

## 研究论文

# *BAX*敲除对小鼠大脑皮层和海马星形胶质细胞分布的影响

朱莉芳, 吴晓阳, 刘学, 马良, 张琪, 余子, 贺智娇, 应玥, 张竹天, 潘晓玉, 蔡予琦, 龚玲\*, 何苗\*

复旦大学脑科学研究院, 上海 200032

**摘要:** 星形胶质细胞是大脑中一类高度异质的重要大胶质细胞, 不仅在脑的发育和功能中起到重要作用, 也参与多种神经病理生理学过程。多项研究表明B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X protein, BAX)依赖性凋亡通路参与调控正常发育过程中脑内神经元的数量与分布, 但是对其调控星形胶质细胞的研究则较为匮乏。本文旨在研究BAX是否参与不同脑区星形胶质细胞分布的调控。以纯合子和杂合子*BAX*敲除小鼠为研究对象, 用SOX9免疫荧光染色法检测6周龄小鼠的大脑皮层和海马中星形胶质细胞的密度。结果显示, 星形胶质细胞的密度在不同皮层分区之间以及皮层和海马之间存在显著差异, 并且*BAX*敲除导致海马中星形胶质细胞的密度显著降低, 皮层中GABA能抑制神经元密度显著升高, 而皮层中星形胶质细胞的密度则未受显著影响。以上结果提示, BAX差异调控皮层星形胶质细胞与神经元, 也差异调控皮层与海马中的星形胶质细胞。这项研究为了解星形胶质细胞的区域异质性和BAX在大脑发育中的功能提供了重要信息。

**关键词:** 星形胶质细胞; B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白; 皮层; 海马

**中图分类号:** Q189

## Absence of *BAX* differentially affects astrocyte density in the mouse cortex and hippocampus

ZHU Li-Fang, WU Xiao-Yang, LIU Xue, MA Liang, ZHANG Qi, YU Zi, HE Zhi-Jiao, YING Yue, ZHANG Zhu-Tian, PAN Xiao-Yu, CAI Yu-Qi, GONG Ling\*, HE Miao\*

*Institutes of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China*

**Abstract:** Astrocytes are a heterogenous group of macroglia present in all regions of the brain and play critical roles in many aspects of brain development, function and disease. Previous studies suggest that the B-cell lymphoma-2 associated X protein (BAX)-dependent apoptosis plays essential roles in regulating neuronal number and achieving optimal excitation/inhibition ratio. The aim of the present paper was to study whether BAX regulates astrocyte distribution in a region-specific manner. Immunofluorescence staining of SOX9 was used to analyze and compare astrocyte density in primary somatosensory cortex, motor cortex, retrosplenial cortex and hippocampus in heterozygous and homozygous *BAX* knockout mice at age of six weeks when cortical development has finished and glia development has reached a relatively steady state. The results showed that astrocyte density varied significantly among different cortical subdivisions and between cortex and hippocampus. In contrast to the significant increase in GABAergic interneurons, the overall and region-specific astrocyte density remained unchanged in the cortex when BAX was absent. Interestingly, a significant reduction of astrocyte density was observed in the hippocampus of *BAX* knockout mice. These data suggest that BAX differentially

Received 2020-05-07 Accepted 2020-11-04

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0108000), the National Natural Science Foundation of China (No. 31970971, 31771196, 31471037), Shanghai Commission of Health Youth Program (No. 2017YQ016), Shanghai Rising-Star Program (No. 18QA1400600), Shanghai Municipal Science and Technology Major Project, China (No. 2018SHZDZX01) and ZJLab.

\*Corresponding authors. GONG Ling: +86-21-54237869; E-mail: gling@fudan.edu.cn. HE Miao: Tel: +86-21-54237869; E-mail: hem@fudan.edu.cn

regulates neurons and astrocytes in cortex as well as astrocytes in different brain regions during development. This study provided important information about the regional heterogeneity of astrocyte distribution and the potential contribution of *BAX* gene during development.

**Key words:** astrocytes; B-cell lymphoma-2 associated X protein; cortex; hippocampus

星形胶质细胞是大脑中一类重要的大胶质细胞, 不仅为神经元提供营养、代谢和结构支持, 而且在突触生成、信号传递、血流调节、损伤修复等方面发挥重要功能<sup>[1,2]</sup>。在雷特综合征<sup>[3,4]</sup>和脆性 X 染色体综合征<sup>[5]</sup>等神经发育性疾病<sup>[6]</sup>、亨廷顿氏病和阿尔兹海默症等神经退行性疾病<sup>[7-9]</sup>以及脑中中风<sup>[10,11]</sup>和脑外伤<sup>[12]</sup>等多种脑疾病的发生、发展与治疗康复中, 星形胶质细胞也起着重要作用<sup>[13]</sup>。近年来, 多项研究揭示正常大脑的不同脑区以及各个脑区内部的星形胶质细胞存在发育起源、形态、基因表达和功能等多方面的异质性<sup>[14-20]</sup>, 在各类病理状态下星形胶质细胞的响应也存在高度异质性<sup>[7,20-22]</sup>, 但目前对于星形胶质细胞分布的脑区差异尚无系统性研究。大脑皮层与海马是调控大脑功能的高级中枢, 均具有层状结构。近年来, 这两个脑区中星形胶质细胞的异质性越来越受到关注。但是, 目前对于星形胶质细胞在这两个脑区中的分布情况及其调控机制的认知仍较为匮乏。

大脑中的星形胶质细胞和神经元共同起源于脑室区和脑室下区的神经干细胞<sup>[23]</sup>。在正常发育过程中, B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, *BAX*) 依赖性细胞凋亡通路对神经干细胞和神经元的数量和分布起到关键调节作用<sup>[24-31]</sup>。多项研究显示, 在离体和病理状况下, 星形胶质细胞的死亡也受到此通路的调控<sup>[32-35]</sup>。虽然有研究者观察到脑中多个区域存在凋亡的星形胶质细胞<sup>[36,37]</sup>, 但也有研究报道 *BAX* 敲除 10 日龄幼鼠脑中胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 阳性细胞总数并未上升, 反而短暂下降<sup>[24]</sup>。近期 Punal 等发现视网膜中星形胶质细胞数量的降低不依赖于凋亡, 推测大脑中星形胶质细胞的数量调控可能也遵循类似的规律<sup>[38]</sup>。因此, 对于在正常发育过程中 *BAX* 是否参与调控大脑皮层和海马等重要脑区中的星形胶质细胞数量和分布目前尚无定论。

性别决定区 Y 框蛋白 9 (sex-determining region Y-box 9, *SOX9*) 这一转录因子对神经干细胞从神经发生到星形胶质发生的转换中起到关键作用, 并在

成熟星形胶质细胞中持续表达。2017 年 Sun 等研究显示, 除了神经发生区域之外, *SOX9* 在各个脑区的星形胶质细胞内特异性高表达<sup>[39]</sup>。2020 年 Batiuk 等通过分析星形胶质细胞单细胞测序数据, 也观察到 *SOX9* 在星形胶质细胞的各种亚型中普遍高表达<sup>[40]</sup>。因此, *SOX9* 的表达可以准确反映星形胶质细胞的分布。本研究利用 *BAX* 敲除小鼠模型和 *SOX9* 免疫荧光染色, 对性成熟后小鼠大脑皮层、海马及不同皮层分区中星形胶质细胞的分布进行定量分析和比较, 以期了解星形胶质细胞的区域异质性和 *BAX* 对星形胶质细胞的发育调控提供重要信息。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** GAD67-GFP 小鼠<sup>[41]</sup>由京都大学 Takeshi Kaneko 研究组友情馈赠; *BAX*<sup>-/-</sup>小鼠 (JAX 002994)<sup>[42]</sup>由丹娜法伯癌症研究所 Stanley J. Korsmeyer 课题组制作, 购自美国杰克逊实验室。实验所用小鼠均为 6 周龄小鼠。饲养小鼠的环境保持为昼夜交替 (12 h/12 h) 的作息节律, 小鼠能自由觅食和饮水。实验和数据分析均在双盲情况下开展以避免实验者的主观意愿对结果产生影响。对小鼠进行的所有研究行为均遵循国家《实验动物管理条例》和有关动物保护与使用的法律和法规, 并获得复旦大学实验动物中心动物伦理委员会批准。

**1.2 基因型鉴定** 通过鼠尾基因组 DNA 的 PCR 扩增进行基因型鉴定, 所用引物如下: *BAX*-koF: 5'-CCGCTTCCATTGCTCAGCGG-3'; *BAX*-wtF: 5'-GAGCTGATCAGAACCATCATG-3'; *BAX*-R: 5'-GTTGACCAGAGTGGCGTAGG-3'。引物位置见图 1。 *BAX*<sup>-/-</sup>用 koF-R 引物对扩增, 产物长度 507 bp; *BAX*<sup>+/+</sup>用 wtF-R 引物对扩增, 产物长度 304 bp。

**1.3 免疫荧光染色和计数** 腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 用 15 mL 生理盐水 (0.9% NaCl) 和 20 mL 4% 多聚甲醛依次进行心脏灌注。将脑组织取出, 在 4% 多聚甲醛中 4°C 后固定过夜。用振动切片机 (Leica S1000S) 将固定后的脑组织切为 30  $\mu$ m 冠状切片。在两侧半球胼胝体相连区间内, 每

间隔 3 片取 1 片进行漂浮脑片染色、成像 (Olympus VS120) 和分析。染色流程如下: 室温封闭 (含 5% 驴血清和 0.5% Triton X-100 的 PBS 缓冲液) 2 h, 换入一抗 4 °C 孵育 48 h; 一抗孵育结束后, PBS 清洗 3 次, 换入荧光二抗室温孵育 2 h; 二抗孵育结束后, PBS 清洗 3 次, 换入含 DAPI 的 PBS 染核 5~10 min; DAPI 染色结束后, PBS 清洗 1 次, 封片。所使用的一抗分别为: 鸡抗 GFP 多克隆抗体 (1:2 000, GFP-1020, Avessellabs), 山羊抗 SOX9 多克隆抗体 (1:500, AF3075, R&D System)。所使用二抗分别为: 驴抗鸡 Alexa 488 结合抗体 (1:500, 800-367-5295, Jackson Immuno Research), 驴抗山羊 Alexa 568 结合抗体 (1:500, A11057, Life Technologies)。脑区的划分依据 Paxinos 小鼠脑图谱<sup>[43]</sup> 和 Allen 小鼠脑图谱<sup>[44]</sup>。对初级体感皮层桶状区 (primary somatosensory cortex, barrel field, S1BF) 进行计数的方法: 在保证不同样品的选区位置保持一致的前提下, 在该区域居中位置截取垂直于皮层表面、宽 650  $\mu\text{m}$ 、包含皮层 1~6 层的矩形框, 对其中全部阳性胞体进行计数, 并记录矩形框内皮层区域的面积。对压片后皮质背侧区 (retrosplenial cortex, dorsal part, RSPd)、运动皮层 (motor cortex, MO)、全皮层计数方法: 对应脑图谱, 根据皮层形态和细胞核分布, 手动框选对应脑区, 对其中全部阳性胞体进行计数, 并记录该区域面积。每个样品各区域中阳性胞体总数除以面积总和, 得到该样品中各区域的细胞密度。

**1.4 统计分析** 实验数据以 mean  $\pm$  SEM 表示, 用 GraphPad Prism 6 软件进行统计检验, 两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  时认为差异具有统计学显著性。

## 2 结果

### 2.1 *BAX* 敲除导致海马中星形胶质细胞的密度降低

在 *BAX* 全敲除 (*BAX*<sup>-/-</sup>)<sup>[42]</sup> 小鼠模型中, *BAX* 基因的第 2~5 外显子被 PGK-Neo 编码框所取代, 导致 BH1 和 BH2 结构域缺失, 蛋白质功能失活 (图 1A、B)。交配获得的纯合子 (*BAX*<sup>-/-</sup>) 小鼠可正常存活和交配, 且 6 周龄小鼠体重与杂合子 (*BAX*<sup>+/-</sup>) 小鼠无显著差异 (图 1C), 但脑重显著升高、脑体积增大 (图 1D、E)。

本研究选用在星形胶质细胞命运决定中起到关键作用的转录因子 SOX9 作为分子标签, 利用免疫荧光染色对 6 周龄小鼠大脑皮层和海马中的星形胶

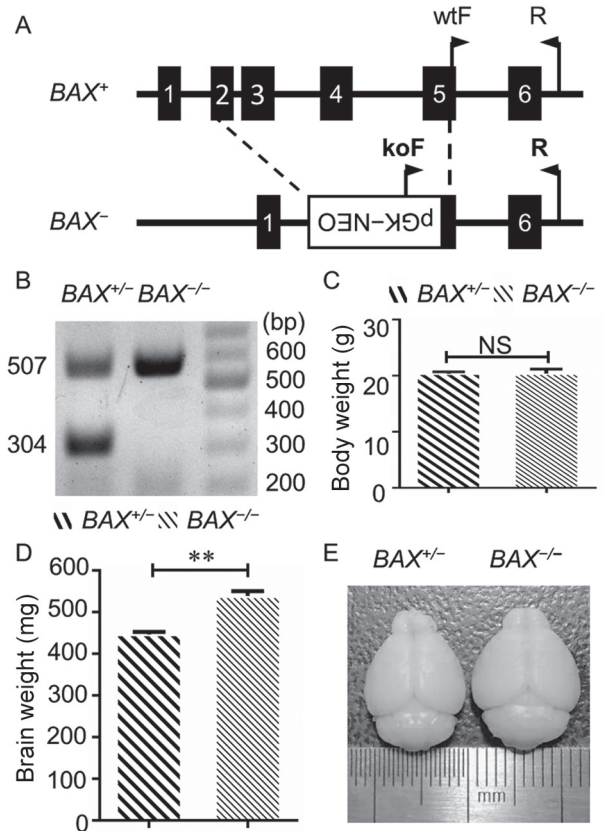


图 1. *BAX* 全敲除模型导致小鼠脑重增加

Fig. 1. *BAX* null mice have bigger brains but normal body weights. A: Genomic structure of wild type and knockout *BAX* alleles (*BAX*<sup>+</sup> and *BAX*<sup>-</sup>), respectively. A PGK-Neo cassette replaced exon 2 through 5 in the *BAX*<sup>-</sup>. The annealing positions (koF, wtF, R) of PCR primers in the genome were annotated. B: Representative PCR genotyping results from heterozygous and homozygous *BAX* knockout mice (*BAX*<sup>+/-</sup> and *BAX*<sup>-/-</sup>). C: No significant difference in body weight was observed between the two genotypes. D: Brains from *BAX*<sup>-/-</sup> were significantly bigger than those of *BAX*<sup>+/-</sup> as indicated by the quantification of brain weight. E: Representative photo of brains.  $n \geq 3$ . Data were shown as mean  $\pm$  SEM. NS:  $P > 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

质细胞进行了计数和密度统计 (图 2A)。结果显示, 星形胶质细胞分布密集、形态复杂, SOX9 作为核定位蛋白, 染色模式相比于标记细胞形态的分子标签, 更利于计数和统计。与其他许多星形胶质细胞的分子标签相似, SOX9 也在神经干细胞中表达, 因此在统计海马时我们排除了成体神经干细胞所在的齿状回区域 (图 2B)。

结果显示, 两种基因型小鼠皮层中的星形胶质细胞密度显著低于海马, 并且 *BAX*<sup>-/-</sup> 小鼠海马中星形胶质细胞的密度相比于 *BAX*<sup>+/-</sup> 小鼠显著降低 (图



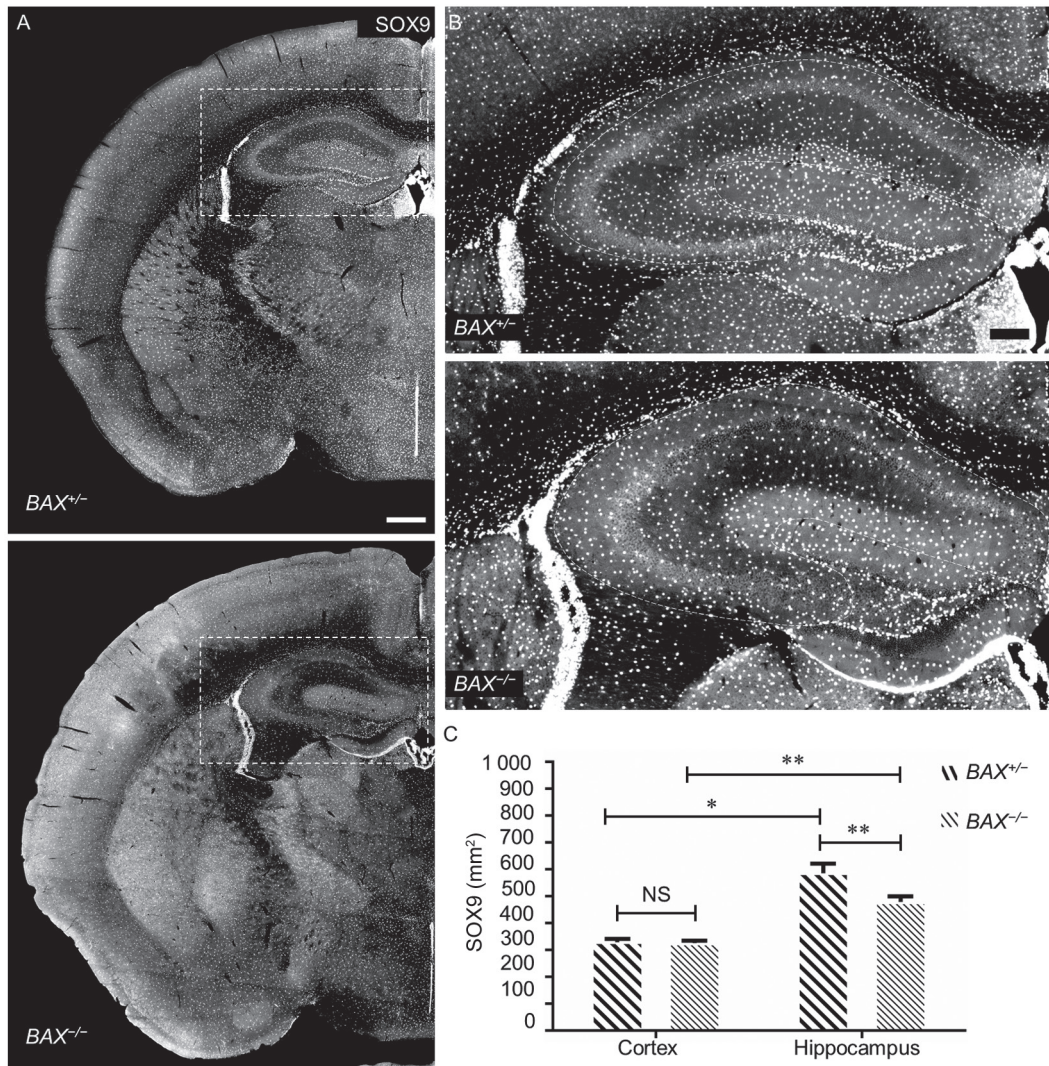


图 2. *BAX* 敲除导致小鼠海马中星形胶质细胞密度降低，但未显著影响皮层中的星形胶质细胞密度

Fig. 2. *BAX* knockout leads to reduction of hippocampal astrocyte density but not cortical astrocyte density. *A*: Representative immunofluorescent images showing astrocytes labeled by SOX9 in the mouse cortex and hippocampus. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ . *B*: High magnification images of boxed area in *A*. Dashed lines indicate the regions for cell counting and quantification in the hippocampus. The dentate gyrus was excluded for quantification as SOX9 also labels adult stem cells in this region. Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ . *C*: Quantification of SOX9-labeled astrocytes showed that hippocampal density was higher than cortex in both genotypes, and was decreased in the *BAX* knockout mice. Mouse number  $\geq 4$ . Slice number  $\geq 40$  per mouse. Data were shown as mean  $\pm$  SEM. NS:  $P > 0.05$ ; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

2C), 但两种基因型小鼠皮层星形胶质细胞密度之间无显著差异。这一结果表明发育成熟后, 星形胶质细胞的分布存在脑区差异, 且 *BAX* 的缺失会导致海马中星形胶质细胞密度降低, 但不影响皮层中星形胶质细胞的密度, 提示 *BAX* 差异调控皮层和海马中的星形胶质细胞。

## 2.2 *BAX* 敲除不影响皮层不同分区中星形胶质细胞的密度

研究显示, *BAX* 依赖性凋亡通路调控皮层中抑

制性神经元的密度 [27, 45, 46]。在 *GAD67-GFP* 小鼠中, *GFP* 被敲入到催化合成抑制性神经递质  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, *GABA*) 的 1 型谷氨酸脱羧酶 (glutamate decarboxylase 1, 又名 67 kDa glutamic acid decarboxylase, *GAD67*) 的内源基因位点中, 其表达与 *GAD67* 一致, 因此能够标记 *GABA* 能抑制性神经元。本研究将 *BAX*<sup>-/-</sup> 小鼠与 *GAD67-GFP* 小鼠进行交配, 获得 *GAD67-GFP*: *BAX*<sup>+/-</sup> 和 *GAD67-GFP*: *BAX*<sup>-/-</sup> 后代。借助上述小鼠模型, 我们可以

在同一个体中同时比较抑制性神经元和星形胶质细胞的分布情况。

与不带有 GAD67-GFP 的小鼠表型一致, GAD67-GFP : *BAX*<sup>+/-</sup> 和 GAD67-GFP : *BAX*<sup>-/-</sup> 小鼠的体重之间不存在显著差异 (图 3A), 但后者脑重在 *BAX* 敲除后显著增加 (图 3B), 皮层中星形胶质细胞的密度低于海马, 并且皮层不受 *BAX* 敲除的影响, 而海马则显著降低 (图 3C)。这些结果再次验证了星形胶质细胞分布及其受 *BAX* 调控的情况均在皮层与海马之间存在差异。

为了进一步确认 *BAX* 是否调控皮层中的抑制性神经元分布, 我们选择了以下三个皮层分区进行分析: 偏外侧、具有六层结构、各层宽度相近的 S1BF; 偏背内侧、与海马相互投射、不具备第 4 层、浅层宽于深层的 RSPd; 位置位于两者之间、不具备第 4 层的 MO (图 3D)。这几个区域在位置、分层、结构、连接和功能等方面存在显著差异, 具备典型性和代表性。结果显示, 三个分区中抑制性神经元的密度均在 *BAX* 敲除后显著升高 (图 3E), 表明 *BAX* 敲除后 GABA 能神经元凋亡受阻, 从而数量

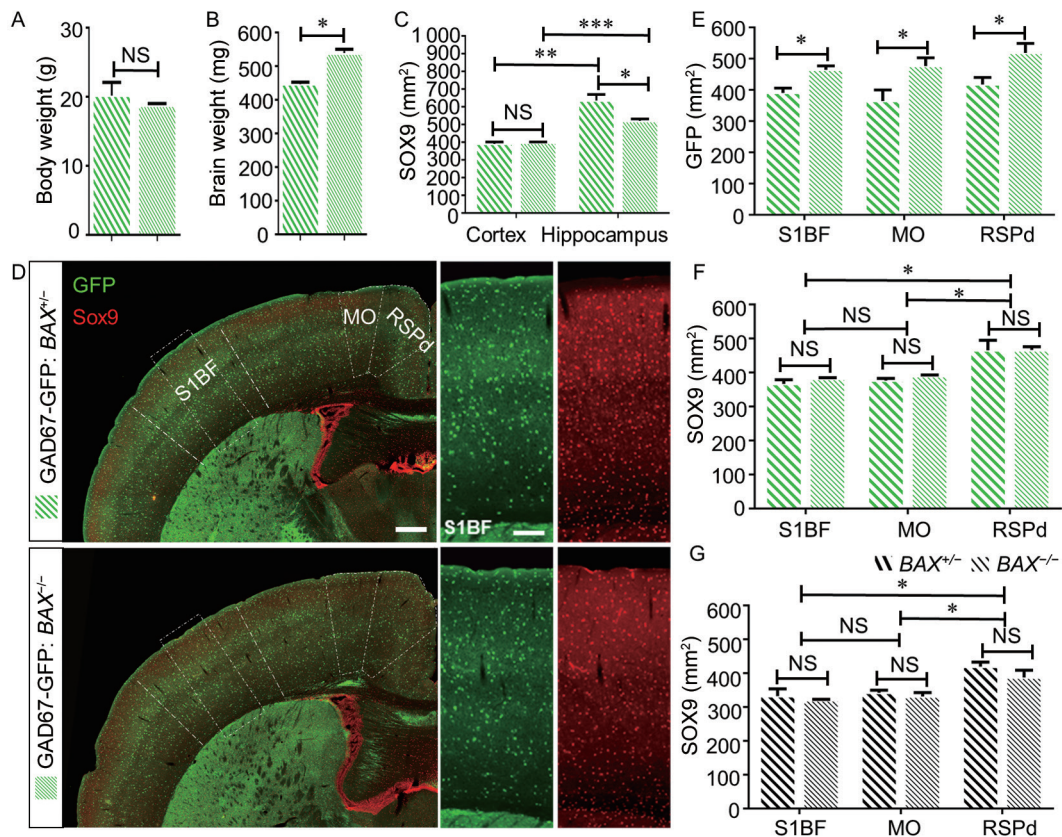


图 3. *BAX* 敲除不影响小鼠大脑皮层不同分区中星形胶质细胞的密度

Fig. 3. The varying astrocyte density in different cortical regions is not affected by *BAX* knockout. *A, B*: No significant difference in body weight was observed between the two genotypes (*A*), but brain weight was significantly elevated by *BAX* knockout (*B*). *C*: Quantification of SOX9-labeled astrocytes showed that hippocampal density was higher than cortex in both genotypes, and was decreased in the *BAX* knockout mice. *D*: Representative images showing GABAergic interneurons labeled by GAD67-GFP and astrocytes labeled by SOX9 in mouse cortex. Dashed lines in the left panels indicate primary somatosensory cortex, barrel field (S1BF), motor cortex (MO) and retrosplenial cortex, dorsal part (RSPd). Individual channels of boxed area in the left panels were shown in higher magnification in the right panels. Scale bar: 500  $\mu$ m in low magnification images and 200  $\mu$ m in high magnification images. *E*: Quantification of GFP-labeled GABAergic interneuron density. Significant increases were observed in the homozygous knockout brain compared to the heterozygous control. *F, G*: Quantification of SOX9-labeled astrocyte density in different cortical regions in GAD67-GFP:*BAX*<sup>+/-</sup> vs GAD67-GFP:*BAX*<sup>-/-</sup> (*F*) or *BAX*<sup>+/-</sup> vs *BAX*<sup>-/-</sup> (*G*). RSPd had higher astrocyte density compared with S1BF and MO, but *BAX* knockout did not affect astrocyte density in all three cortical regions. Mouse number  $\geq 3$ . Slice number  $\geq 40$  per mouse. Data were shown as mean  $\pm$  SEM. NS:  $P > 0.05$ ; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



增加, 确证了 *BAX* 敲除模型的功能性。与此相反, 无论在带有 *GAD67-GFP* 的小鼠中 (图 3F), 还是不带有 *GAD67-GFP* 的小鼠中 (图 3G), 三个分区中星形胶质细胞的密度均未受到 *BAX* 敲除的显著影响。由此可见, 全皮层统计未能观察到差异并不是因为不同分区中变化相反而相互抵消。上述结果表明 *BAX* 差异调控皮层中的神经元和星形胶质细胞。除此之外, 我们还观察到 *RSPd* 中星形胶质细胞的密度显著高于 *S1BF* 和 *MO*, 而后两者密度间无显著差异, 在 *BAX* 敲除后这种差异仍然存在 (图 3F、G), 提示皮层不同分区间也存在星形胶质细胞的差异分布, 但 *BAX* 并非参与调控的关键因子。

### 3 讨论

本研究对 6 周龄小鼠星形胶质细胞在大脑皮层和海马中的分布及其受 *BAX* 敲除的影响情况进行了定量分析, 结果显示, 星形胶质细胞在皮层和海马之间以及皮层的不同分区之间存在显著的分布密度差异; *BAX* 基因敲除导致海马中星形胶质细胞密度显著下降, 但并未改变皮层整体以及不同皮层分区中星形胶质细胞的密度。本研究为星形胶质细胞的区域异质性提供了重要信息, 也为凋亡通路中的关键分子 *BAX* 如何参与正常脑发育过程中星形胶质细胞的调控提供了重要信息。

星形胶质细胞的异质性在近年来越来越受到重视, 前人研究发现皮层和海马等脑区的星形胶质细胞在基因表达和形态等方面存在高度的异质性<sup>[40, 47]</sup>, 但是目前尚无研究系统性观测星形胶质细胞分布的脑区差异。本研究结果表明皮层和海马以及皮层不同分区之间星形胶质细胞密度存在显著差异, 为这类细胞的区域异质性分布提供了重要信息。这种差异很可能也在其他皮层分区和脑区中普遍存在, 值得在未来进一步展开研究。此外, 许多基因差异调控不同细胞类型。鉴于前人<sup>[24, 27, 28, 38, 45, 46, 48–50]</sup>和本研究都提示在正常发育过程中 *BAX* 对皮层神经元和星形胶质细胞密度的调控存在显著差异, 它在不同星形胶质细胞亚型中的作用很可能也存在差别。过去的研究已证明皮层和海马中的星形胶质细胞在基因表达上存在显著差异<sup>[40, 47]</sup>, 因此本研究所观察到的 *BAX* 敲除对皮层和海马中星形胶质细胞的不同影响, 有可能反映了 *BAX* 在不同星形胶质细胞亚型中作用的差异, 但也不能排除皮层与海马在发育历程、结构和功能方面的差异对此有所贡献。

2019 年 Punal 等对视网膜发育过程中星形胶质细胞的数量变化及其调控机制进行了深入研究, 他们研究发现虽然星形胶质细胞与神经元相似, 也在出生后早期大量死亡, 但并非经由 *BAX* 依赖性细胞凋亡通路, 而是受到小胶质细胞的调控<sup>[38]</sup>。该研究还显示出生后早期体感皮层中星形胶质细胞的密度显著下降, 但并未探究这一区域是否与视网膜受到同样机制的调控<sup>[38]</sup>。本研究结果显示, 在 6 周龄小鼠中, *BAX* 敲除并未影响皮层中星形胶质细胞的密度, 说明即便 *BAX* 参与调控星形胶质细胞的数量, 效应也远不如对神经元的调控显著。除了类似于视网膜中小胶质细胞介导细胞吞噬的机制之外, 自平衡机制、非 *BAX* 依赖性的细胞凋亡以及其他类型的细胞死亡通路<sup>[25]</sup> 是否参与调控星形胶质细胞在发育中的数量变化尚待进一步研究。

Chang 等对 10 日龄小鼠全脑中 *GFAP* 阳性细胞进行流式细胞计数, 观察到其在 *BAX* 敲除小鼠显著低于野生型, 但到 1 月龄之后此差异消失<sup>[24]</sup>。由于该研究并未提供 1 月龄的实验结果, 在对 10 日龄小鼠进行计数时也没有区分皮层和海马, 因此并不清楚是否在各个脑区中该差异均消失, 不能排除部分脑区中的差异被其他脑区所掩盖的可能性。Kim 等研究显示, 在 4 月龄小鼠海马的分子层出现反应性星形胶质细胞增生 (reactive astrogliosis), *GFAP* 阳性细胞密度增加, 但在 1 月龄小鼠中则未观察到差异<sup>[51]</sup>。*GFAP* 是一种常用的星形胶质细胞分子标记, 被广泛用于星形胶质细胞的研究。在神经退行性病、神经炎症、中风、癫痫等多种神经病变中, 常会出现 *GFAP* 基因表达水平的变化甚至异常, 因此它也常被用于这些疾病的研究<sup>[52–54]</sup>。此外, 在创伤性脑损伤和中风发生后, *GFAP* 蛋白及其降解产物会释放到体液中, 因此可被用作生物标记辅助这些疾病的诊断和治疗<sup>[55]</sup>。但是, 由于 *GFAP* 的表达存在细胞状态、类型和区域差异, 所标记的细胞形态也较为复杂, 用其进行星形胶质细胞计数的准确度和代表性存在一定疑问。*GFAP* 在反应性星形胶质细胞 (reactive astrocyte) 中的表达水平远高于非反应性星形胶质细胞, 在纤维型星形胶质细胞 (fibrous astrocyte) 中高于原浆型星形胶质细胞 (protoplasmic astrocyte), 在海马和白质中高于皮层<sup>[40, 56–58]</sup>。研究显示, 除了在脑损伤和胶质疤痕形成的状态下, 反应性星形胶质细胞增生中 *GFAP* 染色的增强主要来自其表达水平的上升, 而非其增殖导致的数量增

加<sup>[59]</sup>。在采用流式细胞法进行计数时, 荧光强度的阈值设定会影响所得结果, 因此有可能将 GFAP 表达水平的变化与细胞数量的变化相混淆, 而且制备单细胞悬液的过程会引入损伤与时间延迟导致的生理变化。采用 GFAP 免疫染色对脑片中的星形胶质细胞计数的问题则在于较难准确辨别形态复杂、排布紧密的单个细胞。另外, 反应性星形胶质细胞的胞体增大、突起增多<sup>[22]</sup>, 也会使得单细胞辨别更为困难。本研究所选用的分子标签 SOX9 是核定位的转录因子, 可在脑片中清晰标记单个星形胶质细胞核, 避免了上述由 GFAP 染色带来的不确定性和局限性, 因此能够更为准确地反映正常生理状况下星形胶质细胞在大脑各区域的原位分布情况。

与带有 GAD67-GFP 的小鼠相比 (图 3C), 不带有 GAD67-GFP 的小鼠 (图 2C) 皮层中星形胶质细胞的密度略低、海马中的星形胶质细胞密度没有显著差异。两种小鼠皮层中的这种差异有可能是受到 GAD67-GFP 转基因的影响, 也有可能是缘于两种小鼠品系在遗传背景方面的差异。但是, 在这两种小鼠中所观察到的星形胶质密度分布的区域差异保持一致, 并且 BAX 缺失对皮层星形胶质细胞密度没有产生影响。因此, 无论是哪种因素导致了两者之间的差别, 均不影响本研究的主要结论。

### 参考文献

- Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14(5): 311–321.
- Henneberger C, Petzold GC. Diversity of synaptic astrocyte-neuron signaling. *e-Neuroforum* 2015; 6(3): 79–83.
- Jin XR, Chen XS, Xiao L. MeCP2 deficiency in neuroglia: New progress in the pathogenesis of Rett syndrome. *Front Mol Neurosci* 2017; 10: 316.
- Kahanovitch U, Patterson KC, Hernandez R, Olsen ML. Glial dysfunction in MeCP2 deficiency models: Implications for Rett syndrome. *Int J Mol Sci* 2019; 20(15): 3813.
- Cheng C, Sourial M, Doering LC. Astrocytes and developmental plasticity in fragile X. *Neural Plast* 2012; 2012: 197491.
- Molofsky AV, Krencik R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 2012; 26(9): 891–907.
- Matias I, Morgado J, Gomes FCA. Astrocyte heterogeneity: Impact to brain aging and disease. *Front Aging Neurosci* 2019; 11: 59.
- Perez-Nievas BG, Serrano-Pozo A. Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2018; 10: 114.
- Khakh BS, Sofroniew MV. Astrocytes and Huntington's disease. *ACS Chem Neurosci* 2014; 5(7): 494–496.
- Barreto G, White RE, Ouyang Y, Xu L, Giffard RG. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2011; 11(2): 164–173.
- Liu Z, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 2016; 144: 103–120.
- Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2016; 275 Pt 3: 305–315.
- Liu B, Teschemacher AG, Kasparov S. Astroglia as a cellular target for neuroprotection and treatment of neuro-psychiatric disorders. *Glia* 2017; 65(8): 1205–1226.
- Pestana F, Edwards-Faret G, Belgard TG, Martirosyan A, Holt MG. No longer underappreciated: The emerging concept of astrocyte heterogeneity in neuroscience. *Brain Sci* 2020; 10(3): 168.
- Westergard T, Rothstein JD. Astrocyte diversity: Current insights and future directions. *Neurochem Res* 2020; 45(6): 1298–1305.
- Miller SJ. Astrocyte heterogeneity in the adult central nervous system. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 401.
- Khakh BS, Sofroniew MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci* 2015; 18(7): 942–952.
- Ben Haim L, Rowitch DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 2017; 18(1): 31–41.
- Farmer WT, Murai K. Resolving astrocyte heterogeneity in the CNS. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 300.
- Schitine C, Nogaroli L, Costa MR, Hedin-Pereira C. Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 76.
- Cunningham C, Dunne A, Lopez-Rodriguez AB. Astrocytes: Heterogeneous and dynamic phenotypes in neurodegeneration and innate immunity. *Neuroscientist* 2019; 25(5): 455–474.
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 2014; 565: 23–29.
- Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia* 2015; 63(8): 1320–1329.
- Chang MY, Sun W, Ochiai W, Nakashima K, Kim SY, Park CH, Kang JS, Shim JW, Jo AY, Kang CS, Lee YS, Kim JS, Lee SH. Bcl-XL/Bax proteins direct the fate of embryonic cortical precursor cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27(12): 4293–4305.
- Fricke M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown

- GC. Neuronal cell death. *Physiol Rev* 2018; 98(2): 813–880.
- 26 Denaxa M, Neves G, Burrone J, Pachnis V. Homeostatic regulation of interneuron apoptosis during cortical development. *J Exp Neurosci* 2018; 12: 1179069518784277.
  - 27 Southwell DG, Paredes MF, Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Baraban SC, Alvarez-Buylla A. Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* 2012; 491(7422): 109–113.
  - 28 Causeret F, Coppola E, Pierani A. Cortical developmental death: selected to survive or fated to die. *Curr Opin Neurobiol* 2018; 53: 35–42.
  - 29 Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 2000; 23: 73–87.
  - 30 Wong FK, Marin O. Developmental cell death in the cerebral cortex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2019; 35: 523–542.
  - 31 Yamaguchi Y, Miura M. Programmed cell death in neurodevelopment. *Dev Cell* 2015; 32(4): 478–490.
  - 32 Ng SY, Lee AYW. Traumatic brain injuries: Pathophysiology and potential therapeutic targets. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 528.
  - 33 Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2004; 72(2): 111–127.
  - 34 Giffard RG, Swanson RA. Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia* 2005; 50(4): 299–306.
  - 35 Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol* 2004; 14(2): 215–222.
  - 36 Krueger BK, Burne JF, Raff MC. Evidence for large-scale astrocyte death in the developing cerebellum. *J Neurosci* 1995; 15(5 Pt 1): 3366–3374.
  - 37 Soriano E, Del Rio JA, Auladell C. Characterization of the phenotype and birthdates of pyknotic dead cells in the nervous system by a combination of DNA staining and immunohistochemistry for 5'-bromodeoxyuridine and neural antigens. *J Histochem Cytochem* 1993; 41(6): 819–827.
  - 38 Punal VM, Paisley CE, Brecha FS, Lee MA, Perelli RM, Wang J, O'Koren EG, Ackley CR, Saban DR, Reese BE, Kay JN. Large-scale death of retinal astrocytes during normal development is non-apoptotic and implemented by microglia. *PLoS Biol* 2019; 17(10): e3000492.
  - 39 Sun W, Cornwell A, Li J, Peng S, Osorio MJ, Aalling N, Wang S, Benraiss A, Lou N, Goldman SA, Nedergaard M. SOX9 is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions. *J Neurosci* 2017; 37(17): 4493–4507.
  - 40 Batiuk MY, Martirosyan A, Wahis J, de Vin F, Marneffe C, Kusserow C, Koeppen J, Viana JF, Oliveira JF, Voet T, Ponting CP, Belgard TG, Holt MG. Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat Commun* 2020; 11(1): 1220.
  - 41 Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 2003; 467(1): 60–79.
  - 42 Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995; 270(5233): 96–99.
  - 43 Franklin KBJ, Paxinos G. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th ed. Amsterdam: Academic Press, 2013.
  - 44 Dong HW. Allen Reference Atlas. A Digital Color Brain Atlas of the C57BL/6J Male Mouse. John Wiley and Sons, 2008.
  - 45 Priya R, Paredes MF, Karayannis T, Yusuf N, Liu X, Jaglin X, Graef I, Alvarez-Buylla A, Fishell G. Activity regulates cell death within cortical interneurons through a calcineurin-dependent mechanism. *Cell Rep* 2018; 22(7): 1695–1709.
  - 46 Wong FK, Bercsenyi K, Sreenivasan V, Portales A, Fernandez-Otero M, Marin O. Pyramidal cell regulation of interneuron survival sculpts cortical networks. *Nature* 2018; 557(7707): 668–673.
  - 47 Morel L, Chiang MSR, Higashimori H, Shoneye T, Iyer LK, Yelick J, Tai A, Yang Y. Molecular and functional properties of regional astrocytes in the adult brain. *J Neurosci* 2017; 37(36): 8706–8717.
  - 48 Denaxa M, Neves G, Rabinowitz A, Kemlo S, Liodis P, Burrone J, Pachnis V. Modulation of apoptosis controls inhibitory interneuron number in the cortex. *Cell Rep* 2018; 22(7): 1710–1721.
  - 49 Blanquie O, Yang JW, Kilb W, Sharopov S, Sinning A, Luhmann HJ. Electrical activity controls area-specific expression of neuronal apoptosis in the mouse developing cerebral cortex. *Elife* 2017; 6: e27696.
  - 50 Sun W, Winseck A, Vinsant S, Park OH, Kim H, Oppenheim RW. Programmed cell death of adult-generated hippocampal neurons is mediated by the proapoptotic gene Bax. *J Neurosci* 2004; 24(49): 11205–11213.
  - 51 Kim TW, Kim H, Sun W. Spontaneous reactive astrogliosis in the dentate gyrus of Bax-deficient mice. *Mol Cells* 2011; 31(4): 379–383.
  - 52 Li D, Liu X, Liu T, Liu H, Tong L, Jia S, Wang YF. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Glia* 2020; 68(5): 878–897.
  - 53 Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S. Astrocytes: Role and



- functions in brain pathologies. *Front Pharmacol* 2019; 10: 1114.
- 54 Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Párpura V, Hol EM, Sofroniew MV, Verkhratsky A. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 2016; 131(3): 323–345.
- 55 Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci* 2015; 38(6): 364–374.
- 56 Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 2000; 25(9–10): 1439–1451.
- 57 Hu X, Yuan Y, Wang D, Su Z. Heterogeneous astrocytes: Active players in CNS. *Brain Res Bull* 2016; 125: 1–18.
- 58 Zhang Z, Ma Z, Zou W, Guo H, Liu M, Ma Y, Zhang L. The appropriate marker for astrocytes: Comparing the distribution and expression of three astrocytic markers in different mouse cerebral regions. *Biomed Res Int* 2019; 2019: 9605265.
- 59 Liddelow SA, Barres BA. Reactive astrocytes: Production, function, and therapeutic potential. *Immunity* 2017; 46(6): 957–967.