

miR-362 靶向 *ZNF644* 基因调控猪未成熟支持细胞的增殖和凋亡

冉茂良^{1,2}, 董莲花^{1,2}, 翁波^{1,2}, 曹蓉^{1,2}, 彭馥芝^{1,2}, 高虎^{1,2},
罗荟^{1,2}, 陈斌^{1,2}

1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128

2. 畜禽遗传改良湖南省重点实验室, 长沙 410128

摘要: 睾丸组织中未成熟支持细胞的增殖能力决定成熟支持细胞的数量, 进而制约成年雄性动物的精子生成能力。研究表明 microRNA (miRNA) 参与调控猪未成熟支持细胞的增殖和凋亡, 但大部分鉴定出的 miRNA 功能仍不明确。本文基于前期 RNA-seq 数据筛选结果, 研究了 miR-362 对猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的调控作用。首先利用生物信息学方法预测 miR-362 的靶基因, 通过 qRT-PCR 技术检测 miR-362 和 *ZNF644* 基因在不同发育阶段的猪睾丸组织中的表达水平以及在猪未成熟支持细胞中过表达或抑制表达 miR-362 后 *ZNF644* 基因的表达水平, 采用双荧光素酶报告基因系统验证 miR-362 与 *ZNF644* 基因之间的靶向关系。结果显示, miR-362 与 *ZNF644* 基因 3'UTR 具有一个潜在的结合位点, miR-362 和 *ZNF644* 基因在猪睾丸组织中的 mRNA 表达水平显著负相关($r=-0.723$, $P<0.01$), miR-362 和 psiCHECK2-*ZNF644*-WT 3'UTR 共转染组的双荧光活性显著降低, 且 miR-362 显著调节 *ZNF644* 基因的表达水平, 表明 miR-362 靶向 *ZNF644* 基因并抑制其表达水平。为进一步检测过表达 miR-362 或抑制表达 *ZNF644* 基因对猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的影响, 通过流式细胞术检测细胞周期, CCK8 和 EdU 试剂盒检测细胞增殖情况, Annexin V-FITC/PI 方法和 qRT-PCR 技术检测细胞凋亡情况及凋亡相关基因的表达水平。结果表明, 过表达 miR-362 后, 猪未成熟支持细胞周期被阻滞在 G₁ 期, 抑制表达 *ZNF644* 基因后, 猪未成熟支持细胞被阻滞在 G₂ 期, 细胞增殖能力显著减弱, 细胞凋亡率显著提高, 细胞凋亡相关基因呈促进凋亡的差异表达。本研究结果证实 miR-362 靶向 *ZNF644* 基因抑制猪未成熟支持细胞的增殖而促进其凋亡, 为深入研究 miR-362 在猪精子生成过程中的生物学功能提供了理论基础。

关键词: miR-362; *ZNF644*; 猪; 未成熟支持细胞; 增殖; 凋亡

收稿日期: 2018-01-29; 修回日期: 2018-03-21

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(编号: CARS-36)项目, 湖南省自然科学基金项目(编号: 2018JJ3219)和湖南农业大学省级优秀博士论文培育基金项目(编号: YB2015001)资助[Supported by the China Agriculture Research System (No.CARS-36), Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (No.2018JJ3219) and the Excellent Doctoral Dissertation Cultivating Fund of Hunan Agricultural University (No.YB2015001)]

作者简介: 冉茂良, 博士, 讲师, 研究方向: 猪的分子遗传学。E-mail: ranmaoliang0903@126.com

董莲花, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种。E-mail: 846419902@qq.com

通讯作者: 陈斌, 教授, 博士生导师, 研究方向: 猪的数量遗传学。E-mail: chenbin7586@163.com

DOI: 10.16288/j.yczs.18-028

网络出版时间: 2018/6/25 15:11:17

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180625.1511.002.html>

miR-362 regulates the proliferation and apoptosis of porcine immature Sertoli cells through targeting the *ZNF644* gene

Maoliang Ran^{1,2}, Lianhua Dong^{1,2}, Bo Weng^{1,2}, Rong Cao^{1,2}, Fuzhi Peng^{1,2}, Hu Gao^{1,2}, Hui Luo^{1,2}, Bin Chen^{1,2}

1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Hunan Provincial Key Laboratory for Genetic Improvement of Domestic Animal, Changsha 410128, China

Abstract: In testicular tissue, immature Sertoli cell proliferation ability determines the size of mature Sertoli cell populations, which further regulates the spermatogenesis in the adult male animals. Studies have demonstrated that microRNAs (miRNAs) participate in the regulation of the immature Sertoli cell proliferation and apoptosis, but the functions of most identified miRNAs remain unclear. In this study, based on previous RNA-seq results, we analyzed the regulatory role (s) of miR-362 in proliferation and apoptosis of porcine immature Sertoli cells. The *ZNF644* gene was predicted to be a target gene of miR-362 using bioinformatics methods. The expression levels of miR-362 and *ZNF644* gene were measured using qRT-PCR assay in developing porcine testicular tissues and in immature Sertoli cells transfected with either miR-362 mimic or miR-362 inhibitor. The dual luciferase reporter assay was used to determine the regulatory relationship between miR-362 and *ZNF644*. The results showed that a putative target site of miR-362 was located in the 3'UTR of *ZNF644*. The expression of miR-362 was significantly and negatively correlated with *ZNF644* expression in the developing porcine testicular tissues. Co-transfection of miR-362 and psiCHECK2-ZNF644-WT 3'UTR luciferase vector significantly suppressed luciferase activity. The *ZNF644* gene expression level was significantly regulated by miR-362, demonstrating that miR-362 targets *ZNF644* gene and inhibits its expression in porcine immature Sertoli cells. Flow cytometry, CCK8, and EdU assays were used to measure the effects of over-expression of miR-362 or knockdown of *ZNF644* on porcine immature Sertoli cell proliferation; Annexin V-FITC/PI staining assays and qRT-PCR technology were used to test the apoptosis and the expression levels of cell survival-related genes, respectively. Over-expression of miR-362 and knockdown of *ZNF644* arrested the porcine immature Sertoli cells in G₁ and G₂ phases of the cell cycle, respectively, and inhibited proliferation, enhanced apoptosis in the porcine immature Sertoli cells, and significantly regulated the expression levels of cell survival-related genes. Taken together, these data indicate that miR-362 inhibits proliferation and promotes apoptosis in porcine immature Sertoli cells by targeting the *ZNF644* gene, thereby providing the scientific basis for further study on the function(s) of miR-362 in the porcine spermatogenesis.

Keywords: miR-362; *ZNF644*; porcine; immature Sertoli cell; proliferation; apoptosis

睾丸中的支持细胞是位于曲细精管管壁上的一种体细胞,通过细胞间紧密连接形成血睾屏障为精子生长发育提供有利环境,分泌雄激素结合蛋白,同时也为精子生长发育提供多种营养因子,从而在精子生长发育过程中扮演着重要的角色^[1~3]。研究表明,成熟支持细胞不具有增殖能力^[4],因此未成熟支持细胞的增殖能力决定着成熟支持细胞的数量,进

而制约着成年雄性动物的精子生成能力。研究显示,未成熟支持细胞的增殖受到多种因素的调控,例如蛋白编码基因^[5]、非编码基因^[6]和信号通路^[5]等。

MicroRNA (miRNA)是一类长约 22 nt 的非编码小 RNA,通过与靶基因 3'非翻译区(un-translated region, UTR)的一个或多个位点不紧密的配对结合形成双链 RNA,从而诱导靶 mRNA 降解或抑制其翻

译过程。miRNA 广泛参与调控细胞的多种生物学过程,例如增殖、凋亡、分化、自噬、迁移等^[7-10]。本课题组前期采用 RNA-seq 技术在不同发育阶段的猪睾丸组织中鉴定出 374 个 miRNA^[11],随后其他课题组相继证实多个 miRNA 参与调控支持细胞的增殖和凋亡。如 miR-133b^[12]、miR-762^[13]、miR-1285^[14]、miR-301b-3p^[15]和 miR-3584-5p^[15]促进支持细胞的增殖而抑制其凋亡,miR-638 促进支持细胞凋亡而抑制其增殖^[16]。尽管如此,仍有许多 miRNA 调控猪支持细胞增殖和凋亡的机制尚不清楚。

研究表明,miR-362 与 miR-500 在基因组中成簇位于 X 染色体上,形成 X-linked miRNA,而 X-linked miRNA 的快速进化及表达特异性与多种哺乳动物雄性生殖功能密切相关^[17]。miR-362-5p 通过靶向 *TUBB* (tubulin beta)基因在非梗阻性无精子症过程中具有重要的调控作用^[18]。此外, RNA-seq 结果显示 miR-362 在 60 胎龄至 30 日龄的猪睾丸组织中的表达水平明显高于 60~180 日龄^[11],结合支持细胞的增殖特点,推测 miR-362 在猪未成熟支持细胞的增殖过程中具有调控作用。因此,本研究利用双荧光素酶报告基因检测技术、实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR)技术、流式细胞术、CCK8 (cell counting kit-8)和 EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)试剂盒研究了 miR-362 调控猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的作用机制,为进一步揭示 miR-362 调节猪睾丸发育或精子生成的机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及样品采集

沙子岭公猪(*Sus scrofa*)由湖南省湘潭市沙子岭猪资源场提供,包括 1 日龄(D1)、30 日龄(D30)、60 日龄(D60)、90 日龄(D90)、120 日龄(D120)、150 日龄(D150)、180 日龄(D180)各 3 头。以人工阉割法取其两侧睾丸组织,经预冷的磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L)快速漂洗并沥去溶液后转入 1.5 mL RNase-free 离心管,置于液氮中速冷 5 h,样品置于-80 °C 保存。

1.2 细胞系

猪睾丸细胞系 (swine testicular, ST) ATCC[®]

CRL-1746TM购自武汉博士德生物科技有限公司。该细胞系已被证实是猪睾丸组织中未成熟支持细胞,并广泛应用于相关研究^[13, 16, 19]。

1.3 靶基因预测

利用 miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>)、RNAhybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>)、TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)和 miRanda (<http://www.microrna.org/>)网站分别预测人 (*Homo sapiens*)和小鼠 (*Mus musculus*)的 *ZNF644* 基因 3'UTR 与 miRNA-362 的结合位点。随后,利用 NCBI 中 BLAST 功能分析此结合位点在猪、人、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、恒河猴(*Macaca mulatta*)、小鼠、牛(*Bos taurus*)、绵羊(*Ovis aries*)、狗(*Canis lupus familiaris*)、猫(*Felis catus*)和大象(*Elephantidae*)10 种哺乳类动物中的保守性。

1.4 细胞培养

细胞培养液按胎牛血清(PAN-Biotech, 德国) DMEM high glucose 培养基(Hyclone, 美国)为 1 : 9 比例配置,并将 ST 细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.5 双荧光素酶基因报告载体构建和酶活性检测

参照 GenBank 中猪 *ZNF644* 基因 3'UTR 序列 (NC_010446.5),分别合成正常型和突变型 3'UTR 序列,其中突变型序列在 miR-362 预测结合位点中突变 2 个碱基(CAAGGAUA→CAAGCUUA),两条序列的 5'和 3'端均分别加上 CTCGAG(*Xho* I 内切酶位点)和 GCGGCCGC (*Not* I 内切酶位点)。序列由上海铂尚生物股份有限公司合成。将上述两条序列分别克隆至 psi-CHECK-2 载体(Promega, 美国),构建野生型 psiCHECK2-*ZNF644*-WT 3'UTR 和突变型 psiCHECK2-*ZNF644*-MT 3'UTR 双荧光素酶报告质粒。

将 ST 细胞接种至 12 孔细胞培养板,当细胞融合度达 70%时使用 lipofectamine 2000 试剂盒(Invitrogen, 美国)进行转染。转染分组为:(1) psiCHECK2-*ZNF644*-WT 3'UTR + miR-362 mimic;(2) psiCHECK2-*ZNF644*-WT 3'UTR + mimic NC;(3) psiCHECK2-

ZNF644-MT 3'UTR + miR-362 mimic ;(4) psiCHECK2-ZNF644-MT 3'UTR + mimic NC。每组设置 3 个平行孔,转染 48 h 后收集细胞,利用多功能酶标仪(Molecular Devices, spectra max m5e ,美国)检测双荧光素酶活性。

1.6 细胞转染

将 ST 细胞接种至 6 孔细胞培养板,在融合度达 70%时进行转染。为过表达或抑制表达 miR-362,采用 Lipofectamine 2000 试剂分别将 miR-362 mimic/mimic NC (negative control)/miR-362 inhibitor/inhibitor NC (300 ng/ μ L,苏州吉玛基因股份有限公司)转染细胞。为抑制表达 ZNF644 基因,设计合成 3 条 ZNF644 siRNA 序列,转染入 ST 细胞,采用 qRT-PCR 技术检测抑制效率,挑选出最佳 ZNF644 siRNA 序列,采用 Lipofectamine2000 试剂分别将 ZNF644 siRNA/siRNA NC 转染入 ST 细胞(300 ng/ μ L,广州锐博生物科技有限公司)。以上各组细胞转染实验,设置空白对照组,各组设置 3 个平行孔。将 6 孔细胞培养板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱(ThermoFisher, Forma3111, 美国)中,5 h 后换成不含 Penicillin-Streptomycin 的培养基,继续培养 24 h,收集细胞。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primers used in this study

名称	引物序列(5'→3')
miR-362	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCACTCA
	F:TCG GAATCC TTGGAACCTAGGTG
	R:ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
ZNF644	F:CATCCTGGAAGAGCCGATAG
	R:GAGGATGTTCCGAATGTTGG
Bcl2	F:GAGGATTGTGGCCTTCTTTG
	R:GCCGGTTCAGGTACTCAGTC
BAX	F:TCCGGGGAGCAACCCA
	R:AAACCCTGAAGCAAAAGGGC
Caspase-3	F:TGGATGCTGCAAATCTCA
	R:TCCCACTGTCCGTCTCAA
GAPDH	F:GTTTGTGATGGGCGTGAAC
	R:ATGGACCTGGGTCATGAGT
U6	F:AACGCTTCACGAATTTGCGT
	R:CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT

RT 表示逆转录引物;F 表示正向引物,R 表示反向引物。

1.7 总 RNA 提取和 qRT-PCR

采用 TRIzol 试剂盒提取不同发育时期的猪睾丸组织样品和 ST 细胞样品总 RNA。采用核酸/蛋白质浓度测定仪检查总 RNA 质量,要求 A_{260/280} 介于 1.8~2.1 之间,rRNA Ratio (28S:18S)≥1.8:1,浓度 ≥200 ng/ μ L。

采用 qRT-PCR 技术定量分析 miR-362、ZNF644、Bcl2 (B-cell lymphoma-2)、BAX(BCL2 associated X protein)和 Caspase-3 基因在猪 7 个不同发育时期的睾丸组织和 ST 细胞中的表达水平。采用 Oligo 6.0 软件设计 qRT-PCR 引物,引物信息见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。分别采用 PrimeScript™ RT 试剂盒(TaKaRa 公司)和 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(TaKaRa 公司)进行 cDNA 逆转录和 qRT-PCR 反应,所有操作严格按照试剂盒说明书于 IQ-5 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, 美国)上进行。qRT-PCR 反应体系为 25 μ L,包括 12.5 μ L SYBR Premix Ex Taq™(2 \times)、1 μ L 上游引物、1 μ L 下游引物、2.0 μ L cDNA 模板和 8.5 μ L ddH₂O。反应程序:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 循环;55~95℃ 溶解 30 s,81 个循环。采用 GAPDH 和 U6 基因分别

作为蛋白编码基因和 miR-362 的内参基因, 每组设置 3 个生物学重复。

1.8 细胞增殖检测

为检测过表达 miR-362 或抑制表达 *ZNF644* 基因对猪未成熟支持细胞增殖的影响, 采用流式细胞术检测细胞周期, CCK8 (上海碧云天生物技术有限公司) 和 EdU 试剂盒 (广州锐博生物科技有限公司) 检测细胞增殖情况。

将 miR-362 mimic、mimic NC、*ZNF644* siRNA 或 siRNA NC 分别转染 ST 细胞, 24 h 后收集各组细胞, PBS 洗涤 2 次, 使用 70% 乙醇于 4℃ 过夜, 1000 r/min 离心 3 min 后收集细胞, 使用流式细胞仪 (BD 公司, FACSCalibur) 检测细胞周期。细胞于 96 孔板转染 24 h、48 h、72 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中继续培养 1 h, 随后使用酶标仪于 450 nm 波长下检测吸光度 (OD) 值。细胞于 6 孔板转染 24 h 后, 每孔加入 100 μ L EdU 试剂, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 2 h, 严格按照 EdU 试剂盒说明书对细胞进行染色, 置于荧光显微镜 (Nikon, Ti-E, 日本) 下拍照, 并使用 Image J 软件对图片中的细胞进行计数。

1.9 细胞凋亡检测

为检测过表达 miR-362 或抑制表达 *ZNF644* 基因对猪未成熟支持细胞凋亡的影响, 采用 Annexin V-FITC/PI 方法检测细胞的凋亡率, 利用 qRT-PCR 技术检测细胞凋亡相关基因的表达水平。

将 miR-362 mimic、mimic NC、*ZNF644* siRNA 和 siRNA NC 分别转染 ST 细胞, 24 h 后收集细胞于 1.5 mL 离心管, PBS 洗涤 2 次, 2000 r/min 离心 5 min。每管细胞中分别加入 500 μ L 染色缓冲液和 5 μ L Annexin V-FITC (江苏凯基生物股份有限公司), 混匀后再加入 5 μ L PI 染色液, 室温避光静置 20 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。利用 qRT-PCR 技术检测各组细胞中 *Bcl2*、*BAX* 和 *Caspase-3* 基因 (细胞凋亡相关基因) 的表达水平。

1.10 统计分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 qRT-PCR 结果, 并用 IBM

SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 采用 One-Way ANOVA 方差进行显著性分析, 并采用 Duncan 氏多重比较法以评估各组之间的差异。数据以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 靶基因预测及初步验证

采用 qRT-PCR 技术检测 miR-362 和 *ZNF644* 基因在沙子岭猪 7 个不同发育时期睾丸组织中的表达水平。结果显示, miR-362 在 D1、D30 和 D180 发育时期的表达水平较高, 而在 D60、D90、D120、D150 发育时期的表达水平较低 (图 1A); 而 *ZNF644* 基因在 7 个发育时期呈现出先升高后降低的表达模式 (图 1B)。采用 SPSS 22.0 将 miR-362 和 *ZNF644* 基因的表达量进行相关性分析, 发现二者呈负相关 ($r=-0.723$, $P<0.01$)。

采用 miRWalk、RNAhybrid、TargetScan 和 miRanda 网站预测 miR-362 的靶基因, 发现 *ZNF644* 基因为 miR-362 的潜在靶基因之一, *ZNF644* 基因 3'UTR 存在一个与 miR-362 相结合的潜在位点, 且该位点在 10 种哺乳动物中完全保守 (图 2), 因此推测 miR-362 靶向 *ZNF644* 基因 3'UTR。

2.2 双荧光素酶报告基因载体构建和酶活性检测结果

将合成的 *ZNF644* 基因 3'UTR-WT、3'UTR-MT 序列与 psiCHECK2 载体连接, 提取 psiCHECK2-*ZNF644*-WT 3'UTR 和 psiCHECK2-*ZNF644*-MT 3'UTR 双荧光素酶报告质粒, 经 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切, 进行凝胶电泳检测 (图 3, A 和 B)。结果显示, 两个双荧光素酶报告质粒均含有插入的 *ZNF644* 基因 3'UTR 序列片段, 表明已成功构建 *ZNF644* 基因 3'UTR 双荧光素酶报告质粒。

将 psiCHECK2-*ZNF644*-WT 3'UTR 和 psiCHECK2-*ZNF644*-MT 3'UTR 与 miR-362 mimic 和 miR-362 mimic NC 两两组合共转染至融合度达 70% 的 ST 细胞中, 48 h 后收集细胞并检测双荧光素酶活性。结果显示, miR-362 mimic + psiCHECK2-*ZNF644*-WT

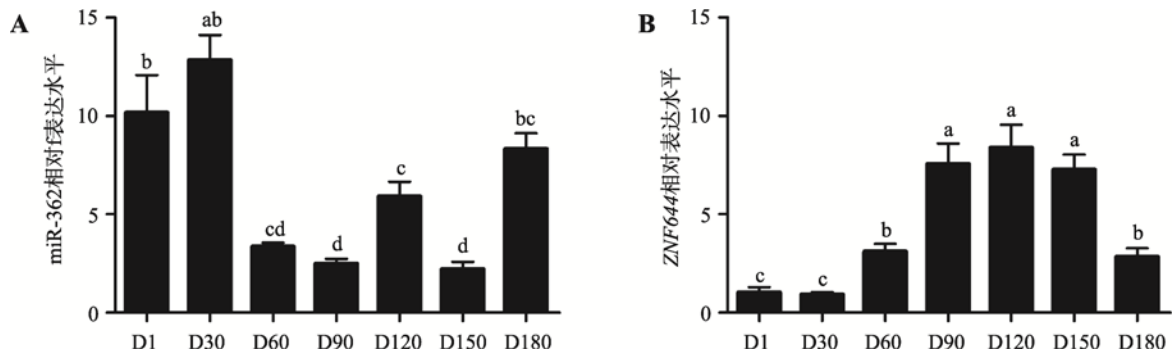


图 1 miR-362 和 *ZNF644* 基因在猪不同发育时期睾丸组织中的 mRNA 表达水平

Fig. 1 Relative expression levels of miR-362 and *ZNF644* gene during the development of porcine testes

A: miR-362 在猪不同发育时期睾丸组织中的表达水平(*U6* 为内参基因); B: *ZNF644* 基因在猪不同发育时期睾丸组织中的表达水平(*GAPDH* 为内参)。D1~D180 表示 1 日龄、30 日龄、60 日龄、90 日龄、120 日龄、150 日龄、180 日龄的猪睾丸组织。肩标不同字母表示差异显著。

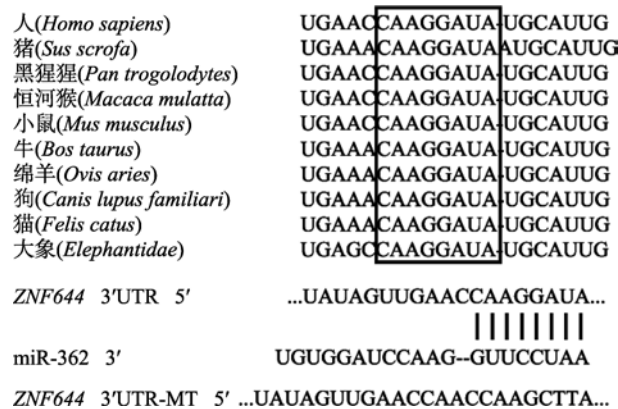


图 2 miR-362 靶基因预测结果和结合位点保守性分析
Fig. 2 The predicted results of miR-362 target genes and conservation analysis of the target site

黑色方框中的序列表示 miR-362 与 *ZNF644* 基因 3'UTR 的潜在结合位点在物种间完全保守。

3'UTR 组的荧光素酶活性显著低于其余 3 组($P < 0.05$) (图 3C), 表明 miR-362 靶向 *ZNF644* 基因 3'UTR。

2.3 miR-362 对猪未成熟支持细胞中 *ZNF644* 基因 mRNA 表达水平的影响

将 miR-362 mimic、mimic NC、miR-362 inhibitor、inhibitor NC 转染 ST 细胞中。qRT-PCR 检测以上各组细胞中 miR-362 和 *ZNF644* 基因的表达水平。结果显示:miR-362 mimic 显著提高 miR-362 的表达水平($P < 0.05$)而抑制 *ZNF644* 基因的表达水平($P < 0.05$), miR-362 inhibitor 显著抑制 miR-362 的表达水平($P < 0.05$)而提高 *ZNF644* 基因的表达水平($P < 0.05$)

(图 4, A 和 B), 表明 miR-362 显著抑制 *ZNF644* 基因 mRNA 的表达。

2.4 过表达 miR-362 抑制猪未成熟支持细胞的增殖而促进其凋亡

采用流式细胞术检测转染 miR-362 mimic 或 NC 后 ST 细胞周期的分布情况, 结果显示转染 miR-222 mimic 后, 处于 G_1 期的细胞比例显著增加($P < 0.05$), 而处于 S 期的细胞比例显著减少($P < 0.05$), 表明细胞周期被阻滞在了 G_1 期(图 5A)。利用 CCK8 试剂盒检测转染 miR-362 mimic 或 NC 后, ST 细胞的增殖情况, 结果显示过表达 miR-362 后, 0~72 h 内细胞增殖能力极显著减弱($P < 0.01$) (图 5B)。此外, 利用 EdU 试剂盒检测转染 miR-362 mimic 或 NC 后, ST 细胞的增殖情况, 结果表明转染 miR-362 mimic 24 h 后, 处于增殖期的细胞数量显著低于 NC 转染组($P < 0.05$) (图 5, C 和 D)。

采用 Annexin V-FITC/PI 方法检测过表达 miR-362 对细胞凋亡的影响(图 6, A 和 B), 相比于 NC, 转染 miR-362 mimic 后处于凋亡早期和凋亡晚期的细胞比例明显增加, 统计结果显示 miR-362 mimic 细胞转染组的凋亡率显著高于 NC 组($P < 0.05$) (图 6C)。qRT-PCR 检测两组细胞中 *Bcl2*、*BAX* 和 *Caspase-3* 基因的表达水平, 结果显示过表达 miR-362 显著增加 *BAX* 和 *Caspase-3* 基因(细胞凋亡促进基因^[20, 21])的表达水平($P < 0.05$), 而对 *Bcl2* 基因(细胞凋亡抑制

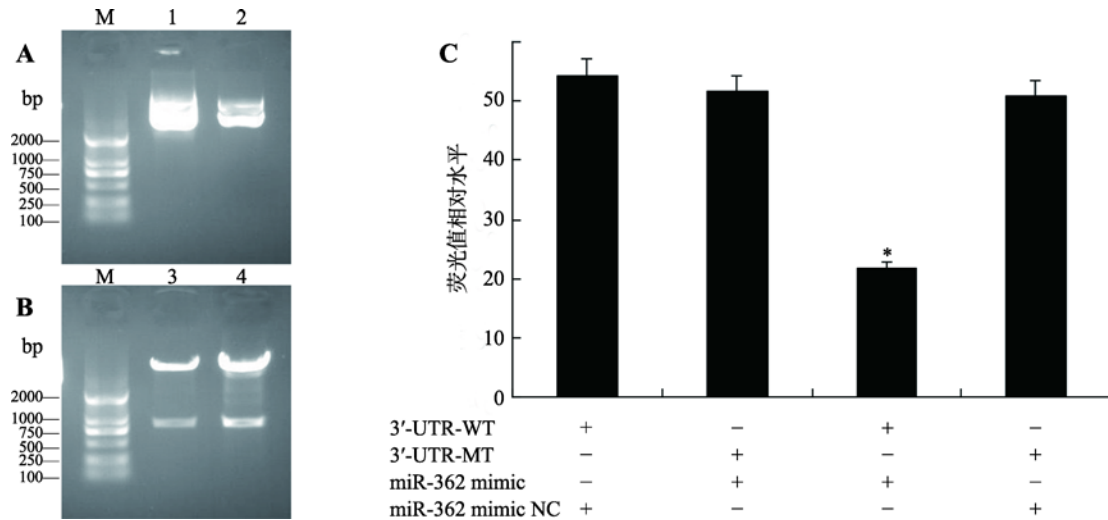


图 3 psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-WT 和 psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-MT 质粒验证及双荧光素酶检测结果
Fig. 3 Characterization of psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-WT and psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-MT plasmid and results of dual-luciferase assays

A: psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-WT 和 psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-MT 质粒鉴定; B: 采用 *Xho* I 和 *Not* I 内切酶对 psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-WT 和 psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-MT 质粒进行双酶切鉴定; C: ST 细胞中荧光素酶活性检测 miR-362 对 ZNF644 3'UTR 的调控。M: DL2000 marker; 1: psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-WT 重组质粒; 2: psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-MT 重组质粒; 3: psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-MT 重组质粒双酶切结果; 4: psiCHECK2-ZNF644-3'UTR-WT 重组质粒双酶切结果; * $P < 0.05$ 表示差异显著。

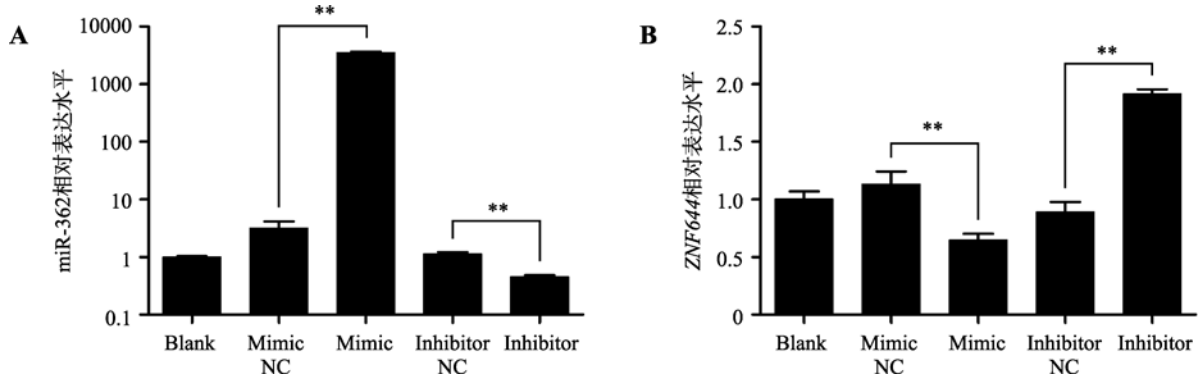


图 4 miR-362 调节 ZNF644 基因在猪未成熟支持细胞中的表达

Fig. 4 miR-362 regulates the expression levels of ZNF644 gene in porcine immature Sertoli cells

A: qRT-PCR 技术检测各组细胞中 miR-362 的表达水平(*U6* 为内参基因); B: qRT-PCR 技术检测各组细胞中 ZNF644 基因的表达水平(*GAPDH* 为内参基因)。** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

基因^[22]的表达水平未见明显影响(图 6D)。综合以上实验结果,过表达 miR-362 抑制猪未成熟支持细胞增殖而促进其凋亡。

2.5 抑制表达 ZNF644 基因抑制猪未成熟支持细胞增殖而促进其凋亡

为抑制 ZNF644 基因在猪未成熟支持细胞中的表达,设计合成了 3 条 ZNF644 siRNA 序列,并分别转染至猪未成熟支持细胞中。qRT-PCR 检测结果

显示,3 条 ZNF644 siRNA 序列均能极显著抑制 ZNF644 基因的表达水平($P < 0.01$) (图 7)。因此,本文将 3 条 ZNF644 siRNA 序列等量混合转染至猪未成熟支持细胞以抑制 ZNF644 基因的表达。流式细胞术检测结果显示,转染 ZNF644 siRNA 后,处于 G_2 期的细胞比例显著增加($P < 0.05$),处于 S 期的细胞比例明显降低,表明细胞被阻滞在了 G_2 期(图 8A)。CCK8 结果显示,转染 ZNF644 siRNA 后,0~72 h 内细胞增殖能力显著降低(图 8B)。此外,EdU 染色

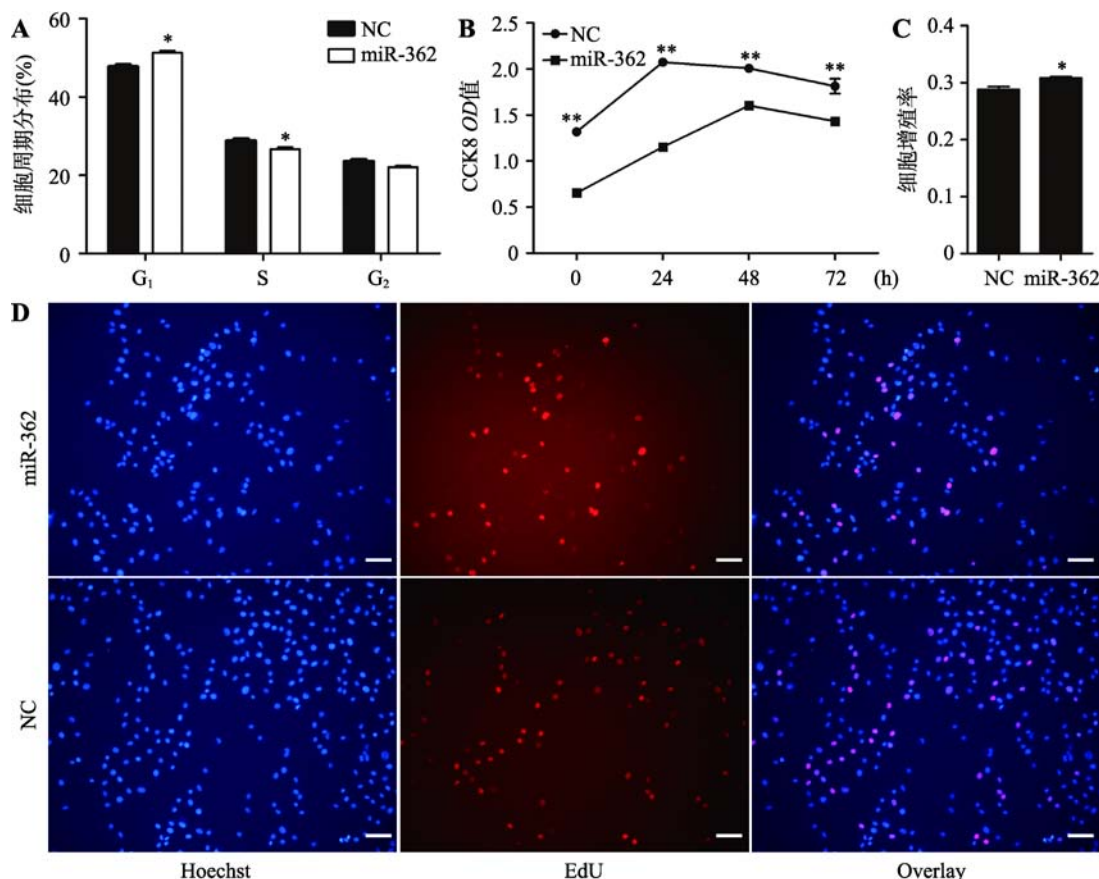


图 5 miR-362 抑制猪未成熟支持细胞增殖

Fig. 5 miR-362 inhibited porcine immature Sertoli cell proliferation

A: miR-362 对猪未成熟支持细胞周期的影响; B: CCK8 检测 miR-362 对猪未成熟支持细胞增殖的影响; C: EdU 检测 miR-362 对猪未成熟支持细胞增殖影响的统计结果; D: EdU 检测 miR-362 对猪未成熟支持细胞增殖影响的代表图。* $P < 0.05$ 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著; 蓝色细胞为 Hoechst 染色, 代表所有的活细胞; 红色细胞为 EdU 染色, 代表正在增殖的细胞; Overlay 为 Hoechst 染色图和 EdU 染色图重叠; 标尺: 50 μm 。

结果显示, 抑制表达 *ZNF644* 基因同样显著抑制细胞的增殖能力(图 8, C 和 D)。

采用 Annexin V-FITC/PI 方法检测抑制表达 *ZNF644* 基因对细胞凋亡的影响(图 9, A 和 B), 相比于 NC, 转染 *ZNF644* siRNA 后处于凋亡早期和凋亡晚期的细胞比例明显增加, 统计结果显示 *ZNF644* siRNA 细胞转染组的凋亡率显著高于 NC 组($P < 0.05$) (图 9C)。qRT-PCR 检测两组细胞中 *Bcl2*、*BAX* 和 *Caspase-3* 基因的表达水平, 结果显示抑制表达 *ZNF644* 基因显著增加 *BAX* 和 *Caspase-3* 基因的表达水平($P < 0.05$), 而对 *Bcl2* 基因的表达水平显著降低(图 9D)。综合以上实验结果, 抑制表达 *ZNF644* 基因抑制猪未成熟支持细胞增殖而促进其凋亡。

3 讨 论

支持细胞作为雄性动物精子生成过程中的“保姆”细胞, 在精子生长发育过程中发挥着重要的作用。近年来, 随着 RNA-seq 技术的发展, 在猪睾丸组织中鉴定出大量 miRNA^[11, 23-25], 对 miRNA 功能研究的不断深入, 发现 miRNA 对猪未成熟支持细胞的增殖和凋亡具有重要的调控作用, 如 miR-762^[13]、miR-1285^[14]和 miR-638^[16]等。另外, 本课题组也证实 miR-26a、miR-10b、miR-34c 和 miR-222 对猪未成熟支持的增殖、凋亡或自噬具有调控作用(结果尚未发表)。在前期研究中, 本课题组利用 miRNA-mRNA 关联

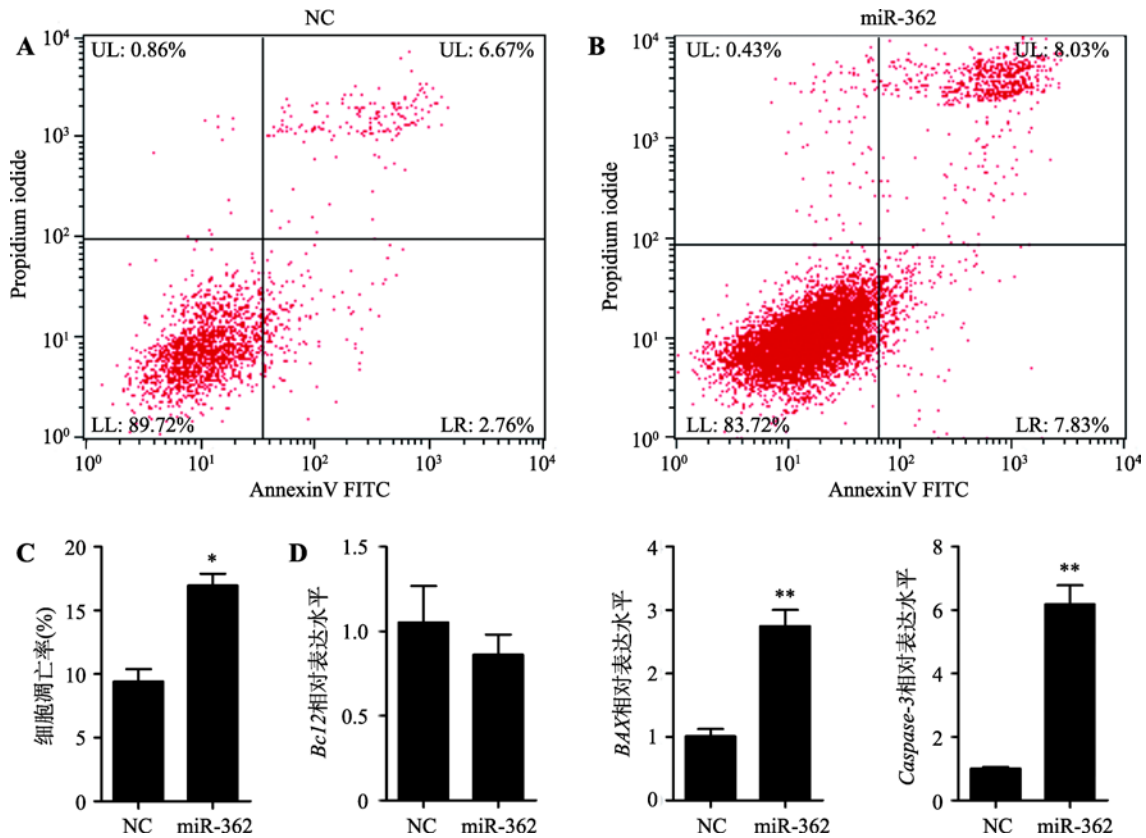


图 6 miR-362 促进猪未成熟支持细胞凋亡

Fig. 6 miR-362 promoted porcine immature Sertoli cell apoptosis

A, B: 采用 Annexin V-FITC/PI 法于流式细胞仪上检测各组细胞凋亡情况; C: 流式细胞术检测细胞凋亡情况的统计结果; D: 采用 qRT-PCR 技术检测两组细胞中 *Bcl2*、*BAX* 和 *Caspase-3* 基因的表达水平(*GAPDH* 为内参基因)。UL: upper left, 为碎片及损失细胞; UR: upper right, 为晚期凋亡细胞和死亡细胞; LL: lower left, 为正常细胞; LR: lower right, 为早期凋亡细胞; * $P < 0.05$ 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

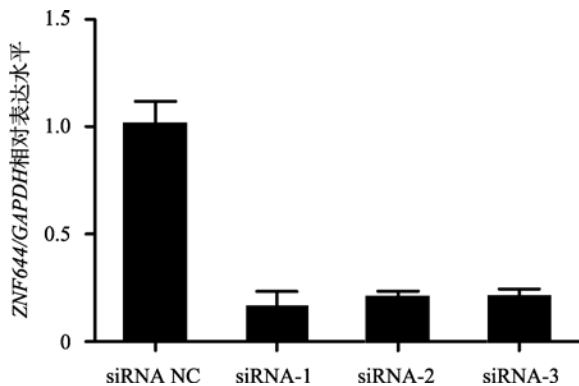


图 7 ZNF644 siRNA 有效抑制 ZNF644 基因表达水平
Fig. 7 ZNF644 siRNAs effectively suppressed the ZNF644 gene expression

设计并合成 3 条 ZNF644 siRNA 和 1 条 siRNA NC, 分别转染至 ST 细胞, 24 h 后收集细胞, 采用 qRT-PCR 技术检测各组细胞中 ZNF644 基因的表达水平。GAPDH 为内参基因, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

分析从不同发育阶段的猪睾丸组织中鉴定出 557 个 miR-362 的靶基因^[11]。但是, 目前关于 miR-362 的研究多集中于癌细胞。例如, miR-362-5p 通过靶向 *PI3K-C2β* (Phosphatidylinositol 3-kinase-C2β) 基因抑制神经母细胞瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[26]; miR-362-5p 通过靶向 *CYLD* 基因抑制人乳腺癌 MCF7 细胞的增殖、迁移和侵袭^[27]。此外, *CD82*^[28]、*GADD45α*^[29] 和 *CYLD*^[30] 等基因与 miR-362-5p 的靶向关系也得到了确定, 表明 miR-362 广泛参与调控细胞生物学过程。为揭示 miR-362 是否参与调控猪未成熟支持细胞增殖和凋亡, 本研究在猪未成熟支持细胞中过表达 miR-362 后, 经流式细胞术、CCK8 和 EdU 试剂盒检测, 结果表明 miR-362 抑制猪未成熟支持细胞增殖。

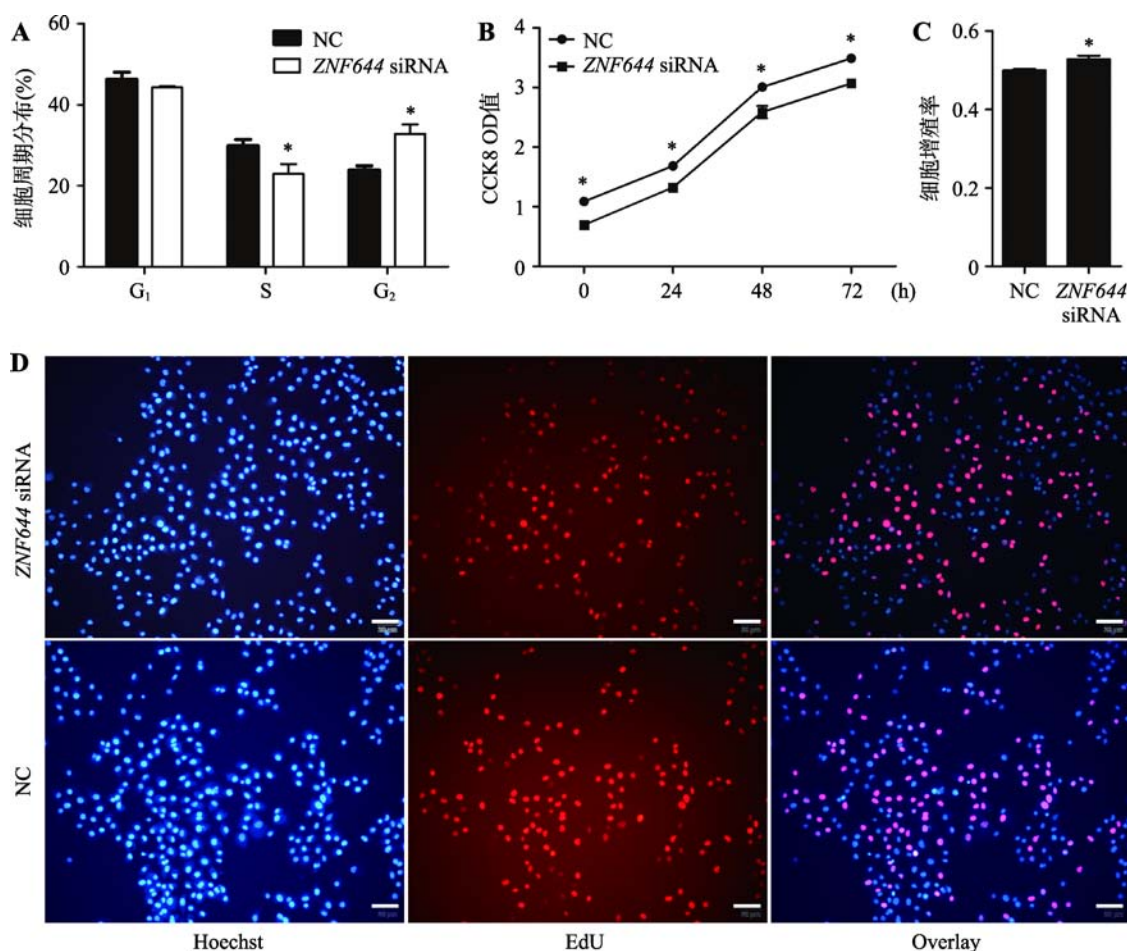


图 8 *ZNF644* siRNA 抑制猪未成熟支持细胞增殖

Fig. 8 *ZNF644* siRNA inhibited porcine immature Sertoli cell proliferation

A: 利用流式细胞术检测两组细胞中 *ZNF644* 基因对猪未成熟支持细胞周期的影响; B: CCK8 检测 *ZNF644* 基因对猪未成熟支持细胞增殖的影响; C: EdU 检测 *ZNF644* 基因对猪未成熟支持细胞增殖影响的统计结果; D: EdU 检测 *ZNF644* 基因对猪未成熟支持细胞增殖情况。* $P < 0.05$ 表示差异显著; 蓝色细胞为 Hoechst 染色, 代表所有的活细胞; 红色细胞为 EdU 染色, 代表正在增殖的细胞; Overlay 为 Hoechst 染色图和 EdU 染色图重叠; 标尺: 50 μm 。

为进一步验证 miR-362 对猪未成熟支持细胞凋亡的调控作用, 本研究采用流式细胞术检测了过表达 miR-362 后细胞的凋亡情况, 结果表明 miR-362 促进猪未成熟支持细胞凋亡。同时, 采用 qRT-PCR 技术检测了细胞凋亡相关基因的表达水平, 包括 *BCL2*、*BAX* 和 *Caspase-3* 基因。*BCL2* 和 *BAX* 基因作为 *BCL2* 基因家族的成员, 广泛参与调控细胞凋亡, 其中 *BCL2* 蛋白位于细胞质与线粒体外膜连接从而发挥抗凋亡作用, 而 *BAX* 蛋白通过调节线粒体外膜通透性而发挥促凋亡作用^[22, 31]。*Caspase-3* 蛋白作为 *Caspase* 级联反应中的一个重要的公共凋亡效应因子, 通过切割多种蛋白质底物, 引起瀑布式的

级联反应, 进而导致细胞死亡, 在细胞凋亡程序中发挥着最后的枢纽作用^[21]。本研究结果显示, 过表达 miR-362 后, *BCL2* 基因的表达水平显著降低, 而 *BAX* 和 *Caspase-3* 基因的表达水平显著增加, 结合流式细胞术结果证明 miR-362 促进猪未成熟支持细胞凋亡。

为进一步确定 miR-362 抑制猪未成熟支持细胞增殖而促进其凋亡的靶基因, 本文通过对前期 miRNA-mRNA 关联分析结果的筛选, 并结合多款 miRNA 靶基因预测软件对 miR-362 靶基因进行预测的结果, 分析预测出 *ZNF644* 基因可能为 miR-362 的靶基因。本研究在验证了 miR-362 和 *ZNF644* 基

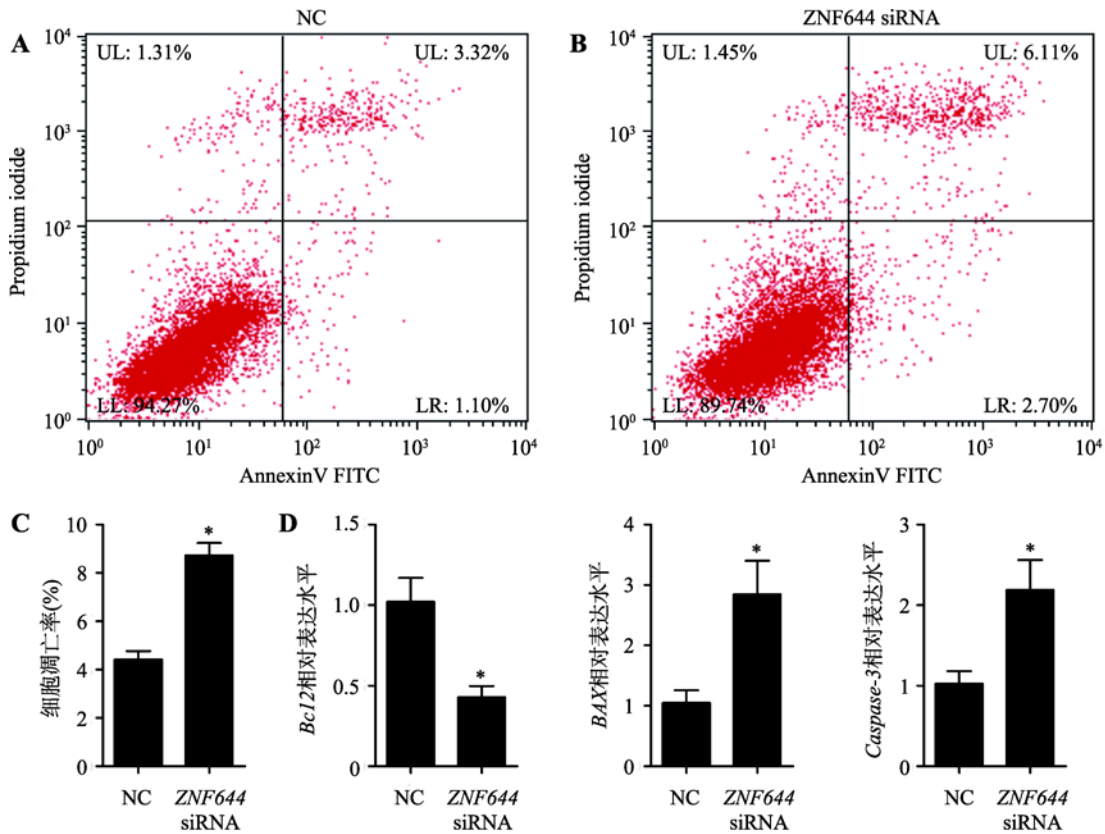


图 9 ZNF644 siRNA 促进猪未成熟支持细胞凋亡

Fig. 9 ZNF644 siRNA promoted porcine immature Sertoli cell apoptosis

A, B: 采用 Annexin V-FITC/PI 法于流式细胞仪上检测各组细胞的凋亡情况; C: 流式细胞术检测细胞凋亡情况的统计结果; D: 采用 qRT-PCR 技术检测两组细胞中 ZNF644 基因对猪未成熟支持细胞中凋亡相关基因表达水平的影响(GAPDH 为内参基因)。UL: upper left, 为碎片及损失细胞; UR: upper right, 为晚期凋亡细胞和死亡细胞; LL: lower left, 为正常细胞; LR: lower right, 为早期凋亡细胞; * $P < 0.05$ 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

因在 7 个发育阶段的猪睾丸组织中的表达水平呈显著负相关的基础上, 采用双荧光素酶报告基因系统验证了 miR-362 在猪支持细胞中靶向 ZNF644 基因 3'UTR, 且 miR-362 抑制 ZNF644 基因在猪支持细胞中的 mRNA 表达水平。以上结果表明, miR-362 调控猪支持细胞增殖和凋亡可能通过抑制 ZNF644 基因的表达而得以实现。

锌指蛋白是指含有通过结合 Zn^{2+} 稳定的、短的、可以自我折叠形成“手指”结构的一类蛋白质, 通过与靶分子 DNA、RNA、DNA-RNA 序列特异性结合, 以及与自身或其它锌指蛋白的结合, 在转录和翻译水平上调控基因的表达。研究表明, 锌指蛋白基因家族成员广泛的表达于动物不同发育阶段的睾丸组织以及精子细胞、间质细胞和支持细胞^[32-34],

提示其在动物睾丸发育和精子生成过程中发挥着重要作用。ZNF644(Zinc finger protein 644)蛋白结构含有多个 C_2H_2 结构, 为 C_2H_2 型锌指蛋白, 研究显示 ZNF644 能与常染色质组蛋白甲基转移酶中的 G9a 和 GLP 形成稳定的复合物并共同调控组蛋白 H3K9 二甲基化, 从而改变染色质结构及影响基因转录, 且该生物学过程与胚胎形成中细胞分化和增殖相关^[35, 36]。尽管如此, 目前尚未有关于 ZNF644 基因在猪未成熟支持细胞中的功能研究报道。本研究不仅将 ZNF644 基因确定为 miR-362 的一个靶基因, 且证明其表达水平受 miR-362 的负向调控。在此基础上, 本研究设计合成 ZNF644 siRNA 并转染至猪未成熟支持细胞, 实验结果表明抑制表达 ZNF644 基因可以抑制猪支持细胞增殖而促进其凋亡, 该结果与过

表达 miR-362 一致。综上所述, miR-362 可能通过靶向 ZNF146 基因抑制猪未成熟支持细胞增殖而促进其凋亡。

参考文献(References):

- [1] Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N. The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: Spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens)*, 2015, 14(4): 479–503. [\[DOI\]](#)
- [2] Chojnacka K, Zarzycka M, Mruk DD. Biology of the Sertoli cell in the fetal, pubertal, and adult mammalian testis. *Results Probl Cell Differ*, 2016, 58: 225–251. [\[DOI\]](#)
- [3] Gerber J, Heinrich J, Brehm R. Blood-testis barrier and Sertoli cell function: lessons from SCCx43KO mice. *Reproduction*, 2016, 151(2): R15–27. [\[DOI\]](#)
- [4] Johnson L, Thompson DL Jr., Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105(1–2): 23–51. [\[DOI\]](#)
- [5] França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 2016, 4(2): 189–212. [\[DOI\]](#)
- [6] Zhou Y, Wang H, Wang C, Qiu XF, Benson M, Yin XQ, Xiang Z, Li DM, Han XD. Roles of miRNAs in microcystin-LR-induced Sertoli cell toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 287(1): 1–8. [\[DOI\]](#)
- [7] Ran ML, Chen B, Yin J, Yang AQ, Li Z, Jiang M. Advances in porcine miRNAome. *Hereditas(Beijing)*, 2014, 36(10): 974–984.
冉茂良, 陈斌, 尹杰, 杨岸奇, 李智, 蒋明. 猪 microRNA 组学研究进展. *遗传*, 2014, 36(10): 974–984. [\[DOI\]](#)
- [8] Ran ML, Chen B, Yin J, Yang AQ, Jiang M. Advances in miRNA research related to testis development and spermatogenesis. *Hereditas(Beijing)*, 2014, 36(7): 646–654.
冉茂良, 陈斌, 尹杰, 杨岸奇, 蒋明. 睾丸发育和精子生成相关 miRNA 研究进展. *遗传*, 2014, 36(7): 646–654. [\[DOI\]](#)
- [9] Zhang XF, Song H, Liu J, Zhang WJ, Yan XH, Li H, Wang N. Identification and analysis of ZFPM2 as a target gene of miR-17-92 cluster in chicken. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(4): 333–345.
张潇飞, 宋鹤, 刘静, 张文建, 闫晓红, 李辉, 王宁. 鸡 miR-17-92 基因簇靶基因 ZFPM2 的鉴定及功能分析. *遗传*, 2017, 39(4): 333–345. [\[DOI\]](#)
- [10] Li JT, Zhao W, Li DD, Feng J, Ba G, Song TZ, Zhang HP. miR-101a targeting EZH2 promotes the differentiation of goat skeletal muscle satellite cells. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(9): 828–836.
李俊涛, 赵薇, 李丹丹, 冯静, 巴贵, 宋天增, 张红平. miR-101a 靶向 EZH2 促进山羊骨骼肌卫星细胞的分化. *遗传*, 2017, 39(9): 828–836. [\[DOI\]](#)
- [11] Ran ML, Chen B, Wu MS, Liu XC, He CQ, Yang AQ, Li Z, Xiang YJ, Li ZH, Zhang SW. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles in development of porcine testes. *Rsc Advances*, 2015, 5(78): 63439–63449. [\[DOI\]](#)
- [12] Yao C, Sun M, Yuan Q, Niu M, Chen Z, Hou J, Wang H, Wen L, Liu Y, Li Z, He Z. MiRNA-133b promotes the proliferation of human Sertoli cells through targeting GLI3. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2201–2219. [\[DOI\]](#)
- [13] Ma CP, Song HB, Yu L, Guan KF, Hu PD, Li Y, Xia XY, Li JL, Jiang S, Li FG. MiR-762 promotes porcine immature Sertoli cell growth via the ring finger protein 4 (RNF4) gene. *Sci Rep*, 2016, 6: 32783. [\[DOI\]](#)
- [14] Jiao ZJ, Yi W, Rong YW, Kee JD, Zhong WX. MicroRNA-1285 Regulates 17 β -estradiol-inhibited immature boar Sertoli cell proliferation via adenosine monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 2015, 156(11): 4059–4070. [\[DOI\]](#)
- [15] Yin X, Ma T, Han R, Ding J, Zhang H, Han X, Li D. MiR-301b-3p/3584-5p enhances low-dose mono-n-butyl phthalate (MBP)-induced proliferation by targeting Rasd1 in Sertoli cells. *Toxicol in Vitro*, 2017, 47: 79–88. [\[DOI\]](#)
- [16] Hu P, Guan K, Feng Y, Ma C, Song H, Li Y, Xia X, Li J, Li F. miR-638 Inhibits immature Sertoli cell growth by indirectly inactivating PI3K/AKT pathway via SPAG1 gene. *Cell Cycle*, 2017, 16(23): 2290–2300. [\[DOI\]](#)
- [17] Guo XJ, Su B, Zhou ZM, Sha JH. Rapid evolution of mammalian X-linked testis microRNAs. *BMC Genom*, 2009, 10: 97. [\[DOI\]](#)
- [18] Chen Y, Zhou Y, Wang J, Wang L, Xiang Z, Li D, Han X. Microcystin-leucine arginine causes cytotoxic effects in Sertoli cells resulting in reproductive dysfunction in male mice. *Sci Rep*, 2016, 6: 39238. [\[DOI\]](#)
- [19] Ma C, Song H, Guan K, Zhou J, Xia X, Li F. Characterization of swine testicular cell line as immature porcine Sertoli cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016, 52(4): 427–433. [\[DOI\]](#)
- [20] Mignard V, Lalier L, Paris F, Vallette FM. Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1266. [\[DOI\]](#)
- [21] Savitskaya MA, Onishchenko GE. Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Mosc)*, 2015, 80(11): 1393–1405. [\[DOI\]](#)

- [22] Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2014, 21(2): 206–215. [DOI]
- [23] Lian C, Sun B, Niu S, Yang R, Liu B, Lu C, Meng J, Qiu Z, Zhang L, Zhao Z. A comparative profile of the microRNA transcriptome in immature and mature porcine testes using Solexa deep sequencing. *FEBS J*, 2012, 279(6): 964–975. [DOI]
- [24] Luo L, Ye L, Liu G, Shao G, Zheng R, Ren Z, Zuo B, Xu D, Lei M, Jiang S, Deng C, Xiong Y, Li F. Microarray-based approach identifies differentially expressed microRNAs in porcine sexually immature and mature testes. *PLoS One*, 2010, 5(8): e11744. [DOI]
- [25] Luo Z, Liu Y, Chen L, Ellis M, Li M, Wang J, Zhang Y, Fu P, Wang K, Li X, Wang L. MicroRNA profiling in three main stages during porcine spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32(3): 451–460. [DOI]
- [26] Wu K, Yang L, Chen J, Zhao H, Wang J, Xu S, Huang Z. miR-362-5p inhibits proliferation and migration of neuroblastoma cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase-C2 β . *FEBS Lett*, 2015, 589(15): 1911–1919. [DOI]
- [27] Ni F, Gui Z, Guo Q, Hu Z, Wang X, Chen D, Wang S. Downregulation of miR-362-5p inhibits proliferation, migration and invasion of human breast cancer MCF7 cells. *Oncol Lett*, 2016, 11(2): 1155–1160. [DOI]
- [28] Zhang QH, Yao YL, Wu XY, Wu JH, Gu T, Chen L, Gu JH, Liu Y, Xu L. Anti-miR-362-3p inhibits migration and invasion of human gastric cancer cells by its target CD82. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(7): 1967–1976. [DOI]
- [29] Yang P, Ni F, Deng RQ, Qiang G, Zhao H, Yang MZ, Wang XY, Xu YZ, Chen L, Chen DL, Chen ZJ, Kan LX, Wang SY. MiR-362-5p promotes the malignancy of chronic myelocytic leukaemia via down-regulation of GADD45a. *Mol Cancer*, 2015, 14: 190. [DOI]
- [30] Ni F, Guo C, Sun R, Fu B, Yang Y, Wu L, Ren S, Tian Z, Wei H. MicroRNA transcriptomes of distinct human NK cell populations identify miR-362-5p as an essential regulator of NK cell function. *Sci Rep*, 2015, 5: 9993. [DOI]
- [31] Correia C, Lee SH, Meng XW, Vincelette ND, Knorr KL, Ding H, Nowakowski GS, Dai H, Kaufmann SH. Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(7): 1658–1671. [DOI]
- [32] Song H, Su D, Lu P, Yang J, Zhang W, Yang Y, Liu Y, Zhang S. Expression and localization of the spermatogenesis-related gene, Znf230, in mouse testis and spermatozoa during postnatal development. *BMB Rep*, 2008, 41(9): 664–669. [DOI]
- [33] Li N, Sun H, Wu Q, Tao D, Zhang S, Ma Y. Cloning and expression analysis of a novel mouse zinc finger protein gene Znf313 abundantly expressed in testis. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40(2): 270–276. [DOI]
- [34] Xu W, Zhang S, Qiu W, He G, Liu Y, Sun Y, Ma Y, Dong J, Zhang W. Spermatogenesis-related ring finger gene ZNF230 promoter: identification and functional analysis. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(5): 1187–1193. [DOI]
- [35] Olsen JB, Wong L, Deimling S, Miles A, Guo H, Li Y, Zhang Z, Greenblatt JF, Emili A, Tropepe V. G9a and ZNF644 physically associate to suppress progenitor gene expression during neurogenesis. *Stem Cell Reports*, 2016, 7(3): 454–470. [DOI]
- [36] Wang H, Su S, Yang M, Hu N, Yao Y, Zhu R, Zhou J, Liang C, Guan H. Association of ZNF644, GRM6, and CTNND2 genes with high myopia in the Han Chinese population: Jiangsu Eye Study. *Eye (Lond)*, 2016, 30(7): 1017–1022. [DOI]

(责任编辑: 李明洲)