

復旦大學

本科畢業論文（設計）



論文題目：組蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2 調控蒼白球神經元命運
決定的機制

姓 名：朱宇卿 學 號：21307110198

院 系：生命科學學院

專 業：生物科學

指導教師：解云禮 職 稱：研究員

單 位：復旦大學腦科學研究院

完成日期：2025 年 5 月 12 日

组蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2 调控苍 白球神经元命运决定的机制

完成人

朱宇卿

指导小组成员

解云礼 研究员

目 录

| | |
|-----------------------------------|----|
| 摘要 | I |
| Abstract | II |
| 一、前 言 | 1 |
| 1.1 引言 | 1 |
| 1.2 苍白球和基底神经节功能简介 | 2 |
| 1.3 苍白球神经元的组成及来源 | 3 |
| 1.4 组蛋白去乙酰化酶 HDACs 调控脑发育的机制 | 5 |
| 1.4.1 组蛋白修饰精确调控大脑发育 | 5 |
| 1.4.2 组蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2 对大脑发育的调控作用 | 6 |
| 二、材料与方 法 | 9 |
| 2.1 材 料 | 9 |
| 2.1.1 实验动物 | 9 |
| 2.1.2 实验耗材 | 9 |
| 2.2 试 剂 | 9 |
| 2.2.1 抗体 | 9 |
| 2.2.2 化学试剂 | 10 |
| 2.2.3 质粒 | 10 |
| 2.2.4 引物 | 11 |
| 2.2.5. 试剂配制 | 11 |
| 2.3 实验仪器 | 12 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.4 | 应用软件 | 13 |
| 2.5 | 方法 | 13 |
| 2.5.1 | 小鼠胚胎基因型鉴定 | 13 |
| 2.5.2 | 单细胞测序结合 CUT&Tag 分析 | 14 |
| 2.5.3 | 小鼠子宫内胚胎电转结合免疫荧光染色 | 15 |
| 三、 | 研究结果 | 16 |
| 3.1 | MGE 区域表达转录因子 <i>Nkx2-1</i> 的神经干细胞中 HDAC1/2 缺失导致其细胞命运改变 | 16 |
| 3.1.1 | MGE 区域神经干细胞缺失 HDAC1/2 导致子代细胞异常分化 | 16 |
| 3.1.2 | <i>Nkx2-1</i> 谱系神经干细胞缺失 HDAC1/2 导致苍白球神经元发育异常 | 18 |
| 3.2 | 转录因子 <i>Nr2f1</i> 的表达在异常分化的神经元中升高 | 19 |
| 3.3 | MGE 区域神经干细胞过表达 <i>Nr2f1</i> 导致子代神经元聚集 | 21 |
| 四、 | 讨论 | 23 |
| | 参考文献 | 25 |
| | 致谢 | 28 |

摘要

大脑作为机体最复杂的器官，其发育相关问题仍未得到解决。目前对于大脑皮层类似的层状结构了解相对清晰，但对于核团的发育机制仍不清楚。在此，我们聚焦到在基底神经节中发挥重要功能的苍白球，发现组蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2 在苍白球发育相关的祖细胞区域高量表达。在小鼠胚胎阶段的此区域敲除 HDAC1/2 后，其子代神经元的发育出现了异常，苍白球发育异常。我们鉴定到 Nr2f1 这个 HDAC1/2 调控的下游转录因子，验证了其对小鼠胚胎 MGE (medial ganglionic eminence, MGE) 区域神经发生的重要作用，并暗示该转录因子对苍白球发育至关重要。

关键词： 大脑发育，苍白球，HDAC1/2，命运决定

Abstract

As the most complex organ in the body, the developmental mechanisms of the brain remain incompletely understood. While the laminar structure of the cerebral cortex has been relatively well characterized, the developmental mechanisms of nuclei remain unclear. This study focuses on the globus pallidus (GP), a critical structure in the basal ganglia, and reveals high expression levels of histone deacetylases HDAC1/2 in progenitor regions associated with GP development. Conditional knockout of HDAC1/2 in this region during mouse embryogenesis resulted in abnormal development of progeny neurons and defective GP formation. We identified Nr2f1 as a downstream transcription factor regulated by HDAC1/2, demonstrating its essential role in neurogenesis within the medial ganglionic eminence (MGE) region of mouse embryos, and suggesting its critical involvement in GP development. These findings provide new insights into the epigenetic regulation of brain nucleus formation.

Key words: Brain Development, Globus Pallidus, HDAC1/2, Fate Determination

一、前言

1.1 引言

大脑是机体最重要且最复杂的器官之一。哺乳动物的大脑中含有成千上万甚至上百亿个神经元，由这些神经元组成的复杂神经网络是完成脑功能的重要基础^[1,2,3]。但这些数目庞大且种类丰富的神经元在胚胎发育时是由数量相对较少的神经干细胞分化而成。因此，神经干细胞必须对其增殖与分化进行严格调控，确保在特定时间、特定位置生成特定数目的神经元，进而维持脑的正常发育。

大脑可以分成两种最主要的解剖学和功能学单位：层状结构（laminated structures）和大脑核团（brain nuclei）。之前的研究对大脑皮层类似的层状结构已有较多了解，比如，神经干细胞在脑发育过程中通过有序分化，生成“由内到外”的6层皮质板结构^[4,5,6,7]，来自胚胎腹侧神经节隆起（ganglionic eminence, GE）的中间神经元经过长距离迁移与皮质神经元进行整合^[8,9,10]。然而，目前对大脑中核团的发育机制仍不清楚。基底神经节是位于大脑深部由一系列核团组成的整体，其主要功能是控制机体自主运动，同时也参与记忆、情感和奖励学习等高级认知功能。苍白球（globus pallidus, GP）是参与构成基底神经节的一个重要核团^[11,12,13]，是控制躯体运动的“中介”，其病变会导致帕金森氏症、亨廷顿氏症等疾病^[14]。但我们对苍白球这一如此重要的大脑核团的发育过程特别是其中的表观遗传调控机制目前仍不清楚。

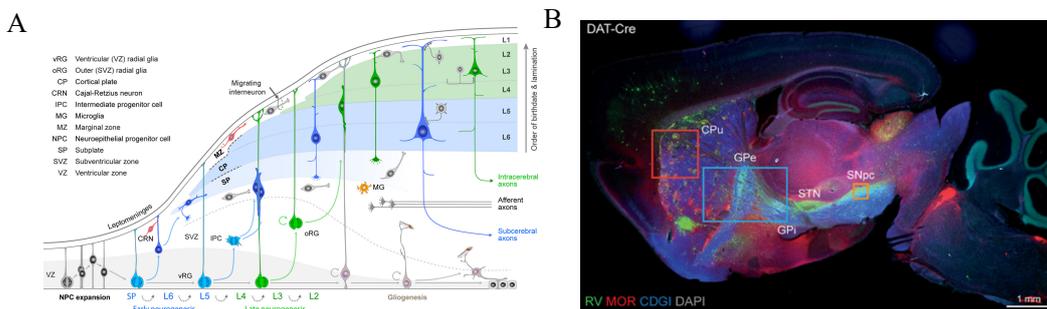


图 1 大脑皮层发育模式及基底神经节的结构示意图（图示 A 来自于 Molnár, Zoltán et al.

Journal of anatomy. 2019，图示 B 来自于 Lazaridis, Iakovos et al, *Current biology*. 2024)

图注：A.大脑皮层发育模式图 B.大脑基底神经节结构示意图。缩写说明：NPC=神经上皮细胞（neuroepithelial progenitor cell）；vRG=脑室区放射状胶质细胞（ventricular radial glial）；oRG=外层放射状胶质细胞（outer radial glia cell）；CRN=Cajal-Retzius 神经元（Cajal-Retzius

neuron); IPC=中间祖细胞 (intermediate progenitor cells); NB=神经母细胞 (neuroblast); MG=小胶质细胞; VZ=脑室区 (ventricular zone); SVZ=亚脑室区 (subventricular zone); IZ=中间区 (intermediate zone); SP=亚板 (subplate); CP=皮质板 (cortical plate); MZ=边缘区 (marginal zone); CPu=壳核尾状部 (caudoputamen); GPe=苍白球外侧部 (Globus Pallidus external segment); GPi=苍白球内侧部 (Globus Pallidus internal segment); STN=丘脑底核 (subthalamic nucleus); SNpc=黑质致密部 (Substantia Nigra pars compacta)

表观遗传调控在哺乳动物大脑的发育中扮演重要角色, 贯穿神经干细胞的命运决定的全过程。实验室前期研究发现, 在小鼠大脑的内侧神经节隆起 (medial ganglionic eminence, MGE) 特异性地敲除组蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2 后, 小鼠苍白球神经元发育异常, 这说明 HDAC1/2 对于苍白球神经元命运决定有很关键的作用, 但目前对于 HDAC1/2 调控苍白球发育的机制目前仍不清楚。本课题基于此表型, 结合细胞生物学、分子生物学、免疫组织化学等手段, 研究组蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2 调控苍白球神经元命运决定的机制。

通过研究苍白球发育过程中的表观遗传调控机制, 能为大脑中类似核团的发育及建构过程的研究提供一定的参考。苍白球作为基底神经环路的重要组成部分, 多种神经疾病 (如帕金森氏症、亨廷顿氏症) 与其病变有关, 苍白球发育过程中的表观遗传调控的研究不仅为理解脑核团发育机制提供理论基础, 而且还能够为潜在治疗发育性脑疾病提供新思路。

1.2 苍白球和基底神经节功能简介

基底神经节 (basal ganglia) 位于大脑白质深部, 由尾核、壳核、底丘脑核、杏仁核、苍白球等一系列核团结构组成。各类核团之间具有多层级的复杂神经元投射关系^[15], 接受皮层反馈并进行动作启动或动作抑制的输出。经典模型根据纹状体中棘神经元 (medium spiny neuron, MSN) 的投射靶点将 MSN 分为两个群体, 即直接通路 MSN (dMSN) 和间接通路 MSN (iMSN)。dMSN 直接投射到苍白球内侧部 (Globus Pallidus internal segment, GPi) 和黑质网状部 (Substantia Nigra pars reticulata, SNr), 并表达 G α olf 偶联的 D1 样多巴胺受体, 因此直接通路的激活会减少基底神经节输出, 解除丘脑抑制并促进运动。iMSN 通过苍白球外侧部 (Globus Pallidus external segment, GPe) 和丘脑底核 (subthalamic nucleus, STN) 间接投射到基底神经节输出并表达 G α i 偶联的 D2 样多巴胺受体, 该通路的激活会增加基底神经节输出, 抑制丘脑并抑制运动。在帕金森病 (Parkinson disease, PD) 患者中, 通常认为 STN 和 GPi 活动过多, 以及某些 dMSN 和 GPe 的活动减

少^[14]。

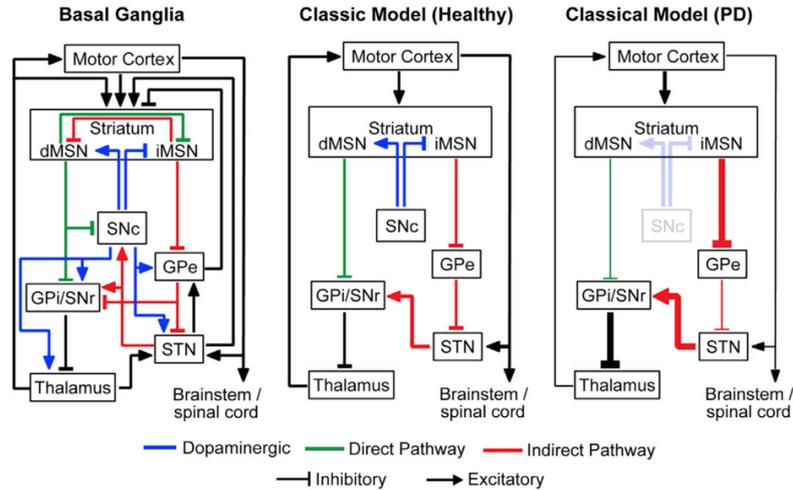


图 2 基底神经节的经典模型（图示来自于 McGregor, M. M., & Nelson, A. B. *Neuron*.

2019)

图注：缩写说明：dMSN=直接通路中棘神经元（direct medium spiny neuron）；iMSN=间接通路中棘神经元（indirect medium spiny neuron）；SNc=黑质致密部（Substantia Nigra pars compacta）；SNr=黑质网状部（Substantia Nigra pars reticulata）；GPe=苍白球外侧部（Globus Pallidus external segment）；GPi=苍白球内侧部（Globus Pallidus internal segment）；STN=丘脑底核（subthalamic nucleus）；PD=帕金森病（Parkinson disease）

为了更简便地理解 PD 等精神疾病发病原因，经典模型将 GP 等核团描述为仅将信息传递到下游基底神经节结构的同质性核团。但近年来的研究显示，GP 包含着丰富的细胞类型及投射关系，GP 与神经活动之间的关系可能更为复杂^[16,17]。

1.3 苍白球的神经元组成及来源

苍白球主要由投射神经元组成，其中包含极少量中间神经元。在苍白球投射神经元中，绝大多数都是 GABA 能投射神经元，苍白球 GABA 能投射神经元主要由两部分组成：表达小清蛋白的 GABA 能神经元（PV 神经元）和表达 Npas1 的 GABA 能神经元^[18]。在小鼠中，PV 神经元发育略早于表达 Npas1 神经元，前者约在 E9.5 开始生成，在 E11.5 达到最大生成数量，后者约在 E10.5 开始生成，在 E11.5-E12.5 达到最大生成数量。苍白球神经元主要来自三个不同且遥远的祖细胞池：内侧神经节隆起（medial ganglionic eminence, MGE）、外侧神经节隆起（lateral ganglionic eminence, LGE）和下丘视前区（preoptic area, POA）。研究显示，构成苍白球的神经元有 70%左右是来自 MGE 区域的 Nkx2-1 阳性的祖细胞

经过迁移定位最终形成的^[18,19]。其中表达小清蛋白的 GABA 能神经元全部来源于 MGE/POA 区域的 Nkx2-1 阳性的神经干细胞，并且在其迁移分化直至成熟一直维持 Nkx2-1 的表达。而表达 Npas1 的 GABA 能神经元约有 35%左右来源于 MGE/POA 区域的 Nkx2-1 阳性的神经干细胞，但在迁移分化过程中逐渐丧失 Nkx2-1 的表达，另外其中还有 50%左右的神经元来自 LGE/CGE 区域。但我们目前尚不清楚上述细胞为什么会特定地形成苍白球神经元，尤其是其表观遗传调控机制仍不清晰。

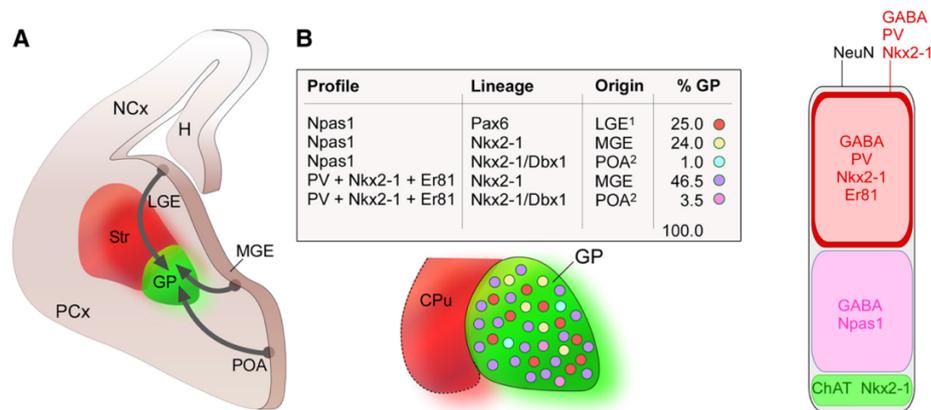


图3 苍白球神经元的来源及组成（图示来自 Nóbrega-Pereira S et al. *J Neurosci.* 2010）

图注: A. 苍白球的神经元来源 B. 苍白球的神经元组成。缩写说明: NCx=新皮质 (neocortex); PCx=梨状皮层 (piriform cortex); LGE=外侧神经节隆起 (lateral ganglionic eminence); MGE=内侧神经节隆起 (lateral ganglionic eminence); POA=下丘视前区 (preoptic area); GP=苍白球 (globus pallidus); Str=纹状体 (striatum); CPu=壳核尾状部 (caudoputamen)

MGE 区域的神经干细胞具有产生不同脑区的中间神经元和投射神经元的潜力。例如，MGE 区域的神经干细胞可以生成皮质和海马中的中间神经元，也可以生成纹状体中的中间神经元和苍白球中的投射神经元^[20]。在同一个祖细胞区域能生成多种不同的神经元亚群，与特定转录因子的时空表达有关。当位于 MGE 区域的神经干细胞降低 Nkx2-1 的表达并且表达 MAF、MAFB 等转录因子时，会朝着皮质中间神经元的方向分化。当其保留 Nkx2-1 的表达时，会生成皮质下的中间神经元或投射神经元。

在 MGE 区域，神经发生遵循着严格的时间序列，在神经发生早期，主要生成 GP 的投射神经元，随后是生成大量的 Sst 阳性和 PV 阳性的中间神经元，但是我们仍不清楚调控 MGE 区域在不同时间产生不同类型的投射神经元或中间神经元的机制，特别是不了解在神经发生早期 MGE 区域生成苍白球神经元的命运

决定机制^[21]。

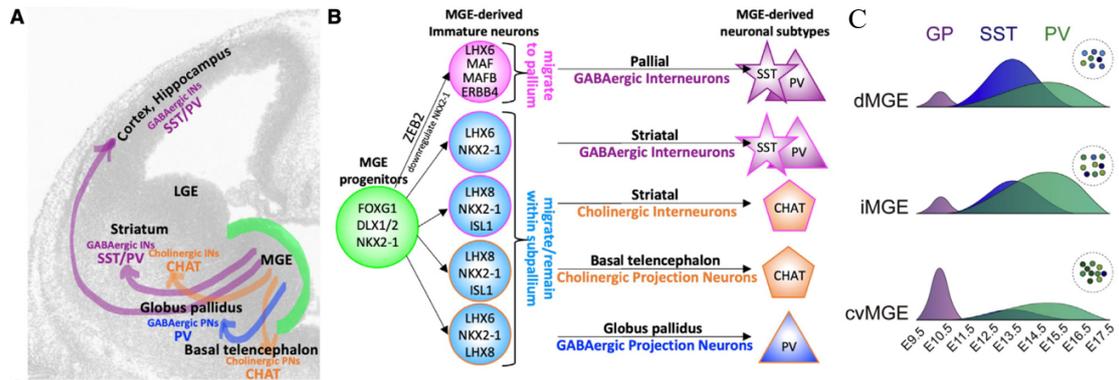


图 4 MGE 区域的神经发生（图示 A、B 来自 Bershteyn, Marina et al. *Cell Stem Cell*. 2023，图示 C 来自 Lim, Lynette et al, *Neuron*. 2018）

图注：A.MGE 区域产生的神经元类型 B.参与调控 MGE 区域神经发生的转录因子 C.MGE 区域神经发生的时间序列。缩写说明：dMGE=背侧 MGE（dorsal MGE）；iMGE=中间 MGE（intermediate MGE）；cvMGE=尾腹侧 MGE（caudoventral MGE）

1.4 组蛋白去乙酰化酶 HDACs 调控脑发育的机制

1.4.1 组蛋白修饰精确调控大脑发育

在大脑发育过程中，种类丰富的神经元是由数量相对较少且基因组成相同的神经干细胞分化而来的^[22]，神经干细胞分化为不同种类的神经元主要依赖表观遗传调控机制来实现对其增殖和分化的严格调控，确保能在规定的位置产生足够数目的正确类型的神经元。组蛋白修饰是哺乳动物中表观遗传修饰的重要类型之一，在哺乳动物细胞的细胞核中，染色质主要依靠组蛋白进行高度压缩。组蛋白由 H2A、H2B、H3、H4 四种亚基各两个拷贝组合成八聚体构成^[23]，每个亚基都具有一个 N 端尾巴，不同类型的氨基酸修饰如甲基化、磷酸化、乙酰化等就发生在此，通过修饰使染色质构象转变来实现对相关基因的转录调控。近年相关研究表明，组蛋白甲基化和乙酰化修饰在哺乳动物大脑发育中发挥重要作用^[24,25]。

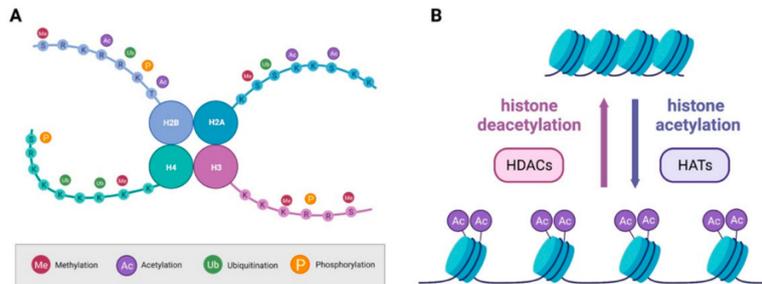


图 5 组蛋白尾部翻译后修饰类型和组蛋白乙酰化调控示意图（图示来自 Mauceri D. *cells*.

图注：A.组蛋白尾部翻译后修饰类型 B.组蛋白乙酰化调控。H2A、H2B、H3、H4 为组蛋白四种亚基。缩写说明：K=赖氨酸；R=精氨酸；S=丝氨酸；T=苏氨酸；Me=甲基化(Methylation)；Ac=乙酰化(Acetylation)；Ub=泛素化(Ubiquitination)；P=磷酸化(Phosphorylation)；HDACs=组蛋白去乙酰化酶；HATs=组蛋白乙酰转移酶

1.4.2 组蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2 对大脑发育的调控作用

组蛋白乙酰化主要发生在核小体 H3、H4 的 N 端的赖氨酸残基上^[26]，组蛋白乙酰化主要与基因转录的激活有关，其中 H3K27ac 能较好地反映基因的启动子和增强子的变化。组蛋白的乙酰化调控依赖组蛋白乙酰转移酶 HATs 和组蛋白去乙酰化酶 HDACs。HATs 将乙酰辅酶 A 的乙酰基转移到组蛋白氨基末端特定的赖氨酸残基上，通过中和赖氨酸的正电荷从而增加组蛋白末端的粘性使得核小体变得松散，使转录得以发生。HDACs 是哺乳动物中普遍表达的一种组蛋白去乙酰化因子，它通过催化组蛋白去乙酰化从而使染色质构象封闭来抑制相关基因的表达^[27]。

HDACs 是由 18 种蛋白组成的家族，根据其结构域和辅助因子可以分成两类：锌依赖型 HDACs (HDAC I、II、IV) 和 NAD 依赖型 HDACs (HDAC III)^[23]。其中 HDAC I 类包含 HDAC1、2、3、8，HDAC II 类包含 IIa (HDAC4、5、7、9) 和 IIb (HDAC6、10)，HDAC IV 类只有一位成员 HDAC11。NAD 依赖型 HDAC 又称为 sirtuins，包含 SIRT1-7。

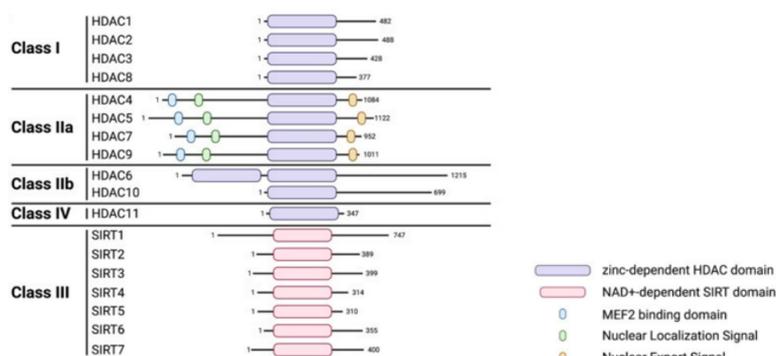


图 6 组蛋白去乙酰化酶类型 (图示来自 Mauceri D. *cells*. 2022)

HDAC1 和 HDAC2 是一对蛋白质序列和功能高度相似的组蛋白去乙酰化酶，HDAC1 和 HDAC2 通过形成不同的大型多蛋白复合物在体内发挥功能，如 NuRD 和 SIN3，这些复合物具有靶向特定 DNA 序列的功能，实现局部染色质去乙酰化^[28]。两种复合物共享四种核心蛋白 (HDAC1、HDAC2、RbAp46、RbAp48)。NuRD 复合物包含一个 MBD3 蛋白 (类似于甲基 CpG 结合结构域蛋白)，充当脚手架

的作用。NuRD 还包含 Mi-2 蛋白，具有 ATP 依赖性核小体重塑活性。此外 NuRD 复合物还具有 p66、MTA1/2 这样功能未知的蛋白。SIN3 复合物包含 Sin3、SAP18 和 SAP30，Sin3 的作用是充当脚手架，而 SAP18 和 SAP30 的作用未知。

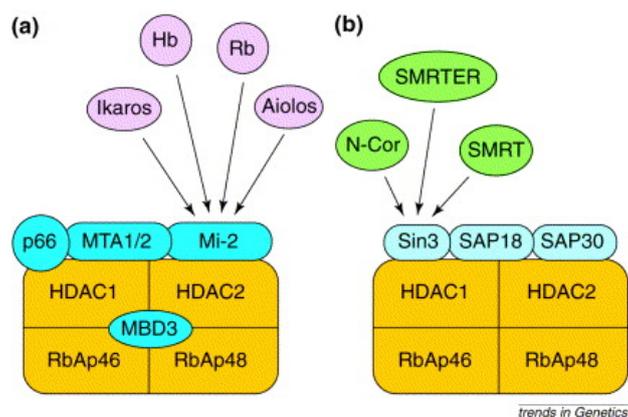


图 7 NuRD 和 SIN3 复合物（图示来自 Ahringer J. *Trends Genet.* 2022）

图注: (a).NuRD 复合物的组成 (b).SIN3 复合物的组成

HDAC1 和 HDAC2 在哺乳动物大脑中普遍表达^[25]，作为一组蛋白质序列高度相似的去乙酰化酶，HDAC1 和 HDAC2 在皮质祖细胞中都被敲除后，新皮质中间祖细胞出现了在脑室区表面异位的现象^[25]。除了在皮质中表达，HDAC1/2 在 MGE 区域的表达水平较高，构成苍白球神经元的祖细胞大部分都来自此区域。

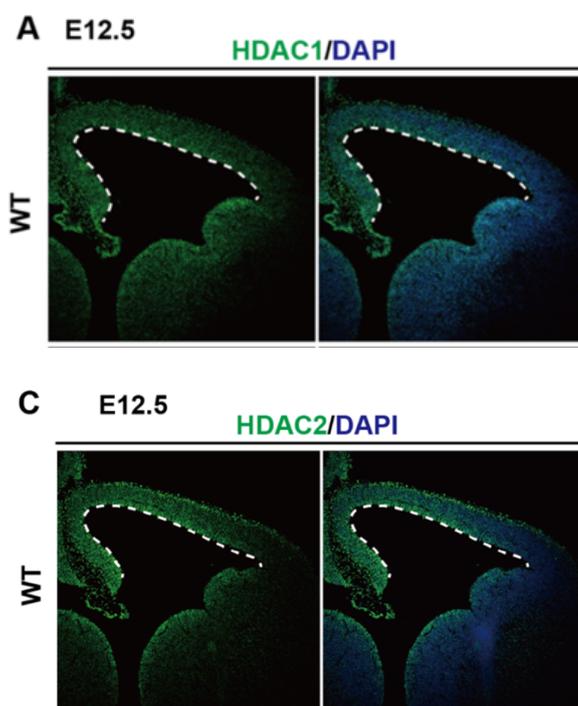


图 8 HDAC1/2 在小鼠胚胎中的表达情况（图示来自 Tang T et al, *Neuron.* 2019）

图注:A.HDAC1 免疫荧光染色 C.HDAC2 免疫荧光染色。标记 E12.5 小鼠胚胎全脑 HDAC1/2，发现其在皮质、内侧神经节隆起和外侧神经节隆起均高表达

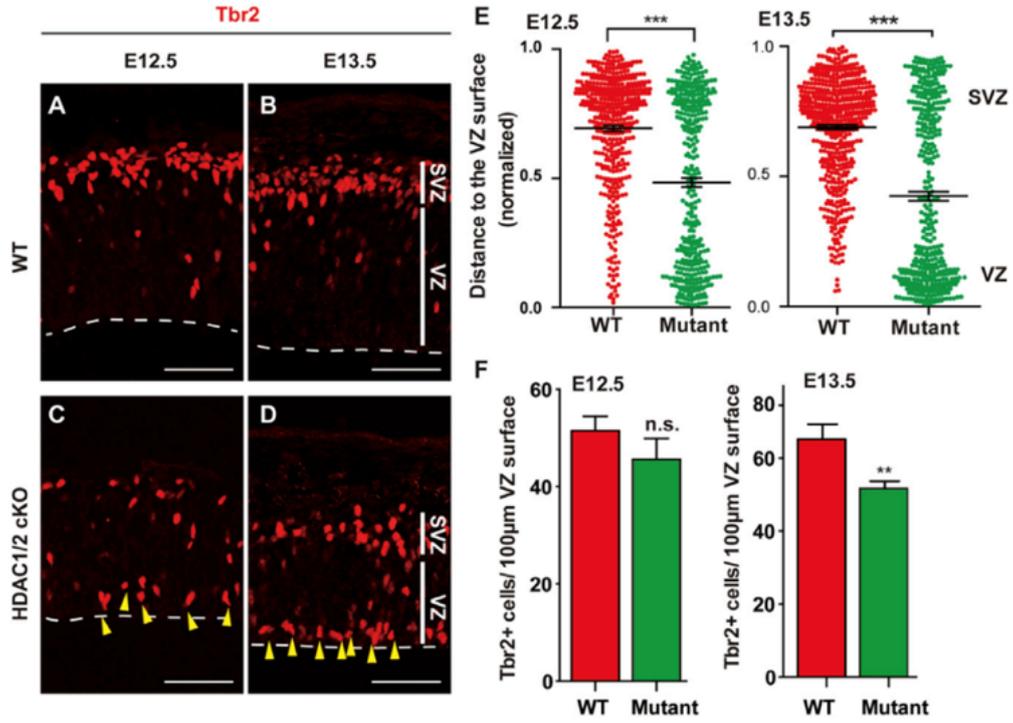


图9 皮质祖细胞缺失 HDAC1/2 导致其在脑室区表面异位 (图示来自 Tang T et al,

Neuron. 2019)

图注: 利用 Tbr2 标记 E12.5 和 E13.5 小鼠胚胎的皮质祖细胞, 发现缺失 HDAC1/2 后其在发育过程中在脑室区表面异位

二、材料与amp;方法

2.1 材料

2.1.1 实验动物

表 1 实验动物

| 动物品系 | 参考文献 |
|------------------------------------|------|
| <i>Nkx2-1-Cre</i> 小鼠 | [29] |
| <i>Hdac^{flox/flox}</i> 小鼠 | [25] |

2.1.2 实验耗材

表 2 实验耗材

| 实验耗材 | 生产商 |
|-------------|-------------------|
| 1.5mL 离心管 | 上海卧宏生物 |
| 15/50mL 离心管 | LABSELECT |
| 8 连排 PCR 管 | 上海生工生物 |
| 移液枪枪头 | LABSELECT |
| 3mL 塑料吸管 | 柏美特 |
| 粘附载玻片 | 世泰 |
| 盖玻片 | Fisher Scientific |
| 免疫组化笔 | DaidoSangyo |
| 无尘纸 | KIMTECH |

2.2 试剂

2.2.1 抗体

表 3 实验所用抗体

| 抗体名称 | 来源 | 货号 |
|--|------------|-----------|
| Chicken anti-GFP | Abcam | Ab13970 |
| Mouse anti-RFP | Invitrogen | MA5-15257 |
| Rabbit anti-Nkx2-1 | Invitrogen | MA5-44853 |
| Goat anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 | Invitrogen | A11039 |
| Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 | Invitrogen | A11037 |
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 | Invitrogen | A21245 |

2.2.2.化学试剂

表 4 实验所用化学试剂

| 试剂名称 | 来源 |
|--|------------------------|
| Hyperactive Universal CUT&Tag Assay Kit for Illumina | Vazyme |
| 20× PBS Buffer | 上海生工生物 |
| Tris-base | 上海生工生物 |
| Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 上海生工生物 |
| 蔗糖 | 上海生工生物 |
| Triton X-100 | 上海生工生物 |
| 甘油 | 上海生工生物 |
| 10× Taq Master Mix | 上海卧宏生物 |
| 5000 bp DNA Marker | 思科捷 |
| YeaRed 核酸染料 | 翌圣 |
| 琼脂糖 | 翌圣 |
| 盐酸 | 国药 |
| 冰乙酸 | 国药 |
| 氢氧化钠 | 国药 |
| 多聚甲醛 | 国药 |
| 乙二醇 | 国药 |
| 十二水合磷酸氢二钠 | 国药 |
| 二水合磷酸二氢钠 | 国药 |
| OCT 包埋剂 | Sakura Finetek USA Inc |
| DAPI | Sigma-Aldrich |
| Mowiol 4-88 | Sigma-Aldrich |
| DABCO | Sigma-Aldrich |
| 驴血清 | 广州蕊特生物 |
| 异氟烷麻醉剂 | RWD |

2.2.3.质粒

表 5 实验所用质粒

| 质粒名称 | 来源 |
|-------------------------|-----|
| pCAG-tdtomato | N/A |
| pCAG-Nr2f1-P2A-tdtomato | N/A |
| pCAG-LSL-Nr2f1-P2A-GFP | N/A |

2.2.4.引物

表 6 实验所用引物

| 引物名称 | 序列 |
|--------------------|---------------------------------|
| Hdac1 flox Forward | 5'-GGTAGTTCACAGCATAGTACTT-3' |
| Hdac1 flox Reverse | 5'-CCTGTGTCATTAGAATCTACTT-3' |
| Hdac2 flox Forward | 5'-CCCTTTAGGTGTGAGTACAT-3' |
| Hdac2 flox Reverse | 5'-AACCTGGAGAGGACAGCAAA-3' |
| Cre Forward | 5'-CTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG-3' |
| Cre Reverse | 5'-GCCTTCTCTACACCTGCGGTGCTAA-3' |

2.2.5.试剂配制

1. 1× 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer saline, PBS)

量筒量取 500 mL 20× PBS Buffer 和 9500 mL ddH₂O, 倒入试剂瓶中混合均匀后经 121°C 高压灭菌处理 20 min, 冷却至室温后使用。

2. 4%多聚甲醛溶液 (Paraformaldehyde, PFA)

量筒量取 400 mL ddH₂O 倒入烧杯中, 用微波炉加热至 65°C, 转移至试剂瓶中。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, 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, 使用 50 mL 离心管分装后于 -20°C 冻存。使用时取出解冻即可。

3. 1 mol/L Tris-HCl 溶液

量筒量取 800 mL ddH₂O 倒入烧杯中, 加入 Tris 121.14 g, 搅拌溶解后缓缓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, 冷却至室温后使用。

4. 1mol/L NaOH 溶液

量筒量取 160 mL ddH₂O 倒入烧杯中, 称取 8 g NaOH 加入烧杯中, 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

量筒量取 800 mL ddH₂O 倒入烧杯中, 称取 186.1 g Na₂EDTA · 2H₂O 和 20 g NaOH 加入烧杯中, 搅拌溶解后用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0, 定容至 1 L。121°C 高压灭菌处理 20 min, 冷却至室温后使用。

6. 0.5% Triton X-100 溶液

量筒量取 50 mL PBS 倒入烧杯中，加入 250 μ L Triton X-100，搅拌混合均匀后使用 4 $^{\circ}$ C 储存。

7. 可凝封片剂

量筒量取 24 mL ddH₂O 倒入烧杯中，称取 9.6 g Mowiol 4-88 和 24 g 甘油，加入烧杯中，磁力搅拌至少 3 h，加入 40 mL 0.2M Tris-HCl pH8.5，50 $^{\circ}$ C 加热搅拌，加入 2 g DABCO，溶解后分装至 50 mL 离心管中 4 $^{\circ}$ C 保存。

8. Tris-乙酸 (TAE) 电泳缓冲液

50 \times TAE 储存液：量筒量取 700 mL ddH₂O 倒入烧杯中，称取 242 g Tris 和 18.61g Na₂EDTA \cdot 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 \times TAE 工作液：量筒量取 980 mL ddH₂O 和 20 mL 50 \times TAE，混合均匀后即可使用。

9. 2%琼脂糖凝胶

量取适量的 1 \times TAE 电泳液，按每 100 mL 溶液加 2 g 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，室温冷却至凝固后使用。

10. 小鼠尾样裂解液

A 液：取 250 μ L 1 M NaOH 和 40 μ L 0.5 M EDTA，混合后用 ddH₂O 定容至 10 mL。

B 液：取 400 μ L 1 M Tris-HCl pH8.0，用 ddH₂O 定容至 10 mL。

2.3 实验仪器

表 7 实验仪器

| 仪器名称 | 厂家 |
|---------|-------------------|
| 微量移液器 | Eppendorf |
| 低温离心机 | Thermo Scientific |
| 小型离心机 | SCILOGEX |
| 涡旋振荡器 | SCILOGEX |
| 磁力搅拌器 | SCILOGEX |
| 高温蒸汽灭菌锅 | 松下 |
| 低温冰箱 | 海尔 |
| 制冰机 | 雪科 |

续表 7 实验仪器

| | |
|--------------------|--------|
| 电子天平 | 舜宇恒平仪器 |
| 分析天平 | 赛多利斯 |
| pH 计 | 赛多利斯 |
| 旋转混合仪 | 其林贝尔 |
| 摇床 | 其林贝尔 |
| 金属浴 | 杭州奥盛 |
| 微波炉 | 格兰仕 |
| DNA 电泳装置 | 天能 |
| 凝胶成像系统 | 天能 |
| PCR 仪 | 东胜 |
| 正置荧光显微镜 | 尼康 |
| 激光共聚焦显微镜 | 尼康 |
| 解剖镜 | 奥林巴斯 |
| 冰冻切片机 | 徕卡 |
| BTX ECM830 方波电穿孔系统 | BTX |
| 动物麻醉机 | Matrx |
| 手术器械 | 瑞沃德 |

2.4 应用软件

表 8 应用软件

| 软件名称 | 开发商 |
|-----------------|-----------|
| ImageJ | NIH |
| NIS Element | Nikon |
| Adobe Photoshop | Adobe |
| Microsoft Excel | Microsoft |
| RStudio | Posit PBC |

2.5 方法

2.5.1 小鼠胚胎基因型鉴定

计划利用 Cre-loxp 重组酶系统在小鼠胚胎的 Nkx2-1 阳性的细胞中特异性地敲除 HDAC1/2, 构建 *Hdac^{fllox/fllox};Nkx2-1-Cre* 小鼠胚胎模型, 以此为研究对象开展工作。

Hdac1/2^{fllox/fllox} 品系为实验室拥有的转基因小鼠品系, 其在 *Hdac1/2* 基因两侧各插入了同向的 Loxp 片段, 可以在 Cre 重组酶的作用下将 *Hdac1/2* 敲除, 使细胞无法表达组蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2。

利用 *Hdac1/2^{flox/flox}* 品系与 *Nkx2-1-Cre* 小鼠杂交，对所获胚胎进行基因鉴定后获得 *Hdac1/2^{flox/flox};Nkx2-1-Cre* 小鼠胚胎，特异性地在小鼠胚胎的 *Nkx2-1* 阳性的细胞中敲除 *Hdac1/2*，对照组为 *Hdac1/2^{flox/flox}*;无 *Cre* 的小鼠胚胎。

取 2-3 mm 小鼠胚胎尾尖组织，加入 100 μ L 小鼠尾样裂解液 A，95°C 金属浴 30 min，后置于冰上，冷却后加入 100 μ L 缓冲液 B，中止裂解，取上清用于 PCR 扩增。

表 9 PCR 反应体系

| 成分 | 体积 |
|---------------------------|-------------|
| 2 \times Taq Master Mix | 10 μ L |
| 上游引物 (10 μ mol/L) | 0.5 μ L |
| 下游引物 (10 μ mol/L) | 0.5 μ L |
| 尾样裂解上清 | 1.0 μ L |
| ddH ₂ O | 8 μ L |

表 10 PCR 扩增程序

| 温度 | 时间 | 循环数 |
|------|-------|-----|
| 95°C | 5 min | 1 |
| 95°C | 30 s | 30 |
| 58°C | 30 s | |
| 72°C | 1 min | |
| 72°C | 5 min | |
| 4°C | 保温 | 1 |

配制 2%琼脂糖凝胶，PCR 结束后，将凝胶放入盛有 1 \times TAE 缓冲液的电泳槽中，每个上样孔加入 8 μ L PCR 产物，每排留一个上样孔加 5 μ L DNA Marker。电压 120 V，时间 30 min。电泳结束后使用凝胶成像系统获取结果。

2.5.2 单细胞测序结合 CUT&Tag 分析

目前实验室拥有 E12.5-14.5 的 HDAC1/2 敲除组和对照组的小鼠胚胎 MGE 区域单细胞测序数据¹。计划通过生物信息学数据分析对不同时间点的单细胞测序数据进行整合分析，研究 HDAC1/2 缺失对苍白球神经元细胞身份的影响，并通过差异分析筛选 HDAC1/2 所调控的关键转录因子或基因，以便之后进行验证。使用 Linux 系统，结合 R 和 Python 等编程语言，对来自 E12.5、E13.5、E14.5 三

¹ 单细胞测序数据为原复旦大学脑科学研究院解云礼实验室博士后唐湉翔获得。

个时间点的小鼠胚胎对照组和实验组的 MGE 区域的数据进行 Seurat 标准流程整合分析, 详见 <https://satijalab.org/seurat/>, RNA 速率分析流程详见 <https://velocity.org/velocity.py/index.html>。

计划通过 CUT&Tag 针对组蛋白 H3K27ac 设计抗体, 利用 CUT&Tag 寻找由于 HDAC1/2 缺失导致的染色体乙酰化水平显著升高的基因序列, 并与单细胞测序结果进行对应和比较, 从而筛选出 HDAC1/2 缺失引起染色质构象变化而直接影响的下游基因, 该实验中实验组为 *Hdac1/2^{flox/flox};Nkx2-1-Cre* 小鼠胚胎, 对照组为 *Hdac1/2^{flox/flox}*;无 *Cre* 的小鼠胚胎。

计划通过 CUT&Tag 针对转录因子序列对应的靶标蛋白设计抗体, 寻找其在染色质上的结合位点, 通过测序明确其调控的下游基因以及转录因子影响下游基因的分子机制。该实验中实验组为 *Hdac1/2^{flox/flox};Nkx2-1-Cre* 小鼠胚胎, 对照组为 *Hdac1/2^{flox/flox}*;无 *Cre* 的小鼠胚胎。

2.5.3 小鼠子宫内胚胎电转结合免疫荧光染色

取孕龄为 12.5 d 的小鼠, 其中的胚胎为 *Hdac1/2^{flox/flox}* 品系与 *Nkx2-1-Cre* 小鼠杂交子代。将小鼠麻醉后通过手术暴露子宫, 对胚胎脑室注射含有相关下游基因过表达载体的质粒, 并通过电转仪施加电场 (50V) 使质粒向 MGE 方向移动, 随后进行缝合, 待小鼠清醒后继续饲养^[30]。待胚胎发育至 E15.5 时取出胚胎, 进行基因鉴定, 确定实验组和对照组 (实验组为: *Hdac1/2^{flox/flox};Nkx2-1-Cre*, 对照组为 *Hdac1/2^{flox/flox}*;无 *Cre*)。

取实验组和对照组的胚胎脑, 使用预冷的 4%多聚甲醛固定至少 4 h, 30%蔗糖溶液振荡过夜。沉糖后的样品进行 OCT 包埋, 待冷却固定后进行冰冻切片, 切片厚度 14 μm 。对切片得到的样品使用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。每个载玻片滴加 200 μL Triton X-100 室温通透处理 30 min。弃去 Triton X-100 后滴加血清封闭液, 室温封闭 30 min。弃去封闭液, 使用封闭液对所需一抗进行稀释后滴加 200 μL 至载玻片上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 弃去一抗, 用 PBS 在室温下清洗 3 次, 每次 5 min。滴加 200 μL 用封闭液稀释的二抗和 DAPI, 室温避光孵育 2 h。弃去二抗和 DAPI 溶液, 用 PBS 避光清洗 3 次, 每次 5 min。晾干样本, 滴加可凝封片剂, 盖上盖玻片待封片剂凝固后, 通过荧光倒置显微镜采集图像, 使用 ImageJ 软件进行图像处理。

三、研究结果

3.1 MGE 区域表达转录因子 *Nkx2-1* 的神经干细胞中 HDAC1/2 缺失导致其细胞命运改变

3.1.1 MGE 区域神经干细胞缺失 HDAC1/2 导致子代细胞异常分化

我们对来自胚胎期 E12.5、E13.5、E14.5 三个时间点实验组和对照组的小鼠胚胎大脑 MGE 区域的单细胞测序数据进行分析,对原始样本进行质控和过滤后,共获得来自三个样本的 84596 个细胞,检测到的平均基因数在 19000 左右。随后我们对来自三个样本的单细胞测序数据进行了整合,使用 SCTransform 进行标准化后,使用 harmony 对样本进行处理,回归时间点。随后我们使用统一流形逼近 (UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection) 进行聚类结果的可视化,我们对数据进行二次质控后获得了最终的聚类结果,共 69164 个细胞。我们共寻找到 16 个聚类,涵盖了由神经干细胞到不同脑区成熟神经元,也包括少量血管相关细胞和胶质细胞 (如图 10)。通过对比实验组和对照组的数据,我们发现在实验组中,出现了一群大量的异常分化的神经元 (图中为 Abnormal_Ns_0),为了解析这群神经元的相关特征,我们对其高表达的标志基因进行了分析,发现与神经发生相关的 *Sox3* 和 *Sox6* 以及成熟神经元标志基因 *Calb1* 在这群神经元中高表达,同时这群神经元高表达 *Chchd10* 和 *Crabp2* 等与细胞代谢相关的特征基因 (如图 11)。由于 *Nkx2-1* 是小鼠胚胎时期 MGE 区域神经干细胞表达的特征基因,并且为了进一步探索异常神经元的来源,我们对其中属于 *Nkx2-1* 谱系的细胞进行了单独分析,共 38538 个细胞。我们发现,在 *Nkx2-1* 谱系中除了有与之前一致的异常神经元的细胞聚类外,我们还发现了一群异常的神经干细胞,这群神经干细胞高表达 *Chchd10* 和 *Igfbp5* (如图 12)。因此我们推测 *Nkx2-1* 谱系的神经干细胞的异常分化是导致子代神经元身份改变的原因。为了验证我们的猜想,我们接下来进行了 RNA 速率分析,结果表明,在干细胞阶段,实验组中神经干细胞的命运发生改变,朝着异常神经元发育的方向进行分化 (如图 13)。

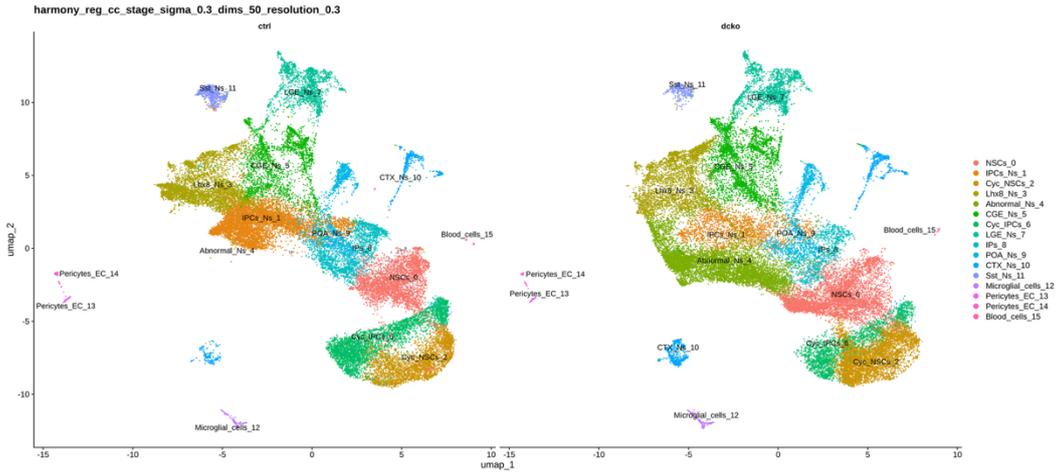


图 10 小鼠胚胎大脑 MGE 区域单细胞测序 UMAP

图注：其中，ctrl 为对照组，dcko 为实验组；小鼠胚胎大脑 MGE 区域单细胞测序 UMAP 聚类结果，使用前 50 个主成分，图示所使用的分辨率为 0.3

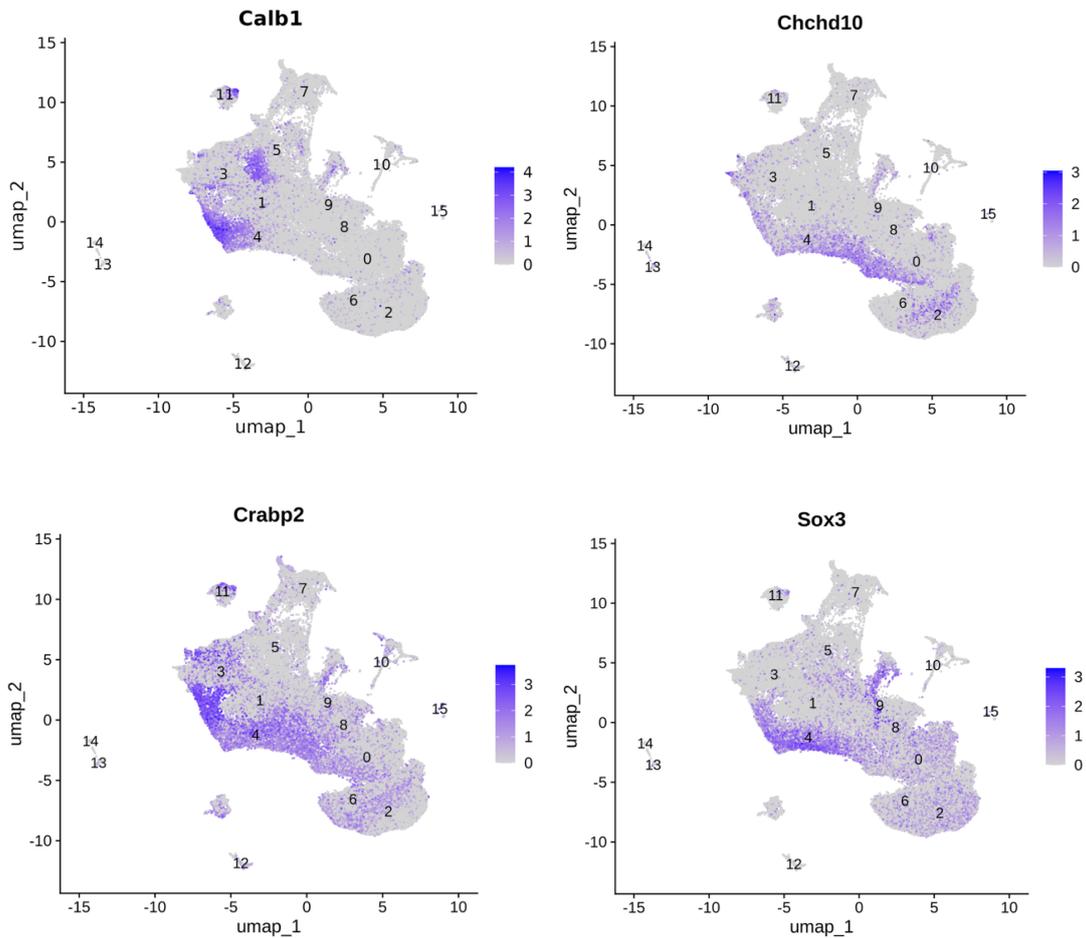


图 11 MGE 区域异常细胞亚群特征基因

图注：图为对照和实验组合并结果；0="NSCs_0", "1"="IPCs_Ns_1", "2"="Cyc_NSCs_2", "3"="Lhx8_Ns_3", "4"="Abnormal_Ns_4", "5"="CGE_Ns_5", "6"="Cyc_IPCs_6", "7"="LGE_Ns_7", "8"="IP8_8", "9"="POA_Ns_9", "10"="CTX_Ns_10", "11"="Sst_Ns_11", "12"

= "Microglial_cells_12","13" = "Pericytes_EC_13","14" = "Pericytes_EC_14","15" = "Blood_cells_15"

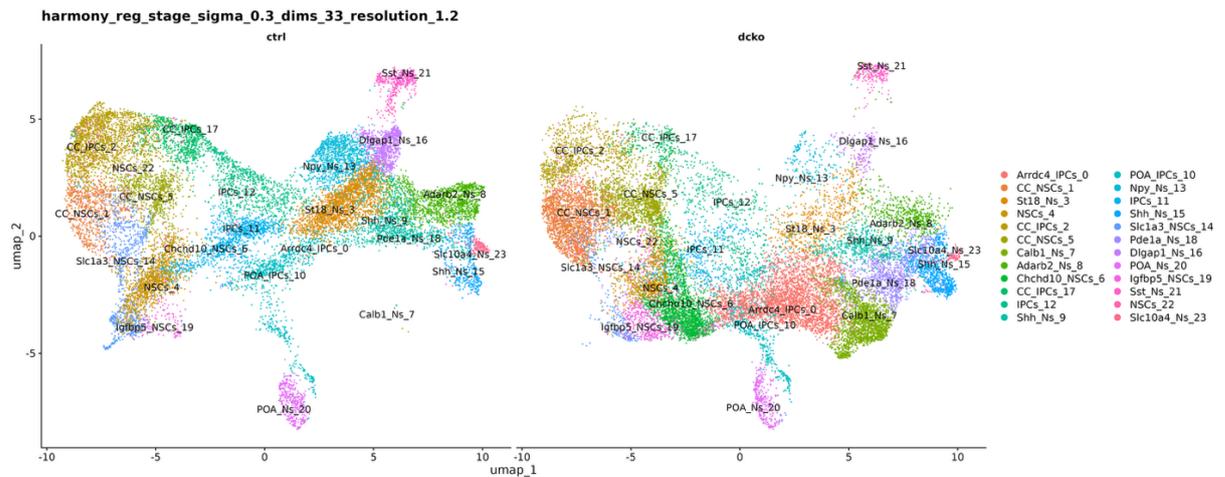


图 12 小鼠胚胎大脑 MGE 区域 *Nkx2-1* 谱系单细胞测序 UMAP

图注：其中，ctrl 为对照组，dcko 为实验组；小鼠胚胎大脑 MGE 区域 *Nkx2-1* 谱系单细胞测序 UMAP 聚类结果，使用前 33 个主成分，图示所使用的分辨率为 1.2

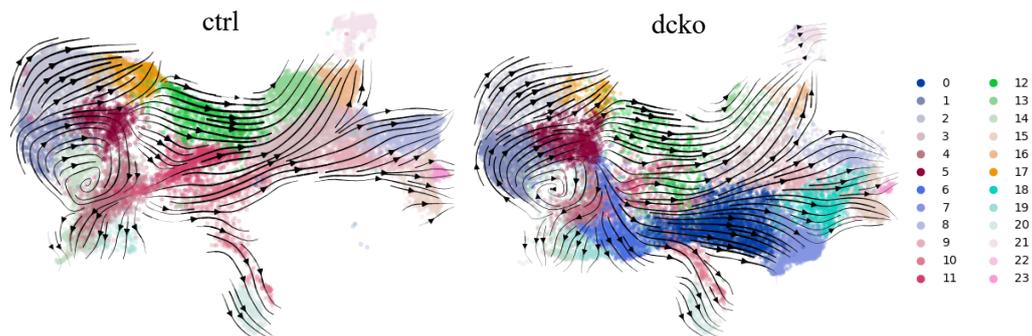


图 13 小鼠胚胎大脑 MGE 区域 *Nkx2-1* 谱系发育轨迹

图注：其中，ctrl 为对照组，dcko 为实验组；0 = "Arrdc4_IPCs_0", "1" = "CC_NSCs_1", "2" = "CC_IPCs_2", "3" = "St18_Ns_3", "4" = "NSCs_4", "5" = "CC_NSCs_5", "6" = "Chchd10_NSCs_6", "7" = "Calb1_Ns_7", "8" = "Adarb2_Ns_8", "9" = "Shh_Ns_9", "10" = "POA_IPCs_10", "11" = "IPCs_11", "12" = "IPCs_12", "13" = "Npy_Ns_13", "14" = "Slc1a3_NSCs_14", "15" = "Shh_Ns_15", "16" = "Dlgap1_Ns_16", "17" = "CC_IPCs_17", "18" = "Pde1a_Ns_18", "19" = "Igfbp5_NSCs_19", "20" = "POA_Ns_20", "21" = "Sst_Ns_21", "22" = "NSCs_22", "23" = "Slc10a4_Ns_23"

3.1.2 *Nkx2-1* 谱系神经干细胞缺失 HDAC1/2 导致苍白球神经元发育异常

为了进一步研究 *Nkx2-1* 谱系中子代神经元的发育情况，我们对单细胞测序数据中的神经元相关亚群进行了单独分析（如图 14）。我们发现，正常神经元在实验组中显著减少（如图 15），并且我们无法检测到正常的苍白球神经元，表明与苍白球相关的神经元出现了缺失。

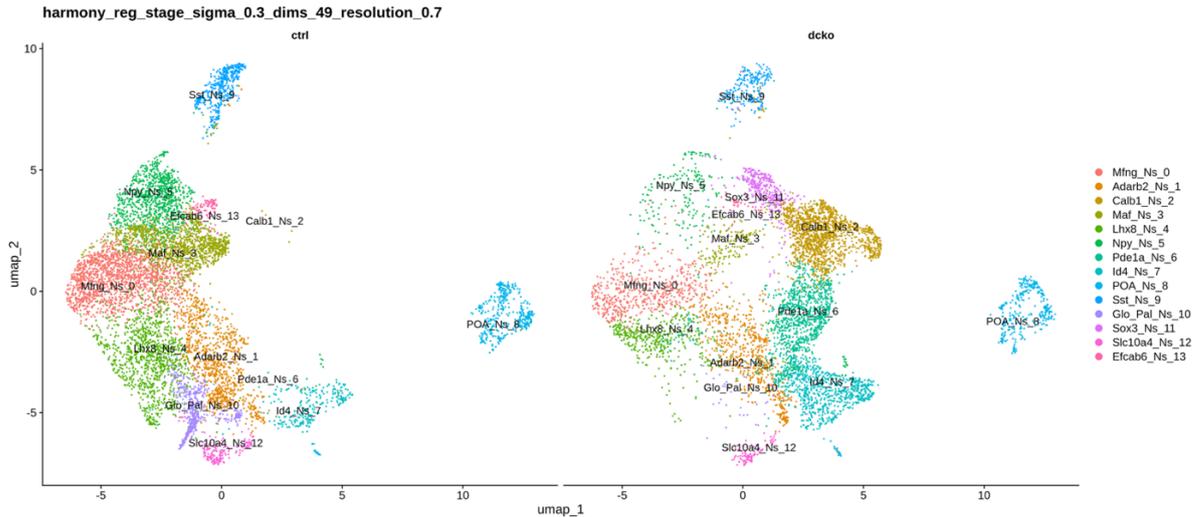


图 14 小鼠胚胎大脑 MGE 区域 *Nkx2-1* 谱系神经元 UMAP 聚类

图注：其中，ctrl 为对照组，dcko 为实验组；小鼠胚胎大脑 MGE 区域 *Nkx2-1* 谱系神经元单细胞测序 UMAP 聚类结果，使用前 49 个主成分，图示所使用的分辨率为 0.7

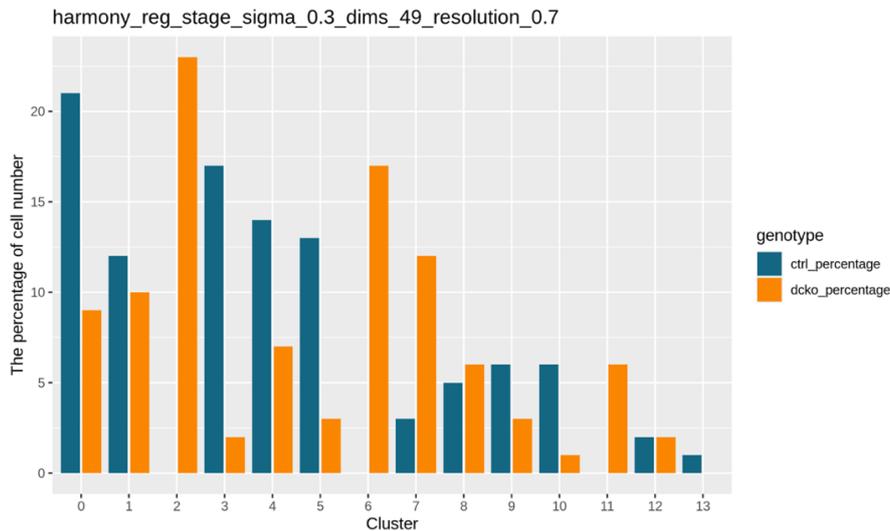


图 15 小鼠胚胎大脑 MGE 区域 *Nkx2-1* 谱系神经元亚群比例

图注：其中，ctrl_percentage 为对照组，dcko_percentage 为实验组；0 = "Mfng_Ns_0", "1" = "Adarb2_Ns_1", "2" = "Calb1_Ns_2", "3" = "Maf_Ns_3", "4" = "Lhx8_Ns_4", "5" = "Npy_Ns_5", "6" = "Pde1a_Ns_6", "7" = "Id4_Ns_7", "8" = "POA_Ns_8", "9" = "Sst_Ns_9", "10" = "Glo_Pal_Ns_10", "11" = "Sox3_Ns_11", "12" = "Slc10a4_Ns_12", "13" = "Efcab6_Ns_13"

3.2 转录因子 *Nr2f1* 的表达在异常分化的神经元中升高

我们为了探究 HDAC1/2 缺失后导致 *Nkx2-1* 谱系神经发生出现异常的原因，我们进行了小鼠胚胎 E13.5 的 HDAC2 和 H3K27ac 的 CUT&Tag 实验，结合单细胞测序结果来寻找与 HDAC2 相关的下游转录因子在实验组和对照组之间的差异表达情况。

通过 CUT&Tag 实验，我们聚焦到了其中一个名为 *Nr2f1* 的转录因子，*Nr2f1*

又名 *COUP-TF1*，是核受体亚家族 2F 组成员 1，该基因编码的蛋白质是核激素受体和转录调节因子，在发育中的中枢神经系统中特异性高表达（如图 16、图 17），该基因的缺陷是导致 Bosch-Boonstra 视神经萎缩综合征（BBOAS）的原因。我们在单细胞测序数据中对这一基因进行了分析，首先我们对所有来自于 MGE 区域的细胞进行了分析（如图 18 A），我们发现 *Nr2f1* 在正常谱系的细胞中，实验组和对照组表达情况无差别，但 *Nr2f1* 在异常神经元中高表达。接下来我们对 *Nkx2-1* 谱系的细胞进行单独分析，发现 *Nr2f1* 在 *Nkx2-1* 谱系的异常神经元中特异性高表达（如图 18 B）。结合 CUT&Tag 中 HDAC2 基因组结合位点分析，我们发现实验组中 *Nr2f1* 的远端调控序列具有相对于对照组较高的乙酰化水平（如图 17），我们推测 *Nr2f1* 的异常表达可能是由于 HDAC2 的缺失而导致的。

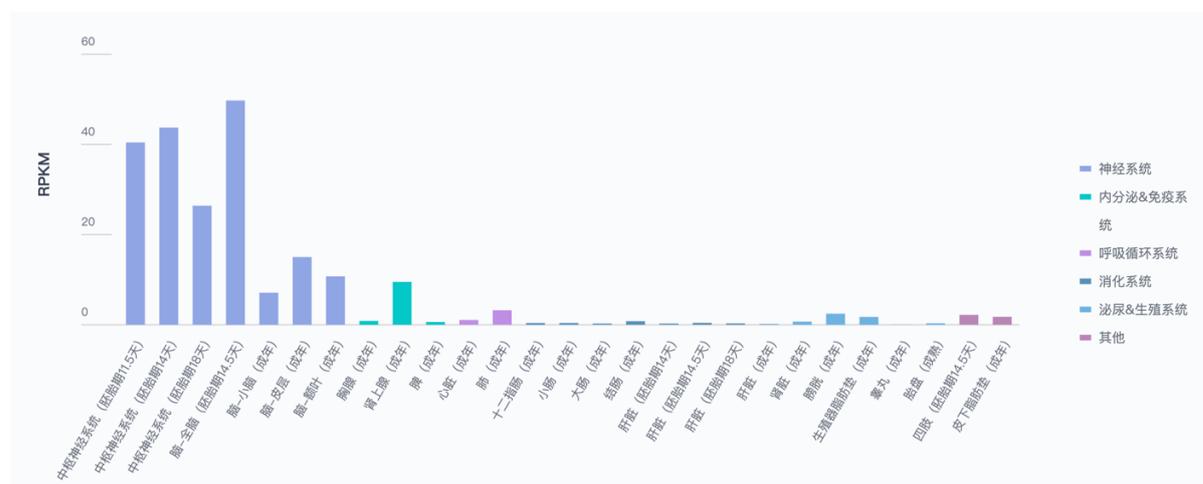


图 16 转录因子 *Nr2f1* 在小鼠各个发育阶段不同器官的表达情况

图注：RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads)，代表 RNA 测序中每百万 reads 中来自于某基因每千碱基长度的 reads 数，表示基因表达量或丰度

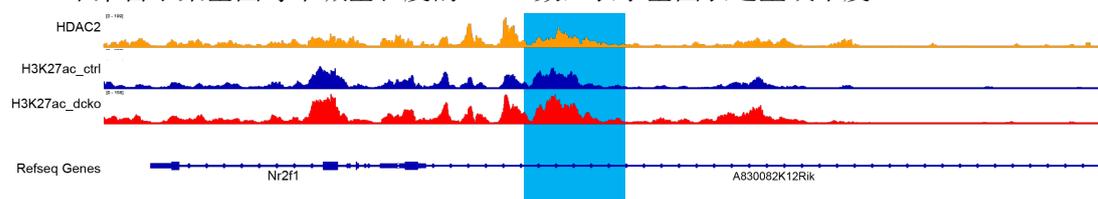


图 17 *Nr2f1* 的远端调控序列具有更高的乙酰化水平

图注：其中，H3K27ac_ctrl 为对照组，H3K27ac_dcko 为实验组；图中蓝色方框为 *Nr2f1* 远端调控序列

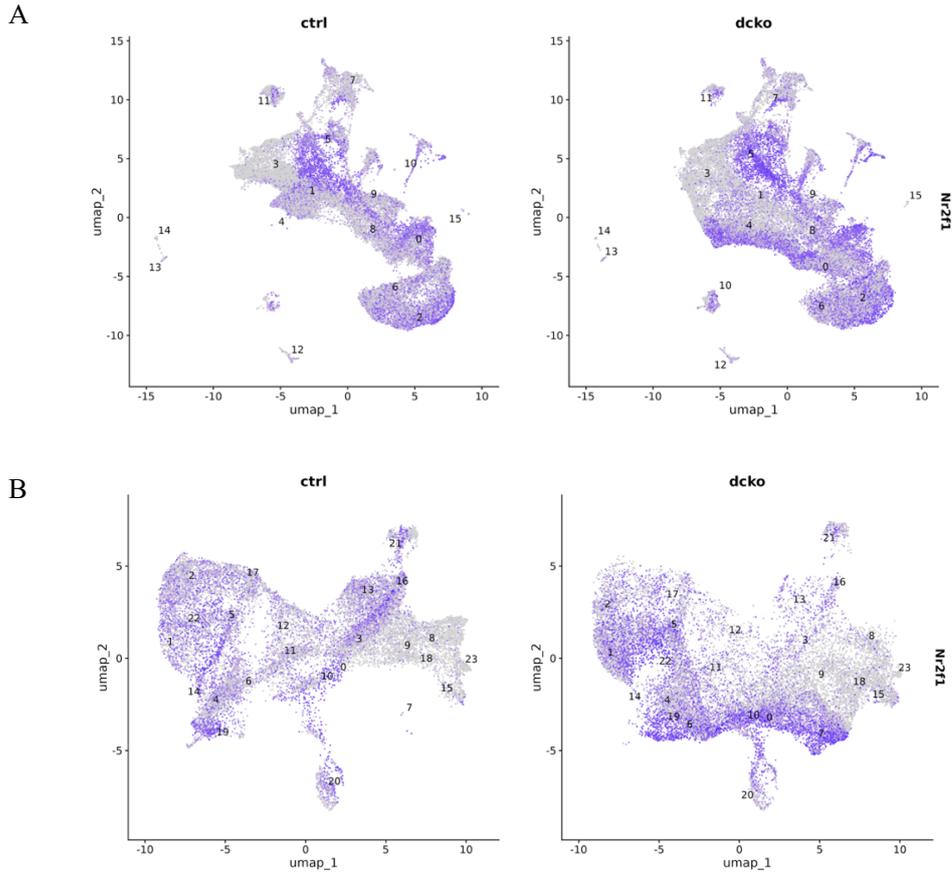


图 18 转录因子 Nr2f1 在异常神经元中特异性高表达

图注：A.MGE 区域细胞 Nr2f1 表达情况 B.*Nkx2-1* 谱系细胞 Nr2f1 表达情况；其中，ctrl 为对照组，dcko 为实验组；A 中 0 = "NSCs_0", "1" = "IPCs_Ns_1", "2" = "Cyc_NSCs_2", "3" = "Lhx8_Ns_3", "4" = "Abnormal_Ns_4", "5" = "CGE_Ns_5", 6 = "Cyc_IPCs_6", "7" = "LGE_Ns_7", "8" = "IPs_8", "9" = "POA_Ns_9", "10" = "CTX_Ns_10", "11" = "Sst_Ns_11", "12" = "Microglial_cells_12", "13" = "Pericytes_EC_13", "14" = "Pericytes_EC_14", "15" = "Blood_cells_15"; B 中 0 = "Arrdc4_IPCs_0", "1" = "CC_NSCs_1", "2" = "CC_IPCs_2", "3" = "St18_Ns_3", "4" = "NSCs_4", "5" = "CC_NSCs_5", 6 = "Chchd10_NSCs_6", "7" = "Calb1_Ns_7", "8" = "Adarb2_Ns_8", "9" = "Shh_Ns_9", "10" = "POA_IPCs_10", "11" = "IPCs_11", "12" = "IPCs_12", "13" = "Npy_Ns_13", "14" = "Slc1a3_NSCs_14", "15" = "Shh_Ns_15", "16" = "Dlgap1_Ns_16", "17" = "CC_IPCs_17", "18" = "Pde1a_Ns_18", "19" = "Igfbp5_NSCs_19", "20" = "POA_Ns_20", "21" = "Sst_Ns_21", "22" = "NSCs_22", "23" = "Slc10a4_Ns_23"

3.3 MGE 区域神经干细胞过表达 Nr2f1 导致子代神经元聚集

为了进一步探究转录因子 Nr2f1 在小鼠胚胎大脑 MGE 区域 *Nkx2-1* 谱系中调控神经发生的功能，我们在小鼠胚胎 E12.5 时进行了胚胎电转 (in utero electroporation, IUE), 在 MGE 区域的 *Nkx2-1* 谱系的神经干细胞中过表达 Nr2f1, E15.5 取样进行免疫荧光染色 (如图 19)。我们发现在对照组中, *Nkx2-1* 谱系的

细胞从脑室区逐渐向皮质以及皮质下区域迁移，呈现弥散状的迁移流，并且结合 Nkx2-1 染色，我们可以清楚看到苍白球所在位置有明显的 Nkx2-1 信号。但是在实验组中，我们发现 *Nkx2-1* 谱系的细胞没有完整有序的迁移流，而是在距离脑室区不远处形成了明显的细胞聚集，结合 Nkx2-1 染色，我们发现苍白球所在区域绝大多数 Nkx2-1 信号消失，证明苍白球发育出现异常。

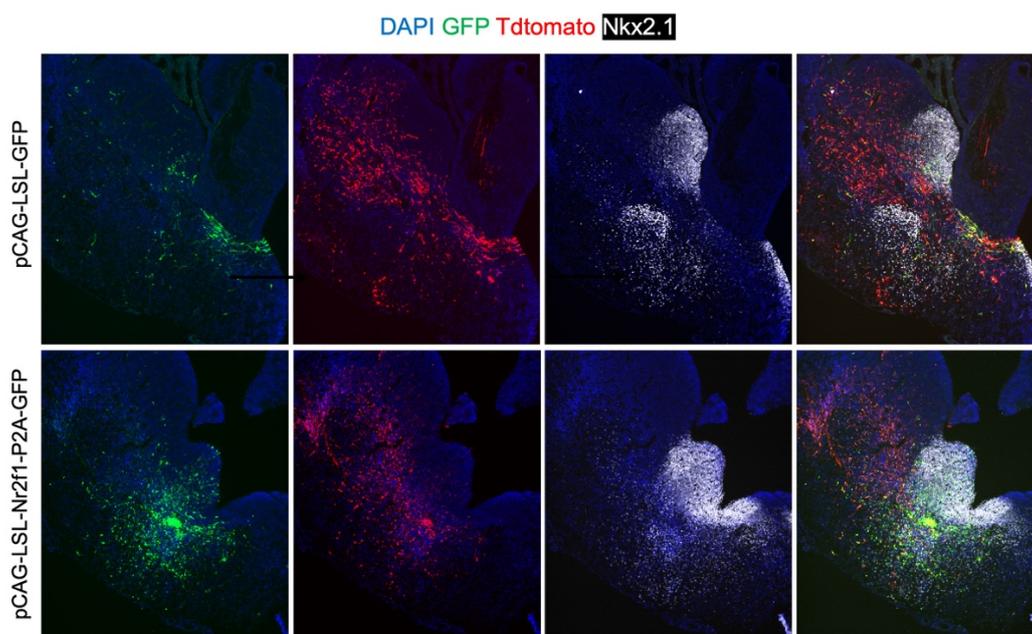


图 19 胚胎电转追踪 MGE 区域神经干细胞分化后迁移情况

图注: Tdtomato 信号为同时使用 pCAG-tdtomato 和 pCAG-Nr2f1-P2A-tdtomato 质粒无差别标识 MGE 区域神经干细胞的谱系分化结果

四、讨 论

目前我们对大脑核团发育机制的解析还远远不够,解析其发育机制有利于我们了解像帕金森氏症、亨廷顿氏症等疾病,我们希望能从其发育的表观遗传机制入手,聚焦 HDAC1/2 这个组蛋白去乙酰化酶,试图阐释其在苍白球神经元发育中的作用。通过我们的实验,可以得出以下结论。

1.通过单细胞测序,发现在小鼠胚胎大脑 MGE 区域 *Nkx2-1* 谱系中敲除 HDAC1/2 后导致神经干细胞出现了异常分化,致使异常子代神经元的产生。这种异常分化造成的结果之一是导致苍白球发育异常。

2.通过 CUT&Tag 实验结合单细胞测序数据对这种异常分化背后的 HDAC1/2 调控的相关转录因子进行了分析,发现了一个与之相关的转录因子 Nr2f1。

3.通过胚胎电转实验验证了这一转录因子在 MGE 区域 *Nkx2-1* 谱系的神经发生中的重要功能,在该区域过表达 Nr2f1 后会导子代神经元出现聚集,苍白球发育异常。

综上我们验证了 HDAC1/2 在小鼠胚胎 MGE 区域神经发生的重要功能,并且我们解释了 HDAC1/2 很可能是通过 Nr2f1 这个下游转录因子来实现对苍白球神经元发育的调控。

但是我们的研究还有不足:

1.HDAC1/2 调控转录因子 Nr2f1 的机制不够明确。在前言中提到,HDAC1/2 是由多个蛋白组成的复合物,我们在本课题中无法确定 HDAC1/2 哪个结构域的缺陷导致 Nr2f1 的表达受影响。另外,我们无法确定 Nr2f1 的过表达是引起神经干细胞命运决定异常的直接原因,其中涉及到复杂的基因调控网络,未来可能需要结合更多的 ATAC-seq 以及 CUT&Tag 数据进行综合分析。

2.本课题只聚焦苍白球神经元的发育问题,仅关注到了胚胎阶段 MGE 区域的 *Nkx2-1* 谱系对苍白球神经元的贡献情况,没有研究苍白球在功能上的改变。我们只观察到苍白球正常神经元在数量上的减少,不清楚在苍白球位置上是否有异常神经元的占位,未来需要结合神经元投射和行为学实验等进行验证。

3.苍白球神经元具有多样性,并且来源于多个不同的祖细胞池。而我们在该

课题中只聚焦了 *Nkx2-1* 谱系，并没有关注 LGE 和 CGE 来源的神经元，虽然我们的课题可以为苍白球的发育提供相关的见解，但无法完全解决其发育问题。

核团是大脑中非常重要的组成部分，也是机体许多重要环路的参与者。解析其形成机制不仅有助于完整地理解大脑的发育过程，更有助于解析帕金森症或亨廷顿氏症等许多与核团相关的疾病的发生过程。而现有的技术难以对核团发育过程的神经干细胞进行准确地标记和谱系追踪，未来需要更多更有效的遗传标记工具来对核团的发育机制进行解析。

参考文献

- [1] Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*. 2009 Apr 10;513(5):532-41. doi: 10.1002/cne.21974. PMID: 19226510.
- [2] Herculano-Houzel S, Catania K, Manger PR, et al. Mammalian Brains Are Made of These: A Dataset of the Numbers and Densities of Neuronal and Nonneuronal Cells in the Brain of Glires, Primates, Scandentia, Eulipotyphlans, Afrotherians and Artiodactyls, and Their Relationship with Body Mass. *Brain Behav Evol*. 2015;86(3-4):145-63. doi: 10.1159/000437413. Epub 2015 Sep 30. PMID: 26418466.
- [3] Herculano-Houzel S, Avelino-de-Souza K, Neves K, et al. The elephant brain in numbers. *Front Neuroanat*. 2014 Jun 12;8:46. doi: 10.3389/fnana.2014.00046. PMID: 24971054; PMCID: PMC4053853.
- [4] Zhou Y, Song H, Ming GL. Genetics of human brain development. *Nat Rev Genet*. 2023 Jul 28. doi: 10.1038/s41576-023-00626-5. Epub ahead of print. PMID: 37507490.
- [5] Andrews MG, Subramanian L, Salma J, et al. How mechanisms of stem cell polarity shape the human cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2022 Dec;23(12):711-724. doi: 10.1038/s41583-022-00631-3. Epub 2022 Sep 30. PMID: 36180551; PMCID: PMC10571506.
- [6] Cárdenas A, Villalba A, de Juan Romero C, et al. Evolution of Cortical Neurogenesis in Amniotes Controlled by Robo Signaling Levels. *Cell*. 2018 Jul 26;174(3):590-606.e21. doi: 10.1016/j.cell.2018.06.007. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29961574; PMCID: PMC6063992.
- [7] Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Oct;10(10):724-35. doi: 10.1038/nrn2719. PMID: 19763105; PMCID: PMC2913577.
- [8] Ma T, Wang C, Wang L, et al. Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. *Nat Neurosci*. 2013 Nov;16(11):1588-97. doi: 10.1038/nn.3536. Epub 2013 Oct 6. PMID: 24097041.
- [9] Shi Y, Wang M, Mi D, et al. Mouse and human share conserved transcriptional programs for interneuron development. *Science*. 2021 Dec 10;374(6573):eabj6641. doi: 10.1126/science.abj6641. Epub 2021 Dec 10. PMID: 34882453.
- [10] Zhao Z, Zhang D, Yang F, et al. Author Correction: Evolutionarily conservative and non-conservative regulatory networks during primate interneuron development revealed by single-cell RNA and ATAC sequencing. *Cell Res*. 2023 Jul;33(7):569-573. doi: 10.1038/s41422-022-00757-0. Erratum for: Cell Res. 2022 May;32(5):425-436. doi: 10.1038/s41422-022-00635-9. PMID: 36526795; PMCID: PMC10313754.

- [11] Giossi C, Rubin JE, Gittis A, et al. Rethinking the external globus pallidus and information flow in cortico-basal ganglia-thalamic circuits. *Eur J Neurosci*. 2024 Nov;60(9):6129-6144. doi: 10.1111/ejn.16348. Epub 2024 Apr 24. PMID: 38659055.
- [12] Soghomonian JJ. The cortico-striatal circuitry in autism-spectrum disorders: a balancing act. *Front Cell Neurosci*. 2024 Jan 11;17:1329095. doi: 10.3389/fncel.2023.1329095. PMID: 38273975; PMCID: PMC10808402.
- [13] Fujiyama F, Karube F, Hirai Y. Globus pallidus is not independent from striatal direct pathway neurons: an up-to-date review. *Mol Brain*. 2024 Jun 7;17(1):34. doi: 10.1186/s13041-024-01107-4. PMID: 38849935; PMCID: PMC11157709.
- [14] McGregor MM, Nelson AB. Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease. *Neuron*. 2019 Mar 20;101(6):1042-1056. doi: 10.1016/j.neuron.2019.03.004. PMID: 30897356.
- [15] Lazaridis I, Crittenden JR, Ahn G, et al. Striosomes control dopamine via dual pathways paralleling canonical basal ganglia circuits. *Curr Biol*. 2024 Nov 18;34(22):5263-5283.e8. doi: 10.1016/j.cub.2024.09.070. Epub 2024 Oct 23. PMID: 39447573.
- [16] Gittis AH, Berke JD, Bevan MD, et al. New roles for the external globus pallidus in basal ganglia circuits and behavior. *J Neurosci*. 2014 Nov 12;34(46):15178-83. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3252-14.2014. PMID: 25392486; PMCID: PMC4228126.
- [17] Hernández VM, Hegeman DJ, Cui Q, et al. Parvalbumin+ Neurons and Npas1+ Neurons Are Distinct Neuron Classes in the Mouse External Globus Pallidus. *J Neurosci*. 2015 Aug 26;35(34):11830-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4672-14.2015. PMID: 26311767; PMCID: PMC4549397.
- [18] Nóbrega-Pereira S, Gelman D, Bartolini G, et al. Origin and molecular specification of globus pallidus neurons. *J Neurosci*. 2010 Feb 24;30(8):2824-34. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4023-09.2010. PMID: 20181580; PMCID: PMC6633933.
- [19] Flandin P, Kimura S, Rubenstein JL. The progenitor zone of the ventral medial ganglionic eminence requires Nkx2-1 to generate most of the globus pallidus but few neocortical interneurons. *J Neurosci*. 2010 Feb 24;30(8):2812-23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4228-09.2010. PMID: 20181579; PMCID: PMC2865856.
- [20] Bershteyn M, Bröer S, Parekh M, et al. Human pallial MGE-type GABAergic interneuron cell therapy for chronic focal epilepsy. *Cell Stem Cell*. 2023 Oct 5;30(10):1331-1350.e11. doi: 10.1016/j.stem.2023.08.013. PMID: 37802038; PMCID: PMC10993865.
- [21] Lim L, Mi D, Llorca A, et al. Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron*. 2018 Oct 24;100(2):294-313. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.009. PMID: 30359598; PMCID: PMC6290988.
- [22] Molnár Z, Clowry GJ, Šestan N, et al. New insights into the development of the human cerebral cortex. *J Anat*. 2019 Sep;235(3):432-451. doi: 10.1111/joa.13055. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31373394; PMCID: PMC6704245.
- [23] Mauceri D. Role of Epigenetic Mechanisms in Chronic Pain. *Cells*. 2022 Aug

- 22;11(16):2613. doi: 10.3390/cells11162613. PMID: 36010687; PMCID: PMC9406853.
- [24] Hou QQ, Xiao Q, Sun XY, et al. TBC1D3 promotes neural progenitor proliferation by suppressing the histone methyltransferase G9a. *Sci Adv*. 2021 Jan 15;7(3):eaba8053. doi: 10.1126/sciadv.aba8053. PMID: 33523893; PMCID: PMC7810367.
- [25] Tang T, Zhang Y, Wang Y, et al. HDAC1 and HDAC2 Regulate Intermediate Progenitor Positioning to Safeguard Neocortical Development. *Neuron*. 2019 Mar 20;101(6):1117-1133.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.007. Epub 2019 Jan 30. PMID: 30709655.
- [26] Musselman CA, Lalonde ME, Côté J, et al. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Dec;19(12):1218-27. doi: 10.1038/nsmb.2436. PMID: 23211769; PMCID: PMC3645987.
- [27] Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Oct 3;6(10):a026831. doi: 10.1101/cshperspect.a026831. PMID: 27599530; PMCID: PMC5046688.
- [28] Ahringer J. NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet*. 2000 Aug;16(8):351-6. doi: 10.1016/s0168-9525(00)02066-7. PMID: 10904264.
- [29] Xu Q, Tam M, Anderson SA. Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *J Comp Neurol*. 2008 Jan 1;506(1):16-29. doi: 10.1002/cne.21529. PMID: 17990269.
- [30] Kittock CM, Pilaz LJ. Advances in in utero electroporation. *Dev Neurobiol*. 2023 Apr-May;83(3-4):73-90. doi: 10.1002/dneu.22910. Epub 2023 Mar 20. PMID: 36861639.

致 谢

看到致谢这两个字，忽然很恍惚。在这二十几年的时光里，遇见了很多的人，经历了很多的事，也是该好好静下心来给自己作一个阶段性总结了。

我来自一个不算很发达但也不落后的城市，家境也是如此。在儿时，我也不知为何，总有一种自命不凡的感觉，现在也是如此，或许我现在还仍未褪去儿时的幼稚吧，不过我挺喜欢这种感觉的，我一直都渴望成为一个成功的人。儿时，在我们城市中，我接触不到许多可以去尝试的新鲜事物，除了学习。但很可悲的是，我在学习上也没有很多天赋，在各个阶段我都不是同龄人中最优秀的，就这样摸爬滚打了十几年，终于高考结束后，我开始换了一个城市生活。在上海，我发觉一切都不是我想象中的那样，在这样多元化的城市中你可以尝试任何想做的东西。初入复旦，我意识到，比我有天赋的人数不清，比我努力的人更数不清。在复旦的这四年，我接受了许多知识，也开阔了自己的视野，可我觉得我在复旦这四年最宝贵的财富则是那句话带给我的，“自由而无用”。在我看来，“自由”就是多元，“无用”则是坚持自己的看法，并且为之奋斗。这并不是一句话这么简单，它藏在清晨雾气弥漫的空气中，藏在与老师和同学的交谈中，藏在校园里的一砖一瓦之中，这是一种独属于复旦和复旦人的气质，很感谢复旦将其带给了我。

感谢过去为我传道授业解惑的所有老师们，师恩终生难忘。在这里我要特别感谢复旦大学脑科学研究院解云礼教授，感谢您在我初次接触科研时的鼓励和支持，感谢您在我申请 FDUROP 望道项目上的帮助，更要感谢您在我生活和未来规划上给予我的宝贵的建议。在您的指导下，我愈发对神经生物学领域感兴趣，希望之后在您的带领下我们团队继续发光发热。

感谢实验室的所有成员。感谢唐湑翔师兄在分子克隆、冰冻切片、免疫荧光染色、胚胎电转、基因鉴定等实验技术上给予我严谨而实用的指导，感谢唐师兄在小鼠饲养上给予我的指导，感谢唐师兄将其科研经验无私分享给我，我受益匪浅。感谢黄云云师姐、曾兰惠师姐和陈晋炜师兄在小鼠管理上给予我的帮助。感谢张燕东师兄、邹锐师兄、李丹师姐、朱悦师姐在生物信息分析上给予我的帮助。

也非常感谢实验室其他师兄师姐在我实验上给予的帮助。感谢鼠房师傅在小鼠看管和鼠笼清洗上的帮助。感谢所有实验动物。感谢所有生物公司等机构为课题给予专业的帮助。

感谢我的女朋友王庆芬女士，感谢你在我的学习和生活上给予我的支持和帮助，感谢你在我的论文格式修改上给予我的帮助，感谢与你相识、相知、相爱……

感谢我的所有家人，感谢他们在我学习和生活上给予我物质和精神上的支持。感谢我的父亲朱峰先生和母亲刘延荣女士。感谢我父亲带给我人生视野上的开阔和许多做人的道理，我向您学习了很多，您永远是我的榜样，您是全天下最好的父亲。感谢我温柔贤惠的母亲在生活和学习上给予我无微不至的关怀，您是全天下最好的母亲。感谢我的爷爷奶奶和姥姥姥爷对我的照料和支持。感谢其他所有家人对我的支持和帮助。

最后，感谢自己，感谢那个曾经自命不凡的自己。