



李劲松, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 研究员, 课题组长, 博士生导师, 细胞生物学国家重点实验室主任。李劲松博士从事干细胞与胚胎发育相关研究。1993年毕业于江西农业大学, 获学士学位; 1996年毕业于扬州大学, 获硕士学位; 2002年毕业于动物研究所, 获博士学位; 2002年至2007年在洛克菲勒大学从事博士后研究; 2007年8月起任中科院上海生化与细胞所研究员、研究组长。率领团队建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞(即“人造精子细胞”), 证明其能代替精子使卵母细胞受精产生健康小鼠(即“半克隆技术”), 并利用“人造精子细胞”携带CRIPSR-Cas9文库实现了小鼠个体水平的遗传筛选; 建立基于受精卵和精原干细胞介导的CRISPR-Cas9遗传疾病治疗策略。研究成果于2011年和2012年入选“中国科学十大进展”。在 *Cell*、*Nature*、*Cell Stem Cell*、*Nature Cell Biology*、*Cell Research* 等杂志上发表90余篇论文。目前, 实验室正在利用“人造精子细胞”介导半克隆技术开展多方面研究, 包括: 揭示生殖前体细胞发育的分子调控机制、建立人类疾病包括出生缺陷和生殖缺陷等在内的小鼠模型、探讨精原干细胞的细胞倍性可塑性的调控机制等。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=65>

## 小鼠和人类生殖干细胞形成、特化和维持

张帆 李劲松\*

(中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**摘要** 哺乳动物胚胎植入子宫后, 随着原肠运动的发生, 胚胎开始向三个胚层分化, 同时生殖细胞开始形成和特化。胚胎最早期的生殖细胞被称为原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC), 雌雄原始生殖细胞增殖并迁移到生殖嵴, 持续增殖后分别进入减数分裂前期和有丝分裂阻滞, 分化形成卵原细胞和精原干细胞, 经过复杂的发育过程分化形成卵母细胞和精子。该文回顾了小鼠和人类的原始生殖细胞的形成和特化过程, 并且对小鼠和人类精原干细胞的分子特征和体外培养体系进行了总结。

**关键词** 原始生殖细胞; 精原干细胞

## The Formation, Specification and Maintenance of Germline Stem Cell

Zhang Fan, Li Jinsong

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** After implantation into uterus, with the gastrulation, the mammalian embryo began to establish three layers and give rise to germ cell lineage at the same time. The earliest germ cells of the embryo are known as primordial germ cells (PGC). The male and female PGC proliferate and migrate to the genital ridge, continue to

\*通讯作者。Tel: 021-54921422, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

\*Corresponding authors. Tel: +86-21-54921422, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2019-07-16 16:50:11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1650.026.html>

proliferate and then enter mitotic arrest and meiosis prophase, respectively. Oogonia and spermatogonial stem cells differentiated into oocytes and spermatozoa through complex developmental processes. Here, we review the origin and specialization of mouse and human primordial germ cells, and summarize the molecular characteristics and *in vitro* culture system of mouse and human spermatogonial stem cells.

**Keywords** primordial germ cells; spermatogonial stem cells

## 1 小鼠原始生殖细胞

### 1.1 小鼠原始生殖细胞的形成、特化

哺乳动物的生殖细胞是一种独立于三胚层之外的特殊细胞类型, 生殖干细胞产生的雌雄配子在受精后形成一个发育全能性的受精卵并发育成为一个个体。小鼠是目前研究哺乳动物生殖细胞形成、特化以及迁移机制最常用的模式动物。胚胎植入子宫之后, 伴随着原肠运动的发生, 在胚外外胚层分泌的BMP4、BMP8B分子和原始内胚层的Wnt信号通路协同作用下, 原始外胚层(epiblast)中极靠近胚外外胚层(extraembryonic ectoderm)的区域产生了一群细胞, 即原始生殖细胞的前体细胞<sup>[1-2]</sup>。小鼠原始生殖细胞最早发现于胚胎发育的第6.25天(E6.25), 位于原条后端, 呈碱性磷酸酶阳性<sup>[3]</sup>, 伴随胚胎的发育, 原始生殖细胞数量逐渐增加, 并且进入后肠(hindgut)内胚层中, 在E9.5时离开后肠进入背侧肠系膜, 向生殖嵴迁移, E10.5时到达生殖嵴; E12.5时, 几乎所有原始生殖细胞到达生殖嵴并持续增殖; E13.5时, 雄性原始生殖细胞进入有丝分裂阻滞, 而雌性原始生殖细胞则停止有丝分裂进入减数分裂<sup>[4]</sup>。

在小鼠中, 胚胎外胚层和腔内内胚层(visceral endoderm)产生的信号是诱导原始生殖细胞的主要原因, BMP信号通路对于小鼠PGC的特化是必需的, 破坏BMP信号通路成员的表达, 比如BMPs、Smad1、Smad4、Smad5或者Alk2将会导致小鼠不能产生PGC或者只能产生少量PGC<sup>[5]</sup>。Blimp1(Prdm1)是最早被发现的早期原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)的标志物<sup>[6]</sup>。胚胎外胚层分泌的BMP4和BMP8b以及从近端的腔内内胚层分泌的BMP2诱导了Blimp1阳性的PGC前体细胞的形成, 虽然这个诱导过程依赖于BMP4和BMP2的剂量, 但是BMP4是最关键的诱导因子<sup>[7]</sup>。胚胎外胚层将形成个体的这部分外围包裹的是腔内内胚层。胚胎根据轴向分布分为前端和后端, 由于胚胎前端的腔内内胚层(anterior visceral endoderm, AVE)分泌拮抗因子, 特化的PGC只存在于外胚层的后端。这些抑制因子包

括拮抗BMP和Nodal信号通路的Cer1、拮抗Nodal的Lefty1以及拮抗Wnt信号通路的Dkk1, 这些抑制因子同时也抑制了外胚层前端细胞与后端接受同样的信号, 从而使得胚胎前后端在发育上形成差别<sup>[8]</sup>。这样的假设在后续的研究中得到了证明, Smad2和FoxH1突变的胚胎没有了AVE, 在近端外胚层(proximal epiblast)的前端和后端均有Blimp1阳性的PGC产生<sup>[2]</sup>。

Wnt信号通路也在PGC特化过程中发挥了重要作用, Wnt3在E6.25时在近端外胚层的前端和后端均有表达, 但是之后只在外胚层和腔内内胚层的后端表达<sup>[9]</sup>。Wnt3敲除的胚胎虽然能形成正常的卵圆筒状胚胎, 但是却缺少了原条和中胚层的形成, 同时也没有Blimp1阳性的PGC形成<sup>[2]</sup>。虽然Wnt3敲除的胚胎外胚层仍然能正常表达和分泌BMP4和其他BMP信号通路的因子, 但是这些突变的胚胎外胚层细胞不能响应这些信号的刺激, 所以Wnt3对于外胚层细胞响应BMP信号分子的刺激而开始形成生殖细胞是必需的。此外, 体外培养的一类外胚层细胞(EpiLCs)中, Wnt3会通过 $\beta$ -catenin诱导许多跟中胚层相关的转录因子的激活。在这些转录因子中, T(brachyury)因子可以通过结合Blimp1和Prdm14基因的不同调节区域直接激活这两个基因的表达, 虽然没有在体内直接证明, T因子通过Blimp1和Prdm14的激活对于PGC特化的作用, 但是这些体外的结果暗示, Wnt3在PGC的特化过程中可能有比BMP信号更多的作用<sup>[8]</sup>。

在Blimp1被诱导表达后, PGC前体细胞在E6.5和E6.75时开始表达另外两个关键的转录因子: Prdm14和Tcfap2c。由于在外胚层后端的细胞将会向体细胞命运发展, 早期的这些PGC细胞也逐渐地开始表达中胚层相关的基因, 比如Hoxa1、Hoxb1和T。但是Blimp1、Prdm14和Tcfap2c形成的转录因子网络抑制了体细胞基因的表达, 从而促进PGC的特化、起始生殖细胞相关基因的表达和全基因组范围内的表观重编程<sup>[10]</sup>, 敲除这三个转录因子中任何一个将会使早期生殖细胞的缺失从而导致PGC特化的失败, 且在体外培养的EpiLCs中同时过表达这三个因子可

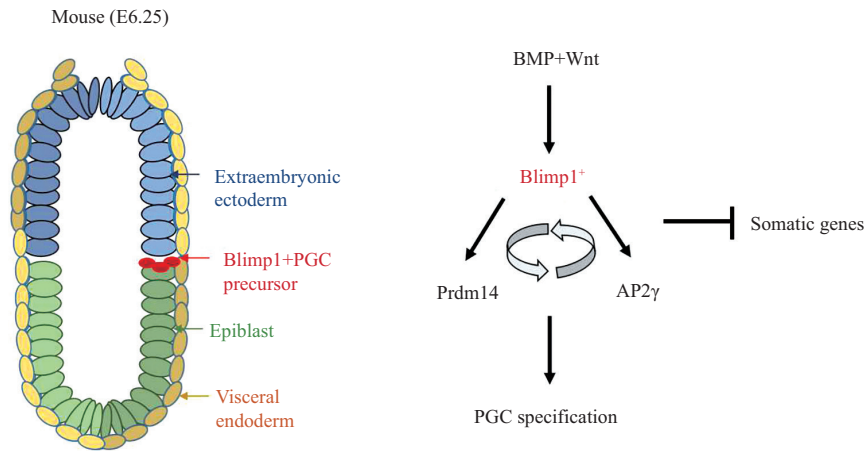


图1 小鼠原始生殖细胞的形成、特化

Fig.1 The formation and specification of mouse primordial germ cell

以在不加其他细胞因子的情况下诱导生殖细胞的形成<sup>[10]</sup>。在生殖细胞特化完成后, PGC逐渐增殖, 并且在E7.25时通过原条向胚外中胚层迁移, 在E8到E11时, PGCs通过肠系膜背部迁移到中肠和后肠内胚层, 进入正在形成的生殖嵴。

除了生殖细胞特异的基因如*AP*、*Nanos3*、*Dazl*、*Mvh*和*Dnd1*的表达之外, PGC同时也表达多能性相关的基因, 如*Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*Klf2*和*Stella*, 不过*Klf2*和*Stella*对于PGC的发育不是必需的<sup>[8]</sup>, 而*Oct4*、*Nanog*、*Sox2*对PGC发育很重要。植入后的胚胎外胚层广泛表达*Oct4*, 生殖细胞直到在性腺中开始性别分化时仍然保持较高的*Oct4*表达<sup>[11]</sup>。*Oct4*对于生殖细胞的特化<sup>[12]</sup>和维持<sup>[13]</sup>都非常重要。还有一个非常重要的多能性基因*Sox2*, *Sox2*在E7.5的PGC中就能检测到, 在PGC特化之后条件性敲除*Sox2*会导致E7.5时生殖细胞数量急剧下降并且在E13.5完全消失<sup>[14]</sup>, 原因是*Sox2*直接调控*Kit*的表达, 而*Kit*对于PGC的存活和增殖都是非常重要的(图1)。

## 1.2 小鼠原始生殖细胞的体外诱导和应用

在体外将多能干细胞诱导成为PGC的研究体系为寻找PGC特化关键的基因和PGC特化的机制提供了一个良好的模型, 其中最为关键的研究是日本科学家Saitou等<sup>[15]</sup>2011年在体外将小鼠胚胎干细胞诱导成为有功能的PGC细胞, 通过将PGC移植入小鼠睾丸中产生有功能的精子, 验证了体外诱导的PGC的功能。他们用*activin*、*FGF2*和1% *KSR*将ESC诱导为EpiLCs, 这些体外诱导的EpiLCs与E5.75的原肠前期的epiblast的基因表达谱一致, 但是与EpiSCs

不同<sup>[15]</sup>。EpiLCs能在细胞因子BMPs、SCF、LIF、EGF的诱导下产生*Blimp1*、*Prdm14*、*Stella*阳性的PGC-LCs, 而且这种体外诱导的PGC-LCs具有与E9.5的PGC相似的基因表达谱和全基因组的表观重编程(H3K9me2的降低和H3K27me3的上调)的现象, 并且在移植入生殖细胞缺陷的小鼠睾丸中能够开始精子发生, 产生有功能的精子。除了细胞因子的诱导体系, 另外一个诱导策略是在不添加任何细胞因子的情况下, 在EpiLCs过表达三个关键的PGC发育的转录因子*Blimp1*、*Prdm14*和*Tcfapc2-24*。mP-GCLC体外诱导体系的建立促进了对PGC特化的分子机制和特化过程中重要的事件的研究。Hackett等<sup>[16]</sup>利用Saitou的体外诱导体系结合CRISPR/Cas介导的全基因组筛选技术筛选到了从ESC到PGC的细胞命运转变过程中的关键基因, 并且分析了*Nr5a2*和*Zfp296*对生殖细胞发生的重要作用。

## 2 小鼠精原干细胞

### 2.1 小鼠精原干细胞的发现和起源

雄性小鼠性腺中的原始生殖细胞在E13.5之后逐渐建立雄性印迹并且进入有丝分裂阻滞, 分化成精原细胞前体细胞-pro-spermatogonia(也称为生殖母细胞, gonocytes)<sup>[17]</sup>, 这些处于曲细精管腔中的精原细胞前体细胞在出生前一直处于阻滞状态, 并且不断建立雄性表观遗传修饰包括父源印记<sup>[18]</sup>, 出生之后, 精原细胞前体细胞迁移到曲细精管的基底膜上分化成精原细胞, A型精原细胞大概出现在出生后第2~3天时, 其中含有少量的精原干细胞(spermatogo-

nial stem cell, SSC)。SSC是成体雄性唯一的生殖干细胞, 可以维持自我更新和启动减数分裂。精原干细胞功能的发现和验证来源于Brinster等<sup>[19]</sup>进行的包含SSC在内的睾丸来源细胞移植实验, 他们将三个不同阶段的睾丸(E18-P2、P5-P15、P21-P28)来源的细胞注射到生殖细胞缺陷的小鼠或者白消安处理的小鼠的曲细精管中, 受体小鼠睾丸中产生了来自供体细胞的克隆, 并且与胚胎干细胞所产生的肿瘤不同, 这意味着睾丸中存在不同于ESC的干细胞。E18-P2的睾丸细胞在受体睾丸中开始形成克隆的效率明显低于P5-P15和P21-P28的睾丸细胞, 这个实验是后续精原干细胞移植的基础。后来, 该团队<sup>[20]</sup>在同年发表的研究证明, 这些睾丸来源的干细胞能够产生使得生殖细胞缺陷的小鼠重新开始精子发生, 并且产生成熟的精子。受体睾丸中形成的克隆理论上来自于供体睾丸细胞中的单个干细胞, 所以睾丸来源的干细胞移植可以确定不同阶段的睾丸中干细胞的数量, Zhang等<sup>[21]</sup>通过混合注射两种转基因小鼠睾丸细胞和鉴定克隆的来源证明了“一个克隆来自于一个细胞”的假设。这些研究之后涌现了大量关于SSC的特征、分类、自我更新机制和体外培养的研究。

## 2.2 小鼠精原细胞的特征和分类

小鼠精原细胞的标志物包括Vasa、Uchl1、Plzf、Thy1、Pou1f1、Gfra1、Gfr125、Id4、Itga6、Itgb1<sup>[22]</sup>和Lin28等, 其中Gfra1阳性标志着干性更高的精原细胞, 但是SSC到目前为止还没有特别精确的标志物。

精原细胞根据分化的阶段分为A型、中间型、B型精原细胞。A型精原细胞被认为是干性最高的精原细胞, A型精原细胞分裂之后细胞之间存在细胞间桥, 形成细胞簇。根据细胞簇的数量分为Asingle(As)、Apaired(Apr)或Aaligned(Aal), 这三种精原干细胞也被认为是分化的精原干细胞。Aaligned逐渐增殖分化产生A1-A4型精原细胞, 单个的A4精原细胞分化成中间型、B型精原细胞, B型精原细胞进入减数分裂。As型精原细胞被认为是精原干细胞, 但是通过细胞形态学鉴定得到的As细胞数量要远大于通过移植实验中证明的具有功能的SSC的数量。这表示, 并不是所有的As型精原细胞都是精原干细胞<sup>[17]</sup>, 但是移植过程中的细胞损失以及在SSC通过血睾屏障回到基底膜并且迁移到生长微环境(这个过程被称为归巢)的效率都是准确确定功能

性SSC数量的障碍。

## 2.3 小鼠精原干细胞的微环境

Chiarini等<sup>[23]</sup>发现, As型精原细胞位于曲细精管的基底膜上, 虽然该研究提出A型精原干细胞在基底膜上的位置不是随机的, 但是确切的精原干细胞的微环境仍然难以定义。因为真正的精原干细胞是通过功能来确定的, 而且SSC至今仍没有确切的标志物。对于SSC微环境的研究, 最主要的集中在支持细胞、间质细胞和睾丸的血管走向这三个方面。SSC被基底膜上的支持细胞包围, 支持细胞分泌的GDNF因子是SSC维持自我更新的重要因子。曲细精管之间的睾丸间质细胞(leydig cells)和部分曲细精管周围肌样细胞(peritubular myoid cells)分泌的CSF1因子被证明能够在体外促进SSC的自我更新, 这暗示在体内, 这些细胞也许在精原干细胞的微环境中发挥一定的作用<sup>[24]</sup>。Shosei Yoshida等<sup>[25]</sup>通过标记未分化的精原细胞和三维重构证明, 在血管位置发生改变时, 未分化的精原细胞开始了重排。近期, Kitadate等<sup>[26]</sup>的研究发现, 在睾丸间质中靠近血管的淋巴内皮细胞分泌的FGF5因子是维持SSC增殖的关键因子。

## 2.4 小鼠精原干细胞的自我更新机制和体外培养

GDNF和FGF2是维持精原干细胞自我更新最重要的两个因子。Gdnf基因杂合敲除的小鼠精原干细胞逐渐减少并最终导致不育, 而过表达GDNF的小鼠会引起未分化的精原细胞的积累<sup>[27]</sup>。GDNF因子通过与精原干细胞表面的受体GFR $\alpha$ 1结合, 激活下游的PI3K-Akt信号通路。基于对小鼠精原干细胞自我更新机制的研究, Shinohara等<sup>[28]</sup>在2003年建立了成熟的小鼠精原干细胞培养体系, 包括GDNF、EGF、FGF2、LIF等细胞因子在内的近20种成分, 成功从新生小鼠睾丸中分离并富集到具有精子发生功能的精原干细胞系, 该研究体系只作了细微调整, 一直沿用至今。在培养体系中的FG2是另外一个维持体外精原干细胞自我更新的因子, FGF2与精原干细胞表达的FGF受体结合, 与GDNF协同激活Src家族激酶, 进而激活Ras, Ras激活下游的Akt和MEK信号通路<sup>[29]</sup>。此外, Yan等<sup>[30]</sup>发现, 睾丸中的支持细胞表达的趋化因子CXCL12与精原细胞上表达的CXCL12的受体CXCR4相互作用, 也在调控小鼠SSC命运决定中有作用。在小鼠未分化精原细胞原代培养中, 抑制CXCL12-CXCR4信号传导会导致

SSC丢失。

## 2.5 小鼠精原干细胞介导的基因编辑

小鼠精原干细胞的体外培养和移植方法的建立意味着在生殖腺中进行基因的编辑成为可能,那么通过对精原干细胞的编辑是否能产生基因修饰的精子,从而获得相应的小鼠呢?最初,CRE酶技术是用来产生基因敲除小鼠最常用的手段,含有loxP的小鼠精原干细胞与CRE酶孵育之后产生基因敲除的精原干细胞,随后移植到受体睾丸中,可得到基因编辑的精子;后来,也有人利用低概率的同源重组的方法在精原干细胞中转入目标载体希望能获得基因编辑的精原干细胞<sup>[31]</sup>。随着基因编辑方法的发展,CRISPR/Cas9的技术被应用到各种细胞中进行基因编辑,在小鼠精原干细胞中利用CRISPR/Cas9不仅获得了基因编辑的小鼠,还可以通过精原干细胞对疾病相关的基因突变进行修复<sup>[32]</sup>。

## 3 人类原始生殖细胞

### 3.1 人类原始生殖细胞的起源和特化

相比于小鼠PGC的研究,由于伦理和技术问题,我们对于人类植入后胚胎PGC起源的了解非常少。人类原始生殖细胞形成的精确的时间我们尚不清楚,可能建立于原肠运动时期,在胚胎发育的2~3周<sup>[33]</sup>。确定的人类原始生殖细胞最早发现于胚胎发育第3~4周(E24),位于胚外卵黄囊中靠近尿囊的位置,在第4周时,PGC进入后肠上皮,第5周时向生殖嵴<sup>[34]</sup>迁移并在第6周前形成克隆。性腺中的PGC会持续增殖到第10周,然后雌性和雄性PGC会分别进入减数分裂时期和有丝分裂阻滞。这样看起来,人类PGC的总体形成和发育过程与小鼠比较相似,那么在PGC特化的机制上是否存在差异呢?

人和小鼠在PGC特化的机制上存在着较大的差异,主要反映在人和小鼠在PGC的多能性调控网络和早期PGC发育方面的差异。相对来说,在小鼠PGC形成和特化的过程中,我们取得了很多的进展和突破,对于关键的调控网络也有比较深入的了解,这些也帮助我们进一步地探索人类原始生殖细胞的特化机制(图2)。人类PGC也表达一些与小鼠PGC相似的标志物,比如BLIMP1、TFAP2C、OCT4、NANOG、AP、SSEA1、cKIT、VASA和DAZL。但是两者之间也存在一些关键的差别,比如在小鼠PGC发育中不可缺少的关键的多能性基因SOX2在人类PGC中却不表达,但是人类PGC表达SOX家族的另外一个成员SOX17。SOX17是一个内胚层的调节因子<sup>[35]</sup>,在小鼠PGC特化过程中并不是必需的,但SOX17在人类PGC特化过程中具有非常重要的作用。这样巨大的差异引起了科学家们的的好奇,虽然SOX2和SOX17是同一个转录因子家族的成员,但其实两者属于不同的亚家族,而且一个是多能性因子,另一个是内胚层调节因子,所以SOX17可能并不是简单地取代了SOX2的作用<sup>[33]</sup>。SOX2与SOX1、SOX3属于SOXB1亚家族,在多能性调控和神经外胚层分化过程中有关键的作用。SOX17与SOX7、SOX18属于SOXF亚家族,对于内胚层分化至关重要。所以SOX17不能取代SOX2在多能性调控方面的作用,而事实上,SOXB1亚家族成员均在人类PGC中不表达,这表明,SOXB1亚家族的相关功能在人类PGC中是不需要的<sup>[33]</sup>。

### 3.2 SOX17在人类原始生殖细胞发育中的关键作用

因为人类PGC体内特化研究的种种阻碍,科学家们尝试用体外诱导的体系研究PGC特化的机制。2009年,Kee等<sup>[36]</sup>通过同时过表达生殖细胞标

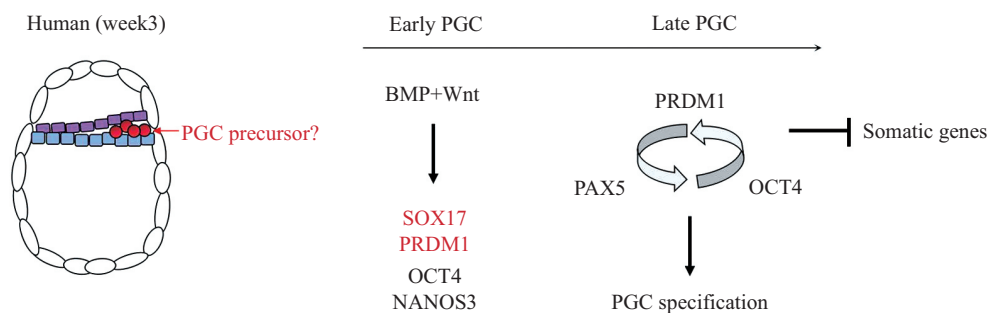


图2 人类原始生殖细胞的形成和特化

Fig.2 The formation and specification of human primordial germ cell

志物VASA、DAZL和添加细胞因子BMPs,建立了从hESC到hPGC体外诱导体系,诱导效率只有5%。2013年, Gkountela等<sup>[37]</sup>分析了6~20周人类胚胎C-KIT阳性PGC细胞基因表达谱特征和确定人类PGC全基因组表观重编程的时间,建立了从hESC到C-KIT阳性hPGC的分化体系,但是效率仍然很低。虽然体外诱导体系可以为研究PGC特化机制提供模型,但是诱导效率低对机制的研究造成很大的困难。Irie等<sup>[38]</sup>在2014年建立了添加包括BMPs在内的各种细胞因子的体外诱导体系,并且将诱导效率提高到20%以上,这样得到的hPGCLC与体内hPGC具有相似的基因表达谱,这为研究PGC特化的机制提供了一个好的体系。他们发现,SOX17是hPGCLC形成的关键调控因子,而BLIMP1作为SOX17的下游因子,抑制了在PGCLC特化过程中SOX17诱导的内胚层和体细胞基因的表达。他们提出,人和小鼠的PGC的特化机制的差异主要是因为不同的胚胎发育过程以及多能性的差异,最终产生不同的细胞命运决定。以此解释了SOX17对hPGC特化的重要性。

SOX17作为一个内胚层调节因子是如何维持PGC的多能性呢?多能性因子OCT4被报道与SOX17有相互作用<sup>[33]</sup>。在人和小鼠的ESC中,OCT4与SOX2协同作用维持多能性。在小鼠ES朝原始内胚层分化时,OCT4相互作用的因子从Sox2转变到Sox17,从而激活内胚层相关基因的表达<sup>[39]</sup>。而OCT4-SOX17的一个下游基因就是BLIMP1,BLIMP1激活生殖细胞相关基因表达,同时抑制内胚层和体细胞基因表达。此外,AP2 $\gamma$ 和TEAD4以及多能性因子Nanog、Tfcp2l1和KLF4在hPGCLC形成的早期也有表达,这些因子的共同作用一起调节了hPGCLC的特化和多能性的维持<sup>[33]</sup>。

### 3.3 PAX5-OCT4-PRDM1核心转录网络

近期,Fang等<sup>[40]</sup>对体内的hPGC进行了OCT4的ChIP-seq分析,发现在hESC向hPGC的发育过程中,多能性转录因子OCT4的相互作用因子有所转变。在ESC中,OCT4与SOX2结合,而在hPGC中,OCT4与PAX5和PRDM1结合,形成PAX5-OCT4-PRDM1三个蛋白组成的核心转录因子网络,激活生殖细胞相关基因的表达同时抑制体细胞相关基因的表达,从而调控hPGC的发育。另外作者提出,在早期PGC中SOX17和PRDM1对PGC的特化具有关键作用,而在晚期PGC中,PAX5-OCT4-PRDM1组成了PGC的核

心调控网络。

### 3.4 人类原始生殖细胞单细胞转录组研究

单细胞测序技术不断发展,对研究人类原始生殖细胞这样难以获得并且数量少的细胞的研究提供了一种新的方法。Guo等<sup>[41]</sup>通过分离C-KIT阳性的PGC,对迁移时期的hPGC到性腺中的hPGC进行了单细胞转录组的分析,揭示了人类PGC展现出一种同时表达多能性基因和生殖相关基因的特殊转录模式,同时建立了PGC迁移、在性腺中进行增殖和全基因组5mc擦除的时间有了大致的判断,并且验证了雌雄生殖细胞在性别分化的时间上的不同步性,鉴定了包括多能性标志物、早期PGC标志物、晚期PGC标志物在内的一系列不同发育时期的PGC标记,并且提出SOX15在雌雄PGC中均有高水平的表达,对PGC的迁移和植入性腺均非常重要,而SOX17则在雄性PGC中表达更强一些。Li等<sup>[42]</sup>在2017年对4~26周雌雄人类胚胎性腺细胞进行单细胞转录组测序,进一步阐述了从迁移的PGC到出生前性腺中PGC的发育过程,检测到PGC在性腺中有丝分裂增殖、有丝分裂阻滞和进入减数分裂等关键事件,并且提出性腺微环境中其他细胞通过BMP和Notch信号通路对PGC发育进行调控。

## 4 人类精原干细胞

### 4.1 人类精原细胞的特征和分类

人类睾丸中包含两种不同形态的未分化的精原细胞,分别是Adark(A1)和Apale(A2),均位于生精小管基底膜上,两种细胞的差异在于核的形态和苏木精染色的程度<sup>[43]</sup>。Adark精原细胞相对较小,形状是球形或略卵球形,其均匀染色的细胞核中有深色、致密的染色质;Apale精原细胞相对较大,形状为椭圆形或几乎圆形,细胞核较浅、细长,核仁在Adark和Apale精原细胞中均可见<sup>[43]</sup>。B型精原细胞比A型精原细胞大,位于生精管基底膜上或靠近基底膜,细胞核清晰而圆,可以通过异染色质染色的颗粒化和程度来区分<sup>[43]</sup>。1959年,Clermont和Leblond提出,A1是可以维持自我更新、维持干细胞库并且产生A2祖细胞的干细胞。10年后,Clermont团队<sup>[43]</sup>的研究对之前的模型做了修正,他提出,Apale是维持成年睾丸生精的“活跃”干细胞,而Adark是储备的干细胞,在精子发生受到损害后发挥作用。

在小鼠和人类的未分化精原细胞中保守的标

志物包括GFRa1、UTF1、PLZF、SALL4、LINH28和ID4<sup>[43]</sup>。到目前为止,还没有可以将Adark和Apale区分开来的分子标记,这可能如前面提到,两者都属于拥有几乎相同的未分化能力的干细胞,只是两者处于细胞周期不同阶段而已<sup>[43]</sup>。到目前为止,还没有发现任何种类的细胞表面标记,其表达仅限于功能性精原干细胞。GFRa1在小鼠和人精原干细胞中保守,似乎都标志着干性最高的精原细胞(小鼠中的AS、Aal和人类中的Adark、Apale)。ITGA6是另一个确定的在小鼠和人类精原细胞中保守的标记,可用于小鼠和人睾丸细胞悬液中分离和富集SSC<sup>[43]</sup>。

#### 4.2 人类精原干细胞/生殖干细胞的体外培养

2008年, Conrad等<sup>[44]</sup>建立了GSC, 随后有团队将Conrad建立的hGSC转录组测序数据进行分析,发现所谓的hGSC与睾丸中体细胞的表达谱相似,而没有干细胞的特征表达谱。事实上, Conrad的文章中用到的hGSC的培养体系中只有GDNF一种因子,而小鼠的SSC培养体系中包含了超过20种成分,其中包括多种有利于SSC自我更新的细胞因子。2015年, Hou等<sup>[45]</sup>报道,将人类SV40 T抗原转入从病人睾丸组织中分离出来的生殖细胞后建立了一株具有无限增殖能力和没有成瘤性的稳定hGSC,虽然检测到常规的几个精原细胞标志物的表达,但没有进一步的功能验证。

#### 4.3 人类睾丸组织单细胞转录组测序

由于到目前为止仍然没有人类精原干细胞体外培养的体系,也没有关键性的标志物,我们对精原干细胞的了解只来源于一些形态学分析和免疫组织化学染色。近几年,单细胞转录组测序技术日渐成熟,人类胚胎和成人睾丸细胞的单细胞转录组测序揭示了人类精子发生的过程。Guo等<sup>[46]</sup>在2017年从成年人睾丸中分选了SSEA1阳性精原干细胞和C-KIT阳性的分化型精原细胞,并进行单细胞转录组测序,揭示了SSEA1阳性的人类精原干细胞染色质的动态变化以及从自我更新到进入减数分裂的分化过程中关键的调控通路,但是SSEA1阳性是否能代表真正的人类精原干细胞群体特征,尚存在疑问。2018年, Guo等<sup>[47]</sup>对之前的方法进行了优化,利用数据分析的方法将睾丸组织中的不同细胞类型进行分群,再根据其标志物对应到睾丸中不同的细胞群体,运用类似方法的还有Wang等<sup>[48]</sup>,他们的单细胞转录组测序数据展示了睾丸中17个细胞群体,在一定程

度上揭示了男性生殖细胞发育轨迹和关键的基因,同时提出, FGF和BMP信号通路可能对人类精原干细胞维持有重要作用。

## 5 总结

小鼠原始生殖细胞的大量研究为我们理解哺乳动物的生殖细胞起源和特化提供了大量信息,并促进了体外诱导体系的建立,体外诱导体系的建立对于大规模筛选和鉴定生殖细胞特化关键基因有重要作用。更重要的是从小鼠体外诱导体系中吸收经验从而实现人类原始生殖细胞的体外诱导。基于高效率的原始生殖细胞体外诱导,更多的科学家致力于在体外实现包括减数分裂在内的完整生殖细胞形成周期。在小鼠中,从胚胎干细胞开始的到具有功能的精子和卵母细胞的体外诱导都已经实现<sup>[29]</sup>;在人类中,从胚胎干细胞到卵母细胞的体外诱导也已经实现<sup>[49]</sup>。虽然,由于取材和伦理的限制,在人类中的研究更为困难,但是在小鼠中研究所得的知识和人类生殖细胞的体外研究体系的优化将会为我们深入了解人类生殖细胞发育机制和疾病原因提供更有力的证据。

## 参考文献 (References)

- 1 Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 2001; 232(2): 484-92.
- 2 Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 2009; 137(3): 571-84.
- 3 Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 1990; 110(2): 521-8.
- 4 Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9(4): 393-400.
- 5 Irie N, Tang WW, Azim Surani M. Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis. *Reprod Med Biol* 2014; 13(4): 203-15.
- 6 Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005; 436(7048): 207-13.
- 7 Ufuk Gu'nesdogan, Erna Magnu'sdo'ttir, Surani MA. Primordial germ cell specification: a context-dependent cellular differentiation event. *PhilTrans R Soc L* 2014; 369(1657): 1-9.
- 8 Reik W, Surani MA. Germline and pluripotent stem cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(11): a019422.
- 9 Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 1999; 22(4): 361-5.

- 10 Magnusdottir E, Dietmann S, Murakami K, Gunesdogan U, Tang F, Bao S, *et al.* A tripartite transcription factor network regulates primordial germ cell specification in mice. *Nat Cell Biol* 2013; 15(8): 905-15.
- 11 Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, *et al.* Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 1996; 122(3): 881-94.
- 12 Okamura D, Tokitake Y, Niwa H, Matsui Y. Requirement of Oct3/4 function for germ cell specification. *Dev Biol* 2008; 317(2): 576-84.
- 13 Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, *et al.* Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* 2004; 5(11): 1078-83.
- 14 Campolo F, Gori M, Favaro R, Nicolis S, Pellegrini M, Botti F, *et al.* Essential role of Sox2 for the establishment and maintenance of the germ cell line. *Stem Cells* 2013; 31(7): 1408-21.
- 15 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.
- 16 Hackett JA, Huang Y, Gunesdogan U, Gretarsson KA, Kobayashi T, Surani MA. Tracing the transitions from pluripotency to germ cell fate with CRISPR screening. *Nat Commun* 2018; 9(1): 4292.
- 17 Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013; 29(1): 163-87.
- 18 Yang QE, Kim D, Kaucher A, Oatley MJ, Oatley JM. CXCL12-CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells. *J Cell Sci* 2013; 126(4): 1009-20.
- 19 AVARBOCK RLBAMR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11303-7.
- 20 Zimmerma N, Rlba JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11298-302.
- 21 Zhang X, Ebata KT, Nagano MC. Genetic analysis of the clonal origin of regenerating mouse spermatogenesis following transplantation. *Biol Reprod* 2003; 69(6): 1872-8.
- 22 Sahare MG, Suyatno, Imai H. Recent advances of *in vitro* culture systems for spermatogonial stem cells in mammals. *Reprod Med Biol* 2018; 17(2): 134-42.
- 23 Chiarini-Garcia H, Hornick JR, Griswold MD, Russell LD. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod* 2001; 65(1): 1179-85.
- 24 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.
- 25 Shosei Yoshida MS, Yo-ichi Nabeshima. A vasculature-associated Niche for undifferentiated spermatogonia. *Science* 2007; 317(5845): 1722-6.
- 26 Kitadate Y, Jorg DJ, Tokue M, Maruyama A, Ichikawa R, Tsuchiya S, *et al.* Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open Niche. *Cell Stem Cell* 2019; 24(1): 79-92.
- 27 Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, *et al.* Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000; 287(5457): 1489-93.
- 28 Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, *et al.* Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 612-6.
- 29 Saitou M, Miyauchi H. Gametogenesis from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2016; 18(6): 721-35.
- 30 Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, *et al.* Role of the Dnmt3 family in *de novo* methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 2007; 16(19): 2272-80.
- 31 Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells. *Dev Growth Differ* 2010; 52(3): 303-10.
- 32 Wu Y, Zhou H, Fan X, Zhang Y, Zhang M, Wang Y, *et al.* Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res* 2015; 25(1): 67-79.
- 33 Tang WW, Kobayashi T, Irie N, Dietmann S, Surani MA. Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nat Rev Genet* 2016; 17: 585-600.
- 34 Mamsen LS, Brochner CB, Byskov AG, Mollgard K. The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *Int J Dev Biol* 2012; 56(10/11/12): 771-8.
- 35 de Jong J, Stoop H, Gillis AJ, van Gurp RJ, van de Geijn GJ, Boer M, *et al.* Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. *J Pathol* 2008; 215(1): 21-30.
- 36 Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA, Human DAZL. DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 2009; 462(7270): 222-5.
- 37 Gkoutela S, Li Z, Vincent JJ, Zhang KX, Chen A, Pellegrini M, *et al.* The ontogeny of cKIT<sup>+</sup> human primordial germ cells proves to be a resource for human germ line reprogramming, imprint erasure and *in vitro* differentiation. *Nat Cell Biol* 2013; 15(1): 113-22.
- 38 Irie N, Weinberger L, Tang WW, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS, *et al.* SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 2015; 160(1/2): 253-68.
- 39 Aksoy I, Jauch R, Chen J, Dyla M, Divakar U, Bogu GK, *et al.* Oct4 switches partnering from Sox2 to Sox17 to reinterpret the enhancer code and specify endoderm. *EMBO J* 2013; 32(7): 938-53.
- 40 Fang F, Angulo B, Xia N, Sukhwani M, Wang Z, Carey CC, *et al.* A PAX5-OCT4-PRDM1 developmental switch specifies human primordial germ cells. *Nat Cell Biol* 2018; 20: 655-65.
- 41 Guo F, Yan L, Guo H, Li L, Hu B, Zhao Y, *et al.* The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells. *Cell* 2015; 161(1): 1437-52.
- 42 Li L, Dong J, Yan L, Yong J, Liu X, Hu Y, *et al.* Single-cell RNA-Seq analysis maps development of human germline cells and gonadal Niche interactions. *Cell Stem Cell* 2017; 20: 858-73.
- 43 Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res* 2018; 29: 207-214.
- 44 Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin



- M, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456(7258): 344-9.
- 45 Hou J, Niu M, Liu L, Zhu Z, Wang X, Sun M, *et al.* Establishment and characterization of human germline stem cell line with unlimited proliferation potentials and no tumor formation. *Sci Rep* 2015; 5: 16992.
- 46 Guo J, Grow EJ, Yi C, Mlcochova H, Maher GJ, Lindskog C, *et al.* Chromatin and single-cell RNA-Seq profiling reveal dynamic signaling and metabolic transitions during human spermatogonial stem cell development. *Cell Stem Cell* 2017; 21(4): 533-46.
- 47 Guo J, Grow EJ, Mlcochova H, Maher GJ, Lindskog C, Nie X, *et al.* The adult human testis transcriptional cell atlas. *Cell Res* 2018; 28: 1141-57.
- 48 Wang M, Liu X, Chang G, Chen Y, An G, Yan L, *et al.* Single-cell RNA sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis. *Cell Stem Cell* 2018; 23(4): 599-614.
- 49 Yamashiro C, Sasaki K, Yabuta Y, Kojima Y, Nakamura T, Okamoto I, *et al.* Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells *in vitro*. *Science* 2018; 362(6412): 356-60.

中国细胞生物学学报