论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0570-04

人精原干细胞分离、培养及鉴定

刘世学,唐 伟,熊 涛 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科)

【摘要】 **目的** 采用两种酶两步法分离培养人睾丸精原干细胞。**方法** 先后应用Ⅰ型胶原酶和胰蛋白酶消化法,Percoll密度梯度离心,差异贴壁法,进行人精原干细胞的分离及培养;采用细胞免疫荧光法进行人精原干细胞的鉴定;流式细胞法对Oct-4标记阳性的细胞进行筛选,并同时检测所获精原干细胞的纯度,建立精原干细胞和支持细胞共培养体系。**结果** 两种酶两步法消化的人睾丸细胞悬液活细胞率为91.07%,Percoll密度梯度离心结合差异贴壁离心纯化后的细胞经Oct-4细胞免疫荧光法检测表达阳性,流式细胞技术检测阳性细胞所占比例为86.7%,该阳性细胞能够在支持细胞饲养层上稳定生长30 d。**结论** 所获Oct-4表达阳性细胞为精原干细胞。Ⅰ型胶原酶和胰蛋白酶两步酶消化法是一种经济、简单易行、对细胞污染损伤少的分离培养人精原干细胞的方法,利用此方法分离的人精原干细胞能够在支持细胞饲养层上形成稳定集落。

【关键词】 精原干细胞;分离;培养;鉴定
【中图法分类号】 R321.1;Q813.11 【文献标志码】 A

Isolation, culture, and identification of human spermatogonial stem cells

Liu Shixue, Tang Wei, Xiong Tao (Department of Urology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To isolate and culture spermatogonial stem cells (SSCs) from human testes with a two-step two-enzyme digestion method. **Methods** A suspension of human SSCs was obtained through enzymatic digestion of human testes with type Ⅰ collagenase and trypsin, and the SSCs in the suspension were isolated and cultured with Percoll density gradient centrifugation and different adherence method. Immunofluorescence assay was employed to identify SSCs and, in combination with flow cytometry, to screen Oct-4-positive cells and detect the purity of the SSCs. A co-culture system for SSCs and Sertoli cells was established. **Results** The viability of the obtained cells was 91.07% in the suspension. Immunofluorescence assay results demonstrated that the cells purified by Percoll density gradient centrifugation and different adherence method were Oct-4 positive. The flow cytometry results indicated the purity of the Oct-4-positive cells was 86.7%. The Oct-4-positive cells could stably grow for 30 days on the feeder layer of Sertoli cells. **Conclusion** The Oct-4-positive cells are SSCs. The two-step two-enzyme digestion method is economical, simple, and feasible for isolating and culturing human SSCs with reduced cell contamination and cell damage. The isolated human SSCs can form a stable cell colony on a supporting cell layer.

【**Key words**】 spermatogonial stem cells; separation; culture; identification; enzyme digestion

Supported by Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau(2009-2-80). Corresponding author: Tang Wei, E-mail: tangwei2060@yahoo.com.cn

近年来,男性不育的发生率逐渐升高,其中,不明原因的无精、少精、弱精症的患者逐年增多。因此,对精子发生机制及其影响因素的研究成为泌尿外科领域的热点之一[1]。精子的发生最早是由精原干细胞(spermatogonial stem cells,SSCs)的自我增殖和分化开始的,由于受到全身及睾丸结构和功能的复杂影响,导致体内研究SSCs很困难。因此,分离培养人SSCs,在体外建立稳定的SSCs系,为研究SSCs的增殖和分化提供了细胞模型。对于人SSCs的分离方法,一般是4种酶联合多步消化法对睾丸组织进行消化,本实验对以往人SSCs的分离培养方法进行了改进。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞来源 6~7月龄的合法引产的男性胎儿睾丸组织(由重庆医科大学附属第一医院产科提供)。本实验得到了重庆医科大学伦理学会的同意。

【基金项目】 重庆市卫生局重点项目(2009-2-80)
【通信作者】 唐 伟,E-mail:tangwei2060@yahoo.com.cn

1.1.2 主要试剂来源 DMEM/F12培养基(HyClone公司),优等胎牛血清(MDgenics公司),胰蛋白酶、胶原酶Ⅰ型(Sigma公司),兔抗人Oct-4一抗、FITC荧光素标记的羊抗兔IgG(北京博奥森生物技术有限公司),Percoll(Pharmacia公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 睾丸组织细胞悬液的制备 无菌采集胎儿睾丸,时间控制在30 min内,将睾丸置入装有PBS的培养皿中,移入超净台工作。用眼科镊及眼科剪剔除附睾、白膜及脂肪垫,将剥离的睾丸组织剪碎,大小约1 mm,用含青霉素200 U/ml、链霉素200 mg/L的D-Hanks液漂洗2遍,移入25 ml培养瓶中,加入1 g/L的Ⅰ型胶原酶,放入37 ℃的水浴箱中轻轻振荡消化10 min,轻轻取出后静置10 min,去上清,再加入3倍组织体积的0.25%的胰蛋白酶溶液,放入37 ℃的水浴箱中轻轻振荡消化10~15 min,在倒置显微镜下观察,见曲细精管软散,消化液中大量细胞悬浮即可。小心吸取消化液,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基终止消化。1 500 r/min离心10 min,见离心管底壁有大量细胞富集,去上清,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基洗涤2次,再加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基制成细胞悬液,用200目滤网过滤,离心后用Tris-NH_4Cl破坏红细胞,用PBS恢复等渗,再次滤网过滤,重悬细胞后台盼蓝检测并计算活细胞率。

活细胞率=活细胞数/(活细胞总数+死细胞总数)×100%

1.2.2 精原干细胞的分离、培养

1.2.2.1 Percoll密度梯度离心 参考毕罡等[1]方法并做一些改进,用PBS将Percoll细胞分离液分别稀释成11%、19%、27%、35%、43%的梯度液。从离心管底部开始依次由高到低浓度加入梯度液各2 ml,在Percoll分离液最上层缓缓加入新收集的细胞悬液。1 400 r/min(800×g)离心30 min使细胞分层。收集分布在27%~35% Percoll梯度之间的细胞,以PBS漂洗细胞2次,用培养液重悬细胞,调整细胞密度为3×10^6/ml。

1.2.2.2 差异贴壁法 将所获得的细胞放入37 ℃、5% CO_2培养箱中培养3~4 h,轻轻吸取培养液,放入25 cm培养瓶。3 h后再次吸取培养液,所获得的培养液中细胞即为纯化的SSCs,将其置入34 ℃、5% CO_2培养箱中培养。

1.2.3 支持细胞的分离、培养及鉴定 将睾丸组织细胞悬液浓度调整至1×10^6/ml后加入到8块96孔板第2、3列的前3孔中(每孔0.2 ml)以及1个25 cm^2培养瓶中(2 ml)和铺有多聚赖氨酸处理过的盖玻片的6孔板中,每孔0.5 ml。置34 ℃、5% CO_2的饱和湿度孵箱中培养3 h,见支持细胞贴壁后,吸去培养液。再加入含10%胎牛血清的DMEM/F12相同条件下培养48 h,支持细胞贴壁并呈现“人”字型,用20 mmol/ml的Tris-HCl处理3 min去除残余生殖细胞,加入10%胎牛血清的DMEM/F12培养,隔天换液,96 h左右支持细胞融和达90%。支持细胞通常以检测细胞内的小脂滴来鉴定[2],将已爬好片的6孔板中的盖玻片取出,70%冰丙酮固定15 min,70%乙醇轻轻清洗3次,加入油红O染色液室温下染色10 min,再以70%乙醇洗涤洗3次、去离子水洗3次,苏木精复染,自来水洗3 min,中性树胶封片。所获细胞每隔1 d换液1次,采用油红O染色对细胞进行鉴定。普通显微镜下观察并采集图像对人支持细胞进行初步生物学特征鉴定。

1.2.4 精原干细胞与支持细胞的共培养 待单独培养的支持细胞达90%汇合时,以10 g/L的丝裂霉素C处理2~4 h,D-Hanks液清洗5次,继续放入培养箱中培养24 h后即可用作SSCs饲养层。将分离获得的SSCs分成两部分,一部分按照和支持细胞1∶1的比例接种在饲养层上;另一部分置入96板中,均放入34 ℃、5% CO_2培养箱中培养。

1.2.5 精原干细胞的鉴定及纯度检测 免疫组化鉴定:将单独培养24 h的SSCs接种于放有盖玻片的6孔板中,爬片后用4%的多聚甲醛固定15 min,PBS冲洗3次,10%的胎牛血清孵育10 min,加入兔抗人Oct-4一抗,4 ℃过夜,PBS冲洗后加入生物素标记的羊抗兔IgG,室温下孵育2 h。滴加SABC液37 ℃孵育30 min;DAB显色后,苏木精染核、脱水透明,中性树胶封片。

免疫荧光鉴定:取(3~5)×10^6个单细胞用1%多聚甲醛固定30 min,用PBS漂洗3次,离心收集细胞。细胞沉淀中加入0.2% Triton X-100通透10 min,PBS洗3遍,再于细胞沉淀中加入兔抗人Oct-4一抗(1∶100),混匀后4 ℃过夜。PBS漂洗后加入荧光二抗(1∶100),4 ℃避光孵育2 h。同时设立以10%的兔血清替代一抗作为对照。荧光显微镜下摄片,计算5个视野的OCT-4阳性细胞百分率,根据公式求阳性细胞率。

阳性细胞率=荧光细胞总数/白光下细胞总数×100%

流式细胞仪检测纯度:PBS漂洗后重悬细胞进行流式细胞仪(FACSAria Ⅰ型,Becton Dickinson公司,由眼科学重庆市市级重点实验室提供)检测。同时设立空白与阴性对照,实验重复3次。用同样的方法检测共培养7 d的Oct-4阳性细胞。

1.2.6 单独培养的精原干细胞生长曲线的绘制 取之前接种好的96孔板中的细胞,每个时间点设12孔。分别于培养0、24、48、72、96、120、144 h时每孔加入5 g/L四甲基偶氮唑蓝(MTT)20 μl,继续培养4 h后,终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加入150 μl DMSO,振荡10 min,使蓝色颗粒充分溶解,酶联免疫检测仪(芬兰)选择570 nm波长测定其光密度值[D(570)],取其算术平均值作为该点的光密度值。

1.3 统计学分析

采用统计软件SAS 9.1,组间比较行单因素多水平间的多重比较分析。

2 结果

2.1 人睾丸两步酶消化后的活细胞计数

对5例男性胎儿睾丸组织分别进行了两步酶消化后活细胞计数,结果见表1,其平均活细胞、死细胞率分别为91.07%、8.93%。

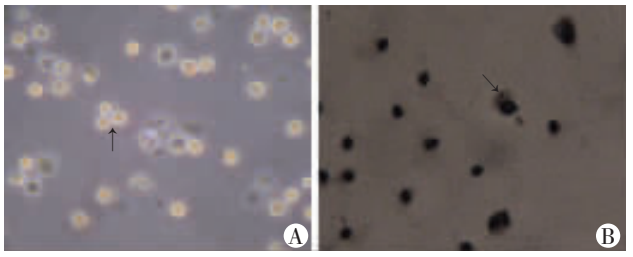
表1 5例男性胎儿睾丸组织两步酶消化后活细胞计数

序号	总的细胞数(×10^6)	活细胞数(×10^6)	死细胞数(×10^6)	活细胞率(%)	死细胞率(%)
1	4.841	4.503	0.338	93.02	6.98
2	3.782	3.365	0.417	88.97	11.03
3	6.458	6.022	0.436	93.25	6.75
4	5.568	4.985	0.583	89.53	10.47
5	3.654	3.257	0.397	89.14	10.86

2.2 人SSCs的鉴定

2.2.1 形态学及免疫组化鉴定 分离后的SSCs培养24 h后,可以观察到大量贴壁的SSCs。在倒置相差显微镜下,细胞

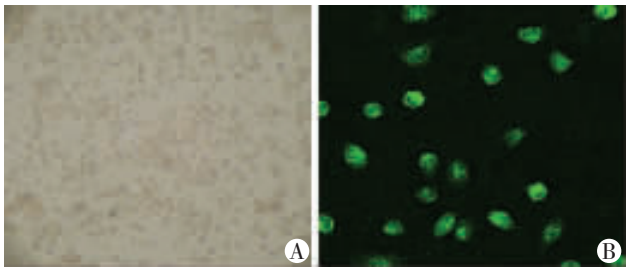
呈圆形或卵圆形，细胞呈现小团状聚集，细胞核大，细胞质少（图1A）。抗Oct-4抗体的免疫组化结果：在SSCs细胞核上有褐色的颗粒沉着（图1B）。



A：倒置相差显微镜观察；B：SSCs细胞核有OCT-4阳性表达（SABC）；↑：SSCs

图1 分离后24 h SSCs的观察及鉴定（×400）

2.2.2 Oct-4免疫荧光细胞鉴定 所得细胞经间接免疫荧光（FITC）法，于荧光显微镜下观察，见细胞质和细胞核均为阳性反应，有部分细胞聚集成团状，细胞数目较多，Oct-4表达阳性（图2）。Oct-4阳性细胞率为（77.87±4.68）%。

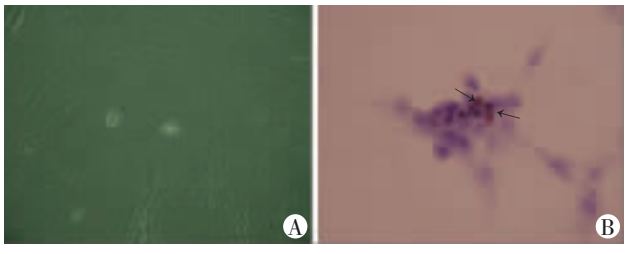


A：倒置相差显微镜观察（×100）；B：绿色荧光细胞为Oct-4阳性细胞（荧光显微镜 ×800）

图2 Oct-4在SSCs中的表达

2.3 支持细胞形态观察及其鉴定

96孔板中的细胞与培养24 h观察，细胞形态似梭形，周围有突起，细胞核圆形或椭圆形，细胞间连接成膜状。经油红O染色鉴定，细胞胞质中的脂肪滴呈现淡红色，可证实是支持细胞（图3）。

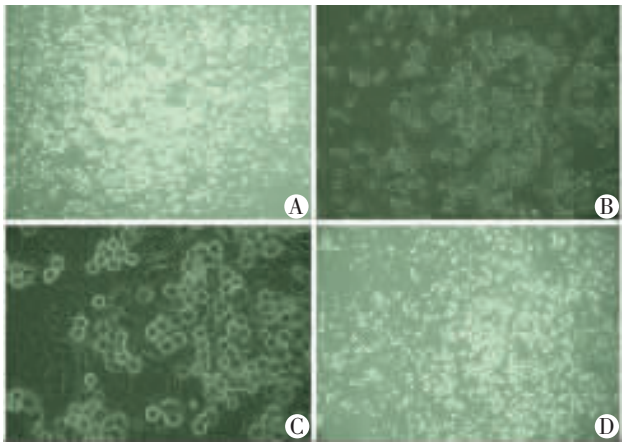


A：倒置显微镜观察（×100）；B：油红O染色（×400） ↑：细胞质中有红色脂滴

图3 支持细胞的观察及鉴定

2.4 SSCs与支持细胞共培养状态的观察

接种后24 h，可见SSCs结合在支持细胞饲养层上，培养48 h，可见明显分裂期的SSCs，且SSCs开始聚集，72 h可见SSCs集落，以后平均每隔1 d换液1次，于1、2周后观察，SSCs有凋亡及分裂增殖，但形成的集落基本稳定，连续培养观察1个月，仍可见大量细胞集落（图4）。



A～C：SSCs在支持细胞饲养层上培养48 h（A：×100；B：×200；C：×400）；D：SSCs在支持细胞饲养层上培养30 d（×100）

图4 SSCs与支持细胞共培养的观察

2.5 单独培养的人SSCs生长曲线

细胞于培养24 h后D（570）下降，之后又升高，于72 h达最高值，培养的细胞于24～72 h倒置显微镜下观察，细胞数目逐渐增加；96 h后活细胞数开始目下降，144 h最少。

2.6 流式细胞仪检测Oct-4免疫荧光阳性细胞

利用流式细胞仪筛选FITC，测得差异贴壁联合Percoll法纯化出的Oct-4标记的阳性细胞比率为86.7%，共培养7 d状态下的Oct-4标记的阳性细胞比率为24.8%。

3 讨论

干细胞是一种特殊的细胞，通过自我不断更新，分化为各类原始细胞系[3]。SSCs又是干细胞群里特殊的一类，由它衍生的精子的遗传信息可以组成新的胚胎干细胞，将遗传信息一代传一代。最近的研究发现，从人睾丸中可以分离出跟原始胚胎干细胞类似的多能干细胞，说明人的睾丸细胞有很大的研究价值[4]。精子的发生最早是由SSCs开始的，由双倍体的A型SSCs分化而来。在人胎儿时期，生精上皮内只有SSCs和支持细胞，几乎无其他各级生精细胞[5]。本实验选用6～7月龄的合法引产的胎儿睾丸组织，理论上可以获得大量的SSCs。目前，国内外对于消化睾丸细胞的方法繁多，消化过程复杂，步骤多，时间长，会影响细胞的活性，同时也增加了污染的机会。因此，选取一种简单易行的消化方法成为制备良好单细胞悬液的关键。在用酶消化过程中，先采用Ⅰ型胶原酶消化纤维组织，再采用胰蛋白酶消化，使得曲细精管里的SSCs和支持细胞大量释放。必要时可以重复消化1次。本实验在探讨两种酶两步法消化的过程中，曾做过较多尝试，多次实验表明，这种方法简便易行，且减少污染，在保证细胞数量的前提下，细胞活率高，达到了平均91.7%的活细胞率。该细胞活率与国内毕罡[1]及国外He等[6]用多种酶消化的人睾丸组织的细胞活率相近。

Herrid等[7]比较了层黏连蛋白黏附的差异贴壁

法、Percoll不连续密度梯度离心、流式细胞分选和磁珠分选4种SSCs分离方法,层黏连蛋白黏附的差异贴壁法可浓缩细胞5.3倍,为所有方法中最高,Percoll法可浓缩3倍左右。本实验采用普通差异贴壁联合Percoll法纯化SSCs。Van-Plet等[8]采用Percoll密度梯度离心,从维生素A缺乏的大鼠睾丸细胞悬液中分离A型精原细胞,在28%~30%密度梯度之间所获精原细胞纯度约为7%,在30%~32%之间所获精原细胞纯度约为80%。Lzadyar等[9]运用类似方法,从5月龄的牛睾丸细胞中获得了纯度为75%的A型精原细胞。本实验主要参考国内毕罡等[1]所用Percoll密度梯度,直接取27%~35% Percoll梯度之间的细胞,SSCs主要分布于此梯度之间。因支持细胞的贴壁速度较快,经两次差异贴壁分离,可去除细胞中绝大部分的支持细胞。本课题利用此方法纯化的SSCs纯度达到86.7%,与国外Hamra等[10]从大鼠睾丸中分离出SSCs纯度为97%的报道差距较小。

Oct-4已成为干细胞标志物,它与其他转录因子如Sox、FoxD3结合,共同作用于许多下游靶基因的启动子或增强子,正/负调控下游靶基因的表达,从而维持干细胞的自我更新状态[11]。在胎儿睾丸细胞中,Oct-4的表达只局限于SSCs,而发生增殖的B型精原细胞,包括原始细线期、偶线期、粗线期的精母细胞Oct-4为阴性。Huang等[12]用带绿色荧光的Oct-4抗体标记小鼠SSCs,结果SSCs呈强阳性表达,且从蛋白质组学和基因组学方面进行了验证。因此其可作为鉴别SSCs的标志物。本实验采用间接免疫荧光技术,采用带绿色荧光的二抗进行标记,利用流式细胞技术筛选出两群细胞,Oct-4标记的阳性细胞所占比例为95.8%;荧光显微镜下观察,Oct-4标记的阳性细胞为圆形,符合SSCs的形态,且非特异性染色少。说明Oct-4标记SSCs是一种有效的方法。

本实验单独培养的SSCs在培养的24 h,活细胞率呈现下降趋势,但48 h活细胞率又逐渐上升,于培养72 h达最高峰,然后再逐渐下降。说明SSCs在单独培养的条件下,由于所处环境由胎儿体内转变为体外,再经过酶的消化影响,血清也由人血清变为胎牛血清等原因,导致SSCs在24 h活细胞数目减少。但在培养的48 h,随着对培养环境的逐步适应,加之血清中也含有一些维持其生长的必需因子,所以细胞开始逐渐增殖。经历一个短暂的增殖期后,由于始终缺乏SSCs所需的bFGF、GFR、GDNF等生长因子,导致活细胞数目逐渐减少。目前,SSCs的长期稳定培养需要的条件一般有两类,一类是添加bFGF、GFR、GDNF等生长因子,另一类就是提供饲养层细胞。Sadri-Ardekani等[13]建立了一种人SSCs的长期体外培养体系,在加入了GDNF等培养因子的前提下,SSCs在体外长期存活28周以上。Koruji等[14]建立了成年小鼠SSCs与支持细胞短期共培养模型,发现SSCs有明显的增长和克隆。本实验将人支持细胞作为SSCs的饲养层,发现SSCs在支持细胞饲养层上贴壁快,有明显增殖,且形成较多SSCs克隆,培养1个月,集落仍较多,说明了人SSCs可以在支持细胞饲养层上形成一段时间的稳定集落。本实验为体外研究人SSCs的分化、后续课题研究精子的发生及影响机制奠定了基础。但是,本实验只进行了人SSCs的单独短期培养,并未形成稳定的细胞系,对于人SSCs的单独长期培养及稳定细胞系的建立有待进一步的实验研究。

参考文献:

[1] 毕罡,李彦锋,李黔生,等. 人睾丸精原细胞的分离和纯化[J]. 第三军医大学学报,2005,27(11):1142-1144.
[2] Wang H, Wang H, Xiong W, *et al*. Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells *in vitro* through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining [J]. Reproduction, 2006, 132(3):485-492.
[3] Nagano M, Patrizio P, Brinster R L. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes[J]. Fertil Steril, 2002, 78(6):1225-1233.
[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] de-Rooij D G, Grootegoed J A. Spermatogonial stem cells[J]. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10(6):694-701.
[6] He Z, Kokkinaki M, Jiang J, *et al*. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia[J]. Biol Reprod, 2010, 82(2):363-372.
[7] Herrid M, Davey R J, Hutton K, *et al*. A comparison of methods for preparing enriched populations of bovine spermatogonia [J]. Reprod Fertil Dev, 2009, 21(3):393-399.
[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.
[9] Izadyar F, Spierenberg G T, Creemers L B, *et al*. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis[J]. Reproduction, 2002, 124(1):85-94.
[10] Hamra F K, Chapman K M, Wu Z, *et al*. Isolating highly pure rat spermatogonial stem cells in culture[J]. Methods Mol Biol, 2008, 450:163-179.
[11] Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells[J]. Dev Biol, 2004, 275(2):269-286.
[12] Huang Y H, Chin C C, Ho H N, *et al*. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1 dependent pathway[J]. FASEB J, 2009, 23(7):2076-2087.
[13] Sadri-Ardekani H, Mizrak S C, van-Daalen S K, *et al*. Propagation of human spermatogonial stem cells *in vitro*[J]. JAMA, 2009, 302(19):2127-2134.
[14] Koruji M, Movahedin M, Mowla S J, *et al*. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 2009, 45(5/6):281-289.

(收稿:2010-10-21 修回:2010-12-03)
(编辑 吴培红)