



睾丸FasL+Sertoli细胞的制备及功能测定

随着电镜技术和细胞培养技术问世及分子生物学技术的广泛应用,对1865年意大利组织学家Sertoli发现的Sertoli系细胞结构和功能有了更进一步的认识和应用。由于睾丸Sertoli细胞是天然、稳定、高表达的FasL,并能够分泌免疫保护因子、多种生长因子和营养因子[1][2],当与其他组织细胞进行联合移植后,可显著降低免疫排斥反应[3],提高移植物的存活率和延长存活时间[4][5],因而倍受移植界学者们高度关注。鉴于Sertoli细胞在移植领域良好的应用前景,本研究用简化无损伤的方法分离了FasL+Sertoli细胞,并对其加以鉴定培养和功能检测,以及FasL表达的剂量时间依从性的探索,为睾丸Sertoli细胞适时适量地与其他组织细胞或器官联合移植诱导组织和器官产生免疫耐受奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物和材料

2~3周龄大小的Wistar雄性大鼠(由南方医科大学实验动物中心提供);胶原酶V(Sigma公司),脱氧核糖核酸酶(DNase酶,德国Boehringer Mannheim公司),DMEM/HAM F-12培养基(Gibco BRL公司),抗卵泡刺激素受体(FSHR, Santa公司),FasL检测试剂盒(武汉博士德公司),SABC试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 睾丸Sertoli细胞的分离、纯化 2~3周龄Wistar幼鼠拉颈处死,75%酒精浸泡消毒,无菌条件下开腹,取双侧睾丸,去除附睾、睾丸白膜及其血管成分,置于HBSS液中,用剪刀剪成1 mm×1 mm×1 mm大小的碎块。参照Cameron、Korbitt等[6][7][8][9]的方法并作改进:将剪碎的睾丸组织置于10 ml含2.5 g/L浓度胶原酶V的培养瓶中,在37 °C恒温水浴箱中震荡消化15 min,用4 °C Hanks液洗2~3次,离心(1000 r/min),经500 μm筛网过滤后,用不含Ca²⁺、Mg²⁺的HBSS/EDTA液反复洗涤3遍。然后用2.5 mg/ml胰蛋白酶和0.4 mg/ml的DNase I,4 °C、1000 r/min条件下消化10 min,经200 μm筛网再过滤后,再用HBSS/EDTA液反复洗涤3遍,收集细胞。将细胞悬液接种在培养瓶或6孔培养板中,加入含5%FCS的DMEM/F-12培养液,在37 °C、5%CO₂孵箱中培养48 h。在倒置相差显微镜下对分离纯化的睾丸支持细胞(Sertoli细胞)活细胞进行连续观察记数;培养24、48、72、96 h分别用台盼蓝染色计算睾丸Sertoli细胞存活率(活细胞拒染,死细胞蓝染)。培养3 d后,取出做HE染色及光学观察;72 h后,在2.5%戊二醛固定液中预固定,经锇酸后固定、脱水、包埋、半薄切片定位、超薄切片等步骤后,JEM-2000EX透射电子显微镜下观察Sertoli细胞超微结构。

1.2.2 免疫组化检测睾丸Fas L和FSHR的表达 采用链霉素亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)试剂盒测定Fas L的表达,操作按说明书进行。镜下观察阳性细胞呈棕黄色。

1.2.3 体外Sertoli细胞诱导活性淋巴细胞死亡检测 SD大鼠拉颈处死后,无菌条件下取SD大鼠脾制成脾细胞悬液(1×10⁶ /ml),台盼蓝法测定活细胞数在90%以上,按每孔200 μl接种于96孔培养板上,加入100 μl PHA(20 μg/ml植物凝素)37 °C、5%CO₂孵育48 h,然后加入经15 Gy照射1 h后的同基因SD大鼠的睾丸细胞(按对数稀释成不同浓度和培养不同天数的Sertoli细胞),37 °C、5%CO₂培养48 h,MTT比色法测定对活性

淋巴细胞的抑制作用。取分离和培养1、3、5、7 d不同数量Sertoli细胞的悬液0.5 ml加入MTT应用液0.5 ml, 于37 °C水浴中孵育4 h, 离心去上清, 加入异丙醇剧烈震荡, 使管底部的紫色沉淀完全溶解后, 以2000 r/min离心5 min。收集上清液, 于波长570 nm以DMEM/F12培养液调零比色, 测定D(λ)值。不加睾丸细胞的脾细胞培养作为对照组。

1.3 统计学处理

所有实验数据均为计量资料, 采用两两间t检验。

2 结果

2.1 睾丸Sertoli细胞的产率、存活率及生存观察

本实验采用2.5 g/L浓度的胶原酶V消化睾丸组织后, 再用胰蛋白酶和DNase I二次消化, 二次不同孔径筛网过滤的方法可获得数量较多的睾丸Sertoli细胞, 平均每只大鼠获取睾丸Sertoli细胞数可达 1.30×10^6 个, 睾丸Sertoli细胞存活率可达到90%以上。睾丸Sertoli细胞悬液经培养4~8 h后细胞变大, 折光性强; 培养12~14 h后可见部分细胞开始贴壁, 胞质拉长, 相邻细胞交织连接; 24 h后细胞完全贴壁, 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; 48 h后, 细胞铺成单层, 细胞体增大, 细胞透明, 细胞核位于胞体中央及边缘, 胞质中可见吞噬的小颗粒物质, 核呈卵圆形, 核膜呈皱褶不规则形, 可见核仁及周围的卫星小核体(图1); 72 h后, 细胞完全贴壁铺开, 相互接壤成片, 核仁明显呈不规则的多边形。



图1 48 h时倒置显微镜下观察的Sertoli细胞

Fig.1 Testicular Sertoli cells observed by inverted microscopy after a 48-hour culture (Original magnification: $\times 400$)

2.2 形态学观察与鉴定

HE染色可见Sertoli细胞轮廓不清, 核呈不规则形, 核染色质稀疏, 染色浅, 核仁明显, 有双核细胞, 胞质中可见有大小不一的空泡状结构(图2)。透射电镜观察示分离培养的Sertoli细胞形态完整, 呈不规则圆柱形, 细胞器和细胞核保持良好, 细胞核不规则, 核大淡染有切迹, 核膜皱褶较多, 核仁明显且周围可见卫星小体, 胞质内见丰富的线粒体、高尔基复合体、滑面和粗面内质网及溶酶体, 相邻细胞间有紧密连接(图3)。

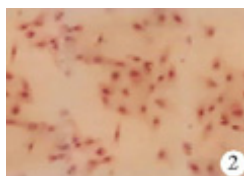


图2 培养72 h睾丸支持细胞HE染色

Fig.2 HE staining of the testicular Sertoli cells cultured for 72 h (Original magnification: $\times 200$)

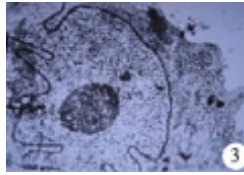


图3透射电镜下培养72 h睾丸支持细胞

Fig. 3 Testicular Sertoli cell cultured for 72 h under transmission electron microscope (Original magnification: $\times 400$)

2.3 Fas L的表达

兔抗鼠FasL抗体的免疫组化显示, 分离的睾丸Sertoli细胞光镜下观察可见细胞胞质和胞膜呈棕黄色, 绝大多数表达FasL, 说明所获得的Sertoli细胞纯度较高(图4)。培养72 h的睾丸细胞中高度表达FasL, 说明培养的睾丸细胞中含有大量的Sertoli细胞。在所有的睾丸组织中只有Sertoli细胞表达FSHR[10]。对培养前后的睾丸细胞FSHR表达的变化对比研究发现, 培养72 h后睾丸Sertoli细胞的数量有明显增加, 出现优势生长现象, 而培养72 h后至2周间睾丸Sertoli细胞的数量变化不大(两个观察者随机抽取5个视野)。

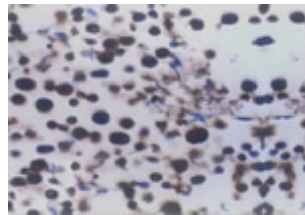


图4 睾丸细胞Sertoli细胞FasL表达

Fig. 4 Fas L expression of testicular Sertoli cells cultured for 72 h (SABC, original magnification: $\times 400$)

2.4 睾丸Sertoli细胞对淋巴细胞的抑制或杀伤作用

SD大鼠淋巴细胞在体外培养时加入Wistar大鼠睾丸Sertoli细胞后, 淋巴活性降低, 与未加睾丸Sertoli细胞组相比具有显著性差异($P < 0.01$)。随着睾丸Sertoli细胞数的递增, 对活性淋巴细胞的杀伤或抑制作用也越大, 当睾丸Sertoli细胞数量增加至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 杀伤作用不再明显增加; 而且这种作用随着共培养的时间推移而逐渐增加, 共培养3 d后作用最明显, 以后这种作用不再增强而维持在一较高水平。

3 讨论

构成睾丸组织主要成分的细胞主要有3种: 生殖细胞、Sertoli细胞及间质细胞, 其中只有有功能的支持细胞稳定、高表达FasL。因此, 所观察的视野中只要FasL表达阳性即可认定为是Sertoli细胞。既往研究表明, 哺乳动物很多种类细胞包括淋巴细胞均表达Fas[11], FasL的表达仅限于活化的T淋巴细胞、NK细胞和睾丸Sertoli细胞等免疫豁免组织的细胞及部分恶性肿瘤细胞, 是细胞表面的II型跨膜蛋白, 属于TNF和NGF受体家族, 是Fas的天然配体。FasL可与活化的T淋巴细胞上的Fas结合, 而使淋巴细胞发生凋亡[12], 被认为是形成某些局部的免疫豁免[13]和肿瘤免疫逃避[14]的主要机制。通过本实验睾丸Sertoli细胞的分离鉴定及功能检测, 我们认为Sertoli细胞也是通过FasL/Fas途径诱导T淋巴细胞凋亡, 使睾丸成为豁免器官。

本研究采用二次消化和不同孔径筛网过滤的方法可获得数量较多的睾丸Sertoli细胞, 平均每只大鼠可获得睾丸Sertoli细胞数可达 1.30×10^6 个, Sertoli细胞存活率达90%以上。简单而损伤小的方法提取的Sertoli细胞, 在体外能明显杀伤或抑制活性淋巴细胞(有丰富的Fas表达), 杀伤或抑制作用不仅随着Sertoli细胞数的递增而增加, 也随着共培养时间的延长而增加, 当数量达 1×10^6 、共培养3 d时抑制作用最

明显,以后再增加Sertoli细胞数量或延长共培养时间,其抑制作用不再增加而维持在一较高水平。提示Sertoli细胞不仅能够诱导T淋巴细胞凋亡,且具有剂量时间依赖性。这一发现为器官或组织细胞联合移植运用Sertoli细胞的数量及时间取舍上奠定了基础。

参考文献:

- [1]Cameron DF, Othberg AI, Borlongan CV, et al. Post-thaw viability and functionality of cryopreserved rat fetal brain cells co-cultured with Sertoli cells[J]. *Cell Transplant*, 1997, 6(2): 185-9.
- [2]彭万勇, 鲁功成, 陈晓春. 睾丸Sertoli细胞的生理作用及调节特点[J]. *临床泌尿外科杂志*, 1998, 13(7): 332-4.
- [3]Emerich DF, Sanberg PR. Novel means to selectively identify Sertoli cell transplant [J]. *Cell Transplant*, 2002, 11(6): 495-7.
- [4]Emerich DF, Hemendinger R, Halberstadt CR. The testicular-derived Sertoli cell: cellular immunoscience to enable transplantation[J]. *Cell Transplant*, 2003, 12(4): 335-6.
- [5]Halberstadt C, Emerich DF, Gores P. Use of Sertoli cell transplants to provide local immunoprotection for tissue grafts[J]. *Exp Opin Biol Ther*, 2004, 4(6): 813.
- [6]Korbitt GS, Elliott JF, Rojotte R. Cotransplantation of allogeneic islets with allogeneic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immunosuppression[J]. *Diabetes*, 1997, 46(2): 317-9.
- [7]Chung SW, Mo MY, Silvestrini B, et al. Rat testicular N-cad-herin:Its complementary deoxyribonucleic acid cloning and regulation[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(9): 1853-62.
- [8]Majumdar SS, Winter SJ, Plant TM. Procedures for the isolation and culture of Sertoli cells from the testes of infant, juvenile, and adult Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. *Biol Reprod*, 1998, 58(6): 633-40.
- [9]Lampa J, Hoogerbrugge JW, Baarends WM, et al. Follicle-stimulating hormone and testosterone stimulation of immature and mature Sertoli cells in vitro: inhibin and N-cadherin levels and round spermatid binding[J]. *J Androl*, 1999, 20(4): 399-406.
- [10]Kliesch S, Penttilar TL, Gromoll J, et al. FSH receptor mRNA is expressed stage-dependently during rat spermatogenesis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1992, 84(2): R45-9.
- [11]Suda T. Molecular mechanisms and biological roles of apoptosis and inflammation induced by Fas ligand[J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 1999, 44(10): 1477-86.
- [12]Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD. Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape [J]. *Cancer*, 2002, 94(10): 2552.
- [13]Huppertz B, Rote NS, Nelson DM, et al. Apoptosis: molecular central of placental function—a workshop report[J]. *Placenta*, 2001, 22(Suppl A): S101-3.
- [14]Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes[J]. *J Exp Med*, 2001, 181(1): 71-7.