

Bmal1 对小鼠胚胎期皮层神经元放射状迁移和轴突投射的影响

李芳¹, 黄青芸², 刘斯佳^{1,2,3,4}, 郭忠信^{1,2,3,4}, 熊欣欣¹, 桂林², 束会娟¹,
黄绍明^{1,4}, 谭国鹤^{1,2,3,4}, 刘媛媛^{1,2,3,4}

1. 广西医科大学基础医学院, 南宁 530021

2. 广西生物医药协同创新中心, 广西再生医学重点实验室, 南宁 530021

3. 广西医科大学转化医学研究中心, 长寿与老年相关疾病教育部重点实验室, 南宁 530021

4. 广西特色新型智库—中国—东盟脑科学创新发展研究中心, 南宁 530021

摘要: 大脑皮层的发育是脑结构形成与功能建立的重要基础, 在此过程中, 皮层神经元放射状迁移及胼胝体区的轴突投射是必不可少的关键环节, 该环节受基因转录的调控, 但相关的分子机制目前仍不明确。转录因子 BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein1) 是体内重要的生物钟节律因子之一, 最新研究发现其还参与调节海马神经祖细胞增殖, 提示其与神经发育存在潜在的相关性。为明确 *Bmal1* 基因在大脑皮层发育中的具体作用, 本研究首先通过 RT-PCR 和 Real-time PCR 检测 *Bmal1* 基因在神经系统中的表达情况。结果表明, *Bmal1* 基因在神经系统中表达丰富, 并且在发育期的大脑内呈现特定的表达规律: 在胚胎后期和出生后早期脑内表达水平相对较高, 以出生后第 3 d 为高峰。进一步通过联合使用小鼠子宫内胚胎电转和 RNAi 干扰方法敲减脑内神经元中 *Bmal1* 的表达水平, 结果发现胚胎期皮层神经元的放射状迁移发生了延迟, 延迟程度与 RNAi 的敲减效率呈正相关, 存在一定的基因剂量-效应关系。进一步观察发现, 在胚胎期脑内神经元中降低 *Bmal1* 表达水平以后, 胼胝体轴突向对侧大脑半球的投射也出现了明显的缺陷。上述研究结果表明, BMAL1 是大脑皮层神经元的放射状迁移以及轴突投射发育过程中的一个重要的调控分子, 为从转录因子角度深入理解大脑皮层发育的分子调节机制和寻找调控靶点提供了新的线索。

关键词: 大脑皮层发育; *Bmal1*; 神经元迁移; 轴突投射; 子宫内胚胎电转

收稿日期: 2019-05-05; 修回日期: 2019-05-28

基金项目: 广西研究生教育创新计划项目(编号: YCSW2018115, YCSW2017113, YCSW2019102, JGY2017039), 广西“新世纪十百千人才工程”项目(2015) (编号: 201501), 广西杰出青年基金项目(编号: 2015GXNSFGA139005)和广西科技基地与人才专项(编号: 桂科 AD17195079)资助[Supported by the Innovation Project of Guangxi Graduate Education (Nos. YCSW2018115, YCSW2017113, YCSW2019102, JGY2017039), the New Century Ten, Hundred, and Thousand Talent Project of Guangxi Province (No. 201501), the Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Guangxi Province (No. 2015GXNSFGA139005) and the Special Project for Platforms and Talents of Science and Technology Foundation of Guangxi Province (No. AD17195079)]

作者简介: 李芳, 硕士研究生, 专业方向: 人体解剖与组织胚胎学。E-mail: 1689795367@qq.com

通讯作者: 刘媛媛, 博士, 副教授, 研究方向: 干细胞与神经发育再生。E-mail: 382890945@qq.com

谭国鹤, 博士, 教授, 研究方向: 脑疾病和神经发育的分子细胞机制。E-mail: tanguohe@gxmu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.19-123

网络出版时间: 2019/6/6 11:30:39

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190606.1130.002.html>

The role of *Bmal1* in neuronal radial migration and axonal projection of the embryonic mouse cerebral cortex

Fang Li¹, Qingyun Huang², Sijia Liu^{1,2,3,4}, Zhongxin Guo^{1,2,3,4}, Xinxin Xiong¹, Lin Gui², Huijuan Shu¹, Shaoming Huang^{1,4}, Guohe Tan^{1,2,3,4}, Yuanyuan Liu^{1,2,3,4}

1. School of Preclinical Medicine of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Guangxi Collaborative Innovation Center for Biomedicine and Guangxi Key Laboratory of Regenerative Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. Key Laboratory of Longevity and Aging-related Diseases of Chinese Ministry of Education, Center for Translational Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

4. China-ASEAN Research Center for Innovation and Development in Brain Science, Nanning 530021, China

Abstract: Normal development of the cerebral cortex is a basis for the formation and function of mammalian brains. During this process, the radial migration of cortical neurons, as well as the axon projection into specific layers, are the most important steps regulated by some transcription factors, but the underlying molecular mechanisms are still obscure. BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein 1) is a newly identified transcription factor that plays important roles in the circadian rhythms. It was recently found to regulate the proliferation of hippocampal neuronal progenitor/precursor cells (NPCs), implicating *Bmal1* in the brain development. Here we employed both RT-PCR and real-time PCR to explore the expression pattern of the *Bmal1* gene in the developing brain. We found BMAL1 is enriched in the brain cortex during the perinatal stages and peaked in P3 mouse brains. Combined with in utero electroporation and interference with RNAi, we found that reducing the expression level of *Bmal1* in neurons, the radial migration of embryonic cortical neurons was largely delayed, in a gene dose-effect pattern. Moreover, reducing the level of *Bmal1* expression in mouse brains, the axonal projection in the corpus callosum was also disrupted from ipsilateral to the lateral cerebral hemisphere. These findings indicate that BMAL1 is essential for the radial migration of neurons in the cerebral cortex and the axonal projection of the corpus callosum, providing insights into the molecular mechanisms of cerebral cortex development.

Keywords: cortical development; *Bmal1*; neuronal migration; axon projection; in utero electroporation

哺乳动物生物钟基因 *Bmal1* 编码蛋白 BMAL1 含有 bHLH (basic helix-loop-helix)-PAS (PER-ARNT-SIM) 结构域, 该蛋白是生物钟转录、翻译反馈环中的核心部分, 也是哺乳动物昼夜节律起搏点不可缺少的组件^[1]。CLOCK 是 BMAL1 的一个重要分子伴侣, 也具有类似的 bHLH 和 PAS 结构域^[2]。BMAL1 与 CLOCK 结合成异源二聚体, 激活 3 种周期基因 (*Per1*、*Per 2* 和 *Per 3*) 和 2 种隐花色素基因 (*Cry1* 和 *Cry2*) 的表达, PER 和 CRY 蛋白形成分子复合体后进入细胞核, 进而抑制 BMAL1/CLOCK 异源二聚体的活性, 构成了反馈性的负向环路^[3,4]。在生物钟调节过程中, BMAL1 是核心的转录因子, 该基因敲

除小鼠 (*Bmal1*^{-/-}) 会丧失昼夜节律。有研究表明, BMAL1 还与许多脑内损伤现象有关。例如, 新生大鼠的松果体中 BMAL1 蛋白在缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 48 h 后表达会显著升高^[5]; *Bmal1* 缺乏会影响大脑的氧化还原稳态, 与神经变性的症状产生以及学习记忆功能衰退有关^[6,7]; 临床上帕金森病患者外周血中 *Bmal1* 和 *Bmal2* 基因的相对表达水平明显降低^[4]; 最新研究还发现, 在 5 周龄小鼠中敲除 *Bmal1* 后, 小鼠脑内海马区的神经祖细胞增殖能力增强, 这可能是由于细胞周期失调所引起的^[8]; 在成年 (10~15 周龄) 小鼠中敲除 *Bmal1* 基因, 海马神经祖细胞池也显著减少,

并且神经祖细胞向神经胶质细胞谱系的转移分化增多^[9]。这些研究结果说明, *Bmal1* 对神经祖细胞的有丝分裂活性有一定的促进作用, 在早期神经元形成中可能起着重要的调节作用^[9,10]。因此, *Bmal1* 可能会在神经发育过程中发挥一定的潜在作用。本研究以小鼠大脑皮层发育为研究模型, 深入探索 *Bmal1* 基因在胚胎发育期神经元放射状迁移和轴突投射中的具体作用, 以期增进人们对大脑皮层发育分子调节机制的新认识。

1 材料与方法

1.1 小鼠饲养

C57BL/6 小鼠和 ICR 小鼠均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 在广西医科大学实验动物中心 SPF 级屏障系统内繁育。

用于实验的母鼠以见阴栓的当天记为胚胎 0.5 d 即 E0.5, 根据实验需求统计不同天数用于后续实验。新生小鼠的年龄按照出生当天记为 P0, 1 月龄小鼠记为 1 M, 小鼠的饲养标准为每笼 5 只, 遵循 12 h 光照与 12 h 黑暗循环, 自由饮食, 室温 25 ± 1 。所有涉及动物的实验均在广西医科大学实验动物中心动物管理和使用委员会许可下进行, 并遵循广西医科大学实验动物中心的相关伦理学规则。

1.2 质粒构建

本研究所使用的 *Bmal1* 敲减质粒和携带 EGFP

的 *Bmal1* 全长质粒均由上海泰儿图生物科技有限公司合成。含 *Bmal1* 全长基因序列的质粒构建: 首先在 GenBank 中查询小鼠 *Bmal1* 全长基因(GenBank 登录号: NM_001243048.1)序列, 直接合成该基因。进一步通过重叠 PCR 扩增将 *Bmal1* 基因序列与 P2A-EGFP 片段连接, 经 *NheI* 和 *XhoI* 内切酶酶切后将该片段连入 pcDNA3.1(+) 载体。*Bmal1* 敲减质粒构建: 针对小鼠 *Bmal1* 的靶向干扰序列构建短发夹环 RNA (shRNA), 然后克隆到 pSUPER-basic 载体, 将无意序列构建的质粒(*Bmal1*-shRNA-Scr)作为阴性对照。质粒构建所用引物见表 1。

针对小鼠 *Bmal1* 的靶向干扰序列信息如下:

Bmal1-shRNA-1#: 5'-GGAAGGATCAAGAATGCAA-3';

Bmal1-shRNA-2#: 5'-GCAACAGGCCTTCAGTAAA-3';

Bmal1-shRNA-3#: 5'-GCGGAGGAAATCATGGAAA-3';

Bmal1-shRNA-scr : 5'-CGCTGAGTACTTTCGAATGTC-3'。

1.3 细胞培养与转染

使用含 10% 胎牛血清(FBS)的细胞培养基 DMEM (Dulbecco modified eagle's medium) 培养 HEK293 细胞(由中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所提供), 并使用 Lipofectamin 3000 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国)进行细胞脂质体转染。以 12 孔细胞培养盘中的单个孔为例, 具体

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5'→3')	用途
<i>Bmal1</i> -shRNA-1#	F: GATCCCCGGAAGGATCAAGAATGCAATTCAAGAGATTGCATTCTTGATCCTTCCTTTT	质粒构建
	R: AGCTTAAAAAGGAAGGATCAAGAATGCAATCTCTTGAATTGCATTCTTGATCCTTCGGG	
<i>Bmal1</i> -shRNA-2#	F: GATCCCCGCAACAGGCCTTCAGTAAATTCAGAGATTTACTGAAGGCCTGTTGCTTTT	质粒构建
	R: AGCTTAAAAAGCAACAGGCCTTCAGTAAATCTCTTGAATTTACTGAAGGCCTGTTGCGGG	
<i>Bmal1</i> -shRNA-3#	F: GATCCCCGCGGAGGAAATCATGGAAATTCAGAGATTTCCATGATTTCTCCGCTTTT	质粒构建
	R: AGCTTAAAAAGCGGAGGAAATCATGGAAATCTCTTGAATTTCCATGATTTCTCCGCGGG	
<i>Bmal1</i> 引物	F: GTGCCACCAACCCATACA	RT-PCR 扩增
	R: TCCCTCGGTCACATCCTAC	
<i>Gapdh</i> 引物	F: CCCCAATGTATCCGTTGTG	RT-PCR 扩增
	R: CTCAGTGT AGCCAGGATGC	

步骤如下:在A管中加入50 μ L Opti-MEM (OMEM), 混入0.5 μ g 携带EGFP的*Bmal1*全长质粒和0.5 μ g *Bmal1* shRNA质粒以及2 μ L P3000,在B管中加入50 μ L OMEM,混入1.5 μ L 脂质体(Lipo3000),静置5 min,将A、B两管的溶液混合,室温静置15 min,将培养细胞的12孔培养盘从培养箱中取出,直接滴入混匀后的AB液,于37 $^{\circ}$ C培养箱继续培养;24 h后用显微镜进行细胞图像采集,然后收集细胞提取细胞总蛋白。

1.4 Western blot

HEK293细胞脂质体转染24 h后收集细胞总蛋白,利用Western blot验证*Bmal1* RNAi的敲减效率。首先将细胞置于冰上,弃去培养液,PBS快速漂洗两次,加入200 μ L的2 \times 蛋白上样缓冲液裂解30 min,收集于1.5 mL EP管中,95 $^{\circ}$ C变性15 min。取20 μ L样品用10%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Bio-Rad)分离等效变性样品,并在PVDF膜(Millipore)上进行印迹。室温封闭1 h,进行一抗(Rabbit anti-GFP antibody,1:2000,美国Sigma公司;GAPDH Antibody (V-18) HRP,1:20000,美国Santa Cruz Biotechnology公司;)和二抗(HRP-conjugated goat anti-rabbit antibodies,1:50000,美国Santa Cruz Biotechnology公司)孵育,ECL反应液显影,全自动成像系统扫描成像。

1.5 RNA提取、RT-PCR和Real-time PCR

收集不同发育期C57 BL/6小鼠的皮层脑组织(E12、E14、E16、E18、P0、P3、P7、P14、1M和2M)和P7时C57 BL/6小鼠的各脏器组织(大脑、小脑、脊髓、心、肝、肺、肾、胃、皮肤、肌肉、大肠和小肠),称量后立即加入Trizol,冰浴5 min后匀浆,加入氯仿震荡15 s,冰上静置10 min,4 $^{\circ}$ C离心15 min。取上清,加入等体积的异丙醇,混匀,冰浴10 min,再次4 $^{\circ}$ C离心15 min。离心后弃上清,75%酒精漂洗沉淀2次,室温下晾干,以30~50 μ L DEPC水溶解RNA,测定浓度,-80 $^{\circ}$ C保存。

以提取的RNA为模板,利用M-MLV反转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司,美国)反转录成cDNA。通过RT-PCR扩增,检测*Bmal1*在小鼠不同发育期的皮层脑组织中的表达情况和*Bmal1*在

P7小鼠各组织器官中的表达情况。扩增引物由桑尼公司(上海)合成,引物序列信息见表1。

以*Gapdh*作为内参基因,经2%琼脂糖凝胶电泳,Tanon-2500凝胶成像系统进行图像采集和分析。

根据SYBR Green I Premix Ex Taq试剂盒(TaKaRa公司,日本)说明书对上述反转录合成的cDNA通过Real-time PCR扩增,检测*Bmal1*在小鼠不同发育期的皮层脑组织中的表达情况。PCR扩增后,进行溶解曲线分析,以判断是否存在非特异性扩增和引物二聚体。PCR扩增结果以2M为对照组进行标准化,使用Prism 6.0软件进行作图分析。

1.6 胚胎电转

小鼠子宫内胚胎电转实验参考文献^[11]并有所修改。实验所用孕鼠为怀孕14.5 d (E14.5)的ICR孕鼠,质粒为CAG-GFP质粒(0.5 μ g/ μ L,由中国科学院神经科学研究所提供)和*Bmal1* shRNA质粒(1.5 μ g/ μ L)。用于标记的0.1%固绿FCF购自美国Sigma公司、ECM830胚胎电转仪购自美国BTX公司。程序为50 ms、30 V电脉冲,5次,间隔1 s。手术过程中不断使用预热的0.85%无菌生理盐水润洗胚胎和手术切口,以保证胚胎始终湿润。电转完成后,将胚胎重新放回母鼠腹腔内,缝合手术切口。术后孕鼠应注意保暖。为了降低致死率及流产率,整个过程须在40 min内完成。

1.7 免疫荧光染色

分别取E18.5和P3时电转后的小鼠脑组织,浸泡在4%多聚甲醛中固定过夜。在恒冷式冰冻切片机上进行连续冠状冰冻切片,厚度为50 μ m,在0.2% Triton X-100的封闭液中室温孵育1 h。分别用一抗(Rabbit anti-GFP antibody,1:2000,美国Sigma公司;)和二抗(Alexa Fluor[®]488 donkey anti-Rabbit IgG (H+L),1:2000,美国Life Technologies公司)进行孵育,用Hoechst 33342(终浓度2 μ g/mL,上海碧云天生物公司)标记细胞核,室温孵育10 min,PBS漂洗3遍(每次10 min),贴片,90%甘油进行封片,使用Thermo Fisher EVOS FL AUTO 2荧光显微镜下观察拍照。

1.8 图像采集与统计分析

经过脂转的 HEK293 细胞与脑片免疫荧光染色结果利用显微镜成像,使用单张扫描法采集图像数据。皮层神经元胞体数量以及胼胝体的轴突长度用 ImageJ 软件进行分析。收集的数据用 Prism 6.0 软件制图,以 SPSS 20.0 软件进行分析。所有统计分析都遵循随机双盲原则。数据以均数(Mean)±标准误(SEM)表示,各组间平均值差异程度用 t 检验(Student's t test)或者 One-way ANOVA 进行检验分析, $*P<0.05$ 表示有统计学差异, $**P<0.01$ 表示统计学差异显著, $***P<0.001$ 表示统计学差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *Bmal1* 在小鼠大脑皮层发育过程中高表达

为研究 *Bmal1* 在大脑皮层发育过程中的潜在作用,本研究首先利用 RT-PCR 扩增 P7 小鼠各组织器官 *Bmal1* 基因,分析 *Bmal1* 在 P7 小鼠各组织器官中的表达情况。结果显示, *Bmal1* 在大脑、小脑、脊髓、心脏、肝脏、肺、肾、胃、皮肤、肌肉、大肠和小肠中均有不同程度的表达,其中在大脑中的表达量相对较高(图 1A)。进一步通过 RT-PCR 扩增不同发育阶段小鼠(E12、E14、E16、E18、P0、P3、P7、P14、1M 和 2M)脑组织 *Bmal1* 基因,分析该基因在脑内的表达规律。结果发现, *Bmal1* 在 E12 已

有表达,在 P3 时期表达水平达到高峰, P14 后 *Bmal1* 基因表达明显降低,在成年期表达相对稳定(图 1B)。本研究进一步通过 Real-time PCR 方法检测了 *Bmal1* 在小鼠不同发育期的皮层脑组织中的表达情况,分析结果与 RT-PCR 结果一致(图 1C)。

以上结果说明 *Bmal1* 在发育早期脑内呈现一过性高表达,提示 *Bmal1* 在脑内的功能可能存在发育相关性,并在脑发育的特定阶段中发挥潜在作用。

2.2 *Bmal1* shRNAs 质粒的敲减效率

为进一步探究 *Bmal1* 在发育期脑内的具体作用,本研究采用 *Bmal1* 的短发夹环 RNA (shRNA)敲减 *Bmal1* 基因,并利用 HEK293 细胞脂质体转染验证 3 条 *Bmal1* shRNA 质粒的敲减效率。Western blot 结果显示, *Bmal1*-shRNA-1#和 *Bmal1*-shRNA-2#质粒的敲减效率明显,而 *Bmal1*-shRNA-3#质粒敲减效果不明显(图 2A)。与对照组相比, *Bmal1*-shRNA-1#和 *Bmal1*-shRNA-2#敲减组 GFP 荧光强度明显降低(图 2B),而 *Bmal1*-shRNA-3#敲减组荧光亮度无明显差异,这些结果表明本研究所构建的 *Bmal1*-shRNA-1#和 *Bmal1*-shRNA-2#干扰质粒能够有效地降低细胞内 *Bmal1* 基因的表达。

2.3 降低 *Bmal1* 基因表达延缓了胚胎发育期皮层神经元的放射状迁移

为在胚胎期快速有效地干预 *Bmal1* 基因的表

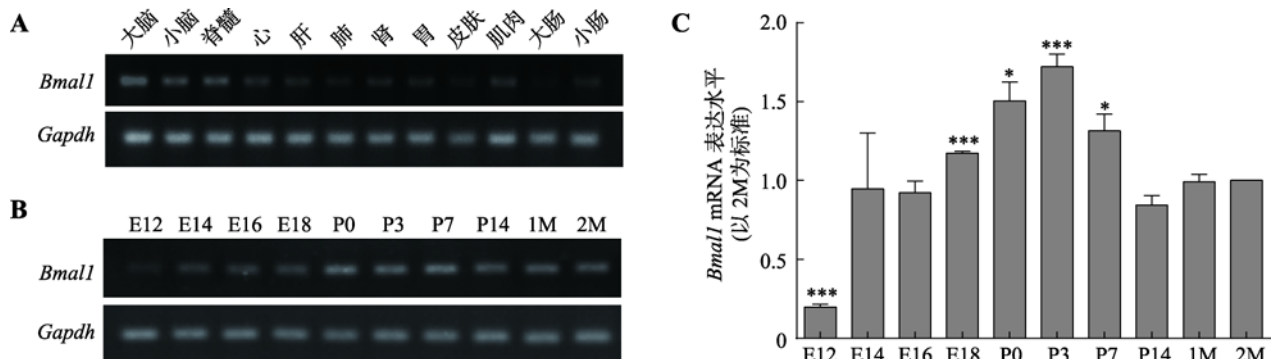


图 1 发育期小鼠脑内 *Bmal1* 基因表达情况

Fig. 1 Expression of *Bmal1* in the developing mouse brain

A: RT-PCR 检测 *Bmal1* mRNA 在 P7 小鼠各组织器官中的表达; B: RT-PCR 检测 *Bmal1* mRNA 在不同发育阶段小鼠脑组织中的表达; C: Real-time PCR 检测 *Bmal1* mRNA 在不同发育阶段的表达水平。数据以平均值±S.E.M 表示, $n=3$; $*P<0.05$ 表示与对照组 2M 相比有统计学差异, $***P<0.001$ 表示与对照组 2M 相比统计学差异极显著。

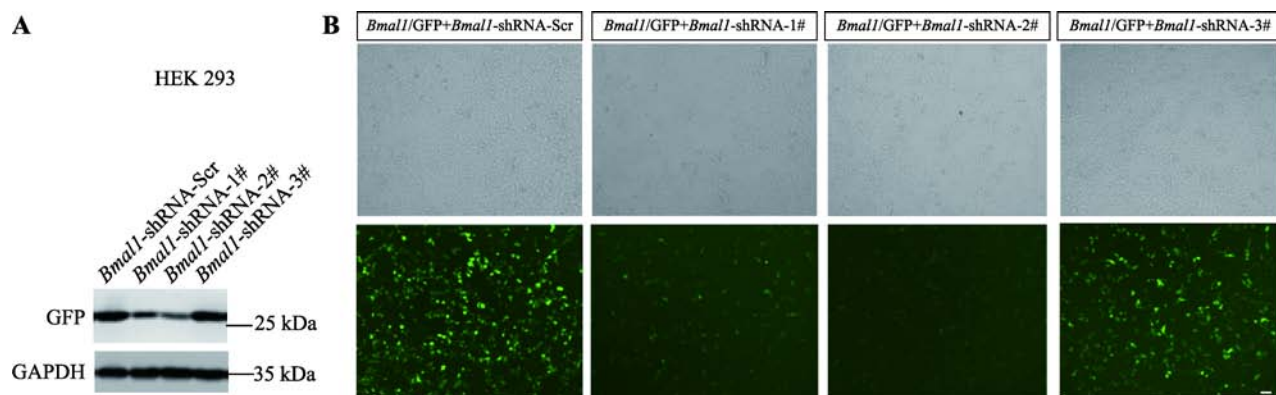


图2 *Bmal1* shRNAs 质粒敲减效率

Fig. 2 Plasmid knockdown efficiency of *Bmal1* shRNAs

A: Western blot 方法检测 HEK293 细胞脂转后 *Bmal1* shRNA 的敲减效率; B: 通过观察荧光强度检测 HEK293 细胞脂转后 *Bmal1* shRNA 的敲减效率。标尺=55 μm 。

达, 本研究采用小鼠子宫内胚胎电转技术将 *Bmal1* 基因的各个 shRNA 干扰质粒和 GFP 蛋白质粒 (CAG-GFP 质粒) 共同注射到 E14.5 胎鼠的侧脑室, 皮层电转位置如图 3A 所示。在直流电场作用下, 这些质粒 DNA 转入胎鼠大脑皮层的室管膜周围细胞, 通过观察表达 GFP 荧光的神经元位置及数量来评估 *Bmal1* 基因的表达变化对神经元放射状迁移的具体影响。结果显示, E18.5 时对照组小鼠(电转 *Bmal1*-shRNA-Scr)的大脑皮层内, 皮质板区(CP)有大量表达 GFP 的细胞, 说明神经元可以顺利迁移(图 3, B 和 C); *Bmal1*-shRNA-1# 质粒与 GFP 质粒共转, 结果显示小鼠脑内表达 GFP 荧光的细胞主要集中于大脑皮层的中间区(IZ)和脑室及脑室下区(VZ/SVZ), 而在 CP 区只有少量神经元迁移到位(图 3, B 和 C), 说明神经元迁移发生障碍; 当转入 *Bmal1*-shRNA-2# 质粒时, 仍有大部分神经元停留在 IZ 和 VZ/SVZ 区; 而转入 *Bmal1*-shRNA-3# 质粒对 *Bmal1* 进行干扰后, 表达 GFP 荧光的细胞位置相比对照组没有明显差异(图 3, B 和 C)。

为明确 *Bmal1* 对神经元放射状迁移的具体影响, 本研究用 *Bmal1*-shRNA-2# 质粒与 CAG-GFP 质粒进行小鼠子宫内胚胎共电转实验, 然后对电转后 P3 时期的幼鼠进行灌注切片继续观察, 延长实验观察时间。结果显示: 在胚胎期对 *Bmal1* 进行敲减, P3 时 shRNA-Scr 组和 shRNA-2# 组的神经元大部分已迁移到 β 层(图 4A), 其中在 β 层中, shRNA-Scr

组带有 GFP 荧光的细胞数目占 97.7%, shRNA-2# 组为 88.6%, 两组相比 P 值为 0.15; 在 γ 层中, shRNA-Scr 组带有 GFP 荧光的细胞数目占 2.2%, shRNA-2# 组为 11.1%, 两组相比 P 值为 0.16; 在 VZ/SVZ 中, shRNA-Scr 组带有 GFP 荧光的细胞数目占 0.18%, shRNA-2# 组为 0.31%, 两组相比 P 值为 0.7 (图 4B)。

综合以上研究结果, 在胚胎早期敲减 *Bmal1*, 造成了皮层神经元放射状迁移发生延缓。

2.4 *Bmal1* 表达下调影响了对侧大脑半球胼胝体的轴突生长

在小鼠大脑胼胝体系统的正常发育模式中, II-III 层的锥体神经元将轴突投射到中线和对侧大脑皮层, 形成胼胝体, 同样这些神经元的胼胝体投射也具有层和区域特异性^[12,13]。为研究 *Bmal1* 与小鼠大脑胼胝体轴突投射的关系, 本研究利用小鼠子宫内胚胎电转方法, 将 *Bmal1* shRNA 质粒与 CAG-GFP 质粒共同转入 E14.5 胎鼠的侧脑室, 然后在 P3 进行灌注取脑, 经冠状切片和免疫荧光染色。结果发现, *Bmal1* 敲减后胼胝体轴突向对侧投射的长度变短(图 5A), 其中 shRNA-Scr 组平均长度为 6294.76 μm , shRNA-2# 组平均长度为 3657.3 μm , 两组相比 P 值为 0.006 (图 5B)。这些数据表明, 在大脑发育过程中, *Bmal1* 对于胼胝体内轴突的生长和投射是必需的。

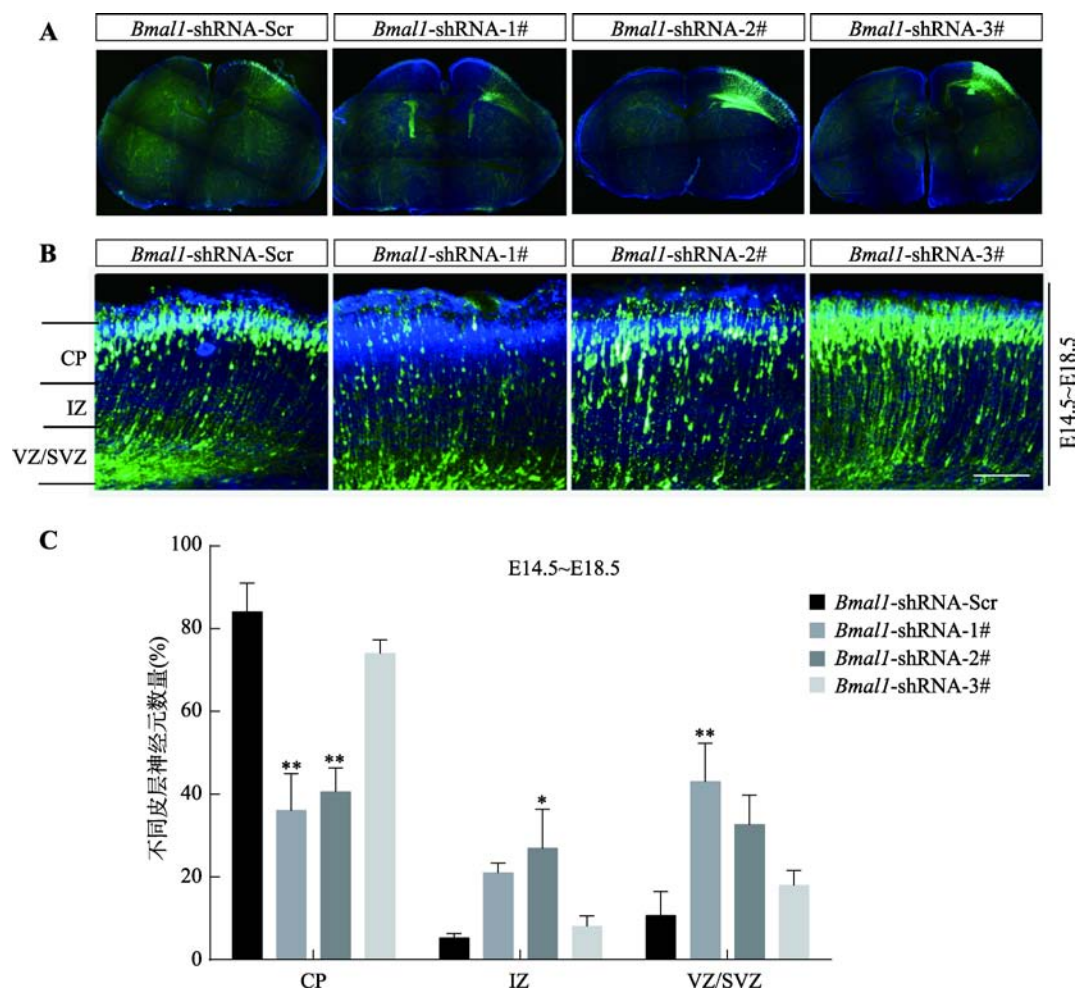


图 3 *Bmal1* 基因表达下调对皮层神经元放射状迁移的影响

Fig. 3 Effect of down-regulation of *Bmal1* gene expression on radial migration of cortical neurons

A: 观察子宫内胚胎电转实验具体皮层电转位置。B: 子宫内胚胎电转实验观察敲减 *Bmal1* 对 E18.5 小鼠神经元迁移的影响。切片用 Hoechst 33324(蓝色)染色, 标记相应皮层; CP: 皮质板区; IZ: 中间区; VZ: 脑室; SVZ: 脑室下区; 标尺=125 μ m。C: 每个区域中 GFP 阳性细胞所占总阳性细胞百分比统计图。结果以平均值 \pm S.E.M 表示; 每个发育阶段收集 3 只小鼠脑片; * $P<0.05$ 表示与 *Bmal1*-shRNA-Scr 组相比有统计学差异, ** $P<0.01$ 表示与 *Bmal1*-shRNA-Scr 组相比统计学差异显著。

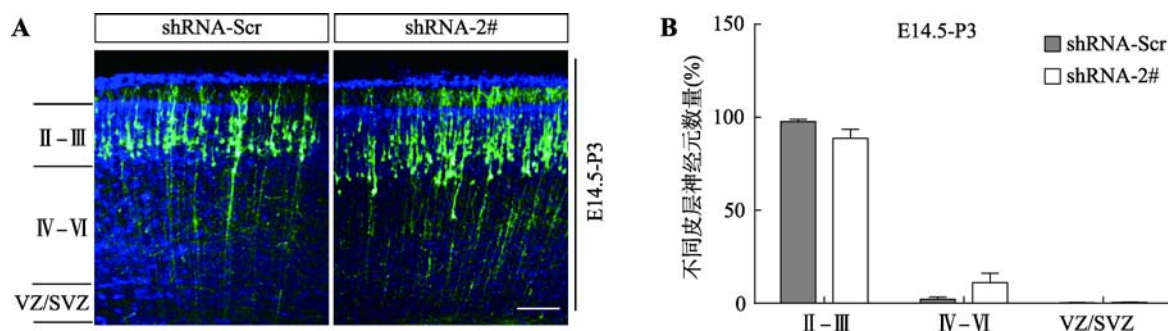


图 4 *Bmal1* 基因表达下调对 P3 期皮层神经元放射状迁移的影响

Fig. 4 Effects of down-regulation of *Bmal1* expression on radial migration of cortical neurons in the P3 stage

A: 子宫内胚胎电转实验观察敲减 *Bmal1* 对 P3 小鼠神经元迁移的影响(标尺=125 μ m); B: 每个区域中 GFP 阳性细胞所占总阳性细胞百分比的统计图。每组样本数量 $n=3$, 结果以平均值 \pm S.E.M 表示。

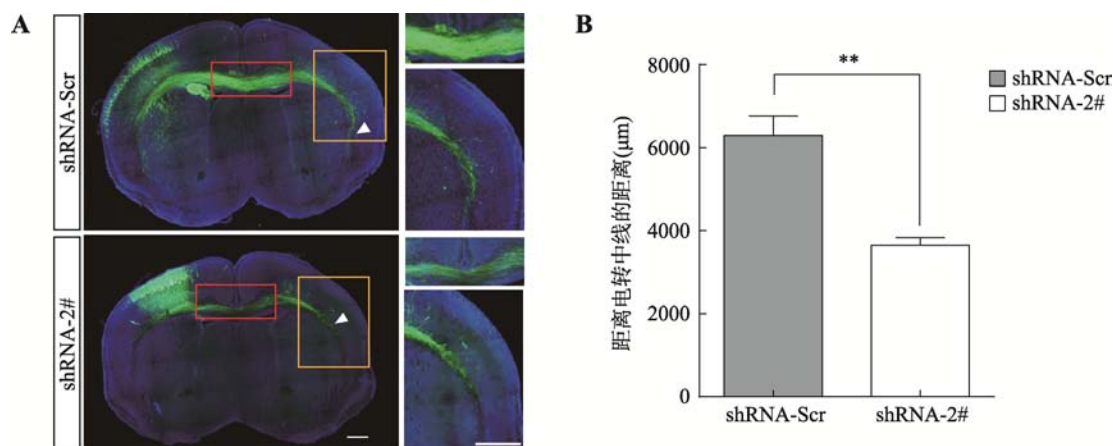


图 5 敲减 *Bmal1* 基因对胼胝体轴突投射的影响

Fig. 5 Effects of knockdown the *Bmal1* gene on axonal projection of corpus callosum

A: 子宫内胚胎电转实验观察敲减 *Bmal1* 对胼胝体轴突投射的影响。箭头表示轴突生长的末端, 右侧是左侧方框区域的放大图, 标尺=450 μm。B: 轴突末端距离电转中线的距离。数据以平均值±S.E.M 表示, ** $P < 0.01$ 表示与 shRNA-Scr 组相比统计学差异显著。

3 讨论

大脑皮层发育是脑行使高级认知功能的基础, 皮层发育异常会引起不同程度的后果, 甚至导致严重的神经系统疾病以及精神类疾病发生, 如大脑发育畸形、智力发育障碍、癫痫等^[14,15]。作为大脑发育的关键环节, 神经元放射状迁移及胼胝体轴突正常投射显得尤为重要。

BMAL1 是体内重要的生物钟节律因子之一, 最新研究发现 *Bmal1* 基因不仅在调控生物的昼夜节律中发挥一定作用, 而且还可以通过调节细胞的有丝分裂活性从而影响海马神经祖细胞增殖^[16], 这提示 *Bmal1* 基因与神经发育之间具有潜在的联系, 但是该基因在胚胎期神经系统发育过程中的作用仍不清楚。本研究发现 *Bmal1* 在发育期小鼠的各脏器组织中都有表达, 但在大脑中表达相对最为显著, 提示 *Bmal1* 在大脑发育的过程中可能起着特定的作用。在大脑皮层发育过程中, 首批皮质投射神经元在 E11.5 时开始出现, 而后迁移形成新生的皮质板区, 继而发展成出生后大脑新皮质的第 1 层^[17], 本研究发现, *Bmal1* 从 E12 开始就已经在脑内表达, 在 P3 时期的脑内达到表达高峰, 至 P7 时仍有很高的表达, 而此阶段也正是大脑皮层神经元放射状迁移以及胼胝体投射神经元轴突生长的关键时期。这提示, *Bmal1* 基因可能在大脑发育过程中皮层神经元

的放射状迁移以及胼胝体神经元轴突投射中发挥着重要的作用。

大脑皮层的发育是一个复杂且精细的过程, 在正常情况下, 这种过程受多种信号通路协同调控以及细胞骨架的动态平衡来完成^[18], 这对于后续神经环路以及神经系统功能的正常发挥起着重要作用。大量研究表明, 在细胞分裂周期或者在细胞骨架形成过程中扮演重要角色的蛋白质分子, 如参与调控细胞骨架中肌动蛋白丝状分支的 N-WASP 蛋白, 下调或者过表达 N-WASP 均会造成大脑皮层神经元迁移障碍^[19]; 与智力障碍相关的候选基因成纤维细胞生长因子 13 (FGF13) 及其受体在神经发育早期具有调节功能, 沉默 FGF13 的表达可以增加啮齿动物胼胝体神经元的轴突的分支^[20]; SOX5 (L-SOX5) 作为转录因子, 对神经元迁移、分化和深层神经元的轴突投射都有着重要作用^[21]。本研究利用小鼠子宫内胚胎电转的方法结合 *Bmal1* RNAi 技术分析小鼠大脑中 *Bmal1* 基因的表达, 发现 *Bmal1* 基因敲减的小鼠在 E18.5 时皮层大部分神经元仍位于皮层的深层 IZ 和 VZ/SVZ 区, 在 P3 时大部分迁移到了皮质的浅层。因此, 在胚胎期敲减 *Bmal1* 基因延缓了皮层神经元的放射状迁移。此外, 本研究还发现在 E14.5 时对 *Bmal1* 基因进行敲减后, 可使 P3 小鼠胼胝体投射神经元的轴突延长发生障碍。综合以上研究结果, 降低 *Bmal1* 基因在脑内的表达, 不仅会影响皮层神经

元的放射状迁移而且对胼胝体投射神经元的轴突延伸也发挥着重要的作用。本研究初步阐明了 *Bmal1* 在大脑发育过程中的调节功能, 揭示了皮层神经元发育调控的一个新分子机制, 并为今后进一步了解 *Bmal1* 在发育期脑内的生理作用以及相关脑疾病发病机制提供了新的科学依据。BMAL1 作为重要的生物钟调节因子, 既可以参与小鼠昼夜节律的调节, 又参与小鼠大脑神经发育系统的调控。在调节生物昼夜节律的负反馈环路中, BMAL1 作为转录因子与周期基因 *Per* 启动子上的 E-box 相结合, 启动 *Per* 基因转录。最新研究发现, 在胚胎期敲除 *Per* 基因也可以影响神经元的迁移^[22]。负反馈环路有多个分子参与, 那么在这一环路中的其他分子是否也参与了胚胎发育期大脑皮层神经元的发育调控? 仍有待进一步研究。因此, 寻找 BMAL1 在神经系统内发挥功能的下游底物或相互作用分子将更有利于人们了解 BMAL1 在体内的正常功能和致病机制方面的作用。

综上所述, 本研究发现 *Bmal1* 基因对胚胎期皮层神经元的放射状迁移和胼胝体投射神经元的轴突延伸是必不可少的。

参考文献(References):

- [1] Huang N, Chelliah Y, Shan Y, Taylor CA, Yoo SH, Partch C, Green CB, Zhang H, Takahashi JS. Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex. *Science*, 2012, 337(6091): 189–194. [DOI]
- [2] King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci*, 2000, 23: 713–742. [DOI]
- [3] Hosoda H, Kida S. NSP-C contributes to the upregulation of CLOCK/BMAL1-mediated transcription. *Cytotechnology*, 2019, 71(1): 453–460. [DOI]
- [4] Lin QL, Cai YN, Yuan YP, Zuo XH, Chen B. Expression of clock genes *bmal1* and *Bmal2* in total leukocytes in health and parkinson's disease. *Chin J Behav Med Brain Sci*, 2011, 20(7): 586–588.
林庆玲, 蔡彦宁, 袁艳鹏, 左晓虹, 陈彪. 帕金森病患者外周血白细胞中时钟基因 *Bmal1* 和 *Bmal2* 的表达. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011, 20(7): 586–588. [DOI]
- [5] Li YF, Jin MF, Sun B, Feng X. Changes of biological clock protein in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. *Chin J Contemp Pediatr*, 2013, 15(1): 62–66.
李永富, 金美芳, 孙斌, 冯星. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠松果体钟基因表达的变化. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(1): 62–66. [DOI]
- [6] Musiek ES, Lim MM, Yang G, Bauer AQ, Qi L, Lee Y, Roh JH, Ortiz-Gonzalez X, Dearborn JT, Culver JP, Herzog ED, Hogenesch JB, Wozniak DF, Dikranian K, Giasson BI, Weaver DR, Holtzman DM, Fitzgerald GA. Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 2013, 123(12): 5389–5400. [DOI]
- [7] Kondratova AA, Dubrovsky YV, Antoch MP, Kondratov RV. Circadian clock proteins control adaptation to novel environment and memory formation. *Aging (Albany NY)*, 2010, 2(5): 285–297. [DOI]
- [8] Bouchard-Cannon P, Mendoza-Viveros L, Yuen A, Kærn M, Cheng HY. The circadian molecular clock regulates adult hippocampal neurogenesis by controlling the timing of cell-cycle entry and exit. *Cell Rep*, 2013, 5(4): 961–973. [DOI]
- [9] Ali AAH, Schwarz-Herzke B, Stahr A, Prozorovski T, Aktas O, von Gall C. Premature aging of the hippocampal neurogenic niche in adult *Bmal1*-deficient mice. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(6): 435–449. [DOI]
- [10] Malik A, Kondratov RV, Jamasbi RJ, Geusz ME. Circadian clock genes are essential for normal adult neurogenesis, differentiation, and fate determination. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139655. [DOI]
- [11] Guo SL, Tan GH, Li S, Cheng XW, Zhou Y, Jia YF, Xiong H, Tao J, Xiong ZQ. Serum inducible kinase is a positive regulator of cortical dendrite development and is required for BDNF-promoted dendritic arborization. *Cell Research*, 2012, 22(2): 387–398. [DOI]
- [12] Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(6): 427–437. [DOI]
- [13] Wang CL, Zhang L, Zhou Y, Zhou J, Yang XJ, Duan SM, Xiong ZQ, Ding YQ. Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. *J Neurosci*, 2007, 27(42): 11334–11342. [DOI]
- [14] Marín O, Rubenstein JL. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci*, 2003, 26: 441–483. [DOI]
- [15] Ayala R, Shu T, Tsai LH. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, 2007, 128(1): 29–43. [DOI]
- [16] Ali AA, Schwarz-Herzke B, Stahr A, Prozorovski T, Aktas

- O, von Gall C. Premature aging of the hippocampal neurogenic niche in adult *Bmal1*-deficient mice. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(6): 435–449. [DOI]
- [17] Marin-Padilla M. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)*, 1978, 152(2): 109–126. [DOI]
- [18] Marín O, Valiente M, Ge X, Tsai LH. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(2): a001834. [DOI]
- [19] Shen XL, Lu YC, Jia ZL, Wu Q. N-WASP regulates cortical neuron migration through its polyPro and VCA domains. *Hereditas (Beijing)*, 2018, 40(5): 390–401. 沈秀莲, 逯宜超, 甲芝莲, 吴强. N-WASP 通过 polyPro 和 VCA 结构域调控大脑皮层神经元迁移. *遗传*, 2018, 40(5): 390–401. [DOI]
- [20] Wu QF, Yang L, Li S, Wang Q, Yuan XB, Gao X, Bao L, Zhang X. Fibroblast growth factor 13 is a microtubule-stabilizing protein regulating neuronal polarization and migration. *Cell*, 2012, 149(7): 1549–1564. [DOI]
- [21] Kwan KY, Lam MM, Krsnik Z, Kawasaki YI, Lefebvre V, Sestan N. SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(41): 16021–16026. [DOI]
- [22] Noda M, Iwamoto I, Tabata H, Yamagata T, Ito H, Nagata KI. Role of *Per3*, a circadian clock gene, in embryonic development of mouse cerebral cortex. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5874. [DOI]

(责任编辑: 王晓群)