

MicroRNA 引起 mRNA 降解关键核酸酶 CAF1 和 POP2 的生物进化分析

张凤娟¹, 朴香花², 吴立刚^{2*}, 高必达^{1*}

(1. 湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 中国湖南 长沙 410128;

2. 中国科学院 上海生命科学研究院 生物化学与细胞生物学研究所, 中国上海 200031)

摘要: MicroRNA (miRNA) 参与调控高等真核生物中三分之一以上基因的表达, 其中核酸酶 CAF1 (CCR4-associated factor 1) 及其同源基因 POP2 在 miRNA 引发的 mRNA 3' 端多聚腺苷酸 (poly(A)) 的脱腺苷酸化过程中起了关键作用. 通过实时定量 RT-PCR 的方法检测了小鼠各个组织中 CAF1 和 POP2 的相对表达情况, 发现 CAF1 和 POP2 的组织分布特征不同. 大多数组织中 CAF1 的表达水平明显高于 POP2, 并且组织间差异很大, 特别是在大脑、小脑以及睾丸组织中 CAF1 的表达量很高, 而 POP2 的表达量和变化幅度都较低. 蛋白质序列比对发现, CAF1 和 POP2 是一类进化过程中高度保守的核酸外切酶, 在酵母、线虫、果蝇和尾索动物代表物种海鞘中都只存在单一基因, 而进化到鱼类后产生了两个同源基因——CAF1 和 POP2, 其中 CAF1 的氨基酸序列保守性较 POP2 更高, 更加接近于原始的单一序列. CAF1 和 POP2 这一对同源基因氨基酸序列的主要差别在蛋白质的 C 端. 鱼类中 POP2 的 C 端序列同 CAF1 的序列较为接近, 而在爬行动物之后 POP2 产生了与 CAF1 具有明显差异的 C 端序列, 并逐渐趋于稳定. 我们的分析结果同已有的功能研究一致, 表明可能在 miRNA 产生后的进化过程中产生了 CAF1 和 POP2 两个同源基因, 其中 CAF1 主要担负 miRNA 调控 mRNA 脱腺苷酸化的功能, 而 POP2 可能主要参与其它不同的调控作用.

关键词: microRNA; 脱腺苷酸化; CAF1; POP2; 进化分析

中图分类号: Q811.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)06-0492-07

Evolution Analysis of Key Deadenylase in miRNA Mediated mRNA Degradation

ZHANG Feng-juan¹, PIAO Xiang-hua², WU Li-gang^{2*}, GAO Bi-da^{1*}

(1. College of Bio-safety Science & Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China; 2. Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) regulate the expression of more than 30% genes in animals. CAF1 and POP2 are exoribonucleases that play a key role in miRNA mediated mRNA deadenylation. The expression of CAF1 and POP2 in different tissues of mouse by qRT-PCR is analyzed. The expression of CAF1 is much higher than POP2 in most tissues, with highest expression level in cerebra, cerebel and testis. Through the alignment of protein sequence, it is found that CAF1 and POP2 are highly conserved exonuclease from yeast to human. Yeast encodes only one CAF1/POP2 homologue. After the emergence of miRNAs, organism evolved two paralogs -CAF1 and POP2. POP2 are less conserved than CAF1 and contain a distinct amino

收稿日期: 2010-09-07; 修回日期: 2010-10-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30970618)

作者简介: 张凤娟 (1988-), 女, 安徽亳州人, 湖南农业大学生物信息学专业学生, E-mail: fengjuanbest@163.com; * 通讯作者: 吴立刚 (1974-), 男, 上海人, 中科院上海生命科学研究院研究员, 博士, 主要从事非编码 RNA 和 RNA 干扰 (RNAi) 研究, Tel: 021-54921321, E-mail: lgwu@sibs.ac.cn; 高必达 (1952-), 男, 湖南常德人, 湖南农业大学教授, 博士, 主要从事植物病理学方面的研究, Tel: 0731-6365136, E-mail: bdgao@yahoo.com.cn.

acid sequences at the C-terminus. The results indicate that CAF1 may mainly take part in mRNA deadenylation mediated by miRNA while POP2 may have other regulatory functions.

Key words: microRNA; deadenylation; CAF1; POP2; evolution analysis

(*Life Science Research*, 2010, 14(6): 492~498)

信使 RNA(mRNA)是细胞中负责 DNA 到蛋白质间遗传信息传递的载体, mRNA 的稳定性调控在整个基因表达调控网络中具有非常重要的意义. 不同基因 mRNA 之间稳定性的差异, 不仅有利于细胞通过基因表达调控对环境的变化作出快速反应, 还有利于严格控制组成性表达的基因的转录本处于恒定水平. mRNA 稳定性的调控大体上可以通过降解 mRNA 或提高 mRNA 稳定性两个方面进行调控, 其中后一种调控方式很少见. 动物细胞中 mRNA 的降解途径主要包括 ARE(AU-rich element)引起的降解、无义突变引起的降解(Nonsense-mediated decay, NMD)以及非编码小 RNA(动物细胞中主要是 microRNA)引起的降解等 3 种途径. 其中由 microRNA(miRNA)引起的 mRNA 降解目前被认为是最重要的一类 mRNA 降解途径.

miRNA 是一种由高等真核生物基因组编码的单链小分子 RNA, 参与调控三分之一以上基因的表达, 是基因表达调控网络中的重要组成成分^[1]. 这种长度仅约为 22 个核苷酸的非编码小 RNA 不仅能抑制靶基因的翻译, 还可以引起 mRNA 的降解^[2]. 早期的报道认为 miRNA 仅在蛋白质翻译水平上抑制基因的表达^[3-5], 但越来越多的研究证据表明 miRNA 也可以影响 mRNA 的稳定性, 并且是 miRNA 调节基因表达的重要方式之一^[6-10]. 研究发现在哺乳动物中 miRNA 可以加速靶标 mRNA 3'端多聚腺苷酸(poly(A))尾巴的脱腺苷酸化, 直接导致 poly(A)结合蛋白 PABP 的逐步丢失, 并促进脱帽酶 DCP1 和 DCP2 对 mRNA 5'端帽子结构(m7Gppp)的切除, 最终导致 mRNA 失去 5'和 3'端的保护而被迅速降解. 其中脱腺苷酸化是 mRNA 降解过程的第一步, 也是其速度限制步骤^[11]. 最新的研究发现 CCR4-NOT 复合体的成员 CAF1 及其同源基因 POP2 在 miRNA 引发的 mRNA 3'末端 poly(A)脱腺苷酸化过程中起关键作用. 此外, CAF1 和 POP2 还参与了 RNA 干扰现象引起的脱靶 (RNAi off-target)作用^[12]. 在哺乳动物细胞中对 miRNA 引起的 mRNA 脱腺苷酸化的研究显示, 在绝大多数组织和细胞中

CAF1 的功能比 POP2 更为重要, 但两者在功能上是否存在冗余, 或者存在调控对象和机制的差异目前还属未知. 因此, 研究 CAF1 和 POP2 的序列特征及其在生物进化过程中的关系, 对理解 miRNA 的功能和调控机制有重要的意义.

1 实验方法

1.1 实时定量 RT-PCR 法检测动物组织中 CAF1 和 POP2 的表达水平

取小鼠各个组织, Trizol 法提取细胞总 RNA, 将 RNA 用 DNase I 进行处理后, 取 0.67 μ g RNA 逆转录为 cDNA, 采用 SYBR Green I 法进行 PCR, 以 18srRNA 作为内参照. 引物序列为:

小鼠 CAF1 上游序列: 5'-CCTTCGGTATTTTTCCTGTC-3',

小鼠 CAF1 下游序列: 5'-CTGTGCCGTTCTGTACATAGGAT-3';

小鼠 POP2 上游序列: 5'-TCTTTTCTTCCCGTCCATTTAC-3',

小鼠 POP2 下游序列: 5'-TCCTCATTCTGCTTCTGGGC-3';

18srRNA 上游序列: 5'-CGGCGACGACCCATTCGAAC-3',

18srRNA 下游序列: 5'-GAATCGAACCCTGATCCCCGTC-3';

PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 共 40 个循环. 采用 $\Delta\Delta$ Ct 法计算 CAF1 和 POP2 mRNA 的相对表达水平.

1.2 CAF1 与 POP2 蛋白序列比对及系统发育分析

在 Ensembl 数据库以及 Swissprot 蛋白质数据库中下载处于不同进化阶段且具有代表性的物种的 CAF1 和 POP2 氨基酸序列, 序列信息如表 1 所示. 用 ClustalW 软件对已产生同源基因的物种的 CAF1 和 POP2 的序列进行序列比对. 并将从低等生物酵母到人的 CAF1 和 POP2 氨基酸序列采用 ClustalW 比对之后, 利用 MEGA4.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 同时 bootstrap 设为 1000.

表 1 CAF1 与 POP2 蛋白序列信息
Table 1 Sequence information of CAF1 and POP2

Species	Proteins	ID
<i>Homo sapiens</i>	CAF1	ENSP00000355279
	POP2	ENSP00000285896
<i>Mus musculus</i>	CAF1	ENSMUSP00000034012
	POP2	ENSMUSP00000020822
<i>Gallus gallus</i>	CAF1	ENSGALP00000022159
	POP2	ENSGALP00000006287
<i>Anolis carolinensis</i>	CAF1	ENSACAP00000006124
	POP2	ENSACAP00000003923
<i>Xenopus tropicalis</i>	CAF1	Q3KQ85(SWISSPROT)
	POP2	Q8AVW1(SWISSPROT)
<i>Danio rerio</i>	CAF1	ENSDARP00000087385
	POP2	ENSDARP00000016880
<i>Takifugu rubripes</i>	CAF1	ENSTRUP00000005418
	POP2	ENSTRUP00000000663
<i>Ciona savignyi</i> gene	CAF1/POP2	ENSCSAVP00000003487
<i>Drosophila melanogaster</i>	CAF1/POP2	FBpp0075790
<i>Caenorhabditis elegans</i>	CAF1/POP2	Y56A3A.20.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAF1/POP2	P39008(SWISSPROT)

注: 未经特别注释, 登录号均是来自 Ensembl 数据库.

Notes: All accession numbers are from Ensembl database unless specially annotated.

2 研究结果

2.1 CAF1 和 POP2 在小鼠各个组织的相对表达水平

我们首先对小鼠不同组织中 CAF1 与 POP2

的相对表达量进行了检测. 通过提取成年雄性小鼠各个组织中的总 RNA, 反转录后利用荧光定量 PCR 方法, 以 18srRNA 作为内参, 对 CAF1 和 POP2 mRNA 的相对表达水平进行了检测.

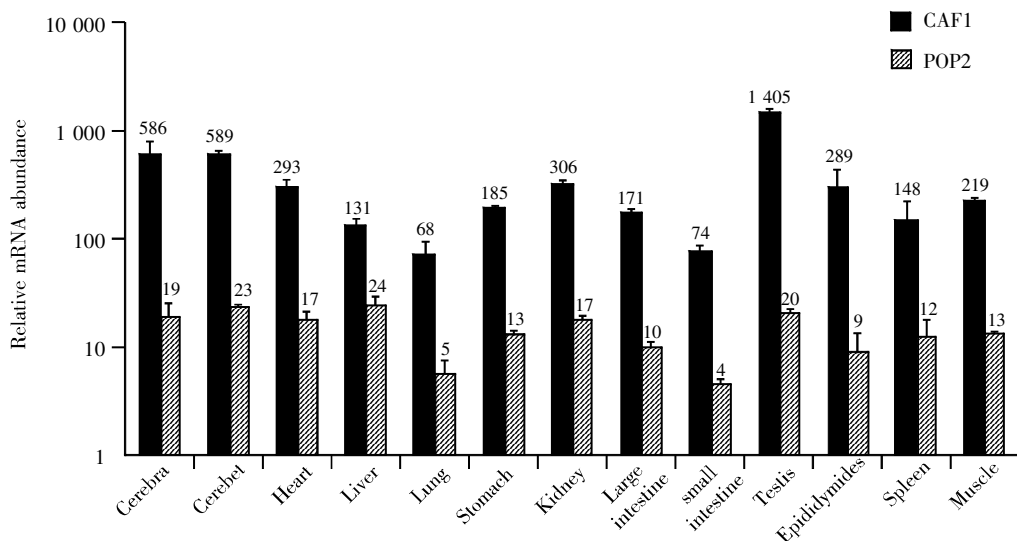


图 1 qRT-PCR 检测小鼠各个组织中 CAF1 和 POP2 mRNA 的相对表达水平

Fig.1 Detection of relative expression of CAF1 and POP2 mRNA in mouse tissues by qRT-PCR

实时定量 PCR 实验数据采用 3 次实验的平均值加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对应数据经 SPSS 软件分析, $P < 0.05$ 为存在显著性差异. 结果显示, 小鼠各个组织中 CAF1 mRNA 的相对表达水平总体比 POP2 高几倍乃至几十倍(图 1, 纵轴为对数值). 我们通过对等量 CAF1 和 POP2 的 DNA 片段进行定量 PCR 扩增, 发现 CAF1 和 POP2 的 PCR 引物的扩增效率基本相同, 证明实时定量 PCR 方法检测到 CAF1 和 POP2 的表达差异并不是由于 PCR 引物自身扩增效率不同所引起的假象. 这一研究结果与之前报导的 CAF1 和 POP2 在细胞水平上功能研究的结果一致, 即 CAF1 对 miRNA 引起的 mRNA 脱腺苷酸化过程中起到了更为重要的作用. 虽然已有的体外和体内实验研究证明 CAF1 和 POP2 都具有核酸外切酶的活性^[13], 但由于在大多数组织和细胞中 CAF1 的表达量远远高于 POP2, 因此造成 CAF1 对 miRNA 引起的 mRNA 脱腺苷酸化过程的贡献远大于 POP2.

我们进一步分别对 CAF1 和 POP2 各自在小鼠不同组织中的相对表达情况进行了比较, 发现 CAF1 和 POP2 在各个组织中的分布有很大差异(图1). 小鼠的睾丸、大脑和小脑中的 CAF1 mRNA 水平非常高, 而肺和小肠中的表达最低. CAF1 在表达最高的睾丸中比在肺中的表达要高 20.6 倍, 比肝脏高 10.7 倍. 而在大脑中 CAF1 的表达也要比肺中的表达要高 8.6 倍, 比肝脏高 4.5 倍. 这说明 CAF1 在雄性生殖系统和神经系统中有着非常重要的功能. 而 POP2 在组织分布上也表现出一定的差异, 但各个组织之间的变化幅度明显低于 CAF1. POP2 表达最高的是肝脏, 比表达最低的小肠高 6 倍, 而在睾丸和大脑中的表达水平则略低于肝脏. 从以上比较可以看出, CAF1 和 POP2 的组织特异性表达特征完全不同, 提示 CAF1 和 POP2 可能具有完全不同的生物学功能. CAF1 除了在大部分组织中都高表达外, 在细胞活动最为活跃的组织如神经系统和生殖系统中的表达水平特别高, 可能与 CAF1 参与 miRNA 介导的基因调控功能相适应.

2.2 CAF1 与 POP2 蛋白序列比对

CAF1 和 POP2 在高等动物不同组织中的表达水平的巨大差异提示它们在功能和作用机制上也可能有明显差别. 因此, 我们对处于不同进化阶段, 并且已经产生两个同源蛋白——CAF1 和 POP2 的几个有代表性的物种, 包括鱼类(斑

马鱼 *D. rerio*、河豚 *T. rubripes*)、两栖类(热带爪蟾 *X. tropicalis*)、爬行类(安乐蜥 *A. carolinensis*)、鸟类(家鸡 *G. gallus*)、哺乳类(小鼠 *M. musculus*、人 *H. sapiens*)的 CAF1 以及 POP2 的氨基酸序列进行了比对.

比对结果显示 CAF1 和 POP2 之间的同源性很高, CAF1 和 POP2 序列的主要差异集中在氨基酸序列的 C 末端(图 2 方框内标示). 不同物种中 CAF1 的序列保守性非常高, 而 POP2 的序列保守性较 CAF1 低. 较低等的斑马鱼与河豚的 POP2 序列与其他进化上更高等的生物相比, 在 C 末端都存在较大差异并且更加接近于 CAF1 的保守序列. 而除斑马鱼与河豚外, 其他高等生物的 POP2 在 C 末端序列相似性较高. 这些现象提示我们, POP2 有可能在鱼类中产生后经历了快速的进化过程, 并在更为高等的动物中趋于稳定.

CAF1 和 POP2 都具有 3'到 5'核酸外切酶活性, 且均属于 DEDD 家族成员, 它们都含有 4 个高度保守的酸性氨基酸位点, 即 3 个天冬氨酸(D)和一个谷氨酸(E), 这 4 个位点即为核酸酶催化活性位点. 另外第 5 个非常保守的组氨酸位点(H, 位于第 4 个位点 D 之前)的具体功能目前尚不清楚^[13]. 如图 2 所示, 不同物种 CAF1 和 POP2 氨基酸序列中 5 个核酸外切酶催化保守位点完全相同(黑色箭头标示), 这说明在进化过程中, 无论是 CAF1 还是 POP2 均保留了核酸外切酶活性. 然而由于氨基酸 C 末端区域的差异, 可能是导致 CAF1 和 POP2 功能上存在差异的主要原因, 这个假设有待于将来进一步的分子生物学和细胞生物学的实验验证.

2.3 CAF1 与 POP2 系统发育分析

为了进一步研究 CAF1 和 POP2 序列上的差异对 miRNA 功能的意义, 我们对不同进化阶段物种中的 CAF1 和 POP2 序列进行系统发育分析. 通过比较包括真菌(酵母 *S. cerevisiae*)、线形动物(线虫 *C. elegans*)、昆虫(果蝇 *D. melanogaster*)、尾索动物(海鞘 *C. savignyi*)、鱼类(斑马鱼 *D. rerio*、河豚 *T. rubripes*)、两栖类(热带爪蟾 *X. tropicalis*)、爬行类(安乐蜥 *A. carolinensis*)、鸟类(家鸡 *G. gallus*)、哺乳类(小鼠 *M. musculus*、人 *H. sapiens*)在内的多个物种的 CAF1 与 POP2 的氨基酸序列, 我们构建了 CAF1 与 POP2 的系统发育树.

通过基因组序列比对, 我们发现处于进化树

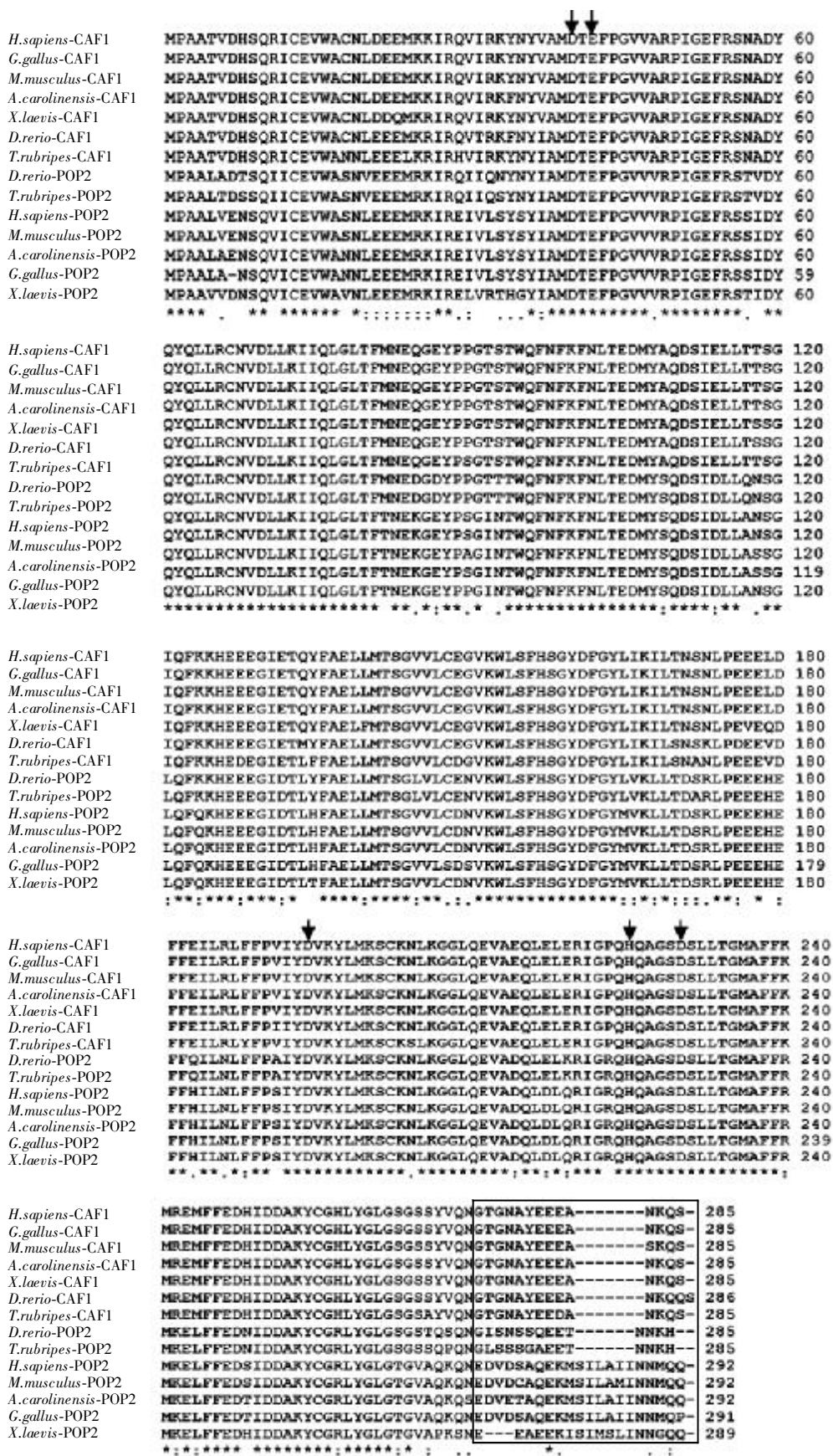


图2 不同物种中 CAF1 与 POP2 蛋白序列比对
Fig.2 Protein sequence alignment of CAF1 and POP2 from different species

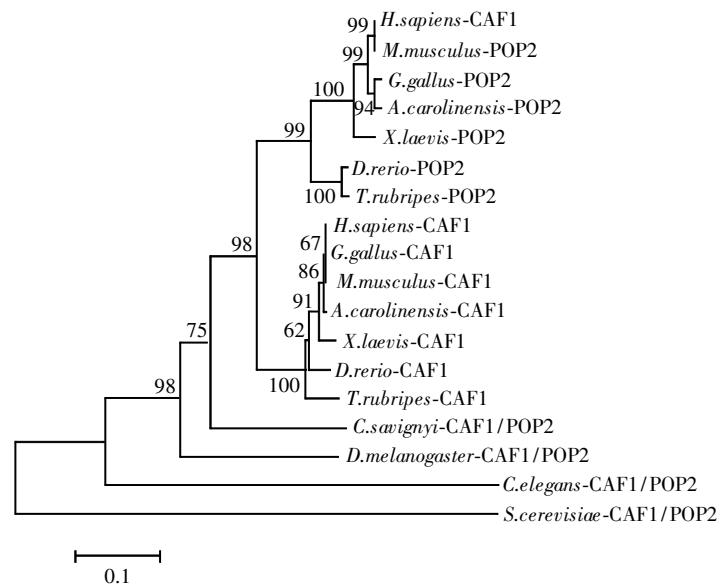


图 3 CAF1 与 POP2 系统发育分析

Fig.3 Phylogenesis analysis of CAF1 and POP2

低端的几个物种(酵母、线虫、果蝇、海鞘)中只含有单一基因 CAF1 或 POP2 (图 3 中标注为 CAF1/POP2),再往上到较高等的鱼类就开始出现 CAF1 与 POP2 两个同源基因.且从图 3 中可以看出,CAF1 较 POP2 更加接近酵母和线虫等低等真核生物的序列,这说明 CAF1 有可能是最原始的基因,在进化过程中由于要满足生物体愈来愈复杂的基因表达调控的需要,而在鱼类(斑马鱼 *D. rerio*、河豚 *T. rubripes*)中进化产生了 CAF1 的同源基因 POP2.有趣的是 miRNA 在酵母中不存在,在衣藻以及贾第虫等低等的单细胞真核生物中才开始出现^[14,15].而 CAF1/POP2 和 miRNA 的另一重要结合蛋白 Argonaute 在酵母中已经存在.说明 miRNA 的最初产生和发挥功能是利用了原始真核生物中已有的一些蛋白质分子,并且在之后的进化过程中,包括 CAF1 和 Argonaute 在内的这些蛋白质为适应 miRNA 的功能,进行了新的进化过程,包括产生功能特异的同源基因,以适应生物体更为复杂的基因调控需求.

3 讨论

通过实验,我们发现在哺乳动物中 CAF1 比 POP2 的表达量要高,可能是造成 CAF1 对 miRNA 引起的 mRNA 脱腺苷酸化过程的贡献远大于 POP2 的主要原因.另外通过 CAF1 与 POP2 蛋白序列比较以及系统发育分析,我们发

现进化中 CAF1 保守性比 POP2 要高,而且 CAF1 更加接近于原始单一基因的序列,这也反映了 CAF1 比 POP2 的功能更加重要.由氨基酸序列比对可以看出,在鱼类中,POP2 的 C 端序列更加接近 CAF1 的保守序列,而在爬行动物之后 POP2 序列开始趋于稳定,并产生了与 CAF1 具有明显差异的 C 端序列.由此我们推测在生物进化中,CAF1 保留了原始的催化 mRNA 脱腺苷酸化的功能,而 POP2 虽然保留了核酸外切酶的活性,但在由 miRNA 引起的 mRNA 降解中并不起主要的作用,可能主要负责参与其他功能.

相对 miRNA 的功能研究,近年来对 miRNA 及其相关蛋白的进化研究也开始受到越来越多的关注.很长时间以来,人们只在高等多细胞真核生物中找到了 miRNA,而在低等的单细胞真核生物,如酵母中却没有发现 miRNA.因此,miRNA 曾一度被认为是生物进化发展到多细胞真核生物才具有的、为增加生物复杂度而产生的一种基因表达调控系统^[16-19].后来人们又在衣藻以及贾第虫等低等的单细胞真核生物中发现 miRNA 的存在^[14,15],将 miRNA 的起源向前追溯到真核生物进化的更早期的阶段,表明了 miRNA 调节系统应该是在真核生物形成之初就已经产生了.另外人们也对 miRNA 发生过程中的几个关键蛋白比如 Dicer, Argonaute, Exportin-5 等进行了进化分析^[20],使我们对 miRNA 这一重要的基因表达调控系统的起源有了较全面的

理解. 我们通过对 CAF1 与 POP2 的表达特征、序列和进化的分析, 更加丰富了对 miRNA 作用机制的认识, 并为进一步研究 CAF1 和 POP2 的功能和作用机制提供了重要的线索.

致谢: 尚仁福对本文的写作和修改提出了宝贵的意见, 在此向他表示诚挚的谢意!

参考文献 (References):

- [1] FRIEDMAN R C, FARH K K H, BURGE C B, *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. *Genome Research*, 2009, 19(1): 92-105.
- [2] WU Li-gang, BELASCO J G. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs[J]. *Molecular Cell*, 2008, 29(1): 1-7.
- [3] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [4] WIGHTMAN B, HA I, RUVKUN G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 855-862.
- [5] ZENG Yan, YI Rui, CULLEN B R. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2003, 100(17): 9779-9784.
- [6] BAGGA S, BRACHT J, HUNTER S, *et al.* Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation[J]. *Cell*, 2005, 122(4): 553-563.
- [7] JING Q, HUANG S, GUTH S, *et al.* Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability[J]. *Cell*, 2005, 120(5): 623-634.
- [8] KRUTZFELDT J, RAJEWSKY N, BRAICH R, *et al.* Silencing of microRNAs *in vivo* with antagomirs[J]. *Nature*, 2005, 438(7068): 685-689.
- [9] LIM L P, LAU N C, GARRETT-ENGELE P, *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. *Nature*, 2005, 433(7027): 769-773.
- [10] MOSS E G, LEE R C, AMBROS V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA[J]. *Cell*, 1997, 88(5): 637-646.
- [11] WU Li-gang, FAN Ji-hua, BELASCO J G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2006, 103(11): 4034-4039.
- [12] PIAO Xiang-hua, ZHANG Xue, WU Li-gang, *et al.* CCR4-NOT Deadens mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2010, 30(6): 1486-1494.
- [13] BIANCHIN C, MAUXION F, SENTIS S, *et al.* Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human[J]. *RNA*, 2005, 11(4): 487-494.
- [14] ZHAO Tao, LI Guang-lin, MI Shi-jun, *et al.* A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Genes & Development*, 2007, 21(10): 1190-1203.
- [15] ZHANG Yan-qiong, CHEN Dong-liang, TIAN Hai-feng, *et al.* Genome-wide computational identification of microRNAs and their targets in the deep-branching eukaryote *Giardia lamblia* [J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2009, 33(5): 391-396.
- [16] CARTHEW R W. Gene regulation by microRNAs[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2006, 16(2): 203-208.
- [17] KLOOSTERMAN W P, PLASTERK R H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease [J]. *Developmental Cell*, 2006, 11(4): 441-450.
- [18] AMBROS V, CHEN X. The regulation of genes and genomes by small RNAs[J]. *Development*, 2007, 134(9): 1635-1641.
- [19] NIWA R, SLACK F J. The evolution of animal microRNA function[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2007, 17(2): 145-150.
- [20] MURPHY D, DANCIS B, BROWN J R. The evolution of core proteins involved in microRNA biogenesis[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 92.