

MicroRNA 参与调控睾丸支持细胞的增殖与粘附功能

夏蒙蒙, 申雪沂, 牛长敏, 夏静, 孙红亚, 郑英

扬州大学医学院组织学与胚胎学教研室, 扬州 225001

摘要: 精子发生过程需要生精细胞及睾丸体细胞的共同参与, 这两种细胞也决定着睾丸的发育及雄性生育力。支持细胞是生精小管中唯一的体细胞, 在正常精子发生过程中发挥重要的作用。支持细胞增殖与粘附功能的异常将导致精子发生异常, 进而引发雄性不育。近年来研究发现, microRNA (miRNA) 可调控支持细胞的增殖与粘附功能, 其表达水平在激素、内分泌干扰素和营养状况等多种因素作用下发生特异性变化。本文总结了与睾丸支持细胞增殖与粘附功能相关的 miRNA 及其作用机制, 以期发现并鉴定更多与支持细胞相关的 miRNA, 进而为探索与支持细胞相关不育症的病因提供理论依据。

关键词: miRNA; 支持细胞; 增殖; 粘附

MicroRNA regulates Sertoli cell proliferation and adhesion

Mengmeng Xia, Xueyi Shen, Changmin Niu, Jing Xia, Hongya Sun, Ying Zheng

Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Abstract: Spermatogenesis requires both germ cells and testicular somatic cells, which are also involved in testicular development and male fertility. Sertoli cells are the only somatic cells in the seminiferous tubules and play very important roles in normal spermatogenesis. Abnormality of Sertoli cells in proliferation and adhesion may induce aberrant spermatogenesis and eventually cause infertility. Recently, various studies have demonstrated that miRNA are involved in the regulation of Sertoli cell proliferation and adhesion. Additionally, miRNA expression could be affected by hormone, endocrine interferon, and nutrition. In this review, we summarize miRNAs related to Sertoli cell proliferation and adhesion, which will be helpful for finding and identifying more miRNAs from Sertoli cells. The review will also provide theoretical basis for the pathogenesis of infertility associated with Sertoli cells.

Keywords: miRNA; Sertoli cells; proliferation; adhesion

收稿日期: 2018-02-27; 修回日期: 2018-06-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31371174)和江苏省自然科学基金项目(编号: BK20131230)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31371174) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20131230)]

作者简介: 夏蒙蒙, 硕士研究生, 专业方向: 生殖医学。E-mail: nursingxmm@163.com

通讯作者: 郑英, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生殖医学。E-mail: yzzkl@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.18-050

网络出版时间: 2018/7/30 15:48:00

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180730.1548.003.html>

精子发生是睾丸生精小管内的多细胞参与过程,在睾丸体细胞的精密协调下,各类生精细胞(精原细胞、精母细胞和精子细胞)经过连续地增殖、分裂和分化,最终转变为高度特异的精子。而支持细胞作为生精小管内唯一的体细胞,通过与各类生精细胞直接接触,维持生精细胞形态、发育及迁徙运动,在精子发生中扮演极为重要的角色^[1,2]。

支持细胞的增殖与粘附功能是其发挥作用的基础,未成熟的支持细胞通过不断的分裂增殖,保持生精小管内自身数量的平衡,维持限定数量的生精细胞,从而决定雄性生精能力^[3-5]。支持细胞与相邻细胞间的粘附连接是细胞间进行物质交流与信息传递的桥梁,同时为精子发生提供免疫屏障^[5]。支持细胞的增殖与粘附功能的改变,都将扰乱精子发生进程,导致雄性生育力下降甚至不育^[6],因此,研究支持细胞增殖与粘附的调控机制具有重要意义。

越来越多的证据表明 microRNA (miRNA)可通过靶向支持细胞内相关基因,调控支持细胞的增殖与粘附功能^[7-14]。同时,miRNA 的表达水平又受到内分泌干扰素、性激素及营养状态等多种因素的调节^[10-16]。

本文综述了近年来与支持细胞增殖及粘附功能相关的 miRNA 的研究进展,以期发现及鉴定更多的与支持细胞相关的 miRNA、深入探索支持细胞的调控网络以及诊断支持细胞相关不育症提供理论基础。

1 支持细胞的增殖与粘附

对睾丸支持细胞的研究始于 1865 年,Enrico Sertoli 首次发现了这类细胞并将其描述为“保姆细胞(nurse cells)”。后来这类细胞被命名为“Sertoli cells”,即支持细胞。支持细胞起始于睾丸生精小管的基膜,不断延伸至生精小管腔面,包绕不同发育阶段的生精细胞及精子,构成生长支架。支持细胞的功能包括:分泌雄激素结合蛋白、类固醇和营养因子等,促进生精细胞发育及精子成熟;参与生精细胞易位,释放成熟精子,同时吞噬发育不良的精子、凋亡生精细胞以及多余胞质^[17]。

不同物种睾丸支持细胞的数量取决于其增殖能

力。啮齿类动物支持细胞增殖发生在胚胎期及新生阶段;在猕猴(*Macaca mulatta*)睾丸中,支持细胞增殖发生在青春期前;人类睾丸支持细胞增殖发生在新生阶段及青春期前。因此,支持细胞的数量在成年之前就已经决定。支持细胞数量决定了生精细胞数量、睾丸大小及精子产量^[18,19],缺少支持细胞可导致生精细胞凋亡、退化,甚至引发雄性不育^[6,20]。同时,支持细胞在精子发生中具有粘附功能。单个支持细胞可与相邻细胞粘附,形成粘附连接。相邻支持细胞间粘附可形成紧密连接,紧密连接是血睾屏障的重要组成部分。血睾屏障能合成、分泌、运输生精细胞增殖及分化所需的营养因子,如转铁蛋白。同时,血睾屏障可防止免疫球蛋白、淋巴细胞等免疫因子进入近腔室,避免这些免疫因子识别圆形精子细胞表面的特异性抗原,进而避免自身免疫反应的发生^[17,21]。支持细胞与各级生精细胞间也存在粘附连接,生精细胞通过粘附连接锚定在支持细胞隐窝中,接受支持细胞提供的营养及物理支持。支持细胞-生精细胞间粘附结构也具有解聚与重塑功能:一方面促进发育期的生精细胞不断向生精小管管腔迁徙,及时释放成熟的精子;另一方面阻止了未成熟生精细胞的释放^[22]。研究表明,支持细胞的生长及相关功能主要受卵泡刺激素的调控^[18],但近年来的研究表明,支持细胞的功能还受到 miRNA 的调控^[7-14]。

2 miRNA 的生物合成及作用机制

miRNA 是一类保守的内源性的小分子 RNA,其合成始于细胞核内的初级 miRNA (pri-miRNA)。pri-miRNA 由 RNA 聚合酶 II (polymerase II, pol II) 或 RNA 聚合酶 III (polymerase III, pol III) 转录生成,长度约为几百至几千个核苷酸^[23]。pri-miRNA 在 RNase III 核酸酶-Drosha 及 RNA 结合蛋白-DGCR8 构成的微小 RNA 处理器复合物(microprocessor)中加工、修饰。DGCR8 识别并结合 N6-甲基腺苷(m6A)甲基化的 pri-miRNA^[24],招募 Drosha 酶进行剪切产生前体 miRNA(pre-miRNA),长度约 60~70 个核苷酸;pre-miRNA 具有发夹结构,5'端含有磷酸盐基团,3'端含有 2 个悬垂碱基,核质/细胞质转运蛋白 5

(Exportin-5, Exp-5)识别悬垂碱基并与 pre-miRNA 结合,在 Ran-GTP 供能下将 pre-miRNA 转运到细胞质中;胞质中 Exp-5 释放 pre-miRNA, pre-miRNA 在另一 RNaseIII 核酸酶-Dicer 切割下去除末端发夹结构,产生 miRNA duplex,长度约 22 个核苷酸^[25-27]。miRNA duplex 为双链结构,由引导链(guide strand)和过客链(passenger strand)组成。在 miRNA 研究中,引导链和过客链也被称为 miRNA:miRNA* 或 miRNA-5p:miRNA-3p^[25,26]。

miRNA duplex 是 miRNA 的前体形式,必须经过解旋及引导链选择性的保留这两个步骤,才能形成引导基因沉默的成熟 miRNA。miRNA duplex 的解旋机制较为复杂,且至今仍在不断探索中。目前,将 miRNA duplex 的解旋机制阐释为两种:切割依赖性/非依赖性解旋和 ATP 依赖性解旋酶解旋^[26-30]。切割依赖性/非依赖性解旋(slicer-dependent/independent unwinding)机制为:miRNA duplex 在 ATP 作用下装载到 AGO 蛋白上,形成前体 RISC(pre-RISC),pre-RISC 不具有转录后调控功能^[26-28]。当引导链和过客链高度互补时,AGO2 蛋白在 Mg^{2+} 参与下切割过客链中特定核苷酸间的磷酸二酯键^[26],且 Mg^{2+} 浓度越高,AGO2 切割活力越强^[27],从而使过客链断裂,降低 miRNA duplex 的热力学稳定性,miRNA duplex 双链分离,这种解旋方式称为切割依赖性解旋^[26];当引导链和过客链之间存在错配,尤其是 5' 端种子区及 3' 端的中间序列错配或存在 G-U 碱基摆动配对时,miRNA duplex 双链变形并解旋,这种解旋方式称为切割非依赖性解旋^[26,28]。由于大多数 miRNA duplex 存在错配现象,因此 miRNA duplex 的解旋多选择切割非依赖性解旋模式^[26,28]。ATP 依赖性解旋酶解旋是最早提出的 miRNA duplex 解旋方式^[30],即 miRNA duplex 在 RNA 解旋酶作用双链分离,引导链与 AGO 蛋白结合直接形成 RISC^[30,31]。最近的研究表明,某些 RNA 解旋酶甚至能解旋 pre-RISC 中的 miRNA duplex,分离引导链和过客链^[32]。

miRNA duplex 解旋后,过客链降解,引导链保留,pre-RISC 转变为成熟的 RISC^[26]。成熟 RISC 在引导链的指引下结合靶 mRNA,根据引导链和靶 mRNA 的序列互补程度,选择不同的基因沉默方式。当引导链和靶 mRNA 的碱基序列完全互补时,靶

mRNA 被切割并降解;当引导链和靶 mRNA 的碱基序列不完全互补时,靶 mRNA 翻译抑制^[33]。

3 miRNA 参与调控支持细胞的增殖与粘附功能

研究表明,超过 60% 的人类基因是 miRNA 的靶基因^[34],而许多 miRNA 倾向于或优先表达于睾丸组织中,提示 miRNA 在精子生成中发挥着重要的转录后调控作用。随着睾丸支持细胞的分离与纯化、高通量测序及 microRNA 微阵列技术的发展,研究人员发现了一些在睾丸支持细胞中特异性表达或高表达的 miRNA,如:Papaioannou 等^[6]对分离纯化的小鼠支持细胞进行 microRNA 微阵列技术分析,发现 miR-299、miR-376a、miR-381、miR-409-5p、miR-674* 在支持细胞中特异表达,miR-431、miR-341、miR-487b 在支持细胞中高表达;Halima 等^[35]应用 microRNA 微阵列技术检测出在唯支持细胞症患者睾丸组织中 miR-449a、miR-125b、miR-204、miR-22 等高表达。

近年来,研究人员应用 qRT-PCR 技术对与支持细胞功能相关的 miRNA 进行了相对定量分析,结合生物信息学软件分析、荧光素酶报告基因及 Western blot 等实验,结果发现:部分 miRNA 可通过调控其靶 mRNA 的表达水平,进一步影响与支持细胞增殖和粘附功能相关基因的表达,从而参与支持细胞的功能调节(表 1)。

3.1 与支持细胞增殖相关的 miRNA

Luo 等^[36]通过 microRNA 微阵列技术比较了大白猪性成熟前与性成熟后睾丸组织中 miRNA 的表达水平,发现了 129 种差异表达的 miRNA,其中在性成熟阶段有 51 种 miRNA 表达上调,78 种 miRNA 表达下调。值得一提的是,miR-762 和 miR-638 在大白猪性成熟睾丸组织中表达显著上调。

miR-762 通过靶向精子发生相关基因 *RNF4*(ring finger protein 4, *RNF4*)调控猪未成熟支持细胞的增殖过程。qRT-PCR 检测显示 *RNF4* 高表达于猪未成熟的睾丸组织,其表达趋势与 miR-762 正好相反,进一步验证了 miR-762 与 *RNF4* 之间的负调控作用^[37]。

表 1 与支持细胞增殖与粘附功能相关的 miRNA
Table 1 miRNAs related to Sertoli cell proliferation and adhesion

名称	物种	靶基因(信号通路)	功能	参考文献
miR-762	猪(<i>Sus scrofa</i>)	<i>RNF4</i>	支持细胞增殖	[7]
miR-638	猪(<i>Sus scrofa</i>)	<i>SPAG1</i> (PI3K/AKT)	支持细胞增殖	[8]
miR-133b	人(<i>Homo sapiens</i>)	<i>GLI3</i>	支持细胞增殖	[9]
miR-301b-3p/3584-5p	大鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>RASD1</i> (ERK1/2)	支持细胞增殖	[10]
miR-1285	猪(<i>Sus scrofa</i>)	(AMPK)	支持细胞增殖	[11]
miR-471	小鼠(<i>Mus musculus</i>)	<i>FOXD1</i>	支持细胞代谢	[12]
		<i>DSC1</i>	血睾屏障形成	[12,13]
miR-23b	大鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>PTEN</i>	支持细胞-精子粘附	[14]
		<i>EPS15</i>		

RNF4 是细胞核内的转录因子,能够结合到雄激素受体(androgen receptor, AR)的 DNA 结合区域并辅助激活雄激素依赖的转录调节^[7]。免疫组织荧光显示, RNF4 与 AR 在猪支持细胞的细胞核共定位,提示两者可能相互作用。在猪支持细胞中过表达 RNF4,可促进 AR 的转录并上调其表达水平,影响 AR 效应基因的表达。这些结果表明在猪未成熟支持细胞中 RNF4 也是 AR 依赖型转录调节共激活因子^[7]。RNF4 还是一类泛素连接酶,通过泛素化作用在 DNA 损伤修复及 DNA 甲基化抑制方面发挥重要的作用^[38,39]。miR-762 与 *RNF4* 的 3'UTR 区域结合,抑制 *RNF4* 的转录及翻译,继而下调 AR 表达。同时上调细胞核增殖抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达,促进支持细胞 S 期进程,减少支持细胞凋亡。此外, miR-762 可降低 γ -H2AX(DNA 双链损伤标记物)的表达水平,促进支持细胞的 DNA 损伤修复^[7]。

miR-638 可靶向生精相关基因 *SPAG1* (sperm-associated antigen 1, *SPAG1*)。 *SPAG1* 最早在不孕症妇女的血清中被发现,可引起人类精子头对头凝集。免疫组织荧光分析显示, *SPAG1* 与支持细胞有丝分裂中期、末期微管蛋白 α -TUBULIN 共定位^[8],提示 *SPAG1* 可能通过参与纺锤体组装调节支持细胞生长。*SPAG1* 抑制后, c-MYC、细胞周期蛋白 CCND1、CCNE1、细胞周期蛋白激酶 CDK4 的表达降低,支持细胞增殖及周期进程阻滞。同时,磷酸化 PI3K、AKT 的蛋白水平降低, PI3K/AKT 信号通路抑制,支持细胞凋亡增加^[8]。

Yao 等^[9]应用 microRNA 微阵列分析方法分析了唯支持细胞征和梗阻性无精症患者支持细胞 miRNA 的表达情况,结果筛选出 174 个差异表达的 miRNA。其中, miR-133b 在唯支持细胞征患者支持细胞中的表达显著上调,并靶向 *GLI3* 基因(GLI family zinc finger 3, *GLI3*)。 *GLI3* 是睾丸组织中重要的转录因子,通过参与 HH (hedgehog, Hh)信号通路,调控细胞增殖与分化^[40,41]。 *GLI3* 的表达起始于新生支持细胞,在未成熟支持细胞中持续表达,提示其可能在未成熟支持细胞的增殖过程中发挥一定的作用。 *DHH* (Desert Hedgehog, *DHH*)是 HH 信号通路中最重要的因子,其缺失将导致雄性不育。 *DHH* 高表达于支持细胞,该基因敲除小鼠生精细胞完全缺失,表现为唯支持细胞综合征。因此, *GLI3* 可能通过下调 *DHH* 的表达而导致唯支持细胞征^[41]。在 miR-133b 过表达的支持细胞中, *GLI3* 表达下调, SOX9、PCNA、细胞周期蛋白 CCNB1 及 CCND1 表达升高,从而促进支持细胞增殖及 DNA 合成^[9]。

Yin 等^[10]使用邻苯二甲酸单丁酯(mono-butyl phthalate, MBP)处理出生 9 天后大鼠,结果发现支持细胞增殖明显,数量增多。microRNA 微阵列分析显示支持细胞内 miR-301b-3p, miR-3584-5p 表达升高,且两者靶向同一基因—*RASD1* (dexamethasone-induced ras-related protein 1, *RASD1*)。 *RASD1* 是一种特异性高表达于睾丸组织的基因,属 RAS 小 G 蛋白家族,参与 G 蛋白偶联受体-丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶的信号转导(G protein-coupled

receptors signaling to MAPK/ERK), 其相关蛋白 DEXRAS1/AGS-1 通过抑制 $G_{i\alpha}$ 亚基 ADP 核糖基化, 促使 $G_{\beta\gamma}$ 解偶联, 进而抑制 RAS/RAF/MEK/ERK 级联活化^[42]。在支持细胞中, miR-301b-3p 和 miR-3584-5p 通过靶向 *RASD1*, 下调其表达水平, 使磷酸化 MEK 蛋白水平升高, 激活 ERK1/2 信号通路, 促进大鼠未成熟支持细胞的增殖^[10]。

Zhang 等^[11]研究发现, miR-1285 通过 AMPK 信号通路参与 17β -雌二醇介导的猪未成熟支持细胞的增殖抑制过程。在一定浓度的 17β -雌二醇作用下, miR-1285 表达水平下降, 支持细胞增殖抑制, 表现为磷酸化 AMPK 表达水平升高, 导致 ATP 含量下降, 细胞代谢阻滞, 生长延缓。此外, mTOR 表达抑制后其下游底物 p70S6K 激酶活化水平降低, 导致细胞增殖受阻。miR-1285 表达抑制后, *P53*、*P27* 基因表达水平上升, 抑制 S 期激酶相关蛋白 SKP2 表达, 阻碍 S 期的 DNA 合成。

3.2 与支持细胞粘附相关的 miRNA

miRNA 除了对支持细胞增殖具有调控作用, 也参与支持细胞粘附连接。支持细胞特异性 Dicer 敲除小鼠表现为支持细胞凋亡增加、成熟支持细胞功能受损、支持细胞间连接缺陷、体细胞退化, 导致未成熟精子释放、生精细胞及睾丸退化, 最终引起小鼠不育^[43]。

Panneerdoss 等^[12]通过 microRNA 微阵列技术比较了雄激素抑制和雄激素替代模型小鼠支持细胞中 miRNA 的表达水平, 结果发现 miR-471 在雄激素抑制模型小鼠支持细胞中的表达显著上调。进一步研究发现 miR-471 同时靶向 *FOXD1* (forkhead/winged-helix transcription factor, *FOXD1*) 和 *DSCI* (desmocollin 1, *DSCI*) 基因, 抑制 *FOXD1*、*DSCI* 基因的表达。*FOXD1* 特异性表达于睾丸, 主要表达于支持细胞中, 在支持细胞代谢中起重要作用^[12,44]。*FOXD1* 还参与性腺激素释放, 间接调控精子发生。此外, *FOXD1* 参与 SHH (Sonic Hedgehog, SHH) 信号通路, 调控胚胎发育及生殖系统稳态^[45,46]。*DSCI* 同时表达于支持细胞及生精细胞, 调节上皮细胞粘附、脱落, 其基因敲除小鼠表现为细胞粘附缺陷^[47]。在 miR-471-5P 转基因小鼠模型中, 血睾屏障因子 *DSC2*、

闭锁蛋白 OCLN、连接蛋白 CLDN3 表达水平下调, 睾丸生精小管中生精细胞脱落, 血睾屏障受损, 提示 miR-471 参与调控细胞间粘附及血睾屏障的形成^[13]。

Nicholls 等^[14]应用 microRNA 微阵列技术分析雄激素抑制模型大鼠支持细胞中 miRNA 的表达水平, 结果发现 miR-23b 在雄激素抑制大鼠支持细胞中的表达显著上升, 模型大鼠表现为生精小管内精子释放失败。进一步研究发现, miR-23b 靶向 *PTEN* 基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome Ten, *PTEN*) 及内吞作用因子 *EPS15* (Epidermal growth factor receptor substrate, *EPS15*)。*PTEN* 通过抑制磷酸酶基因调控粘着斑激酶 FAK 的表达, 抑制细胞的粘附。大鼠睾丸免疫组化染色显示 *EPS15* 定位在管泡复合体 (tubulobulbar complex, TBC)^[14], TBC 是以网格蛋白为骨架的结构, 参与支持细胞与生精细胞间粘附连接。研究表明, TBC 可能通过内化支持细胞与精子间连接蛋白, 促进成熟精子的释放^[48,49]。*EPS15* 是网格蛋白介导的内吞途径必要因子之一, 参与网格蛋白包被小泡组成及内化作用^[50], *EPS15* 表达下调后, 精子释放阻滞, 提示 miR-23b 可通过抑制 *EPS15* 的表达, 干扰 TBC 内化作用, 紊乱精子释放。此外, *EPS15* 基因家族成员 *EHD1* 也与精子发生相关, 其基因敲除小鼠表现为生精小管内成熟精子滞留, 雄性不育^[51]。因此, miR-23b 可能作为雄激素及支持细胞间的中介, 促进支持细胞的粘附功能。

4 调控支持细胞中 miRNA 表达的因素

支持细胞是生精小管内唯一与生精细胞接触的体细胞, 在维持精子发生稳态中发挥重要的作用。同时支持细胞还是许多内外因素作用的靶细胞^[18], 当内外环境发生改变时, 支持细胞内 miRNA 的表达水平也将发生变化。

4.1 激素类

在精子发生过程中, 激素直接靶向体细胞^[18], 因此支持细胞内的 miRNA 表达主要受激素调控。研究发现, 性激素可以调节支持细胞内的 miRNA 的表达水平, 如雌激素、雄激素、卵泡刺激素等^[12-15]。

研究表明,雌激素调节支持细胞内与生长相关的 miRNA,如小鼠支持细胞系中,一定浓度的雌激素可以使 miR-17 的表达水平下降,激活 MAPK 信号,促进支持细胞的增殖^[15]。在 17 β -雌二醇作用下,猪未成熟支持细胞内 miR-1285 的表达降低,磷酸化 AMPK 的水平升高,支持细胞生长抑制^[11]。雄激素在支持细胞紧密连接及其介导的精子释放过程中有重要作用,研究发现使用睾酮抑制剂及替代剂处理小鼠支持细胞后有 218 种 miRNA 表达上调,其中包括 miR-471,提示雄激素可抑制靶向粘附因子的 miRNA^[12]。卵泡刺激素和雄激素联合作用于原代大鼠支持细胞后有 163 种 miRNA 的表达水平发生变化,这些 miRNA 中有多数与 MAPK 信号通路、黏着斑基因、细胞骨架蛋白的调节相关。单独使用卵泡刺激素或雄激素抑制,也会影响支持细胞内相关 miRNA 的表达水平,表明卵泡刺激素和雄激素可协同或独立调节大鼠支持细胞内特定的 miRNA 的表达^[14]。

4.2 内分泌干扰素

内分泌干扰素(endocrine disrupting chemical, EDC)可以通过阻断或模拟体内激素生成,使生殖系统功能紊乱。如邻苯二甲酸单丁酯(Mono-butyl phthalate, MBP)是一种邻苯二甲酸酯,通常作为塑化剂生产各类聚合材料,具有严重的生殖毒性。高浓度的 MBP 可导致小鼠睾丸发生氧化应激反应及丙二醛含量增加,同时精子发生重要基因 *SOX9*、*DAZL* 的转录水平明显下降,最终引起精子计数减少、畸形精子症及生精小管退化^[52]。在大鼠支持细胞中,高浓度的 MBP 处理 24~48 h,可产生毒性作用,表现为支持细胞数量减少、活力降低;相反,低浓度的 MBP 可以明显提高大鼠支持细胞活力、降低凋亡率,并通过上调 miR-301b-3p 及 miR-3584-5p 的表达水平激活 ERK 信号通路,促进支持细胞的增殖^[10]。

4.3 其他因素

除激素、化合物外,热应激、营养状况对支持细胞 miRNA 的表达也有影响。热应激是雄性生育的危害因素之一,Xu 等^[53]发现热处理 TM4 支持细胞后,miR-132、miR-431 和 miR-543 的表达下调,炎症细胞因子中 *IL-6*、*IL-1 α* 、*IL-1 β* 的 mRNA 表达水

平上调,干扰了精子发生或睾丸发育。此外,营养状态也能影响支持细胞内 miRNA 的表达水平。营养不良的绵羊组与对照组相比,miR-99a 表达上调,紧密连接蛋白 ZO-1 基因的表达下调,引起血睾屏障功能受损;miR-98 表达上调,使生精细胞凋亡增加;miR-34c、miR-10b 的表达水平也发生了变化,影响精子质量^[16]。

这些体内外因素通过调控支持细胞内 miRNA 的表达水平,间接影响支持细胞的增殖或粘附功能,最终影响精子发生进程及睾丸发育。

5 结 语

miRNA 自发现以来已逐渐成为生物学领域的研究热点之一,有关 miRNA 的生物合成过程、表达特性以及调控机制仍在不断探索中。已有大量研究阐释了 miRNA 合成的基本过程,涉及多种核酸酶及其辅助因子的剪切修饰、细胞核质转运及 miRNA duplex 的解旋等事件。但在 miRNA 合成方面仍有相关问题亟待解决,如 miRNA duplex 的解旋中切割依赖性/非依赖性解旋机制和 ATP 依赖性解旋酶解旋机制谁为主导?在哪些情况下仅存在一种机制或两种并存?ATP 依赖性的解旋酶有哪些?这些疑问仍需进一步探索。

研究表明,miRNA 广泛存在于动、植物体内,在不同种属组织或细胞中特异性表达^[54,55]。一些细胞内的 miRNA 通过对靶基因进行转录调控,在细胞增殖分化、能量代谢、信号转导等方面发挥重要的作用^[56-59]。近年来,越来越多与睾丸支持细胞相关的 miRNA 通过生物信息学技术、高通量测序、microRNA 微阵列等方法得以发现,其中一些 miRNA 与支持细胞内的信号通路、靶基因相互作用,形成一个复杂的、多层次的支持细胞增殖与粘附功能的调控网络,间接参与精子发生与雄性生育。如 miR-133b 通过靶向 *GLI3*,下调其表达,促进人支持细胞增殖及生精细胞缺失,引发唯支持细胞征^[9];miR-471 可下调 *DSC1*、*DSC2* 的表达,造成睾丸血睾屏障缺损、支持细胞-生精细胞间粘附缺陷^[12,13]。因此,研究支持细胞相关的 miRNA 具有深远意义,不仅能丰富支持细胞生长调控网络,也可支持细胞功能缺陷引

起的不育症的诊断提供新的方法。

目前,支持细胞相关的 miRNA 的研究处于起步阶段,有关支持细胞特异性表达的 miRNA 仍少见报道。虽然某些 miRNA 的调控功能已经明确,但是大部分 miRNA 调节支持细胞的机制及最终是否与精子发生直接相关仍未阐明。已知的支持细胞相关 miRNA 的作用机制多由非人类哺乳动物模型或细胞水平得出,这些 miRNA 是否具有物种间保守性,能否在人体内发挥相同作用尚不明确。

综上所述,在后续的研究中,筛选支持细胞特异性表达的 miRNA、对既往的研究结论进一步体内实验或转化验证、应用合适的 miRNA 分子诊断支持细胞相关不育症将成为支持细胞 miRNA 的研究重点。

参考文献(References):

- [1] Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, He Z. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 29: 66–75. [DOI]
- [2] Chen SR, Liu YX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction*, 2015, 149(4): R159–R167. [DOI]
- [3] Auharek SA, de França LR. Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J Anat*, 2010, 216(5): 577–588. [DOI]
- [4] Escott GM, da Rosa LA, Loss Eda S. Mechanisms of hormonal regulation of sertoli cell development and proliferation: a key process for spermatogenesis. *Curr Mol Pharmacol*, 2014, 7(2): 96–108. [DOI]
- [5] Li L, Gao Y, Chen H, Jesus T, Tang E, Li N, Lian Q, Ge RS, Cheng CY. Cell polarity, cell adhesion, and spermatogenesis: role of cytoskeletons. *F1000Res*, 2017, 6: 1565. [DOI]
- [6] Papaioannou MD, Pitetti JL, Ro S, Park C, Aubry F, Schaad O, Vejnar CE, Kühne F, Descombes P, Zdobnov EM, McManus MT, Guillou F, Harfe BD, Yan W, Jégou B, Nef S. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, 2009, 326(1): 250–259. [DOI]
- [7] Ma C, Song H, Yu L, Guan K, Hu P, Li Y, Xia X, Li J, Jiang S, Li F. MiR-762 promotes porcine immature Sertoli cell growth via the ring finger protein 4 (RNF4) gene. *Sci Rep*, 2016, 6: 32783. [DOI]
- [8] Hu P, Guan K, Feng Y, Ma C, Song H, Li Y, Xia X, Li J, Li F. MiR-638 inhibits immature Sertoli cell growth by indirectly inactivating PI3K/AKT pathway via SPAG1 gene. *Cell Cycle*, 2017, 16(23): 2290–2300. [DOI]
- [9] Yao C, Sun M, Yuan Q, Niu M, Chen Z, Hou J, Wang H, Wen L, Liu Y, Li Z, He Z. MiRNA-133b promotes the proliferation of human Sertoli cells through targeting GLI3. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2201–2219. [DOI]
- [10] Yin X, Ma T, Han R, Ding J, Zhang H, Han X, Li D. MiR-301b-3p/3584-5p enhances low-dose mono-n-butyl phthalate (MBP)-induced proliferation by targeting Rasd1 in Sertoli cells. *Toxicol In Vitro*, 2017, 47: 79–88. [DOI]
- [11] Jiao ZJ, Yi W, Rong YW, Kee JD, Zhong WX. MicroRNA-1285 regulates 17beta-estradiol-inhibited immature boar Sertoli cell proliferation via adenosine monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 2015, 156(11): 4059–4070. [DOI]
- [12] Panneerdoss S, Chang YF, Buddavarapu KC, Chen HI, Shetty G, Wang H, Chen Y, Kumar TR, Rao MK. Androgen-responsive microRNAs in mouse Sertoli cells. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41146. [DOI]
- [13] Panneerdoss S, Viswanadhappalli S, Abdelfattah N, Onyeagucha BC, Timilsina S, Mohammad TA, Chen Y, Drake M, Vuori K, Kumar TR, Rao MK. Cross-talk between miR-471-5p and autophagy component proteins regulates LC3-associated phagocytosis (LAP) of apoptotic germ cells. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 598. [DOI]
- [14] Nicholls PK, Harrison CA, Walton KL, McLachlan RI, O'Donnell L, Stanton PG. Hormonal regulation of sertoli cell micro-RNAs at spermiation. *Endocrinology*, 2011, 152(4): 1670–1683. [DOI]
- [15] Kumar N, Srivastava S, Burek M, Forster CY, Roy P. Assessment of estradiol-induced gene regulation and proliferation in an immortalized mouse immature Sertoli cell line. *Life Sci*, 2016, 148: 268–278. [DOI]
- [16] Guan Y, Liang G, Hawken PA, Malecki IA, Cozens G, Vercoe PE, Martin GB, Guan le L. Roles of small RNAs in the effects of nutrition on apoptosis and spermatogenesis in the adult testis. *Sci Rep*, 2015, 5: 10372. [DOI]
- [17] Iliadou PK, Tsametsis C, Kaprara A, Papadimas I, Goulis DG. The Sertoli cell: novel clinical potentiality. *Hormones (Athens)*, 2015, 14(4): 504–514. [DOI]
- [18] Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood.

- Reproduction*, 2003, 125(6): 769–784. [DOI]
- [19] Procopio MS, de Avelar GF, Costa GMJ, Lacerda S, Resende RR, de França LR. MicroRNAs in Sertoli cells: implications for spermatogenesis and fertility. *Cell Tissue Res*, 2017, 370(3): 335–346. [DOI]
- [20] Leal MC, Franca LR. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera*. *Theriogenology*, 2009, 71(3): 509–518. [DOI]
- [21] Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev*, 2004, 25(5): 747–806. [DOI]
- [22] Huang R, Zhu WJ. Role of Sertoli cell junctions in spermatogenesis. *Reprod Contrac*, 2013, 3: 199–204.
黄瑞, 朱伟杰. 睾丸支持细胞连接结构在精子发生过程的作用. *生殖与避孕*, 2013, 3: 199–204. [DOI]
- [23] Graves P, Zeng Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genom Prot Bioinf*, 2012, 10(5): 239–245. [DOI]
- [24] Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N⁶-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 2015, 519(7544): 482–485. [DOI]
- [25] Hayder H, O'Brien J, Nadeem U, Peng C. MicroRNAs: crucial regulators of placental development. *Reproduction*, 2018, 155(6): R259–R271. [DOI]
- [26] Kwak PB, Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(2): 145–151. [DOI]
- [27] Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 2005, 123(4): 607–620. [DOI]
- [28] Park JH, Shin C. Slicer-independent mechanism drives small-RNA strand separation during human RISC assembly. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(19): 9418–9433. [DOI]
- [29] Kenesi E, Carbonell A, Lozsa R, Vertessy B, Lakatos L. A viral suppressor of RNA silencing inhibits ARGONAUTE 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(13): 7736–7750. [DOI]
- [30] Nykänen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 2001, 107(3): 309–321. [DOI]
- [31] Bourgeois CF, Mortreux F, Auboeuf D. The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(7): 426–438. [DOI]
- [32] Elbarbary RA, Miyoshi K, Hedaya O, Myers JR, Maquat LE. UPF1 helicase promotes TSN-mediated miRNA decay. *Genes Dev*, 2017, 31(14): 1483–1493. [DOI]
- [33] Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol*, 2013, 425(19): 3582–3600. [DOI]
- [34] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92–105. [DOI]
- [35] Abu-Halima M, Backes C, Leidinger P, Keller A, Lubbad AM, Hammadeh M, Meese E. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertil Steril*, 2014, 101(1): 78–86.e2. [DOI]
- [36] Luo L, Ye L, Liu G, Shao G, Zheng R, Ren Z, Zuo B, Xu D, Lei M, Jiang S, Deng C, Xiong Y, Li F. Microarray-based approach identifies differentially expressed microRNAs in porcine sexually immature and mature testes. *PLoS One*, 2010, 5: e11744. [DOI]
- [37] Ma CP. Studies on molecular mechanism of porcine immature sertoli cell growth regulated by miR-762 and genetic improvement for sperm quality traits[D]. *HuaZhong Agricultural University*, 2016.
马昌萍. MiR-762 调控猪未成熟支持细胞生长的分子机制探究及猪精液性状的遗传改良[学位论文]. 华中农业大学, 2016. [DOI]
- [38] Wang Y. RING finger protein 4 (RNF4) derepresses gene expression from DNA methylation. *J Biol Chem*, 2014, 289(49): 33808–33813. [DOI]
- [39] Kuo CY, Li X, Stark JM, Shih HM, Ann DK. RNF4 regulates DNA double-strand break repair in a cell cycle-dependent manner. *Cell Cycle*, 2016, 15(6): 787–798. [DOI]
- [40] Aza-Blanc P, Lin HY, Ruiz i Altaba A, Kornberg TB. Expression of the vertebrate Gli proteins in *Drosophila* reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development*, 2000, 127(19): 4293–4301. [DOI]
- [41] Szczepny A, Hime GR, Loveland KL. Expression of hedgehog signalling components in adult mouse testis. *Dev Dyn*, 2006, 235(11): 3063–3070. [DOI]
- [42] Graham TE, Prossnitz ER, Dorin RI. Dexas1/AGS-1 inhibits signal transduction from the Gi-coupled formyl peptide receptor to Erk-1/2 MAP kinases. *J Biol Chem*, 2002, 277(13): 10876–10882. [DOI]
- [43] Korhonen HM, Yadav RP, Da Ros M, Chalmel F, Zimmermann C, Toppari J, Nef S, Kotaja N. Dicer

- regulates the formation and maintenance of cell-cell junctions in the mouse seminiferous epithelium. *Biol Reprod*, 2015, 93(6): 139. [DOI]
- [44] Cheng P, Wang J, Waghmare I, Sartini S, Coviello V, Zhang Z, Kim SH, Mohyeldin A, Pavlyukov MS, Minata M, Valentim CL, Chhipa RR, Bhat KP, Dasgupta B, La Motta C, Kango-Singh M, Nakano I. FOXD1-ALDH1A3 signaling is a determinant for the self-renewal and tumorigenicity of mesenchymal glioma stem cells. *Cancer Res*, 2016, 76(24): 7219–7230. [DOI]
- [45] Thackray VG. Fox tales: regulation of gonadotropin gene expression by forkhead transcription factors. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 385(1–2): 62–70. [DOI]
- [46] Fink DM, Sun MR, Heyne GW, Everson JL, Chung HM, Park S, Sheets MD, Lipinski RJ. Coordinated d-cyclin/Foxd1 activation drives mitogenic activity of Sonic Hedgehog signaling pathway. *Cell Signal*, 2017, 44: 1–9. [DOI]
- [47] King IA, O'Brien TJ, Buxton RS. Expression of the "skin-type" desmosomal cadherin DSC1 is closely linked to the keratinization of epithelial tissues during mouse development. *J Invest Dermatol*, 1996, 107(4): 531–538. [DOI]
- [48] Guttman JA, Takai Y, Vogl AW. Evidence that tubulobulbar complexes in the seminiferous epithelium are involved with internalization of adhesion junctions. *Biol Reprod*, 2004, 71(2): 548–559. [DOI]
- [49] Adams A, Wayne Vogl A. High resolution localization of Rab5, EEA1, and Nectin-3 to tubulobulbar complexes in the rat testis. *Anat Rec (Hoboken)*, 2017, 300(6): 1160–1170. [DOI]
- [50] Sochacki KA, Dickey AM, Strub MP, Taraska JW. Endocytic proteins are partitioned at the edge of the clathrin lattice in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(4): 352–361. [DOI]
- [51] Rainey MA, George M, Ying G, Akakura R, Burgess DJ, Siefker E, Bargar T, Doglio L, Crawford SE, Todd GL, Govindarajan V, Hess RA, Band V, Naramura M, Band H. The endocytic recycling regulator EHD1 is essential for spermatogenesis and male fertility in mice. *BMC Dev Biol*, 2010, 10: 37. [DOI]
- [52] Du J, Xiong D, Zhang Q, Li X, Liu X, You H, Ding S, Yang X, Yuan J. Mono-butyl phthalate-induced mouse testis injury is associated with oxidative stress and down-regulated expression of Sox9 and Dazl. *J Toxicol Sci*, 2017, 42(3): 319–328. [DOI]
- [53] Xu B, Chen M, Ji X, Yao M, Mao Z, Zhou K, Xia Y, Han X, Tang W. Metabolomic profiles reveal key metabolic changes in heat stress-treated mouse Sertoli cells. *Toxicol In Vitro*, 2015, 29(7): 1745–1752. [DOI]
- [54] Gong SM, Ding YF, Zhu C. Role of miRNA in plant seed development. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(6): 554–560. 龚淑敏, 丁艳菲, 朱诚. miRNA 在植物种子发育过程中的作用. *遗传*, 2015, 37(6): 554–560. [DOI]
- [55] Ran ML, Chen B, Yin J, Yang AQ, Li Z, Jiang M. Advances in porcine miRNAome. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(10): 974–84. 冉茂良, 陈斌, 尹杰, 杨岸奇, 李智, 蒋明. 猪 microRNA 组学研究进展. *遗传*, 2014, 36(10): 974–984. [DOI]
- [56] Wang J, Chen T, Shan G. MiR-148b regulates proliferation and differentiation of neural stem cells via Wnt/ β -Catenin signaling in rat ischemic stroke model. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 329. [DOI]
- [57] Li B, Wang L, Li Z, Wang W, Zhi X, Huang X, Zhang Q, Chen Z, Zhang X, He Z, Xu J, Zhang L, Xu H, Zhang D, Xu Z. MiR-3174 contributes to apoptosis and autophagic cell death defects in gastric cancer cells by targeting ARHGAP10. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9: 294–311. [DOI]
- [58] Foshay KM, Gallicano GI. MiR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation. *Dev Biol*, 2009, 326(2): 431–443. [DOI]
- [59] Chen Z, Shi H, Sun S, Luo J, Zhang W, Hou Y, Looor JJ. MiR-183 regulates milk fat metabolism via MST1 in goat mammary epithelial cells. *Gene*, 2018, 646: 12–19. [DOI]

(责任编辑: 苗龙)