

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.01.0059

$\beta B2$ 基因敲除小鼠睾丸组织长链非编码 RNA 的差异性表达分析

任含笑¹ Δ , 高 谦¹ Δ , 贾 音¹, 张建荣¹, 张俊洁^{2*}, 李闻捷^{1*}

1. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)在 $\beta B2$ 基因敲除小鼠睾丸中的表达及其影响睾丸发育的可能机制。

方法 采用 lncRNA 芯片技术, 筛选野生型(WT)和 $\beta B2$ 基因敲除(KO)小鼠睾丸组织(均 $n=3$)中 lncRNA 及信使 RNA(mRNA)表达谱的变化; 对差异表达 lncRNA 和 mRNA 进行 GO 数据库分析及 KEGG 数据库分析, 建立调控网络图; 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证差异表达的 lncRNA 和 mRNA, 探讨调控通路。**结果** (1)两组小鼠睾丸组织差异表达的 lncRNA 共 140 条, mRNA 共 477 条; (2)通过 GO 数据库分析, 筛选出差异表达 lncRNA 共 12 条, 其中上调 7 条, 下调 5 条; (3)经 KEGG 数据库进行路径分析, 发现差异表达 mRNA 主要经由 Ca^{2+} 信号、配体-受体相互作用等信号通路起作用; (4)用关联矩阵法建立了 lncRNA 和 mRNA 共表达网络图, 共有 17 个节点, 12 条连接, 包含 9 条 lncRNA 和 8 条 mRNA; 其中 *Rs11* 由 3 条 lncRNA 调控, *Lpo* 和 *Mpo* 各由 2 条 lncRNA 调控, *Hdac1*、*Ephb4* 等各由 1 条 lncRNA 调控。(5)qRT-PCR 分析结果表明, 在 $\beta B2$ 基因敲除小鼠睾丸组织中, lncRNA A-30-P01019163 和 *P2rx7* 的表达均下调($P<0.05$)。**结论** lncRNA 与 $\beta B2$ 基因的晶状体外功能密切相关, 其中 lncRNA A-30-P01019163 可能通过调控下游 *P2rx7* mRNA 的表达影响睾丸组织细胞周期及信号转导, 进而调控睾丸发育。

[关键词] lncRNA; $\beta B2$ 晶体蛋白; 睾丸发育; *P2rx7*

[中图分类号] R 697.22

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)01-0059-06

LncRNAs expression profile in testis tissues of *CRYBB2* gene knockout mice

REN Han-xiao¹ Δ , GAO Qian¹ Δ , JIA Yin¹, ZHANG Jian-rong¹, ZHANG Jun-jie^{2*}, LI Wen-jie^{1*}

1. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the expression profile of lncRNAs in the testis tissue of *CRYBB2* gene knockout (KO) mice and its possible role in the testis development. **Methods** Testis tissues ($n=3$) from wild-type (WT) and *CRYBB2* KO mice were subjected to lncRNA and mRNA microarray profiling. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were performed to group the differentially expressed lncRNAs into regulated gene pathways and functions. The correlation matrix method was used to establish a network of lncRNA and mRNA co-expression. Quantitative (q)RT-PCR was used to verify expression of some differentially expressed lncRNAs and mRNAs. **Results** There were 140 differentially expressed lncRNAs and 477 differentially expressed mRNAs between testis tissues from WT and KO mice. There were 12 differentially expressed lncRNAs through the analyses of the GO, with 7 up-regulated and 5 down-regulated. The KEGG analysis showed that these differentially expressed mRNAs played important roles in Ca^{2+} signaling, ligand and receptor interactions, and so on. The correlation matrix method established an lncRNA and mRNA co-expression network, consisting of 9 lncRNAs and 8 mRNAs, with 17 nodes and 12 connections. Furthermore, expression of gene *Rs11* was regulated by three lncRNAs, expression of gene *Lpo* and gene *Mpo* was regulated by two lncRNAs, and expression of gene *Hdac1* and gene *Ephb4* was regulated by one lncRNA. qRT-PCR confirmed the significant down-regulation of lncRNA A-30-P01019163 expression, which significantly down-regulated its downstream gene *P2rx7* in testis tissues of *CRYBB2* KO mice ($P<0.05$).

[收稿日期] 2015-10-12 **[接受日期]** 2015-12-05

[基金项目] 国家自然科学基金(81170834, 81571387, 81300748). Supported by National Natural Science Foundation of China(81170834, 81571387, 81300748).

[作者简介] 任含笑, 硕士生. E-mail: hanxiao_ren@163.com; 高 谦, 研究实习生. E-mail: lovelyjiumei@126.com

Δ 共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-31162044, E-mail: zhangjj910@163.com; Tel: 021-31162064, E-mail: wenjieli@pku.org.cn

Conclusion LncRNA is closely related to the non-crystalline lens function of CRYBB2. LncRNA A-30-P01019163 may affect testicular cell cycle and signaling pathway by regulating *P2rx7* expression in the testis tissues.

[Key words] lncRNA; CRYBB2; testis development; P2rx7

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(1):59-64]

β B2 晶体蛋白(β B2 crystallin,CRYBB2)主要在晶状体表达,对维持晶状体的屈光度及透明性起重要作用。有研究发现 β B2 基因敲除(KO)会引起年龄相关性白内障的发生^[1]。除了晶状体外,CRYBB2 还能在晶状体外表达并具有重要功能,如可在视网膜、脑和睾丸组织表达^[2-5]。尤其令人惊奇的是,Lampi 等^[6]研究发现, β B2 基因敲除小鼠在睾丸组织中表现出形态和功能的异常,表明 β B2 基因可以调控小鼠睾丸发育,并对雄性小鼠的生殖产生影响。此外, β B2 基因敲除后,睾丸组织精原细胞增殖和凋亡紊乱,小鼠生精功能发生障碍,同时血清睾酮含量下降,小鼠精子生成障碍^[7];而 Gao 等^[8]研究发现,与野生型(WT)小鼠相比, β B2 基因敲除小鼠中某些与细胞周期和凋亡相关的蛋白质(如 Bcl-2、CDK4 和 CCND2 等)在基因水平表达量下降,提示 β B2 基因在睾丸的发育过程中可能起重要作用,但是具体的调控机制尚不清楚。

长链非编码 RNA(lncRNA)是一类长度大于 200 个核苷酸(nt)、由 RNA 聚合酶 II 转录而来的、不编码蛋白的 RNA 分子,可以调控基因转录、蛋白质翻译、基因组 DNA 翻译后修饰^[9]。LncRNA 表达的变化跟年龄以及人类疾病相关^[10-13]。有研究表明 lncRNA HOTAIR 的过表达与肝细胞癌的复发、结直肠癌的不良预后以及胃肠道间质瘤的发生有关^[14-16];lncRNA 通过定向调控下游靶基因的表达来调节细胞功能^[17];此外,lncRNA 在调控胚胎发育^[18]、X 染色体失活和基因组印迹方面^[19]也有一定的作用。

本研究对 β B2 基因敲除和 WT 小鼠的睾丸组织实施基因芯片分析,采用生物信息学方法分析其 lncRNA 及 mRNA 表达的差异;并通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术确认差异表达的 lncRNA 和 mRNA,探讨在小鼠睾丸的发育过程中 lncRNA 是否调控 β B2 的功能,进而影响小鼠睾丸的发育。

1 材料和方法

1.1 小鼠模型的建立 第二军医大学长海医院中

心实验室和美国 iGTL (in Genious Targeting Laboratory) 实验室的 Wei Weng 博士合作,利用基因同源重组技术,建立了 β B2 晶体蛋白 KO 的小鼠模型,并成功在国内进行繁殖^[20]。WT 小鼠为 C57BL/C 小鼠,由第二军医大学实验动物中心[SCXK(军)2002-011]提供。

1.2 样本准备 分别取 3 只 8~9 周大的雄性 β B2 晶体蛋白 KO 小鼠(KO 组)和 3 只同龄对照的雄性正常 WT 小鼠(WT 组),乙醚麻醉后采用颈椎脱臼法将其处死,取其睾丸组织准备后续实验。

1.3 样品总 RNA 抽提与检测 取上述睾丸组织,加入 RNA 抽提试剂 TRIzol(Invitrogen 公司)。按照试剂说明,分别抽提两组小鼠睾丸组织的总 RNA,然后用 NanoDrop ND-1000 和琼脂糖凝胶电泳检测鉴定总 RNA 的纯度及质量,合格 RNA 进一步纯化用于芯片杂交。

1.4 cDNA 样品合成、标记和杂交 由上海敏芯信息科技有限公司实施芯片检测及协助进行数据分析。利用 Agilent 公司提供的试剂盒将总 RNA 合成 cDNA,然后用荧光标记合成 cRNA 探针,使用紫外分光光度计检测荧光标记效率,以保证后续芯片实验结果的可靠性。将标记的 cRNA 与 Agilent 小鼠表达谱(8×60 K)芯片杂交,之后进行洗涤。芯片结果采用 Agilent 扫描仪进行扫描,利用 Feature Extraction 进行处理分析。

1.5 生物学意义分析 采用基因本体(GO, <http://www.geneontology.org/>)方法,从生物学进程、细胞元件及分子功能 3 个层面对差异表达的 lncRNA 和 mRNA 进行功能生物学富集分析;然后,利用 KEGG 通路分析工具(<http://www.genome.jp/kegg/>)寻找差异 lncRNA 和 mRNA 所属的生物学过程以及信号通路。结合统计学数据,运用相关矩阵法构建 lncRNA-mRNA 共表达的调控网络图。

1.6 qRT-PCR 采用 TRIzol 试剂提取 β B2 基因敲除小鼠以及 WT 小鼠睾丸组织的总 RNA,使用反转录试剂盒(TaKaRa)将 RNA 反转录为 cDNA。随

后以此 cDNA 为模板进行 qRT-PCR, 所用引物序列见表 1。使用的仪器为 qRT-PCR 仪 (Applied Biosystems 7300, Life Technologies), 试剂为 SYBR-Green PCR Kit (TaKaRa)。qRT-PCR 的反应条件: 95°C 预变性 2 min; 95°C 15 s, 60°C 30 s, 进行 40 个循环。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Tab 1 Primers of fluorescence quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequence(5'→3')
$\beta actin$ -F	AGCCATGTACGTAGCCATCC
$\beta actin$ -R	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA
$P2rx7$ -F	CGAGTTGGTGCCAGTGTGGA
$P2rx7$ -R	CCTGCTGTTGGTGGCCTCTT
LncRNA A-30-P01019163-F	TCCACTCAGGAAGAGCTGGT
LncRNA A-30-P01019163-R	TAGCACCTCGGGATATCTG

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 数据经 t 检验和单向方差分析 (ANOVA), 检验水准 (α) 为 0.05; 筛选差异表达 lncRNA 的阈值是倍数 ≥ 2.0 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 差异表达 RNA 的双向聚类分析 筛选差异表达的 lncRNA 及 mRNA, 采用软件 Gene Cluster 3.0 对差异 lncRNA 和 mRNA 进行系统聚类分析, 上调为红色, 下调为绿色。结果如图 1 所示, 差异表达 lncRNA 共 140 条, 其中下调 88 条、上调 52 条; 差异表达 mRNA 共 477 条, 其中下调 219 条、上调 258 条。表 2、3 列出了部分差异表达的 lncRNA 和 mRNA, FC (abs) 为实验组与对照组差异倍数绝对值。

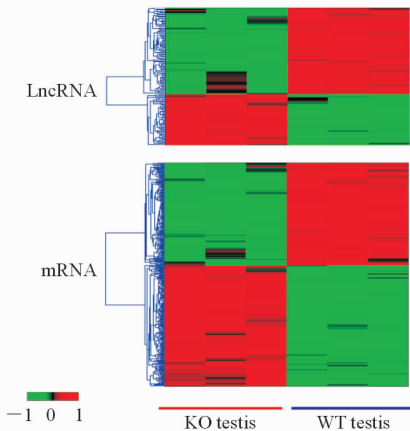


图 1 差异 lncRNAs 和 mRNAs 聚类图

Fig 1 Cluster analysis of differentially expressed lncRNAs and mRNAs in testis tissues from WT and $CRYBB2$ gene knockout mice

KO: $CRYBB2$ knockout; WT: Wild-type

表 2 $\beta B2$ 基因敲除小鼠睾丸组织中部分差异表达的 lncRNATab 2 Differentially expressed lncRNAs in testis tissues of $CRYBB2$ gene knockout mice

Probe	P	FC (abs)	Regulation
A_30_P01019163	0.000	3.278 584	Down
A_30_P01024470	0.004	2.069 293	Down
A_30_P01026056	0.009	2.020 250	Down
A_30_P01020064	0.019	2.503 062	Down
A_30_P01018088	0.036	2.898 239	Down
A_30_P01024567	0.011	2.159 054	Down
A_30_P01019374	0.009	2.836 135	Down
A_30_P01025931	0.000	7.484 935	Down
A_30_P01030023	0.000	15.373 400	Down
A_30_P01032841	0.029	3.015 309	Down
A_30_P01033353	0.009	2.091 677	Up
A_30_P01020057	0.011	2.031 710	Up
A_30_P01021636	0.009	2.036 933	Up
A_30_P01021300	0.000	2.793 220	Up
A_30_P01018840	0.010	4.364 413	Up
A_30_P01023971	0.000	2.362 821	Up
A_30_P01028303	0.031	2.196 047	Up
A_30_P01028580	0.043	2.186 286	Up
A_30_P01019825	0.004	2.162 289	Up
A_30_P01025249	0.001	13.580 640	Up

FC(abs): Absolute difference between groups

表 3 $\beta B2$ 基因敲除小鼠睾丸组织中部分差异表达的 mRNATab 3 Differentially expressed mRNAs in testis tissues of $CRYBB2$ gene knockout mice

Probe	P	FC (abs)	Regulation
Mpo	0.003	3.229 851	Down
$Pdhb$	0.000	3.800 928	Down
$P2rx7$	0.000	3.248 735	Down
$Rhov$	0.000	2.063 710	Down
$Rd3$	0.000	107.550 300	Down
$Gm10037$	0.012	2.015 659	Down
$Arhgap26$	0.047	2.009 457	Down
$Rhobtb3$	0.000	2.694 263	Down
$Sik2$	0.023	2.867 935	Down
$Sgcz$	0.017	2.283 918	Down
$Ephb4$	0.011	2.060 736	Up
$Hdac1$	0.002	4.141 882	Up
Lpo	0.000	24.880 100	Up
$Rsl1$	0.041	2.061 337	Up
$Clra$	0.031	2.043 605	Up
Cfb	0.002	3.479 958	Up
$Cuedc1$	0.016	3.040 276	Up
$Dock7$	0.006	3.072 941	Up
$Depdc1b$	0.000	2.332 794	Up
$Dbx22$	0.000	6.067 065	Up

FC(abs): Absolute difference between groups

2.2 GO数据库分析 通过GO数据库分析,筛选边差异表达的 lncRNA 共 12 条,其中上调 7 条,下调 5 条,将差异表达的 lncRNA 和 mRNA 进行功能注释,得到其参与的部分功能,结果表明差异 lncRNA 和 mRNA 在生物学途径、细胞元件和分子功能中均有分布(表 4)。特别是位于细胞质中的 *P2rx7*,其在调控细胞周期、增殖及信号转导中起重要作用。

2.3 KEGG 数据库分析 将筛选出的差异表达 mRNA 经 KEGG 数据库进行路径分析,结果发现差异 lncRNA 和 mRNA 主要经由 Ca^{2+} 信号、配体-受体相互作用等信号通路发挥作用,如 *P2rx7*;此外 *Hdac1* 还在细胞周期和增殖中发挥作用。

2.4 lncRNA 与 mRNA 相互作用的网络图 用关联矩阵法建立 lncRNA 和 mRNA 共表达网络图。如图 2 所示,本次实验共有 17 个节点,12 条连接,9 条 lncRNA 和 8 条 mRNA。其中 *Rsl1* 由 3 条 lncRNA 调控,*Lpo* 和 *Mpo* 各由 2 条 lncRNA 调控,*Hdac1*、*Ephb4* 等各由 1 条 lncRNA 调控。

2.5 qRT-PCR 验证差异表达的 lncRNA 和 mRNA 采用 qRT-PCR 分析在 WT 和 KO 小鼠睾丸组织中差异表达的 10 组 lncRNA 和 mRNA,发现 A-30-P01019163 和 *P2rx7* 在 WT 和 KO 组小鼠中表达差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

表 4 差异 lncRNA 和 mRNA 在 GO 分析中的表达分布情况
Tab 4 GO analysis of differentially expressed genes in the testis tissues of *CRYBB2* gene knockout mice

	Count	%	P value
Biological process			
Cell cycle and proliferation	1	4	0.443
Stress response	2	9	0.088
Transport	1	4	0.691
Developmental processes	3	13	0.099
RNA metabolism	2	8	0.350
Other metabolic processes	2	8	0.372
Cell organization and biogenesis	2	8	0.209
Cell-cell signaling	1	4	0.142
Signal transduction	2	8	0.528
Protein metabolism	3	13	0.109
Death	1	4	0.319
Cell adhesion	1	4	0.250
Other biological processes	3	13	0.651
Cellular component			
Mitochondrion	1	9	0.352
Other cytoplasmic organelle	1	8	0.183
Extracellular matrix	1	8	0.117
Non-structural extracellular	1	8	0.510
Plasma membrane	1	8	0.718
Other membranes	2	17	0.906
Nucleus	2	17	0.579
Other cellular component	3	25	0.626
Molecular function			
Enzyme regulator activity	1	6	0.277
Transcription regulatory activity	1	7	0.424
Signal transduction activity	2	13	0.544
Transporter activity	1	7	0.405
Nucleic acid binding activity	1	7	0.745
Kinase activity	1	7	0.340
Other molecular function	8	53	0.132

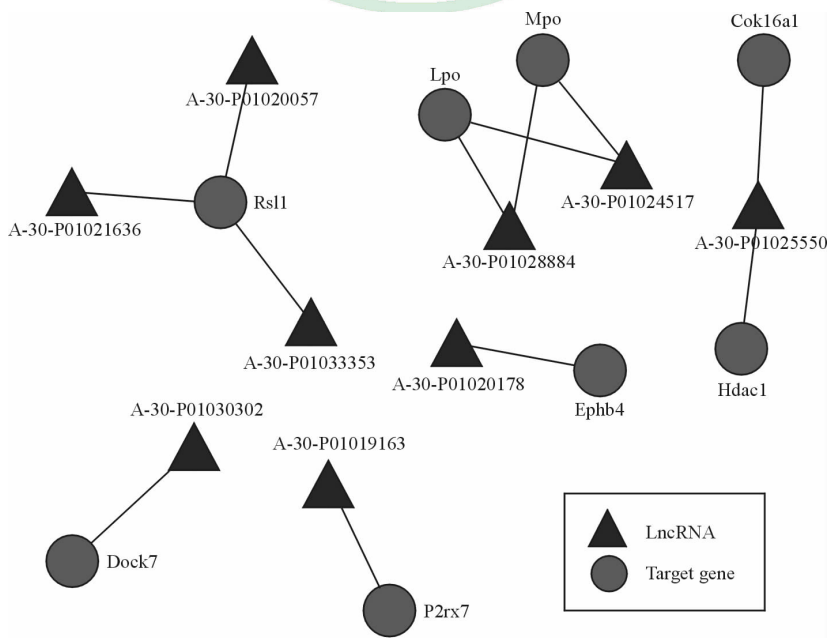


图 2 mRNA-lncRNA 共表达网络图

Fig 2 The lncRNA-mRNA regulatory network

Lines represent the relationship between the two types of regulation

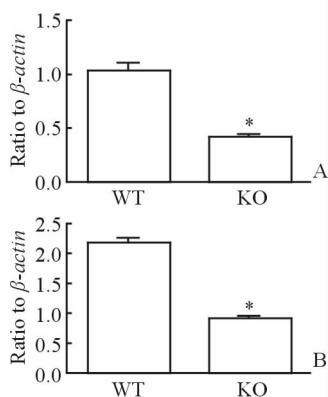


图 3 A-30-P01019163(A)与 P2rx7(B)在 WT 和 KO 小鼠中的表达水平

Fig 3 qRT-PCR analysis of A-30-P01019163 (A) and P2rx7 (B) in the testis tissues of *CRYBB2* gene knockout mice WT: Wild-type; KO: *CRYBB2* knockout. * $P < 0.05$ vs WT group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

CRYBB2 作为一种重要的晶体蛋白, 理应局限于晶状体内发挥功能, 但近年来研究发现该蛋白在晶状体外也具有潜在的重要作用, 如 $\beta B2$ 基因敲除小鼠在睾丸组织中显示出形态和功能的显著异常^[7]。

本研究通过基因芯片分析, 采用生物信息学方法, 获得差异表达的 lncRNA 和 mRNA, 随后进行 GO 数据库分析, 得出这些差异 lncRNA 和 mRNA 主要分布于代谢、免疫系统、信号转导等生物学进程、细胞元件和分子功能中; 又经 KEGG 数据库分析, 得知差异 lncRNA 和 mRNA 发挥作用的主要信号通路; 用关联矩阵法建立了小鼠睾丸组织中 lncRNA 和 mRNA 共表达的网络图, 得到 lncRNA 和 mRNA 的交集。众多研究表明, 离子通道与雄性哺乳动物生精及受精等生殖过程关系密切。其中 Ca^{2+} 通道在哺乳动物精子获能和顶体反应等功能中起重要作用^[21]。综合以上信息, 本研究挑选主要由 Ca^{2+} 信号、配体-受体相互作用等信号通路起作用的差异表达 lncRNA 和 mRNA 进行 qRT-PCR 验证, 发现在 WT 组和 $\beta B2$ 基因 KO 组小鼠睾丸组织中 *P2rx7* 的表达差异有统计学意义。有研究证明, *P2rx7* 在细胞增殖和细胞周期中起重要作用^[22-23], 这与我们 GO 分析的生物学功能结果相匹配, 表明 *P2rx7* 可能通过此途径影响睾丸组织的发育。根据相互作用网络图, 本研究进而验证了与 *P2rx7* 相关

的 lncRNA, 结果发现 lncRNA A-30-P01019163 的表达在两组间的差异也有统计学意义。据此推测, $\beta B2$ 基因敲除后 lncRNA A-30-P01019163、*P2rx7* 表达同步下调, 可能影响睾丸组织的细胞信号转导、细胞周期, 进而影响睾丸组织发育。

近年国内外相关研究通过广泛运用 cDNA 文库以及第二代测序等新技术, 揭示了哺乳动物存在大量 lncRNA, 提示 lncRNA 在哺乳动物的生存、发育过程中起着重要作用。但并非所有 lncRNA 都有功能, 而仅有一小部分有生物学功能^[12,24]。另外, 与 miRNA 不同, lncRNA 可以调节蛋白质表达的转录后调控, 还可以与转录激活因子或者抑制因子结合, 从而上调或下调下游基因的表达^[25]。本实验初步分析了 lncRNA 的调控途径或功能, 得到如下认知: 在 WT 和 $\beta B2$ 基因敲除小鼠的睾丸组织差异表达的 10 组 lncRNA 和 mRNA 中, A-30-P01019163 和 *P2rx7* 同步下调, 提示 $\beta B2$ 基因敲除后, 可能由于 lncRNA A-30-P01019163 的表达量下降, 进而或同时下调了 *P2rx7* 的表达量, 再影响小鼠睾丸组织的细胞信号转导及细胞周期, 最终影响睾丸组织发育。

上述认知还需更进一步实验以确认 $\beta B2$ 基因、lncRNA A-30-P01019163、mRNA *P2rx7* 以及小鼠睾丸组织发育之间存在何种确切的依存关系, 并由此协调控制小鼠睾丸的发育进程。尽管如此, 上述现象及初步研究结果均提示, $\beta B2$ 基因敲除后, 部分 lncRNA 的确可以调控下游基因的表达, 进而影响睾丸功能。

志谢 感谢上海敏芯信息科技有限公司协助进行数据分析。

[参考文献]

- [1] Zhang J, Li J, Huang C, Xue L, Peng Y, Fu Q, et al. Targeted knockout of the mouse $\beta B2$ -crystallin gene (*Crybb2*) induces age-related cataract [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49: 5476-5483.
- [2] Ganguly K, Favor J, Neuhäuser-Klaus A, Sandulache R, Puk O, Beckers J, et al. Novel allele of *crybb2* in the mouse and its expression in the brain [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49: 1533-1541.
- [3] Liedtke T, Schwamborn J C, Schröer U, Thanos S. Elongation of axons during regeneration involves retinal crystallin beta b2 (*crybb2*) [J]. Mol Cell Proteomics, 2007, 6: 895-907.

- [4] Magabo K S, Horwitz J, Piatigorsky J, Kantorow M. Expression of $\beta B(2)$ -crystallin mRNA and protein in retina, brain, and testis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 3056-3060.
- [5] Duprey K M, Robinson K M, Wang Y, Taube J R, Duncan M K. Sub fertility in mice harboring a mutation in $\beta B2$ -crystallin[J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 366-373.
- [6] Lampi K J, Amyx K K, Ahmann P, Steel E A. Deamidation in human lens $\beta B2$ -crystallin destabilizes the dimer[J]. *Biochemistry*, 2006, 45: 3146-3153.
- [7] 相芬芬. $\beta B2$ -晶体蛋白调控雄性小鼠生殖功能的机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [8] Gao Q, Sun L L, Xiang F F, Gao L, Jia Y, Zhang J R, et al. Crybb2 deficiency impairs fertility in female mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453: 37-42.
- [9] Whitehead J, Pandey G K, Kanduri C. Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009: 936-947.
- [10] Faghihi M A, Modarresi F, Khalil A M, Wood D E, Sahagan B G, Morgan T E, et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase[J]. *Nat Med*, 2008, 14: 723-730.
- [11] Goodrich J A, Kugel J F. Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 612-616.
- [12] Mercer T R, Dinger M E, Mattick J S. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 155-159.
- [13] Reinius B, Shi C, Hengshuo L, Sandhu K S, Radomska K J, Rosen G D, et al. Female-biased expression of long non-coding RNAs in domains that escape X-inactivation in mouse[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 614.
- [14] Yang Z, Zhou L, Wu L M, Lai M C, Xie H Y, Zhang F, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18: 1243-1250.
- [15] Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, et al. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers[J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 6320-6326.
- [16] Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshio K, Yamamoto H, Takamaru H, et al. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors[J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 1126-1136.
- [17] Huang M D, Chen W M, Qi F Z, Xia R, Sun M, Xu T P, et al. Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell apoptosis by epigenetic silencing of KLF2[J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 50.
- [18] Kiefer J C. Epigenetics in development[J]. *Dev Dyn*, 2007, 236: 1144-1156.
- [19] Lee J T. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 815-826.
- [20] 张军, 黄才国, 李闻捷, Wei Weng, 汪佳祺. $\beta B2$ 晶体蛋白基因敲除小鼠模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 1246-1248.
- ZHANG J, HUANG C G, LI W J, Wei Weng, WANG J Q. Establishment of a $\beta B2$ crystallin gene knockout mice model[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2006, 27: 1246-1248.
- [21] Luo T, Zou Q X, He Y Q, Wang H F, Li N, Zeng X H. Matrine inhibits mouse sperm function by reducing sperm $[Ca^{2+}]_i$ and phospho-ERK1/2[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35: 374-385.
- [22] Wu P Y, Lin Y C, Chang C L, Lu H T, Chin C H, Hsu T T, et al. Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells[J]. *Cell Signal*, 2009, 21: 881-891.
- [23] Harada H, Chan C M, Loesch A, Unwin R, Burnstock G. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells[J]. *Kidney Int*, 2000, 57: 949-958.
- [24] Dinger M E, Amaral P P, Mercer T R, Mattick J S. Pervasive transcription of the eukaryotic genome: functional indices and conceptual implications[J]. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2009, 8: 407-423.
- [25] Goodrich J A, Kugel J F. Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 612-616.