

## 改良培养基对体外培养生精细胞增殖分化的影响

宋小敏, 姜宏\*, 汪存利, 黄静

(解放军 105 医院生殖中心, 合肥 230031)

**摘要:** 探讨改良培养基对体外培养小鼠生精细胞的增殖分化效应。根据培养基的不同分为: A 组(基础培养液组); B 组[基础培养液+胶质细胞神经营养因子(GDNF)+表皮生长因子(EGF)组]; C1、C2 和 C3 组[A 组+20%、40%、80%睾丸液(TA)]; D1、D2 和 D3 组(B 组+20%、40%、80%TA)。采用上述 8 种培养基对 7~8 日龄小鼠生精细胞进行体外培养, 通过细胞形态学观察、细胞存活率和粗线期精母细胞特异性基因 *P19*、单倍体精子细胞特异性基因 *TP1* 检测及染色体倍性分析, 探讨 TA、GDNF 和 EGF 对小鼠体外培养生精细胞的增殖分化效应, 结果如下: (1) 形态学观察表明, B 组生精细胞生长速度快, 形态好, 细胞集落多, A 组最差; C 组和 D 组细胞传代后培养时间最长, 可达 4 个月。(2) 生精细胞存活率结果显示, 培养 20 d 的 B 组细胞存活率显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ), C、D 组在各培养阶段与 A 组间无显著性差异。(3) *TP1/P19* 培养 15 d 后 B 组的 *TP1/P19* 显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ), 其他各组间均无显著性差异。(4) 单倍体精子细胞比例结果表明, 培养 15 d 后的 B 组单倍体细胞比例显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ), 其他各组间单倍体细胞比例均无显著性差异。GDNF 和 EGF 可显著提高生精细胞体外培养的增殖分化效应, 而睾丸液可显著延长生精细胞体外培养时间。

**关键词:** 生精细胞; 体外培养; GDNF; EGF

中图分类号: S865.13; Q953

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2014)01-0014-06

### Proliferation and differentiation effects of modified culture medium on *in vitro* cultured spermatogenic cells in mice

SONG Xiaomin, JIANG Hong, WANG Cunli, HUANG Jing

(Reproductive Medicine Center, the 105th Hospital of PLA, Hefei 230031)

**Abstract:** The aim of the study was to investigate the proliferation and differentiation potential of juvenile mouse testis spermatogenic cells *in vitro* under modified culture mediums. Based on the difference of culture mediums, eight groups were set: group A (basic culture medium), group B (basic culture medium + EGF + GDNF), group C1, C2 and C3 (basic culture medium combined with 20%, 40% and 80% testicular abstract (TA)), and group D1, D2 and D3 (group B combined with 20%, 40% and 80% TA). Mixed spermatogenic cells of 7-8 days old mouse were cocultured with those cultures. The proliferative and differential effects of TA, GDNF and EGF on mouse spermatogenic cells *in vitro* were evaluated by detecting growth behaviors and viability of spermatogenic cells, chromosome ploidy distribution as well as the expression of pachytene-specific phosphoprotein gene (*P19*) and haploid sperm cell-specific transition protein gene (*TP1*). The results were as follows: (1) Through morphological observation, the growth velocity of spermatogenic cells and cell colonies was best in group B, while-worst in group A; culture duration of spermatogenic cell after passage was longer in group C and group D when compared with group A and group B. (2) Survival rate of spermatogenic cell was significantly higher in group B than that in other groups after culture for 20 days, which showed no significant difference among group A, group C and group D at all culture stages. (3) The *TP1/P19* in group B was significantly higher than in other groups after culture for 15 days ( $P < 0.05$ ), which showed no significant difference among other groups. (4) The proportion of haploid sperm cells in group B was significantly higher than in other groups after culture for 15 days ( $P < 0.05$ ),

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 南京军区医学科技创新项目(09MA040)资助。

作者简介: 宋小敏, 博士生, 医师。E-mail: 407369006@foxmail.com

\* 通信作者: 姜宏, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: jiangh105@sina.com

which showed no significant difference among other groups. In conclusion, GDNF and EGF could significantly improve proliferation and differentiation of spermatogenic cells, and TA could significantly increase the culture duration for spermatogenic cells.

**Key words:** spermatogenic cells; *in vitro* culture; GDNF; EGF

精子的发生不仅需要支持细胞、各种必需的营养物质(氨基酸、维生素、微量元素)和生殖激素(睾酮、促卵泡生成素、促黄体生成素)的参与,而且需要多种细胞因子的协同作用才能满足生精细胞生长、分化和成熟的需要<sup>[1-3]</sup>。有研究证实睾丸内存在多种能够促进精原细胞 DNA 合成和增殖分化的细胞因子,包括表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)、干细胞因子(Stem cell factor, SCF)、胶质细胞神经生长因子(Glial derived neurotrophic factor, GDNF)、胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)等<sup>[4-5]</sup>。有研究发现,生精细胞发育阻滞与睾丸内支持细胞和间质细胞功能异常以及局部微环境失衡等因素相关<sup>[6]</sup>,若脱离患者睾丸内不良环境,在体外可将不成熟生精细胞诱导分化成接近成熟的单倍体精子细胞甚至精子。

生精细胞体外培养方法主要包括 2 种:(1)组织(器官)培养:包括睾丸组织培养和曲细精管培养,睾丸培养虽接近睾丸生理状态,但不能进一步研究精子发生所需条件以及睾丸中生精细胞与体细胞之间的相互关系,而使用曲细精管培养过程中,随着曲细精管片段的剥落,曲细精管结构及功能也随之丧失,不利于细胞体外长期培养。(2)生精细胞-支持细胞共培养,共培养模式虽不能构成以体内血睾屏障为基础的“微环境”,但支持细胞与生精细胞紧密接触,且能分泌各种因子支持生精细胞生长分化,从而使得生精细胞与支持细胞共培养模式成为生精细胞体外培养的重要研究方法,但使用常规培养基进行生精细胞体外培养过程中仍存在存活时间短、增殖分化率不高,受精率低等问题,难以获得足量可应用到临床的精子细胞。小鼠有 80% 的基因与人相同,是研究人类疾病理想的动物模型,且出生 7~8 日龄雄性昆明小鼠睾丸内均为不成熟的生精细胞,与非阻塞性无精子症(nonobstructive azoospermia, NOA)患者睾丸内细胞成分相似,本实验采用两步酶消化法分离 7~8 日龄雄性昆明小鼠生精细胞,使用生精细胞与支持细胞共培养方式,模拟人生精细胞体外培养环境,并在常规培养基的基础上,加入 GDNF、EGF 和睾丸液(Testicular abstract, TA)进行昆明小鼠生精细胞体外培养,旨在

获得一个安全、稳定、高效的生精细胞体外培养体系,获取较多的单倍体精子细胞,为 NOA 患者的临床治疗提供理论和实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

7~8 日和 8~10 周龄雄性昆明小白鼠,由安徽医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(皖)2011-002。

### 1.2 主要设备及试剂

倒置显微镜(Olympus), Hepa class-100 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Scientific), PCR 扩增仪(ABI), TGL-18R 低温高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司), 6 孔培养皿(Corning); DMEM/F12(Gibco)、胎牛血清(FBS)(杭州四季青公司)、0.25%胰蛋白酶-EDTA(Gibco)、透明质酸酶(Sigma-Aldrich)、胶原酶 IV(Sigma-Aldrich)、GDNF(PeproTech)和 EGF(PeproTech)等培养液; PCR 试剂盒(Fermentas)、Taq DNA 聚合酶(Fermentas)和 DNA Marker(Fermentas); 引物(上海生工生物工程技术有限公司)。

### 1.3 睾丸组织液制备

取 8~10 周龄雄性生育功能正常的成年昆明小鼠,颈脱臼处死,收集双侧睾丸,加入适量 DMEM/F12 培养液匀浆,1200 r·min<sup>-1</sup>×10 min,收集上清,4℃ 12000 r·min<sup>-1</sup>×20 min,收集上清,0.2 μm 滤器滤菌,DMEM/F12 定容至 5 mL,4℃ 保存待用。

### 1.4 培养液配制

A 组(对照组): DMEM/F12+50 IU·L<sup>-1</sup> 卵泡刺激素(FSH)+1 μmol·L<sup>-1</sup> 睾酮(T)+10%胎牛血清(FBS)+100 IU·mL<sup>-1</sup> 青霉素+100 μg·mL<sup>-1</sup> 链霉素;

B 组: A 组+20 ng·mL<sup>-1</sup> EGF+10 ng·mL<sup>-1</sup> GDNF;

C 组: C1(A 组+20% TA)、C2(A 组+40% TA)、C3(A 组+80% TA);

D 组: D1(B 组+20% TA)、D2(B 组+40% TA)、D3(B 组+80% TA)。

### 1.5 生精细胞体外培养

取 7~8 日龄雄性昆明小鼠双侧睾丸,制备混合细胞悬液<sup>[7]</sup>,分别用不同培养液调整细胞密度 5×10<sup>6</sup>

mL<sup>-1</sup>, 接种于 6 孔培养皿中, 每孔 3 mL, 每组 3 孔。置于 34℃, 5% CO<sub>2</sub>, 100%饱和湿度培养箱中进行培养。次日观察细胞贴壁情况, 采用半量换液法, 每 2~3 d 更换新鲜培养液 1 次。

传代培养: 胰蛋白酶消化法收集集落细胞, 调整密度 5×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>, 接种于 6 孔皿中, 置于 34℃, 5% CO<sub>2</sub>, 100%饱和湿度培养箱中继续培养。换液及观察方法同前。

### 1.6 形态学观察及细胞存活率检测

取培养前和培养第 5、10、15 及 20 d 的生精细胞,

采用台盼蓝染色法检测细胞存活率, 细胞存活率/%=(非着色细胞数/总细胞数)×100%。

### 1.7 生精细胞阶段特异性基因检测

收集培养前和各培养阶段细胞, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 采用半定量 RT-PCR 法检测圆形精子细胞特异性表达的 *TPI* 基因和粗线期精母细胞编码的磷蛋白基因 *P19*, 通过 *TPI* 与 *P19* 的比值间接反映粗线期精母细胞向圆形精子细胞的转换情况。引物序列及目的基因如表 1 所示。

表 1 引物序列及目的基因  
Table 1 Sequences of primers and target genes

基因 Gene	GenBank 号 Accession number in GenBank	序列 Sequence	产物长度/bp Product length
<i><math>\beta</math>-actin</i>	/	Forward primer: 5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3' Reverse primer: 5'-GACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3'	421
<i>P19</i>	U17259.1	Forward primer: 5'-CCGCAGAAATGAGGAATGGCCG-3' Reverse primer: 5'-CACATGCCTGTCCCGTGCCT-3'	364
<i>TPI</i>	BC061170.1	Forward primer: 5'-AATTACCGCTCCCACTTGTGA-3' Reverse primer: 5'-TCCTTGGCAGTTCCTTCT-3'	100

按下述步骤进行扩增:  *$\beta$ -actin*, 94℃ 30 s, 57℃ 35 s, 72℃ 45 s, 30 个 cycles; *P19*, 94℃ 30 s, 56℃ 35 s, 72℃ 45 s, 35 个 cycles; *TPI*, 94℃ 30 s, 56℃ 35 s, 72℃ 45 s, 35 个 cycles。

### 1.8 培养细胞染色体倍性分析

收集培养前和各培养阶段细胞, PI (碘化丙啶) 染色, 采用流式细胞仪检测细胞的 PI 荧光强度, 激发波长 488 nm, 发射波长 630 nm, 每次计数 10<sup>4</sup> 个细胞, 计算细胞 DNA 倍体分布。

### 1.9 统计学方法

实验结果数据均以均数±标准误 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件, 采用方差分析和  $\chi^2$  检验比较各组参数,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 生精细胞体外培养生长情况

培养 24 h~48 h, 各实验组细胞几乎全部贴壁, A 组约 85% 的细胞贴壁, 生精细胞呈单层附着于支持细胞上。培养 3~4 d, 各实验组支持细胞铺满皿底, 汇合度接近 100%, 可见正在分裂的生精细胞, 细胞间由细胞间桥相连, C、D 组尤为明显, A 组大部分细胞贴壁, 汇合度近 85%。培养 7~8 d, A 组可见个别分裂细胞, 细胞集落较少 (图 1); 各实验组细胞大小均一, 饱满, 折光性较强, 贴壁牢固, 数量多, 增殖速度快, 均可见细胞形成集落; 集落

间可见直径 6~8  $\mu$ m 的圆形精子细胞, 呈圆形, 表明光滑 (图 2)。培养 10d, A 组细胞集落增多, 但明显少于各实验组, 其中 B 组细胞密度最高, C、D 组细胞密度介于 A、B 两组之间; 除对照组外, 其他组均可见圆形精子细胞、变形精子细胞和带鞭毛精子细胞 (图 3)。培养 15 d, 对照组细胞集落稀疏, 而各实验组细胞集落呈爆发性增长。传代后, 对照组细胞生长不良, 折光性变弱, 胞质中出现空泡、脂滴和气体颗粒状物质, 支持细胞贴壁差, 生精细胞表面及周围出现丝絮状物, 可见部分细胞死亡。B 组细胞传至 2~3 代后细胞数明显下降, 色暗发黑, 折光性差, 漂浮细胞数增加; 但 C、D 组仍生长旺盛, 且可见分裂中的细胞, 培养 4 个月之后仍可见细胞生长 (图 4)。

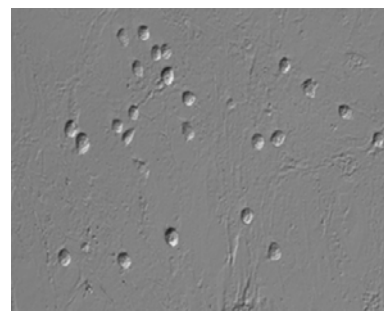


图 1 A 组培养 7~8 d 细胞集落和圆形精子细胞 (×10)  
Figure 1 The colony and round spermatids on 7-8 d of group A (×10)

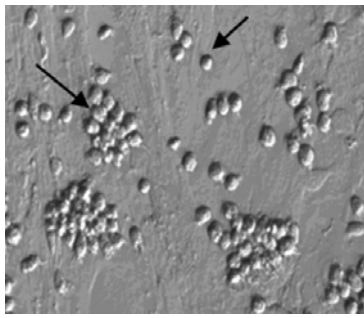


图 2 B 组培养 7-8 d 细胞集落和圆形精子细胞 (×10)  
Figure 2 The colony and round spermatids on 7-8 d of group B (×10)

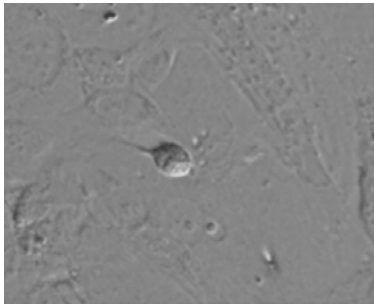


图 3 带鞭毛精子细胞 (×20)  
Figure 3 Flagellate spermatozoon (×20)

2.2 各组间细胞存活率比较

由表 2 可见, 随着体外培养时间的延长, 各组细胞存活率呈先升后降趋势 (培养前细胞存活率均

为 95%); B 组各培养阶段细胞存活率均高于其它各组, 培养 20 d 时, 显著高于其他各组。

2.3 生精细胞阶段特异性基因检测

由图 5 和表 3 可见, *TP1* 和 *P19* mRNA 在细胞培养前均无表达; 培养 5 d 后, 均可检测到 *TP1* 和 *P19* 的表达, 且随着培养时间延长, 各组 *TP1/P19* 均呈增加趋势, 提示单倍体精子细胞转化率增高。培养 15 d 后, B 组 *TP1/P19* 显著高于其他各组; C、D 组与 A 组间无显著性差异。

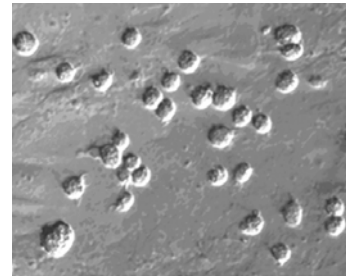


图 4 C 组培养 4 个月后生精细胞 (×20)  
Figure 1 Spermatogenic cell after 4 months of group C (×20)

2.4 细胞倍体分析

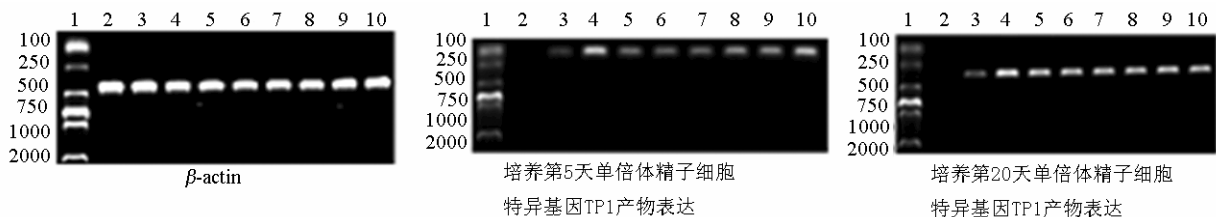
由表 4 可见, 随着培养时间延长, 各组单倍体细胞比例均逐渐增加, 培养 15 d 后, B 组单倍体细胞比例显著高于其他各组; C、D 组与 A 组间无显著性差异。

表 2 不同培养时间各组间细胞存活率比较

Table 2 Comparison of the cell survival rates with different culture time among groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	细胞存活率/% Cell survival rate			
	5 d	10 d	15 d	20 d
A	84.91±16.96	90.25±5.08	89.37±5.02	71.22±6.15
B	90.47±7.00	95.31±2.07	94.81±1.01	82.27±7.05*
C1	90.83±9.86	91.14±6.90	93.68±2.45	80.12±6.50
C2	86.35±14.89	91.87±6.30	91.31±4.90	77.19±3.85
C3	88.02±11.91	90.42±4.72	90.96±4.69	79.30±4.97
D1	91.53±9.46	89.03±5.95	90.62±3.92	80.58±9.30
D2	89.29±10.03	91.04±6.08	89.80±3.50	76.51±9.60
D3	89.53±12.60	88.69±6.27	90.68±4.00	79.94±9.78

注: \*与其他组比较,  $P < 0.05$ 。Note: \* Compared with the other groups,  $P < 0.05$ 。



1: DL2000 Marker; 2: 培养前 Before culture; 3: A 组 Group A; 4: B 组 Group B; 5: C1 组 Group C1; 6: C2 组 Group C2; 7: C3 组 Group C3; 8: D1 组 Group D1; 9: D2 组 Group D2; 10: D3 组 Group D3

图 5 生精细胞阶段特异性基因表达

Figure 5 Expression of spermatogenic cell specific gene

表 3 不同培养时间各组间  $TP1/P19$  比较Table 3 Comparison of  $TP1/P19$  with different culture time among groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	$TP1/P19 (\times 10^{-2})$			
	5 d	10 d	15 d	20 d
A	49.39±11.23	52.97±8.23	56.30±10.91	61.79±11.58
B	59.46±12.97	68.47±13.93	96.12±12.50 <sup>#</sup>	144.40±21.94 <sup>#</sup>
C1	53.67±7.47	59.43±9.39	66.60±11.57	76.28±16.29
C2	52.30±3.97	61.36±10.07	67.19±9.88	70.52±9.76
C3	55.92±5.37	56.94±7.22	67.26±10.87	74.86±11.94
D1	53.82±6.47	60.75±7.69	67.19±11.16	78.26±15.81
D2	56.13±6.82	62.62±9.85	70.98±16.33	78.35±14.17
D3	53.25±7.76	65.62±7.34	66.07±8.09	67.73±4.92

注: #与其他组比较,  $P < 0.05$ 。Note: # compared with the other groups,  $P < 0.05$ .

表 4 不同培养时间各组间单倍体细胞比例比较

Table 4 Comparison of the rates of haploid sperms with different culture time among groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	组间单倍体细胞比例/% Rate of haploid sperm			
	5 d	10 d	15 d	20 d
A	2.49±0.82	5.90±1.40	10.26±1.89	19.47±1.89
B	3.64±0.61	10.80±0.98	26.88±2.68*	38.19±4.90*
C1	2.55±0.75	8.72±1.55	16.96±2.01	22.47±2.19
C2	2.53±0.48	8.11±0.49	16.80±2.26	21.64±2.05
C3	1.96±0.39	8.37±1.37	15.82±1.95	21.48±1.51
D1	2.72±0.67	7.38±0.81	16.38±1.60	23.83±3.07
D2	2.83±0.85	8.56±0.77	15.97±2.42	22.08±3.93
D3	1.97±0.55	7.92±0.81	15.68±1.76	23.89±3.61

注: \*与其他组比较,  $P < 0.05$ 。Note: \* Compared with the other groups,  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

单倍体精子细胞具有完整的单倍染色体, 理论上可与 M II 期卵母细胞正常受精并进一步发育。Tesarik 和 Tanaka 等<sup>[8-9]</sup>分别对阻滞于初级精母细胞阶段的患者进行睾丸生精细胞体外培养, 将获得的单倍体精子细胞行显微注射后成功获得健康后代, 为生精障碍患者提供了新的治疗途径。但睾丸精子的发生涉及神经、内分泌和生精细胞与体细胞之间的相互作用等众多调控因素, 尤其不同分化阶段的关键信号因子尚不清楚, 目前生精细胞在体外培养过程中仍存在存活率、增殖分化率低等问题, 且难以在体外长期培养。

GDNF 是存在于中枢神经的一种多功效营养因子<sup>[10]</sup>, 有研究证实 GDNF 也在睾丸支持细胞表达, 并为生殖细胞提供营养。胡传义等<sup>[11]</sup>发现, GDNF 的高表达可促进精原干细胞自我更新, 对于维持稳定的生精上皮干细胞数量具有十分重要的意义。另 Meng 认为<sup>[5]</sup>, GDNF 作为精子发生的旁分

泌调节因子, 可调节精原干细胞自我更新和分化、促进支持细胞增殖以及血睾屏障的形成。EGF 也是精子发生过程中重要的旁分泌调控因子, 通过与细胞膜表面的 EGF 受体结合, 刺激精原细胞 DNA 的合成和有丝分裂以及细胞集落形成<sup>[4]</sup>。张学明等<sup>[12]</sup>发现, 添加浓度为 20~40 ng·mL<sup>-1</sup> EGF 可显著提高体外培养小鼠生精干细胞的存活率和增殖率。本实验的结果显示, B 组各培养阶段细胞存活率均高于其他各组; RT-PCR 和染色体倍性分析结果也证实, 培养 15 d 后 B 组单倍体细胞比例显著高于其他各组, 表明基础培养液中加入适量的 GDNF 和 EGF, 不仅可显著提高体外培养生精细胞的存活率、增殖率, 而且可显著提高其分化率和单倍体精子细胞形成率。

生精细胞体外培养技术的不断改进虽在一定程度上改善了精子发生环境。但由于体内精子发生微环境的复杂性, 在体外难以完全复制生精细胞体内培养环境, 而生育功能正常的成年小鼠睾丸组织提取液中含有生精细胞在体内生长发育所必需的激

素、营养物质及细胞因子,且 TA 中存在多种对生精细胞增殖分化起重要作用的生长因子,如 EGF、GDNF 和干细胞因子(SCF)等,在培养液中添加适当浓度的 TA 可提高生精细胞的体外增殖、分化效应<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,在基础培养液中加入 TA 后,生精细胞体外培养时间显著高于对照组,且细胞存活率、增殖率及分化率均有增加趋势,表明 TA 能延长生精细胞体外培养时间并可在一定程度上改善生精细胞体外增殖效应。但在含 GDNF 和 EGF 的培养液中加入 TA 后,生精细胞体外培养时间虽有延长,但增殖分化效应反而降低。这可能与培养体系中加入 TA 后改变了培养液中细胞因子间的平衡有关;此外,睾丸液中一些抑制生精细胞增殖分化的因子如成熟抑制因子的存在,也影响了生精细胞体外增殖分化的能力。

综上所述,在生精细胞与支持细胞混合培养体系中,基础培养液中添加 GDNF 和 EGF 可显著提高生精细胞体外培养的增殖分化效应,但不能延长其体外培养时间;加入适量 TA,可延长生精细胞体外培养的时间。因此使用含有 GDNF、EGF 和 TA 的生精细胞与支持细胞混合培养体系可获取较多的单倍体精子细胞,并能延长其培养时间,为临床治疗 NOA 提供新的手段。此外,通过生精细胞体外培养,有利于阐明生精过程的内在调控机制,揭示环境因素对生精过程的影响机制,在治疗无精子症、少精子症和研制男性节育新方法方面均有重要意义。但该培养体系的安全性还有待进一步研究,作者还计划使用该培养体系所获单倍体精子细胞进行卵胞浆内单精子注射,并对受精卵裂情况和胚胎染色体进行观察和检测。

## 参考文献:

- [1] Kierszenbaum A L. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages[J]. *Endocr Rev*, 1994, 15(1): 116-134.
- [2] Abé K, Eto K, Abé S. Epidermal growth factor mediates spermatogonial proliferation in newt testis[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008, 6: 7.
- [3] Bialas M, Borczynska A, Rozwadowska N, et al. SCF and c-kit expression profiles in male individuals with normal and impaired spermatogenesis[J]. *Andrologia*, 2010, 42(2): 83-91.
- [4] Anjamrooz S H, Movahedin M, Tiraihi T, et al. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2006, 18(6): 709-720.
- [5] Meng X, Lindahl M, Hyvönen M E, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF[J]. *Science*, 2000, 287 (5457): 1489-1493.
- [6] Sá R, Neves R, Fernandes S, et al. Cytological and expression studies and quantitative analysis of the temporal and stage-specific effects of follicle-stimulating hormone and testosterone during cocultures of the normal human seminiferous epithelium[J]. *Biol Reprod*, 2008, 79(5): 962-975.
- [7] 于洁, 叶静, 张芳婷, 等. 小鼠生精细胞体外长期培养及超微结构分析[J]. *中国全科医学*, 2006, 20(3): 1689-1691.
- [8] Tesarik J, Bahceci M, Ozcan C, et al. Restoration of fertility by in-vitro spermatogenesis[J]. *Lancet*, 1999, 353(9152): 555-556.
- [9] Tanaka A, Nagayoshi M, Awata S, et al. Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with vero cells[J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(Suppl 1): 795-801.
- [10] Lin L F, Doherty D H, Lile J D, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons[J]. *Science*, 1993, 260(5111): 1130-1132
- [11] 胡传义, 张茨, 王则胜, 等. 胶质细胞源性神经营养因子在小鼠生精恢复过程中的表达和意义[J]. *生殖与避孕*, 2004, 24(2): 78-80.
- [12] 张学明, 李德雪, 岳占碰, 等. 睾丸提取液、EGF、雌激素对小鼠精原干细胞体外存活和增殖的效果[J]. *畜牧兽医学*, 2006, 22(6): 1-6.