

上海交通大学医学院



论文题目<u>小鼠精原干细胞分离纯化、体外培养</u> 及鉴定

学生姓名 _	程姹萍
学生学号	5087609029
专业	药学
指导教师	高维强、陈伟
学院(系)	医学院药学系

完成日期 2012 年 4 月



小鼠精原干细胞分离纯化、体外培养及鉴定

摘要

精原干细胞(Spermatogonial stem cells, 简称 SSCs)是位于睾丸曲细精管基膜一群成体干细胞, 既能自我更新,又能定向分化成各阶段的生精细胞,在雄性一生中持续分化精子,并可在一定条件下诱导分化成类胚胎干细胞以及生殖干细胞。由于精原干细胞在治疗雄性不育、生产转基因动物、干细胞基础理论研究、遗传资源保护等方面具有广阔的应用前景, 精原干细胞目前已然成为新的研究热点。

精原干细胞在睾丸中含量较少,仅占成熟睾丸中所有生殖细胞的 0.03%,如何从组织中获取精原干细胞是针对精原干细胞各项研究能够顺利进行的关键。多篇科学研究文献中采用重力沉降法、差速贴壁法、盘化法、隐睾手术富集法、Percoll 密度梯度离心法、免疫磁珠分选法和荧光结合细胞分选法等方法分离获取精原干细胞,但得到的精原干细胞活度及纯度差异较大。本实验基于人精原干细胞分离纯化的操作方法,尝试利用两步酶消化法,差异贴壁法以及流式细胞分选等方法获取小鼠精原干细胞,体外培养后用形态学以及免疫荧光进行细胞鉴定。

本实验现已基本建立和完善分离提纯小鼠精原干细胞的实验方法,获得细胞进行体外培养,鉴定后基本确定获取的细胞是精原干细胞,为下一步验证精原干细胞诱导分化潜能做好前期实验准备。

关键字:精原干细胞,分离纯化,体外培养,细胞鉴定



SEPARATION、PURIFICATION、CELL CULTURE AND IDENTIFICATION OF MICE SPERMATOGONIAL STEM CELL

ABSTRACT

Spermatogonial stem cells (Spermatogonial stem cells, referred to SSCs) are adult stem cells which are settled in the basement membrane of the testicular seminiferous tubes. They can not only self renew, but also differentiate into the various stages of spermatogenic cells, continuously differentiate into sperm throughout male life. When offered some certain conditions, SSCs can be induced to differentiate into embryonic-like stem cells and germ cells. Spermatogonial stem cells has broad application promising in the treatment of male sterility, production of transgenic animals, stem cells in basic theoretical research, and conservation of genetic resources , and now spermatogonial stem cells has become a new hotspot.

Spermatogonial stem cells are quite rare in the testis, accounting for only 0.03% of all germ cells in the mature testes. How to obtain SSCs from the testis is the key to the reseach of SSCs. There are a number of Articles reminded some methods to obtain SSCs, for example gravity sedimentation method, differential adhesion method, disk method, cryptorchid surgery enriched by Percoll density gradient centrifugation, magnetic cell sorting method, fluorescence combined with cell sorting and so on. With different methods , activity and purity percentage of SSCs are different. In this study, we built our protocol based on human spermatogonial stem cell separation and purification methods , which use the two-step enzymatic digestion, differential adhesion and flow cytometry sorting method to get the purified mouse spermatogonial stem cells. After SSCs in culture ,we identify SSCs with morphological and fluorescence characterization combined. This system has been basically established and the protocol of the separation and purification of mice spermatogonial stem cells been improved . It is a pre-experiment of confirmation in future for the potential exploration of differentiation of spermatogonial stem cells.

Key words: spermatogonial stem cell, separation and purification, cell culture, identification



目 录

另 ^一 早	1
1.1 精原干细胞的起源	1
1.2 精原干细胞的生物学特性	1
1.2.1 形态特性	1
1.2.2 增殖分化特性	2
1.2.3 特异性分子标记	3
1.3 精原干细胞与药物	4
1.3.1 干细胞与药物	4
1.3.1.1 药物筛选	5
1.3.1.2 药物对毒性的检测	5
1.3.2 精原干细胞与药物	5
1.3.2.1 胚胎干细胞的研究局限	5
1.3.2.2 精原干细胞的优势	5
1.4 精原干细胞纯化的研究现状	5
1.5 本课题的研究意义以及需要解决的问题	6
第二章 小鼠精原干细胞分离纯化	7
2.1 主要试剂和仪器	7
2.2 实验前期准备	7
2.3 实验方法	7
2.4 实验结果与讨论	8
第三章 小鼠精原干细胞体外培养	10
3.1 主要试剂和仪器	10
3.2 饲养层制作	10
3.2.1 获取 Sertoli cell	10
3.2.2 Sertoli 传代培养	10
3.2.3 丝裂霉素 C 处理	10
3.3 实验方法	11
3.7 实验结果与讨论	11
第四章 小鼠精原干细胞体外鉴定	14
4.1 主要试剂和仪器	14
4.2 实验方法	14
4.3 实验结果与讨论	15
第五章 结论与展望	
5. 1工作总结	17
5.2 工作展望	
参考文献	
谢辞	19



第一章 绪论

干细胞是一类既能自我复制更新,又能在一定条件下诱导分化成组织细胞的多潜能细胞。根据干细胞的发育潜能,我们将干细胞分为三类:全能干细胞、多能干细胞及单能干细胞。但是大部分干细胞只能分化成特定的细胞系,如造血干细胞、神经干细胞等,并不具有全能性。胚胎干细胞具有全能性,能够分化成所有成体组织细胞,实际上只有受精卵及其初次分裂的细胞属于胚胎干细胞,因此由于受到伦理道德限制,胚胎干细胞并不是很好的试验材料。

随着对各种干细胞的深入研究发现,全能性在一些形成生殖系的细胞中得到保留。有少数细胞在胚胎生殖早期分化成为原始生殖细胞(primordial germ cells,PGCs),这些细胞在生殖系特殊的转录过程中表达了胚胎干细胞特异转录因子Oct-4,以及原始生殖细胞分子标记物VASA基因的产物[1][2]。雄性睾丸中,在某些特殊的信号传导通路作用下,雄性原生殖细胞在发育成熟的睾丸中既分化成各级精原细胞,又成为一种新型的干细胞,而这种新型干细胞能在雄性一生中分化生成成千上万的生殖细胞,这种细胞既是本文的主角一精原干细胞(spermatogonial stem cells)。

1.1 精原干细胞的起源

精原干细胞(Spermatogonial stem cells, 简称精原干细胞)是位于睾丸曲细精管基膜上的一群成体定向干细胞. 既能自我更新,以维持自身数量恒定,又能定向分化成各阶段的生精细胞, 在雄性一生中持续分化精子^[3]。精原干细胞是雄性成体内唯一可复制的二倍体的永生细胞, 也是成年哺乳动物体内唯一能将遗传信息传递给下一代的成体干细胞^[4]。

精原干细胞由原始生殖细胞分化而来。原始生殖细胞(primordial germ cells,PGCs)是来自于外胚层,发育到原肠胚中期,小鼠的 PGC 出现在胚胎后部胚外中胚层;若玄除该区细胞,发育成的胚胎将没有生殖细胞;这是迄今为止所知道的有关 PGC 起源的最早记录,并已被普遍接受 $^{[6]}$ 。随后,PGCs 增殖并且迁移到生殖脊并被前期性腺的体细胞包绕。在雄性生物体中,这些生殖细胞成为性原细胞,停止增殖并停留在 $^{[6]}$ G0 $^{[6]}$ G1 期,一直维持到出生后数日(小鼠约为 $^{[6]}$ d) $^{[6]}$ 。约在小鼠出生第 $^{[6]}$ 天,一部分具有伪足的性原细胞获得迁移功能,向基底膜移动,最终定居在曲精小管基膜内,埋嵌在支持细胞间,分化成以精原干细胞为主的精原细胞;另一部分无伪足的性原细胞则发生凋亡 $^{[7]}$ 。

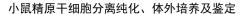
1.2 精原干细胞的生物学特性

1.2.1 形态特性

目前对啮齿类动物的精原干细胞形态特征研究的比较详尽。以小鼠为例,性原细胞迁移附着在曲精小管基膜上形成精原干细胞,此时其形态仍类似于性原细胞,直径约 14—15 μm; 胞核一般为球形或卵圆形,核内有散在的异染色质,染色质较均匀,核内有时会有一个空泡; 多数情况下核仁不清楚,形状不规则,核仁内有一明显的网状核仁线,在核的偏中心存在; 当核变大时,一般有 3—5 个核仁出现,染色质变为更为粗糙的颗粒,核内的空泡多数消失^[8]。

1.2.2 增殖分化特性

生物龛(Niche)是生物体内干细胞自我更新或存活的特定发育环境。在 Niche 中,干





细胞具有较高自我更新的可能性并很少分裂。干细胞分裂得到的两个子细胞,若不能保留在 Niche 中即会发生定向分化。在睾丸中,精原干细胞定居的 Niche 主要由支持细胞(Sertoli cells)形成(见图 1)。

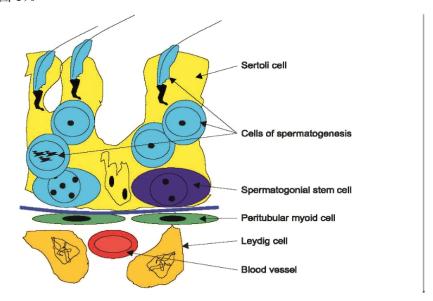


图 1: 精原干细胞生存的 niche 示意图

精原干细胞具有高度的自我更新潜能,正常情况下个体整个生命期中精原干细胞的自我更新与定向分化保持动态平衡,始终保持自身群体数量恒定。在成年动物体内含量极低,据估测,成年小鼠睾丸中约有 10⁸ 个生殖细胞,约有 2×10⁴ 个细胞是精原干细胞,占睾丸内未分化精原细胞的 10.6%、精原细胞的 1.25%、生殖细胞的 0.01%~0.02%^[5]。随着年龄的增长,精原干细胞的自我更新潜能会逐渐下降,导致个体的生精能力逐渐减退。

精原干细胞既能自我更新,以维持自身数量恒定,又能定向分化成各阶段的生精细胞,在雄性一生中持续分化精子。以大鼠为例,根据分化程度的不同可以将精原细胞划分为三种: 1. 干细胞: A_{single} (A_{S}); 2. 增殖细胞: A_{paired} (A_{pr}) 和 A_{aligned} (A_{al}); 3. 分化细胞: A_{1} -A4,间型和 B 型精原细胞。其中 A_{s} 精原细胞被认为是精原干细胞,而 A_{pr} 和 A_{al} 是 A_{S} 未分化的子代细胞; A_{1} -A4,间型和 B 型则是已分化的细胞。

 A_{S} 精原细胞分裂时,其两个子代细胞组成 A_{pr} ,由于 A_{S} 胞质分裂的不完全, A_{pr} 之间有细胞间桥连结。 A_{pr} 或进一步分裂或两个细胞分开重新形成 A_{s} 。 A_{pr} 的进一步分裂形成 8,16,甚至 32 个细胞的链状排列型精原细胞 A_{al} , A_{al} 即为第一代分化细胞——Al 型精原细胞,后者进行连续 6 次分裂,经历 A2、A3、A4、间型、B 型精原细胞,形成初级精母细胞并最终形成精子[9] (图 2)。



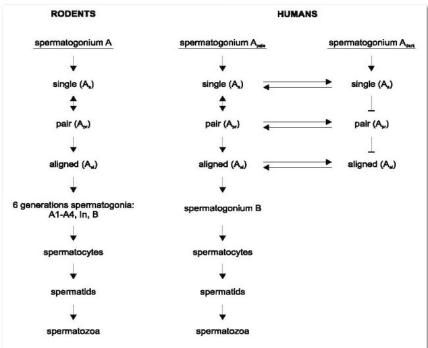


图 2: 表格式的精原干细胞分化图

1.2.3 特异性分子标记

干细胞往往具有一些标记基因,标记基因的表达分析是鉴定干细胞的有力手段。精原干细胞具有的表面标记有α6、β1、SSEA-1、SSEA-4、TRA-1-60、Thy-1、CD9、CD24、PLZF、GFR-α1等,不表达c-kit、MHC-1等表面标记(见表1)。小鼠精原干细胞的研究显示,CDH1,PLZF,GFR-α1是精原干细胞的标记基因。用免疫荧光染色方法分析这些标记基因的表达产物,或用RT-PCR方法分析这些转录本的存在,是常用的鉴定精原干细胞的方法。

Marker	Specification	Germ cell type								
		A,	Apr	A_{al}	A1-4	In	В	Spc	RS	ES
c-Kit-R	The transmembrane tyrosine kinase receptor; receptor for stem cell factor (SCF)			+	+	+	+	+	+	
GCNA1	Germ Cell Nuclear Antigen 1	+	+	+	+	+	+	+	+	
VASA (MvH)	ATP-dependent RNA helicase (from DEAD- box family)	+	+	+	+	+	+	+	+	
EE2 antigen	GTP-binding protein; required for cell transformation and interaction with the putative effector protein GAP	+	+	+	+	+	+	+		
DAZL	Deleted in azoospermia-like, an RNA-binding protein, one of the members of the DAZ family	+	+	+	+	+	+	+		
Stra8	Stimulated by retinoic acid gene 8; required for premeiotic DNA replication	+	+	+	+	+	+	+	+	+
a6-integrin (CD49f)	A cell surface receptor which mediates cell-cell and cell-extracellular matrix attachments	+	+	+	+	+	+	+		
β1-integrin (CD29)		+	+	+	+	+	+			
Ep-CAM	Epithelial cell adhesion molecule	+	+	+	+	+	+			
Oct4 (POU5F1)	Octamer-binding transcription factor 4	+	+	+						
GFR-α1	Receptor for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)	+	+	+						

表1:啮齿类动物中的生殖细胞表面标记分子 [9]



	A glycophosphatidylinositol (GPI)-linked								T	
CD24	membrane sialoglycoprotein	+	+	+						
Thy1 (CD90)	Thymus cell antigen 1, a GPI linked cell surface glycoprotein member of the immunoglobulin superfamily	+	+	+						
Nanos3	A 173 amino acid protein that contains one nanos-type zinc finger, involved in germ cell proliferation	+	+	+						
CD9	A transmembrane glycoprotein that plays a role in cell-cell adhesion	+	+	+	+	+	+			
EGR3	Early growth response transcription factor 3	+	+							
NGN3	Neurogenin 3; a transcriptional regulator that determine cell fate	+	+	+				+		
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc-finger oncoprotein	+	+	+						
RBM	RNA binding motif protein, Y-linked; is involved in spermatogenesis	+	+	+	+					
Sox-3	Comprised a family of genes that are related to the mammalian sex determining gene SRY; Sox genes encode putative transcriptional regulators implicated in the decision of cell fate	+	+	+						
TAF4B	A cell-type specific transcriptional co-activator of the transcription factor NFκB; essential for activation of anti-apoptotic genes	+	+	+	+	+	+	+		+
Bel6b	B-cell CLL/lymphoma 6 member B protein	+	+	+						
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·							•		
Numb	Neuronal cell fate decisions, a signaling adapter protein plays a role in the determination of cell fate during development	+	+	+	+	+	+	+		
Lrp4	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4, also known as multiple epidermal growth factor-like domains 7: MEGF7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ret	Proto-oncogene, structurally related to the growing family of tyrosine kinase transmembrane receptor; involved in GDNF signaling	+	+	+						
Sohlh2	Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2; a nuclear protein that functions as a transcription factor during oogenesis and spermatogenesis	+	+	+						
CDH1 (CD324)	E-cadherin, Ca2+-dependent adhesion molecules	+	+	+						
GPR125	G protein-coupled receptor 125	Ť	+	+						
Nucleostemin	GTP-binding protein 3 that maintains the proliferative capacity of stem cells	+	+	+	+	+	+	+		
UTF1	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1	+	+	+						
I : 20 (T17)	RNA-binding, cytoplasmic protein that	- 1								

 A_i : A_{aingle} : spermatogonia; A_{pr} : A_{paired} spermatogonia; A_{al} : $A_{alignet}$ spermatogonia; A1-A4: differentiating type A1 to A4 spermatogonia; B: type B spermatogonia; Spc: spermatocytes; RS: round spermatids; ES: elongated spermatids

controls the timing of events during embryonic

1.3 精原干细胞与药物研究

- 1.3.1 干细胞与药物
- 1.3.1.1 药物筛选

Lin28 (Tex17)

胚胎干细胞具有全能性,可在体外经过定向诱导分化成各种组织类型的人体细胞,如肿瘤细胞常用于药物筛选,胚胎干细胞这项特性可以使得更多类型的细胞实验成为可能。当研发的药物在细胞系中安全且效果良好,才有资格进一步进行动物和人体试验。

小鼠精原干细胞分离纯化、体外培养及鉴定



利用干细胞用于药物筛选的应用实例不在少数。Wu 等[10]用此方法筛选发现二氨基嘧啶可诱导类胚胎干细胞向心肌细胞分化,进一步研究证明二氨基嘧啶类似物是一个 Hedgehog 途径拮抗剂; Lee 等[11]首次用诱导性多能干细胞细胞建立了家族性植物神经功能不全症(FD)的细胞模型。然后利用这一有利的疾病模型来筛选治疗 FD 的特异性药物。

1.3.1.2 药物对毒性的检测

治疗药物在人体内通过肝脏进行生物转化,新药研发过程中药物的生物转化过程是必须要测定的。以往对于候选化合物的肝毒性评价往往采用实验动物作为模型,实验过程漫长且受限因素较多。而原代人源细胞在体外培养有来源困难、存活时间段、数量少的问题,相比之下干细胞具有无限的增殖能力,可分化为其他多种细胞,及来源方便等优势。其中胚胎干细胞更是具有自我更新及多谱系分化的能力。

1.3.2 精原干细胞与药物

1.3.2.1 胚胎干细胞研究的局限

胚胎干细胞源于受精卵发育形成的桑葚胚和胚囊内细胞团中的早期胚胎细胞。人类胚胎干细胞的来源大约有四种:人工流产后的人类胎儿组织;通过体外受精产生的人类胚胎,治疗不育症的夫妇不再需要;用捐赠者的配子通过体外受精创造的人类胚胎以及通过体细胞核转移技术以及无性生殖方法产生的人类胚胎。关于胚胎是不是"人"的问题一直是干细胞研究伦理学中争论的热点。取材的不便以及伦理道德方面的限制,使得开展利用胚胎干细胞进行药物筛选等实验无法大规模的展开[12]。

1.3.2.2 精原干细胞的优势

精原干细胞能表达胚胎干细胞特有的表面分子,并且可以诱导分化成三个原始胚胎层。 分离纯化后的精原干细胞在体外培养过程中,可以被诱导分化类胚胎干细胞以及生殖干细胞。并且精原干细胞是成年哺乳动物体内唯一能将遗传信息传递给下一代的成体干细胞,具有种群多、比较集中、存在时间长、可以自我增殖与分化等特点。

研究人员认为精原干细胞可体外大量繁殖,定向诱导为特异性细胞,再植入受体内,达到修复损伤、治疗疾病的目的,是临床医学、干细胞生物工程库和组织工程理想的种子细胞之一。虽然目前并没有将精原干细胞用于药物研究的相关研究报道,但根据干细胞在药物上应用的研究以及精原干细胞本身的特性,理论上精原干细胞在新药研发、药物检测等方面会有极好的应用前景。

1.4 精原干细胞纯化的研究现状

精原干细胞纯化的方法有多种,依据精原干细胞与曲精小管细胞悬液中体细胞(支持细胞及少量管周细胞)及其他各级分化的生精细胞在贴壁能力、大小、比重、表面标志等方面的差异,出现有差速贴壁法、Percoll密度梯度离心法、免疫磁珠分选法、流式细胞分选等方法。

差速贴壁法不需要特殊设备,操作简单,费用低廉,可进行较大量细胞的分离。在含有胎牛血清的培养体系中,大部分体细胞对明胶的吸附能力远远超过精原细胞,短时间即可贴壁。而精原细胞尚未贴壁或者贴壁不牢,轻轻吹打即可脱落。另一方面分化的精原细胞比未分化的精原细胞更容易粘附在鼠尾胶原上,而在未分化的精原细胞中精原干细胞更容易吸附在laminin包被的培养皿中,因为Laminin是生精小管基底膜细胞外基质主要成分之一,去掉未贴壁细胞,将贴壁细胞收集即可得到纯化的精原干细胞。多曙光[13]等采用此方法获得纯度达90%的精原干细胞。但耗时较长,并且需要仔细观察细胞贴壁特性,积累经验。

Percoll密度梯度离心法无需特殊设备,便于开展,它是利用不同比重的细胞在Percoll高速离心后形成的连续密度梯度中形成各自的细胞带的原理,吸出细胞带,洗涤后即得到了

小鼠精原干细胞分离纯化、体外培养及鉴定



纯化的细胞。Bucci 等用此法得到了纯度为 51%大鼠A 型精原细胞[14]; 毕罡等发现人精原细胞主要分布于27%~35%Percoll 梯度间。但由于曲细精管细胞悬浮液的复杂性,使用该种方法会使得分层多且不太清晰,而且操作过程繁琐,纯化程度不高。

免疫磁珠分选法的原理是细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合,在外加磁场中,通过抗体与磁珠相连的细胞被吸附而滞留在磁场中,其他的不在磁场中停留,达到分离效果。因此只要根据已报道的精原干细胞特异性表面标志,利用其相应的特异性抗体处理磁珠,即可将偶联在抗体上的磁珠标记细胞分离出来。Brinster实验组^[15]最先以整合素α6为表面抗原进行免疫磁珠分离,分选细胞的效率提高了8.4倍。Kubota等^[16]以Thy-1为表面标志,应用免疫磁珠技术从成年隐睾小鼠、成年小鼠、幼年小鼠以及新生小鼠睾丸中分别获得了富集6倍、30倍、4倍和5倍的精原干细胞。他们实验组还以c-Kit,MHC-1阴性和Thy-1阳性三个参数结合得到了富集25倍的精原干细胞。

流式细胞术:目前研究证实精原干细胞具有低侧向散光特性,具有一些特异表型,根据这些特异性分子标记或荧光染料染色特性,即可用带有荧光标记的抗体或荧光染料对细胞进行染色,然后用流式细胞仪进行分选,从而将精原干细胞分离纯化。Shinohara^[17]等用此法获富集度达几十倍至上百倍的精原干细胞。Kubota等用此法富集到精原干细胞浓度达到每15个细胞中就有一个。

1.5 本课题的研究意义以及需要解决的问题

干细胞为具有无限制自我更新能力、同时也可分化成特定组织的细胞,在发育过程中处于较原始的细胞阶段,人体内多处地方含有干细胞,如脂肪、血液、骨髓等等。根据分化程度,干细胞可被分为胚胎干细胞和成体干细胞,其中胚胎干细胞具有全能性,而成体干细胞具有分化成特异组织细胞的潜能。精原干细胞是位于睾丸曲细精管基膜上的一群成体定向干细胞,永久分化成精子细胞的克隆源,既能自我更新,又能定向分化成各阶段的生精细胞。同时精原干细胞也是雄性成体内唯一可复制的二倍体的永生细胞,成年哺乳动物体内唯一能将遗传信息传递给下一代的成体干细胞。在不必转入外源基因的情况下精原干细胞就可在体外自动被诱导为多能干细胞,并且该多能干细胞可分化为来自三个胚层的多种细胞系,具有多方向分化的潜能。

目前文献中出现过的精原干细胞分离纯化的方法较多,有免疫磁珠分选法、差异贴壁法、流式细胞法等[7]。并且在体外用合适的培养基,培养液以及适当添加生长因子,可连续培养超过6个月,传代超过30代,且保持葡萄串状。虽然文献中提及的分离提纯精原干细胞的方法很多,其中也不乏获得纯度和活度均较好的实验报道,但是由于实验试剂,实验仪器,实验环境,操作人员等多方面因素的不同,同一个实验操作步骤并不一定适合每一个课题组的实验需要。

精原干细胞在治疗雄性不育、生产转基因动物、干细胞基础理论研究、遗传资源保护等方面具有广阔的应用前景,如何高效率获取精原干细胞是研究人员需要解决的问题。为能顺利开展一系列关于精原干细胞的实验,本课题作为前期实验,将基于已有的人精原干细胞分离纯化实验操作步骤,针对实验室中具备的实验条件,通过不断尝试和调整,希望能摸索优化并建立起一套适合小鼠精原干细胞的分离提纯实验方法和详细的操作步骤,为之后的实验提供良好的细胞来源。除此之外,在获取细胞之后,如何鉴定所获取细胞是否是所需细胞以及在体外用何种培养条件使得精原干细胞能保持其增殖能力也是本课题需要解决的问题。尽管已是努力安排实验,但由于时间有限,本课题得到的成果是不足的,有待之后的更深入实验研究。



第二章 小鼠精原干细胞分离纯化

精原干细胞是由一部分具有伪足的性原细胞获得迁移功能后向基底膜移动,最终定居在 曲精小管基膜内,埋嵌在支持细胞间,分化而成。单个精原干细胞在体内呈圆形或椭圆形。 本实验是基于人精原干细胞分离纯化的实验操作步骤,采用传统的两步酶消化法,差异贴壁 法以及流式细胞分选等方法分离获取小鼠精原干细胞。

2.1 主要试剂和仪器

磷酸缓冲液(PBS, GIBCO)、DMEM(GIBCO)、胎牛血清(FBS,SIGMA)、胶原酶IV型(sigma)、胰蛋白酶10X(Trypsin,sigma)、Trypsin-EDTA(TE,sigma)、脱氧核糖核酸酶(DNase,罗氏)、0.1%明胶溶液等

恒温摇床、二氧化碳培养箱、倒置显微镜、高速离心机等

2.2 实验前期准备

(1) 酶I: 1mg/ml 胶原酶IV型+1mg/ml DNase。

精密称取胶原酶IV型3g,用2.7ml DMEM溶解,无菌滤网过滤后,加入提前300μl配置好的DNase溶液(10mg/ml),混合均匀。

- (2) 酶II: 1mg/ml 胶原酶IV型+1mg/ml DNase+1mg/ml 10X trypsin+1ml 1X trypsin/EDTA 精密称取胶原酶IV型5g,用3ml DMEM溶解,无菌滤网过滤,加入500μl DNase溶液,500μl 10X trypsin和1ml Trypsin/EDTA,混合均匀。
 - (3) 10%FBS: 45ml DMEM + 5ml FBS + 双抗P/S 1:100
- (4) 0.1%明胶包被:取一大皿,在里面加入约4ml 0.1%明胶,34℃恒温冰箱包被1小时。 1小时后,取出大皿,弃去上清,用PBS轻轻清洗1次,待用。

2.3 实验方法

2.3.1 获取单细胞悬液

- (1) 出生六天(P6)的昆明小鼠酒精浸泡处死,用己消毒的器械无菌剖开腹腔,取出膀胱附近的2个椭圆形睾丸,放在PBS中待用。
- (2) 细胞房中,在倒置显微镜下用尖头镊子除去睾丸白膜,取出里面的曲精小管,放入PBS中待用。于超净台中除去培养皿中的PBS,余下的曲精小管用弯头剪剪成半液体状,检查是否还有大块的组织块。
- (3) 用提前34℃预热好的酶I冲洗剪刀,减少小管损失。将加好酶I的小培养皿放入大培养皿中放到34℃恒温摇床作用五分钟,视酶作用情况可适当延长作用时间。
- (4) 酶I消化完后,小管呈分散状,此时收集小皿里的液体置于15ml离心管里,用DMEM 清洗小皿数次,也将液体转移到离心管中,再用DMEM重悬到10ml左右,静置沉降10分钟,以除去小管表面松散粘附的细胞。
- (5) 弃去上清,重新用DMEM重悬沉降10分钟。沉降完成后,弃去上清,用酶II重悬,轻轻吹打6[~]8次,用玻璃吸管将小管悬液转移到50ml玻璃瓶中,34℃恒温摇床作用15min(用玻璃管是减少单细胞吸附在塑料制品表面的损失)。
 - (6) 将玻璃瓶悬浊液转移到离心管中,1,000rpm,离心1min,得到的含有单细胞的上清

小鼠精原干细胞分离纯化、体外培养及鉴定



转移至15ml离心管中,沉淀保留。单细胞悬液1,000rpm,离心5min, 获得的上清将上一步的沉淀重悬,继续34℃恒温摇床作用15min。获得的细胞沉淀用1ml 10%FBS重悬并终止胰蛋白酶作用,加14ml DMEM稀释终止其他酶的消化作用。

- (7) 重复步骤6两次。
- (8) 将3次获得的单细胞重悬液1,000rpm, 离心5min, 用10% FBS或PBS重悬获得的沉淀, 重悬后即可获得单细胞悬液。

2.3.2 细胞纯化

(1) 差异贴壁

将获得的单细胞悬液转移到处理好的0.1% 明胶包被的大皿中,添加约5ml 10%FBS,贴壁过夜。第二天将大皿中的上清收集,1,000rpm,离心5min后再用约1ml 10%FBS重悬即可获得比较纯的精原干细胞。

(2) 流式细胞分选

根据精原干细胞特异的表面分子标记,选用兔抗GFR-α1为一抗,驴抗兔荧光染料488作为二抗。标记一抗、二抗后,用流式细胞分选仪对单细胞悬液进行分选。

将用1ml PBS重悬的单细胞悬液,加 $5\mu l$ 一抗以及约 $7\mu l$ FBS(保护细胞的作用),34℃恒温摇床作用25min。

一抗作用完全后,取10ul作为对照,剩余的单细胞悬液1,000rpm,离心5min。700ul PBS 重悬沉淀,加入2ul 二抗以及约7 μl FBS(保护细胞的作用),避光操作,置冰上作用20min。

二抗作用完全后,1,000rpm, 离心5min, 沉淀用200ul PBS重悬,即可进行流式细胞分选。

2.4 实验结果与讨论

精原干细胞的形成出现在小鼠出生的第六天左右,随着发育的进行,精原干细胞在自身增殖的同时也不断分化成为各个阶段的精原细胞,虽说自身数量有所增加,但是其所占生精上皮细胞的比例下降。成年动物体内精原干细胞含量极低,仅占所有生殖细胞的0.01%~0.02%^[5]。由于精原干细胞具有这样的增殖分化特性,作为实验动物的取材时期选择非常重要,如果供体日龄太小,性原细胞还未获得在受体睾丸分化成精原干细胞的能力,如果供体日龄太大,精原干细胞所占的比例很低,分离提纯的效率就很低,精原干细胞的纯度和活度都不能保证。综合考虑,小鼠的取材时期一般为7日龄左右,大鼠为20日龄左右,猪为80日龄左右,兔为1个月,而狗和牛则选用3个月左右为宜;鸡选用15~19日鸡胚。

在本实验早期的时候,我们采用4周大的昆明小鼠作为实验材料,虽然获得睾丸以及曲精小官的体外操作比较简单,但是最后获得的细胞中精原干细胞所占比例很少,其它细胞很多,获得单细胞悬液之后的纯化过程进行的困难。第三次本实验尝试用4周左右的GFP小鼠(携带绿色荧光基因小鼠)分离纯化精原干细胞,但发现GFP这个自身荧光染料对纯化时染得二抗有一定的干扰,流式细胞仪筛选的效果不佳。随后,本实验利用日龄为6的昆明小鼠作为实验材料,按相同的分离纯化方法之后获得单细胞悬液(图3左)。贴壁过夜后,即能获得大小比较均一,且呈圆形的单细胞。

由于我们是直接从小鼠睾丸中获得曲精小管,组织消化后得到的单细胞悬液,因此不可避免的就会需要解决原代细胞培养容易污染的问题。在数次获取精原干细胞的实验中,获得的细胞曾经多次被霉菌、细菌、真菌等微生物污染(图3右)。被污染的细胞基本都只能弃之不用,甚是可惜,除了添加抗真菌素Fungizon、抗生素氨苄、青霉素/链霉素之外,操作过程必须严格保证无菌,解剖器械都要提前用75%酒精擦拭干净后进行紫外消毒。



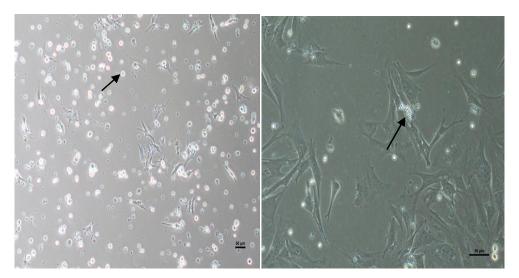


图3: 左图为分离得到的细胞,箭头所指的通过形态认定的精原干细胞,细胞呈圆形,单个分散。右图箭头所指为20倍显微镜下观察到的细菌污染。

精原干细胞位于睾丸曲细精管基膜,生活在主要由支持细胞Sertoli cells组成的生物龛中。从实验供体中获得良好的单细胞悬液,我们采用最常用的两步酶消化法,常用胶原酶、胰蛋白酶、透明质酸酶消化,除掉大部分管周细胞和基底膜部分,并使生精上皮充分散开,释放出支持细胞和生精细胞。除以之外添加DNase以消除细胞破裂释放的DNA 引起已解离细胞之间的黏附现象。但是实验最后不能保证所有的细胞均为单细胞,如果较多细小组织块,可用40um的细胞筛进行过滤。

在获得比较好的单细胞悬液之后,我们就要根据精原干细胞的特性选择纯化效果及效率 比较高的纯化方法。本课题第一次纯化单细胞悬液时选用的免疫磁珠分选法,但纯化的效果 并不好,得到的细胞大小不一,仍有一些组织块等。除去制备单细胞悬液时操作手法不当引 起的失误外,本课题组认为单细胞悬液过磁珠时,悬液是大批量的一次性通过磁场,势必不 能做到每个细胞都经过磁场的筛选以达到高纯度的筛选结果,因此放弃利用此法对精原干细 胞进行纯化。

如今本实验是利用差速贴壁及流式细胞分选相结合的纯化方法。即将获得的单细胞悬液铺在包被有0.1%明胶的大培养皿上,34℃贴壁过夜,此时绝大部分体细胞都已经贴壁完全,收集未贴壁细胞1,000rpm,5min离心,重悬后得到单细胞悬液。采用精原干细胞特异表面分子GFR-α1,进行免疫荧光染色,再利用流式细胞分选仪对细胞重悬液中的阳性表达情况进行分析,收集阳性率较高的一部分细胞进行纯化收集(见图4,方框内即是设定收集的细胞),即可获得大小基本一致,无组织块,无死细胞的单细胞溶液。但是通过流式细胞分选仪分选发现,样本中的高阳性表达率与低阳性表达没有很明显的区分,在坐标图中显示的是连续的区域,因此我们只能主观判断需要纯化的部分。造成这样连续谱图的原因还不清楚,主观判断导致这个实验结果可能不够严谨,目前还在尝试另外一些纯化方法。



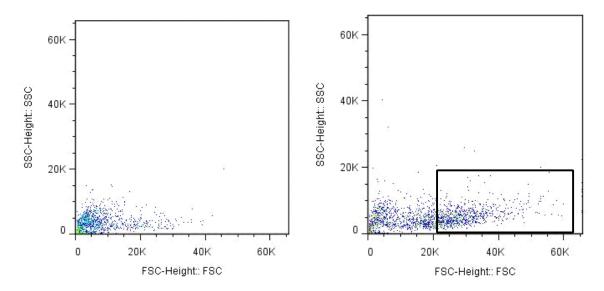


图4: 横坐标显示为荧光染料标记的GFR- a 1表达情况,一个黑点代表一个细胞,数字越大表明该细胞对GFR- a 1的阳性表达率越高,即基本可以确定是精原干细胞。 左图为阴性细胞的流式图,右图为阳性细胞的流式图。

第三章 小鼠精原干细胞体外培养

精原干细胞是动物体内唯一能进行遗传信息传递的干细胞。精原干细胞的体外培养及其细胞系的建立,在生物学、医学及畜牧业生产等领域扮演着重要的角色。在原始生殖细胞在雄性睾丸中定居在主要由Sertoli cell组成的体内环境,以支持细胞为饲养层体外饲养精原干细胞,除了对精原干细胞体外培养起支持作用外,还能分泌免疫保护因子,以及多种生长因子和营养因子,如:胰岛素样生长因子(IGF—1)、白血病抑制因子(LIF)、干细胞因子(SCF)、胶质细胞源性生长因子(GDNF)等提供精原干细胞增殖分化一致的微环境。本课题将获取的精原干细胞与处理后的Sertoli cell共同培养,尝试摸索最佳体外培养条件[18]。

3.1 主要试剂和仪器

磷酸缓冲液 (PBS, GIBCO)、DMEM (GIBCO)、胎牛血清 (FBS,SIGMA)、胶原酶IV型 (sigma)、胰蛋白酶10X (Trypsin,sigma)、Trypsin-EDTA(TE,sigma)、脱氧核糖核酸酶 (DNase,罗氏)、丝裂霉素C等

恒温摇床、二氧化碳培养箱、倒置显微镜(NIKON)、高速离心机等

3.2 饲养层的制作

3.2.1 获取Sertoli cell

将出生六天(P6)的昆明小鼠处死,取出睾丸剥除白膜后用弯头剪剪至半液态,1mg/ml胶原酶IV型34℃恒温水浴作用5分钟。酶I消化至小管呈分散状,收集上清至15ml离心管中,用DMEM补充体积至10ml,沉降10分钟,之后弃去上清,沉淀用DMEM重悬并重复沉降一次。



沉降完成后,弃去上清,用酶II重悬,轻轻吹打6~8次,34℃恒温摇床作用15min。悬液 1,000rpm,离心1min,得到的上清转移至15ml离心管中,沉淀保留。单细胞悬液1,000rpm,离心5min,获得的上清将上一步的沉淀重悬,继续34℃恒温摇床作用15min。获得的细胞沉淀用1ml 10%FBS及DMEM重悬终止消化作用。重复步骤两次。将3次获得的单细胞重悬液 1,000rpm,离心5min,10% FBS重悬后铺在包被有0.1%明胶的培养皿中,贴壁过夜,除去上清即可获得较纯的Sertoli cells。加入10%FBS培养液,青霉素/链霉素处理,34℃恒温培养。

3.2.2 Sertoli 传代培养

细胞长满80%-90%皿底时传代,传代前将上清液弃去,用PBS清洗2次,吸尽PBS后加0.5x 胰蛋白酶(1.5ml 1x 胰蛋白酶+1.5ml PBS,轻摇混匀)镜检后,放入34℃恒温培养箱作用约 2min. 作用后,轻轻震荡摇晃培养皿,使得更多的单细胞脱落,若皿底还贴有单细胞,可用 PBS轻轻5~8次,收集上清并加入1ml 10% FBS中止胰蛋白酶作用,1,000rpm,5min离心,1ml 10% FBS重悬后以约1:3的比例铺在培养皿中,34℃恒温培养箱继续培养。

3.2.3 丝裂霉素C处理

细胞长至一定浓度并且生长状态良好可作为feeder cells时,将丝裂霉素C按20μl/ml的比例加入培养液中,34℃恒温作用2小时,之后弃去培养液,用PBS清洗2次后再加入适量10%FBS即可。

3.2.4 铺被feeder cells

将用丝裂霉素C处理过得Sertoli cell用传代的方法消化得到单细胞悬液,1,000rpm,5分钟离心后,用1ml 10%FBS重悬,细胞计数后,按6×10⁴密度加入到24孔板(提前1小时包被0.1%gelatin)中,补充培养液至750 μ l。34°C恒温培养一天后,可见Sertoli cell伸展吸附在底部。

3.3 实验方法

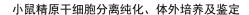
将贴壁过夜的大皿收集上清,1,000rpm,离心5min,得到的细胞沉淀用1ML 10%FBS重悬,放入事先包被好Sertoli cells的24孔板中,补充培养液至合适提及,并加入 1:1000 bFGF、1:1000 LIF、1:100 EGF、1:100 GDNF 34°C 恒温冰箱培养,平均4天换一次培养液,每日倒置显微镜下观察。

3.4 实验结果与讨论

小鼠睾丸生长在腹腔中,环境温度为34℃,因此体外培养精原干细胞的最适合温度为34℃。刚分离纯化得到的精原干细胞均为圆形或椭圆形,大小较为一致,散在分布;集落形态为葡萄串状。Sertoli细胞胞体呈长柱状,两侧大多有突起,折光性较强(图5)。接种在饲养层上的精原细胞会黏附在单层Sertoli细胞上。大约培养24h后可见精原干细胞增殖或集落形态。

细胞在体内的生长环境具有多因素相互干扰相互作用的,精原干细胞在体外培养由于睾丸结构和功能的复杂性,以及睾丸与丘脑、垂体之间的相互作用,使得要在体外完全模拟出体内生长环境是件很困难的事情。张学明等人通过实验发现干细胞因子(stem cell factor,SCF)在一定浓度有利于干细胞状态的维持和自增殖能力的调节;培养液中加入LIF(亦称分化抑制活性分子)后,细胞存活天数明显延长,但对精原干细胞分裂增殖的效果不如SCF明显。bFGF为肝素结合生长因子家族成员,具有诱导各种哺乳类正常二倍体细胞DNA合成的潜能,常与其他因子联合使用。胡建新等得到小鼠精原干细胞在体外培养时,维生素A能提高增殖分化能力的结论。

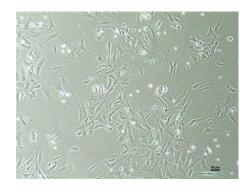
处理Sertoli cells并将其制作成精原干细胞体外培养的饲养层,是为了模拟精原干细胞体内生长环境,并为精原干细胞的生长提供支持。因此Sertoli cells铺在培养板上的密度对精原





干细胞的生长状态有十分直接的影响。过密或者过于稀疏都不能为精原干细胞提供一个好的生长环境。铺板的Sertoli cell最好是在3次传代之内,这时的细胞活性比较好,若使用超过3次传代的细胞,则要适当提高铺板的细胞密度。由于实验本课题初期尝试的是成年小鼠,后期改用出生后6天的小鼠,通过实验发现,出现仅6天小鼠的Sertoli cell活性比成年小鼠的Sertoli cell 要好,基本2天就能长到80%-90%的皿底,并且和提取的精原干细胞属于同个出生天数,因此更适合用于制作成为饲养层。在浓度方面,我们尝试了多种铺板浓度,最后确定用6×10⁴个/孔的密度铺板,得到的饲养层密度还比较合适。但是查阅了很多文献后,我们发现其他课题组利用的饲养层密度相比我们要更低的多,估计这样能给精原干细胞提供更大的生长空间,计划在之后的实验中尝试更小的细胞密度。

在铺了Sertoli cell之后,我们需要加些培养液给饲养层一个生长环境。由于培养板孔径较小,加入培养液后会出现液面效应。过多的培养液会使得细胞向圆孔两侧密集,过少的培养液会使得细胞向中间密集,这些现象都不利于饲养细胞。在多次尝试后,我们发现750ul的体积是比较合适(见图5)。



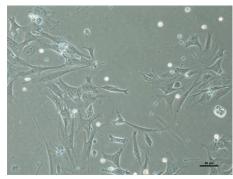


图5: 左图为10倍显微镜下的Sertoli细胞。细胞铺展在培养皿上,突起明显。 右图为20倍显微镜下的Sertoli细胞

待大部分Sertoli cell贴壁完全后,我们就可以将离心重悬的精原干细胞按照一定数量加入到24孔培养板中。单个呈圆形或椭圆形,相较于未贴壁的Sertoli cell个头较小并且比较规则,因此不存在观察干扰的问题。添加好特殊的精原干细胞培养液之后,我们需要每天通过倒置显微镜观察细胞的成长情况。在实验初期,我们得到一批长势优秀的精原干细胞,但是在培养一个礼拜之后,呈葡萄球状的精原干细胞集落在视野中消失观察不到。初步推测可能有两个原因及相应的对策: 1.由于在获取的单细胞悬液中有一些未去除干净的Sertoli cell,在血清环境中,Sertoli cell的增殖能力强过精原干细胞,因此增殖的Sertoli cell 掩埋了精原干细胞。根据这个推测我们采用了两次贴壁的方法,即在0.1%gelatin 贴壁过夜之后,收集上清离心重悬后重新铺在0.1% gelatin 包被的培养皿中贴壁,以除去剩余的Sertoli cell。2.在Sertoli cell包被之前,我们先用丝裂霉素C处理,使细胞失去增殖的能力。不同细胞需要处理的时间各异。在初步尝试时,我们采用2小时的处理时间,可能由于处理时间不够导致部分Sertoli cell没有失去增殖能力,在含有血清的培养条件下,Sertoli cell的增殖能力大于精原干细胞,因此实验过程中出现Sertoli cell过度增殖掩盖精原干细胞也有可能是由于丝裂霉素C处理不够彻底的缘故。根据这个推测,我们在之后的实验中将尝试不同的丝裂霉素C处理时间,以期找出最适处理时间,既保持细胞活性又使其失去增殖能力。

精原干细胞在体外培养一段时间后,显微镜下可明显观察到葡萄球状的细胞集落,这些 集落可能是精原干细胞自身增殖形成,也有可能是多个单细胞集聚而成。在查阅文献后我们 了解到精母细胞等其他细胞并不具有集聚的性质,因此我们初步判断形成集落的细胞就是精 原干细胞。通过多天的培养,培养板中葡萄球状的细胞集落数量明显增多,形状也变大。之



后利用倒置相差显微镜进行拍照(见图6)。

在目前的培养条件下,精原干细胞的增殖速度并不快,那究竟怎样的体外培养条件才是最适合精原干细胞增殖分化?本实验由于时间限制,还没有尝试更多的培养液条件,在之后的试验中我们将继续展开尝试。

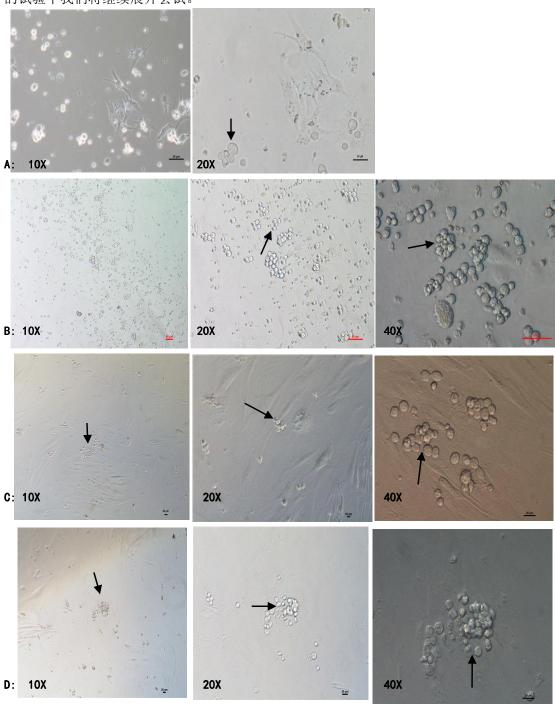


图6:显微镜目镜为10X,10倍为10X物镜照相所得;20倍为20X物镜照相所得;40倍为40X物镜照相所得。 A图为培养2日时的细胞,左图为10倍,右图为20倍。已能观察到一些立体的细胞集落,但大部分仍为分散的单细胞。

B图为培养了4天的细胞,从左至右分别为10倍、20倍、40倍。明显可以观察到聚集或增殖成葡萄串 状的细胞增多。

C图为培养了5天的细胞,从左至右为10倍、20倍、40倍。细胞集落明显增大



D图为培养了6天的细胞,从左至右为10倍、20倍、40倍。

第四章 小鼠精原干细胞体外鉴定

精原干细胞具有的表面标记有很多,比如α6、β1,、SSEA-1、SSEA-4、TRA-1-60、Thy-1、CD9、CD24、PLZF、GFR-α1等,未分化的精原干细胞不表达c-kit、MHC-1等表面标记。近年来,随着精原干细胞的研究深入,研究人员发现CDH1,PLZF,GFR-α1是精原干细胞的标记基因。用免疫荧光染色方法分析这些标记基因的表达产物,或用RT-PCR方法分析这些转录本的存在,是常用的鉴定精原干细胞的方法。

4.1 主要试剂和仪器

多聚甲醛、PBS、驴血清、Triton-PBS、兔抗鼠GFR-α1、兔抗鼠PLZF、驴抗兔IgG(携带绿色荧光染料)、DAPI等

荧光显微镜 (NIKON)、载玻片等

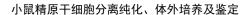
4.2 实验方法

- (1) 在24孔板中提前铺好包被有laminin的玻璃片,获得待鉴定细胞的悬液后小心滴加在玻璃片上,尽量使得平均分布,34℃培养几天后镜检查看大部分细胞是否都贴壁或粘附。
- (2) 将事先已培养有需鉴定的单细胞的小玻璃片取出,放置在直径为10cm的培养皿中,培养皿事先铺好疏水的薄膜。
- (3) 滴加约50ulPBS于玻璃片上,此时细胞处于半悬浮状态因此需要十分小心的清洗,除去培养基中的血清。用纸巾小心吸去PBS。重复清洗3次。
- (4) 滴加约50ul多聚甲醛 (PFA),用以固定细胞状态。在皿中放一些湿润的棉球,以保持培养皿里湿润,盖上盖子后PFA作用10min~15min。
- (5) 作用完成后,小心吸去多余的多聚甲醛,滴加约50ul的Triton(氘核)/PBS溶液作用5min-10min,除去多聚甲醛避免因残留的多聚甲醛使得一抗失效并对细胞进行透化处理。
 - (6) 用PBS清洗三次,每次5min,操作方法同步骤2。
- (7) 将与二抗同源的驴血清加到玻璃片上封闭30min,以排除一些非特异蛋白的干扰。作用完全后,PBS清洗两次。
 - (8) 加入一抗,室温孵育1小时
 - (9) PBS洗三遍,每次5分钟
 - (10) 加入二抗,室温孵育30-45分钟。
 - (11) 加入0.5 ug/ml DAPI (PBS配制)染色10分钟。
 - (12) 用PBS洗三遍,去除多余的DAPI。
 - (13) 加入20 ul封片剂封片。

4.3 实验结果与讨论

精原干细胞体外鉴定的方法有很多,比如形态鉴定、碱性磷酸酶(AKP)染色、免疫荧光染色等。本课题采用免疫荧光染色的方法对精原干细胞进行检测。

免疫荧光的基本原理就是抗原-抗体反应。由于抗原抗体反应具有高度的特异性,所以 当抗原抗体发生反应时,只要知道其中的一个因素,就可以查出另一个因素。免疫荧光技术



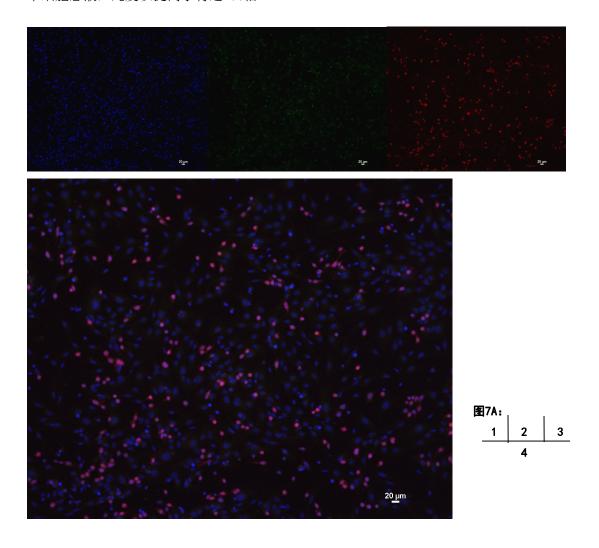


就是将不影响抗原抗体活性的荧光色素标记在抗体(或抗原)上,与其相应的抗原(或抗体)结合后,在荧光显微镜下呈现一种特异性荧光反应。

精原干细胞特异的表面分子标记有GFR-α1, PLZF等,利用标记有不同荧光染料的抗体与精原干细胞特异表面分子发生免疫结合反应,我们就可以基本判定获取纯化的细胞是否是精原干细胞。其中抗体GFR-α1自身不带有荧光标记,所以需要再标记一个二抗,此次用的是绿色荧光染料;抗体PLZF自身带有红色荧光,在荧光显微镜下显红色荧光。

除了给待鉴定的细胞染了两种一抗,以及针对 GFR-α1的二抗外,我们还给细胞染了 DAPI。DAPI即4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole),是一种能够与 DNA 强力结合的荧光染料,常用与荧光显微镜观测。因为 DAPI 可以透过完整的细胞膜,它可以用于活细胞和固定细胞的染色。DAPI 在荧光显微镜下显蓝色荧光。

照片由带照相功能的NIKON荧光显微镜拍摄所得。显微镜目镜为10X,10倍的照片为10X物镜照相所得;20倍为20X物镜照相所得;40倍为40X物镜照相所得。在获得不同荧光反应的照片之后,我们进行了分析(图7)。GFR-α1特异标记的荧光染料在显微镜下显示的是绿色的细胞膜染色,PLZF特异荧光染色显示的是红色的细胞核染色,而DAPI染色的结果是亮蓝色的细胞核染色。我们通过将同一视野下的不同荧光染料通道的照片重合,如果三种荧光能够相互重合,即可在很大程度上证实该细胞就是我们所要的精原干细胞,并且通过计数还能得到目的细胞在所有细胞中所占的比例,为了减少误差,分别分析了10倍以及20倍放大倍数下的荧光染色情况。我们将染细胞核的荧光染料DAPI拍照结果、PLZF拍照结果以及GFR-α1染色结果相重合后,在同片视野范围内,精原干细胞所占的比例约为25%。相比未经纯化的单细胞悬液,纯度以提高了将近100倍。



第 - 15 - 页 共 19 页



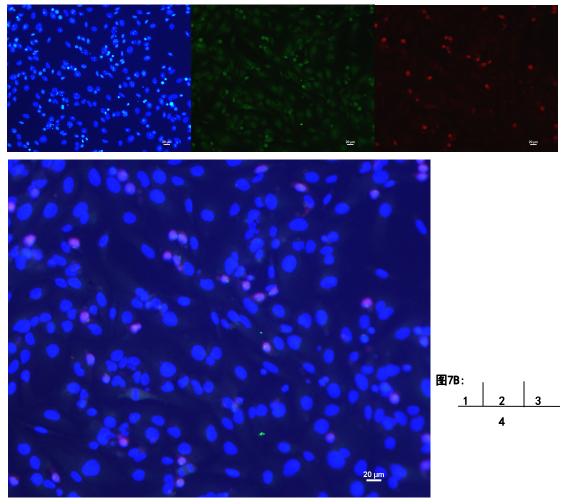


图7: 图7A是10倍物镜放大倍数视野。7A-1为DAPI荧光染色结果,核染色,蓝色;7A-2为GFR-α1荧光染色结果,细胞膜染色、绿色;7A-3为PLZF荧光染色结果,核染色,红色;7A-4为7A-1、7A-2、7A-3重合的效果(GFR-α1荧光染色信号较弱),图中三种颜色重合的即可判定为精原干细胞。

图7B是20倍物镜放大倍数视野。7B-1为DAPI荧光染色结果,核染色,蓝色;7B-2为GFR-α1荧光染色结果,细胞膜染色、绿色;7B-3为PLZF荧光染色结果,核染色,红色;7B-4为7B-1、7B-2、7B-3重合的效果,图中三种颜色重合的即可判定为精原干细胞。



第五章 结论与展望

5.1 实验结论

由于精原干细胞在雄性生物体内含量稀少,生存环境复杂不容易在体外模拟培养环境 等因素,导致获取精原干细胞进行深层次实验研究受到了阻碍。本次试验以获取小鼠精原干 细胞为主要目的,设计建立小鼠精原干细胞分离提纯的实验操作方法。

本次实验,我们先是尝试用成年雄老鼠作为实验材料,但是发现根据精原干细胞的分化特点,在成年小鼠体内细胞成分太过复杂,给之后的纯化过程造成了不小的麻烦。在阅读文献后,我们改用P6天的小鼠进行实验,虽然细胞总数相比于成年老鼠相差很多,但是目的细胞所占的比例却是大大的增加,在贴壁过夜后,上清中基本都是目的细胞。

精原干细胞在睾丸内受多种生物因子影响,生存调节模式复杂,在体外模拟体内生长环境很困难。我们在阅读大量文献后,采用基础培养基+少量血清+生长因子的方法对其进行培养,观察发现SSCs能在体外生长增殖一个多礼拜,但由于我们操作不当等因素,导致细胞到后期就出现污染等现象,很可惜。怎样的体外培养条件是最适合精原干细胞的,这还有待日后继续尝试。

鉴定精原干细胞的方法有形态学、免疫荧光等方法。很多科学家已经通过研究证明发现几个精原干细胞特异的表面标记,并且培养发现精原干细胞增殖之后会形成特殊的葡萄串状。本次实验,我们也同样是采取形态观察,免疫荧光的方法,基本能确定获得的细胞是精原干细胞。但由于这个实验进行一次所需的时间周期比较长,在有效的时间里,我并没有进行多次的鉴定验证,所以只能是基本确定。

5.2 展望

本次实验基本上已经确立了分离纯化精原干细胞的一系列实验操作步骤,同时以在体外培养获得了一些葡萄球状的细胞集落,将这些细胞进行免疫荧光染色后也得到了理想的结果。但是本次实验还是遇到了很多需要解决的问题,比如如何减少获取单细胞悬液时的组织块碎片,如何解决细胞容易污染的问题,如何收集精原干细胞等等。不过遇到问题才能解决问题。

精原干细胞作为成体干细胞的一种,除了有一般干细胞的特性之外,还具有自身强大的优势。它作为雄性成体内唯一可复制的二倍体的永生细胞,成年哺乳动物体内唯一能将遗传信息传递给下一代的成体干细胞,在基因遗传改造等方面的应用时其他干细胞不能替代的。除此之外,我们更感兴趣的是精原干细胞的分化潜能。除了胚胎干细胞之外,精原干细胞具有一部分胚胎干细胞特异的表面分子,在特殊条件诱导分化下能分化成为类胚胎干细胞,更甚者精原干细胞有分化成三个胚层的潜能。如何定向诱导精原干细胞分化必将成为一大研究热点。

本次实验只是个前期实验,如果能获得活度以及纯度都较好的精原干细胞,这为将来开展研究精原干细胞与不孕不育、精原干细胞与药物研究、精原干细胞与诱导分化等实验提供了好的开始。精原干细胞已经深深的吸引了我,在之后的三年研究生生活中,我将继续学习关于精原干细胞方面的知识与实验,以期有所收获。



参考文献

- [1] Sarah Meachem, Stefan Schlatt et al. Spermatogonia: stem cells with a great perspective, Reproduction (2001) 121, 825 834
 - [2] 陈玉冬,邹志华等. VASA 基因研究进展,动物学杂志,2010;45(4):173~180
- [3] Spradling A, Drummond Barbosa et al. Stem cells find their niche. Nature 14,98 104 (2001)
- [4] Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis, Dev Cell, 2007, 12: 195-206.
- [5] 苏亮, 唐志高. 胎儿期哺乳动物进行精原干细胞研究的初步探讨,中国畜牧兽医,2011,38(6):129-131
- [6] Kyle E. Orwig, Buom-Yong Ryu et al.Male germ-line stem cell potential is predicted by morphology of cells in neonatal rat testes. Cell biology,2002,9(99):11706-11711
 - [7] 采克俊,张易祥等. 精原干细胞的分离纯化方法,上海畜牧兽医通讯, 2008,1:67-68
 - [8] 张学明,李德雪等.精原干细胞的生物学特性,细胞生物学杂志,2006,28:37-41
- [9] Agnieszka Kolasa, Kamila Misiakiewicz et al. The generation of spermatogonial stem cells and spermotogonial in mammals. Reproductive biology,2011,1(12):5-23
- [10] Wu X, Ding S, Ding Q, et al. Small molecules that induce cardialgy genesis in embryonic stem cells[J]. J Am Chem Soc, 2004,126(6): 1 590-1591.
- [11] Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modeling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient specific iPSCs[J]. Nature, 2009, 461(7262): 402-406.
 - [12] 朱淼, 有关胚胎干细胞的伦理学讨论, 中国医学伦理学, 2003,4 (16): 6-11
- [13] 多曙光,吴应积,罗奋华,等.牛乳腺上皮细胞的分离培养及其生物学特征,动物学研究,2006,27(3),299-305.
- [14] Bucci LR, Brock WA, Johnson TS, et al. Isolation and biochemical studies of enriched populations of spermatogonia and early primary spermatocytes from rat testes[J].Biol Reprod, 1986,34(1):195.
- [15] Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. β 1- and α 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells, Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96, 5504-5509.
- [16] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells, Proc Natl Acad Sci USA, 2004,101(47), 16489-16494.
- [17] Schonfeldt VV;Krishnamurthy H;Foppiani L Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from Djungarian hamster,mouse,and Marmoset monkey testes.
- [18] 何大维,李旭良等,精原干细胞在支持细胞饲养层上的长期增殖特征,生殖与避孕,2006,6(26):323-327



第六章 谢辞

在毕业设计进行的三个月里,我接触了很多,了解了很多,同样也学习到了很多,有这么多成果,我必须要感谢很多人。

我要感谢高维强教授,感谢高老师能提供给我在这里进行毕业设计的机会,同样感谢高老师在百忙之中仍能不忘对我们毕设学生生活学习的关心。

我要感谢陈伟老师,感谢陈老师手把手教我做实验,让我从生物实验的门外汉开始慢慢 对生物实验有了些了解。陈老师对待科研严谨,充满激情,这些一直是我望尘莫及,急需学 习的。

我要感谢褚明亮师兄、李萍学姐等实验室一起实验的师兄师姐们解答我的困惑,在实验上也是对我有很多的指点。他们和善可亲,给实验室营造了一份积极向上,轻松活泼的实验气氛,让我开始热爱上实验的生活

我还要感谢实验室里一起做毕业设计的同学们,和他们一起共同学习,共同讨论实验心得的日子,使得我对我的课题有了更深刻的理解。

最后我要感谢在实验室的这段经历,使我提前体会到了做科研的乐趣,并且让我对以后的研究生生活有了进一步的理解和计划。这次毕业设计让我学有所得,满载而归。