

# 哺乳动物精原干细胞的研究进展

萨初拉<sup>1</sup> 顾婷玉<sup>2\*</sup> 何志颖<sup>3</sup> Muren Herrid<sup>4</sup> 王欣<sup>1,2</sup> 乌云毕力格<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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 010021;

<sup>2</sup>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;

<sup>3</sup>第二军医大学细胞生物学教研室, 上海 200433;

<sup>4</sup>CSIRO Livestock Industries, FD McMaster Laboratory, Armidale, NSW 2350, Australia)

**摘要** 精原干细胞是雄性体内可以永久维持的成体干细胞, 它具有自我更新和分化的能力, 保证了雄性个体生命过程中精子发生的持续进行, 从而实现将遗传信息传递给下一代。精原干细胞不仅可在体外实现长期培养或诱导分化为各级生精细胞, 并且可在特定条件下将其诱导去分化成为多能性干细胞。同样, 这种多能性干细胞如同胚胎干细胞, 可被诱导形成造血细胞、神经元细胞、肌细胞等多种类型细胞。鉴于其独具的生物学特性, 精原干细胞在揭示精子的发生机制、治疗雄性不育和转基因动物等研究中具有重要价值。该文对精原干细胞的生物学特性、纯化培养、移植、体外诱导分化及其相关调控方面的各项研究进行了小结, 综述了近年来的研究历程和最新研究成果。

**关键词** 精原干细胞; 诱导分化; 移植; 调控

## Advances in the Research of Mammalian Spermatogonial Stem Cells

Sachula Wu<sup>1</sup>, Gu Tingyu<sup>2\*</sup>, He Zhiying<sup>3</sup>, Muren Herrid<sup>4</sup>, Wang Xin<sup>1,2</sup>, Uyunbilig Borjigin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>The Key Laboratory of Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; <sup>2</sup>The laboratory of Cellular and Molecular Biology, Shanghai Institute of Cell Biology and Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

<sup>3</sup>Department of Cell Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

<sup>4</sup>CSIRO Livestock Industries, FD McMaster Laboratory, Armidale, NSW 2350, Australia)

**Abstract** Spermatogonial stem cells (SSCs) are the adult stem cells that are capable of self-renewal and differentiation into sperm cells in the male body. SSCs can maintain capacity of spermatogenesis throughout life in males, thus transmit genetic information to next generation through sperm cells. Under *in vitro* culture conditions, SSCs could be induced into several cell types including hematopoietic cells, neurons and muscle cells besides various cells relative to spermatogenesis. As the cell model, SSCs become an important tool for the researches on spermatogenesis mechanism, regeneration of spermatogenesis in sterile individuals and reproduction of transgenic animals. This article reviewed recent advances in the studies including biological properties, purification, culture, transplantation, induced differentiations and molecular regulation underlining these differentiations of SSCs.

**Key words** spermatogonial stem cell; induced differentiation; transplantation; regulation

收稿日期: 2013-09-11 接受日期: 2014-01-08

国家自然科学基金(批准号: 31060168、31271469、31271474、31271042)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-54921358, E-mail: tygu@sibcb.ac.cn; Tel: 0471-5227683, E-mail: uyunbilig.borjigin@gmail.com

Received: September 11, 2013 Accepted: January 8, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31060168, 31271469, 31271474, 31271042)

\*Corresponding authors. Tel: +86-21-54921358, E-mail: tygu@sibcb.ac.cn; Tel: +86-471-5227683, E-mail: uyunbilig.borjigin@gmail.com

网络出版时间: 2014-03-03 12:04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0293.html>

在体内, 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是位于曲细精管基膜上、能通过自我更新维持自身数量并分化形成精母细胞, 进一步形成成熟精子的一类原始精原细胞。1994年, Brinster等<sup>[1]</sup>通过生殖细胞移植实验验证了SSCs的存在。SSCs和近期发现的卵原干细胞<sup>[2]</sup>分别是雄性或雌性成年哺乳动物体内唯一能通过自然生殖过程将遗传信息传递给下一代的成体干细胞。SSCs具有高度的自我更新能力和分化潜能。SSCs的自我更新与分化过程依赖于睾丸内微环境的调控, 其中主要为支持细胞所分泌的胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)等多种内分泌因子以及相关信号通路参与SSCs的增值与分化的调控网络。SSCs在医学、干细胞生物学、转基因研究等领域具有重要的理论价值和广阔的应用前景。本文对SSCs的生物学特性、移植、体外培养与鉴定、诱导分化和调控网络等几个方面进行简要综述。

## 1 精原干细胞的生物学特性

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是形成动物配子的前体, 在胚胎的发育过程中迁移到生殖嵴, 进而转化为性原细胞(gonocyte), 进一步在个体出生后性原细胞再发育为包括SSCs在内的未分化精原细胞<sup>[3]</sup>。单个型(A single)精原细胞能自我更新或者分裂形成由两个通过胞质桥相连的精原细胞, 即对称型(A paired, Apr)精原细胞。Apr继续分裂形成由4、8、16个细胞组成的链状排列型(A aligned, Aal)精原细胞。Aal通过连续6次的细胞分裂, 依次产生A2、A3、A4等中间型和B型精原细胞。B型精原细胞经过数次分裂后, 体积增大并分化为初级精母细胞, 再经过减数分裂产生圆形精子, 最终变形成为成熟的长型精子<sup>[4]</sup>。目前多数学者认为, 精原细胞群体中仅A single型精原细胞具有干细胞性质, 是真正意义上的SSCs。SSCs不仅能够通过自我更新产生新的SSCs, 维持自身数量的恒定, 而且能够在外来信号等调控下增殖分化为各阶段的生殖细胞, 最终产生精子。SSCs在体内相对数量极少, 仅占成体小鼠生殖细胞的0.02%~0.03%<sup>[5]</sup>。

## 2 精原干细胞的纯化培养与鉴定

SSCs的富集和纯化方法主要有: 差速贴壁法、免疫磁珠细胞分选法(magnetic activated cell sorting,

MACS)、流式细胞分选法(flow cytometry sorting method, FACS)、Percoll密度梯度离心法、重力沉降法、盘化法及隐睾手术富集法等<sup>[6-8]</sup>。目前, 最常用的是MACS细胞分选法。MACS法的关键是鉴定特异的SSCs表面抗原, 并利用这些特异性抗原进行筛选参数组合分选, 进而获得95%以上高纯度的SSCs。

早期小鼠SSCs体外培养研究中常选用DMEM、DMEM/F12和MEM等培养基。Izadyar等<sup>[9]</sup>用MEM培养牛SSCs也取得了不错的效果。Kanatsu-Shinohara<sup>[8]</sup>等使用StemPro-34SF和StemPro-34supplement, 建立了目前常用的、较完善的小鼠精原干细胞体外培养体系, 在保持SSCs长期存活的同时还维持了其分化的多能性。已经建立的多种哺乳动物的SSCs培养体系中, 为抑制SSCs分化和保持其增殖能力, 一般还使用MEF、Sertoli和STO等作为饲养层细胞。SSCs培养基需添加一系列促进细胞生长的物质, 如非必需氨基酸、丙酮酸钠、谷氨酰胺和 $\beta$ -巯基乙醇等, 同时还要添加细胞因子, 如胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和干细胞因子(stem cell factor, SCF)等。其中, 支持细胞分泌的GDNF对维持SSCs自我更新起非常关键的作用, 是体外培养体系中必须添加的细胞因子<sup>[10-12]</sup>。培养温度、血清、活性氧等也影响SSCs体外培养效率。SSCs培养一般添加1%以上的优质胎牛血清作为对基础培养基的补充。Kanatsu-Shinohara等<sup>[13]</sup>报道, SSCs在无饲养层细胞培养时, 必须加入血清才能生长增殖。但也有报道发现, 血清对SSCs的长期培养造成负面影响, 导致其分化<sup>[14-15]</sup>。最近, Hiroko等<sup>[16]</sup>培养小鼠SSCs后添加抑制活性氧功能的药物, 结果SSCs变得难以增殖。过剩的活性氧曾被认为会降低精子功能, 导致不育, 但上述实验结果中活性氧不足也会引发SSCs无法增殖。这个发现为治疗男性不育提供了新思路。

有关SSCs标记物的研究已取得丰硕的成果, 但大多数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的标记物研究相对滞后。现已鉴定了SSCs表达GPR125、PLZF、Neurogin3、Nanos2、E-cadherin、EpCam和GFRa1等多种基因

标记物<sup>[17-23]</sup>。最近研究显示, Fox转录因子家族成员Foxo1也是精原干细胞的表面标记物, 利用其进行免疫标记筛选能获得较好的富集效果。研究显示, Foxo1对于维持SSC稳定性和启动精子发生具有重要作用。缺乏Foxo1、Foxo3和Foxo4后SSC将不能自我更新, 说明Foxo3和Foxo4虽然不是雄性生殖过程中的必要因子, 但是对于SSC的功能维持中起不可缺少的作用<sup>[24-25]</sup>。虽然上述这些基因及其相应抗体可以用来鉴定SSCs, 但鉴定SSCs的金标准仍然是将获得的精原干细胞注入不能产生精子的受体睾丸曲细精管内, 检测接受注射后该受体睾丸是否产生供体来源的精子发生<sup>[1]</sup>。

### 3 精原干细胞的移植

SSCs移植到丧失生精能力的受体动物睾丸曲细精管内, 可产生供体来源的精子。自从1994年Brinster等<sup>[1]</sup>利用显微注射技术, 以LacZ基因为报告基因, 将正常小鼠的SSCs注射到白消安处理的小鼠曲细精管并成功产生供体来源的精子以来, SSCs移植技术得到了飞速的发展。SSCs移植技术目前已经比较完善, 技术路线分6个步骤进行: (1)供体SSCs的分离纯化; (2)SSCs体外培养处理; (3)包含SSCs的移植液的准备和冷冻保存; (4)受体动物的放疗处理或白消安杀死大部分内源性SSCs; (5)将移植液注入受体动物睾丸的曲细精管中; (6)受体动物睾丸中检测供体来源的生殖细胞和精子。啮齿类SSCs移植注射法通常采用睾丸输出管注射法、曲细精管注射法和睾丸网注射法。通常使用绿色荧光蛋白或LacZ基因标记的生精细胞作为供体细胞, 移植后经过一个以上生精周期即可用荧光显微镜或X-gal染色法较方便的检测供体SSCs在受体睾丸内的存活、增殖和分化情况。

SSCs移植技术包括同种移植和异种移植。同种移植是将一种动物睾丸中的SSCs移植到与它同种的另一个体中, 目前已经成功实现了小鼠<sup>[1]</sup>、大鼠<sup>[26-27]</sup>、牛<sup>[28-29]</sup>、猪<sup>[30]</sup>、狗<sup>[31]</sup>、羊<sup>[32]</sup>、猕猴<sup>[33]</sup>等物种的同种移植。异种移植是将一种动物睾丸中的SSCs移植到与它不同种的另一个体中。目前, 大鼠、兔、狗、猴、猪、牛、马以及人的睾丸生殖细胞移植到小鼠体内均获得成功<sup>[34]</sup>。SSCs移植能使睾丸受损伤的优良雄性个体恢复生育能力, 已成为精子发生和雄性遗传改造极有价值的研究工具。随着精原

干细胞移植技术的飞速发展, 在治疗男性不育方面有着广阔的临床应用前景。例如2012年, Orwig等<sup>[33]</sup>在猕猴进行常规使用的化疗药物治疗期间, 冷冻保存其SSCs, 化疗后再将这些SSCs注射到动物的睾丸中, 结果发现大多数接受移植的个体都能产生精子。他们还证明单个SSCs来源的精子能与卵细胞结合, 受精生成胚胎并发育成正常个体。这项工作是再生领域的一项里程碑成果, 为儿童癌症患者恢复生育能力带来了希望。

### 4 精原干细胞的体外分化潜能

人们不断尝试将SSCs体外分化形成精子。2011年, Sato等<sup>[35]</sup>用改进的无血清培养体系进行睾丸组织培养并观察到了精子的形成, 获得了圆形精子及具有尾部的精子。进一步通过圆形精子注射(round spermatid injection, ROSI)技术和卵胞浆内单精子显微注射(intra cytoplasmic sperm injection, ICSI)技术均获得了健康子代。6个月以后, Sato等<sup>[36]</sup>在体外成功地把小鼠SSCs诱导为精子, 为睾丸组织微环境异常导致的不育治疗提供了一个革命性的途径。Sato等<sup>[36]</sup>的一系列实验证明, 即使没有循环系统, 在适当条件下睾丸组织仍然能够为SSCs提供必要的微环境从而维持其自我更新和分化形成精子, 在此过程中同样观察到了移植后SSCs的归巢行为和集落形成能力。2012年, Kanatsu-Shinohara等<sup>[37]</sup>证实了SSCs的归巢行为和集落形成能力均与微环境分泌趋化因子有关, 其中GDNF和CXCL12[chemokine C-X-C motif ligand 12, 又称基质细胞衍生因子-1(stromal-derived factor-1, SDF-1)]是SSCs体内的趋化因子。这一结果为研究SSCs在曲细精管中的行为提供了线索, 也为ES或iPS等其他干细胞向生殖细胞的诱导研究提供新的思路<sup>[38-39]</sup>。

SSCs像其他成体干细胞一样具有体外向其他成体组织细胞转分化的潜能<sup>[40]</sup>。2004年, Kanatsu-Shinohara<sup>[41]</sup>等利用MEF作为饲养层细胞, 将新生小鼠SSCs培养于含有GDNF的培养液内, 4~7周后出现ES样细胞。该细胞在诱导ES细胞分化的条件下可以产生包括造血细胞、神经元细胞、肌细胞以及血管内皮细胞在内的多种成体细胞, 同样将该细胞注射到囊胚后能形成生殖系嵌合体。2006年, Guan等<sup>[42]</sup>证明成年小鼠SSCs也可在体外培养中诱导为ES细胞样细胞, 注射到囊胚后可成功传到子代的生殖细

胞中。2007年, Seandel等<sup>[26]</sup>发现, 小鼠SSCs可改变其精子发生的发育方向, 形成“多能成体精原干细胞(multipotent adult spermatogonial-derived stem cells, MASCs)”。MASCs具有三个胚层的分化潜能, 能够体外分化形成心肌细胞等多种细胞类型。2008年, Conrad等<sup>[43]</sup>从成人睾丸中成功分离培养SSCs, 体外培养后形成人ES样细胞。这些细胞可稳定地分化为分泌胰岛素的细胞或肌性细胞系、成骨细胞系及与神经细胞相似的细胞。将上述ES样细胞进行皮下移植时, 会在裸鼠体内形成畸胎瘤, 进一步证明了它们具有多能性, 也反映了这些细胞在再生治疗中所具有的潜力。

## 5 精原干细胞增殖分化的调控

干细胞微环境(stem cell niche)是体内成体干细胞的集中存储部位, 是由特定的细胞外基质及周围细胞所组成的特殊的微环境, 在维持干细胞的增殖和定向诱导分化中起关键作用。微环境能够提供干细胞的自我更新所需的各类细胞因子, 并具有排除那些已发生分化干细胞的功能。已知, SSCs的微环境非常复杂, 其构成可能包括SSCs周围的支持细胞、间质细胞、管周肌样细胞、血-睾屏障及周围血管网等成分以及结合在胞外基质上的多种生长因子和细胞因子等<sup>[44]</sup>。支持细胞所分泌的GDNF因子在调节SSCs更新增殖中起关键作用。SSCs微环境中生长因子和其他活性分子的合成和更新受到内分泌激素和睾丸组织细胞分泌的多种细胞因子的调控。全身性内分泌因子也通过血液循环作用于SSCs微环境, 这暗示着SSCs及其微环境可能十分靠近脉管系统。Yoshida等<sup>[45]</sup>对*Ngn3-GFP*转基因小鼠中的未分化精原细胞进行定位和追踪研究。结果显示, 随着时间的推移分化的精原细胞从靠近脉管系统的曲细精管区域随机迁移到了其他区域, 同时PLZF标记的未分化精原细胞非常接近间质间隙。这一结果提示, 间质细胞产生的或通过血液运输来的因子对SSCs的自我更新和分化起着重要作用。2012年, Kanatsu-Shinohara等<sup>[37]</sup>把小鼠SSCs接种到不育小鼠的睾丸细胞后SSCs迁移到血睾屏障内的微环境中, 并形成鹅卵石样的集落。这种集落的形成依赖于GDNF和CXCL12, 并发现GDNF能上调CXCL12受体的表达。另外, CXCL12在支持细胞的转染能够提高SSCs的归巢率, 说明微环境提供的GDNF和

CXCL12在SSCs的自我更新和分化中扮演着重要的角色。

GDNF是转化生长因子(TGF- $\beta$ )超家族成员, 在体内SSCs的自我更新中起着关键作用, 而其受体c-Ret和GFR $\alpha$ 1则由SSCs表达<sup>[46-47]</sup>。GDNF参与SSCs自我更新和分化的旁分泌调节。研究显示, 低剂量的GDNF导致精原细胞过度分化和损耗; 而高剂量的GDNF会促进SSCs自我更新, 并抑制其分化。支持细胞所分泌的GDNF还可以以自分泌方式促进自身的分裂增殖, 并促进睾丸发育。Hofmann等<sup>[48]</sup>利用6 d龄小鼠GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup>精原细胞研究了GDNF对其他基因的调控作用, 通过使用添加GDNF的培养液培养10 h, 发现与对照组相比, 受GDNF调控的基因多达1 100多个。其中, 已被确定的对SSCs有调控作用的内源性因子主要有Ets转录相关因子(Ets-related molecule, Erm)、原癌基因*Bcl6*表达蛋白(B-cell CLL/lymphoma 6-member B, Bcl6b)、LIM同源框1(LIM homeobox 1, Lhx1)、Pou3f1(POU domain, class-3 transcription factor 1)及淋巴瘤细胞DNA结合抑制因子4(inhibitor of DNA binding, ID4)等。在小鼠睾丸内, 支持细胞专一性地表达*Erm*并参与SSCs自我更新的调控<sup>[49]</sup>。敲除*Erm*的小鼠睾丸中Gonocyte、SSCs等生殖细胞整体丢失, 仅支持细胞留存, 导致寡精症<sup>[50-51]</sup>。2007年, Oatley等<sup>[52]</sup>发现, 降低Lhx1的转录水平可使SSCs增殖明显受到抑制。2010年, Xin等<sup>[53]</sup>发现, 降低*Pou3f1*基因的表达水平可使SSCs数量显著减少, 生殖细胞凋亡加快。Oatley等<sup>[54]</sup>发现, ID4只在小鼠部分As型精原细胞中表达, 用siRNA干扰技术降低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。

有些不依赖GDNF调控的内源性因子也在SSCs自我更新中扮演着重要角色, 如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<sup>[55]</sup>。目前已证明, Plzf是绵羊、人、恒河猴、猪的未分化精原细胞的标记分子<sup>[56-59]</sup>。Plzf可以通过拮抗哺乳动物雷帕霉素靶蛋白1(mammalian target of rapamycin 1, mTOR1)而调节SSCs的自我更新(图1)。mTORC1是由哺乳动物雷帕霉素靶点蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)所组成的

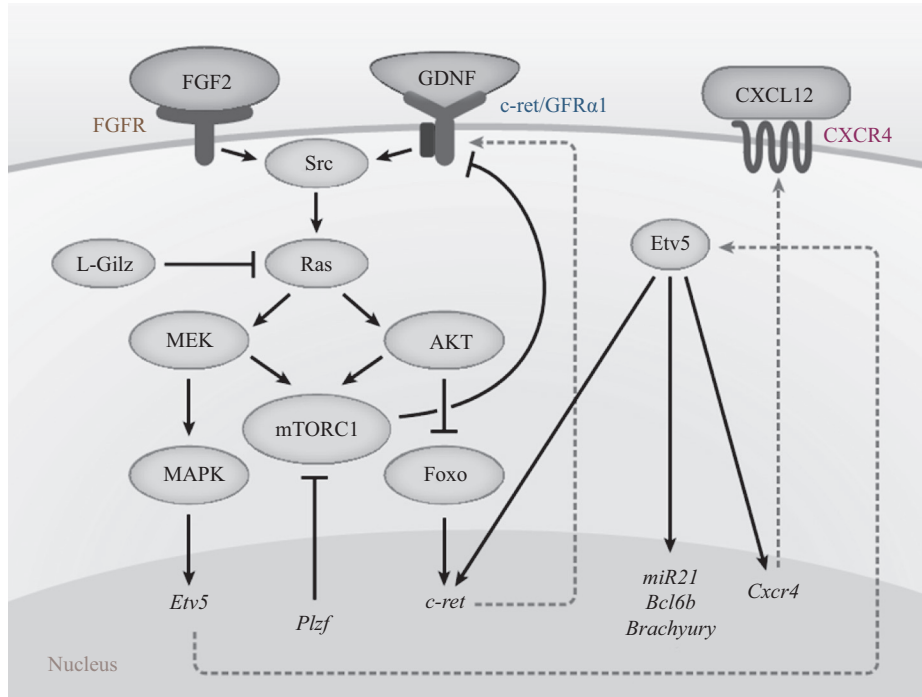


图1 小鼠SSCs自我更新的分子调控网络示意图(根据参考文献[60]修改)

Fig.1 Molecular mechanisms regulating spermatogonial stem cells (SSCs) self-renewal in mice (modified from reference [60])

两种蛋白复合物之一,在调控细胞增殖过程中发挥核心作用。SSCs敲除*Plzf*可增强mTORC1活性,而mTORC1的异常活化能抑制SSCs表面受体与GDNF结合,而*Plzf*通过诱导表达mTORC1的抑制剂——*Redd1*来降低mTORC1的活性。因此,mTORC1-*Plzf*功能互补是SSCs自我更新和分化的重要调解途径之一<sup>[61]</sup>。GDNF对SSCs的自我更新主要通过PI3K/AKT、SFK、MAPK、MEK/ERK等多种信号通路的调控来实现<sup>[62]</sup>。GDNF通过与SSCs细胞膜受体GFR $\alpha$ 1、C-Ret受体复合物结合,进而启动细胞内SSCs自我更新相关的多种信号通路(图1)。在精原细胞中GDNF是在其受体GFR $\alpha$ 1存在的条件下激活酪氨酸激酶RET以发挥其生物学效应的。首先,GDNF与其相应的GFR $\alpha$ 1蛋白结合,形成高亲和力复合物,然后该复合物再与两分子RET结合,引起RET结构域的酪氨酸残基相互磷酸化,使信号转入细胞内。RET具有典型的胞内激酶结构域,该处具有12个自磷酸化位点,可以活化AKT和MEK等多个信号通路。用抑制剂阻断信号通路中的AKT后可导致SSCs的凋亡,并引起其数目迅速减少。通过SFK信号通路刺激SSCs中维持生存的调控因子,如*Etv5*、*Bcl6*、*Lhx1*和*Foxo*等的合成,也能间接起到维持SSCs生存的作用<sup>[53]</sup>。

bFGF在神经细胞中对GDNF起协同作用。睾丸中bFGF由支持细胞、间质细胞、生殖细胞分泌。研究发现bFGF上调支持细胞分泌的GDNF,参与SSCs的自我更新调控(图1)。培养体系中添加bFGF促使SSCs在饲养层上形成集落<sup>[63-64]</sup>。SSCs培养基中添加bFGF能诱导MAPK1/3的磷酸化,然而添加MAP2K1的抑制剂PD0325091能减少生殖干细胞的增殖和MAPK1/3的磷酸化。用激活型的MAP2K1转染SSCs后不仅能上调*Etv5*和*Bcl6b*基因的表达,而且此时的SSCs增值不依赖于bFGF。结果说明,bFGF通过MAP2K1信号通路上调*Etv5*和*Bcl6b*基因来调节SSCs的自我更新<sup>[65]</sup>。

Nodal是转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族成员。He等<sup>[66]</sup>研究发现,Nodal在SSCs与其祖细胞中表达,但在分化的精原细胞和支持细胞中不表达。Nodal受体抑制剂SB431542能阻断SSCs增殖,通过RNA干扰技术抑制Nodal可导致SSCs的凋亡和停止分裂。相反,Nodal过表达后SSCs的增殖显著提高。

Wnt信号途径中的一些信号分子与SSCs自我更新密切相关,如*Wnt5a*和*Wnt3a*。Wnt信号途径基本上可以分为依赖 $\beta$ -catenin和不依赖 $\beta$ -catenin两种方式。Yeh等<sup>[67]</sup>报道,*Wnt5a*在小鼠支持细胞中

表达, 而Wnt5a的受体Fzd、LRP5/6在SSCs上有表达。阻断Wnt信号通路可以引起SSCs凋亡, 从而显著减少SSCs集落的形成。另外, SSCs培养基中添加Wnt5a可以显著增加其总数, 结果显示Wnt5a通过不依赖 $\beta$ -catenin的信号通路促进SSCs的自我更新和增殖。但Golestaneh等<sup>[68]</sup>的结果显示, Wnt3a通过依赖 $\beta$ -catenin的信号通路提高SSCs的自我更新。2012年, Yeh等<sup>[69]</sup>研究发现, Wnt3a选择性地激活已开始出现分化迹象的祖细胞或SSCs的增殖, 导致生殖细胞总体数量的显著增多。

## 6 展望

SSCs是成年雄性哺乳动物体内在自然状态下唯一能产生精子并将遗传信息传递给子代的成体干细胞。SSCs能够进行体外培养、冷冻保存和遗传修饰及同种或异种移植的生物学特性, 这些特性将有助于解开精子发生的机理。理论上, SSCs可在体外大量增殖, 从而为细胞移植提供足够的来源, 还可在体外定向诱导为特定的细胞, 再植入受体达到修复损伤、治疗疾病的目的, 是雄性不育治疗、转基因动物生产以及珍稀濒危动物物种保护等领域中理想的细胞来源。目前, 有关SSCs自我更新和分化的调控机理仍然是本领域研究的一个薄弱环节。本文从SSCs的生物学特性、移植、培养和鉴定方法的研究进展入手, 重点阐述了SSCs微环境、GDNF和其他相关信号通路对SSCs自我更新和分化中的调控作用。该领域的研究成果将对精子发生机制的深入阐明、人类不育疾病的治疗、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 Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11298-302.
- 2 Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Wu J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 11(5): 631-6.
- 3 de Rooij DG. Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(21): 7939-40.
- 4 de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2001; 121(3): 347-54.
- 5 Weiss L. *Histology: Cell and tissue biology*, 5th ed. New York: Elsevier Science Publishing 1983, 1056-61.
- 6 Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models. *Dev Biol* 2000; 220(2): 401-11.
- 7 Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod* 2004; 70(1): 70-5.
- 8 Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Shinohara T, *et al.* Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 612-6.
- 9 Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 2002; 124(1): 85-94.
- 10 Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Shinohara T, *et al.* Genetic and epigenetic properties of mouse male germ line stem cells during long-term culture. *Development* 2005; 132(18): 4155-63.
- 11 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): 9524-9.
- 12 Hofmann MC. GDNF signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 288(1/2): 95-103.
- 13 Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Shinohara T, *et al.* Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum or feeder-free conditions. *Biol Reprod* 2005; 72(4): 985-91.
- 14 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(47): 16489-94.
- 15 HamraFK, ChapmanKM, NguyenDM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stemcells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(48): 17430-5.
- 16 Morimoto H, Iwata K, Ogonuki N, Inoue K, Atsuo O, Kanatsu-Shinohara M, *et al.* ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2013; 12(6): 774-86.
- 17 Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falcatori I, Kim J, Rafii S, *et al.* Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125<sup>+</sup> germline progenitors. *Nature* 2007; 449(7160): 346-50.
- 18 Buafs FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, de Rooij DG, Braun RE, *et al.* Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2004; 36(6): 647-52.
- 19 Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, Abe K, Wakabayashi J, Nabeshima Y, *et al.* Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev Biol* 2004; 269(2): 447-58.
- 20 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): 1394-8.
- 21 Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod* 2007; 76(1): 130-41.
- 22 Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell* 2007; 12(2): 195-206.
- 23 Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Ishii K, Shinohara T. Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. *PLoS One* 2011;

- 6(8): e23663.
- 24 Goertz MJ, Wu Z, Gallardo TD, Hamra FK, Castrillon DH. Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *J Clin Invest* 2011; 121(9): 3456-66.
- 25 Ngo D, Cheng Q, O'Connor AE, DeBoer KD, Lo CY, Morand EF. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) regulates testicular FOXO1 activity and spermatogonial stem cell (SSC) function. *PLoS One* 2013; 8(3): e59149.
- 26 Jiang FX, Short RV. Male germ cell transplantation in rats: Apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia. *Int J Androl* 1995; 18(6): 326-30.
- 27 Ogawa T, Dobrinski I, Brinster RL. Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue Cell* 1999; 31(5): 461-72.
- 28 Herrid M, Vignarajan S, Davey R, Dobrinski I, Hill JR. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. *Reproduction* 2006; 132(4): 617-24.
- 29 Izadyar F, den Ouden K, Stout TA, Stout J, Coret J, de Rooij DG, *et al.* Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2003; 126(6): 765-74.
- 30 Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod* 2002; 66(1): 21-8.
- 31 Kim Y, Turner D, Nelson J, Dobrinski I, McEntee M, Travis AJ. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog. *Reproduction* 2008; 136(6): 823-31.
- 32 Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. *Mol Reprod Dev* 2003; 64(4): 422-8.
- 33 Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Orwig KE. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell* 2012; 11(5): 715-26.
- 34 Honaramooz A, Yang Y. Recent advances in application of male germ cell transplantation in farm animals. *Vet Med Int* 2011; doi: 10.4061/2011/657860.
- 35 Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogawa T, *et al.* *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011; 471(7339): 504-7.
- 36 Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogawa T, *et al.* *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun* 2011; 2: 472.
- 37 Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Takashima S, Takehashi M, Ogonuki N, Shinohara T, *et al.* Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. *Cell Stem Cell* 2012; 11(4): 567-78.
- 38 Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 2011; 146(4): 519-32.
- 39 Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, Saitou M. Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors *in vitro*. *Nature* 2013; 501(7466): 222-6.
- 40 Kee K, Pera RA, Turek PJ. Testicular germline stem cells. *Nat Rev Urol* 2010; 7(2): 94-100.
- 41 Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Shinohara T, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119(7): 1001-12.
- 42 Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Hasenfuss G, *et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440(7088): 1199-203.
- 43 Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Skutella T, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456(7220): 344-9.
- 44 de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech* 2009; 72(8): 580-5.
- 45 Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 2007; 317(5845): 1722-6.
- 46 Spinnler K, Köhn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A. Glial cell line derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum Reprod* 2010; 25(9): 2181-7.
- 47 He Z, Jiang J, Hofmann MC, Dym M. Gfra1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biol Reprod* 2007; 77(4): 723-33.
- 48 Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol* 2005; 279(1): 114-24.
- 49 Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, *et al.* ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* 2005; 436(7053): 1030-4.
- 50 Schlessner HN, Simon L, Hofmann MC, Murphy KM, Murphy T, Cooke PS, *et al.* Effects of ETV5 (ets variant gene 5) on testis and body growth, time course of spermatogonial stem cell loss, and fertility in mice. *Biol Reprod* 2008; 78(3): 483-9.
- 51 Tyagi G, Carnes K, Morrow C, Kostereva NV, Ekman GC, Cooke PS, *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.
- 52 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.
- 53 Wu X, 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.
- 54 Oatley MJ, Kaucher AV, Racicot KE, Oatley JM. Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biol Reprod* 2011; 85(2): 347-56.
- 55 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.
- 56 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.
- 57 He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation,

- characterization and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod* 2010; 82(2): 363-72.
- 58 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.
- 59 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.
- 60 Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013; 29: 163-87.
- 61 Hobbs RM, Seandel M, Falcatori I, Rafii S, Pandolfi PP. Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. *Cell* 2010; 142(3): 468-79.
- 62 He Z, Kokkinaki M, Dym M. Signaling molecules and pathways regulating the fate of spermatogonial stem cells. *Microsc Res Tech* 2009; 72(8): 586-95.
- 63 Ebata KT, Yeh JR, Zhang X, Nagano MC. Soluble growth factors stimulate spermatogonial stem cell divisions that maintain a stem cell pool and produce progenitors *in vitro*. *Exp Cell Res* 2011; 317(10): 1319-29.
- 64 Zhang Y, Wang S, Wang X, Liao S, Wu Y, Han C. Endogenously produced FGF2 is essential for the survival and proliferation of cultured mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res* 2012; 22(4): 773-6.
- 65 Ishii K, Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development* 2012; 139(10): 1734-43.
- 66 He Z, Jiang J, Kokkinaki M, Dym M. Nodal signaling via an autocrine pathway promotes proliferation of mouse spermatogonial stem/progenitor cells through Smad2/3 and Oct-4 activation. *Stem Cells* 2009; 27(10): 2580-90.
- 67 Yeh JR, Zhang X, Nagano MC. Wnt5a is a cell-extrinsic factor that supports self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 14): 2357-66.
- 68 Golestaneh N, Beauchamp E, Fallen S, Kokkinaki M, Uren A, Dym M. Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction* 2009; 138(1): 151-62.
- 69 Yeh JR, Zhang X, Nagano MC. Indirect effects of Wnt3a/ $\beta$ -catenin signalling support mouse spermatogonial stem cells *in vitro*. *PLoS One* 2012; 7(6): e40002.