

纤维母细胞生长因子3对前丘脑 γ -氨基丁酸能抑制性轴突的排斥作用

黄红,余舒扬,张蔚云,肖俐,徐贞刚,刘芳

摘要 目的 研究纤维母细胞生长因子3(FGF3)对前丘脑 γ -氨基丁酸能(GABA)抑制性神经元轴突的导向作用,探讨FGF3对丘脑神经网络形成的影响。方法 采用免疫荧光法检测FGF3及前丘脑GABA标志基因在鸡胚间脑的表达及定位。采用DiI示踪法检测早期前丘脑GABA抑制性神经元轴突走向。三维凝胶共培养实验证明FGF3是否对早期前丘脑GABA抑制性神经纤维具有导向作用。结果 前丘脑GABA细胞与FGF3+的下丘脑相邻,位于下丘脑上方。DiI示踪实验显示,在鸡胚发育的第6天(E6),前丘脑GABA抑制性神经纤维已伸展进入背侧丘脑。与空白对照组比较,FGF3不仅能显著促进前丘脑GABA抑制性神经纤维的生长($P<0.01$),并且排斥新生前丘脑轴突向背侧丘脑方向延伸,前丘脑轴突的数量在FGF3一侧的数量明显少于对侧($P<0.01$)。并且,FGF3对前丘脑轴突的导向功能可被FGF信号通路抑制剂SU5402所阻滞。结论 表达在下丘脑的轴突化学导向分子FGF3对相邻前丘脑GABA抑制性神经纤维的路径选择具有导向作用。

关键词 纤维母细胞生长因子3;GABA神经元;轴突导向

中图分类号 Q 189

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1574-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.012

丘脑是机体重要的感觉传导接替站,来自全身的感觉传导通路(除嗅觉外),均在丘脑内更换神经元,并通过丘脑皮质轴突投射到大脑皮质^[1]。丘脑含有两类主要的神经元群:抑制性的 γ -氨基丁酸能(γ -aminobutyric acid, GABA)神经元和位于后丘脑的兴奋性谷氨酸能神经元^[2]。其中,前丘脑GABA抑制性神经元伸出的轴突对兴奋性谷氨酸能神经元起着重要的调节作用。例如,精神分裂症、阿尔茨海默病的发生,均与前丘脑GABA抑制中间神经元的功能缺陷有关^[3-5]。然而,与大量关于大脑皮层抑

制作用发展的研究相比,丘脑抑制作用的形成与成熟机制尚不清楚。

纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)构成了一个多肽生长因子的大家族。在脊椎动物中,FGFs被化分为7大亚族^[6]。研究^[7]表明,在早期发育中FGF7亚族的FGF3和FGF10调节下丘脑正中隆起基底细胞的分化,但在下丘脑发育后期,FGF3和FGF10能作为化学趋化因子指导下丘脑轴突抵达正中隆起^[8]。这提示表达在下丘脑FGF3也许是另一类对丘脑具有化学导向作用的分子,引导着邻近前丘脑GABA抑制性神经元轴突的生长。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 FGF3(美国R&D公司);SU5402(德国Calbiochem公司);鼠尾胶原蛋白I型(美国R&D公司);Affigel beads(美国Pharmacia Biotech公司);DMEM、M199、胎牛血清(美国Gibco公司);中性蛋白酶(美国Thermo Fisher公司);anti-FGF3(美国Ablonal公司,1:200);anti-TUJ1(英国Abcam公司,1:800);anti-PV(北京博奥森公司,1:400);二抗Alexa Fluor 488、568(美国ThermoFisher公司,1:800);亲脂性羰花青染料(lipophilic carbocyanine dye, DiI)(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 三维组织培养 将受精种鸡蛋(江西省种鸡场)孵育在温度为39℃、湿度为60%的培养箱中5~6 d。中性蛋白酶(20 min, 1 mg/ml)消化分离神经外胚层与中胚层。分离的神经外胚层组织块将依据已发表的技术和方法^[8]培养在胶原蛋白凝胶中,48 h后检测观察。

1.3 免疫荧光 胚胎($n\geq 6$)和组织块($n\geq 6$)的免疫组织化学分析是依据已发表技术在冰冻切片或整体组织块上进行^[7]。样本滴加I抗(封闭液中)后,室温静置1 h或者4℃过夜。PBST洗涤3次,加II抗室温孵育2 h, PBST(PBS+0.1% Triton X-100)洗涤3次,封片,Olympus ix70倒置荧光显微镜下观察。

2022-08-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:32160188)

作者单位:南昌大学医学部基础医学院细胞生物学教研室,南昌 330031

作者简介:黄红,女,硕士研究生;

刘芳,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: fang-liuncueducn@126.com

1.4 DiI 示踪亲脂性羰花青染料 DiI 是神经生物实验中常用的荧光示踪剂。分离 E6 鸡胚大脑, 将 DiI (5 mg/ml 无水乙醇) 注入后丘脑, 固定于 4% 多聚甲醛中 1 个月。PBS 充分清洗后, 显微追踪前丘脑 GABA 抑制性神经纤维的生长。

1.5 统计学处理 运用 SPSS 22.0 统计软件包进行数据处理, 组间比较采用独立样本 t 检验, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FGF3 与 PV 在间脑的表达及定位 首先使用免疫荧光法确定 FGF3 在鸡胚间脑(丘脑和下丘脑)的表达。在 E5, FGF3 的表达扩展到下丘脑的背侧区域(图 1B)。PV 是前丘脑成熟 GABA 神经元标志性基因。E5 前丘脑横切面(图 1A)的免疫荧光结果显示, PV 在前丘脑有着广泛的表达(图 1C)。

2.2 下丘脑源 FGF3 对前丘脑 GABA 轴突的导向作用 为检测 GABA 神经纤维进入丘脑的时期, 本研究将 DiI 注入 E6 鸡胚后丘脑, 并置于 4% PFA 固定四周。荧光显示: 已有少量前丘脑 GABA 抑制性神经纤维平行延伸并在丘脑背侧汇合(图 2A), 说明在 E6 时期前丘脑 GABA 抑制性神经纤维已进入丘脑。

为了验证下丘脑源的 FGF3 的轴突导向功能, 本研究进行了三维组织共同培养实验。间脑不同区域组织块被解剖出来, 并放入三维胶原蛋白凝胶中培养 48 h(图 1D)。将 E5 前丘脑组织块单独培养或与 PBS 珠子共培养时, 在胶原蛋白凝胶中几乎没有观察到神经纤维长出组织块(图 2B、2C)。当前丘脑组织块与下丘脑组织块共培养时, 研究结果显示, 下丘脑组织块排斥前丘脑神经轴突; 轴突伸出凝胶并向远离下丘脑组织块的方向生长(图 2D、2G)。免疫荧光结果显示, FGF3 和 PV 分别在下丘脑和前丘脑组织块表达, 表明组织块解剖的正确性(图 2E、

2F)。TUI1 抗体可识别 class III-tubulin 微管蛋白, 因此能标记正在发育的前体神经细胞及纤维。使用 TUI1 与 PV 抗体共同标记前丘脑轴突显示, 被下丘脑排斥的 TUI1 轴突中含有大量前丘脑 GABA 抑制性轴突(图 2H、2I)。

为检测下丘脑源的 FGF3 是否参与了前丘脑 GABA 神经元轴突的路径选择, 采用 FGF3 的珠子与前丘脑组织块共培养实验。与单独培养的前丘脑组织块相比(图 2B), FGF3 珠子 (300 ng/ml) 能显著促进前丘脑 TUI1 + 轴突在凝胶中的生长 [$n = 6$, $(4.33 \pm 1.21) vs (38.00 \pm 6.72)$ 轴突束, $t = 12.072$, $P < 0.01$](图 3A); 并且, 前丘脑轴突的数量在近侧 (FGF3 侧) 明显少于远侧 (远离 FGF3 侧) [$n = 6$, $(5.50 \pm 1.05) vs (32.50 \pm 7.31)$ 轴突束, $t = 8.950$, $P < 0.01$]。并且, 在这些被排斥的轴突中, 含有大量 PV + GABA 神经纤维(图 3B)。为了确定 FGF 信号是否参与前丘脑 GABA 抑制性神经纤维的引导作用, 前丘脑组织块暴露于 FGFR 抑制剂 SU5402 (20 $\mu\text{mol/L}$) 之中。培养基中含有 SU5402 时, FGF3 珠子无法引导前丘脑 GABA 神经纤维的生长方向; 胶原凝胶中只有少量前丘脑轴突(图 3C)。

3 讨论

中枢神经系统是由许多神经细胞组成的, 这些神经细胞通过神经纤维形成的功能回路对建立正常、有序的中枢系统是极为重要的。在轴突生长过程中, 轴突顶端的生长锥能检测到周围环境中的导向因子; 导向因子通过吸引或排斥轴突的方式帮助轴突找到通往目标的正确路途^[9]。研究^[10]表明, 几类组织形态发生分子, 如 Hhs、骨形态发生因子 (BMPs)、Wnts 和 FGFs 被报道是远程轴突导向因子。组织形态发生分子是一种可扩散的蛋白质, 通过产生长程浓度梯度来提供模式信息。这些形态发生的模式化功能始于发育的早期阶段, 因此有理由

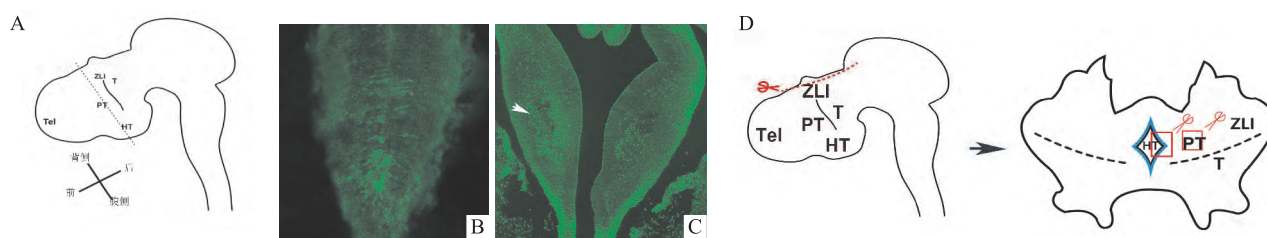


图 1 FGF3、PV 在间脑的表达与组织块分离示意图

A: 鸡胚间脑结构示意图; 虚线: 纵切线; B: FGF3 在下丘脑的表达; C: PV 在 E5 鸡胚前丘脑的表达; D: 鸡胚间脑组织块分离示意图; Tel: 端脑; T: 丘脑; PT: 前丘脑; HT: 下丘脑; B、C: $\times 200$

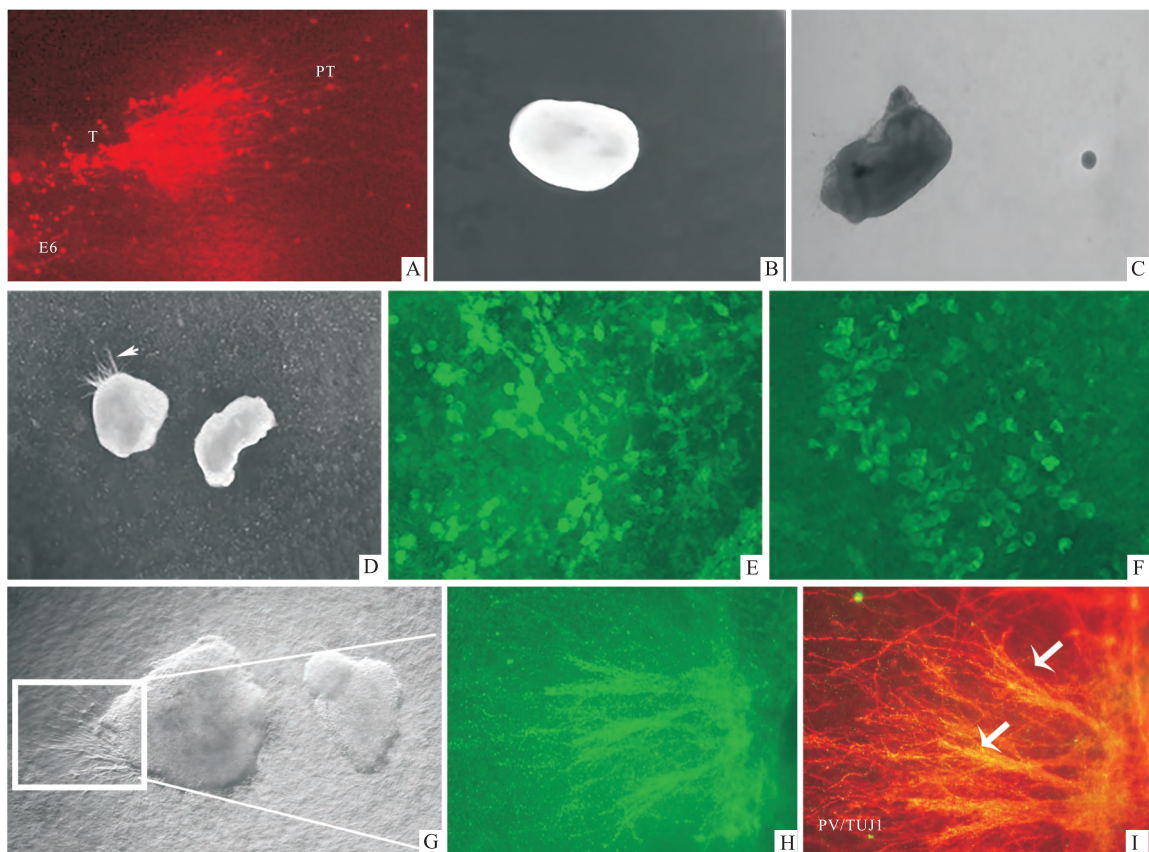


图2 下丘脑组织块对前丘脑 GABA 抑制性轴突生长具有导向作用

A: DiI 示踪结果; B: 前丘脑组织块单独培养; C: 前丘脑组织块与 PBS 珠子共培养; D: 前丘脑与下丘脑组织块共培养; E: FGF3 在下丘脑组织块的表达; F: PV 在前丘脑组织块的表达; G: 前丘脑与下丘脑组织块共培养; H: 共培养中前丘脑 GABA 轴突被 PV 标记; I: 共培养中前丘脑 GABA 轴突被 TUJ1 标记; A、B、C、D、G: $\times 40$

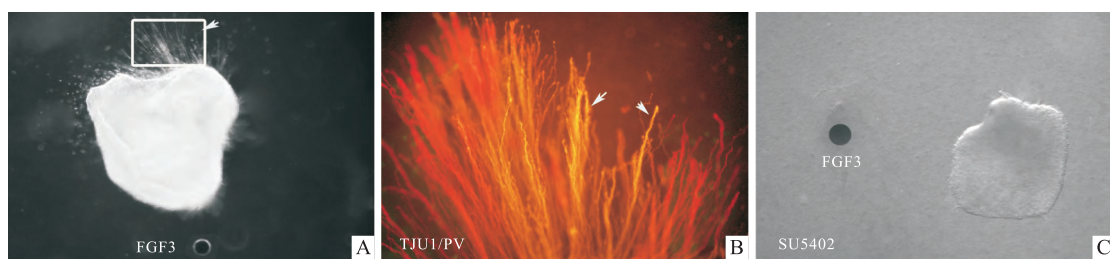


图3 FGF3 对前丘脑 GABA 轴突生长的影响

A: FGF3 珠子与前丘脑组织块共培养; B: PV + 的前丘脑 GABA 轴突标记; C: FGF3 珠子、前丘脑组织块、SU5402 的共培养; A、C: $\times 40$

推测,在胚胎发育后期,形态发生分子的残存梯度可为后期神经元轴突的导向提供方向信息^[10]。在间脑内,FGF3 与 FGF8 协同作用,指导前丘脑的结构锥形的形成;然而,对 FGF3 和 FGF8 在丘脑发育后期的轴突导向作用却不包括在这些研究中^[11-12]。

本研究结果显示,在 E5 前丘脑的新生轴突延伸过程中,FGF3 的表达广泛存在于下丘脑中。在下丘脑,FGF10 也有表达,但 FGF10 只表达在腹侧的正中隆起,离丘脑有较远的距离^[8];而 FGF3 在发育

后期,在下丘脑背侧有着较为广泛的表达,距离丘脑较近。这些都提示 FGF3 也可能是下丘脑中的一种长程扩散性轴突趋化信号,指引着邻近前丘脑 GABA 纤维的路径选择。为了进一步了解 GABA 抑制性神经纤维的走向,使用 DiI 体外跟踪 GABA 抑制性神经纤维的生长。DiI 是一种红色晶体,荧光强而稳定,可沿脂质膜扩散,有良好的轴突特异性。实验结果显示,在 E6,已有少量前丘脑纤维进入了(后)丘脑。因此,选择 E5 鸡胚间脑组织块,进行三维凝

胶共培养实验。三维凝胶神经组织培养能最大程度模拟神经组织在体内生长的立体三维环境,但又能避免体内复杂因素的制约,是目前神经生物学常用实验方法。有研究^[13-14]表明,当环境中没有轴突导向因子时,大部分轴突不会向组织块外生长,而是围绕着组织块边缘生长;但是,当环境中存在导向因子时,轴突才会向组织块外生长,表现为被吸引或被排斥。本研究结果显示下丘脑组织块对前丘脑神经纤维有着化学排斥作用;而来自下丘脑的 FGF3 能模拟下丘脑组织块的功能,可刺激前丘脑轴突在三维凝胶中的生长,并指导相邻的前丘脑 GABA 轴突向后丘脑的方向延伸,构成有效的大脑抑制环路的一部分。在所有被排斥的轴突中,有部分轴突并不是前丘脑 PV+ 的神经纤维,这说明 FGF3 也许对丘脑的另外一种重要神经纤维(丘脑皮质轴突,TCAs)也具有导向作用:排斥 TCAs 进入下丘脑,帮助 TCAs 转弯进入内囊,从而投射大脑皮层。同时,通过抑制 FGF 通路分析,揭示了 FGF3 对前丘脑 GABA 轴突发育的直接作用。这些结果说明,来源于下丘脑的 FGF3 在前丘脑 GABA 轴突导向中不可或缺的作用;下丘脑源的 FGF3 排斥前丘脑轴突向后丘脑延伸以调节兴奋性谷氨酸能神经元的功能。前丘脑 GABA 神经元功能的失调已证实与阿尔茨海默病、癫痫、精神分裂及失眠等疾病相关,因此,FGF3 对前丘脑 GABA 抑制性轴突的导向作用是理解丘脑内抑制性神经网络形成机制的基础,并将可能进一步解决此区域神经损伤与再生等重要临床问题,具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Gezelius H, Lopez-Bendito G. Thalamic neuronal specification and early circuit formation [J]. *Dev Neurobiol*, 2017, 77(7): 830-43.
- [2] Sellers K, Zyka V, Lumsden A G, et al. Transcriptional control of GABAergic neuronal subtype identity in the thalamus [J]. *Neural Dev*, 2014, 9: 14.
- [3] Behrendt R P. Dysregulation of thalamic sensory "transmission" in schizophrenia: neurochemical vulnerability to hallucinations [J]. *J Psychopharmacol*, 2006, 20(3): 356-72.
- [4] Ferrarelli F, Tononi G. Reduced sleep spindle activity point to a TRN-MD thalamus-PFC circuit dysfunction in schizophrenia [J]. *Schizophr Res*, 2017, 180: 36-43.
- [5] Xu Y, Zhao M, Han Y, et al. GABAergic inhibitory interneuron deficits in Alzheimer's disease: Implications for treatment [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 660.
- [6] Mason I. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(8): 583-96.
- [7] Pearson C A, Ohyama K, Manning L, et al. FGF-dependent midline-derived progenitor cells in hypothalamic infundibular development [J]. *Development*, 2011, 138(12): 2613-24.
- [8] Liu F, Pogoda H M, Pearson C A, et al. Direct and indirect roles of Fgf3 and Fgf10 in innervation and vascularisation of the vertebrate hypothalamic neurohypophysis [J]. *Development*, 2013, 140(5): 1111-22.
- [9] Zou Y, Lyuksyutova A I. Morphogens as conserved axon guidance cues [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, 17(1): 22-8.
- [10] Seiradake E, Jones E Y, Klein R. Structural perspectives on axon guidance [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2016, 32: 577-608.
- [11] Walshe J, Mason I. Unique and combinatorial functions of Fgf3 and Fgf8 during zebrafish forebrain development [J]. *Development*, 2003, 130(18): 4337-49.
- [12] Kataoka A, Shimogori T. Fgf8 controls regional identity in the developing thalamus [J]. *Development*, 2008, 135(17): 2873-81.
- [13] Liu K, Lv Z, Huang H, et al. FGF10 regulates thalamocortical axon guidance in the developing thalamus [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 716: 134685.
- [14] 刘芳,李刚,张丝雨,等. FGF10 对鸡胚尿囊膜血管形成的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(2): 208-10.

Repulsive effects of FGF3 on the inhibitory GABAergic axons in the prethalamus

Huang Hong, Yu Shuyang, Zhang Weiyun, Xiao Li, Xu Zhengang, Liu Fang

(Dept of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031)

Abstract Objective To study the guidance effects of fibroblast growth factor 3 (FGF3) on the prethalamus γ -aminobutyric acid (GABA) inhibitory axons, and to explore the effect of FGF3 on the formation of thalamic axonal network. **Methods** Expression and localization of FGF3 and prethalamus GABA marker gene in chicken embryonic diencephalon were detected by immunofluorescence. Early orientation of GABA axons was tracked by DiI. Three-dimensional gel co-culture experiment was carried out to investigate guidance effects of FGF3 on early prethalamus

长链非编码 RNA ANO1-AS1 对食管鳞癌 细胞增殖及凋亡的影响

邵生辉¹, 张 健¹, 彭雅琼¹, 向 辉², 赵 敏², 谢元茂², 郑 勇², 陈卫刚²

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA (LncRNA) 钙离子激活氯离子通道蛋白 1 反义 RNA1 (ANO1-AS1) 对食管鳞癌 (ESCC) 细胞增殖和凋亡的影响及其可能的机制。方法 在 ESCC 细胞 TE-1 和 EC109 中转染沉默 ANO1-AS1 慢病毒, qRT-PCR 检测其和钙离子激活氯离子通道蛋白 1 (ANO1) 表达情况。CCK-8 实验和平板克隆形成实验检测增殖能力;通过 LinkedOmics 数据库获取 ANO1 正相关表达基因集并进行通路富集及可能通路的验证;Western blot 检测增殖细胞核抗原 (PCNA)、抑癌基因 P53 蛋白、促凋亡蛋白 (Bax)、抑凋亡蛋白 (Bcl-2)、ANO1 蛋白和磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 通路相关蛋白的表达情况。结果 转染沉默慢病毒后, ANO1-AS1 的表达减低 ($P < 0.05$); 与阴性对照组相比, 下调 ANO1-AS1 后 ESCC 细胞增殖能力降低 ($P < 0.05$), 克隆形成率下降 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示, 实验组 PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), P53 和 Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 通路蛋白 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平降

低 ($P < 0.05$)。结论 沉默 ANO1-AS1 可能通过影响 PI3K/Akt 通路活性从而降低 ESCC 细胞的增殖能力并促使其发生凋亡。

关键词 长链非编码 RNA; ANO1-AS1; 食管鳞癌; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1578-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.013

目前,我国仍是食管癌发病率最高的国家^[1]。食管鳞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 是食管癌最常见的组织学亚型^[2]。由于 ESCC 起病晚,缺乏早期疾病标志物,通常被诊断已为晚期,其总的 5 年生存率仅有 20% 左右^[3]。研究^[4-5]显示,食管癌的发生发展与基因的表达失衡密切相关,因此,探寻与其相关的分子标志物,对食管癌的防治具有一定意义。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 因其转录本长度超过 200 个核苷酸且不编码蛋白质而得名^[6]。近年来,大量 LncRNA 被发现并证实参与肿瘤的多项生理和病理过程^[7]。课题组前期通过基因芯片技术,发现食管鳞癌组织中有大量 LncRNAs 存在异常表达,其中钙离子激活氯离子通道蛋白 1 反义 RNA1 (anoctamin 1 antisense RNA-1, ANO1-AS1) 在 ESCC 组织中表达上调^[8]。目前 ANO1-AS1 在食管癌中的作用鲜有报道,为探究该基因在食管癌中所发挥的功能,该研究通过转染沉默慢病毒下调食管癌细胞 TE-1 和

2022-05-26 接收

基金项目:中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(编号:2020-PT330-003);国家重点研发计划项目(编号:2016YFC1303601);兵团财政科技计划项目(编号:2020CB002);石河子大学成果转化与技术推广计划项目(编号:CGZH201704)

作者单位:¹ 石河子大学医学院,石河子 832000;

² 石河子大学医学院第一附属医院消化内科,石河子 832008

作者简介:邵生辉,男,硕士研究生;

陈卫刚,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:cwg_sh@126.com

GABA inhibitory axons. **Results** Prethalamal GABA cells were adjacent to the FGF3 + hypothalamas, located above the hypothalamus. DiI tracing experiments revealed that prethalamal GABA inhibitory axons had already extended into the thalamus at E6. Compared with the blank control group, FGF3 not only significantly promoted the growth of prethalamal GABA inhibitory nerve fibers in the prethalamus, but also repelled the newborn prethalamal axons to the dorsal thalamus. The number of prethalamal axons was significantly less in proximal section (towards FGF3 beads) than that in distal section (away from FGF3 beads) ($P < 0.01$). Moreover, the guidance effects of FGF3 on prethalamal axons could be blocked by the FGF pathway inhibitor SU5402. **Conclusion** FGF3, an axon guidance molecule expressed in hypothalamus, exerts guidance effects on the pathway selection of adjacent prethalamal GABA inhibitory nerve fibers.

Key words FGF3; GABA neurons; axon guidance