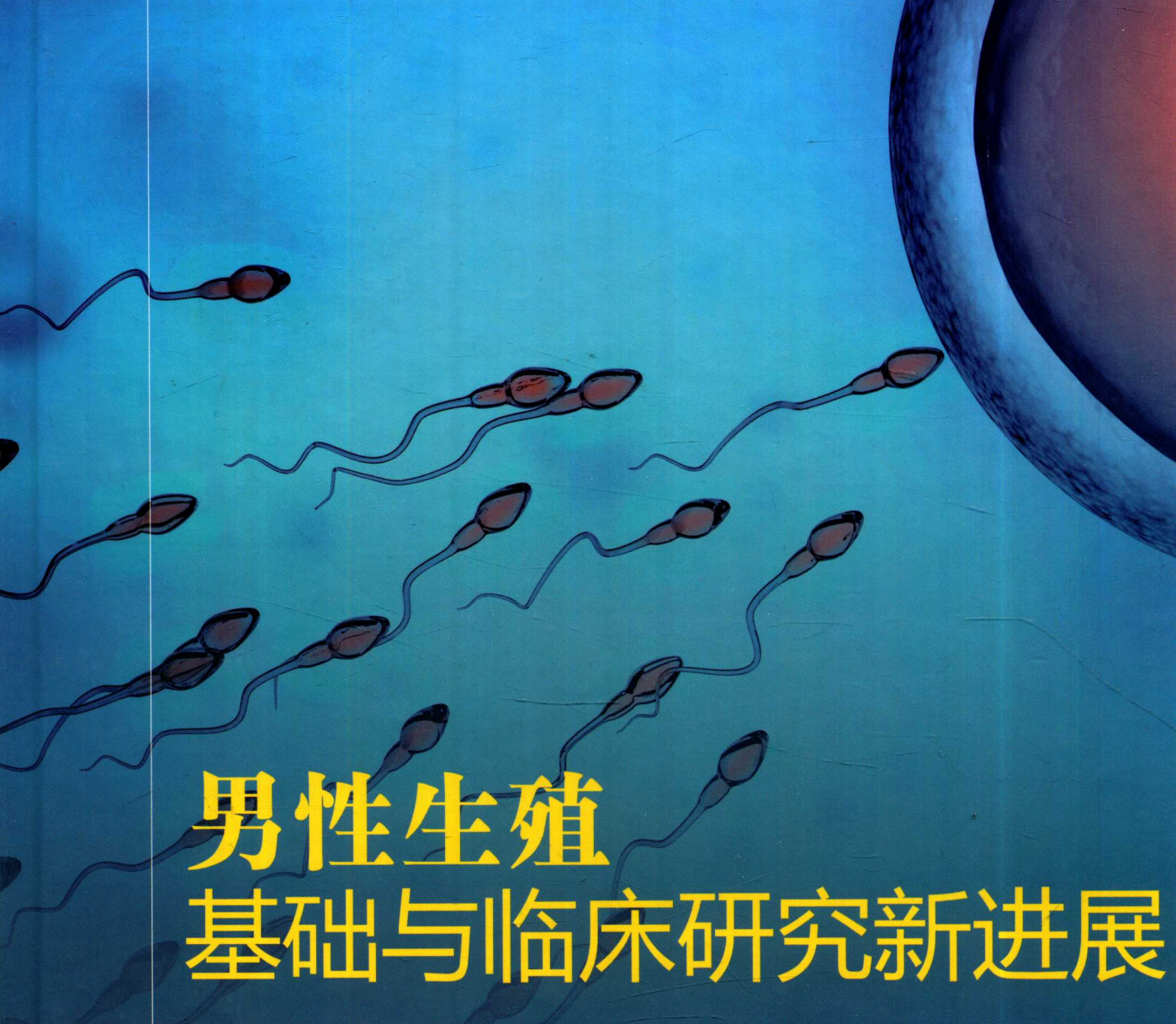
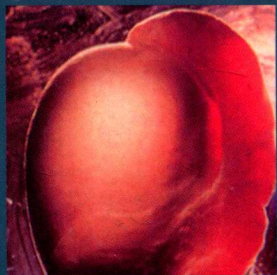




# 男性生殖 基础与临床研究新进展

许 蓬 朱伟杰◎主编



ADVANCES ON BASIC  
AND CLINICAL INVESTIGATION  
OF MALE REPRODUCTION



科学出版社

# 男性生殖基础与临床研究新进展

许 蓬 朱伟杰 主编

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

男性生殖涉及男性生育、男性不育、男性节育、男性生殖健康等诸多领域,基础研究与临床实践并重,与女性生殖、子代安全紧密联系。近年来,随着生殖医学、生殖生理学、循证医学、分子遗传学、现代分子生物学等学科的迅速发展,男性生殖领域无论在基础研究还是在临床诊治方面都取得了很多人瞩目的成绩。本书汇集男性生殖相关综述文章 50 篇,内容包括精子生理学、精子功能评价、男性不育诊疗、男性节育、男性性功能障碍、男性生殖系统感染等方面的问题,尤其是重点吸收了男性生殖在基础研究、临床诊治及实验技术中的新成果,多方面介绍了男性生殖基础与临床研究的现状和新进展,有助于读者了解男性生殖的当前学术动态和发展趋势。

本书对从事男科学、生殖医学、妇产科学和生殖生理学等学科的广大医务工作者、科研人员、高等院校尤其是医学院校师生有参考价值。

### 图书在版编目(CIP)数据

男性生殖基础与临床研究新进展/许蓬,朱伟杰主编. —北京:科学出版社, 2018.3

ISBN 978-7-03-056606-5

I. ①男… II. ①许… ②朱… III. ①男性-生殖医学 IV. ①R339.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 036206 号

责任编辑:岳漫宇 / 责任校对:郑金红

责任印制:肖 兴 / 封面设计:刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2018 年 3 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2018 年 3 月第一次印刷 印张:22 1/2

字数:534 000

定价:168.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

## 前 言

男性生殖涉及男性生育、男性不育、男性节育、男性生殖健康等诸多领域，基础研究与临床实践并重，与女性生殖、子代安全紧密联系。近年来，随着生殖医学、生殖生理学、循证医学、分子遗传学、现代分子生物学等学科的迅速发展，男性生殖领域无论在基础研究还是在临床诊治方面都取得了很多人瞩目的成绩。当前男性生殖深入进行精子发生、成熟与受精的基础研究，重视解决男性临床诊疗的实际问题，积极探索男性抗生育的新措施，并不断加强从基础到临床的转化医学发展。

本书编委会组织编写并汇集男性生殖相关综述文章 50 篇，内容包括精子生理学、精子功能评价、男性不育诊疗、男性节育、男性性功能障碍、男性生殖系统感染等方面的问题，尤其是重点吸收了男性生殖在基础研究、临床诊治及实验技术的新成果，例如，自噬与男性不育、泛素化与精子 DNA 损伤、生精细胞凋亡调控、不育症表观遗传、显微取精、精子冻干保存、干细胞治疗等，多方面介绍了男性生殖基础与临床研究的现状和新进展，有助于读者了解男性生殖的当前学术动态和发展趋势。由于男性生殖涉及的领域广泛，且发展迅猛，尚有诸多方面问题有待总结，特别是精子发生与成熟的分子机制、男性生殖遗传学、中医药对男性生殖系统尤其是精子的效应、男性节育的新方法等，本书收集的文章难以覆盖全面，也难免出现欠妥或错误之处，敬请读者、同行指正。

许 蓬 朱伟杰

2018 年 2 月 6 日

# 目 录

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 精子变态过程中组蛋白变体及其修饰机制的研究进展 .....           | 1  |
| 江 欢 李晓红 杨 乙 朱伟杰                         |    |
| 泛素-蛋白酶体系统与精子 DNA 损伤修复的研究进展 .....        | 9  |
| 张国巍 蔡鸿财 商学军                             |    |
| 自噬与精子发生及父源性线粒体消减 .....                  | 15 |
| 朱洁茹 欧建平 朱伟杰                             |    |
| 自噬及其信号通路 with 男性不育发病机制的关系 .....         | 21 |
| 江 欢 李晓红 杨 乙 朱伟杰                         |    |
| kisspeptin 对男性生殖功能调控机制的研究进展 .....       | 26 |
| 洪驹发 杨柳红 禹艳红                             |    |
| 附睾树突状细胞的研究进展 .....                      | 33 |
| 陈 瑶 陈 雷 禹艳红                             |    |
| 生精细胞凋亡调控机制的研究进展 .....                   | 39 |
| 柯诗韵 林燕霞 禹艳红                             |    |
| 睾丸巨噬细胞的功能 .....                         | 48 |
| Sudhanshu Bhushan 李春义 Andreas Meinhardt |    |
| 抗缪勒氏管激素在男性不育中的临床意义 .....                | 57 |
| 赵 唤 孙龙浩 许 蓬                             |    |
| 食欲刺激素 (ghrelin) 对睾丸功能的影响 .....          | 61 |
| 丁 斐 张紫渊 禹艳红                             |    |
| 睾酮合成分泌信号通路的研究进展 .....                   | 68 |
| 卢小圣 谭安妮 禹艳红 朱伟杰                         |    |
| 促性腺激素释放激素 (GnRH) 疫苗在雄 (男) 性应用的现状 .....  | 75 |
| 李 盼 李 菁 朱伟杰                             |    |
| 男性激素避孕方法的研究进展 .....                     | 84 |
| 李宏军                                     |    |
| 精子 DNA 碎片在男性不育中的临床意义 .....              | 90 |
| 李 丽 赵 唤 许 蓬                             |    |
| 精子 DNA 损伤对男性生育力影响的研究进展 .....            | 94 |
| 范舒舒 罗慧旗 侯志伟 汪 成                         |    |

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| 精子功能检测的研究进展 .....             | 105 |
| 杨旭辉 杨少芬 梁嘉颖 汤惠霞 吴远菲 汪李虎       |     |
| 精子形态学在预测辅助生殖技术妊娠结局的应用价值 ..... | 115 |
| 罗璐璐 马春杰 张欣宗                   |     |
| 精子形态学检验及临床意义的研究进展 .....       | 126 |
| 张 杰 陈柳青 朱照平 黄志承 汪李虎           |     |
| 微流控芯片技术选择精子的应用 .....          | 131 |
| 李彩虹 李春义 许 蓬                   |     |
| 精子的表观遗传学与胚胎发育关系的研究进展 .....    | 136 |
| 何燕芳 马洁桦 潘连军 黄宇烽               |     |
| 男性不育治疗策略 .....                | 142 |
| 李宏军                           |     |
| 辅助生殖技术前应重视男性不育患者的常规处理 .....   | 149 |
| 李宏军                           |     |
| 睾丸显微取精术的研究进展 .....            | 156 |
| 廖黎黎 李金重 邓旭明 黄永汉               |     |
| 外科取精技术在辅助生殖中的临床应用 .....       | 164 |
| 万洋洋 华 娟 童先宏 郭通航 许 波 江小华       |     |
| 隐匿精子症的诊断与治疗 .....             | 170 |
| 汪李虎                           |     |
| 无精子症诊断和治疗的进展 .....            | 177 |
| 郭廷超 卢永平                       |     |
| 精索静脉曲张与男性不育症关系的研究进展 .....     | 187 |
| 沈 文 杜 鹏 肖宗辉 郑毅春               |     |
| 青少年精索静脉曲张评估与干预新进展 .....       | 193 |
| 王沈凡 温耀安 木海琦 赵善超               |     |
| 男性不育伴精索静脉曲张的诊治进展 .....        | 200 |
| 李宏军                           |     |
| 5 型磷酸二酯酶抑制剂治疗早泄的研究进展 .....    | 204 |
| 莫敦胜 商学军 黄宇烽                   |     |
| 早泄的流行病学与病因学 .....             | 212 |
| 李宏军                           |     |
| 硫辛酸在男性生殖中应用的研究进展 .....        | 220 |
| 张国巍 刘 玮 商学军                   |     |
| 虾红素在男性生殖健康中的研究进展 .....        | 227 |
| 刘 玮 张国巍 商学军                   |     |

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| 人文关怀在辅助生殖中心男科中的应用 .....       | 236 |
| 吴冉研 许 蓬                       |     |
| 磷霉素在泌尿男科感染性疾病中应用的研究进展 .....   | 240 |
| 莫敦胜 刘 玮 商学军                   |     |
| 沙眼衣原体对精液参数的影响 .....           | 247 |
| 赵 唤 李 芃 李 杨 宋世威 许 蓬           |     |
| 支原体与衣原体检测及其对男性生殖影响的研究进展 ..... | 250 |
| 王家雄 史轶超                       |     |
| 寨卡 (Zika) 病毒对男性生育的效应 .....    | 259 |
| Andreas Meinhardt 李春义         |     |
| 男性常染色体显性遗传多囊肾病的生殖相关问题 .....   | 262 |
| 蔡鸿财 商学军 黄宇烽                   |     |
| 导致男性不育的常见单基因突变 .....          | 271 |
| 李春义 李彩虹 赵 唤 许 蓬               |     |
| 复发性流产的男性相关因素 .....            | 277 |
| 郭廷超 卢永平                       |     |
| 邻苯二甲酸酯类化合物对睾丸功能的效应 .....      | 285 |
| 王弋毓 朱伟杰                       |     |
| 孕期对乙酰氨基酚暴露对男性生育潜力的影响 .....    | 291 |
| 陈 雷 禹艳红 朱伟杰                   |     |
| 人类低品质精子冷冻保存方法的研究进展 .....      | 297 |
| 黄吴键 陈国勇 陈智鏢 张 燕 刘 芸           |     |
| 冷冻干燥保存对精子的影响 .....            | 308 |
| 王弋毓 朱伟杰                       |     |
| 精子冻干保存的研究现状及未来 .....          | 315 |
| 李彩虹 李春义 许 蓬                   |     |
| 男性青少年肿瘤患者的生育力保护 .....         | 321 |
| 傅龙龙 张开舒 谷翊群                   |     |
| 诱导多能干细胞在精子发生过程中的研究进展 .....    | 328 |
| 方 芳 倪 柯 熊承良                   |     |
| 脂肪源性干细胞治疗阴茎勃起功能障碍的研究进展 .....  | 336 |
| 王 毅 王亚民 陈 晨 王仪春 宋宁宏           |     |
| 人造生殖细胞治疗非梗阻性无精子症的可能应用 .....   | 343 |
| 李彩虹 李春义 许 蓬                   |     |

# 精子变态过程中组蛋白变体及其修饰机制的研究进展

江 欢<sup>1</sup> 李晓红<sup>1</sup> 杨 乙<sup>2</sup> 朱伟杰<sup>3\*</sup>

1 深圳市龙岗区妇幼保健院生殖内分泌科, 深圳

2 深圳市龙岗区妇幼保健院生殖健康科, 深圳

3 暨南大学生命科学技术学院生殖免疫研究所, 广州

**摘 要** 精子细胞在精子变态过程中经历独特的分化, 大部分精子核组蛋白被替换为鱼精蛋白, 以促进染色质压缩。组蛋白是构成核小体的基本组分, 是染色质结构和功能的基础。对于不同状态的染色质, 核小体中会组装相应的组蛋白变体, 该变体的尾部能发生多种修饰, 以发挥不同功能。本文对哺乳动物精子变态过程中, 鱼精蛋白置换组蛋白所涉及的组蛋白变体及其修饰作一综述。

**关键词** 精子变态, 组蛋白变体, 组蛋白变体修饰, 精子细胞

哺乳动物精子发生过程中, 生精细胞依次经历了有丝分裂、减数分裂和精子形成三个阶段 (Wang et al., 2017)。在有丝分裂和减数分裂期间, 生殖细胞的 DNA 被包装在由组蛋白组成的核小体内。真核生物的核小体是由核心组蛋白所构成的八聚体, 核小体和缠绕其上的 DNA 共同决定了染色体的特殊化。完成减数分裂后, 一个精母细胞产生四个单倍体精子细胞, 通过一系列的形态改变和核染色质的浓缩、替换及重组以完成精子变态 (spermiogenesis) (Govin et al., 2004)。期间, 精子浓缩核内的父系基因组被重组包装, 中间经历从基于组蛋白的染色质过渡到鱼精蛋白为基础的染色质, 这样的转变有利于精子头部凝结, 保护父系 DNA 免受损伤和诱变 (Rathke et al., 2014)。目前, 组蛋白到鱼精蛋白替换的分子机制仍未完全阐明, 由于组蛋白在生殖系统内有多种变体, 各变体选择性的翻译后修饰也对置换过程至关重要, 如甲基化、乙酰化、泛素化和磷酸化等, 本文综述精子变态过程鱼精蛋白置换组蛋白所涉及组蛋白变体及其修饰的研究进展。

## 1 组蛋白变体

组蛋白的成分除了基本的 H2A、H2B、H3、H4 和 H1, 还包括其他变体。不同状态的染色质需要相应的组蛋白变体维持结构, 方可完成其特定的生物学功能。不同于体细胞, 生殖细胞内表达很多组蛋白变体, 且大部分均高表达于组蛋白到鱼精蛋白的转换期

\* 通讯作者: tzhujw@jnu.edu.cn

间。组蛋白变体具有三个内在特征。①典型组蛋白仅在细胞周期的 S 期合成,而组蛋白变体则在整个细胞周期中表达 (Henikoff and Smith, 2015)。这个特征对于生殖细胞尤为重要,因为精子的发生是一个具有高度组织性、连续性的过程。②组蛋白变体倾向于由多种疏水性或亲水性氨基酸组成,很容易出现由稳定(开放)或不稳定(压制)的染色质状态相关联的单核小体,进而决定特定基因转录的激活或沉默。例如, H2A.Z 和 H3.3 通常与激活性基因表达相关,而 macroH2A 则出现在转录抑制的过程中 (Chen et al., 2014)。单倍体精子发育需要激活一类特异性基因,如顶体形成、核伸长和鞭毛装配所必需的基因 (Escalier, 2006),同时抑制某些体细胞基因程序的表达。③组蛋白变体含有特殊的翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 标记,通过与效应蛋白的结合传递信号 (Rose et al., 2008)。

## 1.1 H1 变体

与体细胞 H1 变体相比, H1T 是一种睾丸特异性的 H1 组蛋白变体,其最早可出现于粗线期精母细胞中,并持续高水平表达直到长形精子阶段 (Drabent et al., 2003)。H1T 蛋白序列与其他亚型 H1 变体同源性不高,与 H1 家族中最接近的同源蛋白只有 50% 的同源性,但在生殖细胞所有的 H1 蛋白中, H1T 占约 55% (Drabent et al., 1998)。H1T 的表达模式及其生化特性均支持其在置换组蛋白过程中的作用,尽管 *H1t* 缺陷小鼠的睾丸精子发生过程并没有出现明显异常 (Lin et al., 2000),但这并不能说明 *H1t* 没有参与调控精子发生,因为其他 H1 亚型可通过补偿途径降低 *H1t* 敲除对小鼠生育力的影响 (Fantz et al., 2001)。另一个睾丸特异性 H1 组蛋白变体 H1T2 则仅在单倍体精子细胞中表达,其中在 2~4 期精子细胞的表达较弱,而在 5~12 期的表达逐渐升高 (Catena et al., 2006)。与 *H1t* 不同, *H1t2* 的敲除可导致小鼠生育力的显著降低,病理学检查显示大于 80% 的长形精子形态异常 (Tanaka et al., 2005),提示 H1T2 在鱼精蛋白替换组蛋白的过程中起着关键作用。

## 1.2 H2A 和 H2B 变体

除了典型的 H2A 组蛋白之外,在哺乳动物中还存在多种 H2A 组蛋白变体,包括参与双链断裂的 H2AX、在基因的转录起始位点中富集的 H2AZ,以及睾丸特异性组蛋白变体 TH2A、TH2B。睾丸特异性组蛋白变体 TH2B (Shires et al., 1975) 是睾丸中 H2B 组蛋白的主要变体形式。Western 印迹和免疫组化表明 TH2B 从出生后 10 天即开始在精母细胞中累积,此后保持高表达水平 (Shinagawa et al., 2015),而 H2B 的表达水平则在出生后 16 天显著下降 (Rao and Rao, 1987)。生殖细胞中 TH2B 表达的时间特异性提示其可能参与调节减数分裂及其后的精子发生过程。动物模型揭示 TH2B 蛋白的 C 端具有三个连续亲和标签,其相互融合可致雄性小鼠不育 (Montellier et al., 2013)。*Th2b* 敲除的小鼠生长良好,且生育力正常,提示尽管睾丸 TH2B 表达缺陷,机体中仍存在其他补偿机制。进一步研究表明,在 *Th2b* 丢失的小鼠睾丸中, H2B 表达显著上调。此外,

通过使用体外同位素标记结合液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 分析发现, *Th2b* 敲除后, 小鼠精子细胞的 H4R35、H4R55、H4R67 和 H2BR72 基因位点上发生较强的精氨酸甲基化 (Montellier et al., 2013), 这些数据表明体细胞中组蛋白可能通过实施补偿性的 PTM 以替代睾丸特异性组蛋白变体的功能。*Th2a* 基因和与其同源的 *Th2b* 基因均定位在小鼠基因组第 17 号染色体上, 且共有一个位于两者之间的转录启动子, 表明 TH2A 和 TH2B 在生殖细胞中以共调节的方式发挥作用 (Huh et al., 1991)。在小鼠睾丸中, TH2A 和 TH2B 从第一波精子发生的精原细胞开始即迅速增加, H2A 和 H2B 则逐渐降低。TH2A 和 TH2B 的同时失活可导致精子细胞的减数分裂和染色质浓缩过程出现多种缺陷。例如, 在 *Th2a* 和 *Th2b* 双敲除小鼠的睾丸中观察到 10~16 阶段的精子细胞出现多种形态异常, 并且它们的核染色质中显示出较低量的转换蛋白 1 (transition protein 1, TP1) 和鱼精蛋白 2 (protamine 2, PRM2), 表明 TH2A 和 TH2B 是过渡蛋白和鱼精蛋白沉积过程中必需的调节因子 (Shinagawa et al., 2015)。

### 1.3 H3 变体

H3.1 和 H3.2 是哺乳动物精子细胞中典型的 H3 组蛋白变体, 两者仅有一个氨基酸的差别, 此外, 人精子细胞还有另外三种 H3 变体, 分别是 H3.3、H3T 和 CENP-A。H3.3 的一级结构与经典的 H3.1 有五个氨基酸的区别, 由哺乳动物基因组中的两个同源基因 *H3f3a* 和 *H3f3b* 所编码, 尽管两者在 5' 和 3' 端具有不同的调节元件和非翻译区, 但均编码相同的 H3.3 蛋白序列 (Szenker et al., 2011)。虽然 H3.3 和 H3.1 的氨基酸序列的一级结构相差甚微, 两者的三维结构又几乎一样, 但生化研究表明 H3.3 能够产生更开放的染色质构型, 并且可通过破坏更高级的染色质结构来促进转录。同时, 染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 分析显示 H3.3 通常与 H3K4me3 标记的转录活性区域相连, 而 H3.1 则与抑制性转录相关 (Thakar et al., 2009)。在小鼠睾丸中, *H3f3a* 表达于所有类型的生殖细胞, 包括精原细胞、精母细胞和精子细胞, 而 *H3f3b* 仅特异性高表达于精母细胞 (Bramlage et al., 1997)。*H3f3b* 的靶向敲除能够引起雄性小鼠不育, 使其生殖细胞的 H3.3 表达水平明显降低, 生殖细胞凋亡增加, 睾丸体积萎缩。利用免疫组织化学免疫荧光染色法 (immunohistochemistry-based immunofluorescence staining, IHC-IF) 检测到 *H3f3b* 丢失小鼠睾丸中的 H3k9me3 表达水平显著升高。已知 H3k9me3 与转录沉默和异染色质密切相关, 同时, *H3f3b* 敲除小鼠的睾丸中多种与精子发生相关的基因均存在表达异常, 其中 TP1 蛋白在长形精子中异常沉积, 而 PRM1 蛋白在晚期长形精子和成熟精子中则未能检测到。以上证据均表明 *H3f3b* 是参与鱼精蛋白替换组精蛋白过程的重要因子 (Yuen et al., 2014)。H3T 也被称为 H3.4, 最初仅在哺乳动物睾丸中发现, 随后则发现 H3T 蛋白在其他体细胞中也有低水平表达 (Govin et al., 2005)。氨基酸序列比对显示 H3.1 和 H3T 之间仅有 5 个残基的差异, 然而, 生化研究则表明, 与经典 H3.1 装配的核小体相比, 掺入 H3T 的核小体稳定性降低, 由此推测, H3T 在精母细胞减数分裂期的染色体重构和精子细胞的核染色质重新包装过程中均发

挥着作用 (Tachiwana et al., 2010)。

## 2 组蛋白变体修饰

组蛋白的表达受到动态 PTM 的影响, PTM 是通过时空特异性调控基因表达的关键机制之一 (Kouzarides, 2007)。组蛋白修饰也可以作为表观遗传标记, 从而稳定地传递给后代 (Guerrero-Bosagna and Skinner, 2014)。一方面, 通过影响组蛋白的稳定性及组蛋白与 DNA 之间的相互作用, 不同 PTM 的结合可对局部染色质构象产生显著的影响。例如, 赖氨酸乙酰化降低了组蛋白的正电荷, 导致该组蛋白与缠绕其上带负电荷 DNA 分子的相互作用减弱, 从而增加核小体流动性; 另一方面, PTM 是信号通路的汇集点, 单一或多个 PTM 可作为效应分子募集的“对接位点”, 促进来自染色质的信号进一步往下传导 (Venkatesh and Workman, 2015)。因此, 精子发生过程中不同组蛋白的 PTM 有利于促进染色质的重构, 维持特定的染色质结构以调控基因转录, 进而完成组蛋白到鱼精蛋白的替换过程。

### 2.1 磷酸化

一般情况下, 所有组蛋白上的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上均可观察到磷酸化的 PTM。这些修饰通过作为效应蛋白的“对接位点”或参与其他 PTM 的调控网, 如甲基化和泛素化等, 对基因表达可产生关键的影响。整个精子发生过程中, 精子核组蛋白均显示出动态的磷酸化修饰过程 (Song et al., 2011)。其中, 组蛋白 H4 第一位丝氨酸磷酸化修饰 (histone H4 serine-1 phosphorylation, H4S1ph) 从果蝇到哺乳动物保持高度保守。在果蝇中, 从减数分裂期的精母细胞即可检测到 H4S1ph, 于精子致密的染色质中含量最高, 因此, H4S1ph 被认为是晚期精子中连续组蛋白置换的条件之一 (Krishnamoorthy et al., 2006)。近年应用液相色谱-质谱法 (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS) 鉴定睾丸生殖细胞中不同组蛋白变体上的具体磷酸化位点。Rao 研究小组发现精子细胞组蛋白 H1 样蛋白 (histone H1-like protein in spermatids 1, HILS1) 上存在 9 个丝氨酸磷酸化位点和 1 个苏氨酸磷酸化位点。免疫荧光染色进一步显示 HILS1 和 HILS1-Y78p 仅存在于长形精子中 (Mishra et al., 2015)。此外, 该研究组还在 TH2B 中发现新的丝氨酸磷酸化位点 (Pentakota et al., 2014)。

### 2.2 乙酰化

组蛋白 H4 的乙酰化增加是最早被获知的与鱼精蛋白替换组蛋白相关的组蛋白修饰事件, 并且该事件的发生在哺乳动物中高度保守 (Zarnescu, 2007)。研究指出, 组蛋白 H4 的高度乙酰化可以解开高阶染色质结构, 即诱导 DNA 链的断裂, 从而帮助组蛋白离开原染色质, 掺入新的碱性蛋白。H2A、H2B 和 H4 在精原细胞和前细线期精母细胞中被乙酰化, 在减数分裂期的精母细胞和圆形精子细胞中低乙酰化, H4 的 N 端尾部的三

个赖氨酸残基 H4K5、H4K8 和 H4K16 在长形精子中再次检出高度乙酰化,然而这些现象却与 DNA 复制无关,提示在精子发生过程中, H4 的乙酰化是参与鱼精蛋白置换过程中重要但非唯一的影响因素 (Eitoku et al., 2008; Awe and Renkawitz-Pohl, 2010)。

### 2.3 泛素化

泛素是一种具有 76 个残基的小型真核蛋白质,其与底物的结合可参与调控底物蛋白的稳定性、活性或细胞定位 (Weake and Workman, 2008)。泛素化是涉及三种酶参与的反应,包括泛素激活酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶 (ubiquitin conjugating enzyme, E2) 和泛素连接酶 (ubiquitin ligase, E3)。E1 激活泛素,随后转移至 E2,泛素化活化的 E2 和底物蛋白都被 E3 特异性地识别,随后催化泛素部分转移至底物蛋白。底物蛋白可发生单泛素化修饰或经多轮泛素化后发生多泛素化修饰 (Welchman et al., 2005)。在粗线期精母细胞和长形精子中即可观察到高度富集的泛素化 H2A 和 H2B (Weake and Workman, 2008)。环指蛋白 8 (ring finger protein 8, RNF8) 是一种 E3 连接酶,可通过泛素化 H2A 和 H2B,促进修复因子募集到 DNA 损伤部位,防止染色体不稳定。RNF8 缺失的雄性小鼠,由 RNF8 介导的 DNA 损伤应答机制受损,可致其生育力受损 (Guo et al., 2017)。

### 2.4 甲基化

组蛋白甲基化修饰是目前广泛研究的 PTM 之一,其在细胞增殖、分化和转化过程中均可对染色质动力学产生较大的影响。蛋白质赖氨酸甲基转移酶 (protein lysine methyltransferase, PKMT) 是一类含有高度保守结构域的具有甲基转移酶活性的酶类,其作用底物非常广泛,涉及真核细胞 DNA 和 RNA 介导的许多过程。PKMT 可修饰组蛋白,进而调节转录因子,参与 DNA 损伤修复。研究表明 PKMT 可能参与调控精子发生和睾丸发育,但其具体分子机制仍待阐明 (Zhang et al., 2014)。在组蛋白向鱼精蛋白转换前的长形精子中可检测到组蛋白 H3K79 的甲基化修饰,并且其表达水平与组蛋白 H4 的超乙酰化相关,该甲基标记在哺乳动物的睾丸中高度保守,表明它在组蛋白置换过程中起着重要作用 (Dottermusch-Heidel et al., 2014a, b)。与 PKMT 相似,蛋白质精氨酸甲基转移酶 (protein arginine methyltransferase, PRMT) 主要参与组蛋白精氨酸位点甲基化修饰,改变基因组染色质结构,调控基因表达 (Bedford and Richard, 2005)。PRMT 家族中有 9 个成员,可以分为三类: I 型酶主要催化非对称性二甲基精氨酸的形成,包括 PRMT1、PRMT3、PRMT4、PRMT6 和 PRMT8; II 型酶主要催化合成对称二甲基精氨酸,包括 PRMT5 和 PRMT9 (Yang et al., 2015); III 型酶有 PRMT7,仅催化底物中的精氨酸残基发生单甲基化。除了 PRMT8 仅特异性的表达于神经元中,PRMT 家族的其他成员均广泛表达于机体各组织,其中包括雄性睾丸 (Hong et al., 2012)。PRMT1、PRMT4 和 PRMT5 的 mRNA 水平在长形精子中开始逐渐升高,至成熟精子中含量达到高峰,提示这些酶参与调节精子发生过程,可能在鱼精蛋白的置换和精子的表

观遗传调控中发挥着作用 (Nikhil et al., 2015)。

### 3 展 望

深入了解精子变态阶段所涉及的组蛋白变体及其修饰机制,可增进精子细胞核蛋白改变的认识,亦可为男性不育的病因学分析提供研究方向,还有助于发现新型的男性节育生物标志。此外,生育过程中雄性和雌性的单倍体配子基因组将被重新编程,并形成二倍体合子基因组,所以任何表观遗传缺陷都可能会传递给后代,引发子代严重的出生缺陷和发育障碍。目前对组蛋白变体的研究已成为表观遗传学新的研究热点,研究的方向也加强了亲代表观遗传标记在多个物种间的多代和跨代遗传 (Aldrich and Maggert, 2015; Tang et al., 2015)。尽管目前对组蛋白变体的研究已较深入,但仍未能完全阐明其功能和分子机制,表观遗传学的持续发展也必将对组蛋白变体及其修饰的相关研究起到积极的推进作用。

### 参 考 文 献

- Aldrich J C, Maggert K A. 2015. Transgenerational inheritance of diet-induced genome rearrangements in *Drosophila*. *PLoS Genet*, 11(4): e1005148.
- Awe S, Renkawitz-Pohl R. 2010. Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone- to a protamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Syst Biol Reprod Med*, 56(1): 44-61.
- Bedford M T, Richard S. 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*, 18(3): 263-272.
- Bramlage B, Kosciessa U, Doenecke D. 1997. Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation*, 62(1): 13-20.
- Catena R, Ronfani L, Sassone-Corsi P, et al. 2006. Changes in intranuclear chromatin architecture induce bipolar nuclear localization of histone variant H1T2 in male haploid spermatids. *Dev Biol*, 296(1): 231-238.
- Chen P, Wang Y, Li G. 2014. Dynamics of histone variant H3.3 and its coregulation with H2A. *Z at enhancers and promoters. Nucleus*, 5(1): 21-27.
- Dottermusch-Heidel C, Gartner S M, Tegeder I, et al. 2014a. H3K79 methylation: a new conserved mark that accompanies H4 hyperacetylation prior to histone-to-protamine transition in *Drosophila* and rat. *Biol Open*, 3(6): 444-452.
- Dottermusch-Heidel C, Klaus E S, Gonzalez N H, et al. 2014b. H3K79 methylation directly precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to bacterial infections. *Andrology*, 2(5): 655-665.
- Drabent B, Benavente R, Hoyer-Fender S. 2003. Histone H1t is not replaced by H1.1 or H1.2 in pachytene spermatocytes or spermatids of H1t-deficient mice. *Cytogenet Genome Res*, 103(3-4): 307-313.
- Drabent B, Bode C, Miosge N, et al. 1998. Expression of the mouse histone gene H1t begins at premeiotic stages of spermatogenesis. *Cell Tissue Res*, 291(1): 127-132.
- Eitoku M, Sato L, Senda T, et al. 2008. Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. *Cell Mol Life Sci*, 65(3): 414-444.
- Escalier D. 2006. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update*, 12(4): 449-461.
- Fantz D A, Hatfield W R, Horvath G, et al. 2001. Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile

- and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol Reprod*, 64(2): 425-431.
- Govin J, Caron C, Lestrat C, et al. 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem*, 271(17): 3459-3469.
- Govin J, Caron C, Rousseaux S, et al. 2005. Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem Sci*, 30(7): 357-359.
- Guerrero-Bosagna C, Skinner M K. 2014. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of male infertility. *Curr Opin Genet Dev*, 26: 79-88.
- Guo Y, Song Y, Guo Z, et al. 2017. Function of RAD6B and RNF8 in spermatogenesis. *Cell Cycle*, Aug 21: 0. doi: 10.1080/15384101.2017.1361066.
- Henikoff S, Smith M M. 2015. Histone variants and epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1): a019364.
- Hong E, Lim Y, Lee E, et al. 2012. Tissue-specific and age-dependent expression of protein arginine methyltransferases (PRMTs) in male rat tissues. *Biogerontology*, 13(3): 329-336.
- Huh N E, Hwang I W, Lim K, et al. 1991. Presence of a bi-directional S phase-specific transcription regulatory element in the promoter shared by testis-specific TH2A and TH2B histone genes. *Nucleic Acids Res*, 19(1): 93-98.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4): 693-705.
- Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J, et al. 2006. Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev*, 20(18): 2580-2592.
- Lin Q, Sirotkin A, Skoultschi A I. 2000. Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol Cell Biol*, 20(6): 2122-2128.
- Mishra L N, Gupta N, Rao S M. 2015. Mapping of post-translational modifications of spermatid-specific linker histone H1-like protein HILS1. *J Proteomics*, 128: 218-230.
- Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, et al. 2013. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev*, 27(15): 1680-1692.
- Nikhil G, Pradeepa M M, Anayat B U, et al. 2015. Mapping of post-translational modifications of transition proteins, TP1 and TP2 and identification of protein arginine methyltransferase 4 and lysine methyltransferase 7 as methyltransferase for TP2. *J Biol Chem*, 290(19): 12101-12122.
- Pentakota S K, Sandhya S, Aued P S, et al. 2014. Mapping post-translational modifications of mammalian testicular specific histone variant TH2B in tetraploid and haploid germ cells and their implications on the dynamics of nucleosome structure. *J Proteome Res*, 13(12): 5603-5617.
- Rao B J, Rao M R. 1987. DNase I site mapping and micrococcal nuclease digestion of pachytene chromatin reveal novel structural features. *J Biol Chem*, 262(10): 4472-4476.
- Rathke C, Baarends W M, Awe S, et al. 2014. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1839(3): 155-168.
- Rose K L, Li A, Zalenskaya I, et al. 2008. C-terminal phosphorylation of murine testis-specific histone H1t in elongating spermatids. *J Proteome Res*, 7(9): 4070-4078.
- Shinagawa T, Huynh L M, Takagi T, et al. 2015. Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. *Development*, 142(7): 1287-1292.
- Shires A, Carpenter M P, Chalkley R. 1975. New histones found in mature mammalian testes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72(7): 2714-2718.
- Song N, Liu J, An S, et al. 2011. Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta Histochem Cytochem*, 44(4): 183-190.
- Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G. 2011. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res*, 21(3): 421-434.
- Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, et al. 2010. Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(23): 10454-10459.
- Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, et al. 2005. HANP1/HIT2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*, 25(16): 7107-7119.

- Tang W W, Dietmann S, Irie N, et al. 2015. A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. *Cell*, 161(6): 1453-1467.
- Thakar A, Gupta P, Ishibashi T, et al. 2009. H2A.Z and H3.3 histone variants affect nucleosome structure: biochemical and biophysical studies. *Biochemistry*, 48(46): 10852-10857.
- Venkatesh S, Workman J L. 2015. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(3): 178-189.
- Wang Y, Ding Y, Li J. 2017. CRISPR-Cas9-Mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Methods Mol Biol*, 1622: 293-305. doi: 10.1007/978-1-4939-7108-4\_20.
- Weake V M, Workman J L. 2008. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell*, 29(6): 653-663.
- Welchman R L, Gordon C, Mayer R J. 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8): 599-609.
- Yang Y, Hadjikyriacou A, Xia Z, et al. 2015. PRMT9 is a type II methyltransferase that methylates the splicing factor SAP145. *Nat Commun*, 6: 6428.
- Yuen B T, Bush K M, Barrilleaux B L, et al. 2014. Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development*, 141(18): 3483-3494.
- Zarnescu O. 2007. Immunohistochemical distribution of hyperacetylated histone H4 in testis of paddlefish *Polyodon spathula*: ultrastructural correlation with chromatin condensation. *Cell Tissue Res*, 328(2): 401-410.
- Zhang L, Wang J, Pan Y, et al. 2014. Expression of histone H3 lysine 4 methylation and its demethylases in the developing mouse testis. *Cell Tissue Res*, 358(3): 875-883.

# 泛素-蛋白酶体系统与精子 DNA 损伤修复的研究进展

张国巍 蔡鸿财 商学军\*

南方医科大学附属金陵医院/南京军区南京总医院, 南京

**摘 要** 泛素-蛋白酶体系统 (UPS) 是体内广泛存在的一种蛋白酶体系统, 由泛素 (Ub)、泛素激活酶 (E1)、泛素结合酶 (E2)、泛素连接酶 (E3)、26S 蛋白酶体和去泛素化酶 (DUB) 组成, 能够调控体内蛋白质降解。研究发现 UPS 除了具有降解蛋白质的功能以外, 还参与细胞周期调控、免疫应答、信号转导及 DNA 损伤修复等过程。精子发生要经历染色体联会、同源重组等过程, 精子 DNA 在这些过程中易受干扰而出现损伤。近年研究显示 UPS 与精子发生中的 DNA 损伤修复有关。UPS 参与 DNA 损伤的修复机制包括: 泛素化调节 DNA 损伤修复相关酶类、协助识别 DNA 损伤位点、募集损伤修复相关蛋白、启动 DNA 损伤修复途径、维持染色体稳定, 从而保证精子发生正常进行。

**关键词** 泛素-蛋白酶体系统, 精子 DNA, 损伤修复, 男性不育

目前, 不育症发病率呈现逐年升高趋势, 全球约有 15% 的育龄夫妇结婚 1 年内不能怀孕而需干预性治疗 (Jungwirth et al., 2013)。环境污染、内分泌紊乱及基因突变等因素都可造成精子发生障碍, 产生异常精子导致不育, 这些因素造成不育的机制非常复杂, 目前尚未明确, 其中精子发生过程中的 DNA 损伤是导致不育的一个重要原因。

相对于其他细胞而言, 精子发生过程具有特异性, 要经历有丝分裂、减数分裂等阶段, DNA 在整个过程中的改变很容易受到干扰, 外界因素易造成精子 DNA 损伤进而导致精子发生障碍。导致精子 DNA 损伤的因素有很多, 主要包括年龄、环境污染物、重金属、致癌物、男性生殖系统疾病或全身性疾病、季节和温度、生活方式等 (陆金春, 2015)。体内存在多种 DNA 调控与修复机制, 泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 作为重要的调控因素之一参与 DNA 修复。

## 1 泛素-蛋白酶体系统

UPS 是细胞中一条重要的蛋白质降解途径, 该系统主要由泛素 (ubiquitin, Ub)、泛素激活酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating

\* 通讯作者: shangxj@androl.cn

enzyme, E2)、泛素连接酶 (ubiquitin-protein ligase, E3)、26S 蛋白酶体和去泛素化酶 (deubiquitinating enzyme, DUB) 组成 (Hou and Yang, 2013)。泛素是由 76 个氨基酸组成的小分子蛋白, 表达高度保守, 广泛存在于真核生物细胞中。人基因编码 2 种 E1、50 多种 E2 以及 1000 多种 E3, 体现出 UPS 的复杂性。DUB 使底物蛋白去泛素化, 使泛素以单体形式游离进入泛素库, 以备再循环利用。

泛素在 E1 催化下, 其 C 端甘氨酸 (Gly) 残基与 E1 半胱氨酸 (Cys) 残基形成高能硫酯键而被激活, 是整个泛素化的开端。接着泛素被转移到 E2, 通过硫酯键与 E2 相连生成 E2-泛素化中间体。E3 最后募集底物蛋白与 E2-泛素化中间体相互作用, 将泛素转移到底物蛋白的赖氨酸 (Lys) 残基上, 使底物蛋白泛素化, 泛素化的底物蛋白被运送到 26S 蛋白酶体进行降解 (Amerik and Hochstrasser, 2004; 倪晓光和赵平, 2006)。UPS 不仅参与蛋白质降解, 还与免疫应答、细胞周期调控、信号转导和 DNA 损伤修复有关 (陈季武等, 2012)。泛素化修饰大致分为: ①单泛素化: 底物蛋白结合单个 Ub 分子, 研究发现单泛素化调控 DNA 的修复 (Sun and Chen, 2004); ②多泛素化: 底物蛋白的多个 Lys 残基同时被单个 Ub 分子结合, 发挥介导蛋白质水解和信号转导的作用 (Komander and Rape, 2012); ③多聚泛素化: 底物蛋白单个 Lys 残基被多个 Ub 分子标记, 其中 Ub 的 K48 位 Lys 残基多聚泛素链标记的底物蛋白被蛋白酶体降解, K63 位 Lys 残基连接的多聚泛素化具有非蛋白降解功能。UPS 在体内不同的细胞内均有启动 DNA 损伤修复的作用, 其中泛素结合酶 RAD6, 泛素连接酶 RNF8、UBR2、RAD18、CUL4A (Cullin4A) 等与精子发生过程中的 DNA 修复有关。

## 2 泛素结合酶 RAD6 与精子 DNA 损伤修复

RAD6 是一种 E2 蛋白, 最早在酵母中发现。小鼠中存在同源基因 *mHR6A* 与 *mHR6B*, 人体内存在同源基因 *hHR6A* 和 *hHR6B*。RAD6 与多种 DNA 损伤修复途径有关, 目前研究较清楚的是酵母中的 RAD6, 酵母中 RAD6 基因突变可导致子代 DNA 链不可修复性的损伤, 同时 DNA 对损伤因子的敏感性增加。RAD6 能够与多种分子相互作用, 调控 DNA 复制过程中的增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 泛素化。在酵母中, RAD6 与 RAD18 相互作用, 使 PCNA-K164 位发生单泛素化, 并利用 DNA 聚合酶 (polymerase  $\eta$  和 polymerase  $\xi$ ), 使损伤的 DNA 进行易错修复, 与 RAD5 介导的无错修复共同作用, 修复损伤 DNA (Hoege et al., 2002)。Jentsch 等 (1987) 体外实验表明, RAD6 能够使组蛋白 H2A 和 H2B 发生泛素化, 该泛素化作用在酵母孢子形成过程中发挥重要作用, 组蛋白是核小体的重要组成部分, RAD6 使核小体组蛋白泛素化改变染色体结构, 有利于 DNA 损伤修复酶类进行损伤修复。Roest 等 (1996) 敲除小鼠 *mHR6B* 基因发现精子形态普遍异常, 小鼠表现为不育, 原因可能是泛素结合过程中存在缺陷, 使 PCNA 依赖性 DNA 损伤修复无法顺利进行。