



北京大学

# 生命科学学院研究生 资格考试书面报告

题目： 小胶质细胞在睡眠剥夺  
状态中的生理变化

姓 名： 王睿宇  
学 号： 1801110448  
院 系： 生命科学学院  
专 业： 生物学  
研究方向： 神经生物学  
导师姓名： 罗敏教授

二〇二〇年十一月

## 版权声明

任何收存和保管本论文各种版本的单位和个人，未经本论文作者同意，不得将本论文转借他人，亦不得随意复制、抄录、拍照或以任何方式传播。否则，引起有碍作者著作权之问题，将可能承担法律责任。

## 摘要

作为中枢神经系统中的常驻髓细胞，小胶质细胞在神经系统的发育、神经可塑性、神经损伤修复、炎症应答、以及神经系统性疾病的发展中发挥了重要作用。在睡眠与生物节律方面，小胶质细胞的功能没有得到充分的研究。正常的生物节律与睡眠周期是人类健康的基础，睡眠缺失状态下小胶质细胞会发生怎样的生理变化，以及这种生理变化是否会导致神经系统疾病，这些问题对人们理解睡眠及其生物学功能至关重要。本课题拟采用形态学、单细胞转录组学、行为学等方法，对睡眠剥夺或生物节律紊乱状态下小鼠的小胶质细胞进行研究。初步结果发现，小胶质细胞对动物的运动节律可能有稳定和调节作用，对 NREM 睡眠有抑制作用；单细胞转录组数据结果表明，经睡眠剥夺后，小胶质细胞亚群表现出疾病相关的转录组状态。

**关键词：**小胶质细胞，睡眠剥夺，单细胞测序

# Physiological functions and alterations of microglia in the CNS under acute and chronic sleep deprivation

Ruiyu Wang

Directed by Minmin Luo

## ABSTRACT

As the resident myeloid cells of the CNS, microglia are deemed to be involved in a variety of aspects of biological processes including neurodevelopment, neural plasticity, nerve repair, inflammation response and the development of neurodegenerative diseases. However, the role of microglia in sleep and circadian is poorly understood. In the modern society, chronic sleep deprivation has become increasingly prevalent in the individuals' lifestyle which frequently undermines the physical and psychological fitness of the general public. In the present study, the physiological roles of microglia during sleep deprivation are examined with morphological assays, single cell transcriptomics, and behavioral assays. Preliminary data show that loss of microglia in mouse induced a leftward shift of the phase of daily locomotor rhythms and increased the amount of time spent in NREM sleep stage. Single cell transcriptomics data show that mouse underwent sleep deprivation develop subsets of distinct microglia populations that exhibit either a disease-associated phenotype, or a unique sleep-associated phenotype.

KEY WORDS: Microglia, Sleep deprivation, Single cell RNA sequencing

## 目录

<b>第一章 研究背景及文献综述.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 小胶质细胞的发现及历史研究.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 小胶质细胞的发现 .....	1
1.1.2 小胶质细胞的发育来源 .....	2
1.1.3 突触剥离（Synaptic stripping） .....	3
1.1.4 技术革新推动生理研究 .....	3
<b>1.2 近期小胶质细胞领域的研究进展.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 双光子成像揭示“静息”状态小胶质细胞胞突的动态活动 .....	4
1.2.2 小胶质细胞在发育过程中介导突触修剪 .....	5
1.2.3 单细胞测序全面刻画小胶质细胞的分子生物学特征.....	6
<b>第二章 实验设计与方法.....</b>	<b>9</b>
2.1 实验材料 .....	9
2.2 实验方法 .....	10
2.2.1 睡眠剥夺 .....	10
2.2.2 形态学样本收集 .....	11
2.2.3 10X 单细胞测序：小胶质细胞的分离 .....	11
2.2.4 10X 单细胞测序数据分析 .....	12
<b>第三章 前期实验结果与讨论.....</b>	<b>14</b>
3.1 小胶质细胞缺失导致动物运动节律相位发生偏移.....	14
3.2 EEG 记录表明小胶质细胞缺失小鼠 NREM 睡眠增加 .....	15
3.3 10X 单细胞测序揭示睡眠剥夺后小胶质细胞转录组变化.....	16
<b>第四章 未来研究计划及方案设计.....</b>	<b>20</b>
4.1 搭建 fMOST 形态学数据分析管线 .....	20
4.2 开发小胶质细胞吞噬活力指示物 .....	22
<b>第五章 参考文献.....</b>	<b>24</b>

## 主要符号和缩写对照表

- ATM: Axon Tract-Associated Microglia 轴突束相关小胶质细胞  
BBB: Blood Brain Barrier 血脑屏障  
DAM: Disease Associated Microglia 疾病相关小胶质细胞  
dLGN: dorsal Lateral Geniculate Nucleus 外背侧膝状核  
EEG: Electroencephalogram 脑电图  
FISH: Fluorescent in situ hybridization 荧光原位杂交  
fMOST: fluorescence Micro-Optical Sectioning Tomography  
FNX: Facial Nerve Axotomy 面神经切开术  
IEG: Immediate Early Genes 早先表达基因  
PAM: proliferative-region-associated microglia 增殖区相关小胶质细胞  
RGC: Retinoganglion Cells 视网膜神经节细胞  
REM Sleep: Rapid Eye Movement Sleep 快速动眼睡眠  
NREM Sleep: Non-Rapid Eye Movement Sleep 非快速动眼睡眠

## 第一章 研究背景及文献综述

正常的节律作息与充足的睡眠和人们的生理、心理健康息息相关。目前，学界积累的研究证据对生物节律紊乱或睡眠剥夺情形下小胶质细胞的生理状态没有确切的定论，甚至有相当一部分观点是矛盾的。例如，有研究认为长期睡眠剥夺（Chronic sleep restriction）下的小胶质细胞维持在稳定状态（Homeostatic state）(Hall et al., 2020)；但也有研究称睡眠剥夺后小胶质细胞的突触修剪功能发生紊乱，导致动物短期记忆（Short term memory）受损(Tuan and Lee, 2019)。为了澄清睡眠剥夺或生物节律紊乱情形下小胶质细胞的确切状态，本研究计划通过形态学、单细胞转录组学、行为学等研究方法，刻画小胶质细胞在睡眠剥夺或生物节律紊乱时的变化，探索小胶质细胞在睡眠和节律中的潜在功能，并尝试在转录组水平揭示参与这一功能的分子通路。

### 1.1 小胶质细胞的发现及历史研究

小胶质细胞被认为是中枢神经系统中唯一的常驻型髓细胞（resident myeloid cells）。近十几年来，大量工作针对小胶质细胞的生物学功能开展了研究，揭示了小胶质细胞在神经系统发育，神经网络的维持与调节，神经系统损伤和修复，以及神经退行性疾病等过程中所扮演的重要作用(Colonna and Butovsky, 2017)。在本小节，我首先对小胶质细胞领域的开端进行回顾，对历史上已经形成确切结论的几项经典工作作出总结，结合这些经典研究的结果讨论本课题中值得关注的问题。

#### 1.1.1 小胶质细胞的发现

20世纪初，著名的神经解剖学家，1906年诺贝尔生理或医学奖获得者 Santiago Ramón y Cajal 在同事 Nicolás Achúcarro 的启发下，开始着手从事胶质细胞的研究。通过开发新的染色方法，Cajal 清晰地观测到了含有丰富纤维形态的一类细胞并将其命名为星状胶质细胞，但这一染色方法对其他胶质细胞的染色效果不佳，无法观察到任何纤维结构。根据这一结果，Cajal 将其他胶质细胞（实际包括了寡突胶质细胞与小胶质细胞两类）命名为“无极细胞（apolar cells）”或“第三元素（third element）”，以此象征这类细胞的次要地位。不久，年轻学者 Río-Hortega 加入了 Achúcarro 实验室，使用系统的实验策略开发出了新的染色方法。通过这一新方法，Hortega 更正了 Cajal 的观点：所谓的“第三元素”实际包含了寡突胶质细胞及小胶质细胞两类细胞。Hortega 通过观察记录小胶质细胞的一系列特征，对它们做了进一步阐述：**小胶质细胞发生自中胚层，在**

发育上与白细胞是近缘，能够通过吞噬作用清除细胞碎片或树突棘；在外来损伤的刺激下，小胶质细胞会发生形态变化，并伴随着空间迁移和数量增殖……Hortega 敏锐的观察为后人研究留下了宝贵的财富，他的许多猜测亦在后来的研究中被证实(Sierra et al., 2019)。

### 1.1.2 小胶质细胞的发育来源

在早期的小胶质细胞领域中，争论的焦点之一是小胶质细胞的发育来源。这一问题最早由 John Kershman 在 1939 年的一篇论文中提出并作了分析(Kershman, 1939)。在这篇论文中，Kershman 描述道：发育过程中，小胶质细胞成群结队地出现在大脑特定的区域，这些区域与中胚层毗邻，而小胶质细胞如喷泉一般涌入其中（microglial fountains）。他的洞见随即转化为两派富有争议的观点：一派认为小胶质细胞有外胚层（ectodermal）和中胚层（mesoderm）两个来源，持这一观点的包括著名神经病理学家 Alzheimer 等人；另一派认为小胶质细胞全部来源于中胚层（mesoderm），持这一观点的包括 Nissl、Cajal、Hortega 等人(Sierra et al., 2016)。这一争论一直持续到 20 世纪 80 年代，直到 Ling 等人(Ling et al., 1980)采用碳胶体颗粒标记法进行了系统性的发育轨迹解析（fate mapping），才确切确定了第二派的观点是正确的：所有小胶质细胞均为中胚层来源。随后，Ginhoux 等人(Ginhoux et al., 2010)又通过精妙的 fate mapping 实验，确认了小胶质细胞“侵入”中枢神经系统的准确时间段——胚胎期第 8 天（E8）前，以及小胶质细胞发生的来源——卵黄囊（yolk sac）。小胶质细胞侵入中枢神经系统后随即展开自我增殖，填充中枢神经系统的所有空间，且细胞与细胞之间各自占据一定“领土”（territory），基本不发生空间上的重叠。

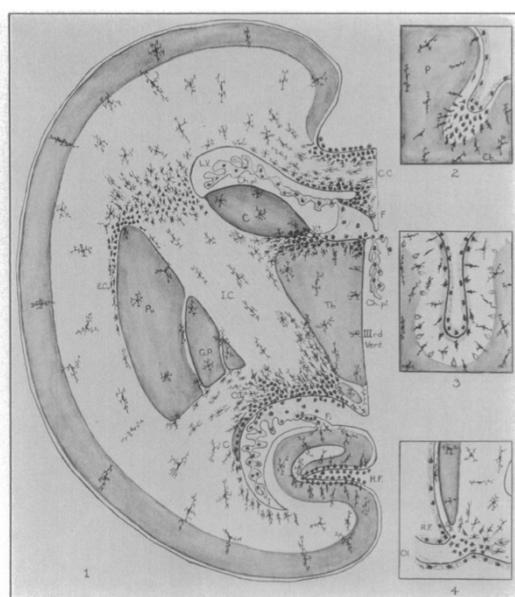


图 1 Kershman 手稿：小胶质细胞喷泉（microglia fountains）(Kershman, 1939)

历史文献的结论明确了小胶质细胞来源于外周髓细胞系。这说明小胶质细胞的生物节律也许与外周同为髓细胞系的巨噬细胞有相似之处。有文献报道，在急性肝衰竭（acute liver failure, ALF）模型中，敲除外周巨噬细胞的节律基因 Per1 后会引发更为严重的炎症表型(Wang et al., 2016)，据此有理由推测，Per1 基因可能在小胶质细胞中节律性表达，并且在抗神经炎症过程中发挥重要作用。

### 1.1.3 突触剥离 (Synaptic stripping)

从 20 世纪 40 年代至 70 年代，小胶质细胞研究领域经历了一段长时间的停滞，直到 1968 年，Karlheinz Blinzingger 与 George Kreutzberg(Blinzinger and Kreutzberg, 1968) 开发了一项新的实验范式——面神经切开术 (Facial nerve axotomy, FNX) 并借此做出了重要的发现，才重新振兴了整个领域。使用电子显微镜，Blinzinger 与 Kreutzberg 观察了面神经核 (Facial Nucleus) 小胶质细胞的亚细胞形态特征，他们发现大鼠经面神经切开后，同侧面神经核中的小胶质细胞往往与核团内运动神经元产生紧密的接触。文章描述道：小胶质细胞与运动神经元的胞质和主树突产生广泛的接触，将伪足伸入突触间隙，似乎在此移除神经元的突触连接。他们将这一现象命名为突触剥离 (Synaptic stripping)。

突触是决定神经系统可塑性的重要结构单元，主流神经生物学观点认为突触可塑性主要由 LTP、LTD 形成。突触剥离现象的发现将小胶质细胞的生物学功能与神经系统可塑性紧密联系在了一起。近期的一篇文献中报道了小胶质细胞可以通过补体系统实施突触清除，从而介导了遗忘过程(Wang et al., 2020)，说明小胶质细胞在学习记忆中扮演了重要作用。睡眠领域一种主流观点认为睡眠的作用之一是记忆巩固 (Memory consolidation) (Rasch and Born, 2013)。小胶质细胞是否能够通过胞吞作用参与睡眠中记忆巩固的过程？本课题计划通过形态学以及小胶质细胞胞吞指标验证这一猜想。

### 1.1.4 技术革新推动生理研究

从 1968 年起到 20 世纪末，小胶质细胞领域迎来了一系列技术和理论的发展。多种研究工具被接连开发并投入使用，伴随着这些工具的诞生，小胶质细胞的生理特性得到了更加清楚的解析。1986 年，Giulian 与 Baker 开发了小胶质细胞的体外培养方法 (Giulian and Baker, 1986)，使得小胶质细胞的体外功能研究变成了可能。这一方法在当时得到了迅速传播。1988 年和 1989 年，Hetier 等人与 Sawada 等人利用细菌内毒素 LPS (Lipopolysaccharide) 刺激诱导小胶质细胞，分别观察到了 IL-1 $\beta$  释放和 TNF- $\alpha$  释放的表型，暗示小胶质细胞可能在免疫应激状态下介导中枢神经系统的炎症。1990 年，Kettenmann 等人利用膜片钳 (patch-clamp) 研究了小胶质细胞的电生理学特性，发现它与同为髓细胞系的巨噬细胞在膜电流特性上完全不同(Kettenmann et al., 1990)；进一

步地, Madry 等人后来发现钾离子通道活性对小胶质细胞的功能起到调节作用(Madry et al., 2018)。1992 年, Bocchini 等人通过 v-raf/v-myc 逆转录病毒侵染鼠源的小胶质细胞的方式, 得到了 BV-2 细胞系, 这一细胞系得到了广泛的应用(Bocchini et al., 1992)(Pluvinage et al., 2019)。1993 年, Walz 等人通过膜片钳证明了小胶质细胞具有嘌呤受体, 可以与胞外 ATP 结合发生激活反应(Walz et al., 1993)。在数据不断积累的过程中, 小胶质细胞领域的学者很快意识到, 小胶质细胞的体外 (*in vitro*) 生理特征与在体 (*in vivo*) 生理特征具有很大差异。1998 年, Iba1 分子被克隆, 相应的抗体投入生产, 自此, 小胶质细胞得以在在体的形式被特异标记出来, 极大推进了小胶质细胞在体生理功能的研究(Ito et al., 1998)。

经过几十年的研究, 领域内对小胶质细胞的主要功能和特点形成了以下几点共识:

- 1) 中枢神经系统的小胶质细胞可以在“静息”(resting) 和“激活”(reactive) 两种状态之间切换。在没有异源物质刺激的情况下, 小胶质细胞表现为“静息”态, 此时小胶质细胞在形态上伸出分叉的胞突 (processes) 结构, 不主动释放促炎细胞因子; 而在有异源物质刺激 (如血脑屏障 (BBB) 泄露、机械损伤、神经元死亡、神经炎症等) 的情况下, 小胶质细胞会发生形态上的转变, 胞突结构膨胀收缩, 细胞由分支形态转变为圆球形, 同时伴随空间位置的迁移, 爬向异源物质 (如死亡细胞的碎片、血液成分、入侵病原体等) 所在位置, 通过胞吞作用清除异物。
- 2) 小胶质细胞发育自中胚层的髓细胞系, 具有单核细胞的特征 (monocytes), 与外周巨噬细胞在发育上同源。在卵黄囊期, 单核细胞自卵黄囊经脉络丛等区域进入中枢神经系统, 分化为小胶质细胞, 增殖并铺满整个中枢神经系统。

## 1.2 近期小胶质细胞领域的研究进展

近年来, 随着生物技术的进步以及多学科交叉研究的发展, 小胶质细胞的生理特征在新方法的帮助下得到了更加精细地研究。新的成像技术, 如共聚焦显微镜、双光子显微镜, 帮助生物学家揭示了小胶质细胞的崭新活动特征; 组学方法如 RNAseq、scRNAseq、ATACseq 技术, 帮助生物学家全面地刻画了生理和病理状态下小胶质细胞的转录组、表观遗传组状态, 将小胶质细胞的生理特征与神经炎症、神经退行性疾病联系起来。

### 1.2.1 双光子成像揭示“静息”状态小胶质细胞胞突的动态活动

2005 年, 两篇高影响力的文章分别在 Science 和 Nature Neuroscience 发表, 标识了

小胶质细胞领域的研究范式进入新阶段。两篇文章的作者，Nimmerjahn 等人(Nimmerjahn et al., 2005)与Davalos等人(Davalos et al., 2005)，利用Cx3cr1<sup>GFP/+</sup>小鼠品系与在体双光子显微镜成像系统，观察了小胶质细胞在“静息”状态(resting state)下的动态形态特征。两组作者发现，即便是“静息”状态的小胶质细胞，其胞突结构依然展现出高度活跃的动态特征，意味着小胶质细胞在所谓的“静息”状态下实际上并不是完全静止的，而是在积极监视(surveying)着周围环境。鉴于这一发现，学界有人提出修改过去使用的术语，不再将非激活小胶质细胞的状态称为“静息”状态，而改称为“稳定”(homeostatic)状态(Hanisch and Kettenmann, 2007)，以表明该状态下的小胶质细胞并非处于绝对静止，而是活跃地履行着监视环境的职能的。

借助同样的实验手段，两篇文章的作者观察了小胶质细胞处于激活状态时的形态变化。他们发现当使用激光烧蚀小胶质细胞周围的组织时，烧蚀点附近的小胶质细胞迅速反应，胞突变粗且向烧蚀点延伸。此外，当使用微电极向环境中加入ATP时也可以诱导小胶质细胞的形态变化，意味着小胶质细胞的形态学反应依赖于ATP。

### 1.2.2 小胶质细胞在发育过程中介导突触修剪

1968年Blinzinger与Kreutzberg发现的突触剥离现象，提示人们尽管小胶质细胞与单核细胞是属于同一谱系的细胞，但其在中枢神经系统的生物学功能可能并不局限于应对炎症反应。在2007年与2012年，Ben Barres实验室的Stevens等人与Schafer等人接连发表了两篇重要工作(Stevens et al., 2007)(Schafer et al., 2012)，揭示了小胶质细胞表达的补体受体C3R，通过与神经元释放的补体分子(Complement)互作，介导了发育过程中突触修剪过程。在两篇文章中，作者使用小鼠视网膜-膝状核系统(retinogeniculate system)作为研究对象。发育早期，该系统双侧视网膜神经节细胞(RGC)与双侧外背侧膝状核(dLGN)的中继神经元产生密集的突触连接，这些连接随即在发育过程中经历频繁的突触修剪，最终在dLGN形成特异的投射模式(eye-specific territories)。作者使用多色CTB标记与高分辨率共聚焦显微镜成像，发现在P5发育阶段，dLGN的小胶质细胞具有很高的胞吞活性，且这些被胞吞的CTB颗粒大部分定位在溶酶体中。进一步的功能实验表明，当敲除小鼠的补体受体CR3后，小胶质细胞的胞吞活性大幅减弱，且RGC末端在dLGN中的投射特征会呈现持久的异常(sustained deficits in eye-specific segregation)。

这一成果与2005年的两项双光子成像实验，将小胶质细胞领域的研究引领向了新的范式。小胶质细胞的生理学功能在这几项工作的基础上得到了拓展。传统意义上普遍认为小胶质细胞主要在中枢神经系统疾病、神经损伤和炎症中扮演重要功能，而这几项工作的结果说明，在非病理状态和神经系统发育过程中，小胶质细胞依然发挥着重要职能(Schafer and Stevens, 2015)。

### 1.2.3 单细胞测序全面刻画小胶质细胞的分子生物学特征

单细胞测序技术是近 10 年来飞速发展的一项转录组学技术。在小胶质细胞领域，多个课题组利用单细胞测序技术刻画了小胶质细胞在生理、病理等多种状态下转录组的变化特征。2017 年，Ido Amit 课题组的 Keren-Shaul 等人使用 MARS-seq 技术研究了神经退行性疾病 Alzheimer Disease (AD) 模型鼠 5XFAD 中小胶质细胞的单细胞转录组状态(Keren-Shaul et al., 2017)。作者通过详实的数据分析，发现了两群与野生型小鼠小胶质细胞状态完全不同的细胞，并将其定义为疾病相关小胶质细胞（Disease-associated microglia, DAM）。与正常生理状态的小胶质细胞一样，DAM 的转录组中表达了大量“稳定”态小胶质细胞的标志基因 (homeostatic signature genes)，如 Cx3cr1、P2ry12、P2ry13、Tmem119、Hexb 等。但与正常小胶质细胞不同的是，DAM 中有一系列已知的 AD 风险基因发生了上调，包括 Apoe、Ctsd、Lpl、Tyrobp、Trem2；同时，DAM 中稳态基因的表达水平与正常小胶质细胞相比发生了下调。基因富集分析与 GO 分析发现 DAM 的特征表达基因主要参与了溶酶体-细胞吞噬通路，内吞作用，以及免疫反应调节，说明 DAM 可能处于类似于激活的小胶质细胞的状态。进一步利用 kNN 图进行二维降维分析表明，DAM 的激活态渐次可分为 Stage 1 DAM 与 Stage 2 DAM 两种不同的状态，其中 Stage 1 DAM 的激活不依赖于 Trem2 通路，而 Stage 2 DAM 依赖 Trem2 通路。通过单分子荧光原位杂交 (smFISH) 技术，作者也发现 DAM 在空间上常定位于 AD 老年斑 (AD plaques) 附近。

2019 年初，三篇小胶质细胞的单细胞测序文章在 Immunity、Neuron、Nature 期刊上接连发表。这三篇文章均对小鼠不同成长阶段、不同生理状态下的小胶质细胞进行了单细胞测序，但各自的侧重点不同。

Hammond 等人(Hammond et al., 2019)通过测序和分析不同样本的 76000 余个小胶质细胞，总结认为小胶质细胞转录组具有异质性 (Heterogeneity)，且异质性在发育阶段表现最明显。通过 smFISH 技术，作者发现这种异质性可能是由小胶质细胞空间差异分布所导致的。例如，在胎鼠早期 (P4/P5) 大脑中，一类小胶质细胞亚群高表达 Spp1 基因，且空间上定位于轴突束附近，作者因此将其命名为轴突束相关小胶质细胞 (Axon Tract-Associated Microglia, ATM)。在老年小鼠中，作者发现了部分小胶质细胞表现出炎症应激状态，且这部分细胞可以进一步细分为不同的炎症亚群。最后，作者使用局部脱髓鞘模型 (focal demyelination，用于模拟多发性硬化症 (MS))，对皮层下白质注射 LPC (lysolecithin)，在注射后第 7 天取出小胶质细胞进行单细胞测序。作者发现，LPC 注射处理的小胶质细胞的稳态基因 (Cx3cr1, P2ry12) 水平发生下调，而其他一些激活相关的基因如 Birc5、Cxcl10、Apoe 等则发生上调，作者将类细胞命名为损伤响应小胶质细胞 (Injury-responsive Microglia, IRM)，并且发现这些细胞在 MS 病人样本中亦有

出现。

Masuda 等人(Masuda et al., 2019)与 Hammond 等人持有类似的观点，认为小胶质细胞转录组具有异质性。通过细致的实验设计，Masuda 探讨并确认了小胶质细胞具有空间和时间异质性。作者通过无监督学习聚类算法定义了 13 个小胶质细胞亚群（包括 10 个发育阶段亚群 C1-C10，1 个神经退行相关亚群 C11，以及脱髓鞘和髓鞘再生相关亚群 C12、C13），发现这些亚群偏好性地富集在不同发育时间、组织来源的细胞群中。通过基因差异表达分析，作者发现，在发育阶段亚群 C1、C2 中，溶酶体相关的基因 Ctsb、Ctsd、Lamp1 具有较高表达水平；在发育阶段亚群 C1、C4、C5 中 Apoe 表达水平发生上调；而在发育阶段亚群 C9、C10 中，两个神经退行性疾病相关基因 Sparc、Cst3(半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白)的表达水平发生了上调。使用毒性脱髓鞘法(cuprizone)以及面神经切开法(FNX)两个神经病理模型得到的激活型小胶质细胞集中富集在 C11 亚群中。通过分析这两组实验的小胶质细胞，作者发现 FNX 3 天后的小胶质细胞高表达 Ctsc，而经 FNX 处理 14 天恢复后，小胶质细胞回到了稳定(Homeostatic)状态；相比之下，经 cuprizone 脱髓鞘处理的动物，其小胶质细胞的转录组水平会长时间维持在激活状态（超过 10 周）。

与前面两文观点不同，Li 等人发表的单细胞测序文章着重强调了在成年、健康大脑中，小胶质细胞的转录组特征不具有明显的异质性(Li et al., 2019)。作者通过对两个无监督学习得到的小胶质细胞亚群进行基因差异表达分析发现，两个细胞亚群只有 27 个基因发生了差异表达，其中一半基因是 IEGs (immediate early genes)，如 Fos、Egr1 等。作者分析道，这些 IEG 的上调很可能是在样本流式分选过程中发生的，这一现象已经有文献报道(van den Brink et al., 2017)。如果去除 IEG 的效应，成年健康小鼠大脑中的小胶质细胞全部呈现出稳态小胶质细胞的特点，高表达多种稳态特征基因如 Tmem119、P2ry12 等。而通过进一步分析发育阶段小胶质细胞的数据，作者得出结论，在早期发育过程中小胶质细胞的转录组状态具有明显异质性。其中，发育阶段中的一类小胶质细胞亚群表现出与 DAM 相似的转录组特征 (Spp1、Apoe、Ctsb、Gpnmb、Clec7a 等上调)，大量胞吞功能相关的基因在这类细胞中发生上调。RNA 原位杂交结果表明，这群细胞主要定位在白质中胶质增生旺盛，以及脑室周围神经发生旺盛的区域。鉴于这一发现，作者将这类细胞命名为增殖区相关小胶质细胞 (proliferative-region-associated microglia, PAM)。

2020 年，Ndoja 等人(Ndoja et al., 2020)从生化水平揭示了一种小胶质细胞激活的机制。作者发现泛素连接酶 COP1 通过泛素化作用，将细胞内转录因子 c/EBP $\beta$  蛋白维持在低水平，而在炎症因子（如 LPS）诱导下 MEK-ERK1/2 通路激活，抑制泛素连接酶复合体 CRL4<sup>COP1/DET1</sup>，从而引起 c/EBP $\beta$  蛋白水平上调，c/EBP $\beta$  的积累随即诱导小胶质细胞状态向促炎表型改变。文章利用单细胞测序发现，COP1 敲除的小胶质细胞的转

录组状态发生了显著的变化，且这些细胞的状态可根据以往文献中的描述(Friedman et al., 2018)划分为不同的亚群：一部分亚群高表达神经退行性疾病相关基因，类似于 DAM；另一类亚群表现出 IFN 响应特征基因；还有一类亚群表现出增殖特征基因的富集。需要注意的是，该实验是在条件性敲除小鼠中 Cop1 完成的，因此可能无法反映实际生理状态下小胶质细胞的转录组变化。

作为一项强有力的工具，单细胞测序可以用于探究小胶质细胞与生物节律在细胞转录组状态与分子层面的联系。通过回顾以上几篇文献，我们也注意到，在使用单细胞测序对小胶质细胞转录组进行解析时有诸多需要注意的因素，例如由于技术因素 (technical factor) 的随机性，不同批次样品得到的结果可能存在较大波动，如何通过合理设计实验减少批次效应，或者通过计算方法对批次效应和技术因素进行矫正，是需要格外关注的问题；细胞解离后的样本处理过程（如流式分选等）可能会对细胞状态产生较大影响，因此分析数据得到的结果需要通过原位杂交等实验手段验证。

上述文献也为小胶质细胞数据分析提供了指导，与此课题密切相关的几个可检验的猜想是：当生物节律被扰乱后，小胶质细胞的转录组水平是维持在稳态状态，还是会发生变化？如果其转录组发生了变化，变化后的转录组特征与文献中定义的 DAM、PAM、ATM 有何异同？

## 第二章 实验设计与方法

本课题计划从形态学、单细胞转录组、行为学三方面对小胶质细胞在睡眠或节律中的作用展开研究。形态学方面，利用 fMOST 成像全脑小胶质细胞形态，开发数据分析管线，对小胶质细胞形态进行全面调查和分析。进一步地，改进制样方法，利用突触后标识物 PSD-95 抗体对样品染色，或开发 pH 敏感探针 pH-Lemon，从而在形态学基础上指示小胶质细胞的胞吞活力。

单细胞转录组方面，使用 10X 单细胞测序平台，对睡眠剥夺或对照组小鼠分离出的原代小胶质细胞进行单细胞测序，分析转录组变化。

行为学方面，对小鼠喂食 BLZ945 食物杀除小胶质细胞，使用跑轮记录有小胶质细胞和小胶质细胞杀除后小鼠的运动节律 (Locomotor rhythms)；利用 EEG 记录系统，记录有小胶质细胞和小胶质细胞杀除后小鼠的 EEG 变化。

### 2.1 实验材料

小鼠品系：

C57BL/6J 小鼠：用于睡眠剥夺、单细胞测序、行为学记录。

Cx3cr1-GFP 小鼠 (Jackson Laboratory, #005582)：用于观察实验和对照组小胶质细胞形态。

Cx3cr1-CreER 小鼠：用于选择性操纵小胶质细胞。

P2ry12-CreER (Jackson Laboratory, #034727) 小鼠(McKinsey et al., 2020)：研究表明，相比于 Cx3cr1-CreER，该小鼠品系的 Cre 重组酶作用更局限于中枢神经系统的小胶质细胞和脉络丛巨噬细胞 (choroid plexus macrophages)，而较少作用于外周血液循环的巨噬细胞 (circulating macrophages)，因此可以更为特异地将基因操纵局限在小胶质细胞上，排除外周巨噬细胞因素。

ROSA-DTA (Jackson Laboratory, #009669)：用于选择性清除小胶质细胞(Saito et al., 2001)。

抗体：Iba1、PSD-95。

药物：BLZ945 (Csf1r 抑制剂，可清除动物体内单核细胞)、Minocycline (抑制小胶质细胞胞吞作用)

试剂：

Percoll (P1644-100ml, Sigma), RNA 酶抑制剂 (RNAsin, AM2684), DNA 酶 I (DNaseI, Worthington), HEPES (15630-080, Gibco), D-glucose (Sigma), 自制零钙零镁 ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  free) 1×HBSS 缓冲液, 10×HBSS 缓冲液：用于小胶质细胞的分离。

阿伏丁 (Avertin): 小鼠麻醉。

AO/PI 染料, 10X Single Cell 3'v3 Kit: 单细胞测序测定细胞活率。

pH-Lemon (pH 敏感报告蛋白): 报告小胶质细胞胞吞作用。

工具及耗材：

10ml 杜氏匀浆器。

70 $\mu\text{m}$  细胞筛网 (BD Bioscience), 30 $\mu\text{m}$  细胞筛网 (Miltenyl)。

仪器及系统：

自制 EEG 记录系统, 行为观察箱, 跑轮运动记录系统。

低温离心机, 自动细胞计数仪 LUNA (Logos Biosystems)。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 睡眠剥夺

睡眠剥夺拟采用两种方式。方式一，水箱剥夺：移除小鼠饲养笼中垫料，加入高度为 10mm 的水，当小鼠试图睡眠时会因为呼吸系统浸入水中而强制苏醒，从而起到睡眠剥夺的效果；对照组中，在饲养笼底部放置一平台，小鼠即可在平台上正常睡眠。这种睡眠剥夺方式操作相对简单，可以长时间进行剥夺。方式二，人工轻微扰动剥夺：将小鼠放置在行为箱中，实验人员保持观察小鼠的活动状态，当小鼠出现即将睡眠的情形时（可通过 EEG 检测），使用毛刷等工具，轻微拨动小鼠身体，使其保持清醒。这种剥夺方式的优点是干扰因素少，可避免引入无关变量，但缺点是对实验人员的作息有较为严苛的要求。

10X 单细胞测序的睡眠剥夺操作采取三种范式：对照组 (Control)，不做睡眠剥夺处理；剥夺组一，剥夺 6 小时，恢复 0 小时 (MG60)，即在 Light phase 小鼠准备睡眠时实行睡眠剥夺处理；剥夺组二，剥夺 48 小时，恢复 0 小时 (MG480)，在 Day1 Light phase 对小鼠执行睡眠剥夺范式，持续 48 小时；剥夺组三，剥夺 48 小时，恢复 3 小时 (MG483)，在 Day1 Light phase 对小鼠执行睡眠剥夺范式，持续 48 小时后，

将小鼠放回铺有垫料的饲养笼，恢复 3 小时。每个处理组重复 2 次，以应对不同实验产生的批次效应。

### 2.2.2 形态学样本收集

形态学研究拟使用 Cx3cr1-GFP 小鼠进行样本制备。Cx3cr1 是 fractalkine 受体，特异表达在单核细胞中。Cx3cr1-GFP 杂合子小鼠带有一条功能完整的 Cx3cr1 基因和一条敲入 EGFP 的嵌合基因，使得 Cx3cr1-GFP 小鼠的中枢神经系统中小胶质细胞和巨噬细胞会被 EGFP 特异性标记。对小鼠实行睡眠剥夺/对照处理后，用生理盐水灌流，PFA 固定处理。解剖出的鼠脑拟采用两种方式进行样本制备和图像采集。

- 1) 共聚焦显微镜成像：解剖出的鼠脑再经 4 小时 PFA 固定后，用 30% 蔗糖水实行脱水处理。充分脱水后（观察鼠脑沉于糖水底部），采用冰冻切片机切片，置于经包被的载玻片上，封片。随后，使用共聚焦显微镜，选取有代表性的几个脑区（皮层、海马、丘脑、下丘脑、中脑、小脑）对其中小胶质细胞形态进行观察。对比实验与对照组小胶质细胞形态。
- 2) fMOST 成像及数据分析：解剖的鼠脑利用 fMOST 系统进行全脑荧光成像。由于小胶质细胞与小胶质细胞之间基本没有形态结构的重叠，该方法获得的图像可以无偏地对小鼠全脑所有小胶质细胞形态特征进行收集。利用 fMOST 成像，单个样本即可一次性获得大量数据，结合前沿的数据分析算法，可大规模分析小胶质细胞形态特征及其变化。

### 2.2.3 10X 单细胞测序：小胶质细胞的分离

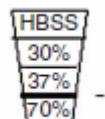
10X 单细胞测序产出的数据质量取决于样本采集时细胞的质量。具体来说，样本制得的单细胞悬液，在浓度适当的前提下活率越高，最终测序获得的数据结果质量越高。为此，我们在文献报道的小胶质细胞提取方法(Cardona et al., 2006)(Nikodemova and Watters, 2012)(Bennett et al., 2016)的基础上，对小胶质细胞分离的实验条件进行了优化，实现了稳定制备高活率小胶质细胞单细胞悬液。需要注意的是，由于我们的实验目的是观察无睡眠剥夺和睡眠剥夺后小胶质细胞转录组的差异表达基因，因此分离过程中应尽量做到严格控制变量，全程在 4℃ 冰上操作，以减少技术因素（technical factor）对小胶质细胞转录组状态的影响。

小胶质细胞由 C57BL/6J 小鼠中分离获得，全程除了 Percoll 密度梯度离心在 20℃ 之外，所有操作均在 4℃ 冰上操作。提前配制研磨缓冲液（Dounce buffer）：10ml 1× HBSS 加 10mM HEPES 和 0.5%D-glucose。使用前在 10ml Dounce buffer 中加入 DNA

酶 I (DNaseI) 至 250U/ml 和 20 $\mu$ l RNA 酶抑制剂 (RNAsin)。对小鼠实行睡眠剥夺/对照处理后，经腹腔注射 Avertin 麻醉。待小鼠呼吸平缓，捏趾无反射后，用消毒的手术剪刀剪开腹腔和胸腔，暴露心脏，使用 10ml 针筒，针尖经左心室穿入心脏，剪开右心耳，平稳推入 10ml 1×HBSS 灌流液。剪下头部，迅速浸入冰冻的 1×HBSS 缓冲液中降温 3 秒，取出后解剖鼠脑。解剖完的鼠脑经 HBSS 缓冲液清洗后，用一次性手术刀切成 6~8 块，放入杜氏匀浆器 (Dounce Homogenizer) 中轻柔研磨。每研磨 10 次左右停下研磨，取出研杵，取出上层细胞悬液至 50ml 锥形管中，再加入研磨缓冲液 (Dounce Buffer) 继续研磨。重复 3 次，尽可能研碎大块组织。

4°C 离心 300g 5 分钟，弃上清，10ml 1×HBSS 重悬细胞，依次过 70 $\mu$ m、30  $\mu$ m 细胞筛网，除去组织块。离心同时配制 30%、37%、70% SIP (Stock Isotonic Percoll) 溶液各 4ml。

4°C 离心 300g 5 分钟，弃上清，用 37% SIP 重悬细胞。在 15ml 离心管中，使用注射器与平口长钢针，从离心管底部依次缓慢加入 1×HBSS、30% SIP、37% SIP 细胞悬液、70% SIP。将离心机升降速均调至最低，20°C 离心 200g 20 分钟。离心结束后，小胶质细胞将位于 37% 与 70% 之间的界面中。



小心吸去上层溶液，将 37%-70% 界面附近的溶液转移 1.5~2ml 至新的 15ml 离心管中，加 5 倍体积 1×HBSS，4°C 离心 300g 5 分钟。

小心吸去上层溶液，用 80~100 $\mu$ l 0.04% BSA 溶液重悬细胞。

取 9 $\mu$ l 细胞悬液，加 1 $\mu$ l AO/PI 染料，使用 LUNA 自动细胞计数仪测算细胞活率及浓度。当样本的细胞活率 >85% 且浓度在 700~1200 cells/ $\mu$ l 时，方可进行 10X 单细胞建库及测序。

#### 2.2.4 10X 单细胞测序数据分析

测序得到的 fastq 文件利用 CellRanger 软件进行上游分析，序列回帖参考基因组选用 Ensembl mm10 (GRCm38)。回帖得到的基因表达矩阵通过 Scater (McCarthy et al., 2017) 进行质量控制，筛除低质量细胞，再用 Seurat v3 (Butler et al., 2018) (Stuart et al., 2019) 进行基础下游分析。

Scater 质控：

测序数据读入 R 工作环境中，将表达矩阵转换为 SingleCellExperiment (SCE) 对象 (Amezquita et al., 2019)，对该 SCE 对象依次在细胞水平 (Cell-level QC)、基因水平 (Feature-level QC)、变量水平 (Variable-level QC) 执行质控。在细胞水平质控中，去除文库含量小 (low library size)，基因含量少 (low features)，线粒体基因含量高 (high

mitochondrial percentage) 的细胞；基因水平质控中，去除表达量为 0 的基因以及线粒体基因、核糖体基因；在变量水平，对每个变量方差解释的贡献率 (variance explained) 作统计，查看是否有异常变量出现。

#### Seurat 分析：

经质控处理后的数据转换为 Seurat 对象，执行 Seurat 基础分析流程：依次进行均一化、特征选择、放缩、线性降维、维度选择、构建最短邻近图、Louvain 聚类、t-SNE 或 UMAP 降维。

此外，由于样品经过不同实验手段处理，可按照实验处理组将 Seurat 对象分离，执行 Seurat v3 锚点法整合分析流程，以便更好地得到细胞类型分群。

在整合后的数据中，结合聚类信息，以及中枢神经系统各细胞类型已知的基因 marker，对数据进行细胞类型注释。常见的细胞类型及其对应 marker 包括，神经元：Map2、Rbfox3；星状胶质细胞（Astrocytes）：Gfap，Aqp4；寡突胶质细胞（Oligodendrocytes）：Olig2；寡突胶质细胞祖细胞（Oligodendrocytes Precursor Cells, OPCs）：Pdgfra；血管内皮细胞（Vascular endothelia）：Pecam1；血管周细胞（Pericytes）：Pdgfrb；小胶质细胞（Microglia）：Cx3cr1、Tmem119、Hexb；巨噬细胞（Macrophage）：Mrc1；室管膜细胞（Ependymal cells）：Ccdc153；红细胞（Red blood cells）：Hbb-bs。

除去非小胶质细胞的细胞类型，只对小胶质细胞数据进行分析。使用 Wilcoxon ranked sum test，检验不同睡眠剥夺处理组，或不同聚类组别的小胶质细胞差异表达的基因。

### 第三章 前期实验结果与讨论

#### 3.1 小胶质细胞缺失导致动物运动节律相位发生偏移

为探究小胶质细胞在生物节律和睡眠中的作用，利用 Csf1r 抑制剂 BLZ945 杀除单核细胞，使用跑轮记录（wheel running test）系统对运动节律基线水平记录 5 天后，执行 2 天睡眠剥夺，记录随后 5 天内小鼠运动节律的恢复情况。最后，操纵环境的光照周期，使小鼠长时间暴露在无光条件下，观察运动节律的变化（图 2）。

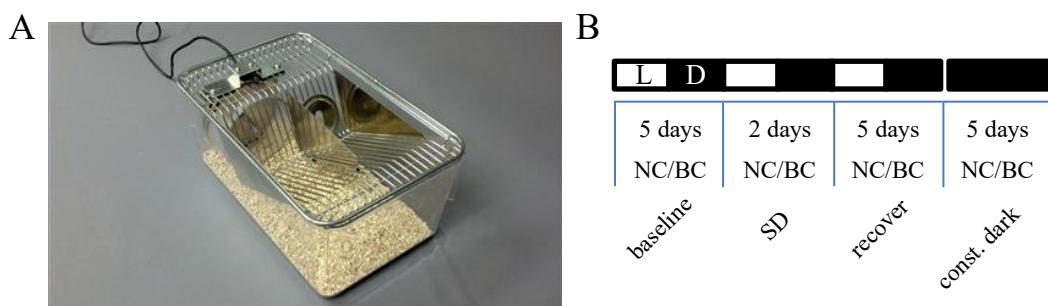


图 2 运动节律记录实验的设计。A. 跑轮运动节律记录系统；B. 运动节律记录范式。NC，普通食物 (Normal Chow)；BC，BLZ945 食物 (BLZ945 Chow)；SD，睡眠剥夺 (sleep deprivation)；L，Light phase；D，Dark phase。

睡眠剥夺后的小鼠，在恢复阶段中睡眠时长会发生反弹（sleep rebound），运动量相应减少。本实验目的之一是观察杀除小胶质细胞后，睡眠时长反弹的现象是否会发生变化。

在正常光周期下，小鼠的运动节律表现为夜相（dark phase）活动高，日相（light phase）活动低。当光照节律发生改变（如光照全部为 Dark Phase）时，小鼠运动节律的相位会发生规律性偏移(Schwartz and Zimmerman, 1990)。本实验的另一个目的是观察杀除小胶质细胞后，运动节律偏移的现象是否会发生变化。

初步结果表明，小胶质细胞被杀除后，小鼠在 SD 后的恢复阶段运动量显著降低，意味着睡眠回弹持续的时间变得更久，即睡眠剥夺后小鼠的恢复变慢（图 3）。

本实验的观察到的另一个现象是，当小胶质细胞被杀除后，运动节律偏移的程度变得更为剧烈。体现于两方面：1) 在 SD 结束后恢复的 5 天内，对照组小鼠没有发生运动节律偏移，而实验组小鼠发生了明显的运动节律；2) 当长时间暴露在夜相时（constant darkness），实验组小鼠的运动节律偏移的幅度显著大于对照组小鼠。

传统观点认为 C57BL/6J 小鼠的内在生物节律周期为 23.77 小时，这一节律在地球 12h: 12h 规律的光照-黑暗交替下，通过视交叉上核（Suprachiasmatic nucleus，

SCN) 实现微调。上述结果表明，在小胶质细胞杀除的情况下，SCN 对生物节律的调节作用发生了缺陷。

本实验的不完善之处在于，用于杀除小胶质细胞的药物 BLZ945，其靶点 Csflr

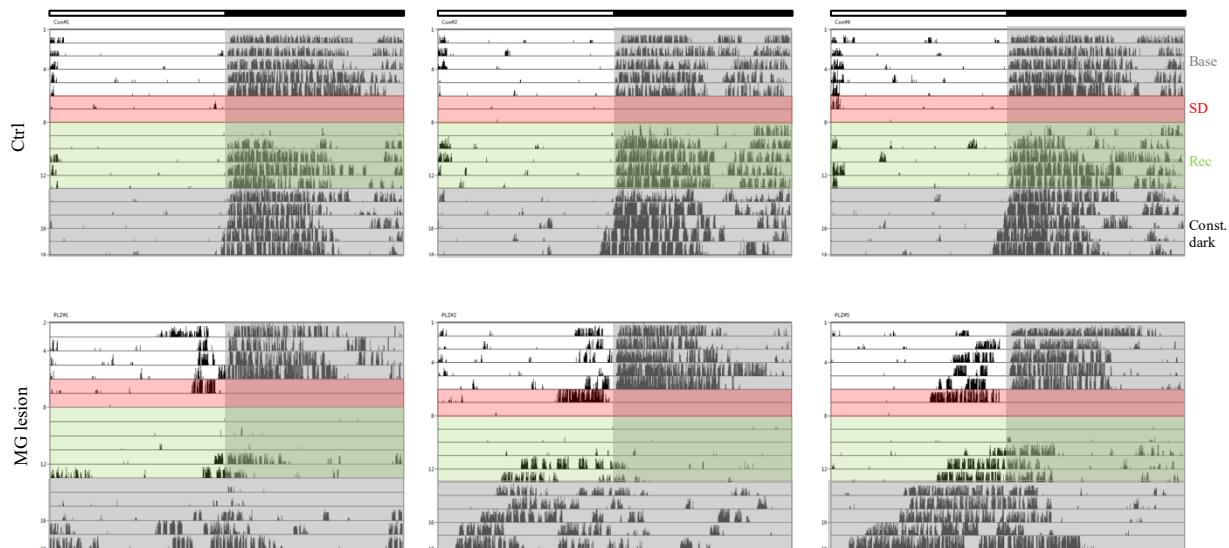


图 3 代表性实验结果：小胶质细胞缺失对睡眠剥夺后睡眠回弹与运动节律偏移的影响 (by 桑迪, Zhang Lab)。

在大量非小胶质细胞的单核细胞中也有表达，包括中枢神经系统中的血管周巨噬细胞 (Perivascular Macrophage, pvMΦ)，软脑膜巨噬细胞 (Leptomeningeal Macrophage, mMΦ)，脉络丛巨噬细胞 (Choroid Plexus Macrophage, cpMΦ)，以及外周血液中的循环巨噬细胞 (Circulating Macrophage) 等。实验观察到的行为表型，无法区分是由于杀除小胶质细胞还是由于药物作用在其他类型单核细胞导致的，尤其是外周血液循环巨噬细胞，可能在睡眠剥夺状态下对小鼠行为有较大影响。为了尽可能排除这部分因素，实验的一种改进方案是使用 P2ry12-CreER 小鼠品系(McKinsey et al., 2020)与 ROSA-DTA 小鼠杂交(Voehringer et al., 2008)，实现较为特异的小胶质细胞敲除，再对运动节律等表型进行监测。

### 3.2 EEG 记录表明小胶质细胞缺失小鼠 NREM 睡眠增加

对小鼠喂给 BLZ945 食物，杀除小胶质细胞后，实施头部立体定位手术安装 EEG 记录装置。小鼠术后恢复 2 周后，置于行为箱内，记录 EEG，统计清醒、REM 睡眠、NREM 睡眠的变化情况。

初步结果显示，与对照组小鼠相比，小胶质细胞被 BLZ945 杀除后的小鼠 NREM 睡眠增加。

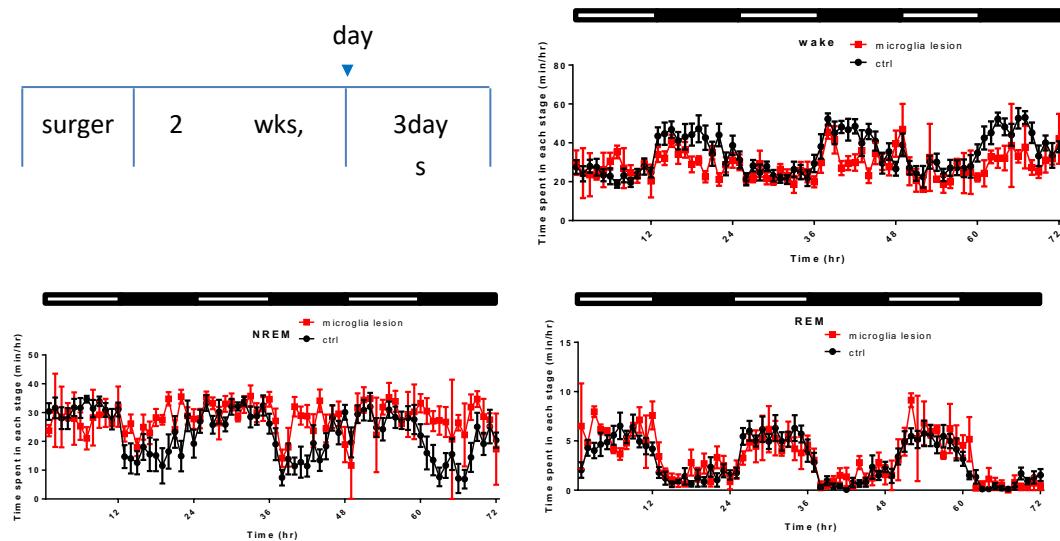


图 4 代表性实验结果：小胶质细胞缺失后 EEG 变化 (by 卢立辉, Luo Lab)。

### 3.3 10X 单细胞测序揭示睡眠剥夺后小胶质细胞转录组变化

为了在转录组层面进一步研究睡眠剥夺对小胶质细胞的影响，对睡眠剥夺后的小鼠取小胶质细胞进行了 10X 单细胞测序。截止到目前为止，对 4 个处理组中的 3 个 (MGC1、MG601、MG4831，每组 1 个重复) 进行了测序。经上游分析管线处理后，共收集到 37397 个细胞，平均每个细胞检测到 3546 个，1642 个基因。Scater 质控后保留 30893 个细胞

测序结果经基础分析流程处理 (详见 2.2.4)，在 t-SNE 图上非线性降维后进行细胞注释。图 5 显示了细胞注释情况，可以看出实验中即便经过 Percoll 分离，依然捕捉到部分其他细胞类型。

对非小胶质细胞的细胞类型进行清理后，共得到 27883 个小胶质细胞。这些细胞均表达小胶质细胞特异性 marker 基因 (P2ry12、Hexb、Tmem119)。利用 Seurat v3 锚点法对三个处理组的小胶质细胞执行整合后，Louvain 聚类算法将整合空间 (integrated space) 下的小胶质细胞分为 11 个亚群 (图 6A)。其中，Louvain clusters 4、5、8、9 中富集了大量 MG601 组小胶质细胞，而 Louvain cluster 7 中富集了大量 MG4831 组的小胶质细胞 (图 6B)。Wilcoxon Ranked Sum Test 发现 Louvain cluster 4、5、8 中 Ddit4 基因的表达有显著上调，可能意味着这三个 cluster 的细胞在分离过程中受技术因素影响进入应激状态，在后续分析中暂时排除。

在 Clusters 7 (MG4831 富集)、9 (MG601 富集) 两个睡眠剥夺相关的细胞亚群中，部分基因的表达水平表现出相同的变化趋势，如 *Csf1r*、*C1qa*、*Calr*、*Fcrls* 均发生了上调，而 *Ftl1*、*Fau*、*Tmsb4x*、*Tpt1* 均发生了下调。同时也注意到，部分基因在 clusters 7 和 9 中变化趋势是相反的，这些基因有 *Cebpb*、*Marcks*、*Plp1*、*Ptgds*（图 6C）。这说明一部分小胶质细胞亚群特异地对睡眠剥夺有应答，且应答模式在不同睡眠剥夺范式下有差异。

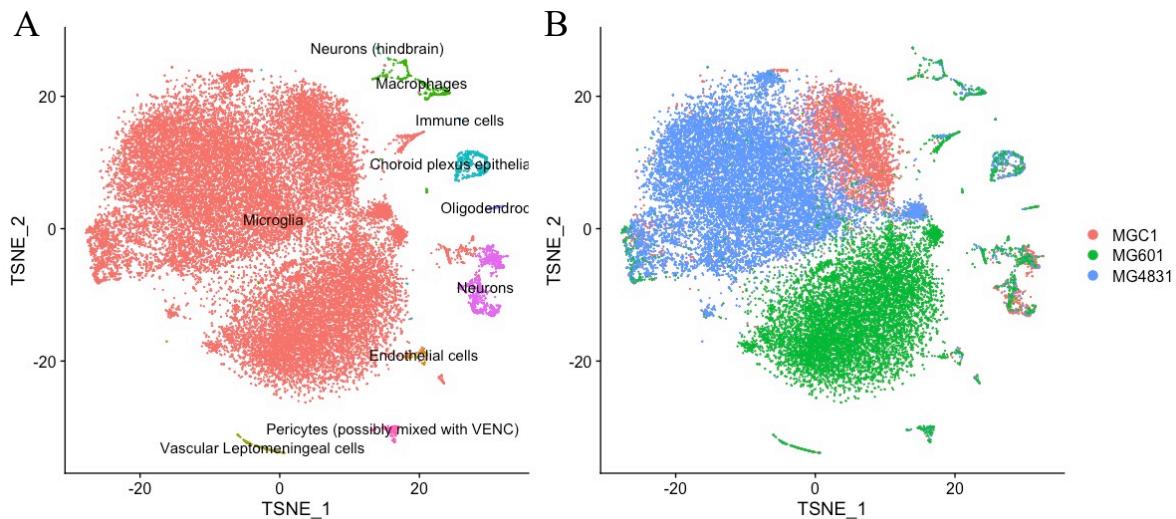


图 5 3 个样本 (MGC1、MG601、MG4831) 的 t-SNE 降维。A. 细胞类型注释；B. 处理组注释。

有文献报道，*Ptgds* 基因编码的蛋白前列腺素-H2 D-异构酶 (Prostaglandin-H2 D-isomerase) 被认为参与了 NREM 睡眠的调节(Pinzar et al., 2000)，该蛋白的生化功能是将 PGH2 转化为 PGD2，而 PGD2 被认为具有促睡眠作用(Hayaishi, 1991)(Urade and Hayaishi, 1999)。

值得注意的是，在目前收集到的数据中，有部分小胶质细胞在睡眠剥夺处理后 *Apoe* 基因发生了上调（图 7）。*Apoe* 被认为是疾病相关小胶质细胞 (DAM) 的 marker 基因，*Apoe* 的上调表达在多种神经退行性疾病中有广泛的证据。这一结果是否意味着睡眠剥夺会将小胶质细胞向疾病表型的方向诱导？在接下来的数据分析中，会着重关注该问题。

单细胞测序方面的工作今后有两个方向可以推进。一方面，此处展示的数据只包括了对照组 (MGC)、6 小时剥夺组 (MG60)、48 小时剥夺 3 小时恢复组 (MG483)，接下来会对 48 小时剥夺无恢复组 (MG480) 取样测序，且对四个处理组

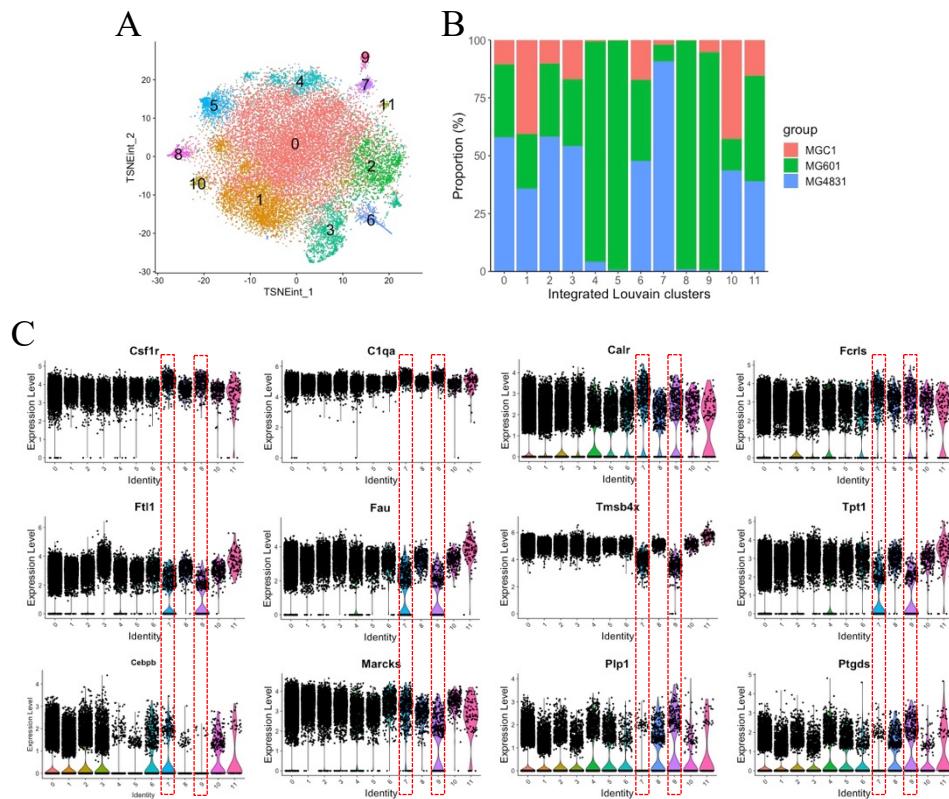


图 6 小胶质细胞单细胞测序初步分析结果。A. t-SNE 降维显示在整合空间下 11 个小胶质细胞 Louvain clusters；B. Louvain clusters 中不同睡眠剥夺组处理的小胶质细胞所占比例；C. Louvain cluster 7 与 9 中，转录水平发生变化的部分基因。

分别增加一个重复，以便于识别批次效应或排除技术因素造成的影响。另一方面，针对测序数据检验出的标志基因，需要进行原位杂交（FISH）实验，以验证这部分基因的上调不是由技术因素引起。FISH 同时可以对表达这些基因的细胞亚群在空间水平进行定位。

在数据分析方面，拟采用 SCENIC 分析流程(Aibar et al., 2017)，对 DAM 等小胶质细胞状态相关的基因表达情况及其调控元件进行全面的勘查。

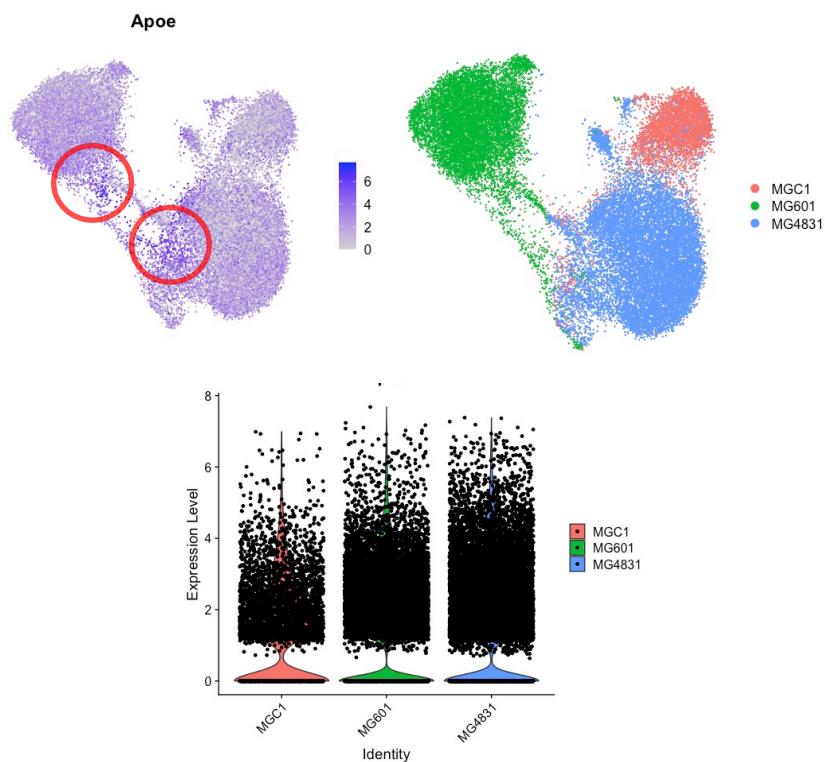


图 7 DAM 相关基因 Apoe 在睡眠剥夺处理后的小胶质细胞亚群中发生上调表达。

## 第四章 未来研究计划及方案设计

### 4.1 搭建 fMOST 形态学数据分析管线

通过对 Cx3cr1-GFP 鼠进行全脑 fMOST 成像，绿色通道采集的信号即包含了小胶质细胞的全部形态学信息。fMOST 系统采样得到的数据，分辨率一般在  $0.2\mu\text{m} \times 0.2\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$  至  $0.35\mu\text{m} \times 0.35\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$  范围内(Lin et al., 2018)(Sun et al., 2019)(Lin et al., 2020)。未激活，分叉状的小胶质细胞，其完整结构覆盖的区域（territory）约占脑组织  $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$  见方的体积(Schafer et al., 2012)。fMOST 成像获得数据体量极大，单个样本数据往往能达到 6~7TB，为了应对这一规模的数据，拟采用以下流程实现大规模小胶质细胞形态学数据的分析：图像二值化/背景分割——数据块切割——数据块清理——特征增强——聚类——降维可视化（图 8）。

图像二值化/背景分割的主要目的是将代表小胶质细胞的形态结构的像素从背景中提取出来，可通过两种策略来实现。一种策略是通过 Otsu 阈值法(Otsu, 1979)，该方法原理是最大化前景图像与背景图像的方差，常被应用于生物图像的快速二值化前景物提取的任务中。另一种策略是使用近期开发的算法 UNet(Ronneberger et al., 2015)(Falk et al., 2019)。UNet 通过编码（降采样）——解码（上采样）网络层学习图像特征，实现对图像语义分割，提取结构信息的目的。该算法被广泛运用于生物医学图像的语义分割任务中。

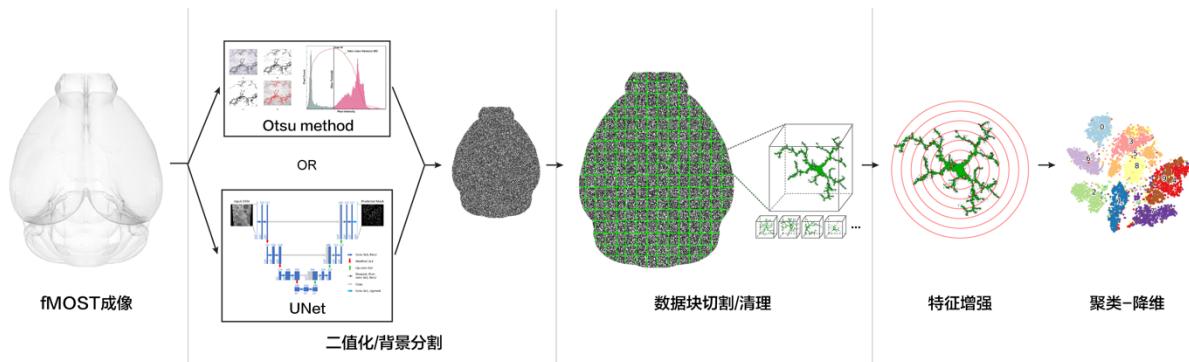


图 8 fMOST 成像数据拟采用的处理、分析流程

提取形态结构信息后，下一步将数据切割成大小相等的数据块。结合前文所述，在  $0.2\mu\text{m} \times 0.2\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$  至  $0.35\mu\text{m} \times 0.35\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$  分辨率范围内，一个  $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$  的立方数据块约含 22000~67500 个体素（voxel），即数据的维度为 22000~67500。为避免数据维度过高，降低聚类算法性能，可对数据块做进一步降采样处理。如果一个小胶质细胞的数据块中包含了另一个小胶质细胞的分支结构，可对像素块中形态结构体积等

变量进行统计，再通过离群值检验，将这些异源的像素替换为背景，从而达到清理像素块的目的。随后，对数据块内小胶质细胞结构进行细胞骨架重构（Skeletonization），在骨架的基础上，使用小胶质细胞形态学统计方法（图 9），如肖尔分析（Sholl analysis）、分形维度（Fractal dimension, D）、间隙度（Lacunarity,  $\Lambda$ ）、体积、凸壳体积（Convex hull volume）等(Fernández-Arjona et al., 2017)对三维图像数据做特征增强（Feature augmentation），将更为丰富的细胞结构和分支特征信息与图像信息并入待分析数据。根据文献的估计，鼠脑的总细胞数约为 70,000,000 个(Herculano-Houzel et al., 2006)，其中 5%~15% 为小胶质细胞，意味着这一流程预计将得到 3,500,000~10,500,000 个小胶质细胞的形态结构信息。

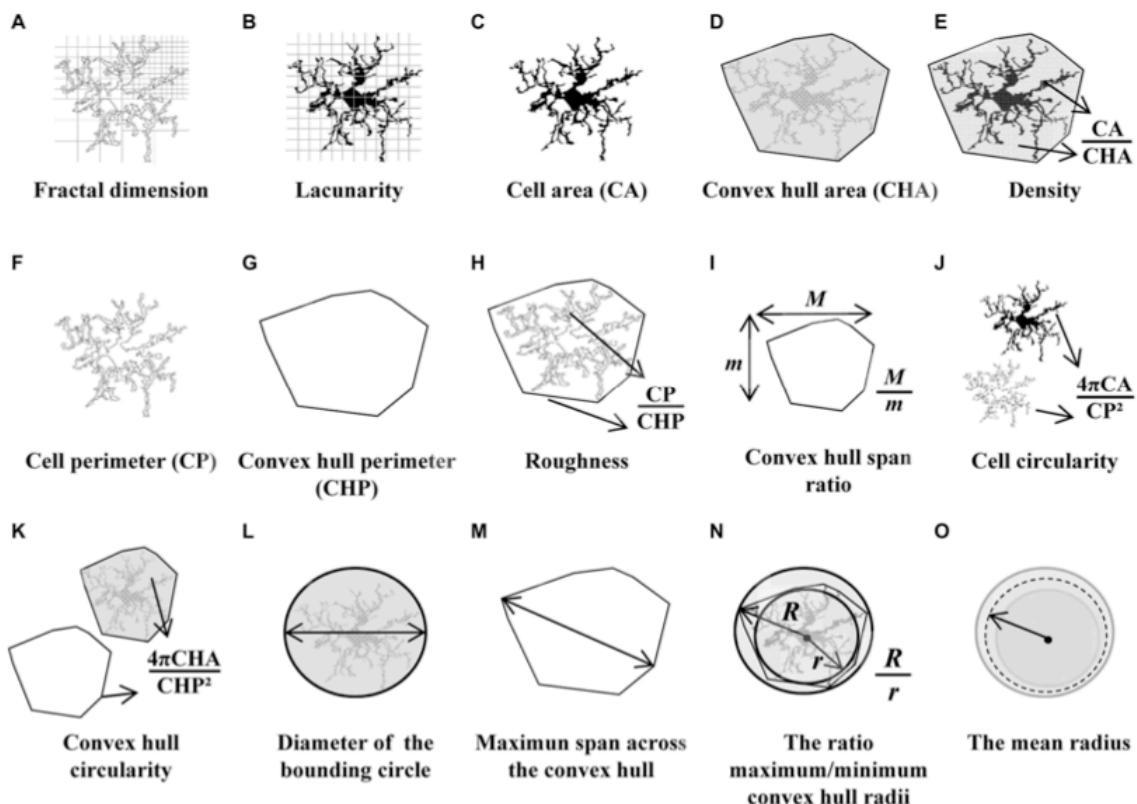


图 9 可用于特征增强的小胶质细胞形态学参数(Fernández-Arjona et al., 2017)。

经特征工程处理后的数据，拟使用 kNN 聚类算法对形态特征进行分类，再利用 t-SNE(Maaten and Hinton, 2008)或 UMAP(McInnes et al., 2020)等非线性降维方法对数据进行降维可视化处理，从而验证小胶质细胞形态的分群特征。非线性数据降维法 t-SNE (图 10)由 Maaten 与 Hinton 于 2008 年提出，用于解决手写数据集 MNIST 的二维可视化问题。MNIST 数据集包含了 70,000 张 28\*28 像素的灰度图像数据，每张图像维度为 784。t-SNE 算法通过学习数据的灰度值特征及其背后流形结构的特征，将高维数据信息降至二维空间，在此空间中，结构相似的数字被赋予临近的坐标值，从而形成结构紧密的类群 (clusters)。

在此，我将小胶质细胞的数据与 MNIST 数据集进行类比，以说明为什么诸如 t-SNE 的非线性降维算法适用于小胶质细胞数据集：1) 二者均为图像数据，没有本质上的区别，唯一不同的在于 MNIST 数据集是二维图像数据，维度为 28\*28 (784)，而小胶质细胞是三维图像数据，维度为 22000~67500 甚至更多（特征增强后）；2) 在 MNIST 数据集上，t-SNE 通过流形学习识别手写数字的内在结构特征，倘若小胶质细胞的形态也具备内在结构特征，比如在特定脑区，小胶质细胞的分支结构更为丰富，而在另一些脑区，分支结构较为稀疏；抑或在一些特定脑组织结构附近（如血管、脑室等）有独特的结构特征，理论上，t-SNE 等算法均可通过流形学习，在低位空间中揭示具备这些结构的细胞类群；3) 最后，假设动物经历睡眠剥夺或生物节律被打乱后，小胶质细胞的

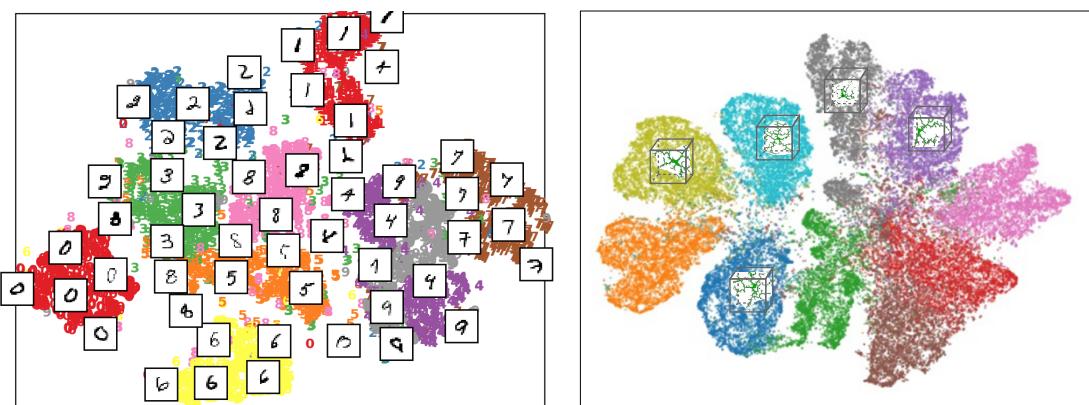


图 10 左：t-SNE 降维后的 MNIST 数据集；右：预期中小胶质细胞形态数据集 t-SNE 降维形态发生改变，比如分支变粗、胞突收缩，理论上，t-SNE 也可以在低位空间中揭示出细胞形态结构特征发生改变的事件，在此情形下，睡眠剥夺/节律紊乱的小胶质细胞与未经睡眠剥夺/节律紊乱操纵的小胶质细胞将在二维降维图像上形成分离的两个类群。

本方案可能会遇到的严峻挑战是 fMOST 数据量的问题。fMOST 产出的图像数据动辄可达到 6~7TB，在这种规模的数据上进行运算，对算法的时间复杂度要求可能会较高。一个可行的解决方案是将原始数据拆分成多个规模较小的数据块，将这些数据分别部署在不同计算节点上执行运算，可能可以显著降低运算压力。

## 4.2 开发小胶质细胞吞噬活力指示物

在最近十年左右的时间里，学界逐渐认识到补体系统介导的小胶质细胞胞吞作用在突触修剪、维持神经网络稳态、神经系统发育中扮演了重要作用。本课题的计划之一是在睡眠剥夺情形下，探讨小胶质细胞胞吞作用是否发生改变，从而确定睡眠剥夺下小胶质细胞的生理状态。

对 Cx3cr1-GFP 小鼠做睡眠剥夺操作，在分别剥夺 0 小时（平台对照）、6 小时、48 小时后，灌流取脑，切片染色，标记 PSD-95，对有代表性脑区（皮层、海马、丘脑、

下丘脑、中脑、小脑)的小胶质细胞绿色荧光内部的 PSD-95 荧光点进行统计。

上述方法操作流程简单,但检测方式是有偏的,得出的结论只能反映部分脑区的情况,可拓展性差。为解决这一问题,我们提出一项备选方案:开发基于 pH 敏感蛋白的胞吞检测工具。该工具核心思路是利用 pH-Lemon 蛋白(Burgstaller et al., 2019) (图 7)作为胞吞探针。pH-Lemon 是酸敏感蛋白,由 mTurquoise2 和 EYFP 两个亚基组成,利用 FRET 原理,pH-Lemon 可实现不同 pH 条件下差异化的光激发-光发射效应。在酸性低 pH 环境中,EYFP 被淬灭,使用 430nm 波段激发 mTurquoise2 后,将在 475nm 波段得到发射光;而在碱性高 pH 环境下,EYFP 复性,FRET 效应使得 430nm 波段激发光得到 525nm 的发射光。我们可在小鼠中敲入 pH-Lemon 蛋白,利用神经元启动子驱使其表达上膜,令其与 Cx3cr1-CreER::Ai14 鼠杂交。当神经元膜结构被小胶质细胞吞噬后,理论上大部分被吞噬的物质 (~80%, (Schafer et al., 2012), Fig.1E) 会通过溶酶体途径降解。如果 pH-Lemon 被吞噬后进入溶酶体,在酸性低 pH 的环境下,pH-Lemon 不再发生 FRET 效应,其荧光信号将在 475nm 波段被检测到,结合小胶质细胞的形态拓扑结构,即可统计出该小胶质细胞胞吞作用的强度。这一方法理论上适用于各种成像平台,且与 fMOST 兼容。

该方案可能存在的困难是, pH-Lemon 作为融合蛋白,其工作效率在在体动物中,尤其是上膜后可能不尽如人意。为此,有必要在离体环境下验证这一方案的可行性,再着手向在体实验推进。

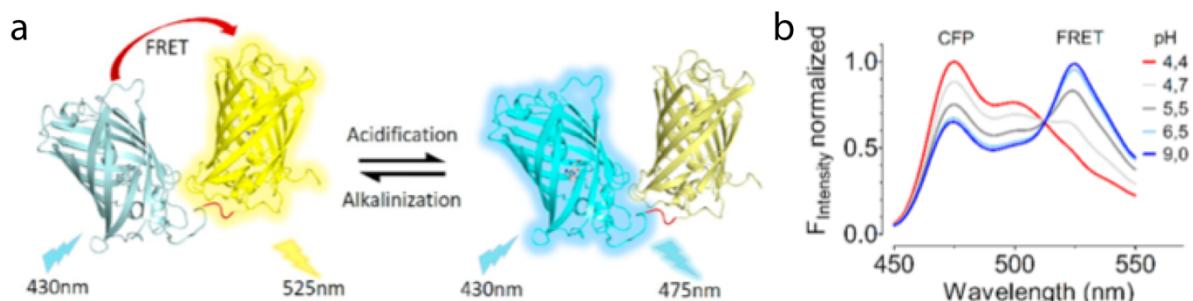


图 7 a. pH-Lemon 原理示意图, b. 体外不同 pH 条件下, 纯化 pH-Lemon 的 FRET 发射光谱  
(Burgstaller et al., 2019)

另一个解决方案是充分利用 fMOST 系统双色成像的特性。使用荧光蛋白检测胞吞的最大障碍是溶酶体内酸性环境容易使蛋白淬灭。只要能够找到一种抗酸性强的蛋白,如 pH-Lemon 中的 mTurquoise2 亚基,使其在被小胶质细胞内吞进溶酶体后不发生或者少发生淬灭,从而能够在成像过程中检测到荧光点,即可作为内吞作用指示物使用。因此,可以尝试不同的耐酸荧光蛋白,测试其作为胞吞指示物的潜力。

## 第五章 参考文献

Aibar, S., González-Blas, C.B., Moerman, T., Huynh-Thu, V.A., Imrichova, H., Hulselmans, G., Rambow, F., Marine, J.-C., Geurts, P., Aerts, J., et al. (2017). SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat Methods* 14, 1083–1086.

Amezquita, R.A., Lun, A.T.L., Becht, E., Carey, V.J., Carpp, L.N., Geistlinger, L., Marini, F., Rue-Albrecht, K., Risso, D., Soneson, C., et al. (2019). Orchestrating single-cell analysis with Bioconductor. *Nat Methods*.

Bennett, M.L., Bennett, F.C., Liddelow, S.A., Ajami, B., Zamanian, J.L., Fernhoff, N.B., Mulinyawe, S.B., Bohlen, C.J., Adil, A., Tucker, A., et al. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, E1738.

Blinzinger, K., and Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Zellforsch.* 85, 145–157.

Bocchini, V., Mazzolla, R., Barluzzi, R., Blasi, E., Sick, P., and Kettenmann, H. (1992). An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *Journal of Neuroscience Research* 31, 616–621.

van den Brink, S.C., Sage, F., Vértesy, Á., Spanjaard, B., Peterson-Maduro, J., Baron, C.S., Robin, C., and van Oudenaarden, A. (2017). Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nat Methods* 14, 935–936.

Burgstaller, S., Bischof, H., Gensch, T., Stryeck, S., Gottschalk, B., Ramadani-Muja, J., Eroglu, E., Rost, R., Balfanz, S., Baumann, A., et al. (2019). pH-Lemon, a Fluorescent Protein-Based pH Reporter for Acidic Compartments. *ACS Sensors* 9.

Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalex, E., and Satija, R. (2018). Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nature Biotechnology* 36, 411–420.

Cardona, A.E., Huang, D., Sasse, M.E., and Ransohoff, R.M. (2006). Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1947–1951.

Colonna, M., and Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 441–468.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8, 752–758.

Falk, T., Mai, D., Bensch, R., Çiçek, Ö., Abdulkadir, A., Marrakchi, Y., Böhm, A., Deubner, J., Jäckel, Z., Seiwald, K., et al. (2019). U-Net: deep learning for cell counting, detection, and

morphometry. *Nat Methods* 16, 67–70.

Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J.M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., and López-Ávalos, M.D. (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 235.

Friedman, B.A., Srinivasan, K., Ayalon, G., Meilandt, W.J., Lin, H., Huntley, M.A., Cao, Y., Lee, S.-H., Haddick, P.C.G., Ngu, H., et al. (2018). Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. *Cell Reports* 22, 832–847.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845.

Giulian, D., and Baker, T.J. (1986). Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *Journal of Neuroscience* 6, 2163–2178.

Hall, S., Deurveilher, S., Robertson, G.S., and Semba, K. (2020). Homeostatic state of microglia in a rat model of chronic sleep restriction. *Sleep* zsaal08.

Hammond, T.R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A.J., Gergits, F., Segel, M., Nemesh, J., et al. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity* 50, 253-271.e6.

Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387–1394.

Hayaishi, O. (1991). Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: roles of prostaglandins D2 and E2. *FASEB J* 5, 2575–2581.

Herculano-Houzel, S., Mota, B., and Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. *PNAS* 103, 12138–12143.

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., and Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research* 57, 1–9.

Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T.K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., et al. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169, 1276-1290.e17.

Kershman, J. (1939). GENESIS OF MICROGLIA IN THE HUMAN BRAIN. *Arch Neuropsych* 41, 24.

Kettenmann, H., Hoppe, D., Gottmann, K., Banati, R., and Kreutzberg, G. (1990). Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J. Neurosci. Res.* 26, 278–287.

Li, Q., Cheng, Z., Zhou, L., Darmanis, S., Neff, N.F., Okamoto, J., Gulati, G., Bennett, M.L., Sun, L.O., Clarke, L.E., et al. (2019). Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron* 101, 207-223.e10.

Lin, R., Wang, R., Yuan, J., Feng, Q., Zhou, Y., Zeng, S., Ren, M., Jiang, S., Ni, H., Zhou, C., et al. (2018). Cell-type-specific and projection-specific brain-wide reconstruction of single neurons. *Nature Methods* 15, 1033–1036.

Lin, R., Liang, J., Wang, R., Yan, T., Zhou, Y., Liu, Y., Feng, Q., Sun, F., Li, Y., Li, A., et al. (2020). The Raphe Dopamine System Controls the Expression of Incentive Memory. *Neuron* S0896627320301082.

Ling, E.A., Penney, D., and Leblond, C.P. (1980). Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the ?ameboid cells? present in the corpus callosum of postnatal rats. *J. Comp. Neurol.* 193, 631–657.

Maaten, L. van der, and Hinton, G. (2008). Visualizing Data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research* 9, 2579–2605.

Madry, C., Kyrargyri, V., Arancibia-Cárcamo, I.L., Jolivet, R., Kohsaka, S., Bryan, R.M., and Attwell, D. (2018). Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 $\beta$  Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K $^{+}$  Channel THIK-1. *Neuron* 97, 299-312.e6.

Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Böttcher, C., Amann, L., Sagar, Scheiwe, C., Nessler, S., Kunz, P., van Loo, G., et al. (2019). Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566, 388–392.

McCarthy, D.J., Campbell, K.R., Lun, A.T.L., and Wills, Q.F. (2017). Scater: pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics* btw777.

McInnes, L., Healy, J., and Melville, J. (2020). UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *ArXiv:1802.03426 [Cs, Stat]*.

McKinsey, G.L., Lizama, C.O., Keown-Lang, A.E., Niu, A., Santander, N., Larphaveesarp, A., Chee, E., Gonzalez, F.F., and Arnold, T.D. (2020). A new genetic strategy for targeting microglia in development and disease. *ELife* 9, e54590.

Ndoja, A., Reja, R., Lee, S.-H., Webster, J.D., Ngu, H., Rose, C.M., Kirkpatrick, D.S., Modrusan, Z., Chen, Y.-J.J., Dugger, D.L., et al. (2020). Ubiquitin Ligase COP1 Suppresses Neuroinflammation by Degrading c/EBP $\beta$  in Microglia. *Cell* S009286742030876X.

Nikodemova, M., and Watters, J.J. (2012). Efficient isolation of live microglia with preserved phenotypes from adult mouse brain. *J Neuroinflammation* 9, 635.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* 308, 6.

Otsu, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9, 62–66.

Pinzar, E., Kanaoka, Y., Inui, T., Eguchi, N., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000). Prostaglandin D synthase gene is involved in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4903–4907.

Pluvinage, J.V., Haney, M.S., Smith, B.A.H., Sun, J., Iram, T., Bonanno, L., Li, L., Lee, D.P., Morgens, D.W., Yang, A.C., et al. (2019). CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in ageing brains. *Nature* 568, 187–192.

Rasch, B., and Born, J. (2013). About Sleep’s Role in Memory. *Physiol Rev* 93, 681–766.

Ronneberger, O., Fischer, P., and Brox, T. (2015). U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. In *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*, N. Navab, J. Hornegger, W.M. Wells, and A.F. Frangi, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 234–241.

Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 19, 746–750.

Schafer, D.P., and Stevens, B. (2015). Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020545.

Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74, 691–705.

Schwartz, W., and Zimmerman, P. (1990). Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J. Neurosci.* 10, 3685–3694.

Sierra, A., de Castro, F., del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., and Kettenmann, H. (2016). The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia: 1919 Río-Hortega Papers on Microglia. *Glia* 64, 1801–1840.

Sierra, A., Paolicelli, R.C., and Kettenmann, H. (2019). Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends in Neurosciences* 42, 778–792.

Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., et al. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131, 1164–1178.

Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 177, 1888-1902.e21.

Sun, Q., Li, X., Ren, M., Zhao, M., Zhong, Q., Ren, Y., Luo, P., Ni, H., Zhang, X., Zhang, C., et al. (2019). A whole-brain map of long-range inputs to GABAergic interneurons in the mouse medial prefrontal cortex. *Nat Neurosci*.

Tuan, L.-H., and Lee, L.-J. (2019). Microglia-mediated synaptic pruning is impaired in sleep-deprived adolescent mice. *Neurobiology of Disease* 130, 104517.

Urade, Y., and Hayaishi, O. (1999). Prostaglandin D2 and sleep regulation. *Biochim Biophys Acta* 1436, 606–615.

Voehringer, D., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2008). Homeostasis and Effector Function of Lymphopenia-Induced “Memory-Like” T Cells in Constitutively T Cell-Depleted Mice. *The Journal of Immunology* 180, 4742–4753.

Walz, W., Ilschner, S., Ohlemeyer, C., Banati, R., and Kettenmann, H. (1993). Extracellular ATP activates a cation conductance and a K<sup>+</sup> conductance in cultured microglial cells from mouse brain. *J. Neurosci.* 13, 4403–4411.

Wang, C., Yue, H., Hu, Z., Shen, Y., Ma, J., Li, J., Wang, X.-D., Wang, L., Sun, B., Shi, P., et al. (2020). Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination. *Science* 367, 688–694.

Wang, T., Wang, Z., Yang, P., Xia, L., Zhou, M., Wang, S., Du, J., and Zhang, J. (2016). PER1 prevents excessive innate immune response during endotoxin-induced liver injury through regulation of macrophage recruitment in mice. *Cell Death & Disease* 7, e2176–e2176.