



表观代际遗传与精子中非编码小RNA

殷鑫, 王延博, 艾仔海尔·艾尼瓦尔, 陈熹*

南京大学生命科学高等研究院, 南京大学生命科学学院, 南京 210023

* 联系人: E-mail: xichen@nju.edu.cn

收稿日期: 2021-05-19; 接受日期: 2021-08-26; 网络版发表日期: 2022-01-04

摘要 近年研究表明, 父亲肥胖、糖尿病和精神压力等后天环境暴露, 不仅损害自身健康, 也可能对其子代健康产生影响, 此类特殊的遗传现象并不涉及DNA序列的改变, 因此科学家使用表观代际遗传现象来解释这种非经典遗传学现象. 已发现的代际遗传机制包括DNA甲基化、组蛋白修饰和精子小RNA调控等, 其中父亲后天环境暴露导致精子小RNA表达谱改变, 潜在调控早期胚胎发育, 从而介导异常表型代际遗传的过程是目前研究的重点方向. 但仍然存在诸多科学问题亟待解决, 包括环境暴露如何影响精子小RNA表达谱, 即小RNA的来源; 精子小RNA传递到卵母细胞通过何种机制影响胚胎早期发育, 从而传递父本环境暴露的信息给子代; 受精卵中只携带了一个精子的小RNA信息, 如此低量的小RNA是如何发挥足以决定子代某方面表型的强大生物学功能的. 本综述将系统阐述父亲精子小RNA在代际遗传方向的既有发现及其作为代际遗传现象的分子信息载体的研究价值, 为代谢类疾病和精神类疾病的代际遗传现象未来的发展方向提供参考.

关键词 代际遗传, 精子, 小RNA, 细胞外囊泡

经典遗传学基于DNA序列, 认为DNA序列携带了所有的表型信息, 但随着近代表观遗传学兴起, 科学家意识到平行于基因组的表观基因组信息不仅能在细胞有丝分裂过程中得以保留, 而且能在种系间遗传, 包括代际遗传和跨代遗传两种方式, 而代际遗传是目前研究较多的方面, 主要由于产生子代的遗传信息直接接触环境刺激而产生表观基因组的变化致使自身产生表型变化^[1-3]. 母亲因为怀孕期间诸如宫内环境等因素复杂多变, 因此研究种系遗传大多集中在父系, 而父本遗传主要包括精子和随后的受精发育过程两方面, 环境刺激对精子表观基因组的改变以及随后这些改变在胚胎受精发育期间对胚胎造成的变化自然变为研究

重点.

目前认为代际遗传与跨代遗传很多机制上可能存在共享, 在胚胎早期发育过程中, 胚胎会经历两次重编程, 这几乎会抹去所有的表观修饰, 从而保证基因组的稳定遗传, 而目前研究表明, 少数表观修饰如甲基化修饰、乙酰化修饰、组蛋白修饰等可能会保留下来影响后代表型^[4,5]. 在近年兴起的代际遗传发现精子中存在非编码小RNA(small non-coding RNA, sncRNA), 包括tsRNAs(tRNA-derived small RNAs), miRNAs(microRNAs), piRNAs(PIWI-interacting RNAs), rsRNAs(rRNA-derived small RNAs). 最初人们认为精子中RNA并不存在生物学功能, 但近年研究表明精子小

引用格式: 殷鑫, 王延博, 艾仔海尔·艾尼瓦尔, 等. 表观代际遗传与精子中非编码小RNA. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 312–321
Yin X, Wang Y B, Azhar A, et al. Epigenetic intergenerational inheritance patterns and spermatozoal small noncoding RNAs (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 312–321, doi: [10.1360/SSV-2021-0147](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0147)

RNA能够传递父本遗传信息到子代,精子小RNA的研究将代际遗传领域往前更加推进了一步,尤其是在几个实验室的工作中,将精子中小RNA分离后直接显微注射进入正常受精卵可以重现父本的表型^[6-10],而注射选定miRNAs的sense/antisense也可以重现/抑制相关表型的发生^[10].这些实验都证明了小RNA是代际遗传信息传递的重要信息载体,越来越多的研究发现在哺乳动物中存在代际遗传现象,这些现象包括但不限于代谢类疾病、精神类疾病和化学暴露等.深入的研究来解释这些后天环境暴露导致的疾病表观遗传机制对预防子代出生即为疾病高风险人群有重大意义,对研究代际遗传现象背后的生命发展进化的奥秘尤为重要.

1 代际遗传起源

人类发展历史中,生物学重大突破来自DNA双螺旋结构的发现,随后奠定了人类遗传密码是由DNA序列编码的,人类大多性状如身高、肤色、性格等都由DNA序列的差异决定,DNA序列的异常突变会造成多种可遗传的疾病.

但近代生物学的发展发现很多独立于DNA序列之外的遗传现象.被引用最多的一个例子就是Bygren等人^[11]在2001年发表的文章,他们发现祖父在青春期的食物获取程度直接影响了他们孙子的寿命,食物较少时,孙子寿命长,而食物充足时,孙子的寿命反而短.并在2002年继续发文指出,这种影响呈现性别依赖特征^[12,13].临床研究还表明,父母的营养不良直接影响了子代的代谢健康,证明了孕妇怀孕期间食物短缺或导致其代谢异常状态遗传给子代^[14].父母的精神压力也会对子代的精神健康产生影响^[15,16].此外,动物实验证明化学物暴露如父亲尼古丁暴露会通过多种机制导致子代多动症及肝纤维化等代际遗传现象^[17-19],而母亲尼古丁暴露甚至会产生跨代遗传现象^[20].这些研究都表明在哺乳动物中的确存在非经典遗传学的现象.

Gapp等人^[21]将这种现象统称为表观种系遗传现象(epigenetic germline inheritance),包括代际遗传(intergenerational epigenetic inheritance)和跨代遗传(transgenerational epigenetic inheritance)两种现象,两种特殊的遗传方式的主要区分方式是其子代是否曾直接暴露

于环境刺激.

早在100多年前,就出现了围绕亲本环境信息是否能传递到子代的学术争论,魏斯曼提出哺乳动物为了遗传物质的稳定,信息流只能是生殖细胞流向体细胞,而不能反向流动^[22].而拉马克则提出“获得性遗传”,这与达尔文提出的“泛生论(Pangenesis)”中观点很像,不过泛生论的解释很有前瞻性,其中指出生物体各部分的细胞都带有特定的自身繁殖的例子,称为“微芽”或“泛子”,这种粒子可由各系统生成并集中于生殖细胞,传递给子代,使他们呈现亲代的特征,这和魏斯曼学说完全对立^[23].从现代生物学研究出发,亲本环境暴露并将信息传递到子代甚至未来几代的现象在人类中的确存在,表观遗传学的很多观点似乎为解释这种遗传现象提供了很好的方向,如DNA甲基化、组蛋白修饰和今年研究火热的非编码小RNA(图1).并且这些研究大多集中在父本代际遗传现象中,主要研究方向包括环境暴露如何介导精子小RNA变化机制和精子中变化的小RNA如何介导代际遗传过程两个方面.

2 精子存在小RNA并介导代际遗传

2.1 精子中存在小RNA

近年研究发现环境暴露会改变精子小RNA表达谱,精子中小RNA组分的改变对其后代产生深远影响.精子中小RNA变化目前认为有两种可能:精子细胞成熟过程精子自身产生以响应外部刺激或者从外部传递给它们.在第一种假设中,精子细胞成熟过程会应对外部刺激转录产生RNAs,包括mRNAs和一些小RNA,以应对精子成熟后转录抑制状态,储存转录信息到成熟精子中,储存的mRNAs能够延迟翻译成蛋白保证精子功能的同时维持蛋白提基因组稳定,而对于小RNA,目前仍然缺乏其在成熟精子中的储存是否为早期精子细胞成熟过程中产生以及小RNA在传递种系遗传信息中的具体作用^[24].第二种假设其实与第一种假设并不互相排斥,小RNA通过远端传递(循环系统)到达精子细胞或者通过精子细胞周边组织(Sertoli细胞等)进行近端传递^[25-27].

科学家其实更加偏向于第二种假设,的确,环境暴露改变体细胞中小RNA水平并通过外泌体,ago2蛋白复合物等形式释放到循环中,经循环系统到达生殖系统并被精子吸收似乎更加合理.早在20世纪末,已经

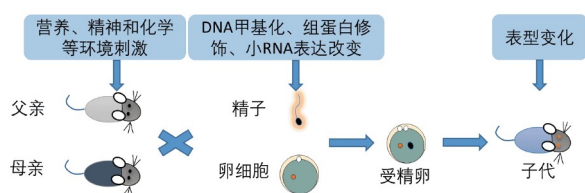


图1 父亲后天环境暴露导致表型改变, 并引起精子表观遗传学修饰状态改变, 包括DNA甲基化、组蛋白修饰和小RNA改变, 最终将其后天获得表型遗传到子代

Figure 1 Paternal environmental exposures that lead to phenotypic and sperm epigenetic changes, including alterations in DNA methylation, histone modification, and small RNAs, and eventually, change in the phenotype of the offspring

有研究表明成熟精子具有自发吸收外源DNA分子并将其内化到细胞核中的能力^[28], 这包括了附睾内和射精后(接触大量精浆后)的精子, 并在多种哺乳动物中都有此类现象^[29]。因此, 尽管精子细胞具有高度致密和不可穿透的结构, 但精子细胞实际上还是高度可渗透外来分子的。既然精子细胞能够内化DNA分子, 那么RNA分子是否也存在内化现象? 有趣的是, 精子细胞虽然处于转录抑制状态, 但其的确可以像内化DNA一样内化RNA进入精子, 并有一套模仿天然PCR/RT-PCR的过程, 具体来说, 精子中存在有活性的LINE-1转座子逆转录基因编码的存在于精子核中的逆转录酶(reverse transcriptase)^[30,31], 这些逆转录酶与同样存在于精子中的DNA依赖性的RNA聚合酶相互作用, 共同放大了内化的RNA通过逆转录形成的cDNA的拷贝数, 随后这些cDNA会被释放到精子悬液中, 并可以被其他精子再次吸收并内化到他们的核中, 这种过程是不断循环的, 保证cDNA拷贝均匀地分布在绝大多数精子细胞中^[32]。小鼠实验还证明, 通过精子中逆转录酶产生的cDNAs在受精时被传递到卵母细胞^[30,33], 并在维持低拷贝(低于一个拷贝/基因组)、非整合染色体外序列的非孟德尔方式遗传给子代并产生表型变异^[33,34]。虽然上述情况仅限编码蛋白的RNAs, 没有触及非编码的小RNA, 但是从以上这些证据可以看出, 精子具有内化核酸片段进入细胞核的能力, 并且这些RNAs在随后的胚胎发育过程中介导了表型的传递, 与精子染色体基因无关, 这提示了因环境变化, 在精子中小RNA的表达差异很大可能是远端传递进入精子的, 并极有可能在精子中经过PCR/TR-PCR过程复制产生不止上述发现的一个拷贝/基因组的现象, 从而进

一步介导表观遗传种系传播现象, 这个猜测在未来需要进一步的实验验证其可能性。

随着高通量测序技术的发展, 如RNA测序技术(RNA-seq)分析, 精子中存在小RNA的现象已经明确^[35], 而将精子RNAs传递到卵母细胞的争议也明确了^[36]。研究表明, 非编码小RNA其实占据了精子RNA的相当大比例^[37,38], 主要表现为精子发生过程中产生的piRNAs, tsRNAs, 而在较小程度上, miRNAs在附睾精子中占据主导地位^[39]。总的来说, 后天环境的暴露会影响精子中小RNA的水平, 并将这些变化的小RNA传递到卵母细胞去, 潜在的调控胚胎发育过程, 很可能参与了代际遗传调控过程。

2.2 精子小RNA能够介导代际遗传

近年代际遗传方向越来越多的研究表明, 精子小RNA的变化可能介导了代际遗传过程, 这些小RNA包括了miRNAs, tsRNAs, piRNAs, rsRNAs等, 并且这些小RNA能够被传递到卵母细胞中去^[36,40]。这些发现改变了人们对精子的传统看法, 因为精子成熟后一直处于转录抑制状态^[41], 精子中变化的小RNA来自哪里, 是否会参与后续的胚胎发育成为研究的重点内容。

首个证明精子小RNA可能参与代际遗传现象的实验来自Rassoulzadegan实验室^[6]的工作, 一个经典的“白尾实验”, 研究人员将Kit转基因小鼠的精子RNA收集后, 注射到正常受精卵中, 意外发现通过注射转基因小鼠的精子RNA可以重复Kit转基因小鼠白尾的表型, 并且在注射体细胞RNA甚至合成的能够靶向Kit基因的miR-221/222时, 都能够重复此表型。

在这个开创性的工作之后, 诸多研究都证明了环境暴露影响父本精子小RNA的表达并跟代际遗传表型有关。以下简述来自不同实验室的重要工作。Fullston等人^[42]发现父亲肥胖会导致代际遗传现象(F1), 但在F2代中只有部分小鼠出现表型, 即只有部分小鼠出现跨代遗传表型。此外, 父本肥胖改变了睾丸和精子小RNA的表达, 主要集中在miRNAs上, 这些变化的miRNAs潜在调控基因组完整性、表观遗传状态和胚胎发育, 为肥胖和代谢健康受损的父系代际遗传提供可能的机制。Gapp等人^[7]发现小鼠早期创伤应激会损伤后代的认知功能并改变突触可塑性, 且在父亲及子代成年后血清和大脑中, 以及父亲精子中, 发现了几种变化相同的miRNAs, 通过注射父亲精子RNA也重

复了该表型。Rodgers等人^[8]的工作发现, 父亲压力应激会改变精子RNA表达谱, 从中将9种已鉴定的miRNAs化合物注射到正常的合子中会最终导致后代中HPA轴激活降低, miRNAs的胚胎注射也降低合子中的几个mRNAs水平。Chen等人^[9]发现tsRNAs能够作为分子信使传递父本的代谢异常, 且tsRNAs自身修饰在此调控过程中发挥了重要作用。Wang等人^[10]近期工作表明, 抑郁症小鼠精子小RNA谱发生变化, 主要集中在miRNAs上变化显著, 经抑郁症父亲精子RNA注射正常受精卵能够重复亲代抑郁症表型, 并且合成的miRNAs也能够重复抑郁症表型, 而注射了miRNAs的anti-sense后, 可消除子代抑郁症表型。此外, 化学物暴露也能够通过改变精子miRNA水平来调控子代表型变化, Qiao研究组^[17]发现父本在后天尼古丁暴露后, 会导致父亲抑郁, 但会减轻子代抑郁并促进小鼠多动, 机制研究发现精子和子代小鼠大脑中miR-15b启动子区域

超甲基化导致其表达水平降低, 激活其靶基因Wnt4通路的表达。

一系列工作表明, 环境暴露致使精子小RNA产生变化, 这些变化的小RNA可能来自精子早起生成阶段受环境刺激后转录产物的保留, 以应对成熟精子转录抑制状态, 也可能是来自体细胞与生殖细胞之间的交流, 体细胞将环境暴露获得的信息以小RNA为载体传递到生殖细胞中, 调控相关基因表达, 影响胚胎早期发育, 最终将父本后天获得的表型遗传给子代, 导致代际遗传现象(图2)。

3 精子小RNA介导不同表型的代际遗传

3.1 精子小RNA介导代谢异常的代际遗传

上述临床研究中, 最早在人类中发现的代际遗传现象是代谢类疾病表型, 即亲本在面对食物短缺造成

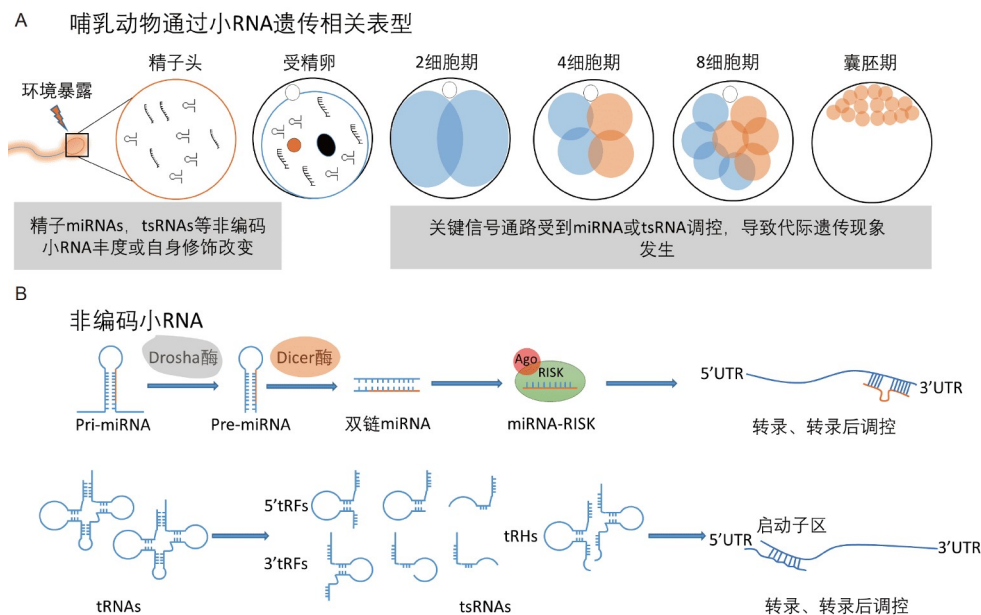


图 2 父亲环境暴露导致精子中小RNA含量改变, 通过已知的机制(miRNA 和 tsRNA)以及其他未知的机制影响早期胚胎发育进程。A: 父本后天环境暴露影响精子miRNAs, tsRNAs等非编码小RNA丰度或自身修饰状态发生变化, 变化的小RNA传递到卵母细胞, 受精卵从2细胞期开始转录、翻译等, 此时精子传递的小RNA发挥转录、转录后调控作用, 调控胚胎早期发育关键信号通路, 最终导致相关表型的代际遗传现象发生; B: miRNAs和tsRNAs生成及发挥调控作用机制, miRNAs成熟体发挥调控作用的主要方式是种子序列与靶基因mRNA的3'UTR区域结合, 抑制mRNA翻译过程; tsRNAs主要通过靶向mRNA启动子区域, 抑制mRNA转录

Figure 2 Paternal environmental exposures induce alterations in spermatozoal small RNA concentrations, thereby creating alterations that affect early embryonic developments through known (miRNA and tsRNA) or unknown mechanisms. A: Paternal environmental exposures affecting the amount and modification of spermatozoal small RNAs, including miRNAs and tsRNAs. Altered small RNAs are delivered to oocytes, which regulate vital signaling pathways in early development at both transcriptional and posttranscriptional levels, leading to intergenerational inheritance of relevant phenotype. B: The mechanism of miRNAs and tsRNAs biogenesis and functions. Mature miRNAs bind to the 3'-UTR ends of targeted genes and inhibit translation, whereas tsRNAs mainly bind to the promoter region of the targeted gene and inhibit its transcription

营养不良的情况下, 会损害子代的代谢健康, 造成子代代谢类疾病的发病率增加。后续动物模型试验通过注射精子中提取的小RNA注射进入正常受精卵重复了相关表型, 强调了精子小RNA在代谢类疾病代际遗传现象中发挥重要调控作用。

Rando研究组^[43]首先在小鼠模型上进行了相关实验, 证明了父本低蛋白饮食造成代谢异常表型具有代际遗传效应, 其子代小鼠肝脏转录组变化显著, 降低了胆固醇水平, 子代小鼠肝脏miRNAs表达水平也受到亲本低蛋白饮食的影响, 其中与肝细胞增殖相关的miRNAs与肝脏转录组中过度增殖的基因表达谱一致, 虽然研究人员没有对精子小RNA水平进行鉴定, 但在子代小鼠肝脏中发现大量变化的miRNAs表明了miRNAs在父本营养状态异常造成子代代谢异常表型中的潜在研究价值。Fullston等人^[42]的工作同样研究了父本饮食改变导致肥胖发生通过代际遗传的方式影响了子代的健康, 不同的是, 研究人员鉴定了父本肥胖小鼠睾丸和精子中有11种miRNAs含量发生变化, 伴随着生殖细胞DNA的整体甲基化降低25%, 提示精子miRNAs水平因肥胖而发生改变, 潜在导致子代表型的变化。上述实验只观察到环境暴露带来的精子小RNA的变化, 而将精子小RNA与代谢异常代际遗传现象直接联系起来的实验来自Rassoulzadegan等人^[6]的工作, 研究人员首先发现父本高脂饮食导致子代代谢异常现象, 高脂组小鼠睾丸和精子中多种miRNAs的表达增加, 其中miR-19b和miR-29a表达丰度最高, 将精子小RNA提取后注射进入正常受精卵, 能够重复子代代谢异常相关表型, 并且在注射单独的miR-19b后, 也能够导致子代体重增加的表型, 这直接证明了精子小RNA参与了代谢异常相关表型代际遗传的过程^[44]。

另一项系统性的工作发现通过高脂诱导父本胰岛素抵抗, 父本胰岛素抵抗表型通过代际遗传的方式遗传到子代; 随后研究人员将高脂喂养的父本精子头体外移植进入正常卵母细胞, 在随后的子代中也发现了代谢异常, 证明了父本胰岛素抵抗是通过精子遗传到子代的; 紧接着, 研究人员将高脂父本精子总RNA, 长链RNA和小RNA分别注射进入正常受精卵, 发现总RNA和小RNA都能重复相关表型, 而长链RNA不行, 证明了小RNA是相关表型代际遗传的信息载体; 最后, 研究人员发现高脂喂养小鼠精子中tsRNAs水平变化显著, 注射合成的相关tsRNAs也能够子代重复相关

表型, 系统证明了高脂诱导精子小RNA的变化参与了相关表型的代际遗传现象^[9]。此外, 在研究人员近期发表的工作中指出, 父本高脂饮食对精子中rsRNAs水平的影响显著, rsRNAs含量甚至比前期报道的tsRNA的含量水平更高, 说明注射30~40 nt的精子小RNA能够在子代中诱导出与父本相似的代谢异常表型很可能是rsRNAs和tsRNAs的“协同效应”^[45]。人体实验进一步证明了tsRNAs和rsRNAs在代际遗传进程中可能扮演的重要角色, 人体受试者接受高糖饮食, 仅一周便检测到精子中tsRNAs和rsRNAs水平的增加, 并且其主要来源于线粒体, 同时, 两者的增加与精子活力呈高度相关^[46]。而在最近发表的研究中指出, 精子中rsRNAs的含量比miRNAs和tsRNAs都要高^[47]。并且rsRNAs能够作为精子质量的生物标志物^[48]。这些结果提示精子中rsRNAs与已发现的tsRNAs在代际遗传进程中可能发挥相似的功能, 未来在针对rsRNAs是否介导代谢类疾病代际遗传现象的问题还需要更多的实验数据来证实。

总的来说, 已有证据证明了父本后天获得性代谢异常能够通过精子小RNA以代际遗传的方式遗传到子代, 精子小RNA在其中扮演了重要的信息载体的作用, 通过注射相关小RNA的antisense是潜在的阻止父本不良代谢表型遗传到子代的有效干预方式, 研究精子小RNA对子代代谢健康具有重要意义。

3.2 精子小RNA介导精神疾病的代际遗传

除了上述代谢类疾病之外, 代际遗传领域发现较多表型的便是精神类疾病相关表型, 精神压力包括各种环境挑战, 这些因素会导致机体的动态平衡被破坏从而导致生理和/或行为反应^[49]。了解父本压力暴露最终通过代际遗传方式影响子代大脑的机制, 对于阐明精神疾病的病因至关重要。现有解释机制中, 精子小RNA逐渐成为研究重点, 变化的精子小RNA经过受孕过程传递到合子, 促进整个妊娠过程中关键发育信号的改变, 对子代产生深远影响。在人类和动物模型研究中, 父本的压力暴露与子代成年后压力相关的精神疾病都表现出下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)应激轴的破坏, 导致糖皮质激素的失调, 其失调也是大多精神类疾病的潜在特征^[50,51]。

Rodgers等人^[8]首次证明了父本社交挫败小鼠压力模型会导致子代小鼠HPA轴敏感性损伤, 并强烈影

响了精子中miRNAs表达谱, 9种miRNAs表达水平显著上调. 随后研究人员将鉴定出的9种差异表达的miRNAs联合注射进入正常受精卵后, 致使几种关键基因mRNA的表达下调, 最终损伤了子代小鼠中HPA轴敏感性^[52]. Gapp等人^[7]构建了小鼠早年创伤性压力模型 (traumatic stress), 发现受创伤小鼠精子中miRNAs表达谱发生显著变化, 定量RT-PCR验证了miR-375-3p, miR-375-5p, miR-200b-3p, miR-672-5p和miR-466-5p在创伤子代精子中也上调, 而在创伤子代血清、海马和下丘脑中, 5个miRNAs也发生了变化, 潜在与大脑结构和应急反应有关, 将来自这些创伤小鼠的精子RNA注射进入正常受精卵可以重现相关行为和代谢表型. 此外还有研究表明, 创伤性压力模型会破坏小鼠认知功能, 改变父本和子代的突触可塑性^[53], 而在父本小鼠进行生存环境改善, 如自主跑轮的加入, 能够提高父本和子代雄性小鼠的认知能力, 而这种逆转作用似乎也跟精子中miRNAs的变化相关, 即异常表达的miRNAs在加入跑轮后恢复到正常水平, 这证明了miRNAs在精神类疾病表型中的重要调控作用^[54]. Wang等人^[10]近期发表工作证明了抑郁症存在代际遗传现象, 并且抑郁症小鼠精子小RNA谱发生变化, 这主要集中在miRNAs变化上, 注射抑郁症小鼠精子小RNA, 合成的miRNAs都能够在子代中重复抑郁症表型, 并且在注射了miRNAs的antisense后, 消除了子代抑郁症表型, 这证明了精子小RNA潜在作为精神类疾病代际遗传的有效干预措施具有重大的研究价值. 这项研究中还发现了抑郁症父本精子中piRNAs和rsRNAs水平的变化, 但tsRNAs的表达水平不变, 鉴于最新研究发现精子rsRNAs实际上占据了精子中小RNA含量的主导地位^[47], 后续精神类疾病代际遗传的研究需要更多的实验来证明精子rsRNAs是否参与了精神类疾病的代际遗传进程.

总的来说, 精子小RNA能够介导父本精神类疾病的代际遗传现象, 能够潜在作为精神类疾病代际遗传的标志物, 并且在预防/治疗精神类疾病在子代中遗传提供了有价值的研究方向.

4 小RNA介导代际遗传机制

4.1 miRNA

父本环境暴露能够改变精子中的小RNA, 进而影

响子代健康^[55]. 显微注射的研究证明了这些存在于精子中的小RNA的确能够转移父本后天获得的表型给下一代^[7,55]. 其中, miRNAs是一类内源性的非编码小RNA, miRNAs通过碱基互补配对的方式与特定的mRNAs相互作用, 在转录水平对基因的表达进行调控(图2)^[56]. 精子中存在的miRNAs可以通过降低合子中的靶mRNA的水平来间接改变发育中胚胎的表观遗传状态. 在经典的Kit突变实验中, 突变小鼠为杂合子, 发现后代野生型小鼠仍有部分存在白尾表型, 在对这部分小鼠进行实验发现其Kit mRNA水平降低到与杂合子亲代相似水平, 在将先前证明靶向Kit基因的miR-221/222注射进入野生型合子后, 可以诱导出类似的白尾表型, 提示精子中miRNAs的变化是通过在合子中影响靶基因的表达, 从而影响胚胎发育的表观遗传学修饰过程, 最终影响了子代的表型^[6]. 近期发表的有关抑郁症代际遗传现象的研究表明, 父本抑郁症显著影响了精子中miRNAs的表达谱, 显微注射精子中提取的小RNA, 合成的miRNAs都能够在子代中诱导出抑郁样行为, 改变胚胎发育早期大量神经发育相关基因的表达. 有趣的是, 这种抑郁样行为在注射了miRNAs的antisense后能够得到抑制, 证明了将疾病诱导变化的精子miRNAs作为药物靶点的可能^[10]. 这些结果都表明父本环境暴露导致精子中miRNAs的表达异常, 异常表达的miRNAs直接参与了异常表型的代际遗传.

除了上述环境暴露导致精子miRNAs表达谱发生改变之外, 研究还发现了一种有趣的代际遗传信息传递的方式, Li研究组^[57]发现, 父本压力模型会导致父本和子代出现肝糖异生以及PEPCK表达升高, 从而出现高血糖, 进一步研究发现压力模型改变了精子Sfmbt2基因启动子区域甲基化, 导致其内含子miR-466b-3p表达下降, 从而在子代肝脏中上调了miR-466b-3p的靶基因PEPCK的表达水平, 导致肝糖异生的发生. 化学物暴露导致精子miRNAs水平变化从而介导代际遗传现象研究中也存在类似机制, Qiao研究组^[17]研究表明, 父本在后天尼古丁暴露后, 父本精子和子代小鼠大脑中都检测到miR-15b启动子区域超甲基化, 从而导致其表达水平降低, 激活其靶基因Wnt4通路的表达. 通过miRNAs启动子甲基化状态改变影响精子miRNAs表达水平从而介导代际遗传表型传递是目前较为重要的研究方向, 为解释后天环境暴露如何影响精子miRNAs表达水平提供机制.

4.2 tsRNA

tsRNAs主要由两类tRNA片段组成: tRNA半分子(tiRNA)和tRNA衍生片段(tRFs)。这些分子衍生自成熟的tRNA或前体tRNA, 涉及基因表达和转录后调控的非编码调控RNA^[58]。父本饮食控制被证明可以导致人类精子中tsRNAs群体快速变化^[46], 父本高脂饮食^[59]和运动^[60]也都被证明可以改变小鼠精子中众多tsRNAs的丰度, 这些变化的tsRNA与靶基因启动子区域结合, 调控基因表达。陈等人在证明了精子tsRNAs是介导父本代谢异常传递到子代的信息载体后, 进一步验证了DNA甲基转移酶(Dnmt2)是tsRNAs靶向作用的靶点, 通过构建Dnmt2基因敲除小鼠, 发现了父本高脂诱导的代谢异常, 无法在敲除小鼠中传递代谢异常到子代。此外, 将高脂诱导的父本精子中收集的小RNA(30~40 nt, 主要包含tsRNAs)注射进入野生型合子无法在子代诱导出代谢异常表型, 证明了Dnmt2是高脂诱导的精子tsRNAs变化后作用的靶点^[45]。有限的证据表明, 精子tsRNAs产生变化后, 可能通过改变例如Dnmt2之类的表观修饰酶的表达从而对表观基因组产生影响, 将信息以表观基因组修饰这种较为稳定的方式在子代中保存下来。

4.3 外泌体

已鉴定的miRNAs和tsRNAs都在代际遗传进程中发挥重要调控作用, 但这些小RNA的来源一直没有定论, 近期Bale研究组^[61]的工作进一步将小RNA介导代际遗传的研究向前推进了一步, 他们发现将应激处理的附睾上皮细胞释放的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)与正常精子共培养后, 精子改变了其产生后代的神经过发育和压力应激反应状态, 并且在处理后的附睾上皮细胞外泌体中miRNAs和蛋白的含量变化显著, 这提示了附睾上皮细胞的功能可能不仅仅局限在维持精子正常成熟, 而且可能在父本经历压力刺激后传递压力信号给精子从而传递压力表型给子代中扮演重要角色。

此外, 有研究表明附睾中的EVs(epididymosome, 附睾小体)含有丰富的tsRNAs, 并且体外实验证明附睾小体可以包裹tsRNAs并转移到精子中去^[62]。值得注意的是, 精子在射精后接触大量的精浆中也含有非常丰富的EVs, 其中包裹了大量的的小RNA^[63], 在精浆环境下是否也会发生类似转移目前还不清楚, 但可能性很大。在诸多动物实验中, 有两个实验引起了注意。

Cossetti等人^[64]将人类肿瘤细胞异种移植到小鼠体内, 发现这影响了小鼠精子中RNA的表达, 研究人员通过在肿瘤细胞中特异性表达增强的绿色荧光蛋白(EGFP)RNA, 随后在小鼠血清和精子中都检测到了EGFP RNA的表达, 研究人员强调排除了可能对精子RNA产生污染的血液和附睾体细胞的干扰, 证明了结果的可靠性。另外一项研究中, 患有肝损伤的大鼠成肌纤维分泌的可溶性因子(可能是EVs或RNAs)能够诱导精子表观遗传修饰改变从而刺激后代肝特异性伤口愈合能力的产生传递^[65]。虽然可溶性因子没有确定, 但与上一个研究一样, 都支持了环境刺激诱导体细胞分泌类似EVs包裹信息分子传递到精子从而介导表观种系遗传的想法。

5 展望

父本后天获得的代谢类和精神类疾病, 很大程度上对子代的健康产生不良影响, 精子中小RNA作为潜在的传递信息的载体, 通过生物学手段特异性地阻断某些小RNA的异常表达是预防疾病在代际间传递的潜在手段, 并且对于小RNA的表达进行干扰技术较为成熟便捷, 是预防疾病代际间传递的有价值的研究方向。已发现的包括精子miRNAs, tsRNAs, piRNAs和rsRNAs在父本后天异常环境暴露后都会改变其表达量或修饰状态, 并潜在介导相关异常表型的代际传递, 其中, 尽管rsRNAs的功能研究较少, 但最新研究表明其含量在精子小RNA中占据主导, 对其进行相关功能研究具有重要价值。而这些精子小RNA在后天环境暴露后表达水平差异的原因可能与其编码基因的启动子区域表观修饰状态有关, 但仍然需要更多的机制去解释精子小RNA是如何在环境暴露后产生表达水平变化及自身修饰变化。

未来在精子小RNA介导代际遗传方向的研究需要集中在解释父本后天环境改变影响精子小RNA的机制, 找到精子小RNA变化的源头; 此外, 变化的精子小RNA影响子代表型的机制, 即不同疾病导致的精子中变化的小RNA如何影响胚胎的早期发育, 具体的通路是什么; 最后, 未来研究中, 探究精子中小RNA是如何在表达量很低的情况下, 造成后代表型的巨大差异, 其调控机制是否在不同表型之间具有相通性或特殊性, 将会为代际遗传现象提供有力的分子依据。

参考文献

- 1 Heard E, Martienssen R A. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*, 2014, 157: 95–109
- 2 Skinner M K. What is an epigenetic transgenerational phenotype. *Reprod Toxicol*, 2008, 25: 2–6
- 3 Lacal I, Ventura R. Epigenetic inheritance: concepts, mechanisms and perspectives. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 292
- 4 Adalsteinsson B T, Ferguson-Smith A C. Epigenetic control of the genome—lessons from genomic imprinting. *Genes*, 2014, 5: 635–655
- 5 Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 517–530
- 6 Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, et al. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, 2006, 441: 469–474
- 7 Gapp K, Jawaaid A, Sarkies P, et al. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci*, 2014, 17: 667–669
- 8 Rodgers A B, Morgan C P, Bronson S L, et al. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *J Neurosci*, 2013, 33: 9003–9012
- 9 Chen Q, Yan M, Cao Z, et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, 2016, 351: 397–400
- 10 Wang Y, Chen Z P, Hu H, et al. Sperm microRNAs confer depression susceptibility to offspring. *Sci Adv*, 2021, 7: eabd7605
- 11 Bygren L O, Kaati G, Edvinsson S. Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period. *Acta Biotheoret*, 2001, 49: 53–59
- 12 Kaati G, Bygren L O, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10: 682–688
- 13 Pembrey M E, Bygren L O, Kaati G, et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet*, 2006, 14: 159–166
- 14 Lumey L H, Stein A D, Kahn H S, et al. Cohort profile: the Dutch Hunger Winter families study. *Int J Epidemiol*, 2007, 36: 1196–1204
- 15 Zerach G, Solomon Z. A relational model for the intergenerational transmission of captivity trauma: a 23-year longitudinal study. *Psychiatry*, 2016, 79: 297–316
- 16 Aloni R, Mikulincer M, Zerach G, et al. The intergenerational sequelae of war captivity: the impact of a self-amplifying cycle of PTSD and attachment insecurities on offspring's attachment orientations. *Eur J Psychotraumatol*, 2020, 11: 1741859
- 17 Dai J, Wang Z, Xu W, et al. Paternal nicotine exposure defines different behavior in subsequent generation via hyper-methylation of *mmu-miR-15b*. *Sci Rep*, 2017, 7: 7286
- 18 Zhang M, Zhang D, Dai J, et al. Paternal nicotine exposure induces hyperactivity in next-generation via down-regulating the expression of DAT. *Toxicology*, 2020, 431: 152367
- 19 Zhang D, Dai J, Zhang M, et al. Paternal nicotine exposure promotes hepatic fibrosis in offspring. *Toxicol Lett*, 2021, 343: 44–55
- 20 Zhang M, Xu W, He G, et al. Maternal nicotine exposure has severe cross-generational effects on offspring behavior. *Behav Brain Res*, 2018, 348: 263–266
- 21 Gapp K, Bohacek J. Epigenetic germline inheritance in mammals: looking to the past to understand the future. *Genes Brain Behav*, 2018, 17: e12407
- 22 Surani M A. Breaking the germ line-soma barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 136
- 23 Liu Y. A new perspective on Darwin's Pangenesis. *Biol Rev*, 2008, 83: 141–149
- 24 Johnson G D, Sendler E, Lalancette C, et al. Cleavage of rRNA ensures translational cessation in sperm at fertilization. *MHR-Basic Sci Reprod Med*, 2011, 17: 721–726
- 25 Dinger M E, Mercer T R, Mattick J S. RNAs as extracellular signaling molecules. *J Mol Endocrinol*, 2008, 40: 151–159
- 26 Sharma A. Transgenerational epigenetic inheritance requires a much deeper analysis. *Trends Mol Med*, 2015, 21: 269–270
- 27 Sharma A. Transgenerational epigenetics: integrating soma to germline communication with gametic inheritance. *Mech Ageing Dev*, 2017, 163: 15–22
- 28 Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays*, 1998, 20: 955–964
- 29 Smith K, Spadafora C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays*, 2005, 27: 551–562
- 30 Giordano R, Magnano A R, Zaccagnini G, et al. Reverse transcriptase activity in mature spermatozoa of mouse. *J Cell Biol*, 2000, 148: 1107–

- 31 Spadafora C. Sperm-mediated “reverse” gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. [Hum Reprod](#), 2008, 23: 735–740
- 32 Fuster C D, Farrell D, Stern F A, et al. RNA polymerase activity in bovine spermatozoa. [J Cell Biol](#), 1977, 74: 698–706
- 33 Pittoggi C, Beraldi R, Sciamanna I, et al. Generation of biologically active retro-genes upon interaction of mouse spermatozoa with exogenous DNA. [Mol Reprod Dev](#), 2006, 73: 1239–1246
- 34 Sciamanna I, Barberi L, Martire A, et al. Sperm endogenous reverse transcriptase as mediator of new genetic information. [Biochem Biophys Res Commun](#), 2003, 312: 1039–1046
- 35 Ostermeier G C, Dix D J, Miller D, et al. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. [Lancet](#), 2002, 360: 772–777
- 36 Ostermeier G C, Miller D, Huntriss J D, et al. delivering spermatozoan RNA to the oocyte. [Nature](#), 2004, 429: 154
- 37 Krawetz S A, Kruger A, Lalancette C, et al. A survey of small RNAs in human sperm. [Hum Reprod](#), 2011, 26: 3401–3412
- 38 Kawano M, Kawaji H, Grandjean V, et al. Novel small noncoding RNAs in mouse spermatozoa, zygotes and early embryos. [PLoS ONE](#), 2012, 7: e44542
- 39 Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. [Nat Rev Genet](#), 2016, 17: 733–743
- 40 Krawetz S A. Paternal contribution: new insights and future challenges. [Nat Rev Genet](#), 2005, 6: 633–642
- 41 Kierszenbaum A L, Tres L L. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. [J Cell Biol](#), 1975, 65: 258–270
- 42 Fullston T, Ohlsson Teague E M C, Palmer N O, et al. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F₂ generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. [FASEB J](#), 2013, 27: 4226–4243
- 43 Carone B R, Fauquier L, Habib N, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. [Cell](#), 2010, 143: 1084–1096
- 44 Grandjean V, Fourré S, De Abreu D A F, et al. RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. [Sci Rep](#), 2015, 5: 18193
- 45 Zhang Y, Zhang X, Shi J, et al. Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. [Nat Cell Biol](#), 2018, 20: 535–540
- 46 Nätt D, Kugelberg U, Casas E, et al. Human sperm displays rapid responses to diet. [PLoS Biol](#), 2019, 17: e3000559
- 47 Shi J, Zhang Y, Tan D, et al. PANDORA-seq expands the repertoire of regulatory small RNAs by overcoming RNA modifications. [Nat Cell Biol](#), 2021, 23: 424–436
- 48 Hua M, Liu W, Chen Y, et al. Identification of small non-coding RNAs as sperm quality biomarkers for *in vitro* fertilization. [Cell Discov](#), 2019, 5: 20
- 49 McEwen B S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. [Brain Res](#), 2000, 886: 172–189
- 50 Bale T L. Stress sensitivity and the development of affective disorders. [Hormones Behav](#), 2006, 50: 529–533
- 51 Fernández-Guasti A, Fiedler J L, Herrera L, et al. Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. [Horm Metab Res](#), 2012, 44: 607–618
- 52 Rodgers A B, Morgan C P, Leu N A, et al. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2015, 112: 13699–13704
- 53 Bohacek J, Farinelli M, Mirante O, et al. Pathological brain plasticity and cognition in the offspring of males subjected to postnatal traumatic stress. [Mol Psychiatry](#), 2015, 20: 621–631
- 54 McGreevy K R, Tezanos P, Ferreiro-Villar I, et al. Intergenerational transmission of the positive effects of physical exercise on brain and cognition. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2019, 116: 10103–10112
- 55 Zhang Y, Shi J, Rassoulzadegan M, et al. Sperm RNA code programmes the metabolic health of offspring. [Nat Rev Endocrinol](#), 2019, 15: 489–498
- 56 Pogue A I, Clement C, Hill J M, et al. Evolution of microRNA (miRNA) structure and function in plants and animals: relevance to aging and disease. [Aging Sci](#), 2014, 02
- 57 Wu L, Lu Y, Jiao Y, et al. Paternal psychological stress reprograms hepatic gluconeogenesis in offspring. [Cell Metab](#), 2016, 23: 735–743

- 58 Li S, Xu Z, Sheng J. tRNA-derived small RNA: a novel regulatory small non-coding RNA. *Genes*, 2018, 9: 246
- 59 de Castro Barbosa T, Ingerslev L R, Alm P S, et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol Metab*, 2016, 5: 184–197
- 60 Short A K, Yeshurun S, Powell R, et al. Exercise alters mouse sperm small noncoding RNAs and induces a transgenerational modification of male offspring conditioned fear and anxiety. *Transl Psychiat*, 2017, 7: e1114
- 61 Chan J C, Morgan C P, Adrian Leu N, et al. Reproductive tract extracellular vesicles are sufficient to transmit intergenerational stress and program neurodevelopment. *Nat Commun*, 2020, 11: 1499
- 62 Sharma U, Conine C C, Shea J M, et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, 2016, 351: 391–396
- 63 Vojtech L, Woo S, Hughes S, et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucl Acids Res*, 2014, 42: 7290–7304
- 64 Cossetti C, Lugini L, Astrologo L, et al. Soma-to-germline transmission of RNA in mice xenografted with human tumour cells: possible transport by exosomes. *PLoS ONE*, 2014, 9: e101629
- 65 Zeybel M, Hardy T, Wong Y K, et al. Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat Med*, 2012, 18: 1369–1377

Epigenetic intergenerational inheritance patterns and spermatozoal small noncoding RNAs

YIN Xin, WANG YanBo, AZHAR Anwar & CHEN Xi

NJU Advanced Institute for Life Sciences, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210023, China

Studies have shown that paternal obesity and mental stress does not only impair them but also affect the health of their offspring. This special genetic phenomenon is independent of changes in DNA sequences. Therefore, potential mechanisms, including DNA methylation, histone modification, and sperm small noncoding RNA (sncRNA) regulation, have been observed. Among these mechanisms, paternal postnatal environmental exposures lead to changes in sperm sncRNA profiles, which potentially regulate early embryonic abnormalities and mediate intergenerational inheritance. This finding is the focus of researchers presently. However, there are some obstacles. First, questions arise on how environmental exposures affect sperm sncRNAs profiles, i.e., the source of sncRNAs; second, the mechanism of how the sperm sncRNAs are transferred to oocytes and influence early embryonic development remain poorly understood; and lastly, how such low concentration of sncRNAs in a single sperm biologically influences the determination of phenotypes of an offspring is yet to be validated. Therefore, this review will systematically demonstrate the research value of sncRNAs in sperm during intergenerational inheritance processes to provide a reference for studies on the paternal intergenerational inheritance of metabolic diseases and mental illnesses.

epigenetic intergenerational inheritance, sperm, small RNA, extracellular vesicles.

doi: [10.1360/SSV-2021-0147](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0147)