

本科毕业论文



论文题目: 大脑皮质神经细胞调控脑血管发育的分子机制探究

- 姓 名:楊欣宜 学 号: 19307110462
- 院 系: 生命科学学院
- 专 业: 生物科学
- 指导教师: 解云礼 职 称: 研究员
- 单 位: 脑科学研究院
- 完成日期: 2023 年 5 月 16 日

大脑皮质神经细胞调控脑血管发育 的分子机制探究

完成人 楊欣宜

指导小组成员

解云礼 研究员

摘要		•••••	I
Abs	tract	•••	II
─`,	前	言	
	1.1	大脑	皮质神经发育1
	1.2	脑血	管基本结构与功能 2
		1.2.1	脑血管 2
		1.2.2	脑血管发育 3
		1.2.3	血脑屏障
	1.3	神经-	血管相互作用 4
		1.3.1	神经-血管单元 4
		1.3.2	发育脑中的神经-血管相互作用5
	1.4	脑血	管发育与脑疾病 6
	1.5	组蛋	白修饰对脑发育的调控作用6
		1.5.1	组蛋白修饰调控神经发生的机制 6
		1.5.2	组蛋白修饰调控发育脑中神经-血管互作的潜在机制7
	1.6	SETE	DB1 对大脑皮质发育的调控作用7
	1.7	本研究	充的目的和意义 8
		1.7.1	研究目的 8
		1.7.2	研究意义9
<u> </u>	材料	与方法	去
	2.1	实验	材料10

		2.1.1	实验动物1	0
		2.1.2	实验耗材1	0
	2.2	实验	试剂1	0
		2.2.1	抗体1	0
		2.2.2	化学试剂1	1
		2.2.3	引物序列1	2
		2.2.4	试剂配制1	2
	2.3	实验	仪器14	4
	2.4	应用	软件及网站1	5
	2.5	实验	方法1	6
三、	研究	究结果		1
	3.1	大脑	皮质 SETDB1 缺失导致小鼠脑血管发育异常2	1
		3.1.1	Emx1-Setdb1条件性敲除导致小鼠脑表面出血2	1
		3.1.2	Emx1-Setdb1 小鼠脑血管网络结构异常2	2
		3.1.3	Emx1-Setdb1 小鼠血脑屏障完整性受损2	3
	3.2	SETE	DB1 缺失引起脑血管缺陷是非细胞自主性的结果 24	4
	3.3	SETE	DB1 缺失导致星型胶质细胞与血管互作异常 2	5
		3.3.1	SETDB1 缺失导致血管表面星胶覆盖率增加 2	5
		3.3.2	SETDB1 缺失导致异常的星胶-血管互作并发生血管破损 2	6
四、	讨	论		8
参考	令文南	汱		0
致谢	1			3

摘要

人脑中复杂的血管网络是脑功能行使的重要基础。脑发育过程中,神经细胞与血管壁细胞相互作用,形成"神经-血管单元",促进血管生长和血脑屏障形成。 神经发育异常可能导致血管发育缺陷,引起疾病发生。脑发育依赖于一系列基因 表达的精准调控,在此过程中,表观遗传修饰具有重要作用。组蛋白甲基转移酶 SETDB1 催化组蛋白 H3K9 残基的三甲基化修饰,是大脑皮质发育的重要调控因 子。然而,表观遗传因子 SETDB1 是否参与神经细胞与血管之间的相互作用?其 对脑血管发育有何意义?这些问题尚属未知。

为探究大脑皮质神经细胞调控脑血管发育的机制,我们利用条件性敲除小鼠 模型,结合分子生物学、免疫组织学等方法,分析了 SETDB1 调控发育脑内神经 -血管相互作用的机制。Setdb1 基因特异性地在大脑皮质神经干细胞中被敲除后, 幼年小鼠脑表面出现血斑,脑血管网络结构异常,血脑屏障完整性受损。然而, 该基因并没有在血管中缺失。我们发现突变体脑血管表面的星形胶质细胞覆盖增 加;部分血管内皮发生破碎,星胶不能在此处形成环绕血管的"终足"结构,而 是异常地呈网状缠绕在血管表面,这可能是扰乱血管发育的关键因素。综上,本 文探究了 SETDB1 通过影响神经-血管相互作用调控脑血管发育的机制,为揭示 脑血管疾病发生机制提供新证据。

关键词: SETDB1, 大脑皮质, 神经血管-单元, 血管发育, 血脑屏障

L

Abstract

In the human brain, the intricate vasculature is a significant basis for brain function. During brain development, neural cells interact with vascular cells. These cells together form the "neurovascular unit" and promote angiogenesis and blood-brain barrier formation. Neurodevelopmental aberrancies can cause vascular defects, which in turn can lead to pathogenesis. Brain development is dependent on precise regulation of gene expression, during which epigenetic modifications play an important role. Histone methyltransferase SETDB1 catalyzes trimethylation of H3K9 and has been shown to be a key regulator of cortical development. However, it remains unknown whether SETDB1 participates in regulating neuro-vascular interactions, nor do we know about its significance in cerebrovascular development.

Here we use conditional knock out mouse models, combining approaches in molecular biology and immunohistology to understand the mechanism of neural regulation of vascular development in the cerebral cortex. After the histone methyltransferase gene Setdb1 was conditionally knocked out during cerebral cortical development, postnatal mice develop microbleeds on the brain surface and have deficiency in the vasculature and the blood-brain barrier. However, SETDB1 was not depleted in the blood vessels. Notably, in the mutant brain cortex, we found increased astrocyte coverage on the vessels. The vascular endothelium is partially broken, where astrocyte processes aberrantly form a net surrounding the vessel instead of forming endfoot junctions. It suggests that astrocytes might be a key factor in disrupting the vasculature in the mutant brain. Thus, we investigated the role of SETDB1 in regulating cerebral vascular development by affecting neural-vascular interactions, and provided novel evidence for revealing the pathogenesis of cerebrovascular diseases.

Key words: SETDB1, Cerebral Cortex, Neurovascular Unit, Vascular Development, Blood-brain Barrier



1.1 大脑皮质神经发育

大脑是人体内最复杂且重要的器官之一。哺乳动物在脑发育过程中产生数量 惊人的神经元和神经胶质细胞,其总量可达到近千亿个^[1]。这些细胞组成的复杂 神经元网络是大脑行使功能的重要基础。然而,在胚胎发育过程中,如此大量的 神经细胞却是由数量有限的神经干细胞分化而来的。

大脑皮质发育是有序的细胞谱系建立的过程,根据产生的细胞类型不同可先 后分为两个阶段:神经发生(neurogenesis)和胶质细胞发生(gliogenesis)^[2]。 在胚胎神经发生的初始阶段,位于端脑泡背侧的神经上皮细胞转变身份,分化为 放射状胶质细胞(radial glial cells, RGCs),这群细胞具有神经干细胞的性质,将 在发育期间产生大脑皮质中的神经元和神经胶质细胞^[3,4]。在神经发生过程中, 放射状胶质细胞通过对称分裂进行增殖,实现自我更新;通过不对称分裂可以产 生一个非干细胞性质的子代细胞,该子代细胞或直接分化为神经元,或先分化为 中间前体细胞(intermediate progenitors, IPs),再由中间前体细胞经有限次数的 增殖后分化为神经元^[5,6](图1)。

部分放射状胶质细胞并不产生神经元,而是参与胶质细胞发生,它们分化为神经胶质细胞的前体细胞,例如增殖性的星型胶质细胞(astrocytes, ACs)或少突胶质前体细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OPCs or OLPs),后两者进一步分裂产生成熟的星型胶质细胞和少突胶质细胞^[6]。在胶质细胞发生的后期,剩余的许多放射状胶质细胞直接分化成为星型胶质细胞^[5]。至此,大多数放射状胶质细胞已经完成了分化,但还有少数放射状胶质细胞在皮质神经发生的过程中始终处于静息状态。有研究认为,这群细胞将储存于室管膜下区,成为负责成年海马区域神经发生的干细胞^[6]。

1



图 1. 大脑皮质神经发育^[6]

神经干细胞的增殖与分化受到严格调控,以确保大脑在发育的特定时间、特定位置生成特定数量的神经细胞,建立起功能正常的神经元网络。如果该过程的调控出现异常,将造成脑发育缺陷,甚至导致严重的脑疾病^[4, 6]。然而,目前对脑发育机制的了解较为有限,许多参与调控的细胞和分子途径尚不清楚。神经增殖与分化的缺陷如何导致脑功能异常?除神经细胞以外,是否还有其他类型的细胞参与脑疾病发生?这些问题都有待研究。

1.2 脑血管基本结构与功能

1.2.1 脑血管

脑血管为大脑复杂的神经活动提供能量与营养支持,与此同时具有排出代谢 产物、输送内分泌信号、协调免疫等功能,对大脑维持其正常功能至关重要^[7]。

哺乳动物脑内有非常丰富的血管网络(图 2),由各级动静脉和微血管组成。 其中微血管(capillaries)约占脑血管总长度的 95%^[8],是脑组织与循环系统进行 物质、信号交流的主要场所。



图 2. 荧光标记的小鼠全脑血管网络¹⁹¹

1.2.2 脑血管发育

胚胎神经发生早期,体节衍生的成血管细胞在神经管周围组装成血管网络,称为环神经管血管丛(perineural vascular plexus, PNVP)^[10]。小鼠在胚胎期第 9-10 天形成 PNVP^[10,11]。此后,伴随着神经干细胞及其子代细胞的增殖、分化与迁移,中枢神经系统同时发生血管化(图 3)^[11]。由 PNVP 分支产生的次级血管向正在发育的脑内生长,并沿背腹轴向脑室延伸,这部分血管将发育为大脑皮质血管的主要成分。到达脑室的血管产生新的分枝环绕脑室,并掉转方向从腹侧向背侧生长。与此同时,胚胎前脑的环脑室血管丛(periventricular vascular plexus, PVVP)也产生一部分血管分枝。最终,血管分枝相互会合,建立复杂的脑血管网络^[10,11]。





神经干细胞(neural stem cells, NSC); 神经前体细胞(neural progenitor cells, NPC); 少突 胶质前体细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OLP); 少突胶质细胞(oligodendrocytes, OL)

1.2.3 血脑屏障

脑血管在发育期间形成特化的"血脑屏障"结构(blood-brain barrier, BBB) ^[7]。与外周组织的血管不同,脑血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)存在特殊 的紧密连接,跨血管壁的物质转运非常有限,转胞吞作用介导的运输也大幅度减 弱^[7, 12, 13]。这些结构使得脑血管壁对物质交换具有严格选择性,血管通透性低, 有助于为神经活动维持相对稳定的脑内环境。血脑屏障在脑血管生长的过程中建 立:内皮细胞受来自神经细胞的信号诱导,特异性表达紧密连接分子,并在周细 胞(pericytes, PCs)等其他血管壁细胞的协调下维持低水平的转胞吞作用^[13, 14]。

血脑屏障对脑组织稳态具有重要意义。脑血管发育成熟后维持其屏障特性, 但始终对神经系统及脑内环境的变化作出响应。在损伤、炎症、神经退行性疾病 等条件下,血脑屏障结构可能发生改变,从而影响脑组织环境^[15,16]。例如:脑损 伤和脑疾病可能引发脑内炎症反应,诱导脑血管壁的紧密连接开放,从而增加跨 血管壁物质运输、激活血管生长信号,导致血液中的免疫细胞浸润脑组织,进一 步推动炎症发展^[7,16]。正常的脑功能需要神经细胞与脑血管相互协调,共同维持 血脑屏障的稳定性。

1.3 神经-血管相互作用

1.3.1 神经-血管单元

值得注意的是,血管并不是独立存在于脑组织中,而是与周围的神经组织有 着密切的相互作用,形成特化的神经-血管单元(neural-vascular Unit, NVU)^[7,11]。 NVU 是脑血管的基本结构与功能单位。对于占血管主要长度的微血管而言,NVU 的主要成分包括内皮细胞组成的血管壁、基底膜,以及覆盖在血管远腔侧表面的 多种细胞——后者主要包括周细胞和星胶突起末端的终足^[7,17](图 4)。内皮细胞 通过紧密连接形成血管壁主体,并分泌胞外蛋白参与基底膜的形成。血管生长过 程中,内皮细胞分泌 PDGF-BB 信号,招募周细胞迁移至血管壁表面并形成黏附 连接,共同参与基底膜的构建。星胶在突起末端形成特化的终足结构,围绕在血 管表面,具有接受神经信号、调节血管周围微环境的作用,是神经系统与血管之 间重要的信息传递员^[7,13]。其他神经元和神经胶质细胞通过分泌因子等途径与血 管进行信号交流[12]。



图 4. 神经-血管单元的细胞组成[17]

1.3.2 发育脑中的神经-血管相互作用

脑发育初期,神经发生导致的缺氧环境诱导血管进入脑实质,并在神经分泌 因子的影响下建立特定的血管发育模式^[11]。例如:各级神经前体细胞分泌 Wnt 信 号诱导血管向脑组织内部生长^[11,18];而在胶质细胞分化时期,来自星形胶质细胞 的 VEGF 等信号进一步促使血管生长,该过程延续至出生后阶段^[14]。出生后的 神经元活动也对脑血管有重要的调节作用^[19,20]。与之相对地,血管内皮通过释放 旁分泌信号影响神经前体细胞的增殖、分化和神经元迁移^[21]。随着大脑发育成熟, 脑血管网络不断进行重塑,直到构成一个能积极调节血流、满足神经活动需求、 与神经组织相互协调的强大系统。

与此同时,神经细胞也调控着血脑屏障的发育。神经前体细胞分泌 Wnt 信 号诱导血管内皮表达 GLUT1 等转运蛋白和多种紧密连接蛋白,使生长中的血管 初步形成屏障结构^[7,13]。较晚分化的星胶是神经-血管单元的重要细胞成分。星胶 分泌的信号对血脑屏障具有双重调控作用:VEGF 等促血管生成因子对细胞连接 分子的表达具有下调作用,而 SHh、Ang 等因子促进屏障结构的强化与维持^[7,14, 17]。虽然体内的血脑屏障在胶质细胞分化之前就已经形成,但体外证据表明,星 胶本身能够诱导来自外周组织的血管内皮细胞产生血脑屏障的特性^[7]。

由此可见,在大脑神经增殖与分化的不同阶段,脑血管受神经细胞一系列信 号的诱导进行发育。这些信号的异常会导致脑血管生长缺陷或屏障功能缺失,影 响中枢神经系统功能,甚至造成严重的发育性脑疾病。然而,作为脑发育研究的 重要问题,神经-血管通讯的许多分子机制尚不清楚,有很大的探索空间。

1.4 脑血管发育与脑疾病

脑血管的正常构建为脑发育提供重要保障。另一方面,脑血管发育缺陷则与脑疾病的发生发展密切相关。多项研究表明,血管在神经发育性疾病中具有不可忽视的作用,包括自闭症谱系障碍^[22,23]、精神分裂症^[24]等困扰着大量人群的脑疾病。相关临床患者和动物模型表现出脑血管功能的多种缺陷,例如血管发生和脑血流量异常,神经-血管耦合失调,以及血脑屏障通透性增加^[16]。此外,越来越多的证据显示,脑血管功能障碍影响生命全过程中多种神经系统疾病的进程,包括神经免疫、代谢和神经退行性疾病等^[16]。虽然由于发病年龄的不同,这些疾病常常与发育性脑疾病区别讨论,但它们在脑血管的病变特征上有着惊人的相似之处。脑血管早期发育缺陷如何参与幼年及成年脑疾病的发展,是发育生物学领域值得关注的问题。

1.5 组蛋白修饰对脑发育的调控作用

1.5.1 组蛋白修饰调控神经发生的机制

脑发育需要精准调控一系列基因的时空特异性表达,即使是同一基因,在不 同类型的细胞中也呈现差异化的表达模式。这些调控发生在基因表达的各个水平。 其中,染色质水平的转录调控依赖于表观遗传修饰,主要包括 DNA 链的修饰和 组蛋白的翻译后修饰。

组蛋白修饰是对构成染色质的组蛋白进行特定氨基酸残基上的共价修饰,包括甲基化、乙酰化、磷酸化等形式^[6]。这类修饰能被表观遗传因子和转录因子识别,从而定义基因组上特定区域的染色质环境,调控基因转录。组蛋白修饰是动态变化的过程,是细胞对其内在信号和环境因子作出响应的结果。对于每种修饰类型,有特定的表观遗传因子介导它们在染色质中的书写、阅读和清除。

大量研究表明,组蛋白修饰——尤其是赖氨酸残基的甲基化和乙酰化修饰— —在脑发育中具有重要作用^[6,25]。神经前体细胞及其子代细胞利用组蛋白修饰的 可逆性将关键基因的表达限制在特定时空范围内,使细胞遵循特定轨迹进行增殖、 分化与迁移^[6]。例如第一个被鉴定的组蛋白赖氨酸去甲基化酶 LSD1,它能选择 性催化 H3K4me2 和 H3K4me1 位点的去甲基化^[26],而抑制 LSD1 活性显著降低 海马中成体神经干细胞的增殖能力^[27]。近年来的多项研究证明了组蛋白去乙酰 化酶 HDACs 对大脑神经发生的关键性调控作用^[28,29]。严格调控的组蛋白修饰控 制神经发生过程中精确的基因表达,确保脑发育正常进行;组蛋白修饰异常则会 导致神经发育缺陷,甚至造成严重的发育性脑疾病。

1.5.2 组蛋白修饰调控发育脑中神经-血管互作的潜在机制

目前许多研究关注组蛋白修饰调控神经发生的作用,并试图理解其异常导致 神经系统疾病的机制^[6,25]。然而,这些研究大多忽视了神经发育缺陷对脑环境中 其他细胞的影响,尤其是对血管的影响。越来越多的证据表明,神经发育中的组 蛋白修饰对神经-血管细胞间通讯具有潜在的调控作用。

例如,组蛋白乙酰转移酶 MOF 通过调节神经代谢维持脑血管发育平衡: MOF 在神经细胞中的缺失导致神经代谢失调,产生的游离脂肪酸诱发血管周细胞产生 促炎症反应,进而导致严重的脑血管损伤和脑发育异常^[30]。体外证据表明,星形 胶质细胞通过组蛋白修饰调节 GLUT1 等细胞膜转运蛋白的表达,从而调控细胞 代谢,对血脑屏障功能具有潜在影响^[31]。此外,神经元胞外信号分子的释放和内 吞受到严格的表观遗传调控,包括组蛋白修饰对生长因子、神经营养因子、细胞 因子和激素等分子运输的调控作用^[6],其中一些信号可能作用于血管内皮细胞^[17], 对血管生理产生影响。

神经发育相关的组蛋白修饰——以及其他表观遗传修饰——是否参与协调 神经与血管之间的相互作用?这对脑发育具有怎样的意义?目前相关机制的研 究仍较为少见,值得探索。

1.6 SETDB1 对大脑皮质发育的调控作用

组蛋白甲基化是组蛋白修饰中最为普遍且重要的形式之一。组蛋白在特定的 赖氨酸、精氨酸残基上可发生单次或多次甲基化修饰,从而改变基因组环境,调 控基因转录。例如 H3K4me3 修饰通常与活跃的转录相关^[6],H3K9me3 修饰则往 往抑制转录^[32]。哺乳动物的组蛋白甲基化修饰主要发生在赖氨酸残基上,是动态 调控的过程,赖氨酸甲基转移酶和赖氨酸去甲基化酶分别负责甲基化修饰的书写和清除^[6]。

SETDB1(SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1)是 H3K9 甲基转移酶,又名为 ESET 或 KMT1E,它与共抑制因子 KAP1 共同作用,催化 组蛋白 H3K9 位点的三甲基化修饰,抑制常染色质基因表达^[33]。虽然 SETDB1 常 被认为是全局性的表观遗传修饰因子,但近年来的研究表明,SETDB1 在特定细 胞类型和基因组环境中特异性地调控基因表达。SETDB1 介导的染色质修饰参与 多种细胞的增殖与分化,在胚胎卵裂^[34]、造血干细胞分化^[35]、肿瘤发生^[36]等干细 胞活动中有重要作用。此外,SETDB1 在成熟的大脑皮层神经元中调节基因组三 维环境,确保神经元功能相关的基因正常表达^[37]。



图 5. SETDB1 催化组蛋白 H3K9 位点的三甲基化修饰[38]

SETDB1 对大脑皮质发育具有关键性调控作用。在小鼠胚胎发育期,敲除前脑神经干细胞中的 Setdb1 基因会导致大量下游基因表达调控异常,造成严重的脑发育缺陷: IAP (intracisternal A-particle) 相关的逆转录转座上调;非神经相关的基因表达激活;早期神经发生和神经迁移紊乱,具体表现为神经前体细胞增殖能力下降、大脑皮质厚度减小,而星形胶质细胞增多^[33]。然而,作为神经发育相关的重要表观遗传因子,SETDB1 是否调控神经与血管之间的细胞间通讯? SETDB1 参与的染色质修饰如何通过神经细胞影响脑血管发育?这些问题尚有待解答。

1.7 本研究的目的和意义

1.7.1 研究目的

脑发育过程中,神经细胞动态调控血管生长和血脑屏障形成,神经发育异常可能导致严重的脑血管缺陷。神经-血管相互作用对脑功能的建立与维持至关重要。然而,相互作用的分子机制还不十分清楚。

哺乳动物脑发育受到严格的表观遗传调控。其中,组蛋白甲基化修饰是非常 重要的途径。实验室前期研究发现,组蛋白甲基转移酶 SETDB1 特异性地在脑发 育过程中被敲除后,幼年小鼠脑表面出现血斑,脑血管存在异常。然而,该因子 并没有在血管中缺失,且只在神经干细胞中进行了敲除。这表明神经干细胞及其 分化的各级子代神经细胞对脑血管发育具有重要作用。组蛋白甲基转移酶 SETDB1 是皮质神经发育的关键性调控因子。SETDB1 是否参与调控神经与血管 的细胞间通讯? SETDB1 在神经细胞中的表达对脑血管发育有何影响?目前尚 无相关研究。本课题基于上述发现,利用转基因小鼠模型,结合分子生物学、细 胞生物学、免疫组织学等方法,探究大脑皮质神经细胞调控脑血管发育的机制。

1.7.2 研究意义

脑血管病具有高发病率、高病残率、高死亡率等特点,是全球性的重大公共 卫生问题^[39]。脑血管疾病与脑组织损伤、神经退行性疾病、认知功能障碍等神经 系统病变密切相关^[16]。

神经与血管相互依存的关系促使我们从新的角度认识脑疾病。在脑发育过程 中,异常的神经细胞活动会改变它们与血管之间的通讯关系,影响脑血管网络的 建立与维持;反之,血管生长和血脑屏障的缺陷也与包括发育性脑疾病在内的神 经系统疾病密切相关。因此,神经-血管互作对脑功能至关重要。然而,目前对其 调控机制的了解却非常有限。研究神经细胞调控脑血管发育的机制,能促进对发 育脑中多系统协调关系的认识,为揭示脑血管疾病发生机制提供新的证据,为治 疗和预防发育脑中的脑血管疾病提供理论支持。

9

二、材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

表1 实验动物

动物品系	参考文献
Emx1-Cre 小鼠	[40]
Emx1-CreER ^{T2} 小鼠	[41]
Ai3 ^{f/f} 小鼠	[42]
Setdb1 ^{f/f} 小鼠	[37]
C57BL/6 野生型小鼠	N/A

2.1.2 实验耗材

实验耗材	生产厂家	国家
15/50 mL 离心管	LABSELECT	中国
1.5 mL 离心管	上海卧宏生物	中国
8 连排 PCR 管	上海生工	中国
枪头	LABSELECT	中国
10 mL 注射器	康德莱	中国
3 mL 塑料吸管	柏美特	中国
24 孔板	LABSELECT	中国
粘附载玻片	世泰	中国
盖玻片	Fisher Scientific	美国
免疫组化笔	DaidoSangyo	日本
无尘纸	KIMTECH	美国

表 2 实验耗材

2.2 实验试剂

2.2.1 抗体

表3 抗体

抗体名称	生产商	货号	稀释比
Goat anti-CD31	R&D Systems	AF3628	1/300

Goat anti-PDGFR-β	R&D Systems	AF385	1/200
Rabbit anti-GFAP	DAKO	Z0334	1/500
Rabbit anti-Laminin	Sigma-Aldrich	L9393	1/1000
Chicken anti-GFP	Abcam	Ab13970	1/2000
Donkey anti-Goat IgG	Thermo Scientific	A-11057	1/1000
Alexa Fluor 568			
Donkey anti-Rabbit IgG	Invitrogen	A21206	1/1000
Alexa Fluor 488			
Donkey anti-Chicken IgY	Jackson I.R.	703-545-155	1/1000
Alexa Fluor 488			

2.2.2 化学试剂

试剂名称	生产商	国家
20× PBS Buffer	上海生工	中国
10× Taq Master Mix	上海卧宏生物	中国
5000 bp DNA Marker	思科捷	中国
YeaRed 核酸染料	꾚圣	中国
琼脂糖	꾚圣	中国
70 kDa FITC-Dextran	Sigma-Aldrich	美国
Tamoxifen	Sigma-Aldrich	美国
葵花籽油	Sigma-Aldrich	美国
Tris-base	上海生工	中国
盐酸	国药	中国
冰乙酸	国药	中国
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	上海生工	中国
氢氧化钠	国药	中国
多聚甲醛	国药	中国
蔗糖	上海生工	中国
乙二醇	国药	中国
十二水合磷酸氢二钠	国药	中国
二水合磷酸二氢钠	国药	中国
OCT 包埋剂	Sakura Finetek USA Inc	美国
DAPI	Sigma-Aldrich	美国
驴血清	广州蕊特生物	中国

表 4 化学试剂

Triton X-100 (普通 IF)	上海生工	中国
Triton X-100 (CUBIC)	Sigma-Aldrich	美国
聚乙烯醇(MW31000)	Sigma-Aldrich	美国
三乙烯二胺	Sigma-Aldrich	美国
丙三醇	国药	中国
尿素	上海生工	中国
四乙二胺	东京化成	日本
三乙醇胺	上海生工	中国
牛血清白蛋白	生工	中国
ProClean 300 抑菌剂	碧云天	中国

2.2.3 引物序列

表5 引物序列

引物名称	序列
Setdb1 flox Forward	5'-GCAAGACCCTGCTTCCATAA-3'
Setdb1 flox Reverse	5'-ATTGCTTCCTTTCCCCATTT-3'
Ai3 Wildtype Forward	5'-CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC-3'
Ai3 Mutant Forward	5'- CCAGGCGGGCCATTTACCGTAAG-3'
Ai3 Common Reverse	5'- GAAGGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'
Cre Forward	5'- CTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG-3'
Cre Reverse	5'- GCCTTCTCTACACCTGCGGTGCTAA-3'

2.2.4 试剂配制

1) 1× 磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS)

量取 500 mL 20× PBS Buffer 和 9500 mL ddH₂O, 混合均匀后经 121℃ 高 压灭菌处理 20 min, 冷却至室温,分装使用。

2) 4%多聚甲醛溶液(Paraformaldehyde, PFA)

量取 400 mL ddH₂O 倒入烧杯,微波炉加热至 65°C,转移至有盖玻璃瓶 中。称取 40 g 多聚甲醛粉末,加入预热的 ddH₂O 中,并加入 0.9 mL 1mol/L NaOH 溶液,盖上瓶盖,65°C 水浴加热至溶解。冷却至室温后加入 500 mL ddH₂O 和 50 mL 20× PBS Buffer。用 ddH₂O 定容至 1 L,分装后冻存于-20°C。 使用时取出解冻即可。

3) 1 mol/L Tris-HCl 溶液

量取 800 mL ddH₂O 倒入烧杯,加入 Tris 121.14 g,搅拌溶解后加入浓盐 酸调节至指定 pH 值,最后用 ddH₂O 定容至 1 L。121°C 高压灭菌处理 20 min, 冷却至室温即可储存使用。

4) 1 mol/L NaOH 溶液

量取 160 mL ddH₂O 倒入烧杯,称取 8 g NaOH 加入水中,搅拌溶解后用 ddH₂O 定容至 200 mL,室温储存使用。

5) 0.5 mol/L EDTA pH8.0

量取 800 mL ddH₂O 倒入烧杯,称取 93.06 g Na₂EDTA • 2H₂O 和 10 g NaOH 加入水中,溶解混匀后用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0,定容至 500 mL。121℃ 高压灭菌处理 20 min,冷却至室温即可储存使用。

6) 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (PB)

量取 800 mL ddH₂O 倒入烧杯,称取 58.01 g Na₂HPO₄·12H₂O 和 5.93g NaH₂PO₄·2H₂O,两种试剂分批加入水中,调 pH 至 7.0-7.4,用 ddH₂O 定容 至 1 L。室温储存使用。

7) 切片冰冻保护液

量取 150 mL 0.1M PB 倒入烧杯,称取 150 g 蔗糖加入 PB 中,搅拌溶解 后用 0.1 mol/L PB 定容至 300 mL,再加入 150 mL 乙二醇,搅拌混匀,用 0.1 mol/L PB 定容至 500 mL。4°C 保存。

8) 0.5% Triton X-100 溶液

量取 50 mL PBS 倒入烧杯,加入 250 μL Triton X-100,搅拌混合均匀。

9) 封片剂

量取 12 mL ddH₂O 倒入烧杯,称取 4.8 g 聚乙烯醇(MW31000)和 12 g 丙三醇加入水中,室温搅拌至溶解。量取 24 mL 0.2 mol/L Tris-HCl (pH8.5) 倒入溶液,50°C 加热搅拌至混合均匀。冷却至室温,称取 1 g 三乙烯二胺加 入溶液,搅拌溶解。4000 rpm 室温离心 10 min,取上清分装于离心管中,4°C 保存。

10) Tris-乙酸(TAE)电泳缓冲液

50×TAE 储存液:量取 700 mL ddH₂O 倒入烧杯,称取 242 g Tris 和 18.61g Na₂EDTA • 2H₂O 加入水中,再量取 57.1 mL 冰乙酸倒入溶液中,混合均匀 后用 ddH₂O 定容至 1 L。室温储存备用。

1× TAE 工作液:量取 980 mL ddH₂O 和 20 mL 50× TAE,混合均匀后即可使用。

11)2%琼脂糖凝胶

量取适量的 1×TAE 电泳液,按每 100 mL 溶液加 2g 琼脂糖粉末的比例 加入琼脂糖,用微波炉加热溶解。按 1:20000 比例加入 YeaRed 核酸染料,混 匀后倒入制胶模板中,室温冷却至凝固。

12) Tamoxifen 溶液

称取 20 mg Tamoxifen 粉末,置于 1.5 mL 无菌离心管中,加入 1 mL 葵 花籽油。用锡箔包裹离心管,置于四维混匀仪上,室温混匀至溶解。配制后 直接使用,或短时间内 4℃ 保存。

13) CUBIC R1

量取 17.5 mL ddH₂O 倒入烧杯,称取 12.5 g 尿素和 12.5 g 四乙二胺加入 水中,室温搅拌溶解。然后称取 7.5 g Triton X-100 加入溶液中,室温搅拌溶 解后,静置 24 h 消除溶液中的气泡,室温储存并在 1 个月内使用。

14) CUBIC R2

量取 7.5 mL ddH₂O 倒入烧杯,称取 12.5 g 尿素和 25 g 蔗糖加入水中, 60°C 加热搅拌溶解。冷却至室温后称取 5 g 三乙醇胺加入溶液中,室温搅拌 溶解。静置 24 h 消除溶液中的气泡,室温储存并在 2 周内使用。

15) CUBIC IF Buffer

量取 30 mL PBS 和 8 mL 0.5% Triton X-100 溶液,混合均匀。称取 0.2 g 牛血清白蛋白加入溶液中,搅拌溶解。加入 20 μL ProClean 300 抑菌剂混合 均匀,然后用 PBS 定容至 40 mL。短时间内 4°C 储存使用。

2.3 实验仪器

仪器名称	厂家	国家
微凉移液器	Eppendorf	德国
	14	

表6 实验仪器

低温离心机	Thermo Scientific	美国
小型离心机	SCILOGEX	美国
高温蒸汽灭菌锅	松下	日本
低温冰箱	海尔	中国
制冰机	雪科	中国
电子天平	舜宇恒平仪器	中国
分析天平	赛多利斯	德国
pH 计	赛多利斯	德国
涡旋振荡器	SCILOGEX	美国
磁力搅拌器	SCILOGEX	美国
旋转混合仪	其林贝尔	中国
摇床	其林贝尔	中国
金属浴	杭州奥盛	中国
微波炉	格兰仕	中国
DNA 电泳装置	天能	中国
凝胶成像系统	天能	中国
PCR 仪	东胜	中国
正置荧光显微镜	尼康	日本
激光共聚焦显微镜	尼康	日本
解剖镜	奥林巴斯	日本
冰冻切片机	徕卡	德国
振动切片机	徕卡	德国
手术器械	瑞沃德	中国

2.4 应用软件及网站

表 7 应用软件及网站

软件名称	开发商
ImageJ	NIH
NIS Element	Nikon
Imaris	Oxford Instrument
GraphPad Prism	Graphpad
Adobe Photoshop	Adobe
Adobe Instrument	Adobe
Microsoft Excel	Microsoft

2.5 实验方法

2.5.1 小鼠基因型鉴定

取 2~3 mm 小鼠尾尖组织,加入 100 μL 裂解液 A (含 25 mmol/L NaOH 和 2 mmol/L EDTA),金属浴 95°C 孵育 30 min。样本裂解后置于冰上,快速 冷却后加入 100 μL 缓冲液 B (含 40 mmol/L Tris-HCl, pH8.0),终止裂解。 4°C 条件下 12000 rpm 离心 10min,用于后续 PCR 扩增。PCR 反应体系和程 序设置如下:

组分	体积
2× Taq Master Mix	10 µL
上游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
下游引物(10 μmol/L)	0.5 µL
组织裂解产物	1.0 µL
ddH ₂ O	补齐至 20 μL

表 8 PCR 反应体系

时间	循环数	
5 min	. 1	
30 s		
30 s	30 次	
1 min		
5 min	1	
保温	1	
	时间 5 min 30 s 30 s 1 min 5 min 保温	

表9 PCR 扩增程序

配制 2%琼脂糖凝胶。将凝胶放入盛有 1×TAE 缓冲液的电泳槽中,每个 上样孔加入 8μLPCR 产物,每排留一个上样孔加 5μLDNA Marker。电泳电 压 120V,时间 40 min。使用凝胶成像系统获取结果,如图 6 所示。



图 6. 小鼠基因型鉴定结果代表图

M 表示 DNA Marker,数字1~9表示小鼠样本编号,f/f、f/+、Cre/-分别表示相应的突变体 阳性参照,WT 表示野生型参照,H₂O 表示空白对照;1~9号小鼠基因型分别为:1号和5号(Setdb1^{f/+};Emx1-Cre/-),2号和6号(Setdb1^{f/+}),3号和4号(Setdb1^{f/f};Emx1-Cre/-),7号和8号(Ai3^{f/+}),9号(Ai3^{f/+};Emx1-CreER^{T2/-})

2.5.2 Tamoxifen 诱导 Cre 重组酶表达

根据孕鼠体重进行相应剂量的给药,每千克体重腹腔注射 100 mg Tamoxifen。Tamoxifen 溶液的配制方法见 2.2.4。

2.5.3 鼠脑切片样本制备

对出生后 7 天的乳鼠进行冰浴麻醉,打开小鼠胸腔,经心脏灌流 5 mL 预冷的 PBS 溶液,随后灌流 10 mL 预冷的 4% PFA 溶液。用眼科剪和镊子剥 离出小鼠大脑,放入 4% PFA 溶液中,置于 4°C 摇床上固定 2 h 用于冰冻切 片,或固定过夜用于振动切片。 用于冰冻切片的样本经 PFA 固定后转移至 30%蔗糖溶液中,置于 4°C 摇床上脱水过夜,随后用 OCT 包埋样本并进行冰冻切片,切片厚度 40 μm。将切片转移到盛有冰冻保护液的塑料 24 孔板中,-20°C 保存。

用于振动切片的样本经 PFA 固定后转移至 PBS 中,室温要床上洗涤 30 min。配制琼脂糖包埋剂:量取适量的 ddH₂O,按每 50 mL 溶液加 1 g 琼脂 糖粉末的比例加入琼脂糖,用微波炉加热溶解,冷却至 50°C 左右倒入模具 中。将洗涤后的脑样放入包埋剂中,待包埋剂冷却凝固后进行振动切片,切 片厚度 150 μm。将切片转移到盛有 PBS 的 5 mL 离心管中,用于组织透明化 处理。

2.5.4 免疫荧光染色

将冰冻切片从-20°C 冰冻保护液中取出,转移至 PBS 中,用毛笔将切片 平铺贴在粘附载玻片上,室温放置 60 min 晾干。用免疫组化笔在切片样本的 周围画圈,等待 1 min 晾干,然后将切片用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。将 样本平放在保湿盒中,滴加 200 μL 0.5% Triton X-100 溶液覆盖切片样本,室 温孵育 30 min。弃去 0.5% Triton X-100,滴加 200 μL 封闭液,室温孵育 30 min。弃去封闭液,滴加 200 μL 以封闭液稀释至工作比例(表 3)的一抗, 4°C 孵育过夜。次日,弃去一抗,将样本在室温下用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。再次将样本平放在保湿盒中,滴加 200 μL 以封闭液稀释至工作比例(表 3)的二抗,室温避光孵育 2 h。弃去二抗,滴加 200 μL 含有 0.5 μg/mL DAPI 的 PBS 溶液,室温避光孵育 15 min。弃去 DAPI 溶液,用 PBS 避光清洗 3 次,每次 5 min。随后晾干样本,滴加封片剂,盖上盖玻片进行封片。待封片 剂凝固后,4°C 避光保存。使用正置荧光显微镜或激光共聚焦显微镜成像, 拍摄染色结果。

2.5.5 血脑屏障通透性检验

对出生后 7 天的乳鼠进行冰浴麻醉,打开小鼠胸腔,经心脏灌流 5 mL 含 0.1% FITC-dextran (70 kDa)的 PBS 溶液,循环 5 min 后断颈处死小鼠。 用眼科剪和镊子剥离出小鼠大脑,放入 4% PFA 溶液中,避光置于 4℃ 摇床 上固定 24 h,转移至 30%蔗糖溶液中,避光置于 4°C 摇床上脱水过夜。随后 用 OCT 包埋样本并进行冰冻切片,切片厚度 40 μm。将切片转移至 PBS 中, 用毛笔将切片平铺贴在粘附载玻片上,室温避光放置 30~60 min,晾干后封 片,使用正置荧光显微镜观察并拍摄结果。

2.5.5 组织透明化及免疫荧光染色

采用 CUBIC 技术对脑片进行组织透明化处理。将脑片用 PBS 清洗3次, 每次 20 min, 然后转移至盛有 5 mL 1/2 R1 (ddH2O 和 R1 的 1:1 混合溶液) 的离心管中,室温摇床孵育6h。用毛笔将脑片转移至盛有5mLR1的离心 管中,室温摇床孵育2天。弃去R1,用PBS清洗3次,每次20min。弃去 PBS, 加入 20%蔗糖溶液对脑片进行脱水处理, 4°C 过夜。弃去蔗糖溶液, 用 PBS 清洗 3 次,每次 20 min。在 1.5 mL 离心管中配制一抗体系:每管总 体系 700 µL, 用 CUBIC IF Buffer 将抗体稀释至指定浓度(Goat anti-CD31 稀 释比 1:100, Rabbit anti-GFAP 稀释比 1:250)。用毛笔小心地将脑片转移至一 抗中,每管不超过6片,室温孵育4天。孵育结束后弃去一抗,用0.1%Triton X-100 清洗脑片 3 次,每次 20 min。在新的 1.5 mL 离心管中配制二抗体系: 每管总体系 700 µL,用 CUBIC IF Buffer 将二抗稀释至指定浓度(Donkey anti-Goat IgG Alexa Fluor 568 和 Donkey anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 647, 稀释比 均为 1:100), 再向体系中加入 3.5 μL 含有 1 mg/mL DAPI 的 PBS 溶液, 混合 均匀。用毛笔将脑片转移至二抗中,每管不超过6片,室温避光孵育4天。 孵育结束后弃去二抗,用 0.1% Triton X-100 清洗脑片 3 次,每次 20 min,避 光。将脑片转移至盛有 5 mL 1/2 R2 (PBS 和 R2 的 1:1 混合溶液)的离心管 中,室温避光孵育6h。随后将脑片转移至盛有5mLR2的离心管中,室温 避光孵育 24 h。取一张载玻片,滴加 400~500 µL R2,用毛笔将脑片小心地 平铺在液滴中,盖上盖玻片,使用激光共聚焦显微镜成像,拍摄染色结果。

2.5.6 数据处理和统计学分析

荧光显微镜和共聚焦显微镜拍摄的图像使用 Nikon NIS-Elements AR 或 Adobe Photoshop 进行整理。3.1.1 和 3.1.2 的统计结果使用荧光显微镜照片经

ImageJ 软件获取,其中使用 ImageJ 软件的 Ridge Detection 插件对脑血管网 络进行自动标记。3.1.3 的统计结果使用共聚焦显微镜照片经 ImageJ 软件获 取,并使用 Imaris 软件对图像进行三维重构。使用 Graphpad Prism 进行统计 学分析并绘制统计图。统计时,实验组和对照组每组取样 3 次,双组实验结 果统计使用双尾 t 检验分析。

三、研究结果

3.1 大脑皮质 SETDB1 缺失导致小鼠脑血管发育异常

3.1.1 Emx1-Setdb1条件性敲除导致小鼠脑表面出血

为了探究 SETDB1 在神经细胞中的表达是否影响脑血管发育,我们利用 Setdb1^{ff}小鼠^[37]和 Emx1-Cre 工具鼠^[40]杂交,构建 Setdb1^{ff};Emx1-Cre/-(后简称 Emx1-Setdb1)小鼠模型,该模型在大脑皮质神经干细胞中特异性地敲除了 Setdb1 基因(图 7.A,B)。小鼠脑发育过程中,EMX1+神经干细胞分化产生大脑皮质和 海马区域的兴奋性神经元、星型胶质细胞和部分少突胶质细胞。现有的研究表明, Emx1 基因不在血管发生的过程中表达^[40],因此,使用 Emx1-Setdb1 模型并没有 在脑血管的细胞中敲除 Setdb1 基因,而是只在神经细胞中进行了敲除。

大脑皮质在胚胎期完成神经元的分化和迁移,而在出生后阶段,神经胶质细胞的增殖与分化以及脑血管的发生仍在进行。出乎意料的是,Setdb1 特异性地在神经细胞中敲除以后,幼年小鼠脑表面出现血斑(图 7.C),脑血管存在异常。



图 7. Emx1-Setdb1 条件性敲除导致小鼠脑表面出血

A. Emx1-Cre 重组酶的表达模式示意图, 蓝色区域^[43]; B. 条件性敲除 Setdb1 基因的示意图, 第三个外显子两侧插入了 loxP 位点^[37]; C. Emx1-Setdb1 条件性敲除小鼠脑表面出现血斑(取样时间为出生后第7天)

3.1.2 Emx1-Setdb1 小鼠脑血管网络结构异常

血液通过动脉、毛细血管和静脉组成的错综复杂的血管网络在脑内流动。脑 血管网络发育异常可能改变脑内血液流速及其对血管壁造成的压力,使血管易于 破裂,导致颅内出血症状的发生^[44]。Emx1-Setdb1 小鼠脑表面出血是否意味着脑 血管网络结构存在异常?为了探究这一问题,我们采用免疫荧光染色并用 CD31 作为血管标记物(图 8.A),对小鼠出生后第7天(Postnatal day 7, P7)的大脑 皮质血管网络进行分析。CD31 是特异性表达于血管内皮细胞表面的黏附分子。 使用 ImageJ 软件处理图像数据,通过 Ridge Detection 插件^[45]自动标记血管分枝 (图 8.B),对血管密度、分枝点数量、方向性等特征进行统计。在突变体大脑皮 质区域,血管总体密度(图 8.C)和分支频率(图 8.E)与对照组没有显著性差 异;但是,突变体的脑血管分布有所改变——浅层灰质的血管密度与对照组一致, 深层灰质的血管密度却显著偏高,靠近腹侧的白质区域则显著偏低(图 8.D);突 变体的血管方向性也呈现异常,垂直于脑表面的血管长度占总长度的比例显著减 少,这一变化在深层灰质尤为显著(图 8.F)。因此说明 Emx1-Setdb1 条件性敲除 导致幼鼠大脑皮质血管网络结构异常,主要表现为深层血管方向性混乱,沿着背 -腹轴的穿透样生长受到限制。



图 8. Emx1-Setdb1 小鼠出生后脑血管网络结构异常

A.免疫荧光染色标记大脑皮质血管(CD31+)的结果图,白色箭头指示垂直于脑表面的穿透样 血管,比例尺 50 μm; B.采用 ImageJ 软件 Ridge Detection 插件对血管进行自动标记的示意 图,比例尺 50 μm; C-D.血管密度统计,纵坐标为每 mm²区域的血管长度总和,C 为皮质总 体统计结果,D 为分层统计;E.血管分枝频率统计,纵坐标为每 mm 血管的平均分支点数量; F.垂直穿透样血管占血管总长度的百分比;取样时间均为出生后 7 天(*n*=3, **P*<0.05, ***P*<0.01)

3.1.3 Emx1-Setdb1 小鼠血脑屏障完整性受损

成熟的脑血管具有血脑屏障结构,血管内皮细胞形成特化的紧密连接并表达 特定的分子转运蛋白,严格限制了脑组织与血液之间的物质交换,为中枢神经活 动提供稳定的环境,是大脑正常运作的重要保障^[7]。在脑血管疾病的发展过程中, 脑出血症状很可能伴有血脑屏障功能的缺失,具体表现为血管壁对生物大分子的 通透性增加^[46]。Emx1-Setdb1 小鼠的脑表面出血现象是否与血脑屏障的异常有关? 为了评估 Emx1-Setdb1 小鼠血脑屏障的完整性,我们采用分子量 70 kDa 的 FITCdextran 对 P7 小鼠进行经心脏灌注(图 9.A),发现对照组脑部的荧光信号仅分 布于血管内,说明血脑屏障在此时已经建立。然而,突变体在大脑皮质的多个位 点出现血脑屏障渗漏,荧光信号扩散至血管周围的脑实质;而在纹状体等不表达 Emx1-Cre 的脑区则没有发现渗漏(图 9.B, C)。可见,Emx1-Setdb1 条件性敲 除导致大脑皮质的血管通透性增加,血脑屏障完整性受损。





A.FITC-dextran 灌注检验血脑屏障通透性的实验流程图; B.对照组和 *Emx1-Setdb1* cKO 组的 FITC-dextran 灌注结果图,绿色代表 FITC-dextran(70kD)荧光信号,白色虚线标记局部的 BBB 渗漏区域,比例尺 50 µm; C.血脑屏障渗漏点的统计结果图(*n*=3, ***P*<0.01)

3.2 SETDB1 缺失引起脑血管缺陷是非细胞自主性的结果

文献报道,在大脑皮质发育过程中,Emx1 仅在皮质神经细胞表达,而不在 血管壁细胞表达^[40]。但是,Emx1-Setdb1 小鼠脑血管网络结构异常且血脑屏障受 损(图 8,9),脑血管系统存在缺陷。基于上述表型,我们需要进一步考察 Emx1-Cre 在血管中诱导基因重组的可能性,因此利用 Gt(ROSA)26Sor^{tm3(CAG-EYFP)Hze}(后简 称为 Ai3, 图 10.A) 报告子小鼠^[42]对 Emx1-Cre 重组酶表达的特异性进行分析。 EMX1+的神经干细胞产生大脑皮质 88%的神经元和数量庞大的胶质细胞,这些 细胞在大脑皮质中的分布非常密集。因而需要减少标记的细胞密度,才能精确观 察报告基因表达的细胞定位,其中一种方法是限制基因重组的时间特异性。为此, 我们采用 Emx1-CreER^{T2}工具鼠^[41]与 Ai3^{ff}小鼠杂交,获得 Ai3^{f/+}; Emx1-CreER^{T2/-} 报告子小鼠。在正常情况下, Cre-ER 定位于胞浆中, 只有与 Tamoxifen 结合才能 进入细胞核介导基因重组,起到诱导敲除的作用。胚胎期第13.5天,前脑神经发 生和血管发生都在活跃地进行,此时注射 Tamoxifen 至孕鼠腹腔,诱导胚胎体内 Cre 依赖的基因重组。出生后第7天,取幼鼠脑样进行免疫荧光染色(图 10.B)。 Emx1-Cre 特异性地在大脑皮质和海马区域介导基因重组, 使重组后的细胞表达 绿色荧光蛋白(GFP),而血管不表达GFP(图10.C,D)。以上说明Emx1-Cre 重组酶不在血管中介导基因重组,间接表明 Emx1-Setdb1 小鼠脑血管缺陷不是血 管壁细胞自主性作用的结果。



图 10. Emx1-Cre 重组酶不在血管中介导基因重组

A. Ai3 报告子小鼠的基因型示意图; B.利用 Ai3^{f/+}; Emx1-Cre^{ER/+}小鼠模型检验 Emx1-Cre 重 组酶表达模式的实验流程图; C-D. Emx1-Cre 在大脑皮质和海马区域介导基因重组,使重组 后的细胞表达绿色荧光蛋白(GFP),而 CD31 标记的血管("*"标记细胞核)不表达 GFP; 图 C 比例尺 500 μm,图 D 比例尺 20 μm

3.3 SETDB1 缺失导致星型胶质细胞与血管互作异常

3.3.1 SETDB1 缺失导致血管表面星胶覆盖率增加

血管内皮细胞形成特化的紧密连接并表达特殊的转运蛋白,使脑血管壁具有 血脑屏障的功能。与此同时,血管周围的周细胞、星型胶质细胞等都与内皮细胞 存在活跃的细胞间通讯,它们共同构成神经-血管单元(图 11.A),诱导血脑屏 障的建立与维持^[7]。已知 Emx1-Cre 介导的条件性敲除不发生在血管(图 10), 故推测突变体脑血管缺陷是非细胞自主性作用的结果,可能与神经-血管单元内 的细胞间互作相关。



图 11. 神经细胞 SETDB1 缺失导致血管表面星型胶质细胞覆盖增加

A.神经-血管单元结构示意图^[7],血管内皮细胞(endothelial cells, EC),周细胞(pericytes, PC),星形胶质细胞终足(astrocyte endfeet, AE),紧密连接(tight junction, TJ); B.血管表面的周细胞覆盖情况,Laminin标记血管,PDGFR-β标记周细胞,比例尺 50 μ m; C.血管表面的星胶覆盖情况,CD31标记血管,GFAP标记星胶,比例尺 50 μ m; D. 血管(CD31+)与星胶(GFAP+)的三维重构图,比例尺 20 μ m; E. 血管表面的星胶覆盖率统计,纵轴为GFAP+CD31+面积与CD31+面积的比值, *n*=3, **P*<0.05

为了从形态上分析血管与其周围细胞的互作关系,我们采用免疫荧光染色标 记不同细胞,发现突变体血管表面的 PDGFR-β+周细胞覆盖正常(图 11.B);然 而,GFAP+星型胶质细胞的覆盖率显著上升(图 11.C),这一比率在深层灰质的 变化幅度(42.9%)远高于浅层灰质(17.3%)(图 11.E)。使用 Imaris 软件对染 色结果进行三维重构,直观展示了突变体深层灰质中星胶终足与血管接触面增加 的现象(图 11.D)。星胶-血管相互作用的异常可能与深层血管网络的混乱(图 8)存在关联。因此,SETDB1缺失可能改变了 GFAP+星型胶质细胞与血管壁的 细胞间通讯,导致脑血管发育异常。

3.3.2 SETDB1 缺失导致异常的星胶-血管互作并发生血管破损

在上述 CD31 标记血管的染色结果中,我们还注意到,神经细胞 SETDB1 缺 失导致小鼠脑内出现血管内皮细胞碎片。这一现象在不同样本中重复出现(图 12.A),是否与突变体血脑屏障的渗漏有关联?星胶与血管的相互作用是否在此 区域发生了改变?解答这些问题需要观察更精细的细胞结构。为此,我们利用 CUBIC 技术对脑组织进行透明化处理,结合免疫荧光染色和激光共聚焦成像技 术,获得高分辨率的细胞形态图(图 12.B)。的确,我们在突变体大脑皮质清晰 地观察到了局部血管破裂的现象。不仅如此,在 CD31 标记的血管内皮破损处, GFAP 标记的星形胶质细胞呈现异常的纤维化结构,星胶的突起呈网状缠绕在血 管表面。而在突变体血管完整的区域,星胶通过在突起末端形成终足结构与血管 表面相连接,形态与野生型相似。因此说明,大脑皮质发育过程中,SETDB1 缺 失导致星胶与内皮细胞形成异常的细胞连接并发生血管破损,与血脑屏障功能的 缺陷密切相关。



图 12. 神经细胞 SETDB1 缺失导致星胶-血管互作异常并发生血管破裂 A.Emx1-Setdb1 小鼠脑内的血管内皮细胞碎片,白色虚线圈出碎片区域,比例尺 50 μm; B. 组织透明化后的免疫荧光染色显示突变体大脑皮质局部血管破裂。在破裂区域,星胶突起形 成异常的网状结构缠绕在血管表面(黄色方框)。CD31 标记血管内皮细胞,GFAP 标记星 形胶质细胞,黄色箭头标记正常的星胶终足,比例尺 20 μm

四、讨 论

脑发育过程中,血管发生需要活跃的细胞增殖与迁移,与此同时血脑屏障尚 未构建成熟。这些特征使发育中的血管比成熟血管更容易受到遗传和环境因子的 影响,从而改变其结构与生理功能。例如:在发育早期,血管内皮细胞 TGFβ通 路相关的基因突变可直接导致动静脉畸形^[44];而在成体中,即使产生了相同位点 的基因突变,还需要同时激活促血管发生的 VEGF 通路才会导致发病^[47]。随着 脑发育期间神经环路的构建以及出生后环境刺激引起复杂的神经活动,脑血管系 统进一步发生适应性的改变^[20,48]。神经活动在发育关键期内的紊乱可抑制血管 生长,导致远离血管的脑组织内氧供应不足,进而抑制神经环路在该区域的形成, 但在成年脑内却没有这种效应^[19]。因此,发育期间的关键基因表达与环境作用共 同决定脑血管系统的构建,对脑功能建立有不可替代的影响。本研究发现,组蛋 白甲基转移酶 SETDB1 在脑发育过程中的缺失导致出生后脑血管网络结构异常, 这可能会导致血管功能的终身缺陷,对大脑发育、脑功能建立和成年脑疾病发生 有深远意义。

脑血管发育是多因素决定的过程,需要血管壁细胞与神经细胞精确调控其基因表达,建立协调的细胞间相互作用。作为神经-血管单元的核心组分之一,星形胶质细胞对血脑屏障的发育和维持有重要调控作用。近年来的研究表明,星胶-血管互作对多种脑疾病的发生发展有重要作用。在星胶中激活促炎症信号通路,可诱导周围的血管内皮细胞失去紧密连接等特性,最终破坏血脑屏障^[49]。Emx1-Setdb1条件性敲除引起血管表面的星胶覆盖率增加;并且,在形态上,血管破裂与异常纤维化的星胶突起密切相关。因此推测,SETDB1缺失可能通过改变星胶与内皮细胞的相互作用导致血脑屏障产生缺陷。然而,星胶与内皮细胞之间存在复杂的通讯网络,涉及 VEGF、Akt、Wnt/b-catenin、SHh 等多种信号通路^[14]。SETDB1通过哪种(些)下游途径调控星胶与内皮细胞互作,进而影响血脑屏障? 其分子机制尚不清楚。此外,突变体小鼠脑血管网络结构存在异常,意味着血管在发育过程中的生长路径被改变,该现象是否与星胶有关?为了进一步探究SETDB1缺失所影响的细胞间通讯途径,可从模型鼠的脑组织中分离血管和星胶,分别进行转录组分析,筛选异常表达的神经-血管通讯因子及其对下游血脑屏障 特异性通路的作用。在此基础上,可通过 Cut&Tag、ATAC-seq 等表观遗传分析 手段探究 SETDB1 对下游靶基因的调控机制。

本研究存在一定的局限性,例如尚未考虑星胶以外的其他神经细胞对血管可能存在的影响。Emx1-Setdb1 模型不仅在星形胶质细胞中敲除了 Setdb1,也在皮层兴奋性神经元和少突胶质细胞中敲除了该基因。虽然神经元和少胶不直接参与神经-血管单元的形成,但它们通过分泌因子、重塑细胞外基质等形式间接作用于血管,诱导血管生长和血脑屏障形成。为了明确 SETDB1 在星胶中的缺失是否是扰乱血管发育的决定性因素,可以利用 Aldh111-Cre^{ER} 工具鼠特异性地在星胶中敲除 Setdb1 基因,检验对脑血管发育的作用。

总的来说,本研究从神经-血管相互作用的角度出发,探究了发育脑中表观 遗传修饰通过非细胞自主性途径调控脑血管发育的机制。大脑皮质神经细胞 SETDB1 缺失导致小鼠出生后脑血管发育缺陷,具体表现为血管网络结构异常和 局部的血脑屏障缺失。机制层面,Emx-Setdb1 条件性敲除导致星形胶质细胞与 血管内皮形成异常的细胞连接,与血脑屏障的破损密切相关。因此说明,SETDB1 调控的神经-血管相互作用对脑血管发育具有重要意义。后续研究可进一步阐释 SETDB1 调控下游细胞间通讯的分子机制,并探究该发育性缺陷对成年后脑功能 的影响;从神经细胞角度出发,为揭示脑血管疾病发生机制提供新的证据,为预 防和治疗发育性脑疾病奠定理论基础。



[1] Azevedo F A, Carvalho L R, Grinberg L T, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain[J]. J Comp Neurol, 2009, 513(5): 532-41.

[2] Kriegstein A and Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells[J]. Annu Rev Neurosci, 2009, 32: 149-84.

[3] Chen V S, Morrison J P, Southwell M F, et al. Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5[J]. Toxicol Pathol, 2017, 45(6): 705-744.

[4] Sun T and Hevner R F. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations[J]. Nat Rev Neurosci, 2014, 15(4): 217-32.

[5] Gotz M and Huttner W B. The cell biology of neurogenesis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(10): 777-88.

[6] Yao B, Christian K M, He C, et al. Epigenetic mechanisms in neurogenesis[J]. Nat Rev Neurosci, 2016, 17(9): 537-49.

[7] Daneman R and Prat A. The blood-brain barrier[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(1): a020412.

[8] Ji X, Ferreira T, Friedman B, et al. Brain microvasculature has a common topology with local differences in geometry that match metabolic load[J]. Neuron, 2021, 109(7): 1168-1187 e13.

[9] Di Giovanna A P, Tibo A, Silvestri L, et al. Whole-Brain Vasculature Reconstruction at the Single Capillary Level[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12573.

[10]Puelles L, Martinez-Marin R, Melgarejo-Otalora P, et al. Patterned Vascularization of Embryonic Mouse Forebrain, and Neuromeric Topology of Major Human Subarachnoidal Arterial Branches: A Prosomeric Mapping[J]. Front Neuroanat, 2019, 13: 59.

[11] Paredes I, Himmels P and Ruiz de Almodovar C. Neurovascular Communication during CNS Development[J]. Dev Cell, 2018, 45(1): 10-32.

[12]Schaeffer S and Iadecola C. Revisiting the neurovascular unit[J]. Nat Neurosci, 2021, 24(9): 1198-1209.

[13] Saunders N R, Liddelow S A and Dziegielewska K M. Barrier mechanisms in the developing brain[J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 46.

[14]Engelhardt B and Liebner S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier[J]. Cell Tissue Res, 2014, 355(3): 687-99.

[15] van der Flier W M, Skoog I, Schneider J A, et al. Vascular cognitive impairment[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18003.

[16]Ouellette J and Lacoste B. From Neurodevelopmental to Neurodegenerative Disorders: The Vascular Continuum[J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 749026.

[17] Walchli T, Wacker A, Frei K, et al. Wiring the Vascular Network with Neural Cues: A CNS Perspective[J]. Neuron, 2015, 87(2): 271-96.

[18] Ma S, Kwon H J, Johng H, et al. Radial glial neural progenitors regulate nascent brain vascular network stabilization via inhibition of Wnt signaling[J]. PLoS Biol, 2013,

11(1): e1001469.

[19] Whiteus C, Freitas C and Grutzendler J. Perturbed neural activity disrupts cerebral angiogenesis during a postnatal critical period[J]. Nature, 2014, 505(7483): 407-11.

[20]Lacoste B and Gu C. Control of cerebrovascular patterning by neural activity during postnatal development[J]. Mech Dev, 2015, 138 Pt 1: 43-9.

[21]Peguera B, Segarra M and Acker-Palmer A. Neurovascular crosstalk coordinates the central nervous system development[J]. Curr Opin Neurobiol, 2021, 69: 202-213.
[22]Ouellette J, Toussay X, Comin C H, et al. Vascular contributions to 16p11.2 deletion autism syndrome modeled in mice[J]. Nat Neurosci, 2020, 23(9): 1090-1101.
[23]Fiorentino M, Sapone A, Senger S, et al. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders[J]. Mol Autism, 2016, 7: 49.
[24]Carrier M, Guilbert J, Levesque J P, et al. Structural and Functional Features of Developing Brain Capillaries, and Their Alteration in Schizophrenia[J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 595002.

[25]Hirabayashi Y and Gotoh Y. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development[J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(6): 377-88.

[26] Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1[J]. Cell, 2004, 119(7): 941-53.

[27] Sun G, Alzayady K, Stewart R, et al. Histone demethylase LSD1 regulates neural stem cell proliferation[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(8): 1997-2005.

[28] Tang T, Zhang Y, Wang Y, et al. HDAC1 and HDAC2 Regulate Intermediate Progenitor Positioning to Safeguard Neocortical Development[J]. Neuron, 2019, 101(6): 1117-1133 e5.

[29]Gallagher D, Voronova A, Zander M A, et al. Ankrd11 is a chromatin regulator involved in autism that is essential for neural development[J]. Dev Cell, 2015, 32(1): 31-42.

[30] Sheikh B N, Guhathakurta S, Tsang T H, et al. Neural metabolic imbalance induced by MOF dysfunction triggers pericyte activation and breakdown of vasculature[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(7): 828-841.

[31]Kim S K, Yang H, Pascual J M, et al. Valproic acid enhances glucose transport in the cultured brain astrocytes of glucose transporter 1 heterozygous mice[J]. J Child Neurol, 2013, 28(1): 70-6.

[32] McCarthy R L, Kaeding K E, Keller S H, et al. Diverse heterochromatin-associated proteins repress distinct classes of genes and repetitive elements[J]. Nat Cell Biol, 2021, 23(8): 905-914.

[33] Tan S L, Nishi M, Ohtsuka T, et al. Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development[J]. Development, 2012, 139(20): 3806-16.

[34]Bilodeau S, Kagey M H, Frampton G M, et al. SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state[J]. Genes Dev, 2009, 23(21): 2484-9.

[35]Koide S, Oshima M, Takubo K, et al. Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes[J]. Blood, 2016, 128(5): 638-49.

[36] Strepkos D, Markouli M, Klonou A, et al. Histone Methyltransferase SETDB1: A Common Denominator of Tumorigenesis with Therapeutic Potential[J]. Cancer Res, 2021, 81(3): 525-534.

[37] Jiang Y, Loh Y E, Rajarajan P, et al. The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain[J]. Nat Genet, 2017, 49(8): 1239-1250.

[38]Nicetto D and Zaret K S. Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance[J]. Curr Opin Genet Dev, 2019, 55: 1-10.

[39]Feigin V L, Forouzanfar, M.H., Krishnamurthi, R., et al. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. The Lancet, 2014, 383: 245-255.

[40]Gorski J A T T, Qiu M, et al. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage[J]. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2002, 22(15): 6309-6314.

[41]Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, et al. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(2): 173-9.

[42] Madisen L, Zwingman T A, Sunkin S M, et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain[J]. Nat Neurosci, 2010, 13(1): 133-40.

[43]Blake J A, Baldarelli R, Kadin J A, et al. Mouse Genome Database (MGD): Knowledgebase for mouse-human comparative biology[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D981-D987.

[44] Shabani Z, Schuerger J and Su H. Cellular loci involved in the development of brain arteriovenous malformations[J]. Front Hum Neurosci, 2022, 16: 968369.

[45]Steger C. An Unbiased Detector of Curvilinear Structures[J]. IEEE TRANSACTIONS ON PATTERN ANALYSIS AND MACHINE INTELLIGENCE, 1998, 20(2): 113-125.

[46]Quick S, Moss J, Rajani R M, et al. A Vessel for Change: Endothelial Dysfunction in Cerebral Small Vessel Disease[J]. Trends Neurosci, 2021, 44(4): 289-305.

[47]Bernabeu C, Bayrak-Toydemir P, McDonald J, et al. Potential Second-Hits in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia[J]. J Clin Med, 2020, 9(11).

[48]Lacoste B, Comin C H, Ben-Zvi A, et al. Sensory-related neural activity regulates the structure of vascular networks in the cerebral cortex[J]. Neuron, 2014, 83(5): 1117-30.

[49]Kim H, Leng K, Park J, et al. Reactive astrocytes transduce inflammation in a blood-brain barrier model through a TNF-STAT3 signaling axis and secretion of alpha 1-antichymotrypsin[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 6581.

致 谢

终于写到致谢了。大学四年逐渐习惯了踩着 DDL 交作业,似乎总是在匆忙 地赶路,赶早班校车,赶晚班地铁,赶早八之前宿舍楼下的最后一辆共享单车, 赶实验结束后马上就要开场的电影。连毕业论文都得赶到最后一天......但无论如 何,还是想好好写一篇致谢。

在复旦学习的四年使我对生命科学的态度从"懵懂地好奇"变成"懵懂地喜 欢"。大二、大三被各种实验课折磨的日子里,偶尔得到漂亮实验成果的欣喜令 我久久难以忘怀。学习生命科学的经历使我更深入地认识了自己,对周遭世界有 了更丰富的体验。我窥见了科研生活的艰难与挑战,在反复的实验失败中意识到: "即使受挫一百次还想在第一百零一次把它做好的事,也只有科研了吧……"现 在的我真的抱着这样简单的念头准备去读博,几年以后再看这段话,也许会觉得 好笑,还会想抽自己几个大嘴巴子,那也没关系。总之先要大大地感谢我自己, 感谢自己在无数次找不到方向的时候依然拥有探索的勇气。

最要感谢的是我的导师解云礼老师。我在大二上学期加入解老师的实验室, 那时的我对神经生物学几乎没有一点认识,也完全不了解科研工作。解老师鼓励 我自己尝试开展课题,并给予我系统的学术指导,帮助我培养良好的科研态度和 学术素养。在我大三申请海外交流、大四申请博士项目的过程中,解老师始终给 予我最大程度的支持,我发自内心地感激。过去三年的科研学习中,解老师一直 是我在学术道路上的榜样,每次与老师的学术讨论都令我受益匪浅。

在此,还要感谢实验室师兄师姐在课题中的帮助。感谢黄云云师姐提供她饲养的 Setdb1^{ff}小鼠和 Emx1-Cre 小鼠,在我的小鼠饲养过程中提供帮助,与我分享基因型鉴定的引物序列,并教我学习小鼠基因型鉴定、冰冻切片、免疫荧光染

色等实验技术。感谢唐湉翔师兄与我分享我小鼠饲养和管理中的技巧,并对课题 实验设计和毕业论文的修改提出宝贵建议。感谢张燕东师兄教我学习小鼠灌流取 脑、振动切片、共聚焦显微镜成像技术,提供他饲养的 Ai3^{ff}小鼠,并在组织透 明化实验中提供帮助。感谢张雯师姐在小鼠剖腹产实验中提供帮助。感谢李丹师 姐提供她饲养的 Emx1-CreER^{T2}小鼠。感谢曾兰惠师姐、梁昕悦师姐、邹锐师兄、 朱悦师姐、张建君师姐在课题进展过程中提供的建议帮助。同时感谢其他师兄师 姐和实验室同学们与我共同分享实验经验、生活趣事和美味的零食。

感谢赵冰樵老师慷慨地提供 PDGFR-β抗体并分享货号。

感谢脑科学研究院实验平台的姜民老师和石莹老师在共聚焦显微镜、公用电脑等平台公共仪器使用上的帮助。感谢实验动物房后勤师傅在动物房维护中的工作。

感谢我的室友们:世界上最会拍照的徐大师、最懂湘菜粤菜的老北京和最正 义雷厉风行的旸姐。感谢有你们一起享受浦江的晚风,也一起渡过了上海疫情最 艰难的日子。在我为申请研究生而焦虑的日子里,谢谢你们包容我的发疯文学, 帮助我排解压力。当然,最要感谢你们三年来包容我早睡的熄灯和早起的铃声。 与你们成为室友是我在复旦遇到的最幸运的事。

感谢我的母亲贺萍女士,作为一位敬业的医生,是您在我心中种下了一颗永 远敬畏生命的种子。感谢我的父亲杨开蒙先生,在您的影响下我始终对身边的世 界拥有观察力和好奇心。感谢你们一直以来鼓励我选择自己的生涯道路,并教育 我为自己的决定负责。

最后感谢所有为这个课题献出生命的实验小鼠,衷心地,谢谢你们。

34