

犏牛雄性不育的减数分裂基因表达与表观遗传调控研究进展

陈会友, 张建敏, 李柏森, 邓永琳, 张龚炜

西南大学动物科学技术学院, 重庆 402460

摘要: 种间杂交雄性不育是自然界普遍现象, 是物种形成生殖隔离的重要方式。犏牛作为牦牛(*Bos grunniens*)和普通牛(*Bos taurus*)的种间杂交后代, 表现为公犏牛不育, 而母犏牛可育, 是研究种间杂交雄性不育的良好动物模型。近年来利用分子生物学技术发现犏牛睾丸组织中大量基因表达紊乱。研究表明, DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 等表观遗传因素参与精子发生过程。本文从减数分裂相关的基因表达、DNA 甲基化、microRNA (miRNA)、PIWI 蛋白相互作用的 RNA (PIWI-interactingRNA, piRNA)、长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)和组蛋白甲基化修饰等方面总结了犏牛雄性不育的相关研究进展, 以期从遗传和表观遗传调控角度更加深入理解犏牛雄性不育的分子机理。

关键词: 犏牛; 雄性不育; 表观遗传; 基因表达

Progress on meiotic gene expression and epigenetic regulation of male sterility in Dzo cattle

Huiyou Chen, Jianmin Zhang, Baisen Li, Yonglin Deng, Gongwei Zhang

College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 402460, China

Abstract: Interspecific hybrid male sterility is a common occurrence in nature and plays an important role in species reproductive isolation. Dzo (cattle-yak), the offspring of interspecific cross between domestic yak (*Bos grunniens*) and cattle (*Bos taurus*), is a unique animal model for investigating interspecific hybrid male sterility. Dzo females are completely fertile while the males are sterile. In recent years, molecular studies have demonstrated that the expressions of genes were dysregulated during meiosis in Dzo testis, as compared to those in cattle or yak. Other studies have revealed that epigenetic factors/events, such as DNA methylation, histone modification and non-coding RNA, are also involved in spermatogenesis. This review summarizes the dysregulation of gene expression, DNA methylation, microRNA (miRNA), PIWI-interacting RNA (piRNA), long non-coding RNA (lncRNA), and histone methylation modification during meiosis in

收稿日期: 2020-06-15; 修回日期: 2020-07-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31802046)和中央高校基本科研业务费(编号: XDJK2020D011, XDJK2019RC001)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31802046) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. XDJK2020D011, XDJK2019RC001)]

作者简介: 陈会友, 在读硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种。E-mail: 17602359737@163.com

通讯作者: 张龚炜, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: zgw-vip@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-176

网络出版时间: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200929.1343.001.html>

URI: 2020/9/30 13:13:34

Dzo testis. These results highlighted the potential roles of genetic and epigenetic regulations of meiosis in Dzo testis, thereby providing a more detailed understanding on the molecular mechanisms of interspecific hybrid male sterility.

Keywords: Dzo; male sterility; epigenetic; gene expression

牦牛(*Bos grunniens*)被称为“高原之舟”，是青藏高原地区不可或缺的全能家畜，对高寒、缺氧和强紫外线等恶劣的生态环境条件有极强的适应性，是当地居民不可或缺的生产资料和生活资料。但是牦牛乳、肉用生产性能较低。为了改善牦牛生产性能，利用牦牛和优良肉用、奶用普通牛(*Bos taurus*)开展种间杂交，F₁、F₂代犏牛具有明显杂种优势，肉用、奶用均比亲本牦牛有显著提高并能适应高原地区环境气候。但是，F₁、F₂代犏牛雄性不育，这使得其杂种优势无法通过横交固定，无法通过杂交育种改良牦牛品种，成为阻碍藏区牦牛产业发展的瓶颈问题。种间杂交雄性不育是自然界普遍现象，是物种形成生殖隔离的重要方式。犏牛雄性不育也是探索物种形成生殖隔离的良好动物模型。目前，国内外学者已从杂交改良、组织学、内分泌学、生物化学、细胞遗传学和分子生物学等主要领域展开研究^[1,2]。最近研究表明，DNA 甲基化、组蛋白修饰

和非编码 RNA 等表观遗传因素是调控基因表达的重要因子，并对精子发生过程起关键作用^[3]。本文从基因表达、DNA 甲基化、组蛋白甲基化修饰和非编码 RNA 等方面总结了犏牛雄性不育的相关研究进展，以期从遗传和表观遗传调控角度更加深入理解犏牛雄性不育的分子机理。

1 基因表达紊乱与犏牛雄性不育

组织学研究发现，犏牛雄性不育主要表现为精母细胞数量减少，生精小管内极少见精子细胞，表明犏牛雄性不育主要是生精细胞减数分裂过程受阻^[4]。减数分裂是有性生殖过程中产生配子的一种特殊分裂方式，是哺乳动物繁衍后代的必须条件。研究人员在减数分裂相关基因上展开大量研究，以探索减数分裂基因表达紊乱与犏牛雄性不育的关系，其研究主要集中在以下蛋白家族(表 1)。

表 1 犏牛雄性不育相关基因

Table 1 Genes related to male sterility in Dzo

| 基因 | 主要功能 | 参考文献 |
|-----------------------|--|---------------|
| DAZ 蛋白家族 | DAZ、DAZL 和 BOULE 蛋白是精子发生的重要调控因子 | [6,26,27] |
| SYCP 蛋白家族 | SYCP1、SYCP2、SYCP3 和 FKBP6 是联会复合体的重要组成部分，与精子发生过程中的减数分裂密切相关 | [11~13,28,29] |
| DEAD-box 蛋白家族 | DDX4、DDX3Y 和 DDX25 是生殖相关基因，参与广泛 RNA 代谢过程 | [15,18,29] |
| 减数分裂同源重组相关基因 | DMC1、RAD51、RPA1 和 BLM 是参与哺乳动物减数分裂同源重组修复的关键基因 | [20,21] |
| MSY (Y 染色体雄性特异区) 相关基因 | Y 染色体连锁基因家族(TSPY、PRAMEY 等)在精子发生和雄性生育中起重要作用 | [25,30,31] |
| SNRPN | SNRPN (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N)与细胞分化和增殖有关 | [32,33] |
| H19、IGF2 | 印记基因 IGF2 (insulin like growth factor 2)、H19 (H19 imprinted maternally expressed transcript)促进多种细胞的增殖、抑制细胞凋亡 | [33,34] |
| CDC2、CDC25A | CDC2(cell division cycle 2)、CDC25A 是减数分裂的两个关键基因 | [35] |
| PIWIL1 | PIWIL1(piwi like RNA-mediated gene silencing 1)在精子发生和转座子控制中起重要作用 | [29,36] |
| STRA8 | STRA8(stimulated by retinoic acid 8)参与调控精原干细胞(SSCs)自我更新与分化 | [37] |
| PRDM9 | PRDM9(PR/SET domain 9)具有 PR 结构域，和雄性不育相关 | [38] |
| DMRT7 | DMRT7(double sex and mab3-related transcription factor7)缺乏是犏牛雄性不育的一个强有力的候选因素 | [39] |
| ERK1、ERK2 | ERK1 (extracellular signal-regulated kinase 1)、ERK2 属于 MAPK 信号通路 | [40] |

1.1 DAZ (deleted in azoospermia)蛋白家族

DAZ 蛋白家族主要有 3 个成员, *DAZ* (the deleted in azoospermia) 基因位于 Y 染色体上, *DAZL* (deleted in azoospermia like) 和 *BOULE* (boule protein) 是常染色体基因, 这 3 个基因编码蛋白是 RNA 结合蛋白, 在生殖细胞特异表达, 是精子发生过程的主要调控因子。*DAZ* 有 4 个拷贝, 以头对头的形式排列在 Y 染色体上, 基因产物具有 RNA 结合蛋白特性, 在睾丸组织特异性表达, 可能与精子生成有关, 是决定精子生成的基因^[5]。*DAZL* 与 *DAZ* 基因同源性约为 83%, *DAZL* 在黄牛 (*Bos taurus domestica*) 和牦牛睾丸组织中表达, 在 F₁ 代犏牛睾丸组织中不表达, 并且 *DAZL* 的 DNA 甲基化程度显著高于黄牛和牦牛^[6]。

这与小鼠 (*Mus musculus*) *DAZL* 基因敲除后导致精子发生停止或功能异常结果一致^[7], 说明 *DAZL* 基因可能对犏牛雄性不育有重要影响。*BOULE* 是动物精母细胞减数分裂过程中的必需蛋白(图 1), 与精子发生减数分裂阻滞、雄性不育等密切相关, F₁ 代犏牛 *BOULE* 基因表达水平显著低于黄牛, *BOULE* 5' 端 DNA 甲基化水平极显著高于黄牛和牦牛^[8], 说明犏牛 *BOULE* 基因的高甲基化可能使其 mRNA 表达下调, 对犏牛生精细胞减数分裂、雄性不育有重要影响。

1.2 SYCP (synaptonemal complex protein) 蛋白家族

SYCP 蛋白家族主要有 4 个成员, 分别是 SYCP1

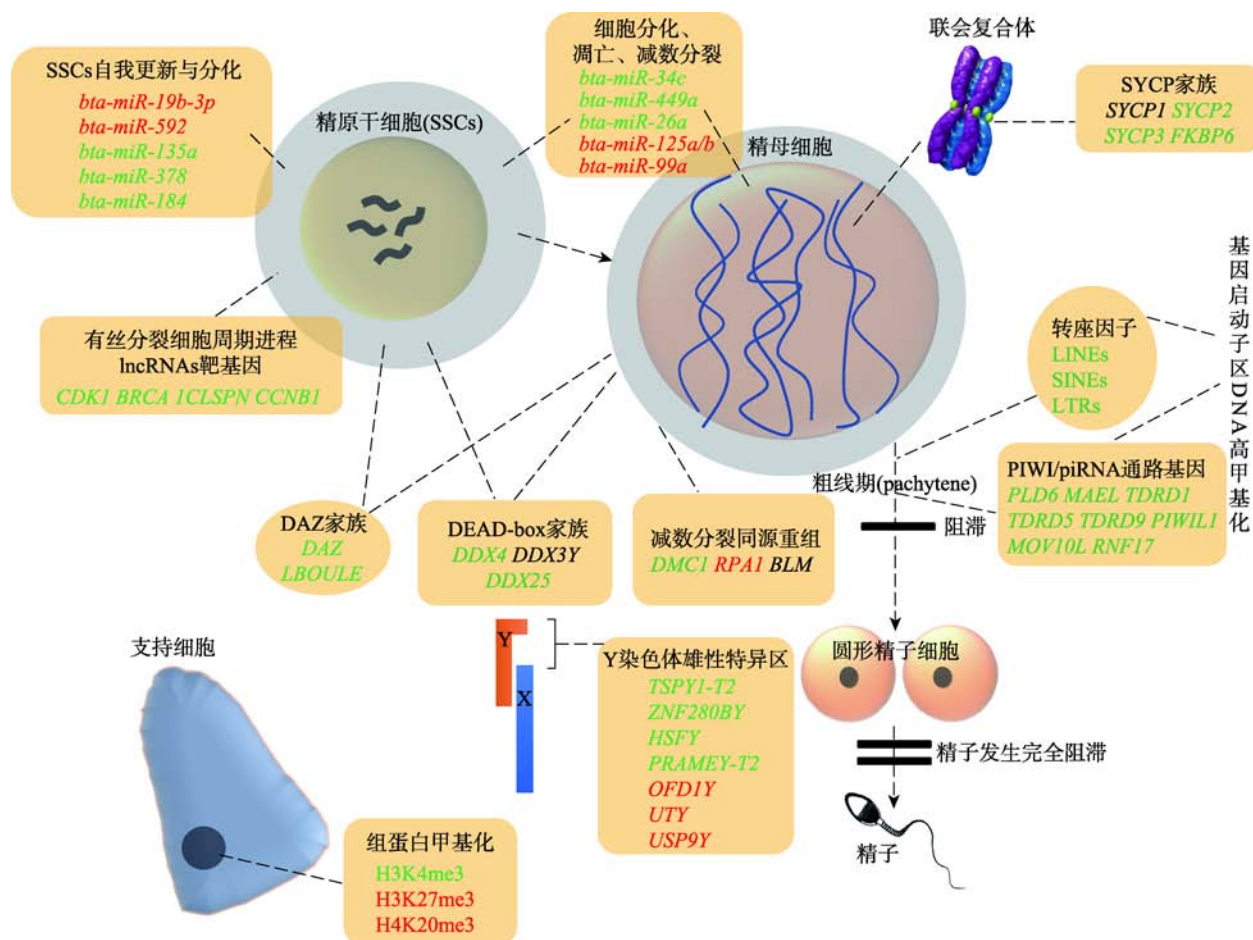


图 1 犏牛睾丸中的生精调控

Fig. 1 Regulation of spermatogenesis in the testes of Dzo

黄色框内所有基因、miRNAs 和组蛋白修饰的符号颜色代表犏牛相对于普通牛和牦牛的差异程度, 红色: 上调; 绿色: 下调; 黑色: 无差异; ----: 代表来源; ---->: 代表过程; []: 代表范围; ■: 代表阻滞。

(synaptonemal complex protein 1)、SYCP2、SYCP3 和 FKBP6 (FKBP prolyl isomerase 6)。它们参与精原细胞的形成,是联会复合体形成的关键蛋白。*SYCP1* 主要在减数分裂前期表达,在同源染色体配对中发挥重要作用,是精子发生过程中所必须的基因。在粗线期和双线期,*FKBP6* 与 *SYCP1* 蛋白共同结合于常染色体的联会区域,辅助 *SYCP1* 形成横丝(transverse filaments, TF)。*SYCP1* 在犏牛、牦牛和普通牛中都有表达,且差异不显著^[9]。*SYCP2* 蛋白能与 *SYCP3* 蛋白结合发挥作用。在哺乳动物中,*SYCP2* 和 *SYCP3* 是轴向元件(axial element, AE)和侧向元件(lateral elements, LE)形成的主要决定成分^[10]。*SYCP3* 蛋白是一个 DNA 结合蛋白,定位于联会复合体的侧成分,在睾丸中特别是在初级精母细胞中表达(图 1),在同源染色体配对中发挥重要作用,是精子发生过程中减数分裂所必须。犏牛睾丸 *SYCP3*、*SYCP2* 表达显著低于牦牛^[11],其 DNA 启动子甲基化水平显著高于牦牛^[12]。*FKBP6* 主要在性腺组织的粗线期表达,犏牛睾丸 *FKBP6* 表达量显著低于牦牛。因此,*SYCP3*、*SYCP2* 和 *FKBP6* 基因表达紊乱与犏牛雄性不育存在一定联系^[13]。

1.3 DEAD-box (DEAD-box helicase)蛋白家族

DEAD-box 蛋白家族是一个 ATP 依赖的 RNA 解旋酶家族,参与多种 RNA 代谢过程。其中 *DDX4* (DEAD-box helicase 4)、*DDX3Y* (DEAD-box helicase 3, Y-linked)和 *DDX25* 是与精子发生密切相关的基因。在哺乳动物中,*DDX4*、*DDX3Y* 和 *DDX25* 的缺失或减少会导致不同形式的精子发生障碍。*DDX4* 在哺乳动物生殖系特异表达,作为一种广泛的分子标记物被应用于生殖研究^[14]。犏牛睾丸组织 *DDX4* 的启动子区甲基化水平显著高于牦牛,其 mRNA 在犏牛睾丸中的表达量也极显著低于牦牛^[15],说明 *DDX4* 对犏牛雄性不育存在一定影响。*DDX3Y* 位于牛 Y 染色体上,在 3 种牛睾丸组织中 mRNA 表达量差异不显著^[16]。*DDX25* 是已知的唯一由激素调节的 RNA 解旋酶,*DDX25* 基因敲除小鼠精子发生受阻,致使圆形精子无法继续变形^[17]。犏牛睾丸组织中 *DDX25* 的基因表达水平也显著低于牦牛^[18],可能致使犏牛精子发生受阻。

1.4 减数分裂同源重组相关基因

在染色体自我复制过程中可能会出现双链断裂(double strand break, DSB)现象,如果这些断裂未能及时修复就会引起细胞凋亡,修复不准确也会引起基因突变和染色体突变。真核生物对这些断裂的修复有两种机理:非同源末端连接和同源重组,而同源重组是 DNA 上 DSB 损伤修复的主要方式,对于保持哺乳动物细胞的基因组完整性十分重要^[19]。*DMC1* (DNA meiotic recombinase 1)、*RPA1* (replication protein A1)和 *BLM* (BLM RecQ like helicase)等是参与哺乳动物减数分裂同源重组修复的关键基因。这些基因的突变、敲除和表达水平的降低均会引起精母细胞减数分裂障碍,最终导致雄性不育。*DMC1*、*RPA1* 基因在犏牛睾丸组织中的表达水平对比黄牛和牦牛差异显著^[20-22],且 *DMC1* 基因 DNA 启动子区甲基化水平也差异显著,提示其可能和犏牛雄性不育相关。

1.5 Y 染色体雄性特异区(male-specific region on the Y, MSY)相关基因

Y 染色体是雄性哺乳动物相对于雌性特有的染色体,由常染色体进化而来,和 X 染色体只有 5% 的区域相同,该区域是和 X 染色体同源重组的拟常染色体区,而 95% 的其他区域则是 MSY (图 1)。牛 Y 染色体基因组已经公布(NCBI GenBank accession no. CM001061),通过对牛 Y 染色体进行测序和注释,牛 Y 染色体共鉴定出 1274 个基因,MSY 包含 28 个蛋白编码基因和 375 个新转录本。利用转录组测序(RNA-seq)技术比较普通牛不同年龄睾丸组织中基因表达模式发现,13 个编码基因和 220 转录本的表达量随睾丸发育显著上调,这表明 Y 染色体 MSY 区域的基因参与牛生精过程^[23]。

MSY 相关基因的拷贝数变异(copy number variation, CNV)被证明和雄性生精功能有关^[24]。张龚炜等^[25]首次对 MSY 相关基因的 CNV 进行研究,发现 F₁、F₂ 代公犏牛 MSY 相关基因 *TSPY* (testis specific protein, Y-linked)、*HSFY* (heat shock transcription factor, Y-linked)、*PRAMEY* (preferentially expressed antigen in melanoma, Y-linked)和 *ZNF280BY* (zinc finger protein 280B, Y-linked)的几何平均拷贝数(the

average geometric mean copy number, CN)显著高于普通牛和牦牛,提示犏牛 MSY 在基因组结构上和牦牛以及普通牛不同, MSY 相关基因的 CNV 可能是犏牛雄性不育的原因。随后详细分析普通牛和牦牛 MSY 相关基因 *TSPY*、*TSPY2*、*PRAMEY*、*HSFY* 和 *ZNF280BY* 序列,发现只有 *TSPY2* 在牛科是保守的,牦牛缺失 *TSPY2-T2* 类型序列, *PRAMEY-T2* 和 *PRAMEY-T4* 在牦牛 Y 染色体上成功扩增, *TSPY-T2* 和 *ZNF280BY* 的平均拷贝数在普通牛和牦牛之间差异显著^[4],说明普通牛和牦牛 MSY 存在差异性。犏牛 *TSPY1-T2*、*ZNF280BY*、*HSFY* 和 *PRAMEY-T2* 表达对比牦牛和普通牛显著下调,究其原因可能是犏牛精子发生异常导致无精子生成,提示这些基因主要参与减数分裂后精子形成过程^[23,4]。除以上多拷贝基因外,犏牛睾丸组织 MSY 区域的单拷贝基因 *UTY* (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked)、*OFDIY* (oral-facial-digital syndrome 1, Y-linked)和 *USP9Y* (ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked)表达对比牦牛和普通牛显著上调。*UTY* 和 *USP9Y* 具有组蛋白甲基化和泛素化的功能,提示后续可进一步从组蛋白甲基化和泛素化角度探索犏牛雄性不育的机理^[16]。

2 表观遗传与犏牛雄性不育

以 DNA 甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑为特征的表观遗传修饰是包括精子发生在内的许多生物学过程中的重要调节因子^[3]。DNA 甲基化^[41]、组蛋白修饰^[42]和非编码 RNA^[43]作为机体重要的表观遗传修饰类型,是在精子发生过程中调控的关键因素。表观遗传修饰的异常,将使生精过程基因的表达紊乱,进而导致雄性不育。

2.1 DNA 甲基化与犏牛雄性不育

DNA 甲基化是在甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化作用下,以 S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine, SAM)作为甲基供体,通过共价键结合的方式使基因组 CpG 二核苷酸中胞嘧啶 5 号位碳原子获得一个甲基基团的化学修饰过程^[44]。DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变,从而

调控基因表达^[45]。DNA 甲基化可能通过调节雄性生殖细胞的增殖和分化而发挥关键作用^[46],是雄性不育的一个重要影响因素。在雄性不育模型中观察到的异常 DNA 甲基化模式可能是精原细胞的再甲基化失败或精母细胞、精子细胞和成熟精子细胞的甲基化状态维持不变所致^[47]。由于启动子 DNA 甲基化通常抑制基因转录,在精子发生过程中 DNA 甲基化的紊乱导致了生精基因的表达紊乱,和雄性不育高度相关^[45]。在犏牛中,研究发现 *PIWILI*、*DAZZL* 和 *FKBP6* 基因启动子区域甲基化水平升高导致基因表达下调,进而影响犏牛生殖^[48-50]。最近利用全基因组甲基化测序技术发现启动子高甲基化基因在配子产生、piRNA (非编码 RNA 的一种)代谢过程和染色质结构的 DNA 甲基化过程中显著富集,表明启动子高甲基化和 piRNA 途径等表观遗传紊乱可能和犏牛雄性不育高度相关^[29]。犏牛睾丸中 *PIWI*/piRNA 通路基因启动子发生 DNA 超甲基化,使 *PIWILI*、*DDX4*、*PLD6* (phospholipase D family member 6)、*MAEL* (maelstrom spermatogenic transposon silencer)、*FKBP6*、*TDRD1* (tudor domain containing 1) 和 *TDRD5* 等基因表达下调,并导致犏牛精子发生过程中粗线期 piRNA 的产生降低,同时还发现转座因子 LINEs (long interspersed nuclear elements)、SINEs (short interspersed nuclear elements)和 LTRs (long terminal repeats)在犏牛睾丸中高甲基化(图 1)。因此, DNA 高甲基化和 piRNA 生成途径中断是导致生殖细胞发育不成功的原因之一,这可能导致犏牛雄性不育^[29]。

2.2 非编码 RNA 与犏牛雄性不育

随着基因组研究的深入,以前普遍认为不编码蛋白质的非编码 RNA 被证明其在转录后具有基因调控的作用。非编码 RNA 主要包括 lncRNA、核糖体 RNA (rRNA)、转运 RNA (tRNA)、核小 RNA (small nuclear RNA, snRNA)、核仁小 RNA (small nucleolar RNA, snoRNA)、miRNA 和 piRNA 等多种已知功能的 RNA,及未知功能的 RNA。这些 RNA 的共同特点是都能从基因组上转录而来,但是不翻译成蛋白,在 RNA 水平上就能行使各自的生物学功能。例如 piRNA 主要在睾丸组织中表达,其在转录后水平调控动物生殖系统^[51-53]。

2.2.1 PIWI/piRNA 途径与犏牛雄性不育

piRNA 一般长约 24~35 nt, 通过与 AGO 蛋白家族相互作用形成 piRNA 沉默复合体(piRNA-induced silencing complex, pi-RISC)来调控基因重复序列及转座子等基因元件的活性^[54], 主要影响动物生殖^[51]。小鼠减数分裂时期 piRNAs 主要分前粗线期 piRNAs (26~28 nt)和粗线期 piRNAs (~30 nt)^[55]。前粗线期 piRNAs 主要在细线期精母细胞中发现, 来源于转座子元件^[56,57]。粗线期 piRNAs 起源于基因组不同区域的 piRNA 簇, 并与粗线期精母细胞中的 PIWIL1 和 PIWIL2 结合维持到圆形精子细胞阶段, 是成年小鼠睾丸中的主要 piRNAs, 约占总 piRNAs 的 95%^[58]。在小鼠中, 编码 PIWI 蛋白的 *PIWIL1/MIWI*、*PIWIL2/MILI* 和 *PIWIL4/MIWI2* 基因以及其他协助 piRNA 产生或功能表达所必需的蛋白是 PIWI/piRNA 通路的重要组成部分, 它们共同维持小鼠的精子发生。一旦 piRNA 通路基因发生突变, 都会导致雄性不育^[59,60]。例如, 转录因子 A-MYB/MYBL1 (myeloblastosis oncogene-like 1)被证明直接识别上游 DNA 元件来启动粗线期 piRNAs 的转录^[55], 生成的 piRNA

前体转录本被输送到核外细胞质, 随后又被 PIWI 蛋白结构域修剪成前体 piRNA, 经过一系列修剪后, 由核酸外切酶(PARN like, ribonuclease domain containing 1, PNLDC1)^[61]对 piRNA 3'端进一步修剪成成熟大小, 最终 piRNA 3'端被 2'-O-甲基转移酶(HEN methyltransferase 1, HENMT1)修饰产生成熟的 piRNA^[62](图 2)。如前所述, 犏牛睾丸中 PIWI/piRNA 通路相关基因(*PIWIL1*、*DDX4*、*PLD6*、*MAEL*、*FKBP6*、*TDRD1* 和 *TDRD5*)启动子超甲基化抑制基因表达, 使 piRNA 生成显著降低^[29], 表明 PIWI/piRNA 通路参与犏牛雄性不育的过程。

2.2.2 miRNA 与犏牛雄性不育

miRNA 是一种长度约为 22 nt 并高度保守的内源性非编码小分子 RNA, 虽然不编码蛋白质但具有调控功能。miRNA 的生物学功能主要体现在对其靶基因的转录后水平调控, 主要有靶标 mRNA 的降解和 mRNA 翻译抑制 2 种方式, 它们在精子发生过程中以相对特异性方式表达, 在雄性动物生殖健康中起着至关重要的作用^[63]。例如, miRNA 参与调控睾

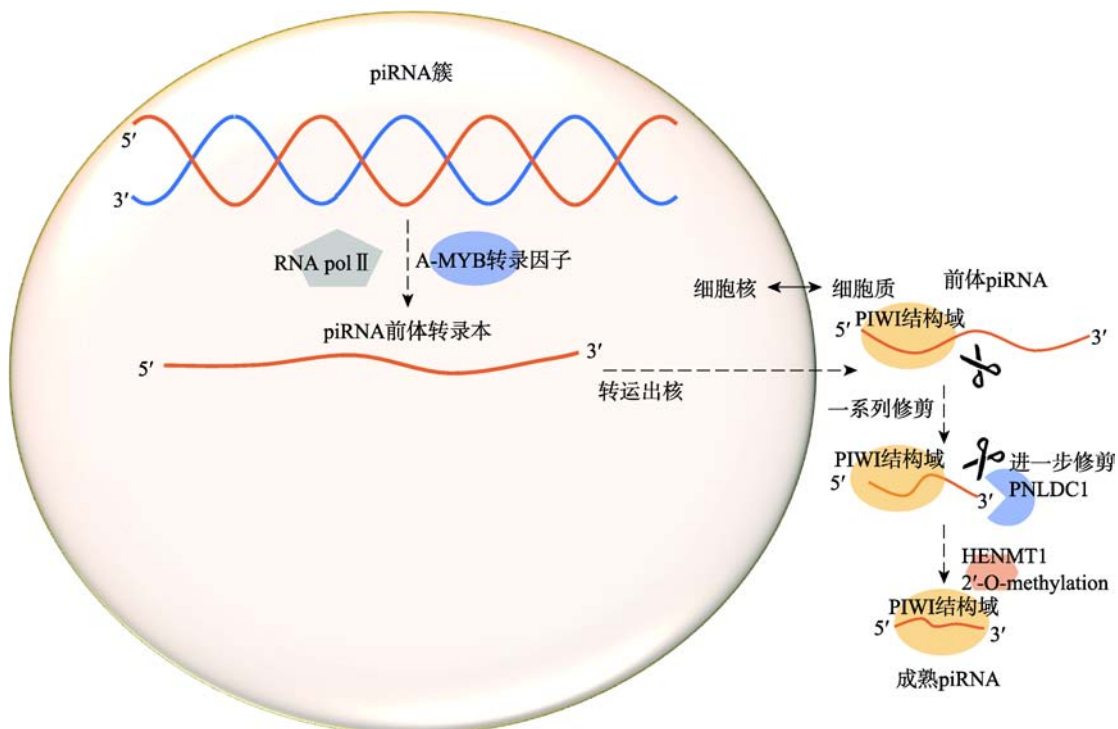


图 2 粗线期 piRNA 的生物发生

Fig. 2 Biogenesis of pachytene piRNA

丸支持细胞的增殖和粘附,一旦支持细胞增殖和粘附功能异常,将会导致精子发生受阻^[64]。因此,miRNAs 的失调被认为是雄性不育的分子基础,这些分子的异常表达模式可以遗传给后代^[65]。研究表明,miRNA 在哺乳动物精子发生的不同过程中起着重要的调节作用:miR-20 和 miR-106a 通过靶向 *STAT3* (signal transducer and activator of transcription 3) 和 *CCND1* (Cyclin D1) 在转录后水平促进小鼠 SSCs 的更新^[66],miR-221/222 通过抑制 *KIT* (*KIT* proto-oncogene, receptor tyrosine kinase) 的表达在维持精原细胞的未分化状态中发挥关键作用^[67]。研究表明,小鼠粗线期精母细胞中存在许多来自 X 染色体的 miRNAs,这些 miRNAs 可能导致性染色体减数分裂失活^[68]。徐传飞^[69]通过对小 RNA 测序发现 61 个 miRNA 在犏牛与牦牛睾丸组织之间差异表达,其中 *bta-miR-19b-3p*、*bta-miR-592*、*bta-miR-135a*、*bta-miR-378* 和 *bta-miR-184* 参与 SSCs 自我更新以及分化过程;*bta-miR-34c* 和 *bta-miR-449a* 参与精子发生过程中减数分离起始过程,说明 miRNA 在犏牛生精过程中具有影响力。廖珂^[70]发现涉及细胞增殖、凋亡过程的 miRNA 表达在犏牛和普通牛间也存在差异,如 *bta-miR-26a*、*bta-miR-125a/b* 和 *bta-miR-99a* 等。徐传飞^[71]对差异 miRNAs 的靶基因进行 GO 分析和 KEGG 分析,结果显示 *bta-miR-34c* 靶向的 *CDK2* (cyclin dependent kinase 2)、*CDK4* 和 *CDK6* 主要参与细胞分化、增殖以及凋亡等通路。

2.2.3 lncRNA 与犏牛雄性不育

lncRNA 长度一般大于 200 nt,主要与染色质修饰蛋白、RNA 结合蛋白、小 RNA 和其他 lncRNA 相互作用调节各种生理过程。lncRNA 的功能大致可分为 3 种调控模式:竞争者(competitor)、激活者(activator)和前体(precursor)^[72]。首先,作为竞争者,lncRNAs 可以与某些 DNA 结合蛋白结合,从而抑制其与靶 DNA 的结合^[73]。例如,一些 lncRNAs 可以与 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 结合,从而阻止 DNMT1 与靶 DNA 结合^[74]。因此,DNA 靶区域的甲基化状态会受到影响,导致靶基因的转录激活。其次,与竞争者相反,lncRNAs 还可以作为招募者,通过将表观遗传修饰因子招募到特定的靶位点来启动表观遗传修饰,从而加强

DNA 甲基化或组蛋白修饰^[75,76]。第三,lncRNAs 可以被某些核糖核酸酶(RNase)如 Dicer 消化,产生小的非编码 RNA,如 *HongrES2*。*HongrES2* 是一种附睾特异的 1.6 kb mRNA 样前体,能产生类似 miRNA 的小 RNA,通过形成类似 miRNA 的小 RNA,*HongrES2* 下调 *CES7/CES5A* (carboxylesterase 5A) 蛋白的表达,从而影响精子获能^[77]。在沉默牛的 lncRNA *H19* (H19 母系印迹表达转录本) 后,生精小管中的细胞数量有减少的趋势,这影响了 IGF-1R (insulin-like growth factor I receptor) 在支持细胞和生精细胞中的表达。IGF-1 维持多种类型干细胞的存活,在雄性生殖系中具有重要功能^[78]。近期,阿果约达等^[79]通过 RNA-seq 技术从犏牛、牦牛和普通牛中筛选出 6178 个差异显著 lncRNA 转录本,候选靶基因 2676 个,最终筛选出犏牛不育相关基因 *PTGDS* (prostaglandin D2 synthase)、*IGF2* (insulin like growth factor 2) 和 *MEST* (mesoderm specific transcript) 等,这些差异靶基因与犏牛雄性不育相关。伍仕鑫^[80]通过分离出犏牛、牦牛睾丸高纯度精原细胞进行 lncRNA 的 RNA-seq、GO 和 KEGG 富集分析后,发现差异 lncRNAs 的靶基因 *CDK1* (Cyclin-dependent kinase 1)、*BRCA1* (BRCA1 DNA Repair Associated)、*CLSPN* (Claspin) 和 *CCNB1* (G2/mitotic-specific cyclin-B1) 等主要参与犏牛生精过程中细胞分裂的起始(图 1),细胞周期负性调控和相变调控,细胞周期进程的检控,DNA 复制的损伤检测及修复,同源重组和细胞的内存、程序性死亡、生长、分化和凋亡,以及细胞物质代谢等重要的信号通路和生物学过程。这些结果提示 lncRNA 可以作为犏牛雄性不育的重点研究方向。

2.3 组蛋白甲基化与犏牛雄性不育

组蛋白甲基化是发生在精氨酸和赖氨酸上的共价修饰,是影响基因活性的一种表观遗传机制,其功能主要体现在异染色质形成、基因印记、X 染色体失活和转录调控等方面^[81]。它由组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferase, HMT) 调节,可在精氨酸和赖氨酸残基中添加或移除甲基^[82,83],所以组蛋白赖氨酸甲基化修饰与基因的活化或抑制有关。通常认为,组蛋白 H3K4、H3K36 和 H3K79 的甲基化与转录活化基因有关,而 H3K9、H3K27 和 H4K20 的甲基化抑制基因表达^[84-86]。例如 *MLL5/KMT2E* (lysine

methyltransferase 2E)催化组蛋白 H3K4 二甲基化(H3K4me2),是形成顶体所必须的组蛋白甲基转移酶, *MLL5* 基因敲除的小鼠是不育的^[87]。而 H3K9 的去甲基化在减数分裂末期对于精子发生的完成至关重要,否则会抑制鱼精蛋白 1 (protamine 1, PRM1)和过渡性蛋白 1 (transition protein 1, TNP1)表达,进而导致染色质凝集和不育^[88]。由此可见,组蛋白甲基转移酶在精子发生中发挥着重要作用。犏牛支持细胞中组蛋白 H3K4 三甲基化(H3K4me3)缺失, H3K27me3 和 H4K20me3 显著富集(图 1),H3K4me3、H3K9me1、H3K9me3 和 H4K20me3 在犏牛精母细胞减数分裂染色体中的水平和定位存在显著差异,这些结果提示了组蛋白甲基化在精子发生和犏牛雄性不育中的潜在作用^[89]。

3 结语与展望

近年来分子生物学兴起,特别是组学技术的发展,可以从全基因组水平分析基因表达、组蛋白甲基化、DNA 甲基化和非编码 RNA 等与犏牛雄性不育的关系,为理解犏牛雄性不育的分子机理提供了新的角度与见解。但要阐述犏牛雄性不育的分子机制,以下几个方面需要引起特别注意:(1)由于睾丸组织细胞异质性和精子发生的动态与连续性,基于睾丸组织的组学研究难以明确具体发生紊乱的细胞类型及发育阶段;(2)由于精子发生细胞无法建立体外培养体系,对候选基因的功能验证需要借助小鼠敲除/敲入体系;(3)前期研究主要关注生精相关细胞的表达调控关系,忽略了支持细胞等睾丸微环境对精子发生的调控作用^[64,89];(4)各种表观遗传因素表现出细胞类型特异性和生精阶段特异性的表达调控特性,阐述不同表观遗传因素的动态调控网络是今后一个主要方向,如 piRNAs 主要在哺乳动物粗线期精母细胞表达^[29,58],miRNA 参与调控支持细胞和精原细胞^[64,69]。

综上所述,表观遗传调控在犏牛雄性不育过程中起到极为关键的作用。今后研究可重点关注犏牛睾丸支持细胞和粗线期以前阶段生精细胞,DNA 甲基化、非编码 RNA 和组蛋白甲基化等表观遗传角度是研究犏牛雄性不育的良好切入点。

参考文献(References):

- [1] Jin YC, Yan ZX, Li SS, Liu LJ. The research progress of Dzo male sterility in China. *Chin Qinghai J Anim Vet Sci*, 2017, 47(3): 41–44.
靳义超, 闫忠心, 李升升, 刘连杰. 我国犏牛雄性不育的研究进展. 青海畜牧兽医杂志, 2017, 47(3): 41–44. [DOI]
- [2] An DK, Xie RQ, Zhou ML. The research progress of male infertility Dzo. *Heilongjiang Anim Sci Veter Med*, 2016, (1): 46–48.
安德科, 谢荣清, 周明亮. 雄性犏牛不育的研究进展. 黑龙江畜牧兽医, 2016, (1): 46–48. [DOI]
- [3] Rajender S, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res*, 2011, 727(3): 62–71. [DOI]
- [4] Zhang GW, Wu YH, Luo ZG, Guan JQ, Wang L, Luo XL, Zuo FY. Comparison of Y-chromosome-linked TSPY, TSPY2, and PRAMEY genes in Taurus cattle, yaks, and interspecific hybrid bulls. *J Dairy Sci*, 2019, 102(7): 6263–6275. [DOI]
- [5] De Vries JWA, Hoffer MJV, Repping S, Hoovers JMN, Leschot NJ, van der Veen F. Reduced copy number of DAZ genes in subfertile and infertile men. *Fertil Steril*, 2002, 77(1): 68–75. [DOI]
- [6] Fu Y, Wei YP, Meng R, Wu KX, Chen SM, Zhang LC, Wang XZ. Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of Dazl gene in testes of yellow cattle, yak and Dzo. *Acta Agric Boreali-Occid Sin*, 2013, 22(1): 12–18.
付永, 魏雅萍, 孟茹, 吴克选, 陈生梅, 张立成, 王谢忠. 黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织 Dazl 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 西北农业学报, 2013, 22(1): 12–18. [DOI]
- [7] Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature*, 1997, 389(6646): 73–77. [DOI]
- [8] Fu Y, Wei YP, Chen SM. Expression level of Boule gene mRNA in testes of yellow cattle, yak and Dzo. *Chin J Anim Sci*, 2013, 49(1): 10–13.
付永, 魏雅萍, 陈生梅. 黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织中 Boule 基因 mRNA 表达水平. 中国畜牧杂志, 2013, 49(1): 10–13. [DOI]
- [9] Qu XG. Study on the relationship between synaptonemal complex related genes and male sterility in Dzo [Dissertation]. *Nanjing Agricultural University*, 2008.
屈旭光. 联会复合体相关基因与犏牛雄性不育关系的研究[学位论文]. 南京农业大学, 2008. [DOI]

- [10] Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ. Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*, 2006, 173(4): 497–507. [DOI]
- [11] Luo H, Jia C, Qu XG, Zhao XB, Zhong JC, Xie Z, Li QF. Cloning of b-Sycp2 gene and expression level of mRNA in testis of yellow cattle, yak and Dzo. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(2): 367–375.
骆骅, 贾超, 屈旭光, 赵兴波, 钟金城, 谢庄, 李齐发. 黄牛、牦牛和犏牛 b-Sycp2 基因的克隆与睾丸组织 mRNA 的表达水平. 中国农业科学, 2013, 46(2): 367–375. [DOI]
- [12] Wang S, Pan Z, Zhang Q, Xie Z, Liu H, Li Q. Differential mRNA expression and promoter methylation status of SYCP3 gene in testes of yaks and cattle-yaks. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47(3): 455–462. [DOI]
- [13] Li BJ, Luo H, Qu XG, Pan ZX, Xie Z, Liu HL, Li QF. Analysis of expression characteristics of synaptonemal complex protein b-FKBP6 gene in yak and Dzo. *J Nanjing Agric Univ*, 2013, 36(5): 129–132.
李伯江, 骆骅, 屈旭光, 潘增祥, 谢庄, 刘红林, 李齐发. 牦牛与犏牛联合复合体蛋白 b-FKBP6 基因的表达特征分析. 南京农业大学学报, 2013, 36(5): 129–132. [DOI]
- [14] Gustafson EA, Yajima M, Juliano CE, Wessel GM. Post-translational regulation by gustavus contributes to selective Vasa protein accumulation in multipotent cells during embryogenesis. *Dev Biol*, 2011, 349(2): 440–450. [DOI]
- [15] Zhou Y, Luo H, Li BJ, Jia C, Xie Z, Zhao XB, Zhong JC, Li QF. mRNA expression level and promoter methylation of DDX4 gene in testes of yak and cattle-yak. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(3): 630–638.
周阳, 骆骅, 李伯江, 贾超, 谢庄, 赵兴波, 钟金城, 李齐发. 牦牛和犏牛睾丸组织 DDX4 基因 mRNA 表达水平与启动子区甲基化. 中国农业科学, 2013, 46(3): 630–638. [DOI]
- [16] Wu Y, Zhang WX, Zuo F, Zhang GW. Comparison of mRNA expression from Y-chromosome X-degenerate region genes in taurine cattle, yaks and interspecific hybrid bulls. *Anim Genet*, 2019, 50(6): 740–743. [DOI]
- [17] Dai LS. Regulation of Testis-specific miRNA-469 by GRTH/DDX25 controls male germ cells development [Dissertation]. *Jilin University*, 2011.
戴立胜. GRTH/DDX25 通过调节睾丸特异 miRNA-469 控制雄性生殖细胞的发育[学位论文]. 吉林大学, 2011. [DOI]
- [18] Zhang SY, Chai ZX, Peng YL, Zhong JC. Sequencing and expression of DDX25/GRTH mRNA in Yak and Cattle-yak testis. *Acta Agric Boreali-Occid Sin*, 2015, 24(10): 1–9.
张思源, 柴志欣, 彭娅林, 钟金城. 牦牛和犏牛 DDX25/GRTH 基因序列及其在睾丸组织的表达水平. 西北农业学报, 2015, 24(10): 1–9. [DOI]
- [19] Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, 2003, 22(37): 5792–5812. [DOI]
- [20] Li X, Li QF, Zhao XB, Xu HT, Gu Y, Zhu X, Xie Z, Liu HL. Sequence analysis and study on the expression level of Dmc1 mRNA in yak and cattle-yak testis. *Sci Agric Sin*, 2010, 43(15): 3221–3229.
李贤, 李齐发, 赵兴波, 徐洪涛, 顾垚, 朱翔, 谢庄, 刘红林. 牦牛和犏牛 Dmc1 基因序列分析及睾丸组织转录水平研究. 中国农业科学, 2010, 43(15): 3221–3229. [DOI]
- [21] Luo H. Expression, cloning and promoter methylation analysis of meiotic homologous recombinant genes in testes of yellow cattle and Dzo [Dissertation]. *Nanjing Agricultural University*, 2013.
骆骅. 黄牛和犏牛睾丸组织中减数分裂同源重组基因表达、克隆与启动子区甲基化分析[学位论文]. 南京农业大学, 2013. [DOI]
- [22] Zeng Q, Huang L, Jin SY, Lin YQ, Zheng YC. Study on the difference of Msh4 gene mRNA expression in testes of yak and Dzo. *Heilongjiang Anim Sci Veter Med*, 2013, (6): 62–64, 191–192.
曾琴, 黄林, 金素钰, 林亚秋, 郑玉才. 牦牛和犏牛睾丸组织 Msh4 基因 mRNA 表达差异的研究. 黑龙江畜牧兽医, 2013, (6): 62–64, 191–192. [DOI]
- [23] Wu YH. Analysis of Y chromosome gene expression patterns and genome-wide DNA methylation differences in cattle, yak and yattle [Dissertation]. *Southwest University*, 2019.
吴雨徽. 普通牛、牦牛和犏牛 Y 染色体基因表达模式及全基因组 DNA 甲基化差异分析[学位论文]. 西南大学, 2019. [DOI]
- [24] Giachini C, Nuti F, Turner DJ, Laface I, Xue YL, Daguin F, Forti G, Tyler-Smith C, Krausz C. TSPY1 copy number variation influences spermatogenesis and shows differences among Y lineages. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(10): 4016–4022. [DOI]
- [25] Zhang GW, Guan JQ, Luo ZG, Zhang WX, Wang L, Luo XL, Zuo FY. A tremendous expansion of TSPY copy number in crossbred bulls (*Bos taurus* x *Bos grunniens*). *J Anim Sci*, 2016, 94(4): 1398–1407. [DOI]
- [26] Wei YP, Fu Y, Wu KX, Chen SM. Boule Gene Evolution Analysis in Cattle, Yak and Cattle-yak Testis Tissue. *Biotechnology*, 2012, 22(4): 53–55.
魏雅萍, 付永, 吴克选, 陈生梅. 黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织中 Boule 基因片段进化分析. 生物技术, 2012, 22(4): 53–55. [DOI]

- [27] Yao W, Li YX, Li BJ, Luo H, Xu HT, Pan ZX, Xie Z, Li QF. Epigenetic regulation of bovine spermatogenic cell-specific gene *boule*. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128250. [DOI]
- [28] Li B, Luo H, Weng Q, Wang S, Pan Z, Xie Z, Wu W, Liu H, Li Q. Differential DNA methylation of the meiosis-specific gene *FKBP6* in testes of yak and cattle-yak hybrids. *Reprod Domest Anim*, 2016, 51(6): 1030–1038. [DOI]
- [29] Zhang GW, Wang L, Chen HY, Guan JQ, Wu YH, Zhao JJ, Luo ZG, Huang WM, Zuo FY. Promoter hypermethylation of *PIWI/piRNA* pathway genes associated with diminished pachytene piRNA production in bovine hybrid male sterility. *Epigenetics*, 2020: 15(9): 914–931. [DOI]
- [30] Yue XP, Chang TC, DeJarnette JM, Marshall CE, Lei CZ, Liu WS. Copy number variation of *PRAMEY* across breeds and its association with male fertility in Holstein sires. *J Dairy Sci*, 2013, 96(12): 8024–8034. [DOI]
- [31] Zhang L, Chen ZH, Zhong JC, Jiang XO, Li N. Cloning and sequence analysis of *TSPY* gene in yak and cattle-yak. *Acta Ecol Anim Domas*, 2013, 34(2): 32–37.
张利亚, 陈智华, 钟金城, 姜雪鸥, 李娜. 牦牛及杂种后代犏牛的 *TSPY* 基因克隆分析. 家畜生态学报, 2013, 34(2): 32–37. [DOI]
- [32] Pan ZX, Liu ZS, Li YX, Yu SL, Li MG, Xie Z, Li QF. Difference of *SNRPN* methylation status and its mRNA expression in testes between cattle-yaks and their parents. *Sci Agric Sin*, 2010, 43(22): 4709–4716.
潘增祥, 刘振山, 李隐侠, 于莎莉, 李明桂, 谢庄, 李齐发. 犏牛及其亲本睾丸组织中印记基因 *SNRPN* DMR 甲基化与 mRNA 表达差异研究. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4709–4716. [DOI]
- [33] Liu ZS. The expression activity and DNA methylation modification of four genes (*IGF2*, *H19*, *SNRPN* and *DAZL*) of Dzo and its parents were analyzed [Dissertation]. *Nanjing Agricultural University*, 2008.
刘振山. 犏牛及其亲本 *IGF2*、*H19*、*SNRPN* 和 *DAZL* 等四个基因表达活性及其 DNA 甲基化修饰分析[学位论文]. 南京农业大学, 2008. [DOI]
- [34] Li MG, Liu ZS, Pan ZX, Luo H, Xie Z, Li QF. The mRNA expression and methylation status in imprinting control region of *H19* gene between cattle-yak and their parents. *J Integr Agric*, 2012, 11(10): 1691–1699. [DOI]
- [35] Dong LY, Li QF, Qu XG, Li YX, Li XF, Xu HT, Xie Z. Expression levels of *Cdc2* and *Cdc25A* mRNA in cattle, yak, and cattle-yak testis. *Hereditas(Beijing)*, 2009, 31(5): 495–499.
董丽艳, 李齐发, 屈旭光, 李隐侠, 李新福, 徐洪涛, 谢庄. 黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织中 *Cdc2*、*Cdc25A* 基因 mRNA 表达水平. 遗传, 2009, 31(5): 495–499. [DOI]
- [36] Russell S, Patel M, Gilchrist G, Stalker L, Gillis D, Rosenkranz D, Lamarre J. Bovine piRNA-like RNAs are associated with both transposable elements and mRNAs. *Reproduction*, 2017, 153(3): 305–318. [DOI]
- [37] Zeng XX, Liu ZN, Yang Q, Song QQ, Zhong JC, Ji QM, Ma ZJ. Self-renewal and differentiation regulation of spermatogonial stem cells in yak and Dzo. In: The Ninth National Congress and academic Symposium of the Chinese Society of Genetics. Haerbin, China, 2013.
曾贤彬, 刘仲娜, 杨琴, 宋乔乔, 钟金城, 姬秋梅, 马志杰. 牦牛和犏牛精原干细胞的自我更新与分化调控. 见: 中国遗传学会第九次全国会员代表大会暨学术研讨会. 中国哈尔滨, 2013. [DOI]
- [38] Ma XQ. Study on hybrid sterile gene *Prdm9* in yak [Dissertation]. *Southwest University for nationalities*, 2014.
马晓琴. 牦牛杂交不育基因 *Prdm9* 的研究[学位论文]. 西南民族大学, 2014. [DOI]
- [39] Yan P, Xiang L, Guo X, Bao PJ, Jin S, Wu XY. The low expression of *Dmrt7* is associated with spermatogenic arrest in cattle-yak. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(11): 7255–7263. [DOI]
- [40] Lei JW, Huang L, Jin SY, Zheng YC. Comparison of mRNA levels of *ERK1*, *ERK2* and *P38* genes in testes of yaks and male sterile Dzo. *Sichuan J Zool*, 2016, 35(5): 666–671.
雷杰雯, 黄林, 金素钰, 郑玉才. 牦牛和雄性不育犏牛睾丸 *ERK1*、*ERK2*、*P38* 基因 mRNA 水平的比较. 四川动物, 2016, 35(5): 666–671. [DOI]
- [41] Stewart KR, Veselovska L, Kelsey G. Establishment and functions of DNA methylation in the germline. *Epigenomics*, 2016, 8(10): 1399–1413. [DOI]
- [42] Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 2005, 308(5727): 1466–1469. [DOI]
- [43] Bie BB, Wang Y, Li L, Fang H, Liu LB, Sun J. Noncoding RNAs: Potential players in the self-renewal of mammalian spermatogonial stem cells. *Mol Reprod Dev*, 2018, 85(8–9): 720–728. [DOI]
- [44] Zeng Y, Chen T. DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. *Genes (Basel)*, 2019, 10(4): 257. [DOI]
- [45] Cui XR, Jing X, Wu XQ, Yan MQ, Li Q, Shen Y, Wang ZQ. DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Exp Ther Med*, 2016, 12(4): 1973–1979. [DOI]
- [46] Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of Azoospermia. *Spermatogenesis*, 2014, 4: e28218. [DOI]
- [47] Lee J, Shinohara T. Epigenetic modifications and self-renewal regulation of mouse germline stem cells. *Cell Res*,

- 2011, 21(8): 1164–1171. [DOI]
- [48] Gu Y, Li QF, Pan ZX, Li MG, Luo H, Xie Z. Molecular cloning, gene expression and methylation status analysis of PIWIL1 in cattle-yaks and the parental generation. *Anim Reprod Sci*, 2013, 140(3–4): 131–137. [DOI]
- [49] Liu ZS, Li QF, Pan ZX, Qu XG, Zhang CX, Xie Z. Comparative analysis on mRNA expression level and methylation status of DAZL gene between cattle-yaks and their parents. *Anim Reprod Sci*, 2011, 126(3–4): 258–264. [DOI]
- [50] Li B, Luo H, Weng Q, Wang S, Pan Z, Xie Z, Wu W, Liu H, Li Q. Differential DNA methylation of the meiosis-specific gene FKBP6 in testes of yak and cattle-yak hybrids. *Reprod Domest Anim*, 2016, 51(6): 1030–1038. [DOI]
- [51] Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, O'Carroll D, Zamore PD. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(2): 89–108. [DOI]
- [52] Yuan ZH, Zhao YM. The regulatory functions of piRNA/PIWI in spermatogenesis. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(8): 683–691.
袁志恒, 赵艳梅. piRNA/PIWI 功能调控与精子发生. 遗传, 2017, 39(8): 683–691. [DOI]
- [53] Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 405–433. [DOI]
- [54] Liu QP, AN N, Cen S, LI XY. Molecular mechanisms of genetic transposition inhibition by piRNA. *Hereditas(Beijing)*, 2008, 40(6): 445–450.
刘启鹏, 安尼, 岑山, 李晓宇. piRNA 抑制基因转座的分子机制. 遗传, 2018, 40(6): 445–450. [DOI]
- [55] Li XZ, Roy CK, Dong XJ, Bolcun-Filas E, Wang J, Han BW, Xu J, Moore MJ, Schimenti JC, Weng ZP, Zamore PD. An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes. *Mol Cell*, 2013, 50(1): 67–81. [DOI]
- [56] 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]
- [57] 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]
- [58] 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]
- [59] Carmell MA, Girard A, Van De Kant HJG, Bourchis 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]
- [60] Weick EM, Miska EA. piRNAs: from biogenesis to function. *Development*, 2014, 141(18): 3458–3471. [DOI]
- [61] Kawaoka S, Izumi N, Katsuma S, Tomari Y. 3' end formation of PIWI-interacting RNAs *in vitro*. *Mol Cell*, 2011, 43(6): 1015–1022. [DOI]
- [62] Lim SL, Qu ZP, Kortschak RD, Lawrence DM, Geoghegan J, Hempfling AL, Bergmann M, Goodnow CC, Ormandy CJ, Wong L, Mann J, Scott HS, Jamsai D, Adelson DL, O'bryan MK. HENMT1 and piRNA stability are required for adult male germ cell transposon repression and to define the spermatogenic program in the mouse. *PLoS Genet*, 2015, 11(10): e1005620. [DOI]
- [63] Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 141–148. [DOI]
- [64] Xia MM, Shen XY, Niu CM, Xia J, Sun HY, Zheng Y. MicroRNA regulates sertoli cell proliferation and adhesion. *Hereditas(Beijing)*, 2008, 40(9): 724–732.
夏蒙蒙, 申雪沂, 牛长敏, 夏静, 孙红亚, 郑英. MicroRNA 参与调控睾丸支持细胞的增殖与粘附功能. 遗传, 2018, 40(9): 724–732. [DOI]
- [65] Rajender S, Meador C, Agarwal A. Small RNA in spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012, 4: 1266–1274. [DOI]
- [66] He ZP, Jiang JJ, Kokkinaki M, Tang L, Zeng WX, Gallicano I, Dobrinski I, Dym M. MiRNA-20 and mirna-106a regulate spermatogonial stem cell renewal at the post-transcriptional level *via* targeting STAT3 and Ccnd1. *Stem Cells*, 2013, 31(10): 2205–2217. [DOI]
- [67] Yang QE, Racicot KE, Kaucher AV, Oatley MJ, Oatley JM. MicroRNAs 221 and 222 regulate the undifferentiated state in mammalian male germ cells. *Development*, 2013, 140(2): 280–290. [DOI]
- [68] Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H, Takayama M, Asada K, Mirochnitchenko O, Inouye M, Kato I. The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(6): 1765–1771. [DOI]
- [69] Xu CF. The identification and functional analysis of microRNAs in the spermatogenic arrest of cattleyak [Dissertation]. *Southwest University of Science and Technology*, 2019.
徐传飞. 犏牛精子发生阻滞相关 microRNA 鉴定与功能分析[学位论文]. 西南科技大学, 2019. [DOI]
- [70] Liao K. Comparative analysis of microRNA in yak, ordinary cattle and cattleyak testis tissue [Dissertation].

- Southwest University for Nationalities, 2016.
- 廖珂. 牦牛、普通牛和犏牛睾丸组织 microRNA 的比较研究[学位论文]. 西南民族大学, 2016. [DOI]
- [71] Xu CF, Shah MA, Mipam T, Wu SX, Yi CP, Luo H, Yuan M, Chai ZX, Zhao WS, Cai X. Bovid microRNAs involved in the process of spermatogonia differentiation into spermatocytes. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(2): 239–250. [DOI]
- [72] Zhang CW, Gao LZ, Xu EY. LncRNA, a new component of expanding RNA-protein regulatory network important for animal sperm development. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 59: 110–117. [DOI]
- [73] Hung T, Wang YL, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, Horlings HM, Shah N, Umbricht C, Wang P, Wang Y, Kong B, Langerød A, Børresen-Dale AL, Kim SK, Van De Vijver M, Sukumar S, Whitfield ML, Kellis M, Xiong Y, Wong DJ, Chang HY. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell cycle promoters. *Nat Genet*, 2011, 43(7): 621–629. [DOI]
- [74] Di Ruscio A, Ebraldidze AK, Benoukraf T, Amabile G, Goff LA, Terragni J, Figueroa ME, De Figueiredo Pontes LL, Alberich-Jorda M, Zhang P, Wu M, D'alo F, Melnick A, Leone G, Ebraldidze KK, Pradhan S, Rinn JL, Tenen DG. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature*, 2013, 503(7476): 371–376. [DOI]
- [75] Berghoff EG, Clark MF, Chen S, Cajigas I, Leib DE, Kohtz JD. Evf2 (Dlx6as) lncRNA regulates ultraconserved enhancer methylation and the differential transcriptional control of adjacent genes. *Development*, 2013, 140(21): 4407–4416. [DOI]
- [76] Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, Ding HM, Butty VL, Torrey L, Haas S, Abo R, Tabebordbar M, Lee RT, Burge CB, Boyer LA. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 2013, 152(3): 570–583. [DOI]
- [77] Ni MJ, Hu ZH, Liu Q, Liu MF, Lu MH, Zhang JS, Zhang L, Zhang YL. Identification and characterization of a novel non-coding RNA involved in sperm maturation. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26053. [DOI]
- [78] Lei QJ, Pan Q, Li N, Zhou Z, Zhang JQ, He X, Peng S, Li GP, Sidhu K, Chen SL, Hua JL. H19 regulates the proliferation of bovine male germline stem cells via IGF-1 signaling pathway. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 915–926. [DOI]
- [79] A GYD, Xiong XR, Wang Y, Yang XY, Han J, Wang B, Li J. Identification and analysis of long non-coding RNA associated with cattle-yak male infertility. *Acta Vet Et Zootech Sin*, 2019, 50(3): 551–561.
- 阿果约达, 熊显荣, 王艳, 杨显英, 韩杰, 王斌, 李键. 犏牛雄性不育相关 lncRNA 的鉴定与分析. 畜牧兽医学报, 2019, 50(3): 551–561. [DOI]
- [80] Wu SX. Identification and functional analysis of lncRNA related to spermatogenesis block in Dzo [Dissertation]. Southwest University of Science and Technology, 2019.
- 伍仕鑫. 犏牛精子发生阻滞相关 lncRNA 的鉴定与功能分析[学位论文]. 西南科技大学, 2019. [DOI]
- [81] Ge SQ, Li JZ, Zhang XJ. Methylation and acetylation of histones during spermatogenesis. *Hereditas(Beijing)*, 2011, 33(9): 939–946.
- 葛少钦, 李建忠, 张晓静. 精子发生过程中组蛋白甲基化和乙酰化. 遗传, 2011, 33(9): 939–946. [DOI]
- [82] Fischle W, Wang YM, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev*, 2003, 17(15): 1870–1881. [DOI]
- [83] Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ. Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(3): 89–91. [DOI]
- [84] Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *Int J Androl*, 2008, 31(6): 537–545. [DOI]
- [85] Werner M, Ruthenburg AJ. The united states of histone ubiquitylation and methylation. *Mol Cell*, 2011, 43(1): 5–7. [DOI]
- [86] Niu YX, Bai JT, Zheng SZ. The regulation and function of histone methylation. *J Plant Biol*, 2018, 61(6): 347–357. [DOI]
- [87] Yap DB, Walker DC, Prentice LM, McKinney S, Turashvili G, Mooslehner-Allen K, de Algara TR, Fee J, de Tassigny Xd, Colledge WH, Aparicio S. Mll5 is required for normal spermatogenesis. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27127. [DOI]
- [88] Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*, 2007, 450(7166): 119–123. [DOI]
- [89] Li YC, Wang GW, Xu SR, Zhang XN, Yang QE. The expression of histone methyltransferases and distribution of selected histone methylations in testes of yak and cattle-yak hybrid. *Theriogenology*, 2020, 144: 164–173. [DOI]