

· 论 著 ·

## 小鼠 Boule 蛋白与 Crem3'UTR 结合并调节其表达\*

林昌海, 曾梅, 陈述, 卢亦路, 马用信<sup>△</sup>

(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, 成都 610041)

**摘要:**目的 研究小鼠 Boule 蛋白与精子成熟相关基因 Crem 之间的相互作用, 揭示 Boule 蛋白在精子发生过程中所起的作用。方法 构建 pGEX-Boule 表达载体, 将表达载体转化宿主菌(BL21)感受态细胞, 诱导纯化出 Boule 蛋白, 应用 RT-PCR 和凝胶滞后实验(EMSA)分析与 Boule 蛋白结合的 mRNA。结果 表达载体 pGEX-Boule 构建成功, 纯化出 GST-Boule 融合蛋白, RT-PCR 和 EMSA 实验证明 Boule 蛋白能够结合 Crem3'UTR。结论 Boule 蛋白能够结合 Crem3'UTR, 可能通过调控 Crem 蛋白的表达作用于精子发生过程。

关键词: EMSA; RNA 结合蛋白; Boule; Crem

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.24.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)24-2462-03

## Mouse boule protein binds to 3'UTR of Crem mRNA and regulates its expression\*

Lin Changhai, Zeng Mei, Chen Shu, Lu Yilu, Ma Yongxin<sup>△</sup>

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

**Abstract: Objective** To investigate the interaction between Boule protein and sperm maturation related gene Crem and reveal the function of Boule protein in spermatogenesis. **Methods** The pGEX-Boule expression vector was constructed and transformed into BL21 competent cells, and induced Boule protein was purified. RT-PCR and EMSA were performed to analyze the mRNA bond to the Boule protein. **Results** The recombinant expression vector pGEX-Boule was successfully constructed and purified GST-Boule protein was obtained, RT-PCR and EMSA experiments indicated that Boule protein was capable to bind to Crem3'UTR. **Conclusion**

Boule protein may regulate the expression of the Crem protein by binding to Crem3'UTR and plays a role in spermatogenesis process.

Key words: EMSA; RNA-binding protein; Boule; Crem

哺乳动物的精子发生可以分为精原细胞(spermatogonium)分化为初级精母细胞(primary spermatocyte), 初级精母细胞通过减数分裂形成次级精母细胞(secondary spermatocyte), 次级精母细胞通过有丝分裂形成圆形精细胞(round spermatid)以及圆形精细胞转变成成熟的精子(elongating spermatid)等 4 个主要阶段, 其中减数分裂是精子发生过程的关键步骤。参与减数分裂调控的基因缺失或突变容易引起无精症和男性不育。DAZ(deleted in azoospermia)家族就是这些基因中的成员。DAZ 基因家族属于生殖特异性基因, 均在生殖细胞中特异表达, 共同特点是都包含一个 RNA 结合域(RNA-binding domain, RBM)和 DAZ 序列重复(DAZ repeat)<sup>[1]</sup>。目前, 已确认 DAZ 基因家族成员主要有 3 个, 包括 1 个位于 Y 染色体上的 DAZ 基因和 2 个位于常染色体上的 Dazl、Boule 基因。在不同物种中, 它们在生殖细胞发育的不同阶段起着关键的作用。Boule 蛋白是 2001 年发现的 DAZ 家族新成员<sup>[2]</sup>, 在睾丸组织中特异表达, 是人精子发生过程中减数分裂转换的主要调控因子。Boule 基因分布于所有后生动物, 人类中定位于染色体 2q33。Xu 等<sup>[3]</sup>发现在小鼠和人类中, Boule 起始表达于细线期的精母细胞, 在偶线期加强, 在粗线期达到最高, 在双线期减弱, 直至次级精母细胞和早期精细胞中都可以检测得到。Michael 等<sup>[4]</sup>的实验结果表明, 在敲除小鼠的 Boule 基因后, 小鼠能够进行正常的减数分裂而产生圆形精细胞, 但是圆形精细胞

却不能正常地进行精子形态变化而形成精子。这说明 Boule 基因在精子形态变化这一过程中起着关键性的作用。Crem(cyclic AMP-responsive element modulator)基因是一种 cAMP 反应元素调节因子, 在减数分裂后精子细胞中高表达, 是一种转录激活因子<sup>[5]</sup>。Crem 基因突变小鼠中<sup>[6]</sup>, 精子形成过程的第一步即被阻断, 生精上皮中后期的精子细胞、成熟精子均缺失, 而发生凋亡的生精细胞数量显著增加, 从而导致不育。由于 Boule 和 Crem 基因最终都能作用于精子成熟这一阶段, 因此, 在 Boule 和 Crem 之间可能存在某种关联。本文拟通过凝胶滞后实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)等方法, 研究 Boule 蛋白与 Crem 基因之间的相互作用方式, 揭示 Boule 蛋白在精子发生过程中所起的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 性成熟的小鼠睾丸组织购自华西动物中心 7 周龄昆明小白鼠; rTaq 酶、高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、逆转录酶购自大连宝生物工程公司; 限制性内切酶购自 Fermentas 公司; 表达载体 pGEX-5X-3、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)本研究室保存; RNA 提取试剂盒购自 Tiangen 公司; Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 购自 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司; T 载体试剂(pGEM-T-easy)购自美国 Promega 公司; SP6/T7 探针标记试剂盒购自美国 Promega 公司; Hybond-N<sup>+</sup>膜购自 Amersham Biosciences 公司; 地高辛检测

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)基金资助项目(2012CB947600); 国家自然科学基金资助项目(31070676); 教育部春晖计划基金资助项目(Z2009-1-61003)。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel: (028)85164010; E-mail: mayongxin@gmail.com。

试剂盒购自 Roche 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠 Boule 基因的克隆** 引物设计:根据 GeneBank 中 Boule 的 mRNA 的序列(NM\_029267.3),经过分析所克隆的核苷酸序列、表达载体多克隆位点内限制性内切酶的情况,设计并合成引物如下:正向引物:CGC GGA TCC ATG GAG ACC GAG TCC CGG (含有酶切位点 BamH I),反向引物:CCG CTC GAG GCC GCT CGA GTC AAA AT (含有酶切位点 XhoI)。

**PCR 扩增:**PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,58.5  $^{\circ}$ C 复性 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,35 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

**1.2.2 重组表达载体 pGEX-Boule 的构建** 将纯化后的 Boule 的胶回收产物以及 pGEX-5x-3 质粒分别用 BamH I 和 XhoI 进行双酶切,37  $^{\circ}$ C 过夜,然后用 Omega Gel Extraction Kit 回收。将回收的 PCR 产物和载体在 16  $^{\circ}$ C 条件下连接过夜。连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。最后对重组菌落进行筛选、酶切、测序鉴定。

**1.2.3 基因工程菌的诱导、表达及纯化** pGEX-Boule 和 pGEX-5x-3 表达载体分别转化 BL21 感受态细胞。挑取单克隆,37  $^{\circ}$ C 摇床振荡培养过夜。第 2 天以 1:100 的比例接种至 1 L 含 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 摇床振荡培养至 OD600 达到 0.6~0.8。加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L,20  $^{\circ}$ C 诱导培养 4~6 h 后将培养菌液置于冰上冷却,于 12 000 r/min,4  $^{\circ}$ C 离心 10 min,收集菌体。将收集的菌体用 5 倍体积的 1 $\times$ PBS 悬浮,置冰上,超声破菌,裂解液于 12 000 r/min,4  $^{\circ}$ C 离心 15 min,收集上清。将蛋白质上清液加入到有 GST Beads 的离心管中,将离心管置于垂直混匀器上,在 4  $^{\circ}$ C 结合 60~90 min。在 4  $^{\circ}$ C 离心机中 500 r/min,离心 3 min,弃上清液。每 0.5 mL GST Beads 中加 5 mL PBS(1% TritonX-100)并来回颠倒混匀,4  $^{\circ}$ C 500 r/min,离心 3 min,弃上清液。重复步骤 4~5 次。每 0.5 mL GST Beads 中加 0.5 mL 洗脱缓冲液,4  $^{\circ}$ C 结合 20 min,4  $^{\circ}$ C 500 r/min,离心 5 min,收集上清液。

**1.2.4 提取与 Boule 蛋白结合的 mRNA** 取新鲜睾丸组织,液氮充分研磨,然后加入裂解缓冲液,吸到 1.5 mL 离心管中,4  $^{\circ}$ C,15 000 g 离心 10 min,收集上清液。将睾丸组织上清液、纯化后的蛋白、GST Beads、RNA 结合缓冲液在 4  $^{\circ}$ C 中结合 1 h,然后用 RNA 结合缓冲液/0.25% TX(并含有肝素)洗 10 min,随后再用 RNA 结合缓冲液/0.25% TX 洗 4 次,用常规提取 RNA 的步骤将结合在 GST Beads 上的 RNA 提取出来。最后把从 GST、GST-Boule 蛋白中分离出来的 RNA 进行反转录。

**1.2.5 RT-PCR 反应** 设计 Crem 基因 5' UTR、CDS 和 3' UTR 特异性引物,利用反转录得到的 cDNA 做模板,进行 RT-PCR 反应。

**1.2.6 凝胶滞后实验(EMSA)** 根据 RT-PCR 反应,将 PCR 产物连接 pGEM-T-Easy Vector 载体,根据插入的方向以及插入的序列中是否含有该酶切位点,用相应的酶将载体进行线性化,分别在其扩增引物前加上 T7 启动子进行扩增,合成带有地高辛标记的探针。将探针分别和纯化后的 GST 和 GST-Boule 蛋白作凝胶迁移滞后实验。

## 2 结果

**2.1 Boule 基因的扩增和 pGEX-Boule 表达载体构建** PCR

产物经 1% 琼脂糖电泳分析可见约 900 bp 的单一一条带,片段大小与预期一致。重组质粒 pGEX-Boule 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后,经 PCR 及双酶切鉴定,酶切片段和载体大小与预期一致(图 1)。

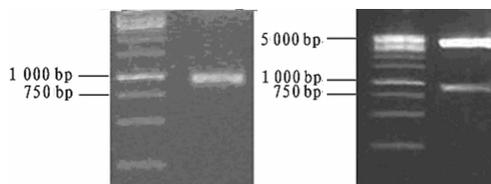
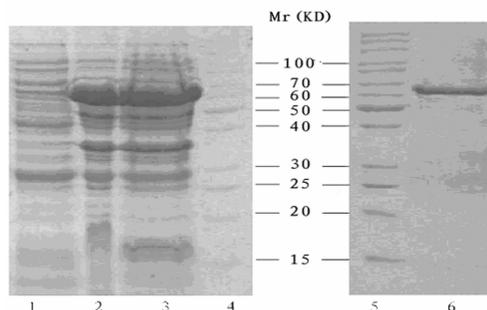


图 1 Boule 的 PCR 产物和 pGEX-Boule 载体双酶切琼脂糖电泳分析

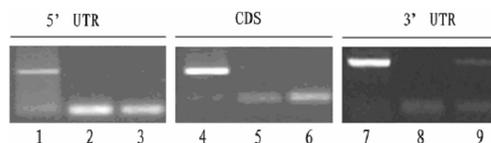
**2.2 融合蛋白 GST-Boule 的表达及纯化** 经双酶切初步鉴定正确的阳性克隆测序,序列正确的表达载体和空载体 pGEX-5x-3 分别转化宿主菌(BL21),IPTG 诱导表达。诱导菌经过超声破碎离心后,收集上清液。用 GST 介质纯化后,进行 SDS-PAGE 电泳,在约 66 KDa 见一条带,与预期的 GST-Boule 大小相符融合蛋白(图 2)。



1:诱导前 GST-Boule;2:诱导后 GST-Boule;3:诱导后 GST-Boule 破菌上清液;4:Marker;5:Marker;6:纯化后 GST-Boule。

图 2 SDS-PAGE 显示 GST-Boule 表达及纯化

**2.3 通过 RT-PCR 证实 Boule 蛋白能与靶 mRNA 底物结合** 用睾丸总 RNA 和 GST 结合的 RNA 为对照,进行 RT-PCR 的扩增。结果表明 Crem5' UTR、Crem CDS 和 Crem3' UTR 都能在总 RNA 反转录出来的 cDNA 中得到,GST-Boule 蛋白能够扩增出 Crem3' UTR,而 GST 蛋白都不能扩增出来(图 3),说明 Boule 蛋白能够与 Crem mRNA 3' UTR 结合。



Boule 和 GST 各自扩增结果:睾丸总 RNA(1,4,7);GST(2,5,8);GST-Boule(3,6,9)。

图 3 Boule 蛋白与 GST 蛋白结合的睾丸 RNAs 各自应用所识别 mRNAs 特异的引物进行 RT-PCR

**2.4 EMSA 实验证明 Crem 能与 Boule 蛋白结合** 根据 RT-PCR 试验结果,在后续试验,选择 Crem3' UTR 进行的研究。利用 EMSA 验证 Boule 蛋白能否与 Crem mRNA 结合。首先用探针标记试剂盒制备 Crem 3' UTR 的探针。将不同浓度的 GST-Boule 蛋白与 Crem 3' UTR mRNA 探针进行结合,结果发现 GST-Boule 蛋白能与 Crem 3' UTR mRNA 探针结合,而 GST 蛋白不能与其结合(图 4)。进一步说明 Boule 蛋白能够与 Crem mRNA 3' UTR 结合。

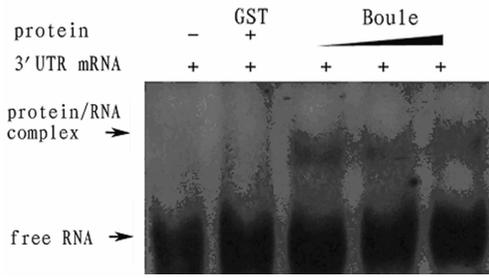


图 4 通过 EMSA 实验证明 Boule 蛋白能与 Crem3'UTR mRNA 结合

### 3 讨论

男性原发无精与少精症的遗传病因正日益受到重视,但由于生精过程的复杂性,长期以来对精子发生的病理生理认识不足,导致部分患者诊疗及预后判断上的困难。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,涉及众多的基因在空间和时间上的差异分布和表达<sup>[2]</sup>。近年来,对与生精过程相关的基因研究仍未发现直接的证据证实某一特定基因与原发无精和少精相关,但目前已确定出部分候选基因,如 Rbmy 基因、DBY 基因、DAZ(Deleted in azoospermia)基因家族等<sup>[7-8]</sup>。Boule 是近年来发现的 DAZ 基因家族的新成员,在结构上与 DAZ 家族的其他成员(DAZ 和 DAZL)有很多共同点<sup>[9]</sup>,三者均含有一个非常相似的 RNA 结合域(RNA-binding domain,RBD)或 RNA 识别基序(RRM),而这个 RNA 结合域与其他 RNA 结合蛋白不同<sup>[10]</sup>,三者均含有 DAZ 重复序列,而这个重复序列可能与蛋白质交互作用有关<sup>[11-12]</sup>。研究发现,DAZ 基因仅在灵长类表达,DAZL 基因分布于脊椎动物中,而 Boule 基因在所有后生动物中都有表达,因此,可以推断与 DAZ 和 DAZL 相比,Boule 是最原始的精子发生调控基因。

Xu 等<sup>[13]</sup>在敲除了果蝇的 Boule 基因后,其生殖细胞停留在第一次减数分裂中期而不能进入第二次减数分裂从而失去生殖能力,而在转入人的 Boule 基因后,果蝇恢复了正常的减数分裂而能够正常的繁殖。经分析,人类和果蝇的 Boule 蛋白在氨基酸水平上有 42% 相似性(30% 相同),其中 RBM 结构域上有 80% 的相似性。这一研究结果表明 Boule 在进化上高度保守而且在精子发生过程中 Boule 起着至关重要的作用。Maines 等<sup>[9]</sup>研究发现,在果蝇中 Boule 蛋白表达始于第一次减数分裂前期,调控 Twine 的表达,而 Twine 可磷酸化 cdc25 进而激活成熟促进因子(MPF),MPF 作为减数分裂过程中的关键性控制因子使细胞从 G<sub>2</sub> 期进入 M 期完成第一次减数分裂。Xu 等<sup>[3]</sup>发现在小鼠和人类中,Boule 表达贯穿于减数分裂和精细胞。Michael 等<sup>[4]</sup>的实验结果表明,在敲除小鼠的 Boule 基因后,小鼠能够进行正常的减数分裂而产生圆形精细胞,但圆形精细胞却不能正常地进行精子形态变化而形成精子。这说明 Boule 基因在小鼠精子形态变化这一过程中起着重要的作用。

由于 Boule 基因是一种 RNA 结合蛋白,为了更好地了解 Boule 对生殖细胞影响的分子机制,本研究从分离它结合的靶 mRNA 着手,研究它对生殖细胞的作用。Crem 基因在减数分裂后精子细胞中高表达,作为一种转录激活因子,它对一些单倍体生殖细胞转变为精子的基因的激活有重要作用,能抑制精细胞凋亡<sup>[14]</sup>。本研究结果表明 Boule 蛋白能够结合 Crem 基因 mRNA 的 3' 端非翻译区,提示 Boule 蛋白通过结合 Crem

mRNA 3'UTR 的方式来调控 Crem 蛋白的表达。在 Boule 基因缺失的小鼠中,Crem 基因的 mRNA 不能正常地翻译表达,因而精细胞转变为精子的过程不能被激活,导致无成熟精子的形成。

由于 Boule 基因序列在果蝇、斑马鱼、小鼠、灵长类和人类中高度保守<sup>[15]</sup>,因此,它们可能拥有相同的靶 mRNA,通过研究 Boule 在这些物种中的靶 mRNA,分析这些靶 mRNA 在进化过程中是否高度保守,以及 Boule 蛋白是通过哪些方式参与这些靶 mRNA 的代谢过程,有助于全面深入地了解 Boule 基因在调控精子发生过程中的作用。

### 参考文献:

- [1] 李齐发,李隐霞. DAZ 家族新成员 Boule 蛋白的结构与功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(10): 823-828.
- [2] 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.
- [3] Xu EY, Moore FL, Reijo RA. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans[J]. Proc Natl Sci USA, 2001, 98(13): 7414-7419.
- [4] Michael JW, Eugene GV, Xu YJ. A novel requirement in mammalian spermatid differentiation for the DAZ-family protein Boule[M]. Human Molecular Genetics, 2010.
- [5] 刘上峰,李麓芸. 人类睾丸生殖细胞凋亡相关基因的分子遗传学研究进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2002, 25(3): 169-172.
- [6] Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, et al. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene[J]. Nature, 1996, 380(6570): 162-165.
- [7] Houston DW, Zhang J, Maines JZ, et al. A Xenopus DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of Drosophila boule[J]. Development, 1998, 125: 171-180.
- [8] Lin Y, Page DC. Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice[J]. Dev Biol, 2005, 288: 309-316.
- [9] Maines JZ, Wasserman SA. Post-transcriptional regulation of the meiotic Cdc25 protein Twine by the Dazl orthologue Boule[J]. Nat Cell Biol, 1999, 1: 171-174.
- [10] Burd CG, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins[J]. Sci, 1994, 265(5172): 615-621.
- [11] Reijo R, Lee TY, Salo P, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene[J]. Nat Genet, 1995, 8(10): 383-389.
- [12] Tsui S, Dai T, Roettger S, et al. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL[J]. Genomics, 2000, 65(3): 266-273.

- 2005,115(4):1095-1102.
- [5] Scott JR, Muangman P, Gibran NS, et al. Making sense of hypertrophic scar; a role for nerves[J]. *Wound Repair Regen*, 2007, 15(Suppl 1):S27-31.
- [6] Huang B, Fu HM, Yang M, et al. Neuropeptide substance P attenuates hyperoxia-induced oxidative stress injury in type II alveolar epithelial cells via suppressing the activation of JNK pathway[J]. *Lung*, 2009, 187(6):421-426.
- [7] Jacob L, Lum L. Deconstructing the hedgehog pathway in development and disease[J]. *Science*, 2007, 318(5847):66-68.
- [8] Wang G, Zhang ZY, Xu Z, et al. Activation of the sonic hedgehog signaling controls human pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation in response to hypoxia[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(12):1359-1367.
- [9] Picicelli CV, Lewis PM, McMahon AP, et al. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung[J]. *Curr Biol*, 1998, 8(19):1083-1086.
- [10] Gomi T, Kimura A, Adriaensen D, et al. Stages in the development of the rat lung; morphometric, light and electron microscopic studies[J]. *Kaibogaku Zasshi*, 1994, 69(4):392-405.
- [11] Kusano KF, Pola R, Murayama T, et al. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling[J]. *Nat Med*, 2005, 11(11):1197-1204.
- [12] Fu M, Lui VC, Sham MH, et al. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut[J]. *J Cell Biol*, 2004, 166(5):673-684.
- [13] Daya-Grosjean L, Couve-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas[J]. *Cancer Lett*, 2005, 225(2):181-192.
- [14] Dieperink HI, Blackwell TS, Prince LS, et al. Hyperoxia and apoptosis in developing mouse lung mesenchyme[J]. *Pediatr Res*, 2006, 59(2):185-190.
- [15] Sugahara K, Tokumine J, Teruya K, et al. Alveolar epithelial cells; differentiation and lung injury[J]. *Respirology*, 2006, 11(Suppl 1):S28-31.
- [16] Bai TR, Zhou D, Weir T, et al. Substance P (NK1)- and neurokinin A (NK2)-receptor gene expression in inflammatory airway diseases[J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(3 Pt 1):L309-317.
- [17] Hafstrom I, Ringertz B, Lundeberg T, et al. The effect of endothelin, neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide and substance P on neutrophil functions[J]. *Acta Physiol Scand*, 1993, 148(3):341-346.
- [18] Oslund KL, Hyde DM, Putney LF, et al. Activation of neurokinin-1 receptors during ozone inhalation contributes to epithelial injury and repair[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39(3):279-288.
- [19] Yaraee R, Ghazanfari T, Substance P. Potentiates TGFbeta-1 production in lung epithelial cell lines[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2009, 8(1):19-24.
- [20] Marwan D, Zsengeller Z, Mitsialis A, et al. A paradoxical protective role for the proinflammatory peptide substance P receptor (NK1R) in acute hyperoxic lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(4):L687-697.
- [21] Miyaji T, Nakase T, Iwasaki M, et al. Expression and distribution of transcripts for sonic hedgehog in the early phase of fracture repair[J]. *Histochem Cell Biol*, 2003, 119(3):233-237.
- [22] Omenetti A, Yang L, Li YX, et al. Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation[J]. *Lab Invest*, 2007, 87(5):499-514.
- [23] Sicklick JK, Li YX, Melhem A, et al. Hedgehog signaling maintains resident hepatic progenitors throughout life[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(5):G859-870.
- [24] Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, et al. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer[J]. *Nature*, 2003, 422(6929):313-317.
- [25] Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, et al. Involvement of sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis[J]. *Development*, 1997, 124(1):53-63.
- [26] Bai CB, AL Joyner. Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2[J]. *Development*, 2001, 128(24):5161-5172.
- [27] Grindley JC, Bellusci S, Perkins D, et al. Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development[J]. *Dev Biol*, 1997, 188(2):337-348.

(收稿日期:2012-03-02 修回日期:2012-04-17)

(上接第 2464 页)

- [13] Xu EY, Lee DF, Klebes A, et al. Kornberg TB, Reijo Pera RA human BOULE gene rescues meiotic defects in infertile flies[J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(2):169-175.
- [14] Christensen GL, Wooding SP, Ivanov IP, et al. Sequencing and haplotype analysis of the Activator of CREM in the Testis(ACT) gene in populations of fertile and infertile males[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2006, 12(4):257-262.
- [15] Jiao X, Trifillis P, Kiledjian M. Identification of target messenger RNA substrates for the murine deleted in azoospermia-like RNA-binding protein[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(2):475-485.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-23)