

· 基础研究 ·

Wnt1-Cre 和 Pax2-Cre 标记的小鼠第一鳃弓 颅颌面部神经嵴细胞异质性研究

徐珏¹ 刘双¹ 符宏高² 邵美瑛¹ 陈美玲² 黄镇^{2,3}

1. 四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院, 成都 610041;

2. 福建师范大学生命科学院, 福州 350007;

3. 福建中医药大学科学创新与转化中心, 福州 350108

[摘要] 目的 利用 Wnt1-Cre 和 Pax2-Cre 小鼠特异性标记颅颌面神经嵴细胞 (CNCs) 迁移到第一鳃弓时的分化异质性及机制。方法 分别收取胚胎期 (E) 8.0~E9.25 Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} 及 Pax2-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠胚胎进行整体荧光观察, 利用石蜡切片免疫荧光对 E15.5 的 Pax2-Cre;R26R^{Ai9} 和 Wnt1-Cre;R26R^{Ai9} 小鼠所标记的 CNCs 在颅面部主要组织器官中的谱系分化情况进行比较分析, 最后对 E10.5 的 Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} 和 Pax2-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠的第一鳃弓组织中 CNCs 进行单细胞测序分析, 并对差异基因进行荧光定量聚合酶链反应 (q-PCR) 验证。结果 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 小鼠特异性标记的 CNCs 均在 E8.0 自神经板开始迁移, 但 Pax2-Cre 小鼠仅标记迁移到第一鳃弓的 CNCs, 而 Wnt1-Cre 同时标记了迁移到第一和第二鳃弓的 CNCs; 在分化谱系示踪方面, 二者皆标记了 CNCs 分化形成的颅颌面部组织器官的间充质, 但 Wnt1-Cre 在上腭和舌中标记 CNCs 更多; 在第一鳃弓间充质中, Pax2-Cre 所标记的 CNCs 特异性表达基因主要参与了成骨, 而 Wnt1-Cre 所标记的 CNCs 特异性表达基因主要参与了肢体发育、细胞迁移和成骨, q-PCR 结果也证实了两者高表达差异基因参与了以上功能。结论 本研究结果提示 Pax2-Cre 小鼠可特异性用于第一鳃弓 CNCs 及其衍生组织成骨方面的研究。

[关键词] 颅颌面部神经嵴细胞; 第一鳃弓; Wnt1-Cre; Pax2-Cre; 单细胞测序

[中图分类号] Q257 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2023374



本文链接 开放科学标识码

Heterogeneity of Wnt1-Cre-marked and Pax2-Cre-marked first branchial arch cranial neural crest cells in mice

Xu Jue¹, Liu Shuang¹, Fu Honggao², Shao Meiyang¹, Chen Meiling², Huang Zhen^{2,3}

1. West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 3. Innovation and Transformation Center,

Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China

Supported by: National Nature Science Foundation of China (82170918); Natural Science Foundation of Sichuan Province (2024NSFSC0549)

Correspondence: Huang Zhen, E-mail: zhuang@fjtc.edu.cn

[Abstract] **Objective** This study aimed to explore the heterogeneity and gene ontology of Wnt1-Cre-marked and Pax2-Cre-marked first branchial arch cranial neural crest cells (CNCs) in mice. **Methods** The embryos of Wnt1-Cre; R26R^{mTmG} and Pax2-Cre; R26R^{mTmG} at embryonic day (E)8.0-E9.25 were collected for histological observation. We per-

formed immunostaining to compare green fluorescent protein (GFP)-positive CNCs in Pax2-Cre;R26R^{Ai9} and Wnt1-Cre;R26R^{Ai9} mice at E15.5. Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) was used to analyze the first branchial arch GFP-positive CNCs from Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} and Pax2-

[收稿日期] 2023-11-08; **[修回日期]** 2024-04-28

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (82170918); 四川省自然科学基金 (2024NSFSC0549)

[作者简介] 徐珏, 副主任医师, 博士, E-mail: xujue1212@qq.com

[通信作者] 黄镇, 教授, 博士, E-mail: zhuang@fjtc.edu.cn

cre;R26R^{mTmG} mice at E10.5. Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) was performed to validate the differential genes. **Results** Wnt1-Cre-marked and Pax2-Cre-marked CNCs migrated from the neural plate to first and second branchial arches and to the first branchial arch, respectively, at E8.0. Although Wnt1-Cre-marked and Pax2-Cre-marked CNCs were found mostly in cranial-facial tissues, the former had higher expression in palate and tongue. The results of scRNA-seq showed that Pax2-Cre-marked CNCs specifically contributed to osteoblast differentiation and ossification, while Wnt1-Cre-marked CNCs participated in limb development, cell migration, and ossification. The q-PCR data also confirmed the results of gene ontology analysis. **Conclusion** Pax2-Cre mice are perfect experimental animal models for research on first branchial arch CNCs and derivatives in osteoblast differentiation and ossification.

[Key words] cranial neural crest cells; first branchial arch; Wnt1-Cre; Pax2-Cre; single-cell RNA sequencing

在颅颌面部发育中,来自于神经板的颅颌面部神经嵴细胞(cranial neural crest cells, CNCs)会迁移到第一鳃弓的组织中发生模式化分化,并定向分化为颌面部的组织和器官。该过程是由一系列精细步骤所构成的,任一环节的差错都会导致CNCs相关的先天性畸形疾病,比如第一鳃弓综合征、Pierre Robin序列综合征、单纯性面裂、单纯性小颌畸形等^[1-2]。第一鳃弓(又称下颌弓),是由上颌突和下颌突构成的。在小鼠胚胎期(Embryonic day, E) 9.5时,前脑会增大并会使其外覆盖的外胚层在前脑的两侧形成一对左右对称的突起,即额鼻突,而第一鳃弓间充质则会在原始口腔的外侧先衍生成成为上颌突,继而在下方衍生出下颌突,额鼻突、上颌突、下颌突共同构成面部突起,并参与大部分的颌面部组织器官的构成^[3]。因此,阐明颅神经嵴细胞的细胞谱系在第一鳃弓组织中是如何迁移和分化对于解析颅面部发育和相关发育畸形疾病具有重要意义。

近年来,随着遗传修饰小鼠构建技术的发展,在细胞谱系追踪研究中最常见的是利用组织特异性的Cre小鼠与荧光报告基因小鼠进行交配后,通过观察和检测荧光阳性细胞从而对表达该基因的谱系细胞进行精细追踪^[4]。目前,在颅面部发育研究中,研究者们^[5-7]构建出了多种可以标记CNCs的Cre谱系小鼠对CNCs进行谱系追踪和迁移、分化、模式化等相关分子机制研究。其中,目前应用最广泛的Cre小鼠是Wnt1-Cre小鼠。通过Wnt1-Cre小鼠与Loxp-LacZ-Loxp活性报告小鼠交配,发现Wnt1早在小鼠胚胎E8.0即会在神经板中标记预迁移的CNCs,至E10.0时,CNCs迁移并侵入第一和第二鳃弓的间充质,最终会分化形成颌面部组织,如颌骨、软骨、上腭、牙和舌^[9]。但是由于Wnt1-Cre小鼠会同时标记第一鳃弓和第二鳃弓CNCs,第二鳃弓仅发育形成面部表情肌、舌骨小脚、舌骨体上部、镫骨和茎突等组织结构,而颌面部大

部分的组织器官都是衍生自第一鳃弓,因此,使用Wnt1-Cre小鼠无法对第一鳃弓来源的CNCs进行精确追踪,并且无法对第一鳃弓来源的CNCs所形成组织器官的分子机制进行精准剖析。

Pax家族在神经嵴发育和迁移过程中发挥关键作用,并参与早期发育与器官发生过程^[8]。其中,Pax2是最早表达于中后脑边界区域的转录因子,并且第一鳃弓和前颅骨的CNCs起源于Pax2/Pax2-Cre表达的中后脑边界区域^[9-10]。Pax2-Cre小鼠由Takahiro和Groves于2004年构建出来,采用原位杂交对Pax2基因和Cre酶的表达进行了对比,证实了两者表达区域相同,且在E9.5时在鳃弓区域有明显表达^[11]。前期研究^[12]发现Pax2-Cre小鼠与R26R^{mTmG}小鼠交配后,通过免疫荧光追踪绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)阳性细胞,发现其会特异性标记第一鳃弓来源的CNCs,而在第二鳃弓中几乎没有表达,因此Pax2-Cre小鼠是一个绝佳的用于研究CNCs衍生的第一鳃弓来源颅颌面组织器官的实验动物模型。当CNCs迁移到第一鳃弓后,随着高通量测序的高速发展,Tang等^[13]在2009年率先采用单细胞测序技术对发育阶段细胞的特征进行了描述。自此,单细胞测序技术不断进步和发展,可以基于转录组建立谱系细胞的分化轨迹并加以细化,通过基因表达的变化情况判断细胞的发育状态,同时进行组织器官的细胞异质性分析^[14]。因此,本研究拟通过胚胎组织学、免疫荧光和单细胞测序分析等技术,对Wnt1-Cre小鼠和Pax2-Cre小鼠所标记的第一鳃弓CNCs进行比较分析,拟在追踪胚胎发育期两者分别标记CNCs的迁移分化路径的同时探明其异质性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所使用的小鼠均购买于上海斯莱克实

验动物有限公司,均为SPF级C57BL/6小鼠遗传背景。Pax2-Cre小鼠为上海中国科学院刘志勇研究员馈赠,Wnt1-Cre与R26R^{Ai9}遗传修饰小鼠购买自美国Jackson Laboratory Inc,R26R^{mTmG}小鼠由Tulane大学Yiping Chen教授馈赠,以上小鼠均饲养并繁殖于福建师范大学动物实验中心。动物饲养和实验已获得福建师范大学实验动物伦理委员会的批准(批准号:IACUC-20210007)。

1.2 小鼠交配、胚胎收取、基因型鉴定

性成熟的公、母鼠于当日18点后置于同一笼,于次日9点前检查母鼠外阴道口,若出现孕栓则

以当日12点为胚胎期0.5 d (E0.5)。分别将怀有E8.0、E9.0、E9.25、E10.5、E15.5胚胎的孕鼠以断颈术处死后取出胚胎。小鼠基因型鉴定方法如下。剪下小鼠/胚胎长约0.5 cm尾部组织,置于200 μ L离心管,加入100 μ L (50 mmol/L)的NaOH溶液后置于恒温孵育器95 $^{\circ}$ C加热30 min后取出,并超声震荡至鼠尾组织完全裂解,瞬时离心后加入40 μ L (1 mol/L)的Tris-HCL (pH=8.0)中和并混匀后离心,则上清液为粗提的小鼠DNA,用于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 小鼠基因型鉴定。所用的引物序列见表1。

表 1 小鼠基因型鉴定PCR引物序列

Tab 1 PCR primer sequences of different type of transgenic mice

基因型	正向引物 (5'-3')	反向引物 (3'-5')	产物大小/bp
Pax2-Cre	TGCCAGGATCAGGGTTAAAG	GCTTGCATGATCTCCGGTAT	400
Wnt1-Cre	CTCATTGTCTGTGGCCCTGACC	ACGCCTGGCGATCCCTGAA	450
R26R ^{mTmG}	CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT	R1: CGAGGCGGATCACAAGCAATA R2: TCAATGGGCGGGGGTTCGTT	Mut: 250 Wt: 330
R26R ^{Ai9} (wild type)	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC	Wt: 297
R26R ^{Ai9} (mutant)	GGCATTAAAGCAGCGTATC	CTGTTCCTGTACGGCATGG	Mut: 196

1.3 小鼠胚胎整体荧光观察

分别收取E8.0、E9.0和E9.25的小鼠胚胎,放入干净PBS溶液后,固定于琼脂糖凝胶上。使用体式荧光显微镜对胚胎进行整体荧光观察及拍照。

1.4 免疫荧光

将小鼠组织进行固定,并脱钙和梯度脱水后透明、透蜡、包埋、切片,脱蜡复水进行抗原修复、封闭。分别采用GFP和红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 一抗进行4 $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗避光室温孵育1 h,避光条件下对切片充分洗涤,加入DAPI细胞核染料2 min后用PBST溶液避光洗涤2次,最后加入防淬灭剂后封片,并在激光共聚焦显微镜下观察及拍照。

1.5 单细胞测序

1.5.1 组织解离及质检

将E10.5的Pax2-Cre;R26R^{mTmG}小鼠和Wnt1-Cre;R26R^{mTmG}小鼠胚胎第一鳃弓组织裂解成细胞悬液后,进行流式细胞分选出GFP阳性细胞后,加入适量试剂盒中的消化液,用40 μ m细胞筛过滤细胞悬液后采用350 \times g离心5 min,加入5 mL PBS重悬清洗细胞,300 \times g离心5 min,去上清后加入少量PBS溶液重悬。将以上细胞悬液与0.4%台盼蓝混匀,Countess II细胞自动计数仪检测细胞浓度及活性(活细胞无颜色,死细胞被染为蓝色)。细胞悬液合格的指标为:细胞总量>20 000个,细胞活

性 \geq 85%。

1.5.2 单细胞捕获

将以上质检合格的单细胞悬液重悬于预冷的PBS溶液中,清洗磁珠后按试剂盒制备Lysis Buffer。清洗微流控芯片后,并与连接模块分别放置Singularon Matrix仪器固定载台,在连接模块中加入PBS、Wash Buffer I、Lysis Buffer、Barcode Beads及细胞悬液后开机,当mRNA捕获完成后回收产物槽中的产物。

1.5.3 逆转录及扩增

以上mRNA中加入RT Mix混匀,置于42 $^{\circ}$ C金属浴中1 300 r/min反应1.5 h,溶液澄清后去上清,加入PCR Mix后扩增,并用Ampure XP纯化磁珠对cDNA进行纯化,对浓度和片段大小进行质检,合格后即制备文库。

1.5.4 文库制备及测序

将以上已纯化的cDNA打断成500 bp的片段后进行末端修复和加A并筛选,P7 Adapter接头连接后采用PCR扩增引入样品Index进行片段筛选,得到cDNA文库。将质检合格的文库上机测序。

1.6 生物信息学分析和差异基因验证

将测序得到的原始数据在Cell Ranger (v3.0)中与参考基因组mm10比对,对Barcode、UMI校正并评估有效细胞数后生成基因表达矩阵。采用Seurat包读取以上表达矩阵,过滤单个细胞的表达

基因 (nFeature_RNA) 过少或过高, 并过滤表达很高的线粒体基因组中 reads 指数 (percent.mt), 得到单个且高质量的细胞。将质控后数据通过归一化、标准化和降维处理, 使用统一流形逼近与投影 (uniform manifold approximation and projection, UMAP) 聚类方法得到适量亚群。将得到的各亚群差异表达基因进行文献和数据库中的细胞标记基因比对, 注释各亚群细胞类型。将以上注

释好的数据导入 Monocle3 中构建基因表达发育轨迹。最后利用 Clusterprofiler 包对各细胞亚群的生物学过程和潜在功能进行分析。为验证生信分析结果, 采用荧光定量聚合酶链反应 (real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, q-PCR) 对 Cluster0、1、2 中的高表达差异基因进行验证, 引物序列见表 2。

表 2 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 标记的第一鳃弓的 CNCs 差异基因 q-PCR 引物序列

Tab 2 The q-PCR primer sequences of differential genes of first branchial arch CNCs in Pax2-Cre and Wnt1-Cre mice

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (3'-5')
Tbx2	CCGATGACTGCCGTATAAGT	CCATCCACTGTCCCCTGT
Prrx1	GAGCGTGTCTTTGAGCGGA	CATGTGGCAGAATAAGTAGCCAT
Prrx2	CGTGGCACCAAACGAAAGAAG	GTAGTGTGTGCGCTCAAATACA
Msx1	TGCTGCTATGACTTCTTTGCC	GCTTCCTGTGATCGGCCAT
Msx2	CAAGAAGCCGCCAAGGAAT	TGCTCCGTCTTCGGAATTTTC
Pitx1	GCCTTCAAGGGAGGCATGAG	GATTCGCTGGCGGAGTTCTC
Gjal	AATTTACTGGGTGGCATCCTAGA	GGGAAAGCATCATCGTAACAGAT
Gnas	CAGAGCCTCCATTGGGGTC	GCTTCTCGCTCAACTGGGG
Igf2	GTCTACTCAAGTCCGGCTAC	CATATTCAGCCAACAGCCCAT
Cited1	AACCTTGGAGTGAAGGATCGC	GTAGGAGAGCCTATTGGAGATGT
Dlk1	AGTGCGAAACCTGGGTGTC	GCCTCCTTGTGAAAGTGGTCA
Cxcl12	TGCATCAGTGACGGTAAACCA	TTCTTCAGCCGTGCAACAATC
Apoe	CTGACAGGATGCCTAGCCG	CGCAGGTAATCCAGAAGC
Nr2f2	TCAACTGCCACTCGTACCTG	CCATGATGTTGTTAGGCTGCAT
Rap2c	ATGAGGGAATACAAGGTAGTGGT	ACTTCGATCTCTTTGCGGTTAGA
Tpm1	CAGAAGGCAAATGTGCCGAG	TCCAGCATCTGGTGCATACTA
Cnn2	AGAACCGGCTCCTGTCCAA	GTGTGCATAGGATAACCCCATC

2 结果

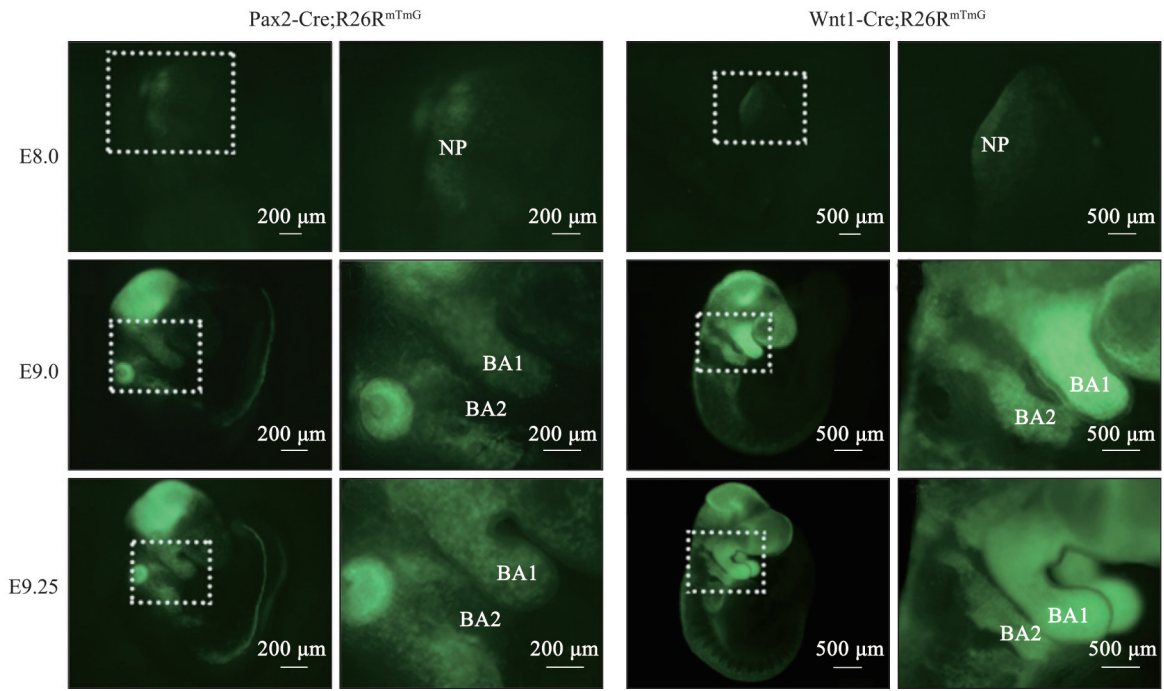
2.1 小鼠胚胎早期 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 标记的 CNCs 的迁移模式和表达范围

在 Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} 和 Pax2-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠的 E8.0 胚胎时已可以在神经板处观察到绿色荧光 (图 1), 说明此时 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 标记的 CNCs 已形成并且均来源于神经板。随后 CNCs 向侧腹方迁移, 当发育至 E9.0 和 E9.25 时, 胚胎外表形成了直线型鳃弓, 荧光显微镜下可见 Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠在第一、二鳃弓都有很强的绿色荧光, 占满整个鳃弓组织, 而 Pax2-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠仅特异性在第一鳃弓中有绿色荧光, 第二鳃弓中几乎观察不到荧光信号 (图 1)。因此, 通过荧光的观察, 发现小鼠早期胚胎发育阶段, Pax2-Cre 标

记的 CNCs 会特异性只迁移到第一鳃弓中, 而 Wnt1-Cre 标记的 CNCs 则会同时迁移到第一和第二鳃弓。

2.2 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 标记的 CNCs 在颌面部的分化谱系比较

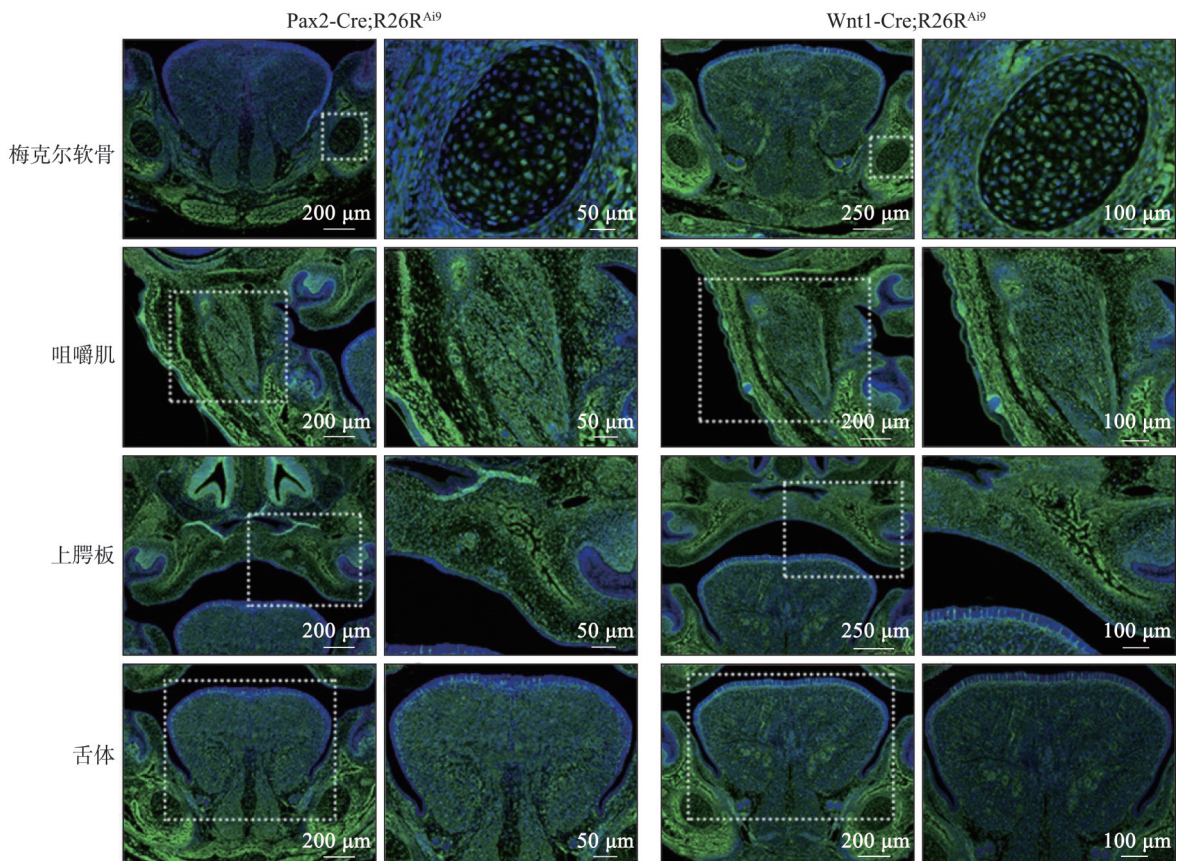
为精确解析 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 各自标记的 CNCs 在颌面部组织器官中的分化谱系, 分别收取了 E15.5 的 Wnt1-Cre;R26R^{Ai9} 和 Pax2-Cre;R26R^{Ai9} 小鼠胚胎头部进行石蜡切片免疫荧光后, 通过观察 RFP 的表达模式, 发现 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 标记的第一鳃弓的 CNCs 经分化后均会构成了切牙、磨牙间充质、舌体、上腭板、咀嚼肌和梅克尔软骨这些组织的部分细胞。但与 Pax2-Cre;R26R^{Ai9} 相比, Wnt1-Cre;R26R^{Ai9} 小鼠中 RFP 阳性细胞在上腭和舌体中的表达范围均更广 (图 2), 表明在上腭和舌体中有部分的细胞是由第二鳃弓组织构成的。



每幅图中右侧图是左侧图白色虚线框中内容的放大图。BA: 鳃弓; NP: 神经板。

图 1 体式荧光显微镜下 Pax2-Cre;R26R^{mTmG}小鼠和 Wnt1-Cre;R26R^{mTmG}小鼠胚胎荧光图

Fig 1 Fluorescence stereo microscope showed the expression pattern of embryos of Pax2-Cre;R26R^{mTmG} and Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} mice



每幅图中右侧图是左侧图白色虚线框中内容的放大图。

图 2 Pax2-Cre和Wnt1-Cre谱系CNCs细胞在颅颌面部表达模式的比较

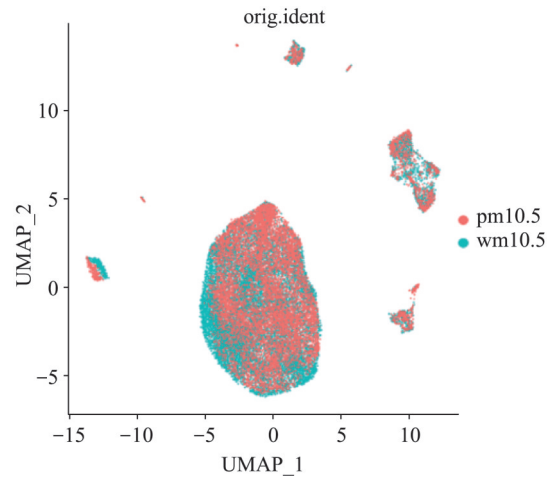
Fig 2 Comparison of Pax2-Cre and Wnt1-Cre labeled CNCs expression patterns in cranial-facial region

2.3 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 标记的 CNCs 在单细胞层面的细胞亚型

由于在组织学层面进行谱系细胞追踪后发现，Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 标记的 CNCs 谱系细胞从神经板迁移出来后，均会迁移到第一鳃弓中，但是并不是完全构成了第一鳃弓组织中全部细胞，因此，进一步利用单细胞测序和生物信息学分析对第一鳃弓组织中两种 Cre 小鼠标记的 CNCs 进行了分析。分别收取 E10.5 的 Pax2-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠和 Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠的第一鳃弓间充质进行单细胞转录组测序。经细胞消化、捕获和单细胞测序后，Pax2-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠一共获得 14 130 个有效细胞，单个细胞的 reads 平均数为 11 584，单个细胞的基因中位数为 1 484。Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} 中共获得 17 703 个有效细胞，单个细胞的 reads 平均数为 10 553，单个细胞的基因中位数为 1 724。两者数据进行合并后通过 Seurat 流程发现两次样本重叠率高（图 3），说明两次数据具有可比性，可用于后续深入分析。

聚类分析后发现 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 的 CNCs 谱系细胞分为 6 个亚群，分别为间充质细胞（Mesenchymal cell）、上皮细胞（Epithelial cell）、肌肉细

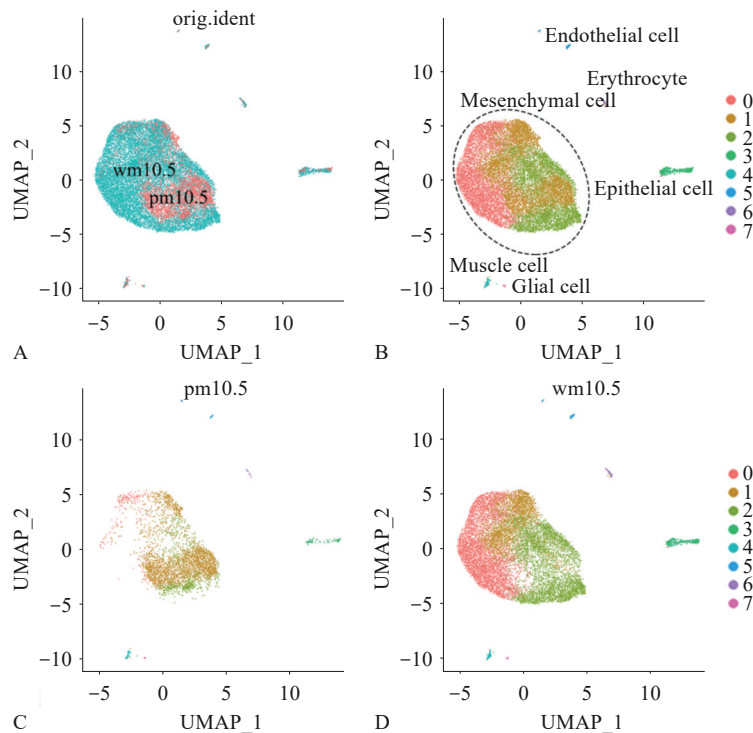
胞（Muscle cell）、红细胞（Erythrocyte）、内皮细胞（Endothelial cell）和胶质细胞（Glial cell）。并且，Wnt1-Cre 谱系的 CNCs 表达较 Pax2-Cre 谱系 CNCs 广，重叠部分主要为间充质细胞（图 4）。



pm: Pax2-Cre;R26R^{mTmG}; wm: Wnt1-Cre;R26R^{mTmG}。

图 3 聚类图示 Pax2-Cre;R26R^{mTmG} 和 Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} 第一鳃弓数据整合情况

Fig 3 Integrative analysis of transcriptome data from Pax2-Cre;R26R^{mTmG} and Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} mice branchial arch single cells



A: 小鼠 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 谱系细胞单细胞数据整合在聚类图中的分布；B: UMAP 聚类后的细胞类群分布图：间充质细胞（Cluster0-2）、上皮细胞、肌肉细胞、内皮细胞、红细胞、胶质细胞；C、D: 聚类结果以不同样本拆分后的分布图，pm: Pax2-Cre;R26R^{mTmG}，wm: Wnt1-Cre;R26R^{mTmG}。

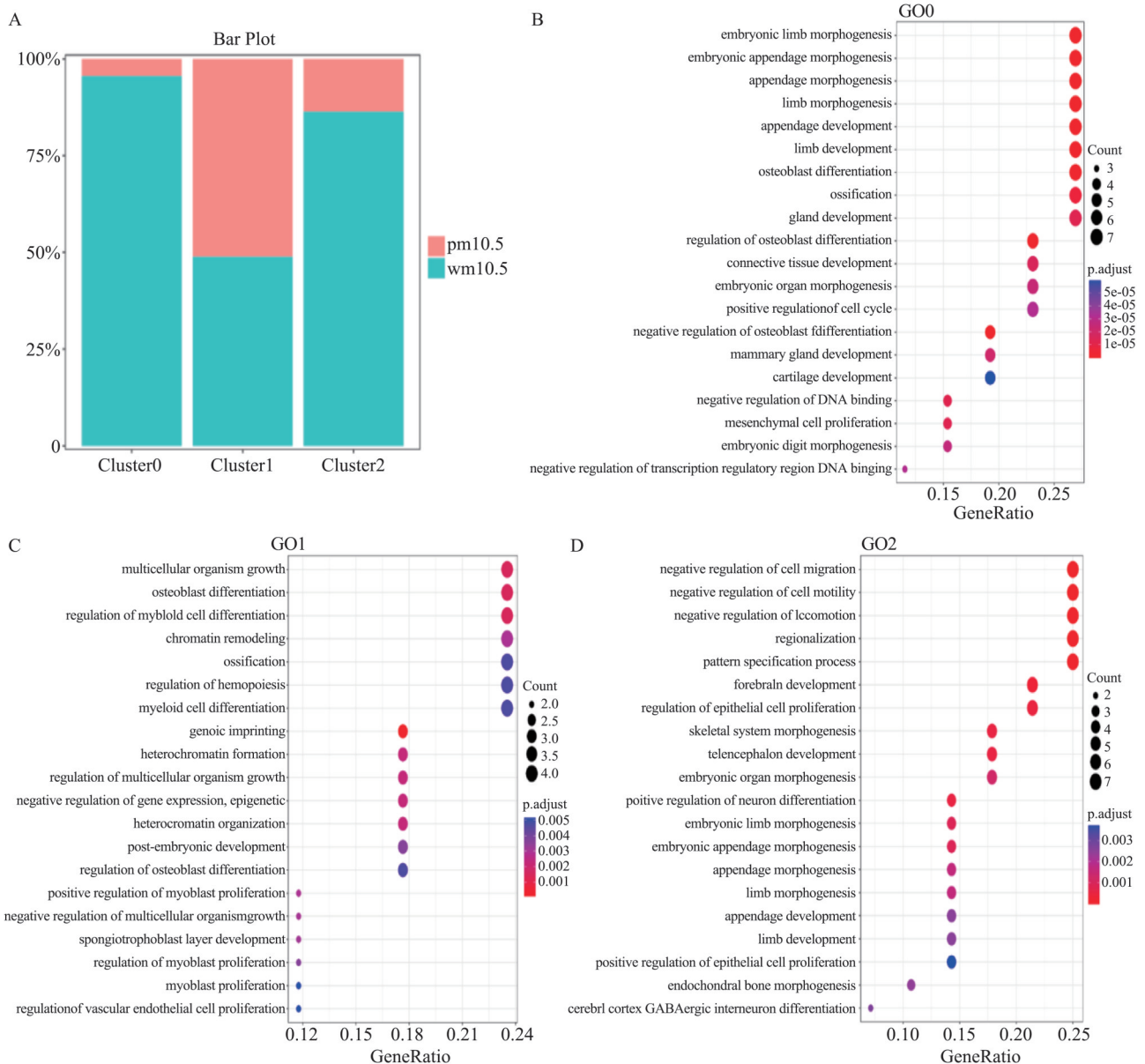
图 4 小鼠 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 谱系细胞整合分析

Fig 4 scRNA-seq results reveal cell type compositions in Pax2-Cre and Wnt1-Cre lineage CNCs

2.4 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 分别标记的 CNCs 在第一鳃弓间充质中各亚群差异基因分析

Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 谱系 CNCs 主要聚集在 Cluster0、1、2 中,为进一步明确两者标记 CNCs 的差异基因及其功能,首先分析了各亚群的细胞数占比后发现:在 Cluster1 中, Pax2-Cre 的细胞数量与 Wnt1-Cre 细胞数量基本相当;而 Cluster0 和 2 中, Pax2-Cre 标记的 CNCs 细胞数量远远少于 Wnt1-Cre。GO0 差异基因富集到的词条皆与肢体发育、附属物形态发生相关;GO1 差异基因富集到的词条皆与成骨细胞分化、成骨作用、骨髓细

胞分化调控相关;GO2 差异基因富集到的词条皆与细胞迁移调控、细胞运动调控、区域化相关(图5)。为了验证 Wnt1-Cre 小鼠和 Pax2-Cre 小鼠均标记的第一鳃弓 CNCs 差异基因表达情况,分别对 Cluster0、1、2 中的差异基因进行了 q-PCR 验证,发现除了 Cluster1 中 Pax2-Cre 小鼠均标记的第一鳃弓 CNCs 中 Gnas 和 Dlk1 基因表达高于 Wnt1-Cre,在 Cluster0 和 2 中均为 Wnt1-Cre 标记的第一鳃弓 CNCs 表达基因水平更高(图6)。这些差异基因均与 GO 分析出的功能所对应。



A: Bar Plot 可视化各亚群细胞数量比例; B: Cluster0 差异基因的 GO 功能富集结果; C: Cluster1 差异基因的 GO 功能富集结果; D: Cluster2 差异基因的 GO 功能富集结果。

图 5 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 谱系 CNCs 差异基因功能分析

Fig 5 The GO analysis of Pax2-Cre and Wnt1-Cre lineage CNCs

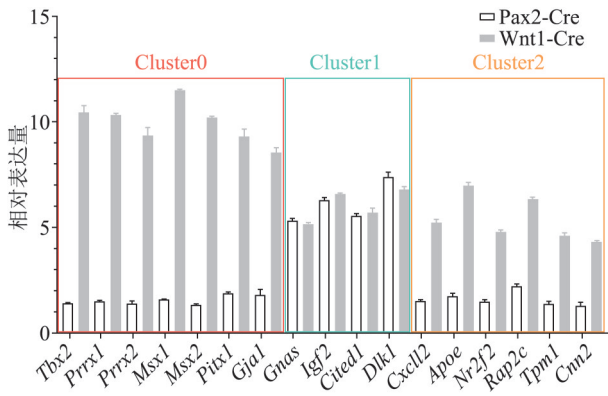


图 6 Pax2-Cre 和 Wnt1-Cre 谱系 CNCs 中差异基因 q-PCR 表达验证
 Fig 6 The q-PCR analysis of differential genes from Pax2-Cre and Wnt1-Cre lineage CNCs

3 讨论

小鼠和人类颅颌面部发育过程十分类似，神经板上的 CNCs 随着胚胎发育，会从颅神经板迁移到第一、第二鳃弓中^[15-16]，并具有强大的多向分化潜能，在特定信号分子网络调控下，决定 CNCs 的分化命运，形成颅颌面部特定的组织和器官，即发生模式化。其中，由于第一鳃弓衍生了大部分的颅颌面部组织，包括牙齿、上下颌骨、上腭等主要器官^[17-18]，因此，对第一鳃弓 CNCs 的精细化研究有助于更好地深入探索这些颅颌面部主要器官发育的分子机制。

Cre 酶标记的遗传修饰小鼠是研究 CNCs 的重要手段之一，由于 Wnt/ β -catenin 信号活跃在小鼠第一鳃弓及多个颅颌面部区域^[19-20]，并对第一鳃弓衍生的颅颌面部组织和器官的发育起重要调控作用，因此在 Wnt1-Cre 遗传修饰小鼠被构建出来以后^[5]，即广泛应用于 CNCs 相关研究。由于 Wnt1-Cre 会同时标记第一和第二鳃弓的 CNCs，会导致第一鳃弓特异性衍生的组织器官发育研究的偏差。而前期研究^[12]发现 Pax2-Cre 小鼠能特异性标记第一鳃弓 CNCs，恰好可以用于第一鳃弓 CNCs 及其衍生组织的相关研究。为了明确 Wnt1-Cre 小鼠和 Pax2-Cre 小鼠所标记的第一鳃弓 CNCs 在胚胎发育过程中的迁移和分化模式，分别对 Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} 和 Pax2-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠通过 GFP 阳性细胞的检测发现两者在胚胎发育早期 (E8.0) 时均在神经板的相似区域表达，并且在 E9.0 时即迁移至第一和第二鳃弓间充质中，其中 Wnt1-Cre 标记的 CNCs 在第一和第二鳃弓间充质表达，而 Pax2-Cre 标记的 CNCs 仅表达于第一鳃弓间充质。在 De Bono 等^[21]

2023 年最新的研究中，也利用 Wnt1-Cre;ROSA-EGFP 小鼠进行了组织学观察，发现 Wnt1 表达的 CNCs 不仅限于第一、二鳃弓，在第三~六鳃弓也有广泛表达。继而对同时期 Wnt1-Cre;R26R^{mTmG} 和 Pax2-Cre;R26R^{mTmG} 小鼠进行免疫荧光发现两者所标记的 CNCs 也会在同样的颌面部组织中表达，但 Wnt1-Cre 小鼠标记范围在一些组织中更广泛。这说明 Pax2-Cre 小鼠可以和 Wnt1-Cre 小鼠一样，作为一种很好的实验动物模型用于 CNCs 的研究，并且对于第一鳃弓衍生的组织更具特异性。

在组织学层面无法区分 Wnt1-Cre 小鼠和 Pax2-Cre 小鼠所标记的第一鳃弓 CNCs 是否一致，因此，采用了单细胞测序的方法，对两者标记的第一鳃弓 CNCs 进行了深入分析。在标记的细胞类型上发现主要标记了 6 个亚群，主要为间充质细胞，还包括了极少量的上皮细胞、肌肉细胞、红细胞、内皮细胞和胶质细胞，这说明了无论是 Wnt1-Cre 小鼠还是 Pax2-Cre 小鼠所标记的 CNCs 都具有异质性，第一鳃弓的 CNCs 由以间充质细胞为主的多种细胞构成。其他对第一鳃弓 CNCs 进行单细胞测序的研究^[22]中也发现细胞具有异质性。其次，两者所标记的细胞数量上也存在差异，在 Cluster0 和 2 中 Wnt1-Cre 标记的 CNCs 数量都远大于 Pax2-Cre，Cluster1 中则各占一半，在对胚胎组织学切片进行的免疫荧光中也发现 Wnt1-Cre 所标记的细胞在颌面部组织中的分布更广，这些结果均表明了在第一鳃弓间充质细胞中，表达 Wnt1-Cre 的 CNCs 范围更广，但表达 Pax2-Cre 的 CNCs 更具特异性。

为了探索 Wnt1-Cre 小鼠和 Pax2-Cre 小鼠标记 CNCs 所参与的生物学功能是否具有差异性，对两者分布较均匀的 Cluster1 进行了生物学功能富集分析后发现：Pax2-Cre 小鼠标记 CNCs 的亚群主要参与了成骨、成骨细胞分化相关功能；Wnt1-Cre 小鼠标记的 CNCs 的亚群参与了肢体发育、细胞迁移及成骨等多种功能。这些结果提示，Wnt1-Cre 小鼠标记的 CNCs 所参与的生物学功能多样性较多，但特异性不足，而 Pax2-Cre 小鼠在 CNCs 及其衍生细胞、组织等的成骨相关研究方面更具特异性，q-PCR 检测差异基因也进一步对其功能进行了验证。

综上，Wnt1-Cre 小鼠和 Pax2-Cre 小鼠均可标记第一鳃弓 CNCs，但 Wnt1-Cre 小鼠同时标记第一鳃弓和第二鳃弓，且标记的第一鳃弓 CNCs 广泛并具有多种生物学功能，而 Pax2-Cre 小鼠只标记第一鳃弓 CNCs，且这些细胞更具成骨特异性，因此，Pax2-Cre 小鼠在第一鳃弓 CNCs 及其衍生细胞

(如牙髓干细胞、成牙本质细胞、上腭间充质细胞等)的成骨分化相关研究方面,是绝佳的小鼠模型,能用以更为精准的分子机制探索。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Johnson JM, Moonis G, Green GE, et al. Syndromes of the first and second branchial arches, part 2: syndromes [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2011, 32(2): 230-237.
- [2] Senggen E, Laswed T, Meuwly JY, et al. First and second branchial arch syndromes: multimodality approach [J]. *Pediatr Radiol*, 2011, 41(5): 549-561.
- [3] Hinrichsen K. The early development of morphology and patterns of the face in the human embryo[J]. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 1985, 98: 1-79.
- [4] Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, et al. A global double-fluorescent Cre reporter mouse[J]. *Genesis*, 2007, 45(9): 593-605.
- [5] Chai Y, Jiang X, Ito Y, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis[J]. *Development*, 2000, 127(8): 1671-1679.
- [6] Chen G, Ishan M, Yang J, et al. Specific and spatial labeling of P0-Cre versus Wnt1-Cre in cranial neural crest in early mouse embryos[J]. *Genesis*, 2017, 55(6): 10.
- [7] Deal KK, Rosebrock JC, Eeds AM, et al. Sox10-Cre BAC transgenes reveal temporal restriction of mesenchymal cranial neural crest and identify glandular Sox10 expression[J]. *Dev Biol*, 2021, 471: 119-137.
- [8] Monsoro-Burq AH. PAX transcription factors in neural crest development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 44: 87-96.
- [9] Rowitch DH, McMahon AP. Pax-2 expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of Wnt-1 and En-1[J]. *Mech Dev*, 1995, 52(1): 3-8.
- [10] Barritt LC, Miller JM, Scheetz LR, et al. Conditional deletion of the human ortholog gene *Dicer1* in Pax2-Cre expression domain impairs orofacial development[J]. *Indian J Hum Genet*, 2012, 18(3): 310-319.
- [11] Ohshima T, Groves AK. Generation of Pax2-Cre mice by modification of a Pax2 bacterial artificial chromosome [J]. *Genesis*, 2004, 38(4): 195-199.
- [12] Xu J, Chen M, Yan Y, et al. The effects of altered BMP4 signaling in first branchial-arch-derived murine embryonic orofacial tissues[J]. *Int J Oral Sci*, 2021, 13(1): 40.
- [13] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-382.
- [14] Kester L, van Oudenaarden A. Single-cell transcriptomics meets lineage tracing[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 166-179.
- [15] Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL. Specification of jaw subdivisions by *Dlx* genes[J]. *Science*, 2002, 298(5592): 381-385.
- [16] Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, et al. Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development[J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155A(2): 270-279.
- [17] Rossant J. Mice development: patterning, morphogenesis and organogenesis[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 219-229.
- [18] Minoux M, Rijli FM. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development[J]. *Development*, 2010, 137(16): 2605-2621.
- [19] Brugmann SA, Goodnough LH, Gregorieff A, et al. Wnt signaling mediates regional specification in the vertebrate face[J]. *Development*, 2007, 134(18): 3283-3295.
- [20] Vendrell V, Summerhust K, Sharpe J, et al. Gene expression analysis of canonical Wnt pathway transcriptional regulators during early morphogenesis of the facial region in the mice embryo[J]. *Gene Expr Patterns*, 2009, 9(5): 296-305.
- [21] De Bono C, Liu Y, Ferrena A, et al. Single-cell transcriptomics uncovers a non-autonomous *Tbx1*-dependent genetic program controlling cardiac neural crest cell development[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1551.
- [22] Yuan Y, Loh YE, Han X, et al. Spatiotemporal cellular movement and fate decisions during first pharyngeal arch morphogenesis[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(51): eabb0119.

(本文编辑 杜冰)