



袁艳, 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PI, 国家优秀青年基金获得者, 国家科技部重点研发青年首席, 中国生理学会生殖分会委员, 江苏省发育生物学会理事, 江苏省青年医学人才。长期致力于体外男性生育力重塑, 包括胚胎干细胞(ESC)和诱导多能干细胞(iPSC)分化、睾丸类器官重构, 及生殖细胞分化的相关机制研究。以通讯作者/第一作者身份在*Cell Stem Cell*、*Cell Res*、*Cell Prolif*等国际刊物上发表多篇SCI论文。获授权8项发明专利。
https://sklrm.njmu.edu.cn/yy_18865/list.htm

体外精子发生的研究进展及临床应用展望

李来花 卢曦彤 袁艳*

(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 不孕不育症已成为继肿瘤和心血管疾病之后, 威胁人类健康的第三大疾病。在男性不育的诸多原因中, 遗传因素、环境因素以及性腺毒素干扰的影响尤为显著。尽管辅助生殖技术的发展为治疗男性不育提供了可能, 但对于因生殖细胞成熟阻滞而不育的患者来说, 传统的辅助生殖技术并不能直接提供有效的解决方案。近年来, 体外诱导生成单倍体精子的技术为治疗无精子症在内的多种不育症提供了新的希望。此外, 该技术还可用于保存青春前期性腺功能受到性腺毒素治疗损害的男孩生育能力。该文就体外精子发生培养体系的最新研究进展及其在不育症治疗中的应用前景与挑战进行综述。

关键词 男性不育症; 体外精子发生; 生育力保存

Overview of *In Vitro* Spermatogenesis and Prospect of Clinical Application

LI Laihua, LU Xitong, YUAN Yan*

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

Abstract Infertility has emerged as the third major threat to human health, following cancer and cardiovascular diseases. Among the various causes of male infertility, genetic factors, environmental influences, and gonadotoxic interference stand out significantly. While the advancement of ART (assisted reproductive technologies) has offered possibilities for treating male infertility, these conventional methods do not provide a direct solution for patients suffering from infertility due to the blockage of germ cell maturation. Recent developments in the technology of *in vitro* induction of haploid spermatid formation have opened new avenues for treating a range of infertility

收稿日期: 2024-01-03 接受日期: 2024-02-01

国家自然科学基金(批准号: 82221005、82201763)和南京医科大学姑苏学院重点项目(批准号: GSKY20220101)资助的课题

*通信作者: Tel: 025-86869387, E-mail: yuanyan@njmu.edu.cn

Received: January 3, 2024

Accepted: February 1, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82221005, 82201763) and Science Foundation of Gusu School (Grant No.GSKY20220101)

*Corresponding author: Tel: +86-25-86869387, E-mail: yuanyan@njmu.edu.cn

issues, including azoospermia. Additionally, this technique holds potential for preserving the fertility of prepubescent boys whose gonadal function has been compromised due to gonadotoxic treatments. This article provides a comprehensive review of the latest advancements in the *in vitro* spermatogenesis culture system and discusses its prospects and challenges in the treatment of infertility.

Keywords male infertility; *in vitro* spermatogenesis; preservation of fertility

高达50%的不育症是由男性因素引起的,且与精子发生异常有关^[1-2]。无精子症在不育男性中约占15%^[3]。男性不育症的病因多样,包括内分泌紊乱、环境内分泌干扰物、病毒感染、隐睾等解剖缺陷,以及癌症的影响^[4]。精子的正常发生,涉及精原细胞自我更新、精母细胞经历两次减数分裂以及精子细胞通过复杂的变形过程形成成熟的精子^[5-6]。精子发生的任何环节异常都可能导致男性不育。因此,阐明精子发生机制在治疗临床男性不育症方面具有重要价值。

体外精子发生技术作为生殖生物学领域的一项重要进展,为解决男性不育问题提供了新的思路和方法。该技术从小鼠模型的体外研究起步,经过灵长类动物的深入探索,至今已有望应用于人类。2011年,OGAWA团队^[7]建立了小鼠新生睾丸体外诱导精子发生的培养体系;2016年,ZHOU和SHA团队^[8]首次报道了从小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem

cells, mESCs)中产生单倍体雄性配子并获得可育后代的新体系,这是首次实现由mESCs来源的完全体外精子发生;五年后,SAITOU团队^[9]构建了类似的睾丸类器官重构体系,也可在体外获得精子。以上小鼠体外精子发生体系的研究结果为进一步探究非人灵长类以及人体外精子发生的研究奠定了基础。2019年ORWIG团队^[10]建立将新鲜或冷冻保存的青春期前恒河猴睾丸自体移植产生精子和后代的移植模型。2020年,SHA团队^[11]首次成功在体外建立人类睾丸器官发生的模型,获得功能性精子细胞。上述结果展示了体外精子发生研究领域取得的突破性进展。

目前,通过睾丸组织培养、类器官构建等方法,已建立了多重体外精子发生体系。在重建男性生育力方面具有广阔的临床应用前景。本文将总结目前体外精子发生研究的突破性成果(图1),并探讨其在临床应用中的前景,为未来的研究和临床实践提供新思路。

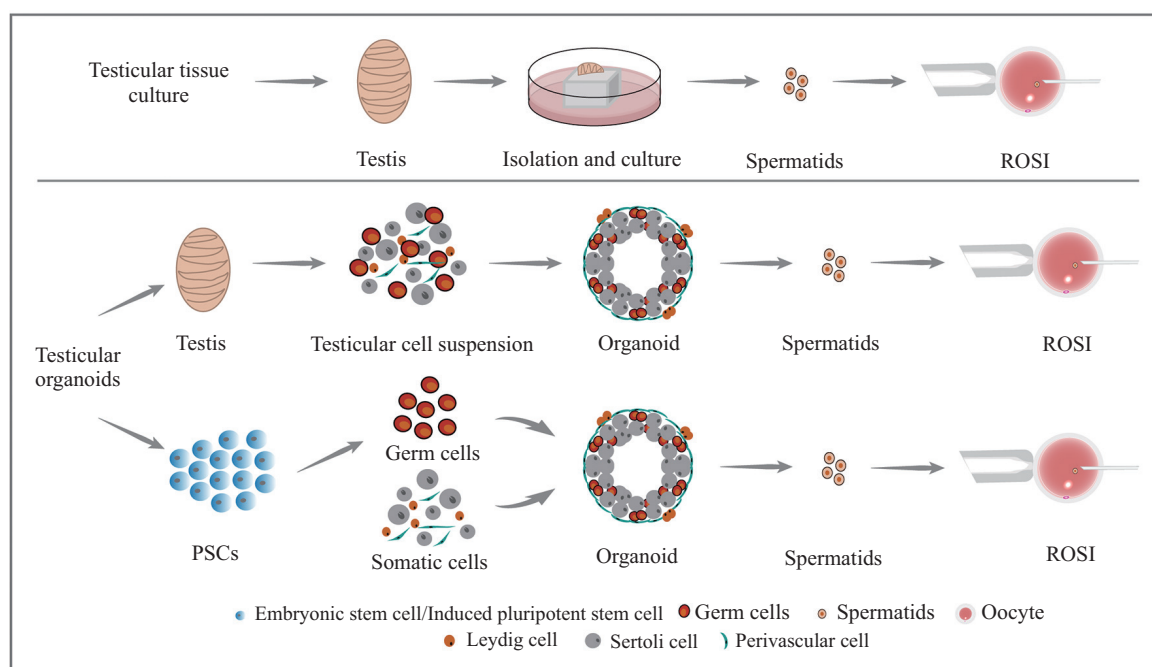


图1 多重体外精子发生体系

Fig.1 Multiple *in vitro* spermatogenic systems

1 睾丸组织体外培养的研究进展

睾丸组织的体外培养起源于20世纪早期,是指通过离体睾丸组织获得功能性精子的培养方法。目前常规使用的培养方法为气-液相界培养系统,即基底与培养基接触,而顶部暴露在空气中。这种培养模式通常使用琼脂糖和嵌套膜等材料,将睾丸组织碎片放置在浸泡有培养基的材料上。由于材料的物理特性,培养组织能够从培养基吸收必要的营养物质,并从周围空气中获取充足的氧气^[12]。

1.1 小鼠睾丸组织体外培养

最早有关小鼠睾丸组织体外培养的研究发表于1937年,MARTINOVITCH^[13]采用禽类的血浆和胚胎混合制成的凝块培养新生小鼠睾丸组织,该组织发育至粗线期的精母细胞后停滞。在接下来数十年的研究中,科研人员不断改良和探索有助于推动精子发生进程的培养条件。2003年,SUZUKI等^[14]诱导新生小鼠睾丸组织中的精原细胞分化为圆形精子细胞,但受精胚胎仅能发育至8细胞期。直至2011年,SATO等^[7]构建了利用新生小鼠睾丸组织诱导分化为功能性精子的体外培养体系,并通过圆形精子注射(round spermatid injection, ROSI)和卵胞质内单精子注射(intra cytoplasmic sperm injection, ICSI)获得健康小鼠子代。此外,实验还证明冻存的睾丸组织碎片能够在该培养体系中恢复完整的精子发生过程^[7]。这是新生小鼠睾丸组织体外精子发生的一项重大突破。

为了更加贴近体内睾丸发育的环境,科学家们采用了跨学科的方法来改善睾丸组织的体外培养体系^[15]。KOMEYA等^[16]通过引入微流体技术,创新性地改进了睾丸组织的培养方法。他们设计的培养装置由组织室和培养基流动通道组成,利用多孔膜将睾丸组织与流动培养基分离,实现营养物质和代谢废物的有效交换。所产生的精子经ROSI或ICSI技术可成功产生健康的后代。进一步地,为了优化培养效率和简化操作过程,KOMEYA等^[17]还发展了一种新型微流体装置,使用聚二甲硅氧烷材料制造的PC芯片进行睾丸组织培养,显著提高了生殖细胞的存活率。

这些研究成果不仅显示了睾丸组织体外培养技术在模拟自然生殖环境方面的重大进步,也为人类睾丸组织的体外培养提供了重要的技术参考。通过这些创新性的方法,可以更有效地研究精子发生的生物学过程,为临床应用提供更多的可能性。

1.2 人类睾丸组织体外培养

科学家们致力于将已有的小鼠睾丸组织培养体系进行优化并应用于人类睾丸组织的诱导中。2018年,MEDRANO等^[18]对7~14岁癌症患者来源的睾丸组织进行培养,诱导精原细胞分化至精母细胞;同年,DE MICHELE等^[19]将尚未进行放化疗的青春期前癌症患者睾丸组织进行体外培养,获得了精子细胞,但缺少进一步的遗传学和功能验证。2020年,YUAN等^[11]首次构建了体外人类睾丸器官发生的模型。这一系统采用了经典气-液相界培养技术,并对培养体系进行了激素和细胞因子的优化,促使生殖嵴中的原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)分化为精原细胞,同时伴随着体细胞的逐步成熟,支持了生殖细胞完成减数分裂并形成精子细胞。在该培养体系中,胚胎12~19周流产胎儿的生殖嵴体外培养50天后,可通过流式分选获得单倍体精子细胞,精子发生过程能够维持超过4个月。经检测该体系诱导获得的精子细胞完成了减数分裂同源重组并建立了正确的表观遗传学特征。此外,这些精子细胞能够使人类卵母细胞受精并支持囊胚形成^[11]。这是第一次成功建立体外人类睾丸器官发生的模型,该模型跨越了近10年的静止期,在30天内完成体外精子发生,包括精原细胞自我更新、精母细胞减数分裂和单倍体精子细胞的形成,该研究成功构建了睾丸器官发生的复杂性平台。

科研人员通过对小鼠和人类睾丸的研究,已经建立了较为成熟的体外诱导精子发生培养体系。体外睾丸组织培养技术的成熟,为因睾丸微环境异常导致生精障碍的患者重建生育力提供了治疗的希望,并为青春期前癌症患者生育力保存的临床技术发展提供了重要参考。目前的挑战在于如何提高精子发生效率,未来的研究需要利用现有的培养模型和睾丸测序数据,深入解析精子发生的关键生物学事件,探索体细胞和生殖细胞之间的相互作用机制,以优化体外精子发生体系(表1)。

2 睾丸类器官构建的研究进展

类器官技术基于三维体外细胞培养系统^[20-22],其目标是构建与体内组织或器官高度相似的模型。睾丸类器官的构建根据细胞来源可以分为两种方法:一是睾丸细胞重组类器官的构建,二是通过干细胞诱导分化为生殖细胞并与体细胞重构。类器官构

表1 睾丸组织体外培养的研究进展

Table 1 Research progress of testicular tissue culture *in vitro*

种属	培养对象	培养结果	参考文献
Species	Object	Result	Reference
Mouse	Neonatal testis tissues	Pachytene spermatocytes were developed from spermatogonia	[13]
Mouse	Neonatal testis tissues	Round spermatids developed from spermatogonia were injected into the oocytes and the embryos developed up to 8-cell stage	[14]
Mouse	Neonatal testis tissues	Spermatids developed from spermatogonia were injected into the oocytes and resulted in the production of healthy and fertile offsprings	[7]
Human	Testis tissues from prepubertal boys with cancer	Spermatocytes were developed from spermatogonia	[18]
Human	Testis tissues from prepubertal boys with cancer	Round spermatids were developed from spermatogonia	[19]
Human	Fetal gonads	Round spermatids developed from immature spermatogonia were injected into the oocytes and the embryos developed up to blastocyst stage	[11]

表2 睾丸细胞重构类器官的研究

Table 2 Testicular cells reconstitute organoids

种属	培养对象	培养结果	参考文献
Species	Object	Result	Reference
Mouse	Neonatal testis	Spermatids developed from spermatogonia	[27]
Human	Puberty and adult testicles	Testicular tubular-like structures were observed, but germ cells can survive briefly	[28]
Human	Fetal gonads	Germ cells in reconstructed organoids can survive briefly	[29]

建的三个标准包括细胞自组装能力、类器官包含的细胞类型(如支持细胞、间质细胞、管周肌样细胞和生殖细胞), 以及是否形成小管结构^[23]。

2.1 睾丸细胞重构类器官

睾丸细胞重组构建的类器官研究较为成熟。研究者们尝试了多种动物模型包括小鼠、大鼠、兔子和猪等的睾丸类器官体外重构。从初步的精原细胞体外分化至精母细胞, 逐步实现了体外精子诱导的目标^[24-26]。2013年, YOKONISHI等^[27]对新生小鼠睾丸细胞进行睾丸类器官重构, 培养后生殖细胞能够分化为圆形精子细胞。

人类睾丸细胞重组构建类器官的研究尚处于初步阶段, 稳定性低, 批次间差异大。2017年, YONIBAERT等^[28]将青春期睾丸以及成年睾丸细胞进行体外重构, 结果显示细胞能在体外形成细胞球聚合物, 但管腔结构形成不清晰, 生殖细胞也未能长期维持。2021年, OLIVER等^[29]构建了三层matrigel基质胶的培养系统, 在中间层加入胎儿生殖嵴细胞悬液, 可见明显的管腔结构, 但未见DDX4的阳性信号。现阶段建立的人类睾丸类器官培养体系仅能维持生殖细胞短暂的存活和发育, 但细胞尚不能完成减数分裂。

睾丸类器官技术的发展为研究生殖细胞和体

细胞的相互作用、治疗因基因问题导致体细胞发育异常而引起的生精障碍的治疗提供了新的可能性; 相较于传统的组织培养方法, 该技术具有大规模生产的潜力, 因此睾丸类器官的构建也为研究各类药物的生殖毒性提供了很好的平台^[30-31]。目前睾丸类器官重构的主要挑战在于维持生殖细胞的存活和分化, 越来越多的研究正尝试结合生物工程技术(如生物打印、微流体等)与各种类型的支架(包括多孔聚合物支架、ECM支架、水凝胶支架等)来优化睾丸类器官的构建^[26,32-33](表2)。

2.2 干细胞来源的睾丸类器官构建

在体外精子发生的研究领域中, 利用有限的生殖细胞进行体外诱导分化面临着诸多限制, 因此, 将多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)体外特化为生殖细胞, 再和体细胞重构形成睾丸类器官成为了一个极具意义的研究方向。目前的研究已经探索了多种类型干细胞包括ESCs、诱导多能干细胞(induced PSCs, iPSCs)等体外精子发生的潜能。其中, ESCs和iPSCs具有多向分化的潜能, 并在传代过程中保持增殖能力, 可通过特定方式诱导分化为所需类型的细胞^[34]。

ESCs来源于囊胚的内细胞团, 能够分化成三个胚层的所有细胞谱系。iPSCs通过体细胞重编程

表3 干细胞来源的睾丸类器官构建

Table 3 Construction of stem cell-derived testicular organoids

种属 Species	培养对象 Object	培养结果 Result	参考文献 Reference
Mouse	mESCs	ESCs were induced into PGCLCs and constructed testicular organoids to obtain functional sperm and fertile offspring	[8]
Mouse	mESCs	ESCs were induced into PGCLCs and constructed testicular organoids to obtain functional sperm	[9]
Human	iPSCs	iPSCs were induced into PGCLCs which mixed with mouse somatic cells to form testicular organoids and differentiated into T1-spermatogonial progenitor cells	[41]

获得,具备多能性和产生多种类型细胞的能力^[35]。2016年,ZHOU等^[8]首次建立了从mESCs到功能性精子的完全体外诱导模型。他们首先将mESCs诱导分化为小鼠外胚层样细胞(epiblast-like cells, EpiLCs),其次诱导分化为原始生殖细胞样细胞(PGC-like cells, mPGCLCs),随后将诱导的mPGCLCs和缺乏内源性生殖细胞的小鼠睾丸体细胞按照1:1的比例共同培养,形成睾丸类器官。体外培养后可见生殖细胞与支持细胞的迁移重构形成小管,并最终获得14%~20%的精子细胞。最后将这些精子细胞注射到卵母细胞中,产生可育子代。该培养体系对人类多能干细胞体外分化获得功能性精子细胞的研究具有重要意义。2021年,ISHIKURA等^[9]将mESCs诱导为mPGCLCs,并与胚胎12.5天雄性小鼠的生殖嵴体细胞共培养,同样构成睾丸类器官获得功能性精子细胞。

随着对人类PGCs早期特化研究的深入,诱导人类多能干细胞定向分化为生殖细胞方面的研究已有了重大突破。hESCs/iPSCs已被证明具有分化潜能,并且其存在与mESCs/iPSCs不同的其他特性^[36],更接近于小鼠外胚层干细胞(epiblast stem cell, EpiSCs),在一定程度上可以进行生殖细胞的命运特化。2014年,DURRUTHY等^[37]将hiPSCs移植到生殖细胞耗尽免疫缺陷小鼠的生精小管中,经鉴定hiPSCs有向生殖细胞分化的趋势,但该方法一方面存在着干细胞移植后成瘤的风险,另一方面异种移植也存在着生物源性的污染问题。2015年,IRIE研究团队^[38]建立了将hESCs体外诱导生成hPGCLCs的模型。SASAKI等^[39]介绍了另外一种体外获得hPGCLCs的方法,该体系通过将始发态(primed态)的hiPSCs进行hPGCLCs诱导,再经过与人类PGCs的转录组分析比对,发现诱导的hPGCLCs处于早期PGCs

阶段。

为了进一步在体外重建人类生殖细胞的发育,需解决已有体系中hPGCLCs进一步分化为晚期hPGCs的问题。YAMASHIRO等^[40]于2018年,报道了将hiPSCs特化为hPGCLCs,并与胚胎期12.5天的雌性小鼠生殖嵴体细胞混合异种卵巢培养,在培养的异种卵巢中先后检测到了少量DDX4和SYCP3的表达。该研究为人类多能性干细胞体外诱导精子发生提供了思路。进一步地,2020年,HWANG等^[41]建立了一种体外iPSCs特化为少量精原前体细胞的睾丸类器官模型。睾丸类器官的重要性在于它们能够通过模拟生精小管中生殖细胞与体细胞构成的微环境,增强这两类细胞之间的相互作用,从而促进早期PGCLCs向晚期PGCLCs的特化。然而,当前研究中只能获得少量表达DDX4的晚期PGCLCs,这成为了未来研究中需要重点攻关的难题。

研究表明,诱导PSCs进行体外精子发生的研究正逐步克服技术障碍,稳步向着实现人类生殖细胞完整体外发育的目标迈进。这一领域的研究不仅为生殖细胞耗竭患者(唯支持细胞综合征)的治疗提供了新的策略,也有可能揭示人类生殖细胞发育的深层机制,为生殖医学领域带来革命性的变革(表3)。

3 体外精子发生临床应用的安全性探讨

对于因遗传或疾病无法通过自然方式产生精子的男性,以及因接受放化疗损害生殖能力的癌症患者来说,体外精子发生提供了一种可能的解决方案。然而,体外精子发生的临床应用尚处于初步阶段,仍存在一系列安全性和有效性的问题需要解决。

首先体外培养的精子细胞必须确保遗传和表观遗传的稳定性。任何DNA损伤或突变都可能导

致后代出现遗传疾病或发育异常^[42]。因此, 确保体外精子发生过程中细胞的遗传完整性是至关重要的^[43]。这意味着需要有更多的基础研究来支持其临床应用, 比如建立体外诱导精子受精来源的ESCs进行安全性评估验证。其次体内精子发生是一个复杂的生物学过程, 涉及精确的温度控制、激素水平和生物化学环境^[44]。在实验室中复刻这一自然过程是极具挑战性的, 任何微小的环境偏差都可能影响精子的质量和功能, 应建立一套高效且稳定的体外诱导体系。为了确保体外诱导精子细胞的质量和功能达到适用于后续体外受精的标准, 科学家们采用了一系列标准进行评估。这些技术包括使用苏木精-伊红染色法来观察精子的形态结构, 通过特异性蛋白标记物来评价细胞的功能状态, 以及运用单细胞转录组测序技术来深入了解精子细胞的基因表达特征。同时, 为了确保精子细胞处于正确的单倍体状态, 研究人员还使用性染色体特异性的荧光原位杂交探针和流式细胞术倍体分析进行鉴定。研究人员也通过单个精子细胞DNA测序的短串联重复序列鉴定减数分裂过程中同源重组的正确发生。同时, 对表观遗传甲基化状态的评估以及对胚胎发育的贡献, 也是检验精子细胞质量和功能的重要方面^[11]。这些全面而细致的评估方法不仅有助于确保体外受精技术的成功率, 也对提升精子发生技术的安全性和有效性至关重要。

此外, 体外精子发生涉及的伦理和法律问题也不容忽视。如何平衡技术创新与伦理道德的界限, 确保研究和应用的合理性和安全性, 是目前该领域面临的重要问题。考虑到不同国家和地区在文化、伦理和法律方面的差异, 国际间在体外精子发生技术的研究和应用上需要加强合作和交流。我们可以通过共享研究成果、统一技术标准和加强伦理审查, 促进这一领域的健康和可持续发展。

总的来说, 体外精子发生技术在理论上为部分不育症患者提供了新的治疗可能, 但其在临床应用中还面临许多科学、技术、伦理和法律上的挑战。未来的研究应集中在提高这一技术的安全性和有效性上, 同时也需要关注其长期影响和社会伦理方面的问题。

4 展望

体外精子发生体系的建立对于解决男性不育

问题具有一定的临床应用潜力。近年来, 该技术在小鼠和其他动物模型中的成功应用为人类临床治疗提供了坚实的理论和实验基础。SHA和ZHOU团队^[8]以及SAITOU团队^[9]在小鼠睾丸培养模型中的研究展示了从ESCs到成熟精子的完整体外精子发生过程的可行性。ORWIG团队^[10]和SHA团队^[11]在非人灵长类动物和人类睾丸组织培养上的突破性进展, 标志着体外精子发生的重要跨越。

一方面, 体外睾丸组织培养技术在治疗由生精微环境异常引起的无精症患者方面显示出巨大的潜力。目前已经建立的睾丸器官体外发生模型为因生殖细胞成熟障碍导致的无精症患者提供了新的治疗思路^[11], 该类患者因非遗传性因素引起的生精微环境异常, 导致精原细胞或精母细胞无法成熟, 从而无精^[45], 无法借助辅助生殖技术获得后代。体外睾丸组织培养技术, 通过模拟体内的生精微环境, 为这些未能正常成熟的细胞提供一个适宜的外部环境, 以促进其发育为精子。该类治疗方法也同样适用于青春期前需接受放化疗治疗的肿瘤儿童生育力的保存^[46-47]。

另一方面, 睾丸类器官的构建有望用于治疗由睾丸体细胞异常(特别是支持细胞)引起的不育症^[48-50]。在这些情况下, 基因异常或其他因素导致的体细胞发育异常, 破坏了睾丸发育的微环境, 造成了减数分裂异常。体外睾丸类器官重构技术通过模拟和重建生精微环境, 提供了一个独特的方法来解决这一问题^[9]。将患者生殖细胞和健康供体的体细胞来构建类器官, 支持精子发生的各个阶段, 以此重建该类患者的生育力。值得一提的是, 利用多能干细胞体外诱导精子细胞的研究, 不仅是该领域的热点也是其中的难题。这种方法适用于缺乏生殖细胞的不育症患者, 通过诱导使多能干细胞特化, 进而在体外获取生殖细胞。目前已经建立了mESCs来源的精子细胞体外诱导体系, 但是人多能干细胞的体外诱导还停留在获得早期生殖细胞的阶段^[41], 如何进一步获得晚期生殖细胞以及完成减数分裂形成精子细胞仍是需要重点突破的。

此外, 体外睾丸类器官重构技术作为药物筛选平台, 为临床应用和药物研发提供了新的可能性。这项技术通过模拟人体生殖系统的微环境, 能够在受控的实验室条件下重建睾丸组织的结构和功能, 为研究药物对生殖系统的影响提供了理想的模型。

在药物筛选方面,体外重构的睾丸类器官能够用于评估潜在药物对男性生殖健康的影响,尤其是对精子生成和生育能力的影响。通过观察药物对类器官中精子发生过程的影响,研究人员可以更准确地预测药物在临床使用中可能产生的副作用,特别是对于生殖毒性的评估。该平台还可用于筛选和测试治疗生殖相关疾病的新药,例如无精症和其他形式的男性不育症。药物的筛选和优化可以在这一体系中进行,以确定最有效和最安全的治疗方案。

纵观目前的体外精子发生研究,与体内正常精子发生相比,体外诱导体系获得的精子细胞比率仍然很低,这可能与体细胞未能很好地同步发育有关。借助各类物种的睾丸高通量测序数据^[51-52],发掘精子发生过程中生殖细胞与体细胞的相互作用机制,找到体细胞成熟的关键因素,以期获得体外培养环境下更接近体内睾丸成熟体细胞的状态,或许是解决上述问题的途径。

体外精子发生技术在生殖生物学和细胞生物学领域的不断进步中展现出巨大潜力,但其安全性和有效性问题尚需通过更多人类应用的研究来验证,特别是在确保精子质量、功能及避免遗传变异方面。此技术的临床应用还须考虑伦理和法律问题。尽管通过体外诱导系统获得功能性精子细胞面临巨大的挑战,但这一研究领域具有重要的临床价值和意义。我们需要通过多种技术手段来不断改进诱导系统,以提高体外诱导精子的质量和效率,以及开发更加高效的精子筛选和评估方法。

参考文献 (References)

- [1] AGARWAL A, MULGUND A, HAMADA A, et al. A unique view on male infertility around the globe [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 37.
- [2] CHEN J, CHEN J, FANG Y, et al. Microbiology and immune mechanisms associated with male infertility [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1139450.
- [3] KOTOV S V, IRITSYAN M M, BADAQVA G V. Results of using the bestfertil preparation in patients after microsurgical sub-groin varicocelectomy (marmaras operation) [J]. *Urologiia*, 2022(1): 50-4.
- [4] BHATTACHARYA I, SHARMA S S, MAJUMDAR S S. Etiology of male infertility: an update [J]. *Reprod Sci*, 2023, doi: 10.1007/s43032-023-01401-x.
- [5] OAKBERG E F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium [J]. *Am J Anat*, 1956, 99(3): 507-16.
- [6] MUCIACCIA B, BOITANI C, BERLOCO B P, et al. Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development [J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(3): 60.
- [7] 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.
- [8] ZHOU Q, WANG M, YUAN Y, et al. Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells *in vitro* [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(3): 330-40.
- [9] 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.
- [10] FAYOMI A P, PETERS K, SUKHWANI M, et al. Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring [J]. *Science*, 2019, 363(6433): 1314-9.
- [11] 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.
- [12] TROWELL O A. The culture of mature organs in a synthetic medium [J]. *Exp Cell Res*, 1959, 16(1): 118-47.
- [13] MARTINOVITCH P N. Development *in vitro* of the mammalian gonad [J]. *Nature*, 1937, 139(3514): 413.
- [14] SUZUKI S, SATO K. The fertilising ability of spermatogenic cells derived from cultured mouse immature testicular tissue [J]. *Zygote*, 2003, 11(4): 307-16.
- [15] GARGUS E S, ROGERS H B, MCKINNON K E, et al. Engineered reproductive tissues [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(4): 381-93.
- [16] KOMEYA M, KIMURA H, NAKAMURA H, et al. Long-term *ex vivo* maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21472.
- [17] KOMEYA M, YAMANAKA H, SANJO H, et al. *In vitro* spermatogenesis in two-dimensionally spread mouse testis tissues [J]. *Reprod Med Biol*, 2019, 18(4): 362-9.
- [18] MEDRANO J V, VILANOVA-PÉREZ T, FORNÉS-FERRER V, et al. Influence of temperature, serum, and gonadotropin supplementation in short- and long-term organotypic culture of human immature testicular tissue [J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(6): 1045-57, e3.
- [19] 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.
- [20] NAKANO T, ANDO S, TAKATA N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 771-85.
- [21] LANCASTER M A, RENNER M, MARTIN C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-9.
- [22] TAKEBE T, SEKINE K, ENOMURA M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant [J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 481-4.
- [23] EDMONDS M E, WOODRUFF T K. Testicular organoid formation is a property of immature somatic cells, which self-assemble and exhibit long-term hormone-responsive endocrine function [J]. *Biofabrication*, 2020, 12(4): 045002.
- [24] HADLEY M A, BYERS S W, SUÁREZ-QUIAN C A, et al. Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development *in vitro* [J]. *J Cell*

- Biol, 1985, 101(4): 1511-22.
- [25] SAKIB S, UCHIDA A, VALENZUELA-LEON P, et al. Formation of organotypic testicular organoids in microwell culture† [J]. Biol Reprod, 2019, 100(6): 1648-60.
- [26] BAERT Y, DVORAKOVA-HORTOVA K, MARGARYAN H, et al. Mouse *in vitro* spermatogenesis on alginate-based 3D printed scaffolds [J]. Biofabrication, 2019, 11(3): 035011.
- [27] YOKONISHI T, SATO T, KATAGIRI K, et al. *In vitro* reconstruction of mouse seminiferous tubules supporting germ cell differentiation [J]. Biol Reprod, 2013, 89(1): 15.
- [28] BAERT Y, DE KOCK J, ALVES-LOPES J P, et al. Primary human testicular cells self-organize into organoids with testicular properties [J]. Stem Cell Rep, 2017, 8(1): 30-8.
- [29] OLIVER E, ALVES-LOPES J P, HARTEVELD F, et al. Self-organising human gonads generated by a matrigel-based gradient system [J]. BMC Biol, 2021, 19(1): 212.
- [30] WU S, LI X, LI P, et al. Developing rat testicular organoid models for assessing the reproductive toxicity of antidepressant drugs *in vitro*. [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2022, 54(11): 1748-52.
- [31] SAKIB S, VOIGT A, GOLDSMITH T, et al. Three-dimensional testicular organoids as novel *in vitro* models of testicular biology and toxicology [J]. Environ Epigenet, 2019, 5(3): 1-8.
- [32] LEE J H, OH J H, LEE J H, et al. Evaluation of *in vitro* spermatogenesis using poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based macroporous biodegradable scaffolds [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(2): 130-7.
- [33] VERMEULEN M, DEL VENTO F, DE MICHELE F, et al. Development of a cytocompatible scaffold from pig immature testicular tissue allowing human sertoli cell attachment, proliferation and functionality [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): 227.
- [34] KOLIOS G, MOODLEY Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine [J]. Respiration, 2013, 85(1): 3-10.
- [35] WEST J A, PARK I H, DALEY G Q, et al. *In vitro* generation of germ cells from murine embryonic stem cells [J]. Nat Prot, 2006, 1(4): 2026-36.
- [36] PARK I H, ZHAO R, WEST J A, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors [J]. Nature, 2008, 451(7175): 141-6.
- [37] DURRUTHY DURRUTHY J, RAMATHAL C, SUKHWANI M, et al. Fate of induced pluripotent stem cells following transplantation to murine seminiferous tubules [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(12): 3071-84.
- [38] IRIE N, WEINBERGER L, TANG W W, et al. SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate [J]. Cell, 2015, 160(1/2): 253-68.
- [39] 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.
- [40] YAMASHIRO C, SASAKI K, YABUTA Y, et al. Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells *in vitro* [J]. Science, 2018, 362(6412): 356-60.
- [41] HWANG Y S, SUZUKI S, SEITA Y, et al. Reconstitution of prospermatogonial specification *in vitro* from human induced pluripotent stem cells [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5656.
- [42] ANNA A, MONIKA G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation [J]. J Appl Genet, 2018, 59(3): 253-68.
- [43] YAMAJI M, SEKI Y, KURIMOTO K, et al. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice [J]. Nat Genet, 2008, 40(8): 1016-22.
- [44] SHUCHAT S, YOSSIFON G, HULEIHEL M. Perfusion in organ-on-chip models and its applicability to the replication of spermatogenesis *in vitro* [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5402-25.
- [45] XIE C, WANG W, TU C, et al. Meiotic recombination: Insights into its mechanisms and its role in human reproduction with a special focus on non-obstructive azoospermia [J]. Hum Reprod Update, 2022, 28(6): 763-97.
- [46] HOLOCH P, WALD M. Current options for preservation of fertility in the male [J]. Fertil Steril, 2011, 96(2): 286-90.
- [47] JOSHI S, SAVANI B N, CHOW E J, et al. Clinical guide to fertility preservation in hematopoietic cell transplant recipients [J]. Bone Marrow Transplant, 2014, 49(4): 477-84.
- [48] MONGAN N P, TADOKORO-CUCCARO R, BUNCH T, et al. Androgen insensitivity syndrome [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015, 29(4): 569-80.
- [49] DE GENDT K, SWINNEN J V, SAUNDERS P T, et al. A sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(5): 1327-32.
- [50] TSAI M Y, YEH S D, WANG R S, et al. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(50): 18975-80.
- [51] CHEN Y, LIU X, ZHANG L, et al. Deciphering the molecular characteristics of human idiopathic nonobstructive azoospermia from the perspective of germ cells [J]. Adv Sci, 2023, 10(17): e2206852.
- [52] GUO J, NIE X, GIEBLER M, et al. The dynamic transcriptional cell atlas of testis development during human puberty [J]. Cell Stem Cell, 2020, 26(2): 262-76.e4.