

人原始生殖细胞的特化和表观遗传重编程研究进展

樊春彪 奥旭东 于海泉*

(内蒙古大学实验动物研究中心, 呼和浩特 010070)

摘要 原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)起源于原肠胚阶段, 是生殖细胞的前体细胞, 由特定细胞经过一系列分子调控特化而成。PGCs完成特化后迁移进入生殖嵴, 在迁移过程中存在一系列的表观遗传修饰的动态变化, 包括DNA甲基化和组蛋白修饰等。PGCs迁移的后期会发生两性分化, 迁入生殖嵴的PGCs影响原始性腺的发育。有关小鼠PGCs特化、迁移/增殖和两性分化等的机制已得到了广泛研究, 而在人类中则由于伦理以及材料获取困难等因素还有待更深入的研究。该文综述了人原始生殖细胞(human PGCs, hPGCs)的特化机制、表观遗传调节在其特化和迁移过程中的作用以及hPGCs对性腺形成的影响。

关键词 人原始生殖细胞; 特化机制; 表观重编程

Specification and Epigenetic Reprogramming of Human Primordial Germ Cells

Fan Chunbiao, Ao Xudong, Yu Haiquan*

(Research Center for Laboratory Animal Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China)

Abstract Primordial germ cells (PGCs) are undifferentiated germ line cells in embryos, which emerged at early stages of embryonic development and were induced for PGCs specification by a unique gene regulatory network. After they specification, PGCs migrate into the developing gonads from ectoderm. Along with their migration, there occurred dynamic changes in PGCs, including epigenetic modifications, such as DNA methylation and histone modifications. After reaching the genital ridge, PGCs cooperate with somatic cells and influence the development of the primordial gonads. The specialization, migration/proliferation and sex-specific development of PGCs have been studied extensively in mouse. While due to the narrow cognition of ethic and the difficult to obtain the cells, there is still lack of knowledge about human germ cell development. Here, we reviewed the latest advances in PGCs specification, epigenetic reprogramming in human and its impact on the development of primordial gonads.

Keyword human primordial germ cells; mechanism for specification; epigenetic reprogramming

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是精子和卵子的前体细胞, 具有较高的多能性。Chiquoine^[1]于1954年在小鼠体内首次发现PGCs。他发现, 在小鼠7.25天胚胎(E7.25)的尿囊基部产

生了一类生殖系细胞, 具有高碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)活性并能够产生精子和卵子。在过去的几十年里, 小鼠一直是研究哺乳动物PGCs特化机制和表观遗传重编程过程的模型^[2-3]。小鼠原始

收稿日期: 2016-12-19 接受日期: 2017-03-26

国家自然科学基金(批准号: 31460311)和内蒙古自然科学基金重大项目(批准号: 2016ZD01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-3679879, E-mail: haiquan_yu@163.com

Received: December 19, 2016 Accepted: March 26, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31460311) and the Inner Mongolia Natural Science Foundation (Grant No.2016ZD01)

*Corresponding author. Tel: +86-471-3679879, E-mail: haiquan_yu@163.com

网络出版时间: 2017-05-22 10:44:45

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170522.1044.002.html>

生殖细胞(mouse PGCs, mPGCs)的特化从其胚胎着床后约E6.25开始。此时,小鼠胚胎的少数外胚层细胞开始表达PRDM1(PR domain zinc-finger protein 1, 也称BLIMP1)、PRDM14和AP2 γ [activate protein 2 γ , 由*Tfap2c*(transcription factor AP-2 gamma)编码],它们共同组成核心调控网络指导mPGCs的发育。到E7.25时初始的40多个mPGCs在尿囊基部形成,随后沿着小鼠胚胎的后肠开始迁移,在E11.5进入生殖嵴。mPGCs在其迁移过程中要同时进行重编程过程,消除其体细胞的表观遗传痕迹,包括全基因组DNA去甲基化、印记基因擦除、X染色体重激活和染色质重修饰。在E13.5时,雄性和雌性的生殖细胞的有丝分裂发生阻滞,进入减数分裂时期,这就标志着生殖细胞的PGCs阶段结束^[3-5]。

随着最近几年小鼠生殖生物学的突飞猛进,人PGCs(human primordial germ cells, hPGCs)发育机制的研究也取得了一些新的突破。但是,对人类早期着床后胚胎的直接研究有悖伦理,因此,hPGCs特化的精确时间没有mPGCs清楚^[6]。目前,对人类生殖细胞系发育的理解仍主要基于小鼠方面的研究,并辅以人类免疫组化的分析。但是也有研究表明,hPGCs和mPGCs的特化机制存在很大的差异,因此,小鼠模型并不能很好地反映hPGCs的特化过程和机制^[7-9]。hPGCs最早出现在第四周(约E24),在外胚层卵黄囊壁附近的尿囊中形成,同mPGCs E8的位置相似,此时hPGCs完成特化。特化后的hPGCs开始迁移,期间hPGCs不断增殖并发生一系列的表观遗传修饰的动态变化,其中包括DNA甲基化和组蛋白修饰等^[7-8]。在第六周初(约E37),hPGCs迁移并植入早期生殖嵴,此时hPGCs已初步分化。分化后的hPGCs与原始性腺相互作用进入配子发育阶段,这就意味着hPGCs阶段结束^[9]。

本文综述了hPGCs特化过程中的信号通路和基因调控网络,以及hPGCs表观遗传学研究进展,同时,也回顾了分化后的hPGCs对原始性腺影响的最新进展,以期为基础生物学研究以及医学发展有所帮助。

1 hPGCs的特化研究

人及大多数非啮齿类哺乳动物的胚胎在E7~E8着床,着床后其外胚层远离滋养层形成羊膜腔^[6]。随后,其外胚层和中胚层底部压平成圆形双层胚盘,夹在充满液体的羊膜腔和卵黄囊(原囊胚)之间。羊

膜和卵黄囊分别起源于外胚层和内胚层形成的羊膜上皮细胞和卵黄囊上皮细胞。在E16,胚胎发生原肠作用的同时原条在胚盘后端形成并延伸横跨半个胚层到达前端。增殖的外胚层细胞沿原条发生上皮间质转化并迁移到外胚层和原始内胚层之间的空间中,从而产生中胚层,此时三胚层形成。mPGCs的特化发生在原肠胚形成之前的外胚层后端,依赖于多能性因子和复杂的信号相互作用。目前,对于初期hPGCs的研究大多集中于人胚胎干细胞(human embryo stem cells, hESCs)体外诱导形成的人PGCs样细胞(human PGC like cells, hPGCLCs)。研究表明,hPGCs可能起源于原肠胚形成中胚层的前体,而不同于小鼠^[10-11]。在hPGCs的特化过程主要受SOX17(SRY-box 17)、PRDM14(PR-domain-containing 14)和POU5F1(POU class 5 homeobox 1)等的调节,因此,在PGCs建立方面,人类和小鼠存在机制上的差异。

1.1 内胚层因子SOX17的关键作用

免疫组化和最新的RNA测序(RNA-seq)研究表明,hPGCs保留了一套核心基因,这些基因对小鼠生殖细胞的发育必不可少^[2-3]。核心基因包括:特化基因(如*PRDM1*和*Tfap2c*)、生殖细胞特异性基因[如*NANOS3*(nanos C2HC-type zinc finger 3)、*DND1*(dead end homologue 1)、*DAZL*(deleted in azoospermialike)和*DDX4*(DEAD box polypeptide 4)]、多能性基因[如*NANOG*(nanog homeobox)、*POU5F1*和*DPPA3*(developmental pluripotency associated 3)]^[12]。通过精确比较小鼠和人类PGCs表达谱发现,小鼠和人类存在明显的差异。例如,hPGCs缺乏核心多能性基因SOX2[SRY(sex determining region)-box 2],但是表达内细胞团(inner cell mass, ICM)自身相关多能性因子TFCP2L1(transcription factor CP2 like 1)和KLF4(kruppel like factor 4)。此外,hPGCs还表达一些谱系特化分子,如滋养层调节因子TEAD4(TEA domain transcription factor 4)和内胚层调节因子SOX17^[13]。

在这些差异中,hPGCs中SOX2的缺失及内胚层特异性蛋白SOX17的存在是值得注意的。在mPGCs中SOX2是其增殖所必需的,而SOX17则是可有可无的^[14]。虽然,SOX17和SOX2同属于SRY相关HMG(high mobility group)盒转录因子家族,但是它们属于不同亚科,因此,SOX17在hPGCs特化过程中

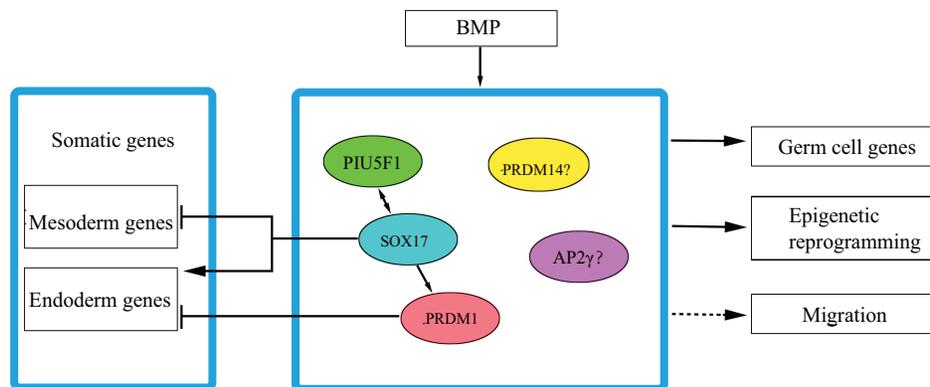
的作用是不能被SOX2替换的。SOX2, 连同SOX1和SOX3都属于SOXB1亚科, 在胚胎多能性的维持及神经外胚层分化过程中具有关键作用。SOX17, 连同SOX7和SOX18同属于SOXF亚科, 是胚胎内胚层分化、胎儿造血和心血管的发育必不可少的因子。此外, SOX17在小鼠多能性维持和细胞重编程上不能取代SOX2。事实上, 在小鼠ES细胞(embryonic stem cell)中, SOX17的过表达可诱导内胚层分化, 使其丧失多能性。相比之下, 与SOX2密切相关的SOXB1亚科成员SOX1和SOX3, 可以取代SOX2作为多能性维持和神经元分化的调控分子。需要注意的是, 所有的SOXB1家族(即SOX1、SOX2和SOX3)在hPGCs中是不存在的。这就表明, hPGCs的特化不需要SOXB1家族的介导。

SOX17是hESCs特化为hPGCLCs过程中第一个上调的转录因子^[15]。SOX17敲除的hES细胞不能特化为hPGCLCs, 这一过程可以通过SOX17的过表达来恢复。SOX17的敲除影响了PRDM1的表达, 这就表明, PRDM1位于SOX17的下游。与小鼠相同, PRDM1的缺失会影响hPGCs发育基因的表达, 并对关键转录因子的表达(如SOX17、AP2 γ 和POU5F1)产生轻度影响。人类PRDM1的缺失会引起内胚层基因, 如GATA4(GATA binding protein 4)、GATA6和FOXA2(forkhead box A2)表达的上调, 这就提示,

PRDM1具有抑制内胚层基因的作用。总之, PRDM1对生殖细胞的程序发生和体细胞基因的抑制起重要作用, 它们可能是由上游的BMP(bone morphogenetic protein)信号通路和SOX17诱导的(图1)^[16]。PRDM1也可能通过抑制DNMT3B(DNA methyltransferase 3B)来开启全基因组去甲基化。

1.2 POU5F1和SOX17相互作用

SOX17是如何参与人类生殖细胞命运建立的呢? SOX17在个体发育过程中扮演着不同角色, SOX17通过与其伴侣的转录因子结合作用于相邻的DNA序列调节其转录活性^[17]。在不同细胞中, SOX17相互作用的分子可能不同。多能性因子POU5F1是一个已知的与SOX17相互作用的分子。目前认为, 在人类和小鼠的ES细胞中POU5F1与SOX2相互作用维持细胞多能性。在人类原始内胚层分化过程中, POU5F1启动的蛋白质从SOX2到SOX17, 这与mESCs不同。研究表明, SOX17-POU5F1可以作为内胚层基因的增强子并明显激活它们的表达, 指导原始内胚层的命运。小鼠中, SOX17-POU5F1的一个靶蛋白是PRDM1。在人的生殖潜能细胞中, 生殖细胞基因和内胚层基因首先激活SOX17-POU5F1, 然后再激活潜在的下游靶位点PRDM1, 然后激活生殖细胞基因, 同时抑制内胚层基因与其他体细胞基因。SOX17在hPGCLCs



在hPGCs中, SOX17是特化的关键, 而且其位于PRDM1表达的上游。SOX17诱导PRDM1抑制内胚层基因, PRDM1与POU5F1相互作用抑制外胚层基因而激活内胚层基因。SOX17和PRDM1共同介导hPGCs形成, 而AP2 γ 和PRDM14在hPGCs中的作用尚待明确。目前还不清楚, BMP信号是否直接或间接地通过其他转录因子激活SOX17。箭头和钝尾箭头分别代表激活和抑制, 虚线箭头表示还未经过验证。

In hPGCs, SOX17 is critical for specification and is located upstream of PRDM1 expression. SOX17 induces PRDM1 to inhibit endoderm genes whereas PRDM1 interacts with POU5F1 to inhibit ectoderm genes and activate endoderm genes. Together, SOX17 and PRDM1 establish the hPGCs programme and the role of AP2 γ and PRDM14 in hPGCs remains to be clarified. It is unclear whether the BMP signal activates SOX17 directly or indirectly through other transcription factors. Arrows and blunt arrows indicate activation and suppression, respectively. Dotted arrows have not been verified.

图1 hPGCs特化基因调控网络

Fig.1 Gene regulatory network models for hPGCs specification

分化中快速下调和在hPGCs缺失可能抑制SOX17-POU5F1相互作用且抑制神经外胚层分化。合适剂量的SOX17和POU5F1也可能对hPGCs的命运起重要作用, 作为转录因子表现出剂量依赖性指导分化。虽然, 在hPGCs中PRDM1抑制内胚层因子, 但它也在原始内胚层表达, 这些现象表明, PRDM1的抑制作用是环境依赖性的^[15]。另一个SOX基因家族蛋白SOX15也在hPGCs和mPGCs中高表达。SOX15是唯一的SOXG亚家族成员, 和SOX2在mESCs中共同表达。在mESCs中, SOX15与POU5F1以物理方式相互作用并共享一些相同的靶位点。然而, 在mESCs中SOX15缺失不会影响其多能性的维持。除了一些SOX家族蛋白质外, 滋养层特异性蛋白质AP2 γ 和TEAD4、转录因子NANOG、TFCP2L1和KLF4, 都在hPGCLCs早期表达。它们在hPGCLCs特化过程中潜在的功能和相互作用还需要进一步研究。

1.3 PRDM14的作用

PRDM14在生殖潜能细胞中高度表达, 而在BMP2和BMP4诱导hESCs形成hPGCLCs过程中迅速下降, 此后在特化的hPGCLCs中适量表达^[16,18]。PRDM14是hESCs细胞核心多能性通路中不可或缺的成分, 抑制其表达可能引起hESCs多能性的丧失。研究表明, PRDM14在hESCs分化过程中的过表达会抑制三胚层基因的上调, 例如, T转录因子(T brachyury transcription factor)、MIXL1(mix paired-like homeobox)、GATA4和PAX6(paied box 6)。条件敲除实验表明, hPGCLCs特化过程可能不需要PRDM14, 但该结果仍需得到后续证明。在小鼠中, PRDM14的上调能够抑制DNA甲基转移酶DNMT3A和DNMT3B的表达, 这就说明, PRDM14能够促进广泛的DNA去甲基化, 但它在hPGCs中的作用尚不清楚^[19-20]。性腺hPGCs的DNA去甲基化结果显示, PRDM14主要表达于细胞质中, 呈低的异源性表达。此外, 即使PRDM14存在于细胞核中, hESCs仍高表达DNMT3A和DNMT3B, 且其基因组仍然高度甲基化。因此, PRDM14可能对hPGCs发育并不是非常重要。当转染mESCs时, 人PRDM14可以代替鼠PRDM14挽救因PRDM14基因敲除导致的mESCs缺陷。这表明, PRDM14在两个物种中存在高度的保守性, 且人PRDM14的行为取决于精确的相互作用和细胞环境。在人类生殖系发育中的PRDM14悖论尚未完全解决。

2 hPGCs迁移中的表观遗传调节研究

hPGCs特化后, 需要经过后肠迁移到生殖嵴中继续发育, 期间PGCs进行增殖并经历一系列表观遗传重编程过程。其中, 包括与亲本印记基因相关的DNA去甲基化、性别特异性基因的重塑及印记擦除过程中的组蛋白修饰。由于取材等因素限制, hPGCs表观重编程多以小鼠模型为基础进行推论, 并辅以相关实验来证明^[6]。

2.1 广泛的DNA去甲基化

PGCs最初的全基因组甲基化水平与其前体的外胚层细胞相似, 目前对它们所具备的全基因组DNA去甲基化机制仍所知甚少。尽管大量动物DNA主动去甲基化潜在的机制已经被提出, 但仍尚未有令人信服的证据证明是负责全基因组DNA去甲基化^[21]。例如, 有证据表明, AID(activation-induced cytidine deaminase)和APOBEC1(apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 1)可将5-甲基胞嘧啶(5mC)通过脱氨作用转化为T(胸腺嘧啶), 形成T:G(鸟嘌呤)不匹配, 进而形成糖基化酶如TDG(thymine DNA glycosylase)和MBD4(methyl-CpG binding domain protein 4)的靶位点, 造成碱基切除错配修复(base excision mismatch repair, BER)^[22]。虽然AID^{-/-}的PGCs全基因组DNA甲基化有一定程度衰减, 但仍有AID和APOBEC1的表达, 并且AID^{-/-}小鼠可育(通过纯合子之间的交配使AID^{-/-}小鼠子代中保持多代), 表明AID在生殖细胞发育中的作用很小^[23]。

最近的证据表明, TET(ten-eleven translocation)酶作用于5mC形成的5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)也在DNA去甲基化的过程中起重要作用。TET酶(TET1、TET2和TET3)氧化5mC形成5hmC和其他下游衍产物, 随后被酶分解, 或被甲基胞嘧啶取代, 或在复制中被动稀释^[24]。小鼠E9.5~E11.5胚胎中TET1和TET2均上调, 同时, 在mPGCs中也观察到瞬时大量的5hmC增加和5mC减少。然而, 敲除实验表明, 生殖系DNA的去甲基化在很大程度上仍然可以独立于TET1和TET2发生。同时又有研究表明, TET1和TET2与有效印记基因擦除和生殖细胞分化过程中减数分裂基因的启动有明显的关系^[25]。

最近, 三个独立的研究表明, hPGCs整体的DNA去甲基化动力学与小鼠类似^[26-28]。在5周时, hPGCs迁移到后肠并表现出比相邻体细胞较低的5mC水平。在8周时, hPGCs进入生殖嵴, DNA甲基化水平

降到最低约4.5%。两性生殖细胞(由hPGCs表面标记KIT分离,又名SCFR^[29]) 在19周时呈现出低甲基化状态,介导两性分化。小鼠大约9周龄时雌性生殖细胞进入减数分裂期,雄性生殖细胞进入有丝分裂静止期。免疫组织化学研究表明,KIT阳性很少出现在小鼠生殖细胞中,因此这是hPGCs所特有的。在人出生之前和小鼠中相同,其卵原细胞可能维持低水平甲基化,但目前尚不清楚是否先于雄性生殖细胞在19周开始的去甲基化^[30-31]。

与mPGCs相同,hPGCs的DNA去甲基化伴随着UHRF1(ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1)、DNMT3A和DNMT3B的抑制。此外,hPGCs具有瞬时5hmC高水平,并伴随着TET1和TET2上调。研究表明,在hPGCs到达生殖嵴之前其大多数的印记基因已完成去甲基化,说明人类印记基因的擦除早于小鼠。

2.2 部分印记基因的保留

尽管在PGCs中存在广泛的DNA去甲基化,但在hPGCs和mPGCs中的一些基因位点则“逃避”了这一过程。在这两个物种中,绝大多数“逃避”与反转录转座元件有关。尤其是一些新的和潜在的反转录转座子,如小鼠中的*iap*和人的*SVA*(sine-vntr-*alu*),它们都保持相对高水平的甲基化,这样就有助于抑制去甲基化发生^[32-33]。同时,这种“逃避”现象也发生在着丝粒卫星重复序列和端粒端处,这些区域的DNA甲基化的保留对维持染色体的稳定性和确保有丝分裂过程中适当的染色体排列和隔离有重要作用;研究表明,少数单拷贝序列也能“逃避”DNA去甲基化。在人类中,多重序列广泛分布在基因组中,包括在启动子、结构基因和增强子。一些“逃避”基因是只在大脑中表达参与神经分化,而另一些基因则广泛表达,如昼夜节律调节酪蛋白激酶1delta(casein kinase 1 delta, *CSNK1D*)。这些重复序列逃避的功能仍有待确定,特别是那些位于调控区域的基因。

有研究认为, DNA去甲基化“逃避”现象的存在表明, DNA甲基化途径在PGCs中并非完全抑制。在hPGCs和mPGCs中, DNMT1仍高水平表达,但DNMT3A、DNMT3B和UHRF1不能被检出。DNMT1一直被认为是维持DNA甲基化水平的关键酶,但最近在体内和体外的研究表明, DNMT1具有在未甲基化位点从头甲基化的活性^[34]。因此, DNMT1

可能独立于UHRF1维持逃避位点的甲基化。在人类中,“逃避”现象多发生于H3K9me3和KAP1(KRAB associated protein 1, 又称TIF1 β)的结合位点,暗示DNMT可能通过KRAB-ZFP(KAP1-Krüppel-associated box zinc-finger protein)来共同阻遏完成针对性的“逃避”^[34]。KRAB-ZFP的锌指结构域与特定的DNA序列结合,为异染色质的形成招募HDACs、组蛋白甲基转移酶SETDB1和/或DNMT1。在人类中有约400个KRABZFPs,其可能与不同的DNA结合,拥有不同的靶位点。例如,ZFP91和ZFP93分别抑制人类SVA反转录转座子,而ZFP57维持印记位点甲基化。许多KRABZFPs在hPGCs高表达,并可能参与募集DNMT1为反转录转座子和单拷贝逃避DNA去甲基化。piRNA(piwi-interacting RNA)途径也可能参与反转录转座子的甲基化过程。值得注意的是,PRDM9已被证明对减数分裂重组是必不可少的,这表明在生殖细胞发育过程中KRABZFPs可能还有其他重要的功能^[35-36]。

2.3 组蛋白甲基化水平的动态变化

组蛋白修饰的全序列分析与单个基因的染色质免疫沉淀分析表明,PGCs和ES细胞都具有H3K27ac修饰,其作用主要是防止分化和维持干细胞特性^[26,37]。此外,H3K27me3集中于在与PGCs分化和发育功能相关基因位点,这就提示,H3K27ac和H3K27me3在PGCs中各自发挥抑制分化的作用。在PGCs中,H3K27me3主要富集在转座重复元件处,包括短散布元件(short interspersed nuclear elements, SINEs)和长散布元件(long interspersed nuclear elements, LINEs),这意味着在相对低甲基化时,该修饰对维持PGCs的DNA转座子是十分重要的。H3K27me3同时还富集在免疫系统激活相关基因,如MHC(major histocompatibility complex)基因簇,这种富集的生理意义目前尚不清楚^[38]。

虽然,这些组蛋白修饰的重要性仍然未知,但一些研究结果表明,这些修饰可能作用于PGCs^[39]。在缺乏PRDM14的PGCs中,H3K9me2的减少和H3K27me3的增加不会出现,并且这些PGCs阻滞于E12.5或完全消失。这些结果表明,这两种组蛋白修饰的同时减少和增加对PGCs的特化与发育起关键作用。H3K27组蛋白去甲基化酶(ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on X chromosome, UTX)的研究也表明,H3K27me3是

PGCs发育的重要修饰。UTX缺乏导致异常的组蛋白修饰和PGCs不能正常发育。在UTX缺乏的PGCs中, H3K27me3在E10.75及时下调不能发生, 且四个多能性因子NANOG、SAL4、POU5F1和SSEA-1(rhodanese-like domain-containing protein-1)不能表达, 同时, PGCs中特异性表达DDX4的正常细胞很少, 而这些异常PGCs不能发育成精子。

H3K9me2的减少可能参与PGCs特异性基因的诱导。在ES细胞中, 转录因子MAX(MYC associated factor X)、H3K9组蛋白甲基转移酶、GLP(alpha-glycerophosphate oxidase)和G9A(euchromatic histone lysine methyltransferase 2)的共同作用可以防止生殖细胞相关基因的激活^[40-41]。如果在ES细胞中干扰MAX, 使其表达降低, PGCs特异基因启动子区的H3K9me2会减少, 从而导致未分化的ES细胞开始表达那些PGCs特异性基因。这些结果表明, H3K9me2可以作为在多能干细胞中防止生殖细胞基因表达的表观遗传屏障, 并且H3K9me2缺失可增加PGCs特异性基因表达。

在减数分裂的配子细胞中, 激活H3K4甲基化是重要的。PRDM9是一种组蛋白H3K4三甲基化酶, 其过表达会影响转录的激活^[42]。PRDM9在早期减数分裂的生殖细胞中特异性表达(胚胎卵巢和成人睾丸)。PRDM9裸鼠分析显示, 它是同源染色体在减数分裂前期联会和重组的必要组成。随后的研究也表明, PRDM9在减数分裂重组中通过结合重组热点直接发挥了重要的作用^[43]。

3 hPGCs对性腺形成的作用

在PGCs迁移过程中, 生殖嵴细胞开始表达WT1(wilms tumor protein homolog 1), 其促进生殖嵴的增厚、组织形成和发育。此外, WT1还参与PGCs的增殖和分化。在性腺发育和生殖器官发生过程中EMX2(empty spiracles homeobox 2)也发挥了重要作用^[44]。与此同时, 另一个性腺发育因子LHX9(LIM/homeobox protein L9)也调节体细胞增殖。目前没有证据证明, EMX2和LHX9直接参与卵母细胞的发生。在E12.5, mPGCs迁入未分化的生殖嵴后经过快速有丝分裂, 分裂到3 000个左右。到E14.5, 卵巢中有大约有18 000个卵原细胞。有丝分裂期后不久, SF1(steroidogenic factor 1)、RSPO1(R-spondin 1)、Wnt4、 β -catenin、DAX1、CYP11A1(cytochrome P450

family 11 subfamily A member 1)和CYP26B1等分化因子开始调控。在卵巢形成过程中, RSPO1在激活Wnt4/ β -catenin信号通路起重要作用。Wnt4/ β -catenin的上调抑制CYP11A1的表达延缓类固醇产生, 促进雌性分化因子FOLLISTATIN(follistatin S homeolog)和DAX1的表达。DAX1能够抑制类固醇生成并且在STRA8(stimulated by retinoic acid 8)刺激下激活类固醇生成。在雄性中, 通过CYP26B1基因的上调, 抑制视黄酸合成实现性别决定。此外, CYP26B1还抑制依赖STRA8的减数分裂和不依赖于STRA8的有丝分裂, 促进雄性配子分化。

性腺原基在人类胚胎发育32 d后出现, 由尿生殖嵴分化得到并成对地依附于中肾腹侧。在这个阶段, 可以区分性别差异的形态, 但是生殖细胞的前体尚未出现。中肾是肾上腺原基和泌尿系统的前体。在小鼠中通过几种转录因子基因的敲除可以看出, 中肾调控的紊乱会导致泌尿生殖道的多发畸形并破坏生殖嵴发育、肾上腺和其他结构。在原始性腺形成过程中, WT1和SF1起重要作用。当小鼠WT1敲除后会导致肾脏、性腺和肾上腺不能正常形成。在人体中敲除与WT1相同功能的LOF(loss-of-function)后, 结果会导致男孩泌尿生殖器畸形以及WAGR综合征、Deny-Drash或Frasier综合征。SF1缺失的小鼠, 其性腺和肾上腺停止发育, 而在人类的相应LOF突变影响较小, 仅是微小的性腺表型改变以及肾上腺皮质功能不全。怀孕第五周后, 来自三种不同谱系的细胞共同发育形成性腺原基^[45-46]。在这个阶段, hPGCs已经完成由细胞外基质蛋白质引导下沿着后肠背肠系膜迁移进入生殖嵴中。两性生殖细胞的缺少对性腺的发育存在差异。在男性胚胎中, 生殖细胞缺乏时, 仍然可以由类固醇激素激活分化体细胞包括间质细胞。受影响的男性胚胎会经历青春期的发育, 但成年后会导致Sertoli-cell-only综合征。在女性胚胎中, 性原细胞的存在影响女性性腺原基进一步分化。在性原细胞缺失的情况下, 滤泡细胞退化会导致形成没有功能的性腺。进入性腺的hPGCs持续增殖到第十周, 此时雄性胚胎进入有丝分裂期阻滞期而雌性胚胎进入减数分裂前期。

4 小结

近期发表了大量关于体外hPGCLCs的特化及体内hPGCs的研究报道, 这使得人们能够更加深入

地了解人类生殖系的发育机制。PGCs的特化及其基因调控网络在人和小鼠这两个物种内大致相同,但仍存在一些明显的差异。如SOX17作为一个独特的关键因子参与hPGCs的特化,而在mPGCs的特化过程中则可有可无。hPGCs和mPGCs的表观遗传重编程过程是相似的,但是其调节存在时间上的差异,在hPGCs到达生殖嵴前大多数的印记基因已经完成了广泛的去甲基化,这早于小鼠。在PGCs表观遗传重编程过程中,生殖系中的一些单拷贝基因或逆转录转座子“逃避”DNA去甲基化的命运可能与基因的稳定性相关,并且可以遗传给后代。hPGCs和mPGCs类似,进入生殖嵴后会影响到生殖腺的发育。

经过十几年的研究,人们对hPGCs的了解越来越多,但仍有许多问题没有解决。如在PGCs特化过程中,虽然BMP信号等调节在人和小鼠的生殖细胞诱导中具有保守的作用,但是其基因调控网络还是存在一些明显的差异,二者之间的差异还有待阐明。表观遗传调节对PGCs特化和迁移作用是当前研究的热点,对有关表观遗传重编程和减数分裂基因的表达调节研究还有待在hPGCLCs和迁移模型上证实。此外,调控网络在性腺形成中的作用还有待深入研究。这些问题的解决有利于加深对hPGCs的认识,有望成为干细胞的另一个重要替代来源。

参考文献 (References)

- 1 Chiquoine AD. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 1954; 118(2): 135-46.
- 2 Nikolic A, Volarevic V, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. Primordial germ cells: Current knowledge and perspectives. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 1-8.
- 3 Matsui Y, Mochizuki K. A current view of the epigenome in mouse primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 2014; 81(2): 160-70.
- 4 Saitou M, Yamaji M. Primordial germ cells in mice. *Bibliotheca Anatomica* 2012; 4(24): 59-66.
- 5 Xuemei L, Jing Y, Bei X, Juan H, Xinling R, Qun L, *et al.* Retinoic acid improve germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Iran J Reprod Med* 2013; 11(11): 905-12.
- 6 Tang WW, Kobayashi T, Irie N, Dietmann S, Surani MA. Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nat Rev Genet* 2016; 17(10): 585-600.
- 7 de Felici M. The formation and migration of primordial germ cells in mouse and man. *Results Probl Cell Differ* 2016; 58: 23-46.
- 8 Leitch HG, Tang WW, Surani MA. Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals. *Curr Top Dev Biol* 2013; 104: 149-87.
- 9 Holt JE, Stanger SJ, Nixon B, McLaughlin EA. Non-coding RNA in spermatogenesis and epididymal maturation. *Adv Exp Med Biol* 2016; 886: 95-120.
- 10 Blakeley P, Fogarty NM, Del Valle I, Wamaitha SE, Hu TX, Elder K, *et al.* Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development* 2015; 142(20): 3613.
- 11 Pastor William A, Chen D, Liu W, Kim R, Sahakyan A, Lukianchikov A, *et al.* Naive human pluripotent cells feature a methylation landscape devoid of blastocyst or germline memory. *Cell Stem Cell* 2016; 18(3): 323-9.
- 12 Skinner DE, Rinaldi G, Suttiprapa S, Mann VH, Smircich P, Cogswell AA, *et al.* Vasa-like DEAD-box RNA helicases of schistosoma mansoni. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(6): e1686.
- 13 Baumann K. Stem cells. Human primordial germ cells in a dish. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16(2): 68.
- 14 Nettersheim D, Heimsoeth A, Jostes S, Schneider S, Fellermeier M, Hofmann A, *et al.* SOX2 is essential for *in vivo* reprogramming of seminoma-like TCam-2 cells to an embryonal carcinoma-like fate. *Oncotarget* 2016; 7(30): 47095-110.
- 15 Irie N, Weinberger L, Tang WC, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS, *et al.* SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 2015; 160(1/2): 253-68.
- 16 Bayne RA, Donnachie DJ, Kinnell HL, Childs AJ, Anderson RA. BMP signalling in human fetal ovary somatic cells is modulated in a gene-specific fashion by GREM1 and GREM2. *Mol Hum Reprod* 2016; 22(9): 622-33.
- 17 Stefanovic S, Abboud N, Desilets S, Nury D, Cowan C, Puceat M. Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: A molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate. *J Cell Biol* 2009; 186(5): 665-73.
- 18 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. *Nature Genetics* 2008; 40(8): 1016-22.
- 19 Antonucci I, Di Pietro R, Alfonsi M, Centurione MA, Centurione L, Sancilio S, *et al.* Human second trimester amniotic fluid cells are able to create embryoid body-like structures *in vitro* and to show typical expression profiles of embryonic and primordial germ cells. *Cell Transplant* 2014; 23(12): 1501-15.
- 20 Carofino BL, Ayanga B, Tracey LJ, Brooke-Bisschop T, Justice MJ. PRDM14 promotes RAG-dependent Notch1 driver mutations in mouse T-ALL. *Biol Open* 2016; 5(5): 645-53.
- 21 Gavin DP, Chase KA, Sharma RP. Active DNA demethylation in post-mitotic neurons: A reason for optimism. *Neuropharmacology* 2013; 75: 233-45.
- 22 Zhao H, Chen T. Tet family of 5-methylcytosine dioxygenases in mammalian development. *J Hum Genet* 2013; 58(7): 421-7.
- 23 Kumar R, DiMenna L, Schrode N, Liu TC, Franck P, Munoz-Descalzo S, *et al.* AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature* 2013; 500(7460): 89-92.
- 24 Hackett JA, Zyllicz JJ, Surani MA. Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends Genet* 2012; 28(4): 164-74.
- 25 Nettersheim D, Heukamp LC, Fronhoffs F, Grewe MJ, Haas N, Waha A, *et al.* Analysis of TET expression/activity and 5mC oxidation during normal and malignant germ cell development.

- PLoS One 2013; 8(12): 828-81.
- 26 Guo F, Yan L, Guo H, Li L, Hu B, Zhao Y, *et al.* The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells. *Cell* 2015; 161(6): 1437-52.
- 27 Tang WW, Dietmann S, Irie N, Leitch HG, Floros VI, Bradshaw CR, *et al.* A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. *Cell* 2015; 161(6): 1453-67.
- 28 Gkountela S, Zhang KX, Shafiq TA, Liao WW, Hargancalvopiña J, Chen PY, *et al.* DNA demethylation dynamics in the human prenatal germline. *Cell* 2015; 161(6): 1425-36.
- 29 Gkountela S, Li Z, Vincent JJ, Zhang KX, Chen A, Pellegrini M, *et al.* The ontogeny of cKIT⁺ human primordial germ cells proves to be a resource for human germ line reprogramming, imprint erasure and *in vitro* differentiation. *Nat Cell Biol* 2013; 15(1): 113-22.
- 30 Bendtsen E. Number of germ cells and somatic cells in human fetal ovaries during the first weeks after sex differentiation. *Hum Reprod* 2005; 21(1): 30-5.
- 31 Bendtsen E, Byskov AG, B.Laursen S, E.Larsen HP, Andersen C, Westergaard L. Number of germ cells and somatic cells in human fetal testes during the first weeks after sex differentiation. *Hum Reprod* 2003; 18(1): 13.
- 32 Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, *et al.* The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell* 2012; 48(6): 849-62.
- 33 Guibert S, Forné T, Weber M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res* 2012; 22(4): 633-41.
- 34 Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem Sci* 2014; 39(7): 310-8.
- 35 Baudat F, Buard J, Grey C, Fledel-Alon A, Ober C, Przeworski M, *et al.* PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* 2010; 327(5967): 836-40.
- 36 Jacobs FM, Greenberg D, Nguyen N, Haeussler M, Ewing AD, Katzman S, *et al.* An evolutionary arms race between KRAB zinc-finger genes ZNF91/93 and SVA/L1 retrotransposons. *Nature* 2014; 516(7530): 242-5.
- 37 Thieme S, Gyarfás T, Richter C, Ozhan G, Fu J, Alexopoulou D, *et al.* The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis. *Blood* 2013; 121(13): 2462-73.
- 38 Mansour AA, Gafni O, Weinberger L, Zviran A, Ayyash M, Rais Y, *et al.* The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* 2012; 488(7411): 409-13.
- 39 Ng JH, Kumar V, Muratani M, Kraus P, Yeo JC, Yaw LP, *et al.* *In vivo* epigenomic profiling of germ cells reveals germ cell molecular signatures. *Dev Cell* 2013; 24(3): 324-33.
- 40 Brinkman AB, Gu H, Bartels SJ, Zhang Y, Matarese F, Simmer F, *et al.* Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res* 2012; 22(6): 1128-38.
- 41 Walter M, Teissandier A, Pérezpalacios R, Bourc'His D. An epigenetic switch ensures transposon repression upon dynamic loss of DNA methylation in embryonic stem cells. *Elife* 2016; 5: 114-8.
- 42 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.
- 43 Parvanov ED, Petkov PM, Paigen K. Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* 2011; 327(5967): 835-35.
- 44 Racca JD, Chen YS, Yang Y, Phillips NB, Weiss MA. Human sex determination at the edge of ambiguity inherited XY sex reversal due to enhanced ubiquitination and proteasomal degradation of a master transcription factor. *J Biol Chem* 2016; 291(42): 22173-95.
- 45 Mak W, Fang C, Holden T, Dratver MB, Lin H. An important role of pumilio 1 in regulating the development of the mammalian female germline. *Biol Reprod* 2016; 94(6): 134.
- 46 McLaren A, Findlay JK, Drummond AE. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Endocrinol* 2000; 163(163): 3-9.