

技术与方法

牛精原干细胞体外分化潜能的分析

罗奋华¹ 萨初拉¹ 黄军就² 吴应积^{1*}

(¹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, 呼和浩特 010070; ²中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 中山大学附属第一医院, 广东省生殖医学重点实验室, 广州 510275)

摘要 家畜精原干细胞操作的核心技术是精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)的长期培养。至今家畜精原干细胞的长期培养方法还没有完善。其中的一个原因是缺乏简便有效的家畜精原干细胞生物活性鉴定手段。该研究的目的是建立一种牛精原干细胞生理潜能的体外分析方法, 用于体外培养的牛精原干细胞的生物活性鉴定。首先培养牛精原干细胞, 进而用干细胞因子(stem cell factor, SCF)对体外长期培养的牛精原干细胞进行诱导分化。在诱导分化过程中对细胞进行显微观察, 并且用免疫荧光染色法鉴定分化的细胞。观察结果显示, 经过诱导培养8 d后, 牛精原干细胞形态发生了明显改变; 细胞的运动行为显示出精母细胞特有的特征。免疫荧光染色结果显示, 分化的细胞表达精母细胞的标记基因*Scp3*。上述结果例证了体外培养的牛精原干细胞具有分化为精母细胞的潜能。该研究建立了牛SSCs体外诱导分化的分析方法, 用于鉴定体外培养的牛SSCs的生理潜能。但是体外诱导培养条件不能满足牛SSCs减数分裂的全部要求, 导致出现一些不完全符合精母细胞特征的现象。诱导分化培养液尚需改进。

关键词 牛; 精原干细胞; 体外分化; 干细胞因子

Analysis of Differentiation Potency of Bovine Spermatogonial Stem Cells *In Vitro*

Luo Fenhua¹, Wu Sachula¹, Huang Junjiu², Wu Yingji^{1*}

(¹The Key Laboratory for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; ²State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences and Key Laboratory of Reproductive Medicine of Guangdong Province, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Long-term culture of spermatogonial stem cells (SSCs) *in vitro* is the core technique of the spermatogonial stem cell manipulation in livestock. However, the method for long-term culture of livestock SSCs has not yet been established so far. One of the reasons is lack of a simple and effective approach for analysis of biological activity of the livestock SSCs. The purpose of this study was to establish a method for identification of the bovine SSCs (bSSCs) biological activity *in vitro*. Firstly, bSSCs were cultured. Then, bSSCs were induced with stem cell factor (SCF) for differentiation *in vitro*. During the induction, the cells were observed with microscope,

收稿日期: 2014-05-08 接受日期: 2014-09-12

国家重点基础研究发展规划(973计划)(批准号: 2010CB945401)和高等学校博士学科点博导类专项科研基金项目(批准号: 20101501110001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4992443, E-mail: wuyj1211@163.com

Received: May 8, 2014 Accepted: September 12, 2014

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2010CB945401) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (Grant No.20101501110001)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4992443, E-mail: wuyj1211@163.com

网络出版时间: 2014-10-20 15:08 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0155.html>

and the differentiated cells were identified by immunofluorescence staining. The results from observations showed that the morphology of the bSSCs was changed obviously after induction culture for 8 d; and the cell motion behavior revealed specific characteristic of spermatocytes. The results from immunofluorescence staining showed that the differentiated cells expressed *Scp3*, a marker gene of spermatocytes. The results above illustrate that the bSSCs cultured *in vitro* possess the potential for differentiation into spermatocytes. In this study, the analysis method for inducing differentiation of the bSSCs has been established, and it can be applied for identification of physiological potential of the bSSCs cultured *in vitro*. However, culture conditions of inducing differentiation *in vitro* can't meet all of the requirements for bSSC meiosis, resulting in some phenomena not fitting completely with the characteristics of spermatocyte. The culture medium of inducing differentiation still needs improvement.

Key words bovine; spermatogonial stem cells; differentiation *in vitro*; stem cell factor

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是分布在雄性动物睾丸曲细精管基底膜上唯一能将遗传信息传给子代的成体干细胞。SSCs既能自我更生又能分化进入精子发生过程,通过这两种形态的动态变化,维持着成体动物睾丸中SSCs库的动态平衡^[1-2]。通过小鼠模式动物的研究已经建立了SSCs操作的两个关键技术,即SSCs移植技术^[3]和SSCs长期培养方法^[4-5]。SSCs经过体外长期培养后,其生理活性通过SSCs移植技术进行验证,即将SSCs移植到受体睾丸中,检验供体SSCs能否重建新的精子发生过程。通过鼠类SSCs的研究,展示出体外操作SSCs在畜牧业中将有重要的应用前景。首先,SSCs可用于优良品种家畜的种质资源保存。其次,优良品种家畜的SSCs可经过远距离运输,移植给本地品种受体,从而产生供体的精子,便于外来优良品种的引进。也可用类似的操作方法,实现家畜野生品种遗传信息的导入,达到改良现有家畜品种的目的。通过SSCs的体外操作,建立起家畜种质资源保存和利用的新技术^[6]。家畜SSCs的长期培养是实现上述家畜SSCs操作技术的瓶颈。当前存在的问题,一是要建立稳定的家畜精原干细胞长期培养体系;二是要建立家畜精原干细胞的鉴定方法。而家畜SSCs的鉴定又可分为两个方面,即标记蛋白的鉴定和生理功能的鉴定。在小鼠的研究中,SSCs的标记蛋白采用PLZF和GFR α -1等抗体进行免疫荧光染色鉴定,SSCs的生理功能则通过移植到受体鼠睾丸进行分析鉴定^[4]。但是家畜SSCs的生理功能分析鉴定目前仍然无法采用移植到受体睾丸的方法。曾经有人采用异种移植法,将体外富集短期培养的牛SSCs移植到免疫缺失的小鼠睾丸中,但是并不能在小鼠睾丸中重建牛的生精过程,只能观察到牛SSCs在小鼠辜

丸中存活增殖^[7-8]。

为了克服家畜等大动物SSCs生理功能分析中存在的困难,我们提出采用SSCs的生理潜能的分析方法,即在体外分析家畜等大动物SSCs是否具有潜在的分化为精母细胞的能力,为解决体外培养的家畜精原干细胞的生物学功能分析提供一个新途径。我们已经建立了牛SSCs的体外培养体系(另文发表)。从实际情况出发,我们选用牛SSCs为研究对象,探索体外培养的牛SSCs生理潜能的分析方法,用以分析牛SSCs在体外启动精子发生过程产生精母细胞的分化能力。

已有研究指出,哺乳动物睾丸中SSCs的命运主要有两种。一种是自我更新,由GFR α -1/GDNF信号系统维持^[9];另一种是分化进入精子发生过程,由c-kit/SCF信号系统维持^[10]。Feng等^[11]的研究表明,干细胞因子(stem cell factor, SCF)能够在体外条件下诱导SSCs的分化,产生精母细胞。进一步的研究表明,SCF通过c-kit受体偶联的信号通路,引发精原细胞的分化^[12]。由于哺乳动物的精子发生过程具有保守性,我们假定SCF也能够在体外条件下诱导牛SSCs产生精母细胞。经过探索,我们建立了体外分析鉴定长期培养的牛SSCs生理潜能的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Gelatin购自Sigma公司,12孔培养板购自Corning公司,DNEM/F12购自Gibco公司,一抗:SCP3、GFR α -1(本实验组制备,待发表)、PLZF购自Santa Cruz公司。二抗:cy3偶联山羊抗小鼠IgG、cy3偶联山羊抗兔IgG购自碧云天生物技术有限公司,FITC偶联兔抗山羊IgG购自武汉博士德生物工程有限公司。

TritonX-100、Hoechst 33342购自Sigma公司, NGS购自武汉博士德生物工程有限公司, 青霉素、链霉素购自Wako公司, 两性霉素购自BBI公司, FBS(标准胎牛血清)购自天津灏洋生物制品科技有限公司, PBS本实验组配制, SSCs培养液SSCM见专利申请号[201210549380.5], 纯化培养的黑白花牛SSCs(以下简称牛SSCs)由本实验室提供, 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 牛SSCs的培养 STO(SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant)细胞的培养及用丝裂霉素处理STO细胞的方法见参考文献[13-14]。黑白花牛SSCs的培养液见专利说明书^[15]。以丝裂霉素处理的STO细胞为滋养层细胞, 用SSCM培养液进行牛SSCs的培养。每2 d换一次培养液, 5~7 d进行一次细胞传代。

1.2.2 牛SSCs的体外诱导分化 取12孔培养板, 用0.1% Gelatin处理。处理4 h后, 铺上预先用丝裂霉素处理过的STO细胞, 在37 °C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养过夜, 然后铺上牛SSCs, 在SSCM中培养。待SSCs生长好以后, 换上SSCs分化诱导液(DNEM/F12培养液, 含10% FBS、100 ng/mL SCF、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素), 用无SCF的分化诱导液为对照。每2 d换一次SSCs分化诱导液, 连续培养10 d左右。

1.2.3 显微镜观察及数字动画显微摄影 用Nikon TE2000-U光学显微镜对细胞进行观察拍照。数字动画显微摄影按参考文献[16]的方法进行。显微镜连接数字照相机(Nikon Digital Camera DXM 1200F)再连接到Dell电脑上。图像处理软件为Nikon ACT-1。时间推移的拍照参数选每分钟12张, 拍照结果用动

画放映软件放映。不同类型的生精细胞会有不同的运动行为, 可作为生精细胞分类的依据^[17-18]。

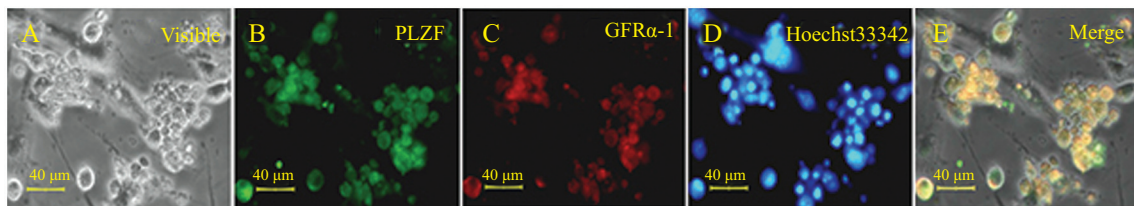
1.2.4 免疫荧光染色 取多次传代培养的牛SSCs, 用4%多聚甲醛固定液室温固定细胞30 min, 然后用SSCs标记分子PLZF和GFR α -1对细胞进行免疫荧光双标染色, 用以鉴定牛SSCs。细胞用含10% NGS的PBS室温封闭30 min, 采用GFR α -1一抗(1:100稀释), 4 °C孵育过夜, 二抗用cy3偶联的羊抗小鼠IgG(1:200), 室温孵育30 min; 再用PLZF一抗(1:50稀释), 4 °C孵育过夜, 二抗用FITC偶联的兔抗羊IgG(1:32), 室温孵育30 min。最后用Hoechst 33342(1:1 000)室温孵育8 min染细胞核。

体外分化培养的细胞用精母细胞特异的标记分子SCP3抗体进行免疫荧光染色。分化诱导10 d后, 用4%多聚甲醛固定液室温固定细胞30 min, 用含10% NGS的PBS室温封闭30 min, 一抗用SCP3(1:50)稀释液4 °C孵育过夜, 二抗用cy3偶联的山羊抗兔IgG(1:100)稀释液室温孵育30 min, Hoechst33342(1:1 000)稀释液室温孵育8 min染细胞核。

2 结果

2.1 牛SSCs诱导前维持细胞簇形态和标记分子表达特征

牛SSCs细胞培养过程中, 用倒置显微镜观察, 可见形态特异的SSCs细胞簇, 类似葡萄串状, 与体外培养的小鼠SSCs类似^[4]。用SSCs的标记抗体进行免疫荧光双标染色, PLZF一抗加FITC偶联的兔抗羊IgG二抗将细胞染成绿色荧光(图1B)。GFR α -1一抗加cy3偶联的羊抗小鼠IgG二抗将细胞染成红色荧光(图1C)。经过图像合并后, 显示这两种荧光染色的细胞是重叠的(图1E), 说明用精原干细胞培养液培

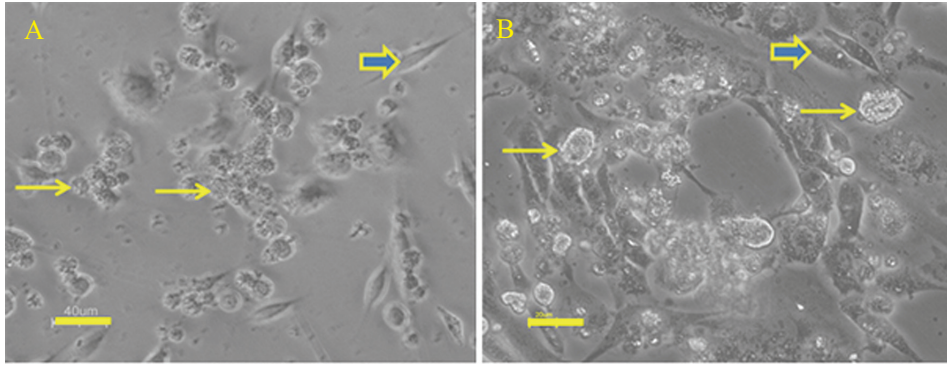


牛精原干细胞免疫荧光双标染色结果。A: 可见光照片; B: 绿荧光照片, 显示PLZF标记的细胞; C: 红荧光照片, 显示GFR α -1标记的细胞; D: 蓝荧光照片, 显示细胞核; E: A、B、C合并图。标尺=40 μm。

The results of immunofluorescence double-label staining of bSSCs. A: visible photograph; B: green fluorescence photograph, showing the cells marked with PLZF; C: red fluorescence photograph, showing the cells marked with GFR α -1; D: blue fluorescence photograph, showing the cell nucleus; E: merge of A, B and C. Scale bars=40 μm.

图1 牛精原干细胞免疫荧光双标染色鉴定

Fig.1 Identification of bSSCs by immunofluorescence double-label staining

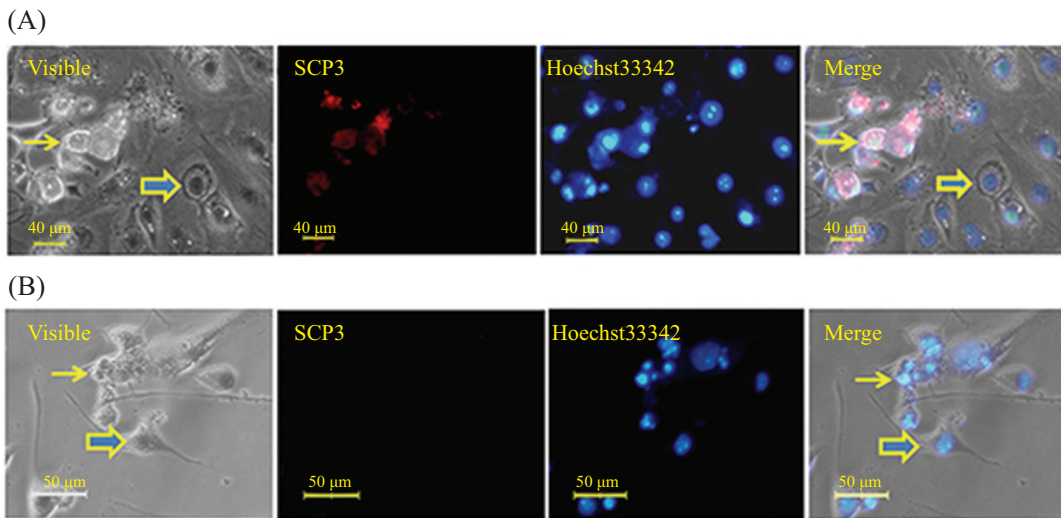


A: 没有诱导培养的牛精原干细胞, 粗箭头指示STO细胞, 细箭头指示牛精原干细胞; B: 诱导分化培养8 d的细胞。粗箭头指示STO细胞, 细箭头指示类精母细胞。标尺=40 μm 。

A: the bovine SSCs without induction. The thick arrow showed STO cells. The thin arrow showed undifferentiated bSSCs; B: differentiated cells after induction for 8 d. The thick arrow showed STO cells. The thin arrow showed spermatocyte-like cells. Scale bars=40 μm .

图2 牛SSCs用SCF诱导8 d后的细胞形态

Fig.2 Cell morphology after induction of bSSCs with SCF for 8 d



A: 用SSC分化诱导液培养牛SSCs 8 d后免疫荧光染色结果, 粗箭头指示STO细胞, 细箭头指示类精母细胞。B: 用无SCF的分化诱导液培养牛SSCs 8 d后免疫荧光染色结果, 粗箭头指示STO细胞, 细箭头指示精原干细胞衍生的细胞。

A: cell culture was performed in SSC differential induction medium. The thick arrow showed STO cells. The thin arrow showed spermatocyte-like cells; B: cell culture was performed in non-SCF differential induction medium. The thick arrow showed STO cells. The thin arrow showed the SSC derived cells.

图3 牛SSCs体外诱导分化后用SCP3抗体进行免疫荧光染色结果

Fig.3 SCP3 immunofluorescence staining was performed after differential induction of bSSCs *in vitro*

养的细胞仍然保持牛SSCs的标记分子表达特征。

2.2 牛SSCs诱导分化后细胞形态和运动行为的变化

体外培养的牛SSCs改用分化诱导液进行诱导分化培养, 2~3 d后发现SSCs及其衍生的细胞减少, 细胞簇开始分散。分化培养至8 d时, 观察细胞可见形态有明显的改变。分化前的牛精原干细胞簇状结构明显, 细胞较小, 大约10~15 μm 左右。用SCF诱导分化8 d后, 细胞增大至25~30 μm (图2)。数字动画显微摄影结果显示, 细胞核有旋转现象, 细胞附器也会

运动, 显示出精母细胞的行为特征^[16-17]。用无SCF的分化诱导液培养的牛SSCs增大不明显(图3B)也没有精母细胞的行为特征。

2.3 诱导分化的细胞SCP3免疫荧光染色结果

用SSC分化诱导液培养牛SSCs, 8 d后用精母细胞特异的标记分子SCP3抗体进行免疫荧光染色, 这些大细胞就会染上红色荧光(图3A)。用无SCF的分化诱导液培养牛SSCs, SCP3抗体免疫荧光染色显阴性(图3B)。说明体外培养的牛SSCs具有分化潜能, 经过SCF诱导能够转化为精母细胞。诱导分化培养

至10 d左右时,STO滋养层细胞表面只能见到很少量的大于25 μm 的大细胞,大部分已经消失。

3 讨论

在体外SSCs培养研究中,除了鉴定SSCs的标记分子表达能力之外,还需要鉴定SSCs的分化能力,以表明体外培养的SSCs具有分化进入精子发生过程的生理功能^[19]。在小鼠SSCs的研究中,Brinster等^[20]创立的SSCs移植法是鉴定精原干细胞生理功能的标准。然而,在牛SSCs的研究中,用睾丸移植法鉴定体外培养的SSCs的生理功能还没有先例。将牛SSCs移植到免疫缺失的小鼠睾丸也观察不到牛SSCs的分化^[7-8]。

本实验室已经成功培养了牛SSCs(图1)。已有报道,PLZF是牛SSCs的标记分子^[21],GFR α -1也是精原干细胞的标记分子。这两种抗体的阳性细胞是重叠的,显示出牛SSCs在诱导之前保留着SSCs标记基因的表达特性。GFR α -1是膜蛋白,染色结果显示,GFR α -1在细胞质和细胞膜中均有分布,这是由于基因在细胞核中转录后,转录本转移到细胞核外形成粗糙内质网,然后启动翻译过程产生前体蛋白,前体蛋白的加工过程也是在细胞质中进行的,最后成熟的蛋白质在引导肽的引导下转运到细胞膜上。所以在细胞质和细胞膜上都会着色。最新发表的猫科SSCs特征的论文中,体外培养的猫SSCs免疫荧光染色结果显示,GFR α -1分布在细胞质和细胞膜中,跟本研究的照片结果是一致的^[22]。

小鼠的研究表明,干细胞因子SCF是诱导SSCs分化的信号分子^[23]。通过siRNA沉默精原细胞中SCF的受体c-kit的表达,可使细胞周期停滞,证实了SCF/c-kit信号系统对减数分裂起到重要的作用^[24]。Feng等^[11]的研究表明,在体外培养条件下,用SCF诱导能够使端粒酶诱导永生化的小鼠SSCs分化产生精母细胞。为了检测长期培养的牛SSCs是否仍然具有分化为精母细胞的潜能,用含有SCF的SSCs分化诱导液进行细胞培养。培养至第8 d时,观察到大于25 μm 的大细胞出现。数字动画显微摄影结果显示出这些大细胞具有精母细胞的行为特征^[16-17]。免疫荧光染色鉴定结果显示,这些大细胞表达精母细胞标记分子SCP3^[25]。研究结果表明,长期培养的牛SSCs经过体外诱导培养能够转变为精母细胞。如果在诱导培养液中不加SCF,就观察不到大于25 μm

的大细胞出现,而且SCP3免疫荧光染色显阴性。说明精母细胞的产生是SCF诱导的结果。用无SCF的分化诱导液培养的牛SSCs细胞增大不明显,也说明培养液中撤去GDNF等维持SSCs自我更新的因子之后,牛SSCs虽然有自分化趋势,但是自分化的启动有一个延时阶段,故而起始阶段变化不大。我们注意到在免疫荧光染色中,SCP3的高表达不出现在细胞核中,在其他物种如山羊的实验中也发现有类似情况。这可能是由于SCP3在内质网合成后,还没有大量转运到细胞核;也有可能是在现有的体外培养条件下,SCP3转运到细胞核存在某些障碍。与上述现象相一致的是,图3A中的SCP3阳性的细胞仍存在明显的核仁,与典型的精母细胞的形态不符。这些结果暗示,现有的体外培养条件不能满足牛SSCs减数分裂的全部要求,造成牛SSCs转化为精母细胞的过程存在一些障碍,导致出现一些不完全符合精母细胞特征的现象。这一点尚待进一步的研究。

体外诱导分析法鉴定SSCs的生理潜能需要用丝裂霉素处理的STO细胞做为滋养层。已有研究表明,STO适宜做体外增殖牛生殖细胞的滋养层^[26]。加入SSC分化诱导液后,经过2~3 d的分化诱导培养,就会有大量的SSCs消失,显示SSCs已经开始分化。Chen等^[27]最近发现,CD147在精原干细胞分化启动后开始表达,它有双重功能,一方面引发细胞迁移,一方面引发细胞凋亡。在睾丸中SSCs分化后,离开曲细精管基底膜,逐渐向管腔迁移。迁移过程中生精细胞依然被Sertoli细胞包围。但是在体外培养条件下,SSCs只有一面黏附于STO滋养层细胞,其余三面被培养液包围。SSCs分化后,随着生理状态的改变,可能会产生迁移或凋亡现象。因此,体外分化会伴随着大量生殖细胞的消失。但是在某种微环境下,在某个分化时间点,还是会捕捉到精母细胞的存在。这个方法的建立,为体外培养的牛SSCs的生理潜能的检测提供了便利,也为体外培养的其他家畜SSCs的生理潜能的检测提供了参考。

本研究建立了牛SSCs体外诱导分化的分析鉴定方法,用于鉴定体外培养的牛SSCs的生理潜能。同时也提出,诱导分化培养液可能存在某些缺陷,使诱导产生的精母细胞的SCP3在细胞质中积累,不能转运到细胞核中,而且SCP3阳性细胞仍存在明显的核仁,与典型的精母细胞的形态不符,说明现有的诱导分化培养液对牛SSCs转化为精母细胞存在不利

的影响,因此诱导培养液尚需改进。

参考文献 (References)

- 1 Huckins C, Oakberg EF. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. the normal testes. *Anat Rec* 1978; 192(4): 519-28.
- 2 Bartmanska J, Clermont Y. Renewal of type A spermatogonia in adult rats. *Cell Tissue Kinet* 1983; 16(2): 135-43.
- 3 Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11298-302.
- 4 Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, *et al.* Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 612-6.
- 5 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(47): 16489-94.
- 6 Dobrinski I. Advances and applications of germ cell transplantation. *Hum Fertil (Camb)* 2006; 9(1): 9-14.
- 7 Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 2002; 124(1): 85-94.
- 8 Fujihara M, Kim SM, Minami N, Yamada M, Imai H. Characterization and *in vitro* culture of male germ cells from developing bovine testis. *J Reprod Dev* 2011; 57(3): 355-64.
- 9 Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, *et al.* Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000; 287(5457): 1489-93.
- 10 Ohta H, Yomogida K, Dohmae K, Nishimune Y. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* 2000; 127(10): 2125-31.
- 11 Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera R, Herr JC, Goldberg E, *et al.* Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 2002; 297(5580): 392-5.
- 12 Dolci S, Pellegrini M, Di Agostino S, Geremia R, Rossi P. Signaling through extracellular signal-regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. *J Biol Chem* 2001; 276(43): 40225-33.
- 13 张岩, 罗奋华, 刘林洪, 萨初拉, 于泊洋, 吴应积. 大鼠精原干细胞的高效分离和纯化方法. *中国细胞生物学学报*(Zhang Yan, Luo Fenhua, Liu Linhong, Wu Shachula, Yu Boyang, Wu Yingji. Efficient separation and purification of rat spermatogonial stem cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2011; 33(5): 543-7.
- 14 刘海超, 张岩, 于泊洋, 吴应积. 制备精原干细胞滋养层细胞条件的优化. *现代生物医学进展*(Liu Haichao, Zhang Yan, Yu Boyang, Wu Yingji. Optimization of preparing feeder layer cells of spermatogonial stem cells. *Progress in Modern Biomedicine*) 2012; 12(4): 626-30.
- 15 吴应积, 罗奋华, 张岩, 萨初拉, 苏慧敏, 刘陶迪, 等. 家畜精原干细胞培养液. 中国, 专利号: ZL 201210549380.5(Yingji Wu, Fenhua Luo, Yan Zhang, Shachula Wu, Huimin Shu, Taodi Liu, *et al.* Culture medium of livestock spermatogonial stem cells. *China Patent #201210549380.5*) 2012-12-07.
- 16 吴应积, 罗奋华, 薛晓先, 旭日干. 绒山羊曲细精管生殖细胞的长期培养和精子发生过程的观察. *内蒙古大学学报(自然科学版)*(Wu Yingji, Luo Fenhua, Xue Xiaoxian, Bou Shorgan. Long-term culture and spermatogenesis observation of germ cells from seminiferous tubules of cashmere goat. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis NeiMongol*) 2005; 36(4): 411-6.
- 17 Tres LL, Kierszenbaum AL. Viability of rat spermatogenic cells in coculture *in vitro* is facilitated by their co-culture with Sertoli cells in serum-free, hormone-supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(11): 3377-81.
- 18 Tres LL, Kierszenbaum AL. Cell death patterns of the rat spermatogonial cell progeny induced by Sertoli cell, geometric changes and Fas (CD95) agonist. *Dev Dyn* 1999; 21(4): 361-71.
- 19 Kubota H, Brinster RL. Technology insight: *In vitro* culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2(2): 99-108.
- 20 Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11303-7.
- 21 Reding SC, Stepnoski AL, Cloninger EW, Oatley JM. THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the prepubertal bull testis. *Reproduction* 2010; 139(5): 893-903.
- 22 Tiptanavattana N, Thongkittidilok C, Techakumphu M, Tharasanit T. Characterization and *in vitro* culture of putative spermatogonial stem cells derived from feline testicular tissue. *J Reprod Dev* 2013; 59(2): 189-95.
- 23 萨初拉, 孔群芳, 吴应积. 哺乳动物睾丸中c-kit基因表达对生精细胞发育的影响. *中国细胞生物学学报*(Sachula, Kong Qunfang, Wu Yingji. The effects of c-kit on development of male germ cells in the mammals testis. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(5): 703-11.
- 24 Sikarwar AP, Reddy KV. siRNA-mediated silencing of c-kit in mouse primary spermatogonial cells induces cell cycle arrest. *Oligonucleotides* 2008; 18(2): 145-60.
- 25 Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Höög C. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 2000; 5(1): 73-83.
- 26 Nasiri Z, Hosseini SM, Hajian M, Abedi P, Bahadorani M, Baharvand H, *et al.* Effects of different feeder layers on short-term culture of prepubertal bovine testicular germ cells *in vitro*. *Theriogenology* 2012; 77(8): 1519-28.
- 27 Chen H, Lam FK, Jiang X, Chan HC. New insights into germ cell migration and survival/apoptosis in spermatogenesis: Lessons from CD147. *Spermatogenesis* 2012; 2(4): 264-72.