

精原细胞移植研究的进展

秦达念*

(汕头大学医学院生理教研室, 汕头 515031)

摘要 自1994年Brinster实验室首次成功地进行了精原细胞移植以来, 近年来在这一领域进行的一系列研究又取得了不少新的重要发现, 生精细胞不但可以在同一种属的不同动物间进行移植, 还可以在不同种属的动物间进行移植. 这对雄性生殖研究, 尤其是对睾丸内支持细胞与生精细胞之间相互作用的研究是一项重大的技术突破. 实质上, Brinster实验室已经开创了一项可以更改动物整个基因组的又一种转基因技术.

关键词 精原细胞, 干细胞, 移植, 生精过程

学科分类号 R321.1

从1994年Brinster等^[1,2]首次报道利用显微注射技术成功进行了精原细胞移植以来, 关于这方面的研究又取得了不少新的进展, 本文就有关重要内容作一介绍.

Brinster和Zimmermann^[1]首先发现, 用显微注射法将一异种供体小鼠的睾丸细胞混合物注入另一不育受体小鼠的曲细精管管腔内, 可诱导受体小鼠的睾丸曲细精管出现供体精子生成过程. 他们选择出生后仅4 d和12 d的供体小鼠, 实验中先将去包膜睾丸放入含有I型胶原酶的培养液中, 在37℃下孵育15 min, 后用无钙磷酸缓冲液冲洗, 接着置于含有胰蛋白酶的缓冲液中, 在37℃下孵育5~10 min, 得到的细胞悬浮液在15℃下离心5 min (600×g), 弃上清后细胞再置于精子细胞培养液中 (含: 138 mmol/L NaCl, 8.1 mmol/L Na₂HPO₄, 2.7 mmol/L KCl, 1.1 mmol/L KH₂PO₄, 0.1 mmol/L EDTA, 5.5 mmol/L 葡萄糖, 5 mg/L 牛血清白蛋白, 100 mg/L I型DNA酶) 待用. 受体小鼠麻醉后, 经腹白线切口暴露睾丸, 固定后使一组曲细精管对准一微细管, 该微细管与注射器连接, 通过解剖显微镜在睾丸包膜上开一小口, 暴露曲细精管, 再将微细管插入曲细精管内并注入细胞悬浮液. 结果发现, 在受体小鼠的睾丸内出现供体细胞的生精过程, 而且形态特征正常, 并能产生成熟精子. 这一结果与我们对精子生成过程的基本认识有很大不同, 因为在正常生理状态下, 精原细胞是位于曲细精管基底部, 正常生精过程是由基底部向管腔方向进行的, 生成精子后才脱落进入管腔. 而用显微技术将精原细胞直接注入曲细精管管腔后, 精原细胞就必须由反方向从管腔内移位到基底部, 这一移位过程

还需要穿过支持细胞与支持细胞间的紧密连接.

Brinster和Avarbock^[2]随后又分别选取在胚胎18 d和出生后2 d之间、出生后5 d和15 d之间及出生后21 d和28 d之间的小鼠进行实验, 所取用的供体细胞含有支持细胞和处于不同生精阶段的生精细胞. 结果发现来自新生供体小鼠的细胞在受体小鼠睾丸中的移植效果不如出生后5 d和15 d之间及出生后21 d和28 d之间的小鼠. 如果增加供体细胞中支持细胞的数量, 可以提高移植效果.

显微注射技术表明, 经曲细精管与睾丸网连接处, 可使大多数曲细精管充盈供体细胞. 在交配实验中还发现, 含有marker LacZ基因的移植细胞分化为精子后, 可将该基因传给其后代. 实际上, Brinster的实验室开创了另一种转基因技术, 它可以修饰动物的整个基因组.

1995年Jiang和Short^[3]成功地将大鼠细胞移植到经白血福安 (busulfan, 一种原用于治疗髓性白血病的化学药物, 后来发现它可以破坏生精细胞, 引起不育) 处理后不育大鼠的曲细精管内, 并发现受体大鼠具备了管腔内生精特征, 而且腔管内生精过程中其细胞所处的发育阶段是与曲细精管上皮的生精阶段是同步的. 目前认为, 如果曲细精管的管周细胞、支持细胞和干细胞以一个聚集体的形式注入曲细精管内, 就可能产生管腔内的生精过程.

1996年Brinster实验室的Clouthier等^[4]在国际权威杂志《Nature》上报道, 他们又成功地进行

* 通讯联系人.

Tel: 0754-8566776, E-mail: Lqchen@mailserv.stu.edu.cn

收稿日期: 2001-02-27, 接受日期: 2001-05-24

了异种动物间的移植, 通过显微注射将转基因 Sprague-Dawley 供体大鼠的睾丸细胞注入免疫缺陷受体小鼠. 供体大鼠携带有 MT-LacZ 转基因, 该基因可在支持细胞和生精细胞表达, 在与 X-gal 孵育后通过蓝染可鉴别该基因. 由于受体小鼠生精细胞不含有该转基因, 所以内源性生精细胞不会被染蓝. 这样就可以鉴定受体小鼠睾丸中的生精过程是发源于供体大鼠还是受体小鼠. 结果发现, 受体小鼠曲细精管出现生精过程并被染蓝. 证明小鼠睾丸内的生精过程发源于大鼠供体细胞. 移植数月后在小鼠附睾内发现具有大鼠精子头部形态特征的大鼠精子. 另外, 他们还观察到, 虽然供体细胞中含有支持细胞, 但在受体小鼠的曲细精管内并无染蓝的支持细胞, 这表明小鼠睾丸内发源于大鼠供体细胞的生精过程并不依赖于供体支持细胞, 而是由小鼠支持细胞来“支持”的. 这一重大发现使学者们必须重新评估和研究支持细胞对生精过程精密调控的理论, 因为根据经典理论, 支持细胞对生精过程的“支持”有严格的时程要求, 对发育时程不同步和形态不同的生精细胞没有“支持”作用, 即生精细胞与支持细胞有严格的对应关系. 但大鼠与小鼠间生精细胞的成功移植对这一理论必然产生很大的冲击. 该实验结果显示, 生精细胞对支持细胞分泌物并没有严格的时程要求, 而且支持细胞对生精细胞的需求也具有更大的灵活性.

1996 年 Russel 和 Brinster^[5] 对同种和异种生精细胞移植进行了光镜和电镜观察, 结果发现这两类移植后的生精过程均具有正常的细胞构成, 但移植动物的生精过程无论在定性还是定量分析上都并不完整, 研究中发现, elongated 精子细胞常常缺失或变形. 在大鼠与小鼠间移植的观察中表明, 大鼠生精细胞发育与小鼠支持细胞整合在一起.

培养和贮存精原细胞是发展新转基因技术的关键, 1998 年 Brinster 和 Nagano^[6] 成功地进行了持续 3 个月培养后的移植. Avarbock 等^[7] 也发现冷冻睾丸细胞混合物可以延长移植前的时间.

1997 年 Ogawa 等^[8] 发表论文详细介绍了精原细胞移植技术, 他们提出了两种移植新方法: a. 通过睾丸包膜直接注入睾丸网; b. 通过输出小管束注入生精细胞混合物到睾丸网可进入曲细精管. 后一种方法已成为大鼠和小鼠生精细胞移植的常用方法.

1998 年至 1999 年, Parreira^[9] 和 Nagano^[10] 先后观察了受体小鼠中发源于供体小鼠干细胞的“移

民”细胞, 结果显示, 一些被推测为精原细胞的细胞在移植后第一周可达到基底层, 在第一个月期间“移民”细胞可确定为 LacZ 阳性细胞, 这一细胞链在进入曲细精管管腔部前, 在基底层约占 1 mm. 在移植 1 个月后, 出现明显的精母细胞. 在移植后两个月有精子生成, 在移植后三个月, 睾丸中平均有 30% 的部位出现由供体衍生而来的生精过程. 生精过程扩展的速度大约是 55~60 $\mu\text{m}/\text{d}$. 另外发现, 巨噬细胞可入侵移植睾丸的曲细精管并吞噬一些精子, 在一些尚无精子生成的曲细精管部位的支持细胞也可以吞噬少量精子^[11].

提高移植效果的一个重要途径就是要确定注入细胞的最适数量, 1999 年 Dobrinski 等^[12] 首先利用图象分析系统研究了在不同数量供体细胞注入受体睾丸后细胞移植的效果, 最后他们建议每只受体睾丸注入大约 10^7 的供体细胞. 另有实验显示, 低水平睾酮有利于提高移植效果^[13].

纯化干细胞是否可以提高移植的成功率? 1999 年 Shinohara 等^[14] 利用抗基底层干细胞表面蛋白质的抗体进行实验后证明, 注入的供体细胞中如干细胞含量增加 10 倍, 受体“移民”生精细胞的数量也可增加 10 倍. 而分离纯干细胞是提高移植效率的最佳途径.

1999 年 Ogawa 等^[15] 报道, 在免疫缺陷受体小鼠的睾丸内移植仓鼠生精细胞后可出现生精过程. 但 Dobrinski 等^[16] 的实验表明, 兔与小鼠间及狗与小鼠间的移植并不能成功地产生精子, 虽然移植后的细胞可从管腔移位于基底部, 也可能有细胞分裂, 但不能产生成熟的细胞类型. 兔的生精细胞可移植于免疫缺陷小鼠的曲细精管并能维持 1 年以上, 植入的生精细胞可出现早期精原细胞的扩展, 在植入后第一个月有细胞增殖现象, 但此后就没有进一步的分化, 而且在超过 12 个月的观察期都无明显改变. 狗生精细胞的移植结果与兔相似, 但效果略差于兔, 这可能与生精过程的成熟状态有关, 因为实验中兔的生精过程尚未成熟, 而狗的生精过程已经成熟. 这提示未成熟动物的移植效果可能更好.

精原细胞移植解决了一个关于生精细胞发展的时程问题. 对各类动物而言, 生精细胞从精原细胞发育到精子的时程都有严格的时程控制. 如小鼠的这一时程大约是 35 d, 大鼠的这一时程是 52~53 d. 以往一直不清楚这个发育时程是遗传给生精细胞的还是受支持细胞影响或控制的. 现在大鼠与

小鼠间的移植实验表明, 移植后的大鼠生精细胞仍按照其原有的严格时程进行发育, 小鼠的生精细胞也是按照其原有的严格时程进行发育, 这说明体细胞对生精细胞的发育速度并没有明显影响。

精原细胞移植技术为干细胞及其微环境的研究提供了一个重要的功能检测系统, 为雄性生精细胞生物学研究开拓了新的广阔空间。必然有助于加深人们对精原细胞增殖和分化调控机制及生精过程紊乱原因的认识。结合冷冻保存及体外培养技术, 精原细胞移植将有可能用于保护有特殊价值的基因物质, 并用于雄性家畜生殖细胞的质量控制。目前已开始探讨精原细胞移植技术应用于人类的可能性, 例如, 是否可以通过自体精原细胞移植, 使接受化疗或放疗的青春期前男性在生育功能损伤后有恢复生育可能?

参 考 文 献

- 1 Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ cell transplantation. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1994, **91** (24): 11298~ 11302
- 2 Brinster R L, Avarbock M R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1994, **91** (24): 11303~ 11307
- 3 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** (6): 326~ 330
- 4 Clouthier D E, Avarbock M R, Maika S D, *et al.* Rat spermatogenesis in mouse testes following spermatogonial stem cell transplantation. *Nature*, 1996, **381** (6581): 418~ 421
- 5 Russel L D, Brinster R L. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *J Androl*, 1996, **17** (6): 615~ 627
- 6 Brinster R L, Nagano M. Spermatogonial transplantation, cryopreservation and culture. *Cell Dev Biol*, 1998, **9** (4): 401~ 409
- 7 Avarbock M R, Brinster C J, Brinster R L. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med*, 1996, **2** (6): 693~ 696
- 8 Ogawa T, Arechaga J, Avarbock M R, *et al.* Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *J Dev Biol*, 1997, **41** (1): 111~ 121
- 9 Parreira G, Ogawa T, Avarbock M R, *et al.* Development of germ cell transplants in mice. *Biol Reprod*, 1998, **59** (6): 1360 ~ 1370
- 10 Nagano M, Avarbock M R, Brinster R L. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testis. *Biol Reprod*, 1999, **60** (6): 1429~ 1436
- 11 Russel L D, Franca L R, Brinster R L. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *J Androl*, 1996, **117** (6): 603~ 614
- 12 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** (2): 142~ 148
- 13 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** (5): 583~ 588
- 14 Shinohara T, Avarbock M R, Brinster R L, *et al.* B1- and A6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (10): 5504~ 5509
- 15 Ogawa T, Dobrinski M, Avarbock M R, *et al.* Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cell. *Biol Reprod*, 1999, **60** (2): 515~ 521
- 16 Dobrinski I, Avarbock M R, Brinster R L. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod*, 1999, **61** (5): 1331~ 1339

Progress in the Study of Spermatogonial Transplantation

QIN Da Nian*

(Department of Physiology, Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China)

Abstract Since the first report of successful spermatogonial transplantation issued by Brinster's laboratory in 1994, some important new findings has been revealed by a series of recently studies relating to spermatogonial transplantation. It has been found that germ cell can be transferred not only from one animal to another, but also from one species to another, which is a big technological breakthrough in the male reproductive researches, especially for the study of Sertoli-germ cell interaction. In essence, Brinster's laboratory has pioneered another transgenic technology that is capable of modifying the entire genome of the animal.

Key words spermatogonia, stem cell, transplantation, spermatogenesis

* Corresponding author. Tel: 86-754-8566776, E-mail: Lqchen@mailserv.stu.edu.cn

Received: February 27, 2001 Accepted: May 24, 2001