

Mical2a 基因表达下调抑制斑马鱼血管发育

杨晋娟^{1,2}, 王淑娟¹, 翟金云¹, 朱顺星^{1,2}

(1. 南通大学杏林学院, 南通 226001; 2. 南通大学实验动物中心, 南通 226001)

[摘要] **目的** 探究斑马鱼胚胎早期发育过程中 *Mical2a* 基因的表达模式, 以及该基因对斑马鱼血管发育的影响。**方法** 使用 *Tg (fli:GFP)* 转基因斑马鱼 (用绿色荧光蛋白标记血管) 和野生型斑马鱼 (AB), 采用全胚胎原位杂交技术检测其早期胚胎不同发育阶段的 *Mical2a* 基因表达水平。通过显微注射吗啉反义寡核苷酸下调 *Mical2a* 基因, 并采用实时荧光定量 PCR 技术检测该基因在斑马鱼胚胎不同发育阶段 mRNA 表达水平。采用激光共聚焦显微成像技术, 观察并分析 *Mical2a* 基因下调后斑马鱼的血管表型变化。**结果** 受精后 24 h (24 hours post-fertilization, 24 hpf)、36 hpf 和 48 hpf 的斑马鱼早期胚胎的脑、心脏、血管系统中均有 *Mical2a* 基因表达。显微注射吗啉反义寡核苷酸后 *Mical2a* 基因的 mRNA 水平增加, 抑制斑马鱼胚胎的血管发育, 导致斑马鱼节间血管发育缺陷。**结论** *Mical2a* 基因表达下调可以抑制斑马鱼血管的发育。

[关键词] *Mical2a* 基因; 原位杂交; 胚胎发育; 血管发育; 斑马鱼; 血管依赖性疾病

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0282-06



Downregulation of *Mical2a* Gene Expression Inhibited Vascular Development in Zebrafish

YANG Jinxian^{1,2}, WANG Shujuan¹, ZHAI Jinyun¹, ZHU Shunxing^{1,2}

(1. Xinglin College of Nantong University, Nantong 226001, China; 2. Laboratory Animal Center of Nantong University, Nantong 226001, China)

Correspondence to: ZHU Shunxing (ORCID: 0000-0001-8011-4099), E-mail: zsx@ntu.edu.cn

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression pattern of *Mical2a* gene during the early development of zebrafish embryos and the effect of this gene on zebrafish vascular development. **Methods** Whole embryo *in situ* hybridization was used to detect *Mical2a* expression levels at different stages of early embryo development of *Tg (fli:GFP)* transgenic (labeled with green fluorescent protein) and wild type zebrafish (AB). *Mical2a* gene expression was downregulated by microinjection of a morpholine antisense oligonucleotide, and real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect mRNA expression of the gene at different developmental stages of zebrafish embryos. Laser confocal microscopy was used to observe and analyze vascular phenotypic changes in zebrafish after the downregulation of *Mical2a*. **Results** *Mical2a* was expressed in the brain, heart, and vascular system of zebrafish embryos at the 24th, 36th, and 48th hours post fertilization. The mRNA level of *Mical2a* increased after microinjection of morpholine antisense oligonucleotides, inhibiting vascular development in zebrafish embryos, resulting in internode angiogenesis defects in zebrafish. **Conclusion** Downregulation of *Mical2a* expression inhibits the development of blood vessels in zebrafish.

[Key words] *Mical2a* gene; *In situ* hybridization; Vascular development; Embryonic development; Zebrafish; Vascular dependent diseases

Mical (molecule interacting with CasL) 是一类细胞质内多结构域蛋白的保守家族, 与细胞的轴突引导和运动、细胞连接的形成、囊泡的转运, 以及癌细胞的

转移等有关^[1-3]。迄今为止, 研究者已发现在斑马鱼 (*Danio rerio*) 体内表达的 8 个 *Mical* 家族同源基因, 并且大多数斑马鱼的 *Mical* 家族基因在神经系统和肌肉系

[基金项目] 江苏省高等学校自然科学研究面上项目“LncRNA SLC25A34-AS1 调控斑马鱼动静脉分化的机制研究”(20KJB310028); 南通市科技计划项目“利用斑马鱼模型研究 miR-22a 调控血管芽生导向的机制”(JC2020104); 南通大学杏林学院大学生创新创业训练计划项目“*Mical2a* 基因调控斑马鱼胚胎血管发育”(201813993021x1)

[第一作者] 杨晋娟 (1990—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 人类疾病与动物模型。E-mail: yjx0815@ntu.edu.cn

[通信作者] 朱顺星 (1968—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 人类疾病与动物模型。E-mail: zsx@ntu.edu.cn。ORCID: 0000-0001-8011-4099

统中表达^[4]。*Micall2a*是在斑马鱼心脏中检测到的5个同源物之一^[5-6]，但其在斑马鱼心血管发育过程中的作用尚未见详细报告。目前，Mical家族的功能研究主要集中在无脊椎动物胚胎、成体组织以及脊椎动物的体外培养细胞中，但是其对于脊椎动物发育的具体功能仍然不清楚^[7]。

心血管是斑马鱼胚胎发育中最早形成并行使功能的组织器官之一。斑马鱼心脏发育大概分为以下几个阶段：(1)最早于受精后5 h (5 hours post-fertilization, 5 hpf)，中胚层前外侧板出现心脏的前体细胞；(2)15 hpf左右，心脏前体细胞向胚胎中线处融合成心锥，然后向前延伸形成线性的心管；(3)约22 hpf，心脏开始出现收缩；(4)28 hpf左右，心房和心室形成；(5)48 hpf左右，瓣膜形成，心房心室可清晰识别^[8]。和高等脊椎动物一样，斑马鱼的血管原细胞也来源于中胚层，14~16 hpf迁移至躯干中线部位，并形成血管索；然后，血管原细胞分化形成血管细胞和造血细胞，血管细胞进一步分化形成轴向血管、背部主动脉和后主静脉，约24 hpf开始出现血液循环^[9]。由于斑马鱼在血管发育研究方面具有优势，且*Tg (fli:GFP)*转基因斑马鱼的血管内皮细胞被绿色荧光蛋白标记，可以通过激光聚集焦观察到斑马鱼的血管发育情况，因此它是一种非常理想的动物模型^[10]。

生理性的血管生成是正常组织发育的必要条件，而包括肿瘤在内的一系列血管生成依赖性疾病中，病理性的血管生成发挥关键作用。1970年代初Folkman提出肿瘤生长依赖于血管形成的概念^[11]，此后大量研究证明肿瘤血管生成与肿瘤生长、侵袭和转移等特性密切相关，进而推动了肿瘤血管生成抑制疗法的产生。本实验利用转基因斑马鱼*Tg (fli:GFP)*和野生型斑马鱼(AB)为研究对象，采用全胚胎原位杂交技术，检测*Micall2a*基因在斑马鱼胚胎期不同发育阶段的表达情况，并通过显微注射吗啉反义寡核苷酸(morpholinoantisense oligos, Mo)法下调*Micall2a*基因表达，探究该基因在斑马鱼胚胎血管发育过程中的作用，为研究血管发育的调控机制提供实验依据，甚至为血管抑制相关的抗癌治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验中使用的*Tg (fli:GFP)*转基因斑马鱼和野生型斑马鱼(AB)^[12]均来自南通大学实验动物中心[SCXK(苏)2019-0001]，使用标准的斑马鱼养殖系

统(北京爱生科技有限公司产品)进行饲养，包括整套的斑马鱼饲养系统、自动换水系统和紫外杀菌过滤系统[SYXK(苏)2020-0029]。斑马鱼养殖水温严格控制28.5℃，且模拟光照/黑暗14 h(8:00—22:00)/10 h(22:00—08:00)，30日龄后斑马鱼饲喂孵化的丰年虫。喂养和杂交方案严格参照文献^[12]进行，根据形态特征与产出时间区分发育阶段^[13]。动物实验方案经南通大学实验动物伦理委员会审查批准(编号S20210911-1001)，所有实验操作按照南通大学实验动物中心标准操作规程进行。

1.2 实验试剂

焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)为生工生物工程(上海)股份有限公司产品(货号B501005)。地高辛标记的原位杂交探针(Anti-Dig-AP, 货号11093274910)和蛋白酶K为美国Roche公司产品。琼脂糖为北京百晶生物技术有限公司产品(货号162135)。氨苄西林(货号A9518)、柠檬酸(货号C2404)和酵母RNA(货号R362920)为美国Sigma公司产品。10×磷酸盐平衡生理盐水(10×PBS)为北京兰杰柯科技有限公司产品(货号21235297)。20×盐酸柠檬酸钠(saline sodium citrate, SSC)为美国Invitrogen公司产品(货号AM9770)。DNA Marker、超凝胶核酸染色剂(货号GR501-01)、PCR扩增高保真酶2×Phanta Flash Master Mix(货号P520-01)、高灵敏性染料法定量PCR检测试剂盒ChamQ SYBR qPCR Master Mix(货号Q341-02)和第三代实时荧光定量PCR预混液(HiScript III RT SuperMix for qPCR, 货号R323-01)为南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品。甲酰胺(货号R21111-500 mL)为上海源叶生物科技有限公司产品。肝素(货号542858)为北京百灵威科技有限公司产品。马来酸(货号M0375)为美国Sigma公司产品。SP6 RNA聚合酶(货号P1085)为普洛麦格(北京)生物技术有限公司产品。TRIzol试剂盒(货号10296010)为美国Invitrogen公司产品。Tween-20为北京索莱宝科技有限公司产品(货号822L0410)。BM-purple-AP(货号11442074001)为瑞士Roche公司产品。合成*Micall2a*基因反义RNA探针的PCR引物由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成，上下游引物序列为5'-GATTTGAAGAGACGCCGCAT-3'和5'-ACCAT-ATCCTCCGCATCCAG-3'。

1.3 溶液配制

50×E3培养液配制：称取NaCl 14.6 g、KCl 0.65 g、CaCl₂ 1.81 g、MgSO₄晶体4.05 g，加入ddH₂O充分溶解

后,定容至1 L,用0.22 μm 滤膜过滤。1×E3培养液配制:量取20 mL的50×E3培养液和10 mL亚甲基蓝,加到10 L超纯水中,充分混匀。0.003% 苯硫脲(phenylthiourea, PTU)培养液配制:称取0.3 g PTU粉末,用1×E3培养液充分溶解,外加10 mL亚甲基蓝,加到10 L超纯水中。麻醉药MS-222配制:称取2 g MS-222粉末,用300 mL超纯水充分溶解,然后定容至500 mL,再用1 mol/L Tris-HCl调节pH至7.0。1×PBST溶液配制:将5 mL 10×PBS加到45 mL DEPC水中,再加50 μL Tween-20。预杂交液配制:吸取25 mL 甲酰胺、12.5 mL 20×SSC、460 μL 柠檬酸(1 mol/L, pH 6.0)和50 μL Tween-20,加入DEPC水补至50 mL。杂交液配制:吸取25 mL 甲酰胺、12.5 mL 20×SSC、460 μL 柠檬酸(1 mol/L, pH 6.0)、250 μL 酵母RNA(20 mg/mL)、50 μL 肝素钠(50 mg/mL)和50 μL Tween-20,加入DEPC水补至50 mL。4%多聚甲醛固定液配制:称取4 g多聚甲醛粉末,用1×PBS充分溶解后,定容至100 mL。

1.4 斑马鱼繁育

受精卵收集前一晚,将野生型斑马鱼成鱼按雌雄比为1:2饲养于杂交缸(中间用挡板隔开),次日早晨亮灯后拨去挡板,待交配后收集受精卵。将受精卵放入适量的胚胎培养液(1×E3)中,置于28.5 °C恒温培养箱中培养孵化,24 hpf开始使用0.003% PTU溶液处理,以防止黑色素生成。分别在24 hpf、36 hpf和48 hpf,各取20条斑马鱼胚胎,先用4%多聚甲醛溶液于室温条件下固定2 h,然后用含Tween-20的1×PBST清洗,甲醇脱水,−20 °C储存。

1.5 全胚胎原位杂交法检测 *Micall2a* 基因表达

取−20 °C储存的不同发育阶段(24、36和48 hpf)的野生型斑马鱼胚胎,各10条,1×PBST溶液清洗后用蛋白酶K消化,室温下根据胚胎不同发育阶段调整蛋白酶K的消化时间:24、36和48 hpf胚胎的消化时间分别为2、5和10 min。加入预杂交液,于70 °C水浴中进行预杂交4 h以上,然后加入*Micall2a*基因的反义RNA探针(1 ng/ μL),70 °C水浴条件下杂交过夜。使用含Tween-20的0.2×SSC溶液洗涤后,加入anti-Dig-AP探针孵育4 °C过夜,然后使用PBST溶液洗涤,加入BM-Purple-AP溶液37 °C避光显色,每隔1 h于正置体式显微镜(Motic, SMZ168)下观察显深紫色情况,当组织器官有明显颜色显现完全后,用NTMT清洗10 min/2次终止反应,用PBST溶液洗脱,用70%乙醇溶液脱水,加入甘油,使用体视显微镜观察,记录大脑、

心脏及血管显色情况并成像^[14-15]。

1.6 显微注射吗啉反义寡核苷酸下调 *Micall2a* 基因表达

通过Genetools公司合成能特异性抑制*Micall2a*基因翻译的吗啉(morpholino, Mo)反义寡核苷酸^[8]。*Micall2a*-Mo反义核苷酸序列为5'-GCGCTTT-AATAGCCGCCATTCTCTC-3'。将3 ng *Micall2a*-Mo显微注射至1细胞时期的*Tg(fli:GFP)*转基因斑马鱼胚胎中,作为*Micall2a*敲降组;对照组显微注射同等体积的1×PBS。将各组胚胎置于28.5 °C条件下培养至24 hpf和48 hpf,然后每组各取45个胚胎,采用实时荧光定量PCR法检测*Micall2a*下调情况。同等条件下培养至24 hpf和50 hpf,然后每组各取10个胚胎,使用激光共聚焦显微成像技术观察血管发育情况。

1.7 实时荧光定量PCR检测 *Micall2a* 基因表达

收集24 hpf和48 hpf发育阶段的*Micall2a*敲降组和对照组斑马鱼胚胎各15条,提取总RNA并反转录成cDNA。针对内参基因*YEF1a*和*Micall2a*基因设计定量PCR引物:*Micall2a*基因的正向引物序列为5'-GTGCGCTCATCCACAAGTTC-3',反向引物序列为5'-GGAGCGGCCATGGAAGTAAT-3';*YEF1a*基因的正向引物序列为5'-TGATCTACAAATGCGGTGGA-3',反向引物序列为5'-CAATGGTGATACCACGCTCA-3'。PCR反应体系包括:2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μL ,上、下游引物各0.4 μL ,cDNA 200 ng混匀,最后加入ddH₂O将体系补至20 μL 。实时定量PCR程序:95 °C预变性10 min;95 °C变性15 s,59 °C退火/延伸1 min,2个温度循环40次。熔解曲线程序:95 °C 15 s,60 °C 15 s,95 °C 15 s。反应结束后确认荧光定量PCR的扩增曲线和熔解曲线,进行PCR定量时制作标准曲线,并分析*Micall2a*基因表达水平。

1.8 激光共聚焦显微成像观察血管发育

将前期获得的*Micall2a*敲降组和对照组24 hpf和50 hpf斑马鱼胚胎各10条,使用麻醉药MS-222麻醉后,用0.7%低熔点的琼脂糖固定^[15]在特制的玻璃皿上。用尼康Nikon A1R HD25激光共聚焦显微镜观察斑马鱼胚胎中血管的发育情况:在蓝光激发下,可显绿色荧光蛋白;利用激光共聚焦显微20倍镜头成像,并进行图像处理。

1.9 统计分析

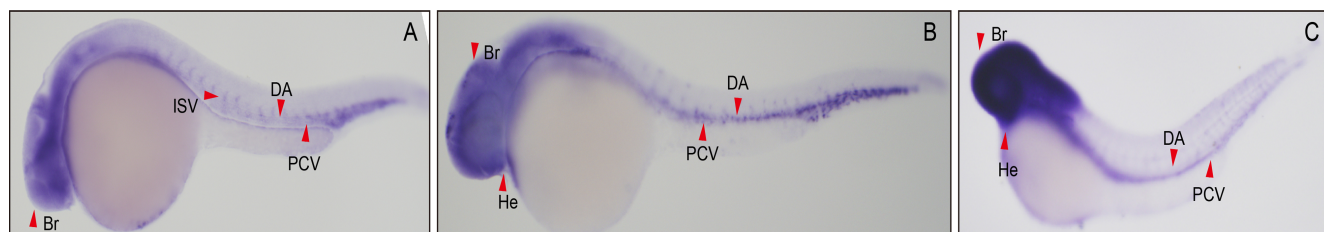
各实验均重复3次,使用GraphPad Prism软件进行统计学分析。两组间差异分析采用*t*检验,以*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *Micall2a*基因在斑马鱼胚胎中高表达

全胚胎原位杂交结果显示, 在24、36和48 hpf的斑马鱼胚胎的背主动脉、后主静脉以及节间血管

中, *Micall2a* 基因均有表达 (图1)。在36 hpf时的斑马鱼心脏和脑中同样能检测到深紫色杂交信号; 尤其当斑马鱼发育到48 hpf阶段后, *Micall2a* 基因在斑马鱼的心脏和脑部表达信号更为显著。



注: A~C分别为受精后24、36和48 h。ISV为节间血管, PCV为后主静脉, DA为背主动脉。Br为大脑, He为心脏 (红色箭头指示位置)。

Note: A-C, *Micall2a* expression levels at the 24th, 36th, and 48th hours post fertilization in the zebrafish. ISV, intersegmental vessel; DA, dorsal aorta; PCV, posterior cardinal vein; Br, brain; He, heart. Red arrow indicates the location.

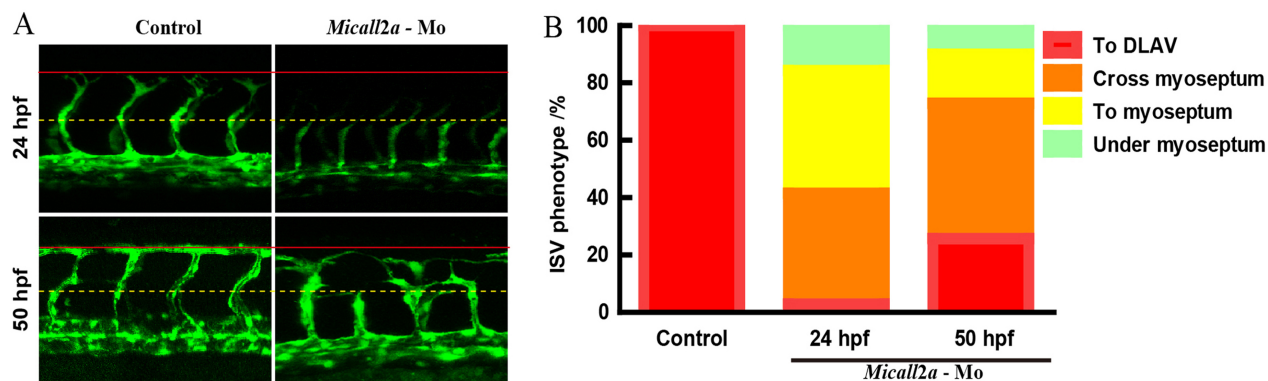
图1 *Micall2a*基因在斑马鱼胚胎血管系统中的表达

Figure 1 Expression of the *Micall2a* gene in the vascular system of zebrafish embryos

2.2 *Micall2a*基因表达下调导致斑马鱼胚胎血管发育缺陷

将 *Micall2a*-Mo 注射到1细胞时期的转基因斑马鱼 *Tg(fli:GFP)* 胚胎中, 分别培养至24 hpf和50 hpf, 用激光共聚焦显微成像技术观察并分析斑马鱼胚胎的节间血管形态。结果如图2所示, *Micall2a* 敲降组斑马鱼胚胎在24 hpf, 仅有约2.86%的节间血管

生长至背部纵向吻合血管, 其中84.29%能生长至横向肌隔; 在50 hpf (大约至48 hpf斑马鱼节间血管发育完全), 约25.71%的节间血管生长至背部纵向吻合血管。另外, 下调 *Micall2a* 基因表达后直至发育到50 hpf, *Micall2a* 敲降组斑马鱼胚胎的背主动脉管腔与对照组相比变细, 并且生长方向受到明显影响 (图2)。



注: A为显微注射吗啉反义寡核苷酸下调转基因斑马鱼 *Tg(fli:GFP)* *Micall2a* 基因 (*Micall2a*-Mo组) 和注射相同体积PBS转基因斑马鱼 (Control组), 并培养至受精后24 h (24 hpf) 和50 h (50 hpf), 斑马鱼胚胎内节间血管形态的激光共聚焦显微成像图片; 背侧纵向吻合口血管 (DLAV) 由红色实线表示, 水平肌间隔用黄色虚线表示。B为各组斑马鱼胚胎中节间血管 (ISV) 生长的表型占比 (红色为血管生长至背侧纵向吻合口血管, 橘色为穿过肌隔膜, 黄色为到达横向肌隔膜, 绿色为肌隔膜下)。每组10个胚胎, 每个胚胎统计7个ISV。

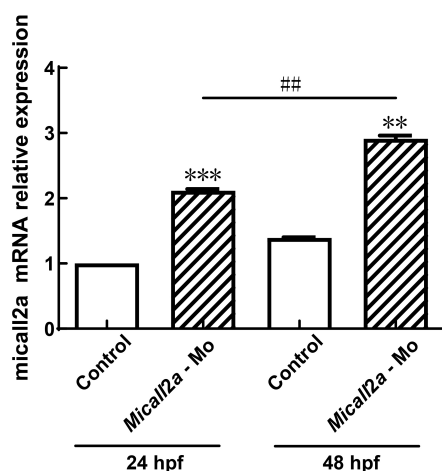
Note: (A) Laser confocal microscope image of internode vascular morphology in zebrafish embryos with microinjection of morpholine antisense oligonucleotide knockdown of the expression of *Micall2a* in *Tg(fli:GFP)* transgenic lines (*Micall2a*-Mo group) and injection of the same volume of PBS in transgenic zebrafish (control group) cultured to 24 and 50 hpf. The dorsal longitudinal anastomosis vessel (DLAV) is indicated by a solid red line and the horizontal septum by a yellow dashed line. (B) Phenotypic proportion of internodal vascular (ISV) growth in zebrafish embryos (red indicates blood vessel growth to the dorsal longitudinal anastomotic blood vessel, orange indicates growth through the myoseptum, yellow indicates growth to the transverse myodiam, and green indicates submyspheric growth). 10 embryos per group and 7 ISVs per embryo were counted.

图2 下调 *Micall2a* 基因表达后24和50 hpf斑马鱼胚胎中节间血管的发育情况

Figure 2 Morphology of zebrafish embryos larval internodal vascular after the knock-down of *Micall2a* gene at 24 and 50 hpf

2.3 *Micall2a* 基因下调后 mRNA 水平增加

为了探究 *Micall2a* 基因敲降效率, 采用实时荧光定量 PCR 的方法检测 *Micall2a* mRNA 转录水平, 结果表明: 在 24 hpf, *Micall2a*-Mo 注射后 *Micall2a* mRNA 水平显著高于对照组 ($P=0.000\ 5$); 在 48 hpf, *Micall2a*-Mo 注射后 *Micall2a* mRNA 水平显著高于对照组 ($P=0.001\ 7$) (图 3)。与 24 hpf 比较, 48 hpf 的 *Micall2a*-Mo 组 mRNA 水平显著高于 24 hpf 的 *Micall2a*-Mo 组 ($P=0.001\ 3$)。



注: *Micall2a*-Mo 组为显微注射吗啉反义寡核苷酸下调转基因斑马鱼 *Tg(fli: GFP)* 中 *Micall2a* 基因并培养至受精后 24 h (24 hpf) 和 50 hpf; 对照组为注射相同体积 PBS 的转基因斑马鱼。与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 24 hpf 相比, *** $P < 0.01$ 。每组 15 个胚胎, 实验重复 3 次。

Note: The *Micall2a*-Mo group was microinjected with morpholine antisense oligonucleotide and the expression of *Micall2a* in *Tg(fli: GFP)* transgenic lines and cultured to 24 and 50 hpf. The control group was injected with an equal volume of PBS. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with 24 hpf, *** $P < 0.01$. The experiment was repeated three times for each group of 15 embryos.

图 3 实时荧光定量 PCR 分析注射 *Micall2a*-Mo 后斑马鱼胚胎体内 *Micall2a* 基因表达变化

Figure 3 Real-time PCR analysis of *Micall2a* gene expression changes in zebrafish embryos after injection of *Micall2a*-Mo

3 讨论

根据数据库分析及分子克隆结果, 目前发现斑马鱼中有 8 个 *Mical* 家族基因, 包括 *Mical2*、*Mical3* 和 *Micall2* 以及它们的两个旁系同源基因。据报告, 果蝇中 *Mical* 基因主要表达于神经系统和肌肉组织, 对轴突导向、肌丝组织和突触发生起作用^[14-18]。对于哺乳动物的胚胎发生, 目前仅研究了啮齿类动物的 *Mical* 亚家

族基因, 并且它们表达于神经系统^[13,17]。而在成年哺乳动物组织中, *Mical* 家族基因主要表达于脑、脊髓、肺、肝、肾、肌肉、心脏、胸腺、脾、睾丸以及造血细胞和某些癌细胞^[19]。Xue 等^[4] 研究结果显示, *Micall2a* 表达于斑马鱼血管。本研究中原位杂交结果同样也证实, *Micall2a* 基因表达于斑马鱼胚胎期的血管系统, 脑与心脏中也有表达, 并在不同胚胎期显现出不同的分布趋势。

遍布全身的血管是脊椎动物体内物质交换的基础。脊椎动物的血管发育可以分为两个阶段: 血管发生 (vasculogenesis) 和血管新生 (angiogenesis)^[20-21]。人类肿瘤发生过程中, 肿瘤细胞通过分泌多种细胞因子诱导内皮细胞活化, 进而导致肿瘤血管生成。血管的新生是肿瘤发生、发展以及转移的重要条件。斑马鱼胚胎早期透明, 是进行活体成像和研究血管新生的良好模型。本研究利用血管内皮细胞被特异性荧光标记的转基因斑马鱼 *Tg(fli: GFP)*^[12,22], 探讨 *Micall2a* 基因在胚胎期血管发育中的功能。在抑制 *Micall2a* 基因表达后, 发现 24 hpf 的斑马鱼大部分节间血管不能生长至背部纵向吻合血管, 并且在发育后期 (50 hpf 后), 血管生长方向受到明显影响。同时本研究采用实时荧光定量 PCR 技术检测敲降 *Micall2a* 基因效率, 发现在注入 *Micall2a*-Mo 的斑马鱼胚胎中 *Micall2a* 基因表达高于对照组, 这可能是由于 *Micall2a*-Mo 导致该基因的翻译过程受到阻碍, 从而产生反馈效果, 诱导更多的 RNA 转录本产生, 本课题组后续将进一步深入探讨该机制。

综上所述, 在斑马鱼胚胎发育过程中 *Micall2a* 基因能够影响血管发育, 其中涉及的分子机制有待进一步研究。本研究结果为进一步探讨 *Micall2a* 基因抑制肿瘤血管的发生提供了重要依据。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验方案经南通大学实验动物伦理委员会审查批准 (批号 S20210911-1001), 所有实验操作均按照南通大学实验动物中心标准操作规程进行, 遵照中国实验动物相关法律法规条例要求。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Nantong University (Approval Letter No. S20210911-1001). All experimental operations are carried out in accordance with the standard operating procedures of the Laboratory Animal Center of Nantong University and in accordance with the relevant laws, regulations and regulations of Chinese laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

杨晋娟负责实验设计、实验操作、数据统计及论文撰写；
王淑娟和翟金云负责文献阅读及筛选，参与前言撰写；
朱顺星提供研究经费，负责研究方案与论文的审核及修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] HUNG R J, YAZDANI U, YOON J, et al. Mical links semaphorins to F-actin disassembly[J]. *Nature*, 2010, 463 (7282):823-827. DOI: 10.1038/nature08724.
- [2] BEUCHLE D, SCHWARZ H, LANGEGER M, et al. Drosophila MICAL regulates myofilament organization and synaptic structure[J]. *Mech Dev*, 2007, 124(5): 390-406. DOI: 10.1016/j.mod.2007.01.006.
- [3] WEIDE T, TEUBER J, BAYER M, et al. MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(1):79-86. DOI: 10.1016/s0006-291x(03)00918-5.
- [4] XUE Y L, KUOK C XIAO A, et al. Identification and expression analysis of mical family genes in zebrafish[J]. *J Genet Genom*, 2010, 37(10):685-693. DOI: 10.1016/S1673-8527(09)60086-2.
- [5] YANG Y X, YE F W, XIA T X, et al. High MICAL-L2 expression and its role in the prognosis of colon adenocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1):487. DOI: 10.1186/s12885-022-09614-0.
- [6] WU H, YESILYURT H G, YOON J, et al. The MICALs are a family of F-actin dismantling oxidoreductases conserved from drosophila to humans[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 937. DOI: 10.1038/s41598-017-17943-5.
- [7] WANG Y, DENG W, ZHANG Y, et al. MICAL2 promotes breast cancer cell migration by maintaining epidermal growth factor receptor (EGFR) stability and EGFR/P38 signalling activation [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2018, 222(2): 10.1111/apha.12920. DOI: 10.1111/apha.12920.
- [8] BAKKERS J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(2):279-288. DOI: 10.1093/cvr/cvr098.
- [9] HOGAN B M, SCHULTE-MERKER S. How to plumb a Pisces: understanding vascular development and disease using zebrafish embryos[J]. *Dev Cell*, 2017, 42(6): 567-583. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.08.015.
- [10] 江霞, 钱豪杰, 魏迅, 等. 斑马鱼糖尿病模型的构建及应用进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(6):547-552. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.06.016.
JIANG X, QIAN H J, WEI X, et al. Research progress in construction and application of diabetes model in zebrafish [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(6):547-552. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.06.016.
- [11] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(4): 273-286. DOI: 10.1038/nrd2115.
- [12] WANG J L, ZHANG X H, XU X Y, et al. Pro-angiogenic activity of Tongnao Decoction on HUVECs *in vitro* and zebrafish *in vivo*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112737. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112737.
- [13] CASEY M J, STEWART R A. Zebrafish as a model to study neuroblastoma development[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 372(2): 223-232. DOI: 10.1007/s00441-017-2702-0.
- [14] CHITRAMUTHU B P, BENNETT H P J. High resolution whole mount in situ hybridization within zebrafish embryos to study gene expression and function[J]. *J Vis Exp*, 2013(80): e50644. DOI: 10.3791/50644.
- [15] 张晶晶, 王新, 刘东. C型利钠肽基因调控斑马鱼胚胎血管发育 [J]. *生理学报*, 2017, 69(1): 11-16. DOI: 10.13294/j.aps.2016.0098.
ZHANG J J, WANG X, LIU D. C-type natriuretic peptide gene regulates the vascular development of zebrafish embryos[J]. *Acta Physiol Sin*, 2017, 69(1): 11-16. DOI: 10.13294/j.aps.2016.0098.
- [16] SUMMERTON J E. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity[J]. *Curr Top Med Chem*, 2007, 7(7):651-660. DOI: 10.2174/156802607780487740.
- [17] ZHOU Y P, GUNPUT R A F, ADOLFS Y, et al. MICALs in control of the cytoskeleton, exocytosis, and cell death[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(24):4033-4044. DOI: 10.1007/s00018-011-0787-2.
- [18] RAHAJENG J, GIRIDHARAN S S P, CAI B S, et al. Important relationships between Rab and MICAL proteins in endocytic trafficking[J]. *World J Biol Chem*, 2010, 1(8): 254-264. DOI: 10.4331/wjbc.v1.i8.254.
- [19] TERA T, NISHIMURA N, KANDA I, et al. JRAB/MICAL-L2 is a junctional Rab13-binding protein mediating the endocytic recycling of occludin[J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(5):2465-2475. DOI: 10.1091/mbc.e05-09-0826.
- [20] 杨晋娟, 王新, 刘东, 等. Clec14a 基因调控斑马鱼胚胎血管发育 [J]. *交通医学*, 2018, 32(6): 535-539. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.118.
YANG J X, WANG X, LIU D, et al. Clec14a gene contributes to zebrafish angiogenesis[J]. *Med J Commun*, 2018, 32(6): 535-539. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.118.
- [21] DIOMEDE F, DILETTA MARCONI G, FONTICOLI L, et al. Functional relationship between osteogenesis and angiogenesis in tissue regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (9):3242. DOI: 10.3390/ijms21093242.
- [22] 王晓航, 陈洋, 戚中田, 等. 血脑屏障动物模型的研究进展[J]. *海军军医大学学报*, 2022(3):314-319.
WANG X H, CHEN Y, QI Z T, et al. Animal models of blood-brain barrier: research progress[J]. *Acad J Nav Med Univ*, 2022 (3):314-319.

(收稿日期: 2022-10-31 修回日期: 2023-04-17)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周烁)

[引用本文]

杨晋娟, 王淑娟, 翟金云, 等. *Mical2a* 基因表达下调抑制斑马鱼血管发育[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(3): 282-287. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.166.
YANG J X, WANG S J, ZHAI J Y, et al. Downregulation of *Mical2a* gene expression inhibited vascular development in zebrafish[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(3): 282-287. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.166.