

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.09.009
文章编号: 1005-8982 (2022) 09-0055-05

综述

MicroRNA与生精障碍的研究进展

孙文文¹, 阿周存²

(大理大学 1.基础医学院, 2.农学与生物科学学院, 云南 大理 671003)

摘要: MicroRNA(miRNA)是一类长度为20~25个核苷酸的内源性非编码RNA,主要在转录后和翻译水平上调控基因表达。许多研究表明,miRNA在生精过程中发挥重要的调控作用,miRNA的异常影响精子形成的多个阶段和不同的细胞类型,导致生精障碍,引起男性不育。现将近年来miRNA在精子发生和生精障碍领域的研究文献作一综述。并介绍miRNA在精子发生中的作用及其与生精障碍的关系,以及miRNA在生精障碍性疾病领域的诊断和治疗潜力。

关键词: 生精障碍; microRNA; 男性不育

中图分类号: R698.2

文献标识码: A

Research progress of microRNA and male spermatogenesis disorder

Wen-wen Sun¹, Zhou-cun A²

(1. School of Basic Medicine, 2. College of Agronomy and Biological Sciences, Dali University, Dali, Yunnan 671003, China)

Abstract: MicroRNA (miRNA) is a type of non-endogenous coding RNA with 20 to 25 nucleotides, which mainly regulates gene expression at post-transcriptional and translation levels. Many studies have shown that miRNA plays an important regulatory role in the process of spermatogenesis. miRNA abnormalities affect multiple stages of sperm formation and different cell types, leading to spermatogenesis disorders, which in turn cause male infertility. This article reviews the recent literature on miRNA in the field of spermatogenesis. To introduce the role of miRNA in spermatogenesis and its relationship with spermatogenesis disorders, as well as the diagnostic and therapeutic potential of microRNA in the field of spermatogenesis disorders.

Keywords: spermatogenesis disorders; microRNA; infertility, male

精子发生是一个严格控制的、多步骤的过程,涉及众多基因的表达调控。相关基因的表达调控异常会引起生精障碍。近年来大量研究表明,miRNA(miRNA)介导的转录后基因表达调控是生精过程中基因表达调控的一种重要方式,对睾丸发育和精子生成至关重要。因此,miRNA在生精障碍中的作用受到人们的关注,成为生精障碍遗传病因学研究的一个新的领域,具有广阔的探索空间。

1 miRNA在生精过程中的调节

miRNA是一类长度为20~25个核苷酸的内源性非编码RNA,参与转录后基因水平的表达调控。其通过与RNA诱导的沉默复合体(miRISC)的结合与靶mRNA的3'-UTRs碱基配对形成双链,造成mRNA碎片化进而抑制靶基因翻译表达。近年来,在人类和哺乳动物研究中发现一些与精子发生相关的miRNA基因。这些miRNA可以调节生精过程中相关靶基因的

收稿日期: 2021-11-28

表达,实现对整个生精过程的调控。见图 1(引自 HE 等^[1])。

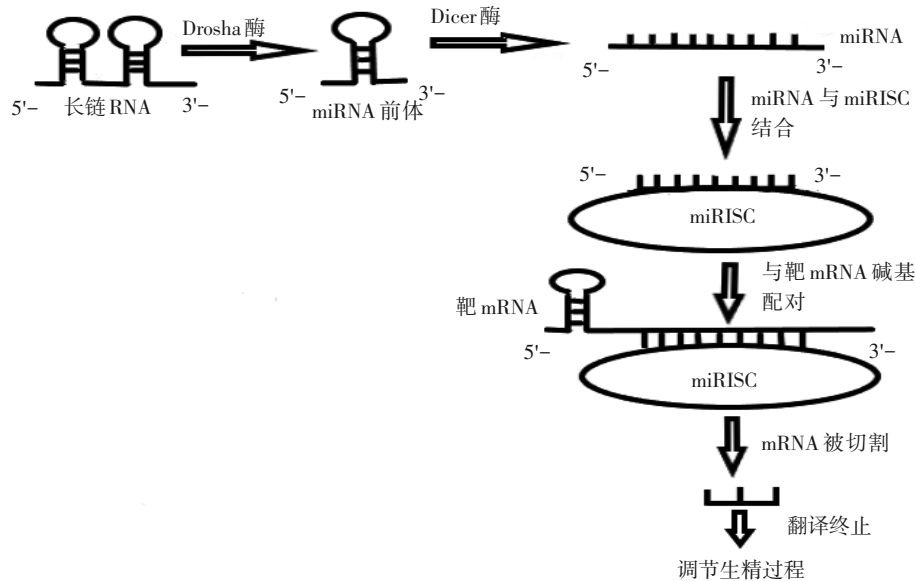


图 1 miRNA 调节生精过程示意图

1.1 miRNA 在精原干细胞自我更新和分化过程中的作用机制

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是睾丸中最原始的精原细胞,其通过自我更新、增殖、分裂等环节最终形成精子细胞^[2]。现在已经发现了几个调节人类 SSCs 细胞的 miRNA 基因,这些 miRNA 能通过靶向特定基因,对 SSCs 增殖和 DNA 的合成起调控作用。其中, *miR-663a* 和 *miR-31-5p* 是比较明确的两个。*miR-663a* 使 *NFIX* 基因沉默,提高 Cyclin A2、Cyclin B1 及 Cyclin E1 细胞周期调节因子的水平,促进人类 SSCs 增殖和分化,同时抑制干细胞早期凋亡^[3]。*miR-31-5p* 具有与 *miR-663a* 相反的作用, *miR-31-5p* 使 *JAZF1* 基因沉默,降低 Cyclin A2 水平,进而降低 SSCs 增殖和 DNA 合成,并促进早期和晚期干细胞凋亡^[4]。

除了在人类 SSCs 中发现与生精相关的 miRNA 外,在动物模型研究中也发现了许多的与 SSCs 细胞调控相关的 miRNA。一些 miRNA 通过影响不同的信号传导通路参与 SSCs 的发育调控。例如, *miR-486*、*miR-322* 及 *miR-224* 分别沉默靶基因 *MMP2*、*RASSF8* 及 *DMRT1*, 激活 WNT/ β -catenin 信号传导通路,参与对 SSCs 自我更新和分化的调控^[5-7]; 而 *miR-19b-3p* 作用于靶基因 *PLZF* 后激活 Jak-Stat 信号传导通路,并通过这一信号通路调控 SSCs 增殖分化过程^[8]。除上述 miRNA 外,还有一些 miRNA 明确的靶基因,并

且都能调控小鼠 SSCs 的自我更新,但其调控过程中具体涉及哪些信号通路仍需进一步研究。如 *miR-31*、*miR-100*、*miR-125a* 等^[9-11]。此外,有研究^[12]报道 *miR-21* 也能促进水牛 SSCs 的分化,但其靶基因和调控机制尚不清楚。

上述在动物 SSCs 发育调控中发挥作用的 miRNA 与人类 SSCs 的关系还有待进一步证实,但有些 miRNA 的发现为阐明人类 SSCs 发育调控相关的 miRNA 提供了有价值的线索。

1.2 miRNA 对减数分裂及减数分裂后的调节

miRNA 在减数分裂和减数分裂后的生精细胞中发挥着重要作用。许多 miRNA 基因序列在 X 染色体上串联重复,形成多个独立、具有选择驱动性的 miRNA 簇,导致哺乳动物 X 染色体 miRNA 基因密度高于常染色体^[13]。在雄性哺乳动物减数分裂粗线期, X 和 Y 染色体转录沉默的过程称为减数分裂性染色体失活。减数分裂性染色体失活在哺乳动物中高度保守,对雄性动物正常生精功能是必须的^[14]。研究表明, X 染色体上的 miRNA (也称为 X 连锁 miRNA) 多基因家族在男性生殖细胞中比其他类型的 miRNA 具有更高的表达水平^[15]。在减数分裂前期,性染色体基因通过减数分裂性染色体失活在精母细胞中发生表观遗传沉默。然而,通过基因重复扩增的 X 连锁 miRNA 家族,却可以避免被减数分裂性染色体失活沉默并继续在精母细

胞和精子细胞中表达。

为了阐明 X 连锁 miRNA 的功能,OTA 等^[16]使用 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑系统敲除小鼠模型中连续位于 X 染色体上的 *miR-741-3p*、*miR-871-3p*、*miR-465a-5p* 基因。虽然小鼠睾丸组织未发现异常,但 *miR-871-3p* 的缺失导致减数分裂在一些生精小管中停止。在培养的小鼠精原干细胞中,如果仅敲除表达最高的 *miR-741-3p*, *miR-465a-5p* 的表达会显著上调并成为含量最丰富的 miRNA,同时 mRNA 的全基因组表达水平保持不变且小鼠的生精过程正常进行。这表明与生精相关的 miRNA 家族成员之间存在功能补偿,并且其靶向标志物之间存在强烈协同进化。

miR-34 家族是第一个被证明为哺乳动物精子产生所必需的 X 连锁 miRNA。缺乏 *miR-34* 家族成员的小鼠的减数分裂不能正常进行且精子出现缺陷^[17]。*miR-29* 簇也被证明在生殖细胞减数分裂期对 mRNA 靶标进行抑制,不过其靶 mRNA 与 *miR-34* 簇的靶 mRNA 有很大不同^[18]。*miR-449* 和 *miR-34* 簇的沉默模式相似,能够靶向多个共同 mRNA。虽然 *miR-34* 或 *miR-449* 簇的缺失在雄性生殖细胞发育中都没有表现出明显的缺陷,但同时敲除这两个基因会导致小鼠减数分裂异常,引起生精障碍^[19]。这说明 *miR-34* 和 *miR-449* 簇之间存在功能冗余,两者在雄性生精过程中不可或缺。

精子发生过程中所必需的过渡蛋白(TNP)和鱼精蛋白(PRM)在减数分裂特定阶段受到 miRNA 转录后调控。*miR-469* 簇以 *TNP2* 和 *PRM2* 为靶点在减数分裂起始阶段高表达,抑制粗线期精母细胞和圆形精细胞中 TNP 和 PRM 蛋白的表达,使圆形精细胞生长停滞^[20]。*miR-122a* 能降解 *TNP2* 转录物,其过度表达使圆形精细胞发生凋亡,进而影响精子成熟^[21]。此外, *RAD51* 和 *HSF2* 基因也是减数分裂进程中的两个重要基因,这两个基因分别是 *miR-10a* 和 *miR-18* 的靶向标志物。*miR-10a* 和 *miR-18* 的异常将导致上述这两个靶基因表达水平改变,最终影响男性精子正常成熟^[22-23]。

2 miRNA 与生精障碍的关系

由于 miRNA 在精子发生过程中具有重要作用,是精子生成所必需的,因此, miRNA 在男性生精

障碍病因学中具有极大研究价值。目前,对 miRNA 与生精障碍的关系已有了一些的研究和认识,主要集中在表达谱分析和作为特异性标志物的可行性等方面。

2.1 miRNA 的表达谱研究

近年来,研究不育症患者睾丸组织或精子中 miRNA 的表达谱成为了解 miRNA 在生精障碍中作用的重要方式和手段^[24]。例如,在睾丸组织中发现梗阻性无精子症患者与非梗阻性无精子症患者之间精原细胞、粗线期精母细胞和圆形精子具有 miRNA 的独特表达谱。相应地,在患者的这 3 种细胞中也发现一些 miRNA 表达水平改变:精原细胞中有 9 种 miRNA 表达水平异常;粗线期精母细胞中有 11 种 miRNA 的表达水平异常;圆形精子细胞有 10 种 miRNA 表达水平异常^[25]。分析这些 miRNA 的差异性表达为进一步阐明生精障碍相关的 miRNA 提供了重要线索。表达谱的研究不只限于睾丸组织,在精液中也发现 miRNA 表达谱的变化。例如,采用高通量测序技术分析弱精子症病例和健康男性精液中的 miRNA 图谱,对比发现弱精子症男性中有 18 种 miRNA 的表达水平发生改变^[26]。提示这些 miRNA 的改变可能与弱精子症的发病有关。由于精液标本相对睾丸组织标本更容易获取,生精障碍患者精液的 miRNA 表达谱的研究为寻找生精障碍相关 miRNA 提供了便利。

此外,隐睾症引起的生精障碍也是男性不育的重要原因之一,但 miRNA 与该疾病的关系目前尚不明确。miRNA 表达谱的研究为了解两者的关系提供了新的探索思路。例如,分析隐睾症患者睾丸组织的 miRNA 表达谱,发现 *miR-299-5p*、*miR-206*、*miR-135a* 等多个 miRNA 高表达,提示相关 miRNA 的表达异常可能与隐睾症发病有关。

总之,对生精障碍患者睾丸组织或精子细胞的 miRNA 表达谱的分析为生精障碍遗传病因学研究开辟了一个新的领域。

2.2 miRNA 为生精障碍诊断的生物标志物

精液中的常规生化标志物,如酸性磷酸酶、柠檬酸、锌、果糖和 α -葡萄糖苷酶,可用于诊断梗阻性生精障碍和生殖腺的功能异常。而现在对于非梗阻性生精障碍引起的不育症却缺乏用于临床检验的特异性生物标志物,因此,探索具有诊

断和预测功能的非侵入分子性标志物显得尤为重要。miRNA 以非常稳定的形式存在于体液中, 且具有组织特异性表达谱、序列保守性、检测扩增简单等优点^[27]。这些有利条件使其成为研究男性不育症病因非侵入性生物标志物的理想候选者。

目前, 已经有一些 miRNA 被证实可作为潜在的生物标志物用于临床。例如, *miR-34b* 和 *miR-122* 与其他常规检测相结合可以提高不同形式非梗阻性无精子症的诊断准确性; 多变量回归分析证明 *miR-10b-3p* 和 *miR-34b-5p* 相较其他检测标志物在非梗阻性无精子症中具有更高的表达水平, 两者联合使用诊断效能更高^[28]。*miR-19b* 和 *LET-7a* 基因在少精子症不育患者中的表达水平明显高于正常个体。因此, *miR-19b* 和 *LET-7a* 被认为是诊断少精子症的良好分子生物标志物^[29]。从目前的研究情况来看, miRNA 作为生物标志物在诊断生精障碍性疾病方面有很大的潜能, 但其应用于临床的条件还不完全成熟, 还需要进一步的研究、筛选并优化。

2.3 miRNA 的 SNP 与生精障碍的关系

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 是人类基因组中最丰富的 DNA 变异形式, 研究表明 miRNA 的 SNP 与多种疾病的发生有关。miRNA 基因中的 SNP 可通过影响前体 miRNA 的转录、前体 miRNA 的加工及 miRNA 与 mRNA 的结合调节靶基因的表达, 进而参与疾病发生^[30]。因此, 分析生精相关的 miRNA 的 SNP 也成为了解 miRNA 与生精障碍性疾病的关系的重要方法。许多研究证明, 一些 miRNA 的 SNP 与生精障碍有关。通过生物信息学分析、病例对照研究和双荧光素酶报告分析, 发现 *miR-1302* 基因 SNP 位点 rs6631 会增加生精障碍的风险^[31]。与 *MTHFR* 基因 3'-UTR 结合的 *miR-34b* 的 SNP 位点 rs55763075 和 *miR-196a-2* 的 SNPs 位点 rs11614913 分别被证实是无精子症的危险因素^[32-33]。最近, 又发现 *miR-34b/c* 基因的 SNP 位点 rs4938723 的多态性与少精症相关, 且 SNP rs4938723 的 CC 基因型可能增加少精症的发病风险^[34]。该研究结果为进一步阐明 miRNA 在人类生精障碍中的作用提供有价值的资料。

由于生精相关的 miRNA 的 SNP 可能影响 miRNA 的功能, 引起生精过程相关靶基因表达调

控出现异常, 进而影响正常生精过程导致生精障碍。因此, miRNA 的 SNP 也被认为是生精障碍临床诊断的候选生物标志物。研究鉴定生精障碍相关的 miRNA 的 SNP 对生精障碍的临床诊断具有重要意义。

3 miRNA 在生精障碍领域的展望

miRNA 对精子发生中的基因调控是男性不育症病因学研究的重大突破之一, 意味着找到了除蛋白质之外的重要调控因子。miRNA 在不同生精阶段和不同类型生精障碍性疾病的差异性表达使其具有极高的特异性和敏感性, 在未来男性生精障碍性疾病的分子机制研究和临床诊断与治疗上具有很大的发展空间, 有望取得突破性的研究成果。

参考文献:

- [1] HE Z P, KOKKINAKI M, PANT D, et al. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis[J]. *Reproduction*, 2009, 137(6): 901-911.
- [2] KUBOTA H, BRINSTER R L. Spermatogonial stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(1): 52-74.
- [3] ZHOU F, YUAN Q Q, ZHANG W H, et al. MiR-663a Stimulates proliferation and suppresses early apoptosis of human spermatogonial stem cells by targeting NFIX and regulating cell cycle[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12: 319-336.
- [4] FU H Y, ZHOU F, YUAN Q Q, et al. miRNA-31-5p mediates the proliferation and apoptosis of human spermatogonial stem cells via targeting JAZF1 and cyclin A2[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 90-100.
- [5] LIU S S, MAGUIRE E M, BAI Y S, et al. A novel regulatory axis, CHD1L-MicroRNA 486-matrix metalloproteinase 2, controls spermatogonial stem cell properties[J]. *Mol Cell Biol*, 2019, 39(4): e00357.
- [6] WANG Y J, LI X Y, GONG X W, et al. MicroRNA-322 regulates self-renewal of mouse spermatogonial stem cells through Rassf8[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(4): 857-869.
- [7] CUI N, HAO G M, ZHAO Z M, et al. MicroRNA-224 regulates self-renewal of mouse spermatogonial stem cells via targeting DMRT1[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(8): 1503-1512.
- [8] CLOTAIRE D Z J, DU X M, WEI Y D, et al. miR-19b-3p integrates Jak-Stat signaling pathway through Plzf to regulate self-renewal in dairy goat male germline stem cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 105: 104-114.
- [9] WANG Y J, ZUO Q S, BI Y L, et al. miR-31 regulates spermatogonial stem cells meiosis via targeting Stra8[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(12): 4844-4853.

- [10] MOHAMMADZADEH E, MIRZAPOUR T, NOWROOZI M R, et al. Differentiation of spermatogonial stem cells by soft agar three-dimensional culture system[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1772-1781.
- [11] 梅星星, 李小勇, 吴际. 一组 miRNAs 在睾丸发育中的表达及 miR-125a 对精原干细胞发育的调节作用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(5): 625-630.
- [12] HE Z P, JIANG J J, KOKKINAKI M, et al. MiRNA-20 and miRNA-106a regulate spermatogonial stem cell renewal at the post-transcriptional level via targeting STAT3 and Ccnd1[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(10): 2205-2217.
- [13] SONG R, RO S, MICHAELS J D, et al. Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(4): 488-493.
- [14] VERNET N, MAHADEVIAH S K, de ROOIJ D G, et al. Zfy genes are required for efficient meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) in spermatocytes[J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(24): 5300-5310.
- [15] ZHANG F J, ZHANG Y, LV X L et al. Evolution of an X-Linked miRNA family predominantly expressed in mammalian male germ cells[J]. *Mol Biol Evol*, 2019, 36(4): 663-678.
- [16] OTA H, ITO-MATSUOKA Y, MATSUI Y. Identification of the X-linked germ cell specific miRNAs (XmiRs) and their functions[J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0211739.
- [17] COMAZZETTO S, DI GIACOMO M, RASMUSSEN K D, et al. Oligoasthenoteratozoospermia and infertility in mice deficient for miR-34b/c and miR-449 loci[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(10): e1004597.
- [18] HILZ S, FOGARTY E A, MODZELEWSKI A J, et al. Transcriptome profiling of the developing male germ line identifies the miR-29 family as a global regulator during meiosis[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(2): 219-235.
- [19] YUAN S Q, LIU Y, PENG H Y, et al. Motile cilia of the male reproductive system require miR-34/miR-449 for development and function to generate luminal turbulence[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(9): 3584-3593.
- [20] DAI L S, TSAI-MORRIS C H, SATO H, et al. Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25) -null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: implications of its role in germ cell development[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(52): 44306-44318.
- [21] FATEMI N, SANATI M H, SHAMSARA M, et al. TBHP-induced oxidative stress alters microRNAs expression in mouse testis[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(10): 1287-1293.
- [22] GAO H H, WEN H, CAO C C, et al. Overexpression of MicroRNA-10a in germ cells causes male infertility by targeting rad51 in mouse and human[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 765.
- [23] BJÖRK J K, SANDQVIST A, ELSING A N, et al. miR-18, a member of oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis[J]. *Development*, 2010, 137(19): 3177-3184.
- [24] PANGANIBAN R P, WANG Y L, HOWRYLAK J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(5): 1423-1432.
- [25] YAO C C, YUAN Q Q, NIU M H, et al. Distinct expression profiles and novel targets of MicroRNAs in human spermatogonia, pachytene spermatocytes, and round spermatids between OA patients and NOA patients[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9: 182-194.
- [26] HEIDARY Z, ZAKI-DIZAJI M, SALIMINEJAD K, et al. MicroRNA profiling in spermatozoa of men with unexplained asthenozoospermia[J]. *Andrologia*, 2019, 51(6): e13284.
- [27] KHAZAIE Y, NASR ESFAHANI M H. MicroRNA and male infertility: a potential for diagnosis[J]. *Int J Fertil Steril*, 2014, 8(2): 113-118.
- [28] ZHANG H T, ZHANG Z, HONG K, et al. Altered microRNA profiles of testicular biopsies from patients with nonobstructive azoospermia[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2020, 22(1): 100-105.
- [29] ABU-HALIMA M, HAMMADEH M, BACKES C, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility[J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(4): 989-997.
- [30] RYAN B M, ROBLES A I, HARRIS C C. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(6): 389-402.
- [31] ZHANG H, LIU Y Q, SU D, et al. A single nucleotide polymorphism in a miR-1302 binding site in CGA increases the risk of idiopathic male infertility[J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(1): 34-39.
- [32] ZHANG W, LIN W Q, CAO H F, et al. Association of a miR-34b binding site single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the methylenetetrahydrofolate reductase gene with susceptibility to male infertility[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 196-204.
- [33] LU J, GU H, TANG Q Q, et al. Common SNP in hsa-miR-196a-2 increases hsa-miR-196a-5p expression and predisposes to idiopathic male infertility in Chinese Han population[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19825.
- [34] KE H L, SUN W W, YU C H, et al. Associations of common single nucleotide polymorphisms in miR-34b/c and miR-499 with male infertility caused by oligospermia or azoospermia in the Chinese population[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2020, 24(6): 359-363.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 孙文文, 阿周存. MicroRNA 与生精障碍的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(9): 55-59.

Cite this article as: SUN W W, A Z C. Research progress of microRNA and male spermatogenesis disorder[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(9): 55-59.