

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00365

恒河猴 *piwil4* 基因的鉴定与表达分析

赵少志, 李玥, 江雪, 卢亦路, 陶大昌, 刘运强, 马用信

四川大学华西医院医学遗传研究室暨生物治疗国家重点实验室疾病基因组学研究室, 成都 610041

摘要: 为了研究人类近亲恒河猴中 PIWI 家族蛋白 PIWIL4 的结构和表达情况, 文章首次利用同源比对和 RT-PCR 方法克隆了恒河猴 *piwil4* 基因, 检测了其 mRNA 在恒河猴心脏、脑、结肠、附睾和睾丸 5 种组织中的表达情况, 利用生物信息学的方法对恒河猴 *piwil4* 基因和人的 *PIWIL4* (*HIWI2*) 基因编码的蛋白产物进行了同源性分析和结构域分析, 并进一步利用免疫组化的方法比较了 PIWIL4 蛋白在成人、成年恒河猴和性未成熟恒河猴睾丸组织中的表达分布。结果表明, 恒河猴 *piwil4* mRNA 在多组织中表达, 恒河猴和人的 PIWIL4 蛋白的氨基酸序列同源性达 97% 以上, 均含有 PAZ 和 Piwi 结构域, 它们在两物种成年个体睾丸组织中空间分布一致, 但在不同发育阶段恒河猴睾丸组织中的分布发生了改变, 幼猴中 PIWIL4 蛋白主要表达于生精小管细胞的细胞核, 在成年猴睾丸组织中则表达于各种细胞的胞浆中。上述结果提示, *piwil4* 基因在人类和恒河猴精子发生过程中作用类似, PIWIL4 蛋白在幼猴和成年猴睾丸组织中的表达差异提示它们在不同发育阶段功能的改变。

关键词: 恒河猴; PIWI 家族; *piwil4* 基因; 免疫组织化学

Identification and expression analysis of *Macaca mulatta piwil4* gene

ZHAO Shao-Zhi, LI Yue, JIANG Xue, LU Yi-Lu, TAO Da-Chang, LIU Yun-Qiang, MA Yong-Xin

Department of Medical Genetics and Division of Human Morbid Genomics, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: To investigate the structure and expression pattern of rhesus monkey PIWIL4 protein, homologous comparison and reverse transcription PCR (RT-PCR) were carried out to identify rhesus monkey *piwil4*. The expression of *piwil4* mRNA was tested in rhesus monkey heart, brain, colon, epididymis and testis, and the result showed that *piwil4* mRNA was expressed in these rhesus monkey tissues. Bioinformatic analysis suggested that the rhesus PIWIL4 protein shared 97% identity in amino acids and the same domains such as PAZ and Piwi with the human PIWIL4 (*HIWI2*) protein. The immunohistochemical result indicated that PIWIL4 proteins had the same localization in adult testes of the two species, but the distribution of these proteins was altered dynamically at different developmental stages in rhesus monkey testes. PIWIL4 protein was expressed in the nucleus of convoluted seminiferous tubules in infant monkey testes, whereas it was expressed in the cytoplasm of adult monkey testes. The results suggest that *piwil4* gene play a similar role in rhesus and human, and different localizations of PIWIL4 protein in infant monkey and adult monkey testes suggest that it functions differently at different developmental stages.

Keywords: rhesus monkey; PIWI family; *piwil4* gene; immunohistochemistry

收稿日期: 2010-08-16; 修回日期: 2010-11-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 90919006, 30770812, 31070676)资助

作者简介: 赵少志, 硕士研究生, 专业方向: 医学遗传学。Tel: 028-85164008; E-mail: teszsz@163.com

通讯作者: 马用信, 教授, 博士生导师, 研究方向: 医学遗传学。E-mail: mayongxin@gmail.com

精子发生是一个复杂而且严密受控的过程, 涉及细胞分裂、分化以及在生精小管微环境里各细胞之间的作用, 这其中涉及众多的基因在空间和时间上的差异分布和表达^[1]。Piwi家族就是这些基因中的成员^[2]。1997 年 Lin 等^[3]首先在果蝇卵巢中发现 *piwi* (P-element induced wimpy testis) 基因, 此后陆续在多种生物中发现 *piwi* 的同源基因^[4]。已有研究表明, Piwi 家族成员在各种生物中具有广泛保守性, 在生殖干细胞的自我更新和生精过程中有着不可或缺的作用, PIWI 家族蛋白的缺失或异常会导致生精障碍^[2], 因此 PIWI 家族蛋白的研究有助于加深对精子发生过程的了解。近年来, PIWI 家族蛋白及 PIWI 家族蛋白相关的一类小 RNA 即 piRNAs (Piwi-interacting RNAs) 在生精过程中的作用已引起越来越多的关注。piRNAs 是一类有别于 siRNA/miRNA 的新的 RNA, 它们的生成及功能与 PIWI 家族蛋白密切相关。一系列的研究显示, PIWI 家族蛋白及 piRNAs 在抑制转座子活性保护基因组及多种表观遗传学调控中发挥作用, 但是 piRNAs 具体的调控机制等关键问题尚无法阐明^[4]。

目前已从人类基因组中鉴定出 Piwi 家族的 4 个成员, *PIWIL1* (*HIWI*)、*PIWIL2* (*HILI*)、*PIWIL3*、*PIWIL4* (*HIWI2*)^[5,6]。Sugimot 等^[7]报道除了人 *PIWIL4* 在多种组织有广泛表达外, 其余 3 个成员主要在睾丸中表达, 通过体外细胞转染实验将上述 4 种蛋白均定位于核周。

关于 PIWI 家族蛋白在精子发生过程中的具体的作用机理现在尚不清楚, 研究对象主要为各种模式生物, 如果蝇、线虫, 以及脊椎动物中的斑马鱼和小鼠等^[2]。小鼠中 *PIWIL1* (*MIWI*)、*PIWIL2* (*MILI*) 和 *PIWIL4* (*MIWI2*) 分别与人的 *PIWIL1*、*PIWIL2* 和 *PIWIL4* 蛋白同源, 主要表达于生殖细胞中, 而目前没有报道小鼠 *PIWIL3* 的同源蛋白^[8,9]。小鼠实验证明 PIWI 家族成员之间存在相互作用, *PIWIL2* 可以引导 *PIWIL4* 的表达定位^[10,11]。人 *PIWIL4* 蛋白与小鼠 *PIWIL4* 蛋白在正常组织中定位的差异, 提示两者在人和小鼠中的功能有所不同。因此, 研究人类近亲恒河猴 *PIWIL4* 蛋白, 对揭示人 *PIWIL4* 蛋白的作用有极大的帮助。

恒河猴 (*Macaca mulatta*) 是目前研究较多的灵长类动物, 雄性在 4 岁左右达到性成熟。利用恒河猴

已开展了许多生殖生物学、生理学、药理毒理学等方面的研究工作, 在形态学、生理生化和代谢上与人类均非常接近, 遗传基因与人类也有近 98% 的同源性, 正因为恒河猴在生理特征和遗传背景上与人类相似, 因此相应的研究结果易推广于人类, 是生殖生物学基础研究及人类健康与疾病问题研究的理想动物模型^[12]。然而在恒河猴中, 尚没有相关 PIWI 家族蛋白的研究报道。

本实验利用同源分析和 RT-PCR 的方法首次克隆了恒河猴 *piwil4* 基因 (GenBank 登录号: HQ003930), 并对该基因进行了表达分析、生物信息学分析及免疫组化研究, 比较其与人 *PIWIL4* 基因的异同, 初步探讨该基因在恒河猴精子发生过程中可能的作用, 为恒河猴 Piwi 家族蛋白及相关 piRNAs 调控机制的研究奠定基础, 也为人类 PIWI 家族的功能研究提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 材料

性未成熟的幼猴睾丸组织取自 1 岁龄正常恒河猴, 成年猴睾丸组织及其心脏、脑、结肠、附睾等组织均取自 6 岁龄的正常恒河猴。成人正常睾丸组织取自意外死亡的 45 岁正常男性, 经捐赠家属同意并经过华西医院伦理委员会批准。冻存组织及石蜡包埋组织均为我室保存。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 提取及 cDNA 的获得

取冻存的组织约 30 mg, 液氮充分研磨; 加 Trizol (Invitrogen 公司) 1 mL, 然后参照 Trizol 说明书提取组织总 RNA, 最后用 RNase-free 的无菌水溶解得到的 RNA。过程中所用的枪尖、离心管、无菌水均经 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC, Sigma 公司) 处理。

逆转录体系遵循 RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas 公司) 说明书, 所需 RiboLock RNase Inhibitor 和 Random Hexamer Primer 购自 Fermentas 公司, 反应条件为 25 10 min; 42 1 h; 70 10 min, 获得睾丸组织的 cDNA。

1.2.2 恒河猴 *piwil4* 基因的克隆

以人的 *PIWIL4* (*HIWI2*) 序列比对恒河猴基因组

序列(<http://genome.ucsc.edu/>), 利用primer premier 5.0 引物设计软件, 保守区跨外显子设计引物P1~P6 (表1), 由华大基因和Invitrogen公司合成。以睾丸组织 cDNA为模板进行PCR, 体系参照TransTaq HiFi DNA Polymerase(北京全式金生物技术有限公司)说明书。应用降落PCR, 反应条件为94 预变性3 min; 94 变性30 s, 62 复性30 s, 此后每循环降低1 , 72 延伸30 s, 共15个循环; 然后再94 变性30 s, 52 复性30 s, 72 延伸30 s, 共20个循环。

PCR 产物序列经测序、同源比对、拼接获得一条完整序列, 登录至 GenBank。

1.2.3 恒河猴 PIWIL4 蛋白的生物信息学分析

利用 NCBI 在线工具 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)对恒河猴 PIWIL4 蛋白和人 PIWIL4 蛋白进行同源比对分析。

采用NCBI的Conserved domains 分别对恒河猴 PIWIL4 蛋白和人 PIWIL4 蛋白进行了结构域预测分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。

1.2.4 *piwil4* 基因在恒河猴 5 种组织中的表达情况分析

利用实时荧光定量PCR检测成年恒河猴睾丸、心、脑、结肠以及附睾5种组织中*piwil4* mRNA的表达情况进行分析。利用primer premier 5.0 引物设计软件设计引物序列 4r-F、4r-R(表1), 由Invitrogen公司合成。实时荧光定量PCR体系: 2×SsoFast Eca-Green Supermix(Bio-Rad公司)10 μL, 10 μmol/L引物 4r-F、4r-R各 0.7 μL, 模板 1 μL, 无菌水加至 20 μL。反应条件参照SsoFast EcaGreen Supermix说明书, 40个循环。循环结束后执行溶解曲线程序。通过溶解曲线判定PCR反应的特异性, 以β-actin (Invitrogen公司)为内参照, 采用相对定量法处理 数据。

1.2.5 免疫组化染色

石蜡包埋的组织切片, 烤片过夜, 梯度酒精脱蜡, 流水冲洗片刻, 蒸馏水洗 5 min。玻片浸入修复液(Tris 1.21 g, EDTA 0.41 g, 加水至 1 L, NaOH调节 pH=8.0), 微波修复, 依次 80 5 min, 60 5 min。自然冷却。蒸馏水洗 5 min, 后用PBS洗 2 次, 每次 5 min。PAP笔围组织划圈, 3% H₂O₂避光处理 15 min 阻断过氧化物酶活性。PBS洗 3 次, 每次 5 min。将稀释的(1:50, 1:100, 1:150)抗PIWIL4 抗体(Santa Cruz 公司)滴加于组织上, 4 过夜, 阴性对照组用PBS代替一抗稀释液。

此后分别按照 PV-9003 山羊超敏二步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)说明书步骤进行。DAB(DAB 染色试剂盒, 北京中杉金桥生物技术公司)显色, 苏木素复染 3 min, 分色 30 s, 自来水充分冲洗反蓝, 梯度脱水, 37 烘干, 加拿大树胶封片。

2 结果与分析

2.1 PIWIL4 蛋白的生物信息学分析

PCR 产物序列测序后经同源比对拼接获得恒河猴 *piwil4* 的完整 CDS 及部分 5' UTR 和 3' UTR 的序列片段(GenBank 登录号: HQ003930), 它的编码产物 PIWIL4 蛋白含 852 个氨基酸。通过对恒河猴 PIWIL4 蛋白和人 PIWIL4 蛋白进行的同源性分析显示, 这两种蛋白氨基酸数目相同, 序列相似性达 97%以上(图1A)。利用 NCBI 对恒河猴 PIWIL4 蛋白的保守结构域进行了分析, 含有 PAZ 和 Piwi 两个保守的结构域, 分别位于 270-386 和 394-835(图1B), 结构域的位置与人 PIWIL4 蛋白上 PAZ 和 Piwi 结构域的位置一致, 提示它们可能具有类似的功能。

表1 根据恒河猴 *piwil4* 基因的保守区域序列信息设计的跨外显子引物序列

序号	上游引物	引物序列(5' 3')	下游引物	引物序列(5' 3')	长度 bp
P1	4-1F	AGGCAGTTTCGCCGTCAC	4-1R	TCGTTTCGTTGAAATCCTGCT	268
P2	4-2F	GGGAACATGAGTGGAAGG	4-2R	GGACAACATTTTGGAGGATCT	660
P3	4-3F	CTGCCATCAAGTTCTCCCG	4-3R	AAACGAGCATTGGTGTTCCT	704
P4	4-4F	GACAACATCCAGAGGAACACC	4-4R	GCAGAATGCACATTACCAACT	400
P5	4-5F	ACCCCAAAATCATAAAAGTG	4-5R	AGCACGGTACACAATTATCC	524
P6	4-6F	TGGAGCACTCAACAAATGGT	4-6R	GGATTCTTCATCTACTGATGCC	583
P7	4r-F	GGAAATACCTTTGAAGTCCCTG	4r-R	GTTGAGTGCTCCAGTCATGAAA	196

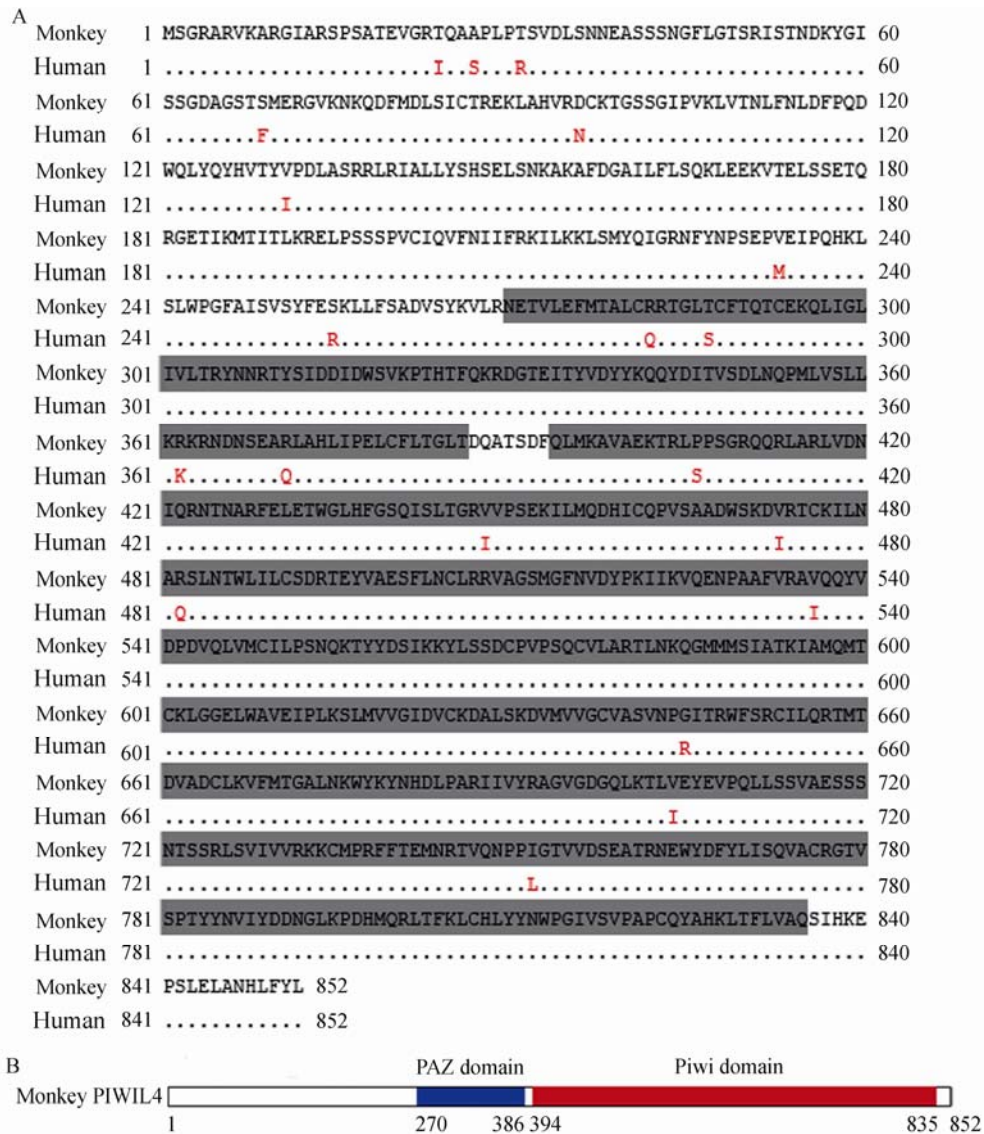


图 1 恒河猴 PIWIL4 蛋白序列的生物信息学分析

A: 恒河猴 PIWIL4 蛋白与人 PIWIL4 蛋白的同源性比对结果, Monkey 指恒河猴 PIWIL4 蛋白的氨基酸序列, Human 指人 PIWIL4 蛋白的氨基酸序列, 其中圆点表示中与恒河猴 PIWIL4 相同的氨基酸序列, 红色字母表示与恒河猴 PIWIL4 不同的氨基酸, 阴影区域表示预测的恒河猴蛋白序列上分别位于 270~386 的 PAZ 结构域和 394~835 的 Piwi 结构域; B: 预测的恒河猴 PIWIL4 蛋白保守结构域的示意图。

2.2 *piwil4* 基因在 5 种组织的表达情况

利用实时荧光定量 PCR 检测了 *piwil4* mRNA 在成年恒河猴睾丸、心、脑、结肠以及附睾 5 种正常组织中的表达情况, 结果显示, *piwil4* mRNA 在 5 种组织中均可见表达, 但是在心、脑、结肠和附睾中的表达量远低于睾丸组织(图 2)。

2.3 PIWIL4 蛋白在成人、成年恒河猴和幼年恒河猴睾丸组织中的免疫组化结果

对成人、成年恒河猴和幼年恒河猴睾丸组织进

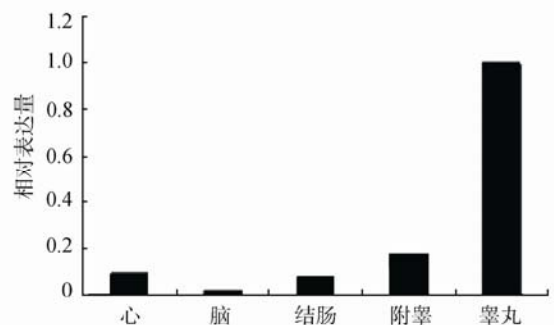


图 2 实时荧光定量分析 *piwil4* 基因在恒河猴 5 种组织中的表达情况

行的免疫组化分析显示, PIWIL4 蛋白在成人和成年猴睾丸组织中的表达模式相同, 均在胞浆中表达, 且广泛见于睾丸组织内的各类细胞(图 3A, B, a, b); 而在幼猴睾丸中, PIWIL4 蛋白表达量较少, 主要表达于生精小管细胞的细胞核及核周(图 3C, c)。PIWIL4 蛋白在不同发育阶段的表达分布差异提示它可能在不同阶段执行不同的功能。

3 讨论

PIWI家族蛋白在多种生物中存在, 包括果蝇、线虫、斑马鱼、小鼠和人等。该家族在进化过程中保守, 均含有中部的PAZ结构域和C端的Piwi结构域, PAZ结构域是小RNA结合区域, Piwi结构域有RNase活性, 与piRNAs的生成有密切关系, 是PIWI蛋白执行其功能的关键。piRNAs和PIWI蛋白家族在精子发生中的调节作用近来愈发受到重视, 成为近几年研究的热点领域。文献报道在常见的哺乳动物模型小鼠中PIWIL4 蛋白与人PIWIL4 蛋白同源, 但是小鼠PIWIL4 主要表达于正常生殖细胞的细胞核上^[11], 而人类PIWIL4 蛋白在各种组织中广泛存在^[7]。这些差异使得在人类PIWIL4 蛋白的相关研究中去寻找更相近的生物模型成为必要。

生物信息学分析结果表明, 恒河猴 PIWIL4 蛋白与人的 PIWIL4 蛋白序列高度同源, 均含有 PAZ 结构域和 Piwi 结构域, 提示两种蛋白具有相近的功能。实时定量分析中显示恒河猴 *piwil4* 除了在睾丸

组织中有较高表达外, 在多组织中有较低表达, 结合免疫组化结果, 两种蛋白均表达于睾丸组织细胞的胞浆中, 可见无论从蛋白结构、组织特异性还是亚细胞定位来看, 恒河猴 PIWIL4 蛋白和人 PIWIL4 蛋白都有一定的相似性。

免疫组化的结果中, 两者分别在睾丸组织内广泛表达于各类细胞的胞浆中, 这说明两种蛋白在睾丸中可能发挥着类似的作用。睾丸内部各种细胞并不孤立存在, 而是组成一个复杂的多细胞网络, 精子发生过程中有许多细胞的间接调控起到了重要作用, 已知的一个例子是, 间质细胞中Leydig细胞分泌睾酮, 而睾酮是生精过程中重要的调节因子, 支持细胞则可以通过在管腔维持适宜浓度的睾酮而为精子发生提供一个有利的微环境^[13]。这说明, 灵长类动物中PIWIL4 蛋白对生精作用的调控或许不局限于生殖细胞本身。它们在成人和成年恒河猴睾丸组织中调节体细胞生命活动, 可以间接地调控精子发生过程, 这种多层次的调控模式在多细胞生物中非常重要。该过程中还可能涉及了多个跨细胞的信息途径。此外, PIWIL4 在睾丸体细胞的生命活动中应该扮演着更重要角色。目前研究人员已经在果蝇生殖细胞附近的体细胞中分离出一类新的piRNAs^[14]。这些说明PIWI家族蛋白及piRNAs的作用并不仅限于生精过程的调控, 在体细胞中也可能存在一些类似机制, 而原以为生殖细胞特异的作用和机制可能更加重要和广泛。

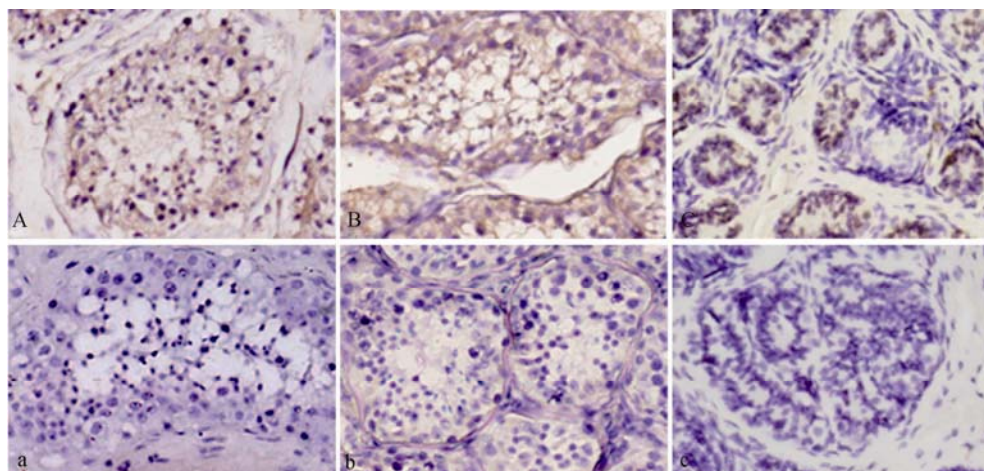


图3 PIWIL4 蛋白的免疫组化

A、B、C 分别为成人睾丸组织、成年猴睾丸组织和幼猴睾丸组织中 PIWIL4 蛋白的表达分布情况, a、b、c 分别为成人睾丸组织、成年猴睾丸组织和幼猴睾丸组织的阴性对照, DAB 显色, $\times 320$ 。

幼猴睾丸组织生精小管中主要以精原干细胞为主,成年猴中则以分化的各时期生精细胞为主^[15,16]。免疫组化结果显示,PIWIL4 蛋白在幼猴睾丸组织中主要在生精小管细胞的核及核周表达,而在成年猴睾丸组织中,PIWIL4 广泛表达于各类细胞的胞浆。PIWI 家族蛋白在精子发生的不同阶段有不同的区域定位,此现象也在其他 PIWI 家族成员中存在。斑马鱼原始生殖细胞中,PIWIL2 蛋白(即 ZILI)由在细胞核上表达渐变在胞浆中表达^[17,18],小鼠中,PIWIL2 蛋白表达于精原细胞的细胞核,在精母细胞中则为胞质^[19]。PIWI 家族蛋白不仅在多个水平上调控基因的表达,还可通过表观遗传的方式抑制转座子活性,维持种系 DNA 的稳定^[20,21]。它们定位的变化揭示在不同阶段 PIWI 家族蛋白和 piRNAs 可能执行了不同的功能,幼年恒河猴中 PIWIL4 蛋白的核定位说明在生殖干细胞中 DNA 稳定的维持或许更为重要。

本实验初步研究了恒河猴 Piwi 家族中的成员 *piwil4*, 为恒河猴整个 Piwi 家族的研究奠定了良好的基础。作为人类的近亲,恒河猴的相关研究成果更易推广于人类,因此,恒河猴 Piwi 家族成员的研究也将有助于人类 Piwi 家族相关研究进一步展开。

参考文献(References):

- [1] Sikarwar AP, Rambabu MK, Reddy KVR. Differential regulation of gene expression in mouse spermatogonial cells after blocking c-kit-SCF interaction with RNAi. *J RNAi Gene Silencing*, 2008, 4(1): 302–311. [\[DOI\]](#)
- [2] Thomson T, Lin HF. The biogenesis and function PIWI proteins and piRNAs: Progress and prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25(1): 355–376. [\[DOI\]](#)
- [3] Lin H, Spradling AC. A novel group of *pumilio* mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 1997, 124(12): 2463–2476. [\[DOI\]](#)
- [4] Seto AG, Kingston RE, Lau NC. The coming of age for Piwi proteins. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 603–609. [\[DOI\]](#)
- [5] Qiao D, Zeeman AM, Deng W, Looijenga LH, Lin HF. Molecular characterization of *hiwi*, a human member of the *piwi* gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene*, 2002, 21(25): 3988–3999. [\[DOI\]](#)
- [6] Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 2003, 82(3): 323–330. [\[DOI\]](#)
- [7] Sugimoto K, Kage H, Aki N, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. The induction of H3K9 methylation by PIWIL4 at the *p16^{Ink4a}* locus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(3): 497–502. [\[DOI\]](#)
- [8] Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Yomogida K, Kuroiwa A, Tadokoro Y, Fujita Y, Sato M, Matsuda Y, Nakano T. Two mouse *piwi*-related genes: *miwi* and *mili*. *Mech Dev*, 2001, 108(1–2): 121–133. [\[DOI\]](#)
- [9] Carmell MA, Girard A, van de Kant HJG, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell*, 2007, 12(4): 503–514. [\[DOI\]](#)
- [10] Samji T. PIWI, piRNAs, and germline stem cells: what's the link? *Yale J Biol Med*, 2009, 82(3): 121–124. [\[DOI\]](#)
- [11] Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell*, 2008, 31(6): 785–799. [\[DOI\]](#)
- [12] 王训立, 谢金东. 恒河猴在生殖生物学中的应用进展. *中国实验动物学报*, 2008, 16(4): 313–316. [\[DOI\]](#)
- [13] 胡火珍. 干细胞生物学. 成都: 四川大学出版社, 2005, 176–185. [\[DOI\]](#)
- [14] Reynolds SH, Ruohola-Baker H. PIWI goes solo in the soma. *Dev Cell*, 2009, 16(5): 627–628. [\[DOI\]](#)
- [15] 贾书花, 王炯, 安炜欣, 王谊荣, 田云, 李凯平, 李建伟. 不同阶段生精小管组织学结构研究. *解剖学研究*, 2010, 32(2): 117–120. [\[DOI\]](#)
- [16] Gartner LP, Hiatt JL 著, 史小林, 翁静, 梁元晶主译. 组织学彩色图谱. 北京: 化学工业出版社, 2008, 367–379. [\[DOI\]](#)
- [17] Houwing S, Berezikov E, Ketting RF. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J*, 2008, 27(20): 2702–2711. [\[DOI\]](#)
- [18] Sun HQ, Li D, Chen S, Liu YY, Liao XL, Deng WQ, Li N, Zeng M, Tao DC, Ma YX. Zili inhibits transforming growth factor- β signaling by interacting with Smad4. *J Biol Chem*, 2010, 285(6): 4243–4250. [\[DOI\]](#)
- [19] Lee JH, Schütte D, Wulf G, Füzesi L, Radzun HJ, Schwyer S, Engel W, Nayernia K. Stem-cell protein Piwi2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(2): 201–211. [\[DOI\]](#)
- [20] 黄文强, 邢万金. piRNA 的生物学功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(9): 783–788. [\[DOI\]](#)
- [21] 谢兆辉. 小RNAs作用机制的研究进展. *遗传*, 2009, 31(12): 1205–1213. [\[DOI\]](#)