



吴鑫, 南京医科大学教授, 博士生导师, 生殖医学与子代健康全国重点实验室课题组长(PI)。2003年博士毕业于复旦大学, 2004年至2012年于美国韦恩州立大学和宾夕法尼亚大学从事博士后研究, 2012年回国加入生殖医学与子代健康全国重点实验室, 任PI。主要研究方向包括生殖干细胞的命运决定, 及转录后调控在配子发生中的作用。代表性研究论文发表在*Mol Cell*、*Nat Commun*、*PNAS*、*Development*、*Hum Reprod*等国际学术杂志。课题组先后获得国家重点研发计划和国家自然科学基金等项目支持。

精原干细胞命运调控的研究进展

朱立发 孙嘉辰 吴鑫*

(南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 南京 211166)

摘要 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是体内一类特殊的成体干细胞, 它的自我更新和分化平衡决定着雄(男)性持续一生的精子发生过程, 是遗传信息在物种间世代稳定传递的基础。半个世纪以来, 对SSCs的识别、培养、移植和命运调控相关分子机制的研究极大拓展了人们对其生物学特性的认知。该综述将介绍SSCs研究的相关历史、重要里程碑、进展和依然面临的瓶颈问题, 以期为生育力拯救、干细胞基因改造、濒危动物多样性保护、畜牧业生产等研究和应用提供参考。

关键词 精原干细胞; 命运决定; 男性生育力; RNA结合蛋白; 表观调控

Advances in Spermatogonial Stem Cell Fate Regulation

ZHU Lifa, SUN Jiachen, WU Xin*

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Abstract SSCs (spermatogonial stem cells) are the unique adult stem cells because the balance between their self-renewal and differentiation determines lifelong spermatogenesis in the body, which also supports the transmission of genetic information from generation to generation in species. Over the past half century, the development of cell identification, culture, allogeneic transplantation and the study of fate regulation on SSCs have greatly improved our understanding of their biological properties. This review introduces the history, milestones, recent progress and unresolved issues still faced of SSC studies, and aims to summarize the current knowledge with a view to providing reference for fertility preservation, stem cell genetic modification, endangered species conservation, and livestock production.

Keywords spermatogonial stem cells; fate determination; male fertility; RNA binding proteins; epigenetic regulation

收稿日期: 2023-12-30 接受日期: 2024-03-04

国家自然科学基金(批准号: 32270897、32070831)资助的课题

*通信作者: Tel: 025-86869506, E-mail: xinwu@njmu.edu.cn

Received: December 30, 2023

Accepted: March 4, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32270897, 32070831)

*Corresponding author. Tel: +86-25-86869506, E-mail: xinwu@njmu.edu.cn

物种的延续依赖配子的精准传递, 其中精子发生(spermatogenesis)产生精子, 为后代提供遗传信息, 保证种系延续和多样性, 而在哺乳动物中, 精子的持续产生依赖于精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)的命运调控, 例如: 自我更新、分化及二者之间的平衡^[1]。SSCs位于睾丸生精小管基底部, 通过自我更新来维持其数目的稳定性; 并通过有丝分裂过程分化为子细胞, 随后进入减数分裂, 形成精子。在睾丸一个生精周期内, 部分SSCs分化启动一波精子发生, 而另一部分SSCs则通过自我更新为下一波精子发生做准备。

探讨SSCs命运调控的机制, 除阐明精子发生这一过程成体干细胞调控的理论基础外, 同时对临床男性不育患者, 尤其是青春期前男性儿童癌症患者的生育力保护上也具有潜在临床价值, 通过SSCs移植技术可以恢复经放化疗后生精受损或丧失的患者生育能力^[1]。随着CRISPR/Cas9等基因编辑技术的发展, 在精子发生的干细胞中, 这些技术的应用也有望重塑遗传性男性不育患者的生育力^[2]。目前, 以啮齿类模式动物为代表的SSCs研究, 已经具有较为成熟的功能性移植和体外培养系统, 对SSCs自我更新与分化机制的探讨, 也将为其他成体干细胞的命运调控提供线索。此外, SSCs的研究也将为濒危动物多样性保护, 干细胞遗传修饰、制造和开展转基因动物研究等带来贡献^[1,3]。

1 SSCs的生物学特征

SSCs起源于原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs), PGCs在迁移过程中, 不断增殖, 到达生殖嵴后, 停止分裂并保持静默状态, 转为性原细胞, 出生后性原细胞开始活跃, 发育为未分化精原细胞^[4]。

在小鼠睾丸中, 未分化精原细胞包括As(Asingle)、Apr(Apaired)和Aal(Aaligned) 3个亚群^[5]。早在1971年, 研究者们提出了传统的As精原干细胞模式, 认为As是精原干细胞, 它们在形态和功能上是同质的^[6-7]。As通过一次对称分裂产生的子细胞, 一方面可以彼此迁移, 成为2个新的As, 或者它们因为胞质分裂不完全, 可以通过细胞间桥连接保持在一起, 成为一对Apr, 这对Apr继续不完全分裂, 形成Aal~4、Aal~8和Aal~16, 进一步在维甲酸(retinoic acid, RA)的诱导下, Aal转化为A1型精原细胞, 即进入分化型精原细胞群, 通常包括6代, 分别为A1、A2、A3、A4、In、B

型精原细胞, 并在最后一次有丝分裂时产生精母细胞, 再经两次减数分裂及精子变形, 完成整个精子发生过程。而在As的分裂模式上, 也有部分研究者提出不对称分裂模式, 认为As经过一次分裂, 可形成一个As, 继续保持干细胞状态, 同时分裂产生的另一个单细胞则在其第一次分裂时产生Apr。几十年来, 基于生精小管整体染色的形态学评估和³H-胸腺嘧啶追踪, 提出的传统“As模型”一直是哺乳动物睾丸中SSCs动力学的主要解释, 并且认为这种As到Apr-Aal的分化是不可逆的过程。但在2010年, YOSHIDA团队^[8]基于报告基因的小鼠进行的谱系追踪和实时成像分析的结果, 发现这种As并不是同质的, SSCs只是As的一个亚群。此外, Apr、Aal可通过断裂生成单个精原细胞, 恢复干细胞的潜能, 故而他们提出“断裂式”模式, 对传统的As模式进行了补充。

值得注意的是, 与啮齿类动物相比, 灵长类SSCs分为两类, 一类为增殖活跃的SSCs, 我们称之为Apale, 另一类为Adark, 是处于静止期的SSCs, 在一定条件下可转化为Apale。此外, 灵长类SSCs通过有丝分裂产生的精原细胞直接过渡为B型分化精原细胞。虽然灵长类动物和啮齿类动物之间的精原细胞活动略有不同, 但其总体原理和动力学是相似的^[9]。

2 SSCs研究历程的关键性事件

2.1 SSCs的最初识别

SSCs的概念最初由CLERMONT和BUSTOS-OBREGON^[10]在1968年提出, 他们通过对大鼠睾丸生精小管的整体染色的观察, 详细描述了各种类型精原细胞的核形态, 并根据细胞的形态将A型精原细胞分为五种不同的类型。其中A1型精原细胞具有圆形的、苍白的细胞核, 它们都在管腔周期IX分裂, 产生A2型细胞。随后, 这些细胞依次在管腔周期XII分裂, 产生A3型精原细胞。A2型和A3型细胞核呈大卵圆形, 随机分布于支持细胞核之间的空间内。A3型精原细胞在周期XIV分裂产生A4型细胞。鉴于在A4型精原细胞有丝分裂高峰之前不会出现A1型细胞, 他们推测A4精原细胞是精子发生过程中活跃的干细胞, 具有提供更多已分化的中间型精原细胞和复制产生A1型细胞的两种功能。此外, 他们还定义了一种新型的精原细胞, 该细胞被称为A0型精原细胞。这些细胞可见于所有管腔周期, 占A型总数的21%, 具有卵形核及较小核仁。由于这些细

胞的有丝分裂很少见, A0精原细胞被定义为储备干细胞, 它们通常不参与精原细胞的更新和分化, 但可以在精原细胞池耗竭后补充精原细胞的数量。

2.2 SSCs体内移植技术的发明和发展

虽然自20世纪50年代以来, 许多实验方法, 包括组织学、免疫染色、整体染色和脉冲追踪标记, 被用于尝试识别SSCs, 但结果均不够非常明确。直到1994年, 遗传学家、转基因技术开拓者——BRINSTER的实验室^[11-13]利用前期转基因后细胞示踪技术结合睾丸移植技术, 对SSCs自我更新和分化能力进行定量功能分析, 首次证明了睾丸中生殖干细胞, 即精原干细胞的存在。化疗药物白消安能够消除小鼠体内生殖细胞, 他们以白消安处理过的小鼠或因内源性*Kit*基因突变而缺乏精子发生的W型小鼠作为受体小鼠, 将供体雄性小鼠的睾丸细胞悬液注入受体小鼠睾丸生精小管内, 供体生殖细胞穿过睾丸支持细胞(Sertoli cells)的紧密连接, 迁移并定植在生精上皮的基膜处, 利用受体小鼠睾丸内生精微环境进行精子发生, 移植两个月后, 供体来源的功能性成熟精子出现, 并且精子形态正常, 与卵子受精后能够产生携带供体基因的可育后代(图1D和图1E)。该移植系统的开发, 从功能上对SSCs有了明确的定义, 同时也为SSCs自我更新的基础研究开辟了新路径。

此外, 为了将精原细胞移植技术扩展到其他物种, 并评估使用小鼠作为异种移植受体的可行性, 1996年, BRINSTER实验室^[14]报道, 基于小鼠的生精微环境, 大鼠的SSCs能够长期自我更新和分化, 并且能够在小鼠睾丸内产生大鼠的精子, 然而对于其他更高级物种, 如人及其他灵长类动物, 它们的SSCs能够在小鼠睾丸中长期存活至少6个月, 但不能进行分化, 提示小鼠睾丸微环境不足以完全支持更高级物种的SSCs发育^[15]。

随着研究者的探索, 精原细胞移植技术已从最开始的小鼠, 扩展到啮齿类动物的研究, 包括家畜和灵长类睾丸生殖细胞移植技术的研究, 这些研究极大推进了生殖生物学技术的发展。例如, OATLEY团队^[16]构建了*Nanos2*基因敲除遗传不育家畜模型(猪、山羊), 该模型作为异体移植受体, 对供体来源的精原干细胞不发生免疫排斥, 并能完成精子发生。2021年, SHETTY等^[17]报道, 在经辐照处理的青春前期恒河猴的睾丸内, 移植青春后期恒河猴的SSCs, 可恢复精子发生, 产生潜在的功能性精子。

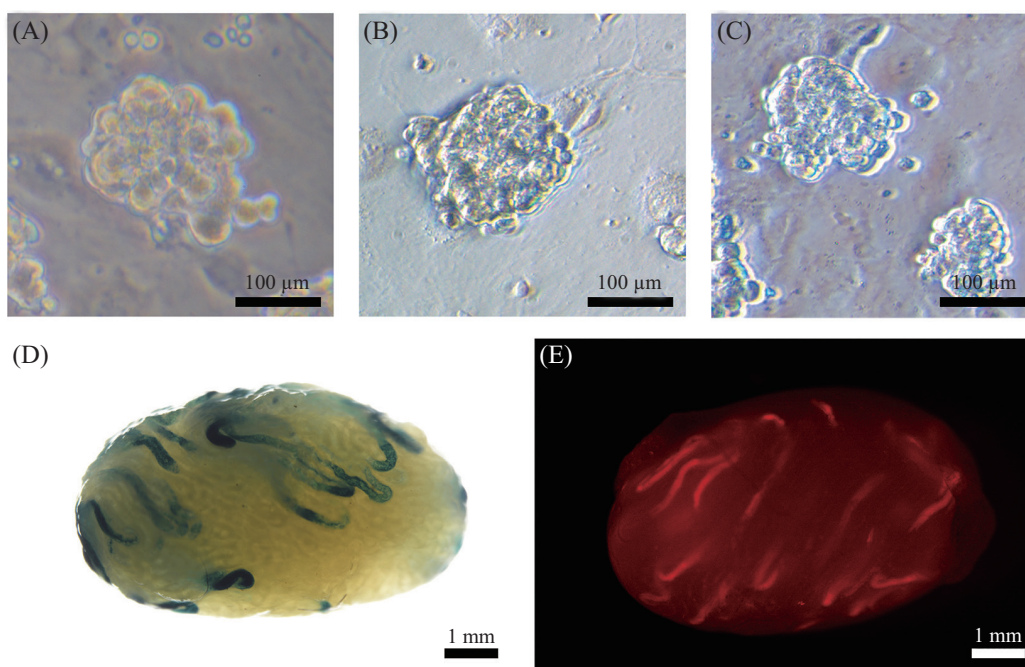
2.3 SSCs体外培养体系的建立

SSCs的体外培养体系是研究睾丸内SSCs命运调控的重要平台, 随着1994年睾丸生殖细胞移植技术的出现, SSCs的功能检测推动了体外培养系统迅速发展并取得了突破性成就。1998年, NAGANO等^[18]将表达 β -半乳糖苷酶的转基因小鼠的睾丸生殖细胞种植在STO[sandos inbred mice (SIM) embryo-derived thioguanine- and ouabain-resistant, SIM小鼠胚胎来源的并具有硫鸟嘌呤和哇巴因抗性]饲养细胞(feeder cells)上, 在含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)补充培养基中培养4个月后, 再将培养的SSCs移植到受体小鼠睾丸内, 依然能够产生生精克隆, 表明SSCs可以在体外培养中维持至少4个月。然而该项研究培养的SSCs缺乏明确的干细胞增殖特征, 并且存活率也非常低, 不能作为有效的SSCs体外培养系统。直到2003年, SHINOHARA团队^[19]首次报道能够长期稳定体外培养遗传背景为ICR(institute of cancer research)或BDF1(C57BL/6 $\times$ DBA/2 F1, 即C57BL/6背景小鼠与DBA/2背景小鼠交配获得的F1代小鼠)的新生小鼠SSCs。该研究团队利用差异贴壁的方式富集小鼠性原细胞, 以丝裂霉素处理后的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)作为饲养细胞, 在含有血清补充的Stempro-34培养基中进行培养, 同时培养液中加入神经胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、碱性成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等生长因子。在该培养体系中, 富集性原细胞恢复并能稳定增殖, 形成葡萄串状细胞克隆, 同时SSCs相关抗原阳性。通过移植技术证实了培养的细胞克隆具有SSCs自我更新和分化能力, 并且能够恢复先天不育小鼠的生育力, 使其产生可育子代。然而该培养系统对小鼠遗传背景具有依赖性, 无法有效培养C57BL/6或者129/Sv遗传背景的小鼠SSCs, 并且该培养系统的培养液加入了血清, 导致培养液具体成分不够明确。2004年, 一种无血清培养的SSCs体外培养系统被BRINSTER实验室^[20]建立起来。通过THY1⁺细胞分选获得的未分化精原细胞种植在STO细胞上, 培养液为不含血清的MEM α (minimum essential medium α)基础培养基, 并在培养基中加入牛血清白蛋白(bovine serum

albumin, BSA)、胰岛素、转铁蛋白、硒、腐胺、2-巯基乙醇、游离脂肪酸、*N*-2-羟乙基哌嗪-*N*-2-乙烷磺酸(HEPES)和抗生素等, 加入GDNF、GFR α 1和FGF2细胞因子能够有效支持C57BL/6、129/SvCP和SJL(Swiss Jim Lambert)背景小鼠SSCs形成葡萄串状的紧密团块, 并能稳定增殖(图1A)。该无血清培养系统, 成分明确, 能够有效鉴定影响SSCs体外自我更新与分化的外源性因子, 为SSCs的基础生物学研究奠定了基础, 并使SSCs基因修饰成为可能。后期该实验室^[21]发现通过降低该培养系统中的氧气浓度能够有效提高SSCs的增殖活性, 并能够进一步优化小鼠SSCs的体外培养体系。

随着小鼠SSCs体外培养体系的建立, 大鼠、仓鼠、兔子等动物的SSCs体外培养体系也相继建立, 并且可以重复和用来开展进一步的研究工作^[22-24]

(图1B和图1C)。然而这些动物均为啮齿类动物, 并且这些培养系统均是依赖于关键的外源性生长因子GDNF的发现^[25]。2009年, SADRI-ARDEKANI等^[26]报道能够体外长期扩增人的SSCs 28周, 并通过一些SSCs标记基因的检测和异种移植方法进行了SSCs鉴定, 但由于缺乏明确的人类SSCs移植功能评估方法, 对其扩增的SSCs功能依然存在争议。2017年, ZHENG课题组^[27]首次报道了灵长类近亲动物树鼩SSCs能够体外大量扩增并能通过移植产生子代。该项研究在GDNF依赖的SSCs体外培养系统的基础上, 外源性细胞因子Wnt3a的补充和以树鼩支持细胞作为饲养细胞是树鼩原代SSCs体外培养的关键。由于树鼩的生理和病理特征均与灵长类物种(包括人)极其相似, 因此, 树鼩SSCs体外培养系统为探讨灵长类物种(包括人)的SSCs体外培养体系以及命运



A~C: 依赖生长因子GDNF的无血清培养体系, 体外培养小鼠(A)、大鼠(B)、兔子(C)的SSCs克隆, 其中小鼠、大鼠以STO细胞为饲养层细胞, 兔子以C166细胞为饲养层细胞^[24,28]; D、E: B6.129S-Gt(ROSA) 26Sor/J小鼠含有内源性报告基因 β -半乳糖苷酶, 经X-Gal染色显示为蓝色(D), B6.129(Cg)-Gt(ROSA) 26Sor^{tm4} (ACTB-tdTomato, EGFP) Luo/J小鼠具有双荧光Cre报告等位基因, 可以在Cre诱导前, 由ACTB启动子启动强烈持久的红色荧光蛋白表达(E), 通过睾丸细胞移植技术将上述两种小鼠分选获得的SSCs移植到129×C57BL/6背景生殖细胞缺失的受体鼠睾丸内, 在睾丸的曲细精管内产生广泛的与移植干细胞起源相对应的再生精克隆^[29]。

A~C: clump forming grape-shaped SSCs of mice (A), rat (B) and rabbit (C), with a GDNF-dependent serum-free culture system *in vitro*, and their feeder cells are STO, STO, and C166 cells respectively^[24,28]; D,E: B6.129S-Gt(ROSA) 26Sor/J mice (D) carry a transgenic allele of the *Escherichia coli* β -galactosidase gene, and cells/tissues were stained blue with X-Gal staining. Mice under B6.129(Cg)-Gt (ROSA) 26Sor^{tm4} (ACTB-tdTomato, EGFP) Luo/J background (E) have two-color fluorescent Cre-reporter allele. Prior to Cre recombination, the ACTB promoter allows much stronger and persistent expression of the red fluorescence proteins in cells/tissues. Transplanted spermatogonial stem cells derived from transgenic mice (D and E) could efficiently repopulate in germ cell-depleted recipient mouse testes under 129×C57BL/6 background shown by the presence of blue (X-Gal positive, D) or red fluorescence-positive (E) colonies^[29].

图1 精原干细胞的体外培养与移植

Fig.1 *In vitro* proliferation and transplantation of spermatogonial stem cells

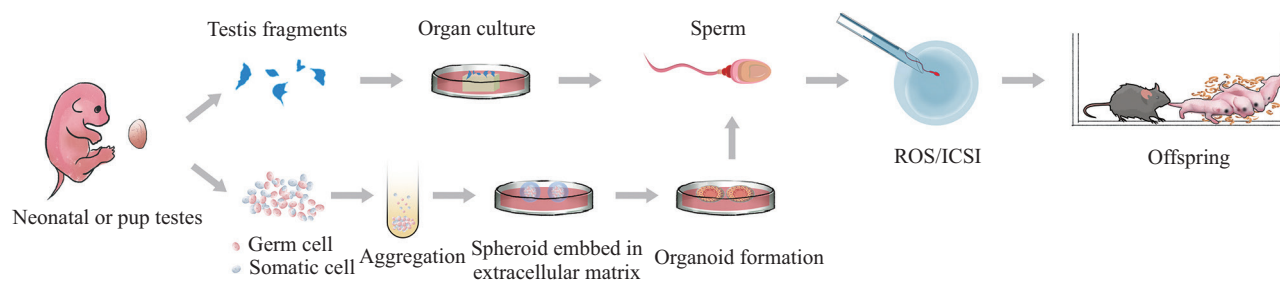


图2 体外精子发生的策略

Fig.2 Strategies for *in vitro* spermatogenesis

调控的分子机制提供了很好的平台。然而该培养体系目前并没有继续开展更深层次的研究工作,目前高级物种的SSCs体外大量增殖建系的体系和相关研究依然报道罕见。

2.4 SSCs多潜能性的验证

2004年,SHINOHARA团队^[30]在新生小鼠SSCs原代培养的4~7周内,偶然发现在 1.5×10^7 个细胞中,约有1个细胞的比例能够形成胚胎干细胞样的细胞克隆,这些克隆被命名为多潜能性生殖系干细胞(multipotent germline stem cells, mGS细胞)。该细胞能够体外诱导分化为多种体细胞,如造血细胞、神经细胞等,注入裸鼠体内可形成畸胎瘤,此外,显微注射到囊胚后能够正常胚胎发育形成嵌合体,提示小鼠SSCs具有多潜能性。然而,由于PGCs到SSCs的发育时间很短,发生在出生前13.5天到出生后3.5天,新生小鼠睾丸不排除有潜在PGCs的可能,为此,成年小鼠睾丸的研究工作也随之开展。2006年,GUAN等^[31]报道,从成年小鼠睾丸中分选出的STRA8⁺的SSCs同时具有单能性和多能性。通过移植,该群细胞能够在小鼠睾丸中进行正常的精子发生。而在胚胎干细胞培养液中,该群细胞又可以转化为多潜能干细胞,并能通过显微注射在囊胚中进行正常的胚胎发育。该项研究提示成年小鼠睾丸中的SSCs也具有多潜能性,但未能对多能性干细胞的来源进行有效验证,不排除有睾丸中其他体细胞来源的情况。2009年,KO等^[32]利用体外培养的成年小鼠睾丸SSCs克隆实验阐明了多潜能性干细胞的来源问题,证实了成年小鼠睾丸的SSCs确实具有多潜能性。因此,在成年小鼠的睾丸中,形成多能性细胞的能力仍然存在,这为是否能够从睾丸活检中建立人类多潜能性干细胞提出了可能,这些细胞能够克服人类胚胎干细胞相关的伦理和免疫学问题,结合未来干细胞治疗技术,为研究和治疗各种细胞系中

的遗传疾病提供新的机会。2008年,一项研究报道人的SSCs也能够体外诱导成多能干细胞^[33],但遗憾的是,这项工作随后被否定,该多能干细胞与人成纤维细胞具有相似的基因表达模式,是由成纤维细胞演变而来的^[34]。

2.5 体外精子发生

精子发生主要包括SSCs的自我更新与分化、精母细胞减数分裂和精子变形三个阶段^[35]。目前,不孕不育困扰着全球约15%的育龄夫妇,男性因素引起的不育约占50%^[36]。其中,非梗阻性无精子症患者的精子发生异常以及青春期前儿童癌症患者的放化疗损伤是男性不育的重要原因。然而,该群体患者可能无法产生功能性精子,目前的辅助生殖技术尚无法使该群体的生育力得到恢复,如体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)、卵胞质内单精子注射(*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI)、圆形精子注射(*round spermatid injection*, ROSI)等。利用SSCs建立可靠的体外精子发生培养体系既能帮助解析精子发生过程中的复杂调控机制,同时也可作为临床上生育力恢复的潜在策略^[37](图2)。

目前,科学家们对体外精子发生已经做了许多方法尝试,涉及多种培养液和生物材料。虽然这些培养技术还未能达到临床应用阶段,但已取得了阶段性的突破。如今,通过体外培养睾丸组织碎片的器官培养方法是最成功的体外精子发生培养系统,已可实现小鼠及大鼠的完整体外精子发生,并通过精子注射实验获得了健康的子代^[38-39]。鉴于器官培养在啮齿类动物精子发生上取得的巨大突破,科学家对人类睾丸也采用了相同的培养方式,并已取得有希望的成果^[40-41]。然而,在人类体外精子发生的探索中,人们也注意到了精子发生在物种间的巨大差异,因此对于培养液的尝试和培养方式的优化仍需不断探索。

此外,得益于生物工程技术的发展,睾丸类器官、睾丸细胞三维培养及三维打印技术也被应用于体外精子发生的尝试中,这些新兴的培养技术可通过体外重建睾丸结构而有望实现体外精子发生^[42]。

3 微环境及外源性细胞因子对SSCs的调控

3.1 生精微环境

睾丸组织主要由生精小管及其周围间质组织组成,SSCs定位于生精小管基底膜上,在那里与周围的体细胞相互作用,形成一个SSCs保护区,被称为SSCs的生精微环境,也被称为“niche”^[43]。其中,支持细胞位于生精小管的基底膜处,可为SSCs提供结构支撑以及SSCs发育过程中的众多关键性细胞因子和外基质,同时支持细胞之间的紧密连接形成血睾屏障,为SSCs提供了一个安全的生精环境。周围的间质组织由各种类型的细胞组成,除巨噬细胞、毛

细血管、淋巴组织、神经纤维组织外,还包括管周肌细胞、间质细胞(Leydig cells)等,这些细胞同样能够产生多种细胞因子,直接或间接调控SSCs的自我更新与分化(表1)。

3.2 外源性细胞因子对SSCs自我更新的调控

3.2.1 GDNF GDNF是转化生长因子β家族中的成员之一,最初被发现于中脑多巴胺能神经元,对多巴胺能神经元的存活与分化极其重要,被命名为神经胶质细胞系来源的神经营养因子。它广泛表达于体内多个组织,在睾丸组织中,主要由支持细胞分泌,2000年的一项开创性研究表明,GDNF是小鼠未分化精原细胞命运决定的关键调控因子^[25]。在该研究中,过表达*Gdnf*的小鼠显示精原细胞异常增殖,而*Gdnf*半敲杂合子小鼠精原细胞逐渐丢失,导致生精小管仅有支持细胞排列。在这两种情况下,雄性小鼠都因精子发生受损而导致不育,表明GDNF可控

表1 参与精原干细胞命运调控的外源性细胞因子

Table 1 Extrinsic cell factors in regulating the fate of spermatogonial stem cells

细胞因子 Cell factors	主要分泌细胞 The main secretory cells	功能调节 Regulation of functions	参考文献 References
GDNF	Sertoli cells, peritubular myoid cells, endothelial cells	Maintaining self-renewal of SSCs by binding to its receptor RET, GFRa1, and activates phosphorylation sites in the downstream PI3K-AKT, ERK, and mTORC1 signaling pathways	MENG, et al. 2000 CHEN, et al. 2016 WANG, et al. 2017
FGF2	Sertoli cells	Synergizing with GDNF to regulate self-renewal of SSCs by activating the MAP2K1 pathway and up-regulating ETV5, BCL6B expression	ISHII, et al. 2012
FGF8	Spermatogonium	Maintaining self-renewal of SSCs by activating the MEK/ERK signaling pathway and inducing GFRa1 and RET expression	HASEGAWA, et al. 2014
FGF5	Lymphatic endothelial cells	Promoting proliferation of SSCs by activating ERK and AKT signaling pathways and upregulating PCNA, Cyclin A2 and Cyclin E1	KITADATE, et al. 2019
FGF9	Leydig cells	Maintaining self-renewal of SSCs by inducing p38 MAPK phosphorylation and upregulating ETV5, BCL6B	YANG, et al. 2021
WNT3a	Spermatogonium	Promoting proliferation of SSCs by activating the Wnt/β-catenin classical signaling pathway	GOLESTANEH, et al. 2009
WNT6	Sertoli cells	Promoting proliferation of SSCs by activating the Wnt/β-catenin classical signaling pathway	TAKASE, et al. 2016
WNT5a	Sertoli cells	Inhibiting apoptosis and maintaining self-renewal of SSCs by activating JNK signaling	YEH, et al. 2011
CSF-1	Leydig cells, peritubular myoid cells	Promoting proliferation of SSCs by binding to CSF1R	OATLEY, et al. 2009 KOKKINAKI, et al.2009
CXCL12	Sertoli cells	Promoting SSCs homing and maintaining self-renewal of SSCs by binding to CXCR4	KANATSU-SHINOHARA, et al. 2012 YANG, et al. 2013
RA	Sertoli cells	Activating STRA8 to initiate differentiation and induce meiosis	ENDO, et al. 2015
BMP4	Spermatogonium	Synergizing with retinoic acid to induce differentiation of SSCs	YANG, et al. 2016
SCF	Sertoli cells	Promoting differentiation of SSCs by upregulating differentiation-related genes including STRA8 and c-KIT	NASIMI, et al. 2021

制精原细胞的增殖和分化。随后, GDNF依赖性的SSCs体外培养系统建立, GDNF对于SSCs的命运调控得到再次验证^[19-20]。

GDNF受体主要由GFR α 1和RET组成, 在哺乳动物睾丸中, GFR α 1和RET在SSCs中优势表达, GFR α 1或Ret突变能够抑制SSCs增殖, 导致SSCs丢失^[44]。GDNF通过与其受体RET、GFR α 1结合, 激活下游多条通路, 如PI3K-AKT信号通路、ERK信号通路, 以及mTORC1复合物Raptor的863丝氨酸位点磷酸化等, 进而调控SSCs的自我更新与分化^[29]。

3.2.2 FGF家族 FGF家族, 即成纤维生长因子家族, 作为另一种外源性生长因子, 在SSCs命运调控中同样扮演着重要角色。其中, FGF2生长因子, 主要由支持细胞分泌, 它能与GDNF协同作用, 通过激活MAP2K1通路上调ETV5、BCL6B表达, 促进SSCs体外自我更新, 已被用于SSCs体外培养体系^[20,45]。然而, 体内实验发现, Fgf2过表达的小鼠睾丸并未明显增加SSCs的数量, 相反, Fgf2敲降后能够促进SSCs增殖, 尽管利用可生物降解明胶微球(biodegradable gelatin microsphere, BGM)系统在小鼠睾丸内释放FGF2细胞因子, 能够扩增SSCs数量, 但这些细胞群表现出与GDNF扩增的SSCs不同的表型, 并且FGF2能够抑制RA代谢和GDNF的产生, 提示FGF2在niche中的功能可能更适合于SSCs的分化^[46-47]。为此, FGF2在SSCs自我更新与分化调控过程中的功能依然存在着争议, 有待于进一步研究, 同时也显示出SSCs生物学功能的复杂性。

除了FGF2生长因子外, 其他FGF家族因子在SSCs命运调控中也具有重要作用, 例如, FGF8通过其受体FGFR1激活MEK/ERK信号通路, 诱导GFR α 1和RET的表达, 维持SSCs的自我更新^[48]。又如靠近血管的淋巴内皮细胞分泌的FGF5能够促进GFR α 1表达阳性SSCs的增殖^[49]。2021年, YANG等^[50]报道, FGF9也能促进SSCs体内外增殖, 它主要由间质细胞分泌, 通过对FGF9处理培养的SSCs进行RNA测序, 发现FGF9可诱导p38 MAPK的磷酸化, 并激活其在SSCs内的信号级联反应, 导致ETV5表达上调, 进而增加BCL6B的表达水平, 最终导致SSCs数量增加。

3.2.3 WNT家族 WNT信号通路是一种高度保守的细胞间通信机制, 也是干细胞(包括SSCs)自我更新调节的关键通路。例如WNT3a能够通过Wnt/ β -catenin经典信号通路促进小鼠C18-4精原干细胞系和新鲜

游离的原代精原细胞的增殖, 由支持细胞分泌的WNT6作为旁分泌信号因子激活Wnt/ β -catenin经典信号通路促进成年小鼠睾丸中SSCs的增殖^[51-52]。在非经典通路调控中, WNT5a通过JNK信号能够抑制凋亡, 维持体外培养的SSCs自我更新^[53]。

3.2.4 其他 除了GDNF、FGF家族、WNT家族外, 其他细胞因子也逐渐被报道, 例如2009年研究报道, 由间质细胞和管周肌样细胞分泌的集落刺激因子1(colony stimulating factor 1, CSF-1)能够体内外调控SSCs的自我更新^[54-55], 2013年, SHINOHARA团队^[56]建立了一个以睾丸细胞为饲养细胞的SSCs体外长期培养系统, 并发现趋化因子配体CXCL12结合其受体CXCR4能够促进SSCs的迁移归巢, 但CXCL12的补充及Cxcr4的敲除并未影响到体外培养的SSCs的增殖, 而另一项研究报道, CXCL12-CXCR4信号通路既能够重塑细胞外基质来控制SSCs的黏附和迁移, 也能够促进细胞增殖, 阻断RA诱导的SSCs分化^[57]。

3.3 外源性细胞因子对SSCs分化的调控

精子发生始于SSCs有丝分裂形成Apr精原细胞, 在部分细胞因子的驱动下, SSCs开始走向分化, 但由于缺乏SSCs和Apr精原细胞明确的分子标记, 破译这一机制仍是一项艰巨的任务^[43]。其中, 维甲酸主要由支持细胞等细胞分泌, 通过周期性的RA-STRA8信号转导, 与生精周期相互协调, 调节SSCs的分化过程^[58]。RA是维生素A的中间代谢产物, 缺失维生素A的小鼠睾丸, 未分化精原细胞停止发育, 补充RA后, 恢复正常精子发生^[59]。骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)属于TGF- β 家族, 主要在生殖细胞中表达, 能够发挥自分泌效应, 与RA信号具有协同作用, 促进SSCs分化^[60]。除此之外, 还有干细胞因子(stem cell factor, SCF)等外源性细胞因子, 它们通过对靶基因的调控, 促进SSCs的分化^[61]。

4 内源性细胞分子对SSCs的调控

4.1 转录因子的转录水平调控

由微环境分泌的细胞因子参与了SSCs的外部调控, 而其作用于SSCs的下游靶标基因构成了SSCs命运决定的内部因素, 其中包括了大量转录因子, 这些转录因子能够相互调节并作用于共同的靶点, 在SSCs自我更新与分化过程中, 整合形成复杂的转录网络^[62](表2)。

表2 参与精原干细胞命运调控的转录因子

Table 2 Transcription factors in regulating the fate of spermatogonial stem cells

转录因子 Transcription factors	主要表达阶段 The primary expression stage	突变小鼠表型* Phenotypes of mutant mice*	功能调节 Regulation of functions	参考文献 References
BCL6B	Spermatogonia, round sperm (stage 7)	Sub-fertile	Regulated by GDNF to maintain self-renewal of SSCs	OATLEY, et al. 2006
ETV5	Spermatogenic cells at all stages	Infertile	Regulated by GDNF to mediate the expression of multiple SSCs self-renewal related genes	CHEN, et al. 2005 OATLEY, et al. 2007 WU, et al. 2011
LHX1	Spermatogonia, round sperm (stage 7)	Lethal at embryo	Regulated by GDNF to maintain self-renewal of SSCs	OATLEY, et al. 2007
POU3F1	Spermatogonia	Lethal at birth	Stimulating Pou3f1 expression through GDNF-PIK3-AKT pathway to maintain self-renewal of SSCs	WU, et al. 2010
T	Spermatocyte, spermatogonia	Lethal at embryo	Regulated by the GDNF/ETV5 pathway to promote proliferation of SSCs	WU, et al. 2011
ID 4	As	Sub-fertile	Regulated by GDNF to maintain self-renewal of SSCs	OATLEY, et al. 2011
EOMES	As, Apr	Lethal at embryo	EOMES ⁺ SSCs are resistant to chemotherapeutic drug damage to maintain SSC homeostasis	SHARMA, et al. 2019
FOXC2	As, Apr	Lethal at birth	Regulated by GDNF, it specifically binds the promoter region of target genes and negatively regulates cell cycle progression	WEI, et al. 2018 WANG, et al. 2023
SIRPA	As, Apr, part of the Aal	Normal	Binding to PTPN11 and activating the MAP2K1 pathway to promote self-renewal of SSCs	MIYAZAKI, et al. 2023
PLZF	As, Apr, Aal	Infertile	Regulating numerous transcription factors and RNA binding proteins to maintain self-renewal of SSCs	BUAAS, et al. 2004 COSTOYA, et al. 2004
TAF4B	Gonocytes, spermatogonia, sperm	Infertile	Maintaining self-renewal of SSCs	FALENDER, et al. 2005
POU5F1	As, Apr, Aal (mainly in As)	Lethal at embryo	Maintaining self-renewal of SSCs	DANN, et al. 2008
FOXO1	Gonocytes, As, Apr, Aal	Infertile	Regulated by the PI3K-AKT pathway to maintain self-renewal of SSCs	GOERTZ, et al. 2011
BMI1	As	Infertile	Maintaining self-renewal of SSCs	ZHANG, et al. 2008 KOMAI, et al. 2014
PAX7	As	Lethal at birth	Maintaining self-renewal of SSCs	ALOISIO, et al. 2014
SOX3	As, Apr, Aal	Infertile	Promoting spermatogonial differentiation	RAVEROT, et al. 2005 LARONDA, et al. 2011
SOHLH1	Spermatogonia	Infertile	After <i>Sohlh1</i> deletion, the differentiation of spermatogonia into spermatocytes is blocked	BALLOW, et al. 2006
SOHLH2	Spermatogonia	Infertile	Promoting differentiation of type A spermatogonia to type B spermatogonia	HAO, et al. 2008
DMRT1	Spermatogonia (mainly in undifferentiated spermatogonia)	Infertile	Recognizing and binding to the <i>Sohlh1</i> promoter to promote spermatogonial differentiation, inhibiting meiosis induced by RA	MATSON, et al. 2010
STAT3	Round spermatid, gonocytes, spermatogonia	Lethal at embryo	Promoting spermatogonial differentiation	OATLEY, et al. 2010
NGN3	As, Apr, Aal (mainly in Aal)	Lethal at birth	A key downstream regulator of Stat3, promoting spermatogonial differentiation	KAUCHER, et al. 2012
RAD9A	Spermatogenic cells at all stages	Infertile	Promoting spermatogonial differentiation	HUANG, et al. 2016

: 突变小鼠表型数据来源于Jackson实验室, 网址: <https://www.informatics.jax.org/>。: the data of mutant mouse phenotype came from Jackson's lab, website: <https://www.informatics.jax.org/>.

4.1.1 GDNF依赖性转录因子 GDNF作为SSCs自我更新调控的关键外源性细胞因子,为了进一步确定GDNF下游靶标,OATLEY等^[63]去除SSCs培养液中GDNF 18 h后,再进行GDNF补充,结合微阵列分析方法,发现*Bcl6b*、*Etv5*、*Lhx1*等基因受GDNF调控,这些基因在GDNF去除时表达量减少,而在补充GDNF后表达量增加。其中,*Bcl6b*是一个含有锌指结构的肿瘤抑制基因,能够在睾丸THY1⁺ SSCs中富集,并受GDNF细胞因子调控,促进SSCs增殖。*Bcl6b*敲除小鼠睾丸变小,约24%的睾丸管腔异常,出现空泡化或异常精子,与野生型小鼠交配可生育后代,但每窝鼠仔数量明显减少。进一步通过siRNA技术对体外培养的SSCs进行*Bcl6b*转录水平敲降,7天后,SSCs克隆大小及数量明显降低,体内移植后约有88%的SSCs发生丢失。ETV5是ETS家族的一个转录因子,受GDNF和FGF2共同调控。2005年的一项研究发现,*Etv5*敲除小鼠(*Etv5*^{-/-})雄性不育,睾丸明显变小。在4周龄时,*Etv5*^{-/-}小鼠的生精小管与野生型相似,有多层生殖细胞,表明第一波精子发生的正常起始,但在6周时,发现许多*Etv5*^{-/-}生精小管生殖细胞逐渐丢失,10周时,大多数小管没有任何生殖细胞,基底膜上只有形态正常的支持细胞,表现为仅支持细胞综合征^[64]。但在该项研究中,ETV5主要在支持细胞中表达,可能通过外源通路调控SSCs自我更新的维持,具体机制有待于进一步阐明。随后的研究表明,ETV5也在生殖细胞中表达,但其表达水平低于支持细胞,对体外培养的SSCs进行*Etv5*敲降后,体内移植的克隆数较对照组减少了62%^[65]。其他转录因子,包括LHX1、POU3F1、BRACHYURY (T)等,也相继通过体外敲降和SSCs移植技术被鉴定,均为受GDNF调控的干性维持相关蛋白,能够促进SSCs的自我更新^[65-67]。

ID4属于DNA结合抑制蛋白家族成员,主要在睾丸A型精原细胞中表达。2011年,OATLEY团队^[68]利用特异性ID4抗体以及ID4-GFP荧光标记小鼠证实,ID4主要在As中表达,是SSCs的标记蛋白。在THY1⁺ SSCs中,ID4受外源性细胞因子GDNF调控,敲降后的SSCs虽然体外增殖的细胞数无明显变化,但经体内移植后生精克隆数明显减少,提示*Id4*的敲降影响了SSCs的自我更新能力。此外,*Id4*敲除小鼠表现为亚可育状态,并且随着年龄增长,小鼠睾丸管腔逐渐出现空泡化,生殖细胞进行性丢失,附睾内精子数也

明显减少,也再次说明体内SSCs的维持严重受损。

2019年,SHARMA等^[69]对luxoid突变小鼠进行*Gdnf*过表达,成功挽救了生殖细胞的丢失。他们发现EOMES因子表达阳性的SSCs能够抵抗化疗药物损伤,维持SSCs稳态。此外,叉头转录因子家族成员FOXC2主要在As、Apr中表达,并受GDNF调控,可特异性结合靶基因启动子区域,负向调控细胞周期进程,维持SSCs静息状态^[70-71]。信号调节蛋白 α (signal regulatory protein alpha, SIRPA)是一种在大鼠和小鼠中均为保守的SSCs标记物,在GDNF的作用下表达水平增加,通过与PTPN11结合,激活MAP2K1通路,促进SSCs的自我更新^[72]。

4.1.2 GDNF非依赖性转录因子 PLZF又称ZFP145或ZBTB16,是一种转录抑制因子,具有Kruppel类型锌指结构域。2004年BUAAS等^[73]证明编码*Plzf*基因的无义突变是导致lu(luxoid)突变雄性小鼠不育的重要原因,该小鼠睾丸变小,生殖细胞进行性丢失,曲细精管结构逐步瓦解。同年,COS-TOYA等^[74]利用基因打靶技术产生了*Plzf*敲除小鼠,同样出现lu突变雄性小鼠不育表型。PLZF主要表达于性原细胞和未分化型精原细胞,对*Plzf*敲除的精原细胞进行转录组分析显示,PLZF能够调控众多转录因子和RNA结合蛋白,可能在SSCs中通过转录、转录后等不同水平调控SSCs的自我更新。

TAF4B是RNA聚合酶II转录因子TFIID复合物重要组成成分,它主要在性原细胞、精原细胞及单倍体精子细胞中表达,是持续精子发生所必需的,也是小鼠生育的必要条件,在SSCs维持自我更新能力上具有重要作用。2005年,FALENDER等^[75]报道,*Taf4b*敲除雄性小鼠年轻时可育,但随后表现出年龄依赖性的生殖细胞进行性丢失,导致*Taf4b*敲除雄性小鼠不育。

OCT4又称POU5F1或OCT3,能够维持胚胎干细胞的多潜能性。它主要在性原细胞和未分化精原细胞(主要为As)中表达。2008年,DANN等^[76]建立RA诱导SSCs体外分化系统,发现OCT4表达水平明显降低,*Oct4*敲降的SSCs体内移植后生精克隆数约为对照组的1/6,说明OCT4在SSCs维持过程中具有重要作用,能够促进SSCs自我更新。而在2010年的研究发现*Oct4*的敲降并没有显著降低SSCs体内移植后的生精克隆数,这可能与两项研究使用的基因敲降方式、体外精原干细胞培养系统以及小鼠背景不

同相关^[66]。

FOXO1是Foxhead转录因子家族成员之一,主要在性原细胞和未分化精原细胞中表达,在性原细胞向未分化精原细胞转化过程中,FOXO1蛋白亚细胞定位发生从胞质向胞核的迁移,是体内性原细胞和未分化精原细胞的独特标记分子,能够通过包括RET在内的特定转录因子靶点网络调控SSCs的自我更新与分化。2011年,GOERTZ等^[77]利用Vasa-Cre工具小鼠与*Foxo1^{Flox/Flox}*小鼠交配获得生殖细胞特异性*Foxo1*敲除小鼠,该小鼠睾丸变小,随着年龄生殖细胞进行性丢失,SSCs自我更新的维持严重受损。通过小鼠睾丸全基因转录组分析发现,FOXO1能够直接或间接调控多个维持促进SSCs自我更新的转录因子,包括LHX1和c-RET等,提示FOXO1可能是SSCs中一个不依赖于GDNF细胞因子调控的转录网络的主调控因子。

B细胞特异性Moloney小鼠白血病病毒整合位点1(B cell-specific Moloney murine leukaemia virus integration site 1, BMI1),属于PcG(polycomb group)家族,是SSCs自我增殖的关键调控因子^[78],2014年,KOMAI等^[79]报道,*Bmi1*是长期生殖干细胞的标记基因,在SSCs稳态维持和精原细胞再生过程中发挥重要作用。同年,ALOISIO等^[80]发现,转录因子PAX7是小鼠As的特异性标记物,能够促进SSCs自我更新,在正常精子发生以及癌症治疗后生育力恢复过程中具有重要作用。

4.1.3 调控SSCs分化的转录因子 近年来,促进SSCs分化的转录因子也逐渐被报道,其中一部分可能影响SSCs开始走向分化的命运决定,而另一部分可能在精原祖细胞分化过程中具有调控作用^[62]。例如:SOX3能够刺激SSCs中*Ngn3*基因表达,抑制自我更新相关基因*Oct4*表达,*Sox3*全身敲除和生殖细胞条件性敲除小鼠出生后14天,睾丸内未分化精原细胞异常累积,分化受阻^[81-82]。*Sohlh1*和*Sohlh2*敲除小鼠睾丸内PLZF⁺未分化精原细胞累积,精母细胞少,提示存在精原细胞分化缺陷^[83-84]。DMRT1既能够识别并结合*Sohlh1*启动子,促进*Sohlh1*基因表达进而促进精原细胞分化,又能抑制RA诱导的减数分裂,协调精原细胞有丝分裂与减数分裂的转换^[85]。在THY1⁺精原细胞培养中,*Ngn3*或*Stat3*敲降的SSCs数量增加,但无明显增殖现象,经体内移植后生精克隆再生受阻,只有As、Apr、Aal未分化精原细胞群,表

明SSCs分化过程受到抑制^[86-87]。*Rad9a*生殖细胞条件性敲除的成年雄性小鼠由于精原细胞分化完全受阻而导致不育^[88]。

4.2 RNA结合蛋白的转录后水平调控

转录后调控,主要包括前体RNA的可变剪接、信使RNA(mRNA)的加帽加尾等多个环节的调控过程,在生命调控过程中同样具有中心作用,特别是在无脊椎动物和脊椎动物中的系统性研究表明,转录后调控是早期发育的关键,这一过程通常需要RNA结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs)来发挥对细胞功能的调节^[89-90]。

RBPs存在于核内或胞质内,通过RNA识别序列与双链或单链RNA结合,来调节RNA的命运。其中,RBPs对mRNA的成熟至关重要,参与mRNA前体的5'末端加帽,内含子的剪接、编辑,3'端多聚腺苷酸尾部加尾,并能进一步指导RNA输出和定位特异细胞质进行翻译,控制RNA的降解等^[91]。近年来的研究发现,RBPs介导的转录后调控在SSCs命运决定中具有重要作用(表3)。

NANOS2是一个进化上保守的锌指结构RBP,受生长因子GDNF调节,并且在成年小鼠早期精原细胞(包括As、Apr)中表达。*Nanos2*条件性敲除小鼠可以耗尽SSCs储备,过表达*Nanos2*可以诱导SSCs的过度积累,因此,NANOS2是SSCs自我更新的关键干细胞调控因子^[92]。2015年,ZHOU等^[93]研究发现NANOS2能够与其他细胞信使核糖核蛋白(messenger ribonucleoprotein, mRNP)组分一起,对促进精原细胞分化的相关基因进行直接招募和翻译抑制,同时抑制雷帕霉素复合物1(mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1)信号通路,确保SSCs原始状态。

DND1是脊椎动物保守的RBP,表达于性原细胞到减数分裂前精原细胞阶段,*Dnd1*敲除小鼠雄性不育。在小鼠SSCs中,DND1结合mRNA的3'非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)中的UU(A/U)三核苷酸序列,并通过直接招募CCR4-NOT去腺苷酶复合物,降低靶向mRNA的稳定性,抑制SSCs凋亡^[94]。

RNA结合蛋白LIN28A是细胞命运和增殖的关键决定因素,并已被证明在人或小鼠睾丸未分化的精原细胞中特异性表达^[95]。尽管*Lin28a*基因敲低并不影响SSCs的再生能力,但*Lin28a*生殖细胞条件性敲除雄性小鼠睾丸变小,生育力降低,对*Lin28a*敲

表3 参与精原干细胞命运调控的RNA结合蛋白

Table 3 RBPs in regulating the fate of spermatogonial stem cells

RNA结合蛋白 RBPs	主要表达阶段 The primary expression stage	突变小鼠表型* Phenotypes of mu- tant mice*	功能调节 Regulation of functions	参考文献 References
NANOS2	As, Apr	Infertile	Recruiting differentiation-related genes for translational repression and inhibiting the mTORC1 signaling pathway to maintain self-renewal of SSCs	SADA, et al. 2009 ZHOU, et al. 2015
DND1	Gonocytes and spermatogonia	Infertile	Recruiting the CCR4-NOT de-adenylase complex and decreasing target mRNA stability to maintain self-renewal of SSCs	YAMAJI, et al. 2017
LIN28A	As, Apr, Aal	Sub-fertile	Binding to CDS or 3'UTR region sites enriched for GGAG (A) sequences to suppresses meiosis-related gene expression	WANG, et al. 2020
TRIM71	As, Apr, Aal	Infertile	Interacting with the EWS RNA-binding protein 1 (EWSR1) to promote spermatogonial differentiation	DU, et al. 2020
DDX5	Spermatogenic cells at all stages	Infertile	Regulating variable splicing of spermatogenesis-critical genes, cell cycle protein mRNA output and stability, and interacting with PLZF to maintain self-renewal of SSCs	LEGRAND, et al. 2019
UHRF1	As, Apr, Aal	Infertile	Regulating variable splicing of targeted precursor mRNAs to maintain self-renewal and differentiation of SSCs	ZHOU, et al. 2022
SRSF10	Spermatogenic cells at all stages	Infertile	Interfering with selective splicing of genes associated with germ cell development, cell cycle and chromosome segregation to regulate SSCs homeostasis	LIU, et al. 2022

*: 突变小鼠表型数据来源于Jackson实验室, 网址: <https://www.informatics.jax.org/>。

*: the data of mutant mouse phenotype came from Jackson's lab, website: <https://www.informatics.jax.org/>。

除小鼠SSCs体外建系发现, 体外培养6天后, *Lin28a*的敲除显著抑制了SSCs的体外扩增。为进一步解析LIN28A在SSCs的调控机制, WANG等^[95]利用交联免疫共沉淀技术游离小鼠睾丸RNA进行高通量测序(highthroughput sequencing of RNAs isolated by crosslinking, HITS-CLIP), 发现LIN28A与mRNA上富集GGAG (A)序列的CDS或3'UTR区域位点结合, 抑制减数分裂相关基因的表达, 调节哺乳动物中未分化精原细胞的命运和雄性小鼠的生育能力。

为了进一步探讨RBPs在未分化精原细胞群(包括SSCs)中的生物学功能活性调控作用, 2020年, DU等^[96]利用mRNA相互作用捕获技术在体外培养的小鼠SSCs中捕获全景式RNA结合蛋白, 通过与蛋白质数据库比较, 分析等电点、无序残基含量以及GO分析分子功能、细胞组分、生物学功能等进行验证, 进一步结合生殖细胞基因表达谱系, 初步寻找到15个在SSCs中特异或优势表达的RBPs, 其中TRIM71、ESRP1、MEX3A这3个蛋白暂无生殖系统报道, 通过小鼠睾丸切片免疫组化和整体荧光染色验证该3

个蛋白在未分化精原细胞中优势表达, 敲降后影响体外培养的SSCs的增殖与存活。通过构建*Trim71*生殖细胞条件性敲除小鼠, 雄性小鼠不育, 睾丸变小空泡化, 生精阻滞, 精原细胞群中SSCs比例增加, 并发现TRIM71可能通过与EWS RNA结合蛋白1(EWS RNA binding protein 1, EWSR1)相互作用调控SSCs的分化过程, 但TRIM71调控SSCs分化过程的具体机制仍需进一步解析。*Esrp1*生殖细胞条件性敲除小鼠, 雄性小鼠睾丸无明显变化, 生育力正常, 但ESRP1的丢失会阻断小鼠卵母细胞的发育, 导致雌性不育^[97]。

除上述RBPs外, 越来越多RBPs被报道在SSCs命运调控中的作用。例如, DDX5能够在未分化精原细胞中调控精子发生关键基因的可变剪接、细胞周期蛋白mRNA的输出和稳定性等过程, 促进SSCs的增殖和生育力的维持^[98]。UHRF1与snRNA相互作用, 并调节靶向前体mRNA的可变剪接维持小鼠SSCs的稳态, *Uhrf1*基因敲除雄性小鼠的SSCs逐渐丢失, 最终导致仅支持细胞综合征和不育^[99]。*Srsf10*的缺失能

够干扰生殖细胞发育、细胞周期和染色体分离相关的基因的选择性剪接, 严重损伤未分化精原细胞的扩增和分化^[100]。

4.3 表观遗传学细胞分子的调控

表观遗传学可以被描述为不改变DNA序列的可遗传性改变, 表观遗传变化能够影响基因表达, 从而导致细胞内蛋白水平表达变化。在哺乳动物细胞中, 表观遗传主要分为: DNA碱基的共价修饰、组蛋白翻译后修饰和非编码RNA(ncRNA), 这些表观遗传学修饰及细胞分子同样也能够参与SSCs的命运调控^[101]。

4.3.1 DNA甲基化与组蛋白修饰 DNMT3A是一种DNA甲基转移酶, 能够广泛甲基化基因组。DURA等^[102]发现*Dnmt3a*敲除小鼠随着年龄增加, 睾丸及生精小管管腔逐渐变小, SSCs累积, 分化阻滞。*Dnmt3a*敲除后, DNA甲基化受到抑制, 干细胞基因增强子异常募集, 促进SSCs自我更新, 抑制分化。DOT1L是一种进化上保守的组蛋白H3K79甲基转移酶, 能够利用SAM(S-腺苷甲硫氨酸)作为甲基供体, 催化H3K79单甲基化、二甲基化和三甲基化^[103]。*Dot1l*敲除小鼠睾丸在出生后40天迅速变小, 生殖细胞丢失, 最终出现仅支持细胞综合征, 抑制DOT1L可降低SSCs体内移植后的干细胞活性。机制上, DOT1L的失活导致H3K79甲基化的整体丢失, 进而抑制转录因子HoxC的表达, 严重降低SSCs的自我更新能力。

4.3.2 LncRNA 长链非编码RNA(lncRNAs)由位于细胞核和细胞质中的核苷酸组成, 这些基因由RNA聚合酶II转录, 长度大于200核苷酸, 不能翻译成蛋白。随着高通量测序技术的发展, 大量的lncRNAs被发现与多种生物过程相关, 包括SSCs的自我更新与分化过程的调控^[104]。为了探讨lncRNAs是否参与SSCs自我更新调控, LI等^[105]于2016年对体外培养的小鼠SSCs提取的RNA进行了高通量测序, 发现了55 924个在SSCs中受GDNF生长因子调控的lncRNAs。为了进行更严格的分析, LI等^[105]关注了在GDNF缺失和恢复时表现出显著表达变化的转录本, 鉴定出了805个lncRNAs, 发现了lncRNA 033862主要在小鼠SSCs中表达, 并受GDNF信号通路的影响, 它是GDNF受体GFR α 1的反义转录本, 通过与GFR α 1染色质相互作用, 调节GFR α 1的表达水平, 进而调控SSCs的自我更新。lncRNA 033862的敲除

严重损伤了体外培养的小鼠SSCs的自我更新以及体内移植后再生精子发生的能力。此外, lncRNA AK015322也被证明在SSCs中高表达, 它通过拮抗miR-19b-3p, 减弱其内源性靶转录因子ETV5的抑制作用, 促进SSCs的自我更新^[106]。lncRNA Mrhl通过结合SOX8转录因子, 负向调控WNT信号通路, 促进精原细胞分化^[107]。lncRNA 106504875通过靶向核心转录因子PLZF促进猪精原细胞增殖^[108]。

4.3.3 microRNA microRNA是含有19~25个核苷酸的短小非编码RNA, 通过与目标基因的3'非翻译区或开放阅读框(open reading frame, ORF)结合, 在转录后水平控制基因表达, 导致mRNA降解或翻译抑制^[109]。越来越多的证据表明, microRNA在SSCs自我更新与分化调控过程中也具有重要作用。例如, miR-21受转录因子ETV5调控, 维持SSCs自我更新, 抑制miR-21能够促进细胞凋亡, 影响干细胞活性^[110]; 又如miR-202是let-7家族的一员, 通过调控STRA8和DMRT6等关键调控因子的表达, 抑制SSCs分化和减数分裂起始, 在miR-202基因敲除小鼠中, 未分化精原细胞池减少, 并伴随着年龄依赖性的生育能力下降^[111]。

5 SSCs目前研究的难点与不足

随着SSCs的命运调控的研究进展, 科学家们提出了大量SSCs相关的标记基因, 用于体内识别和分离纯化, 例如*Gfra1*、*Plzf*、*Ngn3*、*Lin28a*、*Nanos2*、*Id4*、*Bmi1*、*Pax7*、*Eomes*、*Foxc2*等^[68-69,71,73-74,79-80,86, 92,112-113]。然而, 由于SSCs生物学的复杂性, 未分化精原细胞群的细胞形态无明显差异, 这些筛选的标记基因可能在多个精原细胞群中表达, 尽管*Id4*、*Bmi1*、*Pax7*等只在As中表达, 但这些基因标记的SSCs群体也依然存在异质性。为此, 目前暂无明确的SSCs标记基因, 限制了我们对于体内SSCs更为深入的生物学研究。

小鼠SSCs体外培养体系和体内移植系统的建立, 推动了SSCs研究迅速发展, 也为高级生物的SSCs体外培养提供了参照模型, 然而依赖于生物进化史、生存环境等因素, 哺乳动物之间, 甚至是类人猿等近亲之间, SSCs的生精微环境和基因表达调控模式均存在着明显差异^[114-115], 虽然已有研究报道能够长期体外培养灵长类近亲树鼩的SSCs^[27], 但目前大型动物、灵长类(包括人)成熟的体外培养体系依

然缺乏,进一步导致高级生物SSCs机制研究受限。

6 展望

随着谱系追踪、睾丸生殖细胞体内移植、SSCs体外培养等技术的发展,我们开始逐渐打开SSCs领域的未知世界。然而目前人的SSCs分子机制研究和临床应用还处于初步阶段,有待于建立成熟的人的SSCs长期体外培养扩增体系,以及合适的异种植动物模型进行SSCs的功能验证,例如将人的SSCs移植到灵长类受体睾丸模型内^[17]。近年来的研究表明,单细胞转录组测序(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)技术能够在单细胞水平上分辨成人睾丸细胞,并能阐明从精原细胞到精子细胞命运顺序转变中亚型之间的复杂关系,该技术将是研究人类SSCs命运调控的强有力工具^[116]。

此外,近年来,类器官已成为疾病研究、再生医学及药物筛选的理想模型,其他各组织类器官的广泛应用和迅猛发展也证明了类器官作为体外模型的价值。以SSCs为起点构建的睾丸类器官是目前尚未被成功开发的类器官,我们对其研究仍处于起步阶段。通过对SSCs命运调控机制及其生精微环境的探讨,探寻睾丸形态发生因子以及对结构重组阶段的生殖细胞进行保护可能是构建具有完整体外精子发生功能的睾丸类器官的关键因素^[117]。

作者贡献

朱立发: 论文构思, 数据管理, 形式分析, 调查研究, 方法论, 项目管理, 软件, 写作—初稿, 写作—审核与编辑; 孙嘉辰: 论文构思, 数据管理, 形式分析方法论, 项目管理, 软件, 指导, 验证, 写作—初稿, 写作—审核与编辑; 吴鑫: 通讯作者, 论文构思, 形式分析, 获取资助, 方法论, 项目管理, 提供资源, 指导, 写作—审核与编辑。

参考文献 (References)

- BRINSTER R L. Male germline stem cells: from mice to men [J]. *Science*, 2007, 316(5823): 404-5.
- WU Y, ZHOU H, FAN X, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 67-79.
- BRINSTER R L. Germline stem cell transplantation and transgenesis [J]. *Science*, 2002, 296(5576): 2174-6.
- CLERMONT Y, PEREY B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats [J]. *Am J Anat*, 1957, 100(2): 241-67.
- HUCKINS C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation [J]. *Anat Rec*, 1971, 169(3): 533-57.
- DE ROOIJ D G, RUSSELL L D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask [J]. *J Androl*, 2000, 21(6): 776-98.
- DE ROOIJ D G, GRISWOLD M D. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000 [J]. *J Androl*, 2012, 33(6): 1085-95.
- NAKAGAWA T, SHARMA M, NABESHIMA Y, et al. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment [J]. *Science*, 2010, 328(5974): 62-7.
- LORD T, OATLEY J M. A revised asingle model to explain stem cell dynamics in the mouse male germline [J]. *Reproduction*, 2017, 154(2): R55-r64.
- CLERMONT Y, BUSTOS-OBREGON E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto" [J]. *Am J Anat*, 1968, 122(2): 237-47.
- BRINSTER R L, CHEN H Y, WARREN R, et al. Regulation of metallothionein: thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs [J]. *Nature*, 1982, 296(5852): 39-42.
- BRINSTER R L, ZIMMERMANN J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11298-302.
- BRINSTER R L, AVARBOCK M R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11303-7.
- CLOUTHIER D E, AVARBOCK M R, MAIKA S D, et al. Rat spermatogenesis in mouse testis [J]. *Nature*, 1996, 381(6581): 418-21.
- NAGANO M, MCCARREY J R, BRINSTER R L. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64(5): 1409-16.
- CICCARELLI M, GIASSETTI M I, MIAO D, et al. Donor-derived spermatogenesis following stem cell transplantation in sterile NANOS2 knockout males [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(39): 24195-204.
- SHETTY G, MITCHELL J M, LAM T N A, et al. Postpubertal spermatogonial stem cell transplantation restores functional sperm production in rhesus monkeys irradiated before and after puberty [J]. *Andrology*, 2021, 9(5): 1603-16.
- NAGANO M, AVARBOCK M R, LEONIDA E B, et al. Culture of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Tissue Cell*, 1998, 30(4): 389-97.
- KANATSU-SHINOHARA M, OGONUKI N, INOUE K, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(2): 612-6.
- KUBOTA H, AVARBOCK M R, BRINSTER R L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(47): 16489-94.
- KUBOTA H, AVARBOCK M R, SCHMIDT J A, et al. Spermatogonial stem cells derived from infertile Wv/Wv mice self-renew *in vitro* and generate progeny following transplantation [J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(2): 293-301.

- [22] RYU B Y, KUBOTA H, AVARBOCK M R, et al. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(40): 14302-7.
- [23] KANATSU-SHINOHARA M, MUNETO T, LEE J, et al. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes [J]. *Biol Reprod*, 2008, 78(4): 611-7.
- [24] KUBOTA H, WU X, GOODYEAR S M, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties [J]. *FASEB J*, 2011, 25(8): 2604-14.
- [25] MENG X, LINDAHL M, HYVÖNEN M E, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF [J]. *Science*, 2000, 287(5457): 1489-93.
- [26] SADRI-ARDEKANI H, MIZRAK S C, VAN DAALEN S K, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells *in vitro* [J]. *JAMA*, 2009, 302(19): 2127-34.
- [27] LI C H, YAN L Z, BAN W Z, et al. Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring [J]. *Cell Res*, 2017, 27(2): 241-52.
- [28] YANG F, SUN J, WU X. Primary cultures of spermatogonia and testis cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2656: 127-43.
- [29] WANG M, GUO Y, WANG M, et al. The glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)-responsive phosphoprotein landscape identifies raptor phosphorylation required for spermatogonial progenitor cell proliferation [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(6): 982-97.
- [30] KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, LEE J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis [J]. *Cell*, 2004, 119(7): 1001-12.
- [31] GUAN K, NAYERNIA K, MAIER L S, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis [J]. *Nature*, 2006, 440(7088): 1199-203.
- [32] KO K, TAPIA N, WU G, et al. Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 87-96.
- [33] CONRAD S, RENNINGER M, HENNENLOTTER J, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis [J]. *Nature*, 2008, 456(7220): 344-9.
- [34] KO K, ARAÚZO-BRAVO M J, TAPIA N, et al. Human adult germline stem cells in question [J]. *Nature*, 2010, doi: 10.1038/nature09089.
- [35] DE KRETZER D M, LOVELAND K L, MEINHARDT A, et al. Spermatogenesis [J]. *Hum Reprod*, 1998, doi: 10.1093/hum-rep/13.suppl_1.1.
- [36] HALPERN J A, DAVIS A M, BRANNIGAN R E. Diagnosis and treatment of infertility in men [J]. *JAMA*, 2022, 328(20): 2056-7.
- [37] PELZMAN D L, ORWIG K E, HWANG K. Progress in translational reproductive science: testicular tissue transplantation and *in vitro* spermatogenesis [J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(3): 500-9.
- [38] SATO T, KATAGIRI K, GOHBARA A, et al. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes [J]. *Nature*, 2011, 471(7339): 504-7.
- [39] MATSUMURA T, KATAGIRI K, YAO T, et al. Generation of rat offspring using spermatids produced through *in vitro* spermatogenesis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 12105.
- [40] DE MICHELE F, POELS J, VERMEULEN M, et al. Haploid germ cells generated in organotypic culture of testicular tissue from prepubertal boys [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1413.
- [41] YUAN Y, LI L, CHENG Q, et al. *In vitro* testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3): 244-55.
- [42] ROBINSON M, SPARANESSE S, WITHERSPOON L, et al. Human *in vitro* spermatogenesis as a regenerative therapy-where do we stand [J]? *Nat Rev Urol*, 2023, 20(8): 461-79.
- [43] OATLEY J M, BRINSTER R L. The germline stem cell niche unit in mammalian testes [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(2): 577-95.
- [44] NAUGHTON C K, JAIN S, STRICKLAND A M, et al. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate [J]. *Biol Reprod*, 2006, 74(2): 314-21.
- [45] ISHII K, KANATSU-SHINOHARA M, TOYOKUNI S, et al. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of ETV5 and BCL6B through MAP2K1 activation [J]. *Development*, 2012, 139(10): 1734-43.
- [46] TAKASHIMA S, KANATSU-SHINOHARA M, TANAKA T, et al. Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal [J]. *Stem Cell Rep*, 2015, 4(3): 489-502.
- [47] MASAKI K, SAKAI M, KUROKI S, et al. FGF2 has distinct molecular functions from GDNF in the mouse germline niche [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 10(6): 1782-92.
- [48] HASEGAWA K, SAGA Y. FGF8-FGFR1 signaling acts as a niche factor for maintaining undifferentiated spermatogonia in the mouse [J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(6): 145.
- [49] KITADATE Y, JÖRG D J, TOKUE M, et al. Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1): 79-92.e6.
- [50] YANG F, WHELAN E C, GUAN X, et al. FGF9 promotes mouse spermatogonial stem cell proliferation mediated by p38 MAPK signalling [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(1): e12933.
- [51] GOLESTANEH N, BEAUCHAMP E, FALLEN S, et al. Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells [J]. *Reproduction*, 2009, 138(1): 151-62.
- [52] TAKASE H M, NUSSE R. Paracrine Wnt/ β -catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(11): E1489-97.
- [53] YE H J R, ZHANG X, NAGANO M C. Wnt5a is a cell-extrinsic factor that supports self-renewal of mouse spermatogonial stem cells [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 14): 2357-66.
- [54] OATLEY J M, OATLEY M J, AVARBOCK M R, et al. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal [J]. *Development*, 2009, 136(7): 1191-9.
- [55] KOKKINAKI M, LEE T L, HE Z, et al. The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis [J]. *Biol Reprod*, 2009, 80(4): 707-17.
- [56] KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, TAKASHIMA S, et al. Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(4): 567-78.
- [57] YANG Q E, KIM D, KAUCHER A, et al. CXCL12-CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial

- stem cells [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 4): 1009-20.
- [58] ENDO T, ROMER K A, ANDERSON E L, et al. Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(18): E2347-56.
- [59] VAN PELT A M, DE ROOIJ D G. Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice [J]. *Biol Reprod*, 1990, 43(3): 363-67.
- [60] YANG Y, FENG Y, FENG X, et al. BMP4 cooperates with retinoic acid to induce the expression of differentiation markers in cultured mouse spermatogonia [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 9536192.
- [61] NASIMI M, JORSARAEI S G A, FATTAHI E, et al. SCF improves in vitro differentiation of SSCs through transcriptionally up-regulating PRTM1, STRA8, c-KIT, PIWIL2, and OCT4 genes [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(4): 963-72.
- [62] SONG H W, WILKINSON M F. Transcriptional control of spermatogonial maintenance and differentiation [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 30: 14-26.
- [63] OATLEY J M, AVARBOCK M R, TELARANTA A I, et al. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(25): 9524-9.
- [64] CHEN C, OUYANG W, GRIGURA V, et al. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche [J]. *Nature*, 2005, 436(7053): 1030-4.
- [65] OATLEY J M, AVARBOCK M R, BRINSTER R L. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(35): 25842-51.
- [66] WU X, OATLEY J M, OATLEY M J, et al. The POU domain transcription factor POU3F1 is an important intrinsic regulator of GDNF-induced survival and self-renewal of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(6): 1103-11.
- [67] WU X, GOODYEAR S M, TOBIAS J W, et al. Spermatogonial stem cell self-renewal requires ETV5-mediated downstream activation of Brachyury in mice [J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(6): 1114-23.
- [68] OATLEY M J, KAUCHER A V, RACICOT K E, et al. Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice [J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(2): 347-56.
- [69] SHARMA M, SRIVASTAVA A, FAIRFIELD H E, et al. Identification of EOMES-expressing spermatogonial stem cells and their regulation by PLZF [J]. *eLife*, 2019, 8: e43352.
- [70] WEI C, LIN H, CUI S. The forkhead transcription factor FOXC2 is required for maintaining murine spermatogonial stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(9): 624-36.
- [71] WANG Z, JIN C, LI P, et al. Identification of quiescent FOXC2⁺ spermatogonial stem cells in adult mammals [J]. *eLife*, 2023, doi: 10.7554/eLife.85380.
- [72] MIYAZAKI T, KANATSU-SHINOHARA M, EMA M, et al. Signal regulatory protein alpha is a conserved marker for mouse and rat spermatogonial stem cells[†] [J]. *Biol Reprod*, 2023, 108(4): 682-93.
- [73] BUAAS F W, KIRSH A L, SHARMA M, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(6): 647-52.
- [74] COSTOYA J A, HOBBS R M, BARNA M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(6): 653-9.
- [75] FALENDER A E, FREIMAN R N, GELES K G, et al. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(7): 794-803.
- [76] DANN C T, ALVARADO A L, MOLYNEUX L A, et al. Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor down-regulated during retinoic acid-induced differentiation [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(11): 2928-37.
- [77] GOERTZ M J, WU Z, GALLARDO T D, et al. Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9): 3456-66.
- [78] ZHANG S, LI D, LI E, et al. Expression localization of Bmi1 in mice testis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 287(1/2): 47-56.
- [79] KOMAI Y, TANAKA T, TOKUYAMA Y, et al. Bmi1 expression in long-term germ stem cells [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6175.
- [80] ALOISIO G M, NAKADA Y, SAATCIOGLU H D, et al. PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(9): 3929-44.
- [81] RAVEROT G, WEISS J, PARK S Y, et al. Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis [J]. *Dev Biol*, 2005, 283(1): 215-25.
- [82] LARONDA M M, JAMESON J L. Sox3 functions in a cell-autonomous manner to regulate spermatogonial differentiation in mice [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(4): 1606-15.
- [83] BALLOW D, MEISTRICH M L, MATZUK M, et al. Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation [J]. *Dev Biol*, 2006, 294(1): 161-7.
- [84] HAO J, YAMAMOTO M, RICHARDSON T E, et al. Sohlh2 knockout mice are male-sterile because of degeneration of differentiating type A spermatogonia [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(6): 1587-97.
- [85] MATSON C K, MURPHY M W, GRISWOLD M D, et al. The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells [J]. *Dev Cell*, 2010, 19(4): 612-24.
- [86] KAUCHER A V, OATLEY M J, OATLEY J M. NEUROG3 is a critical downstream effector for STAT3-regulated differentiation of mammalian stem and progenitor spermatogonia [J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(5): 164, 1-11.
- [87] OATLEY J M, KAUCHER A V, AVARBOCK M R, et al. Regulation of mouse spermatogonial stem cell differentiation by STAT3 signaling [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(3): 427-33.
- [88] HUANG L, WANG Z B, QI S T, et al. Rad9a is required for spermatogonia differentiation in mice [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 86350-8.
- [89] LÉCUYER E, YOSHIDA H, PARTHASARATHY N, et al. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function [J]. *Cell*, 2007, 131(1): 174-87.
- [90] QIN X, AHN S, SPEED T P, et al. Global analyses of mRNA translational control during early *Drosophila* embryogenesis [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(4): R63.

- [91] MOORE M J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs [J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1514-8.
- [92] SADA A, SUZUKI A, SUZUKI H, et al. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells [J]. *Science*, 2009, 325(5946): 1394-8.
- [93] ZHOU Z, SHIRAKAWA T, OHBO K, et al. RNA binding protein Nanos2 organizes post-transcriptional buffering system to retain primitive state of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Dev Cell*, 2015, 34(1): 96-107.
- [94] 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.
- [95] WANG M, YU L, WANG S, et al. LIN28A binds to meiotic gene transcripts and modulates their translation in male germ cells [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(12): jcs242701.
- [96] DU G, WANG X, LUO M, et al. mRBPome capture identifies the RNA-binding protein TRIM71, an essential regulator of spermatogonial differentiation [J]. *Development*, 2020, 147(8): dev184655.
- [97] YU L, ZHANG H, GUAN X, et al. Loss of ESRP1 blocks mouse oocyte development and leads to female infertility [J]. *Development*, 2021, 148(2): dev196931.
- [98] LEGRAND J M D, CHAN A L, LA H M, et al. DDX5 plays essential transcriptional and post-transcriptional roles in the maintenance and function of spermatogonia [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2278.
- [99] ZHOU S, DONG J, XIONG M, et al. UHRF1 interacts with snRNAs and regulates alternative splicing in mouse spermatogonial stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2022, 17(8): 1859-73.
- [100] LIU W, LU X, ZHAO Z H, et al. SRSF10 is essential for progenitor spermatogonia expansion by regulating alternative splicing [J]. *eLife*, 2022, 11: e78211.
- [101] ODRONIEC A, OLSZEWSKA M, KURPISZ M. Epigenetic markers in the embryonal germ cell development and spermatogenesis [J]. *Basic Clin Androl*, 2023, 33(1): 6.
- [102] DURA M, TEISSANDIER A, ARMAND M, et al. DNMT3A-dependent DNA methylation is required for spermatogonial stem cells to commit to spermatogenesis [J]. *Nat Genet*, 2022, 54(4): 469-80.
- [103] LIN H, CHENG K, KUBOTA H, et al. Histone methyltransferase DOT1L is essential for self-renewal of germline stem cells [J]. *Genes Dev*, 2022, 36(11/12): 752-63.
- [104] ZHAO S, HENG N, WELDEGEGBRIALL SAHLU B, et al. Long noncoding RNAs: recent insights into their role in male infertility and their potential as biomarkers and therapeutic targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13579.
- [105] LI L, WANG M, WANG M, et al. A long non-coding RNA interacts with Gfra1 and maintains survival of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(3): e2140.
- [106] HU K, ZHANG J, LIANG M. LncRNA AK015322 promotes proliferation of spermatogonial stem cell C18-4 by acting as a decoy for microRNA-19b-3p [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2017, 53(3): 277-84.
- [107] KATARUKA S, AKHADE V S, KAYYAR B, et al. Mrhl long noncoding RNA mediates meiotic commitment of mouse spermatogonial cells by regulating Sox8 expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(14): e00632-16.
- [108] YOU X, LI T, CUI Y, et al. Retinoic acid-induced differentiation of porcine prospermatogonia *in vitro* [J]. *Theriogenology*, 2023, 198: 344-55.
- [109] HE L, HANNON G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522-31.
- [110] NIU Z, GOODYEAR S M, RAO S, et al. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(31): 12740-5.
- [111] CHEN J, GAO C, LIN X, et al. The microRNA miR-202 prevents precocious spermatogonial differentiation and meiotic initiation during mouse spermatogenesis [J]. *Development*, 2021, 148(24): dev199799.
- [112] ZHENG K, WU X, KAESTNER K H, et al. The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse [J]. *BMC Dev Biol*, 2009, 9: 38.
- [113] HARA K, NAKAGAWA T, ENOMOTO H, et al. Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(5): 658-72.
- [114] BOITANI C, DI PERSIO S, ESPOSITO V, et al. Spermatogonial cells: mouse, monkey and man comparison [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 59: 79-88.
- [115] MURAT F, MBENGUE N, WINGE S B, et al. The molecular evolution of spermatogenesis across mammals [J]. *Nature*, 2023, 613(7943): 308-16.
- [116] WANG M, LIU X, CHANG G, et al. Single-cell RNA sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 599-614.e4.
- [117] KULIBIN A Y, MALOLINA E A. *In vitro* spermatogenesis: in search of fully defined conditions [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1106111.