

技术与方法

山羊精原干细胞的鉴定及培养体系优化的研究

张钦恺¹ 姜颖¹ 王明明¹ 董焕声¹ 尉玉杰² 潘庆杰^{1*}(¹青岛农业大学动物生殖发育与基因工程研究所, 青岛 266109; ²山东省莱阳市畜牧兽医局, 烟台 265200)

摘要 该研究优化了山羊精原干细胞(goat spermatogonial stem cells, gSSCs)培养体系, 使山羊精原干细胞能在体外长期培养, 维持自我更新的能力并保持未分化状态。取3~5月龄山羊睾丸, 采用两步酶消化结合差速贴壁方法得到山羊精原干细胞悬液, 分别通过形态学观察、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)染色、特异基因表达及蛋白质水平的分析对培养的细胞进行鉴定; 并以山羊睾丸支持细胞(goat sertoli cells, gSCs)、小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)和层黏连蛋白(laminin, L)为饲养层, 观察饲养层对山羊精原干细胞体外增殖的影响。结果表明, 山羊精原干细胞体外增殖形成克隆簇, AKP染色呈阳性。经RT-PCR检测, *Oct-4*、*C-myc*、*CyclinD1*、*Ngn3*和*TERT*等干细胞特异基因均有表达。细胞免疫组化结果显示, *Oct-4*、SSEA-1、 $\alpha 6$ -integrin、Vasa和Thy-1蛋白质呈阳性。克隆簇统计显示, 在山羊睾丸支持细胞上形成的山羊精原干细胞(goat spermatogonial stem cells, gSSCs)克隆数与其他两组比较差异显著($P < 0.05$)。山羊睾丸支持细胞饲养层上的精原干细胞可在体外传3~4代, 培养时间为2个月。结果证明, 通过两步酶消化和差速贴壁法可以分离获得山羊精原干细胞, 且山羊睾丸支持细胞能够促进gSSCs的增殖。

关键词 山羊; 精原干细胞; 睾丸支持细胞; 饲养层

Advanced Study in Enrichment and Identification of Spermatogonial Stem Cells from Goat Testis

Zhang Qinkai¹, Jiang Ying¹, Wang Mingming¹, Dong Huansheng¹, Wei Yujie², Pan Qingjie^{1*}¹Institute of Animal Reproductive Development and Genetic Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;²Shandong Laiyang Animal Husbandry Bureau, Laiyang 265200, China)

Abstract This study developed an optimized stem cell culture method. With this method goat spermatogonial stem cells (gSSCs) can be efficiently isolated and cultured *in vitro* for a long time to maintain self-renewal and remain undifferentiated state. Single gSSC suspension was obtained from testis of 3-5 month old goat by two-step enzymatic digestion and differential adhesion. The gSSCs were identified by morphology observation, alkaline phosphatase (AKP) staining and cell immunohistochemistry. The gSSCs were co-cultured with the feeder layer of goat sertoli cells (gSCs), mouse embryonic fibroblast (MEFs) and laminin. The results showed that gSSC colonies were formed *in vitro*, and were positive AKP staining. The gene expressions of *Oct-4*, *C-myc*, *CyclinD1*, *Ngn3* and

收稿日期: 2016-03-17 接受日期: 2016-05-20

国家转基因新品种培育重大专项(批准号: 2011zx08008-003)和山东省现代农业产业技术体系羊产业创新团队项目(批准号: 621231)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0532-86080759, E-mail: qjpan@126.com

Received: March 17, 2016 Accepted: May 20, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.2011zx08008-003) and Modern Agricultural Industry Technology System of Sheep Industry Innovation Foundation of Shandong Province (Grant No.621231)

*Corresponding author. Tel: +86-532-86080759, E-mail: qjpan@126.com

网络出版时间: 2016-08-01 16:25:34

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160801.1625.020.html>

TERT were identified by RT-PCR in gSSCs. The protein levels of Oct-4, SSEA-1, $\alpha 6$ -integrin were also identified by immunohistochemistry staining. According to statistics of gSSCs colonies, the results showed that the number of colonies on sertoli cell feeder layer was more than on the other two feeder layer, and the difference was significant ($P < 0.05$). The gSSCs were cultured for 3-4 generations as well as 2 months *in vitro* on sertoli cell feeder layer. All the above showed that the gSSCs can be obtained by the methods of two-step enzyme digestion and differential attachment, and the cells can be well cultured *in vitro* for proliferation on the feeder layer of sertoli cell.

Keywords goat; spermatogonial stem cells; sertoli cells; feed layer

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是精子发生和雄性生育能力的基础,在睾丸中,SSCs数量很少,仅占生殖细胞总量的0.03%^[1]。SSCs具有自我更新和向精子分化的能力,这种能力能伴随着雄性动物一生,保证了雄性动物正常的生育能力^[2-3]。精原细胞分为A型精原细胞和B型精原细胞,而A型精原细胞又分成未分化的As、Apr、Aal型精原细胞和分化的A1、A2、A3、A4型精原细胞。目前,把As型精原细胞称为真正意义上的SSCs^[4]。分离精原干细胞的方法主要有两步酶消化、差速贴壁法、Percoll密度梯度离心法、隐睾手术富集法、免疫磁珠分离法和流式细胞分选法^[5-10]。相对于其他方法,免疫磁珠分离法和流式细胞分选法需要较高的实验室条件,在家畜上的研究应用较少。

饲养层细胞对SSCs的培养起到了重要作用,SSCs在无饲养层的培养条件下存活不超过1周^[11],这是因为饲养层细胞能分泌多种细胞因子,促进SSCs的自我更新和维持未分化状态,为SSCs体外生长提供良好的微环境。研究结果显示,常用的饲养层细胞有小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)、抗硫代鸟嘌呤和乌本苷的SIM小鼠成纤维细胞亚系(STO)、人类子宫颈上皮癌细胞(HeLa)、小鼠睾丸支持细胞(sertoli cells)等,近年来的研究报道利用层黏连蛋白代替饲养层细胞同样可以实现SSCs的体外增殖^[12]。

精原干细胞通过分化产生精子,在治疗男性不育症方面具有很高的临床应用价值。2003年, Kanatsu团队^[13]成功地在体外长期培养SSCs,并通过生殖细胞移植技术使不育小鼠产生后代,这为精原干细胞治疗雄性不育带来了可能。SSCs内含有全部的雄性遗传信息,通过分化、受精传递给后代,但睾丸中SSCs的数量极少,严重阻碍了遗传性疾病的治疗及利用精子载体法转基因的研究进程。因此,发展SSCs体外培养系统、体外获得大量的SSCs具有重

要意义。山羊因为具有繁殖能力强、疫病较少、适应性强、易于饲养、产奶量高等特点被用做生物反应器生产药用蛋白质。研究山羊SSCs体外增殖,完善山羊SSCs体外培养系统,对生物医学的研究和生物制药业有重要的意义。目前,山羊SSCs的研究还处于分离和培养的初步阶段,通过提高体外培养的山羊SSCs的数量和纯度,结合精原干细胞介导法和gSSCs移植技术,能为治疗雄性不育和制备转基因动物提供新的途径^[14]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 3~5月龄崂山奶山羊购自青岛奥特羊场,取一侧睾丸(带阴囊),75%酒精消毒30 s后生理盐水冲洗3~4次,放入37 °C含双抗的无菌PBS中,1~2 h内带回实验室。

1.1.2 主要实验耗材及仪器 DMEM/F12培养基、丙酮酸钠、非必需氨基酸、胰蛋白酶、青链霉素溶液均购于Hyclone公司;层黏连蛋白、胶原酶IV、透明质酸酶、Hoechst均购自Sigma公司;DNase I、PCR引物均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;明胶购自Amresco公司;丝裂霉素C、4%多聚甲醛、胎牛血清购自Gibco公司;碱性磷酸酶染色试剂盒购自Millipore公司;一抗均购自Abcam公司;二抗购自中山金桥生物技术有限公司。CO₂培养箱购自日本SANYO公司;荧光倒置显微镜及显微图像分析系统购自日本Olympus公司(XI-41);体视显微镜购自日本Nikon公司(SMZ-1000);PCR仪购自美国MJ公司。

1.1.3 培养基 SSC培养基、睾丸支持细胞培养基、MEF培养基都是以DMEM/F12为基础培养基,添加10% FBS、1%青链霉素混合液、1%非必需氨基酸、1%丙酮酸钠混合液。

1.2 方法

1.2.1 SC饲养层的制备 在本实验室已建立的山

羊睾丸支持细胞分离培养平台^[15]的基础上, 将传至第3代生长稳定的支持细胞用于制作饲养层。当细胞增殖至70%~80%后, 用含10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丝裂霉素C的培养液于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱处理2 h。收集细胞, 重新接种在经明胶包被的6孔板上。培养箱中过夜, 贴壁后作为饲养层。

1.2.2 MEF饲养层的制备 取12.5 d的胎鼠去除内脏和四肢, 胰蛋白酶消化分离MEF, 细胞培养传至3~4代后可用于制备饲养层。细胞用10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丝裂霉素C处理MEF细胞, 2~3 h后PBS冲洗5次, 用0.25%胰蛋白酶消化2 min后终止消化, 离心, 将细胞接种于0.1%明胶涂层的6孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12 h。当MEF细胞铺满培养皿底部的90%时可进行1:2传代。传2~3代后可用于饲养层的制备。饲养层需提前1 d准备^[16]。

1.2.3 睾丸单细胞悬液的制备 剪除白膜, 露出实质, 用镊子仔细挑取曲细精管, DMEM/F12培养基洗2次后加入5倍体积37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的4 mg/mL 胶原酶IV与0.2%透明质酸酶混合消化液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养消化20~30 min后加入等体积DMEM/F12, 1 200 r/min离心5 min。弃上清后加入5倍体积37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase I与0.25%胰蛋白酶混合消化液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱消化10~15 min, 然后加入等体积含血清的细胞培养液, 终止反应。依次过80目、150目和300目细胞筛, 得到山羊睾丸单细胞悬液。

1.2.4 睾丸SSCs的纯化 通过两步差速贴壁获得纯化的精原干细胞, 将得到的睾丸细胞悬液在经明胶包被的6 cm培养皿中培养2 h, 吸取未贴壁的细胞悬液。将吸取的细胞悬液转移到包被有层黏连蛋白的

培养皿(层黏连蛋白在6 cm培养皿上于37 $^{\circ}\text{C}$ 包被1 h)上培养40 min, 轻柔地弃去上清液。将贴壁的精原干细胞过夜培养后用胰蛋白酶消化下来, 1 200 r/min离心5 min后弃上清, 得到精原干细胞离心产物。

1.2.5 gSSCs与饲养层共培养 将得到的精原干细胞离心产物重悬, 调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 分别加到山羊睾丸支持细胞饲养层组、小鼠MEF饲养层组和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 层黏连蛋白包被的培养皿组中, 每组3 mL。以DMEM/F12为基础培养基的培养液培养, 2~3 d换液1次, 当形成的集落数占培养皿的80%左右时, 轻轻吹打离散细胞后, 按1:2接种至新鲜饲养层上进行传代培养。

1.3 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)检测

在支持细胞上培养10~15 d形成克隆的精原干细胞吸去培养液, PBS清洗1遍。加入4%多聚甲醛固定细胞1~2 min。在6 cm培养皿中加1.5 mL AKP染液, 室温避光染色15 min。观察染色情况。在MEF饲养层上培养10~15 d的精原干细胞AKP检测方法相同。

1.4 反转录PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)检测

提取培养精原干细胞总RNA, 将得到的RNA溶液反转录成cDNA, PCR引物参照Zhu等^[17]所设计的引物, 以 $\beta\text{-actin}$ 基因为内参照, PCR产物于1%琼脂糖凝胶电泳, 引物序列见表1。反应总体系为25 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min; 按不同引物的退火温度退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸60 s, 进行40个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min后降到4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 细胞免疫组化

收集20 d左右精原干细胞, 4%多聚甲醛室温固

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Primers used for RT-PCR

基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)	退火温度($^{\circ}\text{C}$)	参考序列
Gene	Sequences of primers (5'→3')	Products (bp)	T _m ($^{\circ}\text{C}$)	Reference sequences
<i>Oct-4</i>	F: GAA GCT GGA CAA GGA GAA GCT R: CAT GCT CTC CAG GTT GCC TC	247	54	NM_013633.2
$\beta\text{-actin}$	F: GCG GCA TCC ACG AAA CTA C R: TGA TCT CCT TCT GCA TCC TGT C	138	58	NM_001101.3
<i>CyclinD1</i>	F: TGA ACT ACC TGG ACC GCT R: CAG GTT CCA CTT GAG YTT GT	212	50	NM_053056.2
<i>C-myc</i>	F: CTG GTG GGC GAG ATC ATC A R: CAC TGC CAT GAA TGA TGT TCC	304	54	NM_001177354.1
<i>TERT</i>	F: GTG TGC TGC AGC TCC CAT TTC R: GCT GCG TCT GGG CTG TCC	264	58	NM_001193376.1
<i>Ngn3</i>	F: GCG AGT TGG CAC TGA GCA R: AAG CTG TGG TCC GCT ATG C	220	58	NM_020999.3

定 15 min; 0.5% Triton X-100 PBST 透化 10 min; 加入含 10% 山羊血清的 PBS, 室温封闭 30~60 min。吸去封闭液, 分别加一抗为 Oct-4、 $\alpha 6$ -integrin、Vasa、Thy-1 和 SSEA-1 的兔多克隆抗体 (1:200 稀释), 4 °C 过夜, PBS 洗涤后加入 1:200 稀释后的二抗 (羊抗兔 IgG), 37 °C 避光孵育 1 h。避光, 用 PBS 洗涤后加入 Hoechst 染液, 室温避光放置 5 min。用荧光倒置显微镜及显微图像分析系统观察并照相。

1.6 数据分析

对不同饲养层上形成的精原干细胞克隆簇进行统计, 统计细胞数大于 6 个的集落数目, 分别在培养的 5、10、15 d 进行克隆数统计, 实验重复 3 次, 并通过 SPSS 软件进行统计学分析, 据此统计数精原干细胞在不同饲养层上的差异。

2 结果

2.1 山羊精原干细胞生长特征

实验发现, 在羊睾丸支持细胞上培养的精原干细胞在开始培养的 1~2 d 内, 有大约 30% 的细胞脱落丢失, 部分细胞依附于在饲养层上, 形成二连体或四连体, 细胞饱满成圆形, 折光性强; 从第 5 d 开始细胞数量开始增加, 第 10 d 可观察到增殖的精原干细胞形成由四到几十个不等的细胞组成的葡萄串珠样集落; 第 15 d 时, 精原干细胞数量成倍增长。第 20 d

时, 周围形成的葡萄串珠样克隆簇聚集形成一个较大的克隆簇群 (图 1A~图 1D)。

山羊精原干细胞在 MEF 饲养层和层黏连蛋白上共培养 5 d 后有部分形成葡萄球串珠样集落 (图 1E 和图 1F)。随着培养时间的延长, MEF 饲养层的上集落数量有一定的增加, 成鸟巢样, 而层黏连蛋白含量下降。

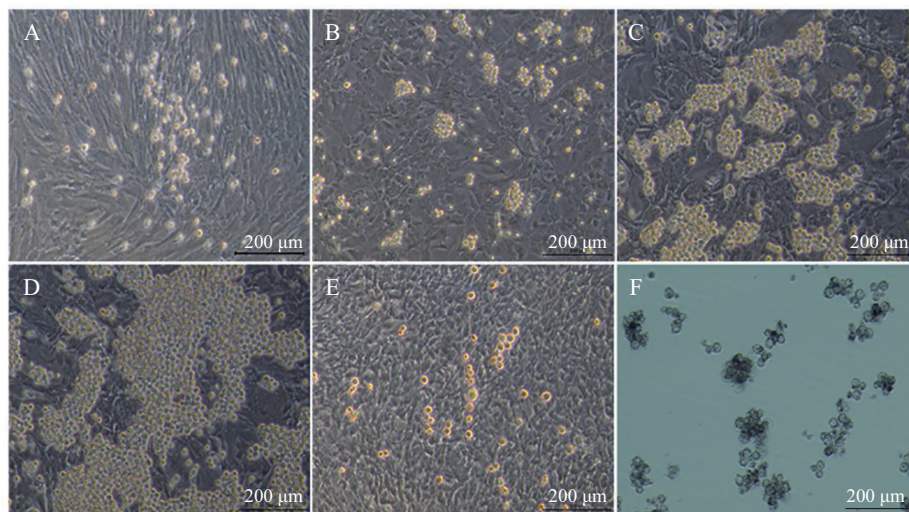
当细胞数量占满培养皿的 80% 左右时, 通过机械吹打的方法将精原干细胞吹打下来, 铺在新的饲养层上进行传代。在本实验中, 精原干细胞可以在羊睾丸支持细胞饲养层培养体系中传 3~4 代, 体外培养时间长达 2 个月。

2.2 山羊精原干细胞的鉴定

培养 20 d 后的 SSCs 经 AKP 染色, 结果显示, 精原干细胞克隆簇呈深紫色 (图 2A 和图 2B), 而饲养层细胞未被染色。经 RT-PCR 检测, *Oct-4*、*C-myc*、*TERT*、*CyclinD1* 和 *Ngn3* 基因在 SSCs 中均有表达 (图 3)。细胞免疫荧光检测发现, *Oct-4*、Vasa、Thy-1、SSEA-1、 $\alpha 6$ -integrin 这五种蛋白质在 SSCs 中呈阳性 (图 4)。

2.3 三种饲养层对山羊 SSCs 增殖的影响

分别统计了第 5、10、15 d 时三种饲养层上 gSSCs 的克隆簇数。在培养前 10 d 时, 羊睾丸支持细胞和小鼠 MEF 饲养层上形成的克隆簇数差异

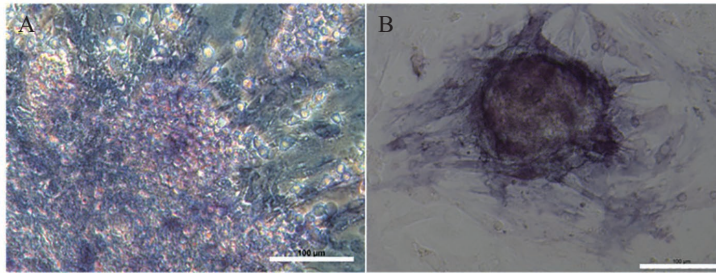


A~D: 分别表示 SSCs 体外培养 5、10、15、20 d 的形态; E: SSCs 在小鼠 MEF 上培养 5 d 的结果; F: SSCs 在层黏连蛋白处理的培养皿中培养的第 5 d。标尺=200 μ m。

A~D: the shapes of goat spermatogonial stem cells (SSCs) co-cultured with sertoli cells in the day 5, day 10, day 15 and day 20. E: the shapes of goat spermatogonial stem cells (SSCs) co-cultured with MEF in the 5 day. F: the shapes of goat spermatogonial stem cells (SSCs) cultured in laminin coated dishes in the day 5. Scale bars=200 μ m.

图1 精原干细胞的体外培养

Fig.1 The goat spermatogonial stem cells cultured *in vitro*



A: 在山羊睾丸支持细胞上培养的葡萄球串珠样山羊精原干细胞克隆簇AKP阳性; B: 在小鼠MEF饲养层上培养的鸟巢样山羊精原干细胞克隆簇AKP阳性; 标尺=100 μm。

A: cultured grape-like gSSCs positively stained with AKP on the feeder of sertoli cells; B: bird-nest-like colony positively stained with AKP on the MEF-feeder. Scale bars=100 μm.

图2 精原干细胞的碱性磷酸酶染色

Fig.2 The alkaline phosphatase staining of spermatogonial stem cells cultured *in vitro*

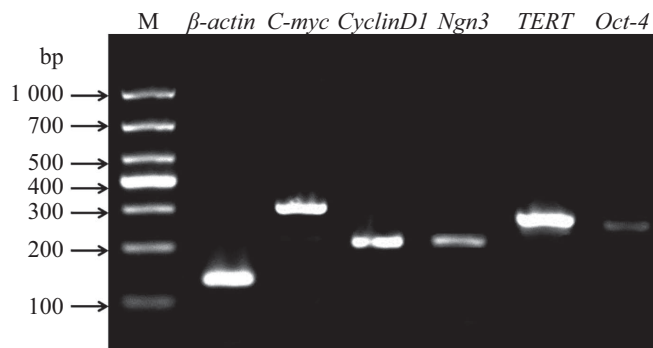


图3 精原干细胞各基因的RT-PCR检测

Fig.3 The identification of the genes in spermatogonial stem cells by RT-PCR

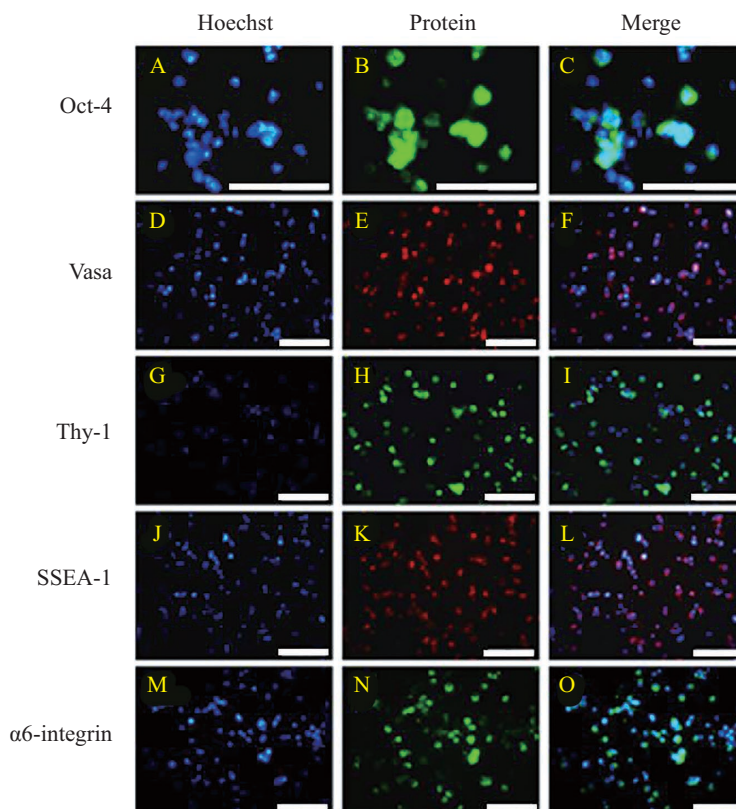
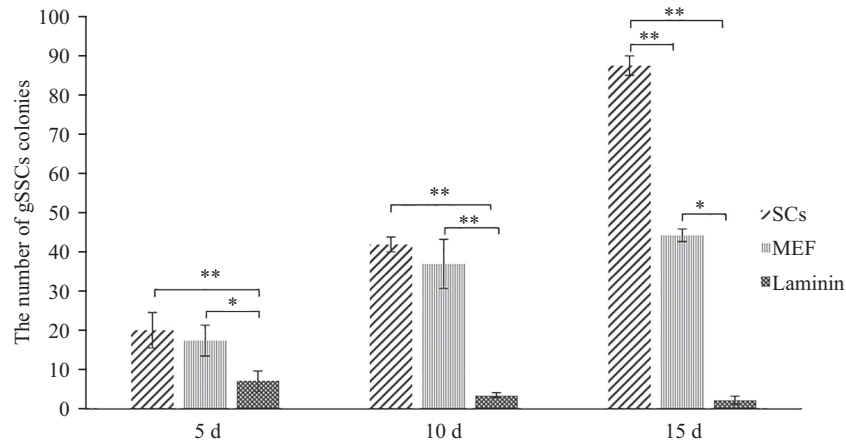


图4 精原干细胞的免疫荧光检测(标尺=100 μm)

Fig.4 The immunofluorescence detection of spermatogonial stem cells (scale bars=100 μm)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 山羊精原干细胞在三种饲养层上形成的克隆簇数

Fig.5 The number of gSSCs colonies in three different kinds of feeder layer

不明显($P > 0.05$)。在培养第15 d时,以山羊睾丸支持细胞和以小鼠MEF细胞为饲养层的gSSCs形成的克隆簇数差异显著($P < 0.05$)。不论是在第5 d、10 d还是第15 d,在层黏连蛋白饲养层上培养的gSSCs形成的克隆簇数都少于其他两种饲养层,且差异显著($P < 0.05$)。山羊睾丸支持细胞和小鼠MEF饲养层在培养前10 d时对gSSCs克隆簇的形成影响不明显,在第15 d时差异显著,且这两种饲养层都好于层黏连蛋白饲养层(图5)。

3 讨论

RT-PCR结果显示,我们培养的gSSCs均能够表达干细胞特异的多能性基因,同时也表达生殖细胞特异基因。通过细胞免疫组化进一步确认Oct-4、Vasa、Thy-1、SSEA-1、 $\alpha 6$ -integrin的表达,证明SSCs具有多功能性并保持自我更新的能力。

饲养层细胞对SSCs的培养非常重要,SSCs在无饲养层条件下生存不超过1周。体外长期培养体系都以小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)或抗硫代鸟嘌呤和乌本苷的SIM小鼠成纤维细胞亚系(STO)作为饲养层细胞,能促进SSCs增殖并维持未分化的二倍体状态和全能性。但MEF细胞作为原代培养细胞在体外的增殖能力差,随着传代次数增加,其支持SSCs细胞生长能力下降,需要不断地制备原代MEF细胞来补充。Kanatsu-Shinohara等^[12]用层黏连蛋白包被的培养皿替代饲养层细胞培养SSC细胞获得成功,但这些研究都是建立在小鼠的研究基础上,在家畜中还很少有人研究。

我们利用山羊自身的睾丸支持细胞来培养gSSCs,克服了异种动物饲养层出现免疫排斥的可能。在培养的第15 d开始,gSSCs在睾丸支持细胞饲养层上形成的克隆簇数比MEF饲养层和层黏连蛋白培养皿上多,差异显著($P < 0.05$)。这说明,支持细胞对gSSCs体外扩增具有促进作用。对第20 d左右的克隆簇AKP染色显示,大部分还保持这干细胞特性,而基因及蛋白的检测也表明gSSCs仍能维持未分化的状态。通过体外长期培养观察,我们建立的体系能使gSSCs在体外培养长达3个月。这为通过精原干细胞介导法制备转基因山羊提供了可能。

细胞因子对gSSCs的生长有重要作用。研究发现,人和小鼠能通过胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)维持SSCs的自我更新和处于未分化的状态^[18]。山羊睾丸支持细胞能分泌GDNF,并且与gSSCs共培养能模拟真实的睾丸微环境。在培养的前5 d,支持细胞贴壁速度快,二连体及四连体的形成时间和数量都早于MEF饲养层和层黏连蛋白。MEF饲养层早期也能促进gSSCs的贴壁,但随着培养时间的延长,gSSCs克隆簇数量增长不明显,这可能是由于MEF细胞分泌的主要细胞因子是白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF),而不是GDNF。

本研究还统一应用了含10%胎牛血清的培养液。这个浓度可应用在山羊睾丸支持细胞、MEF和gSSCs的培养中,解决了因血清浓度和培养液条件不同对共培养体系的不利影响。简化了精原干细胞的培养方法,缩短了精原干细胞分离时间。gSSCs在

体外长期增殖, 为后续精原干细胞的研究提供了数量上的保障, 进而为制备转基因动物和治疗雄性不育提供了基础。

参考文献 (References)

- 1 Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; 290(2): 193-200.
- 2 Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Andro* 2000; 21(6): 776-98.
- 3 Meachem S, von Schonfeldt V, Schlatt S. Spermatogonia stem cells with a great perspective. *Reproduction* 2001; 121(6): 825-34.
- 4 de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2001; 121(121): 347-54.
- 5 Kokkinaki M, lee TL, He Z, Jiang J, Golestaneh N, Hofmann MC, *et al.* The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod* 2009; 80(4): 707-17.
- 6 Meistrich ML. Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell Biol* 1977; 15(15): 15-54.
- 7 Koh KB, Komiyama M, Toyama Y, Adachi T, Mori C. Percoll fractionation of adult mouse spermatogonia improves germ cell transplantation. *Asian J Androl* 2004; 6(2): 93-8.
- 8 Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models. *Develop Biol* 2000; 220(2): 401-11.
- 9 Owen CS, Sykes NL. Magnetic labeling and cell sorting. *J Immunol Methods* 1984; 73(1): 41-8.
- 10 Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(15): 8346-51.
- 11 Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell* 1998; 30(4): 389-97.
- 12 Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol Reprod* 2005; 72(4): 985-91.
- 13 Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 612-6.
- 14 Honaramooz A, Behboodi E, Hausler CL, Blash S, Mengee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. *Mol Reprod Dev* 2003; 64(4): 422-8.
- 15 姜颖, 潘庆杰, 张钦恺, 李岩, 徐君君. 山羊睾丸支持细胞的分离培养及鉴定. *中国畜牧杂志*(Jiang Ying, Pan Qingjie, Zhang Qinkai, Li Yan, Xu Junjun. Separation, culture and identification of goat sertoli cells. *Animal Science and Biotechnology*) 2014; 21: 23-6.
- 16 Richards M, Fong C, Chan W, Wong P, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20(9): 933-6.
- 17 Wu J, Song W, Zhu H, Niu Z, Mu H, Lei A, *et al.* Enrichment and characterization of Thy1-positive male germline stem cells (mGSCs) from dairy goat (*Capra hircus*) testis using magnetic microbeads. *Theriogenology* 2013; 80(9): 1052-60.
- 18 Wu X, Schmidt JA, Avarbock MR, Tobias JW, Carlson CA, Kolon TF, *et al.* Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(51): 21672-7.