



N⁶-甲基腺嘌呤修饰及其调控因子在男性生殖中的作用*

蒋婷^{1,2}, 张学广^{1,2}, 许文明^{1,2Δ}

1. 四川大学华西第二医院 生殖遗传与表观遗传调控研究室(成都 610041);
2. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】 在哺乳动物中,精子发生是一个高度复杂且协调的生殖细胞分化过程,这一过程受到转录、转录后和翻译水平的精确调控,以确保不同发育阶段的生精细胞正确表达特定基因并维持正常的生精过程。N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是真核生物mRNA上最丰富的修饰,在诸如mRNA剪接、转运和翻译等多个生物过程发挥关键作用。RNA甲基化修饰是一个动态可逆的过程,主要通过编码器(writers)催化、消码器(erasers)去除和读码器(readers)识别来调控修饰水平。本文首先概述了精子发生的主要阶段,然后重点介绍m⁶A修饰及相关蛋白在雄性生殖细胞不同发育阶段的关键功能,最后简要总结了目前检测m⁶A的主要方法,以期深入了解RNA修饰在调控精子发生以及在男性不育中发挥的作用和机制。

【关键词】 精子发生 N⁶-甲基腺嘌呤 RNA修饰 男性不育 表观遗传学 综述

The Roles of N⁶-Methyladenosine Modification and Its Regulators in Male Reproduction JIANG Ting^{1,2}, ZHANG Xueguang^{1,2}, XU Wenming^{1,2Δ}. 1. Laboratory of Reproductive Genetics and Epigenetic Regulation, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children of the Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, E-mail: xuwenming@scu.edu.cn

【Abstract】 Infertility affects an estimated 10 to 15 percent of couples worldwide, with approximately half of the cases attributed to male-related issues. Most men diagnosed with infertility exhibit symptoms such as oligospermia, asthenospermia, azoospermia, and compromised sperm quality. Spermatogenesis is a complex and tightly coordinated process of germ cell differentiation, precisely regulated at transcriptional, posttranscriptional, and translational levels to ensure stage-specific gene expression during the development of spermatogenic cells and normal spermiogenesis. N⁶-methyladenosine (m⁶A) stands out as the most prevalent modification on eukaryotic mRNA, playing pivotal roles in various biological processes, including mRNA splicing, transportation, and translation. RNA methylation modification is a dynamic and reversible process primarily mediated by “writers”, removed by “erasers”, and recognized by “readers”. In mammals, the aberrant methylation modification of m⁶A on mRNA is associated with a variety of diseases, including male infertility. However, the precise involvement of disrupted m⁶A modification in the pathogenesis of human male infertility remains unresolved. Intriguingly, a significant correlation has been found between the expression levels of m⁶A regulators in the testis and the severity of sperm concentration, motility, and morphology. Aberrant expression patterns of m⁶A regulatory proteins have been detected in anomalous human semen samples, including those of oligospermia, asthenozoospermia, and azoospermia. Furthermore, the examination of both sperm samples and testicular tissues revealed abnormal mRNA m⁶A modification, leading to reduced sperm motility and concentration in infertile men. Consequently, it is hypothesized that dysregulation of m⁶A modification might serve as an integral link in the mechanism of male infertility. This paper presents a comprehensive review of the recent discoveries regarding the spatial and temporal expression dynamics of m⁶A regulators in testicular tissues and the correlation between deregulated m⁶A regulators and human male infertility. Previous studies predominantly utilized constitutive or conditional knockout animal models for testicular phenotypic investigations. However, gene suppression in additional tissues could potentially influence the testis in constitutive knockout models. Furthermore, considering the compromised spermatogenesis observed in constitutive animals, distinguishing between the indirect effects of gene depletion on testicular development and its direct impact on the spermatogenic process is challenging, due to their intricate relationship. Such confounding factors might compromise the validity of the findings. To address this challenge, an inducible and conditional gene knockout model may serve as a superior approach. To date, nearly all reported studies have concentrated solely on the level changes of m⁶A and its regulators in germs cells, while the understanding of the function of m⁶A modification in testicular somatic cells remains limited. Testicular somatic cells, including peritubular myoid cells, Sertoli cells, and Leydig cells, play indispensable roles during spermatogenesis. Hence, comprehensive exploration of m⁶A modification within

* 国家重点研发计划(No. 2022YFC2702603-1)和国家自然科学基金(No. 82371624)资助

Δ 通信作者, E-mail: xuwenming@scu.edu.cn

出版日期: 2024-05-20

these cells as an additional crucial regulatory mechanism is warranted. In addition, exploration into the presence of unique methylation mechanisms or m⁶A regulatory factors within the testes is warranted. To elucidate the role of m⁶A modification in germ cells and testicular somatic cells, detailed experimental strategies need to be implemented. Among them, manipulation of the levels of key enzymes involved in m⁶A methylation and demethylation might be the most effective approach. Moreover, comprehensive analysis of the gene expression profiles involved in various signaling pathways, such as Wnt/ β -catenin, Ras/MAPK, and Hippo, in m⁶A-modified germ cells and testicular somatic cells can provide more insight into its regulatory role in the spermatogenesis process. Further research in this area could provide valuable insights for developing innovative strategies to treat male infertility. Finally, considering the mitigation impact of m⁶A imbalance regulation on disease, investigation concerning whether restoring the equilibrium of m⁶A modification regulation can restore normal spermatogenesis function is essential, potentially elucidating the pivotal clinical significance of m⁶A modulation in male infertility.

【Key words】 Spermatogenesis N⁶-methyladenosine RNA modifications Male infertility
Epigenetics Review

近几十年来,不孕症的患病率在世界范围内逐步上升,已成为普遍存在的健康问题。研究表明,不孕夫妇中约有30%~50%的病例是由男性不育引起的^[1]。大多数男性不育患者表现为少精、弱精、无精和精子畸形等症状。精子发生,即从精原细胞到精子的转变,是哺乳动物中一个复杂且高度协调的发育过程,此过程需要转录、转录后和翻译水平上的精确调控,以确保不同发育阶段特定基因的正确表达。越来越多的研究表明,表观遗传修饰失调会干扰精子发生,从而导致精子发生障碍和男性不育。

表观遗传学是研究DNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA调控和RNA修饰的学科。迄今为止,在RNA中已经鉴定出170多种不同的化学修饰,这些修饰在精子发生、胚胎发育、神经系统发育和肿瘤等多种生理和病理过程中起着关键作用^[2]。其中,N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是真核生物mRNA上丰度最高的内部修饰,大约25%的mRNA含有m⁶A修饰,主要位于3'非翻译区(3' UTR)、外显子区和终止密码子附近^[3]。由于高丰度以及能够准确定位在转录组中的位置,m⁶A修饰是目前研究最多的RNA修饰之一。

研究表明,雄性生殖系统中m⁶A修饰相关蛋白被敲除后,小鼠的m⁶A修饰水平发生改变,常导致小鼠的睾丸形态变小,雄性生殖细胞不能正常进行精子发生,最终导致雄性小鼠不育^[4]。因此,m⁶A修饰在精子发生过程中发挥着不可或缺的作用。本文综述了m⁶A修饰在精子发生中的功能,以及其与男性不育相关的研究进展,以期未来m⁶A修饰相关的研究能够揭示更深层次的男性不育机制,进而推动创新治疗策略的发展。

1 精子发生过程

精子发生是一个复杂的发育过程,包括3个阶段:精原细胞分化,即精原细胞发育成精母细胞的过程;精母细

胞经历减数分裂成单倍体精子细胞;精子形成,即圆形精细胞经历形态变化产生精子^[5]。具体而言,一部分精原细胞继续保持有丝分裂的能力而不进入精子发生周期,另一部分首先通过分裂增殖形成初级精母细胞。初级精母细胞经历减数分裂形成单倍体的精子细胞。最后精子细胞在经历复杂的演变后形成精子。这些过程在转录、转录后以及翻译水平上均受到多种调控因子的精细调节。深入研究精子发生过程中的调控机制将为理解生殖细胞发生、分化和治疗男性不育提供理论基础和实践指导。

2 m⁶A修饰及相关蛋白

最近的研究揭示了成年小鼠生精细胞5个发育阶段的m⁶A修饰转录组图谱,涉及未分化精原细胞、A1型精原细胞、前细线期精母细胞、粗线期/双线期精母细胞和圆形精子细胞。研究发现m⁶A修饰的丰度和分布随着雄性生殖细胞发育的不同阶段呈现出动态变化,这凸显了m⁶A修饰相关蛋白在精子发生中的重要作用^[4]。调节RNA甲基化修饰的蛋白可以分为3种类型:编码器(writers)、消码器(erasers)和读码器(readers),这些蛋白酶分别能够添加、去除和识别RNA上的m⁶A修饰。

2.1 甲基转移酶“writers”

m⁶A修饰主要由一系列甲基转移酶复合物催化产生,包括METTL3、METTL14和METTL5以及其他蛋白质亚基(如WTAP、VIRMA、HAKAI和ZC3H13)。其中,METTL3是唯一具有催化活性的亚基,METTL14由于缺乏SAM结合位点,能够与METTL3形成稳定的异二聚体从而实现与底物的最佳结合,优先识别RRACH序列,从而影响m⁶A修饰沉积^[6]。而WTAP、VIRMA、ZC3H13、HAKAI和RBM15/RBM15B形成一个被称为m⁶A-METTL的调节亚基(MACOM),主要负责mRNA区域选择性甲基化^[7]。核斑点是在细胞核内染色质区域之间的

非膜结构亚区域,富含RNA和蛋白质的颗粒或核小体,其中许多是剪接因子,因此核斑点能够参与RNA加工和选择性剪接。WTAP能够稳定METTL3和METTL14形成的异二聚体并有助于将复合物招募到核斑点,表明m⁶A修饰可能会影响细胞核内mRNA的剪接和输出^[8]。ZC3H13通过C端片段(1 492 ~ 1 643 aa)深入结合VIRMA的中心部分从而锚定在复合物上^[3]。RBM15能够促进METTL3和WTAP的结合并将这两种蛋白质引导至作用靶点^[9]。

其他甲基转移酶,如近几年发现的METTL5,能够使18S rRNA上1832位点发生m⁶A甲基化^[3]。ZCCHC4则负责在28S rRNA的4 220位点催化形成m⁶A修饰^[10]。METTL16的3个多肽片段(残基34 ~ 48、189 ~ 213和277 ~ 280)相互作用并能够识别编码SAM合成酶的MAT2A转录物和U6 snRNA^[11]。总的来说,目前对m⁶A甲基转移酶的结构和功能的研究仍处于探索阶段,期望未来能够更清晰地解析m⁶A相关蛋白的结构并且发现更多m⁶A甲基转移酶。

2.2 去甲基化酶“erasers”

肥胖相关蛋白(FTO)作为第一个被发现的去甲基化酶,表明了m⁶A修饰是一个动态可逆的过程。FTO属于Fe(II)和 α -酮戊二酸(α -KG)依赖性双加氧酶的ALKB家族蛋白,能够优先与内含子发生甲基化的pre-mRNA结合^[12]。FTO介导的去甲基化过程包括:FTO能以Fe(II)为辅基,通过分子氧催化氧化腺嘌呤第六位的甲基,生成不稳定的中间体-6-羟甲基腺嘌呤(hm⁶A),而 α -KG氧化脱羧形成琥珀酸盐,hm⁶A转化为6-甲酰基腺嘌呤(fm⁶A),最后fm⁶A脱去一分子甲酸变成腺嘌呤(A)^[13]。研究表明,FTO可能与肥胖、脑畸形和生长迟缓有关,提示了RNA修饰在这些疾病中可能具有基本的调节功能^[12]。ALKBH5是一种存在于细胞核斑点中的去甲基化酶,仅负责催化ssRNAs上m⁶A的去除,并且其去甲基活性会影响mRNA的代谢和相关基因的表达^[14]。

2.3 识别蛋白“readers”

RNA上的化学修饰会直接影响转录本的性质,包括电荷、碱基配对、RNA二级结构以及蛋白质与RNA相互作用,进而通过调节RNA加工、定位、翻译和衰变来影响基因表达。有趣的是,m⁶A还可以通过招募特定的识别蛋白间接影响RNA加工。迄今为止,m⁶A读码器主要包括YTH结构域蛋白家族、异质核糖核蛋白家族(HNRNP)、IGF2BPs、eIF3、FMRP、SND1、FXR1、FXR2和PRRC2A等^[13]。由于RNA在代谢过程中定位于不同细胞器,因此识别蛋白可分为核识别蛋白和细胞质识别蛋白,而前者更有可能参与选择性剪接、RNA构象改变和核输出。

YT521-B同源性(YTH)RNA结合结构域高度保守,并包含一个用于特异性识别并结合m⁶A甲基化位点“口袋”,该蛋白家族包括YTHDF1-3、YTHDC1和YTHDC2^[3]。YTHDF2作为第一个被鉴定出的m⁶A识别蛋白,能够选择性地与m⁶A修饰的mRNA结合,并且通过募集CCR4-NOT去甲基化酶复合物来破坏靶向RNA的稳定性,从而促进mRNA降解进而加速mRNA衰变^[15]。相反,YTHDF1通过与翻译起始因子eIF3相互作用来促进mRNA翻译^[16]。此外,YTHDF3不仅可以与YTHDF2协同作用促进mRNA衰变,还可以与YTHDF1合作促进甲基化RNA的翻译,当YTHDF3缺失后,YTHDF1和YTHDF2与转录本的结合降低,表明YTHDF3在与RNA特异性结合中发挥着重要作用^[17]。YTHDC1能够促进剪接过程中的外显子包含和m⁶A修饰的mRNA由细胞核向细胞质的输出^[15]。作为YTH蛋白家族中相对分子质量最大的蛋白,YTHDC2能够形成解旋酶复合物,优先识别m⁶A修饰mRNA转录本并加速mRNA的翻译和衰变^[18]。

HNRNP蛋白家族包括HNRNPC、HNRNPG和HNRNPA2B1等。HNRNPA2B1是该家族中著名的m⁶A识别蛋白,目前关于HNRNPA2B1参与m⁶A修饰调控的机制主要存在两个观点:①HNRNPA2B1与核转录物中含有RG(m⁶A)C基序的RNA结合,通过与METTL3协同作用调节转录物外显子区域的选择性剪接;②m⁶A修饰后的RNA结构构象发生变化,其与HNRNPA2B1的结合位点的可及性增加,能够间接促进pri-miRNAs的加工。HNRNPC和HNRNPG作为细胞核内的RNA结合蛋白,不直接与m⁶A修饰位点结合,是因为m⁶A修饰会改变RNA的结构,影响其与RNA的结合,从而影响靶RNA的丰度和选择性剪接^[19]。

IGF2BPs是高度保守的RNA结合蛋白,通过识别GG(m⁶A)C序列来靶向mRNA。与含有YTH结构域的蛋白质促进mRNA衰变的功能相反,IGF2BPs在正常和应激条件下以m⁶A依赖的方式增强其靶mRNA(如MYC)的稳定性,影响基因表达。此外,IGF2BPs还可以通过募集辅因子,如MATR3和ELAVL蛋白,增强与其结合的靶RNA的稳定性^[20]。

PRRC2A存在于神经细胞,并高表达于神经发育期。主要靶向mRNA的3' UTR和编码区。PRRC2A通过结合Olig2编码区中的GGACU基序,以m⁶A依赖的方式调控Olig2转录本的稳定性^[21]。

3 m⁶A修饰调控精子发生的机制

越来越多的研究表明,m⁶A修饰调节因子的异常表达导致m⁶A修饰水平改变,进而导致小鼠、非洲爪蟾、斑

马鱼和果蝇等物种生殖功能障碍和不育^[5]。因此调节失调的m⁶A修饰可能是治疗由于其在体内水平失衡引起的疾病的重要方向。鉴于人类男性不育的致病机制尚不清楚,并且临床的治疗方法有限,因此,解析m⁶A修饰及相关蛋白在精子发生的分子机制将有助于发现男性不育症的潜在治疗靶点(图1)。

3.1 m⁶A甲基转移酶调控精子发生

研究表明,m⁶A修饰的转录本存在于所有类型的雄性生殖细胞中。在精子发生的晚期阶段,来自精母细胞和圆形精子细胞的转录物为精子变形提供必要的蛋白质合成。甲基转移酶参与精原干细胞的增殖分化、减数分裂和精子发生过程。METTL3不仅具有催化活性,还能够招募翻译起始蛋白eIF3启动翻译^[22]。*Mettl3*或*Mettl14*的生殖细胞条件性敲除会降低小鼠睾丸总RNA的m⁶A修饰水平,导致与精原细胞维持(如*Dazl*、*Ddx4*、*Plzf*、*Pax7*、*Nanos2*、*Id4*、*Pou3f1*、*Taf4b*和*Bcl6*)、分化(如*Sohlh1*、*Sohlh2*、*Neurog3*、*Kit*、*Dmrt1*和*Sox3*)、细胞周期(*Ccna1*、*Ccna2*、*Ccnb1*、*Ccnb2*、*Ccnb3*、*Ccne2*、*Cdk1*和*Rad51*)和减数分裂过程(*Stra8*、*Sycp1*、*Sycp3*、*Spo11*、*Rad18*、*Dmc1*、*Rec8*、*Mlh1*和*Smc1b*)相关的基因水平下调,并且表现出可变剪接异常,引起精原干细胞凋亡,阻碍精子发生^[23-24]。

精原干细胞(SSC)中的大多数关键调节因子都具有广泛的m⁶A修饰,如*Plzf*、*Id4*、*Dnmt3b*和*Sohlh2*。当甲基转移酶*Mettl3*和*Mettl14*双重缺失后,m⁶A水平下降,这些

关键调节因子出现翻译失调,大量精原干细胞发生细胞凋亡,表明METTL3或METTL14通过控制与精原干细胞增殖和分化相关的关键调节因子的甲基化转录物来维持精原干细胞/祖细胞稳态^[24]。

甲基转移酶通过改变m⁶A修饰的丰度和位点来影响精子发生过程中相关基因转录和翻译,进一步调节生精细胞增殖、转移和代谢。截至目前,只有少数甲基化转移酶在精子发生中被研究,但METTL16等多数甲基化转移酶在精子发生中发挥何种作用仍有待研究。目前对甲基转移酶如METTL3、METTL14在精子发生中的作用有了一定认识,但仍有很多问题值得进一步探索。例如,除了影响关键调控基因的表达,m⁶A修饰是否还通过其他机制(如影响RNA稳定性、定位、剪接等)调控精子发生?不同类型的精子发生细胞中m⁶A修饰图谱有何差异?这些差异与细胞命运决定是否相关?细胞内外环境的变化如何影响甲基转移酶的活性从而调节m⁶A修饰水平?未来可通过结合生物信息学分析和实验手段,绘制精子发生不同阶段的m⁶A图谱,并探索其调控机制。此外,通过筛选甲基转移酶的小分子激动剂/抑制剂,有望发现调节m⁶A水平、治疗男性不育的潜在药物。

3.2 去甲基化酶调控精子发生

ALKBH5通过发挥去甲基化活性,对mRNA输出、代谢以及核斑点中mRNA加工因子的组装起着重要作用^[25]。ALKBH5在粗线期精母细胞和圆形精子细胞中高表达,而在长形精子细胞中表达极低甚至无法检测。*Alkbh5*缺

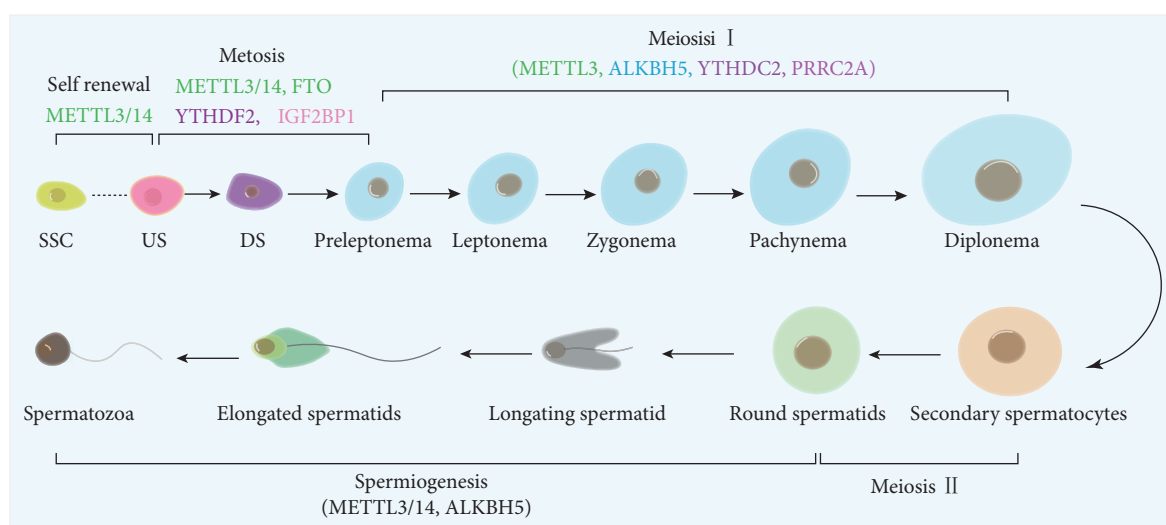


图 1 m⁶A相关蛋白在精子发生过程中的作用研究

Fig 1 Studies on the roles of m⁶A regulators in spermatogenesis

SSC: spermatogenic stem cells; US: undifferentiated spermatogonia; DS: differentiated spermatogonia; METTL3/14: methyltransferase 3/14; FTO: fat mass and obesity-associated protein; YTHDF2: YTH N⁶-methyladenosine RNA binding protein 2; IGF2BP1: insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1; ALKBH5: human AlkB homolog 5; YTHDC2: YTH domain containing 2; PRRC2A: proline rich coiled-coil 2A.

失导致小鼠睾丸组织中mRNA上的m⁶A修饰增加, 睾丸中18种与精子发生和细胞凋亡相关的基因水平发生变化, 导致精母细胞在减数分裂 I 前期的粗线期和中期发生细胞凋亡^[25]。ALKBH5和METTL3的共同调控使得粗线期精母细胞至圆形和长形的精细胞中的m⁶A修饰水平逐渐上升, 从而使m⁶A修饰的mRNA更容易被选择性剪接成circRNA, 引起circRNA的积累。因此, 研究者推测ALKBH5和METTL3或许通过m⁶A依赖的方式调控圆形精母细胞至成熟精子过程中circRNA的表达, 以确保正常的精子生成^[26]。

当小鼠GC-1精原细胞系中的去甲基化酶FTO被敲除后, 有丝分裂检查点复合体(MCC)相关蛋白, 如MAD1、MAD2、BUB1、BUB1B、BUB3和CDC20表达水平显著降低, mRNA稳定性下降, 染色体异常分离, 并诱导细胞在有丝分裂时期形成非整倍体。此外, CDK1/CCNB2蛋白复合物的表达也下降, 导致精原细胞在G₂到M期出现细胞周期停滞^[27]。进一步表明FTO可能与精原干细胞的调控密切相关。

另一项研究表明, FTO通过以m⁶A依赖的方式调节雄激素受体的翻译, 在精子发生和睾丸间质细胞成熟的调节中发挥着至关重要的作用。而在男性不育患者中发现了两个FTO的功能突变, 导致FTO蛋白截短和体外m⁶A修饰增加, 表明开发睾丸中FTO激动剂可能用于治疗少精子症或无精症具有潜在的临床价值, 特别是对于中年男性患者^[28]。然而, 由于FTO的激活可能会引发癌症, 因此需要更加完善的研究, 综合考量m⁶A相关蛋白在体内发挥的作用, 来验证FTO对男性不育症的潜在治疗效果^[29]。

3.3 m⁶A结合蛋白调控精子发生

不同的m⁶A识别蛋白通过识别特定mRNA上的m⁶A修饰参与各种RNA代谢过程, 同样对精子发生至关重要。YTHDC2作为减数分裂启动的重要转录后调控因子之一, 与MEIOC共同作用调节有丝分裂到减数分裂的转变, 能够优先识别含m⁶A的转录物^[30]。当敲除*Ythdc2*后, 小鼠睾丸内m⁶A修饰的mRNA丰度增加, 调控有丝分裂周期的CCNA2蛋白水平上调, γ -H2AX和Sycp3水平下调, 导致精母细胞过早进入减数分裂 I 中期, 阻碍正常精子发生, 这表明YTHDC2是维持雄性生殖细胞中mRNA水平稳定所必需的, 并在精子细胞进入减数分裂早期发挥重要作用^[31]。

YTHDF2在精原细胞和精细胞的细胞质中高表达, 参与调节GC-1精原细胞系的迁移和增殖^[32]。当在小鼠睾丸中特异性敲除*Ythdf2*后, 在分化的精原细胞向粗线期精母细胞过渡的过程中, m⁶A修饰和YTHDF2靶向的转录相

关基因(如*Brwd1*、*Jarid2*、*Egr1*和*Tsc22d3*)降解速率下降, 引起异常转录, 小鼠生精细胞出现大量凋亡, 附睾精子数量和活力降低, 畸形精子数增加, 最终导致雄性小鼠的生育能力受损^[33]。

IGF2BP1在人类胎儿睾丸和成人睾丸之间的表达水平存在显著差异。IGF2BP1在胚胎早期(妊娠10周)主要表达在睾丸支持细胞中; 进入胎儿晚期(孕20~25周)后, IGF2BP1在体细胞中的表达减少而在生精细胞中表达增加; 在成人睾丸中, 其表达仅限于精原细胞, 这表明IGF2BP1可能在睾丸发育中发挥着不可或缺的作用^[34]。

在减数分裂 I 前期, PRRC2A与精原细胞特异基因(*Plzf*、*Foxo1*、*Sall4*和*Sox3*等)结合, 识别并下调特异性转录物, 促进精子发生从有丝分裂过渡到减数分裂。PRRC2A还与多种可降解mRNA和/或促进翻译起始辅因子(包括YBX1、YBX2、FXR1、PABPC1和EIF4G3)相互作用, 可能通过招募不同的相互作用蛋白来分别调控靶mRNA的降解或翻译。敲除*Rppc2a*后, 精母细胞出现染色体着丝排列异常、微管组织中心定位异常且破碎、出现不对称或多级纺锤轴现象, 精子发生在减数分裂 I 中期停滞, 细胞凋亡从减数分裂前期的粗线期开始显著增多, 在中期精母细胞与圆形精子阶段发生大量凋亡^[35]。

m⁶A结合蛋白对精子发生的影响尚未得到机制层面的充分解释, 当前研究多停留在描述性分析阶段。m⁶A结合蛋白在识别m⁶A修饰、介导下游RNA代谢方面发挥关键作用, 但目前对其参与精子发生调控的认识还有待拓展。为进一步探索这些蛋白的功能, 未来可以利用高通量筛选技术识别新的m⁶A结合蛋白及其靶标mRNA, 并通过多层次生物信息学分析结合实验数据进行验证。此外, 结合临床样本分析可以推动理解m⁶A结合蛋白异常与男性不育之间的联系, 为开发新的治疗策略提供依据。

综上所述, 目前对于m⁶A相关蛋白在精子发生过程中的作用已有一定的了解, 但还需要进一步探索。建立m⁶A相关蛋白的生殖系条件性敲除模型, 结合生物信息学方法分析将有助于进一步了解m⁶A修饰及调控蛋白在精子发生过程中的作用机制网络。此外, 最近有研究报道FTO抑制剂甲氯芬酸治疗能够显著增强原发性乳腺肿瘤的植入^[36]。这提示可以开发m⁶A相关蛋白抑制剂或激动剂, 并且将其用于治疗由m⁶A水平失调引起的精子发生障碍进而导致的男性不育等相关疾病。

4 m⁶A修饰相关检测方法

修饰水平的测量通常是表观转录组学研究的第一

步。目前最常用的分析全转录组m⁶A修饰图谱的方法是基于m⁶A抗体富集,即m⁶A-seq和甲基化RNA免疫沉淀测序(MeRIP-seq),它将m⁶A位点鉴定在100~200核苷酸(nt)的分辨率^[37]。近年来,已经开发了一些m⁶A单碱基或近乎单碱基分辨率的测序方法,如基于m⁶A结合蛋白融合碱基编辑蛋白的方法DART-seq^[38],基于m⁶A甲基化敏感的内切酶法MAZTER-seq^[39],基于FTO酶辅助的m⁶A化学标记法m⁶A-label-seq^[40]。表1总结了检测m⁶A修饰的主

要方法,并且简要介绍了各个方法对应的优势和局限性。

m⁶A检测方法的快速发展极大地促进了其在生物体内发挥的功能和机制研究。然而,目前的方法都不是最“理想”的工具(理想状态下,可以达到在低非特异性信号条件下十分精确地检测m⁶A水平)。未来,m⁶A测序方法应达到以下条件:抗体足够特异、单碱基分辨率、RNA输入量降至纳克(ng)甚至单细胞水平,以及能够实现m⁶A定量检测。

表 1 m⁶A修饰的主要检测方法

Table 1 Main testing methods for m⁶A modification

Main testing methods	Advantages	Disadvantages
Thin layer chromatography ^[37]	No involvement of sophisticated technique	Requirement of radioactive reagent
Dot blot ^[41]	Very convenient	Not a quantitative measurement
LC-MS/MS ^[42]	High specificity and sensitivity	Contamination from bacterial systems
m ⁶ A-seq and MeRIP-seq ^[37]	Detection of m ⁶ A sites	Non-specific binding; high false positive rate because of the non-specific binding
DART-seq ^[38]	Low-input and simple procedures	Not suitable for clinical samples and tissues
MAZTER-seq ^[39]	Highly specific and antibody-independent	Limited motifs; only identify 16%-25% m ⁶ A sites
SMRT ^[37]	Base resolution and quantitative measurement	High false positive rate when the abundance of modification is low
m ⁶ A-label-seq ^[40]	Single-base resolution	Low incorporation efficiency (only 0.005% of unmodified adenosine)
m ⁶ A-SEAL ^[43]	High specificity and sensitivity	Extra FTO
Nitrite-mediated deamination ^[44]	Fast detection	RNA degradation; low reaction yield

5 总结与展望

RNA修饰是当前生物医学研究中备受瞩目的领域,而它在男性生殖中的角色和影响也引发了研究者们广泛的兴趣。其中,m⁶A修饰已成为研究的热点,它对男性生殖过程的各个阶段都发挥着关键作用。精子的形成和功能是男性生殖的核心,而m⁶A修饰对精子发生的各个方面都有深远的影响。它的存在可以影响精原细胞的增殖、分化以及精母细胞的减数分裂等。异常的m⁶A修饰会导致精子发生异常,进而导致雄性不育。为了深入研究m⁶A修饰在精子发生中的作用,科学家们开发了多种检测方法,如MeRIP-seq、m⁶A-seq和miCLIP。这些技术方法帮助研究人员确定m⁶A修饰的位置和分布,及其对基因表达的影响,为理解m⁶A修饰在精子发生中如何调控基因表达提供了新视角。

未来,研究RNA修饰在男性生殖中的作用将继续深入。重要的研究方向之一是深入了解RNA修饰的分子机制。这将有助于揭示RNA修饰如何调控精子发生,以及它们如何与其他生殖生物学过程相互作用。未来的研究可考虑采用单细胞测序技术和空间转录组技术等,解析个体间和不同细胞类型之间m⁶A修饰的异质性,从而更加全面地理解m⁶A修饰在精子发生中的动态调控。同

时,基因编辑技术也可用于探究特定m⁶A修饰位点及相关蛋白的功能。另一个关键方向是探索RNA修饰与不育疾病之间的关系。通过了解RNA修饰在不育病因中的作用,我们可能会找到新的治疗不育症的途径。这可能包括开发针对RNA修饰酶或修饰位点的治疗方法,以提高男性生育能力。这些研究可能揭示m⁶A修饰在男性不育发生机制中的作用,并为开发诊断生物标志物和治疗药物提供理论依据。总之,RNA修饰的研究在男性生殖和不育疾病治疗领域有着巨大的潜力,我们期待在不久的将来看到更多创新的研究成果和治疗方法的涌现。

* * *

作者贡献声明 蒋婷负责论文构思和初稿写作,张学广负责论文构思和审读与编辑写作,许文明负责论文构思、经费获取、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution JIANG Ting is responsible for conceptualization and writing--original draft. ZHANG Xueguang is responsible for conceptualization and writing--review and editing. XU Wenming is responsible for conceptualization, funding acquisition, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] EISENBERG M L, ESTEVES S C, LAMB D J, *et al.* Male infertility. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, 9(1): 49. doi: 10.1038/s41572-023-00459-w.
- [2] DELAUNAY S, HELM M, FRYE M. RNA modifications in physiology and disease: towards clinical applications. *Nat Rev Genet*, 2024, 25(2): 104–122. doi: 10.1038/s41576-023-00645-2.
- [3] OERUM S, MEYNIER V, CATALA M, *et al.* A comprehensive review of m⁶A/m⁶Am RNA methyltransferase structures. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(13): 7239–7255. doi: 10.1093/nar/gkab378.
- [4] CAI Z, NIU Y, LI H. RNA N⁶-methyladenosine modification, spermatogenesis, and human male infertility. *Mol Hum Reprod*, 2021, 27(6): gaab020. doi: 10.1093/molehr/gaab020.
- [5] VALLET-BUISAN M, MECCA R, JONES C, *et al.* Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond. *Hum Reprod Update*, 2023, 29(4): 395–433. doi: 10.1093/humupd/dmad006.
- [6] LIU Y, YANG D, LIU T, *et al.* N⁶-methyladenosine-mediated gene regulation and therapeutic implications. *Trends Mol Med*, 2023, 29(6): 454–467. doi: 10.1016/j.molmed.2023.03.005.
- [7] FLAMAND M N, TEGOWSKI M, MEYER K D. The proteins of mRNA modification: writers, readers, and erasers. *Annu Rev Biochem*, 2023, 92: 145–173. doi: 10.1146/annurev-biochem-052521-035330.
- [8] ZHOU H, YIN K, ZHANG Y, *et al.* The RNA m⁶A writer METTL14 in cancers: roles, structures, and applications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(2): 188609. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188609.
- [9] WANG T, KONG S, TAO M, *et al.* The potential role of RNA N⁶-methyladenosine in cancer progression. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 88. doi: 10.1186/s12943-020-01204-7.
- [10] LEI K, LIN S, YUAN Q. N⁶-methyladenosine (m⁶A) modification of ribosomal RNAs (rRNAs): critical roles in mRNA translation and diseases. *Genes Dis*, 2023, 10(1): 126–134. doi: 10.1016/j.gendis.2021.10.005.
- [11] SATTERWHITE E R, MANSFIELD K D. RNA methyltransferase METTL16: targets and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2022, 13(2): e1681. doi: 10.1002/wrna.1681.
- [12] YANG Z, YU G L, ZHU X, *et al.* Critical roles of FTO-mediated mRNA m⁶A demethylation in regulating adipogenesis and lipid metabolism: implications in lipid metabolic disorders. *Genes Dis*, 2022, 9(1): 51–61. doi: 10.1016/j.gendis.2021.01.005.
- [13] SENDINC E, SHI Y. RNA m⁶A methylation across the transcriptome. *Mol Cell*, 2023, 83(3): 428–441. doi: 10.1016/j.molcel.2023.01.006.
- [14] QU J, YAN H, HOU Y, *et al.* RNA demethylase ALKBH5 in cancer: from mechanisms to therapeutic potential. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 8. doi: 10.1186/s13045-022-01224-4.
- [15] CHEN L, GAO Y, XU S, *et al.* N⁶-methyladenosine reader YTHDF family in biological processes: structures, roles, and mechanisms. *Front Immunol*, 2023, 14: 1162607. doi: 10.3389/fimmu.2023.1162607.
- [16] LIU T, WEI Q, JIN J, *et al.* The m⁶A reader YTHDF1 promotes ovarian cancer progression via augmenting EIF3C translation. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(7): 3816–3831. doi: 10.1093/nar/gkaa048.
- [17] SIKORSKI V, SELBERG S, LALOWSKI M, *et al.* The structure and function of YTHDF epitranscriptomic m⁶A readers. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44(6): 335–353. doi: 10.1016/j.tips.2023.03.004.
- [18] LI L, KRASNYKOV K, HOMOLKA D, *et al.* The XRN1-regulated RNA helicase activity of YTHDC2 ensures mouse fertility independently of m⁶A recognition. *Mol Cell*, 2022, 82(9): 1678–1690.e1612. doi: 10.1016/j.molcel.2022.02.034.
- [19] LIU Y, SHI S L. The roles of hnRNP A2/B1 in RNA biology and disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2021, 12(2): e1612. doi: 10.1002/wrna.1612.
- [20] ZHU T Y, HONG L L, LING Z Q. Oncofetal protein IGF2BPs in human cancer: functions, mechanisms and therapeutic potential. *Biomark Res*, 2023, 11(1): 62. doi: 10.1186/s40364-023-00499-0.
- [21] BOHLEN J, ROIUK M, NEFF M, *et al.* PRRC2 proteins impact translation initiation by promoting leaky scanning. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(7): 3391–3409. doi: 10.1093/nar/gkad135.
- [22] MURAKAMI S, JAFFREY S R. Hidden codes in mRNA: control of gene expression by m⁶A. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2236–2251. doi: 10.1016/j.molcel.2022.05.029.
- [23] XU K, YANG Y, FENG G H, *et al.* Mettl3-mediated m⁶A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Res*, 2017, 27(9): 1100–1114. doi: 10.1038/cr.2017.100.
- [24] LIN Z, HSU P J, XING X, *et al.* Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N⁶-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27(10): 1216–1230. doi: 10.1038/cr.2017.117.
- [25] ZHENG G, DAHL J A, NIU Y, *et al.* ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49(1): 18–29. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.015.
- [26] TANG C, KLUKOVICH R, PENG H, *et al.* ALKBH5-dependent m⁶A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2018, 115(2): E325–E333. doi: 10.1073/pnas.1717794115.
- [27] HUANG T, GAO Q, FENG T, *et al.* FTO knockout causes chromosome instability and G2/M arrest in mouse GC-1 cells. *Front Genet*, 2019, 9: 732. doi: 10.3389/fgene.2018.00732.
- [28] WU Y, LI J, LI C, *et al.* Fat mass and obesity-associated factor (FTO)-mediated N⁶-methyladenosine regulates spermatogenesis in an age-dependent manner. *J Biol Chem*, 2023, 299(6): 104783. doi: 10.1016/j.jbc.2023.104783.
- [29] LI Y, SU R, DENG X, *et al.* FTO in cancer: functions, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Trends Cancer*, 2022, 8(7): 598–614. doi: 10.1016/j.trecan.2022.02.010.
- [30] COHEN P E, SOH Y Q S, MIKEDIS M M, *et al.* Meio maintains an extended meiotic prophase I in mice. *PLoS Genet*, 2017, 13(4): e1006704. doi: 10.1371/journal.pgen.1006704.
- [31] WOJTAS M N, PANDEY R R, MENDEL M, *et al.* Regulation of m⁶A transcripts by the 3'→5' RNA helicase YTHDC2 is essential for a

- successful meiotic program in the mammalian germline. *Mol Cell*, 2017, 68(2): 374–387.e312. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.021.
- [32] CHEN Y, ZHENG Y, GAO Y, *et al.* Single-cell RNA-seq uncovers dynamic processes and critical regulators in mouse spermatogenesis. *Cell Res*, 2018, 28(9): 879–896. doi: 10.1038/s41422-018-0074-y.
- [33] QI M, SUN H, GUO Y, *et al.* m⁶A reader protein YTHDF2 regulates spermatogenesis by timely clearance of phase-specific transcripts. *Cell Prolif*, 2021, 55(1): e13164. doi: 10.1111/cpr.13164.
- [34] LOTTRUP G, BELLING K, LEFFERS H, *et al.* Comparison of global gene expression profiles of microdissected human foetal Leydig cells with their normal and hyperplastic adult equivalents. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23(5): 339–354. doi: 10.1093/molehr/gax012.
- [35] TAN X, ZHENG C, ZHUANG Y, *et al.* The m⁶A reader PRRC2A is essential for meiosis I completion during spermatogenesis. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1636. doi: 10.1038/s41467-023-37252-y.
- [36] JESCHKE J, COLLIGNON E, AL WARDI C, *et al.* Downregulation of the FTO m⁶A RNA demethylase promotes EMT-mediated progression of epithelial tumors and sensitivity to Wnt inhibitors. *Nat Cancer*, 2021, 2(6): 611–628. doi: 10.1038/s43018-021-00223-7.
- [37] ZHENG H X, ZHANG X S, SUI N. Advances in the profiling of N⁶-methyladenosine (m⁶A) modifications. *Biotechnol Adv*, 2020, 45: 107656. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107656.
- [38] MEYER K D. DART-seq: an antibody-free method for global m⁶A detection. *Nat Methods*, 2019, 16(12): 1275–1280. doi: 10.1038/s41592-019-0570-0.
- [39] BEZRUKOV F, PRADOS J, RENZONI A, *et al.* MazF toxin causes alterations in *Staphylococcus aureus* transcriptome, translome and proteome that underlie bacterial dormancy. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(4): 2085–2101. doi: 10.1093/nar/gkaa1292.
- [40] SHU X, CAO J, CHENG M, *et al.* A metabolic labeling method detects m⁶A transcriptome-wide at single base resolution. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(8): 887–895. doi: 10.1038/s41589-020-0526-9.
- [41] LIU L, GU M, MA J, *et al.* CircGPR137B/miR-4739/FTO feedback loop suppresses tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 149. doi: 10.1186/s12943-022-01619-4.
- [42] SHAN T, LIU F, WEN M, *et al.* m⁶A modification negatively regulates translation by switching mRNA from polysome to P-body via IGF2BP3. *Mol Cell*, 2023, 83(24): 4494–4508.e4496. doi: 10.1016/j.molcel.2023.10.040.
- [43] WANG Y, XIAO Y, DONG S, *et al.* Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N⁶-methyladenosine. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(8): 896–903. doi: 10.1038/s41589-020-0525-x.
- [44] MAHDAVI-AMIRI Y, CHUNG KIM CHUNG K, HILI R. Single-nucleotide resolution of N⁶-adenine methylation sites in DNA and RNA by nitrite sequencing. *Chem Sci*, 2020, 12(2): 606–612. doi: 10.1039/d0sc03509b.

(2024 – 01 – 15收稿, 2024 – 04 – 22修回)

编辑 余琳



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用

4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*