

# microRNA-10a/b通过抑制Mib1调节 斑马鱼神经元的发育

吕峰<sup>1,2</sup> 石运伟<sup>3</sup> 王新<sup>3</sup> 刘东<sup>3\*</sup> 严兴洪<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; <sup>2</sup>南通科技职业学院, 南通 226007;

<sup>3</sup>南通大学江苏省神经再生重点实验室, 南通 226001)

**摘要** 该文研究了microRNA-10(miR-10)家族miR-10a/b在斑马鱼胚胎发育时期神经管的表达及其对神经元发育的影响。通过斑马鱼胚胎整体原位杂交及TaqMan PCR技术分析研究miR-10a/b在斑马鱼胚胎期神经管的表达情况。利用吗啡啉(morpholino, Mo)修饰的反义寡核苷酸敲低技术建立miR-10a/b下调的斑马鱼模型, 研究miR-10a/b下调后神经元发育异常的表型, 并分析鉴定miR-10调控神经元发育的下游靶点。结果发现, 受精后24 h(24 hours post fertilization, 24 hpf)和48 hpf, miR-10a和miR-10b在斑马鱼神经管中高表达; miR-10a/b-Mo下调miR-10a/b的表达后, 背神经管中神经元数量明显变少; 下调Mib1(mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1)能挽救miR-10下调引起的神经元表型异常; miR-10a/b下调后胚胎神经管中Mib1表达显著上调。上述结果表明, miR-10a/b通过抑制Mib1的表达来影响斑马鱼神经元的发育。

**关键词** miR-10a; miR-10b; 神经元; 发育; Mib1; 斑马鱼

## microRNA-10a/b Regulate Neuron Development by Repressing Mib1 in Zebrafish

Lü Feng<sup>1,2</sup>, Shi Yunwei<sup>3</sup>, Wang Xin<sup>3</sup>, Liu Dong<sup>3\*</sup>, Yan Xinghong<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; <sup>2</sup>Nantong Science and Technology College, Nantong 226007, China; <sup>3</sup>Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China)

**Abstract** To study the role of miR-10a/b in neuronal development of zebrafish, firstly we investigated the expression of miR-10a/b in embryonic neural tube by whole-mount *in situ* hybridization and TaqMan PCR. Then we established zebrafish model with miR-10a/b knockdown using morpholino (Mo) oligonucleotide antisenses. Based on this model, we monitored the abnormal phenotype of neuron in neural tube, and further analyzed whether down-regulated mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1 (*Mib1*) rescue abnormal phenotype caused by miR-10a-Mo injection. We found miR-10a and miR-10b were highly expressed in the zebrafish neural tube at 24 hours post fertilization (hpf) and 48 hpf. Neurons in dorsal neural tube were obviously reduced by miR-10a/b knockdown. In addition, down-regulated *Mib1* could partially rescue neuron phenotype defects induced by miR-10 down-regulation and mRNA level of *Mib1* in miR-10-Mo injected embryos was apparently

收稿日期: 2016-09-01 接受日期: 2016-12-29

南通大学自然科学基金(批准号: 12z053)和南通市科技项目2015N应用基础研究—社会民生创新—现代农业(批准号: MS12015072)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0513-85051593, E-mail: liudongtom@gmail.com; Tel: 021-61900422, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

Received: September 1, 2016 Accepted: December 29, 2016

This work was supported by the Natural Science Foundation of Nantong University (Grant No.12z053) and Applied Basic Research of Nantong Technology Program 2015N-Social Innovation of People, Livelihood-Modern Agriculture (Grant No.MS12015072)

\*Corresponding authors. Tel: +86-513-85051593, E-mail: liudongtom@gmail.com; Tel: +86-21-61900422, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

网络出版时间: 2017-02-10 15:54:14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170210.1554.006.html>

increased. These results indicated that miR-10a/b affected the development of neurons in zebrafish by repressing the Mib1.

**Keywords** miR-10a; miR-10b; neurons; development; Mib1; zebrafish

微RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性单链、非编码小分子RNA,长度约19~25个核苷酸<sup>[1]</sup>。在动物细胞内,通过与一个或多个靶信使RNA(messenger RNA, mRNA)的3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)碱基互补配对,形成RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),抑制蛋白质的翻译或促进靶mRNA降解,从而对靶基因的表达起着反向调节作用<sup>[2-5]</sup>。近年来,miRNA一直是生物医学研究的热点,其参与30%~50%基因的表达调控,调节包括细胞生长、分化、增殖、凋亡、细胞的应激反应及肿瘤发生等若干生物学过程<sup>[6-7]</sup>。特别有趣的是,miRNA被证实参与动物发育的许多方面,例如,神经发育、肌肉发育和心血管系统发育等<sup>[8]</sup>。越来越多的证据表明,miRNA在调控血管发育和相关疾病的基因表达中起重要作用,miRNA已经被证实,参与调控血管新生的多个方面,比如内皮细胞的增殖、迁移和形态发生<sup>[9-10]</sup>。

miR-10家族位于*Hox*基因簇中。*Hox*基因是编码高度保守的、含有同源框结构域的DNA结合转录因子。*Hox*基因在发育过程中起重要作用,它是正确的前侧-后侧构图体轴的决定性因素<sup>[11]</sup>。已有许多研究报道,miR-10a/b基因在许多癌症中表达都失调<sup>[12]</sup>。miR-10a在胰腺癌、乳腺癌、结肠癌等恶性肿瘤中呈高表达且与肿瘤侵袭密切相关<sup>[13]</sup>;miR-10b也高表达于肝癌、胰腺癌和转移性乳腺癌中<sup>[14]</sup>。最近的研究显示,miR-10a/b通过抑制靶基因*Mib1*(mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1)调控血管的新生<sup>[15]</sup>,而后者是一个能激活Notch信号通路的泛素连接酶<sup>[16]</sup>。

本研究首先通过胚胎整体原位杂交和TaqMan PCR技术检测miR-10在斑马鱼胚胎期的表达情况,然后通过注射特异性吗啡啉(morpholino, Mo)建立miR-10a/b表达下调的斑马鱼模型,研究miR-10a/b表达下调对神经元发育的影响。通过下调*Mib1*基因表达来研究其对miR-10下调引起的神经元发育缺陷的影响,为今后根据表型研究miR-10作用的细胞生物学机制和分子机制及未来在人类疾病预防和治疗上的应用提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物材料

AB系野生型斑马鱼及转基因系斑马鱼*Tg(huc:egfp)*、*Tg(Kdrl:egfp)*、*Tg(Huc:mcherry)*、*Tg(Kdrl:egfp::huc:mcherry)*由南通大学神经再生重点实验室斑马鱼养殖基地提供,喂养和杂交方法严格按照文献[17]中描述的进行。雌雄鱼交配后收集受精卵培养于28.5 °C胚胎培养液中,每天更换胚胎培养液。用于原位杂交和显微成像的胚胎,受精后24 h(24 hours post fertilization, 24 hpf)开始用0.003%苯硫脲(1-phenyl-2-thiourea, PTU)处理,以阻止黑色素生成。

### 1.2 整体原位杂交及RT-PCR检测基因表达情况

选取早期不同发育阶段斑马鱼胚胎,4% PFA室温固定2 h, PBS洗去固定液,蛋白酶K进行消化。胚胎先进行预杂交4 h,然后加入合成的反义RNA探针杂交过夜<sup>[18]</sup>。用0.2×标准盐溶液(standard saline citrate, SSC)洗去多余的探针,加入anti-Dig-AP(Roche公司)与反义-RNA探针结合过夜。用PBST溶液洗去未结合的抗体,随后加入5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯/氯化硝基四氢唑蓝/氯化钠-三氨基甲烷盐酸-氯化镁-吐温20(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP/nitroblue tetrazolium chloride, NBT/nacl-trihydroxymethyl aminomethane-MgCl<sub>2</sub>-Tween 20-NTMT)溶液显色约30 min(光学显微镜下控制显色程度),迅速用PBST溶液洗去多余的显色液,于光学显微镜下观察并拍摄。根据miR-10a/b基因的序列,应用Primer 3.0软件在线设计引物,由Invitrogen公司合成。合成miR-10a/b及*Mib1*探针的特异性探针引物序列如下,miR-10a-F: 5'-CGA AAG AAA GCA GCA GTT CC-3'; miR-10a-R: 5'-GCG CCA TCA GGT GTC TAA AT-3'。miR-10b-F: 5'-GCC AGA CAG AAA TAT TCC CAA T-3'; miR-10b-R: 5'-ATG GTA AGC ACC ACA CAC GA-3'。mib1-probe-F: 5'-GCA GTT CAT GGT GGG AGA TT-3'; mib1-probe-R: 5'-TCC ACG CTA TGT TTC AGC AG-3'; mib1-F: 5'-ACT GGC AGT GGG AAG ATC AA-3'; mib1-R: 5'-CAT ATG CTG CGC TAT GTG GG-3'。

### 1.3 TaqMan PCR分析miRNA的表达

用流式细胞分选术从转基因斑马鱼*Tg(huc:egfp)*中分选出神经细胞绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)阳性细胞。*Tg(huc:egfp)*转基因斑马鱼中的神经细胞可通过GFP荧光分选出来, 本实验选用发育22 hpf的胚胎。斑马鱼胚胎总RNA的提取参照Invitrogen公司Trizol试剂使用说明, TaqMan miRNA反应参照Applied Biosystems Real-time PCR仪用两步RT-PCR法检测和精确定量miRNA。实验方法严格按照公司(Life Technologies公司)的TaqMan<sup>®</sup> miRNA Assays说明书进行。预设计TaqMan Gene Expression Assay购置于Thermo公司。在第一步RT-PCR中, 用TaqMan<sup>®</sup> miRNA Reverse Transcription Kit中的试剂和TaqMan miRNA Assays特异性的miRNA环状引物合成第一链cDNA。第二步RT-PCR中, 用TaqMan miRNA Assay和TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix对第一步合成的cDNA样品进行PCR扩增。检测miR-10a/b在斑马鱼胚胎神经细胞中的表达情况, 以斑马鱼EGFP<sup>+</sup>细胞作为参照。

### 1.4 吗啡啉修饰的反义寡核苷酸注射胚胎下调miR-10表达

吗啡啉修饰的反义寡核苷酸(morpholino oligonucleotide antisenses)由美国GENE TOOLS LLC公司设计并合成。所用的Mo序列及注射剂量如下, Dre-miR-10a-Mo(5 ng): 5'-CAC AAA TTC GGA TCT ACA GGG TAT A-3'; Dre-miR-10b-Mo(5 ng): 5'-ACA CAA ATT CGG TTC TAC AGG GTA T-3'; Dre-miR-10a control Mo(5 ng): 5'-CAC AAA TTC GGA TCT ACT GCC TTA A-3'。miR-10-Mo包括Dre-miR-10a-Mo(5 ng)和Dre-miR-10b-Mo(5 ng); 将1 mmol/L Mo稀释成0.3 mmol/L使用浓度, 65 °C促溶10 min。将9.5 μL Mo与0.5 μL酚红混合, 共同注射到斑马鱼*Tg(Kdrl:egfp::huc:mcherry)*转基因系胚胎, 这样有利于在显微镜下观察是否将Mo注射到胚胎中。24 hpf剥膜, 在荧光显微镜下观察表型。收取有异常表型的胚胎, 放于0.8%低熔点的琼脂糖凝胶中固定, 采用共聚焦拍摄。

### 1.5 分析下调Mib1的表达对miR-10a/b下调引起的神经元生成表型缺陷的影响

向*Tg(Kdrl:egfp)*、*Tg(Huc:mcherry)*斑马鱼胚胎中注射miR-10-Mo以及将miR-10-Mo与Mib1-Mo共注射, 待胚胎发育到30 hpf及48 hpf时, 用共聚焦荧光显微镜拍照观察背神经元的表型。分析下调Mib1

的表达对miR-10a/b下调引起的神经元生成表型缺陷是否有拯救作用。所用Mo序列及注射剂量如下, Mib1-Mo(5 ng): 5'-GCA GCC TCA CCT GTA GGC GCA CTG T-3'; Control-Mo(5 ng): 5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'。

### 1.6 共聚焦显微成像与数据统计

共聚焦成像用的是Leica TCS-SP5 LSM共聚焦显微镜。图像分析使用Imaris软件。原位杂交结果使用奥林巴斯体视显微镜和奥林巴斯DP71相机拍照。两组之间的差异分析时选用双尾Student's *t*检验,  $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 miR-10a/b在斑马鱼神经管中高表达

实验采用斑马鱼胚胎整体原位杂交的方法, 分析了miR-10a和miR-10b在斑马鱼24 hpf和48 hpf的胚胎中的表达情况。实验结果显示, miR-10a和miR-10b在斑马鱼神经管中高表达(图1B~图1C'红色三角形所示)。TaqMan PCR分析miR-10a和miR-10b在EGFP<sup>+</sup>细胞中的表达量要明显高于EGFP<sup>+</sup>细胞( $P < 0.001$ )(图1E), 这也从另一个角度证明了miR-10a和miR-10b在斑马鱼神经管中的高表达。

### 2.2 miR-10a表达下调影响斑马鱼胚胎神经管中神经元数目

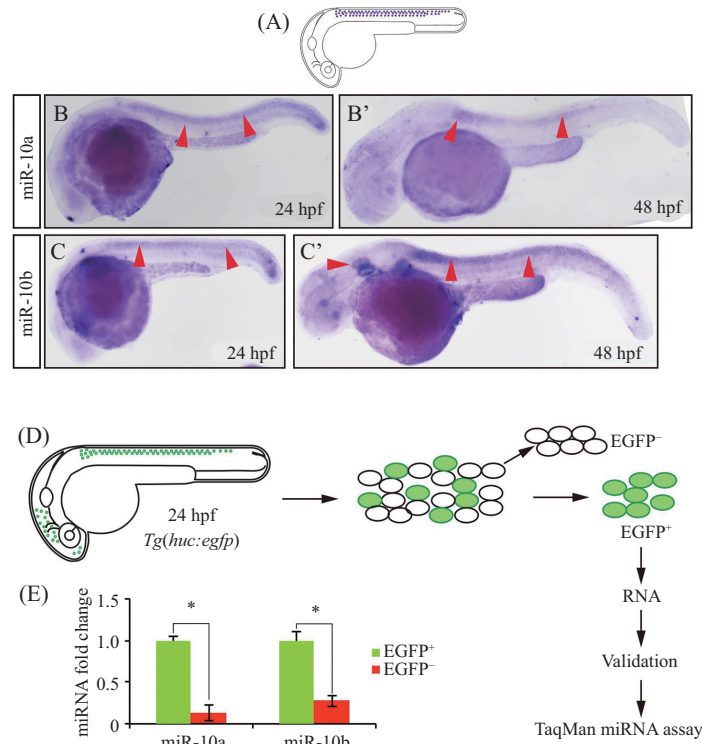
我们进一步研究了神经管中高表达miR-10a和miR-10b可能对神经系统发育产生的影响。向*Tg(Kdrl:egfp::huc:mcherry)*双转基因斑马鱼胚胎中注射miR-10a-Mo下调miR-10a的表达, 注射后的30 h和48 h, 用共聚焦荧光显微镜拍照观察表型。结果显示, 注射miR-10a-Mo的胚胎发育到30 hpf和48 hpf时, 神经管中神经元的数量明显变少(图2A和图2B)。

### 2.3 miR-10下调引起的神经元生成表型缺陷

如图2C~图2D所示, 在*Tg(huc:mcherry)*30 hpf的斑马鱼胚胎中, miR-10-Mo组胚胎神经元数目相比对照组显著减少, 大部分注射胚胎的神经元数目只能长到对照组一半的数目或更少。而Mib1-Mo与miR-10-Mo共注射组的胚胎中, 虽然背神经元的数目也无法回复到对照组的水平, 但神经元的表型缺陷得到了挽救。

### 2.4 miR-10a/b下调对胚胎神经管中Mib1表达的影响

通过对原位杂交结果的分析, 我们发现, 在注

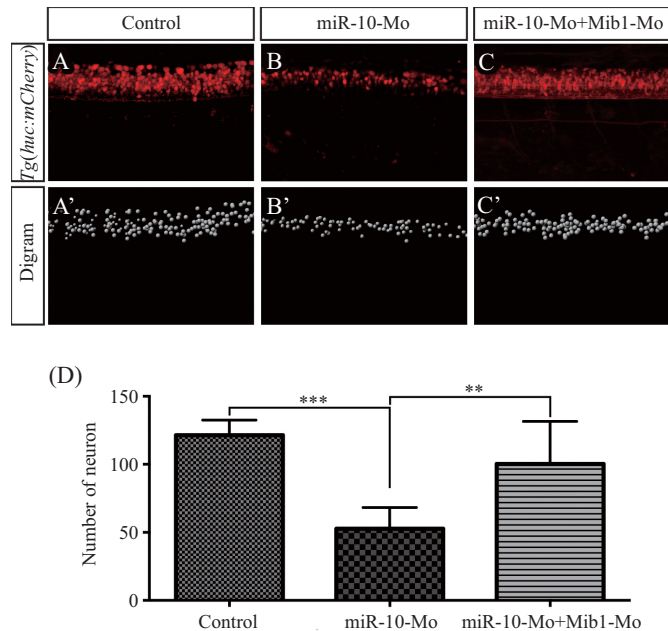


A: 24 hpf斑马鱼胚胎神经管发育位置示意图; B、B': miR-10a分别在24 hpf与48 hpf的斑马鱼胚胎中的整体原位杂交; C、C': miR-10b分别在24 hpf与48 hpf的斑马鱼胚胎中的整体原位杂交; D: TaqMan miRNA assay的流程; E: 在EGFP<sup>+</sup>细胞和EGFP<sup>-</sup>细胞中miR-10a和miR-10b的表达水平。

A: neural tube development diagram of zebrafish embryo at 24 hpf; B,B': whole-mount *in situ* hybridization for miR-10a level in zebrafish embryo at 24 hpf and 48 hpf; C,C': whole-mount *in situ* hybridization for miR-10b level in zebrafish embryo at 24 hpf and 48 hpf; D: procedure of sort the fluorescence positive cells in *Tg(huc:egfp)* embryo by TaqMan miRNA assay; E: levels of miR-10a and miR-10b in EGFP<sup>+</sup> and EGFP<sup>-</sup> cells.

图1 miR-10a/b在斑马鱼神经管中的表达

Fig.1 The expression of miR-10a/b in zebrafish neural tube

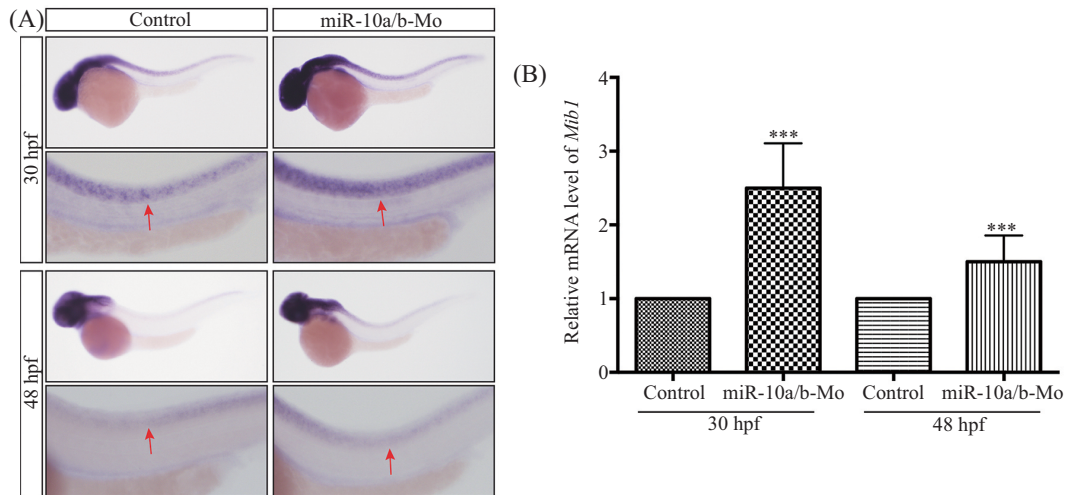


A: 对照组; B: miR-10-Mo注射组; C: Mib1-Mo与miR-10-Mo共注射。A'、B'、C': A、B、C的模式图。D: 统计单位区域内神经元细胞数量, n=30, 同一样本重复计数3次。\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, 与对照组斑马鱼比较。

A: control group; B: injected miR-10-Mo; C: co-injected miR-10-Mo and Mib1-Mo; A',B',C': diagrams of A, B, C; D: counting the neuron numbers in unit area, n=30, repeating 3 times for the sample. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with control group zebrafish.

图2 不同处理组斑马鱼神经元细胞发育情况

Fig.2 Development of neurons on different treatments in zebrafish embryos



A: *Mib1*在对照组及miR-10a/b-Mo注射组胚胎的表达,红色箭头指示神经元细胞; B: *Mib1* mRNA水平的量化图,  $n=30$ , 同一样本重复计数3次。\*\*\* $P<0.001$ , 与对照组比较。

A: expression of *Mib1* in miR-10a/b-Mo injected embryos, red arrowheads indicate neuron cells; B: the statistics of mRNA level of *Mib1* in miR-10a/b-Mo injected embryos,  $n=30$ , repeating 3 times for the sample. \*\*\* $P<0.001$  compared with control group.

图3 miR-10a/b下调后斑马鱼胚胎背神经中*Mib1*的表达

Fig.3 mRNA level of *Mib1* in miR-10a/b-Mo injected embryos

射miR-10a/b-Mo并发育到30 hpf及48 hpf的斑马鱼胚胎神经管中, *Mib1*的表达显著上调(图3A)。同时, RT-PCR结果也表明, 与对照组相比, miR-10a/b表达下调组在30 hpf及48 hpf的斑马鱼胚胎神经管中*Mib1*的表达显著上调, 30 hpf时*Mib1*表达上调尤为明显(图3B)。这些结果进一步说明, miR-10a/b在mRNA水平上通过*Mib1*来调控斑马鱼胚胎背神经管中神经元的发育。

### 3 讨论

近年来, 模式生物斑马鱼的应用研究迅速扩展。在肿瘤、心血管、消化系统等疾病的研究中发挥了重要作用。在中枢神经系统研究中的应用更为广泛, 主要集中在神经遗传性疾病(亨廷顿舞蹈病、运动神经元病等)、神经退行性疾病(阿尔茨海默病、帕金森病等)和精神疾病(精神分裂症、抑郁症、自闭症等)的研究领域。与模式生物大鼠相比, 斑马鱼在神经疾病研究中拥有以下独特的优点: 胚胎体外受精, 单次产卵量大; 胚体透明, 便于观察神经发育; 发育迅速, 受精10 h后神经系统即开始发育。与果蝇、蟾蜍、线虫等模式生物相比, 斑马鱼与人类相似性更高<sup>[19-20]</sup>。

在哺乳动物中, miR-10a定位17号染色体短臂2区1带的*Hox4B*与*Hox5B*基因之间<sup>[21]</sup>, miR-10b定位于2号染色体短臂3区1带1亚带的*HoxD4*与*HoxD8*基因

之间<sup>[22]</sup>。而*Hox*基因是编码高度保守的、含有同源框结构域的DNA结合转录因子。*Hox*基因在发育中起到了重要作用。建立miR-10a/b下调的斑马鱼模型, 研究miR-10a/b下调后神经系统发育的影响及其影响神经发育的分子途径, 具有十分重要的科研价值与临床意义。

不同的miRNA被认为以组织特异性的方式表达, 因此或许其作用也为组织特异性。组织特异性是miRNA一个特别的特征, 并且与需要多个过程高度协调的神经发育事件相关。除了在胚胎的血管中表达外, miR-10a和miR-10b在24 hpf和48 hpf的斑马鱼胚胎神经管中也高表达。通过特异性Mo来下调miR-10a的表达, 神经管中神经元的数量也明显变少。TaqMan PCR及整体胚胎原位杂交结果揭示了miR-10a/b可能在斑马鱼神经元发育过程中的重要作用。

*Mib1*是一个E3泛素连接酶, 由*Mib*基因编码453个氨基酸。*Mib1*蛋白质含有多个锚蛋白重复序列(ankyrin repeat)和RING finger结构域, 通过泛素化Notch受体调控Notch信号通路。Notch受体Delta与*Mib1*相互作用, 促进Delta泛素化(ubiquitylation)和内化(internalization)。Notch信号通路作为细胞间相互作用的因子, 在中枢神经系统的发育过程中发挥着重要作用。在*Mib1*突变体斑马鱼胚胎期, Notch信号被抑制, 侧抑制(lateral inhibition)效应减弱, 神经

祖细胞向神经元分化, HuC<sup>+</sup>细胞增多; 在斑马鱼1~2细胞期注射Xdelta1<sup>dICD</sup> mRNA, 原位杂交结果显示, HuC<sup>+</sup>细胞增多<sup>[23]</sup>。miR-10a/b通过抑制靶基因*Mib1*调控血管新生, 这一结果已经发表<sup>[24]</sup>。我们的实验又证实了下调*Mib1*可以挽救miR-10a/b下调引起的神经元数目减少的表型缺陷以及在注射miR-10a/b-Mo并发育到30 hpf及48 hpf的斑马鱼胚胎神经管中, *Mib1*的表达显著上调, 进一步提示了miR-10a/b可能也是通过Notch信号通路影响斑马鱼神经元发育的分子机制, 为探讨miR-10a/b在神经发育及相关疾病中的作用提供了实验依据。

### 参考文献 (References)

- Hassel D, Cheng P, White MP, Ivey KN, Kroll J, Auqustin HG, *et al.* MicroRNA-10 regulates the angiogenic behavior of zebrafish and human endothelial cells by promoting vascular endothelial growth factor signaling. *Circ Res* 2012; 111(11): 1421-33.
- Weinstein SA, Keyler DE. Local envenoming by the Western hognose snake (*Heterodon nasicus*): A case report and review of medically significant Heterodon bites. *Toxicon* 2009; 54(3): 354-60.
- Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006; 11(4): 441-50.
- Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(3): 219-30.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 858-62.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 862-4.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294(5543): 853-8.
- Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, *et al.* MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: Do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol* 2007; 170(6): 1831-40.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- Nicoli S, Standley C, Walker P, Hurlstone A, Foqarty KE, Lawson ND. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis. *Nature* 2010; 464(7292): 1196-200.
- Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanaqi M, Fischer A, *et al.* MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 2009; 324(5935): 1710-3.
- Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 2008; 133(2): 217-22.
- Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, *et al.* Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood* 2010; 115(23): 4944-50.
- Wang X, Ling CC, Li LP, Qin YY, Qi JL, Liu XY, *et al.* MicroRNA-10a/10b represses a novel target gene *mib1* to regulate angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2016; 110: 140-50.
- Appel B, Eisen JS. Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by Delta function. *Development* 1998; 125: 371-80.
- Wang X, Wang XQ, Yuan W, Chai RJ, Liu D. Egfl6 is involved in zebrafish notochord development. *Fish Physiol Biochem* 2015; 41(4): 961-9.
- 杨阳, 高明, 陈学冉, 史玮, 王芬, 马保华, 等. Zdhc对斑马鱼集中延伸运动的调节及其机制. *解剖学报* (Yang Yang, Gao Ming, Chen Xueran, Shi Wei, Wang Fen, Ma Baohua, *et al.* Zdhc17 regulating convergence and extension movements during zebrafish embryogenesis. *Acta Anatomica Sinica*) 2013; 44(2): 259-63.
- Wilson SW, Brand M, Eisen JS. Patterning the zebrafish central nervous system. *Results Probl Cell Differ* 2002; 40: 181-215.
- Lewis KE, Eisen JS. From cells to circuits: Development of the zebrafish spinal cord. *Prog Neurobiol* 2003; 69(6): 419-49.
- Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 2008; 133(2): 217-22.
- Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seviqani C, Wentzel E, *et al.* Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 2006; 38(9): 1060-5.
- Koo BK, Yoon MJ, Yoon KJ, Im SK, Kim YY, Kim CH, *et al.* An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development. *PLoS One* 2007; 2(11): e1221.
- Koo BK, Lim HS, Song R, Yoon MJ, Yoon KJ, Moon JS, *et al.* Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* 2005; 132(15): 3459-70.
- Appel B, Eisen JS. Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by Delta function. *Development* 1998; 125: 371-80.
- Wang X, Ling CC, Li LP, Qin YY, Qi JL, Liu XY, *et al.* MicroRNA-10a/10b represses a novel target gene *mib1* to regulate angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2016; 110: 140-50.