

猪精原干细胞体外培养条件的优化

师如意^{1,2}, 卫恒习¹, 李莉¹, 白银山¹, 张秀娟^{1,3}, 吴珍芳¹, 张守全¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广东 广州 510642;

2 山西医科大学 基础医学院, 省部共建教育部细胞生理学重点实验室, 山西 太原 030001;

3 广东省昆虫研究所, 广东 广州 510260)

摘要:以出生后1~5 d的长白公猪为主要研究对象,采用两步酶消化法获取睾丸细胞悬液,用Percoll不连续密度梯度法对猪精原干细胞(PSSCs)进行纯化,以碱性磷酸酶(AP)染色鉴定;利用MTT法检测2种细胞因子——胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)和白白血病抑制因子(LIF)对PSSCs发育的影响.结果表明:用Percoll不连续密度梯度法获得的PSSCs占睾丸总细胞数的(8.19±0.83)%,AP染色的阳性率为(87.47±2.90)%,表明该方法可有效获取PSSCs;MTT法检测表明,20 ng·mL⁻¹ GDNF+1 000 U·mL⁻¹ LIF的组合添加对PSSCs体外增殖的效果最好.

关键词:猪; 精原干细胞; 体外培养

中图分类号:Q954.43 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2013)02-0224-06

Optimizing the Culture Conditions of Porcine Spermatogonial Stem Cells (PSSCs) *in vitro*

SHI Ruyi^{1,2}, WEI Henxi¹, LI Li¹, BAI Yinshan¹, ZHANG Xiujuan^{1,3}, WU Zhenfang¹, ZHANG Shouquan¹

(1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education, Preclinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

3 Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China)

Abstract: The testicular cells of Landrace piglets aged from 1 to 5 days were isolated by two-step enzymatic digestion method. The Percoll discontinuous density gradients method was used to purify the porcine spermatogonial stem cells (PSSCs). The effects of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) and leukemia inhibitory factor (LIF) on PSSCs proliferation were investigated by MTT method. The results showed that the method for PSSCs isolation and purification were effective. By means of MTT assay, the results indicated that LIF and GDNF factor could promote PSSCs proliferation, and the combination of 20 ng·mL⁻¹ GDNF and 1 000 U·mL⁻¹ LIF showed the strongest effects.

Key words: porcine; spermatogonial stem cells (PSSCs); *in vitro* culture

精原干细胞(SSCs)是一群具有高度自我更新能力和分化潜能的细胞,是哺乳动物精子发生的最原始细胞,它能向子代传递遗传信息,是雄性成体内唯一可复制的二倍体的永生细胞,也是雄性体内

唯一的能够将基因信息遗传给下一代的干细胞^[1]. SSCs结合冷冻保存、移植技术及转基因技术的运用,可为动物克隆、转基因动物生产、无精男性不育、男性避孕及人类某些遗传性疾病的基因治疗、珍稀动

物物种的保存提供新的方法和途径。

基于此,大量高活性、高纯度的 SSCs 的获得是基础。然而,SSCs 在成年哺乳动物睾丸中的数量非常少,一只成年小鼠睾丸中,约有 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 个被称为 A single(As)的精原细胞^[2]。所以 SSCs 的分离和纯化是开展其生物学研究的关键基础。

目前,获得睾丸组织的单细胞悬液一般都采用两步酶消化法,先用消化能力比较缓和的胶原酶消化间质细胞,暴露曲细精管,再用 0.25% 胰酶-EDTA 进一步消化曲细精管,获得单细胞悬液^[3-7]。当获得睾丸混合细胞悬液后,需要进行纯化。SSCs 的纯化富集方法主要包括以下几种:流式细胞分选法(Fluorescence activated cell sorting, FACS)、免疫磁珠细胞分选法(Magnetic-activated cell sorting, MACS)、差异贴壁分选法、密度梯度分选法等。其中,前 2 种纯化方法相对于后面的方法更为迅速,但是由于目前 SSCs 还没有专一的鉴定标志,从而限制了 MACS 和 FACS 的应用,使得其分选效率不十分理想^[8]。有研究表明,利用 Percoll 不连续密度梯度分选维生素 A 缺失的成年大鼠睾丸中的未分化 A 型精原细胞,纯化效率达到 70% ~ 90%^[9]。利用差异贴壁分选方法从遗传背景分别为 DBA/2 和 ICR 的新生小鼠和成年小鼠中获得 SSCs,在体外长期培养并获得长期稳定增殖的小鼠 SSCs 系^[10]。在有关猪精原干细胞的研究报道中,采用单位重力速度沉降法结合差异贴壁法纯化猪的 A 型精原细胞,获得高达 95% ~ 98% 的纯化率^[11];同样的,使用速度沉降法后再结合差速贴壁法纯化猪 SSCs,结果得到了细胞活率为 80% 的 A 型精原细胞^[12]。

体内转基因小鼠模型试验表明,胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)以一种剂量依赖方式调节未分化的精原细胞的自我更新和分化。在 GDNF 缺失的小鼠模型表现为 SSCs 的枯竭,而在 GDNF 过度表达的小鼠模型则表现为 SSCs 的大量积累^[13]。Kubota 等^[8]已证实 GDNF 可以促进体外培养的 SSCs 自我更新。

中国是世界上养猪最多的国家。猪与人的亲缘关系近,其生理生化指标及生殖系统的组织结构与人类相似,可作为研究人类生殖发育机制的理想材料和理想的试验动物模型。

然而 PSSCs 增殖的体外培养体系对细胞因子的需求还不完全清晰,因此,本试验采用胶原酶-胰酶两步消化法分离睾丸组织,采用 Percoll 不连续密度

梯度离心纯化法,对 PSSCs 进行分离纯化。以 MTT 法检测不同种类细胞因子及其不同浓度对 PSSCs 的影响,以期找到合适 PSSCs 体外培养的细胞因子种类和使用浓度,为进一步研究打下试验基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象与主要试剂

5 日龄之内的长白公猪,购于华南农业大学原种猪场;明胶、Ⅳ型胶原酶粉末、0.25% 胰酶-EDTA 溶液等为 Sigma 公司产品;100 × 双抗溶液、DMEM/F12 液体培养基为 Gibco 公司产品;胎牛血清为 Hyclone 公司产品;NBT/BCIP 染液为北京鼎国生物有限公司产品;Percoll 为 Pharmacia 公司产品;四甲基偶氮唑蓝(MTT)为 Amresco 公司产品;人用 GDNF、白血病抑制因子 LIF 为 Millipore 公司产品。

1.2 PSSCs 的分离纯化

在超净工作台上,手术取出仔猪睾丸,去掉脂肪垫、附睾、睾丸白膜,将睾丸组织用虹膜剪剪成小块,转移到 9 mL 培养皿中,采用两步酶消化法获得睾丸细胞混合悬液。首先加入Ⅳ型胶原酶 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 于 37 ℃ 水浴摇床中 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 消化 30 min,72 g ($600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 离心 5 min,弃上清,收集底部组织块;之后加入 0.25% 胰酶-EDTA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的Ⅳ型胶原酶混合液,于 37 ℃ 水浴摇床中消化 30 min,并用吸管轻轻吸打,以观察不到有微小的组织块为宜,用等体积的含体积分数为 10% FBS 的 DMEM/F12 终止消化,用 100 ~ 200 目的细胞筛过滤细胞悬液,除去未消化完全的组织块。

Percoll 不连续密度梯度的制备:按 $V(9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1})$ 无菌生理盐水): $V(\text{Percoll 原液}) = 1:9$ 配成体积分数为 90% 的 Percoll 溶液,Percoll 不连续密度梯度的设置如表 1。

表 1 Percoll 不连续密度梯度的组成
Tab. 1 The composition of Percoll discontinuous density gradients

Percoll 密度梯度 ¹⁾ /%	V/mL	
	φ(Percoll) = 90% 溶液	DMEM/F12 培养基
11	0.24	1.76
19	0.42	1.58
27	0.60	1.40
35	0.78	1.22
43	0.96	1.04

1) 各密度梯度的体积均为 2 mL。

1.3 PSSCs 纯化率的检测

碱性磷酸酶(Alkaline phoshphatase, AP) 在干细胞内会高表达,干细胞 AP 染色可染成蓝紫或深咖啡色. 将 PSSCs 细胞悬液制成 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 做细胞涂片. 用 AP 对 PSSCs 进行活性检测, 其中 PSSCs 呈蓝紫色, 而其他细胞则不着色. 每张片子选取 10 个不重复的视野, 计算染色细胞数目占总细胞数目的比例, 重复 5 次.

1.4 猪辜丸支持细胞 (Porcine sertoli cell, PSTO) 饲养层的制备

制备的曲精细管单细胞悬液经过首次过夜贴壁, 用长滴管轻轻吹打, 小心吸走上清液, 用 PBS 洗 2 次, 然后改为如下培养基: $V(\text{DMEM 不完全培养基}): V(\text{FCS}): V(100 \times \text{双抗溶液}) = 89: 10: 1$.

传代 3 次, 纯化后的贴壁细胞多为辜丸支持细胞; 用丝裂霉素 C 处理后作为饲养层备用.

1.5 MTT 法检测细胞因子对 PSSCs 体外培养增殖效果

SSCs 基础培养基: $V(\text{DMEM 不完全培养基}): V(\text{FCS}): V(100 \times \text{双抗溶液}): V(\text{必需氨基酸溶液}): V(\text{非必需氨基酸溶液}) = 87: 10: 1: 1: 1$, 其中含有浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 L-谷氨酰胺和丙酮酸钠.

将完全纯化的原代 SSCs 细胞调整细胞密度, 使活细胞密度达到 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 接种至已用丝裂霉素 C 处理好的 PSTO 饲养层细胞上, 96 孔板中每孔接种 $200 \mu\text{L}$.

每个处理设置 6 个重复, 接种至 96 孔板, 放入 34°C 培养箱中继续培养, 培养液采用首次 3 d 全量换液, 以后隔天全量换液. 接种培养 SSCs 3、5 和 7 d 时, 采用光学显微镜观察细胞的生长情况并拍照, 然后利用 MTT 法检测细胞增殖情况, 用 AP 染色法检测细胞分化情况.

1.5.1 LIF、GDNF 分别添加对仔猪 SSCs 的促增殖及抑制分化作用试验设计 LIF 浓度梯度设置为 $500、1\,000、1\,500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; GDNF 质量浓度梯度设置为 $10、20、40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 对照组 (无任何细胞因子添加).

1.5.2 LIF、GDNF 不同组合添加对仔猪 SSCs 的促增殖作用试验设计 GDNF 和 LIF 不同组合浓度见表 2; 对照组 (无任何细胞因子添加).

1.6 数据统计分析

数据采用 EXCEL 和 SPSS14.0 统计分析.

表 2 GDNF 与 LIF 不同浓度组合

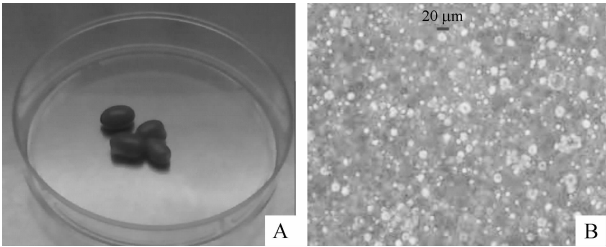
Tab.2 The different concentration combinations of GDNF and LIF

组别	$\rho(\text{GDNF})$ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LIF/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	组别	$\rho(\text{GDNF})$ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LIF/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	10	500	6	40	1 000
2	20	500	7	10	1 500
3	40	500	8	20	1 500
4	10	1 000	9	40	1 500
5	20	1 000			

2 结果与分析

2.1 PSSCs 分离、纯化效果分析

本试验以出生后 1 ~ 5 d 的长白公猪为研究对象, 采用两步酶法消化辜丸组织获得单细胞悬液, 图 1A 中可见消化前去掉附辜和脂肪垫的辜丸形态, 图 1B 中可见消化后分散良好的细胞悬液. 所获得的细胞经台盼蓝染色活率为 $(92.41 \pm 3.41)\%$, 表明这种消化方法对获得辜丸细胞悬液是比较有效的.



A: 消化前辜丸; B: 消化后辜丸组织.

图 1 仔猪辜丸组织消化前后图鉴

Fig.1 The testis of Landrace piglet

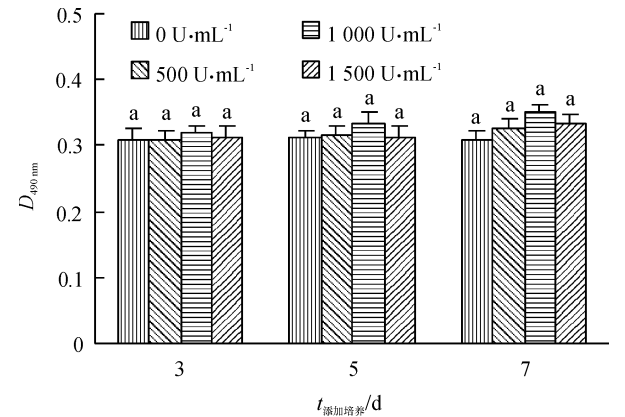
对于 PSSCs, 有多种纯化方法, 本试验主要以 Percoll 不连续梯度离心法对 PSSCs 进行纯化. 利用 Percoll 液纯化 SSCs 的方法是先将辜丸组织单细胞悬液经过夜 (约 6 ~ 8 h) 的差异贴壁, 可以去掉相当部分的体细胞, 然后收集上清细胞经 Percoll 密度梯度离心, 可在各个相邻的密度梯度界面形成细胞带, 将各带的细胞经过观察和后继的培养发现, 从上到下梯度的最上层即 11% 的 Percoll 梯度中, 主要包含一些细胞碎片、死细胞和少量多细胞团; 在 11% ~ 19% 之间和 27% ~ 35% 之间的密度梯度界面, 此细胞带的数量较少, 经后续的接种再培养发现该细胞带主要包含支持细胞和非常少量的 SSCs; 而 35% ~ 43% 之间的密度梯度界面中的细胞大小均一, 吹打悬浮后悬液呈现微红色, 结合形态学判定主要为红细胞; 在 19% ~ 27% 之间的密度梯度界面, 此细胞带

的细胞数量最多,经后续的接种再培养发现该带主要包含大量的 SSCs 和少量的体细胞.小心收集该细胞带的细胞,计算其细胞数量和纯化后此带的细胞占纯化前细胞总量的比率平均为 $(8.19 \pm 0.83)\%$,将纯化的细胞经 AP 活性染色鉴定,其阳性率可达到 $(87.47 \pm 2.90)\%$,说明该方法可以有效地获取 PSSCs.

2.2 细胞因子对 PSSCs 体外培养增殖的影响

2.2.1 LIF 单因子的影响 用 MTT 法测定不同时间不同浓度的 LIF 对 SSCs 的作用效果,发现所有设计的浓度对 SSCs 的增殖都是有限的,效果不明显,差异不显著(图2).

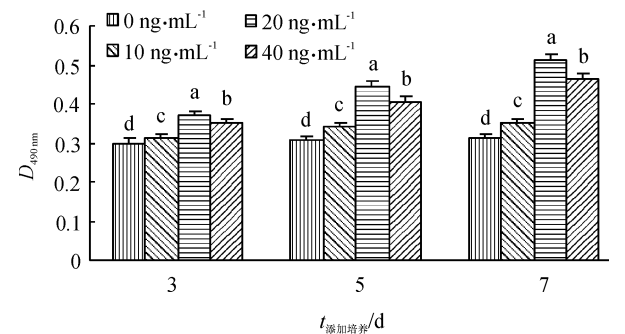
2.2.2 GDNF 单因子的影响 用 MTT 法测定不同时间不同质量浓度的 GDNF 对 SSCs 的作用效果,发现 $20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 GDNF 对 SSCs 的增殖是最有利的,与其他质量浓度相比差异显著(图3).



图中柱上凡是有一个相同小写字母者,表示同一时间不同浓度间差异不显著($P>0.05$).

图2 LIF 对 PSSCs 增殖的作用

Fig. 2 The effects of LIF on proliferation of PSSCs



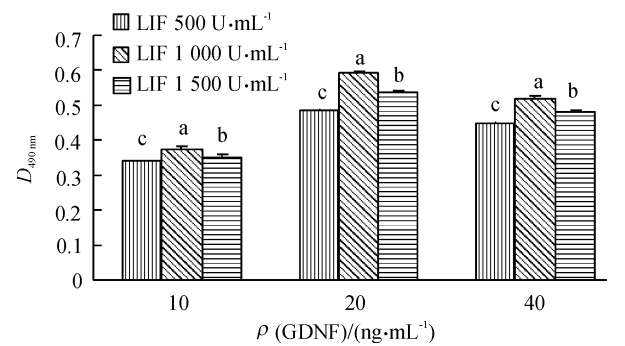
图中柱上凡是有一个相同小写字母者,表示同一时间不同质量浓度间差异不显著($P>0.05$).

图3 GDNF 对 PSSCs 增殖的作用

Fig. 3 The effects of GDNF on proliferation of PSSCs

2.2.3 LIF + GDNF 组合的影响 由图4、图5可知,当 GDNF 质量浓度为 $10 \sim 40\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对各组内 LIF

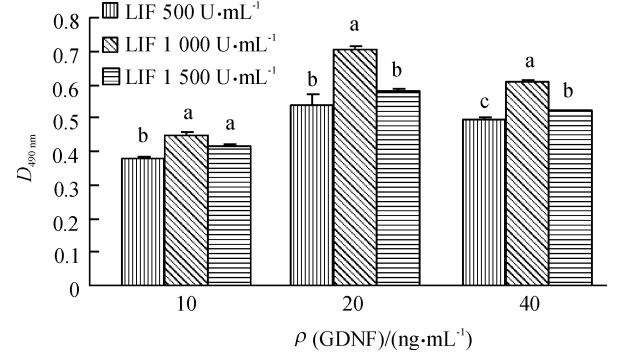
不同浓度的作用进行比较,结果显示 LIF 为 $1\,000\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,PSSCs 增殖情况均好于 LIF 为 500 和 $1\,500\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的组,差异显著;当 GDNF 质量浓度为 $20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,LIF $1\,000\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,PSSCs 增殖情况最好.因此,对于 SSCs. 增殖来说,最适的 GDNF 与 LIF 的浓度组合为 GDNF $20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,LIF $1\,000\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.



图中柱上凡是有一个相同小写字母者,表示同一组不同 LIF 处理间差异不显著($P>0.05$).

图4 PSSCs 体外培养 3 d,GDNF 与 LIF 不同浓度组合的作用效果

Fig. 4 The cooperative effects of GDNF and LIF on PSSCs cultured *in vitro* for 3 days



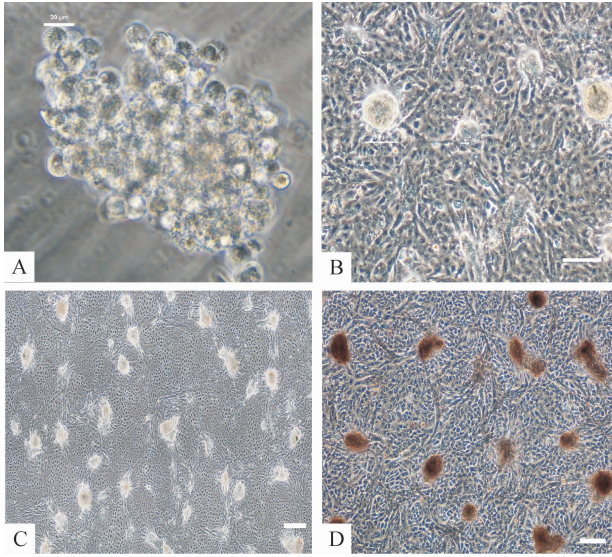
图中柱上凡是有一个相同小写字母者,表示同一组不同 LIF 处理间差异不显著($P>0.05$).

图5 PSSCs 体外培养 5 d,GDNF 与 LIF 不同浓度组合的作用效果

Fig. 5 The cooperative effects of GDNF and LIF on PSSCs cultured *in vitro* for 5 days

2.3 PSSCs 在优化培养条件下的增殖情况

优化培养条件: $V(\text{DMEM 不完全培养基}): V(\text{FCS}): V(100 \times \text{双抗溶液}): V(\text{必需氨基酸溶液}): V(\text{非必需氨基酸溶液}) = 87:10:1:1:1$,其中含有 $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-谷氨酰胺和丙酮酸钠及 $20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ GDNF 和 $1\,000\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ LIF. 当用较优的培养条件对 PSSCs 进行体外培养时,笔者发现可以较长时间地保持未分化状态(图6),并且可以传到第4代细胞.



饲养层为 PSTO, LIF $1\ 000\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, GDNF $20\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

A: PSSCs 接种到 PSTO 上 3 d 的情况, 形成大的细胞团; B: 培养 6 d 后, PSSCs 形成多个克隆团; C: PSSCs 体外培养第 4 代 (35 d) 会出现大量克隆团; D: PSSCs 体外培养第 4 代 (35 d) 克隆团 AP 的染色情况. A 图标尺 = $20\ \mu\text{m}$; B、C、D 标尺 = $100\ \mu\text{m}$.

图 6 优化培养条件下 PSSCs 的增殖情况

Fig. 6 The proliferation of PSSCs under the optimizing culturing situation

3 讨论

3.1 PSSCs 的分离纯化

SSCs 的分离和纯化是开展其生物学研究的关键基础. 目前获得睾丸组织的单细胞悬液一般都是采用两步酶消化法, 该方法虽然得到不断的改良和优化, 但其基本的思路是相同的^[14-17]. 其中第一步消化较为关键, 若消化不足, 则间质和管周肌样细胞残余较多; 若消化过度, 则 SSCs 的产量和活率降低.

Pelt 等^[9]利用差异贴壁结合 Percoll 密度梯度法纯化成年维生素 A 缺乏的大鼠模型的 A 型精原细胞, 结果在 28% 和 30% 梯度界面发现目的细胞, 其纯度鉴定平均为 $(76.0 \pm 6.5)\%$ 和 $(80.0 \pm 6.1)\%$; 有研究报道, 采用单位重力速度沉降法结合差异贴壁法纯化猪的 A 型精原细胞, 获得其纯化率高达 95% ~ 98%^[11]; 本试验利用两步酶消化法结合差速贴壁 + Percoll 密度梯度离心纯化方法, 所获得的细胞经台盼蓝染色活率为 $(92.41 \pm 3.41)\%$, 纯化的细胞经 AP 活性染色鉴定, 其纯化率可达到 $(87.47 \pm 2.90)\%$, 说明这种消化方法和纯化方法可以有效地获取 PSSCs.

3.2 细胞因子对 PSSCs 增殖的影响

(1) GDNF: SSCs 体外自我更新和增殖需要细胞

因子. GDNF 由睾丸支持细胞分泌, 对 SSCs 的自我更新或分化起着关键调节作用. 在 GDNF 缺失的小鼠模型表现为 SSCs 的枯竭, 而在 GDNF 过度表达的小鼠模型则表现为 SSCs 的大量积累^[13]. GDNF 促进体外培养的 SSCs 自我更新已经被证实^[18]. 由此可以看出 GDNF 对 SSCs 的体外自我更新和增殖是一关键因子, GDNF 对 SSCs 体外培养的作用是可以短时间内促进其自我更新和增殖, 但是随着体外培养时间的延长, 其作用不明显. 实践证明, 还需要其他细胞因子的组合添加. 本试验中, 采用 MTT 法检测了不同时间内各种细胞因子对原代长白仔猪 SSCs 的促增殖作用, 培养 5 d 时从细胞形态学观察和 MTT 检测结果发现, 从 SSCs 维持的数量和克隆形成的数量及大小来看, 单独添加 GDNF 组显著比单独添加 LIF 组效果好.

(2) LIF: LIF 是胚胎干细胞 (Embryo stem cell, ESCs) 体外自我更新和促进增殖的关键细胞因子^[19-20]. 有研究报道称, 李恩中等^[21]体外培养昆明小鼠 SSCs, 培养液中仅加入 LIF, 结果获得了 SSCs 体外的快速增殖. 哺乳动物睾丸组织中 SSCs 可以对培养环境产生应答, 在 ESCs 培养条件下 (仅加入 LIF), SSCs 在体外培养甚至可以发生逆向转化为类胚胎干细胞从而具有多能性^[22-24]. 这些提示着 LIF 参与了 SSCs 的多潜能性的维持作用. 本试验发现添加 LIF 的 SSCs 培养体系能够使得 SSCs 克隆团增多, 培养时间延长, 保持较长时间的未分化状态.

同时, 我们发现 GDNF 与 LIF 二者之间有协同作用, 最佳的组合为 GDNF $20\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、LIF $1\ 000\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 此结果与张秀娟等^[25]的结果相似. 用该组合进行 PSSCs 的体外培养, 可以用来进行后续的培养研究.

参考文献:

[1] SCHLATT S. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation [J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 187 (1/2): 107-111.
[2] DE ROOIJ D G. Stem cells in the testis [J]. Int J Exp Pathol, 1998, 79(2): 67-80.
[3] VAN DER WEE K S, JOHNSON E W, DIRAMI G, et al. Immunomagnetic isolation and long term culture of mouse type A spermatogonia [J]. J Andrology, 2001, 22 (4): 696-705.
[4] KUBOTA H, AVARBOCK M R, BRINSTER R L. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic

- and functional characteristics with other stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100(11): 6487-6492.
- [5] KANATSU-SHINOHARA M, OGONUKI N, INOUE K, et al. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells [J]. Hum Reprod, 2003, 18(12): 2660-2667.
- [6] KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, LEE J. Anchorage independent growth of mouse male germline stem cells during long term culture *in vitro* [J]. Biol Reprod, 2006, 74(3): 522-529.
- [7] OATLEY J, AVARBOCK M, TELARANTA A, et al. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival [J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(25): 9524-9529.
- [8] KUBOTA H, AVARBOCK M R, BRINSTER R L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(47): 16489-16494.
- [9] PELT V A M M, MORENA A R, DISSEL-EMILIANI F M, et al. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes [J]. Biol Reprod, 1996, 55(2): 439-444.
- [10] OGAWA T, OHMURA M, TAMURA Y, et al. Derivation and morphological characterization of mouse spermatogonial stem cell lines [J]. Arch Histol Cytol, 2004, 67(4): 297-306.
- [11] DIRAMI G, RAVINDRANATH N, PURSEL V, et al. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type a spermatogonia cultured in KSOM [J]. Biol Reprod, 1999, 61(1): 225-230.
- [12] LUO J, MEGEE S, RATHI R, et al. Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: Application to enrichment and culture of porcine spermatogonia [J]. Mole Reprod Dev, 2006, 73(12): 1531-1540.
- [13] MENG X, LINDAHL M, HYVONEN M E, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF [J]. Science, 2000, 287(5457): 1489-1493.
- [14] NAGANO M, RYU B Y, BRINSER C J, et al. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro* [J]. Biol Reprod, 2003, 68(6): 2207-2214.
- [15] KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, OGONUKI N, et al. Long term culture of mouse male germline stem cells under serum or feeder free conditions [J]. Biol Reprod, 2005, 72(4): 985-991.
- [16] KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, OGONUKI N, et al. Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture [J]. Biol Reprod, 2007, 76(1): 55-62.
- [17] LEE J, KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, et al. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells [J]. Development, 2007, 134(10): 1853-1859.
- [18] HOFMANN M C, BRAYDICH-STOLIE L, DETTIN L, et al. Immortalization of mouse germ line stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(2): 200-210.
- [19] DONOVAN P J. Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development [J]. Curr Top Dev Biol, 1994, 29(1): 189-225.
- [20] SMITH A G. Embryo-derived stem cells: Of mice and men [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17(1): 435-462.
- [21] 李恩中, 李德雪, 张世庆, 等. 以支持细胞为饲养层培养小鼠精原干细胞 [J]. 动物学报, 2006, 52(4): 774-779.
- [22] KANATSU-SHINOHARA M, TOYOKUNI S, SHINOHARA T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells [J]. Biol Reprod, 2004, 70(1): 70-75.
- [23] GUAN K, NAYERIA K, MAIER L S, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis [J]. Nature, 2006, 440(7088): 1199-1203.
- [24] CONRAD S, RENNINGER M, HENNENLOTTER J, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis [J]. Nature, 2008, 456(7220): 344-349.
- [25] 张秀娟, 李莉, 卫恒习, 等. 小鼠精原干细胞分离培养条件的优化 [J]. 华南农业大学学报, 2012, 33(1): 87-91.

【责任编辑 柴 焰】