

· 述 评 ·

## 人类精子体外发生的研究展望

郭雪江\*

南京医科大学生殖医学国家重点实验室,组织与胚胎学系,江苏 南京 211166

**[摘要]** 精子发生(spermatogenesis)包括精原细胞的有丝分裂、精母细胞的减数分裂以及精子细胞的变形,是人体最复杂的细胞分化过程之一。其中人类男性个体进入青春期后才开始减数分裂之后的过程。一个世纪以来,科学家们一直在努力开发和优化能够在体外(*in vitro*)支持这一过程的培养体系。近年来,体外精子发生的研究取得了显著进展,根据目前所采用的研究方法,体外精子发生的相关研究主要可以分为细胞培养法和性腺组织培养法。体外精子发生系统的建立对于完善人类生殖生物学理论,不育相关环境因素的体外评价,以及生育力保存技术等均具有非常重要的意义。

**[关键词]** 精子发生;体外培养;干细胞;减数分裂

**[中图分类号]** R321.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)02-157-04

doi:10.7655/NYDXBNS20210201

### Prospects of studies of human *in vitro* spermatogenesis

GUO Xuejiang\*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Department of Histology and Embryology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** Spermatogenesis, including mitosis of spermatogonia, meiosis of spermatocytes and spermiogenesis of spermatids, is one of the most complicated cell differentiation processes in human body. The process of meiosis begins after puberty. For a century, scientists have been working on developing and optimizing culture systems that can support this process *in vitro*. In recent years, significant progress has been made in the study of *in vitro* spermatogenesis. The *in vitro* spermatogenesis can be achieved by *in vitro* cell culture and gonadal tissue culture. The establishment of *in vitro* spermatogenesis system is important for the development of theories of human reproductive biology, *in vitro* evaluation of infertility-related environmental factors, and technologies of fertility preservation.

**[Key words]** spermatogenesis; *in vitro* culture; stem cell; meiosis

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(02): 157-159, 180]

全球不孕不育症的发病率约为15%,其中男性因素导致的病例占50%<sup>[1]</sup>。在过去的几十年中,男性不育的发病率不断上升,影响大约7%的男性<sup>[2]</sup>。男性不育主要是由于精子发生障碍导致,临床表现为少、弱、畸形精子症以及无精子症。无精子症中的非梗阻性无精子症(nonobstructive azoospermia,

NOA)由于患者睾丸中严重的精子发生障碍,是男性不育中精子发生障碍最严重的一种疾病。NOA在男性不育患者中约占10%<sup>[3]</sup>,其中40%~50%的NOA患者无法被临床医生获取可以用于胞浆内单精子注射技术(intracytoplasmic sperm injection technique, ICSI)的功能性精子<sup>[4]</sup>。因此,NOA患者中部分睾丸活检可获得精原细胞,如能完成体外精子发生,则有望获得可用于辅助生殖的成熟精子。此外,在人类青春期前,精子发生尚未进入减数分裂阶段。儿童期肿瘤的放/化疗治疗可以导致生殖细胞的丢失。儿童肿瘤发病率为1.0‰~1.5‰,大约

**[基金项目]** 国家重点研发计划(2016YFA0503300);国家自然科学基金(81971439, 81771641)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: guo\_xuejiang@njmu.edu.cn

30%的患者由于肿瘤放疗或化疗会导致永久不育。对于儿童期放/化疗之前的生育力保存,由于保留的睾丸组织中生精细胞尚未进入减数分裂,没有形成成熟精子,利用体外精子发生技术完成体外精子发生以及睾丸组织重建精子发生,有着非常重要的意义<sup>[5]</sup>。对于挽救 NOA 患者的生育力及青春期前患者的生育力保存,目前临床尚无好的方法。因此,建立并维持一个稳定的体外精子发生体系,不仅将有助于上述问题的有效解决,还可以帮助丰富人类生殖生物学基础理论研究,评价药物的生殖安全性,为生育力重建提供方法。

精子发生是多步的骤复杂过程,包括在体细胞微环境帮助下,原始生殖细胞分化而来的精原细胞的有丝分裂,精母细胞的减数分裂以及精子细胞的变形产生蝌蚪状精子,上述任一过程的缺陷均会导致精子发生障碍。近一个世纪以来,科学家们一直努力尝试在体外重复上述过程,其中最关键的是通过体外减数分裂形成单倍体细胞。从体外精子发生的策略来说,可以分别从体外干细胞培养分化形成精子细胞,或者通过体外性腺组织培养形成精子细胞,本文围绕这两种策略进行了阐述与分析,并展望体外精子发生的应用前景与伦理挑战。

## 1 体外干细胞培养分化精子细胞

在体外干细胞分化精子细胞方面,已有很多的尝试和研究。在精原干细胞体外分化方面,2002年,Feng等报道了在缺乏支持细胞的情况下,将端粒酶永生化的小鼠A型精原细胞系进行体外分化,最终获得精母细胞和精子细胞。然而,这批由小鼠精原细胞培养得到的圆形精子细胞是否具有受精能力尚不清楚。2003年,Tanaka等报道了将无精子症患者的初级精母细胞与Vero细胞体外共培养,获得了具有23条染色体的单倍体圆形精子细胞,最高成功率约为10%。2014年,Yang等对隐睾来源的精原干细胞体外分化进行了研究,通过使用视黄酸(retinoic acid, RA)和干细胞因子(stem cell factor, SCF)培养后,隐睾患者精原干细胞(spermatogonial stem cell, SSC)中表达了许多减数分裂和减数分裂后的男性生殖细胞标志物,并最终获得单倍体精子细胞,但未能评价使人类卵子受精以及胚胎发育的能力。

在多能干细胞分化方面,Yang等成功将小鼠诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iP-SC)体外诱导分化为阳性表达VASA、c-Kit与SCP3

等生殖细胞标志物的生殖细胞。2015年,Sasaki等将人类多能干细胞经过早期中胚层样细胞(incipient mesoderm-like cell, iMeLC)诱导为人原始生殖细胞样细胞(human primordial germ cell-like cell, hPG-CLC)<sup>[6]</sup>。2016年,中科院动物研究所周琪院士与赵小阳教授,及南京医科大学生殖医学国家重点实验室沙家豪教授首次报道了小鼠胚胎干细胞体外完成减数分裂过程,获得功能性精子细胞的研究。该研究利用小鼠胚胎干细胞,通过诱导分化形成原始生殖细胞样细胞(primordial germ cell like cell, PG-CLC),并将PGCLC与睾丸体细胞(neonatal testicular somatic cell)在睾丸性激素的作用下进行体外共培养,观察到遗传印记的擦除(erasure of genetic imprinting)和染色体联会和重组(chromosomal synapsis and recombination),产生的单倍体精子样细胞(spermatid-like cell)具有正确的核DNA和染色体含量。在卵母细胞胞浆内注射精子样细胞,可产生有活力和可育的后代,表明该方法成功重建了体外雄性配子发生,为未来研究人类体外精子发生奠定了基础。

## 2 体外性腺组织培养诱导精子发生

组织培养法通常是利用多种方法培养组织碎片或小器官来完成体外精子发生的。体外组织培养的核心优势在于,当生殖细胞在体外生长时,用于培养的组织可以保持生殖细胞及体细胞的空间排列,可以最大限度地模拟睾丸组织的微环境。近一个世纪以来,人们进行了许多关于利用器官组织培养法进行生殖细胞培养的研究,最早的体外睾丸组织培养可以追溯到100年前。1920年,法国科学家Champy有史以来第一次报道了用器官组织培养法进行生殖细胞体外分化。1959年,Trowell发明了一种培养方法:将大鼠睾丸小管放在空腔玻片中,同时使用Eagle的最低基本培养基(minimum essential media, MEM),生精小管可存活6d。这一时期,体外睾丸组织培养的主要目标是维持睾丸组织的活力。尽管做出极大努力,但精子体外发生的研究进展不如期望,体外产生具有受精发育能力的单倍体精子细胞更是困难重重。

直到2011年,Yokonishi等用镊子将新生小鼠的睾丸组织分成2~8块,分别在3种不同的基础培养基(alpha-MEM、DMEM、StemPro-34-SFM)中培养,并辅以胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),利用琼脂糖凝胶支撑培养睾丸组织。所产生的精子细胞和精

子分别通过圆形精子细胞注射(round spermatid injection, ROSI)和ICSI成功产生了可存活的后代<sup>[7]</sup>。随后,在2012年,Sato等利用这项技术,将c-Kit配体(c-kit ligand, KitL)基因缺陷的不育小鼠睾丸组织进行体外培养,并且加入外源性的重组KITL蛋白,最终得到了可育精子,这项研究为遗传性精子发生缺陷患者开辟了新的治疗策略。并进一步使用成年小鼠睾丸组织进行培养,实验结果显示成熟成年小鼠睾丸组织的培养是有效的,可以从精原细胞诱导精子发生直到有效的单倍体细胞形成<sup>[8]</sup>。

然而,尽管经过一个世纪的努力,人睾丸器官发生的体外研究依然非常局限。直到2020年,本实验室课题组以及中科院动物研究所课题组实现了人类睾丸器官的体外精子发生体系构建<sup>[9]</sup>。这一人类睾丸类器官培养体系采用流产胎儿的生殖嵴,在体外成功建立了包含生精上皮和各级生殖细胞的培养体系,通过添加骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等细胞因子,最终获得了功能性精子。值得注意的是,上述3种因子都通过受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)通路发挥作用,提示激酶磷酸化通路在体外精子发生中的重要作用<sup>[10-11]</sup>。体外培养的单倍体精子细胞经历了减数分裂重组,达到了体外生殖细胞培养的金标准<sup>[12]</sup>,这些精子细胞能够使人类卵母细胞受精并支持随后的囊胚(blastocyst)形成。

### 3 挑战与展望

经过一个世纪的发展,体外精子发生已经取得了一定的进展。目前这一领域进入了一个挑战与机遇并存的时代。体外精子发生主要基于体外干细胞培养分化精子细胞或体外性腺组织培养诱导精子发生两种体系,无论采用何种方法,都需要获得生殖细胞,生殖细胞经历有丝分裂增殖、启动并完成减数分裂形成单倍体精子细胞。其中体外减数分裂产生单倍体精子细胞的过程最为关键,所以Handel等在2014年提出了体外减数分裂的一系列金标准,包括对减数分裂的同源染色体联会配对、同源重组的观察,染色体与DNA的含量和结构分析,以及单倍体细胞的功能评价<sup>[12]</sup>。对于体外培养获得的精子,可以通过分析染色体倍体和基因组完整性、表观遗传如印记基因甲基化模式建立、顶体等精子特有结构的形成,并评价精子支持胚胎发育

的能力,系统评价体外分化精子的功能。

体外精子发生在面临挑战的同时,也是一个充满机遇的新领域。一方面,由于模式动物并不能完全模拟人类精子发生过程,人类体外精子发生的研究将会进一步阐明人类生殖生物学的相关机制及环境因子和药物对生育力的影响。另一方面,人类男性青春期前,尚无精子的产生。青春期前儿童肿瘤的放疗和化疗会导致部分患者生育力的丧失。如果这部分青少年的睾丸组织可以被保存,并得以用于未来的体外精子发生培养,将对于这部分患者的不孕不育治疗提供巨大的帮助。此外,40%~50% NOA患者经睾丸活检无“单倍体”精子<sup>[4]</sup>,其中约20%患者为唯支持细胞综合征(sertoli cell only syndrome, SCOS)或仅存在精原干细胞或部分精母细胞等生精阶段早期的生殖细胞<sup>[4]</sup>,体外精子发生将有助于上述患者产生遗传学父子关系的子代。可以想像,不远的将来,在相关技术的支持和法规的监管下,科学家和医生可以直接通过微创手术获得不育患者的睾丸组织样本或者通过生育力保存的青春期前睾丸组织,通过体外培养方法获得单倍体精子,解决男性不育的难题。

### [参考文献]

- [1] EDMUND K, RANJITH R, DAMAYANTHI D, et al. An update on male infertility: factors, mechanisms, and interventions [J]. *Andrologia*, 2020, e13741, doi: 10.1111/and.13741
- [2] KRAUSZ C, RIERA-ESCAMILLA A. Genetics of male infertility [J]. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(6): 369-384
- [3] CERVAN-MARTIN M, CASTILLA J A, PALOMINO-MORALES R J, et al. Genetic landscape of nonobstructive azoospermia and new perspectives for the clinic [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2): 300
- [4] CAROPPO E, COLPI E M, GAZZANOET G, et al. Testicular histology may predict the successful sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia undergoing conventional TESE: a diagnostic accuracy study [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2017, 34(1): 149-154
- [5] ANDERSON R A, MITCHELL R T, KELSEY T W, et al. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(7): 556-567
- [6] SASAKI K, YOKOBAYASHI S, NAKAMURA T, et al. Robust *in vitro* induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2):

(下转第180页)

Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup> entry limits endothelial cell inflammation by suppressing calcineurin-NFATc4 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(2):1864-1870

[10] 董洁,邢娟,路国涛,等. 肠内营养对质子泵抑制剂导致的胃肠道不良反应的保护作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(1):77-83

[11] LIN H, LI Y, ZHU H, et al. Lansoprazole alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure in mice by blocking the activation of beta-catenin [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(1):101-113

[12] SEHESTED T S G, GERDS T A, FOSBOL E L, et al. Long-term use of proton pump inhibitors, dose-response relationship and associated risk of ischemic stroke and myocardial infarction [J]. *J Intern Med*, 2018, 283(3):268-281

[13] 周明,黄君文,陈婷,等. Tenascin-X蛋白及CD34在动脉粥样斑块形成过程中的表达及相关性的实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(2):181-186

[14] CHEN X, LIN J, HU T, et al. Galectin-3 exacerbates ox-LDL-mediated endothelial injury by inducing inflammation via integrin beta1-RhoA-JNK signaling activation [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):10990-11000

[收稿日期] 2019-10-27

(上接第159页)

178-194

[7] ISHIKURA Y, YABUTA Y, OHTA H, et al. *In vitro* derivation and propagation of spermatogonial stem cell activity from mouse pluripotent stem cells [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(10):2789-2804

[8] SATO T, KATAGIRI K, KOJIMA K, et al. *In vitro* spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0130171

[9] YUAN Y, LI L, CHENG Q, et al. *In vitro* testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3):244-255

[10] QI L, LIU Z X, WANG J, et al. Systematic analysis of the phosphoproteome and kinase-substrate networks in the mouse testis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(12):3626-3638

[11] LI Y, CHENG Y W, ZHUT Y et al. The protein phosphorylation landscape of mouse spermatids during spermiogenesis [J]. *Proteomics*, 2019, 19(11):e1900055

[12] HANDEL M A, EPPIG J J, SCHIMENTI J C. Applying “gold standards” to in-vitro-derived germ cells [J]. *Cell*, 2014, 157(6):1257-1261

[收稿日期] 2020-12-28