

# 海藻酸微囊法冷冻保存绵羊精原干细胞

刘代艳 罗奋华 孔群芳 包佳婧 吴应积\*

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010070)

**摘要** 细胞冷冻保存技术是动物研究的重要组成部分。该研究首次应用海藻酸微囊冷冻保存绵羊精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs), 旨在提高绵羊SSCs的冷冻保存效率。冻存前后对绵羊SSCs存活率进行评估, 在绵羊SSCs液氮冻存10 d后进行细胞培养和CDH1、PLZF、GFR $\alpha$ 1、OCT-4、Thy-1五个精原干细胞特异分子标记蛋白的免疫荧光鉴定。结果表明, 在液氮冻存1 d后, 绵羊SSCs存活率从58.4% $\pm$ 1.4%(单细胞悬液冻存组)提高到78.7% $\pm$ 1.3%(海藻酸微囊包埋冻存组); 液氮冻存10 d后, 单细胞悬液冻存组细胞存活率降低至48.1% $\pm$ 0.8%, 而海藻酸微囊包埋组细胞存活率仍保持在78.0% $\pm$ 1.5%。对液氮冻存10 d后的细胞进行体外培养, 培养4 d后, 海藻酸微囊包埋冻存组能形成典型的精原干细胞簇。进行细胞免疫荧光鉴定, 发现在微囊包埋冻存10 d后CDH1、PLZF、GFR $\alpha$ 1、OCT-4、Thy-1均显示阳性。海藻酸微囊的应用显著提高了绵羊SSCs的冷冻保存效率, 且对绵羊SSCs的标记基因表达无显著影响。该方法的建立为其他家畜及濒危动物种质资源保存提供了依据。

**关键词** 海藻酸微囊; 绵羊精原干细胞; 冷冻保存; 活率

## The Applications of Alginate Microcapsules in Sheep Spermatogonial Stem Cells Cryopreservation

Liu Daiyan, Luo Fenhua, Kong Qunfang, Bao Jiajing, Wu Yingji\*

(The Key Laboratory for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China)

**Abstract** Cryopreservation of animal cells is an essential part of cell biology. In order to improve efficacy of sheep spermatogonial stem cells (SSCs) cryopreservation, alginate microcapsules were used to cryopreserve the sheep SSCs in the present study. Cell viability and culture were evaluated and compared; The products of five SSC-specific proteins, including CDH1, PLZF, GFR $\alpha$ 1, OCT-4 and Thy-1 were examined by immunofluorescence after stored in liquid nitrogen for 10 d. The results indicated that alginate microcapsules could increase sheep SSCs viability to 78.7% $\pm$ 1.3%, while stored with single cells suspension was 58.4% $\pm$ 1.4% after stored in liquid nitrogen for 1 d. The viability of sheep SSCs with alginate microcapsules was 78.0% $\pm$ 1.5%, while stored with single cells suspension was 48.1% $\pm$ 0.8% after stored in liquid nitrogen for 10 d. After four days culture, the SSCs with alginate microcapsules embedded can form a typical SSCs clusters after stored in liquid nitrogen for 10 d. Immunofluorescence showed that CDH1, PLZF, GFR $\alpha$ 1, OCT-4, Thy-1 were expressed after cryopreservation. Taken together, alginate microcapsules significantly improved the efficacy of sheep SSCs cryopreservation, and maintained the ex-

收稿日期: 2013-06-20 接受日期: 2013-08-20

教育部创新团队计划子课题(批准号: IRT0833)和高等学校博士学科点博导类基金项目(批准号: 20101501110001)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0471-4992443, E-mail: yingji\_wu@yahoo.com

Received: June 20, 2013 Accepted: August 20, 2013

This work was supported by the Ministry of Education Innovation Team Plans Sub-topics (Grant No.IRT0833) and Ph.D. Doctoral Program of Higher Class Foundation (Grant No.20101501110001)

\*Corresponding author. Tel: +86-471-4992443, E-mail: yingji\_wu@yahoo.com

网络出版时间: 2013-10-22 11:12 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131022.1112.004.html>

pression of sheep SSC-specific genes after thawing. This study indicates a new method for the cryopreservation of animal resources by using the alginate microcapsule, especially for the livestock and those endangered species.

**Key words** alginate microcapsules; SSCs; cryopreservation; viability

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是存在于雄性动物睾丸生精小管基膜上的生殖干细胞,是雄性体内将遗传信息传递给后代的唯一成体干细胞,能在不断自我更新的同时,分化形成精母细胞<sup>[1]</sup>。鉴于SSCs携带遗传信息的完整性,众多研究者基于不同的出发点去研究和应用精原干细胞。自SSCs在啮齿类动物中移植成功后<sup>[2-3]</sup>,SSCs的研究和应用拓展到多种动物和多种用途。相关文章针对用SSCs移植技术制作转基因动物这一技术进行了全面展望,从中我们可以看出,这一新技术的发展成熟将大大加速转基因动物制作的步伐<sup>[4]</sup>。针对放疗<sup>[5]</sup>和化疗<sup>[6]</sup>所引起的不育症而言,SSCs的移植技术为其患者带来了恢复生育能力的希望<sup>[7-8]</sup>。SSCs移植技术也为濒危物种和良种家畜的保护或生成提供了新思路<sup>[9]</sup>。从SSCs的干细胞特性出发,可以将其进行抑制分化生成多能生殖干细胞用于再生医学和遗传医学<sup>[10-11]</sup>。上述已有的研究表明,SSCs在大规模品种改良、种质资源保存、转基因动物的制作、再生医学、不育症治疗等领域具有重要的应用前景。

SSCs在成年雄性动物睾丸内的数量较少,因此,SSCs的增殖培养、冷冻保存和鉴定是SSCs应用的关键技术。小鼠SSCs的培养<sup>[12-13]</sup>和大鼠SSCs的培养<sup>[14-15]</sup>已经取得成功。家畜SSCs的长期增殖培养技术至今还没有报道。伴随着培养研究的进展,用于SSCs鉴定的标记分子也逐步增加。到目前为止,已被发现的SSCs特异标记分子包括CDH1<sup>[16]</sup>、PLZF<sup>[17]</sup>、GFR $\alpha$ 1<sup>[18]</sup>、OCT-4<sup>[19]</sup>、Thy-1<sup>[20]</sup>等。其中,CDH1为绵羊SSCs的标记分子已经得到验证(本实验室研究新结果,即将发表)。

家畜SSCs高效的冷冻保存技术在SSCs的实际应用中具有重要意义。本研究以本实验室绵羊SSCs培养研究成果<sup>[21]</sup>为基础,建立一个高效的绵羊SSCs冷冻保存方法。常规的SSCs冷冻保存存在细胞存活率低下的问题,从而严重限制了细胞在实践操作中的应用<sup>[22]</sup>。近几年,应用海藻酸微囊对小鼠骨髓间质干细胞<sup>[23]</sup>、人类牙髓干细胞<sup>[24]</sup>、小鼠胚胎干细胞<sup>[25]</sup>、人类胚胎干细胞<sup>[26]</sup>等进行冷冻保存研究已经取得很好的结果,与常规的冷冻保存方法比,干细胞存活率有

了显著的提高。因此我们假设海藻酸微囊用于绵羊SSCs的冷冻保存也会使细胞存活率显著提高。本研究选取CDH1、PLZF、GFR $\alpha$ 1、OCT-4、Thy-1作为绵羊SSCs的标记分子,在评估干细胞存活率时以CDH1作为干细胞特有标记,Ca-AM为活细胞标记染料,对冷冻保存前后绵羊SSCs的存活率进行研究,取得了令人满意的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞

绵羊SSCs<sup>[21]</sup>、丝裂霉素处理的STO(小鼠鼠胚成纤维细胞系,为绵羊SSCs培养的滋养层细胞)细胞<sup>[27]</sup>均由本实验组提供。

### 1.2 主要仪器及试剂

实验室自制微囊发生器,原理见参考文献[24]。DMEM/F12(Gibco公司),EDTA(上海生工生物工程公司),胎牛血清(FBS,天津灏洋生物制品科技有限公司),钙绿素(Ca-AM)、海藻酸钠、BSA、多聚甲醛、冻存液、gelatin均购自Sigma公司,抗CDH1抗体(1:100稀释)、抗GFR $\alpha$ 1抗体(1:100稀释)、抗PLZF抗体(1:50稀释)、抗Thy-1抗体(1:50稀释)均购自Santa Cruze公司,抗OCT-4抗体(1:100稀释)购自Abcam公司,CY3标记山羊抗小鼠IgG(1:500稀释)、FITC标记山羊抗兔IgG(1:200稀释)、FITC标记山羊抗小鼠IgG(1:200稀释)均购自上海碧云天生物技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

固定液:4%多聚甲醛+0.02%戊二醛溶于PBS,STO细胞培养液配方见参考文献[28],干细胞培养液(SSCM)配方见参考文献[21]。

### 1.3 绵羊SSCs的培养、包埋及冻存

用0.1%的gelatin溶液1 mL/孔处理12孔板,培养箱中静置1 h, PBS洗3次,加入STO细胞培养液重悬的STO细胞,细胞浓度调整为 $3 \times 10^5$ /mL,每孔1 mL,37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养4 h,待STO细胞均匀贴壁后,用干细胞培养液(SSCM)<sup>[21]</sup>重悬绵羊SSCs,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4$ /mL进行细胞接种培养,当干细胞覆盖率达60%左右时进行细胞传代。

细胞的包埋、释放及冷冻程序见<sup>[29]</sup>,细胞浓度

调整为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 重悬于2%(w/v溶于PBS)的海藻酸钠溶液中,然后将海藻酸钠单细胞悬液经恒流泵导入微囊发生器,经高压静电作用滴入0.15 mol/L的氯化钙溶液中制得包埋细胞的海藻酸微囊。室温条件下,200 g/min离心3 min收集海藻酸微囊,用干细胞冻存液重悬细胞微囊体后按冷冻程序进行冷冻保存,同时设单细胞悬液冻存对照组,冻存时间定为液氮保存1 d和10 d。

#### 1.4 绵羊SSCs的收集及细胞活率测定

1.4.1 细胞的收集 在绵羊SSCs生长良好的情况下,收集细胞,将细胞浓度调整为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ,取500  $\mu\text{L}$ 绵羊SSCs悬液于24孔板中,将24孔板进行离心,2 000 r/min、8 min,经离心后的细胞贴于24孔板底部。

1.4.2 活细胞染色 将含5  $\mu\text{mol/L}$  Ca-AM的SSCM对细胞进行活细胞染色,每孔加入500  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下孵育30 min,PBS洗5 min $\times$ 3次。

1.4.3 CDH1抗体染色 每孔加入500  $\mu\text{L}$ 固定液,室温摇床上(60 r/min)孵育30 min,PBS洗5 min $\times$ 3次。用含10% NGS的PBS溶液进行封闭和抗体稀释,室温摇床上封闭30 min后,每孔加入500  $\mu\text{L}$  CDH1一抗稀释液,于4  $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。PBS洗5 min $\times$ 3次,每孔加入500  $\mu\text{L}$  CY3二抗稀释液,室温摇床上(60 r/min)30 min,PBS洗5 min $\times$ 3次。

1.4.4 染核 用PBS以1:1 000稀释Hoechst 33342,每孔500  $\mu\text{L}$ ,室温摇床上孵育8 min,PBS洗5 min $\times$ 3次。

1.4.5 照相 每孔加入500  $\mu\text{L}$  PBS后上Nikon荧光显微镜观察,且进行照相。

1.4.6 统计视野的确定 图1为Nikon荧光显微镜20倍镜下24孔板中一个孔的视野模式图,从不同角度

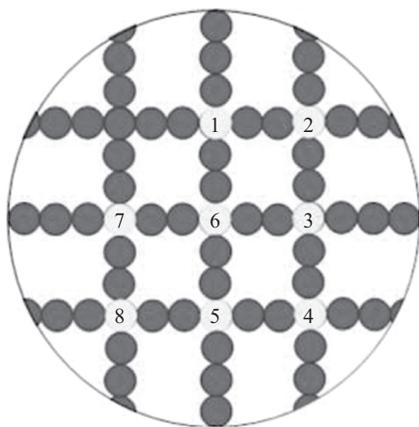


图1 24孔板内选取视野模式图

Fig.1 The viewing mode in 24-well plates

选取8个视野进行拍照,对8个视野中的CDH1阳性细胞和Ca-AM阳性细胞进行统计和分析。

#### 1.5 绵羊SSCs冻存后体外培养

在液氮冻存10 d后将绵羊SSCs以 $5 \times 10^4/\text{孔}$ 的密度接种于 $3 \times 10^5/\text{孔}$ 的STO饲养层上,以未冻存的绵羊SSCs为对照,培养4 d后进行观察照相。其中培养第2 d换一次干细胞培养液(SSCM)。

#### 1.6 绵羊SSCs冻存后的免疫荧光鉴定

海藻酸微囊包埋冻存10 d后解冻培养进行免疫荧光鉴定,具体方法见绵羊SSCs活率测定中抗体染色部分,PLZF和OCT-4均为核蛋白,在添加一抗孵育前用0.5%的Triton-X100通透5 min,进行双染时,重复添加抗体孵育步骤即可。

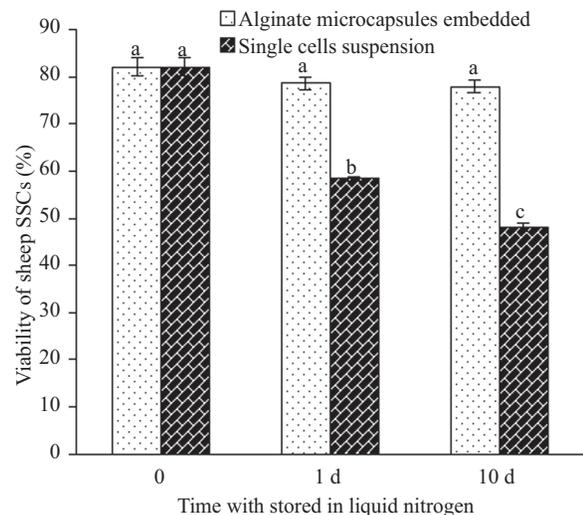
#### 1.7 数据分析

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示,显著性差异分析用SPSS 16.0软件进行,用Excel对实验数据进行统计和作图。

## 2 结果

### 2.1 绵羊SSCs活率的评估

在绵羊SSCs冻存前后对细胞进行计数,取 $5 \times 10^5/\text{孔}$ 于24孔板中,进行细胞存活率评估。三次重复试验所得结果见图2,冻存前绵羊SSCs的存活率为



不同字母组别之间活率呈显著差异( $P < 0.05$ ),相同字母组别之间活率无显著差异( $P > 0.05$ )。

The different letter indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) in viability by one-way ANOVA, and the same letter indicates no significant difference ( $P > 0.05$ ) in viability by one-way ANOVA.

图2 绵羊SSCs冻存前后的细胞存活率

Fig.2 Viability of sheep SSCs before and after cryopreservation

82.15%±1.9%，液氮冻存1 d后海藻酸微囊组细胞存活率为78.7%±1.3%，与冷冻前无显著差异，液氮冻存1 d后单细胞悬液冻存组细胞存活率降为58.4%±1.4%，显著低于冷冻前和海藻酸微囊包埋组冻存1 d的存活率。液氮冻存10 d后海藻酸微囊组细胞存活率为78.0%±1.3%，与冷冻前无显著差异，单细胞悬液冻存组细胞存活率降为48.1%±0.8%，显著低于海藻酸微囊包埋冻存10 d的存活率。将1 d和10 d存活率进行比较发现，单细胞悬液冻存组细胞存活率随着冻存时间的增加下降呈显著水平，而微囊包埋组细胞存活率随时间的增加并未体现出显著下降。

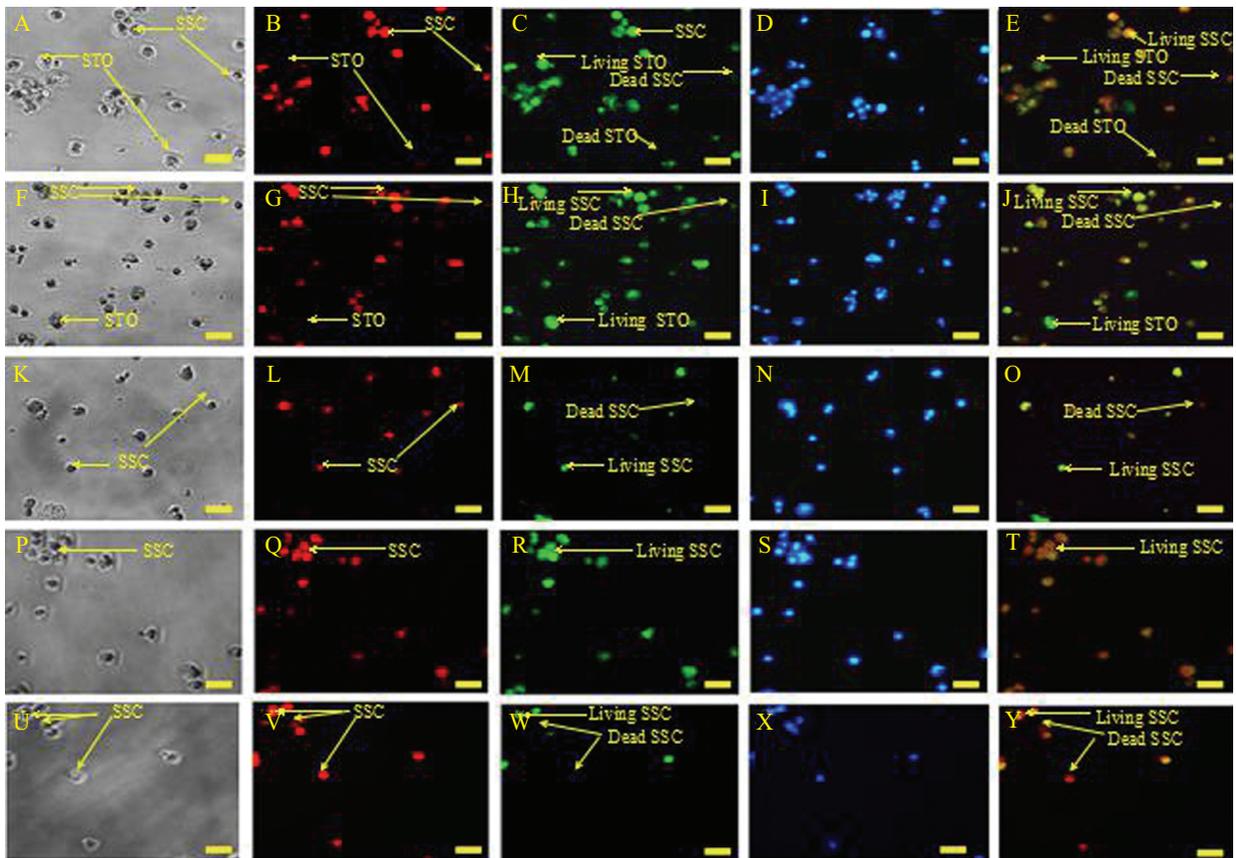
相应的免疫荧光结果见图3，其中绵羊SSCs显示CDH1阳性，活细胞显示Ca-AM阳性，且绿荧光显色均匀，STO细胞则显示CDH1阴性。

## 2.2 绵羊SSCs冻存后体外培养形态

在冻存10 d后，将SSCs培养4 d，对细胞进行照相，结果见图4。从中可以看出液氮保存10 d后，海藻酸微囊包埋冻存组细胞经过4 d的培养，细胞生长正常，与未冻存的精原干细胞一样，能形成典型的精原干细胞簇。

## 2.3 海藻酸微囊包埋冻存后绵羊SSCs免疫荧光鉴定

海藻酸微囊包埋绵羊SSCs液氮冻存10 d后，解冻复苏进行培养，培养8 d后进行细胞免疫荧光鉴定(图5)。结果证明，绵羊SSCs细胞簇显示CDH1、PLZF、GFR $\alpha$ 1、OCT-4、Thy-1阳性，而STO饲养层细胞显示阴性。从最右列Merge图可以发现，CDH1阳性细胞与PLZF、GFR $\alpha$ 1、OCT-4、Thy-1阳性细

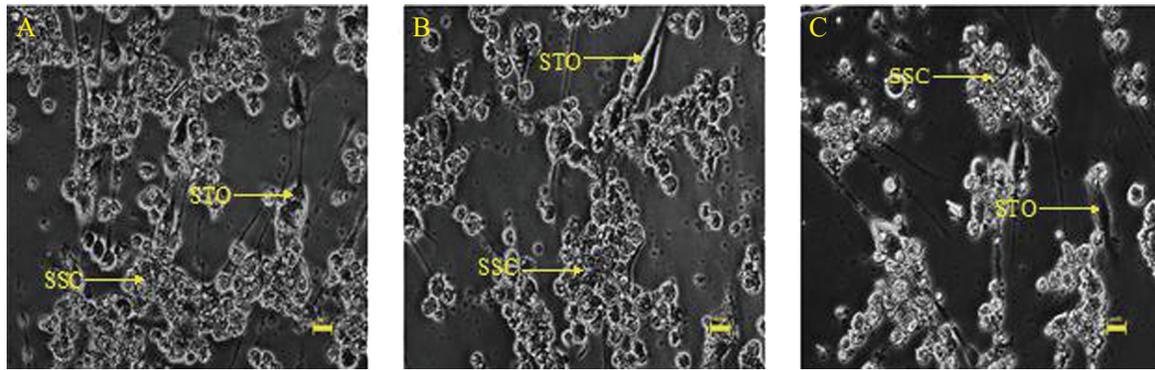


A~E: 冻存时间为0 d; F~J: 微囊包埋冻存1 d; K~O: 单细胞悬液冻存1 d; P~T: 微囊包埋冻存10 d; U~Y: 单细胞悬液冻存10 d; A、F、K、P、U: 可见光; B、G、L、Q、V: E-cadherin (CDH1); C、H、M、R、W: Calcein AM (Ca-AM); D、I、N、S、X: Hoechst 33342; E、J、O、T、Y: CDH1和Ca-AM重叠图。STO: SIM mouse embryo-derived thioquantine and ouabain resistant. Bar=20  $\mu$ m。

A~E: cryopreservation 0 day; F~J: alginate microcapsules cryopreservation 1 day; K~O: single cell suspension cryopreservation 1 day; P~T: alginate microcapsules cryopreservation 10 days; U~Y: single cell suspension cryopreservation 10 day; A、F、K、P、U: visible light; B、G、L、Q、V: E-cadherin (CDH1); C、H、M、R、W: Calcein AM (Ca-AM); D、I、N、S、X: Hoechst 33342; E、J、O、T、Y: CDH1 and Ca-AM merge. STO: SIM mouse embryo-derived thioquantine and ouabain resistant. Bar=20  $\mu$ m.

图3 绵羊SSCs冻存前后细胞活率免疫荧光染色

Fig.3 Immunofluorescence staining of sheep SSCs before and after cryopreservation

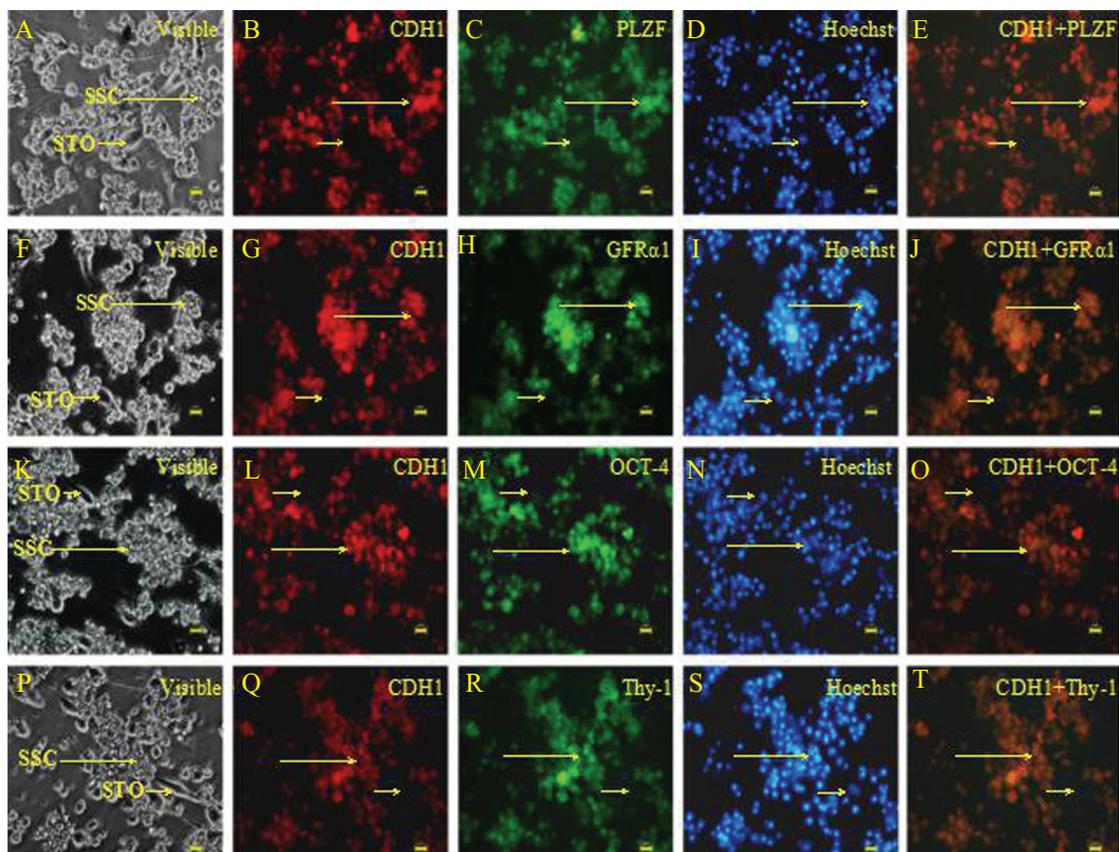


A: 未冻存; B: 微囊包埋冻存; C: 单细胞悬液冻存。标尺=20 μm。

A: non cryopreservation; B: alginate microcapsules cryopreservation 10 days; C: single cell suspension cryopreservation. Bar=20 μm.

图4 绵羊SSCs冻存后体外生长形态

Fig.4 Morphology of sheep SSCs after cryopreservation



A、F、K、P: 可见光; B、G、L、Q: 钙黏连蛋白1; C: 早幼粒细胞白血病锌指蛋白; H: GDNF家族受体 $\alpha$ -1; M: 八聚体结合转录因子-4; R: 胸腺细胞表面糖蛋白1; D、I、N、S: 染核; E: 钙黏连蛋白1和早幼粒细胞白血病锌指蛋白重叠图; J: 钙黏连蛋白1和GDNF家族受体 $\alpha$ -1重叠图; O: 钙黏连蛋白1和八聚体结合转录因子-4重叠图; T: 钙黏连蛋白1和胸腺细胞表面糖蛋白1重叠图。标尺=20 μm。

A,F,K,P: visible light; B,G,L,Q: E-cadherin (CDH1); C: promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF); H: GDNF receptor alpha-1 (GFR $\alpha$ 1); M: octamer-binding transcription factor-4 (OCT-4); R: a protein on the surface of T-cells (Thy-1); D,I,N,S: Hoechst33342; E: CDH1 and PLZF merge; J: CDH1 and GFR $\alpha$ 1 merge; O: CDH1 and OCT-4 merge; T: CDH1 and Thy-1 merge. Bar=20 μm.

图5 海藻酸微囊包埋冻存10 d后绵羊SSCs免疫荧光鉴定结果

Fig.5 Immunofluorescence of sheep SSCs with alginate microcapsules embedded cryopreserved 10 d

胞均能重叠。用标记分子进行免疫荧光双标染色的结果说明, 用海藻酸微囊包埋法对绵羊SSCs进行冷冻保存, 不会影响绵羊SSCs标记分子的表达特性。

### 3 讨论

SSCs是维持雄性动物精子发生过程和正常生育能力的保障。在复杂的微环境下SSCs能实现自我

更新和分化,在不育症、濒危物种种质资源保存等方面具有重要的利用价值<sup>[30]</sup>,其中高效的冷冻保存效率是SSCs利用的重要前提。

2010年,Zhang等<sup>[23]</sup>将海藻酸微囊应用到小鼠骨髓间质干细胞的冷冻保存中,结果发现液氮冻存后单细胞悬液冻存组活率从92.0%±1.3%降到42.0%±4.4%,而微囊包埋冻存组细胞活率仍保持在88.9%±2.9%。本研究在绵羊SSCs的冷冻保存中引入海藻酸微囊,在液氮冻存1 d后,绵羊SSCs活率从58.4±1.4%(单细胞悬液冷冻组)提升到78.7%±1.3%(微囊包埋冻存组)。Zhang等<sup>[23]</sup>认为海藻酸微囊在细胞冻存实验中的应用显著提高细胞存活率,可能是海藻酸微囊构成的三维结构加强了细胞之间的联系,同时为细胞带来了一定的机械保护作用,而单细胞悬液冻存则直接将细胞进行冻存,细胞之间无法形成微环境,同时直接对细胞进行操作将导致细胞不同程度的机械损伤。本研究对解冻后细胞进行培养,结果表明:液氮冻存10 d后,海藻酸微囊包埋冻存组细胞解冻复苏培养4 d后细胞形态正常,和未冻存的绵羊精原干细胞一样,形成典型的精原干细胞簇。免疫荧光双标染色鉴定结果显示,经海藻酸微囊包埋冻存的绵羊SSCs复苏后仍然表达CDH1、PLZF、GFR $\alpha$ 1、OCT-4、Thy-1等精原干细胞标记蛋白,说明海藻酸微囊包埋冻存过程对绵羊精原干细胞的体外培养没有负面影响。同样的结果在人类牙髓干细胞<sup>[24]</sup>、小鼠胚胎干细胞<sup>[25]</sup>和人胚胎干细胞<sup>[26]</sup>的冻存研究中也得到了证实。针对海藻酸微囊的存在能显著提高干细胞冷冻保存效率这一研究结果,有研究者认为海藻酸微囊能在体外环境下形成一个微环境,在维持细胞间紧密联系的同时依靠机械作用对微囊内细胞进行保护<sup>[29]</sup>,能有效降低冷冻过程中冰晶的生成<sup>[31]</sup>,在一定程度上避免了直接用干细胞悬液进行冻存所导致的干细胞存活率低下、功能丢失等现象<sup>[32]</sup>,从而为干细胞的进一步研究应用提供实验根据。

综上,本研究结果表明,海藻酸微囊法显著提高了绵羊SSCs的冷冻保存效率,且冻存后不影响SSCs标记蛋白表达,为SSCs在家畜及濒危物种种质资源保存、转基因动物制作及不育症等领域的研究和应用提供理论和技术参考。

## 参考文献 (References)

- 1 de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2001; 121(3): 347-54.
- 2 Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11303-07.
- 3 Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11298-302.
- 4 Wu Yingji, Luo Fenhua, Bou Shorgan. Prospect of creating transgenic animals by using spermatogonial transplantation. *Chinese Science Bulletin* 2005; 50(19): 2061-8.
- 5 Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 1993; 23(1): 136-141.
- 6 Meistrich ML, Finch M, da Cunha MF, Hacker U, Au WW. Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res* 1982; 42(1): 122-31.
- 7 Aslam I, Fishel S, Moore H, Dowell K, Thornton S. Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: A review of the existing situation and prospects for the future. *Hum Reprod* 2000; 15(10): 2154-59.
- 8 刘陶迪, 吴应积, 罗奋华. 精原干细胞移植的临床应用前景. 现代生物医学进展(Liu Taodi, Wu Yingji, Luo Fenhua. Clinical future of spermatogonial stem cells transplantation. *Progress in Modern Biomedicine*) 2009; 9(19): 3798-800.
- 9 Avarbock MR, Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Retrovirus-mediated gene delivery into male germ line stem cells. *FEBS Lett* 2000; 475(1): 7-10.
- 10 Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, *et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440(7088): 1199-203.
- 11 张岩, 吴应积. 精原干细胞来源的多能干细胞的形成及其应用. *生物医学工程学杂志*(Zhang Yan, Wu Yingji. Generation and application of pluripotent stem cells from spermatogonial stem cells. *Journal of Biomedical Engineering*) 2011; 28(1): 208-12.
- 12 Kanatsu-shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, *et al.* Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 612-6.
- 13 Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell* 1998; 30(4): 389-97.
- 14 Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(48): 17430-5.
- 15 Wu Z, Falcatori I, Molyneux LA, Richardson TE, Chapman KM, Hamra FK. Spermatogonial culture medium: An effective and efficient nutrient mixture for culturing rat spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2009; 81(1): 77-86.
- 16 Tolkunova EN, Malashicheva AB, Chikhirzhina EV, Kostyleva EI, Zeng W, Luo J, *et al.* E-cadherin as a novel surface marker of spermatogonial stem cells. *Tsitologiya* 2009; 51(3): 212-8.
- 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): 733-42.
- 18 He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod* 2010; 82(2): 363-72.
- 19 Goel S, Fujihara M, Tsuchiya K, Takagi Y, Minami N, Yamada M, *et al.* Multipotential ability of primitive germ cells from neonatal pig testis cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21(5): 696-708.
- 20 Sutherland DR, Yeo EL, Stewart AK, Nayar R, DiGiusto R, Zanjani E, *et al.* Identification of CD34<sup>+</sup> subsets after glycoprotein selection: Engraftment of CD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> stem cells in fetal sheep. *Exp Hematol* 1996; 24(7): 795-806.
- 21 吴应积, 罗奋华, 张 岩, 萨初拉, 苏慧敏, 刘陶迪, 等. 家畜精原干细胞培养液SSCM. 中国发明: 201210549380.5, CN103074297A(Wu Yingji, Luo Fenhua, Zhang Yan, Sha Chula, Shu Huiming, Liu Taodi, *et al.* Culture medium SSCM of livestock spermatogonial stem cells. China Patent #201210549380.5, CN103074297A) 2003-05-01.
- 22 Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(8): 2480-87.
- 23 Zhang W, Yang G, Zhang A, Xu LX, He X. Preferential vitrification of water in small alginate microcapsules significantly augments cell cryopreservation by vitrification. *Biomed Microdevices* 2010; 12(1): 89-96.
- 24 Umemura E, Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Hara K, Ueda M. Viable cryopreserving tissue-engineered cell-biomaterial for cell banking therapy in an effective cryoprotectant. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; 17(8): 799-807.
- 25 Sambu S, Xu X, Schiffer HA, Cui ZF, Ye H. *et al.* RGDS-functionalized alginates improve the survival rate of encapsulated embryonic stem cells during cryopreservation. *Cryo Letters* 2011; 32(5): 389-401.
- 26 Serra M, Correia C, Malpique R, Brito C, Jensen J, Bjorquist P, *et al.* Microencapsulation technology: A powerful tool for integrating expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells. *PLoS One* 2011; 6(8): e23212.
- 27 刘海超, 张 岩, 于泊洋, 吴应积. 制备精原干细胞滋养层细胞条件的优化. 现代生物医学进展(Liu Haichao, Zhang Yan, Yu Boyang, Wu Yingji. Optimization of preparing feeder layer cells of spermatogonial stem cells. *Progress in Modern Biomedicine*) 2012; 12(4): 926-30.
- 28 刘代艳, 于泊洋, 孔群芳, 包佳静, 刘林洪, 萨初拉, 等. 海藻酸微囊替代DMSO和FBS的STO细胞冷冻保存研究. 现代生物医学进展(Liu Daiyan, Yu Boyang, Kong Qunfang, Bao Jiajing, Liu Linghong, Sa Chula, *et al.* Research on alginate microcapsules replacing DMSO and FBS on the cryopreservation of STO cells. *Progress in Modern Biomedicine*) 2012; 12(33): 6413-8.
- 29 Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(2): 215-28.
- 30 Silva RC, Costa GM, Lacerda SM, Batlouni SR, Soares JM, Avelar GF, *et al.* Germ cell transplantation in felids: A potential approach to preserving endangered species. *J Androl* 2012; 33(2): 264-76.
- 31 Ryo Shirakashi, Kilian J. Müller. Effects of physiological isotonic cryoprotectants on living cells during the freezing-thawing process and effects of their uptake by electroporation: Sp2 cells in alginate-trehalose solutions. *Heat Transfer—Asian Research* 2003; 32(6): 511-23.
- 32 Sambu S, Xu X, Ye H, Cui ZF. Predicting the survival rate of mouse embryonic stem cells cryopreserved in alginate beads. *Proc Inst Mech Eng H* 2011; 225(11): 1092-107.