



郭雪江, 博士生导师, 南京医科大学教授, 生殖医学与子代健康全国重点实验室常务副主任。国家优秀青年科学基金获得者, 科技部国家重点研发计划首席科学家。美国太平洋西北国家实验室(PNNL)访问学者(2014—2015年)。中国生理学会生殖科学专业委员会副主任委员, 中国解剖学会青年工作委员会副主任委员, 中国动物学会生殖生物学分会理事, 中国生物化学与分子生物学会蛋白质组学专业分会委员。《Andrology》、《PLoS One》编委; 江苏省“333高层次人才培养工程”中青年领军人才; 江苏省“六大人才高峰”高层次人才。主要从事精子发生和男性不育的分子机制和调控研究。主持科技部国家重点研发计划2项, 国家自然科学基金7项, 霍英东教育基金1项。相关研究获国家科学技术进步奖二等奖1项, 省部级奖8项; 获批发明专利8项; 以第一或通讯作者(含共同)身份在《Nature》、《Nat Genet》、《Circulation》、《Mol Cell》、《Nat Commun》、《Cell Res》、《Autophagy》、《eLife》等杂志发表论著80余篇。为《Science》、《Nat Commun》等杂志审稿人。

精子发生过程中蛋白质翻译后修饰的研究进展

霍子安 司徒成昊 郭曰帅 郭雪江*

(南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 南京 211166)

摘要 精子发生是一个高度复杂且受到精密调控的生物学过程, 其中蛋白质作为生命活动的最终执行者, 其翻译后修饰发挥着重要的调控作用。精子发生过程中存在多种蛋白质翻译后修饰, 如磷酸化、乙酰化、泛素化等, 其异常可引起精子发生障碍, 严重的甚至可导致不育。随着蛋白质组学技术的快速发展, 基于临床不育样本和模式动物的功能研究, 可以系统性解析精子发生过程中蛋白质翻译后修饰的动态调节与功能, 揭示精子发生的分子调控机制以及男性不育的发病机理。该文就近年来精子发生过程中蛋白质翻译后修饰调控机制, 以及少精子症、弱精子症和畸形精子症等临床疾病中蛋白质翻译后修饰的研究进展进行了综述。

关键词 精子发生; 蛋白质翻译后修饰; 蛋白质组学; 男性不育

Research Progress on Protein Post-Translational Modifications during Spermatogenesis

HUO Zian, SITU Chenghao, GUO Yueshuai, GUO Xuejiang*

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Abstract Spermatogenesis is a highly complicated biological process with precise regulation. Proteins are the final functional executors of life activities, and protein PTMs (post-translational modifications) exert important regulatory functions. Spermatogenesis involves multiple protein post-translational modifications, such as phos-

收稿日期: 2024-01-01

接受日期: 2024-03-18

国家重点研发计划(批准号: 2021YFC2700200)和国家自然科学基金(批准号: 82371606、32071133、32300716)资助的课题

*通信作者。Tel: 025-86869383, E-mail: guo_xuejiang@njmu.edu.cn

Received: January 1, 2024

Accepted: March 18, 2024

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2021YFC2700200), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82371606, 32071133, 32300716)

*Corresponding author. Tel: +86-25-86869383, E-mail: guo_xuejiang@njmu.edu.cn

phorylation, acetylation and ubiquitination, etc. Aberrant protein PTMs can cause disorders of spermatogenesis, or even lead to infertility in severe cases. With the advance of proteomic technologies, using clinical infertile samples and animal models, it is possible to systematically analyze the dynamic regulation and function of protein PTMs during each stage of spermatogenesis and further unveil the molecular mechanisms of spermatogenesis and the pathogenesis of male infertility. This paper provides a review of the recent progress on the studies of protein PTMs in spermatogenesis, and the roles of protein PTMs in clinical diseases, such as oligozoospermia, asthenozoospermia and teratozoospermia.

Keywords spermatogenesis; post-translational modifications; proteomics; male infertility

精子发生是二倍体精原细胞经过增殖分化形成单倍体精子的过程^[1],包括精原细胞的有丝分裂增殖与分化、精母细胞的减数分裂以及精子细胞的精子形成过程,最终产生的精子可以获得运动能力,使卵子受精。在睾丸生精小管中,精原细胞自我更新维持数量的稳定;形成的初级精母细胞经过第一次减数分裂产生两个次级精母细胞,后者再经过第二次减数分裂,产生单倍体精子细胞^[2];精子细胞不再分裂,经过复杂的变态,由圆形细胞逐渐转变为蝌蚪状的精子,这一过程被称为精子形成,包括染色质的浓缩、顶体的形成、鞭毛的组装、残余体的丢弃以及鱼精蛋白对组蛋白的替换等事件。在精子发生过程中,生精细胞会慢慢从生精小管基底膜迁移到管腔侧,成熟精子最终会被释放到管腔中^[3]。大多数哺乳动物中从精原细胞到精子产生需要30~40天^[4]。

由于减数分裂过程中的性染色体沉默以及精子变形组蛋白被鱼精蛋白替换,RNA转录活性逐步降低,并在活性成熟精子中完全丧失,转录与翻译存在解偶联的现象。蛋白质是生命活动的最终执行者,针对蛋白质水平的调控研究在精子发生过程中显得尤为重要,其中蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)发挥了重要的调控作用。蛋白质翻译后修饰是指蛋白质在翻译中或翻译后经历的一个共价加工过程,即通过一个或几个氨基酸残基加上修饰基团或通过蛋白酶催化去除修饰基团而改变蛋白质的性质^[5]。蛋白质翻译后修饰不仅能使生精细胞中蛋白质的结构发生改变,丰富蛋白质的种类,增加蛋白质的多样性,还能影响细胞中蛋白质的功能和表达水平^[6]。

精子发生过程中发生多种蛋白质翻译后修饰,其中磷酸化修饰得到了较为深入的分析^[7-8],其余修饰如乙酰化^[9-10]、糖基化^[11]、泛素化^[12]、SUMO化^[13]、甲基化^[14]等亦被证明在精子发生过程中发挥调控作

用。上述蛋白质翻译后修饰可以同时在一个蛋白质上存在,又或者相互之间存在串扰,共同调控精子发生^[15]。蛋白质翻译后修饰参与了正常精子发生的维持和调控,其异常可导致精子发生障碍,严重时可导致男性不育,通常表现为精子数量的减少(无精子症或少精子症)、精子活力的降低(弱精子症)和精子结构的异常(畸形精子症)^[16]。此外,睾丸中RNA和蛋白质表达水平存在较低的相关性,因而在蛋白质水平对精子发生进行深入研究十分必要^[17]。

传统的蛋白质翻译后修饰研究,依赖于修饰位点特异抗体^[18],但仅能针对有抗体的已知修饰位点进行的研究。修饰蛋白质组的发展为系统鉴定和解析新的修饰提供了技术基础,由于蛋白质翻译后修饰含量较低,需要使用不同的富集方法对修饰进行富集。磷酸化、糖基化等修饰可以根据材料的结合特性进行富集^[19-20],乙酰化、琥珀酰化、泛素化等修饰可以基于泛抗体进行富集^[21-22],富集后的修饰蛋白或肽段由基于质谱的蛋白质组方法鉴定,可以系统解析该类修饰的位点与蛋白质,然而修饰鉴定的效果依赖于泛抗体的效能与特异性以及修饰的丰度。近年来,随着蛋白质组质谱仪性能的不断改进,修饰蛋白质组鉴定的通量和灵敏度也不断提升^[23],使得对精子发生过程中蛋白质及其翻译后修饰水平进行系统全面的分析成为可能,取得了一系列的研究成果^[24]。本文就精子发生不同阶段蛋白质翻译后修饰的研究进展(图1),以及少精子症、弱精子症和畸形精子症等临床疾病中的蛋白质翻译后修饰异常(图2)进行综述。

1 蛋白质翻译后修饰在精原细胞自我更新与分化中的研究

睾丸组织中精原细胞数量极少,仅占生殖细胞总数的0.03%^[25],其正常自我更新与分化是确保精子

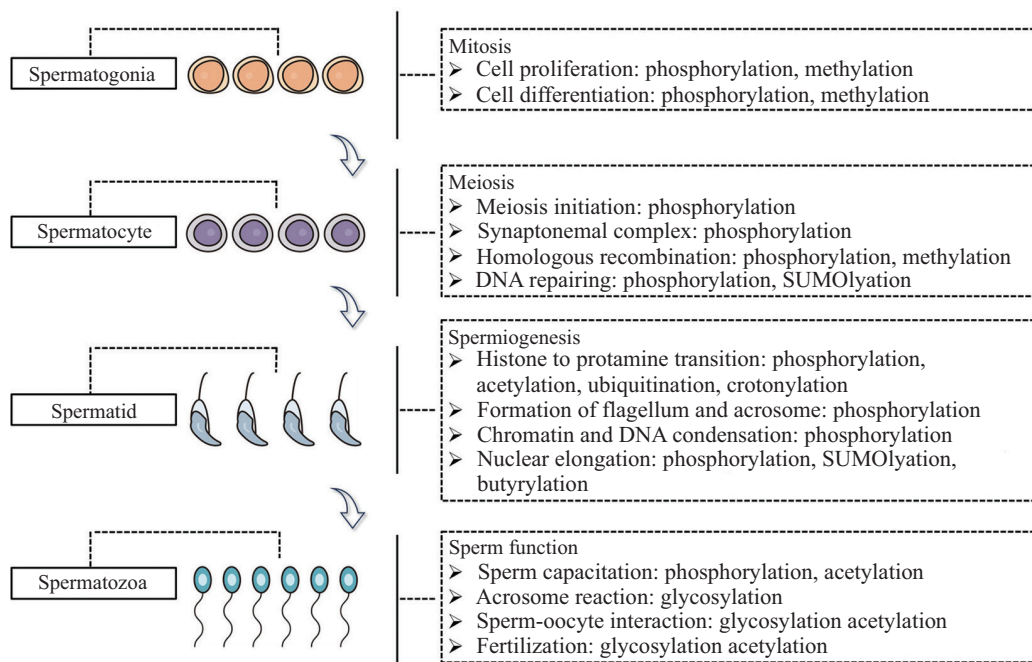


图1 精子发生过程中的蛋白质翻译后修饰类型

Fig.1 Types of protein post-translational modifications in spermatogenesis

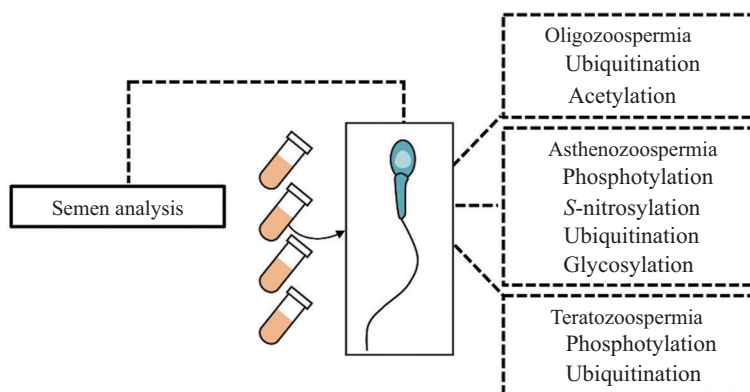


图2 精子发生蛋白质翻译后修饰异常导致的临床疾病

Fig.2 Clinical diseases resulting from aberrant protein post-translational modifications in spermatogenesis

发生正常进行的前提条件和基础。精子发生起始于精原细胞的有丝分裂。

在精原细胞中, 多种蛋白质发生了磷酸化或参与了磷酸化的调控, 在精原细胞功能调节过程中发挥了重要作用。为研究精原细胞中广泛存在的蛋白质磷酸化修饰, WANG等^[26]利用磷酸化蛋白质组学方法定量分析了胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF) 导致的精原细胞蛋白质表达及磷酸化蛋白质谱的变化, 发现精原细胞 12 141个磷酸化位点 (对应于 3 382个磷酸化蛋白) 中 570个磷酸化修饰位点 (对应于 325个磷酸化蛋

白) 发生变化。在 GDNF 调节的差异磷酸化修饰中, ERK1/2、GSK3、CDK1 和 CDK5 等激酶基序显著富集, ERK1/2 激酶的高亲和力抑制剂 U0126 可以导致 G₂/M 期阻滞, 抑制精原细胞增殖。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的表达水平与精子发生呈正相关, mTOR 受到抑制后, 精原细胞增殖受阻, 精子数量明显减少。mTOR 通过调节蛋白质 p70S6K、RPS6 和 4E-BP1 的磷酸化水平促进精原细胞的增殖, 表明蛋白质磷酸化在精原细胞增殖中具有重要调控作用^[27]。牛痘相关激酶 1 (vaccinia-related kinase 1, VRK1) 是有丝分裂调

节的关键蛋白激酶,其缺乏会导致雄性小鼠不育^[28]。VRK1可使组蛋白H3上的Thr3和Ser10位点发生磷酸化,参与调控有丝分裂期间染色质的凝聚^[29],这是精原细胞增殖分化的必要条件^[30]。细胞周期蛋白依赖性激酶7(cyclin dependent kinase 7, CDK7)也可影响精原细胞的增殖和分化,EP300参与染色质凝聚,是其潜在的磷酸化靶点^[31]。

表观遗传修饰如组蛋白甲基化,也参与了精原干细胞的分化。为解决精原干细胞在体内数量稀少、不易获得的困难,LIU等^[32]使用体外精原干细胞分化模型,并结合靶向蛋白质组学技术,系统地鉴定了精原干细胞在早期分化过程中的组蛋白甲基化位点,发现了多种组蛋白甲基化修饰对精原干细胞分化的促进作用。精氨酸甲基化是另一种常见的蛋白质翻译后修饰,参与了大量生物学事件。精氨酸甲基化由蛋白质精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyltransferases, PRMTs)催化,AZHAR等^[14]发现在精子发生过程中,PRMT1主要分布于精原细胞细胞核,可调控精原细胞的分化过程。

精原细胞的正常功能是精子发生的基础,其有丝分裂增殖和分化过程受到磷酸化、甲基化等多种蛋白质翻译后修饰的复杂调节。随着各种生物技术的不断革新,加强对精原细胞的蛋白质翻译后修饰的深入研究有助于我们理解精原细胞有丝分裂过程中蛋白质翻译后修饰的调控作用。

2 蛋白质翻译后修饰在精母细胞减数分裂中的研究

减数分裂是形成单倍体生殖细胞的特殊分裂过程,是配子发生的决定性事件。初级精母细胞经一轮DNA复制后的两轮细胞分裂,产生四个具有一半染色体的精子细胞。在减数分裂过程中,精母细胞经历染色体凝集、联会复合体破裂、纺锤体组装等复杂生物学过程,期间存在着精细的蛋白质翻译后修饰调控^[33]。

在蛋白质磷酸化修饰调控方面,LI等^[34]使用磷酸化蛋白质组学方法对处于第一次减数分裂时期的精母细胞进行了磷酸化蛋白质组分析,从4 419个磷酸化蛋白质中鉴定到了14 660个磷酸化位点,并构建了精母细胞的激酶-底物磷酸化网络。功能分析表明,细胞周期蛋白依赖性激酶9(cyclin dependent kinase 9, CDK9)对于减数分裂发展至中期至关

重要。研究还发现多种组蛋白和表观遗传因子被磷酸化,其中组蛋白激酶HASPIN的缺失将导致染色体错位、分裂期精母细胞凋亡以及精子数量减少,HASPIN可通过磷酸化组蛋白H3上的Thr3位点以招募染色体乘客复合体(chromosomal passenger complex, CPC)蛋白至着丝粒调控姐妹染色单体的分离,表明蛋白质磷酸化的异常可引起减数分裂障碍,进而导致雄性小鼠不育。在fizzy相关蛋白同源物1(fizzy-related protein homolog 1, FZR1)磷酸化修饰缺失的情况下,雄性生殖细胞能正常进入减数分裂,但不能进入第二次减数分裂以及形成精子细胞,可导致睾丸的严重缺陷和男性不育^[35]。CDK7可调节维甲酸介导的STRA8和REC8信号通路以影响减数分裂过程中的减数分裂启动、DNA修复和联会复合体形成^[31]。减数分裂时期蛋白质的磷酸化还对男性生育力的维持至关重要,对这一时期进行磷酸化修饰的研究有助于阐明减数分裂的机制以及加深对精子发生的理解。

此外,人类精子抑制素(human sperm prohibitin, PHB)存在于精母细胞中,其缺失会导致减数分裂停滞和不育。在精子发生过程中,PHB通过JAK2介导的组蛋白修饰,如组蛋白3酪氨酸41磷酸化(H3Y41ph)和组蛋白3赖氨酸9三甲基化(H3K9me3),调节减数分裂过程中的同源重组^[36]。

SUMO化是一种可逆的蛋白质翻译后修饰,涉及到包括生殖在内的多种关键生物过程。CAI等^[13]制备了一种具有高亲和力的SUMO1抗体来富集组织中内源性的SUMO1修饰肽段,并从小鼠睾丸中鉴定出了53个SUMO1修饰位点,这些SUMO化蛋白主要富集于转录调控和DNA修复等生物过程中,这为后续人们研究SUMO化在精子发生中的功能以及研究其他组织样本中的SUMO化修饰位点奠定了基础。在精母细胞中,蛋白质的磷酸化修饰和SUMO化修饰之间存在着串扰^[15];蛋白质SUMO化水平受到抑制后,多种调控减数分裂的磷酸化激酶也受到影响^[37]。减数分裂作为一种不同于体细胞有丝分裂的分裂模式,受到多种复杂的蛋白质翻译后修饰共同调节。

3 蛋白质翻译后修饰在精子形成中的研究

精子形成过程是圆形精子细胞经变形成为蝌蚪状的精子,在这一过程中,精子细胞核浓缩并拉长、

顶体和鞭毛形成, 精子的形态会发生巨大变化^[38]。精子由大量特异表达的蛋白质组成, 由于精子变形过程中鱼精蛋白替换与胞质丢弃, 成熟精子无转录和胞质核糖体翻译活性^[6,39], 因此, 蛋白质翻译后修饰对精子的形成不可或缺。

LI等^[8]对处于变形过程中的小鼠精子细胞进行蛋白质磷酸化富集, 总共鉴定到了4 196个磷酸化蛋白和13 835个磷酸化位点。其中, 735个磷酸化蛋白具有睾丸特异性, 并在精子发生过程中高水平表达。基因本体富集分析显示, 鉴定到的磷酸化蛋白在组蛋白修饰、纤毛组织、中心体以及黏附连接等方面富集。激酶-底物磷酸化网络分析表明与调控精子变形相关的磷酸化底物得到了富集, 这进一步表明精子变形过程中磷酸化调控的重要性。

多种蛋白通过调控蛋白质磷酸化来参与精子变形过程。同源结构域相互作用蛋白激酶4(homeodomain-interacting protein kinase 4, HIPK4)在圆形精子和早期长形精子中表达, 这对精子变形至关重要^[40]。Hipk4的缺失将导致精子头部缺陷进而导致雄性小鼠不育, 在非梗阻性无精子症患者中也可见HIPK4的突变。Hipk4敲除小鼠的睾丸磷酸化蛋白质组学数据表明, HIPK4参与调控了精子形成过程中多种蛋白的磷酸化。另外, HIPK4的磷酸化底物是RIMS结合蛋白3(RIMS binding protein 3, RIMBP3), 而RIMBP3是精子头部的形态形成所必需的。因此, HIPK4还参与了精子头部正常形态的形成和男性生育能力的维持。哺乳动物睾丸特异性丝氨酸/苏氨酸激酶(testis-specific serine/threonine kinases, TSSKs)在睾丸中表达, 并且在精子发生中发挥作用。ZHANG等^[41]发现果蝇中TSSK的同源物dTSSK的突变会严重损害精子变形过程中鱼精蛋白对组蛋白的替换, 并导致精子细胞中核变形、DNA凝聚和鞭毛组装等过程出现缺陷。dTSSK的激酶催化活性与人类的TSSKs在功能上是一致的, 其介导的广泛磷酸化在精子发生过程中发挥着不可或缺的作用, 对男性的生育能力至关重要。磷酸蛋白组学鉴定到449个蛋白是其潜在的底物, 这些蛋白主要富集于微管过程、鞭毛的组装和移动以及精子细胞的分化和发育等过程, 表明dTSSK通过磷酸化各种蛋白以协调减数分裂后的精子变形。

中心体是组成精子的重要结构, 对精子鞭毛的形成和精子头部与尾部的连接十分重要^[42]。多种

精子形态异常引起的男性不育, 如: 精子头颈部缺陷、精子鞭毛多发形态异常(multiple morphological abnormalities of the sperm flagella, MMAF)、精子纤维鞘发育不良和圆头精子症等, 都与中心体的功能障碍有关^[43]。中心体蛋白也可参与磷酸化调控, 影响精子变形过程。中心体蛋白128(centrosomal protein 128, Cep128)可以通过调节精子发生过程中多种基因的表达, 以及TGF- β /BMP信号通路成员的磷酸化水平来参与雄性生殖。CEP128的缺陷将引起精子鞭毛的缺陷, 精子形态、精子数量和精子活力均会出现异常并引起雄性不育^[44]。CDK7可通过激活信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路来影响生殖细胞凋亡和精子活力, STAT3进一步调控细胞皮质区肌动蛋白结合蛋白(cortical actin-binding protein, Cortactin)的表达来影响精子的细胞核伸长、染色质凝聚和顶体形成。抑制CDK7会影响精子分化, 导致精子数量减少、精子活力降低和精子头部畸形率增加^[31]。

SUMO化、泛素化、巴豆酰化、乙酰化和琥珀酰化在精子变形过程中也发挥着重要功能。SUMO1定位于圆形精子以及长形精子核周环和中心体上, 参与了微管成核和核重塑过程^[45]。异常精子中可见过度的SUMO化, 表明其在调节男性生育能力方面的重要性^[46]。植物同源结构域手指蛋白7(plant homeodomain finger protein 7, PHF7)是减数分裂后期精子细胞的组蛋白H3K14的E3泛素连接酶。PHF7通过调节组蛋白去除因子睾丸特异性溴结构域蛋白(bromodomain testis-specific protein, BRDT)的稳定性确保精子变形过程中鱼精蛋白对组蛋白的替换正常进行^[47]。赖氨酸巴豆酰化是一种新发现的组蛋白修饰, 它与哺乳动物细胞中的转录激活有关。染色质结构修饰结构域Y样转录抑制因子(chromodomain Y-like transcription corepressor, CDYL)对组蛋白赖氨酸巴豆酰化具有负调控作用。LIU等^[48]报道Cdy1转基因雄性小鼠生育能力的降低, 并伴随着精子数量的减少、精子活力的降低以及组蛋白赖氨酸巴豆酰化的失调, 提示赖氨酸巴豆酰化与精子发生的紧密联系。YANG等^[49]发现赖氨酸乙酰化和琥珀酰化的减少会影响长形精子中组蛋白向过渡蛋白的转换, 并扰乱生殖细胞在生精小管中的分布。

精子变形是精子发生的最后阶段,蛋白质翻译后修饰对于精子正常形态的形成起着关键的作用,在此过程中,蛋白质翻译后修饰的异常往往会引起精子形态的异常,严重的甚至导致男性不育。

4 蛋白质翻译后修饰在精子功能中的研究

成熟的精子在转录和翻译上几乎是沉默的,因此蛋白质翻译后修饰在决定精子活力和控制蛋白质功能等方面具有重要作用^[6,16]。在精子中,蛋白质翻译后修饰主要调节精子成熟和获能等过程^[50]。

磷酸化是控制精子功能的重要蛋白质翻译后修饰,蛋白质酪氨酸磷酸化水平的升高是精子获能的关键事件之一。WANG等^[51]使用无标记定量磷酸化蛋白质组学技术研究了人精子获能期间的磷酸化事件,鉴定到了231个磷酸化位点的磷酸化水平升高。在酪氨酸磷酸化激酶胰岛素生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 reporter, IGF1R)受到抑制后,精子获能过程中酪氨酸磷酸化水平的升高也会受到抑制,提示IGF1R介导的酪氨酸磷酸化途径可能在人类精子获能的调节中发挥作用,并有望成为改善不育男性精子功能的靶点。

细胞表面存在着丰富的糖蛋白^[52],精子表面被厚厚的糖萼所覆盖,存在着丰富的糖基化修饰,这些糖蛋白参与了精子的发育,并保证了精子在女性生殖道中的存活和迁移^[53],介导了精子和卵子的结合^[54]。睾丸表达101(testis expressed 101, TEX101)和淋巴细胞抗原6家族成员K(lymphocyte antigen 6 family member K, LY6K)是具有生殖细胞特异性的糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定糖蛋白,小鼠中*Tex101*和*Ly6k*的缺失将使精子无法迁移到输卵管中,进而导致不育^[55]。WANG等^[11]使用glyco-FASP的糖基化蛋白质组学技术,从人精子样本中鉴定到了297个N-糖蛋白和554个N-糖基化位点,并发现了许多与受精和细胞识别相关的N-糖蛋白。XIN等^[56]进一步解析了人类精子样本中的N-糖肽,鉴定到了多达968个N-糖蛋白、10 355个N-糖肽和719种N-聚糖结构,这些糖蛋白主要参与精子发生、顶体反应、精卵结合以及受精过程,并在精子的14种糖蛋白上观察到了大量的岩藻糖化修饰,这为精子糖基化和聚糖结构的功能研究奠定了基础。O-糖基化是另一种重要的糖基化类型,与N-糖基化相比,由于其丰度更低,结构更加复杂,O-糖基化的解析往往受到更

大的挑战^[57]。LUO等^[58]使用基于两种互补片段法的糖基化蛋白质组学方法(glycoproteomics based on two complementary fragmentation methods, GlycoTCFM),建立了一个包含68个O-糖蛋白、371个O-糖肽和202个O-糖基化位点的人类精子和精浆O-糖基化蛋白质组学数据库。许多糖蛋白富集于细胞黏附和血管生成等生物学过程,精液凝固蛋白1(semenogelin 1, SEMG1)、精液凝固蛋白2(semenogelin 2, SEMG2)和赤道蛋白(equatorin, EQTN)具有高丰度、高复杂度和高度O-糖基化的特点,可能在精子或精浆的组成和功能中发挥作用。WANG等^[59]从牛精子样本中鉴定到了626个N-糖蛋白和1 188个N-糖基化位点,其中511个糖蛋白是新鉴定到的,发现了半胱氨酸在牛精子的N-糖基化位点附近高度富集。在120个含有半胱氨酸的N-糖蛋白中,金属内肽酶活性和金属离子结合能力均显著提高。在58个氨基酸序列为N-C-S/T的糖蛋白中,15个具有去整合素金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase, ADAM)蛋白结构域,这为理解精子发生过程提供了新的见解。

赖氨酸乙酰化是一种动态、可逆的蛋白质翻译后修饰,在精子的运动和获能、顶体反应以及精卵相互作用等方面发挥着重要作用。在组蛋白乙酰化酶抑制剂和泛抗赖氨酸乙酰化抗体处理后,精子的活力明显降低,并且受精过程也受到抑制^[9],这提示了蛋白质乙酰化在精子中的重要功能。YU等^[10]合成了一种泛抗赖氨酸乙酰化单克隆抗体,对未获能的正常人精子进行了赖氨酸乙酰化蛋白质组学表征,从456个蛋白中鉴定到了973个赖氨酸乙酰化位点,其中205个乙酰化蛋白和671个乙酰化位点是新鉴定到的。这些蛋白主要定位于线粒体和细胞质中,在多种代谢过程中发挥功能。另外,在未获能精子和获能精子之间,参与精子获能、精卵识别、精卵融合和受精的乙酰化蛋白质组存在差异,表明乙酰化修饰在精子获能过程中可能有调控作用。LU-ENSE等^[60]发现组蛋白乙酰转移酶GCN5介导的组蛋白乙酰化促进精子形成过程中的染色质可及性和核小体驱逐,组蛋白乙酰化的缺失会导致男性的生育能力缺陷,并可能影响早期胚胎的形成。此外,在成熟精子中,组蛋白H4赖氨酸5发生乙酰化(acetylation of lysine 5 on histone H4, H4K5ac)和丁酰化(butyrylation of lysine 5 on histone H4, H4K5bu),H4K5ac在核小体解体的表观遗传控制中发挥作用,

有利于鱼精蛋白掺入父系DNA, 而H4K5bu可能在精子的伸长过程中发挥作用^[61]。在临床精子样本中, 正常人精子与少精子症患者精子的赖氨酸乙酰转移酶(lysine acetyltransferases, KATs)和赖氨酸去乙酰酶(lysine deacetylases, KDACs)存在差异, 表明精子中蛋白质乙酰化和男性不育之间存在着关联。

棕榈酰化是由棕榈酰转移酶催化的蛋白质翻译后修饰^[62]。WANG等^[63]的研究发现, 棕榈酰转移酶*Zdhhc19*基因敲除小鼠的精子发生过程并未受影响, 睾丸形态和睾丸/体质量也和正常小鼠无明显差异。但*Zdhhc19*缺失小鼠的精子表现出多种缺陷, 如: 精子头部和尾部的形态异常、精子活力下降和顶体反应异常, 使其无法正常受精, 导致不育。这表明棕榈酰化修饰对小鼠精子功能的维持至关重要。WU等^[64]进一步揭示了*Zdhhc19*缺失小鼠精子畸形率的增加是由于精子细胞膜融合的异常导致的, *Zdhhc19*对于精子膜稳定性的维持至关重要。GAO等^[65]运用蛋白质组学技术解析了小鼠睾丸中的棕榈酰化蛋白。在鉴定到的4 883个棕榈酰化蛋白中, 1 573个为首次报道。生物信息学分析表明, 这些棕榈酰化蛋白主要参与蛋白质转运、代谢过程、蛋白质折叠和细胞黏附等生物过程, 并与精子形态和运动密切相关。

成熟的精子作为精子发生的最终产物, 蛋白质翻译后修饰主导了其功能, 对精子中蛋白质翻译后修饰水平的研究有助于我们对精子功能的深入理解以及男性不育的诊断靶点的发现。

5 精子发生蛋白质翻译后修饰异常导致的临床疾病

据估计, 全球有8%~12%的夫妇患有不育症, 其中男性因素约占50%^[66]。精液分析是评估男性不育的基础, 男性不育患者通常表现为少精子症、弱精子症和畸形精子症, 即精子密度低、精子活力低和精子形态异常, 但在男性不育症中, 仍有30%~40%的病因尚不清楚^[67]。精子发生作为一个复杂的、多过程的生物事件, 受到严格的调控, 任何一个生精过程的紊乱都极有可能导致生育缺陷。除遗传和环境等因素外, 精子发生过程中蛋白质及其翻译后修饰水平的异常也是导致男性不育的重要原因(图2)(表1)。

无精子症即射精中完全没有精子, 可分为阻塞性无精子症和非梗阻性无精子症两类, 是男性不育中最严重的类型, 全球约1%的男性患无精子症, 在男性不育患者中这一比例为10%~20%^[68]。在无精子症患者中观察到了泛素结合酶E2B(ubiquitin conjugating enzyme E2B, UBE2B)和泛素特异性蛋白酶26(ubiquitin-specific protease 26, USP26)^[69]、泛素特异性肽酶9Y连接(ubiquitin specific peptidase 9Y-linked, USP9Y)^[70]的异常, 在少精子症精液样本中也观察到了类似的现象^[71-72], 这提示泛素化的异常可导致精子成熟缺陷^[73], 进而导致无精子症或少精子症。此外, 精子组蛋白H4的乙酰化水平升高将损害精原细胞的功能, 也可导致少精子症^[74]。

弱精子症是导致男性不育的另一常见原因, 其特点是精子活力低。CHAN等^[75]通过磷酸化蛋白质组学分析发现, 和健康人群的精子相比, 在弱精子症患者中, 多种蛋白质, 如 γ -微管蛋白复合体结合蛋白2(γ -tubulin complex associated protein 2, GCP2)的磷酸化水平出现异常。PARTE^[76]等发现与热休克、细胞骨架、纤维鞘、能量代谢等相关的66种磷酸化蛋白在弱精子症中受到不同的调控, 导致线粒体和纤维鞘的缺陷。此外, 精子尾部蛋白质的酪氨酸磷酸化不足也与弱精子症有关^[77], 表明了磷酸化在调节精子活力方面的重要性。除了磷酸化修饰之外, 其他翻译后修饰也与弱精子症密切相关。多种含有S-亚硝基化修饰的蛋白质在弱精子症中可见异常的表达^[78]。BHAGWAT等^[79]发现 α -微管蛋白乙酰化水平的降低也与弱精子症有关。泛素化的异常, 如USP26不仅与少精子症的发生有关, 也可影响精子活力^[72]。糖蛋白的异常同样也可导致弱精子症^[80]。

畸形精子症是指精子形态异常所占比例大于96%^[66], 蛋白质磷酸化异常是引起精子畸形的重要原因。蛋白质酪氨酸磷酸化水平的降低以及精子获能后酪氨酸磷酸化的受损是导致精子畸形患者精子功能受损的因素之一^[81]。极光激酶C(aurora kinase C, AURKC)的突变将导致精子形态的异常, 异常表现为精子头部过大并导致男性不育^[82]。此外, 畸形精子症患者中也可见泛素化水平的异常^[83]。

6 结语和展望

从精原细胞有丝分裂开始, 至最终的精子形成

表1 蛋白质翻译后修饰相关基因突变/敲除对精子发生的影响

Table 1 Effects of mutation or knockout of genes involved in protein post-translational modifications on spermatogenesis

基因名 Gene names	翻译后修饰类型 Types of PTMs	基因突变/敲除对精子发生的影响 Effects of gene mutation or knockout on spermatogenesis
<i>CDYL</i>	Crotonylation	Decline in sperm counts and motility
<i>UBE2B</i>	Ubiquitination	Defects in sperm maturation, azoospermia or oligozoospermia in clinic
<i>USP26</i>	Ubiquitination	Oligozoospermia and asthenospermia in clinic
<i>USP9Y</i>	Ubiquitination	Defects in sperm maturation, azoospermia or oligozoospermia in clinic
<i>AURKC</i>	Phosphorylation	Oversized sperm heads and abnormal sperm morphology, can induce male infertility, teratozoospermia in clinic
<i>CDK7</i>	Phosphorylation	Decline in sperm counts and motility, and increase in sperm head malformation percentage
<i>CEP128</i>	Phosphorylation	Defects in sperm flagellum, abnormal sperm morphology, sperm counts and sperm motility, can induce male infertility
<i>dTSSK</i>	Phosphorylation	Abnormal of histone-to-protamine transition, nuclear shaping, DNA condensation and flagellar organization
<i>FZR1</i>	Phosphorylation	Germ cells failed to enter meiosis II, can induce testicular deficiency and male infertility
<i>GCP2</i>	Phosphorylation	Asthenospermia in clinic
<i>HASPIN</i>	Phosphorylation	Chromosome misalignments, spermatocyte apoptosis and decline in sperm counts, can induce male infertility
<i>HIPK4</i>	Phosphorylation	Defects in sperm head, can induce male infertility, and nonobstructive azoospermia in clinic.
<i>IGF1R</i>	Phosphorylation	Blocks sperm capacitation
<i>mTOR</i>	Phosphorylation	Block proliferation in spermatogonia and decline in sperm counts
<i>PHB</i>	Phosphorylation, methylation	Meiotic arrest, can induce male infertility
<i>Ly6k</i>	Glycosylation	Disorder of sperm migration into the oviduct, can induce male infertility
<i>Tex101</i>	Glycosylation	Disorder of sperm migration into the oviduct, can induce male infertility
<i>GCN5</i>	Acetylation	Induce male infertility and affect early embryogenesis
<i>Zdhhc19</i>	Palmitoylation	Abnormal morphology of sperm head and sperm tail, decline in sperm motility and impaired in fertilization function, can induce male infertility

和成熟,多种蛋白质翻译后修饰如磷酸化、糖基化、乙酰化、甲基化、泛素化、SUMO化等在睾丸精子发生过程中发挥着重要调节的作用。已有的研究表明,在精原细胞时期,蛋白翻译后修饰主要参与精原细胞自我更新与分化调节,在精母细胞中主要调节减数分裂的进展,精子变形过程中精子细胞形态和功能发生巨大的变化,这一时期的蛋白质翻译后修饰比较活跃。蛋白质翻译后修饰的异常往往导致精子发生的阻滞或精子异常,进而导致男性不育。目前,围绕精子发生中的蛋白质翻译后修饰研究多聚焦在上述丰度较高的修饰类型,绝大多数蛋白质翻译后修饰在精子发生中的作用仍有待进一步阐明^[84]。蛋白质组学技术的飞速发展有助于系统性深入分析精子发生过程中的不同类型的蛋白质翻译后修饰的动态调控,发现新的翻译后修饰以及解析多种翻译后修饰之间的联系;单细胞蛋白质组学技术的发展已经使得单个卵母细胞水平的蛋白质组学分析成为可能^[85],随着更高分辨率高灵敏度的质谱仪的开发、

样品处理方法的进步以及数据分析算法的升级,未来有望在单个生精细胞或精子中实现蛋白质翻译后修饰组学的分析,更好地评估蛋白质翻译后修饰在生精细胞中的动态调控与功能。同时,人类睾丸类器官模型的建立有助于研究人员回避人体内睾丸组织研究的伦理问题,为系统性探究人类精子发生过程中的蛋白质翻译后修饰的种类、水平、变化以及功能,阐明精子发生和男性不育调控机制奠定新的基础^[86]。蛋白质翻译后修饰的系统性研究将进一步深化我们对精子发生分子调控机制的理解,进一步丰富生殖生物学理论,并为男性不育的诊断与治疗提供新的线索。

参考文献 (References)

- [1] RABBANI M, ZHENG X, MANSKE G L, et al. Decoding the spermatogenesis program: new insights from transcriptomic analyses [J]. *Annu Rev Genet*, 2022, 56: 339-68.
- [2] TROST N, MBENGUE N, KAESSMANN H. The molecular evolution of mammalian spermatogenesis [J]. *Cells Dev*, 2023,

- 175: 203865.
- [3] NISHIMURA H, L'HERNAULT S W. Spermatogenesis [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(18): R988-R94.
- [4] GRISWOLD M D. Spermatogenesis: the commitment to meiosis [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(1): 1-17.
- [5] RAMAZI S, ZAHIRI J. Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods [J]. *Database*, 2021, 2021: baab012.
- [6] MACIEL V L Jr, TAMASHIRO L K, BERTOLLA R P. Post-translational modifications of seminal proteins and their importance in male fertility potential [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2019, 16(11/12): 941-50.
- [7] QI L, LIU Z, WANG J, et al. Systematic analysis of the phosphoproteome and kinase-substrate networks in the mouse testis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(12): 3626-38.
- [8] LI Y, CHENG Y, ZHU T, et al. The protein phosphorylation landscape of mouse spermatids during spermiogenesis [J]. *Proteomics*, 2019, 19(11): e1900055.
- [9] SUN G, JIANG M, ZHOU T, et al. Insights into the lysine acetylproteome of human sperm [J]. *J Proteomics*, 2014, 109: 199-211.
- [10] YU H, DIAO H, WANG C, et al. Acetylproteomic analysis reveals functional implications of lysine acetylation in human spermatozoa (sperm) [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(4): 1009-23.
- [11] WANG G, WU Y, ZHOU T, et al. Mapping of the *N*-linked glycoproteome of human spermatozoa [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(12): 5750-9.
- [12] HOU X, ZHANG W, XIAO Z, et al. Mining and characterization of ubiquitin E3 ligases expressed in the mouse testis [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 495.
- [13] CAI L, TU J, SONG L, et al. Proteome-wide mapping of endogenous SUMOylation sites in mouse testis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(5): 717-27.
- [14] AZHAR M, XU C, JIANG X, et al. The arginine methyltransferase Prmt1 coordinates the germline arginine methylome essential for spermatogonial homeostasis and male fertility [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(19): 10428-50.
- [15] XIAO Y, LUCAS B, MOLCHO E, et al. Cross-talk between sumoylation and phosphorylation in mouse spermatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(3): 640-5.
- [16] BROHI R D, HUO L J. Posttranslational modifications in spermatozoa and effects on male fertility and sperm viability [J]. *OMICS*, 2017, 21(5): 245-56.
- [17] CAGNEY G, PARK S, CHUNG C, et al. Human tissue profiling with multidimensional protein identification technology [J]. *J Proteome Res*, 2005, 4(5): 1757-67.
- [18] HATTORI T, KOIDE S. Next-generation antibodies for post-translational modifications [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2018, 51: 141-8.
- [19] WANG K, YU A, GAO Y, et al. A nitrogen-doped graphene tube composite based on immobilized metal affinity chromatography for the capture of phosphopeptides [J]. *Talanta*, 2023, 261: 124617.
- [20] LIU Z, WU Z, ZHOU Y, et al. Hydrophilic peptide and glycopeptide as immobilized sorbents for glycosylation analysis [J]. *Anal Chem*, 2024, 96(4): 1498-505.
- [21] DAVIES C W, VIDAL S E, PHU L, et al. Antibody toolkit reveals *N*-terminally ubiquitinated substrates of UBE2W [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4608.
- [22] CHEN S, CHEN S, DUAN Q, XU G. Site-specific acetyl lysine antibodies reveal differential regulation of histone acetylation upon kinase inhibition [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2017, 75(1): 119-29.
- [23] BRODBELT J S. Deciphering combinatorial post-translational modifications by top-down mass spectrometry [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2022, 70: 102180.
- [24] MACLEOD G, VARMUZA S. The application of proteomic approaches to the study of mammalian spermatogenesis and sperm function [J]. *FEBS J*, 2013, 280(22): 5635-51.
- [25] TEGELENBOSCH R A, DE ROOIJ D G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse [J]. *Mutat Res*, 1993, 290(2): 193-200.
- [26] WANG M, GUO Y, WANG M, et al. The glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)-responsive phosphoprotein landscape identifies raptor phosphorylation required for spermatogonial progenitor cell proliferation [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(6): 982-97.
- [27] XU H, SHEN L, CHEN X, et al. mTOR/P70S6K promotes spermatogonia proliferation and spermatogenesis in sprague dawley rats [J]. *Reprod Biomed Online*, 2016, 32(2): 207-17.
- [28] WIEBE M S, NICHOLS R J, MOLITOR T P, et al. Mice deficient in the serine/threonine protein kinase VRK1 are infertile due to a progressive loss of spermatogonia [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(1): 182-93.
- [29] KANG T H, PARK D Y, CHOI Y H, et al. Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(24): 8533-46.
- [30] CHOI Y H, PARK C H, KIM W, et al. Vaccinia-related kinase 1 is required for the maintenance of undifferentiated spermatogonia in mouse male germ cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15254.
- [31] CHEN X, LI Y, DAI H, et al. Cyclin-dependent kinase 7 is essential for spermatogenesis by regulating retinoic acid signaling pathways and the STAT3 molecular pathway [J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(12): 1446-59.
- [32] LIU L, LI H, WANG M, et al. Multi-omics approaches for revealing the epigenetic regulation of histone H3.1 during spermatogonial stem cell differentiation *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3314.
- [33] HANDEL M A. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 296(1): 57-63.
- [34] LI H, CHEN H, ZHANG X, et al. Global phosphoproteomic analysis identified key kinases regulating male meiosis in mouse [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(8): 467.
- [35] TANNO N, KUNINAKA S, FUJIMURA S, et al. Phosphorylation of the anaphase promoting complex activator FZR1/CDH1 is required for meiosis II entry in mouse male germ cell [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10094.
- [36] ZHANG L F, TAN-TAI W J, LI X H, et al. PHB regulates meiotic recombination via JAK2-mediated histone modifications in spermatogenesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(9): 4780-96.
- [37] APPLEBAUM N, CHEMEL S, MATVEEV S, et al. Phosphoproteome analysis of the crosstalk between sumoylation and phosphorylation in mouse spermatocytes [J]. *Biochem Biophys*

- Res Commun, 2023, 681: 194-9.
- [38] GIASSETTI M I, MIAO D, LAW N C, et al. ARRDC5 expression is conserved in mammalian testes and required for normal sperm morphogenesis [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2111.
- [39] JANKOVICOVA J, MICHALKOVA K, SECOVA P, et al. Evaluation of protein phosphorylation in bull sperm during their maturation in the epididymis [J]. Cell Tissue Res, 2018, 371(2): 365-73.
- [40] CRAPSTER J A, RACK P G, HELLMANN Z J, et al. HIPK4 is essential for murine spermiogenesis [J]. eLife, 2020, 9: e50209.
- [41] ZHANG X, PENG J, WU M, et al. Broad phosphorylation mediated by testis-specific serine/threonine kinases contributes to spermiogenesis and male fertility [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2629.
- [42] AVIDOR-REISS T. Rapid evolution of sperm produces diverse centriole structures that reveal the most rudimentary structure needed for function [J]. Cells, 2018, 7(7): 67.
- [43] AVIDOR-REISS T, MAZUR M, FISHMAN E L, et al. The role of sperm centrioles in human reproduction-the known and the unknown [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 188.
- [44] ZHANG X, WANG L, MA Y, et al. CEP128 is involved in spermatogenesis in humans and mice [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1395.
- [45] VIGODNER M, MORRIS P L. Testicular expression of small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) supports multiple roles in spermatogenesis: silencing of sex chromosomes in spermatocytes, spermatid microtubule nucleation, and nuclear reshaping [J]. Dev Biol, 2005, 282(2): 480-92.
- [46] RODRIGUEZ A, PANGAS S A. Regulation of germ cell function by SUMOylation [J]. Cell Tissue Res, 2016, 363(1): 47-55.
- [47] KIM C R, NODA T, KIM H, et al. PHF7 modulates BRDT stability and histone-to-protamine exchange during spermiogenesis [J]. Cell Rep, 2020, 32(4): 107950.
- [48] LIU S, YU H, LIU Y, et al. Chromodomain protein CDYL acts as a crotonyl-CoA hydratase to regulate histone crotonylation and spermatogenesis [J]. Mol Cell, 2017, 67(5): 853-66.e5.
- [49] YANG Q, LIU X, CHEN J, et al. Lead-mediated inhibition of lysine acetylation and succinylation causes reproductive injury of the mouse testis during development [J]. Toxicol Lett, 2020, 318: 30-43.
- [50] SAMANTA L, SWAIN N, AYAZ A, et al. Post-translational modifications in sperm proteome: the chemistry of proteome diversifications in the pathophysiology of male factor infertility [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860(7): 1450-65.
- [51] WANG J, QI L, HUANG S, et al. Quantitative phosphoproteomics analysis reveals a key role of insulin growth factor 1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase in human sperm capacitation [J]. Mol Cell Proteomics, 2015, 14(4): 1104-12.
- [52] CRITCHER M, HASSAN A A, HUANG M L. Seeing the forest through the trees: characterizing the glycoproteome [J]. Trends Biochem Sci, 2022, 47(6): 492-505.
- [53] TECLE E, GAGNEUX P. Sugar-coated sperm: unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx [J]. Mol Reprod Dev, 2015, 82(9): 635-50.
- [54] PANG P C, CHIU P C, LEE C L, et al. Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis(x) oligosaccharide on the zona pellucida [J]. Science, 2011, 333(6050): 1761-4.
- [55] ENDO S, YOSHITAKE H, TSUKAMOTO H, et al. TEX101, a glycoprotein essential for sperm fertility, is required for stable expression of Ly6k on testicular germ cells [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23616.
- [56] XIN M, YOU S, XU Y, et al. Precision glycoproteomics reveals distinctive *N*-glycosylation in human spermatozoa [J]. Mol Cell Proteomics, 2022, 21(4): 100214.
- [57] YIN R, WANG X, LI C, et al. Mass spectrometry for *O*-GlcNAcylation [J]. Front Chem, 2021, 9: 737093.
- [58] LUO M, SU T, CHENG Q, et al. GlycoTCFM: glycoproteomics based on two complementary fragmentation methods reveals distinctive *O*-glycosylation in human sperm and seminal plasma [J]. J Proteome Res, 2023, 22(12): 3833-42.
- [59] WANG N, ZHANG X, LI X, et al. Cysteine is highly enriched in the canonical *N*-linked glycosylation motif of bovine spermatozoa *N*-glycoproteome [J]. Theriogenology, 2022, 184: 1-12.
- [60] LUENSE L J, DONAHUE G, LIN-SHIAO E, et al. Gen5-mediated histone acetylation governs nucleosome dynamics in spermiogenesis [J]. Dev Cell, 2019, 51(6): 745-58.e6.
- [61] DE LA IGLESIA A, JAUREGI P, JODAR M, et al. H4K5 butyrylation coexist with acetylation during human spermiogenesis and are retained in the mature sperm chromatin [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(20): 12398.
- [62] SMOTRYS J E, LINDER M E. Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function [J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73: 559-87.
- [63] WANG S, QIAO H, WANG P, et al. ZDHHC19 is dispensable for spermatogenesis, but is essential for sperm functions in mice [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8894.
- [64] WU Y, ZHANG X, ZHANG X, et al. ZDHHC19 localizes to the cell membrane of spermatids and is involved in spermatogenesis-dagger [J]. Biol Reprod, 2022, 106(3): 477-86.
- [65] GAO J, LI W, ZHANG Z, et al. Proteome-wide identification of palmitoylated proteins in mouse testis [J]. Reprod Sci, 2022, 29(8): 2299-309.
- [66] AGARWAL A, BASKARAN S, PAREKH N, et al. Male infertility [J]. Lancet, 2021, 397(10271): 319-33.
- [67] BRACKE A, PEETERS K, PUNJABI U, et al. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility [J]. Reprod Biomed Online, 2018, 36(3): 327-39.
- [68] TANG D, LI K, GENG H, et al. Identification of deleterious variants in patients with male infertility due to idiopathic non-obstructive azoospermia [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2022, 20(1): 63.
- [69] ZHANG J, QIU S D, LI S B, et al. Novel mutations in ubiquitin-specific protease 26 gene might cause spermatogenesis impairment and male infertility [J]. Asian J Androl, 2007, 9(6): 809-14.
- [70] SUN C, SKALETSKY H, BIRREN B, et al. An azoospermic man with a *de novo* point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y [J]. Nat Genet, 1999, 23(4): 429-32.
- [71] YATSENKO A N, GEORGIADIS A P, MURTHY L J, et al. UBE2B mRNA alterations are associated with severe oligozoospermia in infertile men [J]. Mol Hum Reprod, 2013, 19(6): 388-94.
- [72] SHI Y C, WEI L, CUI Y X, et al. Association between ubiquitin-specific protease USP26 polymorphism and male infertility in Chinese men [J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(7/8): 545-9.
- [73] MOU L, ZHANG Q, DIAO R, et al. A functional variant in the

- UBE2B gene promoter is associated with idiopathic azoospermia [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 79.
- [74] KLEIMAN S E, BAR-SHIRA MAYMON B, HAUSER R, et al. Histone H4 acetylation and AZFc involvement in germ cells of specimens of impaired spermatogenesis [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(6): 1728-36.
- [75] CHAN C C, SHUI H A, WU C H, et al. Motility and protein phosphorylation in healthy and asthenozoospermic sperm [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(11): 5382-6.
- [76] PARTE P P, RAO P, REDIJ S, et al. Sperm phosphoproteome profiling by ultra performance liquid chromatography followed by data independent analysis (LC-MS(E)) reveals altered proteomic signatures in asthenozoospermia [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(18): 5861-71.
- [77] YUNES R, DONCEL G F, ACOSTA A A. Incidence of sperm-tail tyrosine phosphorylation and hyperactivated motility in normozoospermic and asthenozoospermic human sperm samples [J]. *Biocell*, 2003, 27(1): 29-36.
- [78] SIVA A B, KAMESHWARI D B, SINGH V, et al. Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex [J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(7): 452-62.
- [79] BHAGWAT S, DALVI V, CHANDRASEKHAR D, et al. Acetylated alpha-tubulin is reduced in individuals with poor sperm motility [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(1): 95-104,e3.
- [80] KRATZ E M, KALUZA A, ZIMMER M, et al. The analysis of sialylation, *N*-glycan branching, and expression of *O*-glycans in seminal plasma of infertile men [J]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 941871.
- [81] SEPIDEH J, REZA S M, MAHDI A M, et al. Tyrosine phosphorylation pattern in sperm proteins isolated from normospermic and teratospermic men [J]. *J Reprod Infertil*, 2009, 10(3): 185-91.
- [82] DIETERICH K, SOTO RIFO R, FAURE A K, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 661-5.
- [83] PLATTS A E, DIX D J, CHEMES H E, et al. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs [J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(7): 763-73.
- [84] KHOURY G A, BALIBAN R C, FLOUDAS C A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database [J]. *Sci Rep*, 2011, doi: 10.1038/srep00090.
- [85] GUO Y, CAI L, LIU X, et al. Single-cell quantitative proteomic analysis of human oocyte maturation revealed high heterogeneity in *in vitro*-matured oocytes [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2022, 21(8): 100267.
- [86] YUAN Y, LI L, CHENG Q, et al. *In vitro* testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3): 244-55.