

C57BL/6小鼠大脑皮层区与基底神经节隆起区神经元突触发育过程比较

赵艳^{1,2}, 卢广泉², 杜金乐², 潘雨绮², 董子意², 康鑫², 高戈婷², 高方², 杨加周¹

(1. 延安大学医学院组织学与胚胎学教研室, 陕西延安 716099; 2. 空军军医大学基础医学院神经生物学教研室, 陕西西安 710032)

[摘要] **目的:** 观察小鼠皮层区和基底神经节隆起(GE)区神经元突触发育过程, 阐明兴奋性突触和抑制性突触在不同脑区的体内外发育差异。**方法:** C57BL/6雌鼠于妊娠第13.5~15.5天断颈处死后, 经无菌操作取胚胎小鼠, 显微镜下逐步分离获取胚胎小鼠脑组织皮层区和GE区。体外原代培养胚胎小鼠神经元, 于培养3、7、14和21 d分别收集细胞样品, 并将其作为培养3、7、14和21 d组。采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中突触后表达蛋白突触后密度蛋白95(PSD95)及桥尾蛋白(Gephyrin)mRNA表达水平。免疫荧光法检测各组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中囊泡谷氨酸转运蛋白1(vGLUT1)、PSD95、囊泡 γ -氨基丁酸(GABA)转运蛋白(vGAT)及Gephyrin蛋白表达水平。免疫荧光法检测胚胎小鼠脑组织皮层区和GE区神经元中vGLUT1及vGAT蛋白表达水平。**结果:** 与培养3 d组比较, 培养14和21 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中PSD95及Gephyrin mRNA表达水平明显升高($P < 0.01$); 与皮层区比较, 培养14 d组小鼠GE区原代培养神经元中Gephyrin mRNA表达水平明显降低($P < 0.01$)。显微镜下观察, 培养14 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中兴奋性突触及抑制性突触均初步发育, 相关蛋白呈阳性表达; 其中兴奋性突触相关蛋白阳性表达在皮层区神经元中更为明显, 且突触前分子vGLUT1和突触后分子PSD95在皮层区神经元的胞体及突起部位均呈现共定位的特征; 抑制性突触前分子vGAT蛋白和突触后分子Gephyrin蛋白在GE区神经元胞体及突起中也呈现共定位的特征, 且突触前分子较相应的突触后分子蛋白阳性表达更明显。与皮层区比较, 培养14 d组小鼠GE区原代培养神经元中vGLUT1和PSD95蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$), vGAT和Gephyrin蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$)。培养21 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元突触相关蛋白阳性表达增加, 兴奋性突触和抑制性突触进一步成熟并完善。皮层区和GE区原代培养神经元的胞体及突起部位均形成了丰富的突触前后对应的表达模式, 突触结构逐步发育良好, 且突触前分子较相应的突触后分子蛋白阳性表达更明显。与皮层区比较, 培养21 d组小鼠GE区原代培养神经元中vGLUT1和PSD95蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$), vGAT和Gephyrin蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$)。与皮层区比较, 胚胎小鼠脑组织GE区神经元中vGLUT1蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$), vGAT蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。**结论:** 皮层区和GE区神经元的突触发育具有明显的差异性, 皮层区兴奋性突触发育较早, GE区抑制性突触发育较早。突触的脑区特异性发育提示不同细胞类型的神经疾病可能具有不同的发育来源。

[关键词] 神经元发育; 兴奋性突触; 抑制性突触; 皮层区; 基底神经节隆起区

[中图分类号] R394 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-12-18

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82071529)

[作者简介] 赵艳(1993-), 女, 云南省威信县人, 在读硕士研究生, 主要从事神经发育基础方面的研究。

[通信作者] 杨加周, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师(E-mail: jiazhou@163.com)

Comparison of development process of neuronal synapse between cerebral cortex and basal ganglia eminence regions in C57BL/6 mice

ZHAO Yan^{1,2}, LU Guangquan², DU Jinle², PAN Yuqi², DONG Ziyi², KANG Xin², GAO Yiting²,
GAO Fang², YANG Jiazhou¹

(1. Department of Histology and Embryology, School of Medical Sciences, Yan'an University, Yan'an 716099, China; 2. Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the development process of the neuronal synapse in cerebral cortex and basal ganglionic eminence (GE) regions of the mice, and to clarify the differences in the development of excitatory and inhibitory synapses in different brain regions *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** The female C57BL/6 mice were euthanized by cervical dislocation from the 13.5th day to the 15.5th day during the pregnancy, and the embryos were collected under the sterile conditions. The cortex and GE regions of brain tissue of the embryonic mice were gradually isolated under microscope. The primary neurons from the embryonic mice were cultured *in vitro*, and the cell samples were collected on the 3rd, 7th, 14th, and 21th days, respectively, and regarded as culture 3 d, 7 d, 14 d, and 21 d groups. The expression levels of postsynaptic density 95 (PSD95) and Gephyrin mRNA in the primary neurons from the cortex and GE regions of the mice in various groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method. Immunofluorescence method was used to detect the expression levels of vesicular glutamate transporter 1 (vGLUT1), PSD95, vesicular GABA transporter (vGAT), and Gephyrin proteins in the neurons from the cortex and GE regions of the mice in various groups. Immunofluorescence method was also used to detect the expression levels of vGLUT1 and vGAT proteins in the neurons from the cortical and GE regions in brain tissue of the embryonic mice. **Results:** Compared with culture 3 d group, the expression levels of PSD95 and Gephyrin mRNA in cortex and GE regions of the mice in culture 14 d and 21 d groups were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with cortex area, the expression level of Gephyrin mRNA in the neurons from GE region of the mice in culture 14 d group was significantly decreased ($P < 0.01$). The microscope observation results showed that the excitatory and inhibitory synapses in the neurons from cortex and GE regions of the mice in culture 14 d group showed preliminary development, with positive expression of relevant proteins; among them, the excitatory synaptic proteins showed more distinct positive expression in the cortex neurons, and the presynaptic vGLUT1 and postsynaptic PSD95 molecules exhibited co-localization in the cell bodies and protrusions of the cortical neurons; the inhibitory presynaptic vGAT protein and postsynaptic Gephyrin protein in the neurons from GE region also exhibited co-localization in the cell bodies and protrusions, and there were more distinct expressions of the presynaptic molecule proteins than postsynaptic molecule proteins. Compared with cortex region, the levels of vGLUT1 and PSD95 proteins in the neurons from GE region of the mice in culture 14 d group were significantly decreased ($P < 0.01$), while the levels of vGAT and gephyrin proteins were significantly increased ($P < 0.01$). In culture 21 d group, the positive expressions of synaptic protein in the neurons from cortex and GE regions were increased, and the excitatory and inhibitory synapses further matured and enhanced. In the neurons from cortex and GE regions, rich patterns of corresponding pre- and postsynaptic expression were formed in the cell bodies and protrusions, and synapse structures showed gradual, positive development, with more apparent expression of presynaptic molecules compared with

postsynaptic proteins. Compared with cortex region, the levels of vGLUT1 and PSD95 proteins in the neurons from GE region of the mice in culture 21 d group were significantly decreased ($P<0.01$), and the levels of vGAT and Gephyrin proteins were significantly increased ($P<0.01$). Compared with cortex region, the expression level of vGLUT1 protein in the neurons from GE region in brain tissue of the embryonic mice was significantly decreased ($P<0.01$), while the expression level of vGAT protein was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** There are distinct differences in synaptic development between the neurons from cortex and GE regions, the excitatory synapses develop earlier in the cortical region and the inhibitory synapses develop earlier in the GE region. The region-specific development of synapses suggests that different types of neural diseases with different cell types might originate from different developmental processes.

KEYWORDS Neuronal development; Excitatory synapses; Inhibitory synapses; Cortex; Ganglionic eminence

突触是神经系统的基本结构,神经元之间及神经元与效应细胞之间形成突触连接是传递电化学信号的结构基础。因此,突触发育是神经发育的关键步骤。突触结构包括兴奋性突触和抑制性突触,分别由各自特异的突触前后蛋白组成。兴奋性突触通常会形成树突棘样结构,突触前膜和突触后膜均聚集大量特异性蛋白,电镜下观察可见突触后致密体。兴奋性突触可使用的标志物包括兴奋性突触前特异性分子囊泡谷氨酸转运蛋白1 (vesicular glutamate transporter 1, vGLUT1) 和兴奋性突触后特异性分子突触后密度蛋白95 (postsynaptic density 95, PSD95),可分别对突触前成分和突触后成分进行染色并观察^[1-4]。抑制性突触由独特的蛋白聚集于突触前膜和后膜形成,其中具有特征性且常用于染色观察的标志物包括抑制性突触前特异性分子囊泡 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)转运蛋白(vesicular GABA transporter, vGAT)和抑制性突触后特异性分子桥尾蛋白(Gephyrin),相关特异性分子分别组成特定的突触结构,共同形成复杂的神经环路^[5-9]。神经元的体外原代培养是一种常用的神经观察体系^[10]。原代培养神经元被广泛应用于神经发育和突触发育的观察,还可用于药理作用下或病理模型中神经元生理和病理的研究及神经元电生理功能的观测等^[11-14]。不同脑区来源的神经元其体外发育过程不同,突触相关发育也存在差异。对不同脑区神经元的发育和突触发育进行观察可为后续开展针对性的生理病理及电生理研究提供实验基础。研究^[15-16]显示:原代神经元培养大多选择皮层区神经元,对基底神经节隆起(ganglionic eminence, GE)区神经元培养并观察其发育情况的研究较少。本研究对皮

层区和GE区神经元突触发育过程进行比较,探讨体外培养小鼠不同脑区来源神经元的突触结构发育情况,阐明不同性质突触结构中最佳观察和干预时间,为突触发育研究和病理药理研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 10只C57BL/6小鼠来源于空军军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(陕)2019-001。小鼠于SPF级动物房饲养,室内温度约为24℃,相对湿度约为50%,光照为12h光/12h暗循环。神经元基础培养液(neurobasal medium, NB)、0.25%胰酶消化液(Typsin-EDTA)、细胞平衡盐缓冲液(Hanks' balanced salt solution, HBSS)、B27添加剂和青-链霉素混合液(100 U·mL⁻¹青霉素和0.1 g·L⁻¹链霉素)(美国Gibco公司),L-谷氨酰胺(美国Amresco公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程公司),多聚赖氨酸(美国Sigma公司),抗PSD95抗体和抗vGAT抗体(美国Abcam公司),抗Gephyrin抗体(美国Synaptic Systems公司),抗vGLUT1抗体(美国SYSY公司),Alexa Fluor[®] 488标记鼠抗小鼠多克隆二抗、Alexa Fluor[®] 488标记鼠抗兔多克隆二抗、Alexa Fluor[®] 594标记鼠抗兔多克隆二抗和Alexa Fluor[®] 594标记抗豚鼠多克隆二抗(美国Jackson ImmunoResearch公司),4',6-二脒基-2-苯基(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(德国Sigma公司),山羊血清(北京索莱宝科技有限公司),Triton X-100(瑞士Roche公司),NovoStart[®]SYBR High-sensitivity qPCR SuperMix(合肥吉象生物技术有限公司),PrimeScript[™] RT Master Mix(北京宝日医生物技

术有限公司), TRIzol (北京 TIANGEN 公司)。CO₂培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司), 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司), 超净工作台 (苏州苏净集团安泰公司), 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (型号: C1000 Touch, 美国 Bio-Rad 公司), 激光共聚焦显微镜 (型号: FV3000, 日本 Olympus 公司)。

1.2 神经元原代培养及分组 C57BL/6 雌鼠于妊娠第 13.5~15.5 天断颈处死后, 经无菌操作取胚胎小鼠, 置于含提前预冷 1×HBSS 的培养皿中。于显微镜下逐步分离以获取胚胎小鼠皮层区和 GE 区脑组织, 并去掉其表面脑膜。0.25% Trypsin-EDTA 消化脑组织, 制备为单细胞悬液, 接种至预先用多聚赖氨酸包被的 6 孔和 24 孔细胞培养板中, 采用含 2% B27、1% 青-链霉素混合液和 0.5 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺的 NB 培养液培养。神经元细胞于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中孵育。隔日进行半量换液 1 次。于培养 3、7、14 和 21 d 分别收集细胞样品, 并将其作为培养 3、7、14 和 21 d 组。

1.3 RT-qPCR 法检测各组小鼠皮层区和 GE 区原代培养神经元中 PSD95 及 Gephyrin mRNA 表达水平 于培养 3、7、14 和 21 d 取出小鼠皮层区及 GE 区原代培养神经元后, 采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。采用多功能酶标仪检测 RNA 的浓度和纯度, 取吸光度 (A) (260) / A (280) 比值范围于 1.8~2.0 的 RNA 样本, 进行反转录以合成 cDNA。以 β -actin 为内参, 检测小鼠皮层区及 GE 区原代培养神经元中 PSD95 和 Gephyrin mRNA 表达水平。将配制好的反应体系转移至 Bio-Rad CFX96 仪器中, 设置反应程序, 进行 RT-qPCR 反应。反应条件: 95 °C 起始模板变性 15 min; 94 °C 变性 20 s、60 °C 退火 30 s, 75 °C 延伸 30 s, 循环 45 次。扩增结束后, 分析熔解曲线。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因表达水平。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

Primer	Sequence(5'-3')
PSD95	F: TGAGATCAGTCATAGCAGCTACT
	R: CTTCTCCCTAGCAGGTCC
Gephyrin	F: CAACCACGACCATCAAATCCG
	R: CAACAAAGAAGGATCTTGACA
β -actin	F: GGCTGTATTCCCTCCATCG
	R: CCAGTTGGTAAACAATGCCATGT

1.4 免疫荧光法检测各组小鼠皮层区和 GE 区原代培养神经元中 vGLUT1、PSD95、vGAT 及 Gephyrin 蛋白表达水平 于培养第 14 和 21 天时, 由孵箱中取出小鼠皮层区或 GE 区神经元, 4% 多聚甲醛固定细胞, 采用 3% BSA+0.1% Triton X-100 封闭液预处理 15 min, 加入 1% BSA 液体稀释的 vGLUT1 (1: 500) 与 PSD95 (1: 150) 的抗体混合液或 vGAT (1: 1 000) 与 Gephyrin (1: 150) 的抗体混合液, 4 °C 条件下于湿盒中孵育过夜。次日, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤细胞。加入稀释的 Alexa 488 标记 (1: 500) 和 Alexa 594 标记 (1: 500) 的荧光二抗, 于暗室中孵育 1 h。PBS 缓冲液漂洗细胞 3 次后, 于暗室孵育 DAPI (1: 1 000) 染色以衬染细胞核。PBS 缓冲液漂洗细胞 3 次, 所有玻片倒置于加入适量抗荧光淬灭封片液的载玻片上, 小心封片。-20 °C 避光保存。将样品置于激光共聚焦扫描显微镜下观察, 每张玻片在 60 倍目镜下随机采集 3 个视野图像, 采用 Imaris 软件的“Filaments”功能计算树突长度, 计算单位长度树突阳性染色点数, 代表目的蛋白表达水平。阳性染色点数=阳性蛋白染色总点数/树突长度。

1.5 免疫荧光法检测胚胎小鼠脑组织皮层区和 GE 区神经元中 vGLUT1 及 vGAT 蛋白表达水平

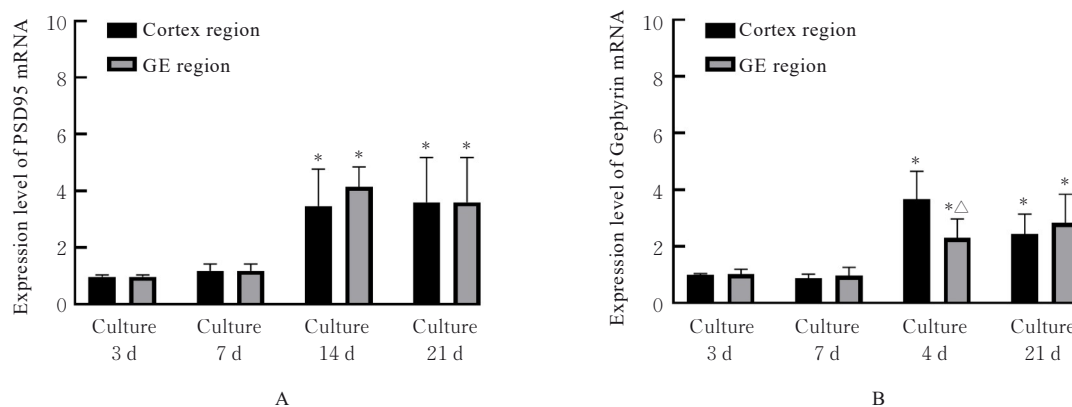
C57BL/6 雌鼠妊娠第 13.5~15.5 天时行腹腔注射 1% 戊巴比妥麻醉, 麻醉起效后取出胚胎小鼠。行 4% 多聚甲醛灌注后, 取出胚胎小鼠脑组织浸泡入 4% 多聚甲醛后固定 2 h, 30% 蔗糖-PBS 缓冲液脱水。脱水 24 h 后, 进行 OCT 包埋和冰冻切片。对脑切片采用 10% BSA+0.1% Triton X-100 预处理 30 min, 加入 1% BSA 稀释的 vGLUT1 (1: 200) 和 vGAT (1: 400) 抗体孵育液, 于 4 °C 湿盒中孵育过夜。次日, PBS 缓冲液洗涤脑片, 加入稀释的 Alexa 488 标记 (1: 500) 和 Alexa 594 标记 (1: 500) 的荧光二抗, 并于暗室孵育 1 h。PBS 缓冲液漂洗切片 3 次后, 暗室孵育 DAPI (1: 1 000) 染液以显示细胞核。PBS 缓冲液漂洗后加入适量抗荧光淬灭封片液于脑片, 盖玻片封片, 待观察。将完成染色的脑片置于激光共聚焦扫描显微镜下观察, 重点观察皮层区和 GE 区视野。采集 10 倍和 40 倍显微镜下的图像, 采用 Image J 软件检测蛋白荧光强度, “Image” 功能标签计算特定颜色的像素值, 代表目的蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8 统计软

件进行统计学分析。各组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中PSD95、Gephyrin mRNA表达水平及vGLUT1、PSD95、vGAT和Gephyrin蛋白表达水平,胚胎小鼠脑组织皮层区和GE区神经元中vGLUT1及vGAT蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中PSD95及Gephyrin mRNA表达水平与培养3 d组



A: PSD95 mRNA (* $P<0.01$ compared with culture 3 d group); B: Gephyrin mRNA (* $P<0.01$ compared with culture 3 d group; $\Delta P<0.01$ compared with cortex region).

图1 各组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中PSD95及Gephyrin mRNA表达水平

Fig. 1 Expression levels of PSD95 and Gephyrin mRNA in primary cultured neurons from cortex region and GE region of mice in various groups

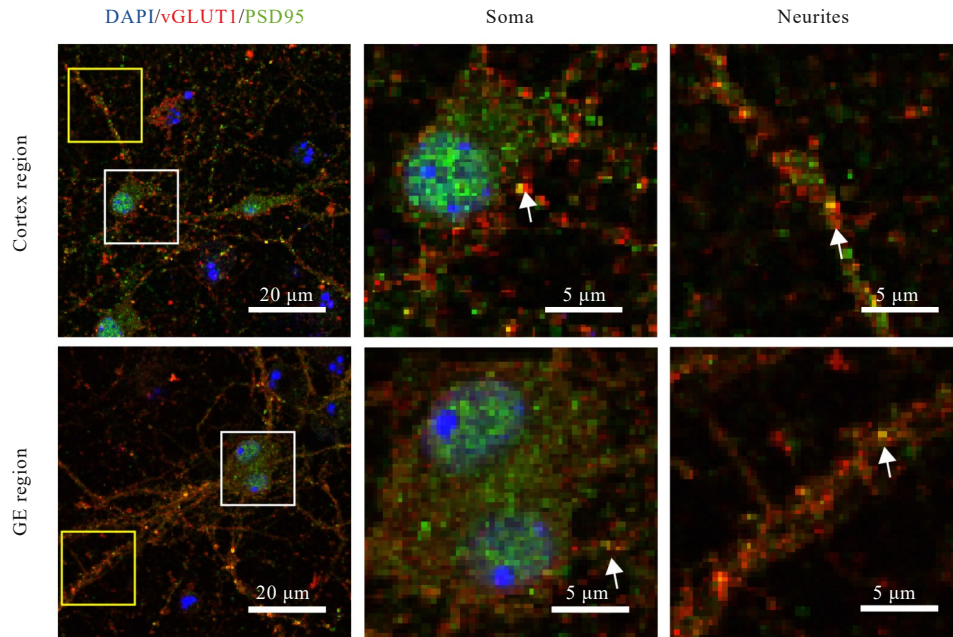
2.2 各组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中vGLUT1、PSD95、vGAT及Gephyrin蛋白表达水平

显微镜下观察可见,培养14 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中兴奋性突触及抑制性突触均初步发育,相关蛋白呈阳性表达。其中兴奋性突触相关蛋白阳性表达在皮层区神经元中更为明显,且突触前分子vGLUT1蛋白和突触后分子PSD95蛋白在皮层区神经元的胞体及突起部位均呈现共定位的特征;抑制性突触前分子vGAT蛋白和突触后分子Gephyrin蛋白在GE区神经元胞体及突起中也呈现共定位的特征,且突触前分子较相应的突触后分子蛋白阳性表达更明显。见图2和3。与皮层区(0.236 ± 0.040 和 0.193 ± 0.040)比较,培养14 d组小鼠GE区原代培养神经元中vGLUT1和PSD95蛋白表达水平(0.195 ± 0.047 和 0.143 ± 0.039)均明显降低($P<0.01$)。与皮层区

比较,培养7 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中PSD95及Gephyrin mRNA表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),培养14和21 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中PSD95及Gephyrin mRNA表达水平明显升高($P<0.01$)。与皮层区比较,培养3、7和21 d组小鼠GE区原代培养神经元中PSD95及Gephyrin mRNA表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$);培养14 d组小鼠GE区原代培养神经元中PSD95 mRNA表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),Gephyrin mRNA表达水平明显降低($P<0.01$)。见图1。

(0.180 ± 0.037 和 0.065 ± 0.027)比较,培养14 d组小鼠GE区原代培养神经元中vGAT和Gephyrin蛋白表达水平(0.251 ± 0.043 和 0.198 ± 0.031)均明显升高($P<0.01$)。

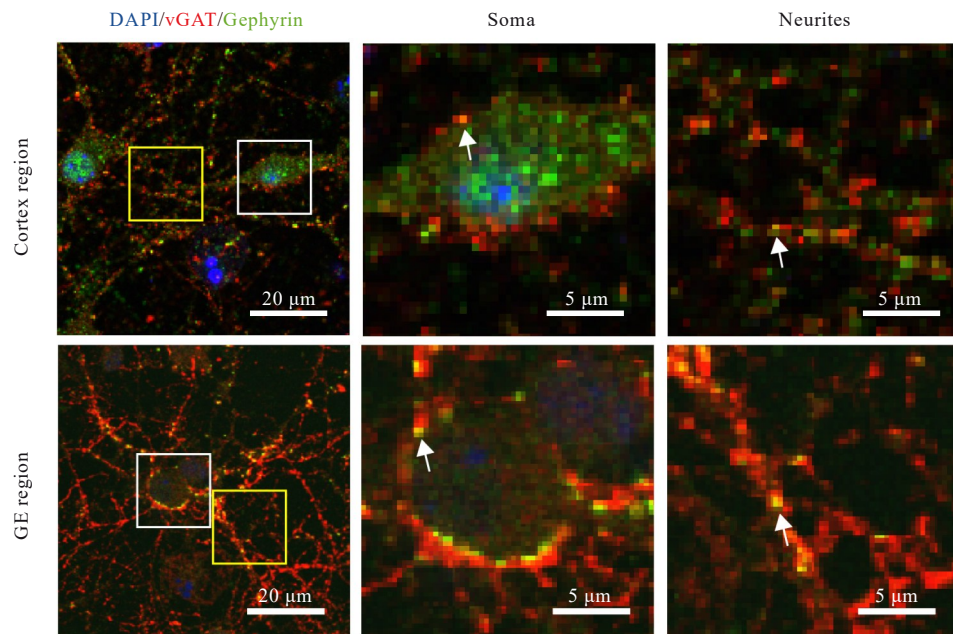
培养21 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元突触相关蛋白阳性表达增加,兴奋性突触和抑制性突触进一步成熟并完善。皮层区和GE区原代培养神经元的胞体及突起部位均形成丰富的突触前后对应的表达模式,突触结构逐步发育良好,且突触前分子较相应的突触后分子蛋白阳性表达更明显。见图4和5。与皮层区(0.474 ± 0.064 和 0.264 ± 0.044)比较,培养21 d组小鼠GE区原代培养神经元中vGLUT1和PSD95蛋白表达水平(0.351 ± 0.072 和 0.231 ± 0.061)均明显降低($P<0.01$)。与皮层区(0.293 ± 0.038 和 0.151 ± 0.028)比较,培养21 d组小鼠GE区原代培养神经元中vGAT和



Arrows: Merge of positive staining.

图2 免疫荧光法检测培养14 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中vGLUT1及PSD95蛋白阳性表达情况

Fig. 2 Positive expressions of vGLUT1 and PSD95 proteins in primary cultured neurons from cortex and GE regions of mice in culture 14 d group detected by immunofluorescence assay



Arrows: Merge of positive staining.

图3 免疫荧光法检测培养14 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中vGAT及Gephyrin蛋白阳性表达情况

Fig. 3 Positive expressions of vGAT and Gephyrin proteins in primary cultured neurons from cortex and GE regions of mice in culture 14 d group detected by immunofluorescence assay

Gephyrin 蛋白表达水平 (0.355 ± 0.063 和 0.269 ± 0.058) 均明显升高 ($P < 0.01$)。

2.3 胚胎小鼠脑组织皮层区和GE区神经元中vGLUT1和vGAT蛋白表达水平与皮层区

(127.70 ± 17.04 和 103.6 ± 8.87) 比较, 胚胎小鼠脑组织GE区神经元中vGLUT1蛋白表达水平 (104.10 ± 9.08) 明显降低 ($P < 0.01$), vGAT蛋白表达水平 (118.30 ± 8.79) 明显升高 ($P < 0.05$)。见图6。

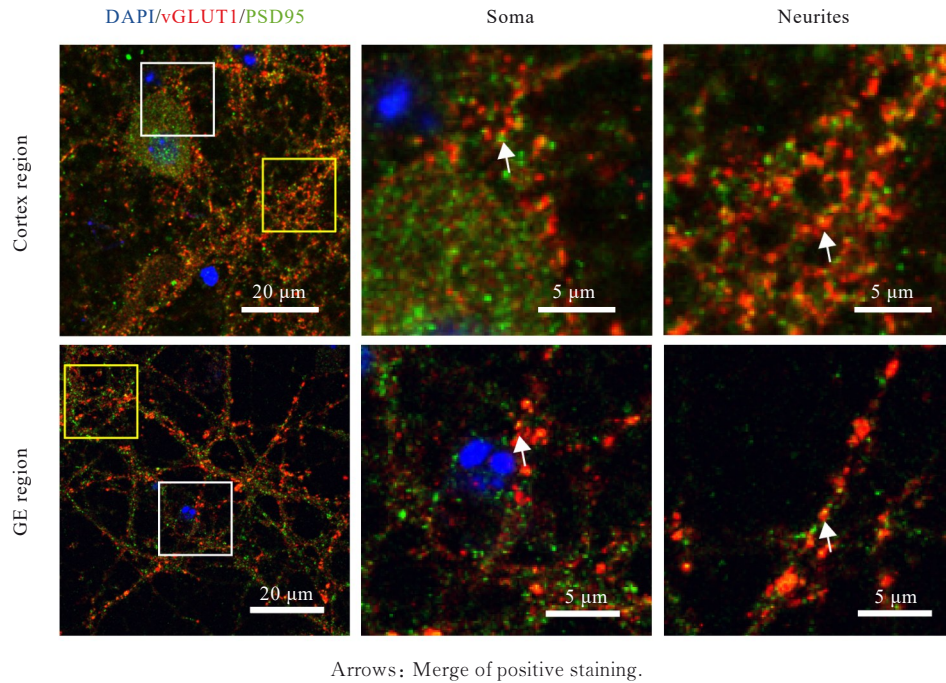


图4 免疫荧光法检测21 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中vGLUT1和PSD95蛋白阳性表达情况

Fig. 4 Positive expressions of vGLUT1 and PSD95 proteins in primary cultured neurons from cortex and GE regions of mice in culture 21 d group detected by immunofluorescence assay

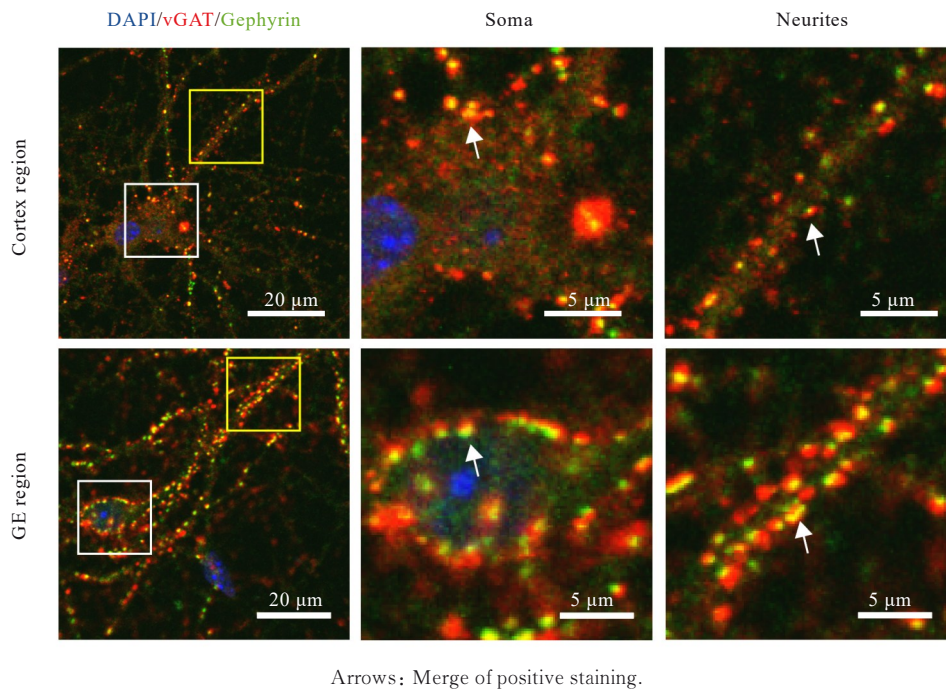


图5 免疫荧光法检测21 d组小鼠皮层区和GE区原代培养神经元中vGAT和Gephyrin蛋白阳性表达情况

Fig. 5 Positive expressions of vGAT and Gephyrin proteins in primary cultured neurons from cortex and GE regions of mice in culture 21 d group detected by immunofluorescence assay

3 讨论

在神经系统相关的研究中,体外培养神经元能够为生理和病理研究提供良好的细胞模型,在神经

元功能、神经发育、细胞内信号转导、神经药理学和神经疾病研究等方面具有重要的意义^[17-18]。在神经退行性疾病阿尔茨海默病的研究中,培养基底前

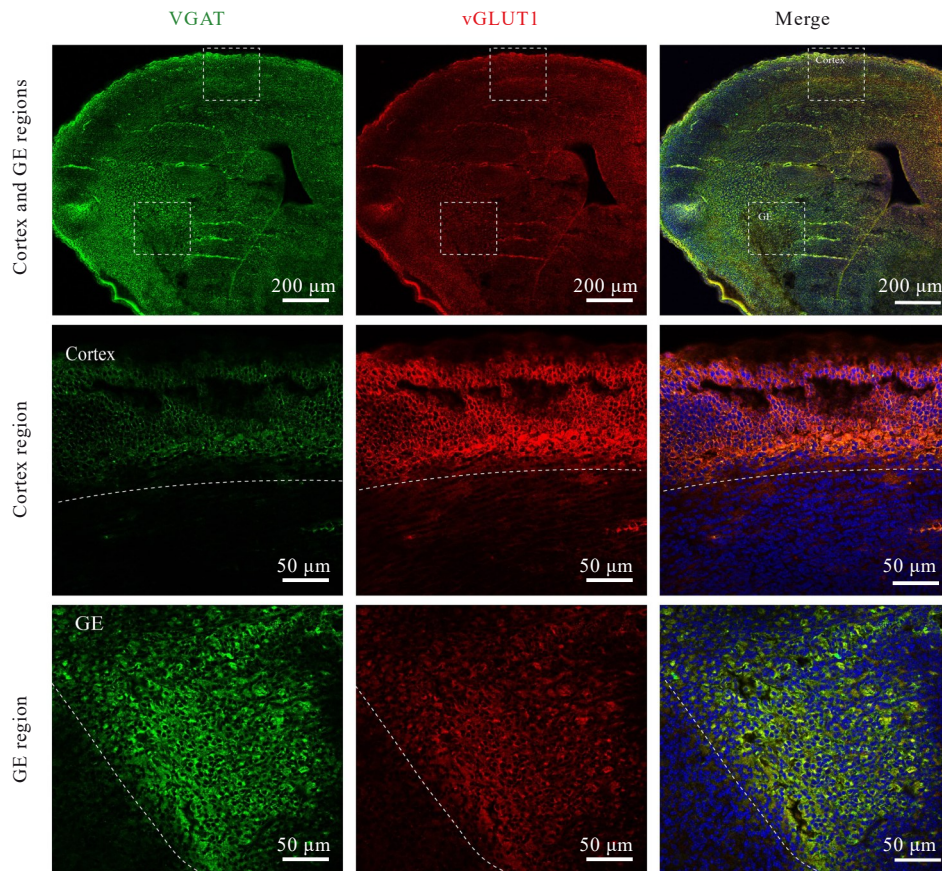


图6 胚胎小鼠脑组织皮层区和GE区神经元中vGLUT1和vGAT蛋白表达情况

Fig. 6 Expressions of vGLUT1 and vGAT proteins in neurons from cortex and GE regions in brain tissue of embryonic mice

脑的神经元可观察其中不同类型神经元（如胆碱能神经元）在致病因素作用下的变化，揭示疾病相关的细胞病理变化及其机制^[19]。因此，对于神经元体外培养发育时程和发育特征等生理过程的研究具有重要意义，也是病理研究的基础。

本研究结果显示：随着培养时间的延长，体外培养皮层区和GE区神经元的发育过程中，突触相关分子vGLUT1、PSD95、vGAT和Gephyrin蛋白表达水平均明显升高，且皮层区和GE区抑制性突触及兴奋性突触发育存在差异。在相同培养时间点，兴奋性突触相关分子在皮层神经元的表达高于GE区神经元，抑制性突触相关分子在GE区神经元的表达高于皮层神经元。提示GE区原代培养神经元较皮层区原代培养神经元更适合进行GABA能神经元的发育研究。此外，突触前分子和突触后分子的表达也存在差异，在皮层区和GE区神经元的兴奋性及抑制性突触中，突触前相关分子的表达均较突触后分子的表达更为明显。

皮层区和GE区神经元突触分子的差异表达可

能是由于2个脑区发育的细胞类型不同所致。本研究结果显示：胚胎小鼠脑组织皮层区和GE区神经元在突触分子表达方面及突触发育方面存在差异，可能与2个脑区的神经元细胞发育有关。GE区是大脑胚胎发育过程中短暂存在的脑结构，位于端脑的腹侧部，被认为是纹状体、杏仁核和基底前脑等重要脑区的发育原基^[20]。GE区神经干（祖）细胞分化为大量的GABA能神经元，分布于皮层区和纹状体等端脑亚区^[21-23]。因此，皮层区的抑制性GABA能中间神经元也来源于GE区，并在分化发育过程中逐渐迁移至皮层区^[24]。皮层区原位的神经干（祖）细胞主要发育为皮层区的兴奋性神经元。本研究结果显示：相同的原代培养时间，与皮层区比较，GE区神经元中vGLUT1和PSD95蛋白表达水平明显降低，vGAT和Gephyrin蛋白表达水平明显升高，可能与不同脑区可作为不同类型神经元的发育原基有关。

突触前后相关分子的先后发育可能反映了发育过程中突触前对突触后的发育引导。在突触发育过

程中,突触前成分与突触后成分之间被证实存在相互作用,且突触前成分对突触后成分具有引导作用^[25]。当突触前神经元释放兴奋性神经递质谷氨酸后,可以通过P38和Jun等信号分子,诱导突触后神经元,上调与谷氨酸相对应的离子型受体在细胞膜上的表达,如兴奋性受体N-甲基-D天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体GluN1亚基的表达。本研究结果显示:相同原代培养时间,突触前成分相关蛋白表达较突触后成分相关蛋白表达更明显,与突触发育过程中突触前对突触后的引导作用一致。

综上所述,皮层区和GE区神经元的突触发育具有明显的差异性,皮层区兴奋性突触发育较早,GE区抑制性突触发育较早。突触的脑区特异性发育提示不同细胞类型的神经疾病可能具有不同的发育来源,需在实验加以甄别。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

赵艳和卢广泉参与文献检索、实验设计及论文撰写,赵艳、杜金乐、潘雨绮和董子意参与数据收集及分析,康鑫和高弋婷参与论文结果分析及讨论,高方和杨加周参与论文写作指导及审校。

[参考文献]

- [1] DU X C, LI J S, LI M H, et al. Research progress on the role of type I vesicular glutamate transporter (VGLUT1) in nervous system diseases[J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 26.
- [2] COLEY A A, GAO W J. PSD95: a synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 82: 187-194.
- [3] MCEACHERN E P, COLEY A A, YANG S S, et al. PSD-95 deficiency alters GABAergic inhibition in the prefrontal cortex [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 179: 108277.
- [4] COLEY A A, GAO W J. PSD-95 deficiency disrupts PFC-associated function and behavior during neurodevelopment[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9486.
- [5] ALONSO-MARTÍNEZ C, RUBIO-TEVES M, PORRERO C, et al. Cerebellar and basal Ganglia inputs define three main nuclei in the mouse ventral motor thalamus[J]. *Front Neuroanat*, 2023, 17: 1242839.
- [6] BOLNEO E, CHAU P Y S, NOAKES P G, et al. Investigating the role of GABA in neural development and disease using mice lacking GAD67 or VGAT genes[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7965.
- [7] OLAH S S, KAREEMO D J, BUCHTA W C, et al. Acute reorganization of postsynaptic GABA_A receptors reveals the functional impact of molecular nanoarchitecture at inhibitory synapses [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(11): 113331.
- [8] JUNG H, KIM S, KO J, et al. Intracellular signaling mechanisms that shape postsynaptic GABAergic synapses[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2023, 81: 102728.
- [9] HOFFMANN C, MILOVANOVIĆ D. Gephyrin: a scaffold that builds a phase at the inhibitory postsynapses[J]. *Cell Res*, 2021, 31(3): 245-246.
- [10] GASPERONI J, DWORKIN S. Neural stem/progenitor cell (NSPC) extraction and culture [J]. *Methods Mol Biol*, 2024, 2746: 109-120.
- [11] ZHOU W H, YANG X Y, WANG H X, et al. Neuronal aerobic glycolysis exacerbates synapse loss in aging mice[J]. *Exp Neurol*, 2024, 371: 114590.
- [12] SOUZA S D, ROSARIO CLAUDIO J, SIM J, et al. Interleukin-10 signaling in somatosensory neurons controls CCL2 release and inflammatory response [J]. *Brain Behav Immun*, 2024, 116: 193-202.
- [13] GAZORPAK M, HUGENTOBLE K M, PAUL D, et al. Harnessing PROTAC technology to combat stress hormone receptor activation[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 8177.
- [14] ALEJANDRA LLANES-CUESTA M, HOI V, HAR, et al. Redox protein thioredoxin mediates neurite outgrowth in primary cultured mouse cerebral cortical neurons[J]. *Neuroscience*, 2024, 537: 165-173.
- [15] 沈永梅,常晓菡,张倩文,等. PM_{2.5}暴露对原代皮层神经元COX-2启动子区甲基化水平的影响[J]. *毒理学杂志*, 2022, 36(2): 152-156, 162.
- [16] 石子璇,饶维,姬广辉,等. Npas4在小鼠原代神经元体外氧糖剥夺/复氧损伤中的保护作用及其可能机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(8): 1409-1414.
- [17] 唐凡人,余萍萍,王莉,等. 白藜芦醇预处理对大鼠皮质神经元氧糖剥夺/再复氧损伤后神经元突起生长的影响[J]. *解剖学报*, 2017, 48(1): 1-6.
- [18] KANG X, ZHANG Z P, SONG C G, et al. γ -secretase inhibitor disturbs the morphological development of differentiating neurons through affecting Notch/miR-342-5p[J]. *Neurosci Lett*, 2022, 778: 136603.
- [19] HAMPEL H, MESULAM M M, CUELLO A C, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease[J]. *Brain*, 2018,

- 141(7): 1917-1933.
- [20] STILES J, JERNIGAN T L. The basics of brain development[J]. *Neuropsychol Rev*, 2010, 20(4): 327-348.
- [21] KEPECS A, FISHELL G. Interneuron cell types are fit to function[J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 318-326.
- [22] NERY S, FISHELL G, CORBIN J G. The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(12): 1279-1287.
- [23] WICHTERLE H, TURNBULL D H, NERY S, et al. *In utero* fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain[J]. *Development*, 2001, 128(19): 3759-3771.
- [24] GROUP P I N, ASCOLI G A, ALONSO-NANCLARES L, et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(7): 557-568.
- [25] HAMMOND-WEINBERGER D R, WANG Y X, GLAVIS-BLOOM A, et al. Mechanism for neurotransmitter-receptor matching [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(8): 4368-4374.