精原干细胞移植治疗不孕不育小鼠模型的初探

谢夏阳^{*†} 滕勇^{*} 马良宏^{*} 刘丽均 王翔 宋云庆 徐平[†]

(中国科学院上海实验动物中心, 国家啮齿类实验动物种子中心上海分中心, 上海 201615; Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Augusta 30912, USA; 北海市炎黄生物技术研究所, 北海 536000; 宁夏医学院附属医院泌尿科, 银川 750004; 复旦大学华山医院泌尿科, 上海 200040. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: xiayangxie@yahoo.com.cn; xuping@slaccas.com)

摘要 通过曲细精管显微注射法, 将雄性 FVB/NJ-GFP 转基因小鼠睾丸内分离得到的精原干细胞注射进不孕不育动物模型——BALB/c 雄性裸鼠的睾丸曲细精管中, 对其生精现象进行了深入的分析. 为了进一步验证精原干细胞移植后的雄鼠重新获得生殖能力, 这些雄鼠被用于自然交配, 并以编码 GFP 荧光蛋白的 cDNA 为杂交探针, 用 Southern Blot 方法分析其后代小鼠的基因型. 实验结果表明, 作为移植受体的不孕不育 BALB/c 裸鼠是一种免疫缺陷性小鼠, 能较好地避免供体和受体之间的免疫排斥反应. 供体精原干细胞可以在 68.33% (41/60) 进行移植实验的受体小鼠睾丸内存活、迁移和增殖, 并在受体睾丸内腔中发育成成熟的精子, 有 5 只杂交后代小鼠的基因型呈现为 GFP 阳性. 本实验室建立了曲细精管显微注射技术, 并在利用精原干细胞移植治疗不孕不育小鼠的实验中获得了初步成功. 精原干细胞移植技术在探讨精子发生机理、重建不育个体的精子发生和恢复不育症患者的生育能力等方面有着重要的应用前景.

关键词 精原干细胞 移植 显微注射 不孕不育 绿色荧光蛋白

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是哺乳动物成体睾丸生精上皮内唯一可复制的多潜能二倍体细胞, 它能在体外分离纯化、培养、冻存及同体或异体移植, 是能将自身遗传信息传给下一代的唯一一种干细胞. 生精现象是一个复杂而系统化的过程, 精原干细胞在雄性动物出生后, 一直处于不断的减数分裂和分化、增殖状态. 精原干细胞有着自我恢复的能力, 既能增殖产生新的干细胞, 也能发育成各级生精细胞, 这些生精细胞最终形成精子并孕育出后代^[1-4]. 精子的发生除依赖于生精细胞与睾丸支持细胞间的密切联系, 还依赖于曲细精管生精上皮基底处精原干细胞的正常自我增殖和分化. 一旦生精细胞发育受到阻断或产生无活性、无功能性的精子, 就有可能造成雄性不育. 精原干细胞移植(spermatogonial transplantation, ST) 技术的原理与其他器官移植技术类似, 主要通过显微外科技术, 将供体精原细胞注入受体, 利用受体微环境使供体细胞分裂分化为精子. 根据所用供体和受体的不同, 精原干细胞移植技术可分为同种移植法、同体移植法和异体移植法^[5-7].

据研究报道, 不育老鼠可以通过精原干细胞的移植而重新产生生精现象. 可育的供体老鼠的精原干细胞移入受体老鼠的曲细精管后, 不仅能在受体老鼠的睾丸内存活、迁移、定居、分化和增殖, 还能启动精子发生过程并产生具有受精能力的精子. 移植后的受体小鼠中有 40% 可以通过正常的交配途径产生后代^[5]. 短短 10 余年里, 精原干细胞移植技术迅猛发展, 已相继在兔子、猪和短尾猴等动物体上得到了广泛应用^[8-15]. 1999 年研究人员在跨物种产生精子领域取得了重大突破. Ogawa 等人^[11]将大鼠的精原干细胞移入 10 只免疫缺陷性小鼠的曲细精管中, 在小鼠的睾丸中产生了大鼠的精子. Dobrinski 等人^[15]先后将兔和狗的精原干细胞移植到小鼠体内, 并在小鼠睾丸中增殖和分化. 由此可见, 这项技术的产生和发展将为探讨精子发生机理和重建不育个体的精子发生机制提供新途径, 也为保存有重要价值的动物生殖细胞系和濒危动物的研究^[14,16,17]、培育转基因动物带来了新思路^[18-21].

目前, 有 3 种比较成熟的精原干细胞移植技术, 分别为曲细精管显微注射、输出管显微注射和睾丸网

显微注射. 这 3 种方法的移植效率基本相同^[22,23]. 用于移植的供体细胞可以是单层细胞、所有双丸状精原细胞和体细胞类型的小片段^[5,7,24]. 供体精原细胞可以在移植前新鲜制备, 也可以在培养体系中或低温冷冻状态下长期保存^[8,25].

最近, 本实验室通过曲细精管显微注射的方法对不育小鼠模型进行了精原干细胞移植. 实验中选用了能表达绿色荧光蛋白(GFP)的转基因 FVB/NJ-GFP 小鼠作为供体, 便于追踪供体精原干细胞在受体小鼠体内的迁移、分化和增殖过程. 然后采用成功移植后的纯合型受体雄鼠与杂合型雌鼠交配的繁殖方式, 获得了 1/2 纯合型仔鼠后代, 证实了供体精原干细胞在移植后能产生具有受精作用的功能性精子. 此外, 还通过 Southern Blot 方法, 进一步验证了遗传后代的基因型来源于杂交的正常母本和被移入精原干细胞的受体父本.

1 材料与方法

() 实验动物. 选用 60 只纯种的 BALB/c 雄性裸鼠作为精原干细胞移植的受体鼠. 为构建不孕不育小鼠模型, 这些已达到性成熟的 BALB/c 裸鼠均被喂服了 40 mg/kg 剂量的白消安. 供体精原干细胞新鲜采集自 10 只 10 日龄的 FVB/NJ-GFP 雄性转基因小鼠(由中国科学院上海实验动物中心提供). 所有动物的实验和处理均在中国科学院实验动物中心进行, 并严格遵守实验动物管理的相关规定.

() 供体细胞的分离. 显微注射用的精原干细胞悬浮液按照以前报道的方法^[26]进行连续消化分离而得. 具体过程如下: 取 10 日龄的雄性小鼠, 颈椎脱臼法处死, 将两侧睾丸取出, 然后将睾丸被膜移除, 用剪刀将睾丸组织剪碎, 再进行一系列的消化处理. 第一次消化在 37℃ 振荡水浴锅中以 90 r/min 的速度振荡 5 min, 在剪碎的睾丸组织中加入添加胶原酶 型(浓度为 1 mg/mL, Sigma 公司, 德国)、抗生素和 DNase (浓度为 5 mg/mL, Sigma 公司, 德国)的 DMEM 溶液(Gibco 公司, 英国). 用自动移液器通过 10 mL 的移液管, 将此次消化后得到的组织碎片吹吸 6 次进行混匀. 然后经过 2 min 沉淀后, 间质细胞随着上层悬浮液被丢弃. 将上述的分离步骤在加入新鲜的 DMEM 溶液后重复一次. 第二次消化所用时间为 20 min, 加入的试剂为胶原酶 型、DNase 和透明质酸酶 型(浓度为 0.5 mg/mL, Sigma 公司). 在

此过程中, 每隔 5 min, 细胞用 10 mL 的移液管来回吹吸混匀. 20 min 后, 细胞以 500 × g 离心 5 min. 然后把细胞沉淀物重悬于磷酸缓冲液(PBS, 50 mmol/L, 150 mmol/L NaCl, pH 7.2). 为了有助于观察曲细精管中的液体流量和计算其中的死细胞数量, 在细胞悬液中加入过滤的台盼蓝染料(最终浓度为 4%).

() 曲细精管的显微注射. 本实验中, 注射针(内径: 0.75 mm; 外径: 1.0 mm. Sutter 仪器公司, 美国)的型号和制作过程与 Brinster 等^[5]报道的相似. 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔麻醉雄性 BALB/c 裸鼠成功后, 术野备皮, 酒精消毒. 取耻骨联合上方正中切口进腹, 拉出一侧睾丸和附睾. 在特殊的解剖显微镜(Nikon SMZ1000 型, Nikon 公司, 日本)下选择呈直线行走的曲细精管, 用眼科镊将其表面的睾丸白膜撕开一个 2~3 mm 的小口, 调节显微注射针, 把转染液注入曲细精管中. 每个睾丸内注射 1~2 条曲细精管, 直到睾丸表面 75%~90% 的部分曲细精管和相连的附睾管变蓝为止. 在注射时, 用 JVC TK-C1481EG 数码相机系统(Nikon 公司, 日本)进行拍摄.

() 移植后受体小鼠生精过程的观测. 在显微注射手术后, 受体小鼠至少单独饲养 50 d. 随后被安乐死处理, 取出睾丸组织用来鉴定曲细精管中的内容物. 为了验证被注射后的供体精原细胞在受体小鼠睾丸中的存活数量, 用扫描电子显微镜(SEM; JEOL, JSM-6700F 型, 日本)检测从受体小鼠中获得的曲细精管样本. 此外, 用荧光显微镜(Nikon X-Cite 120, 日本)检测从对应的副睾和输精管中获得的精子悬浮液中的荧光精子.

() Southern Blot 分析受体小鼠后代的基因型. 为了进一步证实受体小鼠后代的基因型, 我们选择正常的雌性 BALB/c 裸鼠和移植入 FVB/NJ-GFP 转基因小鼠的精原细胞的受体雄性小鼠进行自然交配, 然后提取其后代的 DNA 样本, 用 Southern Blot 方法来分析其基因型. 本实验中的 Southern Blot 方法均按照正常的步骤进行, 分别用限制性内切酶 *Pvu* 消化约 30 μg 小鼠基因组 DNA, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后转移至 Hybond⁺ 尼龙膜, 然后用长度为 700 bp 编码荧光蛋白的 cDNA 作为杂交探针, 按 ECLTM Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System(QIAGEN 公司, 德国)说明书进行 Southern Blot.

2 结果

在曲细精管注射过程中,发现小鼠睾丸的曲细精管看上去较为平直(图 1(a)),大多数可以由睾丸表面接触到.显微注射后,在台盼蓝染料的指示下,可见约90%~95%的曲细精管变蓝(1(b)).图 2 分别显示了注射精原细胞后受体小鼠睾丸内曲细精管变蓝的过程.

分离自雄性 FVB/NJ-GFP 转基因小鼠的供体细胞被注射进 60 只 BALB/c 不孕不育裸鼠模型的睾丸曲细精管中,结果显示,在 41 只(68.33%)受体小鼠的

睾丸曲细精管中观察到生精现象.如图 3(a)所示, BALB/c 不孕不育裸鼠模型的睾丸在未注射前并没有任何成熟精子的存在,但注射后曲细精管的内壁出现了成熟的精子(图 3(b)).而且在受体小鼠的精液中发现了带有绿色荧光的精子(图 4).这些结果表明,受体小鼠曲细精管中的精子来源于 FVB/NJ-GFP 转基因小鼠的精原细胞.这些精原细胞能在受体不孕

图 1 未注射和注射过的小鼠睾丸在形态上的比较

(a) 未注射的小鼠睾丸,曲细精管看上去比较平直;(b) 注射过的小鼠睾丸,在台盼蓝染料的指示下,可见约 90%~95%的曲细精管变蓝

图 2 供体精原细胞注射后在曲细精管中迁移的过程

(a) 未注射的曲细精管;(b) 注射过的曲细精管;(c) 注射针被迅速拔出时的曲细精管;(d) 注射针被拔出几秒钟后的曲细精管.

台盼蓝染料用于指示供体精原细胞的具体迁移位置

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-20-2386>

图 3 电子显微镜下曲细精管注射前后的受体小鼠睾丸 ($\times 1500$)

- (a) 注射前的受体不孕不育小鼠的睾丸, 仅有少量精原细胞可见;
(b) 注射后的受体不孕不育小鼠的睾丸, 可见大量的精原细胞

图 4 用荧光显微镜观察移植入供体精原干细胞的受体小鼠的精液

视野下有许多绿色荧光蛋白标识的精子出现, 从放大的局部图片可见, 精子的形态完整, 带有特殊的镰刀头和长长的尾部

不育小鼠中生存, 并且能促使不孕不育小鼠模型重新出现生精能力。

利用自然交配方法, 我们共获得了 22 只受体小鼠的后代。用 Southern Blot 的方法对这些后代小鼠进行基因型检测时发现, 有 5 只小鼠后代的 DNA 样本杂交时产生 700 bp 大小的产物(图 5), 判定为 GFP 阳性。该结果表明, 来自于 FVB/NJ-GFP 转基因小鼠的精原细胞能够在受体 BALB/c 裸鼠的睾丸中发育并成熟, 而且能够使受体不孕不育小鼠再次表现出生育能力。

图 5 Southern Blot 检测后代小鼠的基因型

如果基因型呈 GFP 阳性, 则在杂交后出现 700 bp 的杂交条带。

1, 阴性对照; 2~6, 阳性样本; 7, 阳性对照

3 讨论

之前的研究报道表明, 供体小鼠的精原干细胞可以对同一品系或品种的正常小鼠进行移植, 也可以对不同品种的免疫缺陷性小鼠进行移植 [9,11,14,24,27,28]。BALB/c-nu 裸小鼠是一种纯合的 (*Foxn1*^{nu}, formerly *Hfh1l*^{nu}) 自发性突变的无毛小鼠, 该突变小鼠无胸腺或胸腺发育不良(异常胸腺上皮不能使 T 细胞正常分化), 导致缺失免疫 T 细胞, 因而细胞免疫功能低下。这种小鼠由于先天性免疫缺陷, 可以用作异体移植方面的研究 [29~34]。

本实验中选用了 BALB/c-nu 裸小鼠作为精原干细胞移植的受体, 并在移植实验前用抗肿瘤药物白消安致使裸小鼠不育。一般来说, 评定供体精原干细胞在受体体内是否产生功能性精子及其产生的精子数量需要通过有效的方法对供体细胞进行长期的追踪。之前许多文献都报道了各种供体细胞的标记系统, 如用荧光染料 PKH26 标记的供体细胞移植到受体兔子的大脑后, 4 个月里都能在特定的组织中检测到红色的荧光 [35]。但这种染料进行标记, 其标记的浓度很难掌握, 且其与细胞膜不可逆地相结合, 对细胞有一定程度的损害。为了更好地进行体内追踪观测, 本实验采用了已成功转入 GFP 绿色荧光蛋白的

FVB/NJ-GFP小鼠作为供体小鼠。实验结果显示,移植后的受体小鼠表现出高水平的生殖能力,但产生的GFP阳性后代所占的比例却很低(22.72%) (5/22)。这可能是因为注射的过程中白消安发生了泄漏,幸存的内源性干细胞仍可以增殖并生成成熟的精子。

精原干细胞移植技术作为一种基因改造手段,已相继运用到其他一些动物体上^[5,6,9-13,24,27,28],其中包括灵长类。对兔子和仓鼠进行精原干细胞移植的实验克服了异种之间发生免疫排斥的困难,使异种移植成为可能。既然放射性治疗和化疗有损于病人的内源性生精细胞,导致严重的不育症,那么自体精原干细胞移植将是治愈这种后遗症的有效方法^[10,11,24,27,28]。近年来,随着精原干细胞移植技术的深入发展,这项技术已开始运用到人类不育症的治疗上。睾丸微环境主要由支持细胞和血睾屏障来维持,影响生精过程。因此无论技术发展到何种程度,保证一个好的受体睾丸微环境对精原干细胞移植的成功具有重要的作用。结合前人的研究方法^[10,11,36],今后,我们将通过给受体注射用促性腺激素释放激素促进剂,对移植后供体精原干细胞在受体睾丸内的定居情况展开深入的研究。

总之,本研究表明,对不育受体裸鼠模型进行精原干细胞的移植后能产生后代。曲细精管集落和产生有效供体精原细胞的能力将在很大程度上推动精原干细胞移植技术的运用。这项技术的发展将给不育症患者带来福音。分化的细胞或是那些保留精原干细胞功能的成熟细胞都可以用来辅助产生功能性精子。有趣的是,如果把不育的睾丸中分离到的干细胞移植到正常的睾丸中,可以有效避免内源和外源生精细胞发生竞争,并为干细胞的形成提供一个必需的环境。

参 考 文 献

- 1 Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 1972, 52: 198—236
- 2 Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. Their morphology, proliferation, and maturation. *Anat Rec*, 1971, 160: 533—558
- 3 Meistrich M L, van Beek M E A B. Spermatogonial stem cells. In: Desjardins C, Ewing L L, eds. *Cell and Molecular Biology of Testis*. New York: Oxford University Press, 1993. 266—295
- 4 Russell L D, Ettlin R A, Sinha Hikim A P, et al. Mammalian spermatogenesis. In: Russell L D, Ettlin R A, Sinha Hikim A P, et al, eds. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press, 1990. 1—40
- 5 Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11298—11302[DOI]
- 6 Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock M R, et al. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod*, 1999, 60: 515—521[DOI]
- 7 Brinster R L, Avarbock M R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11303—11307[DOI]
- 8 Nagano M, Brinster R L. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. *Acta Pathol Microsc Immunol Scand*, 1998, 106: 47—57
- 9 Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock M R, et al. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med*, 2000, 6: 29—34[DOI]
- 10 Jiang F X, Short R V. Male germ cell transplantation in rats: apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia. *Int J Androl*, 1995, 18: 326—330
- 11 Ogawa T, Dobrinski I, Brinster R L. Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue Cell*, 1999, 31: 461—472[DOI]
- 12 Ali H, Susan O M, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*, 2002, 66: 21—28
- 13 Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer G F, et al. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod*, 1999, 14: 144—150
- 14 Franca L R, Ogawa T, Avarbock M R, et al. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod*, 1998, 59: 1371—1377[DOI]
- 15 Dobrinski I, Avarbock M R, Brinster R L. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod*, 1999, 61: 1331—1339[DOI]
- 16 Griswold M D. What can spermatogonial transplantation teach us about male reproductive biology? *Endocrinology*, 2000, 141: 857—858[DOI]
- 17 Mahato D, Goulding E H, Korach K S, et al. Spermatogenic cells do not require estrogen receptor- α for development of function. *Endocrinology*, 2000, 141: 1273—1276[DOI]
- 18 Hammer R E, Pursell V G, Rexroad C E, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, 315: 680—683[DOI]
- 19 Kim J H, Jung-Ha H S, Lee H T. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol Reprod Dev*, 1997, 46(4): 515—526[DOI]
- 20 王宁, 陈晓光, 姚纪花, 等. 利用精原干细胞建立人凝血因子转基因小鼠. *科学通报*, 2003, 48(17): 1848—1850
- 21 吴应积, 罗奋华, 旭日干. 用精原干细胞移植技术制作转基因动物的研究前景. *科学通报*, 2005, 50(19): 2061—2068
- 22 Ogawa T, Arechnaga J M, Avarbock M R. Transplantation of testis

- germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol*, 1997, 41: 111—122
- 23 Russell L D, Nagano M, Brinster R L. Spermatogonial transplantation. In: Stefanini M, Boitani C, Galdieri M, et al, ed. *Testicular function: From gene expression to genetic manipulation*. Berlin: Springer, 1998. 41—57
- 24 Clouthier D E, Avarbock M R, Maika S D. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*, 1996, 381: 418—421[DOI]
- 25 Avarbock M R, Brinster C J, Brinster R L. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med*, 1996, 2: 693—696[DOI]
- 26 Schlatt S, de Kretser D M, Loveland K L. Discriminative analysis of rat Sertoli and peritubular cells and their proliferation *in vitro*: evidence for follicle-stimulating hormone mediated contact inhibition of Sertoli cell mitosis. *Biol Reprod*, 1996, 55: 227—235[DOI]
- 27 Dobrinski I, Ogawa T, Avarbock M R, et al. Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice. *Mol Reprod Dev*, 1999, 53: 142—148[DOI]
- 28 Dobrinski I, Avarbock M R, Brinster R L. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev*, 2000, 57: 270—279[DOI]
- 29 Cordier A C, Haumont S M. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat*, 1980, 157: 227—263[DOI]
- 30 Hirasawa T, Yamashita H, Makino S. Genetic typing of the mouse and rat nude mutations by PCR and restriction enzyme analysis. *Exp Anim*, 1998, 47: 63—67[DOI]
- 31 Kaestner K H, Knochel W, Martinez D E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*, 2000, 14: 142—146
- 32 Kaushik A, Kelsoe G, Jaton J C. The nude mutation results in impaired primary antibody repertoire. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 631—634[DOI]
- 33 Pantelouris E M. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*, 1968, 217: 370—371
- 34 Segre J A, Nemhauser J L, Taylor B A, et al. Positional cloning of the nude locus: genetic, physical, and transcription maps of the region and mutations in the mouse and rat. *Genomics*, 1995, 28: 549—59[DOI]
- 35 Hass S J P, Bauer P, Rolf A, et al. Immunocytochemical characterization of *in vitro* PKH26-labelled and intracerebrally transplanted neonatal cells. *Acta Histochem*, 2000, 102: 273—280[DOI]
- 36 Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock M R et al. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes. *Tissue Cell*, 1998, 30: 583—588[DOI]