

# 胎牛雄性生殖干细胞源类 ES 细胞的分离培养与多能性研究 Study on Pluripotency and Cultivation of ES-like Cells Derived from Male Germ Stem Cells of Bovine Fetuses

董武子 沈文正 华进联 窦忠英\*

DONG Wu-Zi, SHEN Wen-Zheng, HUA Jin-Lian and DOU Zhong-Ying\*

西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心 杨凌 712100

Shaanxi Province Branch Center of National Stem Cell Engineering & Technology Center, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

**摘 要** 雄性生殖干细胞(male germ stem cells, mGSCs)来源于原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs),且终生存在于性分化后的睾丸中。从 20 周胎牛分离睾丸细胞 2 步连续贴壁速率差法能有效纯化胎牛 mGSCs,经流式细胞仪检测,CD9 阳性细胞的比例达到 95.8%。原代与支持细胞共培养,出现隆突状和鸟巢状两种细胞集落。获得 1 株传至 4 代仍呈现集落生长的细胞株,且集落 AKP 染色阳性。对第 3 代鸟巢状细胞集落免疫组化和诱导分化分析,结果显示 SSEA1 和 Oct-4 免疫组化染色阳性;短期内可自发形成 c-kit 染色阳性的分化态精原细胞,定向诱导分化形成了表达神经丝蛋白(Neuro filament, NF)的神经样细胞和表达  $\alpha$ -actin 的心肌样细胞团。试验结果表明:20 周胎牛雄性生殖干细胞在体外可形成具有多分化潜能性的类胚胎干(embryonic stem, ES)细胞。

**关键词** 胎牛,雄性生殖干细胞,类胚胎干细胞,多潜能性

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0751-05

**Abstract** Male germ stem cell(mGSCs), which is in testis after sex differentiation, derive from primordial germ cells. In this study, bovine mGSCs were isolated from testis of 20 weeks fetuses. Number of CD9 positive cells of the cells through two-steps adhering plates velocity different was 95.8% by flow cytometer. The carina-type cells clones and the plane-type cells clones appeared in co-cultured system. One cells lines had been successively maintained for 4 passages, and the cells clusters showed AKP positive staining. The cells clusters showed nest-shape in third passage showed SSEA1 and Oct-4 positive staining. These cells can also spontaneously differentiate into c-kit positive staining germ cells, and the cells were directional induced to form  $\alpha$ -actin positive staining cardiac-like cells cluster and NF positive staining neuron-like cells. The conclusion showed that male germ stem cells from 20 weeks bovine fetuses could be *in vitro* formed like embryonic stem cells.

**Key words** fetal bovine, male germ stem cells, like embryonic stem cells, pluripotency

雄性生殖干细胞(male germ stem cells, mGSCs)是哺乳动物性分化后存在于睾丸中,并能将遗传物质传递给后代, mGSCs 在特定细胞微环境中具有保

持数量的稳定性和定向分化能力的干细胞。mGSCs 的研究主要包括分离纯化<sup>[1,2,3]</sup>与鉴定<sup>[4]</sup>,保证 mGSCs 稳定增殖的体外培养体系构建<sup>[5,6]</sup>;另外,

Received: December 4; Accepted: January 4, 2007.

This work was supported by grants from the Chinese Programs for High Technology Research and Development(863 Program)(No. 2005AA219050) and Northwest A & F University Youth Extra Found(No.08080258).

\* Corresponding author. Tel: +86-29-87080068; E-mail: dongwuzi@nwsuaf.edu.cn

国家高技术研究与发展计划(863)项目(No. 2005AA219050);西北农林科技大学青年专项基金(No.08080258) http://journals.im.ac.cn

mGSCs 同体或异体移植<sup>[7,8,9]</sup>和体外定向分化形成单倍体精子<sup>[10,11]</sup>的研究也报道较多。近年来研究显示 mGSCs 能形成类 ES 细胞,具有与源于内细胞团(ICM)的 ES 细胞相同的特性,如形成典型的鸟巢状细胞集落、表达 ES 细胞的标志、体外形成的内胚体可进一步诱导分化形成三个胚层的细胞、在裸鼠皮下形成具有三个胚层的畸胎瘤等等。有关这方面的报道仅见 Mito Kanatsu-Shinohara 等(2004)<sup>[12]</sup>对新生小鼠和 Kaomei Guan 等(2006 年)<sup>[13]</sup>对成年小鼠的 mGSCs 的研究,并分别将类 ES 细胞成功传代并建系。本研究探讨了胎牛 mGSCs 分离纯化效果,并对胎牛 mGSCs 源类 ES 细胞形成的影响因素、基本特征和体外分化特性进行了研究,为进一步建立胎牛 mGSCs 源类 ES 细胞系提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

牛胎儿从西安屠宰场收集,20 周左右胎牛睾丸从西安某屠宰场收集,在 4℃ 下运回实验室。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养液与诱导程序:

(1)基础培养液:DMEM(高糖)+10% NBS(自制)+2mmol/L 谷氨酰胺+0.01mmol/L 非必需氨基酸+10 $\mu$ g/mL Insulin+100IU/mL 青霉素+100IU/mL 链霉素(现配现用)。

(2)传代细胞培养液:基础培养液+10ng/mL LIF+20ng/mL SCF。

(3)诱导程序 I:添加含有 1mmol/L 2-Me 的基础培养液预诱导 24h, PBS 洗 2~3 次,换为 5mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇浓度的 DMEM 液诱导诱导 0.5h 后,用基础培养液与神经细胞条件培养液(1:1)培养 24h,神经细胞条件培养液参考李勇等<sup>[14]</sup>的方法;倒置显微镜下,观察细胞形态变化。

(4)诱导程序 II:用 30% 基础培养液+70% 心肌细胞条件培养液+10<sup>-7</sup> mol/L RA+0.75% DMSO 配置成培养液,细胞培养一段时间后,更换为 30% 基础培养液+70% 心肌细胞条件培养液,心肌细胞条件培养液参考华进联等<sup>[15]</sup>的方法,每 2~3 d 换液一次,间隔 24 h 观察记录。

#### 1.2.2 胎牛支持细胞(steroli cells, SCs)和 mGSCs 的分离和传代培养:

(1)睾丸细胞的获取:胎牛睾丸细胞的分离方法参考 Izadyar 等<sup>[2]</sup>(2002)的方法。基本过程如下:将从屠宰场取回来的胎牛睾丸,浸泡在 75% 的酒精

2min,用含青链霉素的生理盐水冲洗 4~6 次,无钙镁 PBS 清洗 2~3 次,去除附睾、白膜,分离曲细精管,用眼科镊子拨洗,尽量去除曲细精管外壁的间质细胞,剪碎,静置 10min,去除上清液,加入 10 倍(V:V)的 0.1% 的 IV 型胶原酶,置于 37℃、5% 的培养箱中孵育 20min,10% 血清 DMEM 中和,低速离心(500r/min)2min,除去上清,加入细胞消化液(0.25% 胰蛋白酶+0.04% EDTA)4mL,室温处理 5min。12 号注射针头轻轻吹打数次,用等量含 10% NBS 的 DMEM 细胞培养液中和。用孔径为 100  $\mu$ m 的滤纱过滤后,将细胞悬液移入 10mL 离心管中,1000r/min 离心 5min(10mL 离心管),弃去上清液,用细胞培养液把细胞沉淀制成悬液。细胞记数,调整细胞浓度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup>~2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/mL,接种在 60mm 平皿上。

(2)贴壁速率差分离纯化 mGSCs 和 SCs:原代共培养 6 h 后,换液并分离贴壁细胞和未贴壁细胞,将未贴壁细胞悬液 500r/min 离心 2min,用新鲜培养液重悬,再移入新的培养皿中培养 1h,再分离出未贴壁的细胞和贴壁细胞。未贴壁细胞即为较纯的 mGSCs,收集各阶段的细胞,以流式细胞仪检测细胞 PE-CD9 抗体(Sigma)的阳性比例,其方法参考 Kanatsu-Shinohara 等<sup>[4]</sup>(2004)的方法。

将贴壁细胞用 0.25% 胰酶消化,在 1000r/min 下离心 5min(10mL 离心管),用细胞培养液把所得细胞沉淀制成悬液,并调整细胞浓度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup>~2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/mL。最后在含有 5mL 细胞培养液的培养皿(直径为 60mm)中,用加样器移入细胞悬液 1mL,震荡混合后培养。采取这样的方式传 2 代,可获得较纯的 SCs。选用第 3 代的 SCs 作饲养层细胞(丝裂霉素 C 处理 2h)。

在 38℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的条件下培养,以后每 48h 换液 1 次,每 3~4d 常规传代 1 次。

(3)mGSCs 培养:将 mGSCs 接种在 MEF 饲养层上,在基础培养液+10ng/mL LIF+20ng/mL SCF 中,在 38℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的条件下培养,以后每 48 h 半量换液 1 次。当培养至 8~10d,培养皿中形成典型细胞集落时,显微针剥离并将大集落分散成小细胞团,传代培养于同样的培养系统中,培养 5~6d,一部分细胞进行免疫组化染色分析,一部分细胞进行定向诱导分化培养。

(4)mGSCs 诱导分化培养:选择第 2 代的 mGSCs 细胞集落,挑出细胞集落,用 0.125% 胰酶消化 3~5min,成单细胞和小细胞团,离心重悬,接种在 SCs 饲养层上,在 38℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的条件下基础

培养液中培养。

选择第 2 代的 mGSCs 细胞集落,显微镜剥离并将大集落分散成小细胞团,接种在 MEF 饲养层上。培养 2d,待大多数 mGSCs 贴于饲养层上时,分别采用诱导方法 1 和 2 进行定向诱导分化。

### 1.2.3 细胞的鉴定：

(1)形态学鉴定：倒置相差显微镜下观察集落生长行为和形态特征。

(2)AKP 染色：吸出培养液,无钙镁 PBS 清洗 3 次,4% 戊二醛室温固定 15min,无钙镁 PBS 清洗 3 次,加入 AKP 染色液(0.2mg/mL  $\alpha$ -萘酚磷酸盐,1mg/mL 坚固蓝 0.1mol/L Tris 盐,调至 PH 值为 8.4),作用 15~30min。再用无钙镁 PBS 冲洗 3 次,倒置显微镜下观察照相。

(3)细胞表面标志抗原免疫组化分析：对第 2 代培养于 MEF 饲养层上的细胞或集落进行鉴定,以不同细胞表面标志抗原 SSEA-1 和 Oct-4 检测细胞;对第 3 代定向诱导细胞分别以 NF 单克隆抗体(sigma)和心肌  $\alpha$ -actin 单克隆抗体(sigma)为一抗进行免疫组化检测。按照免疫组化试剂盒说明的方法进行。

### 1.2.4 分子生物学检测：c-kit 引物参考上游序列

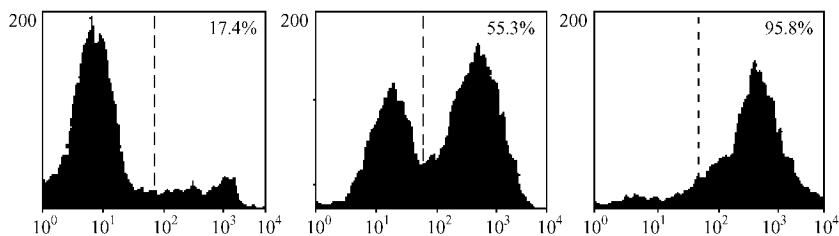


图 1 胎牛睾丸细胞贴壁速率差纯化过程中 CD9 阳性细胞流式细胞仪检测

Fig. 1 Examination of flow cytometry of fetal calves testis cells using during differential plates

Unselected (left), through one-step adhering plates velocity different selected (middle) and through two-steps adhering plates velocity different selected (right) CD9 positive cells ratio. Note the percentage of CD9-positive cells before or after selection.

### 2.2 mGSCs-SCs 原代共培养

实验共收集 20 周胎牛 9 例,将原代共培养系统中的 mGSCs 培养均表现相同的特点。培养 2d,大部分 mGSCs 贴壁 BCs 上生长,培养至 5~6d, mGSCs 成集落样生长,出现较多的隆突状和少量鸟巢状生长的两种集落(图 3-a)。部分细胞不贴壁,去除不贴壁细胞后,再培养 1~2d,细胞集落进一步增大,隆突状集落细胞间隙明显,呈现桑椹状;鸟巢状集落细胞间隙紧密,连续培养至 20d 左右,桑椹状集落脱离皿底,呈悬浮状;鸟巢状集落中细胞变大,出现明显的间隙,AKP 染色显示集落中央细胞呈现弱阳性,周围细胞呈现纤维状分化(图 3-b)。用显微玻璃针挑取培养 6~8d 的集落细胞,RT-PCR 检测结果(图 2)显示,隆突状生长集落细胞表达 c-kit 和鸟巢状生长的

5'-TCAACGACCTTCCCGAAGGA CACCA-3',下游序列 5'-CTGCTGTTTCAGAGTTCATA GAC-3',序列长度为 385bp(Izadyar 等<sup>[21]</sup>,2002);分别收集隆突生长集落、鸟巢状生长集落和纯化培养第 7 代的 SCs,提取总 RNA,采用 RT-PCR 鉴定获得的细胞 c-kit 表达水平。PCR 扩增的条件为:95℃ 5min 预变性,95℃ 50s,55℃ 50s,72℃ 1min,35 个循环后,72℃ 延伸 10min。反应结束后,取 5 $\mu$ L 反应液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

## 2 结果

### 2.1 mGSCs 纯度流式细胞仪检测

分别获取睾丸细胞、原代培养 6h 未贴壁细胞及其传代培养 1h 后的未贴壁细胞,PE-CD9 抗体检测细胞阳性率,每一阶段检测的样本为 5 个,且分别来自 5 个胎儿的睾丸细胞。结果如图 1。

图 1 显示,20 周牛胎儿睾丸中含有大约 17.4% 的细胞表达 CD9,经过原代培养 6h,未贴壁细胞含有约 55.3% 的 CD9 阳性细胞,经 2 次贴壁差培养 1h 获取的未贴壁细胞有 95.8% 的 CD9 阳性细胞,同型抗体对照资料未显示。

集落细胞不表达 c-kit。

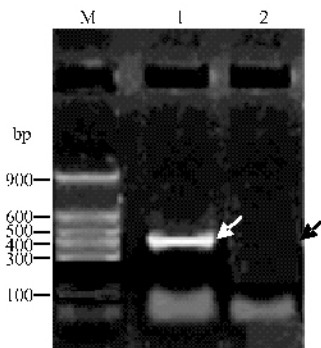


图 2 c-kit mRNA RT-PCR 检测

Fig. 2 c-kit mRNA of different cells examined by RT-PCR.

M: marker; 1: carina-type clusters cells lane; 2: Nest-type clusters cells lane.

### 2.3 鸟巢状生长的集落细胞传代培养

挑取细胞集落 0.1% 胰酶消化成小的细胞团后接种到 MEF 饲养层上传代培养, 两类细胞均呈现平铺或半平铺生长。在该培养体系中, 其中一例细胞传至第 4 代仍呈现集落状生长, 细胞集落 AKP 细胞

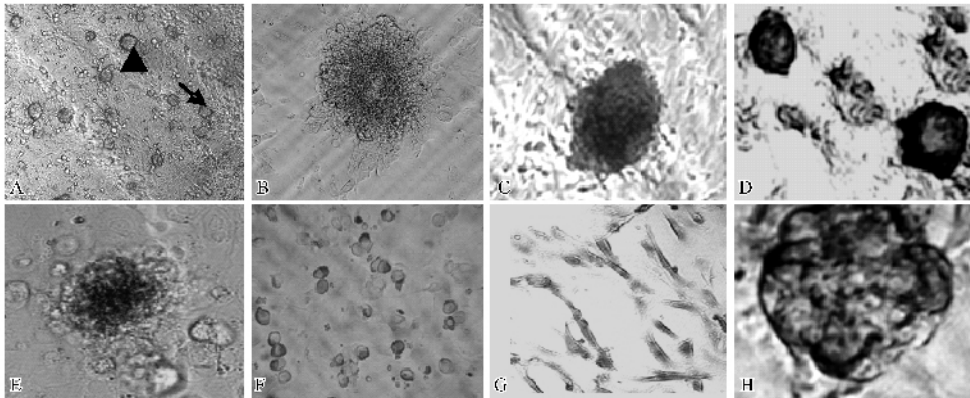


图 3 胎牛 mGSCs 源类 ES 细胞的体外培养与分化

Fig. 3 *In vitro* culture and differentiation of ES-like cells derived from fetal bovine mGSCs

A. Two kinds cells clusters: carina-type cells clones (▲) and plane-type cells clones (→) × 200; B. AKP positive cells in middle of clone at original passage 20d × 200; C. AKP positive clone at 3 passage × 200; D. Oct-4 positive like-ES cells at 3 passage × 200; E. SSEA1 positive like-ES cells clone at 3 passage × 400; F. c-kit positive round cells × 200; G. NF positive like-nerve cells × 400; H.  $\alpha$ -actin positive like-cardiac cells cluster × 400.

### 2.4 mGSCs 源类 ES 细胞体外诱导分化及检测

对传至 3 代的细胞接种在 SCs 饲养层上, 以基础培养液添加 10ng/mL EGF, 培养至第 5 d, 部分贴于 SCs 饲养层上的圆形细胞呈现 c-kit 阳性(图 3-f)。

第 3 代的细胞在 MEF 饲养层上培养 1d 后, 大部分圆形细胞贴壁。在诱导程序 I 定向诱导培养 3d, 成团细胞易脱壁, 呈现多突或双突细胞贴壁牢固, 这类细胞 NF 呈现阳性(图 3-g), 表明这类细胞表达神经细胞特异 NF 表面标记, 未诱导处理组极少细胞 NF 阳性, 且纯化的支持细胞为阴性(资料未显示)。

传代培养 2~3d 后的细胞以诱导程序 II 定向诱导后, 培养 8d, 部分集落呈现  $\alpha$ -actin 阳性(图 3-h), 对照组中细胞呈现  $\alpha$ -actin 阴性(资料未显示)。

## 3 讨论

分离纯化哺乳动物睾丸精原干细胞, 采用贴壁速率差法的细胞用于体外培养, 可获得较好活性细胞, 鉴定精原干细胞主要对其特异细胞表面标志进行检测, 一些研究显示, 哺乳动物精原干细胞特异表达  $\beta$ -整合素<sup>[16]</sup>和 CD9<sup>[4]</sup>等细胞表面标志。本试验采用连续 2 步贴壁速率差获取的细胞流式细胞仪检测, CD9 阳性细胞比例达到 95.8%, 表明连续 2 步贴壁速率差获得细胞主要是 mGSCs。

在牛 mGSCs 体外培养的研究中, Izadyar 等<sup>[11]</sup> (2003) 体外培养 3~5 月龄牛精原干细胞发现, 培养

化学染色显示阳性(图 3-c), 但传至第 5 代时不呈现集落状生长, 传代培养持续存活时间达到 56d。选择第 3 代培养 8~10d 的细胞集落进行间接免疫组化染色显示 SSEA1 阳性(图 3-d)和 Oct-4 阳性(图 3-e)。

至第 3 周和第 4 周, 精原细胞显著增加, 呈现克隆状生长, 在形态学上明显可区分出两种克隆状态: 圆形和放射性, 进一步体外培养, 圆形克隆内的细胞均为 c-kit 阴性, 但是放射状克隆中的细胞呈现 c-kit 阳性。大量研究显示, 表达 c-kit 的精原细胞是分化型的细胞类型<sup>[17, 18]</sup>, 这暗示圆形克隆内的细胞可能是未分化的精原干细胞。本实验首次从 20w 胎牛睾丸细胞原代培养 20d, 获得具有隆突生长和鸟巢状生长集落的两种类型的集落, 隆突状生长集落细胞表达 c-kit 和鸟巢状生长的集落细胞不表达 c-kit, 这与 Izadyar 等<sup>[11]</sup> (2003) 对 3~5 月龄牛的精原干细胞研究报道的结果相近, 尽管细胞生长的集落形态呈现一定差异, 可能与牛发育阶段有关。表明鸟巢状生长的细胞集落呈现未分化状态。

以往研究结果认为 GDNF、LIF、SCF 等细胞因子对 mGSCs 的存活和增殖具有重要作用<sup>[19, 20]</sup>, 并且认为 GDNF 是 mGSCs 存活增殖的主要因素<sup>[21]</sup>, 精原干细胞存活增殖并不依赖于 LIF; 另外, SCF 与 c-Kit 的相互作用调控细胞凋亡, 体内 c-Kit 受体表达下降伴随生殖细胞凋亡增加<sup>[22]</sup>; 高剂量的 SCF 有利于 mGSCs 源的类 ES 细胞集落形成和分裂活性, 添加足量的 SCF 可以抑制或抵消分化型的 mGSCs 表达的 c-kit 的作用, 从而减少 mGSCs 的凋亡。本试验尽管未对 LIF 是否为胎牛 mGSCs 分裂活性所必需进行探讨, 但结果表明, 在 MEF 饲养层上, 当有 LIF、SCF 存在时, 胎牛 mGSCs 分化减慢, 同时有利于源类 ES 细

胞集落的形成。

哺乳动物 mGSCs 源类 ES 细胞研究表明,由新生小鼠<sup>[12]</sup>和转基因 *stra8* + EGFP 的成年小鼠<sup>[13]</sup>的 mGSCs 能获得类 ES 细胞集落,免疫组化表明,这类细胞表达 ES 细胞不仅表达  $\beta 1$ - and  $\alpha 6$ -integrin<sup>[16]</sup>,还表达 SSEA-1<sup>[23]</sup>、Oct3/4<sup>[24]</sup>和 Nanog<sup>[25]</sup>等 ES 细胞标志基因。本试验以 MEF 做饲养层,在 LIF、SCF 等细胞因子存在的条件下,第 3 代胎牛 mGSCs 源细胞集落呈鸟巢状生长,且显示 AKP 染色、SSEA1 和 Oct-4 免疫组化染色为阳性,表明由胎牛 mGSCs 可得到具有类 ES 细胞特性的细胞。

哺乳动物精原干细胞源类 ES 细胞具有与 ES 细胞相同的分化潜能,并体外分化分化成心肌、神经、骨骼肌细胞和上皮细胞<sup>[12,13]</sup>;将类 ES 细胞移植到裸鼠体内,可形成畸胎瘤<sup>[13]</sup>。本实验结果显示,采用牛支持细胞作饲养层,短期内自发向生殖细胞分化,并以 MEF 做饲养层及在特定诱导剂定向培养下,胎牛 mGSCs 源类 ES 细胞分别可形成表达 NF 神经样细胞和表达  $\alpha$ -actin 心肌样细胞,表明胎牛 mGSCs 源类 ES 细胞具有多向分化的潜能,但向其他类型细胞分化的可能性还有待进一步研究。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, *et al.* Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. *Dev Biol*, 2004, **274**( 1 ): 158 - 170.
- [ 2 ] Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Biology Reproduction*, 2002, **124**: 85 - 94.
- [ 3 ] Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL, *et al.* Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testes cells. *PNAS*, 2000, **97**( 15 ): 8346 - 8352.
- [ 4 ] Kanatsu-Shinohara M, Shinya Toyokuni, Takashi Shinohara. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biology of Reproduction*, 2004, **70**: 70 - 75.
- [ 5 ] Cheng G(成钢), Feng SI(冯书堂). Studies on spermatogonial stem cells cultured *in vitro* of Wuzhishan mini porcine. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工学报), 2006, **22**( 4 ): 689 - 693.
- [ 6 ] Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, *et al.* Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum or feeder-free conditions. *Biol Reprod*, 2005, **72**( 4 ): 985 - 991.
- [ 7 ] Mito Kanatsu-Shinohara, Kimiko Inoue, Hiromi Miki, *et al.* Clonal origin of germ cell colonies after spermatogonial transplantation in mice. *Biol Reprod*, 2006, **10**: 106 - 113.
- [ 8 ] Izadyar F, den Ouden K, Stout T, *et al.* Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction*, 2003, **126**: 765.
- [ 9 ] Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. Irradiated mouse testes efficiently support spermatogenesis derived from donor germ cells of mice and rats. *J Androl*, 2006, **27**: 365 - 375.
- [ 10 ] Dong Ryul Lee, Kye-Seong Kim, Yun Hee Yang, *et al.* Isolation of male germ stem cell-like cells from testicular tissue of non-obstructive azoospermic patients and differentiation into haploid male germ cells *in vitro*. *Hum Reprod*, 2006, **21**: 471 - 476.
- [ 11 ] Izadyar F, Krista den Ouden, Laura B. Creemers, George Posthuma, Martti Parvinen, Dirk G. de Rooij. Proliferation and differentiation of bovine type a spermatogonia during long-term culture. *Biology of Reproduction*, 2003, **68**: 272 - 281.
- [ 12 ] Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 2004, **119**: 1001 - 1012.
- [ 13 ] Kaomei Guan, Karim Nayernia, Lars S Maier, *et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 2006, **440**: 1 - 5.
- [ 14 ] Li Y(李勇), Dong WZ(董武子), Dou ZY(窦忠英). Isolation culture and identification of neural stem cells from goat embryonic cerebral cortex. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2004, **5**: 56 - 60.
- [ 15 ] Hua JI(华进联), Xu XM(徐小明), Dou ZY(窦忠英). Rhythmic beating cardiomyocytes derived from human embryonic gem(EG) cells *in vitro*. *Journal of Biomedical Engineering*(生物医学工程学报), 2006, **5**: 1080 - 1085.
- [ 16 ] Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL.  $\beta 1$ - and  $\alpha 6$ -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *PNAS*, 1999, **96**( 6 ): 5504 - 5510.
- [ 17 ] Schrans-Stassen BHGJ, van de Kant HJG, de Rooij DG, *et al.* Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology*, 1999, **140**: 5894 - 5900.
- [ 18 ] Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, *et al.* Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development*, 1991, **71**( 1 ): 85 - 89.
- [ 19 ] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL, 2004. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*, **71**( 3 ): 722 - 731.
- [ 20 ] Yin M(尹明), Li DX(李德雪). Effects of SCF, LIF and bFGF on mouse spermatogonial stem cells proliferation *in vitro*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工学报), 2002, **18**( 6 ): 754 - 757.
- [ 21 ] Shinohara MK, 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.
- [ 22 ] Feng HL, Sparks AE, Sandra A, Zheng LJ, 1999. Decreased expression of the c-kit receptor is associated with increased apoptosis in subfertile human testes. *Fertil Steril*, **71**( 1 ): 85 - 89.
- [ 23 ] Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *PNAS*, 1978, **75**: 5565 - 5569.
- [ 24 ] Pesce M, Schöler HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*, 2001, **19**: 271 - 278.
- [ 25 ] Clark AT, Rodriguez R, Bodnar M, *et al.* The human STELLAR, NANOG and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells*, 2004, **22**: 169 - 179.