论著

文章编号:1000-5404(2005)11-1142-03

人睾丸精原细胞的分离和纯化

毕 罡,李彦锋,李黔生,靳风烁,张 勇,徐序广,靳文生,霍文谦 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要: 目的 探讨人睾丸精原细胞的分离纯化。**方法** 用联合二步酶消化法获得人生殖细胞悬液,经 Percoll 不连续密度梯度离心,再用差异粘附法纯化得到成活率较好、含量较高的人精原细胞。**结果** 所获得睾丸组织细胞悬液内活细胞、死细胞平均所占百分比分别为 89.71%、10.29%。Percoll 不连续密度梯度中,细胞主要在相邻梯度的界面处形成细胞带,其中精原细胞主要分布于 27% ~ 35% Percoll 梯度间,根据细胞体外培养时的形态学特征等进行判断和分析,经纯化后精原细胞的纯度达到 60.42%。**结论** 应用联合酶消化法、Percoll 不连续密度梯度离心和差异粘附等方法可以有效地对人精原细胞进行分离和纯化。

关键词: 精原细胞;分离;纯化
中图法分类号: R321.1; R322.64; R329-33 **文献标识码**: A

Separation and purification of spermatogonia

BI Gang, LI Yan-feng, LI Qian-sheng, JIN Feng-shuo, ZHANG Yong, XU Xu-guang, JIN Wen-sheng, HUO Wen-qian (Department of Kidney Transplantation, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study separation and purification method of human fetal spermatogonia. **Methods** Sequential two-step enzymatic digestion was used to prepare germ cell suspension of human fetus, then Percoll discontinue density gradient centrifugation and isolation according to the different adhesiveness were used to purify spermatogonia. **Results** The average percentages of living cells, dead cells in suspension were 89.71% and 10.29% respectively. Spermatogonia were mainly distributed in Percoll gradient between 27% – 35%. Purity of spermatogonia was 60.42% after observing the morphological characteristics of spermatogonia. **Conclusion** Human fetal spermatogonia can be isolated and purified by sequential two-step enzymatic digestion and Percoll discontinue density gradient centrifugation.

Key words: spermtogonia; separation; purification

随着对人睾丸精原细胞的生理生化特性及其分裂、增殖、分化、凋亡等生命活动的调节机制的深入研究[1],以及对精子发生机制的进一步阐明,迫切需要首先对其进行高效的分离纯化,并应用于体外培养。从动物的睾丸分离粗线期及其后各发育阶段生精细胞的工作已取得可喜成绩,Dirami 等[2]报道从生后 80 d 大小猪睾丸中获得了纯度为 95% ~ 98% 的 A 型精原细胞。在人胎儿时期,其生精上皮内只有支持细胞和 A 型精原细胞,其它各级生精细胞尚少发育形成[3]。但可用于体外培养的人精原细胞的分离国内尚少有报道。在体外,支持细胞总是先生殖细胞而贴壁。因此,本实验选用临床上妊娠月数大于 6 个月的引产胎儿的睾丸,用联合酶消化法获得细胞悬液,经 Percoll 不连续密度梯度离心,再用选择性贴壁法纯化,获得了较高纯度可满足体外培养需要的精原细胞。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞来源 人睾丸组织(取自妊娠 6 个月以上的合法引产胎儿)。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基(Gibco BRL 公司),DMEM/F12 培养基(Gibco BRL 公司),胎牛血清(FCS,Hyclone 公司),胰蛋白酶(Sigma 公司),胶原酶 Ⅰ 型(Sigma 公司),透明质酸酶(Sigma 公司),DNA 酶(Sigma 公司),Percoll(Pharmacia 公司),台盼蓝(上海跃龙化工厂),牛血清白蛋白(BSA,Gibco BRL 公司)。

其它常规试剂均为国产或进口分析纯及优级纯试剂。

1.1.3 主要溶液及其配制方法 ①1 号酶消化液:按胶原酶Ⅰ型:DNA 酶 = 50:1 溶于 DMEM/F12 培养基中配制而成。②2 号酶消化液:按胶原酶Ⅰ型:DNA 酶:透明质酸酶 = 50:1:25 溶于 DMEM/F12 培养基中配制而成。③Percoll 母液的配制:按 PBS:

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200093)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200093)
作者简介:毕 罡(1978 –),男,江西省鹰潭市人,硕士,医师,主要从事人睾丸精原细胞分离、培养及肾移植方面的研究。电话:(023)68757724
收稿日期:2004-12-15;修回日期:2005-01-15

Percoll = 1:9 的比例把 Percoll 原液配制成 90% 的 Percoll 溶液。

1.1.4　Percoll 稀释液的配制　　为不含无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液(PBS)。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞悬液的制备　　无菌采集胎儿睾丸,置于盛有 PBS 的平皿中。用眼科剪及镊子仔细剔除每个睾丸的脂肪垫、附睾及睾丸白膜,睾丸组织反复剪切,使之成为约 1 mm^3 大小的组织碎块。加入适量 PBS(1 ~ 2 ml),转移至 5 ml 离心管中,以 1 000 r/min 转速离心 5 min;弃去上清,加入 1 号酶消化液 2 ~ 3 ml,在 37 ℃下,110 r/min 震荡水浴箱中消化 20 min 后,沉淀 10 min。吸除上清,并应用 DMEM/F12 培养基洗涤 2 次,在倒置相差显微镜下观察,可见大量清晰的曲细精管片段即可。所得曲细精管片段加入 2 号酶消化液,水浴箱中消化 20 min 后,自然沉淀 10 min。吸除上清,并应用 DMEM/F12 培养基洗涤 2 次,在倒置相差显微镜下观察,可见多数已成分散的单细胞或小的细胞团状态即可。加入 DMEM/F12 培养液(含 10% FCS)终止消化。移入离心管中,1 000 r/min 离心 3 min 或静置 10 min。吸去上清,重新加入 DMEM/F12 培养基轻轻吹打 8 ~ 10 次,应用滤网过滤去除未消化成分制成单细胞悬液。细胞数量和浓度通过显微镜观察计数确定。

1.2.2　Percoll 分离

1.2.2.1　Percoll 梯度溶液的制备　　将 Percoll 母液和 Percoll 稀释液按表 1 所列方案配制 Percoll 各密度梯度溶液。用带长针头的注射器从已制备好的每级 Percoll 密度梯度液中各取 2 ml,按密度从大到小依次分层叠加到 15 ml 离心管中。

表 1　Percoll 密度梯度的浓度、组成及密度

Tab 1　Concentration, composition and density of Percoll gradients

Concentration of Percoll(%)	Volume of Percoll gradients (ml)	Pregnant solution of Percoll (ml)	Diluting agent of Percoll (ml)	Density of Percoll gradients (1 000 g/L)
11	9	1.1	7.8	1.021 4
19	9	1.9	7.0	1.031 2
27	9	2.7	6.2	1.041 0
35	9	3.5	5.4	1.050 8
43	9	4.3	4.6	1.060 6

1.2.2.2　加样及分离　　用吸管吸取 2 ml 待分离的细胞悬液,小心加在梯度液顶层的分离介质上面。将离心管放置 4 h 或以 1 400 r/min(800 × g)离心 30 min 使细胞分层。

1.2.2.3　收获及计数　　用带长针头的注射器将各梯度中形成的细胞带小心吸取出,移至事先标记好的 5 ml 离心管中,各加入 2 ml PBS 稀释,以 1 000 r/min 的速度离心 5 min,弃上清,重新加入 2 ml 的 DMEM/F12 培养基,并轻轻吹打均匀。取出 1 滴制备好的细胞悬液,加入 5 μl 0.4% 台盼蓝混匀,在 3 min 内,在倒置相差显微镜下用血球计数板分别计算活细胞、死细胞、细胞团的数目和细胞总数(镜下观察死细胞被染成淡蓝色,而活细胞拒染)。

1.2.3　精原细胞的纯化及其纯度评估　　经 Percoll 分离的细胞接种到培养皿后,每隔 2 ~ 4 h 在倒置相差显微镜下观察细胞贴壁情况。当见到较多的细胞(睾丸体细胞)开始贴壁时,即小心将尚未贴壁的精原细胞连同培养液一起吸出,另行接种培养。同时取少量细胞悬液用血球计数板进行精原细胞计数。

1.3　统计学处理

组间比较采用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析。

2　结果

2.1　人睾丸细胞分离后的活细胞计数

本实验对 6 例睾丸组织分别进行了酶消化分离后获得睾丸组织单细胞悬液,然后对其中活细胞进行计数鉴定,结果如表 2 所示,其活细胞、死细胞平均所占百分比分别为 89.71%、10.29%。根据下式求细胞活力。

$$\text{活细胞率}(\%) = \frac{\text{活细胞总数}}{\text{少细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100\%$$

表 2　两步酶消化法的结果

Tab 2　The results of two-step enzymatic digestion

No. of experiment	total number of germ cells × 10^6	number of living cells × (10^6)	number of dead cells × (10^5,%)	Rate living cells(%)
1	3.732	3.180	5.52(14.78)	85.22
2	2.125	1.856	2.69(12.65)	87.35
3	4.225	3.896	3.29(7.79)	92.21
4	6.532	5.890	6.42(9.83)	90.17
5	5.113	4.667	4.46(8.72)	91.28
6	4.557	4.089	4.68(10.27)	89.73
Average	4.381	3.930	4.51(10.29)	89.71

2.2　Percoll 密度梯度分离结果

在 Percoll 不连续密度梯度离心中,细胞主要在相邻梯度的界面处形成细胞带。如表 3 所示,分布在 11% ~ 19% Percoll 梯度间的主要是细胞间质、细胞碎片及少量死细胞,记为 1 带;分布在 19% ~ 27% Percoll 梯度间的细胞较少,平均密度为 2.39 × 10^5/ml,记为 2 带;分布在 27% ~ 35% Percoll 梯度间的细胞数量最多,平均密度达 1.90 × 10^6,记为 3 带;分布在 35% ~ 43% Percoll 梯度间的细胞也相对较少,平均密度为 1.86 × 10^5,记为第 4 带。统计学分析显示,2、3、4 带中细胞分布存在差异,其中 3 带与 2、4 带之间相比差异非常显著($P < 0.01$),2、4 带之间相比差异不显著($P > 0.05$)。

表 3　细胞在 Percoll 密度梯度中的分布

Tab 3　Distribution of germ cells in Percoll density gradients

No. of experiment	Total number of germ cells (× 10^6)	Percoll gradients			
		Band 1 (× 10^5)	Band 2 (× 10^5)	Band 3 (× 10^6)	Band 4 (× 10^5)
1	2.125	—	1.51	0.82	1.04
2	6.532	—	3.71	2.76	2.29
3	5.113	—	1.95	2.13	2.26
Average	4.59	—	2.39*	1.90	1.86*

*：$P < 0.01$, *vs* band 3

2.3　精原细胞的分离纯度分析

本实验主要根据精原细胞、支持细胞、管周细胞在体外培养时的各自形态学特征来进行判断和计数分析。第 1 带中主要为

死细胞及细胞碎片;而第2,4带中的细胞接种后,大部分细胞延展后伸出突起,从形态学判定,主要为支持细胞及少量管周肌样细胞。主要收集第3带中细胞进行培养。在接种培养3~4 h时,其中的支持细胞开始贴壁而精原细胞尚未贴壁,此时进行精原细胞的纯化;经纯化的细胞体外培养7~8 h后,绝大部分支持细胞已贴壁,大部分精原细胞开始贴壁,此时进行细胞计数。结果见表4,第3带中精原细胞的纯度平均达到60.42%。

表4 第3带中的精原细胞的纯度

Tab 4 Purity of spermatogonia in band 3

No. of experiment	Total number of cells ($\bar{x} \pm s$)	Number of spermatogonia ($\bar{x} \pm s$)	Percentage of spermatogonia (%)
1	288 ± 11	151 ± 10	52.43
2	741 ± 37	452 ± 27	61.00
3	539 ± 16	346 ± 18	64.19
Average	523 ± 21	316 ± 18	60.42

3 讨论

随着个体的发育成长,精原细胞开始分化形成各级生殖细胞,未分化精原细胞所占生殖细胞的比例逐渐下降,会给分离纯化增加困难。在成年动物的睾丸中,A型精原细胞只占未分化精原细胞的10.6%,占所有精原细胞的大约1.25%,仅占所有生殖细胞的0.03%[4]。根据我们的前期工作并参考有关报道[2,3],我们选用胎儿睾丸组织进行精原细胞的分离和纯化,此时的生精上皮内只有A型精原细胞和支持细胞,其它各级生精细胞尚未发育,理论上可获得最大量的精原细胞。

制备良好单细胞悬液的关键环节是采用适当的程序及消化方法。取出睾丸之后,我们先用尖镊仔细去除脂肪垫及睾丸白膜,然后将睾丸组织剪碎。进行第一步酶消化(必要时可重复消化1次)将没有消散的睾丸间质消散后,静置沉淀或低速离心,去除掉大部分间质组织及管周肌样细胞,获得纯度较高的曲细精管片段,最大程度地减少了间质组织及管周肌样细胞。然后进行第二步酶消化,去除基底膜部分并使曲细精管内细胞充分散开,释放出支持细胞和精原细胞。国外相关的文献报道和我们的实验结果表明,这种多步消化过程能有效地分离到纯度较高的曲细精管段并获得出较高产量和活率的单细胞悬液,同时确保绝大部分间质成分、管周肌样细胞去除。

Percoll是一种经聚乙烯吡咯烷酮(PVP)处理的硅胶颗粒,对细胞无毒,惰性,且与生物膜不发生粘附。用它制成的梯度可在室温下放置数星期而梯度的形状不发生丝毫变化。Percoll密度梯度离心已被许多学者用来分离各种动物的精子[5,6],而用于分离早期生精细胞特别是人精原细胞的目前国内尚少见报道。应用差异性粘附和Percoll密度梯度离心可从维生素缺乏(VAD)大鼠和小鼠睾丸中获得80%~90%的未分化型A型精原细胞[7]。Van等[8]应用成年维生素A缺乏的大鼠隐睾模型,首先利用花生凝集素(PNA)与精母细胞的结合作用将该种睾丸细胞悬液中的精母细胞清除,在通过Percoll不连续密度梯度离心分离,结果在比重为1.051 3~1.054 2 g/ml及1.054 2~1.056 4 g/ml两个界面分别获得了76%和80%纯度的A型精原细胞。但目前对人尤其时胎儿睾丸精原细胞的分离效果尚不明确。

通过本实验,我们发现11%~19% Percoll梯度主要为死细胞及细胞碎片;19%~27%及35%~43% Percoll梯度主要是大量支持细胞和少量管周肌样细胞。精原细胞主要分布于27%~35%(1.041 0~1.050 8 g/ml) Percoll梯度。这与有关的文献报道相似。该带细胞接种后,根据精原细胞与睾丸体细胞贴壁速度快慢的差异,利用选择性贴壁法,待睾丸体细胞开始贴壁极化而精原细胞仍然悬浮时(体外培养约在3~4 h后),将其进一步纯化;依据其形态学特征进行计数,结果精原细胞的纯度平均达到60.42%。本研究结果表明Percoll不连续密度梯度离心和差异粘附等方法可以有效的对人精原细胞进行分离纯化,并可应用于体外培养等进一步的研究中。

参考文献:

[1] Meachem S, von Schonfeldt V, Schlatt S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective[J]. Reproduction, 2001, 121(6): 825-834.

[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 A spermatogonia cultured in KSOM[J]. Biol Reprod, 1999, 61(1): 225-230.

[3] De Rooij D G, Grootegoed J A. Spermatogonial stem cells[J]. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10(6): 694-701.

[4] Feng L X, Chen Y, Dettin L, *et al*. Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line[J]. Science, 2002, 297(5580): 392-395.

[5] Morris L H, Randall A E, King W A, *et al*. The contribution of the male to ovine embryogenesis in an *in vitro* embryo production system[J]. Anim Reprod Sci, 2003, 75(1-2): 9-26.

[6] De Rooij D G, Schrans Stassen B H, Van Pelt A M, *et al*. Regulation of the differentiation of the undifferentiated spermatogonia[A]. In: Goldberg E eds. The testis: From stem cell to sperm function[M]. New York: Springer Verlag, 2000. 43-54.

[7] Schrans Stassen B H, Van de Kant H J, De Rooij D G, *et al*. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia[J]. Endocrinology, 1999, 140(12): 5894-5900.

[8] Van Pelt A M, Morena A R, Van Dissel Emiliani F M, *et al*. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes [J]. Biol Reprod, 1996, 55(2): 439-444.

(编辑 薛国文)