

胚胎干细胞分化为表皮样细胞的基因表达谱差异

张仁礼^{1*}, 刘彩霞¹, 孟锦绣², 闻安民¹, 张丽丽¹, 韩冬¹

(广东省医学科学院//广东省人民医院 1.生殖医学中心,2.医学研究中心,广东广州 510080)

摘要:【目的】用全基因表达谱芯片技术筛选小鼠胚胎干细胞(ESC)定向分化为表皮样细胞(ELC)的差异表达的基因并对其进行分析,以进一步阐明 ESC 分化为 ELC 的分子机制。【方法】利用人羊膜建立体外诱导体系,将小鼠 ESC 诱导定向分化为 ELC,做 3 次生物学重复,分别取未分化的 ESC 和诱导分化的 ELC 提取总 RNA 进行扩增、Cy3 标记,与 NimbleGen 135k 小鼠全基因表达谱芯片(含 44170 个基因)杂交,荧光扫描,筛选出差异常表达基因,并进行 GO 分析和 pathway 分析,用实时定量 PCR 对结果进行验证。【结果】芯片筛选结果显示,分化后的 ELC 与 ESC 间的差异表达的基因多达 4856 个(Cut off: 2)。基因本体(GO)分析显示与生物学过程相关的差异表达基因最多的是细胞过程,1931 个;与亚细胞组分(CC)相关的差异表达基因中最多的是细胞和细胞组分相关基因,2391 个;与分子功能相关的差异表达基因中最多的是结合功能(binding)基因,1869 个。Pathway 分析显示,与 DNA 复制通路相关的差异表达基因有 23 个;与蛋白酶体通路相关的 24 个;剪接体通路相关有 47 个;细胞周期相关的有 44 个。【结论】ESC 体外诱导定向分化为 ELC 过程中,基因表达谱发生了巨大的变化,提示细胞分化是一个众多基因参与的复杂的生物学过程,这些基因在分化过程所起的作用和作用机制尚需大量的实验研究阐明。

关键词: 全基因组表达芯片; 胚胎干细胞; 表皮样细胞; GO 分析; Pathway 分析

中图分类号: R329.2+8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)02-0149-07

Genome-wide Expression Profiles Analysis of ES Cells and ES Derived Epidermal-like Cells

ZHANG Ren-li^{1*}, LIU Cai-xia¹, MENG Jin-xiu², WEN An-min¹, ZHANG Li-li, HAN Dong

(1.Reproductive Medicine Center; 2. Medical Research Center, Guangdong General Hospital//Guangdong General Hospital, Guangzhou 215006, China)

Abstract: 【Objective】 To screen and analyze different expressed genes between mouse embryonic stem cells (ESC) and their differentiated epidermal-like cells (ELC) with the whole genomic expression profile chip, and explore the molecular mechanisms of differentiation further. 【Methods】 Mouse ESC was induced differentiation into ELC in vitro by human amnion repeated for three times. Total RNA of ESC and ELC was extracted, and then amplified by RT-PCR. The product cDNA was labeled with Cy3 and hybridized on NimbleGen 135k mouse whole gene chip (containing 44, 170 genes). Fluorescence scanning, Gene Ontology (GO) and pathway analysis were used to screen the different expressed genes. The analytic result was validated by Real-time Quantitative PCR. 【Results】 A total of 4,856 genes showed differentially expressed between ESC and ELC (Cut off: 2). GO analysis showed that the differential expressed genes between ESC and ELC mainly involved cellular process (CP) genes of 1931, Cell/Cell part genes of 2391, and binding function genes of 1869, which belong to biological process (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF), respectively. The pathway analysis showed that the differential expressed genes mainly involved genes related to DNA replication, proteasome pathway, spliceosome pathway, and cell cycle with the number of 23, 24, 47, and 44, respectively. 【Conclusion】 The change of expression profile between ESC and ELC indicated that large variety of genes were involved in this complex cellular differentiation process, and how these gene worked and co worked to regulate the differentiation procedure need further investigations.

Key words: whole genome expression chip; ES cells; epidermal-like cells; GO analysis; pathway analysis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(2): 149-155]

收稿日期: 2011-09-01

基金项目: 国家自然科学基金(30700327); 广东省自然科学基金(9151009101000011, 7300047); 广东省人口与计划生育委员会科研项目(2009227); 广东省科技计划项目(2008658)

作者简介: 张仁礼, * 通信作者, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: renlizhangm@yahoo.com.cn

在前期研究中,我们利用羊膜建立诱导体系将小鼠胚胎干细胞定向诱导为表皮样细胞(epidermal-like cells, ELC),形态学上呈现典型的表皮样单层细胞,免疫组化染色显示,分化后的 ELC 表达表皮特异标志物 $\beta 1$ 整合素($\beta 1$ -integrin)、角蛋白 19(cytokeratin, CK19)和角蛋白 15(CK15)^[1]。将已诱导的胚胎干细胞植入裸鼠皮下获得的瘤体进行病理切片,可见大量表皮样和表皮附属器样结构。这表明羊膜诱导体系能够将胚胎干细胞诱导为表皮细胞,诱导后的细胞具有分化为表皮及表皮附属器的潜能^[2]。但从胚胎干细胞分化为 ELC 的过程中,基因表达谱系的时空变化、起关键作用的信号通路以及相关的表观遗传学调控机制等尚不清楚。本研究先行从全基因组表达芯片分析入手,筛选出分化前后发生显著差异表达的基因,通过基因本体(gene ontology, GO)分析和通路(pathway)分析方法初步明确这些差异表达基因的大体分类和参与的信号通路,为进一步寻找决定分化方向的关键基因及其调控机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

ES-BALB/c 小鼠胚胎干细胞(中山大学附属眼科中心黄冰教授惠赠)。滤膜孔径为 $3\mu\text{m}$ 的双层 6 孔培养板(Transwell),购于 Costar 公司。DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)、小鼠白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)胰蛋白酶和胎牛血清均为 Gibco 公司产品;TRIZOL 为 Invitrogen Life Technologies 公司产品;氯仿为上海化学试剂有限公司产品;异丙醇为上海化学试剂有限公司产品;无水乙醇为上海化学试剂有限公司产品;Invitrogen Superscript 双链 cDNA 合成试剂盒为 Invitrogen 产品;单标 DNA 试剂盒、杂交系统 4 均为 NimbleGen 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 羊膜制备 取足月妊娠剖腹产的胎膜,钝性分离除去绒毛膜,用含庆大霉素的生理盐水反复冲洗,去除血污,剪切成大小约为 $3\text{mm}\times 5\text{mm}$ 方形,浸泡于 ESC 培养液中备用。

1.2.2 ESC 体外诱导分化 取传代培养 48 h 的 ES-BALB/c 细胞,以 1.25g/L 胰蛋白酶-EDTA 消

化液消化,按 $5\times 10^8\text{ cells/L}$ 接种于双层 6 孔培养板的下层,然后将制备好的羊膜置于双层培养板的上层,用无 LIF ESC 培养液培养。每隔 24 h 将培养液换掉一半,培养 3 d,倒置镜下观察细胞形态变化。

1.2.3 RNA 抽提 TRIZOL 法提取小鼠的 ESC 及诱导后的 ELC 的总 RNA,将 1 mL TRIZOL 试剂直接加入 6 孔板中反复吸充分裂解细胞;酚氯仿两相分离,RNA 全部分配在水相,将水相转移异丙醇沉淀 RNA,离心收集,去上清;每 1 mL TRIZOL 试剂匀浆的样品中加入至少 1 mL 的 750 mL/L 乙醇,清洗 RNA 沉淀,振荡离心;去除乙醇溶液,空气中干燥 RNA 沉淀 5~10 min,加入无 RNA 酶的水用枪反复吹打几次,然后 55 到 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。获得的 RNA 溶液保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$;紫外吸收测定法测定 RNA 的纯度及浓度;变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整度。

1.2.4 cDNA 的合成与样本荧光标记 双链 cDNA 的合成采用 Invitrogen Superscript 双链 cDNA 合成试剂盒(Invitrogen, 11917-020)提供步骤合成 cDNA,以总 RNA 平为模板,采用 Oligo dT Primer 反转第一链,T4DNA 聚合酶系统合成第二链 cDNA;用 RNase A 消化掉多余的 RNA 残留;采用 NimbleGen 单标 kit,Cy3-Random Nonamers 标记,标记产物根据浓度,计算每管 Cy3 标记的样本的量,并参照“RNA_cDNA_Labeled DNA -QC”指控情况进行下一步的杂交实验。

1.2.5 全基因表达谱芯片杂交 所用芯片为上海康成生物提供的 Mus musculus 12X135k v2 array 小鼠全基因表达谱芯片,芯片含有 13 万 5 千根 60mer 长的探针,共含有小鼠基因数 44170,每个基因的探针重复数 3 次,源于数据库 NCBI MM9。ELC 和 ESC 分别于芯片杂交,每组 3 次生物学重复,共 6 张芯片。采用 NimbleGen 杂交系统 4 进行杂交,将标记好的样本充分溶于 VWR 水中,再与 NimbleGen 的杂交液 kit 按比例配好 ($3.3\mu\text{L} : 8.7\mu\text{L}$)按操作说明进行一系列反应步骤,整个过程需避光,最后放入杂交盒中 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 16 h 反应,反应完成后洗脱,离心甩干。

1.2.6 图像采集和数据分析 芯片结果由 Axon 的 GenePix 4000B 单通道扫描仪进行扫描读取,采用 NimbleScan v2.5 读取芯片原始信号值并对读取的信号值进行修正及标准化处理,将芯片读取后

的数据采用 GeneSpring v11.0 软件进行诱导的 ELC 组与 ESC 组进行比较分析其差异变化分析。设定阈值为 2, Fold Change ≥ 2 为上调, Fold Change ≤ 2 为下调, 并 NimbleScan v2.5 对基因表达谱进行基因注释, 并对全基因进行 GO 及 Pathway

功能分析。

1.2.7 实时定量 PCR 验证 挑选信号通路中变化大的差异基因, 进行验证。依照 GenBank 序列号获取全长 cDNA 序列, 由上海康成生物设计并合成上下游引物。在 ABI PRISM 7900 检测仪上进行

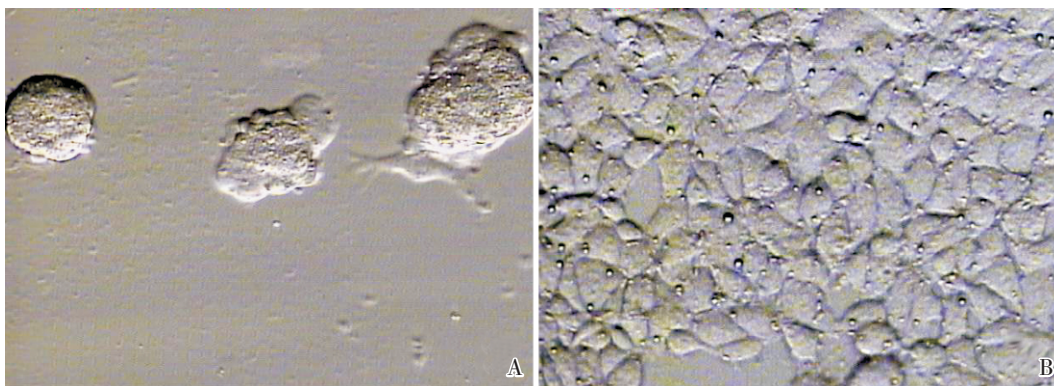


图1 ESC 分化前后的形态学变化

Fig.1 Morphological changes underwent in ESC while differentiated into ELC

A: Undifferentiated ESC($\times 200$); B: Single layer of ELC formed by ESC after induced differentiation ($\times 200$)

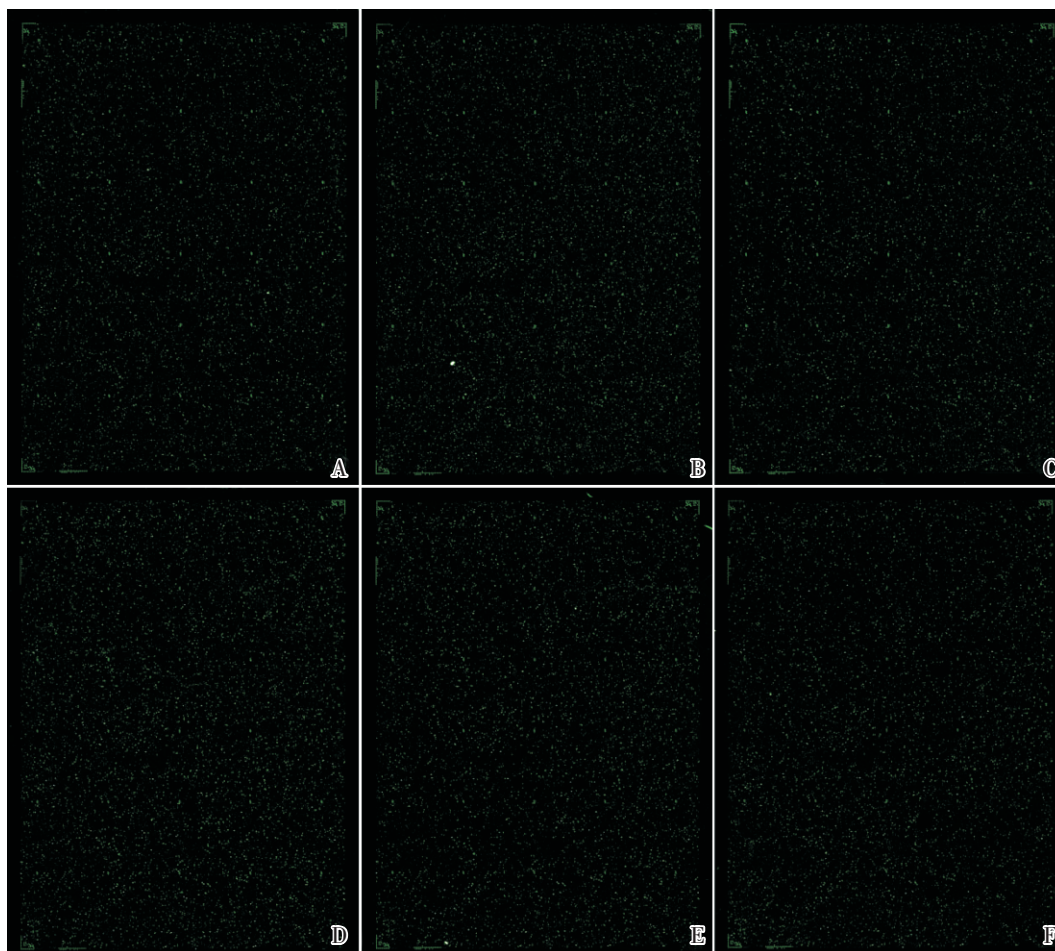


图2 全基因组表达芯片扫描图

Fig.2 Whole-genome expression chip images

A, B, C: ESC; D, E, F: ELC

SYBRGreen 法荧光定量 PCR 检测。各样本的目的基因及管家基因分别进行实时定量 PCR 反应。根据梯度稀释 DNA 绘制标准曲线,各样品目的基因和管家基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品此基因的校正后的相对含量。

1.3 统计学处理

采用 NimbleScan v2.5 对芯片进行扫描,获得原始信号值;GeneSpring v11.0 软件分析对芯片结果原始信号值进行标准化,T 检验比较样本之间的差异表达情况。

2 结果

2.1 ESC 分化前后的形态学变化

ES 在分化前呈现巢式生长,集落大多呈圆形或椭圆形态,边界光滑,细胞排列紧密,细胞边界不清(图 1A);诱导 3 d 后,细胞形态出现明显变化,细胞大而扁平,呈多边形,排列紧密,细胞边界清晰,呈典型单层上皮样改变(图 1B)。

2.2 样本 RNA 质量检测

ESC 组和 ELC 组各制备 2 次重复样本(每组随机选取一份样本做基因芯片的平行重复实验),进行总 RNA 的抽提,4 份样本的 D(260/280)值均在 1.8~2.1 范围内,D(260/230)值均大于 1.8,说明 RNA 纯度高,可用于后续实验。浓度在 1109 ~ 3205 ng/ μ L 之间,每管样本共 30 μ L 的量,样本量充分足够实验所需。

2.3 基因表达谱芯片数据差异分析

采用 NimbleGen 12X135K 小鼠全基因组表达谱芯片进行杂交,样本采用 Cy3 绿色荧光标记(图 2)。从 6 张芯片扫描图上可见每张芯片信号均匀,清晰没有边缘化效应、刮伤等影响信号值,阳性定位点和阴性对照区域结果明显。利用小鼠全基因组表达谱对 ESC 及诱导后的 ELC 进行检测发现,在总共 44170 个基因转录本中,有 25285 个基因转录本有表达,占总转录本的 57.2%;应用软件 GeneSpring v11.0,对结果进行差异分析,在差异表达谱中显示 ESC 与诱导后的 ELC 差异基因多达 4856 个,且在统计学意义范围内 P 值 < 0.05 , cut off=2;其中上调基因数为 2659 个,下调基因数为 2197 个。采用常见的层次聚类法(Hierarchical clustering)对 6 个芯片的结果进行分析,显示同组

样本聚集程度好,小鼠 ES 和诱导后的 ELC 明显区分开(图 3)。

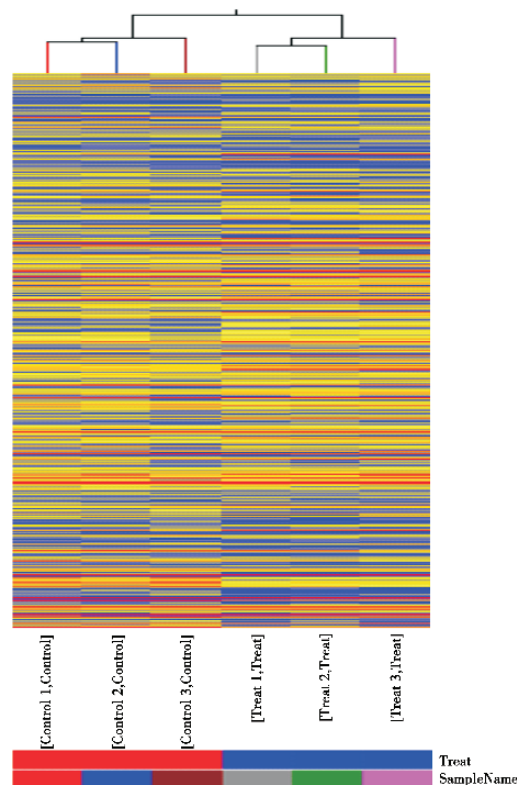


图 3 全基因组表达芯片数据层次聚类分析

Fig.3 Hierarchical clustering of whole-genome expression data Red for high expression, blue for low expression, yellow for midvalue in the clustering

2.4 基因表达谱 GO 及 Pathway 生物信息学分析

通过 GeneSpring v11.0 软件对 6 张小鼠的全基因组表达谱芯片的差异基因进行注释系统(gene ontology)分析和信号通路(pathway)分析,探讨这种共表达现象在生物学上的意义。分析结果显示在 GO 三大类中,生物学过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)、及细胞组分(cellular component, CC)总共有 3735 个基因表达水平发生了变化。按照可信值由高到底排列各挑选前 10 位的注释情况见(表 1)。在 Pathway 分析结果中显示共有 2987 个差异表达的基因发生了变化,并挑选可信值高的前十位进行分析见(表 2)。

2.5 荧光定量 PCR 实验对结果进行验证分析

结合全基因组表达的 GO 分析及 Pathway 分析挑选出可信值高,并可能在小鼠 ESC 诱导 ELC 相

表 1 小鼠 ESC 诱导分化成 ELCGO 分析结果

Table 1 The GO result of the mouse ESC induced to be ELCGO

GO.ID	Term	Count	Pop.Hits
Biological process			
GO:0044237	cellular metabolic process	1279	6046
GO:0008152	metabolic process	1423	7156
GO:0044238	primary metabolic process	1286	6294
GO:0009987	cellular process	1931	11097
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	1009	4723
GO:0043170	macromolecule metabolic process	1085	5283
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	771	3461
GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	709	3156
GO:0010467	gene expression	650	3004
GO:0009058	biosynthetic process	709	3482
Molecular function			
GO:0005488	binding	1869	10643
GO:0003824	catalytic activity	993	4895
GO:0005515	protein binding	964	5293
GO:0003676	nucleic acid binding	529	2481
GO:0000166	nucleotide binding	452	2023
GO:0017076	purine nucleotide binding	385	1763
GO:0003723	RNA binding	180	608
GO:0005524	ATP binding	318	1374
GO:0032553	ribonucleotide binding	372	1699
GO:0032555	purine ribonucleotide binding	372	1699
Cellular component			
GO:0005622	intracellular	1957	9624
GO:0044424	intracellular part	1920	9377
GO:0043226	organelle	1636	7977
GO:0043229	intracellular organelle	1635	7973
GO:0043227	membrane-bounded organelle	1469	7054
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	1468	7048
GO:0044464	cell part	2391	14267
GO:0005623	cell	2391	14268
GO:0005737	cytoplasm	1303	6353
GO:0005634	nucleus	943	4213

关的基因做进一步的芯片验证实验,以证实芯片的结果的可靠性。我们这里挑选了 GO 中的生物学过程(BP)的细胞黏附因子(cell adhesion)过程和 pathway 中的细胞周期(cell cycle)的 5 个基因(CCND2、CDK7、CDH17、PCDH12 和 CNTN1)做验证,验证显示挑选的基因的芯片差异结果和 RT-PCR 结果趋势一致的(图 4),各基因在两组样本间的表达水平具有显著差异 ($P<0.05$),表明芯片数据真实可靠,可为后续的功能研究提供依据。

3 讨论

细胞分化是一个从全能到多能,最后到专能,外延不断缩小,内涵不断扩大的过程。在这个过程中,基因组并未发生明显的序列变化,而是通过基因表达有序的时空变化实现的,即基因表达谱的变化。基因表达谱的变化控制蛋白组的变化,进而控制细胞功能和表型,因此,基因表达谱有序的时空变化是个体发育过程中的主旋律,其中隐藏着

表 2 小鼠 ESC 诱导分化成 ELC Pathway 分析结果

Table 2 The pathway result of the mouse ESC induced to be ELCGO

Definition	SelectionCounts	Count	FDR
DNA replication	23	35	11.76352
Spliceosome	47	126	10.67871
Proteasome	24	46	9.259091
Nucleotide excision repair	23	43	9.182045
Cell cycle	44	127	8.852495
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	20	42	6.956942
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	21	47	6.67945
Galactose metabolism	14	27	5.601142
Citrate cycle (TCA cycle)	15	32	5.256584
Mismatch repair	12	22	5.174638

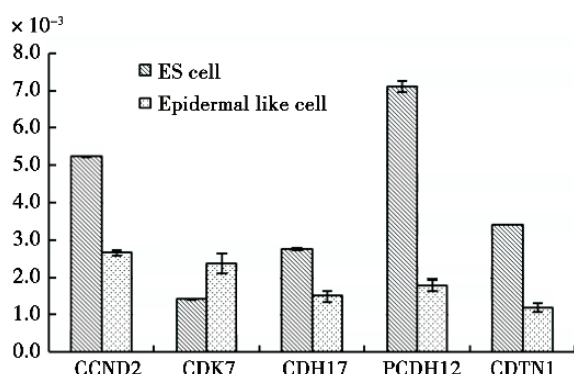


图 4 实时定量 PCR 结果

Fig.4 Results of real-time PCR

大量与生命发生有关的玄机。从表达谱比对入手,可望阐明细胞定向分化的关键调控机制,为细胞分化、个体发育研究进行理论和方法学探索。

全基因表达谱芯片技术作为基因组学研究的工具,经过多年的发展和检验,已是一种成熟,可靠的常用技术。这种技术可以将某一空间和时间的样本转录组水平的表达情况整体的展现出来。这里我们研究采用的是 NimbleGen 公司的 12X135k 的芯片,基因组设计源于 NCBI MM9 权威数据库,每张芯片含有 13 万 5 千根探针含有 44170 个小鼠转录本基因信息,每个转录本基因有三次特异性探针技术重复设计,每个基因的长寡核苷酸探针的长度为 60 mer,可以提供更高的信噪比、灵敏度、专一性和辨别能力。使用该芯片检测出小鼠 ESC 及诱导后的 ELC 的差异表达谱,得到关于影响小鼠 ESC 诱导为 ELC 的大量宝贵的基础信息,为进一步研究其中的发生机制提供

了依据。

GO 分析是对差异表达的基因进行生物学功能进行注释,并筛选出在两个实验组之间具有显著差异的 GO 条目,GO 条目从生物过程、分子功能、和亚细胞组分三个方面对基因的功能进行分类^[3]。从 GO 分析结果中,其中涉及的相关差异基因 3735 条,我们选择基因分类错误率(false discovery rate of the GOID, FDR)最小的前 10 位进行一个初步分析,在生物学过程中,主要是以一系列的细胞基础代谢及生物合成为主,提示在小鼠 ESC 定向分化为 ELC 的过程正如其在胚胎发育的过程中表现的情形类似,开启细胞的相关代谢过程,大量合成成熟分化后细胞所行使生物学功能相关的蛋白组分。在生物学合成的过程中,某些基因的表达开启了引导合成分化后细胞的功能相关蛋白,其中我们会选取具有代表性意义的基因,进行下一步的功能分析,看是否此基因的表达情况能否影响其表型的发生。在分子功能的 GO 条目中,我们可以看出小鼠 ESC 在诱导分化为 ELC 的过程中是处于一种高度的合成状态,合成分化后细胞需要的各个部件,同时也在关闭某些基因的表达,这可能与组织的特化相关。在细胞成分 GO 分类中,我们可以看出细胞膜上的组分合成相关基因的变化差异较大,本身表皮是属于生物体的一种不同于其他细胞器样的膜基质的细胞成分,故细胞膜上的基因表达差异变化明显。这一系列基因表达的变化对于 ESC 分化为 ELC 均可能是必要的。从细胞黏附相关的基因中我们发现钙黏蛋白基因 CDH17 的表达量是下调的,研究表明 CDH17 的主要功能是需要钙离子依赖活性、转运各种寡肽在膜上的一个功能团,在许多研究中表明它的过表达会导致癌症的发生,是癌症发生的标志物^[4]。在本研究中定向诱导分化为 ELC 的发育研究的结果是符合生长发育的基本规律,但是表达量下降还是有存在一定的表达量,这很有可能在定向分化的过程中 CDH17 还是起到某种重要的作用;PCDH12 也是一种钙依赖性跨膜蛋白,有报道它的确实会影响到组织形态的形成,血管生成,细胞-基质的黏附和迁移,免疫反应,和染色质重塑^[5]。在本研究中未分化的 ESC 的 CDH17 表达量,相比已分化完成的 ELC 大很多,这提示,CDH17 可能是 ESC 未分化状态的标志之一,或与 ESC 干细胞特性和分化潜能的维持相关。CNTN1

参与 DNA 甲基化、细胞黏附、Notch 信号通路生物学过程,也是一种膜上蛋白,具有与 DNA 结合、蛋白结合、N 端转移酶活性、GPI 锚定的分子功能,我们知道 DNA 甲基化在定向分化的过程中起着非常重要的作用,某些基因的甲基化和去甲基化,直接决定分化后的生物表型和功能,在生长发育和疾病发生中有指导作用^[6-7],这对今后更深入的研究胚胎干细胞分化为 ELC 的发生机制给予提示和奠定基础。

在信号通路的分析结果中,按通路中的差异基因的富集分值大小,选择富集程度高的前 10 个通路的情况进行分析,发现其中在诱导成为 ELC 占主要地位的通路是细胞周期和剪接体通路。并且在通路分析中,我们同样看到跟合成和代谢相关的通路也发生了比较大的变化。这里我们着重挑选一些感兴趣基因进行了讨论,细胞周期相关的基因细胞周期蛋白 CCND2 参与细胞周期的调控过程,细胞分裂等,定位在核内,具有蛋白结合功能和细胞周期依赖性蛋白激酶调控活性^[8-9]。此基因的表达调控也受到许多研究者的重视,研究其上游调控因子,或者其本身调控的功能,研究发现它是中胚层细胞增殖的关键^[10],而表皮属于外胚层,提示,中胚层和外胚层在细胞增殖过程中具有相类似的调控机制。CDK7 参与转录过程、DNA 依赖的转录调控、蛋白氨基酸的磷酸化、细胞周期和细胞分裂过程,是核内的一种分子结构,具有核苷酸结合、蛋白激酶活性、蛋白丝氨酸苏氨酸激酶活性、细胞周期依赖的蛋白激酶活性、ATP 结合、转移酶活性等功能,本实验中此基因的表达在定向分化过程中具有明显上调的趋势,提示 CDK7 在 ESC 定向分化为 ELC 后在维持 ELC 细胞形态和功能上有一定作用。

综合以上分析,从 ESC 体处定向分化为 ELC 的过程中,基因表达谱发生了巨大的变化,包括众多信号分子、酶和细胞结构蛋白基因表达的变化,提示,细胞分化不是一简单的分子事件,而是由一系列分子事件共同协作完成。该定向分化的关键分子调控机制尚需要进一步大量的实验研究阐明,我们的后续实验将从这些筛选出的结果中,挑

选感兴趣的基因, 讨探其在分化过程中所起作用及作用机理。

参考文献:

- [1] 张仁礼,李海标,黄冰,等. 人羊膜诱导胚胎干细胞向表皮样干细胞定向分化的研究[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(5): 325-328.
- [2] 张仁礼,李海标. ES 细胞源的表皮样干细胞分化潜力的初步研究[J]. 解剖学报, 2004, 35(1): 69-73.
- [3] Parssinen J, AlarmoEL, Khan S, et al. Identification of differentially expressed genes after PPM1D silencing in breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2008, 259(1): 61-70.
- [4] Zhu R, Wong KF, Lee NP, et al. transcriptional factors bind to cadherin-17 (CDH17) gene promoter and modulate its expression in hepatocellular carcinoma [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(3): 618-626.
- [5] Rampon C, Bouillot S, Climescu-Haulica A, et al. Protocadherin 12 deficiency alters morphogenesis and transcriptional profile of the placenta [J]. *Physiol Genomics*, 2008, 34(2): 193-204.
- [6] Xenaki D, Martin IB, Yoshida L, et al. Furley AJ.F3/contactin and TAG1 play antagonistic roles in the regulation of sonic hedgehog-induced cerebellar granule neuron progenitor proliferation [J]. *Development*, 2011, 138(3): 519-529.
- [7] Persson AK, Thun J, Xu XJ, et al. Autotomy behavior correlates with the DRG and spinal expression of sodium channels in inbred mouse strains [J]. *Brain Res*, 2009, 18(1285): 1-13.
- [8] Escamilla-Hernandez R, Chakrabarti R, Romano RA, et al. Genome-wide search identifies Ccnd2 as a direct transcriptional target of Elf5 in mouse mammary gland [J]. *BMC Mol Biol*, 2010, 10(11): 61-68.
- [9] Ichiro Ohbayashi K, Tanaka K, Kitajima K, et al. Novel role for the intraflagellar transport protein CMG-1 in regulating the transcription of cyclin-D2, E-cadherin and integrin-alpha family genes in mouse spermatocyte-derived cells[J]. *Genes Cells*, 2010, 15(7): 699-710.
- [10] Patel SA, Simon MC. Functional analysis of the Cdk7. cyclin H.Mat1 complex in mouse embryonic stem cells and embryos[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(20): 15587-15598.

(编辑 孙慧兰)