

· 论 著 ·

神经肽 P 物质对高氧暴露下肺泡 II 型上皮细胞的影响及其对信号分子 Gli1 的调控*

杨 林, 党红星, 刘 聪, 方 芳, 许 峰[△]

(儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市“儿童发育重大疾病诊治与预防”国际科技合作基地, 重庆医科大学附属儿童医院 PICU, 重庆 400014)

摘 要:目的 探讨神经肽 P 物质(SP)对高氧暴露下早产鼠肺泡 II 型上皮细胞(AEC II)的影响及其对 SHH 信号通路下游信号分子 Gli1 的调控作用。方法 分离纯化原代早产鼠 AEC II, 随机分为空气组、高氧组、高氧+SP 组。空气组和高氧组分别在 21%和 95%氧浓度中暴露 24 h, 高氧+SP 组于高氧暴露前加入 SP 1×10^{-8} mol/L。电子显微镜下观察 AEC II 的形态变化, MTT 法检测细胞存活率, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测 Gli1 信号分子基因和蛋白表达水平。结果 与空气组比较, 高氧暴露 24 h AEC II 出现明显的损伤和凋亡改变, 凋亡率明显增加, 细胞存活率明显降低。神经肽 SP 干预后可明显降低 AEC II 凋亡, 细胞存活率明显升高。高氧刺激可促进 SHH 信号通路激活 Gli1 基因和蛋白表达在高氧损伤的 AEC II 表达增加, SP 干预后, 进一步促进 Gli1 的表达, 其基因和蛋白表达明显增加。结论 SP 是一个保护性的调控因子, 可以降低高氧诱导细胞损伤和凋亡, 促进细胞的存活, 可能与激活 SHH 信号通路有关。

关键词: P 物质; 高氧; 肺泡 II 型上皮细胞; Gli1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.24.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)24-2465-04

Effect of neuropeptide substance P on the type II alveolar epithelial cells exposed to hyperoxia and regulation function on Gli1 signal transduction molecular*

Yang Lin, Dang Hongxing, Liu Cong, Fang Fang, Xu Feng[△]

(Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders; PICU, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014 China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory mechanism of neuropeptide substance P(SP) in lung injury induced by hyperoxia and the relationship between SP and Gli1 of SHH signal transduction pathway. **Methods** The primary premature rats type II alveolar epithelial cells(AEC II) were isolated and purified. The cells were divided into three groups: Air group, Hyperoxia group, Hyperoxia+SP group. SP was added in advance to reach a final concentration 1×10^{-8} mol/L. As following, the group was exposed to 21% or 95% oxygen for 24 h respectively. Morphologic change of AEC II was observed under electron microscope. MTT and Flow cytometry were employed to detect the survival and apoptosis rate. Real time RT-PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of Gli1 signal molecules. **Results** After 24 h of hyperoxia exposure, apoptosis rate of AEC II in hyperoxia group increased significantly and the survival rate decreased remarkably compared to air group. The apoptosis rate decreased obviously after the intervention of SP. Meanwhile, the morphologic injure improved significantly. Hyperoxia stimulation could result in activation of SHH signal transduction pathway, and the expression of Gli1 increased remarkably in the impaired AEC II induced by hyperoxia. **Conclusion** SP could decrease the oxidative stress injury and inhibit the apoptosis of AEC II exposed to hyperoxia, has protective effect on AEC II against hyperoxia, which might be associated with the activation of SHH signal transduction pathway.

Key words: substance P; hyperoxia; type II alveolar epithelial cells; Gli1

氧疗是临床上治疗呼吸系统疾病的常用方法, 但长时间吸入高浓度氧, 可产生大量的氧自由基, 从而引起炎症、细胞损伤、坏死和凋亡, 可导致各种急性或慢性肺损伤^[1-2]。肺泡上皮细胞是高氧所致肺损伤的主要靶点, 其损伤后的修复主要依赖于肺泡 II 型上皮细胞(AEC II)的增殖、分化为肺泡 I 型上皮细胞(AEC I)。AEC II 细胞的功能状态是决定肺损伤病理转归的主要因素^[3]。

神经肽 P 物质(SP)广泛分布于气道上皮细胞层内, 可启动早期的神经源性炎症反应, 参与对损伤细胞的修复、增殖、迁移、分化调控^[4-5]。本课题组前期研究发现 SP 能够降低高氧

诱导的氧化损伤, 但调节的分子机制尚不完全清楚^[6]。SHH 信号通路是一种重要的信号转导通路, 在细胞损伤修复中有着重要的作用, 其成员包括 SHH、Patched1(Ptc1)、Smoothed(Smo)以及 Gli, 而 Gli1 是 SHH 信号通路最主要的效应分子^[7-8]。研究发现 SHH 信号通路在肺的形态发生和器官形成中起着至关重要的作用^[9-10], 并参与了胚胎形成、组织修复、创伤愈合^[11-13]。

SP 能否降低高氧暴露对肺泡 II 型上皮细胞的损伤, 促进损伤后的修复, 且是否与调控 SHH 信号通路有关, 目前, 相关研究甚少。本文探讨了高氧暴露及 SP 干预对 AEC II 细胞存

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973218)。△ 通讯作者, Tel: 15310300613; E-mail: xufeng9899@yahoo.com.cn。

活、凋亡及对 SHH 信号通路分子 Gli1 的影响,为高氧肺损伤预防和治疗提供理论指导和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雌、雄性 SD 大鼠,体质量 180~200 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,所有实验遵守国家关怀和使用实验动物的指导方针,本实验通过了重庆市伦理委员会审查。

1.2 材料 SP(Abcam 公司),DMEM/F12 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司),胰蛋白酶(BBI 公司),AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物),流式细胞仪(美国 BD 公司),Gli1 多克隆抗体(Abbottec 公司),BCA 蛋白定量检测试剂盒(北京百泰克公司),荧光定量 PCR 仪 FTC2000(加拿大),RT 试剂、荧光定量 PCR 试剂、sybr green I (Shine Gene 公司)。

1.3 早产鼠 AEC II 的分离及培养 健康成年 SD 大鼠,雌雄按 1:1 合笼交配,次日晨查见阴栓记为妊娠第 1 天,将孕鼠于孕第 19 天(足月为 22 d)时行剖宫产取出早产鼠,分别用 0.25% 胰酶、0.3% 胶原酶消化,采用差速离心和差速贴壁方法分离 AEC II。AEC II 纯化后 24 h 接近增殖状态,活性良好,用于实验。每天更换培养液并在相差显微镜下观察其形态和基本生长情况,巴氏染色法、透射电镜下观察培养细胞中是否存在板层小体,巴氏染色法检测细胞纯度,台盼蓝染色检测细胞存活率,细胞纯度达 95%,存活率达 90%。

1.4 氧化损伤性细胞模型制备及实验分组 原代培养早产鼠 AEC II, AEC II 贴壁纯化后随机分组的办法将细胞分为空气组、高氧组、高氧+SP 组。空气组和高氧组分别将 AEC II 置于氧体积分数为 0.21(21%)和 0.95(95%)的密闭氧仓中,高氧 SP 组于暴露前加入 SP 1×10^{-8} mol/L,再置于氧体积分数为 0.95(95%)密闭氧仓暴露,各组细胞密闭氧仓均置于 5% CO₂ 培养箱,培养 24 h 后收集细胞检测。

1.5 光镜和电镜下观察细胞形态 原代培养的 AEC II 细胞,分组培养 24 h 后收集细胞,通过透射电镜观察细胞形态。

1.6 MTT 细胞存活检测 AEC II 细胞存活率通过 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)试剂盒检测,按说明书进行。

1.7 AnnexinV/PI 双标记法检测 AEC II 凋亡 原代培养的 AEC II 细胞,以 1×10^6 个/mL 浓度接种于 6 孔板中,按上述分组处理 24 h,胰酶消化贴壁细胞,PBS 重悬 3 次,调整细胞浓度约 1×10^6 个/mL,加入 5 μ L AnnexinV-FITC 和 10 μ L PI,20~25 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min,上流式细胞仪,计算出右下象限的早期凋亡细胞所占比率。

1.8 荧光定量 PCR 检测 Gli1 的 mRNA 的含量 采用 TRizol 一步法提取 AEC II 的总 RNA,测吸光度 A260/A280 值,计算提取的 RNA 浓度。逆转录合成 cDNA,PCR 引物由 Primer premier 5.0 自行设计。扩增 Gli1 基因正义链的引物序列:5'-TGT GGC AAC AGG ACG GAA C-3',反义链序列为:5'-CCA GAG TGT CAG CAG AAG AAA AG-3';GAPDH 正义链的引物序列:5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3',反义链序列为:5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。荧光定量 PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 4 min,94 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,70 $^{\circ}$ C 30 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 检测信号。记录 d_{eta} Ct 值,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算荧光值,并以 GAPDH 为标准计算相对比值。

1.9 Western blot 检测 Gli1 的蛋白含量 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法定量蛋白。取 30 μ g 蛋白质上样,10%

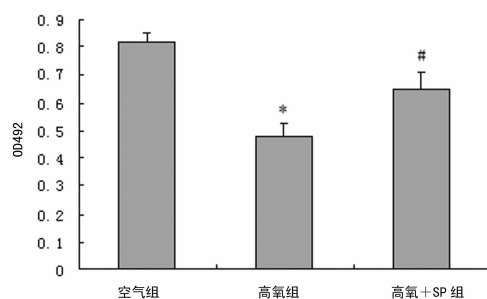
SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜,经 5% 脱脂奶粉封闭后,与 Gli1 多克隆抗体适度稀释,4 $^{\circ}$ C 振摇孵育过夜,再加入稀释后辣根过氧化物酶标记的二抗,用 ECL 法检测,蛋白条带用 Quantity One 4.5.0 软件进行处理分析,蛋白含量用目的条带校正容积(Adj volume)/GAPDH 校正容积(Adj volume)表示。

1.10 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,组间两样本均数的比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

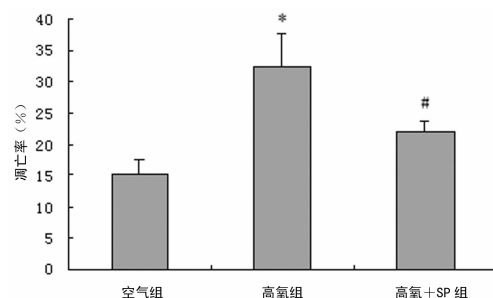
2.1 高氧暴露及 SP 干预后 AEC II 形态学的变化 空气组: AEC II 细胞胞浆丰富,含有大小不一的板层小体,胞膜上有微绒毛结构(封 3 图 1A)。与空气组比较,高氧暴露 24 h, AEC II 细胞核较空气组伸展,细胞器减少,线粒体肿胀,板层小体结构变化甚至消失,胞质边缘有较多吞饮小泡,可见较多早期凋亡的改变(封 3 图 1B)。SP 干预后,与高氧组比较,细胞器变化减轻,细胞形态基本正常(封 3 图 1C)。

2.2 高氧暴露及 SP 干预对 AEC II 存活率和凋亡率的影响 与空气组比较,高氧组 AEC II 在高氧暴露 24 h 后细胞存活率明显降低,凋亡率明显升高($P < 0.05$)。而在高氧+SP 组,SP 干预后与单纯高氧组比较, AEC II 存活率明显增加,凋亡率降低($P < 0.05$),见图 2、3。



*: $P < 0.05$, 与空气组比较; #: $P < 0.05$, 与高氧组比较。

图 2 高氧暴露及 SP 干预对 AEC II 存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

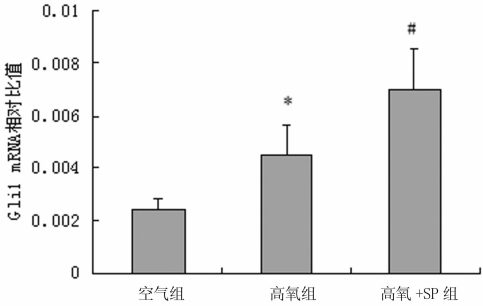


*: $P < 0.05$, 与空气组比较; #: $P < 0.05$, 与高氧组比较。

图 3 高氧暴露及 SP 干预对 AEC II 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

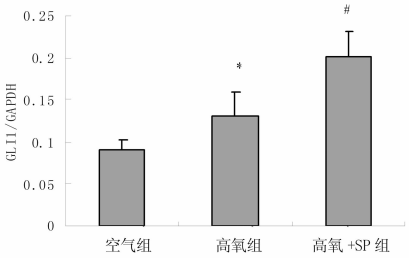
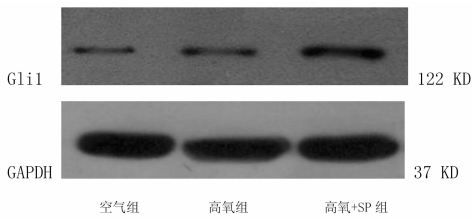
2.3 高氧及 SP 干预后 Gli1 mRNA 表达的影响 空气组 AEC II, 通过荧光定量 PCR 法可检测到 Gli1 mRNA 表达。与空气组比较,高氧暴露 24 h 后, AEC II 内 Gli1 mRNA 表达升高($P < 0.05$)。SP 干预后,进一步促进高氧组 AEC II 内 Gli1 mRNA 表达,高氧+SP 组 Gli1 mRNA 水平较单纯高氧组升高($P < 0.05$),见图 4。

2.4 高氧及 SP 干预对 Gli1 蛋白表达的影响 空气组 AEC II,通过 Western blot 可检测到 Gli1 蛋白表达。与空气组比较,高氧暴露后,Gli1 蛋白表达升高($P<0.05$)。SP 干预后,进一步促进高氧组 AEC II 内 Gli1 蛋白表达,高氧+SP 组 Gli1 蛋白表达水平较单纯高氧组明显升高($P<0.05$),见图 5。



*: $P<0.05$,与空气组比较; #: $P<0.05$,与高氧组比较。

图 4 高氧暴露及 SP 干预对 Gli1 mRNA 的影响
($\bar{x}\pm s, n=5$)



*: $P<0.05$,与空气组比较; #: $P<0.05$,与高氧组比较。

图 5 高氧暴露及 SP 干预对 Gli1 蛋白表达的影响
($\bar{x}\pm s, n=5$)

3 讨 论

慢性肺疾病(CLD)或支气管肺发育不良(BPD)是新生儿持续用氧治疗后的一种肺氧化性损伤疾病,在生存的早产儿中可达 60%以上,发生 CLD 或 BPD 的早产儿均伴有肺发育障碍和呼吸功能低下。目前,国际上尚无确定有效的防治方法,但大量临床资料显示其病因与肺的发育成熟及肺损伤修复密切相关^[14]。

AEC II 是肺泡表面一类重要的细胞群体,在肺泡上皮损伤时可不断增殖,补充和分化为 AEC I,被称为肺泡上皮“干细胞”^[15]。由于肺损伤的修复完全依赖 AEC II 的增殖和分化,因此寻找保护 AEC II 氧化损伤的因素,可为高氧肺损伤的防治提供理论基础。

SP 是一种重要的感觉神经肽,SP 释放后可以特异性地与神经激肽 1 受体(NK1R)结合,具有多种生物学效应,可调节气道血流,气道平滑肌收缩反应,气道炎症和上皮细胞损伤后的迁移和增殖^[16-17]。急性烧伤患者,SP 在增生的疤痕组织中的浓度明显高于烧伤皮肤,其可能启动愈合早期的神经源性炎症反应,与细胞增殖、再生和疤痕形成等密切相关^[4]。Oslund

等^[18]报道通过活化 NK1R 有助于肺损伤后上皮细胞增殖,是参与损伤修复的重要组件。Yaraee 等^[19]发现 SP 能够直接调节人支气管上皮细胞释放 TGF- β ,参与调节肺损伤修复以及肺纤维化过程。Marwan 等^[20-21]发现感觉神经递质通过激活 NK1R 能够保护急性高氧肺损伤。Huang 等^[6]发现 SP 对高氧肺损伤有明显的保护作用,可降低细胞凋亡,促进细胞存活。

本研究发现早产鼠 AEC II 高氧暴露 24 h,电镜下可见明显的细胞损伤和凋亡,流式细胞仪检测细胞的凋亡率明显升高,细胞存活明显降低。SP 干预后从细胞的超微结构可见损伤明显减轻,细胞凋亡率明显降低,细胞存活率升高。提示 SP 可以减轻 AEC II 的氧化损伤,维持细胞的正常生理功能,对氧化应激状态下的 AEC II 细胞可能起到保护作用。

在大量发育和肿瘤形成的研究成果中发现,SHH 信号通路对细胞增生起调节作用,提示该信号途径也可能参与组织损伤修复和再生过程。Kusano 等^[11]报道体外心肌细胞给予 SHH 蛋白能够保护过氧化氢诱导的细胞凋亡。Lavine 报道阻断正常成年小鼠在体心肌细胞中的 SHH 信号传导通路可以导致室腔增大,心肌纤维化,心功能降低甚至死亡。此外,文献报道 SHH 信号在骨折、胆道、肝脏损伤的修复中发挥作用^[22-24]。然而,这一信号途径在呼吸系统,特别是对肺修复再生及 AEC II 细胞损伤修复中的作用还不十分明确。Bellusci 等^[25]报道 SHH 信号通路在肺的支气管形态发育中具有重要作用,转基因老鼠过表达 SHH 可促进间叶细胞和上皮细胞的增殖。SHH 信号通路中的核转录因子 Gli1 有 3 种,即 Gli1、Gli2、Gli3,Gli1 是 SHH 信号途径最重要的下游转录因子之一,也是 SHH 信号最终的响应者和功能的执行者^[26]。Grindley 等^[27]发现在肺组织 SHH 基因过表达时,Gli1 mRNA 明显上调,参与肺发育的调控。因而,Gli1 的表达反映了 SHH 信号通路的功能状态。

本研究显示,SHH 信号通路参与了高氧诱导细胞凋亡的信号转导系统,高氧暴露后 Gli1 信号分子表达明显增加,可能参与高氧损伤后早期的防御作用。SP 干预后,进一步激活高氧组 AEC II 内 Gli1 信号分子基因和蛋白表达,同时,AEC II 凋亡率降低,存活率增加,显示对高氧暴露下 AEC II 起到一定的保护作用。提示 SP 可抑制细胞的凋亡,促进细胞存活,其可能通过对 SHH 信号途径激活而对氧化应激状态下的 AEC II 起到保护作用。

参考文献:

- [1] Mantell LL, Horowitz S, Davis JM, et al. Hyperoxia-induced cell death in the lung—the correlation of apoptosis, necrosis, and inflammation[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 887:171-180.
- [2] Gordo-Vidal F, Calvo-Herranz E, Abella-Alvarez A, et al. Hyperoxia-induced pulmonary toxicity[J]. Med Intensiva, 2010, 34(2):134-138.
- [3] Miyake Y, Kaise H, Kyo-Ichi I, et al. Protective role of macrophages in noninflammatory lung injury caused by selective ablation of alveolar epithelial type II cells[J]. J Immunol, 2007, 178(8):5001-5009.
- [4] Scott JR, Muangman PR, Richard TN, et al. Substance P levels and neutral endopeptidase activity in acute burn wounds and hypertrophic scar[J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 119(3):785-792.

- 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, Lundeborg 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 TGF-beta-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)