

# 斑马鱼 *mcm5* 基因的表达分析及在体节发生中的功能

张雨<sup>1</sup>, 吴永梅<sup>2</sup>, 刘敏<sup>1</sup>, 黄四洲<sup>2\*</sup>

(1. 成都医学院基础医学院, 成都 610500; 2. 成都医学院基础医学院人体解剖与组织胚胎学教研室; 四川省发育与再生四川省重点实验室, 成都 610500)

**【摘要】** 目的 细胞周期因子 MCM5 在 DNA 复制起始中起着关键性作用, 并参与基因转录调控, 但其在胚胎发育中的作用鲜有报道。本文首先研究 *mcm5* 在斑马鱼胚胎发育过程中的表达模式, 然后对 *mcm5* 在斑马鱼体节发生中的作用进行研究。**方法** 通过原位杂交的方法分析 *mcm5* 在斑马鱼发育早期的表达谱, 然后运用 MO 注射的方法敲降 *mcm5* 功能, 并结合原位杂交的方法分析 *mcm5* 在体节发生中的作用。**结果** 整胚原位杂交实验显示, MCM5 为母源性因子。在胚胎 1 细胞期到体节发生早期, *mcm5* 呈广泛表达; 从胚胎发育 4 体节开始, *mcm5* 开始在尾芽、体节、头部区域呈现特异性表达, 暗示其可能参与了体节发生的调控。在 *mcm5* 功能敲降时, 活体胚胎除体轴变短、眼睛变小以外无明显畸形。但原位杂交实验显示体节发生相关标记性基因表达减弱, 表明 *mcm5* 可能参与了体节发生的调控。**结论** 在斑马鱼早期发育中 *mcm5* 参与了体节发生的调控。

**【关键词】** *mcm5*; 体节发生; 斑马鱼

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0008-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.002

## Expression pattern of zebrafish *mcm5* and its role in somitogenesis

ZHANG Yu<sup>1</sup>, WU Yongmei<sup>2</sup>, LIU Min<sup>1</sup>, HUANG Sizhou<sup>2\*</sup>

(1. Basic Medical School, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2. Development and Regeneration Key Laboratory of Sichuan Province, Department of Anatomy and Histology and Embryology; Basic Medical School, Chengdu Medical College, Chengdu 610500)

**【Abstract】 Objective** The cell cycle regulator MCM5 plays a critical role in the initiation of DNA replication and also functions in transcriptional regulation. However, its role in embryonic development is largely unknown. The aims of this study were to examine the expression pattern of *mcm5* in early zebrafish embryos and investigate its function in somitogenesis. **Methods** First, the expression pattern of *mcm5* was analyzed by whole-mount *in situ* hybridization in zebrafish during early embryonic development. Then, antisense morpholinos (MOs) were injected into embryos to disturb Mcm5 protein expression and the associated defects of somitogenesis were examined. **Results** MCM5 is a maternal factor that is ubiquitously expressed from the one-cell to early-somite stage. *mcm5* transcripts are restricted to the tailbud, somite, and head at later stages. These result indicate the possibility that *mcm5* is involved in somitogenesis. *mcm5* morphants exhibit a shortened anterior-posterior axis and smaller eyes compared with control embryos. *In situ* experiments further revealed that some genes crucial for somitogenesis are downregulated during somitogenesis when *mcm5* is depleted. **Conclusions** *mcm5* is involved in zebrafish somitogenesis.

**【Keywords】** *mcm5*; somitogenesis; zebrafish

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(31741091); 四川省教育厅自然科学基金重点项目(18ZA0142)。

**【作者简介】** 张雨(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 发育生物学。E-mail: 605475536@qq.com

**【通信作者】** 黄四洲(1977—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 发育信号转导研究。E-mail: huangyuy1027@126.com

在胚胎发育中受精卵从单细胞到完整生命体,经过了一个极其复杂而漫长的发育过程。在此过程中细胞进行细胞分裂的同时也在发生命运决定,细胞分裂和细胞分化各自相互独立却又互为偶联<sup>[1]</sup>。Gem 最早是在非洲爪蟾中被发现参与细胞周期中 DNA 复制调控<sup>[2]</sup>,随后被发现分别参与了神经<sup>[3-4]</sup>、眼睛<sup>[5]</sup>、血液<sup>[6]</sup>、癌症等发生的调控,并被证明在调控细胞周期和细胞分化中起到了不可取代的作用<sup>[1,7]</sup>,这充分表明细胞周期因子不仅参与了细胞周期的精细调控,同时也作为一重要调控因子参与了胚胎发育的细胞命运决定过程。MCM5 是 DNA 复制起始复合体中 MCM2-7 复合小体的重要因子,在几乎所有真核生物细胞中都存在<sup>[8-9]</sup>,对 DNA 复制的起始和延伸起着重要的作用。MCM5 在细胞中的数量极为丰富,其数量也远远超过了任何情况下起始 DNA 复制所必须<sup>[10]</sup>,这便暗示了 MCM5 可能拥有 Gem 相似的功能,参与到了细胞命运分化决定的过程中。部分报道表明 MCM5 参与了细胞命运的决定和组织器官的发育<sup>[7,11-12]</sup>,但这些都与细胞周期的停止和细胞凋亡相关<sup>[11]</sup>,而鲜有 MCM5 作为调控因子直接参与了胚胎各组织器官发育的特异性调控。

近年来,MCM5 在部分研究中已被证实参与了基因转录调控,暗示 MCM5 可能会作为转录调控因子直接参与胚胎各组织器官的发育调控。运用染色质免疫共沉实验分析复制起始位点与 MCM5 复合体数量关系时,发现在复制起始位点以外的地方存在许多 MCM5 结合的染色质位点<sup>[13]</sup>。这些位点可能与 MCM5 结合,调控特定基因的转录。在果蝇 S2 细胞中将 MCM5 量降低 95% 后,正常生存环境下 S2 细胞 DNA 复制和细胞周期进程仍不受影响<sup>[14]</sup>,这更提示 MCM5 可能还参与到基因转录调控中。另外,在大鼠成纤维细胞<sup>[15]</sup>及免疫细胞<sup>[16]</sup>中发现 MCM5 直接或间接参与基因转录调控;在细胞缺氧情况下 MCM5 与其他 MCM 家族成员形成转录抑制复合体,直接与 HIF1 结合而抑制 HIF1 的转录活性<sup>[17]</sup>。以上信息表明 MCM5 的确参与了基因转录调控,同时也暗示了在胚胎发育中 MCM5 可能通过特定基因的转录调控参与了组织器官的发育调控。MCM5 少有被报道参与胚胎发育组织器官的发育调控,部分缘于在哺乳动物中重要细胞周期因子 MCM5 突变将导致胚胎在囊胚期死亡<sup>[18]</sup>。在斑马鱼中可以成功的将目的基因进行敲降并在体外实

时观察胚胎发育的情况,这为本课题组研究 MCM5 在胚胎发育中的功能提供了便利。

体节是沿胚胎前后轴空间顺序形成一定数目的重复性结构,是轴旁中胚层 (presomite mesoderm) 细胞通过边缘间充质细胞角质化 (MET) 以后形成的细胞团<sup>[19]</sup>,他们最后将形成骨骼、肌肉等组织。体节发生在不同模式动物中其分子调控机制存在一定的差异,但从形态发生上看,各个模式动物具有较高的共性。首先是轴旁中胚层的形成,然后沿体轴从前到后轴旁中胚层细胞以次周期性的形成体节,同时伴随前后轴后端按照一定的速度向后生长延伸,以使新的 PSM 产生<sup>[19]</sup>。从机制上看分析,调控体节发生的细胞及分子调控机制在不同物种中存在高度的保守性:Notch 及 Wnt 信号通路决定了体节发生的周期性及体节极性;而 Fgf 信号通路决定了体节发生的大小<sup>[20]</sup>。三者 在胚胎发育早期共同调控了体节的正常发生。

本研究课题组运用原位杂交及 MO 敲降技术,发现 MCM5 参与了体节发生的调控。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

野生型斑马鱼为 AB 品系。按照 3R 原则及动物喂养及使用伦理要求,斑马鱼在标准养殖条件下维持和喂养 (28℃; pH = 7.2)。

### 1.2 主要试剂

PCR purification Kit (D6492-01, Qiagen); Reverse Transcription (# K1622, Thermo); mMACHINE (AM1340, Ambion); Morpholino 购自 Gene Tools 公司 (*mcm5*MO: 5-ATAGTTTCGATAAGT GCTGTCCGATG-3; *p53*MO: 5-GCGCCATTGCTTTGCAA GAATTG-3); T4 连接酶购自 Invitrogen 公司; Q5 高保真酶、限制性内切酶购自 NEB 公司;原位杂交相关的试剂主要购自 Roche 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 胚胎注射

*mcm5*MO 细胞注射:将 MO 从 -80℃ 冰箱拿出后室温下融化,放入 65℃ 恒温加热 5 min 让沉淀溶解,离心。吸取上清 MO 将其稀释成工作浓度 (300 μmol/L),在胚胎 1~4 细胞时期进行胚胎注射。

*EGFP* mRNA 注射:将制备好的 mRNA 分装,取出部分用 RNase free 水稀释为 30 ng/μL 备用。胚胎在 1~4 细胞期注射注射卵黄。

### 1.3.2 整胚原位杂交

胚胎成长至所需时期,4% PFA 固定 24 h 后剥膜过度到无水甲醇中脱水,于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待用。原位杂交按照已报道方法进行<sup>[7]</sup>。

### 1.3.3 EGFP mRNA 的合成及原位杂交 RNA 探针的合成

限制性内切酶将质粒 DNA 线性化,酶切过夜,用 DNA 快速纯化回收试剂盒回收线性化 DNA 模板,用 mMessageMachine 试剂盒体外转录合成 mRNA;然后利用酚氯仿抽提回收 mRNA,异丙醇沉淀。测定 mRNA 的浓度,分装并放置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存待用。

使用 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) 试剂盒体外转录合成地高辛标记的原位杂交 RNA 探针,然后通过 RNA 纯化试剂盒纯化回收,检测浓度并  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待用。

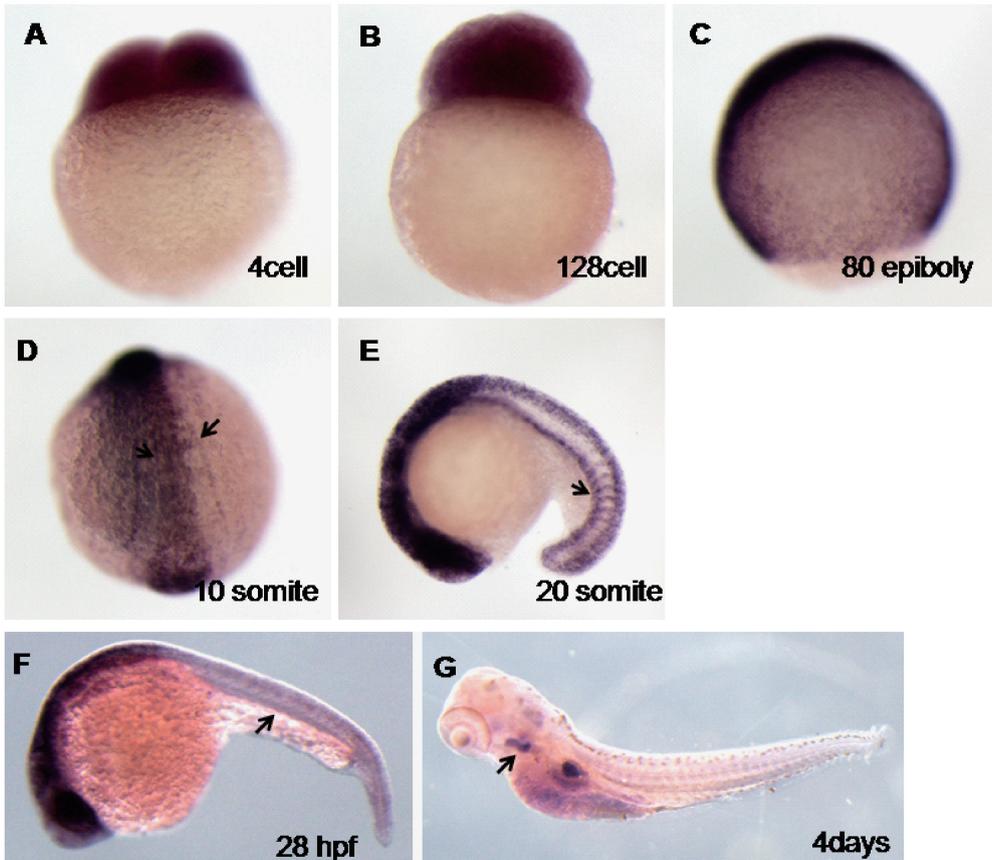
## 2 结果

### 2.1 *mcm5* 在斑马鱼胚胎发育早期的表达模式

在研究 *mcm5* 在胚胎发育中的具体作用前,首先运用原位杂交方法检测其在早期胚胎中的表达模式。研究发现 *mcm5* 是母源性表达因子,在胚胎发育 2 细胞及 128 细胞时呈高表达(图 1A, B),在原肠运动及以前在胚胎中呈广泛性表达(图 1A-C)。从体节发生早期开始表达出现特异性,从 10 体节开始 *mcm5* 在头部、尾牙、侧板中胚层及新生体节(箭头)处等高表达(图 1D-F)。在第 4 天,*mcm5* 被发现在胸腺等处集中表达(图 1G, 箭头所指)。以上数据表明 *mcm5* 在胚胎发育早期可能参与了体节发生的调控。

### 2.2 *mcm5* MO 的设计及功能验证

为研究 *mcm5* 在斑马鱼胚胎发育中的作用,本课题组合成 *mcm5*MO 以特异的阻断胚胎内源性

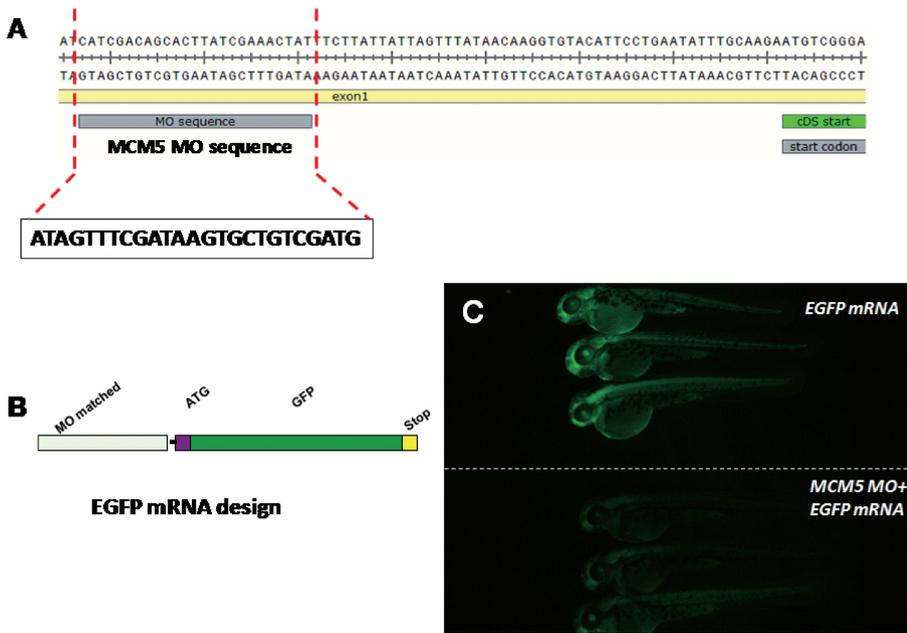


注: A-C: 在 10hpf (hours post fertilization) 前 *mcm5* 广泛表达于胚胎中所有细胞; D-F: 在体节发生期, *mcm5* 在头部、尾牙、新生体节等处高表达; G: 在第 4 天部分表达也与胸腺细胞特异重合(箭头)。

图 1 *mcm5* 在斑马鱼发育早期的表达模式

Note. A-C: *mcm5* is expressed in all the cells before 10 hpf. *mcm5* is restricted in head. D-F: Tailbud and new formed somite. G: In day4, the expression of *mcm5* partially overlaps with that of thymocyte (arrow head).

Figure 1 Expression pattern of *mcm5* in early zebrafish development



注:A:图中所示为 *mcm5* CDs 区域 5' 端部分非翻译序列及 MO 设计序列。B-C:*mcm5*MO 功能验证。在 EGFP 序列上游添加一段与 *mcm5*MO 互为匹配的核酸序列,将整个序列克隆到 pCS2 + 载体中(B)并制备 EGFP mRNA。EGFP mRNA 单独注射 EGFP。C:mRNA 与 *mcm5*MO 共注射实验显示 *mcm5*MO 能很好的抑制 EGFP mRNA 的翻译。

图 2 *mcm5*MO 的设计及功能验证

Note. Note. A: Part of the 5' UTR upstream of *mcm5* CDs and the *mcm5* MO sequence are shown. B, C: Examining the efficiency of *mcm5* MO. An *mcm5* MO matched sequence was added before the EGFP codon sequence, and the whole region was cloned into the vector pCS2 + (B); then, EGFP mRNA was prepared in vitro. C: EGFP was examined for its expression in the embryos injected with EGFP mRNA; the expression was greatly downregulated in embryos co-injected with EGFP mRNA and *mcm5* MO, which indicated that *mcm5* MO worked well.

Figure 2 *mcm5* MO design and efficiency evaluation

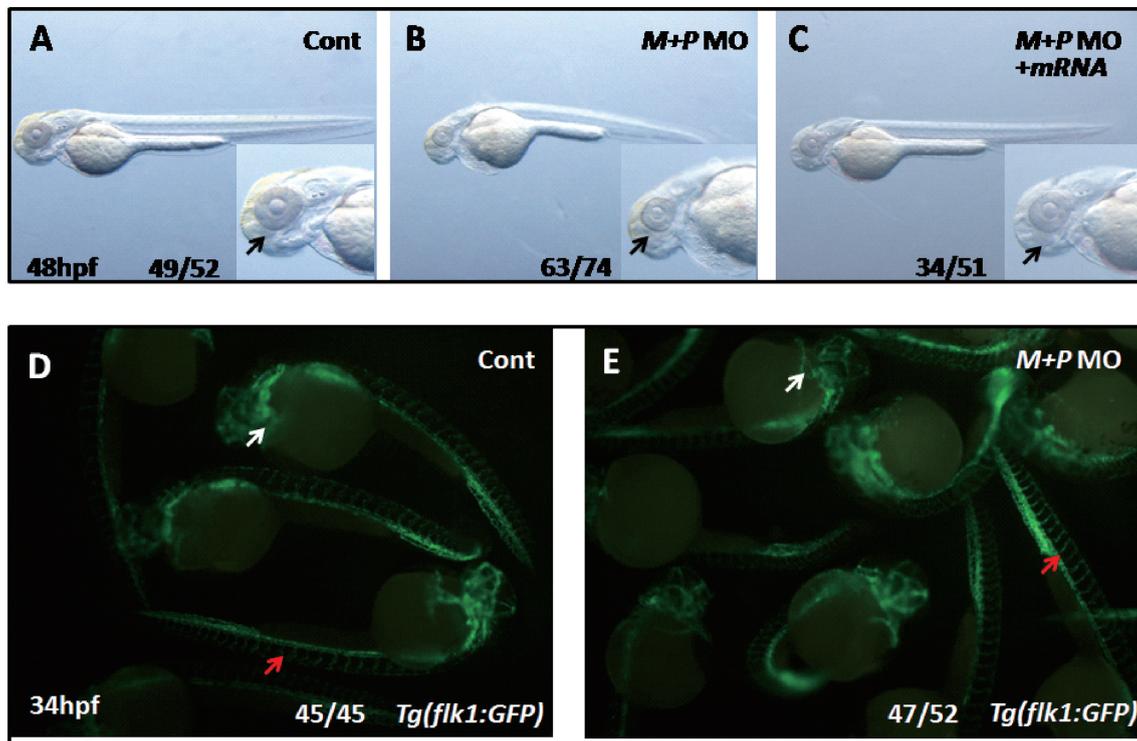
*mcm5* mRNA 的翻译(图 2A)。同时为了研究 *mcm5*MO 是否工作,本课题组构建了体外转录 EGFP mRNA 的载体(图 2B)。在该载体中于 EGFP 编码区的上游添加了与 *mcm5*MO 完全匹配的 DNA 序列,这样设计并体外转录所获得的 EGFP mRNA 可以很好的与 *mcm5*MO 结合(图 2B)。理论上如果 *mcm5*MO 工作良好将会有效的抑制 EGFP 的翻译,进而间接表明 *mcm5*MO 在体内能很好的抑制内源性 *mcm5* mRNA 的翻译。结果表明,当单独注射 EGFP mRNA 时,在胚胎发育到第 36 小时仍然有较高量 EGFP 存在;而在共注射 *mcm5*MO 和 EGFP mRNA 的胚胎中,EGFP 的量明显降低(图 2C)。同时本课题组也发现,*mcm5* 敲降的胚胎外观上无明显表型(图 2C)。以上实验间接表明体外合成的 *mcm5*MO 能较好的抑制内源性 *mcm5*mNA 的翻译。

### 2.3 *mcm5* 参与了体节发生的调控

由于 MCM5 是 DNA 复制重要调控因子,MCM5 功能敲降可能会导致细胞凋亡发生,从而影响 MCM5 功能敲降后表型的观察。为研究 MCM5 功能敲降后胚胎特异性表型,本课题组在胚胎中共注射

*mcm5* MO 及 *p53*MO 以敲降 MCM5 的功能,然后分析胚胎表型。结果发现,在胚胎共注射 *p53*MO 及 *mcm5*MO 后,胚胎体轴变短且眼睛变小(图 3AB),但胚胎无明显外观上的差异(图 3A)。进一步分析 *mcm5* 是否参与了心脏、血管等的发育调控。结果表明在 *mcm5* 功能敲降后心脏和血管的发育无明显缺陷(图 3D-E)。为验证 *mcm5*MO 功能敲降的特异性,分析是否 *mcm5* mRNA 可以回救 *mcm5* MO 注射所导致的眼晴变小、体轴变短的外观缺陷。结果显示 *mcm5* mRNA 能较好的回救 *mcm5* MO 注射所致的胚胎变短、眼晴变小的表型(图 3C),表明 *mcm5* MO 的特异性作用。

由于 *mcm5* mRNA 在体节发生时于轴旁中胚层及新生体节中高表达(图 1),暗示 *mcm5* 可能参与了体节发生的调控。活体胚观察表明在 *mcm5* 功能敲降及对照组胚胎之间,体节形成无明显的形态学差异(图 4A)。为进一步研究 *mcm5* 是否参与了体节发生,在 MCM5 功能敲降的胚胎发育到 10 体节左右本课题组运用原位杂交的方法分别检查体节发生相关基因的表达(图 3B-E)。与对照组相比,



注: A-C: *mcm5* 调控了眼睛及体长的发育。与对照组相比, 在注射 *mcm5* MO 后胚胎体轴变短 (B), 眼睛变小 (C, 箭头所示)。注射 *mcm5* mRNA 回了 *mcm5* MO 注射所导致的表型 (C)。D-E: *mcm5* MO 注射并未导致心脏和血管发育的缺陷 (红色箭头为血管; 白色箭头为心脏)。

图 3 *mcm5* 功能降低使胚胎变短及眼睛变小

Note. A-C: *mcm5* is involved in body length and eye development. Compared with the control, the embryos injected with *mcm5* MO displayed shorter body length (B) and smaller eyes (C, arrow). Injection of *mcm5* mRNA successfully rescued the phenotype created by injection with *mcm5* MO (C). D, E: *mcm5* downregulation did not result in heart and vascular developmental defects (red arrow shows blood vessel; white arrow shows heart).

Figure 3 Downregulation of *mcm5* led to shorter body length and smaller eyes

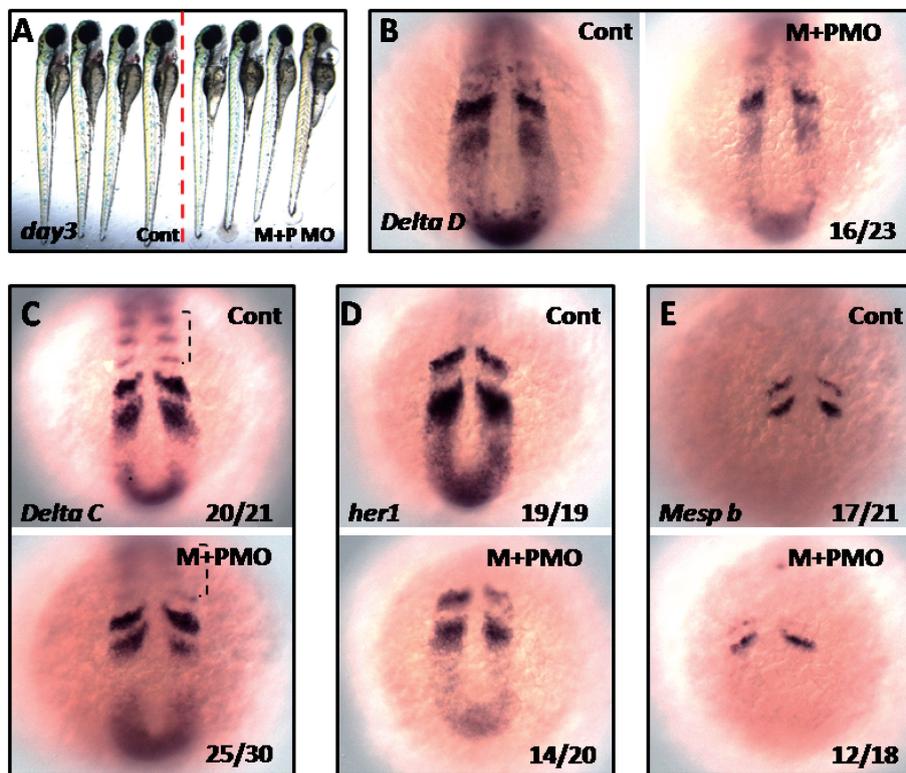
Notch 信号通路配体 *delta D*, *delta C* 表达明显降低 (图 4B-C), 并且在已经形成的体节中, *delta C* 的表达也明显降低 (图 4C 虚线半括号所示), 表明 MCM5 可能通过 Notch 信号通路参与体节发生。为进一步确认 *mcm5* 在体节发生中的作用, 在 *mcm5* 功能敲降后分析振荡基因 *her1* 及体节极性基因 *mespb* 的表达。与对照组相比, 虽然 *her1* 的表达降低, 但其振荡表达模式并未受到影响 (图 4D); 但极性基因 *mespb* 表达明显降低, 表达模式改变 (图 4E)。以上数据表明 MCM5 功能降低导致了 Notch 信号活性降低及体节极性缺陷。

### 3 讨论

MCM5 是 DNA 复制所必须的细胞周期因子, 除调控细胞周期外, MCM5 被发现在多种肿瘤中高表达, 且被作为癌症发生的标记基因。但是 MCM5 在胚胎发育中的作用鲜有报道。本研究通过研究 *mcm5* 在斑马鱼中的表达模式, 发现在发育早期

*mcm5* 于尾牙、轴旁中胚层及新生体节中表达, 推测其可能参与了体节发生的调控。进一步研究发现, 在 MCM5 功能降低后虽然体节外观上无明显缺陷, 但是体节标记性基因 *deltaD* 等表达受阻, 且体节极性基因 *mespb* 从野生型中的 2 条变为 1 条, 表明 MCM5 参与了体节发生的调控。

Notch 信号通路是体节发生的重要调控因子, 众多 Notch 信号通路分子突变直接导致了体节振荡基因 *deltaC*, *her1* 等的振荡表达模式紊乱, 同时使得体节发生缺陷。在 MCM5 功能降低时, 本课题组虽然发现 Notch 信号通路 *deltaD* 表达降低, 但是并未发现振荡基因的振荡表达模式变化, 这暗示在体节发生过程中, 振荡基因的振荡表达模式不仅仅受 Notch 信号通路调控, 同时也说明 Notch 信号通路活性要降低到一定程度才可使得振荡基因的振荡表达模式受损。虽然 MCM5 功能降低后振荡基因振荡表达模式没受影响, 但体节极性基因 *mespb* 表达模式变化, 说明 *mcm5* 以一种较为复杂的方式调控



注:A:与对照组胚胎相比,*mcm5*和*p53*功能敲降的胚胎体轴变短,眼睛变小。B-E:体节发生相关基因表达变化。Notch信号通路配体*deltaD*表达降低(B),振荡基因*deltaC*和*her1*表达降低(C,D),体节极性基因*mespb*从两条变成一条(E)。

图4 *mcm5*参与体节发生相关基因的调控

Note. A: Compared with the control embryos, the AP axis was shorter and the eyes were smaller in *mcm5* and *p53* double morphants. B-E: The expression of genes related to somitogenesis. *deltaD*, the Notch signaling ligand, was downregulated (B), while the oscillators *deltaC* and *her1* were also downregulated in *mcm5* and *p53* double morphants (C, D). Only one stripe of *mespb* was maintained in morphants, while there were two stripes in control embryos (E).

Figure 4 *mcm5* is involved in regulating somite-related genes

了体节的发生。在体节发生中 *mcm5* 以何种方式调控了 Notch 信号通路活性及体节极性,有待进一步研究。

本课题组以往研究表明在原肠运动时 *mcm5* 调控了中内胚层细胞间的剥离<sup>[7]</sup>,本研究又揭示了 *mcm5* 在体节发生中的作用,但 *mcm5* 在胚胎早期发生中的功能研究还远未结束。从前言分析中可知 MCM5 在细胞中的表达量远大于细胞周期中 DNA 复制所必须,作为转录调控因子的作用也被证明。本研究原位杂交实验显示 *mcm5* mRNA 在尾牙、头部等其他组织也搞表达,进一步说明 *mcm5* 可能还通过特定的方式参与了发育过程的其他活动。因此 *mcm5* 在体节发生及其他组织器官发育中的作用及机制有待进一步研究。

参考文献:

[ 1 ] Luo L, Yang X, Takihara Y, et al. The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions [ J ]. Nature, 2004, 427 ( 6976 ): 749 - 753.

[ 2 ] Tada S, Li A, Maiorano D, et al. Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin [ J ]. Nat Cell Biol. 2001, 3(2):107 - 113.

[ 3 ] Kroll KL, Salic AN, Evans LM, et al. Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation [ J ]. Development. 1998, 125(16):3247 - 3258.

[ 4 ] Lim JW, Hummert P, Mills JC, et al. Geminin cooperates with Polycomb to restrain multi-lineage commitment in the early embryo [ J ]. Development. 2011, 138(1):33 - 44.

[ 5 ] Del Bene F, Tessmar-Raible K, Wittbrodt J. Direct interaction of geminin and Six3 in eye development [ J ]. Nature. 2004, 427 ( 6976 ): 745 - 749.

- [ 6 ] Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, et al. Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(50):21529 – 21534.
- [ 7 ] Liu X, Huang S, Ma J, et al. NF-kappaB and Snail1a coordinate the cell cycle with gastrulation [J]. *J Cell Biol*. 2009, 184(6):805 – 815.
- [ 8 ] Diffley JF. Regulation of early events in chromosome replication [J]. *Curr Biol*. 2004, 14(18):R778 – R786.
- [ 9 ] Blow JJ, Gillespie PJ, Francis D, et al. Replication Origins in *Xenopus* Egg Extract Are 5 – 15 Kilobases Apart and Are Activated in Clusters That Fire at Different Times [J]. *J Cell Biol*. 2001, 152(1):15 – 25.
- [ 10 ] Woodward AM, Göhler T, Luciani MG, et al. Excess Mcm2 – 7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress [J]. *J Cell Biol*. 2006, 173(5):673 – 683.
- [ 11 ] Ryu S, Holzschuh J, Erhardt S, et al. Depletion of minichromosome maintenance protein 5 in the zebrafish retina causes cell-cycle defect and apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102(51):18467 – 18472.
- [ 12 ] Ryu S, Driever W. Minichromosome maintenance proteins as markers for proliferation zones during embryogenesis [J]. *Cell Cycle*. 2006, 5(11):1140 – 1142
- [ 13 ] Edwards MC, Tutter AV, Cvetic C, et al. MCM2 – 7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts [J]. *J Biol Chem*. 2002, 277(36):33049 – 33057.
- [ 14 ] Crevel I, Crevel G, Gostan T, et al. Decreased MCM2 – 6 in *Drosophila* S2 Cells Does Not Generate Significant DNA Damage or Cause a Marked Increase in Sensitivity to Replication Interference [J]. *PLoS One*. 2011, 6(11):e27101.
- [ 15 ] Ohtani K, Iwanaga R, Nakamura M, et al. Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F [J]. *Oncogene*, 1999, 18(14):2299 – 2309.
- [ 16 ] Dafonseca CJ, Shu F, Zhang JJ. Identification of two residues in MCM5 critical for the assembly of MCM complexes and Stat1-mediated transcription activation in response to IFN-gamma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(6):3034 – 3039.
- [ 17 ] Hubbi ME, Luo W, Baek JH, et al. MCM Proteins Are Negative Regulators of Hypoxia-Inducible Factor 1 [J]. *Mol Cell*. 2011, 42(5):700 – 712.
- [ 18 ] Gonzalez MA, Tachibana KE, Adams DJ, et al. Geminin is essential to prevent endoreduplication and to form pluripotent cells during mammalian development [J]. *Genes Dev*. 2006, 20(14):1880 – 1884.
- [ 19 ] Pourquié O. Vertebrate somitogenesis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:311 – 350.
- [ 20 ] Maroto M, Bone RA, Dale JK. Somitogenesis [J]. *Development*. 2012, 139(14):2453 – 2456.

[ 收稿日期 ] 2018 – 04 – 23