

piRNA/PIWI 功能调控与精子发生

袁志恒^{1,2}, 赵艳梅²

1. 中国科学院大学, 北京 100049;
2. 中国科学院生物物理研究所, 核酸生物学重点实验室, 北京 100101

摘要: piRNAs(PIWI-interacting RNAs)是一类与 PIWI 相互作用的小非编码 RNAs(small noncoding RNAs, sncRNAs), 其长度介于 24~32 nt, 特异性地在动物生殖腺细胞中表达。近来研究表明 piRNA/PIWI 系统在动物生殖腺细胞的基因组转座元件沉默及转录后调控 mRNAs 方面具有重要功能。最近, 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所刘默芳课题组的一项研究表明, 在人和小鼠的精子发生过程中, PIWI(鼠源同源蛋白 MIWI、人源同源蛋白 HIWI)的严格代谢调控至关重要。以此为契机, 本文综述了 piRNA/PIWI 在哺乳动物(主要是小鼠和人)精子发生过程中调控功能的研究进展。

关键词: 精子发生; piRNAs; PIWI; MIWI

The regulatory functions of piRNA/PIWI in spermatogenesis

Zhiheng Yuan^{1,2}, Yanmei Zhao²

1. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
2. Key Laboratory of RNA Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: A class of 24–32 nt PIWI-binding small noncoding RNAs (sncRNAs) termed as PIWI-interacting RNAs (piRNAs) have been identified in animal germline. Recent studies suggest that piRNA/PIWI pathway plays a critical role in both silencing of transposons and posttranscriptional regulation of mRNAs in animal germline. A study from Dr. Mofang Liu's lab in Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, reveals the physiological and pathological importance of PIWI metabolism (mouse PIWI as known as MIWI; human PIWI as HIWI) in mammalian spermatogenesis. Here, we summarize our current understanding of the piRNA/PIWI pathway in mammals (focusing on mouse and human), which is emerging as a fundamental component of spermatogenesis that ensures male fertility and genome integrity.

Keywords: spermatogenesis; piRNAs; PIWI; MIWI

精子发生(spermatogenesis)是一个复杂分化过程, 双倍型的精原干细胞经此过程分化成高度特异性的单倍型精子^[1]。该过程可分为 3 个时期: (1)精原细胞有丝分裂期: 由原始生殖细胞(primordial

收稿日期: 2017-07-25; 修回日期: 2017-08-10

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31371357, 31571436)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31371357, 31571436)]

作者简介: 袁志恒, 博士研究生, 专业方向: 细胞生物学。E-mail: yuanzhiheng89@126.com

通讯作者: 赵艳梅, 博士, 副研究员, 研究方向: 精子发生与激活的调控机理。E-mail: zhaoy@ibp.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-245

网络出版时间: 2017/8/15 16:03:56

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170815.1603.001.html>

germ cell, PGC)分化而来的精原干细胞进行有丝分裂,产生两类子细胞。一类子细胞用以维持自身数量的恒定,另一类进入分化途径,经多次有丝分裂形成初级精母细胞;(2)精母细胞减数分裂期:初级精母细胞经过一次 DNA 复制两次细胞分裂依次产生次级精母细胞、圆形精子细胞;(3)精子形成期(spermiogenesis):圆形精子细胞进入一个复杂有序的精子形成过程,包括鱼精蛋白取代组蛋白、形成鞭毛状尾巴、丢弃大部分细胞质,最终形成染色体高度浓缩、具有头、颈、尾的精子^[2,3]。

RNAi(RNA interference)及其相关系统是实现转录后基因沉默的关键机制之一^[4],由小非编码 RNA 靶向 Argonaute 蛋白降解或者在翻译水平上抑制与该小 RNA 互补配对的 mRNAs。基于进化分析,Argonaute 蛋白家族被分为 AGO 亚家族及 PIWI 亚家族,AGO 亚家族在多种组织中表达,而 PIWI 亚家族特异性的表达于动物生殖腺^[5]。2006 年,有 4 个独立的研究组几乎同时发现一类在生殖腺中专一表达的小非编码 RNA,因其特异性地与 PIWI 蛋白相互作用,所以被命名为 piRNA(PIWI-interacting RNA)^[6-9]。最近十年的研究发现,在哺乳动物中 piRNA 及 PIWI 亚家族特异性地睾丸组织中表达,主要在精子发生过程中发挥功能。以下就其在哺乳动物(主要是小鼠和人类)精子发生过程的功能展开介绍。

1 介导生殖腺转座子沉默

生殖细胞发育进程中,伴随表观遗传的动态变化^[10]。形成于妊娠后 7.5 天的小鼠的 PGC 在迁移至生殖嵴的过程中,将在全基因组范围内发生渐进性的去甲基化,然后在形成于妊娠后 13.5~15.5 天的原初精原细胞(prospermatogonia)被阻断在有丝分裂的 G₁/G₀ 期,产后 3 天原初精原细胞恢复有丝分裂,妊娠后 15.5 天至产后 3 天是生殖细胞重建甲基化的关键时期。全局范围内去甲基化行为,一方面导致基因表达活性上调,另一方面导致转座子活性加强。在非生殖腺细胞,机体通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰及适应性的 RNAi 介导转座子沉默^[11-13],生殖腺特异性的 piRNA/PIWI 系统则参与生殖腺细胞基因组转座子的沉默^[14-17]。

小鼠基因组编码 3 个 PIWI 亚家族蛋白的基因,分别为 *Miw12*、*Mili* 和 *Miwi*,其编码的蛋白在进化上都有保守的 3 类结构域:PAZ(Piwi-Argonaute-Zwille)、PIWI 和 MID(Middle domains)^[18]。这 3 个基因的表达模式具有一定的发育进程及空间特异性,提示可能通过一种相互协调而非冗余的模式调控生殖细胞发育(图 1)。*Mili* 的表达从妊娠后 12.5 天的 PGC 持续到产后 20 天圆形精子细胞,产前 MILI 定位于细胞质中斑点状颗粒中,产后定位于细胞质的拟染色体颗粒中,而且 MILI 是唯一在雌性生殖细胞

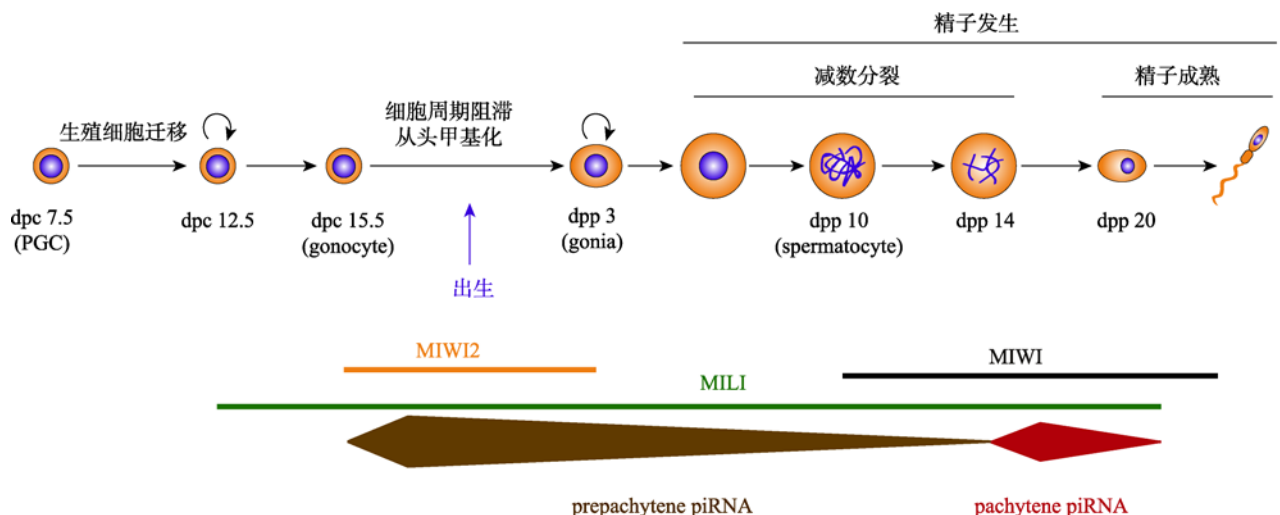


图 1 小鼠中精子发生过程中 3 个 PIWI 蛋白及 piRNAs 的表达模式

Fig. 1 Expression patterns of MILI, MIWI, MIWI2, and mouse piRNAs during spermatogenesis

dpc(days post cyphoria)指妊娠后的天数;dpp(days postpartum)指产后的天数。

中表达的 PIWI 蛋白^[19]。*Miwi2* 的表达从妊娠后 14.5~15.5 天的生殖细胞持续至分娩, 产后 *MIWI2* 的表达急剧降低, 产后 4 天其表达检测不到。*MIWI2* 的定位呈现两相性, 即定位于细胞核又定位于细胞质。*Miwi* 的表达从产后精母细胞持续到晚期的精子细胞(延伸过程中的及已完成延伸的精子细胞), 但在成熟的精子中检测不到^[20,21]。目前, 关于小鼠 PIWI 蛋白如何实现这种时空性的表达的调节机制还不甚清楚。

Mili 雄性敲除小鼠出现不育, 是因为其精子发生被阻断在第一次减数分裂的前期^[22], 不过雄性小鼠的 PGC 的发育及雌性小鼠生殖细胞的发生均不受影响。*Miwi2* 雄性敲除小鼠具有类似的表型^[23]。进一步分析发现, *Mili* 和 *Miwi2* 分别敲除后, 都将导致胚胎期小鼠生殖细胞逆转座子的转录活性增加及 DNA 甲基化程度降低^[19,24,25]。

通过分离不同发育时期的 piRNA/MILI、piRNA/MIWI2 复合体及联合测序分析发现, 与 MILI 结合的 piRNAs 长度为 26 个碱基, 与 MIWI2 结合的 piRNAs 长度为 28 个碱基^[19,25]。由于 MILI 表达时期跨度大, MILI 可结合粗线期前期和粗线期生成的两类 piRNAs, 而 MIWI2 只结合粗线期前期的 piRNAs。其中一项研究对比分析了 MILI 结合的 piRNAs 序列特征发现, 66.8% 的粗线期前期 piRNAs 和 82.9% 粗线期 piRNAs 匹配到单一基因组位点。粗线期前期的 piRNA 主要分为三类, 第一类(35%)对应于逆转座子的重复序列, 包括短散在元件(SINEs)、长散在元件(LINEs)以及长末端重复序列(LTR), 而对应于重复序列的粗线期 piRNA 占比在 17%, 而且其 80% 的序列均匀的分布于基因组; 第二类(29%)对应于基因序列, 包括外显子和内含子; 第三类(28%)匹配到还未被注释的序列^[24]。另一项研究对比分析了 MILI、MIWI2 结合的 piRNAs 发现, 相比于 MILI 而言, MIWI2 结合的粗线期前期 piRNAs 更多的来源于 LTR 和 LINE。*Mili* 突变体中, LTR 和 LINE 来源的 piRNAs 几乎完全缺失^[19]。另一项研究对比分析 *Mili*、*Miwi2* 突变体及野生型中妊娠后 16.5 天的生殖细胞中与重复序列相关 piRNAs 的表达水平发现, *Mili*、*Miwi2* 突变后重复序列相关的 piRNAs 的表达水平呈不同水平的降低^[25]。以上分析表明, 在精子发生过

程中 MILI 和 MIWI2 以不同的偏好性结合转座子来源的 piRNAs, MILI 结合的 piRNAs 呈现发育进程动态变化。

DNA 甲基化是机体沉默转座子实现基因组稳定性的方式之一^[12]。甲基转移酶 DNMT1 负责维持有丝分裂中子链 DNA 甲基化状态^[26], DNMT3L 特异性地在生殖细胞中作用负责 DNA 从头甲基化^[27]。*dnmt3L* 突变后, 对应于 LTR 和 LINE 的 piRNAs 显著上调^[19], 可能是 LINE 和 LTR 甲基化缺失所致。以上结果及 *Mili*、*Miwi2* 敲除后, 小鼠的产前生殖细胞的逆转座子的转录活性增加及 DNA 甲基化程度降低, 说明 piRNAs-PIWI 可能通过介导转座子的从头甲基化, 进而沉默转座子从而在转录水平上维持基因组稳定。然而, 目前 piRNAs 介导转座子从头甲基化的详细生化过程还不清楚。

不同于 MILI 和 MIWI2 在转录水平上介导转座子沉默, MIWI 在转录后水平介导转座子 LINE1 沉默。De Fazio 等^[28]报道 MILI 核酸内切酶结构域参与启动 piRNAs 乒乓循环式的生成过程。催化活性缺失导致以乒乓循环方式生成的 piRNAs 缺失, 进而导致逆转座子 LINE1 沉默失败。Reuter 等^[29]发现在 MIWI 核酸内切酶催化结构域引入活性丧失的点突变后, 小鼠雄性不育, 表现为类似于 MIWI 缺失的表型。进一步的分析发现, 在 piRNAs 生成及 LINE1 甲基化未发生明显改变的情况下, 逆转座子 LINE1 表达量上调 7~22 倍。基于以上结果及测序分析发现 MIWI 结合的 piRNAs 与 LINE1 序列上互补, 推断 piRNAs 序列依赖性的引导 MIWI 靶向切割细胞质中的 LINE1, 进而介导 LINE1 沉默。以上研究丰富了 piRNAs 的调控网络, 说明 piRNAs 类似于 siRNAs 可以在不同层次调控转座子表达。

2 调控非转座子序列

piRNA/PIWI 除了调控转座子沉默, 还调控许多非转座子序列。2002 年林海帆实验室报道, MIWI 可稳定精子形成相关基因的 mRNAs^[20]。*Miwi* 雄性敲除小鼠由于精子发生被阻断在圆形精子细胞这一时期而不育, 表明 MIWI 是精子形成(spermiogenesis)这一过程的关键调节因子。CREM(cAMP-responsive element modulator)是一个转录激活因子, 介导精子

发生过程中全局范围内基因表达转变^[30-32],其突变表型类似于 MIWI。然而 *miwi* 突变体中 CREM 的表达量及亚细胞定位均不受影响,反之亦然。进一步的生化分析发现,MIWI 结合 CREM 的靶基因 *act*、*ace*、*rt7*、*tp1* 等的 mRNA。以上结果说明 MIWI 与 CREM 以一种相互独立的机制调控 CREM 的下游基因,CREM 在转录水平激活精子形成相关基因的表达,MIWI 在转录后水平结合稳定 CREM 靶基因 mRNA。目前还不清楚这种调节作用是否依赖于 piRNAs。

MIWI 不仅介导稳定 mRNAs 还可以在 piRNAs 指导下介导切割降解 mRNAs。2015 年林海帆及刘默芳等研究团队相继发现 piRNA/MIWI 以一种 siRNA-like 的方式介导切割圆形精子细胞中 mRNAs^[33,34]。分析来源于小鼠睾丸的短片段 5'-RACE 文库,发现其中有大量编码基因来源的 mRNAs 短片段,而且这些短片段的生成依赖于 MIWI 的切割活性和 piRNA 结合能力,说明这些短片段的生成是由 piRNA/MIWI 介导的。进一步的序列特性分析发现,类似于 piRNAs, mRNAs 短片段的第一和第十位的碱基偏好 U 和 A,表明 mRNAs 短片段以类似于 piRNAs 二级生成的方式,即乒乓循环的方式生成。进一步的 MIWI CLIP-seq 也证实 MIWI 在 piRNA 结合位点附件与 mRNA 相互作用。RT-PCR 分析 piRNAs 靶向切割的候选基因发现,在圆形精子细胞中靶基因的表达量显著下降。在小鼠精母细胞系 GC-2spd(ts)中构建基于报告基因荧光素酶的检测系统,证实报告基因被抑制是由于共转染的 piRNA 导致 mRNA 水平的下调。在圆形精子细胞中表达两个不能被 piRNAs 靶向切割的基因的 cDNA 导致精子形成障碍。综上所述,在精子形成过程中 piRNA/MIWI 以类似 siRNAs 的机制介导一类靶 mRNAs 的切割,而且这一过程对精子的成熟至关重要。

此外,刘默芳研究组发现,MIWI/piRNA 以一种类似 miRNA 的方式介导精子形成晚期大量 mRNA 降解。2014 年刘默芳研究组发现,小鼠 MIWI 和脱腺苷酶 CAF1 构成的 piRNA 诱导沉默复合体(pi-RISC),以一种类似体细胞中 miRNAs 的作用机制,诱导 mRNA 去腺苷化和降解^[35]。测序分析小鼠精子细胞延长进程中与 MIWI 结合的 RNAs 发现在长度

上可以分为两类:一类长 29~31 个核苷酸,对应于粗线期 piRNAs;另一类长度大于 200 个核苷酸,67% 对应于转座子,大于 20% 对应于编码蛋白的 mRNAs。几乎所有在 MIWI/RNA 复合体中富集的 mRNAs 可以匹配到一类 piRNAs。进一步的 MIWI CLIP-seq 也证实 piRNA:mRNA 对之间的相互作用。在小鼠精母细胞系 GC-2spd(ts)中构建基于报告基因荧光素酶的检测系统,也证实转染 piRNA 导致相应基因 mRNA 水平下调,PAT(poly(A) test)和 RT-qPCR 分析表明 piRNAs 诱导报告 mRNAs 脱腺苷化及降解。进一步的遗传分析证明,piRNAs 介导的 mRNAs 降解依赖于 MIWI 的 piRNA 结合活性而非切割活性。基于 CAF1 参与 miRNA 介导的 mRNA 脱腺苷化^[36],证实在延长进程中的精子细胞中 CAF1 直接与 MIWI 相互作用并组装成 pi-RISC。进一步的遗传、表达谱芯片及转录组分析证实,pi-RISC 介导精子成熟过程中大量 mRNAs 的降解,进而促进精子成熟。此外,在精子成熟过程中降解大量的 mRNAs 可能为细胞质丢弃做准备。

3 促进精子形成(spermiogenesis)

多数研究主要聚焦于 piRNA/PIWI 系统的功能及机制,一项关于 MIWI 最终命运的研究发现,在精子形成晚期 piRNA 触发 MIWI 泛素化及降解。2013 年刘默芳研究组发现,在精子形成的晚期 piRNA/MIWI 复合体以前馈的机制协同降解^[37]。piRNAs 触发小鼠 MIWI 通过 APC/C-26S 蛋白酶体通路降解,MIWI 的降解进一步促进 piRNAs 的降解。体外生化及异源表达系统证实,MIWI 与 APC/C 之间存在直接相互作用,MIWI 一旦结合 piRNAs 其构象发生改变,导致其与 APC/C 底物结合亚基 APC10 之间的相互作用增强。分析不同发育时期生殖细胞 MIWI 泛素化发现,在精子发生早期 MIWI 与 APC/C 在空间上隔离存在,MIWI 泛素化修饰发生在晚期的精子细胞,包括正在延长及完成延长的精细胞。特异性的阻断晚期精子细胞中 MIWI 泛素化修饰及降解,将导致 MIWI 蛋白和 piRNAs 积累,和精子成熟受阻。以上发现说明,在发育进程中时序性地调控 piRNA/MIWI 对精子形成是至关重要的。该研究另一方面暗示人源 PIWI-HIWI 可能是精子形成异常

并导致男性不育症发生的潜在分子靶点。刘默芳课题组在最近的一项研究证实了该推论^[38]。

不孕不育是一种普遍存在的生殖疾病,致病因素较为复杂,可由遗传或环境因素及二者一起导致^[39]。统计显示全球范围内大约 15% 的夫妇不孕不育^[40],男性因素导致的不孕不育约占一半。无精症(表现为完全不具有精液)、无精子症、少精症、弱精症、精子畸形均可导致雄性不育^[41],其中无精子症导致的不育占雄性不育的 10%~15%^[42]。目前仅有极少数与精子发生缺陷相关的遗传突变被鉴定^[43~45]。

近十年基于模式生物的研究发现,在哺乳动物中,piRNA 及 PIWI 亚家族蛋白主要在精子发生过程中发挥功能^[46~52],PIWI 亚家族缺失突变导致雄性不育。人类基因组编码 4 个序列与表达模式均保守的 PIWI 亚家族蛋白的基因,分别为 *Hiwi*、*Hili*、*Hiwi2* 和 *Hiwi3*。然而关于人源 PIWI 亚家族蛋白在人类精子发生过程中的功能目前还鲜有报道,只有两项关于 SNP 的研究^[41, 53]。基于 D-box 区及附近关键氨基酸位点突变导致 MIWI 泛素化修饰水平降低和特异性的阻断晚期精细胞 MIWI 泛素化修饰及降解导致 piRNAs 积累和精子成熟受阻^[37],推断 *Hiwi* D-box 区影响泛素化修饰的突变可能是导致男性不育的潜在原因。

为了研究在人类精子发生过程中 *Hiwi* 的功能,刘默芳及合作研究组首先测序分析无精子症患者 *Hiwi* 编码 D-box 区的序列。在 413 例无精子症患者中发现了 3 例患者 HIWI 蛋白的 D-box 区存在杂合突变,分别是 R218A/L221A、L221G/N225H 和 L221R,家系分析发现以上突变源于母本遗传或自发性突变。为了建立 D-box 突变与无精子症之间关系,研究者构建了条件性 R218A/L221A(此突变以下简称为 *Miwi*^{DB})突变敲入小鼠模型,表型研究显示 *Miwi*^{DB} 敲入导致小鼠雄性不育、精子形态异常以及细胞核结构疏松。*Miwi*^{DB} 敲入小鼠在转录组及 piRNAs 水平未见明显异常,蛋白质组分析发现 19 个蛋白明显上调,包括多个组蛋白及组蛋白变体。进一步分析发现,伴随组蛋白的上调,出现鱼精蛋白 PRM1 和 PRM2 下调以及组蛋白-鱼精蛋白转换过程中的过渡蛋白 TNP1 滞留于细胞质。以上发现说明, *Miwi*^{DB} 敲入导致小鼠组蛋白-鱼精蛋白转换异常。转基因小

鼠模型进一步确认,在精子细胞中表达 R218A/L221A 突变 MIWI 蛋白导致 MIWI 在晚期精子细胞中积累、精子形成受阻及雄性不育。

在精子形成过程中将发生组蛋白被鱼精蛋白取代,这一过程称之为组蛋白-鱼精蛋白转换:组蛋白首先被过渡蛋白 TNP1 和 TNP2 取代,随后 TNP1 和 TNP2 被鱼精蛋白 PRM1 和 PRM2 置换,鱼精蛋白促进染色质进一步压缩及包装到精子头部^[54,55]。Roes 等^[56]发现泛素结合酶 HR6B 缺失导致组蛋白-鱼精蛋白转换异常及雄性小鼠不育。2010 年, Lu 等^[57]证实泛素连接酶 RNF8 介导的组蛋白泛素化触发精子形成过程中组蛋白-鱼精蛋白转换。*Miwi*^{DB} 敲入导致组蛋白 H2A 和 H2B 泛素化水平降低,进一步分析发现 *Miwi*^{DB} 敲入导致 RNF8 被阻断在细胞质中。生化分析发现,MIWI 与 RNF8 之间存在直接的相互作用, D-Box 突变导致 MIWI 细胞质中的累积,一方面抑制了 RNF8 入核,另一反面直接抑制 RNF8 的活性,最终影响精子发生过程中组蛋白的泛素化以及进一步的组蛋白-鱼精蛋白替换过程。通过在 *Miwi*^{DB} 敲入小鼠模型中表达与 MIWI 相互作用的肽段 RNF8-N 可以功能性的挽救小鼠精子活力。以上说明,在精子形成晚期,MIWI 的适时降解可以促进 RNF8 进入细胞核泛素化修饰组蛋白,进而促进组蛋白-鱼精蛋白转换以及精子成熟。相关的机制如图 2 所示。

该研究属首次发现人源 PIWI-HIWI 在生殖系统中的功能。具有以下 3 个方面的意义:(1)建立了人源 D-box 区突变与无精症之间的直接相关性,为部分男性不育临床治疗提供了新思路。由于精子发生是一个极为复杂的分化与细胞命运决定的过程,理论上其中任一发育事件的缺陷均可导致无精子症,即无精子症应是一单因素作用或多因素联合作用导致的疾病。这也解释了为什么 413 例无精症患者中只有 3 例患者的 HIWI D-box 检测到突变。在小鼠模型中引入无精子症患者中发现的 D-box 突变可导致小鼠呈现精子形成障碍、雄性不育表型,说明 D-box 突变与此类男性不育紧密相关。(2)该研究可作为进一步研究人源 PIWI 在生殖系统中功能的研究范式。首先,测序分析临床患者样本与对照组之间基因序列的差异,然后构建相关突变的动物模型,对动物

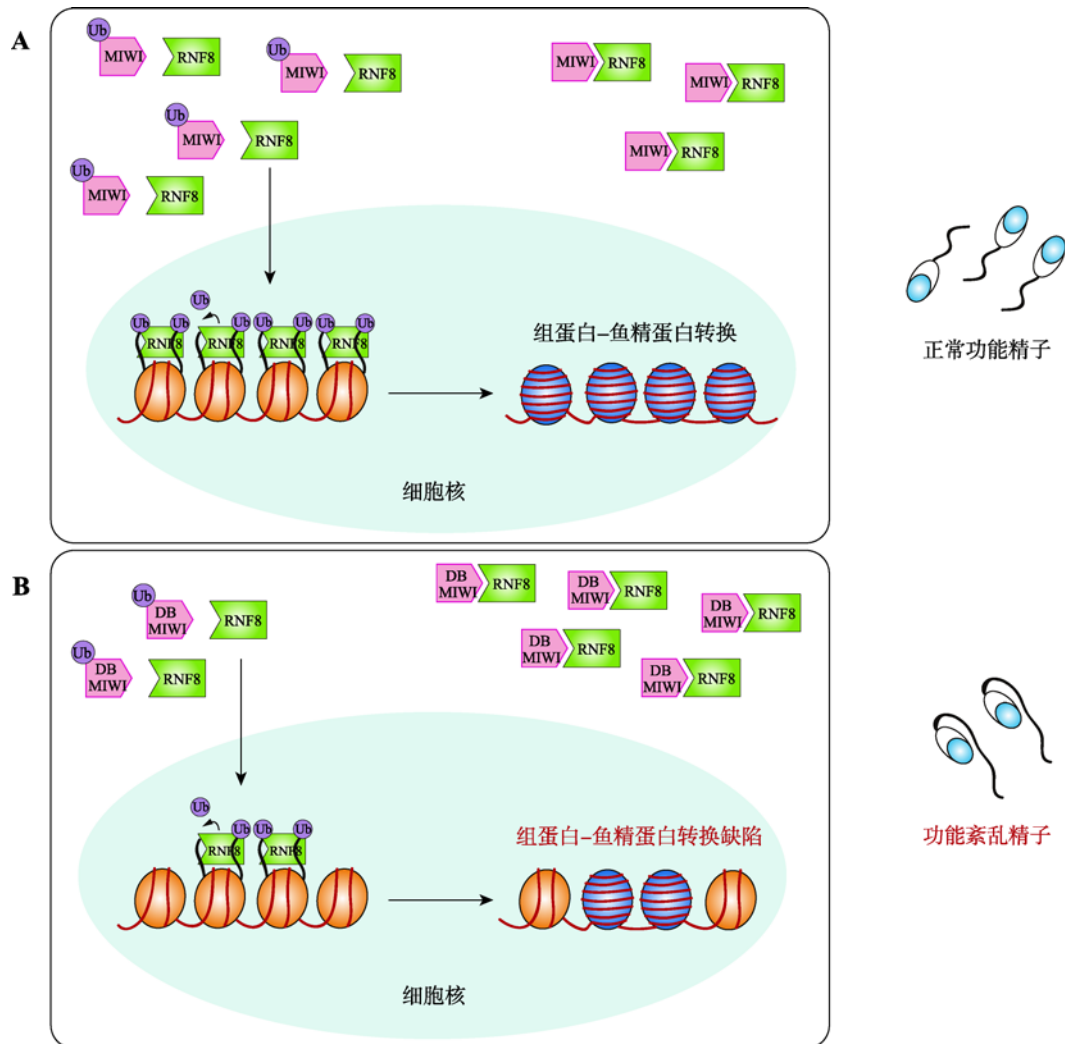


图 2 MIWI 突变导致精子形成异常的作用模型

Fig. 2 The diagram showing that MIWI regulates the histone-to-protamine transition during spermiogenesis

A: 在精子形成后期, MIWI 经 APC/C-泛素通路降解, 与其互作的泛素连接酶 RNF-8 被释放出来, 随后进入细胞核并启动组蛋白泛素化修饰, 促进组蛋白-鱼精蛋白转换及最终形成精子。B: D-box 区突变导致 MIWI 泛素化缺陷而异常滞留, 使得与其相互作用的 RNF-8 被扣留在细胞质中, 进而使得组蛋白-鱼精蛋白转换发生故障, 最终导致精子形成异常。

模型的研究可为揭示人类病理的机制提供线索。虽然文中未提及 3 例无精症患者是否因 HIWI 的 D-box 区域的突变导致组蛋白-鱼精蛋白转换的缺陷, 但是 D-box 区域的突变导致 HIWI 泛素化修饰缺陷, 可能的机制应该与 HIWI 泛素化修饰紧密相关, 可预期不久将有相关的研究成果报道。(3) 该研究开发了活体内追踪精细胞-精子转变的可视化实验方法, 为广大科研人员提供了一种新的研究方法。成熟的精子将外排大量的细胞质, 线粒体重新定位于需要大量能量的尾部。研究人员通过将 EGFP 与线粒体定位的信号肽融合避免了 EGFP 随细胞质被排出, 为相

关研究提供了一种新的“工具”。

4 结语与展望

尽管目前关于 piRNA/PIWI 系统的生物学功能研究已取得一定的进展, 但尚处于初步阶段, 还有一些关键的问题待解决。诸如: 目前还不清楚 PIWIs 亚家族实现时空性表达的机制; piRNAs 的生成过程中 piRNAs 前体首先被加工成中间体, 目前中间体产生的生化机制不清楚; 参与 piRNAs 3'端成熟的核酸酶还未被确定。虽然已建立 piRNA/PIWI 系统与转座子甲基化直接的联系, 但 piRNAs 介导转座子

甲基化的具体生化机制还不清楚。2012 年 Rajaset-hupathy 等^[58]发现一类在海兔神经系统中表达的 piRNAs 参与调控记忆相关突触的可塑性, 2014 年 Xie 等^[59]发现敲低 HIWI 可抑制人肝癌细胞的分化与迁移, 这些研究表明 piRNA/PIWI 系统在非生殖腺中也起作用, 但关于 piRNA/PIWI 系统的这些新功能及机制还待研究。未来 piRNA/PIWI 系统的研究将主要集中在以下几个方面: 解析 piRNAs 生成的具体生化机制、piRNA/PIWI 系统行使功能的机制和该系统在非生殖腺中的功能与机制。

参考文献(Reference):

- [1] Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 1972, 52(1): 198–236. [\[DOI\]](#)
- [2] Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*, 1975, 44(2): 394–436. [\[DOI\]](#)
- [3] Dadoune JP. The cellular biology of mammalian spermatids: a review. *Bull Assoc Anat (Nancy)*, 1994, 78(243): 33–40. [\[DOI\]](#)
- [4] Chuma S, Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368(1609): 20110338. [\[DOI\]](#)
- [5] Juliano C, Wang JQ, Lin HF. Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 447–469. [\[DOI\]](#)
- [6] Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 2006, 442(7099): 199–202. [\[DOI\]](#)
- [7] Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju JY, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 2006, 442(7099): 203–207. [\[DOI\]](#)
- [8] Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin HF. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 2006, 20(13): 1709–1714. [\[DOI\]](#)
- [9] Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, Kingston RE. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science*, 2006, 313(5785): 363–367. [\[DOI\]](#)
- [10] Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*, 2002, 117(1–2): 15–23. [\[DOI\]](#)
- [11] Ito H. Small RNAs and regulation of transposons in plants. *Genes Genet Syst*, 2013, 88(1): 3–7. [\[DOI\]](#)
- [12] Ye RQ, Chen ZL, Lian B, Rowley MJ, Xia N, Chai JJ, Li Y, He XJ, Wierzbicki AT, Qi YJ. A dicer-independent route for biogenesis of siRNAs that direct DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 2016, 61(2): 222–235. [\[DOI\]](#)
- [13] Lippman Z, May B, Yordan C, Singer T, Martienssen R. Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol*, 2003, 1(3): E67. [\[DOI\]](#)
- [14] Vagin VV, Sigova A, Li CJ, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 2006, 313(5785): 320–324. [\[DOI\]](#)
- [15] Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 2007, 128(6): 1089–1103. [\[DOI\]](#)
- [16] Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(4): 272–285. [\[DOI\]](#)
- [17] Saito K, Nishida KM, Mori T, Kawamura Y, Miyoshi K, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev*, 2006, 20(16): 2214–2222. [\[DOI\]](#)
- [18] Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 2009, 457(7228): 405–412. [\[DOI\]](#)
- [19] Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell*, 2008, 31(6): 785–799. [\[DOI\]](#)
- [20] Deng W, Lin HF. *miwi*, a murine homolog of *piwi*, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell*, 2002, 2(6): 819–830. [\[DOI\]](#)
- [21] Grivna ST, Pyhtila B, Lin HF. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(36): 13415–13420. [\[DOI\]](#)
- [22] Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M, Deng W, Lin HF, Matsuda Y, Nakano T. *Mili*, a mammalian member

- of *piwi* family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 2004, 131(4): 839–849. [DOI]
- [23] Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell*, 2007, 12(4): 503–514. [DOI]
- [24] Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*, 2007, 316(5825): 744–747. [DOI]
- [25] Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev*, 2008, 22(7): 908–917. [DOI]
- [26] Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang GN, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(11): 2291–2298. [DOI]
- [27] Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 2004, 431(7004): 96–99. [DOI]
- [28] De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, Antony C, Moreira PN, Enright AJ, O'Carroll D. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*, 2011, 480(7376): 259–263. [DOI]
- [29] Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, Antony C, Sachidanandam R, Pillai RS. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature*, 2011, 480(7376): 264–267. [DOI]
- [30] Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquilier D, LeMeur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature*, 1996, 380(6570): 159–162. [DOI]
- [31] Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schütz G. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature*, 1996, 380(6570): 162–165. [DOI]
- [32] Zhou Y, Sun Z, Means AR, Sassone-Corsi P, Bernstein KE. cAMP-response element modulator tau is a positive regulator of testis angiotensin converting enzyme transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(22): 12262–12266. [DOI]
- [33] Watanabe T, Cheng EC, Zhong M, Lin HF. Retrotransposons and pseudogenes regulate mRNAs and lncRNAs via the piRNA pathway in the germline. *Genome Res*, 2015, 25(3): 368–380. [DOI]
- [34] Zhang P, Kang JY, Gou LT, Wang JJ, Xue YC, Skogerboe G, Dai P, Huang DW, Chen RS, Fu XD, Liu MF, He SM. MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes. *Cell Res*, 2015, 25(2): 193–207. [DOI]
- [35] Gou LT, Dai P, Yang JH, Xue YC, Hu YP, Zhou Y, Kang JY, Wang X, Li HR, Hua MM, Zhao S, Hu SD, Wu LG, Shi HJ, Li Y, Fu XD, Qu LH, Wang ED, Liu MF. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res*, 2014, 24(6): 680–700. [DOI]
- [36] Piao XH, Zhang X, Wu LG, Belasco JG. CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(6): 1486–1494. [DOI]
- [37] Zhao S, Gou LT, Zhang M, Zu LD, Hua MM, Hua Y, Shi HJ, Li Y, Li JS, Li DS, Wang ED, Liu MF. piRNA-triggered MIWI ubiquitination and removal by APC/C in late spermatogenesis. *Dev Cell*, 2013, 24(1): 13–25. [DOI]
- [38] Gou LT, Kang JY, Dai P, Wang X, Li F, Zhao S, Zhang M, Hua MM, Lu Y, Zhu Y, Li Z, Chen H, Wu LG, Li DS, Fu XD, Li JS, Shi HJ, Liu MF. Ubiquitination-Deficient mutations in human *Piwi* cause male infertility by impairing Histone-to-Protamine exchange during spermiogenesis. *Cell*, 2017, 169(6): 1090–1104.e13. [DOI]
- [39] Gunes S, Arslan MA, Hekim GNT, Asci R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(5): 553–569. [DOI]
- [40] Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl*, 2012, 14(1): 40–48. [DOI]
- [41] Kamaliyan Z, Pouriamanesh S, Amin-Beidokhti M, Rezagholizadeh A, Mirfakhraie R. HIWI2 rs508485 polymorphism is associated with non-obstructive azoospermia in Iranian patients. *Rep Biochem Mol Biol*, 2017, 5(2): 108–111. [DOI]
- [42] Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013, 68 Suppl 1: 15–26.

- [43] Layman LC. Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet*, 2002, 39(3): 153–161. [DOI]
- [44] Okada H, Tajima A, Shichiri K, Tanaka A, Tanaka K, Inoue I. Genome-wide expression of azoospermia testes demonstrates a specific profile and implicates *ART3* in genetic susceptibility. *PLoS Genet*, 2008, 4(2): e26. [DOI]
- [45] Aston KI, Krausz C, Laface I, Ruiz-Castan   E, Carrell DT. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Hum Reprod*, 2010, 25(6): 1383–1397. [DOI]
- [46] Wang GL, Reinke V. A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Curr Biol*, 2008, 18(12): 861–867. [DOI]
- [47] Cox DN, Chao AN, Baker J, Chang LS, Qiao D, Lin HF. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev*, 1998, 12(23): 3715–3727. [DOI]
- [48] Cox DN, Chao AN, Lin HF. *piwi* encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*, 2000, 127(3): 503–514. [DOI]
- [49] Schupbach T, Wieschaus E. Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics*, 1991, 129(4): 1119–1136. [DOI]
- [50] Wilson JE, Connell JE, Macdonald PM. *aubergine* enhances *oskar* translation in the *Drosophila* ovary. *Development*, 1996, 122(5): 1631–1639. [DOI]
- [51] Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Filippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB, Plasterk RHA, Hannon GJ, Draper BW, Ketting RF. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell*, 2007, 129(1): 69–82. [DOI]
- [52] Houwing S, Berezikov E, Ketting RF. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J*, 2008, 27(20): 2702–2711. [DOI]
- [53] Gu AH, Ji GX, Shi XG, Long Y, Xia YK, Song L, Wang SL, Wang XR. Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. *Hum Reprod*, 2010, 25(12): 2955–2961. [DOI]
- [54] Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 2003, 111(8): 483–488. [DOI]
- [55] Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(4): 417–435. [DOI]
- [56] Roest HP, van Klaveren J, de Wit J, van Gurp CG, Koken MH, Vermey M, van Roijen JH, Hoogerbrugge JW, Vreeburg JTM, Baarends WM, Bootsma D, Grootegoed JA, Hoeijmakers JHJ. Inactivation of the HR23B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell*, 1996, 86(5): 799–810. [DOI]
- [57] Lu LY, Wu JX, Ye L, Gavrilina GB, Saunders TL, Yu XC. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell*, 2010, 18(3): 371–384. [DOI]
- [58] Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, Frey S, Sander C, Tuschl T, Kandel ER. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell*, 2012, 149(3): 693–707. [DOI]
- [59] Xie YJ, Yang YS, Ji DG, Zhang D, Yao XX, Zhang XW. Hiwi downregulation, mediated by shRNA, reduces the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 1455–1461. [DOI]

(责任编辑: 韩玉波)