

Hedgehog信号通路在睾丸中的作用

卢孟阳¹ 刘彪² 郭倩¹ 彭甲银^{2*}

¹国科大杭州高等研究院, 生命与健康科学学院, 杭州 310024;

²中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200030)

摘要 Hedgehog(Hh)信号通路是一条经典的通路, 在睾丸的发育过程中扮演着重要角色, 参与调控了睾丸中多种细胞的分化, 维持着睾丸结构的稳定。Hh配体Dhh(Desert Hedgehog)由睾丸支持细胞(Sertoli cell)分泌并作用到多种细胞, 通过Gli直接调节细胞中一系列下游靶基因的表达。Hh信号通路的紊乱会造成睾丸结构被破坏, 使得雄性动物生育能力降低。关于Hh在睾丸中的作用目前仍然有许多问题尚未解决, 例如, 它如何决定细胞命运, 下游有哪些靶基因等。该文阐述了目前学界关于Hh在睾丸中的相关研究, 并对尚待研究和解决的问题进行了说明和探讨。

关键词 Hedgehog信号通路; 睾丸发育; 睾丸间质细胞

The Role of Hedgehog Signaling Pathway in Testis

LU Mengyang¹, LIU Biao², GUO Qian¹, PENG Jiayin^{2*}

¹College of Life and Health Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, UCAS, Hangzhou 310024, China;

²Center for Excellence in Molecular Cell Science, CAS, Shanghai 200030, China)

Abstract Hh (Hedgehog) signaling pathway is a classic pathway and it plays critical roles during organogenesis of the testis. Hh pathway regulates the differentiation of several types of cells, affects the patterning of testis and maintains adult testicular homeostasis. The main Hh signaling pathway ligand Dhh (Desert Hedgehog) is secreted from Sertoli cells and targets on distinct cell types. It directly regulates a distinct set of genes through Gli. The disorder of Dhh pathway would cause the defect of the testis architecture and reproduction. However, there are still many questions about the role of Hh signaling in gonad, such as how it determines cell fate and what downstream target genes are. This article reviews the current knowledge of the role of Hh signaling pathway in distinct gonad cell types and highlights the questions that remain to be explored.

Keywords Hedgehog signaling pathway; testis development; Leydig cell

Hh(Hedgehog)信号通路是一条进化上保守的信号通路, 在动物发育过程中发挥重要功能^[1], 并且对调节胚胎发育中细胞定向分化具有重要作用。性腺(睾丸或卵巢)是哺乳动物中唯一具有双向分化潜能的组织。在胚胎期第11.5天, Hh信号通路的配体Dhh会在Sertoli细胞中表达^[2]。睾丸中表达的Dhh通过旁分泌的方式, 可以作用到多种细胞, 促进睾丸形成稳

定的结构。Hh信号通路在不同的时间和空间发挥不同作用, 除了可以调控多种细胞的分化和发育外, 还能维持细胞的稳定结构和分泌能力, 所以研究Hh信号通路中各组分在睾丸中的功能具有重要的意义。除了Hh信号通路外, 睾丸内还存在多种信号通路(Wnt、Bmp等)和细胞因子(FGF9、PDGF等), 它们共同构成了睾丸内多种细胞间复杂的信号调节网

收稿日期: 2022-06-21 接受日期: 2022-09-14

国家自然科学基金(批准号: 31801184)资助的课题

*通讯作者。Tel: 19945799820, E-mail: jiayin.peng@sibcb.ac.cn

Received: June 21, 2022

Accepted: September 14, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31801184)

*Corresponding author. Tel: +86-19945799820, E-mail: jiayin.peng@sibcb.ac.cn

络。研究这些信号通路之间的相互作用网络可以为睾丸发育及睾丸功能的相关研究提供理论基础。在这篇文章中,我们将探讨Hh通路中的主要分子在睾丸发育过程中的表达情况和功能,并探讨Hh信号通路下游靶基因在睾丸中的功能,分析Hh信号通路与其他信号通路之间的联系,为未来相关领域的研究提供参考。

1 Hh通路在睾丸中的表达模式

自从1980年在果蝇中发现Hh以来,关于Hh信号通路的分子转导机制已经有了许多非常细致的研究。在哺乳动物中共发现了Hh的三种配体基因:*Shh*(Sonic Hedgehog), *Ihh*(Indian Hedgehog)和*Dhh*,每一种Hh配体都有其特定的功能和表达模式。*Shh*在消化系统、肺等多种组织器官中表达, *Ihh*主要与骨发育有关, *Dhh*在性腺和神经鞘中表达,且*Dhh*也是睾丸中占主导地位的Hh配体,它主要由生精小管内侧的Sertoli细胞(Sertoli cell, SC)表达。*Dhh*的N-端是生物学活性区域, C-端是一个具有自我催化活性的结构,用以自我加工成熟,此外*Dhh*还需要其他工具酶的修饰才能形成具有生物学功能的构象。在睾丸中一种比较重要的修饰酶是Hh酰基转移酶(hedgehog acyl-transferase, HHAT),它最初是在睾丸不能正常发育的雄性患者中被发现的, *HHAT*基因单

倍剂量不足的患者虽然具有正常的XY染色体核型,但是却无法发育出睾丸^[3]。

*Dhh*从SC分泌出去之后,会以旁分泌的形式作用于附近的细胞,包括生精小管内的原始生殖细胞(perimordial germ cell, PGC)、位于生精小管外侧的管周类肌细胞(peritubular myoid cell, PMC)和睾丸间质区域的Leydig细胞(Leydig cell, LC)(图1)。*Dhh*到达靶细胞之后,会与细胞表面的12次跨膜受体ptch1/2结合,该结合过程会受到协同受体Boc1、Gas1、Cdo等的协助。相较于Ptch2, Ptch1是更普遍的Hh受体形式, Ptch1与Ptch2高度同源,但它们的C-端氨基酸序列有所不同,这可能会影响Ptch1结合配体Hh时的特异性和敏感性。由于Ptch1是Hh的特异性结合受体,所以Ptch1阳性的细胞一般都是Hh的靶细胞,这也是确定Hh靶细胞的一种方式。*Dhh*与Ptch结合之后,会解除其对结合蛋白Smo的抑制,使得Smo发生磷酸化,磷酸化后的Smo开始由初级纤毛底部向顶部聚集。Smo的表达区域在胚胎时期主要集中在睾丸的间质区域^[4]。激活后的Smo可以消除Sufu对转录因子Gli的抑制作用,开启下游基因的表达。Gli蛋白共有Gli1/2/3三种, Gli依据加工方式的不同,被分为激活态(Gli^A)和抑制态(Gli^R)两种形式。Gli1主要是在Hh信号通路被激活时加速下游基因表达的开启, Gli2主要以激活形式存在, Gli3主要

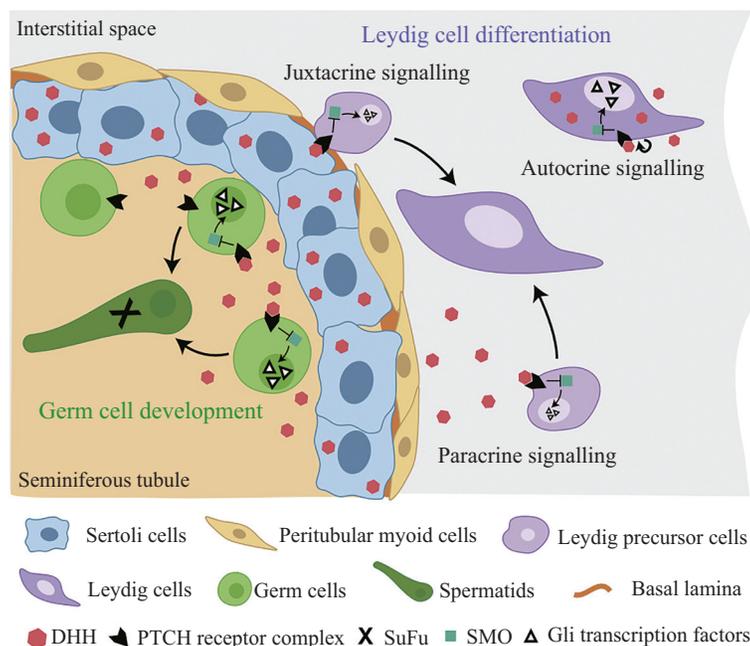


图1 Dhh信号通路在睾丸中的分泌和作用(根据参考文献[5]修改)

Fig.1 Secretion and function of Dhh signaling pathway in testis (modified from the reference [5])

以抑制形式存在。Gli的表达位置随着发育时间而改变,这说明Hh信号通路在睾丸中的功能是动态变化的。在胚胎时期,Gli主要在间质区域表达。小鼠出生5日后,三种Gli蛋白都开始在精原细胞中表达,且其表达会持续到成年期,而此时间质区域中Gli的检测信号则较为微弱^[4]。

2 Hh通路在睾丸发育过程中的作用

初级纤毛在Hh信号转导过程中扮演着重要的角色,在睾丸的类器官中,抑制IFT88、ODF2等纤毛的重要组成蛋白的功能后,细胞集群无法形成正确的组织结构,表明初级纤毛的异常会对睾丸中部分细胞的正常分化产生影响^[6]。另外,在猪睾丸中使用纤毛蛋白D抑制剂破坏初级纤毛结构之后,新生个体睾丸形成生精小管的能力降低^[7],这也反映了初级纤毛对于生殖系统发育的重要作用。LC上初级纤毛的数量能够反映出不同发育时期Dhh对LC调控作用的强弱。初级纤毛主要存在于未成熟或未完全分化的LC和SC中,随着睾丸的发育,初级纤毛结构逐渐减少,这可能是因为Hh对于LC细胞的分化起到极其重要的调控作用,所以使得LC前体细胞对于Hh信号更加敏感。在体外培养的未成熟LC中也有类似的现象,用Hh通路激动剂处理小鼠Leydig细胞,可以引起下游反应发生,但成熟的LC分化完成后,细胞内的初级纤毛结构就已消失^[8]。

在胚胎期睾丸发育过程中,有许多细胞的分化和结构的形成过程依赖于Hh通路功能的正常发挥。小鼠胚胎发育至第11.5天(11.5 dpc)时,Dhh开始在SC细胞中表达,SC细胞开始增殖,细胞数量迅速增多,并在生殖细胞周围延伸,将生殖细胞包围,形成睾丸索结构,睾丸索最终会发育形成个体中的生精小管^[9]。而在同一时期的卵巢中则无Dhh表达,暗示Dhh可能参与了性别分化的调控。SC会分泌包括Dhh在内的多种细胞因子,这些细胞因子会作用于性腺中的干细胞并诱导其分化,LC和PMC在睾丸索之间的间质区域开始形成,而且Hh通路参与了LC和PMC的分化过程。*Dhh*^{-/-}小鼠睾丸中PMC形态不成熟^[10],说明Dhh参与了PMC的分化,但是PMC分化成熟时为长梭形,且其前体细胞缺少标志蛋白,很难对其分化发育的过程进行追踪,所以目前对于Dhh通路调控PMC分化的机制仍然缺乏深入的研究。敲除*Dhh*基因,会造成睾丸索结构异常,这是因为Dhh

缺失造成PMC产生功能缺陷,从而影响基底膜相关组分分泌,使得睾丸索结构瓦解^[11]。在电镜下观察*Dhh*^{-/-}小鼠的睾丸,发现PMC形态不成熟,肌动蛋白微丝结构不完整,PMC胞内缺少胞饮小泡,且PMC的分泌物所形成的基底膜结构异常会造成附着在其上的SC极性缺失,但在对性激素不敏感的转基因小鼠中这些结构功能正常^[10],说明这些转变不是由雄激素异常引起的,而更可能是Hh信号通路缺失造成的结果。在小鼠体内的研究也显示,小鼠胚胎发育到E12.5时,Hhat缺失会使睾丸体积变小,使得睾丸内无法形成睾丸索结构^[3]。睾丸索是胚胎期睾丸中的管状结构,后期会发育成生精小管,且精细胞就在管内形成。在3D培养的小鼠睾丸组织中,加入Hh通路激活剂SAG能够显著提高Gli1的表达量,而通路中的其他分子的水平变化不大,在细胞层面上则表现为PMC的细胞数量上升,用Hh通路抑制剂环巴胺处理则得到完全相反的结果,说明Hh通路主要通过Gli1影响PMC的增殖,促进睾丸结构的发育^[12]。另外一项在袋鼠中的研究表明,PMC的分化过程需要Dhh参与,从而形成正常的睾丸索结构^[13]。

而关于LC的分化情况则更复杂一些。LC细胞位于睾丸间质中,在发育过程中会经历两种不同的阶段,(1)胚胎期的FLC(fetal Leydig cell),从12.5 dpc开始出现,在出生后不久消失;(2)成体期的ALC(adult Leydig cell),从青春期开始出现。在12.0~13.0 dpc时,FLC开始分泌睾酮,当小鼠临近出生时,血液中睾酮浓度达到最大值^[6]。在SC形成后24 h左右(大约12.5 dpc),FLC开始出现。在12.5~18.5 dpc时,FLC的数量一直在增加,而在出生后的一周内,FLC逐渐消失,ALC逐渐取代FLC的位置和功能。LC的分化同样也需要Dhh的调控。观察*Dhh*^{-/-}小鼠的睾丸切片,可以看到LC数量减少^[10]。如果用Hh信号通路抑制剂环巴胺处理在体外培养的睾丸,LC的发育会被完全抑制^[14]。此外,对于Hh下游分子(Ptch、Gli等)的研究也进一步表明,LC的发育需要Hh信号通路的调控。在20日龄的小鼠中,Ptch在生精小管周围的细胞中表达,这些细胞可能是PMC和LC,使用Gli抑制剂GANT61处理体外培养的睾丸,会抑制LC细胞的形成^[15]。除了Gli之外,Hh通路也可能将信号转导至胞内其他分子,例如circRNA分子circ-Bbs9与Hh通路的激活具有显著的协同效果,它们可能共同调节着LC的增殖和分化^[16]。

除了体细胞之外,Hh也参与了生殖细胞系的发

育过程。在10.5~11.5 dpc时, PGC由腹内侧中胚层迁移到性腺区域, 这一过程是由Hh信号驱动的。PGC位于生精小管内SC的内侧, 其细胞结构与管外间质区域的体细胞差异较大, 缺乏初级纤毛结构。PGC表达Ptch2受体, 与Ptch1不同, Ptch2通过和共受体Gas1作用, 使得不具有初级纤毛结构的PGC保持对Hh信号的敏感性, 从而维持Hh通路对PGC分化的调控功能^[17]。

3 Hh通路在成体睾丸功能维持过程中的作用

从胚胎的性别确定后, Dhh就在睾丸中持续表达, 维持着睾丸的功能。虽然在卵巢中也有Dhh的表达, 但是在卵巢中只有同时敲除*Ihh*和*Dhh*, 才能使得雌鼠无法形成卵泡, 失去生殖能力^[18], 而在睾丸中敲除*Dhh*, 会导致睾丸质量降低、体积减小、结构异常, 这些表型说明Dhh对于睾丸的稳定性具有巨大影响, 前面我们已经讨论了在胚胎发育时期Hh通路在睾丸多种细胞的发育和睾丸的形成中起到关键作用, 而实际上, 在成年个体的睾丸中Hh通路基因的正常表达也是必要的, Hh通路维持着睾丸中细胞的稳定, 保证着个体具有正常的生育能力。

3.1 Hh通路直接调控雄激素的合成

通过Amhr2-cre介导SmoM2表达, 持续激活睾丸LC细胞中的Smo, 结果发现单位质量睾丸中所产生的精子数量相较于野生型小鼠几乎没有差别^[19], 这暗示LC中可能一直存在Hh通路的激活, 以维持其正常的细胞功能。Gli2和Gli3分别可以与*Hsd3b1*、*Cyp11a1*的启动子区结合, 直接调控其转录^[20], 而这两个基因在LC中都参与了从类固醇到睾酮的合成步骤, 所以LC中可能需要一直有Hh通路调控雄激素相关酶的表达, 以维持Leydig细胞中激素合成代谢的稳定。

Sfl(又称*Nr5a1*)是睾丸发育过程中LC特异性表达的一个基因。*Sfl*的突变在人和鼠中都会影响睾丸发育, 在人体内与LC功能缺陷有关, 而在鼠中则可能会导致SC和LC的分化时间延迟^[21]。Dhh在LC内的另一个靶点可能是*Sfl*, 敲除*Dhh*会加剧*Sfl*^{-/-}小鼠LC细胞的缺失^[22], 说明Dhh可能通过*Sfl*调控LC的增殖分化。*Sfl*的转录后修饰也会对Hh通路的稳定造成影响。*Sfl*的SUMO化被抑制后, 在胚胎睾丸间质中能检测到Shh蛋白的异位表达, 且Shh下游的Smo、Gli1

表达量升高^[23], 表明*Sfl*可能对Hh信号通路具有调控作用。在*Sfl*启动子区域发现了保守性的Hh信号通路的响应元件(TGGGTGGTC序列), 暗示Hh信号通路可能会直接调控*Sfl*的表达, 然而关于*Sfl*和Hh之间的调控关系还需要进一步的研究。

3.2 Hh通路维持着成体中LC数量的稳定

成体的睾丸间质中的LC数量保持稳定, 但通过同位素标记发现, LC一直处于动态更迭中, 会有新生的LC补充衰老凋亡的LC^[24]。将成年大鼠的曲细精管分离到体外培养, 使用Hh通路激活剂SAG处理之后, 发现睾酮浓度大幅度上升, 而睾酮只由成熟的LC分泌, 说明SAG可以诱导管周的Leydig干细胞分化, 从而维持睾丸中的LC稳定。从大鼠中分离CD90阳性的Leydig干细胞, 用SAG处理两周之后也能得到成熟的Leydig细胞, 从而印证了Hh通路具有可以诱导成体中LC分化的作用^[25]。

3.3 Hh通路与生精过程密切相关

从青春期开始, 小鼠产生精子的数量急剧增加, 且其一直维持着较高的精子产量直至衰老, 睾丸中Dhh的表达量会从出生后开始上升, 在1周龄左右达到峰值, 之后持续下降^[26], 这一变化趋势暗示着Hh通路可能是开启睾丸生精能力的关键通路。通过RNA探针检测和qPCR, 在精原细胞中检测到Smo、Fu、SuFu、Gli1/2/3的表达, 说明精原细胞也是Hh的靶细胞。在精细胞发育的不同时期, Hh通路中的分子的表达量也在变化。圆形精子中SuFu的表达量相对于其他时期较高, Gli1由于SuFu的抑制从而滞留在胞质中, 不能入核^[27]。如果在体外用环巴胺抑制Hh通路, 精细胞的凋亡比例就会明显增加^[4], 说明Hh通路能够抑制精细胞的凋亡。

3.4 Hh通路促进成体的第二性征发生

目前在成体中对于Hh的研究较少, 这可能是因为成体睾丸中Hh通路相关分子的表达量较低。但是, Hh在成体睾丸中发挥的作用可能比我们想的要大得多。一方面, 成体LC在雄性性征二次发育时开始产生, 因为Hh通路参与了胚胎Leydig细胞(fetal Leydig cell, FLC)的增殖分化, 所以ALC的产生可能也需要Hh通路的参与。另一方面, 雄性第二性征的发育必须有雄激素的刺激, 考虑到Hh通路具有调节类固醇代谢的功能, 而雄激素都是类固醇激素, 所以Hh通路对于第二性征发育可能具有调节作用。抽烟会对雄性的生育能力产生影响^[28], 在6周龄小鼠中的研究显

示, 尼古丁可以通过Hh通路, 影响LC的分化成熟, 使得雄激素分泌减少, 雄鼠的生育能力降低^[29]。因此, Hh通路的抑制也会对成体性征产生影响。

3.5 Hh通路相关基因的突变会促进肿瘤发生

睾丸中Hh通路的相关基因发生突变, 也会造成细胞的异常增殖, 诱发肿瘤。有学者对睾丸癌患者的肿瘤细胞的基因组突变进行分析, 发现对于发生癌变的Leydig细胞, Hh通路中异常激活的Gli1和发挥抑制作用的Ptch1都是具有潜力的治疗靶点^[30]。除了Hh通路的核心分子之外, 一些与Hh通路有相互作用的分子也可以作为肿瘤治疗靶点。Hedgehog相互作用蛋白(Hedgehog-interacting protein, Hhip)对于三种Hh蛋白具有与Ptch1相似的亲和力, 在体外培养的Leydig细胞系中过表达Hhip之后, 细胞对于外源Hh刺激的响应能力变弱, 说明Hhip能够阻碍Hh信号的传递^[31]。

4 Hh通路与其他信号通路

性腺的发育过程极为复杂, 有多种信号通路分子参与其中, 它们或相互促进, 或相互抑制, 共同维持着细胞之间的信息交流, 促使不同类型的细胞完成增殖与分化, 从而使性腺完成向睾丸和卵巢两个不同方向的发育。这些信号通路的效应因子通常是转录因子, 这些转录因子结合在基因的启动子或增强子调控下游基因的表达, 不过有时候信号通路也可以通过组蛋白修饰酶、染色体重塑复合物等进行表观遗传层面的调控。Hh信号对睾丸中包括LC在内的多种体细胞具有调节作用, 但除了Hh信号之外还有许多信号通路(包括Pdgf、Notch等)具有与Hh信号相近或相关的功能。与Hh信号相似, Pdgf信号对于FLC的分化来说也是必要的。在*Pdgfra*基因发生突变的XY胚胎中, 睾丸的LC的早期分化也会受到影响。Pdgfa在SC中表达, 其受体Pdgfra在间质细胞中存在, 敲除睾丸中的*Pdgfra*可导致FLC分化受损, SC增殖量降低, 中肾细胞迁移量减少, 血管和睾丸索结构产生缺陷, 这说明LC异常可能不是Pdgfra直接作用到其前体细胞的结果。此外, 成体中*Pdgfa*的突变也会导致ALC的发育异常^[32], 但是尚不清楚*Pdgfa*的敲除影响的是LC前体细胞的迁移过程还是增殖分化。Hh信号能够促进LC的分化, 而Notch信号的功能则相反, 睾丸中的Notch通路会抑制前体细胞向LC的分化。 γ -分泌酶的抑制剂DAPT具有阻断

Notch信号通路的功能, 将性腺置于体外环境培养, 并在培养液中添加DAPT, 继续培养2天后发现LC数量显著增加, SC数量无明显变化, 这表明Notch信号可以抑制LC的分化。同时, Notch也对间质中的血管发育具有调节功能^[33]。关于Hh、Notch这些经典的发育通路在睾丸中的研究虽然不少, 却少有研究关注到不同通路之间的交互作用, 但实际上有许多通路在功能上有重叠, 所以通路之间的相互作用具有重要的研究价值。

5 总结

在海葵、鸡、小鼠、猪等物种中Hh信号通路均参与了睾丸的发育和稳态调控^[7,34-35], 这说明Hh通路在睾丸中是一条进化保守的信号通路, 对模式生物中Hh通路作用方式的研究可以帮助我们深入理解Hh通路在人睾丸中所扮演的角色。

在哺乳动物中, 生精小管内的支持细胞SC是Hh的主要分泌来源, SC也是睾丸发育过程中最早出现的体细胞类型, 通过分泌Hh来调控其他多种细胞的分化发育。而Hh的靶细胞至少有三种: 管周类肌细胞、间质细胞、原始生殖细胞, 这些细胞中也都有Hh的受体Ptch的表达。Dhh对于靶基因的调控是通过三种Gli蛋白的激活和抑制实现的。Gli直接启动下游基因的表达, 调控多种细胞的增殖和分化, 同时还能影响类固醇的合成和代谢, 对于睾丸中固醇类激素具有重要调控作用。不过基于目前的研究结果, 我们还不知道Gli1或Gli2是否在同一类型细胞里均有表达, 还是只是在某些特定细胞群中表达, 如果用Smo激动剂SAG刺激体外培养的LC, 细胞中的Gli1表达含量会上升^[36], 暗示着Gli1可能是Hh通路在睾丸中重要的应答分子, 因此, 在三种Gli蛋白中, Gli1在睾丸中的作用相对更重要一些, 且睾丸中Gli1的相关研究可以帮助我们进一步了解睾丸中Hh通路发挥作用的机制。

在胚胎阶段, Hh通路调控了上述三种细胞的干细胞或前体细胞的分化成熟, 但是对于Hh通路如何发挥调控功能还缺乏深入的研究。实际上, 在每种细胞中Hh都会激活一系列不同的靶基因, 如果能够通过多组学的方法鉴别出Hh能够直接调控的靶基因, 将会使我们更加深刻地理解同一通路如何在细胞中发挥不同方面的功能, 同时也可以帮助我们针对特定的下游基因, 对相关疾病进行靶向治疗。

Hh通路抑制剂在临床上被应用于多种癌症(如基底细胞癌、横纹肌肉瘤、胰腺癌等)的治疗^[37],有学者从睾丸间质细胞瘤患者的病例样本中,发现了肿瘤细胞中Hh通路相关的*PTCH1*和*Gli1*是高突变基因,针对这些靶点开发新的靶向药物能够为治疗睾丸间质瘤提供新的思路。此外,*Gli1*突变后导致的下游基因异常表达可能是导致癌变的直接原因,抑制肿瘤细胞中*Gli1*下游的高差异表达基因也是一种可行的治疗策略。

另外一个重要的研究方向是Hh通路中其他分子(比如*Ptch*的共受体)在睾丸中所发挥的独特作用。Hh在受体细胞表面可以结合两种受体,*Ptch1*和*Ptch2*,这两者的结构相似,但是产生的下游反应却不相同,这可能与它们共同作用的共受体有关。近期有研究表明,*Ptch2*与共受体*Gas1*的共同作用可以使得不具有初级纤毛结构的PGC保持对Hh信号的敏感性,而睾丸内的体细胞则主要依赖*Ptch1*及其共受体*Boc*进行信号转导^[17]。不过Hh通路的调控机制比较复杂,即使对转基因小鼠进行条件性基因敲除,基因敲除后的小鼠也可能会因为作用相似的基因的补偿效应而没有显著表型。在这种情况下,使用类器官是未来能够提高实验效率和精度的一种有效方法。

总之,Hh作为经典信号通路在睾丸的发育和精子成熟具有重要功能,但是其作用机制方面还有很多未解决的问题。随着实验技术的发展,我们会对Hh在睾丸中的作用有更深入的认识,从而为睾丸发育和精子成熟引起的不孕不育相关疾病提供治疗方案。

参考文献 (References)

- [1] WIESCHAUS C N V E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 287: 795-801.
- [2] MARK J, BITGOOD L S A A P M. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline [J]. *Curr Biol*, 1996, 6: 298-304.
- [3] CALLIER P, CALVEL P, MATEVOSSIAN A, et al. Loss of function mutation in the palmitoyl-transferase HHAT leads to syndromic 46,XY disorder of sex development by impeding Hedgehog protein palmitoylation and signaling [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(5): e1004340.
- [4] SZCZEPNY A, HIME G R, LOVELAND K L. Expression of hedgehog signalling components in adult mouse testis [J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(11): 3063-70.
- [5] PACHERNEGG S, GEORGES E, AYERS K. The Desert Hedgehog signalling pathway in human gonadal development and differences of Sex development [J]. *Sex Dev*, 2022, 16(2/3): 98-111.
- [6] GOLDSMITH T M, SAKIB S, WEBSTER D, et al. A reduction of primary cilia but not hedgehog signaling disrupts morphogenesis in testicular organoids [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 380(1): 191-200.
- [7] OU Y, DORES C, RODRIGUEZ-SOSA J R, et al. Primary cilia in the developing pig testis [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 358(2): 597-605.
- [8] BANGS F, ANDERSON K V. Primary cilia and mammalian Hedgehog signaling [J]. *Cold Spring Harb perspect Biol*, 2017, 9(5): a028175.
- [9] COMBES A N, WILHELM D, DAVIDSON T, et al. Endothelial cell migration directs testis cord formation [J]. *Dev Biol*, 2009, 326(1): 112-20.
- [10] CLARK A M, GARLAND K K, RUSSELL L D. Desert hedgehog (*Dhh*) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(6): 1825-38.
- [11] YAO H H, WHORISKEY W, CAPEL B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(11): 1433-40.
- [12] MIN M, SONG T, SUN M, et al. *Dhh* signaling pathway regulates reconstruction of seminiferous tubule-like structure [J]. *Reprod Biol*, 2022, 22(4): 100684.
- [13] CHUNG J W, PASK A J, RENFREE M B. Seminiferous cord formation is regulated by hedgehog signaling in the marsupial [J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(3): 80.
- [14] YAO H H, CAPEL B. Disruption of testis cords by cyclopamine or forskolin reveals independent cellular pathways in testis organogenesis [J]. *Dev Biol*, 2002, 246(2): 356-65.
- [15] BARSOU M I, YAO H H. Redundant and differential roles of transcription factors *Gli1* and *Gli2* in the development of mouse fetal Leydig cells [J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(5): 894-9.
- [16] JIA M, LI X, JIANG C, et al. Testis-enriched circular RNA circ-Bbs9 plays an important role in Leydig cell proliferation by regulating a CyclinD2-dependent pathway [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2020, 32(4): 355-62.
- [17] KIM Y, LEE J, SEPPALA M, et al. *Ptch2/Gas1* and *Ptch1/Boc* differentially regulate Hedgehog signalling in murine primordial germ cell migration [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1994.
- [18] LIU C, RODRIGUEZ K F, BROWN P R, et al. Reproductive, physiological, and molecular outcomes in female mice deficient in *Dhh* and *Ihh* [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(7): 2563-75.
- [19] MIGONE F F, HUNG P H, COWAN R G, et al. Overactivation of hedgehog signaling in the developing Mullerian duct interferes with duct regression in males and causes subfertility [J]. *Reproduction*, 2017, 153(4): 481-92.
- [20] TANG C, PAN Y, LUO H, et al. Hedgehog signaling stimulates the conversion of cholesterol to steroids [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(3): 487-97.
- [21] PARK S Y, MEEKS J J, RAVEROT G, et al. Nuclear receptors *Sfl* and *Dax1* function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development [J]. *Development*, 2005, 132(10): 2415-23.
- [22] PARK S Y, TONG M, JAMESON J L. Distinct roles for steroidogenic factor 1 and desert hedgehog pathways in fetal and adult Leydig cell development [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(8): 3704-

- 10.
- [23] LEE F Y, FAIVRE E J, SUZAWA M, et al. Eliminating SF-1 (NR5A1) sumoylation *in vivo* results in ectopic hedgehog signaling and disruption of endocrine development [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(2): 315-27.
- [24] TEERDS K J, DE ROOIJ D G, ROMMERTS F F, et al. Turnover time of Leydig cells and other interstitial cells in testes of adult rats [J]. *Arch Androl*, 1989, 23(2): 105-11.
- [25] LI X, WANG Z, JIANG Z, et al. Regulation of seminiferous tubule-associated stem Leydig cells in adult rat testes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(10): 2666-71.
- [26] MÄKELÄ J A, SAARIO V, BOURGUIBA-HACHEMI S, et al. Hedgehog signalling promotes germ cell survival in the rat testis [J]. *Reproduction*, 2011, 142(5): 711-21.
- [27] KROFT T L, PATTERSON J, WON YOON J, et al. GLII1 localization in the germinal epithelial cells alternates between cytoplasm and nucleus: upregulation in transgenic mice blocks spermatogenesis in pachytene [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65(6): 1663-71.
- [28] VIRTANEN H E, SADOV S, TOPPARI J. Prenatal exposure to smoking and male reproductive health [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2012, 19(3): 228-32.
- [29] WU J, XU W, ZHANG D, et al. Nicotine inhibits murine Leydig cell differentiation and maturation via regulating Hedgehog signal pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 510(1): 1-7.
- [30] NECCHI A, BRATSLAVSKY G, SHAPIRO O, et al. Genomic features of metastatic testicular sex cord stromal tumors [J]. *Eur Urol Focus*, 2019, 5(5): 748-55.
- [31] OLSEN C L, HSU P P, GLIENKE J, et al. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors [J]. *BMC Cancer*, 2004, 4: 43.
- [32] GNESSI L, BASCIANI S, MARIANI S, et al. Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice [J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(5): 1019-26.
- [33] TANG H, BRENNAN J, KARL J, et al. Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis [J]. *Development*, 2008, 135(22): 3745-53.
- [34] YOSHINO T, MURAI H, SAITO D. Hedgehog-BMP signalling establishes dorsoventral patterning in lateral plate mesoderm to trigger gonadogenesis in chicken embryos [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12561.
- [35] CHEN C Y, MCKINNEY S A, ELLINGTON L R, et al. Hedgehog signaling is required for endomesodermal patterning and germ cell development in the sea anemone *Nematostella vectensis* [J]. *eLife*, 2020, 9: e54573.
- [36] FRANK-KAMENETSKY M, ZHANG X M, BOTTEGA S, et al. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists [J]. *J Biol*, 2002, 1(2): 10.
- [37] PATEL T N, DHANYAMRAJU P K. Role of aberrant Sonic hedgehog signaling pathway in cancers and developmental anomalies [J]. *J Biomed Res*, 2021, 36(1): 1-9.