技术与方法

一种发育期皮质脊髓投射神经细胞基因 表达谱的研究方法

曲春生1,2 赵月娥1,3 陈嘉琦2 高 英1*

(¹卫生部视觉科学重点实验室, 温州医科大学眼视光学院, 温州 325027; ²丽水市人民医院检验科, 温州医科大学附属第六医院, 丽水 323000; ³丽水市中心医院眼科, 温州医科大学附属第五医院, 丽水 323000)

摘要 皮质脊髓投射神经细胞(cortico-spinal projection neurons, CSPN)对于大脑的功能非常 重要,但目前还缺乏研究小鼠发育期CSPN基因表达谱的有效方法。将出生后2 d(P2)的小鼠在脊髓 交叉处注射逆行标记的神经示踪剂,并在P8时进行激光显微切割。提取捕获细胞的RNA并线性放 大,而后利用定量PCR进行皮层标记基因的验证,线性放大后的RNA与大脑皮层组织的RNA相比, 第五皮层标记基因Fezf2(Fez family zinc finger 2)表达明显升高,第四、第六皮层标记基因Rorβ(RAR related orphan receptor β)、Foxp2(forkhead box P2)的表达相对较低。之后,进行小鼠基因芯片表达 谱检测,通过基因功能富集度分析发现,在CSPN中大多数富表达的基因都与G蛋白偶联受体信号 通路以及运动行为有关。而且,染色质的修饰和编排相关基因在CSPN里也有富集表达。通过定量 PCR进一步验证了芯片中CSPN的富集基因,结果发现,Meg3(maternally expressed gene 3)等7个基因 在大脑第五皮层表达丰富。该研究将在体神经细胞荧光标记、激光捕获显微切割、RNA线性放大、 基因芯片及定量PCR等多种技术结合起来,提供了一种研究发育期小鼠CSPN基因表达谱的方法。

关键词 皮质脊髓投射神经元;激光捕获显微切割技术;发育;基因表达谱

A Method for Examining the Gene Expression Profile of Developing Cortico-Spinal Projection Neuron

Qu Chunsheng^{1,2}, Zhao Yue'e^{1,3}, Chen Jiaqi², Gao Ying^{1*}

(¹Key Laboratory of Visual Science, National Ministry of Health, School of Optometry and Ophthalmology, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China; ²Clinical Laboratory of Lishui People's Hospital, the Sixth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Lishui 323000, China; ³Ophthalmology Department of Lishui Central Hospital, the Fifth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Lishui 323000, China)

Abstract The cortico-spinal projection neurons (CSPN) are very important for the brain function. However, an efficient method to study the gene expression profile of developmental CSPN is still lacking. In the present study, mice were injected Red Retrobeads at spinal cross at postnatal day 2 (P2) for retrograde labeling of CSPN and sacrificed at P8 for laser capture micro-dissection (LCMD). Total RNAs of isolated cells were amplified

Received: March 25, 2016 Accepted: April 18, 2016

*Corresponding author. Tel: +86-577-88067934, E-mail: gaoying105@163.com

收稿日期: 2016-03-25 接受日期: 2016-04-18

国家自然科学基金(批准号: 31500850)、浙江省自然科学基金(批准号: LY15H090020、LQ16H120001)、丽水市公益性技术应用项目(批准号: 2014JYZB03) 资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 0577-88067934, E-mail: gaoying105@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31500850), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY15H090020, LQ16H120001) and Lishui Public Projects (Grant No.2014JYZB03)

网络出版时间: 2016-06-22 14:59:49 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160622.1459.004.html

linearly and verified through the marker genes of each layer by qPCR. While layer V marker gene *Fezf2* (Fez family zinc finger 2) was increased, layer IV maker gene *Ror* β (RAR related orphan receptor β) and layer VI maker gene *Foxp2* (forkhead box P2) were decreased in amplified RNAs from LCMD, compared with those from cortical tissue. The RNA products were determined by Affymetrix Mouse GeneChip. GO category analysis found that the most enriched biological processes in the CSPN were the regulations of G-protein coupled receptor signaling pathway and motor behavior. Interestingly, genes for chromatin modification and organization are also enriched in the CSPN. Additionally, we verified the enriched genes from GeneChip by qPCR and found that 7 genes have high level of expression in the CSPN, such as *Meg3* (maternally expressed gene 3) etc. Our study provides a method for examining the gene expression profile of developmental CSPN by composing several techniques such as retrograde labeling, LCMD, RNA amplification, microarray screening and qPCR.

Keywords cortico-spinal projection neuron; laser capture micro-dissection; development; gene expression profile

皮质脊髓投射神经细胞(cortico-spinal projection neurons, CSPN)位于大脑皮层的第五层, 主要负责接 收来自其他各皮层神经细胞的信号, 并将整合的信 号传递出去。作为唯一的脑外投射神经细胞, 其构 成了哺乳动物体内最长的轴突投射, 并控制着四肢 的运动。一旦该神经细胞遭受到外界环境的破坏或 是自身调控发生障碍, 将会引起大脑--四肢运动神经 环路的异常。同样, 该神经元的发育如果出现异常, 也会引起一些运动系统疾病, 如遗传性侧索硬化症、 进行性肌肉萎缩等^[1-2]。因此, 深入地了解皮质脊髓 投射神经细胞发育的分子机制, 对于认识皮质脊髓 投射神经细胞发育相关疾病是十分必要的, 但目前 还缺乏研究小鼠发育期CSPN表达谱的有效方法。

本研究采用逆行神经示踪法标记出生后第2 d (P2)小鼠的CSPN,在出生后第8 d(P8)利用激光捕获 显微切割(laser capture micro-dissection, LCMD)分离 纯化CSPN,将分离的CSPN的RNA线性放大扩增,进 行基因芯片分析,并进一步利用定量PCR验证芯片 结果。通过上述的技术组合,我们成功地完成了小 鼠从出生次日到第8 d CSPN发育的表达谱研究。

1 材料与方法

1.1 小鼠脊髓交叉处注射逆行示踪剂

清洁级美国癌症研究所(Institute of Cancer Research, ICR)小鼠由温州医科大学动物中心提供。 将出生后2 d(P2)的小鼠置于冰上冷冻麻醉后,固定 在小鼠脑立体定位仪上(Kopf 940,美国),切开颈部 背侧皮肤,钝性逐层分离肌肉,直至颈髓部位。于脊 髓中线紧靠第一颈椎处垂直注射红色荧光微球(Red Retrobeads, Lumafluor, 美国)0.3 µL, 而后缝合肌肉与皮肤, 待小鼠恢复后放回母鼠身边饲养, 直至P8。

1.2 小鼠大脑切片的制备

将标记的小鼠麻醉,用10 mL预冷的PBS、20 mL 预冷的20%蔗糖水溶液在冰上进行灌注。灌注后迅 速取出大脑,用包埋剂(SAKURA,4583)包埋后,置 于液氮中冰冻,而后进行冰冻切片,厚度14 μm。将 贴有大脑切片的载玻片分别依次置于预冷的75%、 95%、100%和100%的乙醇中脱水,各30 s/次;然后, 在室温的二甲苯中脱水2次,90 s/次。于空气中干燥 5 min后立即进行激光捕获显微切割。

1.3 激光捕获显微切割

将干燥的切片置于移动载物台上, 开启激光捕获显微切割系统(Arcturus XT, 美国)及荧光灯, 利用 Cy-3滤片在40倍物镜下找到标记带有荧光的神经细 胞, 而后将Capsure HS LCM Cap置于组织的中心进 行捕获切割(激光能量为70 mW, 时程为25 ms), 捕获 约100个细胞。之后, 将Capsure HS LCM Cap取下, 把ExtracSureDevice扣在Cap上, 而后加入10 μL裂解 溶液, 并用0.5 mL离心管盖在ExtracSureDevice上面, 置于42 ℃气浴30 min。而后在室温下以800 ×g离心 2 min, 转入-80 ℃储存, 用于后续的RNA线性放大。

1.4 RNA线性放大

用Picopure RNA提取试剂盒(ABI, KIT0204)从约 1000个激光切割获得的细胞中提取RNA。细胞经裂 解后与乙醇混合加入到RNA纯化柱中,吸附的RNA经 清洗后用DNA酶处理,加11 µL洗脱液离心收集RNA。 RNA的放大遵循Affymetrix少量RNA标记方案,采用 一链合成试剂盒(Thermo Fisher, K1651),以oligo(dT)24-

基因名称 Gene names	引物序列(5'→3') Sequences of primers (5'→3')
Meg3 (maternally expressed gene 3)	Forward primer: CTC CAA TTT CCC CTC CAA C
	Reverse primer: CAA ATG GCA CAG GAA GAC G
Dnmt3a (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha)	Forward primer: TGA TGA TTG ACG CCA AAG AA
	Reverse primer: TCA CAG TGG ATG CCA AAG G
Epha4 (EPH receptor A4)	Forward primer: AGG ACA GGG TCG GAG AGT TC
	Reverse primer: CGC CCA CTG ATA CTA CAG CA
<i>Rbm5</i> (RNA binding motif protein 5)	Forward primer: AGG CAT CAC AGC TCC CAT T
	Reverse primer: CCT GAC AAC CCA TAG GCA CT
Ash11 (ASH1 like histone lysine methyltransferase)	Forward primer: AGA GGG AAC GGC TCA ACC
	Reverse primer: CAG CAG GTA GGT CAC GTC AA
Nsd1 (nuclear receptor binding SET domain protein 1)	Forward primer: CTG ACA AAG CGA CCA GCA
	Reverse primer: GGG CAC ATC TCA CAG AAG G
Arid4b (AT-rich interaction domain 4B)	Forward primer: GAG CAA GCA CGA TCT GGA G
	Reverse primer: TCC TCG TCT TCT TCC TCG TC
Kdm5a (lysine (K)-specific demethylase 5A)	Forward primer: GGC CGT GTA AGG ACA AGG T
	Reverse primer: CCA ACA CAA ACT TGA TGA AAC C
<i>Atrx</i> (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked)	Forward primer: CGA TGT ATT GAC AAA GCA ACA GAT
	Reverse primer: TGC TGT TGC TGC TGA GTG T
<i>Eny2</i> (transcription and export complex 2 subunit)	Forward primer: ACT TGG TGG CTG AAA TCA CTC
	Reverse primer: GAG CAA GGA ATG TTC TTA TTC TCT G
Scn1a (sodium voltage-gated channel alpha subunit 1)	Forward primer: ATC TCG CTC CGC CAT TAT TA
	Reverse primer: CTC CGC AAG AAA CAT CCC TA

表1	荧光定量PCR引物	
Tabla 1	Drimons of aDT DCD	

T7为引物, 逆转录合成第一链cDNA。接着使用大肠杆菌DNA聚合酶I, RNA酶H和DNA连接酶合成第二链。经纯化后, 采用MEGAscript T7试剂盒(Ambion, AM1333M)体外转录为cRNA, 放大后的RNA送上海伯豪生物技术有限公司进行基因芯片分析。

1.5 荧光定量RT-PCR

在确定了候选基因之后,我们通过https://www. roche-applied-science.com/在线设计定量PCR引物 (表1),获得的序列由上海华津生物科技有限公司合成,而后利用SYBR Green试剂盒(Invitrogen, 11733-078)定量检测基因的表达。

2 结果

2.1 激光捕获显微切割分离纯化CSPN

我们通过在P2小鼠的脊髓交叉处注射逆行标

记染料,标记发育期的CSPN(图1A),而后通过激光 显微切割获取P8小鼠大脑皮层的CSPN(图1B~图 1D)。我们共收集了1 000个细胞,并进行了RNA的 线性放大^[9-11]。为了验证这些捕获细胞在RNA放大 后表达谱的正确性,选取了不同皮层的标志性基因 进行定量PCR的验证。结果发现,第五皮层的标志 基因*Fezf2*(Fez family zinc finger 2)在捕获的细胞中 高表达,而第六皮层的*Foxp2*(forkhead box P2)及第 四皮层的*Rorβ*(RAR related orphan receptor β)则相对 较低(图1E)。这一结果表明,通过激光显微切割捕 获的细胞属于CSPN,其线性放大的表达谱可以用于 后续的基因研究。

2.2 分离后CSPN的基因筛选

捕获的细胞RNA在2次线性放大之后,进行 基因芯片分析,检测CSPN的基因表达谱,并与大



A: 红色荧光微球(Red Retrobeads)标记的P8小鼠大脑第五皮层神经元,标尺=100 μm; B: 显微切割位置为CSPN的胞体部分(绿色圆圈所指),标尺 =20 μm; C: 显微切割后大脑皮层组织的图像,标尺=40 μm; D: 分离的细胞图像,标尺=40 μm; E: 大脑各皮层标记基因的定量PCR结果。LCMD 细胞的RNA在线性放大之后检测各基因的CT值差异(DCt),以β-Actin作为内参。Fezf2: 第五皮层神经元标记基因; Foxp2: 第六皮层神经元标记 基因; Rorβ: 第四皮层神经元标记基因。

A: Red Retrobeads labeled neurons in layer V of P8 mouse cortex, scale bar=100 μ m; B: magnified images from A, the somata of the projection neurons were selected by circle (green) for laser capture, scale bar=20 μ m; C: image after the laser capture in the cortical section, scale bar=40 μ m; D: distribution of captured cells in the CapSure cap, scale bar=40 μ m. The pattern of distribution was identical to that of the tissue section in C after LCMD. E: the qRT-PCR result of each cortical layer markers. RNAs from LCMD were amplified linearly and the gene expression levels were determined with the difference in CT values (DCt) using β -Actin as a control. Fezf2 is a marker of the subcerebral projection neurons in layer V. Foxp2, a marker for layer VI, is partly enriched in layer V. Ror β is expressed exclusively in layer IV.

图1 激光捕获显微切割分离纯化CSPN

Fig.1 The CSPN isolated by laser capture micro-dissection (LCMD) method

Table 2Enriched biological processes in CSPN				
功能富集	编号	富集比例		
Enriched biological process	GO ID	Ratio of enrichment		
Regulation of G-protein signaling	GO:0008277	R=24.21		
Adult walking behavior	GO:0007628	R=15.83		
Chromatin modification	GO:0016568	R=4.92		
Chromatin organization	GO:0006325	R=4.77		
Transmission of nerve impulse	GO:0019226	R=4.55		
Synaptic transmission	GO:0007268	R=4.40		
Regulation of metal ion transport	GO:0010959	R=4.40		

表2 CSPN中的基因功能富集度分析

脑皮层组织的基因表达谱进行对比分析。结果发现,与皮层组织相比,CSPN表达差异在两倍以上的有478个基因,4倍以上的有102个基因。我们将4倍差异以上的基因在WebGestalt(WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit, http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/)进行基因功能富集度分析发现,大多数富表达在CSPN中的基因都与G蛋白偶联受体信号通路以及运动行为有关。此外,染色质的修饰和编排相关基因在CSPN中也有富集(表2)。

2.3 分离后CSPN的基因验证

为了验证基因芯片分析的结果,我们利用定量 PCR从上述的差异基因中选取了11个进行验证,结 果发现,有4个基因没有达到2倍以上的表达差异,其 余7个基因的表达差异均在2倍以上,尤其是*Meg3*, 其在CSPN的表达水平远远高于皮层组织(图2)。

3 讨论

哺乳动物大脑皮层是一个复杂的、高度异质



从基因芯片的结果中挑选11个基因,在LCMD细胞和P8的大脑皮层组织中进行qRT-PCR验证,结果以待检基因和β-Actin之间的CT差值(DCt)表示。在这些基因中,Meg3的CT差值最低,表明其在CSPN中表达最高。

A total of 11 genes selected from the microarray analysis were measured by qRT-PCR both in the LCMD cells and cortical tissues isolated from P8 mouse brain. The results were expressed as difference in the threshold cycle numbers between the indicated gene and β -Actin (DCt). Meg3 had the lowest value, which meant a highest level of expression in the CSPN among the selected genes.

图2 比较筛选基因在CSPN及大脑皮层中的表达 Fig.2 The expressions of genes selected from CSPN in compared with cortical tissue

化的层次化结构,各种神经细胞及胶质细胞相互之间形成了紧密的、难以分离的联系。因此,大脑皮层中单一种类神经细胞的辨识与分离在神经细胞发育的分子机制研究中是一项重要的技术手段。最早,人们通过在脊髓交叉处注射逆行神经示踪剂标记CSPN,而后通过流式细胞术分选方法进行分离与纯化⁽³⁾,发现了大量与CSPN发育相关的重要分子^[4]。但是,分化的CSPN具有长的轴突和树突,在流式细胞术分选的过程中会导致细胞的损伤,进而很难保证得到的RNA谱系与在体细胞时一致。可见,如何实现单一神经细胞的分离,且又最大程度避免外源基因的引入及自身遗传物质的丢失,是大脑皮层神经细胞分子机制研究的技术难点。

在本研究中,我们将在体神经细胞标记、激光 捕获显微切割、RNA线性放大、基因芯片及定量 PCR等技术结合起来,形成一个可以用作探索发育过 程中皮质脊髓投射神经细胞分子机制的方法。目前, 这种技术组合研究策略已应用在多巴胺能神经元^[12]、 运动神经元^[13]分子机制的研究中。本文应用红色荧 光微球(Red Retrobeads)作为逆行神经示踪剂,来标记 处于发育期小鼠的CSPN。该示踪剂可以很好地标记 CSPN,在经过梯度浓度的乙醇--水溶液和二甲苯的处 理后,仍然能呈现出CSPN的层次性及CSPN的大体细 胞形态(如顶树突等),使后续使用激光捕获显微切割 方法来特异性地捕获CSPN成为可能。

激光捕获显微切割技术开发于1996年[5],最 早应用于肿瘤细胞分离^[6]。随着技术的不断发展, 激光捕获显微切割在神经系统中的应用也越加频 繁和广泛[7-8]。该技术主要有两个优点: (1)可以有 选择性地原位获取某一类细胞,有效地排除异质 细胞的干扰; (2)可以获取精确的细胞数量。但是, 激光捕获显微切割也有一定的缺陷,在分离单一 种类神经细胞时很难获得大量的细胞,因此提取 的RNA也相对较少, 很难在量上达到基因组学的 实验要求。为解决这一问题,我们将捕获细胞的 RNA进行了二次线性放大,而后进行基因芯片分 析及荧光定量RT-PCR的验证。在各皮层标志物 的检测中,我们发现,Fezf2的表达明显高于其他 皮层的标志基因;而且定量PCR的验证结果中, Meg3在CSPN的富集表达也与文献报道一致[14]。 这些数据说明, RNA的线性放大对于CSPN中高 表达基因的筛选是可行的。另外,我们发现也有 少数基因在芯片分析中差异较大,但在进一步的 荧光定量RT-PCR验证中却没有二倍以上的表达 变化。究其原因,可能存在两方面的干扰,一方面 可能来自于基因芯片固有的假阳性,另一方面则 可能是RNA在二次线性放大之后的产物比原始 转录组短,进而引起表达谱分析出错[12]。

总之,我们将在体神经细胞标记、激光捕获显 微切割、RNA线性放大、基因芯片及定量PCR等技 术结合起来,可应用于CSPN的表达谱研究。虽然, 该方法存在一定缺陷,如放大的RNA不等同于CSPN 本身固有的RNA。但是,这一套技术组合策略在神 经细胞种类繁多的大脑皮层中,不失为一种研究单 一种类神经细胞基因表达谱的有效方法,有助于研 究CSPN发育的分子机制,可为治疗CSPN发育异常 引起的疾病奠定理论基础。

参考文献 (References)

- del Puerto A, Wandosell F, Garrido JJ. Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. Front Cell Neurosci 2013; 7: 197.
- 2 Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE. Motor neuron diversity in development and disease. Annu Rev Neurosci 2010; 33: 409-40.
- 3 Arlotta P, Molyneaux BJ, Chen J, Inoue J, Kominami R, Macklis JD. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development *in vivo*. Neuron 2005; 45(2): 207-21.
- 4 Molyneaux BJ, Arlotta P, Hirata T, Hibi M, Macklis JD. Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. Neuron 2005; 47(6): 817-31.
- 5 Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, *et al.* Laser capture microdissection. Science 1996; 274(5289): 998-1001.
- 6 Lieberman R, Crowell JA, Hawk ET, Boone CW, Sigman CC, Kelloff GJ. Development of new cancer chemoprevention agents: role of pharmacokinetic/pharmacodynamic and intermediate endpoint biomarker monitoring. Clin Chem 1998; 44(2): 420-7.

- 7 Chabrat A, Doucet-Beaupre H, Levesque M. RNA isolation from cell specific subpopulations using laser-capture microdissection combined with rapid immunolabeling. J Vis Exp 2015; 98.
- 8 Kummari E, Guo-Ross SX, Eells JB. Laser capture microdissection-a demonstration of the isolation of individual dopamine neurons and the entire ventral tegmental area. J Vis Exp 2015; (96): e52336.
- 9 Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, et al. Analysis of gene expression in single live neurons. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(7): 3010-4.
- Eberwine J. Single-cell molecular biology. Nat Neurosci 2001; 4 Suppl: 1155-6.
- 11 陈林华,赵月娥,陈晓燕,高 英. 两种微量RNA扩增方法的比较研究. 中国细胞生物学学报(Chen Linhua, Zhao Yuee, Chen Xiaoyan, Gao Ying. Comparison of two different amplification methods for small amounts of total RNA. Chinese Joournal of Cell Biology) 2011; 33(4): 391-6.
- 12 Yao F, Yu F, Gong L, Taube D, Rao DD, MacKenzie RG. Microarray analysis of fluoro-gold labeled rat dopamine neurons harvested by laser capture microdissection. J Neurosci Methods 2005; 143(2): 95-106.
- 13 Cui D, Dougherty KJ, Machacek DW, Sawchuk M, Hochman S, Baro DJ. Divergence between motoneurons: gene expression profiling provides a molecular characterization of functionally discrete somatic and autonomic motoneurons. Physiol Genomics 2006; 24(3): 276-89.
- 14 Qu C, Jiang T, Li Y, Wang X, Cao H, Xu H, et al. Gene expression and IG-DMR hypomethylation of maternally expressed gene 3 in developing corticospinal neurons. Gene Expr Patterns 2013; 13(1/2): 51-6.