

研究简报

MicroRNA在果蝇原始生殖细胞命运 调控中的功能研究

刘冬成 瞿杰 杨蕙铭 李梦婕 宣涛* 李明发

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要 果蝇原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是生殖干细胞的前体。该群细胞在果蝇幼虫期经历特征性的发育过程,这一过程涉及程序化的细胞命运及行为改变。为系统探讨miRNA在上述PGCs命运调控中的作用,对雌蝇幼虫发育中的性腺组织进行了miRNA表达谱分析,发现一组miRNA分子持续在性腺组织细胞中表达。应用GAL4/UAS遗传操作系统验证了部分候选miRNAs的功能,获得了miR-33和miR-278参与调控果蝇幼虫PGCs有序分化的实验证据。该文为发育过程中功能性miRNA研究工作的开展提供了有益的借鉴。

关键词 果蝇; 性腺; 微RNA; 原始生殖细胞; 细胞命运

Functional Dissection of MicroRNA in the *Drosophila* PGCs Fate Regulation

Liu Dongcheng, Qu Jie, Yang Huiming, Li Mengjie, Xuan Tao*, Li Mingfa

(College of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract The *Drosophila* primordial germ cells (PGCs) are the germline stem cell precursors. The PGCs in larval gonads undergo a unique developmental process, which involves a regulatory pattern of cell fate and behavior. To systematically unravel the roles of miRNAs in PGCs fate regulation, we performed a miRNA expression profiling on developing larval gonads in female flies. The analysis identified a group of miRNAs expressing in the tissues. We next examined if those miRNA candidates function in the developmental process via the Gal4/UAS binary system. The results showed that miR-33 and miR-278 controlled the PGCs differentiation in the larvae. The study in this paper provided a good working system for exploring functional miRNAs in the developmental contexts.

Keywords *Drosophila*; gonads; microRNA; PGCs; cell fate

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是果蝇持续不断产生成熟配子的源头。作为生殖干细胞(germline stem cells, GSCs)的前体,果蝇PGCs的细胞命运获得发生在胚胎发育早期。特化后的PGCs定向迁移至性腺原基,被源自中胚层的一群体细胞包裹,共同发育成胚胎性腺^[1-2]。雌蝇进入幼虫

期后,其性腺中的PGCs经历特征性的发育过程,最终在卵巢组织中构建数量恒定的GSCs细胞库,使雌蝇羽化后能在数周内保持生殖活力。雌蝇幼虫性腺中PGCs的发育涵盖了一系列功能上密切关联的细胞学过程:自1龄幼虫期至3龄幼虫晚期(late 3rd instar larvae, LL3),PGCs持续增殖,细胞数目从胚胎期约

收稿日期: 2015-07-06 接受日期: 2015-09-02

国家自然科学基金(批准号: 31471374)和中国博士后科学基金(批准号: 2014M551405)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-34204476, E-mail: xuantao@sjtu.edu.cn

Received: July 6, 2015 Accepted: September 2, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471374) and China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2014M551405)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34204476, E-mail: xuantao@sjtu.edu.cn

网络出版时间: 2015-10-20 09:53:55 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151020.0953.002.html>

12个增至约100个, 该期间PGCs分化处于抑制状态; PGCs在进入LL3期后开启适度、有序的细胞分化过程, 一定数量的PGCs细胞先分化为胞囊母细胞(cystoblast, CB), CB再逐次分化发育为2、4、8、16个生殖细胞胞囊(germline cysts)^[3]。果蝇卵巢能拥有数目恒定的GSCs库则依赖于上述PGCs细胞学过程的高度协同。研究表明, 蜕皮激素、胰岛素信号等系统性全身因子^[4-5]以及来自性腺本身的信号, 如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)信号通路、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)信号通路等^[3,6-7]均在幼虫期PGCs命运调控中(指细胞增殖、有序分化等)起关键作用。

微小RNAs(microRNAs, miRNAs)为一类由21~24个核苷酸组成的短非编码RNA分子, 通过特异性靶向mRNA的降解或抑制其翻译, 下调靶基因的表达^[8], 参与调控几乎所有细胞学过程, 如细胞增殖、凋亡、命运决定、分化及细胞谱系建立等, 从而在机体发育、生理及相关病理中发挥调节作用^[9-13]。已知果蝇拥有多达430种miRNAs分子, 广泛参与调控干细胞、胚胎、眼、神经、翅膀等发育中的重要细胞学过程, 其中, Bantam miRNA抑制雌蝇幼虫PGCs的分化^[14]。为系统探究miRNA在果蝇PGCs命运调控中的功能, 本研究首先对果蝇幼虫性腺组织进行了miRNA表达谱分析, 检测到一组表达于该组织的miRNA分子。研究进而应用GAL4/UAS二元表达系统^[15]对上述候选miRNA分子进行了功能筛查, 发现miR-33和miR-278具有调节果蝇幼虫期PGCs分化的功能, 这一功能可能通过影响PGCs微环境中体细胞的形态发生来实现。

本文采用的果蝇品系: *traffic jam-Gal4(tj-Gal4)*由Weizmann Institute of Science Israel, Lilach Gilboa实验室所赠, 在LL3期之前广泛表达于性腺体细胞谱系, 而待果蝇发育至LL3期时, 局限表达于混合细胞(intermingled cells, ICs)中^[16]。miRNA转基因品系: $w^{1118};;UAS-LUC-miR-33$ 、 $w^{1118};;UAS-LUC-miR-278$ 、 $w^{1118};;UAS-LUC-miR-8$ 、 $w^{1118};;UAS-LUC-miR-14$ 、 $w^{1118};;UAS-LUC-miR-184$ 、 $w^{1118};;UAS-LUC-miR-276b$ 、 $w^{1118};;UAS-LUC-miR-279$ 、 $w^{1118};;UAS-LUC-miR-310$ 以及作为阴性对照的 $w^{1118};;UAS-LUC$ 均购自Bloomington果蝇资源库。

本文采用的实验材料: mouse anti- α -spectrin(1:20 3A9(323 or M10-2)、rat anti-Vasa(1:20 anti-

vasa)、mouse anti-engrailed(1:20 4D9)等一抗购自Developmental Studies Hybridoma Bank(DSHB); rabbit anti-Vasa(1:200)购自Santa Cruz公司; anti-traffic jam(1:5 000)由Lilach Gilboa实验室惠赠; 二抗: goat anti-mouse Alexa 488、goat anti-rat Alexa 546、goat anti-rabbit Alexa 546以及核染料DAPI均购自Molecular Probe公司, 使用浓度均为1:1 000; PBS购自Generay Biotech公司、Triton X-100购自Bio-Rad公司; 多聚甲醛购自Sigma公司; 山羊血清(goat serum, GS)购自Gibco公司。

本文采用Gal4/UAS系统, *tj-Gal4*品系与*UAS-LUC-miRNA*品系果蝇于25 °C杂交, 并进行2 h卵收集。待幼虫生长至三龄幼虫中期(mid 3rd instar larvae, ML3)(卵收集结束后96 h)及LL3期时(卵收集结束后114 h)分别进行果蝇幼虫性腺显微解剖。具体操作为: 使用镊子从中部将果蝇幼虫扯开分成两段, 弃去前段, 将后段中的组织从后往前挤出, 在挤出的组织中找到包含有性腺的脂肪体, 将其挑出, 完成解剖。

本文采用免疫荧光染色标记性腺中的生殖细胞系和体细胞系, 步骤为: 将解剖出的果蝇组织用含有4%多聚甲醛的PBS固定30 min。固定完成后, 用含有0.3% Triton X-100的PBS洗3次, 每次10 min。然后, 使用含有1% Triton X-100的PBS溶液渗透组织1 h。渗透完成后, 再换用含有10%山羊血清、0.3% Triton X-100的PBS封闭组织2 h, 以降低抗体的非特异性结合。封闭完成后, 使用封闭液配制合适工作浓度的一抗并4 °C孵育过夜。第2 d, 使用含有0.3% Triton X-100的PBS洗涤一抗孵育后的组织3次, 每次20 min, 接着封闭1 h。然后使用封闭液配制合适工作浓度的二抗, 室温孵育2 h, 孵育完成后加入适当浓度的DAPI, 继续染色10 min。最后, 使用含有0.3% Triton X-100的PBS洗涤组织3次, 每次20 min, 完成染色。制片操作过程为: 用镊子将染色完成的性腺从脂肪组织中剥离出来, 夹至载玻片上含90%甘油的PBS中, 涂布均匀后盖上盖玻片, 最后用指甲油封片。荧光观察在Nikon Eclipse 80i荧光显微镜下进行。免疫荧光染色图像在Leica TCS SP5激光共聚焦显微镜上采集。

miRNA微阵列芯片分析: 解剖、分离雌蝇LL3期性腺组织, 从中提取总RNA, 构建miRNA文库。使用Affymetrix miRNA array 4.0芯片分析在雌蝇ML3期及LL3期性腺组织中表达的miRNA(此部分

实验由上海伯豪生物技术有限公司协助完成)。

本实验采用SPSS 19.0软件进行数据分析, 显著性检验使用Student's *t*检验和 χ^2 检验。

果蝇幼虫性腺组织表达一组miRNA分子

为系统探讨miRNA在雌蝇PGCs命运调控中的功能, 首先应用微阵列芯片分析技术检测了性腺组织中的miRNAs表达谱。结果发现, 雌蝇幼虫性腺组织细胞持续表达(涵盖三龄幼虫中期至三龄幼虫晚期, ML3至LL3期)包括miR-33和miR-278在内的共64种miRNA分子(表1)。鉴于PGCs的命运与行为(指细胞分化与增殖等)从ML3至LL3期发生特征性的变化(详见论文前言部分), 此表达谱筛查结果提示, 该群表达于性腺组织中的miRNAs分子可能参与PGCs的细胞命运调控过程。

miR-33和miR-278参与调控PGCs的有序分化

为验证基于miRNA表达谱分析结果所做出的功能推测, 采用果蝇GAL4/UAS二元表达系统对表

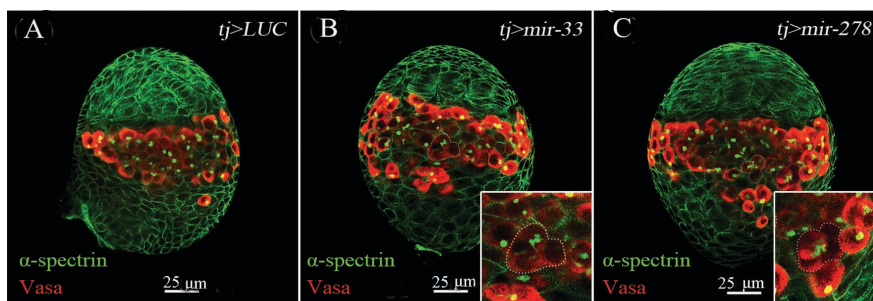
达于幼虫性腺组织中的部分miRNAs分子进行功能筛查, 系统评估候选miRNAs在PGCs的有序分化及细胞增殖过程中的作用。结果鉴定出两种功能性miRNAs分子: miR-33和miR-278。

使用果蝇品系*tj*-Gal4分别驱动*UAS-miR-33*或*UAS-miR-278*转基因特异性表达在组成PGCs微环境的幼虫性腺体细胞中, 检测miRNA过表达对PGCs细胞命运的影响。首先, 依据生殖细胞特有的一种细胞器-融合体(fusome)在PGCs分化发育过程中所发生的特征性形态变化, 评估过表达miR-33或miR-278影响PGCs有序分化的可能性。已知融合体在未分化的PGCs以及CB细胞中呈球形, 而当CB进一步分化为不同发育阶段的生殖系胞囊时, 融合体的形态发生变化, 如融合体在4细胞期胞囊中呈U型; 8细胞期和16细胞期胞囊中融合体呈分枝状。本研究采用Vasa和 α -spectrin抗体免疫荧光双染色技术方法来辨识生殖细胞中融合体的形态结构, 据此对不同遗传背景下的LL3期性腺中的PGCs及其分化细胞进行分类并统计, 进而判断PGCs的分化状态及其程度。实

表1 雌蝇幼虫性腺中表达的microRNA

Table 1 Detected microRNAs expressing in *Drosophila* larval gonad

编号 Number	miRNA	编号 Number	miRNA	编号 Number	miRNA
1	dme-miR-2a	23	dme-miR-276b	45	dme-miR-960
2	dme-miR-2b	24	dme-miR-277	46	dme-miR-962
3	dme-miR-2c	25	dme-miR-278	47	dme-miR-964
4	dme-miR-8	26	dme-miR-279	48	dme-miR-965
5	dme-miR-10	27	dme-miR-281-1	49	dme-miR-970
6	dme-miR-11	28	dme-miR-281-2	50	dme-miR-984
7	dme-miR-12	29	dme-miR-283	51	dme-miR-987
8	dme-miR-13b	30	dme-miR-284	52	dme-miR-988
9	dme-miR-14	31	dme-miR-289	53	dme-miR-989
10	dme-miR-31a	32	dme-miR-305	54	dme-miR-995
11	dme-miR-31b	33	dme-miR-306	55	dme-miR-996
12	dme-miR-33	34	dme-miR-310	56	dme-miR-998
13	dme-miR-34	35	dme-miR-311	57	dme-miR-1003
14	dme-miR-92a	36	dme-miR-312	58	dme-miR-1010
15	dme-miR-92b	37	dme-miR-313	59	dme-miR-2491
16	dme-miR-100	38	dme-miR-314	60	dme-miR-2495
17	dme-miR-125	39	dme-miR-316	61	dme-miR-4948
18	dme-miR-184	40	dme-miR-317	62	dme-miR-4955
19	dme-miR-252	41	dme-miR-375	63	dme-miR-4971
20	dme-miR-263	42	dme-miR-954	64	dme-let-7
21	dme-miR-275	43	dme-miR-958		
22	dme-miR-276a	44	dme-miR-959		



A: 对照组中, PGCs/CB中的融合体均呈球形; B: 过表达miR-33的性腺中可以检测到融合体呈分枝状的胞囊(右下方局部放大图中的虚线部分); C: 过表达miR-278的性腺中同样出现了融合体呈分枝状的胞囊(右下方局部放大图中的虚线部分)。图中 α -spectrin抗体(绿色)标记生殖细胞谱系中的融合体, Vasa抗体(红色)标记生殖细胞谱系。

A: control LL3 gonad carries round fusome; B: gonads overexpressing miR-33 result in formation of cysts harboring branched fusomes (inset, dot line); C: gonads overexpressing miR-278 also result in formation of cysts harboring branched fusomes (inset, dot line). Gonads are stained for α -spectrin (green) and Vasa (red) to outline fusome and germ cell, respectively.

图1 性腺体细胞中过表达miR-33或miR-278对PGCs有序分化的影响

Fig.1 Effect of miR-33 or miR-278 overexpression in somatic cells on PGCs differentiation

表2 miR-33或miR-278过表达对PGCs有序分化的影响

Table 2 Effect of miR-33 or miR-278 overexpression on PGCs differentiation

基因型	出现4细胞胞囊的性腺数目	出现8细胞胞囊的性腺数目	比例
Genotype	Number of gonads containing 4-cell cyst	Number of gonads containing 8-cell cyst	Percent
<i>tj>LUC</i>	0	0	0 (<i>n</i> =15)
<i>tj>miR-33</i>	3	2	38.5%* (<i>n</i> =13)
<i>tj>miR-278</i>	2	2	28.6%* (<i>n</i> =14)

比例: 出现4细胞和8细胞胞囊的性腺占样本总数的比例。* $P < 0.05$, 与对照组(*tj-Gal4>UAS-LUC*)相比。n: 检测样本数。

Percent: percent of gonads harboring 4-cell and 8-cell cyst. * $P < 0.05$ vs control group (*tj-Gal4>UAS-LUC*). n: No. of gonads examined.

验结果显示, 对照组(*tj-Gal4>UAS-LUC*)LL3期性腺组织中未检出4细胞及4细胞以上的生殖系胞囊, 多数生殖细胞处于PGC/CB阶段(图1A和表2)。而在同期miRNA过表达性腺中(*tj-Gal4>UAS-miR-33*或*tj-Gal4>UAS-miR-278*)不仅检出一定比例的4细胞胞囊, 甚至还发现处于8细胞期的生殖系胞囊(图1B和图1C、表2)。这一结果表明, 过表达miR-33或miR-278可促进PGCs的有序分化。

除细胞分化外, 本实验还对miR-33和miR-278在PGCs增殖控制中的可能作用进行了探讨。为此, 通过免疫荧光染色技术对实验组(*tj-Gal4>UAS-miR-33*或*tj-Gal4>UAS-miR-278*)和对照组(*tj-Gal4>UAS-LUC*)LL3期性腺中的PGCs分别进行计数, 统计分析未发现上述两组间PGCs总数存在显著差异(表3), 提示过表达miR-33或miR-278不影响雌蝇幼虫期PGCs的细胞增殖。

过表达miR-33或miR-278对性腺体细胞谱系发育的影响

已知, 作为PGCs发育微环境的性腺体细胞在

PGCs的命运及行为调控中起关键作用。其中, 端丝细胞 (terminal filament cells, TFCs) 和混合细胞 (intermingled cells, ICs) 为功能较为明确的两大类体细胞。本研究发现, 在性腺体细胞谱系中过表达miR-33或miR-278(*tj-Gal4>UAS-miR-33*或*tj-Gal4>UAS-miR-278*)可促进PGCs在LL3期的有序分化, 鉴于TF和IC细胞在PGCs命运调控中的功能, 我们进一步探讨了过表达miR-33或miR-278影响TF和(或)ICs的形态发生(morphogenesis), 进而促进PGCs分化的可能机制。为研究TF细胞的形态发生过程, 本文应用Engrailed抗体免疫荧光染色法选择在ML3和LL3

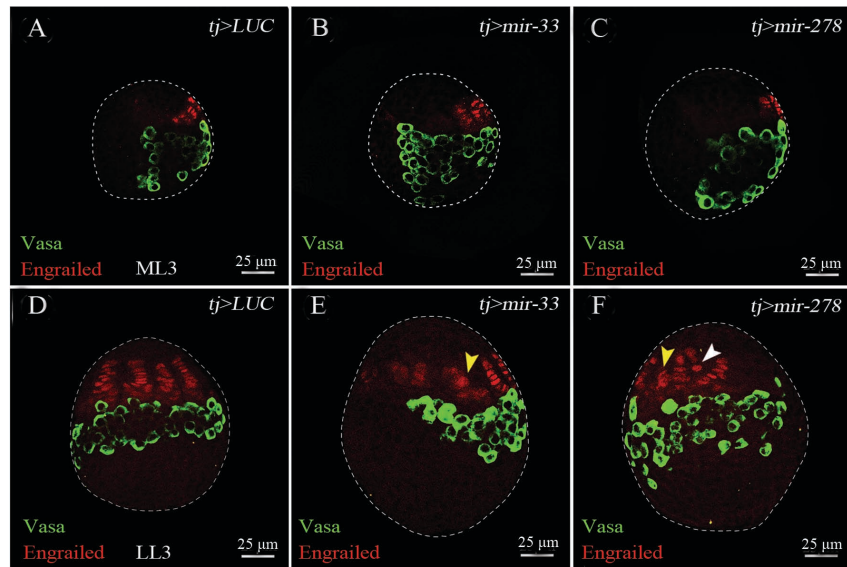
表3 miR-33或miR-278过表达对PGCs增殖的影响

Table 3 Effect of miR-33 or miR-278 overexpression on the proliferation of PGCs

基因型	PGCs平均数目	P值
Genotype	Average number of PGCs	P value
<i>tj>LUC</i>	109.1 (<i>n</i> =15)	
<i>tj>miR-33</i>	110.3 (<i>n</i> =13)	0.48
<i>tj>miR-278</i>	107.4 (<i>n</i> =14)	0.29

n: 检测样本数。

n: No. of gonads examined.

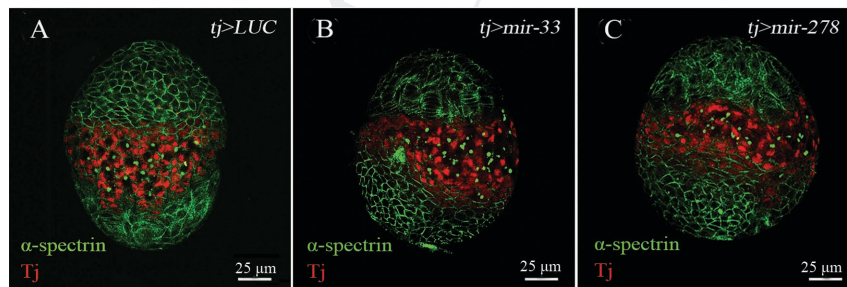


A: ML3期对照组中, TF细胞开始形成并堆叠为TF; B: 与对照组类似, 在过表达miR-33的同时期性腺中, 叠垛状TF开始形成; C: 在过表达miR-278的性腺中, 同样可见叠垛状TF正在形成; D: LL3期对照组中, TF呈叠垛状排列; E: 与对照组相反, 在过表达miR-33的性腺中, TF不能形成清晰的叠垛状结构(黄色箭头); F: 在过表达miR-278的性腺中, TF不能形成清晰的叠垛状结构(黄色箭头), 此外还有部分端丝细胞游离于叠垛状结构之外(白色箭头)。图中Vasa抗体(绿色)标记生殖细胞谱系, Engrailed抗体(红色)标记TF细胞。

A: an ML3 gonad, few TF cells are present in very short filaments; B: as in control, TF cells show up and align in short filaments in miR-33 overexpression gonad; C: as in control, TF cells show up and align in short filaments in miR-278 overexpression gonad; D: an LL3 gonad, TFs are aligned in anterior-posterior oriented stacks; E: in contrast to control, some TFs are not formed correctly (yellow arrow) in miR-33 overexpression gonad; F: in miR-278 overexpression gonad, some TFs are not formed correctly (yellow arrow) and some TFCs are scattered out of the TF stacks (white arrow). Gonads are stained for Vasa (green) and Engrailed (red) to outline germ cells and TF cells respectively.

图2 过表达miR-33或miR-278对TF形态发生的影响

Fig.2 Effect of miR-33 or miR-278 overexpression on the morphogenesis of TF



A: LL3期对照组性腺中, ICs与PGCs混合分布于性腺中部; B: 与对照组相同, 过表达miR-33的性腺中, ICs能够正常地与PGCs混合; C: 过表达miR-278的性腺中, ICs与PGCs同样正常混合, 与对照组相比并无异常。图中α-spectrin抗体(绿色)标记生殖细胞谱系中的融合体, Tj(红色)抗体标记ICs。

A: an LL3 gonad, ICs are intermingled with PGCs locating at the middle part of the gonad; B: miR-33 overexpression gonad has a normal distribution pattern of ICs compared with control group. C: in miR-278 overexpression gonad, ICs are also normally associated with PGCs. Gonads are stained for α-spectrin (green) and Tj (red) to outline fusome and ICs, respectively.

图3 过表达miR-33或miR-278对ICs形态发生的影响

Fig.3 Effect of miR-33 or miR-278 overexpression on the morphogenesis of ICs

期分别检测TF细胞命运获得的起始以及端丝结构 (terminal filament, TF)的建成。结果显示, 与对照组 (*tj-Gal4>UAS-LUC*)类似, 实验组(*tj-Gal4>UAS-miR-33*或*tj-Gal4>UAS-miR-278*)性腺在ML3期叠垛状TF开始形成(图2A和图2C), 表明过表达miR-33或miR-278不影响TF细胞命运获得的起始; 与此相反, 从分

化的TF细胞到TF结构的形成这一形态发生过程在实验组出现异常。在LL3期对照组性腺中, 免疫荧光染色可辨认出呈叠垛状的TF结构, 每个性腺组织含约18~20垛TF, 每垛TF由8~10个TF细胞构成(图2D); 不同于对照组, 实验组性腺不能形成清晰的叠垛状TF结构(图2E和图2F黄色箭头), 同时可见部分TF细

表4 过表达miR-33或miR-278对ICs细胞数量的影响
Table 4 Effect of miR-33 or miR-278 overexpression on the number of ICs

基因型 Genotype	ICs细胞平均数目 Average number of ICs	P值 P value
<i>tj>LUC</i>	332.3 (n=12)	
<i>tj>miR-33</i>	324.3 (n=14)	0.15
<i>tj>miR-278</i>	340.7 (n=13)	0.20

n: 检测样本数。

n: No. of gonads examined.

胞游离于TF结构之外(图2F白色箭头)(*tj-Gal4>UAS-miR-33*, 41.7%, $n=12$, $P<0.05$; *tj-Gal4>UAS-miR-278*, 38.5%, $n=13$, $P<0.05$)。上述表型提示, 过表达miR-33或miR-278可细胞自主性地(cell-autonomously)干扰TF的形态发生。

同时, 本文还使用TJ(traffic jam)抗体免疫荧光染色检测了性腺中ICs的数目及其分布状况。在野生型雌蝇LL3期性腺中, 一定数量的ICs混合分布在PGCs细胞群体中, 从而参与调控PGCs的细胞命运与行为。本研究结果显示, 类似于对照组, 实验组性腺中的ICs与PGCs混合分布; ICs数目在两组间也无显著差异(图3A~图3C)(表4)。我们据此认为, miR-33或miR-278过表达不影响ICs的形态发生。

本文在筛查分析发育组织中miRNA表达谱的基础上, 应用Gal4/UAS二元表达系统对部分候选miRNA分子进行了功能验证。我们发现了miR-33和miR-278在果蝇幼虫性腺发育中作用于PGCs细胞命运调控的实验证据; 进一步研究表明, 过表达miR-33或miR-278仅干扰性腺体细胞谱系中TF细胞的形态发生, 而不影响IC的发育。已知TF和IC细胞作为PGC微环境的不同组分, 通过不同信号路径(如BMP、EGFR等)及特定的分子机制来调控PGCs的命运与行为^[3,6-7]。因此, 上述研究结果提示, miR-33和miR-278在性腺PGCs命运调控中的作用模式具有典型的时空特征。进一步研究将结合基因功能失活(loss of function)分析及相关果蝇遗传操作技术, 确定miR-33和miR-278在幼虫性腺发育中的功能时段(functioning window), 并从靶基因层面揭示其调控PGCs细胞命运的机制, 进而实现miRNAs与信号通路(BMP、EGFR等)及系统性全身因子(蜕皮激素、胰岛素信号等)在特定发育过程调控中的功能关联。

参考文献 (References)

- Asaoka M, Lin H. Germline stem cells in the *Drosophila* ovary descend from pole cells in the anterior region of the embryonic gonad. *Development* 2004; 131(20): 5079-89.
- Jaglarz MK, Howard KR. The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development* 1995; 121(11): 3495-503.
- Gilboa L, Lehmann R. Soma-germline interactions coordinate homeostasis and growth in the *Drosophila* gonad. *Nature* 2006; 443(7107): 97-100.
- Gancz D, Lengil T, Gilboa L. Coordinated regulation of niche and stem cell precursors by hormonal signaling. *PLoS Biol* 2011; 9(11): e1001202.
- Gancz D, Gilboa L. Insulin and Target of rapamycin signaling orchestrate the development of ovarian niche-stem cell units in *Drosophila*. *Development* 2013; 140(20): 4145-54.
- Gilboa L, Lehmann R. Repression of primordial germ cell differentiation parallels germ line stem cell maintenance. *Curr Biol* 2004; 14(11): 981-6.
- Matsuoka S, Hiromi Y, Asaoka M. Egrf signaling controls the size of the stem cell precursor pool in the *Drosophila* ovary. *Mech Dev* 2013; 130(4/5): 241-53.
- Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 2002; 30(4): 363-4.
- Ge W, Deng Q, Guo T, Hong X, Kugler JM, Yang X, *et al.* Regulation of pattern formation and gene amplification during *Drosophila* oogenesis by the miR-318 microRNA. *Genetics* 2015; 200(1): 255-65.
- 赵 琨, 李梦婕, 辛天池, 宣 涛, 李明发. 果蝇卵巢滤泡细胞谱系发育中的功能性microRNA筛查. 中国细胞生物学学报 (Zhao Kun, Li Mengjie, Xin Tianchi, Xuan Tao, Li Mingfa. A screening for functional microRNA in the development of *Drosophila* ovarian follicle cell lineage. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(5): 697-702.
- Iovino N, Pane A, Gaul U. miR-184 has multiple roles in *Drosophila* female germline development. *Dev Cell* 2009; 17(1): 123-33.
- Yuva-Aydemir Y, Xu XL, Aydemir O, Gascon E, Sayin S, Zhou W, *et al.* Downregulation of the host gene *jigr1* by miR-92 is essential for neuroblast self-renewal in *Drosophila*. *PLoS Genet* 2015; 11(5): e1005264.
- Foronda D, Weng R, Verma P, Chen YW, Cohen SM. Coordination of insulin and Notch pathway activities by microRNA miR-305 mediates adaptive homeostasis in the intestinal stem cells of the *Drosophila* gut. *Genes Dev* 2014; 28(21): 2421-31.
- Yang Y, Xu S, Xia L, Wang J, Wen S, Jin P, *et al.* The bantam microRNA is associated with *Drosophila* fragile X mental retardation protein and regulates the fate of germline stem cells. *PLoS Genet* 2009; 5(4): e1000444.
- Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 1993; 118(2): 401-15.
- Hayashi S, Ito K, Sado Y, Taniguchi M, Akimoto A, Takeuchi H, *et al.* GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis* 2002; 34(1/2): 58-61.