

文章编号: 1004-0374(2009)05-0690-05

生精干细胞的研究进展

冯立新^{1*}, Martin Dym²

(1 上海交通大学医学院医学科学研究院, 上海 200025; 2 乔治城大学生物化学与分子细胞生物学系, 华盛顿, 美国)

摘要: 生精干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是动物出生后保持分裂能力的生殖细胞,其通过自身复制从而终生存在,并不停地进行减数分裂而分化成精子。然而,最近的研究发现生精干细胞具有一定的多能性,在体外可被培养和诱导成多能性细胞,显示生精干细胞是再生医学和细胞治疗疾病的另一理想祖细胞来源。该综述将着重讨论生精干细胞的多能性研究情况和相关问题。

关键词: 干细胞; 生精干细胞; 再生; 生殖细胞; 多能性; 生殖细胞来源的多能性干细胞

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Recent advances in the study of spermatogonial stem cells

FENG Li-xin^{1*}, Martin Dym²

(1 Institute of Medical Sciences, Shanghai JiaoTong University School of Medical, Shanghai 200525, China;

2 Department of Biochemistry and Molecular & Cellular Biology, Georgetown

University School of Medicine, Washington, DC 20057, USA)

Abstract: Spermatogonial stem cells (SSCs) are the only postnatal mitotic germ cells in the body; they are capable of self-renewal throughout life, while undergoing spermatogenesis through meiosis to give rise to haploid sperm. Interestingly, recent studies demonstrated that SSCs could be induced to pluripotency in culture. Thus, SSCs could be an alternative cell source for regenerative medicine and cell therapy of diseases. The focus of this review is on the recent advances in the study of SSC pluripotency.

Key words: stem cell; spermatogonial stem cell; self-renewal; germ cell; pluripotency; gPS

干细胞为具有自我更新能力并在一定条件下分化为组织特异的功能性细胞的细胞,包括胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞是从早期动物胚胎中内细胞(inner cell mass, ICM)分离出来并在体外扩增和鉴定为具有无限自我更新能力和分化成各种组织细胞潜能的细胞。成体干细胞包括骨髓干细胞、神经干细胞、雄性生殖干细胞(生精干细胞)、消化道内皮干细胞、皮肤干细胞和骨髓间质干细胞等。与胚胎干细胞不同,成体干细胞理论上不具有全能性,只能单一方向分化成组织特异的细胞。

1 生精干细胞

生精干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)存在于成体睾丸内,具体定位在曲细精管的基底膜上,存活于由Sertoli细胞及相关细胞外基质所形成的微环境(niche)中。干细胞的再生或分化严格受

niche的信号调节^[1]。Sertoli细胞分泌胶质细胞来源的神经营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)和干细胞因子(stem cell factor, SCF)是调控哺乳动物生精干细胞的再生和分化的主要因子^[2-4]。生精干细胞特异性的标记包括阳性分子Oct4、Plzf、胸腺细胞抗原1(thy-1)和GDNF受体GFR1等^[2,5-7]。生精干细胞在动物体中具有终身再生能力而保持生精干细胞群体,GDNF作用于生精干细胞上的其受体GFR1,所产生的信号促使生精干细胞再生^[2,8,9]。SCF/c-kit信号传导是生精干细胞的分化所必需,在SCF突变体或c-kit突变体,生精

收稿日期: 2009-08-16

*通讯作者 Tel:010-68903623; E-mail: fenglx66@yahoo.com

干细胞不能分化从而不能生成精子^[10-13]。所以, 生精干细胞的再生与分化由GDNF和SCF信号传导的平衡来调控(图1)。

2 生精干细胞的形成、特性和培养

生精干细胞来源于胚胎期形成的原生殖细胞(primordial germ cell, PGC)。在小鼠体中, 原生殖细胞形成于7 d左右的胚胎, 随着胚胎发育, 原生殖细胞迁移到生殖脊, 发育成生殖母细胞(gonocyte), 后者如在雌性个体进入减数分裂形成卵子, 如在雄性个体继续有丝分裂, 出生后6 d左右形成具有再生能力的生精干细胞。生精干细胞的形成和发育周期如图2所示。生精干细胞保持类胚胎干细胞和原生殖细胞的形态, 如细胞核大, 而胞浆少, 表达*Oct4*、*Sox2*和*KLF4*基因^[14, 15]。这些特征提示生精干细胞的潜在多能性。

在成体动物中, 生精干细胞在生殖细胞中的含量很低, 在小鼠仅为0.03%, 利用生精干细胞表面的受体Thy-1或GFR1进行细胞筛选是分离生精干细胞的有效途径^[7, 16]。在GDNF的作用和低浓度血清下, 生精干细胞可在体外扩增。目前, 人和小鼠的生精干细胞已成功在体外长时间培养^[7, 17, 18]。

3 生精干细胞多能性的研究进展

虽然胚胎干细胞具有多能性, 理论上可用来治疗各种相关疾病, 但是由于克隆技术和伦理问题的限制, 胚胎干细胞在临床实践中应用的可行性受到挑战。于是, 科学家在研究胚胎干细胞的同时寻找

更理想的细胞源。最近的研究发现雄性生殖干细胞除了分化成精子外, 在体外特定的培养条件下可去分化成多能性干细胞, 成为理想的再生医学和细胞治疗的干细胞来源。2003年, 日本科学家Kanatsu-Shinohara等^[19]发现从刚出生小鼠分离到的生精干细胞中有少数细胞形成像胚胎干细胞的克隆。进一步研究证明, 在敲除*p53*基因的条件下, 这类生精干细胞克隆可在体外形成畸胎瘤, 提示在培养中一些生精干细胞获得一定的多能性。

由于在发育过程中生精干细胞获得雄性生殖细胞特异性的表观遗传和遗传印记的修饰, 许多科学家认为虽然生精干细胞可被诱导成多能性细胞, 但不可能替代胚胎干细胞的作用, 而且Kanatsu-Shinohara等的工作没有证明生精干细胞来源的多能性细胞像胚胎干细胞一样被传到子代生殖细胞中, 另外, 类胚胎干细胞(ES-like cells)还不能从成年小鼠的生精干细胞培养成功。直到2006年, Guan等^[20]研究证明成年小鼠的生精干细胞可在体外培养诱导成类胚胎干细胞, 并成功地传到子代的生殖细胞中。这一工作充分说明成体来源的生精干细胞可被诱导去分化为多能性的干细胞, 提示通过这一途径可获得患者特异的多能性干细胞, 同时避免了体细胞克隆的技术难关以及伦理和免疫排斥问题。2008年, 另外一组德国科学家成功地从人的生精干细胞培养和诱导出多能性干细胞, 并通过比较证明其表观遗传和再编程程度与人胚胎干细胞相似^[21]。2009

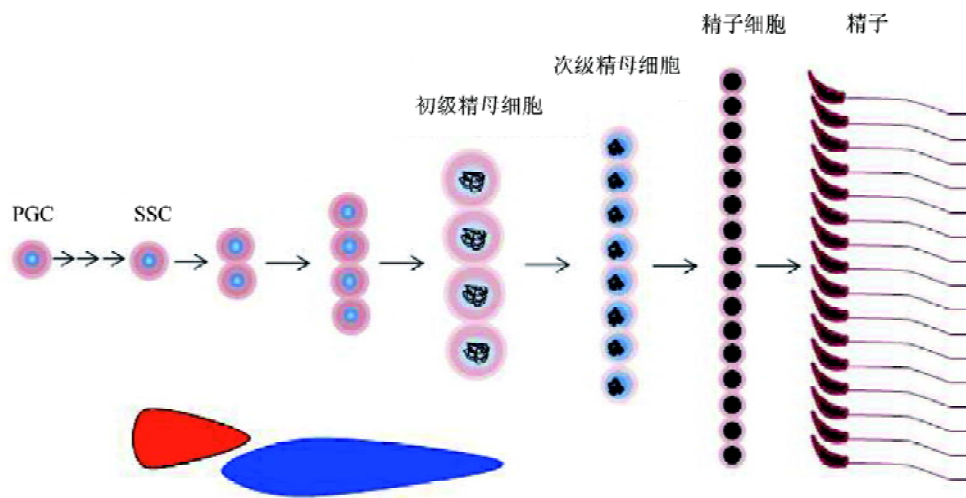


图1 GDNF受体GFR1和SCF受体c-kit在生精细胞中的表达

GFR1高表达在生精干细胞中(如红色所示), 随着生精干细胞的早期分裂和分化, GFR1表达降低, 同时c-kit的表达出现和增加, c-kit阳性的细胞是分化的生精干细胞(如蓝色所示)。

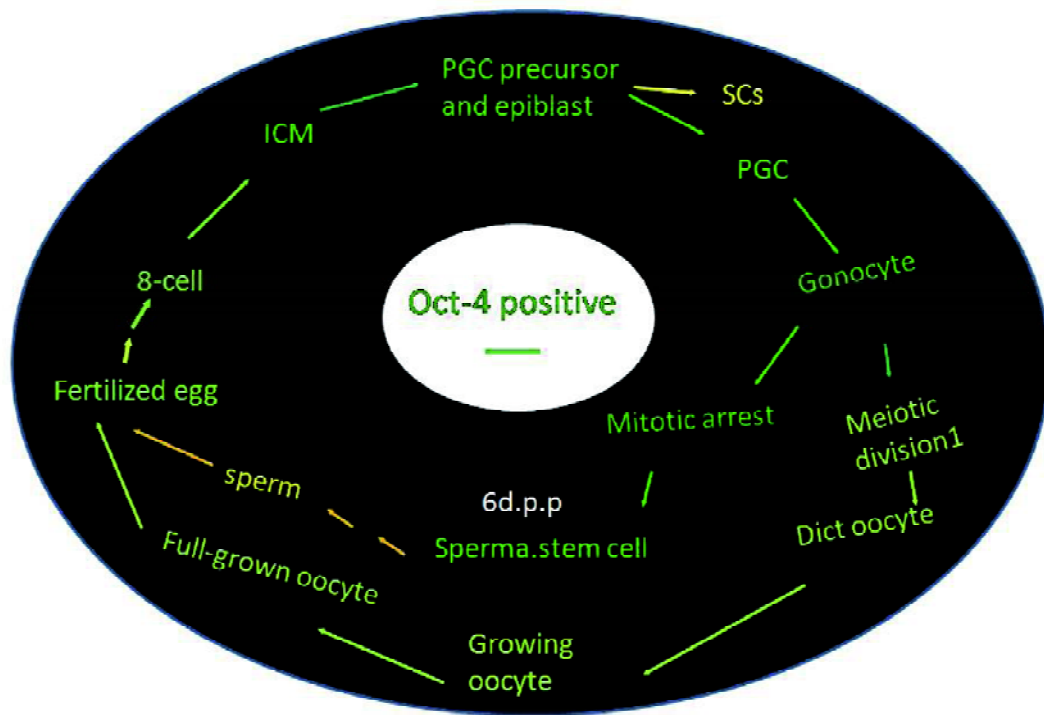


图2 小鼠生殖细胞的生命周期

注：绿色代表生殖细胞是Oct4 阳性的，生精干细胞在小鼠出生后 6 d 左右形成。

年美国斯坦福大学和乔治敦大学的研究小组分别报道了类似的工作^[22, 23]。这些报道使生精干细胞去分化成多能性细胞的研究成为再生生物学研究的一大亮点。

根据已有的报道，从睾丸组织培养和诱导多能性细胞有不同的方法，产生多能性细胞的效率不尽相同。Kanatsu-Shinohara等^[19]用新生小鼠的睾丸组织，生精干细胞可在GDNF刺激和低血清浓度下增殖，并有很少部分细胞形成克隆，这些克隆在小鼠胚胎成纤维细胞作为滋养细胞加白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)培养条件下4—7周后出现类胚胎干细胞克隆，后者在特定的培养环境下可以产生包括造血细胞、神经元细胞、血管内皮细胞以及肌细胞在内的多种成体细胞。在2006年，Guan研究组报道了新的方案，他们选用4—6周的小鼠生殖细胞作为来源，在DMEM培养基中加入GDNF和高浓度的胎牛血清进行培养，4—7 d后利用Stra8(stimulated by retinoic acid gene 8,一种在所有减数分裂前的生精细胞表面表达的蛋白分子)作为表面分子进行筛选，同时去除培养基中的GDNF，添加LIF和/或小鼠胚胎成纤维细胞后即可出现类胚胎干细胞^[20]。2007年，Seandel等^[24]选用3—35周

的小鼠生殖细胞中GPR125阳性的细胞用未加处理的睾丸CD34阳性的间质细胞作为滋养细胞可有效获得SSC克隆，然后转到胚胎成纤维细胞滋养层后可得到类胚胎干细胞，但是出现的时间较晚，至少需要3个月。在对人的生精干细胞培养研究证明GDNF和LIF对形成多能性细胞有促进作用^[21]，而用于培养人胚胎干细胞的bFGF没有这种促进作用，而且人的生精干细胞形成多能性克隆需要的时间很长。最近，Ko等^[25]报道一个比较高效率的从小鼠生精干细胞诱导多能性细胞(gPS细胞)的方法，这一方法在低血清的基础上结合了Kanatsu-Shinohara和Guan的方法，所获得的gPS细胞保持雄性生殖细胞的遗传印记。综合这些报道，从生精干细胞培养和诱导多能性细胞的途径如图3所示。

4 小结

对生精干细胞的研究，作者认为以下几个问题还需进一步思考和探讨。(1)目前对生精干细胞的认识还不是很清楚，尤其是在特定的微环境中，理论上认为已分化了的生精细胞表现出干细胞的行为和特性^[26]，所以，仅个别细胞表面的分子恐怕不能真正反映是否是干细胞，需要进一步的研究工作来发现能真正反映生精干细胞的分子基础；(2)从生精干

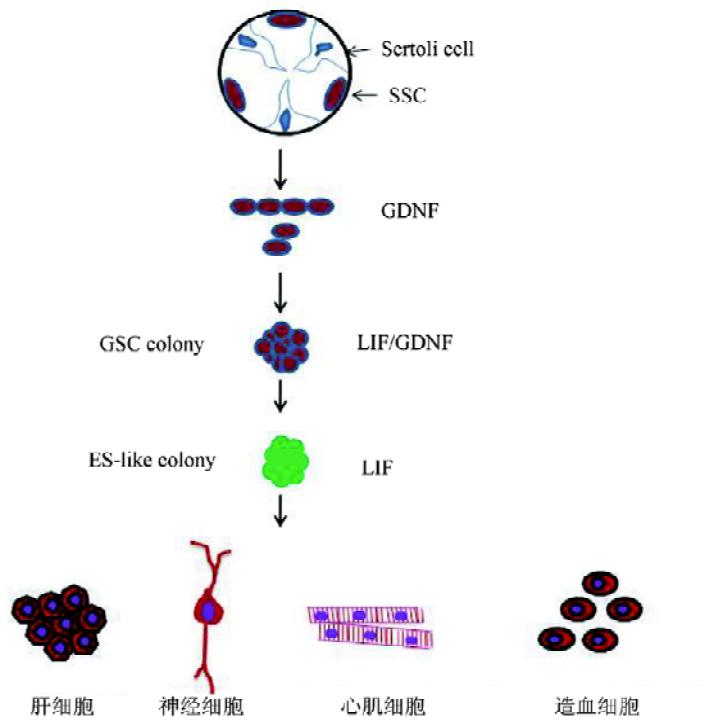


图3 体外培养和诱导生精干细胞成多能性干细胞的路线图

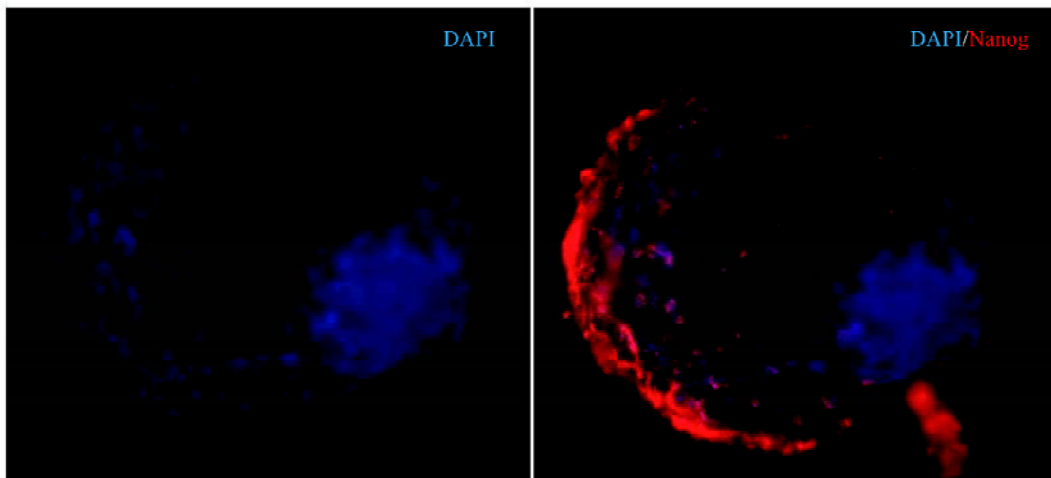


图4 从人生精干细胞培养出的类胚胎干细胞克隆

左图显示细胞染色质和DNA, 右图显示Nanog阳性

细胞诱导为多能性细胞是细胞治疗疾病的理想的祖细胞来源, 尤其在男性患者的细胞治疗的祖细胞来源上是 iPS 细胞的很好的补充, 比较后者的安全性更高些。目前从生精干细胞诱导成多能细胞的研究中主要有以下几方面问题值得进一步探讨: (1) 起始细胞不一, 个别报道提示已在早期分化的生精干细胞也能被诱导成多能干细胞^[24], 虽然最近有报道生精干细胞和组织特异的间充质细胞共培养和移植可

形成相关组织, 如前列腺, 但因起始细胞的不清楚而缺乏具体认识, 不能提供明确的机理数据^[27], 因为起始细胞不一, 在多能性诱导中分子机制和再编程的调控的研究中有不确定的因素和困难, 可能涉及生殖细胞特有的去分化机制; (2) 诱导生精干细胞为多能性干细胞的培养方法还没有象胚胎干细胞和 iPS 细胞的培养方法那样完善, 成功率很低, 有待进一步发展和完善。综合已有报道, 获得多能性细

胞需要两步，第一步是在生精干细胞培养的条件下获得 GSC 克隆，第二步是在培养胚胎干细胞的条件下将 GSC 转变为类胚胎干细胞(或叫 gPS 细胞)；我们研究小组正在探讨一步法获得类胚胎干细胞(如图 4 所示 Nanog 阳性的人生精干细胞来源的类胚胎干细胞克隆)，以便建立从活检得到的少量组织中培养出精原干细胞并诱导成多能性细胞的有效方法。

[参 考 文 献]

- [1] Xie T, Li L. Stem cells and their niche: an inseparable relationship. *Development*. 2007, 134(11): 2001-6
- [2] Meng XJ, Lindahl M, Hyvönen M, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 2000, 287(5457): 1489-93
- [3] Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, et al. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med*, 2000, 6(1): 29-34
- [4] Feng LX, Ravindranath N, Dym M. Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25572-6
- [5] Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, et al. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ*, 1999, 41(6): 675-84
- [6] Buas FW, Kirsh AL, Sharma M, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*, 2004, 36(6): 647-52
- [7] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(47): 16489-94
- [8] Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, et al. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(25): 9524-9
- [9] He Z, Jiang J, Kokkinaki M, et al. Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 266-78
- [10] Koshimizu U, Watanabe D, Tajima Y, et al. Effects of W (c-kit) gene mutation on gametogenesis in male mice: agametic tubular segments in Wf/Wf testes. *Development*, 1992, 114(4): 861-7
- [11] Blume-Jensen P, Jiang G, Hyman R, et al. Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat Genet*, 2000, 4(2): 157-62
- [12] Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, et al. Transplantation of male germline stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med*, 2000, 6(1): 29-34
- [13] Ikawa M, Tergaonkar V, Ogura A, et al. Restoration of spermatogenesis by lentiviral gene transfer: offspring from infertile mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(11): 7524-9
- [14] Imamura M, Miura K, Iwabuchi K, et al. Transcriptional repression and DNA hypermethylation of a small set of ES cell marker genes in male germline stem cells. *BMC Dev Biol*, 2006, 6: 34
- [15] Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Inoue K, et al. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod*, 2008, 78(4): 681-7
- [16] Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol*, 2005, 279(1): 114-24
- [17] Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, et al. Maintenance of mouse male germline stem cells *in vitro*. *Biol Reprod*, 2003, 68(6): 2207-14
- [18] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*, 2003, 69(2): 612-6
- [19] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 2004, 119(7): 1001-12
- [20] Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 2006, 440(7088): 1199-203
- [21] Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*, 2008, 456(7220): 344-9
- [22] Kossack N, Meneses J, Shefi S, et al. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells*, 2009, 27(1): 138-49
- [23] Golestaneh N, Kokkinaki M, Pant D, et al. Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev*, 2009, 12. [Epub ahead of print]
- [24] Seandel M, James D, Shmelkov SV, et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125⁺ germline progenitors. *Nature*, 2007, 449(7160): 346-50
- [25] Ko K, Tapia N, Wu G, et al. Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 87-96
- [26] Barroca V, Lassalle B, Coureuil M, et al. Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells *in vivo*. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(2): 190-6
- [27] Simon L, Ekman GC, Kostereva N, et al. Direct transdifferentiation of stem/progenitor spermatogonia into reproductive and nonreproductive tissues of all germ layers. *Stem Cells*, 2009, 27(7): 1666-75