

人类精子 RNA 生殖功能研究进展

牛志宏^{1,2} 综述; 施惠娟², 张慧琴² 审校

(1. 复旦大学医学院, 上海 200032; 2. 上海市计划生育科研所, 上海 200032)

摘要: 人类成熟精子中 RNA 的存在已经被证实, 主要包括 mRNA 和部分小 RNA 家族成员。随着研究深入, 发现精子 mRNA 表达差异, 与精子活力和男性生育功能相关。而部分精子中特异存在的 mRNA 和小 RNA 在精卵融合和早期胚胎发育调控中有重要作用。已经获得的结果提示精源性 RNA 的表达具有个体差异性, 并且是胚胎发育所必需的。对精子 RNA 功能的深入研究将会对男性不育、人类辅助生育技术以及核移植技术等相关领域产生推动作用。

关键词: 精子 RNA; 精子活力; 受精; 早胚发育

中图分类号: R321.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3591 (2009) 03-0256-05

Updated Reproductive Function of Human Sperm RNA

NIU Zhihong^{1,2}, SHI Huijuan², ZHANG Huiqin²

1. Fudan University School of Medicine Shanghai 200032, China 2. Shanghai Institute of Planned Parenthood Research Shanghai 200032, China

Abstract: The existence of RNA has been confirmed in human mature sperm, including mRNA and some members of the microRNA family. Different expressions of sperm mRNA have been found to be correlated with sperm motility and male reproduction. Some sperm specific mRNA and microRNA play important roles in the regulation of sperm oocyte fusion and early embryogenesis. Many published results indicate the variety of sperm RNA in composition and quantity as well as its indispensability for embryogenesis. Further researches on the function of sperm RNA will promote the progress in such fields as male infertility, human assisted reproduction technology and nuclear transfer. Natl J Androl 2009, 15(3): 256-260

Key words: sperm RNA; sperm motility; fertilization; early embryogenesis

Supported by a grant from National Natural Science Foundation of China (30571968)

Correspondence to: SHI Huijuan E-mail: shihuijuan67@hotmail.com

Received: July 7, 2008; accepted: October 27, 2008

有性生殖中, 胚胎的形成始于精卵结合。由于哺乳动物精卵细胞体积的悬殊及精子发生、成熟过程中特有的形态及细胞成分的变化, 长久以来广泛认为在受精及胚胎早期发育过程中, 精子仅提供

受精所需的雄性来源 DNA。随着近年对精子 RNA 存在的确认和其功能的深入探索, 已有迹象表明精子 RNA 在男性生育功能方面可能存在重要的调控作用。

①收稿日期: 2008-07-07; 接受日期: 2008-10-27

基金项目: 国家自然科学基金 (30571968); 上海市浦江人才计划 (06PJ14078); 上海市人口计生委发展基金 (05JG05009)

作者简介: 牛志宏 (1975-), 女, 山西太原市人, 博士研究生, 从事生殖医学专业。E-mail: kangniu@sina.com

通讯作者: 施惠娟, E-mail: shihuijuan67@hotmail.com

1 精子 RNA 种类与定位

经典理论中的细胞内 RNA 主要包括信使 RNA (mRNA)、转运 RNA (tRNA) 和核糖体 RNA (rRNA), 近年研究又发现有剪切、干扰等多种功能的小分子非编码 RNA 家族。目前人类成熟精子中已经发现的主要是 mRNA 和小 RNA。

精子是由精原细胞增殖分化形成的一种高度特化的细胞, 其形成主要包括精原细胞增殖、精母细胞成熟分裂、精子细胞变态 3 个过程。在精子细胞变态过程中, 成熟精子细胞核染色质高度浓缩 (约为体细胞的 6 倍) 构成精子头部, 核结合蛋白组蛋白也转换成鱼精蛋白 (PRM), 胞质极少, 因此成熟精子曾一度被认为是转录沉默的, 细胞中几乎不存在 RNA。

上世纪五六十年代, 有学者采用放射示踪技术发现了成熟精子中有 RNA 的存在。1988 年 Rejn 等采用胶体金和电镜扫描首次在一种厥类精子细胞核中组织定位了 mRNA。此后 1989 年和 1993 年, 分别在大鼠和人的精子细胞核中定位到 tRNA 和 U1/U2 小核 RNA。目前为止, 人类精子中已检测到多种 RNA, 其中含量最多的是 mRNA。已经确定的包括 cmyc、PRM、热休克蛋白、HLA、L 型钙通道、N 钙粘蛋白、雌激素受体、环核苷酸磷酸二酯酶、整合素、芳香化酶和一氧化氮合酶等。2002 年 Ostermeier 等^[1]报道, 比较睾丸、精子混合标本及个体标本来源的 mRNA, 各确定了 7 157、3 281 和 2 780 种 mRNA, 而且混合精子标本中所有的 mRNA 在睾丸中都存在。Zhao 等^[2]提取 10 例正常男性精子的 RNA 混合后对总 RNA 进行基因表达系列分析 (SAGE) 并与 SAGEmap 数据库比对, 发现了 2 712 种 mRNA, 其中 19.7% 为新基因; 其余能匹配的基因中, 67% 具有蛋白质结合或核酸结合能力, 41% 具有催化活性, 13% 与信号转导有关, 与细胞运输、精子结构、转录调节相关者分别达到 10% 左右, 说明人成熟精子中存在数量庞大、种类繁多的 mRNA。

通过原位电镜扫描确定了成熟精子中 RNA 较为集中的部位, 分别是细胞核、核周鞘膜、顶体后膜和中段。此外, 线粒体和中心小体也被认为是可能聚集部位^[3]。

2 精子 RNA 的功能

精子作为一种终末分化和基因表达“沉默”细胞, 为何会有大量 mRNA 蓄积? 一种观点是这些 mRNA 是精子发生过程中转录关闭后的残余物。由

于基因表达调控的需要, 精子发育依赖长期的 mRNA 蓄积而最终成熟精子停止翻译, 又失去清除它们的能力。然而, 这个假说无法解释胞质中大量 rRNA 被清除或降解, 而将 mRNA 残留下来且种类各异。因此也有学者认为残留的 mRNA 是精子形成的指纹标志。从精子 mRNA^{3'}端的 polyA 尾和缺乏内含子可以判断其是经过加工的成熟 RNA。最近有研究证实获能后的精子中至少部分 mRNA 具有翻译活性^[4]。成熟精子中 RNA 的作用, 主要表现在两方面, 即维持精子功能及在受精和早胚形成过程中发挥作用。

2.1 精子 RNA 与精子活力及男性生育功能的关系 Ostermeier 等^[1]通过将 9 份混合精子标本与每份精子标本 cDNA 进行 27 016 个独特表达序列标签的芯片分析研究成熟精子 mRNA 转录特性, 发现除共有 mRNA 外, 每例男性均有独特的“指纹 mRNA”表达, 因此认为男性生育力可能与其指纹 mRNA 有关。在不育与正常生育男性之间比较睾丸内生精过程中 mRNA 表达种类和丰度也得出类似结论^[5]。Steger 等^[6]在 2003 年报道梗阻性与非梗阻性无精子症患者睾丸活检组织中检测 PRM-1 的表达, 前者的表达显著高于后者, 提示 PRM-1 可能与精子生成有关。Lambard 等^[7]发现 1 份正常精液标本, 经不连续密度梯度离心分离将精子分成活力高与低两个部分, 发现精子 mRNA 的表达随着活力的高低有显著差异。例如与核致密化和获能有关的 PRM-1、表皮神经一氧化氮合酶 mRNA 表达在活力低的部分较高, 而精子获能后其 cmyc mRNA 的表达部分或全部消失。2004 年 Wang 等^[8]利用基因芯片和实时定量 PCR 技术对活力不同的精子标本进行了类似的研究, 也发现了 mRNA 表达的差异性。这些研究提示了两个重要发现。其一, 精子 RNA 表达差异与样品间活力差别有关。但这种差异是直接影响成熟精子功能还是只是生精过程轨迹的反映, 尚未确定。其二, 通过密度梯度离心分离的不同精子成分, 其 RNA 表达存在差异。由于密度梯度离心是辅助生育技术程序中常用的, 而如果精子 RNA 差异对于妊娠或后代的影响能够被证实的话, 第二条发现就尤为有意义。Ostermeier 等^[9]提出将来或许可以将精子 RNA 表达检测作为临床男性生育能力预测指标之一。

2.2 精子 RNA 与精卵结合及早期胚胎发育的关系 精子与卵子体积悬殊, 人类每个精子中所含 RNA 大约为 10~20 fg 较每个卵子中的 0.5~1.5 ng 相差甚远, 因此发现精子 RNA 之初, 尽管推测它可能在

受精后的雄原核形成中有作用,但多数学者认为它只是精子基因表达最后阶段的无功能残留物。卵子提供胚胎发育所需的细胞质和细胞器,而精子只提供雄性染色质,受精后精子结构完全破坏。其实早在1901年Boveri就发现卵子缺乏活性分裂中心,精子中心体是再次激活减数分裂的必要条件。这个父源性基因结构对胚胎发育影响的发现首次提示了精子所提供的并非只有DNA。同样,其他精源性蛋白,包括蛋白激酶通路中的许多信号分子,转录因子和结构蛋白,都可能在卵子激活和原核发育中具有作用。此后陆续有学者推测精子RNA可能具有影响胚胎发育潜能的作用。

2004年Ostemeier等^[10]发表的文章具有重要意义。在人类精子与仓鼠卵的受精实验中,他们首次证实了受精过程中精子将mRNA带入卵子;至少有5个MⅡ期卵子不具备的精子特异性mRNA在受精卵中出现,且至少受精后3 h内持续存在,提示受精过程可能激活这些胚胎发育必须基因的转录。Krawetz等^[11]通过比较精子RNA与人和小鼠卵母细胞cDNA文库的RNA,也发现少数对早期发育是必须的精子衍生的转录在卵母细胞中并不存在。

探讨精子mRNA表达和胚胎发育之间相关性的重要步骤是证实mRNA表达缺陷的精子转入卵子中会导致胚胎发育潜能下降。在人类辅助生育技术中采用圆形精子细胞注射入卵母细胞质内(ROSI)所获得的胚胎大多发育阻滞,即便少数发育至囊胚,种植率也非常低。有学者推测这种现象可能与精子对卵子的不恰当激活有关。Ziyat等在2001年和Hayashi等^[12]对2003年在小鼠的研究显示处在不同发育阶段的圆形精子细胞和成熟精子其所含mRNA有差异,由它们形成的早期胚胎中相关mRNA也存在差异。虽然ROSI后受精率、囊胚形成率与单精子卵细胞胞质内注射(ICSI)相近,但胚胎移植后的着床率与产仔率是显著降低的。

下面就一些与胚胎发育相关的精源性RNA做分类介绍。

2.2.1 未知功能的mRNA 这一类的代表是精子中编码PRM-2的mRNA。在从圆形精子细胞到成熟精子变形过程中,与DNA结合的体细胞组蛋白被碱性睾丸特异过渡蛋白替代,进一步又被PRM替代,从而完成染色质结构致密化。PRM-2在精子DNA致密化的阶段表达丰富。原位杂交技术显示PRM-2在整个精子头部表达。近年,PRM-2被认为是提供精子细胞或精子分化阶段相关信息以及非梗阻性无精子症患者睾丸中有无精子存在的重要分子

诊断标志之一。PRM-2 mRNA能进入卵子且在受精后3 h依然能在受精卵中检测得到。但目前尚未有其在早期胚胎发育中的作用的相关报道。

2.2.2 有潜在功能的mRNA 某些少量但稳定的转入卵子的精源性mRNA不会被卵子降解。这些mRNA会持续存在到至少胚胎基因组被激活之后,在应激、胚胎发育和种植等方面起作用。目前研究较多的几种mRNA都是与卵子激活有关的。AKAP-4蛋白的mRNA是其中一个代表。AKAP-4是构成精子鞭毛的主要成分,能调节精子活动力,精子分化过程中需要大量AKAP-4的翻译。随精子进入成熟卵母细胞后,AKAP-4作为信号级联通道的相关蛋白激活受精^[13]。而精子形成最后阶段的残余物——精子特异性磷脂酶C(PLCZ)则具有激活胚胎发育的作用。受精过程中首先激活的通路之一就是 Ca^{2+} 浓度的增加,使得卵子完成减数分裂进一步开始胚胎发育程序。激发卵子钙震荡的物质就是PLCZ。体外实验发现44~75 fg的重组PLCZ获得了与精子中20~50 fg PLCZ同样激发卵子钙震荡的作用^[14,15]。AKAP-4和PLCZ两种蛋白在细胞信号途径中都具有重要而确定的作用,它们在合子形成以及对稍后胚胎发育的潜在影响使得部分学者推测不能排除2种精子特异mRNA在卵子内被翻译成蛋白的可能性。类似的还有以信号传导蛋白发挥细胞分化作用的FOXG1B和WNT5A。

此外,相关研究报道对胚胎发育有作用的mRNA还包括参与细胞应激的热休克结合蛋白1(HSBP-1)以及调节雄原核转录并保证细胞从G2期转变为M期的信号传递和转录激活因子4(STAT4)^[16,17]。人成熟精子中含有HLA-Ⅱ的HLA-B和HLA-G mRNA。植入前2~8细胞期的胚胎及未受精卵细胞均未见有HLA-Ⅱ类分子,而在胚胎滋养层细胞却可检出,提示其来源于父方,并且可能与胚胎发育的正常极性有关。

2.2.3 外源性RNA 精子mRNA中有一部分RNA不是睾丸来源的,可能是睾丸精子细胞在附睾成熟过程中获得的。Sciamanna等^[4]2003年就证实了鼠精子中外源性mRNA的存在,并且能在内源性反转录酶作用下转变为稳定的cDNA,被带入受精卵内。与此同时,表达产物 β 半乳糖苷酶也以拼接方式出现在子代中。丛生蛋白mRNA就是这种外来mRNA^[18]。它是一种上皮性分泌蛋白,主要在附睾和前列腺表达,对精子成熟及细胞间“对话”有重要作用。射出体外的精子中能检测到此种蛋白mRNA存在,被认为与精子透明带结合有关,而合子和胚

胎中都有丛生蛋白的表达提示这种上皮分泌的 mRNA 可以随精子进入卵子。据推测前列腺小体和上皮小体可能是其进入精子的运输载体。在 2000 年 Flesch 等^[19]在恒河猴的 ICST 实验中,用绿色荧光蛋白标记的外源性 mRNA 被精子纳入,进而受精产生的胚胎中也有外源基因与绿色荧光蛋白融合模式的表达。已经在种内和种间证实外小体能够介导细胞之间 mRNA 和小干扰 RNA (siRNA) 的互换。精子能够纳入外源性 RNA 并将其带入胚胎 (DNA 的纳入也已被证实) 的现象,使得人类体外受精技术中精子处理环境和方法对于子代的影响引起有关学者重视。

2.2.4 小 RNA 成熟精子中存在的小分子非编码 RNA 也可被转入卵子中。Ostermeier 等^[20] 2005 年在 6 个独立精子样本中发现共有 68 个小的反义 RNA 序列,包括微小 RNA (miRNA) 和小干扰 RNA (siRNA),其中某些小 RNA 被认为可能通过 RNA 干扰导致受精卵中相关基因的沉默,在体细胞和卵母细胞表遗传调控方面具有作用。进一步分析发现卵母细胞中确实存在潜在靶点。如 DKK2 是 Wnt 信号通路中的一种蛋白,在胚胎发育中具有活性。这引发了精子干扰性 RNA 对胚胎基因表达调控的可能性推测。胰岛素样生长因子 (IGF-2) 受体在小鼠是母源性的, IGF-2 和其受体的表达比例适当,能确保胚胎正常发育。Krawetz 等^[16] 在小鼠精子中发现 IGF-2 受体的反义 RNA。推测这种 siRNA 可能在胚胎发育时对 IGF-2 的表达作出反应,下调其受体合成以维持两者适当比例。2006 年 Rassoulzadegan 等^[21]的研究首次证实了在小鼠中,精子非编码 c-kit RNA 的过量携带能够改变胚胎发育中的表观遗传,影响子代表型。然而, Amanai 等^[22]学者检测小鼠受精与未受精卵中 mRNA 的水平并未发现有差异,在未受精卵中也有大量精源性 mRNA 的存在,并且直接将外源性反义 mRNA 注入受精卵内,胚胎仍能正常发育。因此他们认为与卵母细胞内 mRNA 水平有数万倍差距的精源性 mRNA 其作用是极其微小的。上述不同研究结果的差异可能与注入卵母细胞 mRNA 的种类和数量有关,例如直接将 siRNA 注入哺乳动物卵母细胞内确实影响到了减数分裂和有丝分裂^[23]。目前还需要更多的试验来证实精源性 mRNA 在胚胎发育中的作用。

3 小结与展望

成熟精子中存在包括 mRNA、miRNA、siRNA 等多种 RNA 已是事实。目前对于这些 RNA 的功能研

究表明,它们与精子活力、受精能力和胚胎发育都存在关联。已经获得的结果提示父源性 RNA 的表达具有个体变异性,并且其转录是胚胎发育所必需的。对精子 RNA 功能的深入研究将会对男性不育、人类辅助生育技术以及核移植技术等相关领域产生推动作用。

参考文献

- [1] Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, et al. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002, 360(9335): 772-777.
- [2] Zhao Y, Li Q, Yao C, et al. 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.
- [3] Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update* 2006, 12(6): 757-767.
- [4] Sciamanna I, Barberi L, Martire A, et al. Sperm endogenous reverse transcriptase as mediator of new genetic information. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 312(4): 1039-1046.
- [5] Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, et al. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet* 2007, 16(7): 763-773.
- [6] Steger K, Fink L, Failing K, et al. Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol Hum Reprod* 2003, 9(6): 331-336.
- [7] Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, et al. 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.
- [8] Wang H, Zhou Z, Xu M, et al. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *J Mol Med* 2004, 82(5): 317-324.
- [9] Ostermeier GC, Goodrich RJ, Diamond MP, et al. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil Steril* 2005, 83(6): 1687-1694.
- [10] Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, et al. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004, 429(6988): 154.
- [11] Krawetz SA. 人类精子 RNA 的重要性. *中华男科学杂志*, 2005, 11(3): 170-174.
Krawetz SA. *Zhonghua Nan Ke Xue Za Zhi* 2005, 11(3): 170-174.
- [12] Hayashi S, Yang J, Christenson L, et al. Mouse preimplantation embryos developed from oocytes injected with round spermatids or spermatozoa have similar but distinct patterns of early messenger RNA expression. *Biol Reprod* 2003, 69(4): 1170-1176.
- [13] Miki K, Willis WD, Brown PR, et al. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev Biol* 2002, 248(2): 331-342.
- [14] Swann K, Laman MG, Saunders CM, et al. The cytosolic sperm factor that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in man-

mals is a novel phospholipase C: PLCzeta Reproduction 2004, 127(4): 431-439.

[15] Nomikos M, Blayney LM, Laman MG et al Role of phospholipase C-zeta domains in Ca^{2+} -dependent phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca^{2+} oscillations J Biol Chem. 2005, 280(35): 31011-31108.

[16] Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges Nat Rev Genet 2005, 6(8): 633-642.

[17] Miller D, Ostermeier GC. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? Gynecol Obstet Fertil 2006, 34(9): 840-846.

[18] Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. A possible role for sperm RNA in early embryo development Theriogenology 2007, 68 Suppl1: S147-S155.

[19] Valadi H, Ekström K, Bossi's A et al Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells Nat Cell Biol 2007, 9(6): 654-659.

[20] Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS et al A suite of novel human spermatozoal RNAs J Androl 2005, 26(1): 70-74.

[21] Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P et al RNA mediated nonmendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse Nature 2006, 441(7092): 469-474.

[22] Amanai M, Brahmajayula M, Pery AC. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization Biol Reprod 2006, 75(6): 877-884.

[23] Amanai M, Shoji S, Yoshida N et al Injection of mammalian metaphase II oocytes with short interfering RNAs to dissect meiotic and early mitotic events Biol Reprod 2006, 75(6): 891-898.

(本文编辑:史铁超)

作者 · 读者 · 编者

本刊可直接使用的医学缩略语

缩写	英文全称	中文全称
BPH	Benign prostate hyperplasia	良性前列腺增生
DAB	Diaminobenzidin	二氨基联苯胺盐酸盐
E ²	Estradiol	雌二醇
ED	Erectile dysfunction	勃起功能障碍
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
eNOS	Epithelial NOS	内皮型一氧化氮合酶
EPS	Expressed prostate secretion	前列腺按摩液
FCM	Flow cytometry	流式细胞术
FSH	Follicle stimulating hormone	卵泡刺激素
hCG	Human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
ICSI	Intra cytoplasmic sperm injection	卵细胞胞质内单精子注射
IEF	International index of erectile function	勃起功能障碍国际指数
NOS	Inducible NOS	诱导型一氧化氮合酶
IPSS	International prostate symptom score	国际前列腺症状评分
LH	Luteinizing hormone	黄体生成素
NIH-CPSP	NIH Chronic prostatitis symptom index	美国国立卫生研究院 慢性前列腺炎症状指数
nNOS	Neuronal NOS	神经型一氧化氮合酶
NO	Nitric oxide	一氧化氮
NOS	Nitric oxide synthase	一氧化氮合酶
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
PCa	Prostate cancer	前列腺癌
PRL	Prolactin	泌乳素
PSA	Prostate specific antigen	前列腺特异性抗原
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
RT-PCR	Reverse transcription PCR	逆转录 聚合酶链反应
SABC	Streptavidin-biotin complex	链霉亲和素 生物素酶复合物
T	Testosterone	睾酮
TUNEL	TdT mediated dUTP nick end labelling	脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP缺口末端标记法
WBC	White blood cell	白细胞