

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00587

精子形成期基因转录表达的研究进展

张俊芳¹, 朱化彬¹, 张留光¹, 郝海生¹, 赵学明¹, 秦彤¹, 路永强², 王栋¹

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部畜禽遗传资源与种质创新重点实验室, 北京 100193;
2. 北京市畜牧兽医总站, 北京 100107

摘要: 减数分裂后, 圆形精子细胞经过一系列变态过程最终发育为成熟精子。期间, 精子细胞质逐渐丢失, 其染色质组蛋白逐渐经过渡蛋白替换为鱼精蛋白, 染色质被致密包装并高度浓缩。很多学者认为, 精子转录活性被关闭, 不存在 RNA。但近些年却在精子中检测到了种类繁多的转录本, 包括精子染色质重新包装所需蛋白的转录本及一些小分子 RNA 等。由于精子核内组蛋白没有完全被鱼精蛋白替换, 且染色质上包含一些核酸活性敏感位点, 推测精子存在一定的转录活性, 并通过激素和表观遗传修饰等调控转录。精子中的这些 RNA 一部分是精子形成过程中残留下来的, 另一部分是精子细胞适时表达的。深入研究精子形成中的基因转录表达, 可增进对精子形成与成熟遗传本质的理解, 为高效利用雄性配子进行生殖控制提供理论依据。文章综述了近年来精子形成期基因转录表达的研究进展, 并提出了未来的研究方向。

关键词: 变态过程; 精子形成; 鱼精蛋白; 转录本; 转录调控

Advance on research of gene expression during spermiogenesis at transcription level

ZHANG Jun-Fang¹, ZHU Hua-Bin¹, ZHANG Liu-Guang¹, HAO Hai-Sheng¹, ZHAO Xue-Ming¹, QIN Tong¹, LU Yong-Qiang², WANG Dong¹

1. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. Animal Husbandry and Veterinary Station of Beijing, Beijing 100107, China

Abstract: After meiosis, round spermatid develops into mature sperm through metamorphosis. During this stage, most cytoplasm in the germ cell is gradually lost. The histones associated with chromatin are replaced by transition proteins and eventually transformed into protamines. Thus, the spermatid chromatin is stringently packaged and highly concentrated. It was thought that the transcription activity of spermatid is lost and RNAs are absent in spermatid. Nevertheless, many types of transcripts are detected in recent years, including the transcripts needed during chromatin repackaged and some small RNAs, etc. Because histones in the nuclear are not replaced entirely, and there are some active sites on the chromatin, we

收稿日期: 2012-09-14; 修回日期: 2012-12-18

基金项目: 国家十二五科技支撑计划课题资助项目(编号: 2011BAD19B02)和奶牛产业技术体系北京创新团队项目

作者简介: 张俊芳, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 15901248677; E-mail: zjfang.carrie@163.com

通讯作者: 路永强, 研究员, 研究方向: 奶牛繁殖。E-mail: luyongqiang@163.com;

王栋, 博士, 研究员, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: dwangcn2002@vip.sina.com.cn

网络出版时间: 2013-2-25 16:37:53

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130225.1637.001.html>

conjectured that spermatid has some transcription activity, and this activity is regulated by hormone and epigenetic modification. These RNAs may be the residues in the spermatogenesis, or timely expressed during spermiogenesis. A deep study on gene transcription in spermiogenesis will help understand the genetic characteristics and provide the theoretic basis for reproductive control using male gamete. This article reviewed recent advances in spermiogenesis at gene transcription level and proposed the future research directions.

Keywords: metamorphosis; spermiogenesis; protamine; gene transcription; transcriptional regulation

作为一种终末分化细胞,成熟精子携带由基因和环境共同决定的遗传信息,直接影响下一代生命的形成与存在状态。精子发育过程中发生形态的变化、部分重要结构(如线粒体、高尔基体等)的重排及代谢途径和方式的改变等,这些变化都是精子为适应环境要求而进行的自身调整,涉及到某些基因的转录表达及调控,并一定程度上影响精子的育性。因此,研究精子转录水平的基因表达及代谢的变化能够揭示细胞表型及功能的改变,在雄性生殖能力研究中具有重要意义。甚至有人推断 mRNA 图谱可以作为雄性动物繁殖能力的一个诊断工具,预估动物个体的繁殖能力^[1]。1957 年, Bhargava 发现精子染色质被致密包装,推断转录功能处于停滞状态,精子中几乎不存在 mRNA^[2]。但近些年很多研究却检测到大量精子 RNA,学者推断这些转录本是精子发生过程中转录关闭后的残余物。Abraham 等^[3]的同位素跟踪实验表明,精子里发生了 RNA 合成和蛋白质合成过程。这表明:像其他体细胞一样,精子也是通过基因表达适应多变的环境并最终完成遗传物质传递重要使命。研究精子生成后精子细胞的基因转录,对于揭示精子转录本的来源及其在成熟、运动、受精过程中的动态变化与调控规律,进而揭示精子成熟过程的生命本质具有重要的理论与实际意义^[4]。此外,精子细胞的基因转录调控与体细胞及卵子有明显区别。

1 精子形成过程中形态学及染色体结构的变化

精子形成过程中,最明显的形态学变化是精子细胞的改变(图 1)。首先,精子细胞核内染色质高度浓缩,核变形并移向细胞一侧形成精子头;高尔基复合体囊泡融合增大成为双层囊泡帽状顶体覆盖在

精子核头部,两个中心粒则逐渐向顶体对侧迁移,并发出逐渐增大的轴丝,形成精子尾部支撑骨架,胞质线粒体逐渐向轴丝近端周围汇集,并螺旋盘绕成线粒体鞘;与此同时,残余胞质逐渐向尾侧汇集并脱落。成形的精子离开曲细精管上皮进入管腔,最终在附睾中发育成熟。在精子刚开始形成时,精子细胞中的线粒体形态已完全不同于精原细胞或体细胞的线粒体形态,此时的线粒体嵴贴附在线粒体膜的周围,其间为弥散的和空泡化的基质。当线粒体组成精子尾部线粒体鞘时,线粒体的形态为月牙状。随着线粒体结构的改变,线粒体的蛋白成分也随之改变。在精子形成完成时,精子细胞多余的胞浆已被除去,残余的胞浆中已检测不到核糖体,因此推断,胞浆蛋白质的合成停止了,但线粒体蛋白质的合成仍在继续^[5]。

减数分裂后,圆形精子细胞经历了漫长而复杂的形变过程,其中,单倍体圆形精子细胞刚形成时,染色质仍呈核小体结构;过渡蛋白(Transition proteins, TPs)开始出现,并逐渐取代染色体中的组蛋白,直至替换掉 90%以上的组蛋白随后鱼精蛋白开始出现并逐渐取代过渡蛋白,最终将精子核包装成高度浓缩的特异结构^[6]。果蝇粗线期精母细胞核直径约为 17 μm ,洋葱头形状的精子细胞核直径约为 6 μm ,成熟精子核长度约为 9 μm ,最大直径为 0.3 μm 。这样,精子形成期核体积缩小了约 200 倍,其中减数分裂仅使核体积缩小 20 倍,鱼精蛋白取代组蛋白重新包装精子核,是核体积缩小的主要因素^[7]。因此有人推测,此时精子细胞核转录被关闭,但是,这很难解释精子染色质重新包装及精子形成时所需要的各种蛋白能源不断地及时供给。有学者推测,为克服基因转录停止而蛋白翻译仍然必要的矛盾,精子细胞内可能存在转录和翻译的解偶联机制,即精子中 RNA 来源的假说:在核转录关闭前,精子细胞

抢先转录并储藏了精子形成所需的各种 mRNA, 并一直保留到其被翻译成蛋白质, 以保证精子细胞核转录关闭后的蛋白质供应。

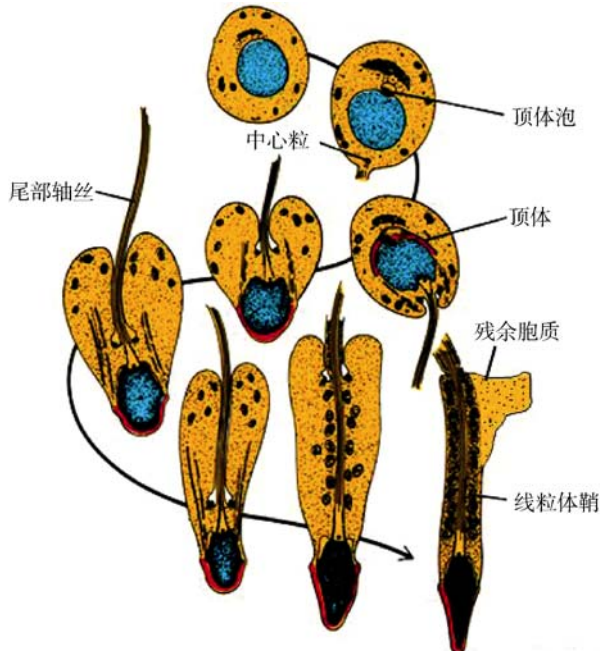


图1 精子细胞的变态过程示意图(<http://image.baidu.com>)

但后来研究发现, 精子染色质不完全是均一紧凑的核精蛋白结构, 还包含一些对核酸活性敏感的位点。首先, 几乎所有物种的精子都能够吸收外源 DNA 分子并将其融入细胞核^[8]。用外源 DNA 分子培养精子细胞, 精子内源核酸会先将外源序列降解, 同时触发精子内源核酸本身的局部降解, 被降解的高度敏感的精子 DNA 序列将会被清除并释放到培养液中^[9]。之后, 外源 DNA 分子被融入精子细胞核, 经历重排过程后, 最终被整合到精子基因组^[10]。这说明, 精子核 DNA 并不是完全紧缩失活的; 而且鱼精蛋白替换组蛋白并不是 100% 的替换, 尤其在很多富含 GC 的基因表达调控区, 还残存有一定比例的组蛋白构成的核小体结构。这些核小体使该基因有可能在必要的时刻启动表达^[11], 即在特殊的环境下, 精子细胞核转录的抑制有可能被解除。

2 精子 RNA 的研究进展

传统观点认为, 精子形成过程中, 由于高度带电、体积更小的鱼精蛋白逐渐取代了组蛋白, 精子基因组更加浓缩, 其基因转录也因此而逐渐被关闭^[12]。

但是, 精子中仍保留了转录关闭前已经转录出的各种信息^[13] 及 micro-RNA^[14], 这些转录本可能是精子顺利完成染色质浓缩及遗传信息传递的前提基础。然而精子 RNA 的保留是有选择性的, 成熟精子中没有检测到 28S 和 18S rRNA^[15]。精子细胞的转录本是否都是转录关闭前的残留物, 精子细胞究竟有无转录能力, 而且在无 rRNA 的情况下精子 mRNA 是否仍可以被翻译, 以及这些精子 RNA 在随后的受精过程及胚胎早期发育中以什么方式发挥了什么作用, 这些问题都有待阐明, 致使精子的转录表达一直处于研究的焦点。

2.1 成熟精子中尽管转录本数量较少, 但种类繁多

早在 1952 年, Mauritzen 等^[16]利用 RNA 的化学性质, 采用比色法对精子头中分离的 RNA 浓度进行了检测。结果发现, 鳕鱼精子核酸含量为 30.3%, 其中 RNA 只占 0.3%; 鲑鱼精子含核酸 59.5%, 其中 RNA 只占 0.1%。1989 年, Pessot 等^[17]使用组织学方法对大鼠精子 RNA 进行了检测, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 发现 5.8S RNAs、5S RNAs 以及 tRNA 等均呈弥散的不连续分布。这一研究证明了成熟精子中 RNA 的存在。1993 年, Concha 等^[18]用放射性同位素标记的寡聚脱氧核苷酸探针进行 Northern 杂交, 在人精子中检测到了 U1 和 U2 snRNA, 并用地高辛标记的反义和正义 oligo 探针通过原位杂交在核内精确定位了这些 snRNA。同年, Kumar 等^[19]采用 RT-PCR 在人精子中检测到 *c-MYC* 的 mRNA, 并通过原位杂交将其定位于精子中部和尾部区域。1997 年, Wykes 等^[20]通过原位杂交发现, 大部分精子 RNA 位于细胞核内或核周围, 在中心粒、线粒体及尾部主段、中段和末段的纤维鞘中也检测到少量 RNA^[21]。近些年来, 随着检测技术的发展, 越来越多的精子 mRNA 被鉴定出来, 比如编码 HLA^[22]、L 型钙通道^[23]、N 钙粘蛋白^[24]、雌激素受体^[25]、环核苷酸磷酸二酯酶^[26]、整合素^[27]、芳香化酶、一氧化氮合酶^[28]、小鼠生精相关基因 4(Spermatogenesis related gene 4, *SRG4*)^[29]和酰基转移酶家族成员 *TSARG7*^[30]等基因的转录本。

高通量基因芯片技术的出现, 使全面、快速地了解精子 mRNA 的种类和组成面临了新机遇。2002 年, Ostermeier 等^[31]分别利用人睾丸混合群体样本

库、精子混合群体样本库和单个健康个体精子样本 cDNA 探针,与含 27 016 个特异性表达序列标签的芯片杂交,分别得到了不同样本的大量 EST 序列,并发现所有精子 mRNA 都存在于睾丸 mRNA 中,而所有睾丸 mRNA 并非都存在于精子中,绝大多数个体精子 mRNA 都能在人群精子 mRNA 库中被找到。随后, Ostermeier 等^[32]通过 DNA 芯片技术联合 RT-PCR 方法对精子 RNA 复杂群体进行了检测,在人精子中同时检测到 3 500 多个独立的 mRNAs,因此推测,正常精子约含有 5 000 多种 mRNA。对检测到的 2 712 种正常男性精子 mRNA 的分析发现, 19.7% 为新基因;其余能与参考基因组匹配的基因中, 67% 的转录产物具有蛋白质结合或者核酸结合能力, 41% 具有催化活性, 13% 与信号转导有关,与细胞运输、精子结构、转录调节相关的分别占 10% 左右^[33]。

这些研究表明,成熟精子中不但存在 RNA,而且种类非常丰富。对果蝇精子发生过程的研究发现,果蝇精子细胞中检测到的很多转录本,在初级精母细胞中也能检测到,且表达水平相同。然而,有些基因初级精母细胞期转录水平很低,圆形精子细胞期不转录,长形精子细胞期出现高水平转录^[7]。对 β 和 γ 两种肌动蛋白基因转录本的检测表明, β 肌动蛋白基因在圆形精子细胞中的转录水平高于粗线期, γ 肌动蛋白基因在粗线期精母细胞和早期精子细胞中转录水平较高,变性后期却较低;对 α 微管蛋白基因的检测表明, α 微管蛋白基因的转录本在精子变态过程中增加^[34]。Lambard 等^[1]用不连续密度梯度法从同一样本中分离得到能动性高和低两个精子类群,并采用半定量 PCR 方法测定了这两种群体里编码特定蛋白质(核浓缩期间 protamines 1 和 protamines 2,精子获能期间 endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) 和 *c-myc*) 的转录本水平。研究发现,低能动性精子类群中 *Prm-1* mRNA 的含量比高能动性精子高很多; eNOS 和 nNOS 两种酶的转录本在大多数高能动性精子中没有检测到,却在低能动性精子中存在;但是 *c-myc* 与 *Prm-2* mRNA 的含量在这两种群体里没有显著变化,而且精子获能后部分或者全部的 *c-myc* 转录本消失了。这些研究说明,虽然大部分精子 mRNAs 被认为是前期各类细胞的转录残留物,但精子细胞变形过程中转录水平发生了变化,来源

相同的精子不同阶段 RNA 存在差异,说明精子细胞也能适时表达 mRNAs,而单倍体基因组无功能的传统假设是值得商榷的^[35]。虽然精子细胞的转录总体水平远远低于精母细胞^[36],但表达的主要是精子细胞特异基因,这些是成熟精子中必须的结构蛋白或功能蛋白基因,这种转录调节对于精子的成熟及正常功能的发挥非常重要。

2.2 成熟精子中 RNA 的可能功能

传统观点认为,精子缺乏 rRNA,翻译过程可能处于停滞状态,但是事实并非如此。例如, *Ube1x* 和 *Ube1y* 的蛋白产物是泛素活化酶,能够促进组蛋白泛素化,促进组蛋白降解,长形精子中这两种基因的表达量都比圆形精子中高; *MHR6A* 的蛋白产物是泛素连接酶,只在圆形精子中有明显而短暂的表达,在其他阶段生殖细胞中表达量为零^[37]。免疫印迹、免疫组织化学染色分析可在野生型小鼠精母细胞粗线期检测到大量组蛋白 H2A 泛素化产物 uH2A,圆形精子中却未检测到,而在长形精子中又检测到很多。长形精子中 uH2A 的形成可促进组蛋白泛素化,引起核小体蛋白质成分的降解,使核小体不稳定性增加,促进组蛋白向鱼精蛋白转化^[38],也是精子头形成的先决条件,这表明精子是存在翻译活性的。另外,从 Abraham 等^[3]的研究结果推断,这种翻译应该具有适时特征。他们采用同位素 ^{32}P 标记磷酸基团, $8\text{-}^{14}\text{C}$ 标记腺嘌呤、 $6\text{-}^{14}\text{C}$ 标记乳清酸(对 RNA 酶很敏感,在细胞内转化为尿嘧啶)、 $2\text{-}^{14}\text{C}$ 标记胸腺嘧啶,并混合进行一段时间牛精子悬浮培养后,在精子中检测到了同位素标记的前三种物质,说明精子里发生了 RNA 合成过程;同时在培养液中加入 21 种氨基酸,一段时间后检测到氨基酸含量逐渐减少,说明发生了蛋白质合成过程。这说明,精子中不但存在转录活性,而且和体细胞一样,精子中基因的转录和翻译也呈现时空特异性。这种时空特异性可能与精子变形、部分重要结构的重排及代谢途径和方式的改变相一致,也可能是精子适应环境要求而进行的自身表达调整,并涉及到一些基因的表达调控。

2006 年 Gur 等^[39]在人和牛精子获能过程中对 ^{35}S Methionine、 ^{35}S Cysteine 和 BODIPY-Lysine-tRNA^{Lys} 摄取的研究有了新的发现。将 ^{35}S 标记的

Met 和 Cys 添加到精子获能液中, 对精子进行短时间培养, 在此期间通过放射性自显影观察到 $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ 和 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ 合成了新的多肽。向获能体系中加入线粒体翻译抑制剂 D-氯霉素能够阻止这一合成过程, 而加入胞质 80S 核糖体抑制剂则不能, 说明精子中存在翻译活性, 并且这种翻译活性来自精子线粒体, 而非细胞质, 线粒体 rRNA 成为支持核编码 mRNAs 翻译的最可能协助者。Gur 等^[39]用 BODIPY-Lysine-tRNA^{Lys} 标记精子获能过程中新合成的多肽后, 用显微荧光技术在精子中段检测到强烈的荧光, 在尾部主段检测到相对较弱的荧光, 说明蛋白质合成的初始阶段主要发生在精子中段。翻译活性的研究表明, 精子中的 RNA 为翻译提供了模板和工具, 以维持精子必需蛋白的代谢平衡, 并使精子适应复杂多变的生存环境。

精子 mRNA 不仅仅对精子细胞本身具有重要作用, 在受精卵中也表现出了至关重要的功能。2005 年, Krawetz 等^[44]用显微排序分析法得到了健康精子中 mRNA 的基因图谱。对精子、未受精卵子和已受精并刚刚开始胚胎发育的合子 mRNA 的比较发现, 刚刚开始发育胚胎中, 有 10 个 mRNA 来源于精子, 而不存在于卵子, 表明胚胎发育完全依赖于卵子 RNA 而非精子 RNA 的传统观点是错误的而且片面的。通过受精作用, 精子将多种多样的 RNA 传递给了受精卵, 其中包含鱼精蛋白-2 和凝集素 RNA 等一些卵子中不存在的 RNA^[32]。这些 RNA 在胚胎发育中起着重要的信号调节作用, 为胚胎发育所需蛋白质的合成奠定了前提基础。宾夕法尼亚 Magee-Womens 研究院的发育生物学家 Schatten 认为, 若从 mRNA 的观点来看, 表面正常的精子有可能存在缺陷, 甚至医生可借助 mRNA 图谱确定男性精子是否正常, 并推断克隆动物遇到的问题可能也与精子 RNA 缺失有关^[40]。受精过程中很多进入卵子的精子 RNA 是低分子量并且是反义性质的。因此, 合子中的父源 RNA 很可能以 siRNA 调控方式进行了合子基因组的表观修饰, 对合子发育起到额外的早期调控, 促使合子基因组逐渐向胚胎基因组过渡^[44]。

Rassoulzadegan 等^[41]发现小鼠 *c-Kit* 等位基因失活可导致小鼠子代皮毛颜色改变, 并证明精子 RNA 可通过表观遗传修饰影响受精卵的发育。非编码基因 *c-Kit* 突变可使小鼠睾丸和精子中 *c-Kit* RNAs 表

达异常增高, 突变小鼠呈现白色斑点皮毛。将 *c-Kit* 突变小鼠的精子 RNA 注射到野生型小鼠胚胎中, 改变了子代小鼠的皮毛颜色。第一次证明, 不用改变基因型, 就可利用精子 RNA 通过表观遗传修饰影响受精卵的基因表达, 进而影响受精卵的发育。说明精子不仅可以传送父源基因组给下一代, 还可以通过精子 RNA 实现对合子基因组的表观修饰, 影响受精卵的发育。上述实验现象表明, 精子 RNA 在精子本身发育及后代合子发育中均扮演着重要的角色, 但是, 精子中大量的 RNA 到底是怎样产生的? 成熟精子面对复杂的生存环境和雌雄生殖道间的转移, 其翻译过程是否与转录过程协调进行? 这些问题的揭示还需要从转录水平对精子生成后的基因表达进行更深入的研究探索。

2.3 精子 RNA 的调控

减数分裂后精子进入形成期, 圆形精子细胞再次启动转录活动并于精子形成的中期停止转录, 这是精子变形过程中转录事件最显著的特征。现代分子生物学对转录及其调控机制的了解是基于对体细胞的研究而建立的, 精子细胞中的基因转录调控与体细胞相比调控方式有不同之处。精子变态过程转录调控方式有多种: 激素通过与其受体结合形成复合物, 该复合物与靶基因的顺式作用元件结合, 调控该基因转录; 精子中形成 TBP mRNA 和核糖核蛋白(RNP)颗粒调控 RNA 的保存和表达方式; 通过表观遗传修饰调控; 小 RNA 可作为转录后基因表达调节因子等等。对精子变形过程中基因转录调控特点的深入研究, 将有助于增进对精子形成、受精及早期胚胎发育中精子 RNA 作用的理解。

雄激素与雄激素受体结合形成复合物, 在圆形精子细胞形成长形精子细胞晚期阶段需要大量这种雄激素受体信号^[42]。雄激素及其受体通过 3 种方式对精子形成过程中的基因表达其调控作用, 具体过程可参考张秀军关于精子发生过程中基因表达转录水平的调控^[42]。

啮齿动物中的 TATA 盒结合蛋白(TATA box-binding protein, TBP)是一个与 RNA 聚合酶 (或) 共同发挥作用的转录因子, 能特异结合 TATA 框并指导形成转录起始复合体, 即使基因无 TATA 框, 该蛋白也能通过与 TBP 结合因子相互作用发挥调节作

用。该蛋白的基因在精子形成期过量表达, 每个圆形精子中包含大约 1 000 个 TBP mRNA。精子细胞中 TBP 的转录, 不同于只起始于第一个外显子(特指 exon 1C)的体细胞启动方式, 可有 6 种不同的启动子, 以其中 3 种为主, 可产生 10 种 TBP mRNA^[43]。推测可能是精子细胞中染色体结构发生了转变, TBP mRNA 过量表达, 导致启动子识别严密性(Stringency)的降低。该基因不同转录产物含有不同的 5'或 3'非编码区, 在所调控基因转录起始中发挥不同的作用, 这可能是精子基因转录表达调控的一种方式。所以, 很可能是非编码区的组成决定了精子中某些 mRNA 的命运。

雄性生殖细胞中许多蛋白质合成的实际时间常依赖于转录后的 mRNA 加工活动。不同于体细胞 hnRNA 的快速代谢, 精子细胞中的 hnRNA 具有很高的稳定性, 许多过量表达的 hnRNA 或 mRNA, 例如圆形精子中初始表达的大量过渡蛋白、鱼精蛋白及线粒体荚膜含硒蛋白(Mitochondrial capsule selenoprotein)的 mRNA, 由于 polyA 较长, 被转运至精子细胞质, 并通过其 5'或 3'非编码区与不同蛋白质结合, 形成了稳定的核糖核蛋白(RNP)颗粒。这种胞质特有浓染颗粒的形成, 使这些 mRNA 得以储存长达 7 d 之久, 直至精子形成末期, 其 polyA 尾被脱腺苷化变短后, 才有可能从 RNP 颗粒中释放出来, 并被激活和翻译。其中, 过渡蛋白 2 浓染颗粒的形成和降解为鱼精蛋白的取代和染色质浓缩奠定了基础, 过渡蛋白 2 过早翻译将导致精子头畸形, 并最终导致雄性不育。翻译的阶段特异性确保了圆形精子细胞正常发育为成熟精子, 部分未参与翻译的颗粒随残余胞质被精子清除, 少量 RNP 颗粒仍遗留在成熟精子中, 并随受精过程进入卵母细胞^[44]。精子中 TBP mRNA 和核糖核蛋白(RNP)颗粒的形成对 RNA 的存在和适时表达起到了一定的调控作用, 这种存在形式可能是精子长期进化形成的一种特异的 RNA 保护与调节机制, 在精子成熟晚期, 许多结构蛋白质和功能蛋白质分子均是这种转录后调控方式的产物, 这种调控方式在精子形成期是相当重要的。

DNA 组蛋白甲基化和乙酰化标记是非常重要的表观遗传修饰方式, 这两种方式具有一定的组成式, 起激活作用和/或抑制作用。例如, 组蛋白 H3 第 9 号位赖氨酸去甲基化在减数分裂末期的移除对于

精子形成的完成至关重要, 有针对性的破坏 H3K9 的去甲基化酶 JHDM2A(又命名为赖氨酸去甲基化酶 3A, KDM3A)会导致鱼精蛋白 1 和过渡性蛋白 1 表达的完全缺失, 染色质凝聚缺陷和不育^[45]。精子形成过程中, 许多物种的核心组蛋白 H4 都被高度乙酰化, 这是组蛋白被鱼精蛋白转换的先决条件, 高度乙酰化促使核小体形成一个比较宽松的结构, 使其容易移除组蛋白而结合过渡性蛋白, 随后再被鱼精蛋白替代^[46]。由此可见, 组蛋白甲基化和乙酰化在精子变态、基因表达阻遏和异染色质形成过程中发挥着重要作用。

小 RNAs(包括 siRNAs、miRNAs 和 piRNAs 等)有可能参与精子形成阶段的基因表达调节。已有研究表明, miRNA122 主要在雄性生殖细胞晚期表达, 抑制圆形精子过渡蛋白 2(TP2)基因的转录^[47]。Dicer 是 miRNA 剪接成熟的关键酶, 敲除 *Dicer1* 的小鼠无法合成 siRNA 和 miRNA, 导致长形精子细胞发育异常, 并最终导致雄性不育^[48]。piRNA 是近年来在动物生殖细胞中新发现的一种调节性小分子非编码 RNA, 这种小 RNA 在小鼠精子发育中起到重要作用。piRNAs 与 Piwi 家族蛋白(在圆形精子细胞拟染色质小体和胞质中有一定的分布)结合形成 piRNA 复合物在精子形成期能够维持 mRNA 的稳定性并促进翻译^[6]。Piwi 蛋白家族成员 *prg-1* 缺失、突变会导致一些 mRNA 显著减少, 尤其是 piRNA(例如线虫 21U-RNA), 进而严重影响精子活性和受精能力^[49]。在生殖细胞中, piRNA-Piwi 复合物能通过 WAGO 通路识别异源 RNA 并使之沉默^[50], 进而保证生殖细胞内源转录本的稳定性^[51]。

这些研究揭示了成熟精子中 RNA 的真实来源及其在成熟过程中的动态变化及调控规律。但为了更加全面认识精子形成期的转录情况, 我们认为有必要对精子细胞转录组进行整体分析, 这将推动对精子成熟生命本质的理解, 具有非常重要的理论与现实意义, 精子转录组的动态变化将成为本领域的研究焦点和热点。

3 展望

精子在形态学上高度压缩, 其细胞核外仅覆一薄层胞质。由于精子坚韧的结构和极其微少的 RNA 含量所带来的研究难度, 这一领域研究进展较为缓

慢, 其确切的种类和丰度及其动态变化过程并不清楚。但迄今为止的研究表明, 精子形成过程和成熟精子中存在 RNA 转录, 这是精子进行适时蛋白表达以适应生存环境的基础和前提条件。生物信息学分析技术、新一代测序技术和微量样品取样技术的出现为揭示精子 RNA 来源及转录复杂性带来了新的希望^[52], 从整体水平研究精子形成期各阶段细胞全基因组转录表达及差异基因转录表达谱将成为可能, 并将很大程度上推动其对精子变形及其在受精和早期胚胎发育中作用的理解。

参考文献(References):

- [1] Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, Carreau S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(7): 535–541. [DOI](#)
- [2] Bhargava PM. Incorporation of radioactive amino-acids in the proteins of bull spermatozoa. *Nature*, 1957, 179(4570): 1120–1131. [DOI](#)
- [3] Abraham KA, Bhargava PM. Nucleic acid metabolism of mammalian spermatozoa. *Biochem J*, 1963, 86(2): 298–307. [DOI](#)
- [4] Chen XL, Zhu HB, Wu CJ, Han WD, Hao HS, Zhao XM, Du WH, Qin T, Liu Y, Wang D. Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa. *J Proteomics*, 2012, 77: 59–67. [DOI](#)
- [5] 熊承良, 吴明章, 刘继红, 黄宇烽. 人类精子学. 武汉: 湖北科技出版社, 2002. [DOI](#)
- [6] Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol*, 1999, 199(6): 471–487. [DOI](#)
- [7] White-Cooper H. Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. *Reproduction*, 2010, 139(1): 11–21. [DOI](#)
- [8] Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *BioEssays*, 1998, 20(11): 955–964. [DOI](#)
- [9] Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol*, 1997, 16(9): 1087–1097. [DOI](#)
- [10] Zoraqi G, Spadafora C. Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. *DNA Cell Biol*, 1997, 16(3): 291–300. [DOI](#)
- [11] Vavouri T, Lehner B. Chromatin organization in sperm may be the major functional consequence of base composition variation in the human genome. *PLoS Genet*, 2011, 7(4): e1002036. [DOI](#)
- [12] Balhorn R, Brewer L. Protamine-mediated condensation of DNA and the subunit structure of sperm chromatin. *Biol Reprod*, 1999, 60: 84. ISSN 0006–3363. [DOI](#)
- [13] Miller D, Tang PZ, Skinner C, Lilford R. Differential RNA fingerprinting as a tool in the analysis of spermatozoal gene expression. *Hum Reprod*, 1994, 9(5): 864–869. [DOI](#)
- [14] Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA. A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J Androl*, 2005, 26(1): 70–74. [DOI](#)
- [15] Miller D, Briggs D, Snowden H, Hamlington J, Rollington S, Liford R, Krawetz SA. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene*, 1997, 237(2): 385–392. [DOI](#)
- [16] Mauritzen CM, Roy AB, Stedman E. The ribonucleic acid content of isolated cell nuclei. *Proc R Soc Lond B-Biol Sci*, 1952, 140(898): 18–31. [DOI](#)
- [17] Pessot CA, Brito M, Figueroa J, Concha, II, Yañez A, Burzio LO. Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 158(1): 272–288. [DOI](#)
- [18] Concha II, Urzua U, Yañez A, Schroeder R, Pessot C, Burzio LO. U1 and U2 snRNA are localized in the sperm nucleus. *Exp Cell Res*, 1993, 204(2): 378–381. [DOI](#)
- [19] Kumar G, Patel D, Naz RK. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res*, 1993, 39(2): 111–117. [DOI](#)
- [20] Wykes SM, Visscher DW, Krawetz SA. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3(1): 15–29. [DOI](#)
- [21] Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(6): 757–767. [DOI](#)
- [22] Chiang MH, Steuerwald N, Lambert H, Main EK, Steinleitner A. Detection of human leukocyte antigen class I messenger ribonucleic acid transcripts in human spermatozoa via reverse transcription-polymerase chain reaction. *Fertil Steril*, 1994, 61(2): 276–280. [DOI](#)
- [23] Goodwin LO, Karabinus DS, Pergolizzi RG, Benoff S. L-type voltage-dependent calcium channel α -1C subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(2): 127–136. [DOI](#)
- [24] Goodwin LO, Karabinus DS, Pergolizzi RG. Presence of N-cadherin transcripts in mature spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(6): 487–497. [DOI](#)
- [25] Durkee TJ, Mueller M, Zinaman M. Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Am J Obstet Gynecol*, 1998,

- 178(6): 1288–1297. [DOI](#)
- [26] Richter W, Dettmer D, Glander HJ. Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(8): 732–746. [DOI](#)
- [27] Rohwedder A, Liedtke O, Schaller J, Glander HJ, Werchau H. Regulators of sperm function Detection of mRNA transcripts of β_1 integrins in ejaculated human spermatozoa by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2(7): 499–505. [DOI](#)
- [28] Lambard S, Galeraud-Denis I, Saunders PT, Carreau S. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *J Mol Endocrinol*, 2004, 32(1): 279–289. [DOI](#)
- [29] 邢晓为, 李麓芸, 刘刚, 卢光琇. 小鼠生精相关基因 SRG4 的 cDNA 克隆及在小鼠各发育阶段的表达. *遗传学报*, 2004, 31(10): 1066–1081. [DOI](#)
- [30] 谭小军, 黄志平, 李麓芸, 聂东宋, 钟翎高, 傅俊江, 卢光琇. 一个人类精子发生相关新基因 TSARG7 的克隆和初步功能研究. *遗传学报*, 2006, 33(4): 294–303. [DOI](#)
- [31] Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, 2002, 360(9335): 772–787. [DOI](#)
- [32] Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, 2004, 429(6988): 154. [DOI](#)
- [33] Zhao YX, Li QL, Yao CJ, Wang ZX, Zhou Y, Wang YJ, Liu LM, Wang YF, Wang LY, Qiao ZD. Characterization and quantification of mRNA transcripts in ejaculated spermatozoa of fertile men by serial analysis of gene expression. *Hum Reprod*, 2006, 21(6): 1583–1590. [DOI](#)
- [34] 葛少钦, 康现江, 刘桂荣, 穆淑梅. 精子发生过程中的相关基因. *遗传*, 2008, 30(1): 3–12. [DOI](#)
- [35] Dadoune JP, Siffroi JP, Alfonsi MF. Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol*, 2004, 237: 1–56. [DOI](#)
- [36] Tanaka H, Baba T. Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(3): 344–354. [DOI](#)
- [37] Hendriksen PJ, Hoogerbrugge JW, Themmen APN, Koken MH, Hoeijmakers JHJ, Oostra BA, van der Lende T, Grootegeed JA. Postmeiotic transcription of X and Y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol*, 1995, 170(2): 730–733. [DOI](#)
- [38] Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Roest HP, Ooms M, Vreeburg J, Hoeijmakers JHJ, Grootegeed JA. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev Biol*, 1999, 207(2): 322–333. [DOI](#)
- [39] Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, 2006, 20(4): 411–416. [DOI](#)
- [40] Schatten GP, Pedersen RA. Current topics in developmental biology. New York: Academic Press, 1998. [DOI](#)
- [41] Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, 2006, 441(7092): 469–474. [DOI](#)
- [42] 张秀军, 刘美玲, 贾孟春. 精子发生过程中基因表达转录水平的调控. *遗传*, 2011, 33(12): 1300–1307. [DOI](#)
- [43] Schmidt EE, Ohbayashi T, Makino Y, Tamura T, Schibler U. Spermatid-specific overexpression of the TATA-binding protein gene involves recruitment of two potent testis-specific promoters. *J Biol Chem*, 1997, 272(8): 5326–5334. [DOI](#)
- [44] Ehrmann I, Elliott DJ. Post-transcriptional control in the male germ line. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10(1): 55–63. [DOI](#)
- [45] Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for *Tnp1* and *Prm1* transcription and spermatogenesis. *Nature*, 2007, 450(7166): 119–123. [DOI](#)
- [46] 葛少钦, 李建忠, 张晓静. 精子发生过程中组蛋白甲基化和乙酰化. *遗传*, 2011, 33(9): 939–946. [DOI](#)
- [47] He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*, 2009, 137(6): 901–911. [DOI](#)
- [48] Romero Y, Meikar O, Papaioannou MD, Conne B, Grey C, Weier M, Pralong F, De Massy B, Kaessmann H, Vassalli JD, Kotaja N, Nef S. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25241. [DOI](#)
- [49] Wang GL, Reinke V. A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Curr Biol*, 2008, 18(12): 861–867. [DOI](#)
- [50] Shirayama M, Seth M, Lee HC, Gu WF, Ishidate T, Conte D Jr, Mello CC. piRNAs Initiate an epigenetic memory of nonself RNA in the *C. elegans* germline. *Cell*, 2012, 150(1): 65–77. [DOI](#)
- [51] Lee HC, Gu WF, Shirayama M, Youngman E, Conte D Jr, Mello CC. *C. elegans* piRNAs mediate the genome-wide surveillance of germline transcripts. *Cell*, 2012, 150(1): 78–87. [DOI](#)
- [52] Zhang GJ, Guo GW, Hu XD, Zhang Y, Li QY, Li RQ, Zhuang RH, Lu ZK, He ZG, Fang XD, Chen L, Tian W, Tao Y, Kristiansen K, Zhang XQ, Li SG, Yang HM, Wang J. Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome. *Genome Res*, 2010, 20(5): 646–654. [DOI](#)