

小鼠精原干细胞系自我更新和分化能力的体外观察

薛江阳,高亭亭,邵彬彬,郑皓宇,郑波,黄晓燕*

(南京医科大学组织胚胎学系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:体外观察小鼠精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)的自我更新和分化能力。方法:体外构建稳定的小鼠 SSCs 系,利用 EdU 细胞增殖分析试剂盒检测小鼠 SSCs 体外自我更新的能力;利用活细胞工作站进一步观察小鼠精原干细胞体外增殖现象;运用 TUNEL 法检测 SSCs 凋亡现象;通过维甲酸(retinoic acid, RA)诱导小鼠 SSCs,观察其体外分化的能力。结果:EdU 孵育小鼠 SSCs 2 h 后,流式检测细胞增殖率平均为 40.75%;活细胞工作站下可见正在分裂的干细胞;TUNEL 检测显示干细胞中凋亡信号很少;RA 诱导后,标记 SSCs 分化的基因(C-kit, Scp3 和 Stra8)表达量明显升高($P < 0.05$)。结论:稳定构建的小鼠 SSCs 系与体内的 SSCs 类似,具有较强的自我更新以及细胞分化能力,为下一步开展精原细胞相关基因和蛋白功能研究提供了良好的技术平台。

[关键词] 精原干细胞;自我更新;分化

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)02-155-05

doi:10.7655/NYDXBNS20160206

In vitro observation of self-renewal and differentiation capacity of mouse spermatogonial stem cell line

Xue Jiangyang, Gao Tingting, Shao Binbin, Zheng Haoyu, Zheng Bo, Huang Xiaoyan*

(Department of Histology and Embryology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the ability of self-renewal and differentiation of mouse spermatogonial stem cells (SSCs) *in vitro*. **Methods:** Mouse spermatogonial stem cell line was established stably. The capacity of SSCs self-renewal *in vitro* was detected *via* EdU Proliferation Kit; Cell proliferation was observed by Live cell Imaging System. Cell apoptosis was tested by TUNEL method. The capacity of SSCs differentiation was observed by retinoic acid(RA) induction. **Results:** After incubation with EdU for 2 hours, the proliferation rate was analyzed as an average of 40.75% by EdU Flow Cytometry Assay Kits. The dividing stem cells were clearly caught *via* short-term live cell imaging. The signal of apoptosis of SSCs was nearly undetected by TUNEL methods. The expression of genes (C-kit, Scp3 and Stra8) marking differentiation was increased after RA induction ($P < 0.05, n=3$). **Conclusion:** Similar as SSCs *in vivo*, SSC line *in vitro* also has the capacity of self-renewal and differentiation. It provides us a good platform to carry out the function of the related genes and proteins during mouse spermatogenesis.

[Key words] spermatogonial stem cells; self-renewal; differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(02): 155-159]

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是哺乳动物雄性生殖系中唯一具有自我更新和分化潜能的干细胞。与机体其他干细胞相似,SSCs 的数量极其稀少,在啮齿类动物睾丸,仅占有生殖细胞数量的 0.03%,但其意义十分重大,在雄性动物一

生中,SSCs 能源源不断地产生数以亿计的精子来维持生殖功能^[1-3]。虽然目前对于人类精原干细胞的研究还正在探索,但是啮齿类精原干细胞研究的蓬勃进展给男性不育带来了新希望和可能的治疗途径。

建立稳定的小鼠 SSCs 培养体系是目前研究 SSCs 自我更新和分化机制的关键技术平台^[4-5]。本课题组在前期研究工作中,参照日本 Shinohara 课题组培养体系^[6],构建了带有红色膜荧光标记的小鼠 SSCs 体外培养平台,目前已经稳定培养到 30(P₃₀)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2011CB944301)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:bbhxy@njmu.edu.cn

多代,同时可以反复冻存和复苏。为了进一步证实 SSCs 的活性,取 P₂₀ 的 SSCs 微注射移植入白消安处理的造模受体小鼠睾丸,证明了 SSCs 在同种异体内具有重建精子发生的潜能^[7]。本研究将在前期工作基础上,通过各种方法进一步体外观察小鼠 SSCs 自我更新和分化的能力,为下一步研究精原细胞相关基因和蛋白功能提供扎实的细胞培养平台。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠 SSCs 系及培养试剂参见文献^[7],Click-iT[®] EdU Flow Cytometry Assay Kit(Invitrogen 公司,美国),Hoechst H33342 (Sigma 公司,美国),TUNEL assay kit (Roche 公司,美国),全反式维甲酸 all-trans retinoic acid (RA,Sigma 公司,美国),DMSO(Sigma 公司,美国),RNeasy Plus micro kit(Qiagen 公司,美国),AMV reverse transcriptase(Promega 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 EdU 掺入法检测小鼠 SSCs 系的自我更新能力

实验组 SSCs 中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ EdU 孵育 2 h,对照组中不加 EdU 孵育,1%BSA/PBS 轻洗 1 遍后,固定剂室温避光固定 15 min,皂素渗透洗涤剂孵育 15 min。在 500 μL 反应体系 (438 μL PBS,10 μL CuSO₄,2.5 μL 叠氮化荧光染料,50 μL 1 \times 反应缓冲剂)中室温避光反应 30 min。1 \times 皂素渗透洗涤剂轻洗 1 遍后,Hoechst 染料染核 1 min,甘油封闭,激光共聚焦显微镜(LSM 710,Zeiss 公司,德国)观察拍照。对于检测增殖率的细胞,用 200 μL PBS 重悬后,40 μm 细胞滤网过滤悬液,用激发波长 488 nm 流式检测细胞中 DNA 含量,实验重复 3 次。

1.2.2 活细胞工作站

为直观观察小鼠 SSCs 体外自我更新的现象,进行了短期的活细胞观察。小鼠 SSCs 培养在 3.5 cm 玻璃皿中,与 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Hoechst H33342 染核孵育,然后放置在 Nikon TE2000-E 倒置显微镜的活细胞孵育小室(37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂,尼康公司,美国)。维持时间为 72 h,每 30 min 在 20 倍镜下采集 1 次图像,图像的分辨率为 1 600 像素 \times 1 200 像素。

1.2.3 TUNEL 法检测小鼠 SSCs 凋亡

根据美国 Roche 公司产品说明书对小鼠 SSCs 系进行 TUNEL 检测,细胞用 4%PFA 室温固定 1 h 后洗涤,阳性对照组用 3 U/mL DNase I 室温孵育 10 min。实验组和阳性对照组加入 TUNEL 反应混合液,避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,阴性对照组中不加 TUNEL

酶。PBS 洗涤后,Hoechst 染核 30 s,封片后激光共聚焦显微镜(LSM 710,Zeiss 公司,德国)观察拍照。

1.2.4 RA 诱导小鼠 SSCs 各相关基因的表达情况

实验组小鼠 SSCs 系用 1 $\mu\text{mol/L}$ 全反式维甲酸处理,对照组小鼠 SSCs 系用相同体积的 DMSO 处理,孵育 24 h 后收细胞,用 RNeasy Plus micro kit 提取 RNA,并用 AMV 反转录酶反转录成 cDNA^[8]。之后用 PCR 的方法检测 C-kit,Scp3,Stras8,Ddx4,Oct4,Plzf,Stella 和 Nanos2 基因表达水平的变化,引物序列见表 1,均由南京金斯瑞生物科技公司合成。

表 1 RA 诱导小鼠 SSCs 后 8 个基因的特异性引物
Table 1 Specific primers of the eight genes expressed in cultured SSCs after RA induction

基因名称	引物序列(5'→3')
C-kit	F: AGGTGTACCACTCCTGTCTC R: TATCTCCTCGACAACCTTCC
Scp3	F: ATGAATGTGTTGCAGCAGTG R: TAACATGGATTGAAGAGACTTTCC
Stras8	F: GTTTCCTGCGTGTTCACAAG R: CACCCGAGGCTCAAGCTTC
Ddx4	F: ATGCTGATCGGAGCAGAGG R: ATCTCTTCTAGCCATGCGGG
Oct4	F: CACGAGTGGAAAGCAACTCAGA R: TCTCCAACCTTACGGCATTG
Plzf	F: GCACGGACATGGCTGTCTTC R: CTGTGTGAACCCTGTAGTGCC
Stella	F: TACAACCAGAAACTAGTAAAGG R: GAAAGTGCAGAGACATCTGA
Nanos2	F: ATGGACCTACCGCCCTTTGA R: AGTGTATGAGCCTGGTCGCC

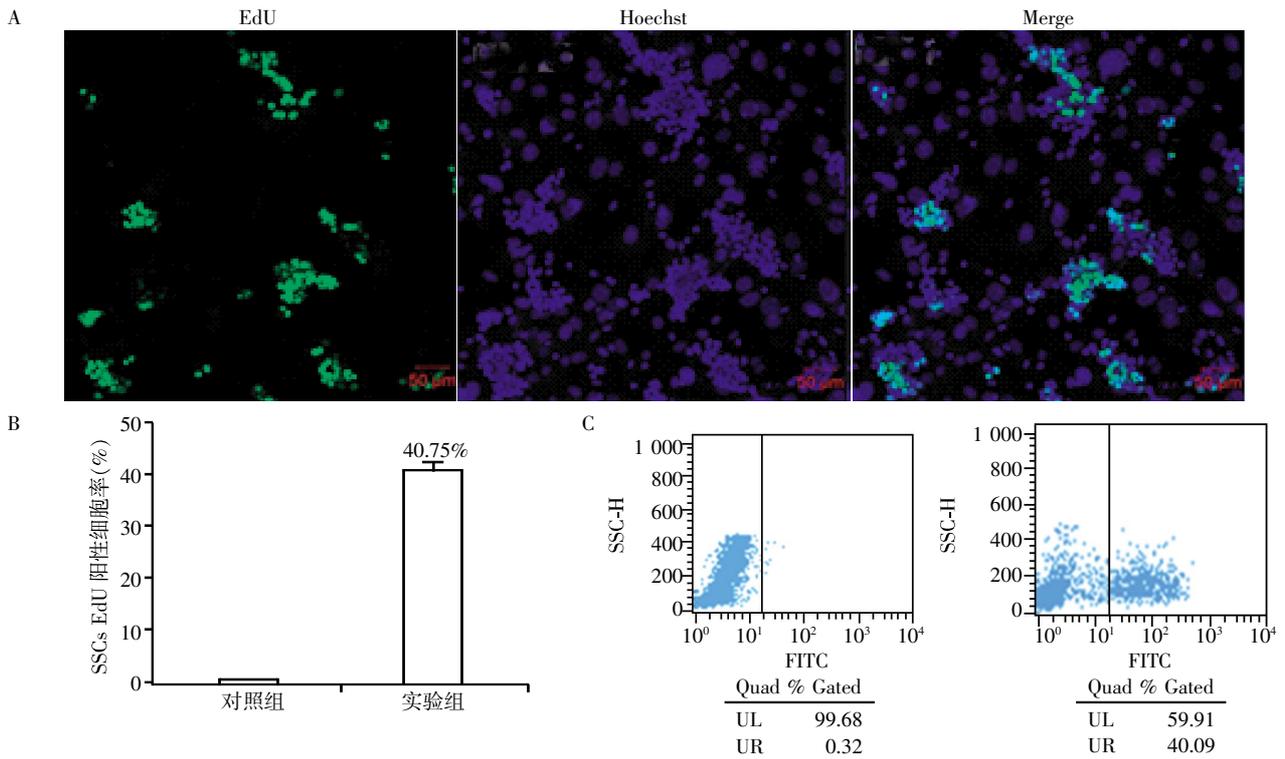
2 结果

2.1 EdU 掺入法检测小鼠 SSCs 的自我更新能力

通过小鼠精原干细胞和胚胎成纤维细胞共培养体系稳定构建了小鼠 SSCs 系^[7]。小鼠 SSCs 与 EdU 孵育 2 h 后,在激光共聚焦显微镜下观察到 SSCs 克隆中部分细胞呈现绿色荧光(图 1A),而成纤维细胞饲养层中未见荧光信号,流式细胞仪检测 EdU 掺入比例,3 次结果显示细胞增殖率平均为 40.75%(图 1B),表明这部分 SSCs 细胞合成出新的 DNA,具有较强的自我更新能力。

2.2 活细胞工作站观察分裂过程中的干细胞

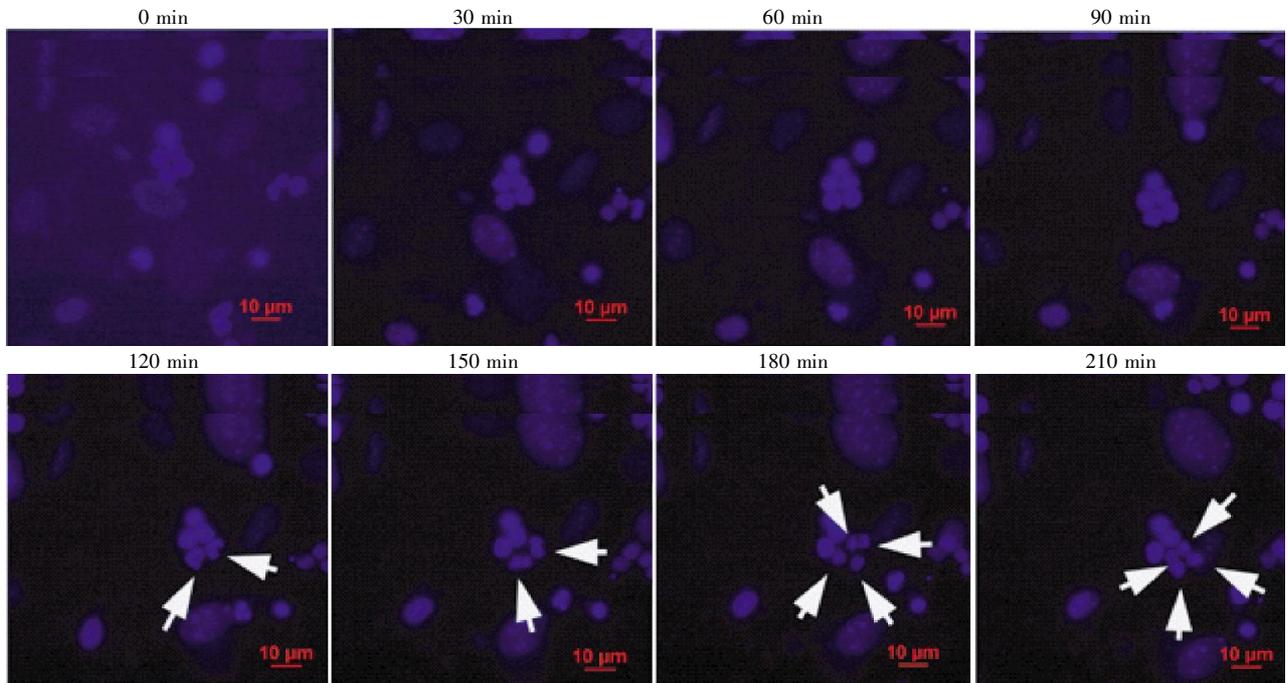
为更直观观察小鼠 SSCs 的增殖现象,将细胞置于活细胞工作站培养 72 h。如图 2 箭头所示,最初 2 h 内,观察到 2 个开始分裂的 SSCs,随后的 1 h,这 2 个细胞完全分裂成 4 个细胞,此后即开始新一



A:EdU 孵育小鼠 SSCs 2 h 后, 荧光显微镜下观察 EdU 荧光细胞;B:EdU 孵育小鼠 SSCs 2 h 后, 流式细胞仪检测 EdU 掺入细胞比例, 图示为 3 次实验的平均值;C:EdU 掺入法流式实验结果图。

图 1 EdU 孵育小鼠 SSCs 检测其自我更新能力

Figure 1 Self-renewal of mouse SSCs detected by EdU incubation



在最初 120~210 min, 可见 2 个细胞正在分裂(箭头所示)。

图 2 活细胞工作站短期观察小鼠 SSCs 的自我更新现象(Hoechst 染核)

Figure 2 Time-lapse imaging of cultured SSCs stained with Hoechst

轮的自我更新。

2.3 TUNEL 检测小鼠 SSCs 凋亡

TUNEL 法检测小鼠精原干细胞的凋亡, 如图 3

所示, 细胞整体凋亡荧光信号散在分布, 数量不多, 而 SSCs 克隆中未见明显凋亡信号。

2.4 RA 诱导小鼠 SSCs 各相关基因的表达情况

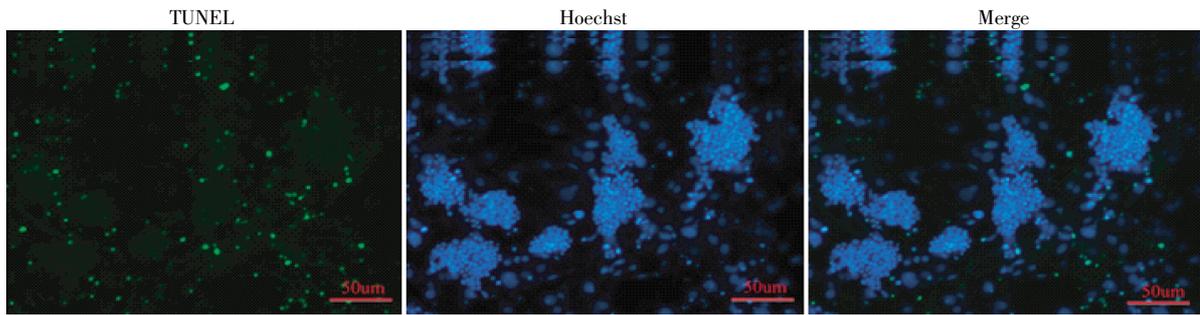
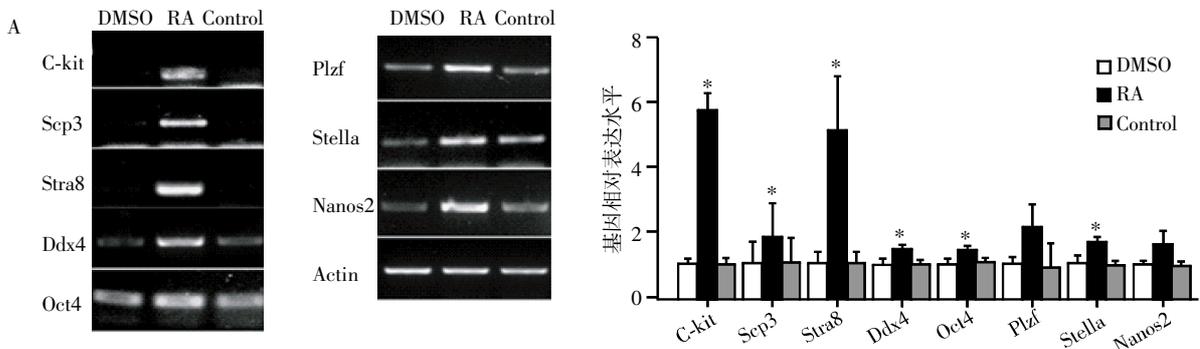


图 3 TUNEL 检测小鼠 SSCs 系克隆中未见明显凋亡

Figure 3 No obvious signal of apoptosis in mouse SSCs via TUNEL detection

RA 或 DMSO 处理 24 h 后,镜下观察小鼠 SSCs 生长状态未发生明显改变的情况下,运用 RT-PCR 检测了 8 个基因的表达变化。如图 4 所示,RA 诱导后,其中与分化相关的 3 个基因,C-kit、Scp3 和

Stra8 表达量明显升高($P < 0.05, n=3$)。与自我更新相关的 4 个基因中,Oct4、Stella 的表达量也明显升高($P < 0.05$),Plzf 和 Nanos2 虽然没有统计学差异,但也呈现高表达趋势。而生殖细胞的标志基因 Ddx4



A: 维甲酸 RA 诱导小鼠 SSCs 系 24 h 后检测相关基因的表达情况; B: 基因表达水平的灰度值统计学分析($n=3$),其中分化相关基因 C-kit、Scp3 和 Stra8,生殖细胞标志基因 Ddx4,自我更新相关基因 Oct4,Stella 表达量明显升高,而 Plzf 和 Nanos2 表达量虽然没有统计学差异,但也有升高趋势。与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图 4 RA 诱导小鼠 SSCs 系后各相关基因的表达变化

Figure 4 RA induced expression of genes in cultured SSCs

随之表达量也明显上升($P < 0.05$)。

3 讨论

精子发生是一个精确复杂的调控过程,而 SSCs 则是精子源源不断产生的源泉。SSCs 是指位于生精小管基膜上既能自我更新维持数量恒定,又能定向分化产生精母细胞的一类干细胞。在啮齿类动物,精原细胞可以分成三大类:干细胞 Asingle(As);增殖细胞[Apaired(Apr)和 Aaligned(Aal)];分化细胞 A1~A4,中间型 In 和 B 型精原细胞。目前普遍认为只有 As 才是真正的 SSCs^[1,9]。

目前 SSCs 体外培养平台的建立是研究其生物学特性的关键技术。2003 年,日本 Shinohara 课题组最早在体外长期稳定培养小鼠 SSCs^[6],之后他们不断完善培养体系,建立了无饲养层和无血清的培养体系^[10-11],在此基础上,他们鉴定出一系列与 SSCs 自

我更新和分化潜能相关的关键基因^[12-17]。在前期研究中,参照该课题组的培养体系,构建了带有红色膜荧光标记的小鼠 SSCs 系,并通过同种异体睾丸移植,证明 SSCs 具有在体内重建精子发生的能力^[7]。

本研究进一步完善小鼠 SSCs 系的生物学特性,通过各种手段观察体外自我更新和分化的潜能。小鼠 SSCs 克隆中散在的凋亡信号表明其具有活跃的生物学特性。EdU 掺入 SSCs 2 h 后,细胞增殖率平均为 40.75%,荧光结果提示 SSCs 克隆中部分细胞呈阳性,而饲养层为阴性。进一步在活细胞工作站下培养 72 h,并捕捉到了正在分裂过程中的 SSCs。这表明我们建立的小鼠 SSCs 同体内的 SSCs 一样,具有旺盛的自我更新能力。

RA 是诱导小鼠精原干细胞分化直至进入减数分裂的关键因子。本研究用 RA 诱导小鼠 SSCs,24 h 后观察关键基因的表达变化,其中分化相关

基因 C-kit、Scp3 和 Stra8 表达量显著升高,生殖细胞标志基因 Ddx4 也明显升高。而自我更新相关基因 Oct4 和 Stella 表达量显著升高,虽然 Plzf 和 Nanos2 表达水平没有统计学差异,但也呈现升高趋势。这个结果和之前 Dann 等^[18] 报道有所矛盾,他们认为 RA 诱导 3 d 后 Oct4 和 Plzf 表达量下降。因此我们认为 RA 诱导时间产生了不同的结果,RA 的短期孵育可以同时促进 SSCs 的自我更新和分化。

在前期研究中,构建了小鼠在体精原细胞增殖、迁移以及分化相关的蛋白谱系^[19],同时,也构建了小鼠 SSCs 系特异表达的蛋白谱系^[7],获得了一系列与精原细胞尤其是 SSCs 高度相关的蛋白。本研究构建的小鼠 SSCs 系与体内的 SSCs 类似,具有较强的自我更新以及细胞分化潜能,这为下一步研究上述精原细胞相关蛋白的生物学功能提供了稳定的技术平台。

[参考文献]

- [1] de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask[J]. *J Androl*, 2000, 21(6): 776-798
- [2] Meachem S, von Schonfeldt V, Schlatt S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective[J]. *Reproduction*, 2001, 121(6): 825-834
- [3] Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse[J]. *Mutat Res*, 1993, 290(2): 193-200
- [4] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(47): 16489-16494
- [5] Ogawa T, Ohmura M, Tamura Y, et al. Derivation and morphological characterization of mouse spermatogonial stem cell lines[J]. *Arch Histol Cytol*, 2004, 67(4): 297-306
- [6] 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
- [7] Zhou Q, Guo Y, Zheng B, et al. Establishment of a proteome profile and identification of molecular markers for mouse spermatogonial stem cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(3): 521-534
- [8] 晏媛,张辰望,朱梦怡,等. Boule 基因在小鼠精子发生过程中的动态表达[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, (1): 1-5
- [9] Caires K, Broady J, McLean D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells[J]. *J Endocrinol*, 2010, 205(2): 133-145
- [10] Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(4): 985-991
- [11] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, et al. Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(1): 97-105
- [12] Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, et al. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Development*, 2007, 134(10): 1853-1859
- [13] Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, et al. Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras-cyclin D2 activation[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 76-86
- [14] Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Shinohara T. Transmission distortion by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(14): 6210-6215
- [15] Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Ishii K, et al. Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23663
- [16] Ishii K, Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, et al. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation[J]. *Development*, 2012, 139(10): 1734-1743
- [17] Morimoto H, Iwata K, Ogonuki N, et al. ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(6): 774-786
- [18] Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, et al. Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor down-regulated during retinoic acid-induced differentiation[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(11): 2928-2937
- [19] Zheng B, Zhou Q, Guo Y, et al. Establishment of a proteomic profile associated with gonocyte and spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice[J]. *Proteomics*, 2014, 14(2-3): 274-285

[收稿日期] 2015-09-23