

文章编号: 1004-0374(2012)01-0037-06

# 胚胎干细胞诱导分化为雄性生殖细胞的研究进展

孙 敏, 施青青, 李碧春\*

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏省动物繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009)

**摘 要:** 胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES 细胞) 具有自我更新及无限分化潜能, 理论上可以分化为生殖细胞。目前, 在人及鼠中已有体外诱导 ES 细胞分化为成熟精子的报道。系统阐述影响 ES 细胞分化为雄性生殖细胞的内源性 & 外源性因素, 并结合国内外最新研究进展总结其诱导分化方法, 展望应用前景, 期望为从事相关研究的学者提供参考。

**关键词:** 胚胎干细胞; 诱导; 雄性生殖细胞

**中图分类号:** Q813 **文献标志码:** A

## Research progress on differentiation of embryonic stem cells into male germ cells

SUN Min, SHI Qing-Qing, LI Bi-Chun\*

(Key Laboratory of Animal Breeding Reproduction and Molecular Design of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** Embryonic stem cells (ESCs) have the potential ability of unlimited differentiation and self-renewal. ESCs can differentiate into germ cells in theory. At present, a successful report has been shown that human or mouse ESCs could be induced into mature sperm *in vitro*. This study aims to systematically describe the endogenous and exogenous factors inducing ESCs differentiate into male germ cells, meanwhile, the inducing method was summarized combing with the latest research progress home and abroad. In addition, the applying prospect of inducing ESCs into male germ cell was analyzed too in order to provide the evaluable information for the scholars engaged in related research.

**Key words:** embryonic stem cells; differentiation; male germ cell

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES 细胞) 是早期胚胎 (原肠胚期之前) 中分离出来的, 具有无限增殖的潜能和发育全能性的一类细胞。ES 细胞的全能性是指 ES 细胞在解除分化抑制的条件下具有分化为包括生殖腺在内的各种组织的发育潜力, 可以为细胞的遗传操作和细胞分化研究提供丰富的实验材料。2003 年, Hubner 首次报道了体外诱导 ES 分化为卵母细胞; 同年报道了鼠 ES 细胞体外诱导分化为雄性配子, 随后 ES 细胞诱导分化为生殖细胞的研究进一步开展。此方面的研究有助于阐明生殖细胞发生和配子生成过程, 对揭示男性不育的病因和治疗有重要意义。本文结合近几年 ES 体外诱导分化为雄性生殖细胞的研究报道, 系统阐述 ES

细胞与雄性生殖细胞间基因表达差异、诱导分化方法及应用前景, 为从事相关研究的学者提供参考。

### 1 ES细胞和SSCs细胞简介

ES 细胞的形态结构与早期胚胎细胞具有相似

收稿日期: 2011-06-25; 修回日期: 2011-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871791); 江苏省高校自然科学重大基础研究项目(08KJA230001); 高等学校博士学科点专项科研基金(20103250110006); 2010年江苏省研究生培养科研创新计划项目; “六大人才高峰”资助项目

\*通信作者: E-mail: yubcli@yzu.edu.cn; Tel: 0514-87997207

性,具有二倍体核型,胞体相对比较小,核明显,有一个或多个核仁,细胞紧密堆积在一起,细胞间无明显界限,呈鸟巢状集落生长。1981年,Evans和Kaufman<sup>[1]</sup>首次成功地分离出了小鼠胚胎干细胞。随后,人们分别建立了猪(piedrahita)、牛(satio)、绵羊(piedrahita)、山羊(meineeke-tillmann)、水貂(sukoyan)、兔(qraves)<sup>[2-3]</sup>及鸡(pain<sup>[4]</sup>, park<sup>[5]</sup>)等动物的胚胎干细胞或类胚胎干细胞系。

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是雄性生殖细胞的母细胞,位于曲精细管基膜上。它一方面可以自我更新生成新的成体干细胞以维持自身数量的恒定,同时又能在自身基因或外来信号的调节下增殖分化成各阶段的精原细胞直至精子,是雄性成体干细胞中唯一与下一代遗传背景密切相关的细胞<sup>[6]</sup>。精原干细胞体积较大,核为圆形或椭圆形,核内有2~3个核仁,细胞聚团生长,细胞间边缘清晰,结构紧密,集落形似葡萄串状。体内自然状态下,内细胞团(ICM)分化为原始生殖细胞(primal germ cells, PGCs)后,PGCs迁移到达生殖嵴。雄性PGCs进入有丝分裂休止期,仍保持增殖潜能;而雌性PGCs则开始减数分裂形成卵原细胞后进入减数分裂前期I,而后进入休止期。出生后性成熟时,雄性生殖细胞恢复有丝分裂,形成精原干细胞,进一步通过减数分裂形成成熟精子;卵原细胞恢复减数分裂波,产生成熟卵子。一般认为ES细胞的增殖分化受到内源性因素和外源性因素的共同调节。内源性因素即不同基因在不同时间和空间的开启和关闭,涉及到各种转录因子的作用。外源性因素是指细胞间的相互作用及细胞外物质的介导作用。

## 2 ES细胞诱导分化为生殖细胞的研究进展

目前ES细胞向生殖细胞分化的研究已取得一定进展,主要集中在人、鼠中。这些研究表明了体外途径获得生殖细胞的可能性。

2003年,Hübner等<sup>[7]</sup>构建了Oct4启动子的GFP表达载体,将其转入ES细胞中,将ES细胞体外诱导分化为卵母细胞,首次证实了ES细胞可以在体外分化为生殖细胞。同年,Toyooka等<sup>[8]</sup>将含lacZ的ES细胞和表达BMP4基因的M15细胞共培养,并将诱导后的阳性与生殖细胞共培养后移入受体睾丸。结果表明,鼠ES细胞可以体外诱导分化为雄性配子。

2004年,Geijsen等<sup>[9]</sup>将鼠ES细胞诱导成胚胎生殖细胞,并发育为成熟单倍体配子,将其注射

入正常卵母细胞完成受精后,观察到胚泡的形成。Clark等<sup>[10]</sup>将人类ES细胞诱导分化为生殖细胞,并阐述了生殖细胞和成熟配子的特异表达基因。

2006年,Nayernia等<sup>[11]</sup>将Stra8基因启动子转染入小鼠ES细胞中,经过视黄酸诱导后,获得雄性配子,并通过受精获得了后代。

2007年,Kerkis等<sup>[12]</sup>利用维甲酸(RA)诱导ES细胞最终获得单倍体精子及卵子,将获得的精子和卵子共培养能形成2个原核结构,最终发育为桑葚胚样结构。这表明ES诱导得到的单倍体精子具有受精能力。

2009年,Yu等<sup>[13]</sup>将Dazl基因转入小鼠ES细胞中,在没有LIF的DMEM/F12培养基中培养获得游动的精子和卵子。他们分析是Dazl的过量表达抑制了Nanog的表达,促使ES细胞向生殖细胞方向分化。

2010年,Yamano等<sup>[14]</sup>通过体外诱导鼠ES细胞分化研究了Akt活性在中胚层的诱导作用。研究表明,Akt信号可以促进球体(位于ES和PGCs中间状态)的自我更新,保持其分化状态。

综上所述,ES诱导分化为雄性生殖细胞的方法主要有以下几种。(1)改变细胞的培养条件,即向培养基中添加生长因子、化学诱导剂等;将ES细胞与其他细胞一起进行培养;将细胞接种在适当的底物上。通过改变培养条件,促使ES细胞中的特定基因表达的变化,进而引发细胞向特定方向变化。(2)导入外源性基因,即将特定发育阶段中起决定作用的基因导入ES细胞的基因组中从而将ES细胞准确地分化为特定类型的细胞。(3)体内诱导,即将ES细胞移植到动物体内的不同部位,在不同的微环境中促使ES细胞向特定细胞分化。

## 3 影响ES细胞分化为雄性生殖细胞的内源性因素

在ES细胞诱导分化为SSCs细胞的过程中内源性因素主要包括:Nanog、Oct-4、Sox2、GDF3、Stella、Fragilis、Dazl、Stra8、SCP3、VASA、integrin  $\beta$ 1、integrin  $\alpha$ 6、c-kit等。

Nanog属于ANTP超家族NK2型基因,在维持干细胞未分化状态中表现全能性。最早在桑葚胚阶段检测到Nanog mRNA的表达,到早期囊胚后,Nanog表达于内细胞团,在滋养外胚层没有表达。胚胎附植后,Nanog出现在上胚体区域表达,进入原条期后表达量开始迅速降低。Nanog在未分化的

ES 细胞中高表达,而敲除 Nanog 的 ES 细胞将向原始内胚层分化<sup>[15-16]</sup>。在鼠 ES 细胞的体外培养体系中, Nanog 能够使 ES 细胞不依赖 LIF-Stat3 途径而维持去多能性的存在。过表达 Nanog 的鼠 ES 细胞在没有 LIF 的培养条件下经长时间培养后,仍能够具有很强的自我复制能力。

Oct-4 (又称 pou5f1) 属于 POU 家族,通过结合八碱基的保守序列“AGTCAAT” (octamer motif) 来激活或者抑制下游基因的表达。Oct4 是第一个被发现只在多能细胞中表达的转录因子,也是控制 ES 细胞多能性的主要因子。它在囊胚阶段表达于内细胞群,而滋养外胚层和原始内胚层中 Oct4 基因表达水平下调。随着胚胎发育的成熟, Oct4 在各种成熟组织中都失去表达,而在具有多能性或全能性的生殖细胞中还维持一定量的表达。Oct4 的表达决定着细胞多能性的有无,敲除 Oct4 基因的小鼠 ES 细胞失去自我增殖能力,有分化为内胚层和滋养层的潜力<sup>[17-18]</sup>。当 Oct4 过量表达时, ES 细胞向原始内胚层方向分化<sup>[19]</sup>。Morrison 和 Brickman<sup>[20]</sup> 发现,非洲蟾蜍在缺失 Oct4 时胎儿易早产,进一步说明 Oct4 在抑制干细胞向内胚层和外胚层的分化时起作用。

Sox2 是 SOX (SRY-related HMG box) 基因家族的一员, SOX 基因家族编码结构高度保守、功能与性别决定基因相关的转录因子。Sox2 在胚胎发育早期表达,常作为 Oct4 的辅助转录因子与其调控动物早期胚胎发育中一些重要基因的表达,对于外胚层的维持和发育是必需的<sup>[21]</sup>,是早期胚胎多能性谱系细胞和胚胎外胚层具有多能发育潜能的一个标志物。外源性表达的 Sox2、Oct4、nanog 对 ES 细胞转录具有关键性调控作用,可认为是保持 ES 细胞多潜能性和自我更新的中心调控因子。

GDF3 (growth differentiation factor 3), 即生长分化因子 3,属于转化生长因子 (TGF- $\beta$ ) 家族,它是分泌型蛋白,可进行旁分泌或自分泌而发挥功能。Chen 等<sup>[22]</sup> 在植入前期和植入后早期的小鼠胚胎中发现了 GDF3 的表达,与前脏内胚层的形成有关。Levine 和 Brivanlou<sup>[23]</sup> 发现 GDF3 在小鼠的早期胚胎发生中表达, GDF3 与小鼠的 ES 细胞分化有关,在人类的多能干细胞中, GDF3 是细胞保持多能性的标记。刘湘华<sup>[24]</sup> 研究表明, GDF3 有可能对中枢神经系统的形成有着重要的功能。

Stella 和 Fragilis 基因是 PGCs 和减数分裂前生殖细胞的特异基因,在体内 ICM 和早期外胚层细

胞中没有表达。Stella 编码高度分歧性蛋白,随 ES 细胞分化而表达下调<sup>[25]</sup>。Fragilis 是一种跨膜蛋白,也是一种干扰素诱导蛋白,能促进生殖细胞形成和同型 PGCs 聚集。它编码干扰素诱导性跨膜蛋白,在 BMP4 刺激后的上胚层细胞中表达,与胚外外胚层诱导生殖细胞特化密切相关<sup>[26]</sup>。Fragilis 在 PGCs 前体的表达可能参与了细胞间的诱导与应答。

Dazl 是 DAZ 基因家族 (DAZ、BOULE、Dazl) 中的重要一员,在进化上高度保守,是生殖细胞形成所必需的调控因子。Dazl 在生殖细胞发育早期开始表达,是减数分裂启动的内因,在配子生成的减数分裂过程中持续存在,对精子发生有重要作用。Kito 等<sup>[27]</sup> 研究表明,在鸡胚胎生殖嵴和未发育的睾丸中发现 Dazl 蛋白的表达。小鼠 Dazl 基因的丢失会导致 A 型精原细胞向 A1 型精原细胞的发育停滞,而敲除 Dazl 的小鼠导入人类 Dazl 基因后可产生大量的早期生殖细胞。Dazl 基因突变或表达缺乏可导致减数分裂障碍、雄性不育<sup>[28-29]</sup>。

*Stra8 (stimulated by retinoic acid gene 8)* 是哺乳动物生殖细胞由有丝分裂转变为减数分裂前特异表达基因<sup>[30]</sup>,仅在雄性发育期性腺和成年精子发生过程减数分裂前的生殖细胞中表达,是雄性生殖细胞特有的基因,所以在胚胎期 *Stra8* 是否表达及其表达时间可决定 PGCs 发育成为雄性还是雌性生殖细胞。*Stra8* 基因表达受视黄酸 (retinoic acid, RA) 的调节,是减数分裂启动的外因,生殖细胞在表达 Dazl 后就能对 RA 起反应引起 *Stra8* 表达而启动减数分裂。米美玲等<sup>[31]</sup> 报道,局部较高视黄酸浓度可诱发 *Stra8* 的表达,胞质 *Stra8* 蛋白增加导致生殖细胞进入减数分裂前期。

SCP3 是联会复合体轴侧成分的一部分,在染色质环黏附位置,其表达对于第一次减数分裂的启动具有重要作用,该蛋白是检测哺乳动物发生减数分裂转变的高度特异性标志<sup>[32]</sup>。郭睿等<sup>[33]</sup> 通过免疫组织化学法和免疫荧光 FITC/DAPI 共染技术得出结论: SCP3 蛋白在雄性小鼠减数分裂各阶段精母细胞核内的表达与 SC 的形成、成熟、解体同步,参与了同源染色体之间的联会和重组。

VASA 是生殖细胞特异的三磷酸腺苷 (ATP) 依赖的 RNA 解旋酶,是迁移后期 PGCs 的重要标志,在卵巢和睾丸组织中表达,是生殖细胞的高度特异性标志。Vasa 的同源基因 *Mvh* 的表达由生殖嵴的体细胞诱导产生, *Mvh* 蛋白在雄性和雌性的生殖细胞发生过程中发挥作用<sup>[8]</sup>。

Integrin  $\beta 1$  和 integrin  $\alpha 6$  是 SSCs 表面层黏连蛋白受体, 是生精上皮基膜处构成细胞外基质的重要原件。1999 年, Shinohara 等<sup>[34]</sup> 通过特异性  $\alpha 6$ 、 $\beta 1$  整合素抗体和免疫磁珠分选系统技术证实  $\alpha 6$ 、 $\beta 1$  整合素可作为小鼠 SSCs 表面标志物。李彦锋等<sup>[35]</sup> 通过免疫组化方法对成人及胎儿睾丸 SSCs 特异性表达进行筛选和鉴定。结果表明,  $\alpha 6$  整合素在生精小管生殖细胞表面存在较广泛而显著地阳性表达,  $\beta 1$  整合素主要在生精小管基底部细胞存在显著阳性染色, 两者可作为阳性标志用于人 SSCs 的分选。Lee 等<sup>[36]</sup> 研究表明, integrin  $\beta 1$  和 integrin  $\alpha 6$  的沉默对于鼠 ES 细胞保持未分化状态具有重要作用。当 integrin  $\beta 1$  和 integrin  $\alpha 6$  被激活后, ES 细胞开始分化且分化的方向也受其控制。

c-kit 是由原癌基因 Wlocus 编码的酪氨酸激酶受体, 其配体为干细胞因子 (SCF)。c-kit 与其配体 SCF 特异性结合, 对 PGCs 和 SSCs 生存、分化具有重要作用<sup>[37]</sup>。c-kit 受体在 A1~4 型精原细胞中为高水平表达, 在 In 型、B 型及早期的前细线期精母细胞中为低水平表达, 在后期的精母细胞及精子细胞中不表达。因此, 常把 c-kit 受体作为 A 型精原干细胞的标记物。

#### 4 影响ES细胞分化为雄性生殖细胞的外源性因素

外源性因素是指细胞间的相互作用及细胞外物质的介导作用, 包括细胞外基质和细胞培养过程中添加的影响因子。

细胞间的相互作用主要来源于其微环境, 又称为小生境 (niches), 由稳定的组织解剖学部位构成。同时, 也是一种相互作用的结构单位, 调节发育组织或器官的自我增殖或分化<sup>[38-39]</sup>。Qing 等<sup>[40]</sup> 将鼠 ES 细胞形成 EB 后与卵巢颗粒层细胞共培养获得卵母样细胞。米美玲等<sup>[41]</sup> 通过骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 与支持细胞共培养可促使 BMSCs 向表达 Stra8 和 c-kit 的雄性生殖细胞方向分化。Tomoiike 通过与未分化的生殖嵴细胞共培养和添加生殖嵴提取液诱导 ES 细胞向生殖细胞分化, 诱导 10 d 后, Mvh、Dazl 基因表达量增加, 证明生殖嵴细胞分泌的生长因子有利于 ES 向 PGCs 的分化。

小生境内除细胞外, 非细胞成分亦具有重要作用, 主要是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 它们被分泌并储存在细胞所在的组织网络中, 为细胞黏附提供支架, 并通过整合素受体向干细胞传递

细胞外信号, 从而调节干细胞增殖、迁移和分化发育<sup>[42-44]</sup>。

ECM 主要包括层黏蛋白 (laminin, LN)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、胶原蛋白 (collagens, Col)、玻连蛋白 (vitronectin, Vn) 和血小板反应蛋白 (thrombospondin, Tsp) 等多种糖蛋白、蛋白多糖和胶原。

在睾丸的曲细精管中, 有两种细胞可产生 ECM, 它们是曲细精管内的支持细胞 (sertoli cell, SC) 和固有层内的管周肌样细胞 (peritubular myoid cell, PC)。SC 和 PC 在产生和形成 ECM 时相互作用。一般认为, SC 产生 IV 型胶原、LN、entactin 和蛋白多糖 (包括硫酸乙酰肝素 HS 和硫酸软骨素); PC 合成 FN、I 型、IV 型胶原和蛋白多糖 (包括硫酸软骨素, 但不含 HS)<sup>[45]</sup>。

小生境中与干细胞分化有关的主要是 LN、FN 和 Col。ES 细胞在体内特定小生境中发育, 其内各种基质蛋白与其他细胞相互作用影响 ES 细胞向生殖细胞分化。Zhou 等<sup>[46]</sup> 研究表明, 饲养在胶原基质胶上的胚胎干细胞可形成 EB, 它具有分化成三胚层能力, 加入维生素 C 可诱导分化为心肌细胞。郭新等<sup>[47]</sup> 研究表明, 细胞层黏蛋白与 integrin  $\beta 1$  和 integrin  $\alpha 6$  的相互作用对于诱导人 ES 细胞分化为神经细胞有重要作用。Ma 等<sup>[48]</sup> 将鼠 EB 接种到 LN、FN、COL 和人工基底膜 (matrigel) 包被的培养皿中培养, 结果显示层黏蛋白和纤维连接蛋白可以促进 mES 来源的 EBs 向 PGCs 分化过程中减数分裂的启动, 推测基质蛋白受体-整合素受体是介导干细胞与细胞外基质黏附的最主要分子。

除细胞外基质外, 一些激素也能诱导 ES 细胞的分化。性激素在生殖细胞发育中可促使细胞进入减数分裂前阶段。Kee 等<sup>[49]</sup> 将化学药物和维生素混合, 成功诱导干细胞变成了精子和卵子。在培养小鼠 ES 细胞产生卵原细胞的过程中, 观察到 12 d 可检测到 E2, 而在人 ES 细胞诱导为精子过程中有双氢睾酮的产生<sup>[7,50]</sup>。

#### 5 体外诱导ES细胞分化为生殖细胞的应用前景

人类胚胎生殖细胞的研究受到资金及材料的限制, 不容易进行。而 ES 细胞易于进行遗传改造, 且已获得其细胞系。因此, 体外诱导 ES 细胞分化为生殖细胞的研究为人类生殖细胞的定位及发育研究提供了新的方法, 且易在分子水平上进行遗传改造。对于鼠和人的生殖细胞系的体外长期培养已经

有报道, 但这些研究只能提供一个特定细胞的静态图片, 而不能准确的揭示生殖细胞的形成过程。对于体外 ES 细胞成功诱导为生殖细胞及成熟配子的研究, 可以解释生殖细胞的形成过程并利用其进行科学及临床治疗上的研究。

在生殖细胞的诱导方面除了关注各种分子信号水平的变化外, 还需要研究生殖细胞小生境的形成及其对生殖细胞发育的影响。精子的形成需要支持细胞的支持, 卵子的发育则需要滋养层和颗粒细胞提供生长环境。体外 ES 细胞诱导分化成功获得精子和卵子样细胞的研究有利于研究 ES 细胞分化过程中支持小生境的发育, 也有助于了解配子发育过程中小生境是否是必需的。生殖细胞小生境的识别或者是从 ES 细胞分化过程中增加其形成方法都可以帮助人们了解生殖细胞的发育过程。

从 ES 细胞获得具有功能的精子或卵子更具有代表意义。获得成熟的卵子过程需要注意避免孤雌生殖的可能, 从而使获得的卵子可以进行人工受精或者进行核移植。如果获得的卵母细胞可以进行供体核的程序性重排, 并成功发育到胚泡期, 则此方法可以充分利用患者自身的 ES 细胞系进行核移植, 实现细胞治疗。而获得成熟的精子的过程可以使人们了解精子发生过程, 为男性不育提供新的治疗方法。

基于 ES 细胞往雄性生殖细胞方向诱导分化的广阔应用前景, 本实验室拟以家鸡作为实验模型, 诱导鸡胚 ES 分化为 SSCs, 进一步发育为成熟精子。相对于人的 ES 细胞, 使用鸡胚 ES 细胞可以克服伦理方面的限制, 且取材方便, 模拟临床治疗实验具有十分明显优势。本实验室已确立了明确区分鸡胚 ES 细胞和 SSCs 的标记基因及蛋白, 下一步将结合基因转染法、因子诱导法及其共培养方法, 探索适宜的诱导体系, 期望为后来的研究者或临床需要提供有价值的参考。

#### [参 考 文 献]

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-6
- [2] 高舒平, 王太一. 哺乳动物胚胎干细胞研究进展. *中国实验动物学杂志*, 1999, 9(2): 106-9
- [3] 郑瑞珍. 胚胎干细胞研究进展. *生物工程进展*, 1994, 14(2): 18-27
- [4] Pain B, Clark ME, Shen M, et al. Long-term *in vitro* culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*, 1996, 122(8): 2339-48
- [5] Park TS, Han JY. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol Rep Dev*, 2000, 56(4): 475-82
- [6] Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*, 2002, 296(5576): 2174-6
- [7] Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 2003, 300(5623): 1251-6
- [8] Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, et al. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20): 11457-62
- [9] Geijsen N, Horoschak M, Kim K, et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, 2004, 427(6970): 148-54
- [10] Clark AT, Bodnar MS, Fox M, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(7): 727-39
- [11] Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, et al. *In vitro*-differentiated embryonic stem cell give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell*, 2006, 11(1): 125-32
- [12] Kerkis A, Fonseca SA, Serafim RC, et al. *In vitro* differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cell*, 2007, 9(4): 535-48
- [13] Yu Z, Ji P, Cao J, et al. *Dazl* promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1(2): 93-103
- [14] Yamano N, Kimura T, Watanabe-Kushima S, et al. Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells by AKT activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 392(3): 311-6
- [15] Pan G, Pei D. The stem cell pluripotency factor nanog activates transcription with two unusually potent subdomains at its C-terminus. *J Biol Chem*, 2005, 280(2): 1401-7
- [16] Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, et al. Human *STELLAR*, *NANOG* and *GDF3* genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hot spot for teratocarcinoma. *Stem Cells*, 2004, 22(2): 169-79
- [17] Velkey JM, O'Shea KS. Oct4 RNA interference induces trophoblast differentiation in mouse embryonic stem cells. *Genesis*, 2003, 37(1): 18-24
- [18] Hay DC, Sutherland L, Clark J, et al. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cell*, 2004, 22(2): 225-35
- [19] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000, 24(4), 372-6
- [20] Morrison GM, Brickman JM. Conserved roles for Oct-4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development*, 2006, 133(10): 2011-22
- [21] Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 2003, 17(1): 126-40

- [22] Chen C, Ware SM, Sato A, et al. The Vgl-related Protein Gdf3 acts in a Nodal signaling pathway in the pre-gastrulation mouse embryo. *Development*, 2006, 133(2): 319-29
- [23] Levine AJ, Brivanlou AH. GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development*, 2006, 133(2): 209-16
- [24] 刘湘华. 两个新的蛋白质结构域的鉴定暨生长分化因子3功能的初步探讨[D]. 上海: 复旦大学, 2006
- [25] Clark AT, Bodnar MS, Fox M, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(7): 727-39
- [26] Lanqe UC, Saitou M, Western PS, et al. The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol*, 2003, 3: 1
- [27] Kito G, Aramaki S, Tanaka K, et al. Temporal and spatial differential expression of chicken germline-specific proteins cDAZL, CDH and CVH during gametogenesis. *J Reprod Dev*, 2010, 56(3): 341-6
- [28] 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
- [29] Vogel T, Speed RM, Ross A, et al. Partial rescue of the *Dazl* knockout mouse by the human *DAZL* gene. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(9): 797-804
- [30] 崔光辉, 张键荣, 漆正宇, 等. 诱导小鼠骨髓间充质干细胞向雄性生殖细胞的定向分化. *中国男科学杂志*, 2008, 22(12): 1-9
- [31] 米美玲, 杨蓓, 徐斯凡, 等. *Stra8*: 生殖细胞有丝分裂转变为减数分裂前特异表达的基因. *中华男科学杂志*, 2009, 15(1): 512-5
- [32] 王芳, 孙莹璞. 小鼠胚胎干细胞分化为精子细胞的研究进展. *生殖与避孕*, 2008, 28: 363-6
- [33] 郭睿, 崔慧林, 赵虹, 等. SCP3在小鼠精母细胞核内的表达及定位. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2008, 17(1): 84-8
- [34] Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL.  $\beta$ 1- and  $\alpha$ 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (10): 5504-9
- [35] 李彦锋, 郭应禄, 李晓红, 等. 人精原干细胞特异性标志的初步筛选. *中华男科学杂志*, 2005, 11(7): 486-9
- [36] Lee ST, Yun JI, Jo YS, et al. Engineering integrin signaling for promoting embryonic stem cell self-renewal in a precisely defined niche. *Biomaterials*, 2010, 31(6): 1219-26
- [37] Besmer P, Manova K, Duttlinger R, et al. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*, 1993: 125-37
- [38] Ohlstein B, Kai T, Decotto E, et al. The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16 (6): 693-9
- [39] Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*, 2006, 311 (5769): 1880-5
- [40] Qing T, Shi Y, Qin 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
- [41] 米美玲, 周玲, 邹挺, 等. 睾丸支持细胞和全反式视黄酸诱导骨髓干细胞向精原细胞分化的研究. *江西医学院学报*, 2007, 47(6): 45-8
- [42] Tanentzapf G, Devenport D, Godt D, et al. Integrin-dependent anchoring of a stem cell niche. *Nat Cell Biol*, 2007, 9 (12): 1413-8
- [43] Tate MC, Garcia AJ, Keselowsky BG, et al. Specific beta1 integrins mediate adhesion, migration, and differentiation of neural progenitors derived from the embryonic striatum. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27 (1): 22-31
- [44] Hayashi Y, Furue MK, Okamoto T, et al. Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 2007, 25 (12): 3005-15
- [45] 宋阳, 许增禄. 睾丸细胞外间质作用的研究. *解剖学报*, 1997, 28(2): 221-3
- [46] Zhou J, Zhang Y, Lin Q, et al. Embryonic bodies formation and differentiation from mouse embryonic stem cells in collagen/Matrigel scaffolds. *J Genet Genomics*, 2010, 37(7): 451-60
- [47] 郭新, 漆正宇, 秦洁, 等. 不同基质蛋白对小鼠胚胎干细胞生殖细胞分化相关基因表达的影响. *中华男科学杂志*, 2009, 15(11): 967-73
- [48] Ma W, Tavakoli T, Derby E, et al. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Dev Biol*, 2008, 8: 90
- [49] Kee K, Angeles VT, Flores M, et al. Human *DAZL*, *DAZ* and *BOULE* genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature*, 2009, 462 (7270): 222-5
- [50] Aflatoonian B, Moore H. Human primordial germ cells and embryonic germ cells, and their use in cell therapy. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(5): 530-5