

GDNF 对精原干细胞增殖及其分化的调控机制

刘姗姗 李树峰 李丹丹 杨 丹 严云勤*

(东北农业大学生命科学学院组织胚胎学教研室, 哈尔滨 150030)

摘要 阐述了胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)及其受体与精原干细胞增殖和分化的关系。GDNF 能够促进未分化的精原细胞增长, 并且可以调节精原干细胞自我更新与分化的微环境, 参与其分化的第一步, 是精原干细胞存活的重要营养因子。

关键词 胶质细胞源性神经营养因子; 精原干细胞; 自我更新; 分化

干细胞是近年来生物学上最有趣、最复杂、也最有吸引力的领域之一, 干细胞的研究已成为 21 世纪现代生命科学研究的最最终汇集点。精原干细胞可进行体外培养、冷冻保存、遗传操作及移植, 因而在畜牧业生产及医学、生物学等领域具有广泛的应用前景。然而, 长期以来有关精原干细胞的研究和应用进展不大。在细胞水平上, 精原干细胞在形态及行为方面是体内各种干细胞系统中认识得较为清楚的一类, 然而在精原干细胞自我更新分化及分子调控机制方面, 人们了解的仍非常有限^[1]。

哺乳动物每一类型细胞的存活、分裂、增殖等活动都依赖于一种或多种生长因子, 这些生长因子的减少或缺乏将导致细胞凋亡。最新研究表明^[2], 胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是精原干细胞体外自我更新的最基础的生长因子, 能够增加干细胞的数量。本文阐述了 GDNF 与精原干细胞增殖分化的关系, 为更好的了解精原干细胞的分子调控机制提供了新的思路。

1 精原干细胞的生物学特性

精子发生是一个复杂的过程, 是维持雄性生殖能力的必要条件。精原干细胞是哺乳类动物成体内唯一可将遗传信息传递给下一代的干细胞, 因此它对生物学、医学和生物学技术等方面的研究具有特殊的价值。

1.1 精原干细胞的自我增殖能力和分化潜能

精原干细胞(SSCs)具有干细胞最基本的生物学特性, 既能经有丝分裂进行自我更新, 维持稳定数量的精原干细胞库, 同时也能逐级分化形成成熟的精子, 维持种系的延续性。精原干细胞的自我更新方式被广泛的认为是 Huckins 和 Oakberg 模式^[3]。在这种学

说中, A_s (Asingle)型精原细胞是被假定的精原干细胞, 它能够自我更新, 同时还可以分化成 A_{pr} (Apaired)型精原细胞, 分化后所形成的细胞均由细胞间桥相连, A_{pr} 型细胞再进一步分化成 4 个、8 个、16 个甚至稀少的 32 个细胞链状的 A_{al} (Aaligned)型精原细胞。在细胞周期的特定时刻, A_{al} 分化为第一代分化细胞—— A_1 型精原细胞(type A_1 spermatogonia, A_1 , 下同), 后者进行连续 6 次分裂, 经历 A_2 、 A_3 、 A_4 、间型(intermediate spermatogonia, In)、B 型精原细胞(type B spermatogonia, B), 形成初级精母细胞并最终形成精子^[4]。

1.2 精原干细胞自我更新与分化的微环境

睾丸大部分由无血管分布的曲细精管组成, 富含大量的营养物质, 来满足精子发生的需要。由于血睾屏障的存在, 体循环的信号分子不能直接作用于生精细胞, 生精细胞的发育和分化需要独特的微环境。

干细胞一般出现于一个被称之为 niches 或发育微环境的特殊细胞组织当中。在自我更新组织中, niches 为干细胞的自我更新或存活提供了特定的发育环境^[5]。事实上, 在精子发生中, 支持细胞(sertoli)充当了 niches 的角色, 为精原干细胞增殖与分化提供了信号调节和营养支持。一方面, 支持细胞分泌的多种蛋白质和细胞因子对精原干细胞增殖和分化起调节作用; 另一方面, 其膜上和细胞核中, 存在丰富的促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)受体和雄激素受体, 其功能接受 FSH 的内分泌调节以及雄激素和多种生长/分化因子的旁分泌/自分泌的调节。

2 GDNF 及其受体

经体外培养技术证实, GDNF 家族是精原干细胞自我更新的基本条件。在睾丸中, GDNF 是支持细

收稿日期: 2007-05-29 接受日期: 2007-07-18

* 通讯作者。Tel: 0451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com

胞分泌的,它是精原干细胞在体外维持生长的必须因子。精原干细胞与支持细胞间通过 GDNF 的变化来调控生精微环境的改变^[6,7]。

2.1 GDNF 分子结构及特性

GDNF 是由 Lin 等^[8]在大鼠胶质细胞株 B49 发现的,含有 134 个氨基酸,属于转化生长因子(TGF- β)超家族的一个新成员,但它与该超家族其他成员间同源性少于 20%。GDNF 对胚胎中脑的多巴胺能神经元具有特殊性营养活性而被广泛重视。随后的研究发现,GDNF 对脊髓运动神经元和中枢神经系统去甲肾上腺能神经元也有强的神经活性,对感觉神经元、交感神经元也有一定的作用。

GDNF 在非神经系统中也有重要作用^[9]。它是肾发育的形态发生素之一,调节肾发育和促进输尿管分支;在睾丸中,GDNF 调节精原干细胞的自我更新、精原干细胞分化、促进支持细胞增殖以及血睾屏障的形成等。

2.2 GDNF 受体

GDNF 家族受体由 GDNF 家族受体 $\alpha 1$ (GDNF family receptor $\alpha 1$, GFR $\alpha 1$)和受体酪氨酸激酶 Ret 两种成分组成。GFR $\alpha 1$ 通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着于细胞质膜外层,与 GDNF 有高亲和力,为其结合亚单位,含有 468 个氨基酸,在氨基末端有具有分泌作用的信号肽,在羧基末端有 23 个疏水氨基酸,3 个糖基化位点和 30 个半胱氨酸残基,其局部配布与细胞激动素相似。由于 GFR $\alpha 1$ 缺乏细胞膜结构域,它只是 GDNF 功能受体的一部分,另一部分是受体酪氨酸激酶 Ret,它是 GDNF 的功能性受体亚单位,是 *c-ret* 原癌基因的产物。GDNF 特异地结合其受体 GFR $\alpha 1$ 后,再激活 Ret 介导的酪氨酸磷酸化传导信号,从而将信息传递到细胞内,产生多种生物效应。

2.3 GDNF 信号通路

GDNF 信号通路是由受体酪氨酸激酶 Ret 和与 GPI 相连的配体结合亚基 GFR $\alpha 1$ 组成的受体复合介导的。Ret 激活多条胞内信号通路,主要包括: MAPK 激活信号通路、PI3K 信号通路、PLC- γ 通路以及 Src 家族激酶转导信号通路,然而关于 GPI 锚定受体如何与 Src 样激酶配对还不十分确定(图 1)。最近的体外研究表明,GDNF 还可以通过 NCAM 转导信号而不依赖于 Ret,但信号转导复合物的组成和信号转导机制尚需要进一步阐明^[10]。

3 GDNF 及其受体对精原干细胞的作用

Naughton 等^[12]发现缺失 GDNF、GFR $\alpha 1$ 和 Ret

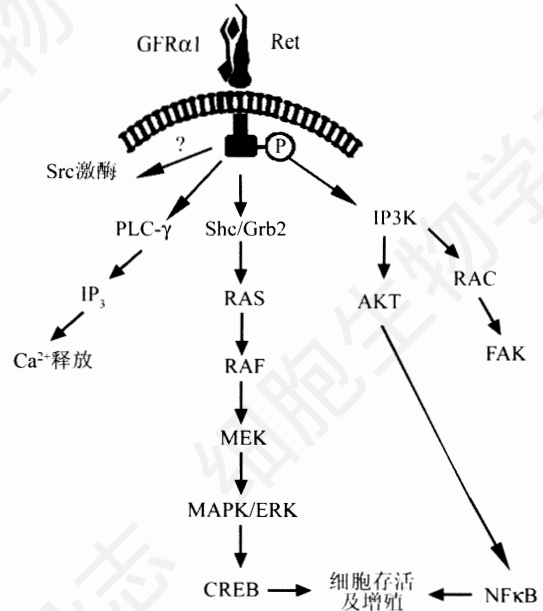


图 1 依赖 Ret 的 GDNF 信号通路^[11]

会导致新生小鼠死亡,缺乏这 3 种因子的睾丸突变体在第一次精子发生波中都显示精原干细胞的缺乏,这种缺乏是因为缺少精原干细胞的增殖和维持未分化状态的能力,通过精原干细胞移植技术可以克服这一现象,发现这几种基因是小鼠出生后精子发生中所必须的,但对胚胎中睾丸的发育是不必要的。这个结果证实 GDNF 介导 GFR $\alpha 1$ /Ret 信号通路是精原干细胞分化的主要因素,并且这个通路出现异常情况会导致男性不育症和睾丸细胞肿瘤。

在过度表达 GDNF 的出生 10 周的小鼠睾丸中,有许多由 As 型精原细胞组成的细胞群在曲细精小管中累积,没有精子产生,并且公鼠不能生育;GDNF 长时间过度表达的小鼠中,发现生殖细胞肿瘤,并且 56% 都是双侧肿瘤^[13]。GDNF^{+/-} 的小鼠的 GDNF 的表达较正常为低,生精小管退化萎缩,生殖细胞数目明显减少,而 GDNF 基因剔除的小鼠的生精小管中无生殖细胞存在。以上数据显示支持细胞分泌的 GDNF 的量调节着精原干细胞的去向^[14]。

GDNF 的受体表达于 A_s 型及 A_{pr} 型、A_{al} 型精原细胞^[15,16]。Tadokoro 等^[14]的研究表明, GFR $\alpha 1$ 对 A_s 型精原干细胞具有自我更新和分化双向调节作用,对 A_{pr} 型、A_{al} 型和分化型精原细胞可能起分化调节作用。张茨等^[17]建立一种白消安损伤的精子再生小鼠模型,通过检测增殖和分化阶段 GFR $\alpha 1$ 基因表达水平,证实 GFR $\alpha 1$ 高表达促进 A_s 型精原干细胞增殖,低表达促进其分化,推测 GFR $\alpha 1$ 表达受微环境调节。

在体外培养精原干细胞中, $GFR\alpha 1$ 呈阳性的干细胞不用饲养层, 只添加 GDNF 最长可以存活 21 天, 培养 3 天后, 出现 5~20 个细胞的聚集体。6 天后, 细胞群数量增加, 有些细胞体积增大, 成为克隆簇(聚集体细胞数目超过 20 个)。有趣的是, 一些聚集体出现 A_1 型精原细胞线状连接, 细胞通过胞质间桥连接在一起, 培养 21 天以后, 一些克隆簇仍然可见, 染色后为 $c-kit$ 阳性细胞。因此, 在体外 GDNF 也可以促进纯化的 $GFR\alpha 1$ 阳性精原细胞增殖, 并且参与精原干细胞分化的第一步^[18]。

4 GDNF 影响精原干细胞的分子机制

4.1 GDNF 对 Notch 信号通路的影响

Notch 信号通路对干细胞的自我更新分化很重要。在人类和大鼠中, Notch 促进精原干细胞的分化, 抑制这个信号通路会导致干细胞的分化停止^[19]。另外, 激活型的 Notch 是一种转录因子, 能激活 $c-Myc$ 启动子。GDNF 不能诱导 Notch 差异性表达, 但它能够引导 $numb$ 基因的上调, 这种基因是 Notch 的抑制物, 因此证实 GDNF 能抑制精原干细胞的分化, 并且在鼠的生精上皮中维持干细胞数量恒定^[20]。

4.2 GDNF 对 bFGF 的调节

GDNF 还能够上调成纤维细胞生长因子受体 2 (FGFR2)。在神经系统中, bFGF 需要 GDNF 来共同促进神经细胞的存活, 在睾丸中它能够使干细胞对 bFGF 迅速产生反应, 因此 GDNF 和 bFGF 共同合作能够更好的维持干细胞的增殖与分化。一些研究表明, 人类的精原干细胞表达 FGFR2, 并且它起到类似于 Ret 信号通路的作用来调节细胞的自我更新^[21]。Kubota 等^[22]研究表明 GDNF 和 bFGF 同时用来建立 A 型精原细胞体外长时间的培养时, bFGF 浓度高于 1 ng/ml 对精原干细胞的聚集会产生负面影响, 但干细胞在饲养层上培养时不会受到影响, 因此 bFGF 根据培养环境的不同会产生差异。

4.3 GDNF 对 POZ 家族蛋白的影响

POZ 蛋白家族是 GDNF 的识别蛋白, 它对精原干细胞的增殖具有重要作用。干细胞体外培养法和微点阵法可以证实 GDNF 能够调节 Bcl6b 因子的表达。

Bcl6b 是 POZ 蛋白家族的成员, 是维持精原干细胞自我更新的必须因子。在果蝇属中, Bcl6b 又是 JAK-STAT 信号通路的靶基因, JAK-STAT 信号通路是维持睾丸微环境的基础因素^[23]。最新研究表明,

当有些分化的精原干细胞从微环境中游离出来时, 它们可以通过 JAK-STAT 信号通路移回微环境中并且恢复干细胞的特性。所以 GDNF 可以通过调节 Bcl6b 来调控 JAK-STAT 信号通路, 最终维持睾丸微环境的稳定性^[24]。

4.4 受 GDNF 调节的转录因子

Satoh 等^[25]发现 GDNF 能够使细胞周期蛋白 B1 和细胞周期蛋白 D3 因子上调, 这时细胞周期蛋白的抑制物 $p19$ 、 $p21$ 、 $p15$ 是下调的, 尽管, 细胞周期蛋白 E 没有被证实是上调的。除此之外, GDNF 对 N-Myc 和 L-Myc 的表达量也起到上调作用。细胞周期蛋白和 Myc 通过 STAT3 或 STAT5 相关的信号通路来激活。

Myc 家族被认为是 DNA 转录过程中重要的参与者, 它对控制基因的转录子有调节作用^[26]。例如, 在造血干细胞中, 一些细胞周期蛋白家族成员是 $c-Myc$ 的靶细胞, 它们在细胞的自我更新过程中起到了重要作用^[27,28]。但是细胞周期蛋白 D3、B1 和 N-Myc 是否参与精原干细胞的自我更新还没有得到证实, 不过在未来的研究中, 人们可以通过睾丸移植技术来回答诸如此类的问题。

5 小结

随着干细胞移植技术的进步, 精原干细胞的存在已经被证实, GDNF 对精原干细胞增殖和分化调控机制的研究也有了很大的进展。目前存在的问题是尽管精原干细胞是维持精子发生的重要元素, 但对于它增殖与分化的分子调控机制了解的非常有限, 主要原因是哺乳动物睾丸中, 在精原干细胞和分化的精原细胞中只有微小的差异, 进一步说, 没有明显的标志来区分精原干细胞和它之后产生的生精细胞, 并且在睾丸中精原干细胞数量之少妨碍了研究。另一方面, 目前为止对 GDNF 激活的下游靶基因了解不够全面, 并且在某些细胞上, 不用 GDNF 刺激, $GFR\alpha 1$ 与 Ret 即有弱结合, Ret 的存在增强了 GDNF 与 $GFR\alpha 1$ 的亲和力, 这说明 GDNF 调节精原干细胞增殖与分化是否存在其他信号通路还需要进一步证实, 从而最终为男性干细胞疾病, 如不育症和癌症病因提供新的见解。

参考文献(References)

- [1] de Rooij DG *et al.* *J Androl*, 2000, **21**: 776
- [2] Oatley JM *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 9524

- [3] Huckins C. *Anat Rec*, 1971, **169**: 533
[4] de Rooij DG. *Reproduction*, 2001, **121**: 347
[5] Fuchs E *et al.* *Cell*, 2000, **100**: 143
[6] Ryu BY *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 14302
[7] Hamra FK *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 17430
[8] Lin LF *et al.* *Science*, 1993, **260**: 1130
[9] Costantini F *et al.* *Bioessays*, 2006, **28**: 117
[10] Paratcha G *et al.* *Cell*, 2003, **113**: 867
[11] Sariolal H *et al.* *J Cell Sci*, 2003, **116**: 3855
[12] Naughton CK *et al.* *Biol Reprod*, 2006, **74**: 314
[13] Meng X *et al.* *Science*, 2000, **287**: 1489
[14] Tadokoro Y *et al.* *Mech Dev*, 2002, **113**: 29
[15] Dettin L *et al.* *Biol Reprod*, 2003, **69**: 1565
[16] Von Schonfeldt V *et al.* *Cytogenet Genome Res*, 2004, **105**: 235
[17] 张 茨等. *中华男科学杂志*, 2003, **9**: 647
[18] Hasthorpe S. *Biol Reprod*, 2003, **68**: 1354
[19] Hayashi T *et al.* *Fertil Steril*, 2004, **81**: 697
[20] Braydich-Stolle L *et al.* *Ann NY Acad Sci*, 2005, **1061**: 94
[21] Goriely A *et al.* *Science*, 2003, **301**: 643
[22] Kubota H *et al.* *Biol Reprod*, 2004, **71**: 722
[23] Terry NA *et al.* *Dev Biol*, 2006, **294**: 246
[24] Payne C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 9751
[25] Calo V *et al.* *J Cell Physiol*, 2003, **197**: 157
[26] Menssen A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 6274
[27] Kamijo T *et al.* *Cytokine*, 2002, **19**: 267
[28] Satoh Y *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 24986

Roles of GDNF in the Proliferation and Differentiation of Spermatogonial Stem Cells

Shan-Shan Liu, Shu-Feng Li, Dan-Dan Li, Dan-Yang, Yun-Qin Yan*

(Histology and Embryology Unit, College of Biological Sciences, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptors during the processes of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells were reviewed in this article. It has been proved that GDNF gets involved in the activation of undifferentiated spermatogonia growth, the regulation of the micro-environment of spermatogonial stem cell self-renewal/differentiation and the participation in the first step of differentiation. According to these researches, GDNF is an important nutritional factor in the survival of spermatogonial stem cells.

Key words glial cell line-derived neurotrophic factor; spermatogonial stem cells; self-renewal; differentiation

Received: May 29, 2007 Accepted: July 18, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com