

· 综述 ·

精原干细胞自我更新及分化的调控机制研究进展

潘瑜, 李文鑫, 张韞超, 荆涛

(青岛大学附属医院男性科, 山东 青岛 266000)

[摘要] 精原干细胞(SSC)是睾丸中最原始的生殖细胞,通过自我更新和连续分化最终成为成熟的精子,SSC对维持高效的精子发生起着至关重要的作用,与生精微环境(niche)之间复杂的分子和细胞相互作用构成了精子发生的基础。以往认为 niche 主要由睾丸支持细胞构成,而新近研究表明,睾丸内多种细胞、分子信号通路均参与调控 SSC 的自我更新及分化。本文就睾丸生精微环境调控 SSC 自我更新及分化的研究进展进行综述。

[关键词] 成体生殖干细胞;细胞自我更新;细胞分化;精子发生;综述

[中图分类号] R321.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2024)03-0462-05

doi:10.11712/jms.2096-5532.2024.60.079

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



[网络出版] <https://link.cnki.net/urlid/37.1517.R.20240521.1613.001>;

2024-05-22 09:09:25

Research advances in the regulatory mechanism of self-renewal and differentiation of spermatogonial stem cells PAN Yu, LI Wen-xin, ZHANG Yunchao, JING Tao (Department of Andrology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China)

[Abstract] Spermatogonial stem cells (SSC) are the most primitive germ cells in the testis and develop into mature sperms through self-renewal and continuous differentiation. SSC play an important role in maintaining efficient spermatogenesis, and the complex molecular and cellular interactions between SSC and microenvironment (also called niche) form the basis of spermatogenesis. Previous studies believed that the niche was mainly composed of Sertoli cells, but recent studies have shown that various types of cells and molecular signaling pathways in the testis are involved in the regulation of the self-renewal and differentiation of SSC. This article reviews the research advances in the microenvironment for spermatogenesis in the testis in regulating the self-renewal and differentiation of SSC.

[Key words] adult germline stem cells; cell self-renewal; cell differentiation; spermatogenesis; review

精原干细胞(SSC)是睾丸中最原始的生殖细胞,精子发生是一个需要 SSC 在自我更新和分化中达到平衡并最终源源不断产生单倍体精子的过程。一方面,SSC 自我更新可以维持干细胞池的细胞数量,从而确保男性在生命的大部分时间里可以持续生精;另一方面,SSC 分化则是生成成熟精子所必经的过程。睾丸内生精微环境(niche)在调控 SSC 自我更新以及分化的过程中发挥重要作用,睾丸内 niche 的形成不仅需要支持细胞、间质细胞、内皮细胞、管周肌样细胞(PMC)、巨噬细胞等多种细胞的相互支持,各种调节因子也在 niche 中发挥调控 SSC 自我更新和分化作用。近年来对 SSC 体外培养体系的探索带动了 niche 的相关研究,新近报道体外培养的小鼠 SSC 可以保留自我更新能力,而且在移植入生精功能衰竭的小鼠睾丸后可以重新恢复持续的精子发生过程^[1]。本文拟综述睾丸内 niche 对 SSC 自我更新和分化调控机制的研究进展,以期改进 SSC 体外培养体系提供理论依据,有助于临床诊治因 SSC 功能受损而导致的男性不育疾病。

[收稿日期] 2023-05-15; **[修订日期]** 2024-02-08

[基金项目] 国家卫生健康委医药卫生科技发展中心项目(HD-SL202001065)

[第一作者] 潘瑜(1998-),男,硕士研究生。

[通信作者] 荆涛(1980-),男,博士,主任医师,硕士生导师。E-mail:jingtao@qdu.edu.cn。

1 参与睾丸内 niche 的细胞类型及其作用

1.1 睾丸支持细胞(SC)

通常认为 SC 是组成睾丸内 niche 最重要的细胞,其主要作用是维持睾丸生精小管的管腔结构,维持血-睾屏障(BTB)的完整性。新近单细胞测序研究提示,SC 可以分为 a、b、c 3 种亚群,除了管腔结构的支撑作用,各亚群 SC 还具有不同的调控生精功能:a 亚群表现出干细胞的一些特征,b 亚群主要参与调控代谢功能,c 亚群主要功能是吞噬生殖细胞及其代谢废物^[2]。SC 的 3 个亚群同时存在并在成人睾丸 niche 中保持稳定状态,从而维持生精小管的基本结构,也保障了睾丸内 niche 稳态。目前已认识到 SC 在生精过程中通过分泌多种细胞因子、调节 BTB 和吞噬凋亡的生精细胞等多种途径发挥重要的支持和调控作用。

1.1.1 分泌多种细胞因子 SC 能够产生抗缪勒管激素(AMH),AMH 参与决定性别分化并反向调节 SC 的发育;分布在 SC 表面的雄激素受体和转铁蛋白可协同促进精子发生过程;SC 还可以产生雄激素结合蛋白,从而维持睾丸内 niche 高水平的雄激素。此外,SC 还被证实可以产生多种调控因子,其中研究较多的包括胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)^[3]、A 型血小板源性生长因子^[4]、血管内皮生长因子 A(VEGFA)家族成员及其受体^[5]、成纤维细胞生长因子

2(FGF2)^[6]、表皮生长因子^[7]等,这些细胞因子均在精子发生的不同阶段发挥着重要的调控作用。

新近研究发现,SC 通过旁分泌作用产生的调控因子对于调控精子发生、维持 SC 自身功能稳态亦有重要作用^[8]。国内研究提示,精浆中来源于 SC 的外泌体不仅可以作为精索静脉曲张疾病造成 SC 功能损伤的标志物,还可以作为非梗阻性无精子症病人的精子发生预测标志物^[9]。除此以外,在小鼠动物实验中还发现 SC 来源的外泌体通过调控多种 miRNA 分子,不仅可以与睾丸 SC 发生互动作用进而调控睾丸内 niche 的雄激素水平^[10],还可以通过 E3-Zeb2-MAPK 信号通路调控 SSC 的增殖和分化^[11]。在生精小管中,SC 分泌的外泌体可促进 SSC 的分化,而未分化 A 型精原细胞分泌的外泌体则抑制 SSC 增殖。未成熟 SC 来源的外泌体可促进睾丸间质细胞(LC)的存活并抑制其类固醇的合成。

1.1.2 调节 BTB 相邻 SC 之间建立的紧密连接、黏附连接和缝隙连接是构成 BTB 的结构基础。Cldn11 已被证实是 BTB 的重要成分,可以促进 SSC 穿过 BTB 结构并定植于野生型小鼠睾丸的生精小管基膜,而 Cldn11 的缺失可以导致 SSC 不能有效迁移和定植,进而引起不育^[12]。

1.1.3 吞噬凋亡的生精细胞 SC 还可以通过黏附和吞噬作用促进凋亡细胞的解体,当 SC 表达 FasL,同时生精细胞表达 Fas,二者相结合就会使生精细胞进入凋亡程序,这是精子发生过程中所必需的步骤。

1.2 LC

睾丸生精小管之间分布的疏松结缔组织即睾丸间质,在睾丸间质内负责合成雄激素的内分泌细胞即 LC,LC 常成群分布于睾丸间质微血管的邻近区域,新近报道显示 LC 可能源自 TCF21⁺间充质细胞^[13]。对人类睾丸组织进行单细胞测序分析,结果显示睾丸 LC 与 SC 起源于同一个异质祖细胞亚群,表明睾丸 LC 与 SC 具有同源性^[14]。LC 主要作用是分泌产生睾酮,除了睾酮,LC 还生成一些在调控精子发生过程中发挥重要作用的因子,例如白细胞介素 1 α ^[15]、骨形态发生蛋白 4(BMP4)^[16]、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)^[17]等,这些因子可以通过调控内源性睾酮生成或 LC 代谢功能从而参与调控精子发生过程。SC 所释放的外泌体可以穿过 BTB 并显著增加 LC 的 Cc 趋化因子配体 20(Ccl20)表达水平,而 Ccl20 可以促进 LC 中蛋白激酶 B 的磷酸化,进而维持 LC 的功能稳态。最新研究显示,来自骨髓间充质干细胞的外泌体,可以通过 AMPK-mTOR 信号通路增强 LC 的细胞自噬,从而改善环磷酰胺导致的 LC 合成睾酮能力下降,为环磷酰胺导致低睾酮血症提供新的治疗靶点^[18]。

1.3 PMC

PMC 是一群平滑肌细胞,包裹着睾丸曲细精管,是曲细精管管壁的主要细胞成分,通过 PMC 节律性收缩可以推动管腔内液体流向睾丸网,对于精子的睾丸内运输具有重要作用。PMC 的节律性运动主要受 LC 分泌的抗利尿激素、缩宫素、前列腺素等调控,GATA4 可以减弱 PMC 的收缩功能,PMC 收缩功能降低与男性少/弱精子症有关。另外,

PMC 还参与构成 BTB,PMC 的结构或功能发生改变时可出现细胞外基质异常沉积或形态变化,进而影响正常的精子发生过程。新近研究显示,褪黑素可以通过调控 PMC 的免疫反应、炎症因子分泌以及细胞顺应性等多种途径,影响 BTB 维持正常生精过程的功能^[19]。另有动物实验证实,PMC 可以表达雄激素受体,通过与 LC 的协同作用,调控睾丸内 niche 的雄激素水平,从而确保正常的精子发生过程^[20]。

1.4 巨噬细胞

睾丸巨噬细胞分布于睾丸间质内和生精小管基底部,位于生精小管基底侧的巨噬细胞数量可以随着 SSC 的增加而增多,其可以分泌促进 SSC 增殖和诱导分化的细胞因子,例如集落刺激因子 1(CSF1)、与合成维甲酸(RA)相关的酶等。既往研究显示,生精小管管周巨噬细胞的缺失可以导致 SSC 分化进程中断,目前发现从巨噬细胞分离所得的外泌体可以保护精原细胞免受辐射损伤,进而促进正常的生精过程。最新研究显示,生精小管管周巨噬细胞在出生前已经出现于胎儿睾丸内,且胎儿睾丸间质内的巨噬细胞和生精小管管周巨噬细胞均主要来源于胎肝源性前体细胞,而在出生后睾丸发育过程中,骨髓源性细胞并未对睾丸巨噬细胞池的补给有实质性作用^[21]。

1.5 睾丸内皮细胞(TEC)

TEC 是睾丸内 niche 的重要组成部分,能够分泌 FGF2、基质细胞衍生因子-1、巨噬细胞炎症蛋白 2、胰岛素样生长因子结合蛋白 2 以及一氧化氮(NO)等多种调节因子,其中 NO 可抑制睾丸 LC 产生雄激素,FGF2 可促进 TEC 产生 GDNF,而且 TEC 是睾丸内 GDNF 的主要来源。新近研究证实,TEC 能够在没有外源性 GDNF 的体外培养环境中维持 SSC 的正常增殖,而且 TEC 分泌产生的调节因子可以显著促进细胞毒性损伤后生精上皮的再生^[22]。另有研究显示,人睾丸内 TEC 的衍生外泌体可能在精子发生过程中作为潜在的效应因子发挥重要调控作用^[23]。

1.6 淋巴管内皮细胞(LEC)

LEC 位于生精小管和睾丸间质交界处,覆盖于淋巴管的表面。靠近血管系统的 LEC 可以产生多种 FGF(例如 FGF4、FGF5、FGF8 等),从而进一步促进 Gfra1⁺的 SSC 持续自我更新,这对于维持 SSC 细胞池的细胞数量是非常重要的^[24]。

2 参与睾丸内 niche 调节因子作用机制

睾丸内 niche 存在大量各类调节因子,在不同年龄阶段发挥不同的作用,调控 SSC 持续进行自我更新或启动分化,从而维持 SSC 细胞池中足够多的细胞数量和正常的男性生育力;而且,SSC 还会根据 niche 中调节因子的变化,在自我更新状态与分化状态之间进行动态、可逆的转换。

2.1 与 SSC 自我更新相关的调节因子

2.1.1 GDNF GDNF 是已知参与调控 SSC 自我更新与分化的最重要的调节因子之一。GDNF 家族成员通过结合未分化型 SSC 表面上的 GFR α 1/Ret 受体复合物,激活 PI3K/

AKT、Ras-ERK、MAPK、SFK 等信号途径,进而激活 SSC 持续自我更新;与 GDNF 协同促进 SSC 自我更新的其他细胞因子包括 FGF2、CXCL12、VEGFA 等。如果未分化型 SSC 表面受体结构或组分发生变化,可导致 SSC 细胞池数量快速衰竭;而且随着 SSC 进入分化过程,其细胞表面的 GFR α 受体表达水平也迅速降低^[24]。

既往观点认为 GDNF 主要来源于 SC, GDNF 在 SC 中受到内分泌、旁分泌和自分泌机制的综合调节。XI 等^[25] 的新近研究发现,卵泡刺激素可以通过激活 PI3K/Akt/mTOR 途径抑制转录因子 EB(TEEB)的核易位以减少溶酶体生物合成来抑制 SC 的自噬作用,从而增强 SC 表达 GDNF 并促进 SSC 的自我更新。另有研究显示,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)通过核因子 κ B(NF- κ B)依赖途径诱导转录阻遏蛋白(HES1)的表达从而抑制 SC 的 GDNF 表达水平^[26]。国外学者 SHARMA 等^[27] 的新近研究认为, GDNF 在 SC 中呈周期性表达,他们提出 GDNF 促进 SSC 持续自我更新的作用是通过抑制分化而不是通过促进增殖来实现的。还有研究显示, GDNF 的分泌和来源受到其他多种因素的调控, TEC 表达 GDNF 的水平甚至要高于 SC, 而且 PMC 在雄激素刺激下也可以产生 GDNF^[22]。

2.1.2 纤维母细胞生长因子家族(FGFs) FGFs(FGF2、FGF9 等)对于维持未分化 A 型精原细胞的自我更新有重要作用,体外实验已证实 FGF2 和 GDNF 可以协同促进未分化 A 型精原细胞的增殖,体内过表达 FGF2 可以诱导未分化 A 型精原细胞的持续增多^[22]。睾丸内 niche 的 FGFs 来源尚存争议,目前认为主要由 SC、LEC 和 LC 产生。

FGFs 如何参与调控 SSC 自我更新和分化的分子机制目前仍不清楚。KITADATE 等^[28] 提出 SSC 细胞池的细胞数量受到来自 LEC 的 FGFs 严密调控,认为睾丸内 niche 的稳态是通过竞争有限的 FGFs 来实现的。新近研究显示, FGF2 可以通过抑制 RA 的分解代谢进而诱导 SSC 的分化^[29]。另有研究表明, FGF9 也是 SSC 不断增殖的重要调控因子,它通过诱导 P38MAPK 磷酸化、上调 *Etv5* 等靶基因进而促进 SSC 不断增殖^[30],其中 *Etv5* 是 ETS 转录因子家族的重要成员, *Etv5*^{-/-} 雄性小鼠可出现唯支持细胞综合征的严重生精衰竭^[31]。RAJACHANDRAN 等^[32] 运用高分辨率空间转录组学技术证明, LC 和 TEC 可以分泌产生多效性生长因子(PTN),其在高浓度时可与 FGF2 竞争结合 SDC 受体,进而抑制 FGF2 介导的 SSC 自我更新功能。

2.1.3 白血病抑制因子(LIF) LIF 是髓系白血病 M1 细胞的分化诱导剂和增殖抑制因子,对细胞的存活、增殖和分化起着重要的调节作用。LIF 在睾丸内主要表达于 PMC,其受体 LIF-R 主要表达于 SSC。LIF 在睾丸内 niche 可能通过信号转导途径发挥生理作用,其与 LIF-R/gp130 受体复合物结合后,进一步激活 STAT3,从而抑制 SSC 的分化程序;此外, LIF 还可以通过激活 PI3K、MEK/ERK 等信号途径,促进 SSC 的自我更新。新近研究发现,在体外培养体系中加入 LIF 则可以促进具有高碱性磷酸酶活性的小鼠 SSC 细胞

克隆生长,表明 LIF 可能在小鼠 SSC 体外培养体系中发挥重要作用^[33]。

2.1.4 干细胞因子(SCF) SCF 广泛表达于多种细胞,在调控细胞存活、增殖、干细胞维持、配子发生等方面均发挥重要作用,若 SCF 表达存在缺陷,则细胞有丝分裂、干细胞维持等生理进程都将受到破坏,甚至导致胚胎停止发育或流产。在生殖系统中, SCF 主要来源于 SC,并特异性作用于精原细胞, SCF 通过结合其受体 c-kit 参与调控 SSC 的自我更新和分化。新近研究证实, MEK 和 PI3K 在 SCF 与 c-kit 共同介导的细胞有丝分裂过程中都是必不可少的,在体外培养体系中加入 MEK 或 PI3K 抑制剂,均可以有效抑制 SSC 的体外增殖^[34]。

2.2 与 SSC 分化相关的调节因子

2.2.1 RA RA 是维生素 A 的代谢中间产物,是一种诱导雄性生殖细胞分化的重要调节因子,主要由睾丸 SC 产生,缺乏 RA 或维生素 A 会导致未分化 A 型精原细胞的持续积累,一旦在生精上皮中重建正常的 RA 代谢途径,未分化 A 型精原细胞即可转变为分化的 A 型精原细胞。

SSC 受到 RA 信号途径的调控进而启动细胞的分化过程,是通过激活 RA 下游的 mTORC1 信号通路而实现的, mTORC1 信号通路在 SSC 中的激活可以导致未分化精原细胞的耗竭,并可上调启动分化的相关基因(包括 *Ngn3*、*Sox3*、*Lin28a*、*Rarg* 等),同时维持自我更新的相关基因(包括 *Gfra1*、*Ret*、*Lhx1*、*Eomes*、*Pdx1* 等)则出现表达下调。新近研究显示, Stra8 在调节未分化精原细胞对 RA 的反应性中发挥重要作用^[35]。

2.2.2 Wnt/ β -连环蛋白信号途径 Wnt/ β -连环蛋白途径在调控 SSC 分化启动过程中具有十分重要的作用。TOKUE 等^[36] 证实,从未分化型精原细胞(*Gfra1*⁺)到分化型精原细胞(*Ngn3*⁺)状态的转换即是由 Wnt/ β -连环蛋白途径所驱动,还发现 SHISA6 可以抑制未分化型精原细胞中的 Wnt 信号途径,以维持 SSC 的自我更新状态并阻止其过早进入分化进程,推测 SHISA6 可以作为 *Gfra1*⁺ 的未分化型精原细胞的新标记。

2.3 睾丸内 niche 的其他重要调节因子

2.3.1 C-X-C 趋化因子 12(CXCL12) CXCL12 是 CXC 趋化因子配体蛋白家族的一个亚型。免疫荧光染色结果显示, CXCL12 表达定位在 SC, CXCL12/CXCR4 信号途径在 SSC 的自我更新、迁移和分化中均发挥重要作用^[37],特别是对于引导 SSC 正确迁徙并定植在生精小管基底侧的 niche 至关重要。另有研究表明, CXCL12 的调控机制可能与激活 SSC 表面的 G 蛋白/PI3K/AKT、G 蛋白/PLC/MAPK 等信号途径有关^[38]。

2.3.2 CSF1 CSF1 是最常见的促炎细胞因子之一,与各种炎症性疾病有关。CSF1 在睾丸 LC 和部分生精小管管周细胞中都有表达,值得注意的是, CSF1 受体在未分化型精原细胞中高度表达,虽然不影响未分化型精原细胞的增殖,却增加了其干细胞特性。

2.3.3 Ets 相关分子(ERM) 已有研究证实 ERM 在 SSC 和 SC 中高表达,参与调控 SSC 的自我更新进程,过表达 ERM 可以增加 SSC 和 SC 中 CXCL12 的表达水平,进一步促进 SSC 的自我更新^[39];而 ERM 表达缺失则会导致 SSC 的自我更新失败,最终产生唯支持细胞综合征的病理表型。

2.3.4 上游刺激因子 1(USF1) USF1 是一种广泛表达的转录因子,人类 USF1 与调节动脉血压、中枢神经系统的突触可塑性和脂类代谢等均相关。新近研究发现,睾丸 SSC 和 SC 中均可检测到 USF1 表达,*Usf1*^{-/-}小鼠可以出现随年龄增加的进行性生精功能下降,可能源于 SSC 无法维持稳定的自我更新^[40]。

2.3.5 生殖细胞增殖相关蛋白 NANOS2 保守的 RNA 结合蛋白 NANOS2 是维持 SSC 自我更新所必需的,但其调控机制尚不完全清楚。新近研究显示,NANOS2 可与 CCR4-NOT 复合体相互作用,并直接结合到对 SSC 自我更新具有重要作用的 mRNA 上以调节其稳定性,进而参与调控 SSC 的自我更新^[41]。

3 总结与展望

随着研究方法和理念不断更新,研究者们对于睾丸内 niche 调控精子发生的认知已有很大进步,除了 SC,人们认识到睾丸内的间质细胞、PMC、LEC 和上皮细胞等也具有十分重要的作用,而且某一特定的调节因子,例如 GDNF 或 CSF1,并不能全面阐释其在调控 SSC 自我更新和分化中的全部作用,因为睾丸内 niche 中同一种调节因子并不全是由同一类型细胞分泌产生的,而且同一种调节因子在不同情形下亦可能发挥不同的调节作用。另外,由于 SSC 体外培养体系的日益完善,新的基因检测技术不断涌现,使得我们可以检测到 SSC 体外培养体系中更多重要的调节因子,探寻高效诱导 SSC 体外增殖、分化的分子机制是未来研究的热点之一。

综上所述,SSC 的自我更新和分化受到睾丸内 niche 的严密调控,niche 的形成不仅需要特定类型细胞在结构上的支持,还需要 niche 中多种细胞所产生的特定调节因子,明确睾丸内 niche 的构成对于研究精子发生至关重要,更有助于改进 SSC 的体外培养体系,从而为探寻 SSC 功能受损导致男性不育的发病机制提供研究基础。

[参考文献]

[1] ISHIKURA Y, OHTA H, SATO T, et al. *In vitro* reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2021,28(12):2167-2179.e9.

[2] ZHAO L Y, YAO C C, XING X Y, et al. Single-cell analysis of developing and azoospermia human testicles reveals central role of Sertoli cells[J]. *Nature Communications*, 2020,11(1):5683.

[3] PARKER N, LAYCHUR A, SUKWANI M, et al. Spermato-

gonial stem cell numbers are reduced by transient inhibition of GDNF signaling but restored by self-renewing replication when signaling resumes[J]. *Stem Cell Reports*, 2021,16(3):597-609.

[4] TSAI Y C, KUO T N, CHAO Y Y, et al. PDGF-AA activates AKT and ERK signaling for testicular interstitial Leydig cell growth via primary cilia[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2023,124(1):89-102.

[5] GUALDONI G S, JACOBO P V, SOBARZO C M, et al. Relevance of angiogenesis in autoimmune testis inflammation[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2021,27(2):gaaa073.

[6] KUBOTA H, KAKIUCHI K. Long-term *ex vivo* expansion of murine spermatogonial stem cells in a simple serum-free medium[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2155:165-182.

[7] LI X H, WANG Y Y, ZHU Q Q, et al. Epidermal growth factor regulates the development of stem and progenitor Leydig cells in rats[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(13):7313-7330.

[8] RUTHIG V A, LAMB D J. Updates in Sertoli cell-mediated signaling during spermatogenesis and advances in restoring Sertoli cell function[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022,13:897196.

[9] MA Y, ZHOU Y, XIAO Q, et al. Seminal exosomal miR-210-3p as a potential marker of Sertoli cell damage in Varicocele[J]. *Andrology*, 2021,9(1):451-459.

[10] LIANG J L, LI H H, MEI J X, et al. Sertoli cell-derived exosome-mediated transfer of miR-145-5p inhibits Leydig cell steroidogenesis by targeting steroidogenic factor 1[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2021,35(6):e21660.

[11] WANG B, ZHAI C X, LI Y Z, et al. Sertoli cells-derived exosomal miR-30a-5p regulates ubiquitin E3 ligase Zeb2 to affect the spermatogonial stem cells proliferation and differentiation[J]. *Reproductive Toxicology*, 2023,117:108340.

[12] KANATSU-SHINOHARA M, Ogonuki N, MATOBA S, et al. Autologous transplantation of spermatogonial stem cells restores fertility in congenitally infertile mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020,117(14):7837-7844.

[13] SHEN Y C, SHAMI A N, MORITZ L, et al. TCF21⁺ mesenchymal cells contribute to testis somatic cell development, homeostasis, and regeneration in mice[J]. *Nature Communications*, 2021,12(1):3876.

[14] GUO J T, SOSA E, CHITIASHVILI T, et al. Single-cell analysis of the developing human testis reveals somatic niche cell specification and fetal germline stem cell establishment[J]. *Cell Stem Cell*, 2021,28(4):764-778.e4.

[15] LI T, ZHENG C, HAN W J, et al. Regulation of STUB1 expression and its biological significance in mouse Sertoli cells[J]. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2022,68(4):298-313.

- [16] LI X H, FANG Y H, CHEN L L, et al. Bone morphogenetic protein 4 inhibits rat stem/progenitor Leydig cell development and regeneration via SMAD-dependent and SMAD-independent signaling[J]. *Cell Death & Disease*, 2022,13(12):1039.
- [17] RADOVIC PLETIKOSIC S M, STAROVLAH I M, MILJKOVIC D, et al. Deficiency in insulin-like growth factors signalling in mouse Leydig cells increase conversion of testosterone to estradiol because of feminization[J]. *Acta Physiologica*, 2021,231(3):e13563.
- [18] LIANG H Y, PENG F, PAN M J, et al. Exosomes derived from BMSCs ameliorate cyclophosphamide-induced testosterone deficiency by enhancing the autophagy of Leydig cells via the AMPK-mTOR signaling pathway[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2022,25(4):474-483.
- [19] WANG Y Q, BATOOL A, CHEN S R, et al. GATA4 is a negative regulator of contractility in mouse testicular peritubular myoid cells[J]. *Reproduction*, 2018,156(4):343-351.
- [20] RIVIERE E, ROSSI S P, TAVALIERY E, et al. Pleiotropic actions of melatonin in testicular peritubular myoid cells of immature Syrian hamsters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 2022,1866(10):130187.
- [21] LOKKA E, LINTUKORPI L, CISNEROS-MONTALVO S, et al. Generation, localization and functions of macrophages during the development of testis[J]. *Nature Communications*, 2020,11(1):4375.
- [22] BHANG D H, KIM B J, KIM B G, et al. Testicular endothelial cells are a critical population in the germline stem cell niche [J]. *Nature Communications*, 2018,9(1):4379.
- [23] SONG W P, GU S J, TAN X H, et al. Proteomic analysis and miRNA profiling of human testicular endothelial cell-derived exosomes: the potential effects on spermatogenesis[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2022,24(5):478-486.
- [24] SUBASH S K, KUMAR P G. Spermatogonial stem cells: a story of self-renewal and differentiation[J]. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 2021,26(1):163-205.
- [25] XI H M, REN F, LI Y, et al. FSH inhibits autophagy and lysosomal biogenesis to regulate protein degradation in cultured goat Sertoli cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2022,540:111505.
- [26] DI PERSIO S, STARACE D, CAPPONI C, et al. TNF- α inhibits GDNF levels in Sertoli cells, through a NF- κ B-dependent, HES1-dependent mechanism[J]. *Andrology*, 2021, 9 (3):956-964.
- [27] SHARMA M, BRAUN R E. Cyclical expression of GDNF is required for spermatogonial stem cell homeostasis[J]. *Development*, 2018,145(5):dev151555.
- [28] KITADATE Y, JÖRG D J, TOKUE M, et al. Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1):79-92.e6.
- [29] MASAKI K, SAKAI M, KUROKI S, et al. FGF₂ has distinct molecular functions from GDNF in the mouse germline niche [J]. *Stem Cell Reports*, 2018,10(6):1782-1792.
- [30] YANG F, WHELAN E C, GUAN X B, et al. FGF₉ promotes mouse spermatogonial stem cell proliferation mediated by p38 MAPK signalling[J]. *Cell Proliferation*, 2021,54(1):e12933.
- [31] ZHANG X Y, ZHAO X, LI G L, et al. Establishment of *Etv5* gene knockout mice as a recipient model for spermatogonial stem cell transplantation[J]. *Biology Open*, 2021,10(1):bio056804.
- [32] RAJACHANDRAN S, ZHANG X, CAO Q Q, et al. Dissecting the spermatogonial stem cell niche using spatial transcriptomics[J]. *Cell Reports*, 2023,42(7):112737.
- [33] KE M, HE Q, HONG D, et al. Leukemia inhibitory factor regulates marmoset induced pluripotent stem cell proliferation via a PI3K/Akt-dependent Tbx-3 activation pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 42 (1): 131-140.
- [34] WANG M, GUO Y S, WANG M, et al. The glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)-responsive phosphoprotein landscape identifies *Raptor* phosphorylation required for spermatogonial progenitor cell proliferation[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017,16(6):982-997.
- [35] SINHA N, WHELAN E C, TOBIAS J W, et al. Roles of Stra8 and Tcerg1l in retinoic acid induced spermatogonial differentiation in mouse[J]. *Biology of Reproduction*, 2021,105 (2):503-518.
- [36] TOKUE M, IKAMI K, MIZUNO S, et al. SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting Wnt/ β -catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2017,8(3):561-575.
- [37] PARK H J, LEE W Y, KIM J H, et al. Expression patterns and role of SDF-1/CXCR4 axis in boar spermatogonial stem cells[J]. *Theriogenology*, 2018,113:221-228.
- [38] YANG G Q, HE Y Q, YANG H. The involvement of bioactive factors in the self-renewal and stemness maintenance of spermatogonial stem cells[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2021,476(4):1813-1823.
- [39] LEE S J, PARK J, LEE D J, et al. Mast4 knockout shows the regulation of spermatogonial stem cell self-renewal via the FGF2/ERM pathway[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2021, 28(5):1441-1454.
- [40] FAISAL I, CISNEROS-MONTALVO S, HAMER G, et al. Transcription factor USF₁ is required for maintenance of germline stem cells in male mice[J]. *Endocrinology*, 2019,160(5): 1119-1136.
- [41] CODINO A, TUROWSKI T, VAN DE LAGEMAAT L N, et al. NANOS2 is a sequence-specific mRNA-binding protein that promotes transcript degradation in spermatogonial stem cells[J]. *iScience*, 2021,24(7):102762.