

斑马鱼原始生殖细胞发育分子调控的研究进展

张小元 李逸平 李世峰*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 细胞生物学国家重点实验室,
上海市分子男科学重点实验室, 上海 200031)

摘要 原始生殖细胞是生物个体中最早出现的生殖细胞。原始生殖细胞经过增殖及迁移, 到达性腺位置, 再经过一系列的分化最终发育成精子或者卵子。在斑马鱼中, 原始生殖细胞最早出现在受精后3小时。而在小鼠中, 原始生殖细胞最早出现在受精后7.25天。在斑马鱼原始生殖细胞发育的过程中, 细胞迁移的启动、细胞数目的变化、细胞干性的维持等均受到严格的基因调控, 以保证原始生殖细胞的正常发育。该文综述了近年来发现的斑马鱼原始生殖细胞发育过程的相关调控分子, 并认识到这些调控分子的功能对哺乳动物生殖细胞发育的研究及人类生殖健康都具有重要的价值。

关键词 斑马鱼; 原始生殖细胞; 迁移; 发育

Advances in Molecular Regulation for the Development of Zebrafish Primordial Germ Cells

ZHANG Xiaoyuan, LI Yiping, LI Shifeng*

(State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract PGCs (primordial germ cells) are the earliest germ cells appeared in organism. PGCs go through proliferation and migration, and reach the sexual gland. Then, by a series of differentiation, PGCs finally become sperms or eggs. For zebrafish, PGCs appear at 3 hpf (hours post fertilization), while mouse PGCs appear at 7.25 dpf (days post fertilization). During the development of zebrafish PGCs, onset of cell migration, change of cell number and maintenance of cell pluripotency are under serious gene regulation, thus ensuring normal development of PGCs. This review summarizes relatedly regulating molecules in the development of zebrafish PGCs in recent years, and recognizing the function of these regulating molecules will be a good help for the research of the development of mammalian germ cells and human reproductive health.

Keywords zebrafish; primordial germ cells; migration; development

作为一种模式动物, 斑马鱼具有很多优点, 诸如体外受精、胚胎透明、胚胎易于获取且数量大、原始生殖细胞出现的时间早且易于标记跟踪, 等

等。所以, 斑马鱼适合用于包括原始生殖细胞研究在内的胚胎发育研究。此外, 一些转基因斑马鱼的基因组上带有特异表达于原始生殖细胞的插入片

收稿日期: 2021-05-19

接受日期: 2021-08-03

国家重点研发计划(批准号: 2019YFA0109900)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921413, E-mail: sfi01@sibcb.ac.cn

Received: May 19, 2021

Accepted: August 3, 2021

This work was supported by the National Key R & D Program of China (Grant No.2019YFA0109900)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921413, E-mail: sfi01@sibcb.ac.cn

段^[1-3], 根据插入片段表达的荧光, 可以方便地跟踪原始生殖细胞的增殖和迁移, 也可以借助荧光进行手动或者利用流式细胞荧光分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)分离原始生殖细胞, 用于后续相关研究。本文综述了原始生殖细胞产生的方式及影响斑马鱼原始生殖细胞发育的基因, 并对斑马鱼原始生殖细胞发育的未来研究作了展望。

1 原始生殖细胞的生成方式

原始生殖细胞是个体中最早出现的生殖干细胞, 最终将会分化为精子或者卵子, 从而维持生物个体繁衍后代的能力^[4-5]。根据特征不同, 人们把原始生殖细胞的生成方式分为预先生成(preformation)和诱导生成(induction)两种^[6]。

预先生成是指受精卵带有母源来源的生殖质(germ plasm, GP), 随着细胞分裂的进行, 生殖质被不均等地分配到特定的细胞中, 获得生殖质的细胞将会发育为原始生殖细胞, 而没有获得生殖质的细胞将会发育为体细胞^[6]。生殖质包括母源RNA和母源蛋白质, 往往与生殖细胞的发育有关。在原始生殖细胞中, 位于细胞质中的生殖质往往聚在一起, 呈颗粒状结构, 定位于细胞核外围^[7]。原始生殖细胞的生成方式为预先生成的物种有秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)等^[6]。在斑马鱼中, 最早在受精后3小时能够检测到原始生殖细胞^[1]。

诱导生成是指在受精卵早期分裂过程中体细胞与原始生殖细胞之间并没有区别, 但是当细胞分裂到一定的时期时, 由于细胞间的信号(例如WNT3信号通路、BMP4信号通路)诱导等原因, 部分细胞会分化为原始生殖细胞^[6]。原始生殖细胞的生成方式为诱导生成的物种有哺乳动物和蟋蟀。在小鼠中, 最早能够在受精后7.25天检测到原始生殖细胞^[8-9]。无论是预先生成还是诱导生成, 最开始生成的原始生殖细胞都会经历两个过程, 一是细胞增殖以增加原始生殖细胞的数量, 二是细胞迁移以到达最终的目的地——性腺位置。

2 斑马鱼原始生殖细胞发育过程的调控

1997年, 有两个实验室均在斑马鱼中发现了第

一个原始生殖细胞生物标志物, *ddx4(vasa)* RNA, 它可以有效地标记斑马鱼原始生殖细胞^[10-11]。后来, 人们又发现了其他的斑马鱼原始生殖细胞生物标志物^[12-15], 对原始生殖细胞的增殖和迁移有了更加深入的认识^[16-19]。

2.1 CDH1和RGS14A参与原始生殖细胞迁移的开始

CDH1(又称E-CADHERIN)可以调节细胞与细胞之间的黏附^[1,20]。在斑马鱼原始生殖细胞发育的过程中, 为了促进原始生殖细胞的迁移, 原始生殖细胞中CDH1的含量随着原始生殖细胞迁移的开始而迅速下降(图1)^[1,21]。高通量测序的结果显示, 当斑马鱼胚胎发育至受精后6小时到受精后24小时时, *cdh1* mRNA的表达量已经低到不能通过测序检测到^[22]。

RGS14A作为一种母源来源的生殖质, 具有G蛋白 α 亚基结合活性(G-protein alpha-subunit binding activity)^[23]。斑马鱼原始生殖细胞最早出现在受精后3小时, 此时其并没有立刻开始迁移, 直到受精后4.5小时才开始迁移(图1)^[1,21]。在受精后3小时到受精后4.5小时期间, 斑马鱼原始生殖细胞会逐步发生变形, 产生前端突起, CDH1和RGS14A的含量也会逐步下降^[21,23]。HARTWIG等^[23]在斑马鱼中发现, RGS14A可以正向调控CDH1, 影响原始生殖细胞变形过程中前端突起的形成(前端突起的形成是原始生殖细胞迁移的前提条件), 从而控制斑马鱼原始生殖细胞开始迁移的时刻。此外, 斑马鱼体细胞形成趋化因子CXCL12A的浓度梯度也需要一定的时间。因此, 原始生殖细胞出现的时刻与开始迁移的时刻并不同步。在原始生殖细胞开始迁移之前, 原始生殖细胞中CDH1与RGS14A的含量较高, 阻碍原始生殖细胞的迁移; 在原始生殖细胞开始迁移之后, 原始生殖细胞中CDH1与RGS14A的含量逐步下降, 促进原始生殖细胞的迁移(图1)。

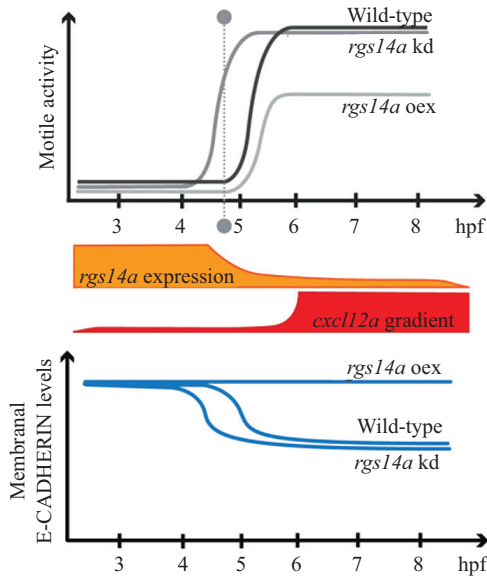
2.2 CA15B和RAC1A调节原始生殖细胞的极化变形

细胞的极化变形对于细胞的迁移至关重要, 且pH能够影响细胞的极化变形^[24-25]。体外实验显示, 在迁移的细胞内存在pH浓度梯度^[26-27], 但是鲜有体内实验证明pH对细胞迁移的影响。CA15B是一种调控pH浓度的蛋白质, 在多种迁移的细胞中均有所表达^[28-29], 对于建立和维持pH在细胞中的不均匀分布至关重要。

在斑马鱼中, CA15B是一种母源来源的生殖质,

在原始生殖细胞和卵巢中表达,但是在精巢中不表达^[30-31]。2015年, TARBASHEVICH等^[31]发现,在斑马鱼原始生殖细胞中,当趋化因子CXCL12A的浓度梯度建立起来后,原始生殖细胞中CXCL12A的受体CXCR4B感受CXCL12A的信号而被激活,接着CA15B使得原始生殖细胞前端的pH升高。pH的升

高促进RAC1A(又称RAC1)的活化,活化的RAC1A接着促进ACTB1(又称ACTIN)朝着原始生殖细胞前端聚集,进而使得原始生殖细胞朝着CXCL12A浓度高的方向定向迁移(图2)。在斑马鱼中,敲低*cal5b*,或者降低原始生殖细胞中的pH后,原始生殖细胞均不能朝着CXCL12A浓度高的方向定向迁移(图2)^[31]。



上图中的虚线表示斑马鱼原始生殖细胞开始迁移的时间。kd: 敲低; oex: 过表达; hpf: 受精后小时数。

The dashed line in the up panel means the time when zebrafish PGCs (primordial germ cells) start migration. kd: knock down; oex: over expression; hpf: hours post fertilization.

图1 斑马鱼原始生殖细胞迁移的启动依赖于*rgs14a* mRNA的降解(根据参考文献[23]修改)

Fig.1 The onset of motile activity of zebrafish PGCs (primordial germ cells) depends on the degradation of *rgs14a* mRNA (modified from the reference [23])

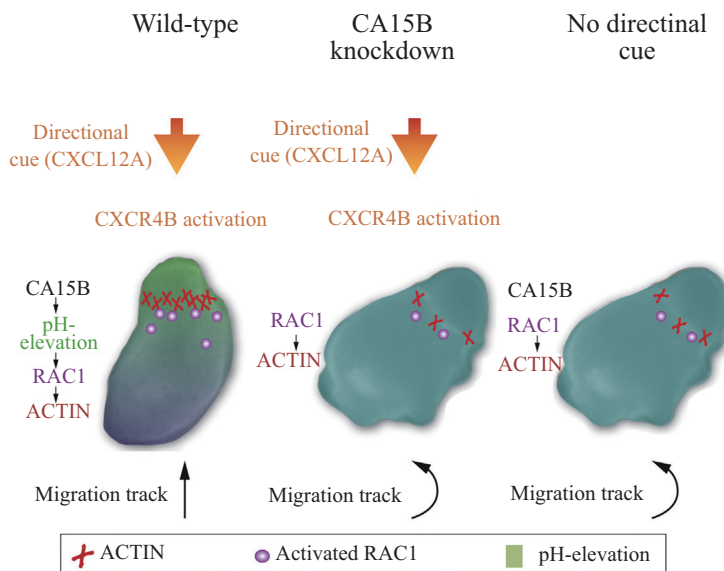


图2 斑马鱼原始生殖细胞内环境pH的升高对其极化变形至关重要(根据参考文献[31]修改)

Fig.2 Cellular environmental pH-elevation in zebrafish PGCs (primordial germ cells) is important for its polarity (modified from the reference [31])

2.3 CXCL12A、CXCR4B、ACKR3B和 miR-430调控原始生殖细胞的定向迁移

2002年, DOITSIDOU等^[16]在斑马鱼中发现, CXCL12A(又称SDF1A)是一种趋化因子, 且其可以介导原始生殖细胞的迁移。若原始生殖细胞不能接收CXCL12A的信号, 则其不能定向迁移到性腺位置。当CXCL12A异位表达时, 原始生殖细胞将迁移到有CXCL12A表达的地方而不是性腺位置^[16]。CXCR4B是一种7次跨膜蛋白, 也是一种G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor), 可以与配体CXCL12A结合^[16,32]。2003年, KNAUT等^[17]发现, 在斑马鱼 *cxcr4b* 基因突变后, 原始生殖细胞还是能够迁移的, 但是不能定向迁移到性腺位置。进一步的研究显示, CXCL12A(配体)与CXCR4B(受体)间的相互作用介导了斑马鱼原始生殖细胞的定向迁移过程(图3A)。2019年, ZHANG等^[22]通过单细胞测序的方法研究了斑马鱼早期原始生殖细胞的转录组, 发现 *cxcr4b* 表达量较高, *cxcl12a* 表达量较低。

在斑马鱼中, CXCL12A的受体除了CXCR4B以外, 还有另外一种受体ACKR3B(又称CXCR7B)。2008年, BOLDAJIPOUR等^[33]在斑马鱼中发现, ACKR3B主要在体细胞中表达, 与CXCL12A结合后能够将CXCL12A转移至细胞内的溶酶体, 促成CXCL12A的降解, 从而形成CXCL12A的浓度梯度, 介导原始生殖细胞朝着CXCL12A浓度高的方向迁移, 以达到细胞定向迁移的目的(图3A)。

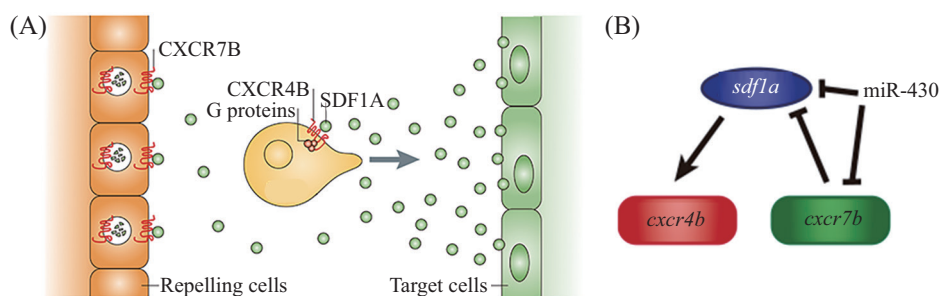
斑马鱼原始生殖细胞的迁移也受到miR-430的影响。2011年, STATON等^[34]发现, miR-430可以调控 *cxcl12a* 和 *ackr3b* 的表达从而影响斑马鱼原始生殖

细胞的迁移。miR-430通过抑制 *cxcl12a* 的表达以形成适宜的CXCL12A浓度梯度, 通过抑制 *ackr3b* 的表达以避免CXCL12A被ACKR3B过度降解, 从而为趋化因子CXCL12A的浓度变化提供缓冲, 以避免CXCL12A浓度的过度变化, 进而保证原始生殖细胞的定向迁移(图3B)^[34]。此外, 2013年, LEWELLIS等^[35]在斑马鱼神经系统的研究中发现, *cxcl12a* 可以同时被miR-430和 *ackr3b* 调控, 从而保证斑马鱼神经元的定向迁移。

2.4 DND1和DAZL抑制原始生殖细胞中转录本的降解

DND1(又称DND)是一种母源来源的生殖质, 也是一种RNA结合蛋白, 在功能上较为保守, 在斑马鱼、非洲爪蟾、小鼠和鸡等物种的生殖细胞中均能检测到DND1蛋白的表达^[36]。2003年, WEIDINGER等^[36]在斑马鱼中发现, 敲除 *dnd1* 基因后, 原始生殖细胞的迁移受阻, 原始生殖细胞发生凋亡, 但是体细胞的发育不受影响。这说明DND1对原始生殖细胞的生存和迁移具有重要的调节作用。

在斑马鱼中, 合子型基因miR-430能够降解母源mRNA^[37]。但是MISHIMA等^[38]发现, 在斑马鱼的原始生殖细胞和体细胞中, miR-430降解母源mRNA的结果存在差异。 *nanos3* 和 *tdrd7a* 是miR-430的两个靶基因, 在体细胞中被降解, 但是在原始生殖细胞中并未被降解, 依然大量存在, 似乎不受miR-430的影响。2007年, KEDDE等^[39]发现, 在斑马鱼原始生殖细胞中, DND1可以结合在 *nanos3* 和 *tdrd7a* 的3'端非翻译区(3' untranslated regions, 3'UTRs)中富含尿嘧啶的位点, 且这些位点也是miR-430的结合位点。DND1与miR-430竞争性结合在这些位点上, 故而



A: 原始生殖细胞朝着SDF1A浓度高的方向迁移; B: miR-430抑制 *sdf1a* 和 *cxcr7b* 的表达。箭头表示促进, T型箭头表示抑制。

A: PGCs migrate towards the direction with high SDF1A concentration; B: miR-430 inhibits the expression of *sdf1a* and *cxcr7b*. The arrowhead means promotion, and the T-shaped arrow means inhibition.

图3 斑马鱼原始生殖细胞迁移路线及miR-430对迁移的影响(根据参考文献[21,34]修改)

Fig.3 Zebrafish PGCs (primordial germ cells) migration path and the influence of miR-430 on migration (modified from the references [21,34])

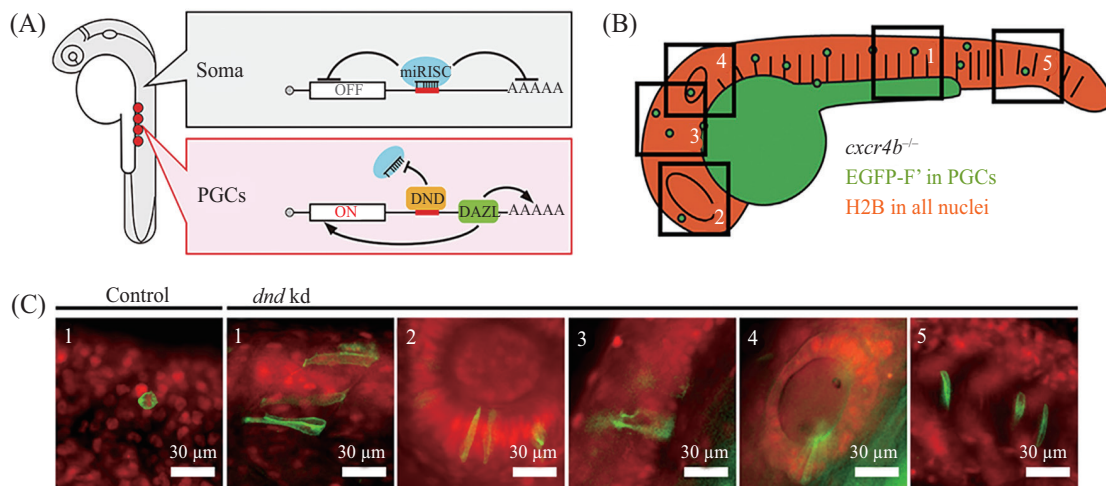
DND1能够阻止包含 miR-430的RNA诱导的沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC)结合到 *nanos3*和 *tdrd7a*的3'端非翻译区,从而抑制 *nanos3*和 *tdrd7a*的降解(图4A)^[39]。

2017年, GROSS-THEBING等^[40]发现, DND1还能够维持斑马鱼原始生殖细胞的干性,抑制原始生殖细胞向体细胞分化。GROSS-THEBING等在斑马鱼中进行的实验表明,与对照组相比,敲除 *dnd1*后原始生殖细胞的数目并没有减少,说明DND1对原始生殖细胞的存活是非必需的,这个结论与2003年 WEIDINGER等^[36]的结论相反。进一步的实验表明,敲除 *dnd1*和 *cxcr4b*(敲除 *cxcr4b*是为了让原始生殖细胞失去定向迁移的能力,使其不仅会迁移到性腺位置,也会迁移到其他组织)后,迁移到非性腺位置的原始生殖细胞会分化为该组织如肌肉、眼、脑、耳软骨囊、脊索等对应的体细胞(图4B和图4C),并且表现出该组织对应体细胞的基因表达模式和细胞外形^[40]。DND1维持生殖细胞干性的功能是保守的,2017年, YAMAJI等^[41]发现,在小鼠的原始生殖细胞中, DND1可以结合到mRNA的3'端非翻译区的含有UU(A/U)三碱基序列的位点上,招募CCR4-NOT脱腺苷酸化酶复合体,降低靶mRNA的稳定性,从而抑制细胞凋亡,进而维持原始生殖细胞的存活及干性。

DAZL是一种母源来源的生殖质,也是一种RNA结合蛋白^[42-43]。2009年, TAKEDA等^[44]发现,在斑马鱼原始生殖细胞中, DAZL可以结合到 *tdrd7a* mRNA的3'端非翻译区,使得 *tdrd7a* mRNA的polyA尾巴变长,抑制包含miR-430的RNA诱导的沉默复合体对 *tdrd7a* mRNA的降解,使得 *tdrd7a* 得以在原始生殖细胞中表达,而在体细胞中降解(图4A)。此外, DAZL结合在自身mRNA(*dazl* mRNA)的3'端非翻译区,可促进DAZL蛋白的合成,使得DAZL能够持续发挥功能^[44]。所以, DND1和DAZL协同作用,使得在斑马鱼原始生殖细胞中,某些转录本能够逃离miR-430的降解,这些没有被降解的转录本可以继续原始生殖细胞中发挥作用(图4A)^[45]。此外,2011年, WISZNAK等^[43]在斑马鱼中发现, ELAVL2是母源来源的生殖质,特意表达于生殖细胞中, DAZL可以结合到 *elavl2* mRNA的3'端非翻译区,抑制 *elavl2* mRNA的降解,促进 *elavl2* mRNA的翻译。

2.5 其他的与斑马鱼原始生殖细胞发育相关的基因

除了上面提到的影响斑马鱼原始生殖细胞发育的基因外,还有一些其他的基因。NANOS3是一种母源来源的生殖质,也是一种RNA结合蛋白,能够影响斑马鱼原始生殖细胞的存活和迁移^[12,46],带有 *nanos3* 3'端非翻译区的RNA可以特意地定位到



A: DND与DAZL协同作用,阻止原始生殖细胞中的mRNA被miRISC降解;箭头表示促进,T型箭头表示抑制;B、C:在斑马鱼中敲除 *dnd*和 *cxcr4b*,当胚胎发育至受精后24小时,原始生殖细胞的形态与其所在组织细胞的形态接近。1:肌肉;2:眼;3:脑;4:耳软骨囊;5:脊索;kd:敲低。

A: DND and DAZL cooperate to stop mRNA degrading by miRISC in PGCs; the arrowhead means promotion, and the T-shaped arrow means inhibition; B,C: *dnd*-deficient PGCs from *cxcr4b*^{-/-} embryos at 24 hpf (hours post fertilization) exhibit different somatic morphologies based on the tissue within which they reside. 1: muscle; 2: eye; 3: brain; 4: otic capsule; 5: notochord; kd: knock down.

图4 DND和DAZL在斑马鱼原始生殖细胞中的作用(根据参考文献[40,45]修改)

Fig.4 Function of DND and DAZL in zebrafish PGCs (primordial germ cells) (modified from the references [40,45])

原始生殖细胞中^[12]。利用 *nanos3* 3'端非翻译区的定位功能, 可以构建带有EGFP-*nanos3*-3'UTR插入片段的转基因斑马鱼^[1,3,47], 或者直接在斑马鱼胚胎中注射含有GFP-*nanos3*-3'UTR的RNA^[12-13,23], 以此来标记原始生殖细胞。此外, DRAPER等^[46]发现, NANOS3能够影响斑马鱼后期卵子的产生, 但是对早期卵子的产生及卵子的成熟过程似乎没有影响。RHOA/ROCK通路能够影响斑马鱼原始生殖细胞生殖质中mRNA的正确定位^[48]。TDRD7A是一种母源来源的生殖质, 能够影响斑马鱼原始生殖细胞中生殖质的形态和数目^[7]。在斑马鱼原始生殖细胞迁移的过程中, TDRD7A通过调节原始生殖细胞中生殖质的分布, 从而影响原始生殖细胞的重编程, 使得原始生殖细胞不朝着体细胞分化的方向发育^[49]。在斑马鱼原始生殖细胞中, TDRD6与BUC相互作用, 使得母源来源的生殖质在受精卵早期分裂过程中以相分离的方式分配到原始生殖细胞, 而敲除*tdrd6*基因后, 生殖质的分配出现障碍, 最后导致原始生殖细胞的数目减少^[19]。NANOG是一种转录因子, 能够抑制斑马鱼早期胚胎发育中原始生殖细胞的增殖, 使得原始生殖细胞的数目维持在相对较低的水平^[18]。RHOA是一种RHO家族蛋白, 也是一种GTP酶, 能够促进斑马鱼原始生殖细胞的肌动蛋白逆流, 而肌动蛋白逆流有利于在原始生殖细胞与周围的组织间产生CDH1介导的牵引力, 这种牵引力对于体内细胞的运动至关重要^[50]。HMGC0A还原酶活性和GGT1异戊二烯化能力都会影响斑马鱼原始生殖细胞的迁移^[51]。

此外, 还有一些基因的产物在斑马鱼原始生殖细胞中高表达, 是生殖质的组成部分, 可以用来标记原始生殖细胞, 但是其功能尚未明确。这些基因包括*ddx4*^[10-11,52-55]、*hlm*^[14-15]、*kop*^[1]、*celfl*^[42]、*elavl2*^[43]和*gra*^[7,40]等。

3 展望

斑马鱼是一种研究生殖细胞发育的模式生物, 特别是在原始生殖细胞研究领域, 人们以斑马鱼为模型深入研究了原始生殖细胞的发育过程。在哺乳动物原始生殖细胞发育的研究中, 人们往往会以斑马鱼原始生殖细胞发育的知识作为参考。单细胞测序是近年来出现的用来研究个体发育的一种强有力的方法, 可以发现新的调控个体发育的关键基因。

未来, 可以借助单细胞测序和生殖细胞特有的生物标志物来研究斑马鱼生殖细胞发育过程的全貌。此外, 斑马鱼原始生殖细胞中非编码RNA的功能也值得研究。目前已知的影响斑马鱼原始生殖细胞发育的基因几乎都是蛋白编码基因, 鲜有非编码RNA影响斑马鱼原始生殖细胞发育的报道。研究非编码RNA对斑马鱼原始生殖细胞的影响, 可以帮助人们更加全面地认识斑马鱼原始生殖细胞的发育机制, 也可以为研究其他物种原始生殖细胞的发育机制提供思路和借鉴。

参考文献 (References)

- [1] BLASER H, EISENBEISS S, NEUMANN M, et al. Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(17): 4027-38.
- [2] LEU D H, DRAPER B W. The *ziwi* promoter drives germline-specific gene expression in zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(10): 2714-21.
- [3] YE D, ZHU L, ZHANG Q, et al. Abundance of early embryonic primordial germ cells promotes zebrafish female differentiation as revealed by lifetime labeling of germline [J]. *Mar Biotechnol*, 2019, 21(2): 217-28.
- [4] HE Z, KOKKINAKI M, PANT D, et al. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis [J]. *Reproduction*, 2009, 137(6): 901-11.
- [5] THOMSON T, LIN H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25(1): 355-76.
- [6] STROME S, UPDIKE D. Specifying and protecting germ cell fate [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(7): 406-16.
- [7] STRASSER M J, MACKENZIE N C, DUMSTREI K, et al. Control over the morphology and segregation of Zebrafish germ cell granules during embryonic development [J]. *BMC Dev Biol*, 2008, 8(58): 1-16.
- [8] GINSBURG M, SNOW M H L, MCLAREN A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation [J]. *Development*, 1990, 110(2): 521-8.
- [9] MCLAREN A. Signaling for germ cells [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(4): 373-6.
- [10] OLSEN L C, AASLAND R, FJOSE A. A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells [J]. *Mech Dev*, 1997, 66(1): 95-105.
- [11] YOON C, KAWAKAMI K, HOPKINS N. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells [J]. *Development*, 1997, 124(16): 3157-66.
- [12] KOPRUNNER M, THISSE C, THISSE B, et al. A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(21): 2877-85.
- [13] SAITO T, FUJIMOTO T, MAEGAWA S, et al. Visualization of primordial germ cells *in vivo* using GFP-nos1 3'UTR mRNA [J]. *Int J Dev Biol*, 2006, 50(8): 691-9.

- [14] MULLER K, THISSE C, THISSE B, et al. Expression of a linker histone-like gene in the primordial germ cells in zebrafish [J]. *Mech Dev*, 2002, 117(1): 253-7.
- [15] WIBRAND K, OLSEN L C. Linker histone H1M transcripts mark the developing germ line in zebrafish [J]. *Mech Dev*, 2002, 117(1/2): 249-52.
- [16] DOITSIDOU M, REICHMAN-FRIED M, STEBLER J, et al. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1 [J]. *Cell*, 2002, 111(5): 647-59.
- [17] KNAUT H, WERZ C, GEISLER R, et al. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor [J]. *Nature*, 2003, 421(6920): 279-82.
- [18] WANG H, LIU Y, YE D, et al. Knockdown of zebrafish Nanog increases primordial germ cells during early embryonic development [J]. *Dev Growth Differ*, 2016, 58(4): 355-66.
- [19] ROOVERS E F, KAAIJ L J T, REDL S, et al. Tdrd6a regulates the aggregation of Buc into functional subcellular compartments that drive germ cell specification [J]. *Dev Cell*, 2018, 46(3): 285-311.
- [20] WHEELOCK M J, JOHNSON K R. Cadherins as modulators of cellular phenotype [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19(1): 207-35.
- [21] RICHARDSON B E, LEHMANN R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(1): 37-49.
- [22] ZHANG X, LI X, LI R, et al. Transcriptomic profile of early zebrafish PGCs by single cell sequencing [J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0220364.
- [23] HARTWIG J, TARBASHEVICH K, SEGGEWISS J, et al. Temporal control over the initiation of cell motility by a regulator of G-protein signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): 11389-94.
- [24] KOIVUSALO M, WELCH C, HAYASHI H, et al. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling [J]. *J Cell Biol*, 2010, 188(4): 547-63.
- [25] STOCK C, SCHWAB A. Protons make tumor cells move like clockwork [J]. *Pflugers Arch*, 2009, 458(5): 981-92.
- [26] MARTIN C, PEDERSEN S F, SCHWAB A, et al. Intracellular pH gradients in migrating cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(3): C490-5.
- [27] SCHNEIDER L A, KORBER A, GRABBE S, et al. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy [J]? *Arch Dermatol Res*, 2007, 298(9): 413-20.
- [28] GILMOUR K M, PERRY S F. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish [J]. *J Exp Biol*, 2009, 212(11): 1647-61.
- [29] CHICHE J, ILC K, BRAHIMI-HORN M C, et al. Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration [J]. *Adv Enzyme Regul*, 2010, 50(1): 20-33.
- [30] WANG H, TENG Y, XIE Y, et al. Characterization of the carbonic anhydrases 15b expressed in PGCs during early zebrafish development [J]. *Theriogenology*, 2013, 79(3): 443-52.
- [31] TARBASHEVICH K, REICHMAN-FRIED M, GRIMALDI C, et al. Chemokine-dependent pH elevation at the cell front sustains polarity in directionally migrating zebrafish germ cells [J]. *Curr Biol*, 2015, 25(8): 1096-103.
- [32] CHONG S W, EMELYANOV A, GONG Z, et al. Expression pattern of two zebrafish genes, *cxcr4a* and *cxcr4b* [J]. *Mech Dev*, 2001, 109(2): 347-54.
- [33] BOLDAJIPOUR B, MAHABALESHWAR H, KARDASH E, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration [J]. *Cell*, 2008, 132(3): 463-73.
- [34] STATON A A, KNAUT H, GIRALDEZ A J. miRNA regulation of Sdf1 chemokine signaling provides genetic robustness to germ cell migration [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(3): 204-11.
- [35] LEWELLIS S W, NAGELBERG D, SUBEDI A, et al. Precise SDF1-mediated cell guidance is achieved through ligand clearance and microRNA-mediated decay [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(3): 337-55.
- [36] WEIDINGER G, STEBLER J, SLANCHEV K, et al. *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(16): 1429-34.
- [37] GIRALDEZ A J, MISHIMA Y, RIHEL J, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs [J]. *Science*, 2006, 312(5770): 75-9.
- [38] MISHIMA Y, GIRALDEZ A J, TAKEDA Y, et al. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430 [J]. *Curr Biol*, 2006, 16(21): 2135-42.
- [39] KEDDE M, STRASSER M J, BOLDAJIPOUR B, et al. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA [J]. *Cell*, 2007, 131(7): 1273-86.
- [40] GROSS-THEBING T, YIGIT S, PFEIFFER J, et al. The vertebrate protein dead end maintains primordial germ cell fate by inhibiting somatic differentiation [J]. *Dev Cell*, 2017, 43(6): 704-15.
- [41] YAMAJI M, JISHAGE M, MEYER C, et al. DND1 maintains germline stem cells via recruitment of the CCR4-NOT complex to target mRNAs [J]. *Nature*, 2017, 543(7646): 568-72.
- [42] HASHIMOTO Y, MAEGAWA S, NAGAI T, et al. Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation [J]. *Dev Biol*, 2004, 268(1): 152-61.
- [43] WISZNIAK S E, DREDGE B K, JENSEN K B. HuB(*elav12*) mRNA is restricted to the germ cells by post-transcriptional mechanisms including stabilisation of the message by DAZL [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20773.
- [44] TAKEDA Y, MISHIMA Y, FUJIWARA T, et al. DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly(A) tail length in zebrafish [J]. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7513.
- [45] MISHIMA Y. Widespread roles of microRNAs during zebrafish development and beyond [J]. *Dev Growth Differ*, 2012, 54(1): 55-65.
- [46] DRAPER B W, MCCALLUM C M, MOENS C B. *nanos1* is required to maintain oocyte production in adult zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2007, 305(2): 589-98.
- [47] WONG T T, COLLODI P. Inducible sterilization of zebrafish by disruption of primordial germ cell migration [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e68455.
- [48] MIRANDA-RODRIGUEZ J R, SALAS-VIDAL E, LOMELI H, et al. RhoA/ROCK pathway activity is essential for the correct localization of the germ plasm mRNAs in zebrafish embryos [J]. *Dev Biol*, 2017, 421(1): 27-42.

- [49] D'ORAZIO F M, BALWIERZ P J, GONZALEZ A J, et al. Germ cell differentiation requires Tdrd7-dependent chromatin and transcriptome reprogramming marked by germ plasm relocalization [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(5): 641-56.
- [50] KARDASH E, REICHMAN-FRIED M, MAITRE J L, et al. A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility *in vivo* [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(1): 47-53.
- [51] THORPE J L, DOITSIDOU M, HO S Y, et al. Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGC α reductase activity and prenylation [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(2): 295-302.
- [52] BRAAT A K, ZANDBERGEN T, WATER S V D, et al. Characterization of zebrafish primordial germ cells Morphology and early distribution of vasa RNA [J]. *Dev Dyn*, 1999, 216(2): 153-67.
- [53] KNAUT H, PELEGRI F, BOHMANN K, et al. Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification [J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(4): 875-88.
- [54] BRAAT A K, WATER S V D, GOOS H, et al. Vasa protein expression and localization in the zebrafish [J]. *Mech Dev*, 2000, 95(1): 271-4.
- [55] BRAAT A K, VAN DE WATER S, KORVING J, et al. A zebrafish vasa morphant abolishes vasa protein but does not affect the establishment of the germline [J]. *Genesis*, 2001, 30(3): 183-5.