

精原干细胞技术研究进展

朱文倩 姜禹 蔡宁宁 杨蕊 张学明*

(吉林大学动物医学学院, 动物胚胎工程吉林省重点实验室, 长春 130062)

摘要 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是位于睾丸曲细精管基膜上能自我更新和连续分化产生精子的最原始精原细胞, 是雄性体内唯一能将遗传信息自然传至于代并可终生复制的双倍体细胞, 对复杂的精子发生过程有着至关重要的作用。作为一个未分化细胞群体, SSCs在精子生成和物种进化所必需的基因传递中发挥作用。基于课题组多年的研究, 该文较系统地评述了SSCs的生物学特性、分离富集、体外培养影响因素和移植技术等方面的进展, 以期对雄性辅助生殖、细胞再生治疗、畜牧业生产等研究应用提供借鉴。

关键词 精原干细胞; 自我更新; 分化; 体外培养; 移植

Advances in the Research of Spermatogonial Stem Cell Techniques

ZHU Wenqian, JIANG Yu, CAI Ningning, YANG Rui, ZHANG Xueming*

(Key Laboratory of Animal Embryo Engineering of Jilin Province, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract SSCs (spermatogonial stem cells) are the most primitive spermatogonial cells located on the basement membrane of the seminiferous tubules in the testis, which can self-renew and differentiate continuously to produce sperm. SSCs are the only replicable diploid cells which can transfer genetic information into offspring naturally in male body throughout life. They play an important role in the complex spermatogenesis process. As an undifferentiated cell population, SSCs have the role of gene transfer necessary for the generation of male gametes and species evolution. Based on our previous research, the biological characteristics, isolation and enrichment, factors affecting *in vitro* culture and transplantation technology of SSCs are systematically reviewed, which has theoretical significance for the research and application of male assisted reproduction, cell regeneration therapy as well as animal husbandry production.

Keywords spermatogonial stem cells; self-renewal; differentiation; culture *in vitro*; transplantation

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是位于睾丸曲细精管基膜上能够自我更新和连续分化产生精子的最原始精原细胞, 具有独特的生物学特征。有关SSCs的研究最初是以啮齿类动物为实验对象, 现已经扩展到猪、牛等家畜以及灵长类动物和人。

这些研究对于深刻阐明生精机制, 促进生殖生物学在医学和畜牧业方面的应用意义深远; 同时, 也为保护濒危稀有物种、培养优良畜种提供了潜在有效途径。本文结合我们多年来关于小鼠和牛等动物未分化精原细胞的研究, 评述了SSCs近期的技术进展。

收稿日期: 2019-06-18 接受日期: 2019-09-03

国家自然科学基金(批准号: 31872434)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0431-87836187, E-mail: zhangxuemi@jlu.edu.cn

Received: June 18, 2019 Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31872434)

*Corresponding author. Tel: +86-431-87836187, E-mail: zhangxuemi@jlu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5187>

1 SSCs的生物学特性

原始生殖细胞迁移至睾丸曲细精管后, 在支持细胞的作用下发育为仍具有干细胞潜能的生精母细胞, 进而演变为SSCs。SSCs与其他成体干细胞一样, 其自我更新与分化能力的维持和生存所需物质的提供是由干细胞微环境完成的。睾丸支持细胞、管周肌样细胞和间质细胞对SSCs赖以生存的微环境起到了重要的维持作用。其中, 支持细胞分泌的多种重要因子, 包括神经胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、碱性成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、维甲酸等与SSCs的自我更新与分化调节有密切关系。在 小鼠中, 精原细胞一般分为A型、B型及处于两者过渡期的中间型。随着研究的深入, 更多的精原细胞亚型被发现。根据形态学特征, 可将其细分为 A_{single} 、 A_{paired} 和 A_{aligned} 等亚群。但高等灵长动物精原细胞根据其核形态和苏木素染色分为 A_{dark} 型和 A_{pale} 型^[1]。通常精原细胞胞质密度较低, 具有1~2个不规则的染色较深的核仁, 细胞核呈卵圆形, 有较大的泡状核。HARA等^[2]认为, 所有的 A_{single} 型、 A_{paired} 型和 A_{aligned} 型精原细胞都具有干细胞潜能, 可通过对称性分裂和精原细胞链的断裂实现干细胞的自我更新。目前, 多数学者认为, A_{single} 精原细胞是真正的SSCs。基于SSCs分子标记鉴定的研究, SUN等^[3]则提出了SSCs的层级假设, 即 A_{single} 精原细胞中只有部

分具有长期自我更新的潜力, 另一部分的自我更新能力是有限的。

与形态学特征相比, 从mRNA、蛋白质和表观遗传等水平对SSCs进行分子特性检测鉴定更加明确。SSCs一般表达种系标记物、干细胞标记物等信号。近年来, 根据其保守标记分子, 我们证实了PLZF(promyelocytic leukemia zinc finger)、GFR α 1(GDNF family receptor α 1)在牛生精母细胞中的表达, 进而从冷冻保存的牛睾丸组织中分离富集了这些细胞(含SSCs)并进行了初步培养(图1)^[4]。虽然根据表面标记特征识别SSCs的方法已经被广泛用于SSCs的表征和分选, 但家畜SSCs及其他生精细胞亚型的鉴定、分离富集和培养仍较为困难(表1)^[5]。

2 SSCs的分离富集

一般动物胎儿期或性成熟前更适宜用来分离SSCs。成年小鼠睾丸中, 在 1×10^8 个睾丸细胞中仅有 3.5×10^4 个细胞可能是SSCs^[26]。因此, 将睾丸中数量极少、比例极低的SSCs分离和富集是进行体外培养、移植的首要步骤, 这也对SSCs的分离和纯化技术提出了更高的要求。SSCs的体外分离技术正在不断发展和完善, 一般采用两步酶消化法。将透明质酸酶和DNase1相结合, 降低细胞之间的黏附效应, 可获得解离效果好、活力高的细胞悬液^[27]。采用两步酶消化法所获生精上皮单细胞悬液中细胞的活力

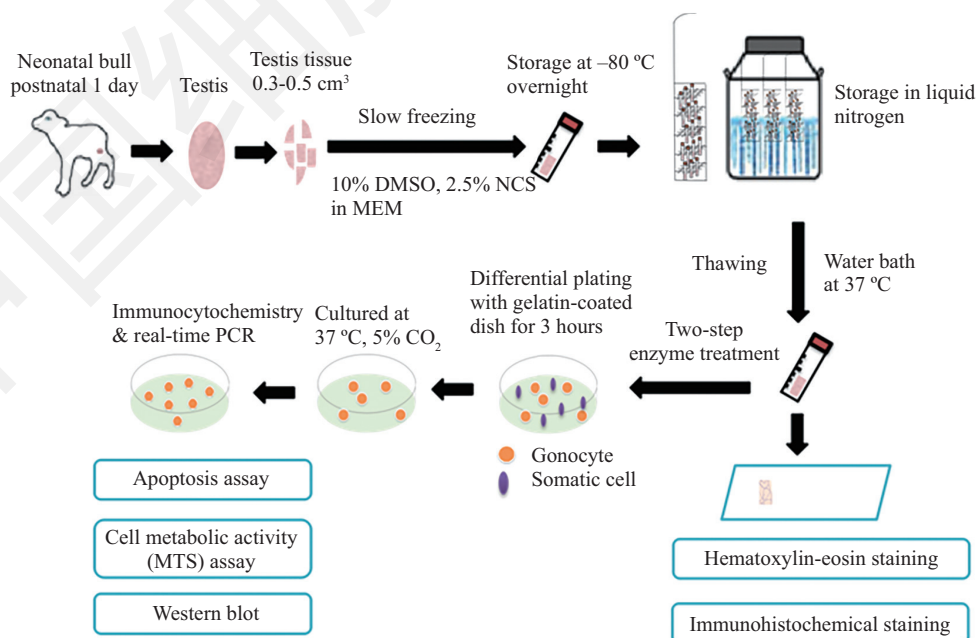


图1 冷冻保存新生牛睾丸生精母细胞的富集和培养(根据参考文献[4]修改)

Fig.1 Gonocyte enrichment and culture from cryopreserved neonatal bull testis (modified from reference [4])

表1 哺乳类动物未分化精原细胞的标记分子
Table 1 Molecular markers of the undifferentiated spermatogonia in mammals

分子标记 Molecular markers	哺乳类动物种属 Mammals species						
	人 Human	猪 Pig	小鼠 Mouse	山羊 Goat	绵羊 Sheep	猴 Monkey	牛 Cattle
GFR α 1	+[6]	+[7]	+[8]	ND	ND	+[9]	+[4]
PLZF/ZBTB16	+[10]	+[11]	+[12]	ND	+[13]	ND	+[4]
UCHL1(PGP9.5)	ND	+[7]	+[14]	+[15]	+[16]	ND	+[17]
ITGA6	+[18]	ND	+[9]	ND	ND	+[9]	+[19]
THY1(CD90)	ND	ND	+[20]	+[21]	ND	ND	ND
LIN28	ND	ND	+[22]	ND	ND	+[23]	ND
GPR125	+[24]	ND	+[25]	ND	ND	ND	ND

+: 蛋白在精原细胞表达; ND: 未确定。

+: expression of the protein in undifferentiated spermatogonia; ND: not determined.

和密度有较高的重复性,因此这种既经济又易操作的技术已经成为SSCs分离的主要方法。

分离后的SSCs通常需要借助物理或免疫学等方法完成体外纯化和富集。目前,用于SSCs的纯化方法主要有差异贴壁法、Percoll密度梯度离心法、流式细胞分选法(fluorescence activated cell sorting, FACS)、免疫磁珠分选法(magnetic activated cell sorting, MACS)等。差异贴壁法基于简单易操作、成本低廉的优势,被广泛应用于SSCs的分离富集。GIASSETTI等^[28]基于种间分子标记ITGA6、GFR α 1、CXCR4和THY1的表达,在不用层黏连蛋白处理培养瓶/皿的条件下,利用此法有效富集了牛SSCs。Percoll梯度离心是根据细胞密度的不同分离SSCs的,对SSCs的活力和形态完整性损伤较小。HEIDARI等^[29]利用不连续Percoll梯度离心法分离山羊SSCs,经检测分析,在32%梯度处获得的A型精原细胞纯化率高达94.60%。FACS法和MACS法都是基于分子标记的富集方法,在哺乳动物精原细胞的富集、纯化方面的应用越来越普遍。KIM等^[30]采用FACS富集到了猕猴的SSCs。不同方法的结合使用,更适于细胞分选。Percoll梯度离心结合FACS法能更准确地表征性成熟前牛生精细胞^[17]。MARCELO等^[31]用MACS法富集得到了由CXCR4标记的性成熟前牛精原细胞;KANATSU-SHINOHARA等^[32]通过MACS分选法,发现在小鼠生殖干细胞(gemline stem cells, GSCs)表达的上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EPCAM)可被用于标记SSCs,将EPCAM与GSCs的另一标记分子CD9结合,显示

CD9^{High}EPCAM^{Low}的细胞群体显著提高了SSCs的纯化效率(48.7倍)。此外,采用GSCs的表面分子黑色素瘤细胞黏附分子(melanin cell adhesion molecules, MCAM)标记包括KIT⁺分化群体在内的功能性精原细胞,可获得2.3倍以上富集度的SSCs。结合以上几种分子标记,可使CD9^{High}EPCAM^{Low}KIT⁺-MCAM细胞群中的功能性精原细胞密度提高560.6倍,其中SSCs所占比例高达1/6^[33]。

3 SSCs体外培养的影响因素

随着对SSCs生物学特性的深入研究,不同种系动物SSCs的体外长期培养已成为可能。建立合适的培养体系,是实现SSCs体外培养的先决条件。KANATSU-SHINOHARA等^[34]利用表皮生长因子、白血病抑制因子、FGF2、GDNF和丝裂霉素C处理的小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层细胞,可使来自幼鼠的培养后睾丸细胞在不育受体小鼠中定殖后形成葡萄串状细胞团块,并以对数生长趋势增殖超过4个月。此外,以上研究还表明,从培养的雄性生殖细胞前体所获的单倍体生殖细胞可以产生后代,表明所培养的细胞具有一定的SSCs活性,因此这些细胞也被称为GSCs。在相似条件下,从其他小鼠品系也可培养获得GSCs。研究表明,小鼠的品系、年龄也会对SSCs的体外培养产生不同程度的影响。最近,OATLEY等^[35]研究了牛未分化精原细胞的培养条件,他们虽未观察到有类似于GSCs的细胞集落,但证明物种、培养基、培养温度和饲养层之间的选择和匹配对建立哺乳动物SSCs的稳定培养体系至为重要。

目前,在基础培养基方面,高糖DMEM和DMEM/F12在家畜SSCs的体外培养中应用最为广泛。PARK等^[36]在以高糖DMEM为基础制备的三维培养基中有效维持了猪SSCs的增殖能力。另处,针对小鼠SSCs的无血清培养体系也已经建立。RADE等^[37]在添加10%血清替代物的培养基中使3日龄小鼠睾丸组织中的SSCs增殖、分化,产生了精子细胞,但将无血清培养体系应用于大家畜SSCs的培养仍处于优化阶段。

细胞因子对SSCs的培养也非常重要。CSF1、WNT5A、WNT3A、WNT6、VEGFA、FGF2、FGF8、GDNF等均可影响SSCs的体外培养^[38]。其中,GDNF能增强SSCs的体外增殖。GDNF由支持细胞和管周肌样细胞分泌,SSCs的自我更新与其分泌剂量有密切关系。GDNF水平降低会导致生精细胞数量的减少,其过表达则会导致生精紊乱,即GDNF分泌不足会使精子发生异常,水平过高则会导致未分化精原细胞过度增殖^[39]。卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)是与GDNF通路有关的激素,影响SSCs自我更新并能维持其未分化状态。最新研究表明,在体外培养3月龄犬的SSCs时,添加FSH的培养体系可以促进细胞自我更新^[40]。FGF2是GSCs的支持因子,然而单独用GDNF或FGF2也可使GSCs在体外培养中扩增,这表明GDNF对于维持SSCs的增殖并非必需^[41]。但是,用FGF2或GDNF培养的精原细胞在形态、增殖状态和活性等方面是不同的。前者细胞在无双特异性有丝分裂原-激活蛋白激酶1活化的情况下可以存活和增殖,而后者则需要其活化。这提示,FGF2可能有不同于GDNF的信号通路促使SSCs存活和增殖。有研究者将FGF2/GDNF信号直接导入小鼠睾丸中,发现这2种因子均能诱导GFR α ¹⁺未分化精原细胞的过度增殖,但细胞集落形态不同^[42]。上述结果提示,FGF2在控制体内SSCs的更新与分化方面有不同于GDNF的作用。

4 SSCs移植技术

以前的研究多采用免疫染色和脉冲追踪标记等实验方法来鉴别SSCs,但无法区别真正的功能性SSCs。精原细胞(含SSCs)移植技术的建立是解决这一难题的突破性进展。研究者利用该技术将供体精原细胞移植到不育小鼠睾丸中,成功在受体的曲细精管中检测到供体基因型精子,为治疗雄性不育提

供了依据。SSCs移植的途径大都是将供体细胞引入受体睾丸的特定部位,被移植细胞存活后进行迁移、归巢,进而重建受体睾丸中的精子发生。现已在小鼠模型中设计了几种途径,包括将供体细胞引入睾丸输出小管、曲细精管以及输精管等,其中输出小管内移植效果较好。由于物种差异,在大型哺乳动物中通过输出小管并不能将供体细胞引入曲细精管,而睾丸网作为所有生精小管连接的中心区域,有利于供体精原细胞从管腔迁移到曲细精管基膜实现其在干细胞微环境中的锚定和增殖(定殖)^[43]。因此,在保持受体睾丸正常结构的同时,制备无内源性精原细胞的受体动物,对于SSCs移植至关重要^[44]。对于啮齿动物,除采用白消安(busulfan)腹腔注射法或局部睾丸辐射法使内源性生精细胞凋亡来制备不育受体外,还可利用Kit^w/Kit^{vy}小鼠作为不育模型。在Kit^w/Kit^{vy}不育小鼠中,其*c-Kit*基因突变、失活,导致原生殖细胞群发育受阻,而将供体精原细胞移入新生Kit^w/Kit^{vy}受体小鼠睾丸中可获最高移植效率,因此该小鼠被广泛用作SSCs移植的受体模型^[45]。移植后SSCs的定殖由受体睾丸中的支持细胞数量决定。在哺乳动物中,支持细胞在成年后不再增殖,其数量增加只在出生前和出生后的发育早期。因此,支持细胞数量的改变可以影响供体SSCs在受体中产生的生精集落的数量和大小^[46]。因此在支持细胞发育早期将供体SSCs移入受体动物睾丸中,能促进SSCs的增殖,这表明受体动物的年龄对SSCs的定殖效率和精子发生有一定影响。啮齿动物SSCs移植方法研究的进展,是建立大家畜相关技术的基础。在畜牧业生产育种中,实现SSCs移植的一个关键因素是建立支持SSCs长期体外扩增的合适环境。从供体家畜的睾丸组织中,依靠现有技术分离得到的SSCs的数量并不足以移植到受体动物睾丸中支持精子发生。因此,供体SSCs在移植前必须经过体外培养来实现细胞数量的扩增。

由于猪、牛等SSCs的体外培养条件和不育受体的制备等方面仍然存在许多问题,因此大家畜实现SSCs移植仍将是一个渐进的过程,尚需进一步探索。MIKKOLA等^[47]通过口服白消安来处理公猪受体,只能使其精子密度和数量减少,并不能有效消除其内源性SSCs。在后续研究中,人们发现SSCs移植技术还存在一些问题。首先,由于SSCs在睾丸细胞中所占比例很低,而且原代培养的精原细胞并不都

是SSCs, 因此移植效率低下; 而且, 目前通过形态学特征并不能准确区分SSCs和已分化精原细胞。换言之, 哺乳动物的SSCs在体外培养过程中所形成的细胞团簇并不都是未分化精原细胞。另外, 大多数的SSCs标记物并不完全是特异性的, 有些也可以在其他生精细胞亚型甚至是体细胞中表达, 所以异种移植后的细胞虽能定殖, 但是大部分并不具有重建精子发生的能力。因此, SSCs的鉴定还需要进一步筛选并使用适当的特异性分子标记, 最好能结合多参数特征来加以评估。此外有研究表明, 将仅含有生精细胞的新生仔猪睾丸组织移植入裸鼠的背部皮下, 可产生形态正常的精子, 再将其注射到体外成熟的猪卵母细胞, 即可受精并产生后代^[48]。应用气-液相间界面睾丸组织培养技术, 也能成功诱导来自幼龄小鼠曲细精管的精子发生, 进而通过精子细胞注射和卵子胞质内单精显微注射受精获得可育后代^[49]。体外精子发生技术和睾丸组织异种移植技术已成为解决上述问题极具吸引力的方法。

5 结语和展望

综上所述, 我们认为, SSCs自我更新与分化间的平衡是建立在其所处的干细胞微环境结构及细胞因子作用的基础上的。尽管单因子或分子对SSCs的调控还存在许多不确定作用, 但是并不妨碍利用目前所掌握的信息对SSCs进行分离、富集及更深入的机制和应用研究。目前, 小鼠等模式动物SSCs的体外培养和移植技术已经趋于成熟, 但对猪、牛等大家畜SSCs的特定培养和移植方法仍处于探索阶段。组织培养能在体外最大限度地还原SSCs的微环境, 维持生殖细胞的空间排列和相互作用, 因此比精原细胞培养具有更高的生精潜力。在培养过程中采取少量的组织即能克服细胞因缺血性应激效应而发生的凋亡和坏死作用, 因此建立无血清、成分确定的睾丸组织培养体系, 诱导体外精子发生, 可能有助于解决SSCs体外培养的部分问题, 从而实现大家畜SSCs的长期培养。

鉴于其独特的生物学特征, SSCs具有非常广阔的研究前景。目前, 有关哺乳动物SSCs的研究范围在不断扩展的同时也取得了大量的研究成果, 有望在今后的临床医学和畜牧业生产等方面提供更多的借鉴。掌握SSCs的生物学特性, 建立高效的分离、纯化和富集方法, 实现其稳定、长期的体外培养, 完

善异种移植技术, 将对其未来的深入研究有着不可估量的作用。

参考文献 (References)

- [1] TAN K, WILKINSON M F. Human spermatogonial stem cells scrutinized under the single-cell magnifying glass [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(2): 201-3.
- [2] HARA K, NAKAGAWA T, ENOMOTO H, et al. Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(5): 658-72.
- [3] SUN F, XU Q, ZHAO D, et al. Id4 marks spermatogonial stem cells in the mouse testis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17594.
- [4] CAI H, TANG B, WU JY, et al. Enrichment and *in vitro* features of the putative gonocytes from cryopreserved testicular tissue of neonatal bulls [J]. *Andrology*, 2016, 4(6): 1150-8.
- [5] SAHARE M G, SUYATNO, IMAI H. Recent advances of *in vitro* culture systems for spermatogonial stem cells in mammals [J]. *Reprod Med Biol*, 2018, 17(2): 134-42.
- [6] DI PERSIO S, SARACINO R, FERA S, et al. Spermatogonial kinetics in humans [J]. *Development*, 2017, 144(19): 3430-9.
- [7] KAKIUCHI K, TANIGUCHI K, KUBOTA H. Conserved and non-conserved characteristics of porcine glial cell line-derived neurotrophic factor expressed in the testis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7656.
- [8] GARBUZOV A, PECH M F, HASEGAWA K, et al. Purification of GFRalpha1⁺ and GFRalpha1⁻ spermatogonial stem cells reveals a niche-dependent mechanism for fate determination [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(2): 553-67.
- [9] FAYOMI A P, ORWIG K E. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men [J]. *Stem Cell Res*, 2018, 29: 207-14.
- [10] LA H M, MAKELA J A. Identification of dynamic undifferentiated cell states within the male germline [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2819.
- [11] ALMUNIA J, NAKAMURA K, MURAKAMI M, et al. Characterization of domestic pig spermatogenesis using spermatogonial stem cell markers in the early months of life [J]. *Theriogenology*, 2018, 107: 154-61.
- [12] MOHAQIQ M, MOVAHEDIN M, MOKHTARI DIZAJI M, et al. Upregulation of integrin-alpha6 and integrin-beta1 gene expressions in mouse spermatogonial stem cells after continues and pulsed low intensity ultrasound stimulation [J]. *Cell J*, 2018, 19(4): 634-9.
- [13] BINSILA K B, SELVARAJU S, GHOSH S K, et al. Isolation and enrichment of putative spermatogonial stem cells from ram (ovis aries) testis [J]. *Anim Reprod Sci*, 2018, 196: 9-18.
- [14] KWON J, KIKUCHI T, SETSUIE R, et al. Characterization of the testis in congenitally ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-1 (UCH-L1) defective (Gad) mice [J]. *Exp Anim*, 2003, 52(1): 1-9.
- [15] HEIDARI B, RAHMATI-AHMADABADI M, AKHONDI M M, et al. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9.5 markers [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(10): 1029-38.
- [16] OLEJNIK J, SUCHOWERSKA N, HERRID M, et al. Sensitivity of spermatogonia to irradiation varies with age in pre-pubertal ram

- lambs [J]. *Anim Reprod Sci*, 2018, 193: 58-67.
- [17] KIM Y H, CHOI Y R, KIM B J, et al. GDNF family receptor alpha 1 is a reliable marker of undifferentiated germ cells in bulls [J]. *Theriogenology*, 2019, 132: 172-81.
- [18] NICKKHOLGH B, MIZRAK S C, KORVER C M, et al. Enrichment of spermatogonial stem cells from long-term cultured human testicular cells [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(2): 558-65.e5.
- [19] DE BARROS F R, WORST R A, SAURIN G C, et al. Alpha-6 integrin expression in bovine spermatogonial cells purified by discontinuous Percoll density gradient [J]. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47(6): 887-90.
- [20] AZIZI H, SKUTELLA T, SHAHVERDI A. Generation of mouse spermatogonial stem-cell-colonies in a non-adherent culture [J]. *Cell J*, 2017, 19(2): 238-49.
- [21] ABBASI H, TAHMOORESPUR M, HOSSEINI S M, et al. THY1 as a reliable marker for enrichment of undifferentiated spermatogonia in the goat [J]. *Theriogenology*, 2013, 80(8): 923-32.
- [22] RODE K, WEIDER K, DAMM O S, et al. Loss of connexin 43 in sertoli cells provokes postnatal spermatogonial arrest, reduced germ cell numbers and impaired spermatogenesis [J]. *Reprod Biol*, 2018, 18(4): 456-66.
- [23] AECKERLE N, EILDERMANN K, DRUMMER C, et al. The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells ? [J]. *Mol Hum Reprod*, 2012, 18(10): 477-88.
- [24] HE Z, KOKKINAKI M, JIANG J, et al. Isolation of human male germ-line stem cells using enzymatic digestion and magnetic-activated cell sorting [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 825: 45-57.
- [25] HE Z, KOKKINAKI M, JIANG J, et al. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(2): 363-72.
- [26] KANATSU-SHINOHARA M, MORI Y, SHINOHARA T. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells based on aldehyde dehydrogenase activity [J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(6): 140.
- [27] GUAN K, WOLF F, BECKER A, et al. Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(2): 143-54.
- [28] GIASSETTI M I, GOISSIS M D, DE BARROS F, et al. Comparison of diverse differential plating methods to enrich bovine spermatogonial cells [J]. *Reprod Domest Anim*, 2016, 51(1): 26-32.
- [29] HEIDARI B, GIFANI M, SHIRAZI A, et al. Enrichment of undifferentiated type a spermatogonia from goat testis using discontinuous percoll density gradient and differential plating [J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2014, 6(2): 94-103.
- [30] KIM Y H, KANG H G, KIM B J, et al. Enrichment and *in vitro* culture of spermatogonial stem cells from pre-pubertal monkey testes [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2017, 14(5): 557-66.
- [31] GOISSIS M D, GIASSETTI M I, WORST R A, et al. Spermatogonial stem cell potential of CXCR4-positive cells from prepubertal bull testes [J]. *Anim Reprod Sci*, 2018, 196: 219-29.
- [32] KANATSU-SHINOHARA M, TAKASHIMA S, ISHII K, et al. Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23663.
- [33] KANATSU-SHINOHARA M, MORIMOTO H, SHINOHARA T. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by melanoma cell adhesion molecule expression [J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(6): 139.
- [34] KANATSU-SHINOHARA M, OGONUKI N, IWANO T, et al. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture [J]. *Development*, 2005, 132(18): 4155-63.
- [35] OATLEY M J, KAUCHER A V, YANG Q E, et al. Conditions for long-term culture of cattle undifferentiated spermatogonia [J]. *Biol Reprod*, 2016, 95(1): 14.
- [36] PARK J E, PARK M H, KIM M S, et al. Porcine spermatogonial stem cells self-renew effectively in a three dimensional culture microenvironment [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(12): 1316-24.
- [37] REDA A, ALBALUSHI H, MONTALVO S C, et al. Knock-out serum replacement and melatonin effects on germ cell differentiation in murine testicular explant cultures [J]. *Ann Biomed Eng*, 2017, 45(7): 1783-94.
- [38] TAKASHIMA S, SHINOHARA T. Culture and transplantation of spermatogonial stem cells [J]. *Stem Cell Res*, 2018, 29: 46-55.
- [39] SHARMA M, SRIVASTAVA A, FAIRFIELD H E, et al. Identification of EOMES-expressing spermatogonial stem cells and their regulation by PLZF [J]. *Elife*, 2019, 8. pii: e43352.
- [40] PIERI N C G, MANCANARES A C F, DE SOUZA A F, et al. Xenotransplantation of canine spermatogonial stem cells (cSSCs) regulated by FSH promotes spermatogenesis in infertile mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 135.
- [41] TAKASHIMA S, KANATSU-SHINOHARA M, TANAKA T, et al. Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal [J]. *Stem Cell Rep*, 2015, 4(3): 489-502.
- [42] MASAKI K, SAKAI M, KUROKI S, et al. FGF2 has distinct molecular functions from GDNF in the mouse germline niche [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 10(6): 1782-92.
- [43] SAVVULIDI F, PTACEK M, SAVVULIDI VARGOVA K, et al. Manipulation of spermatogonial stem cells in livestock species [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2019, 10: 46.
- [44] GIASSETTI M I, CICCARELLI M, OATLEY J M. Spermatogonial stem cell transplantation: insights and outlook for domestic animals [J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2019, 7: 385-401.
- [45] KUBOTA H, BRINSTER R L. Spermatogonial stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(1): 52-74.
- [46] MERONI S B, GALARDO M N, RINDONE G, et al. Molecular mechanisms and signaling pathways involved in Sertoli cell proliferation [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10: 224.
- [47] MIKKOLA M, SIRONEN A, KOPP C, et al. Transplantation of normal boar testicular cells resulted in complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect [J]. *Reprod Domest Anim*, 2006, 41(2): 124-8.
- [48] NAKAI M, KANEKO H, SOMFAI T, et al. Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts [J]. *Reproduction*, 2010, 139(2): 331-5.
- [49] SATO T, KATAGIRI K, GOHBARA A, et al. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes [J]. *Nature*, 2011, 471(7339): 504-7.