

piRNA 的形成及其在雌性动物中生物学功能研究进展

李春艳^{1,2}, 任春环², 刘秋月¹, 胡文萍¹, 王翔宇¹,

曹晓涵¹, 张子军², 狄冉^{1*}, 储明星^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部动物遗传育种与繁殖重点实验室, 北京 100193;

2. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: piRNA 是继 siRNA 和 miRNA 之后发现的一类新型非编码小 RNA, 其与 Piwi 蛋白协同作用参与 piRNA 通路, 保护动物生殖细胞的遗传信息免受分子寄生虫如转座子的有害影响。近年来, 人们对 piRNA 发生过程的相关蛋白及生物学作用做了研究, 发现多种 Piwi 亚家族蛋白能与 piRNA 结合形成 Piwi-piRNA 复合体, 通过表观遗传调控参与生殖细胞形成与发育、生殖干细胞分化、性别决定等生物学功能。本文主要围绕 piRNA 的形成及特点、Piwi-piRNA 复合体发挥生物学作用的方式、piRNA 在雌性动物中的生物学功能这 3 个方面对近期的研究进展进行综述, 为深入探究 piRNA 调控雌性动物繁殖机制提供参考。

关键词: piRNA; Piwi 蛋白; 表观遗传调控; 雌性动物

中图分类号: Q953; S813.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)10-1785-11

Research Progress on piRNA Formation and Function in Female Animals

LI Chun-yan^{1,2}, REN Chun-huan², LIU Qiu-yue¹, HU Wen-ping¹, WANG Xiang-yu¹,

CAO Xiao-han¹, ZHANG Zi-jun², DI Ran^{1*}, CHU Ming-xing^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural

University, Hefei 230036, China)

Abstract: Following the discovery of siRNA and miRNA, a new class of small noncoding RNA, called piRNA, was found. piRNA can interact with Piwi subfamily proteins and they involve in piRNA pathways, which can protect genetic information of animal germ cells from the harmful effects of molecular parasites such as transposon. In recent years, piRNA biogenesis-related proteins and their biological effects were studied. It was found that a variety of Piwi subfamily proteins could bind to piRNA to form Piwi-piRNA complex. These complexes were involved in germ cells formation and development, germline stem cells differentiation, sex determination and other biological functions through the way of epigenetic regulation. In the present paper, we reviewed the research progress on the biogenesis and characteristics of piRNA, the ways of Piwi-piRNA comple-

收稿日期: 2017-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572371; 31472078; 31402041); 宁夏农林科学院科技创新先导资金项目(DWJLC-2016001); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS13); 国家肉羊产业技术体系专项(CARS-39); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2013ywf-zd-1; 2015ywf-zd-2; 2015ywf-zd-8); 内蒙古自治区科技重大专项; 内蒙古自治区战略性新兴产业发展专项资金计划

作者简介: 李春艳(1992-), 女, 甘肃通渭人, 硕士生, 主要从事动物分子育种研究, E-mail: 3010992163@qq.com

* **通信作者:** 狄冉, 博士, 副研究员, E-mail: dirangirl@163.com; 储明星, 博士, 研究员, 主要从事羊优异繁殖性状的分子机理研究, E-mail: mxchu@263.net

xes playing the biological roles and biological functions of piRNA in female animals, which will provide a reference for further research on regulatory mechanism of piRNA in female animal reproduction.

Key words: piRNA; Piwi protein; epigenetic regulation; female animals

真核生物体内分布着大量的小 RNA, 这些不同的小 RNA 参与基因表达调控。秀丽隐杆线虫中 lin-4 (一种小 RNA) 时序性负调控 lin-14 蛋白表达, 这是首次发现的小 RNA 所参与的基因沉默作用^[1]。之后, 科研工作者发现存在 2 类非编码小 RNA: 小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 和微小 RNA (microRNA, miRNA)。2006 年, 多个实验室先后发现了另一种新型的非编码小 RNA, 这种小 RNA 能够特异性结合 Piwi 蛋白, 因此将其命名为 piRNA (Piwi-interacting RNA)^[2-3]。随后 piRNA 成为非编码小 RNA 研究领域的一个热点, 先后在果蝇、线虫、斑马鱼、小鼠、大鼠等动物研究中发现 piRNA 在生殖细胞及干细胞分化^[4]、种系 DNA 完整性^[5]、性别决定^[6]、胚胎发育^[7]、免疫防御^[8] 及癌症预测^[9-10] 等方面有重要作用。本文主要围绕 piRNA 的生物发生、Piwi 与 piRNA 复合体发挥生物学作用的方式、piRNA 在雌性动物中的生物学作用这 3 个方面对近期的研究进展进行综述, 为深入探究 piRNA 调控雌性动物繁殖机制提供参考。

1 piRNA 概述

1.1 piRNA 的产生途径

2006 年 A. Aravin 等^[2]以 3 月龄 C57BL/6J 雄性小鼠为研究对象, 利用吸附柱离心法从输精管中分离得到一种小 RNA, 并通过蛋白印记法检测到这种高表达量的小 RNA 与 MILI (一种 Piwi 亚蛋白) 相互作用, 他们将其命名为 piRNA。之后, 对 piRNA 的生物学来源研究发现, 基因组上基因间区大量的 piRNA 簇经双向或单向转录形成 piRNA 前体, 再由内切酶剪切产生 piRNA^[11]; 此外, 在 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTR) 及基因组中某些长的非编码区域也可产生 piRNA^[12]。这些新生的 piRNA 通常被转运出细胞核, 在胞质中被加工形成成熟的 piRNA 发挥生物学功能。piRNA 的产生机制分为初级 piRNA 途径和次级 piRNA 途径, 主要围绕 Slicer 活性剪切的乒乓扩增循环 (Ping-pong amplification cycle)^[13] 过程完成 piRNA 的成熟加工。E. M. Weick 等^[14]对 piRNA 产生的“乒乓”循环模型进行了总

结: 生殖细胞的细胞核中 piRNA 簇转录产生的长链 pre-piRNA 被转运到细胞质中, 它被 Ago3 识别结合形成 Ago3-piRNA 复合体, 然后 piRNA 5' 端被线粒体外膜的核酸内切酶 Zuc 剪切形成 5' 端磷酸化的 piRNA, 随后与 Piwi 或 Aub 蛋白结合且 5' 端变为尿嘧啶, 3' 端也被剪切; 在之后的“乒乓”扩增循环过程中, 结合了 piRNA 的 Aub 可以识别与 piRNA 互补的 RNA 序列 (例如来源于 piRNA 簇的另一链的 RNA) 并对其进行剪切, 剪切形成的 piRNA 又与 Ago3 结合形成复合体, 反过来诱导剪切与之互补的 RNA, 这样就生成了与循环中最初 piRNA 一致的序列, 如此不断循环下去 (图 1)。该模型对理解 piRNA 发生机制、调控通路、生物学功能有重要意义。之后, 科研工作者对 piRNA 的“乒乓”途径研究不断深入和细化, 发现除了动物生殖细胞外, 体细胞中也存在 piRNA 合成途径, 而且生殖细胞和体细胞中 piRNA “乒乓”扩增过程存在差异。piRNA 的体细胞途径可以直接依赖 Piwi 蛋白和 piRNA 簇 Flamenca 片段产生 piRNA, 以转座子为靶标形成 piRNA, 首先是 piRNA 前体与细胞器 Yb 小体 (Yb body) 结合, 在 Zuc 及辅助因子 (Vret, Mino, Gasz 等) 作用下可形成中间体 piRNA 的 5' U 位点, 再产生 piRNA 次级结构, Zuc 对 Piwi-piRNA 序列剪切形成 3' 末端, 并通过外切酶 trimmer、Papi 作用切割 Piwi-piRNA 的成熟位点, 接着发生 Hen1 介导的甲基化, 最后成熟的 Piwi-piRNA 复合物进入细胞核起沉默作用, 线粒体膜外因子在该途径中扮演重要角色^[15]。生殖细胞和体细胞中 piRNA 生成途径的主要差异总结见表 1。

1.2 piRNA 的结构特征

相比 siRNA 和 miRNA, piRNA 数量较多, 约 5×10^4 种^[5], 其产生不依赖 RNase III 类核酸酶 Dicer^[17], 长度略大于前两者, 约在 24~35 nt 范围内^[18], 3' 端 2'-O-被甲基化修饰, 5' 端第一个核苷酸有尿嘧啶偏向性且第 10 位碱基有腺嘌呤偏向性^[14]。小鼠 piRNA 主要分布在 X 染色体上, Y 染色体上分布很少; 而人体 piRNA 绝大多数分布在常染色体上, 在性染色体上基本没有分布^[3, 19]。果蝇

中 piRNA 通常与 Argonaute 蛋白中 Piwi 亚家族成员 (Piwi、Aub、Ago3) 特异性结合, 分别形成 Piwi-piRNA、Aub-piRNA、Ago3-piRNA 3 类复合体。其中, Piwi-piRNA 和 Aub-piRNA 中 piRNA 来源于

反义链, 5' 端有尿嘧啶偏向性; 而与 Ago3 结合的 piRNA 来源于正义链, 5' 端倾向于腺苷酸。因此, Piwi-piRNA 或 Aub-piRNA 与 Ago3-piRNA 的 5' 端 10 nt 序列恰好互补配对。

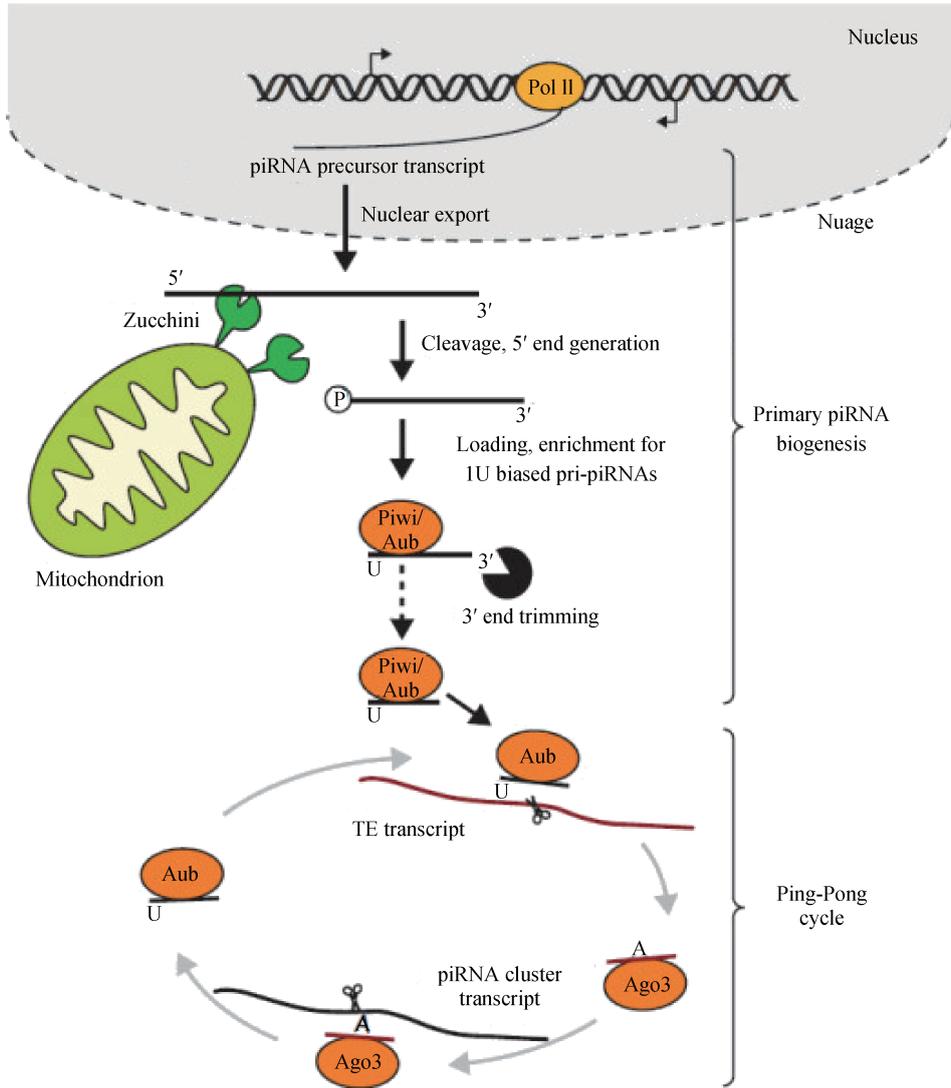


图 1 果蝇生殖细胞 piRNA 形成途径 (乒乓循环)^[16]

Fig. 1 piRNA biogenesis in *Drosophila* germ cells (Ping-Pong cycle)^[16]

表 1 生殖细胞和体细胞中 piRNA 生成途径的主要差异

Table 1 Major difference of the piRNA biogenesis in germ cells and somatic cells

项目 Item	生殖细胞 Stem cell	体细胞 Somatic cell
内切酶 Zuc 发挥作用前与 piRNA 前体结合的蛋白或元件 Proteins and elements binded to piRNA precursor before Zuc playing roles	Ago3 蛋白	细胞器元件 Yb body
“乒乓”循环中与 piRNA 结合的蛋白 Proteins binded to piRNA in Ping-Pong cycle	Ago3、Piwi、Aub、 Vasa, krimper	Piwi

1.3 piRNA 预测和分析

采用有效的方法预测和分析 piRNA,对解读其“乒乓”机制,准确预测 piRNA 的功能具有重要意义。“piRNA Bank”数据库(<http://pirnabank.ibab.ac.in/>)中记录了人和一些模式生物(小鼠、大鼠、果蝇)的 piRNA 相关信息^[19],可查询单个 piRNA、piRNA 簇、同源 piRNAs,还可展示可视化的 piRNA 图谱。2011 年,中国科学院动物研究所 Y. Zhang 等^[20]提出了一种基于 k-mer 串频率的 Fisher 判别式,它是区分 piRNA 和其他非编码 RNA 的

一种方法,能精确预测 piRNA(精度大于 90%)。在此基础上,研究者还开发了在线 piRNA 预测软件 piRNApredictor(<http://59.79.168.90/piRNA/index.php>),可以预测非模式生物的 piRNA 序列,具有广泛的应用价值。近几年,科研工作者创建了“piBase”平台并进一步开发“PirTarget”程序,以利于通过 piRNA “乒乓”循环机制去预测潜在的靶基因(如 mRNA)^[21-22]。笔者总结了几个 piRNA 预测和分析软件或程序的信息,如表 2 所示。

表 2 预测和分析 piRNA 的相关软件或程序

Table 2 The related softwares or programs of predicting and analysing piRNA

名称 Name	网址 Web	适用范围 Range
piRNA Bank	http://pirnabank.ibab.ac.in/	检索人及其他生物的 piRNA、piRNA 簇、同源 piRNAs、piRNA 图谱信息
piRNApredictor	http://59.79.168.90/piRNA/index.php	预测非模式生物的 piRNA 序列信息
piBase	http://www.regulatoryrna.org/database/piRNA/	piRNA 系统表观遗传及转录后数据分析
PirTarget	http://asia.ensembl.org/index.html/	预测 piRNA 靶基因的转录本 mRNA

2 Piwi 蛋白

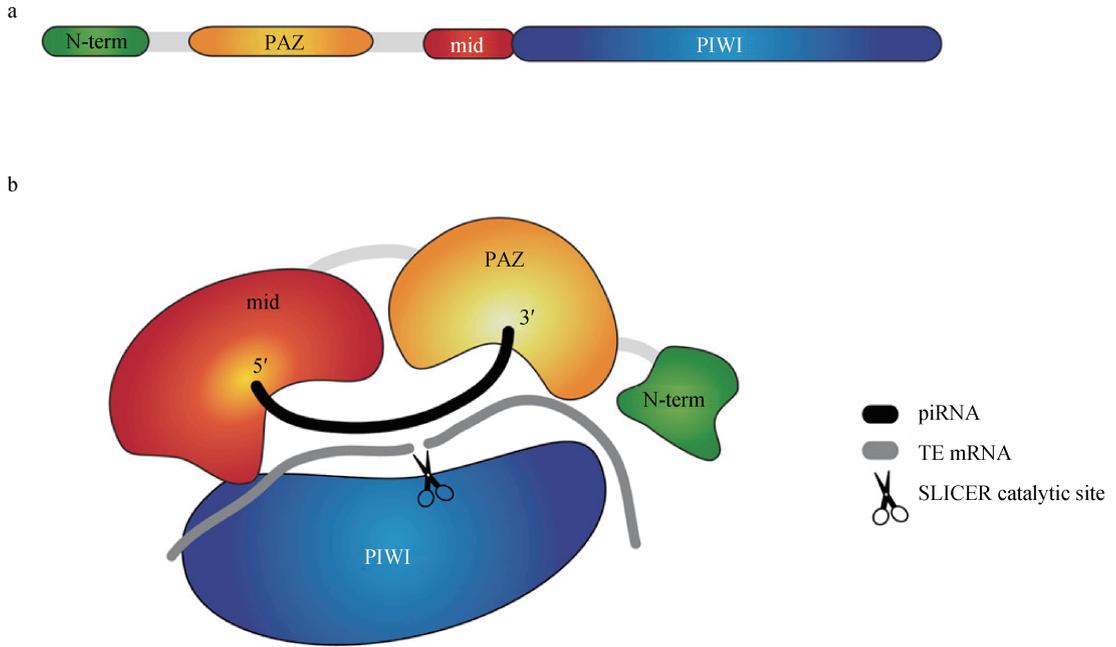
2.1 不同物种的 Piwi 亚家族蛋白

研究表明,果蝇卵巢中卵子的发生过程涉及 2 种特殊蛋白(Pumilio 和 Piwi),它们对维持生殖干细胞、促进配子不对称分裂等有重要的调控作用^[23]。之后研究者在线虫、小鼠、大鼠、斑马鱼等多种试验动物及人类蛋白研究中相继发现了不同种类的 Piwi 亚家族蛋白因子,并且发现 Piwi 亚家族蛋白可特异性结合 piRNA。果蝇中存在 Piwi、Aub、Ago3 3 类 Piwi 亚家族蛋白,且 Ago3 仅在雌性生殖细胞中表达^[24];非洲爪蟾的 Piwi 亚家族蛋白包括 XILI、XIWI、XIWI2 3 种;在小鼠中发现了参与生殖细胞发育的 3 类 Piwi 亚家族蛋白:MIWI (Piwil1)、MILI (Piwil2) 和 MIWI2 (Piwil4)^[25];灵长目动物包含 Piwil1、Piwil2、Piwil3、Piwil4 4 类 Piwi 亚家族蛋白^[26],其中人的 Piwi 亚家族蛋白主要包括 HIWI、HIWI2、Piwil3、HILI 4 类^[27]。大部分动物体的 Piwi 亚家族蛋白通常由 N 端结构域、PAZ 结构域、mid 结构域及 Piwi 结构域共四部分构成其保守结构(图 2a),piRNA 的 5'端和 3'端分别与 mid 结构域和 PAZ 结构域结合,最终形成 Piwi-piRNA

沉默复合物(piRISC,图 2b),参与 piRNA 干扰途径^[28]。

2.2 Piwi-piRNA 复合体发挥生物学作用的方式

Piwi-piRNA 复合体主要以转录水平调控和转录后调控 2 种方式抑制基因表达。其中,转录后调控具有序列特异性,依赖于有活性的催化酶。“乒乓”循环不仅利用转录后调控来破坏转座子 mRNA,而且利用这种机制来扩增沉默活性元件的因子。相反,转录水平调控不依赖于靶 RNA 的催化,主要通过调控异染色质形成和介导基因组 DNA 甲基化修饰等方式调控基因的表达。一方面,Piwi 亚家族蛋白与 piRNA 结合形成 Piwi-piRNA 复合体,可特异性作用于基因组序列或新生转录物上,引导对靶位点的表观遗传调控;另一方面,Piwi-piRNA 的高表达导致 DNA 甲基化转移酶(DNMTs)表达异常,从而提高了 DNA 甲基化水平。不同生物体 piRNA 表观遗传调控的作用方式存在差异(图 3)。在黑腹果蝇中,Piwi 定位于细胞核并启动组蛋白 H3K9 三甲基化,同时抑制 RNA 聚合酶 II 的活性;锌指蛋白 Gtsf1 可能直接与 Piwi 互作,而异染色质蛋白 Hpl 与 H3K9me3 结合;Mael(Maelstrom spermatogenic transposon silencer)蛋白作用于 H3K9me3 甲基化的下游,抑制 RNA 聚合酶 II 活性



a. Piwi 亚家族蛋白结构域由 N 端结构域、PAZ 结构域、mid 结构域及 Piwi 结构域共 4 部分构成,其中 N 端区域是富含精氨酸的概念域。b. Piwi 亚家族蛋白域在空间构成上,其 mid 结构域锚定 piRNA 的 5' 端且 PAZ 结构域与 piRNA 的 3' 端相接; Piwi 域是最大的一个结构域,它的催化位点可剪切与 piRNA 5' 端有关的 10 nt 长的靶向 RNA^[29]

a. The domains of Piwi proteins are comprised of the N-terminal region, PAZ, mid and Piwi domains. The N-terminal region consists of a notional domain that is characterized by arginine rich motifs. b. The organization of the protein domains in space shows how the mid-domain anchors the piRNA at its 5' end and the PAZ domain holds the 3' end of the piRNA. Piwi is the largest domain and its catalytic site responsible for 'slicer' activity is positioned to cleave the backbone of annealed target RNA exactly 10 nt related to the 5' end of the piRNA^[29]

图 2 Piwi 蛋白结构

Fig. 2 Structure of Piwi protein

(图 3A)^[30]。在小鼠中,MIWI2 与 MILI 参与“乒乓”循环并转移至核内,通过 DNA 甲基转移酶(DNMT)作用启动转座子位点上游启动子元件的 CpG 甲基化(图 3B);在 MIWI2 位点的细胞质中存在鼠 MAEL 同源物,这种蛋白在核中的作用与此类似^[31]。在线虫中,RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRP)使 PRG-1、piRNA 和靶 RNA 相互作用产生次级 siRNA,这些 siRNA 结合于二级 Ago3 蛋白 HRDE-1 上,然后被转运至细胞核中,可能与前 mRNA 及核干扰因子(NRDE)协同作用,引发 H3K9me3 甲基化和 RNA 聚合酶 II 停滞^[32](图 3C)。

3 piRNA 在雌性动物中的生物学作用

最早在雄性小鼠生殖细胞中分离得到 piRNA,之后发现果蝇^[33]、爪蟾^[34]及斑马鱼^[35]的雌性配子中也存在 piRNA。这意味着动物睾丸精原细胞、卵巢卵母细胞中均有 piRNA 分布。这些生殖细胞中由初级合成途径产生的 piRNA 分别与 Piwi、Aub 结合,之后通过“乒乓”循环产生次级 piRNA 与

Ago3 结合发挥作用。目前,很多学者报道了 piRNA 在雄性动物生殖细胞中的作用,但是对于 piRNA 在雌性动物中发挥的作用鲜有总结,因此,这里我们重点对不同物种雌性动物中 piRNA 及其作用进行阐述。

3.1 果蝇中的 piRNA

果蝇是生命科学研究领域最经典的模式生物之一,对果蝇 piRNA 的研究也最为深入,研究发现,雌性果蝇中的 piRNA 具有保证雌果蝇正常育性、防止 DNA 损伤、保证正常卵子形成与释放、保证卵巢中生殖细胞与体细胞之间的正常黏结等生物学功能。对果蝇胚胎发育时期的 Piwi 蛋白敲除后发现,卵巢中与 piRNA 簇转录作用有关的 H3K9me3 减少,piRNA 形成受阻,转座子的沉默作用被解除,结果导致雌性不育^[36]。果蝇卵巢体细胞和生殖细胞发育过程中 piRNA 表达有一定差异,体细胞中来源于 flamenco(flam)单链簇的 piRNA 被加载到 Piwi 蛋白上形成 Piwi-piRNA 诱导沉默复合物(Piwi-piRISC),调节特异性反转录转座子 gypsy 的活性,

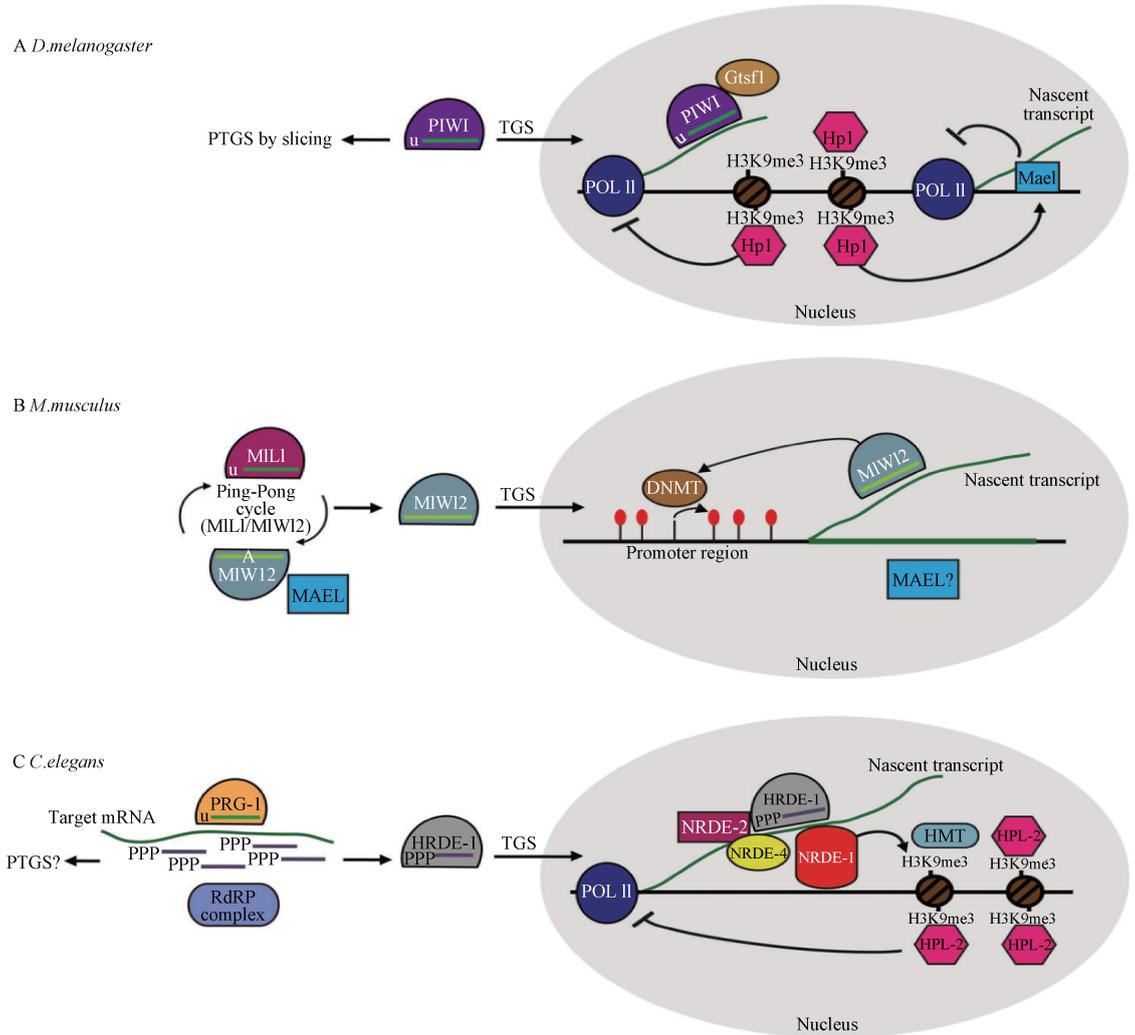


图3 果蝇(A)、小鼠(B)及线虫(C)体内 piRNA 介导的转录沉默机制^[14]

Fig. 3 piRNA mediated transcriptional silencing mechanism in *D. melanogaster* (A), *M. musculus* (B) and *C. elegans* (C) ^[14]

使其维持在较低的表达水平,从而防止因 gypsy 过表达引起的病毒样颗粒感染邻近生殖细胞,保证雌果蝇正常生育;而生殖细胞中,piRNA 簇则通常借助 RNA 聚合酶 II 转录邻近基因的过程跨越终止信号继续转录产生 piRNA,这些 piRNA 与 Aub 结合形成 Aub-piRNA,通过 slicer 活性剪切 mRNA,使其降解^[37-41]。雌性果蝇生殖细胞中还存在一类特异性的反转录转座子 *I* 因子,其序列长约 5.4 kb,主要作用是诱导雌性不育。piRNA 可通过“乒乓”循环特异性抑制活跃的 *I* 因子,使其沉默^[42]。Twin 因子是 CCR4-NOT 脱腺苷酶复合体中 CCR4 的同源物,能够调控生殖干细胞(GSC)自我更新和分化。卵巢 GSC 的 Twin 可与 Aub-piRNA 及 Ago3-piRNA 互作来调节 piRNA 浓度,从而抑制 GSC 的转座子反转录活性,防止 DNA 损伤^[43]。Parasitic-

DNA 是雌性果蝇的遗传转座子,染色体上不同位点 Parasitic-DNA 跳跃使基因失活,可能引起不育。性成熟的雌性果蝇可以产生 piRNA 靶向作用于 Parasitic-DNA,经过 Parasitic-DNA 释放的转座子落入 piRNA 簇,piRNA 簇产生反向 piRNA,进而调控 Parasitic-DNA,防止其跳跃,保证正常卵子形成与释放^[44]。研究者发现,果蝇卵泡中的 fascilins 基因能够编码免疫球蛋白,这种免疫球蛋白有黏着作用,使细胞间黏结异常。piRNA 对 fascilins 有沉默作用,抑制 fascilins 表达,使卵巢中生殖细胞与体细胞间正常黏结^[45]。雌果蝇从胚胎后期至蛹期,其原始生殖细胞中 piRNA 均存在活跃的同源-依赖型反式沉默(Homology-dependent trans silencing)作用,细胞记忆机制使得 piRNA 抑制转座子活性的状态从胚胎期一直保持到成体阶段^[46]。

3.2 其他模式生物中的 piRNA

除了果蝇外,小鼠、蟾蜍等其他模式生物的 piRNA 发挥作用的过程也有其自身的特点。研究表明, Piwi 与 piRNAs 的结合在哺乳动物卵子发生过程中起重要作用^[28], Astrin 因子以蛋白的身份参与小鼠卵母细胞有丝分裂和减数分裂过程,尤其是对卵母细胞减数分裂过程中纺锤体装配及成熟有关键作用, piRNA 可使 Astrin 功能缺失,起辅助干扰作用,导致卵母细胞纺锤体解体^[47]。芳香烃受体 (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 是促进小鼠生殖细胞发育的因子之一, AhR 缺失雌性小鼠的卵泡数减少, piRNA 相关蛋白 (MVH、MILI、MIWI) 表达水平较低且转座子表达下降,暗示 piRNA 及相关蛋白、转座子表达与发育因子呈正相关,共同维持雌性生殖细胞的发育^[48]。利用高通量测序研究非洲爪蟾生殖细胞及体细胞内的小 RNAs 表达情况,结果显示, piRNAs 仅在蟾蜍的生殖细胞中参与表达调控,检测到 piRNAs (piR-1 和 piR-2) 在蟾蜍卵细胞发育的 I 和 II 2 个阶段均有表达^[49],暗示, piRNAs 主要在这 2 个阶段参与蟾蜍卵细胞发育。对非洲爪蟾卵母细胞 Y12 免疫沉淀物中 piRNAs 做深度测序,根据序列互补信息方法分析 piRNAs 的核苷酸组成,发现 piRNA 具有如下特征:核苷酸的第 1 位碱基富含尿嘧啶 (U) 且第 10 位碱基富含腺嘌呤 (A), piRNAs 的第 10 位核苷酸之间互补; piRNA 与 Piwi 特异性结合,靶向性调控反转录转座子^[37]。家蚕雌性染色体为 ZW 型,雄性为 ZZ 型。在家蚕的 W 染色体性别决定区域存在一种由 Feminizer 前体产生的特殊 piRNA (Fem 基因),这种 piRNA 对性别调控级联反应末端的 *Bmdsx* 基因进行雌性特异性剪切调控,最终促使个体发育为雌性^[6,50];当 Piwi-piRNA 复合体功能减弱时, *Masc* 基因 (一种 CCCH 型锌指蛋白) 转录产生的 mRNA 增加,促进 *Bmdsx* 转座子趋向于雄性特异性剪切,成年雌性家蚕出现部分雄性分化,腹部呈雄性特征^[51]。在此基础上,研究者分别构建了 TG-W1、TG-W2 和 TG-Z 3 个拷贝转基因家蚕新品系,研究家蚕 piggyBac 转座子与 piRNA 之间的关系,发现 TG-W1、TG-W2 插入位点两侧的 piRNA 表达量高于 TG-Z 插入位点附近的 piRNA 表达量,由此推测,外源 piggyBac 转座子在 W、Z 染色体上转座效率差异与插入位点附近的 piRNA 数量相关,证明 piRNA 可抑制家蚕卵巢中 piggyBac 转座子的过度活跃^[52]。家蚕卵巢

中表达的 BmN4 细胞的细胞核周围生殖云 (一种细胞器) 中, piRNA 加载到 Armitage 及 Yb 蛋白上,在解旋酶 BmVasa 的作用下,能抑制转座子活性以防 DNA 损伤,保证 BmN4 细胞的正常功能^[53]。 *Bd-tud* 是桔小实蝇 (一种果蔬害虫) 卵巢中 piRNA 通路的相关基因之一,它可以作为桔小实蝇卵巢发育的标志性因子与 piRNA 协作,共同维持卵巢正常发育,这为研制高效杀虫剂以防治害虫产卵及交配提供了参考依据^[54]。斑马鱼母系生殖细胞 piRNA 与 Tudor 域相关蛋白 (Tdrds) 特异性结合参与 piRNA 通路,在生殖细胞减数分裂粗线期的调控及干细胞维持方面有关键作用, Tdrd12 突变的斑马鱼将发育为不育的雄性个体^[55]。

3.3 家养动物中的 piRNA

除了模式生物,研究者还探究了 piRNA 在家养动物中的生物学作用。研究发现,鸡的卵巢及睾丸中均存在 piRNA 序列,暗示 piRNA 分子也参与了禽类生殖细胞的发育过程^[56]。在鱼类中仅发现有 2 个 Piwi 旁系同源基因 (*Piwil1* 和 *Piwil2*),通过比较不同多倍体鲫鲤性腺发育和配子发生过程中 Piwi-piRNA 信号通路表达的异同,发现 piRNA 的表达量与 *Piwi* 基因表达呈正相关,三倍体湘云鲫的 *Piwil1* 与 *Piwil2* 表达水平在繁殖和非繁殖季节均显著高于二倍体红鲫及异源四倍体鲫鲤;繁殖季节可育的鱼类下丘脑-垂体-性腺轴 (HPG axis) 相关因子表达增强,升高的雌激素和促黄体素可以抑制 piRNA 和 *Piwil* 基因的表达,从而解除了 piRNA 对其他性腺发育相关序列的抑制,最终促进排卵;在不育的雌性三倍体湘云鲫中,其卵巢中的促黄体素受体基因表达下调,引起 Piwi-piRNA 信号通路表达异常升高,三倍体湘云鲫最终表现为不育^[57]。在猪发育的各个时期 (初情前期、初情期、性成熟期), 3 种 *Piwi* 基因 (*Piwil1*、*Piwil2* 和 *Piwil4*) 均在性腺中特异性表达,在初情前期和初情期时卵巢中上述 3 种 Piwi 表达量低于同期睾丸中的表达量,仔猪卵巢的 *Piwil2* 表达量高于其他 2 种 *Piwil* 基因,初情前期和初情期卵母细胞中 *Piwil1* 表达量高但 *Piwil4* 无表达,在性成熟的公、母猪生殖细胞中 piRNA 均有表达,但卵巢中 piRNA 长度比睾丸 piRNA 长 2~3 个核苷酸;这些 Piwi 蛋白能促进猪的生殖细胞发育,并与 piRNA 特异性结合共同抑制转座子活性^[58]。

3.4 人的 piRNA

人胎儿卵巢的 piRNA 能够介导卵裂^[59]。人配子体特异性因子 1 (Gametocyte-specific factor 1, GTSF1) 是 piRNA 途径中反转录转座子沉默的关键因子, 研究者对女性生殖细胞中 GTSF1 基因表达进行追踪研究发现, GTSF1 在性成熟和妊娠期第 8~21 周的卵母细胞中有较高的表达^[7], 暗示女性配子中存在 piRNA, 且对配子发育过程的反转录转座子有沉默作用。近几年来, 科研工作者对肿瘤组织 piRNAs 表达的相关研究发现 piRNA 与肿瘤发生有关。乳腺癌是女性患者最常见的疾病之一, 其病理病因有待进一步研究。piR-651 是一种靶点 piRNA, 其在乳腺癌及宫颈癌细胞发育的 G₂/M 阶段表达上调, 当 piR-651 抑制剂转染至其癌组织后癌细胞生长受到抑制, 说明此 piRNA 可促进乳腺癌及宫颈癌细胞的生长^[60]。乳腺癌细胞中 piR-4987、piR-20365、piR-20485 和 piR-20582 这 4 种 piRNA 有明显上调趋势 ($P < 0.001$)^[9], 提示 piRNA 可作为肿瘤标记之一, 这对乳腺癌诊疗有重要意义。多发性骨髓瘤 (Multiple myeloma, MM) 是一种血液恶性肿瘤, 为了验证多发性骨髓瘤 (MM) 组织中 piRNA 的表达情况, 研究者分别选择了 MM 患者骨髓活检组织、骨髓 CD138⁺ 细胞和正常的活检组织及 CD138⁺ 细胞, 发现 MM 患者骨髓活检组织和骨髓 CD138⁺ 细胞中 piRNA-823 高表达; 在此基础上, 注入 piRNA-823 的抑制物 antagomir-823, 观察到 piRNA-823 表达下调后, 加速了 MM 细胞的凋亡; 检测 DNMT3A 和 DNMT3B 与 piRNA-823 之间的变化关系, 发现 piRNA-823 高表达引起 DNMT3A 和 DNMT3B 的活性增强, 基因组甲基化水平升高, 肿瘤抑制基因的甲基化程度也升高, 从而促进肿瘤发生。同时还验证了 piRNA-823 与 MM 血管新生作用的关系, 发现 piRNA-823 表达与 MM 细胞的血管内皮细胞生长因子分泌呈正相关^[61]。这些研究结果表明 piRNA 具有促进肿瘤发生的生物学作用。

4 展望

piRNA 作为一种内源性非编码小 RNA, 是近十年来小 RNA 领域关注的热点之一, 近几年来该领域学者初步阐明了 piRNA 形成过程、piRNA 与 Piwi 亚家族蛋白偶联发挥功能的方式, 发现在雌、雄性动物体均存在 Piwi-piRNA 通路且作用分子机

制类似, piRNA 在雄性动物中保证精子正常生成和成熟, 而在雌性动物中促进卵细胞正常发育和释放、使卵巢生殖细胞和体细胞正常黏结、保证个体正常生育等。piRNA 的这些研究结果对于动物遗传育种和疾病诊治具有重要意义。但是, 还有一些问题尚未解决, 例如: (1) piRNA 簇、piRNA 前体区别于其他基因组的明显特征是什么? 它们在产生 piRNA 过程中有哪些关键细节? (2) 新生 piRNA 输出细胞核过程中会有哪些信号? (3) piRNA 与其他非编码小 RNA (如 miRNA 和 siRNA) 是否存在生物关联、关联的机制是什么? (4) 与 piRNA 互作的因子还有哪些? 它们通过什么相互作用和调控网络调节生殖细胞发育、配子形成等一系列复杂的生理学过程? (5) piRNA 在雌、雄性动物中存在哪些表达差异和突变特性? 这些问题均需要做更深入系统的研究。

参考文献 (References):

- [1] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] 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.
- [3] GRIVNA S T, BEYRET E, WANG Z, et al. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(13): 1709-1714.
- [4] GONZALEZ J, QI H Y, LIU N, et al. Piwi is a key regulator of both somatic and germline stem cells in the *Drosophila* testis [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(1): 150-161.
- [5] HUANG Y, BAI J Y, REN H T. PiRNAs biogenesis and its functions [J]. *Bioorg Khim*, 2014, 40(3): 320-326.
- [6] KIUCHI T, KOGA H, KAWAMOTO M, et al. A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm [J]. *Nature*, 2014, 509(7502): 633-636.
- [7] HUNTRISS J, LU J P, HEMMING S K, et al. Isolation and expression of the human gametocyte-specific factor 1 gene (*GTSF1*) in fetal ovary, oocytes, and preimplantation embryos [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2017, 34(1): 23-31.

- [8] DIETRICH I, SHI X H, MCFARLANE M, et al. The antiviral RNAi response in vector and non-vector cells against orthobunyaviruses[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11: e0005272.
- [9] HUANG G, HU H, XUE X, et al. Altered expression of piRNAs and their relation with clinicopathologic features of breast cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, 15(7): 563-568.
- [10] ASSUMPÇÃO C B, CALCAGNO D Q, ARAÚJO T M T, et al. The role of piRNA and its potential clinical implications in cancer[J]. *Epigenomics*, 2015, 7(6): 975-984.
- [11] YAMANAKA S, SIOMI M C, SIOMI H. piRNA clusters and open chromatin structure [J]. *Mob DNA*, 2014, 5: 22.
- [12] MOYANO M, STEFANI G. piRNA involvement in genome stability and human cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 38.
- [13] GIRARD A, HANNON G J. Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control[J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(3): 136-148.
- [14] WEICK E M, MISKA E A. piRNAs: from biogenesis to function[J]. *Development (Cambridge, England)*, 2014, 141(18): 3458-3471.
- [15] CZECH B, HANNON G J. One loop to rule them all: the Ping-Pong cycle and piRNA-guided silencing [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(4): 324-337.
- [16] LE THOMAS A, TÓTH K F, ARAVIN A A. To be or not to be a piRNA: genomic origin and processing of piRNAs[J]. *Genome Biol*, 2014, 15: 204.
- [17] LUTEIJN M J, KETTING R F. Piwi-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics[J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(8): 523-534.
- [18] SAITO K, ISHIZU H, KOMAI M, et al. Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila* [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(22): 2493-2498.
- [19] LAKSHMI S S, AGRAWAL S. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36 (S1): D173-D177.
- [20] ZHANG Y, WANG X H, KANG L. A k-mer scheme to predict piRNAs and characterize locust piRNAs[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(6): 771-776.
- [21] ZANG P, SI X H, SKOGERBØ G, et al. piRBase: a web resource assisting piRNA functional study[J]. *Database*, 2014, 2014: baul10.
- [22] 许甘霖, 齐绪峰, 蔡冬青. 依据“ping-pong”循环机制预测 piRNA 靶基因的搜索方法[J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(3): 399-401.
- XU G L, QI X F, CAI D Q. The research method of predicting piRNA target genes by “ping-pong” mechanism[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2017, 37(3): 399-401. (in Chinese)
- [23] LIN H, SPRADLING A C. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary[J]. *Development (Cambridge, England)*, 1997, 124(12): 2463-2476.
- [24] SAITO K, NISHIDA K M, MORI T, et al. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(16): 2214-2222.
- [25] SAMJI T. Piwi, piRNAs, and germline stem cells: What's the link? [J]. *Yale J Biol Med*, 2009, 82(3): 121-124.
- [26] HAN B W, ZAMORE P D. PiRNAs[J]. *Curr Biol*, 2014, 24(16): R730-R733.
- [27] SASAKI T, SHIOHAMA A, MINOSHIMA S, et al. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome[J]. *Genomics*, 2003, 82(3): 323-330.
- [28] KLATTENHOFF C, THEURKAUF W. Biogenesis and germline functions of piRNAs[J]. *Development (Cambridge, England)*, 2008, 135(1): 3-9.
- [29] TÓTH K F, PEZIC D, STUWE E, et al. The piRNA pathway guards the germline genome against transposable elements [C]//Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht: Springer, 2016, 886: 51-77.
- [30] LE THOMAS, ROGERS A K, WEBSTER A, et al. Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state[J]. *Genes Dev*, 2013, 27(4): 390-399.
- [31] DI GIACOMO M, COMAZZETTO S, SAINI H, et al. Multiple epigenetic mechanisms and the piRNA pathway enforce LINE1 silencing during adult spermatogenesis[J]. *Mol Cell*, 2013, 50(4): 601-608.
- [32] BUCKLEY B A, BURKHART K B, GU S G, et al. A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality[J]. *Nature*, 2012, 489(7416): 447-451.
- [33] COX D N, CHAO A, LIN H. Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number

- and division rate of germline stem cells[J]. *Development (Cambridge, England)*, 2000, 127(3): 503-514.
- [34] WILCZYNSKA A, MINSHALL N, ARMISEN J, et al. Two Piwi proteins, Xiwi and Xili, are expressed in the *Xenopus* female germline[J]. *RNA*, 2009, 15(2): 337-345.
- [35] HOUWING S, KAMMINGA L M, BEREZIKOV E, et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish[J]. *Cell*, 2007, 129(1): 69-82.
- [36] AKKOUCHE A, MUGAT B, BARCKMANN B, et al. Piwi is required during *Drosophila* embryogenesis to license dual-strand piRNA clusters for transposon repression in adult ovaries[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(3): 411-419.e4.
- [37] KIRINO Y, KIM N, DE PLANELL-SAGUER M, et al. Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(5): 652-658.
- [38] SAITO K, SIOMI M C. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals[J]. *Dev Cell*, 2010, 19(5): 687-697.
- [39] KLATTENHOFF C, XI H L, LI C J, et al. The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters[J]. *Cell*, 2009, 138(6): 1137-1149.
- [40] MALONE C D, BRENNECKE J, DUS M, et al. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary[J]. *Cell*, 2009, 137(3): 522-535.
- [41] MOHN F, SIENSKI G, HANDLER D, et al. The rhino-deadlock-cutoff complex licenses noncanonical transcription of dual-strand piRNA clusters in *Drosophila*[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1364-1379.
- [42] LUO S, LU J. Silencing of transposable elements by piRNAs in *Drosophila*: an evolutionary perspective[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017, 15(3): 164-176, doi: 10.1016/j.gpb.2017.01.006.
- [43] 傅子文. 果蝇基因 Twin 在卵巢生殖干细胞系的维持和分化中的作用[D]. 北京: 清华大学, 2015.
FU Z W. Twin gene functions in the maintenance and differentiation of the ovarian germline stem cell lineage in *Drosophila*[D]. Beijing: Tsinghua University, 2015. (in Chinese)
- [44] LESLIE M. The immune system's compact genomic counterpart[J]. *Science*, 2013, 339(6115): 25-27.
- [45] 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.
- [46] MARIE P P, RONSSERAY S, BOIVIN A. From embryo to adult: piRNA-mediated silencing throughout germline development in *Drosophila*[J]. *G3 (Bethesda)*, 2017, 7(2): 505-516.
- [47] YUAN J, LI M, WEI L, et al. Astrin regulates meiotic spindle organization, spindle pole tethering and cell cycle progression in mouse oocytes[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(20): 3384-3395.
- [48] RICO-LEO E M, MORENO-MARIN N, GONZÁLEZ-RICO F J, et al. piRNA-associated proteins and retrotransposons are differentially expressed in murine testis and ovary of aryl hydrocarbon receptor deficient mice[J]. *Open Biol*, 2016, 6(12): 160-186.
- [49] ARMISEN J, GILCHRIST M J, WILCZYNSKA A, et al. Abundant and dynamically expressed miRNAs, piRNAs, and other small RNAs in the vertebrate *Xenopus tropicalis* [J]. *Genome Res*, 2009, 19(10): 1766-1775.
- [50] XU J, CHEN S Q, ZENG B S, et al. *Bombyx mori* p-element somatic inhibitor (*BmPSI*) is a key auxiliary factor for silkworm male sex determination[J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(1): e1006576.
- [51] SAKAI H, SUMITANI M, CHIKAMI Y, et al. Transgenic expression of the piRNA-resistant *Masculinizer* gene induces female-specific lethality and partial female-to-male sex reversal in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(8): e1006203.
- [52] 高杰. 家蚕内源性 piRNA 促进家蚕 *piggyBac* 转座子的稳定性[D]. 重庆: 西南大学, 2015.
GAO J. Endogenous piRNA promote the stability of *piggyBac* transposon in *Bombyx mori*[D]. Chongqing: Southwest University, 2015. (in Chinese)
- [53] PATIL A A, TATSUKE T, MON H, et al. Characterization of Armitage and Yb containing granules and their relationship to nuage in ovary-derived cultured silkworm cell[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2): 134-140, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.008.
- [54] 谢逸菲. 桔小实蝇 piRNA 通路相关基因 *tudor* 及海藻糖酶基因对卵巢发育影响的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015.
XIE Y F. The influence of piRNA pathway related gene *tudor* and trehalase gene on ovary development in *Bactrocera dorsalis* [D]. Chongqing: Southwest

- University, 2015. (in Chinese)
- [55] DAI X Y, SHU Y Q, LOU Q Y, et al. Tdrd12 is essential for germ cell development and maintenance in Zebrafish[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1127.
- [56] 陈 蓉, 秦玉蓉, 陈国宏, 等. 地方鸡种小分子 RNA 在性腺中表达形式的初步研究[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(10): 30-33.
- CHEN R, QIN Y R, CHEN G H, et al. The preliminary study of micromolecule RNA expression form in indigenous chicken breeds, gonads[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 41(10): 30-33. (in Chinese)
- [57] 周 毅. 多倍体鲫鲤 Piwi 和 piRNA 的表达与育性的相关性研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2012.
- ZHOU Y. Piwi and piRNA expression and their relationships with fertility of ploidy Cyprinids[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2012. (in Chinese)
- [58] KOWALCZYKIEWICZ D, PAWLAK P, LECHNIAK D, et al. Altered expression of porcine *Piwi* genes and piRNA during development [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43816.
- [59] WILLIAMS Z, MOROZOV P, MIHAILOVIC A, et al. Discovery and characterization of piRNAs in the human fetal ovary [J]. *Cell Rep*, 2015, 13(4): 854-863.
- [60] CHENG J, GUO J M, XIAO B X, et al. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(17-18): 1621-1625.
- [61] YAN H, WU Q L, SUN C Y, et al. piRNA-823 contributes to tumorigenesis by regulating de novo DNA methylation and angiogenesis in multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2015, 29(1): 196-206.

(编辑 郭云雁)