

师如意, 张秀娟, 白银山, 等. 猪精原干细胞超微结构观察与体外冻存条件的优化研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 1-5.

猪精原干细胞超微结构观察与体外冻存条件的 优化研究

师如意^{1,2}, 张秀娟^{1,3}, 白银山¹, 卫恒习¹, 李 莉¹, 张守全¹

(1 华南农业大学 动物科学学院/广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广东 广州 510642;
2 山西医科大学 基础医学院/省部共建教育部细胞生理学重点实验室, 山西 太原 030001;
3 广东省昆虫研究所, 广东 广州 510260)

摘要:【目的】检测猪精原干细胞(PSSCs)在分化过程中其内部超微结构及细胞器的变化情况,并且找到适宜 PSSCs 的冷冻保存条件,为长期保存 PSSCs 和研究 PSSCs 的分化机制提供科学依据.【方法】采用两步酶消化法和 Percoll 不连续密度梯度法获取 PSSCs,利用透射电子显微镜(TEM)对 PSSCs 在体外不同培养时间的超微结构变化进行观测,并且利用台盼蓝染色法和碱性磷酸酶(AP)染色法比较不同浓度的甘油和二甲基亚砷(DMSO)保存液对 PSSCs 冻存效果的影响.【结果和结论】未分化的 PSSCs 细胞膜完整平滑,细胞器正常,胞质均匀,无伪足出现,细胞核清晰.而开始分化的 PSSCs 出现伪足,线粒体数量大幅增加.冻存 7 d 后,解冻结果表明, PSSCs 以 V(DMSO): V(DMEM/F12): V(FBS): V(100 × 双抗) = 10: 69: 20: 1 为宜.

关键词:猪精原干细胞; 超微结构; 冻存
中图分类号:Q954. 43 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)02-0001-05

Ultrastructure of porcine spermatogonial stem cells (PSSCs) cultured *in vitro* and optimization of cryopreserving conditions

SHI Ruyi^{1,2}, ZHANG Xiujuan^{1,3}, BAI Yinshan¹, WEI Hengxi¹, LI Li¹, ZHANG Shouquan¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China;
2 Preclinical Medical College, Shanxi Medical University/Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education, Taiyuan 030001, China; 3 Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China)

Abstract:【Objective】The aim of this research was to optimize the cryopreserving conditions of porcine spermatogonial stem cells (PSSCs) and observe the changes of ultrastructure in PSSCs. 【Method】The testicular cells of Landrace piglets aged from 1 day to 5 days were isolated by two-step enzymatic digestion method. The percoll discontinuous density gradients method was used to purify PSSCs. The transmission electron microscope (TEM) was used to observe the ultrastructure of PSSCs during different culturing periods *in vitro*. The effects of glycerine and dimethyl sulfoxide (DMSO) on PSSCs cryopreserving were investigated. 【Result and conclusion】The results showed that the cell membrane of undifferentiated PSSCs was integrated and smoothed without pseudopodia, the cytoplasm was homogeneous and nucleus was clear. The pseudopodia were formed in differentiated PSSCs and the number of the mitochondria greatly

increased. The appropriate cryopreserving medium for PSSCs is $V(\text{DMSO}):V(\text{DMEM}/\text{F12}):V(\text{FBS}):V(100 \times \text{Penicillin}/\text{Streptomycin solution}) = 10:69:20:1$.

Key words: porcine spermatogonial stem cells (PSSCs); ultrastructure; cryopreserving

干细胞生物学特性的研究是生命科学领域研究的热点问题,精原干细胞(Spermatogonial stem cells, SSCs)作为其中一部分,近年来成为干细胞生物学的重点研究模型,因为SSCs的自我更新和分化牵涉到生命科学领域的许多方面,并且SSCs是雄性哺乳动物体内唯一能够将基因信息传递给下一代的干细胞,更为重要的是它强大的功能分析优势^[1].因此,研究SSCs在分化发育过程中其细胞内部超微结构的变化有着很重要的意义.

细胞冻存是细胞保存的主要方法之一.利用冻存技术将细胞置于 $-80 \sim -196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境条件中低温保存,可以使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来,在需要的时候再复苏细胞用于试验.同时,适度地保存一定量的细胞,可以防止因正在培养的细胞被污染或其他意外事件而使细胞丢种,起到了细胞保种的作用.除此之外,还可以利用细胞冻存的形式来购买、寄赠、交换和运送某些细胞.所以提供长期保存的SSCs是进行基础研究的必需途径,如果无法进行长期冷冻保存,那么SSCs的利用率将大大降低,无法突破地域的限制.

因为物种间的差异,SSCs冷冻条件也因物种而异.有研究人员报道牛SSCs冷冻后保持生物活性的能力,同时进行了再移植,发现在移植后的2~3个月能形成克隆^[2-3].对于小鼠而言,冻存一段时间之后,睾丸混合细胞仍可用于SSCs移植,并且将冷冻后小鼠SSCs移植入不育小鼠睾丸,结果不育小鼠产生了后代^[4-5].对于人类而言,当孩子被确诊为癌症时,作为男孩子的家长越来越多的要求对其孩子的SSCs进行长期的冷冻保存,以防孩子在进行抗癌治疗过程中丧失生育能力^[6].

作为与人类亲缘关系较近的猪,其生理生化指标及解剖结构很多与人类相似,越来越多地被用作药物及某些人类疾病的研究,是一种理想的模式动物.如何对猪SSCs(PSSCs)进行冷冻保存仍需进一步的研究.基于此,本试验利用透射电子显微镜对外培养不同时间的PSSCs超微结构进行观测,并研究甘油、二甲基亚砷(DMSO)作为冻存保护剂对PSSCs的影响,为进一步研究PSSCs的冷冻保存技术提供科学依据.

<http://xuebao.scau.edu.cn>

1 材料与方法

1.1 研究对象与主要试剂

5日龄之内的长白仔公猪,购于华南农业大学原种猪场;明胶、Ⅳ型胶原酶粉末、0.25%胰酶-EDTA溶液等为Sigma公司产品;100×双抗溶液、DMEM/F12液体培养基为Gibco公司产品;胎牛血清为Hyclone公司产品;NBT/BCIP染液为北京鼎国生物有限公司产品;Percoll为Pharmacia公司产品;DMSO、甘油、戊二醛、钨酸、醋酸铀、枸橼酸铅、Epson 812树脂为Sigma公司产品.

1.2 PSSCs的分离纯化

PSSCs的分离纯化:利用两步酶消化法获取睾丸混合细胞悬液,利用Percoll不连续密度梯度法纯化PSSCs,具体操作步骤及所需用品参考本课题组已发表文献^[7].

1.3 PSSCs不同培养时间的超微结构观测

1.3.1 PSSCs的基础培养条件 37℃条件下, $V(\text{CO}_2):V(\text{空气}) = 5:95$,100%饱和湿度.

SSCs基础培养基的配制: $V(\text{DMEM}/\text{F12 不完全培养基}):V(\text{FBS}):V(100 \times \text{双抗溶液}):V(\text{必需氨基酸溶液}):V(\text{非必需氨基酸溶液}) = 87:10:1:1:1$ 其中含有2 mmol/L L-谷氨酰胺和丙酮酸钠.无细胞因子添加.

1.3.2 PSSCs的收集 将体外培养不同时间的PSSCs以16℃条件下,1 500 r/min(453 g)离心5 min,之后用PBS清洗1~2次,相同参数进行离心.去掉上清液,用体积分数为2.5%戊二醛固定细胞沉淀.

1.3.3 PSSCs透射电镜超薄切片的制作 1)将体积分数为2.5%戊二醛固定后的细胞用12 g/L的琼脂糖包埋,包埋后可置于体积分数为2.5%戊二醛固定液中保存1周;2)用0.1 mol/L磷酸缓冲液洗样去固定液,洗6次,每次20 min;3)4℃条件下用10 g/L钨酸固定2 h;4)用0.1 mol/L磷酸缓冲液洗样去钨酸,洗6次,每次10 min;5)梯度乙醇逐级脱水;6)梯度丙酮逐级脱水;7)Epson 812树脂包埋,超薄切片;8)醋酸铀和枸橼酸铅双重染色;透射电子显微镜观察.

1.4 PSSCs细胞冻存液的配置

PSSCs不同细胞冻存液具体成分如下(均含1%双抗):

组1, $V(\text{DMSO}):V(\text{DMEM/F12}):V(\text{FBS}):V(100\times\text{双抗})=5:74:20:1$;

组2, $V(\text{DMSO}):V(\text{DMEM/F12}):V(\text{FBS}):V(100\times\text{双抗})=10:69:20:1$;

组3, $V(\text{DMSO}):V(\text{DMEM/F12}):V(\text{FBS}):V(100\times\text{双抗})=20:59:20:1$;

组4, $V(\text{甘油}):V(\text{DMEM/F12}):V(\text{FBS}):V(100\times\text{双抗})=5:74:20:1$;

组5, $V(\text{甘油}):V(\text{DMEM/F12}):V(\text{FBS}):V(100\times\text{双抗})=10:69:20:1$.

将纯化好的 PSSCs,按照 $5\times10^5\text{ mL}^{-1}$ 的密度,用不同的冻存液冻存.先放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冷 20 min ,再放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱预冷 20 min ,最后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱进行冻存研究.分别在 1、3、7 d 定时解冻,用台盼蓝染色,检测细胞活率,细胞活率较低的组则直接淘汰,活率高的组则进行碱性磷酸酶 (AP) 染色以鉴定 PSSCs 是否分化并进行体外培养试验以观测其复苏后基本生物学特性的变化情况.

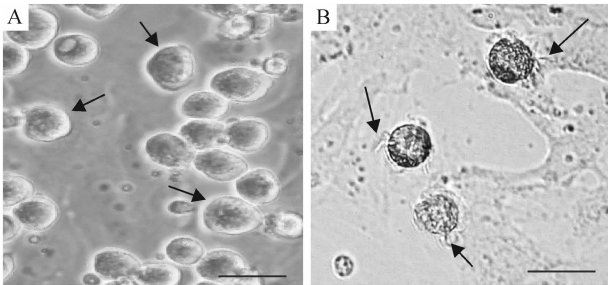
1.5 数据统计分析

数据采用 EXCEL 和 SPSS 14.0 统计分析.

2 结果与分析

2.1 PSSCs 在体外不同培养时间的超微结构观察

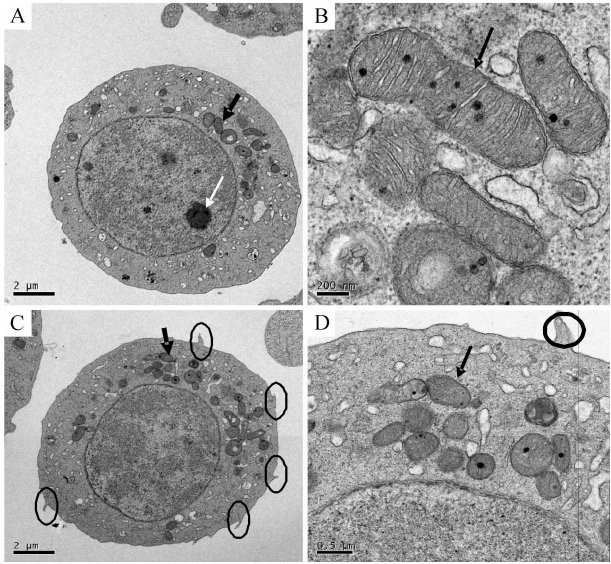
随着 PSSCs 在体外培养时间的不同,其外部形态会发生变化.同时,PSSCs 内部各类细胞器数目及结构也会伴随着变化.图 1A 中可见,PSSCs 在体外培养 24 h 时,细胞外部光滑,细胞呈链状存在;图 1B 中可见,体外培养 8 d 后,PSSCs 表面出现伪足,细胞膜表面粗糙不平,表明 PSSCs 体外开始分化.经过透射电镜检测,发现体外培养 2 d 的 PSSCs 胞质均匀,胞膜光滑平整,细胞核明显,细胞器正常 (图 2A、2B);体外培养 8 d 的 PSSCs 表面有伪足突起产生,细胞内部线粒体数目大量增多 (图 2C、2D).



A: 24 h 的情况; B: 8 d 伪足出现 (箭头); 标尺 = $20\text{ }\mu\text{m}$.

图 1 PSSCs 体外培养不同时间细胞外形变化

Fig. 1 The shape changes of PSSCs during different culturing periods *in vitro*



A: PSSCs 体外培养 24 h 情况,黑色箭头表示线粒体,白色箭头表示细胞核核仁;B: A 图局部放大后情况;C: PSSCs 体外培养 8 d 情况,箭头表示线粒体,圆圈内是突起的伪足;D: C 图局部放大后情况;A、C 图标尺 = $2\text{ }\mu\text{m}$, B 图标尺 = 200 nm , D 图标尺 = 500 nm .

图 2 体外培养不同时间 PSSCs 透射电镜扫描图

Fig. 2 The ultrastructure of PSSCs during different culturing periods *in vitro*

2.2 不同体积分数 DMSO 的冻存效果

由表 1 可知,在冻存 1 d 后,体积分数为 10% 和 5% DMSO 的冻存液中细胞的成活率均高于 80%,而体积分数为 20% DMSO 的冻存液中的细胞成活率只有 40%,差异显著 ($P<0.05$).到第 7 天的时候,只有体积分数为 10% DMSO 的冻存液中的细胞成活率高过 80%,其余体积分数的 DMSO 冻存的细胞成活率大幅下降.同时,随着冻存时间的延长,不同体积分数 DMSO 冻存的细胞成活率均大幅下降,体积分数为 5% DMSO 冻存的细胞成活率由 85% 降到了不足 60%,而体积分数为 20% DMSO 冻存的细胞成活率从 40% 降到了 14%,只有体积分数为 10% DMSO 冻存的细胞成活率维持在 80% 左右基本不变,所以用体积分数为 10% DMSO 的细胞冻存液进行细胞冷冻-复苏后体外培养试验.

表 1 不同体积分数的 DMSO 的冻存效果¹⁾

Tab. 1 The effect of different volume fractions of DMSO on cryopreserving

$\varphi(\text{DMSO})/\%$	成活率/%		
	1 d	3 d	7 d
5	$85.92\pm0.25\text{a}$	$83.15\pm9.36\text{a}$	$59.98\pm0.7\text{b}$
10	$86.39\pm2.03\text{a}$	$79.75\pm2.25\text{a}$	$80.96\pm1.77\text{a}$
20	$40.16\pm3.35\text{b}$	$22.98\pm5.15\text{b}$	$14.22\pm2.66\text{c}$

1) 表中数据为平均值 \pm 标准差, $n=5$, 同列数据后凡有一个相同小写字母者,表示差异不显著 ($P>0.05$, t 检验).

2.3 不同体积分数甘油的冻存效果

由表 2 可知,在冻存 1 d 后,体积分数为 10% 和 5% 的甘油的细胞成活率差异显著 ($P < 0.05$),但成活率都没有超过 40%. 到了第 3 天时,二者的差异仍然显著,但是冻存的细胞成活率均大幅下降,都没超过 30%. 由于甘油冻存液冻存的 SSCs 解冻后成活率非常低,所以,之后的 AP 染色及体外培养试验终止.

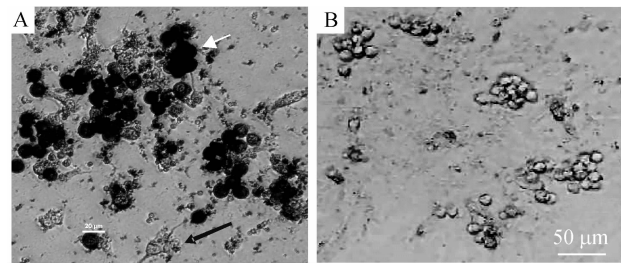
表 2 不同体积分数的甘油的冻存效果¹⁾
Tab.2 The effect of different volume fractions of glycerol on cryopreserving

φ (甘油)/%	成活率/%	
	1 d	3 d
5	14.14 \pm 2.12b	7.46 \pm 3.87c
10	33.63 \pm 6.36a	29.85 \pm 3.49a

1) 表中数据为平均值 \pm 标准差, $n = 5$, 同列数据后凡有一个相同小写字母者,表示差异不显著 ($P > 0.05$, t 检验).

2.4 PSSCs 复苏后体外培养试验

据表 1、表 2 结果, PSSCs 的冷冻-复苏后体外培养试验用体积分数为 10% DMSO 的细胞冻存液进行. 将冻存 7 d 的 PSSCs 复苏后用 AP 染色,着色率为 $(82.94 \pm 2.44)\%$ (图 3A), 同时进行体外培养, 36 h 后, 有细胞团形成 (图 3B), 表明解冻后的 PSSCs 大部分仍表现干细胞的性质, 并且其基本生物学特性未受到影响.



A: PSSCs 解冻后 AP 染色, 白色箭头所指为未分化 PSSC, 黑色箭头所指为已分化 PSSC, 标尺 = 20 μm ; B: PSSCs 解冻后体外培养 36 h, 标尺 = 50 μm .

图 3 PSSCs 解冻后体外培养 36 h 情况

Fig. 3 The PSSCs cultured *in vitro* for 36 h after thawing

3 讨论

3.1 长白仔猪 SSCs 不同培养时间细胞内部超微结构的观察

SSCs 在体内最终会分化成精子, 已有报道称 SSCs 在体外经诱导分化可以形成圆形精子细胞, 伴随有鞭毛出现, 并且发现带鞭毛的精子细胞可以产生有繁殖力的小鼠后代^[8-9].

本课题组前期已利用原子力显微镜 (AFM) 对未

分化的 PSSCs 表面超微结构及细胞力学特性进行了检测^[10]. 但 PSSCs 在分化过程中, 其细胞内部超微结构的变化及细胞器的变化情况并未进行观测, 本次试验经过透射电镜的观察, 发现未分化的 PSSCs 细胞膜完整平滑, 细胞器正常, 胞质均匀, 无伪足出现, 细胞核清晰. 而出现伪足的 PSSCs, 其内部线粒体的数量都大幅增加, 线粒体是用来给细胞提供能量的, 与细胞的生命活动旺盛程度有关. 当细胞伪足出现时, 细胞潜在的“运动量”会增加, 此时已开始分化, 出现伪足后要为将来变成精子游动而做准备, 细胞所需的能量大幅增加, 所以其线粒体数量在出现伪足时相应地大幅增加. 对 PSSCs 在分化过程中内部结构及细胞器数目变化的观测将为研究 SSCs 本身的生物学特性提供科学依据.

3.2 长白仔猪 PSSCs 的冻存研究

细胞冷冻打破了细胞的正常生理过程, 在细胞内部形成冰晶, 破坏细胞的正常结构, 对细胞造成一定的损伤, 在冷冻过程中添加一定剂量的冷冻保护剂可以在一定程度上降低冷冻所造成的损伤. 现在一般认为加入冷冻保护剂主要有以下作用: 1) 可以冲淡溶液中溶质浓度, 使细胞摄入的盐量降低; 2) 进入细胞, 改变细胞内过冷状态, 使胞内压接近胞外压, 降低细胞脱水皱缩程度和速度; 3) 冷冻剂进出细胞容易, 缓解复苏时渗透性肿胀引起的损伤^[11].

DMSO 是一种相对分子质量较小、渗透性强的化学物质, 是目前最常采用的细胞冻存保护剂, 其作用机制是可降低培养液冰点并防止游离蛋白质聚集, 提高细胞膜对水的通透性^[12]; 冻存前渗透到细胞内的 DMSO 可以降低细胞内外未结冰溶液中电解质浓度, 从而保护细胞免受高浓度电解质损伤, 同时细胞内水分不会过度外渗, 避免细胞过度脱水皱缩^[13]. 有研究表明, 用 DMSO 对成年恒河猴 SSCs 进行冷冻保存, 复苏后进行裸鼠的异种移植, 在睾丸的基底膜处会形成链状细胞和克隆团^[14]. Ogura 等^[15] 研究人员对金黄仓鼠睾丸细胞冻存后, 复苏存活的细胞达到 43%. 有研究报道, 利用冷冻人类卵巢组织的方法对小鼠及人睾丸组织进行冻存, 将 DMSO 作为冷冻保护剂, 解冻后的睾丸组织获得了良好的形态^[16-17].

对牛 SSCs 进行冷冻保存后, SSCs 仍具有保持生物活性的能力, 对其进行再移植, 发现在移植后的 2~3 个月仍能形成克隆^[2]. 在对鸡 SSCs 进行冷冻保存试验时, 相较于甘油来说, DMSO 可以作为鸡 SSCs 最佳的冷冻保护剂^[18]. 但是, DMSO 对细胞有一定的毒性, 浓度过高不利于细胞复苏后的存活与活性的

恢复。

由本试验结果可知,体积分数为 10% 的 DMSO 组成的冻存液的冻存效果最好,并且解冻后在体外培养 36 h 还会形成细胞团,并且可以被 AP 染色。体积分数为 20% 的 DMSO 与体积分数为 10% 的 DMSO 的试验结果差异显著,表明体积分数高的 DMSO 对于 PSSCs 的冻存来说也是有害的。

甘油是冻存动物精子最常用的抗冷冻剂,它能渗入细胞内部,浓缩或者结合胞内水分,降低溶液中盐的浓度和冷冻液的渗透压,从而发挥其对细胞的保护作用^[19]。

对于甘油作为冷冻保护剂冻存 PSSCs 来说,活率非常低,甚至连 30% 都不足,这说明甘油作为 PSSCs 的抗冷冻剂效果较差,反映出冷冻精原干细胞与冷冻精液有着较大的本质不同,所以在对 PSSCs 进行低温冷冻保存时,应使用抗冻效果相对良好的 DMSO 而非甘油,此结果与其他物种 SSCs 冷冻研究结果相似,可为以后对 PSSCs 长期研究奠定基础。

参考文献:

[1] SCHLATT S. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 187(1/2):107-111.

[2] OATLEY J M, REEVES J J, McLEAN D J. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during *in vitro* culture[J]. Biol Reprod, 2004, 71(3): 942-947.

[3] IZADYAR F, MATTHITS-RIJSEN BILT J J, OUDEN K D, et al. Development of a cryopreservation protocol for type a spermatogonia[J]. J Androl, 2002, 23(4):537-545.

[4] KANATSU-SHINOHARA M, OGONUKI N, INOUE K, et al. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreservation male germline stem cells[J]. Hum Reprod, 2003, 18(12):2660-2667.

[5] BRINSTER R L, NAGANO M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture[J]. Semin Cell Dev Biol, 1998, 9(4): 401-409.

[6] BERG H, REPPING S, VEEN F. Parental desire and acceptability of spermatogonial stem cell cryopreservation in boys with cancer[J]. Hum Reprod, 2007, 22(2): 594-597.

[7] 师如意,卫恒习,李莉,等.猪精原干细胞体外培养条件的优化[J]. 华南农业大学学报,2013,34(2):224-

229.

[8] MARH J, TRES L L, YAMAZAKI Y, et al. Mouse round spermatids developed *in vitro* from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into *in vivo*-developed mature oocytes[J]. Biol Reprod, 2003, 69(1):169-176.

[9] KIERSZENBAUM A L, TRES L L. Bypassing natural sperm selection during fertilization: The azh mutant offspring experience and the alternative of spermatogenesis *in vitro*[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 187(1):133-138.

[10] 李盛璞,师如意,王秋兰,等.猪精原干细胞的原子力显微镜检测[J]. 动物医学进展,2010,31(6):30-34.

[11] 李莲军,李德雪,张学明,等.7日龄小鼠生精上皮单细胞冷冻保存[J]. 中国兽医学报,2002,22(1):94-95.

[12] KOTOBUKI N, HIROSE M, MACHIDA H, et al. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow derived mesenchymal cells[J]. Tissue Eng, 2005, 11(5/6):663-673.

[13] LI Haisheng, ZOU Xuenong, WOO C, et al. Experimental anterior lumbar interbody fusion with an osteoinductive bovine bone collagen extract[J]. Spine, 2005, 30(8):890-896.

[14] HERMANN B, SUKHWANI M, LIN C, et al. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques[J]. Stem Cells, 2007, 25:2330-2338.

[15] OGURA A, LNOUE K, OGONUKI N, et al. Production of male cloned mice from fresh, cultured and cryopreserved immature sertoli cells[J]. Biol Reprod, 2000,62(6):1579-1584.

[16] HOVATTA O. Cryopreservation of testicular tissue[J]. Mol Cell Endocrinol, 2000, 169(1/2):113-115.

[17] SIIMES M A, RAUTONEN J. Small testicles with impaired production of sperm in adult male survivors of childhood malignancies[J]. Cancer, 1990, 65(6):1303-1306.

[18] 丁志丽,采克俊,刘莉,等.不同冷冻液对鸡精原干细胞冷冻-解冻后存活力的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2009,45(21):16-19.

[19] ALMLID T, JOHNSON L A. Effect of glycerol concentration equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thawed viability of boar spermatozoa frozen in straws[J]. J Anim Sci, 1988, 66(11):2899-2905.

【责任编辑 柴 焰】