

Niche调控精原干细胞命运

王峰 王善林 陈征 安娜 袁丽芳 李宗悦 朱宝长*

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要 正常的精子发生是一个由多种因子参与的精密、有序调控的生理过程。精原干细胞的自我更新维持了精原干细胞本身数量的稳定, 而其分化成为精原祖细胞的节奏保障了形成精子的规模。睾丸微环境(niche)在精原干细胞自我更新和分化过程中起着举足轻重的作用。该文简要描述了精子发生过程中精原干细胞及其微环境形成过程中所涉及的主要细胞因子及其调控机制, 并探讨了该研究过程中所遇到的问题, 最后展望了相关基础研究在临床医疗和科学研究领域中的应用前景。

关键词 微环境; 精原干细胞; 精子发生; 细胞因子

The Niche Regulate Fate of Spermatogonial Stem Cells

Wang Feng, Wang Shanlin, Chen Zheng, An Na, Yuan Lifang, Li Zongyue, Zhu Baochang*

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract The spermatogenesis is sophisticatedly regulated by many growth factors. Self-renewal of spermatogonial stem cells maintain their own population, while, differentiations of SSCs ultimately provide enough mature sperms. SSC activities are regulated by their niche microenvironment. Stem cell niches are formed by contributions of surrounding cells that provide a milieu of growth factors and specialized microarchitecture to promote self-renewal and differentiation of stem cells. In this review, our attempts have been made to focus on new knowledge about niche microenvironment and factors that control self-renewal and differentiation of spermatogenesis. In addition, perspective study for medical care and research fields are discussed briefly.

Key words niche; spermatogonial stem cells; spermatogenesis; cell factors

精子发生紊乱可以导致雄性不育^[1], 大概15%的夫妻受到不孕症的困扰, 其中男性因素占到了近一半^[2]。哺乳类雄性需要持续不断地产生大量的精子才能维持正常的生育能力, 而实现大规模产生精子的细胞学基础就是睾丸内存在着可以不断自我更新并适时分化为各阶段生殖细胞的干细胞, 称为精原干细胞(spermatogonia stem cells, SSCs)。研究

人员一直希望通过研究精原干细胞自我更新与分化的调控机制, 寻找治疗精子发生障碍引起的男性不育的手段。科学家通过对干细胞领域多年的研究意识到, 虽然干细胞具有分化为各种细胞的能力, 但是, 成功地实现这种能力却取决于干细胞发育的微环境(niche)。Niche最初来源于生态学名词, 在细胞生物学理论中, 最初提出是为了解释造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)移植后的行为^[3], 现在已经延伸到所有具备干细胞自我更新的组织^[4], 在这些组织中niche都被一种支持细胞严格调控。睾丸niche泛指精子发生所涉及的所有局部环境, 又与内分泌环境有所区别。目前, 精原干细胞niche主要是指调控其自我更新(未分化状态)及分化为各级生殖细胞(分化状态)动态平衡状态的微环境, 然而, 研

收稿日期: 2014-03-17 接受日期: 2014-06-11

国家自然科学基金(批准号: 30870934)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-68903623, E-mail: baochang@cnu.edu.cn

Received: March 17, 2014 Accepted: June 11, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30870934)

*Corresponding author. Tel: +86-10-68903623, E-mail: baochang@cnu.edu.cn

网络出版时间: 2014-09-26 15:02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0079.html>

研究人员对于niche的定义还不完全一致, 主要分为广义上和狭义上的定义。广义上的niche环境是指调控精原干细胞发生的所有因子所构成的环境, 这些因子包括睾丸内支持细胞(sertoli cells)、间质细胞(leydig cells)、管周肌样细胞等体细胞及其所分泌的因子, 也包括血液中所携带的内分泌因子。狭义的niche则仅指与精原干细胞直接相邻的细胞, 如支持细胞、管周肌样细胞等形成的基底室环境结构。多年来, 科学家通过体外研究试图诱导精原干细胞产生精子但均未实现, 而将其移植到睾丸后则能顺利产生具有受精能力的精子, 突显了niche在精子发生过程中的重要作用。Niche可以根据生理需求来调整精原干细胞自我更新与分化之间的平衡, 维持雄性生殖系统稳态。本文从niche的构成出发, 对精原干细胞维持自我更新和分化过程中所涉及的相关调控机理以及近年来研究中遇到的主要瓶颈作一扼要的叙述, 并对其相关研究的应用前景进行展望。

1 精原干细胞微环境的构成

了解睾丸独特的结构是理解生殖细胞和niche环境相互作用及维持精子发生的关键。哺乳动物的睾丸结构可以分为生精小管和管外间质组织。生精小管由管腔与生精上皮构成, 支持细胞位于生精上皮, 主要为精子发生提供调控微环境以及免疫豁免环境。支持细胞间的紧密连接形成血睾屏障(blood-testis barrier), 该结构将生精上皮分为两部分, 靠近基底膜部分被称为基底室, 靠近管腔的部分则称为近腔室, 精子发生的有丝分裂在基底室完成, 而减数分裂则在近腔室完成。生精上皮中支持细胞除了为精子形成提供支撑(包括所需物质和能量等)以外, 还根据机体需要负责调控精子发生。虽然, 科学家对血睾屏障在精子发生过程中的意义还有不同的看法, 但是, 研究已经表明它对睾丸精子发生是必需的条件, 任何能够损害血睾屏障的因素最终都会导致精子发生过程的异常^[5-7], 只不过它的影响发生在减数分裂过程中, 对SSCs并无直接影响。关于线虫的研究表明, 精原干细胞(SSC)在分裂形成两个子细胞的过程中, 与支持细胞直接接触的子细胞保持为未分化的干细胞状态, 另一个离开了支持细胞的子细胞则启动了分化机制^[8], 因此, 有学者认为, 支持细胞是维持精原干细胞未分化状态的重要细胞。但是, 哺乳动物的情况更为复杂, 各级生殖细胞在精子

发生的整个过程中都与支持细胞保持着直接接触, 故其niche尚未被精确定位。尽管如此, 精原干细胞移植实验发现, 精原干细胞导入到生精小管管腔之后, 它必须迁移到与基底膜相接触的支持细胞之间的位置(归巢, homing), 才能重新启动其自我更新的增殖过程, 否则就会凋亡, 进而被支持细胞吞噬掉^[9], 说明基底膜与支持细胞之间存在着维持精原干细胞自我更新所需要的niche。Yoshida等^[10]通过neurogenin3标记实时定位跟踪精原细胞, 显示精原干细胞更倾向于定位在生精小管基底膜与间质血管系统相邻而不是与其他生精小管相邻的位置, 提示除了支持细胞以外, niche还与来源于血管附近的某些因子有关。尽管作为niche组成的因子尚未统一, 但是, Otaley等^[11]发现, 睾丸间质细胞能够通过分泌克隆促进因子1(colony stimulating factor 1, CSF1)直接影响精原干细胞的自我更新, 说明哺乳动物睾丸niche的细胞组成除了与精原干细胞直接接触的支持细胞和管周肌样细胞外, 间质细胞也可能成为niche的组成部分, niche的定义还有进一步扩大的趋势。

精原干细胞可以按照核形态等特征被分为不同类型(图1)。在生精小管中, A型精原细胞定位在基底室, 按照干细胞特性, 可以将A型精原细胞群分为未分化型和分化型精原细胞。A single(As)型精原细胞分布在生精小管基底室, 目前普遍认为, As型精原细胞包含精原干细胞群^[12]。成年小鼠睾丸中As型精原细胞数量大概是35 000, 真正的精原干细胞只是这些细胞中的一小部分^[13]。As型精原细胞是否保持精原干细胞特性, 取决于As型精原干细胞分裂为As型精原细胞还是A paired(Apr)型精原细胞^[14], Apr至A aligned(Aal)型精原细胞不进行完整的细胞分裂, 通过细胞间的胞桥依然连接在一起, 目前普遍认为, A1型精原细胞是分化完全的细胞^[15](图1)。灵长类A dark(Ad)型和A pale(Ap)型精原细胞均包括精原干细胞, Ap是激活型的精原细胞, Ad是储备的静止型精原细胞^[16], Ad/Ap两种细胞具有相似的表面标记^[17], Ad型精原细胞分裂为Ad型精原细胞或者Ap型精原细胞, 目前还不清楚Ad/Ap两类型精原细胞中精原干细胞的比率。上述概念是人们经过多年研究形成的经典认识, 然而, 它有可能需要被重新认识。Sharma等^[18]通过精原干细胞实时活体标记技术观察到, 裂解成单细胞的Aal型精原细胞将会转分化为As型精原细胞, 说明精原干细胞并不是一个匀质群体,

而是在niche的调控下可以相互转变。也有人认为, Aal精原细胞中一些细胞行使niche功能, 也能同时具有干细胞特性^[19], 这些争论还需要具体的实验证明。目前, 精原干细胞是从其可以维持自我更新并分化为后续类型细胞的功能方面来界定的, 还缺乏相应的细胞表面标记物来认定它, 所以目前还没有实验证据表明精原干细胞在分化为非精原干细胞的过程中是否存在一个明确的标志。

目前看来, niche并非是一个简单的精原干细胞生存环境, 它必须具备相应睾丸细胞组成的特定三维空间结构, 同时各个细胞间紧密配合形成对精原干细胞从自我更新到分化为成熟精子的全过程的调控, 也就是说, 精子发生过程是在niche严格有序的调控下进行的, 表现在睾丸生精小管出现特定的生精上皮周期(如小鼠XII期), 而特定的周期在生精小管横截面上又具有固定的生殖细胞类型组成。生精细胞分化过程中生殖细胞极性建立, 细胞形态发生形变, 位置向生精小管近腔室方向迁移^[20]。维持自我更新的精原干细胞会继续留在niche环境中, 而分化的精原干细胞则穿过紧密连接向近腔室移动, 最终形成精子。尽管该过程中的主导因素尚不清楚, 但近期研究显示, 由支持细胞生成的胶质细胞神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)

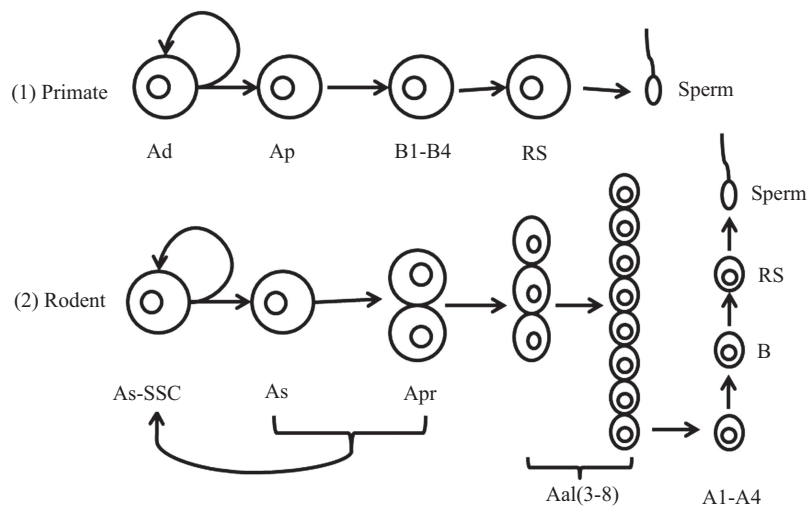
对诱导生殖细胞的迁移发挥着重要的作用^[21]。在精原干细胞移植实验中, 干细胞并未直接导入niche中, 而是导入生精小管管腔中, 所以, 精原干细胞要经历一个归巢的过程, 也就是从管腔向基底膜方向的迁移, 该过程也伴随着睾丸GDNF水平的升高, 提示该过程可能受到支持细胞的严密调控。此外, 有研究发现, 精原干细胞和支持细胞表面的黏附分子在细胞迁移过程中也发挥着重要的作用, 如整合素(beta1-integrin)缺失会阻断上述归巢过程^[9]。研究精原干细胞自我更新与分化间的调节机制, 其核心就是找到调控精原干细胞有丝分裂为两个精原干细胞还是成为分化型精原细胞, 并形成成熟精子的条件。对niche的这条研究之路才刚刚起步。

2 影响精子发生的调控因子

Niche环境对于精子发生的调控主要是调整精原干细胞的自我更新和分化间的平衡。目前研究证实, niche既可以维持精原干细胞自我更新、抑制分化, 也可以在特定时期促进精原干细胞分化补充精子发生。Niche通过不同种类细胞因子的动态平衡, 严格有序地调控整个精子发生的过程。

2.1 维持精原干细胞自我更新的因子

维持精原干细胞自我更新能力可以保证睾丸



A型精原细胞无法通过光学显微镜检测到异染色质, 啮齿类中A型精原细胞包括A single(As)、A paired(Apr)和A aligned(Aal)亚型, 灵长类As细胞根据细胞核形态又可分为A dark(Ad)和A pale(Ap)两类。B型精原细胞有大量异染色质, 可以分化形成圆形精子细胞(round sperm, RS)。在啮齿类精子发生过程中, A1精原细胞是起始分化的精原细胞, 经过一系列有丝分裂形成精子细胞, 最终形成精子。

Heterochromatin of type A spermatogonia can not be detected by optical microscope. Rodent type A spermatogonia include A single (As), A paired (Apr) and A aligned (Aal) subtypes. Primate type A spermatogonia can be divided into A dark (Ad) and A pale (Ap) based on nuclear morphology. Differentiated type B spermatogonia contains a lot of heterochromatin, and it can be differentiated to round sperm (RS). Studies suggested that rodents A1 spermatogonia are initial differentiated spermatogonia, and followed a series mitosis to form sperm.

图1 灵长类与啮齿类精子发生过程

Fig.1 Spermatogenesis in rodent and primate

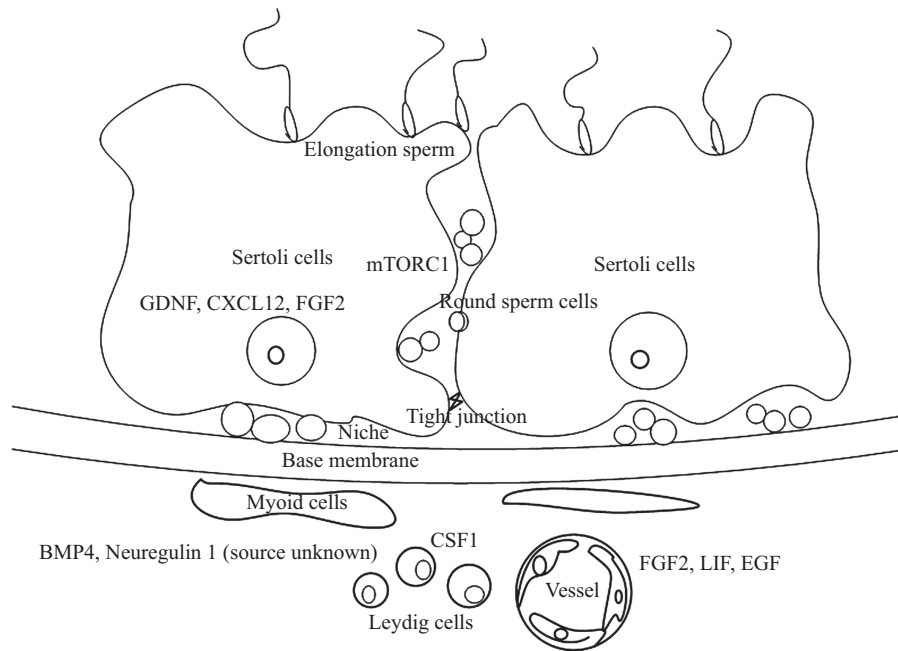
内持续的产生精子, niche环境中包含着维持精原干细胞自我更新能力的所有因子。GDNF最初在研究神经祖细胞群动态平衡的调控过程中被发现^[22]。支持细胞分泌的GDNF调控精原干细胞维持自我更新, 成年小鼠敲除GDNF导致老化过程中生殖细胞明显减少, 小鼠过表达GDNF后精原细胞积累过量, 最后形成生殖细胞瘤, 生精小管包含大量未分化精原细胞而缺少分化的精原细胞, 这些研究说明, GDNF能够维持精原干细胞未分化状态^[23]。通过将年轻和年老小鼠循环系统连体研究发现, 年轻小鼠可以支持肌肉和造血干细胞niche环境的更新^[24]。通过精原干细胞移植实验证实, 年轻小鼠的niche环境也可以促进老龄小鼠精原干细胞的增殖^[23]。将GDNF加入到化学成分确定的无血清培养基中, 可以促进小鼠精原干细胞扩增^[25]。以大鼠和兔子为对象的研究也显示, GDNF对于精原干细胞维持自我更新很重要^[26], 这表明对于大多数哺乳动物来说, 可能普遍存在GDNF调节精原干细胞自我更新的现象^[32]。GDNF的两种受体复合物c-RET和GFR1不仅仅在As型精原细胞表达, 也在Apr型和Aal型精原细胞表达^[27]。根据精原干细胞发育阶段不同, 精原细胞c-RET和GFR1的表达量也不同, 说明As型至Aal型精原细胞的发育过程均需要GDNF的调控^[35]。支持细胞中CXCL12的过表达可以增加精原干细胞自我更新效率^[28]。新生小鼠CXCL12在支持细胞中的表达及其受体CXCR4在精原细胞群的表达均多于成年小鼠, CXCL12可能参与维持精原干细胞自我更新过程。Kubota等^[25]发现, 同时使用成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)和GDNF可以促进C57和其他品系小鼠来源的精原干细胞生长。有研究发现, 加入GDNF与表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)到无血清培养基可以支持DBA小鼠长期的精原干细胞增殖^[29]。细胞克隆促进因子1(CSF1)最初是在研究间质细胞促进精原细胞增殖机制的过程中发现的。将CSF1加入到体外培养体系中, 观察到其特异性促进精原干细胞的自我更新作用^[11]。小鼠睾丸中未分化精原细胞基因表达分析显示, *Csf1r*基因及相应的配体CSF1可以调控精原干细胞功能^[25]。添加CSF1培养21 d后精原干细胞数量明显上升^[11]。所有这些都说明, 除了支持细胞外, 间质细胞对niche可能也有贡献。然而, 间质细胞分泌雄激素并不能直接作用于生殖细胞, 因为雄激素受体仅存在睾丸内的体细胞(如支

持细胞和间质细胞), 一般认为间质细胞可能是通过雄激素来影响支持细胞, 而后者再通过各种细胞因子来调节精原细胞的功能。早幼粒细胞白血病锌指蛋白(promyelocytic leukemia zinc finger, PLZF)在精原干细胞中有表达, 敲除PLZF可以抑制GDNF受体表达进而抑制GDNF应答^[30], 说明精原细胞对niche也可能有某种影响, 这种调节对于精子发生受损后的恢复具有显著的作用。

2.2 启动精原干细胞分化的因子

生长因子调控精原干细胞分化, 启动精子发生形成精原祖细胞。这种诱导分化的机制是非常严格的。解密这些信号途径是一个艰巨的任务, 由于缺少一致的标记分子区分精原干细胞和分化的精原细胞而阻碍了相关机制的研究。培养精原干细胞时, 加入Activin A或者骨形成蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)使精原干细胞数量降低, 这两种因子也许具有促进精原干细胞分化的作用。在小鼠睾丸中精原细胞表达BMP4受体, 在精原细胞培养基中加入BMP4可以促进生殖细胞分化^[31]。对大鼠未分化精原细胞的研究发现, 一种小鼠胎儿成纤维细胞系STOSNL用作饲养层细胞可以促进链状细胞形成, 加速精原干细胞和Apr型精原细胞分化。支持细胞系MSC-1作为饲养层培养精原细胞并没有形成链式的精原细胞。将STOSNL细胞分泌的Neuregulin 1添加到MSC-1作为饲养层的培养液中, 发现Neuregulin 1可以促进精原细胞链形成, 认为Neuregulin 1是精原细胞体外形成链状的调控因子, 但是Neuregulin 1在体内影响精原细胞分化的证据还没有检测到^[32]。mTORC1(mammalian TOR complex 1)可以通过磷酸化核糖体蛋白促进细胞分化, 研究发现, mTORC1上调可以抑制GDNF作用, 进而促进精原干细胞分化^[33]。最近的研究表明, SOHLH1和SOHLH2可以通过抑制全能性因子Kit来促进精原干细胞分化^[34]。关于niche调控精原干细胞的分化机制的研究并不是很充分, niche对于精原干细胞分化调控的机制目前也不是很清楚, 很多因子的作用还不明了, 控制精原干细胞分化成为精母细胞的机制还需要深入的研究。

精原干细胞命运由体细胞提供的niche环境决定, 在特定的niche环境中干细胞保持着自我更新和分化之间的平衡, 精原干细胞和分化的生殖细胞维持相对稳定的数量比, 这样既可以维持干细胞稳态



示意图简要地表示了精原细胞与niche微环境间的关系,后者主要包括各种调控精原干细胞增殖和分化的因子,如由支持细胞分泌的GDNF、FGF2、CXCL12等,间质细胞分泌的CSF1、睾酮等,以及血液及周围体液含有的Neuregulin 1、Activin A、BMP4和SOHLH等因子。同时,也标明了精原干细胞及其相邻细胞的相对位置,如支持细胞、管周肌样细胞等形成的基底室结构。

Relationship between spermatogonia and niche factors was presented briefly in fig.2. Various regulatory factors of spermatogonial stem cell proliferation and differentiation in niche were marked in the figure. At the same time, the arrangement of spermatogonial stem cells and somatic cells in the testis was showed in this figure.

图2 精子发生调控的作用因子

Fig.2 Factors in spermatogenesis regulation

又可以促进分化维持精子发生。综上所述,目前研究发现,促进精原干细胞自我更新的niche因子主要包括GDNF、FGF2和CSF-1等,Neuregulin 1、Activin A、BMP4和SOHLH等因子可以促进精原干细胞分化,而生殖细胞自身也可以根据niche环境来调控自身的因子如*PLZF*、*mTORC1*等基因的表达,缺少这些因子精子发生将会受阻(图2)。这些因子是否在所有哺乳动物体内影响精子发生还需要深入的研究。未来会有更多未知niche因子被发现^[35],这将为改善精原干细胞体外培养体系和寻找治疗男性不育患者提供新的方法。

3 目前研究的困难、应用前景和展望

哺乳动物睾丸中niche通过分泌不同信号调控精原干细胞自我更新和分化,哪些因子可以影响niche功能、niche是如何建立哺乳动物睾丸内稳态的机制,深入研究这些调控机理有助于寻找解决精子发生障碍的方法。目前,研究人员主要关注niche对于生殖细胞的调控作用,但是生殖细胞分泌的因子对于niche环境作用还没有明确的报道。各个阶段的

生殖细胞如何界定在形态学和功能上还不统一,难以分离纯化不同时期的生殖细胞,这成为研究不同生殖细胞特性的一大障碍。精原干细胞体外培养启动减数分裂的效率还很低^[36]。目前,体外培养体系已经可以使精母细胞减数分裂为圆形精子细胞,但还不能形成成熟的精子,目前只能通过胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)手段产生后代,也就是说,目前在体外还无法产生具有正常受精能力的精子^[37]。培养体系研究中一个公认的瓶颈是模拟睾丸细胞的niche环境,使生殖细胞与体细胞间充分作用^[38]。目前,精原细胞体外分化基因表观印记是否正常还需深入研究^[37],精原干细胞体外培养过程中,干细胞分化为成熟配子还存在很多问题,精原干细胞分化为成熟精子所需要的外部条件还不是很清楚。很多应用问题困扰着研究人员,漫长的精子发生过程中相关机理还需要深入的探索。

精原干细胞冷冻保存技术可以在癌症病人药物治疗前先保存部分干细胞,药物治疗后再将其移植回睾丸,从而避免药物治疗造成的男性不育;而体外培养技术不仅可以保存还能在体外扩增精原干细

胞,也有望通过体外基因操作修复某些遗传缺陷所导致的疾病,对家族遗传疾病的治疗具有诱人的应用前景^[39]。最近的研究显示,在体外构建的niche环境已经可以使人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)和诱导多潜能干细胞(human-induced pluripotent stem cells, hiPSCs)进行减数分裂并且分化为单倍体精子细胞^[37],为辅助生殖提供单倍体精细胞,有望使部分男性不育症患者获得后代。精原干细胞在基因工程领域可以作为一种遗传修饰载体生产转基因动物^[40],为变革动物生产方式提供了可能性。已有研究表明,雄性老龄化过程中生精能力的逐渐下降并非精原干细胞本身的老化,而是由于其所在的niche老化所造成的^[24],将来也可以借助改善niche来改善老年男性的生精能力,或者延缓其衰老过程,从而获得状态更佳的精子^[41]。冷冻精原干细胞移植技术也可以为珍稀物种保护提供可选解决方案。某些男性生殖系统疾病具有遗传特性,针对精原干细胞niche环境的研究有助于理解男性精子发生异常相关基因,尽早为患者提供诊断与治疗手段^[42]。深入研究精原干细胞命运决定的分子机制不仅是干细胞生物学以及发育生物学研究的重要内容,也可以为辅助生殖提供新的方法,促进男性避孕药的研发,并在临床上指导一些男性不育患者的针对性治疗。不难看出,随着人们对精原干细胞及其与微环境的相互关系的深入理解,将会促进解决雄性精子发生方面所遇到的难题,当然其过程任重而道远。

参考文献 (References)

- Berookhim BM, Schlegel PN. Azoospermia due to spermatogenic failure. *Urol Clin North Am* 2014; 41(1): 97-113.
- Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: Research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008; 14(11): 1197-213.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4(1/2): 7-25.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, *et al.* Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004; 304(5675): 1338-40.
- Kaur G, Thompson LA, Dufour JM. Sertoli cells—immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 30: 36-44.
- Cheng CY, Wong EW, Yan HH, Mruk DD. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: New insights and advances. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 315(1/2): 49-56.
- Yan HH, Mruk DD, Wong EW, Lee WM, Cheng CY. An auto-crine axis in the testis that coordinates spermiogenesis and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(26): 8950-5.
- Tran J, Brenner TJ, DiNardo S. Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis. *Nature* 2000; 407(6805): 754-7.
- Kanatsu-Shinohara M, Takehashi M, Takashima S, Lee J, Morimoto H, Chuma S, *et al.* Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 533-42.
- Yoshida S. Spermatogenic stem cell system in the mouse testis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; 73: 25-32.
- Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW, Brinster RL. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development* 2009; 136(7): 1191-9.
- Hermann BP, Sukhwani M, Hansel MC, Orwig KE. Spermatogonial stem cells in higher primates: Are there differences from those in rodents? *Reproduction* 2010; 139(3): 479-93.
- Nagano MC. Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 701-7.
- Payne CJ. Cycling to and from a stem cell niche: the temporal and spatial odyssey of mitotic male germ cells. *Int J Dev Biol* 2013; 57(2/3/4): 169-77.
- de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000; 21(6): 776-98.
- Clermont Y. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Am J Anat* 1969; 126(1): 57-71.
- Hermann BP, Sukhwani M, Simorangkir DR, Chu T, Plant TM, Orwig KE. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Hum Reprod* 2009; 24(7): 1704-16.
- Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Y, Braun RE, Yoshida S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science* 2010; 328(5974): 62-7.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414(6859): 98-104.
- Caires K, Broady J, McLean D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol* 2010; 205(2): 133-45.
- Dovere L, Fera S, Grasso M, Lamberti D, Gargioli C, Muciaccia B, *et al.* The niche-derived glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induces migration of mouse spermatogonial stem/progenitor cells. *PLoS One* 2013; 8(4): e59431.
- Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de Graaff E. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* 2002; 129(22): 5151-60.
- Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2006; 24(6): 1505-11.
- Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005; 433(7027): 760-4.
- 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.
- 26 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.
- 27 Grisanti L, Falciatori I, Grasso M, Dovere L, Fera S, Muciaccia B, *et al.* Identification of spermatogonial stem cell subsets by morphological analysis and prospective isolation. *Stem Cells* 2009; 27(12): 3043-52.
- 28 Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Takashima S, Takehashi M, Ogonuki N, Morimoto H, *et al.* Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. *Cell Stem Cell* 2012; 11(4): 567-78.
- 29 Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, *et al.* Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol Reprod* 2005; 72(4): 985-91.
- 30 Hobbs RM, Seandel M, Falciatori I, Rafii S, Pandolfi PP. Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. *Cell* 2010; 142(3): 468-79.
- 31 Pellegrini M, Grimaldi P, Rossi P, Geremia R, Dolci S. Developmental expression of BMP4/ALK3/SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: A potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 16): 3363-72.
- 32 Hamra FK, Chapman KM, Nguyen D, Garbers DL. Identification of neuregulin as a factor required for formation of aligned spermatogonia. *J Biol Chem* 2007; 282(1): 721-30.
- 33 Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(5): 307-18.
- 34 Barrios F, Filipponi D, Campolo F, Gori M, Bramucci F, Pellegrini M, *et al.* SOHLH1 and SOHLH2 control Kit expression during postnatal male germ cell development. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 6): 1455-64.
- 35 Takasaki N, Tachibana K, Ogasawara S, Matsuzaki H, Hagiuda J, Ishikawa H, *et al.* A heterozygous mutation of GALNTL5 affects male infertility with impairment of sperm motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(3): 1120-5.
- 36 Ko K, Huebner K, Mueller-Keuker J, Schoeler HR. *In vitro* derivation of germ cells from embryonic stem cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2010; 15: 46-56.
- 37 Easley CA, Phillips BT, McGuire MM, Barringer JM, Valli H, Hermann BP, *et al.* Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep* 2012; 2(3): 440-6.
- 38 Sato T, Katagiri K, Kubota Y, Ogawa T. *In vitro* sperm production from mouse spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. *Nat Protoc* 2013; 8(11): 2098-104.
- 39 Gat I, Toren A, Hourvitz A, Raviv G, Band G, Baum M, *et al.* Sperm preservation by electroejaculation in adolescent cancer patients. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61(2): 286-90.
- 40 Zhang Y, Xi Q, Ding J, Cai W, Meng F, Zhou J, *et al.* Production of transgenic pigs mediated by pseudotyped lentivirus and sperm. *PLoS One* 2012; 7(4): e35335.
- 41 Crosnoe LE, Kim ED. Impact of age on male fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013; 25(3): 181-5.
- 42 Esteves SC. A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. *J Hum Reprod Sci* 2013; 6(3): 176-82.