



微RNA在大脑新皮层层次形成中的调控作用*

舒鹏程^{*,***} 窦欣怡^{**}(中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院, 重大疾病共性机制全国重点实验室,
生物化学与分子生物学系, 北京 100005)

摘要 种类多样的神经元有序排列和特异性的连接形成了大脑新皮层的6层组织, 从而构成了神经系统高级功能的核心。了解大脑新皮层发育形成的机制将为理解哺乳动物乃至人类的生理与行为提供理论基础, 也为神经系统疾病诊疗带来重大影响。本文以微RNA (microRNAs, miRNAs) 为对象, 结合笔者实验室工作, 总结近年来所发现的miRNAs在大脑皮层层次形成过程中的研究进展, 特别是在神经干细胞时序性命运决定、投射神经元多样性的形成、神经元放射状迁移, 以及分裂后神经元进一步命运特化等方面的进展, 为大脑皮层的发育机制研究提供新的思路。

关键词 大脑新皮层, 投射神经元, 层次形成, 微RNA, Dicer

中图分类号 Q522, Q527, Q593+.4

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0314

哺乳动物大脑新皮层 (neocortex) 是神经系统进化中最晚出现的结构, 也是语言、认知、意识、运动决策等高级神经功能的主要控制中心^[1-2]。大量研究证据表明, 大脑皮层发育异常会导致一系列神经精神疾病, 比如自闭症 (autism)、智力障碍 (intellectual disability, ID)、精神分裂症 (schizophrenia) 等^[3-4]。因此, 探索大脑新皮层的组织发生机制对解析脑功能原理具有重要意义, 同时也有助于理解和治疗多种大脑新皮层发育相关的神经精神类疾病。近20年来, 在大脑皮层发育机制研究方面取得了许多重要进展。本文将微RNA (microRNAs, miRNAs) 为切入点, 介绍近年来所发现的其在大脑新皮层层次形成中, 特别是在投射神经元多样性的生成、迁移定位等方面的作用, 以探讨大脑新皮层层次形成的部分调控机制。

1 大脑新皮层层次结构及发育调控概述

层状结构是大脑皮质 (cerebral cortex) 的关键组织特征, 也是执行大脑高级功能的基础。新皮层具有典型的6层结构, 其本质是具有类似形态和连接特征、生理特性的投射神经元亚型的有序排布。投射神经元 (projection neurons, PNs) 又称谷氨酸能兴奋性神经元, 是新皮层中主要的神经元类型, 约占70%~80%^[5]。第II~IV层 (又称为上层或

浅层 upper/superficial layers, UL) 主要是皮质内投射神经元, 其中第IV层 (Layer IV, 简称L4, 下同) 的颗粒细胞, 也被称为棘状星形神经元 (spiny stellate neurons), 负责接受来自丘脑的特异性传入投射纤维, 第II、III层主要是胼胝体投射神经元 (callosal projection neuron, CPN), 将轴突投射到对侧皮层, 从而实现皮质内联系^[6-7]。第VI、V层, 也称为深层 (deep layers, DL) 发出投射纤维联系皮质下结构, 其中第V层主要是大脑下投射神经元 (subcerebral projection neuron, SCPN), 其轴突投射到中脑、桥脑和脊髓等部位形成皮质脊髓束和皮质脑干束等^[5-6, 8], 第VI层主要是皮质丘脑神经元 (corticothalamic projection neuron, CThPN), 其轴突投射到丘脑的不同核团, 将下行信号传回丘脑, 形成皮质丘脑联系^[9]。所以, 新皮层中神经信号传递主要遵循从丘脑→L4→L2/3→L5/6的路径, 这种层次特征的神经环路构成了执行复杂神经功能的基础。

* 国家自然科学基金 (32370883) 和中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-019) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 010-69156434, E-mail: pengcheng_shu@ibms.pumc.edu.cn

投稿日期: 2024-07-12, 收稿日期: 2024-08-31

了解大脑新皮层层次结构的形成过程, 从根本上来说就是了解这些不同类型的投射神经元是如何有序生成并到达其最终定位的过程。目前对新皮层的组织发生特征已经有了比较清晰的认识, 特别是啮齿类动物的大脑新皮层发育。以小鼠大脑新皮层发育为例, 新皮层神经元发育主要在胚胎期 (embryonic day, E) 11.5~17.5 进行, 端脑背侧室周区 (ventricular zone, VZ) 的神经祖细胞 (neural progenitor cells, NPCs), 也就是放射状胶质细胞 (radial glia cell, RGC), 依次生成兴奋性的投射神经元, 这些神经元通过放射状迁移 (radial migration) 到达新皮层相应的位置, 从而形成大脑皮层的分层结构^[3, 10] (图 1a, b)。NPCs 先生成神经元形成前板层 (preplate, PP), 再依次“由里到外 (inside-out)”生成第 VI 到 II 层神经元, 后生成的神经元把前板层分为底板 (subplate, SP) 和第 I 层。在神经元生成过程中, 室周区的 RGC 可以生成次级的前体细胞, 比如中间前体细胞 (intermediate progenitor cell, IPC), 再进一步生成皮层神经元^[11-12]。有观点认为 IPC 跟上层神经元的生成密切相关^[13]。在神经元生成之后, NPCs 转为生成胶质细胞 (E16.5 左右)^[14] (图 1b)。在大多数哺乳动物新皮层中一般有两个生发区 (germinal zones), 即 RGC 所在的室周区 (VZ) 和 IPC 所在的室下区 (SVZ)。但是随着物种的进化, 在多脑回 (gyrencephalic) 物种中还存在外室下区 (outer subventricular zone, oSVZ), 里面包含更多的次级前体细胞, 如 oRG (outer RG), 从而有效增加新皮层发生过程中神经元产生的数量和多样性^[2, 15-17]。

在体 (*in vivo*) Birthdating 标记示踪实验^[18-19]和离体的 (*in vitro*) 干细胞诱导分化实验^[20-22]均清晰地显示了皮层层次以及相应投射神经元是有序形成的, 遵循“由里到外”的生成模式, NPCs 在不同的时间产生不同层次的投射神经元。同时, 雪貂中的干细胞移植实验^[23-26]、慢病毒介导的谱系示踪 (lineage-tracing) 及小鼠遗传学实验^[27-30], 以及体外培养的单个神经干细胞诱导分化实验^[20]等大量的证据表明, 新皮层不同层次投射神经元的命运决定于相应的 NPCs 时期。NPCs 具有一套内源性的机制, 控制其在不同阶段依次生成这些不同类型的神经元。此外, 这些结果还表明, 早期的 NPCs 具有更高的分化潜能, 随着皮层发育的进行而逐步受限 (progressive restriction), 从而确保了这些神

经元依次生成^[23-26]。例如, 小鼠新皮层发育早期 (E11.5) 的 NPCs 能生成 II~VI 层的神经元, 而后期的 NPCs 仅能生成后生成的上层神经元^[20, 27-30]。然而, 对于 NPCs 的分化潜能是否会受限, 目前尚存在争议。有观点认为: 皮层 NPCs 的可塑性是始终维持的, 且其命运由其所处的环境来决定^[31]。此外, 新生成的神经元在其成熟过程中, 其命运将进一步特化 (specification), 从而获得特异的细胞特性, 包括分子标志、电生理特性以及连接特征等。例如, 第 V 层含有大脑下投射神经元和胼胝体投射神经元两种不同神经元, 其命运的确定需要在分裂生成之后通过不同的调控程序使其特化^[8, 32-34]。

探索大脑皮层神经元命运决定的分子调控网络是理解新皮层层次发育机制的关键。在过去十多年间, 随着高通量技术的进展, 陆续鉴定出一些调控亚型发育的分子, 比如 *Fezf2*、*Ctip2*、*Satb2*、*Sox5*、*Tbr1* 等内源性的转录因子^[6, 35], 以及如 *Wnt*^[36-37]、*Notch*^[38-39] 等细胞内外的关键信号。但总体而言, 目前对新皮层投射神经元命运特化的分子网络以及调控机制的理解仍然有限, 还需要进一步深入探索。

2 miRNA 对大脑皮层层次形成是必要的: 来自 Dicer 敲除小鼠的启示

miRNAs 是一种长度为 18~25 个核苷酸的非编码小 RNA, 通过调控其靶基因的表达来发挥相应作用。miRNA 最早于 1993 年被 Lee 等^[40]在秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 中发现, 其功能就是调控线虫发育的时序性。随后 10 年间, 针对 miRNAs 的生成、作用机制、生理与病理功能等方面开展了大量的研究^[41-42]。有文献表明, 大约 70% 的 miRNAs 在哺乳动物大脑中表达, 且许多 miRNAs 具有细胞类型或者发育阶段特异性的表达特征^[43], 暗示了 miRNAs 可能在神经系统发育中的多个阶段起重要作用。迄今为止, 大量研究报道了 miRNAs 参与神经系统的多个发育过程, 也有综述总结了这些进展^[44-47]。然而, 这些研究主要集中在神经干细胞的增殖和分化调控中, 例如 miR-124^[48]、miR-137^[49]、miR-9^[50]、miR-214^[51]、miR-15b^[52]、miR-17-92 cluster^[53-54]等, 或者是调控突触可塑性, 比如 miR-132^[55]、miR-134^[56]。

对于 miRNAs 在大脑皮层发育中的作用, 最早的证据来自 Dicer 条件敲除小鼠。Dicer 是几乎所有 miRNAs 生成所必需的酶, 用来将 miRNA 前体

(precursor-miRNA, 简称 pre-miRNA) 加工成成熟的 miRNAs^[41, 57]。因此对其进行缺失可以间接反映 miRNAs 在皮层发育中的重要性以及参与了其中哪些方面。Dicer 全敲小鼠会在 E8.5 死亡^[58], 因此多个实验室分别利用不同 Cre 工具鼠进行 Dicer 条件性敲除 (cKO) 来开展探索。不同品系工具鼠 Cre 重组酶的时空表达差异, 导致了不一样的表型 (表 1)。比如使用 Emx1-cre^[59] 或 Emx1^{IREs}-cre^[60] 所介导的 Dicer 敲除都引起大脑新皮层发育缺陷的表型, 但不完全一致。其中 Emx1-cre 介导的 Dicer 敲除引起皮层发育中后期的 NPCs 大量凋亡, 并导致皮层 II~III 层神经元数量减少以及迁移异常^[59];

而 Saurat 等^[60] 利用 Emx1^{IREs}-cre 介导 Dicer 敲除后发现 NPCs 持续产生第 VI 层的神经元, 从而无法生成皮层 II~V 层神经元。需要指出的是, 部分品系中所描述的表型可能是继发性的, 比如 Foxg1-Cre, 该 Cre 表达在 RGC 生成之前, 且在端脑几乎所有神经细胞中均有表达, 可能会影响 RGC 的生成^[61]。此外, 该小鼠构建策略是用 Cre 替换了 Foxg1 的一条等位基因, 因此也存在 Foxg1 单倍体功能不全所产生神经发育方面的表型^[62]。再例如, Nestin-cre 在早期的皮层神经干细胞中具有重组活性较弱的问题^[63], 因此在 E15.5 还能检测到弱的 Dicer 以及 miRNAs 的表达^[64]。

Table 1 Comparison of the phenotypes of six strains of Dicer conditional knockout mice
表1 六种品系Dicer条件敲除小鼠表型的异同比较

表型描述	小鼠品系					
	Emx1-Cre	Nestin-Cre	Foxg1-Cre	CamKII-Cre	D6-cre	hGFAP-cre
Cre表达的时 间与部位	E9.5开始表达在端脑 背侧大部分细胞	E10.5开始表达在 RGC	E8.5开始表达在端 脑大部分细胞	E15.5开始表达在大 脑皮层及海马的分 裂后神经元	E10.5~E11开始表达 在背部端脑	E12.5开始表达 在背部新皮质和 海马
检测miRNA 缺失情况及 时间点	E10.5大量减少; E12.5基本检测不到	E15.5大量减少; E18.5时检测不到	E11.5已检测不到	P15和P21时均可见 减少	E13.5明显减少; E16.5几乎检测不到	E13.5可见减少; E16.5几乎检测 不到
纯合型小鼠 生存情况	P30前死亡	E18.5可见死亡; 但 活不到P0	未提及	P2可见死亡; 但活 不到P21	P28左右死亡	P18~20左右死亡
脑大小与皮 层厚度和海 马结构	脑变小, 大脑皮层明 显变薄, 海马 缺失	E18.5时可见脑变小; 皮层变薄, 脑室增大	脑变小; E13.5时发 现皮层变薄	端脑变小, 脑室 增大	端脑变小、皮层变 薄、脑室增大	端脑变小、皮层 变薄、脑室增 大、海马 缺陷
细胞生存 状态	E14.5时可见皮层大 量细胞凋亡, 特别是 生发区	E18.5检测细胞死亡 增多, 主要在生发 区, 在CP中未见	E11.5检测到细胞 凋亡	P0时检测到明显细 胞凋亡, 主要在室 周区	E14.5、E16.5均未见 明显的细胞凋亡	E14.5、E16.5均 未见明显的细胞 凋亡
NPCs数量及 增殖情况	E14.5时前体细胞增 殖减少, 其中 SVZ>VZ	RGCs未提及; IPs未 见明显异常	RGCs和IPs均出现明 显异常, IPs范围 扩大	未提及	至E16.5时RGCs数量 未见明显减少, IPs 明显减少	至E16.5时RGCs 数量未见明显减 少, IPs明显减少
神经元命运 改变	神经元命运特化异 常, 特别是上层神 经元	后期产生 (late- born) 的上层神经元 生成减少	皮层发育早期未见 明显神经元分化 异常	未提及	命运特化异常: 同时 表达多种标志或者 缺失	神经元命运特化 异常
神经元迁移	神经元迁移异常	上层神经元迁移异常	新生神经元分布 异常	未提及	深层与浅层倒置, 神 经元迁移异常	II~IV层的神经元 存在明显的迁移 障碍
大脑皮层层 次发育改变	层次结构破坏, 神经 元数量剧减且分布 混乱	皮层层次发育异常, 浅层神经元发育缺陷	未提及 (未检测后 期组织结构)	未见异常	层次结构混乱、神经 元分布异常	皮层层次发育缺 陷, 深层与浅层 混乱
参考文献	[59-60, 64-66]	[64]	[67]	[68]	[65-66]	[65-66]

有研究选择了Emx1^{ires}-Cre、D6-Cre、hGFAP-Cre三种品系Cre工具鼠对皮层发育不同时期的Dicer进行条件性敲除^[65-66]。三种Cre均在端脑背侧的神经祖细胞中表达,但各有特点^[66]。D6-Cre和hGFAP-Cre介导的Dicer条件性敲除不会出现Emx1^{ires}-Cre所出现的皮层发育中期的NPCs大量凋亡,继而影响皮层发育的现象^[65-66]。通过比较三种Cre品系介导Dicer缺失后对大脑皮层发育的影响,证实了miRNAs在新皮层不同类型投射神经元的有序生成中是必需的。特别是D6-cre介导的Dicer缺失皮层主要表现如下三个特征:a. 深层神经元与浅层神经元分布倒置;b. 层次命运特化异常,同一神经元同时表达多个层次的标志基因(神经元命运混乱),以及部分层次标志基因表达缺失(例如ROR-β+的第IV层神经元和ER81+的第V层神经元);c. 在神经元发生开始以后,miRNAs缺失基本不影响RGCs的数量和增殖,以及生成神经元的能力(比如Birthdating实验中所标记细胞的数量)^[65]。这些结果表明,miRNAs在大脑新皮层发育过程中能促进各层和各类型神经元的精细特化。

3 miRNA通过调控放射状胶质细胞时序性命运来影响层次发育

虽然基于Dicer敲除小鼠的研究提示miRNAs对皮层发育的作用,包括皮层层次的形成,但是具体是哪种miRNA在调控皮层层次的发生仍不清楚。尽管有一些报道发现miRNA能调控新皮层的发育,但基本是描述相应miRNAs对神经干细胞增殖分化的影响。Zhang等^[69]发现miR-128靶向PCMI来调控NPCs的增殖和分化的平衡;Let-7家族的let-7a^[70]、let-7b^[71]以及let-7d^[72]均被认为可以影响神经干细胞的分化过程,其中7b和7d均可以靶向TLX来促进神经干细胞分化^[71-72];miR-9被报道可以靶向转录因子FoxG1、Hes1和Tlx来调控NPCs的增殖状态^[50]。另一些研究则关注miRNA对神经元迁移的调控作用上^[73-75],比如Franzoni等^[75]发现,miR-128可以靶向Phf6调控神经元的迁移、神经元的形态以及兴奋性。但对miRNAs皮层层次形成以及投射神经元多样性产生的调控作用一直没得到很好的解答。

Shu等^[76]基于芯片及测序数据,对近300个在小鼠新皮层发育阶段表达丰度较高或者有动态变化的miRNAs进行原位杂交分析,以检测这些miRNAs在大脑发育不同时间点的时空表达特征。

从中发现了许多具有特异表达模式的miRNAs,特别是发现了15个具有皮层层次相对特异或高表达的miRNAs^[76],以及在神经祖细胞中表达,且呈现时序性的浓度梯度变化的miRNAs。在对miRNAs表达图谱进行分析的同时还对其进行了功能筛选,鉴定出数个miRNAs在皮层发育过程中具有重要作用。

如前所述,哺乳动物大脑新皮层的形成过程本质上是神经干细胞时序命运调控(temporal patterning)的过程,即端脑背侧的神经干细胞通过内在的固有程序有序生成大脑皮层不同层次的投射神经元,这些神经元有序排布从而形成新皮层的分层结构。在新皮层形成过程中,miR-128、miR-9和let-7在神经发生过程中形成了两个时间依赖且表达上相反的浓度梯度,miR-128和miR-9在神经干细胞中表达由高到低,而let-7家族miRNAs呈现由低到高趋势。有趣的是,在皮层层次形成过程中,这些miRNAs通过它们相对水平的变化来调控神经干细胞依次生成由深到浅不同层次的神经元,而且表达梯度上相反的miRNAs在功能上相互拮抗。miR-128、miR-9和let-7在新皮层不同层次的命运特化过程中可以分别促进第VI层、第V层和第IV~II层神经元的生成^[65](图1d)。该研究报告哺乳动物中存在时间上(temporal)的“Opposing Gradients”,建立了一个皮层发育中的“时序双梯度调控模型”,即miRNA的浓度梯度是神经祖细胞时序性命运决定的关键组成部分。同时该研究发现,miRNAs对皮层神经干细胞的分化潜能(competence)具有调控作用,miRNAs可以在一定程度上逆转晚期神经干细胞的分化潜能,证明了miRNAs对干细胞命运可塑性的调控作用,而且存在一定的时间窗口^[65]。这些研究结果与之前的研究结果一致^[77-79],即神经干细胞会随着时间的推移其分化潜能逐步受限,逐渐失去响应早期信号的能力,从而无法再生成早期产生(early-born)的神经元^[25, 80]。

有意思的是,针对miR-9的小鼠遗传学结果强有力地证明了该miRNA对皮层层次发育的影响。Shibata等^[73]构建了小鼠mir-9-2和mir-9-3(同一个成熟的miRNA可以由多个不同的miRNA基因位点产生,在小鼠基因组中有三个位点可以产生miR-9,这三个位点分别称为mir-9-1~3)双突变小鼠,该小鼠表现出皮层层次发育缺陷,他们认为这是由于miR-9对NPCs增殖和向神经元的分化过程中

所起的调控作用所致, miR-9的敲除会增强NPCs的增殖能力,同时延缓神经分化的时间,从而影响皮层层次形成。但是其结果并不能很好地支持该观点,因为在该敲除小鼠中各层次的改变各不相同,特别是第V层神经元的缺失明显比其他层次严重,而第IV层的变化并不明显,因此反而更支持miR-9对特定层次发育起重要作用的观点。此外, Han等^[39]发现, Notch信号调控皮层层次的发育,特别是上层神经元的生成,该过程是通过let-7、miR-99a/100和miR-125b这个miRNA簇(clusters)来实现的,这也进一步证明了let-7对上层神经元发育的作用。

视网膜中的研究也支持了miRNAs对神经干细胞时序性命运的调节作用。视网膜也是一个具有层状结构的中枢神经系统组织,其中不同类型的神经元也是时序性产生的。Torre等^[81]发现, Dicer敲除影响视网膜中后期产生的神经元的生成,并发现let-7、miR-125和miR-9等视网膜中后期干细胞高表达的miRNA对后期神经元的生成是必需的,提示这种调控模式在不同器官发育中可能是保守的。miR-9^[65]和miR-125(未发表数据)在大脑皮层发育中的作用跟在视网膜中并不相同,而let-7参与到大脑皮层晚期神经元的命运特化这一点与视网膜发育以及该家族成员在线虫和果蝇时序性发育中的作用近似,表明了该家族在功能上的保守性^[82-84]。

4 miRNA通过调控中间前体细胞的命运决定来影响层次发育

除了miRNAs对RGCs时序性命运的调控外, miRNAs还能通过调控中间前体细胞(IPCs)的命运,进而影响皮层不同层次的发育。目前有多个miRNAs被报道参与到IPC的命运决定,包括miR-17-92簇^[53-54, 85]、miR-34/449^[86]、miR-7^[87]等。其中研究最为详尽的是miR-17-92簇, Bian等^[53]发现, miR-17-92簇主要表达在室周区,在发育中的新皮层中敲除miR-17-92及其旁系同源物可抑制RGCs扩增,并促进RGCs向IPCs的转变。进一步的研究表明, miR-17-92簇是通过抑制Pten和Tbr2的表达来控制RGCs自我维持以及向IPCs的转变。类似的, Nowakowski等^[54]在同一时期报道了miR-17-92簇中的miRNA-92b通过靶向Tbr2抑制IPCs的生成。此外, Fei等^[85]发现, miR-92可以作用于Tis21的3'非翻译区(UTR)来调控Tis21的表达,敲除Tis21的3'UTR会导致皮层上层神经元生

成减少。之后, Shu等^[76]发现, 过表达miR-92b能促进干细胞的分化,减少Tbr2的生成,从而提前生成更上层的神经元。

另外,最近还发现了与oSVZ发育相关的两种miRNAs、miR-137和miR-122^[88]。在雪貂和人脑中, miR-137和miR-122在皮层上层发生期间在oSVZ中高表达,但在无脑回的小鼠新皮层中不具备这种表达特征。在小鼠新皮层中过表达这两种miRNAs能促进皮层上层的生成,但是作用机制并不相同。miR-137主要作用于IPCs,促进IPCs的生成并维持其增殖状态,通过IPCs的扩增进而影响上层神经元的产生。miR-122则作用于新生成的神经元,通过延缓新生神经元的迁移以及特化成熟的速度,从而促进皮层上层神经元的生成^[88]。同样具有物种特异性的还有miR-3607, miR-3607在多种多脑回动物新皮层的生发区中表达,比如雪貂以及包括人类在内的多种灵长类动物中,而不在小鼠皮层中表达。与miR-137和miR-122不同的是, mir-3607主要表达在VZ和内室下区(inner SVZ, ISVZ),而不是oSVZ。miR-3607能够通过抑制APC表达来增强Wnt信号活性,进而促进多脑回动物NPCs细胞的扩增。有意思的是,在小鼠新皮层中过表达miR-3607不仅能促进RGCs的扩增,还能改变上层神经元的迁移和定位^[89]。

5 miRNA对大脑皮层投射神经元迁移的调控

在大脑新皮层发育过程中,新生成的神经元需要通过迁移才能到达其最终的目的地,其中投射神经元是通过放射状迁移的方式到达特定的皮层部位,由内到外逐层生成不同层次^[10]。目前认为,放射状迁移具有两种不同的迁移方式:神经元胞体易位(somal translocation)和移动(locomotion)^[10]。早期形成前板(PP)的神经元迁移方式是胞体易位;而形成皮质板(CP)的大部分投射神经元则是通过RGC依赖的移动(radial glia-guided locomotion)来进行迁移。在RGC依赖的移动过程中,可以将其分为几个阶段(图1c)^[10, 90],其中多极向双极转换的这个过程对新皮层神经元的正确迁移和定位至关重要^[91-93]。这个过程也是神经元极性建立的过程,朝向皮层顶部称为引导突起(leading process),对神经元迁移和定位具有重要作用,朝向VZ的称为尾随突起(trailing process),将来发展成神经元的轴突。

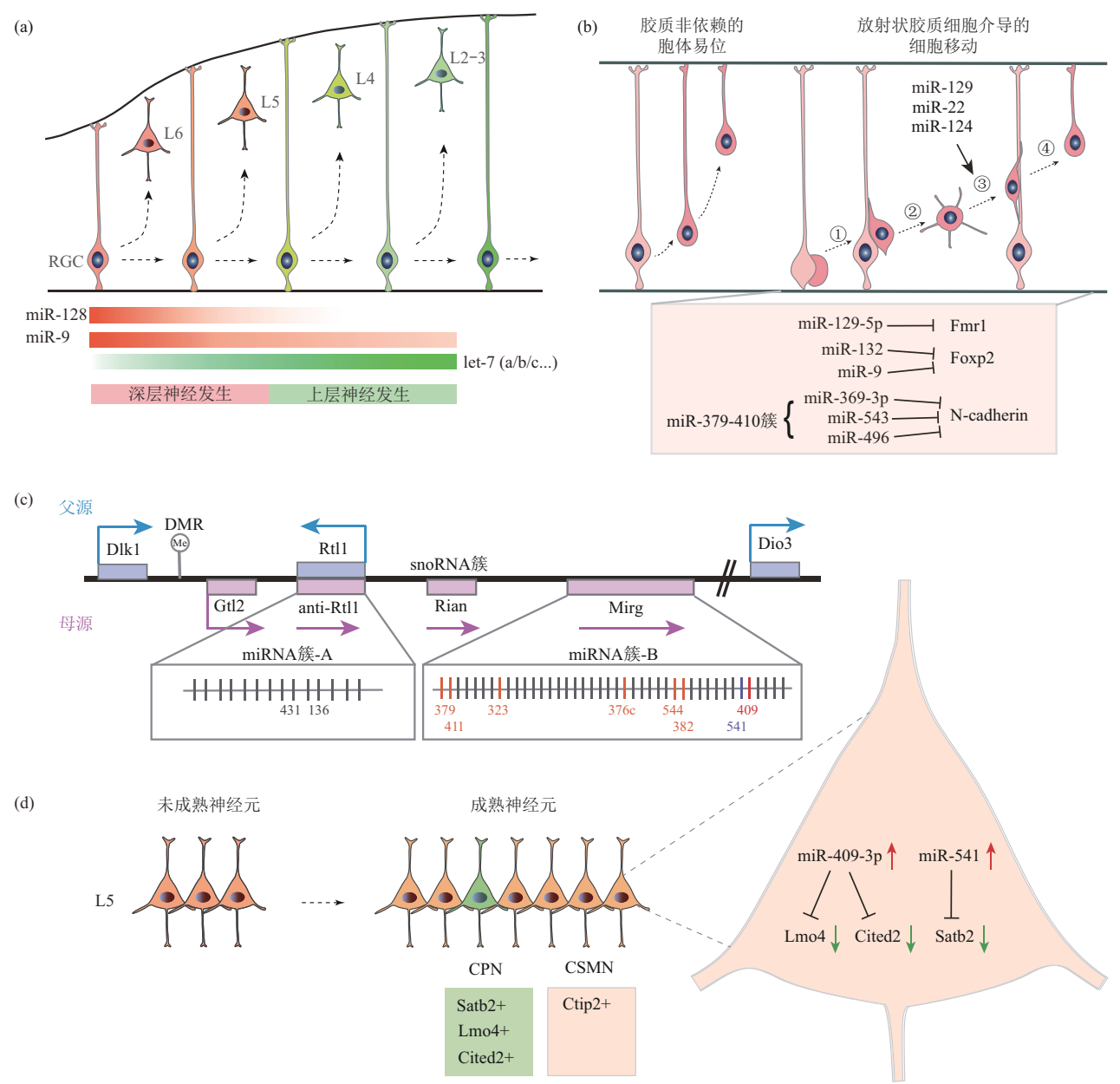


Fig. 1 miRNAs regulate the generation and migration of projection neurons in the mouse neocortex

图1 miRNAs调控小鼠新皮层中投射神经元的生成与迁移

(a) 在神经元生成时期, 放射状胶质细胞作为神经祖细胞分别在相应时间段内依次生成不同类型投射神经元。梯度表达的时序性miRNA (temporal miRNA) 通过它们相对水平的变化来调控小鼠大脑新皮层放射状胶质细胞时序命运决定。RGC: 放射状胶质细胞。(b) miRNAs 调控神经元迁移。左侧为胶质非依赖的胞体移动 (glia-independent somal translocation), 右侧为放射状胶质细胞介导的细胞移动 (radial glia-guided locomotion), 图中①~④显示该过程的四个阶段: ①是新生的神经元沿着放射状胶质细胞向SVZ移动; ②是多极 (multipolar) 阶段, 新生神经元从放射状胶质细胞上脱离, 此时的神经元有多个突起, 呈现多极形态; ③是神经元从多极形态转变成双极 (bipolar) 形态, 再依赖RGC支架作用下向指定位置进行移动; ④是迁移的神经元通过胞体易位到达目的地。期间多个miRNAs被报道参与神经元的迁移过程, 特别是在阶段3时调控多级向双极形态的转换。(c, d) Mirg簇 (cluster) 中的不同miRNAs调控神经元亚型形成的调控第V层CPN和CSMN神经元的特化。(c) 是小鼠中Mirg簇的基因组定位情况以及其中可能参与第V层神经元亚型命运决定的miRNAs。Mirg簇位于Dlk1-Dio3印记基因区, 颜色和箭头标示父源与母源基因的分布及转录方向。下方方框内示意相应簇内miRNAs的分布, 数字代表miRNA名。(d) 是CSMN神经元中表达miR-409-3p和miR-541, 分别抑制CPN命运特化因子Lmo4、Cited2、Satb2的表达, 从而使之获得CSMN的命运。CPN: 胼胝体投射神经元; CSMN: 皮质脊髓运动神经元。

来自 Dicer cKO 小鼠的证据表明, miRNAs 对神经元迁移的过程也起重要的调控作用。例如, McLoughlin 等^[94]通过对神经前体细胞特异表达的 Nestin-Cre-Dicer 条件性敲除小鼠的分析,发现皮层神经元放射状迁移存在缺陷,同时 CR 细胞的数量明显增多,表明 miRNAs 可以参与到神经元的迁移过程中。但是具体调控神经元迁移的 miRNAs 报道较少,包括前文提到的 miR-128^[75]、miR-3607^[89]等。此外,在神经元迁移过程中还存在多个 miRNAs 的协同作用。比如 miR-9 和 miR-132 对 FoxP2 的协同调控作用共同影响了神经元放射状迁移的过程^[95]。有意思的是, Pedersen 等^[96]报道哺乳动物 miR-9 在线虫中的直系同源物 mir-79 能通过调节蛋白多糖的生物合成来影响线虫的神经元迁移。另外, miR-379-410 cluster 也被报道在神经元放射状迁移中起调控作用,该 cluster 中的 3 个 miRNAs (miR-369-3p、miR-496 和 miR-543) 均可以直接调控 N-cadherin, 从而影响神经元迁移的过程。过表达这三个 miRNAs 可以促进神经细胞的分化和迁移^[97]。在多极向双极转换的过程中,也有 miRNAs 被报道参与其中。miR-129 能参与脆性 X 综合征相关分子 Fmr1 对皮层神经元迁移的调控, Fmr1 不仅可以拯救 miR-129 过表达引起的迁移神经元的细胞形态改变,还能拯救 miR-129 过表达引起的神经元迁移障碍^[98]。此外, CoREST 可以在 miR-22 和 miR-124 的调控下影响 DCX 的转录从而促进神经元多极向双极转换的迁移过程^[99]。

6 miRNA对分裂后神经元亚型形成的调控

新皮层的 6 层分层结构并不意味着每一层中细胞类型是单一的,而实际上存在异质性 (heterogeneity), 比如同一层次中存在不同类型的投射神经元, 而且皮层层次存在亚层结构 (sublaminar), 比如啮齿类皮层 L6 可以分为 6a 和 6b 两个亚层, 其神经元的分子表达和连接特征并不相同^[1, 32, 100]。研究发现, miRNA 可以促进特定亚型神经元的形成, 从而产生大脑皮层投射神经元的多样性和投射特异性。最早的报道来自 Jeffrey D. Macklis 和 Suzanne Tharin 实验室。Macklis 等^[101]在 2009 年发现, 第 V 层的皮质脊髓运动神经元 (corticospinal motor neurons, CSMN) 和胼胝体投射神经元 (CPN) 在小鼠 E13.5 时同时生成, 并迁移至皮层深层, 在 E15.5 开始进一步命运特化, 表达不同的特异性基因, 其中 CSMN 表达

Ctip2、Clim1 等, 而 CPN 表达 Lmo4 之后两者分别实现不同的投射特征和功能^[101]。LMO4 是一种 LIM 同源域转录因子, 最初在 CSMN 和 CPN 均表达, 在发育后期逐渐局限于 CPN, 但其中的调控机制并不清楚。Diaz 等^[102]通过表达谱比较发现 17 个在 CSMN 中富集的 miRNAs, 有意思的是, 这 17 个 miRNAs 分别属于两个 miRNAs 簇, 其中有 15 个属于小鼠 Mirg/12qF1 miRNA cluster, 而且该基因组簇是真兽亚纲 (Eutherian) 动物独有的。进一步研究发现, 这 15 个 miRNAs 中的 miR-409-3p 能够抑制 CPN 发育关键的转录调节因子 Lmo4 的表达, 从而促进 CSMN 亚型的身份获得。在体内过表达 miR-409-3p 能够将深层 CPN 转变为 CSMN^[102]。在此之后, Suzanne Tharin 课题组^[103]进一步发现, miR-409-3p 还直接抑制另外一个 CPN 发育的重要调节因子 Cited2, 该调节因子在 CPN 高度表达, 调节新皮层第 II/III 层的生成和胼胝体投射神经元的发育和连接^[104]。Cited2 与 Lmo4 在遗传上相互作用, Cited2 和 LMO4 分别作为体感和运动皮层浅层胼胝体投射神经元内特定区域身份的相反分子控制^[104]。miR-409-3p 能负调控 Cited2, 从而影响 SVZ 中 IPCs 的扩增, 抑制浅层 CPN 的产生^[103]。

此外, Federico Cremisi 实验室^[105]通过研究其他神经元亚型的调控因子, 比如 *Tbr1*、*Bcl11b*、*Fef2*、*Satb2* 和 *Cux1* 等 mRNAs 的表达特征及稳定性, 发现 *Satb2* mRNA 比其蛋白质出现早得多, 提示其存在转录后调控, 进而研究发现 miR-541 和 miR-92a/b 结合 *Satb2* 的 3'UTR 并阻止其翻译。SATB2 蛋白在小鼠中出现的准确时间对于 II~III 层 CPN 神经元的轴突投射至关重要。miR-541 可以在体外和体内结合 *Satb2* 3'UTR 并抑制翻译, 这提供了一种有助于这种异时性转变的分子机制^[105]。需要指出的是, miR-541 也是 Mirg/12qF1 miRNA cluster 中的一个成员, 仅存在于 Dlk1-Dio3 位点内, 这说明该 miRNA cluster 可能是 CPN 重要决定分子之一。

7 展 望

综上所述, miRNA 是大脑皮层的层次形成中必不可少的调控因子, 可以在层次形成的多个环节发挥作用。然而, 目前对 miRNA 在大脑皮层的层次形成中的作用和机制的了解仍不完整, 还有大量的问题需要解答。比如以下两个方面:

第一, 近年来大量新的 miRNAs 被鉴定出

来^[106], 目前人类 miRNA 的总数估计为~2 300 个^[107], 远远多于当年 miRNAs 研究热门时期所发现的数量。但是, 这些新发现的 miRNAs 是否参与大脑皮层发育调控以及它们的具体作用尚不了解。此外, 在皮层层发育过程中也还有很多未曾解答的问题, 比如近年来发现中间神经元^[108-109]和星形胶质细胞^[110]同样也具有层次特异性的分布特征, 是否存在 miRNAs 参与尚不知晓。此外, miRNAs 在多脑回动物, 特别是灵长类大脑皮层的发育中的作用目前报道还比较少, 均有待进一步挖掘。

第二, 目前的研究大多遵循“miRNA—靶基因—生物学作用”的研究范式, 但发育过程中基因表达是一个网络式调控方式, 而 miRNA 是其中的一个层面^[106]。同一个 miRNA 能调控多个靶基因, 同时多个 miRNAs 又能同时调控同一个靶基因。甚至 miRNA 和靶基因之间会形成双负反馈回路来保证调控程序稳健性。这种网络必然存在时空的特异性, 在不同细胞或不同阶段会有选择地作用于其中部分靶基因, 而这种特异性是如何建立的还有待解答。在这个网络中, miRNAs 是如何被调控的, 又如何选择性地调控了哪些基因? 以前文所提到的调控神经干细胞时序命运决定的 Temporal miRNAs 为例, 这些 miRNAs 浓度梯度是如何形成的, 其上游的原始驱动信息是什么, 其作用的时间窗又是如何被调控的, 等等问题均有待进一步阐明。

致谢 感谢中国医学科学院基础医学研究所强伯勤研究员、彭小忠研究员以及博士生余浩洋帮助审阅和提出宝贵意见。

参 考 文 献

- [1] Jabaudon D. Fate and freedom in developing neocortical circuits. *Nat Commun*, 2017, **8**: 16042
- [2] Cadwell C R, Bhaduri A, Mostajo-Radji M A, *et al*. Development and arealization of the cerebral cortex. *Neuron*, 2019, **103**(6): 980-1004
- [3] Kwan K Y, Sestan N, Anton E S. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*, 2012, **139**(9): 1535-1546
- [4] Lein E S, Belgard T G, Hawrylycz M, *et al*. Transcriptomic perspectives on neocortical structure, development, evolution, and disease. *Annu Rev Neurosci*, 2017, **40**: 629-652
- [5] Lodato S, Arlotta P. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2015, **31**: 699-720
- [6] Greig L C, Woodworth M B, Galazo M J, *et al*. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*, 2013, **14**(11): 755-769
- [7] Fame R M, MacDonald J L, Macklis J D. Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci*, 2011, **34**(1): 41-50
- [8] Molnár Z, Cheung A F P. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res*, 2006, **55**(2): 105-115
- [9] Galazo M J, Emsley J G, Macklis J D. Corticothalamic projection neuron development beyond subtype specification: Fog2 and intersectional controls regulate intraclass neuronal diversity. *Neuron*, 2016, **91**(1): 90-106
- [10] Evsyukova I, Plestant C, Anton E S. Integrative mechanisms of oriented neuronal migration in the developing brain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013, **29**: 299-353
- [11] Gao P, Postiglione M P, Krieger T G, *et al*. Deterministic progenitor behavior and unitary production of neurons in the neocortex. *Cell*, 2014, **159**(4): 775-788
- [12] Di Bella D J, Domínguez-Iturza N, Brown J R, *et al*. Making Ramón y Cajal proud: development of cell identity and diversity in the cerebral cortex. *Neuron*, 2024, **112**(13): 2091-2111
- [13] Mihalas A B, Elsen G E, Bedogni F, *et al*. Intermediate progenitor cohorts differentially generate cortical layers and require Tbr2 for timely acquisition of neuronal subtype identity. *Cell Rep*, 2016, **16**(1): 92-105
- [14] Miller F D, Gauthier A S. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron*, 2007, **54**(3): 357-369
- [15] Xu L, Yuan Z, Zhou J, *et al*. Temporal transcriptomic dynamics in developing macaque neocortex. *eLife*, 2024, **12**: RP90325
- [16] Lui J H, Hansen D V, Kriegstein A R. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*, 2011, **146**(1): 18-36
- [17] Thor S. Indirect neurogenesis in space and time. *Nat Rev Neurosci*, 2024, **25**(8): 519-534
- [18] Angevine J B, Sidman R L. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 1961, **192**: 766-768
- [19] Rakic P. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*, 1974, **183**(4123): 425-427
- [20] Shen Q, Wang Y, Dimos J T, *et al*. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci*, 2006, **9**(6): 743-751
- [21] Gaspard N, Bouchet T, Hourez R, *et al*. An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature*, 2008, **455**(7211): 351-357
- [22] Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, *et al*. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(5): 519-532
- [23] McConnell S K. Migration and differentiation of cerebral cortical neurons after transplantation into the brains of ferrets. *Science*, 1985, **229**(4719): 1268-1271

- [24] McConnell S K. Fates of visual cortical neurons in the ferret after isochronic and heterochronic transplantation. *J Neurosci*, 1988, **8**(3): 945-974
- [25] Desai A R, McConnell S K. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development*, 2000, **127**(13): 2863-2872
- [26] Frantz G D, McConnell S K. Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron*, 1996, **17**(1): 55-61
- [27] Luskin M B, Pearlman A L, Sanes J R. Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied *in vivo* and *in vitro* with a recombinant retrovirus. *Neuron*, 1988, **1**(8): 635-647
- [28] Price J, Thurlow L. Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development*, 1988, **104**(3): 473-482
- [29] Reid C B, Liang I, Walsh C. Systematic widespread clonal organization in cerebral cortex. *Neuron*, 1995, **15**(2): 299-310
- [30] Tan S S, Kalloniatis M, Sturm K, *et al.* Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron*, 1998, **21**(2): 295-304
- [31] Oberst P, Fièvre S, Baumann N, *et al.* Temporal plasticity of apical progenitors in the developing mouse neocortex. *Nature*, 2019, **573**(7774): 370-374
- [32] Thomson A M. Neocortical layer 6, a review. *Front Neuroanat*, 2010, **4**: 13
- [33] Arlotta P, Molyneaux B J, Chen J, *et al.* Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development *in vivo*. *Neuron*, 2005, **45**(2): 207-221
- [34] Molyneaux B J, Arlotta P, Menezes J R L, *et al.* Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 2007, **8**(6): 427-437
- [35] Paolino A, Fenlon L R, Suárez R, *et al.* Transcriptional control of long-range cortical projections. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, **53**: 57-65
- [36] Mutch C A, Funatsu N, Monuki E S, *et al.* Beta-catenin signaling levels in progenitors influence the laminar cell fates of projection neurons. 2009, **29**(43): 13710-13719
- [37] Ruan X, Liu G, Zhou J, *et al.* Zbed3 is indispensable for Wnt signaling regulation of cortical layers formation in developing brain. *Cereb Cortex*, 2021, **31**(9): 4078-4091
- [38] Son A I, Mohammad S, Sasaki T, *et al.* Dual role of Rbpj in the maintenance of neural progenitor cells and neuronal migration in cortical development. *Cereb Cortex*, 2020, **30**(12): 6444-6457
- [39] Han J S, Fishman-Williams E, Decker S C, *et al.* Notch directs telencephalic development and controls neocortical neuron fate determination by regulating microRNA levels. *Development*, 2023, **150**(11): dev201408
- [40] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *Lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *Lin-14*. *Cell*, 1993, **75**(5): 843-854
- [41] Shang R, Lee S, Senavirathne G, *et al.* MicroRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet*, 2023, **24**(12): 816-833
- [42] Ros X B D, Ørom U A V. Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biol*, 2024, **21**(1): 1-8
- [43] Krichevsky A M, King K S, Donahue C P, *et al.* A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*, 2003, **9**(10): 1274-1281
- [44] Volvert M L, Rogister F, Moonen G, *et al.* MicroRNAs tune cerebral cortical neurogenesis. *Cell Death Differ*, 2012, **19**(10): 1573-1581
- [45] Ji F, Lv X, Jiao J. The role of microRNAs in neural stem cells and neurogenesis. *J Genet Genom*, 2013, **40**(2): 61-66
- [46] Kawahara H, Imai T, Okano H. MicroRNAs in neural stem cells and neurogenesis. *Front Neurosci*, 2012, **6**: 30
- [47] Lang M F, Shi Y. Dynamic roles of microRNAs in neurogenesis. *Front Neurosci*, 2012, **6**: 71
- [48] Makeyev E V, Zhang J, Carrasco M A, *et al.* The microRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2007, **27**(3): 435-448
- [49] Sun G, Ye P, Murai K, *et al.* MiR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. *Nat Commun*, 2011, **2**: 529
- [50] Coolen M, Katz S, Bally-Cuif L. MiR-9: a versatile regulator of neurogenesis. *Front Cell Neurosci*, 2013, **7**: 220
- [51] Shu P, Fu H, Zhao X, *et al.* MicroRNA-214 modulates neural progenitor cell differentiation by targeting Quaking during cerebral cortex development. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 8014
- [52] Lv X, Jiang H, Liu Y, *et al.* MicroRNA-15b promotes neurogenesis and inhibits neural progenitor proliferation by directly repressing TET3 during early neocortical development. *EMBO Rep*, 2014, **15**(12): 1305-1314
- [53] Bian S, Hong J, Li Q, *et al.* MicroRNA cluster miR-17-92 regulates neural stem cell expansion and transition to intermediate progenitors in the developing mouse neocortex. *Cell Rep*, 2013, **3**(5): 1398-1406
- [54] Nowakowski T J, Fotaki V, Pollock A, *et al.* MicroRNA-92b regulates the development of intermediate cortical progenitors in embryonic mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(17): 7056-7061
- [55] Edbauer D, Neilson J R, Foster K A, *et al.* Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 2010, **65**(3): 373-384
- [56] Gao J, Wang W Y, Mao Y W, *et al.* A novel pathway regulates memory and plasticity *via* SIRT1 and miR-134. *Nature*, 2010, **466**: 1105-1109
- [57] Wu J, Yu H, Huang H, *et al.* Functions of noncoding RNAs in glial development. *Dev Neurobiol*, 2021, **81**(7): 877-891
- [58] Bernstein E, Kim S Y, Carmell M A, *et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 2003, **35**(3): 215-217
- [59] De Pietri Tonelli D, Pulvers J N, Haffner C, *et al.* miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. *Development*, 2008, **135**(23): 3911-3921

- [60] Saurat N, Andersson T, Vasistha N A, *et al.* Dicer is required for neural stem cell multipotency and lineage progression during cerebral cortex development. *Neural Dev*, 2013, **8**: 14
- [61] Hébert J M, McConnell S K. Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol*, 2000, **222**(2): 296-306
- [62] Siegenthaler J A, Tremper-Wells B A, Miller M W. Foxg1 haploinsufficiency reduces the population of cortical intermediate progenitor cells: effect of increased p21 expression. *Cereb Cortex*, 2008, **18**(8): 1865-1875
- [63] Liang H, Hippenmeyer S, Ghashghaei H T. A Nestin-cre transgenic mouse is insufficient for recombination in early embryonic neural progenitors. *Biol Open*, 2012, **1**(12): 1200-1203
- [64] Kawase-Koga Y, Otaegi G, Sun T. Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. *Dev Dyn*, 2009, **238**(11): 2800-2812
- [65] Shu P, Wu C, Ruan X, *et al.* Opposing gradients of microRNA expression temporally pattern layer formation in the developing neocortex. *Dev Cell*, 2019, **49**(5): 764-785.e4
- [66] Zhou J, Liu G, Zhang X, *et al.* Comparison of the spatiotemporal expression patterns of three cre lines, Emx1IRES-cre, D6-cre and hGFAP-cre, commonly used in neocortical development research. *Cereb Cortex*, 2022, **32**(8): 1668-1681
- [67] Nowakowski T J, Mysiak K S, Pratt T, *et al.* Functional dicer is necessary for appropriate specification of radial glia during early development of mouse telencephalon. *PLoS One*, 2011, **6**(8): e23013
- [68] Davis T H, Cuellar T L, Koch S M, *et al.* Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci*, 2008, **28**(17): 4322-4330
- [69] Zhang W, Kim P J, Chen Z, *et al.* MiRNA-128 regulates the proliferation and neurogenesis of neural precursors by targeting PCMI in the developing cortex. *Elife*, 2016, **5**: e11324
- [70] Schwamborn J C, Berezikov E, Knoblich J A. The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell*, 2009, **136**(5): 913-925
- [71] Zhao C, Sun G, Li S, *et al.* MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(5): 1876-1881
- [72] Zhao C, Sun G, Ye P, *et al.* MicroRNA let-7d regulates the TLX/microRNA-9 cascade to control neural cell fate and neurogenesis. *Sci Rep*, 2013, **3**: 1329
- [73] Shibata M, Nakao H, Kiyonari H, *et al.* MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors. *J Neurosci*, 2011, **31**(9): 3407-3422
- [74] Shibata M, Kurokawa D, Nakao H, *et al.* MicroRNA-9 modulates Cajal-Retzius cell differentiation by suppressing Foxg1 expression in mouse medial pallium. *J Neurosci*, 2008, **28**(41): 10415-10421
- [75] Franzoni E, Booker S A, Parthasarathy S, *et al.* MiR-128 regulates neuronal migration, outgrowth and intrinsic excitability *via* the intellectual disability gene Phf6. *eLife*, 2015, **4**: e04263
- [76] Shu P, Wu C, Liu W, *et al.* The spatiotemporal expression pattern of microRNAs in the developing mouse nervous system. *J Biol Chem*, 2019, **294**(10): 3444-3453
- [77] Ray A, Zhu H, Ding A, *et al.* Transcriptional and epigenetic regulation of temporal patterning in neural progenitors. *Dev Biol*, 2022, **481**: 116-128
- [78] Doe C Q. Temporal patterning in the *Drosophila* CNS. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, **33**: 219-240
- [79] Kohwi M, Doe C Q. Temporal fate specification and neural progenitor competence during development. *Nat Rev Neurosci*, 2013, **14**(12): 823-838
- [80] Pearson B J, Doe C Q. Regulation of neuroblast competence in drosophila. *Nature*, 2003, **425**(6958): 624-628
- [81] Torre A L, Georgi S, Reh T A. Conserved microRNA pathway regulates developmental timing of retinal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(26): E2362-E2370
- [82] Caygill E E, Johnston L A. Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the let-7 and miR-125 heterochronic microRNAs. *Curr Biol*, 2008, **18**(13): 943-950
- [83] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, **403**(6772): 901-906
- [84] Wu Y C, Chen C H, Mercer A, *et al.* Let-7-complex microRNAs regulate the temporal identity of *Drosophila* mushroom body neurons *via* chinmo. *Dev Cell*, 2012, **23**(1): 202-209
- [85] Fei J F, Haffner C, Huttner W B. 3' UTR-dependent, miR-92-mediated restriction of Tis21 expression maintains asymmetric neural stem cell division to ensure proper neocortex size. *Cell Rep*, 2014, **7**(2): 398-411
- [86] Fededa J P, Esk C, Mierzwa B, *et al.* MicroRNA-34/449 controls mitotic spindle orientation during mammalian cortex development. *EMBO J*, 2016, **35**(22): 2386-2398
- [87] Pollock A, Bian S, Zhang C, *et al.* Growth of the developing cerebral cortex is controlled by microRNA-7 through the p53 pathway. *Cell Rep*, 2014, **7**(4): 1184-1196
- [88] Tomasello U, Klingler E, Niquille M, *et al.* MiR-137 and miR-122, two outer subventricular zone non-coding RNAs, regulate basal progenitor expansion and neuronal differentiation. *Cell Rep*, 2022, **38**(7): 110381
- [89] Chinnappa K, Cárdenas A, Prieto-Colomina A, *et al.* Secondary loss of *miR-3607* reduced cortical progenitor amplification during rodent evolution. *Sci Adv*, 2022, **8**(2): eabj4010
- [90] Kriegstein A R, Noctor S C. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci*, 2004, **27**(7): 392-399
- [91] Jossin Y, Cooper J A. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nat Neurosci*, 2011, **14**(6): 697-703
- [92] Miyoshi G, Fishell G. Dynamic FoxG1 expression coordinates the integration of multipolar pyramidal neuron precursors into the cortical plate. *Neuron*, 2012, **74**(6): 1045-1058
- [93] Pacary E, Heng J, Azzarelli R, *et al.* Proneural transcription factors

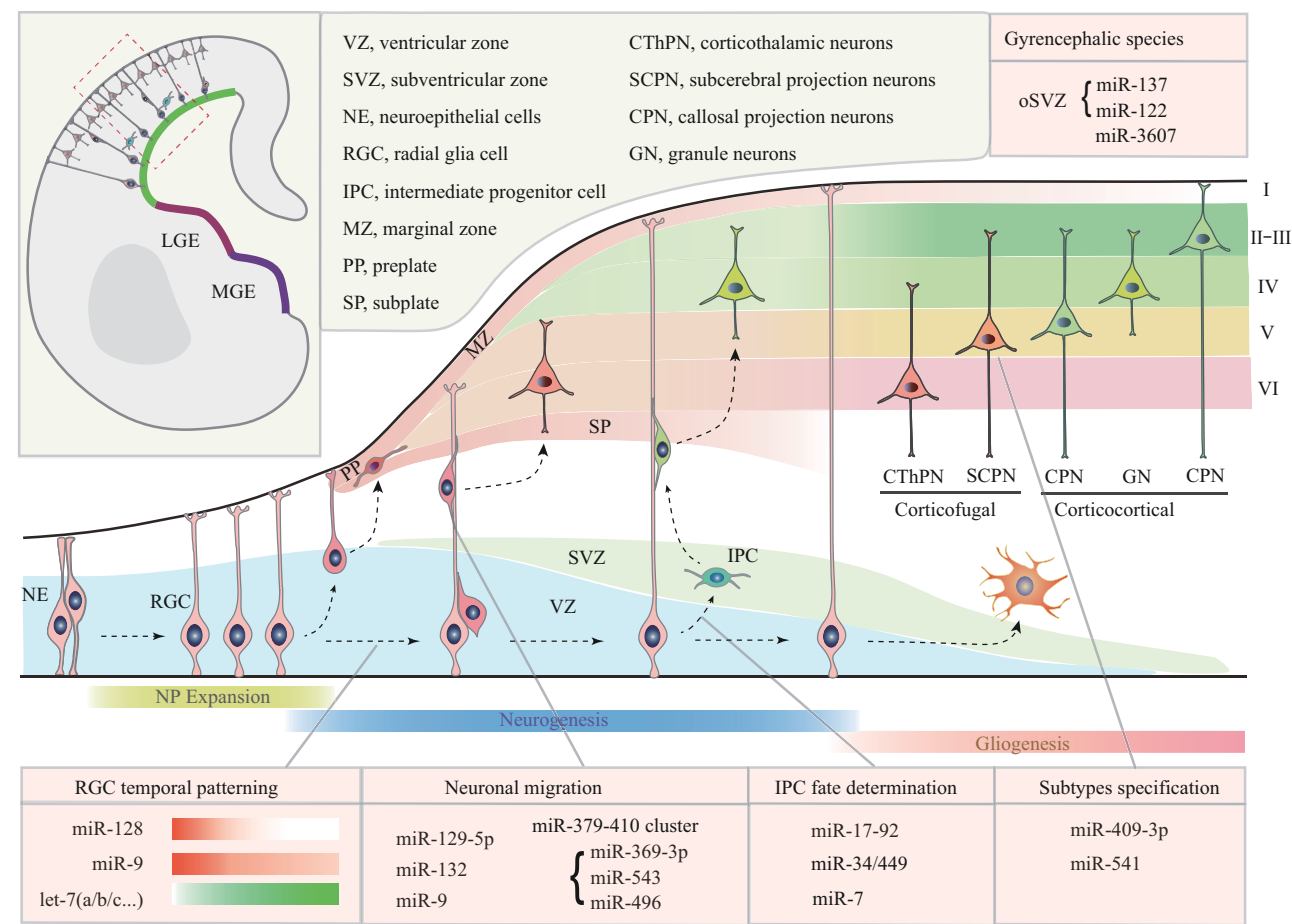
- regulate different steps of cortical neuron migration through Rnd-mediated inhibition of RhoA signaling. *Neuron*, 2011, **69**(6): 1069-1084
- [94] McLoughlin H S, Fineberg S K, Ghosh L L, *et al.* Dicer is required for proliferation, viability, migration and differentiation in corticoneurogenesis. *Neuroscience*, 2012, **223**: 285-295
- [95] Clovis Y M, Enard W, Marinaro F, *et al.* Convergent repression of Foxp2 3'UTR by miR-9 and miR-132 in embryonic mouse neocortex: implications for radial migration of neurons. *Development*, 2012, **139**(18): 3332-3342
- [96] Pedersen M E, Snieckute G, Kagias K, *et al.* An epidermal microRNA regulates neuronal migration through control of the cellular glycosylation state. *Science*, 2013, **341**(6152): 1404-1408
- [97] Rago L, Beattie R, Taylor V, *et al.* miR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *EMBO J*, 2014, **33**(8): 906-920
- [98] Wu C, Zhang X, Chen P, *et al.* MicroRNA-129 modulates neuronal migration by targeting Fmrl in the developing mouse cortex. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(4): 287
- [99] Volvert M L, Prévot P P, Close P, *et al.* MicroRNA targeting of CoREST controls polarization of migrating cortical neurons. *Cell Rep*, 2014, **7**(4): 1168-1183
- [100] Clascá F, Rubio-Garrido P, Jabaudon D. Unveiling the diversity of thalamocortical neuron subtypes. *Eur J Neurosci*, 2012, **35**(10): 1524-1532
- [101] Azim E, Shnider S J, Cederquist G Y, *et al.* Lmo4 and Clim1 progressively delineate cortical projection neuron subtypes during development. *Cereb Cortex*, 2009, **19**(Suppl 1): i62-i69
- [102] Diaz J L, Siththanandan V B, Lu V, *et al.* An evolutionarily acquired microRNA shapes development of mammalian cortical projections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(46): 29113-29122
- [103] Wagner N R, Sinha A, Siththanandan V, *et al.* MiR-409-3p represses *Cited2* to refine neocortical layer V projection neuron identity. *Front Neurosci*, 2022, **16**: 931333
- [104] Fame R M, MacDonald J L, Dunwoodie S L, *et al.* Cited2 regulates neocortical layer II/III generation and somatosensory callosal projection neuron development and connectivity. *J Neurosci*, 2016, **36**(24): 6403-6419
- [105] Martins M, Galfrè S, Terrigno M, *et al.* A eutherian-specific microRNA controls the translation of Satb2 in a model of cortical differentiation. *Stem Cell Rep*, 2021, **16**(6): 1496-1509
- [106] Nowakowski T J, Rani N, Golkaram M, *et al.* Regulation of cell-type-specific transcriptomes by microRNA networks during human brain development. *Nat Neurosci*, 2018, **21**(12): 1784-1792
- [107] Alles J, Fehlmann T, Fischer U, *et al.* An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(7): 3353-3364
- [108] Lim L, Mi D, Llorca A, *et al.* Development and functional diversification of cortical interneurons. *Neuron*, 2018, **100**(2): 294-313
- [109] Wu S J, Sevier E, Dwivedi D, *et al.* Cortical somatostatin interneuron subtypes form cell-type-specific circuits. *Neuron*, 2023, **111**(17): 2675-2692.e9
- [110] Ali Bayraktar O, Bartels T, Holmqvist S, *et al.* Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell *in situ* transcriptomic map. *Nat Neurosci*, 2020, **23**(4): 500-509

The Regulatory Role of microRNA in Neocortical Layer Formation*

SHU Peng-Cheng^{***}, DOU Xin-Yi^{**}

(State Key Laboratory of Common Mechanism Research for Major Diseases, Department of Molecular Biology and Biochemistry, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Graphical abstract



Abstract Laminar organization is a hallmark of the mammalian neocortex, where the orderly arrangement of diverse neurons stereotypically forms into six distinct layers. The laminar structure provides a basis for the

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32370883) and the Medical and Health Science and Technology Innovation Project of the Chinese Academy of Medical Sciences (2021-I2M-1-019).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-10-69156434, E-mail: pengcheng_shu@ibms.pumc.edu.cn

Received: July 12, 2024 Accepted: August 31, 2024

formation of precise neural circuits responsible for high-level cognitive functions. A deeper understanding of the mechanisms underlying neocortical layer formation and cell assembly in the brain will provide a more comprehensive insight into mammalian and even human physiology and behavior. It will also enable the development of novel diagnostic and therapeutic strategies for neurological disorders. To achieve this, it is imperative to elucidate the molecular regulatory networks that determine the fate of neurons in the neocortex. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of 18–25 nucleotides in length that play important roles in the gene expression network. A large number of studies have reported that miRNAs are involved in various developmental processes within the nervous system. This review summarizes the progress of research on miRNAs that have been identified in recent years with regard to neocortical layer formation. We start with a comparative analysis of different Cre-line mediated conditional knockout mice for Dicer, a gene indispensable for the synthesis of almost all miRNAs. The results indicate that miRNAs are essential for the formation of neocortical layers, including the determination of the fate of projection neurons and the migration of these cells. Next, we summarize the regulatory roles of miRNAs in the coordinated execution of a series of developmental events that contribute to neocortical layer formation. First, the temporal patterning of neocortical neural progenitors is regulated by miRNAs. Two types of temporally opposite expression gradients and functionally antagonistic miRNAs modulate the competence of neural progenitors by changing their relative expression levels during neurogenesis, thereby shifting the progressive generation of neocortical neurons. Second, it is described that miRNAs influence lamination by regulating the fate of intermediate progenitor cells (IPCs). In particular, several miRNAs that are specifically expressed in multiple gyrencephalic species have been identified in recent years and are involved in regulating the generation of IPCs as well as the generation of upper layer neurons. Third, the regulatory roles of miRNAs in the migration of cortical projection neurons, including the multipolar to bipolar transition and other processes, were presented. Fourth, we described miRNAs that are expressed in postmitotic neurons but play roles in the further specification of different cortical projection neuron subtype identities, in particular the role of several miRNAs in the Mirg cluster in establishing different subtype identities of projection neurons in layer V, promoting corticospinal motor neuron (CSMN) identity but inhibiting callosal projection neuron (CPN) identity. Finally, we discussed current challenges in the study of miRNAs in neocortical layer formation and looked forward to future directions that deserve further exploration, such as the functions of a large number of newly discovered miRNAs, or whether miRNAs regulate the layer-dependent pattern of other neuronal cells with layer distribution features; the contribution of miRNAs in the rapid evolution of the neocortex, especially in the formation of characteristic structures in the primate neocortex; and the use of miRNAs as an entry point to explore finer regulatory networks.

Key words neocortex, projection neuron, lamination, microRNA, Dicer

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0314