

# 小熊猫精原干细胞的分选与培养

封同英<sup>②</sup> 刘玉良<sup>①②③</sup> 陈依娇<sup>①②</sup> 史可瑜<sup>①</sup> 蔡志刚<sup>①②③</sup>  
王东辉<sup>①②③</sup> 张名岳<sup>①②③</sup> 李博琦<sup>②</sup> 侯蓉<sup>①②③</sup> 安俊辉<sup>①②③\*</sup>

① 成都大熊猫繁育研究基地 成都 610081; ② 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室 成都 610081;

③ 四川省大熊猫科学研究院 成都 610081

**摘要:** 野生动物的保护手段主要包括就地保护、易地保护与离体保护。精原干细胞 (SSCs) 是雄性动物维持生殖能力的根本, 既能通过自我更新产生新细胞, 也能通过分化产生精子, 在小熊猫 (*Ailurus fulgens*) 离体保护方面具有广阔的应用前景。动物睾丸中精原干细胞数量极少, 分离纯化与体外培养对于其研究和应用至关重要。本研究选择整合素  $\alpha 6$  (ITGA6) 蛋白作为精原干细胞分子标记, 采用免疫磁珠分选 (MACS) 技术富集了 3 月龄小熊猫睾丸中的 ITGA6 阳性细胞。流式细胞术检测发现分选后 ITGA6 阳性细胞纯度可达  $74.27\% \pm 8.73\%$ , 显著高于分选前 ( $32.60\% \pm 3.06\%$ )。将分选后的细胞接种到层粘连蛋白包被的细胞培养板中, 用含胶质细胞源性神经生长因子 (GDNF)、表皮细胞生长因子 (EGF) 与成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的培养基进行体外培养。培养 10 d 后, 在显微镜下可观察到典型的精原干细胞集落, 结合逆转录 PCR (RT-PCR) 和细胞免疫荧光染色发现这些细胞集落特异性表达精原干细胞分子标记蛋白 ITGA6、早幼粒细胞白血病锌指蛋白 (PLZF) 和胸腺细胞分化抗原 1 (THY1), 同时也表达生殖细胞标记蛋白 VASA 和 DAZL。本研究结果证实, ITGA6 可作为小熊猫精原干细胞的分子标记用于细胞分选富集, 同时初步建立的培养体系也为小熊猫精子发生机制与应用研究提供材料。

**关键词:** 小熊猫; 精原干细胞; 免疫磁珠分选; 细胞培养

中图分类号: Q952 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2022) 06-897-08

## Purification and Culture of Spermatogonial Stem Cells from Red Panda (*Ailurus fulgens*)

FENG Tong-Ying<sup>②</sup> LIU Yu-Liang<sup>①②③</sup> CHEN Yi-Jiao<sup>①②</sup> SHI Ke-Yu<sup>①</sup> CAI Zhi-Gang<sup>①②③</sup>  
WANG Dong-Hui<sup>①②③</sup> ZHANG Ming-Yue<sup>①②③</sup> LI Bo-Qi<sup>②</sup> HOU Rong<sup>①②③</sup> AN Jun-Hui<sup>①②③\*</sup>

① Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu 610081; ② Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology for Endangered Wildlife, Chengdu 610081; ③ Sichuan Academy of Giant Panda, Chengdu 610081, China

**Abstract:** *In situ*, *ex situ*, and *in vitro* conservation are the principal means of wild animal protection at

**基金项目** 四川杰出青年科技人才项目 (No. 2020JDJQ0074), 成都大熊猫繁育研究基金会项目 (No. CPF2017-15), 成都大熊猫繁育研究基地自立课题 (No. 2020CPB-B02);

\* 通讯作者, E-mail: junhui@panda.org.cn;

**第一作者介绍** 封同英, 女, 科研助理; 研究方向: 濒危野生动物繁育与保护; E-mail: fengtongying1994@163.com.

收稿日期: 2022-02-24, 修回日期: 2022-07-30 DOI: 10.13859/j.cjz.202206009

present. Spermatogonial stem cells (SSCs) not only continuously produce new cells through self-renewal, but also produce sperm through cell differentiation, and thus they have broad application potential for in vitro conservation of Red Panda (*Ailurus fulgens*). However, SSCs in testes are rare, and their purification and culture are very important for scientific research and applications. **[Objectives]** To explore the feasibility of SSCs enrichment and culture in Red Panda. **[Methods]** Testes were collected post mortem from a 3-month-old Red Panda and were used to generate cell suspensions following two-step enzyme (1 g/L collagenase Type IV and 0.25% trypsin-EDTA) digestion. ITGA6 was used as a molecular marker of SSCs, and the ITGA6-positive cells were enriched by magnetic-activated cell sorting (MACS). ITGA6-positive cells were seeded into the cell culture plate coated with laminin and cultured with the medium containing GDNF (20  $\mu\text{g/L}$ ), EGF (10  $\mu\text{g/L}$ ) and bFGF (10  $\mu\text{g/L}$ ). RT-PCR and immunofluorescence staining were used for the cell colonies identification. **[Results]** The purity of ITGA6-positive cell after sorting was  $74.27\% \pm 8.73\%$ , which was significantly higher than that before sorting ( $32.60\% \pm 3.06\%$ ) (Fig. 1). After 10 days of culture, SSC colonies were observed under the microscope (Fig. 2). The results of RT-PCR and immunofluorescence staining showed that ITGA6, PLZF, THY1 (SSC markers), VASA, and DAZL (germ cell markers) were specifically expressed in MGSC colonies (Fig. 3 and 4). **[Conclusion]** The overall results demonstrated the feasibility of ITGA6 as a molecular marker of Red Panda SSCs for cell purification and cultivation.

**Key words:** Red Panda, *Ailurus fulgens*; Spermatogonial stem cells, SSCs; Magnetic-activated cell sorting, MACS; Cell culture

小熊猫 (*Ailurus fulgens*), 又称红熊猫, 在我国主要分布于四川、陕西、青海和西藏等地区 (刘旭等 2011)。由于人类活动的影响, 近几十年来野生小熊猫数量急剧下降, 栖息地逐渐破碎化, 分布范围向西部峡谷地区退缩 (Hu et al. 2020)。在世界自然保护联盟 (IUCN) 的评估中, 小熊猫的种群数量下降了近 50%, 而且这种下降趋势有可能在未来持续加剧, 因此 2015 年小熊猫被 IUCN 红色名录列为濒危物种 (Chilvers et al. 2015)。在 2021 年最新公布的国家重点保护野生动物名录中, 小熊猫亦被列为 II 级重点保护野生动物。细胞资源的获取与冷冻保存是保护野生动物种质资源的一种有效方法。目前, 已成功获得了小熊猫成纤维细胞 (刘健明等 2007) 与骨间充质干细胞 (An et al. 2020), 对其生殖细胞资源的保存尚无报道。

精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs) 是位于雄性动物曲细精管内的成体干细胞类群, 具有自我更新和分化能力, 能够源源

不断产生精子 (Oatley et al. 2008)。在成年小鼠 (*Mus musculus*) 睾丸中, 精原干细胞仅占睾丸总细胞数量的 0.01%~0.03%, 其余大部分为精原细胞、精母细胞、精子细胞以及支持细胞 (Tegelenbosch et al. 1993)。精原干细胞是一种重要的遗传资源, 可以在体外分化为精子, 并且可通过移植技术, 在受体睾丸中定植并启动精子发生, 产生成熟精子 (Brinster et al. 1994), 在野生动物种质资源保存方面具有较大的应用潜力。

体外扩增及保存 SSCs 需要高纯度的细胞, 而 SSCs 在睾丸中含量极低, 因此其分离纯化成为开展后续培养与应用研究的前提。我们前期通过免疫组化染色发现整合素  $\alpha 6$  (integrin  $\alpha 6$ , ITGA6) 在小熊猫曲细精管基底膜上的生殖细胞中特异表达, 定位于细胞膜, 而在周围的支持细胞与间质细胞中不表达 (An et al. 2021), 为小熊猫 SSCs 的分离与纯化奠定了基础。本研究拟通过免疫磁珠分选技术对小熊猫睾丸悬液中的 ITGA6 阳性细胞进行富集, 并对

纯化后细胞群中 SSCs 的纯度、特性与体外增殖能力进行评估, 从而验证 ITGA6 作为小熊猫 SSCs 的分子标记用于细胞纯化及原代培养的可行性。

## 1 材料与amp;方法

成都大熊猫繁育研究基地圈养的 1 只 3 月龄小熊猫, 意外死亡后, 采集其双侧睾丸。

### 1.1 小熊猫睾丸组织消化

将采集到的睾丸组织用含双抗(青霉素  $5 \times 10^5$  U/L, 链霉素 0.5 g/L) 的 PBS 清洗 3 遍, 剥离白膜, 用剪刀剪碎, 加入 IV 型胶原酶 (1 g/L) 消化 20 min。PBS 清洗后, 加入 0.25% 的胰酶消化 5 min 并用血清终止消化。收集到的睾丸细胞悬液分装于冻存管, 在液氮中长期保存。

### 1.2 免疫磁珠分选与鉴定

复苏小熊猫睾丸细胞, 加入 PE 标记的 ITGA6 单克隆抗体 (ITGA6-PE, eBioscience, 12-0495-81) 进行染色, 室温孵育 30 min 后加入抗 PE 的微珠 (美天旎, 130-048-801) 4 °C 孵育 20 min, 结束后将样品转移至分离柱, 在外加磁场的作下, 分离出阳性细胞。使用 PE 标记的大鼠 IgG2a kappa 抗体 (eBioscience, 12-

4321-81) 染色作为同型对照 (isotype control), 取未处理的细胞作为阴性对照 (negative control)。

每组取少量细胞进行流式检测 (BD FACSCanto II, Diva Software v8.0.3), 根据目标荧光及细胞直径的大小, 使用阴性对照上机调整相关参数, 划出目标的 ITGA6 阳性细胞群体, 之后按照设定参数, 依次检测阴性对照、同型对照、ITGA6-PE 分选前及 ITGA6-PE 分选后这 4 组中的 ITGA6 阳性细胞。

### 1.3 小熊猫 SSCs 培养

用层粘连蛋白 (0.02  $\mu$ g/L) 对 48 孔板铺板 6 h, 按每孔  $1.0 \times 10^5$  个细胞进行接种, 培养基成分见表 1。细胞每隔 3 d 换一次液, 在较大集落出现后, 用 0.05% 的胰酶进行传代。

### 1.4 细胞免疫荧光染色

培养板中的细胞用 4% 的多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 固定 10 min, PBS 清洗 3 次后, 加入 5% 的 BSA 室温封闭 2 h。分别加入稀释后的一抗 Anti-ITGA6 (Abcam, ab181551, 1 : 100) 和 Anti-VASA (Abcam, ab13840, 1 : 100), 4 °C 孵育过夜。VASA 是具有 ATP 依赖的 RNA 解旋酶的 DEAD-box 蛋白家族的成员, 定位于细胞质, 在小熊猫生殖

表 1 小熊猫精原干细胞培养基成分

Table 1 Components of Red Panda spermatogonial stem cell culture medium of

成分 Component	品牌, 货号 Supplier, catalog number	工作浓度 Final concentration
无血清培养基 StemPro-34 serum free medium	Invitrogen, 10639-011	1 ×
40 × 培养基补充添加剂 40 × StemPro-34 nutrient supplement	Invitrogen, 10639-011	1 ×
胎牛血清 Fetal bovine serum	Gibco, 10099141	1%
50 × 谷氨酰胺补充添加剂 50 × GlutaMAX supplement	Invitrogen, 25030-149	1 ×
50 × 抗生素补充添加剂 50 × Antibiotic-antimycotic	Invitrogen, 15240-062	1 ×
50 × 维生素补充添加剂 50 × Minimum essential medium vitamins	Invitrogen, 111420-052	1 ×
50 × 非必需氨基酸补充添加剂 50 × Nonessential amino acids	Invitrogen, 11140-050	1 ×
$\beta$ -巯基乙醇 2-Mercaptoethanol	Sigma, M3148	10 $\mu$ mol/L
重组人胶质细胞源性神经营养因子 Recombinant human glial cell derived neurotrophic factor	Peptotech, AF-450-10	20 $\mu$ g/L
重组人胶质细胞源性神经营养因子 Recombinant human basic fibroblast growth factor	Peptotech, AF-100-15	10 $\mu$ g/L
重组人表皮细胞生长因子 Recombinant human epidermal growth factor	Peptotech, AF-100-15	10 $\mu$ g/L

细胞中特异性表达 (An et al. 2021, Castrillon et al. 2000)。次日, PBS 清洗 3 次后, 加入二抗 donkey anti-rabbit Alexa fluor 488 (eBioscienc, A-21206, 1 : 500), 室温避光孵育 2 h。PBS 清洗 3 次, 加入 DAPI(5 mg/L)室温孵育 5 min, 荧光显微镜 (Olympus BX53 microscope) 下观察并拍照。

### 1.5 RNA 提取及 RT-PCR

采用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) 从培养的细胞克隆中提取总 RNA, 之后使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA, RR047A) 对 RNA 进行反转录。通过 RT-PCR 检测细胞克隆中 *thy1*、*plzf*、*dazl* 和 *actb* 基因的表达情况, 引物见表 2。其中, *thy1* 与 *plzf* 均为精原干细胞 (SSCs) 分子标记, *dazl* 为广谱的生殖细胞标记, *actb* 为阳性对照。

### 1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 (v 5.01) 统计软件, 计量资料以平均值 ± 标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小熊猫 SSCs 的分离与纯化

3 月龄小熊猫睾丸用含双抗 (青霉素  $5 \times 10^5$  U/L, 链霉素 0.5 g/L) 的 PBS 清洗 3 次, 使用尖头镊子去掉睾丸外包被的白膜, 用剪刀将睾丸组织剪碎, 加入胶原酶和胰酶消化, 得到了由生殖细胞和体细胞组成的单细胞悬液, 在显微镜下可观察到大小、形态结构不均一的细胞, 其中, 生殖细胞呈圆形且体积较大 (图 1a)。用 ITGA6-PE 抗体对细胞悬液进行染色, 之后加入 ANTI-PE Microbeads 孵育, 使 ITGA6-

PE 标记的细胞群体被磁性微珠二次标记, 在外加磁场的作用下, 纯化出 ITGA6 阳性细胞。使用流式细胞仪对分选前后的细胞进行检测, 结果显示, 分选之前混合细胞悬液中 ITGA6 阳性细胞的纯度为  $32.60\% \pm 3.06\%$ , 免疫磁珠分选后 ITGA6 阳性细胞的纯度提高至  $74.27\% \pm 8.73\%$  (图 1b)。统计学分析表明经, 免疫磁珠分选富集得到的 ITGA6 阳性细胞纯度显著高于未分选组 ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ) (图 1c)。

### 2.2 小熊猫 SSCs 的体外培养

用层粘连蛋白处理 48 孔板 6 h, 将免疫磁珠分选富集后收集到的细胞按每孔  $1.0 \times 10^5$  个细胞进行接种。细胞接种 1 d 后, 大部分支持细胞已经贴附在基质胶上生长, 细胞轮廓不清晰, 呈椭圆形、三角形或不规则形。同时也观察到漂浮的雄性生殖细胞, 其形态多为圆形或卵圆形, 细胞体积较小, 细胞核较大 (图 2a)。细胞培养至第 4 天时, 体细胞快速增殖, 生殖细胞增殖不明显 (图 2b)。培养 6 d 后, 生殖细胞开始聚集生长, 出现小的生殖细胞集落 (约十几个细胞, 图 2c), 而体细胞增殖开始变慢。在第 10 天时, 支持细胞与间质细胞的数量大幅度减少, SSCs 聚集生长成大的细胞集落 (上百个细胞, 图 2d)。

### 2.3 小熊猫 SSCs 集落的免疫荧光染色与 RT-PCR 鉴定

对培养 10 d 后的细胞集落进行 ITGA6 与 VASA 蛋白免疫荧光染色, 蓝色为 DAPI 标记的细胞核, 所有细胞均有着色。染色结果表明, 培养的 SSCs 克隆表达小熊猫 SSCs 分子标记 ITGA6 (图 3c) 与生殖细胞标记 VASA (图 3f), 而周围的体细胞并不表达, 从蛋白水平进一步

表 2 RT-PCR 引物表

Table 2 Primers used in RT-PCR

基因 Gene	引物核苷酸序列 Primer nucleotide sequence (5' - 3')		产物大小 Product size (bp)
<i>dazl</i>	F: GAAAGGCCAGGAACCCACTT	R: GCTGTCCCTGCAGTCTTGAT	220
<i>plzf</i>	F: ACGCTGTGTGATGTGGTCAT	R: ATCTGAGGCCTGGATGGTCT	294
<i>thy1</i>	F: CTGGTGGATCAGAGCCTTCG	R: CCTCGTCTTGGTGGTGAAG	214
<i>actb</i>	F: ACGATATCGCTGCGCTTGTG	R: ACAATACCGTGCTCGATGGG	220

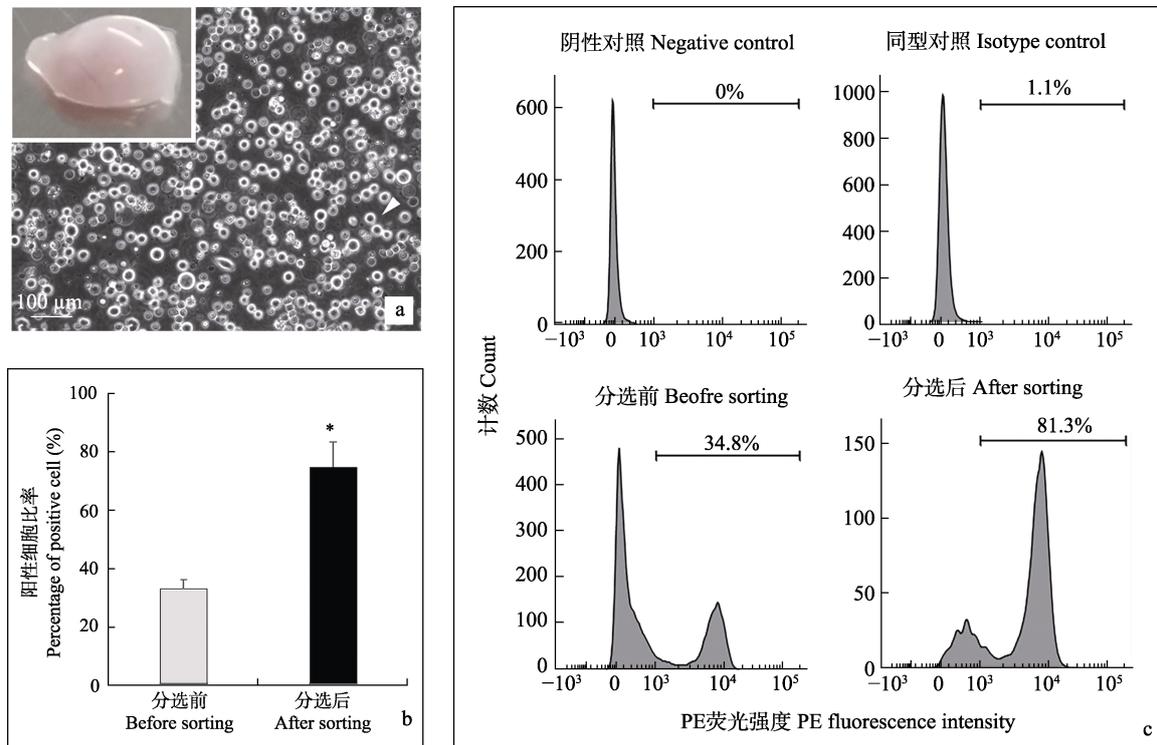


图1 小熊猫睾丸消化与免疫磁珠分选

Fig. 1 Testis digestion and MACS in red panda

a. 细胞悬液, 白色箭头所标记的细胞为生殖细胞 (100 ×), 左上角为小熊猫睾丸; b. 流式统计结果; c. 流式检测结果, 右上角数字显示 ITGA6 阳性细胞比率。\*  $P < 0.05$

a. Cell suspension (100 ×), a germ cell was marked by the white arrow, a red panda testis was showed on the top left; b. Flow cytometry analysis; c. Flow cytometry histograms, ITGA6-positive cell ratios were showed on the top right.

证明体外培养 10 d 的小熊猫 SSCs 仍具有相应的生殖干细胞特性。

收集培养 10 d 后的细胞集落提取 RNA 并进行反转录获得 cDNA。通过 RT-PCR 鉴定发现, 常见的 SSCs 分子标记基因 *plzf* 和 *thy1* 均在小熊猫 SSCs 克隆中表达, 同时与 *vasa* 类似的另一生殖细胞标记基因 *dazl* 也在小熊猫 SSCs 克隆中表达 (图 4), 进一步证明了培养所获得的细胞集落是 SSCs 集落。

### 3 讨论

目前, 对野生动物的保护手段主要包括就地保护、易地保护与离体保护。离体保护通过建立动物种质资源库, 如细胞库等保存现有种

质资源。SSCs 是雄性动物维持生殖能力的根本, 可通过自我更新不断产生新细胞, 是一种可再生的细胞资源 (de Rooij 2017)。SSCs 是精子发生的基础, 可通过体外诱导、移植等技术手段可将 SSCs 分化成精子 (Ogawa et al. 1997, McLean 2005)。SSCs 在小熊猫离体保护方面具有广阔的应用前景和巨大的开发潜力。一方面, 与组织或精液冷冻保存相比, SSCs 可在体外不断扩增, 对于遗传资源极为珍贵的小熊猫种群来说具有重要意义; 另一方面通过体外分化及异种移植技术, 有望将小熊猫 SSCs 进一步分化为精子, 提高小熊猫雄性遗传资源的保护水平与利用率。

动物睾丸中的 SSCs 数量极少, 因此 SSCs

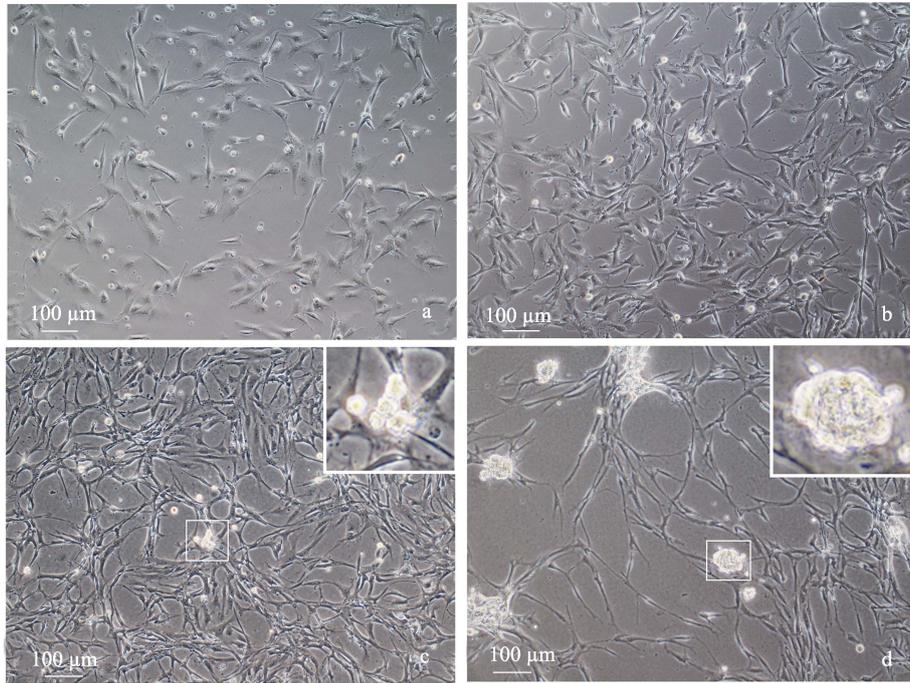


图 2 小熊猫 SSCs 体外培养 (100 ×)

Fig. 2 Cell culture of SSCs from Red Panda (100 ×)

a. 第 1 天; b. 第 4 天; c. 第 6 天; d. 第 10 天。图 c, d 右上角显示更高放大倍数的 SSCs 克隆。  
a. Day 1; b. Day 4; c. Day 6; d. Day 10. SSCs clusters with higher magnification were showed on the top right of figure c and d.

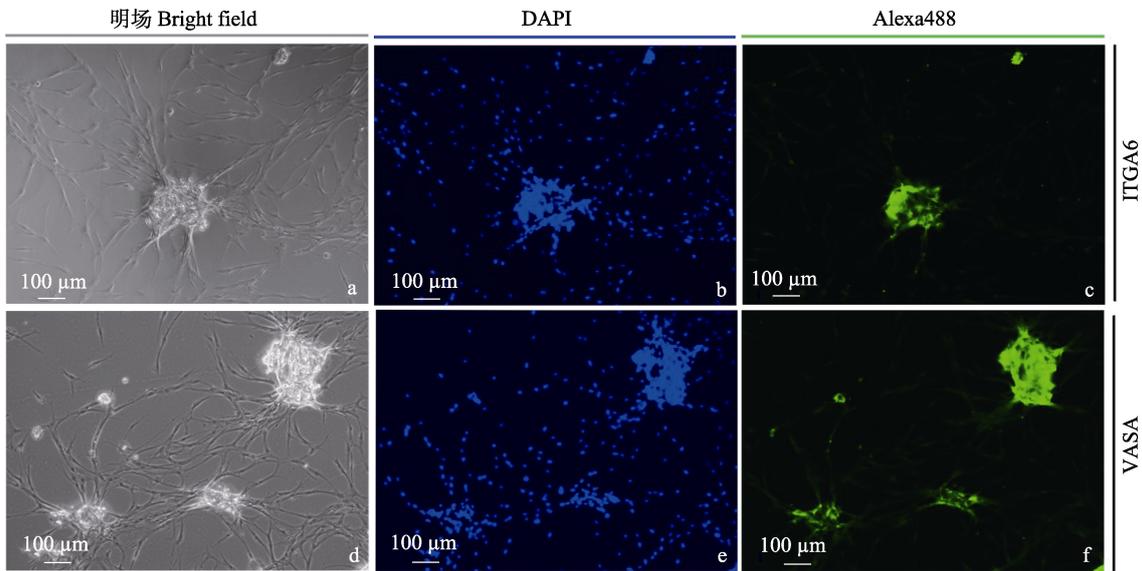


图 3 细胞免疫荧光染色鉴定细胞集落 (100 ×)

Fig. 3 Identification of cell colonies by immunofluorescence staining (100 ×)

a. 明场; b. DAPI 染色; c. ITGA6 免疫荧光染色; d. 明场; e. DAPI 染色; f. VASA 免疫荧光染色。  
a. Bright field; b. DAPI staining; c. ITGA6 immunofluorescence staining; d. Bright field; e. DAPI staining; f. VASA immunofluorescence staining.

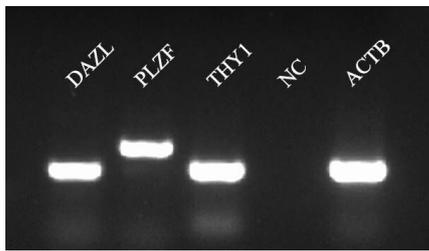


图4 RT-PCR 鉴定细胞集落的 DNA 电泳结果

Fig. 4 DNA electrophoresis results for identification of cell colonies by RT-PCR

DAZL、PLZF、THY1 及 ACTB 分别为相应基因的 RT-PCR 产物电泳结果, ACTB 为阳性对照, NC 为阴性对照。

DAZL, PLZF, THY1 and ACTB indicated electrophoretic result of RT-PCR products for each gen, respectively, ACTB expression was used as an internal control, NC was negative control.

的分离纯化和体外培养对于其研究和应用至关重要。SSCs 的分离纯化方式主要包括两种: 利用其物理学特性的分选, 如密度梯度离心法 (Meistrich 1977)、STAPUT 重力沉降法 (STAPUT gravity sedimentation) (Kokkinaki et al. 2009) 等; 利用特异性表面分子标记的分选, 包括流式细胞分选 (fluorescent-activated cell sorting, FACS) (Ibrahim et al. 2007) 以及免疫磁珠分选 (Owen et al. 1984)。免疫磁珠分选具有效率高、损伤小等优点, 被广泛用于 SSCs 的研究中。目前, 许多 SSCs 的特异性表面分子标记已被成功鉴定, 并用于 SSCs 的流式或免疫磁珠分选中 (Zheng et al. 2020)。2021 年, 我们首次报道了小熊猫睾丸中多类细胞的分子标记, 发现 ITGA6 主要定位于小熊猫未分化精原细胞的细胞膜, 可以作为小熊猫 SSCs 的膜表面分子标记, 为小熊猫 SSCs 的免疫磁珠分选奠定基础 (An et al. 2021)。本研究利用 ITGA6 免疫磁珠分选将幼龄小熊猫 SSCs 纯度提高了 40% 左右, 获得的 ITGA6 阳性细胞可在体外增殖并形成克隆, 进一步证明 ITGA6 用于小熊猫 SSCs 富集与原代培养的可行性。

目前小鼠 (Kanatsu-Shinohara et al. 2005)、大鼠 (*Rattus norvegicus*) (Hamra et al. 2005)

和仓鼠 (Cricetinae) (Kanatsu-Shinohara et al. 2008) SSCs 的体外长期培养体系已先后建立。在体外以失活的小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEF) 为饲养层, 用 Stem Pro-34 SFM (Stem Pro-34 serum free medium) 为基础培养基, 在添加胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF)、表皮细胞生长因子 (EGF) 与成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的条件下, 小鼠和仓鼠的 SSCs 可培养两年或更长时间而不失其干细胞特性。不同动物的 SSCs 生物学特性存在差异, 在体外自我增殖的条件也不完全相同。采用 DMEM/F12 无血清培养体系加入 GDNF、胶质细胞源性神经营养因子受体  $\alpha 1$  (GDNF family receptor alpha 1, GFRA1)、bFGF、胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor 1, IGF1) 四种生长因子能够将猪 (*Sus scrofa*) 的 SSCs 培养两个月以上 (Zhang et al. 2017)。而牛 (*Bos taurus*) 的 SSCs 长期培养中则使用 GDNF 和 bLIF 两种生长因子, 在体外培养了两个月 (Suyatno et al. 2018)。恒河猴 (*Macaca mulatta*) SSCs 培养时加入了 GDNF、GFRA1 和 bFGF, 在体外仅能培养 7~10 d (王庆忠等 2013)。我们之前对小熊猫的研究参考小鼠 SSCs 的培养体系, 添加了 GDNF、EGF 与 bFGF 三种生长因子, 培养未经过分选的混合细胞 (含约 70% 的体细胞), 在培养 5 d 后体细胞呈爆发式增长, 生殖细胞逐渐消失, 未能获得小熊猫 SSCs 集落 (An et al. 2021)。本研究采用分选后的细胞进行培养, 体细胞的含量大幅度降低 (约含 20% 的体细胞), 降低了体细胞过度增殖带来的负面影响, 在培养 10 d 后获得了 SSCs 集落。小熊猫 SSCs 集落在形态上与小鼠和人的类似, 细胞形态不规则, 细胞间有细胞质桥相连。然而在传代培养后, 生殖细胞逐渐减少, 在培养 26 d 后仅能发现散在的生殖细胞, 无法形成集落。因此, 后续的研究重点是探究不同的饲养层及生长因子组合等对小熊猫 SSCs 体外增殖的影响, 优化体外培养条件, 获得更为稳定的体外培养体系。

## 参 考 文 献

- An J H, He L, Hou R, et al. 2021. Characterization of molecular markers of testicular cells in Red Pandas (*Ailurus fulgens styani*). *Mammal Study*, 46(3): 197–204.
- An J H, Li F P, He P, et al. 2020. Characteristics of mesenchymal stem cells isolated from the bone marrow of Red Pandas. *Zoology (Jena)*, 140(125775): 1–6.
- Brinster R L, Avarbock M R. 1994. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24): 11303–11307.
- de Rooij D G. 2017. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development*, 144(17): 3022–3030.
- Hamra F K, Chapman K M, Nguyen D M, et al. 2005. 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*, 102(48): 17430–17435.
- Hu Y, Thapa A, Wei F. 2020. *Ailurus fulgens* (Himalayan Red Panda) and *Ailurus styani* (Chinese Red Panda). *Trends Genet*, 36(8): 624–625.
- Ibrahim S F, van Den E G. 2007. Flow cytometry and cell sorting. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 106: 19–39.
- Kanatsu-shinohara M, Muneto T, Lee J, et al. 2008. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biology of Reproduction*, 78(4): 611–617.
- Kanatsu-shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. 2005. Genetic selection of mouse male germline stem cells in vitro: offspring from single stem cells. *Biology of Reproduction*, 72(1): 236–240.
- Kokkinaki M, Lee T L, He Z, et al. 2009. The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biology of Reproduction*, 80(4): 707–717.
- McLean D J. 2005. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell and Tissue Research*, 322(1): 21–31.
- Meistrich M L. 1977. Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods in Cell Biology*, 15: 15–54.
- Oatley J M, Brinster R L. 2008. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24: 263–286.
- Ogawa T, Arechaga J M, Avarbock M R, et al. 1997. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *International Journal Developmental Biology*, 41(1): 111–122.
- Owen C S, Sykes N L. 1984. Magnetic labeling and cell sorting. *Journal of Immunological Methods*, 73(1): 41–48.
- Suyatno, Kitamura Y, Ikeda S, et al. 2018. Long-term culture of undifferentiated spermatogonia isolated from immature and adult bovine testes. *Molecular Reproduction and Development*, 85(3): 236–249.
- Tegelenbosch R A, De Rooij D G. 1993. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 290(2): 193–200.
- Zhang P F, Chen X X, Zheng Y, et al. 2017. Long-term propagation of porcine undifferentiated spermatogonia. *Stem Cells and Development*, 26(15): 1121–1131.
- Zheng Y, Feng T Y, Zhang P F, et al. 2020. Establishment of cell lines with porcine spermatogonial stem cell properties. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(33): 678–689.
- 刘健明, 陶勇, 韩伟, 等. 2007. 小熊猫耳部成纤维细胞的培养和冷冻保存. *安徽农业大学学报*, 18(1): 70–73.
- 刘旭, 张明海, 刘振生. 2011. 中国小熊猫生态学研究现状. *野生动物*, 32(1): 38–40, 51.
- 王庆忠, 刘慧莲, 王汉海. 2013. 恒河猴精原干细胞的筛选、培养与鉴定. *中国计划生育学杂志*, 21(1): 40–43.