

大动物精原干细胞研究进展

赵鑫, 杨化强

华南农业大学 动物科学学院, 国家生猪种业工程技术研究中心, 广州 510642

摘要: 精原干细胞是存在于雄性动物睾丸内曲细精管基底膜上的生殖系干细胞。精原干细胞一方面通过自我更新来维持其在整个生命周期中自身群体的数量稳定, 另一方面可以在精子发生过程中不断地分化成为各个阶段的生殖细胞并最终形成精子, 从而将亲代携带的遗传信息传递给子代。目前在体外条件下可以进行精原干细胞的长期培养, 并将其诱导分化为各级生精细胞。虽然对啮齿类动物精原干细胞的研究较为成熟, 但是对大动物精原干细胞的研究进展较为缓慢。大动物精原干细胞的研究对了解人类相关生理机制和疾病至关重要, 并且猪、牛和羊等农业动物的精原干细胞的研究为优良种畜扩繁和制备具有重要经济价值的基因修饰家畜提供新的手段。本文在介绍精原干细胞的特征基础上, 重点综述了大动物精原干细胞的研究进展, 探讨了目前研究中面临的主要问题和其未来应用前景, 以为动物新型替代繁殖技术、转基因动物制备、治疗雄性不育以及服务于再生医学提供新思路、新方法。

关键词: 精原干细胞; 大动物; 细胞移植; 精子发生

Progress on spermatogonial stem cells of large animals

Xin Zhao, Huaqiang Yang

National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: Spermatogonial stem cells (SSCs) are male germline stem cells that reside in the basement membrane of the seminiferous tubule in the testis. SSCs are characterized by their capability of self-renewal to maintain the stem cell pool throughout the lifespan and commitments to germ line after puberty, thus transmitting the genetic information from parents to the SSC-derived progenies. SSCs can be isolated from testis, propagated *in vitro*, and induced to differentiate into varied germ cells. Although significant progress has been made in the field of rodent SSCs, the SSCs of large animals have advanced slowly. Studies on SSCs of large animal models can offer insights into the physiological and pathological mechanism of human reproduction. Moreover, SSCs of agricultural large animals can be used as an essential tool for multiplication of elite animal individuals, and generation of genetically modified livestock with valuable economic traits. In this review, we summarize the recent progress on SSCs of large animal models for agricultural and medical purposes, and

收稿日期: 2019-06-10; 修回日期: 2019-07-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31772555)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31772555)]

作者简介: 赵鑫, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 17727753812@163.com

通讯作者: 杨化强, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 大动物基因修饰。E-mail: yangh@scau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.19-167

网络出版时间: 2019/8/5 20:59:45

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190805.2059.001.html>

discuss the present problems and future prospects. This review can give an overall view of large animal SSCs as respect to their applications in novel alternative reproductive technologies, generation of transgenic animals, treatment of male infertility and regenerative medicine.

Keywords: spermatogonial stem cell; large animals; cell transplantation; spermatogenesis

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是雄性哺乳动物体内唯一可以将遗传信息传递给下一代的成体干细胞。SSCs 在生物体的整个生命过程中不断地自我更新,并且在成年雄性睾丸中持续进行的精子发生过程中逐级分化成为精子,从而将亲代的遗传信息传递给子代^[1]。SSCs 奠定了雄性动物精子发生和生殖的基础。尽管 SSCs 对于精子的发生至关重要,但由于睾丸中这些细胞的数量很少以及难以识别,其体外培养、分化以及相关机制和功能研究依然存在诸多尚未解决的问题,因此对 SSCs 的研究一直都进展的较为缓慢。SSCs 自我更新和分化的机制及其应用于细胞移植的研究,不仅对了解哺乳动物生殖相关的生理和病理机制至关重要,而且可以为辅助生殖和细胞治疗提供替代方案。通过 SSCs 的体外培养和移植,为繁育优良动物个体、生产基因修饰动物、治疗雄性不育和人类某些遗传疾病提供新的思路和方法。

1 精原干细胞的特征

1.1 精原干细胞与精子发生

精子的持续产生,即精子发生(spermatogenesis),是一种基于干细胞的高效系统。精子发生的过程起始于 SSCs 的分化,终止于成熟精子的形成,该过程同时也依赖于激素的调节和细胞信号的传导。从自我更新的 SSCs 转化为成熟精子的精子发生过程在不同物种间是完全不同的,这取决于生精上皮周期的长度,如该过程在牛(*Bos taurus*)^[2]中需要 63 天,在猪(*Sus scrofa*)、山羊(*Capra hircus*)、狗(*Canis lupus familiaris*)中分别需要大约 39 天、48 天、56~62 天^[3]。据统计,小鼠(*Mus musculus*)每天每克睾丸组织通过有丝分裂和减数分裂产生约 4000 万精子^[4],而猪和牛分别产生 2300 万和 1200 万精子^[5]。小鼠在妊娠 7.0~7.5 天后,生殖系干细胞首次被确定为胚胎外

胚层中约 100 个原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs),随后迁移至泌尿生殖嵴时会增殖到约 25 000 个细胞^[6]。PGCs 在胚胎发育过程中由尿囊基沿着后肠迁移到生殖嵴并转变为生殖母细胞(gonocytes),进而在个体出生后发育成为包含 SSCs 在内的未分化的精原细胞(spermatogonia)^[1]。在精子发生过程中,不同的生精细胞在曲细精管中按照特殊的细胞联系排列^[7]。A 型精原细胞是由生殖母细胞分化形成的椭圆形的未分化的精原细胞。根据局部排列将 A 型精原细胞分为 As 型(A-single, As)、Apr 型(A-paired, Apr)及 Aal 型(A-aligned, Aal)。As 型精原细胞分裂成为由两个 As 型精原细胞通过胞质桥相连的 Apr 型精原细胞,继续分裂可以形成 4 个、8 个、16 个的 Aal 型精原细胞,进一步分裂形成 A1、A2、A3、A4、中间型(intermediate, In)和 B 型精原细胞。雄性个体出生后,睾丸中 A 型精原细胞通过数次有丝分裂成为 B 型精原细胞, B 型精原细胞经过有丝分裂进一步分裂增大后成为精母细胞(spermatocytes),随后进入减数分裂产生圆形精子细胞(round spermatids),然后经过变形成为长形精子细胞(elongated spermatids)并进入曲细精管管腔^[8](图 1A)。雄性动物性成熟后,精子细胞沿着曲细精管汇入睾丸网,随后通过输出小管进入附睾停留并发育成熟,最后进入输精管。目前普遍认为只有 As 型精原细胞具有干细胞的特性,既可以自我更新又可以分化形成 Apr 型、Aal 型精原细胞,进而启动精子发生以产生精子。然而最近的研究发现,SSC 群体不仅仅限于 As 精原细胞群,一些 Apr 型和 Aal 型精原细胞也表现出干细胞特性^[2]。与小鼠精子发生过程不同,非人灵长类动物猴(*Macaca mulatta*)精子发生从两种不同形态类型的未分化的精原细胞起始,根据核形态和苏木精染色亮度的差异被分为 A dark 和 A pale 精原细胞^[9]。随后经历分裂产生 B1、B2、B3 和 B4 型精原细胞,进一步产生初级精母细胞(primary spermatocytes)、次级精母细胞(secondary

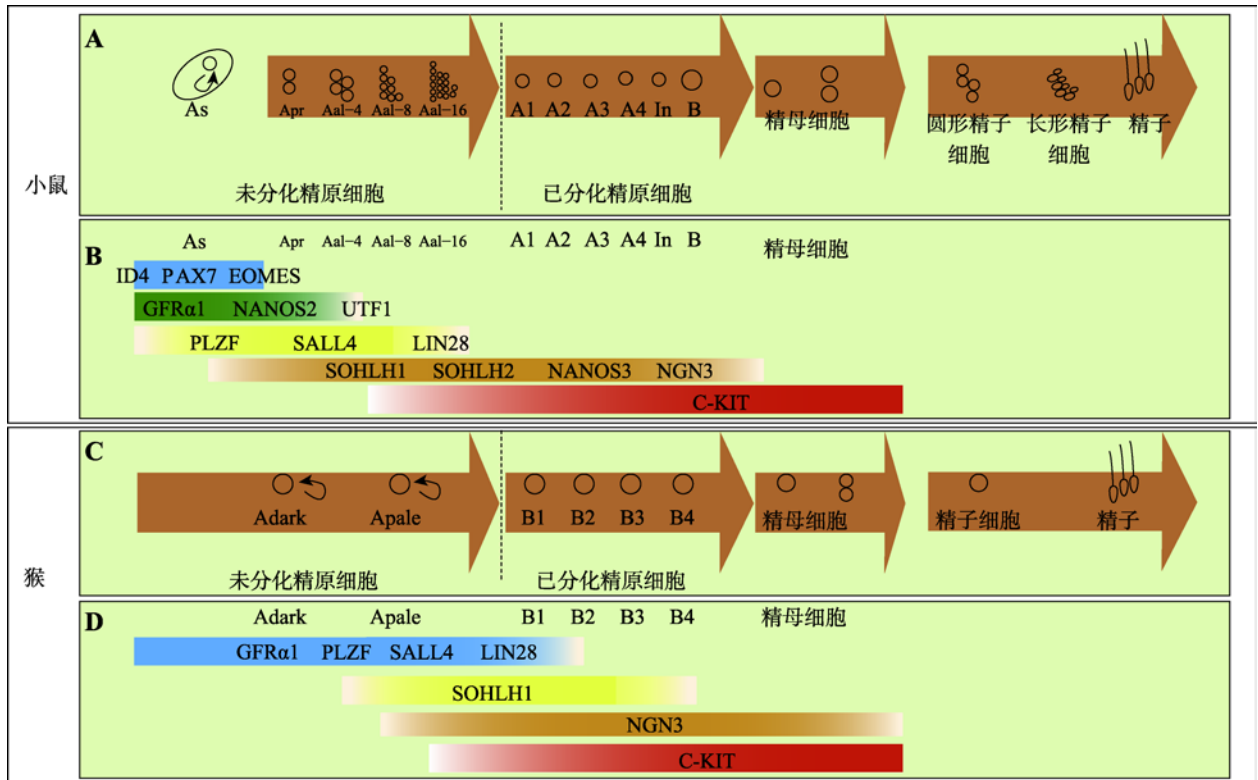


图 1 部分动物典型精子发生过程以及相应的分子标记物

Fig. 1 Schematic of typical spermatogenesis and corresponding molecular markers in some animals

A: 小鼠精原干细胞的体内发育谱系; B: 小鼠体内精原干细胞不同发育阶段相对应的分子标记; C: 猴精原干细胞的体内发育谱系; D: 猴体内精原干细胞不同发育阶段相对应的分子标记。PGCs 在胚胎的发育过程中迁移至生殖嵴后分化为生殖母细胞, 生殖母细胞增殖一段时间后进入静息状态, 在出生后第 1 周作为 SSCs 恢复生理活动。随着生长发育的进行, SSCs 不断地增殖与分化以维持精子发生的稳态。根据参考文献[2, 4, 8, 10, 11]修改绘制。

spermatocytes)和精子细胞(spermatids), 它们经历精子发生以产生成熟精子^[4](图 1C)。

1.2 精原干细胞的标记

由于对 SSCs 的特征和分子标记的认识并不全面, 不同物种 SSCs 的鉴别工作一直困扰着研究者们。小鼠中已报道的未分化精原细胞表达的分子标记包括 ITGA6、GFR α 1、PAX7、ID4、EOMES、THY1、PLZF(ZBTB16)、UTF1、SALL4、LIN28、POU5F1(OCT4)和 NANOS2 等^[1,4,12,13], 其中 PAX7、ID4 和 EOMES 只在 As 型精原细胞中表达。GFR α 1、NANOS2 和 UTF1 在 As、Apr 和 Aal4 精原细胞群中表达, 而 PLZF、SALL4 和 LIN28 则在大部分 As、Apr 和 Aal 精原细胞群中表达^[4]。SOHLH1、SOHLH2、NANOS3、NGN3 以及 C-KIT 一般在已分化的精原细胞中表达, 不过在未分化细胞群也有少量表达^[4,10]。猴中已报道的未

分化精原细胞的标记包括 GFR α 1、PLZF、SALL4 和 LIN28。SOHLH1、NGN3 和 C-KIT 则通常作为已分化精原细胞的分子标记, 但也在一些 Apale 精原细胞群中表达^[4,9]。虽然小鼠以及猴的精原干细胞不同发育阶段的分子标记已研究的较为深入, 并取得了较多的成果(图 1, B 和 D), 但是一些家畜类大动物的 SSCs 分子标记依然不够明确。

最初在小鼠中发现未分化的精原细胞表达的早幼粒细胞白血病锌指蛋白(promyelocytic leukaemia zinc finger protein, PLZF) (也称为 ZBTB16)是 SSCs 维持和自我更新所必需的转录因子^[14], 随后其在猪^[15]、牛^[16]、绵羊(*Ovis aries*)^[17]、山羊^[18]和马科(*Equus caballus*)^[19]动物的生殖细胞和 SSCs 细胞亚群中的表达得到了验证。泛素羧基末端水解酶-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 1, UCHL1) (也称为 PGP 9.5)被鉴定为猪未分化精原细胞的分子标

记可能与 SSCs 的不对称分裂有关,因为未分化精原细胞中 UCHL1 的不对称分离伴随着自我更新和分化标记的共定位^[20]。磷脂酶 D6 (phospholipase D6, PLD6)是位于细胞和线粒体表面的磷脂酶超家族成员之一,Zhou 等^[21]在进行组织特异性表达分析时发现小鼠睾丸和培养的 SSCs 中特异性地高表达 PLD6,细胞定位结果表明它主要在小鼠睾丸和培养的 SSCs 细胞膜中表达。因此,PLD6 被认为是小鼠 SSCs 的一种潜在的新型分子标记。随后在 2018 年,Zhang 等^[22]研究表明,PLD6 在公猪睾丸组织未分化的精原细胞中特异性表达,并采用这种新型分子标记通过免疫磁珠激活细胞分选(magnetic-activated cell sorting, MACS)富集到了猪未分化的精原细胞。GDNF 家族受体 $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$)也被认为是小鼠睾丸中未分化精原细胞的表面分子标记^[23],最新研究表明它也是牛未分化精原细胞群的一种可靠的分子标记^[24]。近来对猪精原细胞的研究发现,青春期前后 DDX4 (DEAD-Box polypeptide 4, 又称 VASA)和 C-KIT 的表达存在差异。DDX4 和 C-KIT 可以作为青春期前猪睾丸中未分化精原细胞的潜在分子标记;而在青春期后的猪睾丸中,它们则是分化的精母细胞的分子标记^[25]。这些基于小鼠模型的分子标记的表达可以鉴定小鼠 SSCs 的存在,也可为其他物种 SSCs 的鉴定和体外培养提供参考。通过总结已有的文献报道,大动物 SSCs 可能的分子标志物见表 1。

1.3 精原干细胞微环境

青春期前的生殖细胞分化开始后,SSCs 能够持续分化提供精子,从而维持精子发生。理论上,SSCs 可以对称分裂产生两个新的 SSCs 或分化的细胞,也可以进行不对称分裂产生一个新的 SSCs 和一个将继续分化的祖代精原细胞(progenitor spermatogonia)^[45]。为了保持无限的自我更新和分化能力以维持自身数量稳定和精子发生,SSCs 需要存在于一个能提供对其生存和分化潜力至关重要的因子及其相互作用的独特的微环境。通过阻止 SSCs 分化来维持干细胞命运的独特的微环境被定义为“生态位”(Niche),通常“生态位”本身是组织特异性的,随着组织功能的状态变化,“生态位”的特征可以通过支持细胞的贡献来改变,以提示 SSCs 进行对称或不对称分裂^[45]。供体 SSCs 移植到已消除内源性 SSCs 的受体动物生精小管后可以成功定植,这证明了 SSCs “生态位”的存在。在 SSCs 增殖期间,曲细精管似乎提供了支持新“生态位”形成的环境。Shinohara 等^[46]将 SSCs 移植到未成熟幼鼠(出生后第 5~12 天)和成年小鼠的睾丸中,结果显示供体细胞在幼鼠中比在成年小鼠睾丸中定植机率高 9.4 倍,并且供体细胞定植的区域在受体幼崽睾丸中比成年睾丸大近 4.0 倍,这些结果表明 SSCs 可以在精子发生过程中发展出新的“生态位”。近年来发现 SSCs 的诸多功能(包括归巢、自我更新和分化)受到这个高度动态的“生态位”

表 1 大动物精原干细胞的分子标记

Table 1 Molecular markers of large animal spermatogonial stem cells

物种	分子标记									
	DBA	PLZF	GFR $\alpha 1$	THY1	POU5F1	SSEA1	CSF1R	ITGA6	UCHL1	NANOG
猪	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	[15,26]	[15, 26]	[31]	[33]	[15]	[36, 37]			[26, 39]	[37, 44]
牛	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	[27]	[16]	[32]	[16]	[27]			[38]	[40]	
水牛	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	[28]			[34]	[28]				[28]	
绵羊	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	[17]	[17]							[41]	
山羊	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
				[35]					[42, 43]	
猴	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
		[30]	[4, 11]	[30]				[4]		
马	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	[29]	[19]	[19]				[19]			

+ : 未分化的精原干细胞中蛋白质表达 (方括号内的数字表示参考文献序号); - : 尚未确定是否表达。

精准调控,参与调控 SSCs 增殖与分化的是多种细胞内分泌因子以及与其相关的多个重要的信号通路,其中最重要的是胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF),它也是 SSCs 体外培养不可缺少的细胞因子^[47]。

SSCs “生态位”非常复杂,其构成包括 SSCs 周围的支持细胞、间质细胞、管周肌样细胞、血-睾屏障及其周围血管网等成分以及结合在胞外基质上的多种生长因子和细胞因子等^[48]。其中支持细胞是一种柱状上皮细胞,为 SSCs 和分化的生殖细胞提供营养并介导复杂的信号以支持精子发生,同时又分泌产生许多影响精原细胞行为的生长因子^[7],如 GDNF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和趋化因子(C-X-C 基序)配体 12 (chemokine (C-X-C motif) ligand 12, CXCL12)。支持细胞产生 GDNF 和 bFGF,它们对体外培养 SSCs 的自我更新至关重要。同时,支持细胞在血-睾屏障形成中也起着重要作用,两个支持细胞间形成紧密连接并且这个屏障可以起到将生精上皮的基底室中的精原细胞与顶端室中的精母细胞和精子细胞分隔开的作用^[49]。睾丸间质细胞是睾丸中主要的类固醇生成细胞,通过分泌因子影响 SSCs,如胰岛素生长因子 1 (insulinlike growth factor-1, IGF1)和集落刺激因子 1 (colony stimulating factor 1, CSF1),其中 CSF1 表现出与 GDNF 的协同作用^[50,51]。除了分泌 CSF1 的能力外,睾丸间质细胞还能通过产生睾酮来刺激性腺的发育并维持精子发生^[50]。另外,管周肌样细胞能够产生 GDNF 以及 CSF1 来调控 SSCs 的自我更新,而管周巨噬细胞在 SSCs “生态位”中也起着十分重要的作用,它产生 CSF1 并表达参与维甲酸(retinoic acid, RA)生物合成的酶进而调节精原细胞分化^[52]。在了解 SSCs 微环境中的细胞组成,及其分泌的影响 SSCs 自我更新和分化的关键因子的基础上,进一步阐明各关键因子的功能及其相互作用对于充分理解 SSCs “生态位”至关重要^[53]。

2 精原干细胞的分离、体外培养与移植

2.1 精原干细胞的分离纯化

精原干细胞在成年小鼠睾丸中仅占总生殖细胞

的 0.02%~0.03%^[54]。极其稀有的 SSCs 群体使得精原干细胞的分离与培养十分困难。为了体外培养或操作这些细胞(如转染、遗传修饰等),有必要分离和富集具有高纯度和高活力的 SSCs。分离精原干细胞的常用物理方法有差异平板培养、细胞外基质选择(extracellular matrix, ECM)、速度沉降或密度梯度离心^[55]。Izadyar 等^[56]采用 Percoll 密度梯度离心法结合差速贴壁法从 5~7 日龄牛睾丸中分离出 A 型精原细胞,纯度达到 67%~85%,表明富集技术的组合可以增加 SSCs 的纯度。Tiptanavattana 等^[57]使用不同的 ECM 和不连续的梯度密度纯化家猫(*Felis catus*)的 SSC 样细胞,结果表明,用 Percoll 梯度密度离心和层粘连蛋白铺板双重富集可使家猫 SSC 样细胞群体得到高度富集。

SSCs 表面分子标记的研究也为 SSCs 的高效分离奠定了基础。荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)或 MACS 可以获得纯度更高的 SSCs,这两种方法也经常用于分离大动物的 SSCs。FACS 主要是将 SSCs 与带有免疫荧光的抗体相结合,从而依据所需的荧光信号收集目的细胞^[55]。Kim 等^[36]选用猪 A 型精原细胞分子标记 PGP9.5 进行 20%、30%、40%、50%和 60% Percoll 密度梯度沉降初选,收集每层的细胞并分析 PGP 9.5 的表达,结果显示 40%Percoll 梯度层大部分细胞呈 PGP 9.5 阳性。当从 30%和 50%Percoll 梯度层回收细胞时,只有 1.7%±0.4%的细胞呈 PGP 9.5 阳性。而当 30%和 50%Percoll 梯度层的细胞群经 SSEA-1 进行标记的 FACS 分选后,有 48.2%±3.2%的 SSEA-1 阳性细胞,使来自猪的未分化精原细胞群显著富集。

MACS 是利用细胞表面抗原与连接有磁珠的异性抗体相结合,在外加磁场的作用下通过磁珠把需要富集的细胞筛选出来^[55]。Reding 等^[16]采用 THY1-MACS 来富集性成熟前的牛睾丸中未分化的精原细胞,THY1 阳性群体中 64.4%±5.0%的细胞表达 PLZF;而未经 MACS 富集的总睾丸细胞群中仅有 24.7±3.5%的细胞表达 PLZF。相比之下,MACS 分选使 PLZF 阳性精原细胞富集了 2.6 倍(64.4/24.7)。Zhang 等^[22]使用 PLD6-MACS 从青春期前公猪睾丸组织中富集猪未分化的精原细胞,2×10⁶分离的总细胞经 MACS 分选得到 3.24±0.48×10⁵ PLD6 阳性细胞。

随后通过 FACS 检测分选的 PLD6 阳性细胞中 VASA、UCHL1 和 PLZF 的表达, 结果表明, PLD6 阳性细胞群由 $91.31\% \pm 0.56\%$ 的 VASA 阳性细胞群、 $86.04\% \pm 0.63\%$ 的 UCHL1 阳性细胞群和 $84.45\% \pm 0.35\%$ 的 PLZF 阳性细胞群组成。MACS 分离的 PLD6 阳性细胞群体中含有 84.45% 的 PLZF 阳性精原细胞, 这意味着在分选的部分中未分化的精原细胞(PLZF 呈阳性)富集约 8.4 倍, 使未分化的精原细胞得到高度纯化与富集。由于 MACS 具有快速、方便, 并且能很好地适应较大细胞数量的粗单细胞悬液等诸多优势, MACS 在从大动物中分离和富集精原细胞方面发挥着越来越重要的作用。

2.2 精原干细胞的体外培养

SSCs 的体外培养是扩增和操作这种稀有细胞群的重要手段。鉴定影响 SSCs 自我更新的外在因素对建立 SSCs 的长期培养体系至关重要, 因此有必要在已添加各种候选的体外生长因子的培养系统中培养 SSCs, 经培养后进行移植来评估 SSCs 活性, 进而评估 SSCs 培养的体外因子需求^[53,58]。体外培养的小鼠 SSCs 一般呈克隆团形态, 并松散地粘附于饲养层细胞上, 单个细胞来源的克隆团植入内源生殖细胞缺陷的小鼠睾丸内可以产生供体 SSCs 来源的后代, 显示体外培养的 SSCs 具有在体内分化为精子并产生后代的能力^[59]。为了研究饲养层细胞中 GDNF 的表达是否足以支持 SSCs 增殖, Wei 等^[60]用小鼠 GDNF 的 cDNA 构建慢病毒颗粒以及表达 GDNF 的支持细胞系, 研究发现使用该细胞系作为饲养层细胞体外培养 SSCs 时, SSCs 的生长和增殖超过 3 个月, 并且没有明显的表型变化或功能丧失。

即使研究人员对家畜 SSCs 的最佳体外培养条件进行了大量探索, 家畜等大动物 SSCs 的长期体外培养也只能维持很短的时间, 仍然处于起步阶段^[2]。但近来, 也有一些大动物 SSCs 在体外成功长期培养的报道, 如猪^[61]、牛^[32,62,63]和树鼯(*Tupaia belangeri*)^[64]等。由于啮齿类动物 SSCs 的长期培养体系不能支持家畜 SSCs 的不断增殖, 因此推测可能是来自大型动物的 SSCs 具有独特的特征^[65]。SSCs 的富集方法、培养基组成中特定营养成分、适当的生长因子的组合、各种类型的饲养层细胞以及不同的物

理环境条件(如温度、氧浓度等)是实现 SSCs 体外长期培养的关键因素^[53]。在 SSCs 的体外培养体系中, 为了保证 SSCs 的长期生长, 必须在培养基中添加适当的促进生长发育的物质, 如非必需氨基酸、谷氨酰胺和 β -巯基乙醇等; 同时还要添加一些必要的细胞因子, 如 GDNF、bFGF、IGF1、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等^[54]。通常在培养期间使用 GDNF 进行小鼠 SSCs 的长期维持和自我更新, 研究表明 GDNF 也在家畜 SSCs 的长期培养中发挥不可或缺的作用, 另外血清和饲养层细胞也是 SSCs 长期培养不可或缺的组成部分^[1]。SSCs 培养一般添加 1% 以上的优质胎牛血清作为对基础培养基的补充, 体外培养的环境温度、活性氧等也影响 SSCs 体外培养效率^[63]。Oatley 等^[63]采用供体来源的牛胎儿成纤维细胞作为饲养层细胞培养牛未分化的精原细胞成功存活了 2 个多月。Zhang 等^[61]使用新生仔猪支持细胞作为饲养层细胞, 以 DMEM/F12 添加 10% 血清替代物(knockout serum replacement, KSR)和 4 种细胞因子(GDNF、GFR α 1、bFGF 和 IGF1)作为培养基, 未分化的猪精原细胞可以在体外增殖至少 2 个月而不丧失干性。然而迄今为止, 仍没有建立起能够支持家畜等大动物 SSCs 增殖和维持干性的长期培养体系, 且培养后的 SSCs 不能在免疫功能缺陷的小鼠睾丸或同一物种受体睾丸中重建供体来源的精子发生^[3,53]。大动物体外长期培养体系的建立, 不仅有助于研究 SSCs 的生物学功能, 而且对 SSCs 的应用(如遗传修饰、辅助生殖等)至关重要。因此, 对家畜等大动物 SSCs 体外长期培养条件的进一步深入研究是后续 SSCs 成功应用于实践的基础。

2.3 精原干细胞移植

SSCs 移植是鉴定 SSCs 的黄金标准, 也是实现 SSCs 具体应用的最重要的技术手段。此过程将来自供体睾丸的 SSCs 移植到宿主的生精小管中, 植入的 SSCs 可重新定植到基底膜, 进而启动精子发生过程并产生功能型精子。SSCs 移植能使睾丸受损伤的雄性个体恢复生育能力, 已成为精子发生和雄性遗传改造极有价值的研究工具。1994 年, Brinster 等^[66]

首次将小鼠生殖细胞悬液注射到经白消安(Busulfan)处理的生精缺陷小鼠曲细精管中,使受体小鼠精子发生得以恢复。该研究首次实现了 SSCs 的移植,证实了 SSCs 移植后继续向精子分化的能力。SSCs 移植主要分为以下几个步骤:(1)供体 SSCs 的分离和纯化;(2)SSCs 体外处理(体外培养或者基因操作);(3)SSCs 的冷冻保存;(4)受体动物的准备,一般需缺失受体动物内源精子发生,为供体 SSCs 提供合适的睾丸微环境;(5)SSCs 移植技术,即将 SSCs 移植到受体睾丸的曲细精管中。

根据供受体物种不同,SSCs 移植技术可以分为同种移植和异种移植。同种移植是将一种动物睾丸中的 SSCs 移植到与它同种的另一个体中。目前已经实现了小鼠、大鼠、牛、猪、狗、羊和猕猴(*Macaca*)等物种的同种移植,但只有小鼠、大鼠、山羊和绵羊通过生殖细胞移植产生了后代,其它物种的同种移植的研究还处于 SSCs 附植、增殖或产生供体衍生的精子等不同的阶段^[1,67,68]。异种移植是将一种动物睾丸中的 SSCs 移植到与它不同种的另一个体中。Clouthier 等^[69]在小鼠睾丸中观测到了植入的大鼠 SSCs 产生的完整的精子发生,为其他物种提供了异种精子发生的可能性。Dobrinski 等^[70]研究发现,猪供体生殖细胞可以在免疫缺陷小鼠体内定植,但是未观察到供体衍生的精子发生的后期阶段;移植的牛睾丸细胞最初看起来与猪生殖细胞的定植特征相似,但随后主要发育成受体曲细精管内的纤维组织;在小鼠睾丸中,马生殖细胞可以附植但几乎没有增殖。这些都表明来自大型动物的新鲜或冷冻保存的生殖细胞可以定植免疫缺陷小鼠睾丸,但不能进一步增殖与分化。大鼠(*Rattus norvegicus*)^[69]、仓鼠(*Mesocricetus auratus*)^[71]SSCs 作为供体移植到免疫缺陷的小鼠睾丸中,均检测到了完整的供体来源的精子发生。这些都表明异种移植的成功可能依赖于供体和受体物种之间的系统发育距离的远近。但与啮齿类动物进行 SSCs 移植会产生免疫排斥反应不同的是,家畜等大动物的 SSCs 同种移植并不会引起具有正常免疫功能的供受体间的免疫不相容^[72]。尽管人们并不清楚造成这种种间差异的原因,然而普遍的观点认为,睾丸支持细胞在赋予供体细胞在受体中免疫豁免方面发挥着重要作用^[73]。

如何准确地将供体来源的 SSCs 移植到已消除内源 SSCs 的受体动物体内是影响 SSCs 移植成败的一个关键因素。研究较为成熟的是小鼠 SSCs 移植,有 3 种将供体细胞注入到受体睾丸中的注射方法可供选择^[74,75]:(1)微量移液管可以直接插入生精小管中;(2)微量移液管直接插入到一个称为睾丸网的收集系统中,该系统由许多生精小管末端附着形成;(3)微量移液管直接插入到睾丸的输出小管。Ogawa 等^[75]研究发现,细胞悬液微量注射到曲细精管、输出小管或睾丸网中对于在受体中产生供体 SSCs 衍生的精子发生同样有效,但小鼠的 SSCs 移植方法作为一个模型,延伸到其他物种时应根据物种的不同来选择具体的供体细胞悬液注射方法。由于睾丸解剖学结构的物种特异性,特别是睾丸大小和结构,因此小鼠的移植方法推广到家畜等大动物时需要进行适当的修改。虽然在小鼠系统中开发了 3 种生殖细胞注射方法,但是通过超声引导或者外科手术解剖的方法将供体的生殖细胞悬液注射到受体睾丸的睾丸网部位已经被证明是家畜和伴生动物等 SSCs 移植的一种可行的方案^[68,76-79]。

无论用何种方法在受体睾丸中引入供体 SSCs,为了实现定植,供体 SSCs 细胞必须从睾丸内腔移位到曲细精管的基底膜上,这一过程受到受体睾丸中内源 SSCs 存在的阻碍^[74]。因此在消除受体动物的内源精子发生的同时保留受体睾丸曲细精管的正常结构是决定 SSCs 移植成败的又一个关键因素。当前采取的主要手段有药物处理、辐射和基因修饰操作。白消安是一种可以诱导分裂细胞凋亡的细胞周期特异性药物,由于未分化的精原细胞比其他体细胞具有更强的增殖能力,该细胞群极易受到白消安的影响而引起细胞凋亡,因而被广泛应用于消除受体动物的内源性生殖细胞^[80]。注射白消安消除内源生殖细胞群的效率具有剂量依赖性的特点。如何在完全消除受体动物的内源精子发生的同时,尽可能的减少对受体动物副作用是该方法所面临的主要问题^[81]。亚致死剂量的白消安有助于消除内源精子发生,但不会损伤曲细精管的微环境。Ogawa 等^[81]采用腹腔注射白消安的方法消除受体大鼠的内源性 SSCs,取得了比阿霉素等更完全的内源性 SSCs 消除效果。Lin 等^[82]直接将白消安注入到猪阴囊的鞘膜腔中,

使完整的内源生殖细胞丢失,为外源 SSCs 的进入提供了有利的微环境。另一种消除内源精子发生的方法是直接对成体睾丸进行辐射。由于对睾丸进行局部辐射而不损害体内其他组织,因此对受体动物的毒副作用比药物处理低。研究发现,对常规小鼠进行 X 射线局部照射时,使用 1.5+8Gy 或 1.5+12Gy 剂量可以较为完全地破坏受体睾丸精原细胞,且对其他细胞几乎没有损伤^[83]。Izadyar 等^[68]用 10~14Gy 剂量 X 射线局部照射牛睾丸制备受体,移植后睾丸能支持供体 SSCs 的增殖与分化并产生精子。

新近开发的基因编辑技术提供了一种新的消除动物内源 SSCs 的理想方法。利用基因编辑技术敲除某种仅在雄性生殖细胞中表达并在其存活中起关键作用的基因,可以起到消除内源 SSCs 且不影响其他支持细胞的效果,获得“唯支持细胞表型”。完整的支持细胞功能和结构可以保留睾丸的正常结构,为 SSCs 的移植提供了良好的生长环境^[84]。Tsuda 等^[85]研究发现,前体雄性生殖细胞在 *NANOS2* 基因敲除小鼠的睾丸中经历细胞凋亡,从而导致成年期完全不育。Suzuki 等^[86]研究发现,雄性小鼠敲除 *NANOS2* 基因会因精母细胞前体凋亡而不育,但纯合子敲除雌性以及杂合子敲除雄性和雌性具有正常的生殖细胞系,并且可育。Park 等^[84]使用 CRISPR/Cas9 系统成功的在猪胚胎中 *NANOS2* 基因编码区产生了失活突变,获得了内源性生殖细胞近乎完全消融但曲细精管结构完整的理想猪模型。同时,由于 *NANOS2* 基因敲除猪与 *NANOS2* 基因敲除小鼠的表型相似,当杂合子敲除猪雄性 & 纯合子敲除猪雌性(均可育)交配时,可以高效地产生 *NANOS2* 基因敲除猪。因此,纯合子 *NANOS2* 敲除雄性会大大减少内源的生殖细胞,可作为理想的 SSCs 移植受体。

3 大动物精原干细胞

3.1 猪

猪是与人类生活息息相关的家畜之一,作为重要的农业资源为人类提供大部分的肉食,而且由于其在解剖学和生理学上与人类的高度相似性,也越来越多地被应用于生物医学研究。猪 SSCs 体外培养

技术仍需完善。Zhang 等^[61]使用支持细胞作为饲养层和补充含有 KSR、GDNF、bFGF、GFR α 1 和 IGF1 的细胞因子组合的培养基,体外培养猪未分化的精原细胞,超过 2 个月仍具有正常核型。Wang 等^[87]使用差速贴壁法和支持细胞作为饲养层,猪 SSCs 能够在体外传代培养至 15 代。Park 等^[88]采用基于琼脂糖的水凝胶三维培养系统培养猪 SSCs,有效地维持猪 SSCs 的干细胞特性并促进猪 SSCs 的增殖。与二维培养环境相比,猪 SSCs 在三维微环境中培养时与 SSCs 自我更新相关的基因没有明显的转录或翻译下调,*NANOG*、*UCHL1*、*PLZF* 的转录水平和 *PLZF*、*OCT4*、*SOX2* 蛋白水平明显增加,此外精原细胞分化的标志 *C-KIT* 的转录显著下调,这些都表明在三维微环境中猪 SSCs 可以更有效地维持在未分化状态。

体外培养的猪 SSCs 可以移植到曲细精管后重新启动宿主睾丸中供体 SSCs 衍生的精子发生^[55]。Honaramooz 等^[77]使用 PKH26 红色荧光染料标记青春前期的供体公猪的睾丸细胞,在超声引导下将供体来源的生殖细胞悬液注入受体猪睾丸网。通过检查睾丸中荧光标记供体细胞的定位,在接受生殖细胞移植的 11 只受体猪中,有 10 只猪的睾丸生精小管中发现了移植的供体细胞,并且移植的细胞在受体睾丸中保留至少 1 个月。这些结果表明生殖细胞移植在未性成熟猪中是可行的。内源 SSCs 的缺失可以提高植入 SSCs 定植的效率。利用药物处理消除内源 SSCs 所需的药物剂量、注射途径、受体年龄都影响药物处理的效果。Honaramooz 等^[76]用白消安(7.5 mg/kg)处理第 98 天和 108 天妊娠母猪子宫,以消融仔猪内源性的生殖细胞,结果显示经白消安处理的妊娠母猪的仔猪生殖细胞数量在出生后第 2、4 和 8 周显著减少,到 16 周龄时,只有不到 8% 的曲细精管横切面含有减数分裂的生殖细胞。因此,用低剂量白消安对晚期妊娠母猪进行子宫内处理可导致内源生殖细胞群的减少,这可以促进生殖细胞移植后的供体细胞定植。猪 SSCs 研究进展缓慢主要是由于对猪 SSCs 自我更新和分化的机制还知之甚少;猪 SSCs 分离富集的方法效率不高,用于 SSCs 移植的受体动物的有效制备和 SSCs 移植方法还有待进一步研究;同时,如何高效准确地进行 SSCs 原位移

植也是实际操作中的难点之一^[80]。

基因修饰技术的不断发展为 SSCs 的研究提供了新思路。近年来,研究人员可以通过将外源基因随机整合到细胞基因组中或人工核酸酶精确的基因组编辑方法对家畜等大动物雄性生殖系干细胞进行遗传修饰^[73]。Kim 等^[89]将经 EGFP 标记的猪 SSCs 移植到内源性精原干细胞消除的受体猪中,成功产生了转基因精子,并且采用卵胞浆内单精子显微注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术可以使卵子受精。Tang 等^[90]设计了一对专门针对猪杜氏肌营养不良症(Duchenne's muscular dystrophy, DMD)基因座的 TALENs (DMD7.1),通过核转染的方法将 TALENs 引入猪精原细胞进行精准的基因打靶。在猪中,基于 ES 细胞的转基因技术尚不能应用且当前生产转基因猪的方法存在效率低下、花费高昂等缺点^[3],所以基于猪 SSCs 的基因工程生产转基因猪将具有巨大的潜力。

3.2 牛

牛具有体质强壮、适应性强、食物范围广、肉质鲜美等优点,在我国的畜牧业中有着举足轻重的地位。但是牛 SSCs 的研究仍然处于探索的阶段,还存在许多待解决的问题,如 SSCs 体外存活时间短、分裂增殖能力差、长期培养体系尚未建立、体外培养时无法长久保持分化潜能等^[91]。目前,诸多小鼠上的分子标记被证实可用于鉴定牛 SSCs。Fujihara 等^[28]研究发现,UCHL1 在雄性生殖细胞中表达,并且在体细胞中不表达,可以作为分子标记鉴定、富集以及纯化牛 SSCs。植物凝集素(dolichos biflorus agglutinin, DBA)特异性结合牛睾丸内的末端 N-乙酰半乳糖胺残留物,广泛应用于生殖母细胞和 SSCs 的富集与标记^[29]。牛 SSCs 的长期培养条件仍需完善,Aponte 等^[92]用牛支持细胞做饲养层,最低必须培养基(minimum essential medium, MEM)体外培养牛精原干细胞可使 A 型精原细胞在体外存活至少 1 个月。Oatley 等^[63]采用供体来源的牛胎儿成纤维细胞作为饲养层细胞培养牛未分化的精原细胞,成功存活了两个多月,基于细胞团形态与小鼠精原细胞的高度相似性以及保守分子标记 PLZF、LIN28、NANOS2、GFR α 1 和 ID4 等的表达,培养的细胞被

证实是未分化的精原细胞。

Dobrinski 等^[70]将牛生殖细胞异种移植到受体小鼠中,发现牛异种移植时生殖细胞最初看起来与猪生殖细胞特征相似,但随后主要发育成受体曲细精管内的纤维组织。该结果表明来自牛的新鲜或冷冻保存的生殖细胞可以定植小鼠睾丸,但不能分化超出精原细胞扩增阶段。Izadyar 等^[68]分离 5 个月大荷斯坦-弗里斯兰牛犊睾丸的 A 型精原细胞,一半阉割进行自体移植,一半进行同种移植。移植前用 10~14Gy 的 X 射线局部照射受体睾丸以消耗内源性精子发生。在照射后 2 个月,通过长注射针、超声波检查和超声造影剂溶液将 A 型精原细胞(约 10×10^6)注射到受体睾丸中。移植后 2.5 个月,取睾丸样本进行组织学检查,结果显示经辐照的非移植对照组睾丸中只有 45% 的生精小管含有 A 型精原细胞,而在自体精原细胞移植组超过 80% 的生精小管横切面含有 A 型精原细胞。自体精原细胞移植后,约 60% 的生精小管含有精母细胞、30% 的生精小管含有精子细胞;而同种移植后未发现精原细胞再增殖的改善。该研究结果首次证明了牛 SSCs 的自体移植是可行的,并且形成了完整的精子发生。2006 年,Herriid 等^[93]采用青春期前的不同品种的牛进行了 SSCs 移植试验,用荧光染料 PKH26 标记经酶消化制备的供体睾丸细胞的单细胞悬液,然后在超声介导下转移到具有完整的内源种系的受体公牛睾丸的睾丸网中。移植几周后几个月后,经标记的细胞仍存在于受体睾丸中,表明移植的供体生殖细胞在受体睾丸中持续存在。3 年后,该小组采用相同的方法将来自供体公牛犊的睾丸细胞悬液移植到青春期前(5~9 个月龄)受体公牛睾丸网中,在生殖细胞移植后 52~56 周从 6 个受体获得精液样品,并在此后 46 周的时间内再收集 4 次,样品中供体 DNA 是否存在由微卫星标记进行确定。其中一个受体公牛的精液样本显示对供体来源的细胞呈阳性,但受体精子中供体精子的百分比随时间而下降。这些结果首次表明,不同品种的牛之间的睾丸生殖细胞移植是可行的,并且移植后受体公牛能够产生供体来源的精子^[94]。然而,这些结果并不能令人信服,因为受体公牛中仍存在内源 SSCs,而且不可能区分供体和受体来源的精子^[74]。

3.3 羊

羊 SSCs 的体外培养以及移植研究对于羊高效繁育技术的研究、生产转基因羊和保存优良羊品种具有重要意义。羊 SSCs 移植虽然有成功的报道,但是其一般是供体睾丸的生殖细胞混合液移植到受体睾丸内且其效率较低,稳定的羊 SSCs 分离、培养和移植技术流程依然有待完善^[67,95]。羊 SSCs 目前只能进行初步的分离和短期的体外培养,其富集纯化的方法还不够成熟,纯化的效果很不理想,体外培养的体系还没有建立,在体外增殖分化过程中的多种细胞因子的作用还没有完全了解。

2003 年, Honaramooz 等^[68]用荧光亲脂性染料 PKH26 标记来自山羊的供体细胞,在移植后 12 周的期间内,每 3 周检查受体睾丸中被标记供体细胞的存在和定位,结果发现在所有睾丸的曲细精管中均有标记的供体细胞,受体睾丸的组织学检查发现除了针插入部位的有限纤维变化外无明显的组织损伤,这些结果表明生殖细胞移植在未性成熟的雄性山羊中在技术上是可行的。并且供体来源的细胞在受体睾丸中保留至少 3 个月并且移植后在受体山羊中检测到了供体精子的存在。Herriid 等^[67]对受体美利奴公羊进行辐照以消除内源生殖细胞,并将边区莱斯特羊的睾丸生殖细胞移植到受体睾丸内。通过采集受体精液对 50 只美利奴母羊进行子宫内人工授精,每个子宫角接受约 $(4\sim 5)\times 10^6$ 个运动精子,结果产生了 6 只供体基因型的成活后代。该研究通过移植产生了供体 SSCs 来源后代,表明不同品种的公羊之间的睾丸生殖细胞移植是可行的。

3.4 猴

作为最接近于人类的模式大动物,猴 SSCs 的体外培养条件的研究和移植技术的突破将对人类 SSCs 相关研究和临床应用提供重要的临床前参考。SSCs 的稀有性要求更加有效的分离选择方法,但人们对体外猴 SSCs 增殖的培养条件仍知之甚少^[30]。近来研究表明,与其他无血清培养基(包括小鼠无血清培养基和大鼠无血清培养基)相比,猴生殖细胞在补充 4 种生长因子(bFGF、GDNF、LIF 和 EGF)的 StemPro 培养基(StemPro-34-based medium)中,于

37 温度条件下更好地维持增殖^[30]。首次对大型动物 SSCs 移植是 2002 年在猴中进行的, Schlatt 等^[96]将食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*)的睾丸生殖细胞移植到受体睾丸中,4 周后在其中一只猴子的生精上皮基膜上发现了供体来源的 B 型精原细胞。Hermann 等^[97]通过超声引导的睾丸网注射,将经慢病毒处理的半阉割自体 SSCs 移植到 12 只成年和 5 只青春前期经白消安处理的受体猕猴的生精小管中。PCR 检测结果显示,在自体移植后,在 12 只成年猕猴和白消安处理的 5 只猕猴性成熟后的精液中,分别有 9 只和 3 检测到了慢病毒携带的转基因,显示了植入 SSCs 的成功定植并分化为精子。通过 ICSI 技术将来自供体 SSCs 的精子注射到 85 个恒河猴(*Macaca mulatta*)卵母细胞中,有 81 个卵母细胞受精,产生从 4 细胞到胚泡的胚胎,在 81 个胚胎中有 7 个胚胎是来自供体 SSCs 分化的精子。这些结果表明移植后的非人灵长类动物猴 SSCs 能重启精子发生过程,且分化的精子能够支持受精和完成胚胎植入前的发育。Fayomi 等^[98]将新鲜分离和冷冻保存的青春期前睾丸组织自体移植到阉割的青春期恒河猴的背部皮肤或阴囊皮下,移植后观察到移植的睾丸组织生长并产生睾酮、进而恢复精子发生产生使恒河猴卵子受精的功能型精子。随后采用 ICSI 技术获得不同时期的胚胎,胚胎移植到代孕母体后可以完成发育并获得了健康的后代,为睾丸组织移植的临床应用奠定了基础。

3.5 其他动物

家猫是猫科家族的代表,也是发育生物学、生理学和神经科学研究的重要模型^[99],并且与其他高等哺乳动物的精子发生起始和调节过程十分相似^[100]。目前对猫 SSCs 的表达模式还知之甚少。Powell 等^[101]发现家猫未分化的 A 型精原细胞表达 GFR α 1 标记,这些细胞位于生精小管的基底膜并表达 SSCs 的特异性基因 *GFR α 1*。Silva 等^[102]获得的数据表明,来自家猫和豹猫(*Leopardus pardalis*)的供体生殖细胞能够在经 X 射线处理消除内源生殖细胞的家猫睾丸中定植,并形成更成熟的生殖细胞。由于多数猫科动物都处于濒临灭绝或是生存受到威胁的状态,开发有效同种和异种猫科动物 SSCs 移植的程序为繁

殖野生猫科大动物提供候选方案。鉴于家猫是濒危猫科动物保护的潜在模型,因此相关物种珍贵遗传物质能否成功保存取决于能否建立体外扩增家猫 SSCs 的培养体系^[103]。

狗因其大小、寿命、生理学和遗传学等参数与人类相似,因此被认为是研究疾病的遗传基础和再生治疗的最佳预测模型^[104]。Kim 等^[105]在移植前对 5 个月大的狗进行辐射处理以消除内源的生殖细胞但保留较为完整的睾丸结构,供体来源的生殖细胞注射后 12 个月从受体附睾中收集精子检测,基于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的定量 PCR 的结果显示约在受体中有 19.5% 的供体来源的精子,这也是狗首次成功完成同种移植并产生了供体来源的精子。

树鼩是应用于若干人类重要疾病如 HBV、HCV 感染以及抑郁症的重要动物模型。2017 年,树鼩 SSCs 在其基因修饰和移植上取得重大突破。Li 等^[64]使用 THY1 表面蛋白富集树鼩 SSCs,在树鼩支持细胞作为饲养层培养时,SSCs 可大量增殖并长期存活。树鼩 SSCs 增殖后用表达 EGFP 的慢病毒载体转染,移植到已通过腹腔内注射白消安(40 mg/kg)消除内源生殖细胞的成年雄性树鼩睾丸后,EGFP 标记的 SSCs 能够恢复精子发生并成功产生转基因后代。该研究利用 SSCs 转基因和移植制作出了转基因树鼩,为其他多种无成熟胚胎操作技术物种的辅助生殖技术开发、转基因/基因修饰动物制备提供了重要技术手段。

4 结语与展望

相比于啮齿类动物 SSCs 的分离培养、遗传修饰以及细胞移植等方面的研究,大动物的 SSCs 体外培养及移植等方面的研究仍然处于起步阶段。SSCs 作为家畜等大动物的辅助生殖技术的成功应用还存在诸多未解决的问题,其中最重要的有以下两点:(1)大动物 SSCs 的体外稳定和长期培养。培养基是 SSCs 体外培养的关键。适量的生长因子是大动物 SSCs 体外培养不可缺少的,但大动物 SSCs 培养时,啮齿动物 SSCs 培养中常用生长因子(如 bFGF、EGF 和 LIF 等)的功能仍不清楚。自体支持细胞通常作为

大动物 SSCs 长期培养的饲养层细胞,但支持细胞可能会分泌一些促进 SSCs 分化的生长因子。Zheng 等^[1]推测,家畜 SSCs 长期培养时使用支持细胞或层粘连蛋白(laminin)替代饲养层细胞效果会更好。通过解析体外培养过程中的分子机制,有望获得更优越的大动物 SSCs 培养体系。(2)受体动物的处理。白消安处理具有剂量依赖性效应,虽然可以较好地消除内源 SSCs,但其造成的副作用仍然难以解决,如白消安会消融骨髓干细胞,常常导致贫血^[80];在消融内源的 SSCs 的同时会损伤其支持细胞等^[106,107]。而且与所有化学治疗药物一样,由于个体的差异,白消安通过粪便和尿液从家畜体内排出的时间跨度不同,这些细微差别可能会引起生物安全问题。辐射处理可以通过局部照射睾丸而到达消融受体睾丸内源 SSCs 的目的。但是,成年雄性受体的睾丸的大尺寸可能需要极高剂量才能消除所有内源性 SSCs,而一些内源性精原细胞可能经辐射严重损害后仍然存活,如若进一步发育成精子细胞,可能会将获得的基因组畸变传递到下一代^[108]。并且辐射处理的所需的仪器设备、操作过程的繁复及不稳定性都限制了辐射处理的广泛应用。基因编辑技术的发展为建立内源 SSCs 缺失动物提供了一种新思路,CRISPR/Cas9 技术敲除猪的 *NANOS2* 基因提供了理想的 SSCs 移植受体动物,并且可以预计有其他多种候选基因的修饰可以获得同样的效果。在实际操作中,人们可以维持可育的基因修饰杂合子群体以达到长期保有受体动物的目的,在使用时通过配种获得纯合子动物用于移植受体。

稳定的 SSCs 体外培养和移植技术的建立无论对农业还是在生物医学领域都具有重要意义。主要表现在:(1)快速扩繁优良种畜和保存濒危物种。优良种畜的经济价值远大于其饲养价值,通过分离富集优良种畜的 SSCs,可以在体外培养条件下扩繁 SSCs,然后通过高效的移植技术将 SSCs 移植到生育能力受损的公畜睾丸内就可以快速繁殖优良种畜。同时我们可以通过 SSCs 的保存和移植对我国的畜禽地方品种和濒危物种进行保护。(2)制作转基因家畜。目前常用的生产转基因家畜的方法主要是原核显微注射法、胚胎干细胞转染法和体细胞转染结合细胞核移植。但是这些方法都需要成熟的胚胎操作

技术手段和设备,故而在一定程度上限制转基因技术的广泛应用。SSCs的体外长期培养并发育成功能型精子为生产转基因家畜提供了一种新方法。通过转基因SSCs,而后进行细胞移植即可以制作出转基因动物,该方法不需要复杂的显微操作技术和昂贵的设备,具有广泛的应用和推广价值。(3)服务生物医学领域。大动物SSCs的研究和移植可以为人类生殖相关研究、男性不育相关致病的细胞治疗提供重要的临床前实验依据。人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)、和诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)已成功分化为原始生殖细胞(PGCs),并获得了在两个基因座(*H19*、*IGF2*)类似于人类精子单亲基因组印记的精子样细胞(spermatid-like cells)^[109]。此外,其他类型的干细胞也已经被证明可以分化为PGC样细胞(PGC-like cells),且这些细胞在移植到不育小鼠睾丸后可以产生有功能的单倍体精子细胞(haploid sperm cells)^[110]。虽然其他干细胞可以分化为PGC样细胞并产生有功能的单倍体精子细胞,但这些精子细胞的发育潜力以及存活率仍然很低^[110]。故而大动物SSCs的研究与进步都将为人类生殖发育的基础研究、更好的为人类雄性不孕治疗提供一些新的策略。随后Wang等^[87]研究发现,与其他的成体干细胞相似,SSCs可以去分化成为具有胚胎干细胞特性的多能性干细胞,该多能性干细胞在特定的培养条件下可以被诱导分化为造血细胞、神经元样细胞、脂肪细胞等,并且在早期发育阶段注入胚胎时能够发育成各种器官。这使得SSCs还可以作为提供重要细胞的来源服务于再生医学。

参考文献(References):

- [1] Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*, 2014, 147(3): R65–74. [DOI]
- [2] Sahare MG, Suyatno, Imai H. Recent advances of *in vitro* culture systems for spermatogonial stem cells in mammals. *Reprod Med Biol*, 2018, 17(2): 134–142. [DOI]
- [3] González R, Dobrinski I. Beyond the mouse monopoly: studying the male germ line in domestic animal models. *ILAR J*, 2015, 56(1): 83–98. [DOI]
- [4] Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res*, 2018, 29: 207–214. [DOI]
- [5] Staub C, Johnson L. Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal*, 2018, 12(s1): s27–s35. [DOI]
- [6] Mclean DJ. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res*, 2005, 322(1): 21–31. [DOI]
- [7] De Rooij DG. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development*, 2017, 144(17): 3022–3030. [DOI]
- [8] Olive V, Cuzin F. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(2): 246–250. [DOI]
- [9] Boitani C, Di Persio S, Esposito V, Vicini E. Spermatogonial cells: mouse, monkey and man comparison. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 59: 79–88. [DOI]
- [10] Suzuki H, Ahn HW, Chu T, Bowden W, Gassei K, Orwig K, Rajkovic A. SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation. *Dev Biol*, 2012, 361(2): 301–312. [DOI]
- [11] Huleihel M, Nourashrafeddin S, Plant TM. Application of three-dimensional culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Asian J Androl*, 2015, 17(6): 972–980. [DOI]
- [12] Azizi H, Ghasemi Hamidabadi H, Skutella T. Differential proliferation effects after Short-Term cultivation of mouse spermatogonial stem cells on different feeder layers. *Cell J*, 2019, 21(2): 186–193. [DOI]
- [13] Goodyear S, Brinster R. Isolation of the spermatogonial stem cell-containing fraction from testes. *Cold Spring Harb Protoc*, 2017, 2017(4): pdb.prot094185. [DOI]
- [14] Buas FW, Kirsh AL, Sharma M, Mclean DJ, Morris JL, Griswold MD, De Rooij DG, Braun RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*, 2004, 36(6): 647–652. [DOI]
- [15] Goel S, Sugimoto M, Minami N, Yamada M, Kume S, Imai H. Identification, isolation, and *in vitro* culture of porcine gonocytes. *Biol Reprod*, 2007, 77(1): 127–137. [DOI]
- [16] Reding SC, Stepnoski AL, Cloninger EW, Oatley JM. THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. *Reproduction*,

- 2010, 139(5): 893–903. [DOI]
- [17] Borjigin U, Davey R, Hutton K, Herrid M. Expression of promyelocytic leukaemia zinc-finger in ovine testis and its application in evaluating the enrichment efficiency of differential plating. *Reprod Fertil Dev*, 2010, 22(5): 733–742. [DOI]
- [18] Song W, Zhu H, Li M, Li N, Wu J, Mu H, Yao X, Han W, Liu W, Hua J. Promyelocytic leukaemia zinc finger maintains self-renewal of male germline stem cells (mGSCs) and its expression pattern in dairy goat testis. *Cell Prolif*, 2013, 46(4): 457–468. [DOI]
- [19] Costa GM, Avelar GF, Rezende-Neto JV, Campos-Junior PH, Lacerda SM, Andrade BS, Thomé RG, Hofmann MC, Franca LR. Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. *PLoS One*, 2012, 7(8): e44091. [DOI]
- [20] Luo J, Megee S, Dobrinski I. Asymmetric distribution of UCH-L1 in spermatogonia is associated with maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol*, 2009, 220(2): 460–468. [DOI]
- [21] Zhou Q, Guo Y, Zheng B, Shao B, Jiang M, Wang G, Zhou T, Wang L, Zhou Z, Guo X, Huang X. Establishment of a proteome profile and identification of molecular markers for mouse spermatogonial stem cells. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(3): 521–534. [DOI]
- [22] Zhang P, Qin Y, Zheng Y, Zeng W. Phospholipase D family member 6 is a surface marker for enrichment of undifferentiated spermatogonia in prepubertal boars. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(1): 55–64. [DOI]
- [23] Bugeaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, Ehmcke J, Rawe VY, Pholpramool C, Orwig KE, Schlatt S. GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol Reprod*, 2005, 73(5): 1011–1016. [DOI]
- [24] Kim YH, Choi YR, Kim BJ, Jung SE, Kim SM, Jin JH, Yun MH, Kim SU, Kim YH, Hwang S, Pang MG, Ryu BY. GDNF family receptor alpha 1 is a reliable marker of undifferentiated germ cells in bulls. *Theriogenology*, 2019, 132: 172–181. [DOI]
- [25] Lee R, Lee WY, Park HJ, Ha WT, Woo JS, Chung HJ, Lee JH, Hong K, Song H. Stage-specific expression of DDX4 and c-kit at different developmental stages of the porcine testis. *Anim Reprod Sci*, 2018, 190: 18–26. [DOI]
- [26] Almunia J, Nakamura K, Murakami M, Takashima S, Takasu M. Characterization of domestic pig spermatogenesis using spermatogonial stem cell markers in the early months of life. *Theriogenology*, 2018, 107: 154–161. [DOI]
- [27] Fujihara M, Kim SM, Minami N, Yamada M, Imai H. Characterization and in vitro culture of male germ cells from developing bovine testis. *J Reprod Dev*, 2011, 57(3): 355–364. [DOI]
- [28] Goel S, Reddy N, Mandal S, Fujihara M, Kim SM, Imai H. Spermatogonia-specific proteins expressed in prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis and their utilization for isolation and in vitro cultivation of spermatogonia. *Theriogenology*, 2010, 74(7): 1221–1232. [DOI]
- [29] Herrid M, Nagy P, Juhasz J, Morrell JM, Billah M, Khazanehdari K, Skidmore JA. Donor sperm production in heterologous recipients by testis germ cell transplantation in the dromedary camel. *Reprod Fertil Dev*, 2019, 31(3): 538–546. [DOI]
- [30] Kim YH, Kang HG, Kim BJ, Jung SE, Karmakar PC, Kim SM, Hwang S, Ryu BY. Enrichment and in vitro culture of spermatogonial stem cells from Pre-pubertal monkey testes. *Tissue Eng Regen Med*, 2017, 14(5): 557–566. [DOI]
- [31] Lee KH, Lee WY, Kim JH, Yoon MJ, Kim NH, Kim JH, Uhm SJ, Kim DH, Chung HJ, Song H. Characterization of GFR α -1-positive and GFR α -1-negative spermatogonia in neonatal pig testis. *Reprod Domest Anim*, 2013, 48(6): 954–960. [DOI]
- [32] Sahare M, Kim SM, Otomo A, Komatsu K, Minami N, Yamada M, Imai H. Factors supporting long-term culture of bovine male germ cells. *Reprod Fertil Dev*, 2016, 28(12): 2039–2050. [DOI]
- [33] Zheng Y, He Y, An J, Qin J, Wang Y, Zhang Y, Tian X, Zeng W. THY1 is a surface marker of porcine gonocytes. *Reprod Fertil Dev*, 2014, 26(4): 533–539. [DOI]
- [34] Rafeeqi T, Kaul G. Isolation and enrichment of type A spermatogonia from pre-pubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis. *Andrologia*, 2013, 45(3): 195–203. [DOI]
- [35] Abbasi H, Tahmoorespur M, Hosseini SM, Nasiri Z, Bahadorani M, Hajian M, Nasiri MR, Nasr-Esfahani MH. THY1 as a reliable marker for enrichment of undifferentiated spermatogonia in the goat. *Theriogenology*, 2013, 80(8): 923–932. [DOI]
- [36] Kim YH, Kim BJ, Kim BG, Lee YA, Kim KJ, Chung HJ, Hwang S, Woo JS, Park JK, Schmidt JA, Pang M G, Ryu BY. Stage-specific embryonic antigen-1 expression by undifferentiated spermatogonia in the prepubertal boar testis. *J Anim Sci*, 2013, 91(7): 3143–3154. [DOI]

- [37] Goel S, Fujihara M, Tsuchiya K, Takagi Y, Minami N, Yamada M, Imai H. Multipotential ability of primitive germ cells from neonatal pig testis cultured in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21(5): 696–708. [DOI]
- [38] De Barros FR, Worst RA, Saurin GC, Mendes CM, Assumpção ME, Visintin JA. α -6 integrin expression in bovine spermatogonial cells purified by discontinuous Percoll density gradient. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47(6): 887–890. [DOI]
- [39] Luo J, Megee S, Rath R, Dobrinski I. Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: Application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(12): 1531–1540. [DOI]
- [40] Herrid M, Davey RJ, Hill JR. Characterization of germ cells from pre-pubertal bull calves in preparation for germ cell transplantation. *Cell Tissue Res*, 2007, 330(2): 321–329. [DOI]
- [41] Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology*, 2006, 66(9): 2091–2103. [DOI]
- [42] Heidari B, Rahmati-Ahmadabadi M, Akhondi MM, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Shirazi A, Naderi MM, Behzadi B. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9.5 markers. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(10): 1029–1038. [DOI]
- [43] Zeng W, Tang L, Bondareva A, Luo J, Megee SO, Modelski M, Blash S, Melican DT, Destrempe MM, Overton SA, Gavin WG, Ayres S, Echelard Y, Dobrinski I. Non-viral transfection of goat germline stem cells by nucleofection results in production of transgenic sperm after germ cell transplantation. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(4): 255–261. [DOI]
- [44] Park MH, Park JE, Kim MS, Lee KY, Park HJ, Yun JI, Choi JH, Lee E, Lee ST. Development of a high-yield technique to isolate spermatogonial stem cells from porcine testes. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(8): 983–991. [DOI]
- [45] Oatley JM, Brinster RL. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev*, 2012, 92(2): 577–595. [DOI]
- [46] Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(11): 6186–6191. [DOI]
- [47] Kokkinaki M, Lee TL, He Z, Jiang J, Golestaneh N, Hofmann MC, Chan WY, Dym M. The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod*, 2009, 80(4): 707–717. [DOI]
- [48] Sachula Wu, Gu TY, He ZY, Herrid M, Wang X, Uyumbilig Borjigin. Advances in the research of mammalian spermatogonial stem cells. *Chin J Cell Biol*, 2014, 36(3): 392–399.
- 萨初拉, 顾婷玉, 何志颖, Herrid M, 王欣, 乌云毕力格. 哺乳动物精原干细胞的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(03): 392–399. [DOI]
- [49] Griswold MD. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biol Reprod*, 2018, 99(1): 87–100. [DOI]
- [50] Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW, Brinster RL. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*, 2009, 136(7): 1191–1199. [DOI]
- [51] Potter SJ, Defalco T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction*, 2017, 153(4): R151–R162. [DOI]
- [52] Meistrich ML, Shetty G. The new director of "the spermatogonial niche": introducing the peritubular macrophage. *Cell Rep*, 2015, 12(7): 1069–1070. [DOI]
- [53] Kubota H, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*, 2018, 99(1): 52–74. [DOI]
- [54] Takashima S, Shinohara T. Culture and transplantation of spermatogonial stem cells. *Stem Cell Res*, 2018, 29: 46–55. [DOI]
- [55] Zhao HM. Studies related to spermatogonial stem cells of Bama mini-pig[Dissertation]. Guangxi University, 2014.
- 赵会敏. 巴马小型猪精原干细胞相关问题的研究[学位论文]. 广西大学, 2014. [DOI]
- [56] Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, De Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod*, 2003, 68(1): 272–281. [DOI]
- [57] Tiptanavattana N, Techakumphu M, Tharasanit T. Simplified isolation and enrichment of spermatogonial stem-like cells from pubertal domestic cats (*Felis catus*). *J Vet Med Sci*, 2015, 77(11): 1347–1353. [DOI]
- [58] Kubota H, Brinster RL. Culture of rodent spermatogonial

- stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. *Methods Cell Biol*, 2008, 86: 59–84. [DOI]
- [59] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*, 2003, 69(2): 612–616. [DOI]
- [60] Wei X, Jia Y, Xue Y, Geng L, Wang M, Li L, Wang M, Zhang X, Wu X. GDNF-expressing STO feeder layer supports the long-term propagation of undifferentiated mouse spermatogonia with stem cell properties. *Sci Rep*, 2016, 6: 36779. [DOI]
- [61] Zhang P, Chen X, Zheng Y, Zhu J, Qin Y, Lv Y, Zeng W. Long-Term propagation of porcine undifferentiated spermatogonia. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(15): 1121–1131. [DOI]
- [62] Suyatno, Kitamura Y, Ikeda S, Minami N, Yamada M, Imai H. Long-term culture of undifferentiated spermatogonia isolated from immature and adult bovine testes. *Mol Reprod Dev*, 2018, 85(3): 236–249. [DOI]
- [63] Oatley MJ, Kaucher AV, Yang QE, Waqas MS, Oatley JM. Conditions for Long-term culture of cattle undifferentiated spermatogonia. *Biol Reprod*, 2016, 95(1): 14. [DOI]
- [64] Li CH, Yan LZ, Ban WZ, Tu Q, Wu Y, Wang L, Bi R, Ji S, Ma YH, Nie WH, Lv LB, Yao YG, Zhao XD, Zheng P. Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring. *Cell Res*, 2017, 27(2): 241–252. [DOI]
- [65] Han SY, Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Isolation and *in vitro* culture of pig spermatogonial stem cell. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2009, 22(2): 187–193. [DOI]
- [66] Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11298–11302. [DOI]
- [67] Herrid M, Olejnik J, Jackson M, Suchowerska N, Stockwell S, Davey R, Hutton K, Hope S, Hill JR. Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. *Biol Reprod*, 2009, 81(5): 898–905. [DOI]
- [68] Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. *Mol Reprod Dev*, 2003, 64(4): 422–428. [DOI]
- [69] Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*, 1996, 381(6581): 418–421. [DOI]
- [70] Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev*, 2000, 57(3): 270–279. [DOI]
- [71] Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod*, 1999, 60(2): 515–521. [DOI]
- [72] Kaur G, Long CR, Dufour JM. Genetically engineered immune privileged sertoli cells: a new road to cell based gene therapy. *Spermatogenesis*, 2012, 2(1): 23–31. [DOI]
- [73] Savvulidi F, Ptacek M, Savvulidi Vargova K, Stadnik L. Manipulation of spermatogonial stem cells in livestock species. *J Anim Sci Biotechnol*, 2019, 10: 46. [DOI]
- [74] Giassetti MI, Ciccarelli M, Oatley JM. Spermatogonial stem cell transplantation: insights and outlook for domestic animals. *Annu Rev Anim Biosci*, 2019, 7: 385–401. [DOI]
- [75] Ogawa T, Aréchaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol*, 1997, 41(1): 111–122. [DOI]
- [76] Honaramooz A, Behboodi E, Hausler CL, Blash S, Ayres S, Azuma C, Echelard Y, Dobrinski I. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J Androl*, 2005, 26(6): 698–705. [DOI]
- [77] Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*, 2002, 66(1): 21–28. [DOI]
- [78] Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, Stout J, Coret J, Lankveld DP, Spoormakers TJ, Colenbrander B, Oldenbroek JK, Van Der Ploeg KD, Woelders H, Kal HB, De Rooij DG. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction*, 2003, 126(6): 765–774. [DOI]
- [79] Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer GF, Rolf C, Brook PF, Nieschlag E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod*, 1999, 14(1): 144–150. [DOI]
- [80] Oatley JM. Recent advances for spermatogonial stem cell transplantation in livestock. *Reprod Fertil Dev*, 2017, 30(1): 44–49. [DOI]
- [81] Ogawa T, Dobrinski I, Brinster RL. Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue Cell*, 1999, 31(5): 461–472. [DOI]
- [82] Lin Z, Bao J, Kong Q, Bai Y, Luo F, Songyang Z, Wu Y,

- Huang J. Effective production of recipient male pigs for spermatogonial stem cell transplantation by intratesticular injection with busulfan. *Theriogenology*, 2017, 89: 365–373.e2. [DOI]
- [83] Creemers LB, Meng X, Den Ouden K, van Pelt AM, Izadyar F, Santoro M, Sariola H, de Rooij DG. Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol Reprod*, 2002, 66(6): 1579–1584. [DOI]
- [84] Park KE, Kaucher AV, Powell A, Waqas MS, Sandmaier SE, Oatley MJ, Park CH, Tibary A, Donovan DM, Blomberg LA, Lillico SG, Whitelaw CB, Mileham A, Telugu BP, Oatley JM. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. *Sci Rep*, 2017, 7: 40176. [DOI]
- [85] Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*, 2003, 301(5637): 1239–1241. [DOI]
- [86] Suzuki A, Tsuda M, Saga Y. Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. *Development*, 2007, 134(1): 77–83. [DOI]
- [87] Wang X, Chen T, Zhang Y, Li B, Xu Q, Song C. Isolation and culture of pig spermatogonial stem cells and their in vitro differentiation into Neuron-like cells and adipocytes. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26333–26346. [DOI]
- [88] Park JE, Park MH, Kim MS, Park YR, Yun JI, Cheong HT, Kim M, Choi JH, Lee E, Lee ST. Porcine spermatogonial stem cells self-renew effectively in a three dimensional culture microenvironment. *Cell Biol Int*, 2017, 41(12): 1316–1324. [DOI]
- [89] Kim BG, Kim YH, Lee YA, Kim BJ, Kim KJ, Jung SE, Chung HJ, Hwang S, Choi SH, Kim M J, Kim DH, Kim IC, Kim MK, Kim NH, Kim CG, Ryu BY. Production of transgenic spermatozoa by lentiviral transduction and transplantation of porcine spermatogonial stem cells. *Tissue Eng Regen Med*, 2014, 11(6): 458–466. [DOI]
- [90] Tang L, Bondareva A, González R, Rodriguez-Sosa JR, Carlson DF, Webster D, Fahrenkrug S, Dobrinski I. TALEN-mediated gene targeting in porcine spermatogonia. *Mol Reprod Dev*, 2018, 85(3): 250–261. [DOI]
- [91] Li TT, Xie L, Li MQ, Yang H, Yang XG, Lu YQ, Lu SS, Lu KH. Research progress of buffalo spermatogonial stem cells. *Genom Appl Biol*, 2015, 34(10): 2287–2291. 李婷婷, 谢龙, 李孟琪, 杨欢, 杨小淦, 陆阳清, 卢晟盛, 卢克焕. 水牛精原干细胞研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(10): 2287–2291. [DOI]
- [92] Aponte PM, Soda T, Teerds KJ, Mizrak SC, van de Kant HJ, de Rooij DG. Propagation of bovine spermatogonial stem cells *in vitro*. *Reproduction*, 2008, 136(5): 543–557. [DOI]
- [93] Herrid M, Vignarajan S, Davey R, Dobrinski I, Hill JR. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. *Reproduction*, 2006, 132(4): 617–624. [DOI]
- [94] Stockwell S, Herrid M, Davey R, Brownlee A, Hutton K, Hill JR. Microsatellite detection of donor-derived sperm DNA following germ cell transplantation in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21(3): 462–468. [DOI]
- [95] Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinski I. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biol Reprod*, 2003, 69(4): 1260–1264. [DOI]
- [96] Schlatt S, Foppiani L, Rolf C, Weinbauer GF, Nieschlag E. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Hum Reprod*, 2002, 17(1): 55–62. [DOI]
- [97] Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, Valli H, Rodriguez M, Ezzelarab M, Dargo G, Peterson K, Masterson K, Ramsey C, Ward T, Lienesch M, Volk A, Cooper DK, Thomson AW, Kiss JE, Penedo MC, Schatten GP, Mitalipov S, Orwig KE. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(5): 715–726. [DOI]
- [98] Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich ML, Houser L, Robertson N, Roberts V, Ramsey C, Hanna C, Hennebold JD, Dobrinski I, Orwig KE. Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*, 2019, 363(6433): 1314–1319. [DOI]
- [99] O'Brien SJ, Johnson W, Driscoll C, Pontius J, Pecon-Slattery J, Menotti-Raymond M. State of cat genomics. *Trends Genet*, 2008, 24(6): 268–279. [DOI]
- [100] Silva AF, Escada-Rebelo S, Amaral S, Tavares RS, Schlatt S, Ramalho-Santos J, Mota PC. Can we induce spermatogenesis in the domestic cat using an in vitro tissue culture approach? *PLoS One*, 2018, 13(2): e0191912. [DOI]

- [101] Powell RH, Galiguis J, Biancardi MN, Pope CE, Leibo SP, Wang G, Gomez MC. Phenotypic and molecular characterization of domestic cat (*Felis catus*) spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*, 2016, 95(1): 20. [DOI]
- [102] Silva RC, Costa GM, Lacerda SM, Batlouni SR, Soares JM, Avelar GF, Böttger KB, Silva SF Jr, Nogueira MS, Andrade LM, França LR. Germ cell transplantation in felids: a potential approach to preserving endangered species. *J Androl*, 2012, 33(2): 264–276. [DOI]
- [103] Bedford-Guaus S J, Kim S, Mulero L, Vaquero JM, Morera C, Adan-Milanès R, Veiga A, Raya Á. Molecular markers of putative spermatogonial stem cells in the domestic cat. *Reprod Domest Anim*, 2017, 52(Suppl.2): 177–186. [DOI]
- [104] Tsai KL, Clark LA, Murphy KE. Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. *Mamm Genome*, 2007, 18(6–7): 444–451. [DOI]
- [105] Kim Y, Turner D, Nelson J, Dobrinski I, Mcentee M, Travis AJ. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog. *Reproduction*, 2008, 136(6): 823–831. [DOI]
- [106] Anand S, Bhartiya D, Sriraman K, Mallick A. Underlying mechanisms that restore spermatogenesis on transplanting healthy Niche cells in busulphan treated mouse testis. *Stem Cell Rev*, 2016, 12(6): 682–697. [DOI]
- [107] Bhartiya D, Anand S. Effects of oncotherapy on testicular stem cells and niche. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23(9): 654–655. [DOI]
- [108] Mulder CL, Zheng Y, Jan SZ, Struijk RB, Repping S, Hamer G, van Pelt AM. Spermatogonial stem cell autotransplantation and germline genomic editing: a future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(5): 561–573. [DOI]
- [109] Easley CA, Phillips BT, Mcguire MM, Barringer JM, Valli H, Hermann BP, Simerly CR, Rajkovic A, Miki T, Orwig KE, Schatten GP. Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 440–446. [DOI]
- [110] Lorzadeh N, Kazemirad N. Embryonic stem cells and infertility. *Am J Perinatol*, 2018, 35(10): 925–930. [DOI]

(责任编辑: 苗龙)