

曹 访,刘 莉,采克俊,等.翘嘴红鲌精原干细胞的分离培养及鉴定[J].江苏农业科学,2015,43(6):209-211.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.069

翘嘴红鲌精原干细胞的分离培养及鉴定

曹 访^{1,2},刘 莉³,采克俊^{1,2},叶金云^{1,2},卢中玉¹

(1. 浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室/湖州师范学院,浙江湖州 313000;

2. 湖州师范学院,浙江湖州 313000; 3. 浙江省淡水水产研究所,浙江湖州 313001)

摘要:通过制作、观察翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)各生长阶段的精巢切片,确定翘嘴红鲌精原干细胞最佳分离时间。采用两步酶消化法分离其精原干细胞,并进行体外初步培养研究,最后通过碱性磷酸酶染色、干细胞标志基因 *Oct-4* RT-PCR 扩增进行鉴定。结果显示:7 月龄翘嘴红鲌精巢为分离精原干细胞的最佳时期,所分离的精原干细胞符合干细胞的形态、增殖及表达特征,且细胞碱性磷酸酶染色呈阳性,支持细胞碱性磷酸酶染色呈阴性,*Oct-4* 基因表达呈阳性。

关键词:翘嘴红鲌;精原干细胞;分离培养;标志基因

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0209-03

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)具有自我更新及分化的潜能,是动物体内唯一能传递遗传信息的干细胞。SSCs 起源于原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs),存在于动物的睾丸或者精巢中,是雄性动物精子发生的前体细胞^[1]。SSCs 在医学、畜牧生产学等领域应用前景极为广阔,如探究精子的发生机制、治疗雄性不育及制作转基因动物等。当前对 SSCs 研究多集中在体外分离、培养、增殖、诱导分化、移植等方面,涉及的物种主要包括小鼠^[2-3]、大鼠^[4-5]、禽类^[6-7]、灵长类等,关于鱼类 SSCs 研究相对较少^[8-10]。研究显示,鱼类 SSCs 细胞相较哺乳类动物及禽类具有更强的可塑性,在一定条件下不但可以分化为精子,甚至可以分化发育为卵子^[11]。翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)别称太湖白鱼,是“太湖三白”之一,是长江中下游地区重要的经济鱼类,关于其人工繁育、养殖技术等研究已经很多,但是关于其生殖发育研究较少。本研究以翘嘴红鲌 SSCs 为研究对象,研究翘嘴红鲌 SSCs 分离的最佳年龄段,并进行初步培养,旨在为采用生殖细胞移植法开展替代育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验用鱼 试验所用翘嘴红鲌购自浙江省湖州市菱湖镇某养殖场,暂养于 1.2 m × 1.0 m 的孵化桶中,每隔 3 d 更换 1 次水。

1.1.2 试剂 DMEM/F12 购自 Gibco 公司;胰蛋白酶(1:250)、胶原酶Ⅳ、青链霉素混合液(100 ×)购自 Solarbio 公司;明胶、HEPES、β-巯基乙醇购自生工生物工程(上海)有限公司;胎牛血清(FBS)购自 PAA 公司;碱性磷酸酶试剂

盒购自碧云天生物技术研究;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;RNA 酶抑制剂、M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司;Taq 酶、DNase I、pMD20-T 载体、Oligo d(T)15 等购自大连宝生物工程公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 翘嘴红鲌精巢石蜡切片的制作 取各年龄段翘嘴红鲌精巢,用 Bouin 氏液固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,厚度 7 μm 连续切片,H. E 染色,中性树胶封片后显微镜下观察、拍照^[12-13]。

1.2.2 翘嘴红鲌精原干细胞的分离与培养 无菌条件下收集 8~10 尾 7 月龄翘嘴红鲌精巢,用含有双抗的 PBS 漂洗 3 遍,剥离脂肪、白膜等附属组织,将剩余的精巢组织剪成 1 mm³左右的小块,用 2.5 mL 一次性注射器尾部进行碾压,使精巢组织尽量分散,向分散的组织中添加 0.1% IV 型胶原酶,26 ℃消化 1.5 h,其间每 10 min 轻摇 1 次以加速消化,收集消化液 800 r/min 离心 3 min,弃上清;剩余组织块用 10 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶消化 15 min,其间用吸管不停吹打,使细胞尽可能游离分散,过 200 目滤网;用含有 10% FBS 的培养基终止消化,800 r/min 离心 3 min,弃上清;用 DMEM/F12 完全培养基(含 10% FBS、100 μg/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、10 μg/mL bFGF、10 μg/mL LIF、5 μg/mL HELPS)重悬细胞,调整细胞浓度为 10⁶ 个/mL,按照 1 mL/孔的量铺于明胶包被的 24 孔细胞培养板中,26 ℃培养 2 h 后加新鲜培养基 1 mL,以后每 60 h 换 1 次液。

1.2.3 碱性磷酸酶(AKP)活性鉴定 取培养 4 d 且生长良好的细胞进行 AKP 活性检测,按照说明书进行操作。

1.2.4 SSCs 细胞表面标记物的检测 分别收集培养 2、4、6、8 d 的细胞,采用 Trizol-酚-氯仿法提取总 RNA,用 DU530 型紫外分光光度计(Beckman 公司)测定纯度、浓度,取 2 μg 反转录为第一链 cDNA。根据笔者所在课题组已获得的翘嘴红鲌 *Oct-4* cDNA 部分序列(GenBank 登录号:KF381388)设计引物, P1: GCGCATCACACTGGGCTTCAC, P2: TGTTGGGTTTGGGGCACTTCATAA,目的片段长度为 308 bp。利用

收稿日期:2014-09-14

基金项目:浙江省淡水养殖科技创新团队项目(编号:2012R10026_05);浙江省钱江人才计划(编号:2012R10076)。

作者简介:曹 访(1980—),男,江苏丰县人,硕士,实验师,研究方向为动物遗传育种。E-mail:hzzyzucf@hotmail.com。

反转录获得的第一链 cDNA 为模板在 PCR 扩增仪 (S1000, Bio-Rad) 上扩增 *Oct-4* 片段, 扩增条件为: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 61 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环; 延伸 10 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

2 结果与分析

2.1 翘嘴红鲌精巢的发育规律

为研究分离翘嘴红鲌 SSCs 的最佳时间段, 笔者采用制作

石蜡切片方法研究翘嘴红鲌性成熟前各时间段精巢发育规律。切片观察证实, 5 月龄之前的冬片鱼种, 性腺发育处于 II 期左右, 性腺细胞分化尚不明显, 只有少量的性原细胞 (图 1-A)。5~7 月龄, 精巢发育处于 III~IV 期, 此时 SSCs 已经形成, 且未发生分化, 是翘嘴红鲌 SSCs 分离的理想时期 (图 1-B)。8 月龄开始, 随着鱼体的快速生长, 性腺发育速度加快, 精巢内开始出现各个阶段的生殖细胞, 10 月龄已经出现精子细胞, 不利于 SSCs 分离 (图 1-C)。

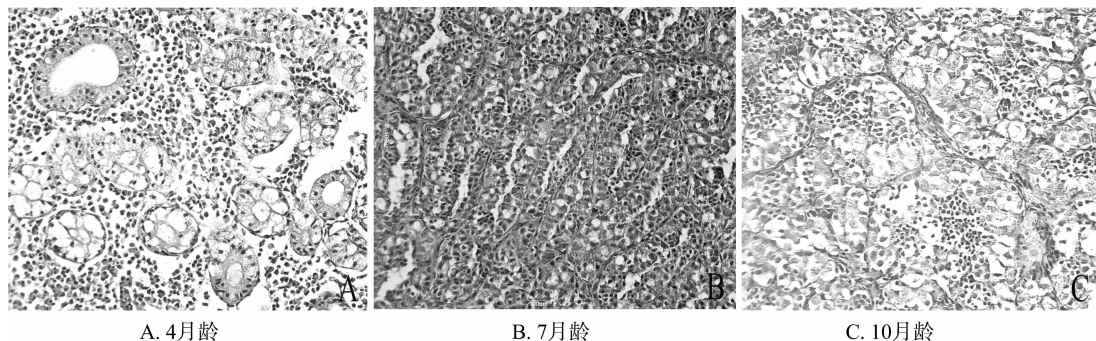
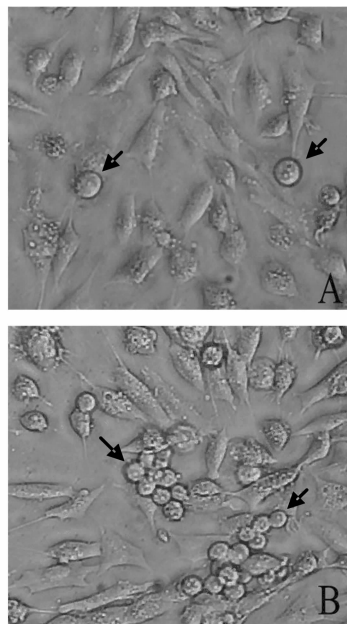


图1 翘嘴红鲌各生长阶段精巢组织切片 (400 ×)

2.2 SSCs 的分离与培养

2.2.1 SSCs 的分离培养 细胞悬液培养 3~4 h 开始有细胞贴壁, 培养 6~7 h 多数体细胞已贴壁, 培养 24 h 几乎所有细胞均已贴壁, 倒置显微镜下观察, 大多数体细胞已经铺展成梭形、三角形等不规则形状, SSCs 仍保持圆形镶嵌在体细胞层上, 铺展面积较小。培养 48 h 支持细胞已全部铺展为面积较大的不规则形状, SSCs 仍贴于支持细胞上, 大多为单个细胞。培养 72 h 圆形 SSCs 开始缓慢增殖, 此时培养体系中 SSCs 已出现 2、4 个或多个连成一串的现象 (图 2)。

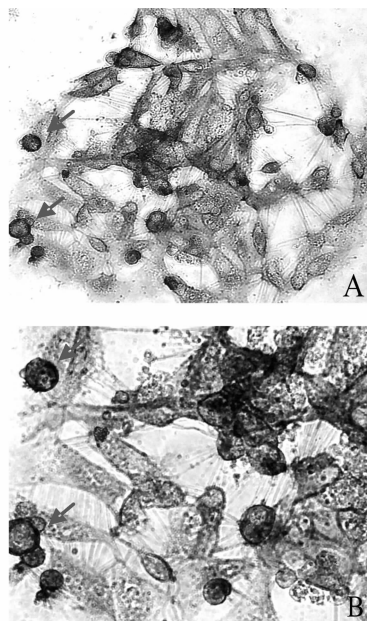


A—培养 48 h 后, SSCs 呈圆形镶嵌于支持细胞上 (箭头所指为 SSCs); B—培养 72 h 后, 2 个、4 个或多个 SSCs 逐渐增多 (箭头所指为增殖的 SSCs)

图2 翘嘴红鲌 SSCs 培养 (200 ×)

2.2.2 碱性磷酸酶 (AKP) 染色 碱性磷酸酶活性是检测细胞分化程度的重要指标, 相比而言 SSCs 分化程度低, 碱性磷

酸酶活性高, 染色也较深, 通过对培养 4 d 的精巢细胞进行碱性磷酸酶染色, 可见 SSCs 细胞被染成深棕色, 支持细胞等着色较浅或不着色, 所分离的 SSCs 细胞尚处于未分化状态 (图 3)。

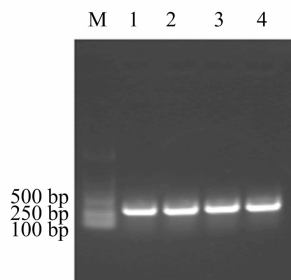


A—200×; B—400×; 箭头所指为精原干细胞
图3 翘嘴红鲌 SSCs 培养 4 d 后 AKP 染色结果

2.2.3 SSCs 细胞表面标记物 *Oct-4* 的检测 根据翘嘴红鲌 *Oct-4* 基因序列设计引物, 采用 RT-PCR 方法检测所培养细胞 *Oct-4* 基因的表达, 琼脂糖电泳结果显示, 培养 2、4、6、8 d 的细胞中均有明显的条带 (图 4), 且大小为 300 bp 左右, 与预期相符, 表明所分离的 SSCs 细胞克隆仍保持较好的干细胞活性。

3 结论与讨论

研究表明, 雄性动物生殖干细胞起源于胚胎外胚层, 经过一系列的迁移、增殖等逐渐被生精小管索包围而形成生殖腺,



M为DL 2 000 DNA Marker; 1~4分别为培养 2、4、6、8 d 细胞的 *Oct-4* 基因 RT-PCR 电泳图

图4 细胞*Oct-4*基因的 RT-PCR 结果

其中生精小管内的体细胞被诱导分化成围性原细胞,并停留在 G1/G0 期直至动物出生,然后逐渐发育为 SSCs 等。鱼类精原细胞不规则排列在精巢之中,和多数脊椎动物一样,鱼类精原细胞在形态上可分为 A 型精原细胞、B 型精原细胞。本试验选用了 4~10 月龄翘嘴红鲌的精巢制作石蜡切片,结果表明,7 月龄翘嘴红鲌精巢中的性原细胞已经逐渐发育为 SSCs,且未见精子发生,表明细胞还未分化,仍保持干细胞特性,10 月龄时已有精子细胞出现,已经不适合 SSCs 分离。鱼类 SSCs 分离主要采用酶消化法,该方法分离的细胞较多,且便于纯化。Risley 等和 Panda 等采用胶原酶消化法分别成功从幼年非洲蛙鱼、南亚野鲮精巢组织分离得到了 SSCs^[14-15]。Lacerda 等采用组合酶(胶原酶、胰蛋白酶)消化法从罗非鱼精巢组织获得了 SSCs^[16]。另外也有研究人员采用组织块培养法从鳊鱼、斑马鱼精巢中成功分离得到 SSCs,但该方法分离到的 SSCs 细胞较少,且杂细胞较多,不利于后期纯化^[17]。本试验采用组合酶消化法,从 7 月龄翘嘴红鲌精巢中成功分离出 SSCs 细胞,且细胞经过长时间的培养,已具有干细胞形态及表达特征。碱性磷酸酶活性是评价细胞具有多能性与否的重要标志之一。对培养 4 d 的细胞进行碱性磷酸酶染色,发现碱性磷酸酶染色阳性的圆形细胞。当前已知的鱼类 SSCs 细胞表面标记物较少,且不同鱼的标记物也不尽相同,但是 POU 结构域转录因子家族的 *Oct-4* 基因被广泛应用于 ES 细胞、成体干细胞鉴定^[18]。Kehler 等研究表明,*Oct-4* 是 PGCs 发育的必需基因,*Oct-4* 基因敲除胚胎的 PGCs 细胞会凋亡^[19]。本研究采用 RT-PCR 技术检测细胞是否表达干细胞标志基因 *Oct-4*,结果显示,培养 2~8 d 的细胞均有 *Oct-4* 基因表达,说明所培养的翘嘴红鲌 SSCs 细胞克隆仍然保持较好的干细胞活性。本研究通过制作、观察 4~10 月龄翘嘴红鲌精巢组织切片,发现 7 月龄的翘嘴红鲌幼鱼精巢为分离 SSCs 的最佳材料,采用两步酶消化法分离得到其精巢细胞,最后通过碱性磷酸酶染色、干细胞标志基因 *Oct-4* 的 RT-PCR 鉴定,确定所分离的细胞为翘嘴红鲌 SSCs,初步建立了翘嘴红鲌精原干细胞培养体系,为下一步开展翘嘴红鲌生殖细胞移植替代育种研究打下基础。

参考文献:

[1] Phillips B T, Gassei K, Orwig K E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2010, 365 (1546):

1663-1678.
[2] Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91 (24): 11298-11302.
[3] Brinster R L, Avarbock M R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91 (24): 11303-11307.
[4] Gassei K, Ehmcke J, Schlatt S. Efficient enrichment of undifferentiated GFR α^{1+} spermatogonia from immature rat testis by magnetic activated cell sorting[J]. Cell and Tissue Research, 2009, 337 (1): 177-183.
[5] Guan K M, Nayernia K, Maier L S, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis[J]. Nature, 2006, 440 (788): 1199-1203.
[6] Lee Y M, Jung J G, Kim J N, et al. A testis-mediated germline chimera production based on transfer of chicken testicular cells directly into heterologous testes[J]. Biology of Reproduction, 2006, 75 (3): 380-386.
[7] Trefil P, Micáková A, Mucksová J, et al. Restoration of spermatogenesis and male fertility by transplantation of dispersed testicular cells in the chicken[J]. Biology of Reproduction, 2006, 75 (4): 575-581.
[8] Bérar J, Hong Y H, Alvarez M C. An ES-like cell line from the marine fish *Sparus aurata*: characterization and chimera production[J]. Transgenic Research, 2002, 11 (3): 279-289.
[9] Chen S L, Ye H Q, Sha Z X, et al. Derivation of a pluripotent embryonic cell line from Red Sea bream blastulas[J]. Journal of Fish Biology, 2003, 63 (3): 795-805.
[10] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q, et al. Pluripotency and chimera competence of an embryonic stem cell line from the sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9 (1): 82-91.
[11] Okutsu T, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Spermatogonial transplantation in fish: production of trout offspring from salmon parents [M]// Tsukamoto K, Kawamura T, Takeuchi T, et al. Fisheries for global welfare and environment. Tokyo: Terapub, 2008: 209-219.
[12] 刘 筠. 鱼类繁殖生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993.
[13] 楼允东. 组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
[14] Risley M S, Eckhardt R A. Dissociation and separation of *Xenopus laevis* spermatogenic cells[J]. The Journal of Experimental Zoology, 1979, 207 (1): 93-106.
[15] Panda R P, Barman H K, Mohapatra C. Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from *Labeo rohita* testis for *in vitro* propagation[J]. Theriogenology, 2011, 76 (2): 241-251.
[16] Lacerda S M, Batlouni S R, Costa G M, et al. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model[J]. PLoS One, 2010, 5 (5): e10740.
[17] Miura T, Miura C, Konda Y, et al. Spermatogenesis - preventing substance in Japanese eel[J]. Development, 2002, 129 (11): 2689-2697.
[18] Frankenberg S, Pask A, Renfree M B. The evolution of class V POU domain transcription factors in vertebrates and their characterisation in a marsupial[J]. Developmental Biology, 2010, 337 (1): 162-170.
[19] Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, et al. *Oct4* is required for primordial germ cell survival[J]. EMBO Reports, 2004, 5 (11): 1078-1083.