

原始生殖细胞发生的机制 *

冷丽智^{1,2} 林 戈^{1,2} 卢光琇^{1,2△}

(1 中南大学生殖与干细胞工程研究所 湖南 长沙 410078 2 人类干细胞国家工程研究中心 湖南 长沙 410078)

摘要 生殖细胞的发生是发育和遗传的基础。在几乎所有哺乳动物中,原始生殖细胞(primordial germ cell,PGC)均由近端上胚层体细胞在周边细胞特定的信号诱导下特化而成。目前的研究已经发现一些与生殖细胞特化有关的信号分子和关键转录调控元件,以及特化后生殖细胞获得的与体细胞不同的生物特性。生殖细胞的特化是一个结合了体细胞发育程序的抑制、细胞多能性程序的启动和全基因组表观遗传重编程三个方面的动态的复杂过程。多能性干细胞(胚胎干细胞或诱导型多能干细胞)具有发育全能性,能分化为机体任何一种细胞类型,包括生殖细胞。利用多能性干细胞体外分化形成生殖细胞有助于深入地研究配子发生的调控机制,为干细胞在不育症治疗方面的应用带来新希望。

关键词 多能性干细胞 原始生殖细胞 分化 表观遗传重编程

中图分类号 Q81 Q492 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)18-3569-04

The Mechanism of Primordial germ cells Specification*

LENG Li-zhi^{1,2}, LIN Ge^{1,2}, LU Guang-xiu^{1,2△}

(1 Institute of Reproductive&Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha 410078;

2 National Engineering Research Center of Human Stem cells, Changsha 410078, China)

ABSTRACT: Specification of germ cell fate is fundamental in development and heredity. In almost all mammals, the primordial germ cells are induced in pluripotent epiblast cells by specific signaling molecules. The current study has found some signal molecules and key transcription regulators related to the specification of germ cell lines, and different biological characteristics acquired by specialized germ cells compared to somatic cells. The corresponding experimental results show that the germ cell specification integrates at least three key events: repression of the somatic program, re-acquisition of potential pluripotency, and ensuing genome-wide epigenetic reprogramming. Pluripotent stem cells (embryonic stem cells or iPS) have the developmental totipotency, and can differentiate into any cell type of the body, including germ cells. Therefore, the model of using multipotent cells to differentiate into germ cells in vitro can thoroughly and systematically contribute to the regulation mechanism of gamete genesis, bringing new hope to the application of stem cells in infertility treatment.

Key words: Embryonic Stem Cells; Primordial germ cells; Differentiation; Epigenetic reprogramming

Chinese Library Classification: Q81, Q492 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)18-3569-04

前言

原始生殖细胞的特化是生殖细胞发生的第一个关键步骤,从目前的研究可知 PGC 由近端上胚层体细胞在周边细胞特定的信号诱导下特化而成。大致有两种途径可实现 PGC 的特化。一种是通过卵母细胞中的特殊细胞质-生殖质(先成论);另一种是通过胚胎发育过程中多能性细胞产生的特定信号的诱导(后成论)。现代生物学中先成论在许多模式生物中都存在,如:线虫、果蝇。但在小鼠和几乎所有哺乳动物中后成论更为普遍。尽管 PGC 的模式不同,最近的研究发现,两种特化模式涉及相同的细胞机制,其中最显著的是体细胞程序的抑制。虽然此机制在不同生物体有差异,但越来越多的证据显示特化的生殖细胞在后续发育中会经历一些相同的信号途径,提示不同物种间

生殖细胞系具有保守性。

1 PGC 特化的信号调控

1.1 BMP 信号途径对 PGC 特化的重要调控作用

经典胚胎学研究表明,近端上胚层细胞在特定的信号作用下特化出一群 AKP 阳性细胞,这群细胞被称为原始生殖细胞(PGC)。基因敲除实验证明骨形态发生蛋白(BMP),包括 BMP4、BMP8b 和 BMP2,对 PGC 的形成具有重要作用^[1]。其中来自胚外外胚层的 BMP4 信号能诱导上胚层中 Blimp1 和 Prdm14 两个 PGC 特化关键调控基因的表达。具体过程如下: BMP4 信号通过复合物 Alk3(或 Alk6)、型受体(主要是 Bmpr),再经过 Smad1 和 Smad5 激活上胚层中 Blimp1 和 Prdm14 表达。同样来自胚外外胚层的 BMP8b 能调控脏内胚层(VE)发

* 基金项目 中南大学前沿研究计划前瞻布局研究重大项目(201021200070) 国家 973 项目(2005CB522705);

国家 863 计划项目(2006AA02A102)

作者简介 冷丽智(1983-),女,硕士研究生,主要从事多能性细胞向生殖细胞诱导分化的研究。E-mail:lenglizhi.csu@163.com

△通讯作者 卢光琇 E-mail:lugxdirector@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-05-10 接收日期 2011-05-30)

育,限制脏内胚层前端(AVE)的抑制信号,使生殖细胞特化处于合适水平。BMP2在小鼠 E5.5 脏内胚层表达,且结构上与 BMP4 非常相似,能够提高 BMP4 的诱导作用,确保形成足够数量的 PGC。2009 年 Mitinori Saitou 等^[1]发现 Wnt3a 能够影响 BMP 信号途径。在 Wnt3a 纯和突变体胚胎上胚层有 BMP4 表达,但 Smad1/5/8 磷酸化下调, Blimp1 等生殖细胞早期基因表达缺失或显著减少,这提示 Wnt3a 通过作用于 BMP4 信号途径而启动生殖细胞发育。然而, BMP 信号途径是通过何种机制产生生殖细胞系(如直接作用靶细胞,受体复合物, BMPs 靶基因),以及为何上胚层中只有一小部分细胞具有生殖细胞发育命运等等,这些问题还有待进一步探究。

1.2 Blimp1 是 PGC 特化的关键调控元件

2005 年, Ohinata Y 利用单细胞芯片分析得知 Blimp1/Prdm1 在原始生殖细胞特异表达^[2]。Blimp1 编码一个有效的转录抑制因子,这个转录抑制因子具有一个 N-末端 PR/SET 结构域,5 个 C2H2 组成的富含脯氨酸的锌指结构和 C-末端酸性区域。Blimp1 最初作为一个能特异诱导 B 细胞终末分化成浆细胞的基因被克隆^[3],后来, Blimp1 被证实是 B 细胞终末分化的必需基因^[4,5]。基因表达分析发现 Blimp1 最初在原肠作用发生之前约 6.25 天小鼠胚胎上胚层近后端少量细胞中有表达,并且 Blimp1 阳性细胞数量不断增加,在小鼠 E6.75 大约有 20 个聚集成群的阳性细胞,在小鼠 E7.25 细胞数量增加到 40。遗传谱系追踪证实胚胎早期发育阶段几乎所有 Blimp1 阳性细胞最终都发育为呈 stella 阳性的 PGC。因此,可以认为小鼠 E6.25 近端上胚层出现的 Blimp1 阳性细胞是 PGC 前体细胞^[2,6]。Blimp1 功能实验发现它在早期胚胎 PGC 特化阶段发挥重要作用。Blimp1 突变体胚胎的 PGC 特化停止在一个非常早期阶段, AKP 阳性细胞的数量会显著减少,形成一些紧密的细胞聚集体,产生的 PGC 样细胞不发生向后肠内胚层的迁移。这些异常细胞也不能完全表达 PGC 特异基因,如 stella、fragilis 等,并且不能持续抑制 Hox 基因的表达^[1]。

2 早期生殖细胞分化相关基因

PGC 由近端上胚层中少量细胞特化而成,特化形成的 PGC 沿特定路径迁移至生殖嵴,在迁移的同时细胞增殖并发生印迹基因的表现遗传修饰。早期生殖细胞的发生受到一系列复杂的分子网络信号调控,目前对参与的信号调控已有一定认识,如 Kit/KL 通路、FGFs 通路、LIF 细胞因子对 PGC 增殖和存活具有正调控作用, TGF β -activin/nodal 信号对 PGC 增殖具有抑制作用^[7],并且,对参与调控的重要基因也有所了解,如 Ifitm3、C-kit、E-cadherin、Stella、DAZL、Vasa 和 Nanog 等。

Ifitm3 是干扰素诱导的跨膜蛋白家族成员之一,在 BMP4 刺激后的上胚层细胞中有表达,编码干扰素诱导性跨膜蛋白,与 PGC 特化时获得外胚层诱导信号相关^[8]。Ifitm3 首先在小鼠 E6.25 的近端上胚层被检测到,在小鼠 E6.5,其表达转移至胚胎后端,局限在胚外中胚层细胞,小鼠 E6.75 之后, Ifitm3 在 PGC 中表达^[9]。用 Oct3/4-EGFP 示踪生殖细胞的转基因小鼠进一步验证了早期 PGC 的转移过程^[10]。Ifitm3 在 PGC 前体的表达可能参与细胞间的诱导与应答反应,这对于 PGC 命运的决定是非常重要的。

经典遗传学研究表明 Steel 和 W 位点对 PGC 迁移、增殖和存活非常重要^[11,12]。Steel 位点编码分泌型配体 -SCF/Kitl,而 W 位点编码能与之结合的细胞表面酪氨酸激酶受体 -Kit^[13,14]。PGC 表达 c-kit 受体,而 PGC 迁移路径上的体细胞表达 SCF (stem cell factor),并且 SCF 表达具有明显梯度,生殖嵴表达最高^[15]。SCF/c-kit 介导迁移途中的 PGC 附着到体细胞上,引导 PGC 向生殖嵴运动^[16]。PGC 完全迁移到生殖嵴后, c-kit 表达迅速下调,从而对 SCF 作用反应性降低。体内外实验证实 SCF 通过 AKT/mTOR/Bax 途径可抑制 PGC 凋亡和促进 PGC 增殖,但具体的分子机制还不清楚。

Stella 基因编码高度分歧性蛋白,定位于人类染色体 12p13,与小鼠 Stella 基因只有 31.2%的同源性^[17]。Stella 特异表达于 PGC 和减数分裂前的生殖细胞,在 PGC 特化阶段发挥重要作用^[18]。目前的研究发现 Stella 是早期生殖细胞命运决定的最可靠的分子标记,可用于追踪体内外生殖细胞的发育状况。

VASA 是移行后期进入生殖嵴并发生减数分裂和配子形成的生殖细胞特异性基因。VASA 编码 RNA 结合蛋白并定位于胞质,可能参与卵子发生期间 mRNA 的运输和翻译。人类 VASA 基因在雄性和雌性生殖细胞均有表达,与生殖细胞发育过程中进化保守性相一致。到目前为止, VASA 是唯一对于生殖细胞系完全特异的基因,大多数种属细胞中 VASA 的表达即代表生殖细胞的出现。

DAZ(Deleted in Azoospermia,DAZ)基因家族缺失常见于无精症或少精症患者,是男性精子形成障碍的主要遗传因素。该基因家族编码有活性的核糖蛋白型 RNA 结合蛋白,其在出生前、后生殖细胞中均有表达^[19]。该基因家族至少包括 3 个成员:DAZ,位于人类 Y 染色体长臂,缺失与男性不孕有关;DAZL 是 Y 染色体上 DAZ 的常染色体同源体,其功能不限于精子发生,与卵子形成也有关;BOULE 具有调节减数分裂的作用。人类 DAZ 和 DAZL 蛋白,在性腺细胞的胞核和胞质以及精原细胞的胞核中均有表达,当雄性生殖细胞进入胞质减数分裂时,这些蛋白重新定位在胞质中。

3 PGC 迁移阶段的表现遗传重编程

随着原肠作用进行,PGC 开始迁移,从尿囊迁移到内胚层来源的后肠,经背侧肠系膜迁移入正在发育的生殖嵴。在迁移过程中 PGC 自我增殖,并发生表现遗传重编程,包括全基因组 DNA 去甲基化、父源性和母源性印迹擦除以及失活 X 染色体重新活化。在小鼠 E6.75 中 Blimp1 阳性的 PGC 前体开始启动全基因组表现遗传修饰以区别于周边的中胚层体细胞^[20]。表现遗传修饰包括活化和抑制两个方面,其中活化修饰有 H3K4me2、me3 和 H3K9ac,抑制修饰有 H3K9me1、me2、me3 和 H3K27me2、me3^[20]。小鼠 E8.0,PGC 开始发生迁移,迁移后 PGC 在全基因组水平的 DNA 甲基化和 H3K9me2 两个主要抑制修饰下调^[20,21],并且 H3K9me2 以一种渐进式的、逐个细胞下调。小鼠 E8.75,几乎所有 PGC 处于低水平 H3K9me2。对小鼠 E8.0-E9.0 迁移 PGC 的细胞周期分析发现约 60%PGC 处于 G2 期。有趣的是,恰巧在这一时期,因 RNA 聚合酶 II 合成受阻,PGC 的整个转录作用被迫暂停^[20]。这些现象表明当 PGC 停止

在 G2 时期全基因组抑制修饰下调,与此同时,关闭 RNA 聚合酶 依赖型转录作用。因此 PGC 迁移过程中全基因组 DNA 甲基化和 H3K9me2 下调是一个主动过程。

在全基因组 DNA 甲基化和 H3K9me2 下调的同时,另一个由 PRC2 (polycomb repressive complex2) 调控的抑制修饰 H3K27me3 上调^[20,21]。H3K27me3 上调是一个逐渐进行的过程。PGC 迁移阶段的表现遗传重编程具有潜在的生物学意义,迁移 PGC 从 DNA 甲基化、H3K9me2 到 H3K27me3 在整个基因组范围内改变它的抑制修饰。有文献报道 DNA 甲基化和 H3K9me2 在维持抑制基因稳定性方面起关键作用。相比之下,PRC2 介导的 H3K27me3 则抑制发育过程中谱系特异性基因的表达,其中许多调控发育相关基因同时拥有 H3K27me3 和 H3K4me3 两种修饰,以此确保一旦启动诱导分化谱系发育相关基因能够迅速表达。

DNA 甲基化和 H3K9me2 被认为与沉默基因抑制状态的稳定性有关,这些沉默基因能决定细胞的发育命运。H3K27me3 可能参与抑制多能性细胞谱系特异性基因的表达,并且这种抑制作用具有较强的可塑性。在生殖细胞中 H3K27me3 上调可能有助于创造一个胚胎干细胞样的基因组环境。事实上,可以从 PGC 获得多能性胚胎生殖细胞 (EG)^[22,23]。表观遗传重编程和 Oct3/4、Sox2、Nanog 等多能性关键基因的特异表达或重新表达对 PGC 获得多能性潜能具有重要作用^[24,25]。但另一方面,早期胚胎的某些基因能够阻止 PGC 完全回复到多能性状态。因此,要理解迁移途中 PGC 发生的全基因组表观遗传重编程的意义所在,就必须明确 DNA 甲基化和 H3K9me2 表达下调激活的靶基因以及 H3K27me3 表达上调沉默的靶基因。

4 多能性干细胞向生殖细胞的诱导分化

多能性干细胞(胚胎干细胞或 iPS 细胞)具有发育全能性,能分化为机体任何一种细胞类型。已有实验证实多能性干细胞可以在体外分化形成各种不同发育程度的生殖细胞^[17,26-28]。2003 年,Hubner 等^[29]最早报道小鼠胚胎干细胞在无滋养层培养体系下诱导分化能形成表达 Oct4 和 Vasa 的早期生殖样细胞,继续培养 3-4 周,这些细胞表达减数分裂标记基因,形成卵泡样结构,并排出由原始透明带包裹的卵母细胞,获得的卵母细胞最终发生孤雌激活发育为囊胚样结构。同年,Toyooka 等^[30]将小鼠胚胎干细胞聚集成拟胚体(EB)并结合体内移植方法,成功获得了高度分化的精子,但该实验缺乏精子的生物学功能和受精能力的分析。2004 年,Geijsen 等^[27]从小鼠胚胎干细胞形成的 EB 中分离出 PGC,体外经维甲酸(RA)诱导分化为成熟的精子,用识别精子顶体(FE-J1)的抗体进一步纯化分离圆形精子,行卵胞浆内单精子显微注射(ICSI)约 50%受精卵进行卵裂,发育到二细胞期胚胎,其中 20%的受精卵发育到囊胚期,但并未得到出生的新生小鼠。2004 年,Clark 等^[17]报道人胚胎干细胞形成的 EB 体外自发分化有减数分裂前生殖细胞特异基因的表达,如 Dazl、Vasa 和 SYCP3 等,暗示胚胎干细胞具有体外自发分化为生殖细胞并进入减数分裂的能力,但实验并未观察到完整的联会复合体的形成,说明细胞并不能进入减数分裂,他们认为减数分裂的完成可能还需要一些生殖细胞因子和(或)促

进其分化发育的微环境的参与。2009 年,冯立新等^[31]将小鼠胚胎干细胞的 DAZL 基因异位表达后直接诱导出游动的精子和卵母细胞。2009 年,Kehkooi Kee 等^[32]通过构建携带生殖细胞特异基因荧光报告系统的人胚胎干细胞系,利用荧光报告细胞系进行生殖细胞的体外诱导分化,结合流式分选技术获得了足够数量的、高纯度的生殖细胞。他们还发现编码生殖细胞特异性胞浆 RNA 结合蛋白的 DAZ 基因家族对生殖细胞形成有重要调控作用。在人胚胎干细胞中过表达 DAZ 基因家族的两个基因(DAZL、DAZ 和 BOULE)可获得单倍体精子样细胞。2010 年,Renee A.Reijo Pera 等^[33]将胎儿皮肤细胞和成体皮肤细胞来源的 iPS 细胞体外诱导分化获得了早期生殖细胞,最先证实 iPS 细胞也具有向生殖细胞分化的潜能。

利用多能性干细胞体外分化体系研究生殖细胞的发生和发育已开展了将近 10 年,并取得了一些进展。例如,证实了多能性干细胞可以通过拟胚体(EB)或者单层贴壁培养方式在体外自发或诱导分化形成原始生殖细胞^[17,26-28],并建立了原始生殖细胞体外筛选的荧光报告基因体系 Stella-GFP^[18,34,35]或 Vasa-GFP^[32,30,36],通过报告基因体系结合 FACS 技术可获得高纯度的生殖细胞。多能性干细胞体外分化为生殖细胞虽然取得了令人鼓舞的研究进展,但这一领域仍存在许多尚未解决的问题。主要包括:(1)受研究材料的限制,生殖细胞的发生机制还远未阐明;(2)多能性干细胞体外分化为生殖细胞的体系还不成熟,目前利用多能性干细胞体外分化形成生殖细胞大多是自发的过程,外源性的诱导因子作用不明显,因而分化效率非常低,最高分化率仅为 5%,这便限制了 PGC 下游的研究和应用。因此,多能性干细胞向生殖细胞的诱导分化还需要在技术体系和分化机制上不断探索。

5 展望

生殖细胞的发生和发育是一个复杂且高度动态变化的过程,目前对生殖细胞的发生机制尚未清楚。如:Bmp4-Smad 信号激活 Blimp1 和 Prdm14 表达的精确分子机理;上胚层中为何只有少量细胞对周边信号作出应答,启动生殖细胞发育程序;PGC 特化阶段是否还有一些尚未发现的关键转录调控元件等等。另一方面如何提高多能性干细胞向生殖细胞诱导分化的效率也亟待解决。

参考文献(References)

- [1] Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, et al. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice [J]. Cell,2009, 137: 571-584
- [2] Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice [J]. Nature,2005, 436: 207-213
- [3] Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells [J]. Cell,1994, 77: 297-306
- [4] Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program [J]. Immunity,2002, 17: 51-62
- [5] Hangaishi A, Kurokawa M. Blimp-1 is a tumor suppressor gene in lymphoid malignancies [J]. Int J Hematol,2010, 91: 46-53
- [6] Saitou M, Payer B, O'Carroll D, et al. Blimp1 and the emergence of the

- germ line during development in the mouse [J]. *Cell Cycle*,2005, 4: 1736-1740
- [7] Ewen KA, Koopman P. Mouse germ cell development: from specification to sex determination [J]. *Mol Cell Endocrinol*,2009, 323: 76-93
- [8] Lange UC, Saitou M, Western PS, et al. The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice [J]. *BMC Dev Biol*,2003, 3: 1
- [9] Saitou M, Payer B, Lange UC, et al. Specification of germ cell fate in mice [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*,2003, 358: 1363-1370
- [10] Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, et al. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice [J]. *Dev Growth Differ*,1999, 41: 675-684
- [11] Mintz B, Russell ES. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse [J]. *J Exp Zool*,1957,134: 207-237
- [12] McCoshen JA, McCallion DJ. A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice [J]. *Experientia*, 1975, 31: 589-590
- [13] Bernstein A, Chabot B, Dubreuil P, et al. The mouse W/c-kit locus [J]. *Ciba Found Symp*,1990, 148: 158-166; discussion 166-172
- [14] 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 [J].1993, *Dev Suppl*: 125-137
- [15] De Felici M, Pesce M. Growth factors in mouse primordial germ cell migration and proliferation [J]. *Prog Growth Factor Res*,1994, 5: 135-143
- [16] De Felici M. Regulation of primordial germ cell development in the mouse [J]. *Int J Dev Biol*,2000, 44: 575-580
- [17] Clark AT, Bodnar MS, Fox M, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro [J]. *Hum Mol Genet*,2004, 13: 727-739
- [18] Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice [J]. *Nature*,2002, 418: 293-300
- [19] Xu EY, Moore FL, Pera RA. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2001, 98: 7414-7419
- [20] Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, et al. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice [J].*Development*,2007,134: 2627-2638
- [21] Seki Y, Hayashi K, Itoh K, et al. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice [J]. *Dev Biol*, 2005, 278: 440-458
- [22] Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture [J]. *Cell*, 1992,70: 841-847
- [23] Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines [J].*Development*, 1994,120: 3197-3204
- [24] Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, et al. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling [J]. *Biol Reprod*,2006, 75: 705-716
- [25] Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, et al. Nanog expression in mouse germ cell development [J]. *Gene Expr Patterns*,2005, 5: 639-646
- [26] Clark AT. Egg-citing advances in generating primordial germ cells in the laboratory [J]. *Biol Reprod*,2010,82: 233-234
- [27] Geijsen N, Horoschak M, Kim K, et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells [J]. *Nature*,2004, 427: 148-154
- [28] Park TS, Galic Z, Conway AE, et al. Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells [J]. *Stem Cells*,2009, 27: 783-795
- [29] Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells [J]. *Science*,2003, 300: 1251-1256
- [30] Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, et al. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2003, 100: 11457-11462
- [31] Yu Z, Ji P, Cao J, et al. Dazl promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells [J]. *J Mol Cell Biol*,2009, 1: 93-103
- [32] Kee K, Angeles VT, Flores M, et al. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation [J]. *Nature*,2009,462: 222-225
- [33] Panula S, Medrano JV, Kee K, et al. Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells [J]. *Hum Mol Genet*,2011, 20: 752-762
- [34] Payer B, Chuva de Sousa Lopes SM, Barton SC, et al. Generation of stella-GFP transgenic mice: a novel tool to study germ cell development [J]. *Genesis*,2006, 44: 75-83
- [35] Sato M, Kimura T, Kurokawa K, et al. Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells [J]. *Mech Dev*,2002, 113: 91-94
- [36] Tilgner K, Atkinson SP, Yung S, et al. Expression of GFP under the control of the RNA helicase VASA permits fluorescence-activated cell sorting isolation of human primordial germ cells [J]. *Stem Cells*, 2010, 28: 84-92