

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.10.005

抑制糖酵解活性限制雄性原始生殖细胞的增殖*

徐瑜珊 陈 丽 王 娜 臧春燕 彭凡珂 张 军[△]

(南京医科大学生殖医学国家重点实验室 江苏 南京 210000)

摘要 目的: 雄性原始生殖细胞在植入生殖嵴后, 会从有丝分裂退出进入静息状态, 在这一过程中伴随着细胞内代谢状态的改变, 本研究旨在体解析原始生殖细胞增殖的改变与细胞代谢之间的因果关系。**方法:** 通过体内 BrdU 掺入实验明确不同时间点雄性生殖细胞的增殖状态; 分析比较增殖状态和静息状态原始生殖细胞糖酵解相关基因的表达; 利用腹腔注射 HK2 特异性抑制剂 2-Deoxy-D-glucose (2-DG), 构建糖酵解抑制小鼠模型; 通过免疫荧光与 qPCR 分析抑制糖酵解后原始生殖细胞的表型。**结果:** 免疫荧光结果显示雄性生殖细胞增殖停滞从 E13.5 开始, 至 E15.5 完全停滞; qPCR 和 Western Blot 显示在此过程中 HK2 的表达是逐渐降低的; 在 E11.5 抑制小鼠胚胎中的糖酵解过程, 可以在 E13.5 检测到雄性 PGCs 增殖下降, 并且可以抑制多能性基因如 Sox2、Oct4 的表达。**结论:** 研究发现, E11.5-E13.5 雄性原始生殖细胞内增殖与多能性的维持需要糖酵解。改变胚胎糖酵解水平可以影响原始生殖细胞增殖分化进程。

关键词: 雄性生殖细胞; 糖代谢; 多能性; 分化

中图分类号: R-33; Q132.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)10-1823-06

Inhibition of Glycolysis Activity Limits the Proliferation of Male Primordial Germ Cells*

XU Yu-shan, CHEN Li, WANG Na, ZANG Chun-yan, PENG Fan-ke, ZHANG Jun[△]

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nan Jing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210000, China)

ABSTRACT Objective: Male primordial germ cells will exit from mitosis and enter a cell cycle arrest after implantation of genital ridge, accompanied by changes in intracellular metabolic states. Our work is to explore causal relationship between primordial germ cells proliferation and cell metabolism. **Methods:** The proliferation states of male primordial germ cells at different time points was determined by BrdU incorporation assay. The expression of glycolysis related genes of primordial germ cells in the proliferative state and cell cycle arrest state was compared by qPCR. A mouse model of glycolysis inhibition was established by intraperitoneal injection of HK2-specific inhibitor 2-DG, and phenotype was analyzed by immunofluorescence and qPCR. **Results:** The results of immunofluorescence showed that the cell cycle arrest of male germ cells start at E13.5 and completely arrest at E15.5. qPCR and Western Blot showed that Hk2 was decreased during this process. Inhibition of Hk2 in mouse embryos at E11.5, the proliferation of male germ cells was significantly inhibited at E13.5, and the expression levels of pluripotent genes such as Sox2 and Oct4 were decreased. **Conclusion:** This study found that in E11.5-E13.5, glycolysis is required for proliferation and maintenance of pluripotency in male primordial germ cells. Changing the level of embryonic glycolysis can affect the proliferation and differentiation of primordial germ cells.

Key words: Male primordial germ cell; Glycolysis; Pluripotency; Differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q132.7 **Docuement code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)10-1823-06

前言

生殖细胞是一类负责传递物种遗传信息的特殊细胞谱系。所有的生殖细胞均来自于原始生殖细胞(PGCs)^[1]。小鼠 PGCs 最早在 E6.25 的原肠期胚胎中检测到^[2], 在 Blimp1 (PR domain containing 1, with ZNF domain) 等核心转录因子协同作用下^[3], 中胚层分化相关的体细胞基因表达被抑制, 而全能

性相关基因的表达被重新激活^[4]。PGC 在离开肠内胚层后沿被肠系膜向体腔壁转移, 在迁移期间其数量增加。PGC 在 E10.5-E11.5 到达生殖嵴, 一旦 PGCs 定植于生殖嵴, 雌性和雄性生殖细胞均经历数轮有丝分裂^[5,6]。生殖嵴原基明显的性别分化出现于 E12.5, 雌性生殖细胞迁移到未来的卵巢中后, 停止分裂并进入减数分裂, 阻滞在第一次减数分裂前期。而雄性生殖细胞迁移到未来睾丸中后继续增殖, 直至发生有丝分裂阻滞。雄性

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31871445); 国家自然科学基金项目(31501211)

作者简介: 徐瑜珊(1993-), 硕士研究生, 主要研究方向: 生殖细胞命运决定的调控机制, E-mail: xuyushan1008@foxmail.com

[△] 通讯作者: 张军(1982-), 博士生导师, 研究员, 主要研究方向: 生殖细胞命运决定的调控机制,

E-mail: zhang_jun@njmu.edu.cn, 电话: 025-86869381

(收稿日期: 2019-01-14 接受日期: 2019-02-05)

PGC 分化过程涉及减数分裂起始的抑制、多能性基因表达的抑制和有丝分裂的阻滞,在这一分化过程中分泌因子 Fgf9 (成纤维细胞生长因子 9) 以及转录因子 Nanos2 (nanos C2HC-type zinc finger 2) 发挥着重要的调控作用^[7-13]。

新陈代谢是生命活动的基本特征,细胞代谢为细胞增殖分化等生理活动提供能量和物质基础^[14]。同时代谢过程是调节分化事件的主要候选者,因为化学通量在数分钟内发生变化,并且可能影响转录和表观遗传机制。最近有研究表明,在小鼠胚胎发育过程中细胞代谢状态是动态变化,细胞内代谢产物的积累和改变,通过表观遗传修饰影响细胞内的基因表达从而调控细胞的增殖与分化。例如内皮细胞内 FGF(成纤维细胞生长因子)调节糖酵解限速酶 HK2(己糖激酶 II),控制细胞内糖酵解从而调控血管增殖与发育^[15]。HK2 可以将葡萄糖磷酸化为 G6P(葡萄糖 6-磷酸),是葡萄糖细胞内利用的第一步。由于该反应不可逆,因此 HK2 是糖酵解反应的关键限速酶之一。强糖酵解活性是无限增殖的肿瘤细胞的基本特征之一,糖酵解与细胞增殖密切相关^[16]。由于雄性 PGCs 在分化过程中会经历从有丝分裂的状态转换成静息状态,在这一过程中对糖酵解的调控目前还没有相关研究,因此本研究选择 HK2 作为靶标研究糖酵解在雄性生殖细胞维持与分化中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

实验小鼠品系选取 C57BL/6J 背景(SPF 级),所有实验动物均按照实验鼠饲养标准饲养在南京医科大学实验动物房中:温度:20-22℃;湿度:50%-70%;光周期:12 h/12 h;食物和水:无限供应。利用合笼见栓获得怀孕母鼠,18:00 交配,次日 8:00 观察,若见阴栓记为胎龄 E0.5。兔 DDX4 抗体(ab13840),兔 Sox2 抗体(ab97959),大鼠 BrdU 抗体(ab6326)均购自 Abcam 公司。鼠 Gata4 抗体(sc25310)购自 santa cruz 公司。兔 Hk2 抗体(C64G5)购自 Cell Signaling Technology 公司。TRIzol (invitrogen,15596018);ALEXA FLUOR 555 DONKEY anti-mouse、ALEXA FLUOR 488 DONKEY anti-rabbit(THERMO A21432 A21208);Goat anti Rabbit IgG(HRP)(invitrogen);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天 P0012)。

1.2 方法

1.2.1 BrdU 掺入实验 怀孕雌鼠腹腔注射 Bromodeoxyuridine (BrdU)(sigma B5002),剂量为 100 mg/kg。2 小时后处死孕鼠,取出胚胎生殖嵴,去中肾,用 4%多聚甲醛 -PBS(4%PFA)4℃固定 2 h,梯度蔗糖脱水(生工 A502792-0500):10% 2 h,20% 过夜,次日 OCT 包埋冰冻切片。

BrdU / DDX4 免疫荧光双染色:5%羊血清封闭 2 h,一抗(DDX4:1:200)4℃过夜,次日 1XPBS 洗 3 次每次 5 分钟,二抗室温孵育 2 h,1XPBS 洗 3 次每次 5 分钟,4%PFA 固定 5 分钟后洗 3 次,2 M HCL 37℃处理 45 分钟,1XPBS 洗后一抗(BrdU:1:200)室温 2 h,1XPBS 洗后二抗室温孵育 2 h,1XPBS 洗 3 次后 50%甘油封片。

1.2.2 糖酵解抑制小鼠模型建立 选取年龄体重相仿孕鼠两只,实验组从 E11.5 开始进行腹腔注射 2-Deoxy-D-glucose (2-DG)(sigma D8375),剂量为 500 mg / kg,连续注射两天。对

照组腹腔注射物为等量双蒸水。至 E13.5 取出胚胎进行分析。

1.2.3 免疫荧光实验 取小鼠生殖嵴 4%PFA 固定 2 h,梯度蔗糖(10% 2 h,20% 过夜)脱水后 OCT 包埋冰冻切片。免疫荧光染色用 5% 羊血清封闭 2 h,一抗 4℃过夜,次日 1XPBS 洗 3 次每次 5 min,二抗室温孵育 2 h,1× PBS 洗 3 次每次 5 min 后 50%甘油封片。一抗稀释比:DDX4 (1:200);Gata4(1:250);Oct4(1:100);Sox2(1:200)。

1.2.4 qPCR 实验 TRIzol 法提取小鼠生殖嵴 RNA,逆转录为 cDNA,获得的 cDNA 稀释到适当浓度进行 qPCR。扩增基因引物见表格附录 1。

1.3 统计学分析

本实验中所有数据均使用均值±标准差表示(mean±SEM),两组数据的比较使用 t 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。实验数据采用 SPSS20.0 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为具有统计学差异,作图采用 GraphPad Prism7 软件。扩增基因引物见表 1。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequences
<i>Pfkm-For</i>	GTGTGGAAGCAGTGATGGCACTTT
<i>Pfkm-Rev</i>	TAGCCTTGGTACAGTCTTTGGTCA
<i>Pfkl-For</i>	GAGAAGATGAAGACAGACATCC
<i>Pfkl-Rev</i>	CCAGTTTGGTCCCATAGTTC
<i>Pfjp-For</i>	CTGCCAAAGCAATGGAGTGGATCT
<i>Pfjp-Rev</i>	CAGTGACTTTCTTCAGCTCTGCCA
<i>Pkm1-For</i>	TCTGCTGTTTGAAGAGCTTGTGCG
<i>Pkm1-Rev</i>	GGGATTTTCGAGTCACGGCAATGAT
<i>Pkm2-For</i>	ACTTGCAGCTATTTCGAGGAACTCCG
<i>Pkm2-Rev</i>	GGGATTTTCGAGTCACGGCAATGAT
<i>Pkm-For</i>	TGGGAGAGAAGGGCAAGAACATCA
<i>Pkm-Rev</i>	TCTCTGCAGGAATCTCAATGCCCA
<i>HK1-For</i>	CACCGGCAGATTGAGGAAAC
<i>HK1-Rev</i>	CTCAGCCCCATTTCCATCTCT
<i>HK2-For</i>	CCTGTTCTACTTCTCTGTA
<i>HK2-Rev</i>	AAGATGTTCTCCACCTAT
<i>18s-For</i>	TAACGAACGAGACTCTGGCAT
<i>18s-Rev</i>	CGGACATCTAAGGGCATCACAG
<i>Nanos2-For</i>	CCCTTTGACATGTGGAGAGAC
<i>Nanos2-Rev</i>	TTGCTTCCGGCTCTGAATTA
<i>Fgf9-For</i>	TGCAGGACTGGATTTCATTTAG
<i>Fgf9-Rev</i>	CCAGGCCCACTGCTATACTG

2 结果

2.1 探究雄性原始生殖细胞有丝分裂阻滞发生时期

BrdU (5-溴-2'-脱氧尿苷)是一种核苷类似物,与胸腺嘧

啶竞争性整合到 DNA。通过 BrdU 的掺入可以确定 DNA 合成进程,从而推断出有丝分裂阻滞发生的具体时间。我们对 E12.5、E13.5、E15.5 的生殖嵴进行分析,用 DDX4(Dead-box helicase 4)标记生殖细胞,观察 DDX4 阳性细胞中 BrdU 掺入,

以此判断生殖细胞增殖比率。我们观察到从 E12.5 至 E13.5,生殖细胞处于快速增殖状态,而从 E13.5 至 E15.5 增殖出现明显下降,到 E15.5 时生殖细胞几乎没有 BrdU 的掺入,证明 E15.5 雄性生殖细胞已经进入有丝分裂停滞状态(图 1)。

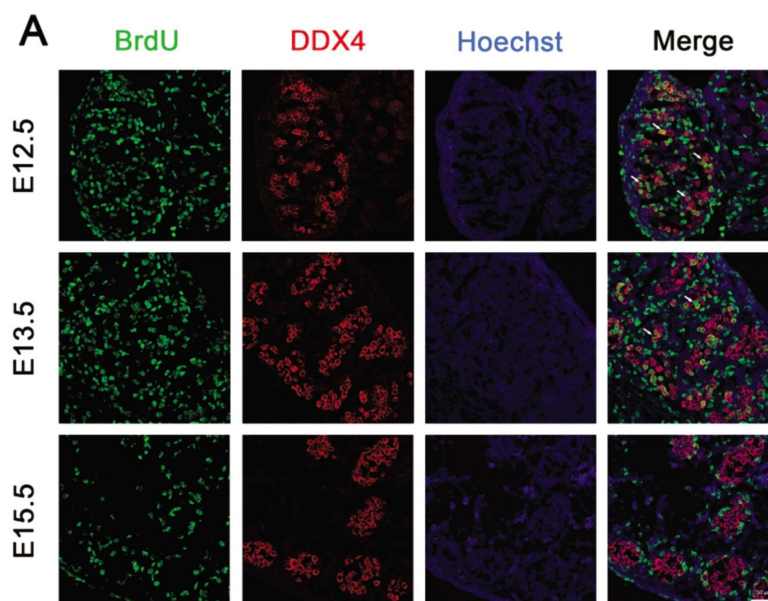


图 1 雄性胚胎有丝分裂停滞具体过程

Fig.1 The process of mitotic arrest of fetal male

Note: Arrow: BrdU-incorporated germ cells.

2.2 雄性生殖细胞分化过程中糖酵解的变化

由于糖酵解在各类生物学过程中都起着重要的作用^[15-17,20-21],我们对糖酵解限速酶 Hk(己糖激酶)、Pfk(磷酸果糖激酶)、Pfk(丙酮酸激酶)进行了表达量研究,以此来推测雄性 PGCs 分化过程中的糖酵解的变化。qPCR 分析显示, Hk2 在两个不同时间点的雄性生殖嵴转录水平有差异: E15.5 雄性生殖

嵴具有比 E13.5 更低的 Hk2 mRNA 表达水平 ($p < 0.05$) (图 2A)。Hk2 催化葡萄糖代谢的第一步,是可以将葡萄糖磷酸化为葡萄糖 6-磷酸(G6P)的一种糖酵解限速酶。

使用抗 Hk2 抗体,通过 Western Blot 检测 E13.5 和 E15.5 雄性生殖嵴 Hk2 蛋白表达水平。较于 E13.5, E15.5 观察到更低的 Hk2 蛋白表达水平(图 2B, 2C)。

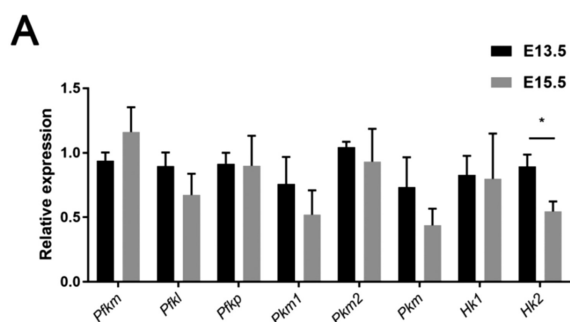
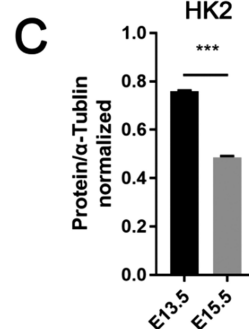
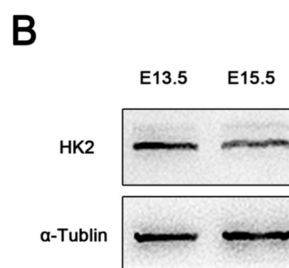


图 2 糖酵解基因表达情况

Fig.2 Glycolysis gene expression

Note: Data were expressed as SEM $\pm$ SD, n=3. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, Unlabeled: $P > 0.05$.



2.3 构建糖酵解抑制小鼠模型

为了探究糖酵解的快速抑制是否可以提前开启雄性 PGCs 分化事件,如多能性的抑制和细胞增殖的下降,我们在雄性 PGCs 有丝分裂停滞开启之前用糖酵解的抑制剂 2-Deoxy-D-glucose(2-脱氧葡萄糖)处理孕鼠^[22]。2-DG 是一种葡萄糖类似物,可以被 Hk 磷酸化为 2-DG-P(磷酸化 2-脱氧葡萄糖),但其不能进一步代谢从而再细胞内累积,这种与 Hk 的相互作用抑制糖酵解过程^[22]。具体而言,从 E11.5 开始进行腹腔注射,连续注射两天,每天以 500 mg/kg 进行注射,至 E13.5 取出胚胎进行分析(图 3A)。体式镜下,抑制剂处理组较于对照组小鼠胚胎没有出现明显发育差异(图 3B)。通过明视野检查,抑制剂处理组和对照组的小鼠胚胎都具有正常的生殖嵴形态。

葡萄糖),但其不能进一步代谢从而再细胞内累积,这种与 Hk 的相互作用抑制糖酵解过程^[22]。具体而言,从 E11.5 开始进行腹腔注射,连续注射两天,每天以 500 mg/kg 进行注射,至 E13.5 取出胚胎进行分析(图 3A)。体式镜下,抑制剂处理组较于对照组小鼠胚胎没有出现明显发育差异(图 3B)。通过明视野检查,抑制剂处理组和对照组的小鼠胚胎都具有正常的生殖嵴形态。

通过标记生殖细胞的 DDX4 和标记体细胞的 Gata4 (GATA binding protein 4) 的免疫荧光染色可以发现抑制剂处理组和对照组胚胎的 PGCs 均存在与正常的睾丸索内(图 3C)。

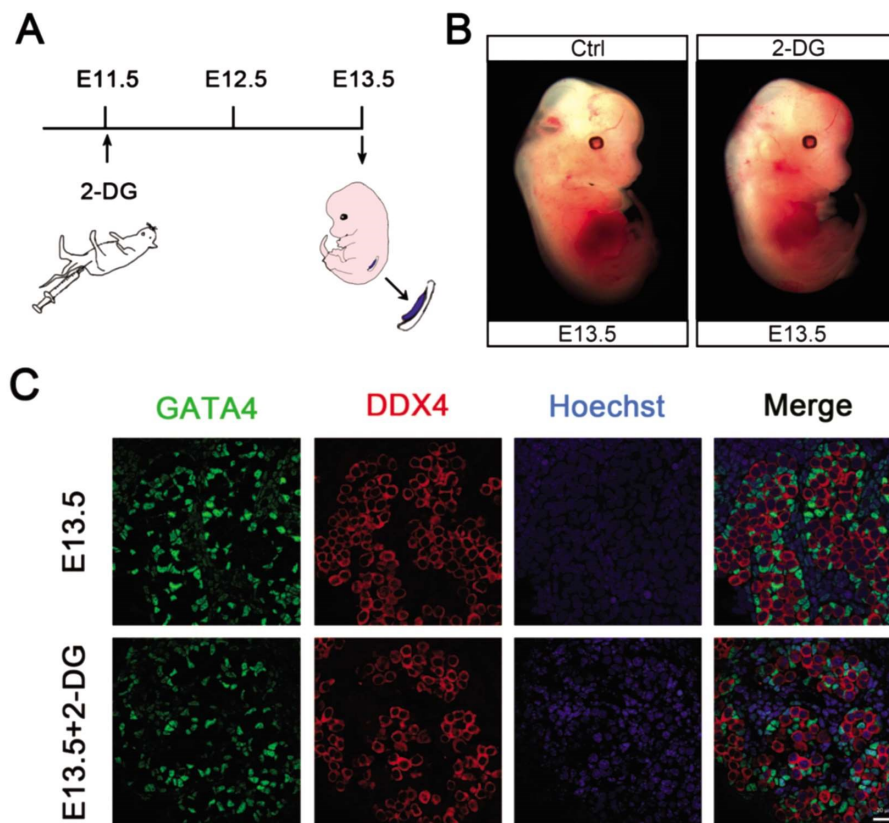


图 3 建立糖酵解抑制小鼠模型

Fig.3 A mouse model of glycolysis inhibition

2.4 糖酵解的抑制影响雄性小鼠 PGCs 分化过程

我们发现在抑制剂处理组 PGCs 内, BrdU 的掺入(45.1%) 低于对照组的掺入(67.2%)($p < 0.001$)(图 4A-B), 说明在加入糖酵解抑制剂后 PGCs 增殖水平下降。通过免疫荧光, 我们发现抑制剂处理组 PGCs 多能性基因 Oct4, Sox2 荧光强度明显下降, Oct4 表达量可下降至 E15.5 PGCs 相类似水平(图 4C-D), 说明抑制剂处理后降低了 PGCs 内多能性基因的表达。综上所述, 在 E11.5-E13.5 抑制雄性小鼠胚胎的糖酵解可导致细胞增殖的下降以及多能性基因表达的下降。

2.5 糖酵解的抑制不影响雄性命运分化基因转录水平的表达

已知在雄性 PGCs 分化过程中, 有丝分裂阻滞以及从多能性向分化的转变, 都是雄性 PGCs 发育的关键过程。E12.5 至 E14.5 期间多能性基因的表达下降伴随着雄性命运分化基因的表达上升, 包括 Nanos2 等。同时, 已有研究证明在雄性生殖嵴中 Fgf9 独立于 Cyp26b 对多能性基因 Oct4 和 Sox2 的表达进行调控^[23,24]。并且 Nanos2 的缺乏增加小鼠的畸胎瘤发病率, 并诱导与畸胎瘤抗性生殖细胞中肿瘤起始相关的发育异常^[25]。那么糖酵解抑制对于小鼠增殖分化的影响是否是通过 Nanos2 或 Fgf9 进行? 我们通过 qPCR 检测发现, 相比于对照组生殖嵴, 糖酵解抑制剂处理组的 Nanos2、Fgf9 表达在转录水平没有明显差异($p > 0.05$)(图 5A)。综上所述, 在 E11.5-E13.5 抑制糖酵解可以降低多能性基因的表达, 并且这个过程不是通过在转录水平影响 Nanos2、Fgf9 而调控的。

3 讨论

在本研究中, 我们表明了糖代谢在小鼠雄性 PGCs 增殖分化中的重要作用。本篇文章中数据表明雄性小鼠 PGC 在 E13.5 开始进入有丝分裂阻滞, E15.5 完全停滞, 有丝分裂停滞的开始代表雄性 PGC 分化的开启。代谢过程是调节分化事件的主要候选者, 因为化学通量在数分钟内发生变化, 并且可能影响转录和表观遗传机制。我们数据证明在雄性 PGC 分化开始阶段, Hk2 表达水平下降, 这提示在细胞增殖与分化状态发生改变时, 细胞内对葡萄糖的利用也发生了相应的改变。为找出两者之间的因果关系, 我们通过腹腔注射糖酵解抑制剂 2-DG 的方法构建糖酵解抑制小鼠, 表型分析发现糖酵解抑制后雄性 PGCs 增殖下降, 多能性基因表达下降。已知生理条件下 E11.5-E12.5 雄性小鼠生殖细胞仍处于增殖状态, 并且多能性基因的表达相比于同期的雌性 PGC 要长 24h^[13]。结合本文数据, 我们认为 E11.5-E13.5 这一时期雄性 PGC 的增殖与多能性维持需要糖酵解, 在此阶段抑制糖酵解会使 PGC 增殖水平下降同时提前开启雄性抑制多能性基因的分化事件。但代谢水平和细胞分化事件的直接联系还需进一步探讨。

雄性 PGC 的分化是多层次调控的复杂现象。本文我们专注于随着多能性丧失而发生的 earliest 的事件。已知高糖酵解水平是快速增殖细胞的重要特征, 因其以比氧化磷酸化更快的速率生成 ATP, 且具有较低的 ROS(活性氧)产生^[27]。糖酵解也分流

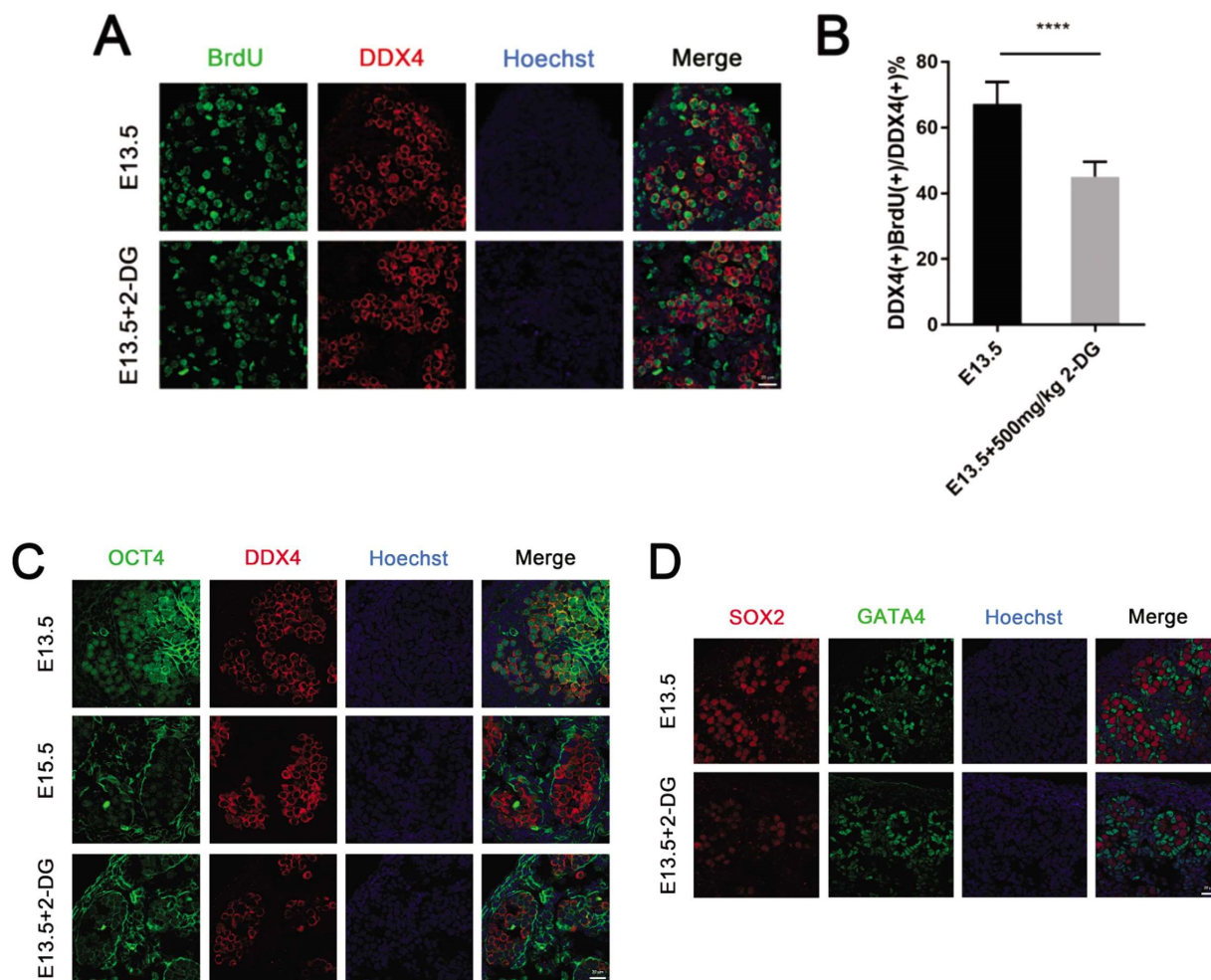


图 4 糖酵解抑制小鼠表型分析

Fig.4 Phenotypic analysis of glycolysis inhibition mice

Note: Data were expressed as SEM $\pm$ SD, E13.5(n=5), E13.5+2-DG(n=10). *** $P < 0.001$.

到戊糖磷酸途径,产生用于核糖核苷酸合成的戊糖磷酸酯和 NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)^[28]。已有多项研究表明糖酵解在细胞周期与细胞增殖过程中的重要作用,例如 FGF(成纤维细胞生长因子)信号通路活性缺失时,Hk2 的表达会相应减低,糖酵解的降低造成内皮细胞增殖和迁移机制的缺陷^[15];高糖酵解水平也是大量增殖的癌细胞的特点,加入糖酵解抑制剂 2-DG 可以抑制非霍奇金淋巴瘤细胞中葡萄糖的消耗,乳酸的生成和细胞增殖,同时诱导细胞周期停滞^[16,31]。在本篇文章中,糖酵解的下降可能是直接导致雄性 PGC 增殖水平下降的重要因素。

已有研究表明,糖酵解在维持组蛋白乙酰化,与多能干细胞的开放染色质结构相关方面发挥关键作用^[18,19]。并且在分化的最初 24 小时糖酵解开关发生改变,糖酵解的快速丧失下调导致乙酰辅酶 A 下降,组蛋白乙酰化和多能性标记物的丧失^[29]。这与本文数据相对应,因此我们合理猜测在雄性 PGC 分化初期,糖酵解下调导致多能性基因组蛋白乙酰化的下降使多能性基因表达下降。进一步深入研究可以验证乙酸盐是否可以挽救糖酵解抑制小鼠多能性下降的表型。另一方面,前人研究中已表明核心多能性因子和胚胎干细胞(ESC)代谢特征之间有着

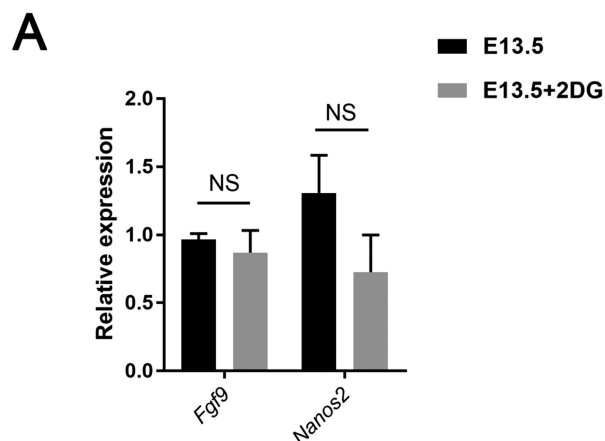


图 5 糖酵解抑制小鼠表型机制研究

Fig. 5 Mechanism analysis of glycolysis inhibition mice

Note: Data were expressed as SEM $\pm$ SD, n=3. NS: $P > 0.005$.

直接分子联系^[17,30],如 Oct4 直接调控 Hk2 和 Pkm2,并且 Hk2 和 Pkm2 的过表达可以维持高水平糖酵解并阻碍了胚胎干细胞的分化,并在没有白血病抑制因子(LIF)的情况下保持胚胎干细胞的多能性。结合 Qpcr 数据,我们发现在雄性生殖细胞分

化过程中,糖酵解限速酶仅 Hk2 出现明显变化。提示了多能性因子和 Hk2 之间可能存在相互作用关系。本实验提示细胞内代谢的改变可能是细胞增殖分化的动因之一。

参 考 文 献(References)

- [1] Hu YC, Nicholls PK, Soh YQ, et al. Licensing of primordial germ cells for gametogenesis depends on genitalridge signaling [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005019
- [2] Mochizuki K, Tando Y, Sekinaka T et al. SETDB1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination by ensuring BMP signaling[J]. *Development*, 2018, 145(23)
- [3] Weber S, Eckert D, Nettersheim D, et al. Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82: 214-223
- [4] Kumar DL, DeFalco T. Of Mice and Men: In Vivo and In Vitro Studies of Primordial Germ Cell Specification [J]. *Semin Reprod Med*, 2017, 35(2): 139-146
- [5] Ewen KA, Koopman P. Mouse germ cell development: from specification to sex determination[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 323(1): 76-93
- [6] Morgan CT, Noble D, Kimble J, et al. Mitosis-meiosis and sperm-oocyte fate decisions are separable regulatory events [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(9): 3411-3416
- [7] Lin YT, Capel B. Cell fate commitment during mammalian sex determination[J]. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 2015, 32: 144-152
- [8] Spiller CM, Bowles J. Sex determination in mammalian germ cells[J]. *Asian J. Androl*, 2015, 17: 427-432
- [9] Spiller C, Koopman P, Bowles J. Sex Determination in the Mammalian Germline[J]. *Annu Rev Genet*, 2017, 51: 265-285
- [10] Koubova J, Hu YC, Bhattacharyya T, et al. Retinoic acid activates two pathways required for meiosis in mice[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004541
- [11] Yao X, Tang F, Yu M, et al. Expression profile of Nanos2 gene in dairy goat and its inhibitory effect on Stra8 during meiosis [J]. *Cell Prolif*, 2014, 47: 396-405
- [12] Barrios F, Filipponi D, Pellegrini M, et al. Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells[J]. *Cell Sci*, 2010, 123: 871-880
- [13] Rossitto M, Philibert P, Poulat F, et al. Molecular events and signalling pathways of male germ cell differentiation in mouse[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 45: 84-93
- [14] Teng H, Sui X, Zhou C, et al. Fatty acid degradation plays an essential role in proliferation of mouse female primordial germ cells via the p53-dependent cell cycle regulation [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(3): 425-431
- [15] TeSlaa T, Chaikovsky AC, Lipchina I, et al. alpha-Ketoglutarate accelerates the initial differentiation of primed human pluripotent stem cells[J]. *Cell Metab*, 2016, 24: 485-493
- [16] Pengchun Yu, Kerstin Wilhelm, Alexandre Dubrac, et al. FGF-dependent metabolic control of vascular development[J]. *Nature*, 2017, 545: 224-228
- [17] Aduma N, Izumi H, Mizushima S, et al. Knockdown of DEAD-box helicase 4 (DDX4) decreases the number of germ cells in male and female chicken embryonic gonads.[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2019, 31(5): 847-854
- [18] Carey BW, Finley LW, Cross JR, et al. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2015, 518: 413-416
- [19] Kim H, Jang H, Kim TW, et al. Core Pluripotency Factors Directly Regulate Metabolism in Embryonic Stem Cell to Maintain Pluripotency[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(9): 2699-2711
- [20] Peng M, Yin N, Chhangawala S, et al. Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism [J]. *Science*, 2016, 354(6311): 481-484
- [21] Esteban-Martínez L, Sierra-Filardi E, McGreal RS, et al. Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation[J]. *EMBO J*, 2017, 36(12): 1688-1706
- [22] Zhong D, Xiong L, Liu T, et al. The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple prosurvival pathways through IGF1R[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(35): 23225-23233
- [23] Gustin SE, Stringer JM, Hogg K, et al. FGF9, activin and TGF β promote testicular characteristics in an XX gonad organ culture model [J]. *Reproduction*, 2016, 152: 529-543
- [24] Bowles J, Feng CW, Spiller C, et al. FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice[J]. *Dev Cell*, 2010, 19(3): 440-449
- [25] Dawson EP, Lanza DG, Webster NJ. Delayed male germ cell sex-specification permits transition into embryonal carcinoma cells with features of primed pluripotency[J]. *Development*, 2018, 145(6)
- [26] Chandel NS, Jasper H, Ho TT, et al. Metabolic regulation of stem cell function in tissue homeostasis and organismal ageing [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 823-832
- [27] H N Xu, G Zheng, J Tchou, et al. Characterizing the metabolic heterogeneity in human breast cancer xenografts by 3D high resolution fluorescence imaging[J]. *Springerplus*, 2013, 2(1): 73
- [28] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033
- [29] Moussaieff A, Rouleau M, Kitsberg D, et al. Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells [J]. *Cell Metab*, 2015, 21(3): 392-402
- [30] Tischler J, Gruhn WH, Reid J, et al. Metabolic regulation of pluripotency and germ cell fate through α -ketoglutarate [J]. *EMBO J*, 2019, 38(1)
- [31] Pang YY, Wang T, Chen FY, et al. Glycolytic inhibitor 2-deoxy-d-glucose suppresses cell proliferation and enhances methylprednisolone sensitivity in non-Hodgkin lymphoma cells through down-regulation of HIF-1 α and c-MYC[J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(6): 1821-1830