

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.07.003
文章编号: 1005-8982 (2018) 07-0012-07

神经细胞分化中 microRNA-134 靶基因网络功能分析*

苏立宁, 尹海峰, 宋小青, 魏会平

(河北北方学院基础医学院, 河北 张家口 075000)

摘要: 目的 检测 microRNA-134 在神经细胞分化过程中表达量的变化, 分析调控神经分化的分子机制。**方法** 采用表皮生长因子和成纤维细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化, 实验分为两组: 对照组不加任何因子, 诱导组加入表皮生长因子和成纤维细胞生长因子。通过形态、免疫组织化学和实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 3 种技术鉴定骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的情况, 并通过 qRT-PCR 检测 microRNA-134 在神经细胞分化中表达量的变化。利用 miRWalk、DAVID、STRING 和 Cytoscape 生物信息学软件分别对 microRNA-134 靶基因进行预测, 对靶基因进行 GO 功能富集分析, 筛选与神经分化相关的基因进行蛋白网络功能分析。**结果** MicroRNA-134 在神经细胞分化过程中表达量上升, 生物信息学分析结果显示 microRNA-134 的靶基因半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (CASP3)、整合素 β 亚基 1 (ITGB1)、血小板活化因子乙酰水解酶 1b 调控子单元 1 (PAFAH1B1)、蛋白激酶 C (PRKCA)、膜附着型本体 A (EFNA2)、NK6 同源框 1 (NKX6-1)、神经细胞黏附分子 (NRCAM)、突触融合蛋白结合蛋白 1 (STXBP1)、钾离子通道相互作用的蛋白 2 (KCNIP2)、蛋白磷酸酶 ABI2、CNTN2 及 FOXA1 与神经分化有关。**结论** MicroRNA-134 通过作用于靶基因在神经细胞分化中起促进作用。

关键词: MicroRNA-134; 骨髓间充质干细胞; 神经细胞; 分化

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Analysis of microRNA-134 target gene interaction network in neural progenitor-like cell differentiation*

Li-ning Su, Hai-feng Yin, Xiao-qing Song, Hui-ping Wei

(Basic Medical School, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To detect the expression of microRNA-134 at different time after induction and better investigate the molecular mechanism in the regulation of neural differentiation. **Methods** Epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) were used to induce the differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) into neural progenitor-like cells (NPCs). BMSCs were divided into two groups: control group (without the growth factors) and induction group (added with EGF and bFGF). The morphological changes were observed and the neuronal specific markers were detected by qRT-PCR and immunohistochemical technique. The expression of microRNA-134 was determined by qRT-PCR. The target gene interaction network was analyzed using miRWalk, DAVID, STRING and Cytoscape softwares. **Results** MicroRNA-134 was up-regulated after EGF/bFGF-induced differentiation of rat BMSCs, similar to the expression of microRNA-134 in the rat fetal brain. Bioinformatics analysis revealed that some target genes of microRNA-134 were associated with neuron

收稿日期: 2017-03-07

* 基金项目: 河北北方学院重大项目 (No: ZD201413)

[通信作者] 魏会平, E-mail: whp123456@sina.com; Tel: 18931316067

differentiation, such as *CASP3*, *ITGB1*, *PAFAH1B1*, *PRKCA*, *EFNA2*, *NKX6-1*, *NRCAM*, *STXBP1*, *KCNIP2*, *ABI2*, *CNTN2*, and *FOXA1*. **Conclusions** MicroRNA-134 promotes the differentiation of BMSCs into NPCs through target genes.

Keywords: microRNA-134; BMSCs; neuron; differentiation

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种重要的多功能干细胞, 具有取材方便, 分化易控制等特点。研究表明, 在合适的诱导条件下 BMSCs 可向成骨细胞、肌细胞、软骨细胞、肝细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞和内皮细胞等多方向分化^[1-7]。研究^[8-9]发现在特殊的培养条件下, BMSCs 可分化为神经细胞, 但有关其分子机制还有待进一步研究。

MicroRNAs, 是一种短的非编码单链 RNA, 长约 20 ~ 24 个核苷酸, 通过碱基互补配对原则, 与 mRNA 结合, 直接靶向切割 mRNA 或抑制靶基因的翻译对转录后基因表达进行调控。MicroRNAs 通过与 mRNA 结合可调控神经系统发育和功能^[10], 脑特异性 microRNA-134 在神经突生成及突触成熟等发育阶段发挥调控作用^[10-11]。研究^[12]表明 microRNA-134 通过抑制单丝氨酸蛋白激酶 1 (LIM-kinase 1, LIMK1) 控制神经突的生成或脊柱的生长, 通过降低胚胎干细胞关键蛋白 NANOG 和肝受体类似物 LRH1 的转录后表达调节小鼠 BMSCs 的分化^[13]。本实验推测 microRNA-134 在神经分化过程中发挥重要作用。

为了进一步验证 microRNA-134 在 BMSCs 向神经分化过程中的功能, 本实验检测了神经分化过程中 microRNA-134 表达量的变化, 利用生物信息学软件对其靶基因进行预测, 结合所研究的目标, 分析与神经分化相关的基因。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 ~ 6 周龄大鼠 3 只, 购自河北北方学院实验动物中心。

1.2 主要试剂

DMEM 购自美国 Gibco 公司, 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 和表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 购自上海 PrimeGene Bio-Tech 公司, RNA 提取试剂盒和兔抗神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 引物购自日本 TaKaRa 公司, 兔抗巢蛋白 (nestin) 和 NSE 购自北京博奥森

生物技术有限公司。

1.3 BMSCs 的分离与培养

颈椎脱臼法处死大鼠, 75% 的酒精浸泡 10 min 消毒, 无菌条件下取出股骨, 置无菌 PBS 液中清洗 2 次, 露出骨髓腔, 用 5 ml 的无菌注射器吸取含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液冲洗骨髓腔, 收集洗液, 置无菌培养瓶中培养, 72 h 后换液去除未贴壁的细胞, 每隔 3 d 换液 1 次, 待细胞密度达 80% 左右时按 1 : 2 进行传代, 直至第 4 代。流式细胞仪检测 BMSCs 的表面标志物。

1.4 BMSCs 诱导分化为神经细胞

取第 4 代的细胞分为两组, 对照组不加任何因子, 诱导组加入含 20 ng/ml EGF 和 20 ng/ml bFGF 的诱导液。对照组每隔 3 d 换液 1 次, 诱导组每隔 2 d 半量换液。

1.5 MicroRNA-134 表达量分析

收集对照组细胞和诱导组细胞 (诱导 1、2、3、4 d)。利用 RNA 提取试剂盒分别提取两组总 RNA。采用 microRNA-134 逆转录引物, 逆转录为 cDNA, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 microRNA-134 在两组不同时间点的表达量变化, 反应体系为 95 °C 5 min, 94 °C 30 s 40 个循环, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s。成熟 microRNA-134 的正向扩增引物为 5'-CGTGTGACTGGTTGACC-3', 反向引物 5'-GAGCAGGCTGGAGAA-3'。内参 β -actin 的正向引物为 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3', 反向引物为 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。采用 Ct 值比较法^[14], 比较两组的表达差异。

1.6 MicroRNA-134 靶基因预测及 GO 功能富集

利用数据库 miRWalk^[15] 对 microRNA-134 靶基因进行预测。预测得到的靶基因上传至 DAVID 数据库进行 Gene Ontology (GO) 功能富集分析, 筛选与神经分化相关的基因, 应用 Fisher's exact test 方法选取 $P < 0.05$ 注释基因条目。

1.7 神经分化相关基因蛋白互作网络构建及分析

将选取的神经分化相关基因输入到 STRING

10^{16} 数据库中, 选取交互作用评分 <0.7 (高等可信度) 的互作关系构建神经分化相关基因的蛋白互作网络 (protein-protein interaction network, PPI)。网络分析采用生物图表可视化工具 Cytoscape3.2.1 软件^[17] 进行, 且利用“Network Analyzer”工具对各节点的“度”进行计算。“度”代表了与目标蛋白相互作用的蛋白的数量。网络中, 节点越大, “度”越大。利用 Cytoscape3.2.1 软件中的“ClusterONE”工具对蛋白质相互作用网络进行功能模块分析, 筛选标准为 minimum size=6, minimum density=0.05, $P<0.05$ 。

1.8 统计学方法

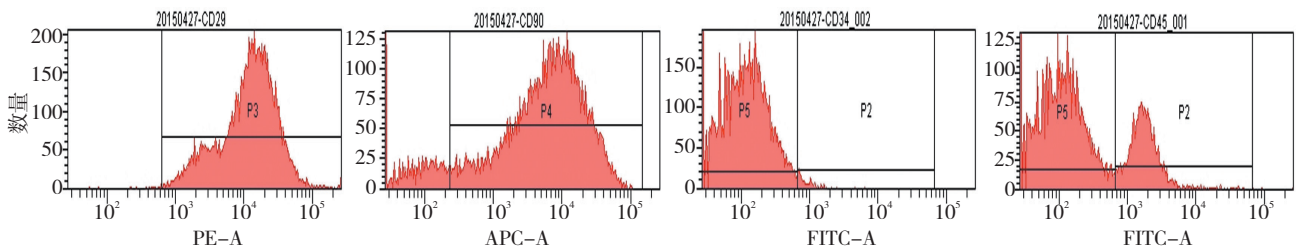
采用 SPSS17.0 软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各指标间比较采用

重复测量设计的方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的鉴定结果

大鼠骨髓中获取的间充质干细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 培养 48 h 后半量换液, 待细胞密度达 80% ~ 90% 传代, 3 代细胞生长较稳定, 密度较均匀, 形态以长梭形为主, 符合 BMSCs 的细胞形态特征。待细胞传至 4 代, 流式细胞仪检测细胞的表面标志物, 检测结果显示, 标志物 CD29 和 CD90 表达阳性, CD34 和 CD45 表达弱阳性, 符合骨髓间充质干细胞的特点 (见图 1)。



流式细胞仪检测干细胞表面标志物, CD29 的阳性率为 99.8%, CD90 的阳性率为 88.6%; CD34、CD45 阳性率分别为 1.8% 和 23.3%, 表达弱阳性

图 1 BMSCs 的鉴定结果

2.2 BMSCs 向神经细胞的诱导分化结果

向传至第 4 代的 BMSCs 中加入含 20 ng/ml EGF 和 20 ng/ml bFGF 的诱导液, 诱导 2 ~ 3 d 后, 出现少量的神经样细胞; 继续诱导 4 d, 大部分已分化为神经样细胞 (见图 2A)。免疫组织化学法检测分化后神经细胞标志物 nestin 和 NSE 的表达量, 结果为阳性 (见图 2B)。收集对照组诱导 1 ~ 4 d 的细胞, 利用 qRT-PCR 进行 NSE 基因表达量的检测, 结果显示诱导 4 d 后, NSE 基因的表达量达到高峰。与对照组相比, 诱导组 1 ~ 4 d 后表达量分别升高 1.08、1.25、2.01 和 2.94 倍 (见图 2C), 其中, 诱导组第 3 和 4 天表达量与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.3 BMSCs 诱导分化后 microRNA-134 表达量的变化

诱导组与对照组细胞培养 1、2、3 及 4 d 的 microRNA-134 表达量比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点间的 microRNA-134 表达量有差别 ($F=69.711$, $P=0.003$), ②诱导组与对照组细胞的 microRNA-134 表达量有差别 ($F=18.096$, $P=0.021$), 诱导组与对照组相比 microRNA-134 表达

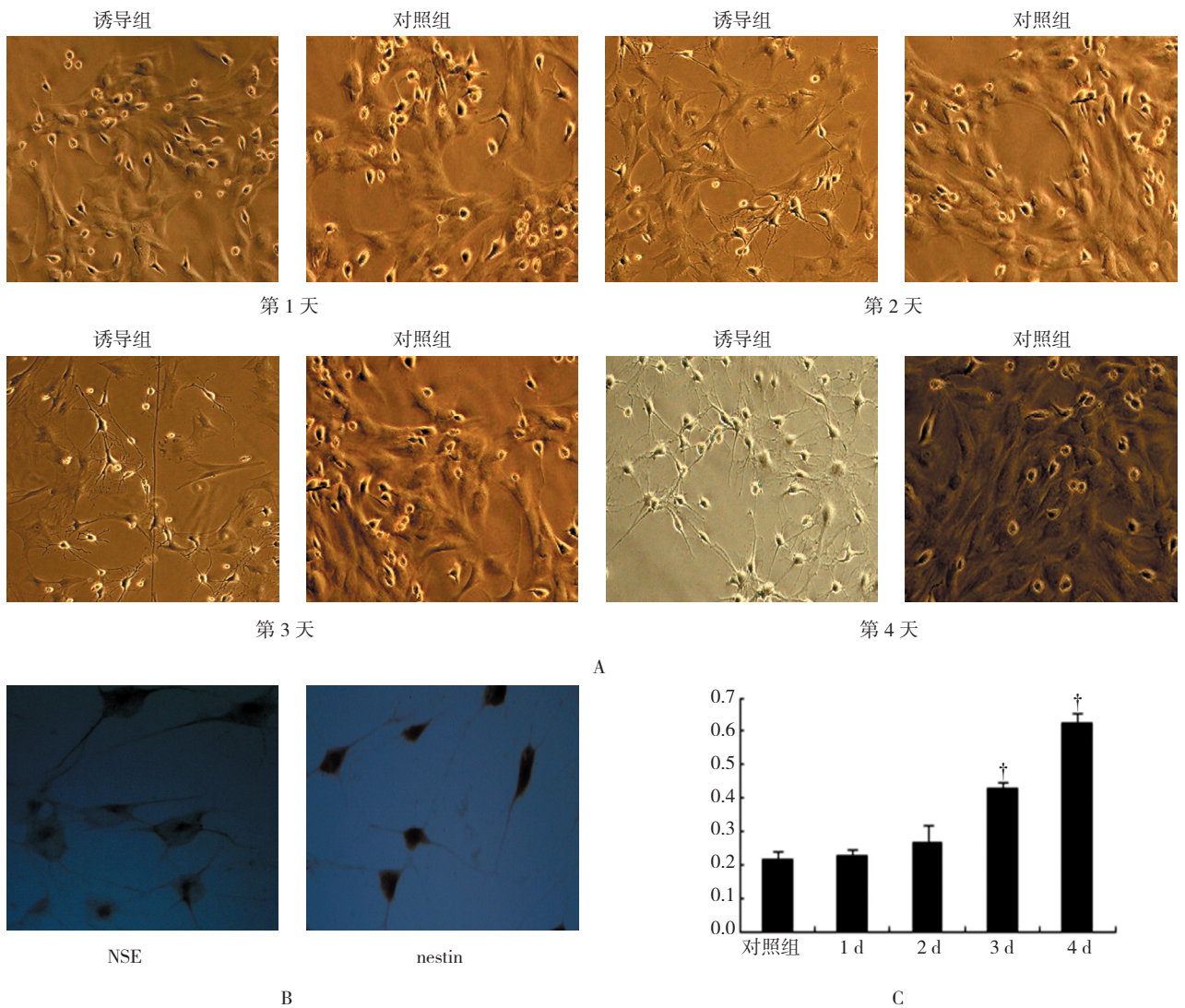
量较高, 可诱导 BMSCs 细胞向神经细胞分化, ③不同诱导时间和诱导方法间存在交互作用, 诱导组与对照组的不同诱导时间有差别 ($F=5.390$, $P=0.014$)。见表 1。

2.4 MicroRNA-134 靶基因网络相互作用分析

为了进一步研究 microRNA-134 在神经分化中的作用, 利用在线数据库 miRWalk 预测 microRNA-134 靶基因, 得到 1 220 个靶基因。将靶基因输入到 DAVID 软件 6.7 中进行 GO ($P<0.05$) 功能富集分析, 选取与神经分化相关的 GO 功能组: GO 0030182 和 GO 0048667 (见表 2)。

2.5 GO 0030182 和 GO 0048667 PPI 网络分析

为了预测与神经元分化相关的靶基因 (GO 0030182 和 GO 0048667) 及与其他基因之间的蛋白质相互作用, 利用 STRING10 数据库构建 PPI 网络, 然后利用生物图表可视化工具 Cytoscape3.2.1 软件进行网络分析, 且利用“Network Analyzer”工具对各节点的“度”进行计算 (见图 3)。构建结果显示, 21 个靶基因蛋白均与 STRING 数据库中蛋白质匹配, 这 21 个基因为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3



A: 诱导组诱导 1 ~ 4 d 后的细胞形态学变化 (倒置相差显微镜 × 40); B: 已分化神经细胞的标志物 nestin 和 NSE 的表达为阳性; C: 诱导组细胞被诱导不同时间后 NSE 基因表达量的变化; † 与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 BMSCs 分化为神经细胞的鉴定结果

表 1 microRNA-134 表达量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 |
|-----|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 对照组 | 0.018 ± 0.002 | 0.019 ± 0.002 | 0.021 ± 0.002 | 0.021 ± 0.001 |
| 诱导组 | 0.037 ± 0.003 | 0.041 ± 0.003 | 0.045 ± 0.003 | 0.050 ± 0.002 |

表 2 与神经分化相关的 microRNA-134 靶基因

| GO | 生物过程 | 基因数量 | 基因 |
|---------|----------------|------|---|
| 0030182 | 神经元样细胞分化 | 28 | SEPT2, LPPR4, ADORA2A, EFNA2, ABI2, KCNIP2, ITGB1, NRCAM, SEMA5A, CASP3, POU4F3, ETV1, PAFAH1B1, CD24, DCX, TLX1, PRKCA, PTPRM, FOXA1, STXBP1, GAS7, NKX6-1, EPHA4, CHRDL1, CNTN2, APBB2, CUX1, DST |
| 0048667 | 神经元分化相关的细胞形态发生 | 15 | PRKCA, PTPRM, LPPR4, EFNA2, STXBP1, NRCAM, SEMA5A, EPHA4, CNTN2, POU4F3, ETV1, PAFAH1B1, APBB2, DCX, DST |

(Caspase-3, CASP3)、靶向整合素 $\beta 1$ (Integrin $\beta 1$, ITGB1)、血小板激活因子乙酰水解酶 bata1 (platelet-activating factor acetylhydrolase, PAFAH1B1)、蛋白激酶 C (Protein kinase C alpha, PRKCA)、酪氨酸蛋白激酶 A4 (tyrosine protein kinase A4, EPHA4)、肝配蛋白 A2 (Ephrin-A2, EFNA2)、NK6 同源框蛋白 1 (NKX6-1)、神经细胞黏着分子 (neural cell adhesion molecule, NRCAM)、突触融合蛋白结合蛋白 1 基因 (synaptic fusion protein binding protein 1 gene, STXBP1)、钾离子通道相关作用蛋白 2 (Kv channel-interacting protein 2, KCNIP2)、蛋白磷酸酶 ABI2、腺嘌呤核苷 A2a 受体

(adenine nucleoside both A2a receptors, ADORA2A)、接触蛋白 2 (contactin-2, CNTN2)、锌指转录因子 DST、叉头状转录因子 FOXA1 (forkhead box A1)、SEPT2 (septin-2)、微管相关蛋白 Doublecortin (DCX)、ETS 变异基因 1 (ETS gene variant 1, ETV1)、睫蛋白样蛋白 1 (cordin-like 1, CHRDL1)、生长休止蛋白 7 (growth arrest-specific, GAS7) 和蛋白酪氨酸磷酸酶受体 M (protein tyrosine phosphatase receptor type M, PTPRM)。利用 Cytoscape3.2.1 软件中的“ClusterONE”工具进行了模块分析, 结果 12 个基因被聚集在模块中 (见图 4)。

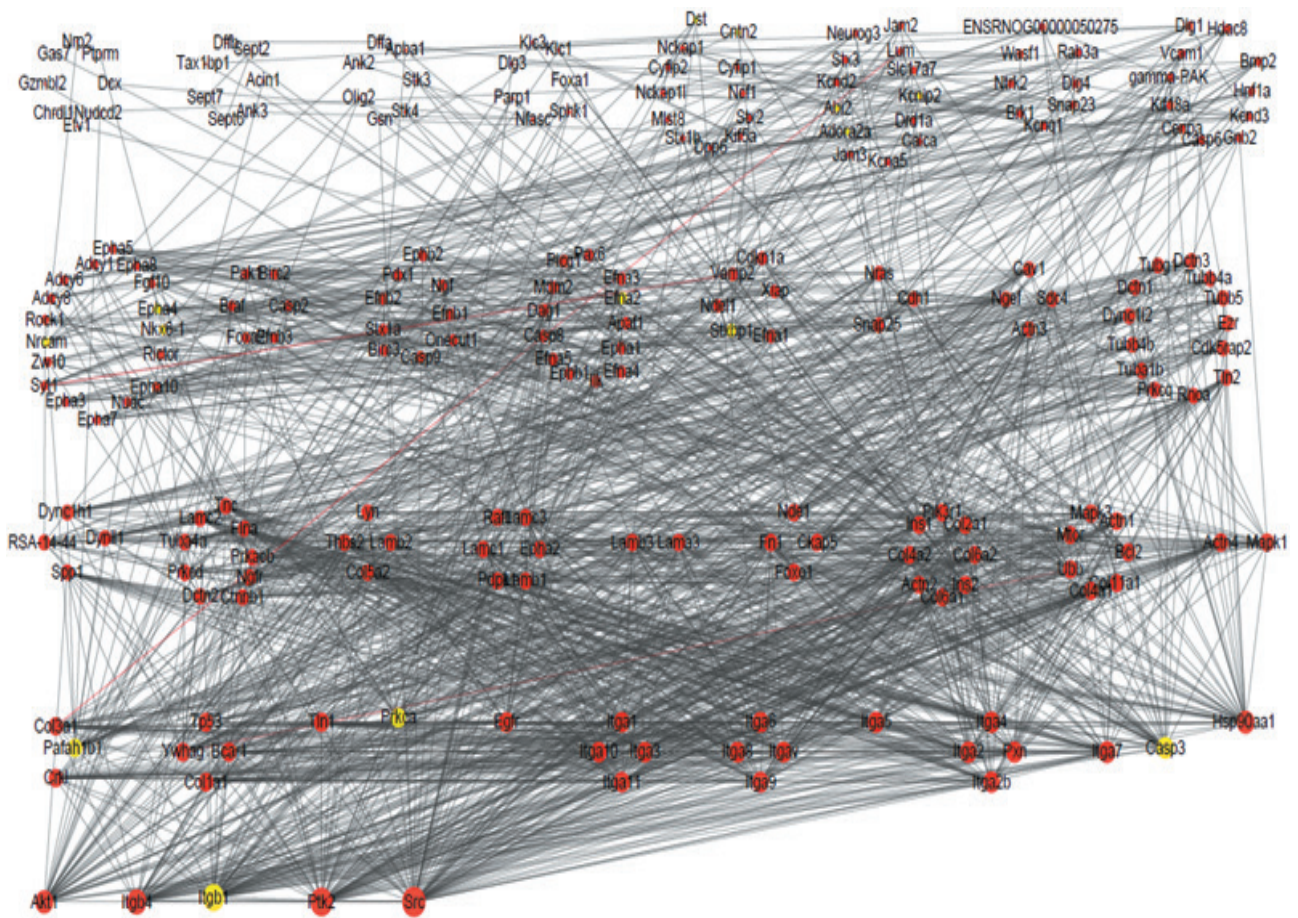
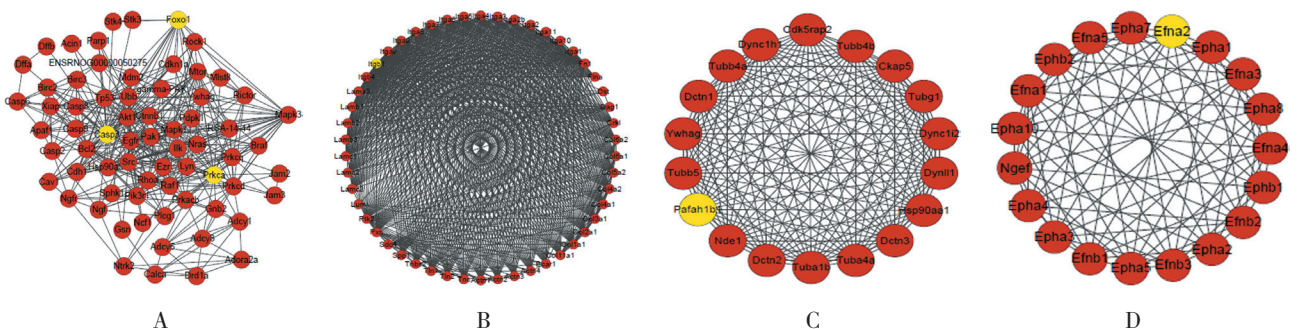
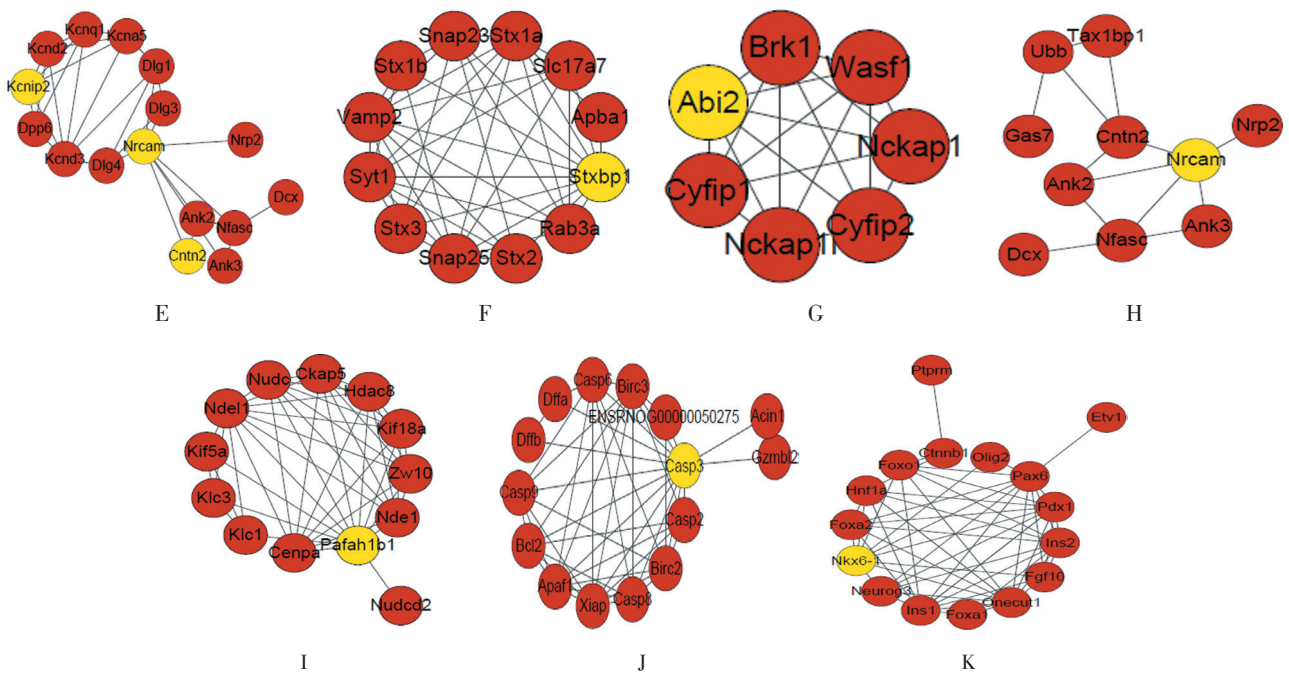


图 3 MicroRNA-134 靶基因 PPI 网络分析





黄色节点代表靶基因, 红色节点代表与靶基因蛋白相互作用的蛋白。节点越大, “度”越大

图 4 MicroRNA-134 靶基因相互作用网络的 11 个模块

3 讨论

MicroRNAs 通过作用于靶基因调控细胞分化等各种生物学过程。

MicroRNA-134 具有脑特异性, 在神经中枢中高表达。而 microRNA-134 在 BMSCs 诱导分化为神经细胞过程中的作用机制还有待研究。

许多研究已证明 EGF 和 bFGF 联合作用可以诱导 BMSCs 向神经细胞分化^[18], 因此本实验选择的诱导剂为 EGF 和 bFGF。利用 qRT-PCR 检测 microRNA-134 在各实验组的表达量变化, 诱导组随诱导时间的递增表达量升高。因此初步假设 microRNA-134 在促进 BMSCs 分化为神经细胞过程中发挥作用。以往的研究证明^[19], microRNA-134 通过降低转录因子蛋白 FOXM1 的表达量调控人类多能干细胞分化发挥作用。神经系统中, LIMK1 通过抑制 microRNA-134 的表达量调节神经突的生成、脊柱的生长及树突棘的大小^[12, 20]。另外还有研究发现沉默信息调节因子 2 相关酶 1 通过转录抑制因子复合体作用于 microRNA-134 调控神经突触的可塑性^[21]。本实验初步验证了在神经分化过程中 microRNA-134 表达量升高, 与前人的结论一致。MicroRNA-134 以哪些基因为靶基因调控神经分化, 在本文中进行了理论的预测。

本文以 miRWalk 和 DAVID 数据库为依据, 以 GO

功能为基础筛选了与神经分化相关的 microRNA-134 靶基因 (GO 0030182 和 GO 0048667), 并构建了 PPI 网络图, 通过 ClusterONE 功能模块分析发现 CASP3, ITGB1, PFAH1B1, PRKCA, EFNA2, NKX6-1, NRCAM, STXBP1, KCNIP2, ABI2, CNTN2, FOXA1 等 12 个基因聚集在 11 个模块中发挥作用, 说明这 12 个基因作用在神经分化中比较重要。NKX6-1, 是一种同源框转录因子, 通过调控 3 个神经元轴突导向分子的表达量控制神经元轴突的生长^[22], 且通过与 PR 结构域蛋白 12 的交叉抑制作用促进中间神经元的生长^[23]。FOXA1, 作为一种转录因子, 可调控中脑多巴胺能神经元的分化^[24], CNTN2 在早期脑神经节和脊髓运动神经元中不表达, 而在成熟神经元中表达^[25]。

综上所述, 本文初步验证了 microRNA-134 在促进 BMSCs 向神经细胞分化的过程中发挥重要作用, 应用生物信息学的方法分析了在神经分化中发挥作用的 microRNA-134 的靶基因, 并筛选了与神经分化相关的 12 个关键蛋白, 但这些蛋白的作用还需实验的进一步验证。

参考文献:

[1] ZHENG G, LIU Y, JING Q, et al. Differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes in

- vitro[J]. *Biomed Mater Eng*, 2015, 25(Suppl): 145-157.
- [2] JIQING C, YAQIN L, YINGYIN L, et al. BMP4 inhibits myogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in mdx mice[J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(9): 1213-1219.
- [3] HU N, FENG C, JIANG Y, et al. Regulative effect of mir-205 on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs): possible role of SATB2/Runx2 and ERK/MAPK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 10491-10506.
- [4] GHALI O, BROUX O, FALGAYRAC G, et al. Dexamethasone in osteogenic medium strongly induces adipocyte differentiation of mouse bone marrow stromal cells and increases osteoblast differentiation[J]. *BMC Cell Biol*, 2015, 16(9): 1-15.
- [5] HIROTA N, MCCUAIG S, O'SULLIVAN M J, et al. Serotonin augments smooth muscle differentiation of bone marrow stromal cells[J]. *Stem Cell Res*, 2014, 12(3): 599-609.
- [6] OUYANG J F, LOU J, YAN C, et al. In-vitro promoted differentiation of mesenchymal stem cells towards hepatocytes induced by salidroside[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(4): 530-538.
- [7] CHOI Y A, LIM J, KIM K M, et al. Secretome analysis of human BMSCs and identification of SMOC1 as an important ECM protein in osteoblast differentiation[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(6): 2946-2956.
- [8] CAPKIN M, CAKMAK S, KURT F O, et al. Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs[J]. *Biomed Mater*, 2012, 7(4): 045013.
- [9] JIANG X, XU R, GUO Z, et al. Neurobiochemistry and neuroelectrophysiology of neuron-like cells differentiated from neural BMSCs-D-NSCs[J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2005, 5: 5215-5218.
- [10] MAES O C, CHERTKOW H M, WANG E, et al. MicroRNA: implications for alzheimer disease and other human CNS disorders[J]. *Curr Genomics*, 2009, 10(3): 154-168.
- [11] SUN E, SHI Y. MicroRNAs: Small molecules with big roles in neurodevelopment and diseases[J]. *Exp Neurol*, 2007, 268: 46-53.
- [12] COOLEN M, BALLY-CUIF L. MicroRNAs in brain development and physiology[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2009, 19(5): 461-470.
- [13] TAY Y M, TAM W L, ANG Y S, et al. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 17-29.
- [14] QU K, WANG Z, LIN X L, et al. MicroRNAs: Key regulators of endothelial progenitor cell functions[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 448: 65-73.
- [15] DWEEP H, STICHT C, PANDEY P, et al. MiRWalk-database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes[J]. *J Biomed Inform*, 2011, 44(5): 839-847.
- [16] VON MERING C, HUYNEN M, JAEGGI D, et al. STRING: a database of predicted functional associations between proteins[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 258-261.
- [17] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [18] HUAT T J, KHAN A A, ABDULLAH J M, et al. MicroRNA expression profile of neural progenitor-Like cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells under the influence of IGF-1, bFGF and EGF[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 9693-9718.
- [19] CHEN Y, MENG L, YU Q, et al. The miR-134 attenuates the expression of transcription factor FOXM1 during pluripotent NT2/D1 embryonal carcinoma cell differentiation[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 330(2): 442-450.
- [20] SCHRATT G M, TUEBING F, NIGH E A, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development[J]. *Nature*, 2006, 439(7074): 283-289.
- [21] GAO J, WANG W Y, MAO Y W, et al. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134[J]. *Nature*, 2010, 466(7310): 1105-1109.
- [22] PRAKASH N, PUELLES E, FREUDE K, et al. Nkx6-1 controls the identity and fate of red nucleus and oculomotor neurons in the mouse midbrain[J]. *Development*, 2009, 136(15): 2545-2555.
- [23] THELIE A, DESIDERIO S, HANOTEL J, et al. Prdm12 specifies V1 interneurons through cross-repressive interactions with Dbx1 and Nkx6 genes in *Xenopus*[J]. *Development*, 2015, 142(19): 3416-3428.
- [24] METZAKOPIAN E, BOUHALI K, ALVAREZ-SAAVEDRA M, et al. Genome-wide characterisation of foxa1 binding sites reveals several mechanisms for regulating neuronal differentiation in midbrain dopamine cells[J]. *Development*, 2015, 142(7): 1315-1324.
- [25] RATIE L, WARE M, JAGLINE H, et al. Dynamic expression of notch-dependent neurogenic markers in the chick embryonic nervous system[J]. *Front Neuroanat*, 2014, 8: 158.

(张蕾 编辑)