

不同培养条件对牛精原干细胞增殖的影响与特性鉴定

张仕强¹, 毕聪明^{1,2}, 彭树英¹, 吕宁¹, 张涌^{1*}

(1. 西北农林科技大学生物工程研究所, 杨凌 712100; 2. 锦州医学院畜牧兽医学院, 锦州 121000)

摘要: 探索血清浓度以及干细胞因子(SCF)、白血病抑制因子(LIF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)对牛精原干细胞体外增殖的影响,并对其进行鉴定。试验1:以高糖DMEM为基础培养液,添加浓度为0%、2.5%、5%和10%的胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS),分为4个试验组。结果表明,血清浓度影响牛精原干细胞的体外增殖,添加2.5%的FBS比较合适。试验2:培养液中加入不同浓度的SCF、LIF及GDNF,可增加精原干细胞的数量,其中加入20 μg/L SCF、80 μg/L GDNF、10 μg/L LIF后,与对照组比较能显著提高精原干细胞数($P < 0.05$)。采用碱性磷酸酶染色、细胞免疫组织化学染色和RT-PCR对牛精原干细胞进行鉴定,结果碱性磷酸酶染色呈弱阳性;细胞免疫组织化学染色 Integrin β1 阳性、c-kit 阳性;经RT-PCR扩增,获得了120 bp的Gfra1序列和280 bp的c-kit序列,与预期的产物大小一致。因此,培养液中添加2.5%FBS、20 μg/L SCF、80 ng/mL GDNF、10 μg/L LIF对精原干细胞的增殖有利。

关键词: 精原干细胞; SCF; LIF; GDNF; 牛

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)06-0542-06

Effect of Different Culture Condition on Bovine Spermatogonial Stem Cells Proliferation and Characteristic Identification

ZHANG Shi-qiang¹, BI Cong-ming^{1,2}, PENG Shu-ying¹, LÜ Ning¹, ZHANG Yong^{1*}

(1. Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

2. Department of Veterinary Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract: The aim of this paper was to study the effects of serum, SCF, LIF and GDNF on proliferation of bovine spermatogonial stem cells(SSC) *in vitro*, the identification of SSC was also conducted. Experiment 1: Adding 0%, 2.5%, 5% and 10% fetal bovine serum(FBS), respectively, to the basal culture medium DMEM (Dulbecco minimal essential medium) with high glucose. The results showed that DMEM with 2.5% FBS was mostly proper for the proliferation of bovine SSC *in vitro*. Experiment 2: Adding SCF, LIF or GDNF to the medium could increase the number of SSCs. However, only the concentrations of SCF, LIF and GDNF 20, 80, 10 μg/L, respectively, could significantly increase the number of SSCs compared to the control group($P < 0.05$). Alkaline phosphatase (AP) staining, immunohistochemical staining and RT-PCR were conducted to identify bovine SSC. The results showed that AP staining was weakly positive; Integrin β1 and c-kit staining were both positive. The sequences of Gfra1 and c-kit were also obtained by RT-PCR, the sizes(120 bp and 280 bp) were identical to the expected sizes. Therefore,

收稿日期: 2006-06-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2004AA213072)

作者简介: 张仕强(1981-), 男, 四川彭山人, 硕士生, 主要从事转基因与胚胎工程研究, Email: sq.zhang@yahoo.com.cn; 毕聪明(1973-), 男, 黑龙江海伦人, 博士生, 讲师, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究, Email: bcm818417@yahoo.com.cn. 张仕强, 毕聪明为并列第一作者

* 通讯作者: 张涌, Tel: 029-87080085, Email: zhy1956@263.net

DMEM with 2.5% FBS, adding 20 $\mu\text{g/L}$ SCF, 80 ng/mL GDNF and 10 $\mu\text{g/L}$ LIF, respectively, was appropriate for bovine SSCs culture *in vitro*.

Key words: spermatogonial stem cells; SCF; LIF; GDNF; bovine

1994年, Brinster 等人^[1]发表了精原干细胞(Spermatogonia stem cell, SSC)移植的新方法,实现了供体小鼠的精原干细胞在受体中进行精子发生和单倍体的生殖遗传。精原干细胞移植法不仅为精子发生过程的研究提供了有力的工具,也为转基因动物的制作指出了可能实现的新途径。精原干细胞可在体外合适的条件下长期存活并保持其生物学功能^[2]。精原干细胞可以接受基因操作而携带外源基因,并能将外源基因稳定地传递给后代^[3]。本试验主要研究了不同血清浓度、不同浓度细胞因子对牛精原干细胞体外培养增殖和分化的影响并对其进行鉴定,为牛精原干细胞体外长期培养打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 5月龄小公牛由杨陵区养殖场提供。

1.1.2 主要试剂 IV型胶原酶(Col IV)、胰蛋白酶、EDTA、固红、 α -萘酚磷酸盐均为Sigma公司产品; PBS(自制); DMEM(Gibco BRL); 胎牛血清(FBS)为杭州四季清生物工程材料有限公司产品; Percoll(Pharmacia公司); c-kit兔抗人抗体、Integrin $\beta 1$ 兔抗人抗体、生物素化羊抗兔IgG、SABC试剂盒、DAB显色试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。SCF(Stem cell factor)、LIF(Leukaemia inhibitory factor)、GDNF(Glial cell line-derived neurotrophic factor)均为Invitrogen产品; TRIZOL试剂、反转录试剂盒 ThermoScriptTM RT-PCR System购自Invitrogen公司; DEPC为AMRESCO公司产品; 引物由上海生物工程公司合成; Pyrobest DNA聚合酶、dNTP Mixture购自大连宝生物公司; 其余药品为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 取样 阴囊清洗剃毛消毒后, 无菌切开摘取两侧睾丸, 置加入500 IU/mL青链霉素的PBS液中1h内带回实验室, 用加入100 IU/mL青链霉素的PBS冲洗5次后切开白膜取约1g睾丸实质。

1.2.2 精原干细胞的分离纯化 采用Percoll密度梯度离心^[4], 结合3次差速贴壁法分离纯化。

1.2.3 饲养层细胞的制备 取细胞刚好铺满皿底、生长旺盛的支持细胞培养皿, 吸去培养液, 加入含丝裂霉素-C 5 ng/mL的培养液, 在培养箱中处理2h。吸去含丝裂霉素-C的培养液, 并用无钙镁PBS冲洗4~5次, 加入0.25%胰蛋白酶4mL, 作用3~5min后, 用等量细胞培养液终止消化, 并用吸管吹打成单细胞悬液。把细胞悬液移入10mL离心管中, 1000 r/min离心5min。弃上清, 把细胞沉淀用细胞培养液制成悬液, 并调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。在已经吸去明胶的培养皿中加入细胞悬液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的条件下培养。

1.2.4 试验设计 试验1: 不同血清浓度对牛精原干细胞体外培养的影响。经过分离纯化的细胞悬液, 调整密度为 $5.0 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于支持细胞饲养层上, 取24孔板4个, 每个板为1组, 以高糖DMEM+100 IU/mL青霉素+100 IU/mL链霉素为基础培养液, 每组再分别添加浓度为0%、2.5%、5%和10%的FBS, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度, CO_2 培养箱中培养。每24h, 每组收获3孔细胞, 计算每孔细胞数/mL。细胞接种当天记为第0天, 连续测定7d。绘制细胞生长曲线。观察精原干细胞培养特性, 100倍镜下随机选取5个视野每隔24h统计精原干细胞数。试验2: 不同细胞因子对精原干细胞体外增殖的影响。经过分离纯化的精原细胞, 以 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于饲养层上, 基础培养液为DMEM+2.5% FBS+0.01 mol/L β -巯基乙醇, 24h后将培养液换为添加不同生长因子的培养液。SCF分为4组, 即无SCF对照组及10、20、30 $\mu\text{g/L}$ 组; LIF分为4组, 即无LIF对照组及10、20、30 $\mu\text{g/L}$ 组; hGDNF组分为4组, 即无hGDNF对照组及20、40、80 $\mu\text{g/L}$ 组, 每隔24h观察细胞的分裂增殖情况, 100倍镜下随机取5个视野, 统计2周内的精原干细胞数目, 精原干细胞克隆作为一个精原干细胞计数。

1.2.5 牛精原干细胞的鉴定

1.2.5.1 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)染色: 吸出培养液, 无钙镁PBS洗3次, 4%多聚甲醛室温固定15min, 无钙镁PBS洗3次, 加入AKP染色液(1.2 mg/mL α -萘酚磷酸盐, 1 mg/mL

固红, 0.1 mol/L Tris 盐, 调至 pH 值为 8.4), 作用 15~30 min, 再用无钙镁 PBS 洗 3 次, 倒置显微镜下观察, 照相。

1.2.5.2 细胞免疫组织化学染色: 按照 SABC 试剂盒说明书进行, c-kit 兔抗人一抗及 Integrin β 1 兔抗人一抗 1:300 倍稀释。

1.2.5.3 RT-PCR 鉴定: 取精原细胞集落数多、集落突起明显的 100 mm 培养皿, 0.1% 胰蛋白酶消化 1 min, 终止消化, 轻轻吹打, 将精原细胞集落吹下, 重新接种, 3 h 后将精原细胞吸出再接种, 3 h 后吸出精原细胞, 1 000 r/min 离心 3 min, 采用 TRIZOL 法提取精原细胞总 RNA, 根据 GenBank 中登录的 Gfra1 和 c-kit 序列, 设计两对引物, Gfra1(PS): 5'-CCACCAGCATGTCCAATGAC-3', Gfra1(PA): 5'-GAGCATCCCATAGCTGTGCTT-3'; c-kit (PS): 5'-GTTACAAAATTGGTGGCA-3', c-kit(PA): 5'-CTGGGTTCTGGGCTCTTA-3'。Gfra1 和 c-kit cDNA 序列的反转录合成按 ThermoScriptTM RT-PCR System 的说明书配置, 反应结束后取 2 μ L cDNA 产物进行 PCR 扩增, PCR 扩增反应体系按 Pyrobest DNA 聚合酶说明书配置, 取 PCR 扩增产物 5 μ L 与 6 \times 凝胶加样缓冲液 1 μ L 混匀后, 点样电泳, 电压 5 V/cm, 45 min 后, 在凝胶成像分析系统中观察结果。

1.2.6 统计分析 数据以平均数和标准误表示, 用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 不同血清浓度对牛精原干细胞体外培养的影响

精原干细胞接种后多为单个存在, 24 h 后出现成对的中间有胞质桥连接的精原细胞(图 3A), 3~5 d 有 4~8 个细胞的小集落产生(图 3B), 集落逐渐长大, 突起明显, 中心致密, AKP 染色弱阳性(图 3C), 细胞免疫组织化学染色, Integrin β 1 阳性(图 3D)、c-kit 阳性(图 3E), 7~8 d 后集落消失, 细胞间隙加大, 形成许多圆形细胞聚集区(图 3F)。不加 FBS 组, 3 d 后在细胞内出现黑色颗粒, 细胞逐渐凋亡, 有死细胞漂浮。不同血清浓度对精原干细胞增殖影响较大, 其中 2.5% FBS 能明显促进 SSC 增殖(图 1), 2.5% FBS 组与其他组比较差异极显著($P < 0.01$)。RT-PCR 扩增出长度约为 120 bp 的 Gfra1 和 280 bp 的 c-kit 条带(图 2), 与目的片段大小一致。

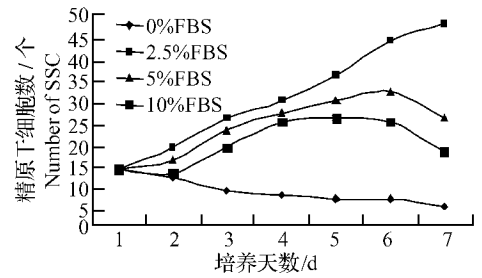
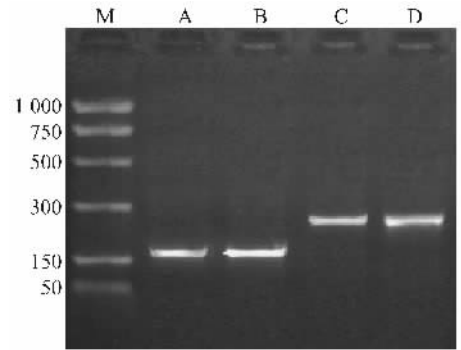


图 1 不同血清浓度对精原干细胞数的影响

Fig. 1 The effect of different serum concentrations on colony number of spermatogonia stem cell



M. PCR marker; A, B. Gfra1; C, D. c-kit

图 2 精原干细胞表面标志 RT-PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of spermatogonial stem cells

2.2 不同细胞因子对精原干细胞体外增殖的影响

在加入 SCF 后 48~72 h, 可在 20、30 μ g/L 组见到 8~16 个细胞的小细胞团, 培养 4~5 d, 10 μ g/L 组也出现增殖的细胞团, 此时对照组中的精原干细胞数量下降; 培养 10 d 左右, 30 μ g/L 组中仍可见到增殖的细胞团, 而其他各组精原干细胞大多已崩解消失。加入 LIF 后, 培养 10 d, 只在 10 μ g/L 组观察到细胞有增殖活动, 其他组精原干细胞大多凋亡。hGDNF 对精原干细胞分裂增殖活动的作用明显。加入 hGDNF 后 48 h 即可发现小的细胞集落, 随着培养时间的延长克隆体积变大, 中央突起, 培养至 2 周仍可见到精原干细胞集落, 80 μ g/L hGDNF 促进 SSC 增殖效果明显($P < 0.05$)(表 1)。

3 讨论

3.1 关于血清对 SSC_s 的作用

虽然在 ESC_s 和 PGC_s 体外培养中, 相对较高浓度的血清是必要的, 但是血清对 SSC_s 体外存活和增殖的作用却因培养基和饲养层的不同而不同。

表 1 不同浓度细胞因子对 SSC 体外增殖的影响

Table 1 Effect of different cell factor concentrations on proliferation of SSC

SCF /($\mu\text{g/L}$)	SSC/个 Number of SSC	LIF /($\mu\text{g/L}$)	SSC/个 Number of SSC	hGDNF /($\mu\text{g/L}$)	SSC/个 Number of SSC
对照组 Control	93.57 \pm 4.12 ^a	对照组 Control	100.71 \pm 11.18 ^a	对照组 Control	103.58 \pm 17.12 ^a
10	125.57 \pm 5.62 ^a	10	143.48 \pm 6.47 ^b	20	226.57 \pm 11.47 ^b
20	247.01 \pm 10.44 ^b	20	110.43 \pm 7.68 ^a	40	356.29 \pm 15.85 ^b
30	163.29 \pm 4.91 ^a	30	86.41 \pm 6.32 ^a	80	555.29 \pm 23.75 ^c

同列肩注中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Different small letters in the same row means significant difference($P < 0.05$)

在本试验中对照了不同血清浓度对牛 SSC_s 增殖活力的影响,加入 2.5% FBS 浓度的试验组相对克隆形成率最高,而加入更高的血清浓度,培养前期单个精原细胞增多,6 d 后急剧下降,高血清浓度反而抑制了 SSC_s 克隆的形成,这与 Fariborz 等人的研究结果一致^[5],而在小鼠 SSC 培养中,加入 10% 的 FBS 更能促进其存活和增殖^[6],所以 FBS 中的复杂成分对不同培养物及在不同培养体系中的作用是不一样的。在无血清培养体系中,加入 FBS 反而对 SSC 的增殖不利^[7]。可以推测,在血清中存在对 SSC 增殖调控的正、负两大类细胞因子,如果正、负因子在整个培养体系中达到平衡或负调控因子占主导地位,那么就不利于 SSC 增殖或抑制其增殖;如果正调控因子占主导地位,那么就促进 SSC 增殖,所以,在本研究的试验体系中,加入 2.5% FBS,SSC 克隆形成率最高,说明正调控因子在该体系中占主导地位,有利于 SSC 增殖。

3.2 关于支持细胞

作为生精上皮中仅有的体细胞,支持细胞具有许多独特功能。相邻支持细胞之间出现多处膜融合,形成缝隙结构,这是形成血睾屏障的结构基础。本研究发现 SSC 集落容易在培养皿的边缘及细胞爬片的边缘形成,这可能与这些部位的空间构型有关,这种小环境更象体内的微环境。另外,SSC 集落容易在支持细胞比较密集的地方形成,这可能与其局部的小环境(壁龛)和分泌功能有关。支持细胞可以合成一种特殊的雄激素结合蛋白(ABP),ABP 可以与睾酮等雄激素发生可逆性结合,对雄激素的转运及其在曲细精管内维持一定浓度具有重要作用。支持细胞还分泌选择性抑制卵泡刺激素(FSH)分泌的抑制素,抑制精原细胞的分裂。此外,支持细胞还可产生多种局部调节因子,与睾丸内其他类型细胞之间以旁分泌方式互相影响和作用,为生殖细胞

的增殖和分化提供了必要的条件^[8],所以支持细胞对 SSC 的增殖起重要作用,但是支持细胞的存在造成了 SSC 基因修饰、分子鉴定及功能研究的困难,因此,无饲养层培养 SSC,并保持其长期增殖是以后研究的重点。

3.3 关于几种生长因子

SCF 也叫 c-kit 配体、肥大细胞生长因子(Mast-cell growth factor, MGF),是一种作用广泛的多肽生长因子,为 c-kit 受体的配体^[9]。SCF 促进精原干细胞分裂增殖的机制,可能是由于 SCF 弥补了体外环境中 SCF 的不足,SCF 与精原干细胞膜上的 c-kit 酪氨酸激酶受体发生特异性结合,诱导该受体自动磷酸化,从而有利于其干细胞状态的维持和自增殖能力的调节。

LIF(Leukaemia inhibitory factor)是一种多功能细胞因子,LIF 由多种细胞合成,具有广泛的生物学作用,包括血细胞发育、神经元发育、胚胎发育、细胞分化、炎症等^[10],是一种多功能糖蛋白,以往主要用于 ES 细胞的分离培养,其主要功能是抑制干细胞的体外分化。培养液中加入 LIF 后,对细胞增殖起一定的作用,其中以 10 $\mu\text{g/L}$ 效果最好,20 $\mu\text{g/L}$ LIF 似乎促进了精原干细胞的凋亡,至于机理还有待于进一步研究。

GDNF(Glial cell line-derived neurotrophic factor)是转化生长因子- β 超家族的一个相关成员。它的信号转导受体复合物包括酪氨酸激酶 Ret 受体和 GDNF 家族受体 $\alpha 1$ ^[11],GDNF 能促进神经系统中多种类型神经元存活和分化。在中枢神经系统中,胶质细胞为神经元提供营养因子。与此类似,睾丸中支持细胞为生殖细胞提供营养因子。睾丸中支持细胞表达 GDNF 作为精子发生的旁分泌调节因子,GDNF 受体表达于未分化型精原细胞。本试验中牛精原干细胞数目有随着 hGDNF 浓度增高而增高

的趋势,80 $\mu\text{g/L}$ 的 hGDNF 能显著提高精原干细胞的数量,至于再高浓度的 hGDNF 能否起到更大的作用,或者会抑制精原干细胞的增殖还有待于进一步验证。

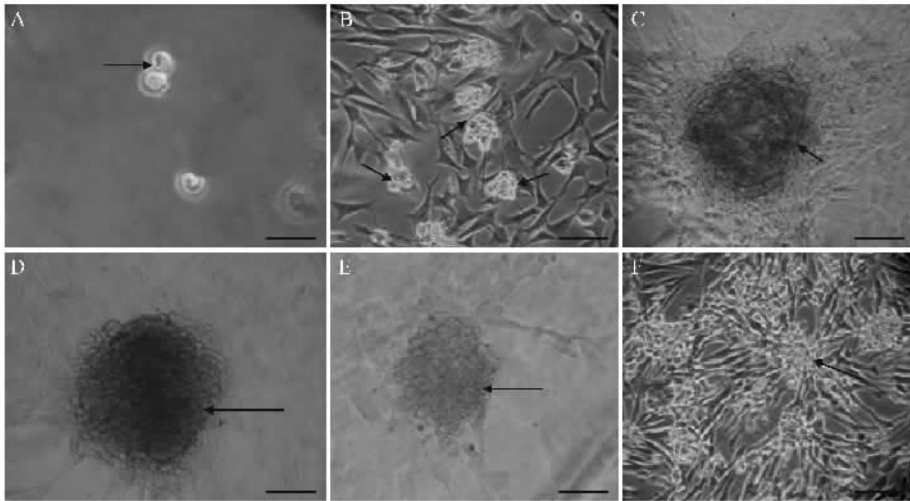
3.4 关于 SSC 的鉴定

SSC 的鉴定主要包括形态学鉴定、细胞表面特异性标记鉴定和功能鉴定。从发育生物学的角度来看,SSC 起源于原始生殖细胞(PGCs),PGC 又是起源于外胚层的细胞,而外胚层细胞则是由囊胚内细胞团(ICM)分化而来。所以,可以推测 SSC、PGC 和 ESC 是 3 类密切相关的细胞,在很多方面存在共性,当然也存在差异。当前 PGC 和 ESC 的研究远比 SSC 深入,所以 SSC 的很多鉴定仍借鉴 PGC 和 ESC 的鉴定方法和某些表面标记。在本研究中选择 AKP、 $\beta 1$ -整合素和 c-kit 进行了分析。ESC 和 PGC 的研究表明 AKP 染色呈强阳性,而在本研究中结果却显示 SSC 的 AKP 染色呈弱阳性,这可能是 SSC 发生了分化的结果。从 ESC 到 PGC,再到 SSC,可能一些基因的差异表达导致它们三者之间

存在一些根本的差异。

在小鼠 SSC 鉴定中, $\beta 1$ -整合素是其表面特异性标志之一^[12]。在本试验中,对牛 SSC 也进行了 $\beta 1$ -整合素检测,免疫组化反应结果呈阳性,这说明小鼠和牛 SSC 表面 $\beta 1$ -整合素是一个保守蛋白,关键基因的氨基酸序列具有保守性。 $\beta 1$ -整合素如果在更多物种 SSC 中检测到阳性,那么, $\beta 1$ -整合素有望成为 SSC 的一个特异性的并通用的表面标记。

c-kit 在 SSC 中的表达呈现阶段性, A_s 和 A_{pr} 精原细胞为 c-kit 阴性,而 A_{al} 、 $A_1 \sim A_4$ 、In 和 B 型精原细胞为 c-kit 阳性^[13]。本试验检测到 c-kit 阳性,说明 SSC 形成的克隆中已经有部分发生了分化,这与 AKP 染色结果一致。也与本研究所进行的 c-kit RT-PCR 检测结果一致^[14]。为了进一步检测培养体系形成的克隆中存在真正未分化的 SSC,选择了 *Gfra1* 基因作为特异标志基因进行了 RT-PCR 检测,结果呈阳性,这从分子水平进一步说明本研究观察到的克隆中存在未分化的 SSC。



A. 中间有胞质桥连接的成对 A 型精原细胞($\times 200$);B. 精原干细胞形成的小集落($\times 100$);C. 精原干细胞集落碱性磷酸酶表达呈弱阳性($\times 200$);D. 精原干细胞集落 Integrin $\beta 1$ 阳性($\times 200$);E. 精原干细胞集落 c-kit 阳性($\times 200$);F. 精原干细胞集落突起变得扁平,细胞间隙加大($\times 100$)。A、B、F. 标尺为 20 μm ,C、D、E 标尺为 100 μm

A. A_{pr} spermatogonia with cytoplasmic bridge($\times 200$);B. Small colony formed by spermatogonial stem cells($\times 100$);C. The colony of spermatogonial stem cells expressed low alkaline phosphatase ($\times 200$) D. The Integrin $\beta 1$ staining of spermatogonial stem cells colony was positive($\times 200$);E. The C-kit staining of spermatogonial stem cells colony was positive($\times 200$);F. The protuberance of spermatogonial stem cells colony became flat and the gap of cells widened($\times 100$). The bar of picture A, B, F were 20 μm , and C, D, E were 100 μm

图 3 牛精原干细胞的生长特性

Fig. 3 Growth characteristics of bovine spermatogonial stem cells

参考文献:

- [1] Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ cell transplantation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 11 298~11 302.
- [2] De Rooij D G, Grootegoed J A. Spermatogonial stem cells[J]. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10: 694~701.
- [3] De Rooij D G. Stem cells in the testis[J]. Int J Exp Pathol, 1998, 79: 67~80.
- [4] 张学明, 赖良学, 李德雪, 等. 小鼠精原细胞的分离和纯化[J]. 解剖学报, 2000, 31(3): 235~238.
- [5] Fariborz I, Krista D O, Laura B C. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during Long-Term culture[J]. Biol Reprod, 2003, 68: 272~281.
- [6] Makoto N, Buom Y R, Clayton J B. Maintenance of mouse male gene line stem cells *in vitro*[J]. Biol Reprod, 2003, 68: 2 207~2 214.
- [7] Hiroshi K, Mary R A, Ralph L B. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 16 489~16 494.
- [8] De Rooij D G, Van DisseI-Emiliani F M F. Regulation of proliferation and differentiation of stem cells in the male germ line in stem cells[C]. London Academic Press Potten CS, 1997. 283~313.
- [9] Copeland N C, Gilbert D J, Cho B C, *et al.* Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles[J]. Cell, 1990, 63: 175~182.
- [10] Saarma M, Ssriola H. Other neurotrophic factors: glial cell line~ derived neurotrophic factor (GDNF) [J]. Microsc Res Tech, 1999, 45: 292~302.
- [11] Meng X, de Rooij D J, Wwsterdahl K, *et al.* Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in mouse testis[J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3 267~3 271.
- [12] Shinobara T, Avarbxxk M R, Brinster R L. $\beta 1$ and $\alpha 6$ integrin are surface markers on mouse Spermatogonial stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 5 504~5 509.
- [13] Schrans-Stassen B H G J, Van de kant H J G, de Rooij D G, *et al.* Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A[J]. Spermatogonia Endocrinology, 1999, 140: 5 894~5 900.
- [14] Jon M O, Jerry J R, Derek J M. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during *in vitro* culture [J]. Biology of Reproduction, 2004, 71: 942~947.