

孙艳梅, 孙敬帅, 秦佳丽, 等. 大白公猪精浆外泌体 miRNA 表征鉴定及功能分析 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 340-347.
SUN Yanmei, SUN Jingshuai, QIN Jiali, et al. Characterization, identification and functional analysis of miRNA in seminal plasma exosomes of Yorkshire boar[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 340-347.

大白公猪精浆外泌体 miRNA 表征鉴定及功能分析

孙艳梅¹, 孙敬帅¹, 秦佳丽¹, 袁仁强², 朱晓萍¹, 赵云翔^{1,3}

(1 佛山科学技术学院 生命科学与工程学院, 广东 佛山 528231; 2 广西扬帆农牧有限责任公司, 广西 贵港 537000; 3 广西贵港秀博基因科技股份有限公司, 广西 贵港 537000)

摘要:【目的】精浆外泌体 (Seminal plasma exosome, spEX) 在精子成熟、凋亡、受精中起着至关重要的作用。本文旨在探究种公猪 spEX miRNA 表达及 miRNA 在精子成熟及功能维持过程中的潜在调控作用。【方法】提取大白公猪 spEX 并进行电镜分析、粒径分析、标志性蛋白表达分析和 miRNA 高通量测序。【结果】成功分离出 spEX, 利用 miRNA 测序共鉴定出 329 个 spEX miRNA。对高表达 miRNA 进行靶基因预测和功能富集分析, 结果表明 spEX miRNA 在射精、P53 信号通路、前列腺癌、细胞对 DNA 损伤刺激的反应、负调控凋亡过程、顶体膜结合、受精等通路中均发挥了潜在调控作用。【结论】本研究为 spEX miRNA 在调控精子活力和精子受精作用方面提供基础数据, 并为精液保存调控机制的研究提供参考。

关键词: 精浆外泌体; 大白公猪; miRNA; 靶基因; 精子活力; 精子凋亡

中图分类号: S85;Q25

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0340-08

Characterization, identification and functional analysis of miRNA in seminal plasma exosomes of Yorkshire boar

SUN Yanmei¹, SUN Jingshuai¹, QIN Jiali¹, YUAN Renqiang², ZHU Xiaoping¹, ZHAO Yunxiang^{1,3}

(1 School of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528231, China; 2 Guangxi Yangxiang Agriculture and Animal Husbandry Co., Ltd., Guigang 537000, China; 3 Guangxi Guigang Xiubo Gene Technology Co., Ltd., Guigang 537000, China)

Abstract: 【Objective】Seminal plasma exosomes (spEXs) play a crucial role in sperm maturation, apoptosis and fertilization. This study was aimed to explore the miRNA expression of boar spEXs and the potential regulatory role of miRNA in sperm maturation and functional maintenance. 【Method】The spEXs from Yorkshire boar semen were isolated and the exosomes were identified through transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, marker protein expression analysis and high-throughput miRNA sequencing. 【Result】The spEXs were successfully isolated. A total of 329 spEX miRNAs were identified by miRNA sequencing. Through target gene prediction and functional enrichment analysis of highly expressed miRNAs, it was concluded that spEX miRNAs played potential regulatory roles in sperm ejaculation, P53 signaling pathway, prostate cancer, cell response to DNA damage stimuli, negative regulation of apoptosis, acrosome

收稿日期: 2023-01-01 网络首发时间: 2023-03-17 15:08:00

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230316.0940.006.html>

作者简介: 孙艳梅, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 773648973@qq.com; 通信作者: 朱晓萍, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: zhuxiaoping@fosu.edu.cn; 赵云翔, 讲师, 博士, 主要从事动物遗传育种与研究, E-mail: yunxiangzhao@126.com

基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2022B0202090003); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-35); 广东省科技创新战略专项资金 (pdjh2022b0547)

membrane binding, fertilization, etc. 【Conclusion】 This study provides basic data for spEX miRNAs regulating sperm motility and sperm fertilization, and provides references for studying the regulation mechanism of semen preservation.

Key words: Seminal plasma exosome; Yorkshire boar; miRNA; Target gene; Sperm motility; Sperm apoptosis

外泌体 (Exosome, EX) 是指包含了复杂 RNA 和蛋白质, 直径为 30~150 nm 的膜性小囊泡。外泌体存在于体液中, 是多泡体 (Multivesicular body, MVB) 与细胞质膜融合并且以胞外方式降解释放的小泡^[1], 参与调控精子体内的生理活动^[2]。由于细胞类型不同, 外泌体通过旁分泌和自分泌的调节方式, 与靶细胞融合或传递其内载物, 参与免疫应答等生理和病理过程^[3-4]。外泌体携带细胞来源的多种蛋白质、脂类、DNA、mRNA、miRNA 等, 与细胞间通信、细胞迁移、血管新生和免疫调节等过程有关。精液中富含的外泌体称为精浆外泌体 (Seminal plasma exosome, spEX)。研究表明, 精浆和细胞外囊泡 (外泌体和微囊泡) 不仅是精子的载体, 在其他生殖生理活动中也起着至关重要的作用^[5]。spEX 具有改善精液质量、调节精子活力、影响精子受精能力的功能^[6]。有研究表明, 精浆外泌体产生的胞外三磷酸腺苷 (Extracellular adenosine triphosphate, exATP) 可以通过孵育新鲜猪精子达到提高精子活力、调节线粒体代谢并控制精子运动的目的^[7]。miRNA (microRNA) 是一类由内源基因编码、长度约为 20~25 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子^[8], 广泛存在于生物体各种组织或器官中, 调控机体生长发育和细胞凋亡。哺乳动物中, miRNA 与靶 mRNA 不完全互补, 可在翻译水平上抑制靶基因表达, 调控生命活动^[9]。有研究表明, miRNA 通过识别并结合目标 mRNA 的部分互补位点, 介导精子和精浆两者细胞间的接触, 形成诱导的沉默复合物的一部分, miRNA 通过翻译抑制或降解靶 mRNA 而沉默基因^[1], 具有调节基因表达的作用^[10]。miRNA 可以潜在地调控精子发生和成熟的许多方面, 包括增殖、分化发育^[11] 和凋亡^[12]。但目前对 spEX 与 miRNA 之间的调控关系研究较少。

随着人工受精技术的普及, 种公猪的地位显著提高, 公猪的精液品质也愈发受人关注。中国是养猪大国, 在繁育过程中, 良好的猪精液质量可以带来更大的经济效益, 深入了解精子活力的影响因素以及寻找决定精子活力的关键因子成为当前亟需解决的技术难题之一^[13]。本研究通过对大白公猪精浆外泌体进行分离提取和鉴定^[14], 测序分析 spEX

miRNA 表达谱在精子受精中的调控作用, 可以更好地了解精子获能与精浆外泌体之间的表达情况, 这些数据可为改善精液质量、提高精子受精能力等方面的研究提供一定参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 5 头 25~32 月龄的优秀大白公猪作为研究对象, 所有公猪均来自同一猪场 (广西某猪场), 处于相同饲养管理条件下, 按时接种疫苗。采精间隔 5~7 d。室温手握法进行采精, 初次射出的 5~10 mL 的精液不收集。所有样品均采用计算机辅助精液分析仪 (CASA) 检测精子的活力和形态^[2]。样本在 17 ℃、2 840 r/min 离心 10 min 使精子和精浆初分离, 精浆保存于-40 ℃, 用干冰运回实验室。

1.2 方法

1.2.1 外泌体分离 37 ℃ 条件下解冻精浆, 取 10 mL 精浆于 4 ℃、5 620 r/min 离心 30 min 收集上清液, 继续在 4 ℃、11 240 r/min 离心 70 min 分离出细胞外大囊泡, 得到的每份样品液依次使用 0.45 μm、0.22 μm 针孔过滤器过滤, 将过滤后的液体在 4 ℃、33 200 r/min 离心 80 min, 去除上清液后加入 PBS 溶液反复吹打, 白色胶絮状物质即为外泌体, 进一步在 4 ℃、33 200 r/min 离心 80 min 纯化外泌体, 加 400 μL PBS 溶液于-80 ℃ 存放备用。

1.2.2 透射电镜分析 取 10 μL 外泌体样品置于碳涂层铜网格上吸附 20 min, 干燥后避光, 用 15 μL 醋酸双氧铀负染 1 min。在 Hitachi H-7700 透射电子显微镜下拍照, 检测外泌体的形态。

1.2.3 纳米颗粒跟踪分析 取 5 μL 外泌体样品稀释至 30 μL, 用 ZetaView Nanoparticle Tracker 测量外泌体的平均直径和浓度, 分析外泌体的粒径大小分布情况。

1.2.4 Western blot 鉴定分析 取外泌体样品加入适量的 SDS-PAGE 缓冲液, 99 ℃ 变性 10 min。用 SDS-PAGE 凝胶快速配置试剂盒 (上海碧云天生物有限公司), 进行制胶、电泳、转膜、封闭、孵育一抗 Calnexin (Abcam, ab133615)、Hsp70 (Abcam, ab181606)、β-Actin (Beyotime, ab82226) 和 Tsg101

(Beyotime, ab125011), 一抗均已以 1:1 000 的体积比稀释, 然后根据说明书配制显色液, 通过成像系统对条带进行曝光拍照。

1.2.5 miRNA 的提取 用 miRNeasy®Mini 试剂盒 (Qiagen) 从分离鉴定取得的样品中提取和纯化 miRNA。提取后的 miRNA 用 Agilent Bioanalyzer 2100 系统 (Agilent Technologies) 及配套的 RNA Nano 6000 Assay Kit 进行质控。

1.2.6 cDNA 文库构建及测序 用 QIAseq miRNA (Library Kit, Qiagen) 构建文库。5 个单独测序样品在属性序列中额外加入索引代码, 最终经 Bioanalyzer 2100(Agilent) 和 qPCR 评估 miRNA 文库构建的质量, 并用 Illumina Hiseq2000 (Illumina) 进行 miRNA 测序。

1.2.7 miRNA 数据处理及分析 用 Bowtie 软件, 将测序得到的 miRNA 分别与 Silva、GTRNadb、Rfam 和 Repbase 数据库进行序列比对, 筛选出 miRNA 并计算 miRNA 的表达量 (Transcript per million, TPM), 公式为 $TPM = \text{Readcount} \times 10^6 / \text{MappedReads}$ (Readcount 表示比对到某一 miRNA 的 Read 数目; MappedReads 表示比对到所有 miRNA 上的 Read 数目)。

1.2.8 miRNA 靶基因的预测、GO 分类及 KEGG 富集分析 根据鉴定得到的高表达量的 miRNA, 基于 3'UTR 作为靶向序列, 用 miRanda 和 RNAhybrid 软件预测 miRNA 的靶基因, 用 GO(<http://www.genecology.org>) 和 KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>) 对预测的靶基因进行功能注释和通路分析。

2 结果与分析

2.1 精浆外泌体的鉴定

CASA 系统对大白公猪原始精液的精子活力检测 (表 1), 结果显示精子活力良好, 符合国家制定的种猪常温精液质量标准^[15]。透射电子显微镜观察精浆中所分离的细胞外囊泡, 可见明显的立体膜结构

散在分布, 呈圆形或椭圆形, 大小较为均一, 其形态具有典型的茶杯托样特征 (图 1); 粒径分析显示囊泡粒子平均粒径为 96.9 nm, 粒径主峰占比为 94.9%(图 2); Western blot 结果显示囊泡包含 Tsg101、Hsp70 等外泌体标志性膜蛋白, Tsg101 和 Hsp70 蛋白表达为阳性 (图 3)。这些数据与前人的研究一致, 表明精浆中所分离的细胞外囊泡为外泌体。

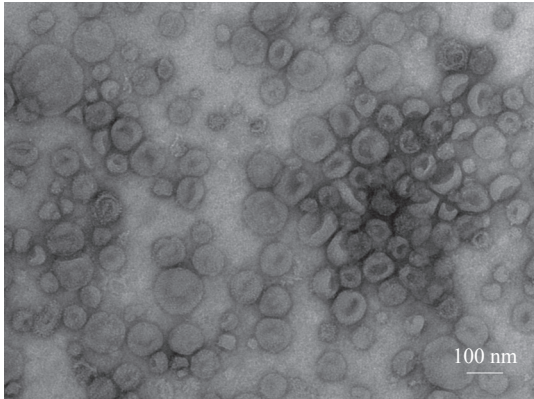
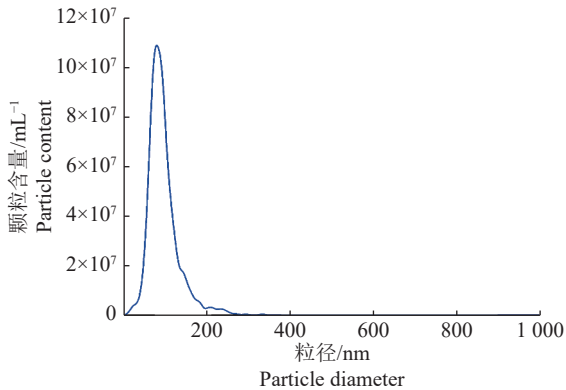


图 1 精浆外泌体透射电镜检测结果

Fig. 1 Transmission electron microscopic detection of seminal plasma exosomes

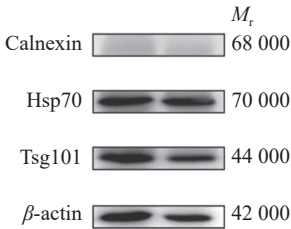


精浆外泌体的平均粒径为 96.9 nm; 粒径主峰为 85.2 nm; 主峰占检测所有峰的比例为 94.9%; 颗粒含量为 $3.4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$

The average particle diameter of seminal plasma exosomes was 96.9 nm; The particle diameter of main peak was 85.2 nm; The main peak accounted for 94.9% of all the detected peaks; The particle content was $3.4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$

图 2 精浆外泌体粒径分析

Fig. 2 Particle size analysis of seminal plasma exosomes



2 个条带为 5 个样品中随机挑选的 2 个样品

The two strips were two samples randomly selected out of five samples

图 3 精浆外泌体标志性蛋白的 Western blot 检测

Fig. 3 Western blot assay of marker proteins in seminal plasma exosomes

表 1 精液质量基本信息

Table 1 Basic information of semen quality

公猪编号 Boar number	精子活力/% Sperm vitality	精子畸形率/% Semen malformation rate	精子密度/ mL ⁻¹ Semen density
1	95	3	4.18×10^8
2	97	1	3.68×10^8
3	96	2	4.74×10^8
4	97	2	3.87×10^8
5	95	5	5.22×10^8

2.2 猪精浆外泌体中 miRNA 测序和鉴定

对 5 头大白公猪 spEX 样品 miRNA 测序, 检测到 Raw read 数量为 108 849 665, Clean read 数量为 60 882 083, 碱基质量值 (Q30) 范围为 96.89%~

97.40%, 共鉴定出 329 个已知 miRNA。miRNA 片段长度为 19~24 bp, 其中 22 bp 的片段占比超过 45%。根据计算 miRNA 的表达量 TPM, 筛选前 20 个代表性 miRNA(表 2)。

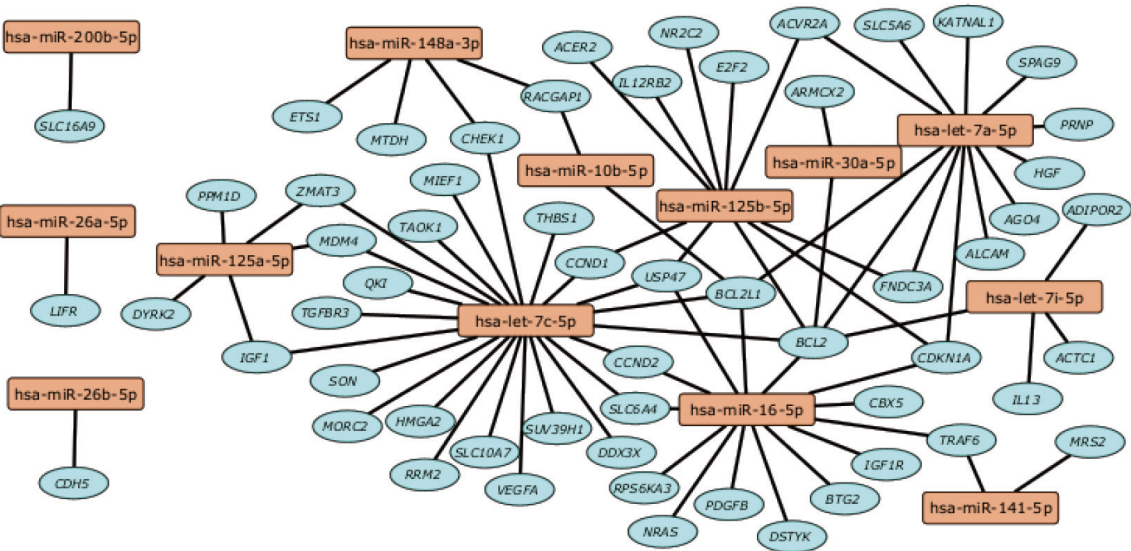
表 2 精浆外泌体中标志性 miRNA
Table 2 Representative miRNAs in seminal plasma exosomes

miRNA	长度/bp Length	序列(5'→3') Sequence	TPM
ssc-let-7c	22	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	851 579.790 6
ssc-let-7a	22	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	655 084.476 6
ssc-let-7f-5p	22	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	513 356.528 7
ssc-let-7e	22	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	426 156.852 5
ssc-miR-10a-5p	22	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGU	181 651.350 8
ssc-miR-10b	22	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGU	181 595.663 5
ssc-miR-141	21	UAACACUGUCUGGUAAAGAUG	163 842.735 2
ssc-miR-21-5p	22	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	125 987.756 2
ssc-miR-125b	22	UCCCUGAGACCCUAAACUUGUGA	118 310.997 3
ssc-miR-200b	23	UAAUACUGCCUGGUAUAUGAUGAC	99 945.770 5
ssc-miR-16	22	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	96 309.612 1
ssc-miR-30a-5p	22	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	93 885.972 8
ssc-miR-30d	24	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAGCU	74 152.951 0
ssc-miR-148a-3p	22	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	73 369.856 2
ssc-miR-191	23	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG	65 102.657 0
ssc-miR-26a	22	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	59 547.668 1
ssc-miR-26b-5p	22	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU	53 532.438 3
ssc-miR-125a	23	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUG	51 427.264 4
ssc-let-7i-5p	19	UGAGGUAGUAGUUUGUGCU	50 378.368 8
ssc-miR-29c	22	UAGCACCAUUUGAAUUCGGUUA	44 726.243 0

2.3 miRNA 靶基因预测

用 miRanda 和 RNAhybrid 软件预测和筛选得到 miR-10 家族 (miR-10b 和 miR-10a-5p)、let-7 家族 (let-7c、let-7a、let-7f-5p 和 let-7e) 等前 10 个高表达 miRNA 的靶基因。利用 Cytoscape 软件对 miRNA 与靶基因互作分析进行可视化 (图 4)。富集结果显示, miRNA 中高表达的 miR-let-7c-5p 潜在调控染色质重塑蛋白 MORC 家族 CW 型锌指结构蛋白 2(MORC family CW-type zinc finger 2, MORC2)、人转化生长因子 β 受体 3(Transforming growth factor beta receptor 3, TGFBR3)、DEAD-box RNA 解旋酶 3(DEAD-box RNA helicase 3 X-linked, DDX3X)、核糖核苷酸还原酶 M2(Ribonucleotide reductase regulatory subunit M2, RRM2) 等多个靶基因; MiR-125a-5p 潜在调控镁离子依赖的蛋白磷酸酶 (Protein phosphatase,

Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1D, PPM1D) 和双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶-2(Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 2, DYRK2), 且和 miR-let-7c-5p 联合调控靶基因鼠双微体 4(Murine double minute 4, MDM4)、锌指基质蛋白型蛋白 3(Zinc finger matrin-type protein 3, ZMAT3) 和胰岛素样生长因子 1(Insulin like growth factor 1, IGF1); miR-16-5p 潜在调控血小板衍生生长因子 (Platelet derived growth factor subunit B, PDGFB)、核糖体蛋白 S6 激酶多肽 3(Ribosomal protein S6 kinase A3, RPS6KA3)、神经母细胞瘤鼠肉瘤同系物 (NRAS proto-oncogene, GTPase, NRAS)、胰岛素样生长因子 1 受体 (Insulin like growth factor 1 receptor, IGFIR) 等多个靶基因; miR-let-7a-5p 潜在调控活化白细胞黏附分子 (Activated leukocyte cell adhesion molecule, ALCAM)、精子相关抗原 9(Sperm



橘色方框代表 miRNA, 蓝色圆圈代表 miRNA 靶向的靶基因
The orange box represents miRNA, and the blue circle represents the target gene of the miRNA

图 4 精浆外泌体 miRNA 与靶基因互作分析

Fig. 4 Interaction analysis between miRNAs in seminal plasma exosomes and target genes

associated antigen 9, *SPAG9*)、肝细胞生长因子 (Hepatocyte growth factor, *HGF*)、类剑蛋白 p60 亚基 A1(Katanin catalytic subunit A1 like 1, *KATNAL1*) 等多个靶基因; miR-let-7i-5p 潜在调控靶基因 Th2 型炎症因子 (Interleukin 13, *IL13*)、 α -心脏肌动蛋白 (Actin alpha cardiac muscle 1, *ACTC1*)、脂联素 2 型受体 (Adiponectin receptor 2, *ADIPOR2*) 和 B 淋巴细胞瘤-2(*BCL2* apoptosis regulator, *BCL2*); miR-125b-5p 潜在调控 E2F 家族转录因子 2(E2F transcription factor 2, *E2F2*)、受体亚家族 2C 成员 2(Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2, *NR2C2*)、碱性神经酰胺酶 2(Alkaline ceramidase 2, *ACER2*)、III 型纤维连接蛋

白域蛋白 3A(Fibronectin type III domain containing 3A, *FND3A*) 等多个靶基因; 其中泛素特异性蛋白酶 47(Ubiquitin specific peptidase 47, *USP47*)、B 细胞淋巴瘤-2(*BCL2* apoptosis regulator, *BCL2*)、细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂 1A(Cyclin dependent kinase inhibitor 1A, *CDKN1A*) 被多个 miRNA 联合调控。

2.4 猪精浆外泌体中 miRNA 功能分析

GO 和 KEGG 富集分析结果显示, spEX 中 miRNA 的调控功能主要表现在射精、P53 信号通路、前列腺癌、细胞对 DNA 损伤刺激的反应、负调控凋亡过程、跨膜运输、质膜外侧、顶体膜结合、受精等通路中发挥潜在调控作用 (图 5)。其中, 射精

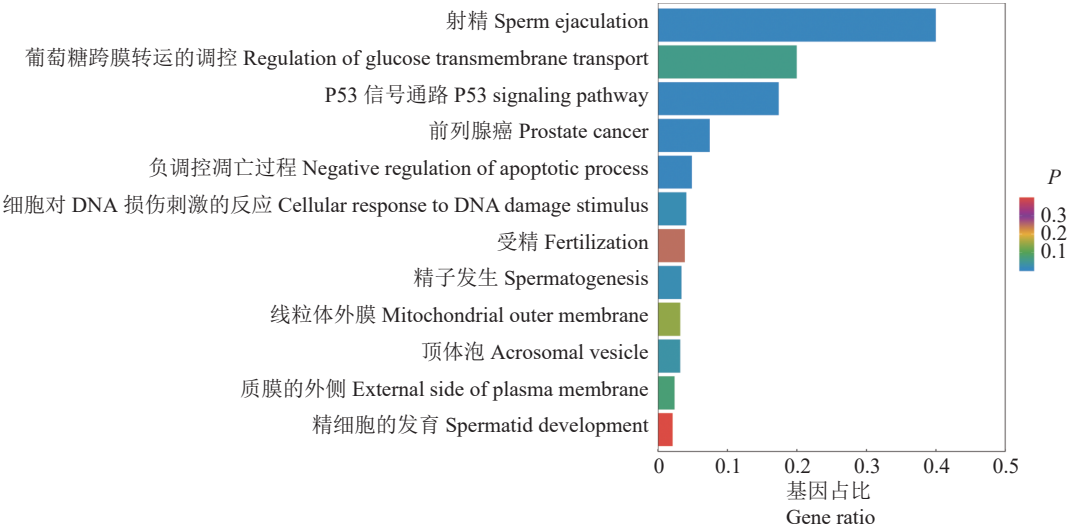


图 5 精浆外泌体 miRNA 靶基因功能 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 5 GO and KEGG enrichment analyses of miRNA target gene functions of seminal plasma exosomes

通路中, miR-16-5p 的靶基因包括 *ACVR2A* 和 *SLC6A4*; P53 信号通路中, let-7c-5p 的靶基因包括 *BCL2L1*、*IGF1*、*CCND1* 和 *CDKN1A*; 细胞对 DNA 损伤刺激反应通路中, miR-125a-5p 的靶基因包括 *MORC2*、*BTG2* 和 *TRAF6*; 精子受精通路中, let-7c-5p 的靶基因包括 *BCL2L1* 和 *FNDC3A*; 质膜外侧的通路中, miR-16-5p 的靶基因是 *TGFBR3*, miR-200b-5p 的靶基因是 *IL12RB2*, miR-148a-3p 的靶基因是 *ALCAM*, let-7i-5p 的靶基因是 *IL13*, let-7a-5p 的靶基因是 *THBS1*, miR-125a-5p 的靶基因是 *LIFR*, miR-125b-5p 的靶基因是 *CDH5*。

3 讨论与结论

外泌体可携带多种核酸、蛋白质、脂质以及小分子物质等重要信息物质, 形成细胞间通信, 直接影响细胞迁移、免疫反应和细胞分化生长等过程。外泌体具有脂质双层膜结构, 其组成成分和功能具有特异性, 被其包裹的内容物可稳定存在^[16]。外泌体的形成以及被包裹内容物的分拣、释放是一系列精细调控的过程, 需要很多蛋白质和能量的参与。细胞通过不断吸收释放外泌体, 实现了与外界微环境的信息交互, 参与到各种生理病理疾病中。本研究提取的大白猪 spEX 平均粒径约为 96.9 nm, 电镜下形态呈茶杯托状结构, Western blot 结果显示大白公猪精浆外泌体中 Tsg101 和 Hsp70 蛋白表达为阳性, 这与其他报道 EX 的特征结果一致^[17], 表明已成功提取到大白猪精液中的 spEX。

精液中的 EX 主要是睾丸、附睾、副性腺分泌物的混合物, 即精浆外泌体。其成分因动物物种而异^[18]。在外泌体运载的生物分子中, 越来越多 miRNA 的作用被发掘关注。有研究表明 miRNA 是外泌体中含量最丰富的细胞间信息交流的主要分子之一^[19], 外泌体携带的生物活性调节分子参与精子发生、修饰加工及受精能力的调控^[20]。一些 miRNA 的数量和种类一旦改变会导致配子发育停滞、精卵受精障碍和各种生殖系统疾病的产生, 显示出 EX 携带的 miRNA 在配子发育和精子加工中起重要作用^[20-21]。本研究主要对大白公猪 spEX miRNA 的表达情况进行检测, 并对前 10 个高丰度的 miRNA 相关功能进行预测, 分析发现高表达的前 10 个 miRNA 中 let-7 家族占了 4 个 (let-7c、let-7a、let-7f-5p、let-7e), 显著高于其他 miRNA。其中, let-7 家族在哺乳动物、昆虫和植物中高度表达和保守, 是基本生物学过程中最重要的 miRNA 调节因子之一^[22]。有研究表明在公猪睾丸

中 miR-let-7 家族的成员 (let-7a-5p、let-7f-5p、let-7c-5p) 高度表达, 这与本研究预测结果基本一致, let-7 家族可能与公猪睾丸的发育和睾丸中精子发生有关^[23], 在生精过程中, 高水平的 let-7 表达可能会改变正常生精所需的蛋白质的产生, 从而影响与精子形态和运动性相关的蛋白质^[24]。miR-let-7a 在猪睾丸^[23]、小鼠附睾精液^[25]、人精浆^[26] 中均有发现, 提示其可抑制维甲酸诱导的精原细胞分离并介导胚胎附着^[27]。精子获能的过程需要能量, miR-26a 与精子能量代谢有关, 其可能影响精子活力和凋亡^[28], 有研究表明 *PDHX* 基因可能是 miR-26a 的潜在靶点, 其参与丙酮酸氧化脱羧连接糖酵解和氧化磷酸化的关键步骤, 可以调节糖代谢途径, 最终影响公猪精子的活力和存活率^[29]。范宇^[30] 研究表明, miR-26a 可以调节 PTEN 表达, 通过靶向调控 PTEN 减少精子细胞凋亡和促存活作用, 这可能是雄性不育的原因。在公猪中, miR-26a 被多个环状 RNA 靶向以调节精子活力, 这也表明 miR-26a 具有作为精子质量和雄性生育能力的非侵入性生物标志物的潜力^[31]。精子的发生包括 3 个主要发育阶段: 精原干细胞自我更新、精原干细胞分化和精子细胞变形, 在每个阶段中均检测到 miRNA 表达, 许多 miRNA 参与调节睾丸的发育阶段和控制精子发生^[32-33]。有研究报道血浆外泌体中高表达的 miRNA 没有发现 miR-10 家族^[34], 这排除了 miR-10 家族来自血浆的可能性。有研究分析 miR-10b 在不同年龄的小鼠睾丸中表达, 且在睾丸发育过程中表达降低^[35], Li 等^[36] 研究发现 miR-10b 主要在 thyl 细胞中表达, 并且在出生后第 6 天的小鼠睾丸中高表达, 这些结果表明 miR-10b 在精原干细胞有丝分裂的调节中起作用, 可能与精子发生有关。本研究结果显示 spEX 也检测到 miR-10 家族, 说明了 miR-10 家族可能是在附睾或副性腺等生殖器官中特异性表达。

GO 和 KEGG 通路分析表明, 高表达 miRNA 的靶基因在 P53 信号通路、精子受精、负调控凋亡过程、跨膜运输和能量代谢等方面具有潜在的调控作用。P53 是细胞内最重要的蛋白之一, 能介导细胞应答诸多类型的应激信号。P53 蛋白通过参与促进 DNA 损伤修复、诱导细胞周期阻断、细胞衰老凋亡等通路来维持基因组的稳定性和完整性^[37]。有研究表明, P53 信号通路与男性生殖能力有关^[23], 这也说明了精浆外泌体中的 miRNA 可能与公猪繁育有关。有些前列腺小体 (前列腺分泌的外泌体) 可以特异性地将遗传物质和生物活性物质传递给精子, 随后可以提高精液质量和公猪的受精率^[38]。有研究

发现,前列腺癌患者血清中 miR-141 的含量明显增高,且与特异性抗原 (PSA) 相比较,两者具有相关性,表明 miRNA 在前列腺癌的发生中起着重要的作用^[39]。因此这些表达失调的 miRNA 可能可以用于癌症的诊断、治疗以及治疗效果的评价。此外,通路分析表明,高表达 miRNA 的靶基因参与了氧化磷酸化和泛素介导的蛋白水解等活动。蛋白质磷酸化对精子活力至关重要,研究显示,核糖体蛋白 S6 激酶 A3(RPS6KA3) 与磷酸化 (V-ATPase) 运输调节有关,RPS6KA3 磷酸化各种底物,这种蛋白质的活性与控制细胞生长和分化有关^[40]。泛素蛋白酶系统可通过降解有毒蛋白质聚集体和错误折叠的蛋白质来参与调节精子蛋白质的稳态^[41]。在附睾运输过程中,附睾起始段的精子蛋白与附睾尾段的精子蛋白不一致,意味着运输过程中精子蛋白选择性丢失^[42]。泛素介导的蛋白水解过程可能在精子附睾成熟阶段发挥作用。

综上,本研究报道大白公猪精浆外泌体高表达的前 10 个 miRNA,通过靶基因预测和通路富集分析,预测了这些 miRNA 可能与精子的发生、P53 信号通路、线粒体外膜调节、精细胞发育等过程有关,为大白公猪精浆外泌体中 miRNA 基因表达调控研究提供基础数据,这将有助于确定与精子的生育能力有关的基因及利用 miRNA 作为生物标志物预测公猪的生育力。但本研究结果基于生物信息学预测,所涉 miRNA、靶基因及其相关通路还需进一步试验验证。

参考文献:

[1] SHAO H, IM H, CASTRO C M, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(4): 1917-1950.

[2] SUN J, ZHAO Y, HE J, et al. Small RNA expression patterns in seminal plasma exosomes isolated from semen containing spermatozoa with cytoplasmic droplets versus regular exosomes in boar semen[J]. *Theriogenology*, 2021, 176: 233-243.

[3] 杜冠潮, 王福, 张继伟, 等. 精浆外泌体在精子成熟过程中的调节机制研究进展[J]. *山东医药*, 2020, 60(36): 105-107.

[4] THERY C, OSTROWSKI M, SEGURA E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(8): 581-593.

[5] SAINT-DIZIER M, MAHE C, REYNAUD K, et al. Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020, 516: 110956.

[6] 秦佳丽, 孙敬帅, 曹婷婷, 等. 精浆外泌体的转运机制及生物学功能研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58(2):

52-58.

[7] GUO H, CHANG Z, ZHANG Z, et al. Extracellular AT-Ps produced in seminal plasma exosomes regulate boar sperm motility and mitochondrial metabolism[J]. *Theriogenology*, 2019, 139: 113-120.

[8] 杨秀芹, 万洪宇, 王金奎, 等. 猪 miR-101 表达特性分析[J]. *东北农业大学学报*, 2016, 47(6): 74-80.

[9] 曲波, 甄贞, 仇有文, 等. 基于生物信息学方法挖掘奶山羊 miRNAs 研究[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(1): 86-93.

[10] TWENTER H, KLOHONATZ K, DAVIS K, et al. Transfer of MicroRNAs from epididymal epithelium to equine spermatozoa[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2020, 87: 102841.

[11] FOSHAY K M, GALLICANO G I. miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation[J]. *Developmental Biology*, 2009, 326(2): 431-443.

[12] BOUHALIER F, ALLIOLI N, LAVIAL F, et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis[J]. *RNA*, 2010, 16(4): 720-731.

[13] 薛林涛, 黄悦悦, 施文. 精浆外泌体在精子发生与功能调控中的研究进展[J]. *右江医学*, 2021, 49(9): 706-709.

[14] 吴志胜, 陈慧芳, 刘俊杰, 等. 长白猪精浆外泌体 miRNAs 的鉴定与功能分析[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(2): 279-287.

[15] 白绪祥, 韩帅琪, 胡建宏. 猪精液常温保存研究进展[J]. *畜牧兽医杂志*, 2021, 40(1): 28-30.

[16] 舒密. 外泌体 miRNAs 在结直肠癌中的研究进展[J]. *医学信息*, 2021, 34(15): 15-18.

[17] 卞玉莹. 精浆外泌体 miRNA 作为男性不育症新型分子标志物的临床研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020.

[18] MCGRAW L A, SUAREZ S S, WOLFNER M F. On a matter of seminal importance[J]. *BioEssays*, 2015, 37(2): 142-147.

[19] TEOH S, LIEW K, KHOO A S, et al. Pathogenic role of exosomes in Epstein-Barr virus (EBV)-associated cancers[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2017, 13(10): 1276-1286.

[20] 陈慧芳, 杨镁楹, 吴志胜, 等. 外泌体 miRNA 在配子发育和受精中的调控作用[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(1): 17-24.

[21] SANTONOCITO M, VENTO M, GUGLIELMINO M R, et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation[J]. *Fertility and Sterility*, 2014, 102(6): 1751-1761.

[22] ROUSH S, SLACK F J. The let-7 family of microRNAs[J]. *Trends in Cell Biology*, 2008, 18(10): 505-516.

[23] LUO Z, DAI X, RAN X, et al. Identification and profile of microRNAs in Xiang pig testes in four different ages detected by Solexa sequencing[J]. *Theriogenology*, 2018,

117: 61-71.

[24] CURRY E, SAFRANSKI T J, PRATT S L. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility[J]. *Theriogenology*, 2011, 76(8): 1532-1539.

[25] LUO M, HAO L, HU F, et al. MicroRNA profiles and potential regulatory pattern during the early stage of spermatogenesis in mice[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(5): 442-450.

[26] WU W, HU Z, QIN Y, et al. Seminal plasma microRNAs: Potential biomarkers for spermatogenesis status[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2012, 18(10): 489-497.

[27] HOSSEINI S, HOSSEINI S, SALEHI M. Upregulation of Toll-like receptor 4 through anti-miR-Let-7a enhances blastocyst attachment to endometrial cells in mice[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(12): 9752-9762.

[28] BISSONNETTE N, LÉVESQUE-SERGERIE J, THIBAUT C, et al. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: A potential tool to evaluate semen quality[J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2009, 138(1): 65-80.

[29] WANG W, LIANG K, CHANG Y, et al. miR-26a is Involved in glycometabolism and affects boar sperm viability by targeting PDHX[J]. *Cells*, 2020, 9(1): 146.

[30] 范宇. 睾酮缺乏诱导 miR-26a-5p 和 let-7g-5p 作为信号递质靶向作用于 PTEN 和 PMAIP1 调控公猪精子细胞凋亡[D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.

[31] GODIA M, CASTELLÓ A, ROCCO M, et al. Identification of circular RNAs in porcine sperm and evaluation of their relation to sperm motility[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1-11.

[32] GONZALEZ-GONZALEZ E, LOPEZ-CASAS P P, DEL MAZO J. Gene silencing by RNAi in mouse Sertoli cells[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2008, 6: 29.

[33] KOTAJA N, BHATTACHARYYA S N, JASKIEWICZ L, et al. The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(8): 2647-2652.

[34] HUNTER M P, ISMAIL N, ZHANG X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles[J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3694.

[35] 梅星星, 李小勇, 吴际. 一组 miRNAs 在睾丸发育中的表达及 miR-125a 对精原干细胞发育的调节作用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(5): 625-630.

[36] LI J, LIU X, HU X, et al. MicroRNA-10b regulates the renewal of spermatogonial stem cells through Kruppel-like factor 4[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2017, 35(3): 184-191.

[37] 王道光. p53 蛋白介导的细胞 DNA 损伤响应的动力学机制研究[D]. 南京: 南京大学, 2017.

[38] SANTO G D, FRASCA M, BERTOLI G, et al. Identification of key miRNAs in prostate cancer progression based on miRNA-mRNA network construction[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2022, 20: 864-873.

[39] RAUHALA H E, JALAVA S E, ISOTALO J, et al. miR-193b is an epigenetically regulated putative tumor suppressor in prostate cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2010, 127(6): 1363-1372.

[40] MERKULOVA M, PĂUNESCU T G, AZROYAN A, et al. Mapping the H⁺ (V)-ATPase interactome: Identification of proteins involved in trafficking, folding, assembly and phosphorylation[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14827.

[41] SILVA J V, SANTIAGO J, SOUSA M, et al. New evidences of ubiquitin-proteasome system activity in human sperm[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2021, 1868(3): 118932.

[42] IJIRI T W, MERDIUSHEV T, CAO W, et al. Identification and validation of mouse sperm proteins correlated with epididymal maturation[J]. *Proteomics*, 2011, 11(20): 4047-4062.

【责任编辑 庄 延】