

小鼠睾丸支持细胞的分离培养与鉴定

杨君杰,刘善荣,杨玲,王凤玫,任传路,胡凯猛,刘厚奇*

(第二军医大学基础医学部组织胚胎学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**分离培养小鼠睾丸支持细胞并进行鉴定。**方法:**取 18~20 d 雄性小鼠的睾丸,酶消化法原代培养。用 RT-PCR 的方法克隆带有锌指结构域的支持细胞基因 SERZ,与 pcDNA3.0 连接后构建重组质粒 pcDNA3.0-SERZ。用 *Kpn* I 和 *Xba* I 分别酶切质粒 pcDNA3.0-SERZ,获得线性化模板进而合成探针。原位杂交检测 SERZ mRNA 在培养细胞中的表达;用 RT-PCR 的方法检测雄激素结合蛋白(ABP)在支持细胞中的表达。**结果:**支持细胞多为多边形,核呈三角形或不规则形,染色浅,核仁明显,细胞完全铺开,成膜状,相邻细胞之间交织连接,细胞纯度为(85.1±2.5)%。SERZ mRNA 在培养细胞的胞质中高水平表达。RT-PCR 结果表明我们分离的支持细胞能够表达 ABP mRNA。**结论:**我们成功分离和鉴定了小鼠睾丸支持细胞,纯度为(85.1±2.5)%。

[关键词] 睾丸;支持细胞;细胞分离;SERZ;雄激素结合蛋白

[中图分类号] Q 2-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)07-0741-04

Isolation and identification of Sertoli cells from mouse testis

YANG Jun-jie, LIU Shan-rong, YANG Ling, WANG Feng-mei, REN Chuan-lu, HU Kai-meng, LIU Hou-qi* (Department of Histology & Embryology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To isolate and identify Sertoli cells from mouse testis. **Methods:** Testis were isolated from male mouse aged 18-20 days old and were cultured by enzymatic digestion. The Sertoli cell gene with a zinc finger domain (SERZ) was obtained by RT-PCR and was inserted into pcDNA3.0 to construct recombinant plasmid pcDNA3.0-SERZ. pcDNA3.0-SERZ was then cleaved by restriction endonuclease *Kpn* I and *Xba* I to obtain the linear templates for preparation of the probes. The expression of SERZ mRNA in the cultured cells was analyzed by *in situ* hybridization with the prepared probes. The expression of androgen binding protein (ABP) mRNA in the cultured cells was detected by RT-PCR. **Results:** Under light microscope, most Sertoli cells were polygonal and were completely extended, mimicking a membrane. The nuclei were triangular or irregular, weakly stained and with obvious nucleoli. The neighbouring cells were interlaced with one another and the cell purity was (85.1±2.5)%. SERZ mRNA was highly expressed in the cytoplasm of the cultured cells. RT-PCR showed that ABP mRNA was expressed in the cultured cells. **Conclusion:** We have successfully isolated and identified Sertoli cells from mouse testis, with the cell purity being (85.1±2.5)%.

[KEY WORDS] testis; Sertoli cells; cell separation; SERZ; androgen binding protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(7): 741-744]

文献^[1,2]报道可以从胚胎干细胞起源的类胚体中分离到类原始生殖细胞,然后移植到睾丸获得精子细胞。但在这两个实验中存在共同的问题,胚胎干细胞进行随机分化,分化概率较低且不稳定,难以作为一种稳定的模式来研究生殖细胞发生分化的机制。而支持细胞是睾丸生精小管中的上皮细胞,为精子发生提供微环境,在精子发生中起主要作用^[3,4]。因此,我们拟把胚胎干细胞与支持细胞共培养,在体外诱导分化出精原细胞,从而建立一种胚胎干细胞向生殖细胞分化的稳定模型并探讨其中可能的机制。

本实验是该研究的初期工作,主要是分离和培养支持细胞,并检测支持细胞的特异性基因 SERZ 的表达,同时还检测了支持细胞的一种分泌性功能蛋白——雄激素结合蛋白(andro-

gen binding pro-

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂的来源 ICR 小鼠,雄性,18~21 d 龄,购自第二军医大学实验动物中心。pcDNA3.0 质粒和大肠杆菌 DH5 α 为本教研室保存;小量柱式离心组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物科技有限公司)、3S Plasmid Miniprep Kit V3.1、3S DNA Gel Purification Kit V3.1(上海中科英达生物科技有限公司);限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xba* I

[基金项目] 国家自然科学基金(90208026)。Supported by National Natural Science Foundation of China(90208026)。

[作者简介] 杨君杰,硕士生。E-mail: junjieyang@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: houqiliu@hotmail.com

(Promega Corporation); T₄ DNA 连接酶(Fermentas, MBI); 日常 DNA 电泳琼脂糖(TYPE A, electrophoresis grade, Amresco); 溴化乙锭(EB, Amresco); γ DNA Marker(Fermentas, MBI); 高效感受态细菌制备试剂盒(上海生工试剂公司, Sangon); Agar A (Bacteriological, BBI); 胰蛋白胨、酵母提取物(OXOID, England); 氨苄青霉素(10 mg/ml, 上海生工生物工程技术有限公司, Sangon); 甘油(biotechnology grade, Amresco); 胎牛血清(FBS, 56°C 30 min 灭活, 杭州四季青生物工程材料有限公司); DMEM、0.25% 胰蛋白酶-EDTA (high glucose, Gibco); L-谷氨酰胺(high pure grade, Amresco); 碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(Boehringer-Mannheim)。

1.2 支持细胞原代培养 支持细胞原代培养主要参照 Welsh 和 Wiebe^[5]的方法, 略加改变, 以下各步操作均在无菌条件下进行。处死 18~20 d 的雄性小鼠, 取出睾丸, 剥除被膜, 含抗生素的 D-Hanks 液洗 3 次, 并切碎。胰酶与胶原酶按 1:1 的比例消化 12~15 min 后, 经 75 μ m 的滤网过滤, 含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液洗细胞 2 次, 以每皿 5×10^5 个细胞的密度接种至 100 mm 培养皿中。含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液、CO₂ 培养箱(饱和湿度; 95% 空气-5% CO₂; 37°C) 培养。24 h 后换液。以后每 3~4 d 换液 1 次。

1.3 组织和细胞总 RNA 提取 用小量柱式离心组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒。取 5 μ l 总 RNA 进行 1% 甲醛变性凝胶电泳, 电泳结果可见 28 S、18 S 2 条清晰完整的带, 证实所提取的总 RNA 无降解。将总 RNA 用适量 ddH₂O 稀释后于紫外分光光度计扫描测定, D₂₆₀/D₂₈₀ 稳定在 1.8~2.2 之间, 表明所提取之总 RNA 质量较好。

1.4 引物设计与合成 PCR 引物用 Primer Premier 5.0 设计并由博亚生物有限公司合成。SERZ (291 bp): 5'-GG G GTA CC C TCA GCA TCC TCT TCG TCC TC-3', 5'-G CT CTA GA A AGC TCT CCA TGT ACT CCT TCG T-3'。上游引物的酶切位点为 Kpn I, 下游引物的酶切位点为 Xba I (见下划线)。ABP (324 bp): 5'-CTC GGC TCA CAG TAG GCT-3', 5'-GCA GGT CCA CAT CAC AGT TT-3'。

1.5 RT-PCR 两步法 RT-PCR, 第一步: 逆转录反应。反应体系参考说明书, 条件如下: 42°C, 30 min; 99°C, 5 min; 5°C, 5 min。第二步: PCR 反应。反应体系参考说明书, 条件分别如下: SERZ: 94°C, 5

min; 94°C, 30 s; 60°C, 35 s; 72°C, 40 s; 共 30 个循环。ABP: 94°C, 5 min; 94°C, 30 s; 60°C, 35 s; 72°C, 40 s; 共 30 个循环。最后延伸温度为 72°C, 10 min。PCR 产物在加有 EB 2.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 以紫外凝胶扫描仪 FR-200 观察结果并拍照。

1.6 连接与转化 取 90 μ l RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳(含 EB 0.5 μ g/ml; 电压 50 V) 分离出目的条带, 在紫外灯上切下含目的条带的凝胶, 用 3S DNA Gel Purification Kit V3.1 回收、纯化目的片段。用限制性内切酶 Kpn I 和 Xba I 双酶切 pcDNA3.0 载体质粒和目的片段。分别回收、纯化双酶切后的载体片段和目的片段, 方法同前。用 T₄ DNA 连接酶重组连接双酶切载体片段和目的片段, 形成 pcDNA3.0-SERZ 重组质粒。用上述重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 。

1.7 重组质粒的鉴定 涂有重组质粒转化菌的琼脂平板上选择分散良好的单克隆菌落, 挑至 3 ml LB 培养基(含氨苄青霉素 60 μ g/ml) 中, 37°C 振荡摇床, 200~300 r/min, 培养过夜(12~16 h)。用 3S Plasmid Miniprep Kit V3.1 抽提质粒, 操作方法见说明书, 最后用 30 μ l ddH₂O 溶解质粒 DNA。取 10 μ l 重组质粒做双酶切鉴定。若双酶切鉴定表明重组成功, 则进行保种与保存。

1.8 测序 以 T7/SP6 为通用引物, 由上海生工生物工程技术有限公司测序。测序结果用 DNASTar 软件与目的 DNA 序列比对。

1.9 地高辛标记体外制备 RNA 探针 用 Kpn I 和 Xba I 分别酶切质粒 pcDNA3.0, 用 3S DNA Gel Purification Kit V3.1 纯化线性 DNA, 以此为模板合成 RNA 探针。标记程序按照 Roche 公司 Dig RNA 标记试剂盒操作方法进行。以线性质粒 pcDNA3.0/Kpn I 为模板, SP6 RNA 聚合酶催化合成反义链 RNA 探针; 以线性质粒 pcDNA3.0/Xba I 为模板, T₇ RNA 聚合酶催化合成正义链 RNA 探针。

1.10 原位杂交鉴定支持细胞 所有杂交用器皿均严格按无 RNAase 方法处理。(1) 细胞预处理: 室温下, 将细胞爬片用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1 mol/L PBS 洗 3 \times 5 min; 0.1 mol/L 甘氨酸/PBS 处理 5 min; 0.4% Triton X-100 / PBS 洗 15 min; 0.1 μ g/ml 蛋白酶 K 37°C 消化 30 min; 4% 多聚甲醛冲洗 5 min; 0.1 mol/L PBS 洗 2 \times 3 min; 0.25% 乙酸酐(0.1 mol/L 三乙醇胺配制) 10 min; 2 \times SSC 冲洗 10 min。(2) 杂交处理: 将切片用灭菌滤纸吸干, 并将其放入杂交缓冲液(探针至终浓度 0.5 μ g/ml) 中, 43°C 保温 12~16 h。4 \times SSC 37°C 漂洗 15

min; 2 × SSC 37℃ 漂洗 30 min; 1 × SSC 37℃ 漂洗 15 min; 0.5 × SSC 37℃ 漂洗 15 min; 0.1 × SSC 37℃ 漂洗 15 min。(3) 检测: 上述细胞用 0.05 mol/L PBS 洗 3 × 5 min, 加入碱性磷酸酶 (AKP) 标记的地高辛抗体, 室温湿盒 1 h; 用 0.05 mol/L PBS 洗 4 × 5 min; TSM1 冲洗 2 × 5 min; TSM2 冲洗 2 × 5 min; NBT 和 BCIP 显色液中, 室温暗处显色 6 min。0.05 mol/L PBS 洗 2 × 5 min, 终止反应。本实验设置 2 种阴性对照: (1) 杂交前用 100 μg/ml RNaseA, 37℃ 预处理细胞 1 h; (2) 加正义探针进行反应, 其余步骤与加反义探针的样本相同。结果判定: 400 倍光镜下随机选择视野, 计数 200 个细胞以上, 计算支持细胞原位杂交阳性细胞百分率。

2 结果

2.1 原代培养 培养 8 h 后, 用倒置相差显微镜观察, 此时细胞变大, 折光性强。24 h 后细胞贴壁, 相邻细胞交织连接, 细胞呈镶嵌状排列, 细胞间隙较大且不规则。此后胞质逐渐增大, 折光性减弱。3~4 d 后细胞铺成膜状单层, 细胞间隙变小, 呈圆形或椭圆形。4~6 d 细胞完全铺开。细胞多为多边形, 有较大核仁, 其形态和胞质面积不再改变 (图 1)。



图 1 相差显微镜下的支持细胞
Fig 1 Sertoli cells under phase-contrast microscope (×100)

2.2 RT-PCR 1% 琼脂糖凝胶电泳显示, SERZ RT-PCR 产物为 291 bp, ABP RT-PCR 产物为 324 bp, 分别与预期扩增片段长度相符, 应是我们的目的片段 (图 2)。

2.3 重组质粒的酶切鉴定 pcDNA3.0 载体插入片段 SERZ 测序结果用 DNASTar 与小鼠 SERZ mRNA 蛋白编码区序列比对, 结果 100% 符合。重组质粒双酶切后, 一条较短的片段与预期 DNA 片段的长度 (291 bp) 相符; 较长一条与双酶切的 pcDNA3.0 质粒 (约 5.4 kb) 等长 (图 3)。

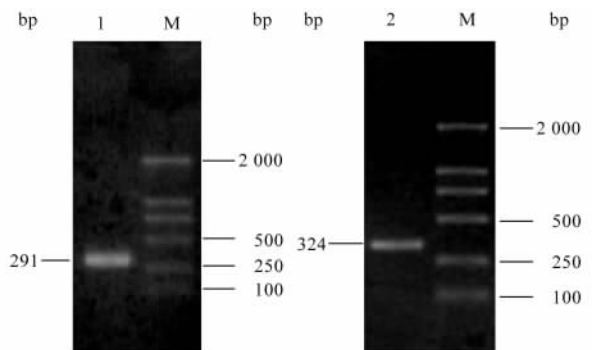


图 2 RT-PCR 产物的电泳分析

Fig 2 Electrophoretic analysis of RT-PCR products
1: SERZ; 2: ABP; M: DNA marker

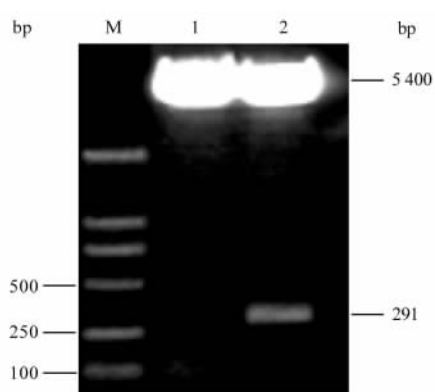


图 3 pcDNA3.0-SERZ 重组质粒的酶切鉴定

Fig 3 Digestive identification of recombinant plasmid pcDNA3.0-SERZ

M: DNA marker; 1: pcDNA3.0-SERZ; 2: pcDNA3.0-SERZ/*Kpn* I + *Xba* I

2.4 RNA 探针的制备 第 2 泳道为反义探针, 第 3 泳道为正义探针, 大小为 154 bp 左右 (图 4)。

2.5 原位杂交鉴定 反义探针的检测结果为阳性杂交信号, 胞质深蓝色, 胞核不着色; 阴性对照未见阳性信号, 胞质、胞核均不显色 (图 5)。支持细胞原位杂交阳性细胞率为 (85.1 ± 2.5)%。

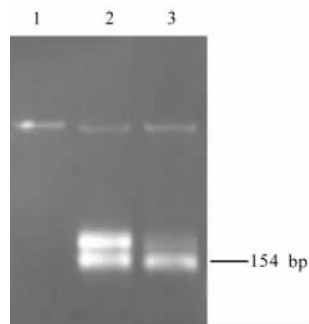


图 4 RNA 探针

Fig 4 RNA probes

1: Templates; 2: Antisense probes; 3: Sense probes

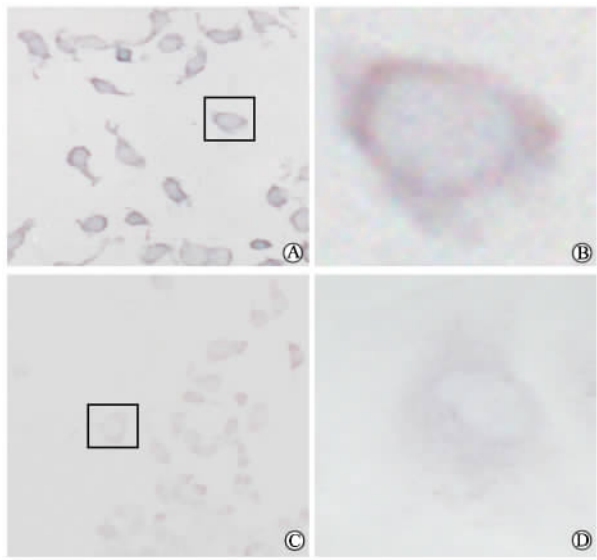


图5 原位杂交鉴定支持细胞

Fig 5 Identification of Sertoli cells by *in situ* hybridization

A, B: SERZ positive cells; C, D: SERZ negative cells; A, C: $\times 100$; B, D: $\times 400$

3 讨论

支持细胞有较多的分离和培养方法,但一致认为支持细胞的培养成功主要取决于两个方面:细胞活性与目的细胞的纯度^[6]。我们在实验中发现,在从组织分离的过程中,用胰酶与胶原酶按1:1的比例消化12~15 min后,直接过滤,这种方法对细胞的活性影响较小,最大限度的保持了细胞体内生长的活性;在细胞原代培养时,我们在文献^[5]报道的基础上避开了低渗处理,结果表明这种处理方法也有效地保持了细胞的活性,且杂细胞比例与传统方法无明显差别。在此基础上我们分离获得的支持细胞既维持了较高的活性,又拥有较高的纯度,这为下一步工作奠定了基础。

本研究从形态和功能两个水平对培养的支持细胞进行了鉴定。从形态上看,我们分离培养的支持细胞多为多边形,完全铺开,有较大核仁,这符合支持细胞的典型特征。此外,最新文献^[7]报道SERZ

在调控支持细胞功能和激素代谢中起重要作用,是鉴定支持细胞的特异性基因。原位杂交结果表明我们分离的支持细胞高表达SERZ基因。从功能上看,雄激素结合蛋白是支持细胞的一种分泌性蛋白,通过维持睾丸和副睾中较高的雄激素水平来调节精子发生和精子成熟^[8],也是支持细胞功能和血睾丸屏障形成的一个生化标志物^[9]。RT-PCR结果表明我们分离的支持细胞能够表达ABP mRNA。

本研究成功地分离了支持细胞,为支持细胞和胚胎干细胞共培养的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, et al. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro* [J]. PNAS, 2003, 100: 11457-11462.
- [2] Geijsen N, Horoschak M, Kim K, et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells [J]. Nature, 2004, 427:148-154.
- [3] Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, et al. Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway[J]. J Endocrinol, 2002, 174:195-204.
- [4] Barone F, Aguanno S, D'Alessio A, et al. Sertoli cell modulates MAA-induced apoptosis of germ cells throughout voltage-operated calcium channels[J]. FASEB J, 2004, 18:353-354.
- [5] Welsh MJ, Weibe JP. Rat Sertoli cells: a rapid method for obtaining viable cells[J]. Endocrinology, 1975, 96:618-624.
- [6] Kodani M, Kodani K. The *in vitro* cultivation of mammalian Sertoli cells[J]. PNAS, 1966, 56:1200-1206.
- [7] Chaudhary J, Skinner MK. Identification of a novel gene product, Sertoli cell gene with a zinc finger domain, that is important for FSH activation of testicular Sertoli cells[J]. Endocrinology, 2002, 143:426-435.
- [8] Anthony CT, Danzo BJ, Orgebin-Crist MC. Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and androgen-binding protein in the restricted rat[J]. Endocrinology, 1984, 114:1413-1418.
- [9] Johnson L, Petty CS, Neaves WB. Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production[J]. Biol Reprod, 1983, 29:207-215.

[收稿日期] 2006-03-28

[修回日期] 2006-05-29

[本文编辑] 尹 茶