

特约综述



本实验室主要开展以下两方面工作: (1)精原干细胞命运决定的调控机制研究; (2)雄性生殖细胞减数分裂启动的机制研究。总体目标是: 建立包括人精原干细胞在内的精原细胞培养、体外分化及减数分裂的技术平台, 实现在培养皿中培养获取单倍体精子细胞, 为临床治疗男性不育提供潜在的选择; 发现一些参与精原干细胞命运决定、精原细胞减数分裂启动的关键调控因子, 包括miRNAs、lncRNAs和蛋白质, 并阐明这些因子决定精原干细胞命运、启动减数分裂的机制。
<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=152>

维甲酸与精子发生

陈瑶 童明汉*

(上海市分子男科学重点实验室, 分子生物学国家重点实验室, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 维生素A的活性代谢物维甲酸在哺乳动物精子发生过程中发挥着重要的调节作用, 但其具体调节机制并不十分清楚。该文拟对睾丸内维甲酸的运输、代谢、信号系统以及维甲酸调控精子发生的研究进展进行简单总结。

关键词 维甲酸; 精子发生; 精原细胞分化; 减数分裂; 精子形成

Role of Retinoic Acid in the Regulation of Spermatogenesis

Chen Yao, Tong Minghan*

(Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Retinoic acid, an active metabolite of vitamin A, has been shown to be essential for mammalian spermatogenesis. However, the molecular mechanisms underlying this requirement remain to be determined. The goal of this review is to outline retinoic acid transport, metabolism and signaling in testis. Finally, this review will explore the role of retinoic acid in the regulation of spermatogenesis.

Key words retinoid acid; spermatogenesis; spermatogonial differentiation; meiosis; spermiogenesis

国家重大科学研究计划(批准号: 2014CB943101)和国家自然科学基金(批准号: 31471401)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921264, E-mail: minghan@sibcb.ac.cn

This work was supported by the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2014CB943101) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471401)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921264, E-mail: minghan@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2014-10-09 13:38 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.9002.html>

作为维生素A(又称视黄醇, retinol, ROL)在体内的活性代谢产物——维甲酸(retinoic acid, RA), 为精子发生所必需。早期营养学研究表明, 长期维生素A缺乏(vitamin A-deficient, VAD)的大鼠^[14]或小鼠^[15], 精子发生会出现异常; 予以补充维生素A或者维甲酸后, 这些动物的精子发生则可完全恢复。近期, 通过对与维生素A转运、代谢相关基因及其受体基因敲除小鼠的研究, 进一步证明了维甲酸在精子发生过程中发挥着重要作用。本文将对维甲酸调控精子发生的研究现状和进展作一简要介绍。

1 精子发生

精子发生(spermatogenesis)始于精原干细胞, 完成于精子形成, 是一个高度复杂和特化的细胞发育过程。该过程包括精原细胞增殖、精母细胞减数分裂(meiosis)和精子形成(spermiogenesis)等三个阶段^[6]。以小鼠为例, 就精原细胞增殖而言, 首先是单个型精原细胞(A single spermatogonia, A_s)通过自我更新或增殖形成配对型精原细胞(A paired spermatogonia, A_p), A_p进一步增殖生成链状型精原细胞(A aligned spermatogonia, A_{al})。A_p和A_{al}的细胞分裂都不完全, 细胞之间以细胞间桥相连。A_{al}一般包含4、8或16个细胞, 偶尔也会出现32个细胞^[7-11](图1)。A_s、A_p以及A_{al}统称为未分化型精原细胞。经典观点认为, 唯有A_s才是精原干细胞^[12-13]。然而, 最近的研究揭示, 至少是在非生理状态下, A_p和A_{al}也能转化为精原干细胞^[14]。A_{al}不经过有丝分裂直接转化形成A₁型精原细胞, 该过程称为精原细胞分化(spermatogonial differentiation)。随后, A₁型精原细胞经过五次有丝分裂逐次形成A₂、A₃、A₄、中间型(In型)直至B型精原细胞。A₁至B型精原细胞统称为分化型精原细胞^[15]。B型精原细胞再经一次有丝分裂生成细线前期精母细胞(preleptotene), 进而启动减数分裂。减数分裂过程中染色体复制一次, 细胞连续分裂两次, 从而产生单倍体的圆形精子细胞。在此过程中, 非同源染色体分配时自由组合, 而同源染色体的非姐妹染色单体间发生配对、联会和重组交换。减数分裂可分为I期(meiosis I, MI)和II期(meiosis II, MII), 而MI和MII又可各自被分为前期、中期、后期和末期。其中, 同源染色体分离于MI, MII则发生了类似于有丝分裂的姐妹染色体分离。根据染色质形态, MI前期通常被人为地划分为细线期(leptotene)、合

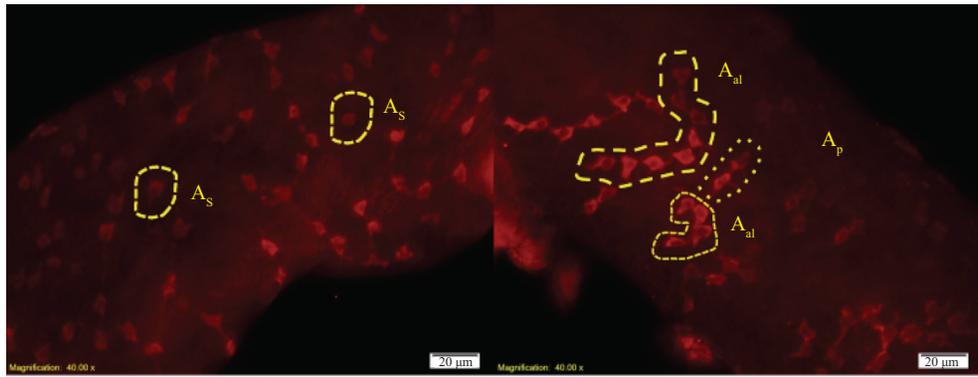
线期(zygotene)、粗线期(pachytene)、双线期(diplotene)和终变期(diakinesis)等五个阶段。减数分裂的关键性生物学事件, 包括同源染色体配对、联会、重组交换与分离, 都发生在MI前期。经过一系列复杂的形态学变化过程(小鼠需要16步, 大鼠则为19步^[16]), 包括组-精蛋白转换、核浓缩与细胞变态等, 单倍体的圆形精子细胞最终形成长形精子^[6]。

精子发生过程中, 精原细胞分化形成A₁后的每次有丝分裂耗时都相对固定并且同步。在此基础上, 处于不同发育阶段(generation)的生殖细胞能形成固定的细胞群(association), 而非随机组合。生精上皮中的这种细胞群称之为“期(stage)”^[17](图2)。例如, VIII期的生精上皮包括A₁精原细胞、细线前期精母细胞、变态中的第八步精子细胞和释放中的精子(图2)。然而, 并非所有A_{al}都同时分化形成A₁精原细胞, 即精原细胞分化不同步。不同步的精原细胞分化导致精子发生的不同步。因此, 在睾丸中能观察到处于不同“期”的生精上皮。其中, 小鼠、大鼠的生精上皮可分别被划分为十二期、十四期, 而人的生精上皮则分为六期^[18-19]。小鼠自A₁精原细胞至形成细线前期精母细胞的时间约为8.62 d, 即小鼠单个生精上皮周期的长度为8.62 d(图2), 而人类单个生精上皮周期的长度约为16 d。从A₁精原细胞到精子完全形成需经历四个生精上皮周期, 故小鼠精子发生约需要35 d, 而人类则长达64 d^[8]。若精原细胞分化同步化, 则小鼠或人分别每隔8.62 d或16 d才能生成一次精子, 而非持续化生成精子^[2]。由此可见, 精原细胞分化不同步是哺乳动物能持续不断生成精子的基础。

哺乳动物精子发生是在睾丸生精小管中进行的。生精小管的结构极其复杂, 能为不同阶段生殖细胞的发育提供相应的高度特异的微环境——“龕(niche)”^[20]; 而支持细胞(sertoli cell)是构成“龕”的最主要结构。支持细胞之间的紧密连接将生精小管分为基底小室和近腔小室。精原细胞增殖发生于基底小室, 而减数分裂和精子形成都发生于近腔小室。生成的精子一般在第八期生精上皮被释放至生精小管的管腔中, 最终进入附睾, 在其中储存并获得功能上的成熟。

2 维甲酸合成和代谢

维甲酸合成的前体原料是维生素A。但是, 哺乳动物自身不能合成维生素A, 必须从食物中获取。

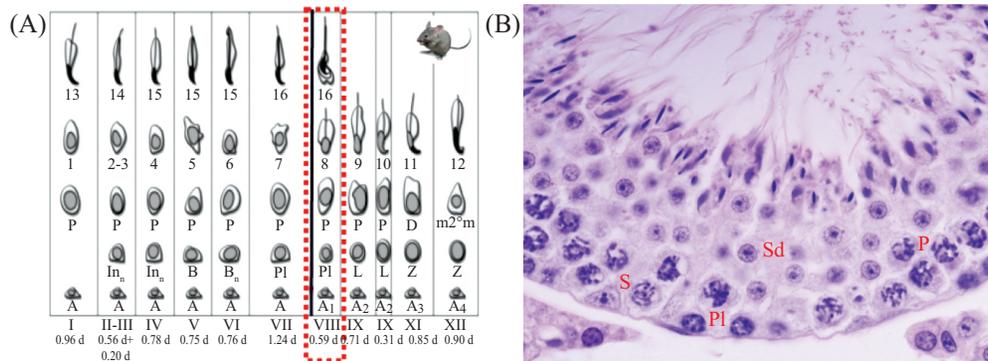


LIN28: 未分化精原细胞标志物。A_s: 单个型精原细胞; A_p: 配对型精原细胞; A_{al}: 链状型精原细胞。

LIN28: an undifferentiated spermatogonial marker. A_s: a single spermatogonia; A_p: a paired spermatogonia; A_{al}: a aligned spermatogonia.

图1 小鼠曲精小管整装片LIN28免疫荧光染色

Fig.1 Whole-mount immunodetection of LIN28 (red) on seminiferous tubules of mouse



A: 小鼠生精上皮周期; B: 小鼠第八期生精上皮(HE染色)。S: 支持细胞; Pl: 细线前期精母细胞; P: 粗线期精母细胞; Sd: 圆形精子细胞。

A: diagram depicting the twelve stages of seminiferous epithelium in mouse spermatogenesis; B: stage VIII of seminiferous epithelium in mouse spermatogenesis (H&E staining). S: sertoli cells; Pl: preleptotene; P: pachytene; Sd: round spermatid.

图2 小鼠精子发生

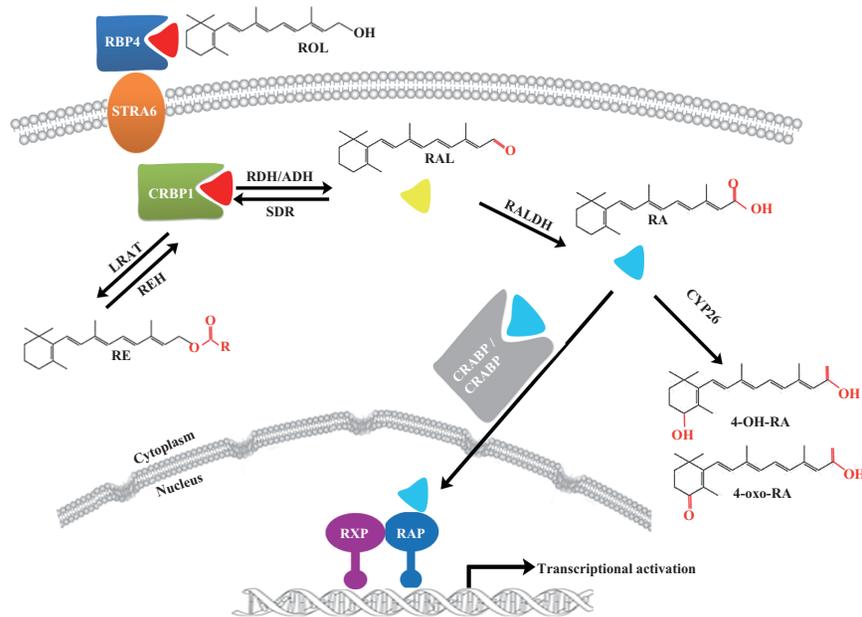
Fig.2 Murine spermatogenesis

哺乳动物从食物中摄取的视黄酯(retinyl ester, RE)或维生素A前体物 β -胡萝卜素经小肠消化、吸收后,生成的维生素A在视黄醇酰基转移酶(lecithin retinol acyltransferase, LRAT)的催化下,主要以视黄酯形式储存于肝脏内。肝脏是体内维生素A最大的储存器官。肝脏释放的维生素A与血清RBP4(retinol-binding protein)结合形成RBP4-ROL复合物^[21],该复合物通过RBP4和其位于细胞膜上的受体STRA6结合^[22],将维生素A转运至肝外组织的细胞内,以供细胞合成维甲酸,或以视黄酯形式再储存于细胞内(图3)。通过两步酶反应,无活性的维生素A能氧化生成维甲酸。第一步反应为维生素A氧化生成视黄醛(retinal),催化该反应的酶包括胞浆乙醇脱氢酶系(cytosolic alcohol dehydrogenases, ADHs)和视黄醇脱氢酶系(retinol dehydrogenases, RDHs)两大家族;第二步反应是视黄醛氧化生成维甲酸,由视黄醛脱氢酶系(retinaldehyde

dehydrogenase, RALDH)催化完成^[23-24](图3)。第一步酶反应为限速反应,并且可逆,第二步酶反应为单向不可逆。新合成的维甲酸可由细胞维甲酸结合蛋白质(cellular RA binding proteins, CRABPs)运输至细胞核内^[25-26],通过激活其核受体发挥生物学作用,或被细胞色素P450酶系26(cytochrome P450, family 26 enzyme, CYP26)降解^[27](图3)。细胞内维甲酸水平要受到精确控制,是其合成和分解代谢平衡的结果。睾丸内维甲酸主要来源于其自身合成,睾丸能表达各种与维甲酸合成和代谢相关的转运蛋白和酶。

2.1 睾丸内维生素A的储存和运输

支持细胞表达STRA6,而STRA6被认为是RBP4的膜受体^[22]。当RBP4-ROL复合物通过血液循环进入睾丸后,该复合物通过结合STRA6可将ROL转运至支持细胞内。但是,雄性Strat6基因敲除小鼠生育力正常,精子发生也无异常,这表明可能存在



维生素A能与血清RBP4结合形成RBP4-ROL复合物,通过RBP4和其位于细胞膜上的受体STRA6结合,使维生素A转运至细胞内。进入细胞内的维生素A以视黄酯形式再储存于细胞内,或首先被胞浆乙醇脱氢酶系(ADHs)和视黄醇脱氢酶系(RDHs)氧化成视黄醛,再为视黄醛脱氢酶系(RALDH)催化生成维甲酸。新合成的维甲酸或者通过细胞维甲酸结合蛋白质(CRABPs)运输至细胞核,结合其受体,从而激活其靶基因表达,或者被细胞色素P450酶系26(CYP26)降解。

Vitamin A circulates in complex with retinol binding protein (RBP4). RBP4 facilitate the uptake of vitamin A into the cell through binding to the transmembrane receptor STRA6. Vitamin A can either be stored as retinyl esters by lecithin retinol acyltransferase (LRAT) or oxidized reversibly to retinal (RAL) via RDHs/ADHs enzymes, and further oxidized to retinoic acid (RA) by RALDHs. RA is then either transported into nucleus with CRABPs to stimulate target gene expression through binding to the RAR or degraded by CYP26 family enzymes.

图3 维生素A代谢

Fig.3 Vitamin A metabolism

其他使ROL进入细胞内的通路。此外,细胞视黄醇结合蛋白I(cellular retinol binding protein, CRBPI)和CRBPII存在于生精细胞^[28]和支持细胞^[29],LRAT和RBP1也表达于睾丸组织内^[30]。这些蛋白的表达与睾丸内维生素A的储存和运输密切相关。

2.2 睾丸内维甲酸的合成与降解

哺乳动物的睾丸组织含有丰富的维甲酸合成酶,能以进入睾丸的维生素A为原料,合成维甲酸。小鼠睾丸内存在三种ADHs,其中ADH1和ADH3特异性表达于支持细胞,而ADH4则表达于晚期精子细胞^[31-32]。同时,小鼠睾丸还能检测到七种不同RDHs的表达,包括RDH1、RDH9、RDH10、RDH11、RDH13、RDH14和RDH15^[23-24],如RDH10表达于青春期前小鼠的睾丸支持细胞和生精细胞,RDH11则表达于精母细胞。催化视黄醛氧化生成维甲酸的RALDH家族共包含四个成员,即RALDH1~4,分别由*Aldh1a1*、*Aldh1a2*、*Aldh1a3*和*Aldh8a1*编码生成^[33-34]。在啮齿类动物睾丸中,仅发现三种RALDH的存在,分别为RALDH1、RALDH2和RALDH3^[35-36]。*Rdh10*或*Aldh-*

*la2*基因敲除小鼠均可导致胚胎组织维甲酸缺乏,而造成胚胎致死,表明RDH10和RALDH2是维甲酸合成所需的关键酶^[37-38]。睾丸内细胞特异性*Rdh10*或*Aldh1a1-3*基因敲除小鼠研究证明,小鼠睾丸内支持细胞和生精细胞都能合成维甲酸,但睾丸内维甲酸主要来源于支持细胞^[39]。

除了合成,维甲酸的降解也至关重要,它能够使睾丸内维甲酸浓度维持在一个相对稳定的水平,从而保护细胞免受持续性维甲酸信号的刺激而出现异常生理现象。参与维甲酸降解的三种细胞色素氧化酶CYP26A1、CYP26B1和CYP26C1均可表达在管周肌样细胞(peritubular myoid cell)内,形成一道代谢屏障,有效地阻止外源性维甲酸进入生精上皮^[27]。此外,CYP26B1在胚胎期睾丸支持细胞内就已经有表达^[40],但是否表达于出生后小鼠睾丸支持细胞目前仍不明确。

3 维甲酸受体

维甲酸的作用依赖于其特异性核受体。该核受

体属于核受体超家族, 包括维甲酸受体(retinoic acid receptors, RARs)和维甲酸X受体(retinoid X receptors, RXRs)两大类^[41-43], 前者能结合维甲酸或9-顺式维甲酸(9-cis RA), 而后者只为9-顺式维甲酸所激活^[44]。每大类受体各自存在三种亚型(isotype): RAR α 、RAR β 、RAR γ 和RXR α 、RXR β 、RXR γ 。这些受体亚型分别由不同的基因编码; 而每种亚型受体又至少包含两种异构体(isoform), 同一亚型受体的不同异构体来源于一个基因的不同剪接子^[45]。与其他核受体超家族成员结构相似, RARs也由A~F六个结构域组成, 但RXRs只有A~E五个结构域而无F结构域。其中, 以DNA结合区(DNA binding domain, DBD)所在的C区和配体结合区(ligand binding domain, LBD)所在的E区最为保守; N末端的A/B区含有一配体非依赖性转录激活功能区(AF-1)。A区在同一亚型受体的不同异构体之间差异较大, 而B区则相对保守^[45]。RARs和RXRs以异源二聚体方式结合于维甲酸反应元件(RA response element, RARE), RARE一般位于维甲酸靶基因的调控区(如启动子)^[46]。若无配体结合, 则结合于RARE的异源二聚体和NCoR/SMRT、PcGs(polycomb group proteins)等蛋白复合体相互作用, 使染色质维持致密和抑制状态, 导致靶基因转录关闭。若维甲酸与RAR结合, 则受体构象发生变化, 造成RAR/RXR释放具有抑制作用的蛋白复合体, 同时招募具有不同酶活性(包括组蛋白乙酰化酶、甲基转移酶、DNA依赖性ATP酶等)的辅激活因子(coactivator), 导致染色质构象处于开放状态, 最终激活靶基因转录^[47]。

长期以来, 研究人员应用原位杂交、免疫细胞化学等技术对各种类型的维甲酸受体在不同发育阶段哺乳动物睾丸中的表达进行了广泛的研究。因为研究方法不同, 尤其是免疫细胞化学使用的抗体来源不一, 因此不同研究组报导的维甲酸受体在睾丸中的具体表达结果并不一致。以下内容概述了几个不同实验室的研究结果: 胚胎期和新生期的大鼠睾丸生殖原细胞(gonocyte)和支持细胞均表达有除Rxb外的其他五种维甲酸受体, 而胚胎型大鼠Leydig细胞则能表达全部维甲酸受体。在成年大鼠, 可见Rara、Rarb、Rxra和Rrxg表达于精原细胞、精母细胞以及圆形精子细胞, 而所有六种维甲酸受体都表达于支持细胞和成年型Leydig细胞。通过对不同小鼠模型的研究发现, Rara与Rxb存在于支持细胞

中, Rara和Rarg表达在精原细胞内, 而Rarb、Rxra和Rrxg则共定位于第7~8步的精子细胞中。由此可见, 睾丸内每种细胞都能表达多种维甲酸受体^[48-50]。

4 维甲酸与精子发生

Wolbach实验室于1925年就已观察到, 除附睾、前列腺、精囊腺等器官的上皮出现异常外, 维生素A缺乏大鼠的精子发生也会停滞^[51]。进一步的研究表明, 主要是维生素A的活性代谢产物维甲酸, 调控包括精原细胞分化、精母细胞减数分裂、精子形成在内的精子发生的多个阶段。

4.1 维甲酸与精原细胞分化

精原细胞分化是精子发生的关键步骤, 也是精子发生不可逆转的起始阶段。大量研究表明, 维甲酸是启动精原细胞分化的关键因子。其一, 长期维生素A缺乏的大鼠或小鼠, 其生精上皮仅含有支持细胞和未分化精原细胞, 表明精原细胞分化障碍; 若给这些动物补充维生素A或者维甲酸, 则24 h后生精上皮内可见大量A₁精原细胞, 精原细胞分化得以恢复^[1,4-5]。其二, 特异性敲除睾丸内细胞的维甲酸合成关键酶基因Rdh10或Aldh1a1~3后, 小鼠睾丸内维甲酸因此缺乏, 造成精子发生停滞于未分化精原细胞阶段, 其表型类似于VAD小鼠^[39,52]。如果给这些小鼠补充维甲酸, 则其精原细胞分化能够恢复; 但若给这些动物补充维生素A, 则其精原细胞分化不能恢复。其三, 维甲酸能在体外诱导培养的未分化精原细胞分化形成分化型精原细胞^[53]。

维甲酸通过其受体发挥生物学功能。各型维甲酸受体均广泛表达于生精上皮, 当某一维甲酸受体功能丧失, 细胞内其他功能正常的维甲酸受体可以补偿其功能。所以, 单一维甲酸受体基因敲除后, 小鼠生精功能包括精原细胞分化可能受影响并不严重。早期研究发现, 只有Rara、Rarg、Rxb单个基因敲除小鼠表现为雄性不育^[54-55]。其中, 只有一岁以上Rara基因敲除小鼠表现为精原细胞分化异常, 其生精上皮仅有未分化精原细胞和支持细胞, 表型与维生素A缺乏小鼠^[56]相似。

目前仍不清楚维甲酸通过何种途径调控精原细胞分化, 如维甲酸是否直接作用于精原细胞而引发精原细胞分化? 或者是通过作用于支持细胞间接调控精原细胞分化? 抑或是通过精原细胞和支持细胞共同作用从而调节精原细胞分化? 如前所述,

*Rara*基因敲除可导致精原细胞分化障碍^[56]。然而,因为*Rara*既表达于生精细胞,也表达于支持细胞,所以无从得知其敲除后的表型是来源于生精细胞,亦或是支持细胞。之后法国一小组研究显示,支持细胞特异性*Rara*基因敲除成年小鼠的精原细胞分化未见异常,但一岁龄以上支持细胞特异性*Rara*基因敲除的小鼠,超过80%的生精小管其生精上皮仅含有支持细胞^[27]。来自于同一个小组的最近研究显示,一岁龄以上生殖细胞特异性*Rarg*基因敲除、或生殖细胞特异性*Rarg/Rara*双基因敲除小鼠表现为精子发生障碍,但仍有大量STRA8和KIT阳性细胞存在于生精小管,表明精原细胞分化未受显著影响^[57]。结合上述两组实验,文章作者推测,维甲酸可能通过精原细胞和支持细胞共同调控精原细胞分化。然而,当特异性敲除生殖细胞的一种维甲酸受体亚型*Rarg*或两种亚型*Rarg/Rara*后,其他未被敲除的维甲酸受体亚型可能代偿已被敲除的亚型。因此,仍然无法排除其他两种可能性:维甲酸通过支持细胞间接调控精原细胞分化或维甲酸直接调控精原细胞分化。

由此可见,研究维甲酸通过哪种或哪些细胞调控精原细胞分化,关键在于特异性失活某种细胞内整个维甲酸信号系统。其策略之一是制备所有维甲酸受体亚型的基因条件性敲除复合性小鼠(*Rara*^{fllox/fllox}*Rarb*^{fllox/fllox}*Rarg*^{fllox/fllox}, *cell specific Cre*)。其策略之二是利用显性负突变维甲酸受体失活内源性维甲酸介导的靶基因转录的特征,制备显性负突变维甲酸受体条件性转基因小鼠,结合细胞特异性表达的Cre小鼠,分别特异性失活精原细胞或支持细胞内的维甲酸信号系统。应用该实验系统,作者实验室证明了维甲酸能直接调控精原细胞分化(未发表资料)。

维甲酸能改变靶基因如*Stra8*^[53,58]和*Kit*^[59]的表达,这与精原细胞分化可能相关。最近的研究表明,*LIN28*、*CCND1*、*MYCN*以及*Mirc1*、*Mirc3*等家族小RNAs高表达于未分化精原细胞,这些因子的表达与细胞增殖密切相关;而与细胞分化相关的*let-7*家族小RNAs则高表达于分化型精原细胞^[60-61]。维甲酸能直接抑制未分化精原细胞*LIN28*的表达,而*LIN28*可以抑制*let-7*家族小RNAs的生成,从而造成*let-7*家族小RNAs水平的升高。同时,*LIN28*又是*let-7*的靶基因,故水平升高的*let-7*会造成*LIN28*水平的降低,进一步刺激*let-7*的生成。此外,*let-7*还能抑制其靶基因*CCND1*、*MYCN*在精原细胞中的表达。*MYCN*水

平降低造成其正向调节的基因*Mirc1*、*Mirc3*等家族小RNAs的表达关闭。因此,维甲酸信号系统可能通过*LIN28-let-7-MYCN-Mirc1/Mirc3*通路调控精原细胞分化。

4.2 维甲酸与精母细胞减数分裂

减数分裂为生殖细胞所特有的生物学事件,是生物有性生殖的根本基础。减数分裂过程中染色体复制一次,细胞连续分裂两次,从而产生单倍体的精子或卵子(哺乳动物)。在此过程中,非同源染色体分配时自由组合,而同源染色体的非姐妹染色单体间发生配对、联会和重组交换,从而使配子呈现遗传多样化,增加了后代的适应性。因此,减数分裂是保证物种繁衍、染色体数目稳定的基础,也是物种适应环境变化而不断进化的机制。

哺乳动物中,雌雄生物体的减数分裂启动时间、发生方式和调控机制不尽相同。雌性生殖细胞减数分裂始于胚胎期,其发展过程中经历了两次停滞;而雄性生殖细胞减数分裂则始于出生后,为一连续发育过程。近期的研究表明,维甲酸能诱导胚胎期雌雄小鼠生殖细胞减数分裂的启动,其关键证据为维甲酸能诱导大量减数分裂相关因子包括STRA8的表达。在小鼠,胚龄12.5 d后的卵巢不表达维甲酸代谢酶CYP26B1,雌性生殖细胞(卵原细胞)经生成的维甲酸诱导表达STRA8后24~36 h直接进入减数分裂;而胚胎期的睾丸支持细胞表达高水平CYP26B1,即使生成维甲酸也被快速降解,所以生理状态下胚胎期的睾丸生殖原细胞不能启动减数分裂^[62-64]。后续的研究表明,生殖原细胞即使经维甲酸诱导表达STRA8也不能进入减数分裂,或者部分能进入减数分裂但也不能完成,最终表现为凋亡。这表明,生殖原细胞尽管对维甲酸具有反应性,但其内源性程序不足以支持减数分裂的启动和发展,或者是构成其发育微环境的支持细胞不能提供足够的支持,或者是二者兼而有之^[65-66]。

维甲酸是否能启动出生后雄性生殖细胞的减数分裂?最近,通过对支持细胞内*Aldh1a1~3*基因特异性敲除小鼠(*Aldh1a1~3*^{Ser-/-})模型的研究,揭示了维甲酸也为出生后雄性生殖细胞减数分裂启动所必需^[39],其证据主要包括以下两点:(1)维甲酸处理能恢复*Aldh1a1~3*^{Ser-/-}小鼠的精原细胞分化和减数分裂的启动;(2)在维甲酸恢复*Aldh1a1~3*^{Ser-/-}小鼠的精原细胞分化后,再以维甲酸受体反向激动剂BMS493处

理小鼠, 其减数分裂则不能启动。但是, 如果同时以BMS493和维甲酸处理小鼠, 则小鼠减数分裂能正常启动。然而, 维甲酸通过何种途径启动雄性生殖细胞减数分裂及其启动机制目前并不清楚, 仍然有待阐明。

维甲酸信号通路可以通过调控支持细胞的功能, 参与维持血睾屏障(the blood testis-barrier, BTB)的完整性。血睾屏障的完整性对包括减数分裂在内的正常精子发生是不可或缺的。例如, 敲除小鼠的*Rara*, 会导致支持细胞参与形成的紧密连接结构异常, 使得原本无法通过血睾屏障的染料能够渗透进入近腔小室, 表明血睾屏障的完整性受到了破坏^[67]。近期也有研究证实, 在VAD小鼠青春期到成年期间, 其血睾屏障的形成会滞后, 细线前期与细线期精母细胞的数量会不断减少; 甚至在大于两月龄的小鼠中, 仍然有减数分裂停滞现象^[68]。

4.3 维甲酸与精子的形成及释放

Wolgemuth实验室的系列研究证实, 维甲酸与精子形成相关, 其主要证据包括: (1)*Rara*基因敲除小鼠的第一波精子发生(the first wave of spermatogenesis)受阻于第8步精子阶段(step 8 spermatid); 但是, 在特异性过表达RARA于*Rara*基因敲除小鼠的圆形精子细胞后, 其精子形成能完成, 精子发生恢复正常^[69]。(2)RAR拮抗剂BMS-189453处理的小鼠精子形成障碍^[70]。更多的研究表明, 维甲酸不但参与精子形成, 而且能影响精子释放, 如VAD大鼠精子滞留于生精上皮不能正常释放于曲精小管管腔^[71]; 饲以VAD饲料的*Rbp4*和*Lrat*基因敲除小鼠精子也滞留于生精上皮^[55,72]。此外, *Rara*、*Rxrb*基因敲除小鼠的精子也不能正常释放^[48,55]。Komada等^[73]发现, 维甲酸调控蛋白E-MAP-115(epithelial microtubule associated protein of 115 kDa)可能参与了小鼠精子的释放过程。

5 总结

维甲酸调控精子发生的多个阶段, 包括精原细胞分化、减数分裂和精子形成。然而, 目前对维甲酸调控精子发生的途径和分子机制所知甚少。睾丸内维甲酸主要来源于自身合成, 其水平受到精确调控, 但是, 有关维甲酸的细胞来源、代谢途径仍有许多问题有待阐明。深入研究维甲酸在精子发生中的功能, 将对最终阐明精原细胞分化、减数分裂的启动和发展以及精子形成的分子机制发挥极其重要的作用。

参考文献 (References)

- Morales C, Griswold MD. Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology* 1987; 121(1): 432-4.
- Griswold MD, Bishop PD, Kim KH, Ping R, Siiteri JE, Morales C. Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 564: 154-72.
- van Beek M, Meistrich M, de Rooij DG. Probability of self-renewing divisions of spermatogonial stem cells in colonies, formed after fission neutron irradiation. *Cell Tissue Kinet* 1990; 23(1): 1-16.
- van Pelt AM, de Rooij DG. The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement. *Biol Reprod* 1990; 42(4): 677-82.
- van Pelt A, de Rooij DG. Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice. *Biol Reprod* 1990; 43(3): 363-7.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52(1): 198-236.
- Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(15): 8346-51.
- Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, *et al.* Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. *Dev Biol* 2003; 258(1): 209-25.
- Barroca V, Lassalle B, Coureuil M, Louis JP, Le Page F, Testart J, *et al.* Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells *in vivo*. *Nat Cell Biol* 2008; 11(2): 190-6.
- Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science* 2009; 325(5946): 1394-98.
- Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Yi, Braun RE, Yoshida S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science* 2010; 328(5974): 62-7.
- Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* 1971; 169(3): 533-57.
- Huckins C, Oakberg EF. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. The normal testes. *Anat Rec* 1978; 192(4): 519-28.
- Hara K, Nakagawa T, Enomoto H, Suzuki M, Yamamoto M, Simons Benjamin D, *et al.* Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell* 2014; 14(5): 658-72.
- de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2001; 121(3): 347-54.
- de Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol* 1998; 79(2): 67-80.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52(1): 198-236.
- Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and

- its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 1956; 99(3): 391-413.
- 19 Russell LD, Ettlin RA, Hikim AP, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Int J Androl* 1993; 16(1): 8.
- 20 de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech* 2009; 72(8): 580-5.
- 21 Chainani M, Sampsel B, Elliott RW. Localization of the gene for plasma retinol binding protein to the distal half of mouse chromosome 19. *Genomics* 1991; 9(2): 376-9.
- 22 Bouillet P, Sapin V, Chazaud C, Messaddeq N, Decimo D, Dolle P, *et al.* Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mech Dev* 1997; 63(2): 173-86.
- 23 Jornvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeffery J, *et al.* Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 1995; 34(18): 6003-13.
- 24 Pares X, Farres J, Kedishvili N, Duester G. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(24): 3936-49.
- 25 Zhai Y, Higgins D, Napoli JL. Coexpression of the mRNAs encoding retinol dehydrogenase isozymes and cellular retinol-binding protein. *J Cell Physiol* 1997; 173(1): 36-43.
- 26 Rajan N, Sung WK, Goodman D. Localization of cellular retinol-binding protein mRNA in rat testis and epididymis and its stage-dependent expression during the cycle of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1990; 43(5): 835-42.
- 27 Vernet N, Dennefeld C, Guillou F, Chambon P, Ghyselinck NB, Mark M. Prepubertal testis development relies on retinoic acid but not retinoid receptors in Sertoli cells. *EMBO J* 2006; 25(24): 5816-25.
- 28 Rajan N, Kidd GL, Talmage DA, Blaner WS, Suhara A, Goodman D. Cellular retinoic acid-binding protein messenger RNA: Levels in rat tissues and localization in rat testis. *J Lipid Res* 1991; 32(7): 1195-204.
- 29 Zheng W, Bucco RA, Schmitt MC, Wardlaw SA, Ong DE. Localization of cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) II and CRABP in developing rat testis. *Endocrinology* 1996; 137(11): 5028-35.
- 30 Schmitt MC, Ong DE. Expression of cellular retinol-binding protein and lecithin-retinol acyltransferase in developing rat testis. *Biol Reprod* 1993; 49(5): 972-9.
- 31 Deltour L, Haselbeck RJ, Ang HL, Duester G. Localization of class I and class IV alcohol dehydrogenases in mouse testis and epididymis: Potential retinol dehydrogenases for endogenous retinoic acid synthesis. *Biol Reprod* 1997; 56(1): 102-9.
- 32 Molotkov A, Fan X, Deltour L, Foglio MH, Martras S, Farrés J, *et al.* Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(8): 5337-42.
- 33 Duester G. Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem Biol Interact* 2001; 130-132(1/2/3): 469-80.
- 34 Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem* 2003; 278(11): 9856-61.
- 35 López-Fernández LA, del Mazo J. The cytosolic aldehyde dehydrogenase gene (Aldh1) is developmentally expressed in Leydig cells. *FEBS Lett* 1997; 407(2): 225-29.
- 36 Zhai Y, Sperkova Z, Napoli JL. Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: Effects of vitamin A status on testis mRNA. *J Cell Physiol* 2001; 186(2): 220-32.
- 37 Sandell LL, Sanderson BW, Moiseyev G, Johnson T, Mushegian A, Young K, *et al.* RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev* 2007; 21(9): 1113-24.
- 38 Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 1999; 21(4): 444-8.
- 39 Raverdeau M, Gely-Pernot A, Feret B, Dennefeld C, Benoit G, Davidson I, *et al.* Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(41): 16582-87.
- 40 MacLean G, Abu-Abed S, Dolle P, Tahayato A, Chambon P, Petkovich M. Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech Dev* 2001; 107(1/2): 195-201.
- 41 Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83(6): 841-50.
- 42 Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996; 10(9): 940-54.
- 43 Piedrafita FJ, Pfahl M. Nuclear retinoid receptors and mechanisms of action. *Retinoids* 1999; 153-84.
- 44 Repa JJ, Hanson KK, Clagett-Dame M. All-trans-retinol is a ligand for the retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(15): 7293-7.
- 45 Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 2004; 328: 1-16.
- 46 Chung SSW, Wolgemuth DJ. Role of retinoid signaling in the regulation of spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2004; 105(2/3/4): 189-202.
- 47 Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000; 14(2): 121-41.
- 48 Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck NB, *et al.* Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* 2006; 147(1): 96-110.
- 49 Kim KH, Griswold MD. The regulation of retinoic acid receptor mRNA levels during spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 1990; 4(11): 1679-88.
- 50 Ulven SM, Gundersen TE, Weedon MS, Landaas VO, Sakhi AK, Fromm SH, *et al.* Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: Important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid. *Dev Biol* 2000; 220(2): 379-91.
- 51 Wolbach SB, Howe PR. Tissue changes following deprivation of fat-soluble a vitamin. *J Exp Med* 1925; 42(6): 753-77.
- 52 Tong MH, Yang QE, Davis JC, Griswold MD. Retinol dehydrogenase 10 is indispensable for spermatogenesis in juvenile males.

- Proc Natl Acad Sci USA 2012; 110(2): 543-8.
- 53 Zhou Q, Li Y, Nie R, Friel P, Mitchell D, Evanoff RM, *et al.* Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid *in vitro*. *Biol Reprod* 2008; 78(3): 537-45.
- 54 Wolgemuth DJ, Chung SS. Retinoid signaling during spermatogenesis as revealed by genetic and metabolic manipulations of retinoic acid receptor alpha. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 63: 11-23.
- 55 Vernet N, Dennefeld C, Klopfenstein M, Ruiz A, Bok D, Ghyselinck NB, *et al.* Retinoid X receptor beta (RXRB) expression in Sertoli cells controls cholesterol homeostasis and spermiation. *Reproduction* 2008; 136(5): 619-26.
- 56 Lufkin T, Lohnes D, Mark M, Dierich A, Gorry P, Gaub MP, *et al.* High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(15): 7225-9.
- 57 Gely-Pernot A, Raverdeau M, Celebi C, Dennefeld C, Feret B, Klopfenstein M, *et al.* Spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor gamma. *Endocrinology* 2012; 153(1): 438-49.
- 58 Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dolle P, *et al.* Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol* 1996; 135(2): 469-77.
- 59 Busada JT, Kaye EP, Renegar RH, Geyer CB. Retinoic acid induces multiple hallmarks of the prospermatogonia-to-spermatogonia transition in the neonatal mouse. *Biol Reprod* 2014; 90(3): 64.
- 60 Tong MH, Mitchell D, Evanoff R, Griswold MD. Expression of Mirlet7 family microRNAs in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod* 2011; 85(1): 189-97.
- 61 Tong MH, Mitchell DA, McGowan SD, Evanoff R, Griswold MD. Two miRNA clusters, Mir-17-92 (Mir1) and Mir-106b-25 (Mir3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod* 2011; 86(3): 72.
- 62 Le Bouffant R, Guerquin MJ, Duquenne C, Frydman N, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, *et al.* Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Hum Reprod* 2010; 25(10): 2579-90.
- 63 Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(8): 2474-9.
- 64 Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, *et al.* Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 2006; 312(5773): 596-600.
- 65 Snyder EM, Davis JC, Zhou Q, Evanoff R, Griswold MD. Exposure to retinoic acid in the neonatal but not adult mouse results in synchronous spermatogenesis. *Biol Reprod* 2011; 84(5): 886-93.
- 66 MacLean G, Li H, Metzger D, Chambon P, Petkovich M. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology* 2007; 148(10): 4560-7.
- 67 Chung SSW, Choi C, Wang X, Hallock L, Wolgemuth DJ. Aberrant distribution of junctional complex components in retinoic acid receptor alpha-deficient mice. *Microsc Res Tech* 2010; 73(6): 583-96.
- 68 Chihara M, Otsuka S, Ichii O, Kon Y. Vitamin A deprivation affects the progression of the spermatogenic wave and initial formation of the blood-testis barrier, resulting in irreversible testicular degeneration in mice. *J Reprod Dev* 2013; 59(6): 525-35.
- 69 Chung SS, Sung W, Wang X, Wolgemuth DJ. Retinoic acid receptor alpha is required for synchronization of spermatogenic cycles and its absence results in progressive breakdown of the spermatogenic process. *Dev Dyn* 2004; 230(4): 754-66.
- 70 Chung SS, Wang X, Roberts SS, Griffey SM, Reczek PR, Wolgemuth DJ. Oral administration of a retinoic acid receptor antagonist reversibly inhibits spermatogenesis in mice. *Endocrinology* 2011; 152(6): 2492-502.
- 71 Huang HF, Marshall GR. Failure of spermatid release under various vitamin A states—an indication of delayed spermiation. *Biol Reprod* 1983; 28(5): 1163-72.
- 72 Ghyselinck NB, Vernet N, Dennefeld C, Giese N, Nau H, Chambon P, *et al.* Retinoids and spermatogenesis: Lessons from mutant mice lacking the plasma retinol binding protein. *Dev Dyn* 2006; 235(6): 1608-22.
- 73 Komada M, McLean DJ, Griswold MD, Russell LD, Soriano P. E-MAP-115, encoding a microtubule-associated protein, is a retinoic acid-inducible gene required for spermatogenesis. *Genes Dev* 2000; 14(11): 1332-42.