

Dicer 调节生殖功能的研究进展

符梅¹, 徐克惠², 许文明²

1. 成都中医药大学, 成都 611137

2. 四川大学华西第二医院, 四川大学 - 香港中文大学生殖医学联合实验室, 教育部出生缺陷与相关妇儿疾病重点实验室, 成都 610041;

摘要: *Dicer* 是微小非编码 RNA 生成的关键内切酶, 介导微小 RNA(micro RNA, miRNA)和小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)的产生, 通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)途径实现转录或转录后水平基因调控, 在调节细胞增殖、分化、凋亡等方面起重要作用。近年来 *Dicer* 基因在生殖领域的研究越来越受关注, 最近的研究表明 *Dicer* 与男性生精细胞发育、精子形成及成熟、精子活力和形态生成、卵泡发育、排卵及黄体形成、性激素合成、输卵管功能、子宫内膜容受性等方面都有密切关系。繁衍后代需要精子和卵子的共同参与, *Dicer* 可能通过影响精子和卵子的数量或者质量进而导致胚胎发育异常, 因此理解 *Dicer* 在雄性与雌性生殖的重要调节作用对于理解生殖调节异常相关的疾病如无精子症、复发性流产等的发病机制具有重要的作用。本文对 *Dicer* 在雄性生殖道与雌性生殖中的关键作用进行了综述, 旨在进一步从分子层面深入理解 *Dicer* 与生殖相关疾病的关系。

关键词: miRNA; *Dicer*; 精子生成; 卵母细胞; 胚胎发育; 基因多态性

Research advances of *Dicer* in regulating reproductive function

Mei Fu², Kehui Xu¹, Wenming Xu¹

1. Joint Laboratory for Reproductive Medicine, SCU-CUHK; Key Laboratory of Obstetric & Gynecologic and Pediatric Diseases and Birth Defects, Ministry of Education, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: *Dicer*, an RNase III endonuclease, is critical for the biogenesis of small noncoding RNAs (microRNAs), including the biogenesis of microRNAs and small interfering RNAs, which transcriptionally and post-transcriptionally regulate mRNA expression through binding to target mRNA and leading to subsequent mRNA degradation. Recent studies show that *Dicer* plays important roles in cell proliferation, differentiation and apoptosis. It has been attracted more and more attention in the reproductive field. In the male reproduction field, mouse model shows that *Dicer* is critical for the development of spermatogenic cell, sperm maturation, sperm motility and morphology. On the other hand, *Dicer* is broadly in-

收稿日期: 2016-01-24; 修回日期: 2016-02-23

基金项目: 国家重点基础研究计划(973 计划)(编号: 2012CB944903)和新世纪人才计划项目(编号: NCET-12-0382)资助[Supported by the National Basic Research Program of China (No. 2012CB944903) and the Program for New Century Excellent Talents in University of Ministry of Education(No. NCET-12-0382)]

作者简介: 符梅, 硕士研究生, 专业方向: 妇产科学。E-mail: 497783767@qq.com

通讯作者: 许文明, 副研究员, 博士生导师, 研究方向: 生殖生物学与生殖医学。Email: xuwenming1973@163.com

DOI: 10.16288/j.yczz.16-042

网络出版时间: 2016/5/16 14:36:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160516.1436.001.html>

1、2 单位为共同第一单位。

volved in not only follicular development, ovulation, luteinization, sex hormone synthesis, but also regulating the functions of the fallopian tube, endometrial receptivity in female reproduction. Since sperm and egg are the only two types of gametes for producing offspring, *Dicer* dysregulation may be the underlying cause of compromised embryo development through affecting the quantity or quality of sperm and eggs. Therefore, understanding the function of *Dicer* in reproduction of female and male is of great significance to study the pathogenetic mechanism related to dysfunctional reproduction, such as azoospermia and recurrent spontaneous abortion. We review the pivotal roles of *Dicer* in the male and female reproduction field in order to understand the relationship between *Dicer* and related disease.

Keywords: miRNA; *Dicer*; spermatogenesis; oocyte; embryonic development; genetic polymorphism

Dicer 是微小非编码 RNA 生成的关键内切酶,它不仅参与小非编码 RNA(如 miRNA 和 siRNA)的产生,还参与染色体结构重装、DNA 降解、甲基化等^[1]。*Dicer* 基因或者蛋白水平的微小变化能引起病理现象的发生,如 Hill 等^[2]对 11 个肺胸膜母细胞瘤家系进行基因突变检测,发现所有家系均存在 *Dicer1* 基因的突变,只有 1 个家系为错义突变(L1583R),导致蛋白从非极化变为极化,其中 10 个家系为无义突变,使蛋白质翻译提前终止,从而造成肿瘤细胞中 *Dicer* 表达缺失。Foulkes 等^[3]也讨论了 *Dicer* 变异与家族性肾囊肿、卵巢性索间质细胞瘤、横纹肌肉瘤、支持细胞肿瘤、肾母细胞瘤等相关,证明其在多种疾病发生中有重要作用。

Dicer 于 2000 年被发现,在多种原核生物和几乎所有真核生物都有表达。除细菌和古菌外,*Dicer* 家族在动物、植物、真菌等不同种属中的分类是多样化的。随着生物的不断进化,在动物中发现有 *Dicer*-1 和 *Dicer*-2 两种亚型,植物中的 *Dicer*-like(DCL)分为至少 4 种亚型,包括 DCL-1、DCL-2、DCL-3 和 DCL-4,而人类目前只发现有 *Dicer1* 的表达^[4]。已往的研究已经证明 *Dicer* 与 miRNA 和 siRNA 复杂的调控机制在肿瘤的发生发展过程中具有重要意义。但近年来,

Dicer 在生殖领域的研究越来越受关注,通过建立的一些 *Dicer* 小鼠敲除模型已证实,*Dicer* 对男性和女性的生殖功能,以及胚胎发育、胎盘功能、神经形成等方面起重要调节作用^[5-9]。本文对 *Dicer* 的结构、作用机制,以及在生殖方面的影响进行了综述,旨在为阐述 *Dicer* 调节生殖功能的机制和将来靶向治疗生殖功能相关疾病提供参考。

1 *Dicer* 基因结构及作用机制

1.1 *Dicer* 基因结构

人类 *Dicer* 基因(*Dicer1*)定位于 14q32.13,有 27 个外显子,编码 1922 种氨基酸^[3]。*Dicer* 蛋白是一个相对分子质量约 200 kDa 的多结构域蛋白质,包括 1 个 RNA 解旋酶结构域(DEXHc)、1 个含结合双链 RNA(Double-stranded RNA, dsRNA)折叠的 DUF283、1 个 PAZ 结构域、2 个 RNase III 结构域(RNase III a 和 RNase III b)和 1 个 dsRNA 结合结构(dsRBD)。PAZ 和 dsRBD 结构域是 *Dicer* 与 miRNA 前体(Precursor-microRNAs, pre-miRNA)、dsRNA 相互作用的关键位点,能促使 pre-miRNA 或者 dsRNA 在 RNase III 结构域的催化活性下与 3'端的突出结构和 5'端的游离磷酸根结合,从而决定 *Dicer* 剪切的微小 RNA 的大小^[10]。*Dicer* 结构如图 1 所示。



图 1 *Dicer* 基因结构示意图

Fig. 1 The structure of *Dicer* gene

各结构域的功能如下: DEXHc domain 负责 dsRNA 的解螺旋作用和区分 miRNA 底物与 siRNA 底物并能与 pre-miRNA 的环状结构结合; DUF283(Domain of unknown function 283) domain 的确切功能尚不清楚,可能与剪切活性有关; PAZ(Piwi-Argonaute-Zwille) domain 负责 siRNA 和 miRNA 前体的识别和结合; RNase III (RNase III a 和 RNase III b) domain 作为活性中心,负责剪切 dsRNA; dsRBD(dsRNA-binding domain) domain 辅助 *Dicer* 完成对底物的识别和结合。

1.2 依赖 Dicer 的 microRNAs(miRNA)生成途径的经典作用机制

Dicer 是 RNase III 家族成员,为 miRNA 和 small interfering RNAs(siRNA)合成的关键分子,并介导逆转录降解。在细胞核内转录形成的 pri-miRNA 在 Drosha 等 RNase 的作用下,剪切为 60~70 nt 具有茎环结构的 pre-miRNA。然后经偶联有辅助因子 GTP 的 Exportin5(输出蛋白)转移到细胞质,在胞浆中 pre-miRNA 在 Dicer 酶的作用下被剪切成具有 5'端磷酸基和 3'端 2 nt 突出的长度为 21~25 nt 的双链 miRNA (图 2A)。Dicer 在细胞质中促进 miRNA 组装形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA silencing complex, RISC), RISC 由 Dicer 酶、Argonaute(Ago)蛋白、miRNA 及其他辅助蛋白装配而成,miRNA 通过其 5'端的种子序列与靶 mRNA 3'端非翻译区(3-UTR)序列互补配对,也可以通过识别靶 mRNA 的开放阅读框,将与它们结合的 Ago 蛋白定位到 miRNA 的靶 mRNA 上,使靶 mRNA 基因沉默或翻译抑制^[11]。

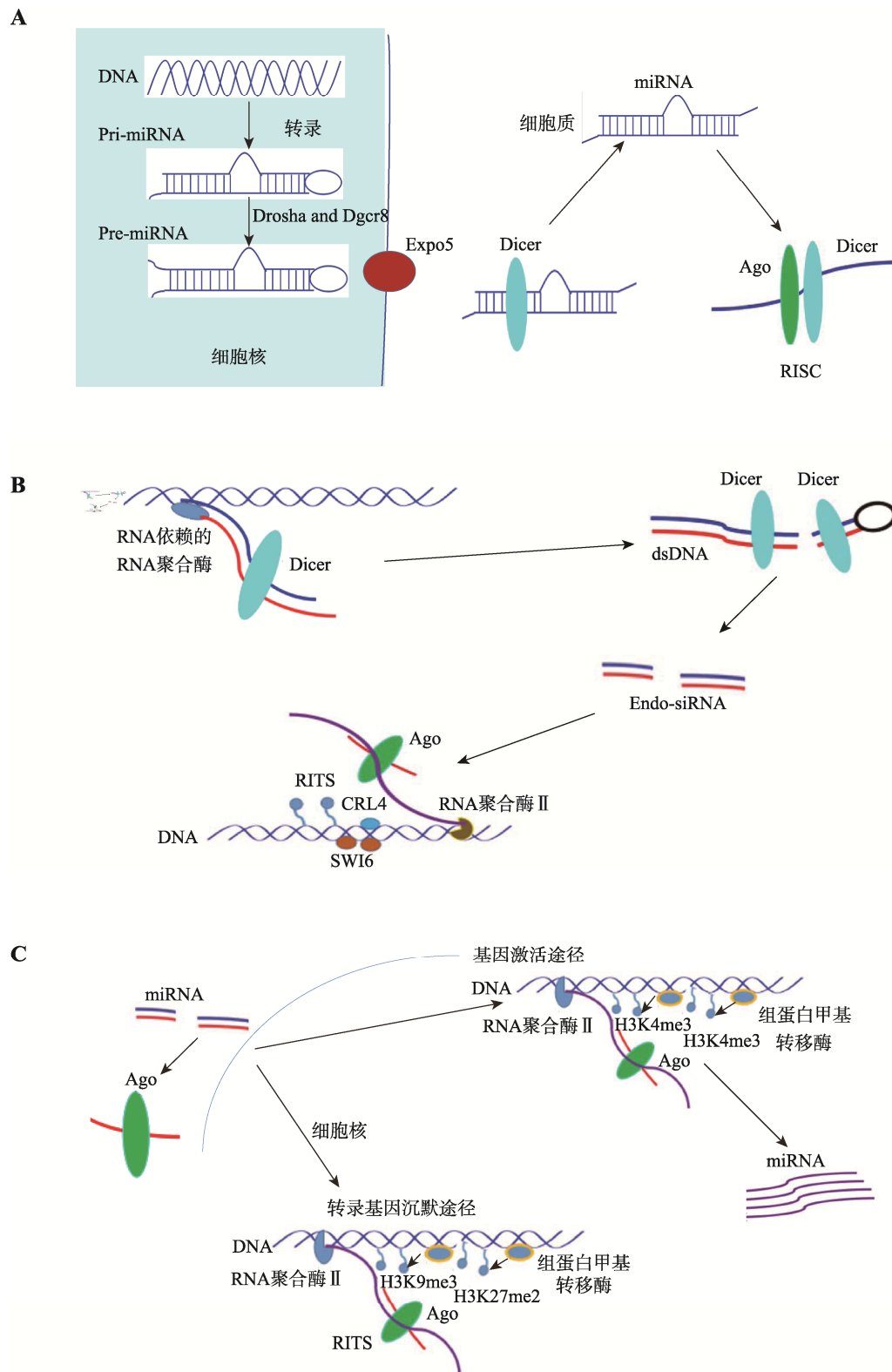
1.3 Dicer 非经典的核内作用机制

近来研究报道细胞核内的 RNA 干扰(RNA interfere, RNAi)途径对于保持基因的完整性、基因剪接、DNA 修复至关重要^[12,13]。Dicer 除了参与 miRNA 的成熟,还能剪切产生内源性 siRNA 和病毒 siRNA^[13,14]。在裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中,dsRNA 在细胞核内由 Dicer 加工成小片段 siRNA,单链 siRNA 可以绑定 Ago1 组装成转录沉默复合物(RNA-induced transcriptional silencing complex, RITS),RITS 结合转录中的 mRNA,并与组蛋白甲基转移酶(Cryptic loci regulator 4, CLR4)相互作用,使得染色质转录抑制的标记分子(Histone H3Lys9 methylation, H3K9me)形成,H3K9me 同时募集异染色质蛋白-1(SWI6),RITS 与 H3K9me 结合,联合 Dicer 和 CLR4 共同导致转录终止(图2B)。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,核内 Dicer 切割成的内源性 siRNA 参与 DNA 甲基化,通过 RITS 与 DNA 甲基转移酶直接相互作用,使得核染色质内具有抑制效应的 5-甲基胞嘧啶形成,促进异染色质形成和转录沉默。同时,细胞质中依赖 Dicer 成熟的 miRNA 也能参与基因沉默,成熟 miRNA 绑定 Ago 蛋白后穿

梭入细胞核内,结合新生转录子,经转录抑制因子 H3K9me3 和 H3K27me2 (Histone H3Lys27 methylation)途径介导基因沉默,经转录激活因子 H3K4me3 (histone H3Lys4 methylation)途径促进转录(图 2C)^[12]。Dicer 剪切形成的 siRNA 还能参与降解重复转座子,抑制 SINE/ALU 等转座子激活,降解基因和细胞毒性,此外还与 DNA 损伤有关^[13]。Kaneko 等^[15]研究显示 Dicer 与逆转录降解有关,Dicer 表达的下调导致 ALU 序列在人色素上皮细胞累积,并且能在体外水平降解 dsRNA。在线虫(*Caenorhabditis. Elegans*)中发现 Dicer 可以介导 DNA 的降解和后续的细胞凋亡^[16]。

2 Dicer 与男性生殖功能

精子形成包括有丝分裂、减数分裂、精子细胞成熟 3 个阶段。研究表明大量的 miRNA 和 siRNA 存在于精子细胞中,参与精子的发生及成熟,而 Dicer 是 miRNA 和 siRNA 合成的关键酶。Dicer 基因在维持染色体正常排列、纺锤体完整性、完成减数分裂,以及控制非整倍体发生方面发挥重要作用^[17]。多项关于 Dicer 敲除小鼠模型的研究报道显示 Dicer 与精原细胞增殖、分化、精母细胞减数分裂、精子成熟、精子形态形成及活力有关^[5,18~22]。Romero 等^[18]利用 *Ddx4-Dicer-ck* 条件性敲除雄性小鼠生殖细胞 *Dicer1*,敲除小鼠在精母细胞减数分裂粗线期出现生殖细胞脱落、支持细胞细胞质膨胀、精母细胞阻滞在第一次减数分裂粗线期、凋亡细胞增加 2.5 倍等表型。而且其附睾管内生精细胞分布紊乱,与对照组相比,精母细胞数量减少 99%,单倍体细胞数量减少 30%,4 倍体细胞增加 2.5 倍,管腔内缺乏通过减数分裂的精细胞和成熟精子,部分曲精小管管腔出现空泡化现象,曲细精管数量减少,睾丸重量减少 50%。该研究还发现 *Dicer1* 突变小鼠转座子基因 SINE 的表达量上调,但与精母细胞存活和精子生成的关系有待进一步研究。而在 *Ngn3-Dicer1-ck* 敲除小鼠模型^[19]的研究中,却没有发现 ALU/SINE 转座子的改变,但发现着丝点区大量重复转录,曲细精管里的精原细胞染色体联会正常,分化未受影响,该研究表明 Dicer 基因敲除后主要缺陷表现为单倍体精子细胞数量减少。*Ddx4-Dicer-ck* 敲除小鼠模型^[20]

图 2 *Dicer* 作用机制**Fig. 2 Mechanisms of *Dicer* action**

A: *Dicer* 介导的 miRNA 经典途径的 RNAi 机制; B: 裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)中 *Dicer* 介导转录基因沉默机制; C: 依赖 *Dicer* 成熟的 miRNA 由细胞质穿梭入核内介导基因沉默和激活。

研究进一步表明, *Dicer* 影响减数分裂和减数分裂后精子成熟, 导致少精、无精最终不育, 其表型为雄性条件性敲除小鼠精子细胞顶体不连续和不对称^[19,20], 染色质固缩功能缺陷和空泡形成, 导致精子形态异常(包括镰刀状、中间型、细长型等头部畸形)和精子活力异常^[5,20]。*Dicer* 敲除后, 与凋亡相关的基因 *Bax*、*Apaf1*、*CytC*、*Casp7* 表达上调, 细胞减数分裂阻滞和凋亡增加, 最终影响了精子生成。利用 *TNAP-Dicer-ck* 的小鼠模型在原始生殖细胞敲除 *Dicer* 后, 小鼠睾丸原始生殖细胞和精原细胞早期增殖及分化受限, 原始生精细胞因增殖障碍引起数量减少而非凋亡增加, 精子生成障碍^[21]。从 miRNA 表达水平来看, 原始生殖细胞中的 let-7 家族(抑制肿瘤细胞增殖, 促进细胞分化)表达上调。*Stra8-Dicer-ck* 小鼠除了成熟精子数量、精子形态异常外, 还发现 X 染色体连锁的基因有 44.3% 过表达, 而 Y 染色体连锁的基因 77.8% 过表达, 性连锁基因的过表达导致减数分裂的染色体联会失败, 大多数生殖细胞减数分裂受阻, 停滞在细线期和偶线期, 少部分在粗线期、双线期、分裂中期停滞^[22]。Bonache 等^[23]研究人精子生成障碍与 *Dicer* 基因表达的相关性, 对非梗阻性严重少精、无精, 唯支持细胞综合症患者睾丸生精细胞减数分裂前基因表达的检测发现 *Dicer* 基因表达降低, 而细胞的增殖和凋亡基因表达没有变化。精子生成的不同阶段敲除 *Dicer* 产生的表型不同, 精原细胞阶段敲除 *Dicer* 较精母细胞阶段影响更大, 认为 *Dicer* 对精子生成过程呈连续和累积效应^[24]。

睾丸中支持细胞具有支撑和给生殖细胞提供营养, 分泌雄激素和细胞因子, 具有促进精子形成的作用。*Dicer* 在支持细胞发育、存活以及维持生精功能具有关键作用^[25,26], 睾丸支持细胞 *Dicer* 敲除后出现生精障碍和睾丸萎缩致不育, 敲除 *Dicer* 后, 支持细胞特异表达的 miR-125a-3p、miR-872 和 miR-24 下调, 蛋白表达受到影响, 尤其是 SOD-1 蛋白(超氧化物歧化酶)表达上调明显, 其过量表达会通过增强氧化应激反应引起细胞凋亡^[27]。精子分化过程中除了有丝分裂和减数分裂精细调控, 支持细胞与生精细胞间的细胞连接作用也很关键, 细胞连接参与血睾屏障、使生精细胞在生精上皮定位并逐渐向生精小管管腔移动。Hanna 等^[28]用 *Ngn3-Dic-*

er1-ck 模型证实, 睾丸 *Dicer* 特异敲除后, 细胞连接解体, 导致未成熟精子释放, 是生精细胞分化异常的原因之一。同时 *Dicer1* 可能通过调节粘连蛋白相关基因(*Cldn5*)来调节细胞连接的形成和功能^[28]。

Dicer 除了对睾丸发育及生精功能的影响, 同时也参与附睾、前列腺、精囊等器官的发育^[14]。附睾分泌各种蛋白、脂质、细胞因子等促进精子的成熟, 其结构包括起始段、头部、体部、尾部 4 部分。*Defb-Dicer-ck* 模型^[29]敲除小鼠附睾起始段和附睾头部 *Dicer* 基因后, 附睾头及起始段柱状上皮细胞萎缩, 细胞分化功能退化, 平滑肌细胞增殖较对照组明显, 上皮细胞增殖能力加强但同时伴随凋亡增多。该研究发现雌激素受体基因(*ESR1*)表达上调, 雄激素受体基因(*AR*)表达下调, 两者比例失调也促使附睾上皮分化障碍, 小鼠的精子成熟数量减少, 共同导致不育。精子细胞膜的完整性是精子成熟、精子获能、发生顶体反应、并与卵母细胞结合的关键, Bjorkgren 等^[30]利用 *Defb-Dicer-ck* 模型进一步研究表明, 附睾 *Dicer* 缺乏将会出现精子颈部和顶体区细胞膜破坏, 同时精子细胞膜内不饱和脂肪酸(PUFAS)降低, 胆固醇合成酶相关基因表达上调, 胆固醇含量升高 1.7 倍, 胆固醇:PUFAS 比例增加, 导致细胞膜稳定性降低从而影响精子活力, 影响男性生育。不同 *Dicer* 基因敲除模型结果如表 1 所示。

3 *Dicer* 与女性生殖功能的调节

miRNA 仅占人类基因组的 1%~3%, 但可调节人类 60% 的基因表达^[31]。miRNA 和 siRNA 广泛分布于卵巢、子宫、输卵管等器官, miRNA 在女性生殖卵泡发育不同周期, 其表达存在时序、空间特异性。miRNA 和 siRNA 成熟的关键分子 *Dicer* 与女性生殖密不可分, 参与卵泡发育, 卵子成熟、合成性激素、促进子宫内膜蜕膜化、调节输卵管运动等方面的调节^[17]。*Dicer* 在 RNAi 通路中起重要作用, 调节转录水平基因重组和基因表达, Murchison 等^[6]报道 *ZP3-Dicer-ck* 基因敲除的卵母细胞基因 3'-UTRs 的转录重复序列增多, mRNA 转录增加, 影响纺锤体形成和染色体联会, 90% 卵母细胞不能完成第一次减数分裂。卵母细胞中 miR-30、miR-16、let-7 表达上调, 这些 miRNAs 被认为参与细胞减数分裂过

表 1 条件敲除 *Dicer* 的小鼠模型及对男性生殖功能的影响

Table 1 Phenotypes of different conditional *Dicer* knock-out mouse models in the male reproductive tract

小鼠模型	细胞类型	主要表现	参考文献
<i>Dicer-Ddx4-ck</i>	生殖细胞	生精细胞凋亡, 数量减少、减数分裂缺陷	[18, 20]
<i>Dicer-Ngn3-ck</i>	精原细胞	精子生成障碍、减数分裂受阻, 单倍体精子数量减少	[19]
<i>Dicer-TNAP-ck</i>	原始生殖细胞	原始生殖细胞增殖障碍	[21]
<i>Dicer-Stra8-cK</i>	生殖细胞	染色体联会, 减数分裂阻滞, 精子成熟及形态异常	[5, 22]
<i>Dicer-Stra8-Ck</i>	精原细胞	精原细胞数量减少, 但精子分化不受影响	[24]
<i>Dicer-Pgk2-CK</i>	精母细胞	与对照组表型无差异	[24]
<i>Dicer-Vasa-ck</i>	精原细胞	减数分裂未受影响, 单倍体精子无明显减少, 但精子形态、活力异常	[24]
<i>Dicer-Amh-ck</i>	睾丸支持细胞	支持细胞凋亡、生精障碍、细胞间的连接解体	[27, 28]
<i>Dicer-Defb-ck</i>	附睾上皮细胞	附睾上皮萎缩, 精子成熟障碍。精子细胞膜破坏, 稳定性下降, 影响精子活力	[29, 30]

程的调控。Liu 等^[32]用 siRNA 干扰 *Dicer* 在卵母细胞中的表达, 证实 *Dicer* 基因缺乏使生发泡期的卵母细胞 50%以上阻滞在第一次减数分裂, 纺锤体错乱和染色体错配率增加, 较对照组卵母细胞成熟率显著下降(34.4% vs. 75.7%; $P<0.005$), 进一步将 *Dicer*-siRNA 卵母细胞的胞浆用正常组的胞浆替换, 发现卵母细胞能排出第一极体并完成第二次减数分裂。其机制可能为降低了卵母细胞 *Dicer* 的表达, 导致 let-7 和 miR-30c 表达下调, 纺锤体形成相关蛋白(PLK1 和 AURKA)减少引起。孕激素对于维持黄体功能、促进母胎免疫耐受、促进胚胎发育具有必不可少的作用。Otsuka 等^[33]研究表明黄体功能受到 *Dicer* 依赖的 miRNA 的调控, 雌性小鼠 *Dicer* 基因敲除后, 小鼠排卵和受精正常, 但表现为黄体功能不全, 与黄体血管内皮生成相关的 miR17-5p 和 let7b 表达缺乏, 使血管形成抑制因子(TIMP1)增加, 导致新生血管形成不足继发黄体功能不全, 无法维持妊娠而流产。

Dicer 蛋白在原始卵泡、颗粒细胞、各级生长卵泡的卵母细胞都有表达, *Ddx4-Dicer-ck* 小鼠胚胎期的卵巢, 原始卵泡及各级生长卵泡数量明显减少, 出现类似人类的卵巢早衰现象^[34]。Lei 等^[35]建立 *AmhrII-Dicer-ck* 小鼠模型, 条件性敲除 *Dicer* 后, 青春前期伴随原始卵泡募集增加, 与对照组比较, 生长卵泡闭锁加剧(41.78% vs. 21.57%), 虽有各级卵泡发育成熟、排卵及黄体形成, 但黄体血管异常, 黄体细胞浆增大。在 mRNA 水平, 与卵泡发育相关的基因 *Zps*、*Gdf9* 和 *Bmp15* 表达降低, 雌激素合成相关基因 *Cyp19a1*

上调 5 倍, 孕激素合成和黄体细胞发育相关基因(*Cyp11a1* 和 *Cdkn1b*)下调 2 倍。该研究证实 *Dicer* 在卵泡募集、启动、发育、闭锁、黄体形成过程扮演重要角色。而 Tang 等^[36]敲除卵母细胞 *Dicer*, 发现其卵母细胞数量、形态、成熟不受影响并能受精, 但其形成的胚胎不能完成第一次减数分裂, 50%以上发生碎裂。Nagaraja 等^[37]同样建立 *AmhII-Dicer-ck* 小鼠模型, 也表明卵泡生成、排卵级黄体功能未受影响, 血清 FSH 和 E2 水平正常, 但阴道涂片揭示 E2 无周期变化。在雌性生殖细胞的减数分裂中 *Dicer* 和 Ago2 作用类似, 卵母细胞 Ago2 敲除, 卵泡发育、卵泡数量、性激素合成、排卵等不受影响, 卵母细胞减数分裂过程中纺锤体形成和染色体联会受阻, 提出内源性 siRNA 为卵母细胞减数分裂的根本而非 miRNA^[38]。

子宫内膜容受性是胚胎植入、发育的重要条件, 受性激素、细胞因子、免疫细胞等调控, 大量的 miRNA 参与内膜容受性相关基因和蛋白的表达。Estella 等^[39]研究证实 *Dicer* 在蜕膜化的子宫内膜中表达是增加的, 用 siRNA 干扰人内膜基质细胞的 *Dicer* 基因表达后, 经蜕膜刺激后内膜没有发生蜕膜化, 而 miRNA-135b 上调, 参与蜕膜化的 HOXA10 表达下降, 蜕膜化不良与子痫前期及流产相关。子宫 *PR-Dicer-ck* 小鼠^[40]是不孕的, 检测小鼠卵巢组织、激素水平、受精都正常, 主要由于 *Dicer* 敲除后子宫变小, 内膜腺上皮减少, 基质细胞凋亡增加, mRNA 表达芯片分析表明腺上皮增殖相关的基因 *Foxa2* 表达减少, miR-101 和 miR-181 下降, 导致凋亡基因表

达(*BCL2L1*)增加,促进基质细胞凋亡。该研究提示 miRNA 通过参与 Wnt/ β -catenin 信号通路对子宫功能起调控作用。而 *AmhrII-Dicer-ck* 模型研究发现敲除后子宫角较小,但内膜对激素的反应及蜕膜化功能正常^[37]。总之,*Dicer*-miRNA-性激素循环通路调节子宫 miRNA 表达,从而参与子宫内膜的增殖、分化、凋亡、炎症等反应^[41]。

女性生殖道(输卵管、子宫、宫颈、阴道)由米勒管发育而来,Gabriel 等^[42]用 *Amhr-Dicer-ck* 模型发现,*Dicer* 敲除后雌性小鼠的输卵管变细、平滑肌细胞减少、输卵管壁薄弱致局部囊肿形成、炎症细胞增多、上皮细胞水肿,以上均可导致输卵管运输功能障碍,不能将卵子输送至子宫,易发生输卵管妊娠,而对子宫而言,子宫内膜腺体组织减少。*Dicer* 缺乏可能通过调节 *wnt* 基因表达从而影响内膜腺体组织的形成^[40,42,43]。Nagaraja 等^[37]发现 *Dicer* 敲除后形成的输卵管囊肿内有卵母细胞、桑葚胚、囊胚,使卵子受精和胚胎运送障碍,提示 *Dicer* 对输卵管功能的重要作用。在输卵管妊娠组织中,种植位点与非种植位点比较,let-7i、miR-149、miR-182 和 miR-424 四个植入相关的候选基因表达失调,*Dicer* 和雌激素受体(ER α)表达减少,可能与异位妊娠有关^[44]。以上研究结果差异可能是因为敲除模型、鼠系、检测方法等不同造成。对雌性小鼠的条件性 *Dicer* 基因敲除后的表型总结见表 2。

4 *Dicer* 与胚胎发育

Dicer 在早期胚胎发育过程中起重要作用,能调

节与胚胎植入、分化、增殖、血管形成有关的基因表达。*Dicer* 缺失的胚胎干细胞在 7.5 d 死亡^[7],说明 *Dicer* 在生命的早期发育过程中是不可或缺的。通过 *Dicer^{fl/fl}* 与 *Sox2 Cre* 小鼠的交配,*Dicer* 敲除小鼠胚胎滋养层干细胞有丝分裂停滞,失去多向分化能力,细胞凋亡增加,胚胎生长缓慢。其主要机制在于 *Dicer* 依赖的 miRNA 失去对滋养层干细胞分化相关基因 *P21* 和 *P57* 的抑制^[45],表明 *Dicer* 在维持胚胎滋养层干细胞的重要作用。而 Forbes 等^[8]利用 siRNA 敲减孕 3 个月内胎盘 *Dicer* 基因,导致胎盘滋养层细胞增殖加强,*Dicer* 依赖的 miRNA 可能通过负反馈调节局部生长因子或者直接激活胎盘内源性有丝分裂通路(ERK 和 SHP-2)影响滋养细胞增殖。Yang 等^[46]研究发现 *Dicer^{ex 1/2}*(*Dicer* 第 1 和第 2 外显子)敲除小鼠在妊娠 12.5~14.5 d 胚胎死亡,*Dicer* 通过影响 miRNA 的成熟及表达,使血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(flt-1 和 kdr)过表达,胚胎血管结构异常,同时使酪氨酸激酶受体(tie1)表达降低,导致血管内皮细胞凋亡,胚胎新生血管生成障碍,使胚胎处于缺氧环境致胚胎死亡。

在线虫(*C. elegans*)的研究表明 ERK(细胞外信号调节激酶)激活可导致 *Dicer* 蛋白的两个结构域 RNase IIIb 和 dsRNA 磷酸化,抑制 *Dicer* 的功能,使 *Dicer* 定位于核内,抑制小 RNA 的形成,因而认为 *Dicer* 不影响雌性线虫的卵泡生成、成熟及排卵,但在卵母细胞向胚胎转换过程中,ERK 信号下调导致 *Dicer* 去磷酸化,促进小 RNA 的生成及调控胚胎形成的基因表达,ERK-*Dicer* 负反馈调节是卵母细

表 2 条件性敲除 *Dicer* 小鼠模型及对女性生殖功能的影响

Table 2 Phenotypes of different conditional *Dicer* knock-out mouse models in the female reproductive tract

小鼠模型	细胞类型	主要表现	参考文献
<i>Dicer-ZP3-ck</i>	发育卵泡	卵泡发育正常,卵母细胞纺锤体紊乱,减数分裂受阻	[6]
siRNA- <i>Dicer-ck</i>	卵母细胞	卵母细胞减数分裂阻滞	[32]
逆转录病毒敲减 <i>Dicer</i>	卵巢	排卵、受精正常,黄体功能不全	[33]
<i>Dicer-Ddx4-ck</i>	卵巢	卵巢早衰现象	[34]
<i>Dicer-Amhr II-ck</i>	卵泡颗粒细胞	卵泡募集增加,卵泡闭锁加剧,黄体功能不全	[35]
<i>Dicer-Amhr II-ck</i>	卵巢颗粒细胞、米勒管	输卵管功能障碍,窦卵泡数减少,排卵率下降、但黄体功能正常	[37, 43]
siRNA- <i>Dicer</i>	子宫内膜基质细胞	失去蜕膜化反应	[39]
<i>Dicer-PR-ck</i>	主要为卵巢、子宫	卵巢激素正常,内膜腺上皮减少,基质细胞凋亡增加	[40]
<i>Dicer-AmhrII-ck</i>	子宫	子宫发育不良,但蜕膜化功能正常	[41]
<i>Dicer-AmhII-ck</i>	米勒管间充质细胞	输卵管平滑肌细胞增多,功能障碍,内膜腺体减少	[42, 43]

胞向胚胎转变的关键机制^[47]。在鼠胚胎的激活和植入过程中, *Dicer-let-7a* 回路呈负反馈调节, *Dicer* 敲除可影响囊胚的激活, 成熟的 *let-7a* 增多而 *miRNA-181a* 降低, 抑制了胚胎的植入, 部分归因于 *Dicer* 敲除后引起表皮生长因子受体(EGFR)减少, 表皮生长因子(EGF)对胚胎的分化、植入、侵袭的促进作用减弱^[48]。*AmhII-Dicer-ck* 模型小鼠因输卵管、子宫发育不良^[25,33,45], 导致输卵管支持胚胎发育和运送胚胎能力丧失, 使小鼠胚胎种植失败。在 ICSI 中, *Stra8-Dicer-ck* 敲除精子细胞中的部分 *miRNA* 或者 *siRNA*, 受精卵从原核到囊胚发育潜能显著下降, 植入后出生率较对照组下降 4~6 倍, 接着用野生型小鼠精子细胞的总 RNA 或小 RNA 替换治疗后, 50% 的胚胎可以发育到囊胚, 出生率可以提高 2 倍^[49]。该研究表明父源性 *miRNA/siRNA* 对受精后胚胎激活及发育至关重要, 而母源性 *miRNA* 对受精和植入前胚胎发育是非必须的或者影响小。

5 *Dicer* 基因多态性与生殖相关疾病

Dicer 基因多态性与肿瘤的发生、分期、预后关系已有报道^[50-52]。近来报道 *Dicer* 基因多态性对生殖功能有显著影响, *Dicer* 基因多态性与原发不育及精液异常的相关性研究表明, *rs12323635* 位于 *DICER* 基因的启动子区, 其中 *rs12323635 C* 等位基因可能降低了不育及少精的风险, 该 SNP 点可能改变了转录因子(Ftz 和 Oct-1)的结合位点, 阻碍了成熟 *miRNA* 的合成^[53]。*Dicer rs3742330* 位于基因的 3'UTR, 本课题组之前的研究纳入原发性非梗阻性无精子症患者 330 人, 对照组 400 人, 发现 *Dicer rs3742330* 可能与男性无精症有关。在病例组和对照组相比, 病例组中 *Dicer* 基因的多态位点 *rs3742330* 等位基因 A 显著高于对照组(72% vs. 64.4%, OR=1.422, 95% CI= 1.116~1.811, $P=0.004$), 有统计学意义($P<0.05$), *Dicer* 基因 *rs3742330* 等位基因型 AA 的频率在病例组高于对照组(53% vs. 41.8%, OR=1.829, 95% CI=1.071~3.124, $P=0.027$), 有统计学意义($P<0.05$)。在 3 次及以上复发流产的患者中, *Dicer rs3742330 GG* 基因型为危险因素, 且 *Drosha rs10719 TC + CC* 增加了 *Dicer rs3742330 GG* 基因型对复发流产的风险(OR = 1.990, 95% CI = 1.048~3.778,

$P=0.036$)^[54]。*Dicer rs 1057035* 也位于 3'UTR, 其基因多态性可能影响了 *hsa-miR-574-3p* 与其 UTR 区域的结合, *Dicer rs 1057035* 变异的 C 等位基因减少了 *Dicer* 的表达^[55]。Rah 等^[56]研究得出 *Dicer rs13078* 和 *Dicer rs3742330* 与原发卵巢功能不全没有相关性。

以上对 *Dicer* 基因在生殖功能的研究表明, *Dicer* 具有强大的生物学功能, 但上述研究结果略有差异, 可能与研究方法、鼠系、建立模型的方法和时间等有关。必须指出的是 *Dicer* 不是完全只通过影响 *miRNA* 的生成而导致相应的病理表型, 还包括 *Dicer* 经 *siRNA*、转座子调控、核内穿梭机制介导的。由一种或多种机制的相互作用共同参与了细胞代谢平衡, 从而导致相关病理过程的发生。*Dicer* 除了在生殖功能中的关键作用, 近来研究表明在肿瘤的发病机制、病理分期与肿瘤预后中也具有重要作用, 其基因多态性与相关疾病的关系尚需要更多的功能研究加以证实。关于 *Dicer* 未来的研究方向, 重点在于阐明 *Dicer* 非依赖 *miRNA* 的作用及在生殖功能方面的调节, 通过建立相应的细胞与动物模型, 将致力于明确信号通路中相关的特异调节因子和蛋白, 理解与依赖 *Dicer* 的经典 *miRNA* 作用机制与非依赖 *Dicer* 的 *miRNA* 的区别和联系。另外对于 *Dicer* 基因多态性目前大多数研究只探究了与疾病的相关性, 并没有确立因果关系, 对于筛查出阳性的多态位点, 将来需做进一步的功能研究, 从 mRNA 和蛋白水平加以证实。另外, 关于调控 *Dicer* 活性的化合物和小分子抑制剂/活化剂的开发将为与 *Dicer* 基因相关的疾病的治疗提供新的手段。总之, 阐明 *Dicer* 在生殖过程的调节作用与机制将对临床相关疾病的检测和干预提供新的靶点。

参考文献(References):

- [1] Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, Figlerowicz M. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(9): 4365-4380.
- [2] Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, Gurnett CA, Dehner LP, Desruisseau D, Jarzembowski JA, Wikenheiser-Brokamp KA, Suarez BK, Whelan AJ, Williams G, Bracamontes D,

- Messinger Y, Goodfellow PJ. *DICER1* mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science*, 2009, 325(5943): 965.
- [3] Foulkes WD, Priest JR, Duchaine TF. *DICER1*: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(10): 662–672.
- [4] Peng JJ, Yan F, Chen HR, Chen JP. Progress of studies on Dicer structure and function. *Hereditas(Beijing)*, 2008, 30(12): 1550–1556.
彭杰军, 燕飞, 陈海如, 陈剑平. *Dicer* 结构和功能研究进展. *遗传*, 2008, 30(12): 1550–1556.
- [5] Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, Moore K, Harfe BD. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. *Biol Reprod*, 2008, 79(4): 696–703.
- [6] Murchison EP, Stein P, Xuan ZY, Pan H, Zhang MQ, Schultz RM, Hannon GJ. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev*, 2007, 21(6): 682–693.
- [7] Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 2003, 35: 215–217.
- [8] Forbes K, Farrokhnia F, Aplin JD, Westwood M. Dicer-dependent miRNAs provide an endogenous restraint on cytotrophoblast proliferation. *Placenta*, 2012, 33(7): 581–585.
- [9] Zindy F, Lee Y, Kawauchi D, Ayrault O, Merzoug LB, Li Y, McKinnon PJ, Roussel MF. Dicer is required for normal cerebellar development and to restrain medulloblastoma formation. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129642.
- [10] Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(4): 436–440.
- [11] Chen LJ, Yang M, Chen Y, Sun HQ, Xu WM. Roles of miR-15b in endothelial cell function and their relevance to vascular diseases. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(2): 121–127.
陈良樑, 杨明, 陈艳, 孙华钦, 许文明. miR-15b 在内皮细胞的功能及其与血管相关性疾病的关系. *遗传*, 2015, 37(2): 121–127.
- [12] Burger K, Gullerova M. Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(7): 417–430.
- [13] Johanson TM, Lew AM, Chong MMW. MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Drosha and Dicer. *Open Biol*, 2013, 3(10): 130144.
- [14] Björkgren I, Sipilä P. The role of Dicer1 in the male reproductive tract. *Asian J Androl*, 2015, 17(5): 737–741.
- [15] Kaneko H, Dridi S, Tarallo V, Gelfand BD, Gelfand BD, Fowler BJ, Cho WG, Kleinman ME, Ponicsan SL, Hauswirth WW, Chiodo VA, Karikó K, Yoo JW, Lee DK, Hadziahmetovic M, Song Y, Misra SS, Chaudhuri G, Buaas FW, Braun RE, Hinton DR, Zhang Q, Grossniklaus HE, Provis JM, Madigan MC, Milam AH, Justice NL, Albuquerque RJC, Blandford AD, Bogdanovich S, Hirano Y, Witta J, Fuchs E, Littman DR, Ambati BK, Rudin CM, Chong MMW, Provost P, Kugel JF, Goodrich JA, Dunaief JL, Baffi JZ, Ambati J. *DICER1* deficit induces *Alu* RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature*, 2011, 471(7338): 325–330.
- [16] Nakagawa A, Shi Y, Kage-Nakadai E, Mitani S, Xue D. Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease. *Science*, 2010, 328(5976): 327–334.
- [17] Li P, Zhu WJ. Advance on Dicer gene and its role in female reproduction. *Chin J Med Genet*, 2011, 28(3): 275–278.
李平, 朱伟杰. *Dicer* 基因在女性生殖中的作用及研究进展. *中华医学遗传学杂志*, 2011, 28(3): 275–278.
- [18] Romero Y, Meikar O, Papaioannou MD, Conene B, Grey C, Weier M, Pralong F, De Massy B, Kaessmann H, Vassalli JD, Kotaja N, Nef S. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25241.
- [19] Korhonen HM, Meikar O, Yadav RP, Papaioannou MD, Romero Y, Da Ros M, Herrera PL, Toppari J, Nef S, Kotaja N. Dicer is required for haploid Male germ cell differentiation in mice. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24821.
- [20] Zimmermann C, Romero Y, Warnefors M, Bilican A, Borel C, Smith LB, Kotaja N, Kaessm H, Nef S. Germ cell-specific targeting of *DICER* or *DGCR8* reveals a novel role for endo-siRNAs in the progression of mammalian spermatogenesis and male fertility. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107023.
- [21] Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang FC, Hajkova P, Lao KQ, O'Carroll D, Das PP, Tarakhovsky A, Miska EA, Surani MA. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1738.
- [22] Greenlee AR, Shiao MS, Snyder E, Buaas FW, Gu TJ, Stearns TM, Sharma M, Murchison EP, Puente GC, Braun RE. Deregulated sex chromosome gene expression with male germ cell-specific loss of *Dicer1*. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46359.
- [23] Bonache S, Algaba F, Franco E, Bassas L, Larriba S. Altered gene expression signature of early stages of the germ line supports the pre-meiotic origin of human spermatogenic failure. *Andrology*, 2014, 2(4): 596–606.
- [24] Liu DK, Li LY, Fu HL, Li SZ, Li JM. Inactivation of *Dicer1* has a severe cumulative impact on the formation of mature germ cells in mouse testes. *Biochem Biophys Res*

- Commun*, 2012, 422(1): 114–120.
- [25] Papaioanno MD, Pitetti JL, Ro S, Park C, Aubry F, Schaad O, Vejnar CE, Kühne F, Descombes P, Zdobnov EM, McManus MT, Guillou F, Harfe BD, Yan W, Jégou B, Nef S. Sertoli cell *Dicer* is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, 2009, 326(1): 250–259.
- [26] Kim GJ, Georg I, Scherthan H, Merckenschlager M, Guillou F, Merckenschlager M, Guillou F, Scherer G, Barriónuevo F. *Dicer* is required for sertoli cell function and survival. *Int J Dev Biol*, 2010, 54: 867–875.
- [27] Papaioannou MD, Lagarrigue M, Vejnar CE, Rolland AD, Kühne F, Aubry F, Schaad O, Fort A, Descombes P, Neerman-Arbez M, Guillou F, Zdobnov EM, Pineau C, Nef S. Loss of *Dicer* in sertoli cells has a major impact on the Testicular proteome of mice. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(4): M900587–MCP200.
- [28] Korhonen HM, Yadav RP, Da Ros M, Chalmel F, Zimmermann C, Toppari J, Nef S, Kotaja N. DICER regulates the formation and maintenance of cell-cell junctions in the mouse seminiferous epithelium. *Biol Reprod*, 2015, 93(6): 139.
- [29] Björkgren I, Saastamoinen L, Krutskikh A, Huhtaniemi I, Poutanen M, Sipilä P. *Dicer1* Ablation in the mouse epididymis causes dedifferentiation of the epithelium and imbalance in sex steroid signaling. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38457.
- [30] Björkgren I, Gylling H, Turunen H, Huhtaniemi I, Strauss L, Poutanen M, Sipilä P. Imbalanced lipid homeostasis in the conditional *Dicer1* knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. *FASEB J*, 2015, 29(2): 433–442.
- [31] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92–105.
- [32] Liu HC, Tang YX, He ZY, Rosenwaks Z. *Dicer* is a key player in oocyte maturation. *J Assist Reprod Genet*, 2010, 27(9–10): 571–580.
- [33] Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, Lee JD, Yoshino O, Lin SC, Han JH. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest*, 2008, 118(5): 1944–1954.
- [34] Yuan SQ, Ortogero N, Wu QX, Zheng HL, Yan W. Murine follicular development requires oocyte DICER, but not DROSHA. *Biol Reprod*, 2014, 91(2): 39.
- [35] Lei L, Jin S, Gonzalez G, Behringer RR, Woodruff TK. The regulatory role of *Dicer* in folliculogenesis in mice. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 315(1–2): 63–73.
- [36] Tang FC, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovsky A, Lao KQ, Surani MA. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev*, 2007, 21(6): 644–648.
- [37] Nagaraja AK, Andreu-Vieyra C, Franco HL, Ma L, Chen RH, Han DY, Zhu HF, Agno JE, Gunaratne PH, DeMayo FJ, Matzuk MM. Deletion of *Dicer* in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol Endocrinol*, 2008, 22(10): 2336–2352.
- [38] Stein P, Rozhkov NV, Li F, Cárdenas FL, Davydenko O, Vandivier LE, Gregory BD, Hannon GJ, Schultz RM. Essential role for endogenous siRNAs during meiosis in mouse oocytes. *PLoS Genet*, 2015, 11(2): e1005013.
- [39] Estella C, Herrero I, Moreno-Moya JM, Quiñero A, Martínez S, Pellicer A, Simón C. miRNA signature and *Dicer* requirement during human endometrial stromal decidualization *in vitro*. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41080.
- [40] Hawkins SM, Andreu-Vieyra CV, Kim TH, Jeong JW, Hodgson MC, Chen RH, Creighton CJ, Lydon JP, Gunaratne PH, DeMayo FJ, Matzuk MM. Dysregulation of uterine signaling pathways in progesterone receptor-Cre knockout of *Dicer*. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(9): 1552–1566.
- [41] Nothnick WB, Healy C, Hong XM. Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components exportin-5 and *Dicer1*. *Endocrine*, 2010, 37(2): 265–273.
- [42] Gonzalez G, Behringer RR. *Dicer* is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(7): 678–688.
- [43] Hong XM, Luense LJ, McGinnis LK, Nothnick WB, Christenson LK. *Dicer1* is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology*, 2008, 149(12): 6207–6212.
- [44] Feng Y, Zou SE, Weijdegård B, Chen J, Cong Q, Fernandez-Rodriguez J, Wang L, Billig H, Shao RJ. The onset of human ectopic pregnancy demonstrates a differential expression of miRNAs and their cognate targets in the Fallopian tube. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(1): 64–79.
- [45] Spruce T, Pernaute B, Di-Gregorio A, Cobb BS, Merckenschlager M, Manzanares M, Rodriguez TA. An early developmental role for miRNAs in the maintenance of extraembryonic stem cells in the mouse embryo. *Dev Cell*, 2010, 19(2): 207–219.
- [46] Yang WJ, Yang DD, Na SQ, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao GS. *Dicer* is required for Embryonic Angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*, 2005, 280(10): 9330–9335.
- [47] Drake M, Furuta T, Suen KM, Gonzalez G, Liu B, Kalia A, Ladbury JE, Fire AZ, Skeath JB, Arur S. A requirement for

- ERK-dependent Dicer phosphorylation in coordinating oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev Cell*, 2014, 31(5): 614–628.
- [48] Cheong AWY, Pang RTK, Liu WM, Kottawatta KSA, Lee KF, Yeung WSB. MicroRNA Let-7a and dicer are important in the activation and implantation of delayed implanting mouse embryos. *Hum Reprod*, 2014, 29(4): 750–762.
- [49] Yuan SQ, Schuster A, Tang C, Yu T, Ortogero N, Bao JQ, Zheng HL, Yan W. Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs Are important for fertilization and preimplantation Embryonic development. *Development*, 2016, 143(4): 635–647.
- [50] Cho SH, Ko JJ, Kim JO, Jeon YJ, Yoo JK, Oh J, Oh D, Kim JW, Kim NK. 3'-UTR polymorphisms in the miRNA machinery genes DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5 are associated with colorectal cancer risk in a Korean population. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131125.
- [51] Xie Y, Wang Y, Zhao Y, Guo Z. Single-nucleotide polymorphisms of microRNA processing machinery genes are associated with risk for gastric cancer. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 567–571.
- [52] Cao WM, Gao Y, Yang HJ, Xie SN, Meng XL, Pan ZW, Chen ZH, Huang J, Ye WW, Shao XY, Wang XJ. Germline mutations of DICER1 in Chinese women with BRCA1/BRCA2-negative familial breast cancer. *Genet Mol Res*, 2014, 13(4): 10754–10760.
- [53] Lu CC, Xu MF, Wang Y, Qin YF, Du GZ, Wu W, Han XM, Ji C, Yang YL, Gu AH, Xia YK, Song L, Wang SL, Wang XR. Genetic variants in meiotic program initiation pathway genes are associated with spermatogenic impairment in a Han Chinese population. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53443.
- [54] Jung YW, Jeon YJ, Rah H, Kim JH, Shin JE, Choi DH, Cha SH, Kim NK. Genetic variants in microRNA machinery genes are associate with idiopathic recurrent pregnancy loss risk. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95803.
- [55] Ma HX, Yuan H, Yuan ZY, Yu CJ, Wang RX, Jiang Y, Hu ZB, Shen HB, Chen N. Genetic variations in key microRNA processing genes and risk of head and neck cancer: a case-control study in Chinese population. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47544.
- [56] Rah H, Jeon YJ, Lee BE, Kim JO, Shim SH, Lee WS, Choi DH, Kim JH, Kim NK. Association of polymorphisms in microRNA machinery genes (DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5) with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women. *Menopause*, 2013, 20(10): 1067–1073.

(责任编辑: 苗龙)