

## 精原细胞分化及维甲酸在其中的作用与机制研究进展

龙治峰<sup>1</sup>, 欧含笑<sup>2</sup>, 莫中成<sup>2</sup>, 谢远杰<sup>2\*</sup>

(1. 南华大学显微形态中心, 湖南 衡阳 4210012; 2. 南华大学组织学与胚胎学教研室)

**摘要:** 多种 microRNAs 及 RNA 结合蛋白参与调控精原细胞分化, 维甲酸 (retinoic acid, RA) 在精原细胞分化过程发挥了重要作用, RA 可通过调控 microRNA 及 RNA 结合蛋白影响 Stra8、Sox11、Sox12 及 Kit 等精原细胞分化决定因子的转录后加工、修饰, 或直接激活 mTOR 信号通路促进精原细胞分化, 但睾丸内调控精原细胞对 RA 反应的机制及 RA 作用于精原细胞后的下游分子机制尚未完全明确。

**关键词:** 精原细胞; 分化; 维甲酸; microRNA; RNA 结合蛋白

**中图分类号:** R339.2 **文献标识码:** A

### Advances in mechanisms of spermatogonial differentiation and function of retinoic acid in this process

LONG Zhifeng, OU Hanxiao, MO Zhongcheng, et al

(Micromorphology Laboratory Center, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

**Abstract:** Several microRNAs and RNA binding protein are involved in the differentiation of spermatogonia and retinoic acid (RA) has an important role in the process of spermatogonial differentiation. RA can affect the post-transcriptional modification and expression of its determinative factor such as Stra8, Sox11, Sox12 and Kit by regulating microRNAs and RNA binding protein, or directly activate mTOR signaling pathway and promote the differentiation of spermatogonia. However, mechanism of how to regulate spermatogonia response to RA and its downstream molecular pathway of RA acting on spermatogonia is not completely clear.

**Key words:** spermatogonia; differentiation; retinoic acid; microRNA; RNA binding protein

哺乳动物精子发生其实就是干细胞发育过程, 成年哺乳动物睾丸内包含大量精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs), 它们一方面通过自我更新保持干细胞的数目与特性, 另一方面通过增殖分化产生注定要进入减数分裂的精原细胞, 从而保证生殖期内正常的精子发生。SSCs 分化不足或过度分化均可导致精子数目减少甚至完全没有精子, 称非梗阻性少精子症或无精症<sup>[1]</sup>。目前对精原细胞分化的分子机制还知之甚少, 研究发现维甲酸 (retinoic acid, RA) 在精原细胞分化过程发挥了必不可少的作用, 干扰维甲酸代谢的药物可能成为有效

的男性避孕药<sup>[2]</sup>, 本文就精原细胞分化及维甲酸在其中的作用与相关机制予以综述。

### 1 精原细胞的正常发育生物学

小鼠胎儿性别决定后, 睾丸内的原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 首先分化形成精原细胞前体细胞 (pro-spermatogonia), 也称为生殖母细胞 (gonocytes), 该细胞仅增殖到胚胎 14.5 天就进入静止状态直至出生。研究表明, 抑制 Sertoli 细胞的 Notch 信号是精原细胞前体细胞保持静止的重要原因<sup>[3]</sup>。精原细胞前体细胞大约在产后 1~2 天 (Postnatal Day 1-2, P1-2) 重新进入细胞周期, 并从睾丸索的中心迁移至外周, 大约在 P3-4 分化成为精原细胞。染色质修饰蛋白 SIN3A (Swi-independent 3a) 及激活素 (activins)、抑制素 (inhibins)、骨形态蛋白 (bone morpho-

收稿日期: 2016-03-28; 修回日期: 2016-10-26

基金项目: 湖南省科技厅项目 (2014SK3085)、湖南省卫生厅项目 (B2013-037) 及南华大学“蒸湘学者”唐向阳教授研究计划资助。

\* 通讯作者, E-mail: charlesking8888@163.com.

genetic proteins, BMPs)等转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )超家族成员也参与了调控精原细胞前体细胞的细胞周期<sup>[4]</sup>。精原细胞随后继续增殖分化,首先由单个型A精原细胞(A single spermatogonia, As)通过自我更新或增殖形成配对型精原细胞(A paired spermatogonia, Ap), Ap再增殖生成链状型精原细胞(A aligned spermatogonia, Aal), Aal不经过有丝分裂直接转化形成A1型精原细胞,该过程称为精原细胞分化。As、Ap、Aal统称为未分化的精原细胞,其表面标志主要包括早幼粒细胞白血病锌指蛋白(Promyelocytic leukemia zinc finger protein, Plzf, 也称为Zinc Finger and BTB Domain Containing 16, ZBTB16)、GFRA1(GDNF family receptor alpha 1)、NANOS2/3(Nanos homolog 2/3)等<sup>[1,5]</sup>。大量体内、外研究显示,精原细胞未分化状态的保持依赖于支持细胞和/或肌样细胞提供配体与精原细胞的相应受体结合。目前已知胶质细胞衍生神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)与GFRA1<sup>[6]</sup>、C-X-C基序的趋化因子配体12(C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12)与趋化因子受体4<sup>[7]</sup>(CXCR4)、成纤维细胞生长因子2和8(fibroblast growth factors 2 and 8, FGF2和FGF8)与FGFR<sup>[8]</sup>等结合参与了精原细胞未分化状态的维持。

A1型精原细胞经过6次有丝分裂逐次形成A2、A3、A4、中间型(In型)、B型精原细胞直至生成细线前期(preleptotene)初级精母细胞,进而启动减数分裂。A1型以后的精原细胞均属于分化型精原细胞,目前其常用的表面标志包括维甲酸诱导的基因8(stimulated by retinoic acid gene 8, Stra8)、Kit<sup>[9]</sup>等,但尚未发现能区分各种分化型精原细胞(A1、A2、A3或A4)的蛋白质标记物。包括人在内的灵长类动物精原细胞分化略有不同,人类睾丸中存在Adark、Apale、B型3种精原细胞,精原细胞前体细胞大约在出生后2~3月转化为Adark和Apale精原细胞,在4~5岁能见到最早分化的B型精原细胞,但此时B型精原细胞的数量只有青春期时的10%左右。目前认为Adark精原细胞是暂时不进入细胞周期的“储备”干细胞群,而Apale精原细胞类似啮齿动物中未分化的精原细胞,可以单个细胞存在或形成有胞质桥相互连接的长链细胞,Apale精原细胞经过1次有丝分裂即可形成B型精原细胞<sup>[10]</sup>。对于具有高度分化能力的组织,其稳态的维持必须通过干细胞不断增殖实现自我更新与储备,同时产生能增殖和分化的细胞,并在它们之间存在精细的平衡,睾丸内也存在调节精原细

胞增殖、分化的信号途径。

## 2 精原细胞分化过程中基因表达的变化

目前关于精原细胞分化的分子机制还知之甚少,大多从与人类基因组具有很大相似性的小鼠获得。多个基因如Stra8、SYCP3(Synaptonemal complex protein 3)编码的蛋白质在减数分裂中具有明确作用,在已分化精原细胞内它们的mRNA表达水平增高,提示它们可能参与了精原细胞分化<sup>[11]</sup>。敲除转录因子Sohlh1(spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1)、Sohlh2或敲除Sox3(Sex Determining Region Y-Box 3)均会损害精原细胞分化,但Sox3敲除导致的生精缺陷主要体现在第一轮精子发生过程,且随着小鼠年龄的增加生精状况逐渐改善,在出生后10天左右睾丸索结构基本正常,这表明Sox3在精原细胞分化中并不是绝对必需的<sup>[12]</sup>。特定基因的mRNA丰度虽然在不同精原细胞之间存在差异,但在蛋白质表达水平无差异甚至检测不到相应的蛋白质,表明这些基因存在转录后的调控。如Kit受体酪氨酸激酶的mRNA在睾丸的整个发育过程中能检测到,但其蛋白质只表达于特定的时期,Kit蛋白质在PGCs有表达,由PGCs形成的精原细胞前体细胞中不表达Kit蛋白,但在P3-4又开始在分化的精原细胞中表达Kit蛋白<sup>[13]</sup>。研究发现,miR-146、miR-221/222、miR-17-92、miR-106b-25和miR-let7等microRNA参与了精原细胞分化相关基因转录后的调控<sup>[14]</sup>,NANOS2/3、DAZL(Deleted In Azoospermia-Like)等RNA结合蛋白及Eif2s3y(eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked)都已经被证明在哺乳动物胎期和新生儿生殖细胞发育和分化中发挥了重要作用。研究认为NANOS2是维持胎儿精原细胞前体细胞及产后未分化精原细胞功能和存活所必需的RNA结合蛋白。在精子发生过程中NANOS2通过促进其靶基因mRNA降解或阻止其与核糖体结合而抑制其靶基因的翻译<sup>[15]</sup>。DAZL基因编码一段含单个RNA识别基序的结构域和DAZ重复序列的RNA结合蛋白,它与多聚腺苷酸结合蛋白共同调控配子生成过程有关mRNAs的翻译,DAZL<sup>-/-</sup>小鼠大部分生殖细胞停留于Aal阶段<sup>[16]</sup>。Eif2s3y是Y染色体上编码真核起始因子EIF2复合物 $\gamma$ 亚基的基因,在翻译起始时它和三磷酸鸟苷(GTP)、Met-

tRNA 形成三元复合物。Eif2s3y 敲除的小鼠睾丸内仅包含 GFRA1 阳性的未分化精原细胞,表明 EIF2S3Y 是精原细胞增殖和分化所必需的,其机制也可能是激活被抑制的 mRNA 重新翻译<sup>[17]</sup>。未分化精原细胞为何依靠翻译过程而不是通过转录来调控多种基因的表达,至今也未得到合理的解释,可能由于未分化精原细胞缺乏从转录水平精确控制某些基因表达的能力,因此采用转录后调控的方式来调节基因的表达<sup>[18]</sup>。

### 3 睾丸内维甲酸代谢过程

维甲酸 (retinoic acid, RA) 是维生素 A 在体内通过两步氧化反应生成的活性代谢产物。维生素 A 首先被胞浆乙醇脱氢酶系 (cytosolic alcohol dehydrogenases, ADHs) 和视黄醇脱氢酶系 (retinol dehydrogenases, RDHs) 氧化生成视黄醛 (retinal), 视黄醛随后被视黄醛脱氢酶系 (retinaldehyde dehydrogenase 1-3, RALDH1-3 or Aldh1a1-3) 氧化生成 RA, RA 由细胞维甲酸结合蛋白 (cellular RA binding proteins, CRABPs) 运输至细胞内, RA 再通过与其高亲和力的维甲酸受体 (retinoic acid receptor, RAR) 结合, 作用于靶基因启动子的 RA 反应元件 (RA response elements, RAREs), 调控相关基因的转录而发挥生物学作用。睾丸支持细胞和生精细胞能表达各种与维甲酸合成和代谢相关的转运蛋白和酶, 睾丸内维甲酸主要来源于其自身特别是支持细胞的合成。RAR 有 RARA、RARB 和 RARG 三种同分异构体, 每种 RAR 可分别与视黄醇 X 受体 A、B 或 G (retinoid X receptor A, B or G, RXRA, RXRB or RXRG) 形成异二聚体。RAR 同分异构体在睾丸内有不同的表达模式, 在新生期、青春期及成年哺乳动物内, RARA 主要表达在 Sertoli 细胞, RARG 主要表达在分化的精原细胞, RARB 不表达, 由此可推测 RA 调控精原细胞分化主要是通过 RARG 实现的<sup>[19]</sup>。RA 可被细胞色素 P450 酶系 26 家族 A1, B1, C1 (cytochrome P450 family 26 enzyme A1, B1, C1, CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1) 降解, CYP26A1、CYP26B1 和 CYP26C1 均可表达在管周肌样细胞内, 生精上皮内 RA 水平通过合成和分解代谢得到精准的控制<sup>[20]</sup>。

### 4 维甲酸对精原细胞分化的调控与机制

研究表明, 由未分化精原细胞向 A1 型精原细

胞转化过程需要维甲酸参与<sup>[2,21]</sup>。长期维生素 A 缺失 (vitamin A deficient, VAD) 饲料喂养的小鼠或给予维甲酸合成酶抑制剂如 WIN18446 后, 精原细胞不能越过 Aa1 阶段而停留在未分化阶段, 导致无精子产生及不育, 而补充维生素 A 或 RA 能使精原细胞完成从 Aa1 型至 A1 型的转化, 恢复其生育能力<sup>[22]</sup>; 条件性敲除支持细胞和生精细胞内视黄醇脱氢酶 10 (retinol dehydrogenase 10, Rdh10) 将导致比单纯敲除支持细胞内 Rdh10 更加严重的 A1 型精原细胞缺失, 但这种缺失只在小于 7 周龄的小鼠第一轮精子发生过程中最明显, 7 周以上的小鼠表现为正常的睾丸组织学结构和生育能力, 该结果提示成年小鼠将视黄醇转化为视黄醛可能是由 Rdh10 以外的其他视黄醇脱氢酶催化完成的<sup>[23]</sup>。此外, 支持细胞 Aldh1a1-3 条件性敲除鼠均导致精原细胞分化停止, 给予 RA 或使用 RARA 的选择性激活剂能重新活化精子发生<sup>[24]</sup>。这些研究结果表明, RA 对精原细胞分化肯定具有调控作用, 但其调控的分子机制是怎样的呢?

Stra8 是最先明确的 RA 下游靶基因, 但 RA 如何调控 Stra8 及 Stra8 下游的分子机制不明确。研究报告, RA 能通过上调鸡胚 PGCs 中 piwi 样 1 (piwi-like 1, Piwil1) 及 Stra8 mRNA 的表达, 促进其分化并进入减数分裂<sup>[25]</sup>。RA 能引起未分化精原细胞 miR-146 及 ZBTB16 的表达下调, 从而导致 Stra8、Kit 表达上调, 促进精原细胞分化。RA 也能引起未分化精原细胞 miR-221/222 表达下调, 而过表达 miR-221/222 能抑制 RA 导致的精原细胞分化及 Kit 的表达<sup>[26]</sup>。精原细胞分化必需因子 Sohlh1、Sohlh2 及 Kit 的 mRNA 在未分化精原细胞就存在, 但未见蛋白质表达, 在 RA 刺激下这些 mRNA 才开始翻译成蛋白质, 但是 mRNA 丰度没有显著增加, 这表明在精原细胞分化过程中, RA 并不只是促进单一基因的转录激活, 而是将多个被抑制基因的 mRNA 翻译后予以表达<sup>[27]</sup>。在 NIH3T3、MEF 等细胞系中, RARA 还可结合 PI3K 的调节亚基 (p85), 并通过募集其催化亚基快速地磷酸化 ERK 和 AKT 而活化 mTOR 通路。研究证实, 给出生后第 1 天 (P1) 小鼠添加外源 RA 可导致精原细胞前体细胞中 mTOR 磷酸化而激活, 活化的 mTOR 磷酸化其底物 EIF4E 结合蛋白 1 (EIF4E-binding Protein1, EIF4EBP1) 和核糖体蛋白 s6 激酶 (ribosomal protein S6-kinase, S6K), 前者可调节帽依赖的 mRNA 的翻译, 后者直

接修饰核糖体增强其合成蛋白质功能,传递生长增殖、分化和存活信号。在未分化精原细胞内缺失 Tsc2,将导致 mTORC1 过早激活从而促进精原细胞分化,而应用雷帕霉素、敲除激活 AKT 所需的 Pdk1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) 基因或降低 AKT 表达从而抑制其下游靶基因 Foxo1 均可导致精原细胞分化受抑制<sup>[28]</sup>。这些结果表明,RA 可激活 PI3K/AKT/mTORC1 信号途径促进精原细胞分化,抑制 mTORC1 活化对保持精原细胞的干细胞特性非常重要。目前关于 RA 与 microRNA 及 NANOS2 等结合蛋白在出生后睾丸中表达的关系研究较少,但在缺乏 Cyp26b1 的胎鼠睾丸中其 RA 水平更高,而 NANOS2 mRNA 水平显著降低,这提示 RA 可以负调控 NANOS2 的表达,且位于 RA 信号下游的 NANOS2 表达缺失后,可导致精原细胞内被抑制的 Sohlh1、Sohlh2 及 Kit 等精原细胞分化决定因子 mRNA 的翻译,促进精原细胞分化<sup>[20]</sup>。

睾丸内包含一小部分数目恒定的 SSCs 和产生正常配子所必需的数以百万计准备增殖分化的精原细胞,为何 RA 只对正准备分化或已分化的精原细胞起作用呢? 有研究认为,RA 能对所有精原细胞起作用,但精原细胞被暴露于 RA 是被严格控制的。胎儿时期静止状态的精原细胞前体细胞通过高表达 CYP26B1 并降解 RA,防止其被暴露于 RA,否则它们将提前开始分化,进入减数分裂并过早凋亡。出生后 3~4 天,由于精原细胞内 CYP26B1 活性降低或消失,导致它们被暴露于 RA,从而出现 Stra8 基因阳性表达、已分化的精原细胞<sup>[29]</sup>。另一种观点认为,所有精原细胞都被暴露于 RA,但只有某些精原细胞能表达相应的 RAR 而对 RA 做出回应。如正准备分化的精原细胞表达 RARG 而未分化的精原细胞不表达,或者通过 RA 合成及降解酶精细控制细胞内 RA 的水平。整体敲除 RAR 或者条件性敲除生殖细胞、支持细胞 RAR 的研究发现,RARB<sup>-/-</sup>小鼠能存活并保持正常的生育力,因为正常生精上皮内本来就不表达 RARB。而 RXRA<sup>-/-</sup>、RXRG<sup>-/-</sup>小鼠精子发生均出现不同程度的缺陷,但两者无论是单一敲除还是联合敲除都不能表现出 VAD 小鼠呈现的精原细胞分化阻滞和不育的表型。RXRA<sup>-/-</sup>小鼠可表现为不育,而 RXRG<sup>-/-</sup>小鼠在第一轮精子发生过程无明显异常,许多生精小管结构是正常的<sup>[19]</sup>;采用转基因方法利用 Gfra1 启动子在未分化精原细胞表达 RARG,可导致这些精原细胞在 VII-

VIII 期出现分化<sup>[30]</sup>,说明 RAR 及 RXR 确实参与了精原细胞分化,但没有哪一种受体是精原细胞分化过程必不可少的。处于生精周期第 VII 至 VIII 期的生精上皮暴露于浓度最高的 RA,但第 VII 至 VIII 期生精上皮中同时也包含有 Stra8 及 Kit 均阴性表达的未分化精原细胞<sup>[21]</sup>,表明它们确实暴露于 RA 但未接受 RA 信号或者不能对 RA 信号做出回应。由于细胞对 RA 的暴露可以在其合成、接收、存储/运输及降解多个环节进行调控,因此可推测,调控细胞对 RA 做出适当反应的机制并不依赖于单个基因的功能,同时也说明调节雄性生殖细胞的 RA 暴露及其对 RA 的反应与男性生殖健康的关系很密切。

综上所述,RA 在减数分裂之前的精原细胞分化过程发挥了重要作用,但睾丸内调控精原细胞对 RA 反应的机制及 RA 作用于精原细胞后的下游分子机制尚未完全明确。RA 可通过调控 microRNA 及 RNA 结合蛋白影响 Stra8、Sohlh1、Sohlh2 及 Kit 等精原细胞分化决定因子的转录后加工、修饰,或直接激活 mTOR 信号通路促进精原细胞分化。未来的研究应该着眼于睾丸内 RA 的代谢机制,关注精原细胞分化过程中蛋白质组的变化及 RA 对其表达的影响,进一步鉴定分化过程中特定的信号途径及其作用,明确 RA 在雄性生殖细胞发育阶段 SSC 自我更新及其精原细胞分化中的作用机制,最终为调控男性生殖健康特别是保证正常精子发生服务。

#### 参考文献:

- [1] Yang QE, Oatley JM. Spermatogonial stem cell functions in physiological and pathological conditions [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2014, 107: 235-267.
- [2] Whitmore LS, Ye P. Dissecting germ cell metabolism through network modeling [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (9): e0137607.
- [3] Garcia TX, DeFalco T, Capel B, et al. Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence [J]. *Dev Biol*, 2013, 377(1): 188-201.
- [4] Itman C, Wong C, Whiley PA, et al. TGFbeta superfamily signaling regulators are differentially expressed in the developing and adult mouse testis [J]. *Spermatogenesis*, 2011, 1(1): 63-72.
- [5] Zhou Z, Shirakawa T, Ohbo K, et al. RNA binding protein nanos2 organizes post-transcriptional buffering system to retain primitive state of mouse spermatogonial stem cells [J]. *Dev Cell*, 2015, 34(1): 96-107.
- [6] Grasso M, Fuso A, Dovere L, et al. Distribution of GFRA1-

- expressing spermatogonia in adult mouse testis [J]. *Reproduction*, 2012, 143(3):325-332.
- [7] Yang QE, Kim D, Kaucher A, et al. CXCL12-CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 4): 1009-1020.
- [8] Hasegawa K, Saga Y. FGF8-FGFR1 signaling acts as a niche factor for maintaining undifferentiated spermatogonia in the mouse [J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(6):145.
- [9] Shirakawa T, Yaman-Deveci R, Tomizawa S, et al. An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity [J]. *Development*, 2013, 140(17):3565-3576.
- [10] Hermann BP, Sukhwani M, Hansel MC, et al. Spermatogonial stem cells in higher primates; are there differences from those in rodents [J]. *Reproduction*, 2010, 139(3): 479-493.
- [11] Li M, Feng R, Ma H, et al. Retinoic acid triggers meiosis initiation via *stra8*-dependent pathway in Southern catfish, *Silurus meridionalis* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2016, 232:191-198.
- [12] Raverot G, Weiss J, Park SY, et al. *Sox3* expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis [J]. *Dev Biol*, 2005, 283(1):215-225.
- [13] Mithraprabhu S, Loveland KL. Control of KIT signalling in male germ cells; what can we learn from other systems [J]. *Reproduction*, 2009, 138(5):743-757.
- [14] Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1):498-508.
- [15] Sada A, Hasegawa K, Pin PH, et al. NANOS2 acts downstream of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling to suppress differentiation of spermatogonial stem cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(2):280-291.
- [16] Richardson TE, Chapman KM, Tenenhaus Dann C, et al. Sterile testis complementation with spermatogonial lines restores fertility to *DAZL*-deficient rats and maximizes donor germline transmission [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7):e6308.
- [17] atsubara Y, Kato T, Kashimada K, et al. TALEN-mediated gene disruption on Y chromosome reveals critical role of *EIF2S3Y* in mouse spermatogenesis [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(10):1164-1170.
- [18] Schwanhausser B, Busse D, Li N, et al. Global quantification of mammalian gene expression control [J]. *Nature*, 2011, 473(7347):337-342.
- [19] Mark M, Teletin M, Vernet N, et al. Role of retinoic acid receptor (RAR) signaling in post-natal male germ cell differentiation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(2):84-93.
- [20] Hogarth CA, Evans E, Onken J, et al. CYP26 enzymes are necessary within the postnatal seminiferous epithelium for normal murine spermatogenesis [J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(1):19.
- [21] Hogarth CA, Arnold S, Kent T, et al. Processive pulses of retinoic acid propel asynchronous and continuous murine sperm production [J]. *Biol Reprod*, 2015, 92(2):37.
- [22] Paik J, Haenisch M, Muller CH, et al. Inhibition of retinoic acid biosynthesis by the bisdichloroacetyldiamine WIN 18, 446 markedly suppresses spermatogenesis and alters retinoid metabolism in mice [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(21):15104-15117.
- [23] Tong MH, Yang QE, Davis JC, et al. Retinol dehydrogenase 10 is indispensable for spermatogenesis in juvenile males [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(2):543-548.
- [24] Arnold SL, Kent T, Hogarth CA, et al. Importance of *ALDH1A* enzymes in determining human testicular retinoic acid concentrations [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(2):342-357.
- [25] Xu L, Chang G, Ma T, et al. *Piwi1* mediates meiosis during spermatogenesis in chicken [J]. *Anim Reprod Sci*, 2016, 166:99-108.
- [26] Yang QE, Racicot KE, Kaucher AV, et al. MicroRNAs 221 and 222 regulate the undifferentiated state in mammalian male germ cells [J]. *Development*, 2013, 140(2):280-290.
- [27] Busada JT, Geyer CB. The role of retinoic acid (RA) in spermatogonial differentiation [J]. *Biol Reprod*, 2016, 94(1):10.
- [28] Busada JT, Chappell VA, Niedenberger BA, et al. Retinoic acid regulates Kit translation during spermatogonial differentiation in the mouse [J]. *Dev Biol*, 2015, 397(1):140-149.
- [29] Evans E, Hogarth C, Mitchell D, et al. Riding the spermatogenic wave: profiling gene expression within neonatal germ and sertoli cells during a synchronized initial wave of spermatogenesis in mice [J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(5):108.
- [30] Ikami K, Tokue M, Sugimoto R, et al. Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis [J]. *Development*, 2015, 142(9):1582-1592.

(本文编辑:秦旭平)