

· 基础研究 ·

小RNA 2'-O-甲基转移酶 Henmt1 在小鼠精子发生中的作用

戴馨缘,王仿竹,靳佳川,李 伟,沈 彬*

南京医科大学生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 211166

[摘要] 目的:通过构建基因突变小鼠模型,研究小RNA 2'-O-甲基转移酶 Henmt1 在小鼠精子发生中的作用。方法:利用CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9)技术,构建 Henmt1 基因突变小鼠,通过计算机辅助精子分析、HE染色及免疫荧光检测等技术对小鼠表型进行分析。结果:成功构建 Henmt1 基因突变小鼠模型;生育力测试结果提示 Henmt1 基因突变雄鼠不育;Henmt1 基因突变导致雄性小鼠精子发生阻滞;突变小鼠睾丸中逆转座子元件LINE1表达上调。结论:Henmt1 对雄性小鼠精子发生有重要调控作用。

[关键词] Henmt1;精子发生;RNA修饰;雄性不育

[中图分类号] R339.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)09-1263-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20200904

Roles of small RNA 2'-O-methyltransferase Henmt1 during mouse spermatogenesis

DAI Xinyuan, WANG Fangzhu, JIN Jiachuan, LI Wei, SHEN Bin*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to observe the role of small RNA 2'-O-methyltransferase Henmt1 during mouse spermatogenesis by generation of Henmt1 mutant mouse model. **Methods:** Henmt1 mutant mouse were constructed by CRISPR/Cas9 system(clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9) and analyzed the phenotype of mutant mice by computer-aided sperm analysis, HE staining and immunofluorescent staining. **Results:** Henmt1 mutant mouse model were successfully generated. Henmt1 mutant males are sterility with spermatogenic arrest and up-regulation of retrotransposon LINE1. **Conclusion:** This study found that HENMT1 plays an important regulatory role during spermatogenesis.

[Key words] Henmt1; spermatogenesis; RNA modification; male sterile

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1263-1268, 1296]

RNA沉默是基因沉默的一种途径,它通过形成双链RNA识别序列特异的RNA,精准调节基因表达,在原核生物和真核生物中都保守存在且对调节生命活动有重要意义^[1-7]。RNA沉默维持生命活动的功能和机制逐渐被证实和发现^[10-14],但尚存在诸多不清楚的地方。RNA的成熟依赖RNA剪接^[14,18-19]和化学修饰^[12-13],前者根据RNA类别和序列信息中的元件对RNA进行加工^[20],后者为RNA提供了更精确的标记,可以更加灵活地调节生物学功能^[15-17]。

Henmt1 (HEN methyltransferase 1) 是小RNA 2'-O-甲基转移酶的编码基因,是小RNA成熟的关键条件,其同源基因在真核生物和古细菌中广泛保

[基金项目] 国家自然科学基金(31622039,31970796)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:binshen@njmu.edu.cn

守存在^[8-9]。目前已有文章报道Henmt1参与RNA沉默和基因表达^[21-22],在小鼠中, Henmt1点突变导致雄鼠的精子发生障碍^[8],为了进一步研究Henmt1在精子发生中的功能和作用机制,本研究利用Cas9和两条sgRNA删除Henmt1基因的5号外显子片段,构建了两个Henmt1突变品系,探索小RNA 2'-O-甲基转移酶Henmt1在小鼠精子发生中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究中所有动物均构建和饲养于南京医科大学动物中心,环境标准SPF级别,12 h光暗循环。所有动物实验均通过南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准。

实验中使用的主要仪器如下:计算机辅助精子分析(computer-aided sperm analysis, CASA)仪(Hamilton Thorne公司,美国),激光共聚焦显微镜(Zeiss公司,德国),PCR扩增仪(Bio Rad公司,美国),石蜡包埋机(Leica公司,德国),石蜡切片机(Leica公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 生育力测试及精子表型分析

突变小鼠和同窝对照小鼠均与雌鼠设置繁殖笼,通过每窝出生小鼠数评价生育力。

精子相关分析采用8周龄成年小鼠,处死后取附睾尾部做横向切口,置于37℃水浴锅预热获能液中静待5 min,待精子自然游出,取上清用于精子动力分析,或将上清滴加于载玻片,将液滴轻轻在玻片上摇开,等待自然干燥,滴加4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗30 min后用苏木素染色。

1.2.2 构建CRISPR/Cas9突变小鼠

针对Henmt1 exon 5设计了两条sgRNA,经体外转录后与spyCas9 mRNA一同注射入小鼠受精卵,经过注射的受精卵植回雌鼠子宫内获取子代小鼠后,与野生型C57BL/6J小鼠回交获取稳定突变小鼠品系。

1.2.3 HE染色和免疫荧光染色

用于HE染色和免疫荧光染色的组织均由多聚甲醛固定液或MDF(modified Davidson's fluid)固定液固定24 h以上,在65℃石蜡中包埋后5 μm厚度切片。HE染色:切片脱蜡水化后苏木素染色30 s,伊红染色2 min,梯度酒精脱水后置于二甲苯中,树脂封片。免疫荧光染色:切片通过酒精水化后经柠檬酸钠溶液酸性修复,5%牛血清白蛋白封闭2 h以上,一抗于4℃孵育过夜后, PBS缓冲液洗涤3次,每次15 min,二抗室温孵育2 h,再次洗涤后封片。所用抗体:一抗兔抗LINE1抗体由生殖医学国家重点实验室叶岚教授惠赠,二抗488标记的驴抗兔IgG(Life公司,美国),花生凝集素(peanut agglutinin, PNA)(Vectorlab公司,美国)与二抗混合孵育使用。

1.2.4 RT-qPCR

利用TRIzol(TaKaRa公司,日本)提取组织总RNA,通过Primescript™ RT reagent Kit(TaKaRa公司,日本)反转录,获取cDNA并进行RT-PCR定量。

Real-time RT-PCR引物如下:18S mouse For 5'-CATTTCGAACGTCTGCCCTATC-3', 18S mouse Rev 5'-CCTGCTGCCTTCCTTGA-3'; RT003-Q-Henmt1 E4-R2 5'-GGATCGCCATGAACCCAAGAAG-3', RT004-Q-Henmt1 E6-R2 5'-CCAAATAGGGAGACAAGC-

GATG-3'。

1.2.5 基因型鉴定

取少量小鼠组织于100 μL碱性A液中95℃裂解30 min,加入等体积酸性B液中和,混匀离心后,取适量上清液PCR扩增。扩增引物如下:Henmt1 C9 For 5'-CAGAGCCTCTCCTCGTTTAGC-3', Henmt1 C9 Rev 5'-GATACATCCAAGTGACAAGCCATT-3'。

1.3 统计学方法

所有实验均经过多次独立重复,实验数据由GraphPad Prism 7.0统计分析。单细胞RNA数据分析与算法均参考之前研究,通过对睾丸单细胞转录组测序,并根据转录组信息对细胞进行聚类,计算目的基因转录本在生精周期各阶段的表达量^[25]。

2 结果

2.1 Henmt1突变小鼠的建立

RT-PCR结果显示,相比其他器官, Henmt1在睾丸中特异高表达(图1A)。进一步对不同发育阶段的小鼠睾丸进行RT-PCR定量,结果显示 Henmt1于3周开始明显表达,说明 Henmt1在粗线期精母细胞开始高表达。通过分析睾丸单细胞RNA-seq数据^[25],发现 Henmt1开始高表达于粗线期和双线期(图1B),和RT-PCR结果一致。为了探索小RNA 2'-O-甲基转移酶在生殖系统中的功能,首先利用CRISPR/Cas9构建了 Henmt1突变小鼠。针对 Henmt1 exon 5设计1对sgRNA,利用微注射技术将体外转录的 Cas9 mRNA和两条sgRNA注射到一细胞期受精中,移植回受体鼠之后,出生了8只首建鼠,通过目标片段的PCR扩增和TA克隆测序,鉴定首建小鼠的基因型(图1C)。通过和野生型C57BL/6J小鼠回交,得到携带-63 bp和-115 bp突变的后代,而其他突变形式没有遗传下来,可能是脱靶或者其他原因导致。-115 bp突变使 exon 5的剪接信号丢失,会导致 exon 5的跳跃,但不会造成翻译提前终止;-63 bp造成非移码突变,但没有影响 exon 5的剪接,这两种突变所丢失的片段处在 Henmt1的S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶功能域,很有可能会影响 Henmt1的甲基转移酶功能。

2.2 Henmt1突变小鼠雄性不育

首先对-63 bp突变小鼠进行分析表型,通过基因型鉴定和RT-PCR,发现不管在基因组DNA上还是在转录组RNA上,都丢失了63 bp(图2A、B),说明并没有影响 exon5的剪接,但这种非移码突变是否会导致 Henmt1的功能丧失需要进一步研究。通过交配实

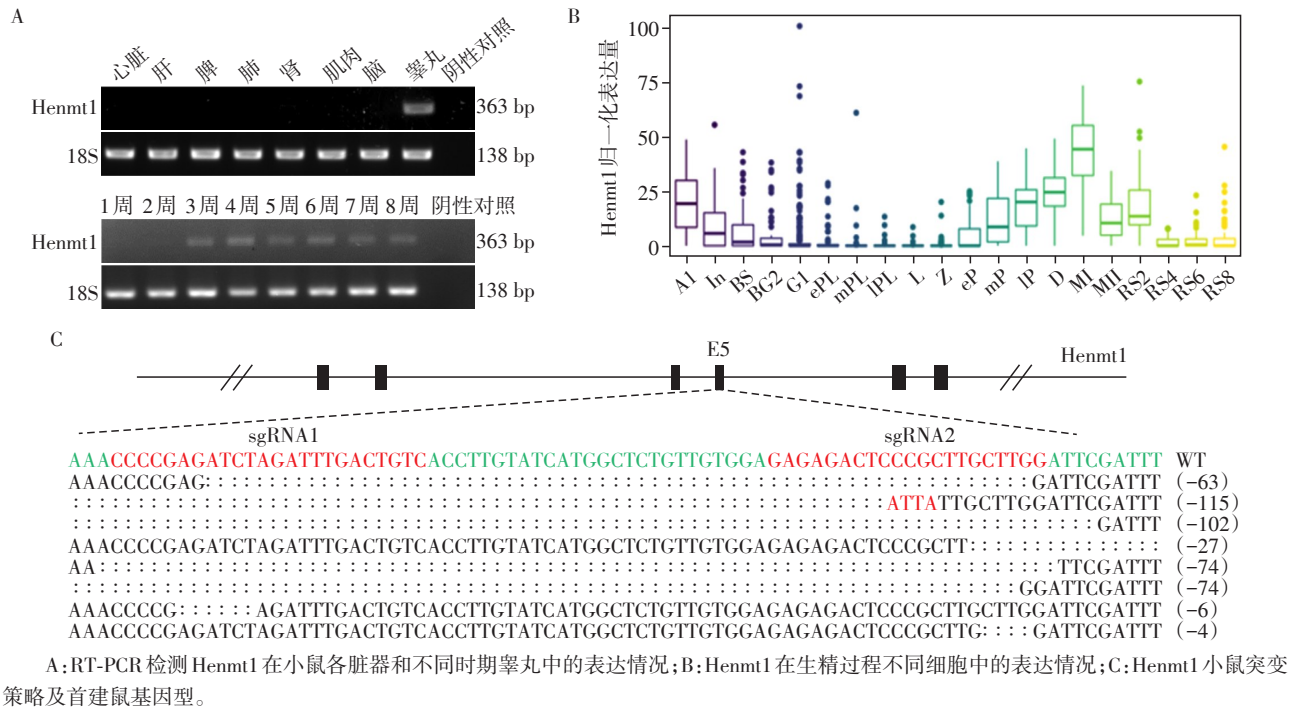
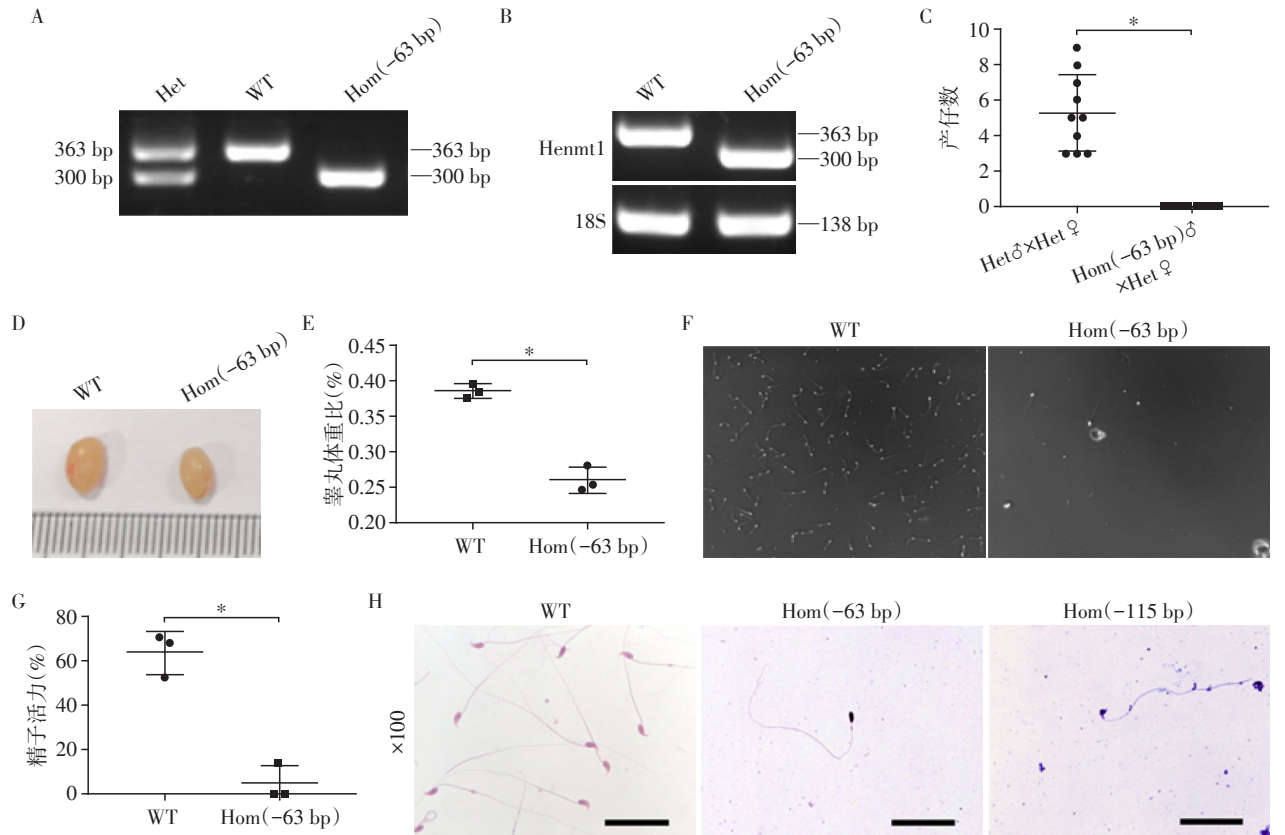


图1 Henmt1在小鼠中的表达情况和突变小鼠构建

Figure 1 The expression of Henmt1 and targeting strategy of mutant mice



A、B: -63 bp Henmt1 突变小鼠基因型鉴定(A)和 RT-PCR(B)结果; C: -63 bp Henmt1 突变小鼠生育力检测, 两组比较, $P < 0.001$ ($n=10$); D: -63 bp Henmt1 突变小鼠和同窝对照小鼠睾丸; E: -63 bp Henmt1 突变小鼠睾丸体重比显著降低, 两组比较, $P=0.0004$ ($n=3$); F、G: CASA 检测小鼠附睾精子数量(F)和活力(G), 两组比较, $P=0.0013$ ($n=3$); H: 精子涂片结果显示两个突变品系小鼠的仅存精子畸形, 标尺=20 μm。

图2 Henmt1 突变小鼠雄性不育

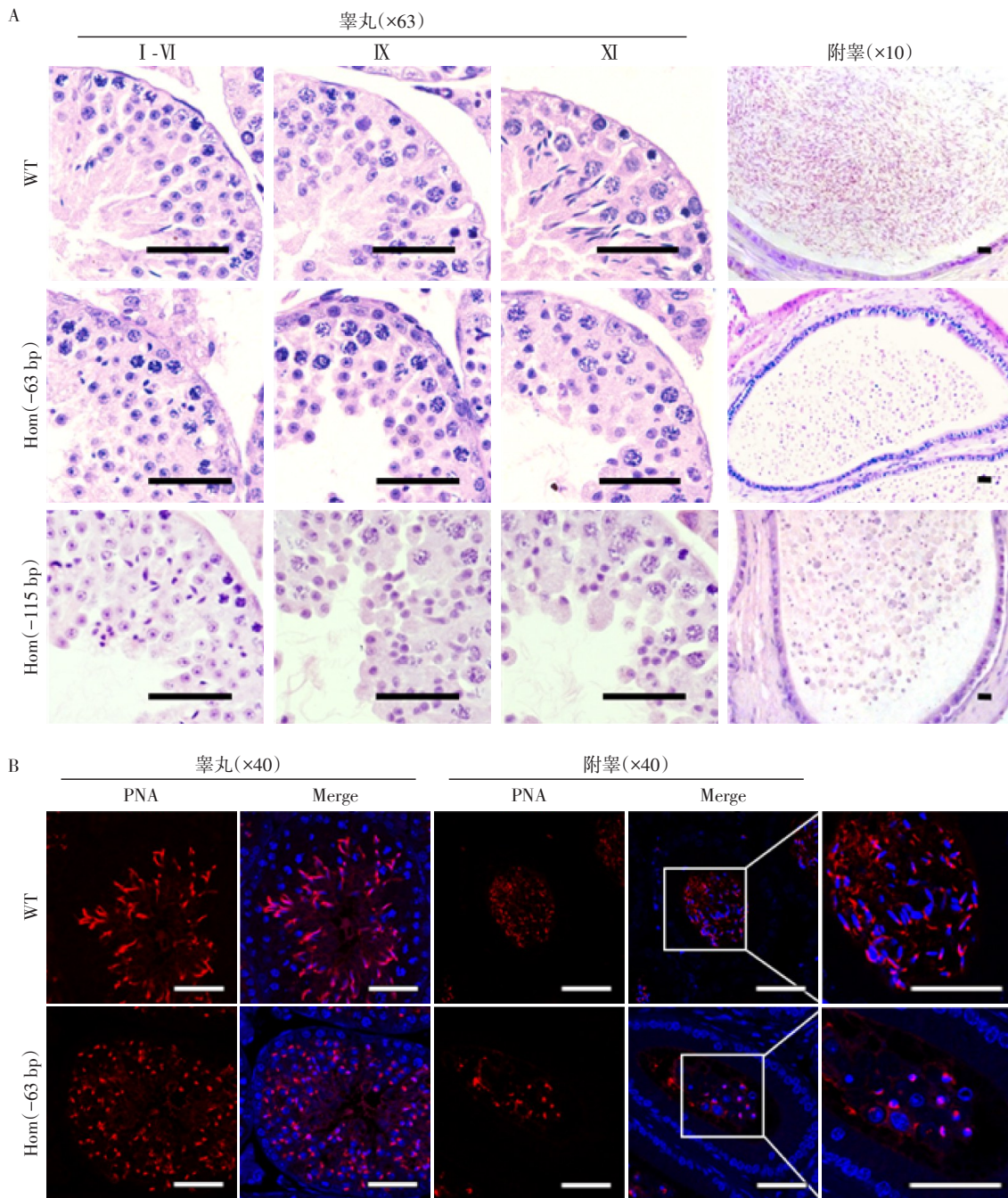
Figure 2 Henmt1 mutant male mice are infertile

验,发现-63 bp的 *Henmt1* 纯合突变雄鼠不育(图2C),经解剖发现,*Henmt1* 突变小鼠睾丸与野生型小鼠相比明显变小(图2D),睾丸体重比显著下降(图2E)。CASA结果显示,与野生型雄鼠相比,突变小鼠几乎检测不到精子(图2F),仅存的精子活力也显著降低(图2G)。精子涂片结果显示,-63 bp *Henmt1* 纯合突变小鼠的仅存精子严重畸形(图2H)。*-115 bp* 的纯合突变小鼠也是雄性不育,和-63 bp纯合突变的

小鼠显示一致的表型(图2H)。以上结果说明,两种突变都影响到了*Henmt1* 最核心的S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶功能域的功能,并导致雄性小鼠不育。

2.3 *Henmt1* 突变导致精子发生停滞

为了探索 *Henmt1* 突变导致雄性小鼠不育的机制,对 *Henmt1* 突变小鼠的生精时相进行了分析。HE染色结果显示(图3A),*Henmt1* -63 bp和-115 bp纯合突变的所有生精时相中难以发现形态正常的



A: *Henmt1* -63 bp和*Henmt1* -115 bp纯合突变小鼠和同窝对照雄鼠的生精时相及附睾切片染色;B: *Henmt1* -63 bp纯合突变小鼠和同窝对照雄鼠的睾丸和附睾PNA染色。标尺=40 μm。

图3 *Henmt1* 突变导致精子发生停滞

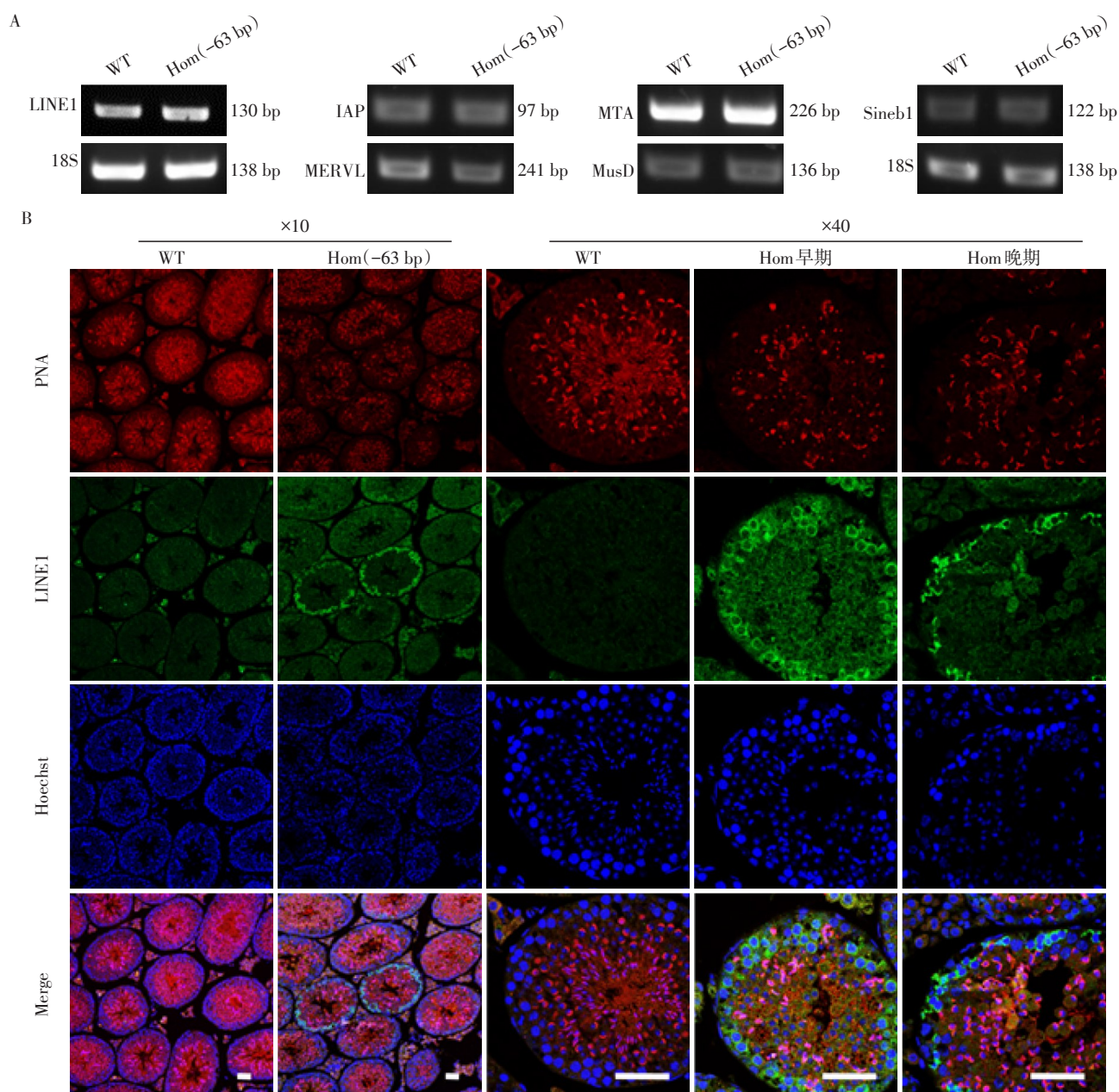
Figure 3 Mutation of *Henmt1* induces spermatogenic arrest

长形精子,并且形态异常的变形精子在生精上皮中的位置也出现异常,而圆形精子细胞看上去正常,附睾中也没有成熟精子存在。睾丸及附睾切片的免疫荧光结果同样显示 Henmt1 -63 bp 纯合突变小鼠精子发生阻滞,附睾中无成熟精子,但发现大量脱落的生殖细胞(图 3B)。

2.4 Henmt1 突变小鼠睾丸中转座子元件表达上调

Henmt1 是小 RNA 2'-O-甲基转移酶,小 RNA 2'-O-甲基化修饰是小 RNA 成熟的重要因素。小 RNA 中的 piRNA 在人和小鼠的精子发生中都存在保守

的高表达,且已被证实对精子发生有关键作用^[21-22],比如 piRNA 会影响逆转座子 LINE1 (long interspersed nuclear elements1) 的表达。本研究 Henmt1 突变小鼠睾丸中,RT-PCR 结果显示 LINE1 mRNA 表达量轻微上调(图 4A),而其他重复序列未见明显变化(图 4B)。进一步通过免疫染色检测 LINE1 ORF1 在睾丸中的表达,在 Henmt1 突变小鼠的粗线期细胞中,LINE1 ORF1 出现一过性的高表达,而野生型小鼠睾丸中,完全检测不到信号(图 4C)。目前已经有篇文章指出,LINE1 的表达与雄性不育紧密相关,



A: 重复序列的 RT-PCR 结果; B: Henmt1 突变及对照小鼠睾丸 LINE1 ORF1 免疫荧光染色, 标尺=40 μm。

图4 Henmt1 突变小鼠中 LINE1 表达上调

Figure 4 Up-regulation of LINE1 in Henmt1 mutant mouse

且其表达与 piRNA 抑制功能缺失紧密相关^[23-24]。以上结果说明, Henmt1 突变可能导致 piRNA 的成熟受阻, 进而导致逆转座子 LINE1 的表达激活。

3 讨论

本研究中, Henmt1 突变小鼠丢失部分 S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶区域, 使其失去小 RNA 修饰功能, 在 Henmt1 RT-PCR 实验中, 发现 Henmt1 缺失导致转录本改变, 而表达量无明显差异, 说明构建的小鼠模型可能并不影响截短 Henmt1 蛋白的翻译, 可以用于 S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶区域的功能研究。生育力测试和精子分析结果显示 Henmt1 是雄性小鼠精子发生和生育力的关键调控因素, Henmt1 突变雄鼠无法自然交配产生后代, 精子涂片、CASA、小鼠生精时相结果提示 Henmt1 突变雄鼠无成熟精子, 精子发生阻滞在变形中的长形精子时期。

Henmt1 是小 RNA 2'-O-甲基转移酶, 已有文章提示小 RNA 的沉默功能在雄性配子发生中维持基因组稳定性, 对精子发生有重要作用^[21-24], 在表型分析结果中, Henmt1 纯合突变小鼠中 LINE1 的异常表达提示小 RNA 对转座子元件的沉默功能丢失, 提示小 RNA 修饰是小 RNA 发挥功能抑制转座子元件的必要条件, 这和现有研究指出的转座子元件的活跃影响基因组稳定性从而导致精子发生停滞一致。Henmt1 突变小鼠精子发生停滞在长形精子变形时期, 精子变形需要将染色质浓缩并脱去大量细胞质, 推测导致停滞的机制与转座子异常活跃影响基因组稳定性从而导致染色质压缩异常和脱胞质异常有关。Henmt1 通过修饰 piRNA 进而调控逆转座子 LINE1 的机制对理解雄性精子发生有重要意义, 雄性配子发生过程复杂而精密, 小 RNA 的成熟和对精子发生的调控维持了雄性配子发生的有序进行, Henmt1 如何在睾丸小 RNA 中进行修饰以及如何调控小 RNA 发挥功能等具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] CARNEY E F. A novel RNA interference approach to targeting sFLT1 in pre-eclampsia [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(2):62-63

[2] ARAVIN A A. Pachytene piRNAs as beneficial regulators or a defense system gone rogue [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(7):644-645

[3] MATTOU A, GAIDATZIS D, PADEKEN J, et al. LSM2-

8 and XRN-2 contribute to the silencing of H3K27me3-marked genes through targeted RNA decay [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(5):579-590

[4] STOJIC L, LUN A T L, MASCALCHI P, et al. A high-content RNAi screen reveals multiple roles for long non-coding RNAs in cell division [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):1851

[5] NIGAM D, LATOURRETTE K, GARCIA - RUIZ H. Mutations in virus-derived small RNAs [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):9540.

[6] HU B, ZHONG L, WENG Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):101

[7] KABAYAMA Y, TOH H, KATANAYA A, et al. Roles of MIWI, MILI and PLD6 in small RNA regulation in mouse growing oocytes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(9):5387-5398

[8] BILLI A C, ALESSI A F, KHIVANSARA V, et al. The *Caenorhabditis elegans* HEN1 ortholog, HENN-1, methylates and stabilizes select subclasses of germline small RNAs [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(4):e1002617

[9] HUANG R H. Unique 2'-O-methylation by Hen1 in eukaryotic RNA interference and bacterial RNA repair [J]. *Biochemistry*, 2012, 51(20):4087-4095

[10] LI X, FU X. Chromatin-associated RNAs as facilitators of functional genomic interactions [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(9):503-519

[11] GUTBROD M J, MARTIENSEN R A. Conserved chromosomal functions of RNA interference [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(5):311-331

[12] SHULMAN Z, STERN-GINOSSAR N. The RNA modification N6-methyladenosine as a novel regulator of the immune system [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(5):501-512

[13] VELEMA W A, KOOL E T. The chemistry and applications of RNA 2'-OH acylation [J]. *Nat Rev Chem*, 2020, 4(1):22-37

[14] BARALLE F, GIUDICE J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(7):437-451

[15] BARBIERI I, KOUZARIDES T. Role of RNA modifications in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(6):303-322

[16] 刘媛媛, 宋小玲, 王仿竹. m6A 识别蛋白 Ythdf1 在精子发生中的作用研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(2):171-175

[17] NISHIBUCHI G, DEJARDIN J. The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals [J]. *Chromosome Res.*, (下转第 1296 页)