

DOI: 10.13376/j.cblls/2023155

文章编号: 1004-0374(2023)11-1424-10

小鼠顶体形成相关蛋白的研究进展

杨玲^{1,2}, 袁露^{1,2}, 郑英^{1,2*}

(1 扬州大学医学院组织学与胚胎学教研室, 扬州 225009; 2 江苏省非编码RNA基础与临床转化重点实验室, 扬州 225009)

摘要: 顶体形成过程分为高尔基期、帽期、顶体伸长期和成熟期四个主要阶段, 其正确形成对精子结构和功能具有重要影响。顶体形成需要各种细胞器(内质网和高尔基体)和细胞质结构(顶体板和精子领)之间的积极和特异性协调。本文主要对顶体形成过程中参与反式高尔基体网络囊泡分类运输、顶体附着到细胞核等过程的蛋白质的功能及调控机制进行了总结与讨论。这些蛋白质大多相互作用, 表现出复杂的分子调控机制, 促进了这一事件的发生。对精子顶体形成相关蛋白的功能及机制的研究将为临床男性不育症的诊断和治疗提供新的思路和对策。

关键词: 精子形成; 顶体形成; 男性不育

中图分类号: Q954.43 **文献标志码:** A

Research advances in mouse sperm acrosome formation-associated proteins

YANG Ling^{1,2}, YUAN Lu^{1,2}, ZHENG Ying^{1,2*}

(1 Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2 Jiangsu Key Laboratory of Experimental & Translational Non-coding RNA Research, Yangzhou 225001, China)

Abstract: Acrosome biogenesis is classically divided into four major phases: Golgi, cap, acrosome, and maturation phases. Its correct formation has a significant impact on the structure and function of sperm. The smooth run of above processes needs an active and specific coordination between the all kinds of organelles (endoplasmic reticulum and Golgi) and cytoplasmic structures (acroplaxome and manchette). In this article, we summarize and discuss the sorting and transport of vesicles involved in acrosome formation, as well as the proteins involved in anchoring the acrosome to the cell nucleus. Most of these proteins interact with each other and show complicated molecular regulatory mechanism to facilitate the occurrence of this event. The study of the functions and mechanisms of sperm acrosome formation related proteins provides new ideas and strategies for the diagnosis and treatment of male infertility in clinical practice.

Key words: acrosome formation; spermiogenesis; male infertility

生育问题影响着全球约8%~12%的育龄夫妇^[1], 其中男方因素占不孕不育症病例的50%。影响男性不育的原因有很多, 其中遗传因素影响精子的结构与功能。精子发生是一个复杂且多方调控的过程, 包括精原细胞的有丝分裂、精母细胞的减数分裂和精子形成。精子形成过程中会发生形态学的改变, 包括顶体形成、核浓缩和尾部形成等, 最终发育为成熟的精子。顶体形成是精子细胞分化为精子的关键步骤, 顶体发育缺陷会导致精子形态异常, 如圆头精子症及相关男性不育。在顶体形成过

程中, 有大量的蛋白质参与调控。本文将对与顶体形成相关的蛋白质及其在顶体形成中的调控机制的最新研究进展进行综述, 以期对临床男性不育症的诊断和治疗提供新思路。

收稿日期: 2023-07-03; 修回日期: 2023-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(82071696); 江苏省高校自然科学研究重大项目(20KJA310002)

*通信作者: E-mail: yzzkl@163.com

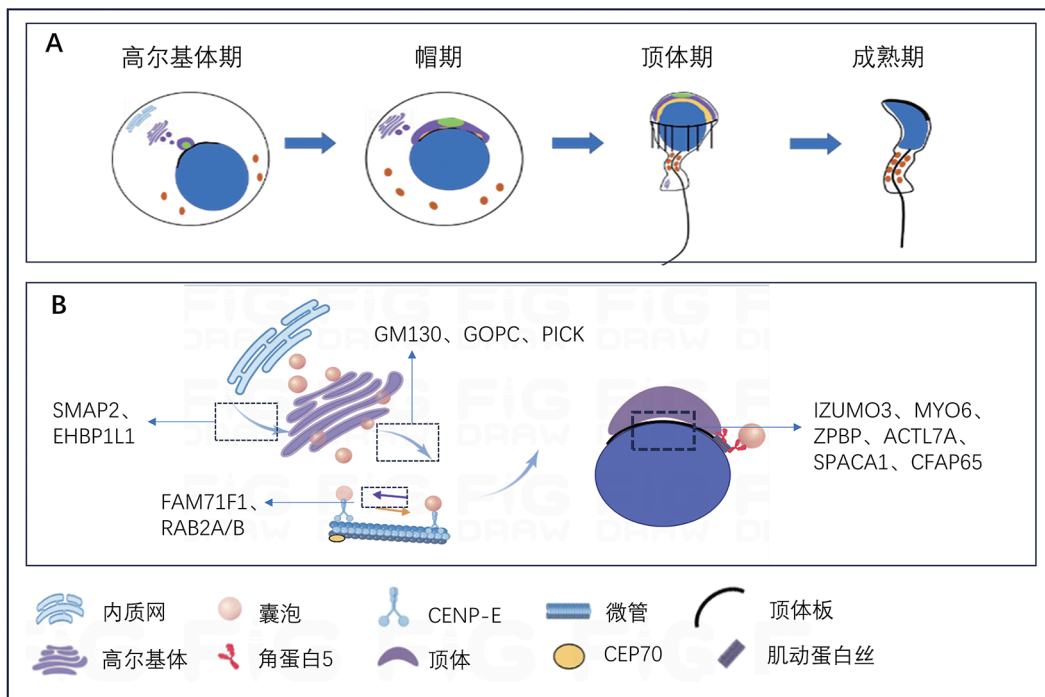
1 顶体形成的过程

顶体形成是精子变形过程中一个有序且复杂的过程,可分为四个阶段:高尔基期(1~3步)、帽期(4~7步)、顶体伸长期(8~12步)和成熟期(13~16步)。在高尔基期,高尔基体发挥了重要的桥梁作用。前顶体囊泡首先从内质网和质膜逆向转运到高尔基体,然后通过反式高尔基体网络(trans-Golgi network, TGN)顺向转运到细胞核表面。在一系列蛋白质的协助下,这些囊泡被分类并转运到细胞核表面凹陷区域附近,随后相互黏附融合,形成单个大的顶体囊泡^[2]。在帽期,附着在核表面的顶体囊泡逐渐增大并在细胞核表面扩散形成独特的帽状结构。高尔基体移动到顶体远端的新生颈部区域,而顶体板开始形成。顶体板由角蛋白和F-肌动蛋白组成,位于细胞核膜和顶体内膜之间,将顶体与细胞核紧密连接在一起^[3]。在顶体期,顶体停止生长,顶体颗粒凝结后附着在顶体内膜上^[4],一些细胞骨架,包括钙调蛋白、肌动蛋白在顶体组织中起重要作用。同时,精子领在核周环附近形成,顶体逐渐向质膜移动。最后,成熟期的精子细胞核凝结,顶体颗粒浓缩并扩散到整个顶体膜上。此时,顶体分为前区和赤道区,顶体的前区覆盖在细胞核表面,除此之外的顶体部分称为赤道区^[5-6],表明成熟的

顶体形成(图1)。

顶体的正确定位对顶体发挥功能至关重要,顶体内容物被封闭在单个膜中,该膜通常分为外顶体膜(outer acrosomal membrane, OAM)和内顶体膜(inner acrosomal membrane, IAM)。OAM位于精子的质膜正下方,并且在顶体反应(acrosome reaction, AR)时,这两个膜融合, IAM作为盖子位于核包层上方^[6]。顶体的正确定位还牵涉到核包膜(nuclear envelope, NE)、核外膜(outer nuclear membranes, ONM)和核内膜(inner nuclear membranes, INM)在形成核孔复合体(nuclear pore complexes, NPC)的部位定期融合,发挥不同的作用:核外膜蛋白与核定位和移动有关,而核内膜蛋白则与核薄层和染色质密切相关^[7], NE和IAM之间由顶体板连接,通过稳定的蛋白质骨架将顶体与细胞核紧密连接。

虽然对顶体的形成过程已经进行了充分的研究,但其形成的分子机制仍不完全清楚。目前的研究已发现许多蛋白质在不同的阶段参与顶体形成,任何关键蛋白质的缺失都可能导致顶体畸形,并最终导致不育(表1)^[8-28]。一些参与顶体生物发生的基因已经被发现在小鼠中缺失,但只有少数基因在患者中被发现(表2)^[25, 29-35]。了解顶体生物发生对于揭示男性不育症的分子基础,开发新的诊断工具和辅助生殖技术,通过更有效的治疗方式帮助不



(A)顶体变形的四个阶段;(B)顶体变形过程中各基因在不同阶段发挥作用。

图1 顶体形成过程

表1 参与顶体发生的蛋白质

分类	名称	定位	表型	功能	参考文献	
囊泡运输	EHBP1L1	细胞质	未知	调节从反式高尔基体网络到顶端质膜的囊泡运输	[8]	
	TMF	高尔基体	雄性不育; 精子缺乏顶体; 细胞质未被正确去除; 头部和尾部变形; 缺乏运动能力	参与囊泡的逆向转运	[9-10]	
	VPS54	早期内质网	雄性不育; 顶体形成失败; 精子畸形; 核形状的不规则轮廓	参与囊泡的逆向运输	[9-10]	
	CENP-E	细胞质	雄性不育; 高尔基体堆叠混乱和解体; 顶体的结构不对称; 顶体囊泡分散在精子细胞的胞质中	识别并结合囊泡后沿微管运输	[11]	
	GM130	顺式高尔基体	雄性不育; 缺乏顶体	参与高尔基体囊泡运输	[12]	
	VPS13B	高尔基体和顶体内膜	雄性不育; 高尔基体碎裂; 早期顶体结构缺失	参与囊泡的运输、分选以及囊泡锚定细胞核	[13]	
	SIRT1	精子头部	男性不育; 顶体生物发生缺陷; 自噬流被破坏	参与囊泡运输和顶体融合	[14]	
	RAB6	细胞质和顶体	胚胎致死	参与囊泡运输和囊泡锚定细胞核	[15]	
	FAM71F1、RAB2B	高尔基体	顶体肿胀; 顶体覆盖整个精子头部	抑制过度囊泡运输	[16]	
	顶体锚定	MYO6	普遍存在	男性低生育能力; 影响顶体的形成; 精子数量减少; 高尔基体结构破坏	保持顶体颗粒固定到顶体内膜以及其对称性	[17]
IZUMO3		顶体内膜	影响顶体形成	保持顶体颗粒固定到顶体内膜以及其对称性	[18]	
ACTL7A		细胞核、顶体、顶体板	顶体-顶体板复合物损伤; 顶体消失	协助顶体囊泡锚定在肌动蛋白丝	[19]	
CFAP65		顶体	雄性不育; 精子顶体形成缺陷; 顶体缺失	参与顶体凝集以及将顶体定位于顶体内膜	[20]	
SUN1H、SYNE3		顶体外膜	未知	形成非核LINC复合物, 将顶体锚定在核膜上	[21]	
圆头精子症		SPACA1	顶体外膜	顶体-顶体板复合物损伤; 顶体消失	参与顶体颗粒固定于顶体膜	[22]
ZPBP		顶体基质	男性不育; 顶体碎裂; 连接结构缺失	参与顶体的凝集, 并参与将顶体固定于顶体板上	[23]	
FAM209、DPY19L2		核内膜	雄性不育; 顶体缺失; 精子数量减少; 精子细胞核形状失败	参与顶体锚定细胞核	[23-24]	
CCIN		核膜	头部缺陷; 顶体脱离; 线粒体鞘组装错误	参与精子领主导的精子头部塑造	[25]	
GOPC、PICK1		反式高尔基体	雄性不育; 顶体断裂; 核畸形	参与囊泡运输	[26-27]	
SMAP2	反式高尔基体	雄性不育; 顶体形成受损; 细胞核重组阻滞	调节囊泡从内质网到高尔基体的逆行运输	[28]		

育症患者至关重要。

2 参与顶体形成的蛋白质

2.1 参与反式高尔基体囊泡分类运输和融合的蛋白在顶体发生过程中, 高尔基体参与分类并将前

顶体囊泡输送到细胞核。在高尔基体期和帽期, 前顶体囊泡在 TGN 处合成^[12], 并运输到细胞核的前部。高尔基体衍生的囊泡需要先从内质网和细胞质膜向高尔基体逆行运输, 然后从高尔基体顺行运输到细胞核成为成熟的前顶体囊泡^[13], 其中小 Arf

表2 已知有男性不育相关研究的基因

名称	相关患者表型	遗传模式	参考文献
CFAP65	鞭毛多种形态异常(multiple morphological abnormalities of the sperm flagella, MMAF)	常染色体隐性遗传	[29]
ACTL7A	全受精失败(Total fertilization failure, TFF)	常染色体隐性遗传	[30]
FSIP2	圆头精子症	-	[31]
ACTL9	TFF	常染色体隐性遗传	[32]
IQCN	TFF	常染色体隐性遗传	[33]
CEP70	无精症	常染色体隐性遗传	[34]
CCIN	畸形精子症	-	[25]
SPACA1	圆头精子症	常染色体隐性/X连锁遗传模式	[35]

GTP酶激活蛋白2 (small Arf GTPase-activating protein 2, SMAP2)、EH结构域结合蛋白1样1 (EH domain binding protein 1-like 1, EHBP1L1) 等参与逆行运输网络^[28, 36], 着丝粒蛋白E (centromeric protein E, CENP-E)、高尔基体基质蛋白130 kD (Golgi matrix protein 130 kD, GM130)、高尔基相关PDZ和卷曲线圈基序 (Golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing, GOPC) 以及C激酶1互作蛋白 (protein interacting with C kinase 1, PICK1) 介导囊泡从高尔基体复合体到细胞核的运输^[12, 26-27, 37], 液泡蛋白分选13同源物B (vacuolar protein sorting 13 homolog B, VPS13b) 与ras相关蛋白Rab-6 (ras-related protein Rab-6, RAB6) 相互作用参与前顶体囊泡全程^[13], 具有序列相似性71的家族成员F1 (family with sequence similarity 71 member F1, FAM71F1) 和活性RAS癌基因家族成员 (member RAS oncogene family, RAB2B) 的复合物参与调节囊泡大小^[16], 富含丝氨酸的单程膜蛋白1 (serine rich single-pass membrane protein 1, SSMEM1) 则在精子伸长时参与高尔基体从精子的顶体区域转移到细胞的尾部^[36]。

SMAP2是一种Arf GTP酶激活蛋白 (Arf GTPase-activating protein, Arf GAP), 主要分布于循环内体 (recycling endosomes, REs), 少量定位于TGN^[28], 其基因缺陷小鼠多表现为圆头精子症^[38]。在顶体形成的早期阶段, 可以检测到与TGN相关的SMAP2, 而在顶体和成熟阶段则消失。SMAP2缺陷小鼠的前顶体囊泡被破坏, 缺乏明显帽状结构, 顶体分散, 形状不规则, 呈现为多个假顶体。evection-2是一种含有N端PH结构域和C端疏水区域的内质网蛋白, 在逆行转运中起着至关重要的作用^[39]。evection-2招募SMAP2到REs, 从而调节囊泡从内质网到高尔基体的逆行运输^[28]。另外, SMAP2与网格蛋白、网格蛋白组装蛋白 (clathrin assembly

protein, CALM) 及突触融合蛋白2 (syntaxin 2, STX2) 相互作用参与囊泡运输和融合。网格蛋白包被的囊泡属于一种特定类型的膜囊泡, 在包括膜蛋白内吞和胞吐作用在内的广泛运输途径中发挥重要作用。该囊泡的形成受到许多分子和Arf蛋白的协同调节, 这些分子和Arf蛋白属于小GTP酶家族, 在囊泡形成过程中发挥关键作用^[40-42]。SMAP2在这个过程中帮助CALM将囊泡调动到高尔基体^[38]。STX2是可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE) 复合物的一个组成部分, 参与顶体囊泡的融合^[43-44]。在缺乏SMAP2的小鼠中, SNARE复合物的功能受到抑制, 从而导致顶体无法顺利形成。

EHBP1L1也参与逆向囊泡转运, 它是一种具有单个钙蛋白同源性结构域的蛋白质, 该结构与信号转导和细胞骨架肌动蛋白相关过程相关^[45], 主要是平滑肌收缩/舒张周期和神经元生长。EHBP1L1通过二价Mical/EHBP Rab (bMERB) 和其氨基酸序列中的富含脯氨酸的结构域与小GTP酶Rab8/10、Bin1/两栖素II和动力蛋白相互作用, 形成多蛋白复合物, 调节从反式高尔基体网络到顶端质膜的囊泡运输^[8]。

CENP-E是一种运输马达, 其二聚体可以识别并结合在高尔基体形成的合适囊泡上, 然后沿微管进行运输^[11]。CENP-E缺陷的小鼠精子细胞表现出高尔基体堆叠混乱和解体, 顶体结构不对称, 顶体囊泡分散在胞质中^[37]。GM130是定位在顺式高尔基体上的一种参与高尔基体囊泡运输的蛋白。使用GM130标记CENP-E缺陷的高尔基复合体时发现, 高尔基体的形态变得杂乱无章并分散在细胞质中, 这表明CENP-E在维持高尔基体形态、运输囊泡、膜定位和促使顶体对称方面起重要作用。PICK1位

于精子细胞的高尔基复合体中,通过与 GOPC 相互作用介导囊泡从高尔基复合体到顶体的运输^[26], CENP-E 缺失导致精母细胞中 PICK1 和 GOPC 阳性囊泡解体,使顶体形成早期缺陷,由此推测 CENP-E 参与了高尔基复合体的组合,并在顶体生成过程中将由高尔基复合体产生的囊泡运输到顶体。另外,中心体蛋白 70 (centrosomal protein 70, CEP70) 被发现参与微管的延伸和动态调节,并参与顶体的形成^[46]。

VPS13b 参与囊泡的运输和分选,定位于高尔基体膜和顶体内膜上^[13],与 RAB6 相互作用的 VPS13b 能将高尔基体产生的囊泡定位到微管和肌动蛋白上,并将其运输至细胞核致密层 (nuclear dense layer, NDL)。RAB6 是一种小 GTPase,在逆行运输和基于肌动蛋白的囊泡运输过程中发挥作用^[15]。RAB6 与 TATA 元件调节因子 (TATA element modulatory factor, TMF) 和 GARP 复合物的 VPS54 亚基共同参与囊泡从内质网到高尔基体的逆行转运^[9-10]。TMF 是一种与高尔基体相关的蛋白质,在小鼠体内的缺失会导致圆头精子症。VPS54 是高尔基体相关逆行蛋白复合物 (Golgi-associated retrograde protein, GARP) 的一部分,通过与 RAB6 的 VPS52 亚基相互作用发挥功能。核膜上顶体囊泡的形成取决于微管和肌动蛋白丝,RAB6 被证明介导 Dynein-Dynactin 复合物向高尔基体衍生囊泡的募集^[47],囊泡的形成和运输依赖于微管和肌动蛋白丝。RAB6 在募集 Dynein-Dynactin 复合物参与运输高尔基体衍生囊泡的过程中发挥作用。然而, *Vps13b* 的缺失可能导致 RAB6 的功能受阻,从而妨碍囊泡通过 Dynein-Dynactin 复合物与微管连接,影响前顶体囊泡的运输。此外,在缺乏 VPS13b-RAB6 复合物的情况下,定位于顶体板上的运动肌球蛋白 Va 可能无法与前顶体囊泡结合。因此, VPS13b-RAB6 复合物在囊泡的逆向运输、顺向运输以及锚定到细胞核上都发挥着重要的作用。

去乙酰化酶 1 (sirtuin 1, SIRT1) 属于 sirtuin 蛋白家族,它在顶体发生中通过调节自噬通量来调控顶体生物发生。SIRT1 缺陷小鼠的精子细胞在高尔基体期和帽期中显示出多个顶体结构,提示顶体颗粒未能正确运输到顶体前结构或顶体融合发生异常。在顶体发生的后续阶段,观察到空泡状或不规则形状的顶体。SIRT1 能够通过去乙酰化 LC3 和 Atg7 (autophagy related 7, ATG7) 来调节自噬^[14]。自噬相关基因 ATG7 从高尔基体期开始参与顶体生物

发生, ATG7 缺陷小鼠中的前顶体囊泡无法融合形成单个顶体囊泡,导致圆头精子的产生^[2]。自噬相关基因 12 (ATG12)-ATG5 复合物和 LC3-脂质/膜是自噬体形成的核心机制。LC3 经 ATG7 激活后转移到另一种 E2 样酶 ATG3 上,并与脂质/膜结合。当 LC3 与膜结合时,促进膜扩张和囊泡结合,最终导致来自高尔基体的囊泡相互融合。GOPC 参与从高尔基体到顶体的囊泡运输^[27],且与另一种自噬相关蛋白 Beclin1 (autophagy-related 6, ATG6) 相互作用,两者合作诱导自噬^[48]。PICK1 是与 GOPC 相关的蛋白,它是在圆形精子细胞中高表达的外周膜蛋白,定位于高尔基体来源的顶体前颗粒^[26]。许多 PICK1 分子未能被募集到 *Sirt1* 缺陷精子细胞的顶体区域。只有当 LC3 与膜结合时,才能将 GOPC 递送到顶体,当 *Atg7* 缺陷时, LC3 不能与膜结合, GOPC 无法被递送到顶体,前顶体囊泡无法被运输和融合成顶体^[2]。由此可见, SIRT1 和 ATG7 调节自噬通量,对顶体生物发生起重要作用。LC3 和 Atg7 的去乙酰化调节自噬过程,并对顶体的形成和融合产生影响。

FAM71F1 和 RAB2B 是在高尔基体上共定位的蛋白,可以通过特异性结合抑制过度的囊泡运输^[16]。RAB2B 属于参与囊泡运输和膜运输的一种小 GTP 酶^[15-17],活性 RAB2A/B 能与 Fam71f1 结合并被负调节以形成适当大小的顶体囊泡^[49-50]。活性 GTP 结合蛋白 rab-2 同源物 (GTP-binding protein rab-2 homologue, RAB2) 在高尔基体来源的囊泡中被转运,能与 RAS 癌基因家族成员 (member RAS oncogene family, RAB7) 阳性囊泡融合后形成顶体^[51]。在 Fam71f1 缺陷小鼠中,顶体异常肿胀,分布在整个精子头部,由于顶体受损,透明带 (ZP) 穿透失败,无法完成顶体反应。因此,在顶体形成过程中,适当的囊泡大小同样重要,其中 FAM71F1 与 RAB2B 结合调节囊泡的运输,并确保顶体囊泡的正确形成。

Ssmem1 被鉴定为睾丸特异性基因,在哺乳动物中高度保守。在精子伸长过程中, Ssmem1 参与将高尔基体从精子的头部转移到细胞的尾部区域;在 Ssmem1 敲除小鼠中,高尔基体迁移失败,顶体膜和质膜之间的接触丧失,导致精子形态异常,因此正确的细胞器定位对顶体形成也有重要意义^[36]。

2.2 参与顶体附着到细胞核的蛋白质

多个基因参与顶体锚定细胞核,其中肌动蛋白 6 (myosin VI, MYO6)、myb1 膜运输蛋白的靶点 (target of myb1 membrane trafficking protein, TOM1/

L2)、IZUMO 家族成员 3 (IZUMO family member 3, IZUMO3) 将顶体颗粒定位于顶体内膜^[17, 52]; 肌动蛋白样 7A (actin like 7A, ACTL7A)、精子顶体相关蛋白 1 (sperm acrosome associated 1, SPACA1)、透明带结合蛋白 (zona pellucida binding protein, ZBPB)、纤毛和鞭毛相关蛋白 65 (cilia and flagella associated protein 65, CFAP65)、SUN1 的睾丸特异性亚型 SUN1 η (Sad1 and UNC84 domain containing 1 η) 与含有核包膜家族成员 3 的血影蛋白重复序列 (spectrin repeat containing nuclear envelope family member 3, SYNE3) 形成非 LINC 复合物, 将顶体连接到顶体板上^[21, 35, 52-54]; 具有序列相似性的家族 209 (family with sequence similarity 209, FAM209)、dpy-19 like 2 (DPY19L2) 定位于核膜上, 参与顶体锚定^[24, 55]。

2.2.1 顶体颗粒固定到顶体内膜

MYO6 与 TOM1/L2 相互作用, 定位于精子细胞高尔基复合体和新生顶体周围^[17], 共同保持顶体发育的对称性; TOM1/L2 包含一个中央 GAT 结构域, 该结构域结合泛素, 使 TOM1/L2 与泛素化蛋白相互作用^[56], 通过 MYO6 将顶体颗粒束缚在顶体板中的肌动蛋白丝上, 从而将顶体颗粒锚定在 IAM 的中心位置^[17]。在 *Myo6* 缺失小鼠精子细胞超微结构中, 典型的高尔基体结构丧失, 前顶体囊泡被隔开, 顶体颗粒错位。IZUMO 蛋白家族由四个旁系同源物 IZUMO1~4 组成, 包含八个半胱氨酸的保守簇, 除 IZUMO4 外均为 I 型整合蛋白, IZUMO3 定位于 IAM; 在 *Izumo3* 缺陷的小鼠中, 顶体颗粒和 IAM 在早期缺乏接触, 晚期顶体颗粒不对称延伸, 影响顶体颗粒的定位, 和 *Myo6* 缺失的表型相似^[17]。因此, MYO6 和 IZUMO3 是与顶体发育密切相关的蛋白质。它们通过与其他蛋白质相互作用, 参与顶体颗粒的定位和锚定。因此, 缺乏 MYO6 或 IZUMO3 会导致顶体颗粒的异常定位和顶体发育的障碍。

2.2.2 顶体连接顶体板

SPACA1 是一种跨膜的睾丸特异性蛋白, 仅在圆形精子细胞中定位在顶体外膜, 随着精子的延长, 移到顶体的赤道段^[22]。*Spacal* 缺陷小鼠的顶体-顶体板复合物损伤, 导致顶体、顶体板消失。有报道, ZBPB 将顶体颗粒锚定在顶体内膜, 并通过与 SPACA1 和 ACTL7A 互作形成复合物, 共同将顶体锚定在顶体板的肌动蛋白丝上^[19, 22]。ZBPB 缺陷可导致圆头精子症^[23]。ACTL7A 是一种细胞骨架蛋白, 动态存在于细胞核和顶体内, 在精子变形的步

骤 9 定位于细胞核, 在步骤 2~13 定位于顶体板中, 步骤 6 后定位于精子的边缘环中, 从步骤 7~14 定位于头尾连接处, 以及从步骤 10 开始定位到精子的后顶体;*Actl7a* 敲除小鼠缺乏顶体蛋白酶相关的 F-肌动蛋白, 并表现出顶体与顶体板的黏附缺陷, 在其圆形精子细胞中, 顶体颗粒的锚定异常, 随着精子变形、伸长, 顶体与细胞核分离^[19, 52]。SPACA1 与 ACTL7A 相互作用, 并且 SPACA1 缺乏会影响 ACTL7A 的表达, 破坏顶体对顶体板的锚定, 并导致其分离和塌陷^[57]。顶体板的最顶层富含 ACTL7A 依赖的丝状肌动蛋白轨道, 其上附着有先前描述的顶体颗粒黏附 MYO6 运动蛋白复合物^[17]。除此之外, ACTRT1、ACTRT2、ACTL7A 和 ACTL9 蛋白都是主要定位于核周膜的细胞骨架蛋白, 并且在顶体板内相互作用形成多聚体复合物, 参与连接顶体和细胞核^[32, 58]。

CFAP65 曾被报道会引起精子头部形状或顶体形成缺陷^[20]。在 CFAP65 缺陷小鼠精子发生后期 (步骤 14~15), 发现异常的顶体缺失、顶体凝集失败以及无法准确与 IAM 结合, 顶体在细胞核上的扩散受到影响。同时, CFAP65 与 SPACA1、ZBPB1 相互作用, 也参与顶体锚定顶体板。

抑制蛋白 (profilin, PFN) 是细胞中肌动蛋白聚合的关键调节蛋白, 在小鼠和人类中由四个 *Pfn* 基因编码。PFN3 和 PFN4 都在自噬中起作用, 从而影响顶体发育^[59-60]。PFN3 定位于顶体-顶体板-精子领复合体, 随着精子的顶体发生, 在高尔基体期主要定位在高尔基复合体, 帽期主要定位于前顶体囊泡。在 *Pfn3* 敲除小鼠中, 高尔基体亚域结构被破坏, 顶体畸形、脱落。PFN3 的缺失导致包含三元基序 27 (tripartite motif containing 27, Trim27) 上调, 抑制 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬, 从而使顶体发育停滞^[60]。类似地, PFN4 也定位于顶体-顶体板-精子领复合体。研究发现, *Pfn4* 敲除小鼠的顺式和反式高尔基体的结构均被破坏, 顶体生物发生从高尔基体期到成熟期均异常, 未能形成正常的顶体形态。PFN4 的缺失会影响自噬相关的 PI3K/AKT 和 mTOR 信号通路以及 ER-TGN (ER-TGN) 中的蛋白质加工, 从而影响顶体发生^[61]。

核骨架和细胞骨架复合物 (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton, LINC) 的接头是一种核膜 (nuclear membrane, NE) 桥结构, 参与核骨架与细胞骨架的连接, 对核迁移、定位和锚定至关重要^[61]。LINC 复合物由两个跨膜蛋白家族形成: 位于 ONM

的核包膜特异蛋白重复蛋白和位于 INM 的 Sad1p-UNC84 (SUN) 结构域蛋白, 两个家族均具有单一跨膜通路^[62]。其中, SUN1 的睾丸特异性亚型 SUN1 η 被发现特异性定位在顶体膜上, 它与 SYNE3 形成非核 LINC 复合物, 通过凝集素与顶体板相互作用^[21]。富含角蛋白和纤维肌动蛋白的顶体板包围发育中的顶体并将其锚定在核膜上。SUN5-2 和 SUN5 是新发现的睾丸特异性 SUN 结构域蛋白, 定位于核膜的跨膜蛋白^[55]。SUN5 被描述为具有单个跨膜结构域 (TM) 和 C-末端 SUN 结构域的蛋白质^[63], SUN5-2 是 SUN5 的一种亚型, SUN5 限制于面向顶体的圆形精子细胞的顶端核区域, 因此最可能参与顶体囊泡与细胞核的连接, 并参与顶体生物发生。

精子领与其他蛋白质合作, 确保顶体和细胞核的形成, 从而决定精子头部的形状^[64]。有研究表明, 钙蛋白 (calicin, CCIN) 是一种参与精子领形成的细胞骨架蛋白, *Ccin* 突变小鼠钙蛋白的稳定性被损害从而影响精子主导的精子头部塑造^[25]。另一个参与精子领形成的蛋白 IQ 基序 N (IQ motif-containing N, IQCN) 包含 2 014 个 IQ 基序, 含有 IQ 基序的蛋白质可以招募钙调蛋白, 钙调蛋白是精子中一种后顶体鞘限制表达蛋白, IQCN 通过与钙调蛋白相互作用影响精子领的组装并导致精子头部畸形, 顶体无法正确定位, 被过度拉长, 完全包围精子头部^[33]。

2.2.3 顶体锚定细胞核

DPY19L2 与圆头精子症有关^[65], 它是一种跨膜蛋白, 位于面向核内膜的 INM 上。DPY19L2 的缺失破坏了核 / 顶体连接处的层状结构, 在顶体扩散过程中导致顶体脱离细胞核^[65]。FAM209 是第一个被发现与 DPY19L2 相互作用并作为顶体生物发生所需的核内膜蛋白^[24]。在缺乏 FAM209 的情况下, DPY19L2 与睾丸特异表达的核 E3 泛素连接酶包含三重模体 69 (tripartite motif containing 69, TRIM69/RNF36) 的结合增加, 诱导细胞凋亡^[66], 导致顶体丢失, 提示 FAM209 影响与 DPY19L2 相关的蛋白质。在纤维鞘相互作用蛋白 1 (fibrous sheath interacting protein 1, FSIP1)、FSIP2、锌指 MYND 15 (zinc finger MYND-type containing 15, Zmynd15) 突变患者中 DPY19L2 下调, 这些基因可能会通过调控 DPY19L2 影响精子发生^[31, 67-68]。FSIP1 是精子鞭毛蛋白质组的细胞骨架结构蛋白, FSIP1 缺失小鼠精子头部和顶体膜发生形态学改变。FSIP1 和顶体囊泡蛋白 1 (acrosomal vesicle protein 1, ACRV1) 在顶体囊泡中共表达, ACRV1 是一种顶体囊泡蛋白, FSIP1 缺失导致 ACRV1 蛋

白显著降低, 顶体囊泡易位和扩散。FSIP2 在人和小鼠精子发生过程中定位于精子细胞的顶体。FSIP2 突变患者有发育不全的顶体, FSIP2 变体导致了精子鞭毛和头部的缺陷, 顶体和核膜接触不良或脱离, 产生无顶体精子或破碎的顶体。FSIP2 在顶体生物发生中有综合调节作用, 包括顶体囊泡加工和运输、顶体基质的完整性以及顶体与顶体板和核膜之间的相互作用。SPACA1 是内顶体膜的跨膜蛋白, 参与顶体与顶体膜的对接, DPY19L2 是细胞核内膜的一种结构蛋白, 是将顶体锚定在细胞核上所必需的。FSIP 位于顶体板之间, 通过与 SPACA1 和 DPY19L2 连接组成复合物, 确保顶体的正确定位^[31]。如前所述, SPACA1 参与将顶体锚定到顶体板上, 而 DPY19L2 是细胞核内膜的一种结构蛋白, 是将顶体锚定在细胞核上所必需的, 因此, FSIP2 分别参与顶体和顶体板以及顶体和核膜的连接^[31]。

聚苯乙烯纳米塑料 (polystyrene nanoplastics, PS-NPs) 给药后, 顶体完整性和顶体反应降低^[69], 给药小鼠睾丸中 GOPC 和 DPY19L2 明显降低并且自噬受到抑制, 表明前顶体颗粒运输过程及将顶体锚定到核膜的过程受到干扰, 而自噬参与 PS-NPs 诱导的高尔基体相关囊泡解体, 从而导致顶体缺陷。

3 总结与展望

本文重点综述了近年来发现的与顶体形成过程相关的蛋白分子, 为进一步认识顶体形成过程提供了非常重要的信息, 也有助于进一步认识可能导致男性不育和男性生育力低下的某些分子。小鼠顶体形成是精子发生过程中非常重要的过程, 精子经历了复杂的演变才能成熟, 从而获得与卵子结合的能力。顶体的缺陷会导致多种类型的男性不育症, 因此, 发现更多的顶体形成相关的未知蛋白并开展顶体形成相关蛋白之间的相互作用及其调节机制的研究至关重要, 这将有助于阐明顶体形成这个高度复杂的过程, 以为诊断和治疗男性不育提供新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Vander Borcht M, Wyns C. Fertility and infertility: definition and epidemiology. *Clin Biochem*, 2018, 62: 2-10
- [2] Wang H, Wan H, Li X, et al. Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. *Cell Res*, 2014, 24: 852-69
- [3] Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol*

- Biol Cell, 2003, 14: 4628-40
- [4] Berruti G, Paiardi C. Acrosome biogenesis: revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*, 2011, 1: 95-8
- [5] Xiong W, Shen C, Wang Z. The molecular mechanisms underlying acrosome biogenesis elucidated by gene-manipulated mice. *Biol Reprod*, 2021, 105: 789-807
- [6] Khawar MB, Gao H, Li W. Mechanism of acrosome biogenesis in mammals. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 195
- [7] Manfredola F, Guillou F, Fasano S, et al. LINCKing the nuclear envelope to sperm architecture. *Genes*, 2021, 12: 658
- [8] Venditti M, Minucci S. Differential expression and localization of EHBP1L1 during the first wave of rat spermatogenesis suggest its involvement in acrosome biogenesis. *Biomedicines*, 2022, 10: 181
- [9] Yamane J, Kubo A, Nakayama K, et al. Functional involvement of TMF/ARA160 in Rab6-dependent retrograde membrane traffic. *Exp Cell Res*, 2007, 313: 3472-85
- [10] Bonifacino JS, Hierro A. Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 159-67
- [11] Yardimci H, Van Duffelen M, Mao Y, et al. The mitotic kinesin CENP-E is a processive transport motor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 6016-21
- [12] Han F, Liu C, Zhang L, et al. Globozoospermia and lack of acrosome formation in GM130-deficient mice. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2532
- [13] Da Costa R, Bordessoules M, Guilleman M, et al. Vps13b is required for acrosome biogenesis through functions in Golgi dynamic and membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77: 511-29
- [14] Liu C, Song Z, Wang L, et al. Sirt1 regulates acrosome biogenesis by modulating autophagic flux during spermiogenesis in mice. *Development*, 2017, 144: 441-51
- [15] Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, et al. Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 2015, 290: 3349-58
- [16] Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, et al. FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice. *Development*, 2021, 148: dev199644
- [17] Zakrzewski P, Rędowicz MJ, Buss F, et al. Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis. *Biol Reprod*, 2020, 103: 521-33
- [18] Inoue N, Satouh Y, Wada I. IZUMO family member 3, IZUMO3, is involved in male fertility through the acrosome formation. *Mol Reprod Dev*, 2021, 88: 479-81
- [19] Zhou X, Liu Z, Jia W, et al. Actl7a deficiency in mice leads to male infertility and fertilization failure. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 623: 154-61
- [20] Wang W, Tu C, Nie H, et al. Biallelic mutations in CFAP65 lead to severe asthenoteratospermia due to acrosome hypoplasia and flagellum malformations. *J Med Genet*, 2019, 56: 750-7
- [21] Göb E, Schmitt J, Benavente R, et al. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS One*, 2010, 5: e12072
- [22] Fujihara Y, Satouh Y, Inoue N, et al. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development*, 2012, 139: 3583-9
- [23] Oud MS, Okutman Ö, Hendricks LAJ, et al. Exome sequencing reveals novel causes as well as new candidate genes for human globozoospermia. *Hum Reprod*, 2020, 35: 240-52
- [24] Castaneda JM, Shimada K, Satouh Y, et al. FAM209 associates with DPY19L2, and is required for sperm acrosome biogenesis and fertility in mice. *J Cell Sci*, 2021, 134: jcs259206
- [25] Fan Y, Huang C, Chen J, et al. Mutations in CCIN cause teratozoospermia and male infertility. *Sci Bull*, 2022, 67: 2112-23
- [26] Xiao N, Kam C, Shen C, et al. PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest*, 2009, 119: 802-12
- [27] Yao R, Ito C, Natsume Y, et al. Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 11211-6
- [28] Matsudaira T, Uchida Y, Tanabe K, et al. SMAP2 regulates retrograde transport from recycling endosomes to the Golgi. *PLoS One*, 2013, 8: e69145
- [29] Li W, Wu H, Li F, et al. Biallelic mutations in CFAP65 cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella in humans and mice. *J Med Genet*, 2020, 57: 89-95
- [30] Zhao S, Cui Y, Guo S, et al. Novel variants in ACTL7A and PLCZ1 are associated with male infertility and total fertilization failure. *Clin Genet*, 2023, 103: 603-8
- [31] Zheng R, Wang Y, Li Y, et al. FSIP2 plays a role in the acrosome development during spermiogenesis. *J Med Genet*, 2022, 60: 254-64
- [32] Dai J, Zhang T, Guo J, et al. Homozygous pathogenic variants in ACTL9 cause fertilization failure and male infertility in humans and mice. *Am J Hum Genet*, 2021, 108: 469-81
- [33] Dai J, Li Q, Zhou Q, et al. IQCN disruption causes fertilization failure and male infertility due to manchette assembly defect. *EMBO Mol Med*, 2022, 14:e16501
- [34] Ruan T, Yang Y, Jiang C, et al. Identification of biallelic variations of CEP70 in patients with male infertility. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1133222
- [35] Chen P, Saiyin H, Shi R, et al. Loss of SPACA1 function causes autosomal recessive globozoospermia by damaging

- the acrosome-acroplaxome complex. *Hum Reprod*, 2021, 36: 2587-96
- [36] Nozawa K, Zhang Q, Miyata H, et al. Knockout of serine-rich single-pass membrane protein 1 (Ssmem1) causes globozoospermia and sterility in male mice. *Biol Reprod*, 2020, 103: 244-53
- [37] She ZY, Yu KW, Wei YL, et al. Kinesin-7 CENP-E regulates the formation and structural maintenance of the acrosome. *Cell Tissue Res*, 2021, 383: 1167-82
- [38] Funaki T, Kon S, Tanabe K, et al. The Arf GAP SMAP2 is necessary for organized vesicle budding from the trans-Golgi network and subsequent acrosome formation in spermiogenesis. *Mol Biol Cell*, 2013, 24: 2633-44
- [39] Uchida Y, Hasegawa J, Chinnapen D, et al. Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 15846-51
- [40] Donaldson JG, Jackson CL. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 362-75
- [41] Kahn RA. Toward a model for Arf GTPases as regulators of traffic at the Golgi. *FEBS Lett*, 2009, 583: 3872-9
- [42] Kon S, Funaki T, Satake M. Putative terminator and/or effector functions of Arf GAPs in the trafficking of clathrin-coated vesicles. *Cell Logist*, 2011, 1: 86-9
- [43] Roqueta-Rivera M, Abbott TL, Sivaguru M, et al. Deficiency in the omega-3 fatty acid pathway results in failure of acrosome biogenesis in mice. *Biol Reprod*, 2011, 85: 721-32
- [44] Rizo J, Südhof TC. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Annu Rev Biophys*, 2002, 3: 641-53
- [45] Venditti M, Donizetti A, Aniello F, et al. EH domain binding protein 1-like 1 (EHBP1L1), a protein with calponin homology domain, is expressed in the rat testis. *Zygote*, 2020, 28: 441-6
- [46] Liu Q, Guo Q, Guo W, et al. Loss of CEP70 function affects acrosome biogenesis and flagella formation during spermiogenesis. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 478
- [47] Wanschers B, Van De Vorstenbosch R, Wijers M, et al. Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2008, 65: 183-96
- [48] Yue Z, Horton A, Bravin M, et al. A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron*, 2002, 35: 921-33
- [49] Kajihō H, Kajihō Y, Frittoli E, et al. RAB2A controls MT1-MMP endocytic and E-cadherin polarized Golgi trafficking to promote invasive breast cancer programs. *EMBO Rep*, 2016, 17: 1061-80
- [50] Lőrincz P, Tóth S, Benkő P, et al. Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *J Cell Biol*, 2017, 216: 1937-47
- [51] Ramalho-Santos J, Moreno RD. Targeting and fusion proteins during mammalian spermiogenesis. *Biol Res*, 2001, 34: 147-52
- [52] Ferrer P, Upadhyay S, Ikawa M, et al. Testis-specific actin-like 7A (ACTL7A) is an indispensable protein for subacrosomal-associated F-actin formation, acrosomal anchoring, and male fertility. *Mol Hum Reprod*, 2023, 29: gaad005
- [53] Lin YN, Roy A, Yan W, et al. Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 6794-805
- [54] Wang W, Tian S, Nie H, et al. CFAP65 is required in the acrosome biogenesis and mitochondrial sheath assembly during spermiogenesis. *Hum Mol Genet*, 2021, 30: 2240-54
- [55] Frohnert C, Schweizer S, Hoyer-Fender S. SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol Hum Reprod*, 2011, 17: 207-18
- [56] Yamakami M, Yoshimori T, Yokosawa H. Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin. *J Biol Chem*, 2003, 278: 52865-72
- [57] Aizawa M, Fukuda M. Small GTPase Rab2B and its specific binding protein Golgi-associated Rab2B interactor-like 4 (GARI-L4) regulate Golgi morphology. *J Biol Chem*, 2015, 290: 22250-61
- [58] Zhang XZ, Wei LL, Zhang XH, et al. Loss of perinuclear theca ACTRT1 causes acrosome detachment and severe male subfertility in mice. *Development*, 2022, 149: dev200489
- [59] Umer N, Phadke S, Shakeri F, et al. PFN4 is required for manchette development and acrosome biogenesis during mouse spermiogenesis. *Development*, 2022, 149: dev200499
- [60] Umer N, Arévalo L, Phadke S, et al. Loss of profilin3 impairs spermiogenesis by affecting acrosome biogenesis, autophagy, manchette development and mitochondrial organization. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 749559
- [61] Ungricht R, Kutay U. Mechanisms and functions of nuclear envelope remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 229-45
- [62] Sosa BA, Rothballer A, Kutay U, et al. LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell*, 2012, 149: 1035-47
- [63] Xing XW, Li LY, Liu G, et al. Identification of a novel gene SRG4 expressed at specific stages of mouse spermatogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, 36: 351-9
- [64] O'Donnell L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*, 2014, 4: e979623
- [65] Pierre V, Martinez G, Coutton C, et al. Absence of

- Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development*, 2012, 139: 2955-65
- [66] Shyu HW, Hsu SH, Hsieh-Li HM, et al. Forced expression of RNF36 induces cell apoptosis. *Exp Cell Res*, 2003, 287: 301-13
- [67] Gamallat Y, Fang X, Mai H, et al. Bi-allelic mutation in *Fsip1* impairs acrosome vesicle formation and attenuates flagellogenesis in mice. *Redox Biol*, 2021, 43: 101969
- [68] Wen Y, Wang X, Zheng R, et al. Sequencing of the *ZMYND15* gene in a cohort of infertile Chinese men reveals novel mutations in patients with teratozoospermia. *J Med Genet*, 2022, 60: 380-90
- [69] Zhou L, Yu Z, Xia Y, et al. Repression of autophagy leads to acrosome biogenesis disruption caused by a sub-chronic oral administration of polystyrene nanoparticles. *Environ Int*, 2022, 163: 107220