

# 食蟹猴精原干细胞体外培养体系的初步建立

张秀娟<sup>①</sup> 李学家<sup>①</sup> 张守全<sup>②</sup> 饶军华<sup>①</sup> 张艳春<sup>①</sup> 季芳<sup>①</sup> 彭白露<sup>①</sup> 刘晓明<sup>①\*</sup>

① 广东省昆虫研究所 华南灵长类研究开发中心 广州 510260;

② 华南农业大学动物科学学院 广州 510642

**摘要:**为了掌握食蟹猴(*Macaca fascicularis*)精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)体外培养生长特性,并建立其培养体系。手术法获得幼年期食蟹猴单侧睾丸,改良的两步酶消化法获得其细胞悬液,添加特定培养液进行体外培养,以碱性磷酸酶(AKP)染色鉴定培养细胞,并评价不同饲养层细胞和不同接种密度对SSCs体外培养的增殖效果。结果表明,含10% FCS等补充物的DMEM液可支持食蟹猴SSCs的体外存活与增殖,培养3~5 d可观察到SSCs集落, AKP染色呈阳性;以支持细胞为饲养层体外培养SSCs 3 d和7 d, SSCs集落形成率均显著高于皮肤成纤维细胞饲养层( $P < 0.05$ ),且以 $1 \times 10^5$ 个/ml SSCs接种密度是较好的原代培养开始。该培养体系的初步建立可为体外研究非人灵长类精子发生机制和SSCs基因修饰提供便利。

**关键词:**食蟹猴;精原干细胞;体外培养;集落形成率

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)06-46-07

## The Preliminary Establishment of *in Vitro* Culture System for Spermatogonial Stem Cells of Cynomolgus Monkey

ZHANG Xiu-Juan<sup>①</sup> LI Xue-Jia<sup>①</sup> ZHANG Shou-Quan<sup>②</sup> RAO Jun-Hua<sup>①</sup>

ZHANG Yan-Chun<sup>①</sup> JI Fang<sup>①</sup> PENG Bai-Lu<sup>①</sup> LIU Xiao-Ming<sup>①\*</sup>

① South-China Primate Research and Development Center, Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260;

② Animal Science College, South-China Agriculture University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** This study was designed to understand the growth characteristics of spermatogonial stem cells (SSCs) of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and establish an *in vitro* culture system. Unilateral testis from male cynomolgus monkey of juvenile stage was obtained by surgical operation, and testicular cells were collected by two-step enzymatic digestion method. Purified SSCs were cultured in a special medium *in vitro* and cultured SSCs were identified by alkaline phosphatase (AKP) dye. Meanwhile, clone formation rate was used to evaluate the effect of different feeder cells and different seeding densities on SSCs proliferation. The results showed that the culture medium consisted of DMEM supplemented with 10% FBS supported SSCs survival and proliferation *in vitro*. The typical clone clumps formed during 3–5 days and were positive for AKP dye. Judged from the observations 3 days and 7 days after culture, SSCs plated on Sertoli cells (SC) feeder layer performed better than on cynomolgus monkey skin fibroblast (CSF) cells feeder layer, with significant difference in clone formation rate ( $P < 0.05$ ), and  $1 \times 10^5$  cells/ml SSCs seeding density was proper for primary culture. This

基金项目 广东省自然科学基金项目(No. 10451026001004520),广州市重大科技专项计划项目(No. 2010U1-E00811);

\* 通讯作者, E-mail: xemoonliu@hotmail.com;

第一作者介绍 张秀娟,女,博士;研究方向:非人灵长类实验动物生殖生物学;E-mail: hallen6424@tom.com。

收稿日期:2011-04-16,修回日期:2011-09-06

culture system provides convenience for the research of spermatogenesis mechanism and germ-line cells modification by gene targeting technology in nonhuman primates.

**Key words:** Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*); Spermatogonial stem cells; *In vitro* culture; Clone formation

精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs) 是睾丸内具有自我复制和分化为精子潜能的干细胞。精原干细胞体外培养体系的建立,在 SSCs 生物学、医学、畜牧业生产及珍稀濒危物种保护等方面具有广阔的应用前景。目前,已报道了很多物种 SSCs 的体外培养体系,其中啮齿类 SSCs 的研究最为成熟<sup>[1-3]</sup>,还有山羊 (*Capra hircus*)<sup>[4]</sup>、猪 (*Sus scrofa*)<sup>[5]</sup>、牛 (*Bos taurus*)<sup>[6]</sup> 和禽类<sup>[7]</sup>,这些物种间 SSCs 体外培养的生长特性既有共性又存在种属差异。最新研究表明,动物遗传背景不同会直接影响体内外 SSCs 的自我更新<sup>[8]</sup>。非人灵长类是生命科学领域的最高级模式动物,基因组测序表明,猕猴 (*Macaca mulatta*) 与人 (*Homo sapiens*) 有 97.5% 的基因高度相似<sup>[9]</sup>,在生殖生理学、神经生物学及遗传学等方面开展研究具有重要的理论指导意义和比较医学价值。然而非人灵长类 SSCs 相关研究因材料难以获得、费用昂贵等原因,研究报道甚少,其体外培养特性尚不清楚,尚未建立理想的体外培养体系。因此本研究利用本中心特有的丰富的非人灵长类资源,以近年来备受关注的食蟹猴 (*M. fascicularis*) 为研究对象,就分离纯化方法、饲养层和接种密度等因素开展食蟹猴 SSCs 体外培养研究,以期掌握食蟹猴 SSCs 体外培养特性,并建立其理想的体外培养体系,从而为开展食蟹猴 SSCs 的深入研究奠定坚实的基础。

## 1 材料与amp;方法

**1.1 主要试剂** IV型胶原酶、0.25% 胰酶-EDTA 和 DNase I (美国 Sigma 公司), DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司), 丝裂霉素 C (美国 Roche 公司), 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司) 和即用型 AKP 染色液 (北京鼎国生物技术有限公司)。

**1.2 实验材料** 参考实验室前期基础<sup>[10]</sup>, 本研究以 1.5 岁左右的幼年雄性食蟹猴为研究对象,由华南灵长类研究开发中心/广东蓝岛生物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK (粤) 2009-0010。实验猴经盐酸氯胺酮溶液按照体重的 10 mg/kg 麻醉后,无菌手术室内手术法摘取食蟹猴单侧睾丸。

**1.3 睾丸组织细胞悬液的制备** 以两步酶消化法<sup>[11]</sup>并经改良,先以 1 g/L IV型胶原酶和 100 mg/L 的 DNase I 37℃ 水浴消化 6 ~ 10 min, 4℃ 600 r/min 离心 5 min,收集曲精细管;再以 0.25% 胰酶-EDTA 和 100 mg/L 的 DNase I 的消化液 37℃ 水浴消化 8 ~ 10 min。0.4% 的台盼蓝染液检测,细胞活率 ≥ 95%。

**1.4 差速贴壁分选方法纯化 SSCs** 根据睾丸内曲精细管内支持细胞在体外培养时贴壁速度较 SSCs 快的特点,采用多次差速贴壁方法纯化 SSCs,将睾丸单细胞悬液以  $1 \times 10^6$  个/ml 密度接种至预先用 0.2% 的明胶溶液处理过的培养瓶中,首次差速贴壁时间为 8 ~ 10 h,转移尚未贴壁的细胞接种至新的 0.2% 明胶包被的培养瓶中,第二次贴壁时间为 12 h 左右,用吸管轻轻吹吸贴附在支持细胞的 SSCs,再次转移未贴壁的细胞,即为较纯化的 SSCs。

**1.5 食蟹猴皮肤成纤维细胞饲养层和支持细胞饲养层的制备** 本研究中采用 2 种饲养层细胞,即皮肤成纤维细胞 (cynomolgus monkey skin fibroblast cell, CSF) 和支持细胞 (sertoli cell, SC)。CSF 细胞从流产食蟹猴的腹股沟皮肤分离,原代细胞采用组织块贴壁培养获得,第 3 ~ 6 代 CSF 细胞性状最为稳定、生长活力最佳,用来制作饲养层;SC 来源于 SSCs 纯化过程中首次差速贴壁后那些贴壁的细胞,经形态学判定,95% 为 SC,第 2 ~ 6 代 SC 被用来制作饲养层。饲养层细胞经 10 mg/L 的丝裂霉素 C 溶液处

理 2.0 ~ 2.5 h, 常规消化冻存备用。

**1.6 培养液成分** DMEM 高糖培养基, 添加 55  $\mu\text{mol/L}$  2-巯基乙醇溶液、4 mmol/L L-谷氨酰胺、30 mg/L 丙酮酸钠、10% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS)、1% 的非必需氨基酸溶液、1% 维生素溶液、1% 的双抗溶液。

**1.7 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 染色和 SSCs 的增殖鉴定** 离心收集纯化后的 SSCs 细胞或 12 孔板中培养的克隆簇, PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 再加入 NBT/BCIP 染色, 室温避光孵育 10 ~ 20 min, 及时用蒸馏水终止反应, 倒置显微镜下观察并拍照。

**1.8 数据处理与分析** 采用 EXCEL 和 SPSS 17.0 进行数据的统计分析, 其中 AKP 染色检测纯化效率, 每张细胞涂片选取  $n$  个 ( $n \geq 3$ ) 视野, 计算染色细胞数占细胞总数的百分比, 重复 3 次, 相关数据以 Mean  $\pm$  SE 表示。不同培养条件下的克隆形成率进行单因素方差分析 (one-way ANOVA),  $P < 0.05$  认为有显著差异。

## 2 结果

**2.1 食蟹猴 SSCs 体外培养的生长特性** 差速贴壁法纯化食蟹猴 SSCs, AKP 检测其纯化效率平均为 45.07%。为了更好地掌握食蟹猴 SSCs 的体外培养生长特性, 将 SSCs 与更接近体内微环境的体细胞共培养, 培养第 2 天, 细胞形态明显分为两类, 一类是体细胞贴壁呈长形或多边形伸展, 而另一类 SSCs 则呈圆形或椭圆形贴附于体细胞周围, 大多仍呈悬浮状态存在, 培养至第 7 天, 体细胞明显增多, 形成底部致密的“饲养层”, 而 SSCs 数量略多, 未见 SSCs 集落式生长, 共培养至第 3 代, 体细胞和 SSCs 呈现稳定共生状态, SSCs 仍大多呈单个细胞状态存在, 偶见成对的细胞, 未见明显增多 (图 1A)。

将第 3 代与体细胞共培养的 SSCs 接种至丝裂霉素 C 处理的皮肤成纤维细胞饲养层, 培养 3 ~ 5 d, 可看到明显的 SSCs 集落, 并随培养时间的延长集落直径增大, SSCs 集落呈现两种细胞

学形态, 一种呈典型的 SSCs 样克隆 (图 1B); 另一类呈胚胎干细胞样 (embryonic stem like, ES-like) 克隆, 集落周围边缘整齐、光滑且折光性强, 类似“鸟巢” (图 1C)。

将原代纯化的 SSCs 接种至丝裂霉素 C 处理的支持细胞饲养层上, SSCs 贴壁时间缓慢且在饲养层上贴壁不紧密, 据统计仍有 50% ~ 60% 的 SSCs 呈悬浮生长, 且在培养的 3 ~ 5 d, 会看到有 SSCs 集落生长现象, 形成的 SSCs 克隆立体感强, 且随培养时间的延长, 其直径明显增大 (图 1D), 偶见细胞之间有细胞间桥连接。

**2.2 SSCs 鉴定** 多次差速贴壁后, AKP 染色, 鉴定细胞呈现两种形式: 一类是呈蓝紫色的 SSCs, 一类是不着色的体细胞 (图 2A), 对比明显; 体外培养的 SSCs 集落鉴定结果表明, 集落中大多数 SSCs 呈 AKP 阳性, 极少数细胞 AKP 染色阳性较弱, 甚至阴性 (图 2B)。

**2.3 不同饲养层细胞和不同接种密度对食蟹猴 SSCs 体外培养的增殖影响** 纯化的 SSCs 接种至 2 种不同饲养层细胞上培养 7 d, 发现支持细胞饲养层能较好地维持 SSCs 的生长。采用集落形成率来评价不同培养条件的增殖效果, 即不同视野下 2 个以上细胞形成的集落数占全部细胞的百分率。SSCs 在支持细胞饲养层体外培养 3 d 和 7 d, 其集落形成率都显著高于以皮肤成纤维细胞饲养层相同培养时间的集落形成率 ( $P < 0.05$ , 图 3); 以支持细胞为饲养层, 低密度 ( $5 \times 10^4$  个/ml)、中密度 ( $1 \times 10^5$  个/ml) 和高密度 ( $1.5 \times 10^5$  个/ml) 接种纯化的 SSCs 进行体外培养均能观察到 SSCs 的增殖和集落形成, 并且随着培养时间的延长, 集落形成率渐增, 中密度组的培养效果好于其他两组 (图 4)。

## 3 讨论

SSCs 的生物学研究需要大量高活性、高纯度的细胞。然而, SSCs 在成年哺乳动物睾丸中的数量非常低, 如一只成年雄性小鼠 (*Mus musculus*) 的睾丸, 仅有  $(2 \sim 3) \times 10^4$  个被称为

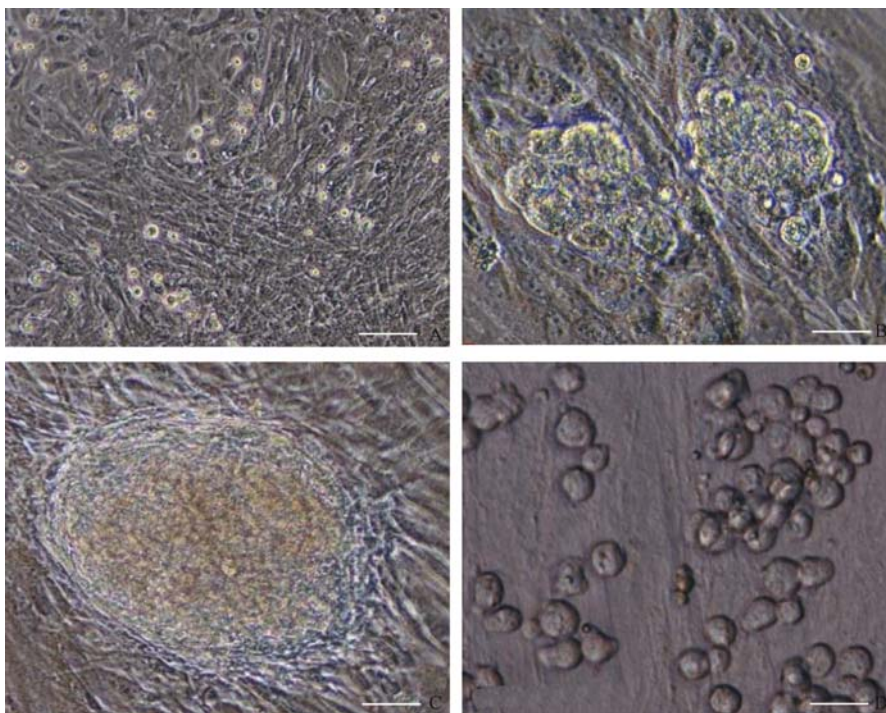


图 1 食蟹猴 SSCs 体外培养的生长特性

Fig. 1 The *in vitro* growth characteristics of SSCs of Cynomolgus Monkey

- A. SSCs 与体细胞共培养第 3 代培养第 9 天, ×100; B. 将共培养体系第 3 代的 SSCs 接种至皮肤成纤维饲养层培养 3 d 形成的典型的 SSCs 样集落, ×200; C. SSCs 继续培养第 9 天出现的鸟巢样集落, ×200;
- D. 纯化的 SSCs 接种至支持细胞饲养层培养第 7 天, ×400。标尺 = 50 μm
- A. The third passage SSCs co-cultured with somatic on 9 day of culture, ×100; B. The third passage SSCs co-cultured with somatic cells were plated to CSF feeders and SSCs clumps were observed on day 3, ×200; C. SSCs formed ES-like clump on day 9, ×200;
- D. Purified SSCs were plated to SC feeder layer on day 7, ×400. Bar = 50 μm

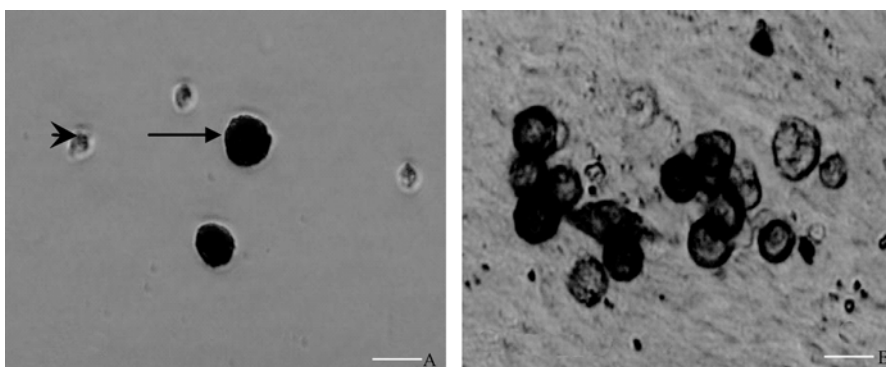


图 2 AKP 染色结果

Fig. 2 The detection results of AKP dye

- A. 纯化鉴定,黑色长箭头表示 AKP 阳性的 SSC,短箭头表示 AKP 阴性的体细胞, ×400,标尺 = 20 μm;
- B. 培养的 SSCs 集落 AKP 活性检测, ×400,标尺 = 50 μm。
- A. Purification identification; Black arrow indicated AKP positive SSC, and arrowhead indicated AKP negative somatic cell, ×400, bar = 20 μm; B. Cultured SSCs clumps were identified by AKP dye, ×400, bar = 50 μm.

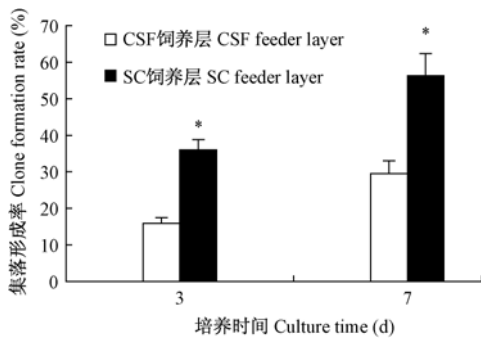


图3 不同饲养层细胞对食蟹猴 SSCs 增殖的影响

Fig. 3 The effect of different feeder layer cells on SSCs proliferation

每个时间点的柱形图上方的 \* 表示两组之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Groups in the same time with \* are significantly different between two groups ( $P < 0.05$ ).

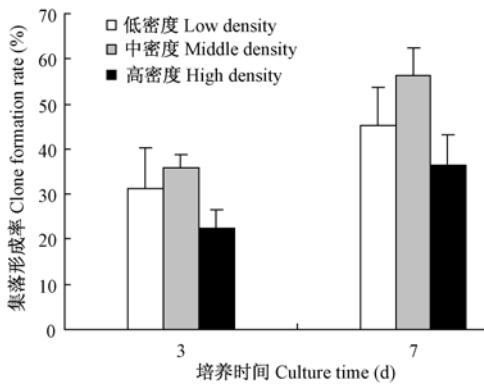


图4 不同接种密度对食蟹猴 SSCs 增殖的影响

Fig. 4 The effect of different seeding densities on SSCs proliferation

Asingle 的精原细胞<sup>[12]</sup>。动物年龄会影响睾丸中 SSCs 的分离效果和活性。众多的研究表明,幼年动物是理想的实验材料,无分化的生精细胞且富含 SSCs<sup>[13-14]</sup>,同时细胞活性较高<sup>[15]</sup>。食蟹猴性成熟一般为 3~4 岁,此时睾丸内存在包括精子在内的所有不同分化阶段的生殖细胞,我们的前期研究表明,幼龄(1.5 岁左右)是食蟹猴 SSCs 分离的最佳时间<sup>[10]</sup>,富含 SSCs 且细胞活性高,非常适合使用差异贴壁分选法纯化。

SSCs 的体外培养受诸多因素影响,早在 1998 年, Nagano 等<sup>[16]</sup>研究表明,SSCs 的体外培

养需要饲养层。研究表明,支持细胞饲养层 (mouse Sertoli cell line-1, MSC-1) 与小鼠胚胎成纤维细胞 (SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant-Neomycin-LIF 76/7 fibroblasts, SNL) 饲养层相比,能较好维持体外培养的小鼠 SSCs 的干细胞活性<sup>[2, 17]</sup>。近来利用聚硫脲嘧啶处理的小鼠模型研究证明,支持细胞是哺乳动物睾丸内 SSCs 的自我更新与内环境功能维持的关键直接因子<sup>[18]</sup>。本研究中所用到的 2 类饲养层细胞全部来自于同源食蟹猴,发现与 CSF 饲养层相比,SC 饲养层在维持 SSCs 存活、SSCs 集落形成率等方面具有更好的作用,推测可能与支持细胞可分泌多种生长因子,如胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、干细胞生长因子 (stem cell factor, SCF) 等有关,已有报道这些生长因子在 SSCs 的存活和增殖中发挥重要的作用<sup>[13]</sup>。

SSCs 在体外不同培养条件的微环境下,呈现出不同的生长特性。小鼠 SSCs 与体细胞共培养可见到 SSCs 克隆<sup>[16]</sup>,而食蟹猴 SSCs 与体细胞共培养,大多以单个细胞状态存在,偶见成对的细胞,这点与关于小鼠的报道不同,可能是非人灵长类 SSCs 特有的体外培养增殖特性,有报道成年猕猴和绒猴 (*Callithrix jacchus*) SSCs 的体内增殖模式与此相同<sup>[19]</sup>。猪 SSCs 克隆在无饲养层培养条件下,生长成多边形的单层贴壁细胞<sup>[5]</sup>。人和小鼠 SSCs 在小鼠胚胎成纤维饲养层 (SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant, STO) 上培养,都发现 SSCs 呈现两种生长形态:一类是居多的典型 SSCs 样克隆,一类是具多能性的 ES-like 克隆<sup>[20-21]</sup>。将与体细胞共培养传 3 代的食蟹猴 SSCs 接种至食蟹猴皮肤成纤维细胞饲养层,除了出现典型的 SSCs 克隆,也出现了 ES-like 克隆,但随培养时间的延长,这种克隆丢失了,这可能与本实验培养条件的营养成分还不充足有关。ES-like 克隆在食蟹猴 SSCs 的培养中出现,意味着可能从非人灵长类获得多能的生殖系干细胞,相信随着对培养条件的进一步优化,非人灵长类多

能性的生殖系干细胞的研究能得到突破。

SSCs 的体外长期培养需要特定生长因子的添加,胶质细胞源性神经生长因子(GDNF)是其中重要因子之一。GDNF 促进 SSCs 的自我更新主要通过两个信号通路来实现:其一是通过 Ras 信号通路最终上调细胞内癌 *fos* 基因(*C-fos*)的表达<sup>[22]</sup>;另一条是通过 Src 家族激酶信号通路最终上调 *N-Myc* 基因的表达<sup>[23-24]</sup>。小鼠 SSCs 在体外培养可长达 6 个月以上<sup>[1]</sup>,而本研究在无生长因子添加的情况下,以支持细胞为饲养层成功地对食蟹猴 SSCs 进行了体外短期培养,传代培养过程中,发现无生长因子添加 SSCs 的数量在逐渐降低。添加特定生长因子培养非人灵长类 SSCs,获得能够稳定增殖的 SSCs 培养体系是接下来的研究重点。

总之,本研究中以含 10% FCS 等补充物的 DMEM 液和  $1 \times 10^5$  个/ml 的密度接种纯化食蟹猴 SSCs 至支持细胞饲养层上,获得了较为理想的培养效果,该培养体系的初步建立,不但可为非人灵长类 SSCs 的增殖和分化机制研究奠定基础,同时也为实现体外对非人灵长类 SSCs 进行基因修饰,进而为制备转基因动物开辟一条新途径。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*, 2003, 69(2): 612-616.
- [ 2 ] Hamra F K, Chapman K M, Nguyen D M, et al. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(48): 17430-17435.
- [ 3 ] Guan K, Nayernia K, Maier L S, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 2006, 440(7088): 1199-1202.
- [ 4 ] 吴应积, 罗奋华, 薛晓先, 等. 绒山羊曲细精管生殖细胞的长期培养和精子发生过程的观察. *内蒙古大学学报: 自然科学版*, 2005, 36(4): 411-416.
- [ 5 ] Kuijk E W, Colenbrander B, Roelen B A J. The effects of growth factors on *in vitro*-cultured porcine testicular cells. *Reproduction*, 2009, 138(4): 721-731.
- [ 6 ] Aponte P M, Soda T, Teerds K J, et al. Propagation of bovine spermatogonial stem cells *in vitro*. *Reproduction*, 2008, 136(5): 543-557.
- [ 7 ] 孙思宇, 李碧春, 魏彩霞, 等. 鸡精原干细胞的体外培养. *中国兽医学报*, 2008, 28(1): 102-105.
- [ 8 ] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Miki H, et al. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *J Reprod Dev*, 2010, 56(1): 145-153.
- [ 9 ] Hernandez R D, Hubisz M J, Wheeler D A, et al. Demographic histories and patterns of linkage disequilibrium in Chinese and Indian Rhesus Macaques. *Science*, 2007, 316(5822): 240-243.
- [ 10 ] 李学家, 张秀娟, 陈子亮, 等. 性成熟前食蟹猴生精细胞的发育进程. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(3): 31-35.
- [ 11 ] Hermann B P, Sukhwani M, Lin C C, et al. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells*, 2007, 25(9): 2330-2338.
- [ 12 ] De Rooij D G. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol*, 1998, 79(2): 67-80.
- [ 13 ] Kubota H, Avarbock M R, Brinster R L. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*, 2004, 71(3): 722-731.
- [ 14 ] Shinohara T, Orwig K E, Avarbock M R, et al. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(11): 6186-6191.
- [ 15 ] Nagano M, Ryu B Y, Brinster C J, et al. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*. *Biol Reprod*, 2003, 68(6): 2207-2214.
- [ 16 ] Nagano M, Avarbock M R, Leonida E B, et al. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue and Cell*, 1998, 30(4): 389-397.
- [ 17 ] Hamra F K, Schultz N, Chapman K M, et al. Defining the spermatogonial stem cell. *Dev Biol*, 2004, 269(2): 393-410.
- [ 18 ] Oatley M J, Racicot K E, Oatley J M. Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biol Reprod*, 2011, 84(4): 639-645.
- [ 19 ] Ehmcke J, Luetjens C M, Schlatt S. Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. *Biol Reprod*, 2005, 72(2): 293-300.

- [20] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 2004, 119(7): 1001 – 1012.
- [21] Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*, 2008, 456(7220): 344 – 351.
- [22] He Z, Jiang J, Kokkinaki M, et al. GDNF upregulates c-Fos transcription via the Ras/ERK1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 266 – 278.
- [23] Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, et al. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development*, 2007, 134(10): 1853 – 1859.
- [24] Braydich-Stolle L, Kostereva N, Dym M, et al. Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev Biol*, 2007, 304(1): 34 – 45.