

雄性多能性生殖干细胞及其 应用于制作转基因动物的潜能

李治国, 刘林*

(南开大学 生命科学学院 天津 300071)

摘要: 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是雄性动物体内唯一可以将遗传信息遗传给后代的成体干细胞,具有自我更新和分化为精子的能力。对于小鼠而言,随着精原干细胞体外培养体系的逐渐建立和完善,人们不仅对精原干细胞自身的增殖和分化调节机制有了较深入的了解,同时也发现了精原干细胞在再生医学和转基因动物领域具有其独有的优越性,目前的研究结果已经可以通过安全的途径将小鼠精原干细胞诱导转变为和胚胎干细胞功能相似的多能性干细胞,同时也实现了通过异体移植精原干细胞的方式来制作转基因小鼠和大鼠。这些研究结果让人们看到了精原干细胞对人类再生医学和制作大型转基因动物具有巨大的应用潜力。本文将对通过诱导精原干细胞获得的多能性干细胞的研究现状及其用于制作大型转基因动物所面临的问题和可能的解决途径加以概述和总结。

关键词: 精原干细胞;多能性生殖干细胞;转基因动物

中图分类号: Q2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)05-0855-05

Pluripotent Male Germline Stem Cells and Their Potential in Generation of Transgenic Animals

LI Zhi-guo, LIU Lin*

(College of Life Sciences, Nankai university, Tianjin 300071, China)

收稿日期: 2010-09-25

基金项目: 科技部 973 重大专项及转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08006-010B)

作者简介: 李治国(1985—),男,硕士生,研究方向为生殖干细胞。

* 通讯作者: 刘林(1964—),男,江西湖口人,博士,教育部“长江学者”奖励计划特聘教授,国家杰出青年基金获得者,南开大学生命科学学院副院长。1984年本科毕业江西农业大学,1987年硕士毕业后留校任教;1990年9月—1993年7月在北京农业大学生殖生理与生物技术学习,获博士学位。

1994—1996年赴英国剑桥 Babraham 研究所发育及信号传递系分子胚胎学实验室做访问学者及博士后研究。1996—1998年在美国康奈尔大学、康州大学动物科学系做博士后研究。1998—2004年,在美国布朗大学妇产科系生殖医学实验室任研究员、助理教授。1998—2009年,美国海洋生物学实验室(MBL)兼职研究员。2003年被聘为中山大学国家教育部“长江学者奖励计划”特聘教授。2007年受聘为南开大学生命科学学院特聘教授。在包括《Nature》,《Nature Cell Biology》,《Nature Biotechnology》,《Proc Natl Acad Sci USA》,《Stem Cells》,《EMBO Reports》,《Human Molecular Genetics》,《Developmental Biology》,《Biology of Reproduction》等SCI收录杂志上发表学术论文60余篇。曾获得多项奖励,包括2003年度美国生殖医学协会辅助生殖技术奖,中国动物学会生殖生物学会第五届理事会理事,国家科学技术奖评审专家。《中国科学-生命科学》编委。

主要从事特异多能性干细胞端粒功能重编程和转基因研究和哺乳动物胚胎早期发育的分子机制、老龄卵子与端粒功能研究。现主持973项目重大专项“猪诱导多能干细胞(iPS)及其分化发育研究”、转基因重大专项“利用生殖系多能性干细胞构建高效的培育优良品种猪和转基因猪的新技术平台”,参加973项目重大专项“卵巢衰老机理及相关重大疾病的基础研究”。

Abstract: Spermatogonial stem cells (SSCs) have the ability of self-renewal and differentiation and are the unique adult stem cells in males that can transmit genetic messages to offspring. The establishment and gradual improvement of culture systems for SSCs in mice not only allow a good understanding of regulatory mechanisms underlying proliferation and differentiation of SSCs, but also suggest that SSCs have unique advantages in regenerative medicine and generation of transgenic animals. It might be safer to convert SSCs to embryonic stem cells-like pluripotent germ line stem cells, compared to virus vector transduced induced pluripotent stem (iPS) cells. Attempts have been made to produce transgenic mice and rats by allogenic transplantation of SSCs. This review will discuss current research progress of pluripotent germline stem cells, and challenges and possible solutions of producing large domestic transgenic animals using those stem cells.

Key words: spermatogonial stem cells; pluripotent germ line stem cells; transgenic animals

1 精原干细胞的发育过程

对于雄性哺乳动物而言,精原干细胞的形成经历了一个复杂的发育过程。当精子与卵子结合形成受精卵,受精卵经过卵裂发育成囊胚,再由囊胚发育为内胚层、中胚层和外胚层。生殖干细胞起源于外胚层,一些外胚层细胞从尿囊出发迁移到生殖脊,在此处发育为原始生殖细胞(PGCs)。原始生殖细胞被支持细胞(Sertoli 细胞)的前体细胞包围,形成精索(seminiferous cords)。精索形成后,PGCs 随着形态的变化而发育成为性原细胞(gonocytes),性原细胞在动物出生后,逐渐发育为精原干细胞^[1]。对于人类而言,在出生后约 2 个月时性原细胞开始逐渐发育为精原干细胞^[2],而小鼠在出生后 6 d 左右就开始此过程^[3-4]。精原干细胞具有自身决定的自我更新和分化的能力^[5]。精原干细胞通过自我更新产生新的精原干细胞,精原干细胞经过逐级分化可形成精母细胞(spermatocyte),精母细胞经过减数分裂可形成雄性配子——精子。精原干细胞的自我更新和分化几乎伴随着雄性个体的终生,因此精原干细胞是雄性哺乳动物唯一能向子代传递遗传信息可自我更新的二倍体体细胞。

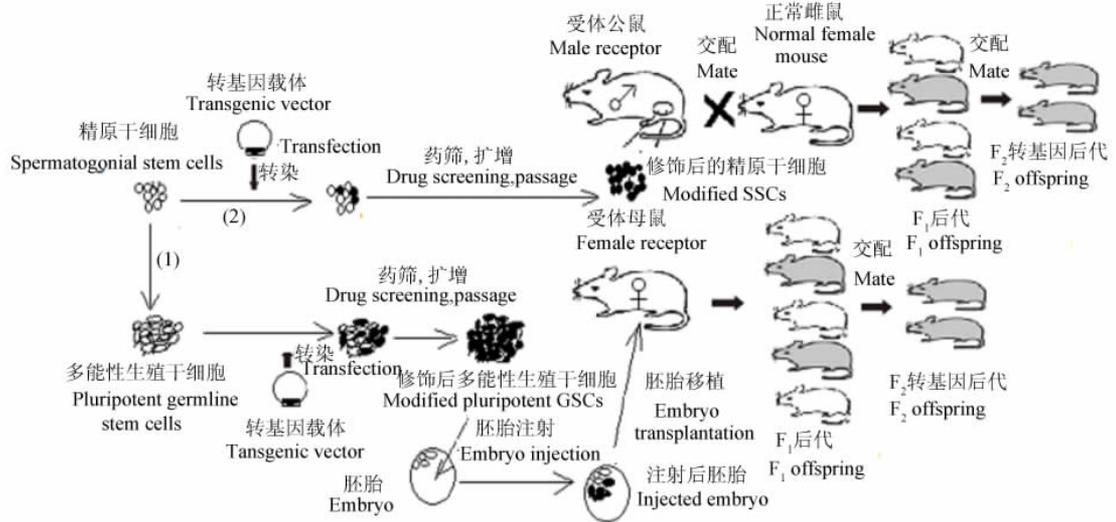
2 多能性生殖干细胞的研究进展

多能性生殖干细胞是指具有多向分化潜能类似胚胎干细胞(ES-like 细胞)的生殖干细胞,具有和胚胎干细胞相似的基因表达水平、体外分化潜能和嵌合体生成能力^[6-7]。正常情况下,生殖干细胞只有单能性,只会向精子方向定向分化形成雄性的配子。但在体外长期培养的情况下,有极少数精原干细胞会自发发生去分化,重新获得胚胎干细胞的特性并能保持正常的核型。

2003 年日本科学家 Shinohara^[8]首次获得了长期体外培养小鼠精原干细胞的培养体系,随后在 2004 年,他便从刚出生的小鼠的睾丸里分离出精原干细胞并通过在体外长期培养获得了多能性生殖干细胞,他们称这种细胞为 ES-like 细胞,这种细胞形成之后可以用小鼠胚胎干细胞培养液进行传代培养,在外型上与小鼠胚胎干细胞相似,并具有分化为多种类型细胞的能力,可形成畸胎瘤和通过胚胎注射获得生殖系转移的后代,从而首次证明了这种多能性生殖干细胞具有和胚胎干细胞相似的分化潜力^[6]。

在 2006 年,Guan 等^[7]用成体小鼠的精原干细胞获得了 ES-like 细胞并再次证实了这种细胞的多能性和嵌合体生成能力。之后研究人员更是对多能性生殖干细胞的研究推向到人和其他物种。2008 年,Conrad 等^[9]的研究表明可以从人成体睾丸里分离和富集精原干细胞,之后用含有 LIF 或 LIF + GDNF 的培养液培养 3~4 周即可获得多能性生殖干细胞,这些多能性生殖干细胞与人的胚胎干细胞一样都高水平表达 STAT3、CD9、KLF4、OTEX 和 VASA,然而前者的 POU6F1 和 DAZL 的表达量要高于后者,而后的 OCT4、SOX2、e-cadherin、NANOG 和 GDF3 表达量又明显高于前者,说明这些多能性生殖干细胞与人的胚胎干细胞之间还存在一定的差异性,虽然体内实验可以形成畸胎瘤,表明其在体内具有分化为多种组织的能力,但是否具有真正意义上的多能性还有待证实。

对于猪、牛和羊等大动物的精原干细胞的体外培养而言,目前主要通过用小鼠的培养体系或对其进行改良期望找到在体外长期培养的方法体系^[10-12]。但物种之间存在差异性,小鼠的培养体系尚不能满足大鼠及仓鼠精原干细胞的培养要求^[13-14],使得此方法体系运用于大动物精原干细胞的培养进展比较



(1) 将精原干细胞转变为多能性生殖干细胞,对基因组修饰后通过胚胎注射和移植,获取转基因后代;(2) 精原干细胞在体外培养,对基因组修饰后,注射到受体小鼠睾丸内,通过交配,获得转基因后代。

(1) Spermatogonial stem cells are converted into pluripotent germline stem cells, for which genomic DNA can be modified and then used to obtain transgenic offspring by embryo injection and transplantation. (2) Spermatogonial stem cells are cultured in vitro and then genome is modified. These cells are injected into the testis of recipients to generate transgenic offspring by mating the recipients with normal female mice.

图 1 精原干细胞用于制作转基因动物的途径

Fig. 1 Ways to generate transgenic animals using spermatogonial stem cells

缓慢。另一方面当前对精原干细胞自然转变为多能性生殖干细胞的机制了解得不多,尤其是大动物真正多能性胚胎干细胞系尚未建立,培养体系不成熟,也限制了除小鼠之外的大动物多能性生殖干细胞的研究进展。

3 精原干细胞和多能性生殖干细胞用于生产转基因动物

小鼠和大鼠胚胎干细胞分离和培养的成功使得人们可以在体外对胚胎干细胞在基因水平上进行改造,通过同源重组和基因打靶技术使得制作转基因动物成为可能,然而运用胚胎干细胞制作转基因动物目前还仅局限于小鼠^[15]和大鼠^[16]。对于猪、牛和羊等大型哺乳动物,由于目前其胚胎干细胞建系还处于探索阶段,尚未获得真正意义上的多能性胚胎干细胞,从而阻止了使用此方法来构建大型转基因动物。

通过核移植和 DNA 原核显微注射法也可以制作转基因动物,但由于此技术效率极低,对基因组改造也十分困难,外源基因整合的随机性可使动物发育异常或不健康,使得此方法用于制作大型转基因动物有明显的局限性。

近几年来,随着诱导多能性干细胞(iPS 细胞)的出现,使得制作转基因动物又获得了一个新的途径。对于小鼠而言,iPS 细胞和胚胎干细胞具有相近的基因表达水平、体外分化能力和嵌合体生成能力^[17]。然而当前 iPS 细胞的安全性和效率问题仍未得到很好的解决,诱导过程中涉及的外源基因的整合可能会破坏基因组的功能,胚胎注射生成的后代能否发育正常以及能否实现生殖系转移也将影响运用此方法制作转基因动物的效率。同时对于大型哺乳动物而言,其获得的诱导多能性干细胞是否具有多能性,目前还缺乏可以做对照标准的胚胎干细胞,用于做转基因动物还需要不断的探索。

运用精原干细胞来制作转基因动物可以克服以上 3 种方法的不足之处,并且已在小鼠和大鼠上获得成功^[18-21]。精原干细胞可以通过 2 种方式来获得转基因动物,一种是在体外培养使其逐渐转变为多能性生殖干细胞,再对多能性生殖干细胞进行基因组修饰,通过胚胎注射的方法获得含有生殖系转移的后代,再经过杂合体后代之间交配,从而获得纯种的转基因后代(图 1)。目前在小鼠方面此方法仅有嵌合体后代的报道,尚无对多能性生殖干细胞进行基因组改造来产生转基因后代^[6-7,22]。另一种方法是通过精原干细胞移植的方法来制作转基因后代,这种方法得益于小鼠及大鼠精原干细胞体外长期培养体

系的建立以及睾丸注射方法^[23-24]的产生,从而能够在体外对精原干细胞进行长期培养,使得对其进行基因组改造得以实现。对将基因组改造后的精原干细胞进行药物筛选后,注射到除去内源精原干细胞的小鼠的睾丸的曲细精管内,启动外源精原干细胞的精子发生过程,与雌鼠交配后即可获得杂合体后代,再通过杂合体之间的交配就可获得纯种的转基因或基因敲除后代。

精原干细胞用于制作转基因动物在小鼠和大鼠上的成功,使得人们看到有希望运用此方法来获得大型哺乳类转基因动物。然而运用此方法制作大型转基因动物,目前还比较困难。主要有两方面的原因,一方面是目前还没有体外长期培养大动物精原干细胞的理想培养体系,使得较难获得充足的基因组改造后的可供异体移植的精原干细胞。另一方面是对精原干细胞向多能性生殖干细胞自然转变的机制知之甚少,自然转变的时间较长,不太容易控制大型动物精原干细胞体外的培养条件使之倾向于向多能性生殖干细胞转化。

然而近年来随着对精原干细胞的深入研究,对 SSCs 自身的自我更新及分化的调节机制有了较深入的了解。GDNF 被认为是调节精原干细胞增殖及分化的最为关键的生长因子,通过激活 Ras/ERK1/2 信号通路,来促进精原干细胞的增殖^[25]。BMP4 通过下调 *cdh 1* 和上调 *kit* 基因使得精原干细胞粘附性下降和趋于分化^[26]。而 ERK1/2 信号通路和 BMP4 对小鼠胚胎干细胞的作用却刚好相反,这些研究表明精原干细胞与胚胎干细胞在维持自我更新方面存在很大不同。这些结果有利于研究精原干细胞向多能性生殖干细胞自然转变的机制。同时精原干细胞在大型动物猪、牛和羊实现了异体移植。这些研究都为通过精原干细胞的方法制作大型转基因动物奠定了基础,相信在未来几年内这方面研究会有突破性进展。

4 小 结

生殖干细胞正在以其独有的特性吸引着人们越来越多的关注。这是由于生殖干细胞在实际应用上存在其它类型的细胞所不具有的优点。对于生产转基因动物而言,尤其是大型哺乳类动物(如猪、牛和羊)将目的基因整合到生殖干细胞里,供体可以不断地产生含目的基因的精子,从而与雌性个体交配,可以源源不断地产生转基因后代,可以提高转基因效率,对提高畜牧业生产和制作医学上大动物模型有重大意义。

诱导多能性生殖干细胞不仅可以用于制作转基因动物,更可以用于再生医学治疗人类组织损伤或功能缺陷性疾病。胚胎干细胞具有分化为各种组织细胞的潜能,可以很好地被用于再生医药,然而胚胎干细胞来自于胚胎,用于人类疾病治疗存在伦理道德和法律的约束。iPS 细胞有望成为胚胎干细胞的替代品用于再生医药,从而克服胚胎干细胞所存在的伦理道德问题。然而,当前通过体细胞诱导获得的 iPS 细胞,需要外源基因的插入,存在不安全性,要实现临床应用还需要较长的时间。生殖干细胞很好的避开了这些问题,近年来的研究表明生殖干细胞可以在体外的培养条件下自然转化为类胚胎干细胞,不需要任何外源的转录因子的参与。因此对生殖干细胞的研究,无疑会加快转基因动物及再生医药的发展,并提高运用干细胞对人类疾病的临床治疗的可行性。

参考文献:

- [1] Dym M. Expression of c-kit receptor and its autophosphorylation in immature rat type A spermatogonia [J]. *Biol Reprod*, 1995, 52(1): 8-19.
- [2] Paniagua R, Nistal M. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty [J]. *J Anat*, 1984, 139 (Pt 3): 535-552.
- [3] Wu X. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(51): 21672-21677.
- [4] Culty M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009, 87(1): 1-26.
- [5] Wu Z. Capacity for stochastic self-renewal and differentiation in mammalian spermatogonial stem cells [J]. *J Cell Biol*, 2009, 187(4): 513-524.
- [6] Kanatsu-Shinohara M. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis [J]. *Cell*, 2004, 119(7): 1001-1012.

- [7] Guan K. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis [J]. *Nature* 2006 440(7088): 1199 – 1203.
- [8] Kanatsu – Shinohara M. Long – term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells [J]. *Biol Reprod* ,2003 69(2): 612 – 616.
- [9] Conrad S. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis [J]. *Nature* 2008 456(7220): 344 – 349.
- [10] Kuijk E W ,Colenbrander B ,Roelen B A. The effects of growth factors on in vitro – cultured porcine testicular cells [J]. *Reproduction* 2009 138(4): 721 – 731.
- [11] Aponte P M. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro [J]. *Reproduction* 2008 136(5): 543 – 557.
- [12] Cheng G S ,Feng T. Studies on spermatogonial stem cells cultured in vitro of Wuzhishan Mini Porcine [J]. *生物工程学报* , 2006 22(4): 689 – 93.
- [13] Ryu B Y. Conservation of spermatogonial stem cell self – renewal signaling between mouse and rat [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 102(40): 14302 – 14307.
- [14] Kanatsu – Shinohara M. Long – term culture of male germline stem cells from hamster testes [J]. *Biol Reprod* ,2008 78 (4): 611 – 617.
- [15] Robertson E B A , Kuehn M , Evans M. Germ – line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector [J]. *Nature* , 1986 323(6087): 445 – 458.
- [16] Kawamata M ,Ochiya T. Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2010 107(32): 14223 – 14228.
- [17] Kou Z. Mice cloned from induced pluripotent stem cells (iPSCs) [J]. *Biol Reprod* 2010 83(2): 238 – 243.
- [18] Nagano M. Retrovirus – mediated gene delivery into male germ line stem cells [J]. *FEBS Lett* ,2000 475(1): 7 – 10.
- [19] Nagano M. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ – line stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2001 98(23): 13090 – 13095.
- [20] Kanatsu – Shinohara M , Toyokuni S , Shinohara T. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ line stem cells in vivo [J]. *Biol Reprod* 2004 71(4): 1202 – 1207.
- [21] Hamra F K. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ – line stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2002 99(23): 14931 – 14936.
- [22] Ko K A. – B M , Kim J , Stehling M , et al. Conversion of adult mouse unipotent germline stem cells into pluripotent stem cells [J]. *Nat Protoc* 2010 5(5): 921 – 928.
- [23] Brinster R L , Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ – cell transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1994 91(24): 11298 – 11302.
- [24] Brinster R L , Avarbock M R , Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1994 91(24): 11303 – 11307.
- [25] He Z. Gdnf upregulates c – Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation [R]. *Stem Cells* 2008 26(1): 266 – 278.
- [26] Carlomagno G. BMP4 – Induced Differentiation of a Rat Spermatogonial Stem Cell Line Causes Changes in Its Cell Adhesion Properties [R]. *Biol Reprod* , 2010. on line.