

Stra 8 基因的激活与精原干细胞的特异性分化研究

Activation of *Stra 8* Gene During the Differentiation of Spermatogonial Stem Cells

李 巍, 窦忠英, 华进联, 王华岩*

LI Wei, DOU Zhong-Ying, HUA Jin-Lian and WANG Hua-Yan*

西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心 杨凌 712100

Northwest A & F University, Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering & Technology Center, Yangling 712100, China

摘 要 视黄酸对维持正常的雄性睾丸结构和功能起着重要的作用。近来的研究发现,在雄性生殖腺发育过程中有一组基因,它们可以被视黄酸特异性的诱导活化,称为 *Stra* (Stimulated by Retinoic Acid) 基因。从鼠源分离得到的 *Stra 8* 基因编码一种细胞质蛋白,该基因只特异性的在成熟雄性生殖细胞中表达,其功能被认为与精子形成有关。为研究 *Stra 8* 基因的表达特性,我们从小鼠的基因组中克隆了 *Stra 8* 基因的启动子序列(1.4kb)。将 *Stra 8* 基因的 1.4kb 启动子序列克隆到 pEGFP-1 载体的 EGFP 基因之前,构建成由 *Stra 8* 基因 1.4kb 启动子序列调控表达绿色荧光蛋白的 p*Stra8*-EGFP 载体。将其分别转化到不同类型的细胞中,如小鼠 ES-129 细胞、人胎儿胰腺干细胞、小鼠骨髓间充质干细胞和小鼠精原干细胞等,通过荧光显微镜观察发现,绿色荧光蛋白只在小鼠精原干细胞中表达,表明 *Stra 8* 基因是组织特异性表达的基因。将 p*Stra8*-EGFP 转化小鼠骨髓间充质干细胞,经 G418 筛选 2 周后,用视黄酸诱导,12h 培养后,有一部分转化 p*Stra8*-EGFP 载体的细胞表达绿色荧光蛋白。RT-PCR 证明这些细胞中有精原干细胞特异表达基因 *Stra 8* 的转录,还有生殖细胞特异表达基因 *CyclinA8* 和 *Oct4* 的转录,这些结果说明小鼠骨髓间充质细胞经视黄酸的诱导可以向生殖细胞方向分化。

关键词 视黄酸, p*Stra8*-EGFP, 骨髓间充质干细胞, 精原干细胞

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0639-06

Abstract Retinoic acid plays an important role in maintaining the structure and function in male testis. Recent studies showed that there is a group of genes that can be specially activated by retinoic acid during the development of male reproductive gland. The gene *Stra 8* (Stimulated by Retinoic Acid) was one of the gene in this group. In mouse, *Stra 8* is restrictively expressed in male germ line cells and its function is related to the development of sperm. In order to investigate the feature of *Stra 8* gene expression, the 1.4kb (- 1407 ~ + 7) promoter region of *Stra 8* gene was amplified from mouse genomic DNA. The DNA fragment was then cloned into a promoter less vector to form the construct that contained the 1.4kb promoter region, and the reporter gene of EGFP that was regulated by 1.4kb *Stra 8* promoter. To investigate the specificity of *Stra 8* promoter, the vector p*Stra8*-EGFP was transfected into undifferentiated mouse stem cells such as ES-129, bone marrow mesenchymal stem cell (mMSC) and spermatogonial stem cell (mSSC). The results showed that the expression of GFP was only observed in the mSSC cells, which indicated that *Stra 8* gene was specially regulated in testis tissue. As the gene marker, vector p*Stra8*-EGFP was then transfected to undifferentiated mMSC cells. After being selected by G418 for 2 weeks, the mMSC cells were induced by retinoic

Received: December 20, 2006; Accepted: February 8, 2007.

This work was supported by the grants from the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2005AA21905), the Key Program of National Ministry of Education (No. 0316), and the Sci-Tech Research Development Program of Shaanxi Province (No. 2006KZ05-G1).

* Corresponding author. Tel: 86-29-87080068, Fax: 86-29-87080068, E-mail: hhwang101@163.com

国家高技术研究发展计划(863)(No. 2005AA21905), 教育部重大项目(No. 0316)和陕西省科技研究发展计划项目(No. 2006KZ05-G1)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

acid. After 12 hours induction, some induced cells started to express GFP protein, which was observed under the fluorescence microscope. At the same time, several stem cell specificity biomarkers such as *Oct4*, and spermatogonial stem cell biomarkers such as *CyclinA2* and *Stra8* were detected in the induced cells by RT-PCR method. These results showed that the mMSCs would differentiated to spermatogonial stem cells after induced by Retinoic Acid.

Key words retinoic acid, pStra8-EGFP, mesenchymal stem cells, spermatogonial stem cells

根据广泛临床调查显示,在世界范围内不孕不育症困扰着 13% 以上的育龄夫妇^[1]。越来越多的证据显示,男性原因引起不育的情况在不断地增加,已占达到近半数的比例。男性不育的原因是生殖细胞不能正常分化和增殖,导致精子产生的数量下降。因此,如何能提高男性生殖细胞的活性,成了解决男性不育问题的关键。

通过干细胞的手段来治疗人类的疾病是目前非常活跃的研究领域,有着广阔的前景。成体骨髓干细胞应用于临床治疗也已经有较长的时间了^[2]。越来越多的证据表明,在骨髓中除了造血干细胞之外,还有内皮干细胞和骨髓间充质干细胞等成体干细胞。成体骨髓源的骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能,在一定条件下能分化为多种不同组织的细胞,如骨细胞、肝脏细胞、心肌细胞,甚至脑细胞等等^[3-4]。

视黄酸为脊椎动物的生殖所必需,在雄性体内,视黄酸对于维持睾丸组织的正常结构和功能发挥着重要的作用。缺乏视黄酸将导致精子产生的停滞和曲细精管组织的退化^[5]。另有报道称,视黄酸对原始生殖细胞的存活和增殖也有影响^[6]。

Nayernia 等人用小鼠 P19 畸胎瘤干细胞作为模型,分离出一些由视黄酸诱导表达的基因片段,称之为“*Stra*”(Stimulated By Retinoic Acid)系列基因,*Stra8* 基因是其中之一^[7-11]。实验证明,*Stra8* 基因的表达仅限于小鼠胚胎发生过程中的生殖腺和成年雄性的减数分裂前生殖细胞^[12]。用含有 *Stra8* 基因启动子(1.4kb DNA 片段)和绿色荧光蛋白的载体制作的转基因小鼠只在睾丸部位有绿色荧光蛋白的表达,说明 1.4kb 启动子具有组织特异性表达特性,由它启动绿色荧光蛋白的表达可以作为细胞向生殖细胞分化的早期标志^[12]。

本实验成功诱导骨髓间充质干细胞向精原干细胞分化,成功构建了 pStra8-EGFP 载体,经转化后,小鼠精原干细胞表达绿色荧光蛋白,而小鼠 ES-129 细胞、人胎儿胰腺干细胞、小鼠骨髓间充质干细胞不表达。转化 pStra8-EGFP 载体的小鼠的骨髓间充质干细胞在视黄酸诱导前不表达绿色荧光蛋白,经 RA 诱导后表达绿色荧光蛋白。表明小鼠骨髓间充质干细胞具有向精原干细胞分化的能力,而且 pStra8-EGFP

载体特异性标记了向精原干细胞方向分化的细胞,为下一步通过流式细胞仪从定向诱导分化的骨髓间充质干细胞中分选出能用于治疗的精原干细胞打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肌肉组织取材于昆明系雄性小鼠,小鼠精原干细胞从 6~8 日龄的昆明系雄性新生小鼠和 8~10 周龄昆明系雄性小鼠中分离得到。血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;pMD-18T 载体购自 TaKaRa 公司,pEGFP-1 购自 BD Biosciences 公司;小鼠 ES-129 细胞是北京大学干细胞研究中心赠送,小鼠成纤维细胞和人胎儿胰腺干细胞由本实验室分离,C418 购自 Sigma 公司,细胞裂解液,反转录试剂盒等购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 *Stra8*-EGFP 载体的构建 根据基因文库中小鼠 *Stra8* 基因启动子序列设计出一对引物(序列见表 1)。以小鼠的肌肉组织为材料,提取基因组 DNA,然后用 PCR 方法从基因组 DNA 中扩增出 1.4kb *Stra8* 基因的启动子片段。PCR 反应采用 50 μ L 的反应体系,反应进行 34 个循环,其中包括:94 $^{\circ}$ C 变性 45s,65.3 $^{\circ}$ C 退火 45s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min。后经电泳和胶回收目的 DNA 片段,再克隆到 pMD-18T 载体中。因为这个 1.4kb 启动子的上游有一个单一 *Bgl* II 的酶切位点,同时 pMD-18T 载体上有一个 *Eco*RI 酶切位点,因此可以用 *Bgl* II 和 *Eco*RI 双酶切判断插入片段的方向,然后选择插入方向正确的 pStra8-MD18T。再用 *Hind*III 和 *Sac*I 双酶切下目的片段,将其连接到启动子检测载体 pEGFP-1 上。同时将克隆的 DNA 片段作序列分析测定。

1.2.2 细胞的分离培养 为了获得小鼠精原干细胞,在无菌条件下摘取 3~6 日龄小鼠的睾丸组织,用含青霉素和链霉素各 200IU/mL 的 PBS 浸泡 3min,然后用含青霉素和链霉素各 100IU/mL 的 PBS 洗 2 遍。先在实体显微镜下用异物针剥去睾丸表面的包膜,分离出曲细精管。然后将组织剪碎,吸至离心管中,1000r/min 离心 5min,弃上清,接着先用 0.05% trypsin 消化 10min,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养。

胶原酶Ⅳ在 37℃ 下消化 30min(每隔 5min 涡旋一次) ,再用 0.25% 胰酶 + 0.08% EDTA 消化 5min ,而后加入等量 DMEM + 10% NBS 终止酶反应。用 100 目滤纱过滤组织消化液 ,得到的原代细胞在 DMEM + 10% NBS 的培养液中培养。细胞培养到第 5 天时培养液半量换液 ,以后每隔 3d 进行一次半量换液。培养 12d 左右 ,可观察到细胞开始明显增殖 ,支持细胞逐渐老化。可以传代培养。传代需要用成纤维细胞(MEF)做饲养层。

小鼠 ES-129 细胞的培养需要先用 MEF 细胞做饲养层。MEF 在用丝裂酶素处理 4h 后 ,吸去培养液 ,加 0.25% 胰酶 + 0.08% EDTA 37℃ 消化 3min ,然后加入等量的 DMEM 培养液中中和酶反应。再 1000r/min 离心 5min ,弃上清 ,重悬 ,记数 ,而后接种于已铺明胶的平皿中 ,每个 6cm 的平皿接种约 2×10^6 个细胞 ,12h 后将 ES-129 细胞以每个 6cm 平皿 3×10^5 个细胞的密度接种于饲养层上。ES-129 的培养液用高糖的 DMEM + 15% FCS ,其他成分包括 :0.1mmol/L β -巯基乙醇 ,2mmol/L 谷氨酰胺 ,0.01mmol/L 非必须氨基酸 ,10ng/mL LIF ,100IU 青霉素 + 100IU 链霉素。

小鼠骨髓间充质干细胞的分离培养是在无菌条件下 ,取 8 ~ 10 周成年雄性小鼠的股骨 ,先用含青霉素和链霉素 200IU/mL 的 PBS 浸泡 3min ,然后用含青霉素和链霉素各约 100IU/mL 的 PBS 冲洗两遍 ,剪成小段 ,用注射器吸取培养液 DMEM + 10% NBS 冲洗骨髓中的细胞 ,再用 100 目的滤纱过滤 ,DMEM +

10% NBS 37℃ 5% CO₂ 培养。3d 后半量换液 ,以后每 3d 半量换液 ,细胞增殖至 80% 时进行传代。

1.2.3 用 pStra8-EGFP 载体转化小鼠骨髓间充质干细胞 :用 0.25% 胰酶 + 0.08% EDTA 消化(37℃ , 5min)小鼠的骨髓间充质干细胞 ,DMEM + 10% NBS 终止消化 ,1000r/min 离心 5min ,弃上清 ,DMEM + 10% NBS 重新悬浮细胞 ,以 $0.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ /孔的密度接种于 24 孔板。将 2 μ L 的 Lipofectin 2000 与 48 μ L 的 DMEM(无血清)混合为溶液 I ,将含 0.8 μ g pStra8-EGFP 或 p α Actin-EGFP^[13,14] 或 pCMV-EGFP 与 DMEM 培养液混合成 50 μ L 的溶液 II ,室温放置 5min 后 ,将上述两种溶液再混合成 100 μ L 的溶液 ,室温放置 20min。细胞接种 12h 后 ,每孔加入 100 μ L 上述配好的溶液(溶液 I + 溶液 II)。每个实验作 3 个重复。

1.2.4 经转化小鼠骨髓间充质干细胞的筛选和诱导 :小鼠的骨髓间充质干细胞在转化 48h 后 ,换 DMEM + 10% NBS + 350ng/mL G418 的培养液培养。以后每 3d 换一次溶液 ,持续筛选两周 ,然后用 DMEM + 10% NBS + 10^{-6} mol/L 视黄酸进行诱导分化。处理 12h 后 ,在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。

1.2.5 RT-PCR 检测 :经视黄酸诱导的小鼠骨髓间充质干细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化 ,100 μ L DEPC 处理的 PBS 洗 1 遍 ,加入 10 μ L 细胞裂解液 ,提出总 RNA。然后做 RT-PCR 反应。PCR 所用的引物序列分别列于表 1 中。

表 1 应用在本实验中的 PCR 引物
Table 1 The primers used in this study

Name	Sequence	Mer	T _m /℃
Stra8 Promoter	Sense : 5'-CTTGCTCCAAGGGGTAAGGTGTA-3'	25	65.3
	Anti-sense : 5'-CGACTGCCCGTCGCAGAATAAGAAG-3'	25	
Stra8 Coding region	Sense : 5'-TCACAGCCTCAAAGTGGCAGG-3'	21	65
	Anti-sense : 5'-GCAACAGAGTGGAGGAGGAGT-3'	21	
CyclinA2	Sense : 5'-CACCTCGAGGCATTCCGG-3'	18	60
	Anti-sense : 5'-CGGGTAAAGACAGCTGC-3'	19	
Oct4	Sense : 5'-ATCTGCTGAAGCAGAAGAGG-3'	20	56.5
	Anti-sense : 5'-GGTTCTCATTGTTGTCGGCT-3'	20	

2 结果

2.1 构建 pStra8-EGFP 载体

用 PCR 方法 ,将 Stra8 基因的 5' 端非编码区 1.4kb DNA 片段从小鼠肌肉组织的基因组 DNA 中扩增得到(图 1A)。对此序列进行分析的结果表明 ,所得片段与已知发表的序列有 99% 的同源性。该片段中不仅包括 -10 区 Pribnows Box 和 -35 区的 Sextama box 等保守区 ,上游还含有许多干细胞特异性因子 ,如 ES

细胞自我更新维持因子 Nanog、干细胞特异性标记基因 Oct4、干细胞多能性维持基因 Sox2 等。将 1.4kb DNA 片段先克隆到 pMD-18T 载体上 ,然后用 BglⅡ和 EcoRⅠ双酶切判断片段的插入方向。根据实验设计 ,因为在 pMD-18T 载体多克隆位点上游 29 处有一个 EcoRⅠ位点 ,在目的片段 + 231 处有一个 BglⅡ位点 ,所以如果插入的方向正确 ,可切出一个 267bp 大小的片段(图 1B)。将目标 DNA 片段从克隆载体上切下后 ,再连接到不含启动子的 pEGFP 载体上构成 pStra8-

EGFP 载体(图 1C)。新构建的载体 pStra8-EGFP 含有 1.4kb *Stra8* 基因启动子,该启动子可特异性的调控绿色荧光蛋白基因 EGFP 在精原干细胞中的表达。其结构模式图见图 1D。

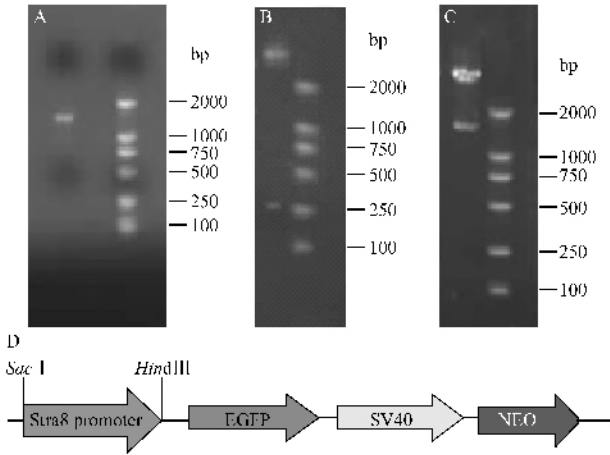


图 1 电泳结果和载体模式图

Fig.1 The results of electrophoresis and the mode chart of the construct

A: 1.4kb promoter of *Stra8*, which was purified from agarose gel after PCR; B: double digestion to analysis if the 1.4kb promoter of *Stra8* inserted in the right way; C: agarose gel analysis of pStra8-EGFP after digesting by restriction endonuclease; D: schematic representation of the pStra8-EGFP fusion gene showing 1.4kb promoter region of mouse *Stra8* gene linked to the coding region of EGFP.

2.2 载体转化与表达

为了检验所构建的载体能否正常工作,将 pStra8-EGFP 载体分别转化小鼠 ES-129 细胞、人胎儿胰腺干细胞和小鼠骨髓间充质干细胞。结果显示在未经诱导的情况下,三种转化了 pStra8-EGFP 的细胞都不表达绿色荧光蛋白,这表明 *Stra8* 启动子不论是在胚胎干细胞还是在成体干细胞中都不能活化。为进一步证明 *Stra8* 启动子细胞特异性活化的特性,我们分别将含有非特异性启动子的 pCMV-EGFP,含有心肌细胞特异性启动子的 pActin-EGFP 以及 pStra8-EGFP 等三个载体转化到小鼠原代培养的睾丸组织细胞中。结果显示,作为阳性对照的转化了 pCMV-EGFP 载体的细胞在转化 12h 后出现绿色荧光蛋白强阳性表达,其中不论是多角型的支持细胞还是圆形精原干细胞都表达绿色荧光蛋白(图 2A, B)。作为阴性对照的转化了 pActin-EGFP 载体的细胞在转化 12h 后,无绿色荧光蛋白的表达。将实验组载体 pStra8-EGFP 转化到原代培养的睾丸组织细胞中,12h 后,只有圆形的精原干细胞表达出绿色荧光蛋白(图 2C, D),而其他类型的转化细胞如成

纤维细胞和多角型的支持细胞都不表达绿色荧光蛋白。这个实验结果证明所构建的载体能够正常工作,同时进一步证明 *Stra8* 启动子只在精原干细胞中活化,调控表达目的基因。

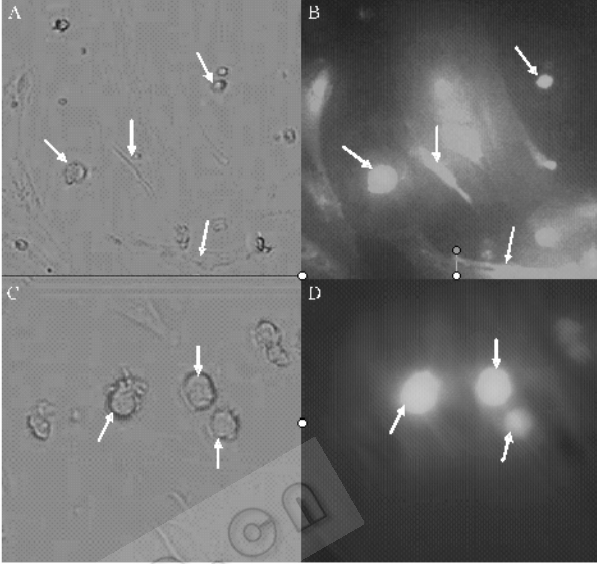


图 2 由 *Stra8* 启动子调控的绿色荧光蛋白在精原干细胞中的表达

Fig.2 The expression of GFP after transfecting the pCMV-EGFP and pStra8-EGFP to mSSCs

A and C were observed by ordinary microscope, and B and D were observed by fluorescent microscope. A and B were the mSSCs transfected with pCMV-EGFP; C and D were the mSSCs transfected with pStra8-EGFP.

2.3 诱导骨髓间充质干细胞向精原干细胞分化

为了检测小鼠骨髓间充质干细胞经视黄酸的诱导,是否向精原干细胞方向分化,将所构建的 pStra8-EGFP 载体转化骨髓间充质干细胞。经过两周 G418 药物筛选,得到稳定转化的细胞。然后,用视黄酸诱导转化的骨髓间充质细胞向精原干细胞的方向分化。当培养体系中加入诱导剂 12h 之后,可见少量细胞形态由骨髓间充质干细胞所固有的长梭形变为精原细胞所固有的圆形,在荧光显微镜下观察,部分圆形细胞表达了绿色荧光蛋白(见图 3 箭头所示),这说明经诱导的骨髓间充质细胞表达了精原干细胞所特异表达的基因。为进一步证明骨髓间充质细胞向精原干细胞的方向分化,我们除了采用一对 *Stra8* 引物之外,还用了精原干细胞特异性标记 *CyclinA2* 和干细胞标记 *Oct4* 等两个基因的引物做 PCR 分析。RT-PCR 检测结果表明,骨髓间充质干细胞在未被视黄酸诱导之前,不表达 *Stra8*、*CyclinA2* 和 *Oct4* 等基因。经视黄酸诱导 12h 后,可以检测到 *Stra8*、*CyclinA2* 和 *Oct4* 等基因的表达,表明细胞已开始向

精原干细胞分化(如图 4 所示)。

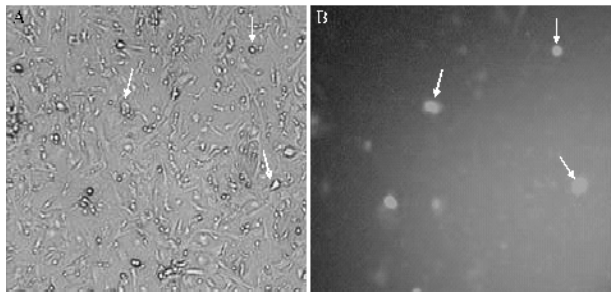


图 3 由 Stra8 启动子调控的绿色荧光蛋白在诱导后的骨髓间充质细胞中的表达

Fig.3 The expression of GFP of mMSCs ,which were transfected with pStra8-EGFP after induced by retinoic acid for 12 hours

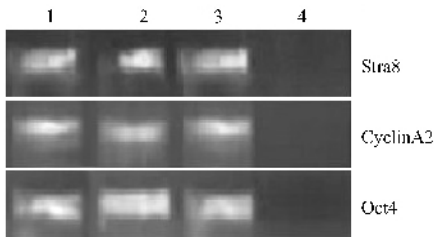


图 4 用 RT-PCR 方法检测骨髓间充质细胞分化为精原干细胞后 Stra8 ,CyclinA2 和 Oct4 的表达

Fig.4 RT-PCR shows the transcription of Stra8 ,CyclinA2 and Oct4 Lane 1 was the result of RT-PCR of mMSCs ,which were not transfected with pEGFP-Stra8 after induced by retinoic acid ;Lane 2 was the result of RT-PCR of mMSCs after induced by retinoic acid ; Lane 3 was the result of RT-PCR of mMSCs as the positive control ; Lane 4 was the result of RT-PCR of mMSCs which was not induced by retinoic acids .

3 讨论

近年来的一些研究证明 ,ES 细胞和畸胎瘤细胞经体外诱导 ,如用视黄酸诱导 ,可以形成类似于早期生殖细胞的群落 ,将这些细胞进行体内移植或是体外的培养 ,将会向生殖细胞方向分化 ,使不孕不育的治疗和生殖细胞的发生过程的研究展现出空前的前景^[12 ,15 - 17]。可是 ,由于受取材方面的制约 ,胚胎干细胞要应用于临床还有很长的路要走^[18]。

2006 年 Nayernia 等人构建了 Stra8-EGFP 载体 ,通过原核注射的方法制作了转基因小鼠。分离 8 ~ 10 周龄的转基因小鼠的骨髓间充质干细胞 ,经传代培养后 ,用视黄酸诱导 ,有约 3% 的细胞表达绿色荧光蛋白。然后通过荧光激活细胞分选的方法分选到这些发荧光的细胞 ,经检测 ,这些细胞表达早期生殖细胞特异性表达的基因。他们的研究证明了雄性骨髓间充质干细胞可以向生殖细胞方向分化^[19]。本实验在参考了 Nayernia 等人的实验的基础上 ,在实

验方法上作了改进。本实验构建了含有 Stra8 基因特异性启动子和绿色荧光蛋白编码序列的 pStra8-EGFP 载体 ,证明了其特异性。然后分离普通小鼠的骨髓间充质干细胞 ,转化 Stra8-EGFP 载体 ,经 G418 筛选两周后 ,再用视黄酸诱导 ,12h 后可出现表达绿色荧光蛋白的圆细胞 ,RT-PCR 也检测到 Stra8、CyclinA2 和 Oct4 的表达 ,这些结果进一步证明了视黄酸能诱导骨髓间充质干细胞向精原干细胞分化。此外 ,通过本实验的方法也能获得被绿色荧光蛋白标记的原始生殖细胞 ,为进一步用流式细胞仪分选可用于治疗雄性不育的成体干细胞打下基础。

由于本实验所用的骨髓间充质干细胞是直接取材于正常小鼠 ,而不是转基因小鼠 ,使得用于向精原干细胞 ,以至最终向雄性生殖细胞诱导的骨髓间充质干细胞具有个体特异性。因此也就更接近于应用 ,特别是对于人类男性不育的临床治疗。另外 ,Nayernia 等人用转基因小鼠的骨髓间充质细胞向生殖细胞方向诱导分化实验时 ,将分选到的表达绿色荧光蛋白的细胞做体内移植后 ,细胞分化至减数分裂前的生殖细胞时 ,就会发生“停滞”现象 ,即细胞不再继续分化^[19]。而用 P19 向生殖细胞诱导的时候不会出现这种现象。出现“停滞”现象的原因目前还不清楚 ,如果是由于转基因小鼠的骨髓间充质干细胞中 ,由于基因组中插入了外源基因 ,使得某些基因的表达受到了抑制 ,那么 ,取材于正常小鼠的骨髓间充质干细胞将会使这一问题得到解决。

到目前为止 ,已经有了很多关于由干细胞诱导分化为生殖细胞的报道。Hubner 等人用小鼠胚胎干细胞诱导分化为卵母细胞^[17] ;Geijsen 等人由小鼠胚胎干细胞在体外得到了雄性生殖系细胞^[15] ;Toyooka 等人用 Mvh 位点的基因敲除的小鼠胚胎干细胞诱导分化得到了原始生殖细胞^[16] ;Nayernia 等人用 P19 细胞诱导分化为精子细胞^[1]。包括本研究在内的这些研究 ,不仅为研究生殖细胞和体细胞的分化过程中基因的功能和体细胞和生殖细胞之间的关系提供了理论基础 ,而且对于建立新型繁殖工程 ,特别是对于男性不育的治疗方面 ,也有着重大的意义。

REFERENCES (参考文献)

[1] Nayernia K , Li M , Jaroszynski L , et al . Stem cell based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells . *Human Molecular Genetics* 2004 ,13 (14) :1451 - 1460 .

[2] Srour EF , Jetmore A , Wolber FM , et al . Homing cell cycle kinetics and fate of transplanted hematopoietic stem cells . *Leukemia* 2001 ,

- [3] Grove JE ,Bruscia E ,Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004 **22**(4): 487 – 500.
- [4] Jiang Y ,Jahagirdar BN ,Reinhardt RL , *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002 , **418**(6893) :41 – 49.
- [5] Thompson NJ ,Mc CJ ,Howell ,Pitt GAJ. Vitamin A and reproduction in rats. *Proceedings of the Royal Society of London . Series B , Biological Sciences* ,1964 **159**(976) 510 – 535.
- [6] Koshimizu U ,Watanabe M ,Nakatsuji N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro* . *Developmental Biology* ,1995 **168**(2) :683 – 685.
- [7] Bouillet P ,Oulad-Abdelghani M ,Vicaire S , *et al.* Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene ,Stra1 (mouse LERK-2/Eplg2). *Developmental Biology* ,1995 **170**(2) : 420 – 433.
- [8] Bouillet P ,Chazaud C ,Oulad-Abdelghani M , *et al.* Sequence and expression pattern of the Stra7 (Gbx-2) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Developmental Dynamics* ,1995 **204**(4) 372 – 382.
- [9] Oulad-Abdelghani M ,Bouillet P ,Chazaud C , *et al.* AP-2. 2 : a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Experimental Cell Research* ,1996 **255**(2) 338 – 347.
- [10] Roy B ,Taneja R ,Chambon P. Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RA receptor a (RAR α) ,RAR β , or RAR γ -selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand. *Molecular and Cell Biology* ,1995 **15**(12) :6481 – 6487.
- [11] Taneja R ,Thisse B ,Rijli F , *et al.* The expression pattern of the mouse receptor tyrosine kinase gene MDK1 is conserved through evolution and requires Hoxa-2 for rhombomere-specific expression in mouse embryos. *Developmental Biology* ,1996 **177**(2) 397 – 412.
- [12] Oulad-Abdelghani M ,Bouillet P ,Decimo D , *et al.* Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8 ,a novel retinoic acid-responsive gene. *The Journal of Cell Biology* ,1996 **135**(2) :469 – 477.
- [13] Shotaro K ,Takehide M ,Hiromicki K , *et al.* Regulation of transcription of the Dnmt1 gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins. *European Journal of Biochemistry* 2002 **269**(12) 2961 – 2965.
- [14] Philippen S ,Suske G. A tale of three fingers : the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Research* , 1999 **27**(15) 2991 – 3000.
- [15] Geijsen N ,Horoschak M ,Kim K , *et al.* Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* , 2004 **427**(6790) :148 – 154.
- [16] Toyooka Y ,Tsunekawa N ,Akasu R , *et al.* Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro* . *Proceedings of the National Academy of Science* 2003 **100**(20) :11457 – 11462.
- [17] Hubner K ,Fuhrmann G ,Christenson LK , *et al.* Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* ,2003 **300**(5623) :1251 – 1256.
- [18] Young HE ,Black AC. Adult stem cells. *The Anatomical Record* , 2004 **276**(1) :75 – 102.
- [19] Nayernia K ,Lee J ,Drusenheimer N , *et al.* Derivation of male germ cells from bonemarrow stem cells. *Laboratory Investigation* 2006 **86**(7) :654 – 663.