



## RNA 参与获得性性状代际/跨代遗传的功能与机制研究进展

汪鑫, 曹政, 杨依婷, 李韵, 张云芳\*

同济大学生命科学与技术学院, 教育部细胞干性与命运编辑前沿科学中心, 上海 200092.

\*联系人, Email: [zhangyunfang@tongji.edu.cn](mailto:zhangyunfang@tongji.edu.cn)

国家重点研发计划(批准号: 2019YFA0802600)和国家自然科学基金(批准号: 82022029, 81971460, 82371727)资助。

2023-08-30; 2023-10-23

**摘要:** 获得性遗传这一概念在 19 世纪初被提出后就一直饱受争议, 直到近几十年, 随着分子生物学和表观遗传学的发展, 科学家们才开始重新审视和探究获得性遗传现象的真实性, 并对获得性遗传现象的遗传规律、分子载体和调控机制进行了深入的研究。作为新型表观遗传调控因子, 非编码 RNA 表现出多维调控能力, 在细胞命运决定、自我更新、细胞增殖和凋亡中发挥着不可或缺的调控功能。近年来的研究发现非编码 RNA 及其 RNA 修饰可以作为表观遗传信息载体介导获得性遗传, 为获得性性状的跨代遗传研究提供了新的研究思路和视角。本文将针对近年来获得性遗传的研究进展, 综述 RNA 在跨代遗传中的功能及调控机制。

**关键字:** RNA; 获得性遗传; 精子 RNA 编码指纹; 表观遗传调控;

# Progress in RNA mediated intergenerational / transgenerational epigenetic inheritance of acquired traits

WANG Xin, CAO Zheng, YANG Yiting, LI Yun & ZHANG Yunfang

Frontier Science Center for Stem Cell Research, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China.

**Abstract:** The concept of inheritance of acquired traits has been controversial since it was proposed in the early 19th century, and it was not until recent decades that scientists began to revisit and explore the authenticity of this concept. Recently, researchers have been dedicated to identifying the epigenetic information carriers, the inheritance laws and the regulatory mechanisms of intergenerational / transgenerational epigenetic inheritance of parentally acquired traits. As novel epigenetic regulators, non-coding RNAs show multidimensional capability in regulating gene expression, and play indispensable roles in regulating stem cell fate determination and self-renewal, cell proliferation and apoptosis. In recent years, it has also been found that non-coding RNAs and RNA modifications can be served as epigenetic information carriers to transmit the parentally acquired traits to the offspring, providing new research insights and perspectives for the mechanical exploration of epigenetic inheritance of acquired traits. In this review paper, we will comprehensively summarize the functional roles and molecular mechanisms of RNA in regulating intergenerational / transgenerational epigenetic inheritance of acquired traits in view of the recent research progress in this rising field.

**Key words:** RNA, epigenetic inheritance of acquired traits, sperm RNA code signature, epigenetic regulation

自从 2001 年人类基因组被解析以来, 科学家们在过去二十年进行了众多基因型-表型的一致性分析研究, 取得了令人瞩目的成就。然而, 对于多种人类复杂疾病, 其发病及遗传性仍不能归因于特定基因座改变或者基因突变, 也就是说传统观点认为的 DNA 序列决定遗传性状并不能解释多种疾病的发生和遗传现象 [1, 2]。这种“遗传性缺失”提示在生命体中可能还存在 DNA 序列之外的其他遗传模式。实际上, 基因遗传和表观遗传都能够调节性状从亲代向子代的传递。其中, 基因遗传控制着大多数遗传性状, 这些性状依赖于 DNA 序列作为信息载体介导细胞与细胞间以及亲代个体与子代间的遗传信息传递 [1]。表观遗传是指非 DNA 序列变化导致的基因表达及功能改变, 起初用来研究不同类型细胞中基因表达的可遗传改变 [3]。随着获得性遗传机制研究的推进, 表观遗传也被用来解释非 DNA 序列变化引起的获得性表型在子代间的遗传现象 [4]。

越来越多的证据表明获得性遗传现象在植物、动物乃至人类中普遍存在, 其遗传机制涉及 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质结构及非编码 RNA 和 RNA 修饰等表观遗传信息的动态调控 [5, 6]。然而, 哺乳动物在早期胚胎发育及配子形成过程中存在剧烈的表观遗传信息重编程现象 [7], 亲代由于环境、营养应激所导致的表观遗传信息改变能否逃逸发育过程中的表观遗传信息重编程介导获得性性状向子代的传递成为了获得性遗传领域的研究重点和热点。非编码 RNA (non-coding RNAs, ncRNA) 主要是指一类在基因组中不直接编码蛋白的 RNA 序列。根据非编码 RNA 的序列长度, 人们将非编码 RNA 分为长非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNAs, 一般大于 200 nt) 和小非编码 RNA (Small non-coding RNA, SncRNAs), 其中一些非编码 RNA 被证实可以作为反式作用因子调控基因的表达 [8, 9]。在哺乳动物细胞中, 非编码 RNA 占细胞总 RNA 的 90% 以上, 广泛参与了细胞生命活动的各个环节, 表现出了重要的生物学调控功能, 并与多种人类疾病的发生和发展密切相关 [10, 11]。此外, RNA 修饰作为一种新型表观遗传因子广泛分布于 mRNA 和非编码 RNA 上, 在细胞内调控 RNA 的生成、剪接、代谢、高级结构及互作分子识别等方面具有重要作用 [12, 13]。RNA 修饰的发现及其功能研究不仅增加了 RNA 携带的遗传信息的复杂性, 也使得 RNA 的多维调控机制更加多元化。近年来, 来自多个实验室的研究发现非编码 RNA 可以作为表观遗传信息载体参与获得性遗传, 本文将针对哺乳动物获得性遗传研究进

展，重点综述父源 RNA 及其 RNA 修饰在获得性性状的代际/跨代遗传中的作用及机制。

## 1. 获得性遗传现象的研究

获得性遗传现象主要是指亲代由于环境应激、营养失衡等所致的一些获得性性状能够被“记忆”在配子（精子/卵子）中，并传递到下一代，对下一代的健康造成影响的一种表观遗传现象。早在 1809 年，法国生物学家 Jean Baptiste Lamarck 就在前人的基础上，在其撰写的《动物学哲学》一书中提出了获得性遗传的观点 [14]，也被称为“拉马克学说”。虽然，在当时这一观点饱受争议，但随着分子生物学及表观遗传学的发展，越来越多的证据表明获得性遗传现象在植物、动物乃至人类中都普遍且真实存在 [15-17]。其中，在秀丽线虫、小鼠及大鼠等模式动物中发现，环境应激（如寒冷、化学毒物接触）、营养失衡（高脂饮食、低蛋白饮食、高糖高脂饮食等）以及精神压力/创伤（抑郁、分离焦虑）等因素造成的获得性性状可以通过不依赖于 DNA 序列的表观遗传方式传递给下一代，甚至一些获得性性状能够持续在多代之间进行传递，影响后续子代的健康 [18]。人类流行病学研究结果同样提示孕期、青少年时期营养缺乏以及气候温度的改变也可以导致一些获得性性状的代际/跨代遗传，对子代健康产生不良影响 [19, 20]。例如，对暴露于饥荒、压力/创伤或有毒物质的人类的流行病学研究为人类获得性遗传现象的存在提供了证据，证明父母接触某些不良因素刺激后会影响后代的健康，在某些情况下，会影响几代人的健康（图 1） [15, 21]。而关于人类精子质量的研究表明，肥胖、营养失衡、吸烟、酗酒以及吸食毒品等会对精子中的表观遗传信息载体如 DNA 甲基化水平、非编码小 RNA 的组成等造成影响 [22-24]。基于此，美国 NIH 机构也于 2016 年提出了“Environmental Influences on Child Health Outcomes”项目(ECHO; <https://echo.nih.gov>)，重点资助环境应激及营养失衡对儿童及其子代健康影响的相关研究 [21]，表明环境、营养应激引起的亲代健康改变所导致的子代健康问题已在国际上引起了广泛的关注和重视 [25]。此外，研究还发现一些成人疾病如 II 型糖尿病、肥胖、精神创伤及心脑血管疾病的发生或起源于生命早期，并对子代的健康产生深远影响 [26]，进一步提示获得性遗传已成为导致成人疾病发生窗口期提前的重要原因之一 [23, 27]，是影响

国民健康、威胁人口安全的重大隐患，而对获得性遗传机制及其传递规律的深入认识则是保障人口健康，进行疾病早期防控以及指导优生优育的关键，同时也对维护国家人口可持续发展具有重大战略意义。然而，关于人类的获得性遗传研究面临诸多困难和挑战，例如，难以获得多代人群性状的研究队列、收集暴露父母的生殖细胞涉及复杂伦理问题，以及难以排除心理、社会和文化因素对获得性性状代际/跨代遗传的影响 [21, 28]。

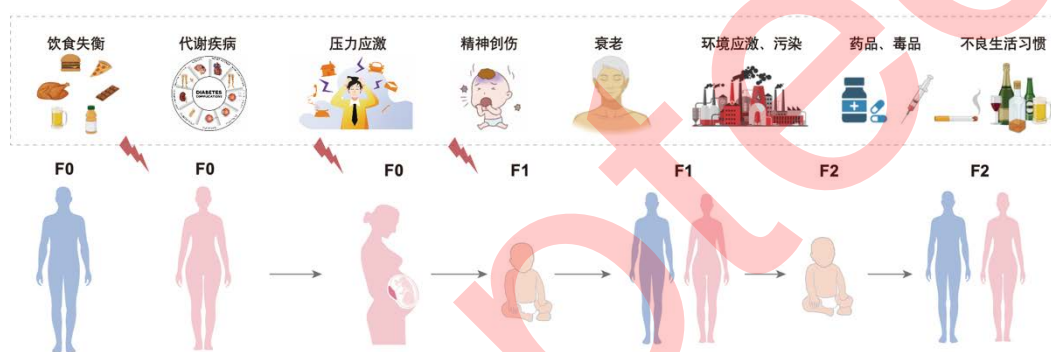


图 1. 营养失衡、环境暴露等不良应激引起的获得性性状对子代健康造成威胁。

Figure 1. Acquired traits caused by adverse stresses, such as nutritional imbalance and environmental exposure, pose a threat to the health of offspring.

获得性遗传根据获得性表型传递的代数又被分为代际遗传和跨代遗传现象。其中代际遗传主要是指亲代 F0 受到的应激反应产生的获得性表型能够通过配子遗传给下一代 F1，但是 F1 代的表型不能通过配子传递给 F2 代；而跨代遗传通常是指获得性的表型能够通过配子传递给 F2，F3 以及更多的子代（图 2） [4, 29]。需要特别指出的是，处于孕期的雌性（F0）所受到的一些应激因素可能对宫内胚胎的发育以及生殖细胞产生了直接影响，由该胚胎发育的子代（F1）产生获得性表型的现象并不能称为获得性性状的代际遗传现象，只有当该 F1 代所产生的子代（F2 代）也具有相似的获得性表型时才能称为代际遗传现象。进一步该 F2 代将获得性表型通过配子传递给 F3 代的现象被称为跨代遗传现象（图 2）。在线虫及果蝇中，很多获得性的性状能够进行 3-4 代的跨代遗传，例如野生型线虫幼虫阶段的饥饿经历引起的寿命延长表型 [30]、果蝇胚胎时期的热应激引起的眼睛颜色的改变等获得性表型等 [31]。在哺乳动物中的研究发现多种应激反应也能

够引起获得性性状的跨代遗传，如营养代谢失衡引起的代谢表型 [32]、神经创伤引起的行为学变化表型 [33]、化学毒物引起的疾病表型、代谢表型 [34]等，但是这种跨代遗传现象一般在 3-4 代以后就会慢慢消失。虽然获得性遗传现象在哺乳动物中得到了广泛的研究，然而，关于介导获得性遗传的表观遗传载体及其调控机制还尚不清晰。目前，现在普遍观点认为 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质高级结构、非编码 RNA 及其修饰等都可以作为表观遗传信息载体介导亲代获得性性状向子代的传递 [35]，为揭示获得性遗传规律及阐明获得性遗传调控机制奠定了研究基础。

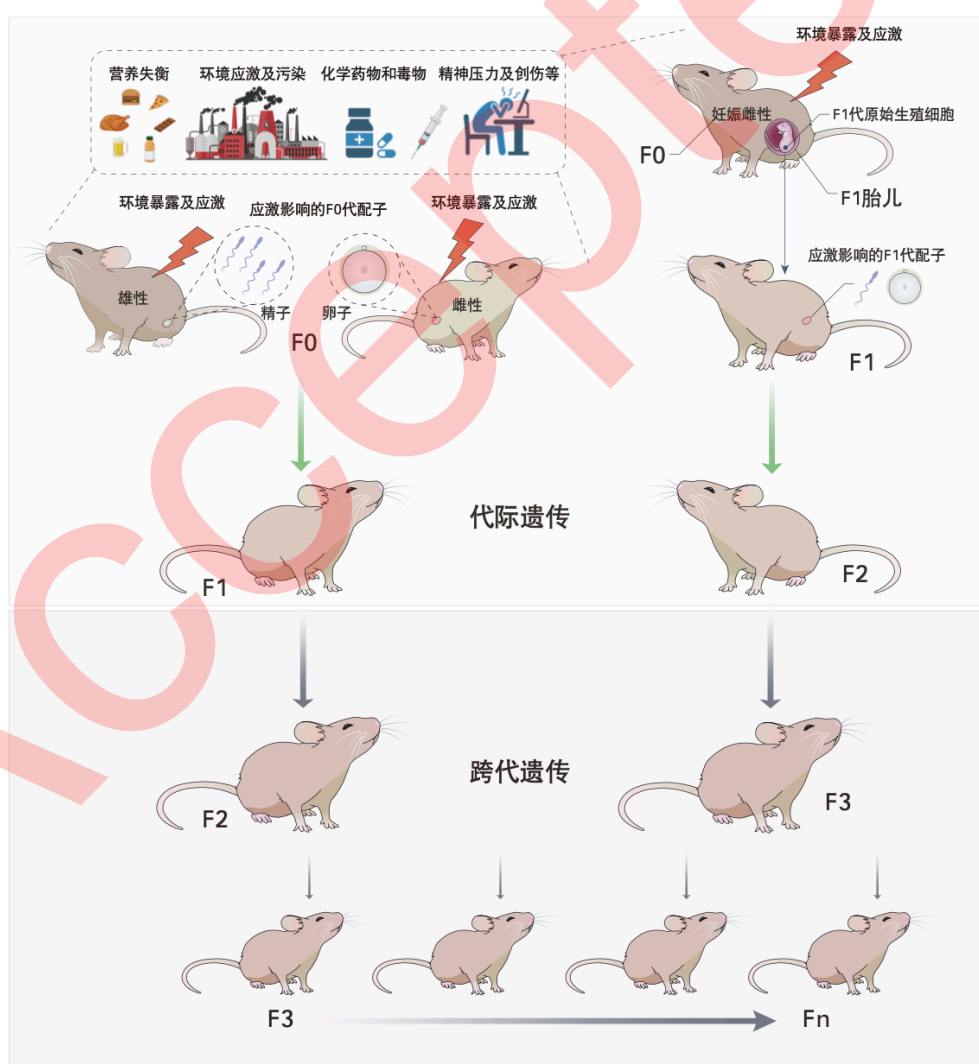


图 2. 获得性性状的代际遗传和跨代遗传模式图。营养失衡、环境应激、化学药物和毒物以及精神压力创伤等引起的获得性性状通过配子表观遗传信息载体进行代际遗传和

跨代遗传。

Figure 2. Illustration diagram of intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance of acquired traits. Acquired traits caused by nutritional imbalance, environmental stress, drugs and chemical toxicant, and mental stress and trauma are inherited intergenerationally and transgenerationally through gamete epigenetic information carriers.

## 2. DNA 甲基化和组蛋白修饰介导的获得性遗传研究

近年来，表观遗传学的发展为获得性遗传机制的深入探究发挥了重要作用。在上个世纪 90 年代初，围绕表观遗传学的研究主要以组蛋白修饰、DNA 甲基化以及染色质状态等表观遗传因子展开，其调控机制的发现极大地推进了表观遗传领域的发展，同时也丰富了现代分子遗传学。随着高通量测序技术的不断开发及分子生物学技术的不断成熟，非编码 RNA 及 RNA 修饰作为新型表观遗传学因子被发现在细胞命运决定、个体发育、配子形成以及细胞增殖、凋亡、分化和重编程过程中发挥了关键调控作用 [36]，并被发现在植物、线虫、果蝇乃至哺乳动物配子中能够作为表观遗传信息载体介导亲代获得性性状向子代的传递 [18]。

在哺乳动物中，表观遗传信息主要以 DNA 甲基化模式 (DNA methylation pattern)、组蛋白修饰谱图 (Histone modification spectrum)、染色质状态 (chromatin states)、表观转录谱式 (Epitranscriptome) 以及非编码小 RNA 表达谱 (sncRNA profile) 和 RNA 修饰谱的方式被编码 (图 3) [37]。在早期胚胎发育以及配子发生过程中表观遗传因子经历了大规模的重编程过程 [38]。在受精早期，父源基因组中的鱼精蛋白被组蛋白迅速替换，然后组蛋白 H3/H4ac 模式迅速建立，H3K27me3 和 H3K9me2 模式逐步建立；而母源基因组中 H3/H4ac、H3K27me3 和 H3K9me2 模式则一直维持在较高水平 [39]。同时，父源和母源 DNA 都经历了大规模 DNA 甲基化擦除和重新建立过程。其中父源 DNA 上的大部分甲基化位点通过 Tet 双加氧酶介导的主动去甲基化过程被迅速擦除，而母源 DNA 上的甲基化擦除过程则主要依赖于被动去甲基化，擦除过程相对缓慢 [40]。胚胎整体甲基化水平在囊胚期降至最低，随后逐步完成 DNA 甲基化模式的重新建立，并在 E6.5 天达到最高水平 [41]。此外，在配子形成过程中，随着原始生殖细胞 (Primordial germ cell, PGC) 向生殖脊的迁移，PGC 发生大规模的 DNA 去甲基

化、印记基因擦除和重建以及配子基因组 DNA 甲基化模式的重建 [42]。同时，组蛋白也随着 DNA 甲基化模式的改变在配子发生和成熟过程中发生动态改变。在成熟精子中，大部分的组蛋白被鱼精蛋白替换，完成父源染色质的压缩 [43]。因此，科学家们一度认为在如此大规模的表观遗传信息重编程过程中，环境因素导致的获得性表型和配子中的表观遗传信息改变很难保留下来并传递给子代，进而引发子代获得性表型的产生。直到 1999 年，Emma Whitelaw 实验室发现，DNA 甲基化水平改变能够调控小鼠毛色基因的表达并引发不依赖于 DNA 序列的毛色表型跨代遗传 [44]。这项研究首次证实 DNA 甲基化能够作为表观遗传因子逃逸哺乳动物早期胚胎发育和配子发生过程中的表观遗传信息重编程过程，将父代非基因调控的表型传递给子代。此后，研究人员通过对环境、营养应激引起的获得性遗传调控机制研究发现 DNA 甲基化似乎也参与了亲代获得性性状的跨代遗传。其中，Wei et al.等在 2014 年发现二型糖尿病小鼠子代患糖尿病的风险显著增加，其机制可能与父代二型糖尿病导致的精子 DNA 甲基化水平改变有关 [45]。Chen et al. 等在 2022 年利用雌性高糖小鼠模型证实，Tet3 调控的父源基因组 DNA 主动去甲基化过程参与了葡萄糖不耐受这一亲代获得性表型的代际遗传 [46]。2023 年 2 月 Takahashi et al.等发现通过人工定点编辑代谢相关基因启动子附近 CpG 岛的 DNA 甲基化状态可以调控子代的代谢紊乱表型，证明配子中 DNA 甲基化印记能够被记忆并传递给子代。有趣的是，这种经过编辑的 DNA 甲基化状态在生殖细胞发育过程中实际上被擦除了，但仍然能在早期胚胎发育过程中进行 DNA 甲基化重建，从而将代谢相关基因沉默，引发代谢异常表型的跨代遗传 [47]。然而，生殖细胞中被擦除的 DNA 甲基化模式是如何在早期胚胎发育过程中进行原位重建的仍然是未解之谜。

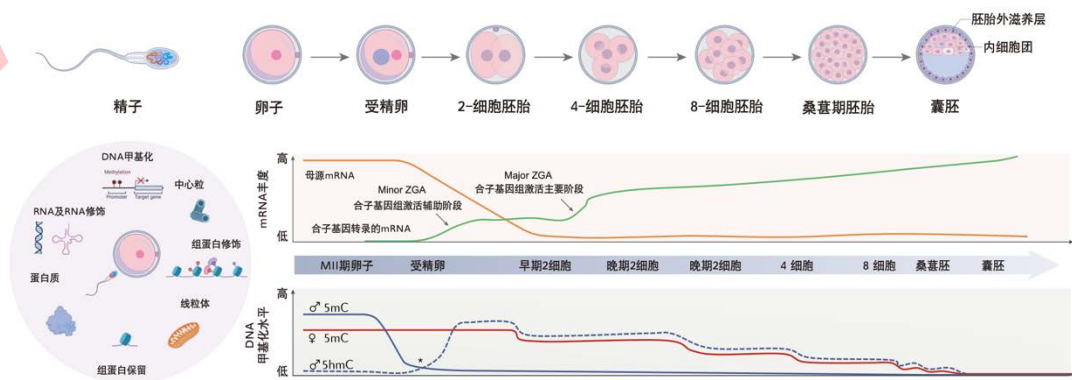




图 3. 早期胚胎发育过程中表观遗传信息重编程事件。精子中可能的表观遗传信息载体包含了 DNA 甲基化模式、中心粒、组蛋白修饰、线粒体、组蛋白保留、蛋白质、RNA 以及 RNA 修饰等。受精后，母源 mRNA 逐渐降解，合子基因组激活，同时伴随着父源和母源基因组 DNA 甲基化的去除等表观遗传信息重编程事件。

Figure 3. Epigenetic reprogramming during early embryonic development. The potential epigenetic information carriers in sperm include DNA methylation patterns, centrioles, histone modifications, mitochondria, histone retention, proteins, RNA and RNA modifications. After fertilization, the maternal mRNA is gradually degraded, and the zygotic genome is activated, accompanied by epigenetic reprogramming of DNA methylation.

除了 DNA 甲基化外，近年来在哺乳动物获得性遗传模型中发现组蛋白修饰也参与获得性性状的跨代遗传现象。2021 年 Sarah Kimmins 团队通过叶酸摄入限制的小鼠模型发现，叶酸摄入限制能够引起精子中发育相关基因上组蛋白 H3K4me3 水平差异改变，并引发子代小鼠骨发育异常的跨代遗传现象 [48]。值得注意的是，这种骨发育异常在 H3K4me3 去甲基化酶 KDM1A 过表达之后表现出更强的发育异常表型，并且 KDM1A 过表达显著降低了精子中 H3K4me3 的水平，但是并没有改变精子中 DNA 甲基化的水平。该实验室进一步的研究发现，精子中的 H3K4me3 也可以作为一种父代肥胖的代谢感受器，可能通过影响胎盘发育调控子代代代谢紊乱表型的发生 [48]。在线虫和果蝇中，H3K27me3 和 H3K9me3 介导的获得性遗传研究较为常见，能够调控果蝇眼睛颜色及线虫长寿表型的跨代遗传 [31, 49-51]。以上研究表明组蛋白修饰广泛的参与了包括哺乳动物在内的多种物种的获得性遗传机制调控。

虽然，多种证据表明 DNA 甲基化以及组蛋白修饰能够参与获得性遗传调控，但是由于 DNA 甲基化修饰和组蛋白修饰都与配子基因组密切结合在一起，在获得性遗传中只能对通过配子结合方式产生子代的获得性表型进行研究，不可控因素较多，增加了其作为介导获得性遗传信息载体传递亲代性状的研究难点。首先，虽然没有明确的证据表明环境、营养等应激会引起配子中 DNA 序列的改变，但是很难完全排除基因突变对子代获得性表型的影响 [2]；其次，虽然可以通过实验手段研究在环境应激或营养失衡等条件下配子中发生的 DNA 甲基化及组蛋白修饰的差异改变，但是这种差异改变无法通过有效方式或者直接实验证实是介导

亲代获得性表型向子代传递的直接载体，也不能明确 DNA 甲基化和某种组蛋白修饰是否具有独立介导获得性遗传的功能。另外通过干扰 DNA 甲基化及组蛋白修饰的相关作用酶的表达来研究其介导获得性遗传的作用涉及的调控范围较广，不能明确子代表型是否由观察到的 DNA 甲基化及组蛋白修饰差异改变直接引发。

非编码 RNA 其实在获得性遗传载体及机制研究中具有天然优势。首先在研究方法上，研究人员可以直接将配子中提取的 RNA 或体外转录、合成的 RNA 通过显微注射的方式导入到正常受精卵中，对产生的子代表型进行分析研究，排除应激引起亲代配子的 DNA 序列信息层面的改变对子代表型的影响 [52]。其次，RNA 作为反式调控因子可能更容易逃逸哺乳动物早期胚胎发育表观遗传信息重编程过程，多维度调控亲代印记信息重建，指导子代表型发生 [53]。然而，哺乳动物中 RNA 如何维持亲代印记信息并定向指导子代表型形成依然是领域内尚未解决的难题。

### 3. RNA 介导的获得性遗传研究

RNA 干扰(RNAi)现象调控秀丽隐杆线虫获得性表型跨代遗传的机制研究比较成熟 [30, 54]。将与目的 mRNA 互补的双链 RNA(Double strand RNAs, dsRNAs) 注射到亲代线虫中会诱发目的基因的沉默，但是其所产生的子代线虫并没有直接接触 dsRNAs，却也能诱发靶标基因的沉默，并且这种 RNAi 现象可以通过不依赖 dsRNAs 结合蛋白 RDE-1 和 RDE-4 的方式进行多代跨代遗传 [55]。有趣的是，线虫中 RNAi 现象的跨代遗传甚至不依赖于目的基因位点的存在也能够进行基因沉默表型的跨代遗传 [56]，还可以通过与组蛋白甲基化修饰（如 H3K27me3 和 H3K9me3）互作的调控方式进行跨代遗传 [57-59]。此外，研究人员还发现，线虫中除了 RNA 干扰现象能够进行跨代遗传外，线虫的繁殖能力、寿命、病原体感染的免疫反应、各种类型的压力和学习行为等复杂性状的遗传也可以通过 sncRNA 进行跨代遗传 [60-62]，其中线虫 microRNA、endo-siRNAs 以及 piRNA (PIWI-interacting RNAs, piRNAs) 等其他种类的 sncRNAs 也都能通过不同的分子机制介导不同获得性性状的跨代遗传 [63]。这些研究为哺乳动物中获得性遗传的分子机制研究提供了新视角，提示 sncRNA 可能可以作为一种普适性的表观遗传信息载体，在哺乳动物中介导获得性性状的代际/跨代遗传 [64]。

2006年, Minoo et al. 等首次在哺乳动物中发现了 RNA 介导的旁突变现象 (Paramutation) 的跨代遗传 [65]。研究人员在 *Kit* 杂合子 (*Kit<sup>m1Alf/+</sup>*) 小鼠雌雄交配产生的野生型小鼠中观察到与 *Kit<sup>m1Alf/+</sup>* 小鼠相类似的白尾巴的表型, 他们把这种小鼠称之为 *Kit\** 小鼠。这种 *Kit\** 小鼠的基因型虽为野生型小鼠, 但是具有 *Kit* 杂合子小鼠的表型, 并且这种 *Kit\** 小鼠的白尾巴表型可以进一步传递给子代。在机制研究中, 研究人员发现 *Kit* 基因的单倍体敲除引起了 *Kit* mRNA 在生殖细胞中的异常累积, 并且当研究人员把 *Kit<sup>m1Alf/+</sup>* 基因型小鼠的精子以及脑的总 RNA 注射到正常的受精卵中, 所产生的子代小鼠也会发生白尾巴的表型。更为有趣的是注射 miR-221/222 到正常受精卵, 产生的子代也会产生与 *Kit\** 小鼠类似的白尾巴表型, 进一步表明 RNA 能够作为独立因素能够介导子代发生与亲代类似的表型 [65]。这些研究为 RNA 介导获得性表型的跨代遗传提供了最早的直接证据支持, 打开了哺乳动物中 RNA 介导获得性遗传研究的大门。后续研究人员通过在正常受精卵中注射 RNA 的方法, 发现多种非编码 RNA 都能够介导子代产生发育、代谢以及生长差异的表型。例如, 将 miRNA-124 注射到正常的受精卵中后, 所产生的子代小鼠个体更大 [66]; 注射 miR-1 会产生心肌肥大病理表型的子代小鼠 [67], 进一步表明 RNA 在哺乳动物早期胚胎发育过程中具有指导子代表型形成的能力。

### 3.1 哺乳动物配子中的 RNA 种类及来源

精子是一类高度特化的细胞类型, 其细胞核高度浓缩, 细胞质被最大限度去除, 因此在过去一些学者认为精子不具有携带 RNA 的能力 [68]。随着高通量测序的发展, 研究人员逐渐证实精子中, 尤其是精子头部含有大量的 RNA, 包括片段化的 mRNA、rRNA、lncRNA 以及多种 sncRNA, 在受精过程、早期胚胎发育以及代际/跨代遗传中都表现出重要调控作用 [53, 69]。其中, 精子中一些大片段 RNA, 包括片段化的 mRNA、rRNA、lncRNA 以及一些重复序列如 LINE1 来源的 RNA 等主要在精子外膜的胞质中富集 [70]; 而一些 sncRNA, 如 tsRNAs (tRNA derived small RNAs, tsRNAs)、miRNA 和 rsRNAs (rRNA derived small RNAs, rsRNAs) 则被紧密的包裹在精子核中。除了精子头外, 精子的颈部、尾部以及包浆小滴 (Droplet) 都发现有 RNA 的存在, 如线粒体 RNA、miRNA、tsRNA

以及 piRNAs 等 [53]。然而，精子 RNA 的来源是什么呢？有观点认为一些 RNA 能够随着睾丸中的精子发生被选择性的保留下来，富集在成熟精子中；也有观点认为精子在附睾中的成熟过程，附睾外泌体能够作为一个 RNA 载体将体细胞中 RNA 转移到成熟精子中，并且这些附睾外泌体 RNA 对精子成熟及早期胚胎发育是必需的 [71-73]，但是该观点提出后受到了较大的争议。原因是多个实验室发现睾丸及附睾中分离的精子同样能够完成受精并支持早期胚胎发育 [74-76]。2023 年，Wei Yan 实验室发现小鼠成熟精子中的 sncRNAs 主要来源于精子胞浆小体，而非附睾外泌体 [77]。总的来说，RNA 在精子中的位置分布可能与其来源和生物生成途径具有密切关联，前人的研究为精子 RNA 的来源提供了一些可能的解释，但精子 RNA 具体的产生机制及来源还需更多的研究去证实。

相比于精子中少量的父源 RNA，成熟卵子中则储存着大量的 mRNA 和非编码 RNA。这些 RNA 在成熟卵子中呈区域化分布，在受精后的受精卵发育及合子基因组激活发挥着重要调控功能，其中在内质网附近的大量聚集的 mRNA 为受精后快速的蛋白质合成做好准备 [78, 79]。此外，卵子中 RNA 组成可能受到颗粒细胞、卵泡液以及输卵管液等中的外泌体 RNA 贡献的影响 [73, 80]。有趣的是，母源 RNA 在合子基因组激活之前必须完成快速降解，这对于合子基因组的激活非常关键，其异常保留则会导致胚胎发育失败 [39]。受精卵中母源 RNA 降解受到多种信号通路的调控，其中 mRNA 的 poly (A) 尾巴 [81]、m<sup>6</sup>A [82] 及 m<sup>5</sup>C [83] 等 RNA 修饰对于母源 RNA 的降解及合子基因组激活具有重要调控作用。最近的研究还发现母源 lncRNA 可以作为母源饮食记忆，将母亲的饮食记忆传递到子代，影响子代的代谢健康和发育 [84, 85]。此外，通过显微注射的方式在 MII 期卵子中补充 Tet3 的 mRNA 能够缓解母源高糖饮食引起的子代代谢紊乱疾病的发生 [46]。虽然关于母源 RNA 对于早期胚胎发育的作用有大量研究，但是哺乳动物中母源 RNA 参与介导获得性遗传的研究还尚处于起步阶段，还需更多的证据支持。

### 3.2 精子 RNA 介导的获得性代谢紊乱表型向子代的传递

近年来，随着人们生活水平的逐渐提高，世界肥胖人群逐年递增，同时伴随糖尿病、心血管疾病患者比例迅速增加，为世界医疗卫生事业和患者家庭生活

带来极大挑战，而获得性代谢紊乱疾病的代际/跨代遗传现象为代谢疾病的防治增加了困难和复杂度 [86]。利用哺乳动物模型，研究人员发现父母亲代由于营养失衡引起的获得性代谢紊乱表型都能够通过配子中的表观遗传信息载体传递给子代 [18, 53]，并且亲代连续多代经历高糖高脂饮食的应激，会引起子代更为严重的代谢紊乱和体重增加表型 [87]。在人类中发现，精子 RNA 的表达谱对于机体的营养状况、环境应激、酗酒、毒品以及化学药品等暴露非常敏感 [27]。正常体重男性与肥胖男性的精子中 tsRNA 的表达差异显著，而同一肥胖男性通过切胃治疗减肥后，其精子中 tsRNAs 的表达对比切胃减肥治疗前也发生了显著的变化 [22]。另外，选取健康男性进行一周的健康饮食和一周高糖饮食实验，发现精子 tsRNA 及 rsRNA 也随着饮食改变产生了显著改变 [24]，进一步表明精子 sncRNA 能够积极应答机体的营养代谢水平，可能是介导父代获得性代谢紊乱性状向子代传递的有效分子载体。

我们前期通过高脂饮食诱导的父系获得性代谢紊乱小鼠模型，发现精子中的 RNA，尤其是 tsRNAs 能够直接介导子代在正常饮食条件下发生与父代相类似的获得性代谢紊乱表型，证实精子 RNA 可以作为新型表观遗传信息载体介导获得性代谢紊乱性状的代际遗传 [88]。此外，我们还发现高脂饮食诱导的代谢紊乱小鼠的精子 30-40 nt 的小 RNA 上 RNA 修饰水平也发生了显著的改变，其中以  $m^2G$  和  $m^5C$  的升高最为明显，而当把 tRNA 上 C38 位的  $m^5C$  修饰酶 Dnmt2 敲除之后，高脂饮食则不能诱导小鼠精子 30-40 nt 的小 RNA 上  $m^2G$  和  $m^5C$  修饰水平的升高，并且无论是精子的总 RNA 还是精子 tsRNAs 都失去了将父代的获得性代谢紊乱表型传递给子代的能力，提示 RNA 修饰酶 Dnmt2 可能作为精子 RNA 介导的获得性遗传现象的关键调控基因发挥了举足轻重的作用 [89]。近期，我们还发现精子上的 RNA 修饰水平也能够响应环境应激反应 [90]，且在人类中多种 RNA 修饰与精子活力线性相关 [91]。高原低氧缺氧应激能够显著改变睾丸及精子 RNA 上的多种 RNA 修饰水平，其中睾丸中 tRNA 上的 RNA 修饰水平改变与 tsRNA 的生成及细胞内翻译控制密切相关 [92]。高脂饮食和高原低压缺氧环境应激能够引起机体整体炎症水平升高 [93, 94]，最近的一项研究发现，父代炎症应激也能够引起子代发生葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗的代谢紊乱表型，而这一子代表型的形成与炎症应激导致的精子 30-40nt sncRNA 的改变有关。非常有趣

的是, 当把调控 tsRNA 的生成的核酸酶-血管生成素 ANG (Angiogenin, ANG) 敲除后, 无论是炎症应激父代交配产生的子代还是经过炎症应激父代精子 30-40nt sncRNA 受精卵显微注射产生的子代都不能发生代谢紊乱表型, 并且 *Ang* 敲除显著改变了精子中 tsRNA 的编码指纹, 可能是导致子代无法产生父代表型的原因 [95]。

在低蛋白饮食小鼠模型中, 精子中 5'端来源的 tsRNAs 的表达显著升高, 其中 5'tsRNA<sup>Gly-GCC</sup> 被发现在植入前胚胎中能够通过抑制内源性逆转录转座子 MERVL 相关的基因表达影响子代的代谢表型 [96]。另一项在低蛋白饮食小鼠模型中的研究发现, 激活转录因子 (Activating transcription factor 7) ATF7 可能通过调控 H3K9me2 的水平影响了精子中 tsRNAs 的差异表达, 进而参与了低蛋白饮食导致的获得性代谢紊乱表型向子代的传递 [97]。非常有趣的是, 雌性在妊娠前、妊娠期以及产后哺乳期经高脂饮食刺激产下的雄性子代小鼠也可以通过精子 tsRNA (30-40 nt RNA) 将自身的代谢紊乱性状和享乐样行为传递给后代, 其机制可能与 tsRNA 参与调控了子代大脑中神经发育和成瘾性相关基因的表达有关 [98]。除了 tsRNA 之外, 研究人员同样利用受精卵显微注射的手段, 发现 miRNA 也能介导子代代谢紊乱表型的形成。例如, 将高糖高脂饮食 (Western-like diet: WD) 小鼠精子中显著升高的 miRNA 如 miR-19b 注射到正常的受精卵, 子代小鼠发生了与父代相类似的葡萄糖不耐受以及胰岛素抵抗表型 [99]。然而, 在连续多代西方饮食引起的代谢紊乱小鼠模型中发现, 精子 sncRNA 的表达差异在第一代 (WD1) 中就发生了明显改变, 其中 tsRNAs、rsRNAs 以及 miRNA 的表达都发生了显著改变, 而在第五代 (WD5) 精子中, sncRNAs 的变化则相对于 WD1 产生的变化较小 (与 CD 相比, 在 WD1 中 479 个 sncRNAs 发生差异变化, WD5 中 66 个 sncRNAs 发生差异变化, 其中有 47 共同差异变化的 sncRNAs)。同样, 无论是 WD1 和 WD5 小鼠精子的总 RNA 都能引起 F1 和 F2 代在正常饮食条件下发生代谢紊乱表型, 该表型在 F3 和 F4 代中逐渐消失, 提示精子 sncRNA 介导获得性遗传主要以短时效的代际遗传调控方式进行 [87]。

### 3.3 精子 RNA 介导的其他获得性表型向子代传递的研究

父代经历早期的精神创伤及分离焦虑所引起的神经行为学变化以及机体的

代谢水平改变也能够通过精子 RNA 传递给子代 [100]。研究人员发现当把刚出生的幼鼠与母鼠分离后, 这些幼鼠长大后会出现抑郁症样的行为, 并且这种表型可以通过精子总 RNA 传递下去, 使子代也呈现出抑郁症样的行为学表现并伴随机体代谢水平的异常 [101]。有趣的是, 研究人员进一步发现, 如果将出生后精神创伤雄性小鼠精子中的 RNA 按照序列长度分为大于 200 nt 的 RNA 部分和小于 200nt 的 RNA 部分, 然后分别将其注射到正常的受精卵中, 所产生的子代小鼠都不能完全复制亲代的抑郁倾向表型, 提示大于 200 nt 的 RNA 部分和小于 200 nt 的 RNA 部分都有可遗传的因子, 需要合并在一起共同发挥介导获得性遗传的功能。其中注射大于 200nt RNA 的子代小鼠表现出更喜欢待在明亮的地方, 但在强迫游泳实验中不能复制抑郁表型; 而注射小于 200 nt RNA 的子代虽然减少了在明亮地方的时间, 但是在强迫游泳实验中表现出了抑郁的表型, 进一步表明小 RNA 和长 RNA 都具有作为信息载体编码并传递父代的获得性表型 [100]。除了早期精神创伤外, 研究人员还发现长期的压力应激引起的机体健康风险也能够进行跨代遗传, 其中精子中 sncRNA 尤其是 tsRNA、miRNA 和 rsRNA 水平在压力应激下产生显著差异改变, 可能与 DNA 甲基化协同调控精子“表观遗传记忆”, 介导子代表型的发生 [102]。也有研究发现, 父代慢性压力应激会引起精子中 sncRNA, 尤其是 miRNA 的表达发生显著差异变化, 并引起子代下丘脑-垂体-肾上腺轴压力负荷 [103]。将精子中差异显著的 9 个 miRNA 通过显微注射的方式注射到正常受精卵中, 所产生的子代能够复制下丘脑-垂体-肾上腺轴压力负荷的表型 [104]。此外, 随着世界人口老龄化现象的不段加重, 生育年龄增加, 高龄人群的子代健康问题也逐渐凸显。已有研究发现高龄人群的子代患有神经精神疾病(精神分裂症、自闭症等) 概率显著增加, 其机制可能与年龄增加引起的精子 DNA 甲基化异常有关 [105]。一项最近的研究发现, 精子 tsRNA 在年老小鼠中发生显著改变, 而将年老小鼠的精子 tsRNA 分离出来注射到正常受精卵中, 会引起植入前胚胎中神经信号通路相关基因的差异表达, 而产生的小鼠则表现出跟年老小鼠子代相类似的精神焦虑样行为。同样, 在衰老人类的精子中也观察到了 tsRNA 的显著差异变化, 提示人类年老男性也可能通过精子 tsRNA 影响子代的精神健康 [106]。

### 3.4 介导获得性遗传的功能 sncRNA 的鉴定与筛选研究

研究发现精子 RNA 作为表观遗传信息载体介导父代获得性表型向子代传递的过程中，大部分都是基于一群 RNA 的共同作用所引起的。我们的前期研究同样发现精子小 RNA 的表达谱和 RNA 修饰谱共同构成了高脂饮食诱导的能够传递父代获得性遗传的功能性精子 RNA 信息图谱，即精子 RNA 编码指纹 [53]。通过高通量测序技术对精子 RNA 编码指纹信息进行精确解读能够帮助研究人员更好的理解其在早期胚胎中的调控行为及介导子代表型发生的作用机制。然而，现有小 RNA 测序技术和 RNA 修饰检测技术是否能够准确、无偏差的展现精子中 RNA 编码指纹成为了筛选精子中介导获得性遗传的功能 sncRNA 的关键 [9, 53]。

在关于精子 RNA 介导的获得性遗传研究中，精子 tsRNA 及 miRNA 作为获得性遗传载体研究的证据较为明确 [107]。其中 miRNA 的作为一类标准的小 RNA，具有完整的 RNA 末端修饰和较少的分子内 RNA 修饰，而 tsRNAs 是一类来源于成熟 tRNA 的 sncRNAs，富含多种 RNA 修饰，其生物合成过程涉及多种 RNA 修饰酶和核酸酶的协同调控 [108]。我们前期发现，常规测序往往不能克服 tsRNA 本身所具有的一些分子特征而产生测序偏好性，无法对精子中 tsRNAs 的真实表达水平进行定量 [9]。其主要原因如下：首先，tRNA 是目前已知含有 RNA 修饰最多的一类 RNA，平均每条 tRNA 上约含有 8~13 个不同类型的 RNA 修饰 [109]，而 tsRNAs 自身携带了 tRNA 前体的多种 RNA 修饰，其中一些 RNA 修饰类型如 m<sup>1</sup>A、m<sup>3</sup>C、m<sup>1</sup>G 和 m<sup>2</sup><sub>2</sub>G 已经被证实能够抑制 RNA 的反转录过程 [110, 111]，从而严重影响富含这些 RNA 修饰的 tsRNAs 在 cDNA 文库中的占比；其次，tsRNAs 的生成涉及多种核酸酶对 tRNA 特定位点的酶解切割，通常情况下会产生 5'末端为羟基(5'-OH)，3'末端则形成磷酸或者环磷酸(3'-P, 2'3'-CP)的 tsRNAs [108]，而这种不规则的末端修饰则会严重影响 tsRNAs 的接头连接效率，导致大量的 tsRNAs 不能有效加上测序接头而在 cDNA 文库中丢失。此外，除了 tsRNAs，一些其他种类的非典型 sncRNA，例如 rsRNAs 也很有可能由于上述两种原因导致其在 cDNA 文库中缺失，从而不能通过常规小 RNA 建库测序技术揭示其在细胞与组织内的真实分布状况，并夸大 miRNA 及 piRNA 等所占的比例 [112]。因此，常规测序并不能体现不同类型和来源的 sncRNA 在精子中的真实表达情况，从而干扰了对精子小 RNA 编码指纹的理解，也使得小鼠精子中由于环



境应激、营养失衡以及精神创伤等因素导致的精子 RNA 编码指纹信息难以真正解析, 进一步直接影响父系获得性遗传载体及其调控机制后续研究的开展。

近年来随着 sncRNA 测序的发展, 多个实验室优化了小 RNA 的建库流程, 建立了小 RNA 测序的新方法(TGIRT-seq [113]、AQRNA-Seq [114]、CPA-seq [115] 以及 PANDORA-seq [112]), 让研究人员能够有机会理解组织细胞中真实的小 RNA 分布情况。这些方法克服了小 RNA 的测序偏差, 主要从两个方面对现有的小 RNA 建库策略进行改进: 一是解决 RNA 序列末端修饰问题, 提高接头的连接效率; 二是解决 RNA 中间影响反转录酶的 RNA 修饰, 提高 RNA 序列反转录为 cDNA 的效率。其中, PANDORA-seq 主要通过对 15-50nt 区段的小 RNA 进行酶学(T4PNK, AlkB)处理, 解决了由于末端修饰导致的接头连接问题(将 3'-P, 2'3'-CP 转换为 3'-OH; 将 5'-OH 转换为 5'-P); 并将部分 RNA 修饰, 如 m<sup>1</sup>A, m<sup>1</sup>G, m<sup>3</sup>C, m<sup>2</sup>G 去除以解决这些修饰妨碍逆转录酶通过的问题。利用 PANDORA-seq 揭示的组织细胞中 miRNA/tsRNA/rsRNA 的表达占比能够很好地被 Northern blot 验证, 而其他一些 sncRNA-seq 获得的很多小 RNA 的变化趋势则无法被验证, 甚至与 Northern blot 结果相悖 [112]。因此, 利用 PANDORA-Seq 等新型 sncRNA 测序技术分析不同应激条件下精子中 sncRNA 图谱, 有助于揭示获得性遗传分子载体并解析子代表型的形成机制。

值得注意的是, 在特定的环境应激中, 精子中产生改变的 sncRNA 往往不止一个, 有时候甚至是不止一个类群的 sncRNA 的差异改变。纵然能够利用新型测序技术揭示精子 sncRNA 在环境应激下产生的真实差异变化, 但是利用该技术去筛选单个差异表达的精子 sncRNA 进行受精卵注射实验来明确子代表型的形成原因可能会得出具有偏好性的结论。因为, 一些子代表型的形成可能不是由单一 RNA 进行调控的, 可能是多个 sncRNA 共同作用的调控行为介导了子代表型的发生。此外, 精子 sncRNA 表达谱差异改变也会伴随 RNA 修饰水平的改变 [89], 而这些修饰改变也是体外合成 RNA 无法模拟的, 不能直接解释子代表型的形成原因, 并且环境应激介导的精子 RNA 修饰水平改变与 sncRNA 表达谱改变之间的因果关系还无法用目前的技术手段解析。最近, 纳米孔测序技术同步解析了细胞中 tRNA 的表达谱与 RNA 修饰谱 [116], 而 MLC-Seq 技术则实现了对单根 tRNA 的序列与 RNA 修饰的准确检测 [117]。这些新型测序技术的联合应用会进

一步帮助我们更全面的认识和理解父代获得性性状下的精子 RNA 编码指纹信息。

#### 4. 精子 RNA 介导的获得性遗传信息在早期胚胎中的解码机制研究

##### 4.1 精子 RNA 编码指纹直接参与早期胚胎发育调控影响子代表型

已有多项研究提示精子 RNA 介导的子代表型形成原因或来源于早期胚胎中父源 RNA 对表型相关基因的表达调控 [88, 96, 106]。我们前期研究发现经高脂饮食小鼠精子 30–40 nt sncRNAs（主要是 tsRNAs）显微注射产生的子代在 8 细胞胚胎期和囊胚期胚胎中代谢相关基因的表达显著下调，且在 HFD 子代胰岛组织中多种代谢相关基因的表达也出现显著下调，提示后代胰岛中的变化可能来源于早期胚胎 [88]。同样，年老小鼠精子 tsRNAs 注射引起了 2 细胞胚胎和囊胚中与神经发育和精神疾病相关基因的差异表达，并且差异变化的基因与经过序列匹配预测的 tsRNA 靶基因存在重合子集，提示精子 tsRNAs 进入到受精卵后可能可以通过直接互作的方式调控其靶标基因的表达 [106]。除了 tsRNA 之外，其他种类的小 RNA，如 siRNA、miRNA 和 piRNA 都具有重要的转录后调控功能 [118]，在获得性遗传中发挥着不可忽视的作用 [119]。其中 miRNA 不仅可以通过 RNA 沉默复合体 (RISC) 与 mRNA 的 3'UTR 序列完全匹配或不完全匹配的方式降解靶标 mRNA 或者抑制 mRNA 的翻译活性，还可以与靶标 mRNA 的 5'UTR 进行配对从而激活目的基因的翻译活性 [120]。近年来研究发现 piRNA 也可以与 MIWI 蛋白结合形成沉默复合体以序列互补的方式识别 mRNA 的 3'UTR 诱导 mRNA 的降解或者通过与 RNA 结合蛋白以及翻译起始因子结合激活 mRNA 翻译的方式参与生殖细胞的翻译调控。此外，除了 sncRNA 之外，研究发现精子中大片段的 RNA (> 200 nt) 和环形 RNA (circular RNA, circRNA) 同样也能够参与父系获得性遗传。利用核酸酶将 MSUS 父代小鼠精子中的大片段的 RNA 酶解为小于 200 nt 的 RNA 片段再注入正常的受精卵，则不能引起子代发生与父代类似的精神行为表型，表明大片段 RNA 发挥代际遗传的功能与其完整 RNA 长度的功能有关。

此外，除了这种直接序列互补调控目标基因的表达外，一些 tsRNAs 还可以参与逆转录转座子的调控影响相关基因的表达 [121]。研究人员在低蛋白饮食小鼠模型中发现，精子 5'tsRNA<sup>Gly-GCC</sup> 能够在早期胚胎中参与内源逆转录转座子

MERVL (Murine Endogenous Retrovirus-L, MERVL) 长末端重复序列 (Long terminal repeat-LTR) 介导的基因表达调控 [96]。虽然在早期胚胎发育过程中关于 tsRNAs 直接调控转座子活性及其表达的研究并未报道, 然而在早期胚胎发育过程中逆转录转座子, 如 LINE1 (Long Interspersed Nuclear Elements 1), 大多处于非常活跃的状态并参与了早期胚胎发育调控。精子携带的 RNA 编码指纹信息如 tsRNAs 以及 piRNAs 等也很有可能具有调控早期胚胎发育过程中转座子活性的功能。其中 piRNA 作为转座子沉默重要调控非编码 RNA 可以通过降解转座元件转录本和介导转座元件异染色质化的方式调控转座子的活性, 而 3'tsRNA<sup>Leu</sup> 能够在肿瘤细胞中通过与 tRNA 竞争性结合逆转录转座子引物结合位点 PBS (Primer Binding Site, PBS) 影响逆转录转座子的反转录过程, 或者通过序列完全互补的方式降解逆转录转座子的 RNA, 进而影响逆转录转座子活性 [122], 提示精子携带的是 sncRNAs 也有可能通过调控逆转录转座子活性参与早期胚胎发育调控及子代表型形成。。非常有趣的是, 在斑马鱼的早期胚胎发育过程中一些 tsRNAs 还可以进入细胞核以序列互补的方式调控 tRNA 基因的转录速率, 影响 tRNA 的表达, 进而调控胚胎发育过程 [123]。这些研究提示 sncRNA 作用机制多样, 能够从转录、转录后以及翻译效率等多个层面调控基因的表达 [124], 增加了精子 RNA 编码指纹在早期胚胎中的解码方式的研究难度。

此外, RNA 修饰作为精子 RNA 编码指纹的重要组成部分, 可能在调控 tsRNA 的细胞生物学功能方面发挥了举足轻重的作用。 [88, 89] [125, 126]我们发现高脂饮食能够引起小鼠精子 tsRNAs 上 m<sup>5</sup>C 及 m<sup>2</sup>G 修饰水平的显著升高, 而敲除 tRNA 甲基转移酶 Dnmt2, tsRNAs 上 m<sup>5</sup>C 修饰水平则不受高脂饮食的调控, 且精子 tsRNAs 不能将父代的获得性代谢紊乱表型传递给子代, 进一步提示 tsRNAs 上的 m<sup>5</sup>C 修饰对于精子 RNA 介导的获得性遗传具有重要调控作用 [88, 89]。此外, 我们发现相同序列的 tsRNA 由于 m<sup>5</sup>C 修饰水平的差异形成了不同的 RNA 二级结构, 其对核酸酶稳定性和细胞内调控行为也同样表现出了显著的差异 [89]。这可能与 RNA 修饰的插入改变了碱基之间的配对和相互作用力和 tsRNA 的高级结构, 进一步影响互作分子对 tsRNA 识别和结合, 从而改变了 tsRNA 的细胞内功能 [18, 127]。 [118] [119] [120]总的来说, 精子中不同种类的 RNA 的表达谱和修饰谱共同构成了具有介导特定获得性表型代际/跨代遗传功能

的精子 RNA 编码指纹，这些特定的 RNA 编码指纹信息可能通过多种方式的调控行为共同调节了早期胚胎中的基因转录和翻译过程，最终通过蝴蝶效应式的级联反应，介导细胞内多个信号通路的调控异常，引发子代表型的形成 [18]。

#### 4.2 精子 RNA 通过与其他表观遗传因子互作间接调控获得性遗传

近年来的研究表明，不同的表观遗传信息之间存在较为明确的互作调控关系，从而共同调控基因的表达，参与早期胚胎发育及组织细胞生理病理过程的调控。例如，DNA 甲基化和 H3K9me3 存在普遍共定位现象，并且在植入前胚胎中 DNA 甲基化还可以和 H3K9me3 共同标记一些 CpG 区域，使之作为潜在印记基因控制区域调控早期胚胎的发育 [128]。同样的，RNA 修饰与组蛋白修饰之间也存在密切调控关系。组蛋白 H3K36me3 可以通过与 m<sup>6</sup>A 修饰酶 Mettl14 直接结合，促进 m<sup>6</sup>A 甲基化酶复合体与 Pol II 的结合，从而实现边转录边添加 m<sup>6</sup>A 修饰并影响 m<sup>6</sup>A 在 mRNA 上的整体分布谱式 [129]。在小鼠胚胎干细胞 (mESC) 中去除 H3K36me3 可以显著影响转录本上 m<sup>6</sup>A 的修饰水平，并影响胚胎干细胞的干性。此外，Mettl3 介导的 RNA 上 m<sup>6</sup>A 修饰也可以通过其 Reader 蛋白 YTHDC1 影响 mESC 中组蛋白的修饰状态，进而调控染色质可及性和基因表达 [130, 131]。最新的研究发现，m<sup>6</sup>A 也可以通过其 Reader 蛋白 FXR1 招募 DNA 双加氧酶 Tet1 介导 DNA 的去甲基化过程 [132]，表明 RNA 修饰与 DNA 甲基化之间也存在密切的互作调控关系。非编码 RNA 同样也参与了表观遗传的调控。例如，在植物中普遍存在 RNA 指导的 DNA 甲基化现象 (RNA-Directed DNA methylation pathway)，在哺乳动物中 piRNA 及其结合蛋白也被证实参与了转座子上的 DNA 甲基化调控 [133, 134]，而 miRNA (miR-155-5P) 也可以通过与 DNMT1 结合抑制 DNMT1 的甲基转移酶活性进而扰乱基因组中 DNA 甲基化模式 [135]。此外，哺乳动物细胞中 miRNA 的生物生成也受到了 DNA 甲基化的调控 [136]，piRNA 前体 RNA 的转录同样也受到了组蛋白修饰的调控 [137]。非常有趣的是组蛋白修饰水平改变同样可以影响精子中 tsRNAs 的表达谱 [97]，且在早期胚胎发育的过程中组蛋白修饰 H3K4me3 的水平与 tsRNA 的水平具有较强的表达相关性 [53]，进一步证实不同类型的表观遗传调控分子存在广泛的互作关系，共同调控基因的有序表达。近年来，在环境毒物暴露引起的跨代遗传机制研究中发现精子

非编码 RNA 与精子中差异甲基化区域 (Differential DNA Methylation Regions, DMR) 在基因组上存在共定位现象, 且 DMR 与差异组蛋白保留 (Differential Histone Retention, DHR) 区域也存在重叠 [138-140], 提示在哺乳动物获得性遗传调控中可能存在普遍的表观遗传因子互作现象。因此, 在父系获得性遗传中, 精子 RNA 编码指纹是否通过协调不同类型的表观因子之间的互作参与早期胚胎表观遗传谱式的建立并介导获得性性状向子代传递是非常值得探索的研究方向。

## 5. 讨论与展望

环境、压力应激及营养失衡导致的多种获得性疾病的代际/跨代遗传使得一些成人慢性疾病, 如糖尿病、心血管疾病、精神性疾病等的发病率逐渐递增, 且逐渐呈现低龄化发病规律, 为世界医疗卫生事业带来极大挑战的同时也为无数家庭带来了沉重的负担。大医医未病, 如何在生命早期及时发现并预防疾病发生对世界人口健康及人类可持续发展具有至关重要的作用, 而对获得性遗传规律及机制的揭示则有望在源头实现对成人慢性疾病的防治。非编码 RNA 及其 RNA 修饰作为一类新型表观遗传信息载体在研究获得性遗传及制定获得性遗传干预政策具有天然优势, 但同时也面临诸多挑战和尚未解决的难题: 如配子中介导获得性遗传的 RNA 编码指纹形成的机制是什么? 不同的 RNA 分子是否介导不同的获得性遗传表型, 是否存在普适性的获得性遗传规律和关键调控基因? 配子 RNA 编码指纹在早期胚胎中的解码机制如何? 不同表观遗传调控分子在早期胚胎发育过程中是否存在广泛互作调控共同介导亲代基因印记的擦除和重新建立? RNA 是否在基因印记的重建中起关键指导作用? 相信通过对获得性遗传机制深入研究则有助于帮助我们解决上述难题, 进一步认识获得性性状代际/跨代遗传的现象和遗传规律, 理解获得性遗传分子载体及其在早期胚胎中的解码机制, 为获得性遗传的临床分子靶标筛选和临床干预政策的制定提供理论和技术支持。

### 参考文献:

- [1] Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, *et al.* The genetic basis of mendelian phenotypes: Discoveries, challenges, and opportunities. *Am J Hum Genet*, 2015, 97: 199-215
- [2] Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*, 2019, 571: 489-499
- [3] Peixoto P, Cartron PF, Serandour AA, *et al.* From 1957 to nowadays: A brief history of epigenetics. *Int J Mol Sci*, 2020, 21:

- [4] Fitz-James MH, Cavalli G. Molecular mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Nat Rev Genet*, 2022, 23: 325-341
- [5] Perez MF, Lehner B. Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 143-151
- [6] Bohacek J, Mansuy IM. Molecular insights into transgenerational non-genetic inheritance of acquired behaviours. *Nat Rev Genet*, 2015, 16: 641-652
- [7] Xu R, Li C, Liu X, *et al.* Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. *Protein & Cell*, 2021, 12: 7-28
- [8] Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, *et al.* Long non-coding RNAs: Definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 430-447
- [9] Shi J, Zhou T, Chen Q. Exploring the expanding universe of small RNAs. *Nat Cell Biol*, 2022, 24: 415-423
- [10] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 861-874
- [11] Statello L, Guo CJ, Chen LL, *et al.* Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 96-118
- [12] Wiener D, Schwartz S. The epitranscriptome beyond m(6)a. *Nat Rev Genet*, 2021, 22: 119-131
- [13] Frye M, Harada BT, Behm M, *et al.* RNA modifications modulate gene expression during development. *Science*, 2018, 361: 1346-1349
- [14] Burkhardt RW, Jr. Lamarck, evolution, and the inheritance of acquired characters. *Genetics*, 2013, 194: 793-805
- [15] Jawaid A, Jehle KL, Mansuy IM. Impact of parental exposure on offspring health in humans. *Trends Genet*, 2021, 37: 373-388
- [16] Nilsson EE, Maamar MB, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance and the weismann barrier: The dawn of neo-lamarckian theory. *J Dev Biol*, 2020, 8:
- [17] Daxinger L, Whitelaw E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat Rev Genet*, 2012, 13: 153-162
- [18] Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17: 733-743
- [19] Sanchez-Garrido MA, Garcia-Galiano D, Tena-Sempere M. Early programming of reproductive health and fertility: Novel neuroendocrine mechanisms and implications in reproductive medicine. *Hum Reprod Update*, 2022, 28: 346-375
- [20] Sun W, Dong H, Becker AS, *et al.* Cold-induced epigenetic programming of the sperm enhances brown adipose tissue activity in the offspring. *Nat Med*, 2018, 24: 1372-1383
- [21] Breton CV, Landon R, Kahn LG, *et al.* Exploring the evidence for epigenetic regulation of environmental influences on child health across generations. *Commun Biol*, 2021, 4: 769
- [22] Donkin I, Versteyhe S, Ingerslev LR, *et al.* Obesity and bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans. *Cell Metab*, 2016, 23: 369-378
- [23] Donkin I, Barres R. Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Mol Metab*, 2018, 14: 1-11
- [24] Natt D, Kugelberg U, Casas E, *et al.* Human sperm displays rapid responses to diet. *PLoS Biol*, 2019, 17: e3000559
- [25] Blaisdell CJ, Park C, Hanspal M, *et al.* The NIH ECHO program: Investigating how early

- environmental influences affect child health. *Pediatr Res*, 2022, 92: 1215-1216
- [26] Hoffman DJ, Powell TL, Barrett ES, *et al.* Developmental origins of metabolic diseases. *Physiol Rev*, 2021, 101: 739-795
- [27] Zhang Y, Chen Q. Human sperm RNA code senses dietary sugar. *Nature Reviews Endocrinology*, 2020, 16: 200-201
- [28] Xavier MJ, Roman SD, Aitken RJ, *et al.* Transgenerational inheritance: How impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health. *Hum Reprod Update*, 2019, 25: 518-540
- [29] Radford EJ. Exploring the extent and scope of epigenetic inheritance. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14: 345-355
- [30] Rechavi O, Houry-Ze'evi L, Anava S, *et al.* Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *c. Elegans*. *Cell*, 2014, 158: 277-287
- [31] Seong KH, Li D, Shimizu H, *et al.* Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. *Cell*, 2011, 145: 1049-1061
- [32] Carone BR, Fauquier L, Habib N, *et al.* Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell*, 2010, 143: 1084-1096
- [33] Dias BG, Ressler KJ. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci*, 2014, 17: 89-96
- [34] Anway MD, Memon MA, Uzumcu M, *et al.* Transgenerational effect of the endocrine disruptor vinclozolin on male spermatogenesis. *J Androl*, 2006, 27: 868-879
- [35] Jian SJ NC, Gao L, Ke YW, Liu J. The transgenerational inheritance and reprogramming of epigenetic information in animals (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2021, 51: 556-566. [荐思婧, 宁超, 高磊, 柯玉文, 刘江. 表观遗传信息在动物中的跨代遗传和重编程. *中国科学: 生命科学*, 2021, 51: 556-56]
- [36] Frye M, Jaffrey SR, Pan T, *et al.* RNA modifications: What have we learned and where are we headed? *Nat Rev Genet*, 2016, 17: 365-372
- [37] Shi J, Zhang X, Liu Y, *et al.* Epigenetic information in gametes: Gaming from before fertilization: Comment on "epigenetic game theory: How to compute the epigenetic control of maternal-to-zygotic transition" by qian wang et al. *Phys Life Rev*, 2017, 20: 146-149
- [38] Du Z, Zhang K, Xie W. Epigenetic reprogramming in early animal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2022, 14:
- [39] Eckersley-Maslin MA. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. 2018,
- [40] Shen L, Inoue A, He J, *et al.* Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 459-471
- [41] Yan R, Cheng X, Gu C, *et al.* Dynamics of DNA hydroxymethylation and methylation during mouse embryonic and germline development. *Nat Genet*, 2023, 55: 130-143
- [42] Lee HJ, Hore TA, Reik W. Reprogramming the methylome: Erasing memory and creating diversity. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 710-719
- [43] Torres-Flores U, Hernandez-Hernandez A. The interplay between replacement and retention of histones in the sperm genome. *Front Genet*, 2020, 11: 780
- [44] Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, *et al.* Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet*, 1999, 23: 314-318
- [45] Wei Y, Yang CR, Wei YP, *et al.* Paternally induced transgenerational inheritance of

- susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 1873-1878
- [46] Chen B, Du YR, Zhu H, *et al.* Maternal inheritance of glucose intolerance via oocyte Tet3 insufficiency. *Nature*, 2022, 605: 761-766
- [47] Takahashi Y, Morales Valencia M, Yu Y, *et al.* Transgenerational inheritance of acquired epigenetic signatures at CpG islands in mice. *Cell*, 2023, 186: 715-731 e719
- [48] Lismer A, Dumeaux V, Lafleur C, *et al.* Histone H3 lysine 4 trimethylation in sperm is transmitted to the embryo and associated with diet-induced phenotypes in the offspring. *Dev Cell*, 2021, 56: 671-686 e676
- [49] Ciabrelli F, Comoglio F, Fellous S, *et al.* Stable polycomb-dependent transgenerational inheritance of chromatin states in drosophila. *Nat Genet*, 2017, 49: 876-886
- [50] Klosin A, Casas E, Hidalgo-Carcedo C, *et al.* Transgenerational transmission of environmental information in *C. elegans*. *Science*, 2017, 356: 320-323
- [51] Greer EL, Maures TJ, Ucar D, *et al.* Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2011, 479: 365-371
- [52] Mashoodh R, Ferguson-Smith AC. Dad's diet - smRNA methylation signatures in sperm pass on disease risk. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14: 446-447
- [53] Zhang Y, Shi J, Rassoulzadegan M, *et al.* Sperm RNA code programmes the metabolic health of offspring. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019, 15: 489-498
- [54] Posner R, Toker IA, Antonova O, *et al.* Neuronal small RNAs control behavior transgenerationally. *Cell*, 2019, 177: 1814-1826 e1815
- [55] Grishok A, Tabara H, Mello CC. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*, 2000, 287: 2494-2497
- [56] Marre J, Traver EC, Jose AM. Extracellular rna is transported from one generation to the next in *caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 12496-12501
- [57] Burton NO, Burkhardt KB, Kennedy S. Nuclear RNAi maintains heritable gene silencing in *caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 19683-19688
- [58] Gu SG, Pak J, Guang S, *et al.* Amplification of siRNA in *caenorhabditis elegans* generates a transgenerational sequence-targeted histone H3 lysine 9 methylation footprint. *Nat Genet*, 2012, 44: 157-164
- [59] Mao H, Zhu C, Zong D, *et al.* The NRDE pathway mediates small-RNA-directed histone H3 lysine 27 trimethylation in *caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 2015, 25: 2398-2403
- [60] Moore RS, Kaletsky R, Murphy CT. Piwi/PRG-1 argonaute and TGF-beta mediate transgenerational learned pathogenic avoidance. *Cell*, 2019, 177: 1827-1841 e1812
- [61] Barucci G, Cornes E, Singh M, *et al.* Small-RNA-mediated transgenerational silencing of histone genes impairs fertility in piRNA mutants. *Nat Cell Biol*, 2020, 22: 235-245
- [62] Ashe A, Sapetschnig A, Weick EM, *et al.* piRNAs can trigger a multigenerational epigenetic memory in the germline of *C. elegans*. *Cell*, 2012, 150: 88-99
- [63] Houry-Zeevi L, Rechavi O. A matter of time: Small RNAs regulate the duration of epigenetic inheritance. *Trends Genet*, 2017, 33: 46-57
- [64] 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. [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]
- [65] 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
- [66] Grandjean V, Gounon P, Wagner N, *et al.* The mir-124-sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. *Development*, 2009, 136: 3647-3655
- [67] Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, *et al.* RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Dev Cell*, 2008, 14: 962-969
- [68] Hosken DJ, Hodgson DJ. Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control. *Trends Ecol Evol*, 2014, 29: 451-455
- [69] Santiago J, Silva JV, Howl J, *et al.* All you need to know about sperm RNAs. *Hum Reprod Update*, 2021, 28: 67-91
- [70] Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, *et al.* Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, 2002, 360: 772-777
- [71] Sharma U, Sun F, Conine CC, *et al.* Small RNAs are trafficked from the epididymis to developing mammalian sperm. *Dev Cell*, 2018, 46: 481-494 e486
- [72] Conine CC, Sun F, Song L, *et al.* Small RNAs gained during epididymal transit of sperm are essential for embryonic development in mice. *Dev Cell*, 2018, 46: 470-480 e473
- [73] Conine CC, Rando OJ. Soma-to-germline RNA communication. *Nat Rev Genet*, 2022, 23: 73-88
- [74] Wang Y, Yamauchi Y, Wang Z, *et al.* Both cauda and caput epididymal sperm are capable of supporting full-term development in FVB and CD-1 mice. *Dev Cell*, 2020, 55: 675-676
- [75] Conine CC, Sun F, Song L, *et al.* MicroRNAs absent in caput sperm are required for normal embryonic development. *Dev Cell*, 2019, 50: 7-8
- [76] Zhou D, Suzuki T, Asami M, *et al.* Caput epididymal mouse sperm support full development. *Dev Cell*, 2019, 50: 5-6
- [77] Wang H, Wang Z, Zhou T, *et al.* Small RNA shuffling between murine sperm and their cytoplasmic droplets during epididymal maturation. *Dev Cell*, 2023, 58: 779-790 e774
- [78] Cabral SE, Mowry KL. Organizing the oocyte: RNA localization meets phase separation. *Curr Top Dev Biol*, 2020, 140: 87-118
- [79] Hwang H, Yun S, Arcanjo RB, *et al.* Regulation of RNA localization during oocyte maturation by dynamic RNA-ER association and remodeling of the ER. *Cell Rep*, 2022, 41: 111802
- [80] Zhang Y, Wang Q, Wang H, *et al.* Uterine fluid in pregnancy: A biological and clinical outlook. *Trends Mol Med*, 2017, 23: 604-614
- [81] Liu Y, Zhao H, Shao F, *et al.* Remodeling of maternal mRNA through poly(A) tail orchestrates human oocyte-to-embryo transition. *Nat Struct Mol Biol*, 2023, 30: 200-215
- [82] Wu Y, Xu X, Qi M, *et al.* N(6)-methyladenosine regulates maternal RNA maintenance in oocytes and timely RNA decay during mouse maternal-to-zygotic transition. *Nat Cell Biol*, 2022, 24: 917-927
- [83] Yang Y, Wang L, Han X, *et al.* Rna 5-methylcytosine facilitates the maternal-to-zygotic transition by preventing maternal mRNA decay. *Mol Cell*, 2019, 75: 1188-1202 e1111
- [84] Koh XY, Pek JW. Passing down maternal dietary memories through lncRNAs. *Trends Genet*, 2023, 39: 91-93
- [85] Chen YT, Yang QY, Hu Y, *et al.* Imprinted lncRNA DIO3OS preprograms intergenerational brown fat development and obesity resistance. *Nat Commun*, 2021, 12: 6845
- [86] Kusuyama J, Alves-Wagner AB, Makarewicz NS, *et al.* Effects of maternal and paternal

- exercise on offspring metabolism. *Nat Metab*, 2020, 2: 858-872
- [87] Raad G, Serra F, Martin L, *et al.* Paternal multigenerational exposure to an obesogenic diet drives epigenetic predisposition to metabolic diseases in mice. *Elife*, 2021, 10:
- [88] Chen Q, Yan M, Cao Z, *et al.* Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, 2016, 351: 397-400
- [89] Zhang Y, Zhang X, Shi J, *et al.* Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. *Nature Cell Biology*, 2018, 20: 535-540
- [90] He T, Guo H, Shen X, *et al.* Hypoxia-induced alteration of RNA modifications in the mouse testis and sperm. *Biol Reprod*, 2021, 105: 1171-1178
- [91] Guo H, Shen X, Hu H, *et al.* Alteration of RNA modification signature in human sperm correlates with sperm motility. *Mol Hum Reprod*, 2022,
- [92] Guo H, Xia L, Wang W, *et al.* Hypoxia induces alterations in tRNA modifications involved in translational control. *BMC Biol*, 2023, 21: 39
- [93] Lu X, Kong X, Wu H, *et al.* UBE2M-mediated neddylation of TRIM21 regulates obesity-induced inflammation and metabolic disorders. *Cell Metab*, 2023, 35: 1390-1405 e1398
- [94] El Alam S, Pena E, Aguilera D, *et al.* Inflammation in pulmonary hypertension and edema induced by hypobaric hypoxia exposure. *Int J Mol Sci*, 2022, 23:
- [95] Zhang Y, Ren L, Sun X, *et al.* Angiogenin mediates paternal inflammation-induced metabolic disorders in offspring through sperm tsRNAs. *Nat Commun*, 2021, 12: 6673
- [96] Sharma U, Conine CC, Shea JM, *et al.* Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, 2016, 351: 391-396
- [97] Yoshida K, Maekawa T, Ly NH, *et al.* ATF7-dependent epigenetic changes are required for the intergenerational effect of a paternal low-protein diet. *Mol Cell*, 2020, 78: 445-458 e446
- [98] Sarker G, Sun W, Rosenkranz D, *et al.* Maternal overnutrition programs hedonic and metabolic phenotypes across generations through sperm tsRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116: 10547-10556
- [99] Grandjean V, Fourre S, De Abreu DA, *et al.* RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci Rep*, 2015, 5: 18193
- [100] Gapp K, van Steenwyk G, Germain PL, *et al.* Alterations in sperm long RNA contribute to the epigenetic inheritance of the effects of postnatal trauma. *Mol Psychiatry*, 2020, 25: 2162-2174
- [101] Gapp K, Jawaid 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
- [102] Zheng X, Li Z, Wang G, *et al.* Sperm epigenetic alterations contribute to inter- and transgenerational effects of paternal exposure to long-term psychological stress via evading offspring embryonic reprogramming. *Cell Discov*, 2021, 7: 101
- [103] Rodgers AB, Morgan CP, Bronson SL, *et al.* Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring hpa stress axis regulation. *J Neurosci*, 2013, 33: 9003-9012
- [104] Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA, *et al.* Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 13699-13704
- [105] Milekic MH, Xin Y, O'Donnell A, *et al.* Age-related sperm DNA methylation changes are transmitted to offspring and associated with abnormal behavior and dysregulated gene expression. *Mol Psychiatry*, 2015, 20: 995-1001

- [106] Guo Y, Bai D, Liu W, *et al.* Altered sperm tsRNAs in aged male contribute to anxiety-like behavior in offspring. *Aging Cell*, 2021, 20: e13466
- [107] Wang L M, Hu J, Zhang J, *et al.* Role of non-coding RNAs in response to environmental exposure and mediating epigenetic inheritance in mammals (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2022, 52: 1137–1147. [王璟璠, 胡婧, 张佳, 等. 非编码 RNA 在哺乳动物中介导环境暴露信息的研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52: 1137–1147]
- [108] Chen Q, Zhang X, Shi J, *et al.* Origins and evolving functionalities of tRNA-derived small RNAs. *Trends in Biochemical Sciences*, 2021, 46: 790-804
- [109] Suzuki T. The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 22: 375-392
- [110] Cozen AE, Quartley E, Holmes AD, *et al.* ARM-Seq: AlkB-facilitated RNA methylation sequencing reveals a complex landscape of modified tRNA fragments. *Nature Methods*, 2015, 12: 879-884
- [111] Zheng G, Qin Y, Clark WC, *et al.* Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing. *Nature Methods*, 2015, 12: 835-837
- [112] Shi J, Zhang Y, Tan D, *et al.* PANDORA-Seq expands the repertoire of regulatory small RNAs by overcoming RNA modifications. *Nature Cell Biology*, 2021, 23: 424-436
- [113] Xu H, Yao J, Wu DC, *et al.* Improved TGIRT-Seq methods for comprehensive transcriptome profiling with decreased adapter dimer formation and bias correction. *Sci Rep*, 2019, 9: 7953
- [114] Hu JF, Yim D, Ma D, *et al.* Quantitative mapping of the cellular small RNA landscape with AQRNA-Seq. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 978-988
- [115] Wang H, Huang R, Li L, *et al.* CPA-Seq reveals small ncRNAs with methylated nucleosides and diverse termini. *Cell Discov*, 2021, 7: 25
- [116] Lucas MC, Prysycz LP, Medina R, *et al.* Quantitative analysis of tRNA abundance and modifications by nanopore RNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 2023,
- [117] Yuan XH, Su Y, Zhang XD *et al.* MLC Seq: De novo sequencing of full-length tRNA isoforms by mass ladder complementation. *bioRxiv*, 2021,
- [118] Saw PE, Xu X, Chen J, *et al.* Non-coding RNAs: The new central dogma of cancer biology. *Sci China Life Sci*, 2021, 64: 22-50
- [119] Quarato P, Singh M, Bourdon L, *et al.* Inheritance and maintenance of small RNA-mediated epigenetic effects. *Bioessays*, 2022, 44: e2100284
- [120] Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 475-488
- [121] Zhang Y, Shi J, Chen Q. Tsnas: New players in mammalian retrotransposon control. *Cell Research*, 2017, 27: 1307-1308
- [122] Kim HK, Fuchs G, Wang S, *et al.* A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature*, 2017, 552: 57-62
- [123] Chen L, Xu W, Liu K, *et al.* 5' half of specific tRNAs feeds back to promote corresponding trna gene transcription in vertebrate embryos. *Sci Adv*, 2021, 7: eabh0494
- [124] Shi J, Zhang Y, Zhou T, *et al.* tsRNAs: The swiss army knife for translational regulation. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44: 185-189
- [125] Wang X, Matuszek Z, Huang Y, *et al.* Queuosine modification protects cognate tRNAs against ribonuclease cleavage. *RNA*, 2018, 24: 1305-1313
- [126] Li J, Zhu WY, Yang WQ, *et al.* The occurrence order and cross-talk of different tRNA

modifications. *Sci China Life Sci*, 2021, 64: 1423-1436

[127] Schimmel P. The emerging complexity of the tRNA world: Mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 45-58

[128] Yang H, Bai D, Li Y, *et al.* Allele-specific H3K9me3 and DNA methylation co-marked CpG-rich regions serve as potential imprinting control regions in pre-implantation embryo. *Nat Cell Biol*, 2022,

[129] Huang H, Weng H, Zhou K, *et al.* Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m(6)A RNA modification co-transcriptionally. *Nature*, 2019, 567: 414-419

[130] Xu W, Li J, He C, *et al.* Mettl3 regulates heterochromatin in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2021, 591: 317-321

[131] Liu J, Dou X, Chen C, *et al.* N(6)-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription. *Science*, 2020, 367: 580-586

[132] Deng S, Zhang J, Su J, *et al.* RNA m(6)A regulates transcription via DNA demethylation and chromatin accessibility. *Nat Genet*, 2022, 54: 1427-1437

[133] He XJ, Chen T, Zhu JK. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res*, 2011, 21: 442-465

[134] Wang X, Ramat A, Simonelig M, *et al.* Emerging roles and functional mechanisms of Piwi-interacting RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 123-141

[135] Zhang G, Esteve PO, Chin HG, *et al.* Small RNA-mediated DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 inhibition leads to aberrant DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 6112-6124

[136] Glaich O, Parikh S, Bell RE, *et al.* DNA methylation directs microRNA biogenesis in mammalian cells. *Nat Commun*, 2019, 10: 5657

[137] Casier K, Autaa J, Gueguen N, *et al.* The histone demethylase KDM3 prevents auto-immune piRNAs production in *Drosophila*. *Sci Adv*, 2023, 9: eade3872

[138] Beck D, Ben Maamar M, Skinner MK. Integration of sperm ncRNA-directed DNA methylation and DNA methylation-directed histone retention in epigenetic transgenerational inheritance. *Epigenetics Chromatin*, 2021, 14: 6

[139] Skinner MK, Ben Maamar M, Sadler-Riggelman I, *et al.* Alterations in sperm DNA methylation, non-coding RNA and histone retention associate with DDT-induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Epigenetics Chromatin*, 2018, 11: 8

[140] Ben Maamar M, Beck D, Nilsson E, *et al.* Developmental origins of transgenerational sperm histone retention following ancestral exposures. *Dev Biol*, 2020, 465: 31-45