

技术与方法

仔猪睾丸支持细胞的体外生物学特性研究

刘欢欢 余树民* 夏娟 孙成亮 沈留红 曹随忠 左之才 马晓平

(四川农业大学动物医学院, 成都 611130)

摘要 为研究仔猪睾丸支持细胞生物学特性, 以3~5周龄仔猪睾丸为材料, 优化消化和差异贴壁方法, 分离纯化支持细胞, 研究其体外培养特性包括增殖活力、标志分子和细胞因子的表达。结果显示, 先以0.25%胶原酶IV和0.1%透明质酸酶消化60 min, 再以0.25%胰蛋白酶和0.1% DNase I 消化20 min, 有利于获得支持细胞; 支持细胞接种后贴壁时间主要集中在3~5 h; 纯化后细胞胞体宽大, 呈梭形或不规则形; GATA4染色呈阳性, 碱性磷酸酶染色呈阴性; RT-PCR结果表明, 细胞表达 *GATA4*、*SOX9*和*INHB*, 不表达*CYP17*、*3 β -HSD*和 α -*SMA*; ELISA结果表明, 细胞表达GDNF、LIF、CSF-1、EGF和FGF2, 符合支持细胞的基本特征。

关键词 猪; 支持细胞; 分离; 体外培养; 细胞因子

Characterization of Sertoli Cells from Prepubertal Porcine Testis *In Vitro*

Liu Huanhuan, Yu Shumin*, Xia Juan, Sun Chengliang, Shen Lihong, Cao Suizhong, Zuo Zhicai, Ma Xiaoping
(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract To analysis the characterization of sertoli cells *in vitro*, the modified digestion and differential plating methods were used for isolating sertoli cells from 3~5 week-old porcine testis. Then, cell proliferation, the expression of markers and secretion of cytokines were detected. The results showed that prepubertal porcine treated with 0.25% collagenase IV and 0.1% hyaluronidase for 60 min, and then with 0.25% trypsin and 0.1% DNase I for 20 min was the optimal method for isolating sertoli cells. And after inoculation, the adhesion process of sertoli cells were accomplished within 3~5 h. The purified cells were showed with large body and fusiform or irregular shape, and were positive for GATA4, but negative for alkaline phosphatase (CAKP) staining. Simultaneously, RT-PCR analysis showed these cells expressed *GATA4*, *SOX9* and *INHB*, did not express *CYP17*, *3 β -HSD* and α -*SMA*. And detected by ELISA, cells express GDNF, LIF, CSF-1, EGF and FGF2. In summary, all these features were in line with sertoli cells.

Keywords porcine; sertoli cells; isolation; cultivation; cytokine

支持细胞是睾丸曲细精管上皮的重要组分, 调节精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)自我

更新和数量稳定, 是精子发生所必需的。支持细胞的数目及其结构和功能决定着动物个体的繁殖能

收稿日期: 2015-05-05 接受日期: 2015-06-25

国家自然科学基金(批准号: 31172379)和四川省学术和技术带头人培养基金资助的课题

*通讯作者。Tel: 13551554379, E-mail: yayushumin@163.com

Received: May 5, 2015 Accepted: June 25, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31172370) and the Fostering fund for the Academic-Technical Leaders in Sichuan Province

*Corresponding author. Tel: +86-13551554379, E-mail: yayushumin@163.com

网络出版时间: 2015-08-21 10:42:56 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20150821.1042.001.html>

力和生精效率^[1-2]。目前, 支持细胞以其强大的分泌功能, 在细胞工程、组织工程以及再生医学研究方面有愈加广泛的应用。Minace等^[3]以支持细胞作饲养层培养SSCs, 能有效促进精原干细胞增殖, 并维持其未分化状态。Luca等^[4]将小鼠支持细胞和胰岛细胞共培养, 能显著促进胰岛细胞增殖, 提高胰岛细胞分泌胰岛素的能力。本文研究了仔猪睾丸支持细胞的分离和纯化及支持细胞表达标记分子和分泌细胞因子的特性, 为深入阐明支持细胞的生理功能和进一步研究精子发生机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

3~5周龄雅安本地长白仔猪睾丸。

1.2 试剂

胎牛血清和DMEM高糖培养基购自Gibco公司; 胶原酶IV和胰蛋白酶购自Amresco公司; 高纯总RNA快速提取试剂盒购自北京百泰克生物科技有限公司; PrimeScript™ RT Reagent Kit和Premix Taq™购自TaKaRa公司; 一抗GATA4(1:100)购自Novus公司; SP-9000免疫组化染色试剂盒和DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 碱性磷酸酶(CAKP)染色试剂盒购自南京建成生物科技有限公司; pGDNF(porcine glial cell-derived neurotrophic factor)、pLIF(leukemia inhibitory factor)、pSCF(stem cell growth factor)、pCSF-1(conly-stimulating factor-1)、pEGF(epidermal growth factor)、pFGF2(fibroblast growth factor2)、ELISA试剂盒均购自Rapidbio公司。

1.3 仔猪睾丸支持细胞的分离和纯化

收集仔猪睾丸, 于无菌PBS中送至实验室, 经75%酒精浸泡数秒, 移入超净工作台。无菌条件下去除附睾和白膜, 组织剪成1~2 mm³大小。取等量组织分3组进行消化, 具体消化方法见表1。

经过滤、离心获得细胞, 分别以等量DMEM重悬, 取100 μL细胞悬液, 用0.4%台盼蓝染色, 进行细

胞计数。将3组细胞调整为相同密度, 取等体积细胞悬液收集细胞提取RNA, 检测GATA4 mRNA相对表达量(引物序列信息见表2)。比较3组消化所获细胞数量、细胞活率、细胞团块所占比例和GATA4 mRNA相对表达量。

分离细胞以(0.5~1)×10⁶/mL密度接种于60 mm培养皿中, 于37 °C、5% CO₂条件下培养, 分别于细胞接种后1, 2, 3, 4, 5, 6 h收集悬浮细胞。收集悬浮细胞后, 贴壁细胞添加新鲜培养液继续培养, 至细胞80%融合后, 分别消化收集细胞。收集所有细胞, 调整为相同密度, 取等体积细胞悬液用于RNA提取, 检测GATA4相对表达量, 分析支持细胞贴壁性质, 选择最佳贴壁时间。

经差异贴壁后细胞, 用20 mmol/L Tris-HCl处理5 min, 经PBS清洗后, 加入新鲜培养液继续培养。

1.4 支持细胞的鉴定

GATA4是睾丸内支持细胞的标记基因^[8-9], 本文采用GATA4评价酶消化法和差异贴壁中支持细胞的纯度。

1.4.1 形态学鉴定 取纯化细胞制作细胞爬片, 经PBS清洗, 4%多聚甲醛固定15 min, 苏木素染色15 min, 0.1%盐酸酒精分色, 伊红染色1 min, PBS清洗, 风干, 中性树脂封片, 镜检。

1.4.2 RT-PCR检测标记基因表达 收集纯细胞提取RNA, 检测GATA4、SOX9、INHB、CYP17、3β-HSD和α-SMA的表达情况。

1.4.3 支持细胞免疫组化分析 取出细胞爬片用PBS清洗, 4%多聚甲醛固定15 min, 干燥3 min; PBS冲洗后加入3% H₂O₂孵育8 min; PBS冲洗后用山羊血清37 °C封闭10 min, 滴加一抗4 °C过夜; PBS冲洗后滴加生物素标记二抗, 37 °C孵育15 min; PBS冲洗后滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37 °C孵育15 min; 经PBS冲洗后DAB显色, 镜检, 阳性细胞为黄褐色, 阴性细胞不着色。

1.4.4 碱性磷酸酶染色 细胞爬片用固定液固定3 min, 滴加新鲜配置底物反应液, 37 °C孵育15 min,

表1 酶消化方法分组(根据参考文献[5-7]进行分组)

Table 1 The groups divided by the digestion methods (groups dividing according to references [5-7])

| 组别 Groups | 消化方法 Digestion methods |
|--------------|---|
| A | 0.25% trypsin+0.1% hyaluronidase, 37 °C digest 30 min; 0.25% collagenase IV+0.1% DNase I, 37 °C digest 15 min |
| B | 0.25% collagenase IV+0.1% hyaluronidase, 37 °C digest 15 min; 0.25% trypsin+0.1% DNase I, 37 °C digest 20 min |
| C | 0.25% collagenase IV+0.1% hyaluronidase, 37 °C digest 60 min; 0.25% trypsin+0.1% DNase I, 37 °C digest 20 min |

表2 RT-PCR目的基因引物的相关信息

Table 2 Information on the primers of the target genes used for RT-PCR

| 基因 | 上游引物(5'→3') | 下游引物(5'→3') | 产物大小(bp) |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Gene | Forward primer (5'→3') | Reverse primer (5'→3') | Product length (bp) |
| <i>GATA4</i> | TCT CGA TAT GTT TGA TGA CTT CTC | GTC TTC GAT TTG TTA AGG TTC TTG | 378 |
| <i>SOX9</i> | CCT AAT CTC GAT ATG TTT GAT GAC | GTC TTC GAT TTG TTA AGG TTC TTG | 383 |
| <i>α-SMA</i> | AAT GGC TCT GGG CTC TGT AAG | CTT TTC CAT GTC GTC CCA GT | 219 |
| <i>CYP17</i> | GCT GGC ACT GAG CAC CTT T | TGC GTT CGT CTT GGC TTG | 442 |
| <i>3β-HSD</i> | TGG CAA GTA TTT CTC GGT G | CCA GCA CAG CCT TCT CAG | 534 |
| <i>INHB</i> | GAA GGA GCA GTC GCA CAG A | CTC GCC CTC GCA GTA GTT | 208 |
| <i>GAPDH</i> | TCG GAG TGA ACG GAT TTG | CCT GGA AGA TGG TGA TGG | 219 |

水洗, 镜检, 阳性细胞内有灰褐色颗粒, 阴性细胞仅见复染液颜色。

1.5 支持细胞的传代培养和生长曲线绘制

观察各代细胞的生长状态, 并取原代(P0)和第3代(P3)对数生长期细胞, 以 $(0.5\sim 1)\times 10^4/\text{mL}$ 接种于24孔板, 每孔接种0.5 mL, 于37 °C、5% CO₂培养箱培养, 每隔24 h进行细胞计数, 每次记录3孔, 共计数9 d, 绘制生长曲线。

1.6 ELISA检测部分细胞因子含量

以 $1\times 10^6/\text{mL}$ 密度接种于100 mm平皿中, 培养2 d后分别收集培养液和细胞样品。培养液样品经3 000 r/min离心30 min, 收集上清; 细胞样品经0.25%胰蛋白酶消化, 离心清洗后, 以PBS调整细胞密度至 $1\times 10^6/\text{mL}$, 反复冻融, 破坏细胞释放细胞内成分,

3 000 r/min离心30 min, 收集上清, 用于检测样品中GDNF、LIF、SCF、CSF-1、FGF2和EGF的含量, 并选取未培养细胞的新鲜DMEM培养液作阴性对照。

1.7 数据统计

PCR结果运用Image J分析灰度值, 相对表达量=目的基因灰度值/内参基因灰度值。所有实验独立重复3次, 采用SPSS 20.0软件进行统计单因素方差分析(ANOVA), 数据以 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 表示, 并进行 t 检验, 以 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 酶消化分离仔猪睾丸支持细胞

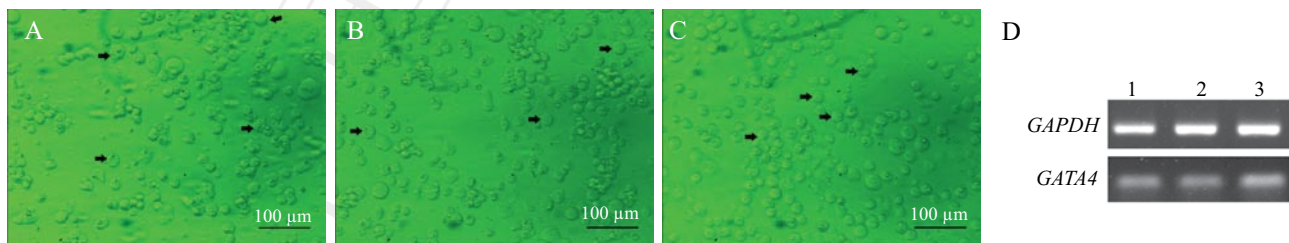
3组酶消化睾丸组织的结果如图1和表3所示, 支持细胞为镜下中等大小的细胞(图1), A组所获细

表3 不同酶消化方法的支持细胞分离效果($n=3$)Table 3 The effect of separation of Sertoli cells by different digestion methods ($n=3$)

| 组别 | 细胞数量($\times 10^5/\text{mL}$) | 细胞存活率(%) | 细胞团块率(%) | <i>GATA4</i> 相对表达量 |
|--------|---|--------------------|---------------------|----------------------------------|
| Groups | Cell number ($\times 10^5/\text{mL}$) | Cell viability (%) | Cell mass ratio (%) | <i>GATA4</i> relative expression |
| A | 87.83 ± 0.74^a | 85.33 ± 0.45^b | 9.28 ± 0.50 | 0.87 ± 0.01^c |
| B | 43.00 ± 1.87^c | 92.14 ± 1.30^a | 8.66 ± 0.54 | 0.86 ± 0.05^b |
| C | 62.00 ± 5.34^b | 94.30 ± 2.31^a | 7.28 ± 1.11 | 1.04 ± 0.03^a |

同列数据后所标字母相同表示差异不显著($P>0.05$), 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Values with the same letter in the same row mean no significant difference ($P>0.05$). Values with the different letters in the same row mean significant difference ($P<0.05$).



A~C: A、B和C三种分离方法所分离支持细胞。箭头所示为支持细胞; D: *GAPDH*和*GATA4*的RT-PCR结果, 泳道1、2和3分别为A、B和C三种分离方法所获得的细胞。

A~C: the obtained cells by digestion methods A, B and C, respectively. It indicated by the arrows for sertoli cell; D: RT-PCR results of *GAPDH* and *GATA4*. Line 1~3 stands for cells from digestion methods A, B and C, respectively.

图1 酶消化方法获取支持细胞的优化

Fig.1 Optimization of digestion method to obtain Sertoli cells

胞数量显著高于B组和C组($P<0.05$), 但细胞活率显著低于B组和C组($P<0.05$); C组所获细胞数量显著高于B组($P<0.05$), B组和C组细胞活率无显著差异($P>0.05$); RT-PCR分析3组分离方法所获细胞中 *GATA4* mRNA的相对表达量(图1D), 结果显示, C组样品的 *GATA4* mRNA表达量显著高于A组和B组($P<0.05$), B组显著高于A组(表1)($P<0.05$), 说明C组支持细胞含量显著高于A组和B组, B组显著高于A组。上述结果表明, 从睾丸中分离支持细胞的最适消化程序是先用0.25%胶原酶IV和0.1%透明质酸酶于37 °C消化60 min, 再用0.25%胰蛋白酶和0.1% DNase I于37 °C消化20 min。

2.2 差异贴壁纯化仔猪睾丸支持细胞

睾丸组织消化所获的细胞悬液接种后, 2 h内仅有少量细胞贴壁且不紧密, 轻微晃动或吹打即漂浮, 2 h后贴壁细胞数目明显增加, 至6 h大多数体细胞已贴壁, 部分细胞极化呈多角形(图2); 对不同时间所取悬浮细胞和贴壁细胞进行RT-PCR分析, 结果显示悬浮细胞 *GATA4* mRNA相对表达量在接种2 h内依次显著升高, 2~5 h逐渐降低, 5 h和6 h差异不显著; 在贴壁细胞中, 接种2 h内 *GATA4* mRNA相对表达量低且变化不显著, 2~5 h则依次显著升高, 到5 h

升至最高, 6 h时略有下降(图3A和图3B)。 *GATA4*作为睾丸支持细胞的标志基因, 据此结果可说明睾丸支持细胞在接种2 h内几乎不贴壁, 其贴壁时间主要集中在接种后3~5 h。因此, 消化所获睾丸细胞接种2 h后, 收取悬浮细胞重新接种并培养5~6 h, 去除悬浮细胞, 在培养皿中加入20 mmol/L Tris-HCl处理5 min, 用PBS漂洗, 添加新鲜培养液继续培养, 可获得纯净的睾丸支持细胞。

2.3 仔猪睾丸支持细胞的鉴定

所分离支持细胞经H&E染色可见细胞形态不规则, 胞体宽大, 细胞核呈卵圆或不规则形(图4A), 免疫组化染色 *GATA4*呈阳性(图4B), 碱性磷酸酶染色呈阴性(图4C)。RT-PCR结果显示, 所分离细胞表达支持细胞标记基因——*GATA4*、*SOX9*和*INHB*, 不表达间质细胞标记 *CYP17*、*3 β -HSD*和管周细胞标记 *α -SMA*(图4D), 说明分离细胞符合睾丸支持细胞的特征。

2.4 仔猪睾丸支持细胞的传代培养和生长去曲线绘制

原代支持细胞开始贴壁时为圆形或不规则多角形, 培养过夜后完全贴壁呈纤维状或梭形, 胞体大, 至48 h细胞完全铺展, 培养3 d后细胞融合成片,

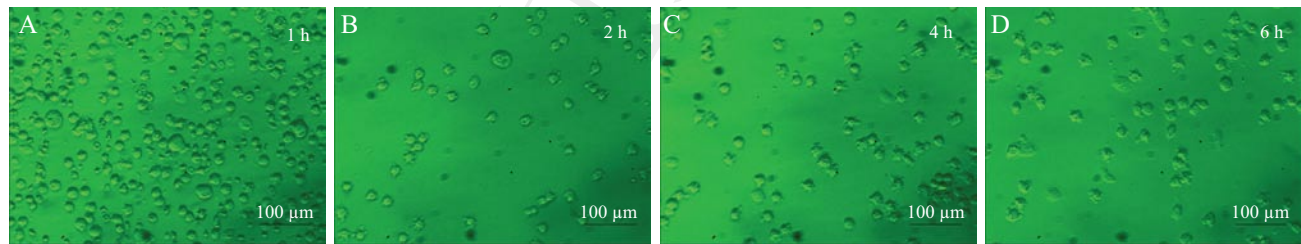
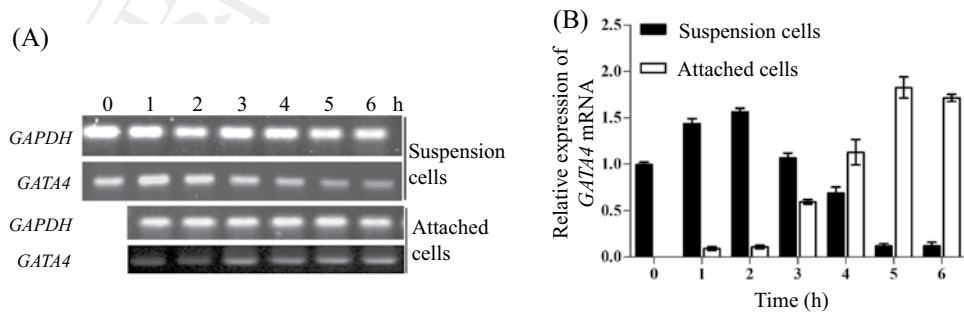


图2 细胞接种不同时间的细胞贴壁情况

Fig.2 The attached cells at different times after inoculation

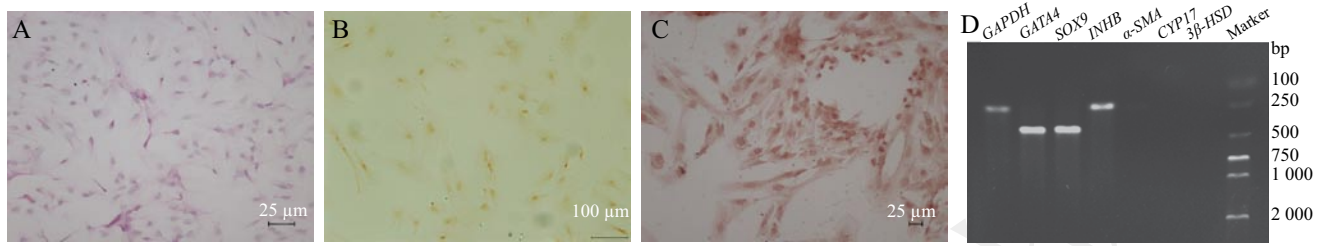


A: 悬浮细胞和贴壁细胞 *GAPDH*和 *GATA4*电泳图; B: *GATA4* mRNA在悬浮细胞和贴壁细胞中的相对表达量。

A: the electrophoretogram *GAPDH* and *GATA4* in suspension cells and in attached cells, respectively; B: relative expression of *GATA4* mRNA in suspension cells and attached cells.

图3 贴壁不同时间细胞中 *GATA4*相对表达量

Fig.3 The relative expression of *GATA4* in cells at different times of adherence

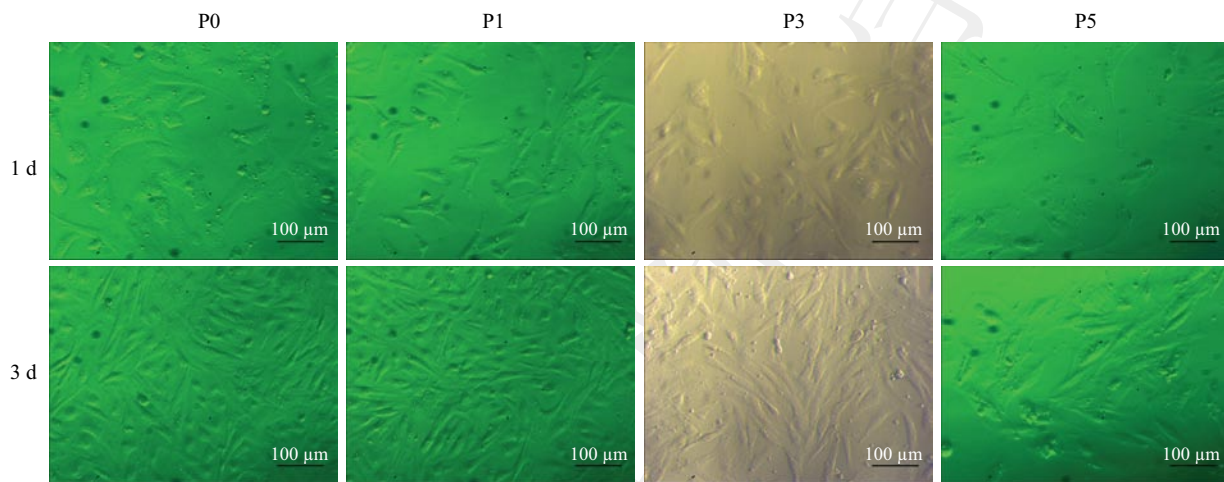


A: H&E染色; B: GATA-4免疫组化染色; C: 碱性磷酸酶染色; D: RT-PCR检测结果。

A: H&E staining ; B: GATA-4 staining; C: cell alkaline phosphatase staining; D: result of RT-PCR.

图4 纯化后支持细胞的H&E染色、表达睾丸细胞标记基因的免疫组化和RT-PCR检测

Fig.4 H&E staining, immunohistochemical staining and RT-PCR detecting of the purified sertoli cells



P0、P1、P3、P5分别代表原代、第1代、第3代和第5代支持细胞; 1 d和3 d代表细胞分别培养1 d和3 d。

P0, P1, P3 and P5 stands for the primary, the first generation, the third generation of cells and the fifth generation of cells, respectively. 1 d and 3 d stands for cells cultured for 1 and 3 days, respectively.

图5 原代、第1代、第3代和第5代支持细胞的形态

Fig.5 The morphology of sertoli cells in P0, P1, P3 and P5, respectively

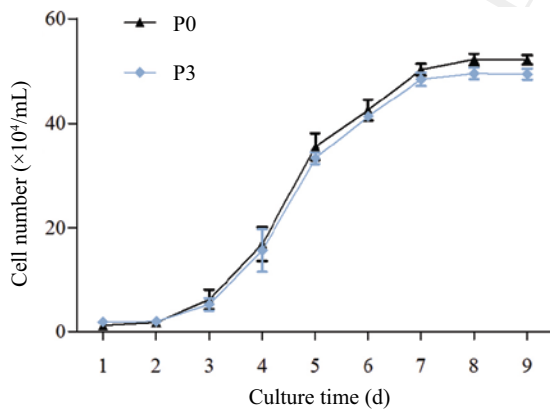


图6 支持细胞的生长曲线

Fig.6 Growth curve of sertoli cells

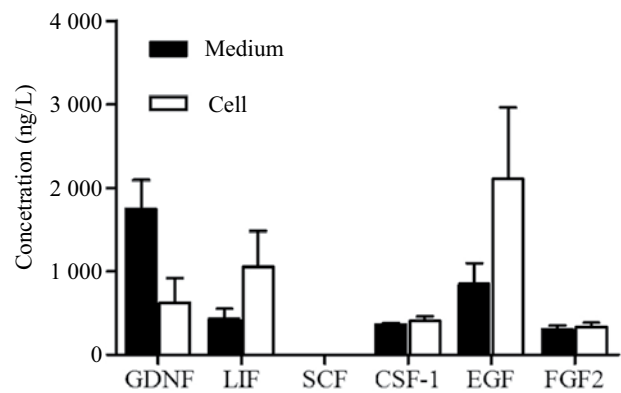


图7 ELISA检测细胞因子浓度

Fig.7 Growth factor concentration detected by ELISA

排列致密; 传代后细胞增殖速度变快, 以适宜密度接种后培养3 d可传代, 传至5代, 细胞开始出现老化, 胞内出现空泡或颗粒, 增殖速度变慢, 细胞排列稀疏(图5)。原代和第3代细胞的生长曲线显示细胞生长曲线呈S型, 即1~2 d为潜伏期, 3~7 d为对数生长期,

7 d后进入平台期(图6), 与原代细胞相比第3代细胞增殖速度开始变慢, 差异不显著。

2.5 ELISA检测分析细胞因子的表达

经ELISA(enzyme-linked immuno sorbent assay)检测分析显示, 所分离支持细胞可表达与分

泌GDNF、LIF、CSF-1、EGF和FGF2, 但SCF未检出(图7)。

3 讨论

目前, 从睾丸组织中分离细胞多采用胶原酶和胰蛋白酶分步消化^[5-7], 但消化所用酶浓度、消化时间有一定差异, 有的还通过添加透明质酸酶和DNase酶来提高效率^[10]。本文综合消化所获细胞数量及其活力、GATA4 mRNA相对表达量, 证明采用Benbrahim等^[7]报道的方法, 同时分步添加透明质酸酶(0.1%)和DNase I(0.1%)消化睾丸组织有利于分离支持细胞。

睾丸组织消化获得的细胞以支持细胞和生精细胞为主, 同时包括少量间质细胞、管周肌样细胞以及其他类型细胞, 差异贴壁为目前常用的支持细胞纯化方法。Rossi等^[11]报道, 在细胞接种后34 h换液能获得纯化的睾丸支持细胞。本文结果表明, 细胞接种后支持细胞贴壁时间主要集中在3~5 h之间, 因此细胞接种2 h后取悬浮细胞重新接种, 培养5~6 h换液可纯化仔猪睾丸支持细胞。然而, 此时所获细胞中仍含有少量生精细胞。有研究表明, 支持细胞比生精细胞能耐受低渗处理, Syed等^[12]报道使用20 mmol/L Tris-HCl进行低渗处理可有效去除生精细胞, 对支持细胞生长没有显著影响。基于此, 本文选取二次贴壁去除悬浮细胞后, 采用20 mmol/L Tris-HCl处理5 min, 提高支持细胞的纯化效率。

已有研究显示, 在睾丸中, 支持细胞表达标记分子GATA4^[5-6]、SOX9^[13]和INH^[14], 而不表达间质细胞标记分子CYP17^[15]、3 β -HSD^[16]和管周细胞标记分子 α -SMA^[17], 碱性磷酸酶染色为阴性^[18]。本实验采用RT-PCR检测和免疫组化鉴定所分离支持细胞, 结果与上述描述一致, 符合支持细胞的基本特征。本文中所分离的睾丸支持细胞能稳定传4代, 传到5代以后出现老化现象, 活性降低。因此, 进行支持细胞的形态和生物学特性相关研究, 最好选取2~4代的细胞。

支持细胞通过分泌多种细胞因子调节调节睾丸功能和精子发生过程, 但目前对支持细胞在体外培养条件下分泌细胞因子的系统研究较少, 且多数资料来源于大鼠和小鼠。已有研究表明, 支持细胞分泌GDNF^[19]、LIF^[20]、SCF^[21]、FGF2^[22]和EGF^[23]等, 上述数种细胞因子以及CSF-1在调节SSCs自我更新

和分化中有重要作用^[24], 但支持细胞是否表达CSF-1未见报道。本文使用ELISA检测支持细胞表达细胞因子, 结果显示支持细胞分泌GDNF、LIF、CSF-1、FGF2和EGF, 而SCF未检出, 我们究其原因可能有以下两方面: 一方面, SCF的分泌量过低, 本文所用ELISA试剂盒SCF蛋白的检测范围为20~600 ng/L, 未能检出SCF; 另一方面, 可能与本试验所选用的材料有关, SCF作用的发挥需要c-Kit介导^[25], 本文以3~5周龄仔猪睾丸为材料, 此时期睾丸曲细精管中的精原细胞处于未分化状态, 不表达c-Kit^[26-27], 缺少对支持细胞表达SCF的刺激, 故而不表达SCF。结果揭示, 支持细胞分泌SCF具有阶段性, 但在体外条件下刺激SCF合成和分泌的条件需要进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Auharek SA, Avelar GF, Lara NL, Sharpe RM, Franca LR. Sertoli cell numbers and spermatogenic efficiency are increased in inducible nitric oxide synthase mutant mice. *Int J Androl* 2011; 34(6 Pt 2): e621-6.
- 2 Lui WY, Lee WM, Cheng CY. Transforming growth factor- β 3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier *in vitro* possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *Endocrinology* 2001; 142(5): 1865-77.
- 3 Minaee ZB, Rastegar T, Habibi RM, Habibi RM, Ragerdi KI, Amidi F, *et al.* Co-culture of spermatogonial stem cells with sertoli cells in the presence of testosterone and FSH improved differentiation via up-regulation of post meiotic genes. *Acta Med Iran* 2013; 51(1): 1-11.
- 4 Luca G, Calvitti M, Baroni T, Basra G, Angeletti G, Neri LM, *et al.* Sertoli cell-induced adult rat islet beta-cell mitogenesis: Causative pathways. *Diabetes Nutr Metab* 2003; 16(1): 1-6.
- 5 Han SY, Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Isolation and *in vitro* culture of pig spermatogonial stem cell. *Asian-Aust J Anim Sci* 2009; 22: 187-93.
- 6 陈思怀, 付文贵. 荣昌猪睾丸支持细胞的分离培养. *中国兽医杂志*(Cheng Sihuai, Fu Wengui. Isolation and culture of sertoli cell. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*) 2009; 2009(6): 25-7.
- 7 Benbrahim-Tallaa L, Boussouar F, Rey C, Benahmed M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits glutathione S-transferase- alpha expression in cultured porcine Sertoli cells. *J Endocrinol* 2002; 175(3): 803-12.
- 8 McCoard SA, Lunstra DD, Wise TH, Ford JJ. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. *Biol Reprod* 2001; 64(2): 689-95.
- 9 Kyrönlähti A, Euler R, Bielinska M, Schoeller EL, Moley KH, Toppari J, *et al.* GATA4 regulates Sertoli cell function and fertility in adult male mice. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 333(1): 85-95.
- 10 Wang XZ, Zhao BC, Zhou YL, Ma K, Zhang JH. 17 β -Estradiol

- regulates cultured immature boar Sertoli cell proliferation via the cAMP-ERK1/2 pathway and the estrogen receptor β . *Agriculture Sciences in China* 2010; 9(8): 1201-10.
- 11 Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Ricca R, Geremia R. Follicle-stimulating hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Dev Biol* 1993; 155(1): 68-74.
- 12 Syed V, Hecht NB. Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186(2): 155-7.
- 13 Lasala C, Schteingart HF, Arouche N, Badecarras P, Grinspon RP, Picard JY, *et al*. SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Mullerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301(3): E539-47.
- 14 Lahlou N, Fennoy I, Carel J C, Roger M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone, but not testosterone levels, are normal in infants with nonmosaic Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(4): 1864-8.
- 15 Payne AH, Youngblood GL. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod* 1995; 52(2): 217-25.
- 16 Van Straaten HW, Wensing CJ. Leydig cell development in the testis of the pig. *Biol Reprod* 1978; 18(1): 86-93.
- 17 Ranieri E, Gesualdo L, Grandaliano G, Maiorano E, Schena FP. The role of alpha-smooth muscle actin and platelet-derived growth factor-beta receptor in the progression of renal damage in human IgA nephropathy. *J Nephrol* 2000; 14(4): 253-62.
- 18 Wang J, Fu YH, Xie SG, Zhou ZY. Cultivation and identification of spermatogonial stem cell from mice testis *in vitro*. *Journal of Shihezi University (Natural Science)* 2009; 4: 1-20.
- 19 Meng X, Lindahl M, Hyvönen M E, 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.
- 20 De Miguel MP, De Boer-Brouwer M, Paniagua R, van den Hurk R, De Rooij DG, Van Dissel-Emiliani FM. Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotropic factor promote the survival of sertoli cells and gonocytes in coculture system. *Endocrinology* 1996; 137(5): 1885-93.
- 21 Hakovirta H, Yan W, Kaleva M, Zhang F, Vanttinen K, Morris PL, *et al*. Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 1999; 140(3): 1492-8.
- 22 El Ramy R, Verot A, Mazaud S, Odet F, Magre S, Le Magueresse-Battistoni B. Fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF9 mediate mesenchymal-epithelial interactions of peritubular and Sertoli cells in the rat testis. *J Endocrinol* 2005; 187(1): 135-47.
- 23 Holmes SD, Spotts G, Smith RG. Rat Sertoli cells secrete a growth factor that blocks epidermal growth factor (EGF) binding to its receptor. *J Biol Chem* 1986; 261(9): 4076-80.
- 24 Kubota H, Avarbock M R, Brinster R L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(47): 16489-94.
- 25 Ohtta 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.
- 26 Harayama H, Nanjo I, Kanda S, Kato S. Testicular development in Chinese Meishan boars. *Theriogenology* 1991; 36(4): 637-43.
- 27 Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest* 2000; 23(9): 609-15.