

五指山猪近交系精原干细胞体外培养研究

Studies on Spermatogonial Stem Cells Cultured *in vitro* of Wuzhishan Mini Porcine

成 钢¹, 冯书堂^{2*}

CHENG Gang¹ and FENG Shu-Tang^{2*}

1 湖南文理学院, 常德 415000

2 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094

1 Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China

2 Institute of Animal Science, China Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China

摘 要 对不同发育阶段五指山小型猪(WZSP)近交系的睾丸组织,采用不同的消化和培养方法进行了一系列的探索、研究。实验显示:培养 SSCs 的最佳时限为仔猪出生后 1~20 日龄;对不同日龄仔猪采用不同消化方法,以 DMEM 为基础培养液并添加不同成分,34℃,5% CO₂ 培养箱中饱和湿度条件下培养,可获得较好的分离培养结果;原代 SSCs 在培养 8d 后,SSCs 开始增殖,桑椹状的 SSCs 集落半悬浮隆突生长,SSCs 集落 AKP 染色,细胞呈阳性反应;对 SSCs 细胞团在 STO 饲养层上进行传代培养,SSCs 贴壁良好,培养 4d 左右大部分 SSCs 集落和单细胞消失;采用曲精细管组织贴壁培养法也同样获得桑椹状 SSCs 集落,细胞集落在培养 5d 后出现,半悬浮生长。此外,睾丸组织在 4℃ PBS 液中存放 24h 后,仍可作为 SSCs 分离、培养的材料。结果表明,本研究初步掌握了 WZSP 近交系精原干细胞体外分离、培养的技术方法,为其进一步深入研究提供了技术方法和操作依据。

关键词 五指山猪, SSCs, 消化方法, 日龄, 体外培养

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0689-05

Abstract The isolation and cultivation of SSCs of different stage of Wuzhishan Mini Porcine (WZSP) with different way of enzymatic digestion and cultivation were deaded in this study. The results of the experiment described are as the following: The proper time of isolation and cultivation of SSCs of WZSP is 1~20 old days. Different old of piglets with different method. Using DMEM medium as a fundamental culture medium add different gradient at 34℃ in a water-saturated atmosphere of 95% air, 5% CO₂. The mulberry-shaped SSCs clusters appeared as original generation in 7~8 days culture, The SSCs clusters developed half-suspendedly in the culture medium. SSCs alkaline phosphatas(AKP) staining expressed positively. Mouse embryonic fibroblast was used as feeder layer for the SSCs passage cultured, The SSCs show good attached attributes, but the number of SSCs decreased quickly after 4 days culture. By seminiferous cord fragment cultivation can also appear SSCs clusters in 5 days, The SSCs clusters developed half-suspendedly in the culture medium. In addition, the testes placed in cold (4℃) PBS banlanced salt solution for 24h also can be used as a good matierials for preparation of SSCs. These results indicate that the method of solation and cultivation of SSCs are very correct and efficient, all these can be utilized as a good reference for future studies.

Key words Wuzhishan Mini Porcine, SSCs, digestion method, old of piglets, culture *in vitro*

Received: February 20, 2006; Accepted: April 7, 2006.

This work was supported by a grant from the National High Technology Research and Development Program of China(No.2003AA205100).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62815893; E-mail: fst508@sina.com

国家高技术研究发展计划项目资助(No.2003AA205100)

精原干细胞 (spermatogonial stem cell, SSCs) 是指未分化的 A 型精原细胞, 位于雄性哺乳动物体内的曲精细管生精上皮基膜内, 在复杂且高度有序的精子发生过程中占据极其重要的地位。精原干细胞独有的生物学特性, 使其在医学、畜牧业生产等领域有其广阔的应用前景, 转基因技术与精原干细胞异体及异种移植技术相结合将会为克隆动物、转基因动物生产及一些人类遗传性疾病的基因治疗提供新的机遇与途径。从所得资料, 国外已成功对小鼠、大鼠、猪、人等多种哺乳动物睾丸内的精原干细胞进行分离纯化。Bellve 等^[1]报道, 从生后 8d 小鼠睾丸中获得了纯度 91% 的 A 型精原细胞, 产量达 2×10^7 个; Dirami 等 (1999)^[2]从 80 日龄仔猪睾丸分离出 A 型精原细胞的纯度达到 95% ~ 98%; Brook 等^[3] (2001) 分离出人的精原细胞并进行低温冷冻保存实验。在国内, 精原干细胞的分离、纯化主要集中在小鼠, 经纯化后其纯度可达 68.76% (2000, 张学明)^[4]。体外分离、培养 SSCs 是件费时、费力的工作, 在目前, 国内还没有见到关于猪 SSCs 体外分离、培养的系统报道。本实验的研究意义在于, 确定体外分离、培养 SSCs 的相对日龄时限, 最大程度, 最为有效的分离 SSCs, 总结出一套简单可行的消化培养方法及步骤。实验以五指山小型猪近交系为材料, 更显示出其独特的研究意义和应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验动物

中国农科院畜牧研究所提供五指山小型猪近交系。分别采取 1 日龄、2 日龄、3 日龄、4 日龄、6 日龄、8 日龄、2 周龄、18 日龄、21 日龄、40 日龄、1 月龄、2 月龄、2 月龄以上各个不同发育阶段 WZSP 的睾丸组织。

1.2 实验方法

1.2.1 基础培养液: DMEM + 7.5% NBS + 7.5% FBS + 1% 谷氨酰胺 + 1% 非必需氨基酸 + 1% 青链霉素 + 1% 丙酮酸钠, 使用前应将培养液在 34℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育 2h 以上。

1.2.2 曲精细管组织贴壁培养法 (目的是为了更好地在显微镜下观察曲精细管内部的发育情况, 细胞类型, 最终确定消化方法, 同时也作为培养 SSCs 方法的另一种尝试): 无菌取出睾丸, 去除睾丸脂肪垫、附睾及白膜, 取出 0.3 ~ 0.5g 睾丸组织, 用眼科剪将组织剪成大小一致的小块, 采用静置法, 双抗 PBS 液多次洗涤, 去除红细胞及杂细胞, 用吸管吸取适量

已经沉降到管底的曲精细管小段, 放置于事先涂有明胶的 35mm 培养皿, 曲精细管应均匀涂散于皿中, 最后用吸管吸除多余液体, 放置于 34℃, 5% CO₂ 培养箱中饱和湿度条件下培养, 24h 后显微镜下观察见曲精细管已贴壁时, 小心加入培养液, 继续培养观察。

1.2.3 不同日龄 WZSP 睾丸细胞悬液的制备:

(1) 1 日龄, 2 日龄, 3 日龄, 4 日龄, 6 日龄, 8 日龄仔猪睾丸细胞悬液的制备: 1 日龄 ~ 8 日龄仔猪睾丸由于体积小, 重量轻, 先用双抗 PBS 冲洗数次后, 小心拨去睾丸被膜, 在玻璃表面皿中用眼科剪剪碎, 放入离心管, 采用沉降或低速离心的方法去除血细胞, 经多次洗涤后, 用 0.25% 的胰蛋白酶 37℃ 水浴消化 10 ~ 15min, 见曲精细管软散, 消化液中有大量单细胞时, 用大剂量 PBS 液终止消化, 沉降 5 ~ 10min 后, 收集上清, 4 层铜网过滤后多次离心洗涤, 最后将沉降的细胞用适量培养液吹起, 制得细胞悬液。

(2) 11 日龄, 14 日龄, 21 日龄仔猪睾丸细胞悬液的制备: 由于此阶段睾丸内间质细胞已大量出现, 消化程序为: 将剪碎的曲精细管小段采用沉降或低速离心的方法去除血细胞, 用 0.5mg/mL 胶原酶消化 5min, 然后加入 0.25% 的胰蛋白酶 37℃ 水浴消化 10 ~ 15min, 消化液中有大量单细胞时, 用大剂量 PBS 液终止消化, 沉降 5 ~ 10min 后, 4 层铜网过滤, 多次离心洗涤, 沉降的细胞用适量培养液吹起, 制得细胞悬液。

(3) 1 月龄以上猪睾丸细胞悬液的制备: 通过曲精细管组织培养观察, 此阶段睾丸内各种细胞已分化, 种类繁多、复杂, 将获得较纯的曲精细管小段用 0.5mg/mL 胶原酶 (II) 消化 5min, 再加入 0.25% 胰酶 - 0.04% EDTA 37℃ 消化 10 ~ 15min 后, 轻轻吹打, 中和后较大体积 PBS 多次重悬细胞, 1000r/min 离心 3min, 加入适量培养液吹散, 制成细胞悬液, percoll 不连续密度梯度离心, 收集 20% ~ 40% 梯度之间的生殖细胞, 多次离心洗涤, 最后将沉降的细胞用适量培养液吹起, 制得细胞悬液。

1.2.4 SSCs 的原代培养: 取一滴制备好的生殖细胞悬液, 加入 10 μ L 0.4% 台盼蓝混匀用红细胞计数板记算细胞数目, 调整细胞密度至 3×10^5 个/mL, 将细胞接种在预先涂有明胶直径 35mm 的塑料培养皿中, 每皿接种 1.5mL, 置于 34℃、5% CO₂ 培养箱饱和湿度条件下培养。

1.2.5 小鼠成纤维细胞饲养层的制备, 参考文献 [5]

1.2.6 SSCs 在小鼠成纤维饲养层上的传代培养 :用拨针将在曲精细管培养皿中和采用酶消化法平皿中形成的 SSCs 集落按一定的密度接种到有小鼠成纤维细胞饲养层的四孔板或 35mm 培养皿上 ,每 24 小时换液 1 次。

1.2.7 对形成的 SSCs 集落进行 AKP 染色鉴定 :将待测细胞用无钙镁离子的 PBS 液洗 2~3 次 ,无水乙醇 4℃ 固定 10min ,无钙镁离子的 PBS 液洗 2~3 次 ,用 25mmol/L Tris-Cl(pH 9.5)漂洗 1 次 ,加入新鲜配制的坚牢红 AKP 染色液 ,室温放置约 30min 后 ,阳性细胞呈现深红(褐)色 ,用无钙镁离子的 PBS 液终止染色 ,饲养层细胞、分化细胞不着色。

1.2.8 睾丸组织 4℃ 冰箱存放 24h 后 ,按照上述方法进行精原细胞的分离接种培养。

2 结果

2.1 曲精细管组织贴壁培养法培养结果

1~8 日龄仔猪睾丸曲精细管培养显微镜下观察 ,曲精细管管壁薄而透明 ,培养 24h 后 ,曲精细管的两个断面 ,一部分细胞已“ 涌 ”到细管的外部贴铺于培养皿(图 1) ,培养 72~96h 以后 ,大部分曲精细管段已不复存在 ,培养第 5 天后 ,SSCs 集落出现 ,3~5 个细胞为一团 ,悬浮或半悬浮于已铺展的曲精



图 1 曲精细管内细胞的扩散情况

Fig.1 The cells expand in Seminiferous tubule fragments phase contrast(×100)

细管附近 ,有的甚至完全贴于皿底。曲精细管周围主要为成纤维样细胞 ,支持细胞数量骤减 ,培养 6d 时 ,集落中的细胞团进一步增殖 ,有的可达 15~25 个以上(图 2) ,培养 8~9d 后 ,集落基本消失。1 月龄以上睾丸曲精细管培养过程中 ,没有 SSCs 集落出现(图 3)。

2.2 不同日龄对猪精原干细胞体外培养的影响

本实验采取不同发育阶段仔猪睾丸进行体外培养 SSCs ,观察结果显示 :性成熟后猪睾丸制取 SSCs 过程中 ,由于睾丸内各种细胞已分化、种类繁多、复

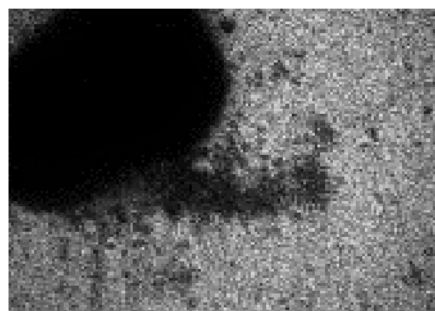


图 2 曲精细管培养法中出现的 SSCs 集落

Fig.2 SSCs colone with seminiferous cord fragment cultured method phase contrast(×200)



图 3 曲精细管间的成团间质细胞

Fig.3 The leydig cells between seminiferous tubule fragments phase contrast(×200)

杂制取的 SSCs 纯度及质量较 20 日龄以前的仔猪显著降低。对 1~8 日龄仔猪采用 0.25% 胰蛋白酶消化 ,对 2~3 周龄左右仔猪采用组合酶消化 ,以 DMEM 为基础培养液并添加不同成分 ,34℃ 5% CO₂ 培养箱中饱和湿度条件下培养 ,均可获得较好的分离培养结果 ,实验证明 培养猪精原细胞的最佳时限为 1~20 日龄 ,此时睾丸组织内细胞类型较少 ,区分明显。表 1 为不同发育阶段 WZSP 睾丸内 SSCs 培养结果。

2.3 SSCs 原代培养及贴壁行为

原代细胞接种后 3~4h 混杂在其中的支持细胞、间质细胞开始贴壁 ,细胞呈梭形或不规则多角形 ,7~8h 后绝大多数睾丸体细胞都已贴壁 ,部分精原细胞开始贴壁 ,培养 72h 后 ,睾丸内成纤维样细胞明显 ,SSCs 散落分布于其间 ,1~2 日龄仔猪 SSCs 集落在培养 3d 左右出现 ,2~8 日龄仔猪 SSCs 集落培养 7~8d 后 ,SSCs 开始增殖 ,2~3 个细胞成团出现 ,培养 9~10d 较大的 SSCs 集落出现 ,8~14d 左右为 SSCs 的增殖期 ,SSCs 细胞团数量可达 20~30 以上(图 5) ,桑椹状的 SSCs 集落悬浮或半悬浮生长 ,仅有少量细胞贴于皿底 ,SSCs 集落主体向培养液中隆突生长 ,随着培养时间的延长 ,SSCs 集落向周边扩散

(图4)对 SSCs 集落进行 AKP 染色,细胞呈阳性反应,染成红色(图6),其它细胞不着色。

表 1 不同发育阶段 WZSP 睾丸内 SSCs 培养结果
Table 1 The culture result of SSCs of different old WZSP

Age/d	Weight of teste/g	Cell type	SSCs cluste appear or not	The time of SSCs cluste appear/d	Cell attachment
1	0.3~0.4	3	appear	3	good
2	0.4~0.5	3	appear	3~4	good
6	0.5~0.8	3	appear	8	good
8	0.5~1	3	appear	8	good
14	1.5~2	3	appear	8~10	less good
21	2~2.5	4	appear	9~10	less good
30	10~12	5	not	—	less good
40	10~15	5	not	—	not good
60	15~18	6	not	—	not good

Note: Cell type is that the cells of in and off the tube fragment under phase-contrast microscope.

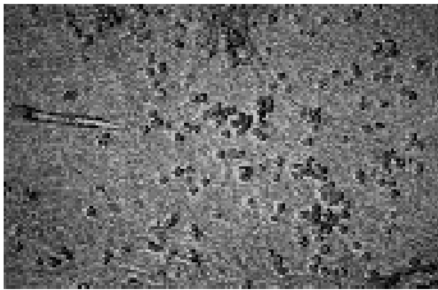


图 4 桑葚状 SSCs 集落在扩散

Fig.4 Mulberry-shaped SSCs colone expanding phase contrast ($\times 200$)



图 5 形成中的 SSCs 集落

Fig.5 SSCs colone forming phase contrast ($\times 200$)



图 6 精原干细胞 AKP 染色呈阳性

Fig.6 Positive AKP staining of SSCs colone phase contrast ($\times 200$)

2.4 SSCs 在小鼠成纤维细胞饲养层(STO)上的传代培养

接种在小鼠成纤维饲养层上的 SSCs 集落和单细胞,数小时后几乎全部贴壁,培养 24h 后,成团的细胞逐渐向四周扩散,培养第 4 天后,大部分 SSCs 集落和成团状细胞消失,多数为散在的单个 SSCs,培养 6~7d 后大部分 SSCs 消失,只有极少量 SSCs 分散牢固贴于 STO 饲养层,相差显微镜下观察,小鼠成纤维饲养层细胞和 SSCs 层次分明,SSCs 透明,细胞的形态大小与原代培养的 SSCs 无异。实验显示 SSCs 集落接种在 STO 饲养层后,贴壁良好,不能在 STO 饲养层上长期培养。

2.5 睾丸组织存放时间对 SSCs 培养的影响

睾丸组织在 4℃ 存放 24h 后按上述分离培养方法进行 SSCs 原代培养,通过相差显微镜连续观察,其贴壁行为,集落出现的时间与新鲜组织基本相同,由此说明睾丸组织在 4℃ 存放 24h 内仍然可进行 SSCs 培养。

3 讨论

3.1 猪不同发育阶段睾丸组织内的细胞类型

哺乳动物的睾丸是一个极为复杂的组织,细胞的分化类型较多^[7,9]。但在胎儿期以及性成熟前,支持细胞和 SSCs 为主要细胞类型。本实验中,通过曲精细管培养显微镜下观察,1~8d 仔猪曲精细管内仅有支持细胞和 SSCs,曲精细管间仅有少量形态扁平、体积较大的椭圆形细胞,估计为间质细胞的前体细胞,由于细胞类型较少,我们仅采用胰酶消化就可得到富含 SSCs 的细胞悬液,8~20d 仔猪曲精细管间有大量间质细胞(图 3)。采用组合酶酶消化法去除

间质细胞后同样得到富含 SSCs 的细胞悬液,20d 后的猪睾丸细胞类型复杂,SSCs 在细胞悬液中所占比例随日龄的增加而下降,不适合 SSCs 细胞悬液的制备。实验中,仅采用胰酶和胶原酶消化组织,并得到较高产量和活率的单细胞悬液,与张学明等(2000)和 Dirami 等(1999)程序相比,我们没有用透明质酸酶和脱氧核糖核酸酶(DNase)等。用本实验确定的日龄和方法,分离猪 SSCs 是有效的。

3.2 STO 饲养层与 SSCs 培养的微环境

本实验接种到 STO 饲养层上的 SSCs 贴壁性能良好,但维持时间不长。SSCs 的自我复制还是分化成各类生殖细胞的功能取决于细胞所处的微环境和干细胞本身的状态,微环境因素包括干细胞与周围细胞,干细胞与细胞外基质以及干细胞与各种可溶性因子的相互作用。在体内,SSCs 与各类生殖细胞,支持细胞形成微环境,支持细胞等分泌大量的不同种类的生长因子及各种细胞活性物质,对 SSCs 正常的增殖、更新、分化等生命活动提供了良好的在细胞微环境^[6,8];在体外,由于培养环境中缺少某些营养成分等因素所营造的细胞微环境并不太充分,从而 SSCs 的增殖能力及细胞状态会随培养时间的延长而丧失。本实验表明:STO 饲养层辅助培养 SSCs 为 SSCs 体外培养提供的细胞生存微环境可能还不太完善,也可能与物种间细胞的差异有关,猪 SSCs 接种到 STO 饲养层上不能长期培养,与董武子等^[10](2003)将山羊胎儿 SSCs 传代接种到 STO 饲养层上的结果一致。相信随着对培养条件的深入研究,可使 WZSP 的 SSCs 体外长期培养提供可能。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF *et al.* Spermatogenic cells of the prepuberty mouse. *J Cell Biol*, 1977, **74**(1): 68 - 85
- [2] Dirami G, Ravindranath N, Pursel V *et al.* Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type Aspermatogonia culture in KSOM. *Biol Reprod*, 1999, **61**: 225 - 230
- [3] Brook PF, Radford JA, Shalet SM, *et al.* Isolation of germ cell from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril*, 2001, **75**: 269 - 274
- [4] Zhang XM(张学明), Lai LX(赖良学), Li DX(李德雪) *et al.* Separation and purification of spermatogonia in mouse. *Chinese Journal of Veterinary Science*(中国兽医学报), 2000, **31**(3): 235 - 239
- [5] Hua JL(华进联), Dou ZY(窦忠英), Zhang RF(张若平) *et al.* Isolation and culture human embryonic stem like cells derived from primordial germ cells. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报) 2002, **10**(1): 54 - 66
- [6] Ohta H, Tohda A, Yoshitake N. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells in the W/W' mutant mouse testis. *Biol Reprod*, 2003, **69**(6): 1815
- [7] Guan JK(关纪奎), Xue SP(薛社普), Han DS(韩代书). The progress on transplantation of spermatogonial stem cells. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2002, **11**(3): 326 - 328
- [8] Kubota H, Ararbock RM, Brinster LR. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(11): 6478
- [9] Kyle Eorwig, Buom-yong Ryu, Mary R Avarbock *et al.* Male germline stem cell potential is predicted by morphology of cell in neonatal rat testes. *PNAS* 2002, **99**(18): 11706 - 11711
- [10] Dong WZ(董武子), Hua JL(华进联). Separation and *in vitro* culture of the goat fetal testicular cells and the behavior of mGSCs. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2004, **12**(6): 548 - 652