



N⁶-甲基腺苷修饰在精子发生中的作用及分子机制*

孟诗奇^{1,2)} 陆雯婷^{1,2)} 程 絮³⁾ 杨 凡^{1,2)} 牛长敏³⁾ 郑 英^{1,2)**}

(¹⁾ 扬州大学医学部组织学与胚胎学教研室, 扬州 225009; (²⁾ 扬州大学江苏省核酸与细胞命运调控高校重点实验室, 扬州 225009;

(³⁾ 扬州大学医学部护理学院, 扬州 225009)

摘要 精子发生是雄性生殖系统中高度有序且时空特异的发育过程, 精原干细胞在睾丸微环境的支持下依次经历有丝分裂、减数分裂及精子形成, 最终形成结构完整的精子。该过程中RNA命运的精确调节对于维持精子发生过程的连续性和稳定性至关重要, 其紊乱也是造成男性不育的重要分子基础之一。N⁶-甲基腺苷 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 修饰作为真核生物最丰富的RNA修饰形式, 通过“写入酶 (writers) -擦除酶 (erasers) -读写酶 (readers)”系统, 在RNA剪接、稳定性、翻译及降解等多个层面动态调控转录本命运, 不仅在精原干细胞/精原细胞自我更新与分化、减数分裂启动与进展以及精子形态构建等关键阶段发挥重要作用, 还通过对间质细胞与支持细胞的调控为生殖细胞发育提供激素、代谢与结构支持。不同类型的m⁶A调控因子在时间与功能上呈现出一定的阶段特异与分工协同, 共同构建多层级RNA调控网络, 同时部分传统定义的m⁶A相关蛋白还可通过RNA结合、解旋酶活性或复合体组装等非经典机制参与转录后调控。相关因子功能异常可导致生精阻滞、精子质量下降甚至雄性不育。本文将系统综述m⁶A调控网络在精子发生中的分子机制及阶段特异性功能, 为雄性不育的发病机制与临床诊疗策略提供理论依据。

关键词 N⁶-甲基腺苷, 精子发生, 作用机制

中图分类号 Q954.43

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0532

CSTR: 32369.14.pibb.20250532

RNA修饰是发生在RNA分子上的共价化学修饰, 在转录后基因表达调控中发挥重要作用。目前已鉴定出170余种RNA修饰类型, 其中甲基化修饰约占总量的2/3, 常见形式包括N⁶-甲基腺苷 (N⁶-methyladenosine, m⁶A)、N⁷-甲基鸟苷 (N⁷-methylguanosine, m⁷G)、5-甲基胞苷 (5-methylcytidine, m⁵C) 和N³-甲基胞苷 (N³-methylcytidine, m³C) 等^[1-2]。其中, m⁶A修饰是真核细胞多类RNA (如mRNA、lncRNA、rRNA、tRNA及miRNA前体等) 中最丰富普遍的内部修饰, 动态且可逆, 类似于DNA和组蛋白甲基化。m⁶A通过影响RNA稳定、剪接、转运及翻译效率, 广泛参与肿瘤、神经、代谢及心血管等多种疾病过程。近年来随着转录组学研究的深入, m⁶A修饰在精子发生以及男性生育调控中的重要性也逐渐显现^[3-6]。值得注意的是, m⁶A调控并非局限于单一转录本, 而是在不同发育阶段由多类调控

因子协同构建层级化RNA稳态网络, 其作用范围可从RNA命运延伸至翻译装置及细胞应激与死亡通路等。本文将尝试从阶段特异性调控与功能层级整合的角度, 对m⁶A修饰的调控分子及其在精子发生中的关键调控机制进行综合讨论。

1 m⁶A的发现、研究方法及其调控因子分类

1.1 m⁶A的发现

m⁶A修饰主要发生在RNA序列的RRACH基序中 (其中R=A/G, H=A/C/U) 的腺嘌呤 (A) 上, 占总腺苷的0.1%~0.4%, 在mRNA的3'非翻译区

* 国家自然科学基金 (82371614, 82071696) 和江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX24-3851) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0514-87973588, E-mail: yzzkl@163.com

收稿日期: 2025-12-04, 接受日期: 2026-03-21

(3' untranslated region, 3' UTR) 以及终止密码子附近高度富集, 并在 mRNA 剪接、稳定性、核输出与翻译调控等多个转录后环节中发挥重要作用^[7-8]。

m⁶A 的鉴定可追溯至 1974 年, Desrosiers 等^[9]在研究大鼠来源的 Novikoff 肝癌细胞系时使用 L-[甲基-(3)H] 甲硫氨酸标记结合色谱分析技术, 首次在 mRNA 中鉴定出 m⁶A 修饰, 并证实该修饰占 mRNA 总甲基化修饰的约 80%。同期研究进一步证实, m⁶A 在哺乳动物、植物与病毒的 mRNA 中普遍存在, 揭示其进化上的高度保守性^[8, 10-11]。20 世纪 90 年代, 研究者从 HeLa 细胞核提取物中纯化出首个 m⁶A 甲基转移酶 (m⁶A methyltransferase) 催化亚基——甲基转移酶 3 (methyltransferase 3, METTL3)^[12]。此后, 去甲基化酶 (demethylase)——脂肪量和肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity-associated protein, FTO) 的发现及功能验证进一步证实 m⁶A 具有动态可逆特性^[13]。而后, YTH 结构域家族蛋白 2 (YTH domain family protein 2, YTHDF2) 被鉴定为首个功能明确的 m⁶A 结合蛋白 (m⁶A-binding protein), 能通过识别 m⁶A 介导 RNA 的稳定性调控^[14]。随着多种参与 m⁶A 修饰沉积、去除与识别的关键因子被鉴定, 研究者们构建了“写入酶 (writers) - 擦除酶 (erasers) - 读写酶 (readers)”三类蛋白质协同调控的基本框架, 逐步建立起一个精密、动态的 m⁶A 表观遗传调控网络。

1.2 研究 m⁶A 修饰的技术与方法

对于转录组 m⁶A 位点的鉴定, 传统的甲基化 RNA 免疫沉淀测序 (methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq) 仍是最常用的高通量测序方法, 通过特异性抗体富集 m⁶A 修饰的 RNA 片段实现全转录组范围的 m⁶A 定位, 但其分辨率有限且易受抗体特异性干扰。近几年发展的一系列非抗体依赖性化学标记策略, 如 FTO 辅助的 m⁶A 选择性化学标记与测序 (FTO-assisted m⁶A selective chemical labeling and sequencing, m⁶A-SEAL-seq)、m⁶A 选择性烯丙基化学标记与测序 (m⁶A-selective allyl chemical labeling and sequencing, m⁶A-SAC-seq) 及基于未甲基化的乙二醛和亚硝酸盐介导腺苷脱氨的 m⁶A 识别测序 (glyoxal and nitrite-mediated deamination of unmethylated adenosines for m⁶A identification sequencing, GLORI-seq) 等, 在检测灵敏度、定

量准确性以及样本兼容性等方面展现出独特优势^[15-17]。与此同时, 纳米孔直接测序技术 (nanopore direct RNA sequencing, DRS) 可在单分子层面读取 RNA 修饰信号, 辅以多种计算工具与检测系统可实现全长转录本与剪接异构体层面的 m⁶A 修饰分析^[18-19]。

在获得 m⁶A 位点信息的基础上, 结合免疫共沉淀结合质谱分析 (co-immunoprecipitation coupled with mass spectrometry, IP-MS)、RNA 免疫共沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP)、酵母双杂交等蛋白质相互作用与转录后调控分析手段, 研究者逐步鉴定了 m⁶A 修饰相关蛋白, 为深入解析 m⁶A 调控 RNA 命运的分子机制提供了重要实验基础。

1.3 m⁶A 调控因子的分类

根据结构和功能特征, m⁶A 调控因子可分为甲基转移酶复合物、去甲基化酶以及甲基结合蛋白三类, 分别被习惯性称为“写入酶 (writers)”、“擦除酶 (erasers)”和“读写酶 (readers)”。

1.3.1 甲基转移酶复合物“写入酶”

“写入酶”, 即 m⁶A 甲基转移酶 (m⁶A methyltransferases), 是一类具备 RNA 甲基转移活性的蛋白酶复合物, 负责将甲基基团添加至 RNA 底物的 N⁶-腺苷位点, 从而调控转录本的剪接、稳定性及翻译效率。其核心包括经典的 m⁶A 甲基转移酶复合物 (m⁶A methyltransferase complex, MTC) 以及若干具有独立催化作用的甲基转移酶, 如 METTL16、METTL5 与其辅助因子 tRNA 甲基转移酶激活亚基 11-2 (tRNA methyltransferase activator subunit 11-2, TRMT112) 组成的复合物以及含 CCHC 型锌指蛋白 4 (zinc finger CCHC-type containing 4, ZCCHC4) 等。其中 MTC 由具有催化活性的 m⁶A-METTL 复合物 (m⁶A-METTL complex, MAC) 及其辅助组分 m⁶A-METTL 相关复合物 (m⁶A-METTL-associated components, MACOM) 共同构成^[20]。

MAC 以 I 类甲基转移酶 (class I methyltransferase, Class I MTase) 家族成员 METTL3-METTL14 异二聚体为核心, 其中 METTL3 作为核心催化物通过 Rossmann 折叠结合 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-methionine, SAM) 提供催化活性, METTL14 则作为结构支架增强复合物对 RNA 底物的特异性识别能力, 二者共同介导哺乳动物核内 RNA 上的 m⁶A 沉积^[21-22]。除了以上两者, 其他 I 类 MTase 亦在特定 RNA 底物上发挥

作用: METTL16 特异性识别 UACAGAGAA 序列, 催化甲硫氨酸腺苷转移酶 2A (methionine adenosyltransferase 2A, *Mat2a*) mRNA 和 U6 snRNA 的 m⁶A 修饰以维持 SAM 稳态^[23-24]; METTL5-TRMT112 与 ZCCHC4 分别介导 18S 和 28S rRNA 的 m⁶A 修饰^[25]。

MACOM 不具备催化活性, 但能够募集 RNA 底物并稳定细胞核和核斑中的 MTC 组分, 提高 m⁶A 甲基化效率^[20, 26]。其组分包括 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白 (Wilms tumor 1-associating protein, WTAP)、含 CCCH 型锌指蛋白 13 (zinc finger CCCH-type containing 13, ZC3H13)、RNA 结合基序蛋白 15/15B (RNA binding motif protein 15/15B, RBM15/15B)、病毒样 m⁶A 甲基转移酶 (vir like m⁶A methyltransferase associated, VIRMA, 又称 KIAA1429)、CBL 原癌基因样 1 (CBL proto-oncogene like 1, Cbl1, 又称 HAKAI)。其中, WTAP 作为 MTC 中的调节亚基, 可引导 METTL3-METTL14 复合物在核斑的定位富集, 增强其与靶 RNA 的相互作用效率, 调控全局 mRNA 修饰水平^[27]。

1.3.2 去甲基化酶“擦除酶”

在 m⁶A 修饰的动态可逆过程中, “擦除酶”, 即 m⁶A 去甲基酶 (m⁶A demethylases), 承担着移除 m⁶A 修饰、调控 RNA 命运的关键角色。

“擦除酶”包括 FTO 和 AlkB 同源物 5 (AlkB homolog 5, ALKBH5), 两者均属于 α 酮戊二酸 (α -ketoglutaric acid, α -KG) 依赖的双加氧酶家族成员。其中, FTO 通过两步氧化反应先将 m⁶A 转化为不稳定的 N⁶-羟甲基腺苷 (N⁶-hydroxymethyladenosine, hm⁶A), 再进一步氧化为 N⁶-甲酰基腺苷 (N⁶-formyladenosine, f⁶A), 最终生成腺苷 (adenosine, A), 而 ALKBH5 则通过单步氧化反应直接特异性识别 mRNA 内部 m⁶A 位点并将其去甲基化为腺苷, 赋予该修饰以可逆性与可调控性^[13, 28]。

1.3.3 甲基结合蛋白“读写酶”

“读写酶”, 即 m⁶A 结合蛋白 (m⁶A-binding proteins), 负责识别 m⁶A 修饰并介导其生物效应, 根据其结构特征可分为含 YT521-B 同源性结构域蛋白 (YT521-B homology domain-containing protein, YTH) 家族、核不均一核糖核蛋白 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP) 家族、胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白

(insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein, IGF2BP) 家族及其他非典型 m⁶A 结合蛋白。

YTH 家族是目前研究最深入的 m⁶A “读写酶”蛋白家族, 包括 YTHDF1/2/3 与 YTHDC1/2, 广泛参与 mRNA 稳定性、降解、翻译与剪接调控^[29-30]。其中 YTHDF1/2/3 三者协同作用: YTHDF1 与翻译起始因子相互作用以促进 m⁶A 修饰 mRNA 的翻译; YTHDF2 分别与碳分解阻遏蛋白 4 (carbon catabolite repressor 4-negative on TATA, CCR4-NOT) 复合体的亚基 1 (CNOT1) 及热响应蛋白 12 (heat-responsive protein 12, HRSP12) 相互作用, 招募 CCR4-NOT 脱腺苷酶复合体与 RNase P-MRP 复合体, 协同促进 mRNA 降解; YTHDF3 与二者共享 mRNA 靶标并在翻译与降解之间发挥协同调控作用^[29, 31-35]。YTHDC1 通过调控可变剪接并促进 mRNA 核输出发挥功能, YTHDC2 则兼具 m⁶A 识别和解旋酶活性, 促进高度结构化 mRNA 的翻译^[36-38]。

hnRNP 家族包括 hnRNPC、hnRNPG 以及 hnRNPA2B1。这些蛋白质凭借其 RNA 识别基序 (RNA recognition motif, RRM) 结构域, 通过“m⁶A-结构开关 (m⁶A-switch)”机制参与 RNA 结合与代谢^[39]。hnRNPC 和 hnRNPG 诱导 RNA 的二级结构变化从而调控 mRNA 的剪接、稳定性及核输出, hnRNPA2B1 则与 DiGeorge 综合征关键区域 8 (DiGeorge syndrome critical region 8, DGCR8) 相互作用, 促进 pri-miRNA 加工并影响选择性剪接^[39-41]。

IGF2BP 家族包括 IGF2BP1/2/3, 通过 K-同源 (K-homology, KH) 结构域识别 mRNA 上的 m⁶A 共有基序, 促进 mRNA 的稳定及翻译^[42]。

此外富脯氨酸卷曲螺旋蛋白 2A (proline rich coiled-coil 2A, PRRC2A) 与脆性 X 智力障碍蛋白 (fragile X mental retardation protein, FMRP) 均参与 mRNA 稳定性、翻译等调控^[43-45]。

2 m⁶A 调控因子在精子发生中的功能

2.1 m⁶A 与精子发生

精子发生是一个高度有序的发育过程, 在稳定的睾丸微环境支持下, 雄性生殖细胞从精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs) 出发, 依次经历增殖、减数分裂和形态重塑, 最终形成结构完整的精子。该过程中, m⁶A 修饰通过调控关键转录本的稳定性、选择性剪接及翻译等, 广泛参与 SSCs

命运决定、精原细胞分化、精母细胞减数分裂推进以及精子形成等多个关键环节，并通过间质细胞与支持细胞中的作用参与睾丸微环境的调控，为生殖细胞的发育提供激素、代谢与结构支持（图1）。

因此，当m⁶A修饰因子功能出现异常时会破坏上述调控网络的稳态，导致生精障碍，进而引发雄性不育（表1）。

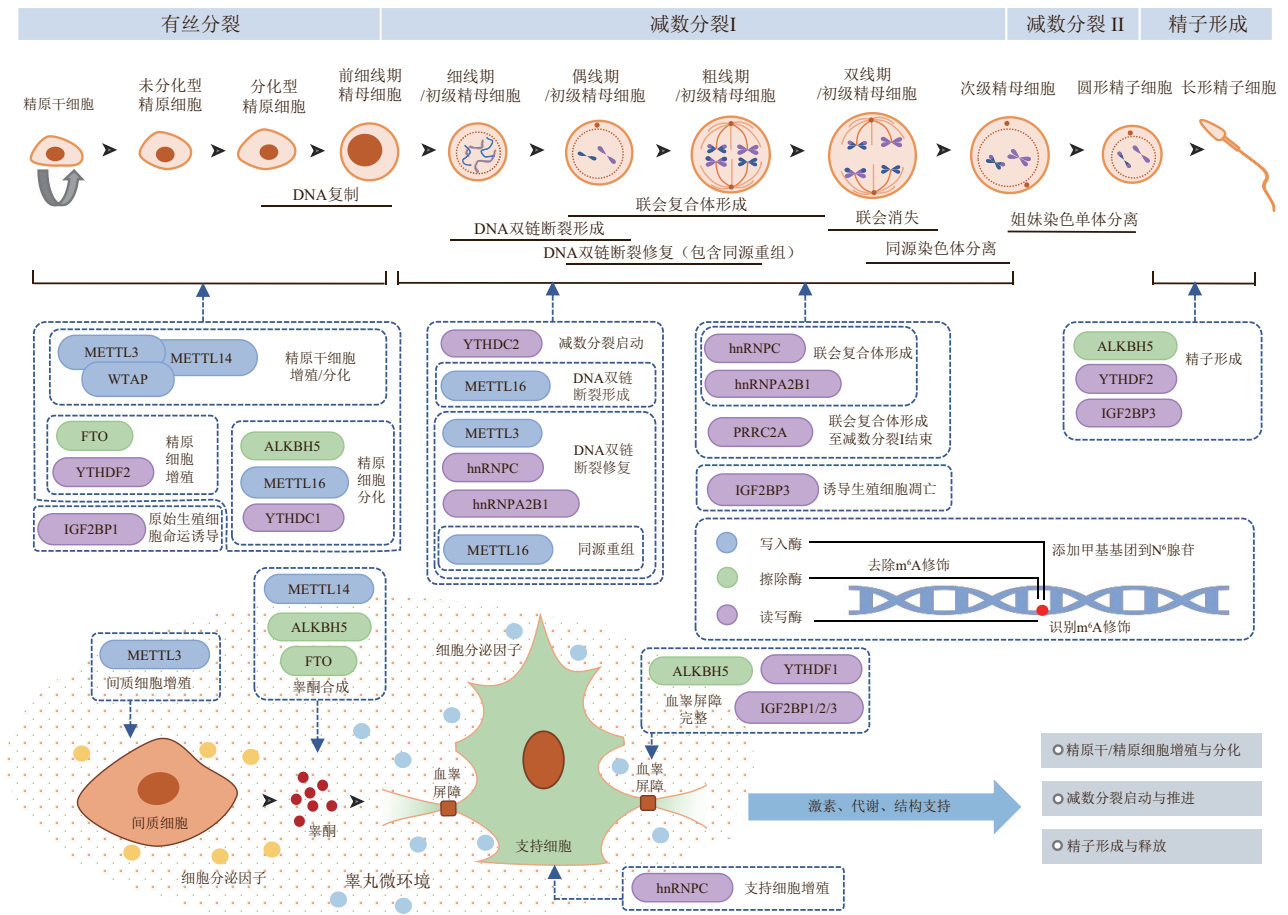


Fig. 1 Schematic diagram of m⁶A regulators' function in spermatogenesis and testicular somatic cells

图1 m⁶A调控因子在精子发生不同阶段及体细胞中的作用示意图

m⁶A: N⁶-甲基腺苷 (N⁶-methyladenosine); METTL: 甲基转移酶 (methyltransferase); WTAP: Wilms肿瘤1相关蛋白 (Wilms tumor 1-associating protein); ALKBH5: AlkB同源物5 (AlkB homolog 5); FTO: 脂肪量和肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity-associated protein); YTHDF: YTH结构域家族蛋白 (YTH domain family protein); YTHDC: YTH结构域 (YTH domain containing); hnRNP: 核不均一核糖核蛋白 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein); IGF2BP: 胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白 (insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein); PRRC2A: 富脯氨酸卷曲螺旋蛋白2A (proline rich coiled-coil 2A)。

Table1 Expression, function and mechanisms of m ⁶ A regulators in the testis						
表1 m ⁶ A调控因子在睾丸中的表达、作用及机制						
分类	蛋白质名称	多组织/细胞表达	亚细胞定位	雄性缺失表型	机制	参考文献
写入酶	METTL3	广泛表达（睾丸中表达较低）/未分化精原细胞高表达	细胞核	不育，睾丸萎缩，空泡化，无精子细胞；SSCs分化受阻；减数分裂异常	调控mRNA的选择性剪接及翻译效率，维持SSCs增殖和分化；稳定mRNA，促进DSB修复；调节间质细胞增殖	[46-47]

续表1						
分类	蛋白质名称	多组织/细胞表达	亚细胞定位	雄性缺失表型	机制	参考文献
擦除酶	METTL14	广泛表达（睾丸较低）	细胞核	与METTL3类似：不育，睾丸萎缩，空泡化，SSCs分化缺陷	作为结构支架与METTL3协同作用：调控mRNA的选择性剪接及翻译效率，维持SSCs增殖和分化；调节间质细胞自噬与睾酮合成	[47]
	WTAP	广泛表达（睾丸较低）/支持细胞高表达	细胞核	不育，睾丸萎缩，空泡化，无精子细胞；SSCs分化受阻；减数分裂异常	METTL3/METTL14辅助因子，调控mRNA转录和翻译，维持SSCs增殖和分化	[48]
	METTL16	睾丸高表达/精原细胞和减数分裂I期精母细胞高表达/	周期性核质-核仁定位	不育，睾丸萎缩，精原细胞分化障碍，精母细胞减少，纯睾丸支持细胞综合征	介导mRNA的选择性剪接及翻译效率，调控m ⁶ A水平，调控SSCs增殖和分化，调节 <i>Ubr2</i> 表达，影响DSB形成/重组	[49-51]
	FTO	睾丸高表达/未分化精原细胞和间质细胞高表达	细胞质 细胞核	随年龄逐步不育，睾丸萎缩，精子减少；精原细胞增殖减少	去除相关因子m ⁶ A修饰，调控AR水平及睾酮合成	[52]
	ALKBH5	睾丸高表达/主要定位于粗线期精母细胞和圆形精子细胞	细胞核	不育，睾丸萎缩，精子少弱畸	介导mRNA的选择性剪接，调控m ⁶ A水平，调节精母细胞及精子形成相关转录本成熟；调节间质细胞自噬与激素合成，调控 <i>Cdh2</i> mRNA翻译维持BTB的完整	[53-54]
读写酶	YTHDF2	睾丸高表达/定位于精原细胞和粗线期精母细胞	细胞质	不育，精子少弱畸，生殖细胞退化凋亡	介导晚期精子发生中的m ⁶ A修饰转录本的调控与清除	[55-57]
	YTHDC1	核定位，睾丸高表达/遍布精原细胞、精母细胞和圆形精子细胞	细胞核	不育，精原细胞分化停滞，睾丸发育不良	调控精原细胞分化	[51, 58]
	YTHDC2	睾丸高表达/主要定位于粗线期精母细胞	细胞质 细胞核	不育，睾丸萎缩；精子缺失，早期精母细胞异常	调控mRNA翻译效率及丰度，确保转录组程序切换；	[59-60]
	hnRNPc	睾丸高表达/分布于精原细胞、精母细胞及圆形精子细胞	细胞核	不育，睾丸萎缩，精子发生停滞	调控细胞黏附、增殖、凋亡相关基因；调节mRNA选择性剪接，控制减数分裂起始及进展	[61-62]
	hnRNPA2B1	睾丸高表达/精原细胞、精母细胞、圆形精子细胞普遍表达	细胞核	不育，睾丸萎缩，纯睾丸支持细胞综合征	调节pri-miRNA选择性剪接，促进pri-miRNA加工；调控转录本表达，与相关蛋白相互作用，参与减数分裂粗线期进程	[30, 41, 63]
	IGF2BP1	睾丸低表达/精原细胞高表达	细胞质	年龄相关不育，睾丸病理变化，精原细胞数量减少	调控PGCs命运；调节mRNA稳定性，维持SSCs功能；参与BTB维持	[64-66]
	IGF2BP3	睾丸高表达/定位于精原干细胞和精母细胞	细胞质	不育，精子头部畸形	调节mRNA稳定性，调控组蛋白向鱼精蛋白替换，诱导生精细胞凋亡；参与BTB维持	[67-68]
	PRRC2A	睾丸高表达/定位于晚期精母细胞和早期精子细胞	细胞质	不育，睾丸萎缩，生殖细胞凋亡	调控mRNA稳定性和翻译	[43]

续表1

分类	蛋白质名称	多组织/细胞表达	亚细胞定位	雄性缺失表型	机制	参考文献
	FMRP	睾丸高表达	细胞质	小鼠生育力正常, 果蝇生育力下降, 睾丸变大, 精子畸形	通过miRNA介导路径调节细胞周期及DNA损伤应答; 在精子发生中扮演转录后调控与DDR调节角色, 可能部分依赖m ⁶ A, 但机制尚不完全清楚	[69-70]

m⁶A: N⁶-甲基腺苷 (N⁶-methyadenosine); METTL: 甲基转移酶 (methyltransferase); WTAP: Wilms肿瘤1相关蛋白 (Wilms tumor 1-associating protein); ALKBH5: AlkB同源物5 (AlkB homolog 5); FTO: 脂肪量和肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity-associated protein); YTHDF2: YTH结构域家族蛋白2 (YTH domain family protein 2); YTHDC: YTH结构域 (YTH domain containing); hnRNPC: 核不均一核糖核蛋白C (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C); hnRNPA2B1: 核不均一核糖核蛋白A2/B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1); IGF2BP: 胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白 (insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein); PRRC2A: 富脯氨酸卷曲螺旋蛋白2A (proline rich coiled-coil 2A); FMRP: 脆性X智力障碍蛋白 (fragile X mental retardation protein); SSCs: 精原干细胞 (spermatogonial stem cells); DSB: DNA双链断裂 (double-strand break); Ubr2: 泛素蛋白连接酶E3组分N-识别蛋白2 (ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 2); AR: 雄激素受体 (androgen receptor); Ccdh2: 钙黏蛋白2 (cadherin 2); BTB: 血睾屏障 (blood-testis barrier) PGC: 原始生殖细胞 (primordial germ cell); DDR: DNA损伤反应 (DNA damage response)。

2.2 写入酶在精子发生中的作用

在精子发生过程中,“写入酶”呈现严格的阶段与细胞类型特异性表达:METTL3-METTL14-WTAP复合物主导SSCs自我更新、精原细胞分化以及精母细胞减数分裂进程,并通过调节睾丸体细胞参与塑造睾丸微环境;非典型“写入酶”METTL16则通过独立调控网络协调精原细胞分化和精母细胞减数分裂启动。

2.2.1 METTL3-METTL14-WTAP复合物调控精子发生与睾丸微环境多维度进程

METTL3、METTL14与WTAP作为MTC核心组分,在多组织广泛表达并定位于细胞核。其中METTL3与METTL14在未分化精原细胞中表达相对较高,而WTAP在支持细胞中高表达,早期生殖细胞中任一组分突变均可导致雄性小鼠不育,表现为睾丸萎缩与生精小管空泡化^[46-48]。

METTL3作为催化亚基,结合METTL14支架作用,促进多种精子发生关键基因的选择性剪接与表达^[46]。在Vasa-Cre (Cre-LoxP介导,胚胎期原始生殖细胞即启动表达并覆盖全部生殖细胞谱系,适用于早期全生殖细胞敲除)介导的*Mettl3-vKO*和*Mettl14-vKO* (分别删除外显子4和外显子2)小鼠模型中,SSCs池完全耗竭且缺乏后续生殖细胞,多种携带m⁶A位点SSC关键转录本 (如*Sohlhlh2*、*Dnmt3b*、MCM家族以及*Id4*等)翻译效率均呈现高度重叠的失调模式^[47]。与此同时,WTAP作为结构与调节亚基,通过稳定METTL3-METTL14构象并将其募集到靶RNA、参与对富含m⁶A修饰转录本的表达与翻译调控,影响SSCs的维持和分

化^[27, 48]。相较于早期全生殖细胞敲除,在Stra8-GFPCre (Cre-LoxP介导,出生后分化型精原细胞至减数分裂起始阶段特异表达,实现减数分裂前后阶段特异性敲除)介导的较晚期敲除模型 (*Mettl3-sKO*和*Mettl14-sKO*)中,小鼠整体精子发生基本正常,仅表现为粗线期精母细胞与圆形精子细胞中m⁶A水平下降伴随生育力减退^[31, 47]。而在Prm1-Cre (Cre-LoxP介导,利用鱼精蛋白1启动子在精子变形期开始表达,实现单倍体精子期敲除)细胞中敲除*Mettl3*基因未引起明显生精障碍,提示METTL3介导的m⁶A修饰在精子发生晚期的功能相对有限^[31]。

值得注意的是,同样以Vasa-Cre介导但删除更多外显子区域的*Mettl3-cKO* (删除外显子2~4)小鼠模型表现出精原细胞分化与减数分裂启动异常,精母细胞阻滞在偶线期/类偶线期阶段^[46]。转录组数据显示,SSCs干性维持、精原分化、细胞周期启动及减数分裂相关的多类关键基因表达均显著下调,并伴随部分mRNA (如*Sohlhlh1*、*Nasp*、*Cdk11b*等)异常剪接,提示m⁶A修饰在生精程序中的多阶段化^[46]。此外,METTL3还可通过稳定DNA损伤修复因子 (*Rad51/51b*、*Xrcc5*和*Faap20*)的mRNA,正向调控DNA损伤反应 (DNA damage response, DDR),进一步保障减数分裂期基因组完整性^[71]。

除生殖细胞内在调控外,m⁶A修饰亦参与睾丸体细胞功能调节,间接塑造精子发生微环境。在山羊睾丸的发育过程中,METTL3通过miR-145-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶1 (phosphoenolpyruvate

carboxykinase 1, PCK1) 轴调节糖异生与间质细胞增殖, 且大鼠模型中, METTL3 被环境内分泌干扰物上调可抑制间质细胞功能^[72-73]。在间质细胞分化过程中, METTL14 缺失或 ALKBH5 过表达均可增强自噬活性, 促进胆固醇利用及睾酮合成^[74]。

综合来看, m⁶A 相关因子缺失的时序、程度、残余活性以及蛋白质间的代偿差异均可显著影响其在睾丸微环境与 SSCs 稳态维持及减数分裂中的功能结局。因此, 未来仍需借助更精细的时间与空间特异性模型, 以探索基因的多方位调控机制。

2.2.2 METTL16 调控精原细胞分化和精母细胞减数分裂启动

METTL16 是一种独立于 METTL3-METTL14 复合物的 m⁶A 甲基转移酶, 在睾丸中高表达, 富集于精原细胞和减数分裂 I 期精母细胞, 呈周期性核质-核仁定位特征, 在精原细胞分化、减数分裂及 DNA 损伤修复中起关键作用^[49-51, 75]。其缺失导致雄性不育, 表现为睾丸萎缩、精原细胞分化阻滞、精母细胞数量减少伴随生精小管空泡化^[49, 51]。

尽管 METTL16 可以通过调控 *Mat2a* mRNA 的 m⁶A 修饰影响 SAM 合成, 但其缺失并不破坏小鼠精母细胞中的 SAM 稳态, 提示其功能模式区别于经典“写入酶”^[76]。转录组分析显示, 在精原细胞分化和精母细胞减数分裂启动阶段, 分化关键基因 (如 *Sohlh2*) 显著下调, 染色体装配及细胞周期相关基因 (*Nasp*、*Esco2*、*Fbxo31* 和 *Ns1l* 等) 异常表达, 导致精原细胞分化缺陷及分化细胞死亡^[49, 51]。

机制上, METTL16 展现出 m⁶A 依赖和非依赖性双重途径调控: 既可影响精母细胞部分转录本的 m⁶A 修饰, 又能通过调控基质抗原 3 (stromal antigen 3, *Stag3*) 选择性剪接参与减数分裂的启动^[49]。鉴于 *Stag3* 上无 m⁶A 修饰位点, 该过程更可能依赖 METTL16 介导的如 U6 snRNA 或剪接因子 3B (splicing factor 3B, SF3B) 复合体通路间接影响选择性剪接 (alternative splicing, AS)^[49]。在减数分裂过程中, METTL16 通过下调泛素蛋白连接酶 E3 组分 N-识别蛋白 2 (ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 2, *Ubr2*) 转录本的 m⁶A 水平并抑制其表达影响 SPO11 减数分裂双链断裂启动者 (SPO11 initiator of meiotic double strand breaks, SPO11) 依赖性 DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB) 形成与重组, 还可与 DNA 损伤检查点介导蛋白 1 (mediator of DNA damage checkpoint 1, MDC1) 及 Scm 样蛋白 2 (Scm-like

protein 2, SCML2) 相互作用参与 XY 小体 (XY body) 与减数分裂期性染色体失活 (meiotic sex chromosome inactivation, MSCI) 的建立和维持^[50]。值得注意的是, m⁶A 富集与否并不显著影响翻译效率, 且 DSB 形成/重组相关基因的 m⁶A 水平变化有限, 提示 METTL16 可能通过 m⁶A 非依赖机制直接与翻译因子相互作用来调节相关基因的翻译效率^[50]。考虑到 MeRIP-seq 技术的局限性, 未来可结合位点特异的 m⁶A 标记技术及紫外交联免疫沉淀结合高通量测序 ((UV) crosslinking and immunoprecipitation coupled with high-throughput sequencing, CLIP-seq) 等, 并辅以位点突变或可编程 RNA 编辑策略, 在单细胞或阶段特异水平验证 METTL16 对 *Ubr2* 及 DSB 相关基因的真实修饰与翻译效应。

2.3 擦除酶在精子发生中的作用

目前已知的两种主要 m⁶A 去甲基化酶——FTO 与 ALKBH5, 在睾丸中呈现显著的时空特异性表达, 分别参与 mRNA 稳定性调控、可变剪接、染色质重构、类固醇合成及血睾屏障 (blood-testis barrier, BTB) 维护等重要生物过程。

2.3.1 FTO 在精原细胞与间质细胞中发挥双重调控功能

FTO 是首个被鉴定的 m⁶A 去甲基化酶, 属于 ALKB 蛋白家族成员, 睾丸高表达并定位于未分化的精原细胞和间质细胞, 在胞质与胞核均有定位^[52]。FTO 缺失小鼠随着年龄增长出现生精小管紊乱、精子数量显著减少、睾丸萎缩等症状, 最终导致不育^[52]。

在未分化精原细胞中, FTO 通过去除多个关键细胞周期调控因子的 m⁶A 修饰以维持其正常增殖及染色体稳定, 其直接靶点包括有丝分裂检查点复合物 (mitotic checkpoint complex, MCC) 成员 (如 *Mad1*、*Mad2* 和 *Bub1b*) 以及 G2/M 调控因子 (*Cdk1*、*Ccnb2*), FTO 的缺失导致上述转录本 m⁶A 水平升高, 诱发 G2/M 期阻滞、染色体不稳定及精原细胞凋亡^[77]。此外, 小分子抑制剂甲氯芬酸钠 (meclofenamic acid 2, MA2) 靶向抑制 FTO 去甲基化活性可阻断 G1/S 转变, 增强细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK2) 3' UTR 上的 m⁶A 修饰并降低其翻译效率, 从而抑制精原细胞增殖^[78]。

在间质细胞中, FTO 以 m⁶A 依赖性方式调控雄激素受体 (androgen receptor, AR) 的蛋白质水

平, 从而促进间质细胞成熟并调控睾酮合成^[52, 79]。值得注意的是, 环境毒素双酚 F (bisphenol F, BPF) 可抑制 FTO 表达与 AR 转录调节, 破坏 BTB 并诱导细胞铁死亡, 而 FTO 可通过调控转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TfRc)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、铁蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1) 等铁死亡相关转录本的 m⁶A 修饰, 并依赖 YTHDF1/2 介导其翻译和稳定性对抗 BPF 诱导的生殖毒性^[80-81]。

临床研究也发现, 存在 FTO 蛋白截短的少精子症和 NOA 患者中全局 m⁶A 水平升高, 表现出的年龄依赖性生精缺陷提示 FTO 激动剂治疗的潜在价值^[52]。总体而言, FTO 在精原细胞和间质细胞中发挥着阶段与细胞类型特异的调控作用, 未来在其靶点识别机制、m⁶A 位点调控的功能层级差异以及是否参与 AR 翻译复合体或核转运过程上可进一步研究。

2.3.2 ALKBH5 在晚期生殖细胞与睾丸体细胞中发挥多维度调控作用

ALKBH5 以 m⁶A 为主要底物, 在睾丸中表达最高, 主要定位于精母细胞及圆形精子细胞核内^[53]。ALKBH5 敲除导致小鼠生精小管空泡化、精子数量显著减少、形态异常与活力下降, 表现为睾丸萎缩与雄性不育^[53]。

研究表明, ALKBH5 对精子发生的调控亦呈现显著的阶段特异性, 其缺失不仅影响部分精原细胞分化, 还导致减数分裂中粗线期精母细胞及圆形精子细胞数量显著减少^[53-54, 82]。转录组分析显示, 多种与精子发生及 p53 功能网络相关的基因 (如 *Eif4g1*、*Fos*、*Spata3* 等) 在 ALKBH5 缺失后表达异常, 其中 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, *Dnmt1*) 和含泛素样 PHD 和指环结构域蛋白 1 (ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1, *Uhrf1*) 的特定剪接变体的失调提示, ALKBH5 可能通过调控 mRNA 加工参与减数分裂相关的表观遗传调控^[53]。高通量测序分析进一步揭示, ALKBH5 缺失导致精母细胞与圆形精子细胞中 m⁶A 修饰谱与表达谱的同步重构, 差异甲基化转录本富集于“共价染色质修饰”和“组蛋白修饰”等通路, 表明其去甲基化活性与染色质重塑及表观遗传程序密切相关^[83]。信号通路层面, 粗线期精母细胞中 m⁶A 修饰水平上调的基因多与丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein

kinase, MAPK) 激活有关, 下调基因则关联于其负调控^[83]。此外, ALKBH5 可影响 mRNA 加工因子 (如 SC35、ASF/SF2、SM) 的组装/修饰及 mRNA 输出, 其缺失引发多种剪接因子 (如 *Sfswap*、*U2af2*、*Srdfl* 等) 功能紊乱, 导致转录本 3' UTR 异常及精子发生相关基因 (如 *Foxj1*、*Dnaaf3*、*Crem* 等) 表达失衡, 最终导致减数分裂推进和单倍体精子形成异常^[53-54]。与 FTO 类似, ALKBH5 的活性及底物选择亦可受到 RNA 结合蛋白 (RNA-binding protein, RBP) 的影响, 其去甲基化特异性究竟源于细胞的 RNA 底物差异, 还是由剪接复合体或 RBPs 介导的底物识别机制决定, 仍需进一步分析^[84]。

在支持细胞中, ALKBH5 调控钙黏蛋白 2 (cadherin 2, *Ccdh2*) mRNA 翻译以维持血睾屏障的完整性, 且该 mRNA 的翻译还可由 IGF2BP1/2/3 复合物和 YTHDF1 介导^[85]。对比 FTO 可发现, 二者除生殖细胞中明显的阶段特异性分工外, 睾丸体细胞中也呈现明显的层级分化: ALKBH5 偏向结构与代谢重塑, 而 FTO 偏向信号与应激适应。这提示 m⁶A 去甲基化系统在体细胞中可形成互补的保护网络, 而非单一因子主导的线性调控途径。

2.4 读写酶在精子发生中的作用

精子发生过程中, “读写酶”构建了多层次转录后调控网络, 主要包括两类功能模块: YTH 结构域家族蛋白 (YTHDF1/2/3、YTHDC1/2) 主要介导胞质 RNA 转录本命运转换与核内 RNA 加工; 非 YTH 结构域蛋白 (hnRNPs、IGF2BPs、PRRC2A、FMRP) 则通过稳定性、剪接及翻译复合体协同调控共建分层转录后调控网络。

2.4.1 YTHDF2 调控精子发生相关 mRNA 命运

YTHDF1/2/3 均为细胞质型 m⁶A 结合蛋白, 广泛表达于多组织, 其中 YTHDF1 和 YTHDF3 在精原细胞中表达, 而 YTHDF2 在精原细胞及早期精母细胞中均有表达, 也是唯一对精子发生至关重要的“读写酶”^[31]。缺失 YTHDF2 的幼崽出生后的死亡率达到 80%, 存活雄性小鼠生育力低下, 曲细精管表现出轻微的退行性变化, 包括支持细胞出现大分散空泡以及附睾尾部中精子数量锐减^[31]。

YTHDF2 可直接识别 METTL3 催化的 L1 逆转录转座子的 m⁶A 修饰并促其转录本降解, 从而抑制异常转座子活化并维持 SSCs 分化稳态^[86]。体外细胞模型实验表明, YTHDF2 可通过调节基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 家族基因

的表达, 部分地调节精原细胞的迁移和增殖, 也可介导细胞周期相关基因 Wee1 样蛋白激酶 (Wee1-like protein kinase, WEE1) 转录本的降解, 促进 G2/M 转换, 从而调控精原细胞有丝分裂进程^[87-88]。此外, YTHDF2 可正向调节精原细胞中的 SET 结构域分支型组蛋白赖氨酸甲基转移酶 1 (SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, SETDB1) 促进 DDR, 但相关靶标是否必然携带 m⁶A 仍需验证^[89]。值得注意的是, YTHDF2 的自身稳定性依赖于细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1) 活性, 后者通过抑制 YTHDF2 与 S 期激酶相关蛋白 2 (S-phase kinase-associated protein 2, SKP2) -E3 泛素连接酶复合物的结合, 避免其被 Cullin-RING E3 连接酶 (Cullin-RING E3 ligase, CRL) -NEDD8 途径降解, 构成 “CDK1-YTHDF2-WEE1” 正反馈回路^[88]。

尽管早期研究中混合遗传背景下的雄性 *Ythdf2*^{-/-} 小鼠仍具有正常的生育能力和睾丸结构, 但 *Vasa-Cre* 介导的 *Ythdf2* 条件性缺失引发多个精子发生关键基因 (如 *Smcp*、*Sord*、*Atp1a4* 等) 异常积累, 导致少弱畸精症及不育, 提示 YTHDF2 通过清除冗余或滞留转录本以维持生殖细胞转录的时序精确性^[55-57]。结合体外细胞模型中的机制通路, YTHDF2 并非单纯调控 mRNA 命运, 更通过 “转座子沉默-转录本清除-DNA 稳定性维护-细胞周期推进” 多层次联动, 构建精子发生过程中的时间控制网络。需要提及的是, 尽管 *Ythdf2* 与 *Ythdf1* 和 *Ythdf3* 具有高序列同源性, 但由于三者表达时空不同, 后两者也不能完全补偿 YTHDF2 在配子发生过程中的缺失^[31]。

2.4.2 YTHDC1 调控精原细胞分化

YTHDC1 为定位于细胞核的 m⁶A 结合蛋白, 广泛表达于脑、睾丸和卵巢中, 在精原细胞、精母细胞以及圆形精子细胞中均有定位^[58]。其全身敲除可导致胚胎致死, 而雄性生殖系统中的特异性缺失则引发精原细胞逐渐丧失和不育^[51, 58]。

研究显示, *Stra8-cre* 介导的 *Ythdc1*-sKO 小鼠中精原细胞分化受阻, 并随年龄增长呈现生殖细胞数量递减趋势^[51]。YTHDC1 缺失诱导的表型和 METTL16 缺失表现相似且早于后者, 在 METTL16 缺失后, 其靶 RNA 上的 m⁶A 修饰仍可短暂维持, 但 YTHDC1 缺失则立即破坏靶 RNA 的调节, 导致精原细胞分化受损, 提示 YTHDC1 在 m⁶A 信号传

递中的即时作用^[51]。此外, 除了均在细胞核内发挥作用, YTHDC1 也在很大程度上特异性识别 METTL16 的靶基因, 其缺失也会导致染色体组装/分离相关蛋白 (NASP、ESCO2) 的水平降低^[51]。结合其在卵母细胞中与富含精氨酸/丝氨酸剪接因子 3/7 (serine and arginine rich splicing factor 3/7, SRSF3/7) 及切割及多腺苷酸化特异性因子 6 (cleavage and polyadenylation specific factor 6, CPSF6) 等 RNA 加工因子形成复合物以调控可变剪接和 3' UTR 的报道, YTHDC1 在雄性生殖细胞中是否亦可通过协同其他 RBPs 参与共转录加工调控, 可作为进一步的探究^[58]。

2.4.3 YTHDC2 调控精母细胞减数分裂启动

YTHDC2 是同时定位于胞质与胞核的 m⁶A 结合蛋白, 在睾丸中显著表达, 尤其富集于粗线期精母细胞, 是精子发生过程中减数分裂启动与进展的关键调控因子^[59-60, 90]。YTHDC2 在人类中的纯和错译突变导致男性无精症, 其缺失小鼠表现为睾丸萎缩和不育, 精母细胞在减数分裂前期程序性凋亡, 减数分裂启动阻滞^[59-60, 90-93]。与其他典型 “读写酶” 不同, YTHDC2 除 YTH 结构域外, 还包含 RNA 解旋酶结构域、R3H 结构域等多个 RNA 结合模块, 赋予其多层次 RNA 调控能力^[59]。

早期研究表明, YTHDC2 通过 YTH 结构域识别富含 m⁶A 修饰的转录本如细胞周期蛋白 A2 (cyclin A2, *Ccna2*), 调节有丝分裂相关 mRNA 稳定性与翻译效率以确保其表达与关闭, 从而驱动减数分裂启动^[59-60, 90]。然而后续研究对这一模型提出了重要修正: YTHDC2 被鉴定为 RNA 诱导的 ATP 酶, 具有 3'→5' RNA 解旋酶活性, 并能够与减数分裂特异性卷曲螺旋结构域蛋白 (meiosis-specific coiled-coil domain-containing protein, MEIOC) 以及 5'→3' 核酸外切酶 1 (5'→3' exoribonuclease 1, XRN1) 相互作用^[59]。体内遗传学证据显示, 破坏其解旋酶活性导致精母细胞在粗线期停滞并广泛凋亡, 且 m⁶A 结合口袋 (m⁶A-binding pocket) 突变对雄性生育力影响有限, 提示 YTHDC2 的减数分裂功能更依赖 RNA 解旋酶活性^[94]。此外, *Ythdc2* 在进化上与果蝇 Bam-结合蛋白 (BAM-binding protein, *Bgcn*) 同源, 而 *Bgcn* 并不具备 YTH 域, 进一步支持 YTHDC2 存在 m⁶A 非依赖机制^[59]。阶段特异性敲除研究亦显示, YTHDC2 在粗线期到双线期精母细胞中的缺失导致染色体配对异常和细胞凋亡, 提示其在减数分裂

中后期维持RNA稳态和翻译调控的重要作用,但m⁶A依赖性尚不明确^[93]。

总体而言,YTHDC2更可能作为减数分裂阶段的“RNA重编程平台”,在m⁶A依赖的靶标选择与m⁶A非依赖的RNA解旋降解之间协同作用,推动转录程序向减数分裂程序的系统性切换。未来在阶段化的精母细胞中平行比较m⁶A结合缺失与解旋酶失活突变体的多组学特征,将有助于厘清两种机制的功能分工及其动态协作关系。

2.4.4 非YTH结构域蛋白调控精子发生相关RNA稳定性与翻译

除YTH家族蛋白外,越来越多非典型m⁶A结合蛋白(如hnRNPs、IGF2BPs、PRRC2A、FMRP等)也被证实精子发生中发挥重要作用。不同于典型“读写酶”,这类蛋白质更多参与RNA剪接、稳定、存储及翻译调控等多层级转录后调控,构建维持生殖细胞转录组稳态的协同网络。

HNRP蛋白家族的hnRNPC和hnRNPA2B1,前者低组织特异性而后者富集于睾丸,均高表达于精原细胞至圆形精子细胞阶段并定位于细胞核^[62]。二者缺失皆可导致不育及减数分裂缺陷,表现为DSB修复障碍、同源重组异常及转录组广泛失衡^[62-63]。机制上,hnRNPC与人类抗原R(human antigen R, HuR, 又称ELAVL1)协同作用,以m⁶A依赖的方式调控减数分裂相关基因转录本的选择性剪接,控制减数分裂的起始与进展,hnRNPA2B1则直接结合并m⁶A依赖地调控减数分裂转录本(如*Ep400*、*Rrs1*等),同时与多种mRNA加工调节及翻译相关蛋白相互作用,促进减数分裂的推进^[30, 62-63]。此外,支持细胞hnRNPC条件性敲除亦引起细胞黏附、增殖、凋亡等相关基因的表达失调,造成支持细胞功能障碍和精子发生异常^[61]。

IGF2BP家族是另一类重要的细胞质型m⁶A结合蛋白。IGF2BP1在睾丸中整体表达水平较低,富集于SSCs及未分化精原细胞,其功能高度依赖发育阶段,Cre启动时序与靶向细胞谱系的差异会导致表型不同。采用Nanos3-Cre在原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)阶段清除IGF2BP1以干扰生殖谱系建立及表观遗传重塑,引发随年龄加重的精子发生障碍,表现为纯睾丸支持细胞综合征(sertoli-cell-only syndrome, SCOS)小管增多和精原细胞数量显著减少;而Vasa-Cre在较晚阶段启动重组,其表型则相对轻微或可被代偿^[65-66, 95-96]。人类体系也显示,IGF2BP1通过m⁶A依赖性机制限制

人类PGCs命运异常的诱导,提示其主要作用于生殖谱系早期的细胞命运阈值调控^[64]。机制层面,IGF2BP1可协同ELAVL1稳定多种关键SSC转录本(如*Lin28a*、*Dnd1*、*Gfra1*、*Mov10*)以维持能量代谢与自我更新能力,并通过稳定AKT丝氨酸/苏氨酸激酶2(AKT serine/threonine kinase 2, *Akt2*) mRNA以促进葡萄糖代谢维持精原细胞增殖,同时以m⁶A依赖性方式稳定血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, *HMOX1*) mRNA抑制铁死亡,二者之一的功能受损均可导致SSCs增殖障碍并与非阻塞性无精症显著相关^[65-66, 95]。相较之下,IGF2BP3在睾丸高表达,富集于精原干细胞和精母细胞,既可通过m⁶A依赖性方式稳定转录因子4(transcription factor 4, *Tcf4*) mRNA诱导生精细胞凋亡,也可在减数分裂后精子细胞中特异性识别并稳定多种染色质重塑相关转录本,协调组蛋白向鱼精蛋白替换^[67-68]。因此,IGF2BP3缺失会导致小鼠精子染色质压缩受阻、头部畸形及雄性不育,而其过表达则可在一定程度上逆转无精症小鼠的生育缺陷^[67-68]。

PRRC2A在睾丸中高表达,富集于晚期精母细胞和早期精子细胞,定位于长形精子细胞外的所有生殖细胞胞质中,其缺失导致小鼠不育,减数分裂I阻滞、染色体未对齐、纺锤体紊乱及细胞凋亡^[43]。机制上,PRRC2A可与Y-box结合蛋白1/2(Y-box binding protein 1/2, YBX1/2)、脆性X相关蛋白1(fragile X-related protein 1, FXR1)、真核翻译起始因子4G3(eukaryotic translation initiation factor 4G3, EIF4G3)等蛋白质相互作用,定位精子特异性RNA颗粒,调控mRNA稳定性与翻译^[43]。

FMRP是一种含KH与精氨酸-甘氨酸-甘氨酸(arginine-glycine-glycine, RGG)结构域的胞质型m⁶A结合蛋白,在睾丸中高表达,并定位于精原细胞。这种蛋白质的缺失在小鼠和果蝇模型中均导致睾丸增大以及晚期精子细胞畸形,其中果蝇表现出生育力下降^[70, 97]。尽管FMRP具备m⁶A结合能力,现有研究更集中于组蛋白甲基化依赖性的DNA损伤应答过程,其在精母细胞中的m⁶A依赖性作用仍需进一步验证^[97]。

综合来看,若干非典型m⁶A结合蛋白在精子发生中的作用模式提示m⁶A调控已从单一“读码器-位点”模型扩展成更为复杂的调控网络。不同于YTH家族主要介导转录本快速降解与命运切换,

这些非典型蛋白质更倾向于通过间接调控、稳定性增强、RNA 颗粒存储及翻译抑制等方式延长或缓冲转录本寿命, 从而在生殖细胞高度依赖转录后调控且转录活性显著下降的背景下维持蛋白质表达的连续与稳态输出。未来在单细胞分辨率下整合“读写酶”表达图谱、m⁶A 表观转录及翻译组学数据将有助于验证二者建立的“开关-缓冲”双层架构, 并阐明不同“读写酶”组合是否决定了精子发生过程中 RNA 命运的可塑性窗口和关键转折点。

3 总结与展望

精子发生是一个高度时序化且不可逆的分化过程, 伴随转录重编辑、减数分裂启动及转录后沉默, 对 RNA 命运的精准调控提出了极高的要求。随着高通量组学技术与 RNA 修饰检测手段的迅速发展, m⁶A 通过“写入酶-擦除酶-读写酶”协同作用, 构建了多维度、时空特异的 RNA 调控网络。

除了三类因子的基础功能, “写入酶”呈现出剂量与时序窗口依赖、“擦除酶”在不同细胞间形成阶段分工与功能互补、YTH 结构域与非 YTH 结构域“读写酶”共同组成“开关-缓冲”双层架构且有 RBPs 参与 m⁶A 调控因子底物选择与转录后调控。此外, 部分传统定义的 m⁶A 蛋白如 YTHDC2 在生殖细胞中的核心功能更多依赖其解旋酶活性或复合体组装, 提示 m⁶A 修饰在精子发送过程中的作用并非始终通过“修饰-识别-效应”的经典线性模式实现, 更可能作为 RNA 调控网络中的定位信号或调节阈值, 与 RNA 结合蛋白的内在活性协调发挥功能。同时, METTL5 介导的 18S rRNA m⁶A 修饰进一步将 m⁶A 的作用层级由 mRNA 拓展至翻译装置本身^[98]。

尽管相关蛋白已得到广泛表征, 现有研究仍存在多方面空白: m⁶A 修饰在生殖细胞发育不同阶段缺少与细胞命运转变相对应的单细胞分辨率图谱; 功能分化蛋白之间的协同与拮抗关系尚未被充分阐明; 另外, 现有遗传模型多删除完整的蛋白质而非特异性破坏识别或催化结构域, 睾丸细胞的差异与蛋白质复合体的存在使 m⁶A 究竟充当指令开关还是稳态缓冲尚难判定。

未来可采用结构域特异突变体、位点特异 RNA 编辑、单细胞与空间表观转录组以及系统层网络分析, 在时间与空间维度解析瞬时甲基化动态与阶段特异功能, 并在位点水平直接验证 m⁶A 的真实作用。此外, 可编程的 RNA 编辑工具, 如基

于 CRISPR-dCas13 的位点特异性甲基化或去甲基化以及结构域特异性遗传模型, 将能够直接测试 m⁶A 是发挥指令信号还是调节性缓冲作用^[99-100]。而将 RNA 相互作用捕获 (RNA interactome capture, RIC) 与 m⁶A 特异性化学或酶促标记策略相结合, 则有望在更高分辨率下描绘 m⁶A 依赖的 RBPs 相互作用网络, 为阐明精子发生的表观转录组机制及其与男性不育的因果联系提供新的突破口。

参 考 文 献

- [1] Cappannini A, Ray A, Purta E, *et al.* MODOMICS: a database of RNA modifications and related information. 2023 update. *Nucleic Acids Res*, 2024, **52**(D1): D239-D244
- [2] Artika I M, Arianti R, Demény M Á, *et al.* RNA modifications and their role in gene expression. *Front Mol Biosci*, 2025, **12**: 1537861
- [3] Chen X, Yuan Y, Zhou F, *et al.* m6A RNA methylation: a pivotal regulator of tumor immunity and a promising target for cancer immunotherapy. *J Transl Med*, 2025, **23**(1): 245
- [4] Wang S, Feng Z, Wu H, *et al.* The m⁶A modification in neurodegenerative disease: a cellular perspective. *Cells*, 2025, **14**(22): 1820
- [5] Huang Y, Xue Q, Chang J, *et al.* M6A methylation modification in autoimmune diseases, a promising treatment strategy based on epigenetics. *Arthritis Res Ther*, 2023, **25**(1): 189
- [6] Wang H, Han J, Kong H, *et al.* The emerging role of m6A and programmed cell death in cardiovascular diseases. *Biomolecules*, 2025, **15**(2): 247
- [7] Meyer K D, Saletore Y, Zumbo P, *et al.* Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, **149**(7): 1635-1646
- [8] Dubin D T, Taylor R H. The methylation state of poly A-containing messenger RNA from cultured hamster cells. *Nucleic Acids Res*, 1975, **2**(10): 1653-1668
- [9] Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, **71**(10): 3971-3975
- [10] Nichols J L. N6-methyladenosine in maize poly(A)-containing RNA. *Plant Sci Lett*, 1979, **15**(4): 357-361
- [11] Furuichi Y, Miura K. A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature*, 1975, **253**(5490): 374-375
- [12] Bokar J A, Shambaugh M E, Polayes D, *et al.* Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 1997, **3**(11): 1233-1247
- [13] Jia G, Fu Y, Zhao X, *et al.* N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**(12): 885-887
- [14] Wang X, Lu Z, Gomez A, *et al.* N6-methyladenosine-dependent

- regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, **505**(7481): 117-120
- [15] Wang Y, Xiao Y, Dong S, *et al.* Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N⁶-methyladenosine. *Nat Chem Biol*, 2020, **16**(8): 896-903
- [16] Ge R, Ye C, Peng Y, *et al.* m⁶A-SAC-seq for quantitative whole transcriptome m⁶A profiling. *Nat Protoc*, 2023, **18**(2): 626-657
- [17] Liu C, Sun H, Yi Y, *et al.* Absolute quantification of single-base m⁶A methylation in the mammalian transcriptome using GLORI. *Nat Biotechnol*, 2023, **41**(3): 355-366
- [18] Liu C, Liang H, Wan A H, *et al.* Decoding the m⁶A epitranscriptomic landscape for biotechnological applications using a direct RNA sequencing approach. *Nat Commun*, 2025, **16**(1): 798
- [19] Teng H, Stoiber M, Bar-Joseph Z, *et al.* Detecting m⁶A RNA modification from nanopore sequencing using a semi-supervised learning framework. *bioRxiv*, 2024: 2024.01.06.574484
- [20] Su S, Li S, Deng T, *et al.* Cryo-EM structures of human m⁶A writer complexes. *Cell Res*, 2022, **32**(11): 982-994
- [21] Wang X, Feng J, Xue Y, *et al.* Structural basis of N⁶-adenosine methylation by the METTL3 – METTL14 complex. *Nature*, 2016, **534**(7608): 575-578
- [22] Corbeski I, Vargas-Rosales P A, Bedi R K, *et al.* The catalytic mechanism of the RNA methyltransferase METTL3. *eLife*, 2024, **12**: RP92537
- [23] Doxtader K A, Wang P, Scarborough A M, *et al.* Structural basis for regulation of METTL16, an S-adenosylmethionine homeostasis factor. *Mol Cell*, 2018, **71**(6): 1001-1011.e4
- [24] Pendleton K E, Chen B, Liu K, *et al.* The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, **169**(5): 824-835.e14
- [25] van Tran N, Ernst F G M, Hawley B R, *et al.* The human 18S rRNA m⁶A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(15): 7719-7733
- [26] Pandey K, Poh H X, Jaffrey S R. Why does the m⁶A writer complex require so many proteins?. *PLoS Biol*, 2025, **23**(9): e3003386
- [27] Ping X L, Sun B F, Wang L, *et al.* Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 2014, **24**(2): 177-189
- [28] Toh J D W, Crossley S W M, Bruemmer K J, *et al.* Distinct RNA N-demethylation pathways catalyzed by nonheme iron ALKBH5 and FTO enzymes enable regulation of formaldehyde release rates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(41): 25284-25292
- [29] Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, *et al.* N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, **161**(6): 1388-1399
- [30] Wang X, Fan X, Zhang J, *et al.* hnRNPA2B1 represses the disassembly of arsenite-induced stress granules and is essential for male fertility. *Cell Rep*, 2024, **43**(2): 113769
- [31] Lasman L, Krupalnik V, Viukov S, *et al.* Context-dependent functional compensation between Ythdf m⁶A reader proteins. *Genes Dev*, 2020, **34**(19/20): 1373-1391
- [32] Du H, Zhao Y, He J, *et al.* YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12626
- [33] Park O H, Ha H, Lee Y, *et al.* Endoribonucleolytic cleavage of m⁶A-containing RNAs by RNase P/MRP complex. *Mol Cell*, 2019, **74**(3): 494-507.e8
- [34] Li A, Chen Y S, Ping X L, *et al.* Cytoplasmic m⁶A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res*, 2017, **27**(3): 444-447
- [35] Shi H, Wang X, Lu Z, *et al.* YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, **27**(3): 315-328
- [36] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, *et al.* Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, **61**(4): 507-519
- [37] Roundtree I A, Luo G Z, Zhang Z, *et al.* YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs. *Elife*, 2017, **6**: e31311
- [38] Mao Y, Dong L, Liu X M, *et al.* m⁶A in mRNA coding regions promotes translation via the RNA helicase-containing YTHDC2. *Nat Commun*, 2019, **10**: 5332
- [39] Liu N, Dai Q, Zheng G, *et al.* N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015, **518**(7540): 560-564
- [40] Liu N, Zhou K I, Parisien M, *et al.* N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(10): 6051-6063
- [41] Alarcón C R, Goodarzi H, Lee H, *et al.* HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 2015, **162**(6): 1299-1308
- [42] Huang H, Weng H, Sun W, *et al.* Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 2018, **20**(3): 285-295
- [43] Tan X, Zheng C, Zhuang Y, *et al.* The m⁶A reader PRRC2A is essential for meiosis I completion during spermatogenesis. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 1636
- [44] Edupuganti R R, Geiger S, Lindeboom R G H, *et al.* N⁶-methyladenosine (m⁶A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, **24**(10): 870-878
- [45] Edens B M, Vissers C, Su J, *et al.* FMRP modulates neural differentiation through m⁶A-dependent mRNA nuclear export. *Cell Rep*, 2019, **28**(4): 845-854.e5
- [46] Xu K, Yang Y, Feng G H, *et al.* Mettl3-mediated m⁶A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Res*, 2017, **27**(9): 1100-1114
- [47] Lin Z, Hsu P J, Xing X, *et al.* Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N⁶-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, **27**(10): 1216-1230
- [48] Jia G X, Lin Z, Yan R G, *et al.* WTAP function in sertoli cells is essential for sustaining the spermatogonial stem cell niche. *Stem Cell Reports*, 2020, **15**(4): 968-982
- [49] Ma Q, Gui Y, Ma X, *et al.* N⁶-methyladenosine writer METTL16-mediated alternative splicing and translation control are essential

- for murine spermatogenesis. *Genome Biol*, 2024, **25**(1): 193
- [50] Yin L, Jiang N, Xiong W, *et al.* METTL16 is required for meiotic sex chromosome inactivation and DSB formation and recombination during male meiosis. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, **12**(3): e2406332
- [51] Gu X, Dai X, Sun H, *et al.* METTL16 and YTHDC1 regulate spermatogonial differentiation via m⁶A. *Cell Prolif*, 2025, **58**(5): e13782
- [52] Wu Y, Li J, Li C, *et al.* Fat mass and obesity-associated factor (FTO)-mediated N⁶-methyladenosine regulates spermatogenesis in an age-dependent manner. *J Biol Chem*, 2023, **299**(6): 104783
- [53] Zheng G, Dahl J A, Niu Y, *et al.* ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, **49**(1): 18-29
- [54] Tang C, Klukovich R, Peng H, *et al.* ALKBH5-dependent m⁶A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(2): E325-E333
- [55] Zhao X, Lin Z, Fan Y, *et al.* YTHDF2 is essential for spermatogenesis and fertility by mediating a wave of transcriptional transition in spermatogenic cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2021, **53**(12): 1702-1712
- [56] Ivanova I, Much C, di Giacomo M, *et al.* The RNA m⁶A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence. *Mol Cell*, 2017, **67**(6): 1059-1067.e4
- [57] Qi M, Sun H, Guo Y, *et al.* m⁶A reader protein YTHDF2 regulates spermatogenesis by timely clearance of phase-specific transcripts. *Cell Prolif*, 2022, **55**(1): e13164
- [58] Kasowitz S D, Ma J, Anderson S J, *et al.* Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development. *PLoS Genet*, 2018, **14**(5): e1007412
- [59] Wojtas M N, Pandey R R, Mendel M, *et al.* Regulation of m⁶A transcripts by the 3'→5' RNA helicase YTHDC2 is essential for a successful meiotic program in the mammalian germline. *Mol Cell*, 2017, **68**(2): 374-387.e12
- [60] Bailey A S, Batista P J, Gold R S, *et al.* The conserved RNA helicase YTHDC2 regulates the transition from proliferation to differentiation in the germline. *Elife*, 2017, **6**: e26116
- [61] Mo S, Shu G, Cao C, *et al.* Sertoli cells require hnRNPC to support normal spermatogenesis and male fertility in mice. *Biol Reprod*, 2024, **111**(1): 227-241
- [62] Xiong X, Feng S, Ma X, *et al.* hnRNPC functions with HuR to regulate alternative splicing in an m⁶A-dependent manner and is essential for meiosis. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, **12**(13): e2412196
- [63] Yin L, Zhang Y, Zhang B, *et al.* m⁶A reader hnRNP2B1 modulates late pachytene progression in male meiosis through post-transcriptional control. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, **12**(38): e06600
- [64] Zhang J, Gu Y, Tong L, *et al.* IGF₂BP₁ restricts the induction of human primordial germ cell fate in an m⁶A-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2025, **32**(7): 1122-1138.e13
- [65] Luo J, Yang C, Xu S, *et al.* RNA-binding protein IGF₂BP₁ is required for spermatogenesis in an age-dependent manner. *Commun Biol*, 2024, **7**(1): 1362
- [66] Liu Y, Chen Y, Fan J, *et al.* IGF₂BP₁ stabilizes Akt2 mRNA to promote glucose metabolism and maintain spermatogonial proliferation. *Reproduction*, 2025, **169**(4): e240202
- [67] Wang D, Huang Z, Zhou Y, *et al.* IGF₂BP₃ recognizes m⁶A to regulate histone-to-protamine replacement during mouse sperm development. *EMBO J*, 2026, **45**(2): 504-536
- [68] Dong M, Xue Z, Weihao S, *et al.* O-257 IGF₂BP₃ induces apoptosis of spermatogenic cells by regulating the stability of Tcf4 mRNA in an m⁶A-dependent manner, thereby affecting the occurrence of azoospermia. *Hum Reprod*, 2023, **38**(Supplement_1): dead093.311
- [69] Johannisson R, Rehder H, Wendt V, *et al.* Spermatogenesis in two patients with the fragile X syndrome. I. Histology: light and electron microscopy. *Hum Genet*, 1987, **76**(2): 141-147
- [70] Zhang Y Q, Matthies H J, Mancuso J, *et al.* The *Drosophila* fragile X-related gene regulates axoneme differentiation during spermatogenesis. *Dev Biol*, 2004, **270**(2): 290-307
- [71] Fu H, Zhu X, Di Q, *et al.* m⁶A contributes to a pro-survival state in GC-2 cells by facilitating DNA damage repair: novel perspectives on the mechanism underlying DEHP genotoxicity in male germ cells. *Sci Total Environ*, 2023, **859**(Pt 2): 160432
- [72] Tang W, Cao M, Qiao F, *et al.* METTL3 regulates Leydig cell proliferation via miR-145-PCK1 mediated gluconeogenesis in goats. *J Anim Sci Biotechnol*, 2026, **17**(1): 10
- [73] Zhai Y, Zhang H, Hu C, *et al.* Bisphenol Z inhibits the function of Leydig cells via upregulation of METTL3 expression in adult male rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2025, **252**: 106786
- [74] Chen Y, Wang J, Xu D, *et al.* m⁶A mRNA methylation regulates testosterone synthesis through modulating autophagy in Leydig cells. *Autophagy*, 2021, **17**(2): 457-475
- [75] Stixová L, Komůrková D, Svobodová Kovaříková A, *et al.* Localization of METTL16 at the nuclear periphery and the nucleolus is cell cycle-specific and METTL16 interacts with several nucleolar proteins. *Life (Basel)*, 2021, **11**(7): 669
- [76] Mendel M, Chen K M, Homolka D, *et al.* Methylation of structured RNA by the m⁶A writer METTL16 is essential for mouse embryonic development. *Mol Cell*, 2018, **71**(6): 986-1000.e11
- [77] Huang T, Gao Q, Feng T, *et al.* FTO knockout causes chromosome instability and G2/M arrest in mouse GC-1 cells. *Front Genet*, 2018, **9**: 732
- [78] Huang T, Guo J, Lv Y, *et al.* Meclofenamic acid represses spermatogonial proliferation through modulating m⁶A RNA modification. *J Anim Sci Biotechnol*, 2019, **10**: 63
- [79] Wang C, Yang K, Gao F, *et al.* FTO regulates testosterone secretion in Leydig cells: insights into the role of m⁶A modifications and the therapeutic potential of hCG. *Reprod Biol Endocrinol*, 2025, **23**(1): 121
- [80] Shi Y, Yin L, Li J Y, *et al.* FTO mediates bisphenol F-induced

- blood-testis barrier impairment through regulating ferroptosis via YTHDF1/TfRc and YTHDF2/SLC7A11 signal axis. *Environ Pollut*, 2024, **359**: 124531
- [81] Zhou S M, Shi Y, Li J Y, *et al.* Bisphenol F induces spermatogenic cell ferroptosis via FTO-mediated m6A regulation of FTH1. *Free Radic Biol Med*, 2025, **229**: 364-373
- [82] Hong S, Shen X, Luo C, *et al.* Comparative analysis of the testes from wild-type and Alkbh5-knockout mice using single-cell RNA sequencing. *G3 (Bethesda)*, 2022, **12**(8): jkac130
- [83] Hong S, Shen X, Cheng J, *et al.* Comprehensive analysis of the transcriptome-wide m6A methylation in mouse pachytene spermatocytes and round spermatids. *Front Genet*, 2022, **13**: 832677
- [84] Yu F, Zhu A C, Liu S, *et al.* RBM33 is a unique m6A RNA-binding protein that regulates ALKBH5 demethylase activity and substrate selectivity. *Mol Cell*, 2023, **83**(12): 2003-2019.e6
- [85] Cai Z, Zhang Y, Yang L, *et al.* ALKBH5 in mouse testicular Sertoli cells regulates Cdh2 mRNA translation to maintain blood-testis barrier integrity. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, **27**(1): 101
- [86] Li Z, Fang F, Zafar M I, *et al.* RNA m6A modification regulates L1 retrotransposons in human spermatogonial stem cell differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Cell Mol Life Sci*, 2024, **81**(1): 92
- [87] Huang T, Liu Z, Zheng Y, *et al.* YTHDF2 promotes spermatogonial adhesion through modulating MMPs decay via m6A/mRNA pathway. *Cell Death Dis*, 2020, **11**(1): 37
- [88] Fei Q, Zou Z, Roundtree I A, *et al.* YTHDF2 promotes mitotic entry and is regulated by cell cycle mediators. *PLoS Biol*, 2020, **18**(4): e3000664
- [89] Guo M, Li X, Li T, *et al.* YTHDF2 promotes DNA damage repair by positively regulating the histone methyltransferase SETDB1 in spermatogonia. *Biol Reprod*, 2024, **110**(1): 48-62
- [90] Hsu P J, Zhu Y, Ma H, *et al.* Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, **27**(9): 1115-1127
- [91] Tian S, Faheem M, Satti H S, *et al.* A homozygous missense variant in YTHDC2 induces azoospermia in two siblings. *Mol Genet Genomics*, 2024, **299**(1): 84
- [92] Jain D, Puno M R, Meydan C, *et al.* *ketu* mutant mice uncover an essential meiotic function for the ancient RNA helicase YTHDC2. *eLife*, 2018, **7**: e30919
- [93] Bailey A S, Fuller M T. YTHDC2 serves a distinct late role in spermatocytes during germ cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, **121**(42): e2309548121
- [94] Saito Y, Hawley B R, Puno M R, *et al.* YTHDC2 control of gametogenesis requires helicase activity but not m6A binding. *Genes Dev*, 2022, **36**(3/4): 180-194
- [95] Du L, Liu W, Cui Y, *et al.* IGF2BP1/HMOX1 mediates fate determinations of human spermatogonial stem cells and male infertility via an m6A-dependent manner. *Research (Wash D C)*, 2025, **8**: 1005
- [96] Wang S, Wu S, Tang J, *et al.* The RNA-binding protein IGF2BP1 marks germ cells but is dispensable for mouse fertility. *Mol Reprod Dev*, 2025, **92**(2): e70016
- [97] Alpatov R, Lesch B J, Nakamoto-Kinoshita M, *et al.* A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. *Cell*, 2014, **157**(4): 869-881
- [98] Zhang M, Zhang X, Tan C, *et al.* METTL5 deficiency induces oligoasthenoteratozoospermia via impaired 18S rRNA m6A methylation in humans and mice. *Mol Ther*, 2025, **33**(11): 5883-5900
- [99] Xu Y, Tian N, Shi H, *et al.* A split CRISPR/Cas13b system for conditional RNA regulation and editing. *J Am Chem Soc*, 2023, **145**(9): 5561-5569
- [100] Zhang X, Zhang Y, Liu X, *et al.* FOCAS Transcriptome-wide screening of individual m6A sites functionally dissects epitranscriptomic control of gene expression in cancer. *Cell*, 2026, **189**(3): 922-938.e23

The Role and Molecular Mechanism of N⁶-methyladenosine Modification in Spermatogenesis*

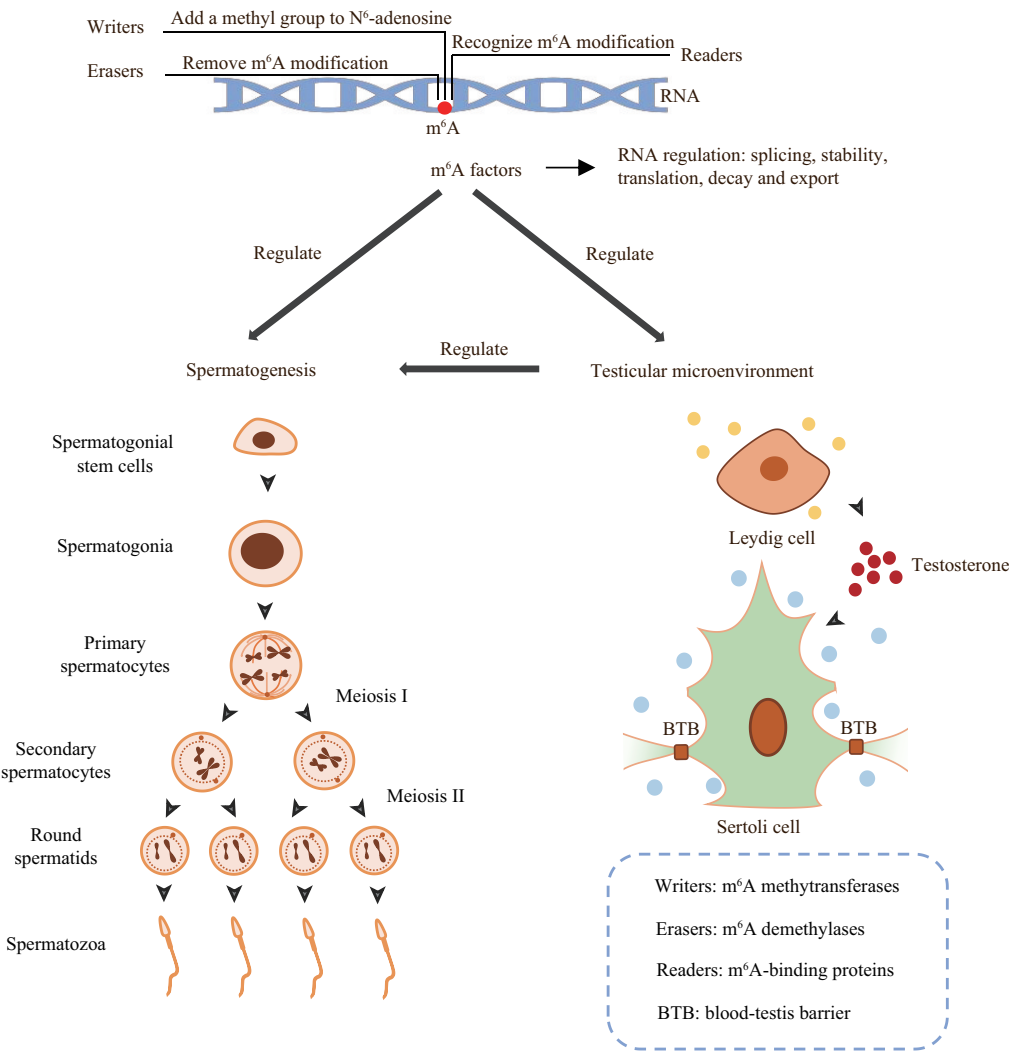
MENG Shi-Qi^{1,2)}, LU Wen-Ting^{1,2)}, CHENG Xu³⁾, YANG Fan^{1,2)},
NIU Chang-Min³⁾, ZHEGN Ying^{1,2)**}

(¹⁾Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

²⁾Key Laboratory of Nucleic Acids and Cell Fate Regulation of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

³⁾School of Nursing, Faculty of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82371614, 82071696) and Research and Practice Innovation Plan for Graduate Students in Jiangsu Province (KYCX24-3851).

** Corresponding author.

Tel: 86-514-87973588, E-mail: yzzkl@163.com

Received: December 4, 2025 Accepted: March 21, 2026

Abstract Spermatogenesis is a highly ordered and spatiotemporally regulated developmental process in the male reproductive system, during which spermatogonial stem cells (SSCs), supported by the seminiferous tubule microenvironment, sequentially undergo mitosis, meiosis, and spermiogenesis to ultimately generate structurally intact spermatozoa. This complex process is accompanied by extensive transcriptional reprogramming, chromatin remodeling, and finely tuned post-transcriptional regulation. Precise control of RNA fate is therefore essential for maintaining the continuity and fidelity of spermatogenesis, and its disruption represents a major molecular basis of male infertility. N⁶-methyladenosine (m⁶A), the most abundant internal RNA modification in eukaryotes, has emerged as a critical regulator of post-transcriptional gene expression. m⁶A methyltransferases (“writers”) catalyze the addition of a methyl group to the N⁶ position of adenosine, m⁶A demethylases (“erasers”) remove the modification, and m⁶A-binding proteins (“readers”) recognize m⁶A-modified transcripts. Through the coordinated actions of these factors, m⁶A regulates transcript fate at multiple levels, including RNA splicing, nuclear export, stability, translation, and decay. Emerging evidence indicates that m⁶A-mediated regulation is essential across multiple stages of spermatogenesis, including SSC self-renewal and differentiation, meiotic progression, maintenance of chromosomal stability, and sperm morphogenesis. Beyond its intrinsic functions in germ cells, m⁶A also contributes to the regulation of the testicular microenvironment. In Sertoli cells, m⁶A is involved in maintaining blood-testis barrier integrity, RNA processing, and paracrine signaling, thereby providing structural and metabolic support for germ cell development. In Leydig cells, m⁶A regulates steroidogenesis, particularly testosterone synthesis, and participates in cellular stress responses and metabolic homeostasis. Through these mechanisms, m⁶A indirectly influences spermatogenesis by modulating the functional state of testicular somatic cells, highlighting an integrated regulatory mode that combines cell-intrinsic and microenvironment-mediated effects. Notably, distinct classes of m⁶A regulators exhibit pronounced stage-specific functions and coordinated division of labor, collectively forming a multilayered and dynamic regulatory network. Writers often display dosage- and temporal window-dependent effects; erasers contribute to stage-specific demethylation and functional compensation; while readers function through a “switch-buffer” dual-layer architecture, and RNA-binding proteins (RBPs) participate in substrate selection and post-transcriptional regulation. Importantly, emerging evidence suggests that some m⁶A-related proteins can function through noncanonical mechanisms independent of m⁶A recognition, such as intrinsic RNA-binding activity, helicase function, or ribonucleoprotein complex assembly, thereby expanding the functional landscape of the m⁶A regulatory system. Dysregulation of m⁶A machinery can lead to multiple spermatogenic defects, including impaired SSC self-renewal, meiotic arrest, abnormal chromatin remodeling, and defective sperm formation, ultimately resulting in male infertility. Despite substantial advances, several critical questions remain unresolved, including the distinction between m⁶A-dependent and -independent mechanisms, the spatiotemporal dynamics of m⁶A modifications at single-cell resolution, and the coordination and antagonism among different regulatory factors. In this review, we systematically summarize the dual regulation of spermatogenesis by germ cell-intrinsic mechanisms and the testicular microenvironment, and delineate the molecular mechanisms and stage-specific functions of the dynamic m⁶A regulatory network. We further discuss the current limitations in the field and propose feasible experimental strategies for future investigation. Collectively, this work aims to provide a comprehensive framework for understanding the epitranscriptomic regulation of spermatogenesis and to offer theoretical insights into the pathogenesis and clinical management of male infertility.

Key words m⁶A, spermatogenesis, functional mechanism

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0532

CSTR: 32369.14.pibb.20250532