

· 论 著 ·

曲细精管片段培养法和混合细胞共培养法 对小鼠生精细胞的增殖分化效应

汪存利¹, 姜 宏¹, 孙静波²

[摘要] 目的 探讨曲细精管片段培养法和混合细胞共培养法对体外培养生精细胞的增殖、分化效应。方法 采用曲细精管片段培养法和生精细胞-支持细胞共培养法对 7~8 d 小鼠生精细胞进行体外培养,通过细胞形态学观察、细胞存活率和精母细胞特异性基因 P19、单倍体精子细胞特异性基因 TP1 检测及染色体倍性分析,比较两种培养法生精细胞的存活、增殖以及分化情况。结果 两种培养方法均可见生精细胞增殖,P19/TP1 比值呈降低趋势,并可获得少量带鞭毛的精子细胞和长形精子,但共培养法生精细胞增殖速度及存活时间均优于片段法。体外培养各阶段,共培养法所获细胞数和存活率及单倍体精子细胞形成率均显著高于片段培养法($P<0.05$);P19/TP1 比值显著低于组织片段培养法($P<0.05$)。结论 生精细胞-支持细胞共培养法的细胞增殖速度、存活率、存活时间及单倍体精子细胞形成率均优于曲细精管片段培养法,是较为理想的小鼠生精细胞体外培养方法。

[关键词] 生精细胞;曲细精管片段培养;混合细胞共培养;流式细胞术

[中图分类号] R321.1 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.06.003

Proliferation and differentiation effects between seminiferous tubule segments culture and mixed cells coculture on mouse spermatogenic cells in vitro

WANG Cun-li¹, JIANG Hong¹, SUN Jing-bo². 1. Center of Reproductive Medicine, 105 Hospital of PLA, Hefei, Anhui 230031, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, the Second People's Hospital of Hefei, Hefei, Anhui 230031, China

[Abstract] **Objective** To investigate the proliferation and differentiation effects for mouse spermatogenic cells between seminiferous tubule segments culture and mixed cells coculture in vitro. **Methods** Spermatogenic cells of 7-8 days mouse were separated and cultured by the methods of seminiferous tubule segments culture and mixed cells coculture, the survival rates, proliferation and differentiation rates in two culture methods were evaluated by morphological observation, viability testing, pachytene-specific phosphoprotein gene (P19) and haploid sperm cell-specific transition protein gene (TP1) detecting and ploidy analysis of cells. **Results** In both culture methods, the rate of P19/TP1 were on a declining curve, round spermatid and a small number of sperm cells with flagella or elongating spermatid could be observed. But the proliferation rate and survival time of mixed cells coculture was superior to seminiferous tubule fragments. Compared mixed cells coculture with seminiferous tubule fragments, cell numbers, survival rate, rate of haploid sperm cells was significantly higher ($P<0.05$), the rate of P19/TP1 was significantly lower ($P<0.05$). **Conclusion** Mixed cells coculture is better method than seminiferous tubules fragment culture with superior proliferation rate, survival time, and the rate of haploid sperm cells.

[Key words] spermatogenic cells; seminiferous tubules fragment culture; mixed cells coculture; flow cytometry

生精功能障碍患者由于精子发育阻滞,无法获得具有父系遗传物质的子代,易对患者夫妇造成较大心理负担,并引起一系列伦理道德问题。有研究证实,通过体外培养使生精细胞脱离体内不利的病理环境,可能使生精细胞的增殖和分化进程重新启动,进一步发育成为单倍体精子细胞甚至成熟精子,

再通过卵细胞胞浆内显微授精技术可使该类患者获得父本遗传的后代^[1-3]。哺乳动物精子发生是在曲精细管微环境内进行的一个复杂过程^[4-5]。自 20 世纪初哺乳动物生精细胞开始体外培养以来,生精细胞体外培养有着较大发展,但始终没有一种培养方法能获得令人满意的单倍体精子细胞的转化率^[6-9]。本研究采用曲细精管片段培养和生精细胞-支持细胞共培养法对小鼠生精细胞进行体外培养,通过细胞形态学观察、细胞存活率和精母细胞特异性基因 P19、单倍体精子细胞特异性基因 TP1 检测及染色体倍性分析,试图获得一个稳定、高效的生精细胞

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(090413271X)

作者单位: 1. 230031 安徽合肥,解放军 105 医院生殖医学中心;2. 230031 安徽合肥,合肥市第二人民医院妇产科

通讯作者: 姜 宏, E-mail: jiangh105@sina.com

体外培养体系,为非梗阻性无精子症的临床治疗提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 7~8 d 雄性昆明小白鼠 4 只,体重(4.87±0.36)g,由安徽医科大学实验动物中心提供(实验动物合格证号:340002000310)。

1.2 实验试剂和仪器 改良的 Eagle 培养基(Sigma,美国)、胎牛血清和 0.25% 胰蛋白酶-EDTA(Gibco 公司,美国)、卵泡刺激素(FSH)(Serono 公司,瑞士)、P19 和 TP1 试剂盒(Ferment 公司,南非)。基础培养液:DMEM/F12 + 50 IU/L FSH + 1 μmol/L T + 10% FBS + 100 IU/mL 青霉素 + 100 μg/mL 链霉素。实验所需仪器主要包括:IX71 倒置显微镜、SZX10 解剖显微镜(Olympus,日本)、Forma 3131CO₂ 培养箱(Thermo,美国)、PCR 扩增仪(APPOLO,USA)、CW-CJ-1F 超净工作台(苏州安泰公司,中国)、EPICS XL-MCL 流式细胞仪(Beckman,USA)。

1.3 曲细精管片段培养法 无菌获取 4 只 7~8 d 雄性昆明小鼠的双侧睾丸,并将其切成约 1 mm³ 的组织碎块,以间距 0.5 cm 左右均匀分布于底部湿润的培养瓶中(25 mL 斜颈细胞培养瓶以 20~30 块为宜)。将斜颈培养瓶倒置于 34 ℃,5% CO₂,100% 饱和湿度培养箱中约 4 h。待组织块贴壁后正置培养瓶,再缓慢向瓶底注入基础培养液,24 h 后显微镜下观察曲细精管贴壁情况。

1.4 混合生精细胞与支持细胞共培养法 将上述小鼠睾丸组织块移入离心管,加入 10 倍体积 1 g/L 胶原酶Ⅳ,混匀,37 ℃ 消化 10~15 min,1000 r/min 离心 5 min(离心半径 9 cm),弃上清,加入 2.5 g/L 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)和 1.5 g/L 透明质酸酶各 2 mL,37 ℃ 下消化 5~10 min,细胞筛过滤制成单细胞悬液,调节细胞密度至 5×10⁶/mL,接种于 25 mL 斜颈细胞培养瓶中。置 34 ℃,5% CO₂,100% 饱和湿度培养箱,每 48 h 更换培养液,每 24 h 观察、记录细胞生长情况。

1.5 形态学观察和计数 镜下(×400)随机计数 300 个细胞,记录生精细胞数量,取计数 3 次的平均值,计算生精细胞百分率(%)=生精细胞数/被计数细胞总数×100%。

1.6 生精细胞存活率检测 生精细胞悬液经 0.4% 台盼蓝溶液染色后用 Makler 精子计数板计数总生精细胞数和非着色生精细胞数,3 min 内完成,取计数 3 次的平均值。生精细胞存活率(%)=非着色生精细胞数/总生精细胞数×100%。

1.7 生精细胞阶段特异性基因检测 取培养各阶段待测生精细胞悬液,采用半定量 RT-PCR 法检测 P19 和 TP1(具体操作按说明书进行)。通过 P19/TP1 间接判断粗线期精母细胞向圆形精子细胞的转换情况。

1.8 染色体倍性分析 取培养各阶段待测生精细胞悬液,70% 冷乙醇处理 12 h 以上,碘化丙啶(PI)室温避光作用 15 min,流式细胞仪进行染色体倍性检测。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;定性数据以百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种培养法生精细胞生长发育形态学观察 与片段培养法相比,混合细胞共培养法生精细胞增殖速度快,存活时间长(表 1)。

表 1 两种培养法生精细胞生长发育比较		
生精细胞生长形态	片段培养法	共培养法
支持细胞形成单层	5 d 后	2~3 d 后
次级精母细胞出现	7 d	3~4 d
圆形精子细胞出现	10~12 d	5~7 d
长形精子细胞出现	13~14 d	8~10 d
支持细胞开始脱落	15~17 d	15~18 d
所有细胞几乎凋亡	3 周后	4 周后

2.2 不同培养方法对生精细胞的增殖分化效应

2.2.1 生精细胞数和存活率比较 随体外培养时间的延长,两组的生精细胞数和存活率均呈下降趋势,而混合细胞共培养法在各培养时间获得的生精细胞数和细胞存活率均显著高于曲细精管片段培养法(*P* < 0.05,表 2)。

2.2.2 生精细胞阶段特异性基因表达分析 随时间延长,两组 P19/TP1 比值均呈降低趋势,且支持细胞-生精细胞共培养法显著低于组织片段培养法(*P* < 0.05,表 3),提示随着培养时间的延长,两种培养法单倍体精子细胞转化率均逐渐增高,但共培养法的转化率要显著高于片段培养法。

2.2.3 流式细胞仪(FCM)细胞倍体分析 培养 10 d 后两种培养法单倍体精子比例均随培养时间延长而逐渐递增,而共培养法在各培养阶段获得的单倍体精子细胞比例均显著高于曲细精管片段培养法(*P* < 0.05,表 4)。

表 2 两种培养方法不同培养阶段生精细胞数和存活率比较($\bar{x} \pm s$)

项目	方法	培养 4 d	培养 10 d	培养 15 d	培养 20 d
细胞数($\times 10^6$ /mL)	片段培养法	4.22 \pm 0.83	2.53 \pm 0.52	1.98 \pm 0.93	0.66 \pm 0.71
	共培养法	6.01 \pm 1.18 *	4.84 \pm 0.73 *	2.85 \pm 1.02 *	1.74 \pm 0.47 *
存活率(%)	片段培养法	92.54 \pm 0.69	71.32 \pm 0.91	57.43 \pm 0.62	10.53 \pm 0.47
	共培养法	95.87 \pm 0.91 *	85.72 \pm 0.66 *	72.28 \pm 0.48 *	48.93 \pm 0.39 *

注:与曲细精管片段培养法同期比较,* $P < 0.05$

表 3 两种培养方法不同培养阶段 P19/TP1 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	培养 5 d	培养 10 d	培养 15 d	培养 20 d
片段培养法	8.06 \pm 0.59	4.26 \pm 0.47	3.91 \pm 0.54	1.59 \pm 0.42
共培养法	4.13 \pm 0.71 *	1.92 \pm 0.23 *	1.34 \pm 0.63 *	0.92 \pm 0.31 *

注:与曲细精管片段培养法同期比较,* $P < 0.05$

表 4 两种培养方法不同培养阶段单倍体精子细胞比例(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	培养 4 d	培养 10 d	培养 15 d	培养 20 d
片段培养法	0	8.33 \pm 0.42	11.24 \pm 0.72	12.36 \pm 0.32
共培养法	0	19.14 \pm 0.59 *	27.22 \pm 0.46 *	30.25 \pm 0.22 *

注:与曲细精管片段培养法同期比较,* $P < 0.05$

3 讨论

哺乳动物生精细胞体外培养始于 20 世纪 20 年代,主要经历了组织培养、曲细精管片段培养和混合细胞培养等发展阶段^[6,10]。早期生精细胞体外培养主要是部分睾丸组织培养,但该法不能明确精子发生所必需的条件以及睾丸组织中生精细胞与支持细胞之间的相互作用,且大块组织培养易因组织缺氧导致大片坏死,生精细胞存活率较低,目前已很少采用。

曲细精管片段培养是将曲细精管进行简单的物理分离或酶消化法处理后,对获取的曲细精管碎片进行培养,该培养方法基本上保留了睾丸组织的原有结构,能在体外模拟体内的微环境,充分利用了生精细胞与支持细胞的相互作用,避免了因缺氧导致的组织大片坏死,有利于启动生精细胞增殖分化。该法成功的关键取决于曲细精管碎片的大小和酶消化处理的程度^[11]。

20 世纪 70 年代发明了重力沉降法分离各种生精细胞,使单独培养各阶段生精细胞成为可能。由于生精细胞的增殖分化需支持细胞提供支持和营养,该法因缺乏支持细胞,生精细胞存活时间较短。随后学者们采用物理和酶消化方法处理睾丸组织,将纯化后的生精细胞种植于支持细胞饲养层上,使

得生精细胞与支持细胞在体外培养过程中重新建立联系,由于预先对生精细胞进行纯化,便于鉴定体外培养过程中各阶段生精细胞,为研究支持细胞在生精细胞体外增殖、分化中的作用、精子细胞发生的分子机制以及生精细胞减数分裂的相关调节因素提供了条件^[12-13]。但该法实验条件要求较高,过程繁琐,且难以获得纯度较高的各级生精细胞。

支持细胞是睾丸的主要基质细胞,在生精细胞体内发育过程中参与血-睾屏障的组成,对精子的发生、成熟、分化、获能和受精等方面均起重要作用^[14]。在生精细胞体外培养中添加支持细胞作为饲养层,可使生精细胞体外培养环境与体内精子发生的微环境更为相似,有利于延长生精细胞的体外存活时间,提高精子的分化率。

本研究采用的曲细精管片段培养法和混合细胞(支持细胞-生精细胞)共培养法均为支持细胞存在下的生精细胞培养模式。RT-PCR 结果显示,随着培养时间的延长,粗线期精母细胞特异基因 P19 与单倍体精子细胞特异基因 TP1 的比值逐渐降低,表明精母细胞向单倍体细胞的转化率逐渐增高;FCM 细胞倍体分析结果也表明,随着培养时间的延长,两种培养法的单倍体细胞占比逐渐增高。与曲细精管片段培养法相比,混合细胞共培养法获得的细胞数更多,细胞存活率和单倍体精子细胞转化率更高,二者之间的差异显著($P < 0.05$),且单倍体精子细胞特异表达基因 TP1 在第 5 天即有表达,提示混合细胞共培养法优于曲细精管片段培养体系。

本研究还发现,生精细胞体外培养到 3~4 周,大量支持细胞开始退化,生精细胞也随之脱落、凋亡。结果提示虽然生精细胞在与支持细胞共培养的条件下可增殖、分化,但支持细胞在体外的存活、传代时间是有限的,随着支持细胞的退化、凋亡,生精细胞亦失去了生长和分化所需要的营养和细胞因子,不能在体外长时间保持增殖分化能力。因此,今后仍需探寻更加理想的饲养层细胞,建立更加稳定、高效的生精细胞体外培养体系。

是 OGTT 餐后 AUC_{0-3h} 观察疗效,结果表明 GLP-1 在各给药组升高均比安慰剂组显著,并且在 100 和 200 mg 组改变显著,说明此剂量范围内有较好的治疗改善作用。

胰岛素和 C 肽等比例释放,研究中胰岛素和 C 肽具有显著性差异的改变主要集中在 100 和 200 mg 给药组(表 4,5)。证实了 100 和 200 mg 的药物能有效促进胰岛素和 C 肽释放。

血糖控制是糖尿病治疗的最终目标,降低血糖可以降低对靶器官的损害,减少并发症的发生,因此降血糖作用是疗效评价的重要指标。本研究中 50 mg 组对空腹血糖降低显著,而 100 mg 组在空腹血糖、餐后 3 h 血糖、OGTT 后血糖 AUC_{0-3h} 均有显著降低,说明 100 mg 剂量组作为推荐剂量的优势。以上结果表明,本研究采用的 DPP IV 抑制剂在 50 ~ 200 mg 剂量范围内是安全的,耐受性良好,似可推荐 100 mg 为 II 期临床试验剂量。

【参考文献】

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2010 年版)[J]. 中国糖尿病杂志,2012,20(1):S1-S35.
- [2] Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, et al. Incretins; their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2014, 30(5):354-371.
- [3] Garg K, Tripathi CD, Kumar S. Clinical review of sitagliptin; a DPP-4 inhibitor[J]. J Assoc Physicians India, 2013, 61(9):645-649.

(上接第 571 页)

【参考文献】

- [1] Hamra FK, Chapman KM, Wu Z, et al. Isolating highly pure rat spermatogonial stem cells in culture[J]. Methods Mol Biol, 2008, 450:163-179.
- [2] 朱培元, 黄宇烽. 精子细胞显微受精技术的研究进展[J]. 中华男科学, 2003, 9(7):532-535.
- [3] He X, Cao Y, Zhang Z, et al. Spermatogenesis affects the outcome of ICSI for azoospermic patients rather than sperm retrieval method[J]. Syst Biol Reprod Med, 2010, 56(6):457-464.
- [4] Griswold MD. The central role of sertoli cells in spermatogenesis[J]. Semin Cell Dev Biol, 1998, 9(4):411-416.
- [5] Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008, 24:263-286.
- [6] Reuter K, Schlatt S, Ehmecke J, et al. Fact or fiction in vitro spermatogenesis[J]. Spermatogenesis, 2012, 2(4):245-252.
- [7] Mruk DD, Cheng CY. In search of suitable in vitro models to study germ cell movement across the blood-testis barrier[J]. Spermatogenesis, 2012, 2(1):11-15.
- [8] Gourdon JC, Travis AJ. Spermatogenesis in ferret testis xenografts; a

- [4] 杨宗学, 陈 丽, 姜林芹. 复方地蒽酚软膏的临床研究[J]. 东南国防医药, 2012, 14(2):117-119.
- [5] 舒荣文, 顾佳云, 孔庆军. 枸橼酸铋雷尼替丁为基础治疗萎缩性胃炎患者 Hp 的疗效观察[J]. 东南国防医药, 2013, 15(1):27-29.
- [6] Kalra S. Glucagon-like peptide-1 receptors agonists (GLP1 RA) [J]. J Pak Med Assoc, 2013, 63(10):1312-1315.
- [7] Umpierrez GE, Schwartz S. Use of incretin-based therapy in hospitalized patients with hyperglycemia[J]. Endocr Pract, 2014, 20(9):933-944.
- [8] Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, et al. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 17-36 amide but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus[J]. J Clin Invest, 1993, 91(1):301-307.
- [9] Karagiannis T, Boura P, Tsapas A. Safety of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors; a perspective review[J]. Ther Adv Drug Saf, 2014, 5(3):138-146.
- [10] Said S, Nwosu AC, Mukherjee D, et al. Alogliptin; a review of a new dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2014, 14(1):64-70.
- [11] Calanna S, Christensen M, Holst JJ, et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus; systematic review and meta-analyses of clinical studies[J]. Diabetologia, 2013, 56(5):965-972.
- [12] Vollmer K, Holst JJ, Baller B, et al. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucosetolerance[J]. Diabetes, 2008, 57(3):678-687.

(收稿日期:2014-08-20;修回日期:2014-10-14)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)

new model[J]. Comp Med, 2011, 61(2):145-149.

- [9] Lim JJ, Seol DW, Choi KH, et al. Spermatogonial stem cell enrichment using simple grafting of testis and in vitro cultivation[J]. Sci Rep, 2014, 1(4):5923-5932.
- [10] Tesarik J. Overcoming maturation arrest by in vitro spermatogenesis; search for the optimal culture system[J]. Fertil Steril, 2004, 81(5):1417-1419.
- [11] 于 洁, 叶 静, 张芳婷, 等. 睾丸组织异体异位移植生成成熟精子的动物模型建立[J]. 北京大学学报:医学版, 2004, 36(6):591-594.
- [12] Liu SX, Tang ZW, Xiong T, et al. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011, 9(1):141-149.
- [13] Kala S, Kaushik K, Singh KP, et al. In vitro culture and morphological characterization of prepubertal buffalo (Bubalus bubalis) putative spermatogonial stem cell[J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(12):1335-1342.
- [14] Xie B, Qin Z, Huang B, et al. In vitro culture and differentiation of buffalo (Bubalus bubalis) spermatogonia[J]. Reprod Domest Anim, 2010, 45(2):275-282.

(收稿日期:2014-05-18;修回日期:2014-10-11)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)