

精原干细胞移植相关技术研究进展

刘玲¹, 朱化彬¹, 王琛^{1,2}, 郝海生¹, 赵学明¹, 冯荣³,
杜卫华¹, 秦彤¹, 刘岩¹, 王栋^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业部畜禽遗传资源与利用重点开放实验室, 北京 100193; 2. 广西大学动物科技学院, 南宁 530004; 3. 乌兰察布职业学院, 乌兰察布 012000)

摘要: 精原干细胞的分离培养及移植等相关技术对于雄性动物不育、精子发生机理的研究及转基因新技术的建立都具有重要意义。虽然小鼠精原干细胞的生物学特性已经研究得较为清晰, 并建立了较为成熟的分离、纯化、培养技术体系, 其受体制备和移植技术也较为成熟, 但是, 技术效率仍然很低。对小鼠精原干细胞生物学特性、分离培养及受体制备与移植方法的分析总结, 将对干细胞制备最佳时机的确定、已有精原干细胞分离纯化、培养和受体准备及移植方法的改进提高起到重要的推动作用, 也为今后大型动物的相关研究指明了方向。

关键词: 精原干细胞; 分离; 纯化; 培养; 移植

中图分类号: S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)11-1677-06

Research Progress of Spermatogonial Stem Cells Transplantation Technology

LIU Ling¹, ZHU Hua-bin¹, WANG Chen^{1,2}, HAO Hai-sheng¹, ZHAO Xue-ming¹,
FENG Rong³, DU Wei-hua¹, QIN Tong¹, LIU Yan¹, WANG Dong^{1*}

(1. *The Key Laboratory for Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture of China, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*; 2. *Animal Science and Technology College, Guangxi University, Nanning 530004, China*; 3. *Wulanchabu Vocational College, Wulanchabu 012000, China*)

Abstract: The culture and transplantation of spermatogonial stem cells (SSCs) and related researches will be significant in some fields, such as male infertility, spermatogenesis mechanism research and set-up of transgenic technology. Biological characteristics of mouse SSCs had been studied clearly. The technology system of isolating, purifying and cultivating these stem cells had been built, as well as recipient preparation and transplantation technology. However, the efficiency of these technologies is not high. Reviewing all the above technologies, not only the optimum preparation time of the stem cells can be determined, but also the technique of recipient preparation and the techniques of purification, cultivation and transplantation of SSCs will be improved. And these will also provide guidance for the future study on farm animals in this field.

Key words: spermatogonial stem cells; isolation; purification; cultivation; transplantation

精原干细胞 (Spermatogonial stem cells, SSCs) 是一类具有自我更新和定向分化潜能的组织特异性干细胞, 通过自我更新维持自身数目的相对恒定, 并通过定向分化产生各级精原细胞直至精子, SSCs 又

是成年动物体内唯一能将遗传信息传递给子代的干细胞类型^[1]。SSCs 的分离鉴定与移植对人类临床医学以及试验方法学等的发展具有重要的理论与实践意义, 放化疗前获取并保存病人的生殖细胞, 治疗

收稿日期: 2012-03-02

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划课题 (2011BAD19B02)

作者简介: 刘玲 (1986-), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: liuling-1986@163.com

* 通讯作者: 王栋, E-mail: dwangcn2002@vip.sina.com.cn

后进行 SSCs 移植即可恢复放化疗病人的生育力^[2];同时,SSCs 的分离、培养与移植为深入开展雄性性腺细胞的机能和精子发生等基础研究奠定了基础;SSCs 研究又开辟了一条不同于原核显微注射和核移植的转基因动物制备新途径,既避免了技术精度要求较高的卵母细胞和胚胎操作,又降低了制作转基因动物的成本。目前,小鼠中已建立了较成熟的 SSCs 技术体系,大动物的相关研究还处于探索阶段,为迅速建立成熟的大动物技术体系、加快大动物的相关研究,有必要对 SSCs 的各个技术细节进行总结分析。此外,动物睾丸中精原干细胞的数量和比例很低^[3],增加了 SSCs 移植和转基因动物制备等相关操作的难度,因此,SSCs 的分离、培养成为限制 SSCs 技术发展的重要环节。

1 SSCs 的生物学特性及 SSCs 移植制备时机的确定

在小鼠胚胎期第 13.5 天,雄性原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs)被支持细胞前体细胞及管周肌细胞前体细胞包围形成精索,此时的 PGCs 称性原细胞(Gonocytes)或前精原细胞(Prospermatogonia),数目约 25 000 个,之后进入有丝分裂静止期^[4]。出生后性原细胞开始向曲细精管周围迁移,至出生后 4~6 d,大部分已迁移到曲细精管基膜,并转化为原始 A 型精原细胞,即精原干细胞。出生后 6~8 d,静止的精原干细胞重新进入细胞周期,一部分精原干细胞维持干细胞池,另一部分逐次分化为 A 型精原细胞、中间型及 B 型精原细胞、各级精母细胞等,并直到完成第 1 次精子发生(约出生后 35 d)。此后,生精周期持续进行,未分化精原细胞的数量基本保持恒定^[5]。

Olive 等将啮齿动物精子发生过程中的细胞分为精原干细胞(原始 A 型精原细胞)、精原细胞(A 型精原细胞、中间型精原细胞(Intermediate)、B 型精原细胞)、各级精母细胞和精子细胞(图 1)。其中精原干细胞包括单个 As(Asingle)细胞和通过细胞间桥相连的 Apar(Apared)细胞及 4、8 或 16 个细胞一组的 Aali(Aaligned)细胞类型;As 细胞通过不对称分裂产生 1 个 As 和 1 个 Apar 细胞,或通过对称分裂产生 2 个 As,有的 As 细胞通过对称分裂产生 Apar,并进一步分裂为 Aali 细胞。然而,这几种精原干细胞中只有 As 细胞具有自我更新和继续分化潜能^[6]。Hermann 等将啮齿类动物 As 到 Aali(16)

之间的细胞归类为未分化的精原细胞(图 2),其中,As 细胞为精原干细胞(SSCs),具有自我更新和继续分化功能,其它细胞为祖精原细胞;A1 到 B 间的各类细胞为分化的精原细胞。灵长类动物细胞类型的界定与啮齿类动物不同,在 B 型精原细胞之前,只有 Adark 和 Apale 2 种未分化的精原细胞,分别代表 SSCs 和祖精原细胞^[7]。对于 As 细胞的数目,研究结果不尽相同。早期对 6~20 日龄未成熟小鼠各级精原细胞的形态学分析结果表明,每个睾丸大概有 35 000 个 As 细胞,占有睾丸生殖细胞的 0.03%^[3],而 Olive 的研究表明,每个性成熟小鼠睾丸有约 20 000~30 000 个 As 精原细胞^[6]。上述研究说明了 SSCs 数量的有限性,其较大的变化范围表明了 As 细胞纯化的难度。同时,随着年龄的增加,精原干细胞比例明显降低,获得并富集精原干细胞的难度增加。因此,在小鼠出生后 4~6 d,更容易获得大量精原干细胞。同理,牛的最适期为 5~7 月龄^[8],羊为 4 月龄^[9],猪为 1 月龄^[10]。甚至有的直接利用只含性原细胞类生殖细胞的新生动物为研究对象^[11],因为移植后,只有 12% 的小鼠精原干细胞能在受体中形成克隆,并进行正常的精子发生^[2],所以,SSCs 分离纯化的时机和技术本身及体外培养富集技术优化对确保 SSCs 移植和转基因效率非常重要。

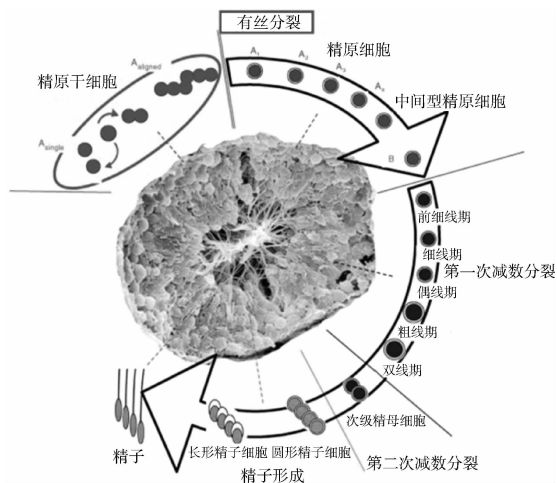


图 1 啮齿类动物精子发生^[6]
Fig. 1 Rodent spermatogenesis

2 供体精原干细胞的分离、纯化及培养

2.1 精原干细胞的分离

组织消化是分离精原干细胞的第一步,方法有

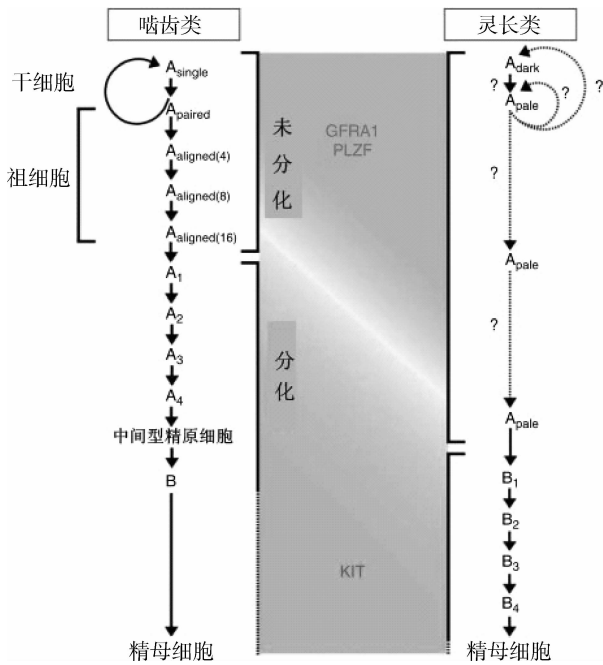


图 2 啮齿类和灵长类动物精子发生模型^[7]

Fig. 2 Current conceptual models of rodent and primate spermatogenesis

机械分离、酶学分离、培养过程中的选择性分离等。常选用机械分离与酶学分离相结合的方法解离睾丸组织,制备单细胞悬液。Yang 等比较了 1 周龄猪睾丸性原细胞的不同分离方法,结果显示,机械法与酶消化法相结合比单纯使用机械法的活细胞获得率提高约 9 倍^[12],其具体操作如下:将除去白膜的供体睾丸剪切成小组织块,再采用 2 步酶消化,依次破坏睾丸内部的结缔组织和细胞间质,使大多数细胞分散为单细胞,然后用一定孔径细胞筛过滤,获得含目的细胞的单细胞悬液。组织消化时,酶的种类及使用的方法直接影响分离、培养和移植的效率。目前,使用的酶主要有胶原酶、胰蛋白酶、透明质酸酶以及分散酶。Brinster 等首先采用胶原酶和胰蛋白酶建立了最经典的两步酶消化法,并将制备的细胞悬液直接移植,在 104 个受体睾丸中 38 个呈供体细胞阳性,即移植成功效率为 37%^[13]。为避免采用胰蛋白酶容易消化过度对细胞造成伤害,Ogawa 等在完成第一步胶原酶消化后,使用胶原酶和透明质酸酶替代单一的胰蛋白酶进行第二步消化^[14],透明质酸酶不但可以消化结缔组织,又能分散单个细胞,但性质较胰蛋白酶温和,操作较为宽泛,不易对细胞造成伤害。对不孕鼠移植精原干细胞悬液后,单个受体睾丸切片检测到 67.9%的曲细精管恢复了精子发生。

近来,可以用于组织细胞分散的分散酶,因为不损坏细胞膜而保持了细胞的活力,在 SSCs 细胞的分离培养中受到了重视。Hamra 等以分散酶对睾丸组织进行一步消化,制备的细胞悬液中,精原细胞标记 DAZL 检测阳性同时体细胞标记 vimentin 呈阴性的细胞占 83%^[15],取得了较理想的分离富集效果,同时仅一步消化就能达到理想效果,减少了工作量,提高了工作效率。最新研究表明,适当的机械处理方式有助于提高消化分离效率。传统的机械法结合酶消化法所获得的猪性原细胞比例约为 7%,但在消化前后分别将机械破碎的睾丸组织在振荡器上震荡 1 min 和 30 s,分离到的性原细胞比例可达 40%,分离效果明显改善^[12]。

2.2 精原干细胞的纯化

得到单细胞悬液后,可利用密度梯度离心、差异贴壁分选、免疫磁珠细胞分选、流式细胞仪分选等方法进行精原干细胞的富集,这些方法各有优缺点。密度梯度离心法操作简单^[16],但可能会导致富集的细胞中混有大小相近的已分化细胞。差异贴壁分选是基于细胞不同黏附特性的最简单的富集方法。先以明胶包被培养皿对睾丸细胞悬液进行短时培养,获得不贴壁的包含精原干细胞的生精细胞,再以层粘连蛋白包被培养皿,进行二次培养即可获较纯的贴壁 SSCs^[17]。免疫磁珠和流式细胞仪分选法均以细胞表面标志为依据,是基于亲和原理较为可靠的细胞富集方法。前者将特异性表面抗原(表面标志)的抗体与磁珠偶联成免疫磁珠,细胞悬液过分离柱后,因为表面特异性抗原与磁珠的特异结合,而使目标细胞得以分离纯化。以干细胞通用标记 c-kit 为表面标志,经免疫磁珠分选后,可获得大于 95%的 c-kit 阳性细胞^[18]。后者先将荧光素标记抗体与细胞表面标志结合,再经流式细胞仪分选。另外,将隐睾手术法获得的睾丸生殖细胞悬液移植到受体,获得的干细胞克隆是非隐睾手术对照组的 25 倍^[19]。隐睾法造成动物睾丸内温度升高,干扰了正常的精子发生,减少了各级生精细胞,精原干细胞因为在生精上皮中的比例大大提高而得到了相对富集。该方法较适合于实验动物,对于大家畜及灵长类动物,其应用则受到了限制。而将不同方法优化组合已成为富集干细胞的研究趋势,如造血干细胞、角质化干细胞、脑干细胞均高表达整合素分子,因此,Shinohara 等利用 alpha6-整合素和 alpha-v-整合素这 2 个标记对隐睾小鼠 SSCs 进行了流式细胞分选,结果,在隐

辜基础上干细胞又富集了 3.7~4.3 倍,即约是非隐辜对照组的 100 倍^[20]。虽然目前已针对干细胞表面分子标记建立了流式细胞分离技术,并借鉴其他干细胞的表面分子标记进行了 SSCs 的分离与纯化,但由于还没有鉴定出可以 100% 富集 SSCs 的特异性表面分子标记^[7],限制了流式细胞分离纯化技术在 SSCs 分离纯化中的应用,因此,特异标记分子的挖掘成为本领域的重要研究方向。

2.3 精原干细胞的培养

精原干细胞分离富集后的适当培养,可使 SSCs 完成自身损伤修复和增殖,并为细胞的遗传修饰及受体动物准备争取时间,提高移植和转基因效率。培养效果取决于最佳培养条件(例如基本培养基、血清、饲养层细胞、生长因子)的探索 and 选择。Piquet-pellorce 等富集 SD 大鼠生殖细胞后,在基本培养基基础上添加 LIF 进行 SSCs 培养,结果表明,该生长因子具有明显促进精原干细胞增殖的作用^[21]。Kanatsu-Shinohara 等富集 DBA/2 小鼠性原细胞后,以 StemPro-34 SFM 为基础培养基,并添加了 EGF、bFGF、LIF、GDNF 等基本生长因子和 0.1% 血清,以丝裂霉素 C 处理的 MEF(Mouse embryonic fibroblasts)为饲养层,培养 134 d,传递了 27 代^[22]。因为在 SSCs 传代培养中的良好表现,该实验室专门进行了 LIF 添加与否的对比试验,结果证明 LIF 确实能促进精原干细胞克隆数量的增加^[23]。Kubota 等富集 DBA/2 品系小鼠的 SSCs 后,以不含血清的 MEMa 为基础培养基,并添加基本生长因子,以丝裂霉素 C 处理的 STO(SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant 抗硫代鸟嘌呤和乌本苷的 SIM 小鼠成纤维细胞)为饲养层,连续培养了 6 个月。该实验室同时证实,无血清时,DBA/2 品系小鼠 SSCs 只在 GDNF 条件下就可培养 80 d,而 C57 品系小鼠无论是否有 GDNF 都不能长期培养^[24]。Hamra 实验室富集大鼠 SSCs 后,以 DMEM/F12 为基本培养基,以丝裂霉素 C 处理的 MEF 细胞为饲养层,以 B27 代替血清,添加基本生长因子,培养 151 d,传递了 12 代^[25]。上述研究表明,尽管建立了鼠 SSCs 培养体系,可进行长时间培养,但培养时间和传代次数还因品种、实验室而异。

目前,在大动物 SSCs 培养中尚缺乏特定的培养体系,培养时间较短,培养效果有一定的不确定性。Aponte 等采用 Kanatsu-Shinohara 等建立的小鼠 SSCs 培养体系进行牛 SSCs 的分离培养,可使

SSCs 增殖 10 000 倍,但仅能培养 1 个月^[26]。深入研究小鼠精原干细胞培养体系对大动物 SSCs 的影响及大动物 SSCs 的自我更新和分化机制,以实现大动物 SSCs 的长期培养,将是今后本领域的又一个重要研究方向。

3 精原干细胞移植受体的准备及移植

移植受体的准备是精原干细胞移植的重要环节,决定了精原干细胞移植能否成功及其效率。影响受体对外源干细胞接受性能的因素主要有 2 个:(1)内源生殖细胞对外源干细胞定植的阻碍作用;(2)异体移植中存在的免疫排斥作用。

受体中原有干细胞对外源干细胞的进入具有阻碍作用^[27]。正常情况下,辜丸中充满了各种类型的生殖细胞,这些细胞影响了供体精原干细胞在受体曲细精管中的迁移和定位。不仅如此,精原干细胞生存在由支持细胞和基底膜构成的微环境(Niche)中,供体精原干细胞需逐渐向基膜迁移,直至竞争到微环境,定居于其中并启动自我更新,否则将走向定向分化。所以,为便于外源 SSCs 的迁移和定位,内源生殖细胞的消除是必要的。目前,消除内源生殖细胞的方法主要有白消安、X 射线、低温缺血及热应激处理等。低温缺血和热应激处理因效果相对不明显而较少使用。射线处理技术仅对目标位置进行照射即可达到理想的受体处理效果,更适用于牛、羊、猴等繁殖力较低、阴囊较大、辜丸游离于体外的大动物^[28]。但仪器笨重,携带不方便。白消安处理能有效消除内源生殖细胞及精子,但传统的腹腔注射法会导致骨髓细胞的减少,甚至会危及受体生命^[28]。如能采用其他药物替代白消安或者改善注射方法避免对造血系统的伤害,将会使白消安注射法更安全可靠,同时为大动物受体制备提供更科学的理论指导。因此,对处理时间和方式的深入探索将是移植受体制备的一个重要研究方向。

SSCs 移植的免疫排斥性曾备受关注。Brinster 设计与供体遗传背景相同的免疫相容不育小鼠、以白消安处理的与供体遗传背景相同的免疫相容可育小鼠和白消安处理过的裸鼠 3 种受体,3 种受体移植后都有供体精子发生^[13],证明对同一品系受体鼠或免疫缺陷型鼠进行 SSCs 移植,不会发生免疫排斥。Izadyar 等进行了牛 SSCs 自体移植和同种异体移植研究,自体移植后有精子发生而异体移植未观察到供体精原细胞亚群^[29]。推测,受体免疫排斥

导致了同种异体移植的失败。然而, Herrid 等进行了不同品系牛个体间 SSCs 移植, 试验中同样未进行受体免疫抑制处理, 但在未消除内源生殖细胞的未成年受体睾丸中观察到了供体精原细胞克隆^[8]。对 Stockwell 等移植的受体牛 52~96 周精子的微生物检测分析表明, 受体精液中含有供体源性精子^[30]。同种异体移植在猪^[10]、羊^[9]、狗^[31]等动物上也相继获得成功。因为未成熟受体睾丸曲细精管中生殖细胞较少, 有利于供体细胞的定位, 这 3 种动物的移植试验均以未成熟动物为受体, 这也为本领域的研究提供了一种新思路, 虽然很多研究都进行了内源生殖细胞的去除处理, 并有文章专门表述了该处理的必要性, 但是这种处理是否是必要的, 是否在特定环境、特定条件下可以有特例, 这将是受体制备领域中值得深入研究的内容。综上所述, 除 Lzadyar 的同种异体移植试验外, 受体均不拒绝供体的生殖细胞, 这引起了对 SSCs 移植受体排斥的重新考虑。有研究人员认为, 移植的部位是睾丸组织, 而免疫排斥是由血液介导的抗原抗体反应, 曲细精管中由基底膜和支持细胞形成的血睾屏障, 阻止了血液中免疫因子透过血睾屏障与供体细胞的结合, 使供体生殖细胞逃避了免疫系统的监控^[32]。

4 问题与展望

目前, 虽然在小鼠中建立了较为成熟的 SSCs 分离培养及移植技术体系, 并且在大动物中也取得了成功的案例, 但因为缺乏精原干细胞表面特异标记, 除了最基本的形态学和耗时费力的移植受体试验等鉴定方法外, 仅能借用胚胎干细胞、成体干细胞等的表面特异标记进行流式细胞仪分析鉴定^[19], 这种研究状况不利于进行精原干细胞的高效分离研究。然而, 干细胞研究取得了较快进展, 这些研究对具有很多共性特点的精原干细胞研究具有重要的指导意义, 较多的共性标记和试验手段为精原干细胞特异表面标记的挖掘鉴定奠定了充分的试验基础, 同时, 蛋白质组学、转录组学及生物信息学的飞速发展也为精原干细胞表面特异性分子标记的研究提供了重要的理论指导。

虽然大动物精原干细胞的分离鉴定和移植研究还处于探索阶段, 但对模式动物小鼠的研究为开展大动物相关研究奠定了基础, 同时大动物同种异体移植试验的成功说明了血睾屏障在精原干细胞移植中的重要作用。超声波介导技术在大动物精原干细

胞的移植和受体制备研究中都将起到积极作用。随着对睾丸中精子发生过程的深入了解、白消安作用机理研究的逐渐深入, 以及白消安作用途径的系统分析, 药物的处理方式也将会越来越科学高效, 内源生殖细胞对精原干细胞移植的影响将会逐渐明了。所以, 随着分子细胞生物学及相关学科的快速发展, 必将推动精原干细胞表面分子标记和移植技术取得较快突破, 并带动上游的大动物 SSCs 分离培养和鉴定技术的提高^[2], 这些技术研究将会有助于高效精原干细胞介导法转基因技术的开发, 并推动精子发生机理^[22]和男性生育力恢复等研究取得较快进展。

参考文献:

- [1] EHMCKE J, WISTUBA J, SCHLATT S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(3): 275-282.
- [2] YE H J R, NAGANO M C. Spermatogonial stem cell biomarkers: improved outcomes of spermatogonial transplantation in male fertility restoration? [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2009, 9(2): 109-114.
- [3] BELLVE A R, CAVICCHIA J C, MILLETTE C F, et al. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. I - isolation and morphological characterization [J]. *J Cell Biol*, 1977, 74(1): 68-85.
- [4] TAM P P, SNOW M H. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1981, 64: 133-147.
- [5] 杨增明, 孙青原, 夏国良. 生殖生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 348-351.
- [6] OLIVE V, CUZIN F. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(2): 246-250.
- [7] HERMANN B P, SUKHWANI M, HANSEL M C, et al. Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? [J]. *Reproduction*, 2010, 139(3): 479-493.
- [8] HERRID M, VIGNARAJAN S, DAVEY R, et al. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients [J]. *Reproduction*, 2006, 132(4): 617-624.
- [9] 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.
- [10] HONARAMOOZ A, MEGEE S O, DOBRINSKI I. Germ cell transplantation in pigs[J]. *Biol Reprod*, 2002,66(1):21-28.
- [11] KIM B G, CHO C M, LEE Y A, et al. Enrichment of testicular gonocytes and genetic modification using lentiviral transduction in pigs[J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(6):1162-1169.
- [12] YANG Y F, YARAHMADI M, HONARAMOOZ A. Development of novel strategies for the isolation of piglet testis cells with a high proportion of gonocytes[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2010,22(7):1057-1065.
- [13] BRINSTER R L, ZIMMERMANN J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994,91(24):11298-11302.
- [14] 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.
- [15] 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(25):16376.
- [16] IZADYAR F, SPIERENBERG G T, CREEMERS L B, et al. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis[J]. *Reproduction*, 2002,124(1):85-94.
- [17] KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, OGONUKI N, et al. Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2011,84(1):97-105.
- [18] 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 Androl*, 2001, 22(4):696-704.
- [19] SHINOHARA T, AVARBOCK M R, BRINSTER R L. Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models[J]. *Dev Biol*, 2000,220(2):401-411.
- [20] SHINOHARA T, ORWIG K E, AVARBOCK M R, et al. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000,97(15):8346-8351.
- [21] PIQUET-PELLORCE C, DORVAL-COIFFEC I, PHAM M D, et al. Leukemia inhibitory factor expression and regulation within the testis[J]. *Endocrinology*, 2000,141(3):1136-1141.
- [22] KANATSU-SHINOHARA M, OGONUKI N, INOUE K, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2003,69(2):612-616.
- [23] 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.
- [24] 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 USA*, 2004,101(47):16489-16494.
- [25] 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.
- [26] APONTE P M, SODA T, TEERDS K J, et al. Propagation of bovine spermatogonial stem cells *in vitro* [J]. *Reproduction*, 2008,136(5):543-557.
- [27] KOSTEREVA N, HOFMANN M C. Regulation of the spermatogonial stem cell niche [J]. *Reprod Domest Anim*, 2008,43(Suppl 2):386-392.
- [28] 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.
- [29] IZADYAR F, DEN OUDEN K, STOUT T A E, et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells [J]. *Reproduction*, 2003,126(6):765-774.
- [30] STOCKWELL S, HERRID M, DAVEY R, et al. Microsatellite detection of donor-derived sperm DNA following germ cell transplantation in cattle[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2009,21(3):462-468.
- [31] KIM Y, TURNER D, NELSON J, et al. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog [J]. *Reproduction*, 2008, 136(6):823-831.
- [32] PHILLIPS B T, GASSEI K, ORWIG K E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis[J]. *Phil Trans Roy Soc B-Biol Sci*, 2010, 365(1546):1663-1678.