

文章编号: 1004-0374(2011)03-0244-05

精原干细胞自我更新和分化的调控

金 波, 刘 洋, 岳占碰, 李子义, 张学明*
(吉林大学畜牧兽医学院, 动物胚胎工程吉林省重点实验室, 长春 130062)

摘 要: 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是体内自然状态下惟一能将遗传信息传至子代的成体干细胞, 它们能通过维持自我更新和分化的稳定从而保证雄性生命过程中精子发生的持续进行。了解SSCs自我更新和分化的调节机制有助于阐明精子发生机理, 并为探究其他组织中成体干细胞增殖分化的调节机制提供依据。然而目前对于SSCs自我更新和分化的调控机制所知甚少。SSCs的更新与分化遵循特定模式, 受以睾丸支持细胞为主要成分的微环境及各种内分泌因素如胶质细胞源神经营养因子(GDNF)、维生素、Ets转录因子ERM/Etv5等的调控。本文评述了SSCs更新与分化的模式以及上述因素对其更新、分化的调控, 探讨了其中可能涉及的信号通路, 以期为本领域及其他成体干细胞相关研究提供借鉴。

关键词: 精原干细胞; 干细胞微环境; 自我更新; 分化

中图分类号: S814.1 **文献标识码:** A

Regulation of spermatogonial stem cells self-renewal and differentiation

JIN Bo, LIU Yang, YUE Zhan-Peng, LI Zi-Yi, ZHANG Xue-Ming*

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

Abstract: Naturally, spermatogonial stem cells (SSCs) are the only adult stem cells in the body, which can transfer genetic information into offspring. They maintain the continuous spermatogenesis by balancing their self-renewal and differentiation through the male life. Understanding of the modulation of SSCs self-renewal and differentiation is great beneficial to elucidate the mechanisms of spermatogenesis, and will provide useful information for the proliferation and differentiation investigation of other adult stem cells. However, little is known upon the mechanisms that govern SSCs self-renewal and differentiation, up to now. Accumulated evidences indicate that the self-renewal and differentiation of SSCs follow specific models, and are comprehensively regulated by SSCs microenvironment/niche constituted mainly with Sertoli cells, endocrine factors including glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), vitamine, Ets transcriptional factor ERM/Etv5. By reviewing the recent related reports, here we discussed the models, the effects of those factors mentioned above, and the possible signaling pathways regarding SSCs self-renewal and differentiation, with a hope that this information will be helpful for the researchers both in SSCs field and other stem cell fields.

Key words: spermatogonial stem cells; stem cell microenvironment/niche; self-renewal; differentiation

在机体内, 干细胞持续产生的分化细胞对维持组织器官的功能至关重要。哺乳动物睾丸中精原细胞持续分化产生精子这一过程贯穿着整个雄性的生命过程。1956年, Oakberg根据成体干细胞的相关研究, 最先提出了精子发生的动力学机制, 推论生殖细胞的分化可能需要一个干细胞群。然而直到1994年, Brinster等^[1]通过精原干细胞

(spermatogonial stem cells, SSCs)移植实验才最终验证了这类干细胞群的存在。该实验对于SSCs研究具有里程碑式的意义。通过这种方法, 研究人员可以

收稿日期: 2010-07-29; 修回日期: 2010-11-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771555)

*通讯作者: E-mail: zhxueming@yahoo.com

将供体精原细胞移植到受体小鼠体内,最终产生供体基因型的精子,从而验证供体精原细胞内是否有SSCs的存在,该技术也为人类相关疾病的治疗提供了依据。

与其他干细胞一样,SSCs能否移植成功并产生精子取决于干细胞所处的微环境。然而SSCs所处的这种微环境在体外很难重建,并且具有种属特异性,这是SSCs研究的一大难点。此外,SSCs的分化潜能并不仅仅局限于生殖细胞。研究表明,通过体外培养,从睾丸分离到的精原细胞可诱导形成胚胎干细胞样细胞,后者可分化形成多类分化的细胞系。Simon等^[2]证实小鼠SSCs或其前体细胞能产生三胚层组织,如前列腺、子宫、皮肤上皮等。结果表明,SSCs不仅可以用于再生性治疗,也是成体干细胞研究的良好模型。本文综合最近的相关报道,就SSCs自我更新与分化的模式、调控机制及所涉及到的信号通路等进行了评述。

1 SSCs自我更新与分化的模式

精原细胞是指存在于生精上皮中的一大类相对非特化的原始双倍体生殖细胞,可分为未分化精原细胞和分化精原细胞2大类。未分化精原细胞从形态上又可根据其合胞体组成的细胞数目再细分为单个存在的 A_s 型(type A-single)、成对存在的 A_{pr} 型(type A-paired)及4~16甚至32个细胞连成串的 A_{al} 型(type A-aligned,包括 A_{al4} 、 A_{al8} 、 A_{al16} 等)。此外,根据未分化精原细胞的功能差异又可以分为两类:一类是具有自我更新能力的真正的干细胞,另一类是潜在干细胞。在正常情况下,潜在干细胞会快速分裂分化形成分化型精原细胞,表明它们属于过渡增殖性细胞^[3]。潜在干细胞也具有自我更新的潜能,但这种潜在在正常情况下并不表现出来;而当睾丸受到损伤或进行精原细胞移植时,它们可以从潜在状态转变为具有活跃自我更新能力的状态。

由于SSCs数量稀少且缺乏特异性标志,目前对于真正意义上的SSCs仍缺乏有力的鉴定手段。早先许多研究中的SSCs,如无特殊说明,一般指的都是未分化精原细胞。但并非所有的未分化精原细胞都是SSCs。研究人员曾普遍认为,只有 A_s 才是真正的SSCs。因为 A_s 可以在受体小鼠睾丸曲细精管内定居并持续产生来自供体细胞的精子,而 A_{pr} 和 A_{al} 却没有这种能力。然而,是否所有 A_s 都是SSCs抑或只有部分 A_s 才是SSCs,仍有待更多的实验来证实。

近年来,有关未分化精原细胞基因表达研究方

面已取得长足进步,现已鉴定了SSCs特异性表达的多个基因,如Zbtb16 (Plzf)^[4]、Neurog3 (Ngn3)^[5]、Nanos2^[6]、E-CAD (E-cadherin)^[7]和Gfra1等。而未分化精原细胞基因表达的差异可能预示着它们功能的不同。Sada等^[6]和Nakagawa等^[8]利用这种未分化精原细胞基因表达的差异进行了相关研究,发现GFRa1⁺的 A_s 更接近真正意义上的SSCs,而NGN3⁺的 A_s 只是过渡性增殖细胞。目前认为,SSCs的最小细胞群是GFRa1⁺的 A_s ,但是否所有的GFRa1⁺的 A_s 都是SSCs仍有待进一步研究。

2 微环境对SSCs的调控

所谓SSCs微环境是指能对SSCs产生影响并维持SSCs自我更新状态的场所。这是一个很模糊的定义,包括SSCs周围的结构和成分,如附近的精原细胞、SSCs自身、支持细胞、管周肌样细胞等细胞以及结合在胞外基质上的各种生长因子和细胞因子等^[9]。微环境对SSCs的调节大致分为两种方式:一是外源性调节,机体其他组织和器官产生的活性物质通过内分泌系统运输到睾丸,作用于微环境,间接调控SSCs的增殖和分化;二是内源性调节,微环境中各类因素通过复杂的网络调控机制直接或间接作用于SSCs,影响其增殖、分化、代谢及功能活动。

然而SSCs数量稀少且缺乏特异性分子标记,阻碍了研究人员对SSCs微环境的定位。因此,目前还无法从空间上将SSCs微环境精确地划分出来。SSCs微环境内生长因子和其他活性分子的合成和更新的速率受到内分泌激素和睾丸局部组织细胞分泌的多种细胞因子的调控。全身性内分泌因子通过血液循环作用于SSCs微环境,这预示着SSCs及其微环境可能十分靠近脉管系统。Yoshida等^[10]对此进行了验证。他们利用Ngn3-GFP标记了转基因小鼠中的未分化精原细胞,对这些细胞进行了定位和追踪。随着时间的推移,他们发现分化的精原细胞从靠近脉管系统的曲细精管区域随机迁移到了其他区域。此外,他们利用PLZF标记未分化精原细胞也得到了相似的结果,且大多数PLZF⁺生殖细胞十分接近间质间隙。微环境与脉管系统和间质细胞的紧密关系提示,通过血液运输来的或间质细胞产生的因子对SSCs的自我更新和分化至关重要。

3 GDNF对SSCs的调控

胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived

neurotrophic factor, GDNF)是1993年从大鼠胶质细胞系B49分离纯化出来的一种新型神经营养因子。在小鼠睾丸中,支持细胞、已分化的生殖细胞、管周肌样细胞及间质细胞都表达GDNF mRNA。根据小鼠体内外的大量研究,现已证实GDNF是SSCs自我更新和增殖的关键因子。GDNF对睾丸的调节功能主要体现在以下几个方面。首先,GDNF参与精子发生。来自转基因鼠的体内研究资料证实,GDNF参与了SSCs自我更新和分化的旁分泌调节。这些研究说明,低剂量的GDNF导致精原细胞过量分化、损耗;而高剂量的GDNF会促进SSCs自我更新,并抑制其分化。其次,GDNF参与睾丸发育和血睾屏障的形成。在睾丸中,支持细胞分泌的GDNF还可以自分泌方式促进自身的分裂增殖,促进睾丸发育。GDNF对睾丸发育的影响可能主要表现在它对前支持细胞和未成熟支持细胞增殖的促进作用。毛细血管内皮细胞表达GFR α 1,管周肌样细胞分泌GDNF,可能GDNF以旁分泌方式作用于毛细血管内皮细胞,一方面促进其增殖,另一方面促进毛细血管内皮细胞间紧密连接的形成^[11]。

Hofmann等^[12]研究了GDNF对其他基因的调控作用。实验中的GFR α 1⁺精原细胞来源于出生后6 d的小鼠睾丸,用添加有GDNF的培养液培养10 h,然后对其进行分析,结果发现与对照组相比,受GDNF调控的基因多达1 100多个。这与Oatley等^[13,14]发现有270个基因的表达受GDNF调控的结果之间差异很大,这可能是由于两个实验中细胞分离和培养条件不同而引起的。Hofmann等用含GDNF的培养液将GFR α 1⁺精原细胞培养了10 h,而Oatley等则培养了几周。其次,Oatley等所用的无血清培养液只含外源性的碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、GDNF及可溶性GFR α 1;而Hofmann等则没有添加外源性的bFGF和可溶性GFR α 1,但却添加了10%的血清。

4 参与SSCs调控的信号通路

既然GDNF对SSCs的增殖分化和自我更新有密切关系,那么阐明GDNF活化的细胞信号转导通路就显得尤为必要。在精原细胞中,GDNF是在GFR α 1存在条件下激活酪氨酸激酶RET以发挥其生物学效应的。首先,GDNF与其相应的GFR α 1蛋白结合,形成高亲和性复合物;然后,该复合物再与两分子RET结合,引起RET结构域的酪氨酸残基相互磷酸化,使信号转入细胞内。RET具有典型的胞

内激酶结构域,该处具有12个自磷酸化位点,可以活化多个信号通路,包括PI3K、MAPK、SFK以及PLC- γ 等。RET与GDNF形成复合物导致受体寡聚化,其自身磷酸化也需要钙离子的存在。这表明除了GFR α 1,钙离子也是GDNF信号转导的重要组成部分。Dann等^[15]用shRNA抑制Pou5f1,结果导致移植后受体小鼠内的精原细胞克隆减少。此外,在培养的SSCs中,GDNF/GFR α 1的去除和再次添加均未改变Pou5f1的表达。这提示除了GDNF信号通路外,可能还存在其他的通路调节SSCs的分化。

先前的研究表明,bFGF在神经细胞中对GDNF起协同作用。最近研究发现,GDNF通路与bFGF通路之间可能存在相互对话。bFGF与酪氨酸激酶受体结合后,激活细胞内的多条信号通路,如Ras/raf/mek、p38/MAPK、PKC和PI3K通路等,多数哺乳动物SSCs的自我更新需要bFGF通路的激活和调节^[16]。

Oct4表达于胚胎干细胞和SSCs,说明Oct4介导的信号通路在干细胞自我更新中起重要作用。在胚胎干细胞中,Oct4与Sox2形成异二聚体,调控Oct4自身。Oct4与Sox2形成的异二聚体与干细胞自我更新有关的许多基因的表达相关^[17]。但关于Oct4通路在SSCs调节中的详细机制仍不清楚。

5 维生素对SSCs的调控

维生素A、C、E等对小鼠和大鼠雄性的正常精子发生至关重要。维生素A的活性代谢产物视黄酸(retinoic acid, RA)能促使精原细胞分化并诱导生殖细胞进入减数分裂,而维生素C和E则是SSCs的存活因子。大鼠维生素A的缺乏将导致其生殖细胞分化的终止。睾丸中生殖细胞和体细胞上都有RA的受体,因此RA可以直接调节生殖细胞或通过调节体细胞间接作用于SSCs微环境。从微阵列分析中发现,培养的SSCs表达RXRa、RXRb和RARa,且这些基因的表达不受GDNF的影响^[13]。这说明RA的调控机制不依赖于GDNF信号通路,可能参与其他信号通路或直接调控SSCs。

研究体内RA所参与的SSCs的调控时经常会用到维生素A缺乏小鼠模型。由于该模型中已分化生殖细胞的缺乏,维生素A缺乏将导致小鼠SSCs的富集。然而,利用SSC移植技术却发现,该模型小鼠睾丸内有生物学活性的SSCs却远远少于预期数量^[18]。这说明该模型中RA信号的缺乏可能导致了SSCs的损耗。由于睾丸内生殖细胞和微环境周围的体细胞上都有RA受体,因此目前还不能确定该模

型中SSCs的损耗究竟是由SSCs上RA信号的缺失还是体细胞上RA信号的缺失所引起的。

6 ERM/Etv5对SSCs的调控

Ets转录因子家族包括30多个成员,通过调节细胞的增殖、分化、凋亡及细胞间相互作用,在胚胎发生早期的血细胞生成和血管发生及胚胎发育后期的组织发生中发挥重要的调控作用。研究发现,Ets相关分子/Ets变种基因5(Ets related molecular,ERM/Ets variant gene 5, *Etv5*)对SSCs的自我更新起着重要的调节作用^[14,19-22]。在小鼠睾丸内,支持细胞专一性地表达ERM并参与SSCs自我更新的调控^[19]。小鼠ERM的缺失将导致其睾丸和身体发育的异常,随着时间的推移,其SSCs逐渐减少并最终耗尽;另外,尽管其附睾中存在着活动的精子,但它们已无受精能力;靶向剔除ERM的小鼠主要表现为第一次精子发生波后SSCs/祖细胞整体丢失,从而导致仅存支持细胞(Sertoli cell-only)的表型和寡精症^[21,22]。

对*Etv5*^{-/-}鼠原代支持细胞的微阵列分析表明,与对照鼠相比,其多种趋化因子的表达均显著下降^[19]。趋化因子分析表明,GFRa1⁺精原细胞向*Etv5*^{-/-}支持细胞的迁移率与向对照组支持细胞的迁移率相比显著下降。有趣的是,分化型精原细胞、精母细胞及圆形精子则不受对照组支持细胞趋化作用的影响;而干细胞/祖细胞则表现出显著地趋化作用^[23]。用重组的趋化因子进行的拯救分析(rescue analysis)显示,趋化因子9(CCL9)促进了支持细胞对SSCs/祖细胞的趋化作用。另外,在ETV5与*Ccl9*之间也存在着蛋白质—DNA间的相互作用^[23]。这提示ETV5可能直接调控了CCL9的表达,进而对SSCs的归巢(stem cell homing)、自我更新和分化进行了调节。

7 结语

作为体内在自然状态下唯一能产生精子并将遗传信息传递给子代的成体干细胞,SSCs不仅是雄性生育能力的基础和保证,也是成体干细胞研究的良好模型。SSCs能够进行体外分离、冻存、培养、遗传操作及异种/异体移植的生物学特性,将有助于人们更好地理解精子发生的机理,从而最终应用于雄性不育的治疗、转基因动物的生产以及珍稀濒危动物种质资源的保护等领域。然而有关SSCs自我更新和分化的调控机理仍然是本领域研究的一个瓶颈。本文主要从SSCs更新与分化的模式入手,评述了干细胞微环境、GDNF、维生素、Ets转录因子

ERM/*Etv5*等因素通过内分泌、旁分泌和自分泌系统对SSCs自我更新和分化的调节作用,并探讨了影响SSCs更新与分化的可能的信号通路。综合相关主要文献,我们认为调控SSCs的分子主要来源于两个方面:一是微环境,二是全身内分泌系统。目前,对于它们所构成的复杂的网络调控机理虽然已经有了一些认识,但仍缺乏系统、全面的深刻理解。建立SSCs更新与分化的确切模式,阐明微环境及内分泌系统对其自我更新与分化的调控机理,将极大地促进SSCs相关研究应用,同时也会为其他成体干细胞生物学研究提供借鉴。

[参 考 文 献]

- [1] Brinster RL, Zimmermann JW, Ralph L. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 11298-302
- [2] Simon L, Ekman GC, Kostereva N, et al. Direct trans-differentiation of stem/progenitor spermatogonia into reproductive and nonreproductive tissues of all germ layers. Stem Cells, 2009, 27: 1666-75
- [3] Yoshida S, Nabeshima Y, Nakagawa T. Stem cell heterogeneity: Actual and potential stem cell compartments in the mouse spermatogenesis. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1120: 47-58
- [4] 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: 647-52
- [5] Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, et al. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. Dev Biol, 2004, 269: 447-58
- [6] Sada A, Suzuki A, Suzuki H, et al. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. Science, 2009, 325: 1394-8
- [7] Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, et al. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. Biol Reprod, 2007, 76: 130-41
- [8] Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S, et al. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. Science, 2010, 328: 62-7
- [9] de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. Microsc Res Tech, 2009, 72: 580-5
- [10] Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. Science, 2007, 317: 1722-6
- [11] Caires K, Broady J, McLean D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. J Endocrinol, 2010, 205: 133-45
- [12] Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. Dev Biol, 2005, 279: 114-24
- [13] 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: 9524-9
- [14] Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL, et al. 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 Biol Chem*, 2007, 282: 25842-51
- [15] Dann CT, Alvarado AL, Porteus MH, et al. Spermatogonial stem cell self renewal requires OCT4, a factor down-regulated during retinoic acid induced differentiation. *Stem Cells*, 2008, 26: 2928-37
- [16] Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol*, 2004, 275: 269-86
- [17] Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, et al. Oct-3/4 and Sox2 regulate *Oct-3/4* gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2005, 280: 5307-17
- [18] McLean DJ, Russell LD, Griswold MD. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol Reprod*, 2002, 66: 1374-9
- [19] Chen C, Ouyang W, Grigura V, et al. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*, 2005, 436: 1030-4
- [20] Morrow CM, Hostetler CE, Griswold MD, et al. ETV5 is required for continuous spermatogenesis in adult mice and may mediate blood testes barrier function and testicular immune privilege. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1120: 144-51
- [21] Schlessner HN, Simon L, Hofmann MC, et al. Effects of ETV5 (ets variant gene 5) on testis and body growth, time course of spermatogonial stem cell loss, and fertility in mice. *Biol Reprod*, 2008, 78: 483-9
- [22] Tyagi G, Carnes K, Morrow C, et al. Loss of *Etv5* decreases proliferation and RET levels in neonatal mouse testicular germ cells and causes an abnormal first wave of spermatogenesis. *Biol Reprod*, 2009, 81: 258-66
- [23] Simon L, Ekman GC, Garcia T, et al. *Etv5* regulates sertoli cell chemokines involved in mouse stem/progenitor spermatogonia maintenance. *Stem Cells*, 2010, 28(10): 1882-92