

# 成年昆明小鼠雄性生殖干细胞的 分离培养及其多能性研究

潘少辉, 胡 玥, 张姗姗, 王 静, 李飞飞, 高志敏, 杨春荣, 华进联

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** **【目的】**从成年昆明小鼠睾丸组织中分离具有多能性的雄性生殖干细胞(Male germline stem cells, mGSCs)。**【方法】**采用机械法和 2 步酶消化法分离出成年昆明小鼠的精原细胞,经差速贴壁后,培养在小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)饲养层上,2 周后得到类胚胎干细胞(ESCs)样 mGSCs。对得到的 mGSCs 进行碱性磷酸酶(AP)染色、免疫荧光染色、RT-PCR、体内分化等检测。**【结果】**mGSCs 具有类似 ESCs 的形态和多能性,AP 染色呈阳性,免疫荧光 *Oct4*、*Vasa* 染色呈阳性,RT-PCR 检测其表达 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 等多能性基因和 *Vasa*、*C-kit* 等生殖细胞的标记基因,在免疫缺陷鼠体内能形成畸胎瘤,组织学检测其可形成包括 3 个胚层在内的多种类型细胞。**【结论】**从成年昆明小鼠睾丸分离的精原细胞,在体外培养去分化形成了具有类 ESCs 生物学特性的 mGSCs,mGSCs 既具有多能性,也具有生殖细胞的基本生物学特性。

**[关键词]** 成年昆明小鼠;精原细胞;雄性生殖干细胞;多能性

**[中图分类号]** Q813.1<sup>+</sup>1;Q492.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2010)06-0023-08

## Isolation and cultivation of pluripotent male germline stem cells(mGSCs) derived from adult KM mouse testis

PAN Shao-hui, HU Yue, ZHANG Shan-shan, WANG Jing, LI Fei-fei, GAO Zhi-min,  
YANG Chun-rong, HUA Jin-lian

(College of Veterinary Medicine, Shaanxi Centre of Stem Cells Engineering & Technology, Shaanxi Key Lab for Agriculture Molecular Biotechnology Centre, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** **【Objective】** Male germline stem cells(mGSCs) were obtained from adult KM mouse testis. **【Method】** Spermatogonial cells were isolated from adult mouse testis using mechanical and two-step enzymatic digestion method, and then cultured on mouse embryonic fibroblasts (MEF) feeder after differential plating. Embryonic stem cells (ESCs)-like mGSCs were obtained after 2 weeks. The characteristics of mGSCs were analyzed by alkaline phosphatase(AP), immunofluorescence, RT-PCR and *in vivo* differentiation. **【Result】** mGSCs was similar to ESCs in morphology and pluripotency. AP staining is positive. They expressed pluripotent genes: *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* and some germ cell markers such as *Vasa*, *C-kit* analyzed by RT-PCR and immunofluorescence. The transplanted cells formed mature teratomas containing derivatives of three embryonic germ layer cells when the mGSCs were injected into severe combined immunodeficiency mice(SCID) mice. **【Conclusion】** These results demonstrated that isolated adult mouse spermatogonia was reprogrammed to form pluripotent ES-like mGSCs *in vitro*, and these cells also shared characteristics of germ cells. This will provide unlimited resource to understand their biological characteristics and clinical

\* [收稿日期] 2009-12-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30972097);教育部重点科研项目(109148);中国博士后科学基金项目(200801438)

[作者简介] 潘少辉(1981-),男,安徽亳州人,在读硕士,主要从事生殖干细胞研究。E-mail: panshaohui2007@126.com

[通信作者] 华进联(1971-),男,陕西商州人,副教授,博士,主要从事动物干细胞和胚胎工程研究。E-mail: jlhua2003@126.com

application.

**Key words:** KM mouse; spermatogonial cell; male germ stem cells(mGSCs); pluripotency

胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ESCs)因具有自我更新、无限增殖和多向分化潜能等特性,一直是生命科学领域研究的热点之一。小鼠作为模型动物,在医学、农业、生物学等领域被广泛使用。小鼠 ESCs 在研究细胞分化、器官发生、新基因功能及人类疾病和药物开发等方面发挥了巨大作用<sup>[1]</sup>。自 1981 年 Evans 等<sup>[2]</sup>首次成功分离得到 ESCs 系以来,科学家们已经从很多品系的小鼠得到 ESCs 系,但这些细胞系大多数来源于 129、C57BL/6J 和 BALB/C 品系的小鼠,而昆明小鼠 ESCs 建系的成功率很低<sup>[3]</sup>。昆明小鼠是我国培育的小鼠品系,是国内生命科学研究中最为常用的实验小鼠,很多学者已经对昆明小鼠 ESCs 的分离建系进行了大量研究,但是目前仍没有真正成功建系的报道,使得昆明小鼠在生命科学研究中的应用潜力尚未得到充分发挥。

近几年,国外有报道<sup>[4-6]</sup>称,已从新生和成年小鼠睾丸中分离培养出类 ESCs 样雄性生殖干细胞(mGSCs),其在形态、表面标志物、分化潜能等方面具有与 ESCs 相同的特性,能分化为多种细胞或组织。mGSCs 起源于原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGC),存在于新生和成年哺乳动物睾丸内,是精子发生的基础,能够进行自我更新并能分化为子代的精原细胞。通常认为,mGSCs 获得了组织特异性的表观遗传和遗传印记修饰,在体内正常的发育过程中,只能定向分化为精原细胞和精子<sup>[7-8]</sup>。但在适当的体外培养条件下,生殖系来源的 mGSCs 也能获得类似于 ESCs 的多能性<sup>[4-6]</sup>。最近,研究人员将 mGSCs 与前列腺、皮肤和子宫上皮组织细胞等混合移植到小鼠体内时,mGSCs 在体内转化为前列腺细胞、皮肤细胞和子宫细胞<sup>[9]</sup>。有研究表明,mGSCs 有望代替 ESCs 用于临床治疗和再生医学等领域。

目前,国内尚未见小鼠 mGSCs 成功分离建系的报道,成年小鼠 mGSCs 分离建系的成功率很低,而不同品系小鼠 mGSCs 的分离和培养需要不同的条件<sup>[10-11]</sup>。本研究尝试从我国培育的成年昆明小鼠分离 mGSCs 并建系,以期将其作为昆明小鼠源的多能性细胞,替代 ESCs 进行转基因动物、治疗性克隆、细胞分化调控机理和生殖细胞发生机理等方面的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

8~10 周龄雄性昆明小鼠,购自第四军医大学实验动物中心。

### 1.2 主要试剂

胎牛血清(FBS),Hyclone;重组白血病抑制因子(LIF),Millipore; $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -Me)、丝裂霉素 C(Mitomycine)、明胶,Sigma;高糖 DMEM、谷氨酰胺(L-glutamine)、非必需氨基酸(NEAA),Gibco;反转录试剂盒,TAKARA。

混合消化酶:1 mg/mL 胶原酶 I (Sigma)+10  $\mu$ g/mL DNase I (Sigma)+1 mg/mL 透明质酸酶(Sigma)。

MEF 培养液:高糖 DMEM+体积分数 10% 新生牛血清(NBS)+0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇+100 IU/mL 青霉素钠和 0.1 mg/mL 硫酸链霉素。

小鼠雄性生殖干细胞培养液:高糖 DMEM+体积分数 15% FBS+100 IU/mL 青霉素钠和 0.1 mg/mL 硫酸链霉素+0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇+2 mmol/L 谷氨酰胺+0.1 mmol/L 非必需氨基酸+1 000 IU/mL LIF。

### 1.3 小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)饲养层的制备

MEF 分离自孕龄 13.5 d 的昆明鼠胎儿,选择 1~3 代的 MEF 细胞,用 10  $\mu$ g/mL 丝裂霉素 C 处理 2 h 后,PBS 洗 4~6 次以除去可能残留的丝裂霉素 C,并按  $0.8 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$  /mL 的细胞密度接种于预先用 1 g/L 明胶处理过的培养板中备用。

### 1.4 精原细胞的分离与培养

脱颈处死成年雄性昆明小鼠,在无菌条件下取出双侧睾丸,置于加有 PBS(含双抗)的培养皿中浸泡 2~3 min,洗涤睾丸 2~3 遍;用镊子小心除去附睾、脂肪垫及睾丸白膜,用小剪刀将睾丸组织剪碎后,加入 10 倍于睾丸组织体积的混合酶,置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中消化 20 min(其间每隔 5 min 吹打 1 次),加入等体积的 2.5 g/L 胰酶消化 5 min;用等体积含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液中和,用孔径 75  $\mu$ m 纱网过滤,经 1 000 r/min 离心 5 min 后,倒掉上清液,然后加入适量雄性生殖干细胞培养液,以  $1 \times 10^6$  /mL 的密度接种于用明胶处理过的培养皿中贴壁;7~9 h 后,吸出培养皿中的悬浮细胞接

到明胶处理过的皿中,贴壁 7~9 h,再吸出培养皿中的溶液接到经丝裂霉素 C 处理过的 MEF 饲养层上;每天换液,细胞在 MEF 饲养层上生长 1 周后,用 0.5 g/L 胰酶消化传代,再接到 MEF 饲养层上,继续培养 2 周后,开始出现 ES 样的集落。将 ES 样集落挑出,放入 0.5 g/L 胰酶中,37.0 °C 消化 3~10 min,期间辅以轻柔的吹打,之后用 MEF 培养液中和。最后,将分离开的细胞团块移至新的 MEF 饲养层培养。当集落能稳定传代时,可直接采用 0.5 g/L 胰酶将克隆消化下来,按 1:3~1:6 的密度传至新的饲养层上培养。

## 1.5 mGSCs 的检测

1.5.1 mGSCs 的形态学观察 在倒置显微镜下定期观察小鼠 mGSCs 的形态及生长行为,并记录其形态特征。

1.5.2 碱性磷酸酶(AP)染色 对培养的 P3 和 P9 代的 mGSCs 进行碱性磷酸酶染色。用 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 15 min,无钙镁 PBS 冲洗 3 次,加入 AP 染色液(0.2 mg/mL  $\alpha$ -萘酚磷酸钠,1 mg/mL 坚固红,0.1 mol/L Tris 盐,pH 8.4)作用 5~10 min,观察 AP 显色情况,拍照并记录结果。

1.5.3 免疫荧光染色 培养的 mGSC 用 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,无钙镁 PBS 冲洗 3 遍,体积分数 0.1% Triton X-100 孵育 20 min,无钙镁 PBS 冲

洗 3 遍,体积分数 1% BSA 封闭 30 min,分别滴加一抗 Oct4(1:500,Chemicon)和 Vasa(1:1000,Abcam),4 °C 孵育过夜;然后再用无钙镁 PBS 洗 3 遍,滴加荧光二抗(Invitrogen),37 °C 避光孵育 30 min,无钙镁 PBS 冲洗 3 遍,荧光显微镜下观察并照相。

1.5.4 RT-PCR 检测 用 Trizol 一步法分别提取培养的 mGSCs、ES 细胞、成年小鼠睾丸及悬浮培养 3 d 的 mGSCs 形成的类胚体(EB)的总 mRNA,调整 RNA 质量浓度至 500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,用反转录试剂盒将 RNA 反转录,得到 cDNA。根据 GenBank 中报道的小鼠 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*C-kit*、*Vasa*、 *$\beta$ actin* 等的 cDNA 序列(登录号分别为:NM\_001101.3, NM\_013633.2, NM\_011443.3, NM\_010029.1, NM\_021099.2, NM\_028016.1),利用 Premier 5 软件设计引物序列(表 1)。反应总体积为 15  $\mu\text{L}$ : ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  buffer 1.5  $\mu\text{L}$ , MgCl<sub>2</sub> 1.6  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTP 1.2  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 0.1  $\mu\text{L}$ , 上游引物 0.3  $\mu\text{L}$ , 下游引物 0.3  $\mu\text{L}$ , 模板 cDNA 0.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。取 RT-PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析仪检测各基因的表达。

表 1 RT-PCR 反应所用引物序列及反应条件

Table 1 Sequence of primers and PCR reaction conditions

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer	退火温度/°C T <sub>m</sub>	扩增片段长度/bp Size
<i><math>\beta</math>actin</i>	Forward: ACGGCATCGTCACCAACT Reverse: AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	58	583
<i>Oct4</i>	Forward: CGCCCGCATAACGAGTTCT Reverse: GCACCAGGGTCTCCGATT	58	487
<i>Sox2</i>	Forward: GCCCAGGAGAACCCTAAGAT Reverse: GGGTGCCTGCTGCGAGTA	54	520
<i>Nanog</i>	Forward: GATTCTTCTACCAGTCCCAAAC Reverse: ATGCGTTCACCAGATAGCC	54	376
<i>C-kit</i>	Forward: TATGATCACAAATGGGAGTTTCC Reverse: TTCTTATAAAGTGCCGCTTCTG	57	383
<i>Vasa</i>	Forward: AAAGTGCCAGTTCTTGTTGCTAC Reverse: ACTGGATTGGGAGCTTGTGAAG	58	392

1.5.5 体内分化试验 收集第 8 代 mGSCs 细胞,每只裸鼠注射  $5 \times 10^6$  细胞到背部皮下,共注射 3 只裸鼠,4 周后,成瘤,取下畸胎瘤,40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色,于光学显微镜下观察瘤体的组织构成。

## 2 结果与分析

### 2.1 成年小鼠 mGSCs 的生长行为和形态学特征

本试验采用机械法+酶消化法消化成年昆明系

小白鼠的睾丸细胞,得到的单细胞在用明胶处理过的玻璃皿上经 2 次差速贴壁后,去除间质细胞和支持细胞,分离纯化出生殖细胞。试验所得到的精原干细胞呈圆形,3~4 个或更多细胞成群或成簇状生长,大小均匀,折光性强,核大(图 1-A, B);经传代培养 1 周后,开始出现形态上较为松散的鸟巢状 mGSCs 集落(图 1-C, D);继续传代培养 1 周, mGSCs 集落呈现典型的鸟巢状结构,较为致密,克隆不断增大,数目也逐渐增多(图 1-E, F)。以后按 1:3~1:

6 密度传代, 细胞生长旺盛, 每 2~3 d 传代 1 次。

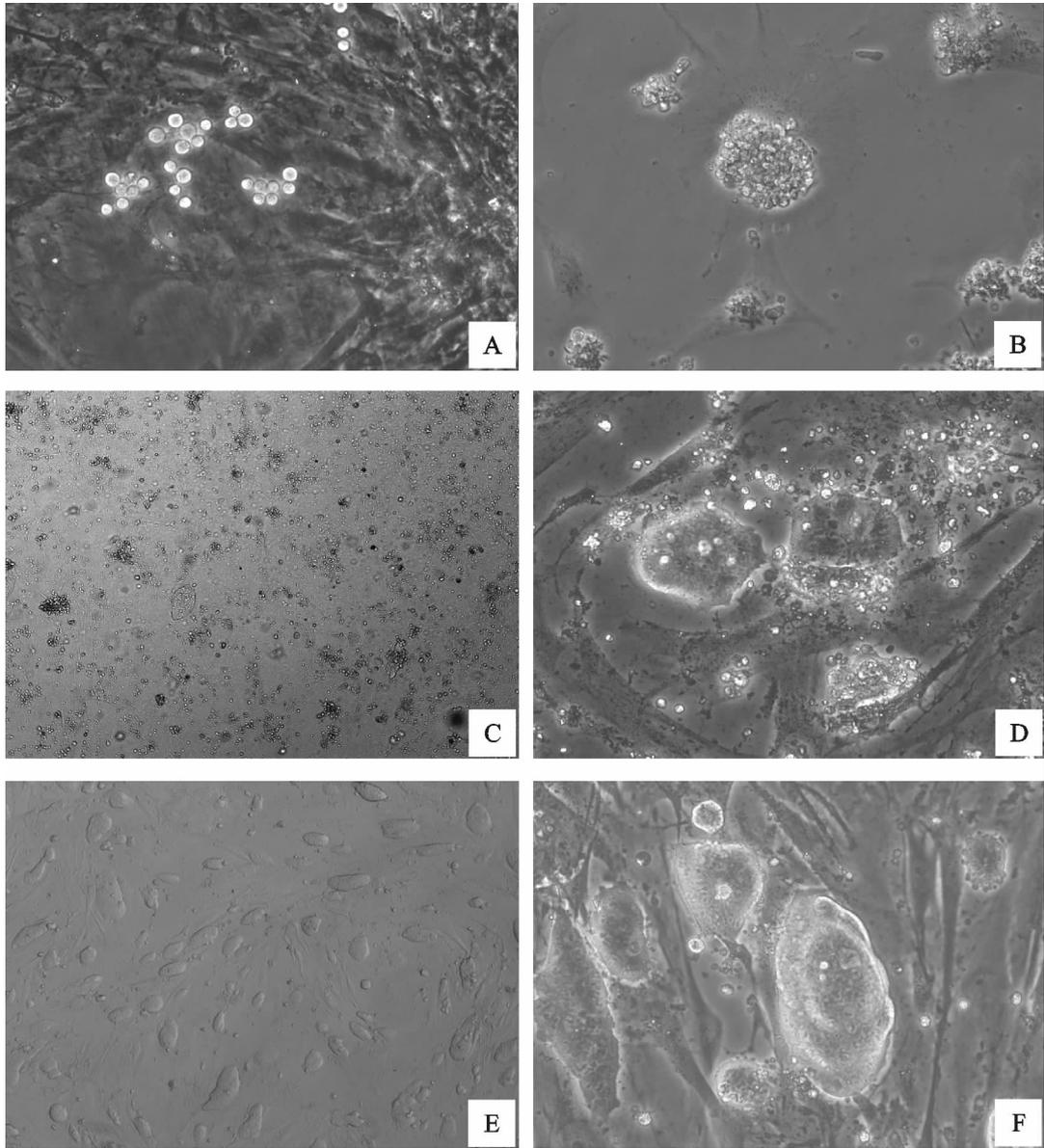


图 1 分离培养的 mGSCs 的形态学特征

- A. 分离培养的精原细胞(200×); B. 精原细胞的克隆(200×); C. mGSCs 第 1 次传代后形成的 ESCs 样克隆(50×);  
D. mGSCs 第 1 次传代后形成的 ESCs 样克隆(200×); E. mGSCs 第 3 次传代后形成的 ESCs 样克隆(50×);  
F. mGSCs 第 3 次传代后形成的 ESCs 样克隆(200×)

Fig. 1 Characterization of mGSCs colonies cultured *in vitro*

- A. Isolation and cultivation of spermatogonia cell(200×); B. Colonies of spermatogonia cell(200×);  
C. mGSCs formed ES-like colonies after the first passage(50×); D. mGSCs formed ES-like colonies after the first passage(200×);  
E. mGSCs formed ES-like colonies after the third passage(50×); F. mGSCs formed ES-like colonies after the third passage(200×)

## 2.2 mGSCs 的 AP 染色

AP 是 ESC 的多能性标志之一<sup>[12-13]</sup>。本试验原代 mGSCs 形成的类 ESC 样克隆 AP 染色呈弱阳性(浅红色, 图 2-A, B); 随着培养时间的延长和传代次数的增加, AP 活性增强(深红色, 图 2-C, D), 表明 mGSCs 的多能性逐渐增强。本试验所得到的 mG-

SCs, AP 染色呈阳性, 说明 mGSCs 表达 AP 活性, 具有类 ESC 多能性。

## 2.3 mGSCs 的免疫荧光染色

睾丸源的精原细胞在适宜的培养条件下, 形成典型的类 ESCs 样 mGSCs 克隆, 免疫荧光染色显示, Oct4(图 3-A)、Vasa(图 3-B)均为阳性。

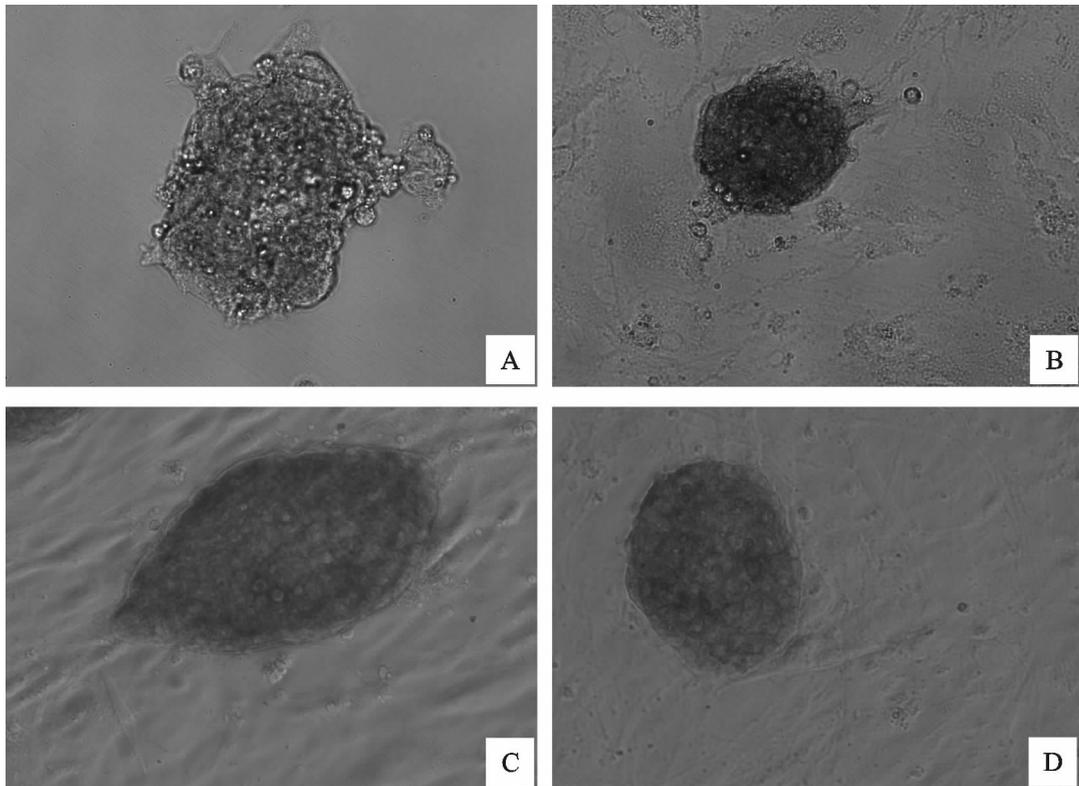


图 2 mGSCs 的 AP 染色(200×)

A,B. 第 1 代的 AP 染色;C,D. 第 9 代的 AP 染色

Fig. 2 Alkaline phosphatase (AP) staining of mGSCs colonies(200×)

A,B. Alkaline phosphatase (AP) staining of the first passage; C,D. Alkaline phosphatase (AP) staining of the ninth passage

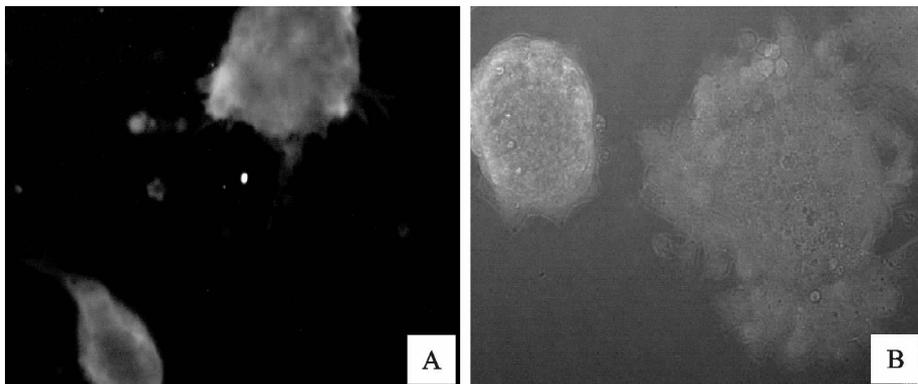


图 3 mGSCs 的免疫荧光染色(200×)

A. Oct4;B. Vasa

Fig. 3 Immunofluorescence staining of mGSCs(200×)

#### 2.4 mGSCs 特异性表达基因的 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测结果显示,mGSCs 既表达 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 等 ESCs 表达的多能性基因(图 4),同时也表达生殖细胞特异性的 *C-kit* 和 *Vasa* 基因,睾丸组织表达 *Oct4*、*C-kit* 和 *Vasa*,悬浮培养的 EB 表达 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*C-kit* 和 *Vasa*。说明分离培养的 mGSCs 具有类 ESCs 的多能性,同时也表达生

殖细胞的标记基因。

#### 2.5 mGSCs 在裸鼠体内的分化结果

注射 mGSCs 4~5 周后,3 只裸鼠均成瘤,瘤体光滑,质硬,呈粉红色。组织学切片显示,mGSCs 在裸鼠体内分化形成肿瘤组织,畸胎瘤组织包括肌肉组织(图 5-A)、皮肤样组织及皮下腺体等结构(图 5-B)、脂肪样和气管样结构(图 5-C)、胃肠样结构(图

5-D)等,表明其可分化形成包含 3 个胚层在内的多种组织类型细胞。

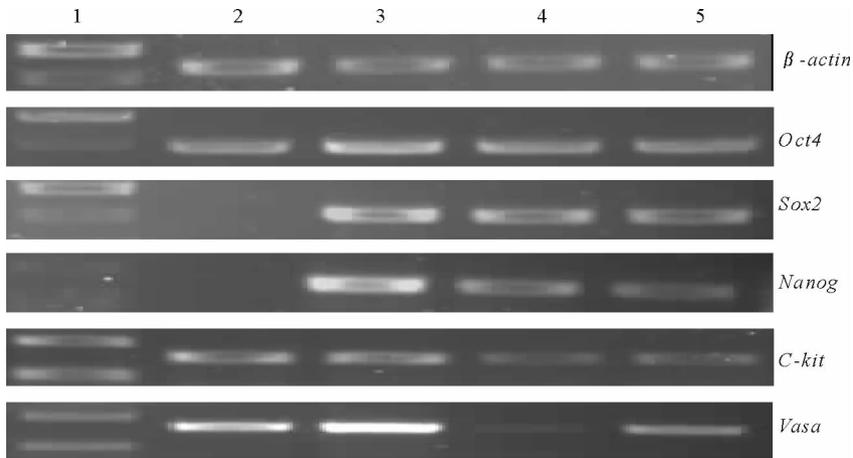


图 4 mGSCs 特异性表达基因的 RT-PCR 检测结果

1. DNA Marker;2. 睾丸组织;3. ESCs;4. mGSCs;5. mGSCs 形成的 EBs

Fig. 4 Analysis of specific gene expression of mGSCs by RT-PCR

1. DNA Marker;2. Testis;3. ESCs;4. mGSCs;5. EBs derived from mGSCs

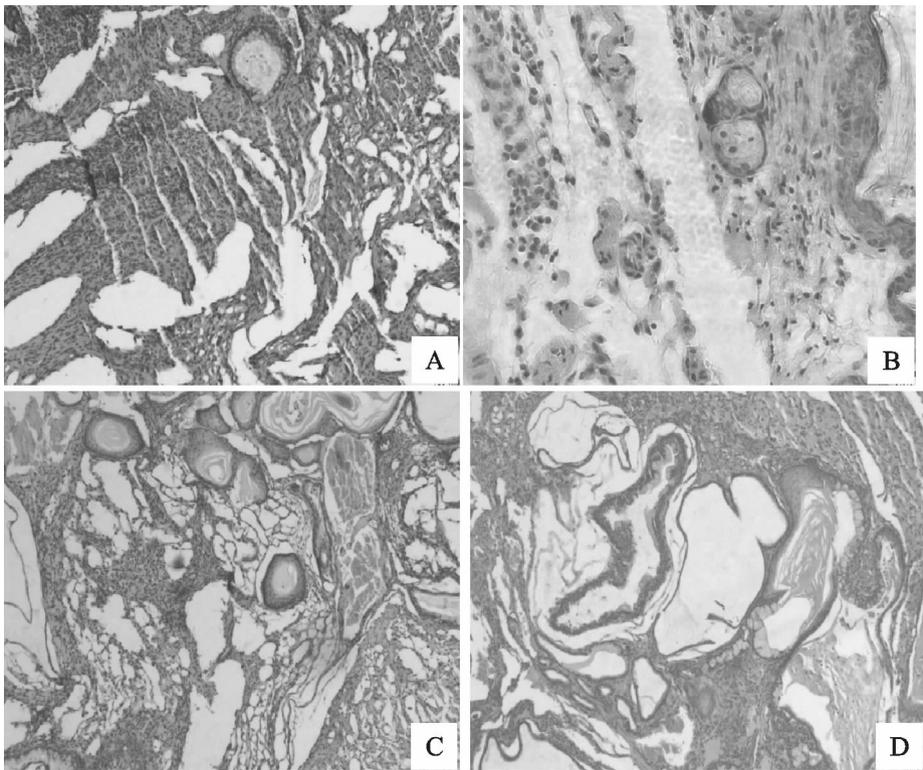


图 5 畸胎瘤的组织学检测(200×)

A. 肌肉组织;B. 皮肤腺体结构;C. 脂肪和管状结构;D. 胃肠样结构

Fig. 5 Histological detection of Teratoma(200×)

A. Muscle tissue;B. Skin and gland-like structure;C. Adipose tissue and Trachea-like structure;D. Gastrointestinal-like structure

### 3 讨论

昆明小鼠是我国培育的一个近交小鼠品系,其抗病力和适应力强、繁殖率和成活率高,因此在我国生物医学研究领域中被广泛使用。近几年,国内学

者对昆明小鼠 ESCs 的建系做了大量研究工作,但至今尚未有成功建系的报道,这在很大程度上限制了对它的进一步研究。近几年,国外有几个研究小组已成功地从新生和成年小鼠睾丸中分离培养出具有多能性的 mGSCs<sup>[4-5]</sup>。本试验尝试从成年昆明小

鼠的睾丸组织分离培养具有多能性的 mGSCs,以替代胚胎来源的昆明鼠 ESCs 用于进一步的研究,同时对昆明鼠 ESCs 的分离培养和重编程可能也有一定的借鉴意义。

不同品系和年龄小鼠的 mGSCs,其分离和培养方法亦不同。Kanatsu-Shinohara 等<sup>[4]</sup>采用新生小鼠的睾丸组织作为生殖干细胞来源,在培养液中添加胶质源细胞生长因子(GDNF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)和白血病抑制因子(LIF),并利用 MEF 作为饲养层细胞,培养睾丸组织细胞,4~7 周后出现类 ESCs,然后转入含有 LIF 的 ESCs 培养液中培养。Guan 等<sup>[5]</sup>选用 4~6 周龄成年小鼠睾丸组织作为生殖干细胞来源,采用生殖细胞特异性标记基因 *stra8*(stimulated by retinoic acid gene 8, 维甲酸刺激基因 8, 一种减数分裂前的精原细胞表面标记)进行筛选,分离富集 mGSCs,先直接在明胶处理的培养板上用含 GDNF 的培养液培养睾丸细胞 4~7 d,随后添加 LIF 并在 MEF 饲养层上培养出 mGSCs 克隆团,分离这些 mGSCs 克隆团后转移至 MEF 饲养层上培养。

本试验中,通过机械法+两步酶消化法消化 8~10 周龄的成年昆明小鼠睾丸细胞,利用间质细胞和支持细胞与精原细胞贴壁速率的差异,采用差速贴壁法分离出较高纯度的精原细胞,再接到 MEF 饲养层上,采用含有 LIF 和血清的培养液培养,1 周后,雄性生殖干细胞会形成松散的克隆团。对其进行传代培养,在 MEF 饲养层上,2 周后出现一些类 ES 样的典型 mGSCs 克隆,用机械的方法分离和转移这些克隆至 MEF 饲养层上培养。3 周后 ES 样 mGSCs 克隆稳定增殖,3 d 传代 1 次,继续培养,即得到稳定传代的细胞。本研究得到的第 1 株 mGSCs 已传至 24 代。

mGSCs 体外培养时很容易发生凋亡和分化,但在含 LIF 和血清以及有饲养层的培养条件下,既能促进 mGSCs 的增殖,又能维持其未分化状态。在培养一段时间后,可形成致密的 mGSCs 克隆,其既表达 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*SSEA-1* 等 ESCs 表达的多能性基因,AP 染色呈强阳性,还能分化成心肌细胞、神经、骨骼肌细胞和上皮细胞<sup>[4-6,14-15]</sup>;将其注射到免疫缺陷鼠体内,4~8 周形成畸胎瘤<sup>[4-6]</sup>;体外培养 5 个月以上,再移植到小鼠睾丸曲细精管内,能产生正常的精子。本研究从成年昆明小鼠睾丸分离培养得到的 mGSC 也具有类似的特性,表达 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 等多能性基因,同时也表达 *C-kit*、*Va-*

*sa* 等生殖细胞特异性基因;AP 染色呈强阳性;注射到裸鼠体内后,4~5 周即可形成畸胎瘤。

mGSCs 形成多能性克隆与培养条件有很大关系<sup>[11,16]</sup>。有研究表明,细胞因子 bFGF、EGF、GDNF、LIF 等对 mGSCs 的增殖及维持其多能性具有重要作用<sup>[11,17-19]</sup>。Kanatsu-Shinohara 等<sup>[4]</sup>的研究结果证实,GDNF 和 LIF 等因子能促进体外培养新生小鼠 mGSCs 的形成和保持其未分化状态。在培养液中同时添加 GDNF、bFGF、EGF 和 LIF,可促进生殖细胞的增殖和 mGSCs 克隆的形成,在不添加 GDNF 的情况下不能产生 mGSCs 克隆。Guan 等<sup>[5]</sup>研究表明,在开始培养的 4~7 d 加入 GDNF,有利于生殖细胞的增殖。在有饲养层并添加 LIF 的条件下培养的 mGSCs 克隆致密,而无饲养层和不添加 LIF 的 mGSCs 就会分化。GDNF 虽然对生殖细胞的早期增殖有重要作用,但是在体外,mGSCs 克隆的形成和增殖更多地依赖于 LIF<sup>[4]</sup>。血清对于 mGSCs 的增殖也有重要作用,除了提供细胞必需的营养物质外,还可能含有一些外源性的生长因子。Kubota 等<sup>[11]</sup>研究表明,不同小鼠品系的 mGSCs 对生长因子的需求也不同。另外,MEF 饲养层对于维持 mGSCs 增殖并使其处于未分化状态有重要作用。

本试验在分离培养 mGSCs 的过程中,只用到标准的含 LIF 的小鼠 ES 细胞培养液,并没有添加 GDNF 等因子,同样也能得到形态和多能性类似 ES 的 mGSCs。这可能是由于成年小鼠睾丸生殖细胞数量较多,两侧共有  $(2\sim 3)\times 10^7$  个细胞,不需要 GDNF 来维持生殖细胞增殖,生殖细胞的数量已足够形成 mGSCs。而新生鼠来源的生殖细胞较少,需要 GDNF 来促进生殖细胞的增殖。

Guan 等<sup>[5]</sup>认为,在睾丸微环境中,SSCs 由于受支持细胞的作用,多向分化潜能受到抑制,只能定向分化为生殖细胞。在体外培养的条件下,没有了体内各种因素的影响,SSCs 去分化形成 mGSCs 获得多能性,类似于克隆过程中的基因重编程。mGSCs 起源于原始生殖细胞(PGCs),其很可能是因为保留了 PGCs 的多向分化潜能,所以可以从出生后的动物睾丸组织中分离出类似于 PGCs/ESCs 的多能性干细胞 mGSCs。这类类似于从 PGC 向 EGC 的转化<sup>[20]</sup>。

mGSCs 分离的成功率较低,一般在 14%~33%。Kanatsu-Shinohara 等<sup>[4]</sup>从新生鼠分离 mGSCs 的成功率为 19%,Guan 等<sup>[5]</sup>从成年鼠分离

mGSCs 的成功率为 27%。本研究从 7 只成年昆明小鼠睾丸组织成功分离出 2 株 mGSCs, 效率为 29%, 第 1 株已传至 24 代。有报道称, mGSCs 克隆形成的时间为 4~8 周<sup>[3-5]</sup>。本研究从昆明小鼠中分离的 mGSCs 2 周即形成较致密的克隆, 明显早于之前的报道, 原因除了与小鼠遗传背景有关外, 还可能在于本试验所使用的细胞密度和饲养层种类不同。造成分离成功率差异的原因除了与分离的方法有关外, 还可能与小鼠的品系有很大关系。不同品系小鼠的分离效率不同, C57BL/6 为 18%, FVB 为 14%, 129/Ola 为 33%<sup>[5]</sup>。

综上所述, 本试验建立了一种便捷的 mGSCs 的分离和培养体系, 能从成年昆明小鼠的睾丸组织分离 mGSCs 并长期稳定传代。mGSCs 在形态、分子标记、生物学特性、分化潜能等方面与 ESCs 有相似的特性, 能转分化为多种细胞或组织。研究表明, mGSCs 或能作为研究生殖细胞发育分化机理的体外模型, 并可能作为多能性细胞的来源代替 ESCs 广泛应用于临床及再生医学领域, 尤其是对重症患者, 可望获得没有免疫排斥的自身来源的多能干细胞, 以避免胚胎干细胞来源和伦理问题及 iPS 细胞的安全性等问题。

### [参考文献]

- [1] Christopher P A, James F B, Allan B, et al. The knockout mouse project [J]. *Nature Genetics*, 2004, 36: 921-924.
- [2] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292: 154-156.
- [3] 叶鑫生, 许田, 汤锡芳, 等. 干细胞和发育生物学 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000: 185-190.  
Ye X S, Xu T, Tang X F, et al. Stem cell and development biology [M]. Beijing: Military Medical Science Publishing House, 2000: 185-190. (in Chinese)
- [4] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis [J]. *Cell*, 2004, 119(7): 1001-1012.
- [5] Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis [J]. *Nature*, 2006, 440(7088): 1199-1203.
- [6] Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis [J]. *Nature*, 2008, 456(7220): 344-349.
- [7] Brinster R L, Avarbock M R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11303-11307.
- [8] Kubota H, Brinster R L. Technology insight: *in vitro* culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses [J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2006, 2(2): 99-108.
- [9] Liz Simon, Gail C E, Natalia K, et al. Direct transdifferentiation of stem/progenitor spermatogonia into reproductive and nonreproductive tissues of all germ layers [J]. *Stem Cells*, 2009, 27: 1666-1675.
- [10] 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.
- [11] Kubota H, Avarbock M R, Brinster R L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(47): 16489-16494.
- [12] Steward R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells [J]. *European Journal of Cancer*, 2006, 42(9): 1257-1272.
- [13] Wobus A M, Hol Z H, Jakel P, et al. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo [J]. *Experimental Cell Research*, 1984, 152(1): 212-219.
- [14] Nagano M, Ryu B Y, Brinster C J, et al. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 2207-2214.
- [15] Baba S, Heike T, Umeda K, et al. Generation of cardiac and endothelial cells from neonatal mouse testis derived multipotent germline stem cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(6): 1375-1383.
- [16] Guan K, Wagner S, Unsold B, et al. Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells [J]. *Circ Res*, 2007, 100: 1615-1625.
- [17] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, et al. Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(1): 55-62.
- [18] Kubota H, Avarbock M R, Brinster R L. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(3): 722-731.
- [19] 尹明, 李德雪. 体外培养条件下 SCF, LIF 与 bFGF 对昆明白小鼠精原干细胞增殖的影响 [J]. *生物工程学报*, 2002, 18(6): 754-757.  
Yin M, Li D X. Effects of SCF, LIF and bFGF on mouse spermatogonial stem cells proliferation *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2002, 18(6): 754-757. (in Chinese)
- [20] Matsui Y, Zsebo K, Hogan B L. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture [J]. *Cell*, 1992, 70: 841-847.