。用不同的饲养层(小鼠胎儿成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, mEF)作为饲养层和层粘连蛋白与多聚赖氨酸联合铺板),不同的培养基(StemPro-34 培养基和 DMEM 培养基),添加不同的生长因子(GDNF、LIF、EGF、bFGF、IGF1)来观察体外 SSCs 的生长。将传代至第 6 代的 SSCs 用免疫染色法和分子检测法来评估细胞增殖。最后将稳定增殖的 SSCs 移植到受体睾丸中进行功能鉴定。结果显示,通过两步酶消化法和差速贴壁法获得纯度约 79% 以上的 SSCs 细胞;mEF 作为饲养层,StemPro-34 作为培养基,组合添加 GDNF、LIF、EGF、bFGF、IGF1 生长因子能促进 SSCs 的体外长期培养;SSCs 克隆集落用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)染色、PLZF 和 UCHL1 蛋白免疫荧光检测均显示为阳性,用反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和荧光实时定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测显示,克隆集落高表达多能基因和自我更新基因,说明体外培养的 SSCs 实现了稳定增殖;SSCs(带有报告基因 EGFP)移植到受体睾丸后,受体附睾中精子头部发出绿光,证明精子为供体 SSCs 来源。研究表明,本试验中的培养体系适用于 ICR 品系小鼠的体外培养,且稳定培养后的 SSCs 具有正常生物学功能。本研究为别的品系小鼠和大动物 SSCs 的体外培养提供了参考和借鉴。

关键词: SSCs;体外培养;细胞增殖;功能鉴定

中图分类号:S814.1

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2021)02-0408-12

Establishment of the Culture System *in Vitro* and Functional Identification of Mouse Spermatogonial Stem Cells

ZHANG Xianyu^{1,2}, ZHAO Xin², LI Guoling², XING Pingping²,

LI Zicong², YANG Huaqiang², WU Zhenfang^{2*}, CHEN Bin^{1*}

(1 College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2 National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The objective of the present study was to provide a reference for *in vitro* culture of spermatogonial stem cells (SSCs) for other strain mice and megafauna by exploring the SSCs stable culture from ICR strain mice. Testes were harvested from 6-8 days old postpartum ICR male pups and digested using a two-step enzymatic (collagenase and trypsin) digestion protocol, then

收稿日期: 2020-08-03

基金项目: 国家科技重大专项(2016zx08006002); 国家自然科学基金(31772555)

作者简介: 张仙玉(1983-), 女, 苗族, 广东肇庆人, 博士生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: 1569206967@qq.com

* 通信作者: 陈斌, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: chenbin7586@126.com; 吴珍芳, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: wzfemai@

SSCs were purified by differential adherent method. The growth of SSCs *in vitro* culture was detected by using different feeder layers (mouse embryonic fibroblasts as feeder layer or laminin combined with polylysine), different media (StemPro-34 medium or DMEM medium) and different growth factors (recombinant rat glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF), recombinant mouse leukemia inhibitory factor (LIF), epidermal growth factor (EGF), recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factors-1 (IGF1)). Proliferation of SSCs in the F6 was evaluated by immunostaining and molecular detection. Finally, stable proliferative SSCs *in vitro* were transplanted into recipient testes for functional identification. The results showed that SSC cells with purity higher than 79% could be achieved by two-step enzymatic digestion and differential adherent method; Using mouse embryonic fibroblasts as feeder layer, StemPro-34 as base medium, and adding GDNF, LIF, EGF, bFGF, IGF1 composite growth factors, the proliferation and long-term culture of SSCs *in vitro* were observed. SSC colonies showed positive signals by alkaline phosphatase (AKP) immunostaining, and promyelocyte leukemia zinc-finger factor (PLZF) and ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1) immunofluorescence detection. Moreover, the high expression of pluripotent and self-renewal genes in colonies indicated the stable proliferation of SSCs by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) testing. After transplanting SSCs (with the enhanced green fluorescent protein (EGFP) reporter gene) into recipient testes, the heads of sperm in the epididymides emitted green light, indicating the sperm originated from the donor-SSCs. The results illustrated that the culture system obtained in this study was suitable for SSCs *in vitro* culture of ICR strain mice, and cells cultured *in vitro* had normal biological function. This study provided a reference for *in vitro* culture of spermatogonial stem cells of other strain mice and megafauna.

Key words: SSCs; culture *in vitro*; cell proliferation; functional identification

* **Corresponding authors:** CHEN Bin, E-mail: chenbin7586@126.com; WU Zhenfang, E-mail: wzfemail@163.com

精子发生周期贯穿雄性的整个生命过程,从精原干细胞开始直到精子的形成,而精原干细胞(SSCs)在维持这一周期不断交替进行中起着至关重要的作用。它是体内唯一能将遗传信息传递给下一代的成体干细胞,被应用在转基因育种、物种的保种及生殖疾病治疗等各个研究领域。它的数量非常稀少,在鼠中 SSCs 仅占生殖细胞的 0.3%,比人类(22%)要少的多^[1]。所以对它的研究均建立在体外培养并富集后的 SSCs 样细胞基础上。而目前在大动物身上实现体外长期培养还很难。非啮齿类实现了生殖细胞集落的第一次长期培养并具有 SSCs 潜能的动物是兔^[2]。然而除了兔以外,非啮齿类其他动物 SSCs 长期培养体系的开发尚未成功,家畜的 SSCs 长期培养仍处于起步阶段^[3]。到目前为止,人类 SSCs 的体外培养似乎并没有找到维持和增殖的最佳条件^[4-5]。事实上,即使是小鼠的生殖系

干细胞(germline stem, GS)培养基的配方也还没有得到优化^[6]。甚至不同品系的小鼠其 SSCs 体外培养效果也不同^[7]。由此可见,目前,精原干细胞的体外培养还存在很多局限,一方面在于 SSCs 的来源,不同物种来源的 SSCs 其体外培养的难易程度不同。总体来说,啮齿类动物 SSCs 体外培养的难度要小,大动物及人类 SSCs 体外培养的难度大,这可能与睾丸微环境调控精原干细胞增殖和分化关键因子的确定有关,大动物上有待寻找到这些关键因子。据文献报道,啮齿类动物 SSCs 体外培养的效果与收获的 SSCs 是何种品系来源有关,杂交品系 B6D2F2 体外培养效果没有近交品系 C57BL/6J 明显,可能是由于睾丸微环境中体细胞对 SSCs 调控的影响^[8-9]。另一方面在于饲养层和培养体系,为了对分离纯化的精原干细胞进行长期体外培养,使用适宜的培养基(如 DMEM、DMEM/F12、Stem-

Pro34 等), 添加合适的生长因子(如 GDNF、LIF、bFGF、IGF1、EGF 等), 取舍胎牛血清以及饲养层细胞(如 STO (SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant) 或 mEF) 似乎是必要的^[10-12]。很多体外培养成功的报道是基于标志蛋白的检测, 如 SSCs 阳性标记 GDNF 家族受体 α -1 (GDNF family receptor alpha-1, GFRA1)、泛素羧基末端水解酶-1 (ubiquitin C-terminal hydrolase 1, UCHL1)、早幼粒细胞白血病锌指蛋白 (promyelocyte leukemia zinc finger factor, PLZF)、受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RET)、B 细胞/淋巴瘤 6B (B cell CLL/lymphoma 6B, BCL6B)、分化抑制剂 4 (inhibitor of differentiation 4, ID4)、B 细胞特异性小鼠白血病病毒整合位点 1 (B cell-specific moloney murine leukemia virus integration site 1, BMI1) 等^[13-19], 阴性标记如 v-kit 细胞同源 (cellular homolog of v-kit, C-KIT)、染色体结构维持 6 (structural maintenance of chromosomes 6, SMC6)、DEAD 盒多肽 4 (DEAD box polypeptide 4, DDX4, also known VASA) 等^[20-22]。这些蛋白都有助于区分 SSCs, 但是值得注意的是, 标志蛋白通常鉴定到的是未分化的精原细胞, 并不是特定于 SSCs。表达这些标志物的细胞移植后是否还能形成增殖的细胞集落, 将是体外培养后需要解答的首要问题^[23]。事实上, 只有 1%~2% 的培养物细胞在移植后还能产生集落^[24]。由于目前还没有特定的 SSCs 标志基因, 生殖细胞移植被认为是鉴定体外培养 SSCs 样细胞功能的金标准。

本研究通过对培养条件和体系进行优化, 在体外实现 ICR 小鼠 SSCs 的稳定培养, 并通过移植验证 SSCs 的生物学功能。这可为别的品系小鼠 SSCs 体外培养提供重要参考。另外, 来自不同物种 SSCs 的特性是相似的, 大动物乃至人类精原干细胞的培养经验都是从啮齿类动物的培养中借鉴而来, 本研究也可为大动物及人类 SSCs 的体外培养提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

ICR 乳鼠购自广东省医学实验动物中心; 小鼠胎儿成纤维细胞 (mEF)、内源性生殖细胞消融的受体小鼠均为华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心提供; StemPro-34 无血清培养基为 Invitro-

gen 公司产品; 重组人白血病抑制因子 (LIF) 为 Milipore 产品; 重组大鼠胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 为 RD 产品; 重组人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、胰岛素样生长因子 (IGF1)、小鼠表皮生长因子 (EGF) 均为 Novus 产品; 泛素羧基末端水解酶-1 (UCHL1) 小鼠单克隆抗体为 Proteintech 产品; 早幼粒细胞白血病锌指因子 (PLZF) 小鼠单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品; Anti-Mouse IgG (Alexa Flour 488) 为 CST 产品; 慢病毒颗粒细胞感染 (LPP-EGFP-Lv156-400) 试剂盒为广州易锦生物技术有限公司产品。

1.2 小鼠睾丸细胞的分离

取 6~8 日龄新生 ICR 乳鼠的睾丸, 用两步酶消化法进行消化, 即先用胶原酶 IV (工作液浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 DNase I (工作液浓度为 $20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 37°C 消化 10 min, 使曲细精管分散; 再用 0.25% 胰蛋白酶和 DNase I ($20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 继续 37°C 消化 5 min, 使曲细精管充分消化, 睾丸单细胞形成。用 $40 \mu\text{m}$ 孔径的尼龙细胞筛过滤单细胞悬液。滤液用血球计数板统计睾丸单细胞活力。

1.3 小鼠 SSCs 的纯化

将上述得到的睾丸单细胞悬液进行 5 次差速贴壁处理, 即将睾丸单细胞悬液接种在一个 6 cm 的细胞培养皿中, 放在 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养。每隔 1 h 收集尚未贴壁的细胞悬液, 重新接入一个新的 6 cm 的细胞培养皿中继续培养。如此重复操作, 至最后一次差速贴壁完, 将收集到的未贴壁细胞转入一个新的 6 cm 培养皿中继续过夜培养。第 2 天, 收集到的未贴壁的细胞悬液即为纯化后的 SSCs 细胞。

1.4 饲养层的制备

F3 代的 mEF 细胞培养到 95% 汇合时, 加丝裂霉素 C 溶液进行处理。设置 4 个浓度梯度, DMEM/F12 培养基中丝裂霉素 C 的含量分别为 0、10、20、30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。各组于 37°C 细胞培养箱中孵育 5 h 后进行换液, 换为正常的完全培养基 (DMEM/F12 + 10% FBS) 继续培养。第 2 天用 96 孔板进行传代。设置了 3 个时间点收集细胞, 分别是传代培养后第 1、3、5 天, 用 MTT 法检测细胞增殖情况, 确定最佳处理浓度, 并将用它处理之后的 mEF 作为 SSCs 饲养层。另外, 用多聚赖氨酸 (polylysine, PLL) 和层粘连蛋白 (laminin) 联合铺板 (PLL-L) 用于体外 SSCs 的培养, 即加多聚赖氨酸

酸溶液到一个 6 cm 培养板上,将板放入细胞培养箱中孵育 4 h 后倒掉孵育液,加入层粘连蛋白工作液,继续孵育 1 h 后倒掉孵育液,将板放在培养箱中备用。

1.5 用不同的体系来培养小鼠 SSCs 细胞

分别用 DMEM/F12 和 StemPro-34 作为培养基,两种培养基中均加入 2% 的血清替代物 B27 和 1% 的谷氨酰胺来培养 SSCs,并在培养后 24 h 观察 SSCs 的增殖情况,以此来评估两种培养基对 SSCs 体外培养的效果。用 StemPro-34(添加 B27 和谷氨酰胺)作为基础培养基,添加不同的生长因子:20 ng · mL⁻¹ GDNF、10 ng · mL⁻¹ LIF、10 ng · mL⁻¹ EGF、10 ng · mL⁻¹ bFGF、10 ng · mL⁻¹ IGF1,在 SSCs 体外培养 4 d 后,用 MTT 法检测细胞增殖,来评估生长因子的添加效果。

1.6 小鼠 SSCs 体外增殖的免疫法检测

收集饲养层上增殖的 SSCs,用 4% 多聚甲醛溶液固定后,按照 AKP 显色试剂盒说明书来进行免

疫显色,显微镜下观察 SSCs 细胞状态。同样,对多聚甲醛溶液固定后的 SSCs 分别进行通透化处理、封闭、一抗孵育(PLZF 和 UCHL-1 抗体均用一抗稀释液 1 : 200 进行稀释)、二抗孵育、Hochest33342 细胞核复染,最后在荧光显微镜下观察细胞增殖情况。

1.7 小鼠 SSCs 体外增殖的分子检测

收集饲养层上增殖的 SSCs,按照 Eastep[®] Super 总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA。按照 TaKaRa 说明书进行 cDNA 的合成。以合成的 cDNA 为模板,以 $\beta actin$ 为内参基因,对培养的 SSCs 的自我更新基因及生殖标志基因等进行 RT-PCR 检测,检测基因及引物序列见表 1。同时,以培养前的 SSCs 为对照,实时定量分析培养后的 SSCs 中多能基因 *SOX2* 和自我更新基因 *C-RET*、*GFRA1*、*UCHL1*、*BCL6B* 的表达水平。每个样品 3 个重复。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算。qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR(qRT-PCR)引物

Table 1 The primer sequences for RT-PCR(qRT-PCR)

基因 Gene	序列(5'→3') Primer sequence	产物片段/bp Product size	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>$\beta actin$</i>	F: TGCTGTCCCTGTATGCCTCT R: ATGTCACGCACGATTTCC	214	60(60)
<i>BCL6B</i>	F: GCGTGTCCACCGTTTCAT R: ACTGCCTGGTGGAGCGACTG	155	55(60)
<i>C-RET</i>	F: ACTGGAAAGAAGTGACCCACATGA R: GCTTCTTACCCTGTTCTG	103	60(60)
<i>ETV5</i>	F: GCCTTGTTTTCTTTTTCTTTTCAGT R: GCTCTACCTGTGCGTGA	93	55(60)
<i>GFRA1</i>	F: ATCCCTTTCCATTTTGCTGGCGTCC R: CATCCTGGGCTCCTTCCT	193	55(60)
<i>NANOG</i>	F: GAGGATGAGACAGAAGGACCAGGAG R: GGACAAGCAAGCACCT	165	55
<i>OCT4</i>	F: ACCACCATCTGTCGCTTCG R: GTTCTCATTGTTGTCGGCTTCC	105	60
<i>PLZF</i>	F: CTGTGGCAAGAAGTTCAGCCTCAAG R: CACTGGTATGGCGAGGC	162	64.3
<i>SOX2</i>	F: CCTACATGAACGGCTCGCCACCTA R: GCCTCGGACTTGACCACAG	100	60(60)
<i>TAF4B</i>	F: GTTTGCGTGGAGTCTGTG R: AGGGCTGCCGAGTTTAGG	184	60
<i>UCHL1</i>	F: CCTTCCCTGGCAGGTGCGCGCGGC R: GGCTGTAGAACGCAAGAA	86	55(60)
<i>VASA</i>	F: TTGGGACTTGTGTAAGAGCTGTGGT R: CTTGACTTGTGTTGAGGC	155	60

1.8 小鼠 SSCs 的传代与冻存

当 SSCs 克隆团增殖到一定的密度或者克隆团长势异常时,进行传代培养。首先,进行换液,随后,拧紧细胞培养瓶的瓶盖,轻轻晃动培养液,显微镜下观察克隆团是否脱离饲养层。然后,将尚未脱离下来的团块,用枪头轻轻地反复吹打,显微镜下观察是否吹打干净。最后,将细胞悬液转移至一个新的接种了饲养层的细胞培养瓶中,于 CO₂ 培养箱中继续培养,每培养 1 周左右进行再次传代。也可以根据需要进行常规的细胞冻存方法对 SSCs 进行冻存处理。

1.9 小鼠 SSCs 生物学功能的检测

在 SSCs 传代至第 6 代时,收集饲养层上的 SSCs,用慢病毒感染使其带有 EGFP 报告基因。首先,轻轻吹散克隆团细胞,在 1 mL(细胞数约为 2.5×10^4)细胞悬液中加入 10 μ L 慢病毒包装载体 (1×10^8 TU \cdot mL⁻¹),用枪头轻轻混匀。接着,将混合溶液转移到 12 孔板的一个孔,孔里有层粘连蛋白与多聚赖氨酸的联合铺板,可短时期内支持 SSCs 的贴壁生长。然后,将培养板放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h。孵育结束后,丢弃孵育液,加 DPBS 洗涤细胞,并用枪头在 DPBS 中轻轻吹打,直到所有细胞漂浮。收集悬浮液到 15 mL 离心管中,300 g 离心 5 min。离心结束丢弃上清,用 HBSS 溶液 200 μ L 重悬细胞。移植细胞悬液到 ETV5 基因敲除后内源性生殖细胞消融的受体小鼠睾丸中。移植后 2 个月采集附睾,观察精子的形成及检测精子来源。

1.10 小鼠睾丸组织的苏木素伊红染色和免疫组织化学处理

采集不同周龄的 ICR 小鼠新鲜睾丸,将其制作成石蜡切片后,先后进行苏木素伊红(hematoxylin-eosin, H. E.)染色和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)处理。将石蜡切片依次进行脱蜡至水、苏木素染色、伊红染色、脱水封片制作成 H. E. 染色切片,随后显微镜镜检;同样,将石蜡切片依次进行脱蜡至水、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭、一抗孵育(PLZF)、二抗孵育、DAB 显色、细胞核的苏木素复染制作成 IHC 切片,最后显微镜镜检、分析。

1.11 统计学分析

每个组别均至少包含 3 个生物学重复。所有数据均以“平均数 \pm 标准误(mean \pm S. E. M)”来表示。采用 SPSS Statistics 22 软件对数据进行统计学分

析。两组数值比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著(用 * 表示), $P < 0.01$ 表示差异极显著(用 * * 表示)。3 组及以上的数值比较采用单因素方差分析, $P < 0.01$ 表示差异极显著(用不同字母 A、B、C、D、E 表示)。

2 结果

2.1 小鼠生殖细胞的发育

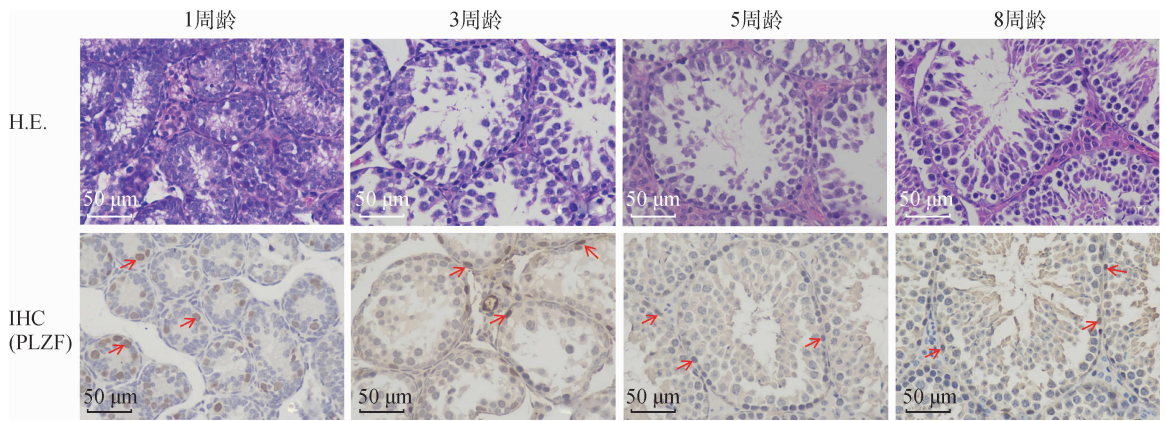
由图 1 可以看出,小鼠 1 周龄时,生殖细胞(含 SSCs)基本定位在基底膜,管腔中几乎没有发育的细胞;3 周龄时管腔中的细胞增多;5 周龄时各级生殖细胞增多,管腔中开始有精子的形成;8 周龄时管腔中已经有大量的精子。纵观各个周龄发育中的生殖细胞数量,SSCs 均占比很少,而在乳鼠阶段(1 周龄左右),睾丸中生殖细胞最单一,最有利于 SSCs 的纯化。

2.2 小鼠精原干细胞的分离与纯化

用两步酶消化法获得睾丸单细胞悬液(图 2A),统计细胞活力为 $(99.27 \pm 0.70)\%$ 。睾丸单细胞悬液差速贴壁处理后,对留下来的未贴壁细胞进行免疫荧光染色,PLZF 蛋白标记的细胞显示为绿色,被统计为 SSCs 细胞(图 2B)。随机选取 6 个视野,分别统计 PLZF 蛋白标记的细胞数和 Hoechst33342 染核的细胞总数,前者与后者的比值计为 SSCs 的纯度。统计到的差速贴壁后 SSCs 的纯度为 $(79.30 \pm 1.56)\%$ 。

2.3 小鼠精原干细胞体外培养饲养层的优化

4 组不同浓度的丝裂霉素 C 孵育液处理 F3 代的 mEF 细胞后,用 MTT 法检测细胞增殖情况(图 3A)。以无药物处理组于体外培养 1 d 的细胞数为对照组。结果显示,无药物处理组,相比第 1 天的细胞增殖,培养到第 3 天时细胞增殖数达到极显著水平($P < 0.01$);相比如对照组,10 μ g \cdot mL⁻¹ 处理组在第 1 天时细胞数量极显著减少($P < 0.01$),第 3 天时细胞数量增多,第 5 天时细胞生长状态良好,细胞数量没有明显变化;20 μ g \cdot mL⁻¹ 组前 3 d 细胞数量无明显变化,到第 5 天时部分细胞生长状态不佳,细胞开始出现死亡;30 μ g \cdot mL⁻¹ 处理组在第 1 天时,细胞数量就出现极显著减少($P < 0.01$),之后一直在不断减少。故 10 μ g \cdot mL⁻¹ 组为最佳处理浓度,用它处理后的 mEF 细胞作为 SSCs 的饲养层(图 3B)。另外,对比了 mEF 饲养层和 PLL-L 铺板对 SSCs 体外培养的效果。结果显示,在 mEF 饲养

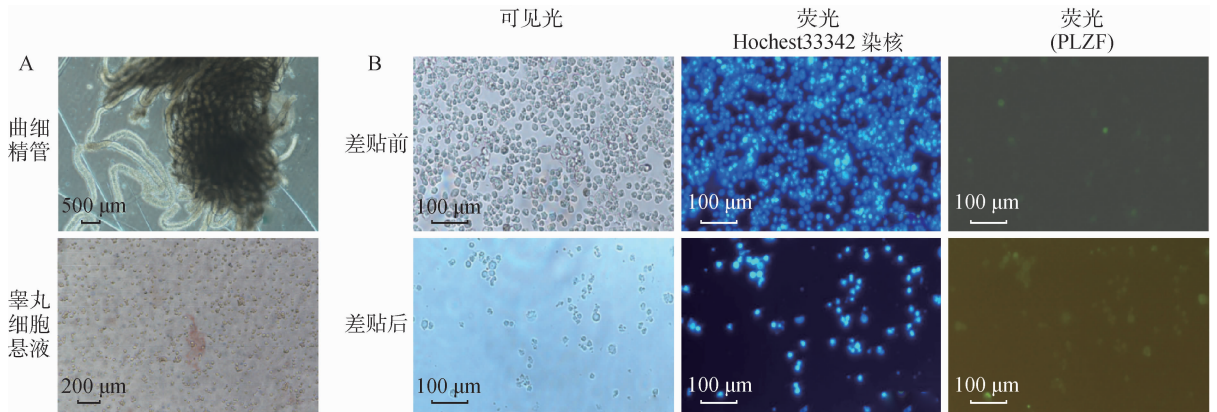


H. E. 苏木素伊红染色;IHC. 免疫组织化学;红色箭头指示精原干细胞

H. E. Hematoxylin-eosin dyeing; IHC. Immunohistochemistry; red arrows indicate spermatogonial stem cells

图 1 不同周龄小鼠生殖细胞发育及 SSCs 定位

Fig. 1 The growth of mouse germ cells and position of SSCs at each week of age



A. 睾丸细胞分离;B. 精原干细胞的纯化

A. Isolation of testicular cells; B. Purification of spermatogonial stem cells

图 2 小鼠睾丸细胞分离与 SSCs 纯化

Fig. 2 Isolation of testicular cells and purification of mouse SSCs

层上培养 2 d 后 SSCs 小小克隆团已经出现,培养 7 d 后克隆团进一步增大(图 3C)。在 PLL-L 板上培养 2 d 后也出现了 SSCs 小小克隆团,但是培养 7 d 后发现克隆团消失,细胞死亡(图 3C)。可见, mEF 作为饲养层优于 PLL-L,后者不能替代 mEF 作为 SSCs 的饲养层。

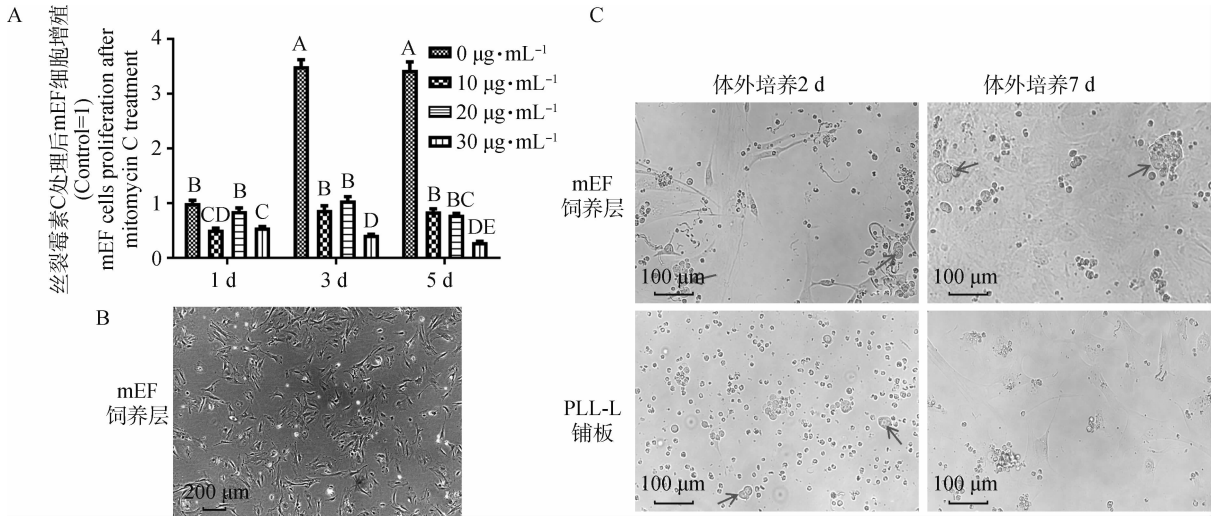
2.4 小鼠精原干细胞体外培养体系的优化

比较了 DMEM/F12 培养基和 StemPro-34 培养基对 SSCs 体外增殖的影响(图 4A),结果显示,在 DMEM/F12 培养基中培养 24 h 后,SSC 细胞几乎全部死亡(图 4A),而在 StemPro-34 培养基中培养 24 h 后的 SSC 细胞存活下来,且出现小小的克隆团(图 4A)。比较了不同生长因子对 SSCs 体外增殖的影响(图 4B),以 StemPro-34 基础培养基(不加

任何因子)培养的细胞为对照组(Control),体外培养 4 d 后统计各组的细胞增殖情况。结果显示,StemPro-34 培养基中细胞增殖缓慢(图 4B)。在加了 GDNF 生长因子之后,细胞增殖迅速(图 4B, $P < 0.01$)。再加了 LIF、bFGF 和 IGF1 之后,细胞增殖均变得迅速(图 4B, $P < 0.01$)。而 EGF 因子的添加对细胞的增殖效果不明显(图 4B, $P > 0.05$)。

2.5 小鼠精原干细胞体外增殖的检测

体外培养 2 和 14 d 后,分别用 AKP 染色检测 SSCs 增殖情况,着色为蓝紫色的细胞被认为是阳性 SSCs。培养初期,SSC 细胞是小小的、圆圆的、孤立的,培养 14 d 后增殖的克隆集落抱团生长,分不清楚单个细胞,克隆集落边缘不整齐,表面凹凸不平,以一种健壮的表现紧紧黏附在饲养层上(图 5A)。

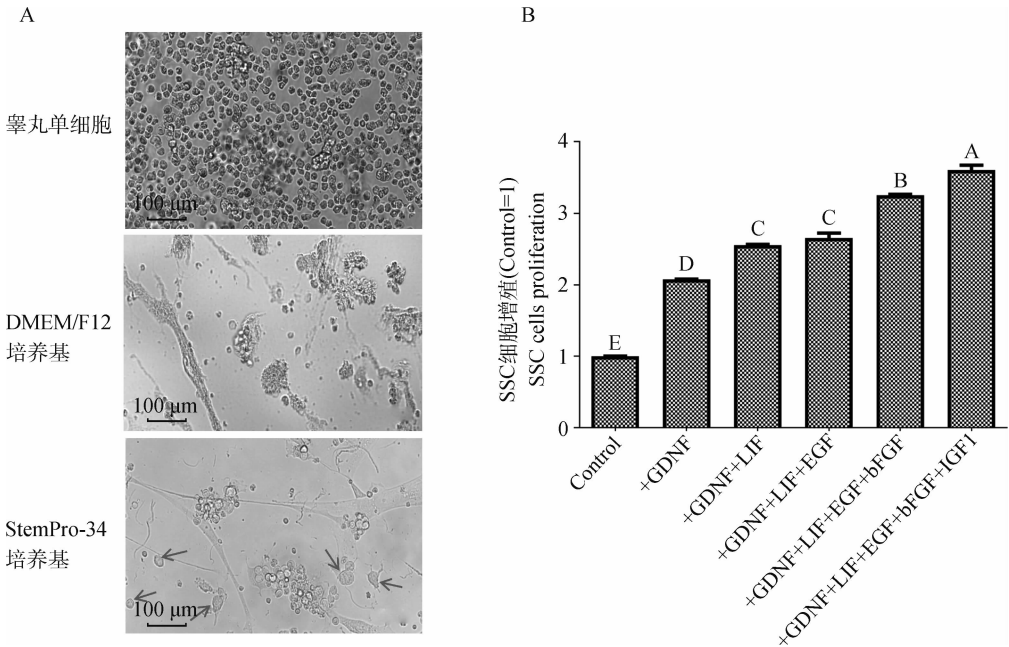


A. 不同浓度丝裂霉素 C 对 mEF 细胞生长的影响 ($n=3$), 不同字母 (A, B, C, D, E) 表示差异极显著 ($P<0.01$), 下同; B. SSCs 接种时的饲养层细胞; C. mEF 和 PLL-L 分别作为饲养层对 SSCs 体外增殖的影响, 箭头指示精原干细胞克隆

A. Effect of mitomycin C with different concentrations on growth of mEF cells ($n=3$), different letters (A, B, C, D, E) represent extremely significant difference ($P<0.01$), the same as below; B. Feeder layer cells for SSCs culture; C. The effect of two feeding layers (mEF and PLL-L) on SSCs proliferation *in vitro*, arrows indicate clone formation of spermatogonial stem cells

图 3 mEF 饲养层的制备及两种饲养层 (mEF 和 PLL-L) 对小鼠 SSCs 增殖的影响

Fig. 3 Preparation of mEF feeder layer and the effects of two feeder layers (mEF and PLL-L) on the proliferation of mouse SSCs



A. 不同培养基对 SSCs 体外增殖的影响, 箭头指示精原干细胞克隆; B. 不同生长因子对 SSCs 体外增殖的影响 ($n=3$), control 代表 StemPro-34 培养基

A. Effects of different media on SSCs proliferation *in vitro*, arrows indicate clone formation of spermatogonial stem cells; B. Effects of different growth factors on SSCs proliferation *in vitro* ($n=3$), control represents StemPro-34 medium

图 4 不同培养体系对细胞增殖的影响

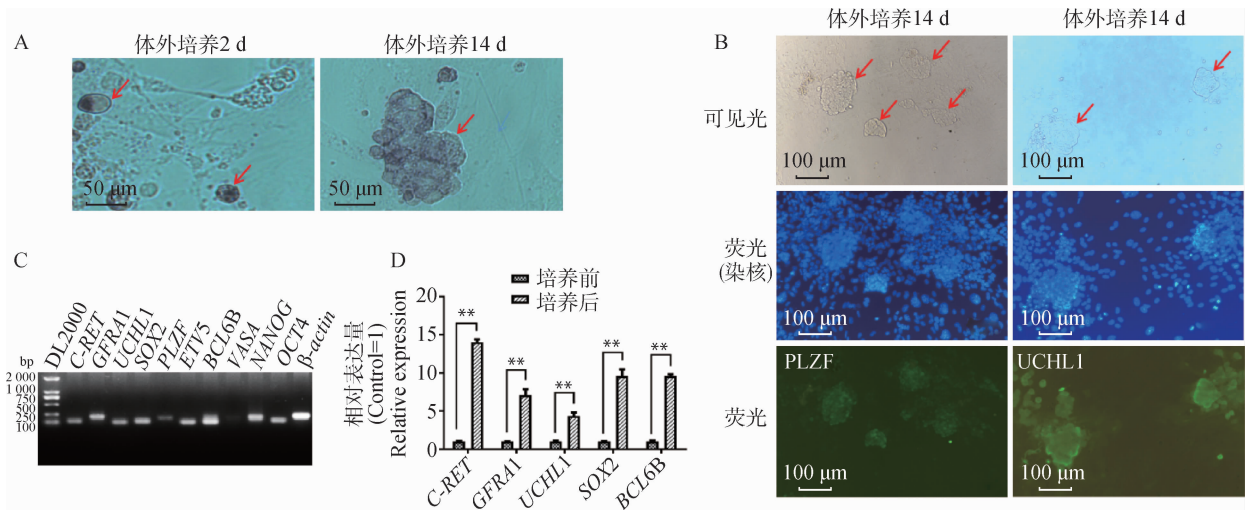
Fig. 4 Effects of different culture systems on SSCs proliferation

抗体免疫荧光染色显示, 这些克隆集落表达 SSCs 自我更新因子 PLZF 和 UCHL1 (图 5B)。提取这些

增殖克隆集落的总 RNA, RT-PCR 检测 SSCs 中多能基因 OCT4、SOX2、NANOG 和自我更新基因

GFRA1、*C-RET*、*UCHL1*、*PLZF*、*ETV5*、*BCL6B* 以及生殖标志基因 *VASA* 的表达。结果显示,培养 14 d 后的 SSCs 集落除了不表达生殖标志基因 *VASA* 外,其余标志基因均得以表达(图 5C)。这个结果说明,体外培养的 SSCs 处于增殖阶段。随后,用纯化后未进行体外培养的 SSCs 作为对照组,比较

了体外培养 14 d 后的 SSCs 克隆集落中多能基因 *SOX2* 和自我更新基因 *C-RET*、*GFRA1*、*UCHL1*、*BCL6B* 的表达量。结果显示,培养后的细胞中这些基因的表达量均极显著高于培养前(图 5D, $P < 0.01$)。这个结果进一步说明,体外培养 14 d 后的 SSCs 大量增殖。



A. 体外培养 2 和 14 d 的 SSCs 分别用 AKP 染色检测细胞增殖; B. 用 PLZF 和 UCHL1 蛋白的免疫荧光检测 SSCs 的增殖,红色箭头指示精原干细胞克隆; C、D. 体外培养 14 d 的 SSCs 其生殖相关基因的 RT-PCR 检测和 qRT-PCR 检测 ($n=3$)

图 5 小鼠 SSCs 体外增殖的检测

Fig. 5 Detection of mouse SSCs proliferation *in vitro*

2.6 体外稳定培养的小鼠精原干细胞功能检测

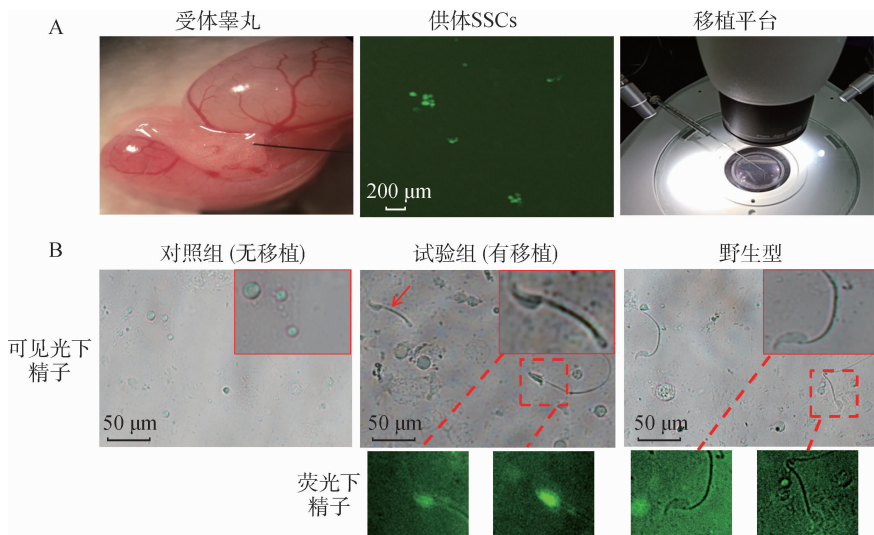
将体外传代培养至第 6 代的 SSCs 用慢病毒感染使其带 *EGFP* 报告基因,随后被转移到受体小鼠的一侧睾丸中(图 6A),另一侧睾丸不做移植作为对照组。移植后 2 个月分别采集对照组和试验组的附睾,观察附睾中精子的形成与形态。结果显示,对照组睾丸其相连的附睾中无精子形成,而移植的睾丸其相连的附睾中有很多形态正常的精子(图 6B)。在荧光显微镜下观察这些精子,看到精子的头部发绿光,而任何一只野生型的小鼠,其精子头部在荧光下不发绿光(图 6B),说明了试验组产生的精子为供体 SSCs 来源。这个结果也进一步说明了体外稳定培养的 SSCs 具有正常生物学功能。

3 讨论

精原干细胞的体外长期培养被认为是探索 SSCs 自我更新和分化的先决条件。小鼠 SSCs 的体外长期培养,需要考虑几个要素。

首先是精原干细胞的分离和纯化。在睾丸细胞的分离方法上,应用的比较多的是两步酶消化法,即胶原酶和胰蛋白酶。从睾丸细胞悬液中纯化 SSCs 的方法有很多,最常用的包括差速贴壁、密度梯度离心、形态学分选以及基于抗体的选择(如荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)或免疫磁珠分选(magnetic activated cell sorting, MACS))。这些方法各有利弊,相比之下差速贴壁法最大的优势是对试验条件和设备的要求最低,操作简便,省时又省力。且结合文献的报道^[25-27],通过差速贴壁法,获得了纯度 36%~77% 的 SSC 细胞,虽然比报道的通过 FACS 和 MACS 可获得 90% 以上高纯度的 SSCs 要低^[28],但是,本研究获得的纯度约为 79% 的 SSCs 在体外获得的稳定培养也说明了差速贴壁是一种纯化 SSCs 的实用方法。

其次是饲养层的选择,本研究利用丝裂霉素 C 处理之后的 mEF 作为饲养层,实现了 SSCs 的体外



A. 供体 SSCs 移植, SSCs 带有 *EGFP* 报告基因; B. 精子来源检测, 对照组没有进行移植, 无精子生成, 试验组产生的精子头部发出绿光, 野生型组精子头部不发绿光; 红色箭头指示精子

A. Transplantation of SSCs with *EGFP* reporter gene; B. Detection of sperm origin, no sperm was detected in control group (no transplantation), and the head of sperm originated in experimental group glowed green, but not in WT group; Red arrows indicate sperms

图 6 体外稳定培养的小鼠 SSCs 功能鉴定

Fig. 6 Functional identification of mouse SSCs culture *in vitro*

稳定培养。这与前人的文献报道相一致, mEF 作为饲养层有它独特的优势, 丝裂霉素 C 处理之后的 mEF 自身的有丝分裂受抑制, 失去了增殖能力, 不会与干细胞竞争营养。但是它的细胞活性没有受到影响。它能产生多种生长因子, 包括碱性成纤维细胞生长因子 2、转化生长因子- β 2、细胞外基质蛋白、活化素以及骨形态发生拮抗蛋白等^[29-32], 这些因子对于干细胞的体外维持很重要。也有文献报道, 多聚赖氨酸和层粘连蛋白的联合铺板对体外培养 SSCs 的效果甚至优于 mEF^[33]。这与本研究结果不一致, 本研究中, PLL-L 体外培养 SSCs 的第 2 天也出现了 SSCs 的小小克隆团, 但是随着 SSCs 的逐渐死亡, 培养到第 7 天时发现之前已经建立起来的克隆团均已消失, 这说明在本研究中 PLL-L 并不适合小鼠 SSCs 的体外增殖与培养。

再次是培养体系的建立, 目前对于 SSCs 的培养, 应用最广泛的培养基依然是 DMEM(高糖)和 DMEM/F12, 尤其是在家畜 SSCs 培养上^[34-35]。有文献报道, DMEM 很可能促进 SSCs 的自我更新和分化。一种可能含有未暴露成分的专有改良培养基 StemPro-34, 其中搭配的 StemPro-34 补充剂(含 16 个单独的化合物)可能对细胞的增殖有利^[36]。本研究采用了这种改良培养基来培养小鼠 SSCs, 效果优于

上述两种普通的培养基。用血清替代物代替传统的血清, 不仅在本试验中获得了 SSCs 的稳定培养, 在大动物上, 虽然成功培养的报道少, 但是血清替代物的使用对大动物 SSCs 的体外培养也成效显著。山羊的 SSCs 在含血清的培养基中只能维持 2 周, 在无血清培养基中能维持 4 周^[37]。在有血清替代物的培养基中, 水牛 SSCs 能体外增殖维持 28~30 d^[38-40]。所以, 无论在啮齿类动物还是大动物上, SSCs 的体外培养都可以借鉴这种无血清培养体系。根据前人研究的经历, 在培养体系中添加其他成分, 如非必需氨基酸、丙酮酸钠、葡萄糖、巯基乙醇等, 它们对 SSCs 的体外培养效果甚微。在本研究中, 这些成分的添加也不能支持小鼠 SSCs 的体外增殖, 是在选用了 StemPro-34 培养基, 添加无血清和多种因子组合的体系后, 成功的支持了 ICR 小鼠 SSCs 体外稳定培养。在别的物种上的研究也表明, 虽然饲养层细胞能分泌多种生长因子和细胞素, 但是 GDNF 能促进 SSC 的增殖和存活, 这在许多物种上都取得了效果^[37]。本研究显示, 没有添加 GDNF 时, 即使采用了 StemPro-34 培养基和无血清培养体系, 也不能支持 SSCs 的稳定增殖, 而当添加 GDNF 之后 SSCs 的增殖明显。LIF 在小鼠胚胎干细胞自我更新中是必需添加的^[41]。有研究表明, 在没有 LIF 的培养基

中干细胞的多能特性等性能会降低,细胞会倾向于分化,SSCs 的数量从培养第 1 天的 54.3% 减少到第 6 天的 18.7%^[42]。在 SSCs 培养中,bFGF 的存在导致 PI3K/AKT 和 MAPK 通路的激活,并提高 SSCs 的存活率和增殖率^[43-44]。在添加 GDNF、bFGF 和 LIF 因子后,公鸡 SSCs 的增殖和克隆集落都有很大改善,然而,当培养基中 3 种因子同时添加时,增殖效果最为明显^[45]。IGF1 调节 G2/M 期细胞分裂的进程,可能有利于培养的 SSCs 进行有丝分裂^[46]。本研究中的 5 种因子,在单独添加时均有促进小鼠 SSCs 增殖的效果,在多种因子组合添加时其增殖效果最为明显。可见,无论在啮齿类动物还是大动物 SSCs 培养上,这 5 种因子的添加尤其是组合添加体系都具有借鉴意义。虽然不同的物种其睾丸中微环境有所不同,造成体外培养 SSCs 的难易程度也不同,但是来自不同物种 SSCs 的特性是相似的,相信通过学者们的不懈努力,在大动物上只要找到调控微环境中 SSCs 增殖和分化的关键因子,大动物乃至人类 SSCs 的体外培养便会取得很大突破。

4 结 论

在本研究中,培养的 SSC 细胞是抱团生长的,用标志性蛋白检测均呈现阳性,也表达多能基因和自我更新基因,且最后移植的结果证明,体外稳定培养的 SSCs 具有正常生物学功能。本研究中的 SSCs 体外培养条件和体系的优化结果可以为别的品系小鼠和大动物以及人类的 SSCs 体外培养提供参考。

参考文献(References):

[1] LAROSE H, SHAMI A N, ABBOTT H, et al. Gametogenesis: a journey from inception to conception [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2019, 132: 257-310.

[2] KUBOTA H, WU X, GOODYEAR S M, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties[J]. *FASEB J*, 2011, 25(8): 2604-2614.

[3] GONZÁLEZ R, DOBRINSKI I. Beyond the mouse monopoly: studying the male germ line in domestic animal models[J]. *ILAR J*, 2015, 56(1): 83-98.

[4] GUO Y, LIU L H, SUN M, et al. Expansion and long-term culture of human spermatogonial stem cells via

the activation of SMAD3 and AKT pathways[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(8): 1112-1122.

[5] KORUJI M, SHAHVERDI A, JANAN A, et al. Proliferation of small number of human spermatogonial stem cells obtained from azoospermic patients[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(9): 957-967.

[6] ISHII K, KANATSU-SHINOHARA M, TOYOKUNI S, et al. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell selfrenewal via upregulation of *Etv5* and *Bcl6b* through MAP2K1 activation[J]. *Development*, 2012, 139(10): 1734-1743.

[7] SARIOLA H, SAARMA M. Novel functions and signalling pathways for GDNF[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(19): 3855-3862.

[8] AZIZI H, HAMIDABADI H G, SKUTELLA T. Differential proliferation effects after short-term cultivation of mouse spermatogonial stem cells on different feeder layers [J]. *Cell J*, 2019, 21(2): 186-193.

[9] PORTELA J M D, MULDER C L, VAN DAALEN S K M, et al. Strains matter: success of murine *in vitro* spermatogenesis is dependent on genetic background [J]. *Dev Biol*, 2019, 456(1): 25-30.

[10] ZHENG Y, ZHANG Y Q, QU R F, et al. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects[J]. *Reproduction*, 2014, 147(3): R65-R74.

[11] KUBOTA H, BRINSTER R L. Spermatogonial stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(1): 52-74.

[12] 王烁程, 陈晓丽, 张林波, 等. 支持细胞对精原干细胞增殖、分化调控的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(2): 253-260.

WANG S C, CHEN X L, ZHANG L B, et al. The progress of the study on the regulation of the proliferation, differentiation of spermatogonial stem cells by the Sertoli cells [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(2): 253-260. (in Chinese)

[13] TSUDA M, SASAOKA Y, KISO M, et al. Conserved role of nanos proteins in germ cell development[J]. *Science*, 2003, 301(5637): 1239-1241.

[14] LUO J P, MEGEE S, DOBRINSKI I. Asymmetric distribution of UCH-L1 in spermatogonia is associated with maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 220(2): 460-468.

- [15] COSTOYA J A, HOBBS R M, BARNA M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells [J]. *Nat Genet*, 2004, 36 (6):653-659.
- [16] BRAYDICH-STOLLE L, KOSTEREVA N, DYM M, et al. Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation [J]. *Dev Biol*, 2007, 304(1):34-45.
- [17] OATLEY J M, AVARBOCK M R, TELARANTA A I, et al. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(25):9524-9529.
- [18] OATLEY M J, KAUCHER A V, RACICOT K E, et al. Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the selfrenewal of spermatogonial stem cells in mice [J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(2):347-356.
- [19] DE ROOIJ D G. Recent developments in the spermatogonial stem cell field [J]. *Anim Reprod*, 2017, 14(1):82-88.
- [20] YOSHINAGA K, NISHIKAWA S, OGAWA M, et al. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function [J]. *Development*, 1991, 113(2):689-699.
- [21] VERVER D E, VAN PELT A M, REPPING S, et al. Role for rodent Smc6 in pericentromeric heterochromatin domains during spermatogonial differentiation and meiosis [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4 (8):e749.
- [22] AZIZI H, RANJBAR M, RAHAIEE S, et al. Investigation of VASA gene and protein expression in neonate and adult testicular germ cells in mice *in vivo* and *in vitro* [J]. *Cell J*, 2020, 22(2):171-177.
- [23] DE ROOIJ D G. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells [J]. *Development*, 2017, 144 (17):3022-3030.
- [24] KANATSU-SHINOHARA M, SHINOHARA T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013, 29: 163-187.
- [25] 余冬冬. 精原干细胞体外培养和移植的探究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
YU D D. Exploration of the culture of spermatogonial stem cells *in vitro* and transplantation [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2013. (in Chinese)
- [26] 陈庭锋, 王霄燕, 李东, 等. 猪精原干细胞体外分离培养及诱导分化的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45 (7):1104-1112.
CHEN T F, WANG X Y, LI D, et al. Study on the culture and induced differentiation of spermatogonial stem cells in porcine [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45 (7): 1104-1112. (in Chinese)
- [27] 何莹. 猪精原干细胞分离纯化及分子标记 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
HE Y. Molecular marker, isolation and purification of spermatogonial stem cells in pigs [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012. (in Chinese)
- [28] GROMPE M. Tissue stem cells: new tools and functional diversity [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 685-689.
- [29] MOSCATELLI D, PRESTA M, JOSEPH-SILVERSTEIN J, et al. Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor [J]. *J Cell Physiol*, 1986, 129(2):273-276.
- [30] CHEN S, CHOO A, CHIN A, et al. TGF- β 2 allows pluripotent human embryonic stem cell proliferation on E6/E7 immortalized mouse embryonic fibroblasts [J]. *J Biotechnol*, 2006, 122(3):341-361.
- [31] CONRAD S, AZIZI H, HATAMI M, et al. Expression of genes related to germ cell lineage and pluripotency in single cells and colonies of human adult germ stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016:8582526.
- [32] PROWSE A B J, MCQUADE L R, BRYANT K J, et al. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(9):3796-3807.
- [33] HE B R, LU F, ZHANG L L, et al. An alternative long-term culture system for highly-pure mouse spermatogonial stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(6):1365-1375.
- [34] BAHADORANI M, HOSSEINI S M, ABEDI P, et al. Short-term *in-vitro* culture of goat enriched spermatogonial stem cells using different serum concentrations [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29 (1):39-46.
- [35] ZHU H J, LIU C, LI M Z, et al. Optimization of the conditions of isolation and culture of dairy goat male germline stem cells (mGSC) [J]. *Anim Reprod Sci*,

- 2013,137(1-2):45-52.
- [36] 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.
- [37] SHARMA A, SHAH S M, TIWARI M, et al. Propagation of goat putative spermatogonial stem cells under growth factors defined serum-free culture conditions[J]. *Cytotechnology*, 2020,72(3):489-497.
- [38] SHARMA A, SHAH S M, SAINI N, et al. Optimization of serum-free culture conditions for propagation of putative buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogonial stem cells[J]. *Cell Reprogram*, 2019, 21(1):1-10.
- [39] LI T T, GENG S S, XU H Y, et al. Effects of different culture systems on the culture of prepuberal buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogonial stem cell-like cells *in vitro*[J]. *J Vet Sci*, 2020,21(1):e13.
- [40] SUYATNO, KITAMURA Y, IKEDA S, et al. Long-term culture of undifferentiated spermatogonia isolated from immature and adult bovine testes[J]. *Mol Reprod Dev*, 2018,85(3):236-249.
- [41] WILLIAMS R L, HILTON D J, PEASE S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells[J]. *Nature*, 1988,336(6200):684-687.
- [42] PRASETYANINGTYAS W E, KARJA N W K, AGUNGPRIYONO S, et al. Characteristics of testicular cell development of 5-day-old mice in culture *in vitro*[J]. *Anim Sci J*, 2020,91(1):e13332.
- [43] KÖSE S, YERSAL N, ÖNEN S, et al. Comparison of hematopoietic and spermatogonial stem cell niches from the regenerative medicine aspect[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018,1107:15-40.
- [44] FU H Y, ZHANG W H, YUAN Q Q, et al. PAK1 promotes the proliferation and inhibits apoptosis of human spermatogonial stem cells via PDK1/KDR/ZNF367 and ERK1/2 and AKT pathways[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018,12:769-786.
- [45] RASOULI-GHAREHSAGHAL K, SHAKERI M, ZHANDI M, et al. Improvement of *in vitro* proliferation of cockerel spermatogonial stem cells using different combinations of growth factors[J]. *Br Poult Sci*, 2020:1-9.
- [46] BINSILA B K, SELVARAJU S, GHOSH S K, et al. EGF, GDNF, and IGF-1 influence the proliferation and stemness of ovine spermatogonial stem cells *in vitro*[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2020, 37(10): 2615-2630.

(编辑 郭云雁)