

张霞,王配,刘志朋,等. 基于转录组测序研究 *CatSper1* 在版纳微型猪近交系睾丸组织中的转录调控特征 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 619-628.

Zhang X, Wang P, Liu ZP, et al. Transcriptional regulation characteristics of *CatSper1* in testis of Banna mini-pig inbred line based on transcriptome sequencing [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 619-628.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.004

基于转录组测序研究 *CatSper1* 在版纳微型猪近交系 睾丸组织中的转录调控特征

张霞^{1,2#}, 王配^{2#}, 刘志朋², 霍海龙³, 代红梅², 赵筱³, 霍金龙^{2*}

(1. 吕梁学院 生命科学系, 山西 吕梁 033001; 2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 昆明 650201;
3. 云南农业职业技术学院, 昆明 650212)

【摘要】 目的 *CatSper1* 是精子特定的电压门控 Ca^{2+} 通道蛋白, 在精子生成和受精过程中具有重要作用。本研究旨在分析 *CatSper1* 基因在版纳微型猪近交系(BMI)的表达调控模式、序列特征与潜在的生物学功能。**方法** 取成年 BMI 公猪睾丸进行转录组测序; 采用 RT-PCR 技术克隆 *CatSper1* 的完整编码序列; 分析 *CatSper1* 的序列、结构特征及相互作用蛋白; 利用转录组测序数据构建 *CatSper1* 的 lncRNA 和 miRNA 调控网络, 并进行 GO 功能注释。**结果** RNA-seq 获得 *CatSper1* 基因的平均表达量和平均 TPM 值分别为 2817.5 和 33.6。*CatSper1* CDS 区全长为 2166 bp (GenBank 登录号: OK042306), 编码 721 个氨基酸, 含有 233 个氨基酸残基组成的 Ion_trans 保守结构域以及与精子生成相关的保守跨膜螺旋结构。*CatSper1* 蛋白与 10 个雄性育性相关蛋白质存在相互作用, 尤其与该基因家族成员 *CatSper2-4* 蛋白互作最为紧密。*CatSper1* 基因受 10 个 miRNAs 靶向调控, 分别有 16 个和 14 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-1343 和 ssc-miR-744。GO 注释发现 *CatSper1* 基因在分子功能(MF)、生物学过程(BP)、细胞成分(CC)等方面均具有重要功能。**结论** 本研究报道了 *CatSper1* 在 BMI 睾丸中的表达, 基因的分子结构特征和表达调控网络, 为深入研究 *CatSper1* 基因在 BMI 精子发生、精子获能和顶体反应等重要生物学过程中的功能奠定了基础。

【关键词】 版纳微型猪近交系; 阳离子通道精子相关蛋白 1; 转录组测序; 精子生成; 转录调控

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0619-10

Transcriptional regulation characteristics of *CatSper1* in testis of Banna mini-pig inbred line based on transcriptome sequencing

ZHANG Xia^{1,2#}, WANG Pei^{2#}, LIU Zhipeng², HUO Hailong³, DAI Hongmei², ZHAO Xiao³, HUO Jinlong^{2*}

(1. Department of Life Science, Lyuliang University, Lvliang 033001, China. 2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201. 3. Yunnan Vocational and Technical College of Agriculture, Kunming 650212)

Corresponding author: HUO Jinlong. E-mail: jinlonghuo973@163.com

【Abstract】 Objective *CatSper1* is a sperm-specific voltage-gated Ca^{2+} channel protein that plays an essential role in spermatogenesis and fertilization. We analyzed the expression regulation pattern, sequence characteristics, and potential biological function of *CatSper1* gene of Banna mini-pig inbred (BMI) line. **Methods** The testes of adult BMI boars were

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (32060733, 31460580, 31660637, 31660650), 吕梁学院博士科研启动基金项目。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32060733, 31460580, 31660637, 31660650), Doctoral Research Foundation of Lyuliang University.

【作者简介】 张霞 (1990—), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 猪分子生物学研究。Email: xiazhang1425@163.com;

王配 (1987—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 猪分子遗传学研究。Email: peipei99999@126.com。

#共同第一作者

【通信作者】 霍金龙 (1975—), 男, 副教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 猪分子遗传育种和生殖生理研究。Email: jinlonghuo973@163.com

used for RNA sequencing (RNA-seq), and the complete coding sequence of *CatSper1* was cloned using reverse-transcription polymerase chain reaction. The sequence, structural characteristics, and interacting proteins of *CatSper1* were analyzed. The lncRNA and miRNA regulatory network of *CatSper1* was constructed, and gene ontology function annotations were carried out using RNA-seq data. **Results** The average expression level and transcripts per million of *CatSper1* obtained by RNA-seq was 2817.5 and 33.6, respectively. The full-length coding sequence of *CatSper1* was 2166 bp (GenBank accession number: OK042306), encoding 721 amino acids. *CatSper1* protein contained an Ion_trans conserved domain of 233 amino acid residues and a conserved transmembrane helix structure related to spermatogenesis. *CatSper1* protein interacted with 10 proteins related to male reproduction, especially *CatSper2-4* of the *CatSper* family. Ten miRNAs regulated *CatSper1* gene by a targeted mode, and 16 and 14 lncRNAs completed with *CatSper1* for binding to ssc-miR-1343 and ssc-miR-744, respectively. The gene ontology annotation result indicated that the *CatSper1* gene plays important roles in molecular functions, biological processes, and cellular components. **Conclusions** This study reported the expression *CatSper1* in BMI testis, the molecular structure characteristics and expression regulatory network. The fundings will lay groundwork for further research of *CatSper1* function in important biological processes such as spermatogenesis, sperm capacitation and acrosome reaction in BMI line.

【Keywords】 Banna mini-pig inbred line (BMI); cation channel sperm-associated protein 1 (*CatSper1*); RNA-seq; spermatogenesis; transcriptional regulation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

在哺乳动物的许多生物学过程中,离子通道具有重要的功能,其不仅能传导电信号,还具有传送 Ca^{2+} 化学信号、跨上皮转运、调节细胞质或囊泡离子浓度和 pH 值以及调节细胞体积等功能^[1]。精子细胞内的 pH 和 Ca^{2+} 浓度可调节精子活力、趋化性、获能和顶体反应,并对精子到达卵子以及受精成败至关重要^[2]。*CatSper* 家族是精子特定的电压门控 Ca^{2+} 通道,对酸碱度较为敏感^[3]。该通道蛋白主要存在于成熟精子尾部鞭毛细胞的质膜中^[4],它允许 Ca^{2+} 流入精子,并参与其生理过程,最后启动酪氨酸磷酸化级联放大反应来控制精子的活力^[5]。有研究发现,若小鼠 *CatSper* 通道功能被抑制,则卵子受精能力将严重下降^[6]。*CatSper* 家族包含 4 个成员 (*CatSper1-4*) 和 6 个辅助亚基 (*CatSper* β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 和 EFCAB9)^[7],*CatSper* 家族成员的序列同一性在整个离子通道结构域中介于 22% ~ 27% 之间^[8]。在小鼠中,*CatSper1*、2、3 或 4 的缺失会导致精子活力异常甚至雄性不育^[9]。在人类中,该家族能够介导类固醇性激素黄体酮诱导的 Ca^{2+} 流入,进而影响精子的活力、过度活化、获能和顶体反应,最终影响雄性的生育能力^[10]。另外,辅助亚基 *CatSper* β 、 γ 、 δ 、 ϵ 均包含 1 个跨膜片段和 1 个大的细胞外结构域,可与 *CatSper1-4* 相互作用形成稳定复合体,在精子生成过程和受精过程的活化阶段发挥重要作用。

CatSper1 (Cation channel sperm-associated protein 1) 是男性不育的重要标志物之一,其表达水平在精

子活力不足的低生育力患者中显著降低^[11]。敲除 *CatSper1* 基因的小鼠,其精子的鞭毛弯曲程度和游动振幅会受到严重影响,精子运动能力明显减弱,最终无法使卵子受精^[4]。而且敲除该基因后,精子质膜上无法检测到 *CatSper* β 、*CatSper* γ 、*CatSper* δ 、*CatSper2*、*CatSper3* 和 *CatSper4*,这表明所有 *CatSper* 亚基都需要正确的通道组装,单个亚基的缺失可能导致剩余的 *CatSper* 蛋白降解^[6]。在大鼠中,敲低 *CatSper1* 会诱发特发性弱精子症^[12]。综上所述,*CatSper1* 基因在雄性育性方面至关重要,本研究采用 RNA-Seq 二代测序研究检测版纳微型猪近交系睾丸组织中 *CatSper1* 基因的表达^[13],获得与之相互作用的 lncRNA 和 miRNA,并利用睾丸 RNA 克隆 *CatSper1* 基因,对其序列特征和功能进行分析,最终通过大数据联合分析获得 *CatSper1* 和 lncRNA、miRNA 的调控网络,以期解析 *CatSper1* 调控版纳微型猪近交系精子生成及受精过程的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

版纳微型猪近交系是利用云南特有地方猪种资源,采用连续高度近交加严格选择的科学方法,经过 40 多年的连续高度近交,培育成功的基因高度纯合、遗传背景清楚的大型哺乳类实验动物近交

系。本研究选用普通级版纳微型猪近交系 12 月龄成年公猪 4 头,来自昆明原种猪场【SCXK(滇)2021-0008】,饲养于云南农业大学【SYXK(滇)2021-0019】,体重 35 ~ 40 kg,光照昼夜交替各 12 h,猪舍内温度 16 ~ 25℃,湿度 60% ~ 70%。去势取睾丸组织样品。本研究相关的动物护理和实验程序均严格执行中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》(【2006】398 号),并经云南农业大学动物保护委员会批准(2021-JJX-001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

RNAiso Plus (9108)、反转录试剂盒 (6110A)、Premix Taq™ version 2.0 (R004Q) 均购自大连 TaKaRa。高通量测序仪为 Illumina 公司的 HiSeq2000 平台;PCR 仪为 Eppendorf 公司的 Mastercycler proS。

1.2 方法

1.2.1 RNA-seq 测序及数据质控

提取睾丸组织 RNA,反转录为 cDNA,采用 RNA-seq Illumina HiSeq 2000 平台进行转录组测序,利用 Fastp 软件^[14]对原始数据进行质控并过滤,分别去除含接头的序列、含 N 比例大于 10% 的序列、全部是 A 碱基的序列和低质量序列。

1.2.2 序列比对

使用 bowtie2-2.1.0 比对工具^[15]将过滤好的数据与猪核糖体数据库进行比对,去除比对到核糖体的序列(不允许错配),并保留剩下的数据用于后续比对分析。

1.2.3 基因扩增及序列测定

根据 Ensembl 猪 *CatSper1* 201 转录本 (ENSSSCT00000014164.3) 设计 *CatSper1* 基因引物 F₁R₁、F₂R₂(表 1),以睾丸 cDNA 为模板通过 PCR 扩增、测序、拼接来获得全长编码序列。反应体系 25 μL;Premix Taq™ version 2.0 12.5 μL, 10 μmol/L *CatSper1*-1/2 上、下游引物各 1 μL,25 ng/μL cDNA

1 μL, H₂O 9.5 μL;PCR 程序:95℃ 5 min;95℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 80 s,35 个循环;72℃ 5 min。

1.2.4 CatSper1 功能分析

利用 Lasergene 7.1 校对测序的 *Catsper1* 序列;分别用 ProtParam 程序、SOPMA、ProtScale 和 Prosite 对 *CatSper1* 蛋白质序列的结构进行预测分析;用 String 进行蛋白互作网络分析。

1.2.5 CatSper1 的 GO 功能注释和 miRNA、lncRNA 调控网络构建

利用 Uniprot 进行 GO (Gene Ontology) 注释;利用已获得的猪 RNA-seq 数据进行 miRNA 和 lncRNA 表达分析;利用 miRanda 3.3 和 RNAhybrid 2.1.2 软件对潜在的调控 *Catsper1* 的 miRNA 和 lncRNA 进行分析;用 Cytoscape 3.8.2 进行网络图绘制。

1.3 统计学分析

从 Ensembl 网站下载猪参考基因组 (Sus scrofa 11.1) 和注释文件 (gtf 11.1),用 STAR-2.5.2a^[16] 软件建立参考基因组 index,并将已去除核糖体序列的数据与猪参考基因组比对。用 featureCounts-2.0.1 软件^[17]和 salmon-1.5.1 软件^[18]分别计算每个样本中所有基因原始表达量和 TPM 值校正表达量。

2 结果

2.1 CatSper1 基因的转录组表达结果

RNA-seq 获得 *CatSper1* 基因的平均表达量为 2817.5,其转录本 ENSSSCT00000014164.3 在 4 个样本中的平均 TPM 值为 33.6。

2.2 CatSper1 基因及氨基酸结构信息

利用 F₁/R₁、F₂/R₂ 引物分两段扩增 *CatSper1* 基因,分别获得 1313 bp 和 1324 bp 长的产物(图 1A),通过核对测序峰图并拼接,获得 *CatSper1* 基因全长 CDS 序列 2166 bp,已获得 Genbank 认证 (Accession No. OK042306),编码 721 个氨基酸(图 1B)。其中,384 ~ 617 AA 处含有 Ion_trans 保守结构域(图 1B,图 1C)。

2.3 CatSper1 基因组结构信息

CatSper1 基因定位于猪 (Sscrofa11.1) 2 号染色体 6312906 ~ 6321690 bp 位置,有 12 个外显子和 11 个内含子(图 2),剪接位点符合 GT-AG 法则。

2.4 CatSper1 蛋白质序列及结构分析

猪 *CatSper1* 蛋白质分子量 41.19×10^3 ,分子式 C₁₈₂₆H₂₇₇₅N₅₀₇O₅₄₅S₂₀,等电点 6.89,正电荷残基和负

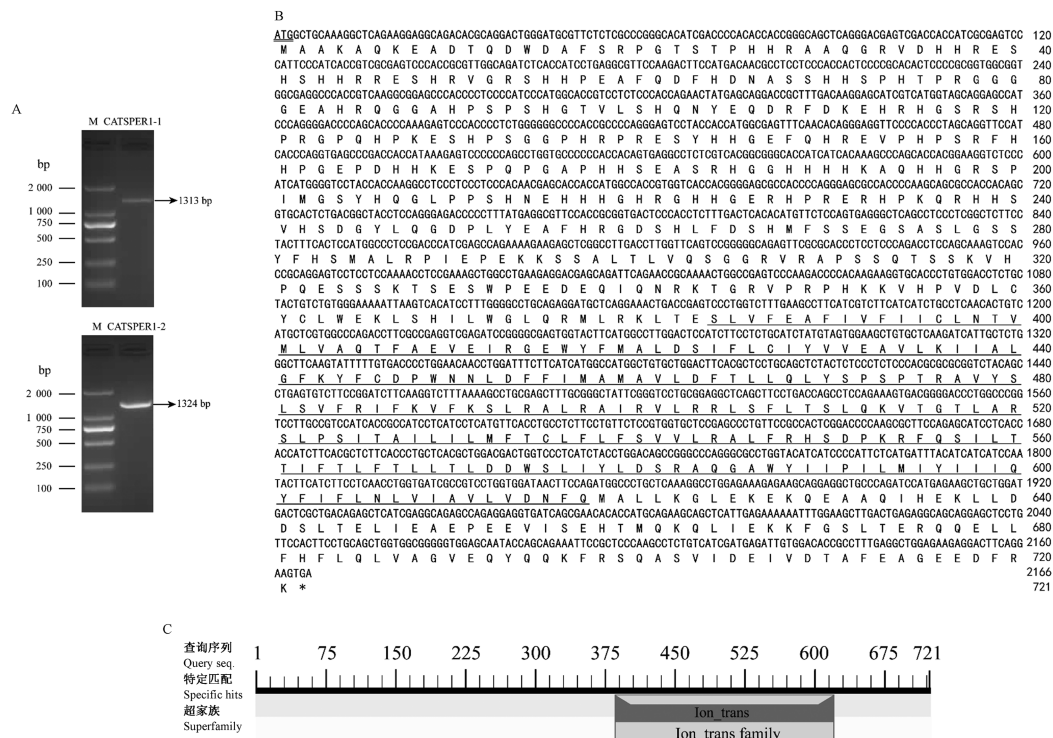
表 1 *CatSper1* 基因引物信息

Table 1 Primer information of *Catsper1* gene

名称 Name	引物 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	产物 (bp) Product (bp)
<i>CatSper1</i> -1	F ₁ : GTCTTTTGGGCCCGTCTT	1313
	R ₁ : TCGCCCCGATCTCGACCT	
<i>CatSper1</i> -2	F ₂ : CCCAGACCTCCAGCAAAGTCCA	1324
	R ₂ : TGCAGGCCCAACGATCTTTCC	

电荷残基均为 26。二级结构元件中无规则卷曲、 α 螺旋、延伸链分别包含 293、54 和 29 个氨基酸;在

393 和 234 氨基酸处分别具有最大疏水值 3.489 和最小疏水值-3.600, N 端和 C 端均亲水。



注:A: *CatSper1* 基因 RT-PCR 产物;M:DL2000 DNA 分子量标准; *CatSper1*-1: F_1/R_1 的 PCR 产物; *CatSper1*-2: F_2/R_2 的 PCR 产物;B: *CatSper1* 基因编码序列及氨基酸序列;双下划线:起始密码子;单下划线:保守结构域 Ion_trans (384-617 位氨基酸);“*” :终止密码子;上一行和相应的下一行字母:核酸和氨基酸序列;C: *CatSper1* 蛋白质保守结构域。

图 1 *CatSper1* 基因结构

Note. A. RT-PCR product of *CatSper1*. M. DL2000 DNA Marker. *CatSper1*-1, PCR product of F_1/R_1 . *CatSper1*-2, PCR product of F_2/R_2 . B. Coding sequence and corresponding amino acid sequence of *CatSper1* gene. Double underline, start codon. Single underline, conserved domain Ion_trans (384-617AA). Asterisk, stop codon; Letters in upper line and lower line are nucleotides and amino acids, respectively. C. Conserved domain of *CatSper1*.

Figure 1 Gene structure of *CatSper1*

2.5 *CatSper1* 蛋白互作网络

PPI 蛋白互作网络分析表明, BMI *CatSper1* 蛋白与其他 10 个蛋白有相互作用关系, 包括 *CatSper2*、*CatSperB*、*CatSperG*、*CatSper4*、HSP70.2、CKAP2、*CatSperD*、KCNU1、HSPA2 和 CATSPER3, 其中与 *CatSper2*、*CatSper3* 和 *CatSper4* 蛋白相互作用最为紧密(图 3)。

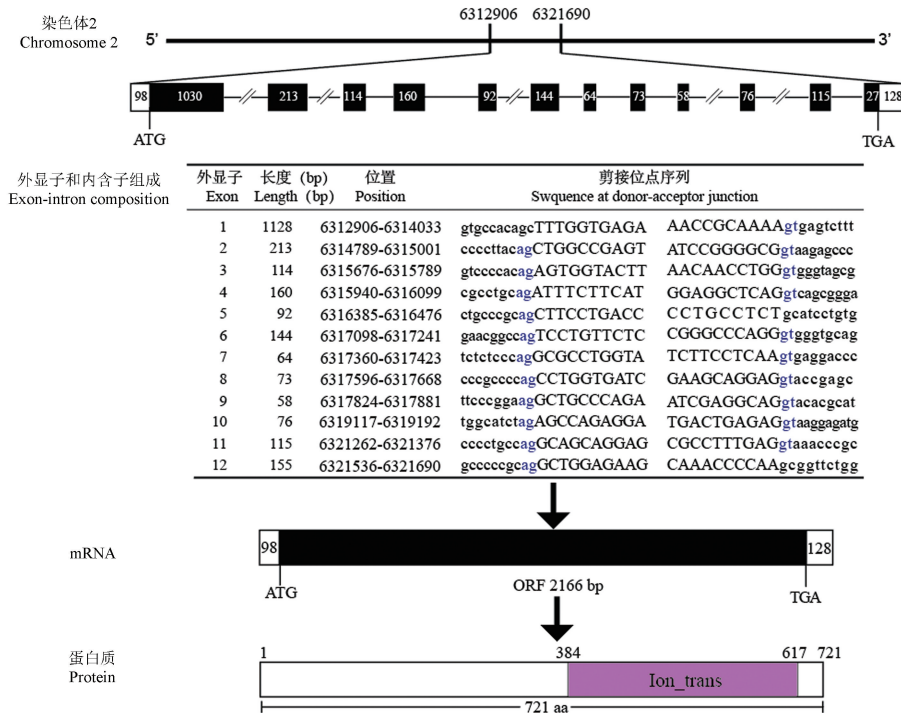
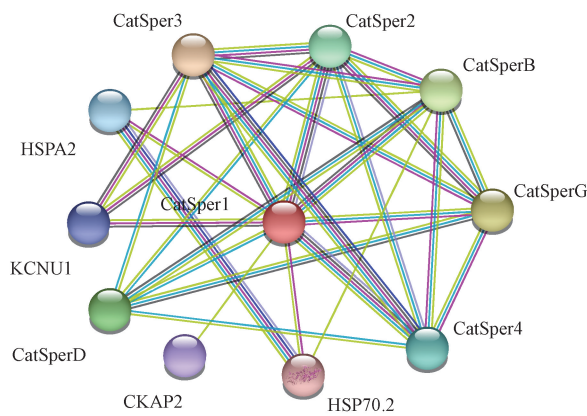
2.6 跨膜螺旋结构

BMI *CatSper1* 具有 6 个跨膜螺旋结构, 分别位于 386 ~ 408 AA、418 ~ 440 AA、452 ~ 471 AA、521 ~ 543 AA、555 ~ 577 AA 和 587 ~ 609 AA 位置。通过 BLAST 获得人和小鼠的 *CatSper1* 基因的氨基酸序列, 比对结果发现该基因在人类中具有

782 个氨基酸, 有 5 个跨膜螺旋结构, 分别位于 443 ~ 465 AA、486 ~ 508 AA、583 ~ 605 AA、612 ~ 629 AA、644 ~ 666 AA 位置。在小鼠中具有 686 个氨基酸, 有 7 个跨膜螺旋结构, 分别位于 347 ~ 369 AA、390 ~ 412 AA、422 ~ 444 AA、465 ~ 484 AA、489 ~ 511 AA、518 ~ 535 AA、550 ~ 572 AA(图 4A)。BMI、人和小鼠跨膜螺旋结构长度分别为 224 AA、224 AA 和 226 AA, 序列长度较为保守, 且序列碱基也很保守, 100% 同源的氨基酸占比较大(图 4B)。

2.7 BMI *CatSper1* 的 GO 注释和潜在的 miRNA 和 lncRNA 调控网络

网络图分析发现, 版纳微型猪近交系 *CatSper1*

图2 *CatSper1* 基因染色体定位、mRNA 序列和蛋白质保守结构域Figure 2 Chromosome location, mRNA sequence of *CatSper1* and its conserved protein domain

注:线:蛋白质之间作用的置信度,线越多置信度越高。

图3 猪 *CatSper1* 蛋白互作网络

Note. Line. The confidence of interactions among proteins, and more lines indicates higher confidence.

Figure 3 Interacting network of pig *CatSper1* protein

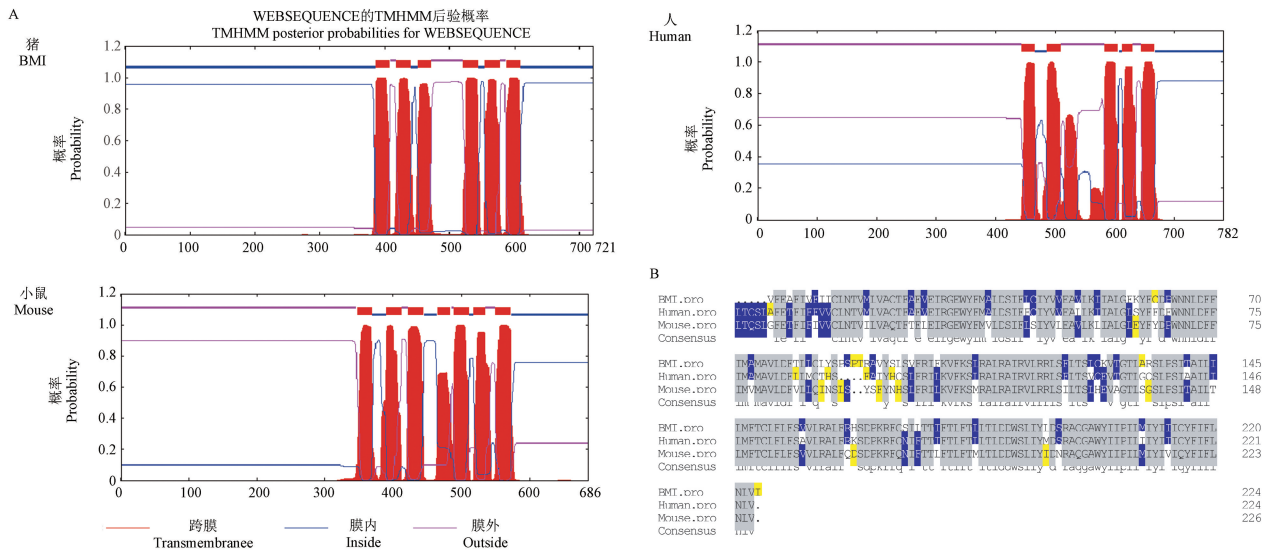
受到 10 个潜在的 miRNAs (ssc-miR-24-1-5p、ssc-miR-24-3p、ssc-miR-378、ssc-miR-423-3p、ssc-miR-24-2-5p、ssc-miR-193a-5p、ssc-miR-331-5p、ssc-miR-1343、ssc-miR-744 和 ssc-miR-378b-3p) 靶向调控。有 16 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-1343, 有 14 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-744, 有 3 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合

ssc-miR-24-3p, 有 2 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-423-3p, 有 1 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-378b-3p, 有 1 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-193a-5p, 有 1 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-378。

通过对 *CatSper1* 的功能注释结果发现其参与 15 个 GO: 在分子功能 (molecular function, MF) 方面, 主要涉及电压门控 Ca^{2+} 通道活性和钙激活阳离子通道活性等 3 个 GO; 在生物学过程 (biological process, BP), 主要涉及鞭毛精子活力、精子发生、钙离子转运、参与纤毛运动的纤毛搏动频率的调节、 Ca^{2+} 跨膜转运等 9 个 GO; 在细胞成分 (cellular components, CC), 主要涉及 G Ca^{2+} Sper 复合体、质膜、膜的组成等 3 个 GO (图 5)。

3 讨论

本研究通过版纳微型猪近交系睾丸转录组测序, 获得了 *CatSper1* 基因在睾丸中的表达量, 并通过 RT-PCR 克隆了该基因, 拼接后获得 2 166 bp 全长 CDS 序列, 编码 721 个 AA。将获得的 CDS 序列与猪基因组 (Sscrofa11.1) 比对, 发现 *CatSper1* 基因位于 2 号染色体 6 312 906 ~ 6 321 690 bp 之间, 共包含 12 个外显子和 11 个内含子。有研究通过对啮齿类动物 9 个亚科的物种进行研究, 发现 *CatSper1* 基



注:A;CatSper1的跨膜螺旋结构;B;CatSper1的跨膜螺旋结构在猪、人和小鼠间的保守性。红色线条:跨膜;蓝色线条:细胞膜内;紫色线条:细胞膜外;替换;白色背景;缺失;点;灰、蓝和黄色阴影:序列同源性为100%、50%和25%。

图4 BMI、人和小鼠 CatSper1 的跨膜螺旋结构及保守性

Note. A. Transmembrane helix structure of CatSper1. B. Conservation of transmembrane helix structure of CatSper1 in BMI, human and mouse. Red line, transmembrane. Blue line, Inside of the cell membrane. Purple line, Outside of the cell membrane. Substitutions, White background. Deletions, Dots, Gray. Yellow and blue background, Homologies of 100%, 50% and 25%, respectively.

Figure 4 Transmembrane helix structure of CatSper1 and its conservation in BMI, human and mouse

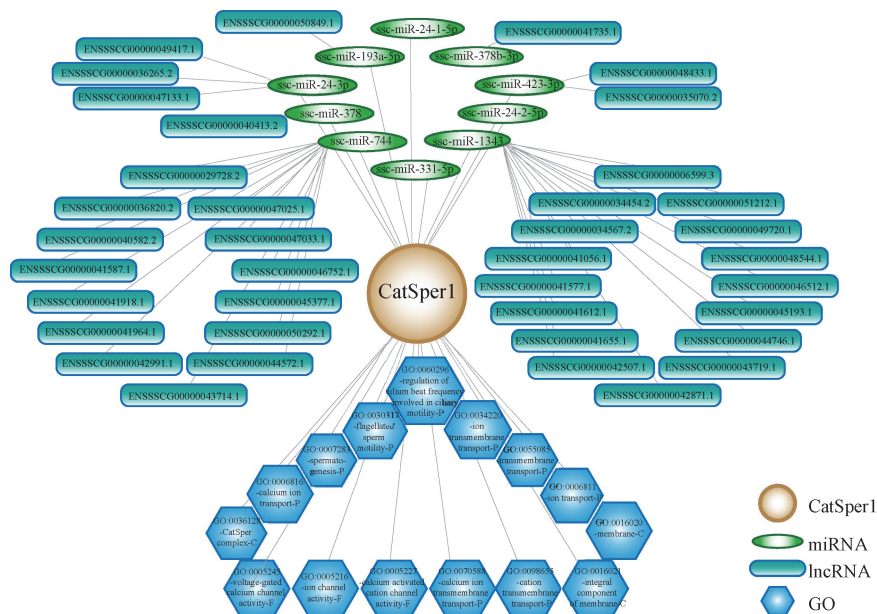


图 5 BMI *CatSper1* 的 GO 注释和潜在的 miRNA 和 lncRNA 调控网络

Figure 5 GO annotation of BMI *CatSper1* and potential miRNA and lncRNA regulatory network

因外显子 1 在调节通道失活过程中起重要作用,能影响精子的运动和竞争能力^[19]。对瘤牛和杂交牛测序分析发现, *CatSper1* 基因在瘤牛的第 5 外显子序列中存在变异^[20]。在斑马中发现, *CatSper1* 基因的 1、7 和 9 内含子区域中存在 4 个 SNP, 分别是位于外显子 1 下游 89 bp 处的 G1547A; 位于外显子 2

上游 126 bp 处的 G2241A;位于外显子 7 下游 43 bp 处的 C4675T,以及位于外显子 9 下游 206 bp 处的 G5270A^[21]。单核苷酸多态性和插入缺失 (INDELs) 是目前研究基因组变异的重要方法,目前已证明 *CatSper1* 基因的 c. 539-540insT 和 c. 948-949insATGCG 会导致移码突变和终止密码子提前,

并与人类男性不育相关^[22]。另外, *CatSper1* 基因的 rs1893316 多态性与男性特发性弱精子症显著相关^[23]。另外, 对于 *CatSper1* 基因其他家族成员的核酸序列变异已经有所研究和发现。

有研究表明 *CatSper1* 的 N 端区长度可作为精子游动速度的标志之一^[24], 本研究发现 *CatSper1* 的 N 端氨基酸为亲水性氨基酸, 可与其他残基或水分子形成氢键或盐桥, 从而稳定 *CatSper1* 蛋白质的构象并协助形成蛋白质表面的水合层, 表明 *CatSper1* N 端侧链氨基酸的特征与精子运动有关, 且在第 393 AA 有最大疏水值 3.489, 第 234 AA 处有最小疏水值 -3.600。跨膜螺旋结构是 *CatSper1* 家族的重要特征, *CatSper1* 在 BMI、人和小鼠均具有跨膜螺旋结构, 分别位于 223 AA (386 ~ 609 AA)、223 AA (443 ~ 666 AA) 和 225 AA (347 ~ 572 AA) 位置, 从跨膜区域长度和氨基酸同源性来说, 该基因的跨膜螺旋结构域高度保守, 能在精子运动过程中发挥重要作用。有研究发现 *CatSper1* 基因的启动子序列中含有性别决定基因 *SRY* 的 4 个特异性结合位点, 说明该基因的转录水平受 *SRY* 调控^[25]。*CatSper1* 在减数分裂的生精细胞中表达^[26], 其表达水平在男性精子活力不足的低生育力患者中显著降低^[11]。*CatSper1* 基因的表达会受到外界因素影响, 如醋酸铅或氯化汞会导致小鼠生精小管的退行性损伤和精子质量下降, 且由于结构的相似性, 这些金属可能会替代 Ca^{2+} 的作用, 对钙通道产生影响, 导致 *CatSper1* 基因表达量降低, 从而影响雄性育性^[27]。 γ 辐射不仅会改变睾丸组织学和精子参数, 还会降低雌性小鼠中 *CatSper1* 基因的表达^[28]。镉和镍均会导致精子参数降低以及生发上皮厚度减少, 镉会导致 *CatSper1* 基因表达下调^[29]。硒可上调该基因在的表达, 提高精子活力、改善精子形态以及存活率^[30]。苦参碱能通过 *CatSper* 通道抑制小鼠精子的总运动力、进行性运动、线速度、获能和孕酮诱导的顶体反应, 在苦参碱暴露小鼠的睾丸中, *CatSper1* 基因表达量降低^[31]。人参可使小鼠睾丸中 *CatSper1* 的 mRNA 水平和蛋白水平显著增加, 从而改善精子的过度活化^[32]。过量的氟化物会对小鼠精子的趋化性产生不利影响^[33], 如氟化钠会使小鼠体内 Ca^{2+} 浓度降低, 从而导致 *CatSper1* 的 mRNA 水平降低^[34]。Vitamin E 和左旋肉碱可提高成年小鼠中 *CatSper1* 蛋白的表达量^[35]。同样该基因的表达水平也会受到自身疾病的影响, 甲状腺激素是睾丸功

能的重要调节剂, 精子的受精能力与精子的正常形态、染色质质量和运动能力之间关系密切。甲状腺功能减退使 *CatSper1* 基因的表达下调, 从而影响了小鼠的精子形态、精子染色质凝聚和 *CatSper1* 基因的表达^[36]。精索静脉曲张对大鼠的精子参数、睾丸结构以及 *CatSper1* 基因的表达均具有不利影响^[37]。

CatSper1-4 是 *CatSper* 家族的 4 个成员, 在雄性育性方面均发挥着重要作用。由图 4 可以看出, 该家族的 4 个成员彼此之间的相互作用较为紧密, 且主要形成四聚复合体发挥作用。*CatSperG* 是 *CatSper* 家族的相关蛋白, 具有一个跨膜螺旋结构域, 该蛋白仅在睾丸中表达并且位于精子的主要部分。若 *CatSper1* 缺失, *CatSperG* 蛋白也会相应失去功能, 但 K^{+} 通道亚家族 U1 (potassium channel subfamily u1, KCNU1) 蛋白依然可以正常发挥其功能^[38]。有研究表明, *CatSperG* 和 *CatSperB* (*CatSper β*) 能否发挥正常的生理功能, 主要取决于 *CatSper1* 蛋白。在不同发育阶段的成年小鼠组织中, *CatSperB* 只在睾丸中表达, 且在生精小管中的特异性染色效果较显著, 在精母细胞和精子细胞中表达, 这与 *CatSper1-4* 是一致的^[39]。KCNU1 位于精子的鞭毛部位, 是负责获能诱导超极化的主要 K^{+} 通道, 能影响精子形态、运动性能和顶体反应, 进而影响雄性育性^[40]。KCNU1 (SLO3) 突变后, 精子细胞在过度活化终止后可能会发生顶体反应, 但不能实现透明带穿透, 渗透环境是精子流向卵母细胞的重要问题之一, K^{+} 和 KCNU1 通道在这种渗透环境调节中发挥着重要作用。如果渗透量失调, 会导致精子细胞膨胀并发生形态变化, 这些变化可能会阻止精子细胞粘附在卵母细胞上, 最终导致不育^[40]。由图 4 可以看出, KCNU1 确实与 *CatSper1/2/3* 相互作用紧密, 说明在雄性育性方面发挥着重要作用。*CatSperD* 编码一种非成孔跨膜亚基 *CatSper δ* , 该亚基是 *CatSper* 家族辅助成员之一, 如果雄性小鼠的 *CatSperD* 缺失, 会导致精子特定的电压门控 Ca^{2+} 通道无法正常进行生理活动, 进而导致不育^[41], 造成这种原因可能是 *CatSper δ* 的缺失以及 *CatSperD* 在精子细胞中跨膜蛋白的缺失。*CatSper* 家族的非成孔辅助亚基具有较大的胞外域, 可能是结合该家族 Ca^{2+} 通道的重要因子^[42]。这也说明 *CatSper δ* 对 *CatSper* 家族正常功能的发挥起着至关重要的作用。HSP70-2 是哺乳动物的生殖细胞和体细胞组织中常见的 5 种 70×10^3 热休克蛋白 (HSP70) 外的一种重

要热休克蛋白,该蛋白在减数分裂过程中参与联会复合体的形成,并且与抑制细胞凋亡有关^[43]。图 3 显示,CatSperB、CatSperD 和 CatSperG 彼此之间均有相互作用,且这三个亚基均与 CatSper 家族的 4 个主要成员有紧密的相互作用,也进一步说明,该家族成员之间存在着依附关系,且主要通过形成复合体发挥功能。HSP70.2 是 HSP70 家族在精子发生过程中表达的成员之一,主要在小鼠精母细胞粗线期中表达量较高^[44]。HSPA2(热休克蛋白 A2)是 HSP70 家族在精子发生过程中表达的另一成员,该蛋白与精子成熟度、精子功能和生育力相关,在精子获能和精卵识别过程中发挥重要作用^[45]。HSPA2 的表达与精子浓度和形态显著相关,且在可育个体中的表达显著高于不育个体^[46]。HSPA2 蛋白与精子细胞 DNA 包装蛋白、过渡蛋白 1 和 2 紧密相关,所以 HSPA2 也被确定为第一个过渡蛋白伴侣^[47]。从图 3 中也可以看出 HSPA2 和 HSP70.2 蛋白的相互作用较为紧密,说明二者在精子发生过程中可能会有协同作用。在有丝分裂期间,CKAP2(细胞骨架相关蛋白 2)与纺锤体和纺锤体微管相关,从前期到后期,并在胞质分裂期间从微管中消失,该蛋白的调节对于正常有丝分裂进程至关重要^[48]。当复制的中心体分离后,CKAP2 在细胞的整个细胞周期均有波动现象,与 G2 晚期的中心体微管相关。

本研究发现 *CatSper1* 受到 10 个潜在的 miRNA 靶向调控。*ssc-miR-1343* 和 *ssc-miR-744* 目前已被广泛研究,使用 *ssc-miR-1343* 和 *ssc-miR-744* 的模拟物,介导猪的颗粒细胞,发现 *ssc-miR-1343* 可以靶向调控 *Pak4* 基因,*ssc-miR-744* 可靶向调控 *Elk1* 转录因子^[49]。另外有报道认为 *miR-744* 可以参与调节细胞增殖和细胞周期^[50]。*p21* 活化蛋白激酶(PAK)丝氨酸/苏氨酸激酶主要参与细胞形态、细胞运动以及细胞转化等生物学过程,是 Rho 家族 GTP 酶的主要效应物之一。*Pak4* 是 PAK 激酶的成员,被认为是 *Cdc42* 的效应蛋白^[51]。真核转录因子的众多家族中,通常含有相似度较高的 DNA 结合序列,*Elk1* 转录因子具有独特的结合方式,并证明该转录因子在控制细胞迁移过程中起重要作用^[52]。对患有乳腺炎的中国荷斯坦奶牛 NF- κ B 通路中 miRNA 的研究发现,相比健康的牛 *ssc-miR-24-1-5p* 表达有所下调^[53]。*miR-24-2-5p* 可以通过介导的 *EZH2*(*zeste* 同源物 2 的组蛋白增强子)调节,进而

影响 *PCSEAT* 基因促进前列腺癌细胞的增殖^[54]。*miRNA* 可在转录水平调节病原体和宿主的相互作用,研究表明 *miR-24-3p* 可调节血红素加氧酶-1(HO-1)的表达,过表达 *miR-24-3p* 可降低 HO-1 的 mRNA 和蛋白质的表达,并能致使猪繁殖与呼吸综合征(PRRSV)病毒快速复制^[55]。为了研究猪不同月龄阶段的肌肉发育情况,通过 miRNA 检测和鉴定发现,*ssc-miR-378* 在骨骼肌中有较高表达,且骨骼肌的表达谱表明 *ssc-miR-378* 是用于肌生成的新候选 miRNA,并参与猪的骨骼肌发育。*miR-378* 可能通过调节骨形态发生蛋白 2(BMP2)和丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)来调节肌肉生成,并参与细胞增殖和分化^[56]。综上,miRNA 不仅在精子生成过程中至关重要,而且在免疫调节、细胞增殖、细胞凋亡、乳腺癌以及前列腺癌等方面也发挥着重要作用。*lncRNA* 在表观遗传、细胞分裂和凋亡等多种生命活动中不可或缺,是研究分子机制的热点方向。大部分 *lncRNA* 需与一种或多种 RNA 结合蛋白(RBP)相互作用来发挥其生理功能;同样,RBP 也能够结合大量不同的 RNA^[57]。本研究发现 16 个 *lncRNAs* 与 *CatSper1* 竞争性结合 *ssc-miR-1343*,14 个 *lncRNAs* 与 *CatSper1* 竞争性结合 *ssc-miR-744*,*lncRNA* 数量最多,这也说明 *lncRNA* 的重要性。从 GO 分析来看,不管是分子功能、生物学过程或者细胞成分,主要富集的条目都与精子生成过程相关,且与 *CatSper1* 基因的结构功能紧密相关,如精子活力,精子发生、钙离子转运以及电压门控 Ca^{2+} 通道活性等,说明 *CatSper1* 基因在 BMI 精子发生和受精过程中发挥重要作用。

综上所述,本研究使用 RNA-seq 二代测序技术获得了版纳微型猪近交系睾丸组织 *CatSper1* 基因的表达量,获得了 *CatSper1* 基因的全长 CDS;分析了该基因的结构、氨基酸序列特征;构建了蛋白质互作 PPI 网络;注释了该基因并构建了基因与 miRNA 和 *lncRNA* 调控网络。结果可为深入研究 *CatSper1* 基因在 BMI 精子发生过程的功能提供数据资料,也可为挖掘与其他哺乳动物精子发生相关基因的研究提供借鉴。

参 考 文 献(References)

- [1] Hübner CA, Jentsch TJ. Ion channel diseases [J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(20): 2435-2445.
- [2] Lishko PV, Kirichok Y. The role of hv1 and CatSper channels in sperm activation [J]. J Physiol, 2010, 588(23): 4667-4672.
- [3] Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp

- measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel [J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 737–740.
- [4] Marquez B, Ignatz G, Suarez SS. Contributions of extracellular and intracellular Ca^{2+} to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm [J]. *Dev Biol*, 2007, 303(1): 214–221.
- [5] Chung JJ, Shim SH, Everley RA, et al. Structurally distinct Ca^{2+} signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility [J]. *Cell*, 2014, 157(4): 808–822.
- [6] Nazari M, Mirshahi M, Mowla SJ, et al. Investigation *in vitro* expression of CatSper sub fragment followed by production of polyclonal antibody: potential candidate for the next generation of non hormonal contraceptive [J]. *Cell J*, 2012, 14(3): 215–224.
- [7] Wang H, Liu J, Cho KH, et al. A novel, single, transmembrane protein CatSperg is associated with CatSper1 channel protein [J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(3): 539–544.
- [8] Lobley A, Pierron V, Reynolds L, et al. Identification of human and mouse *CatSper3* and *CatSper4* genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1: 53.
- [9] Qi H, Moran MM, Navarro B, et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(4): 1219–1223.
- [10] Strinker T, Goodwin N, Brenker C, et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm [J]. *Nature*, 2011, 471(7338): 382–386.
- [11] Nikpoor P, Mowla SJ, Movahedin M, et al. CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(1): 124–128.
- [12] Jin ZR, Fang D, Liu BH, et al. Roles of CatSper channels in the pathogenesis of asthenozoospermia and the therapeutic effects of acupuncture-like treatment on asthenozoospermia [J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2822–2844.
- [13] Huo JL, Zhang LQ, Zhang X, et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism array and whole-genome sequencing reveal the inbreeding progression of Banna minipig inbred line [J]. *Anim Genet*, 2022, 53(1): 146–151.
- [14] Chen S, Zhou Y, Chen Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one Fastq preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884–i890.
- [15] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with bowtie 2 [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(4): 357–359.
- [16] Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(1): 15–21.
- [17] Liao Y, Smyth GK, Shi W. feature Counts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923–930.
- [18] Patro R, Duggal G, Love MI, et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(4): 417–419.
- [19] Podlaha O, Webb DM, Tucker PK, et al. Positive selection for indel substitutions in the rodent sperm protein CatSper1 [J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(9): 1845–1852.
- [20] Geetha T, Subodh K, Dubey PP, et al. Sequence variability in catsper1 gene in vrindavani crossbred cattle [J]. *Indian J Anim Sci*, 2011, 81(9): 981–983.
- [21] Smith RM, Kotzé A, Grobler JP, et al. Identifying sequence variation in cation channel sperm associated genes in cape mountain zebra (*Equus zebra*) [J]. *S Afr J Anim Sci*, 2020, 50(6): 807–813.
- [22] Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, et al. Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein [J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 84(4): 505–510.
- [23] Shu F, Zhou X, Li F, et al. Analysis of the correlation of CATSPER single nucleotide polymorphisms (SNPs) with idiopathic asthenospermia [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32(11): 1643–1649.
- [24] Vicens A, Tourmente M, Roldan ER. Structural evolution of CatSper1 in rodents is influenced by sperm competition, with effects on sperm swimming velocity [J]. *BMC Evol Biol*, 2014, 14: 106.
- [25] Olivares A, Hernández-Reyes A, Felix R, et al. Regulation of CATSPER1 expression by the testis-determining gene SRY [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205744.
- [26] Yu Q, Mei XQ, Ding XF, et al. Construction of a *CatSper1* DNA vaccine and its antifertility effect on male mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127508.
- [27] Mohammadi S, Gholamin M, Mohammadi M, et al. Down-regulation of CatSper 1 and CatSper 2 genes by lead and mercury [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 59: 82–86.
- [28] Mohammadi S, Kianmehr M, Mohammadi M, et al. Correlation between expression of CatSper1,2 and sperm parameters in the gamma irradiated adult mouse testis [J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(6): 691–696.
- [29] Mohammadi S, Gholamin M, Mansouri A, et al. Effect of cadmium and nickel on expression of CatSper 1 and 2 genes in mice [J]. *Toxin Rev*, 2018, 37(3): 216–222.
- [30] Mohammadi S, Movahedin M, Mowla SJ. Up-regulation of CatSper genes family by selenium [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7: 126.
- [31] Luo T, Zou QX, He YQ, et al. Matrine compromises mouse sperm functions by a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -related mechanism [J]. *Reprod Toxicol*, 2016, 60: 69–75.
- [32] Park EH, Kim DR, Kim HY, et al. Panax ginseng induces the expression of CatSper genes and sperm hyperactivation [J]. *Asian J Androl*, 2014, 16(6): 845–851.
- [33] Lu Z, Wang S, Sun Z, et al. *In vivo* influence of sodium fluoride on sperm chemotaxis in male mice [J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88(2): 533–539.

- [34] Sun Z, Niu R, Su K, et al. Effects of sodium fluoride on hyperactivation and Ca^{2+} signaling pathway in sperm from mice; an *in vivo* study [J]. Arch Toxicol, 2010, 84(5): 353–361.
- [35] Mohammadi S, Jalali M, Nikraves MR, et al. Effects of l-carnitine treatment on expression of catsper proteins in the aging mouse model [J]. Eur J Exp Biol, 2013, 3(3): 731–735.
- [36] Alipour F, Jalali M, Nikraves MR, et al. Assessment of sperm morphology, chromatin integrity, and *catSper* genes expression in hypothyroid mice [J]. Acta Biol Hung, 2018, 69(3): 244–258.
- [37] Soleimani MZ, Jalali Mashayekhi F, Mousavi Hasanzade M, et al. Alteration in *CatSper1* and 2 genes expression, sperm parameters and testis histology in varicoceles rats [J]. Int J Reprod Biomed, 2018, 16(3): 183–190.
- [38] Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. KSper, a pH-sensitive K^{+} current that controls sperm membrane potential [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(18): 7688–7692.
- [39] Liu J, Xia J, Cho KH, et al. CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex [J]. J Biol Chem, 2007, 282(26): 18945–18952.
- [40] Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán JL, et al. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility [J]. FEBS Lett, 2010, 584(5): 1041–1046.
- [41] Chung JJ, Navarro B, Krapivinsky G, et al. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa [J]. Nat Commun, 2011, 2: 153.
- [42] Chung JJ, Miki K, Kim D, et al. CatSper ζ regulates the structural continuity of sperm Ca^{2+} signaling domains and is required for normal fertility [J]. Elife, 2017, 6: e23082.
- [43] Dix DJ, Allen JW, Collins BW, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(8): 3264–3268.
- [44] Allen RL, O'Brien DA, Eddy EM. A novel hsp70-like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells [J]. Mol Cell Biol, 1988, 8(2): 828–832.
- [45] Redgrove KA, Nixon B, Baker MA, et al. The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50851.
- [46] Jenkins TG, Aston KI, Meyer TD, et al. Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns [J]. Fertil Steril, 2016, 105(1): 51–57.
- [47] Govin J, Caron C, Escoffier E, et al. Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis [J]. J Biol Chem, 2006, 281(49): 37888–37892.
- [48] Seki A, Fang G. CKAP2 is a spindle-associated protein degraded by APC/C-cdh1 during mitotic exit [J]. J Biol Chem, 2007, 282(20): 15103–15113.
- [49] Tian Y, Zhang MY, Li N, et al. Zearalenone exposure triggered porcine granulosa cells apoptosis via microRNAs-mediated focal adhesion pathway [J]. Toxicol Lett, 2020, 330: 80–89.
- [50] Lin F, Ding R, Zheng S, et al. Decrease expression of microRNA-744 promotes cell proliferation by targeting c-Myc in human hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell Int, 2014, 14: 58.
- [51] Liu Y, Xiao H, Tian Y, et al. The PAK4 protein kinase plays a key role in cell survival and tumorigenesis in athymic mice [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(7): 1215–1224.
- [52] Odrowaz Z, Sharrocks AD. ELK1 uses different DNA binding modes to regulate functionally distinct classes of target genes [J]. PLoS Genet, 2012, 8(5): e1002694.
- [53] Chen L, Liu X, Li Z, et al. Expression differences of miRNAs and genes on NF- κ B pathway between the healthy and the mastitis Chinese Holstein cows [J]. Gene, 2014, 545(1): 117–125.
- [54] Yang X, Wang L, Li R, et al. The long non-coding RNA PCSEAT exhibits an oncogenic property in prostate cancer and functions as a competing endogenous RNA that associates with EZH2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 502(2): 262–268.
- [55] Xiao S, Wang X, Ni H, et al. MicroRNA miR-24-3p promotes Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication through suppression of heme oxygenase-1 expression [J]. J Virol, 2015, 89(8): 4494–4503.
- [56] Hou X, Tang Z, Liu H, et al. Discovery of microRNAs associated with myogenesis by deep sequencing of serial developmental skeletal muscles in pigs [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52123.
- [57] Ferrè F, Colantoni A, Helmer-Citterich M. Revealing protein-lncRNA interaction [J]. Brief Bioinform, 2016, 17(1): 106–116.

[收稿日期] 2022-01-28