

DOI: 10.13376/j.cblls/2017076

文章编号: 1004-0374(2017)06-0562-07

# 调控精子成熟和功能的生殖道胞外囊泡研究进展

李坤<sup>1\*</sup>, 倪崖<sup>2\*</sup>

(1 浙江省医学科学院生殖生理实验室, 杭州 310013; 2 浙江省医学科学院生殖医学中心, 杭州 310013)

**摘要:** 哺乳动物精子从发生到具备受精能力到达受精部位是一个漫长的过程。在此过程的不同环境中存在可调控精子成熟和功能的胞外囊泡, 这些胞外囊泡包括来自雄性生殖道内的附睾小体和前列腺小体, 以及来自雌性生殖道内的阴道小体、输卵管小体及子宫小体。现介绍胞外囊泡的概况、生殖道内的胞外囊泡特征、精子摄取胞外囊泡的可能机制以及生殖道胞外囊泡研究的未来展望, 以期更好地理解在受精过程中精子功能如何受胞外囊泡调控, 为男性不育诊治提供线索。

**关键词:** 胞外囊泡; 外泌体; 附睾小体; 前列腺小体; 输卵管小体; 子宫小体; 阴道小体; 精子

**中图分类号:** Q954.44      **文献标志码:** A

## Progress in the extracellular vesicles regulating maturation and functions of sperm in the reproductive tracts

LI Kun<sup>1\*</sup>, NI Ya<sup>2\*</sup>

(1 Department of Reproductive Physiology, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

2 Center for Reproductive Medicine, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

**Abstract:** Mammalian sperm undergo a long journey from the spermatogenesis to fertilization at the suitable site. Through the passage, the maturation and functions of sperm are synchronized by communicating with different extracellular vesicles including epididymosomes and prostasomes in male reproductive tracts as well as oviductosomes, uterosomes and vaginosomes in female reproductive tracts. In this review, the summary of extracellular vesicles, the features of extracellular vesicles in reproductive tracts, the underlying mechanism of sperm uptake and the future of researches on the extracellular vesicles in reproductive tracts will be described. This article will gain insight into how sperm maturation and functions are regulated by extracellular vesicles in reproductive tracts and provide the potential clues for the diagnosis and treatment of male infertility.

**Key words:** extracellular vesicles; exosomes; epididymosomes; prostasomes, oviductosomes; uterosomes; vaginosomes; sperm

哺乳动物精子从发生开始到达受精部位, 在雄性及雌性生殖道均会经历一段漫长的旅程: 精子从睾丸发生经历附睾头到附睾尾, 逐步获得运动能力并向前游动, 通过输精管射出雄性体外, 经过雌性生殖道阴道、子宫及输卵管最终到达受精部位, 在此过程中精子发生一系列变化而获能, 包括质膜胆固醇外流、胞内钙浓度升高、蛋白酪氨酸磷酸化增强、运动呈超激活状态等<sup>[1]</sup>, 从而进一步促使精子发生顶体反应<sup>[2]</sup>, 促进其与卵子识别、结合、融合进而受精。在此过程中, 精子高度依赖其周围环境,

持续发育、被保护存活且不断完善自身功能, 防止过早成熟“老化”, 以保证恰好在到达受精部位时

收稿日期: 2017-04-19; 修回日期: 2017-05-17

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY14H040012); 浙江省科技计划公益技术研究社会发展项目(2013C31066); 国家留学基金委公派高级研究学者和访问学者项目(201508330004); 国家自然科学基金项目(81000244, 81571426)

\*通信作者: E-mail: likun\_email@126.com(李坤); niya99@126.com(倪崖)

具有受精能力<sup>[3]</sup>。精子胞质量少, 缺乏一些体细胞所具有的清除酶和细胞器, 同时, 伴有基因组转录沉默, 因而其所处的环境对于其受精调控具有极其重要的意义。而精子所处的雄性和雌性生殖道环境存在膜囊泡、外泌体和微泡等胞外囊泡, 可与精子发生相互作用, 并参与精子成熟和功能调节。本文将综述影响精子成熟和功能的生殖道内胞外囊泡特征及其可能作用机制。

## 1 胞外囊泡的概述

胞外囊泡是由真核细胞和原核细胞产生的具有膜结合特征的磷脂双层结构, 可携带并传递各种调节分子, 如蛋白质、微小 RNA (microRNA, miRNA)、mRNA 和脂质等<sup>[4]</sup>, 它们可作为信息交流的一种模式, 向靶细胞提供各种调节分子<sup>[5]</sup>。胞外囊泡根据直径大小可分为外泌体 (exosomes) 和微泡 (microvesicles), 30~100 nm 称为外泌体, 100 nm~1 μm 为微泡。此外, 在生殖系统中还存在两种其他类型的胞外囊泡: 细胞凋亡释放的凋亡小体 (1~5 μm) 以及从胎盘表面合体滋养层释放的合体核聚集体 (20~500 nm)<sup>[6]</sup>。胞外囊泡还可根据所在部位不同而被命名为小体 (-some), 如存在于生殖道内的附睾、前列腺、阴道、子宫及输卵管中的胞外囊泡可分别称为附睾小体 (epididymosome)、前列腺小体 (prostasome)、阴道小体 (vagosome)、子宫小体 (uterosome) 和输卵管小体 (oviductosome)。胞外囊泡可通过膜定位和生化标志物进行鉴定, 其膜定位于细胞质内侧, 标志

物最常见的包括分化抗原 (cluster of differentiation, CD) 9、CD63 和 CD81 等四次跨膜蛋白黏附分子 (tetraspanin), 以及热休克蛋白 70 (heat shock cognate protein 70, HSC70)、糖磷脂酰肌醇锚定蛋白、质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶 4 (plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 4, PMCA4) (如图 1 所示); 还包括多种其他蛋白质、mRNA、miRNA、其他非编码 RNA 和脂类, 其中一些物质参与细胞的重要信号通路。具体信息可登录外泌体数据库 (ExoCarta) 查询, 该数据库目前 (2017 年 5 月 9 日) 共收录蛋白质条目 41 850 条, mRNA 条目 4 945 条, 脂类条目 1 116 条, miRNA 信息 2 838 种。目前尚未发现可以区别外泌体与微泡的特定标志物<sup>[7]</sup>。

胞外囊泡的形成途径有顶浆分泌和多泡小体两种途径。顶浆分泌通路是指微泡从膜顶侧突出形成, 这些微泡由芽状的小泡最终分离并释放入管腔<sup>[8]</sup>。质膜的这种直接出芽受细胞内钙离子浓度升高刺激触发, 这种途径是微泡形成的途径; 多泡小体 (multivesicular body, MVB) 途径是由细胞发挥内吞作用的核内体 (endosome) 形成, 核内体膜向核内体内部不断出芽形成的多个囊泡即外泌体。此时, 包绕有外泌体的核内体即多泡小体, 当多泡小体外膜与细胞的顶膜靠近融合时, 就会导致多泡小体内容物外泌体通过胞吐作用释放, 该途径被认为是产生外泌体的主要途径<sup>[6]</sup>。胞外囊泡与释放它们的细胞具有相同的成分<sup>[9]</sup>, 但比例会发生变化<sup>[10]</sup>。胞外囊泡常分泌于组织管腔液 (luminal fluid) 中, 因此,

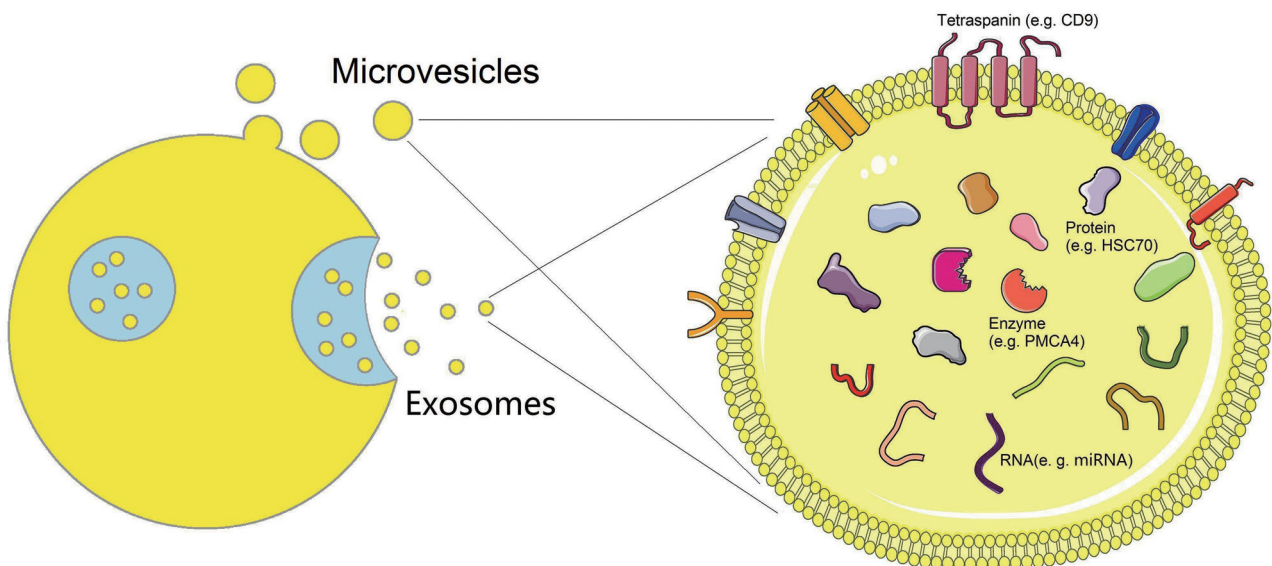


图1 胞外囊泡的形成及结构示意图

有些研究可能用除去细胞的管腔液来反映胞外囊泡的情况。

## 2 影响精子成熟及功能的胞外囊泡

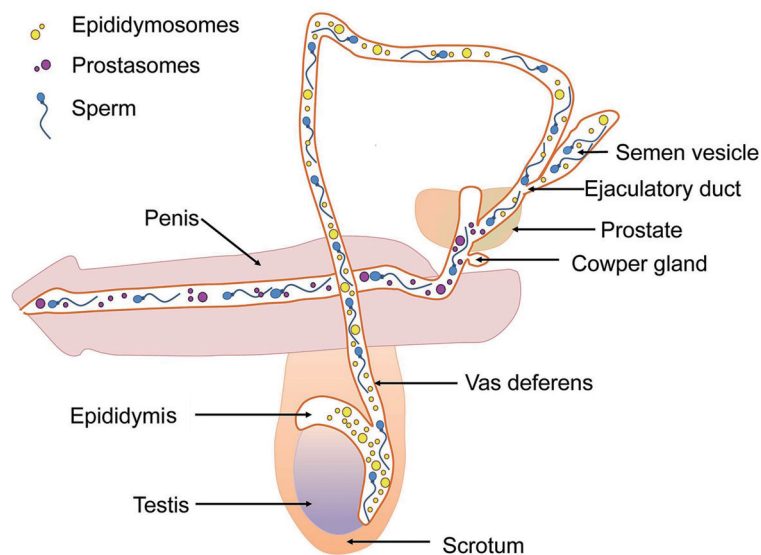
哺乳动物精子离开睾丸后虽然形态完全形成,但尚未成熟,并未获得受精能力。在到达受精部位过程中,精子将进一步受到雄性生殖道的附睾小体、前列腺小体(如图2所示),雌性生殖道内的阴道小体、子宫小体和输卵管小体等胞外囊泡的信号刺激和功能调节。附睾腔液中的附睾小体和精液中的前列腺小体中存在许多种蛋白质,可促进精子成熟并在生育过程中起重要调节作用<sup>[11-12]</sup>,顶浆分泌途径参与前列腺、凝固腺、精囊、附睾和输精管等男性生殖道胞外囊泡产生<sup>[8]</sup>,其中上皮细胞膜的出泡是激素依赖性<sup>[11,13]</sup>。雌性生殖道胞外囊泡被证明存在于阴道、子宫和输卵管三个区域的腔液中(如图3所示),可以通过腔液冲洗获得,同时也可从其上皮细胞系的培养基获得。

### 2.1 附睾小体

附睾具有运输精子、精子成熟和精子储存功能,可分为头部、体部和尾部三个部分。精子能成熟与附睾每个部位的微环境必不可分,微环境中存在附睾小体,其外观呈现为大小不均的球状,直径范围约50~250 nm,携带丰富的蛋白质、miRNA和mRNA,调节精子成熟与功能。附睾小体由附睾上皮细胞中的主细胞分泌<sup>[13-14]</sup>。附睾小体首次在仓鼠

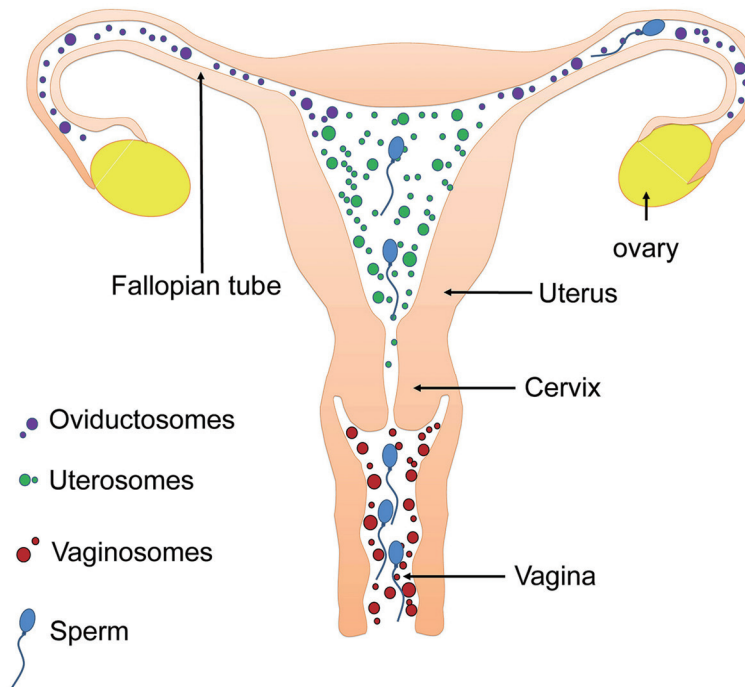
中被发现证明,后来在老鼠、大鼠、牛、绵羊和人等物种中均有报道<sup>[3]</sup>。

附睾小体可携带多种具有生物学功能的蛋白质。蛋白质组学研究发现,人附睾小体中的蛋白质相对分子质量大且具有不同功能类别,包括酶、黏附分子、转运和信号传递蛋白质<sup>[15]</sup>;牛附睾头部和尾部的附睾小体所携带的脂类和蛋白质数量及类型均不同<sup>[16]</sup>。牛附睾尾部检测到555种脂类,与头部不同的接近60%,而尾部检测到438种蛋白质,与头部不同的接近50%;头部附睾小体具有聚糖修饰酶特征,其中头部和尾部共有蛋白质主要是参与囊泡运输和膜融合的小鸟苷三磷酸酶Rab亚类(Rab subclass of small GTPase)和可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子连接蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor, SNARE)蛋白亚类<sup>[16]</sup>。附睾小体内的蛋白质对精子有多方面的生物学作用<sup>[4,17]</sup>:(1)参与活力和受精能力获得、防止活性氧损伤,如醛酮还原酶家族1成员B1(aldo-keto reductase family 1, member B1, AKR1B1)、磷脂酰乙醇胺结合蛋白1(phosphatidylethanolamine binding protein 1, PEBP1)、巨噬细胞移动抑制因子、多元醇通路酶、5型谷胱甘肽过氧化物酶、泛素和精子黏附分子-1(sperm adhesion molecule 1, SPAM1)等;(2)参与精子成熟和受精,如巨噬细胞移动抑制因子和促进精子活力的多元醇途径酶;(3)防止过早顶体反应,如与泛素一起保护精子避免氧化



semen vesicle, 精囊; vas deferens, 输精管; scrotum, 阴囊; testis, 睾丸; epididymis, 附睾; penis, 阴茎; cowper gland, 尿道球腺; prostate, 前列腺; ejaculatory duct, 射精管; prostatosomes, 前列腺小体; epididymosomes, 附睾小体; sperm, 精子。

图2 男性生殖道内的胞外囊泡



vagina, 阴道; cervix, 宫颈; uterus, 子宫; fallopian tube, 输卵管; ovary, 卵巢; vaginosomes, 阴道小体; uterosomes, 子宫小体; oviductosomes, 输卵管小体; sperm, 精子。

图3 女性生殖道内的胞外囊泡

应激的 5 型谷胱甘肽过氧化物酶 (type 5 glutathione peroxidase, GPX5); (4) 调节精子状态, 如附睾尾部可使精子在运输过程中保持静止状态的 AKR1B1 和 PEBP1; (5) 促进精子穿透围绕卵母细胞的卵丘细胞层、参与精子黏附透明带, 如透明质酸酶 SPAM1/PH20; (6) 促进精子结合透明带, 如人类二羧基木糖还原酶 (dicarbonyl/L-xylulose reductase) P25b/P26; (7) 调节钙离子浓度, 如 PMCA4。

胞外囊泡具有运送 miRNA 的能力<sup>[18-19]</sup>。牛附睾管腔液中的附睾小体 miRNA 集合以特异的方式释放在不同区域, 不同区域的附睾小体可携带不同 miRNA, 一些 miRNA 可同时富集在头部和尾部, 而另一些则是差异表达的。如 miR-449 在头部和尾部附睾小体均表达, miR-145、miR-143、miR-214 和 miR-199 在头部富集, 而 miR-654、miR-1224 和 miR-395 在尾部表达更丰富。不同 miRNA 参与头部、体部和尾部不同区域的通信<sup>[19]</sup>。此外, 人类附睾小体也存在 miRNA 运输的间接证据<sup>[20]</sup>。最近研究表明, 小鼠附睾小体携带与精子成熟度吻合的 RNA, 可以在体外运送 RNA 到未成熟的精子。tRNA-glycine-GCC 片段被递送到睾丸成熟的精子后, 该片段可抑制胚胎干细胞和胚胎中与内源性逆转录因子 MERVL 相关联的基因<sup>[21]</sup>。

## 2.2 前列腺小体

精浆含有来自前列腺上皮细胞的前列腺小体以及附性腺和输精管上皮细胞来源的胞外囊泡。前列腺小体在 1978 年首次在精浆中检测到, 也是第一个被确定的生殖道胞外囊泡<sup>[22]</sup>, 它存在于所有已研究的哺乳动物体内。与附睾小体类似, 前列腺小体 30~500 nm, 包括外泌体和微泡<sup>[23]</sup>, 被薄片状的脂蛋白双层环绕<sup>[24]</sup>。通常情况下, 前列腺小体可与精子结合融合, 对生育有刺激作用<sup>[25]</sup>, 可刺激获能早期活动, 而同时抑制获能后期事件和自发顶体反应<sup>[26]</sup>。

蛋白质组学分析显示, 人前列腺小体与附睾小体的蛋白种类不同<sup>[15]</sup>, 总共有 400 多种不同蛋白, 其中约 1/3 种类的蛋白功能已报道, 具有抗微生物、抗氧化和免疫调节等不同功能的蛋白, 包括前列腺特异性蛋白、前列腺干细胞抗原、结构蛋白、信号转导蛋白和鸟苷三磷酸蛋白等<sup>[27]</sup>。

前列腺小体含有脂类并具有鲜明的特征: 高比率的胆固醇/磷脂, 其与膜硬度相关<sup>[28]</sup>; 高比例的鞘磷脂, 约占总磷脂的 50%, 与体细胞以磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱成分为主不同; 高比例的硬脂酸、棕榈酸或油酸<sup>[29]</sup>。根据脂质成分中的鞘磷脂和己糖神经酰胺比例, 前列腺小体大致分为两个亚群: 较大的前列腺小体中有更丰富的鞘磷脂, 而较小的有

更丰富的己糖神经酰胺<sup>[30]</sup>。前列腺小体可向精子运送鞘磷脂、胆固醇和饱和糖磷脂等物质以降低其膜的流动性,防止过早或自发的顶体反应和过早获能<sup>[26]</sup>;前列腺小体还抑制和刺激顶体反应和活力,但是依赖于环境条件<sup>[31]</sup>;在体外培养中微酸性pH值时,人精子能融合前列腺小体,导致精子细胞膜的流动性下降<sup>[28]</sup>。

### 2.3 子宫小体

子宫小体是第一个被证明的雌性生殖道胞外囊泡,2008年首次被报道存在于小鼠子宫腔液中<sup>[32]</sup>。子宫小体分散在宫腔液中,可以通过子宫冲洗获得,同时也可从其上皮细胞系的培养基获得<sup>[33]</sup>。

子宫小体同样包括微泡和外泌体两种类型,可收集子宫管腔液通过超速离心分离而来,对于非妊娠小鼠的子宫小体需要用雌激素诱导发情后获得<sup>[32,34-35]</sup>,子宫小体携带的物质可受雌激素调节,如PMCA4<sup>[35]</sup>。顶浆分泌途径可能参与子宫小体的形成,因为子宫小体的生化标志物CD9和CD63已在子宫内膜上皮细胞的顶面被确定<sup>[33,35]</sup>。

子宫小体携带多种功能蛋白。用质谱研究不同月经周期的母羊子宫小体发现,被鉴定的蛋白质没有经典分泌中所需的信号肽或者仅是胞内蛋白质<sup>[36]</sup>,这些蛋白质成分可能对精子功能存在重要影响。研究结果显示,子宫小体携带对精子功能非常重要的跨膜蛋白和糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)连接蛋白,如SPAM1<sup>[32,37-38]</sup>。SPAM1在精子调节功能方面具有多种作用,参与精子成熟过程即获能,可增强精子透明质酸结合能力和卵丘渗透效率,增加受精能力<sup>[37]</sup>。已证明子宫小体SPAM1可被共孵育的附睾尾部精子获得<sup>[39]</sup>。因此,有人提出,子宫小体输送的SPAM1可以帮助稳定精子在胆固醇外流时的精子膜<sup>[32]</sup>。像附睾小体和前列腺小体一样,子宫小体能够递送PMCA4到精子表面,调节精子的钙动态平衡<sup>[32,40]</sup>。子宫小体还被精子摄取影响其酪氨酸磷酸化并促进其受精能力<sup>[41]</sup>。

子宫小体也携带miRNA等RNA核酸信息物质。对培养的人子宫内膜上皮细胞ECC1细胞系及其胞外囊泡miRNA分析发现,胞外囊泡的miRNA可被转移到邻近细胞。绵羊子宫液胞外囊泡被发现具有特定的miRNA及其他形式RNA,怀孕和未怀孕期间的子宫小体存在显著差异<sup>[36]</sup>。

### 2.4 输卵管小体

目前有关输卵管小体的研究报道主要集中在牛和小鼠两个物种。牛输卵管小体的获得有两种途径,

一种是从体内的输卵管腔液中收集;另一种也可在体外的条件培养基中收集。两种途径获得的输卵管小体的大小分布与小鼠输卵管小体的大小分布相似,但从腔液中获得的输卵管小体与体外培养基中收集的有差别。从输卵管小体大小来看,体外培养基获得的主要是微泡。从输卵管小体所携带的蛋白质种类来看,只有体内腔液中获得的才表达输卵管特异的糖蛋白<sup>[42]</sup>,而输卵管特异的糖蛋白是一种参与受精的透明带相关蛋白,有卵子受精前硬化透明带的作用,以减少其多精受精<sup>[43]</sup>,因此,输卵管小体可影响双方的配子。有证据显示,从牛输卵管上皮细胞的条件培养基中分离的输卵管小体还可改善胚胎质量,并在体外培养中诱导冷冻保护<sup>[44]</sup>。目前已证明输卵管小体中存在SPAM1<sup>[45]</sup>、CD9和PMCA4<sup>[35]</sup>,但目前从输卵管小体中所获得的蛋白质信息还是有限的<sup>[42,46]</sup>,仍需进一步深入研究。

### 2.5 阴道小体

阴道小体存在微泡和外泌体两种形式,并存在于阴道管腔液中,此处也是雌性生殖道内PMCA4表达水平最低的部位<sup>[35]</sup>。由于人类和小鼠一样,在受精过程中精子储存在阴道,因此,很可能精子会受到阴道中的胞外囊泡影响<sup>[47]</sup>,因此,这将推动人们进行这方面的研究。

## 3 精子摄取胞外囊泡的机制

已有实验证明,体细胞通过内吞作用和融合机制从胞外囊泡摄取运送的物质。然而精子没有胞吞作用<sup>[49]</sup>,前列腺小体、附睾小体和输卵管小体等胞外囊泡通过膜融合机制被精子摄取。最近采用三维超分辨率结构照明显微镜检测到输卵管小体—精子膜相互作用的融合<sup>[50]</sup>。利用亲脂性染料标记输卵管小体,发现可以通过阻断整合素配体的相互作用而抑制输卵管小体运送PMCA4蛋白的过程,表明整合素(integrin)  $\alpha v \beta 3$ 和 $\alpha 5 \beta 1$ 的受体/配体相互作用促进融合<sup>[50]</sup>。虽然该摄取机制模型产生于输卵管小体研究,但是它可能适用于所有运送物质给精子的生殖道胞外囊泡,从这个模型中收集的信息将有助于在今后研究中将分子成分运送到配子和胚胎的设计策略,从而增加目前辅助生殖技术成功率<sup>[51]</sup>。

精子摄取包括附睾小体、前列腺小体、子宫小体和输卵管小体等生殖道不同部位的胞外囊泡,通过获得胞外囊泡所携带的功能蛋白调节精子自身的成熟和生物学功能。钙离子/钙调蛋白依赖的丝氨酸激酶( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent serine kinase, CASK)/

PMCA4 从输卵管管腔液内递送到附睾尾精子的过程需要充足的子宫小体<sup>[35]</sup>。由此可见, 胞外囊泡可在不同的时间空间运送具有重要调节作用的物质给精子以维持其成熟及所需的功能。也许胞外囊泡像为精子这些作战部队提供物质保障的后勤部队, 在其需要时提供必需的物质供给。

#### 4 胞外囊泡的研究对生殖医学的价值及前景展望

加深对生殖道胞外囊泡的分子组成及其对细胞生理作用的理解, 可为某些不育不孕疾病查找病因和诊治以及改进现行的辅助生殖技术提供有价值的信息, 具有显著的理论意义和实践意义。生殖道胞外囊泡来自于产生它的细胞, 反映细胞生理状态, 因而可利用胞外囊泡所携带的生物标志物来对相关细胞的病变进行诊断。同时, 在病理状态下, 生殖道胞外囊泡自身性质也可能发生一系列变化, 也可通过检测胞外囊泡对不孕不育等疾病进行诊断。胞外囊泡可被细胞摄取, 故可根据细胞的摄取机制设计相应的靶向给药, 从而用于不孕不育的疾病治疗。在辅助生殖技术中, 体外授精过程中培养的胚胎也会分泌胞外囊泡; 由于胞外囊泡携带有 miRNA、mRNA 等遗传物质, 因此可利用分子生物学方法通过胞外囊泡对分泌它的胚胎进行植入前诊断; 这种植入前诊断方法是对胞外囊泡进行操作, 而不需对胚胎进行直接操作, 所以对胚胎来说, 该方法具有非侵入性, 更加安全。目前有关雄性生殖道的胞外囊泡、附睾小体和前列腺小体研究相对较多, 而雌性生殖道的胞外囊泡输卵管小体、子宫小体和阴道小体等研究才刚刚开始, 还有许多科学问题亟待解决, 特别是生殖道不同解剖位置的胞外囊泡有哪些差异, 彼此之间的生物学作用有何不同; 精子在何种情况下才去摄取胞外囊泡, 是被动的还是主动的; 摄取的物质与细胞自身的物质如何协调发挥作用; 摄取的胞外囊泡物质可参与哪些信号通路; 不正常的(如炎症病变)或机体外源的胞外囊泡(如阴道菌群所释放的胞外囊泡)对精子功能调节是否具有致病性等等。因此, 未来应围绕这些问题进一步深入开展研究。

#### [参 考 文 献]

[1] Li K, Xue Y, Chen A, et al. Heat shock protein 90 has roles in intracellular calcium homeostasis, protein tyrosine phosphorylation regulation, and progesterone-responsive

sperm function in human sperm. *PLoS One*, 2014, 9: e115841

[2] Li K, Jin JY, Chen WY, et al. Secretory phospholipase A2 group IID is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis of human spermatozoa. *J Androl*, 2012, 33: 975-83

[3] Martin-DeLeon PA. Extracellular vesicles in the reproductive tracts: roles in sperm maturation and function.[M]// Meyer A. *Exosomes: biogenesis, therapeutic applications, and emerging research*. Hauppauge, New York: Nova publishers, 2016: 79-100

[4] Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update*, 2016, 22: 182-93

[5] Yamashita T, Kamada H, Kanasaki S, et al. Epidermal growth factor receptor localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis. *Pharmazie*, 2013, 68: 969-73

[6] Tannetta D, Dragovic R, Alyahyaei Z, et al. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cell Mol Immunol*, 2014, 11: 548-63

[7] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 569-79

[8] Hermo L, Jacks D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev*, 2002, 63: 394-410

[9] Raimondo F, Morosi L, Chinello C, et al. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics*, 2011, 11: 709-20

[10] Yoon YJ, Kim OY, Gho YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Rep*, 2014, 47: 531-9

[11] Sullivan R. Epididymosomes: Role of extracellular microvesicles in sperm maturation. *Front Biosci: Schol Ed*, 2016, 8: 106-14

[12] Fabiani R, Johansson L, Lundkvist O, et al. Enhanced recruitment of motile spermatozoa by prostasome inclusion in swim-up medium. *Hum Reprod*, 1994, 9: 1485-9

[13] Hermo L, Oko R, Morales CR. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int Rev Cytol*, 1994, 154: 106-89

[14] Sullivan R, Saez F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, 2013, 146: R21-35

[15] Thimon V, Frenette G, Saez F, et al. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum Reprod*, 2008, 23: 1698-707

[16] 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: e475-86

[17] Patel R, Al-Dossary AA, Stabley DL, et al. Plasma

- membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 4 in murine epididymis: secretion of splice variants in the luminal fluid and a role in sperm maturation. *Biol Reprod*, 2013, 89: 6
- [18] Jr. Meckes DG, Raab-Traub N. Microvesicles and viral infection. *J Virol*, 2011, 85: 12844-54
- [19] Belleannee C, Calvo E, Caballero J, et al. Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. *Biol Reprod*, 2013, 89: 30
- [20] Belleannee C, Legare C, Calvo E, et al. microRNA signature is altered in both human epididymis and seminal microvesicles following vasectomy. *Hum Reprod*, 2013, 28: 1455-67
- [21] Sharma U, Conine CC, Shea JM, et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, 2016, 351: 391-6
- [22] Ronquist G, Brody I, Gottfries A, et al. An  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid-part II. *Andrologia*, 1978, 10: 427-33
- [23] Breitbart H, Rubinstein S. Characterization of  $\text{Mg}^{2+}$ - and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in membrane vesicles from ejaculated ram seminal plasma. *Arch Androl*, 1982, 9: 147-57
- [24] Ronquist G, Brody I. The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 822: 203-18
- [25] Aalberts M, Stout TA, Stoorvogel W. Prostrasomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction*, 2014, 147: R1-14
- [26] Pons-Rejraji H, Artonne C, Sion B, et al. Prostrasomes: inhibitors of capacitation and modulators of cellular signalling in human sperm. *Int J Androl*, 2011, 34: 568-80
- [27] Utleg AG, Yi EC, Xie T, et al. Proteomic analysis of human prostrasomes. *Prostate*, 2003, 56: 150-61
- [28] Carlini E, Palmerini CA, Cosmi EV, et al. Fusion of sperm with prostrasomes: effects on membrane fluidity. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 343: 6-12
- [29] Arienti G, Carlini E, Polci A, et al. Fatty acid pattern of human prostrasome lipid. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 358: 391-5
- [30] Brouwers JF, Aalberts M, Jansen JW, et al. Distinct lipid compositions of two types of human prostrasomes. *Proteomics*, 2013, 13: 1660-6
- [31] Palmerini CA, Saccardi C, Carlini E, et al. Fusion of prostrasomes to human spermatozoa stimulates the acrosome reaction. *Fertil Steril*, 2003, 80: 1181-4
- [32] Griffiths GS, Galileo DS, Reese K, et al. 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: 1627-36
- [33] Ng YH, Rome S, Jalabert A, et al. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS One*, 2013, 8: e58502
- [34] Ikawa M, Inoue N, Benham AM, et al. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest*, 2010, 120: 984-94
- [35] 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: e80181
- [36] Burns G, Brooks K, Wildung M, et al. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS One*, 2014, 9: e90913
- [37] Griffiths GS, Miller KA, Galileo DS, et al. Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. *Reproduction*, 2008, 135: 293-301
- [38] Griffiths GS, Galileo DS, Aravindan RG, et al. Clusterin facilitates exchange of glycosyl phosphatidylinositol-linked SPAM1 between reproductive luminal fluids and mouse and human sperm membranes. *Biol Reprod*, 2009, 81: 562-70
- [39] Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol*, 2001, 20: 515-25
- [40] Martin-DeLeon PA. Uterosomes: Exosomal cargo during the estrus cycle and interaction with sperm. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2016, 8: 115-22
- [41] Franchi A, Cubilla M, Guidobaldi HA, et al. Uterosome-like vesicles prompt human sperm fertilizing capability. *Mol Hum Reprod*, 2016, 22: 833-41
- [42] Alminana C. Snooping on a private conversation between the oviduct and gametes/embryos. *Anim Reprod*, 2015, 12: 366-74
- [43] Ghersevich S, Massa E, Zumoffen C. Oviductal secretion and gamete interaction. *Reproduction*, 2015, 149: R1-14
- [44] Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Fernandez-Fuertes B, et al. Extracellular vesicles from BOEC in *in vitro* embryo development and quality. *PLoS One*, 2016, 11: e0148083
- [45] Acuna OS, Vilella I, Canovas S, et al. Detection of SPAM1 in exosomes isolated from the bovine oviductal fluid. *Reprod Dom Anim*, 2015, 49 (Suppl 4): 97-8
- [46] Al-Dossary AA, Martin-Deleon PA. Role of exosomes in the reproductive tract oviductosomes mediate interactions of oviductal secretion with gametes/early embryo. *Front Biosci:Landmark Ed*, 2016, 21: 1278-85
- [47] Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, 2006, 12: 23-37
- [48] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 2013, 200: 373-83
- [49] Oko R, Hermo L, Chan PT, et al. The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *J Cell Biol*, 1993, 123: 809-21
- [50] Al-Dossary AA, Bathala P, Caplan JL, et al. Oviductosome-sperm membrane interaction in cargo delivery: detection of fusion and underlying molecular players using three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM). *J Biol Chem*, 2015, 290: 17710-23
- [51] Barkalina N, Jones C, Wood MJ, et al. Extracellular vesicle-mediated delivery of molecular compounds into gametes and embryos: learning from nature. *Hum Reprod Update*, 2015, 21: 627-39