

特约综述



胚胎干细胞是从内细胞团分离建立的一类具有自我更新及多能性的细胞,在体外可以长期培养,在适当条件下分化形成包括生殖细胞在内的三胚层组织。本实验室利用胚胎干细胞体外培养体系结合小鼠模型,研究胚胎干细胞向原始生殖细胞分化过程中的转录调控网络及信号传导通路,优化生殖细胞的形成效率,探讨生殖系统疾病的发病机制,为干细胞在再生医学及畜牧业生产中的应用提供理论及实验依据。

<http://www.biomed.ecnu.edu.cn/newsite/research.asp>

生殖细胞形成的调控机制及体外培养体系的研究进展

王 乾 李 进 唐 超 张 静 静 王 媛*

(华东师范大学生命科学学院, 生命医学研究所, 上海市调控生物学重点实验室, 上海 200241)

摘要 生殖细胞是多细胞生物体遗传物质传递的载体,在发育生物学、临床医学及畜牧业生产等领域中具有广阔的应用前景。原始生殖细胞作为胚胎体内最早出现的生殖细胞,在发育过程中受多种信号因子的诱导,发生特化、迁移、分化及减数分裂,最终形成单倍体的配子,此过程在遗传学和表观遗传学方面受到严格的调控。另外,多能性干细胞向生殖细胞的分化以及生殖细胞的体外培养方面在最近均取得了较大的进展。该文将主要围绕原始生殖细胞,综述最近几年来关于生殖细胞形成中的转录调控及体外培养体系的进展。

关键词 多能干细胞; 原始生殖细胞; 定向分化

生殖细胞是多细胞生物体内能繁殖后代的细胞的总称,包括原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)、生殖母细胞(gonocytes)和最终形成的成熟配子(精子和卵子)。哺乳动物生殖细胞在发育过程中经减数分裂形成单倍体的精子和卵子,交配后形成的受精卵又恢复成为二倍体,物种的遗传物质通过这种方式向子代传递,生物体从而得以繁衍不息。

1 PGCs的形成、迁移及分化

PGCs是最早出现的生殖细胞,在细胞结构、遗传学和表观遗传学方面与体细胞均有不同,这些在基因和细胞水平的变化,是PGCs形成功能性配子及产生下一代所必需的。总体来说,PGCs的发育过程大致分为三个阶段:在胚胎尿囊的早期形成及命运决定过程;在后肠和肠系膜的中期迁移;在生殖嵴的后期分化^[1]。因此,PGCs一系列复杂发育的过程具

有时空的依赖性。

1.1 PGCs的形成与迁移

在哺乳动物中,PGCs的命运决定发生在受精卵着床之后。以小鼠为例,PGCs的命运决定可分为两步^[2]:首先,在胚胎发育第5~6天(days post coitum, dpc)左右,一小群近顶胚层(proximal epiblast, 位于尿囊基部)来源的细胞受胚外组织(如胚外外胚层, extraembryonic ectoderm, ExE; 及内脏内胚层, visceral endoderm, VE)所分泌的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)、Nodal、Fgf8等的诱导,开始表达fragilis,继而形成表达fragilis/Blimp1的

科技部蛋白质重大研究计划(No.2010CB945400)、国家自然科学基金(No.30971522)、上海市浦江人才计划(No.10PJ1403000)、上海市教委创新项目(No.10ZZ34)和上海市科学技术委员会调控生物学重点实验室(No.11DZ2260300)资助项目

*通讯作者。电话: 021-54345024, E-mail: ywang@bio.ecnu.edu.cn

PGCs前体细胞;之后,其中的一部分细胞在胚胎发育7.25 dpc,体细胞的标志基因受到抑制,形成表达Blimp1、Prdm14、fragilis、Stella及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)检测呈阳性的PGCs。之后,PGCs逐渐向胚内迁移,经尿囊基部的后背原条(posterior primitive mesoderm)到达后肠内胚层(hindgut endoderm),随后在8.5 dpc通过后肠经背肠系膜(dorsal mesentery)从胚胎中线(midline)开始向胚胎两侧的生殖嵴迁移。在12.5 dpc之前,大多数PGCs已进入生殖嵴,而在生殖嵴之外的PGCs将会走向凋亡(图1)。

1.2 PGCs的分化、减数分裂与配子的形成

PGCs到达生殖嵴后,失去迁移能力,增殖停滞,不再具有多潜能性,体外培养难以形成全能性胚胎生殖细胞克隆,这时的生殖细胞被称为生殖母细胞。由于胚胎本身的性别不同,受生殖嵴内微环境影响,生殖母细胞有两种不同的发育方式:雄性生殖母细胞停滞在细胞周期的G₁/G₀期,在出生后的7~10天左右恢复,开始减数分裂,经历精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞和精子几个阶段;雌性生殖母细胞在迁移至生殖嵴后即从13.5 dpc进入第一次减数分裂前期,经细线期、偶线期和粗线期,至出生后细胞停滞在双线期,排卵前才开始第二次减数分裂^[3]。

目前对减数分裂的调控机制了解还较少,比较清楚的是视黄酸(retinoic acid, RA)及Stra8的作用。Bowles等^[4]利用RA启动子调控的报告基因实验研究发现,RA与RA合成有关的酶如RALDH2均是由胚胎10 dpc时期的中肾产生,由于胚胎时期的中肾管开放,与生殖嵴直接相连,RA可能就是通过开放的中肾管进入生殖嵴,启动Stra8以及减数分裂标志基

因Scyp1、Dmc1等的表达,诱导生殖母细胞开始减数分裂。RA分解必需的酶CYP2B1在雄性生殖嵴中高表达,从而降解RA,使RA量减少,减数分裂在胚胎期的雄性生殖母细胞得以抑制^[5]。在CYP2B1缺失的小鼠中, Stra8及Scyp1等在13.5 dpc的雄性生殖嵴中高表达,导致雄性生殖母细胞在13.5 dpc即提前进入减数分裂,在出生前发生凋亡,造成雄性不育^[6]。同样, Stra8基因敲除的小鼠在胚胎期即发生雌性生殖母细胞减数分裂受阻,青春期雄性小鼠的精母细胞亦停滞在减数分裂的前期^[7]。

1.3 PGCs形成过程中涉及的重要基因

PGCs的形成包括了几方面的共同作用:旁分泌信号的诱导(BMPs、Nodal、Fgf8等);体细胞命运的抑制(Blimp1);表观遗传标志的改变(Blimp1/Prdm14)及多能性的维持(Oct4、Nanog、Sox2、Blimp1/Prdm14等)。由于生殖细胞发育的复杂性,这其中包括自身发育过程和微环境的支持,至今对生殖发育机制的研究还不完全清楚,目前发现的多个在PGCs分化和发育过程中起关键作用的基因大多为基因敲除实验的结果。

1.3.1 BMPs为PGCs特化的关键诱导因子 如上所述,在胚胎的5 dpc, ExE(BMP4/8b)及VE(BMP2)就开始分泌BMPs。BMP信号通过与Alk2/3/6受体结合,导致Smad1/5/8的磷酸化,进一步与Smad4形成异二聚体,入核激活顶胚层中Blimp1和Prdm14表达,对PGCs特化起了至为关键的作用^[8-10]。Ohinata等^[10]和Ying等^[11-12]认为, ExE分泌的BMP4为PGCs特化的主要诱导因子,剂量至关重要, BMP2与BMP4结构上存在相似性,在小鼠5 dpc胚胎的VE细胞群中表达,加

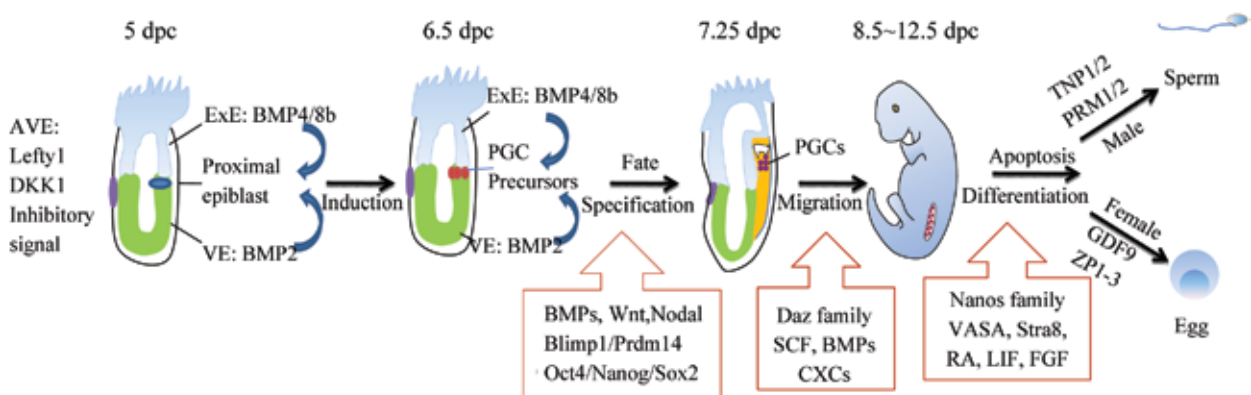


图1 PGCs的形成、迁移、增殖、凋亡与分化中的信号通路及转录调节

Fig.1 The signaling pathways and transcriptional regulation in fate specification, migration, proliferation, apoptosis and gamete formation in mice

强BMP4剂量效应,起辅助作用;而BMP8b则调控VE的发育,拮抗内脏内胚层前端(anterior visceral endoderm, AVE)的抑制信号,使只有受到最高量BMP诱导的近顶胚层细胞可以最终成为PGCs。在BMP信号通路上的任何组分的缺失均会导致小鼠PGCs的形成障碍。例如, *BMP4*或*BMP8*纯合缺失的小鼠胚胎内无PGCs的形成及*Blimp1*的表达^[13-14]; PGCs的数量在*BMP2*纯合缺失时明显减少^[12]; *Alk2*、*Smad1/4/5*的基因敲除均会导致PGCs形成缺陷,小鼠不孕不育^[15-20]。另外, Wnt、FGF、Activin/Nodal等信号亦参与了PGCs的形成: *Wnt3*的缺失小鼠无表达*Blimp1/Prdm14*的PGCs形成^[10]; 而*Smad2*突变导致*Nodal*、*Fgf8*表达失调,多处顶胚层细胞形成PGCs^[21]。

1.3.2 *Blimp1*和*Prdm14*对PGCs的形成起至关重要的作用 *Blimp1*为转录抑制因子,包含一个N末端的PR/SET结构域,5个C₂H₂组成的富含脯氨酸的锌指结构和C末端的酸性区域。*Blimp1*最初作为一个能特异诱导B细胞终末分化的基因被克隆^[22]。Ohinata等^[23]通过基因敲除及谱系追踪实验的分析发现, *Blimp1*在胚胎6.25 dpc的PGCs前体中即有特异表达,被敲除*Blimp1*的小鼠在PGCs形成的初期就会受到阻滞。*Prdm14*和*Blimp1*同样包含一个PR结构域,并在部分*Blimp1*阳性的PGCs前体细胞中表达,但在*Blimp1*基因缺失的PGCs前体中, *Prdm14*的表达正常,表明*Prdm14*的表达至少在初期不受*Blimp1*的调控,是独立于*Blimp1*之外起作用的^[24]。在*Prdm14*缺失突变的小鼠中同样没有PGCs的形成,从而证实了*Blimp1*及*Prdm14*均对PGCs的特化起重要的作用^[24]。*Blimp1*及*Prdm14*的表达均受BMPs的直接调控^[24]。另外, West等^[25]报道*Blimp1*是microRNA-Let7的一个靶基因。*Lin28*编码一种microRNA结合蛋白,与Let7的前体相结合阻止其成熟microRNA的形成,因此, *Lin28*亦可通过间接正调控*Blimp1*的表达来影响PGCs的发生。

如上所述, PGCs的形成意味着一小群近顶胚层细胞的体细胞命运被抑制,重获多能性,并发生表观遗传标志的改变。在*Blimp1*基因缺失的PGCs中, *Hoxb1*等体细胞标志基因的表达抑制丧失, *Sox2*表达下降^[23]。另外, Ancelin等^[26]研究发现,精氨酸甲基转移酶*Prmt5*能和*Blimp1*相互作用形成复合物,在小鼠8.5 dpc胚胎的PGCs中诱导H2A/H4-R3的高度甲基化。在胚胎11.5 dpc时, *Blimp1-Prmt5*蛋白复合

体从细胞核转移到细胞质,导致H2A/H4-R3的去甲基化,因而*Blimp1*影响PGCs的组蛋白修饰,其基因缺失会导致PGCs表观遗传标志异常。与*Blimp1*不同,在*Prdm14*缺失的PGCs中, *Sox2*表达下降,表观遗传标志如组蛋白甲基化(H3K9me2、H3K27me3)亦受到影响,但*Hoxb1*等体细胞标志基因的表达正常,意味着*Prdm14*可以改变PGCs的表观遗传标志,启动多能性基因,但不能抑制体细胞标志基因的表达^[24]。

1.3.3 Nanos家族成员在生殖细胞形成中的作用

Nanos家族共包含3个成员: *Nanos1*、*Nanos2*和*Nanos3*,编码包含锌指结构域的RNA结合蛋白。*Nanos*最早在果蝇中被发现,对PGCs体细胞命运的抑制,多能性的获得,及PGCs的迁移均有作用。在哺乳动物中, *Nanos1*仅在睾丸组织高表达,基因敲除后的小鼠并没有出现生殖发育方面的缺陷,这可能是由于家族成员间的功能冗余造成的^[27]。*Nanos2*在小鼠胚胎13.5 dpc,即PGCs迁移到生殖嵴后的雄性生殖母细胞中开始表达,在*Nanos2*突变型的小鼠中,精子的发育受到了阻滞,因此, *Nanos2*促进精子的形成而对PGCs的发育并无影响^[28-30]。但*Nanos3*则不同,在小鼠胚胎7.5 dpc的PGCs中就开始表达,一直延续到PGCs的迁移阶段。*Nanos3*缺失的小鼠无论在雄性还是雌性中都没有生殖细胞的形成,与*Prdm14*的基因敲除小鼠表型类似,但*Nanos3*的缺失不会引起表观遗传标志发生改变,相反,会导致PGCs的凋亡^[30]。另外, Julaton等^[31]最近利用胚胎干细胞体外分化体系,报道*Nanos*家族在人类PGCs的形成中亦是必不可少的,表明了*Nanos*基因功能在哺乳动物中具有保守性。

1.3.4 *DAZ*基因家族在生殖细胞形成中的作用

*DAZ*家族成员是一类在生殖细胞中有特异性表达的RNA结合蛋白,均具有RNA结合区(RPM)及24个氨基酸组成的*Daz*重复序列。*DAZ*家族有三个成员,按进化的先后为:位于2号染色体上的*BOULE*基因,在各种两性动物的生殖细胞中都有表达;位于3号染色体上的*Dazl*基因仅在脊椎动物的生殖细胞中表达;进化中出现最晚的*DAZ*基因在很多人类精子缺乏症的患者当中发现其缺失,仅在部分灵长类动物及人类的生殖细胞中表达,并由于基因复制等机制在Y染色体上具有多个拷贝,与*Dazl*在蛋白序列上有90%的同源性^[32]。在小鼠中, *Dazl*最早在11.5 dpc胚

胎的PGCs中可被检测到, 敲除后在14.5 dpc的生殖腺中生殖母细胞明显减少, 到了胚胎15.5 dpc时存活下来的生殖母细胞大部分呈现出凋亡的状态, 随着时间推移凋亡细胞出现增多的趋势, 最终导致雄性及雌性小鼠不孕不育^[33]; BOULE在人和小鼠的睾丸有特异性表达, 其缺失的精原细胞虽可发生减数分裂, 但精子发育受阻, 因而造成雄性不育^[34]。

1.3.5 其他在PGCs中特异性表达的基因 其他在PGCs中特异性表达的基因包括*Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*Stella*、*Fragilis*等^[35-36]。*Oct4*、*Nanog*及*Sox2*均与PGCs多能性的维持有关, *Oct4*基因缺失会导致PGCs的凋亡及形成减少^[37]。*Fragilis*(又名*Ifitm3*)是干扰素诱导表达的跨膜蛋白大家族的成员, 与其他的*Ifitm*成员位于同一染色体上形成*Ifitm cluster*。1999年, Yoshimizu等^[38]用OG-2小鼠(*Oct4*启动子融合EGFP的转基因小鼠)作为实验模型, 通过跟踪小鼠生殖细胞的分化、迁移增殖和发育过程, 证明了在小鼠胚胎发育的6.25 dpc, 顶胚层细胞在BMP4的作用下即开始表达*Fragilis*, 但其功能目前尚有争议。Tanaka等^[39]曾提出了“homing and repulsion”的模型, 认为在*Ifitm3*/*Ifitm1*介导PGCs与周围体细胞间的相互作用, 使PGCs得以迁移到生殖嵴, 并与中胚层细胞分离开来。但2008年, Lange等^[40]把整个*Ifitm*家族敲除或把*Ifitm3*单独敲除后均未发现PGCs的形成受到任何影响, 突变型小鼠生殖细胞在成体中的发育亦正常, *Ifitm*家族缺失小鼠能够正常繁衍后代。这些结果的分歧是否与实验方法及使用小鼠的基因背景有关尚需更多的实验证据。

*Stella*在胚胎干细胞、卵子、受精卵和PGCs中都有较高的表达。早期的报道中一直认为*Stella*对PGCs的特化有至关重要的作用, 但随着研究的深入, 2003年Payer等^[41]通过基因敲除小鼠实验发现, *Stella*基因缺失的小鼠体内仍能正常产生PGCs, 在PGCs发生的时间、生成的数量和迁移的方式和路线方面均未发现异常, 但*Stella*缺陷型的雌性小鼠繁殖能力受到了严重影响, 说明*Stella*在PGCs中虽有特异性的表达, 但对其特化和发育没有影响, 而是一个母性效应(maternal effect)基因。

1.4 在PGCs增殖、凋亡和迁移中发挥作用的信号通路和重要的细胞因子

最早形成的PGCs数量极少, 从7.5 dpc的40个, 增加到13.5 dpc的25 000个, 所以在进入生殖嵴之

前, 伴随PGCs的迁移肯定有一个增殖的过程。之后PGCs进一步受生殖嵴微环境的影响成为生殖母细胞。在整个过程中, 生殖细胞亦经历了多次凋亡。首先, 那些未在特定时间内进入生殖嵴的细胞发生凋亡, 以避免生殖嵴外的PGCs形成肿瘤的可能性; 另外, 进入生殖嵴的PGCs在出生前亦有两次凋亡发生, 以排除那些有缺陷的生殖细胞, 保证后代遗传物质的稳定性及质量。例如, 线粒体DNA的缺陷可诱导生殖细胞的凋亡^[42]。PGCs及生殖母细胞的凋亡主要由*Bcl-x*及*Bax*的平衡来调控。*Bcl-x*基因敲除的小鼠体内无精子产生, 雌鼠的卵细胞数量亦明显减少, 而这一生殖细胞缺陷的表型可被*Bax*基因缺失所纠正^[43]。此外, *Nanos3*亦对生殖细胞的凋亡有调节作用: 即使在*Bax*基因缺失的小鼠体内, *Nanos3*基因的敲除仍会导致PGCs的凋亡, 说明*Nanos3*的作用独立于*Bax*之外^[44]。

在PGC增殖和迁移过程中同样有许多信号通路和重要基因参与其中, 已知的较为重要的如SCF/*c-KIT*、LIF(leukemia inhibitory factor)、FGFs以及细胞趋化因子CXCR4、CXCL12等。其中, *c-KIT*是一种酪氨酸激酶受体, 与其配体SCF结合后激活下游一系列STAT介导的信号通路, 在PGCs增殖和迁移中起着重要的作用。在胚胎发育时期, 打断该通路中的任何一个环节都会导致PGCs的迁移发生错误。例如, *c-KIT*编码区域缺失(dominant white spotting locus, W)的小鼠体毛为白色, 同时伴有不育^[45]。多个体内体外实验均证实SCF与LIF、FGF可共同作用促进PGCs的增殖^[3]。

2 多能干细胞(pluripotent stem cells)向生殖细胞分化的体系

干细胞是一类具有自我更新能力和分化潜能的细胞群体, 按照其来源及分化能力可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)和成体干细胞(adult stem cells, ASCs)。干细胞可以分化成为不同类型的细胞, 进一步形成更为高级复杂的组织和器官, 所以在再生医学上具有重要的临床应用价值。ESCs及iPS具有最高的自我更新能力及分化潜能, 在合适的条件下, 在体内外均可以被诱导形成各种类型的成体细胞, 例如, 心肌细胞、神经细胞、血细胞等, 其中也包括生殖细胞。

2.1 小鼠多能干细胞向生殖细胞分化的体系(图2)

最早的多能干细胞形成生殖细胞的报道出现于2003年。Toyooka等^[46]将报告基因绿色荧光蛋白(*GFP*)插入到*VASA*启动子, 而*VASA*是一种ATP依赖的RNA解旋酶, 在迁移后期到减数分裂后的生殖细胞中均有表达, 其缺失导致雄性生殖细胞增殖和分化的缺陷。Toyooka等便利用这一*VASA*报告基因ES细胞株, 将其分化形成拟胚体(embryoid bodies, EBs), 与分泌*BMP4*的饲养层细胞共培养, 观察到有*GFP+*的生殖细胞的产生, 将这群细胞分选后移植入不育小鼠睾丸曲细精管, 产生了高度分化的精子, 但该实验尚缺乏精子的生物学功能检测。在2004年, Geijsen等^[47]发现在小鼠ESCs自然分化时存在一小群SSEA1阳性、持续表达*Oct4*的细胞, 这群细胞高度表达生殖细胞特异性基因, 并发生基因印记(imprinting)消除, 分选后在体外经RA及LIF共培养后形成了胚胎生殖细胞样(embryonic germ cells, EGCs)克隆, 从而表明这些SSEA1+的细胞为PGCs; 研究进一步发现, ESCs在分化中出现了极少量(0.01%)表达精子顶体蛋白(*FE-J1*)的单倍体类精母细胞, 这些类精母细胞进行卵细胞浆内显微注射后, 大约50%的受精卵可发生卵裂并发育到二细胞期胚胎, 其中约有20%的受精卵发育到囊胚期, 但最终并没有得到新生的小鼠。之后, Nayernia等^[48]利用含*Stra8-GFP*及*Prm1-dsRed*报告基因的ESCs, 最终在2006年成功

地分离单倍体细胞, 显微注射后得到了小鼠, 从而证明ESCs来源的生殖细胞是有功能的。

多能干细胞来源的卵母细胞的最早报道来自Hübner等^[49], 他们将含*Oct4-GFP*报告基因的ESCs, 在无饲养细胞和生长因子的条件下进行分化, 观察到有滤泡样结构的类似卵母细胞的生成, 并检测到了卵细胞透明带蛋白*ZP2*、*ZP3*等标记的表达, 继续培养产生了类似囊胚的结构, 暗示其具有自发的孤雌生殖活性。之后, Kerkis等^[50]报道用RA诱导小鼠ESCs分化为精子和卵子, 这些精卵共培养后能形成受精卵并最终发育为桑葚胚样结构。Qing等^[51]将小鼠ESCs分化后产生的PGCs再与卵巢颗粒细胞共培养, 约10天后生成表达卵母细胞特异基因*GDF-9*、*ZP1*、*ZP2*和*ZP3*的细胞克隆, 说明卵巢颗粒细胞能有效地诱导ESCs来源的PGCs向雌性生殖细胞方向分化。Yu等^[52]通过*Dazl*基因的过表达, 经过贴壁培养, 约20天将小鼠ESCs诱导出游动的精子, 同时也伴有表达*GDF9*的卵母细胞出现, 但产率较低。迄今为止, 这些多能干细胞来源的卵母细胞在体内的功能及生物学活性尚未有报道。

尽管多个实验室用ESCs成功诱导出生殖细胞, 但由于PGCs以及减数分裂的发生机制还远未阐明, 这一领域仍存在许多尚未解决的问题。利用ESCs体外分化形成PGCs大多是自发的过程, 因而分化效率非常低, 不超过5%, 这便限制了PGCs的大量获得

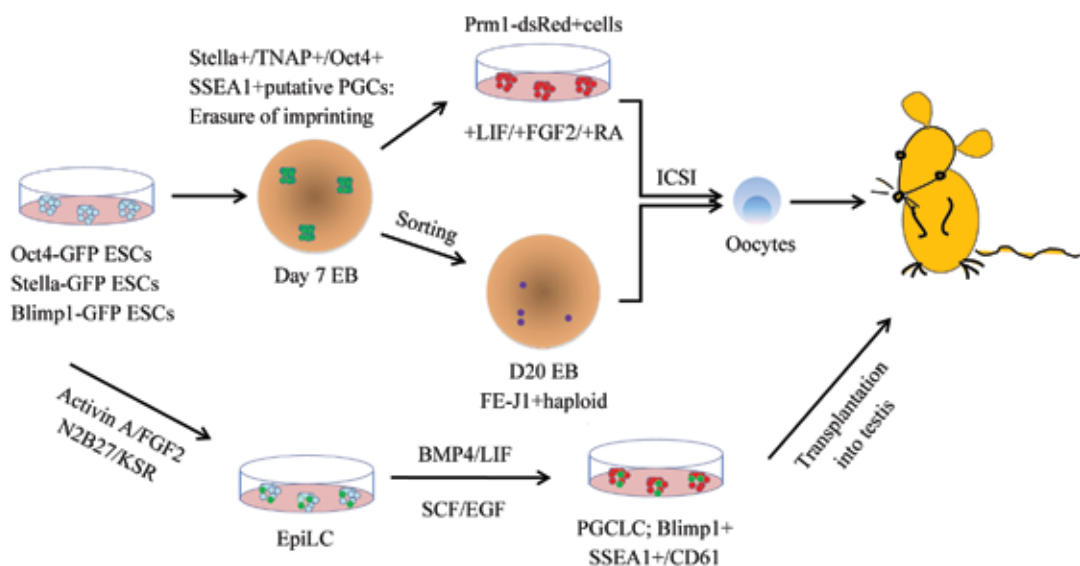


图2 小鼠ESCs向PGCs分化的体外体系

Fig.2 The *in vitro* differentiation of ESCs towards PGCs

及形成机制的研究和应用。2011年Hayashi等^[53]以 *Blimp1* 启动子融合 *GFP* 报告基因的小鼠 ESCs 为实验材料, 利用含 Activin A 和 beta-FGF 的 N2B27 培养基将其诱导形成 *Blimp1* 阳性的顶胚层类似细胞 (epiblast like cells, EpiLCs), 然后在 BMP4 和 LIF 等作用下利用 EB 分化方式将 EpiLCs 进一步诱导形成 PGCs 类似细胞 (primordial germ cell-like cells, PGCLCs), 部分 PGCLCs 亦共表达 SSEA1 及 CD61, 被植入生殖缺陷型新生小鼠的曲细精管中, 可发育成有功能的成熟精子, 经过受精最终得到正常的子代小鼠, 据报道利用此种方法诱导的 PGCLCs 形成效率为 40%。

2.2 人多能干细胞(hESCs)向生殖细胞分化的体系

hESCs 向生殖细胞分化的研究起步较晚, 体外诱导分化的效率也很低, 其分化后生殖细胞的表面标记目前也并不完全清楚。诱导 hESCs 分化常采用拟胚体 EB 或贴壁培养分化的方法: Clark 等^[54] 采用拟胚体 EB 分化的方法, 首先发现 hESCs 在这种自发分化条件下生殖细胞特异性基因 (包括 *VASA*、*SCPI*、*SCP3*、*GDF9* 及 *TEKTI*) 表达升高, 暗示可能有生殖细胞的形成。Tilgner 等^[55] 通过贴壁培养分化发现, hESCs 在分化 3 周后可形成 SSEA1+/c-kit+/VASA+ 的细胞, 进一步研究发现, 这些细胞的印记基因甲基化程度降低, 可能为 PGCs。Bucay 等^[56] 在不加诱导因子的条件下, 通过控制 hESCs 克隆所含细胞数 (少于 50 个) 和细胞换液时间和次数, 贴壁培养分化亦诱导出表达 FSHR 的 Sertoli 细胞和 SSEA1+/CXCR4+/SSEA4+ 及表达 VASA 的 PGCs。

目前, hESCs 诱导分化成为生殖细胞主要采用 3 种方式: ① 特定细胞因子诱导; ② 与特定的体细胞 (例如: STO、Sertoli 细胞等) 共培养; ③ 导入与生殖细胞形成有关的特定基因以提高其形成效率。例如, Kee 等^[57] 发现 BMP4/7/8b 可共同作用, 提高 hESCs 向 VASA+ 细胞的形成。另外, Park 等^[58] 将 VASA 作为 PGCs 的标志基因, 在对 10 周龄的人类胚胎生殖嵴的免疫组化染色时发现表达 VASA 的 PGCs 共表达 c-KIT、SSEA1 及胎盘碱性磷酸酶 PLAP, 因而在进一步研究中将 hESCs 与人胚胎生殖腺支持细胞共培养, 通过 VASA、c-KIT、PLAP、SSEA1 的免疫荧光识别从 hESCs 中分化形成的 PGCs, 发现共培养可以促进 PGCs 的形成。由于 VASA 的生殖细胞特异性, Kee 等^[59] 在最近的另一报道中, 构建了 VASA-GFP 的 hESCs, 诱导分化后分选出表达绿色荧光的细胞,

这些细胞经过遗传基因印记消除实验证明是 PGCs, BMPs 能大大增加其生成的效率。和小鼠 PGCs 类似, 这些 PGCs 可在特定培养条件下形成 EG 样细胞。更为重要的是, Kee 等^[59] 发现, 过表达 *Daz* 家族成员 *Boule* 不仅能提高 hESCs 向 VASA-GFP+ 的 PGCs 分化效率, 还可以促进这些生殖细胞进行减数分裂并形成单倍体配子, 但由于伦理学及方法学的限制, hESCs 来源的 PGCs 及其配子的生物学功能在目前的条件下尚难以验证。

3 生殖细胞向多能干细胞的转化

3.1 PGCs 的分离及体外培养

尽管小鼠的 PGCs 在 1954 年即被 Chiquoine 等^[60] 发现, 其分离与体外培养却在近 30 年后。de Felici 等^[61] 在 1982 年首先从小鼠体内成功地分离 PGCs, 并在低温下可使 PGCs 在体外培养一周以上。之后的研究发现, 尽管单独培养的 PGCs 只能存活几天, 和 STO 等饲养层细胞共培养可使 PGCs 存活 7 天甚至更长, 而 SCF、LIF、beta-FGF 能促进其生长, 形成致密的集落。1992 年, de Felici 等^[61] 建立了 PGCs 来源的类似小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 的细胞系, 命名为胚胎生殖细胞 (embryonic germ cells, EGCs)。小鼠 EGCs 注入裸鼠皮下, 2~3 周可形成畸胎瘤, 不但包括大量间充质细胞, 还包括神经、血细胞、上皮、软骨和心肌等多种类型的三胚层组织细胞, 表明 EGCs 具有多能性。继小鼠 EG 细胞系建立之后, 科学家又成功利用人的 PGCs 建立了 EG 细胞系^[62]。研究发现, 只有 8.5 到 12.5 dpc 小鼠胚胎的 PGCs 可以形成 EGCs, PGCs 进入生殖嵴后, 就会失去这种多潜能性。尽管 PGCs 与 EGCs 形态相似, 但 PGCs 的裸鼠皮下接种不能形成畸胎瘤, 体外培养分化亦不能形成三胚层来源的组织细胞^[63]。

小鼠的 EGCs 呈碱性磷酸酶阳性和 SSEA1 阳性, 人的 EG 细胞除了 AP 和 SSEA1 阳性外, 有报道为 SSEA-3、SSEA-4 阳性。EGCs 有很多特点和 ESCs 类似, 例如, 两者都形成岛状的集落克隆, 核仁大, 并且核质比较高; 连续多次传代后, 核型仍能保持正常, 但二者的表观遗传标志不同^[62]。例如, 从 11.5~12.5 dpc 小鼠胚胎分离培养的 EGCs 已发生遗传基因印记消除^[63]。PGCs 的体外培养和 EG 细胞系的建立为生殖发育提供了一种理想细胞的模型, 对发育生物学的理论研究及实际的临床应用均具有重要意义。

3.2 生殖干细胞的体外培养体系及减数分裂诱导

小鼠出生后6~8天的睾丸内几乎只有A型精原干细胞(spermatogonia stem cell, SSCs)和Sertoli等支持细胞,8天后开始出现B型SSCs, A型SSCs不但能分化为B型SSCs,而且能够自我更新,但B型SSCs只能继续发育最终形成精子。SSCs在形态上与支持细胞、间充质细胞有明显的不同,呈圆形或椭圆形,核质比较大,接种培养后,睾丸支持细胞贴壁速度较快且呈成纤维细胞样等不规则形状,而SSCs贴壁速度较慢且呈圆形或椭圆形,SSCs系呈葡萄状的克隆存在,细胞间的致密程度要比ESCs克隆松散。另外, A型SSCs中Oct4、Plzf和AP表达呈阳性,而B型SSCs,包括原始细线期、偶线期、粗线期的精母细胞, Oct4、Plzf和AP均为阴性,因此这些蛋白可作为早期A型SSCs的标志。培养SSCs的培养基比较特殊,在基本培养基的基础上还需要许多其他细胞因子的共同参与,这其中包括:EGF、SCF、类胰岛素样生长因子、促卵泡生成素、人生长激素、胰岛素、转铁蛋白、维生素A、视黄醛、睾酮、二氢睾酮和核苷^[64]。

Kanatsu-Shinohara等^[65]在2003年首先在体外建立了SSCs的长期培养体系,在特定的培养条件下,这些SSCs在体外可存活长达5个月以上,被命名为生殖干细胞(germline stem cells),移植小鼠的曲细精管后可形成精子,繁衍后代。在之后的另一研究中, Kanatsu-Shinohara等^[66]发现体外培养的SSCs在GDNF、beta-FGF、EGF及LIF等诱导下,部分细胞可形成类似EGC的克隆,可进一步在含LIF的培养基中扩增形成多能干细胞,在体内体外形成三胚层来源的组织细胞。Conrad等^[67]及Kossack等^[68]在2008、2009年相继报道了从人SSCs建立的多能干细胞系。长期以来科学家认为,在出生后的成体组织不存在雌性生殖干细胞。最近, Zou等^[69]及White等^[70]相继在小鼠及人的卵巢中分离了雌性生殖干细胞,但其多能干细胞的培养体系还未有报道。

尽管体外培养的SSCs或PGCs可移植小鼠体内形成有功能的精子,但它们在体外难以发生减数分裂,同样,近期研究报道ESCs或多能干细胞来源的PGCs的形成体系已有较大提高,但单倍体精子发生的效率仍然很低,可能与体外培养缺乏减数分裂所需的Sertoli等支持细胞所形成的微环境有关。最近,日本科学家利用睾丸组织与SSCs或体外建立的

精原干细胞系共培养,成功诱导了SSCs的减数分裂,为生殖发育的研究提供了新的方法与模型^[71-72]。

4 展望

生殖细胞作为动物体内遗传信息传递的载体,在发育生物学、医学及畜牧业生产等领域具有广阔的应用前景。2006年日本科学家山中伸弥首次成功地把小鼠的成纤维细胞诱导形成多能干细胞^[73],而这种多能干细胞可进一步分化成为包括生殖细胞在内的多种组织细胞,为再生医学中干细胞在临床上的应用向前推进了坚实的一步。

目前,生殖干细胞及EGCs的体外培养体系虽已经建立,ESCs体外分化为生殖细胞方面亦取得了瞩目的成就,但在hESCs分化为精子细胞上的研究还仅停留在体外实验阶段。另外,由于对生殖细胞分化发育及其微环境缺乏足够的了解,分离纯化各级生精细胞难度较大,体外诱导减数分裂的效率仍需提高,小鼠和人存在种属差异,分化形成的生殖细胞的质量及生物学活性难以检测,从而使ESCs或iPS向生殖细胞的诱导及应用遇到了一些困难。在成熟的生殖细胞体外诱导分化和分离系统建立之前,还需对生殖细胞分化发育的进程及机制有更深的认识。总之,生殖细胞的诱导、分化及培养目前还处在基础研究阶段,但随着技术的成熟,必将会为不孕不育的临床治疗及畜牧业生产开辟一条崭新的途径。

参考文献 (References)

- 1 Saitou M. Germ cell specification in mice. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19(4): 386-95.
- 2 Hayashi K, de Sousa Lopes SM, Surani MA. Germ cell specification in mice. *Science* 2007; 316(5823): 394-6.
- 3 Ewen KA, Koopman P. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 323(1): 76-93.
- 4 Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, *et al.* Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 2006; 312(5773): 596-600.
- 5 White JA, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, *et al.* Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(12): 6403-8.
- 6 MacLean G, Li H, Metzger D, Chambon P, Petkovich M. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology* 2007; 148(10): 4560-7.
- 7 Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, Dennefeld C, Feret B, Vernet N, *et al.* STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail

- to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 19): 3233-42.
- 8 Zhao GQ, Garbers DL. Male germ cell specification and differentiation. *Dev Cell* 2002; 2(5): 537-47.
- 9 Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 2002; 418(6895): 293-300.
- 10 Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 2009; 137(3): 571-84.
- 11 Ying Y, Qi X, Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14): 7858-62.
- 12 Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 2001; 232(2): 484-92.
- 13 Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 2000; 14(7): 1053-63.
- 14 Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, *et al.* *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999; 13(4): 424-36.
- 15 de Sousa Lopes SM, Roelen BA, Monteiro RM, Emmens R, Lin HY, Li E, *et al.* BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 2004; 18(15): 1838-49.
- 16 Chu GC, Dunn NR, Anderson DC, Oxburgh L, Robertson EJ. Differential requirements for *Smad4* in TGFbeta-dependent patterning of the early mouse embryo. *Development* 2004; 131(15): 3501-12.
- 17 Chang H, Lau AL, Matzuk MM. Studying TGF-beta superfamily signaling by knockouts and knockins. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 180(1/2): 39-46.
- 18 Chang H, Matzuk MM. *Smad5* is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev* 2001; 104(1/2): 61-7.
- 19 Hayashi K, Kobayashi T, Umino T, Goitsuka R, Matsui Y, Kitamura D. SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast. *Mech Dev* 2002; 118(1/2): 99-109.
- 20 Tremblay KD, Dunn NR, Robertson EJ. Mouse embryos lacking *Smad1* signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* 2001; 128(18): 3609-21.
- 21 Waldrip WR, Bikoff EK, Hoodless PA, Wrana JL, Robertson EJ. *Smad2* signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* 1998; 92(6): 797-808.
- 22 Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, *et al.* *Blimp-1* orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002; 17(1): 51-62.
- 23 Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, *et al.* *Blimp1* is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005; 436(7048): 207-13.
- 24 Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, *et al.* Critical function of *Prdm14* for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet* 2008; 40(8): 1016-22.
- 25 West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park IH, *et al.* A role for *Lin28* in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature* 2009; 460(7257): 909-13.
- 26 Ancelin K, Lange UC, Hajkova P, Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T, *et al.* *Blimp1* associates with *Prmt5* and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol* 2006; 8(6): 623-30.
- 27 Haraguchi S, Tsuda M, Kitajima S, Sasaoka Y, Nomura-Kitabayashi A, Kurokawa K, *et al.* *nanos1*: A mouse *nanos* gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mech Dev* 2003; 120(6): 721-31.
- 28 Suzuki A, Saga Y. *Nanos2* suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev* 2008; 22(4): 430-5.
- 29 Suzuki A, Tsuda M, Saga Y. Functional redundancy among *Nanos* proteins and a distinct role of *Nanos2* during male germ cell development. *Development* 2007; 134(1): 77-83.
- 30 Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, *et al.* Conserved role of *nanos* proteins in germ cell development. *Science* 2003; 301(5637): 1239-41.
- 31 Julaton VT, Reijo Pera RA. NANOS3 function in human germ cell development. *Hum Mol Genet* 2011; 20(11): 2238-50.
- 32 Kerr CL, Cheng L. The dazzle in germ cell differentiation. *J Mol Cell Biol* 2010; 2(1): 26-9.
- 33 Lin Y, Page DC. *Dazl* deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice. *Dev Biol* 2005; 288(2): 309-16.
- 34 Xu EY, Moore FL, Pera RA. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(13): 7414-9.
- 35 Anderson RA, Fulton N, Cowan G, Coutts S, Saunders PT. Conserved and divergent patterns of expression of *DAZL*, *VASA* and *OCT4* in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Dev Biol* 2007; 7: 136.
- 36 Western PS, Miles DC, van den Bergen JA, Burton M, Sinclair AH. Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells* 2008; 26(2): 339-47.
- 37 Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, *et al.* *Oct4* is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* 2004; 5(11): 1078-83.
- 38 Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, *et al.* Germline-specific expression of the *Oct-4/green fluorescent protein (GFP)* transgene in mice. *Dev Growth Differ* 1999; 41(6): 675-84.
- 39 Tanaka SS, Yamaguchi YL, Tsoi B, Lickert H, Tam PP. *IFITM/Mil/fragilis* family proteins *IFITM1* and *IFITM3* play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev Cell* 2005; 9(6): 745-56.
- 40 Lange UC, Adams DJ, Lee C, Barton S, Schneider R, Bradley A, *et al.* Normal germ line establishment in mice carrying a deletion of the *Ifitm/Fragilis* gene family cluster. *Mol Cell Biol* 2008; 28(15): 4688-96.
- 41 Payer B, Saitou M, Barton SC, Thresher R, Dixon JP, Zahn D, *et al.* *Stella* is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr Biol* 2003; 13(23): 2110-7.

- 42 Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis *in vitro*. *Mol Endocrinol* 1999; 13(6): 841-50.
- 43 Rucker EB, 3rd, Dierisseau P, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Flaws JA, *et al.* Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol* 2000; 14(7): 1038-52.
- 44 Suzuki H, Tsuda M, Kiso M, Saga Y. Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and-independent apoptotic pathways. *Dev Biol* 2008; 318(1): 133-42.
- 45 Buehr M, McLaren A, Bartley A, Darling S. Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. *Dev Dyn* 1993; 198(3): 182-9.
- 46 Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(20): 11457-62.
- 47 Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004; 427(6970): 148-54.
- 48 Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathack K, Drusenheimer N, *et al.* *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 2006; 11(1): 125-32.
- 49 Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, de La Fuente R, *et al.* Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300(5623): 1251-6.
- 50 Kerkis A, Fonseca SA, Serafim RC, Lavagnoli TM, Abdelmassih S, Abdelmassih R, *et al.* *In vitro* differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells* 2007; 9(4): 535-48.
- 51 Qing T, Shi Y, Qin H, Ye X, Wei W, Liu H, *et al.* Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. *Differentiation* 2007; 75(10): 902-11.
- 52 Yu Z, Ji P, Cao J, Zhu S, Li Y, Zheng L, *et al.* Dazl promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells. *J Mol Cell Biol* 2009; 1(2): 93-103.
- 53 Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 2011; 146(4): 519-32.
- 54 Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, *et al.* Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum Mol Genet* 2004; 13(7): 727-39.
- 55 Tilgner K, Atkinson SP, Golebiewska A, Stojkovic M, Lako M, Armstrong L. Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(12): 3075-85.
- 56 Bucay N, Yebra M, Cirulli V, Afrikanova I, Kaido T, Hayek A, *et al.* A novel approach for the derivation of putative primordial germ cells and sertoli cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(1): 68-77.
- 57 Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RA. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2006; 15(6): 831-7.
- 58 Park TS, Galic Z, Conway AE, Lindgren A, van Handel BJ, Magnusson M, *et al.* Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells* 2009; 27(4): 783-95.
- 59 Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 2009; 462(7270): 222-5.
- 60 Chiquoine AD. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 1954; 118(2): 135-46.
- 61 de Felici M, McLaren A. Isolation of mouse primordial germ cells. *Exp Cell Res* 1982; 142(2): 476-82.
- 62 Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13726-31.
- 63 McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 2003; 262(1): 1-15.
- 64 Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, *et al.* Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 2002; 297(5580): 392-5.
- 65 Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, *et al.* Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 612-6.
- 66 Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119(7): 1001-12.
- 67 Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456(7220): 344-9.
- 68 Kossack N, Meneses J, Shefi S, Nguyen HN, Chavez S, Nicholas C, *et al.* Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* 2009; 27(1): 138-49.
- 69 Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, *et al.* Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 11(5): 631-6.
- 70 White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 2012; 18(3): 413-21.
- 71 Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, *et al.* *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011; 471(7339): 504-7.
- 72 Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, *et al.* *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun* 2011; 2: 472.
- 73 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.

Mammalian Germ Cell Development: From *in vivo* Specification to *in vitro* Differentiation

Wang Qian, Li Jin, Tang Chao, Zhang Jingjing, Wang Yuan*

(Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, Institute of Biomedical Research, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract Germ cell lineages ensure genetic information through generations, and have great implications in developmental biology, clinical therapy and agriculture. Primordial germ cells (PGCs) are the first germ cell population that is segregated from somatic cells during early embryonic development, and are thus the founder cells for all progeny gametes. The specification, migration and differentiation of PGCs is induced by various signaling and strictly controlled through transcriptional regulations and epigenetic modulations. The *in vitro* culture of germ cell had been established, and recent studies demonstrated the improved differentiation of germ cell lineages from pluripotent stem cells. In this review, we will summarize reports regarding transcriptional regulation and epigenetic modulation of PGC specification as well as *in vitro* system to derive and to culture germ cells.

Key words pluripotent stem cells; primordial germ cell; *in vitro* differentiation

This work was supported by Grants from the Ministry of Science and Technology of China (No.2010CB945400), the National Natural Science Foundation of China (No.30971522), Shanghai Pujiang Program (No.10PJ1403000), Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (No.10ZZ34) and the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No.11DZ2260300)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54345024, E-mail: ywang@bio.ecnu.edu.cn