

体外培养条件下 SCF、LIF 与 bFGF 对昆明 白小鼠精原干细胞增殖的影响

尹 明^{1,2*} 李德雪^{1,3}

(1 中国人民解放军军需大学 长春 050016)

(2 国家人类基因组北方研究中心 北京 100176)

(3 军事医学科学院 北京 100850)

关键词 小鼠精原干细胞, 增殖, 生长因子, 体外培养

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0754-04

生长因子作为细胞体外培养和在体细胞生长及增殖必需的调节因子,一直被广泛的关注。业已证明干细胞因子(Stem Cell Factor, SCF)白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)和碱性成纤维细胞生长因子(Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)具有刺激细胞增殖的作用^[1-4],但大都是对单一因子进行研究。本实验探讨用这三种生长因子的不同组合观察对小鼠精原干细胞增殖的作用,以期定性和定量的探讨出体外培养初期三种因子对小鼠精原干细胞生长的影响,为小鼠精原干细胞系的建立奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 酶和试剂:DMEM 培养基、胎牛血清、非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、丙酮酸钠购自 GIBCO BRL 公司,胶原酶 IV、胰蛋白酶、透明质酸酶、维生素 A、C、E、噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)购自 SIGMA 公司, Percoll 为 Pharmacia 公司产品, L (+)谷氨酰胺购自中国医药公司。

1.1.2 实验动物:7~8 日龄的雄性昆明小白鼠,解放军军需大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 分离纯化小鼠精原干细胞:无菌收集 7~8d 雄性小鼠睾丸,加入适量 PBS 将生精小管吹散,静置 5min 后弃上清。加入 1mg/mL 胶原酶在 37°C、5% CO₂ 条件下作用 15min (期间晃动数次)后去上清,重复上述过程一次。加入 1.5mg/mL 透明质酸酶和 0.25% 胰蛋白酶同样条件下作用 5~10min, 350 目尼龙网过滤制成单细胞悬液。将单细胞悬液置于 Percoll 密度梯度(按 1.061、1.051、1.041、1.031、1.021 依次叠加)的最上层, 200g 离心 20min^[5]。吸取梯度在 1.031 和

1.041 之间的细胞小带加入 PBS 稀释, 1000r/min 离心 3min, 弃上清,重新加入 1.5mL 培养液吹起,调整细胞密度至 10⁵ 个/mL。每次实验干细胞纯度均在 75% 以上。

1.2.2 精原干细胞培养:将 200 μ L/孔细胞悬液接种于 96 孔培养板中,实验分 7 组,每组设 6 个重复,置于 34°C、5% CO₂、100% 湿度条件下培养。待 24h 细胞贴壁后,除对照组外,各组分别加入事先配置好的不同生长因子的培养液。每隔 8~12h 观察细胞的存活及分裂增殖情况。在加入生长因子 72h 和 120h 后对各组进行 MTT 检测。各组中生长因子的浓度及其配置见表 1,三因子组合实验分组见表 2。

表 1 含不同浓度生长因子精原干细胞培养液的配制

Table 1 The collocation of medium containing different growth factor with different concentration

Concentration of growth factor (ng/mL)	Groups						
	1	2	3	4	5	6	7
SCF	5	10	20	30	40	100	
LIF	0.1	1	5	10	20		
bFGF	0.1	1	5	10	20	50	100

1.2.3 MTT 检测:0.25% 胰蛋白酶消化单层培养细胞,用 DMEM 培养液制成单细胞悬液,以 10³~10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔培养板中,37°C、5% CO₂ 及 100% 湿度条件下培养 3~5d 后,每孔加入 MTT 溶液(5mg/mL) 20 μ L, 37°C 孵育 4h,终止培养,弃上清。每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10min。选择 490nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值,记录结果。以时间为横轴,光吸收值为纵轴,绘制细胞生长曲线。

收稿日期 2002-06-13, 修回日期 2002-08-22。

基金项目 国家自然科学基金资助(No. 39770554)。

* 通讯作者。 Tel 86-10-67883332-836; Fax 86-10-86781036; E-mail yinminger@hotmail.com

表 2 组合实验中生长因子的浓度

Table 2 The concentration of growth factors combination

Concentration of growth factor (ng/mL)	Groups															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
SCF	0	0	0	0	5	5	5	5	30	30	30	30	10	10	10	10
LIF	0	5	10	20	0	5	10	20	0	5	10	20	0	5	10	20
bFGF	0	5	10	20	5	0	20	10	10	20	0	5	20	10	5	0

1.2.4 统计学分析:用 Q-BASIC 软件和 STATISTIC 软件进行单因素方差分析、正交实验设计、多因素方差分析、相关回归分析、非线性估计检验。

2 结果

2.1 不同浓度的三种因子体外培养小鼠精原干细胞的 MTT 检测结果

加入 SCF 72h 后,MTT 检测结果显示,剂量组与对照组之间、各剂量组之间活细胞数量均有显著差异($P < 0.05$)。其中 30ng/mL 剂量组的 OD 值显著高于其它各组($P < 0.05$)。体外培养 120h 后,方差分析显示各组间 OD 值差异极显著($P < 0.01$)。其中 20、30、40ng/mL 剂量组的活细胞数量明显高于其它各组($P < 0.01$)。

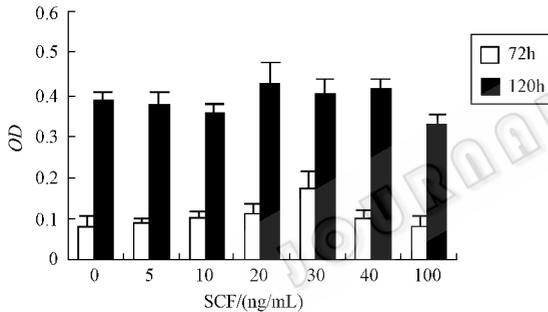


图 1 不同浓度的 SCF 体外培养小鼠精原干细胞的 MTT 检测结果

Fig.1 MTT level on SSC with different concentration of SCF in culture

加入 LIF 的小鼠精原干细胞在体外培养 72h 及 120h 后进行 MTT 检测。结果显示,72h 时方差分析表明各组与对照组差异不显著($P > 0.05$)。5、10ng/mL 剂量组的 OD 值略高于其它组。体外培养 120h 时,方差分析显示 10、20ng/mL 剂量组与对照组之间差异显著($P < 0.05$)。

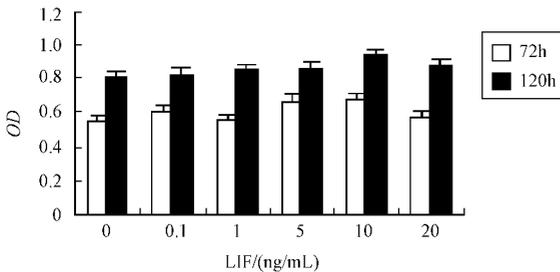


图 2 不同浓度的 LIF 体外培养小鼠精原干细胞的 MTT 检测结果

Fig.2 MTT level on SSC with different concentration of LIF in culture

检测,方差分析表明各组与对照组差异不显著($P > 0.05$)。20、50ng/mL 剂量组的活细胞数量略高于其它各组。体外培养 120h 时,各因子组与对照组差异极显著($P < 0.01$)。其中 20ng/mL 剂量组与 50 ng/mL 剂量组 OD 值明显高于其它各组,多重比较结果显示差异显著($P < 0.05$)。

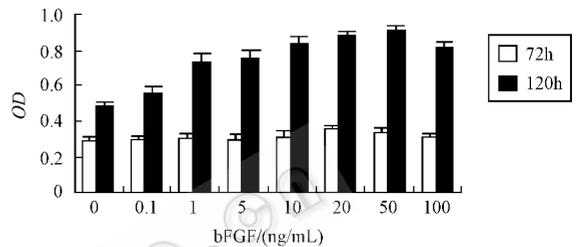


图 3 不同浓度的 bFGF 体外培养小鼠精原干细胞的 MTT 检测结果

Fig.3 MTT level on SSC with different concentration of bFGF in culture

2.2 三种因子不同浓度的不同组合体外培养小鼠精原干细胞的 MTT 检测结果

加入三种因子不同浓度的组合后,细胞培养 120h 时 MTT 检测,经多元回归分析表明:SCF 与 bFGF 对小鼠精原干细胞增殖的影响显著($P < 0.01$)。相关系数 $R_{SCF} = 0.330$ 和 $R_{bFGF} = 0.520$ 。根据所得的方程(图 4)求出在这种条件下,SCF 的最佳作用剂量是 16ng/mL; bFGF 的作用效果呈线性变化(图 5)在这种条件下,其作用效果随 bFGF 的剂量增高而上升。而 LIF 对小鼠精原干细胞增殖的影响不显著($P > 0.05$)。逐步回归分析将其淘汰。SCF 与 bFGF 的交互作用显著($P < 0.01$)。综合作用效果见图 6。

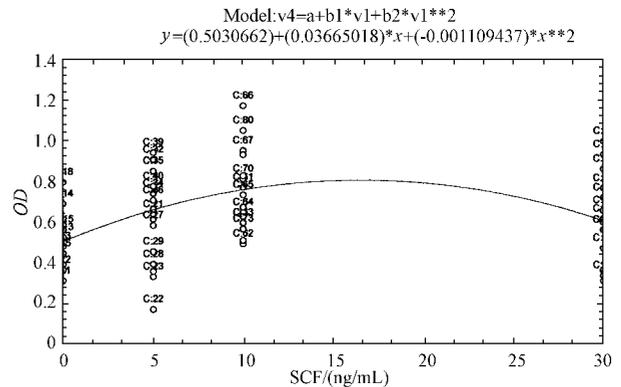


图 4 三因子体外培养 SSC 120h SCF 作用的非线性估计趋势图

Fig.4 The non-linear trend of SCF effect on SSC after 120h cultured with the combination of SCF, LIF and bFGF (ng/mL)

体外培养 72h 时,加入 bFGF 的小鼠精原干细胞经 MTT

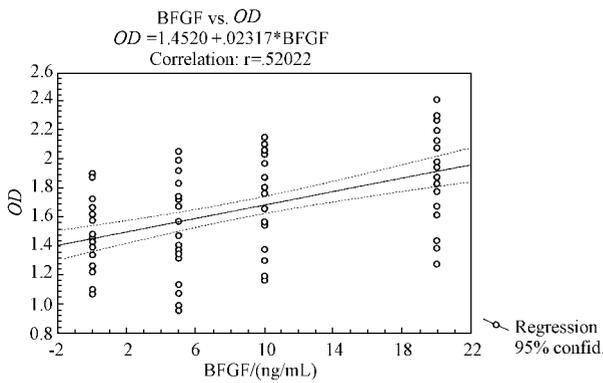


图5 多因子体外培养 SSC 120h bFGF 作用的多元回归趋势图

Fig.5 The multiple-regression trend of bFGF effect on SSC after 120h cultured with the combination of SCF, LIF and bFGF (ng/mL)

Data:120.STA 4v * 96c

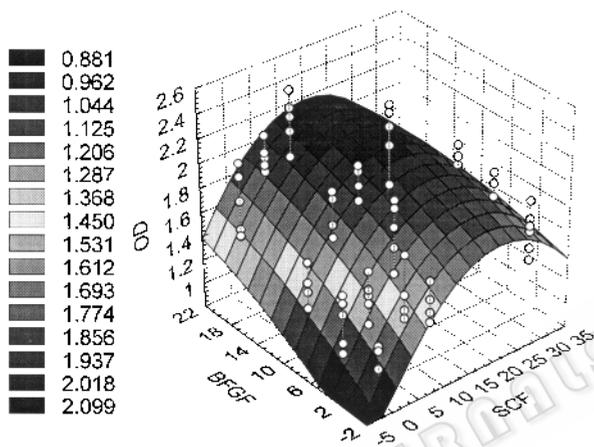


图6 体外培养 SSC 120h 时多因子组合的作用趋势

Fig.6 The effect of SSC cultured after 120h with SCF, LIF and bFGF combination(ng/mL)

3 讨 论

使小鼠精原干细胞在体外无限增殖且保持未分化状态是建立小鼠永生细胞系的前提和基础。在体外培养过程中,一般添加一种到两种生长因子^[6]以维持细胞的存活。考虑到细胞在体内处于精确而复杂的微环境,组织和细胞的稳态机制是由细胞因子网络控制,本实验将与小鼠精原干细胞在体内存活有关的 SCF、LIF 和 bFGF 三种生长因子添加到培养液中发现,三种因子单独和联合作用均对小鼠精原干细胞的增殖产生影响。

SCF 及其 c-kit 受体在小鼠精子发生和精原干细胞(Spermatogonial Stem Cell, SSC)的增殖/分化中具有至关重要的作用,已有报道 SCF 能够显著促进精原干细胞的增殖^[4,6]。本实验也证明了这一点,当浓度低于 30 ng/mL 时,活细胞的数量随着 SCF 浓度的增加而上升,但当 SCF 增至 100ng/mL 时其促增殖效果反而减弱,推断其原因可能为:在 SCF 从低到高浓度变化过程中,SCF 与 c-kit 之间的特异性结合激活多种蛋白激酶,通过多条途径诱导目的基因的表达,产生最大的细

胞增殖反应^[7,8],当 SCF 达到一定的阈值水平时,细胞膜上全部的 c-kit 受体都被结合,再多的 SCF 也无法继续发挥这种生物学效应,而这些 SCF 可能又和培养基中的物质或胞外、胞膜上的其它物质结合,从而诱发了抑制细胞分裂物质的活性,或激活了细胞内一些潜在的负调控因子,使某些蛋白酪氨酸激酶与 c-kit 的偶联能力显著减弱,最终导致细胞增殖的下降。LIF 能够使 PGCs 和前精原细胞增殖并抑制其分化,在本实验中 LIF 同样可以促进 SSC 的增殖,表明 SSC 有着象它们祖先——PGCs 对 LIF 一样的感受性,因为 PGCs 可以表达一种 LIF 受体,即使在无饲养层的情况下,LIF 也可以与受体相结合从而发挥其生物学作用。这也和 LIF 有可能抑制精原干细胞凋亡的说法相辅相成,已有研究发现,LIF 可以直接抑制 PGCs 的凋亡^[9,10],表明 LIF 在生殖细胞的发育中可能存在另外一种新的影响机制,当然也不排除作用于精原干细胞的可能。同样,加入 bFGF 的 SSC 在体外培养 120h 后,20ng/mL 和 50 ng/mL 的剂量组都呈现出很好的生长态势,表明 bFGF 也增强了小鼠精原干细胞的有丝分裂能力。

在本研究中,三种因子组合的作用效果不是累加的,也不是完全相互抑制。体外培养 120h 精原干细胞的增殖对 SCF 和 bFGF 呈剂量依赖性。SCF 的效应值呈一条曲线,开始时随着 SCF 浓度的增加细胞增殖加快,当 SCF 超过某一浓度时,细胞的增殖反而受到抑制,这和 SCF 单一作用小鼠精原干细胞时的效果相似。所不同的是,在三种因子共同作用的环境中,SCF 达到最佳作用效果的浓度只是单一作用时的一半,即 SCF 为 16ng/mL 时 SSC 的增殖达到颠峰。bFGF 则与小鼠精原干细胞的增殖显示出一种正向的量效规律。交互作用结果显示,SCF 与 bFGF 的作用是相互促进、彼此加强的。也就是说,在本实验中,当 SCF 为 16ng/mL 时,bFGF 的作用剂量越大,促增殖的效果就越显著。可以得出这样的结论,在小鼠精原干细胞体外培养的早期,SCF 与 bFGF 联合加入优于单因子的作用效果,因为只要向培养液中加入很少的剂量就能比单因子更显著地促进小鼠精原干细胞的增殖。从结果中看出 LIF 的加入本实验中未有明显的量效关系。此结果尚需以后的实验来证实,LIF 在细胞增殖和分裂的早期或更晚一些时候是否发挥着特定的生物学作用还需要进一步探讨。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Ohta H, Yomogida K, Dohmae K *et al.* Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of *c-kit* and its ligand SCF. *Development*, 2000, **127** (10): 2125 ~ 2131
- [2] Feng L X, Ravindranath N, Dym M. Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem* 2000, **275** (33): 25572 ~ 25576
- [3] Nikolova D, Martinova Y, Seidensticker M *et al.* Leukaemia inhibitory factor stimulates proliferation of prospermatogonial stem cells. *Reprod Fertil Dev* 1997, **9**: 717 ~ 721
- [4] Feng LX, Chen Y, Dettin L *et al.* Generation and *in vitro* differenti-

- ation of a spermatogonial cell line. *Science*, 2002, **297**(5580) 392 ~ 395
- [5] Sell C, Rubini M, Rubin R *et al.* Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, **90**(23) :11217 ~ 11221
- [6] Rossi P, Dolci S, Albanesi C *et al.* Follicle-stimulating hormone induction of steel factor(SCF)mRNA in Mouse sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SCF. *Dev Biol*, 1993, **155**(1) 68 ~ 74
- [7] ZHANG X M(张学明), LAI L X(赖良学), LI D X(李德雪) *et al.* Separation and Purification of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Acta Anatomical Sciences*(解剖学报) 2000, **31**(3) 235 ~ 238
- [8] Ohta H, Yomogida K, Dohmae K *et al.* Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of *c-kit* and its ligand SCF. *Development*, 2000, **127**(10) 2125 ~ 2131
- [9] Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S *et al.* Effect of steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, 1991, **353** 750 ~ 752
- [10] Pesce A, Filippi C, Rosenthal E *et al.* Malignant fibrous histiocytoma following bone marrow transplantation for acute leukemia. *Transplant Proc*, 1993, **25**(3) 2299 ~ 2301

Effects of SCF , LIF and bFGF on Mouse Spermatogonial Stem Cells Proliferation *in vitro*

YIN Ming^{1, 2*} LI De-Xue^{1, 3}

¹(Quartermaster University of PLA , Changchun 050016 , China)

²(Chinese National Human Genome Center , Beijing 100176 , China)

³(Academy of Military Medical Science , Beijing 100185 , China)

Abstract The present study identified the favorable environment conditions for Spermatogonial stem cells *in vitro* according to their unique biological properties. Three growth factors , stem cell factor(SCF) , leukemia inhibitory factor(LIF) and basic fibroblast growth factor(bFGF) were all found to independently contribute to the proliferation of mouse spermatogonial stem cell. The percentage of cell proliferation significantly enhanced by SCF at 30 ng/mL but decreased with heightening its combination after cultured 120 hours. The mice spermatogonial stem cells were significantly proliferated after 120 hours ' culture with 10 ng/mL and 20 ng/mL($P < 0.01$) of LIF , between 20 ng/mL and 50 ng/mL($P < 0.01$) for bFGF. SCF and bFGF were significantly enhanced mice spermatogonial stem cells proliferation after these three factors combination. For LIF , no obvious effect was observed.

Key words spermatogonial stem cell , proliferation , growth factor , culture *in vitro*

Received : 06-13-2002

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China(No.39770554).

* Corresponding author. Tel 86-10-67883332 ; Fax 86-10-86781036 ; E-mail : yinminger@hotmail.com