

## 实验室介绍



张云芳, 同济大学生命科学与技术学院教授、博士生导师, 获国家自然科学基金委优秀青年项目资助。课题组主要聚焦于tsRNAs及tsRNAs RNA修饰在父系获得性遗传调控、早期胚胎发育以及疾病发生中的作用机制研究。具体包括: 研究父系获得性性状代际/跨代遗传的分子基础及调控网络; 探究精子中表观遗传印记信息的形成及其在早期胚胎中的解码机制; 解析tsRNAs及RNA修饰调控早期胚胎发育及疾病发生的作用及机制; 挖掘RNA修饰参与tRNAs功能调控及tsRNAs生物合成的机制。

<https://life.tongji.edu.cn/16/c0/c12618a202432/page.htm>

## tRNA来源的非编码小RNA的生成调控 及功能研究前沿进展

杨依婷<sup>#</sup> 李韵<sup>#</sup> 郭艾莲 吕欣宜 汪鑫 曹政 疏泽 张云芳<sup>\*</sup>

(同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

**摘要** 转运RNA衍生小RNA(tRNA-derived small RNAs, tsRNAs)是一类来源于tRNAs的新型非编码小RNA, 广泛存在于动物、植物的组织细胞以及体液中, 在胚胎发育、细胞命运决定、机体免疫调控、获得性遗传以及包括癌症在内的多种人类疾病的发生发展中发挥着不可或缺的作用。然而, 由于tsRNAs含有从其tRNAs前体继承而来的多种RNA修饰, 这些RNA修饰一方面增加了tsRNAs信息编码的深度, 丰富了tsRNAs在细胞内功能和作用机制的多样性, 另一方面也增加了其功能研究的复杂性。近年来, tsRNAs的作用机制成为该领域的研究焦点和关键点。该文系统性地综述了tsRNAs的最新研究进展, 包括其生成途径、检测方法、作用机制以及生物学功能的多样性, 并探讨了tsRNAs作为生物标志物在临床疾病诊断中的应用前景。

**关键词** tRNA; tsRNA; RNA修饰; 翻译调控; 生物标志物

## Advances in the Biogenesis and Functional Research of tRNA-Derived Small Non-Coding RNA

YANG Yiting<sup>#</sup>, LI Yun<sup>#</sup>, GUO Ailian, LÜ Xinyi, WANG Xin, CAO Zheng, SHU Ze, ZHANG Yunfang<sup>\*</sup>

(School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

收稿日期: 2023-10-31

接受日期: 2023-11-29

国家重点研发计划(批准号: 2019YFA0802600)、国家自然科学基金(批准号: 82022029、81971460、82371727)和中央高校基本科研经费资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

<sup>\*</sup>通信作者。Tel: 18810085579, E-mail: zhangyunfang@tongji.edu.cn

Received: October 31, 2023

Accepted: November 29, 2023

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2019YFA0802600), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82022029, 81971460, 82371727) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-18810085579, E-mail: zhangyunfang@tongji.edu.cn

**Abstract** tsRNAs (tRNA-derived small RNAs, also known as tRNA fragments) are a novel class of tRNA-derived small non-coding RNAs that extensively expressed in multiple tissues and body fluids of animals and plants. tsRNAs play indispensable roles in embryonic development, cell fate determination, immune regulation, epigenetic inheritance of acquired traits, and various human diseases including cancer. tsRNAs contain various RNA modifications that inherited from their tRNAs precursors. These RNA modifications have not only increased the information coding compacity of tsRNAs and enriched the diversity of tsRNAs functions, but also increased the mechanism complexity of tsRNAs, which leads tsRNAs become a hotspot in small non-coding RNAs field in recent years. This review systematically summarizes the latest research progresses of tsRNAs in their biogenesis regulation, molecular mechanisms, biological functions and sequencing methods. Additionally, it explores the potential of tsRNAs as diagnostic biomarkers in clinical application.

**Keywords** tRNA; tsRNA; RNA modification; translational regulation; biomarkers

转运RNA(tRNAs)是一类能够特异性识别信使RNA(mRNAs)密码子并将对应的氨基酸携带到核糖体中参与蛋白质合成的重要非编码RNA,占细胞总RNA的10%~15%<sup>[1]</sup>。除了其在蛋白质合成中的主要功能外, tRNAs还在其他生物学过程中发挥作用,包括在氨基酸匮乏时参与细胞应答机制<sup>[2-4]</sup>,以及作为逆转录病毒逆转录过程中的引物<sup>[5]</sup>,在细胞功能的调节中扮演着重要角色。tRNA根据其来源可分为两类:一类由核基因编码,另一类由线粒体基因编码。其中成熟的tRNAs长度为70~90个核苷酸(nt),在细胞内形成具有独特“三叶草”形态的二级结构,包括D环、反密码子环、TΨC环和接受臂<sup>[6]</sup>。tRNAs的二级结构在氢键的作用下进一步折叠形成倒L型的三级结构<sup>[7]</sup>,然后被氨酰tRNA合成酶识别并加上特定的氨基酸。tRNAs分子的正确折叠对tRNAs的功能行使及细胞正常运转至关重要,因此tRNAs的生成在细胞内受到了严格的调控。tRNA的基因具有多拷贝性,在细胞核中由RNA聚合酶III(Pol III)将tRNA基因转录为前体tRNAs(Pre-tRNAs),经过一系列剪接去除5'、3'端序列和内含子,然后经过多种RNA修饰酶修饰并添加CCA 3'末端形成成熟的tRNAs<sup>[8]</sup>。tRNAs是细胞内RNA修饰含量最为丰富的一类RNA,平均一条tRNA上含有8~13个修饰碱基,这些RNA修饰对tRNAs二级结构的形成和tRNAs稳定性的维持至关重要。近年来的研究发现在正常生理条件以及多种环境应激条件下(包括营养失衡等),细胞内tRNAs可以被特异性的核酸酶识别并切割生成一类tRNA来源的非编码小RNA——tsRNAs(transfer RNA-derived small RNAs),来继续发挥基因表达调控功能。

哺乳动物中的tsRNAs最早是于20世纪70年代末在癌症患者的尿液中被发现的。然而,当时tsRNAs被认为是机体在应激条件下引起的tRNAs随机降解的产物,并没有引起广泛关注和重视<sup>[9-11]</sup>。2012年,PENG等<sup>[12]</sup>在生理条件下发现tsRNAs大量富集于成熟精子的头部,能够随着精卵结合进入到卵子中去,重新引起了人们对tsRNAs功能机制的研究兴趣。我们通过对小鼠各个组织的高通量小RNA测序发现,除了精子外,tsRNAs还作为一种序列保守的非编码小RNA广泛存在于脊椎动物的血清中。此外研究还揭示了tsRNAs在调节机体急性炎症反应中的潜在作用,从而为深入探索tsRNAs的功能和生物学意义开启了新的篇章<sup>[13]</sup>。近年来,越来越多的研究证据表明,tsRNAs是一类具有重要生物学功能的新型非编码小RNA,在胚胎发育、细胞命运决定、机体免疫调控、获得性遗传调控以及包括癌症在内的多种疾病的发生发展中发挥着不可或缺的重要功能<sup>[9,14]</sup>。本文旨在综合回顾近年来关于tsRNAs的研究进展,详细探讨其生成与调控机制、检测技术、生物学功能,以及其在临床应用方面的潜在前景,从而为tsRNAs的功能性研究提供理论支持。

## 1 tsRNAs的生成调控机制

### 1.1 特异性核酸酶对tRNAs的识别和切割

细胞内tsRNAs的生成主要依赖于内源性核酸酶对tRNAs进行的特异性识别与切割作用。因此,内源性核酸酶在tsRNA生成中发挥着重要作用。这些特异性核酸酶能够识别不同修饰状态下的tRNAs,并在其特定位置进行切割,产生长度和序列多样的tsRNAs片段。研究发现,大部分的tsRNAs来源于

成熟的tRNAs,但是也有一小部分tsRNAs是来源于Pre-tRNAs。不同核酸内切酶的酶切活性和切割特异性,决定了它们在tRNAs上的具体剪切位置以及生成的tsRNAs的碱基长度。在Pre-tRNAs的成熟过程中,核糖核酸酶P(RNase P)能够切除Pre-tRNAs的5'末端序列生成5'-leader-tsRNAs,而核糖核酸酶Z(RNase Z)、ELAC2能够对Pre-tRNAs的3'末端进行切割生成3'-trailer-tsRNAs<sup>[15]</sup>。哺乳动物核酸酶A家族中的血管生成素(angiotensin, ANG)在应激条件下可在成熟tRNA反密码子环附近进行切割,产生长度为30~40 nt的5'tsRNAs和3'tsRNAs[又被称为5'tRNA半分子(5'tRNA halves)和3'tRNA半分子(3'tRNA halves)];核糖核酸酶Dicer可在D环及TΨC环附近进行切割产生长度在18~25 nt的5'tsRNAs和3'tsRNAs<sup>[16]</sup>。此外, RNase P还可以靶向tRNA反密码子环茎部特定(如富含GC碱基对)序列进行切割生成tsRNAs<sup>[17]</sup>。一直以来关于tsRNAs的命名都没有统一,tsRNAs在其他文献中也被称为“tRFs(tRNA fragments)”、“tiRNAs(tRNA derived stress-induced RNAs)”、“SHOT-RNAs(sex Hormone-dependent tRNA-derived RNAs)”、“tRNA halves”<sup>[18]</sup>。我们根据tsRNAs在成熟tRNA上的位置来源将tsRNAs分为5'tsRNA、inner'tsRNA和3'tsRNA<sup>[19]</sup>。最近,LOWE联合tsRNAs研究领域的多名资深科学家共同拟定了tsRNAs的命名系统,将其统称为tDRs(tRNA derived RNAs)。该命名系统标明了其tRNA前体的信息和其在tRNA上的位置信息,例如tDR-1:31-Pro-AGG-1-M5是指一条来源于tRNA<sup>Pro-AGG-1-M5</sup> 5'末端的包含tRNA的1~31位碱基的tsRNA<sup>[18]</sup>。

## 1.2 RNA修饰通过影响tRNAs稳定性调控tsRNAs的生成

tRNAs是细胞内RNA修饰含量最为丰富的一类RNAs,不仅tRNAs上修饰的相对丰度较高,同时修饰碱基的种类也非常丰富。目前,自然界已知存在多达170多种RNA修饰类型,其中大部分的RNA修饰类型都于tRNAs中被发现<sup>[20]</sup>。tRNA修饰是tRNA成熟的象征,只有被正确修饰的tRNAs才能够在细胞中稳定存在,发挥运载氨基酸合成肽链的功能<sup>[21]</sup>。tRNAs上丰富的RNA修饰是在多种RNA修饰酶的作用下共同完成的。这些RNA修饰一方面增加tRNA结构的稳定性,提高tRNAs调控翻译过程的保真性;另一方面还可以影响内源性核酸酶对tRNAs的识别

和切割,调节tsRNA生成<sup>[22]</sup>。例如,tRNAs上的5-甲基胞嘧啶(m<sup>5</sup>C)修饰、1-甲基腺嘌呤(m<sup>1</sup>A)修饰等,这些RNA修饰的缺失能够降低tRNA的稳定性,促进核酸酶的酶切反应生成tsRNAs。其中DNMT2和NSUN2是tRNAs上m<sup>5</sup>C的主要修饰酶,负责对tRNA<sup>Asp</sup>、tRNA<sup>Val</sup>、tRNA<sup>Gly</sup>和tRNA<sup>Leu</sup>等tRNAs上C(38)、C(47—50)进行m<sup>5</sup>C修饰<sup>[23-25]</sup>。敲除*Dnmt2*或*Nsun2*基因会影响tRNA的稳定性促进tsRNA生成,引发小鼠的发育异常<sup>[23]</sup>。QTRT1介导的Q(Queuosine)修饰也具有相似的作用,通过对tRNA<sup>His</sup>、tRNA<sup>Asn</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup>和tRNA<sup>Asp</sup>反密码子的摆动碱基(34位)进行Q修饰,防止tRNAs被剪切<sup>[26]</sup>。ALKBH3是tRNAs上m<sup>1</sup>A 58位的去甲基化酶,ALKBH3过表达则会引起tRNA m<sup>1</sup>A 58位去甲基化,引起核酸酶对tRNAs的剪切,促进tsRNA生成<sup>[27]</sup>。值得注意的是,不同RNA修饰之间可能会互相影响。我们发现多种RNA修饰的丰度在不同组织细胞中呈现高度线性相关性,如m<sup>5</sup>C和m<sup>2</sup>G水平在多组织多类型的RNA上呈现出广泛的线性关系<sup>[28-29]</sup>;此外,研究人员还发现C34位的Q修饰可以促进DNMT2介导的tRNA<sup>Asp</sup> C38位的m<sup>5</sup>C修饰的形成<sup>[30-31]</sup>。

tsRNAs主要来源于成熟的tRNAs,且tsRNAs继承了其tRNA前体上数量众多的RNA修饰。这些RNA修饰不仅对tRNAs的稳定性和二级结构有重要调控作用,还对tsRNAs的稳定性、二级结构形成以及其在细胞内的功能有重要调控作用<sup>[24]</sup>。我们前期研究发现,从血清或者受精卵中抽提出来的tsRNAs相比于合成的tsRNAs以及内源性抽提出来的miRNAs具有更好的抵抗核酸酶裂解的能力,在血清和受精卵裂解液等富含核酸酶的体系中更加稳定<sup>[13,32]</sup>。此外,我们还发现人工合成的序列相同但修饰水平不同(带有不同数量的m<sup>5</sup>C修饰)的tsRNAs抵抗核酸酶的能力不同,且在非变性聚丙烯酰胺凝胶中表现出不同的迁移效率,提示m<sup>5</sup>C的位置和数量能够影响tsRNAs对核酸酶的耐受性及其二级结构<sup>[24]</sup>。有趣的是,这些序列相同修饰不同的tsRNAs在被转染进入细胞后其功能调控行为也不相同,进一步强调了RNA修饰对tsRNAs功能与结构的重要作用<sup>[24]</sup>。总之,RNA修饰的类型及位置对tsRNA生成效率及其在tRNAs上的位置来源具有重要调控作用,赋予了tsRNAs复杂信息的承载力和作用机制的多样性。



## 2 tsRNAs及其RNA修饰的检测

传统的小RNA检测方法主要以Q-PCR以及小RNA高通量测序为主,但这两种方法都是基于形成反转录cDNA文库后再进行定量检测的。这种方式在进行miRNA测序时效果较好,因为miRNAs的5'端通常为磷酸,3'端通常为羟基,有利于反转录或者cDNA文库构建时末端接头序列的添加,而且miRNAs通常含有较低的逆转录中止碱基修饰水平,较少产生序列偏好性的文库扩增。tsRNAs作为一类非典型的非编码小RNA,除了携带大量反转录中止碱基修饰外,其生成过程也会产生非经典RNA末端。其中由ANG切割产生的tsRNAs的3'末端往往携带2'-3'环磷酸(2'-3'-cyclic phosphate),而5'末端往往失去磷酸生成5'羟基(5'-OH),无法通过连接反应加上末端接头序列,导致tsRNAs的cDNA文库建库产出低且具有偏好性。此外,与miRNAs不同,tsRNAs的序列长度主要集中在30 nt以上,按照传统miRNA测序方法(测序长度为30 nt)容易造成大量tsRNAs的序列信息被过滤掉而丢失<sup>[33-34]</sup>。因此,我们和合作者共同开发了一种新型小RNA测序技术——PANDORA-seq。利用该技术能够将具有非典型末端的tsRNAs修复为5'端为磷酸以及3'端为羟基的末端类型,并且有效去除大部分逆转录中止RNA修饰,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等,可降低小RNA建库的偏好性。所以,与传统小RNA测序方法相比,以PANDORA-seq为代表的新型小RNA测序技术提高了tsRNAs等非经典小RNA在测序结果中的丰度,更加真实地反映了小RNA在体内的表达情况<sup>[33]</sup>。

研究表明RNA修饰对于tsRNAs的功能发挥具有重要作用<sup>[24]</sup>,因此,开发针对tsRNAs的修饰检测手段对于揭示tsRNAs生物学功能尤为关键。目前,tsRNAs的RNA修饰鉴定主要分为高效液相色谱-质谱的检测方法和基于高通量测序的检测方法。高效液相色谱-质谱法主要通过切胶回收富含tsRNAs的区段,或者通过探针捕获某种特定的tsRNA分子,将其酶解成单核苷酸后,通过高效液相色谱将单核苷酸分离,再按照保留时间依次对单核苷酸进行质谱检测<sup>[35]</sup>。质谱法检测的优点在于可以同时测定数十种RNA修饰类型的丰度,缺点是不能获得修饰的具体位置信息。为了解决这个问题,有研究者开发出了新型的基于质谱的检测方法——MLC-seq,将分离纯化的tRNAs及tsRNAs在核酸酶的可控酶解

作用下形成不同大小的RNA片段,然后通过质谱分析不同RNA片段上的分子信息结合质谱峰图分析出每个序列上的核苷酸信息及RNA修饰信息<sup>[36]</sup>。但是该方法需要投入大量的RNA进行tRNA及tsRNA的纯化,不利于微量样本的检测。

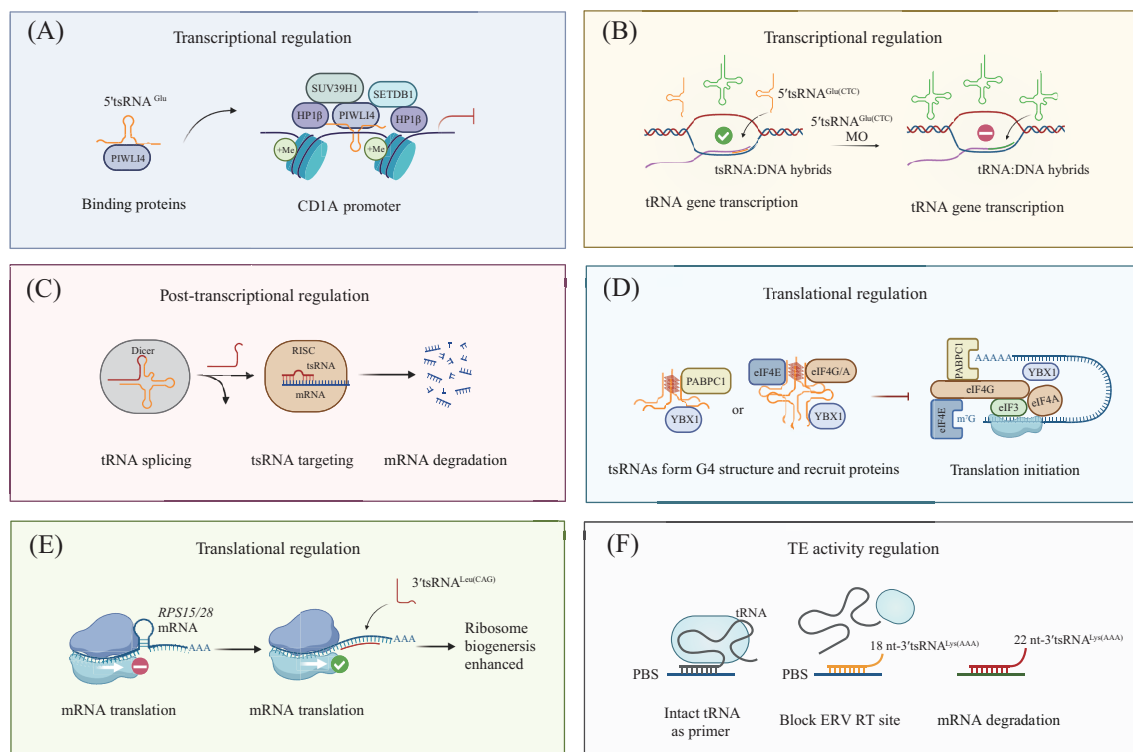
基于测序的检测方法相比于质谱的检测方法无法同时测定多种修饰类型的分布和丰度,但是可以在较高分辨率下同时获得小RNA的某种RNA修饰类型的全局位置信息。针对小RNA的修饰测序,目前已经开发出多种基于二代测序的可检测特定修饰的测序方法,以及新兴的可同时检测tRNA序列及修饰信息的三代测序<sup>[37]</sup>。基于二代测序的修饰检测技术如miCLIP可以在单碱基分辨率的情况下测得snoRNAs的m<sup>6</sup>A信息和Vault RNAs的m<sup>5</sup>C信息<sup>[38-39]</sup>,BoRed-seq可以比较特异地检测miRNAs上的m<sup>7</sup>G修饰信息<sup>[40]</sup>;Ψ-seq可以在单碱基分辨率下对snRNAs进行单碱基分辨率的全局无偏检测<sup>[41]</sup>,除此之外还有针对m<sup>5</sup>C、m<sup>3</sup>C、m<sup>1</sup>A、Nm等修饰的检测技术<sup>[42-45]</sup>,这些RNA修饰检测技术的开发有利于研究人员在RNA修饰层面进一步拓宽对tsRNA功能的理解。

## 3 tsRNAs的分子作用机制

由于tsRNAs在tRNA上来源的位置不同,序列特征及序列长度多样,且含有从其tRNA前体继承而来的多种RNA修饰,因此形成了不同于其他小RNA的独特分子特征。tsRNAs的这些分子特征一方面增加了tsRNAs信息编码的深度,丰富了tsRNAs在细胞内功能调控和作用机制的多样性,另一方面也增加了其功能研究的复杂性。已有研究发现,tsRNAs可以在转录水平、转录后水平以及翻译层面多维度调控基因的表达,甚至有些tsRNAs还能通过多种机制调控转座子的转座活性,丰富了非编码小RNA基因表达调控的广度和深度(图1)。

### 3.1 tsRNAs参与基因的转录调控

研究发现,一些tsRNAs如5'tsRNA<sup>Glu</sup>可通过类似piRNAs的方式抑制基因的转录活性。tRNA<sup>Glu</sup>来源的tsRNAs可以与PIWIL4蛋白结合形成复合物,然后招募H3K9甲基转移酶(SETDB1和SUV39H1)以及异染色质蛋白1β(heterochromatin protein 1β, HP1β)到CD1A启动子区域,从而促进该区域的异染色质化,显著抑制CD1A的转录<sup>[46]</sup>。而5'tsRNA<sup>Glu</sup>的表达下降则会降低CD1A启动子区域的H3K9me3的水平,



tsRNAs在转录水平(A、B)、转录后水平(C)、翻译水平(D、E)通过多种作用方式调控基因的表达,此外,还可以通过与tRNAs竞争引物结合位点调控逆转录转座子的转座活性(F)。

tsRNAs regulate gene expression via multifaceted mechanisms at transcriptional (A,B), post-transcriptional (C) and translational levels (D,E). Moreover, tsRNAs also show TE regulation activity by competing primer binding site of ERVs with tRNAs (F).

图1 tsRNAs的分子作用机制

Fig.1 The molecular mechanisms of tsRNAs

促进*CD1A*启动子区域的活化,使之被转录因子识别从而启动转录过程(图1A)<sup>[46]</sup>。此外,最近一项研究还发现,在斑马鱼胚胎发育过程中,5'tsRNA能够进入细胞核促进其tRNA基因的转录。在胚胎中通过加入能与5'tsRNA<sup>Gly(GCC)</sup>和5'tsRNA<sup>Glu(CTC)</sup>互补结合的MO(Morpholino),达到敲降这两种tsRNA的效果,之后观察到tRNA<sup>Gly(GCC)</sup>的转录下调以及斑马鱼胚胎发育失败的现象,而注射tRNA<sup>Gly(GCC)</sup>和tRNA<sup>Glu(CTC)</sup>可以有效挽救这种胚胎致死现象。造成这一表型的原因是在tRNAs基因转录过程中新生的tRNA与其转录的模版链形成tRNA:DNA稳定复合物,该复合物的形成能抑制tRNA基因的进一步转录;而5'tsRNA能够与转录出的tRNA竞争性结合tDNA模版链,促进5'tsRNA:DNA复合物的形成,该复合物则不会影响tRNA基因的转录,从而解除tRNA基因的转录抑制(图1B)<sup>[47]</sup>。此外,tsRNAs在细胞核中还可以在不影响靶基因转录状态的情况下调控靶基因的表达。一类依赖于Dicer切割产生tsRNAs能够在细胞核内通

过与AGO2(Argonautes 2)蛋白结合,以序列互补的方式靶定到目标基因正在转录的mRNAs的内含子序列上,从而引起靶基因新生RNA的沉默(nascent RNA silencing, NSR)<sup>[48]</sup>。

### 3.2 tsRNAs参与基因的转录后调控

近年来的研究发现,tsRNAs可以通过多种作用方式在转录后水平调控基因的表达。其中,一些tsRNAs能够利用与miRNAs相似的方式调控基因的转录后沉默(图1C)<sup>[49-51]</sup>。这些tsRNAs通过与AGO蛋白结合形成RNA沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),以序列互补配对的方式与靶基因3'非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)结合引起靶mRNAs降解<sup>[52]</sup>。此外,Dicer切割产生的核酸长度在21~22 nt的3'CCA tsRNAs也可以与AGO蛋白结合,通过序列特异性方式影响mRNA稳定性并抑制翻译<sup>[53]</sup>。tsRNAs这种依赖AGO蛋白的转录后调控现象也存在于原核生物与真核生物互作过程中,例如根瘤菌产生的tsRNAs能够与宿主(大豆)的AGO蛋白结合,

对宿主细胞靶基因 mRNAs 进行切割降解, 进一步沉默靶基因的表达<sup>[54]</sup>。呼吸道核胞体病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 感染诱导的人细胞系来源 5'tsRNA<sup>Glu(CTC)</sup> 可以结合 AGO4 蛋白, 通过转录后基因沉默的方式调控基因的表达, 在病毒的复制和调控宿主基因表达中发挥重要作用<sup>[55]</sup>。

另外, 一些 5'tsRNAs 还可以通过与 mRNA 竞争性结合 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 的方式影响 mRNAs 的稳定, 从而对基因的表达进行转录后调控。例如, 一些 5'tsRNAs 能够竞争性结合胰岛素样生长因子 2 的 mRNA 结合蛋白 1 (insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1, IGF2BP1), 从而抑制 *c-Myc* 的 mRNA 与 IGF2BP1 的结合, 降低其 mRNA 的稳定性<sup>[56]</sup>。再如一些 tsRNAs 通过竞争性结合 YBX1 (Y-box binding protein 1), 抑制 mRNAs 与 YBX1 的结合, 引起 mRNA 不稳定而降解。除了 5'tsRNAs 外, inner'tsRNAs 也能够以类似的作用方式发挥转录后沉默的作用。研究发现, 一些 inner'tsRNAs 也能够与 YBX1 结合, 导致多种致癌基因 mRNA 不稳定而沉默, 进而抑制肿瘤的发生<sup>[57]</sup>。

### 3.3 tsRNA 在翻译水平调控基因的表达

有研究发现, 一些 5'tsRNAs, 如 5'tsRNA<sup>Ala</sup> 和 5'tsRNA<sup>Cys</sup> (约 30 nt) 具有末端多聚鸟嘌呤基序 (terminal oligo-G motif, TOG), 该基序的存在会促进分子间 RNA G 四连体结构 (RNA G-quadruplexes, RNA G4) 的形成, 这种结构可以通过与 mRNAs 竞争性结合翻译起始复合物 eIF4G/eIF4E, 抑制 mRNAs 的翻译起始, 进而影响蛋白质的合成 (图 1D)<sup>[58]</sup>。非常有趣的是, tsRNAs 对蛋白合成的抑制作用受到 RNA 修饰及其二级结构的影响<sup>[59]</sup>。TOG-5'tsRNA<sup>Ala</sup> 第 8 位尿嘧啶 (U8) 修饰在假尿苷合酶 7 (pseudouridine synthase 7, PUS7) 的作用下修饰为第 8 位假尿嘧啶 (pseudouridine 8, Ψ8) 后, 能够增强该 tsRNA 与翻译起始复合物中相关蛋白的结合能力, 抑制翻译起始<sup>[59]</sup>。此外, 5'tsRNA 的序列长度和 RNA 修饰与否同样也会引起 tsRNAs 的蛋白质结合偏好性差异。例如, 研究发现 30 nt 的 U8-TOG-5'tsRNA 能够结合 eIF4A/G, 而 18 nt 的 U8-TOG-5'tsRNA 则不能<sup>[59-60]</sup>; 但是 18 nt 的 Ψ8-TOG-5'tsRNA 则能够结合翻译起始因子中的 PABPC1 影响蛋白质合成。tsRNAs 除了影响 mRNAs 与翻译起始因子的结合外, 还可以通过与 YBX1 结合促进应激颗粒形成、竞争性结合核糖体等机制抑制蛋白合成过程<sup>[61]</sup>。例

如, 酵母中 3'tsRNA 和 5'tsRNA 都能够在应激条件下与核糖体结合, 但其结合位点不同于经典的 A-和 P-tRNA 位点, 而是与核糖体小亚基结合影响 tRNA 的进入, 或者与氨酰 tRNA 合成酶结合, 干扰 tRNAs 的氨酰化等多种途径抑制蛋白的合成<sup>[62-63]</sup>。

除了影响翻译起始过程外, tsRNAs 还可以通过调节 mRNA 二级结构变化的方式调控 mRNA 翻译的延伸过程。研究发现, 在肿瘤细胞中, 3'tsRNA<sup>Leu(CAG)</sup> 可以通过碱基配对的方式结合到核糖体蛋白 *RPS28* 和 *RPS15* 的 mRNA 的特定位置上, 从而将该位置上形成的 mRNA 二级结构打开, 使核糖体能够顺利通行, 完成核糖体蛋白的翻译过程 (图 1E)。反之, 如果抑制 3'tsRNA<sup>Leu(CAG)</sup> 的水平, 则会使 *RPS28* 蛋白质合成受到抑制, 进而影响 18S rRNAs 前体的加工并导致 40S 小亚基数量下降, 最终阻碍 80S 核糖体的组装。值得注意的是, 有些 *RPS* 的 mRNA 虽然具有 tsRNAs 的靶序列, 但其 mRNA 并没有形成对应的二级结构 (如 *RPS9* 和 *RPS14*), 那么, 这些 *RPS* 的翻译并不会受到 tsRNA 表达的影响, 提示 tsRNA 调节 *RPS* 蛋白质合成的关键是打开 *RPS* mRNA 的二级结构, 便于翻译过程中核糖体的通行<sup>[64]</sup>。这一发现更新了人们对非编码小 RNA 调控基因表达作用方式的认识, 为 tsRNA 的调控机制研究打开了全新视角。

此外在果蝇中, tsRNAs 能够以 7 个核苷酸组成的短序列与 mRNA 保守区域配对, 在不影响靶基因 mRNA 水平的情况下通过与 AGO 蛋白结合抑制靶基因 mRNA 的翻译<sup>[65]</sup>。值得注意的是, 在真核生物中, tsRNAs 在抑制蛋白质翻译的过程中具有优先靶向翻译复合物关键基因的倾向性, 如核糖体蛋白 (ribosomal proteins, *RPs*)、翻译起始因子 (eukaryotic initiation factors, *eIFs*) 或延伸因子 (eukaryotic elongation factors, *eEFs*) 的 mRNAs, 进一步通过抑制翻译机器的功能在整体上抑制细胞的翻译。然而, tsRNAs 为何有这种调控倾向? 其识别和调控机制如何? 还有待进一步深入研究。

### 3.4 tsRNA 参与逆转录转座子活性调控

转座子 (transposon element, TE) 与基因插入突变、新基因形成、染色体异常和生物进化有关, 对基因组稳定性的维持有重要调控作用<sup>[66]</sup>。因此, TE 的转座活性在细胞内受到组蛋白修饰和 DNA 甲基化等表观遗传因子的严格调控<sup>[67]</sup>。逆转录转座子作为 TE 中重要的一类, 可以利用 RNA 作为中间体,

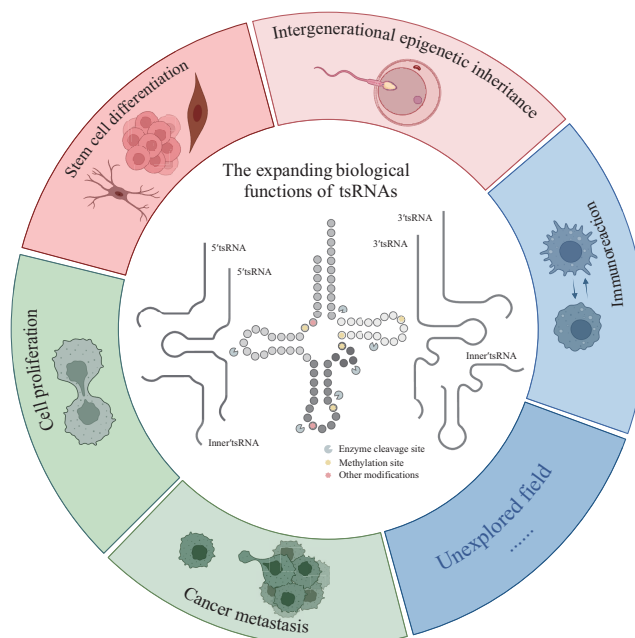


将其逆转录为DNA, 然后插入到基因组中。逆转录转座子主要分为两类, 长末端重复逆转座子(long terminal repeat-retrotransposons, LTR-RTs)和非LTR逆转录转座子(non-LTR-RTs), 其中LTR-RTs包括内源性逆转录病毒(endogenous retrovirus, ERV), non-LTR-RTs包括长散在重复元件(long interspersed nuclear elements, LINEs)和短散在重复元件(short interspersed nuclear elements, SINEs)<sup>[67]</sup>。近年来的研究发现, 很多tsRNAs也能够参与TE活性的调控。研究发现, 一些ERVs可以通过利用成熟tRNAs的3'末端作为反转录引物锚定到高度保守的引物结合序列(primer binding sequence, PBS)来起始反转录过程, 增强转座子的转座活性。2017年, MARTIENSSEN实验室<sup>[68]</sup>发现, 两种不同序列长度的3'tsRNA<sup>Lys(AAA)</sup>(18 nt和22 nt)能够通过序列互补的方式抑制逆转录转座子的活性。其中18 nt的3'tsRNA<sup>Lys(AAA)</sup>的作用机制是通过与tRNAs竞争性结合ERV的PBS序列引起了ERV的反转录终止进而抑制ERV的反转录活性(图1F)。18 nt的3'tsRNA<sup>Lys(AAA)</sup>这种抑制效应在tsRNAs与PBS完全互补时最强, 其强度随着不匹配碱基数量的增加而减弱。然而, 22 nt的3'tsRNA<sup>Lys(AAA)</sup>抑制ERV的效应虽然也依赖于PBS靶位点的存在, 但主要是通过诱导ERV

mRNA的转录后沉默或者翻译抑制来抑制LTR-逆转录转座子活性的。有趣的是, 22 nt的3'tsRNA<sup>Lys(AAA)</sup>这种调控作用不需要完全的碱基互补配对, 当存在不配对碱基时仍可有效沉默ERV<sup>[68]</sup>。然而, 一些在逆转录病毒感染的研究中发现, 病毒可以利用宿主的tsRNAs而非tRNA作为逆转录病毒的反转录引物以促进病毒复制。如人1型T细胞白血病病毒(human T-cell leukaemia virus type 1, HTLV-1)可以利用宿主细胞的3'tsRNA<sup>Pro</sup>作为反转录引物促进病毒自身的复制<sup>[69]</sup>; 人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)可以利用宿主3'tsRNA<sup>Lys</sup>作为病毒的反转录引物促进HIV的复制<sup>[70]</sup>。此外, tsRNAs除了直接调控转座子的活性外, 还可以参与转座子调控的下游基因的表达。例如, 研究发现精子5'tsRNA<sup>Gly(GCC)</sup>, 能够在早期胚胎中参与内源逆转录转座子(murine endogenous retrovirus-L, MERV-L)介导的基因表达调控<sup>[71]</sup>。

#### 4 tsRNAs的生物学功能

研究表明, tsRNAs可发挥多种生物学功能, 如tsRNAs可介导获得性遗传、影响干细胞命运、参与机体免疫相关过程, 以及参与癌症的发生发展等进程(图2)。



不同来源和长度的tsRNAs在获得性遗传、细胞命运决定、免疫调节和癌症等方面发挥重要生物学调控功能。

tsRNAs of different origins and nucleotide lengths play important biological regulatory functions in epigenetic inheritance of paternal acquired traits, cell fate determination, immune regulation, and cancer metastasis.

图2 tsRNAs的生物学调控功能

Fig.2 The expanding biological functions of tsRNAs

#### 4.1 tsRNAs与获得性遗传

获得性遗传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,对后代的健康造成影响的现象,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。近年来,越来越多的证据表明,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<sup>[72]</sup>。我们前期的研究发现,精子RNA及RNA修饰可以作为“精子RNA指纹”介导父系获得性性状向子代的传递<sup>[32]</sup>。利用高脂饮食诱导的代谢紊乱小鼠模型,我们发现将高脂饮食的小鼠精子30~40 nt的RNA片段(富含tsRNAs的小RNA片段)注射到正常受精卵的雄原核中,可以导致子代产生葡萄糖不耐受的代谢紊乱的表型<sup>[32]</sup>。此外,研究发现低蛋白饮食能够导致小鼠成熟精子中tsRNA表达改变,这种改变了的精子tsRNAs(小于40 nt的RNA片段)能够影响早期胚胎的基因表达<sup>[71]</sup>。还有研究表明,母体营养过剩所诱导的肥胖等表型可跨代遗传至子代雄性小鼠,子代雄性小鼠的精子tsRNAs富集片段注射至正常受精卵可以导致肥胖等代谢紊乱表型<sup>[73]</sup>。同时,雄性个体的衰老过程可能也会伴随着精子tsRNA表达谱的改变,将衰老个体的精子tsRNAs富集的片段注射至正常受精卵中,会导致子代出现行为学上的改变<sup>[74]</sup>。还有研究发现,将炎症小鼠的精子tsRNAs注射至正常的受精卵中则会引发子代小鼠产生肥胖以及葡萄糖不耐受的代谢紊乱表型,而与炎症和tsRNAs生成密切相关的关键因子血管生成素Ang敲除后则会影响该表型的代际遗传<sup>[75]</sup>。同时,tsRNAs的RNA修饰对于tsRNAs调控代际遗传起到了不可或缺的作用。高脂饮食诱导除了引起精子小RNA表达的差异改变外,同样会导致精子30~40 nt的小RNA上RNA修饰水平发生显著的改变,其中m<sup>2</sup>G和m<sup>5</sup>C含量的升高最为明显。有趣的是,当把tRNAs上C38位的m<sup>5</sup>C修饰酶Dnmt2敲除之后,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,同时,精子小RNA上的RNA修饰水平差异也消

失了,进一步提示了RNA修饰酶DNMT2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<sup>[24]</sup>。

#### 4.2 tsRNAs与干细胞命运决定

干细胞是一类具有自我更新能力、能沿着谱系分化路径发育成体内全部或多种类型细胞的细胞。根据干细胞的分化能力又将干细胞分为全能干细胞和多能干细胞。研究发现一些tsRNAs同样对干细胞命运决定发挥着重要调控作用。我们前期发现,小鼠胚胎干细胞诱导胚状体(embryonic body, EB)形成过程中,转染几组特定种类的tsRNAs能够显著影响胚胎干细胞的分化倾向,其调控机制可能与tsRNAs介导的翻译抑制有关<sup>[33]</sup>。此外,研究还发现一些在小鼠胚胎干细胞分化过程中显著上调的5'tsRNAs可以在视黄酸(retinoic acid, RA)介导的细胞分化过程中优先与IGF2BP1结合,从而影响*c-Myc* mRNA与LGF2BP1的结合,降低*c-Myc*转录本的稳定性并抑制了其蛋白翻译,从而抑制mESCs的自我更新促进细胞分化<sup>[56]</sup>。值得注意的是,tsRNAs上的RNA修饰水平对tsRNAs调控干细胞命运决定发挥了重要作用。研究发现,敲除假尿嘧啶合成酶PUS7导致了5'-TOG-tsRNAs第8位核苷酸上的Ψ(Ψ8)水平下降,而5'-TOG-tsRNAs(Ψ8)的下调解除了tsRNAs对胚胎干细胞翻译起始抑制,促进了细胞内蛋白质的合成效率。这种翻译抑制的解除一方面引起了胚胎干细胞胚层分化的缺陷,另一方面引起了造血干细胞定向分化的异常,提示了RNA修饰酶对tsRNAs的生物学功能调控具有重要作用<sup>[59]</sup>。除了调控胚胎干细胞的分化能力外,tsRNAs也可调控成体干细胞的自我更新和分化过程。如tsRNA<sup>16902</sup>/tsRNA<sup>06018</sup>通过结合视黄酸受体γ(retinoic acid receptor γ, RARγ)或者斯钙素2(stanniocalcin 2, STC2)的3'UTR,导致RARγ/STC2蛋白水平下降,从而促进人类间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSCs)的成脂分化<sup>[76-77]</sup>。

#### 4.3 tsRNAs与免疫调控

tsRNAs在病毒感染、应激与炎症、免疫细胞通讯及自身免疫反应等过程中同样发挥着重要调控作用。我们前期发现,tsRNAs在脊椎动物血清中大量富集,并且随着机体炎症反应进程而发生显著改变<sup>[13]</sup>。在乙肝病毒感染的人类中,血清tsRNAs,如5'tsRNA<sup>Gly</sup>的水平在乙肝病毒复制期显著升高,而在



乙肝病毒静止期则表达显著下降<sup>[13]</sup>。同样,在许多应激暴露或者病毒感染的组织细胞中, tsRNAs的丰度也会发生明显改变。研究发现,慢性病毒性乙肝或丙肝患者肝组织中的5'tsRNA<sup>Gly</sup>和5'tsRNA<sup>Val</sup>表达相比于健康人显著增加<sup>[78]</sup>。自身免疫疾病如系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中存在大量差异表达的tsRNAs<sup>[79]</sup>,其中tsRNA<sup>Leu(TAA)</sup>(又称tsRNA-3009)在SLE的CD4<sup>+</sup> T细胞中高表达并与SLE疾病活性、红斑性肾炎以及血清IFN $\alpha$ 水平呈正相关<sup>[80]</sup>,而骨髓间充质细胞来源的tsRNA-21109可通过抑制M1巨噬细胞极化缓解SLE症状<sup>[81]</sup>。此外,免疫激活的T细胞可以促进含有tsRNAs的细胞外囊泡的分泌,从而抑制T细胞的激活和细胞因子的产生<sup>[82]</sup>,表明tsRNAs通过多种作用方式积极参与了机体免疫调控过程。

#### 4.4 tsRNAs与癌症

tsRNAs在癌症的发生、发展以及诊断和预后中扮演多种角色。如前所述,一些tsRNAs可以通过调控基因的表达促进癌细胞的增殖。例如,由ELAC2剪切pre-tRNA<sup>Ser(TGA)</sup>产生的tsRNA<sup>Ser(TGA)</sup>可以促进癌细胞的增殖;而抑制tsRNA<sup>Ser(TGA)</sup>的表达则会引起细胞DNA合成减少并使细胞停滞在细胞周期G<sub>2</sub>期,抑制癌细胞的增殖<sup>[83]</sup>。还有研究发现在前列腺癌和乳腺癌细胞系中敲除5'tsRNAs也可以显著抑制癌细胞的增殖<sup>[84]</sup>。相反,一些研究发现,某些tsRNAs也可以显著抑制癌细胞增殖。例如5'tsRNA<sup>Glu</sup>可以通过抑制乳腺癌抗雌激素抵抗蛋白3(breast cancer anti-estrogen resistance protein 3, *BCAR3*) mRNA的表达,阻碍卵巢癌细胞的增殖<sup>[85]</sup>。而tRNA<sup>Asp</sup>、tRNA<sup>Glu</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup>和tRNA<sup>Gly</sup>可与致癌基因转录本竞争结合YBX1从而抑制癌细胞增殖<sup>[57]</sup>。

tsRNAs还可通过不同的作用机制在癌症的转移中发挥作用。在低氧条件下,tsRNAs可以通过调控与上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关的*Claudin-1*的表达来抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭<sup>[86]</sup>。另外,tsRNAs还可通过抑制致癌信号通路来抑制癌细胞转移,如tsRNA<sup>Leu</sup>通过靶向JAG2抑制Notch信号通路,影响肿瘤干细胞的功能,进而抑制结肠癌的肿瘤形成的癌细胞的转移<sup>[87]</sup>;5'tsRNA<sup>Val</sup>可以通过靶向FZD3抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的活性,从而抑制乳腺癌

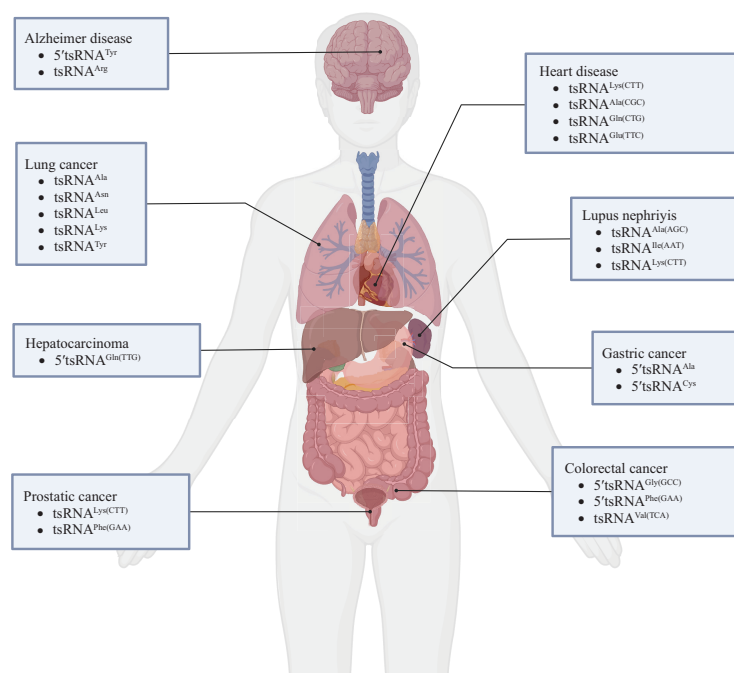
细胞的迁移和侵袭<sup>[88]</sup>。

## 5 tsRNAs及其RNA修饰作为疾病分子标志物

tsRNAs在多种疾病的发展和进展中发挥着重要作用,目前科研人员已发现一些tsRNAs可作为潜在标志物用于疾病例如心脏疾病<sup>[89]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[90]</sup>、狼疮性肾炎等<sup>[91]</sup>的早期诊断和疾病监测(图3)。同样在肿瘤中,时空特异性表达的tsRNAs也可以作为疾病早期诊断和预后的分子标志物提高肿瘤如肺癌、胃癌、结直肠癌、前列腺癌、肝癌等<sup>[92]</sup>诊断的效率并预测其发展(图3)。值得注意的是,tsRNAs广泛存在于哺乳动物的外周血、尿液、唾液、乳汁等体液中,有望作为一种非侵入性的分子标志物辅助评估疾病的发生、发展和预后。最近,我们发现血清中的19个tsRNAs可以作为临床诊断分子标志物从健康人中高效区分出急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者,并发现一些tsRNAs的表达与AML患者的预后密切相关<sup>[19]</sup>。有趣的是,我们还发现,人类外周血血清及骨髓上清中非编码小RNA的表达模式非常相似,这种表达模式相似性在AML患者中表现的更为一致,提示血清tsRNAs可能可以替代骨髓活检进行白血病的临床辅助诊断。此外,研究发现外周血单核细胞中tsRNAs、rsRNAs(rRNA derived small RNAs)以及ysRNAs(Y RNA derived small RNAs)可以组合为TRY-RNA来精确区分健康对照、肺癌患者和肺结核患者<sup>[93]</sup>。

此外,随着基于液相色谱与质谱联用(liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS/MS)高通量定量RNA修饰水平技术的开发, RNA修饰与疾病之间的关系也逐渐被揭示,例如,肺动脉高压的外周血中,7个RNA修饰(m<sup>1</sup>A、m<sup>1</sup>G、m<sup>2</sup>G、m<sup>5</sup>C、m<sup>5</sup>U、Am和Im)的组合可作为诊断的潜在标志物<sup>[94]</sup>。sncRNAs(包括tsRNAs)的相关修饰与阿尔茨海默病的发病和发展具有相关性<sup>[90]</sup>。近期,利用该技术我们发现人类精子RNA中多种RNA修饰在弱精症或畸形精子症患者的精子样本中发生显著改变且与精子的活力呈现出极强的线性相关,例如m<sup>1</sup>G、m<sup>5</sup>C、m<sup>2</sup>G和m<sup>1</sup>A等。其中,精子17~25 nt以及25~50 nt小RNA片段中也有多种RNA修饰水平在弱精症患者和畸形精子症患者中显著改变。实际上,tsRNAs及其RNA修饰水平对于机体环境应激和营养供应十分

The potential application of tsRNAs as the diagnostic biomarkers



tsRNAs作为疾病诊断标志物在各种癌症、阿尔茨海默病、心脏疾病和狼疮肾炎等疾病诊断中临床应用潜力。

The potential for clinical application of tsRNAs as biomarkers in the diagnosis of various cancers, Alzheimer's disease, heart disease, lupus nephritis and et al.

图3 tsRNAs作为疾病诊断生物标志物的潜在应用

Fig.3 The potential applications of tsRNAs as the diagnostic biomarkers

敏感, 如高脂饮食能够引起的小鼠精子小RNA表达谱以及RNA修饰谱的改变<sup>[24,32]</sup>, 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tRNAs上的RNA修饰水平改变与tsRNA生成及细胞内翻译控制密切相关<sup>[29]</sup>。

## 6 结论与展望

tsRNAs是一类富含多种RNA修饰的新型非编码小RNA, 可以在转录水平、转录后水平以及翻译水平等对基因的表达进行多维度时空调控, 在早期胚胎发育、干细胞命运决定、获得性遗传、免疫应答、病毒感染以及包括肿瘤在内的多种人类疾病发生、发展中发挥着不可忽视的重要调控作用。虽然近年来对tsRNAs的生物发生过程和细胞内调控机制研究已取得了许多重要进展, 但相比于miRNA及piRNA, 对tsRNA调控机制的研究仍处于早期阶段, 有许多关键科学问题尚未解答。例如, tsRNAs的生成调控机制是否有物种保守性? 不同种类和来源的tsRNAs在其分子调控机制上是否有共性? RNA修

饰如何参与tsRNAs的生成调控和分子功能调控? 如何在单碱基分辨率下同时解析不同组织细胞或者疾病状态下的tsRNAs的表达谱和修饰谱变化? 对这些问题的解答必将帮助我们更全面地理解tsRNAs的生物合成过程, 揭示tsRNAs在发育和疾病中的功能和作用机制, 进一步为推进tsRNAs在疾病诊断和治疗中的潜在应用提供理论基础和技术支持。

### ——致谢

感谢Biorender.com提供的科研绘图平台。

### 参考文献 (References)

- [1] HUANG S Q, SUN B, XIONG Z P, et al. The dysregulation of tRNAs and tRNA derivatives in cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 101.
- [2] WEK S A, ZHU S, WEK R C. The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(8): 4497-506.
- [3] HOPPER A K, SHAHEEN H H. A decade of surprises for tRNA

- nuclear-cytoplasmic dynamics [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(3): 98-104.
- [4] GREEN N J, GRUNDY F J, HENKIN T M. The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(2): 318-24.
  - [5] NUNES A, RIBEIRO D R, MARQUES M, et al. Emerging roles of tRNAs in RNA virus infections [J]. *Trends Biochem Sci*, 2020, 45(9): 794-805.
  - [6] HOLLEY R W, APGAR J, EVERETT G A, et al. Structure of a ribonucleic acid [J]. *Science*, 1965, 147(3664): 1462-5.
  - [7] KIM S H, QUIGLEY G J, SUDDATH F L, et al. Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain [J]. *Science*, 1973, 179(4070): 285-8.
  - [8] PHIZICKY E M, HOPPER A K. tRNA biology charges to the front [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(17): 1832-60.
  - [9] KIM H K, YEOM J H, KAY M A. Transfer RNA-derived small RNAs: another layer of gene regulation and novel targets for disease therapeutics [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(11): 2340-57.
  - [10] BOREK E, BALIGA B S, GEHRKE C W, et al. High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue [J]. *Cancer Res*, 1977, 37(9): 3362-6.
  - [11] SPEER J, GEHRKE C W, KUO K C, et al. tRNA breakdown products as markers for cancer [J]. *Cancer*, 1979, 44(6): 2120-3.
  - [12] PENG H, SHI J, ZHANG Y, et al. A novel class of tRNA-derived small RNAs extremely enriched in mature mouse sperm [J]. *Cell Res*, 2012, 22(11): 1609-12.
  - [13] ZHANG Y, ZHANG Y, SHI J, et al. Identification and characterization of an ancient class of small RNAs enriched in serum associating with active infection [J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(2): 172-4.
  - [14] ZHU L, GE J, LI T, et al. tRNA-derived fragments and tRNA halves: the new players in cancers [J]. *Cancer Lett*, 2019, 452: 31-7.
  - [15] LIU B, CAO J, WANG X, et al. Deciphering the tRNA-derived small RNAs: origin, development, and future [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 13(1): 24.
  - [16] SU Z, WILSON B, KUMAR P, et al. Noncanonical roles of tRNAs: tRNA fragments and beyond [J]. *Annu Rev Genet*, 2020, 54: 47-69.
  - [17] KIKUCHI Y, SASAKI N, ANDO-YAMAGAMI Y. Cleavage of tRNA within the mature tRNA sequence by the catalytic RNA of RNase P: implication for the formation of the primer tRNA fragment for reverse transcription in copia retrovirus-like particles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(20): 8105-9.
  - [18] HOLMES A D, CHAN P P, CHEN Q, et al. A standardized ontology for naming tRNA-derived RNAs based on molecular origin [J]. *Nat Methods*, 2023, 20(5): 627-8.
  - [19] XIA L, GUO H, WU X, et al. Human circulating small non-coding RNA signature as a non-invasive biomarker in clinical diagnosis of acute myeloid leukaemia [J]. *Theranostics*, 2023, 13(4): 1289-301.
  - [20] BOCCALETTO P, MACHNICKA M A, PURTA E, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D303-D7.
  - [21] SCHIMMEL P. The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(1): 45-58.
  - [22] CHEN Q, ZHANG X, SHI J, et al. Origins and evolving functionalities of tRNA-derived small RNAs [J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(10): 790-804.
  - [23] TUORTO F, LIEBERS R, MUSCH T, et al. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(9): 900-5.
  - [24] ZHANG Y, ZHANG X, SHI J, et al. Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(5): 535-40.
  - [25] SCHAEFER M, POLLEX T, HANNA K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(15): 1590-5.
  - [26] WANG X, MATUSZEK Z, HUANG Y, et al. Queuosine modification protects cognate tRNAs against ribonuclease cleavage [J]. *RNA*, 2018, 24(10): 1305-13.
  - [27] CHEN Z, QI M, SHEN B, et al. Transfer RNA demethylase ALKBH3 promotes cancer progression via induction of tRNA-derived small RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(5): 2533-45.
  - [28] GUO H, SHEN X, HU H, et al. Alteration of RNA modification signature in human sperm correlates with sperm motility [J]. *Mol Hum Reprod*, 2022, 28(9): gaac031.
  - [29] GUO H, XIA L, WANG W, et al. Hypoxia induces alterations in tRNA modifications involved in translational control [J]. *BMC Biol*, 2023, 21(1): 39.
  - [30] TUORTO F, LEGRAND C, CIRZI C, et al. Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation [J]. *EMBO J*, 2018, 37(18): e99777.
  - [31] MULLER M, HARTMANN M, SCHUSTER I, et al. Dynamic modulation of Dnmt2-dependent tRNA methylation by the micronutrient queuine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(22): 10952-62.
  - [32] CHEN Q, YAN M, CAO Z, et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder [J]. *Science*, 2016, 351(6271): 397-400.
  - [33] SHI J, ZHANG Y, TAN D, et al. PANDORA-seq expands the repertoire of regulatory small RNAs by overcoming RNA modifications [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(4): 424-36.
  - [34] SHI J, ZHOU T, CHEN Q. Exploring the expanding universe of small RNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(4): 415-23.
  - [35] SU D, CHAN C T, GU C, et al. Quantitative analysis of ribonucleoside modifications in tRNA by HPLC-coupled mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(4): 828-41.
  - [36] YUAN X, SU Y, ZHANG X, et al. MLC Seq: *De novo* sequencing of full-length tRNA isoforms by mass ladder complementation [J]. *bioRxiv*, 2021: doi: 2021.05.22.445286.
  - [37] LUCAS M C, PRYSZCZ L P, MEDINA R, et al. Quantitative analysis of tRNA abundance and modifications by nanopore RNA sequencing [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, doi: 10.1038/s41587-023-01743-6.
  - [38] LINDER B, GROZHIK A V, OLARERIN-GEORGE A O, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(8): 767-72.
  - [39] HUSSAIN S, SAJINI A A, BLANCO S, et al. N-Sun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its



- processing into regulatory small RNAs [J]. *Cell Rep*, 2013, 4(2): 255-61.
- [40] PANDOLFINI L, BARBIERI I, BANNISTER A J, et al. METTL1 promotes let-7 microRNA processing via m7G methylation [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(6): 1278-90.e9.
- [41] SCHWARTZ S, BERNSTEIN D A, MUMBACH M R, et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA [J]. *Cell*, 2014, 159(1): 148-62.
- [42] MARCHAND V, AYADI L, ERNST F G M, et al. Alk aniline-Seq: profiling of m<sup>7</sup>G and m<sup>3</sup>C RNA modifications at single nucleotide resolution [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(51): 16785-90.
- [43] LEGRAND C, TUORTO F, HARTMANN M, et al. Statistically robust methylation calling for whole-transcriptome bisulfite sequencing reveals distinct methylation patterns for mouse RNAs [J]. *Genome Res*, 2017, 27(9): 1589-96.
- [44] KHODDAMI V, YERRA A, MOSBRUGER T L, et al. Transcriptome-wide profiling of multiple RNA modifications simultaneously at single-base resolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(14): 6784-9.
- [45] INCARNATO D, ANSELM I, MORANDI E, et al. High-throughput single-base resolution mapping of RNA 2'-O-methylated residues [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(3): 1433-41.
- [46] ZHANG X, HE X, LIU C, et al. IL-4 Inhibits the biogenesis of an epigenetically suppressive PIWI-interacting RNA to upregulate CD1a molecules on monocytes/dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2016, 196(4): 1591-603.
- [47] CHEN L, XU W, LIU K, et al. 5' half of specific tRNAs feeds back to promote corresponding tRNA gene transcription in vertebrate embryos [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(47): eabh0494.
- [48] DI FAZIO A, SCHLACKOW M, PONG S K, et al. Dicer dependent tRNA derived small RNAs promote nascent RNA silencing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(3): 1734-52.
- [49] KUMAR P, ANAYA J, MUDUNURI S B, et al. Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets [J]. *BMC Biol*, 2014, 12: 78.
- [50] HAUSSECKER D, HUANG Y, LAU A, et al. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing [J]. *RNA*, 2010, 16(4): 673-95.
- [51] BURROUGHS A M, ANDO Y, DE HOON M J, et al. Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin [J]. *RNA Biol*, 2011, 8(1): 158-77.
- [52] HE L, HANNON G J. microRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522-31.
- [53] MAUTE R L, SCHNEIDER C, SUMAZIN P, et al. tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(4): 1404-9.
- [54] REN B, WANG X, DUAN J, et al. Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation [J]. *Science*, 2019, 365(6456): 919-22.
- [55] CHOI E J, REN J, ZHANG K, et al. The importance of AGO 1 and 4 in post-transcriptional gene regulatory function of tRF5-GluCTC, an respiratory syncytial virus-induced tRNA-derived RNA fragment [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8766.
- [56] KRISHNA S, YIM D G, LAKSHMANAN V, et al. Dynamic expression of tRNA-derived small RNAs define cellular states [J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(7): e47789.
- [57] GOODARZI H, LIU X, NGUYEN H C, et al. Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement [J]. *Cell*, 2015, 161(4): 790-802.
- [58] LYONS S M, GUDANIS D, COYNE S M, et al. Identification of functional tetramolecular RNA G-quadruplexes derived from transfer RNAs [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1127.
- [59] GUZZI N, CIESLA M, NGOC P C T, et al. Pseudouridylation of tRNA-derived fragments steers translational control in stem cells [J]. *Cell*, 2018, 173(5): 1204-16.e26.
- [60] LYONS S M, ACHORN C, KEDERSHA N L, et al. YB-1 regulates tRNA-induced stress granule formation but not translational repression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(14): 6949-60.
- [61] SHI J, ZHANG Y, ZHOU T, et al. tsRNAs: the swiss army knife for translational regulation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(3): 185-9.
- [62] BAKOWSKA-ZYWICKA K, KASPRZYK M, TWARDOWSKI T. tRNA-derived short RNAs bind to *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in a stress-dependent manner and inhibit protein synthesis *in vitro* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2016, 16(6): fow077.
- [63] MLECZKO A M, CELICHOWSKI P, BAKOWSKA-ZYWICKA K. Transfer RNA-derived fragments target and regulate ribosome-associated aminoacyl-transfer RNA synthetases [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2018, 1861(7): 647-56.
- [64] KIM H K, FUCHS G, WANG S, et al. A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis [J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 57-62.
- [65] LUO S, HE F, LUO J, et al. Drosophila tsRNAs preferentially suppress general translation machinery via antisense pairing and participate in cellular starvation response [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(10): 5250-68.
- [66] ZHANG Y, SHI J, CHEN Q. tsRNAs: new players in mammalian retrotransposon control [J]. *Cell Res*, 2017, 27(11): 1307-8.
- [67] SLOTKIN R K, MARTIENSSSEN R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(4): 272-85.
- [68] SCHORN A J, GUTBROD M J, LEBLANC C, et al. LTR-retrotransposon control by tRNA-derived small RNAs [J]. *Cell*, 2017, 170(1): 61-71.e11.
- [69] RUGGERO K, GUFFANTI A, CORRADIN A, et al. Small noncoding RNAs in cells transformed by human T-cell leukemia virus type 1: a role for a tRNA fragment as a primer for reverse transcriptase [J]. *J Virol*, 2014, 88(7): 3612-22.
- [70] YEUNG M L, BENNASSER Y, WATASHI K, et al. Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(19): 6575-86.
- [71] SHARMA U, CONINE C C, SHEA J M, et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals [J]. *Science*, 2016, 351(6271): 391-6.
- [72] CHEN Q, YAN W, DUAN E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(12): 733-43.
- [73] SARKER G, SUN W, ROSENKRANZ D, et al. Maternal over-

- nutrition programs hedonic and metabolic phenotypes across generations through sperm tsRNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(21): 10547-56.
- [74] GUO Y, BAI D, LIU W, et al. Altered sperm tsRNAs in aged male contribute to anxiety-like behavior in offspring [J]. *Aging Cell*, 2021, 20(9): e13466.
- [75] ZHANG Y, REN L, SUN X, et al. Angiogenin mediates paternal inflammation-induced metabolic disorders in offspring through sperm tsRNAs [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6673.
- [76] WANG T, MEI J, LI X, et al. A novel tsRNA-16902 regulating the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 365.
- [77] WANG T, CAO L, HE S, et al. Small RNA sequencing reveals a novel tsRNA-06018 playing an important role during adipogenic differentiation of hMSCs [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12736-49.
- [78] ZHU L, LI Z, YU X, et al. The tRNA-derived fragment 5026a inhibits the proliferation of gastric cancer cells by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 418.
- [79] XU H, CHEN W, ZHENG F, et al. The potential role of tRNAs and small RNAs derived from tRNAs in the occurrence and development of systemic lupus erythematosus [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(2): 561-7.
- [80] GENG G, WANG H, XIN W, et al. tRNA derived fragment (tRF)-3009 participates in modulation of IFN- $\alpha$ -induced CD4<sup>+</sup> T cell oxidative phosphorylation in lupus patients [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 305.
- [81] DOU R, ZHANG X, XU X, et al. Mesenchymal stem cell exosomal tsRNA-21109 alleviate systemic lupus erythematosus by inhibiting macrophage M1 polarization [J]. *Mol Immunol*, 2021, 139: 106-14.
- [82] CHIOU N T, KAGEYAMA R, ANSEL K M. Selective export into extracellular vesicles and function of tRNA fragments during T cell activation [J]. *Cell Rep*, 2018, 25(12): 3356-70.e4.
- [83] LEE Y S, SHIBATA Y, MALHOTRA A, et al. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs) [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(22): 2639-49.
- [84] HONDA S, LOHER P, SHIGEMATSU M, et al. Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(29): E3816-25.
- [85] ZHOU K, DIEBEL K W, HOLY J, et al. A tRNA fragment, tRF5-Glu, regulates BCAR3 expression and proliferation in ovarian cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95377-91.
- [86] LUAN N, CHEN Y, LI Q, et al. TRF-20-M0NK5Y93 suppresses the metastasis of colon cancer cells by impairing the epithelial-to-mesenchymal transition through targeting Claudin-1 [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(1): 124-42.
- [87] HUANG B, YANG H, CHENG X, et al. tRF/miR-1280 suppresses stem cell-like cells and metastasis in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(12): 3194-206.
- [88] MO D, JIANG P, YANG Y, et al. A tRNA fragment, 5'-tiRNA(Val), suppresses the Wnt/beta-catenin signaling pathway by targeting FZD3 in breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2019, 457: 60-73.
- [89] XU J, QIAN B, WANG F, et al. Global profile of tRNA-derived small RNAs in pathological cardiac hypertrophy plasma and identification of tRF-21-NB8PLML3E as a new hypertrophy marker [J]. *Diagnostics*, 2023, 13(12): 2065.
- [90] ZHANG X, TREBAK F, SOUZA L A C, et al. Small RNA modifications in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 145: 105058.
- [91] JIA Y, TAN W, ZHOU Y. Transfer RNA-derived small RNAs: potential applications as novel biomarkers for disease diagnosis and prognosis [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(17): 1092.
- [92] FU B F, XU C Y. Transfer RNA-derived small RNAs: novel regulators and biomarkers of cancers [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 843598.
- [93] GU W, SHI J, LIU H, et al. Peripheral blood non-canonical small non-coding RNAs as novel biomarkers in lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 159.
- [94] ZHANG L, LI Y, WANG J, et al. RNA modification signature of peripheral blood as a potential diagnostic marker for pulmonary hypertension [J]. *Hypertension*, 2022, 79(3): e67-e9.