哺乳动物精原干细胞自我更新调控的研究进展

高永甫 杨思强 刘 丹 余树民*
(四川农业大学动物医学院, 雅安 625000)

摘要 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)具有自我更新和分化的功能, 这两种功能的平衡协调不仅能维持其自身数量的稳定, 还能满足雄性动物精子生成的需要。近几年, 由于细胞培养技术、基因工程技术、生殖细胞移植技术的建立和完善, 使SSCs自我更新调控机制的研究取得了许多突破, 主要体现在蛋白调控因子和微小RNA分子以及DNA甲基化新作用的发现等方面。该文将着重围绕调控SSCs自我更新的外源性细胞因子和内源性转录因子等蛋白因子进行综述, 以期为哺乳动物SSCs的深入研究提供借鉴。

关键词 精原干细胞; 自我更新; 调控; 哺乳动物

1 引言

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是位于睾丸曲细精管基膜上既能通过自我更新维持自身群体数量的稳定, 又能在体内定向分化并最终生成精子的一类成体干细胞。近年来的研究显示, SSCs在一定条件下具有与胚胎干细胞类似的多向分化潜能。鉴于SSCs独具的功能特性(干细胞特性和无可比拟的遗传放大效应), 基因工程、生殖医学、物种保护等领域的众多学者都将其作为重点来研究。近年来, 由于细胞生物学技术和分子生物学技术在小鼠SSCs研究体系中的广泛应用, 有关SSCs的自我更新调控机制已经在蛋白调控因子和微小RNA调控分子以及DNA甲基化作用等方面有了许多新的发现。本文就该领域进行综述, 以期为哺乳动物SSCs的深入研究提供借鉴。

2 SSCs的生物学特性

2.1 SSCs的自我更新和分化

SSCs属于精原细胞的一个亚群, 精原细胞包括未分化精原细胞和分化中的精原细胞。未分化精原细胞包括A_s、A_{pr}、A_{al}型; 分化中的精原细胞包括A_1-A_4型、中间型、B型精原细胞, 通常认为A_s细胞为SSCs。A_s细胞经过有丝分裂可能形成2个A_s细胞, 或者形成胞质间桥相连的2个A_{pr}细胞, 也可能形成一个A_s细胞和1个既定分化(committed differentiating)的精原细胞(该细胞进一步分裂成A_{pr}-A_{pr})。A_s的形成过程即为SSCs的自我更新, 而A_{pr}-A_{pr}的生成过程则为分化过程[1](图1)。A_{pr}随后依次分化为A_{al}→(A_1→A_2→A_3→A_4)→中间型(In)→B型→精母细胞→精子, 而从A_s到精子生成为一个完整的生精周期。

2.2 SSCs的微环境

学者们通常认为SSCs的微环境是由曲细精管内SSCs周围的细胞、胞外基质、细胞因子组成的, 而没有把曲细精管以外的因子包括进去[2]。2007年, Yoshida等[3]发现处于有丝分裂状态的SSCs在曲细精管中更倾向于分布在脉管系统丰富并毗邻间质细胞的曲细精管基膜上。Oatley等[4]发现小鼠睾丸中管周肌样细胞和间质细胞分泌的集落刺激因子1(colony stimulating factor 1, CSF1)对SSCs的增殖分裂发挥了调控作用。上述资料均提示, SSCs的微环境应包括曲细精管外的一些因子。

2.3 SSCs的“异质性”

SSCs的“异质性”指SSCs不是由处于同一发育阶段的精原细胞组成的。目前, 普遍认为SSCs就是A_s型精原细胞。但Zheng等[5]报道, A_{al}型精原细胞在睾丸中可以返祖, 即分裂形成A_s型或A_{pr}型精原细胞; Barroca等[6]将已分化的精原细胞移入不育小鼠睾丸曲细精管中后, 发现这些细胞可重新获得干细胞特性而在曲细精管基膜处定植并增殖分裂。这些说明除A_s之外, 其它类型的精原细胞同样也具有干细胞特性(或潜能性)。除此之外, 有多位学者还报道小鼠

收稿日期: 2012-02-14 接受日期: 2012-04-10
国家自然科学基金(No.31172379)和四川省教育厅青年基金(No.08-zb033)资助项目
*通讯作者。Tel: 0835-2885312, E-mail: yayushumin@yahoo.com.cn

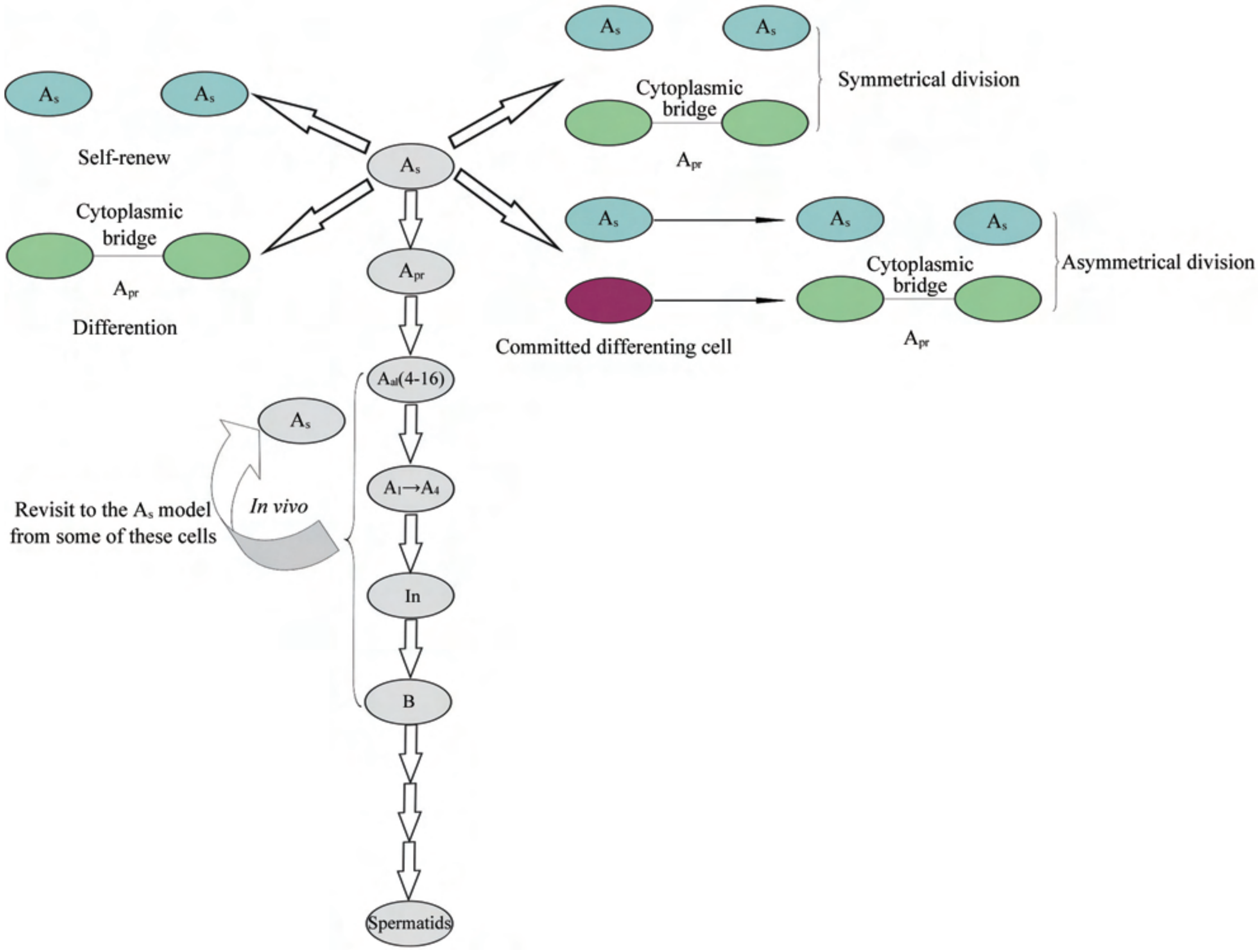

图1　SSCs的自我更新和分化以及既定分化精原细胞的返祖模式图(根据参考文献[2]修改)

Fig.1　Diagram of the self-renewal and differentiation of SSCs as well as the reversion of committed differentiating spermatogonia(modified from reference [2])

的A_s型精原细胞中只有部分细胞表达未分化的精原细胞标记, 如神经元素3(neurogenin 3, NGN3)、胶质细胞源神经营养因子α1受体(GDNF family receptor α1, GFRα1)、DNA结合抑制因子4(inhibitor of DNA binding 4, ID4), 而且人的A_{pale}型和A_{dark}型精原细胞同样也只有部分表达GFRα1[5,7-8]。

3　研究SSCs调控机制的思路

目前, SSCs发育调控机制大致结合两种模型来研究: 一是基因敲除模型, 主要用于发现SSCs功能调控基因, 即首先敲除预想的SSCs调控基因, 然后观察基因敲除动物的曲细精管及SSCs的形态学变化。如果某种基因对A型精原细胞功能发挥调控作用, 那么该基因敲除后睾丸组织曲细精管中A型精原细胞数量就会显著减少甚至消失, 而仅能观察到支持细胞; 二是SSCs离体培养结合生殖细胞移植模型, 根据SSCs表面标记利用流式细胞仪或免疫磁珠分选(MACS)获得纯化的SSCs, 在适宜的条件下进行离体培养, 经过扩增使其满足实验需要, 结合RNA干涉、基因敲除或过表达等方法, 再进行生殖细胞移植, 对处理后离体培养中的SSCs、总生殖细胞数进行评估, 从而检验外源性生长因子和内源性基因对SSCs自我更新和分化功能的调控作用。

4　SSCs自我更新的调控机制

SSCs的自我更新能力包含了三个要素: 维持自身生存、稳定增殖、保持未分化状态, 这三个要素不是孤立的, 而是相互依赖的, 任何一个因素发挥作用的前提都是其它两个因素也在同时发挥作用。

4.1　外源性因子

4.1.1　胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)　最初, 因其影响

发育早期胚胎神经元及其前体细胞的增殖与分化过程而被发现。小鼠睾丸中的GDNF由支持细胞、精原细胞和圆形精子细胞分泌[9-10], 它通过与SSCs膜上的GFRα1、C-Ret受体复合物结合, 进而启动细胞内PI3K/AKT、SFK、MAPK信号通路, 最终对SSCs的自我更新和分化发挥调控作用, 是平衡SSCs自我更新和分化功能不可缺少的细胞因子。GDNF对SSCs的调控作用可归纳为以下两点[11]: (1)平衡自我更新与分化: GDNF过表达小鼠曲细精管中会出现因分化障碍形成的未分化型精原细胞瘤, 由此还导致了该模型小鼠不育, 证明GDNF的精确表达对平衡SSCs自我更新和分化是十分重要的; (2)维持生存: 当使用抑制剂钝化信号通路中的AKT后, 导致了SSCs的数目的迅速减少, 这种减少并不是因为SSCs分化, 而是因为凋亡。可见, GDNF调控系统中的AKT通路对SSCs的生存至关重要。另外, 通过SFK信号通路刺激SSCs中维持生存的调控因子, 如原癌基因*Bcl6*表达蛋白(B-cell CLL/lymphoma 6-member B, Bcl6b)、Ets转录相关因子(Ets-related molecule, Erm)、LIM同源框1(LIM homeobox 1, Lhx1)等的合成, 也能间接起到维持SSCs生存的作用[12]。

4.1.2 成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2) FGF2又称碱性成纤维细胞生长因子, 可促进各种类型细胞的增殖, 特别是内皮细胞。睾丸中, FGF2由支持细胞、间质细胞、生殖细胞分泌。FGF2的作用可以归纳为两个方面: (1)强烈刺激支持细胞分泌GDNF和Erm, 这两种蛋白对SSCs的存活和更新发挥着重要作用[13]; (2)与GDNF协同作用, 促使SSCs在饲养层上形成集落, 集落类似睾丸组织中SSCs的微环境, 可诱导SSCs分裂产生A_s精原细胞和既定分化的精原细胞, 使SSCs数量维持稳定[14]。但Kuijk等[15]指出, 体外条件下添加FGF2使猪SSCs的Nanog和Plzf表达下调, 不利于SSCs的分离培养。

4.1.3 CSF1 CSF1最初因其刺激造血干细胞分化而被发现。Dirami等[16]报道, CSF1在体外能延长猪A型精原细胞的存活时间。2009年, Oatley等[4]报道了小鼠睾丸中CSF1由管周肌样细胞和间质细胞分泌, 其受体在SSCs上高表达, 证实了CSF1与GDNF协同促进SSCs的自我更新。

4.1.4 Wnt5a Wnt5a属于Wnt蛋白家族, 该家族蛋白可以分泌形态发生素从而调控细胞的增殖和分化。Wnt5a对多种干细胞具有调控作用, 如维持间充质干细胞的多潜能性、通过抑制β-catenin信号通路提高造血干细胞移植后在受体组织中的定植能力[17-18]。2011年, Yeh等[19]报道Wnt5a在小鼠睾丸的支持细胞中表达, 而Wnt5a的受体Fzd、LRP5/6在SSCs上有表达。通过离体培养技术, Jonathan等[19]发现抑制Wnt信号通路可以引起SSCs凋亡, 从而显著减少SSCs集落的形成; 生殖细胞移植实验表明, 向培养基中添加Wnt5a可以显著增加SSCs的总数。说明Wnt5a对SSCs的自我更新和增殖起着促进作用。

4.2 内源性因子

4.2.1 依赖GDNF调控的内源性因子 2006年, Oatley等[20]利用DNA芯片技术发现了有70多个受GDNF刺激而转录上调的基因, 其中已被确定的对SSCs有调控作用的内源性因子有Bcl6b、Erm、Lhx1、Pou3f1(POU domain, class-3 transcription factor 1)、ID4。

*Bcl6b*是原癌基因*Bcl6*家族中的一员, 最初是以抑制IL-2诱导的B细胞分化而被发现的。Bcl6b只在小鼠未分化的精原细胞中表达[12]。Oatley等[20]用靶向siRNA转染技术配合细胞移植发现, 降低*Bcl6b*的转录水平可以显著减少SSCs集落的形成, 增加生殖细胞凋亡; 而敲除*Bcl6b*等位基因后, 敲除小鼠睾丸出现曲细精管仅存支持细胞的表型, 说明Bcl6b对维持SSCs的生存发挥着重要作用。

*Erm*基因编码的转录因子属于ETS家族, 该家族成员主要的作用是调控哺乳动物生长发育过程中细胞的增殖、分化、迁移和凋亡。最初, Erm只在睾丸支持细胞中表达, 随着日龄增加Erm逐渐在精原细胞中开始表达。*Erm*等位基因敲除小鼠经历了第一波生精周期后, 会出现仅存支持细胞的曲细精管表型, 这种表型的出现由SSCs消耗所导致, 将该敲除模型小鼠的生殖细胞植入W/W^v小鼠后, 不形成细胞克隆, 也不生成精子, 从而说明Erm对SSCs的存活和数量稳定具有重要作用, 这种作用可能是通过Erm维持SSCs Ret受体表达以保证GDNF信号通路保持畅通来完成的[21]。

*Lhx1*属于同源盒基因*Lim*家族中的成员, 该类基因是发育调控的主要基因, 对动物的器官发生和细胞分化起着关键性调控作用, 已证实在小鼠未分化的精原细胞中表达。2007年, Oatley等[12]用siRNA转染技术和细胞移植发现降低*Lhx1*的转录水平可使SSCs增殖明显受到抑制。因为敲除*Lhx1*等位基因对小鼠是致死性的, 所以没能观测到*Lhx1*敲除对精子

发生过程的影响, 目前只是推测其对维持SSCs增殖起作用。

Pou3f1(又称Oct6)属于POU蛋白家族, 是一类在动物早期胚胎发育中起重要作用的转录因子, 参与维持细胞全能性及未分化状态。Pou3f1在小鼠精原细胞中表达, 其表达受GDNF参与的PI3K/AKT信号通路调控[22]。2010年, Xin等[22]通过siRNA转染技术和细胞移植发现, 降低*Pou3f1*基因的表达水平可以使SSCs数量显著减少、生殖细胞凋亡增加。

ID4又称做淋巴瘤细胞DNA结合抑制因子4。已发现ID4只在小鼠部分A_s型精原细胞中表达, 并证实ID4能将A_s型精原细胞与A_{pr}和A_{al}区分开来。敲除*ID4*等位基因的小鼠睾丸出现仅存支持细胞的曲细精管表型; 用siRNA转染技术配合细胞移植发现, 降低*ID4*转录水平可以显著抑制SSCs增殖, 但不影响生殖细胞数的增加, 说明ID4仅对SSCs自我更新起调控作用[8]。

4.2.2 不依赖GDNF调控的内源性因子 Mili (Miwi-like)属于PIWI(P-element-induced wimpy testis)蛋白家族。PIWI家族是在果蝇卵巢和睾丸中发现的可以调控生殖干细胞(germline stem cell, GSC)自我更新的一类蛋白。已经证实, *Mili*基因在雄性小鼠性原细胞(gonocytes)、精原细胞、早期精母细胞中表达。*Mili*等位基因敲除小鼠在早期首先出现各级精原细胞有丝分裂能力下降, 进而导致SSCs数量显著减少, 随着日龄增加逐渐出现仅存支持细胞的曲细精管表型。综上所述, Mili因子对未分化精原细胞(包含SSCs)和既定分化精原细胞起着维持增殖的作用[23], 但该因子对SSCs的其他调控作用还没有通过生殖细胞移植模型和离体培养技术来研究。

*Nanos2*是NANOS锌指RNA结合蛋白家族表达基因。该家族基因的时空表达对于个体发育起着重要作用。对成年雄性小鼠而言, NANOS2在A_s型和A_{pr}型精原细胞中表达。条件性基因敲除*Nanos2*将诱导小鼠未分化精原细胞的凋亡, *Nanos2*基因过表达则会出现精原细胞分化障碍而发生精原细胞瘤。因此, NANOS2对SSCs有协调其存活、更新和分化的作用[24]。同时, 已有报道称, NANOS2蛋白在成年人的各级生殖细胞中表达[25], NANOS2是不同物种SSCs的标记, 具有保守性。

早幼粒细胞白血病锌指蛋白(promyelocytic leukemia Zinc-finger, Plzf)是一种具有序列特异性DNA结合活性的转录抑制因子。Plzf最初在小鼠性原细胞和未分化型精原细胞中表达, 随着性原细胞逐渐全部转化为SSCs, Plzf就只在未分化精原细胞中表达。敲除*Plzf*将使小鼠睾丸发生仅存支持细胞的曲细精管表型, 而该表型的出现是由于未分化精原细胞分化后不能维持SSCs数量稳定所造成的, 所以, 科研人员推测Plzf表达对SSCs保持未分化状态和数量稳定是必需的[26]。另外, 已证实Plzf也是人、恒河猴、猪的未分化精原细胞(包含SSCs)的标记分子[27-29]。

性腺发育基因表达受RNA聚合酶II转录起始机制调控, 该酶的转录表达需要TFIID(transcription factor IID)复合物, TFIID复合物由TATA结合蛋白(TATA-binding protein, TBP)和TBP相关因子(TAFs)组成, 而TAF4B就是小鼠A型精原细胞中发现的一种TAFs分子。*Taf4b*$^{-/-}$小鼠会出现仅存支持细胞的曲细精管表型, 将*Taf4b*$^{+/+}$小鼠生殖细胞植入该型小鼠曲细精管后可启动精子生成, 可见Taf4b对SSCs生存的维持也是至关重要的[30]。另外, *Taf4b*$^{-/-}$也引起*Plzf*基因表达的显著下调。

4.3 微小RNA分子与DNA甲基化

微小RNA分子, 即MicroRNA, 是一类由内源基因编码的长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子, 通过和靶基因mRNA碱基配对引导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)降解mRNA或抑制mRNA的翻译, 从而在转录后水平调控蛋白质表达, 它们参与调控多种细胞的自我更新、分化、增殖及凋亡。2008年, Hayashi等[31]报道条件性基因敲除小鼠生殖细胞中的RNA诱导沉默复合体的切割酶基因后可以引起小鼠不育, 最早说明MicroRNA对生殖细胞具有调控作用。2011年, Niu等[32]用高通量测序发现, MicroRNA-21在小鼠Thy1$^+$睾丸细胞中显著高表达, 用瞬时转染抑制培养基中SSCs的MicroRNA-21会引起SSCs凋亡数目增加; 生殖细胞移植实验也表明, MicroRNA受到抑制后SSCs的总数也显著减少, 因此, MicroRNA-21对SSCs有维持生存和促进增殖的作用。

DNA甲基化是一种DNA的天然修饰方式, 哺乳动物中DNA甲基化不仅可以影响细胞基因的表达, 而且这种影响还可随细胞分裂而遗传, 它在维持正常细胞功能、胚胎发育、遗传印记、细胞分化、肿瘤发生等生命活动中起着重要的调节作用。干细胞的自我更新及分化潜能一方面受内源性转录因子

的相互协调控制, 另一方面表观遗传修饰也起着重要的作用, 而表观遗传修饰就包括DNA甲基化。在干细胞命运决定过程中与自我更新有关的基因甲基化程度较低, 与特异性分化有关的基因甲基化程度较高, 这说明低甲基化状态可以维持干细胞的自我更新使其保持在未分化状态。2007年, Han等[33]报道DNA甲基化对MicroRNA的表达具有调控作用, 因为MicroRNA已被发现有调控SSCs的作用, 所以DNA甲基化对SSCs一定也起着某种调控作用, 而这有待科研工作者的进一步探索。

5 小结

综上所述, SSCs调控的研究主要集中在小鼠等啮齿类哺乳动物, 而人、灵长类、家畜等SSCs自我更新调控的研究还未深入。已经证实, NANOS2、Plzf等在非啮齿类动物SSCs中有表达, 对SSCs的自我更新发挥了重要作用, 它们对SSCs的功能调控具有针对不同物种的保守性。Wnt5a有促进造血干细胞在受体组织中定植的特点, 假如这一特点也针对SSCs存在, 就可以有效解决移植SSCs在受体动物睾丸中定植率低(对小鼠而言仅10%~12%)[34]的难题。

睾丸中, A_{al}型和已分化型精原细胞可以返祖重新获得干细胞特性形成SSCs, 这一新的特性值得科研工作者尝试在体外培养中阐释其机制, 从而克服因SSCs数量较少带来的研究困难。条件性基因敲除模型可避免经典等位基因敲除对胚胎发育产生的致死性影响, 是研究器官发生、细胞更新和分化等过程中基因表达调控的一项重要分子生物学技术, 相信在SSCs自我更新和分化的调控机制研究中会继续发挥作用。除小鼠外, 其它动物SSCs的纯化富集和长期培养仍然是当今该领域研究的重点和难点, 而该领域的研究成果将对人类不育疾病的治疗、精子发生机制的深入阐明、动物种质资源保护和转基因动物生产等发挥积极作用。

参考文献 (References)

1 Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. Annu Rev Cell Dev Biol 2008; 24: 263-86.

2 de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction 2001; 121(3): 347-54.

3 Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. Avasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonial in the mouse testies. Science 2007; 317(5845): 1722-6.

4 Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW, Brinster RL. Colony stimulatingfactor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. Development 2009; 136(7): 1191-9.

5 Zheng K, Wu X, Kaestner KH, Wang J. The pluripotency factor Lin28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. BMC Dev Biol 2009; 9: 38.

6 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.

7 Grisanti L, Falciatori L, Grasso M, Dovere L, Fera S, Muciaccia B, *et al*. Identification of spermatogonial stem cell subsets by morpholo-gical analysis and prospective isolation. Stem Cells 2009; 27(12): 3043-52.

8 Oatley MJ, Kaucher AV, Racicot KE, Oatley JM. Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germaline and regulates the delf-renewal of spermatogonial stem cells in mice. Biol Reprod 2011; 85(2): 347-56.

9 Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, *et al*. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatagonia by GDNF. Science 2000; 287(5457): 1489-93.

10 Yu Z, Guo R, Ge Y, Ma J, Guan J, Li S, *et al*. Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis. Biol Reprod 2003; 69(1): 37-47.

11 Caires K, Broady J, Mclean D. Maintaining the male germline: Regulation of spermatogonial stem cell. J Endocrinol 2010; 205(2): 133-45.

12 Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. J Biol Chem 2007; 282(35): 25842-51.

13 Simon L, Ekman GC, Tyagi G, Hess RA, Murphy KM, Cooke PS. Common and distinctfactors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for Spermatogonial stem cell maintenance. Exp Cell Res 2007; 313(14): 3090-9.

14 Ebata KT, Yeh JR, Zhang XF, Nagano MC. Soluble growth factors stimulate spermatogonial stem cell divisions that maintain a stem cell pool andproduce progenitors *in vitro*. Exp Cell Res 2011; 317(10): 1319-29.

15 Kuijk EW, Colenbrander B, Roelen BA. The effects of growth factors on *in vitro* cultured porcine testicular cells. Reproduction 2009; 138(4): 721-31.

16 Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. Biol Reprod 1999; 61(1): 225-30.

17 BiolKoski R, Schulte DM, Oberhauser F, Gomolka M, Udelhoven M, Hettich MM, *et al*. Role of Wnt5a in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. J Biol Chem 2010; 285(9): 6170-8.

18 Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(39): 15436-41.

19 Yeh JR, Zhang XF, Nagano MC. Wnt5a is a cell-extrinsic factor

that supports self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. J Cell Sci 2011; 124(Pt14): 2357-66.
20 Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(25): 9524-29.
21 Tyagi G, Carnes K, Morrow C, Kostereva NV, Ekman GC, Meling DD, *et al*. Loss of ETV5 decreases proliferation and RET levels in neonatal mouse testicular germ cells and causes an abnormal first wave of spermatogenesis. Biol Reprod 2009; 81(2): 258-66.
22 Xin WU, Oatley JM, Oatley MJ, Kaucher AV, Avarbock MR, Brinster RL. The POU domain transcription factor POU3F1 is an important intrinsic regulator of GDNF-induced survival and self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. Biol Reprod 2010; 82(6): 1103-11.
23 Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, Yin H, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T. Mili, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation. J Biol Chem 2009; 284(6): 6507-19.
24 Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cell. Science 2009; 325(5946): 1394-8.
25 Kusz KM, Tomczyk L, Sajek M, Spik A, Latos-Bielenska A, Jedrzejczak P, *et al*. The highly conserved NANOS2 protein: Testis-specific expression and significance for the human male reproduction. Mol Hum Reprod 2009; 15(3): 165-71.
26 Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, *et al*. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. Nat Genet 2004; 36(6): 653-9.
27 He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization and culture of human spermatogonia. Biol Reprod 2010; 82(2): 363-72.
28 Hermann BP, Meena S, Simorangkir DR, Tianjiao C, Plant TM, Orwig KE. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. Hum Reprod 2009; 24(9): 1704-16.
29 Luo JP, Susan M, Rahul R, Ina D. Protein gene product 9.5 is a spermatogonia specific marker in the pig testis: Application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. Mol Reprod Dev 2006; 73(12): 1531-40.
30 Falender AE, Freiman RN, Geles KG, Lo KC, Hwang K, Lamb DJ, *et al*. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonadspecific subunit of TFIID. Genes Dev 2005; 19(7): 794-803.
31 Hayashi K, CdSL SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, *et al*. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. PLoS One 2008; 3(3): e1378.
32 Niu Z, Goodyear SM, Rao S, Wu X, Tobias JW, Brinster RL, *et al*. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(31): 12740-5.
33 Han LF, Dane-Witmer P, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates microRNA expression. Cancer Biol Ther 2007; 6(8): 1284-8.
34 Nagano MC. Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cellsfollowing transplantation in mice. Biol Reprod 2003; 69(2): 701-7.

Advance on Self-renewal Regulation of Mammalian Spermato-gonial Stem Cells

Gao Yongfu, Yang Siqiang, Liu Dan, Yu Shumin*

(*College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625000, China*)

Abstract Spermatogonial stem cells (SSCs) possess both self-renewing division and differentiating division functions, the balance of the two functions not only maintains the stem cell number stable but also meets the demand of the testis to produce millions of sperms each day. Recently, because of the establishment and perfection on techniques of culture *in vitro*, genetic engineering and germ cell transplantation, the largest break-through in self-renewal regulation mechanism of SSCs has already been made, including the new discoveries of protein regulatory factors, MicroRNA and the DNA methylation. The present review mainly focuses on the protein regulatory factors such as extrinsical cytokines and specific endogenous transcription factors controlling the SSCs self-renewal, which purposes to provide ideas on the mammalian SSCs.

Key words spermatogonial stem cells; self-renewal; regulation; mammalian

Received: February 14, 2012 Accepted: April 10, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31172379) and the Youth Fund of Sichuan Provincial Educational Department (No.08zb033)

*Coresponding author. Tel: 86-835-2885312, E-mail: yayushumin@yahoo.com.cn