

精子成熟度在辅助生殖中的研究进展*

武 健¹, 李立鹏²综述, 曹金凤^{2△} 审校

1. 河北医科大学研究生学院, 河北石家庄 050000; 2. 河北医科大学

第二医院生殖医学科, 河北石家庄 050000

关键词: 精子成熟度; 男性不育; 胚胎发育

中图分类号: R321.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)24-3688-04

精液常规分析作为评估精子质量的方法已普遍应用于临床,但是具有一定的局限性。单纯评价精子数量、活力、形态并不能全面展现精子质量。睾丸中产生的精子从其形态结构和染色质的角度看已基本成熟,进入附睾后,在随着附睾头、体、尾运行和储存过程中,精子最终获得了运动能力、精卵识别能力和受精能力。一个成熟的精子不应只是细胞核的成熟,其细胞质、细胞膜均应达到相应的成熟标准。在辅助生殖过程中,如何全面评估精子成熟度及挑选有助于受精和胚胎发育的成熟精子仍然是临床面临的巨大挑战。本文将立足于精子发育成熟的整个过程,从精子形态、精子核、精子表观遗传修饰、精子膜 4 个方面,对近年来精子成熟度相关指标在辅助生殖中的研究进展作一综述。

1 精子形态评估

1.1 胞质小滴(CD) CD 位于精子中段近端,大多数被睾丸支持细胞吞噬掉。作为精子细胞浆的残余体,CD 在附睾移行过程中逐渐向末端移动,最后脱落。如果 CD 移行发生障碍,精子形态未完全成熟,则不能完全暴露顶部细胞质膜上的抗原决定簇,影响精卵细胞结合及受精。精子在成熟过程中 CD 会自行脱落,且不超过头部的 1/3,当大于精子头部的 1/3 时即为过量残留胞质(ERC),是精子不成熟的表现。刘瑜等^[1]对精子 ERC 的检测方法进行探讨发现,与湿片法相比,精子自然干燥后检测的 ERC 百分比临床意义更大,与精子核蛋白成熟度有关。

1.2 顶体 顶体是覆盖在精子细胞核前 2/3 的扁囊状结构,位于精子头部细胞质膜与细胞核膜之间,可分为顶体帽和赤道段两个部分。顶体反应是受精发生的过程之一,受钙离子调节。顶体反应过程包括受体激活、顶体膜与精子细胞质膜融合、水解酶释放、卵细胞透明带水解等,最终使精子细胞质膜与卵细胞质膜融合。成熟精子具有形态正常且功能完好的顶体结构,若精子成熟异常可导致精子顶体缺陷,影响精子功能。顶体的缺陷包括顶体破损、泡状顶体等形态

异常,也包括顶体酶缺乏或已发生顶体反应等内容物缺失,伴随着顶体酶系活性的降低。研究发现,顶体完整、缺陷率低的精子,透明质酸(HA)结合位点更多,其成熟程度更好,受精潜能更佳^[2]。刘树沅等^[3]研究发现,精子自发顶体反应率与体外受精(IVF)受精率、优胚率呈负相关,提示可通过降低自发顶体反应率对男性不育患者进行治疗,改善 IVF 妊娠结局。

2 精子核成熟度

2.1 组蛋白转换 精子形成阶段,以赖氨酸为主的组蛋白逐渐被富含精氨酸的鱼精蛋白代替。鱼精蛋白分为鱼精蛋白 P1 和鱼精蛋白 P2 两种,成熟精子中 P1/P2 为 0.54~1.43。除鱼精蛋白外,人类染色质还残留有约 15% 的组蛋白和其他蛋白,因此鱼精蛋白和残留组蛋白量的多少成为衡量精子核蛋白成熟度的指标。检测组蛋白转换的方法主要有精子核蛋白提取定量、色霉素 A3(CMA3)染色、苯胺蓝染色。提取精子核蛋白可以对精子中的组蛋白、鱼精蛋白 P1 和 P2 分别进行定量,计算 P1/P2。CMA3 染料可与鱼精蛋白竞争结合精子 DNA,通过观察精子着色情况,间接反映鱼精蛋白对精子 DNA 的包装质量。苯胺蓝染料则可以与组蛋白进行特异性结合,据着色深浅评估组蛋白转换程度是否完全。FOURNIER 等^[4]在一项前瞻性队列研究中发现,精子组蛋白与鱼精蛋白的比例(HPR)在 6%~26% 范围内时,IVF 和卵泡浆内单精子注射(ICSI)的囊胚形成率最高。除了定量检测外,还可以直接对精子染色质凝聚程度进行分析,通过透射电子显微镜可以直接观察精子细胞核染色质的致密程度,评估精子细胞核成熟度;也可以利用未成熟精子染色质凝聚程度差的特点,对精子进行染色质解聚试验,通过显微镜下计数因解聚头部变大的精子百分比来判定精子细胞核成熟度的高低。

2.2 DNA 完整性 精子 DNA 碎片指数(DFI)是指发生 DNA 断裂的精子占全部精子的百分比,可用于 DNA 完整性的评估。成熟精子细胞核 DNA 与鱼精蛋白紧密结合,形成一个高度浓缩的染色质结构,以

* 基金项目:河北省卫生和计划生育委员会科学基金资助项目(20170084)。

△ 通信作者, E-mail: jfcaoc@126.com。

保持遗传物质的稳定性。若精子发生过程中组蛋白与鱼精蛋白转化发生异常,则会引起精子染色质结构异常,引起 DNA 损伤。因此,精子 DNA 完整性受损可作为精子成熟障碍的一种间接表现,其与精子细胞核蛋白成熟度之间的相关性也已经在研究中得到证明^[5]。目前检测精子 DNA 碎片的方法可分为 2 大类,一类是利用探针检测 DNA 断裂的位点,另一类是利用受损 DNA 变性的特点进行检测。由于原理不同,不同方法检测的 DNA 损伤类型有所差异。精子染色质结构分析(SCSA)不仅能检测 DNA 受损精子情况,而且还能同时检测高可染性精子百分比,评估细胞核未完全浓缩的不成熟精子情况,在评价精子成熟度上更有优势。DFI 与 IVF 结局的关系已有相关研究进行过探讨,但结论不一。有研究发现,DFI 增高可降低 IVF 受精率、妊娠率,影响胚胎质量^[6],也有研究表明 DFI 与 IVF 受精率、优胚率、妊娠率均无关^[7]。目前大多证据表明,DFI 对 ICSI 结局几乎无影响^[8],可能与临床行 ICSI 时人为选择了形态和活力较好的精子有关。

3 精子表观遗传修饰调控

精子表观遗传修饰在一定程度上调控着睾丸精子和附睾精子的成熟过程,但具体机制尚不明确。临床中,有待于建立表观遗传质量新指标,从表观遗传水平对精子质量进行评价,用于辅助判断精子成熟质量及预测早期胚胎发育。

3.1 DNA 甲基化 DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶(DNMTs)作用下,转运一个甲基基团至基因组 CpG 双核苷酸胞嘧啶 5' 位置碳原子上,可通过改变染色质结构及 DNA 与蛋白质相互作用方式等机制调控基因表达。从原始生殖细胞至成熟精子的分化过程中,精子 DNA 甲基化呈动态变化。妊娠中期,原始生殖细胞中父系 DNA 的高甲基化修饰大多数被擦除,在精子发生的有丝分裂时期,精子 DNA 重新甲基化,并在随后的减数分裂和精子形成时期维持高甲基化状态。因此,DNA 甲基化异常在一定程度上可反映精子成熟质量。近年来,通过对男性不育患者进行分析发现,DNA 异常甲基化与男性不育有关,不育男性精子中印记基因和其他基因的异常甲基化可降低精子数目,影响精子活力^[9]。

3.2 非编码 RNA(ncRNA) 成熟精子携带大量不同类型的 ncRNA,包括微小 RNA(miRNA)、小干扰 RNA(siRNA)、tRNA 来源的 RNA 片段(tRFs)、Piwi 蛋白相互作用 RNA(piRNA)和长链非编码 RNA(LncRNA)。正常的精子发生与成熟需要 ncRNA 参与,ncRNA 可在多个水平上参与基因表达,并且可由精子携带进入受精卵,影响早期胚胎发育。

miRNA 和 siRNA 大量表达于精子发生过程中的雄性生殖细胞中,可通过诱导目标 mRNA 降解并阻止其翻译,以调控相关基因的表达。在一项对健康

男性精子 736 个 miRNA 表达的研究中发现,在所有个体中都存在的 miRNA 有 221 种,且这些 miRNA 的潜在靶点均富集在发育、形态、精子发生和胚胎发生过程中,揭示出 miRNA 在精子成熟中的重要调控作用^[10]。YUAN 等^[11]利用基因敲除小鼠也证明了 miRNA 和 siRNA 在控制受精卵胚胎转录平衡中的关键作用,他们发现 miRNA 和 siRNA 谱异常的精子通过 ICSI 产生的胚胎早期发育能力降低。其他相关研究还发现,miR-122a 在异常精子中呈高表达^[12];miR-469 异常增高将导致过渡蛋白 2 及鱼精蛋白 P2 的表达减少,影响精子形成^[13];miR-27b 则通过抑制 CRISP2 蛋白表达,影响精子活力和形态^[14]。

研究发现,精子在睾丸形成及运输至附睾的成熟过程中,piRNA 水平下降,tRFs 水平明显升高^[15]。piRNA 只存在于粗线期的精母细胞及圆形精子细胞中,通常与 Ago 蛋白家族中的 Piwi 亚家族蛋白相互作用,与精子发生密切相关。CHEN 等^[16]发现,高脂饮食雄性小鼠的后代会出现糖耐量减低和胰岛素抵抗,推测父亲的饮食通过改变精子成熟过程中的 tRFs 对后代的基因调控造成影响。SHARMA 等^[17]发现,睾丸中未成熟精子的 tRFs 与低蛋白饮食没有对应关系,但附睾中成熟精子的 tRFs 受到了显著影响,且低蛋白饮食小鼠高水平的 tRNA-Gly-GCC 抑制了与小鼠胚胎干细胞可塑性有关基因的表达。CONINE 等^[18]分别利用附睾头部和尾部来源的精子进行 ICSI,并观察胚胎发育情况发现,附睾头部来源精子形成的胚胎植入率低且植入后胚胎快速失活,提示精子在附睾成熟过程中获得 RNA 在某种程度上对健康的胚胎发育是必需的。但是,ZHOU 等^[19]发现,即使精子在附睾成熟时没有获得 tRFs,也可以生出健康的小鼠。因此,在附睾成熟过程中,外源性 tRFs 对精子质量及胚胎发育的影响还需要进一步研究。目前,关于人类成熟精子中 LncRNA 的研究较少。精子成熟阻滞是临床上男性不育的常见原因之一。HongrES2 是一种在附睾尾部特异性表达的 LncRNA,研究发现,HongrES2 可以调控精子的成熟过程,其剪切后产生的 miL-HongrES2 可通过调节附睾羧酸酯酶 7 的表达影响附睾精子获能^[20]。JIANG 等^[21]发现,多种 LncRNA 可通过调控赖氨酸特异性组蛋白 H3 甲基转移酶 Ezh2,影响基因转录和染色质重塑,直接影响精子成熟过程。

3.3 组蛋白修饰 在细胞有丝分裂及精子发生成熟过程中,组蛋白修饰有重要作用。残留的组蛋白尾部残基可被甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化及 ADP 核糖基化,通过调节基因转录和改变染色质结构,影响精子成熟。随着对精子成熟过程中组蛋白修饰的动态变化认识增加,将有望在组蛋白修饰方面找到评估精子成熟度的新指标。

在组蛋白乙酰化转移酶(HATs)和组蛋白去乙酰

化酶(HDACs)作用下,组蛋白 H3 和 H4 乙酰化修饰能够使染色体结构松弛,有助于精子发生过程中精蛋白并入 DNA 和激活转录,反之,染色体结构紧密则抑制转录。有研究发现,使用 HDACs 抑制剂处理小鼠,可导致成熟精子数量显著减少和严重的男性不育症^[22]。MENG 等^[23]首次对染色质重塑与男性不育的机制进行探讨,发现若致死性恶性肿瘤样蛋白 2 (L3MBTL2)缺失,会阻碍 E3 泛素连接酶 RNF8 的入核,从而抑制延长中的精子细胞组蛋白 H2A 泛素化及组蛋白 H4、H2B 和 H3 乙酰化,最终抑制组蛋白转换,影响精子成熟。

组蛋白磷酸化和甲基化在精子成熟过程中也有重要作用。ZHANG 等^[24]发现,小鼠和螃蟹的精子在睾丸和附睾成熟过程中,组蛋白 H4 第一位丝氨酸磷酸化修饰(H4S1ph)信号显著降低,且动态变化,表明大部分 H4S1ph 表观遗传标记在细胞核中的丢失与精子成熟度和染色质致密程度密切相关。最近,该团队对健康和早熟的螃蟹进行研究,发现,雄性早熟螃蟹的 H4S1ph 水平较健康螃蟹更高,认为 H4S1ph 可作为精子成熟的表观遗传标记物^[25]。关于组蛋白甲基化修饰,有研究发现,5 种甲基化修饰(H3K4Me1、H3K4me3、H3K9me2、H3K79Me2、H3K36me3)在正常和异常成熟精子中呈异质分布,推测精子发生缺陷可能改变了精子的甲基化修饰,需要进一步的研究来评估这些甲基化修饰对精子质量和胚胎发育的影响^[26]。

4 精子膜成熟度

成熟精子具有完整的精子膜,分为头部膜和尾部膜。低渗肿胀实验(HOST)可评估精子尾部膜完整性,查树伟等^[27]指出伊红 Y 水试验方法简便、快捷,可对头、尾部膜的完整性进行全面评估,可作为精液分析的一项常规检测指标。精子成熟过程中,在经过质膜重构后,膜成分发生了巨大变化。唾液酸(SA)以 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)的形式存在于成熟精子表面,KHOSRAVI 等^[28]发现,附睾炎引发的附睾上皮细胞减少可能与成熟精子表面唾液酸水平降低有关,进而影响后期精子获能及精卵结合。精子成熟过程中膜蛋白变化最为复杂,一部分膜蛋白由睾丸产生、加工,另一部分膜蛋白由附睾分泌并结合到精子表面,与精卵识别及融合有关。HUSZAR 等^[29]发现,与成熟精子相比,成熟阻断精子热休克蛋白 A2 (HspA2)表达下调可导致减数分裂缺陷和染色体的非整倍性。马晓萍等^[30]发现,精子表面蛋白 P34H 表达水平与精子 HA 酶活性呈正相关,其表达降低会造成精子受精能力下降。

针对成熟精子膜的特性,已有一些检测方法被用于临床。精子膜上 HA 受体的存在是精子成熟的标志,可与卵母细胞透明带上的 HA 结合完成受精。根据此原理,临床中采用精子 HA 结合试验(PICSI)评

估精子成熟度。杨雪莲等^[31]发现,结合常规参数,精子 HA 结合率 $<63.8\%$ 时,IVF 失败风险增加,但其对妊娠的影响还需要进一步研究。ERBERELLI 等^[32]发现,应用 PICSI 的 ICSI 成功妊娠的概率明显高于仅通过形态学观察选择精子的 ICSI,这项技术可纳入实验室常规,避免选择未成熟精子,增加过氧化和 DNA 碎裂率。同理,也可以直接用 MI 期卵母细胞行精子与透明带结合及穿透试验筛选精子,但是存在伦理问题。此外,利用膜联蛋白 V 与磷脂酰丝氨酸结合的特异性还可除去凋亡的精子,ZAHEDI 等^[33]发现,利用膜联蛋白 V 筛选后的精子精蛋白缺陷率低,具有较高的成熟度。RAHIMIZADEH 等^[34]发现,与可生育对照组相比,不明原因不育和弱精子症患者精子顶体的磷脂酶 C(PLC)显著减少,且 PLC 与精子 HA 结合率呈正相关,推测精子成熟受损可能导致 PLC 水平降低,影响卵母细胞激活,降低受精率。

5 小结与展望

除了精液常规检测,临床中对于精子成熟度的评估仅限于核蛋白组成检测和 DNA 完整性分析,但单一指标并不能直接代表精子成熟度,必须从多方面对精子成熟度进行评估。随着对精子成熟过程研究的深入和检测技术的不断发展,精子成熟度检测会日趋完善,为辅助妊娠结局的改善、男性不育的诊断和治疗开辟新思路。

参考文献

- [1] 刘瑜,杨伟萍,陈晓兰,等.精子过量残留胞质的特性研究[J].中华生殖与避孕杂志,2018,38(10):852-859.
- [2] 刘瑜,龙映,刘蒙,等.透明质酸受体精子的质量特性研究[J].中华男科学杂志,2014,20(1):37-43.
- [3] 刘树沅,韦剑洪,陈伟辉,等.精子自发顶体反应率与体外受精胚胎质量的相关性研究[J].检验医学与临床,2018,15(1):16-18.
- [4] FOURNIER C, LABRUNE E, LORNAGE J, et al. The impact of histones linked to sperm chromatin on embryo development and ART outcome[J]. Andrology, 2018, 6(3):436-445.
- [5] 杨雪梅,李俊,谭宇哲,等.精子核蛋白成熟度与精液常规参数的相关性分析[J].中国现代医学杂志,2018,28(15):81-85.
- [6] 谭艳,范立青. Meta 分析精子 DNA 完整性对辅助生殖结局的预测价值[J].生殖医学志,2017,26(1):39-47.
- [7] SUN T C, ZHANG Y, LI H T, et al. Sperm DNA fragmentation index, as measured by sperm chromatin dispersion, might not predict assisted reproductive outcome[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2018, 57:493-498.
- [8] SIMON L, ZINI A, DYACHENKO A, et al. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome[J]. Asian J Androl, 2017, 19:80-90.

- [9] XU J, ZHANG A, ZHANG Z, et al. DNA methylation levels of imprinted and nonimprinted genes DMRs associated with defective human spermatozoa[J]. *Andrologia*, 2016, 48(9):939-947.
- [10] SALAS-HUETOS A, BLANCO J, VIDAL F, et al. New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa[J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(1):213-222.
- [11] YUAN S, SCHUSTER A, TANG C, et al. Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development[J]. *Development*, 2016, 143(4):635-647.
- [12] LIU T, HUANG Y, LIU J, et al. MicroRNA-122 influences the development of sperm abnormalities from human induced pluripotent stem cells by regulating TNP2 expression[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(12):1839-1850.
- [13] DAI L, TSAI-MORRIS C H, SATO H, et al. Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region; implications of its role in germ cell development[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(52):44306-44318.
- [14] ZHOU J H, ZHOU Q Z, LYU X M, et al. The expression of cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) and its specific regulator miR-27b in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia[J]. *Biol Reprod*, 2015, 92(1):28-31.
- [15] CHEN Q, YAN W, DUAN E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(12):733-743.
- [16] CHEN Q, YAN M, CAO Z, et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder[J]. *Science*, 2016, 351(6271):397-400.
- [17] SHARMA U, CONINE C C, SHEA J M, et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals[J]. *Science*, 2016, 351(6271):391-396.
- [18] CONINE C C, SUN F, SONG L, et al. Small RNAs gained during epididymal transit of sperm are essential for embryonic development in mice[J]. *Dev Cell*, 2018, 46(4):470-480.
- [19] ZHOU D, SUZUKI T, ASAMI M, et al. Caput epididymidal mouse sperm support full development[J]. *Dev Cell*, 2019, 50(1):5-6.
- [20] SCHMID R, GRELLSCHEID S N, EHRMANN I, et al. The splicing landscape is globally reprogrammed during male meiosis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(22):10170-10184.
- [21] JIANG G J, ZHANG T, AN T, et al. Differential expression of long noncoding RNAs between sperm samples from diabetic and non-diabetic micet [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4):e0154028.
- [22] FENIC I, HOSSAIN H M, SONNACK V, et al. In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis[J]. *J Androl*, 2008, 29(2):172-185.
- [23] MENG C, LIAO J, ZHAO D, et al. L3MBTL2 regulates chromatin remodeling during spermatogenesis[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(11):2194-2207.
- [24] ZHANG Z H, MU S M, GUO M S, et al. Dynamics of histone H2A, H4 and HS1ph during spermatogenesis with a focus on chromatin condensation and maturity of spermatozoa[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25089.
- [25] ZHANG Z, MU S, CHEN T, et al. H4S1ph, an alternative epigenetic marker for sperm maturity[J]. *Andrologia*, 2019, 20:e13352.
- [26] LA SPINA F A, ROMANATO M, BRUGO-OLMEDO S, et al. Heterogeneous distribution of histone methylation in mature human sperm[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(1):45-49.
- [27] 查树伟, 吕年青, 许豪勤. 伊红 Y 水试验法应用研究进展[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 21(6):566-569.
- [28] KHOSRAVI F, MICHEL V, GALUSKA C E, et al. Desialylation of spermatozoa and epithelial cell glycocalyx is a consequence of bacterial infection of the epididymis[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(34):17717-17726.
- [29] HUSZAR G, STONE K, DIX D, et al. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2[J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(3):925-932.
- [30] 马晓萍, 高晓勤, 丁贤胜, 等. 沉默附睾 P34H 基因对小鼠精子 P34H 表达和精子透明质酸酶活性的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(1):133-138.
- [31] 杨雪莲, 赵焕, 罗宇富. 短时受精中不同受精结局组间精子-透明质酸结合率及妊娠率的比较[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2017, 37(11):896-899.
- [32] ERBERELLI R F, SALGADO R M, PEREIRA D H, et al. Hyaluronan-binding system for sperm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2017, 21(1):2-6.
- [33] ZAHEDI A, TAVALAEE M, DEEMEH M R, et al. Zeta potential vs apoptotic marker; which is more suitable for ICSI sperm selection? [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30(9):1181-1186.
- [34] RAHIMIZADEH P, TOPRAGGALEH T R, NASR-ESFAHANI M H, et al. The alteration of PLC protein expression in unexplained infertile and asthenoteratozoospermic patients: a potential effect on sperm fertilization ability[J]. *Mol Reprod Dev*, 2020, 87(1):115-123.