

# Mex3c 基因敲除对小鼠胚胎神经管发育的影响及其机制

路志国<sup>1,2</sup>, 吴晓婷<sup>3</sup>, 王凯<sup>2</sup>, 张波<sup>1</sup>, 汪涌<sup>1\*</sup>, 杜勇<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>空军军医大学第二附属医院泌尿外科, 陕西西安 710000; <sup>2</sup>宁夏医科大学总医院小儿外科, 宁夏银川 750000;

<sup>3</sup>西安国际医学中心消化内镜诊疗科, 陕西西安 710000

[中图分类号] R363.2 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1012.2024.0124

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 路志国, 吴晓婷, 王凯, 等. Mex3c 基因敲除对小鼠胚胎神经管发育的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(9): 1029-1037.

[收稿日期] 2023-07-31 [录用日期] 2023-10-08 [上线日期] 2024-01-24

**[摘要]** **目的** 研究 Mex3c 基因敲除对小鼠胚胎神经管发育的影响及其可能的机制。**方法** 利用 NCBI 数据库分析 Mex3c 基因在小鼠各个组织中的表达情况, 荧光原位杂交技术(FISH)检测 Mex3c 在 Mex3c<sup>+/+</sup> 小鼠不同发育时期(E12.5 d、E14.5 d)神经管中的表达情况。将性发育成熟的小鼠按照 Mex3c<sup>+/+</sup> 雄:雌(1:1)的比例进行合笼繁殖, 取繁殖的胚胎, 采用 PCR 鉴定小鼠基因型, 按照基因型分为 3 组: 野生型组(Mex3c<sup>+/+</sup>, WT 组)、纯合子敲除组(Mex3c<sup>-/-</sup>, KO 组)与杂合子敲除组(Mex3c<sup>+/-</sup>), 采用 HE 染色观察 3 组胚胎神经管的发育情况; 免疫荧光染色及 Western blotting 检测 WT 组、KO 组的胚胎神经干细胞增殖及凋亡情况; 透射电镜观察 WT 组、KO 组神经管发育及线粒体的超微结构。提取 WT 组、KO 组神经管的 RNA, 进行 RNA-seq 测序, 利用 R.3.6.3 对差异表达基因进行 KEGG 信号通路富集分析, 并采用 RT-qPCR 验证测序结果。**结果** NCBI 数据库分析及 FISH 检测结果显示, Mex3c 基因主要表达于胚胎的中枢神经系统。HE 染色结果显示, 在 E12.5 d、E13.5 d, 胚胎神经管的发育在 KO 组、WT 组及杂合子敲除组无明显差异; 而在 E14.5 d, KO 组较 WT 组的胚胎神经管发育迟缓, 表型明显异常, 据此选择 E14.5 d 的 KO 组及 WT 组胚胎神经管组织进行后续实验。免疫荧光染色结果显示, KO 组 PCNA 阳性细胞率明显低于 WT 组( $P<0.001$ )。Western blotting 检测结果显示, KO 组 Bax/Bcl-2 比值高于 WT 组( $P<0.01$ )。透射电镜观察显示, 与 WT 组比较, KO 组突触间隙消失, 胚胎神经管的线粒体水肿, 线粒体嵴断裂, 结构明显异常。RNA-seq 测序分析结果显示, 共获得 377 个差异基因, 其中表达上调 101 个, 表达下调 276 个。KEGG 信号通路富集分析发现, 差异基因的主要信号通路富集于神经活性配体受体相互作用信号通路。RT-qPCR 验证结果显示该信号通路中的 Avpr1a、Drd1、Htr7、Sstr1、Oxtr、Gabra5 mRNA 表达水平下调( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 与 RNA-seq 结果一致。**结论** Mex3c 在小鼠胚胎神经管发育过程中起着重要作用, 可能通过神经活性配体受体相互作用信号通路, 参与调控神经干细胞的增殖及凋亡过程, 进而影响神经管的发育。

**[关键词]** 基因, Mex3c; 神经管; 发育异常; 基因敲除

## Effect and mechanism of Mex3c gene knockout on embryonic neural tube development

Lu Zhi-Guo<sup>1,2</sup>, Wu Xiao-Ting<sup>3</sup>, Wang Kai<sup>2</sup>, Zhang Bo<sup>1</sup>, Wang Yong<sup>1\*</sup>, Du Yong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Urology Department, the Second Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710000, China

<sup>2</sup>Department of Pediatric Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750000, China

<sup>3</sup>Digestive Endoscopy Diagnosis and Treatment Department of Xi'an International Medical Center, Xi'an, Shaanxi 710000, China

\*Corresponding author, Du Yong, E-mail: niniduy@126.com; Wang Yong, E-mail: dryongwangfmmu@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82260308, 81560253)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of Mex3c gene knockout on embryonic neural tube development and its possible mechanisms. **Methods** The NCBI database was used to analyze the expression of Mex3c gene in various tissues of mice. Fluorescence in situ hybridization (FISH) was employed to detect the expression of Mex3c in neural tubes of Mex3c<sup>+/+</sup> mice at

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82260308, 81560253)

**[作者简介]** 路志国, 硕士研究生, 主要从事神经管发育方面的研究

**[通信作者]** 杜勇, E-mail: niniduy@126.com; 汪涌, E-mail: dryongwangfmmu@163.com

different developmental stages (E12.5 d, E14.5 d). Sexual mature mice were mated at a ratio of *Mex3c*<sup>+/-</sup> male to female (1:1) in the same cage. Embryos were collected and genotyped using PCR. They were divided into 3 groups based on their genotype: wild-type group (*Mex3c*<sup>+/+</sup>, WT group), homozygous knockout group (*Mex3c*<sup>-/-</sup>, KO group), and heterozygous knockout group (*Mex3c*<sup>+/-</sup>). HE staining was employed to observe the development of neural tubes in the 3 groups of embryos. Immunofluorescence staining and Western blotting were performed to detect the proliferation and apoptosis of embryonic neural stem cells in the WT and KO groups. Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of the neural tubes and mitochondria in the WT and KO groups. RNA was extracted from the neural tubes of WT and KO groups for RNA-seq sequencing. The R.3.6.3 software was used to perform KEGG signaling pathway enrichment analysis on differentially expressed genes. RT-qPCR was used to validate the sequencing results. **Results** The NCBI database analysis and FISH detection results showed that the *Mex3c* gene was mainly expressed in the central nervous system of embryos. HE staining results showed that there was no significant difference in the development of embryonic neural tubes between KO group, WT group, and heterozygous knockout group at E12.5 d and E13.5 d. However, at E14.5 d, the embryonic neural tube development in KO group was delayed and the phenotype was significantly abnormal compared with those in WT group. Therefore, the embryonic neural tube tissues of KO group and WT group at E14.5 d were selected for subsequent experiments. The immunofluorescence staining results showed that the PCNA positive cell rate in KO group was significantly lower than that in WT group ( $P < 0.001$ ). The Western blotting results showed that the Bax/Bcl-2 ratio in KO group was higher than that in WT group ( $P < 0.01$ ). Transmission electron microscopy observation showed that compared with WT group, the synaptic gap in KO group disappeared, the mitochondria of the embryonic neural tube in KO group were swollen, the mitochondrial cristae were disrupted, and the structure was significantly abnormal. The results of RNA-seq analysis showed that a total of 377 differentially expressed genes were obtained, including 101 up-regulated genes and 276 down-regulated genes. KEGG signaling pathway enrichment analysis revealed that the main signaling pathways of differentially expressed genes were enriched in the neuroactive ligand receptor interaction signaling pathways. The RT-qPCR validation results showed that the mRNA expression levels of *Avpr1a*, *Drd1*, *Htr7*, *Sstr1*, *Oxtr* and *Gabra5* in this signaling pathway were down-regulated ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), which was consistent with the RNA-seq results. **Conclusion** *Mex3c* plays an important role in the development of neural tubes in mouse embryos, which may participate in regulating the proliferation and apoptosis of neural stem cells through neural active ligand receptor interaction signaling pathways, thereby affecting the development of neural tubes.

**[Key words]** gene, *Mex3c*; neural tube; dysplasia; gene knockout

神经管作为胎儿中枢神经系统发育的原基，是脑和脊髓发育的前体，其由外胚层增殖分化而来，对胚胎的正常发育至关重要<sup>[1-2]</sup>。神经管必须在一系列基因的精准调控下按时关闭<sup>[3]</sup>，若神经管闭合不全或不闭合，会形成无脑畸形和脊柱裂等，称为神经管畸形(neural tube defects, NTDs)；若神经管闭合之后发育异常，会形成小头畸形、智力障碍相关的先天性畸形，称为神经发育障碍(neurodevelopmental disorders, NDDs)<sup>[4]</sup>。目前针对神经系统发育缺陷的治疗有限，给家庭和社会带来了沉重的负担，因此，研究神经管发育过程中的各种危险因素是揭示NTDs和NDDs等发病机制的关键，对神经管发育缺陷的早期筛查及防治具有重要意义。*Mex3c*是一种RNA结合蛋白<sup>[5]</sup>，而RNA结合蛋白在正常的神经嵴发育和神经管形成中也发挥重要作用，在神经管发育过程中，RNA结合蛋白的缺陷可导致一系列的病理和综合征<sup>[6]</sup>。有研究发现，*Mex3c*在睾丸、卵巢、脑和发育骨中高表达，但在肝脏、肌肉和脂肪组织中的表达较低，且*Mex3c*基因突变可避免小鼠发生肥胖，降低肥胖小鼠的血糖和胆固醇<sup>[7]</sup>，表明*Mex3c*可能在神经管发育过程中发挥一定作用。本课题组长期致力于胚胎NTDs模型构建和发病机制的研究，前期

研究先后利用全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA)、*Mex3c*基因敲除成功构建鼠神经管缺陷模型，发现*Mex3c*通过增加下丘脑C-FOS蛋白的表达参与机体能量代谢过程，同时*Mex3c*<sup>+/-</sup>雌鼠的胚胎在发育过程中出现神经管发育缺陷，但具体机制尚不明确<sup>[8-9]</sup>。因此，本研究通过CRISPR-Cas9基因编辑技术构建*Mex3c*基因敲除小鼠模型，探讨神经管发育状况，并利用RNA-seq筛选*Mex3c*基因在神经管发育过程中的重要信号通路，以期揭示神经管发育的调控机制，为寻找神经管发育缺陷的治疗靶点提供新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂及仪器** 小鼠组织直接PCR试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)；全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(南京凯基生物技术有限公司)；HRP标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥公司)；鼠抗地高辛标记过氧化物酶anti-DIG-HRP(美国Jackson公司)；B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、BCL2关联X蛋白(BCL2-associated X, Bax)、 $\beta$ -肌动蛋白(beta-actin, ACTB)(美国Abcam公司)。荧光显微

镜、石蜡切片机(德国Leica公司);蛋白电泳仪、凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad公司)。

**1.1.2 实验动物** *Mex3c* 基因敲除 C57BL/6J 小鼠 (*Mex3c*<sup>-/-</sup>雌鼠与雄鼠各 10 只)购自赛业实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2018-0032], 饲养于宁夏医科大学实验动物中心, 室温 25 ℃, 昼夜明暗各 12 h 日光灯交替, 自由饮用去蒸馏水。本研究经宁夏医科大学实验动物使用与管理委员会批准(IACUC-NYLAC-2021-029)。

## 1.2 方法

**1.2.1 NCBI 数据库分析 *Mex3c* 基因在小鼠组织中的表达情况** 从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>)中分析 *Mex3c* 基因在小鼠各个组织中的表达情况。

**1.2.2 胚胎实验样本获取及分组** 将 8 周龄 *Mex3c*<sup>+/-</sup> 雌鼠与雄鼠各 10 只按照雄:雌=1:1 的比例于晚上 8:00 进行合笼, 第 2 天观察到雌鼠阴道栓记为妊娠第 0.5 天(E0.5 d)。到妊娠 E14.5 d 常规消毒, 1% 戊巴比妥钠(0.05 mg/g)腹腔注射麻醉后, 眼科剪剪开腹部, 沿“Y 形子宫”找到孕囊, 计数, 观察有无死胎、吸收胎。分离胚胎尾部用于基因型鉴定。获得胚胎后按照胚胎的基因型分为 3 组: 野生型组 (*Mex3c*<sup>+/+</sup>, WT 组)、纯合子敲除组 (*Mex3c*<sup>-/-</sup>, KO 组) 与杂合子敲除组 (*Mex3c*<sup>+/-</sup>)。

**1.2.3 胚胎组织石蜡包埋** 取正常妊娠 E12.5 d、E14.5 d、E16.5 d 的胚胎组织置于多聚甲醛溶液中, 4 ℃ 放置 4 h; 包埋盒置于 PBS 缓冲液中, 在摇床上浸洗 30 min×3 次; 30%、50%、75%、80% 乙醇各 30 min→90%、95% 乙醇各 15 min→100% 乙醇 I、II 各 10 min→二甲苯 I、II 各 5 min; 将石蜡缸 I、II、III 置于 65 ℃ 恒温箱中融化, 包埋盒置于蜡缸中各 20 min; 用石蜡包埋机包埋; 利用切片机切片(厚度 4 μm), 60 ℃ 烤片机中烘烤 2 h 备用。

**1.2.4 荧光原位杂交技术(FISH)检测 *Mex3c* 在神经管中的表达情况** 采用 FISH 检测 *Mex3c* 基因在 E12.5 d、E14.5 d 的表达情况。将包埋好的 WT 组胚胎的石蜡切片置于二甲苯 I、二甲苯 II、无水乙醇 I、无水乙醇 II 中各 5 min 脱蜡; 切片于修复液中煮沸 10 min, 自然冷却, 加蛋白酶 K, 37 ℃ 消化 18 min, PBS 洗 3 次×5 min; 加预杂交液, 37 ℃ 孵育 1 h; 加含探针 *Mex3c* 的杂交液(*Mex3c* 探针序列: 5'-CAACATGGTTGCCTGTACTAGGTGGGTCCTCA-3'), 浓度 500 nmol/L, 42 ℃ 杂交过夜; 洗去杂交液, 加封闭血清, 室温 30 min; 加 anti-DIG-HRP, 37 ℃ 孵育 50 min, PBS 洗 3 次×5 min; 加 FITC-tyramide, 避光室温反应 5 min, TBST 洗 3 次×10 min, PBS 洗 5 min; DAPI 复染, 避光孵育 8 min, 加抗荧光淬灭剂封片,

镜检拍片。

**1.2.5 小鼠胚胎 DNA 提取** 将性成熟后小鼠按照 *Mex3c*<sup>+/-</sup> 雄:雌(1:1)的比例进行合笼繁殖, 繁殖的胚胎利用 DNA 提取试剂盒获取 DNA 后进行基因鉴定。剪取胚胎的尾部置于 1.5 ml 离心管中; 向离心管加入 90 μl Buffer ML, 轻轻涡旋使样品完全被浸润, 短暂离心; 在恒温孵育仪中 95 ℃ 孵育 15 min; 加入 10 μl Buffer MT, 轻弹混匀, 终止裂解; 以 12 000 r/min 离心 2 min; 将上清转移至新的离心管中, -20 ℃ 保存用于后续 PCR 扩增。使用核酸检测仪测量 DNA 的浓度和纯度。

**1.2.6 聚合酶链式反应(PCR)鉴定小鼠基因型 *Mex3c* 基因的引物序列如下:** 正向引物, 5'-CTAGAACCAGAGATAATCCAGAG-3'; 反向引物 1, 5'-CAGGAGTGTAAGTTAGAAAGGAG-3'; 反向引物 2, 5'-TAGA CCTCCCGCCTGGTTTAA-3'。取高压灭菌的 200 μl PCR 管, 按如下体系添加: DNA 模板 1 μl, 正向引物 0.5 μl, 反向引物 0.5 μl, 小鼠直接 PCR Mix 10 μl, ddH<sub>2</sub>O 8 μl。将上述混管离心后置于 PCR 仪中, PCR 反应条件: 预变性 94 ℃ 5 min; 变性 94 ℃ 10 s、退火 60 ℃ 20 s、延伸 72 ℃ 30 s, 共 35 个循环; 延伸 72 ℃ 5 min。取 50 ml 1×TAE 注入含 1 g 琼脂糖粉的 200 ml 锥形瓶中, 微波加热至澄清液体; 用流水将上述溶液冷却, 待温度达到 60 ℃ 左右, 加入 2.5 μl 核酸染料; 缓慢摇匀后倒入胶模槽中; 待胶凝固后移入电泳槽中, 上样; 在 70 V 电压下进行电泳, 45 min 后停止, 在仪器下观察结果。

**1.2.7 HE 染色** 取包埋好的 E12.5 d、E13.5 d、E14.5 d WT 组、KO 组及杂合子敲除组胚胎的石蜡切片, 分别置于: 二甲苯 I、II 中各 10 min, 100% 乙醇 I、II 中各 5 min, 95% 乙醇 2 min, 90% 乙醇 2 min, 80% 乙醇 2 min, 70% 乙醇 3 min, 蒸馏水 1 min; 苏木精染色 4 min, 流水冲洗; 盐酸乙醇分化液 1~2 s, 流水冲洗 10 min; 伊红染色 3 min, 流水冲洗; 再分别置于 90%、95% 乙醇各 2 min, 100% 乙醇 I、II 各 1 min, 二甲苯 I、II 中各 2 min; 加中性树脂封片, 镜检拍片。

**1.2.8 免疫荧光染色** 将 E14.5 d WT 组及 KO 组胚胎的石蜡切片依次置于二甲苯 I、II 中各 15 min, 100% I、100% II, 90%、85%、75% 乙醇中各 5 min, 蒸馏水中 1 min; 随后置于 EDTA 抗原修复液中, 微波炉中火煮沸 8 min, 再转低火 7 min, 自然冷却后 PBS 洗 3 次×5 min; 加山羊血清, 封闭 30 min; 加配好的一抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA; 稀释倍数 1:500), 湿盒内 4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗 3 次×5 min; 滴加荧光二抗, 避光室温孵育 50 min; PBS 洗 3 次×5 min, 加 DAPI 染液, 避光

室温孵育 10 min; 用抗荧光淬灭剂封片, 镜检拍片。

**1.2.9 Western blotting** 将 E14.5 d WT 组及 KO 组胚胎的神经管组织加适量裂解液, 匀浆后在 4 °C 下 12 000×g 离心 15 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 上样 30 μg 蛋白经 12% SDS 凝胶电泳分离后转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBSB 洗膜后, 分别加入 Bax、Bcl-2、ACTB 抗体(1:1000)孵育过夜, 然后用 HRP 标记的二抗孵育(1:10 000), 化学发光, 采用 ImageJ 软件分析蛋白相对表达量。

**1.2.10 透射电镜观察** 将 E14.5 d WT 组及 KO 组胚胎的神经管组织置于 2.5% 戊二醛溶液中, 4 °C 固定 2 h, 缓冲液清洗 3 次×2 h; 然后在 1% 锇酸中浸泡 2 h → 缓冲液冲洗 3 次×15 min。4 °C 下依次置于 30%、50%、70% 乙醇中脱水 10 min, 然后于室温下 80%、90% 乙醇中各 10 min, 100% 乙醇 I、II 中各 15 min, 最后用环氧丙烷 I、II 各渗透 15 min。按不完全包埋液环氧丙烷(1:1)渗透 1 h, 完全包埋液 35 °C 渗透 6 h 后转移至包埋板, 42 °C 烘箱过夜; 置于 60 °C 烘箱中 48 h。在超薄切片机上切 50 nm 厚切片, 采用醋酸铀、枸橼酸银染色, 透射电镜下观察小鼠神经管中突触、线粒体的超微结构。

**1.2.11 RNA 提取、cDNA 文库构建和 Illumina 测序** 胚胎神经管的转录组测序 RNA-seq 分为两组: WT 组与 KO 组, 每组各 5 只生物学重复。该部分实验由百迈客生物科技有限公司完成。

**1.2.12 差异表达基因筛选及 KEGG 信号通路富集分析** 以差异倍数 ≥1.5 且  $P < 0.05$  作为筛选标准进行差异表达基因的筛选, 利用 R3.6.3 软件对差异表达基因进行 KEGG 信号通路富集分析。

**1.2.13 RT-qPCR 验证** 引物的设计与合成由上海生物工程技术有限公司完成, 通过 NCBI 基因库搜索小鼠 *Avpr1a*、*Drd1*、*Htr7*、*Sstr1*、*Oxtr*、*Gabra5* 和 *GAPDH* 编码序列, 名称及序列如表 1 所示, Trizol 法提取 RNA, 将提取的 RNA 用反转录试剂盒反转录为 cDNA。反应体系: 2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μl, 正向引物 0.4 μl, 反向引物 0.4 μl, 反转录 cDNA 2 μl, ddH<sub>2</sub>O 7.2 μl; 反应条件: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s、60 °C 30 s, 共 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算相对表达量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, Graph Pad Prism 6.0 软件制图。本研究均为计量资料, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较首先进行正态性检验, 满足正态性则进行两样本 *t* 检验, 若不满足则进行秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *Mex3c* 基因在小鼠胚胎神经管中的表达情况

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

基因	引物序列(5'-3')
<i>Avpr1a</i>	正向: TTGTGTCAGCAGCGTGAAGAGC
	反向: GATGAAGAAAGGTGTCCAGCAGAGG
<i>Drd1</i>	正向: GCATACCTAAGCCACTGGAGAAGC'
	反向: AGGTTGAATGCTGTCCGCTGTG
<i>Htr7</i>	正向: CATGTCTGTGGCTGGGCTATGC
	反向: CTGGAGTAGGCTACGATAGGTGGTC
<i>Sstr1</i>	正向: CCGTGAGCCAGTTGTCTGTGCATC
	反向: GTTCCTCCGCAGCGTTATCCATC
<i>Oxtr</i>	正向: GGACATCACCTTCCGCTTCTACG
	反向: CGACATCAGCAACAGCAGGTAGG
<i>Gabra5</i>	正向: TCCACAACGGCAAGAAGTCCATTG
	反向: GGCACCTCAGCAGAGATTGTCCAGAC
<i>GAPDH</i>	正向: CAAGTTCATCCATGACAACCTTG
	反向: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

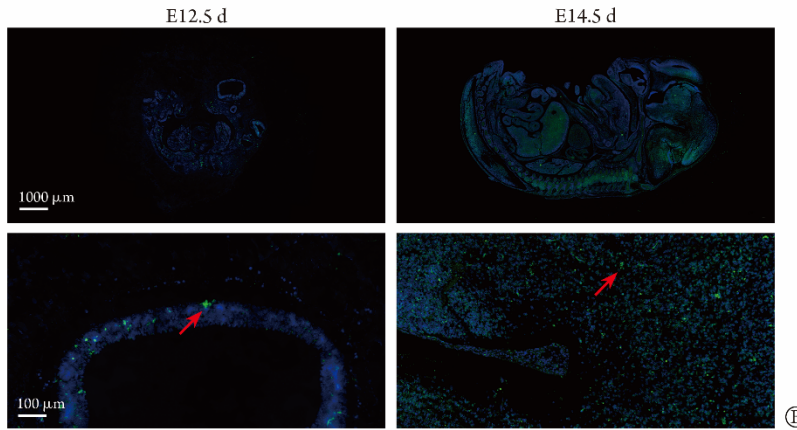
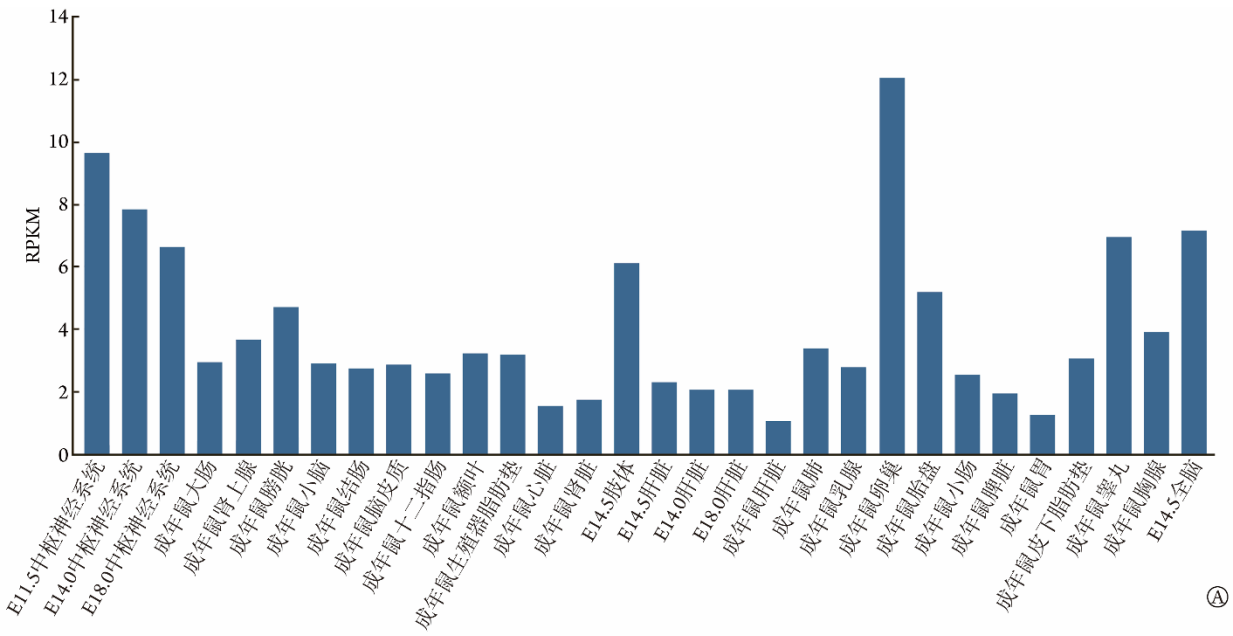
NCBI 数据库分析结果显示, *Mex3c* 基因在小鼠胚胎中枢神经系统(胚胎期 E11.5 d、E14 d、E14.5 d、E18 d 的中枢神经系统或脑部)及生殖系统(如睾丸、卵巢等组织)中的表达高于其他组织(图 1A)。

为验证数据库结果, 采用 FISH 检测 *Mex3c* 基因在 E12.5 d、E14.5 d 的表达水平, 结果显示, 在这两个时间点 *Mex3c* 基因均有表达, 在 E12.5 d 主要表达于脑部, 在 E14.5 d 主要表达于脑部及脊髓部(图 1B)。

**2.2 *Mex3c* 基因敲除小鼠构建** 通过 PCR 对繁殖的胚胎进行基因型鉴定, 以方便按基因分型分组观察表型。将反向引物 1(R1)和反向引物 2(R2)分成两板(图 2A、B)。第一次 PCR R1(563 bp)阳性说明得到 *Mex3c* 基因敲除胚胎, 包括杂合子敲除 *Mex3c*<sup>-/-</sup> 和纯合子敲除 *Mex3c*<sup>+/-</sup>。第二次 PCR R2(557 bp)阳性, 结合 R1 阳性则可判定为 (*Mex3c*<sup>+/-</sup>); 若 R2 阴性条带, R1 阳性则为 *Mex3c*<sup>-/-</sup>; 只有 R2 阳性为野生型胚胎 (*Mex3c*<sup>+/+</sup>)。

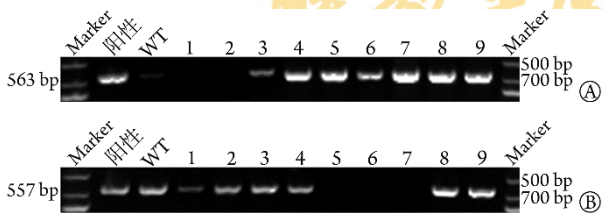
**2.3 *Mex3c* 基因敲除小鼠胚胎的表型分析** HE 染色结果显示, KO 组、WT 组、杂合子敲除组的胚胎神经管在 E12.5 d、E13.5 d 无明显差异, 而在 E14.5 d, 与 WT 组比较, KO 组胚胎神经管发育迟缓, 表型明显异常, 而 E14.5 d 的杂合子未见明显异常(图 3), 表明 *Mex3c* 基因敲除引起胚胎神经管发育异常可能主要发生在 E14.5 d。据此选择 E14.5 d 的 KO 组及 WT 组胚胎神经管进行后续实验。

免疫荧光染色检测结果显示, 与 WT 组比较, KO 组 PCNA 阳性细胞率明显降低 ( $P < 0.001$ , 图 4)。Western blotting 检测结果显示, KO 组 Bax/Bcl-2 比值高于 WT 组 ( $P < 0.01$ , 图 5A)。透射电镜观察显示, WT 组及 KO 组胚胎神经管中神经元细胞突触前、后



RPKM. 每千碱基每百万次读取数; A. NCBI数据库分析 *Mex3c* 基因在神经管中的表达情况; B. FISH检测 *Mex3c* 基因在E12.5 d和E14.5 d的表达情况(红色箭头所指绿色荧光代表 *Mex3c* 基因在神经管中的表达, 蓝色荧光代表细胞核)

图1 *Mex3c* 基因在小鼠神经管中的表达情况  
Fig.1 Expression of *Mex3c* gene in neural tube



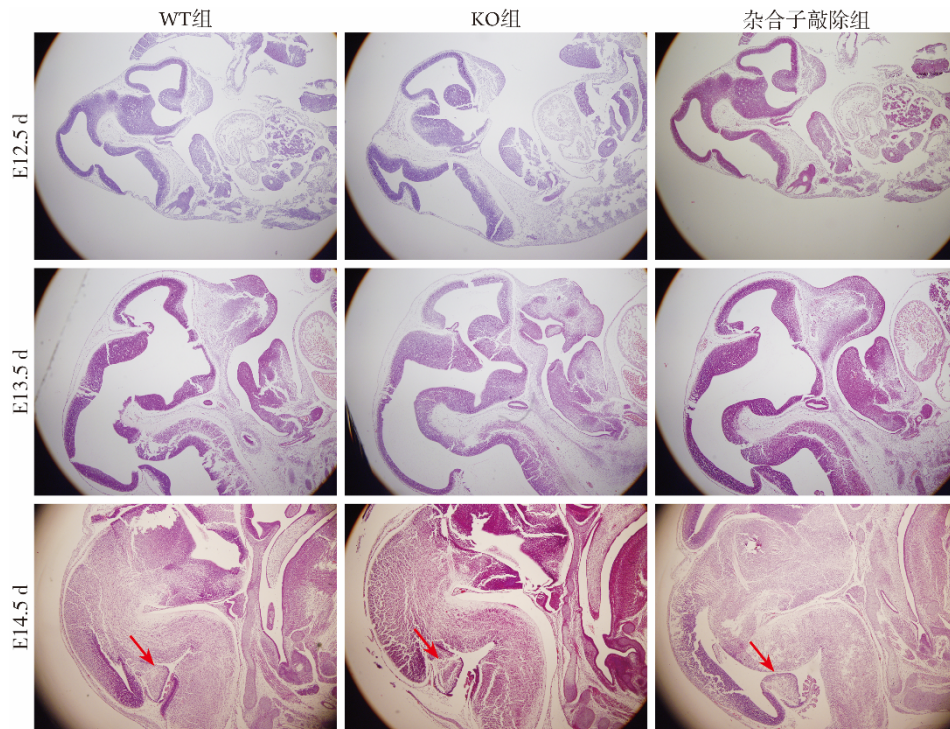
A. 反向引物R1; B. 反向引物R2

图2 小鼠胚胎基因型鉴定(PCR)

Fig.2 Genotypic identification of mouse embryos (PCR)

膜均清晰, 但KO组突触间隙消失, 有一定程度融合, 神经管发育具有明显的缺陷; WT组胚胎神经管的线粒体呈椭圆形, 线粒体嵴形态正常, 而KO组胚胎神经管的线粒体水肿, 显示大量空泡, 线粒体嵴断裂、模糊甚至消失, 表现为变形、增大, 结构明显异常(图5B)。

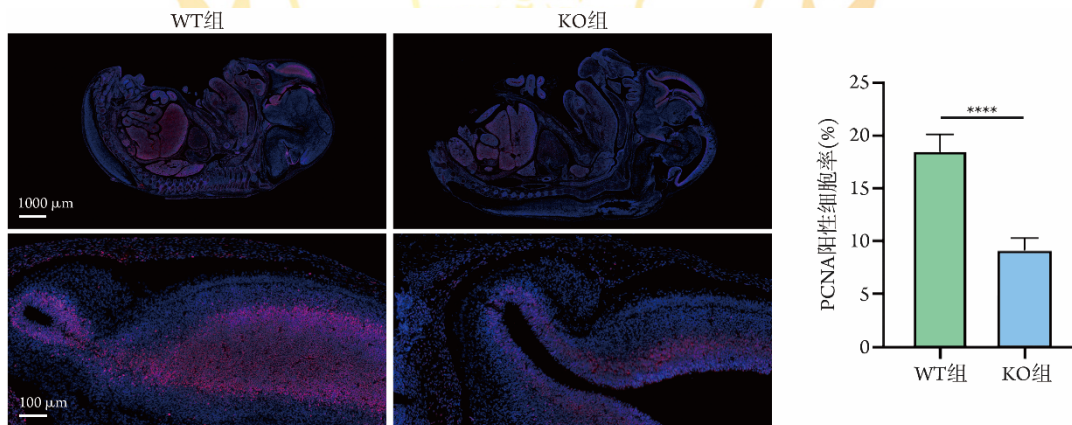
2.4 RT-qPCR检测结果及RNA-seq转录组测序分析 *Mex3c* 基因敲除的差异基因表达 RT-qPCR检测结果如图6所示, 在 *Mex3c* 基因敲除的胚胎神经管中, 神经活性配体受体相互作用信号通路中 *Avpr1a*、*Drd1*、*Gabra5*、*Sstr1*、*Htr7*、*Oxtr* mRNA相对表达水平下调 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 与RNA-seq结果一致。RNA-seq转录组测序共获得377个差异基因, 其中表达上调101个, 表达下调276个。将差异基因进行KEGG信号通路富集分析, 结果显示, 差异基因的主要信号通路富集于神经活性配体受体相互作用信号通路(图7A、B)。其中与神经发育密切相关的有神经活性配体受体相互作用、TGF- $\beta$ 信号通路及Notch信号通路, 神经活性配体受体相互作用信号通路中的 *Avpr1a*、*Drd1*、*Htr7*、*Sstr1*、*Oxtr*、*Gabra5* 基因下调。



红色箭头示神经元细胞突触前、后膜

图3 胚胎神经管E12.5~E14.5 d的HE染色结果(HE×40)

Fig.3 HE staining of embryonic neural tube at E12.5 d-E14.5 d (HE×40)



增殖细胞核抗原(PCNA)染色为红色荧光, DAPI染核为蓝色; \*\*\* $P < 0.001$

图4 胚胎神经管E14.5 d的免疫荧光染色检测( $n=3$ )

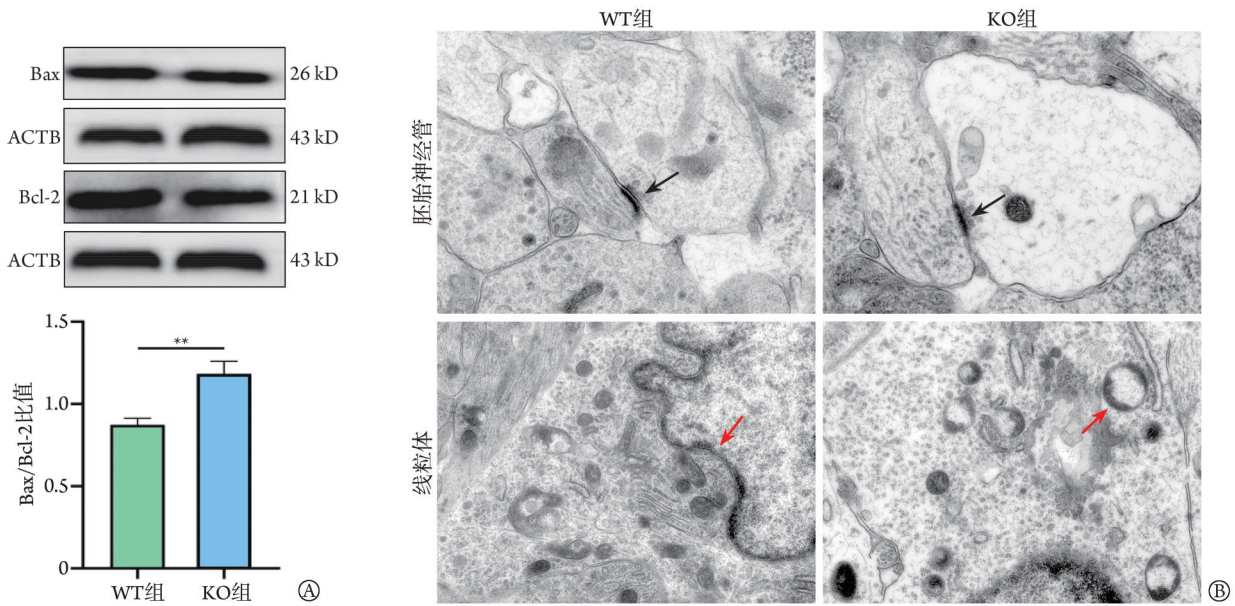
Fig.4 Immunofluorescence detection of embryonic neural tube at E14.5 d ( $n=3$ )

### 3 讨论

神经管是胎儿中枢神经系统的始基,在胚胎的第4周末,由神经褶两侧开始相互靠拢形成的一个管道<sup>[10]</sup>,神经管的正确形成对生物体的生长和发育至关重要。在神经管发育的关键时期,需要众多基因在时空上准确表达以及精细的网络调控,任何环节出现问题都能引起神经管发育缺陷<sup>[11-12]</sup>,但其具体的致病机制尚未明确。因此,研究影响神经管发育过程中的危险因素刻不容缓。

本研究首先通过NCBI数据库分析 *Mex3c* 基因在

小鼠各个组织中的表达情况,发现 *Mex3c* 基因在胚胎的中枢神经系统(如胚胎的脑部)及生殖系统(如睾丸、卵巢等组织中)呈高表达,特别是在胚胎神经管发育过程中神经干细胞增殖、分化、凋亡的高峰期(E12.5~E14.5 d),提示 *Mex3c* 基因可能在神经干细胞的增殖、分化、凋亡过程中发挥一定的作用。研究发现,小鼠 *Mex3c* 蛋白特异性表达于卵巢的卵母细胞,同时发现RNA结合蛋白PUF-8和 *Mex3c* 并不是通过阻止减数分裂来维持生殖干细胞的功能,而是促进生殖干细胞的有丝分裂,进而促进生殖干细胞的作用<sup>[13]</sup>。而本研究发现在胚胎期 *Mex3c* 在神经系



A. Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达; B. 透射电镜观察胚胎神经管及线粒体的超微结构, 黑色箭头示胚胎神经管的突触结构, 红色箭头示线粒体(神经管结构:  $\times 15\,000$ ; 线粒体结构:  $\times 8000$ );  $**P < 0.01$

图5 Western blotting 检测凋亡相关蛋白及透射电镜观察胚胎神经管与线粒体的超微结构

Fig. 5 Western blotting detection of apoptosis-related proteins and transmission electron microscopy were used to observe the ultrastructure of neural tube and mitochondria

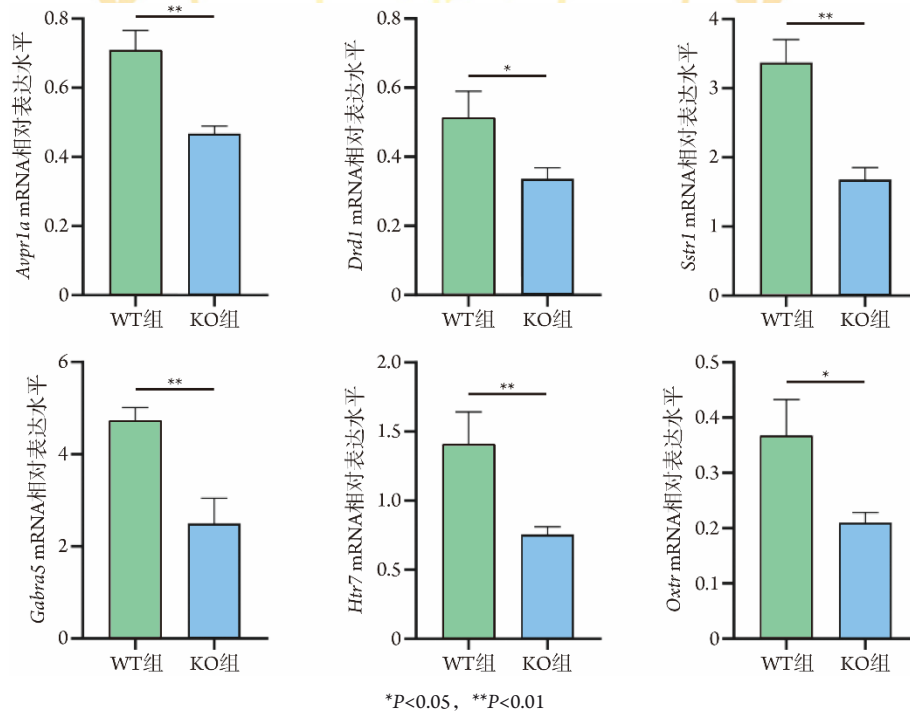


图6 神经活性配体受体相互作用信号通路的RT-qPCR验证( $n=3$ )

Fig.6 RT-qPCR validation of neural active ligand-receptor interaction signaling pathways ( $n=3$ )

统中表达较高, 结合本课题组前期研究发现在 E14.5 d 的 *Mex3c* 基因敲除小鼠胚胎神经管发育存在异常, 因此选择 E12.5 d、E14.5 d 这两个时间, 利用 FISH 检测发现 *Mex3c* 基因在 E12.5 d 主要表达于脑部, 在 E14.5 d 主要表达于脑部及脊髓部, 提示 *Mex3c* 在胚胎神经管发育过程中可能发挥重要作用。

本研究 HE 染色发现, *Mex3c* 基因敲除对胚胎 E12.5 d 及 E13.5 d 的神经管发育无明显影响, 可见 *Mex3c* 基因敲除对 E13.5 d 之前的小鼠胚胎无明显影响, 而在 E8.5~E10.5 d 是小鼠神经管闭合的过程, 结合 HE 染色结果可知, *Mex3c* 基因敲除不会影响神经管的闭合; 但在 E14.5 d 发现 *Mex3c* 基因敲除小鼠的

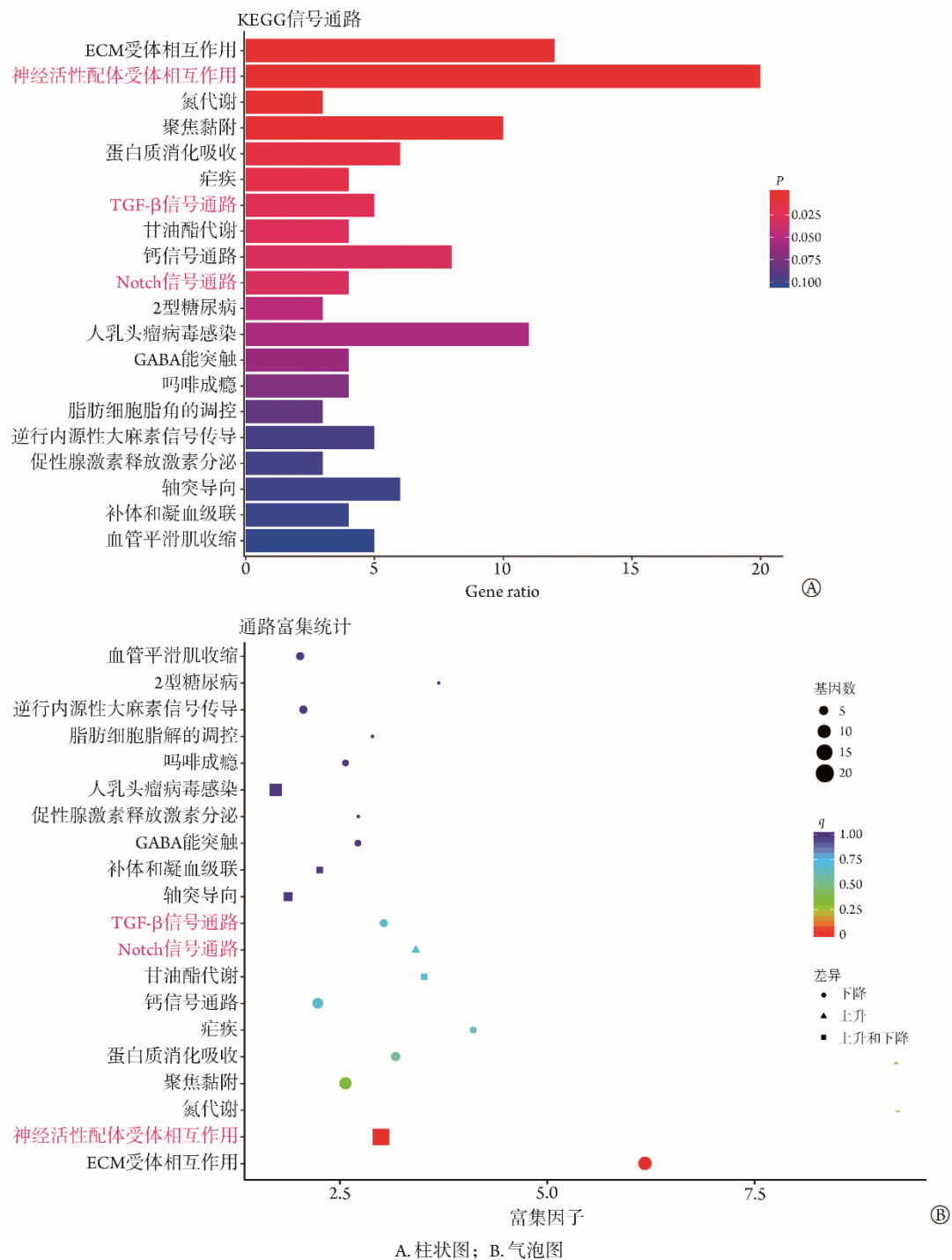


图7 *Mex3c* 基因敲除小鼠胚胎神经管差异表达基因的KEGG通路富集分析

Fig.7 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in mouse embryonic neural tube with *Mex3c* gene knockout

胚胎神经管发育迟缓, 表型发育异常, 提示 *Mex3c* 基因敲除可能在 E14.5 d 这一节点影响神经管的发育, 而 E14.5 d 正是神经管闭合之后神经干细胞迅速增殖分化的高峰期, 因此后续实验重点关注 E14.5 d 的胚胎神经管发育状况。

神经管闭合之后, 神经干细胞进入增殖、分化及凋亡的高峰期, 以保证神经管头端发育为脑, 尾端发育为脊髓, 这依赖于复杂的基因调控及信号通

路来平衡 NSCs 的增殖、分化和凋亡, 若这一平衡被打破, 则会导致 NDDs, 包括小头畸形、发育迟缓等<sup>[14-15]</sup>。本研究免疫荧光染色及 Western blotting 检测结果发现, *Mex3c* 基因敲除可引起神经干细胞增殖减少而凋亡增加, 神经干细胞的增殖、凋亡平衡被打破, 进一步验证了 HE 染色结果; 透射电镜观察发现, *Mex3c* 基因敲除后胚胎神经管中神经元细胞突触前、后膜均清晰, 但突触间隙消失, 有一定程度融

合, 神经管发育具有明显的缺陷; 同时发现 *Mex3c* 基因敲除可引起神经管线粒体水肿, 显示大量空泡, 线粒体嵴断裂、模糊甚至消失, 表现为变形、增大, 结构明显异常。由此可见, *Mex3c* 基因敲除可明显引起胚胎神经管的发育缺陷及线粒体的发育缺陷, 但不影响神经管的闭合过程。

为深入探究 *Mex3c* 基因敲除引起胚胎神经管的发育缺陷的内在机制及涉及的信号通路, 本研究利用 RNA-seq 技术检测 *Mex3c* 基因敲除引起胚胎神经管的转录组变化, 筛选出重要的差异表达基因参与的生物学过程及信号代谢通路, 结果显示共筛选出 377 个差异表达基因, 其中表达上调 101 个, 表达下调 276 个。对差异基因进行 KEGG 信号通路富集分析, 发现与神经管发育相关的神经活性配体受体相互作用这一信号通路, 并对其中关键基因的 mRNA 表达水平进行 RT-qPCR 验证, 结果与 RNA-seq 结果一致, 提示 *Mex3c* 基因敲除可能与下调神经活性配体受体相互作用信号通路有关。

神经活性配体受体相互作用信号通路与神经功能直接相关, 神经活性配体通过与细胞内受体结合影响神经功能, 具有结合转录因子和调节基因表达的能力<sup>[16]</sup>。一项探讨纳米二氧化硅 (nano-silicon dioxide, Nano-SiO<sub>2</sub>) 对神经系统不良影响的研究发现, Nano-SiO<sub>2</sub> 可通过影响神经活性配体受体相互作用信号通路而诱发发育性神经毒性<sup>[17-18]</sup>, 表明神经活性配体受体相互作用这一信号通路参与了神经管发育过程并发挥重要作用, 而 *Mex3c* 可能通过调节这一信号通路而影响神经干细胞的增殖、凋亡过程, 进而参与神经管的发育, 而具体如何通过这些信号通路进行调控仍须进一步探讨。

本研究揭示了 *Mex3c* 在小鼠胚胎神经管发育过程中的重要作用, *Mex3c* 基因敲除引起神经管发育缺陷, 致使神经干细胞的增殖、凋亡平衡被打破, 这可能是通过参与调控神经活性配体受体相互作用信号通路实现的。

#### 【参考文献】

- [1] Karzbrun E, Khankhel AH, Megale HC, et al. Human neural tube morphogenesis *in vitro* by geometric constraints[J]. *Nature*, 2021, 599(7884): 268-272.
- [2] Fame RM, Lehtinen MK. Mitochondria in early forebrain development: from neurulation to mid-corticogenesis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 780207.
- [3] Werner JM, Negesse MY, Brooks DL, et al. Hallmarks of primary neurulation are conserved in the zebrafish forebrain[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 147.
- [4] Engel M, Do-Ha D, Muñoz SS, et al. Common pitfalls of stem cell differentiation: a guide to improving protocols for neurodegenerative disease models and research[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(19): 3693-3709.
- [5] Draper BW, Mello CC, Bowerman B, et al. MEX-3 is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early *C. elegans* embryos [J]. *Cell*, 1996, 87(2): 205-216.
- [6] Liu W, Wang K, Lv X, et al. Up-regulation of RNA binding proteins contributes to folate deficiency-induced neural crest cells dysfunction[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(1): 85-98.
- [7] Jiao Y, George SK, Zhao Q, et al. *Mex3c* mutation reduces adiposity and increases energy expenditure[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(21): 4350-4362.
- [8] Du Y, Huo Q, Li T, et al. Construction of a *Mex3c* gene-deficient mouse model to study C-FOS expression in hypothalamic nuclei and observe morphological differences in embryonic neural tube development[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e927334.
- [9] Zhai SF, Zhao MZ, Zhou CC, et al. The association and significance of H3K27me3 and a folate metabolic gene *ACat2* in neural tube defects[J]. *Nutr J*, 2016, 15(1): 95.
- [10] Molè MA, Galea GL, Rolo A, et al. Integrin-mediated focal anchorage drives epithelial zippering during mouse neural tube closure[J]. *Dev Cell*, 2020, 52(3): 321-334.e6.
- [11] La Manno G, Siletti K, Furlan A, et al. Molecular architecture of the developing mouse brain[J]. *Nature*, 2021, 596(7870): 92-96.
- [12] Rifes P, Isaksson M, Rathore GS, et al. Modeling neural tube development by differentiation of human embryonic stem cells in a microfluidic WNT gradient[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(11): 1265-1273.
- [13] Li X, Li Y, Liu C, et al. Oocyte-specific expression of mouse *Mex3c652AA* in the ovary and its potential role in regulating maternal Fos mRNA[J]. *Biol Reprod*, 2016, 94(5): 115.
- [14] Sadler TW. Embryology of neural tube development[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2005, 135C(1): 2-8.
- [15] Duy PQ, Rakic P, Alper SL, et al. Brain ventricles as windows into brain development and disease[J]. *Neuron*, 2022, 110(1): 12-15.
- [16] Duan J, Yu Y, Li Y, et al. Low-dose exposure of silica nanoparticles induces cardiac dysfunction *via* neutrophil-mediated inflammation and cardiac contraction in zebrafish embryos[J]. *Nanotoxicology*, 2016, 10(5): 575-585.
- [17] Wei J, Liu J, Liang S, et al. Low-dose exposure of silica nanoparticles induces neurotoxicity *via* neuroactive ligand-receptor interaction signaling pathway in zebrafish embryos[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 4407-4415.
- [18] Vranic S, Shimada Y, Ichihara S, et al. Toxicological evaluation of SiO<sub>2</sub> nanoparticles by zebrafish embryo toxicity test[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 882.

(责任编辑: 纪方方)