

小鼠生殖细胞的胚胎发育

韩 嵘, 尚克刚

(北京大学生命科学学院, 100871)

摘要:本文综述了近年来小鼠胚胎发育过程中生殖细胞的起源、迁移与增殖、性别分化及其基因组修饰等方面的研究进展。小鼠生殖细胞在 7~7.5dpc 时由原始生殖细胞(PGC)演变而来,至 12.5dpc 时 PGC 全部迁移进入生殖嵴,到 13.5dpc 时停止分裂。Steel/c-kit 信号途径在 PGC 迁移过程中起重要作用。生殖细胞的性别主要是由生殖腺中体细胞的微环境决定的。Y 染色体上存在精子形成所必需的基因。生殖细胞的全基因组范围的重新甲基化晚于胚胎体细胞的重新甲基化,到 18.5dpc 时才完成。雌性生殖细胞的 X 染色体重新活化在 14.5~15.5dpc 时完成,并且与生殖嵴的性别分化无关。

关键词:原始生殖细胞;小鼠胚胎发育

中图分类号:Q344

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2002)01-0077-05

Germ Cells in the Murine Embryonic Development

HAN Rong, SHANG Ke-gang

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: This paper reviewed the recent progress of the origin, migration and proliferation, sex determination, and genomic modification of murine germ cells during its embryonic development. Murine germ cells originate from primordial germ cells at about 7~7.5dpc. Then PGCs migrated into germinal ridge at about 12.5dpc during which Steel/c-kit signal pathway plays important roles and stopped division at 13.5dpc. The sex of germ cells was mainly determined by the soma microenvironment in the gonad. And there are essential genes for sperm formation on the Y chromosome. The de novo methylation of murine germ cells was much later than soma cells and was completed at about 18.5dpc. The X chromosome reactivation of female germ cells was finished at about 14.5~15.5dpc which was independent of sexual differentiation of germinal ridge.

Key words: primordial germ cells; murine embryonic development

所有有性生殖的有机体都来源于由生殖细胞分化形成的配子。生殖细胞可通过遗传物质的传递使物种得以繁衍,并且是进化过程中物种形成与变异的开始^[1]。由于不同哺乳动物生殖细胞的很多特性是一致的,目前人们对哺乳动物生殖细胞的研究主要以小鼠为材料^[2]。

1 生殖细胞的起源

胚胎中生殖细胞的前体称为原始生殖细胞(primordial germ cells, PGC)。哺乳动物的 PGC 一般具有表达高水平碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)的特性(兔及有袋目除

外)^[2],可以通过组织化学染色的方法显示 PGC 在胚胎中的分布。可通过 AP 表达检测出小鼠 PGC 的最早时间是胚胎进入原肠胚形成中期时,约 7~7.5dpc (days postcoitum, 发现阴栓的当天记为 0.5dpc),位于原条后端的胚外组织中^[3]。原肠胚形成结束时 PGC 的数目约为 50~80 个。8~8.5dpc 时 PGC 约有 100 个,位于尿囊基部,并进入后肠内胚层中。9~9.5dpc 时 PGC 离开后肠,沿着背部肠系膜向生殖嵴迁移,从 10.5dpc 起开始进入生殖嵴,至 12.5dpc 时 PGC 全部进入生殖嵴并继续分裂,至 13.5dpc 时停止分裂,PGC 数目约可达到 25000 个^[4]。

收稿日期:2001-02-26;修回日期:2001-4-28

基金项目:国家自然科学基金资助课题(39730250)

作者简介:韩 嵘(1972-),女(汉族),杭州人,博士学位,专业方向:遗传学。电话:010-627594983

1.1 PGC 的前体细胞

早于 7.5dpc 的小鼠胚胎中,由于缺乏合适的特异性遗传标记而不能直接检测出 PGC 细胞。嵌合体实验证明,PGC 来源于早期胚胎中的上胚层细胞(epiblast,也称作原始外胚层或胚外胚层),单个的 4.5dpc 上胚层细胞可同时形成体细胞和生殖细胞^[5]。1994 年,Lawson 等人通过单细胞克隆分析的方法,证明卵柱期胚胎(6.0dpc)中 PGC 的前体细胞位于上胚层中靠近胚外外胚层的位置(称近端位置),而且随着上胚层细胞的增殖向原条后端移动,并于原肠胚形成早期通过原条进入胚外中胚层^[6]。克隆分析的结果还表明,6.0 和 6.5dpc 的 PGC 前体细胞都不仅参与 PGC 的形成,还大量形成胚外中胚层细胞,证明原肠胚形成前生殖细胞世系还没有被决定,因而没有与体细胞世系分离开来^[6]。Lawson 利用上胚层细胞与 PGC 细胞倍增时间不同的原理进行了计算,得出如下结论:确定 PGC 的时间是 7.2dpc,即中原条期,与 Ginsberg 利用 AP 活性最早检测到 PGC 的时间一致;PGC 决定时的起始群体大小约为 45 个细胞^[6]。

1.2 生殖细胞决定的机制

1996 年,Tam 等人巧妙地利用胚胎移植实验研究了小鼠上胚层细胞的发育潜能^[7]。他们发现,前原条期和早原条期(6.0~6.5dpc)的上胚层细胞不论来自于胚胎的哪个位置,都将与移植后所处位置周围的细胞同样发育,即不论上胚层近端或远端的细胞,移植到近端位置则都可能形成 PGC。由此证明:原肠胚形成早期的所有上胚层细胞都具有相似的发育潜能,是由细胞所处的位置决定其发育方向;而且在早期小鼠胚胎中并不存在预先决定的生殖细胞系,生殖细胞的特化可能受到局部组织间相互作用和原肠胚形成时上胚层组织的形态建成运动的影响^[7]。

Lawson 等人发现胚外外胚层表达的骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenetic protein 4, BMP4) 是小鼠 PGC 形成所必需的信号分子之一^[8]。BMP4 是转化生长因子(TGF β)超家族的一种胞间信号蛋白,对小鼠的胚胎发育具有重要作用,敲除 *BMP4* 基因会引起胚胎死亡^[9],多数 BMP4 $-/-$ 胚胎死于 6.5dpc 时,而在某些遗传背景(129/SvEv \times Black Swiss, C57BL/6 \times CBA)下,部分 BMP4 $-/-$ 胚可发育至体节期,这些突变胚具有严重的表型缺陷,尤其是在胚外中胚层区域。Lawson 研究了这两种遗传背景下的 *BMP4* 突变体,发现 *BMP4* 纯合突变(*BMP4* $+/-$)的胚胎既无尿囊,也无 PGC,而杂合突变(*BMP4* $+/-$)的胚胎中尿囊正常,PGC 的数量比野生型(*BMP4* $+/+$)减少一半^[8]。Lawson 还发现胚外外胚层表达的 BMP4 是尿囊形成和 PGC 特化所必需的^[8]。

2 原始生殖细胞的迁移与增殖

很多动物的原始生殖细胞都不是直接在生殖腺原基中形成的,而是在生殖腺以外的区域起源,通常都是起源于胚

胎的边缘区域,随后沿着一定的路线迁移到生殖腺中^[1,10]小鼠的生殖细胞也是如此,当 PGC 前体通过原条进入胚外中胚层并被决定后,就开始了向生殖嵴迁移的旅程。PGC 于体外起源可能是为了使 PGC 不致受到体细胞分化的影响,以便保持其全能性^[2]。另外,生殖细胞在进化上的出现早于生殖腺,在无生殖腺的动物体内,生殖细胞在配子形成过程中一直在不断地迁移,以便更好地吸收营养,促进其生长。高等动物中 PGC 的迁移可能也是一种进化过程中的原始特性的反映^[11]。PGC 的迁移可能还有助于从种系中剔除不正常的细胞^[10]。

2.1 PGC 迁移的机制

小鼠 PGC 的迁移过程可分为两个阶段^[2]:第一个阶段(大约从 7.5dpc 至 9.0dpc),PGC 从原条的后端,也是正在形成的后肠所处的区域,随着后肠的内卷被带进胚胎内部,并到达后肠内胚层。这时它们是被被动地卷入后肠的形态建成运动。第二个阶段大约从 9.5dpc 至 12.5dpc,PGC 离开后肠内胚层,沿着背肠系膜运动,最终进入生殖嵴。这一时期的 PGC 具有伪足等特征结构,它们是以变形虫样运动的方式主动地向生殖嵴迁移。若将这一阶段的 PGC 分离出来在体外培养,仍然可以观察到它们的自主运动^[12]。体外培养的 PGC 达到相当于 12.5dpc 时,就丧失了运动的特性,表明 PGC 运动能力的变化可能是内源性的。

生殖嵴释放的某些趋化性物质,具有吸引 PGC 的能力。在体外培养的情况下,10.5dpc 胚胎的生殖嵴和生殖嵴条件培养基都具有吸引 PGC 朝之运动及促进其增殖的能力^[2]。PGCs 迁移路径上的体细胞及周围的胞外基质对 PGC 也有重要影响^[2,13]。小鼠 PGC 在迁移过程前后(8.5~12.5dpc)对胞外基质糖蛋白的黏着力的变化,促使其离开后肠向生殖嵴迁移并停留在生殖嵴中^[14]。PGC 之间的相互联系也对迁移有重要的影响,PGC 离开后肠时,立即开始伸出伪足互相联系,最终连成一个大的网络,PGC 网络的形成可能参与 PGC 迁移的引导和促使它们在生殖嵴中聚集^[15]。

在 PGC 与迁移路径上的体细胞间的相互作用方面,目前了解比较多的是 Steel/*c-kit* 信号途径。*c-kit* 是由显性白斑基因(dominant white spotting, *W* locus, 也称 *c-kit* 基因)编码的酪氨酸激酶受体,其配体是由 Steel(*Sl*)基因编码的干细胞生长因子(stem cell factor, SCF)。蛋白 C-KIT 在 PGC 中表达,而干细胞生长因子(SCF)在 PGC 迁移路径上的体细胞中表达,并且表达量形成明显的梯度,在生殖嵴中表达量最高^[16],但干细胞生长因子对 PGC 并不具有趋化性作用^[17]。C-KIT/SCF 可以介导 PGC 附着到体细胞上,可能通过这一方式引导 PGC 向生殖嵴运动^[2],而且 SCF 是 PGC 存活所必需的生长因子^[18]。

2.2 PGC 的增殖

PGC 的迁移过程伴随着 PGC 数量的大量增加^[2],这一阶段 PGC 群体加倍时间为 16 小时。对 PGC 数量的控制依

赖于对 PGC 增殖和存活的精确调控。由于这时 PGC 在胚胎中的数量仍然很少,所以影响 PGC 增殖和存活的分子机制的研究主要是通过体外培养实验来进行的。在体外能够刺激 PGC 数量增加的分子有很多,而它们在体内是否具有相同的作用还需要更多的实验证明。

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、SCF、白介素-4(interleukin-4, IL-4)可以促进 PGC 的存活^[18~21],有证据表明,SCF 和 LIF 可以抑制 PGC 的凋亡^[22]。IL-4 在 10.5dpc~12.5dpc 胚胎生殖嵴组织中表达,同时其受体在含有 PGC 的组织中表达,说明 IL-4 在体内可能也是 PGC 的存活因子^[21]。

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和 cAMP 信号途径具有刺激 PGC 增殖的作用^[23~25]。在 bFGF、SCF、LIF 和饲养层细胞的共同作用下,体外培养的 PGC 能够不断增殖,成为类似胚胎干细胞的永久细胞系,被称作胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EG)^[26]。无饲养层或使用纯化的 PGC 时, bFGF 同样具有刺激 PGC 生长的作用,表明 bFGF 可能直接作用于 PGC,而不是间接地通过饲养层或体细胞作用于 PGC^[27]。

3 生殖细胞的性别分化

生殖细胞在刚刚决定时不论形态还是行为在雌雄两性之间都没有差别,一般在进入生殖嵴以后才开始出现性别分化^[13]。12.5dpc 起才可以从生殖嵴形态上区分出性别,雄性生殖腺(精巢)含有条纹状的结构,而雌性生殖腺(卵巢)呈现一种均一的、未分化的形态^[28]。

3.1 性别的决定

小鼠 PGC 的性别由生殖腺中体细胞的微环境决定^[13]。不论 PGC 本身的基因型如何,进入精巢的 PGC 都成为精原细胞,而进入卵巢的 PGC 都发育成卵原细胞,进入卵子发生过程,XY 型的 PGC 甚至也能够最终发育成有功能的卵子。但精巢中 XX 型的 PGC 虽然能够进入精子发生过程,却在减数分裂开始前就退化了,表明 Y 染色体上存在精子发生所必需的基因^[11]。

在生殖腺中存在三种体细胞:支持细胞(精巢中为足细胞,sertoli cell;卵巢中为滤泡细胞 follicle cell)、间质细胞和结缔组织细胞。一般认为是支持细胞启动了生殖腺的性别分化^[13]。现在已经知道, *Sry* 基因(sex determining region Y gene, 人类中称 *SRY* 基因)是 Y 染色体上唯一的精巢决定基因^[29],可以说,性别决定就是精巢的决定,没有 *Sry* 基因表达的生殖腺就发育成卵巢。*Sry* 的表达使支持细胞分化为足细胞(Sertoli cell),再由足细胞引导性腺中其他细胞,包括生殖细胞的分化^[30]。目前已发现的与哺乳动物性别分化有关的基因还有 *Sox9*、*Dax1*、*Sfl1*、*Wtl*、*Amh* 等,但这些基因产物之间的相互作用和级联关系还不甚明确,可能还存在其

他的中间基因有待发现^[30]。

足细胞分化完成后,可能通过细胞之间的相互作用和某些分泌产物来引导生殖腺、生殖管道等其他细胞发生性别分化^[30]。生殖细胞的性别可能也是通过这种方式被决定的,但参与这一作用的分子尚未确定。有些 PGC 细胞迁移时可能会走错方向而进入肾上腺,这可能是由于肾上腺与性腺具有相同的起源^[22],不论雌性或雄性胚胎,错误进入肾上腺中的生殖细胞的表现都和卵巢中的一样,即进入卵子发生过程,说明精巢分泌的可溶性因子对于生殖细胞的性别分化可能作用不大^[11]。

3.2 从有丝分裂到减数分裂

小鼠生殖细胞进入生殖嵴后,约 13.5dpc 时停止有丝分裂,随后根据胚胎性别不同进入不同的发育途径:精巢中的生殖细胞停滞在细胞周期中的 G_1 或 G_0 期,成为 T-前精原细胞(T-prospermatogonia),至出生时恢复有丝分裂,而减数分裂在出生后一周才开始^[13];卵巢中的生殖细胞(卵原细胞, oogonia)则立即进入第一次减数分裂前期,成为卵母细胞(oocytes),经细线期、偶线期和粗线期,出生后停滞于双线期,减数分裂停滞期是卵母细胞生长的主要时期,直至排卵前才恢复减数分裂^[11]。

如前文所述,错误迁移进入肾上腺的生殖细胞的行为和卵巢中一样,在出生后的雌性小鼠肾上腺中,都曾发现进入减数分裂前期的卵母细胞^[13]。如果将 11.5dpc 的生殖细胞从生殖嵴中分离出来进行培养,即使来自雄性生殖嵴的生殖细胞也将进入减数分裂前期^[31]。据此推测,生殖细胞进入减数分裂可能是一种细胞自主行为,而不是由生殖腺中体细胞的诱导引起的^[11]。

13dpc 精巢的条件培养基会引起整体培养的卵巢中生殖细胞数量的减少^[10],而 12.5dpc 的雄性生殖细胞在体外培养时已无法进入减数分裂^[31],说明精巢中可能同时存在有丝分裂抑制物质(mitosis-inhibiting substance)和减数分裂抑制物质(meiosis-preventing substance, MPS)。精巢中睾丸索结构的形成是减数分裂抑制所必需的,不能形成睾丸索将导致生殖细胞进入减数分裂^[31]。

4 生殖细胞基因组的修饰

哺乳动物生殖细胞的发育伴随着一系列特征性的基因组修饰,使种系细胞与体细胞相区别,其中包括染色体的广泛去甲基化、印记基因座上等位基因特异的甲基化的去除,以及失活的 X 染色体的重新活化^[32]。受精后,小鼠胚胎基因组立即发生去甲基化作用,这与合子基因表达的启动同步^[33]。原肠胚形成开始前,胚胎体细胞中发生全基因组范围的重新甲基化(de novo methylation),而生殖细胞能避开体细胞中的全基因组重新甲基化作用^[34],因此生殖细胞基因组是甲基化不足的。在胚胎发育的较晚时期生殖细胞中发生重新甲基化,并于 18.5dpc 完成^[33],而在配子发生过程

中,性别特异的甲基化修饰作用使精子和卵子最终获得不同程度的甲基化^[33]。

体细胞中印迹基因的独特甲基化修饰模式在早期胚胎发育时并不去除,而在生殖细胞发育过程中将经历一系列独特的变化。

4.1 基因印迹的去除和重建

印迹基因(imprinted gene)是哺乳动物体内一类单等位基因表达的基因,其表达依赖于等位基因的亲本来源,在某些组织和器官中特异性地只表达父源或母源的等位基因。印迹基因的差异表达方式必然与亲本等位基因间的差异性修饰相联系,并且这种修饰可以从配子遗传给胚胎并在胚胎体细胞中保持,而在生殖细胞中需要去除旧的印迹,然后再根据个体的性别,给两个等位基因都加上特异性的修饰^[10,35]。有证据表明等位基因间差异性的甲基化修饰和染色质构象的变化,对基因印迹的建立和维持具有重要作用^[36,37]。

小鼠 EG 细胞的建立为研究生殖细胞中基因印迹的情况创造了良好的条件。因为 EG 细胞保持了 PGC 基因组的修饰状态^[38,39],同时可以提供大量的细胞,弥补由于 PGC 数目太少而难以研究的不足。考查来自于 8.0 和 8.5dpc PGC 的 EG 细胞中 *Igf2r* 基因的与印迹相关的甲基化位点发现,多数 EG 细胞系的两个等位基因都是去甲基化的,只有个别 EG 细胞系的甲基化模式与体细胞相同,表明该位点(site)上亲本甲基化的去除可能就发生在 8.0~8.5dpc^[38]。*Igf2r* 基因的甲基化与否似乎并不影响 EG 细胞的发育潜能,因为这两类 EG 细胞都能够参与嵌合体种系和体系细胞的发育^[38]。目前,从 11.5~12.5dpc 雌性或雄性小鼠胚胎中都能够建成 EG 细胞系。在这些细胞中,多个印迹基因两个等位基因的甲基化状态都类似于体细胞中的父本等位基因,如 *Igf2r*、*Peg1/Mest*、*Peg3*、*Nnat* 和 *p57kip2*,只有 *H19* 和 *Igf2* 基因仍保持与体细胞中相同的甲基化模式^[40]。用这些细胞制作的嵌合体胚胎表现出胚胎过度增长及骨骼异常等特征,较类似于用孤雄生殖的 ES 细胞获得的嵌合体。从以上结果来看,生殖细胞不论性别如何都具有同样的后生型(epigenotype),去除亲本印迹的过程可能也就是父本印迹的获得,而母本印迹可能在卵子发生的晚期获得^[40]。

4.2 X 染色体失活与重新活化

在哺乳动物发育过程中,由于剂量补偿效应,雌性胚胎细胞中的一条 X 染色体会发生随机失活,生殖细胞中也不例外,但在卵子发生时又需要使失活的 X 染色体重新活化,以确保单倍体卵母细胞中具有活化的 X 染色体^[41]。通过对 X 染色体连锁的 *lacZ* 转基因在胚胎生殖细胞中的表达情况的研究证明,小鼠 7.5~8.5dpc 的 PGC 大部分含有两个活化的 X 染色体,X 染色体的随机失活始于 PGC 离开后肠开始迁移时,而且在迁移过程中完成,PGC 群体中的不同细胞间这一过程并不是同时发生的^[41]。大约从 10.5dpc 起,进

入生殖嵴的 PGC 中开始发生 X 染色体的重新活化,并在减数分裂开始前完成。至 14.5~15.5dpc,卵巢中 90% 的 PGC 的两条 X 染色体都是活化的。X 染色体的重新活化受到生殖嵴的作用,因为 13.5~15.5dpc 迁移到生殖嵴外的 PGC 中没有发生这一过程^[41]。在 XXY 雄性小鼠胚胎中,12.5~14.5dpc 时 PGC 的两条 X 染色体也都是活化的,表明 X 染色体的重新活化与生殖嵴的性别分化无关^[42]。但正确的 X 染色体剂量对精子发生是必要的,XXY 的生殖细胞在 X 染色体重新活化后不久就会因为发育异常而从精巢中消失^[42]。

生殖细胞是动物体内最独特的一类细胞,对哺乳动物生殖细胞发育的研究目前较多的仍是描述性的工作,对其分子机制的研究才刚刚开始,这一领域还隐藏着大量激动人心的秘密等待科学家们去发掘。

参考文献(Reference):

- [1] Wylie C. Germ cells[J]. Cell, 1999, 96: 165~174.
- [2] Buehr M. The primordial germ cells of mammals: some current perspectives[J]. Exp Cell Res, 1997, 232: 194~207.
- [3] Ginsburg M, Snow M H L, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation[J]. Development, 1990, 110: 521~528.
- [4] Cooke J E, Godin I, French-Constant C, et al. Culture and manipulation of primordial germ cells[A]. Wassarman PM. Guide to techniques in mouse development[C]. (Methods in Enzymology, Vol 225) San Diego: Academic Pr., Inc., 1993, 37~58.
- [5] Gardner R L, Papaioannou V E. Differentiation in the trophectoderm and inner cell mass[A]. Balls M. The early development of mammals [C]. Cambridge: Cambridge University Press, 1975, 107~132.
- [6] Lawson K A, Hage W J. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse[A]. Marsh J. Germline Development[C]. (Ciba Foundation Symposium, Vol 182). Chichester: Wiley, 1994, 84~91.
- [7] Tam P P L, Zhou S X. The allocation of epiblast cells to the ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo[J]. Dev Biol, 1996, 178: 124~132.
- [8] Lawson K A, Dunn N R, Roelen B A J et al. *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo[J]. Genes & Dev, 1999, 13: 424~436.
- [9] Winner G, Blessing M, Labosky P A et al. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse[J]. Genes & Dev, 1995, 9: 2105~2116.
- [10] Wei G, Mahowald A P. The germline: familiar and newly uncovered properties[J]. Annu Rev Genet, 1994, 28: 309~324.
- [11] Denis H. A parallel between development and evolution: Germ

- cell recruitment by the gonads[J]. *BioEssays*, 1994, 16: 933~938.
- [12] Donovan P J, Scott D, Cairns L A *et al.* Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture[J]. *Cell*, 1986, 44: 831~838.
- [13] McLaren A. Germline and soma: interactions during early mouse development[J]. *Dev Biol*, 1994, 5: 43~49.
- [14] Garcia-Castro M I, Anderson R, Heasman J I *et al.* Interaction between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonads assembly in the mouse embryo [J]. *J. Cell Biol*, 1997, 138: 471~480.
- [15] Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C *et al.* Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos[J]. *Development*, 1994, 120: 135~141.
- [16] De Felici M, Pesce M. Growth factors in mouse primordial germ cell migration and proliferation[J]. *Prog. Growth Factor Res*, 1994, 5: 135~143.
- [17] Godin I, Deed R, Cooke H, *et al.* Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture [J]. *Nature*, 1991, 352: 807~809.
- [18] Buehr M, McLaren A, Bartley A, *et al.* Proliferation and Migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos[J]. *Dev Dyn*, 1993, 198: 182~189.
- [19] Matsui Y, Nishikawa S, Nishikawa S-I *et al.* Effect of Steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture[J]. *Nature*, 1991, 353: 750~752.
- [20] Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J *et al.* The origin and migration of primordial germ cell in the mouse[J]. *Cell Dev Biol*, 1998, 9: 393~400.
- [21] Cooke J E, Heasman J, Wylie C C. The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cell numbers[J]. *Dev Biol*, 1996, 174: 14~21.
- [22] Pesce M, Farrace M G, Piacentini M *et al.* Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis) [J]. *Development*, 1993, 118: 1089~1094.
- [23] Matsui Y, Zsebo K, Hogan B L M. Derivation of pluripotential embryonic stem cell from murine primordial germ cells in culture[J]. *Cell*, 1992, 70: 841~847.
- [24] Kawase E, Yamamoto H, Hashimoto K. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture[J]. *Dev Biol*, 1994, 161: 91~95.
- [25] De Felici M, Dolci S, Pesce M. Proliferation of mouse primordial cells in vitro; a key role for cAMP[J]. *Dev Biol*, 1993, 157: 277~280.
- [26] Resnick J L, Bixler L S, Cheng L Z, *et al.* Long term proliferation of mouse primordial germ cells in culture [J]. *Nature*, 1992, 359: 550~551.
- [27] Resnick J L, Ortiz M, Keller J R, *et al.* Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth[J]. *Biol Reprod*, 1992, 59: 1224~1229.
- [28] Buehr M, McLaren A. Isolation and culture of primordial germ cells[A]. Wassarman PM. *Guide to techniques in mouse development*[C]. (Methods in Enzymology, Vol 225) San Diego: Academic Pr, Inc, 1993. 58~77.
- [29] Koopman P, Gubbay J. The biology of sry[J]. *Semin Dev Biol*, 1991, 2: 259~264.
- [30] Swain S, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama[J]. *Genes & Dev*, 1999, 13: 755~767.
- [31] McLaren A, Southey D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis[J]. *Dev Biol*, 1997, 187: 107~113.
- [32] Kato Y, Rideout III A M, Hilton K, *et al.* Development potential of mouse primordial germ cells [J]. *Development*, 1999, 126: 1823~1832.
- [33] Kafri T, Ariel M, Brandeis M, *et al.* Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line[J]. *Genes & Dev* 1992, 6: 705~714.
- [34] Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development[J]. *Development*, 1987, 99: 371~382.
- [35] Szabo P E, Mann J R. Allelic expression of imprinted genes in the mouse germ line: implications for erasure, establishment, and mechanisms of genomic imprinting [J]. *Genes & Dev*, 1995, 9: 1857~1868.
- [36] Latham K E, Doherty A S, Scott C D, *et al.* *Igf2r* and *Igf2* gene expression in androgenetic, gynogenetic, and parthenogenetic preimplantation mouse embryos: absence of regulation by genomic imprinting[J]. *Genes & Dev*, 1994, 8: 290~299.
- [37] Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting[J]. *Nature*, 1993, 366: 362~365.
- [38] Labosky P A, Barlow D P, Hogan B L M. Embryonic germ lines and their derivation from mouse primordial germ cells [A]. Marsh J. *Germline Development*[C]. (Ciba Foundation Symposium, Vol 182). Chichester: Wiley, 1994, 157~178.
- [39] Stewart C L, Gadi I, Bhatt H. Stem cells from primordial germ cell can reenter the germ line[J]. *Dev Biol*, 1994, 161: 626~628.
- [40] Tada T, Tada M, Hilton K. Epigenotype switching of imprinted loci in embryonic germ cells[J]. *Dev Genes Evol*, 1998, 207: 551~561.
- [41] Tam P P L, Zhou S X, Tan S S. X-chromosome activity of the mouse primordial germ cells revealed by the expression of an X-linked lacZ transgene[J]. *Development*, 1994, 120: 2925~2932.
- [42] Mroz K, Carrel L, Hunt P A. Germ cell development in the XXY mouse evidence that X chromosome reactivation is independent of sexual differentiation[J]. *Dev Biol*, 1999, 207: 229~238.