

山羊精原干细胞的分离纯化及鉴定

孔群芳, 罗奋华, 萨初拉, 包佳婧, 刘代艳, 吴应积*

(内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要: 旨在探究 1 种简便高效分离纯化山羊精原干细胞的方法。采用三步酶消化对 4 月龄的山羊睾丸进行处理, 分离获得单细胞悬液。将细胞依次培养于明胶、大鼠鼠尾胶原和层粘连蛋白涂层的细胞培养皿中, 根据各类细胞贴壁能力和贴壁速度不同进行精原干细胞的富集和纯化, 并在各步纯化过程中用精原干细胞特异标记分子 PLZF 和 CDH1 进行免疫荧光标记染色鉴定, 统计精原干细胞所占的比率, 并对获得的细胞进行初步培养和鉴定。每克睾丸中分离出 1.36×10^7 个细胞。纯化后每克睾丸组织获得 8.7×10^4 个细胞, 其中精原干细胞纯度达 87.0%。将分离纯化后的细胞在体外培养可形成细胞簇, 并表达精原干细胞标记分子 CDH1 和 PLZF。结果表明, 通过三步酶消化和差异贴壁方法已经建立起山羊精原干细胞的分离纯化技术。用此技术纯化的山羊精原干细胞(SSCs)能在体外培养增殖, 形成细胞簇。

关键词: 山羊; 睾丸; 精原干细胞; 分离纯化; 免疫荧光染色

中图分类号: S827; Q28

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)10-1554-07

Enrichment and Identification of Spermatogonial Stem Cells from Goat Testis

KONG Qun-fang, LUO Fen-hua, WU Sachula, BAO Jia-jing, LIU Dai-yan, WU Ying-ji*

(The Key Laboratory for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract: The present study was aimed to establish a novel method that can efficiently isolate and purify spermatogonial stem cells (SSCs) from goat testis. Single cell suspension was prepared from testis of 4-month old goat by three-step enzymatic digestion. The SSCs were enriched from the suspended cells via differential attachment in gelatin, collagen, and laminin coated dishes respectively, according to the differential adherence capability in different kinds of cells. Immunofluorescent staining by using SSC molecular marker PLZF and CDH1 was performed for analysis of enrichment efficiency of the SSCs. The percentages of SSCs were calculated through PLZF- and CDH1- positive cells. The enriched cells were primarily cultured and carried out identification. 1.36×10^7 suspended cells were harvest from per gram of goat testis. 8.7×10^4 cells were obtained after purification, in which the purity of SSCs was 87.0%. The purified cells could be cultured to form clusters *in vitro*, and CDH1 and PLZF were identified to express in the cells by immunofluorescent staining. The results show that a technique for purification of goat SSCs has been established by three-step enzymatic digestion and differential attachment. Goat SSCs purified by this technique can be cultured *in vitro* for proliferation and forming clusters.

Key words: goat; testis; spermatogonial stem cells; isolation and purification; immunofluorescence staining

收稿日期: 2013-04-03

基金项目: 教育部创新团队计划(IRT0833); 高等学校博士学科点博导类基金(20101501110001)

作者简介: 孔群芳(1988-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士生, 主要从事生殖生物学与生殖技术研究, E-mail: kongqf1113@163.com

* 通信作者: 吴应积, 教授, 主要从事精原干细胞、精子发生过程及乳腺生物反应器研究, E-mail: wuyj1211@163.com

精原干细胞(Spermatogonial stem cells, SSCs)是指位于曲细精管基膜上,既能自我更新,维持自身群体数量恒定,又能定向分化产生精母细胞的成体干细胞,是雄性成体内唯一可将遗传物质传递到下一代的永生细胞^[1]。位于曲细精管基底膜的 As (A single)细胞是最原始的精原细胞,As 细胞不断分裂,或以对称分裂的形式分裂成为 2 个分离的新的 As 细胞,或以不对称分裂的形式分裂成一个 As 型细胞,另一个进一步分裂呈 2 个通过细胞间桥相连的 Apr(A-paired)型精原细胞。Apr 细胞有丝分裂成 4 链、8 链或 16 链 Aal(A-aligned)精原细胞。Aal 经过有丝分裂分化成 A1~A4、In(Intermediate)型和 B 型精原细胞。B 型精原细胞开始分化成为精母细胞。在传统模型中认为单个的 As 细胞为精子发生的干细胞^[2],但是 As 细胞在睾丸内数量很少,在成年小鼠睾丸内的全部生殖细胞中,仅有 0.03%是干细胞^[3]。SSCs 的独特优势使其成为动物转基因的理想载体细胞^[4]。而 SSCs 转染,异体、异种移植技术的实际应用,都要用高度纯化的 SSCs。但目前为止还没有一种分子和表型标记来纯化出真正干细胞意义的 As 细胞, Apr 和 Aal 也能表达 As 所能表达的标记,在体外培养中普遍将 As、Apr 和 Aal 型的精原细胞称为未分化型精原细胞,所以 As、Apr、Aal 精原细胞统一被称作 SSCs^[5]。目前,小鼠中已建立了较成熟的 SSCs 技术体系,而大动物的相关研究还处于探索阶段^[6],要将小鼠的研究成果应用于家畜的精原干细胞操作,首先需要解决的问题是找到一种可行的方法将其分离纯化,并进行体外培养扩增。在小鼠研究中,用于富集和纯化 SSCs 的方法主要有:隐睾手术富集法、免疫磁珠分选法、流式细胞分选法、Percoll 密度梯度离心法和差异贴壁法。流式细胞分选法和免疫磁珠分选法都需要 SSCs 特异的表面抗原的抗体。然而,家畜 SSCs 中表面抗原抗体的研究报道不多,基因文库中家畜 SSCs 表面抗原的基因序列也不多。为了解决这个问题,笔者克隆了绵羊 CDH1 基因^[7],测定了基因序列,并制作了抗体。

山羊具有繁殖率高、产乳量高、适应性强、易管理等特点,是最适合做乳腺生物反应器的家畜动物之一,其应用价值已经越来越被国内外科研工作者所重视。然而目前关于山羊 SSCs 的研究还处于初步分离和短期培养的阶段^[8-10],关于 SSCs 移植的研究也大多集中在用雄性睾丸混合细胞直接移植到受

体山羊睾丸中^[11-13],这在一定程度上制约了移植的成功率。如果取得足够的较高纯度 SSCs 将对于山羊 SSCs 的移植是一个很大的突破。国内外关于纯化的研究报道很少,有人用细胞外基质对山羊 SSCs 的纯化进行了初步研究,结果纯度不高^[14]。M. Bahadorani 等发现山羊 SSCs 特异表达 PLZF 活性^[10]。本研究在前人研究的基础上,采用三步酶消化对 4 月龄的山羊睾丸进行处理,制备单细胞悬液,然后根据各类细胞贴壁能力和贴壁速度不同进行 SSCs 的富集和纯化,对各步纯化过程中用 SSCs 特异标记分子 PLZF 和 CDH1 进行免疫荧光标记染色鉴定,统计精原干细胞所占的比率,对纯化获得的细胞培养后用 CDH1 和 PLZF 免疫荧光双标记染色鉴定。这是首次对差异贴壁后各个纯化过程收集的细胞进行 SSCs 纯化效率进行记录。主要目的是探索一种简便高效的分离纯化山羊 SSCs 的方法,为进一步研究山羊 SSCs 的增殖、分化、遗传修饰及移植打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 山羊睾丸取自于内蒙古呼和浩特市穆斯林屠宰场,取 4 月龄山羊的睾丸 1 对,保存于 4℃,在 1~2 h 内用于细胞分离培养。

1.1.2 主要试剂、溶液 SSCM 培养液^[15], DMEM/F12(Gibco),胎牛血清(FBS,天津濒洋生物), β -巯基乙醇(SERVA),两性霉素 B(BBI),Collagenase IV (Worthington),EDTA(上海生工),Trypsin (Amresco),DNase I(上海生工),明胶、层粘连蛋白(Sigma),CDH1 抗体(本实验室制备),PLZF 抗体(Santa Cruze),山羊抗小鼠 cy3 二抗、兔抗山羊 FITC 二抗(碧云天),Hoechst(Sigma),其他化学试剂均为国产分析纯,PBS、大鼠尾胶原均为本实验室自制^[16]。

1.2 方 法

1.2.1 山羊睾丸单细胞悬液的制备 山羊睾丸精原干细胞的分离参照 A. Honaramooz 等^[11]和张岩等^[17]组合酶消化的方法,并做了一些改进:山羊睾丸除去阴囊和睾丸鞘膜,在无菌条件下去除白膜,剪切为 2~3 mm³ 左右的小块。去除睾丸网和血管后,用剪刀将组织块剪碎,并加入 Collagenase IV 在 37℃ 孵育 40 min。随后加入透明质酸酶和 DNase I,在 37℃ 孵育 20 min。将消化后的曲细精管用

PBS 洗 3 次, 然后加入 0.25% Trypsin /EDTA 和 DNaseI 溶液, 37 °C 孵育 10 min, 反复吹打, 使其形成单细胞悬液, 立刻加入含 FBS 的培养液终止反应。依次通过 200 目和 300 目的尼龙膜过滤得到单细胞悬液。台盼蓝染色计数检测细胞存活率, 取出适当数量的细胞做细胞涂片用于 SSCs 检测。

1.2.2 山羊精原干细胞的纯化 山羊睾丸 SSCs 的纯化参照 F. K. Hamra 等^[18] 和张岩等^[17] 差异贴壁纯化 SSCs 的方法, 并做了一些修改: 将得到的细胞悬液依次接种在明胶、大鼠鼠尾胶原、层粘连蛋白涂层的培养皿中, 在 32.5 °C、5.5% CO₂ 的细胞培养箱中分别培养 68 h、4 h 和 40 min。在层粘连蛋白涂层的培养皿中培养 40 min 后吸去未贴附的悬浮细胞及培养液, 加入 PBS-BSA 溶液使黏附细胞脱壁, 收集脱壁的细胞, 细胞计数, 并进一步体外培养。分别取明胶未贴附、鼠尾胶原未贴附的细胞做细胞涂片, 和层粘连蛋白贴附的细胞用于 SSCs 检测。

1.2.3 SSCs 的培养 收集到的山羊 SSCs, 用丝裂霉素处理的 STO 细胞^[19] 为滋养层, SSCM 为培养液在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养, 隔天换液。

1.2.4 细胞的免疫荧光染色 对分离的单细胞悬液、明胶未贴附的细胞、鼠尾胶原未贴附的细胞涂片和层粘连蛋白贴附的细胞进行免疫荧光标记染色鉴定。用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 并用含有山羊血清的封闭液封闭 30 min, 然后加入稀释的一抗分别为抗 CDH1 抗体 (1:100 稀释), 抗 PLZF 抗体 (1:100 稀释), 4 °C 孵育过夜, 用 CY 3 标记山羊抗小鼠 IgG (1:300 稀释), FITC 标记兔抗山羊 IgG (1:400 稀释) 二抗孵育 30 min, Hoechst33342 (1:1000) 孵育 8 min, 用 Nikon TE 2000-U 光学显微镜对细胞进行观察并照相。对初步培养的精原干细胞进行免疫荧光双标记染色鉴定, 步骤同上。

1.2.5 数据分析 对分离的单细胞悬液、明胶未贴附的细胞、鼠尾胶原未贴附的细胞涂片和层粘连蛋白贴附的细胞进行免疫荧光标记染色鉴定后, 对各个分离过程得到的细胞至少统计 200 个细胞。分别统计 PLZF 和 CDH1 阳性细胞数, 重复 3 次。计算各个分离纯化过程中 PLZF 和 CDH1 阳性细胞比率, 据此计算出山羊 SSCs 纯化效率。

2 结果

2.1 山羊 SSCs 的分离纯化

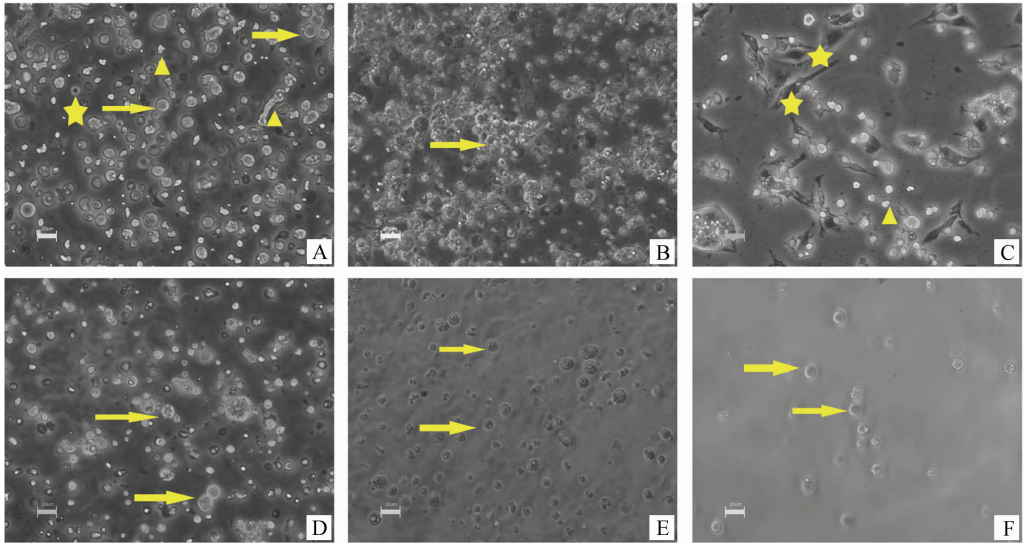
经过组合酶消化处理和过滤, 得到山羊睾丸单细胞悬液, 平均每克睾丸组织分离出 1.36×10^7 个细胞, 细胞存活率为 92.4%。该细胞悬液中有未分化的 SSCs、分化的精原细胞和体细胞, 偶尔可见未消化的曲精细管团块和凋亡的细胞 (图 1A)。经明胶涂层的培养皿贴壁分离之后, 发现有悬浮的圆形细胞和半贴壁的细胞团 (图 1B) 形成。轻轻去除死亡的细胞后, 收集未贴壁的细胞, 剩余贴壁的细胞为体细胞, 包括肌样细胞和支持细胞 (图 1C)。收集到的未贴附的细胞主要为精原细胞, 将这些细胞铺到大鼠鼠尾胶原涂层的培养皿中 (图 1D), 分化的精原细胞先于未分化的精原细胞贴在鼠尾胶原上。在鼠尾胶原贴壁培养后, 收集未贴附的细胞主要为未分化的精原细胞, 铺在层粘连蛋白涂层的 12 孔板内 (图 1E)。SSCs 先于其他细胞黏附于层粘连蛋白上, 轻轻洗去未贴壁的细胞后, 剩余贴壁的细胞主要为 SSCs (图 1F), 平均每克睾丸组织得到 8.7×10^4 个细胞。

2.2 山羊 SSCs 分离纯化效率

对分离的单细胞悬液、明胶未贴附的细胞、鼠尾胶原未贴附的细胞涂片和层粘连蛋白贴附的细胞进行 PLZF 和 CDH1 免疫荧光双标记染色 (图 2)。图 2 显示, PLZF 和 CDH1 染色重叠, 阳性细胞的细胞核致密, 这些细胞计数为 SSCs。SSCs 分离纯化效率如图 3 所示。酶消化分离的单细胞悬液中, 阳性细胞比率为 $14.2\% \pm 0.8\%$ 。经过明胶贴壁负选后, 在未贴壁的细胞中, 阳性细胞比率为 $48.5\% \pm 0.7\%$ 。经过鼠尾胶原贴壁负选后, 在未贴壁的细胞中, 阳性细胞比率为 $61.5\% \pm 2.2\%$ 。最终在层粘连蛋白贴壁细胞中, 阳性细胞比率为 $87.0\% \pm 0.8\%$ 。

2.3 山羊 SSCs 的培养和免疫荧光双标记染色鉴定

收集到的 SSCs 培养 4 d 后, 可以观察到细胞数量增加, 培养 1 周后可见大量增殖的精原干细胞聚集形成细胞簇。经免疫荧光双标记染色鉴定后, 发现这些细胞簇可同时表达 SSCs 特异的标记基因 PLZF 和 CDH1, 而 STO 细胞则不表达 (图 2)。

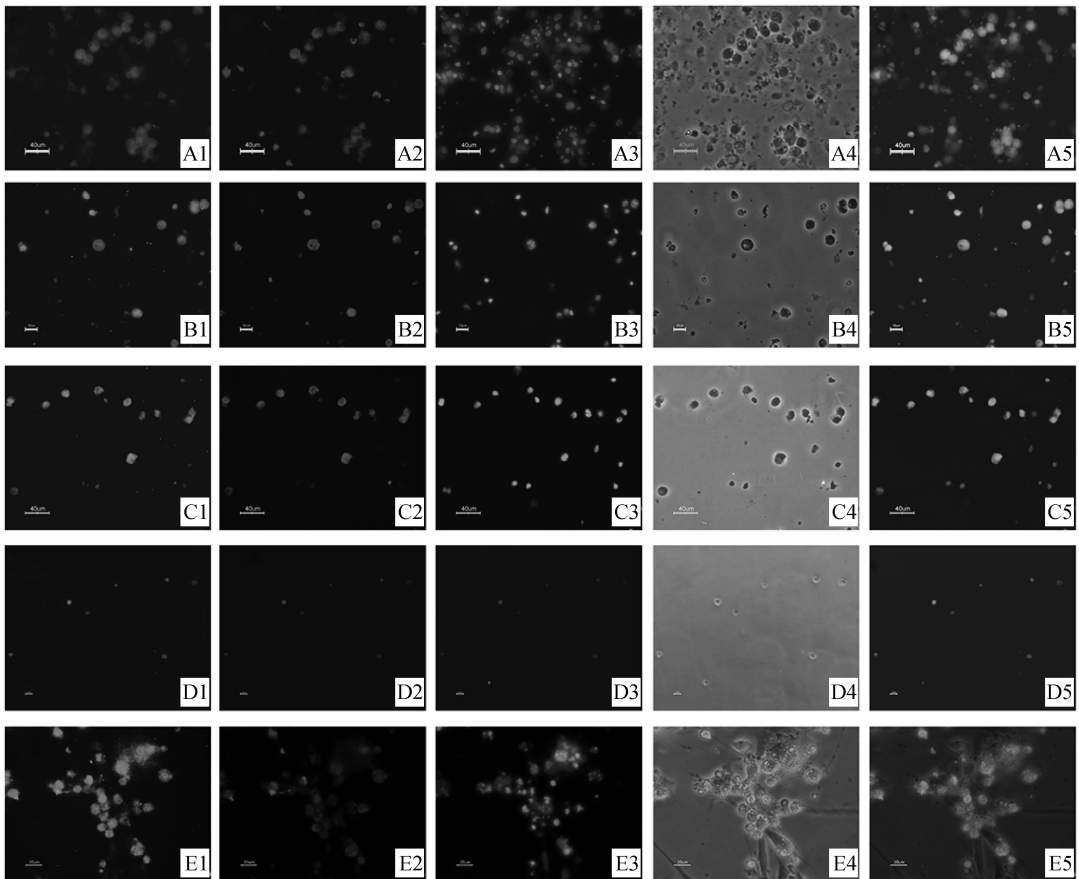


A. 单细胞悬液; B. 明胶涂层培养 68 h 的细胞; C. 明胶涂层培养 68 h 后贴壁的细胞; D. 明胶涂层培养 68 h 后未贴壁的细胞; E. 大鼠尾胶原涂层培养 4 h 后收集的未贴壁的细胞; F. 层粘连蛋白涂层贴壁的细胞。箭号表示精原细胞, 星号表示体细胞, 箭头表示曲细精管团块和凋亡细胞

A. Single cell suspension; B. Cells cultured 68 h in gelatin coated culture dish; C. Gelation binding cells cultured 68 h in gelatin coated culture dish; D. Gelation Non-binding cells cultured 68 h in gelatin coated culture dish; E. Collagen non-binding cells after 4 h of culture in rat tail collagen coated culture dish; F. Laminin binding cells in laminin coated culture dish. Arrow indicate spermatogonia, asterisks indicate somatic cells, and arrow head indicate seminiferous tubules clumps and apoptotic cells

图 1 分离纯化的山羊精原干细胞(标尺=20 μm)

Fig. 1 Goat SSCs obtained after isolation and purification(Scale bar=20 μm)



A1~A5. 单细胞悬液免疫荧光染色鉴定; B1~B5. 明胶未贴附的细胞免疫荧光染色鉴定; C1~C5. 胶原蛋白未贴附的细胞免疫荧光染色鉴定; D1~D5. 层粘连蛋白贴附的细胞免疫荧光染色鉴定; E1~E5. 体外培养的 SSCs 染色鉴定。绿色代表 PLZF 阳性细胞 (A1、B1、C1、D1、E1), 红色代表 CDH1 阳性细胞 (A2、B2、C2、D2、E2), 蓝色代表 Hoechst33342 核染色 (A3、B3、C3、D3、E3), 可见光显微镜照片 (A4、B4、C4、D4、E4), 合并图 (A5、B5、C5、D5、E5)。A1~A5、C1~C5 标尺 = 40 μm , B1~B5、D1~D5、E1~E5 标尺 = 20 μm

A1-A5. Single cell suspension; B1-B5. Gelatin non-binding cells; C1-C5. Collagen non-binding cells; D1-D5. Laminin binding cells. E1-E5. SSCs cultured in vitro. Green color indicates PLZF-positive cells (A1, B1, C1, D1, E1). Red color indicates CDH1-positive cells (A2, B2, C2, D2, E2). Blue color indicates nuclei stained with Hoechst33342 (A3, B3, C3, D3, E3). Visible picture (A4, B4, C4, D4, E4). Merged picture of PLZF, CDH1 and Hoechst33342 picture (A5, B5, C5, D5), Merged picture of PLZF, CDH1 and visible picture (E1). Merged picture of PLZF, CDH1 and visible picture. Scale bar = 40 μm (A1-A5, C1-C5), Scale bar = 20 μm (B1-B5, D1-D5, E1-E5)

图2 分离纯化过程和体外培养的山羊 SSCs 的免疫荧光标记染色鉴定

Fig. 2 Immunofluorescence staining of goat SSCs for each enrichment procedure and *in vitro* culture

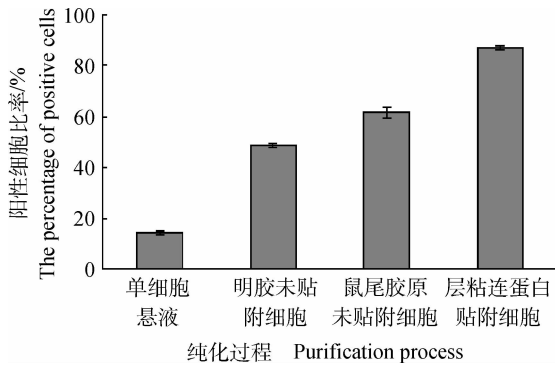


图3 山羊 SSCs 纯化效率

Fig. 3 The enrichment efficiency of goat SSCs

3 讨论

SSCs 既能通过自我更新维持生殖干细胞库的稳定, 又能通过严格而有序的调控, 最终分化形成精子, 在整个生命过程中维持雄性动物正常的生殖能力。研究者在研究 SSCs 的细胞学特性、分离纯化 SSCs 的方法、SSCs 体外诱导单倍体细胞甚至精子的形成、探索 SSCs 的体外长期培养系统、SSCs 的基因修饰和同种异种间的移植方面做了很多工作, 而 SSCs 的研究必需有足够数量和较高纯度的细胞。

青春期前期, 精原干细胞发生后, 随动物日龄的增加, 精原细胞开始分化形成各级生殖细胞, 其绝对数目及所占生殖细胞的比例都逐渐下降, 因此选择合适的年龄是首先应该考虑的, 一般日龄相对小的睾丸组织能得到较高的 SSCs 消化分离率^[20]。4 月龄的山羊睾丸内未分化的生殖母细胞大量增殖发育, 形成原始 A 型精原细胞^[21], 据此本研究选用 4 月龄的山羊睾丸进行 SSCs 的分离纯化。

分离出所有的 A 型精原细胞是目前为止最有

效的富集 SSCs 的方法^[22]。睾丸细胞分离的最终目的是将细胞分离成单细胞形式, 并且尽量避免影响细胞的活性。通常报道的分离方法一般是利用 Collagenase、透明质酸酶、Trypsin 和 DNase 消化 60 min, 去除间质细胞和曲细精管团块后再加入 Collagenase、透明质酸酶和 DNase 消化 45 min 进行两步酶消化^[22]。本试验采用三步酶消化法, 用 Collagenase IV 处理后, 使曲细精管分解成小段, 然后加入透明质酸酶和 DNA 酶消化曲细精管。最后用 Trypsin 和 DNase 消化, 将细胞分离成单细胞。用此方法平均从每克睾丸组织获得 1.36×10^7 个细胞。这一结果高于前人对山羊 (1.08×10^7)^[14]、牛 (1.33×10^6)^[22]、水牛 (2.88×10^6)^[23] 和绵羊 (8.0 ± 2.6) $\times 10^6$ ^[24] 用二步酶消化法获得的细胞数。分离的细胞存活率为 92.4%, 表明三步酶消化法分离睾丸细胞效果较好。

SSCs 数量稀少, 对其进行体外分离培养较为困难, 因此必须寻找合适的分子标记来分离富集精原干细胞。PLZF (Promyelocytic leukemia zinc-finger, 早幼粒细胞白血病锌指) 是转录抑制因子 Poz 和 Kruppel (POK) 家族的一个成员, 在睾丸中 PLZF 仅在早期未分化的精原细胞中表达, 它的表达是维持 SSCs 自我更新所必需的^[25-26]。M. Bahadorani^[27] 等对绵羊和山羊睾丸组织的 PLZF 抗体免疫组化显示 PLZF 在它们的未分化的精原细胞均有表达, 表明 PLZF 的表达在这些物种中具有保守性。另外他们发现在分离的山羊 SSCs 中也有 PLZF 的表达^[10]。研究报道 CDH1 (E-cadherin) 是小鼠 SSCs 的特异表面标记基因^[28], 在大鼠^[29] 部分 SSCs 中也有表达, 是否在山羊 SSCs 内表达, 至今还没有报道。本研究以 PLZF 和 CDH1 为标记, 对山羊 SSCs 的分离纯化效率进行了统计。酶消化分离的单细胞悬液中, 阳性细胞比率为 14.2%, 这与绵羊

的研究结果相似(17.7%)^[24]。

曲细精管基底膜细胞外基质成分中包括层粘连蛋白和胶原蛋白。研究发现 SSCs 特异表达细胞表面分子 $\beta 1$ 和 $\alpha 6$ 整合素^[30],而这些整合素是层粘连蛋白的受体^[31]。所以 SSCs 与层粘连蛋白的亲合力最高^[30, 32],而分化的精原细胞优先于未分化的精原细胞附着在胶原蛋白上^[33]。明胶是一种变性的胶原蛋白衍生物,也是一种细胞黏附蛋白,通常将明胶涂层到玻璃或塑料培养皿中用来培养多种类型的体细胞。根据上述机理采用差别贴壁法对山羊 SSCs 进行分离纯化。在明胶涂层的培养皿中,体细胞贴壁的速度远远超过精原细胞,培养 68 h 后,体细胞大多完成贴壁,而精原细胞贴壁不牢甚至不贴壁,轻轻吹打即脱落。经过明胶贴壁负选后,在未贴壁的细胞中,SSCs 阳性细胞比率为 48.5%。在鼠尾胶原涂层的培养皿中,分化的精原细胞比未分化的精原细胞更容易黏附在鼠尾胶原上。在未贴壁的细胞中,SSCs 阳性细胞比率为 61.5%。而未分化的精原细胞更容易附着在层粘连蛋白上,去掉未贴壁细胞,将贴壁细胞收集即可得到大量纯化的精原干细胞。最终在层粘连蛋白贴壁细胞中,SSCs 阳性细胞比率为 87.0%。这个纯化结果高于用 Percoll 密度梯度离心法富集水牛 SSCs(71.86%±2.34%)^[23]和绵羊 SSCs(65.3%±3.2%)^[24]的纯化效率,明显高于用细胞外基质纯化的山羊 SSCs(49%)^[14]。这是首次对差异贴壁各个步骤得到的 SSCs 的比率进行统计。纯化得到的细胞经过培养,能够形成细胞簇,并且具有干细胞标记分子表达特性。本研究中 CDH1 在山羊 SSCs 内表达首次得到验证。

本研究通过酶消化得到的细胞通过差异贴壁法,不需要专门的仪器设备和特异的细胞表面分子标记抗体,简便易行,能够高效的富集山羊 SSCs。纯化得到的细胞经过培养,能够形成 SSCs 簇,并且维持表达 SSCs 标记基因。这些结果将为进一步研究山羊 SSCs 的增殖、分化、长期培养、遗传修饰及移植操作打下基础。

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] TEGELENBOSCH R A, DE ROOIJ D G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse [J]. *Mutat Res*, 1993, 290(2): 193-200.
[4] WU Y J, LUO F H, BOU S. Prospect of creating transgenic animals by using spermatogonial transplantation[J]. *Chin Sci Bull*, 2005, 50(22): 2537-2545.
[5] APONTE P M, VAN BRAGT M P, DE ROOIJ D Q, et al. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities [J]. *APMIS*, 2005, 113: 727-742.
[6] 刘玲,朱化彬,王琛,等. 精原干细胞移植相关技术研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(11): 1677-1682.
[7] 胡甜园,白音巴图,罗奋华,等. 绵羊 *cdh1* 基因全编码区的克隆及序列分析[J]. *生物技术通报*, 2011, 9:96-101.
[8] 周汉林,施力光,侯冠彧,等. 山羊睾丸生精细胞体外培养和鉴定[A]//中国畜牧兽医学学会养羊学分会 2012 年全国养羊生产与学术研讨会会议论文集[C]. 横山:2012.
[9] BANAFSHEH H, MARYAM R A, MOHAMMAD M A, 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): 1029-1038.
[10] BAHADORANI M, HOSSEINI S M, ABEDI P, et al. Short-term *in vitro* culture of goat enriched spermatogonial stem cells using different serum concentrations[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(1): 39-46.
[11] HONARAMOOZ A, BEHBOODI E, HAUSLER C L, et al. Germ cell transplantation in goats[J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 64(4): 422-428.
[12] HONARAMOOZ A, BEHBOODI E, MEGEE S O, et al. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats[J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(4): 1260-1264.
[13] HONARAMOOZ A, BEHBOODI E, HAUSLER C L, et al. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation[J]. *J Androl*, 2005, 26(6): 698-705.
[14] 朱海鲸. 奶山羊雄性生殖干细胞的分离培养及向精子细胞的诱导分化[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2011.
[15] 吴应积,罗奋华,张岩,等. 家畜精原干细胞培养液

- SSCM[P]. 中国:201210549380. 5, CN103074297A, 2013-05-01.
- [16] 多曙光,吴应积,罗奋华,等. 牛乳腺上皮细胞的分离培养及其生物学特征[J]. 动物学研究, 2006, 27(3): 299-305.
- [17] 张 岩,罗奋华,刘林洪,等. 大鼠精原干细胞的高效分离和纯化方法[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(5): 543-547.
- [18] HAMRA F K, CHAPMAN K M, NGUYEN D M, et al. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(48): 17430-17435.
- [19] 刘海超,张 岩,于泊洋,等. 制备精原干细胞滋养层细胞条件的优化[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(4): 626-630.
- [20] HERRID M, DAVEY R J, HILL J R. Characterization of germ cells from pre-pubertal bull calves in preparation for germ cell transplantation [J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 330(2): 321-329.
- [21] 岳文斌,施力光,杨茄洁. 波尔山羊性成熟前辜丸发育的显微变化过程[A]//中国畜牧兽医学学会养羊学会全国养羊生产与学术研讨学会论文集[C]. 德令哈:2007-2008.
- [22] IZADYAR F, SPIERENBERG G T, CREEMERS L B, et al. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis [J]. *Biol Reprod*, 2002, 124(1): 85-94.
- [23] RAFEEQI T, KAUL G. Isolation and enrichment of type A spermatogonia from pre-pubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis[J]. *Andrologia*, 2013, 45(3): 195-203.
- [24] RODRIGUEZ-SOSA J R, DOBSON H, HAHNEL A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep [J]. *Theriogenology*, 2006, 66(9): 2091-2103.
- [25] BUAAS F W, KIRSH A L, SHARMA M. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(6): 647-652.
- [26] COSTOYA J A, HOBBS R M, BARNA M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(6): 653-659.
- [27] BAHADORANI M, HOSSEINI S M, ABEDI P, et al. Comparative immunohistochemical analysis of VASA, PLZF and THY1 in goats and sheep suggests that these markers are also conserved in these species [J/OL]. *J Cytol Histol*, 2011, 2: 126. <http://www.omicsonline.org/2157-7099/2157-7099-2-126.php>.
- [28] MASUTAKA T, YUZO K, HIROKI K, et al. CDH1 (E-cadherin) is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76: 130-141.
- [29] ZHANG Y, SU H, LUO F, et al. E-cadherin can be expressed by a small population of rat undifferentiated spermatogonia *in vivo* and *in vitro* [J]. *In vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011, 47: 593-600.
- [30] SHINOHARA T, AVARBOCK M R, BRINSTER R L. β 1- and α 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cell [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(10): 5504-5509.
- [31] KON Y, ENDOH D, IWANAGA T. Expression of protein gene product 9.5, a neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase, and its developing change in Sertoli cells of mouse testis[J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54(4): 333-341.
- [32] ORWIG K E, SHINOHARA T, AVARBOCK M R, et al. Functional analysis of stem cells in the adult rat testis[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(4): 944-949.
- [33] HAMRA F K, GATLIN J, CHAPMAN K M, et al. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 14931-14936.

(编辑 程金华)