

# 附睾小体功能蛋白及 sRNA 研究进展

肖娟, 王讯, 罗毅, 李晓开, 李学伟

四川农业大学动物科技学院, 动物遗传育种研究所, 成都 611130

**摘要:** 精液质量是反映男性生殖健康最基本和最重要的指标。哺乳动物的精子需在附睾中经历一系列复杂的结构与功能的变化才能成熟并具有潜在受精能力。精子成熟是由大量转录因子、激素等信号分子协同调控的复杂生理过程。近年来越来越多的证据表明附睾小体(epididymosomes)中的功能蛋白和 sRNAs(small RNAs)可参与调节精子成熟及受精等过程。本文主要综述了附睾小体中功能蛋白及两类主要的 sRNAs(tRNAs 和 miRNAs)的生物学作用, 以为男性不育等疾病的治疗提供一定的理论指导和新的治疗思路。

**关键词:** 精液; exosome; 附睾小体; 蛋白质; miRNA; tsRNA

## Research progress in sRNAs and functional proteins in epididymosomes

Juan Xiao, Xun Wang, Yi Luo, Xiaokai Li, Xuwei Li

College of Animal Science and Technology, Institute of Animal Genetics and Breeding, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

**Abstract:** The semen quality is a basic and the most important indicator of male reproductive health. Mammalian spermatozoa undergo a series of complex structural and functional changes in the epididymis to mature and achieve fertilization capacity. Sperm cell maturation is mediated by a complex physiological process, which is synergistically regulated by a large number of transcription factors, hormones and other signaling molecules. In recent years, there is increasing evidence supporting the notion that functional proteins and sRNA (small RNAs) in epididymosomes participate in sperm maturation and fertilization process. In this review, we summarize the biological roles of functional proteins and two major sRNAs (tRNAs and miRNAs) in sperm maturation in epididymosomes, and provide some theoretical guidance and new ideas for treatments of low fertility, infertility and other reproductive diseases in men.

**Keywords:** semen; exosome; epididymosomes; protein; miRNA; tsRNA

收稿日期: 2017-09-15; 修回日期: 2018-01-29

基金项目: 四川省科技厅应用基础计划(编号: 2016JY0167), 四川省教育厅重点项目(编号: 15ZA0008), 四川省青年科技创新研究团队项目(编号: 2015TD0012)和农业部现代农业产业技术体系建设专项项目(编号: NYCYTX-009)资助[Supported by the Application Basic Research Plan Project of Sichuan Province (No.2016JY0167), the Key Project of Sichuan Education Department (No.15ZA0008), the Program for Innovative Research Team of Sichuan Province (No.2015TD0012) and the Specialized Research Fund of Ministry of Agriculture of China(No.NYCYTX-009)]

作者简介: 肖娟, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 751190178@qq.com

通讯作者: 王讯, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: wangxun99@163.com

DOI: 10.16288/j.yczs.17-148

网络出版时间: 2018/2/1 13:25:27

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180201.1325.003.html>

近年来,由于精液质量下降而引起的男性不育现象正逐年增加,其中精子质量下降是主要因素之一<sup>[1]</sup>。哺乳动物睾丸曲细精管产生的精子需要在附睾中经过一系列复杂的结构与功能变化才能成熟,经附睾转运后精子膜蛋白新组分呈现出低分子量的特征,这与附睾液中蛋白组分相似,这一变化很可能源自精子与附睾液的相互作用<sup>[2]</sup>。由于和附睾腔内液体(包括蛋白质<sup>[3]</sup>和附睾小体<sup>[4]</sup>)相互作用,精子的功能发生了改变。附睾上皮细胞通过顶浆分泌的方式产生的外泌体(exosome)被定义为附睾小体(epididymosomes)<sup>[5,6]</sup>,属于精液外泌体(semen exosomes, SE)中的一种<sup>[7]</sup>。虽然精液外泌体发现已有 30 余年,但有关附睾小体的研究却相对较少,现有证据表明附睾小体在精子成熟等过程中发挥重要的调控作用<sup>[4,8,9]</sup>。本文基于附睾小体的功能蛋白质及两类主要的 sRNAs 能参与调节精子成熟及受精等过程,对近年来附睾小体及其生物学功能的最新研究进展进行了综述,通过深入了解附睾小体对精子的作用,有助于揭示雄性动物繁殖能力低下及临床男性不育的发病机制,为提高雄性动物繁育能力及治疗男性不育提供新的思路。

## 1 附睾小体的发现和产生

哺乳动物精液主要是由精子和生殖道中的多种细胞分泌物组成,而富含高浓度胆固醇、鞘磷脂及结构蛋白等成分的附睾小体也存在于这种复杂流体中<sup>[4,7]</sup>。1985 年, Yanagimachi 等<sup>[5]</sup>首次在中国仓鼠(Chinese hamster)附睾管腔内隔室中发现附睾上皮

细胞能产生直径为 20~100 nm 的纳米囊泡。因其是附睾上皮细胞分泌且与 exosome 类似,因此被称为附睾小体<sup>[6]</sup>。后续的研究表明,除仓鼠外,在猴(*Cercopithecidae*)<sup>[10]</sup>、牛(*Bos taurus*)<sup>[11~13]</sup>、鼠(*Mus musculus*)<sup>[14~16]</sup>和猫(*Felinae*)<sup>[17]</sup>等不同物种的附睾液中也存在附睾小体。顶浆分泌是 1923 年首次被提出<sup>[18]</sup>,其分泌过程是分泌细胞首先形成突起囊泡,随后逐渐变大的突起囊泡与细胞分离,最终囊泡破裂将其内容物释放出来。附睾小体是通过顶浆分泌的方式产生,附睾小体的形成主要包括以下几个过程(图 1):首先附睾上皮主细胞形成了顶端突起囊泡,突起以出芽的方式生长,从微绒毛之间穿出形成顶端囊泡,然后直径逐渐变大的突起囊泡被释放到附睾管腔液中,最后囊泡膜破裂释放其包裹的能与精子结合的纳米囊泡,即附睾小体<sup>[8]</sup>。

## 2 附睾小体主要成分及其生物学功能

附睾是雄性哺乳动物重要的生殖器官,主要负责精子的传输、浓缩、贮存及成熟,而附睾液中由附睾上皮细胞分泌的附睾小体主要通过转运精子成熟及受精所需的蛋白和 RNA 促进精子成熟,此外,附睾小体除了富含蛋白质和脂类<sup>[7]</sup>,还含有很多非编码 RNA,如 tRNA<sup>[19]</sup>、miRNA<sup>[20]</sup>等(图 2)。附睾分为 3 段,即附睾头部、附睾体和附睾尾部,这 3 段均可分泌附睾小体<sup>[21]</sup>。附睾小体在附睾和精子交流中发挥了重要的作用,能够包裹来源于附睾的 sRNA<sup>[19,21]</sup>和蛋白质<sup>[9]</sup>并将其转移至精子发挥重要的生理作用。

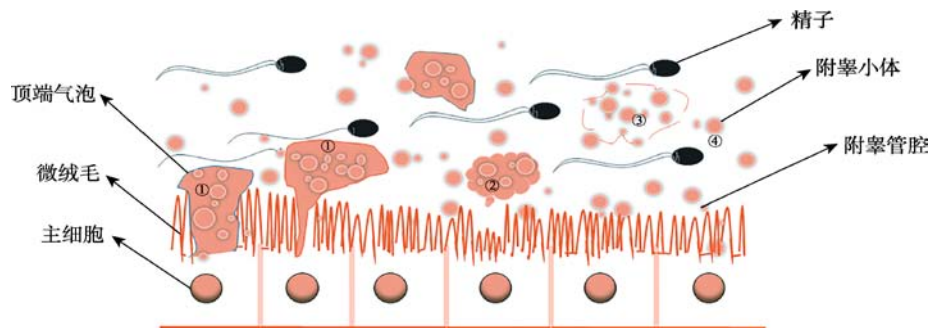


图 1 附睾小体的生成

Fig. 1 The formation of the epididymosomes

①顶端囊泡的产生;②释放到附睾的管腔液中;③囊泡膜破裂释放纳米囊泡;④附睾小体产生。参考文献[5,6,8,18]内容修改绘制。

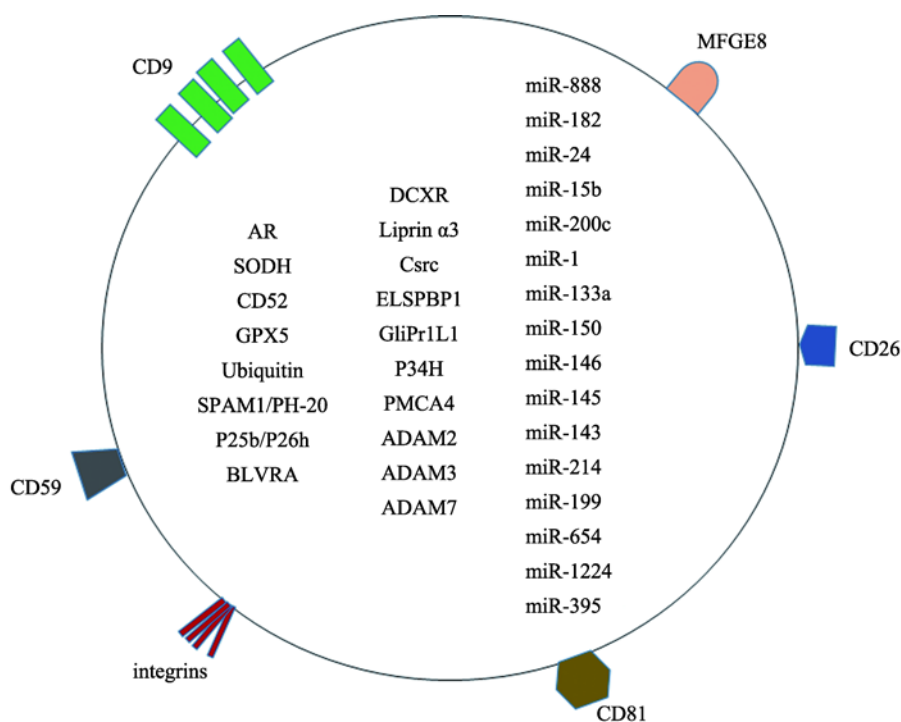


图2 附睾小体功能蛋白及部分 sRNA

Fig. 2 The functional proteins and partial list of sRNAs in epididymosomes

CD9、CD59、integrins、CD81、CD26 为附睾小体膜上跨膜连接蛋白,能促进细胞间及细胞内信号转导。MFGE8 也是膜上蛋白,其结构域 C2 区能和暴露在精子细胞表面的磷脂酰丝氨酸残基结合。圆圈内为部分附睾小体内容物。参考文献[8,20,25,26,31,35,39,41,44,48,50,58,61,62,64,65]内容修改绘制。

除了参与精子成熟及受精<sup>[22~24]</sup>,附睾小体中的蛋白<sup>[8,25,26]</sup>还能参与精子抗氧化或消除缺陷精子等过程<sup>[27~29]</sup>。附睾小体中的 miR-15b、miR-182 和 miR-24<sup>[20]</sup>可能影响精子活力和正常形态<sup>[30]</sup>;当炎症存在时,附睾小体 miRNA(miR-29a、miR-181a 和 miR-146)<sup>[20,31]</sup>还具有抑制附睾上皮细胞增殖,控制 T 细胞敏感性或抑制促炎通路<sup>[32~34]</sup>。功能研究显示附睾小体内所含的部分 miRNA(miR-150<sup>[20]</sup>和 miR-133b<sup>[35]</sup>)具有影响早期胚胎的发育的功能<sup>[36,37]</sup>,以上结果提示附睾小体内的 miRNA 随精子进入卵母细胞后还可能参与早期胚胎发育。

## 2.1 附睾小体蛋白及其功能

Girouard 等<sup>[38]</sup>发现附睾头部和尾部分泌的附睾小体的蛋白种类差异很大,牛附睾头部和附睾尾部的附睾小体中分别含有 555 和 438 种蛋白质,其中共有的蛋白质有 231 种。附睾小体与精子之间存在蛋白转移的现象已经得到广泛认可;研究发现将牛

附睾尾部的附睾小体与头部的精子体外培养,附睾小体蛋白会转移到精子上<sup>[12]</sup>。这些附睾小体蛋白在精子的成熟及运动能力的调节等过程中扮演重要角色(表 1),可以影响精子的成熟<sup>[39]</sup>,或有助于精子和透明带结合<sup>[23]</sup>,还能保护精子抵抗氧应激<sup>[8]</sup>。

### 2.1.1 精子活力及能量代谢相关蛋白

附睾小体中包含醛糖还原酶(aldose reductase, AR)<sup>[40]</sup>、山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SODH)<sup>[24,41]</sup>和巨噬细胞迁移酶抑制因子(microphage migration inhibitory factor, MIF)<sup>[39,40,42,43]</sup>等多种蛋白,它们参与精子活力获得及成熟。Kobayashi 等<sup>[24]</sup>和 Frenette 等<sup>[41]</sup>发现 AR 和 SODH 都是通过参与多元醇相关通路影响精子的活力及成熟,其中 AR 是利用电子供体 NADPH 增加葡萄糖向山梨糖醇的转变,而 SODH 则通过 NAD<sup>+</sup>作为电子受体将山梨糖醇氧化成果糖,它们通过控制精子能量的来源,进而影响精子的活力。附睾小体的 MIF 穿过精子质膜被转

表 1 附睾小体相关蛋白对精子的调控作用

Table 1 The regulation of epididymosomes-associated proteins on sperm

参与过程	相关蛋白名称缩写	功能	参考文献
精子活力及能量代谢	MIF	与精子纤维密度相关：参与精子能动性获得	[39,40,42,43]
	SODH	通过 NAD 作为电子受体将山梨糖醇氧化成果糖，控制精子能量来源	[24,41]
	AR	利用电子供体 NADPH 增加葡萄糖向山梨糖醇转变，控制精子能量的来源	[24,40,41]
	PMCA4	是小鼠精子的必需蛋白以及主要的钙离子外排泵,调节精子的活力	[9,44~46]
精子获能及受精	MFGE8	与卵子衣壳糖蛋白羧基端的 F5/8C 部位结合介导精子和卵子粘附,促进精卵结合	[48~54]
	SPAM1/PH20/P25b/P26h/DCXR/P34H	增加精子对卵子周围积云细胞层的渗透力使精子成功附着卵子透明带，促进精卵透明带反应	[13,23,25,56,59]
	Liprin α3	Liprin α3 表达影响精子顶体反应和受精作用	[57,58]
	cSrc	Src 激酶家族通过增强胞内蛋白酪氨酸磷酸化作用，转导精子获能的级联信号影响精子获能	[60]
	GLIPR1L1	参与透明带反应从而精卵融合过程	[61]
	ADAM2/ADAM3/ADAM7	ADAMs 家族与卵子膜蛋白整合素 β <sub>1</sub> 、α <sub>4</sub> /α <sub>9</sub> 、α <sub>6</sub> 和 CD9 相互作用介导了精卵质膜的结合和融合	[22,43,47]
保护精子抵抗氧应激	ELSPBP1/BLVRA	ELSPBP1/BLVRA 复合物能清除 ROS，保护活精子抵抗氧化应激	[63,64]
	GPX5	精子的抗氧化损伤过程。此外，还能避免未成熟精子在 ROS 作用下过早获能	[8,28]
	泛素(ubiquitin)	参与了消除缺陷精子	[10,29]

移到精子鞭毛内从而影响精子的活力<sup>[39,42]</sup>。此外，小鼠附睾分泌的钙离子-腺苷三磷酸膜蛋白(plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 4, PMCA4)<sup>[9]</sup>作为钙离子外排泵，能影响钙离子信号通路的激活并维持精子内Ca<sup>2+</sup>的稳态<sup>[44,45]</sup>；精子若缺失 *PMCA4* 基因将不能发生超活化和获能反应<sup>[45]</sup>，因此 *PMCA4* 对精子运动活力和受精具有极其重要的作用<sup>[46]</sup>。

2.1.2 精子获能及受精相关蛋白

附睾小体中所含的部分蛋白质还能参与精子获能及受精过程,如:金属蛋白酶解离素(a disintegrin and metalloprotein, ADAMs)<sup>[43]</sup>家族成员(ADAM2/ADAM3/ADAM7)属于 I 型跨膜蛋白。附睾小体中的 ADAMs 被转移到精子后能与卵子膜蛋白整合素 β<sub>1</sub>、α<sub>4</sub>/α<sub>9</sub>、α<sub>6</sub> 和 CD9 相互作用介导了精卵质膜的结合和融合<sup>[22,47]</sup>。附睾小体也含有乳脂球表皮生长因子(milk fat globule-EGF factor 8 protein, MFGE8；在小鼠的精子细胞上该蛋白根据其结构不同被命名为：

secreted protein containing N-terminal Notch-like type II epidermal growth factor (EGF) repeats and C-terminal discoidin/F5/8C domains, SED1)也具有重要功能<sup>[48-50]</sup>。Ensslin 等<sup>[48,51]</sup>和 Shur 等<sup>[52,53]</sup>研究表明 MFGE8 的结构域 C2 区能和暴露在精子细胞表面的磷脂酰丝氨酸残基结合，而 SED1/MFGE8 的结构域 C1 区则能与卵子衣壳糖蛋白羧基端的 F5/8C 部位结合介导精子和卵子粘附，使 SED1/MFGE8 作为二聚体或多聚体促进精卵结合。Hoffhines 等<sup>[54]</sup>研究发现了体内无 MFGE8 表达的小鼠生育能力低下,且其精子在体外不能与卵细胞结合；证明了 SED1/MFGE8 的硫酸化在精卵结合中起重要作用。

此外，附睾小体中精子粘附分子 1(sperm adhesion molecule 1 ,SPAM1)/PH-20<sup>[23,26,55]</sup>、P25b/P26h<sup>[13]</sup> [在人类被称为二羧基/L-木酮糖还原酶(dicarbonyl/L-xylulose reductase ,DCXR)或 P34H<sup>[56]</sup>]和酪氨酸磷酸酶受体相互作用蛋白 α3 (liprin α3)<sup>[57,58]</sup>等都是与精子获能及受精相关的蛋白。SPAM1/PH20 是一种透明质酸酶，其主要生物功能包括在透明质酸酶活



性作用下协助精子穿过放射冠,在顶体反应后参与透明带的次级结合<sup>[23,55,59]</sup>。Joshi 等<sup>[57]</sup>发现 Liprin  $\alpha 3$  的表达影响精子的顶体反应和受精作用,但其具体作用机制还有待研究。具有酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinase, PTK)活性的 cSrc 激酶家族通过转导精子获能的级联信号可影响精子获能<sup>[60]</sup>。此外,附睾小体中还含有胶质瘤致病相关蛋白 1 (glioma pathogenesis-related protein 1, GLIPR1L1)<sup>[61]</sup>, Gibbs 等<sup>[62]</sup>的研究显示 GLIPR1L1 蛋白在精子与透明带结合过程中发挥一定作用。

### 2.1.3 精子抗氧化相关蛋白

除上述附睾小体蛋白发挥的生物学功能外,部分附睾小体蛋白还表现出和精子死亡存在高度密切关系。牛附睾小体中 ELSPBP1<sup>[63]</sup>(epididymal sperm binding protein1)等蛋白水平与牛射精前附睾中死亡的精子数量相关。ELSPBP1/BLVRA(biliverdin reductase A, BLVRA)复合物的形成能清除活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),从而保护活精子抵抗氧化应激<sup>[64]</sup>。此外,小鼠的谷胱甘肽过氧化物酶 5(glutathione peroxidase 5, GPX5)是一种由附睾头部上皮细胞分泌的附睾小体蛋白,是 GPXs 家族中的一员。该家族蛋白在附睾精子的抗氧化损伤过程中起关键作用,是有效的抗氧化剂清除剂,可保护精子抵抗氧化损伤,从而保证其完整性<sup>[8,28]</sup>。泛素(ubiquitin)是另一种附睾小体蛋白,该蛋白在精子经过附睾的过程中转移到精子上,参与了消除缺陷精子的过程<sup>[10,25]</sup>。此外,泛素-蛋白酶体途径(Ubiquitin-proteasome pathway, UPP)在精子变态过程中细胞器降解及精子细胞中多余蛋白质的去除中发挥重要调控作用,在精子变态过程中 UPP 调控异常会导致精子畸形及精子活力降低,并引发少精子症、不育及睾丸肿瘤等生殖系统疾病<sup>[29]</sup>。

近年来,关于附睾小体蛋白的研究逐渐增多,以上证据均表明它们与精子的发生、成熟及受精等关系密切,然而其具体作用机制仍有待进一步确定。

## 2.2 附睾小体中两种主要 sRNA 及其功能

sRNA(small RNAs)包括多种非编码 RNA,但目前附睾小体中 miRNA (microRNA)和 tsRNA (tRNA-

derived small RNAs)的研究较多。miRNA 是一类高度保守的非编码调控单链 sRNA,参与各种生物功能的调节途径,包括发育、病毒防御、细胞增殖和凋亡等,此外 miRNA 还参与生殖功能相关途径<sup>[65,66]</sup>。而 tsRNA 是由 tRNA 及前体 tRNA 通过一系列酶作用断裂后形成的短链 RNA,普遍存在于哺乳动物精子和附睾小体中,目前研究表明 tsRNA 同样具有调控基因转录、细胞的增殖凋亡和应激反应等功能,很可能通过精子传递行使其生物学功能<sup>[19,67]</sup>。附睾小体具有选择性包裹 sRNA 的能力, Belleannée 等<sup>[20]</sup>研究表明小鼠附睾不同部位分泌的附睾小体所含的 miRNA 丰度存在差异,例如 miR-654、miR-1224 和 miR-395 在附睾尾分泌的附睾小体中高度富集,而 miR-145、miR-143、miR-214 和 miR-199 则在头部分泌的附睾小体中含量较高,小鼠的附睾小体能和精子发生融合并将其中的 sRNA 转移到精子中,从而发挥其生物学功能(表 2)。

### 2.2.1 精子活力相关 miRNA

附睾小体中含有 miR-888<sup>[20,31]</sup>,它可调控 *SPAG6* 和 *SPAG1* 基因从而维持精子鞭毛的蠕动和成熟的精子结构<sup>[66,68]</sup>。附睾小体中还含有 miR-182、miR-24 及 miR-15b 等 miRNA<sup>[20]</sup>,靶基因预测显示 miR-15b 可靶向调节 *IDH3A*(Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD) alpha)基因的表达控制三羧酸循环中能量代谢;而 miR-182 和 miR-24 可靶向调节糖原合成酶激酶 3 $\alpha$ (Glycogen synthase kinase 3 alpha, *GSK3A*)基因的表达,而 *GSK3A* 的磷酸化可影响精子的运动能力;此外,miR-24 还可靶向调节肌动蛋白(Actin)结合蛋白 Fascin1(fascin actin-bundling protein 1, *FSCN1*)基因的表达,*FSCN1* 基因编码的肌动蛋白结合蛋白与细胞运动相关<sup>[30]</sup>。因此附睾小体中 miRNA 和精子质量关系密切,这些 miRNA 可能是今后研究男性不育等疾病及雄性动物繁殖力低下的重要靶点。

### 2.2.2 胚胎生长及发育相关 miRNA

附睾小体能和精子发生融合并将其中的 miRNA 转移到精子内,在受精过程中,这些 miRNA 被带入卵母细胞中进而可能对胚胎发育产生重要影响。如图 2 所示,附睾小体内含有 miR-200c、miR-150、

表 2 附睾小体相关 miRNA 的生物学功能

Table 2 List of miRNAs associated with biological processes in epididymosomes

参与过程	相关 miRNA	功能	参考文献
精子活力相关	miR-888	调节 <i>SPAG6</i> 和 <i>SPAG1</i> 而维持精子鞭毛蠕动和成熟精子结构	[20,31,66,68]
	miR-15b	调节靶基因 <i>IDH3A</i> 表达控制三羧酸循环中能量代谢。	[20,30]
	miR-182/miR-24	调节 <i>GSK3A</i> 的表达从而使精子获能	[20,30]
胚胎生长及发育	miR-200c	靶向抑制 <i>GATA4</i> 表达, <i>GATA4</i> 高表达会诱导 hESC 凋亡	[20,69]
	miR-150	抑制原癌基因 <i>c-Myb</i> 表达, 而该基因的缺失将导致机体后期出现严重的表型缺陷	[20,36]
	miR-1-1/miR-1-2	调节平滑肌基因表达使胚胎心肌细胞成熟	[20,37]
	miR133a-1/miR-133a-2	调节平滑肌基因表达促使胚胎心肌细胞成熟	[20,37]
雄性生殖免疫、炎症及细胞增殖	miR-181a	调节 B 细胞分化和 T 细胞受体信号参与炎症反应	[20,34]
	miR-146	下调各种促炎性细胞因子来抑制炎症及先天免疫反应	[20,33]
	miR-1224	下调 <i>TNF-<math>\alpha</math></i> 的表达, 在免疫反应中发挥重要作用	[20,71]
	miR-29a	通过抑制细胞 <i>NASP</i> 表达, 抑制附睾上皮细胞增殖	[20,32]

miR-1、miR-133a 等多种 miRNA<sup>[20,21]</sup>, 功能富集分析显示这些 miRNA 对于胚胎发育具有重要功能。Huang 等<sup>[69]</sup>研究表明 miR-200c 可靶向抑制 *GATA4* (*GATA binding protein 4*) 基因的表达, 且敲除人胚胎干细胞(Human embryonic stem cells, hESC)中的 miR-200c 将上调 *GATA4* 的表达进而诱导 hESC 的凋亡。Wystub 等<sup>[37]</sup>报道了 miR-1-1/133a-2 和 miR-1-2/133a-1 簇可通过调节平滑肌基因表达使胚胎心肌细胞从不成熟状态转变为更成熟的表型, miR-1/133 簇的缺失诱导平滑肌特异性基因的上调从而导致胚胎心脏多重转录变化, 最终导致心脏发育异常并引起胚胎致死, 因此 miR-1/133a 对于早期的心脏发育非常重要。Lin 等<sup>[36]</sup>表明受精卵中 miR-150 的表达水平和 *c-Myb* 基因呈负相关, 而 *c-Myb* 基因的缺失将导致机体后期出现严重的表型缺陷, 这暗示 miR-150/*c-Myb* 的相互作用对胚胎发育至关重要。Reilly 等<sup>[35]</sup>通过靶基因预测、功能富集分析 gene ontology(GO)和 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)通路分析, 发现附睾小体中大多数 miRNA 的靶基因是和细胞生长、增殖、发育、死亡等相关, 其中还有 6%~7%和胚胎发育相关。

### 2.2.3 雄性生殖免疫、炎症及细胞增殖相关 miRNA

雄性生殖道感染及其所引起的炎症反应均会影响精液的质量, 从而导致雄性生育能力降低<sup>[70]</sup>。附

睾小体中还存在和炎症相关的 miRNA, 如 miR-181a 和 miR-1224<sup>[20]</sup>。Li 等<sup>[34]</sup>研究表明 miR-181a 通过调节 B 细胞分化和 T 细胞受体信号参与炎症反应。Cheng 等<sup>[33]</sup>发现 miR-146 可通过下调各种促炎性细胞因子来抑制炎症及先天免疫反应, 但其具体机制需进一步研究。当炎症存在时, miR-1224<sup>[71]</sup>通过下调肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , *TNF- $\alpha$* )的表达从而在免疫反应中发挥重要作用。附睾小体中还含有 miR-29a<sup>[20]</sup>, 其表达上调可靶向抑制核自身抗原精子蛋白(nuclear autoantigenic sperm protein, *NASP*)基因的表达从而抑制附睾上皮细胞增殖<sup>[32]</sup>。这些附睾小体包裹的 miRNA 可作为一种非侵入性的生物标记来评估附睾自身生理和病理学变化<sup>[31]</sup>。

### 2.2.4 精子成熟及胚胎发育相关 tsRNA

附睾小体中除了蛋白质和 miRNA 等主要成分能发挥重要作用外, 来源于 tRNA 的小分子 tsRNA (tRNA-derived small RNAs)也具有重要的作用。研究表明 tsRNA 同样具有调控基因转录、细胞的增殖凋亡和应激反应等功能, 并能通过精子传递行使其生物学功能<sup>[19,72]</sup>。Sharma 等<sup>[19]</sup>研究表明附睾尾部分泌的附睾小体富含 tsRNA, 且这些 tsRNA 与成熟的精子中的极其相似。通过显微注射法将部分 tsRNA 注入正常胚胎中, 结果表明 tsRNA 能引起胚胎阶段多种基因表达量的改变且大部分基因聚集在代谢调控通路中<sup>[72]</sup>。Chen 等<sup>[72]</sup>研究发现 tRNA(transfer RNA)

的修饰会影响 tsRNA 的功能,而 tsRNA 自身的修饰同样会影响遗传代谢疾病,通过级联效应调控下游大量基因表达的重编程从而引起早期胚胎的转录本变化。目前,精子自身是否具有剪切 tRNA 的能力尚不清楚,但来源于附睾小体的 tsRNA 的确是精子重要的表观遗传因子并影响子代的代谢。因此,通过研究附睾小体中的 tsRNA 对精子及早期胚胎的具体调控机制将对后代的健康和疾病预防产生重大的影响。与此同时,关于附睾小体中的 piRNA、rRNA 和 lncRNA 等其他生物学成分的研究较少,其具体调控机制还需要进一步研究。

### 3 附睾小体其他生物学功能

除参与精子成熟及受精外,精液 exosome 还具有抗 HIV 1 病毒的功能以及作为疾病诊断的生物标记。Madison 等<sup>[73]</sup>从健康个体得到的纯化精液 exosome 可通过阻断病毒 RNA 后续逆转录来抑制 HIV-1 病毒在不同类型细胞中的复制。人类精液 exosome 能够限制艾滋病毒在 LP-BM5 感染小鼠模型体内传播<sup>[74]</sup>,但这种抗 HIV 1 病毒的功能是否是由精液 exosome 中附睾小体实现的还有待进一步研究。附睾小体中的 RNA(let-7d 和 let-7e)<sup>[20]</sup>能反映精液中不同细胞来源的 RNA 表达情况,可作为雄性生殖系统的生物标志物,阐明某些疾病的病因及发病机制,如某些特发性雄性动物不育或繁殖力低下<sup>[30,31]</sup>。输精管结扎逆转手术是目前可靠的男性避孕方法,通过检查输精管切除术的上游和下游的相关 miRNA 和蛋白质(DCXR/P34H)变化可以鉴定结扎或恢复结扎手术是否成功<sup>[31]</sup>,研究进一步表明结扎手术后前后相关 miRNA 出现显著改变,在这些 miRNA 中表达上调的 miR-421<sup>[75]</sup>及下调的 miR-941<sup>[76]</sup>分别与炎症反应、细胞增殖及细胞分化相关。所以了解精液中附睾小体是如何改变细胞程序性免疫应答对于开发下一代疫苗和预防性治疗性传播等疾病非常重要。

### 4 结语与展望

精子质量下降引起的特发性少精子症、弱精子症及无精子症等正逐年上升,已成为影响男性生育

及雄性动物繁育能力的最大杀手。近年来研究发现附睾小体中 sRNAs 和蛋白质等生物学成分与精子的质量密切相关,它们分别作用于精子成熟相关的转录因子以及各种促炎性细胞因子从而调控精子成熟和抑制雄性生殖系统感染,以保证机体具备良好的受精能力。附睾小体中 miRNA 表达量变化对精子及早期胚胎的影响提示人们是否可以通过注射相关 miRNA 达到治疗疾病的目的,而 tsRNA 对精子及早期胚胎的调控也暗示了附睾小体中可能还有更多调控因子可影响精子的质量。因此,通过对附睾小体内容物及其与精子相互作用的深入研究、从而构建完善的附睾小体对精子调控网络,不但有助于进一步了解附睾内精子的成熟及附睾小体与精子相互作用的分子机制,同时又将成为临床上附睾问题造成的男性不育的诊断与治疗开辟新途径,这将成为未来提高雄性动物繁育能力及治疗男性不育的新方向。

### 参考文献(References):

- [1] Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New Engl J Med*, 2001, 345(19): 1388–1393. [DOI]
- [2] Dacheux J, Voglmayr J. Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. *Biol Reprod*, 1983, 29(4): 1033–1046. [DOI]
- [3] Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux JL. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82–83: 321–339. [DOI]
- [4] Caballero J, Frenette G, Sullivan R. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Vet Med Int*, 2010, 2011: 757194. [DOI]
- [5] Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, Suzuki F, Yanagimachi H. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *Devel Dyn*, 1985, 172(4): 317–330. [DOI]
- [6] Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cell Mol Dis*, 2005, 35(1): 1–10. [DOI]
- [7] Sullivan R, Saez F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive

- physiology. *Reproduction*, 2013, 146(1): R21–R35. [DOI]
- [8] Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl*, 2007, 9(4): 483–491. [DOI]
- [9] Martin-DeLeon PA. Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface. *Asian J Androl*, 2015, 17(5): 720–725. [DOI]
- [10] Bajpai V, Shipstone A, Ratna KB, Qaisar J, Setty B. Ultrastructure of the epididymal epithelium of rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Acta Eur Fertil*, 1984, 16(3): 207–217. [DOI]
- [11] AGRAWAL Y, VANHA-PERTTULA T. Electron microscopic study of the secretion process in bovine reproductive organs. *J Androl*, 1988, 9(5): 307–316. [DOI]
- [12] Frenette G, Lessard C, Sullivan R. Selected proteins of “prostasome-like particles” from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod*, 2002, 67(1): 308–313. [DOI]
- [13] Frenette G, Sullivan R. Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev*, 2001, 59(1): 115–121. [DOI]
- [14] Hermo L, Adamali HI, Andonian S. Immunolocalization of CA II and H<sup>+</sup>-V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J Androl*, 2000, 21(3): 376–391. [DOI]
- [15] Fornés M, Barbieri A, Cavicchia J. Morphological and enzymatic study of membrane-bound vesicles from the lumen of the rat epididymis. *Andrologia*, 1995, 27(1): 1–5. [DOI]
- [16] Eickhoff R, Wilhelm B, Renneberg H, Wennemuth G, Bacher M, Linder D, Bucala R, Seitz J, Meinhardt A. Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med*, 2001, 7(1): 27–35. [DOI]
- [17] Morales A, Cavicchia J. Release of cytoplasmic apical protrusions from principal cells of the cat epididymis, an electron microscopic study. *Tiss Cell*, 1991, 23(4): 505–513. [DOI]
- [18] Schiefferdecker P. Die Hautdrüsen des Menschen und der Säugetiere, ihre biologische und rassenanatomische Bedeutung sowie die Muscularis sexualis. *Naturwissenschaften*, 1923, 11(44): 895–896. [DOI]
- [19] Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, Belleanne C, Kucukural A, Serra RW, Sun FL, Carone BR, Ricci EP, Li XZ, Fauquier L, Moore MJ, Moore R, Mello CC, Garber M, Rando OL. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, 2016, 351(6271): 391–396. [DOI]
- [20] Belleanne C, Calvo É, Caballero J, Sullivan R. Epididymosomes convey different repertoires of micrornas throughout the bovine epididymis. *Biol Reprod*, 2013, 89(2): 30. [DOI]
- [21] Reilly JN, McLaughlin EA, Stanger SJ, Anderson AL, Hutcheon K, Church K, Mihalas BP, Tyagi S, Holt JE, Eamens AL, Nixon B. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Sci Rep*, 2016, 6: 31794. [DOI]
- [22] Zhou SC, Ni Y, Shi QX. ADAMs involved in mammalian sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *Life Sci*, 2005, 17(4): 323–327.  
周思畅, 倪崖, 石其贤. ADAMs 参与哺乳动物精-卵结合与融合. *生命科学*, 2005, 17(4): 323–327. [DOI]
- [23] Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 250(1–2): 114–121. [DOI]
- [24] Kobayashi T, Kaneko T, Iuchi Y, Matsuki S, Takahashi M, Sasagawa I, Nakada T, Fujii J. Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. *J Androl*, 2002, 23(5): 674–684. [DOI]
- [25] Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Sci*, 2001, 114(9): 1665–1675. [DOI]
- [26] Griffiths GS, Galileo DS, Reese K, Martin-DeLeon PA. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(11): 1627–1636. [DOI]
- [27] Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, Kerckhove N, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Janny L, Pons-Rejraji H, Conrad M, Drevet JR, Kocer A. Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGpx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38565. [DOI]
- [28] Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J, Schoor M, Gottwald U, Habenicht U, Drevet JR, Vernet P. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119(7): 2074. [DOI]
- [29] Dong LH, Rang ML, Li Z, Peng FZ, Chen B. The role of ubiquitin-proteasome pathway in spermatogenesis. *Hereditas (Beijing)*, 2016, 38(9): 791–800.  
董莲花, 冉茂良, 李智, 彭馥芝, 陈斌. 泛素-蛋白酶体途径在精子生成中的作用. *遗传*, 2016, 38(9): 791–800. [DOI]



- [30] Curry E, Safranski TJ, Pratt SL. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology*, 2011, 76(8): 1532–1539. [DOI]
- [31] Belleannée C, Légaré C, Calvo É, Thimon V, Sullivan R. microRNA signature is altered in both human epididymis and seminal microvesicles following vasectomy. *Hum Reprod*, 2013, 28(6): 1455–1467. [DOI]
- [32] Ma WB, Xie SS, Ni MJ, Huang XX, Hu SG, Liu Q, Liu AH, Zhang JS, Zhang YL. MicroRNA-29a inhibited epididymal epithelial cell proliferation by targeting nuclear autoantigenic sperm protein (NASP). *J Biol Chem*, 2012, 287(13): 10189–10199. [DOI]
- [33] Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, Delgado-Olguin P, Cybulsky MI, Fish JE. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(7): 1017–1034. [DOI]
- [34] Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P, Klein LO, Davis MM, Chen CZ. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*, 2007, 129(1): 147–161. [DOI]
- [35] Reilly JN, McLaughlin EA, Stanger SJ, Anderson AL, Hutcheon K, Church K, Mihalas BP, Tyagi S, Holt JE, Eamens AL, Nixon B. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Sci Rep*, 2016, 6: 31794. [DOI]
- [36] Lin YC, Kuo MW, Yu J, Kuo HH, Lin RJ, Lo WL, Yu AL. c-Myb is an evolutionary conserved miR-150 target and miR-150/c-Myb interaction is important for embryonic development. *Mol Biol Evol*, 2008, 25(10): 2189–2198. [DOI]
- [37] Wystub K, Besser J, Bachmann A, Boettger T, Braun T. miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003793. [DOI]
- [38] Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *Int J Androl*, 2011, 34(5 Pt 2): e475–e486. [DOI]
- [39] Eickhoff R, Baldauf C, Koyro HW, Wennemuth G, Suga Y, Seitz J, Henkel R, Meinhardt A. Influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on the zinc content and redox state of protein-bound sulphhydryl groups in rat sperm: indications for a new role of MIF in sperm maturation. *Mol Human Reprod*, 2004, 10(8): 605–611. [DOI]
- [40] Frenette G, Lessard C, Madore E, Fortier MA, Sullivan R. Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. *Biol Reprod*, 2003, 69(5): 1586–1592. [DOI]
- [41] Frenette G, Thabet M, Sullivan R. Polyol pathway in human epididymis and semen. *J Androl*, 2006, 27(2): 233–239. [DOI]
- [42] Frenette G, Légaré C, Saez F, Sullivan R. Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol Human Reprod*, 2005, 11(8): 575–582. [DOI]
- [43] Thimon V, Frenette G, Saez F, Thabet M, Sullivan R. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum Reprod*, 2008, 23(8): 1698–1707. [DOI]
- [44] Ho HC, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by  $\text{Ca}^{2+}$  and not cAMP. *Dev Biol*, 2002, 250(1): 208–217. [DOI]
- [45] Al-Dossary AA, Strehler EE, Martin-Deleon PA. Expression and secretion of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80181. [DOI]
- [46] Chen ZL, Feng MY, Chen YM, Wei HX, Li L, Wu TS, Zhang SQ. The progress of sperm functional proteins regulating the process of fertilization. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(8): 747–755.  
陈志林, 冯美莹, 陈预明, 卫恒习, 李莉, 吴同山, 张守全. 精子功能相关的蛋白质调控受精过程的研究进展. *遗传*, 2014, 36(8): 747–755. [DOI]
- [47] Oh JS, Han C, Cho C. ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane. *Mol Cells*, 2009, 28(5): 441–446. [DOI]
- [48] Ensslin MA, Shur BD. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell*, 2003, 114(4): 405–417. [DOI]
- [49] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 581–593. [DOI]
- [50] Raymond AS, Elder B, Ensslin M, Shur BD. Loss of SED1/MFG-E8 results in altered luminal physiology in the epididymis. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(6): 550–563. [DOI]
- [51] Ensslin MA, Shur BD. The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFGE8, is required for mammary gland branching morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(8): 2715–2720. [DOI]
- [52] Shur BD, Ensslin MA, Rodeheffer C. SED1 function during mammalian sperm-egg adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(5): 477–485. [DOI]
- [53] Raymond AS, Shur BD. A novel role for SED1 (MFGE8) in maintaining the integrity of the epididymal epithelium. *J Cell Sci*, 2009, 122(6): 849–858. [DOI]
- [54] Hoffhines AJ, Jen CH, Leary JA, Moore KL. Tyrosylprotein sulfotransferase-2 expression is required for

- sulfation of RNase 9 and Mfge8 *in vivo*. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3096–3105. [DOI]
- [55] Chen H, Griffiths G, Galileo DS, Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 is a marker for sperm maturation in the mouse. *Biol Reprod*, 2006, 74(5): 923–930. [DOI]
- [56] Boué F, Sullivan R. Cases of human infertility are associated with the absence of P34H an epididymal sperm antigen. *Biol Reprod*, 1996, 54(5): 1018–1024. [DOI]
- [57] Joshi CS, Suryawanshi AR, Khan SA, Balasinor NH, Khole VV. Liprin alpha3: a putative estrogen regulated acrosomal protein. *Histochem Cell Biol*, 2013, 139(4): 535–548. [DOI]
- [58] Joshi CS, Khan SA, Khole VV. Regulation of acrosome reaction By Liprin  $\alpha$ 3, LAR and its ligands in mouse spermatozoa. *Andrology*, 2014, 2(2): 165–174. [DOI]
- [59] Kimura M, Kim E, Kang W, Yamashita M, Saigo M, Yamazaki T, Nakanishi T, Kashiwabara S, Baba T. Functional roles of mouse sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization. *Biol Reprod*, 2009, 81(5): 939–947. [DOI]
- [60] Krapf D, Ruan YC, Wertheimer EV, Battistone MA, Pawlak JB, Sanjay A, Pilder SH, Cuasnicu P, Breton S, Visconti PE. cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Dev Biol*, 2012, 369(1): 43–53. [DOI]
- [61] Caballero J, Frenette G, D'Amours O, Belleannée C, Lacroix-Pepin N, Robert C, Sullivan R. Bovine sperm raft membrane associated Glioma Pathogenesis-Related 1-like protein 1 (GliPrIL1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. *J Cell Physiol*, 2012, 227(12): 3876–3886. [DOI]
- [62] Gibbs GM, Lo JCY, Nixon B, Jamsai D, O'Connor AE, Rijal S, Sanchez-Partida LG, Hearn MTW, Bianco DM, O'Bryan MK. Glioma pathogenesis-related 1-like 1 is testis enriched, dynamically modified, and redistributed during male germ cell maturation and has a potential role in sperm-oocyte binding. *Endocrinology*, 2010, 151(5): 2331–2342. [DOI]
- [63] D'Amours O, Frenette G, Bordeleau LJ, Allard N, Leclerc P, Blondin P, Sullivan R. Epididymosomes transfer epididymal sperm binding protein 1 (ELSPBP1) to dead spermatozoa during epididymal transit in bovine. *Biol Reprod*, 2012, 87(4): 94. [DOI]
- [64] Sullivan R. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian J Androl*, 2015, 17(5): 726–729. [DOI]
- [65] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297. [DOI]
- [66] Ran ML, Chen B, Yin J, Yang AQ, Jiang M. Advances in miRNA research related to testis development and spermatogenesis. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(7): 646–654. 冉茂良, 陈斌, 尹杰, 杨岸奇, 蒋明. 睾丸发育和精子生成相关 miRNA 研究进展. *遗传*, 2014, 36(7): 646–654. [DOI]
- [67] Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(12): 733–743. [DOI]
- [68] Rajender S, Meador C, Agarwal A. Small RNA in spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012, 4: 1266–1274. [DOI]
- [69] Huang HN, Chen SY, Hwang SM, Yu CC, Su MW, Mai W, Wang HW, Cheng WC, Schuyler SC, Ma NH, Lu FL, Lu J. miR-200c and GATA binding protein 4 regulate human embryonic stem cell renewal and differentiation. *Stem Cell Res*, 2014, 12(2): 338–353. [DOI]
- [70] Liu P, Xiang DJ, Wang CB. Male genital tract infection and inflammation and male infertility. *Clinical Laboratory Journal (Electronic Edition)*, 2015, 4(2): 867–871. 刘萍, 向代军, 王成彬. 泌尿生殖道感染及炎症与男性不育. *临床检验杂志: 电子版*, 2015, 4(2): 867–871. [DOI]
- [71] Niu YN, Mo DL, Qin LM, Wang C, Li AN, Zhao X, Wang XY, Xiao SQ, Wang QW, Xie Y, He ZY, Cong PQ, Chen YS. Lipopolysaccharide-induced miR-1224 negatively regulates tumour necrosis factor- $\alpha$  gene expression by modulating Sp1. *Immunology*, 2011, 133(1): 8–20. [DOI]
- [72] Chen Q, Yan MH, Cao HZ, Li X, Zhang YF, Shi JC, Feng GH, Peng HY, Zhang XD, Zhang Y, Qian JJ, Duan EK, Zhai QW, Zhou Q. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, 2016, 351(6271): 397–400. [DOI]
- [73] Madison MN, Roller RJ, Okeoma CM. Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology*, 2014, 11(1): 102. [DOI]
- [74] Madison MN, Jones PH, Okeoma CM. Exosomes in human semen restrict HIV-1 transmission by vaginal cells and block intravaginal replication of LP-BM5 murine AIDS virus complex. *Virology*, 2015, 482: 189–201. [DOI]
- [75] Marchand A, Proust C, Morange PE, Lompré AM, Trégouët D-A. miR-421 and miR-30c inhibit *SERPINE 1* gene expression in human endothelial cells. *PloS One*, 2012, 7(8): e44532. [DOI]
- [76] Hu HY, He L, Fominykh K, Yan Z, Guo S, Zhang XY, Taylor MS, Tang L, Li J, Liu JM, Wang W, Yu HJ, Khaitovich P. Evolution of the human-specific microRNA miR-941. *Nat Commun*, 2012, 3: 1145. [DOI]