

文章编号: 1004-0374(2010)09-0925-05

# 小 RNAs 在生殖细胞发育过程中的作用

谢兆辉

(德州学院生物系, 德州 253023)

**摘要:** 很多动物可以产生具调节作用的小 RNAs, 根据产生方式和作用机制可以将它们分为三类: 微小 RNAs (miRNAs)、与 Piwi 相互作用的 RNAs (piRNAs) 和内源小干扰 RNAs (endo-siRNAs), 这些小 RNAs 可以在生物生殖细胞发育过程中发挥重要作用。其中 miRNAs 的主要作用是调节蛋白质基因的表达; piRNAs 主要的作用是沉默转座因子, 但 piRNAs 主要存在于生殖细胞中; endo-siRNAs 则可能具有上述两种主要作用。该文论述了这三种小 RNAs 在生物生殖细胞发育过程中的作用, 同时也讨论了它们在治疗生物不育及其在生物节育方面的应用前景。

**关键词:** 生殖细胞; 微小 RNAs; 与 Piwi 相互作用的 RNAs; 内源小干扰 RNAs

**中图分类号:** Q132.1; Q52 **文献标准码:** A

## The role of small RNAs in the development of germline cells

XIE Zhao-hui

(Department of Biology, Dezhou University, Dezhou 253023, China)

**Abstract:** Many animals express three classes of small RNAs, which are classified into three classes according to their mechanisms of biogenesis, and these RNAs have critical roles in germline cell development. Among the three classes of small RNAs, miRNAs mainly regulate the expression of protein-coding genes; Piwi-interacting RNAs (piRNAs) mainly function in transposon silencing and are restricted to gonadal tissues; while endogenous siRNAs (endo-siRNAs) have been proposed to function in both regulation of gene expression and in transposon silencing. In this review, we addressed the mechanisms of action and functions of siRNA, miRNA and piRNA in germline cell development, the potential application of these small RNAs in the treatment of infertility or in the development of contraceptions was also discussed.

**Key words:** germline cells; miRNAs; piRNAs; endo-siRNAs

后基因组研究揭示了基因组大部分区域是转录的, 可以产生众多非编码蛋白质的 non-coding RNAs (nc-RNAs), 长度小于 40 nt 的小 RNAs 是 nc-RNAs 重要的一部分, 现在生物中已发现了多种这样的小 RNAs。这些小 RNAs 根据产生方式和作用机制大致可以分为三类: 微小 RNA (miRNAs)、Piwi 蛋白相互作用的 RNAs (piRNAs) 和小干扰 RNAs (siRNAs)。其他动物中还有一些特有的小 RNAs, 如线虫 21U-RNAs、四膜虫 scnRNAs 和老鼠 smRNAs 等。这些小 RNAs 可以在转录水平或转录后水平对基因表达进行精细地调节, 其作用几乎涉及所有的生命活动过程, 如细胞的增殖、分化和死亡, 发育时间调

控, 代谢调节, 转座子沉默或胁迫反应。这些小 RNAs 很多在动物生殖细胞发育中也具有重要作用, 同时也涉及生物不育。另外, 这些小 RNAs 还可以用于治疗一些生殖系统疾病和进行节育, 本文就这些小 RNAs 在生殖细胞发育过程中的作用作一论述。

### 1 miRNAs 在生殖细胞发育中的作用

miRNAs 是生物体存在最广泛的小 RNAs, 其作用涉及生殖细胞发育的很多阶段。首先, 一些

收稿日期: 2010-04-08; 修回日期: 2010-05-18

通讯作者: E-mail: xiezh0523@163.com

miRNAs在生殖细胞中的表达具有明显的组织特异性和时序性:不同年龄小鼠睾丸组织及2种小RNA的克隆文库测序显示,约35%的miRNAs在睾丸组织高表达,在其他组织则表达较弱,而5%的miRNAs在睾丸组织特异性表达<sup>[1]</sup>。miR-469等随睾丸发育成熟,其表达量会逐渐上调,miR-465等的表达则相对下降<sup>[2]</sup>。Landgraf等<sup>[3]</sup>也鉴定出了5个小鼠miRNAs和3个人类miRNAs在睾丸组织特异性高表达。其次,miRNAs在调节原始生殖细胞发育中具有重要作用:小鼠中一些miRNAs在原始生殖细胞增殖和分化过程中非常保守,如miR-17-92族和miR-290-295可以促进细胞周期,在全部原始生殖细胞中保持稳定的高效表达;在胚胎原始生殖细胞发育过程中,miR-141等的表达逐步下降,而let-7a等的表达则随雄性原始生殖细胞的发育而增加,在雌性中表达不增加<sup>[4]</sup>。另外,miRNAs途径中的Dicer蛋白缺失,小鼠胚胎中原始生殖细胞的数量明显减少,精原细胞数只有正常的一半<sup>[4]</sup>。斑马鱼早期胚胎发育过程中,*nanos*是一个对早期原始生殖细胞发育非常重要的一个基因,*nanos*基因的3'非翻译区就被发现含有一个特异的miR-430目标位点<sup>[5]</sup>。再次,miRNAs在生殖干细胞发育中也具有重要作用:果蝇中一些miRNAs可以促进生殖干细胞的细胞周期和维持在壁笼中的生殖干细胞。发育过程中果蝇的*Dicer-1*突变或miRNAs合成消失,生殖干细胞虽仍保留在壁笼中,但细胞周期减慢。如果成体果蝇*Dicer-1*突变,则生殖干细胞会消失。果蝇*bantam*基因是Hippo信号途径中调节细胞增殖和死亡的一个关键靶标,*bantam*-miRNAs不仅可以抑制原始生殖细胞和维持生殖干细胞的自我更新,也可以与*dfmr1*相互作用,调控生殖干细胞的命运<sup>[6-7]</sup>。最后,miRNAs也影响精子发生。小鼠睾丸大量miRNAs的表达在减数分裂及圆形精子早期进行,而此期正与精子mRNA活跃转录,而翻译受到抑制的时期相一致,推测miRNA参与了调节靶mRNA的过程<sup>[2]</sup>。miR-17-5p在小鼠睾丸正常精子发生过程中表达不断上调,抑制目标mRNA的翻译,保护生精细胞免受凋亡的威胁和利于正常的精子发生<sup>[8]</sup>。用PicTar方法预测miRNA的靶标,发现小鼠mmu-miR-127的靶基因*brd2*在精母细胞和圆形精子细胞中高水平表达,而在精原细胞表达很低<sup>[9]</sup>。

一个有趣的发现是在精子形成过程中,X染色体上86%的miRNAs逃过了减数分裂性染色体失活,在减数分裂粗线期的中期到后期,虽然精母细

胞X和Y染色体上的基因发生转录沉默,但是大多数X染色体上的miRNA还可以转录和加工,揭示这些miRNA可能涉及减数分裂性染色体失活,并在精子发生过程中具有重要作用<sup>[10]</sup>。另外,部分哺乳动物X染色体上的miRNA比常染色体上的miRNA进化快,丰度高,很多X-miRNA的靶标为调节细胞周期的基因,也说明它们涉及精子发生过程<sup>[11]</sup>。

在雌性中,虽然miR-143在卵母细胞中不表达,但miR-143等可以在原始卵泡的颗粒细胞内表达,通过调控原始卵泡颗粒细胞的增殖和(或)分化,或通过调控下游靶基因表达直接或间接地影响卵泡形成和发育中的重要因子、抗苗勒氏管激素、生长分化因子等,从而对原始卵泡的形成和生长启动产生影响<sup>[12]</sup>。果蝇和哺乳动物的miRNAs可以从母体遗传给后代,在合子发育过程中具有重要作用,但一些小鼠精细胞中含量较多的miRNAs在刚刚受精的合子中很少,表明父本miRNAs在合子发育过程中的作用不大<sup>[13]</sup>。

## 2 piRNAs在生殖细胞发育中的作用

piRNAs是近年来新发现的一类小RNAs,主要在生殖细胞中表达,可以同Piwi亚家族蛋白形成复合物,对维持生殖系DNA完整、抑制转座子转录、抑制翻译、形成异染色质、执行表观遗传调控和生殖细胞发生等具有重要作用。果蝇中piRNAs的合成方式有两种途径:初级加工途径和乒乓放大回路。放大回路依赖Piwi类蛋白,不依赖Dicer,这种放大回路可能被现在还不清楚合成方式的初级piRNAs或母体遗传来的piRNAs引发,Piwi作为引发受体<sup>[14]</sup>。这种放大途径在哺乳动物和斑马鱼中也是保守的。

果蝇Piwi亚家族蛋白成员有Piwi、Aubergine(Aub)和AGO3三类,卵巢部分体细胞也可以表达部分Piwi亚家族蛋白,但是只表达Piwi一种,不表达Aub和AGO3,且这些体细胞中也只形成初级piRNAs。果蝇生殖细胞中*Piwi*突变可以引起不育和生殖干细胞的丢失;Aub对生殖细胞系产生具正常功能的卵母细胞具有重要作用,Aub突变会导致反转录转座子的去抑制<sup>[15]</sup>。Aub和Piwi也是重要的表观遗传调控因子,如参与形成异染色质等。果蝇卵巢体细胞中的反转录病毒原件可以通过感染附近生殖细胞而增殖,最近发现果蝇卵巢体细胞中也有独特的piRNAs途径沉默这些转座元件。如蝇卵巢体细胞片层细胞系(ovary somatic sheet, OSS)可以广泛表达miRNAs、endo-siRNAs和piRNAs等三种小

RNA, 其中 piRNAs 表达非常丰富。但 OSS 中只存在 Piwi 和初级 piRNAs, 推测 OSS 中 piRNAs 可以沉默转座成分, 但并不形成乒乓放大机制。gypsy 元件是无脊椎动物中第一个被发现的内源性逆转录病毒, gypsy 元件与其他两种逆转录元件 *Idefix* 和 *ZAM* 共同受 *flamenco* 元件控制。Lau 等<sup>[16]</sup>发现 *flamenco* 位点是一个簇, 特异性的在 OSS 细胞和卵巢滤泡细胞中表达, 产生 *flamenco*-piRNAs, 并与 Piwi 结合沉默反转录病毒原件——gypsy、*Idefix*、*ZAM*。最近 Saito 等<sup>[17]</sup>又发现卵巢体细胞中的 *traffic jam (tj)* 位点(编码一个大的 *Maf* 基因)是一个新的 piRNAs 簇, *tj*-piRNAs 与目标 mRNA 的非翻译区域一致, 一个编码细胞质核酸酶的基因 *zucchini* 是 *tj*-piRNAs 合成必需的。在 *tj* 和 *Piwi* 突变的卵巢中, 卵巢体细胞不能和生殖细胞相容, 且 *Fasciclin III* 超表达。失去 *tj* 会破坏 Piwi 在性腺体细胞中表达。这说明在性腺体细胞中, *tj* 位点可以同时产生两种物质: 激活 *Piwi* 表达的 *tj* 蛋白和沉默目标基因的 piRNAs<sup>[17]</sup>。生殖细胞系和体细胞 piRNA 簇的目标转座子在果蝇中比较保守, 推测 piRNAs 簇的结构和它们的靶标转座子得到了共同进化<sup>[18]</sup>。

在哺乳动物中, Piwi 亚家族的 3 种蛋白成员 MIWI、MILI 和 MIWI2 也主要局限于生殖细胞中。MILI 和 MIWI 主要存在于细胞质中, 在精子发生过程的不同阶段先后表达; MIWI2 则为细胞核内蛋白, 只在发育过程中的某一个短暂时期内表达。三者的突变会引起精子发生出现显著缺陷, 致使雄性不育<sup>[19]</sup>。MILI 在早期的精子发生时表达, 即从精原细胞的有丝分裂到精母细胞的粗线期, 缺失 MILI 的小鼠生殖细胞发育会停止在粗线期。鼠科 MILI 在睾丸生殖系干细胞、精原细胞和早期的精母细胞细胞质中富集在类核周体(nuage)或拟染色质区(chromatoid body), 作用涉及生殖干细胞的自我更新, 对生殖干细胞的发育是必需的, 但不影响产后 7 d 最初生殖干细胞的形成<sup>[20]</sup>。为了检测精子发生中 MILI 剂量依赖性, 对转基因过量表达 MILI 的小鼠进行前减数分裂生殖细胞分析, 结果表明: 虽然转基因小鼠在早青春期精子发生正常, 但后期生殖细胞发育损伤, 还会由于精母细胞和精细胞阻滞而导致精子减少<sup>[21]</sup>。此外, MILI 还可以不依赖 piRNAs 的形式发挥作用, MILI 的 N 端能与 TDRD1 的 N 端结合, 促进精子发生<sup>[22]</sup>, 也许 MILI 和 MIWI 与 TDRD1/MTR-1 结合并形成复合物对精子发生是必需的<sup>[23]</sup>。MIWI 的表达则要晚一些, 从粗线期到

球形精细胞期, 基因敲除 MIWI 会导致精子发生停止在球形精细胞期。而 MIWI2 基因敲除的小鼠, 在减数分裂早期有减数分裂进展缺陷, 并且生殖细胞随龄期有显著的损失。MIWI2 突变体中生殖细胞表型的损失, 证明了小鼠中的 MIWI2 在维持生殖系和干细胞时起作用。MILI 蛋白在卵母细胞生长早期大量表达, 但是检测不到 MIWI 或 MIWI2<sup>[24]</sup>。

### 3 endo-siRNAs 在生殖细胞发育中的作用

由于 siRNAs 的合成往往需要 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP), RDRP 只存在于植物、真菌和少数动物中, 大部分动物缺乏这种酶, 所以很长时间内没有在动物中发现 siRNA。只是近来才发现动物虽不能通过 RDRP 方式形成 siRNAs, 却可以通过转座因子双向转录发夹结构 RNAs (hpRNAs) 或天然反义转录(NATs) 产生 endo-siRNAs。果蝇中 endo-siRNAs 表达较为普遍, 哺乳动物由于 dsRNAs 形成可以激活蛋白激酶 R (PKR), 诱发 dsRNAs 降解, 所以哺乳动物表达 endo-siRNAs 的组织较少, 现在鉴定出的 endo-siRNAs 都是在缺乏 PKR 或 PKR 活性很低的卵母细胞或胚胎干细胞中。endo-siRNAs 合成过程需要 Dcr-2 和 AGO2, 果蝇还需要 Logs<sup>[25]</sup>。首先, 因为很多 endo-siRNAs 来源于转座因子, 如果蝇中来自长末端重复反转录元件的最多, 推测 endo-siRNAs 和 piRNAs 一样, 具有沉默转座因子的作用。果蝇 *Dcr-2* 和 *AGO2* 突变, *Stalker4* 和 F 因子两种转座子的表达是对照的 3 倍。沉默转座因子的作用在果蝇体细胞中由 endo-siRNAs 承担, 在生殖细胞中可能由 endo-siRNAs 和 piRNAs 两者共同承担。小鼠的卵母细胞含有丰富的 endo-siRNAs, piRNAs 好像可有可无的, 其中卵母细胞中 *MT* 转座子就主要受到 endo-siRNAs 的调节, 卵母细胞中没有发现 *MT*-piRNAs, *Dicer* 突变 *MT* 表达上调, 而 *piwi* 突变没有发现上述情况<sup>[26]</sup>。endo-siRNAs 可以来自 piRNAs 的基因位点, 如果蝇卵巢中 *Mdg-1* 和 *Stalker4* LTR 反转录转座子<sup>[27]</sup>, 揭示这些位点可以产生两种沉默转座因子的小 RNAs。这类 endo-siRNAs 最近又在植物中发现, 拟南芥的花粉粒中, 伴细胞可以保护精细胞并向精细胞提供能量和营养物质。伴细胞也向精细胞提供指示, 使其 DNA 免受损害, 从而帮助精细胞稳定地传递基因组信息至下一代。这种提示是以 endo-siRNAs 的形式存在的, 通过 RNA 干扰使转座子沉默, 推测这种机制在植物和昆虫中也许是保守的<sup>[28]</sup>。热带爪蟾的

研究发现了丰富的 miRNAs、piRNAs、endo-siRNAs、miR-202-5p 等在雌性爪蟾中表达。其中, piRNAs 只限于生殖细胞中表达, 多对应基因组重复序列, endo-siRNAs 可以在生殖细胞和体细胞中表达, 并对应相似的基因组重复序列, 说明它们可以在两类细胞中沉默基因组重复序列<sup>[29]</sup>。其次, 因为哺乳动物有些 endo-siRNAs 来自编码基因与其同源假基因转录物形成的双链 RNA, 说明这些 endo-siRNAs 具有调节基因表达的功能, 同时也说明假基因可能具有重要的调节功能。微管代谢中很多的酶都是 endo-siRNAs 的靶标, *Dicer* 突变的小鼠卵母细胞成熟过程中, 染色体分离和纺锤体形成异常。由于果蝇假基因少, 这类具调节作用的 siRNAs 主要在小鼠中发现。果蝇胚胎中也有很多 endo-siRNAs 可以在转录后水平缓冲 mRNAs 大的波动, 防止不利环境造成的危害, 维持不同温度下细胞的生长<sup>[30]</sup>。除了果蝇和哺乳动物之外, 最近在线虫中的研究也发现, 突变 endo-siRNA 途径中的蛋白质 RRF-3/ERI 影响 endo-siRNAs 的形成, 最终干扰线虫的精子发生过程<sup>[31]</sup>。最近在线虫中发现了一类新 endo-siRNAs, 即 26G endo-siRNAs, 长度为 26 nt, 第一个碱基是鸟嘌呤(G), 可以在线虫精子发生和合子发育过程中调控基因表达, 从而影响线虫的育性和发育<sup>[32]</sup>。

#### 4 前景与展望

越来越多的研究发现, 小 RNAs 在生殖细胞发育和配子发生过程中具有重要作用, 对这些小 RNAs 的研究使我们对生殖细胞发育的机制有了深入的认识。如现在发现生殖腺体细胞中的小 RNAs 也对配子发生具有重要意义; 小鼠睾丸细管塞尔托利细胞(Sertoli cells)中的 *Dicer* 基因突变会发生精子丧失和睾丸退化造成的不育<sup>[33]</sup>。而卵巢中的体细胞有的也有着相似的功能, 这不仅有助于我们更好的认识生物的不育现象, 还为我们治疗不育或进行节育开拓了新思路, 也许我们可以通过抑制在生殖细胞或相关体细胞中特异表达的 microRNAs 或 piRNAs 进行节育。再有, 由于在很多生殖腺癌中都发现一些小 RNAs 表达发生异常<sup>[34]</sup>, 对这些小 RNAs 研究有助于我们更好地研究并治疗这类癌症。最后, 对这些小 RNAs 的研究也有助于利用它们保卫生殖健康, 如 Palliser 等<sup>[35]</sup>首先根据 II 型单纯疱疹病毒的基因组序列设计出几种 siRNAs, 并且在 20 只雌性小鼠的生殖器局部使用了这种混合物, 观察发现 siRNAs 能

够迅速进入阴道和子宫颈的细胞内, 附着并摧毁病毒 RNA, 进而抑制了病毒的传染。现在很多小 RNAs 的功能和作用机制还并不十分清楚, 相信随着研究的深入, 小 RNAs 在生物生殖研究和应用方面会展现出广阔的前景。

#### [参 考 文 献]

- [1] Ro S, Park C, Sanders KM, et al. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Dev Biol*, 2007, 311(2): 592-602
- [2] Yu Z, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the post-transcriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol Reprod*, 2005, 73(3): 427-33
- [3] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 2007, 129(7): 1401-14
- [4] Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1738
- [5] Mishima Y, Giraldez AJ, Takeda Y, et al. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol*, 2006, 16(21): 2135-42
- [6] Nolo R, Morrison CM, Tao C, et al. The bantam microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. *Curr Biol*, 2006, 16(19): 1895-904
- [7] Yang Y, Xu S, Xia L, et al. The bantam microRNA is associated with *Drosophila* fragile X mental retardation protein and regulates the fate of germline stem cells. *PLoS Genet*, 2009, 5(4): e1000444
- [8] Novotny GW, Sonne SB, Nielsen JE, et al. Translational repression of E2F1 mRNA in carcinoma *in situ* and normal testis correlates with expression of the miR-17-92 cluster. *Cell Death Differ*, 2007, 14(4): 879-82
- [9] 段桂华, 王成, 张春妮. 微小核糖核酸与生殖关系的研究进展. *中华男科学杂志*, 2009, 15(6): 556-60
- [10] Song R, Ro S, Michaels JD, et al. Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet*, 2009, 41(4): 488-93
- [11] Guo X, Su B, Zhou Z, et al. Rapid evolution of mammalian X-linked testis microRNAs. *BMC Genomics*, 2009, 10: 97-104
- [12] 姚楠, 陆彩玲, 李丹, 等. MicroRNAs 在新生鼠卵巢中的表达研究. *生殖与避孕*, 2009, 29(5): 289-303
- [13] Liu X, Park JK, Jiang F, et al. *Dicer-1*, but not *Loquacious*, is critical for assembly of miRNA-induced silencing complexes. *RNA*, 2007, 13(12): 2324-9
- [14] Samji T. PIWI, piRNAs, and germline stem cells: what's the link? *Yale J Biol Med*, 2009, 82(3): 121-4
- [15] Vagin VV, Sigova A, Li C, et al. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 2006, 313(5785): 320-4
- [16] Lau NC, Robine N, Martin R, et al. Abundant primary piRNAs, endo-siRNAs, and microRNAs in a *Drosophila* ovary cell line. *Genome Res*, 2009, 19(10): 1776-85

- [17] Saito K, Inagaki S, Mituyama T, et al. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature*, 2009, 461(7268): 1296-9
- [18] Malone CD, Brennecke J, Dus M, et al. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell*, 2009, 137(3): 522-35
- [19] 石敏, 唐爱发, 蔡志明. 抑制基因组转座子活性的小RNAs在生育调节中的作用. *遗传*, 2010, 32(1): 11-6
- [20] Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, et al. MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germline stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation. *J Biol Chem*, 2009, 284(10): 6507-19
- [21] Lee JH, De Rooij DG, Schweyer S, et al. Impaired spermatogenesis in mice overexpressing stem cell protein Piwil2 (Mili). *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(5), doi: 10.1002/mrd.21071
- [22] Wang J, Saxe JP, Tanaka T, et al. Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis. *Curr Biol*, 2009, 19(8): 640-4
- [23] Kojima K, Kuramochi-Miyagawa S, Chuma S, et al. Associations between PIWI proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cells. *Genes Cells*, 2009, 14(10): 1155-65
- [24] Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, et al. Endogenous siRNA from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 2008, 453(7194): 539-43
- [25] Zhou R, Czech B, Brennecke J, et al. Processing of *Drosophila* endo-siRNAs depends on a specific Loquacious isoform. *RNA*, 2009, 15(10): 1886-95
- [26] Murchison EP, Stein P, Xuan Z, et al. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev*, 2007, 21(6): 682-93
- [27] Czech B, Malone CD, Zhou R, et al. An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*, 2008, 453(7196): 798-802
- [28] Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, et al. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*, 2009, 136(3): 461-72
- [29] Armisen J, Gilchrist MJ, Wilczynska A, et al. Abundant and dynamically expressed miRNAs, piRNAs, and other small RNAs in the vertebrate *Xenopus tropicalis*. *Genome Res*, 2009, 19(10): 1766-75
- [30] Lucchetta EM, Carthew RW, Ismagilov RF. The endo-siRNA pathway is essential for robust development of the *Drosophila* embryo. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7576
- [31] Gent JI, Schvarzstein M, Villeneuve AM, et al. A *Caenorhabditis elegans* RNA-directed RNA polymerase in sperm development and endogenous RNA interference. *Genetics*, 2009, 183(4): 1297-314
- [32] Han T, Manoharan AP, Harkins TT, et al. 26G endo-siRNAs regulate spermatogenic and zygotic gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(44): 18674-9
- [33] Papaioannou MD, Pitetti JL, Ro S, et al. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, 2009, 326(1): 250-9
- [34] Toloubeydokhti T, Bukulmez O, Chegini N. Potential regulatory functions of microRNAs in the ovary. *Semin Reprod Med*, 2008, 26(6): 469-78
- [35] Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, et al. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*, 2006, 439(7072): 89-94