

DOI: 10.13376/j.cbls/2018023

文章编号: 1004-0374(2018)02-0169-09



刘默芳, 中科院上海生化与细胞所研究组长(PI)、研究员、国家杰出青年科学基金获得者(2013)、上海市优秀学术带头人(2016)、科技部国家重点研发计划项目首席科学家(2017)。刘默芳研究员主要从事非编码RNA功能机制研究,围绕 piRNA 与精子发生、miRNA 与癌症等开展系统性探索,获得了前沿性进展,已发表论文 50 多篇,包括通讯作者研究论文 12 篇(*Cell*, 2017; *Cancer Res*, 2017; *Oncogene*, 2016; *EMBO J*, 2015; *Cell Res*, 2015; *Cancer Res*, 2014; *Cell Res*, 2014a; *Cell Res*, 2014b; *Dev Cell*, 2013; *EMBO J*, 2012; *Cell Res*, 2012; *Cancer Res*, 2010)。这些原创性研究成果揭示了小分子非编码 RNA 的生理和病理功能机制,可为男性不育症及肿瘤等疾病的诊治研究提供理论依据和相关基础。

Piwi/piRNA 调控异常与男性不育症

王 鑫, 李智彤, 刘默芳*

(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘 要: 男性不育是一个全球性的人口与健康问题, 主要病因是少弱畸形精子症或不明原因。最近的生殖生物学和临床医学研究发现了一系列与男性不育相关的基因突变和调控通路, 促进了对男性不育致病原因及机理的认识。piRNA (piwi-interacting RNA) 是 2006 年发现的一类动物生殖细胞特异性小分子非编码 RNA, 通过与 Piwi 家族蛋白结合形成 Piwi/piRNA 复合物, 在沉默转座子、维持生殖细胞基因组稳定性和完整性、调控生殖细胞发育分化和配子形成等过程中发挥不可或缺的重要生物学功能。近期的研究提示, Piwi/piRNA 调控通路异常与男性不育相关。现简要总结和概述了近期关于 Piwi/piRNA 调控通路在精子发生和男性不育中的生物学功能和机制方面的研究进展。

关键词: 男性不育; piRNA; Piwi; 基因突变; 精子发生

中图分类号: Q522; R698.2

文献标志码: A

Piwi/piRNA dysregulation and male infertility

WANG Xin, LI Zhi-Tong, LIU Mo-Fang*

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Male infertility is a serious social problem all over the world, with major abnormalities as oligo-asthenoteratozoospermia and no demonstrable cause. Recent findings in reproduction biological and clinical studies have advanced our understanding of male infertile factors and underlying pathological mechanisms. Importantly, a number of genetic mutations and regulatory pathways have been identified to be correlated with male infertility.

收稿日期: 2017-09-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31325008, 91640201); 科技部国家重点研发计划项目(2017YFA0504400); 上海市科委基础研究项目(17JC1420100)

*通信作者: E-mail: mliu@sibcb.ac.cn

piRNAs (Piwi-interacting RNAs) were identified in animal germlines as a novel class of small noncoding RNAs in 2006. Increasing evidence shows that piRNAs, in complex with Piwi proteins, suppress transposable elements and protect the integrity of the genome in animal germ cells, and are essential for germline development and gametogenesis in animals. Recent studies implicate that dysregulation in Piwi/piRNA pathway is associated with male infertility. In this review, we briefly summarized the recent progresses in understanding the biological function and molecular mechanisms of Piwi/piRNA regulation in spermatogenesis and male infertility.

Key words: male infertility; piRNAs; Piwi; genetic mutations; spermatogenesis

根据世界卫生组织 (WHO) 统计, 全球约有 6 000 万~8 000 万人罹患不孕症, 大约占到育龄夫妇的 15%~20%^[1]。在我国, 不孕不育的发生率从 1988 年的 6.89% 增加到了 2001 年的 17.13%, 并呈现出逐年递增的趋势^[2]。男性不育主要病因是无精症、少弱畸形精子症及不明原因。在男性不育症患者中, 无精子症占 20%, 包括先天性无精子症和梗阻性无精子症^[3]。精子异常占男性不育症患者 30%, 包括少、弱、畸形精子症^[4]。其他症状, 如精液液化异常、精液 pH 值异常及不明原因等, 占 50% 左右。Piwi 家族蛋白特异性地在动物生殖细胞中表达, 通过与 piRNA 结合形成 Piwi/piRNA 复合物, 沉默转座子来维持生殖细胞基因组稳定性和完整性, 在动物生殖细胞发育分化和配子形成过程中发挥极其重要的作用。虽然目前对于 Piwi/piRNA 在调控人精子发生中的功能机制还鲜有报道, 但一些研究表明, Piwi/piRNA 调控通路异常可能与男性不育相关。例如, 有研究发现, 人 *Piwi* 家族基因在原发性无精和少精症患者中存在多种不同的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)^[5], *Hiwi* (人 *Piwi1*) 和 *Hili* (人 *Piwi2*) 基因甲基化的改变可能与精子发生障碍相关^[6]。本文将简要介绍 Piwi/piRNA 调控通路在精子发生和男性不育中的生物学功能和机制。

1 Piwi/piRNA 通路

Argonaute 蛋白家族分为 Ago 和 Piwi 两个亚家族: Ago 亚家族蛋白结合 20~22 nt 长度的 siRNA 和 miRNA, 普遍存在于各种组织细胞; 而 Piwi 亚家族蛋白则结合 24~31 nt 长度的 piRNA, 特异性地在动物生殖细胞中存在^[7]。

1.1 Piwi 蛋白与 piRNA

作为 Argonaute 家族中 Piwi 亚家族成员, Piwi 蛋白特异性地在动物生殖细胞中表达, 调控生殖干细胞自我更新和维持、生殖细胞发育分化等一系列生殖相关事件, 为动物配子形成所必需。*Piwi* 基因

是在 1998 年从果蝇中被鉴定到的, 当时发现 *Piwi* 基因敲除导致果蝇卵巢生殖干细胞自我更新分裂发生障碍^[8]。随后的研究发现, 在线虫、果蝇、斑马鱼等低等动物中, Piwi 蛋白在雌性和雄性生殖细胞均表达, 为配子发生必需, *Piwi* 基因的突变导致雌性和雄性均出现不育表型^[9]。然而, 在哺乳动物中, Piwi 蛋白主要在雄性生殖细胞中表达, 如小鼠的 3 个 Piwi 蛋白 MIWI、MIWI2 和 MILI, 均特异地在睾丸组织中表达, 在小鼠中缺失任何一个 Piwi 蛋白均可致雄性不育, 但对雌性个体的生育无明显影响^[9]。2006 年 7 月, 四家实验室几乎同时报道了一类与 Piwi 结合的新型小分子非编码 RNA, 被命名为 Piwi 相互作用 RNA (Piwi-interacting RNA), 简称 piRNA^[10-13]。

小鼠的 3 个 Piwi 蛋白在精子发生中呈现严格的时序性表达: MILI 开始表达的时间最早, 从胚胎期 12.5 d 即开始表达, 并持续到减数分裂完成后的球形精子细胞期; MIWI2 的表达始于胚胎期 15.5 d, 结束于出生后第三天, 是表达时程最短的 Piwi 蛋白; 最后一个是 MIWI, 其表达始于减数分裂的细线期, 结束于后期精子细胞^[9]。与之对应, piRNA 的表达也在小鼠出生前后和减数分裂阶段出现两次高峰, 分别为前粗线期 piRNA 和粗线期 piRNA^[14] (图 1)。前粗线期 piRNA 主要来自于转座元件序列, 并与 MILI 和 MIWI2 结合; 粗线期 piRNA 则来自于基因间、内含子和外显子等区域, 主要与 MILI 和 MIWI 结合。小鼠中不同的 Piwi 蛋白结合不同长度的 piRNA: MILI 结合的 piRNA 最短, 为 ~26 nt; MIWI2 结合 ~28 nt 的 piRNA; 而 MIWI 结合的 piRNA 最长, 为 ~30 nt^[9]。一方面, Piwi/piRNA 的表达和功能行使为生精细胞发育分化所必需; 另一方面, Piwi/piRNA 功能性复合物的组成在精子发生过程中也呈现时空特异性的动态变化。

1.2 piRNA 的形成机制

大多数 piRNA 都能对应到相对小范围的基因区域, 这些基因区域称为 piRNA 簇。piRNA 簇范

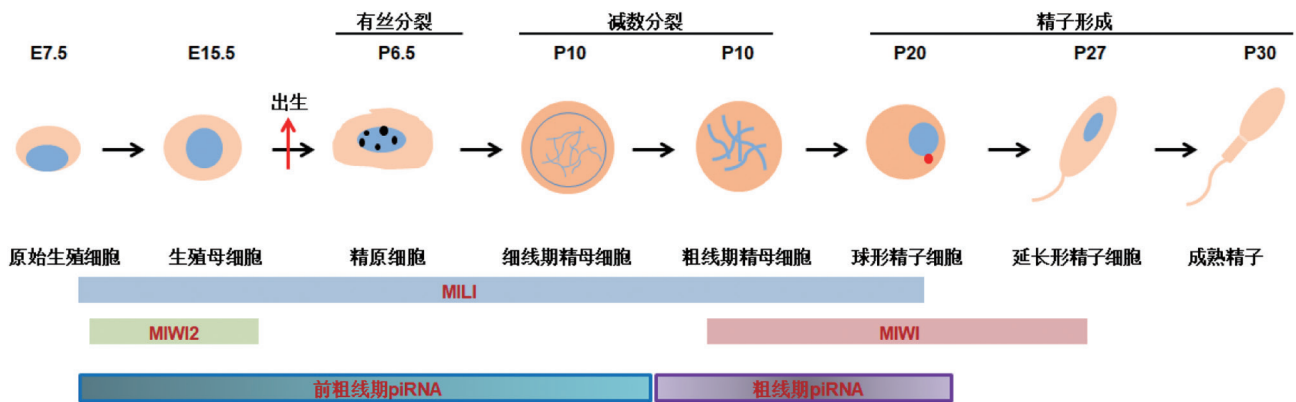


图1 小鼠Piwi蛋白和piRNA在精子发生过程中呈时序性表达

围从几个 kb 到 200 kb 不等, 每个 piRNA 簇都能产生多种 piRNA。生物信息学分析表明, piRNA 来自于长单链 RNA, 这些长单链 RNA 横跨 piRNA 簇并能加工产生成熟的 piRNA, 因此, 这些长单链 RNA 也被称作 piRNA 前体^[15]。

piRNA 前体的转录受到多种转录因子的调控。已有的研究表明, A-MYB 这种古老的转录因子能够起始小鼠粗线期 piRNA 前体的转录, 另外, A-MYB 对 MIWI 等粗线期 piRNA 加工生成必需因子也有一定的转录调控作用^[16]。BTBD18 是一种小鼠生精细胞中的核蛋白, 能够锚定到一部分粗线期 piRNA 前体产生位点, 通过促进转录的延伸来促进锚定区域 piRNA 前体的表达^[17]。有趣的是, 2017 年的一项研究发现, 在果蝇中基础转录因子 IIA (TFIIA) 同源蛋白 Moonshiner, 通过识别结合在 piRNA 簇的异染色质蛋白 -1 (HP-1) 变体蛋白 Rhino, 招募 TATA-box 结合蛋白 (TBP) 相关因子 TRF2 (一种动物 TFIID 核心变体蛋白), 可从 piRNA 簇内部起始转录、驱动 piRNA 表达, 表明定位于异染色质区域的小 RNA 基因转录依赖于组蛋白标记而不是 DNA 序列招募核心转录机器^[18]。

从 piRNA 前体加工成熟 piRNA, 包括初级加工途径和乒乓循环次级加工途径。初级加工途径产生的 piRNA 绝大多数 5' 端以 “U” 开头; 而乒乓循环产生的次级 piRNA 与初级 piRNA 在 5' 末端存在 10 个碱基的互补配对, 并且次级 piRNA 在第十位碱基存在 “A” 的偏好性^[15]。在小鼠中, 前粗线期 piRNA 由初级加工途径和乒乓循环共同产生^[9]。在前粗线期 piRNA 的产生过程中, 转座子来源的长单链 piRNA 前体从细胞核运输到细胞质中, 经由定位在线粒体表面单链特异的核酸内切酶

MitoPLD 切割产生 5' 端以 “U” 开头的 35~43 nt 的 piRNA 中间体。然后, piRNA 中间体再经由某种未知的 3'-5' 核酸外切酶截短到适当长度的 piRNA。最近已从家蚕、线虫、果蝇中鉴定了截短 piRNA 的核酸外切酶, 分别被命名为 PNLDC1、PARN-1 和 Nibbler^[19-21], 但目前小鼠中该外切酶尚在确认中。最后, 适当长度的 piRNA 需经 RNA 甲基化酶 HEN1 催化产生 2'-O-Me 修饰, 从而形成成熟的初级 piRNA。在小鼠雄性生殖细胞中最早表达的 Piwi 蛋白 MILI, 首先结合初级加工成熟的前粗线期 piRNA, 并在 piRNA 的引导下, 靶向 piRNA 反向互补的转座元件 RNA 链, 然后由 MILI 切割 piRNA 对应的第 10 位和第 11 位中间的位置, 产生次级 piRNA 的 5' 末端, 次级 piRNA 经过 3' 端的核酸外切酶截短并加上 2'-O-Me 修饰, 形成成熟的次级 piRNA^[9]。MILI 将次级 piRNA 呈递给 MIWI2 后, MIWI2 在 piRNA 的引导下入核并介导靶位点转座元件 DNA 的甲基化, 这导致 MIWI2 不能在细胞质中与 MILI 进行下一轮的乒乓循环, 提示 MILI 与 MIWI2 之间的乒乓循环是一步乒乓循环。也有研究表明, MILI 蛋白之间可以形成内部的乒乓循环, 从而源源不断地产生前粗线期 piRNA^[15]。乒乓循环中 MILI 蛋白切割靶转座元件 RNA 链和 MIWI2 介导靶转座元件 DNA 的甲基化, 均能有效地抑制生殖细胞中转座元件的活性 (图 2)。

粗线期 piRNA 可能主要通过初级加工途径产生。产生的成熟 piRNA 分别与 MILI 和 MIWI 蛋白相互结合, 然后引导 MILI 和 MIWI 蛋白切割靶 RNA 链, 可能介导基因在生殖细胞发育过程中的动态表达^[15](图 3), 但目前对粗线期 piRNA 的功能和作用机制了解还不多。

1.3 Piwi/piRNA功能

已有的研究表明, Piwi/piRNA 主要在表观遗传水平和转录后水平沉默转座元件和调控编码蛋白基因的表达, 从而在动物生殖细胞发育分化和配子

发生中发挥重要功能。转座元件可在基因组中通过转录或逆转录, 并在内切酶的作用下, 跳跃插入到基因组其他位点, 从而影响基因组的稳定性和完整性, 因此, 转座元件的活性需要被严格控制。在小

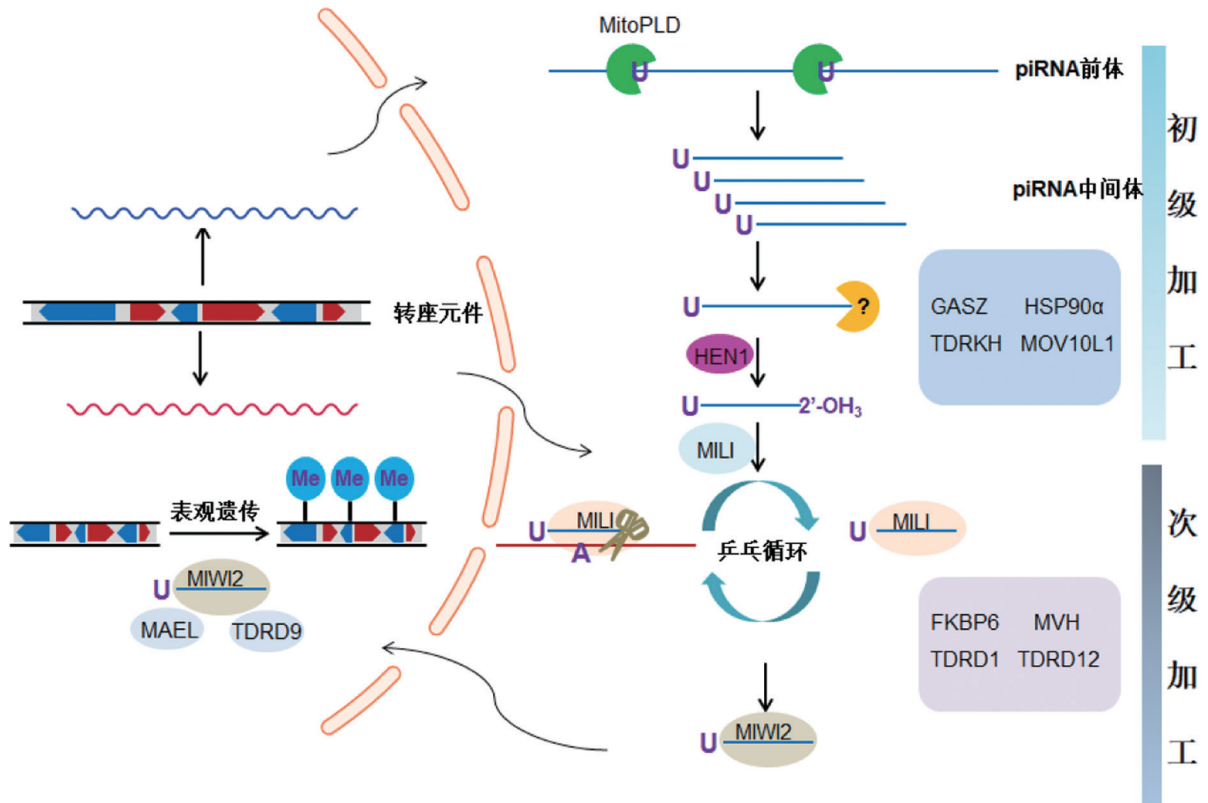


图2 小鼠前粗线期piRNA的生成机制和功能

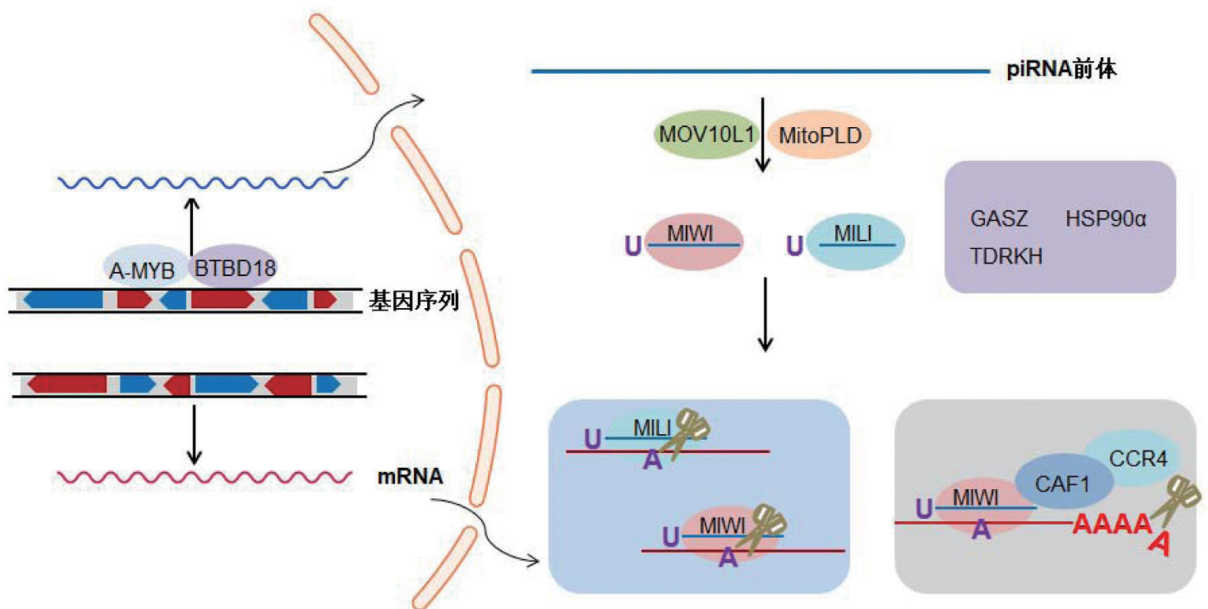


图3 小鼠粗线期piRNA的生成机制和功能

鼠等哺乳动物中, LINE 和 IAP 这两种转座元件异常活跃, 需要被严格控制。在小鼠出生前后, MILI 蛋白能够结合转座元件来源的 piRNA, 然后去切割与 piRNA 同源互补的转座元件 RNA, 生成次级 piRNA; 新生成的次级 piRNA 也能与 MILI 结合, 同样切割与次级 piRNA 同源互补的转座元件 RNA, 产生新的初级 piRNA, 如果往复循环, 即乒乓循环, 能够源源不断地切割从转座元件转录的 RNA, 从而有效沉默转座元件活性; 另一方面, MIWI2 及前粗线期 piRNA 在小鼠胚胎期 15.5 d 和出生前 3 d 高表达, 这一短暂时间正是胚胎发育过程中雄性精细胞重新甲基化的阶段, 提示 MIWI2 以及前粗线期 piRNA 可能与 DNA 重新甲基化有关; MILI 切割产生的次级 piRNA 能够呈递给 MIWI2, 介导 MIWI2 入核, 然后 MIWI2 能够在转座元件区域来源的 piRNA 引导下, 定位到转座元件基因组区域, 介导转座元件 DNA 的重新甲基化, 从而高效地沉默转座元件^[9]。MIWI 和 MILI 蛋白的切割活性丧失可导致 LINE-1 等转座元件的激活, 提示 MIWI 和 MILI 蛋白可能在小鼠出生后的雄性生殖细胞中, 直接切割转座元件 RNA^[22-23]。

除了沉默转座元件以外, 小鼠中的 Piwi/piRNA 还能够调控精子细胞中蛋白编码基因的表达。本实验室的研究发现, 在小鼠延长形精子细胞中, 粗线期 piRNA 与其结合蛋白 MIWI、脱腺苷酸酶 CAF1 组成 pi-RISC 复合物, 通过一种类似于 miRNA 的碱基不完全配对方式识别靶 mRNA 3' 非翻译区 (3'UTR) 的序列元件, 诱导靶 mRNA 脱腺苷酸及降解, 并且依赖于 piRNA 百万级数量的不同序列, pi-RISC 介导了精子细胞发育后期数千不同 mRNA 的降解^[24]。此外, 本研究组还发现, 当与靶 mRNA 完全或接近完全配对时, 粗线期 piRNA 还能够指导 MIWI 蛋白通过类似 siRNA 的机制切割降解睾丸组织中的靶 mRNA^[25]。

2 Piwi/piRNA与雄性不育

小鼠因其个体小、容易控制、繁殖快等因素成为生物和医学研究中最常用模式生物之一。2002年, 小鼠基因组的测序工作初步完成时, 研究者们分析了 96% 小鼠基因组序列, 发现其中有 99% 的基因能在人基因组中找到同源序列, 证实了小鼠与人类在基因水平上高度同源^[26]。哺乳动物的精子发生是一个复杂而特异的细胞分化过程, 但由于缺乏合适的体外系统, 目前对哺乳动物精子发生和不育症的

研究大多以小鼠作为模式动物进行研究。基于在小鼠中构建的基因敲除动物模型发现, 缺失 Piwi/piRNA 通路的多种因子, 均能导致精子发生异常和雄性不育, 证明 Piwi/piRNA 调控对哺乳动物精子发生和雄性生殖具有不可或缺的重要作用。

2.1 Piwi蛋白缺失导致雄性不育

小鼠的 3 个 Piwi 蛋白缺失均导致雄性不育, 其中 MILI 和 MIWI2 缺失均导致小鼠精子发生阻滞在减数分裂期, 前粗线期 piRNA 生成被严重破坏, 某些转座元件启动子区域甲基化程度降低、异常活跃^[14,27-28]; 而 MIWI 缺失导致小鼠精子发生阻滞在球形精子阶段^[29], 与其结合的 ~30 nt piRNA 缺失, 转座子 LINE-1 去抑制, 拟染色质小体 (chromatoid body) 结构被破坏^[9]。

2.2 Piwi/piRNA通路关键蛋白缺失致雄性不育

piRNA 加工成熟需要多种蛋白质因子参与, 缺失这些蛋白会导致小鼠 piRNA 生成受阻, 转座元件启动子区甲基化减少, 转座元件异常高表达, 从而使精子发生受阻、雄性不育。MitoPLD、MOV10L1、HSP90 α 、GASZ 和 TDRKH 在小鼠 piRNA 初级加工途径中发挥重要作用。核酸酶 MitoPLD 定位在线粒体膜上, 在 piRNA 的初级加工途径中切割 piRNA 前体产生 35~43 nt 的 piRNA 中间体, 缺失 MitoPLD 导致 piRNA 初级加工损坏, 并且线粒体以及 piRNA 生成相关的组分定位异常^[30]。生殖细胞特异的 RNA 解旋酶 MOV10L1 缺失后, MILI 和 MIWI2 能够表达, 但是不能够结合 piRNA, 推测 MOV10L1 可能在 piRNA 生成和装载到 Piwi 蛋白等过程中起重要作用^[31]。HSP90 α 是一种脊椎动物中保守的分子伴侣蛋白, 缺失 HSP90 α 的小鼠初级 piRNA 和次级 piRNA 均大量减少, 并且 MIWI2 的定位也出现异常, 提示 HSP90 α 在 piRNA 生成过程中发挥重要作用^[32]。GASZ 与 MILI 共同定位在一起, 当 GASZ 敲除后, MILI 蛋白大量减少, 初级 piRNA 和次级 piRNA 也大量减少^[33]。TDRKH 敲除后, 成熟的 piRNA 减少, 而 5' 端以 “U” 开头, 3' 端有 2'-O-Me 修饰的 31~37 nt piRNA 中间体则大量积累, 提示 TDRKH 可能参与 piRNA 成熟过程中中间体的 3' 末端形成^[34]。这些 piRNA 初级加工关键蛋白的缺失均导致小鼠精子发生阻滞在减数分裂期^[30-34]。

MVH、TDRD1、TDRD12、FKBP6 等在 piRNA 次级加工途径中发挥重要作用, 这 4 种蛋白的缺失均导致次级 piRNA 不能呈递给 MIWI2, 使得 MIWI2 因没有结合 piRNA 而不能正常入核, 但这

些因子的缺失不影响 MILI 蛋白正常结合 piRNA^[35-38]。TDRD9 和 MAEL 敲除小鼠中, MILI 和 MIWI2 均能够正常结合 piRNA, 并且 MILI 和 MIWI2 的亚细胞定位也正常, 但是转座元件启动子区的甲基化程度大大降低, 提示 TDRD9 和 MAEL 可能在 MIWI2 介导转座元件 DNA 的重新甲基化过程中发挥作用, 但具体的机制还不太清楚^[39-40]。这些涉及 piRNA 次级加工途径的蛋白因子的缺失也导致小鼠精子发生阻滞在减数分裂期^[35-40]。

PIWI/piRNA 通路中的某些蛋白是拟染色质小体结构完整所必需的, 缺失这些蛋白后粗线期 piRNA 生成受阻或者拟染色质小体结构破坏, 小鼠精子发生阻滞在球形精子阶段。BTBD18 是一个粗线期核蛋白, 能够锚定在一些粗线期 piRNA 簇上。小鼠缺失 BTBD18 导致粗线期 piRNA 生成受阻, 精子发生阻滞在球形精子阶段; 进一步分析表明, BTBD18 能够作为转录因子通过促进某些 piRNA 前体的转录而促进粗线期 piRNA 的生成^[17]。RNF17 又叫 TDRD4, 作为 TDRD 蛋白家族的一员, 能够抑制次级加工产生粗线期 piRNA。RNF17 敲除后, 粗线期 piRNA 也出现了次级加工途径, 而这些次级加工途径能够产生大量识别蛋白编码基因 mRNA 的 piRNA, 过度抑制这些蛋白表达而使精子发生阻滞在球形精子阶段^[41]。TDRD5、TDRD6 和 TDRD7 均为拟染色质小体中特异的组分, 缺失这 3 种蛋白的任意一种均导致拟染色质小体结构被破坏, 精子发生阻滞在球形精子阶段。缺失 TDRD5 和 TDRD7 会导致转座元件 LINE-1 异常高表达, 但是 TDRD6

缺失后转座元件仍被抑制^[42-44]。

2.3 Piwi蛋白切割活性(Slicer)缺失致雄性不育

Piwi 蛋白的 PIWI 结构域为其核酸内切酶活性功能域。而 PIWI 结构域的核酸内切酶活性依赖于保守基序 DDH (Asp-Asp-His; DDH motif), 将 DDH 基序突变为 DAH 或者 ADH, Piwi 蛋白将不再具有核酸内切酶活性。*Mili*^{DAH} 纯合子小鼠精子发生阻滞在减数分裂期, MIWI2 结合的 piRNA 大量减少, 并且转座元件不再被抑制。有趣的是, *Miwi2*^{DAH} 雄性纯合子小鼠则能正常生育^[23]。而 *Miwi*^{ADH} 纯合子小鼠阻滞在球形精子阶段, 拟染色质小体结构损坏, LINE-1 异常高表达, 而且 *Miwi*^{ADH} 杂合子能产生少量畸形精子, 同样表现为雄性不育^[22](图 4)。

虽然现有的研究显示缺失或突变多种 PIWI/piRNA 通路的关键蛋白能够导致雄性不育, 但是目前尚未发现缺失单个 piRNA 簇可影响小鼠精子发生, 提示不同 piRNA 簇产生的 piRNA 可能存在功能冗余。

3 HIWI蛋白D-box突变与男性不育

人的基因组共编码 4 个 Piwi 蛋白成员: PIWIL1/HIWI、PIWIL2/HILI、PIWIL3 和 PIWIL4/HIWI2, 均特异性地在睾丸组织中表达^[45]。其中 HIWI、HILI 和 HIWI2 分别对应于小鼠中的 MIWI、MILI 和 MIWI2。虽然已证明在线虫、果蝇和斑马鱼中缺失 *Piwi* 及 piRNA 通路关键基因可导致雌性和雄性均出现不育表型, 在小鼠中则导致雄性不育, 但目前对 Piwi/piRNA 调控通路在人生殖细胞发育

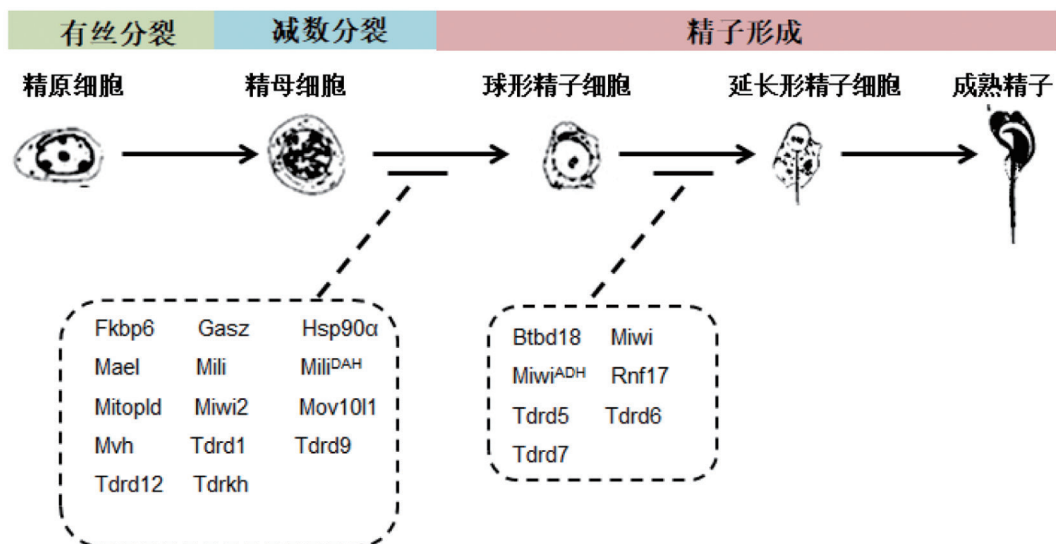


图4 Piwi/piRNA通路关键蛋白因子突变致小鼠精子发生阻滞在不同发育时期

及配子形成中的作用还鲜为人知。

本研究组之前的一项研究发现, MIWI 蛋白在小鼠精子形成后期将通过泛素连接酶 APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) 介导的泛素化途径降解清除, 并发现 MIWI 蛋白在后期精子细胞中的适时清除对小鼠精子形成至关重要^[46]。在后续工作中, 本研究组通过测序筛查 413 例临床无精、少弱精症患者 *Hiwi* 基因中控制 HIWI 蛋白泛素化修饰降解的关键元件 D-box, 发现有 3 例患者在此元件中存在杂合性基因突变, 且发现此类突变既可来源于基因自发突变, 也可从母亲遗传获得。为鉴定此类突变是否是造成这些患者发生无精/少弱精的原因, 本研究组将其中的一组突变条件型敲入 *Miwi* 基因, 在小鼠模型中研究此类突变对精子发生的作用。研究发现, *Miwi* D-box 杂合突变小鼠均出现雄性不育, 证明此类突变确实是造成这些患者不育的关键原因。深入研究发现, *Miwi* D-box 杂合突变小鼠精子发生阻滞在延长形精子细胞发育阶段, 尽管能产生少量精子, 但精子形态异常、细胞核结构疏松、无活力。机制研究揭示, MIWI 蛋白与组蛋白泛素连接酶 RNF8 相互作用, 可将 RNF8 扣留在精子细胞胞质中。RNF8 对组蛋白 H2A 和 H2B 的单泛素化修饰是启动精子变形后期组蛋白-鱼精蛋白交换的关键步骤^[47]。在野生型小鼠中, MIWI 蛋白将在后期精子细胞中被 APC/C 泛素连接酶介导的泛素化通路降解, 从而使得 RNF8 入核泛素化修饰组蛋白, 进而启动组蛋白-鱼精蛋白交换; 而在突变小鼠中, D-box 突变使 MIWI 蛋白不能被 APC/C 泛素化修饰降解, 导致 MIWI 蛋白异常积累在后期精子细胞中, 从而造成本应进入核行使功能的 RNF8 蛋白因子被继续扣留于胞质, 进而抑制了组蛋白修饰及组蛋白-鱼精蛋白交换的启动, 导致组蛋白大量滞留精子中, 最终造成精子数量剧烈减少、精子头部结构异常及精子活力丧失。有趣的是, 将一段 RNF8 N 端多肽导入突变小鼠的精子细胞中, 可有效阻断 MIWI 对内源 RNF8 的扣留, 逆转精子细胞中组蛋白-鱼精蛋白交换障碍, 恢复精子活动能力, 提示这一策略可有效治疗这类无精症/少弱精症^[48]。这项研究首次证明 *Piwi* 基因突变可致男性不育, 并为这类不育症的早期分子诊断及临床治疗提供了理论依据和方法策略。

4 展望

总之, 男性不育症的致病机制非常复杂, 是多

种因素共同作用的结果。在这些因素中, 遗传因素往往能导致少精症、弱精症、精子畸形症, 甚至引起精子发生阻滞等严重表型。作为生殖系统中特异表达的小分子非编码 RNA——piRNA 通过沉默转座子、反转座子等自私型遗传元件, 维持生殖细胞基因组的稳定性和完整性, 在哺乳动物精子发生中发挥着至关重要的作用。piRNA 功能的缺失会导致精子发生阻滞, 引起雄性不育。

虽然目前还没有在小鼠中敲除 piRNA 簇引起雄性不育的报道, 但是多种 piRNA 相关蛋白的缺失或者突变都能够导致 piRNA 通路异常, 从而引起雄性不育。目前对 piRNA 通路异常与男性不育的研究尚处于起步阶段, 相信未来结合基础和临床的生物学研究将在男性不育症患者中发现更多的 piRNA 通路基因突变, 而对这些突变的功能机制研究将从分子层面进一步揭示男性不育症的致病机制, 为男性不育症的诊断和精准治疗提供新的思路和方法技术。

[参 考 文 献]

- [1] Boivin J, Bunting L, Collins JA, et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 2007, 22: 1506-12
- [2] Stephen EH, Chandra A. Use of infertility services in the United States: 1995. *Fam Plan Perspect*, 2000, 32: 132-7
- [3] Kuzmin A, Jarvi K, Lo K, et al. Identification of potentially damaging amino acid substitutions leading to human male infertility. *Biol Reprod*, 2009, 81: 319-26
- [4] Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl*, 2006, 8: 143-57
- [5] Gu A, Ji G, Shi X, et al. Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. *Hum Reprod*, 2010, 25: 2955-61
- [6] Friemel C, Ammerpohl O, Gutwein J, et al. Array-based DNA methylation profiling in male infertility reveals allele-specific DNA methylation in PIWIL1 and PIWIL2. *Fertil Steril*, 2014, 101: 1097-103.e1
- [7] Thomson T, Lin H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25: 355-76
- [8] Cox DN, Chao A, Baker J, et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev*, 1998, 12: 3715-27
- [9] Siomi MC, Sato K, Pezic D, et al. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 246-58
- [10] Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*,

- 2006, 442: 203-7
- [11] Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 2006, 442: 199-202
- [12] Grivna ST, Beyret E, Wang Z, et al. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 2006, 20: 1709-14
- [13] Lau NC, Seto AG, Kim J, et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science*, 2006, 313: 363-7
- [14] Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'His D, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to *de novo* DNA methylation in mice. *Mol Cell*, 2008, 31: 785-99
- [15] Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. PIWI-interacting RNA: its biogenesis and functions. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 405-33
- [16] Li XZ, Roy CK, Dong X, et al. An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes. *Mol Cell*, 2013, 50: 67-81
- [17] Zhou L, Canagarajah B, Zhao Y, et al. BTBD18 regulates a subset of piRNA-generating loci through transcription elongation in mice. *Dev Cell*, 2017, 40: 453-66.e5
- [18] Andersen PR, Tirian L, Vunjak M, et al. A heterochromatin-dependent transcription machinery drives piRNA expression. *Nature*, 2017, 549: 54-9
- [19] Izumi N, Shoji K, Sakaguchi Y, et al. Identification and functional analysis of the Pre-piRNA 3' trimmer in silkworms. *Cell*, 2016, 164: 962-73
- [20] Tang W, Tu S, Lee H, et al. The RNase PARN-1 trims piRNA 3' ends to promote transcriptome surveillance in *C. elegans*. *Cell*, 2016, 164: 974-84
- [21] Hayashi R, Schnabl J, Handler D, et al. Genetic and mechanistic diversity of piRNA 3'-end formation. *Nature*, 2016, 539: 588-92
- [22] Reuter M, Berninger P, Chuma S, et al. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature*, 2011, 480: 264-7
- [23] De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, et al. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*, 2011, 480: 259-63
- [24] Gou LT, Dai P, Yang JH, et al. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res*, 2015, 25: 266
- [25] Zhang P, Kang JY, Gou LT, et al. MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes. *Cell Res*, 2015, 25: 193-207
- [26] Bradley A. Mining the mouse genome. *Nature*, 2002, 420: 512-4
- [27] Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 2004, 131: 839-49
- [28] Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell*, 2007, 12: 503-14
- [29] Deng W, Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell*, 2002, 2: 819-30
- [30] Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, et al. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Dev Cell*, 2011, 20: 364-75
- [31] Zheng K, Xiol J, Reuter M, et al. Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 11841-6
- [32] Ichianagi T, Ichianagi K, Ogawa A, et al. HSP90 plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 11903-11
- [33] Ma L, Buchold GM, Greenbaum MP, et al. GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000635
- [34] Saxe JP, Chen M, Zhao H, et al. Tdrkh is essential for spermatogenesis and participates in primary piRNA biogenesis in the germline. *EMBO J*, 2013, 32: 1869-85
- [35] Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, et al. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev*, 2010, 24: 887-92
- [36] Reuter M, Chuma S, Tanaka T, et al. Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16: 639-46
- [37] Pandey RR, Tokuzawa Y, Yang Z, et al. Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 1107: 16492-7
- [38] Xiol J, Cora E, Kogelgruber R, et al. A role for Fkbp6 and the chaperone machinery in piRNA amplification and transposon silencing. *Mol Cell*, 2012, 47: 970-9
- [39] Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, et al. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev Cell*, 2009, 17: 775-87
- [40] Soper SF, van der Heijden GW, Hardiman TC, et al. Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis. *Dev Cell*, 2008, 15: 285-97
- [41] Wasik KA, Tam OH, Knott SR, et al. RNF17 blocks promiscuous activity of PIWI proteins in mouse testes. *Genes Dev*, 2015, 29: 1403-15
- [42] Tanaka T, Hosokawa M, Vagin VV, et al. Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 10579-84
- [43] Yabuta Y, Ohta H, Abe T, et al. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *J Cell Biol*, 2011, 192: 781-95
- [44] Vasileva A, Tiedau D, Firooznia A, et al. Tdrd6 is required for spermiogenesis, chromatoid body architecture, and regulation of miRNA expression. *Curr Biol*, 2009, 19: 630-9
- [45] Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, et al. Identification

- of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 2003, 82: 323-30
- [46] Zhao S, Gou LT, Zhang M, et al. piRNA-triggered MIWI ubiquitination and removal by APC/C in late spermatogenesis. *Dev Cell*, 2013, 24: 13-25
- [47] Lu LY, Wu J, Ye L, et al. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell*, 2010, 18: 371-84
- [48] Gou L, Kang J, Dai P, et al. Ubiquitination-deficient mutations in human Piwi cause male infertility by impairing histone-to-protamine exchange during spermiogenesis. *Cell*, 2017, 169: 1090-4.e13