

人 BMSCs 移植小鼠睾丸后向 Leydig 细胞或产类固醇激素细胞诱导分化的实验研究*

任尚青¹, 邓 实¹, 吴云剑¹, 侯 琳¹, 董 天², 董 强¹

1. 四川大学华西医院 泌尿外科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 血液科(成都 610041)

【摘要】 目的 研究人体骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)在体内条件下能否向 Leydig 细胞或产类固醇激素细胞定向诱导分化,及是否发生免疫排斥反应。**方法** 将分离培养获得的第 3 代 BMSCs 经核荧光标记物标记后,制备成细胞悬液,注射至经二甲磺基乙烷(EDS)处理后的 20 只 BALB/c 小鼠睾丸内。从移植 BMSCs 前 1 d 开始,每隔 2 d 处死 1 只小鼠,测尾静脉游离睾酮浓度,对照组为同期未作任何处理 BALB/c 小鼠 20 只。同时睾丸组织经荧光显微镜摄片,追踪观察 BMSCs,行 3 β -羟类固醇脱氢酶(3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -HSD)单克隆抗体和鼠抗人细胞核单克隆抗体双重免疫荧光检测,寻找 3 β -HSD 和鼠抗人细胞核单克隆抗体荧光染色均阳性的细胞。**结果** EDS 对小鼠 Leydig 细胞有一定杀伤作用;采用睾丸网注射法行人 BMSCs 移植小鼠睾丸获得了成功,未见免疫排斥反应;移植 BMSCs 后的睾丸组织未检测到 3 β -HSD 和鼠抗人细胞核单克隆抗体免疫荧光染色均阳性的细胞。**结论** 采用人 BMSCs 移植小鼠睾丸的方法获得成功,未见免疫排斥反应,移植后的 BMSCs 未向 Leydig 细胞或产类固醇细胞定向分化。

【关键词】 骨髓间充质干细胞 Leydig 细胞 睾丸

Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Leydig or Steroidogenic Cells *in vivo* REN Shang-qing¹, DENG Shi¹, WU Yun-jian¹, HOU Lin¹, DONG Tian², DONG Qiang¹. 1. Department of Urology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 Objective To study the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into Leydig or steroidogenic cells *in vivo* and the immunoreaction related to transplantation into mouse testis. **Methods** After differentiation and cultivation, the 3rd-passage BMSCs were collected and labeled with Hoechst 33342, and joined the saline fluorouracil to form cell-suspending fluid. After injection of the etgane dimethane sulphonate (EDS), the mice received the transplanted cell-suspending fluid by testis net injection with a dose of each side testicular 0.05 mL. Since the first day prior to transplantation, mice were executed every 2 d (one mouse each time) and the testosterone concentrations were analyzed. The control group included 20 BALB/c mice without any treatment during the same period. The results were analyzed by microscopic observation, using 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) monoclonal antibody and mouse anti-human cell nucleus monoclonal antibody for immunofluorescence assay on the testis. For tracking the BMSCs, the cells which were positively stained with both 3 β -HSD and mouse anti-human cell nucleus monoclonal antibodies were retrieved. **Results** Certain killing effect of EDS to the mouse Leydig cells was observed. Transplantation of human BMSCs into the mouse testis by testis net injection was effective and feasible, no immunoreactions were detected. After transplantation, no positive cells of 3 β -HSD and mouse anti-human cell nucleus monoclonal antibody were found. **Conclusion** Transplantation of human BMSCs into the mouse testis by testis net injection was effective and feasible, no immunoreactions were detected. After transplantation, the human BMSCs failed to differentiate into Leydig cells or steroidogenic cells.

【Key words】 Mesenchymal stem cells Leydig cells Testicle

Leydig 细胞是男性体内合成分泌雄激素的细胞,也是其体内睾酮的主要来源^[1],3 β -羟类固醇

脱氢酶(3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -HSD)是 Leydig 细胞的标志物。Chen 等^[2]认为人类 Leydig 细胞具有从始末分化的干细胞(stem Leydig cells, SLCs)向功能成熟的 Leydig 细胞(adult Leydig cells, ALCs)分化的动态过程。由此提出一种新的临床治疗方案,即获取生理性或病理

* 国家自然科学基金(No. 30872569)、四川省科技厅应用基础计划(No. 2010JY0017)和四川省科技厅科技支撑项目(No. 2012SZ0025)资助

性睾酮低下患者的 SLCs 或间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs), 通过定向诱导分化为 ALCs 后, 回输患者体内, 进入机体的下丘脑-垂体-性腺调节系统, 通过机体调节机制补充雄激素, 这种治疗方案也避免了外源补充雄激素导致的异常反应。二甲磺基乙烷 (etgane dimethane sulphonate, EDS) 处理大鼠是目前研究 Leydig 细胞功能、增殖与分化的理想模型^[3]。本研究选取人骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 为细胞来源, 尝试将其移植入经 EDS 处理后的 BALB/c 小鼠模型, 观察其 Leydig 细胞破坏情况, 并观察能否发生免疫排斥反应, 以及睾丸微环境能否定向诱导人 BMSCs 向 Leydig 细胞或产类固醇激素细胞分化, 探索 EDS 处理的小鼠模型是否理想, 为细胞治疗及基因治疗类固醇激素缺乏类疾病提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

骨髓来源于 2010 年 3 月就诊于华西医院的 4 例非造血系统疾病患者, 经髂后上嵴骨髓穿刺获得骨髓共 25~30 mL, 年龄 18~37 岁, 2 男 2 女。该研究取得华西医院伦理委员会的批准, 所有患者均知情同意。

1.2 BMSCs 的分离、培养

将获得的骨髓加入肝素抗凝 (50 U/mL), 通过 Ficoll-Paque 密度梯度离心法, $400 \times g$ 30 min, 分离获得骨髓中的单个核细胞 (MNCs), L-DMEM 培养基洗涤 2 次, $200 \times g$ 10 min/次, 随后将获得的 MNCs 接种到含 10% FCS 的 L-DMEM 培养基中。在饱和湿度、5% CO₂、37 °C 孵箱内进行培养, 72 h 后首次换液, 随后根据细胞生长情况每周半量换液 2 次。当 MNCs 贴壁覆盖面达到培养瓶底部的 80% 后, 通过 TNE (0.25% 胰蛋白酶, 0.01% EDTA) 室温下消化细胞 0.5~1 min, 由此得到原代 BMSCs 悬液 (P1)。将细胞 (P1) 按照 1:3 的比例传代培养, 细胞生长 80% 左右再次传代 (P2) 培养, 留取第 3 代 (P3) 的 BMSCs 进行核荧光标记及小鼠睾丸细胞移植。

1.3 BMSCs 的 Hoechst 33342 核染色液荧光染色标记

吸去培养液, PBS 液冲洗 3 次, 避光加入 5 mg/L 的核荧光标记物 Hoechst 33342 染液 3~4 mL 后置入孵箱内 15 min 后取出在荧光显微镜下观察染色后细胞形态。加入 TNE 覆盖培养瓶底,

消化 BMSCs, 制备成细胞悬液。细胞计数后以 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清后获得细胞沉淀, 加入适量生理盐水, 制备成 1×10^6 /mL 细胞悬液 2 mL。

1.4 EDS 处理 BALB/c 小鼠制备动物模型及 BMSCs 细胞移植

无菌秤取 EDS 150 mg, 将其溶解于 1:3 比例的 DMSO 和三蒸水的 2 mL 混合液中, 制备为 75 mg/mL 的 EDS 溶液。将 40 只 6~8 周龄雄性健康 BALB/c 小鼠随机分为 2 组, 即实验组及对照组。麻醉实验组小鼠后秤取质量按照 2 mL/kg 的剂量腹腔注射 EDS 溶液, 注射 1 次, 对照组不行任何特殊处理。将制备 Hoechst 33342 液标记、密度为 1×10^6 /mL 的 BMSCs 细胞悬液移植入实验组小鼠睾丸网, 每侧睾丸注入细胞悬液 0.05 mL, 共注射 1 次。

1.5 小鼠尾静脉游离睾酮的测定

从移植前 1 d 开始, 每隔 2 d 各从两组取 1 只小鼠尾静脉抽取血液 1 mL, 持续 58 d。4 °C 放置全血标本 4 h, 待血液凝固纤维蛋白收缩后, 常温离心 $3\,000 \times g$ 8 min, 取上层血清 200 μ L 备用, -80 °C 冰箱冻存备用, 待标本收集完毕测试小鼠血清睾酮浓度, 按照睾酮酶联免疫试剂盒 (Testosterone Assay KGE010) 的说明检测上清液中睾酮相对浓度。

1.6 β -HSD 抗体和鼠抗人细胞核抗体双重免疫荧光染色

从移植前 1 d 开始, 每隔 2 d 处死一只实验组小鼠, 持续 58 d。脱臼法处死后取双侧睾丸, 固定后, 置于染色湿盒内, 滴加 PBS 液于标本上, 10 min 弃去, 使标本保持一定湿度。滴加绿色荧光标记 1:100 比例稀释的一抗, 即兔抗人 β -HSD 单克隆抗体, 37 °C 孵育 1 h。PBS 液漂洗 3 次, 每次 2 min。用吸水纸吸去残留液体。滴加红色荧光 1:50 稀释的鼠抗人细胞核抗体作为二抗。4 °C 孵育 1 h。PBS 液冲洗玻片, 去除二抗, 遂室温加入 DAPI 染色液作用 5 min, 冲洗。加入缓冲甘油于玻片上封固标本, 盖上盖玻片, 24 h 内荧光显微镜下观察, 是否发现双重免疫荧光细胞, 同时观察是否出现明显炎症坏死区域, 用以判断免疫排斥反应的发生。

2 结果

2.1 BMSCs 的分离与培养

原代人 BMSCs 分离后接种 2 h 内可见细胞呈圆形漂浮于培养液中, 2~4 h 后部分细胞开始下沉

贴壁,24 h 后大多数已贴壁,也可见少数未贴壁细胞漂浮于培养液中,原代及第 3 代 BMSCs 形态见图 1、图 2。

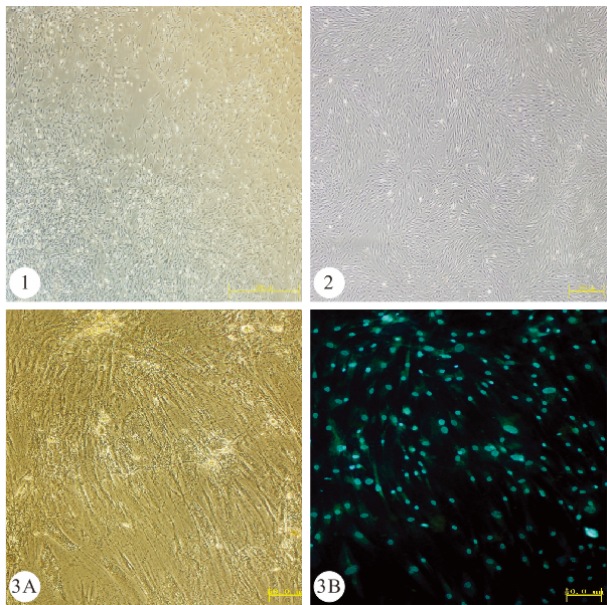


图 1 人原代 BMSCs 形态学表现 图 2 第 3 代 BMSCs 的形态学表现 图 3 第 3 代 BMSCs 21 d(A)与 Hoechst 33342 核荧光标记物标记后的第 3 代 BMSCs(B)对比(×100)

Fig 1 Morphology of the original generation of BMSCs Fig 2 Morphology of the 3rd-passage of human BMSCs Fig 3 The 3rd-passage of 21 days of human BMSCs (A) and the 3rd-passage human BMSCs were labeled with Hoechst 33342 (B)

2.2 经 Hoechst33342 核荧光标记物标记后的第 3 代人 BMSCs

由图 3 可见,普通光学显微镜下第 3 代人 BMSCs 21 d,细胞呈长梭形,大小均一,排列整齐,细胞核不明显;Hoechst 33342 核荧光标记物标记后的第 3 代人 BMSCs,荧光显微镜下细胞核呈蓝色

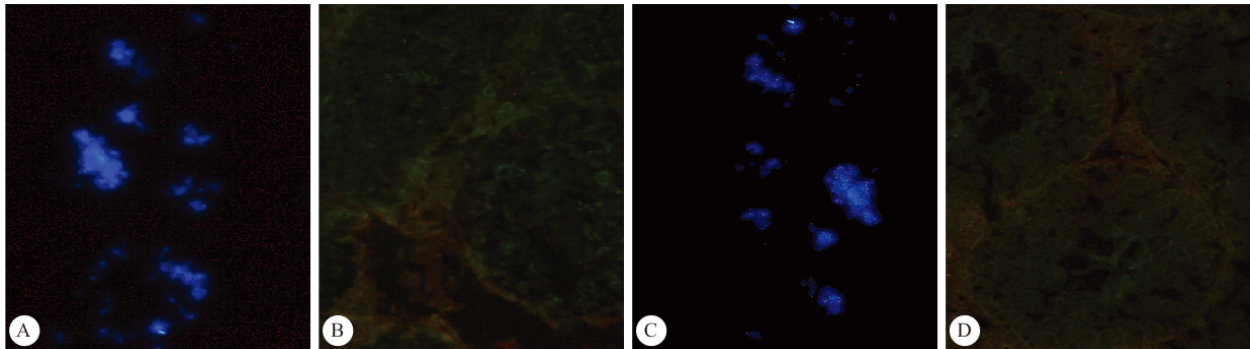


图 5 经 Hoechst 33342 核荧光标记物标记后(A,C)及经 3β-HSD 单克隆抗体和鼠抗人细胞核单克隆抗体双重免疫荧光染色的第 3 代人 BMSCs(B,D)

Fig 5 The 3rd-passage human BMSCs were labeled with Hoechst 33342 (A,C) and immunofluorescence assayed by 3β-HSD monoclonal antibody and mouse anti-human cell nucleus monoclonal antibody (B,D)

A, B: 5 d after transplantation; C, D: 8 d after transplantation

荧光。

2.3 EDS 处理后 BALB/c 小鼠与对照组小鼠静脉游离睾酮浓度

由图 4 可见,与对照组相比,注射 EDS 后实验组小鼠睾酮有所降低,提示 EDS 对小鼠睾丸 Leydig 细胞有一定程度的损伤。21 d 后两组保持一致。

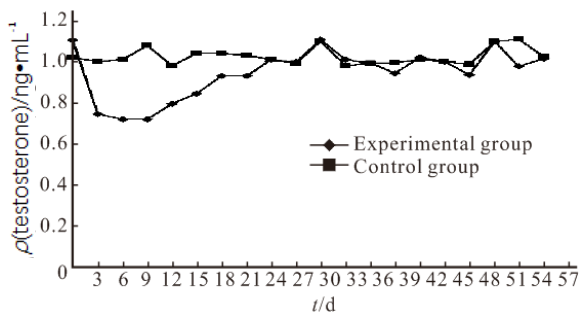


图 4 EDS 处理后 BALB/c 小鼠与对照组小鼠静脉游离睾酮浓度变化曲线

Fig 4 The testosterone concentration curve of EDS and control group BALB/c mice

2.4 移植人 BMSCs 小鼠睾丸标本免疫荧光染色

经 EDS 处理的 BALB/c 小鼠,实验期间辜组织未发现明显炎性坏死区域,排斥反应。

由图 5 可见,移植 5 d 后,经 Hoechst 33342 核荧光标记物标记后的第 3 代人 BMSCs,蓝色荧光细胞仍比较集中;但未见 3β-HSD 单克隆抗体和鼠抗人细胞核单克隆抗体双重免疫荧光染色双阳性细胞。

由图 5 可见,移植 8 d 后,经 Hoechst 33342 核荧光标记物标记后的第 3 代人 BMSCs,荧光细胞比较分散,仍未见 3β-HSD 单克隆抗体和鼠抗人细胞核单克隆抗体双重免疫荧光染色双阳性细胞。

移植 20 d 后,荧光显微镜下未见经 Hoechst 33342 核荧光标记物标记后的人 BMSCs,直至实验结束移植后(56 d 时),一直未见 β -HSD 单克隆抗体和鼠抗人细胞核单克隆抗体双重免疫荧光染色双阳性细胞。

3 讨论

MSCs 存在于机体器官间质和结缔组织间,骨髓中含量较多,其次为脐带、脐血及脂肪组织等^[4]。它具有高度增殖、自我更新、多向分化及免疫学原性低等特点^[5,6],移植后不引起移植物抗宿主病。国外的一些研究也发现在一定条件下,BMSCs 能够诱导分化为产生类固醇的细胞,证实了定向诱导分化为 Leydig 细胞的可能性^[7,8]。Yazawa 等^[7]也报道了将荧光小鼠 BMSCs 注射入其它小鼠睾丸内的方式来进行向产类固醇类细胞的体内诱导分化的研究。

睾酮的合成过程是由多种细胞因子参与的级联酶促反应,睾丸的发育也与参与该过程的多种酶和调节因子的表达有着十分密切的关系^[9,10]。目前认为参与睾丸 Leydig 干细胞分化发育调控过程的细胞因子主要包括胰岛素样生长因子-I (IGF-I)、黄体生成激素(LH)、白血病抑制因子(LIF)、PDGF 等几种,但具体调节过程的信号通路仍需要进一步的研究。

EDS 是一种化学治疗药物,特异性地定向破坏杀伤啮齿类动物尤其是鼠类体内 Leydig 细胞,具体的破坏机制尚不明了。部分研究学者认为该过程与 Leydig 细胞的细胞膜表面黄体生成素的受体有关,现研究认为 LH 和 SLCs 的增殖分化密切相关^[11],EDS 可以通过同 LHR 结合发挥其细胞毒性,使基因转录减少、 β -HSD 的活性减低,引起 Leydig 细胞的凋亡^[9,12,13]。

本研究为尝试性探索 EDS 处理小鼠的动物模型,观察 EDS 与小鼠 Leydig 细胞破坏情况,研究人体 BMSCs 移植小鼠睾丸后能否发生免疫排斥反应,以及小鼠睾丸微环境能否定向诱导人 BMSCs 向 Leydig 细胞或产类固醇激素细胞分化。实验组小鼠按照目前已研究对鼠类 Leydig 细胞最佳杀伤剂量 EDS 75mg/kg 进行腹腔注射,对比同期对照组,可见实验组小鼠睾丸有所减小,体重有所减轻,但测试血清睾酮降低程度不及大鼠模型^[14]。本次小鼠模型在注射后 7 d 后血清睾酮有所下降,最低值仍在正常值的 60% 以上,表明 EDS 对小鼠睾丸

Leydig 细胞有一定程度的破坏,但杀伤程度远不及大鼠动物模型。大鼠腹腔注射 EDS 后 4 d 开始,血清睾酮迅速降低至正常的 30% 以下,处理 21 d 后由于机体新的 SLCs 的分化,血清睾酮逐渐上升^[2]。这可能是因为 EDS 对不同品系动物 Leydig 细胞作用的敏感度及选择性不同有关。

本实验中在移植后 5 d 和 8 d 小鼠睾丸标本中找到 Hoechst33342 核荧光标记物标记的细胞团,排列成条状,提示移植后的 BMSCs 存活,但未在小鼠睾丸间质的损伤部位归巢及形成嵌合。免疫荧光染色未见双重阳性,提示 BMSCs 未向 Leydig 细胞或产类固醇类细胞分化,这可能是因为 Leydig 细胞的增殖分化是多因素和多细胞因子参与的过程,人 BMSCs 未在小鼠睾丸间质的损伤部位归巢及形成嵌合,以致于小鼠睾丸微环境的各种细胞因子及酶等调节因素不能作用于人 BMSCs,未能调控其向 Leydig 细胞或产类固醇类细胞定向分化。

本研究 EDS 处理 BALB/c 小鼠建立的动物模型可行,但效果不及大鼠模型。Hoechst 33342 核荧光标记物标记后的细胞移植后获得成功,实验过程中见 BMSCs 移植后存活,所有睾丸标本切片中未见明显炎性坏死变化,即未见免疫排斥反应,这可能是因为 MSCs 的免疫特性及小鼠睾丸为免疫豁免器官有关。本实验尚属探索性的基础研究,也存在一些不足之处,如 EDS 对 BALB/c 小鼠 Leydig 细胞破坏的不够彻底,研究样本的限制可能影响结果的偏倚,细胞悬液的浓度可能过低,移植细胞的数目过少等,这些都与移植细胞的嵌合归巢及定向分化有关。

本研究是 MSCs 从体外向体内过渡的探索性研究,为人 BMSCs 作为干细胞来源治疗类固醇激素缺乏类疾病探索一条新途径,证实了其可以成为治疗该类疾病的一种理想干细胞来源。今后,我们将继续深入探索体内影响分化的诸多因素,为创建 MSCs 治疗男性不育奠定理论依据和实用基础。

参考文献

- 1 Wang XY, Xing X, Zhou GD, *et al.* Testosterone-secreting tissue construction with tissue engineering technique. *Plast Reconstr Surg*, 2007; 120(1): 34-36.
 - 2 Chen H, Ge RS, Zirkin BR. Leydig cells: from stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol*, 2009; 306(1-2): 9-16.
 - 3 陈丽,赵岩,张蕴辉等. 啮齿类动物睾丸 Leydig 干细胞系研究进展. *卫生研究*, 2012; 41(1): 158-162.
 - 4 Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 2000; 109(1): 235-224.
- (下转第 201 页)

H19 和 IGF2 印记基因表达的研究. 四川大学学报(医学版), 2009;40(5):770-774.

7 Gabory A, Jammes H, Dandolo L. The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. Bioessays,2010;32(6):473-480.

8 Nativio R, Wendt KS, Ito Y, *et al.* Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-H19 locus. PLoS Genet,2009;5(11):e1000739.

9 Yao H, Brick K, Evrard Y, *et al.* Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA-binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA. Gene Dev,2010;24(22):2543-2555.

10 Ratajczak MZ. Igf2-H19, an imprinted tandem gene, is an important regulator of embryonic development, a guardian of proliferation of adult pluripotent stem cells, a regulator of longevity, and a ‘passkey’ to cancerogenesis. Folia Histochem Cytobiol,2012;50(2):171-179.

11 Wu J, Qin Y, Li B, *et al.* Hypomethylated and hypermethylated profiles of H19DMR are associated with the aberrant imprinting of IGF2 and H19 in human hepatocellular carcinoma. Genomics,2008;91(5):443-450.

12 Wan LB, Pan H, Hannenhalli S, *et al.* Maternal depletion of CTCF reveals multiple functions during oocyte and preimplantation embryo development. Development,2008;135(16):2729-2738.

13 Heath H, De Almeida CR, Sleutels F, *et al.* CTCF regulates cell cycle progression of $\alpha\beta$ T cells in the thymus. EMBO J, 2008;27(21):2839-2850.

14 Torrano V, Chernukhin I, Docquier F, *et al.* CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. J Biol Chem,2005;280(30):28152-28161.

15 Rasko JEJ, Klenova EM, Leon J, *et al.* Cell growth inhibition by the multifunctional multivalent zinc-finger factor CTCF. Cancer Res,2001;61(16):6002-6007.

(2013-08-12 收稿,2013-11-29 修回)

编辑 余 琳

(上接第 195 页)

5 De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P, *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum,2001;44(8):1928-1942.

6 Maitra B, Szekely E, Gjini K, *et al.* Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. Bone Marrow Transplant, 2004, 33(6): 597-604.

7 Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, *et al.* Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. Endocrinology, 2006; 147(9): 4104-4111.

8 Gondo S, Okabe T, Tanaka T, *et al.* Adipose tissue-derived and bone marrow-derived mesenchymal cells develop into different lineage of steroidogenic cells by forced expression of steroidogenic factor 1. Endocrinology, 2008; 149(9): 4717-4725.

9 Sriraman V, Sairam MR, Rao AJ. Evaluation of relative roles of LH and FSH in regulation of differentiation of Leydig cells using an ethane 1, 2-dimethylsulfonate-treated adult rat model. J Endocrinol,2003;176(1):151-1611.

10 王鲜忠, 孙 燕, 吴建云等. 不同时期小鼠睾丸合成睾酮能力的差异. 农业生物技术学报,2007;15(2):207-211.

11 张思孝, 董 强. 睾丸 Leydig 细胞干细胞研究进展. 中华男科学杂志,2005;11(11):803-805.

12 Morris ID. Leydig cell resistance to the cytotoxic effect of ethylene dimethanesulphonate in the adult rat testis. J Endocrinol,1985;105(3):311-316.

13 Bakalska M, Atanassova N, Koeva Y, *et al.* Induction of male germ cell apoptosis by testosterone withdrawal after ethane dimethanesulphonate treatment in adult rats. Endocr Regul, 2004;38(3):103-110.

14 Jackson AE, O’Leary PC, Ayers MM, *et al.* The effects of ethylene dimethane sulphonate (EDS) on rat Leydig cells: evidence to support a connective tissue origin of Leydig cells. Biol Reprod,1986;35(2):425-437.

(2013-10-09 收稿,2013-12-07 修回)

编辑 汤 洁