

基因印记与精子发生障碍的研究进展

王思梦, 宋杨, 吴南翔

摘要: 基因印记是特定基因的一对等位基因发生差异性的表达, 机体仅表达来自亲本一方的等位基因, 而另一方保持沉默。精子发生是一个高度复杂的独特分化过程, 包括精原细胞发育为精母细胞、单倍体精细胞的形成和精子成熟。本文通过探讨精子发生障碍与基因印记的关系, 分析不育男性表观遗传缺陷的潜在风险, 为临床男性不育的预防和治疗提供理论支持。

关键词: 基因印记; DNA 甲基化; 精子发生; 表观遗传缺陷; 综述

Research Advance on Genomic Imprinting and Spermatogenesis Dysfunction WANG Si-meng, SONG Yang, WU Nan-xiang (Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang 310013, China). Address correspondence to SONG Yang, E-mail: sygp_0@163.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: Genomic imprinting is a mechanism that regulates monoallelic gene expression in a parental origin-dependent way. Spermatogenesis is a highly complex and unique differentiation process that involves development of spermatogonia into spermatocytes, formation of haploid spermatid, and maturation of spermatozoa. This review aimed to discuss the relationship between spermatogenesis disorder and genomic imprinting, evaluate the potential risks of epigenetic defects in the infertile men, and provide theoretical evidence for clinical treatment of male infertility.

Key Words: genomic imprinting; DNA methylation; spermatogenesis; epigenetic defect; review

基因印记 (genomic imprinting) 是一种不遵循孟德尔遗传定律的亲本等位基因差异性表达的现象, 即通过修饰使启动子附近的差异甲基化区域来控制等位基因的不对称表达, 这种修饰常为 DNA 甲基化修饰, 也包括组蛋白乙酰化、甲基化等修饰。虽然印记基因在基因组所占比例很小, 但在生命过程中发挥着十分重要的作用。印记错误不仅会导致胚胎发育异常、先天性畸形、肿瘤等疾病, 它对男性生殖健康也极其不利。本文通过探讨基因印记在精子发生 (spermatogenesis) 过程中的作用, 分析不育男性表观遗传缺陷的潜在风险, 为临床男性不育的预防和治疗提供理论支持。

1 基因印记

基因印记, 是指体细胞来源于不同亲代的一对等位基因发生差异性表达的现象, 也叫配子印记或亲代印记, 其不会改变基因序列, 而是通过改变基因转录来调节基因表达。如父源等位基因被印记, 其转录将被抑制, 只能使母源等位基因表达, 即为父源印记; 而母源等位基因被印记后, 只能使父源等位基

因表达, 称为母源印记。基因印记保证了正常基因表达模式, 阻止哺乳动物的单性生殖。一旦发生印记错误, 就会引起机体的一系列异常。

1.1 印记基因

印记基因是指某些基因由于亲源不同而呈差异性表达。其呈簇排列, 含 CpG 岛 (CpG island), 并呈现单等位基因表达, 表达或抑制受印记调控区域 (imprinting control region, ICR) 调控并在体细胞分裂中稳定遗传。DECHIARA 等^[1] 在小鼠中通过基因敲除方法发现了第一个内源性印记基因——胰岛素样生长因子 II (insulin-like growth factors II, *Igf2*)。若被敲除的等位基因来于母本, 小鼠无特殊表型; 若其来自父本, 则小鼠表现为侏儒。有研究表明^[2], 在胚胎中 *Igf2* 基因被打上印记, 仅父源等位基因正常表达。但同时发现在脉络丛和柔脑膜中 *Igf2* 的两个等位基因是同时表达, 这说明基因组印记具有组织特异性调节作用。

1.2 印记基因与 DNA 甲基化

尽管组蛋白乙酰化、甲基化等修饰在基因印记中也发挥重要作用^[3], 但 DNA 甲基化 (DNA methylation) 是基因印记最常见的修饰, 也是调控的关键所在。在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, Dnmt) 的催化下, 以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体, 将甲基转移到 DNA 分子中特定碱基上的过程。DNA 甲基化转移酶 (Dnmt) 是 DNA 甲基化的关键酶, 包括 Dnmt1、Dnmt2、Dnmt3。其中 Dnmt1 在维持甲基化模式中起到重要作用, 而 Dnmt3a、Dnmt3b 及 DnmtL 在重新甲基化过程中发挥重要作用^[4]。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0117

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81102161); 浙江省自然科学基金 (编号: LY14H260004); 浙江省医药卫生科技计划 (编号: 201475777)

[作者简介] 王思梦 (1988—), 女, 硕士生; 研究方向: 生殖毒理学; E-mail: 125097661@qq.com

[通信作者] 宋杨, E-mail: sygp_0@163.com

[作者单位] 浙江省医学科学院, 浙江 310013

印记基因的表达或抑制受印记调控区域(ICR),即原发性差别甲基化区(differentially DNA methylated region, DMR)调控,其中含有3个以上印记基因共同组成的1个元件,可以顺式调控基因的活性,印记基因能否表达主要根据ICR甲基化状态而控制这些元件的开与关。以*Igf2*(母系印记、父系表达)及其交互基因*H19*(父系印记、母系表达)为例,甲基化修饰的DMR可作为增强子和基因的作用中心,使父源*Igf2*激活;而进行去甲基化时则充当了边界元件或绝缘子的角色,阻止增强子和父源*Igf2*的相互作用,使*Igf2*转录不能有效的进行,而只能表达*H19*。JULLIEN等^[5]发现,在拟南芥生长周期中,维持DNA甲基化模式对基因印记在亲代之间的遗传是必须的。此外,敲除小鼠DNA甲基化的关键酶Dnmt1后,胞嘧啶就不能发生甲基化,可导致小鼠基因组中印记缺失。在配子形成过程中,源于双亲的等位基因可以被打上不同的印记,这种印记对基因在之后的发育过程中是否发生以及何时何地发生甲基化起到决定性作用。以上研究均证实,DNA甲基化模式的建立是基因印记的关键。

2 基因印记在精子发生过程发挥重要作用

精子发生经历了精原干细胞的增殖分化、精母细胞的减数分裂和精子形成等3个主要阶段,最终生成精子。在这个过程中受许多有序表达的基因调控。

印记基因可分为父系印记基因和母系印记基因,父系印记基因有*H19*、*Igf2r*等;母系印记基因有*Igf2*、*Peg1/Mest*(mesodermal specific transcript gene)、*Ins1/Ins2*、*Peg3*等,这些均是与精子发生及成熟过程密切相关的关键印记基因。

印记基因*Igf2*是重要的促胚胎生长因子,参与细胞增殖、分化和凋亡的调节^[6],还通过自分泌或旁分泌的方式作用于细胞表面的*Igf1*受体,刺激精原细胞分化为初级精母细胞。*H19*无蛋白产物,但其转录的RNA可以调节*Igf2*的印记和表达。BOISSONNAS等^[7]分析了正常男性精液中的CpG岛都呈现预期的高甲基化水平,而在19个精液中有畸形精子症的男性11人在*Igf2* DMR2和*H19* DMR中的第6个CCCTC结合因子(CTCF)中的多个CpG位点发生去甲基化。还发现许多畸形精子症患者精液表现出*H19*处多个CpG岛低甲基化,精子质量差可能与*H19/Igf2* ICR1低甲基化有关。POPLINSKI等^[8]发现精子活力下降与*H19/Igf2* ICR1甲基化水平的下降有直接关系,他们比较了148名先天不育男性和33名健康捐精者的精液中*H19/Igf2* ICR1的甲基化水平,发现正常男性精液中*H19/Igf2* ICR1有95.9%被甲基化,而先天不育患者精液中有89.6%被甲基化,且精子数目和甲基化水平呈正相关。这些研究均提示,印记基因*Igf2-H19* DMR甲基化对正常的生精过程有着至关重要的作用。

除了印记基因*Igf2*和*H19*外,*Mest*基因在男性生殖过程中也发挥重要作用。POPLINSKI等^[8]研究发现,正常男性精液中的*Mest*位点表现出低甲基化水平,而先天不育男性精液中的*Mest*位点表现出高甲基化水平。还有研究指出,*Mest*位点处的甲基化水平的增长与精子活力的下降成线性关系^[7]。所以,印记基因*Mest*处的甲基化对正常生精过程也起着重要作用。

尽管印记改变导致精子发生障碍的机制不清楚,但是研究指出,基因组印记是在配子形成过程中产生。首先基因印记发生在配子发生时和受精后。在原始生殖细胞(PGMs)阶段,亲代的生殖细胞中的印记通过去甲基化消除。因成熟的精子细胞中已有许多CpG位点被甲基化,此时甲基化水平最高;随后父源染色体上会立即发生由Dnmt3介导的主动去甲基化,而母源染色体则会经历依赖于DNA复制的被动去甲基化;在胚胎发育早期,雄性生殖细胞通过重新甲基化再次建立印记,主要通过甲基化转移酶Dnmt3a、Dnmt3b、Dnmt1以及其他甲基化转移酶的介导,然后在甲基化CpG结合蛋白(MBD4)及Dnmt1的介导下维持现有的甲基化;胚胎发育中DNA甲基化水平的改变致个体建立新的DNA甲基化模式,使得印记在体细胞分裂中稳定遗传。其中任何步骤出现错误均可影响生精过程。

3 印记改变导致精子发生异常的可能机制

印记改变导致精子发生异常的可能机制从三条通路进行阐明,如图1,分别为激素信号、piRNA及miRNA。

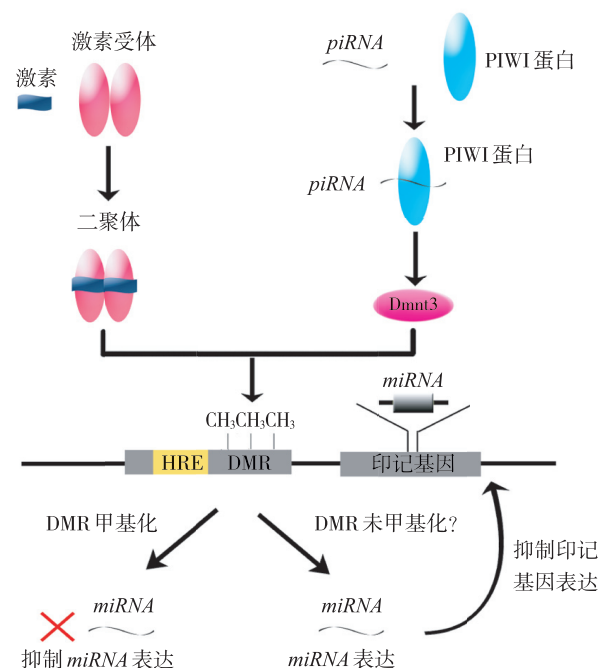


图1 印记改变导致精子发生异常的可能机制

3.1 与经典激素信号的 crosstalk

激素信号异常可能是印记改变导致精子发生异常的机制之一。正常情况下,激素或激素类化合物进入细胞后与激素受体结合形成二聚体,进入细胞核共同作用于靶基因调节区的激素反应元件,顺式激活下游基因的表达,从而发挥激素样作用。有研究发现,这些激素反应元件同样存在于某些印记基因的印记控制区中,异常的激素信号可通过改变基因印记导致精子发生异常。动物实验发现,与男性生殖密切相关的关键印记基因*Igf2-H19*印记控制区有雌激素受体的结合位点即雌激素反应元件,雌激素干扰物它莫西芬可以抑制雌激素受体 β 和雌激素反应元件(ERE)的结合从而影响雄性生殖细胞印记基因*Igf2-H19* DMR甲基化^[9-10],诱导凋亡相关蛋白的表达^[11],导致

生精功能障碍。

除了雌激素外,有研究发现,雄激素对 DNA 甲基化也有一定的调节作用。JUE 等^[12]对出生 4 周后的大鼠睾丸中 DNA 甲基化转移酶的激素调控进行了研究,即对实验组经垂体切除术后的大鼠模型植入雄激素,而对照组未做处理,结果发现,实验组大鼠睾丸中的 DNA 甲基化转移酶 mRNA 表达水平高于对照组,而且 DNA 甲基化转移酶 mRNA 在早期生殖细胞中高水平表达,在成熟精子细胞中表达最低。同源异型盒 A5 (*HOXA5*) 是一个蛋白编码基因,代表了雄激素启动子甲基化的一个候选基因。研究表明,正常男性中 *HOXA5* 启动子甲基化模式保持稳定的低水平,雄激素不敏感综合征患者 *HOXA5* 基因启动子甲基化模式表现出显著的高甲基化水平,这使 *HOXA5* 启动子甲基化受雄激素受体控制得到了验证^[13]。这些研究均证实雄激素及其受体可通过多种方式调节 DNA 甲基化,这些甲基化改变是否会导致印记改变有待于深入研究。

近年来,研究发现,具有激素活性的化学物可影响基因印记及基因组甲基化过程^[14]。妊娠小鼠被给予抗雄激素乙烯雌核利 (VCZ) 后,其雄性后代两个父系印记基因 (*H19*、*GTL2*) 的差异性甲基化区甲基化水平下调^[14]。体外研究证实,胚胎植入前暴露环境激素四氯二苯并-*p*-二恶英 (TCDD) 可以使印记基因 *H19* 和 *Igf2* 的转录水平下调。在体细胞中 *Dnmt1* 的基因表达受转录激活因子 Sp1 调控^[15], TCDD 可能通过 Sp1 对 DNA 甲基化转移酶活性产生影响而使印记基因表达下调。流行病学研究同样也发现,具有雌激素活性的多种持久性有机污染物 (POPs) 可干扰体内正常甲基化水平。通过对 70 个格陵兰因纽特人血样中提取的 DNA 来评估持久性有机污染物蓄积与全基因组甲基化的关系,发现基因组甲基化水平与 DDT 即 2, 2-双(4-氯苯基)-1, 1, 1-三氯乙烷 (p, p'-DDT)、DDMU 即 2, 2-双(对氯苯基)-1-氯乙烯 (p, p'-DDE)、 β -六氯化苯 (1, 2, 3, 4, 5, 6-六氧环己烷, 六六六的 β 异构体)、氧化氯丹 (oxychlordane)、 α -氯丹 (alpha-chlordane)、灭蚊灵 (mirex)、总多氯联苯 (PCBs) 含量及总持久性有机污染物 (POPs) 负荷成负相关关系。这些 POPs 都具有一定的激素活性和雄性生殖毒性,这些 POPs 引起的生殖毒性是否源于激素信号导致印记改变有待于深入研究^[16]。

激素信号异常可能是印记改变导致精子发生异常的重要机制之一。以印记改变为代表的新表观遗传修饰调控和经典信号调控途径之间的关系就是一个新的科学问题,这两个事件孰先孰后,有无交互作用均有待于深入研究。

3.2 非编码 RNA

3.2.1 piRNA

最新研究发现^[17-18], piRNA 是印记改变导致精子发生异常的另一重要机制。piRNA 是最近从哺乳动物睾丸组织中发现的一类能与 PIWI 蛋白质相互作用的长度约为 30 nt 的新型小分子单链 RNA,因在生理状态下能与 PIWI 蛋白偶联,故命名为 piRNA (Piwi-interacting nucleotides, PiRNA)。PIWI 亚家庭主要有 3 个成员,分别是 MIWI, MILI 和 MILI2。piRNA 仅在精子发生过程中的粗线期精母细胞和圆形精子细胞中表达,小鼠 piRNA 结合蛋白 MIWI 突变中的雄性不育现象均显示其在配子发育过程中起作用。研究还发现^[19], piRNA/PIWI 可通过表观遗传学机制发挥基因沉默作用。

最近的报道表明,基因组印记区可能存在 piRNA,在人类印记基因 15q11q13 和 14q32 区分别存在 *CL132* (17 piRNAs) 及 *CL124* (11 piRNAs)^[20]。*Rasgrfl* 印记控制区的甲基化也存在 PIWI/piRNA 复合体的作用^[21]。研究发现,piRNA 结合蛋白突变体小鼠, *Rasgrfl* 甲基化水平受到显著影响,且 MILI 突变体甲基化水平受影响程度高于 MIWI2 突变体^[17]。还有研究报道, *Rasgrfl* DMR 中有一段重复序列作为 piRNA 的启动子,调节 *Rasgrfl* 的甲基化和印记。piRNA 可调节 DNA 甲基化转移酶 *Dnmt3a* 和 *Dnmt3L* 表达,影响原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 的 DNA 去甲基化和生殖细胞 DNA 重新甲基化过程,piRNA 出现在 *Dnmt3L* 突变体中,作用于重新甲基化的上游^[18],影响印记控制区的再甲基化过程^[17, 22]。此外, piRNA 途径的核心组份 MIWI2 和 MILI 的表达与印记重建的关键期一致,在精子发生中起到重要作用。

PIWI/piRNA 复合体对转座子甲基化形成有着至关重要的调节作用。研究发现^[23],鼠的 piRNA 结合蛋白 MILI 和 MIWI2 蛋白对于其睾丸中 IAP 和 LINE-1 转座子成分的沉默至关重要,转座子甲基化标记的丢失是由于 MILI 或 MIWI2 的缺失所导致。还有研究发现^[22],在 MILI 和 MIWI2 缺陷的雄性生殖细胞中逆转录转座子新生 DNA 的甲基化受到抑制,影响生殖细胞印记基因甲基化,导致精子发生异常。

3.2.2 miRNA

miRNA 也可能是印记改变导致精子发生异常的机制。miRNA 是一类内源性的具有调控功能的长约 21~25 nt 的单链 RNA,通过和靶基因 mRNA 碱基配对引导沉默复合体 (RISC) 降解 mRNA 或阻碍其翻译。其表达的同时可以反馈性地调节抑制印记基因的表达。多项研究发现^[24-25], microRNA 很有可能参与了与基因组印记相关的 DNA 甲基化修饰。在 *Dlk1-Dio3* 印记区中的一个基因簇有 40 拷贝的 microRNA,其介导的转录水平基因沉默与特异的甲基化修饰相关。三个印记 microRNAs,包括 mi-127、mi-483 和 mi-296 分别来自 *Dlk1-Dio3*、*Igf2-H19* 以及 *Gnas-Nespas* 印记基因簇。在各个受印记调控区域 (ICRs) (*Dlk1-Dio3* IG-DMR、*Igf2-H19* ICR 以及 *Gnas-Nespas* DMR) 的调控下,父源染色体中的 *Dlk1-Dio3* IG-DMR 和 *Igf2-H19* ICR 发生甲基化来抑制分别来自父源和母源染色体 mi-127、mi-483 基因的表达。另一方面,在母源染色体中 *Gnas-Nespas* DMR 被印记来抑制来自母源染色体 mi-296 基因的表达^[24]。SMITS 等^[25]发现 *H19* 基因在有袋类动物中有印记表达,这进一步证实了 *H19* 基因与印记表达相关。此外,mi-675 作为 *H19* 中一个 microRNA,在整个有胎盘的哺乳类动物中十分保守,这说明它可能行使重要的调控功能^[25]。而 *Igf2* 基因作为蛋白质编码基因,其第七内含子区域编码一条 microRNA 即 mi-483。mi-483 能够反馈抑制 *Igf2* 基因的表达,导致印记表达异常。因此 microRNA 可能通过基因印记改变影响精子发生。

4 结语

近年来,基因印记与精子发生的关系研究虽然取得了一些进展,但仍存在许多有待于深入研究的问题。本文根据有关最新研究报道对基因印记在精子发生过程中的作用以及激素

信号、piRNA、其他非编码 RNA 的可能机制进行了较系统的综述, 这些研究结果可能对男性生精障碍的预防、诊断和治疗提供一个全新的理论和方法, 将有助于预防某些遗传疾病与提高生育能力, 或通过纠正甲基化异常来治疗男性不育。

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] DECHIARA TM, ROBERTSON EJ, EFSTRATIADIS A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene[J]. Cell, 1991, 64(4): 849-859.
- [2] 彭凤兰. 胰岛素样生长因子 2(Igf2) 研究进展[J]. 实用预防医学, 2008, 14(6): 1963-1966.
- [3] 葛少钦, 李建忠, 张晓静. 精子发生过程中组蛋白甲基化和乙酰化[J]. 遗传, 2011, 33(9): 939-946.
- [4] RAJENDER S, AVERY K, AGARWAL A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility[J]. Mutat Res, 2011, 727(3): 62-71.
- [5] JULLIEN PE, KINOSHITA T, OHAD N, et al. Maintenance of DNA methylation during the Arabidopsis life cycle is essential for parental imprinting[J]. Plant Cell, 2006, 18(6): 1360-1372.
- [6] CHAO W, D'AMORE PA. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2008, 19(2): 111-120.
- [7] BOISSONNAS CC, ABDALAOUI HE, HAELEWYN V, et al. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men[J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18(1): 73-80.
- [8] POPLINSKI A, TüttELMANN F, KANBER D, et al. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1[J]. Int J Androl, 2010, 33(4): 642-649.
- [9] WU Q, OHSAKO S, ISHIMURA R, et al. Exposure of mouse preimplantation embryos to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes H19 and Igf2[J]. Biol Reprod, 2004, 70(6): 1790-1797.
- [10] PATHAK S, D'SOUZA R, ANKOLKAR M, et al. Potential role of estrogen in regulation of the insulin-like growth factor 2-H19 locus in the rat testis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 314(1): 110-117.
- [11] SINGH SK, MORETTA D, ALMAGUEL F, et al. Precursor IGF-II (proIGF-II) and mature IGF-II (mIGF-II) induce Bcl-2 and Bcl-XL expression through different signaling pathways in breast cancer cells[J]. Growth Factors, 2008, 26(2): 92-103.
- [12] JUE K, BENOIT G, ALCIVAR-WARREN AA, et al. Developmental and hormonal regulation of DNA methyltransferase in the rat testis[J]. Biol of Reprod, 1995, 52(6): 1364-1371.
- [13] BENS S, AMMERPOHL O, MARTIN-SUBERO JI, et al. Androgen Receptor Mutations Are Associated with Altered Epigenomic Programming as Evidenced by HOXA5 Methylation[J]. Sex Devt, 2011, 5(2): 70-76.
- [14] STOUDE C, PAOLONI-GIACOBINO A, et al. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm[J]. Reproduction, 2010, 139(2): 373-379.
- [15] WORRAD DM, SCHULTZ RM. Regulation of gene expression in the preimplantation mouse embryo: temporal and spatial patterns of expression of the transcription factor Sp1[J]. Mol Reprod Dev, 1997, 46(3): 268-277.
- [16] RUSIECKI JA, BACCARELLI A, BOLLATI V. Global DNA Hypomethylation Is Associated with High Serum-Persistent Organic Pollutants in Greenlandic Inuit[J]. Environ Health Perspect, 2008, 116(11): 1547-1552.
- [17] WATANABE T, TOMIZAWA S, MITSUYA K, et al. Role for piRNAs and Noncoding RNA in de Novo DNA Methylation of the Imprinted Mouse *Rasgrfl* Locus[J]. Science, 2011, 332(6031): 848-852.
- [18] 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[J]. Mol Cell, 2008, 31(6): 785-99.
- [19] 赵爽, 刘默芳. piRNA 和 PIWI 蛋白的功能机制研究进展[J]. 生命科学, 2010, 22(7): 623-627.
- [20] ROYO H, CAVAILLÉ J. Non-coding RNAs in imprinted gene clusters[J]. Biol Cell, 2008, 100(3): 149-166.
- [21] TOMIZAWA S, SASAKI H. Genomic imprinting and its relevance to congenital disease, infertility, molar pregnancy and induced pluripotent stem cell[J]. J Hum Genet, 2012, 57(2): 84-91.
- [22] KURAMOCHI-MIYAGAWA S, WATANABE T, GOTOH K, et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes[J]. Genes Dev, 2008, 22(7): 908-917.
- [23] 石敏, 唐爱发, 蔡志明. 抑制基因组转座子活性的小 RNAs 在生育调节中的作用[J]. 遗传, 2010, 32(1): 11-16.
- [24] SHIN JY, GUPTA MK, JUNG YH, et al. Differential genomic Imprinting and expression of imprinted microRNAs in testes-derived male germ-line stem cells in mouse[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22481.
- [25] SMITS G, MUNGALL AJ, GRIFFITH-JONES S, et al. Conservation of the H19 noncoding RNA and H19-IGF2 imprinting mechanism in therians[J]. Nat Genet, 2008, 40(8): 971-976.

(收稿日期: 2013-11-07)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶; 校对: 郑轻舟)