

小分子非编码 RNA 与雄性不育

廖珂 柴志欣 钟金城

(西南民族大学 动物遗传育种学国家民委-教育部重点实验室 西南民族大学青藏高原研究院, 成都 610041)

摘要: 小分子非编码 RNA (Small non-coding RNA, sncRNA) 是一类 20-30 个左右核苷酸长度的 RNAs, 不具有编码蛋白质的功能, 但在调控机制方面具有广泛的生物学功能。在动物精子形成过程中有两类 sncRNAs, 即 miRNAs 和 piRNAs 起着重要调控作用, 它们在动物睾丸组织中表达异常会导致精子生成障碍从而表现出雄性不育性状。综合分析了 sncRNA 的结构、功能以及对雄性动物生育能力的影响, 以期为进一步研究 sncRNA 的调控机制提供参考。

关键词: 小分子非编码 RNA; 精子形成; 雄性不育

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016.01.007

Small Non-coding RNA and Male Sterility

LIAO Ke CHAI Zhi-xin ZHONG Jin-cheng

(Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding of State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Southwest University for Nationalities, Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041)

Abstract: Small non-coding RNA (sncRNA) is a kind of RNA with 20-30 nucleotides, and does not have the function of encoding proteins, but has extensive biological functions in terms of regulatory mechanism. In the process of animal sperm formation there are two types of sncRNAs, namely miRNAs and piRNAs playing a critical regulatory role. When they are expressed abnormally in testicular tissues of animals, which causes the production of sperms in obstacle, so as male sterility would appear. In this paper, we summarize sncRNA's structure and function, and effects on male fertility in order to offer the references for the further researches of the sncRNA regulatory mechanisms.

Key words: small non-coding RNA; spermatogenesis; male sterility

以往很多研究更为重视的是基因组中的编码序列, 而约 98% 的非编码序列是随着对基因组及其功能的研究深入才逐渐引起人们的重视。小分子非编码 RNA (Small non-coding RNAs, sncRNAs) 是一类核苷酸长度在 20-30 nt 左右的非编码 RNA (Non-coding RNA, ncRNA)^[1], 过去被认为是剪切加工的剩余产物, 近年来的研究发现这一类小分子的生物学功能具有高度的组织特异性或发育阶段特异性, 逐渐成为研究的热点。目前主要将 ncRNAs 分为 3 类, 即 piRNA (Piwi-interactingRNA, 与 piwi 蛋白相互作用的 RNA)、microRNA (miRNA, 微小 RNA) 和 si-

RNA (小干扰 RNA)^[1]。研究发现 sncRNA 参与生殖细胞转录水平、翻译水平上的调控, 其中 miRNA 和 piRNA 通路是雄性不育动物模型研究中最重要两条路径^[2-4]。一般情况下, miRNA 调节精子形成是通过靶向结合在转录本的 3' UTR 区和下调细胞中特定的转录本来促进精子的发育, 而 piRNA 则在生精过程中强烈抑制转座子元件的表达。本文综合分析了精子形成过程中相关 sncRNAs 的结构、功能、调控机制以及对动物雄性不育的影响, 以期为进一步研究 sncRNA 的调控机制提供参考。

收稿日期: 2015-05-08

基金项目: 国家科技支撑计划课题 (2012BAD13B06), 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (11NZYTH03)

作者简介: 廖珂, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传学与基因组学; E-mail: 15184442679@163.com

通讯作者: 钟金城, 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物遗传学; E-mail: zhongjincheng518@126.com

1 sncRNA 概述

真核生物细胞内的 RNA 一般分为编码 RNA 和非编码 RNA。目前发现, 人类基因组中有 2% 的序列参与编码蛋白质, 即翻译过程中产生的 mRNA 属于典型的可编码 RNA, 其余为非编码序列^[5]。sncRNAs 是一类非编码 RNAs, 即属于不会编码蛋白质 RNAs (ncRNA) 的一部分。而 ncRNA 早在 50 年前就已被发现, 1965 年 R. W. 霍利^[6]在面包酵母细胞中发现的丙氨酸 tRNA 和之后发现的 rRNA 都是非编码 RNA; 其中 rRNA 含量占总 RNA 的约 82%, 随着研究的发展, 现在越来越多的新型 ncRNA 得以被发现, 如核小 RNA (snRNAs)、小 RNA (miRNA)、与 Piwi 蛋白结合 RNA (piRNA)、长链非编码 (lncRNA) 等。

ncRNA 主要从转录来源、分子长度、功能等进行分类。从 ncRNA 转录来源分类, 主要有内含子型和基因间型, 前者由基因中的内含子序列转录而来, 后者主要源于两基因间 DNA 序列的转录^[7]。ncRNA 核苷酸片段同时也具有高度的大小特异性, 其中分子长度多于 200 个核苷酸的通常被称作长链 ncRNA, 少于 200 个核苷酸的称为短链 ncRNA^[8]。sncRNAs 属于短链 ncRNA, 长度在 20–30 nt 左右。它主要包括小干扰 RNA (siRNA) 长度在 21–23 nt, 微小 RNA (miRNA) 长度在 19–25 nt, 生殖细胞含量丰富的与 piwi (p-element induced wimpy testis) 作用的 RNA (piRNA) 大部分在 24–34 nt^[1]。

sncRNAs 通常与高度保守的 Argonaute 蛋白家族结合, 该蛋白家族根据结构特异性可要分为两个亚家族: AGO 和 PIWI; 两类亚家族分别具有两个特殊的结构域, 即 PAZ (Piwi-Argonaute-zwille) 域和 PIWI (p-element induced wimpy testis) 域^[3]。在体细胞和生殖细胞中, miRNA、siRNA 一般与 AGO 蛋白家族结合; 而 piRNA 与 piwi 蛋白结合并且高度富集在生殖细胞中。miRNA 在哺乳动物细胞中的基本功能是负调节 mRNA 的翻译, 但是通过 Dicer 敲除实验发现后代生殖细胞中 miRNA 的含量大幅减少^[3]; 还有相关实验通过对猪性成熟前后睾丸组织差异表达 miRNA 鉴定及功能分析发现, miRNAs 在动物睾丸发育成熟、生殖细胞的功能分化以及精子发生过程

中发挥着重要的作用^[9]。Watanabe 等^[10]研究发现病变的睾丸组织中发现 piwi-RNA 分子的初级加工产物受到影响而次级加工产物未受影响, 同时发现 piwi 蛋白家族 (MILI、MIWI2 和 MIWI 3 个成员) 是成功形成精子所必需的一类蛋白家族, 在精子形成过程中起到关键作用。miRNA 和 piRNA 都在调节雄性生殖细胞分化过程中起到重要作用。

2 sncRNA 的结构与功能

2.1 miRNA 的结构与功能

miRNA 是一种约 19–25 nt 长度的高度保守的内源性非编码小分子 RNA, 在动物睾丸的发育成熟、生殖细胞的功能分化以及精子发生过程中发挥着重要作用^[11]。miRNA 以单拷贝、多拷贝或基因簇等多种形式存在于基因组中, 主要由基因间隔区、内含子区转录而来^[9]。这一类 sncRNA 的表达具有组织特异性, 但在不同生物体又表现出较高的同源性。

大量实验证据表明, miRNA 可能是不同类型的组织细胞调控基因表达的重要元件, 尤其是在睾丸组织中, 现已发现对精子的发育起到至关重要的作用。大多数哺乳动物的 mRNA 都是 miRNA 的保守靶位, 主要是通过转录修饰后 mRNA 的 3' UTR 区结合来抑制 mRNA 翻译, 与 mRNA 的作用结合部分高达 2–7 个核苷酸; 这类 sncRNAs 与编码蛋白的基因间有着较大的关联性, 因为许多基因编码蛋白都会受到 miRNA 路径的调控^[12]。在 miRNA 的调控机制中其表达与相关因子呈现负相关, Björk 等^[13]发现在睾丸组织中富含 miR-18, 精子形成过程中它的表达与热休克因子 2 (HSF2) 的表达呈现负相关, 曲精小管中抑制 miR-18 的表达会导致 HSF2 蛋白水平增加、调控 HSF2 靶基因的表达。在精子形成过程中, 许多组织如何利用 miRNAs 来控制基因的表达, miRNA 通路中 miRNAs 的调控作用和靶位结合, 目前这一系列的具体机制尚未明确; 只是在圆形精细胞的拟染色体上发现了 miRNA 和 miRNA 相关蛋白, miRNA 路径中其他组件蛋白在拟染色体外。

miRNA 的编码序列在基因组中全部能够找到, 但将近 50% 位于内含子区^[14]。miRNA 的生成主要是由这部分序列编码的, 形成初始 miRNA (pri-miRNA) 后经加工成为前体 miRNA (pre-miRNA),

最后剪切成为成熟的 miRNA。pri-miRNA 由 miRNA 相应的基因序列在 RNA 聚合酶 II 的作用下转录形成的产物,此时在核内的 pri-miRNA 具有一个长的发卡茎环结构,发卡尾部还有两条单链;然后被双链 RNA 核酸内切酶 Drosha 切割形成 pre-miRNA 被转运到细胞质^[5, 10, 16, 17], pre-miRNA 此时的结构与 pri-miRNA 相比是丢失了发卡尾部的单链。细胞质中 pre-miRNA 的茎环区在内切核酸酶 Dicer 的作用下切除,形成成熟的 miRNA,此时 miRNA 仍然具有前体的发卡样结构,只是失去了茎环。随后进入一个具有 AGO 蛋白的核糖蛋白复合体,这个复合体是 miRNA 诱导的沉默复合体(miRISC),在 mRNA 翻译中起到靶位锚定作用^[16]。mRNA 被锁定与否主要根据 AGO 蛋白的类型和 mRNA 与 miRNA 的互补程度^[16, 17]。例如,哺乳动物 AGO 蛋白家族中的 AGO2 是唯一能裂解 RNA 的成员,它能在 mRNA-miRNA 高度互补配对的情况下与 mRNA 结合并使其降解^[16-18]。然而,与 miRNA 互补性较低或者完全不互补配对的 mRNA 被认为是封存在细胞质颗粒内或是翻译抑制。通过 miRNA 引起的翻译抑制机制已经被提出,miRNA 能立即对 mRNA 的 poly-A 尾巴进行脱腺苷化,避免 poly-A 绑定蛋白结合而发生有效翻译^[19]。此外,AGO2 绑定在修饰过的 mRNA 的 5' 端,与真核起始因子 4E (eIF4E) 竞争结合位点,从而阻止翻译起始^[20],同时 eIF6 阻止功能型核糖体 80s 亚基的形成^[21]。另一方面,miRNA 也能促进翻译的发生,但是仅限于细胞处于增殖状态或 mRNA 靶位的 3' UTR 富含腺嘌呤和鸟嘌呤核糖核苷酸。

在小鼠发育早期阶段,让小鼠条件性的失去 Drosha 或 Dicer 酶类,精子形成会被阻断,由此睾丸中 miRNA 功能机制的研究对精子发育十分重要。通过部分纯化的生殖细胞或是整个睾丸组织的表达模式研究发现,小鼠或人类的睾丸中都有其特有的 miRNA 类群^[22-31],其中已发现部分参与哺乳动物精子的形成。

2.2 piRNA 结构与功能

正如前面所提到的,snRNA 的生物学功能对精子的形成过程至关重要。piRNA 是另一类内源性

snRNA,其核苷酸长度为 24-30 个左右,它的产生不依赖 Dicer 酶,而是与 piwi 蛋白作用^[30]。随着物种不断的进化,piRNA 基因序列具有较低的保守性,但这类分子仍有活性,在果蝇中,piRNAs 主要存在于胚胎、雌性和雄性生殖系中,编码 piRNAs 的基因主要位于基因组重复区域的转座元件中,piwi 通路在精子形成过程中有沉默逆转录转座子的特定作用^[31, 32]。在哺乳动物中,区别于果蝇,piRNAs 主要富集在雄性生殖系,且编码 piRNAs 基因序列主要存在于不含有转座子等重复序列的未注释的基因间区域内^[33]。然而,目前对于起源于转座元件外的 piRNAs 的功能仍然未知。有实验表明,转座子的控制与精子的发生有关,有利于保护遗传信息的稳定传递^[34-36]。缺乏 piwi 通路元件的动物模型表现为雄性不育,例如,敲除 MIWI, MILI 或 MIWI2 基因,都会造成小鼠精子产生明显缺陷,表现为雄性不育这也揭示了 piRNA 与精子形成的相关性^[30, 37]。

piRNA 具有广泛的多样性,大约有上百万种类别,与仅有几百种的 miRNA 相比数目就显得庞大许多,这种多样性可能主要来源于对前体 piRNA 的剪切加工。在精子形成过程中,piRNA 的序列大小与特异性变化很大,哺乳动物中主要将其分为两类:粗线前期 piRNA 与粗线期 piRNA^[5, 37]。piRNA 序列包含重复序列、来自基因间和基因区域的序列,由此大多数 piRNAs 定位于基因组的簇集位点,存在于遗传序列之间、遗传序列内部以及外部。粗线前期 piRNA 富含重复序列,主要与 MIWI2 和 MILI 两种蛋白结合;而粗线期 piRNA 大多是基因间 DNA 编码的序列,主要与 MILI 和 MIWI 蛋白结合,这一类分子通常出现在精母细胞的粗线期和圆形精细胞中^[34, 38-41]。在刚出生几天小鼠的睾丸组织中主要发现的是粗线前期 piRNA,在产后 14.5 d 小鼠体内发现,精细胞发育进入到第一次减数分裂的粗线期时,粗线期 piRNA 出现^[42]。有趣的是这些粗线期 piRNA 在成年小鼠 piRNA 总量中所占比例高于 95%,转录因子 A-MYB 通过直接调控 piRNA 转录本和参与 piRNA 通路的蛋白组件的编码基因来促进起始粗线期 piRNA 的产生^[42]。

piRNA 通路十分复杂,且目前尚未有明确定论。piRNA 通路不同于 miRNA 路径,它不依赖

Dicer 酶活动。目前大多认为有两种通路,对初始 piRNA 进行初级加工,再通过“乒乓”扩增效应机制扩增 piRNA 且 piwi 蛋白具有酶切活性,由此来促进 piRNA 前体形成 piRNA。在小鼠前精原细胞的粗线前期,piRNA 是仅通过前体初级加工而成的产物,后续在初级精母细胞和次级精母细胞中“乒乓”效应机制是主要的生物途径^[43]。在初始加工中,piRNA 前体是一条长的单链 RNA,由 piRNA 基因簇转录而来,包括正义链和反义链;正义 piRNA 前体优先与 MILI 绑定活化转座子元件,反义前体 piRNAs 次级加工产物大多与 MIWI2 作用,能在转录水平通过 DNA 甲基化沉默转座子;其 5' 端与 piwi 蛋白家族成员相连,3' UTR 被剪切产生特异的 piRNA^[32, 38, 43, 44]。关于“乒乓”扩增机制,piwi 蛋白(小鼠中的 MILI)能识别初始 piRNA 前体,在其距离 5' 端 10th 的位置结合产生切割活性,形成次级 piRNA 前体^[32, 44];在这个位置上次级 piRNA 前体被另一个 piwi 蛋白 MIWI2 识别结合并扩增,扩增出来的则是初始 piRNA 前体又再一次被 MILI 识别进入下一个扩增循环。MILI 偏向于与初始 piRNA 前体结合,MIWI2 则更易与次级 piRNA 前体结合,在“乒乓”机制中各司其职^[40]。通过“乒乓”循环同时产生的 piRNA,转座子转录本由 piRNA 诱导的沉默复合体降解^[44, 45],这个机制只有在初生小鼠的睾丸组织中能观察到,而成年小鼠中却没有,成年小鼠中 MIWI2 不表达,说明 MILI 和 MIWI 涉及 piRNA 的初始加工^[46]。

3 sncRNA 对雄性动物生育能力的影响

物种的起源和自我维护会依靠一种生殖隔离机制,即排斥与其他物种进行基因交流。其中一种生殖隔离机制的表现形式是雄性不育,许多自然杂交的后代可以存活,但是其雄性个体往往表现为完全不育或者部分不育。杂种雄性不育个体通常在两个水平上发育受到影响:一是性腺发育;二是精子形成。性腺发育受阻,不能发育成完整的睾丸因此表现为雄性不育,或是产生较小的睾丸进而有可能导致产生精子数量偏少。精子形成水平上一般存在两方面问题,一是生精过程受阻导致产生的精子数量不足或不产生精子;二是产生异常精子。sncRNA 会

调控精子的形成对雄性动物的生育能力产生影响。这方面的研究开始于睾丸组织切片、精子形态数量的观察研究,并逐步从组织形态观察过度到分子层面的研究,大量研究表明挖掘雄性不育的机理更有助于了解或解决雄性不育的问题。目前对精子形成过程中的 sncRNA 研究已初见成就,下面主要描述 3 种 miRNA,即 miR-122、miRNA-383、mir146,在雄性不育精子形成过程中的研究进展。

精子异常是雄性不育的主要因素,其发病机理仍不明确。MicroRNA 在不育男性患者异常精子中的作用还未被研究清楚。Liu 等^[46]用人类诱导多能干细胞探究 miR-122 在体外表达对精细胞分化的影响;在诱导以后,用 miR-122 突变体转染已形成细胞的精子,再用流式细胞仪分析细胞形精子的单倍体细胞群中 DNA 含量,miR-122 突变体转染细胞的 DNA 含量明显比正常 miR-122 转染细胞的有所增加。诱导过程中,突变体 miR-122 转染细胞中的核转换蛋白 2 (TNP2) 含量和鱼精蛋白的 mRNA、蛋白水平含量都比正常 miR-122 转染细胞中的要高^[47]。对两组转染的细胞进行蛋白质分析,脂蛋白含量存在显著差异。研究表明 miR-122 与精子变形有关,miR-122 可能通过抑制 TNP2 的表达来影响细胞形成精子,并抑制精子发育过程中蛋白质的表达。

最近研究发现 miRNA-383 的异常表达也与雄性不育有关。miRNA-383 的表达在精子成熟性障碍不育男性的睾丸组织中相对下调,但其在精子形成过程中的作用机制和功能还不清楚。Tian 等^[47]的研究发现,在小鼠睾丸组织中有 88 种 miRNAs 与 X 脆性智力低下蛋白 (FMRP) 有关,其中也包括 miRNA-383。敲除 *Fmr1* 基因 (X 脆性智力低下蛋白基因) 以后,睾丸畸胎瘤细胞 (NT-2) 中 FMRP 变低,miRNA-383 对细胞增殖的抑制作用增强,FMRP 与 miRNA-383 作用大幅度减少,影响 miRNA-383 与靶基因 3'-UTR 区的结合,比如,干扰素调节因子 1 (IRF1) 和细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) mRNA 的 3'-UTR 区。另一方面,精原细胞和 NT-2 中 miRNA-383 的过度表达能下调 FMRP 的水平含量。miRNA-383 直接与细胞周期蛋白 D1 结合,抑制其基因的下游效应元件,减少 FMRP 的表达。在 FMRP 下调表达的病人和敲除 *Fmr1* 基因

的小鼠睾丸中都有发现,降低 miRNA-383 的表达,miRNA-383 的下游基因表达异常。通常认为在精子形成过程中 FMRP 和 miRNA-383 之间可能存在一种反馈链,FMRP 对 miRNA-383 的功能起负调控作用。FMRP 通过与 miRNA-383 和它的靶位 IRF1/ Cyclin D1 结合来影响 miRNA-383 与其 3'-UTR 作用并调控 miRNA-383 的功能。

Huszar 等^[48]发现 mir146 生物合成受阻会破坏精子形成从而导致雄性小鼠不育,此外还发现小鼠体内 mir146 高度调节精原细胞的分化,这个过程有赖于视黄酸信号。相对于分化的精原细胞, mir146 在未分化的精原细胞中含量较高, mir146 直接作用靶标是中间复合体 1, mir146 与中间复合体亚基 1(一种类维生素 A 受体的辅助调节因子)的 3' UTR 区结合。mir146 的表达水平会影响精原细胞转录本的水平,一般过分表达会减少精原细胞过程中的转录本水平,如在未分化的精原细胞中 mir146 过分表达会减少中间复合体 1 转录本和蛋白水平,反之,抑制 mir146 会影响精原细胞分化的相关基因表达上调,这样培养的细胞往往不能正常分化为精子,可能导致细胞凋亡。体外暴露在视黄酸下的雄性生殖细胞会诱导精原细胞的分化及后来精母细胞的减数分裂。研究发现暴露在视黄酸条件下的精原细胞 mir146 会被下调,精原细胞在转录水平上响应视黄酸诱导而促进分化,生殖细胞成分中已分化精细胞趋于含量更低,由此看来在分化过程中依靠视黄酸信号来调节精细胞的分化过程。

国内对动物 sncRNA 方面的研究亦随着小分子 RNA 研究的兴起而逐渐被重视,有研究者利用动物模型对 sncRNA 在精原干细胞分化过程中的作用或生殖干细胞中的表达做了一定的研究。例如,在 miR-34 家族中的 miR-34c,在细胞内的多个过程中都有作用,对精子发生过程也有重要的调控作用。Nanos 是一类进化保守的 RNA 结合蛋白,在生殖细胞(包括原始生殖细胞和生殖干细胞)发育中发挥功能。在小鼠中, Nanos2 在精原干细胞中表达,在精子发生过程中具有维持干细胞多能性的作用。于萌等^[49]以 miR-34c 作为研究对象,预测发现 Nanos2 是 miR-34c 的靶基因之一,构建其双荧光素酶报告基因载体及双荧光素酶报告基因突变载

体验证靶基因,通过在分离的原代及传代精原干细胞中转染合成的 miRNA 模拟物、抑制物,及使用含有 miR-34c 慢病毒颗粒转导小鼠的曲细精管,检测、分析生殖细胞分化特异性标志基因的变化,深入研究了 miR-34c 对生殖细胞分化特异性标志基因的调控作用,研究结果证实 miR-34c 可能会通过靶向 Nanos2 以促进精原干细胞的分化。徐璐等^[50]以原始生殖细胞和精原干细胞为细胞模型,利用 Real-time qPCR 技术检测了 Piwil1 基因在如皋黄鸡生殖系干细胞中的相对表达量。结果表明, Piwil1 基因在生殖系细胞中特异性表达,且 Piwil1 基因在精原干细胞中的表达量显著高于原始生殖细胞,这表明 Piwil1 基因可能在精原干细胞的“DNA 重新甲基化”以及自我更新过程中发挥重要作用。

精子的形成过程是雄性不育研究的重点,但是目前都还处于起步阶段,很多机理及作用机制还未研究清楚,也许将来这方面会成为 sncRNA 的研究热点,同时也对雄性问题不育研究提供参考,有望解决动物遗传育种方面的雄性不育问题。

4 在动物遗传育种中应用

杂种雄性不育在物种间是一种普遍的生殖隔离现象,然而很少知道导致这种不育现象的发生原因,尤其是在自然杂交的物种中。为探究雄性不育的原因, Lisa 等^[51]以蟾蜍为研究对象,使美国西南部地方的平地蟾蜍和墨西哥蟾蜍杂交得到杂交后代发现,杂种后代可以存活,但雄性杂交后代生育能力降低。比较杂交后代和正常蟾蜍的睾丸大小和不同发育阶段生殖细胞的形成状态发现,杂交雄性后代的睾丸大小与纯种的不同,杂交个体中睾丸大小变异范围比较大。精细胞形成早期阶段数目与纯种相似,但是成熟精子的形成明显少于纯种的。渗入过其他物种基因的个体产生的精细胞要么异常畸形要么不具游动性。这些结果表明,杂种的不相容性在精子的后期发育中也是种间繁殖的屏障。类似的试验在国内也曾做过,余劲聪等^[52]在牦牛和杂交后代犏牛上做过组织形态学、精子发生过程研究。犏牛,即牦牛和普通黄牛的杂种。牦牛主要分布于以青藏高原为中心及其毗邻的高山、亚高山地区的特有牛种,对高寒草地的生态环境有极强的适应性,在空气

稀薄、牧草生长期短、寒冷和枯草期长的恶劣环境下生活自如,繁衍后代,为当地牧民提供奶、肉、毛、役力及燃料等生产、生活必需品,是当地不可或缺畜牧业经济^[53]。但是繁殖能力在2年一胎或3年一胎的水平,无法满足当地牧民的需求,于是想通过牦牛与普通牛杂交得到较高繁殖力、较高产奶量等经济价值较高的杂种牛即犏牛。杂交代(犏牛)产奶量高,但雄性不育,而母犏牛无论与普通牛回交还是与牦牛回交,生产的后代生产性能都低下。若能解决犏牛的雄性不育问题则有助于提高当地畜牧业经济,从而能解决犏牛这种较高经济性状的繁殖问题以满足人类所需。

目前关于miRNA通过对关键基因的转录后水平调控来介导精子生成的遗传机制的报道较少,有关动物miRNAs基因功能以及与动物繁殖性状相关的miRNAs也鲜有研究。Chen等^[54]在对水稻细胞质雄性不育系研究中,设计了一个转基因的方法来改善植物的高度和雄性不育系杂交水稻圆锥花序的延伸和培养杂交半矮秆植物。使用方法包括两个部分:人工microRNA(amiRNA)和人工靶序列模拟,可以篡改内源性Eui1基因(与水稻节间伸长有关)的差异表达。amiRNA是近年来发展起来具有较高特异性基因沉默的方法,而人工靶序列模拟具有天然抑制miRNA功能机制的特点,是最近发展起来的一种方法。这种方法提供了一个范例,通过与amiRNA结合和人工靶序列模拟技术,调节内源基因的表达和实现所需的表型。

5 展望

综上所述,有望通过对犏牛和普通牛睾丸组织的sncRNAs的深入研究解决犏牛的雄性不育问题,可对精子形成过程中研究比较多的miRNA、piRNA及其靶位进行人工干预。随着研究的不断展开和深入,对于miRNA在精子形成中的作用及其机制的阐明,以及利用多种分析预测手段研究miRNA与精子形成中各调控蛋白组成的关系,将会使人们对高等真核生物基因表达调控的网络理解提高到一个新的水平,对miRNA作用机制的研究可以为解决雄性不育问题奠定理论基础,也可对未来采用小分子干预生殖调节、治疗生殖相关疾病以及动物育种方面的

问题提供新策略。

参考文献

- [1] Saxe Jonathan P, Lin HF. Small noncoding RNAs in the germline [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011, 3: a002717.
- [2] Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells [J]. Nature, 2005, 434 (7033): 583-589.
- [3] Papaioannou MD, Nef S. microRNAs in the testis: building up male fertility [J]. Journal of Andrology, 2010, 31 (1): 26-33.
- [4] Meikar O, Da Ros M, Korhonen H, Kotaja N. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells [J]. Reproduction, 2011, 142 (2): 195-209.
- [5] Balakirev ES, Ayala FJ. Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? [J] Annu Rev Genet, 2003, 37: 123-151.
- [6] Holley RW, Apgar J, Zamir A. Structure of a ribonucleic acid [J]. Science, 1965, 147 (3664): 1462-1465.
- [7] Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40 (14): 6391-6400.
- [8] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. Cell, 2011, 147 (2): 358-369.
- [9] 罗立凡. 猪性成熟前后睾丸组织差异表达miRNA鉴定及功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 1-9.
- [10] Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, et al. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline [J]. Developmental Cell, 2011, 20 (3): 364-375.
- [11] Thomas M, Lieberman J, Lal A. Desperately seeking microRNA targets. [J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2010, 17 (10): 1169-1174.
- [12] Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. Genome Research, 2009, 19 (1): 92-105.
- [13] Björk JK, Sandqvist A, Elsing AN, et al. miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis [J]. Development, 2010, 137 (19): 3177-3184.
- [14] Shomron N, Levy C. MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing

- crosstalk [J]. Biomed Research International, 2009, 2009 : 594678.
- [15] Yokota S. Historical survey on chromatoid body research [J]. Acta Histochem Cytoc, 2008, 41 : 65-82.
- [16] McIver SC, Roman SD, Nixon B, et al. miRNA and mammalian male germ cells [J]. Human Reproduction Update, 2012, 18 (1) : 44-59.
- [17] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10 (2) : 126-139.
- [18] Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi [J]. Science, 2004, 305 (5689) : 1437-1441.
- [19] Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, et al. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system [J]. Genes & Development, 2007, 21 (15) : 1857-1862.
- [20] Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinak S, et al. An mRNA m⁷G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation [J]. Cell, 2007, 129 (6) : 1141-1151.
- [21] Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6 [J]. Nature, 2007, 447 (7146) : 823-828.
- [22] Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, et al. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline [J]. Biology of Reproduction, 2008, 79 (4) : 696-703.
- [23] Romero Y, Meikar O, Papaioannou MD, et al. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects [J]. PLoS One, 2011, 6 (10) : e25241.
- [24] Wu Q, Song R, Ortogero N, et al. The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287 (30) : 25173-25190.
- [25] Yu Z, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA Mirm122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage [J]. Biology of Reproduction, 2005, 73 (3) : 427-433.
- [26] Ro S, Park C, Sanders KM, et al. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs [J]. Developmental Biology, 2007, 311 (2) : 592-602.
- [27] Yan N, Lu Y, Sun H, et al. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues [J]. Reproduction, 2007, 134 (1) : 73-79.
- [28] Smorag L, Zheng Y, Nolte J, et al. MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis : Evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203 and-34b-5p mediated spermatogenesis regulation [J]. Biology of the Cell, 2012, 104 (11) : 677-692.
- [29] Bao J, Li D, Wang L, et al. MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287 (26) : 21686-21698.
- [30] Klattenhoff C, Theurkauf W. Biogenesis and germline functions of piRNAs [J]. Development, 2008, 135 (1) : 3-9.
- [31] Chuma S, Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences, 2013, 368 (1609) : 20110338.
- [32] Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race [J]. Science, 2007, 318 (5851) : 761-764.
- [33] 张颖. 鸡 piRNAs 的克隆, 表达及体外抑制 Piwi 基因表达的研究 [D]. 扬州 : 扬州大学, 2012 : 2-3.
- [34] Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins [J]. Nature, 2006, 442 (7099) : 199-202.
- [35] Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, et al. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons [J]. Genes & Development, 2010, 24 (9) : 887-892.
- [36] Reuter M, Chuma S, Tanaka T, et al. Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2009, 16 (6) : 639-646.
- [37] Pillai RS, Chuma S. piRNAs and their involvement in male germline development in mice [J]. Development, Growth & Differentiation, 2012, 54 (1) : 78-92.
- [38] Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes [J]. Nature, 2006, 442 (7099) : 203-207.
- [39] Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice [J]. Molecular Cell, 2008, 31 (6) : 785-799.

- [40] Reuter M, Berninger P, Chuma S, et al. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing [J] . *Nature*, 2011, 480 (7376) : 264-267.
- [41] Li XZ, Roy CK, Dong X, et al. An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes [J] . *Molecular Cell*, 2013, 50 (1) : 67-81.
- [42] Siomi MC, Sato K, Pezic D, et al. PIWI-interacting small RNAs : the vanguard of genome defence [J] . *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12 (4) : 246-258.
- [43] Ishizu H, Siomi H, Siomi MC. Biology of PIWI-interacting RNAs : new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines [J] . *Genes & Development*, 2012, 26 (21) : 2361-2373.
- [44] Luteijn MJ, Ketting RF. PIWI-interacting RNAs : from generation to transgenerational epigenetics [J] . *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14 (8) : 523-534.
- [45] Beyret E, Liu N, Lin H. piRNA biogenesis during adult spermatogenesis in mice is independent of the ping-pong mechanism [J] . *Cell Research*, 2012, 22 (10) : 1429-1439.
- [46] Liu T, Huang Y, Liu J, et al. MicroRNA-122 Influences the development of sperm abnormalities from human induced pluripotent stem cells by regulating TNP2 expression [J] . *Stem Cells and Development*, 2013, 22 (12) : 1839-1850.
- [47] Tian H, Cao YX, Zhang XS, et al. The targeting and functions of miRNA-383 are mediated by FMRP during spermatogenesis [J] . *Cell Death & Disease*, 2013, 4 (5) : e617.
- [48] Huszar JM, Payne CJ. MicroRNA 146 (Mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice [J] . *Biology of Reproduction*, 2013, 88 (1) : 15.
- [49] 于萌. miR-34c 在 小 鼠 精 原 干 细 胞 体 外 分 化 过 程 中 的 作 用 [D]. 杨凌 : 西北农林科技大学, 2013 : 1-2.
- [50] 徐璐, 陈蓉, 徐琪, 等. il1 基 因 在 鸡 生 殖 系 干 细 胞 中 的 表 达 研 究 [J] . *中国家禽*, 2014, 7 : 13-16.
- [51] Wünsch LK, Pfennig KS. Failed sperm development as a reproductive isolating barrier between species [J] . *Evolution and Development*, 2013, 15 (6) : 458-465.
- [52] 余劲聪, 潘春, 马正花, 等. 牦牛远缘杂种雄性不育的研究现状 [J] . *西南民族大学学报 : 自然科学版*, 2008 (S1) : 16-19.
- [53] 钟金城. 牦牛遗传与育种 [M]. 成都 : 四川科学技术出版社, 1996.
- [54] Chen H, Jiang S, Zheng J, Lin Y. Improving panicle exertion of rice cytoplasmic male sterile line by combination of artificial microRNA and artificial target mimic [J] . *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11 (3) : 336-343.

(责任编辑 狄艳红)