

## 制备精原干细胞滋养层细胞条件的优化\*

刘海超<sup>1</sup> 张 岩<sup>2</sup> 于泊洋<sup>2</sup> 吴应积<sup>1,2△</sup>

(1 内蒙古大学生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010021 ;

2 内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010021)

**摘要** 目的:优化精原干细胞培养滋养层细胞的制备条件。方法:首先根据文献资料报道和实践经验确定丝裂霉素 C 作用 STO 细胞的浓度范围和时间范围,利用双因素优选法缩短丝裂霉素 C 处理 STO 细胞的试验范围。然后采用 MTT 检测法确定丝裂霉素 C 处理 STO 细胞的最佳浓度和时间。结果:滋养层细胞处理后不经过冷冻保存的情况下,17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 处理条件的 STO 细胞在培养 14 天内细胞数量基本保持稳定,其它处理条件的细胞数量均有所增加;经冷冻保存的情况下,14.72  $\mu\text{g/ml}$  2 h 处理条件的 STO 细胞在培养 14 天内细胞数量基本保持稳定,其它处理条件的细胞数目均有所降低。结论:滋养层细胞处理后不经过冷冻保存的情况下,17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 的处理条件是丝裂霉素 C 处理 STO 细胞的最佳条件;经冷冻保存的情况下,14.72  $\mu\text{g/ml}$  2 h 的处理条件是丝裂霉素 C 处理 STO 细胞的最佳条件。

**关键词** 精原干细胞;滋养层;丝裂霉素 C;STO 细胞;MTT 法

**中图分类号** Q952 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)04-626-05

## Optimization of Preparing Feeder Layer Cells of Spermatogonial Stem Cells\*

LIU Hai-chao<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, YU Bo-yang<sup>2</sup>, WU Ying-ji<sup>1,2△</sup>

(1 College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot, 010021, China; 2 Key Laboratory of Education Ministry of China for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot, 010021, China)

**ABSTRACT** Objective: To investigate the optimal conditions in establishing STO as spermatogonial stem cells' feeder layer cells. Methods: According to literature reports and experience, the concentration range and the processing time range of mitomycin C treating STO cells for use as the feeder layers was determined. Two-factor optimization method was used. Two relatively better experimental points that MMC treats STO cells were used. Then, the optimal concentration and treatment time of MMC treating STO cells with MTT method was determined. Results: Without cryopreservation, after treatment with the condition of 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2h, the number of STO cells remained stable in culture for 14 days, and the number of STO cells is increased after treatment with the other conditions; With cryopreservation, after treatment with the condition of 14.72  $\mu\text{g/ml}$  2h, the number of STO cells remained stable in culture for 14 days, and the number of STO cells is decreased after treatment with the other conditions. Conclusion: Without cryopreservation, the condition of 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2h is the optimal condition for mitomycin C treating STO cells; With cryopreservation, the condition of 14.72  $\mu\text{g/ml}$  2h is the optimal condition for mitomycin C treating STO cells.

**Key words:** Spermatogonial Stem Cells; Feeder Layer; Mitomycin C; STO Cells; MTT Method

**Chinese Library Classification:** Q952 R954.4 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2012)04-626-05

### 前言

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是精子发生的前体细胞。在自然状态下,它是出生后个体在整个生命过程中能够进行自我更新并将基因传递至子代的惟一干细胞群<sup>[1,2]</sup>。SSCs 在干细胞生物学、医学、农牧业等领域都具有重要的理论和实践意义<sup>[3,4]</sup>。然而,由于 SSCs 在睾丸组织中的数量极少,在体外存活和增殖又受到多种因素的影响<sup>[5-9]</sup>。因此,建立和优化 SSCs 的体外长期培养体系一直是本研究领域的重要课题。要建立 SSCs 的体外长期培养体系,不但要保证 SSCs 在体外能够无限增殖,同时还要保持其未分化状态。大量的研究表明,滋养层在促进 SSCs 存活、增殖及抑制其分化等方面起着重要作

用<sup>[10-11]</sup>。

研究发现,丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC)可以用来处理 STO 细胞,用于制备精原干细胞体外培养的滋养层细胞<sup>[12,13]</sup>。目前为止,有关丝裂霉素处理小鼠胎儿成纤维细胞用于胚胎干细胞培养的研究报道较多,但是,丝裂霉素处理 STO 细胞作为精原干细胞长期培养的滋养层的研究报告很少,而且丝裂霉素 C 处理 STO 细胞的最佳剂量及最佳处理时间还没有量化。本文探索丝裂霉素 C 处理 STO 细胞的最佳处理条件,对完善精原干细胞的体外培养技术具有重要意义。

### 1 材料与方法

\* 基金项目:国家基础科学人才培养基金项目(J0730648)、教育部“春晖计划”合作科研项目(Z2007-1-01036);

高等学校博士学科点专项科研基金项目(20101501110001)

作者简介:刘海超(1986—),女,本科生,电话:15049136048, E-mail: haichao1219@126.com

△通讯作者:吴应积, E-mail: wuyj1211@163.com

(收稿日期:2011-07-28 接受日期:2011-08-23)

### 1.1 材料

STO 细胞为本实验室保存。

### 1.2 主要试剂

PBS、噻唑蓝(MTT 购于上海生工生物工程技术有限公司)、二甲基亚砷(DMSO)、DMEM 培养基(购自 Gibco 公司)、丝裂霉素 C(海正药业生产 H33020786)、胎牛血清(FBS)、0.1% 明胶。

### 1.3 双因素优选法

根据文献资料报道<sup>[13-14]</sup>和本实验室实践经验确定两个因素的试验范围:时间从 1 h 到 4 h,丝裂霉素浓度从 10  $\mu\text{g/ml}$  到 30  $\mu\text{g/ml}$ 。经过黄金分割法得到四个试验点:17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min, 22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min, 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min, 22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min。

培养 STO 细胞,生长至 80% 左右以  $1 \times 10^5$  /孔传代至 12 孔板,每孔加入 1 ml 培养液。生长至 50-80% 时用丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC) 处理,每个条件处理三个复孔。作用时间一到,立刻用 1 ml PBS 洗三遍,加入 1 ml 新鲜培养液,放入培养箱中培养,每天观察细胞的生长状况并做记录,待培养孔中的细胞可以数清时,在十倍镜视野下数细胞数(如图 1 所示:10 倍镜下每孔 10 个视野,记录所示标记有 "@" 的五个视野中的细胞数目,求平均值,此平均值即为细胞数。若此细胞数小于 60 个,则按细胞死亡来记录)。

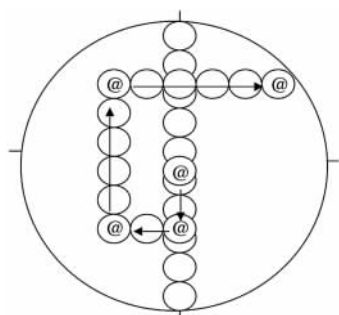


图 1.10 倍镜视野中记录细胞数目的区域

Fig.1 Region of recording the number of cells in  $\times 10$  view

根据第一次的实验结果(确定 2 h 9 min, 17.64  $\mu\text{g/mL}$  的丝裂霉素处理条件为最好),在 1 h 到 2 h 9 min, 10  $\mu\text{g/ml}$  到 17.64  $\mu\text{g/ml}$  之间经黄金分割法得到四个优选条件,即 12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min; 14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min; 12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min; 14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min, 然后进行试验。试验方法同第一次实验。

### 1.4 MTT 法测定 MMC 处理 STO 细胞的最佳条件

根据上述双因素优选法确定 MMC 处理 STO 细胞的最佳条件位于 14.72  $\mu\text{g/ml}$  2 h 和 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 之间。为进一步确定其最佳处理条件,结合 1/2 法和 MTT 法来确定丝裂霉素 C 处理 STO 细胞的最佳条件。经过 1/2 法于 14.72  $\mu\text{g/ml}$  2 h 和 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 之间得到一个实验点,即 16.18  $\mu\text{g/ml}$  2 h,所以利用 MTT 法测定经 0  $\mu\text{g/ml}$  2 h (阳性对照)、14.72  $\mu\text{g/ml}$  2 h、16.18  $\mu\text{g/ml}$  2 h 和 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 四个条件丝裂霉素 C 处理后的细胞在 96 孔板中培养 2,4,6,8,11,14 天时的细胞数量(以 0 天时的细胞数量为对照),并绘制 STO 细胞在这段时间内的生长曲线,从而确定丝裂霉素 C 处理 STO 细胞的最佳条件。

培养 STO 细胞,生长至 80% 左右时传代至四个 100 mm 的培养板中,并第二天分别以 0  $\mu\text{g/ml}$  2 h (阳性对照)、14.72

$\mu\text{g/ml}$  2 h、16.18  $\mu\text{g/ml}$  2 h 和 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 进行丝裂霉素 C 处理。2 h 后,用 PBS 洗 3 遍,悬浮细胞,接种于预先用 0.1% 明胶处理的 96 孔板中(接种密度为  $1 \times 10^5/\text{ml}$ ,每孔 200  $\mu\text{l}$ ,每个条件处理的细胞分别铺 5 个复孔),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养。96 孔板中的细胞培养 2,4,6,8,11,14 天时,取出 96 孔板,每孔用 200  $\mu\text{l}$  PBS 洗一遍后,加入 200  $\mu\text{l}$  细胞培养液和 10  $\mu\text{l}$  MTT 溶液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 4 h 后,取出 96 孔板,小心除去培养孔中的液体,再用 PBS 洗 2 次,最后加入二甲基亚砷(DMSO)150  $\mu\text{l}$ ,酶标仪上振荡 10 min,使结晶物完全溶解,测定 OD490nm 值。

MTT 法测定 STO 细胞经 0  $\mu\text{g/ml}$  2 h (阳性对照)、16.18  $\mu\text{g/ml}$  2 h、14.72  $\mu\text{g/ml}$  2 h 和 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 丝裂霉素处理后冻存,解冻于 96 孔板中培养 2,4,6,8,11,14 天时的细胞数量(以 0 d 时的细胞数量为对照),确定在冻存的情况下 MMC 处理 STO 细胞的最佳条件。培养 STO 细胞并传代至四个 100mm 的培养板中(步骤同上),第二天进行丝裂霉素处理。时间到时用 PBS 洗 3 遍,悬浮细胞,然后进行冻存(每个处理条件冻存一管细胞)。两天后,解冻丝裂霉素处理过的细胞,接种于预先用 0.1% 明胶处理的 96 孔板中(接种密度为  $1 \times 10^5/\text{ml}$ ,每孔 200  $\mu\text{l}$ ,每个条件处理的细胞分别铺 5 个复孔),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养。96 孔板中的细胞培养 2,4,6,8,11,14 天时,进行 MTT 检测,测定 OD490nm 值(方法同上)。

### 1.5 统计分析

实验数据使用 SPSS 软件进行方差统计分析,确定差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 双因素优选法

双因素优选法第一次实验中,经不同丝裂霉素浓度和时间处理后的 STO 细胞存活状况(见图 2)。22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min 处理组的细胞存活至 14 天时的细胞数量为 42,即细胞已经死亡;17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min 处理组的细胞存活至 14 d 时的细胞数量为 23,即细胞已经死亡;22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min 处理组的细胞存活至 9 d 时的细胞数量为 44,即细胞已经死亡,而 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min 处理组的细胞存活至 14 d 仍有大约 20% 左右的细胞存在,说明该处理条件下的细胞不会被过度抑制而导致过早死亡,在四组处理条件中为最佳实验条件。

双因素优选法第二次实验中,经不同丝裂霉素浓度和时间处理后的 STO 细胞存活状况(见图 3)。经 12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min、14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min、12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min、14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min 四组条件处理后的 STO 细胞在培养过程中都存在明显的增殖现象,说明这四组处理条件都没有较好地抑制细胞的增殖,所以在四组处理条件中 14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min 为最佳实验条件。

根据以上两次实验可以确定,MMC 处理 STO 细胞的最佳条件位于 14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min 和 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min 之间,由于 1 h 43 min 和 2 h 9 min 都与 2 h 较接近,故认为 MMC 处理 STO 细胞的最佳条件位于 14.72  $\mu\text{g/ml}$  2 h 和 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 之间。

### 2.2 MTT 法

采用 MTT 法测定 MMC 处理 STO 细胞的最佳条件,在未

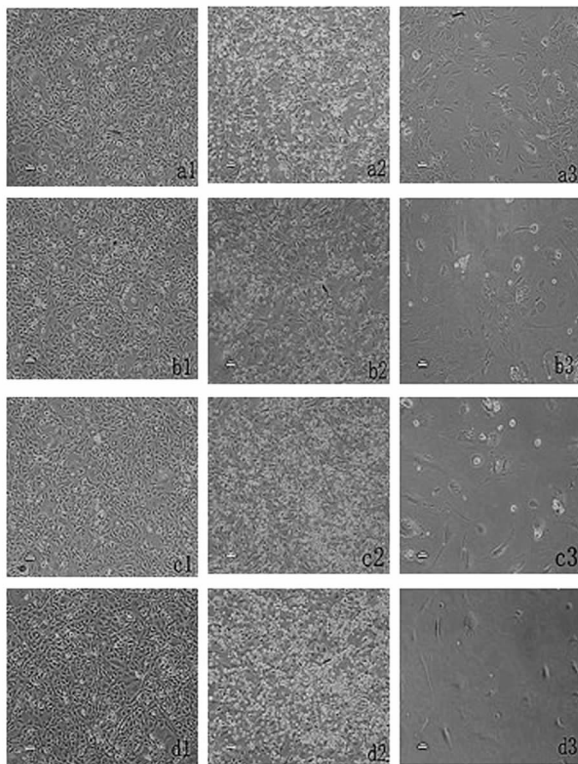


图2 经 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min、22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min、17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min、22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min 四组丝裂霉素处理条件处理前后的 STO 细胞的存活状况。a 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min 处理组, a1 为处理前, a2 为处理后第 2 d, a3 为处理后第 14 d; b 22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min 处理组, b1 为处理前, b2 为处理后第 2 d, b3 为处理后第 14 d; c 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min 处理组, c1 为处理前, c2 为处理后第 2 d, c3 为处理后第 14 d; d 22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min 处理组, d1 为处理前, d2 为处理后第 2 d, d3 为处理后第 14 d。10 倍镜照相, 标尺为 50  $\mu\text{m}$ 。

Fig.2 STO cell survival situation before and after treatment with mitomycin C with the four treatment conditions of 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min, 22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min, 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min, 22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min. a 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9 min treatment group, a1 Before treatment, a2 The second day after treatment, a3 The fourteenth day after treatment; b 22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 9min treatment group, b1 Before treatment, b2 The second day after treatment, b3 The fourteenth day after treatment; c 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min treatment group, c1 Before treatment, c2 The second day after treatment, c3 The fourteenth day after treatment; d 22.36  $\mu\text{g/ml}$  2 h 51 min treatment group, d1 Before treatment, d2 The second day after treatment, d3 The fourteenth day after treatment.  $\times 10$ , Bar: 50  $\mu\text{m}$ .

经冻存的情况下,不同浓度 MMC 处理 STO 2 h 后对 STO 细胞分裂和存活的影响(见表 1)。

对照组 STO 细胞第 2~14 d 的 OD490nm 值与第 0 d 的 OD490nm 值相比,差异显著( $P < 0.05$ , 见表 1、图 4)。实验结果表明未经丝裂霉素处理的细胞,第 2 天进入对数生长期,细胞数量随培养时间的增加而显著增加。

丝裂霉素 C 处理时间是 2h 时, 14.72  $\mu\text{g/ml}$  处理组第 2~14d 的 OD490nm 值与第 0 d 的 OD490nm 值相比,差异显著( $P < 0.05$ , 见表 1、图 4); 16.18  $\mu\text{g/ml}$  处理组第 2~14 d 的 OD490nm 值与第 0 d 的 OD490nm 值相比,差异显著( $P < 0.05$ , 见表 1、图 4); 而 17.64  $\mu\text{g/ml}$  处理组第 2~14 d 的 OD490nm

值与第 0 d 的 OD490nm 值相比,无显著差异( $P > 0.05$ , 见表 1、图 4),细胞数量保持较稳定状态。

采用 MTT 法测定丝裂霉素 C 处理 STO 细胞的最佳条件。在冻存的情况下,不同浓度丝裂霉素 C 处理 STO 2 h 后对 STO 细胞分裂和存活的影响(见表 2)。

对照组 STO 细胞第 2~14 d 的 OD490nm 值与第 0 d 的 OD490nm 值相比,差异显著( $P < 0.05$ , 见表 2、图 5)。实验结果表明未经丝裂霉素处理的细胞,第 2 天进入对数生长期,细胞数量随培养时间的增加而显著增加,第 11 d 开始进入平台期。

丝裂霉素 C 处理时间是 2h 时, 16.18  $\mu\text{g/ml}$  处理组第 6~14d 的 OD490nm 值与第 0 d 的 OD490nm 值相比,差异显著( $P < 0.05$ , 见表 2、图 5); 17.64  $\mu\text{g/ml}$  处理组第 8~14 d 的 OD490nm 值与第 0 d 的 OD490nm 值相比,差异显著( $P < 0.05$ , 见表 2、图 5); 而 14.72  $\mu\text{g/ml}$  处理组第 2~14 d 的 OD490nm 值与第 0 d 的 OD490nm 值相比,无显著差异( $P > 0.05$ , 见表 2、图 5),细胞数量保持较稳定状态。

### 3 讨论

单独对纯化的 SSCs 进行体外培养, SSCs 往往很难存活,适宜的滋养层是 SSCs 体外培养的关键性因素之一。滋养层在 SSCs 的培养过程中发挥两方面的作用:促进精原干细胞的增殖和抑制其分化。促进增殖作用主要是由于滋养层细胞能分泌许多促有丝分裂因子,分化抑制作用主要是由于滋养层细胞能分泌一些细胞分化抑制因子<sup>[11]</sup>。STO 细胞取材方便,常被用来制备 SSCs 的滋养层细胞。STO 滋养层细胞与 SSCs 共培养过程中,若滋养层细胞增殖过快则会与精原干细胞争夺营养,同时干扰细胞克隆的形成。因此,对 STO 预处理的目的是抑制细胞的增殖并保持其分泌细胞因子的功能。常用的预处理方法有两种,使用丝裂霉素处理和  $\gamma$  射线照射<sup>[15]</sup>。多数学者采用丝裂霉素的处理方法。

丝裂霉素为细胞周期非特异性药物,对肿瘤细胞的 G1 期,特别是晚 G1 期及早 S 期最为敏感,在组织中经酶活化后,通过烷化作用与细胞 DNA 交联,使其双链解聚,可抑制肿瘤细胞的 DNA 合成<sup>[16]</sup>,因此主要用于各种肿瘤的治疗。在滋养层制备中,若丝裂霉素作用过弱,STO 细胞仍具有有丝分裂能力,则对 SSCs 细胞产生竞争性抑制;若丝裂霉素作用过强,则会使 STO 细胞死亡,干扰 SSCs 的生长,甚至导致 SSCs 的死亡和分化<sup>[17]</sup>。目前为止,有关丝裂霉素处理 STO 细胞条件的研究报道很少。对制备小鼠 SSCs 培养滋养层条件的优化有利于获得高质量的 SSCs 滋养层细胞,为大规模体外培养 SSCs 提供基础,有利于干细胞生物学、医学、农牧业等领域的发展。本实验根据文献资料报道<sup>[13-14]</sup>和本实验室以往的研究经验,确定最初丝裂霉素处理 STO 细胞的条件范围(时间从 1 h 到 4 h,丝裂霉素浓度从 10  $\mu\text{g/ml}$  到 30  $\mu\text{g/ml}$ )。利用双因素优选法,经过观察发现丝裂霉素处理 STO 细胞的最佳条件位于 14.72  $\mu\text{g/ml}$  2 h 和 17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 之间。为了进一步确定其最佳处理条件,采用 MTT 法测定细胞数量,并绘制细胞生长曲线,最终可以得出结论:未经冻存情况下,17.64  $\mu\text{g/ml}$  2 h 的处理条件是丝裂霉素处理 STO 细胞的最佳条件,经该条件处理后,在培养 14 天之内 STO 的细胞数量基本保持稳定;冻存的情况下,14.72  $\mu\text{g/ml}$  2 h 的处理条件是丝裂霉素处理 STO 细胞的最佳条件,经该条

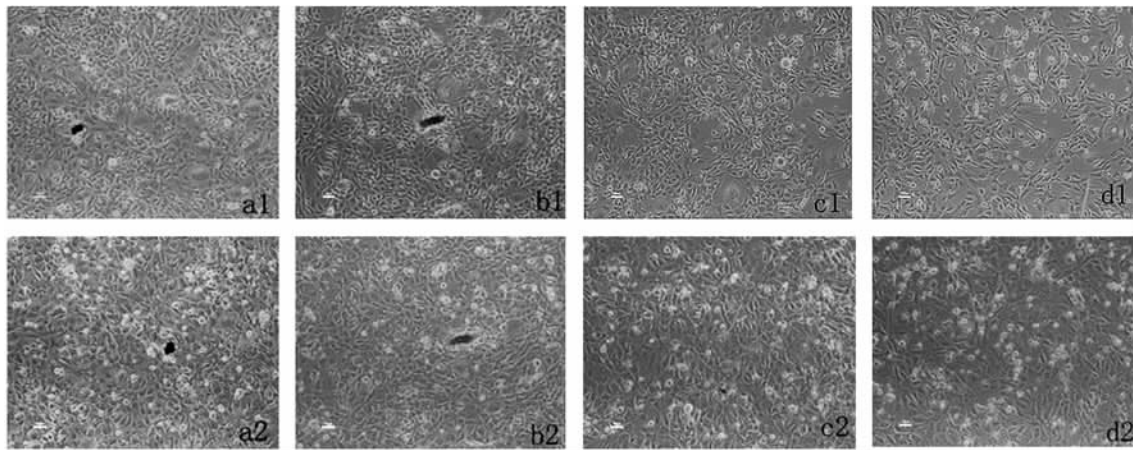


图3 经 12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min、14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min、12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min、14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min 四组丝裂霉素处理条件处理前后的 STO 细胞的存活状况。a 为 12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min 处理组 a1 为处理前 a2 为处理后第 3 d b 为 14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min 处理组 b1 为处理前,b2 为处理后第 3 d c 为 12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min 处理组 c1 为处理前 c2 为处理后第 3 d d 为 14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min 处理组 d1 为处理前 d2 为处理后第 3 d。10 倍镜照相 标尺为 50  $\mu\text{m}$

Fig.3 STO cell survival situation before and after treatment with mitomycin C with the four treatment conditions of 12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min,14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min,12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min,14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min. a 12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min treatment group, a1 Before treatment,a2 The third day after treatment; b 14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 26 min treatment group, b1 Before treatment, b2 The third day after treatment; c 12.92  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min treatment group, c1 Before treatment,c2 The third day after treatment; d 14.72  $\mu\text{g/ml}$  1 h 43 min treatment group, d1 Before treatment, d2 The third day after treatment.  $\times 10$ , Bar:50  $\mu\text{m}$

表 1 未经冻存情况下,不同浓度丝裂霉素 C 处理对 STO 细胞活力的影响

Table 1 In the case of without cryopreservation, effects of treatment of different concentrations of mytomycin C on STO vitalities

| 处理浓度( $\mu\text{g/ml}$ )<br>Treating concentrations | 培养时间(d) Culture time |               |               |               |               |               |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                                     | 0                    | 2             | 4             | 6             | 8             | 11            | 14            |
| 0 $\mu\text{g/ml}$                                  | 0.125                | 0.312         | 0.438         | 0.705         | 0.812         | 1.045         | 1.243         |
|                                                     | $\pm 0.004$          | $\pm 0.002^*$ | $\pm 0.004^*$ | $\pm 0.018^*$ | $\pm 0.048^*$ | $\pm 0.004^*$ | $\pm 0.018^*$ |
| 14.72 $\mu\text{g/ml}$                              | 0.106                | 0.148         | 0.158         | 0.218         | 0.402         | 0.550         | 0.690         |
|                                                     | $\pm 0.005$          | $\pm 0.002^*$ | $\pm 0.006^*$ | $\pm 0.001^*$ | $\pm 0.009^*$ | $\pm 0.011^*$ | $\pm 0.011^*$ |
| 16.18 $\mu\text{g/ml}$                              | 0.109                | 0.153         | 0.150         | 0.263         | 0.435         | 0.528         | 0.345         |
|                                                     | $\pm 0.004$          | $\pm 0.004^*$ | $\pm 0.008^*$ | $\pm 0.008^*$ | $\pm 0.035^*$ | $\pm 0.033^*$ | $\pm 0.021^*$ |
| 17.74 $\mu\text{g/ml}$                              | 0.123                | 0.165         | 0.123         | 0.113         | 0.148         | 0.127         | 0.128         |
|                                                     | $\pm 0.004$          | $\pm 0.012^*$ | $\pm 0.009$   | $\pm 0.010$   | $\pm 0.020^*$ | $\pm 0.022$   | $\pm 0.011$   |

注 利用 SPSS 统计软件进行统计学分析。数据为 OD490nm 值的平均值和标准差;与对照组(0 d)的 OD 值相比较 未加 "\*" 表示差异不显著( $P > 0.05$ ), "\*" 表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Analysis with SPSS statistical software. The numbers refer to averages and derivation of OD490nm data; compared with control group(the OD value of 0d is the control group), the numbers marked without "\*" represent no significant difference between them ( $P > 0.05$ ), and the numbers marked with "\*" represent the significant difference between them ( $P < 0.05$ ).

件处理后冻存,在解冻后培养 14 天之内 STO 的细胞数量基本保持稳定。

#### 参考文献(References)

- Brinster RL. Male Germline Stem Cells: From Mice to Men [J]. Science, 2007, 316(5823): 404-405
- Shinohara T, Kanatsu SL, T Muneto, et al. Long-Term Culture of Male Germline Stem Cells From Hamster Testes [J]. Biol Reprod, 2008, 78 (4): 611-617
- Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis [J]. Science, 2002, 296(5576): 2174-2176
- Zhang XM, DX Li, Yue ZP, et al. Advances in mammalian spermatogonial stem cell transplantation [J]. Progress in Natural Science, 2004, 14(6): 467-47
- Kanatsu SM, Ogonuki N, Inoue K, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells [J]. Biol Reprod, 2003, 69: 612-616
- Brinster RL, Kubota H, Avarbock M. Growth factors essential for self renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(47): 16489-16494
- Gaebler DL, Hamra FK, Chapman KM, et al. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(48): 17430-17435
- Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A Vasculature-Associated Niche

表 2 冻存情况下,不同浓度丝裂霉素 C 处理对 STO 细胞活力的影响

Table 2 In the case of cryopreservation, effects of treatment of different concentrations of mytomycin C on STO vitalities

| 处理浓度( $\mu\text{g/ml}$ )<br>Treating concentrations | 培养时间(d) Culture time |               |               |               |               |               |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                                     | 0                    | 2             | 4             | 6             | 8             | 11            | 14            |
| 0 $\mu\text{g/ml}$                                  | 0.147                | 0.268         | 0.415         | 0.681         | 0.956         | 1.478         | 1.715         |
|                                                     | $\pm 0.006$          | $\pm 0.006^*$ | $\pm 0.005^*$ | $\pm 0.021^*$ | $\pm 0.057^*$ | $\pm 0.016^*$ | $\pm 0.025^*$ |
| 14.72 $\mu\text{g/ml}$                              | 0.131                | 0.126         | 0.135         | 0.122         | 0.123         | 0.111         | 0.130         |
|                                                     | $\pm 0.006$          | $\pm 0.007$   | $\pm 0.0010$  | $\pm 0.007$   | $\pm 0.007$   | $\pm 0.005$   | $\pm 0.033$   |
| 16.18 $\mu\text{g/ml}$                              | 0.129                | 0.130         | 0.126         | 0.106         | 0.071         | 0.070         | 0.075         |
|                                                     | $\pm 0.015$          | $\pm 0.014$   | $\pm 0.007$   | $\pm 0.009^*$ | $\pm 0.022^*$ | $\pm 0.005^*$ | $\pm 0.005^*$ |
| 17.74 $\mu\text{g/ml}$                              | 0.112                | 0.115         | 0.110         | 0.103         | 0.074         | 0.064         | 0.061         |
|                                                     | $\pm 0.004$          | $\pm 0.008$   | $\pm 0.007$   | $\pm 0.004$   | $\pm 0.002^*$ | $\pm 0.008^*$ | $\pm 0.009^*$ |

注 利用 SPSS 统计软件进行统计学分析。数据为 OD490nm 值的平均值和标准差;与对照组(0 d)的 OD 值相比较,未加 "\*" 表示差异不显著( $P > 0.05$ ), "\*" 表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Analysis with SPSS statistical software. The numbers refer to averages and derivation of OD490nm data; compared with control group(the OD value of 0d is the control group),the numbers marked without "\*" represent no significant difference between them ( $P > 0.05$ ), and the numbers marked with "\*" represent the significant difference between them ( $P < 0.05$ ).

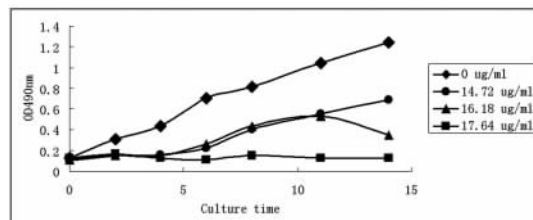


图 4 未经冻存的情况下,不同浓度丝裂霉素 C 处理对 STO 细胞分裂与存活的影响

Fig.4 In the case of without cryopreservation, effects of treatment of different concentrations of mytomycin C on STO division and survival

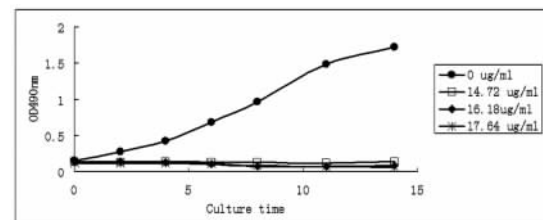


图 5 冻存的情况下,不同浓度丝裂霉素 C 处理对 STO 细胞分裂与存活的影响

Fig.5 In the case of cryopreservation, effects of treatment of different concentrations of mytomycin C on STO division and survival

for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis[J]. Science, 2007, 317(5845): 1722-1726

- [9] Yoshida S, Nakagawa T, Sharma M, et al. Functional Hierarchy and Reversibility within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment[J]. Science, 2010, 328(5974): 62-67
- [10] 胡一新, 黄王景. 小鼠胚胎干细胞饲养层的制备 [J]. 吉林医学, 2009, 30(9): 778-780  
HU Yi-xin, HUANG Wang-jing. Preparation of feeder cells of mouse embryonic stem cell[J]. Jilin Medical, 2009, 30(9): 778-780
- [11] 丁海雷. 鸡精原干细胞和支持细胞的分离培养与鉴定[D].扬州大学研究生学位论文, 2008, 6: 4-67  
DING Hai-lei. The Culture and Identification of the Chicken Spermatogonial Stem Cells and Sertoli Cells [D]. Graduate degree thesis of Yangzhou University, 2008, 6: 4-67
- [12] 张岩, 罗奋华, 吴应积, 等. 大鼠精原干细胞的高效分离和纯化方法[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(5): 543-547  
ZHANG Yan, LUO Fen-hua, WU Ying-ji, et al. Efficient separation and purification of rat spermatogonial stem cells. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33(5): 543-547
- [13] 李昆, 于艳秋, 金玉楠, 等. STO 转基因小鼠饲养层细胞的最佳预处理条件 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(15): 2861-2864  
LI Kun, YU Yan-qiu, JIN Yu-nan, et al. The best pretreatment condition of STO feeder layer cells in transgenic mice [J]. Journal of

clinical rehabilitative tissue engineering research, 2007, 11(15): 2861-2864

- [14] 刘永刚, 李芳菲, 陈地龙, 等. 以 STO 细胞和 hELF 作为胚胎生殖细胞培养饲养层的比较 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(18): 1704-1707  
LIU Yong-gang, LI Fang-fei, CHEN Di-long, et al. Comparison between STO cells and hELF used as feeder layers of embryonic germ cells [J]. Journal of the fourth military medical university, 2006, 27(18): 1704-1707
- [15] 袁路. 多种细胞饲养层的制备及其资源建立[D]. 广西医科大学硕士研究生学位论文, 2008, 6: 6-49  
YUAN Lu. Feeder Preparation of Several Cells [D]. Master's degree thesis of Guangxi Medical University, 2008, 6: 6-49
- [16] Raekil P, Gong JS, Channy P, et al. Mitomycin-C Induces the Apoptosis of Human Tenon's Capsule Fibroblast by Activation of c-Jun N-Terminal Kinase 1 and Caspase-3 Protease [J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005, 46(10): 3545-3552
- [17] 袁龙, 郭庆勇, 武聚富, 等. 丝裂霉素 C 对小鼠胎儿成纤维细胞增殖抑制作用的研究[J]. 动物医学进展, 2007, 28(5): 41-45  
YUAN Long, GUO Qing-yong, WU Ju-fu, et al. The Effects of Fibroblasts Feeder Layer Treated with Mitomycin C in Different Times on Mouse Embryonic Stem Cell Culture [J]. Progress in veterinary medicine, 2007, 28(5): 41-45