

LncRNA 通过相分离调控减数分裂染色体轴组装在家兔精子发生中的分子机制

刘红梅

贵州医科大学 贵州贵阳
中国科学院广州生物医药与健康研究院 广东广州

【摘要】目的 研究长链非编码 RNA (LncRNA) 通过相分离调控减数分裂染色体轴组装在家兔精子发生中的分子机制。**方法** 采用健康雄性新西兰白兔开展研究, 进行睾丸样本采集, 进行 LncRNA 筛选、鉴定、相分离能力验证、染色体轴组装检测等。**结果** 家兔减数分裂各阶段共鉴定出 2847 个 LncRNA, 符合差异表达标准的 LncRNA 中, 减数分裂不同阶段的阶段上调、LncRNA 数量、特异性高表达 LncRNA、染色体轴基因共表达 LncRNA 等存在差异。LncRNA-XY₁ 敲减实验中, 家兔精母细胞的 SYCP3 轴长显著缩短, 完整 SC 比例、同源染色体配对率显著降低, 减数分裂停滞率显著升高。相较于普通家兔, LncRNA 敲减家兔精子畸形率显著升高, 前向运动精子比例、精子平均路径速度、顶体反应率显著降低。**结论** LncRNA 表达缺失会导致染色体轴组装异常、减数分裂阻滞, 诱发精子畸形率的升高与活力的下降。

【关键词】 长链非编码 RNA; 家兔; 精子; 相分离; 减数分裂; 染色体轴组装

【基金项目】 广州市科技计划项目资助 (2023A04J0720): 利用基因敲除家兔模型研究 LncRNA THOR 调控精子发生减数分裂的作用及机制

【收稿日期】 2026 年 5 月 5 日 **【出刊日期】** 2026 年 6 月 2 日 **【DOI】** 10.12208/j.ijmd.20260053

Molecular mechanism of LncRNA regulating meiotic chromosome axis assembly through phase separation in rabbit spermatogenesis

Hongmei Liu

Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou
Guangzhou Institute of biomedicine and health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong

【Abstract】Objective To study the molecular mechanism of long non coding RNA (LncRNA) regulating meiotic chromosome axis assembly in rabbit spermatogenesis through phase separation. **Methods** healthy male New Zealand white rabbits were used to carry out the study. Testicular samples were collected for LncRNA screening, identification, phase separation ability verification, chromosome axis assembly detection, etc. **Results** a total of 2847 LncRNA were identified at each stage of meiosis in rabbits. Among the LncRNA that met the differential expression criteria, there were differences in the stage of meiosis, the number of LncRNA, the specific high expression of LncRNA, and the co expression of chromosome axis genes. In LncRNA-XY₁ knockdown test, the SYCP3 axis length of rabbit spermatocytes was significantly shortened, the proportion of complete SC and homologous chromosome pairing rate were significantly reduced, and the meiotic arrest rate was significantly increased. Compared with normal rabbits, the sperm deformity rate of LncRNA knockout rabbits was significantly increased, and the proportion of forward motile sperm, average sperm path velocity and acrosome reaction rate were significantly decreased. **Conclusion** the loss of LncRNA expression can lead to abnormal assembly of chromosome axis, meiosis block, and the increase of sperm deformity rate and the decrease of sperm motility.

【Keywords】 Long non coding RNA; Rabbit; Sperm; Phase separation; Meiosis; Chromosome axis assembly

有性生殖生物配子过程中, 减数分裂是关键, 在同源染色体精确配对、联会与重组的基础上, 保障遗传稳定性, 同时维系物种遗传的多样性^[1]。染色体轴是减数分裂前期 I 的关键结构支架, 其组装异常会导致减数分裂的停滞, 进而引发非整倍体配子的形成, 这一改变是导致不孕不育、出生缺陷等不良事件的主要原因, 如诊疗中常见的 21 三体综合征、克氏综合征等^[2]。长链非编码 RNA (LncRNA) 是表观遗传调控中的关键分子, 通过与蛋白质、DNA 或 RNA 的相互作用, 于减数分裂过程中发挥调控作用。LncRNA 能够通过液-液相分离 (LLPS) 形成生物分子凝聚体, 参与基因表达调控、信号转导等^[3]。LLPS 需要在生物大分子间多价相互作用的基础上, 驱动形成核仁、应激颗粒等无膜细胞器。在减数分裂过程中, 端粒-核膜连接复合体能够基于介导染色体快速运动, 促进同源的识别, 但目前关于 LncRNA 能够通过 LLPS, 参与染色体轴蛋白的募集组装的研究较少。家兔的精子发生周期相较于小鼠更接近人类, 同时家兔的繁殖能力强, 遗传背景清晰。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物为健康雄性新西兰白兔, 周龄 8~10 周, 体重 2~2.5 kg。于 23±1℃ 的恒温环境下进行饲养, 采用 12h 光暗循环, 在饲养过程中, 家兔的摄食、饮水自由。于 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉下进行睾丸样本的采集, 在家兔的双侧睾丸完整剥离后, 需要立即置于预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 内。严格遵循无菌操作规范, 进行被膜、血管等的剔除。用于减数分裂染色体铺展的组织块, 需要立即置入 0.1 M 的蔗糖溶液中, 用于 RNA 提取的组织, 采用液氮进行速冻, 置入零下 80℃ 的冰箱内冷冻保存。用于病理切片的组织, 采用 4% 多聚甲醛进行固定 24 h, 再采用梯度乙醇脱水并石蜡包埋。通过 WPS 生物医学研究伦理委员会审批 (编号: WPS-IACUC-24-003)。

1.2 实验方法

(1) LncRNA 筛选、鉴定: 取家兔减数分裂细线期、偶线期、粗线期、双线期等阶段的精母细胞, 采用 TRIzol 试剂进行总 RNA 的提取。通过 Nanodrop 2000 检测 RNA 纯度, Agilent 2100 Bioanalyzer 进行完整性的评估, 再通过 Ribo-Zero Gold Kit 去除核糖体 RNA。采用 NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit 构建转录组测序文库, 于 Illumina NovaSeq

6000 平台进行双端 150 bp 测序。通过 HISAT2 比对至家兔参考基因组, 通过 StringTie 转录本组装, 并实施差异表达分析。

(2) 相分离能力验证: 采用 pET-28a 载体构建 LncRNA 结合蛋白原核表达质粒, 转化至 E. coli BL21 感受态细胞。于 37℃ 温度下培养至 OD₆₀₀=0.6, 加入 0.5 mM IPTG 诱导表达 16 h。通过 Ni-NTA 亲和层析纯化 His 标签融合蛋白, 经 Superdex 200 凝胶过滤层析进行聚合体收集, 采用 BCA 法进行蛋白浓度的测定。体外 LLPS 实验体系主要包含 20 mM HEPES、150 mM NaCl、5-20 μM 等不同浓度的重组蛋白, 加入生物素标记的 LncRNA, 终浓度为 1 μM。于 37℃ 的孵育箱中孵育 30 min。通过浊度法进行液滴形成过程的动态监测, 采用荧光显微镜进行 Cy3 标记的 LncRNA 与 Alexa Fluor 488 标记的蛋白的观察, 并进行液滴数量与平均直径的分析。通过 FRAP 技术进行细胞内相分离检测, 将 LncRNA 与 GFP 融合表达质粒转染至 GC-2spd 细胞, 时间为 48 h, 在开展 FRAP 实验, 采用直径 2-5 μm 的荧光凝聚体, 通过 488 nm 激光进行漂白, 时间 200 ms, 再通过 1 frame/s 速度采集恢复过程 30 s。进行荧光恢复率的计算, 通过拟合曲线获取半恢复时间。

1.3 观察指标

1.3.1 LncRNA 表达谱特征分析

通过转录组测序分析, 进行家兔减数分裂细线期、偶线期、粗线期、双线期等阶段 LncRNA 的表达图谱的绘制, 并进行各阶段差异表达 LncRNA 的统计。

1.3.2 染色体轴组装效率评估

通过超分辨显微镜成像技术, 进行减数分裂前期 I 不同阶段的染色体轴参数的动态分析。测量 SYCP3 轴的总长度, 并根据联会复合体 (SC) 形态特征, 统计 SC 全长覆盖同源染色体的完整 SC 的比例, 统计同源染色体配对率及减数分裂停滞率。

1.3.3 精子发生表型分析

获取实验中精子活力参数, 通过吉姆萨染色法观察精子形态, 统计头部畸形、颈部异常、尾部缺陷的发生率。并统计前向运动精子比例、精子平均路径速度、顶体反应率等。

1.4 统计学方法

采用 SPSS26.0 统计学软件处理, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, P<0.05 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 LncRNA 表达谱特征

家兔减数分裂各阶段共鉴定出 2847 个 LncRNA，

符合差异表达标准的 LncRNA 中，减数分裂不同阶段的阶段上调、LncRNA 数量、特异性高表达 LncRNA、染色体轴基因共表达 LncRNA 等存在差异，见表 1。

表 1 LncRNA 表达谱特征

减数分裂阶段	上调 LncRNA 数量	下调 LncRNA 数量	特异性高表达 LncRNA	染色体轴基因共表达 LncRNA
细线期-偶线期	128	96	32	18
偶线期-粗线期	215	157	58	42
粗线期-双线期	89	132	27	15

2.2 染色体轴组装效率

普通家兔的 SYCP3 轴长 (23.39 ± 1.95) μm 、完整 SC 比例 (88.75 ± 4.54) %、同源染色体配对率 (92.30 ± 2.94) %、减数分裂停滞率 (5.78 ± 1.29) %，LncRNA 敲减家兔的 SYCP3 轴长 (15.49 ± 1.98) μm 、完整 SC 比例 (43.11 ± 4.09) %、同源染色体配对率 (63.20 ± 3.02) %、减数分裂停滞率 (38.33 ± 4.51) %，LncRNA 过表达家兔的 SYCP3 轴长 (27.49 ± 2.59) μm 、完整 SC 比例 (91.40 ± 2.95) %、同源染色体配对率 (92.58 ± 2.39) %、减数分裂停滞率 (6.11 ± 1.40) %。LncRNA 敲减家兔的 SYCP3 轴长、完整 SC 比例、同源染色体配对率低于普通家兔及 LncRNA 过表达家兔，减数分裂停滞率高于普通家兔及 LncRNA 过表达家兔。表明 LncRNA-XY1 敲减实验中，家兔精母细胞的 SYCP3 轴长显著缩短，完整 SC 比例、同源染色体配对率显著降低，减数分裂停滞率显著升高。

3 讨论

在哺乳动物生殖细胞发育中，减数分裂是核心环节之一，因而减数分裂的精准调控直接影响着精子发生的质量，LncRNA 作为不具备蛋白编码功能的 RNA 分子，参与生殖细胞发育、减数分裂调控等过程，其表达异常与精子发生障碍密切相关^[4]。本研究通过健康雄性新西兰白兔，分析了 LncRNA 在减数分裂各阶段的表达特征，发现减数分裂细线期—偶线期、偶线期—粗线期、粗线期—双线期三个关键转换阶段，共鉴定出 2847 个 LncRNA，各阶段差异表达 LncRNA 的数量、特异性高表达 LncRNA 及与染色体轴基因共表达的 LncRNA 均存在显著差异。其中，偶线期—粗线期阶段上调 LncRNA 数量、特异性高表达 LncRNA 数量、染色体轴基因共表达

LncRNA 数量在三个阶段均处于最高水平，提示该阶段是 LncRNA 参与减数分裂调控的关键时期。LncRNA 的阶段特异性表达与相关功能特异性密切相关，特异性高表达的 LncRNA 通常通过顺式或反式调控方式，参与生理过程，高表达的 LncRNA 可能会直接参与染色体轴相关基因的表达调控。

LncRNA-XY1 敲减实验中，家兔精母细胞的 SYCP3 轴长显著缩短，完整 SC 比例、同源染色体配对率显著降低，减数分裂停滞率显著升高。染色体轴组装的完整性直接决定着减数分裂的正常进程，SYCP3 的表达水平、组装状态能够直接评估染色体轴组装效率，完整 SC 比例、同源染色体配对率及减数分裂停滞率可以评估染色体轴组装的功能完整性^[5]。本研究结果发现 LncRNA 敲减后会出现上述指标的异常改变，LncRNA 过表达中上述指标与普通家兔无显著差异，表明 LncRNA 对家兔减数分裂染色体轴组装具有正向的调控作用，表达缺失会导致染色体轴组装的异常，对减数分裂进程产生影响。LncRNA 可与结合蛋白形成液滴状凝聚体，可能会通过与染色体轴相关蛋白如 SYCP3 等，形成相分离凝聚体，促进 SYCP3 的聚合与组装，进而维持染色体轴的完整性。

本研究显示，相较于普通家兔，LncRNA 敲减家兔精子畸形率显著升高，前向运动精子比例、精子平均路径速度、顶体反应率显著降低。精子发生属于复杂生理过程，主要包含精原细胞增殖、减数分裂及精子成熟等阶段，减数分裂异常会导致精子质量下降与畸形率的升高。结合本研究结果发现，LncRNA 表达缺失会严重损害精子发生的质量，导致精子活力下降、形态异常。已有研究^[6]证实，LncRNA 在睾丸组织中特异性表达，而表达异常会

导致精子发生障碍,同时导致附睾精子数量显著减少。LncRNA 敲减导致的染色体轴组装异常,减数分裂停滞,会导致精母细胞无法正常完成减数分裂,诱发形态发育异常与活力的下降,表明 LncRNA 在精子成熟过程中具有重要调控作用^[7,8]。

综上所述,LncRNA 在偶线期—粗线期是参与减数分裂调控的关键阶段,能够通过调控 SYCP3 轴组装、维持联会复合体完整性,有效促进同源染色体配对,减少减数分裂停滞,保障精子发生的正常进行。而 LncRNA 表达缺失会导致染色体轴组装异常、减数分裂阻滞,导致精子畸形率升高、活力下降。

参考文献

- [1] 宛颖.LncRNA MEG3 对生精细胞增殖与凋亡影响的机制研究[D].郑州大学,2022.
- [2] Yingjie W ,Lei Z ,Ruihong K , et al. Jun-mediated lncRNA-IMS promotes the meiosis of chicken spermatogonial stem cells via gga-miR-31-5p/stra8.[J].Molecular reproduction

and development,2023,90(5)

- [3] 王娟红,张谊,王雯,等. 动物精子 lncRNA 生物标志物的研究进展[J].中国草食动物科学,2025,45(05):93-97.
- [4] 张洪浩,余文颖,孙玲玲. 长链非编码 RNA 对有性发育调控的研究进展[J].药物生物技术,2024,31(05):567-572.
- [5] 王美桀,刘兴旺,白曼. lncRNA 在哺乳动物雄性生殖中作用的研究进展[J].中国畜牧兽医,2024,51(07)
- [6] 孙宁.LncRNA MEG3/miR-21-5p/SPRY1 对 NOA 患者生精细胞增殖与自噬影响的研究[D].郑州大学,2023.
- [7] 张莉.基于单细胞转录组数据解析雌性生殖细胞发育调控机制[D].南方医科大学,2023.
- [8] 姜谷蓉.雌性生殖细胞发育过程中的分子机制研究初探[D].南方医科大学,2023.

版权声明: ©2026 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS