

非编码 RNA 在胚胎发育过程中的作用

吴昊^{1,2,3}, 张运海^{1,2}, 凌英会^{1,2*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036; 3. 安徽省羊繁育工程技术研究中心, 合肥 230036)

摘要: 胚胎发育是一个复杂的过程, 其发生受到了很多转录调控因子的调控。随着高通量深度测序技术的发展, 研究发现非编码 RNA(ncRNA)对动物胚胎发育、X 染色体失活、性别调控、脑部发育都具有十分重要的调控作用。其中, miRNA 主要通过与其靶向 mRNA 的 3'UTR 结合参与调控胚胎发育的相关基因; lncRNA 通过转录干扰或是修饰染色质来调控相关基因从而介导哺乳动物 X 染色体失活和昆虫 W 染色体的剂量补偿; piRNA 通过沉默转座子来维持生殖细胞 DNA 完整性, 并参与生殖细胞形成及家蚕性别调控; circRNA 可以作为 miRNA 的海绵调控动物脑部的发育。本文拟从 miRNA、lncRNA、piRNA、circRNA 等 ncRNA 角度阐述其在胚胎发育过程中的研究进展, 为进一步研究 ncRNA 参与调控动物胚胎发育过程的作用机制提供参考。

关键词: 非编码 RNA(ncRNA); 胚胎发育; X 染色体失活; 性别调控; 脑部发育

中图分类号: S813.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)01-0001-07

The Progress of Recent Advances in the ncRNA-Mediated Regulation during Embryogenesis

WU Hao^{1,2,3}, ZHANG Yun-hai^{1,2}, LING Ying-hui^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Local Animal Genetic Resources Conservation and Biobreeding Laboratory of Anhui Province, Hefei 230036, China; 3. Goat Breeding Engineering Technology Research Center of Anhui Province, Hefei 230036, China)

Abstract: Embryogenesis was a complex progress which is regulated by many transcriptional regulation factors. With the development of high-throughput sequencing technology, non-coding RNAs (ncRNAs) are found to play an important role in the embryogenesis, X chromosome inactivation, gender regulation and the development of animal brain. Firstly, miRNAs regulate the expression of genes related to embryogenesis through targeting the 3' UTR of the targeted mRNAs. Secondly, lncRNAs mediate mammal X chromosome inactivation and insect X chromosome dosage compensation through interfering transcription or modifying chromatin. Thirdly, piRNAs can maintain the DNA integrity of the germ cell in the way of silencing transposon and regulating silkworm sex differentiation. Lastly, circRNAs can act as the spongy of miRNAs and play a great role in the development of mammal animal brain. Here, we elucidate the advances of ncRNAs through the regulation during animal embryogenesis, which will provide a reference for further study on the mechanism of ncRNA during the embryogenesis.

Key words: ncRNA; embryogenesis; X chromosome inactivation; gender regulation; the development of brain

收稿日期: 2016-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301934; 31372310); 安徽省现代农业产业技术体系(2016-2020)

作者简介: 吴昊(1991-), 男, 安徽巢湖人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 1057982334@qq.com

* 通信作者: 凌英会, 博士, 副教授, 主要从事草食动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: caaslyh@163.com

人类基因组计划表明,在人类基因组中的 30 亿个碱基中,仅有 1.5% 的碱基序列编码蛋白,其他 98.5% 都是非蛋白编码序列。这些非编码序列曾一度被认为是“垃圾”,在随后的 ENCODE 计划中表明这些序列绝大多数都能被转录成非编码的 RNA (ncRNA),这些 ncRNA 曾一度被认为是“转录噪音”,近几年的研究表明,这些 ncRNA 在细胞增殖、分化、凋亡和重大疾病的发生中发挥了重要的作用^[1-2]。ncRNA 可以分为具有调控作用的 ncRNA 和不具有调控作用的“管家”ncRNA。其中具有调控作用的 ncRNA 可以按照其长短分为:小 RNA 包括 siRNA、miRNA;长度在 24~31 nt 略长于小 RNA 的 piRNA;长度大于 200 nt 的 lncRNA;以及最新发现的环状的 circRNA。它们通过一系列复杂的机制调控基因表达。例如,最先发现的 miRNA 主要通过与其靶向的 mRNA 的 3'UTR 结合来消除或者破坏 mRNA 的稳定性^[3];lncRNA 可以通过转录干扰或是修饰染色质来调控相关基因^[4];piRNA 可以通过沉默转座子来维持生殖细胞 DNA 完整性^[5];circRNA 可以作为海绵来吸附 miRNA 从而间接地调控相关基因的表达^[6]。

ncRNA 广泛地参与并调控与生殖相关的一些关键步骤,包括精子和卵母细胞的发生与成熟、早期胚胎和动物中脑的发育,以及维持胚胎干细胞的多能性等。研究表明,从早期胚胎的形成再到发育成完整个体的各个阶段,它们共同组成一个复杂的调控机制,对于胚胎的发育至关重要。本文拟从与胚胎发育和生殖相关的几个关键步骤来阐述 ncRNA 与胚胎发育之间的联系。

1 miRNA 参与早期胚胎发育

大多数 miRNA 的产生都依赖于特别的 RNA 处理酶包括 Drosha,它的重要辅助因子 Dgcr8,以及 Dicer。由于内源性 siRNA 的产生依赖于 Dicer 而不是 Dgcr8,Dicer 的缺失阻碍了大多数 miRNA 和内源性 siRNA 的成熟,然而敲除了 Dgcr8 仅仅只是阻碍了 miRNA 的产生,根据这一特性可以通过特异性敲除 Dgcr8 来研究 miRNA 在胚胎发育过程中的功能。

Dicer 酶突变的斑马鱼的卵母细胞和受精卵在胚胎发育过程中出现了严重缺陷,说明 miRNA 对胚胎发育的不同阶段都具有十分重要的意义^[7-9]。卵母细胞和受精卵 Dicer 突变的斑马鱼经历了胚子

的形成和细胞命运的决定,但是它们在胚层的形成、形态的发生、以及器官的形成中都出现严重的缺陷。这些缺陷都可以通过体外注射相应成熟的 miRNA 得以弥补,说明正是由于 miRNA 的功能性缺失才导致了 Dicer 突变的斑马鱼卵母细胞和受精卵发育异常。

miRNA 的活性对于早期胚胎的发育极其重要,突变 miRNA 生源机制中重要辅酶 Dgcr8 酶造成小鼠受精卵和卵母细胞发育畸形^[10-11]。Dgcr8 突变的小鼠卵母细胞可以正常发生,但是 Dicer 突变的小鼠产生了受损的卵母细胞并且这些卵母细胞有几百个错误的转录本^[12-13]。说明小鼠卵母细胞内源性的 miRNA 而不是 siRNA 对于小鼠卵母细胞成熟极为重要。通过组织特异性敲除 Dicer 揭示了 miRNA 在哺乳动物胚胎受精后发育的作用。

早期关于 miRNA 的报道是其在母型-合子型过渡(MZT)中的研究,当受精卵转录本开始表达时,母系的 mRNA 随之开始降解^[8]。斑马鱼的 miR-430 家族在精卵结合后开始表达,有研究表明,miR-430 可以加速受精卵基因组的激活和数以百计的母系 mRNA 的脱腺苷化和清除。在 MZdicer 突变体中,这些母系的 mRNA 持续存在,它们所造成的胚胎形态发生的缺陷可以被体外注射 miR-430 家族成员所弥补。在斑马鱼和线虫中,miR-430 具有高度的保守性,这也增加了 miR-430 家族在人类同源家族(miR-302、miR-327 和 miR-516-520)和小鼠同源家族(miR-290-295)同样涉及 MZT 的可能性。这些 miRNA 在早期的胚胎发育中表达,但是没有体外的突变分析试验来验证它们的功能^[14]。

miRNA 在胚胎干细胞增殖与自我更新方面也具有重要的作用。其中 miR-302 家族和小鼠 miR-290-295(人 miR-371-373 家族)在 ESC 中高度表达^[15]。特别是一些与增殖相关的因子如 SOX2、OCT4 都可以通过结合在 miR-302 的启动子保守区域来激活它的表达^[15]。miR-302a 可以抑制 G1 期调控蛋白 D1 表达,该蛋白可以增加 hESC 的 S 期细胞数目以及调控细胞周期,因此 miR-302a 可以促进细胞的自我更新和增殖^[15]。研究表明,在 ESC 中,OCT4、miR-320 在转录和转录后可抑制 NR2F2、COOP-TF II 的表达,在一个正反馈的循环中,NR2F2 可以抑制 OCT4 表达^[16]。鼠 miR-290-295 的人源同系家族 mi-371-373 在 hESC 中同样高度表达,而在其他组织中表达量下调^[17]。最近研究

表明,Wnt 信号通路基因包括 *DKK1*、*TGFBR2*、*BTG1* 和 *LEFTY1*,这些基因可以直接靶向结合 miR-372-373^[18]。miR-371-373 家族的表达可以通过直接结合 β -catenin/LEF1 到 miR-371-373 的启动子区域被 Wnt/ β -catenin 通路反式激活。这些发现阐明了一个新的 β -catenin/LEF1-miR-372 和 miR-DKK1 正反馈调节循环,这些 miRNA 在 ESC 的维持和增殖中起关键作用^[18]。

此外,有研究表明 miRNA 在调控胚胎干细胞的发育和分化中也同样具有重要的作用。突变 miRNA 生源机制的关键酶 *Dicer1* 导致小鼠早期胚胎的死亡^[19]。*Dicer* 突变的 ESC 在诱导分化条件下,由于分化标志物 OCT4 缺失,细胞仍表现为多能性^[20]。在 *Dgcr8* 突变的小鼠中,与多能性相关标志物如 OCT4 和 *Nanog* 无法下调,细胞增殖出现 G1 期阻滞^[10]。*Dicer* 突变小鼠和野生型的对比发现,干细胞多能性因子明显上调,细胞增殖和分化出现明显障碍。*let-7* 存在于与分化相关的大多数组织中,将 *let-7* 注射到 *Dgcr8* 突变的小鼠胚胎干细胞中发现,在一定条件下这些细胞又恢复了分化潜能;*let-7* 靶向与胚胎干细胞多能性相关的 miRNA 如 *c-myc*、*sal 14*、*lin 28*^[21]。一些 miRNA 的靶标则是一些与多能性相关的 mRNA,例如 miR-134、miR-296、miR-470 的靶标为 *Nanog*、OCT4、SOX2;miR-145 的靶标为 OCT4、SOX2、KLF4^[22-23]。

2 lncRNA 介导哺乳动物 X 染色体失活和昆虫 W 染色体的剂量补偿

lncRNA 是一类长度大于 200 nt 的非编码 RNA,早期关于 lncRNA 的研究是其在胚胎发育中的剂量补偿和基因印记中作用^[24-25]。这两个过程都依赖 lncRNA 介导染色质来调控表观遗传学修饰相关基因的表达。

绝大多数印记区域都包含至少一个反义相关的 lncRNA,这些 lncRNA 多数都参与了基因印记^[26]。lncRNA 对于大多数区域的基因印记仍然是不明确的,但是在生长调控期间拮抗印记基因活力的胰岛素样生长因子 IGF2 和 IGF2 受体说明基因印记在发育中的功能^[27-28]。基因印记阐述了正正式作用的 lncRNA 可以沉默毗邻的基因并调控基因的剂量。亲代特异性等位基因的表达受控于差异甲基化 DNA 序列,即所谓的印记控制区(ICRS)。一个未

甲基化 ICR 能够确保一个附近的 lncRNA 的表达,这个 lncRNA 可以诱导所选的毗邻亲本基因的沉默。尽管在胚胎中这一机制尚不明确,但是在胚胎外的组织中例如胎盘,lncRNA 则可以通过招募修饰 DNA 和组蛋白的复合物致使特异性的等位基因表达^[29-30]。

雌性哺乳动物的胚胎双 X 染色体中的一条随机失活使其 X 染色体相关的基因数量与雄性的动物保持一致。一个被称为 X 染色体失活中心的基因组区域介导了 X 染色体失活,这个区域编码了至少 7 个有调控作用的 ncRNA。其中最关键的是 *Xist* 和 *Tsix* 这对反义的双等位 17 kb 的 lncRNA^[31]。起初 *Xist* 和 *Tist* 双等位基因均表达,但是到一定时期,在尚不明确的机制作用下,*Tist* 只表达于有活性的 X 染色体。*Tist* 的转录本通过正式作用招募 DNA 转甲基酶到 *Xist* 的启动子区域来沉默 *Xist*,这一过程是否涉及到 *Dicer* 酶介导的 *Tsix-Xist* 双重 RNA 是有争议的^[32-33]。失活的一条 X 染色体 *Xist* 的表达上调需要一个反式作用 lncRNA (*Jpx*),*Jpx* 是由 XIC 区域编码的并且已被证实它可以拮抗 *Tsix*^[34]。在 Xi 上由于缺乏 *Tsix* 而确保了一个被称为 *RepA* 的转录本的表达。*RepA* 则可以通过正式作用招募 PRC2,之后 PRC2 在 *Xist* 的 5' 末端沉淀抑制 H3K27me3^[35-36]。在 Xi 上 *RepA* 直接抑制染色质状态对于 *Xist* 表达的上调非常重要,随之依赖于 *Xist* 沉默标记基因的机制扩散至整个 Xi^[37]。*Xist* 覆盖于整个 Xi 导致染色质变异,这个状态伴随雌性动物的一生^[33]。X 染色体的失活阐述了多个 lncRNA 一连串的互相反应如何建立一个稳定的染色体沉默区域,这个区域决定并维持了一个胚胎的分化命运。

在果蝇胚胎中,剂量补偿存在一套完全不同的机制,果蝇进化出一套不同策略来平衡 X 染色体的数量。剂量补偿同样依赖于 X 染色体密切相关的 lncRNA、*rox1* 和 *rox2*,但是果蝇 *rox1* 和 *rox2* 还包含了剂量补偿复合物(DDC),这其中并不诱导基因的沉默,相反地,它可以在单个雄性染色体上诱导基因的成倍表达。DDC 通过乙酰化组蛋白 H4 来激活毗邻基因的表达。DDC 核心蛋白突变和 *rox1* 与 *rox2* 双功能性突变的果蝇由于 X 染色体相关基因的缺失而造成胚胎致死^[38-39]。

3 piRNA 参与生殖细胞的形成及家蚕的性别调控

在真核生物中小 RNA 以各种不同的功能构成了一个大的分子调控家族。最近的研究发现了一种新的小 RNA 长度略大于 miRNA 和 siRNA, 长度大约在 24~31 nt 的小 RNA。这种新的 RNA 的产生不依赖于 Dicer 和 Drosha 酶, 可以与 piwi 交互, 被命名为 piwi 交互 RNA (piwi-RNA), 简称 piRNA。相对于其他的小 RNA, piRNA 的产生过程仍然不为人知, piRNA 除了在生殖细胞中起作用外, 还可以沉默转座子。与绝大多数动物一样, 人类基因不少来自于自私的 DNA 链——转座子。这类遗传物质能够在染色体不同位点间跳跃, 导致基因的失活甚至引发癌症。在生殖细胞系中, 转座子的跳跃还可能导致不孕。对于绝大多数的动物来说, 无法控制转座子都会最终导致物种灭绝^[5]。显然, piwi-interacting RNA (piRNA) 的机制是通过沉默转座子来维持基因组的完整性。

关于 piRNA 的产生机制, 研究推测可能来源于两个途径: 第一个是初级加工途径, 第二个是“乒乓球”扩增途径。大多数 piRNA 的序列都对应了一个被称为 piRNA 簇的短基因组片段^[40-41]。果蝇的 piwi 蛋白包括 Ago3、AUB 和 piwi; 小鼠中, 有 4 种 Ago 蛋白 (Ago1~4) 和 3 种 piwi 蛋白: MIWI、MILI (PIWIL2) 和 MIWI2 (PIWIL4)。在哺乳动物中这些进化上保守的 piwi 家族蛋白对于生殖细胞的发育具有极其重要的意义, 它们在小鼠生殖细胞中的表达具有时空差异性。精子的形成可以分为 3 个阶段, 第一阶段生殖干细胞的有丝分裂自我更新复制产生原始的精母细胞; 第二阶段, 精母细胞通过减数分裂产生单倍体圆形的精子细胞, 这一阶段可细分为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期; 第三阶段, 单倍体的圆形精子细胞经过重新的组装和形态的改变成为成熟的精子细胞^[42]。Mili、Miwi 和 Miwi2 突变的小鼠出生后 2 周睾丸发育异常, 这个时期恰好对应第一次减数分裂。Miwi2 和 Miwi 的突变则阻碍了精母细胞发育到中线期, 而 Miwi 突变的精母细胞可以发育到圆形精子, 但无法发育成一个完整的精子^[43-44]。粗线期 piRNA 是最近研究的热点, 粗线期 piRNA 的产生独立于乒乓球循环, 它可以通过与 MIWI 蛋白以及脱腺苷酶 CAF1 组

装成 pi-RISC 复合物, 通过不完全配对行使类似 miRNA 的功能, 对精子发生后的 mRNA 进行大规模清除, 这对于胚胎发育中父本 mRNA 的清除具有非常重要的意义^[45]。在果蝇卵泡细胞中, piRNA 可以识别并沉默一种名为 *fascilins* 的基因, 这种基因可以编码类似于细胞粘连分子的免疫球蛋白, piRNA 突变导致 Fas 的表达量升高, 最终阻碍果蝇卵巢中生殖细胞与体细胞的混合, 也阻碍卵细胞的发育^[46]。另外, 也有研究表明, 在果蝇早期胚胎发育过程中, Aub 和 Ago3 可以与 piRNA 通过碱基互补配对识别 nos mRNA, 进而招募 RNA 结合蛋白 Smaug 与 CCR4-NOT 复合物, 介导 nos mRNA 脱腺苷化和消除, 维持果蝇早期胚胎的正常发育^[47]。相关研究也表明, piRNA 可以调控家蚕的性别, 区别于哺乳动物 XY 染色体决定性别, 家蚕的性别是由 W 和 Z 染色体决定的, WW 的表型是雄性, 而 WZ 则表型为雌性, 家蚕的 W 染色体可以编码一种叫 Fem 的 piRNA, 这种 piRNA 在早期胚胎发育中对于家蚕性别的调控至关重要^[48]。

4 circRNA 作为 miRNA 的海绵在维持哺乳动物脑部发育中的作用

环状 RNA (circRNA) 过去一直被认为是一种错误的剪切体, 是飞行于“雷达”之下的新型 RNA, 但是最近的研究表明 circRNA 通过一系列方式来调控基因的表达。伴随着高通量深度测序技术的发展, 越来越多的 circRNA 被发现于各个组织和细胞中, 这也暗示 circRNA 对于真核细胞有着重要的作用。

大多数的真核 circRNA 分子是在剪切和拼接过程中产生的, 这一过程是由剪切体机制或是由 group1 和 group2 核酸酶所催化的。这些一连串连续的序列普遍地被剪切出来并连在一起, 而这其中的内含子则以线型或是套锁型的分子结构被剪切出来, 并发挥了一定的功能。由于缺乏 5' 帽子或是多聚 A 尾, 这些 circRNA 明显区别于它们的线型对应物, 这些特性也使得 circRNA 能够避免被核酸外切酶降解。关于 circRNA 的作用方式现阶段普遍认为, circRNA 可以通过调控转录本或是作为 miRNA 的海绵来调控 miRNA^[49-50]。circRNA 作为 miRNA 的海绵通过吸附 miRNA 来调控基因的表达。例如外显子 circRNA, ciRs-7/CDR1as 可以作

为 miR-7 或是反义的 CDR-1 的海绵^[51]。T. B. Hansen 等发现了 CDR-1 可以翻译一个自然的反义的 CDRas, CDRas 可以结合 miR-7 而被 miR-67 所切割^[52]。随后发现, CDRas 包括了超过 70 个可以与之匹配的 miR-7 和 Ago 蛋白, 而 Ago 蛋白可以与 miRNA 结合。沉默 CDRas 或是 miR-67 的过表达都可以降低 miR-7 靶基因的表达, 与之对照的试验通过增强 CDRas 的表达来增强 miR-7 的靶基因的表达^[49]。此外, CDRas 在神经组织中高度表达, 在缺乏 CDR1 位置的胚胎中, CDRas 的过表达降低中脑的尺寸, 并且表型为 miR-7 功能性缺失, 造成了中脑的形态学的缺陷^[50]。类似地, 在鼠科动物中发现了性别决定区域 Y(Sry), 该区域负责哺乳动物的性别决定和产生睾丸特异性的 circRNA^[53]。这种单个外显子 circRNA 与 miR-138 有 16 个结合部位, 此外在 HEK293 细胞中共转染的 circRNA Sry 载体和 PJEBB-138 载体试验证明 miR-138 可以与 AGO2 被共沉淀^[49]。circRNA 也可以作为诊断一些疾病的生物标记, 在不同的细胞内 circRNA 表达的种类和数量都是不同的, 因此它也可以作为诊断一些疾病的生物标志物^[54]。在早期胚胎发育中 miRNA 起到了关键性的作用, 在此过程中是否也有 circRNA 作为海绵来吸附相关的 miRNA, 从而调控相关基因的表达来调控胚胎的发育有待进一步地研究。

5 展望

动物的胚胎发育是一个复杂且高度有序的过程, 除了一些编码蛋白的 DNA 在这一过程中参与了调控, 更多是 ncRNA 参与了这一复杂而精细的调控, ncRNA 除了参与胚胎的发育, 生殖细胞的维持分化, 此外, ncRNA 对一些重大疾病, 例如心血管疾病、癌症的发生和物种的进化等各方面都有着重要的作用。在早期胚胎发育中 ncRNA 之间构成了一个复杂的调控网络, 从生殖细胞的成熟, 到胚胎着床, 以至于后期胚胎干细胞的分化, ncRNA 如何有序调控这一系列复杂的生理生化反应至今尚不明确, ncRNA 在胚胎发育中作用的研究将为人类生殖疾病的发生与控制, 发育生物学的研究, 干细胞治疗等重大医学难题的解决提供了参考。

参考文献 (References):

- [1] 戴梦红, 陆启荣, 程古月, 等. 畜禽动物中长链非编码 RNA 的研究现状 [J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(5): 864-869.
- [2] 占思远, 李利, 王林杰, 等. 骨骼肌发育调控相关 lncRNAs 研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(4): 637-644.
- [3] ZHAN S Y, LI L, WANG L J, et al. Research progress of long noncoding RNAs in the regulation of skeletal muscle development [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(4): 637-644. (in Chinese)
- [4] BUSHATI N, COHEN S M. microRNA functions [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23:175-205.
- [5] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: insights into functions [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3):155-159.
- [6] LESLIE M. Cell biology. The immune system's compact genomic counterpart [J]. *Science*, 2013, 339(6115):25-27.
- [7] ANDREEVA K, COOPER N G. Circular RNAs: New players in gene regulation [J]. *Adv Biosci Biotechnol*, 2015, 6(6):433-441.
- [8] GIRALDEZ A J, CINALLI R M, GLASNER M E, et al. microRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish [J]. *Science*, 2005, 308(5723):833-838.
- [9] GIRALDEZ A J, MISHIMA Y, RIHEL J, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs [J]. *Science*, 2006, 312(5770):75-79.
- [10] CHOI W Y, GIRALDEZ A J, SCHIER A F. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430 [J]. *Science*, 2007, 318(5848):271-274.
- [11] WANG Y M, MEDVID R, MELTON C, et al. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(3):380-385.
- [12] SUH N, BAEHNER L, MOLTZAHN F, et al. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos [J]. *Curr Biol*, 2010, 20(3):271-277.
- [13] LUNDE E, LIU M, HARTLEY R S, et al. Deadenylation of maternal mRNAs mediated by miR-427 in *Xenopus laevis* embryos [J]. *RNA*, 2009, 15(12):2007-2017.

- 2351-2363.
- [13] MISHIMA Y, GIRALDEZ A J, TAKEDA Y, et al. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430 [J]. *Curr Biol*, 2006, 16(21):2135-2142.
- [14] KOERNER M V, PAULER F M, HUANG R, et al. The function of non-coding RNAs in genomic imprinting [J]. *Development*, 2009, 136(11):1771-1783.
- [15] CARD D A, HEBBAR P B, LI L, et al. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(20):6426-6438.
- [16] ROSA A, BRIVANLOU A H. A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation [J]. *EMBO J*, 2011, 30(2):237-248.
- [17] STADLER B, IVANOVSKA I, MEHTA K, et al. Characterization of microRNAs involved in embryonic stem cell states [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(7):935-950.
- [18] ZHOU A D, DIAO L T, XU H, et al. β -Catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/ β -catenin-signaling pathway [J]. *Oncogene*, 2012, 31(24):2968-2978.
- [19] BERNSTEIN E, KIM S Y, CARMELL M A, et al. Dicer is essential for mouse development [J]. *Nat Genet*, 2003, 35(3):215-217.
- [20] MURCHISON E P, PARTRIDGE J F, TAM O H, et al. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(34):12135-12140.
- [21] MELTON C, JUDSON R L, BLELLOCH R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2010, 463(7281):621-626.
- [22] LA ROCCA G, BADIN M, SHI B, et al. Mechanism of growth inhibition by MicroRNA 145: The role of the IGF-I receptor signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 220(2):485-491.
- [23] TAY Y, ZHANG J, THOMSON A M, et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation [J]. *Nature*, 2008, 455(7216):1124-1128.
- [24] SLEUTELSI F, ZWART R, BARLOW D P. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes [J]. *Nature*, 2002, 415(6873):810-813.
- [25] UMLAUF D, GOTO Y, CAO R, et al. Imprinting along the Kenq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(12):1296-1300.
- [26] NAGANO T, MITCHELL J A, SANZ L A, et al. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin [J]. *Science*, 2008, 322(5908):1717-1720.
- [27] PANDEY R R, MONDAL T, MOHAMMAD F, et al. Kenq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation [J]. *Mol Cell*, 2008, 32(2):232-246.
- [28] TERRANOVA R, YOKOBAYASHI S, STADLER M B, et al. Polycomb group proteins Ezh2 and Rnf2 direct genomic contraction and imprinted repression in early mouse embryos [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(5):668-679.
- [29] MOHAMMAD F, MONDAL T, GUSEVA N, et al. Kenq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1 [J]. *Development*, 2010, 137(15):2493-2499.
- [30] PENNY G D, KAY G F, SHEARDOWN S A, et al. Requirement for Xist in X chromosome inactivation [J]. *Nature*, 1996, 379(6561):131-137.
- [31] OGAWA Y, SUN B K, LEE J T. Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways [J]. *Science*, 2008, 320(5881):1336-1341.
- [32] KANELLOPOULOU C, MULJO S A, DIMITROV S D, et al. X chromosome inactivation in the absence of Dicer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(4):1122-1127.
- [33] SUN B K, DEATON A M, LEE J T. A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization [J]. *Mole Cell*, 2006, 21(5):617-628.
- [34] TIAN D, SUN S, LEE J T. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation [J]. *Cell*, 2010, 143(3):390-403.
- [35] WUTZ A, RASMUSSEN T P, JAENISCH R. Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA [J]. *Nat Genet*, 2002, 30(2):167-174.
- [36] NAVARRO P, PAGE D R, AVNER P, et al. Tsix-

- mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(20):2787-2792.
- [37] ZHAO J, SUN B K, ERWIN J A, et al. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome [J]. *Science*, 2008, 322(5902):750-756.
- [38] AKHTAR A, BECKER P B. Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in drosophila [J]. *Mol Cell*, 2000, 5(2):367-375.
- [39] MELLER V H, RATTNER B P. The roX genes encode redundant male-specific lethal transcripts required for targeting of the MSL complex [J]. *EMBO J*, 2002, 21(5):1084-1091.
- [40] 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.
- [41] GIRARD A, SACHIDANANDAM R, HANNON G J, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins [J]. *Nature*, 2006, 442(7099):199-202.
- [42] 胡庭溪, 刘 霞, 孙尉峻, 等. 精子动力学分析与其体内、体外受精能力的相关性[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(8): 1727-1732.
- HU T X, LIU X, SUN W J, et al. Correlation between sperm kinetics parameters and fertility of Holstein sex-sorted sperm *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(8): 1727-1732. (in Chinese)
- [43] CARMELL M A, GIRARD A, VAN DE KANT H J, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline [J]. *Dev Cell*, 2007, 12(4):503-514.
- [44] DENG W, LIN H. Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis[J]. *Dev Cell*, 2002, 2(6):819-830.
- [45] KURAMOCHIMIYAGAWA S, KIMURA T, IJIRI T W, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis [J]. *Development*, 2004, 131(4):839-849.
- [46] GOU L T, DAI P, YANG J H, et al. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6):680-700.
- [47] SAITO K, INAGAKI S, MITUYAMA T, et al. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in Drosophila [J]. *Nature*, 2009, 461(7268): 1296-1299.
- [48] KIUCHI T, KOGA H, KAWAMOTO M, et al. A single female-specific piRNA is the primary determinant of sex in the silkworm [J]. *Nature*, 2014, 509(7502):633-636.
- [49] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
- [50] JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5): 453-461.
- [51] HANSEN T B, WIKLUND E D, BRAMSEN J B, et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA [J]. *EMBO J*, 2011, 30(21):4414-4422.
- [52] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388.
- [53] CAPEL B, SWAIN A, NICOLIS S, et al. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis [J]. *Cell*, 1993, 73(5):1019-1030.
- [54] SATOH J, YAMAMURA T. Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2004, 24(6):793-814.

(编辑 郭云雁)