

# 牛雄性生殖系干细胞的体外诱导分化

赵云程, 董红, 陈静波

新疆畜牧科学院 畜牧科学研究所, 乌鲁木齐 830000

**摘要:** 雄性生殖系干细胞(Male germ-line stem cells, mGSCs)是一群具有高度自我更新能力和分化潜能的细胞, 是雄性成体内唯一可复制的二倍体永生细胞。转基因技术与雄性生殖系干细胞异体及异种移植技术相结合, 将会为克隆动物、转基因动物生产及一些人类遗传性疾病的基因治疗提供新的机遇与途径。本试验采用组合酶消化和选择贴壁法, 对5月龄、6月龄牛胎儿及新生牛雄性生殖系干细胞体外培养及分化进行了研究。试验结果显示, 睾丸支持细胞对雄性生殖系干细胞体外增殖、分化所必需的, 同时对数期睾丸支持细胞对雄性生殖系干细胞贴壁、增殖与分化效果明显; 共培养16 d后, 牛雄性生殖系干细胞分化为长形精子细胞, 试验建立了牛雄性生殖系干细胞体外诱导培养分化体系。

**关键词:** 牛, 雄性生殖系干细胞, 诱导分化, 长形精子

## Differentiation of bovine male germ-line stem cells *in vitro*

Yuncheng Zhao, Hong Dong, and Jingbo Chen

Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China

**Abstract:** Male germ-line stem cells (mGSCs) have the capability of self-renewal and latent capability of differentiation. mGSCs is the unique diploid immortal cell which can transfer genetic information to filial generation. The combination of transgenic technology and mGSCs heterotransplanting will supply new opportunities and paths to cloning animal, transgenic animal and gene therapy of some human hereditary disease. We studied the isolation and cultivation of mGSCs that were isolated and purified from 5–6 month old bovine fetal testis, new born bovine testis by adopting mixed enzymes digestion and different attaching velocities methods. The results showed that sertoli cells were indispensable to mGSC's proliferation and differentiation *in vitro*. The sertoli cells in logarithmic phase have a significant effect on mGSC's attaching, proliferation and differentiation. Co-culture with Sertoli cells, mGSCs differentiated to long sperm after 16 days. A preliminary system for mGSC's inducing differentiation was established.

**Keywords:** bovine, male germ-line stem cells (mGSCs), inducing differentiation, long sperm

雄性生殖系干细胞(Male germ-line stem cells, mGSCs)是包括性分化后到精子发生过程中, 具有自我增殖和分化潜能的细胞总称<sup>[1,2]</sup>, 位于雄性哺乳动物体内的曲细精管生精上皮基膜内, 在复杂而且高

度有序的精子发生过程中, 占据着重要的地位。

目前, 国内外已成功建立小鼠<sup>[3]</sup>、人<sup>[4]</sup>、兔<sup>[5]</sup>、山羊<sup>[6]</sup>、绒山羊<sup>[7]</sup>、五指山猪<sup>[8]</sup>、牛<sup>[9,10]</sup>等雄性生殖系干细胞体外培养体系。同时, 研究表明雄性生殖系干细

**Received:** August 1, 2008; **Accepted:** November 28, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30760167), High-tech Development Plan Project of Xinjiang Uighur Autonomous Region (No. 200711104), Youth Research Fund of Animal Science Academy in Xinjiang Uighur Autonomous Region (No. 2008QJ01).

**Corresponding author:** Jingbo Chen. Tel: +86-991-4848227; Fax: +86-991-4848227; E-mail: chenjingbo126@126.com

国家自然科学基金(No. 30760167), 新疆维吾尔自治区自治区高技术研究发展计划项目(No. 200711104), 新疆畜牧科学院青年科研基金(No. 2008QJ01)资助。

胞具备体外分化为精子细胞的能力<sup>[6,7,11]</sup>,这一特性使得雄性生殖系干细胞在医学、畜牧业生产等领域有着广阔的应用前景,为克隆动物、转基因动物生产及一些人类遗传性疾病的基因治疗提供新的机遇与途径。截止到目前为止,牛胎儿雄性生殖系干细胞体外诱导分化为长形精子未见报道。本试验研究了牛胎儿雄性生殖系干细胞与睾丸支持细胞共培养条件下的生长行为,同时记录了现有培养系统中雄性生殖系干细胞分化为长形精子的分化过程,为相关研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

4个5月龄牛胎儿睾丸、2个6月龄牛胎儿睾丸,采自乌鲁木齐天鹰屠宰场,月龄判断标准参照秦鹏春《哺乳动物胚胎学》<sup>[12]</sup>;1个新生牛睾丸,由新疆乌鲁木齐种牛场一分场提供。

### 1.2 试剂及器械

L-谷氨酸盐、谷胱甘肽、卡那霉素、胶原酶IV、胰蛋白酶、胎牛血清、新生牛血清(NBS)均为Sigma试剂,DMEM培养基(Gibco),瑞氏-姬姆萨染色液(珠海贝索生物),FSH(中国科学院动物研究所),细胞碱性磷酸酶染液(CAKP,南京建成生物工程研究所),其他化学试剂均为国产分析纯,实验用金属及玻璃器皿用前均清洗干净并高压灭菌处理。

### 1.3 组织取样与分离

#### 1.3.1 组织取材

取牛睾丸,一侧除去鞘膜及白膜,切取成约0.5~1.0 cm的小块,立即置入多聚甲醛固定液中,按常规步骤制作石蜡切片,HE染色。另一侧或两侧连同阴囊低温保存,2 h内带回实验室,剥离阴囊及鞘膜后,将睾丸置于75%的乙醇中浸泡2 min,然后用加有双抗的PBSA冲洗3遍,在睾丸白膜上做T字形切口,取出睾丸实质组织,用添加双抗的PBSA漂洗3次,洗去血污后置于平皿中。

#### 1.3.2 睾丸细胞的酶解分离

组织块离散后剪碎,采用两步酶消化法分离睾丸细胞。第1步消化时,以1 mg/mL胶原酶IV,室温下振荡消化15 min,500 r/min,离心5 min弃上清。第2步消化以0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA室温下消化15 min,加入DMEM+10% NCS终止消化,100目滤网过滤,1500 r/min离心5 min,弃上清,取适量

细胞悬液进行存活率测定。

### 1.4 培养液主要成份

M1 培养液: h-DMEM, 10% NCS; 用于饲养层细胞的制备;

M2 培养液: h-DMEM, 2.5%~5% FCS, 0.5%~1% 公牛血清, FSH 1 ng/mL; 用于雄性生殖系干细胞的体外诱导分化。

### 1.5 睾丸支持细胞单层的制备

#### 1.5.1 原代睾丸支持细胞单层的制备

利用睾丸支持细胞与雄性生殖系干细胞差速贴壁特性,将酶解后睾丸细胞悬液接种于培养皿中,37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养5 h后弃去上清,即可获得原代睾丸支持细胞单层。

#### 1.5.2 对数增长期睾丸支持细胞单层的制备

选择接种72 h后牛睾丸支持细胞单层,吸除培养液并用PBSA冲洗3次,加入1 mL 0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA消化至60%细胞脱落,加入等量M1终止消化。1500 r/min离心5 min,弃上清。加入M1培养液调整细胞密度为 $1 \times 10^7$ 个/mL,接种于细胞培养瓶,5 h后即可获得传代牛睾丸支持细胞单层。

### 1.6 雄性生殖系干细胞的分离提纯与培养

#### 1.6.1 雄性生殖系干细胞的分离

利用睾丸支持细胞与雄性生殖系干细胞差速贴壁特性,将酶解后睾丸细胞悬液接种于培养皿中,37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养5 h,将上清缓慢倾出,上清即为雄性生殖系干细胞悬液。

#### 1.6.2 雄性生殖系干细胞与睾丸支持细胞的共培养

将分离提纯的雄性生殖系干细胞悬液,1500 r/min离心5 min,弃上清,加入适量M2培养液,调整密度后接种于制备好的睾丸支持细胞单层培养瓶中;之后,每48 h以M2培养液半量换液1次,1周内将FCS浓度调整为2.5%,持续培养4 d后,每48 h半量换液1次,2次后将FCS终浓度调整为5%。

#### 1.6.3 传代培养

细胞共培养过程中,待支持细胞长满皿底发生接触抑制时,可进行传代处理。传代前用PBS清洗2次,镜下观察待60%贴壁细胞脱落时加入新培养液轻吹打数次,1:2传代,37°C、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度培养,隔日换液,倒置显微镜下观察。

### 1.7 雄性生殖系干细胞的鉴定

培养细胞采用重氮盐法进行干细胞特性鉴定。

将雄性生殖系干细胞接种于含睾丸支持细胞单层的24孔板中, 培养一定天数后, 取形态发育正常细胞固定5~10 min, 再用细胞碱性磷酸酶(CAKP)染液试剂盒检测<sup>[10]</sup>, 按说明书步骤进行, 红棕色为阳性。

## 2 结果

### 2.1 睾丸支持细胞对雄性生殖系干细胞体外培养的影响

试验对比了雄性生殖系干细胞与睾丸支持细胞共培养, 及单独培养效果, 结果表明: 37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下, 雄性生殖系干细胞接种于睾丸支持细胞饲养层上后(图1A), 6~9 h生殖细胞开始贴壁, 且保持特有的形态学特征, 即呈圆形、周缘平滑, 单个散在。24 h后, 雄性生殖系干细胞除少量仍呈悬浮状态外, 其余大部分已贴壁(图1B)。

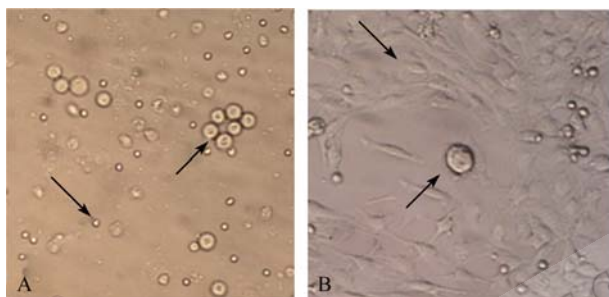


图1 牛雄性生殖系干细胞与睾丸支持细胞共培养  
Fig. 1 Bovine male germ-line stem cells co-culture with sertoli. (A) the cell suspension of bovine testis in this stage, only sertoli cells (arrows) and mGSCs (arrowheads) were present (100×). (B) after 24 h co-culture with Sertoli cells, most of the mGSCs (arrowhead) were adhering on the sertoli (arrow) feeder cell layer (200×).

在共培养体系中, 雄性生殖系干细胞接种24 h后, 即贴附于睾丸支持细胞单层之上, 轻摇培养瓶不易脱落; 在单独培养条件下, 雄性生殖系干细胞72 h后, 仍保持悬浮状态, 半量换液时细胞丢失较多。

### 2.2 原代与对数期睾丸支持细胞对雄性生殖系干细胞体外培养的影响

试验对比了雄性生殖系干细胞在原代与对数期睾丸支持细胞单层上的生长行为。在对数期睾丸细胞单层培养系统中, 雄性生殖系干细胞表现出较强的适应性, 接种48 h后二联体细胞数量剧增, 接近半数二联体细胞产生芽苞, 芽苞生长迅速, 三联体开始形成, 出现个别三联体细胞, 72 h后三联体细胞明显增多; 在原代睾丸细胞单层培养系统中, 雄性生殖系干细胞贴附于睾丸细胞单层后, 呈现一个

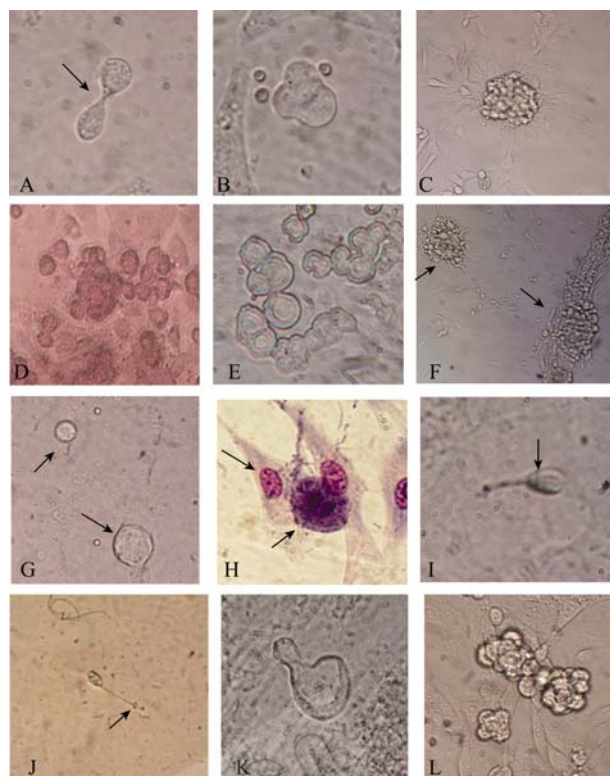


图2 牛雄性生殖系干细胞体外诱导分化

Fig. 2 The differentiation of bovine male germ-line stem cells *in vitro*. (A) After 48 h co-culture with sertoli cells, some of the mGSCs divides to a pair (Ap<sup>+</sup>). The intercellular bridge (arrow) connects two mGSCs (600×). (B) mGSCs triad were observed when co-culture with sertoli cells for 48 h (600×). (C-E) After 4 d, bird-nest-like colonies (Fig. 2C, 200×) and cell chains (Fig. 2E, 400×) were observed. The positive clone with alkaline phosphatase staining (Fig. 2D, 200×). (F) After 6 d, lots of bird-nest-like (arrowhead) and mountain-like (arrow) colonies were observed (100×). (G) 13 d later, spermatocyte (Fig. 2G, arrow) were observed, which characteristic of twofold volume of mGSC (Fig. 2G, arrowhead) (200×). (H) 13 d later, the nucleus and cytoplasm of spermatocyte (arrowhead) were amethyst and spodo-violet staining by Wright-Giemsa. Arrow indicated the sertoli (600×). (I) After 16 days co-culture with sertoli cells, mGSC differentiated into elongation spermtids. Arrowhead point to the acrosomal cap (600×). (J) After 16 days, protoplasm drop were observed in most of the immature sperm. Arrowhead point to the protoplasm drop (600×). (K) After 16 days, the structure of exfoliated cytoplasmic is observed accompanied with spermatogenesis (600×). (L) After 20 days, the new clone were observed after digestion by trypsin (200×).

潜伏期, 生长分化能力明显滞后于对数期睾丸细胞单层培养系统, 且贴附数量与前者相比较少。

### 2.3 雄性生殖系干细胞体外分化行为

观察了雄性生殖系干细胞在对数期睾丸支持细胞单层上的分化特性。结果显示, 48 h后培养体系中, 二联体细胞数量明显增加(图2A), 接近半数二联体细胞产生不规则小突起, 突起生长迅速, 三联体即将形成, 同时培养体系中可见少量三联体细胞(图2B)。4 d后, 雄性生殖系干细胞主要以小集落式生

长为主(图 2C), AKP 染色呈阳性(图 2D), 同时可见少量细胞链出现(图 2E)。6 d 后, 雄性生殖系干细胞增殖迅速, 主要以桑椹状集落和山脉状集落形式出现(图 2F), 增殖产生的雄性生殖系干细胞集结成团, 堆叠紧密, 呈圆球形, 酷似葡萄串。13 d 前后, 培养体系中出现体积约为雄性生殖系干细胞 2~3 倍的精母细胞(图 2G), 瑞姬染色后细胞核呈蓝紫色, 细胞质呈灰紫色<sup>[13]</sup>(图 2H)。16 d 后, 培养体系中陆续出现漂浮状长形精子细胞, 其中少量头部可见类似正常精子的核环结构(图 2I), 多数长形精子细胞尾部可见原生质滴(图 2J), 同时培养体系中可见漂浮状细胞质(图 2K), 半量换液时细胞易丢失。体外培养 20 d 后, 雄性生殖系干细胞集落逐渐开始凋亡, 轻摇培养瓶, 集落出现脱落现象。24 d 时, 传代处理后, 培养皿中再度出现雄性生殖干细胞新生集落(图 2L), 2~5 联体细胞出现, 换液时原集落脱落严重。31 d 后, 培养体系中, 再度出现长形精子细胞。

### 3 讨论

#### 3.1 睾丸支持细胞单层对雄性生殖系干细胞体外培养的影响

本研究采用睾丸支持细胞作饲养层, 结果显示, 睾丸支持细胞饲养层能促进共培养的雄性生殖系干细胞贴壁, 并且对雄性生殖系干细胞的增殖、分化培养起重要作用。雄性哺乳动物从性分化至性成熟前, 这一时期的睾丸中仅存在雄性生殖系干细胞和支持细胞<sup>[14]</sup>, 其中睾丸支持细胞具有极性, 接种后可自然贴壁生长, 而雄性生殖系干细胞为无极性细胞, 扩增的前提是粘附于饲养层之上。已有研究表明, 雄性生殖系干细胞接种于睾丸支持细胞培养皿中, 其贴壁时间与增殖速度均明显提高, 而在单独培养条件下, 雄性生殖系干细胞几乎不贴壁, 并逐渐衰退、凋亡<sup>[15-17]</sup>。结合本试验结果, 雄性生殖系干细胞能较好地粘附于睾丸支持细胞上进行增殖, 这可能与睾丸支持细胞分泌的多种可调节共培养细胞粘附、运动与增殖的细胞粘附分子有关。

#### 3.2 原代、对数期睾丸支持细胞对雄性生殖系干细胞体外培养的影响

本实验发现, 接种于对数期睾丸支持细胞单层上的雄性生殖系干细胞, 其粘附数量与后期分化能力均优于原代期睾丸细胞单层培养系统。通过对这一时期睾丸支持细胞生物学特性的研究, 此期睾丸支持细胞

潜伏期为 72 h<sup>[18]</sup>, 这一时期的睾丸支持细胞单层形成缓慢, 接种后雄性生殖系干细胞散在睾丸支持细胞间, 类似于混合培养; 而处于对数期睾丸支持细胞对培养环境表现出较好的适应性, 功能也进一步趋于完善, 能较好地促进雄性生殖系干细胞的贴壁与增殖。但是, 对数期 Sertoli 细胞数量接种过多, 将堆积生长, 细胞卷曲呈“拉网”状, 不易形成单细胞层, 将会影响雄性生殖系干细胞后期增殖、分化培养。

#### 3.3 雄性生殖系干细胞体外分化行为

精子的发生是一个高度复杂而有序的过程, 涉及到细胞的增殖和分化。Lee、杨延飞、吴应积等<sup>[6,7,11]</sup>成功实现了精原干细胞的体外培养及向精子的定向分化。

血清是细胞培养的重要添加成分, 高浓度的血清可使培养细胞迅速增殖, 低浓度的血清则对细胞的分化起重要作用, 遵照这一原则, 本试验培养初期, 将血清浓度初定为 10%, 其目的主要是用于饲养层的培养, 后期通过多次半量换液, 将血清浓度降为 2.5%, 其目的在于减缓饲养层细胞的增殖, 同时诱导雄性生殖系干细胞的体外分化, 但在前期试验中发现, 在长时间保持 2.5% 浓度血清条件下, 支持细胞凋亡严重, 雄性生殖系干细胞集落也出现脱落现象, 因此在后期试验中, 将血清浓度维持在 2.5% 一段时间后, 再度半量换液, 最终将血清浓度调整为 5%, 进行雄性生殖系干细胞长期分化培养。结果证明, 这样连续改变血清浓度的方法, 并未对体外培养细胞产生不良影响, 同时可以促进雄性生殖系干细胞的体外分化。

生精细胞的体外分化具有明显的激素依赖性, 体外培养中采用的浓度虽不同, 但促卵泡素(FSH)和睾酮(T)是不可缺少的<sup>[19]</sup>。研究表明, FSH 是精子启动形成所必须的, 对精原干细胞的分化起关键作用<sup>[20]</sup>, 但过高的 FSH 浓度对精子发生有不利的影响<sup>[21]</sup>; 同时, 睾酮则在精母细胞减数分裂到精子成熟的各个阶段起作用。因此, 本试验 M2 培养液中主要添加了 FSH 与公牛血清(公牛血清主要为培养系统提供 T), 结果表明, 该试验方案能有效促进雄性生殖系干细胞体外分化为精子。

雄性生殖系干细胞分化为精子细胞, 依次经历有丝分裂、减数分裂的过程。在体内, 牛雄性生殖系干细胞完成有丝分裂需要 21 d, 减数分裂需要 9 d, 此后最终分化为精子细胞。本研究中, 牛雄性生殖系干细

胞接种 13 d 后, 培养系统中即出现了体积较大的精母细胞, 此后 3 d 出现了长形精子细胞, 其体外精子发生周期较体内缩短一半。有关雄性生殖系干细胞体外完成完整精子发生的过程, 目前尚无权威报道, 对于本试验中出现的长形精子细胞, 也仅从形态学角度进行了鉴定, 有待采用单精子注射技术(Introcytoplasmic sperm injection, ICSI)从功能角度对其进一步鉴定。

## REFERENCES

- [1] Zhang XM, Wen XH, Lai LX. Developmental process of germ cells in prenatal mouse. *Chin Ve Sci*, 2000, **20**(3): 273-279.
- [2] Zhang XM, Lai LX, Li DX, *et al.* Separation and purification of spermatogonia in mouse. *Acta Anat Sin*, 2000, **31**(3): 235-238.
- [3] Yi M, Li DX. Effects of SCF, LIF and bFGF on mouse spermatogonial stem cells proliferation *in vitro*. *Chin J Biotech*, 2002, **18**(6): 754-757.  
尹明, 李德雪. 体外培养条件下 SCF, LIF 与 bFGF 对昆明小白鼠精原干细胞增殖的影响. *生物工程学报*, 2002, **18**(6): 754-757.
- [4] Bi G, Li YF. Separation and purification of spermatogonia. *Acta Acad Med Milit Tertiae*, 2005, **27**(11): 1142-1144.  
毕罡, 李彦锋. 人睾丸精原细胞的分离和纯化. *第三军医大学学报*, 2005, **27**(11): 1142-1144.
- [5] Wang P, Wu SH, He JY, *et al.* Preliminary study on the culture of rabbit spermatogonial stem cells and its biological characteristics. *J Luzhou Med Coll*, 2005, **28**(1): 13-15.  
王萍, 吴绍华, 何红媛, 等. 兔精原干细胞培养及生物学特征的初步研究. *泸州医学院学报*, 2005, **28**(1): 13-15.
- [6] Yang YF, Zhang Y. Culture and differentiation of goat spermatogonial stem cells. *Chin J Cell Biol*, 2005, **27**(2): 221-224.  
杨延飞, 张涌. 山羊精原干细胞体外培养分化. *细胞生物学杂志*, 2005, **27**(2): 221-224.
- [7] Wu YJ, Luo FH, Xue XX, *et al.* Long-term culture and spermatogenesis observation of germ cells from seminiferous tubules of cashmere goat. *Acta Sci Natl Univ NeiMongol*, 2005, **36**(4): 411-416.  
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.
- [8] Cheng G, Feng ST. Studies on spermatogonial stem cells cultured *in vitro* of Wuzhishan mini porcine. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(4): 689-693.  
成钢, 冯书堂. 五指山猪精原干细胞与睾丸间质细胞体外培养研究. *生物工程学报*, 2006, **22**(4): 689-693.
- [9] Fariborz I, Krista D, Laura B, *et al.* Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod*, 2003, **68**(1): 272-281.
- [10] Bi CM, Zhang SQ, Peng SY, *et al.* Isolation and purification of bovine spermatogonial stem cells and general properties *in vitro*. *Acta Vet Zootech Sin*, 2006, **37**(10): 977-981.  
毕聪明, 张仕强, 彭树英, 等. 牛精原干细胞的分离和纯化及体外培养的一般特性. *畜牧兽医学报*, 2006, **37**(10): 977-981.
- [11] Lee DR, Parks J. Blastocyst production by intracytoplasmic injection of haploid germ cells derived *in vitro* from bovine neonatal gonocytes. *Biol Reprod*, 2001, **64**(Suppl. 1): 131.
- [12] Qin PC. *Mammalian Embryology*. Beijing: Science Press, 2001.  
秦鹏春. *哺乳动物胚胎学*. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] Huang YF. *Color Atlas of Practical Semen Cytology*. 1st ed. Nanjing: Southeast University Press, 1994.  
黄宇烽. *实用精液细胞学彩色图谱*. 第 1 版. 南京: 东南大学出版社, 1994.
- [14] Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta 1-and alpha 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(10): 5504.
- [15] Li EZ, Li DX, Zhang SQ, *et al.* Culture of mouse spermatogonial stem cells with the sertoli cells as feeder layer. *Acta Zool Sin*, 2006, **52**(4): 774-779.  
李恩中, 李德雪, 张世庆, 等. 以支持细胞为饲养层培养小鼠精原干细胞. *动物学报*, 2006, **52**(4): 774-779.
- [16] He DW, Li XL, Wei GH, *et al.* Long-term proliferation characteristics of spermatogonial stem cells coculture with sertoli cell layer *in vitro*. *Reprod Contract*, 2006, **26**(6): 323-327.  
何大维, 李旭良, 魏光辉, 等. 精原干细胞在支持细胞饲养层上的长期增殖特征. *生殖与避孕*, 2006, **26**(006): 323-327.
- [17] Li LJ. Study on survival and proliferation of mouse spermatogonia *in vitro*. The Doctoral Dissertation of Chinese PLA Vet College, 2002.  
李莲军. 小鼠精原细胞体外长期存活及增殖研究. 中国人民解放军军需大学博士论文, 2002.
- [18] Zhao YC, Xu Q, Liu S, *et al.* The Study of isolation, purification and growth behaviors of bovine sertoli cells. *China Biotechnol*, 2007, **27**(5): 96-100.  
赵云程, 许琴, 刘赛, 等. 牛睾丸支持细胞分离, 纯化及体外生长行为的研究. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(5): 96-100.
- [19] Zhu PY. Culture of mammalian testicular spermatogenic cells *in vitro*. *J Med Postgrad*, 2001, **14**(5): 449-451.  
朱培元. 哺乳动物睾丸生精细胞的体外培养. *医学研究生学报*, 2001, **14**(5): 449-451.
- [20] Boitani C, Politi MG, Menna T. Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biol Reprod*, 1993, **48**(4): 761-767.
- [21] Tesarik J, Mendoza C, Greco E. *In vitro* culture facilitates the selection of healthy spermatids for assisted reproduction. *Fertil Steril*, 1999, **72**(5): 809-813.