

DOI: 10.13376/j.cblls/2017058

文章编号: 1004-0374(2017)05-0443-07

## 精原干细胞分离、鉴定、培养及其应用进展

徐远飞<sup>1</sup>, 侯彬<sup>1,2</sup>, 周继昌<sup>1\*</sup>

(1 深圳市慢性病防治中心, 深圳 518020; 2 上海体育科学研究所, 上海 200030)

**摘要:** 雄性哺乳动物睾丸内持续的精子发生是维持其生殖能力的必备条件。精原干细胞 (SSCs) 是精子发生的基础, 是永久分化成精子的克隆源, 它既可以自我更新维持体内干细胞的数量, 又可以增殖分化形成各阶段的生精细胞直至成熟精子。现对 SSCs 分离、鉴定与培养等技术及其应用的进展进行综述, 发现两步酶消化、差异贴壁、磁珠分选等方法为体外分离与纯化 SSCs 的常用方法。特异性标志物的研究一直在推进 SSCs 的纯化与鉴定, 并仍将是 SSCs 技术的研究重点之一。培养基、血清、生长因子和饲养层在 SSCs 体外培养中至关重要, 但长期培养中血清可引起 SSCs 分化的问题有待解决。在基础与临床方面的应用中, SSCs 体外培养系统为研究精子发生过程、遗传学、雄性辅助生殖和细胞再生治疗等开辟了新的道路。

**关键词:** 精原干细胞; 分离; 鉴定; 培养

中图分类号: Q78; Q813.1 文献标志码: A

## Advances in isolation, identification and culture of spermatogonial stem cells and their applications

XU Yuan-Fei<sup>1</sup>, HOU Bin<sup>1,2</sup>, ZHOU Ji-Chang<sup>1\*</sup>

(1 Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China;  
2 Shanghai Research Institute of Sports Science, Shanghai 200030, China)

**Abstract:** The continuous spermatogenesis in testis is essential to maintain the reproductive ability of male mammals, while the spermatogonial stem cells (SSCs) are fundamental for this process as “permanent” sources to form sperm clone. The SSCs can not only renew themselves to maintain the number of stem cells, but also can proliferate into different stages of reproductive cells from spermatogenic cells to mature sperms. By summarizing the current advances in the technology of isolation, identification and culture of SSCs and their applications, the two step enzyme digestion, differential attachment, and magnetic bead sorting were found to be the commonly used methods for the separation and purification of SSCs *in vitro*. The study of specific surface markers has been improving the purification and identification of SSCs, which will continue to be one of the hot topics in the SSCs-related techniques. Culture medium, serum, growth factor and feeders were important factors in SSCs culture, but in the long-term culture, the SSCs differentiation caused by serum was a problem to be solved. For the applications in the basic and clinic medicine, the systematic SSCs methods paved new ways for the study of spermatogenesis, genetics, assisted male reproduction, and regeneration therapy.

**Key words:** spermatogonial stem cells; isolation; identification; culture

精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs) 是位于曲细精管基膜上的一种干细胞, 是精子发生的基础, 具有既能够自我更新维持其干细胞的数量, 又能够定向分化成精母细胞的特点。SSCs 的这种双重功能保证了雄性哺乳动物可以不断地产生精

子。目前, 雄性生殖的许多基础医学与临床医学问题悬而未决, SSCs 的体外培养技术与应用的尝试

收稿日期: 2016-11-01; 修回日期: 2016-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81172669, 81372993)

\*通信作者: E-mail: flintzhou@163.com; Tel: 755-25503842

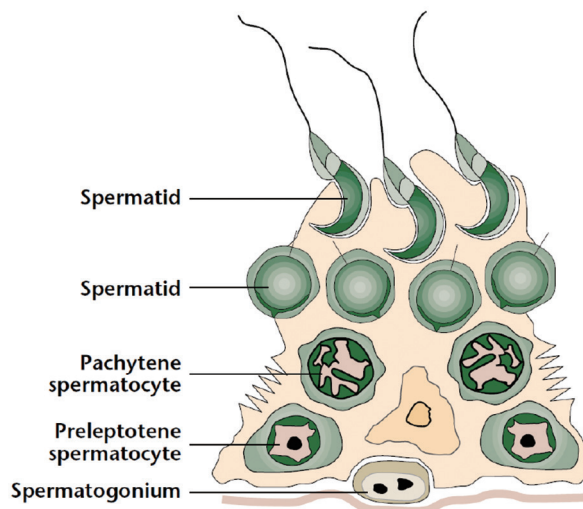
因而一直备受关注。本文将对该领域的进展做一综述。

## 1 SSCs的分化与分类

非灵长动物 SSCs 大致分为 A、B 和 In 型 3 类, 而小鼠体内 A 型精原细胞有 7 种, 即  $A_s$ 、 $A_{pr}$ 、 $A_{al}$ 、 $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  和  $A_4$ <sup>[1]</sup>。其中,  $A_s$  精原细胞被认为是啮齿类“真正的”SSCs, 属于未分化 A 型精原细胞<sup>[2]</sup>。形态学上,  $A_s$  细胞在睾丸中位于紧贴曲细精管基膜的部位<sup>[3]</sup>,  $A_s$  细胞可分裂成两个  $A_{pr}$  细胞<sup>[4]</sup>,  $A_{pr}$  细胞进一步分裂形成由 4 个、8 个、16 个或 32 个细胞链组成的链状  $A_{al}$ 。  $A_{al}$  型精原细胞再分裂形成  $A_1$  型精原细胞, 后者经过连续 6 次分裂分化形成  $A_2$  型精原细胞。  $A_2$  型精原细胞进一步逐级分化为  $A_3$ 、 $A_4$  型精原细胞。  $A_{pr}$  和  $A_{al}$  精原细胞所进行的是与生精上皮周期不同步的细胞克隆, 以扩大种群, 而  $A_1$ ~ $A_4$  精原细胞则是与生精上皮周期同步的精原细胞克隆。 B 型和 In 型精原细胞处在定义上的生精阶段, 是形态清晰的互相连接的细胞群。 尽管学者们在啮齿类动物的 SSCs 扩张方式上有轻微的分歧, 但都普遍认同  $A_s$  精原细胞是小鼠和大鼠睾丸内唯一能够自我更新的精原细胞<sup>[5-7]</sup>。 与非灵长类动物不同的是, 包括人在内的灵长类生物的 SSCs 分为  $A_{dark}$ 、 $A_{pale}$  和 B 型 3 种,  $A_{dark}$  和  $A_{pale}$  型为未分化的精原细胞。  $A_{dark}$  型精原细胞为储备型干细胞,  $A_{pale}$  型精原细胞为自我更新型干细胞, 有丝分裂保持活跃状态<sup>[8]</sup>。 与非灵长动物相比, 灵长类 SSCs 缺少  $A_1$ ~ $A_4$  和 In 型 SSCs 分化过程。

## 2 SSCs的分离与鉴定

睾丸是雄性激素和生殖细胞形成的必需器官, 其组织包括生精小管 (seminiferous tubule, 又称“曲精小管”) 和睾丸间质, 前者主要由生精细胞 (spermatogenic cell) 和支持细胞 (sertoli cells, SCs) 构成 (图 1)<sup>[9]</sup>。 生精细胞是精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子的总称, 这些细胞依次从基膜向管腔方向移行、成熟并进入管腔的过程称为精子发生 (spermatogenesis)。 在精原细胞中还有一定数量的未分化干细胞, 即 SSCs, 它是精子发生过程持续不断、终生不息的细胞学基础。 支持细胞分布于生精细胞之间, 其作用包括支持、营养生精细胞, 促进生精细胞成熟等。 生精小管之间的睾丸间质中还含有一种分泌雄激素的间质细胞 (Leydig 细胞)。



从下至上依次为: 精原细胞(spermatogonium)、初级(前细线期)精母细胞(preleptotene spermatocyte)、次级(粗线期)精母细胞(pachytene spermatocyte)和精子(前体)细胞(spermatid)。

图1 睾丸支持细胞及其相连的生精细胞模型<sup>[9]</sup>

### 2.1 SSCs的分离

用来分离 SSCs 的动物一般取其胎儿期或性成熟以前。小鼠出生后 4~6 d 更容易获取大量的 SSCs<sup>[10]</sup>; 同样, 牛的最适期 5~7 月龄<sup>[11]</sup>, 羊为 4 月龄<sup>[12]</sup>, 猪为 1 月龄<sup>[13]</sup>, 也可用 9 d 的大鼠<sup>[14]</sup> 和 1 d 的鸡<sup>[15]</sup> 进行实验。1981 年, Meistrich 等<sup>[16]</sup> 提出应用胰蛋白酶组合 DNase I 对小鼠 SSCs 一步法进行分离。随着后期研究的不断改进, 更多的采用两步酶消化法, 即 1 mg/mL 胶原酶和 0.25% 胰蛋白酶消化法对新生鼠睾丸进行消化<sup>[17]</sup>。但其也还具有一些不足, 需在研究中不断摸索与改进, 如酶消化时间、消化不足或过度 (尤其是胰蛋白酶) 使所需细胞收获率低<sup>[18]</sup>。王庆忠等<sup>[19]</sup> 对两步法的酶进行了改进, 并对大鼠的 SSCs 进行分离, 取得了良好的效果; 2016 年, Akbarinejad 等<sup>[20]</sup> 进一步改进, 第一步采用 1 mg/mL 胶原酶、1 mg/mL 透明质酸酶、1 mg/mL 胰蛋白酶及 0.5  $\mu$ g/mL DNase 混匀 DMEM 溶液进行消化, 清洗后再用 1 mg/mL 胶原酶、1 mg/mL 透明质酸酶及 0.5  $\mu$ g/mL DNase 混匀 DMEM 溶液进行消化。人类的 SSCs 细胞的分离也同样地采取了直接机械法<sup>[21]</sup> 和两步酶消化法<sup>[22-23]</sup>。用上述方法将组织分散后, 接下来采用以下方法分离获得 SSCs。

#### 2.1.1 差异贴壁法

该法将曲细精管细胞悬液接种于经明胶或层黏连蛋白 (laminin) 处理过的培养器皿中, 利用 SCs

与 SSCs 贴壁速率的差异, 对精原细胞进行分离。该方法的实验条件比较简单, 常被用于大鼠<sup>[19]</sup>、小鼠<sup>[24]</sup>等动物的 SSCs 分离纯化。该方法主要对原代细胞培养产生影响, 适用于早期快速获取纯度较高的方式, 且操作简单; 但其纯化效果会被过度生长的 SCs 所影响, 且只能从出生后 5~6 d 的小鼠分离 SSCs, 而 7 d 后不适合。

**2.1.2 Percoll 密度梯度离心法**

该法在离心管中依次加入浓度递减的 Percoll 淋巴细胞分离液, 再将待分离细胞悬液加于最上层并离心, 从而达到分离的目的。Izadyar 等<sup>[25]</sup>通过对纯度为 25.5% 的牛 A 型精原细胞的睾丸细胞悬液进行 Percoll 密度梯度离心, 获得浓缩型精原细胞, 得到了纯度达 51% 的 A 型精原细胞。最近的研究中, 用不连续的 Percoll 密度梯度法对猪的 SSCs 进行了纯化<sup>[26]</sup>。此外, 该方法还被用于羊<sup>[27]</sup>、猴<sup>[28]</sup>、人<sup>[29]</sup>的 SSCs 分离。Herri 等<sup>[30]</sup>对差异贴壁法、Percoll 不连续密度梯度离心、流式细胞分选法和免疫磁珠分选法进行了比较, 发现差异贴壁法可浓缩细胞 5.3 倍, 浓缩效果比其他 3 种好, 但与之比较后两者的特异性较好。该方法基于细胞大小和重量而进行分离, 其优点是常见的实验室设备及较低成本足以执行, 但分层不清晰、操作麻烦、离心时间长, 容易造成 SSCs 的丢失, 且其较低特异性也是待解决的一个重要问题<sup>[31]</sup>。

**2.1.3 荧光激活细胞分选法(fluorescence activated cell sorting, FACS)**

FACS 是利用流式细胞仪进行的一种单细胞定量分选技术, 需用 SSCs 表面的相对特异性标志物, 利用流式细胞仪进行阴性或阳性的筛选。Liu 等<sup>[29]</sup>以 OCT4 为表面抗原, 利用 FACS 筛选人的 SSCs

纯度达 86.7%。该方法分离细胞的纯度较高, 但由于需要特殊仪器且价格比较昂贵, 并不适合常规实验室使用。

**2.1.4 免疫磁珠分选法(magnetic beads assisted cell sorting, MACS)**

MACS 是将磁珠直接或间接偶联在抗体上, 通过抗原抗体特异性识别, 使其与带有抗原的细胞相连, 在高强度、梯度磁场中通过分离磁珠将目标细胞分离出来。最早由 Brinster 和 Avarbock<sup>[32]</sup>提出使用免疫磁珠分选法, 以  $\alpha$  整合素 ( $\alpha$ 6-integrin, ITGA6 或 CD49f) 作为表面抗原对精原细胞进行分离, 分选细胞的效率提高了 8.4 倍。后期有研究以 CD9 作为表面抗原<sup>[33]</sup>和采用 CD90.2 免疫磁珠分离纯化小鼠的 SSCs<sup>[34]</sup>。该方法的分离效率随抗原抗体亲和力大小和可利用表面抗原的数量而变化。其不同于 FACS 分离, 可对少量 SSCs 进行分析, 也避免了 FACS 繁琐、严格的前处理和高要求的无菌条件, 磁珠对细胞无损伤, 分选后不影响细胞活性<sup>[35]</sup>。近年来, 使用该方法的研究者也越来越多。

为了在下文继续讨论 SSCs 标志物的相关内容前给读者一个背景信息, 表 1 罗列了研究者在人和啮齿类动物研究中提及的 SSCs 标志物。

各种属之间的 SSCs 表面标志物的表达情况不完全相同, 且也没有一种生物学标志是单独存在于人或鼠等动物中的<sup>[41]</sup>, 上表单列入人或鼠中的标志物仅仅是相应研究者的报道。虽然受很多不确定因素的影响, 目前 SSCs 似乎还没有公认的绝对特异性标志物, 但对 SSCs 表面标记的持续研究正在努力解决这一问题。

**2.2 SSCs 的鉴定分析**

目前大多数的 SSCs 鉴定方法都是基于其特有

**表1 人和鼠的精原干细胞标志物**

物种	精原干细胞标志物	文献
人	CD133、CHEK2、MEAGA4、UTF1、SSEA4、CD90	[36-37]
	DAZL	[21]
	VASA	[23,38]
鼠	KIT、NANOS2、CDH1、ID4、NANOS3、NGN3、PIWI12、STRA8	[36,39]
	VASA、CD44	[24]
	PCNA、ZBTB16	[40]
	TH2B	[17]
人和鼠	GPR125、UCHL1、THY1、CD9、LIN28、NANOG、RET、SOX3、GFR $\alpha$ 1、ITGA6 ( $\alpha$ 6-INTEGRIN, CD49f)、ITGB1 (1 $\beta$ -INTEGRIN, CD29)、SSEA1	[34,36]
	OCT4、PLZF	[17,35-36]
	SALL4	[29]

标志物而开展的。有研究发现 Oct4、Piwi12 和 Ngn3 (neurogenin3) 仅在培养细胞上表达, 而 GFR $\alpha$ 1 在 SSCs 上高水平表达, 证明细胞克隆主要是由 SSCs 组成的<sup>[19]</sup>, 且不同 SSCs 来源导致标志物的选取也有所差异, 寻找简单而通用的标志物是本领域较长时期内的热点之一。

### 2.2.1 荧光定量PCR (qPCR)检测

qPCR 可直接检测 SSCs 基因转录产物, 结果仅由细胞本身基因的表达量所决定, 能在分子水平上较为精确地评估分选效果。以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 选择 SCs 特异表达基因 *GATA4* 和 SSCs 表达基因 *OCT4* 和 *GFR $\alpha$ 1* 作为待检测基因。该研究中 qPCR 分析结果显示, MACS 纯化 SSCs 的效率为 5.9~6.5 倍<sup>[35]</sup>。有研究通过内参基因 *GAPDH*、 $\beta$ -actin 和干细胞的标志基因 *OCT4* 等基因的 qPCR 反应, 确定其所获得的 SSCs<sup>[15]</sup>。现在越来越多 SSCs 的研究鉴定与分析采用该方法<sup>[20]</sup>。

### 2.2.2 免疫细胞化学检测法

通过 SSCs 的标志基因 CD9, 对细胞进行免疫组化实验, CD9 抗原与带有荧光信号的 CD9 抗体结合产生荧光, 用显微镜观察可以对细胞进行鉴定<sup>[17]</sup>。通过免疫荧光检测细胞内 GFR $\alpha$ 1、VASA、CD44 的表达, 对培养的 SSCs 进行鉴定<sup>[24]</sup>。ITGA6、PLZF<sup>[17]</sup> 等标志物也有被用于该检测方法。

此外, 我国研究者还用 iTRAQ 质谱法发现 GFR $\alpha$ 1、CD49f、CD29 等已知标志物在 SSCs 中的变化趋势与以往文献一致, 同时筛选出 10 种可供进一步研判的 SSCs 标志物<sup>[34]</sup>。

## 3 SSCs的体外培养

### 3.1 饲养层细胞的选择

不同的饲养层细胞或滋养层细胞 (feeder layer cell) 对 SSCs 的培养具有不同的影响效果。常将原代小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs)、小鼠成纤维细胞 (SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabian resistant, STO)、小鼠睾丸间质细胞 (mouse testicular stromal, MTS)、SCs 等细胞用丝裂霉素处理后作为饲养层用于 SSCs 的培养。有研究用 STO、MEFs、牛的 SCs 和层黏连蛋白这 4 种不同的饲养层对牛的 SSCs 进行培养, 发现 STO 能提供 SSCs 更良好的生长环境<sup>[42]</sup>。在人 SSCs 细胞的培养中用 MEFs<sup>[43]</sup> 和 SCs<sup>[29]</sup> 也是可行的。早期对 C57BL/6 小鼠的研究认为 MTS 能代替 MEFs, 但单从这一实验结果尚不足以确认两者的优劣<sup>[44]</sup>。不同

的饲养层及不同来源的 SSCs 细胞是影响体外培养 SSCs 自我更新与增殖的重要因素<sup>[45]</sup>, 因此, 在实验中应根据不同来源的 SSCs 选择合适的饲养层细胞。

### 3.2 SSCs的血清培养基

2005 年, Kanatsu-Shinohara 等<sup>[46]</sup> 研究发现, 高浓度血清可以促进 SSCs 的生长, 但同时也刺激了饲养层 SCs 的生长。在羊的 SSCs 实验中, 1% 的血清培养基比高浓度血清更利于细胞增殖<sup>[47]</sup>。Aoshima 等<sup>[48]</sup> 用血清替代物 KSR (knockout serum replacement) 与血清进行 SSCs 的培养研究。SSCs 的血清培养基也是 SSCs 培养研究的一个焦点。

### 3.3 SSCs的细胞因子

Lee 等<sup>[49]</sup> 研究表明, SSCs 的自我更新过程中需要多种细胞因子的相互作用, 但相互作用机制相当复杂。目前, 常用 DMEM/F12、DMEM、MEM $\alpha$  为基础培养基, 同时根据实验需求添加相应的细胞因子, 常用因子有以下几种。

#### 3.3.1 干细胞因子(stem cell factor, SCF)

SCF 又称为 c-kit 配体, 对 SSCs 体外增殖具有一定的作用。刘茜等<sup>[50]</sup> 研究指出, 可在培养液内加入 40 g/L 的 SCF 与 2 g/L 全反式维甲酸 (all trans retinoic acid, RA), 以促进 SSCs 的体外增殖。

#### 3.3.2 胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)

GDNF 与 SSCs 细胞膜上的 GFR $\alpha$ 1 结合形成 GDNF-GFR $\alpha$ 1 复合物, 结合并活化 RET, 并进一步激活 MAPK、SFK 和 PI3K-AKT 信号通路, 进而调节 SSCs 的自我更新和分化<sup>[51]</sup>。Wang 等<sup>[52]</sup> 研究提出, 在 SSCs 培养初期高浓度的 GDNF (20 ng/mL) 有利于细胞的增殖, 低浓度 (4 ng/mL) 有利于后期稳定培养, 后期研究用 20 ng/mL GDNF 与 1 000 U/mL 白血病抑制因子 (leukemia inhibition factor, LIF) 可促进小鼠的 SSCs 增殖也证明了这一结论。

#### 3.3.3 成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)

bFGF 在 SSCs 的体外培养中也是必不可少的。Wu 等<sup>[53]</sup> 的研究表明, 在培养基内添加 25 ng/mL bFGF 及其他因子能够使小鼠 SSCs 在体外持续增殖超过 120 d。Momeni-Moghaddam 等<sup>[15]</sup> 采用 15 ng/mL bFGF 也取得了良好的效果。

#### 3.3.4 白血病抑制因子(LIF)

LIF 能够抑制干细胞体外分化, Momeni-Mog-

haddam 等<sup>[15]</sup>采用 15 ng/mL LIF 使细胞持续增殖。红景天多糖联合 LIF、GDNF 也能使 SSCs 增殖<sup>[54]</sup>。

### 3.3.5 其他因子

除上述辅助因子之外, 根据实验需求可加入乳酸盐和丙酮酸盐以及一些其他的常用添加剂, 如非必需氨基酸、 $\beta$ -巯基乙醇、转铁蛋白等营养物质对 SSCs 的体外存活和增殖有重要作用。

## 4 SSCs 的应用

### 4.1 在基础医学中的应用

在营养物质、药物及环境污染物等因素对雄性生殖作用的研究中, SSCs 可作为良好的靶细胞或研究材料。睾丸是硒蛋白的重要靶组织之一<sup>[55-56]</sup>。在研究硒蛋白 V (selenoprotein V) 在精子发生过程具有某种重要功能中, SSCs 是重要的靶细胞。Livera 等<sup>[57]</sup>对啮齿动物维生素 A 缺乏或过多的研究表明, 维生素 A 对雄性生殖系统的发育和正常维持是必需的。锌在各种生物活动中扮演重要角色。锌是一个重要的微量元素, 在生殖细胞的修护、精子发生发展和精子运动中都起着重要的作用<sup>[58]</sup>。SSCs 除了自我更新和分化外, 还能在潜在自我重编程去分化过程中获得全能性<sup>[59]</sup>。基于这种特性, 有实验将小鼠 SSCs 转化为心肌细胞、内皮细胞、血液细胞、胰岛细胞<sup>[60]</sup>, 或是将人的 SSCs 转化为成骨细胞、神经细胞和胰岛细胞<sup>[43]</sup>。

### 4.2 在临床医学中的应用

关于 SSCs 的临床研究逐渐增多。1994 年, Brinster 和 Avarbock<sup>[32]</sup>第一次提出 SSCs 移植技术。为了继续该研究的临床应用, 通过构建基因突变, 如 W 突变小鼠<sup>[61]</sup>, 或经白消安<sup>[62]</sup>等诱导实验处理得到无生育能力的雄性动物, 再尝试用 SSCs 移植来恢复其生育能力。SSCs 移植是鉴定和评估 SSCs 活性的金标准<sup>[63]</sup>, 但是这种方法还存在技术上的挑战, 有待进一步的研究与探索。此项技术的发展对于雄性不孕不育的治疗, 以及濒危动物的保护等都有着非常重要的意义。李俊涛等<sup>[64]</sup>发现养精胶囊提取液促进了 SSCs 的增殖及活性, 这可能为养精胶囊在临床上治疗不育症提供了理论依据。添加  $\beta$ -甘油磷酸钠、地塞米松、维生素 C、胰岛素、碱性成纤维细胞生长因子条件培养液诱导培养 SSCs 提示, SSCs 在一定的诱导条件下具有成骨能力, 有望为骨组织工程学研究提供种子细胞<sup>[65]</sup>。这些工作显示 SSCs 在再生医学中具有良好的应用前景。

## 5 小结与展望

随着 SSCs 研究领域新实验技术和方法的应用, 越来越多的营养素、基因、调节蛋白及生长因子不断被发现与 SSCs 增殖和分化密切相关。SSCs 的研究逐渐成为生殖健康领域中的热点和重点, SSCs 有可能通过诱导和重编程在体内分化为其他全能性细胞, 表明 SSCs 具有很大的潜能与可塑性, 具有可转分化为肝干细胞及其他细胞的能力。SSCs 体外培养就可直接转分化, 不需外源基因驱动, 安全性更高。同时 SSCs 来源于患者自身组织时, 可以减少免疫排斥反应。现阶段小鼠的 SSCs 在体外能完成生精过程, 并培养出精子, 并且该项技术在其他物种体外培养中也逐渐发展, 包括猫甚至人类。通过细胞移植、组织培养等方式, SSCs 分化为精子细胞和成熟精子的体外实验逐步发展, 这对临床研究和治疗等再生医学领域具有重要价值。SSCs 增殖分化的基因调控机制尚不明确, 调控因子是通过哪种信号转导发挥其调节作用依然不是很确定, 这些都需要进一步的深入研究, 从而为动物克隆、无精男性不育症及人类某些遗传性疾病的基因治疗与研究提供新的方法和途径。

### [参 考 文 献]

- [1] Dettin L, Ravindranath N, Hofmann MC, et al. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1565-71
- [2] Tegelenbosch RA, Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res*, 1993, 290: 193-200
- [3] Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, et al. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8346-51
- [4] Huckins C, Oakberg EF. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. *Anat Rec*, 1978, 192: 519-27
- [5] Komai Y, Tanaka T, Tokuyama Y, et al. Bmi1 expression in long-term germ stem cells. *Sci Rep*, 2014, 4: 6175
- [6] Waheeb R, Hofmann MC. Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. *Int J Androl*, 2011, 34: e296-305
- [7] Oatley JM, Kaucher AV, Avarbock MR, et al. Regulation of mouse spermatogonial stem cell differentiation by STAT3 signaling. *Biol Reprod*, 2010, 83: 427-33
- [8] Chen Z, Sun M, Yuan Q, et al. Generation of functional hepatocytes from human spermatogonial stem cells.

- Oncotarget, 2016, 7: 8879-95
- [9] Cooke HJ, Saunders PT. Germ cell transplantation--a fertile field. *Nat Med*, 2002, 6: 16-7
- [10] 刘玲, 朱化彬, 王琛, 等. 精原干细胞移植相关技术研究进展. *畜牧兽医学报*, 2012, 43: 1677-82
- [11] Herrid M, Vignarajan S, Davey R, et al. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. *Reproduction*, 2006, 132: 617-24
- [12] Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, et al. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1260-4
- [13] Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*, 2002, 66: 21-8
- [14] Dym M, Jia MC, Dirami G, et al. Expression of c-kit receptor and its autophosphorylation in immature rat type A spermatogonia. *Biol Reprod*, 1995, 52: 8-19
- [15] Momeni-Moghaddam M, Matin MM, Boozarpour S, et al. A simple method for isolation, culture, and *in vitro* maintenance of chicken spermatogonial stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2014, 50: 155-61
- [16] Meistrich ML, Longtin J, Brock WA, et al. Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol Reprod*, 1981, 25: 1065-7
- [17] Wang P, Suo LJ, Wang YF, et al. Effects of GDNF and LIF on mouse spermatogonial stem cells proliferation *in vitro*. *Cytotechnology*, 2014, 66: 309-16
- [18] Zou K, Hou L, Sun K, et al. Improved efficiency of female germline stem cell purification using fragilis-based magnetic bead sorting. *Stem Cells Dev*, 2011, 20: 2197-204
- [19] 王庆忠, 王东方, 刘慧莲, 等. 大鼠精原干细胞的筛选与培养. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28: 747-51
- [20] Akbarinejad V, Tajik P, Movahedin M, et al. Removal of spermatogonial stem cells (SSCs) from *in vitro* culture modulates testosterone synthesis in bovine. *Comp Clin Pathol*, 2016, 25: 785-90
- [21] Mirzapour T, Movahedin M, Koruji M, et al. Xenotransplantation assessment: morphometric study of human spermatogonial stem cells in recipient mouse testes. *Andrologia*, 2015, 47: 626-33
- [22] Simon L, Ekman GC, Kostereva N, et al. Direct trans-differentiation of stem/progenitor spermatogonia into reproductive and nonreproductive tissues of all germ layers. *Stem cells*, 2009, 27: 1666-75
- [23] Koruji M, Shahverdi A, Janan A, et al. Proliferation of small number of human spermatogonial stem cells obtained from azoospermic patients. *J Assist Reprod Gen*, 2012, 29: 957-67
- [24] 郑艳波, 李毅, 甄永苏. 小鼠精原干细胞的分离培养及相关标记物检测. *中国医学科学院学报*, 2013, 35: 243-8
- [25] Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, et al. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction*, 2002, 124: 85-94
- [26] Shi R, Bai Y, Li S, et al. Characteristics of spermatogonial stem cells derived from neonatal porcine testis. *Andrologia*, 2015, 47: 765-78
- [27] Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology*, 2006, 66: 2091-103
- [28] Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, et al. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 715-26
- [29] Liu S, Tang Z, Xiong T, et al. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrin*, 2011, 9: 141
- [30] Herrid M, Davey RJ, Hutton K, et al. A comparison of methods for preparing enriched populations of bovine spermatogonia. *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21: 393-9
- [31] Zhang R, Sun J, Zou K. Advances in isolation methods for spermatogonial stem cells. *Stem Cell Rev*, 2016, 12: 15-25
- [32] Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11303-7
- [33] Kaul G, Kumar S, Kumari S. Enrichment of CD9<sup>+</sup> spermatogonial stem cells from goat (*Capra aegagrus hircus*) testis using magnetic microbeads. *Stem Cell Discov*, 2012, 2: 92-9
- [34] 马良宏, 田稼, 裴秀英, 等. 应用iTRAQ质谱分析技术对小鼠精原干细胞标志物进行动态研究与筛选. *中华男科学杂志*, 2015, 21: 200-7
- [35] 贺亚南, 陈晓丽, 任晓霞, 等. 免疫磁珠纯化小鼠精原干细胞的研究. *中国生物工程杂志*, 2014, 34: 38-43
- [36] Guo Y, Hai Y, Gong Y, et al. Characterization, isolation, and culture of mouse and human spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol*, 2014, 229: 407-13
- [37] 王俊龙, 杨施, 田汝辉, 等. 人精原干细胞分离、培养与鉴定. *中华男科学杂志*, 2015, 21: 208-13
- [38] Golestaneh N, Kokkinaki M, Pant D, et al. Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev*, 2009, 18: 1115-26
- [39] 范翠花. 灵长类动物精原干细胞的研究进展. *中华男科学杂志*, 2016, 22: 347-51
- [40] He Z, Kokkinaki M, Jiang J, et al. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Reprod Biol Endocrin*, 2010, 82: 363-72
- [41] Hermann BP, Phillips BT, Orwig KE. The elusive spermatogonial stem cell marker? *Biol Reprod*, 2011, 85: 221-3
- [42] Nasiri Z, Hosseini SM, Hajian M, et al. Effects of different feeder layers on short-term culture of prepubertal bovine testicular germ cells *in-vitro*. *Theriogenology*, 2012, 77: 1519-28
- [43] Kossacka N, Menesen J, Shefi S, et al. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells*, 2009, 27: 138-49
- [44] Guan K, Wolf F, Becker A, et al. Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nat Protoc*, 2009, 4: 143-54
- [45] He Y, Chen X, Zhu H, et al. Developments in techniques for the isolation, enrichment, main culture conditions and identification of spermatogonial stem cells. *Cytotechnology*,

- 2015, 67: 921-30
- [46] Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions I. *Biol Reprod*, 2005, 72: 985-91
- [47] Bahadorani M, Hosseini SM, Abedi P, et al. Short-term *in-vitro* culture of goat enriched spermatogonial stem cells using different serum concentrations. *J Assist Reprod Gen*, 2012, 29: 39-46
- [48] Aoshima K, Baba A, Makino Y, et al. Establishment of alternative culture method for spermatogonial stem cells using knockout serum replacement. *PLoS One*, 2013, 8: e7771
- [49] Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, et al. Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal *in vitro* by Ras-cyclin D2 activation. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 76-86
- [50] 刘茜, 余荣娇, 张凯, 等. 体外培养条件下SCF与RA对昆明小鼠精原干细胞增殖的影响. *四川解剖学杂志*, 2015, 23: 10-3
- [51] 刘欢欢, 陈曦, 余树民, 等. 以GDNF为核心的哺乳动物精原干细胞调控网络. *基础医学与临床*, 2015, 35: 409-12
- [52] Wang P, Zheng Y, Li Y, et al. Effects of testicular interstitial fluid on the proliferation of the mouse spermatogonial stem cells *in vitro*. *Zygote*, 2014, 22: 395-403
- [53] Wu Z, Falciatori I, Molyneux LA, et al. Spermatogonial culture medium: an effective and efficient nutrient mixture for culturing rat spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*, 2009, 81: 77-86
- [54] 李俊涛, 张培海, 曲晓伟, 等. 红景天多糖对精原干细胞体外增殖的影响. *中国组织工程研究*, 2016, 20: 1501-7
- [55] Flohé L. Selenium in mammalian spermiogenesis. *Biol Chem*, 2007, 388: 987-95
- [56] Boitani C, Puglisi R. Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 636: 65-7
- [57] Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, et al. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction*, 2002, 124: 173-8
- [58] Yamaguchi S, Miura C, Kikuchi K, et al. Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 26: 10859-64
- [59] Rooij DG, Mizrak SC. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development*, 2008, 135: 2207-13
- [60] Kanatsu-Shinohara M, Tnoue K, Lee J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 2004, 119: 1001-12
- [61] Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, et al. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med*, 2000, 6: 29-34
- [62] Ganguli N, Wadhwa N, Usmani A, et al. An efficient method for generating a germ cell depleted animal model for studies related to spermatogonial stem cell transplantation. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 142
- [63] Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci*, 2010, 365: 1663-78
- [64] 李俊涛, 张培海, 曲晓伟, 等. 养精胶囊提取液对精原干细胞增殖的影响. *中国组织工程研究*, 2016, 20: 2104-9
- [65] 胡红梅, 李伟, 孙新明, 等. 小鼠精原干细胞体外培养诱导成骨的能力. *中国组织工程研究*, 2014, 18: 3702-6