

## 子宫内电穿孔转染胎鼠脑室管膜下区神经干细胞的条件优化

<https://doi.org/10.12307/2022.769>邹明明<sup>1</sup>, 倪莉<sup>2</sup>, 周立宇<sup>2</sup>, 李迪<sup>3</sup>, 赛吉拉夫<sup>2</sup>, 韦善文<sup>2</sup>, 张鹏飞<sup>1</sup>

投稿日期: 2021-06-22

采用日期: 2021-08-23

修回日期: 2021-11-03

在线日期: 2021-11-30

中图分类号:

R459.9; R318; R394.2

文章编号:

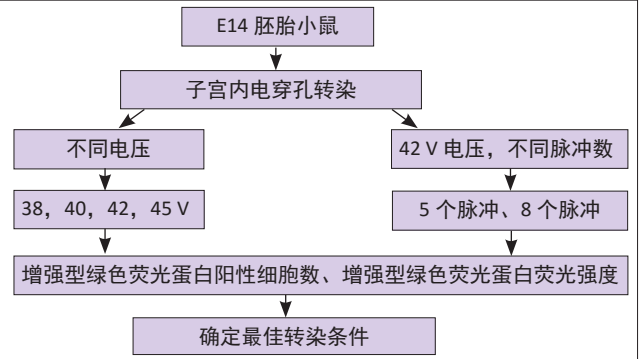
2095-4344(2022)30-04879-05

文献标识码: B

## 文章快速阅读:

## 文章特点一

- △探索出了小鼠子宫内电穿孔转染的最佳条件;
- △在E14胎鼠侧脑室内注射目的质粒,采用目前使用最广泛的ECM830电转仪和活体基因电转镊子电极将质粒瞬时转入胎鼠神经细胞内;
- △此转染可用来研究大脑皮质发育相关的一些神经疾病。



## 文题释义:

**神经前体细胞:** 能够进行自我增殖和分化的多潜能细胞, 可通过增殖维持所需的神经前体细胞数目, 也可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

**子宫内电转染技术:** 子宫内电穿孔是研究神经发育过程中细胞增殖、分化、迁移和成熟分子机制的一项重要技术。利用电脉冲在细胞膜上产生瞬时孔隙, 快速和靶向地将物质导入到细胞中。电穿孔在体外研究中的使用由来已久, 但科学的发展将它的使用范围扩展到了研究完整的器官, 如在子宫内发育的小鼠胚胎器官。

## 摘要

**背景:** 神经干细胞是一群可以自我增殖并具有多向分化潜能的细胞。子宫内电穿孔转染可将RNA或质粒瞬时转入活体小鼠神经干细胞内对目的基因进行干扰或过表达, 是目前活体研究大脑皮质发育的最直接可靠的研究方法。

**目的:** 以胎鼠小鼠脑室管膜下区的神经干细胞为目标, 以增强型绿色荧光蛋白作为报告基因, 优化子宫内电穿孔转染的条件, 为研究大脑皮质的发育提供更加有效的方法。

**方法:** 将成年ICR小鼠以1只雄鼠和3只雌鼠的比例进行交配, 晚上8点将小鼠合笼, 第2天早晨8点查雌鼠阴栓, 将有阴栓的雌鼠计为怀孕0.5 d。待怀孕14 d(E14)时腹腔注射Ketamin(120 mg/kg)和Xylazine(10 mg/kg)麻醉孕鼠, 剃掉孕鼠腹部毛发, 打开腹腔, 不剪开孕鼠子宫, 用ECM803电穿孔转染仪和BTX电极在不同的电压下将pEx-4-eGFP质粒在电场的作用下瞬时转入胎鼠脑室管膜下区的神经干细胞内。转染3 d后取出转染小鼠脑组织进行冰冻切片, 观察增强型绿色荧光蛋白在大脑皮质上的表达, 统计绿色荧光蛋白阳性细胞数来评估转染效率。

**结果与结论:** ①电转电压在38, 40, 42, 45 V时小鼠存活及转染效果不同, 38 V电压对胎鼠的致死性较小, 但是转染效率较低, 在42 V电压下电转的小鼠可存活, 且电转的脑组织中绿色荧光蛋白荧光强度高于40 V电压, 但是45 V电压对小鼠的致死性较大。因此, 42 V电压是一个较好的电转条件。②在电压42 V条件下, 脉冲数由5个改为8个后绿色荧光蛋白阳性细胞更多, 荧光更亮。③改良后的电转条件对转染成功的细胞生长无影响。

**关键词:** 子宫; 电穿孔; 转染; 神经干细胞; 电压; 脉冲; 转染效率

## Optimization of conditions for intrauterine electroporation transfection in neural stem cells from the subependymal region of fetal mice

Zou Mingming<sup>1</sup>, Ni Li<sup>2</sup>, Zhou Liyu<sup>2</sup>, Li Di<sup>3</sup>, Saijilafu<sup>2</sup>, Wei Shanwen<sup>2</sup>, Zhang Pengfei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100700, China; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; <sup>3</sup>Affiliated Zhangjiagang Hospital of Soochow University, Zhangjiagang 215600, Jiangsu Province, China

<sup>1</sup>解放军总医院第一医学中心神经外科医学部派驻第七医学中心神经外科, 北京市 100700; <sup>2</sup>苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215000; <sup>3</sup>苏州大学附属张家港市第一人民医院, 江苏省张家港市 215600

**第一作者:** 邹明明, 女, 1981年生, 河北省承德市人, 满族, 2016年中国人民解放军第三军医大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事神经发育和神经损伤后的再生研究。

**共同第一作者:** 倪莉, 女, 1983年生, 江苏省苏州市人, 汉族, 2019年苏州大学毕业, 博士, 助理研究员, 主要从事骨质疏松的防御和治疗及神经再生的研究。

**通讯作者:** 张鹏飞, 硕士, 主治医师, 解放军总医院第一医学中心神经外科医学部派驻第七医学中心神经外科, 北京市 100700

**共同通讯作者:** 韦善文, 硕士, 主管技师, 苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215000

<https://orcid.org/0000-0002-4382-3483> (邹明明)

**基金资助:** 国家自然科学基金面上项目(81571189), 项目负责人: 赛吉拉夫; 国家自然科学基金青年项目(81801238), 项目负责人: 李迪

**引用本文:** 邹明明, 倪莉, 周立宇, 李迪, 赛吉拉夫, 韦善文, 张鹏飞. 子宫内电穿孔转染胎鼠脑室管膜下区神经干细胞的条件优化 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(30):4879-4883.



Zou Mingming, PhD, Attending physician, Department of Neurosurgery, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100700, China

Ni Li, MD, Assistant researcher, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Zou Mingming and Ni Li contributed equally to this article.

**Corresponding author:** Zhang Pengfei, Master, Attending physician, Department of Neurosurgery, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100700, China

**Co-corresponding author:** Wei Shanwen, Master, Technologist-in-charge, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Neural stem cells are a group of cells that can self-proliferate and have multidirectional differentiation potential. In utero electroporation, which is the most direct and reliable method to study the development of cerebral cortex *in vivo*, can transduce RNA or plasmids into neural stem cells of mice to interfere with or overexpress target genes.

**OBJECTIVE:** To optimize the conditions of in utero electroporation by targeting neural stem cells in the subependymal region of embryonic mice and using enhanced green fluorescent protein as the reporter gene, so as to provide an effective method for studying the development of cerebral cortex.

**METHODS:** Adult ICR mice were mated at the ratio of one male to three female mice. The mice were caged at 8 p.m., and female mice with vaginal embolus were tested at 8 a.m. the next morning. The female mice with vaginal embolus were counted as 0.5-day pregnancy. On embryonic day 14 (E14), the pregnant mice were intraperitoneally anesthetized with ketamin (120 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After shaving off the hair of the pregnant mouse's abdomen and opening the abdominal cavity without cutting the pregnant mouse's uterus, pEx-4-eGFP plasmid was transfected into neural stem cells of the subependymal region of fetal mice at different voltages using ECM803 electroporation transfection instrument and BTX electrode. After 3 days of transfection, the transfected mouse brain tissue was removed and frozen sections were performed to observe the expression of enhanced green fluorescent protein fluorescence on the cerebral cortex. The number of enhanced green fluorescent protein-positive cells was counted to evaluate the transfection efficiency.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The survival and transfection effect of mice were different at 38, 40, 42, and 45 V. The mortality of fetal mice was less at 38 V, but the transfection efficiency was lower. Mice treated at 42 V survived and the fluorescence intensity of enhanced green fluorescent protein was higher in the brain tissue treated at 42 V than in the brain treated at 40 V. However, 45 V was more lethal to mice. Therefore, 42 V was a better transformation condition. (2) Under the condition of 42 V, enhanced green fluorescent protein positive cells were more and the fluorescence was brighter after the pulse was changed from 5 to 8. (3) The improved conditions had no effect on the growth of transfected cortical cells.

**Key words:** uterus; electroporation; transfection; neural stem cells; voltage; impulse; transfection efficiency

**Funding:** National Natural Science Foundation of China (General Project), No. 81571189 (to Saijilafu); National Natural Science Foundation of China (Youth Project), No. 81801238 (to LD)

**How to cite this article:** ZOU MM, NI L, ZHOU LY, LI D, SAIJILAFU, WEI SW, ZHANG PF. Optimization of conditions for intrauterine electroporation transfection in neural stem cells from the subependymal region of fetal mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2022;26(30):4879-4883.

## 0 引言 Introduction

神经干细胞也称神经前体细胞，是一群可以自我更新并具有多向分化潜能的细胞<sup>[1]</sup>，放射状胶质细胞是神经前体细胞的祖细胞<sup>[2]</sup>。在中枢神经系统发育过程中，脑室管膜下区和海马区是放射状胶质细胞分布最多的部位，它们可对称分裂维持前体细胞的数目，亦可不对称分裂产生多种类型的神经细胞<sup>[2]</sup>。放射状胶质细胞以特定的时间顺序增殖、迁移和分化<sup>[3]</sup>，从而产生大脑皮质特异性的多种类型神经元<sup>[4]</sup>，放射状胶质细胞内存在严格调控神经前体细胞自我增殖和分化的机制<sup>[5-6]</sup>。

成年哺乳动物的大脑皮质神经元排列成典型的板层结构，这种规则的板层结构是通过发育过程中神经元放射状迁移来实现的<sup>[7-8]</sup>。在大脑皮质的发育过程中，由室管膜下区的放射状胶质细胞或脑室管膜下区的中间前体细胞分化而来的神经元细胞，会沿着贯穿神经管内外壁的胶质细胞纤维向外迁移，抵达大脑皮质的特定位置<sup>[9]</sup>。人类有很多种发育性神经系统疾病是由神经元放射状迁移异常造成的<sup>[10-11]</sup>，这类疾病的患者大脑板层结构丧失，并伴随有癫痫和智障等症状。

子宫内电转染技术是研究神经发育过程中细胞增殖、分化、迁移和成熟等分子机制的一项重要技术<sup>[12-15]</sup>。它利用电脉冲在细胞膜上产生瞬时孔隙，在电场的作用下瞬时且靶向地将外源 RNA 或过表达质粒导入到目标细胞中，用来研究特定基因是如何参与哺乳动物神经系统的发育以及发育过程中

神经元之间是如何建立连接的<sup>[16]</sup>。电穿孔在体外研究中的使用由来已久，但近年研究将它的使用范围扩展到了完整的器官，如在子宫内发育的小鼠胚胎器官。

子宫内电穿孔转染技术具有转染方法高效简便、操作简单、可重复性强、费用低以及适用范围广等优势<sup>[17]</sup>。但是，电转效率和电转后胚胎小鼠的存活率及神经元生长状态受多种因素的影响，如电压、脉冲时间和 DNA 浓度等<sup>[18-19]</sup>。为了探索出更好的用于研究小鼠大脑皮质神经发生的最佳活体电转染方法，仍需对转染条件进行优化。该研究旨在改良小鼠活体电穿孔转染方法，从而提高对室管膜下区神经干细胞的转染效率，为大脑皮质的神经发生提供更有效的研究方法。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 小鼠子宫内电穿孔转染实验，以增强型绿色荧光蛋白表达作为转染成功的指标，观察转染 3 d 后胎鼠大脑皮质上增强型绿色荧光蛋白阳性细胞表达数和荧光强度，进一步培养皮质神经元评估转染后神经元轴突的生长情况。

**1.2 时间及地点** 实验于 2020 年 1 月至 2021 年 12 月在解放军总医院第一医学中心神经外科实验室完成。

**1.3 材料**

**1.3.1 实验动物** 2 月龄的成年 ICR 小鼠，饲养于解放军总医院第一医学中心 SPF 级动物房，所有动物实验均遵从解放军总医院第一医学中心动物伦理与使用委员会批准的实验方案

进行处理。

1.3.2 孕鼠的获得 2月龄的成年ICR小鼠,以1只雄鼠和3只雌鼠的比例进行交配,第1天晚上8点合笼开始交配,第2天早晨8点查验雌性小鼠的阴栓,有阴栓的雌鼠计为已怀孕0.5 d,待14 d时观察孕鼠腹部可见明显的隆起,此时可进行下一步的电转实验。

### 1.3.3 实验用仪器及试剂

(1) 仪器:活体基因电转仪ECM830(美国BTX公司);活体基因电转镊子电极(美国BTX公司);荧光显微镜(ZEISS, M1);玻璃微量注射管(Drummond, #5-000-1001-X10);注射泵(RWD);光学立体显微镜(OMT45-STL1);细胞培养箱(Thermo);冰冻切片仪(Leica 3050S, 德国);Picospritzer III压力注射系统(Parker公司);小鼠加热毯(RWD);毛细管显微注射针拉制仪(NARISHIGE);水浴锅、电子称、外科显微手术器械一套。

(2) 试剂:体积分数为75%乙醇、Triton X-100、体积分数为10%山羊血清、胎牛血清、0.01 mol/L磷酸盐缓冲液、生理盐水、安尔碘消毒剂、麻醉剂Ketamin(120 mg/kg)和Xylazine(10 mg/kg)、MEM培养基、Neurobasal培养基、青霉素和链霉素(Sigma);多聚-L-赖氨酸、胰酶(Life Technology);层粘连蛋白(Sigma);B27、GlutaMax 无菌去离子水、封固剂。

### 1.4 实验方法

1.4.1 子宫内电穿孔转染 腹腔注射Ketamin(120 mg/kg)和Xylazine(10 mg/kg)麻醉怀孕14 d的小鼠,待小鼠深度麻醉后剃掉腹部的毛发,用体积分数为75%乙醇对腹部皮肤进行消毒,之后剖开腹腔,将子宫暴露出来(子宫暴露后将预热的37℃生理盐水滴加在子宫上使子宫保持温度和湿润),采用拉细的毛细玻璃微量注射管(Drummond, #5-000-1001-X10)将1 μL pEx-4-eGFP质粒(2 000 mg/L)注射到胚胎的侧脑室里,用BTX电极夹住胚胎脑的两侧,进行电穿孔。电穿孔参数如下:电压(38, 42, 45 V);5个电脉冲;每个电脉冲持续50 ms,2个电脉冲之间间隔1 s;另外一组电转条件为电压42 V;8个电脉冲;每个电脉冲持续50 ms,2个电脉冲之间间隔1 s。电转结束之后,将胚胎放入孕鼠腹中,缝合伤口。3 d后,取出胚胎进行检测。

1.4.2 脑组织冰冻切片及荧光观察 电转染3 d后取出胎鼠脑组织浸于体积分数为4%的甲醛溶液中于4℃固定过夜,固定后依次使用10%, 20%, 30%的蔗糖溶液对组织进行梯度脱水,脑组织在每种梯度的蔗糖溶液中脱水24 h。脱水结束后用OCT组织包埋剂于-20℃下包埋脑组织进行冰冻切片,切片厚度为12-14 μm,待切片在室温下晾干后于荧光显微镜下进行拍片观察。

1.4.3 电穿孔脑组织转染率及荧光强度 于正置荧光显微镜下观察电转侧脑组织的大脑皮质是否有绿色荧光蛋白的表达,将有荧光表达的皮质在10×倍数下进行图片采集,每个脑组织采集10张切片用来数据分析。为了统计绿色荧光蛋白的荧光强度,所有切片在同一曝光度下进行图片采集。采

用Adobe photoshop软件统计大脑皮质整个层面上表达绿色荧光蛋白的神经元细胞数,采用Image J软件统计荧光强度,计算转染效率。

1.4.4 原代皮质神经元培养 在无菌环境下,去除多余脑组织,分离胎鼠皮质组织(E18),加入TrypLE™ Express于37℃消化5 min;消化后,使用含体积分数10%胎牛血清的MEM培养基终止残留的TrypLE™ Express活性,洗涤3次后,缓慢均匀吹散成单个细胞,离心沉淀神经元细胞(700 r/min, 6 min);去除MEM培养基,用含有B27、青霉素、链霉素、谷氨酰胺的神经元培养基缓慢均匀吹散细胞;最后取10 μL皮质神经元悬液计数,接种于24孔培养板(10 000/孔),置于37℃,体积分数5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养3 d。

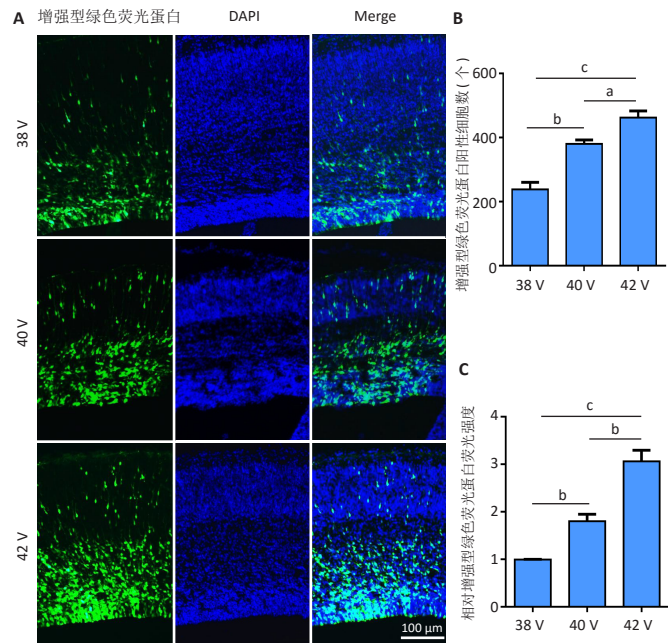
1.4.5 神经元轴突的测量 所有图像使用AxioVision 4.7软件(Carl Zeiss MicroImaging)处理,使用“测量/曲线”对所有图像进行分析。为了对轴突长度进行定量,仅拍摄轴突长度超过细胞胞体直径2倍的神经元,在随机选择的多个区域手动追踪每个神经元的 longest 轴突,进行3组独立实验,每组选择100个神经元测量其神经突长度。

1.5 主要观察指标 ①电转染脑组织中增强型绿色荧光蛋白阳性细胞的数目和荧光强度;②增强型绿色荧光蛋白阳性神经元的轴突生长情况。

1.6 统计学分析 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用GraphPad Prism 5.01和SPSS 15.0软件对实验数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 42 V电压电穿孔转染效果更佳 小鼠子宫内电穿孔转染的效果主要受电压和脉冲数的影响<sup>[20]</sup>,电压太小无法将DNA成功转入神经前体细胞内,电压太高又会致使胎鼠死亡,因此探索出合适的电压至关重要。为了探索出更好的用于小鼠子宫内电穿孔转染条件,将电转电压设为4个梯度,分别为38, 40, 42, 45 V,在其他参数不变的条件(5个电脉冲;每个电脉冲持续50 ms;2个电脉冲之间间隔1 s)进行活体子宫内电穿孔转染。首先向每只胎鼠的侧脑室内注射质量浓度约为2 000 mg/L的pEx-4-eGFP质粒后立刻进行电穿孔,电转结束后将子宫放入孕鼠腹腔中,滴加预热的生理盐水后进行缝合,小心护理待孕鼠苏醒。为了减小实验误差,不同电压的电穿孔在同一只孕鼠体内完成。待3 d后收取胎鼠脑组织进行切片检测,结果显示45 V的电压会致使胎鼠死亡,与较低的38 V电压相比,电压提高到40 V和42 V时,电转皮质上绿色荧光蛋白阳性的神经细胞数目增多,尤其42 V电压下,与38 V的电转电压相比,转染成功的细胞增多了1倍,见图1A, B, 荧光强度也显著增强,见图1A, C; 42 V电压比40 V电压电转的效果更佳,细胞数由400个增多到了460个。从以上数据可以得出这样的结论,42 V电压下电转对胎鼠的致死性低且转染效率最高,42 V是E14胎鼠的最佳转染电压。



图注：图 A 为电转后 3 d 的胎鼠脑组织冰冻切片，切片厚度为 12  $\mu\text{m}$ ，在蔡司正置荧光显微镜下采集图片，绿色为增强型绿色荧光蛋白，蓝色为细胞核的标记物 DAPI，标尺为 100  $\mu\text{m}$ ；B 为 A 图中绿色荧光蛋白阳性细胞数的统计，计数每张切片整个皮质中绿色荧光蛋白阳性细胞数，每个脑组织统计 8 个层面；C 为 A 图中单位面积内绿色荧光强度的统计。<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，<sup>b</sup> $P < 0.01$ ，<sup>c</sup> $P < 0.001$

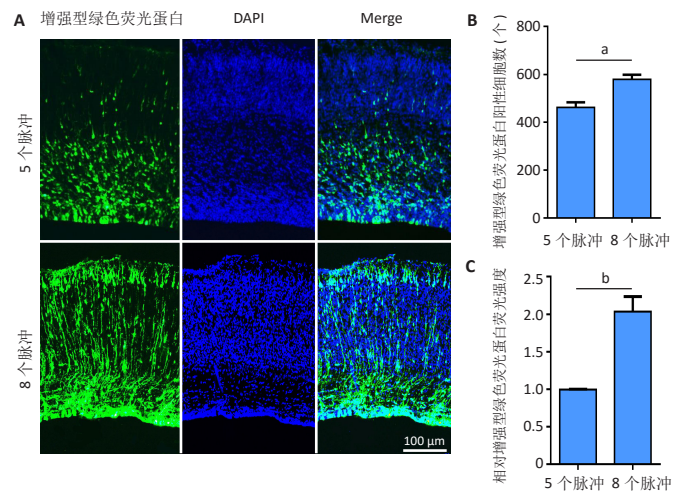
图 1 | 电压对转染效果的影响

Figure 1 | Influence of voltage on transfection effect

2.2 42 V 电压和 8 个脉冲的电转条件下子宫内电穿孔转染效率最高 脉冲数在电穿孔转染的参数中对转染效率起着重要的作用<sup>[21]</sup>，在电压为 42 V 的前提下，作者试图通过提高电转的脉冲数来改善电转的效果。选择在以下条件下进行转染：脉冲数为 5 和 8，42 V 电压，每个电脉冲持续 50 ms，2 个电脉冲之间间隔 1 s，通过数据统计分析发现，把脉冲数从 5 提高到 8 后，受转染大脑皮质上绿色荧光蛋白阳性的神经细胞数目增多且荧光强度增强，细胞数由 460 个增多到了 585 个，荧光强度也增强了 1 倍，见图 2A-C。以上数据显示，42 V 电压和 8 个脉冲以及每个电脉冲持续 50 ms，两个电脉冲之间间隔 1 s 的电转条件可有效改善小鼠子宫内电穿孔转染的效率。

2.3 受转染细胞生长状态良好 在大脑皮质的发育过程中，神经干细胞主要分化为神经元来搭建复杂的皮质神经网络<sup>[22]</sup>，因此，作者进一步检测了改良的电转条件是否对细胞的生长有影响。

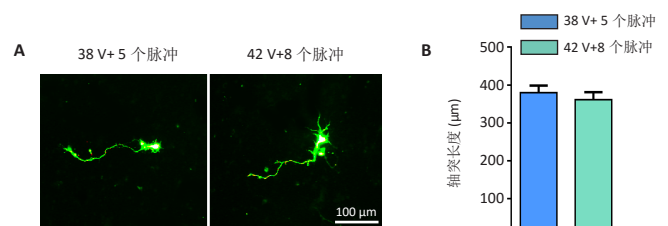
分离 E18 受转染胚胎小鼠的大脑皮质组织，用胰酶将分离的皮质组织消化为单个神经元细胞，之后将细胞接种于经层粘连蛋白和多聚赖氨酸包被过的 24 孔细胞培养板的玻片上进行培养，培养 3 d 后检测表达绿色荧光蛋白阳性神经元的轴突长度。结果显示，42 V 电压 8 个脉冲和 38 V 电压 5 个脉冲的电转条件下绿色荧光蛋白阳性神经元的轴突长度比较无显著差异，见图 3A, B，以上结果表明，42 V 电压 8 个脉冲的电转条件不影响胎鼠神经元的正常生长。



图注：图 A 为 5 个和 8 个脉冲数下进行子宫内转染，脑切片进行 DAPI 染色后观察绿色荧光蛋白在相应皮质神经细胞上的表达，标尺为 100  $\mu\text{m}$ ；选不同层面的 8 张脑组织切片进行统计，用 ImageJ 软件分析每张切片上所有增强型绿色荧光蛋白阳性细胞的数目 (B) 和绿色荧光的荧光强度 (C)，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，<sup>b</sup> $P < 0.01$

图 2 | 脉冲数对转染效果的影响

Figure 2 | Influence of pulse number on transfection effect



图注：图 A 为子宫内电转后 3 d，用胰酶将胚胎小鼠大脑皮质组织消化为单个神经元后进行培养，待细胞生长 3 d 进行观察，用 AxioVision 4.72 软件进行轴突长度的测量，统计轴突长度大于神经元胞体直径的神经元轴突，绿色为转染神经元，标尺为 100  $\mu\text{m}$ ；B 为 A 图中绿色荧光蛋白阳性神经元轴突长度的统计

图 3 | 改良后的电转条件对神经细胞生长的影响

Figure 3 | Effect of modified electrical transfer conditions on nerve cell growth

### 3 讨论 Discussion

在神经系统尤其是大脑的发育过程中，研究某些基因对大脑的调控作用通常有以下几种方法对特定基因进行干扰或过表达：其一，可用条件性基因敲除小鼠来针对性研究，但是基因敲除小鼠有它的不足，一方面是费用昂贵，另一方面是有些基因敲除小鼠在胚胎期就会死亡，这给神经系统发育的研究带来了不便，此外，基因敲除小鼠不能用于研究特定基因在特定时间点的功能；第二种常用的方法是采用转染试剂如常用的 Lipofectamine 2000 将目标 RNA 和 DNA 等转染到相应细胞内进行研究，但是目前常用的转染试剂盒在原代细胞上的转染受限，不能在体外和体内转染原代细胞。还有一种常用的方法是采用病毒包被目的基因对相应组织进行感染，但是病毒的侵染一般需要两三天来完成，在时间上存在一定的缺陷。因此，科学家们在神经系统的转染上探索出来电穿孔转染，目前，此技术已广泛应用在神经系统的发育研

究中<sup>[20, 23-25]</sup>。此转染技术花费低且可在体内将各类 RNA 或质粒瞬时转入细胞内发挥作用,可方便快捷地干预基因的表达,可定时研究某一分子在特定脑区域和发育时间段的功能,这为神经系统发育的研究带来了便利。

大脑皮质的发育受多种基因和信号通路时空性的调控<sup>[4, 26]</sup>。在胚胎发育时期,大脑皮质深层神经元在 E16 时基本完成,而上层神经元是在 E16 时开始形成, E14 时的室管膜下区神经前体细胞可形成上层神经元<sup>[2, 27]</sup>。因此,在 E14 时对神经前体细胞进行标记可用来研究特定基因对神经前体细胞增殖及上层皮质神经元分化及迁移的影响,这为一些因皮质上层神经元发育异常引起的神经疾病提供了理论基础。

已有的子宫内电转条件可成功转染一小部分神经前体细胞,而小部分转染的细胞在实验过程中容易产生比较大的统计误差。因此,改良的电转条件很大程度上克服了这一不足,更多神经前体细胞被成功转染就会有足够多数目的神经干细胞和神经元用来进行统计分析,可有效提高实验数据的准确性。

对小鼠子宫内电转条件进行了改良,分别提高了电转电压和脉冲数,结果表明,电压由常用的 38 V 提高到 42 V 时大脑皮质的转染效果明显增强,绿色荧光阳性细胞数目增多了 45%–48%,绿色荧光的强度也明显增强。之后,作者在提高电压的基础上将脉冲数由常用的 5 个脉冲改为 8 个脉冲,电转结果表明,与 5 个脉冲的电转相比,8 个脉冲有效增强了电转效率。实验中发现,将电压提高到 45 V 而所有其他条件不变的情况下,受电转胚胎难以存活。虽然 42 V、8 个脉冲的转染条件提高了转染效率,但是受转染细胞的生长是否会受影响需要验证,因此,培养了转染 3 d 后胎鼠的大脑皮质神经元,观察了神经元轴突的生长情况,与 38 V、5 个脉冲的转染条件相比,电压和脉冲数分别提高到 42 V、8 个脉冲时,神经元轴突生长没有受到影响。以上结果表明,改良后的转染条件可有效提高子宫内电穿孔转染的效率,这为采用子宫内电穿孔转染技术研究小鼠大脑皮质发育奠定了基础。子宫内电穿孔转染除了能用于转染脑室管膜下区的神经前体细胞外,也可用于转染海马区的神经前体细胞和神经元<sup>[28-29]</sup>,但是改良后对海马的转染效果没有检测,这需要进一步的实验验证。

**作者贡献:** 实验设计为邹明明、张鹏飞、倪莉,实验实施为邹明明、韦善文,实验评估为赛吉拉夫,资料收集为李迪、倪莉、周立宇。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金面上项目(81571189)”及“国家自然科学基金青年项目(81801238)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经解放军总医院第一医学中心动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过解放军总医院第一医学中心生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容进行编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] 方富贵,张丽霞,李福宝.神经干细胞的研究进展[J].四川畜牧兽医,2002,29(11):28-29,31.
- [2] TEMPLE S. The development of neural stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):112-117.
- [3] GUY B, ZHANG JS, DUNCAN LH, et al. Human neural organoids: Models for developmental neurobiology and disease. *Dev Biol*. 2021;478:102-121.
- [4] GUILLEMOT F, MOLNÁR Z, TARABYKIN V, et al. Molecular mechanisms of cortical differentiation. *Eur J Neurosci*. 2006;23(4):857-868.
- [5] DOUGLAS RJ, MARTIN KA. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:419-451.
- [6] GUO Z, CHEN M, CHAO Y, et al. RGCC balances self-renewal and neuronal differentiation of neural stem cells in the developing mammalian neocortex. *EMBO Rep*. 2021;22(9):e51781.
- [7] RAKIC P, LOMBROSO PJ. Development of the cerebral cortex: I. Forming the cortical structure. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1998;37(1):116-117.
- [8] WANG XL, MA YX, XU RJ, et al. c-Myc controls the fate of neural progenitor cells during cerebral cortex development. *J Cell Physiol*. 2020;235(4):4011-4021.
- [9] WU S, WEI T, FAN W, et al. Cell cycle during neuronal migration and neocortical lamination. *Int J Dev Neurosci*. 2021;81(2):209-219.
- [10] LIU HK, WANG Y, BELZ T, et al. The nuclear receptor tailless induces long-term neural stem cell expansion and brain tumor initiation. *Genes Dev*. 2010;24(7):683-695.
- [11] REIF A, FRITZEN S, FINGER M, et al. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry*. 2006;11(5):514-522.
- [12] POTTER H. Transfection by electroporation. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 10:Unit 10.15.
- [13] POTTER H. Transfection by electroporation. *Curr Protoc Mol Biol*. 2003;Chapter 9:Unit 9.3.
- [14] PACARY E, GUILLEMOT F. In Utero Electroporation to Study Mouse Brain Development. *Methods Mol Biol*. 2020;2047:513-523.
- [15] MEYER-DILHET G, COURCHET J. In Utero Cortical Electroporation of Plasmids in the Mouse Embryo. *STAR Protoc*. 2020;1(1):100027.
- [16] 冯永杰,陈溪萍,黄娅,等.胎鼠子宫内电穿孔检测胎鼠脑生物学形态指标[J].中国血液流变学杂志,2013,23(3):395-397.
- [17] 詹从清,黄静,魏燕燕,等.小鼠大脑皮质神经元电穿孔转染条件的优化[J].神经解剖学杂志,2011,27(3):253-257.
- [18] 徐锋,吕杨,谢院生,等.原代大鼠肾小球系膜细胞最佳电转染条件的探索和验证[J].解放军医学院学报,2010,31(5):459-461.
- [19] 韦善文,马艳霞.小鼠背根神经节取材与电穿孔转染的条件优化[J].中国血液流变学杂志,2018,28(4):377-379.
- [20] 陈鑫,卢亦成.子宫内电穿孔技术在神经系统发育中的研究[J].国际神经病学神经外科学杂志,2009,36(6):542-544.
- [21] KUBINIEC RT, LIANG H, HUI SW. Effects of pulse length and pulse strength on transfection by electroporation. *Biotechniques*. 1990;8(1):16-20.
- [22] 岳英杰,费昶,张健.神经干细胞向神经元分化调控的研究进展[J].现代生物医学进展,2012,12(3):584-587.
- [23] ROSIN JM, KURRASCH DM. In utero electroporation induces cell death and alters embryonic microglia morphology and expression signatures in the developing hypothalamus. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):181.
- [24] HAMABE-HORIIKE T, KAWASAKI K, SAKASHITA M, et al. Glial cell type-specific gene expression in the mouse cerebrum using the piggyBac system and in utero electroporation. *Sci Rep*. 2021;11(1):4864.
- [25] TANIGUCHI Y, YOUNG-PEARSE T, SAWA A, et al. In utero electroporation as a tool for genetic manipulation in vivo to study psychiatric disorders: from genes to circuits and behaviors. *Neuroscientist*. 2012;18(2):169-179.
- [26] PRODRONIDOU K, PAPAISTEFANAKI F, SKLAVIADIS T, et al. Functional cross-talk between the cellular prion protein and the neural cell adhesion molecule is critical for neuronal differentiation of neural stem/precursor cells. *Stem Cells*. 2014;32(6):1674-1687.
- [27] MA YX, WANG XL, CHEN JQ, et al. Differential Roles of Glycogen Synthase Kinase 3 Subtypes Alpha and Beta in Cortical Development. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:391.
- [28] MURALIDHARAN B, D'SOUZA L, TOLE S. An Efficient System for Gene Perturbation in Embryonic Hippocampal Progenitors Using Ex Vivo Electroporation Followed by In Vitro Dissociated Cell Culture. *J Exp Neurosci*. 2018;12:1179069518767404.
- [29] WANG K. Manipulating Potassium Channel Expression and Function in Hippocampal Neurons by In Utero Electroporation. *Methods Mol Biol*. 2018;1684:1-5.

(责任编辑: MZH, ZN, SX)