

哺乳动物体外配子发生研究进展

陈澜歆 杨蕊 张博洋 朱春玲 赵彦森 唐博 张学明*

(吉林大学动物医学学院, 动物胚胎工程吉林省重点实验室, 长春 130062)

摘要 生殖细胞的全能性保证了遗传信息和表观遗传信息的多样化和持续性。基于人们对生殖细胞发育机制理解的不断深入和干细胞技术在生殖领域中的应用, 目前利用多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)在体外重建生殖细胞发育过程的相关研究已取得显著进展。PSCs包括通过转录因子或化学小分子诱导体细胞重编程产生的诱导性PSCs(induced PSCs, iPSCs)和来自植入前胚胎的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)。体外重建生殖细胞发育也称为体外配子发生(*in vitro* gametogenesis, IVG)。IVG不仅可为进一步探索生殖细胞发育机制奠定基础, 还可为创新医学的应用开辟前景。该文主要讨论了哺乳动物IVG的研究现状以及该领域当前面临的挑战。

关键词 体外配子发生; 生殖细胞; 多能干细胞

Advances in *In Vitro* Gametogenesis of Mammals

CHEN Lanxin, YANG Rui, ZHANG Boyang, ZHU Chunling, ZHAO Yansen, TANG Bo, ZHANG Xueming*

(Key Laboratory of Animal Embryo Engineering of Jilin Province, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract The totipotency of germ cells ensures the diversification and sustainability of the genetic and epigenetic information. Based on the deep understanding of the mechanisms of germ cell development and the applications of stem cell technology in reproduction, significant progress has been made in the research of using PSCs (pluripotent stem cells) to reconstruct germ cell development *in vitro*. These PSCs include the iPSCs (induced PSCs) generated by somatic reprogramming induced by transcription factors/chemical small molecules and ESCs (embryonic stem cells) from the preimplantation embryos. The reconstruction of germ cell development *in vitro* is also known as IVG (*in vitro* gametogenesis), which is important not only to lay the foundation for further exploration of the mechanisms of germ cell development, but also to open up prospects for innovative medical applications. Here, the current progress of mammalian IVG and its challenges were discussed.

Keywords *in vitro* gametogenesis; germ cells; pluripotent stem cells

哺乳动物生殖细胞可分化成两性配子^[1]。两性配子融合后发育形成新个体, 新个体会继承来自亲本的遗传和表观遗传信息。生殖系发育异常会导致后代不育或遗传和表观遗传障碍。近年来, 通过诱导培养多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)从而重建生殖细胞发育过程的体外配子发生(*in vitro* game-

togenesis, IVG)研究取得了很大进展。小鼠IVG和人IVG的成功为探索人生殖细胞发育机制过程中规避技术和伦理方面的难题提供了新途径。IVG技术也可用于其他动物如濒危物种。如能从濒危物种得到其PSCs, 即可拯救其基因组或细胞资源, 在不牺牲亲本的情况下产生生殖细胞, 从而保护生物多样性^[2]。

收稿日期: 2022-05-11 接受日期: 2022-07-25

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31872434、32172803)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0431-87836187, E-mail: zhangxuem@jlu.edu.cn

Received: May 11, 2022 Accepted: July 25, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31872434, 32172803)

*Corresponding author. Tel: +86-431-87836187, E-mail: zhangxuem@jlu.edu.cn

1 哺乳动物生殖细胞发育

原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 是最早可识别的雌雄配子的祖细胞, 其进一步发育分化后能将亲本遗传性状传至子代, 因此是基因组编辑的理想目标。PGCs在胚胎发育早期就已生成, 但很难在体外扩增^[3]。在小鼠胚胎第8.0~9.5天 (E8.0~E9.5), PGCs沿内胚层 (未来的后肠) 迁移; 在E9.5, PGCs通过后肠迁移至中胚层, 最后定植于生殖嵴^[4]。PGCs最终的性别分化不仅受染色体结构的控制, 也受性腺体细胞的控制。在与胚胎性腺体细胞信号互作之前, PGCs尚未发生性别分化^[5]。PGCs在迁移和增殖过程中进行表观遗传重编程, 使其DNA全基因组去甲基化并改变组蛋白修饰, 从而使母细胞的亲代印记消失, X染色体重新被激活^[6]。

在雌性胚胎卵巢中, 卵原细胞接收原始颗粒细胞或卵巢环境的信号后分化为初级卵母细胞, 进入减数分裂时期^[7]。减数分裂受阻的卵母细胞最终被颗粒细胞包围, 形成单个或多个成群的原始卵泡^[8]。卵母细胞的生长是在原始卵泡向初级卵泡转变时被触发的, 其生长伴随着颗粒细胞层的扩张。随着卵母细胞的生长和卵泡颗粒细胞层数的增多, 初级卵泡发育为次级卵泡、成熟卵泡。一般在青春期前后, 卵巢上才会有成熟卵泡。此时卵母细胞发育为成熟卵母细胞^[9], 后者具有母体基因组和表观基因组。卵母细胞完成两次减数分裂, 最终与精子结合形成受精卵。因此, 卵巢体细胞尤其是卵泡颗粒细胞在促进雌性生殖细胞发育方面有重要作用。

在雄性胚胎睾丸中, 新生的支持细胞 (包绕PGCs发育而来的性原细胞) 或睾丸内环境信号使性原细胞 (gonocyte) 分化为前精原细胞, 后者经历有丝分裂阻滞并获得父系表观基因组和对抗转座子活性的能力^[10]。出生后, 前精原细胞分化为精原细胞或精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs)。这些细胞基本上停止发育, 直到青春期前它们才开始产生强劲的精子发生波, SSCs既能自我更新维持干细胞群, 又能进行连续、同步和广泛的增殖、分化, 最终形成精子^[11]。因此, 睾丸体细胞特别是支持细胞在支持雄性生殖细胞发育中起关键作用。

2 小鼠IVG

2.1 小鼠PGCs样细胞 (mouse PGCs-like cells, mPGCLCs)

在发育过程中, mPGCs起源于E6.5的近端外胚

层, 一些表达B淋巴细胞诱导成熟蛋白1 (B lymphocyte induced maturation protein 1, BLIMP1) 的细胞对mPGCs的形成和特异性基因表达至关重要^[12]。另外, 通过骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 信号通路激活的WNT3也是mPGCs特化所必需的。BLIMP1、PRDM14 (PR/SET domain 14) 和TFAP2C (transcription factor AP-2 gamma) 这3个转录因子涉及到体细胞编程的抑制、干细胞多能性的重新激活和全基因组表观重编程, 是mPGCs特化的关键^[13]。在BMP4作用下, E5.25~E6.25的上胚层细胞可分化为mPGCs。

多能性细胞在胚泡中以初始群体的形式出现, 它们具有形成生殖系和体细胞的能力, 能启动谱系分化。多能性细胞在培养中至少有两种多能性状态: 初始态 (naïve state) 和始发态 (primed state)。小鼠ESCs代表了多能性的初始态, 上胚层干细胞 (epiblast stem cells, EpiSCs) 代表了最终的启动阶段/始发态。小鼠ESCs能形成体细胞嵌合体和生殖系嵌合体, 通常在使用白血病抑制因子 (leukaemia inhibitory factor, LIF)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 抑制剂 (PD0325901) 和糖原合成酶激酶3 (glycogen synthase kinase-3, GSK3) 抑制剂 (CHIR99021) 的培养条件 (2i+LIF) 下培养。小鼠EpiSCs (mEpiSCs) 则具有偏分化潜能, 在常规条件下其嵌合能力较弱。在激活素 (Activin) 和成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 存在的条件下, mEpiSCs自我更新并在E6.5之后表现出类似于上胚层的特性。最近, KINOSHITA等^[14]在低浓度生长因子条件下培养小鼠上胚层细胞, 使其衍生出介于初始态细胞和始发态细胞之间的形成态干细胞 (formative stem cells, FSCs), 并证明此法同样适于人胚胎中类似干细胞的诱导和扩增 (表1)。

E5.5~E6.0的所有上胚层细胞基本都能响应BMP4信号而表达BLIMP1和PRDM14, 如能在体外产生小鼠上胚层样细胞 (mouse epiblast-like cells, mEpiLCs), 就能对生殖细胞进行定向诱导^[15]。研究者们现已摸索出将E6.0 mESCs诱导为mEpiLCs的策略, 发现用Activin和FGF对mESCs进行约2天的刺激可将mESCs诱导为mEpiLCs。在BMP4作用下, mEpiLCs在迁移阶段分化为mPGCLCs, 而且该mPGCLCs具有与E9.5 mPGCs相似的特性^[16]。将雄性mPGCLCs移入无内源性精子发生的新生小鼠睾丸

表1 多能性的3个阶段及特点

Table 1 The three stages and characteristics of pluripotency

多能性 Pluripotency	培养条件 Culture condition	衍生细胞 Derived cell	依赖的转录因子 Dependent transcription factors	嵌合体定植 Chimera colonization
Naïve	2i+LIF	ESCs	ND	Complete chimerism
Formative	AloXR	FSCs	Otx2	Micro chimerism
Primed	Activin, FGF	EpiSCs	Etv4/5	No chimerism

ND: 未确定; AloXR: 低激活素+XAV939(WNT通路抑制剂)+RARI(泛维甲酸受体逆激动剂)。

ND: not determined; AloXR: low Activin+XAV939 (WNT pathway inhibitor)+RARI (pan-retinoic acid receptor inverse agonist).

中可以促进精子发生, 而将雌性mPGCLCs与小鼠胚胎卵巢体细胞聚集培养后移入免疫缺陷小鼠的卵巢囊中则能诱导卵子产生, 且这样产生的精子和卵子都能产生可育后代。这些过程可用雄性和雌性小鼠的iPSCs(miPSCs)进行重复, 为IVG奠定了基础。最近, OIKAWA等^[17]在大鼠上重复了此过程, 其IVG系统有利于筛选代间或跨代遗传疾病的致病因素。

转录组分析表明, mEpiLCs与mEpiSCs不同, 前者更类似于前原肠胚形成的E5.5~E6.0上胚层细胞^[18]。mEpiLCs和小鼠原肠上胚层细胞所表现的状态属于形成态, 可对外界信号做出多向分化反应^[19]。mEpiLCs还具有较为独特的富含组蛋白修饰的表观基因组, 这些表观修饰一般在关键性发育调节基因上, 对相关基因的及时激活至关重要^[20]。最近, 通过调节Activin和WNT信号通路已在体外诱导出了稳定的FSCs^[21]。

总之, mPGCLCs诱导体系有助于分析mPGCs的特化机制。例如, ARAMAKI等^[22]发现了可激活BLIMP1和PRDM14的WNT信号通路的下游效应因子T, 进而阐明了衔接mPGCs和mPGCLCs特化所需的外部信号转导和内部转录网络的机制。

2.2 体外卵子发生

在气-液界面条件下聚集培养重组卵巢(胚胎卵巢体细胞和雌性mPGCLCs的混合物)可重建体外卵子发生, 整个过程分为体外分化、体外生长和体外成熟3个阶段。体外分化中mPGCLCs在次级卵泡期分化为初级卵母细胞, 在体外生长阶段则进一步分化为成熟卵母细胞。结果表明, 来自mESCs和miPSCs的MII卵母细胞都可以受精形成后代, 证明体外卵子发生成功^[23]。与体内卵子发生相比, 体外来源的卵母细胞的2细胞胚胎发育到足月胎儿的成功率远低于体内。体外卵子发生还有同源染色体错配率高、线粒体DNA含量低等问题, 这可能与mPSCs的质量及培养条件等因素有关。总之, 改善雌性mPSCs

的培养条件和体外卵子发生仍面临挑战。

尽管有上述局限性, 体外卵子发生系统在阐明卵母细胞发育机制方面仍有重要作用。在卵巢中, 大多数卵母细胞在原始卵泡中保持休眠状态, 保障了卵母细胞的储备, 延长了雌性个体的生殖寿命。在重组卵巢中却很少形成休眠的卵母细胞(原始卵泡), 几乎所有的卵母细胞都与体细胞一起发育, 形成次级卵泡。转录组分析显示, 体内原始卵泡中的卵母细胞高表达与缺氧反应和细胞外基质相关的基因。因此, 在低氧或超静水压力条件下培养重组卵巢可以产生休眠卵母细胞, 这证明了生物物理机制对原始卵泡募集起关键作用。

目前, 科学家们已确定了一组足以触发卵母细胞生长的转录因子(NOBOX、FIGLA、LHX8、TBPL2、SOHLH1、STAT3、SUB1、DYNLL1), 其同时表达对卵母细胞生长至关重要, 是原始卵泡向初级卵泡过渡所必需的。这些因子的表达可以迅速将PSCs转化为能够受精并随后卵裂的卵母细胞样细胞, 后者的形成不涉及PGCs的表观遗传重编程和减数分裂, 说明卵母细胞生长和谱系特异性DNA重新甲基化与PGCs的表观重编程是可分离的。这为生殖生物学和医学提供了一种独特的材料——卵质^[24]。总之, 重组卵巢体系有助于揭示卵母细胞发育机制, 以及转录因子在诱导mESCs产生卵母细胞样细胞中的关键机制。

2.3 体外精子发生

与重组卵巢相似, 雄性mPGCLCs和胚胎睾丸体细胞的聚集培养体被称为重组睾丸。在气-液界面条件下培养的重组睾丸自组织成细管状结构, 促使mPGCLCs分化为精原细胞样细胞。与体内发育相比, mPGCLCs来源的精原细胞体外发育时间长、效率低, 在长期培养(约8周)后只有部分细胞进入第一次减数分裂前期^[25]。

利用 mPGCLCs 来源的精原细胞样细胞可以衍生出具有 SSCs 功能的生殖干细胞 (germline stem cells, GSCs) 样细胞 (GSCLCs), GSCLCs 可以进行精子发生, 产生可育后代。因为存在一定的表观遗传差异, GSCLCs 的精子发生效率明显低于 GSCs, 但从 GSCLCs 衍生的后代大体正常。这表明 GSCLCs 在精子发生或早期发育过程中选择了适当的表观基因型。体外精子发生过程中生精细胞的遗传和表观遗传特性还有待进一步研究, 精子发生过程中减数分裂的体外重建目前仍有困难。

3 人类 IVG

3.1 人类生殖系的起源

将小鼠 IVG 方法应用于人, 有可能实现人 IVG。但在哺乳动物不同物种之间, 生殖细胞的发育机制存在显著差异, 需要对不同物种进行详细研究才能准确了解特定物种的生殖细胞发育机制。由于实验材料获取的限制, 有关人生殖细胞发育机制方面的数据非常匮乏, 人生殖细胞的起源问题也很棘手。

为此, 科学家们建立了食蟹猴 (*cynomolgus monkey*) 模型。单细胞转录组分析显示食蟹猴 ESCs (cyESCs) 具有与植入后晚期 (E16 或 E17) 和早期 (E12 或 E13) 上胚层细胞高度相似的转录组。在上胚层细胞从初始态向始发态发育的过程中, hPSCs 的基因表达与 cyESCs、植入后晚期或早期上胚层细胞的基因表达都很相似^[26]。TAN 等^[27]将 hPSCs 显微注射到体外发育 20 天的食蟹猴囊胚中, 检测其在不同时间点与猴胚胎的嵌合情况, 结果证实 hPSCs 可以嵌合到晚期猴胚胎的内细胞团中, 并在胚胎植入前后和早期胚胎培养过程中促进胚胎和胚外细胞系的分化, 他们还通过单细胞 RNA 测序进一步确定了 hPSCs 在培养的猴子胚胎中的分化轨迹。这有助于我们更好地理解早期人类发展和灵长类进化进程; 同时, 通过囊胚互补将 PSCs 用于种间器官发生和器官移植, 可为再生医学提供大量体内生成的人类细胞、组织和器官。最近, 其他关于人 E16~E19 原肠胚的单细胞转录组研究也表明 hPSCs 相当于植入后的上胚层细胞。

组织学研究表明, 食蟹猴 PGCs (cyPGCs, 表达关键标记物 SOX17 和 TFAP2C) 起源于羊膜, 并从植入后的上胚层分化而来。cyPGCs 可见于 E11~E17 的羊膜中, 最初存在于羊膜背侧, 之后沿着羊膜后中线向下迁移, 随后向后部上胚层下方迁移并扩增。羊

膜不仅表达 BMP4 及其效应因子, 还表达一些中胚层标记物, 符合作为 PGCs 前体的要求^[28]。有关食蟹猴和人类植入前胚胎的培养实验也表明, cyPGCs 和 hPGCs 确实源自羊膜样结构。

在人 IVG 中, 初始态 hPSCs 的获得十分关键。目前有非转基因体系可以诱导始发态 hPSCs 转化为具有植入前上胚层转录和表观遗传特征的细胞^[29]。但这些培养体系仍需优化, 因其培养出的细胞与植入前上胚层细胞的转录组一致性较弱, 从 hPSCs 培养所获细胞的表观遗传和核型也都不稳定。尽管如此, 这些细胞仍可被诱导分化为滋养外胚层细胞, 证明它们获得了植入前胚胎细胞的潜能。人类原始多能干细胞可分化为胚外滋养层和下胚层细胞, 现已建立了原始干细胞胚泡模型^[30], 这种模型的获得将使对早期人类胚胎发生的分子信号、遗传解剖、辅助生殖培养条件的探索成为可能^[31]。最近, GAN-JIBAKHSH 等^[32]采用人类脱细胞羊膜支架, 建立了从人 iPSCs 生成男性生殖细胞的 3D 培养模型, 成功将人包皮成纤维细胞重编程为 hPSCs, 这种 hPSCs 不但能表达多能性标记, 也可分化为三胚层来源的组织细胞。

3.2 hPGCLCs 的诱导及 hPGCs 和 hPGCLCs 的特化机制

科学家探索了将 hPSCs 诱导为人类 PGCLCs (hPGCLCs) 的方法^[33]。在含有 GSK-3 抑制剂 CHIR99021、MEK 抑制剂 PD0325901、p38 MAPK 抑制剂 SB203580 和 JNK 抑制剂 SP600125 (4 种抑制剂, 4i) 的培养基中培养 hPSCs, 在 BMP 信号通路作用下, hPSCs 可被诱导为近似原肠期的上胚层样 hPGCLCs^[34]。在常规培养条件下, hPSC 可先被诱导成中胚层样细胞 (incipient mesoderm-like cells, iMeLCs), iMeLCs 再经 BMP 信号转导后形成 hPGCLCs。这两种条件下获得的 hPGCLCs 都显示出与早期 hPGCs 相似的基因表达特性。进一步研究表明, hPGCLCs 还具有表观重编程潜力, 能分化为早期卵母细胞或前精原细胞, 证明 hPGCLCs 确为 hPGCs 的体外对应物。hPSCs 的始发态多能性不同于 mEpiSCs。hPSCs 诱导的尤其是通过 iMeLCs 得到的 hPGCLCs 具有始发态多能性, 能产生包括羊膜细胞和生殖细胞在内的所有类型细胞; 而始发态 EpiSCs 几乎没有能力向生殖细胞分化^[35]。

通过 hPGCLCs 诱导系统, 可以探讨 hPGCs 和 hPGCLCs 的特化机制。有研究表明, 在 BMP 信号作用下,

SOX17、TFAP2C和BLIMP1的表达对hPGCLCs的特化是必需的。同时, BMP效应蛋白GATA2/3与SOX17和TFAP2C结合可以诱导hPGCLCs的产生。SOX17还是hPGCs和hPGCLCs特化最上游的转录因子之一, 对下游关键基因(包括*BLIMP1*)的表达以及其他生殖细胞特化程序的激活至关重要。SOX17不仅在灵长类PGCs中起关键作用, 在猪等动物中也是如此; 但在小鼠生殖细胞特化中不起作用, 这表明小鼠可能具有独特的PGCs特化程序^[36]。目前已知hPGCs和hPGCLCs特化所涉及的关键转录因子的作用层次、调控网络都与mPGCs和mPGCLCs特化不同。

此外, mPGCs和mPGCLCs特化与表观重编程耦合, 而hPGCLCs特化则与表观重编程相分离。在mPGCs和mPGCLCs特化中, BLIMP1、PRDM14和TFAP2C抑制了DNA甲基化从头修复和维持的关键机制, 使mPGCs和mPGCLCs形成几乎无DNA甲基化活性的状态, 导致mPGCs和mPGCLCs增殖时全基因组DNA的被动去甲基化。相比之下, 尽管hPGCLCs特化伴随着DNA甲基转移酶3A/B的下调, 但它维持了泛素样含PHD和环指域1(ubiquitin-like with PHD and ring finger domain 1, UHRF1)的表达, UHRF1蛋白识别半甲基化位点, 招募维持了DNA甲基转移酶1的水平, 使新合成的DNA链甲基化^[37]。在增殖时hPGCLCs保留了全基因组DNA甲基化谱和甲基化水平, 表明小鼠和人PGCs和PGCLCs特化的转录网络确有不同。

3.3 人早期卵母细胞及前精原细胞的诱导

组学技术的进步使我们对人生殖细胞发育相关的转录组和表观遗传动力学的理解更加深入。人生殖细胞有着独特的基因调控网络, 在数月之内, 生殖细胞通过细胞间演变进行全基因组DNA去甲基化、雌性印记擦除及X染色体重激活以及进化中较年轻转座子的耐去甲基化(这可能导致跨代表观遗传)等表观遗传重编程。胎儿生殖细胞(fetal germ cells, FGCs)是成熟配子的胚胎前体细胞。雌性FGCs经历了4个不同的连续阶段(有丝分裂、视黄酸信号转导、减数分裂前期和卵子发生^[38]), 后3个阶段的FGCs分别在胚胎第11、14、18周左右出现。雄性FGCs的发育经历迁移、有丝分裂和细胞周期阻滞等阶段。研究发现, 尽管部分有丝分裂FGCs在第10周左右就进入视黄酸反应期或有丝分裂阻滞期, 但直到第26周仍能发现有丝分裂FGCs。不同阶段的FGCs可在中后期胚胎的卵巢或睾丸中被发现,

这表明两性FGCs发育具有异步性^[39]。

将hPGCLCs与小鼠胚胎卵巢体细胞在气-液界面条件下的聚集培养物称为异种重组卵巢, 培养约4个月后hPGCLCs可分化为卵原细胞和前卵母细胞。在异种重组卵巢中, 培养77天左右hPGCLCs可分化为卵原细胞和生殖母细胞, 120天左右其可获得与FGCs高度相似的状态。由hPGCLCs衍生的卵原细胞可表现出表观重编程特征, 如全基因组DNA去甲基化、印记擦除、hPSCs中异常DNA甲基化的消除等。此外, 部分失活的X染色体又被去甲基化和重激活^[40]。这些发现为人类IVG的研究奠定了基础。同理, 将hPGCLCs与小鼠胚胎睾丸体细胞聚集培养称为异种重组睾丸, 培养一段时间后hPGCLCs可分化为雄性性原细胞, 随后分化为前精原细胞。但目前尚未实现来自hPSCs的完整体外精子发生过程。

hPGCLCs在异种重组卵巢和睾丸中分化为早期卵母细胞和前精原细胞的机制尚不清楚。雌性hPSCs中X染色体的状态对hPGCLCs特化和成熟的影响仍需探究。hPSCs通常携带一条激活的X染色体(Xa)和一条灭活的X染色体(Xi), Xi在体外对重编程更有抵抗力, 表明Xi在hPSCs中具有独特的表观遗传机制。唐氏综合征患者患有不孕症, 因此其hPGCLCs可作为研究人早期生殖细胞发育、PGCs特异性、生殖细胞形成的表观遗传和分子机制以及一些不育疾病(无精子症和畸形精子症)的模型^[41]。

4 其他哺乳动物的IVG

目前, IVG技术尚未在其他物种中实现(图1)。小鼠和人类IVG的研究说明生殖细胞发育机制存在物种差异, 这反映了在其他哺乳动物中建立IVG体系的必要性, 由于ESCs的获取和建立存在困难, 科学家们试图通过iPSCs来打破这一瓶颈。目前, 羊和马的iPSCs已被建立。有研究表明, cyESCs和cy-iPSCs在WNT信号抑制剂作用等特定条件下可以维持未分化状态, 这些PSCs都可被有效诱导为类似于早期cyPGCs转录组的PGCLCs^[42]。目前, 从猪源性PSCs(piPSCs)中诱导PGCLCs的固定培养体系也已被建立^[43]。在牛iPSCs方面, 国内外学者尝试使用了多种类型的体细胞进行诱导并建立了细胞系。然而, 所获牛iPSCs的分化状态、增殖能力, 特别是多次传代和反复冻存复苏后的发育能力尚未确证。另外, 其重编程过程中的表观遗传和转录组学规律也不清

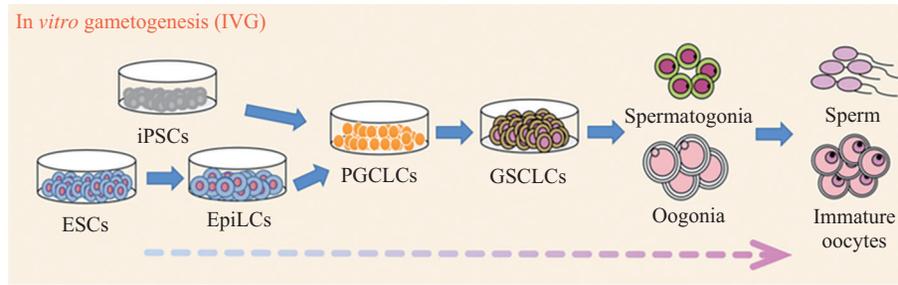


图1 体外配子发生(根据参考文献[15,25]修改)

Fig.1 *In vitro* gametogenesis (modified from the references [15,25])

楚。最近,国内团队获得了牛的扩展多能干细胞,为牛体外配子发生研究提供了新的细胞材料^[44]。总体上,目前大家畜的IVG仍有许多问题亟待解决。

5 IVG面临的挑战

迄今虽已进行了大量小鼠卵子和精子发生研究,但尚不能将其直接应用于人类。在IVG应用于人类之前,要考虑3个因素。首先要确定卵子发生和精子发生的起始细胞类型;其次要消除无用的其他细胞类型,纯化PGCs;最后要从PSCs中产生有功能的精子或卵子,仍需将其移入卵巢或睾丸中。PGCs在卵巢或睾丸中发育过程的体外重现至关重要,需要进一步探索。

体内性腺环境是减数分裂必需的,但将iPSCs或iPSCs来源的细胞移入人睾丸仍有伦理和安全方面的限制。雄性生殖细胞分化的另一主要方法是将iPSCs异种移植到小鼠或灵长类动物的睾丸中来评估其分化为生殖系细胞的潜力^[45]。然而,异种移植系统也不理想,物种差异会妨碍系统中有效人类配子的发生。如果用人胎儿或新生儿性腺体细胞形成人重组卵巢或睾丸,有可能取得更大的成功;用同一物种的性腺材料同样也可以提高濒危动物IVG的效率。但要想在适当发育阶段分离到足够数量的人胎儿性腺体细胞仍存在技术和伦理挑战。随着人们对性腺发育机制的理解,现已经从mPSCs诱导出完全能支持卵子发生的胎儿卵巢体细胞样细胞,这项技术将为人和其他物种提供相当于胚胎性腺体细胞的细胞。

目前,利用类器官培养系统使人和其他物种的未成熟生殖细胞在体外发育成熟还很困难。利用类器官培养系统获得的GSCLCs与从精原细胞获得的GSCs还存在一定的表观遗传差异,体外精子发生培

养过程中生精细胞的遗传和表观遗传特性也有待进一步研究。

hiPSCs的建立不仅为解决配子体外发育缺陷导致的不孕/育症提供了方法,还为研究人生殖细胞发育的转录控制、表观重编程、减数分裂和基因组稳定性等提供了新途径。但hiPSCs的遗传和表观遗传质量及其产生的配子的质量均需审慎评估。研究表明,体细胞会积累大量突变,而iPSCs在衍生过程中也会获得遗传和表观遗传突变,使其衍生的配子因失去正常生殖系机制的保护而发生更多突变^[46]。因此,在使用此类细胞时,必须严格检查起始材料hiPSCs及其所得配子的基因组序列,还应监测所获配子或胚胎的表观遗传谱,以防止配子遗传任何有害的表观突变。在实际操作中,使用累积突变较少的胚胎或新生儿细胞作为下一代hiPSCs的供体细胞,可规避这一问题。

除生殖细胞的起源外,IVG也可以涵括生殖细胞在体内发育过程中所经历的主要生物学事件,如表观遗传重编程、减数分裂重组等。IVG研究的最终目标是使用确定因素来重建配子发生的整个过程。随着对生殖细胞发育机制的进一步了解,在特定条件下配子发生过程的再现程度和范围将进一步扩大。人IVG的实现将为生殖医学提供新的可能,如不育/孕症、遗传和表观遗传疾病的诊断和建模、新型治疗方法的探索,以及辅助生殖技术和培养方法的改进等^[47]。基于法律和伦理方面的考虑,需审慎评估是否可用IVG衍生的人类配子来产生后代。通过体外卵子发生所获卵母细胞产生的小鼠胚胎,许多因发育异常而在产前死亡,且正常出生的小鼠也存在胎盘较重的问题,这表明存活的个体可能存在隐性畸形。因此,应该对IVG衍生个体的基因表达、表观特性、行为、寿命和疾病易感性等进行深

入研究。由于一些表观遗传突变是可遗传的,因此这种评估和研究应进行数代。在基础医学领域,创建IVG衍生的与人类生理更相似的动物模型(如IVG衍生的猕猴)以及进行类似的评估都至关重要且前景广阔。

6 结语

生殖细胞的主要功能是保证遗传和表观遗传信息的准确性,以及创造生物信息的多样性。通过IVG技术,在体外探究并阐明生殖细胞发生发育的机制具有重要科学意义和潜在实践价值。本文主要评述了哺乳动物生殖细胞发育、小鼠IVG和人IVG的最新进展和面临的挑战。需要注意的是,对于人IVG必须慎之又慎。随着人们对实验动物IVG和人IVG的不断研究和探索,相信IVG在未来将会对医学、畜牧业生产、濒危动物保护等产生巨大影响。

参考文献 (References)

- [1] SPILLER C, KOOPMAN P, BOWLES J. Sex determination in the mammalian germline [J]. *Annu Rev Genet*, 2017, 51(1): 265-85.
- [2] HONDA A. Applying iPSCs for preserving endangered species and elucidating the evolution of mammalian sex determination [J]. *BioEssays*, 2018, 40(6): e1700152.
- [3] MALAVER-ORTEGA L F, SUMER H, JAIN K, et al. Bone morphogenetic protein 4 and retinoic acid trigger bovine VASA homolog expression in differentiating bovine induced pluripotent stem cells [J]. *Mol Reprod Dev*, 2016, 83(2): 149-61.
- [4] LUO Y, YU Y. Research advances in gametogenesis and embryogenesis using pluripotent stem cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 9: 801468.
- [5] GULIMIHERANMU M, WANG X, ZHOU J. Advances in female germ cell induction from pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 8849230.
- [6] BEN MAAMAR M, NILSSON E E, SKINNER M K. Epigenetic transgenerational inheritance, gametogenesis and germline development [J]. *Biol Reprod*, 2021, 105(3): 570-92.
- [7] SARMA U C, FINDLAY J K, HUTT K J. Oocytes from stem cells [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2019, 55: 14-22.
- [8] SILBER S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(12): 1595-603.
- [9] LI X, ZHU M, ZANG M, et al. PUMILIO-mediated translational control of somatic cell cycle program promotes folliculogenesis and contributes to ovarian cancer progression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(5): 279.
- [10] MANKU G, CULTY M. Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges [J]. *Reproduction*, 2015, 149(3): R139-57.
- [11] GRISWOLD M D. Spermatogenesis: the commitment to meiosis [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(1): 1-17.
- [12] OHINATA Y, PAYER B, O'CARROLL D, et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice [J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 207-13.
- [13] SAITOU M, MIYAUCHI H. Gametogenesis from pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6): 721-35.
- [14] KINOSHITA M, BARBER M, MANSFIELD W, et al. Capture of mouse and human stem cells with features of formative pluripotency [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(3): 453-71.e8.
- [15] SAITOU M, HAYASHI K. Mammalian *in vitro* gametogenesis [J]. *Science*, 2021, 374(6563): eaaz6830.
- [16] OSTEIL P, STUDDERT J, WILKIE E, et al. Generation of genome-edited mouse epiblast stem cells via a detour through ES cell-chimeras [J]. *Differentiation*, 2016, 91(4/5): 119-25.
- [17] OIKAWA M, KOBAYASHI H, SANBO M, et al. Functional primordial germ cell-like cells from pluripotent stem cells in rats [J]. *Science*, 2022, 376(6589): 176-9.
- [18] SMITH A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum [J]. *Development*, 2017, 144(3): 365-73.
- [19] 刘芳远, 赵超越, 吴宝江, 等. 形成态多能干细胞的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*(LIU F Y, ZHAO C Y, WU B J, et al. Progression in formative stem cell [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2021, 43(4): 881-7.
- [20] KURIMOTO K, YABUTA Y, HAYASHI K, et al. Quantitative dynamics of chromatin remodeling during germ cell specification from mouse embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(5): 517-32.
- [21] SUGIMOTO M, KONDO M, KOGA Y, et al. A simple and robust method for establishing homogeneous mouse epiblast stem cell lines by wnt inhibition [J]. *Stem Cell Rep*, 2015, 4(4): 744-57.
- [22] ARAMAKI S, HAYASHI K, KURIMOTO K, et al. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants [J]. *Dev Cell*, 2013, 27(5): 516-29.
- [23] HIKABE O, HAMAZAKI N, NAGAMATSU G, et al. Reconstitution *in vitro* of the entire cycle of the mouse female germ line [J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 299-303.
- [24] HAMAZAKI N, KYOGOKU H, ARAKI H, et al. Reconstitution of the oocyte transcriptional network with transcription factors [J]. *Nature*, 2021, 589(7841): 264-9.
- [25] ISHIKURA Y, OHTA H, SATO T, et al. *In vitro* reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(12): 2167-79.e9.
- [26] NAKAMURA T, OKAMOTO I, SASAKI K, et al. A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans [J]. *Nature*, 2016, 537(7618): 57-62.
- [27] TAN T, WU J, SI C, et al. Chimeric contribution of human extended pluripotent stem cells to monkey embryos *ex vivo* [J]. *Cell*, 2021, 184(8): 2020-32.e14.
- [28] SAITOU M. Mammalian germ cell development: from mechanism to *in vitro* reconstitution [J]. *Stem Cell Rep*, 2021, 16(4): 669-80.
- [29] DONG C, BELTCHEVA M, GONTARZ P, et al. Derivation of trophoblast stem cells from naive human pluripotent stem cells [J]. *eLife*, 2020, 9: e52504.
- [30] XIANG L, YIN Y, ZHENG Y, et al. A developmental landscape of 3D-cultured human pre-gastrulation embryos [J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 537-42.
- [31] YANAGIDA A, SPINDLOW D, NICHOLS J, et al. Naive stem

- cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(6): 1016-22, e4.
- [32] GANJIBAKHSH M, MEHRAEIN F, KORUJI M, et al. Three-dimensional decellularized amnion membrane scaffold promotes the efficiency of male germ cells generation from human induced pluripotent stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 384(1): 111544.
- [33] 胡智超, 陈慧芳, 蔡健锋, 等. 生殖细胞系建立的研究进展与应用[J]. *中国细胞生物学学报*(HU Z C, CHEN H F, CAI J F, et al. Research progress and application of germ cell line establishment [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2021, 43(9): 1901-10.
- [34] HONG T K, SONG J H, LEE S B, et al. Germ cell derivation from pluripotent stem cells for understanding *in vitro* gametogenesis [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1889.
- [35] SASAKI K, YOKOBAYASHI S, NAKAMURA T, et al. Robust *in vitro* induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 178-94.
- [36] KOJIMA Y, YAMASHIRO C, MURASE Y, et al. GATA transcription factors, SOX17 and TFAP2C, drive the human germ-cell specification program [J]. *Life Sci Alliance*, 2021, 4(5): e202000974.
- [37] RULANDS S, LEE H J, CLARK S J, et al. Genome-scale oscillations in dna methylation during exit from pluripotency [J]. *Cell Syst*, 2018, 7(1): 63-76, e12.
- [38] LI L, DONG J, YAN L, et al. Single-cell RNA-seq analysis maps development of human germline cells and gonadal niche interactions [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(6): 858-73, e4.
- [39] WEN L, TANG F. Human germline cell development: from the perspective of single-cell sequencing [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(2): 320-8.
- [40] YAMASHIRO C, SASAKI K, YOKOBAYASHI S, et al. Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in culture [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(4): 1560-83.
- [41] ABDYYEV V K, DASHENKOVA N O, DASHINIMAEV E B, et al. NANOS3 downregulation in Down syndrome hiPSCs during primordial germ cell-like cell differentiation [J]. *Histochem Cell Biol*, 2022, 157(1): 83-91.
- [42] SAKAI Y, NAKAMURA T, OKAMOTO I, et al. Induction of the germ cell fate from pluripotent stem cells in cynomolgus monkeys [J]. *Biol Reprod*, 2020, 102(3): 620-38.
- [43] WANG H, XIANG J, ZHANG W, et al. Induction of germ cell-like cells from porcine induced pluripotent stem cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27256.
- [44] ZHAO L, GAO X, ZHENG Y, et al. Establishment of bovine expanded potential stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(15): e2018505118.
- [45] FANG F, LI Z, ZHAO Q, et al. Human induced pluripotent stem cells and male infertility: an overview of current progress and perspectives [J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(2): 188-95.
- [46] MUSSON R, GAŚSIOR Ł, BISOGNO S, et al. DNA damage in preimplantation embryos and gametes: specification, clinical relevance and repair strategies [J]. *Hum Reprod Update*, 2022, 28(3): 376-99.
- [47] ISHII T, SAITOU M. Promoting *in vitro* gametogenesis research with a social understanding [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(11): 985-8.