

参赛学生姓名： 杨舒淇

中学： 北京师范大学附属实验中学

省份： 北京市

国家/地区： 中国/北部赛区

指导老师姓名： 米达、林芳珍

指导老师单位： 清华大学、北京师范大学
附属实验中学

论文题目： 人类脑室下区神经干细胞维持
大脑皮层抑制性神经元的产生

人类脑室下区神经干细胞维持大脑皮层抑制性神经元的产生

杨舒淇

摘要

人类大脑皮层在进化过程中显著扩张，皮层 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能抑制性神经元的数量与组成也发生相应变化。这些细胞主要起源于胚胎期腹侧端脑的内侧神经节隆起 (medial ganglionic eminence, MGE)。近期研究在人类 MGE 脑室下区 (subventricular zone, SVZ) 鉴定出一类具有独特分子、形态和分裂特征的放射状胶质细胞 (radial glial cells, RGCs)；猕猴中存在相似细胞，而小鼠中尚未发现明确对应类型，提示其可能参与灵长类皮层抑制性神经元的扩增。然而，人类 MGE 脑室区 (ventricular zone, VZ) RGCs 与 SVZ RGCs 在单细胞层面的谱系分化潜能是否存在差异，仍缺乏直接实验验证。本研究取多个孕周 (GW11-GW24) 的人类胚胎 MGE 组织，分别显微分离 VZ 和 SVZ，经木瓜蛋白酶解离、慢病毒荧光标记及流式细胞分选，以 CD24 低表达/阴性、PDGFR α 阴性和 DAPI 阴性为条件富集活 RGCs，并在小鼠原代星形胶质细胞饲养层及 FGF-2 支持下开展 14 d 单细胞克隆培养。通过 SOX2/DCX 共染评估克隆中的祖细胞与神经元状态，采用 GABA/ISL1 区分 GABA 能与胆碱能神经元谱系，并以 EPHA5/CRABP1 进一步判定皮层与皮层下 GABA 能神经元命运倾向。结果显示，VZ RGC 群体具有谱系异质性：不同单细胞克隆可分别产生 GABA 阳性神经元或 ISL1 阳性胆碱能神经元，但单个克隆内未见两类细胞混合，提示个体 VZ RGC 的命运倾向可能在 RGC 阶段已初步建立。相比之下，对来自不同发育阶段的 14 个 SVZ RGC 克隆进行 GABA/ISL1 鉴定时，所有克隆均仅检测到 GABA 阳性后代，未检测到 ISL1 阳性后代，表明 SVZ RGCs 在 GABA 能与胆碱能谱系分化层面已表现出明显的 GABA 能命运限定。进一步对 24 个 SVZ RGC 克隆进行 EPHA5/CRABP1 分析发现，各克隆分别呈 EPHA5 阳性/CRABP1 阴性或 CRABP1 阳性/EPHA5 阴性的单一组成，未见两类细胞混合或双阳性克隆，且前一类型占多数，支持 SVZ RGCs 在 GABA 能谱系内部进一步具有偏向皮层抑制性神经元的分化特征。综上，本研究建立了适用于人类胚胎 MGE RGCs 的体外单细胞克隆分析体系，并揭示 VZ RGCs 与 SVZ RGCs 在谱系潜能上的差异：前者在群体层面包含不同神经元谱系祖细胞，后者则表现出更强的 GABA 能及皮层命运偏向。该结果为理解人类皮层抑制性神经元扩增的祖细胞基础提供了直接的体外细胞学证据，并为后续结合体内谱系示踪、三维 MGE 模型和单细胞多组学解析其命运决定机制奠定了基础。

关键词：内侧神经节隆起；放射状胶质细胞；脑室下区；GABA 能抑制性神经元；谱系限定；单细胞克隆

Abstract

The human cerebral cortex underwent marked expansion during evolution, accompanied by changes in the abundance and composition of cortical gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic inhibitory neurons. Cortical GABAergic neurons arise largely from the ventral telencephalon, including the MGE. Recent studies identified a population of radial glial cells (RGCs) with distinctive molecular, morphological, and mitotic features in the subventricular zone (SVZ) of the human MGE. Similar cells are present in macaques, whereas no clear counterpart has been identified in mice, suggesting that SVZ RGCs may contribute to the expansion of cortical inhibitory neurons in primates. However, direct single-cell evidence for differences in lineage potential between ventricular zone (VZ) RGCs and SVZ RGCs in the human MGE remains limited. Here, VZ and SVZ tissues were microdissected from human fetal MGE samples spanning multiple gestational stages (GW11-GW24). Following papain dissociation and lentiviral fluorescent labeling, viable RGCs were enriched by fluorescence-activated cell sorting using a CD24-low/negative, PDGFR α -negative, and DAPI-negative gating strategy. Individual cells were cultured for 14 days on primary mouse astrocyte feeder layers with FGF-2 support. We performed SOX2/DCX co-staining to evaluate progenitor and neuronal states in clones. GABA and ISL1 staining was used to characterize GABA-associated and cholinergic-associated phenotypes. EPHA5/CRABP1 staining was used to further examine fate bias between cortical and subcortical GABAergic populations. VZ RGCs displayed lineage heterogeneity at the population level: individual clones generated either GABA-positive neurons or ISL1-positive cholinergic neurons, whereas mixed clones containing both lineages were not observed. This finding suggests that the fate bias of individual VZ RGCs may already be established at the RGC stage. In contrast, all 14 SVZ RGC clones examined by GABA/ISL1 staining across different developmental stages contained GABA-positive progeny without detectable ISL1-positive progeny, indicating pronounced GABAergic lineage restriction. We analyzed 24 additional SVZ RGC clones with EPHA5 and CRABP1 staining. Every clone contained only EPHA5-positive/CRABP1-negative progeny or CRABP1-positive/EPHA5-negative progeny. We detected no mixed or double-positive clones, and the former clone type predominated. This finding supports an additional bias toward cortical inhibitory neuron fates within the GABAergic lineage. Collectively, this study establishes an in vitro single-cell clonal framework for human fetal MGE RGCs and reveals distinct lineage properties of VZ and SVZ RGCs. VZ RGCs comprise progenitors with different neuronal lineage outputs, whereas SVZ RGCs exhibit stronger GABAergic and cortical fate biases. These findings provide direct in vitro cellular evidence for a specialized progenitor basis of human cortical inhibitory neuron expansion and establish a foundation for future validation using in vivo lineage tracing, three-dimensional MGE models, and single-cell multi-omics.

Keywords: medial ganglionic eminence; radial glial cells; subventricular zone; GABAergic inhibitory neurons; lineage restriction; single-cell cloning

目录

摘要	1
ABSTRACT	2
目录	3
插图列表	5
1. 引言	6
1.1 问题的提出	6
1.2 研究的重要性和意义	7
2. 背景	8
2.1 中枢神经系统的发育	8
2.2 神经系统的基本细胞组成	8
2.2.1 神经元类型多样性	9
2.2.2 大脑皮层的神经发生	10
2.2.3 人类 MGE 神经发生的时空规律	11
2.3 人与其他物种大脑的区别	12
2.4 抑制性神经元与神经疾病	14
2.5 小结	14
3. 实验材料及方法	15
3.1 人类 MGE SVZ 原代细胞解离	15
3.2 小鼠原代星形胶质细胞分离及传代	16
3.3 小鼠原代星形胶质细胞冻存及复苏	18
3.4 小鼠原代星形胶质细胞铺板及分裂终止	19
3.5 细胞流式分选人类 MGE VZ 和 SVZ RGC	19
3.6 MGE VZ 和 SVZ RGC 单细胞形态鉴定	19
3.7 单克隆细胞免疫荧光染色及数据获取	20
4. 实验结果	20
4.1 人类 MGE VZ/SVZ RGC 的分离和培养	20
4.2 MGE VZ RGC 既可以产生 GABA 能神经元也可以产生胆碱能神经元	22
4.3 MGE SVZ RGC 仅贡献于 GABA 能神经元产生	24
4.4 已发生命运限定的 MGE SVZ RGC 主要贡献于皮层 GABA 能神经元产生	26
5. 总结与展望	27
5.1 研究工作总结	27
5.2 外部环境因素对谱系发育的潜在影响	28
5.3 SVZ RGC 特殊谱系倾向的分子机制尚待阐明	29
5.4 对人类脑进化研究的启示	30
5.5 在神经发育疾病研究中的潜在价值	30
5.6 在抑制性神经元再生与细胞治疗中的潜在应用	31
5.7 未来展望	

致谢	32
参考文献	34

2026 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖论文公示

插图列表

图 2.1 神经板闭合形成神经管的发育过程.....	8
图 2.2 MGE 起源的抑制性神经元类型.....	10
图 2.3 MGE 细胞发生模式图.....	11
图 3.1 P0–P2 小鼠脑组织的取材与初步解剖.....	17
图 3.2 小鼠星形胶质细胞纯化过程.....	18
图 4.1 单细胞克隆分析实验流程.....	21
图 4.2 单细胞克隆谱系分析实验筛选标准及克隆展示.....	22
图 4.3 人类 MGE VZ RGC 单细胞克隆培养 14 天后的细胞数量.....	23
图 4.4 人类 MGE VZ RGC 单细胞克隆可以贡献产生胆碱能神经元.....	24
图 4.5 人类 MGE SVZ RGC 单细胞克隆培养 14 天后的细胞数量.....	25
图 4.6 人类 MGE SVZ RGC 单细胞克隆只贡献产生 GABA 能神经元.....	25
图 4.7 人类 MGE SVZ RGC 单细胞克隆子代细胞具有谱系倾向性.....	27

1. 引言

1.1 问题的提出

人类在抽象推理、工作记忆、语言等高级认知能力上显著区别于其他物种，表现出更高的智力水平¹。基于结构决定功能这一生物学基本逻辑，目前普遍认为，人脑与其他物种的结构差异构成了认知能力差异的基础^{1,2}。大脑皮层是人脑中体积最大的结构，构成了其一半以上的体积，被认为是支撑感知、思维、语言、注意、情景记忆及随意运动等复杂认知功能的核心物质基础²。人类的感知、记忆、思维与语言均依赖于这一结构³。人脑的结构优势可从两个维度加以分析：其一是宏观结构的组织模式，其二是细胞层面的组成特征。人脑结构建立在细胞组成及其连接方式之上，细胞是构成脑功能的基本单元²。因此，解析上述人类大脑皮层结构差异的发育机制，将有助于进一步理解人类高级认知能力的形成。

因此，本研究聚焦于解析人类与其他物种大脑皮层在细胞组成上的差异。构成大脑皮层的细胞主要分为神经元和神经胶质细胞，二者共同参与脑功能的实现。神经元是神经系统信息处理的基本功能单位，通过化学信号与电信号的传递实现信息的接收、整合与输出，同时也是思维、语言等高级行为的功能基础⁴。神经胶质细胞主要为神经元提供支持功能^{4,5}。因此，神经元是我们理解人脑功能的重要研究对象。

大脑皮层神经元分为 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能抑制性神经元和谷氨酸 (glutamate) 能兴奋性神经元两大类，两种神经元共同构成神经网络，通过协调决定了神经环路的正常运行。兴奋性神经元主要负责信号的激活与传递，而抑制性神经元则负责调控神经环路的兴奋性水平，维持兴奋-抑制平衡^{6,7}。从神经元种类上看，人类与其他哺乳动物的神经元类型相似，难以以此解释人脑功能的特异性^{1,2}。神经元的绝对数量是一个更可能的解释方向⁵。已有研究表明人脑在上述两方面均与其他物种存在显著差异^{2,5}。人类新皮层表面积显著扩大，伴随复杂的脑回折叠模式^{2,3}，而小鼠大脑则呈平滑表面。在皮层厚度方面，灵长类皮层灰质厚度约为小鼠的 2.5 倍，其中浅层（第 2-3 层）的扩展尤为显著，可达 4 倍以上¹。灵长类大脑遵循等速缩放 (isometric scaling) 规律，即脑质量与神经元数量呈线性关系；啮齿类则遵循超线性缩放 (hypermetric scaling) 规律，脑质量增长快于神经元数量增长。因此，1.5 kg 的人类大脑在相同脑质量下所拥有的神经元数量约为啮齿类的 7 倍⁵。在皮层抑制性神经元方面，人类皮层中 CalR+ (calretinin) 中间神经元占皮层神经元总数的约 13%，而在小鼠中仅占约 4%²；且 CalR+ 中间神经元在人类前额叶联合区高度富集，约占该区 GABA 能神经元总数的近 50%²。人类大脑皮层抑制性神经元数量的增加，提示其可能为人类智力的提升做出了重要贡献⁸。

人类大脑皮层抑制性神经元产生于发育中胚胎大脑的腹侧端脑，主要来源于内侧神经节隆起 (medial ganglionic eminence, MGE)、尾侧神经节隆起 (caudal ganglionic eminence, CGE) 和视前区 (preoptic area, POA)^{6,7,9}。MGE 是人类大脑皮层抑制性神经元的重要来源，并同样负责产生很大一部分皮层下区域的神经元，包括纹状体 GABA 能中间神经元、苍白

球 GABA 能神经元、杏仁核 GABA 能中间神经元和基底前脑的胆碱能 (cholinergic) 神经元^{6,9}。人类 MGE (hMGE) 中存在一类进化上新颖的神经干细胞类型——脑室下区放射状胶质细胞 (subventricular zone radial glial cell, SVZ RGC)。这类细胞具有独特的分子特征、时空分布、细胞形态及有丝分裂行为, 在猕猴 MGE 中存在同源细胞类型, 但在小鼠中未见⁸。

人类大脑不同区域的扩张程度并不均匀。在宏观层面, 前额叶联合区显著扩大, 覆盖额叶前部近 80% 的区域, 占整个皮层表面积的三分之一²。此外, 人类新皮层面积显著扩大, 脑回折叠更加复杂, 且前额叶、顶叶和颞叶联合皮层均显著扩张^{2,3}。联合皮层的扩张伴随着皮层-皮层连接的显著增加以及丘脑的相应扩大²。在细胞层面, 人脑不同脑区的神经元数量分布同样不均: 大脑皮层 (含灰质与白质) 约含 160 亿神经元, 占全脑神经元总数的 19%; 小脑约含 690 亿神经元, 占全脑神经元总数的 80%, 但小脑质量仅约 154 g, 占全脑质量的 10%⁵。更重要的是, 灵长类皮层遵循等速缩放规律——皮层质量与神经元数量呈线性关系, 而啮齿类皮层则呈超线性缩放, 即皮层越大, 神经元密度越低。这意味着, 在相同皮层质量下, 灵长类可容纳的神经元数量远多于啮齿类⁵。值得注意的是, 上述皮层扩张不仅涉及兴奋性神经元数量的增加, 还伴随着 GABA 能抑制性神经元数量的显著上升。在进化过程中, 抑制性神经元与兴奋性神经元的比例在哺乳动物大脑皮层中发生了重要变化, 抑制性神经元的数量和多样性均有所增加, 这对于塑造人类大脑皮层环路的特征性功能具有重要意义⁸。人类 MGE 在进化中表现出 SVZ 的显著扩张和独特的细胞组织结构, 提示 MGE 的 SVZ 可能为抑制性神经元的扩增提供了特殊的细胞来源。人类 MGE 的单细胞转录组研究揭示了不同神经元类型祖细胞来源的差异性, 基底前脑的胆碱能神经元似乎由 VZ RGC 不经过 SVZ RGC 产生, SVZ RGC 不贡献于胆碱能神经元发生且主要产生 GABA 能神经元尤其是皮层 GABA 能神经元; 相较于从孕中晚期转向胶质细胞发生的 VZ RGC 而言, 进化上特殊的人类 MGE SVZ RGC 一直持续存在到接近胎儿出生的 GW39, 并持续进行神经发生⁸。基于上述证据, 本研究提出以下问题: 人类 MGE 的神经元产生是否在祖细胞层面已经发生了谱系限制?

1.2 研究的重要性和意义

解析人类智力优势的深层机制, 既是回应人类对自身认知的探索好奇心, 也在神经医学等领域具有重要的实际应用价值。

从认知角度来看, 通过对比人类的抑制性神经元, 可为人类智力的研究提供细胞层面的证据。从实际应用角度来看, 对人脑抑制性神经元数量规律的基础研究, 是相关疾病病理机制研究与仿生技术开发的重要基础。此外, 人脑的高级认知能力来源于复杂神经网络。深入理解人脑抑制性神经元的发育机制, 也能够为计算模型构建、人工智能性能优化及发展提供一定的生物学参考。

抑制性神经元负责维持神经网络的兴奋-抑制平衡, 其数量异常可能导致神经环路功能障碍。例如, 抑制性神经元数量或功能异常与癫痫、自闭症谱系障碍等精神疾病存在相关

性⁷。阐明人类 MGE SVZ RGC 维持大脑皮层 GABA 能抑制性神经元产生的机制，可能有助于相关疾病的早期诊断与干预治疗。

2. 背景

2.1 中枢神经系统的发育

人类受精卵发育至第三周时，胚胎通过细胞增殖、分化与迁移，逐渐形成三胚层结构，即外胚层、中胚层和内胚层，三个胚层此后将分化为不同器官的原基⁴。其中内胚层主要分化为消化系统与呼吸系统，中胚层分化为骨骼、肌肉与循环系统，外胚层则分化为表皮与全部神经系统⁴。在三胚层结构的基础上，背侧外胚层细胞逐渐分化为神经外胚层和神经嵴⁴。神经外胚层进一步增厚，形成平整的板状结构，即神经板⁴。伴随发育进程推进，神经板发生连续的形态变化。首先，神经板中央沿前后轴向内侧凹陷，形成纵向的神经沟，沟两侧的组织隆起形成神经褶。随后两侧神经褶向胚胎中线靠拢、融合，形成封闭的管状结构，即神经管⁴。神经管的闭合并非同步完成，而是从中段率先开始，向头尾两端逐步推进⁴。神经管闭合后，遵循时空顺序逐步形成明确的分区，管壁神经上皮细胞持续增殖、分化，依次形成前脑、中脑、后脑与脊髓四个主要区域。其中前脑进一步分化为端脑与间脑⁴。

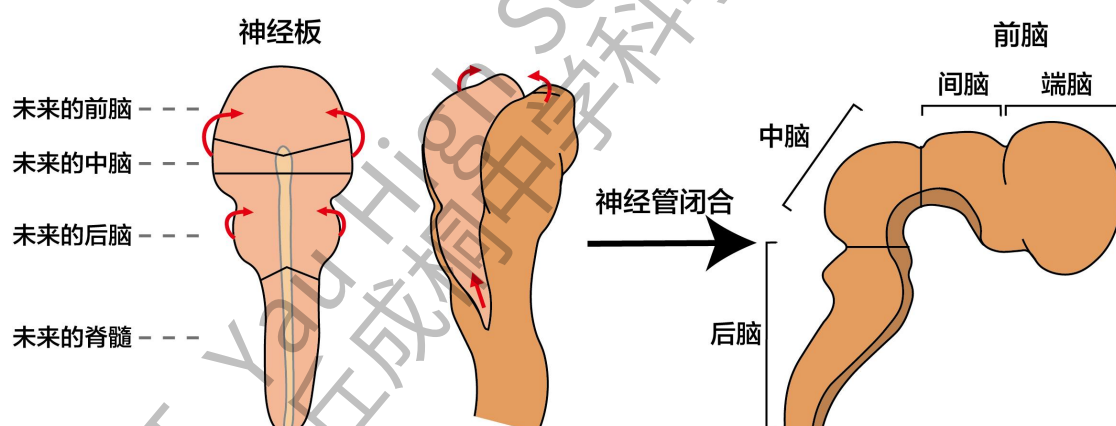


图 2.1 神经板闭合形成神经管的发育过程

如虚线所示，神经板可分为若干区域，这些区域将分别发育形成前脑、中脑、后脑和脊髓。神经板由两侧边缘向内折叠形成神经管，并进一步发育形成前脑、中脑和后脑。改编自文献¹⁰

端脑发育形成大脑半球，其灰质既包括表面的皮层，也包括深部核团；白质则包含连接不同区域的轴突束。在同时计入相关白质的统计口径下，大脑皮层相关组织约占全脑质量的 82%，这一数值不同于单独皮层灰质的质量占比⁵。皮层各区域通过局部和长程连接参与感觉、运动及认知活动，区域功能的形成依赖其细胞组成与连接方式^{2,3}。

基底神经节是位于大脑深部、靠近脑底的灰质核团群，主要包括纹状体和苍白球。纹状体作为输入核团接收来自皮层、丘脑和黑质的信息，经基底神经节内部处理后，由苍白球和黑质作为输出核团向丘脑传递信号，丘脑又将信息投射回大脑皮层，从而形成皮层-基底节-皮层环路，在运动编程与执行、学习、行为调控及情绪调节等过程中发挥关键作用⁹。

2.2 神经系统的基本细胞组成

大脑主要由神经元和神经胶质细胞组成。神经元是神经系统执行信息加工的基本单位。神经元通常由胞体、树突和轴突三部分构成。胞体是细胞的营养和代谢中心；树突呈树枝状分支，负责接收上游信号的输入；轴突通常只有一个，负责向其他神经元传递信号。突触 (synapse) 是神经元之间信号传递的关键结构。神经元通过电信号与化学信号的相互转换，完成信息的接收、整合、传导与输出，是神经功能实现的基础⁴。

神经胶质细胞是神经系统的重要组成部分。中枢神经系统的胶质细胞主要包含星形胶质细胞 (astrocytes)、少突胶质细胞 (oligodendrocytes) 和小胶质细胞 (microglia) 三大类。胶质细胞参与构建神经元活动所需的局部环境。星形胶质细胞涉及代谢支持、屏障相关功能和突触调节；少突胶质细胞形成中枢髓鞘；小胶质细胞参与免疫监测及组织稳态。这些功能相互配合，但各类胶质细胞的发育来源和作用并不相同⁴。

2.2.1 神经元类型多样性

大脑皮层神经元主要由兴奋性谷氨酸能 (glutamatergic) 神经元和抑制性γ-氨基丁酸能 (GABAergic) 神经元组成。

皮层兴奋性谷氨酸能神经元是大脑皮层中数量最多的神经元群体，起源于背侧端脑的神经祖细胞^{2,3}。小鼠 GABA 能抑制性神经元约占大脑皮层神经元总数的 20%，但这一数值受脑区和分类标准影响，不能直接套用于人类^{6,11,12}。尽管数量相对较少，GABA 能神经元在维持神经环路功能和皮层信息处理过程中发挥着不可替代的作用。GABA 能神经元通过释放抑制性神经递质 GABA，作用于突触后膜的 GABA 受体，调节神经元的兴奋性，从而维持皮层兴奋与抑制之间的动态平衡，并参与多种脑功能的调控。

与兴奋性投射神经元相比，皮层 GABA 能抑制性神经元在形态学特征、分子标志物、电生理特性、发育来源及突触连接方式等方面均表现出显著差异。近年来，随着单细胞 RNA 测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 等技术的发展，人们发现人类和小鼠大脑皮层中间神经元均有约 50 种类型⁶。从发育来源及功能特点来看，目前普遍认为皮层 GABA 能抑制性神经元主要可归纳为三大类：小白蛋白 (parvalbumin, PV) 阳性神经元、生长抑素 (somatostatin, SST) 阳性神经元以及 5-羟色胺受体 3A (5-hydroxytryptamine receptor 3A, 5HT3AR) 阳性神经元⁶。其中 PV 和 SST 神经元主要来源于内侧神经节隆起 (medial ganglionic eminence, MGE)，而 5HT3AR 阳性神经元主要来源于尾侧神经节隆起 (caudal ganglionic eminence, CGE)^{6,9}。

PV+ GABA 能抑制性神经元是皮层 GABA 能抑制性神经元中占比最大的类群，主要包括篮状细胞 (basket cells) 和吊灯样细胞 (chandelier cells)。这类细胞具有快速放电的特性，其轴突主要投射至锥体神经元胞体及轴突初始段 (axon initial segment)。PV+ GABA 能抑制性神经元在γ频段振荡 (gamma oscillation) 的形成、神经网络同步及工作记忆等认知功能中发挥关键作用^{6,7}。

SST+ GABA 能神经元是皮层 GABA 能抑制性神经元中占比第二大的类群，主要分为 Martinotti 细胞、non-Martinotti 细胞和长投射 (long-range projection, LRP) 神经元三种类

型。与 PV+ GABA 能神经元主要支配胞体不同, SST+ GABA 能神经元主要投射至锥体神经元树突, 通过调节树突接受的兴奋性输入, 参与突触可塑性、感觉信息整合及学习记忆等过程⁶。

5HT3AR 阳性神经元主要来源于 CGE, 主要包括血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 阳性神经元、Reelin 阳性神经元等多个亚型。其中 VIP 神经元最具代表性, 主要靶向 SST+等其他抑制性中间神经元, 而较少直接作用于锥体神经元, 因此能够通过去抑制 (disinhibition) 间接增强兴奋性神经元活动, 在感觉加工、行为状态转换及社会行为调控等过程中发挥重要作用⁶。

纹状体中主要的细胞类型是 GABA 能纹状体投射神经元 (striatal projection neuron, MSN), 起源于外侧神经节隆起 (lateral ganglionic eminence, LGE)。GABA 能纹状体投射神经元约占纹状体神经元总数的 90%–95%, 其余则为抑制性中间神经元。纹状体中间神经元可进一步分为 GABA 能中间神经元和胆碱能中间神经元两类。其中, 胆碱能中间神经元约占纹状体神经元总数的 1%–2%。GABA 能中间神经元主要由 MGE 的祖细胞产生, 可进一步分为 PV 阳性、SST 阳性、TH 阳性和 PTHLH 阳性等⁹。

苍白球中神经元以 GABA 能投射神经元为主, 并以 PV 的高表达为特征。根据投射靶向区域的差异, 苍白球外侧部的投射神经元可分为靶向丘脑底核的 prototypic 神经元和靶向纹状体的 arkypallidal 神经元两类。苍白球中还存在约 5% 的胆碱能神经元以及少量 CalR 阳性 GABA 能中间神经元。苍白球内侧部则主要由 GABA 能投射神经元构成。在发育来源上, 约 70% 的苍白球 GABA 能投射神经元和全部苍白球胆碱能神经元来自 MGE。同时, prototypic 神经元也被认为完全来源于 MGE⁹。

除 GABA 能神经元外, MGE 还产生胆碱能 (cholinergic) 神经元。胆碱能神经元是一类以合成和释放神经递质乙酰胆碱 (acetylcholine) 为特征的神经元群体, 在皮层信息处理、注意力调控、学习与记忆等过程中发挥重要的调节作用。基底前脑的胆碱能投射神经元起源于 MGE⁹。在纹状体和苍白球中, 胆碱能中间神经元虽然数量较少, 但同样起源于 MGE, 参与局部环路的调控⁹。



图 2.2 MGE 起源的抑制性神经元类型

产生于 MGE 的抑制性投射神经元和中间神经元类型及其分布的大脑结构。改编自文献¹³。PN, projection neuron; IN, interneuron; LRP, long-range projection neuron。

2.2.2 大脑皮层的神经发生

神经发生是神经干细胞通过分裂产生神经元后代的过程。神经干细胞具备通过分裂进行自我更新的能力, 和分裂产生不同谱系神经元后代的多能性^{3,4}。

在大脑皮层发育过程中，主要的神经干细胞是放射状胶质细胞（radial glial cell, RGC）。放射状胶质细胞可以进行自我更新，或通过分裂产生中间祖细胞（intermediate progenitor cell, IPC）及神经元。IPC 具备有限的增殖能力，可经过多次分裂进一步扩增细胞数量，最终产生数量有限的神经元后代²⁻⁴。

MGE 的神经发生通常在特定的生发区域完成。根据空间位置与细胞组成的差异，MGE 的生发区域主要分为脑室区（ventricular zone, VZ）与脑室下区（subventricular zone, SVZ）两层。VZ 紧邻脑室，主要由 RGC 的胞体组成。RGC 在 VZ 完成自我更新与分裂，产生中间祖细胞或新生神经元。SVZ 位于 VZ 的外侧，在鼠中主要由 VZ 的放射状胶质细胞产生的中间祖细胞组成^{3,4}。

2.2.3 人类MGE神经发生的时空规律

人类 MGE 的神经发生在时间和空间上均受到严格的调控。以小鼠为主的研究显示，MGE 在空间上可划分为不同的祖细胞区域，各有不同的分子特征和发育倾向。根据转录因子的组合表达，MGE 内部可区分出背侧、中间和腹侧等不同区域。背侧 MGE 倾向于产生 SST+ GABA 能抑制性神经元，腹侧 MGE 则更大比例上产生 PV+ GABA 能抑制性神经元，而中间区域的 MGE 同时产生 PV 和 SST 两种类型，但在喙侧更倾向于 PV 类型，尾侧更偏向 SST 类型。从细胞类型角度来看，皮层 GABA 能抑制性神经元主要产生于 MGE 的背侧和中间区域，而 MGE 腹侧则主要进行苍白球 PV+ 投射神经元的产生^{6,12}。

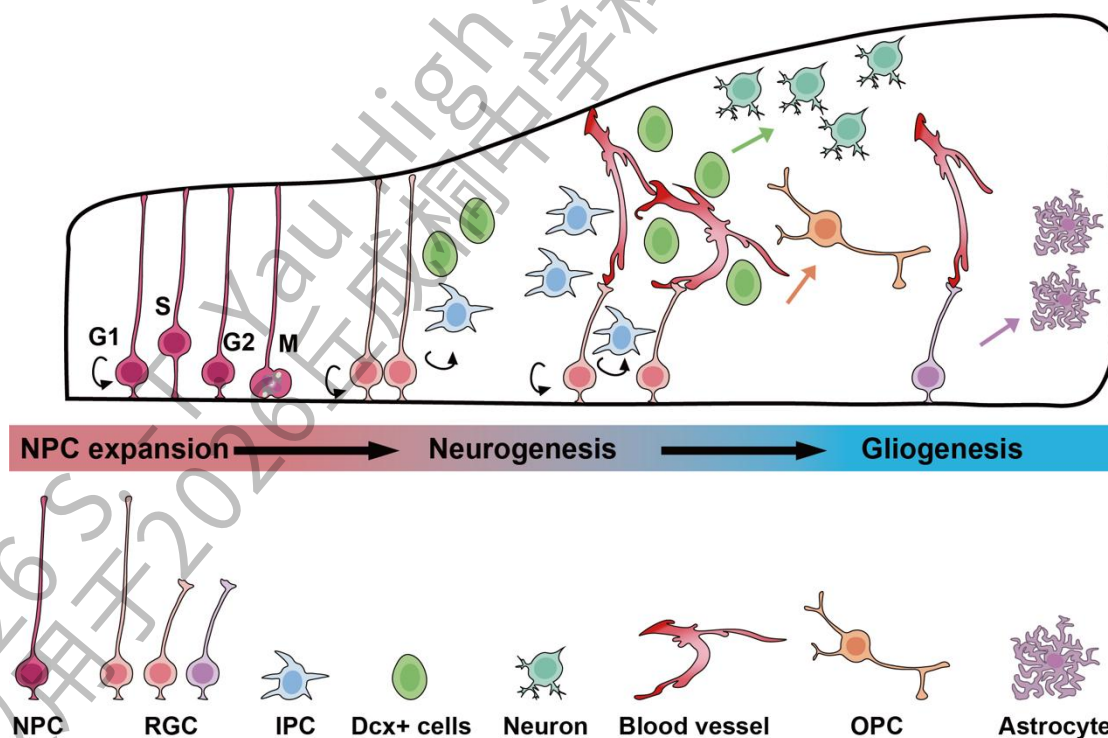


图 2.3 MGE 细胞发生模式图

如图所示，MGE 神经发生和胶质发生过程中的细胞谱系及其变化。环形箭头表示细胞具有自我更新能力。VZ, ventricular zone; NSC, neuroepithelial stem cell; RGC, radial glial cell; IPC, intermediate progenitor; OPC, oligodendrocyte precursor cell.

MGE 来源的不同神经元具有一定的出生时序。以小鼠皮层抑制性神经元为例，SST 类型的 GABA 能抑制性神经元大多在神经发生的前半段产生，而 PV 类型的 GABA 能抑制性神经元在整个神经发生过程中以相对稳定的速率产生。这些时序规律主要来自啮齿类

研究，不能直接对应人类的发育阶段；人类 MGE 的神经发生时间窗口更长，其不同谱系的出生时序仍需结合人类样本解析^{6,12}。

新生神经元在生发区产生后，需要经过长距离的切向迁移到达皮层的相应位置⁴。相比于抑制性神经元，径向迁移是皮层兴奋性神经元的主要迁移方式，新生神经元以 RGC 的突起为支架，从生发区沿垂直于皮层表面的方向向外侧迁移，最终定位于对应的皮层板^{3,4}。皮层抑制性神经元在腹侧端脑产生后，以切向迁移方式经过长距离迁移进入背侧皮层，迁移途经边缘带（marginal zone, MZ）、SVZ 和中间区（intermediate zone, IZ）等多个通道^{4,9}。进入特定的皮层区域后，它们通过径向迁移，分散至皮层的各层之中，完成空间上的正确定位⁴。

皮层兴奋性神经元的发育遵循典型的“由内向外”（inside-out）原则。发育早期产生的神经元迁移距离较短，定位于皮层的深层（第五、六层）。发育后期产生的神经元则须越过早期形成的深层神经元层，最终定位于皮层板的外侧，形成浅层皮层^{3,4}。最终，大脑皮层形成从内到外的六层结构，各层神经元产生的时间与功能存在一定差异³。

神经元到达皮层板的目标位置后，继续分化和成熟，通过延伸树突和轴突建立突触连接，逐步整合进入神经环路⁴。亚板层（subplate, SP）在环路建立中发挥关键作用。在丘脑皮层轴突抵达皮层时，它们首先与亚板层神经元建立临时连接，亚板层神经元再将信息传递给皮层第 4 层的目标神经元，最终形成完整的丘脑-皮层通路^{3,4}。人类的亚板层体积庞大，在发育中期厚度可达皮层板的四倍，远大于啮齿类动物，为人类复杂皮层环路的精确组装提供了独特的结构基础^{2,3}。初始环路的建立以突触的过度产生为特征，突触数量在发育早期达到峰值，远超成人水平⁴。成熟阶段以突触修剪和髓鞘化为核心。过量的突触连接根据神经元活动进行筛选，被频繁激活的连接得以保留和加强，不活跃的连接则被清除。这一过程称为活动依赖性修剪，持续整个童年和青春期⁴。与此同时，少突胶质细胞的前体细胞在轴突周围包裹髓鞘，显著提高神经信号的传导速度。人类大脑的成熟过程高度延长，许多脑区的突触密度在青春期才逐渐达到成人水平，前额叶皮层等高级联合区的髓鞘化可持续至成年早期¹⁴。

2.3 人与其他物种大脑的区别

人脑与其他哺乳动物脑的结构差异可从多个维度进行分析。其一为组装方式的差异，表现为脑区结构、皮层折叠程度及脑区间连接模式等架构特征。研究发现，人类新皮层面积显著扩大，脑回折叠更加复杂，且前额叶联合区在皮层中占据异常大的比例，覆盖额叶前部近 80% 的区域、整个皮层表面积的三分之一²。

其二为组成成分的差异，表现为构成脑组织的细胞数量与比例的不同。在细胞组成层面，研究揭示，人类与其他哺乳动物在神经元大类组成上总体保守，并未演化出全新的神经元类别²。神经元的绝对数量是解释人类脑功能特异性的重要线索⁵。该结论基于各向同性分馏法（isotropic fractionation）得出：将脑组织制备为细胞核悬液，利用免疫组化标记神经元核抗原（neuronal nuclei, NeuN）区分神经元与非神经元细胞核，并在显微镜下进行直接计数，可获得全脑各类细胞的绝对数量¹⁴。并且，该方法的跨物种应用揭示了灵长类

与啮齿类之间根本不同的细胞缩放规律：灵长类大脑遵循等速缩放（isometric scaling）规律，脑质量与神经元数量呈线性关系，神经元密度不随脑质量变化；而啮齿类则遵循超线性缩放（hypermetric scaling）规律，脑质量增长快于神经元数量增长，神经元密度随脑质量增大而降低⁵。这一发现为理解人类大脑在相同质量下容纳远超啮齿类神经元数量的能力提供了直接的定量依据。

神经元亚群的相对比例需要在相同脑区和分类标准下比较。小鼠初级躯体感觉皮层的经典数据中，PV、SST与5HT3AR相关群体约占GABA能神经元的40%、30%和30%^{6,11}。在人类大脑皮层中，PV阳性和SST阳性中间神经元与兴奋性投射神经元的比例与小鼠相似，但CalR阳性中间神经元的比例存在显著差异。CalR阳性中间神经元占人类皮层神经元总数的约13%，而小鼠中仅约4%²。值得注意的是，灵长类中全部CalR阳性中间神经元的约一半分布于前额叶联合区，占该区域GABA能神经元总量的近50%²。在皮层抑制性神经元方面，人类皮层GABA能中间神经元的数量与亚型构成亦与小鼠存在显著差异。上述PV、SST和5HT3AR三分法及其比例主要基于小鼠研究，不能直接外推至人类；CalR也可在部分SST阳性细胞中表达，并非仅限于5HT3AR阳性类群^{11,12}。人类皮层中CalR+中间神经元占皮层神经元总数的约13%，而在小鼠中仅占约4%²。人类皮层约含160亿个神经元^{5,15}，据此推算其皮层GABA能中间神经元的绝对数量远超小鼠。这种数量与比例层面的差异被认为能够提高神经网络的信息处理复杂性和计算能力⁵。

在纹状体中，与小鼠相比，人类大脑皮层及纹状体中的抑制性中间神经元在数量、组成及亚型分布等方面存在一定差异¹²。在胶质细胞方面，人类星形胶质细胞体积远大于啮齿类，其中层间星形胶质细胞（interlaminar astrocytes）在人类、黑猩猩和猕猴中具有长的跨层突起，其密度与形态复杂度随发育增加；小鼠也存在较为简单的对应细胞^{1,16}。

除上述两个维度外，人脑与其他动物最根本的区别还体现在神经发育程序的改变。首先，人类神经发育呈现系统性的时间延长，即具有“慢时性”（bradychrony）。与黑猩猩等近亲相比，人类神经前体细胞的增殖期、神经元成熟期及突触形成期均显著延长，这种发育节奏的放缓为皮层扩张提供了更长的增殖周期¹。在神经发生启动之前，人类神经上皮向放射状胶质细胞转化的速度较黑猩猩更慢，从而建立了更大的神经祖细胞池¹。其次，人类特定的神经祖细胞亚型，尤其是基底放射状胶质细胞（basal radial glia, oRG；亦称outer radial glia）在外侧室下区（outer subventricular zone, oSVZ）的大规模扩增，进一步驱动了浅层神经元的扩增和脑沟回的形成^{1,2}。灵长类动物中基底祖细胞的显著扩张使得oSVZ在中期神经发生过程中成为神经发生的主要部位，此时深层神经元的产生已经完成，浅层神经元的产生占据主导，从而解释了灵长类皮层灰质增厚和浅层比例增加的原因¹。此外，人类特异性基因如NOTCH2NL、ARHGAP11B及人类加速进化区（human accelerated regions, HARs）通过调控神经祖细胞的增殖能力，同样推动了皮层神经元数量的增加¹。

值得注意的是，尽管人类大脑在多个层面表现出独特性，但神经元大类的组成在哺乳动物中总体保守，并未演化出全新的细胞类型。研究表明，哺乳动物大脑的进化更多是通过在已有细胞类型中修改神经肽或神经调节剂基因的表达及投射靶向来改变神经回路，

而非在发育早期创造全新的细胞类型。这一观点与单细胞转录组学的研究结论一致——人类与小鼠皮层中间神经元的转录组差异主要体现在特定基因表达水平的调整，而非根本性的细胞类型创新^{2,6}。

2.4 抑制性神经元与神经疾病

目前，关于 GABA 能抑制性神经元与神经疾病关系的研究主要集中于精神分裂症、自闭症谱系障碍（autism spectrum disorder, ASD）及多种神经发育障碍。不同疾病虽具有不同的遗传背景和临床表现，但均存在不同程度的抑制性环路功能障碍，提示抑制性神经元功能受损可能是多种疾病共同的基础⁷。

在精神分裂症中，GABA 能抑制性神经元异常是目前证据较为充分的病理机制之一。大量患者脑组织分析、遗传学研究及动物实验表明，PV+ GABA 能抑制性神经元功能受损及 GAD67 表达下降可导致 GABA 合成减弱，进而影响 γ 振荡及皮层网络同步活动，可能造成工作记忆、执行功能及认知能力受损。因此，PV+ GABA 能抑制性神经元被认为是精神分裂症中最主要的受累抑制性神经元类型⁷。

与精神分裂症不同，ASD 并非由某一种特定的抑制性神经元类型的缺陷所致。ASD 的致病机理可能涉及更为广泛的 GABA 能神经元亚群及突触发育过程，现有研究支持多种抑制性神经元共同参与 ASD 的疾病发生这一假设。大量遗传学和动物模型研究表明，多种 ASD 风险基因与中间神经元发育、突触形成及环路建立有关，其异常可能导致皮层兴奋-抑制平衡失调及网络活动紊乱，并与社交障碍、重复刻板行为等 ASD 临床表现密切相关⁷。

此外，GABA 能抑制性神经元异常也可能导致 Rett 综合征、Angelman 综合征等神经发育障碍。在 Rett 综合征动物模型中，特异性敲除 GABA 能神经元的 MECP2 基因可重现多种综合征典型症状⁷。Angelman 综合征模型则表现为 GABAA 受体功能异常、抑制性传递减弱及癫痫易感性增加⁷。

值得注意的是，抑制性神经元功能障碍所导致的表型并非只是由于抑制功能减弱，而是更可能反映神经发育过程中环路建立及活动依赖性重塑发生的异常。不同遗传风险因素和环境因素可能作用于抑制性神经元发育和成熟的不同阶段并干扰环路形成，最终导致各类疾病的表型产生^{6,7}。

2.5 小结

本章系统回顾了中枢神经系统发育的基本过程、大脑皮层的细胞组成及其神经元多样性的发育来源，并重点比较了人类与其他物种在脑结构与发育程序上的差异。

在发育层面，神经管的分化与区域化、神经发生与迁移、突触建立与修剪等事件在不同物种间遵循相似的基本规律，但人类在这些过程的时序上表现出显著延长——神经前体细胞增殖期、神经元成熟期及突触形成期的延缓为皮层扩张提供了更长的增殖周期¹。在细胞层面，灵长类等速缩放规律使得人类在相同脑质量下可容纳远超啮齿类的神经元数量⁵。具体到抑制性神经元，人类皮层 CalR+中间神经元的比例（13%）显著高于小鼠（4%），且在前额叶联合区高度富集²，这一特征可能为人类高级认知功能提供了细胞层面的基础。

在发育来源上，皮层 GABA 能抑制性神经元主要产生于腹侧端脑的 MGE、CGE 和 POA^{6,7,9}。其中，人类 MGE 在进化中表现出 SVZ 的显著扩张和独特的细胞组织结构，近期发现的 SVZ RGC 在猕猴中存在同源类型但在小鼠中未见，可持续产生 GABA 能抑制性神经元和胶质细胞⁸。这一发现提示，MGE SVZ RGC 可能是人类皮层抑制性神经元数量增加的重要细胞来源。

综上所述，人类大脑皮层的结构优势与功能特化是多层面因素共同作用的结果——从宏观的脑区扩张与折叠模式，到细胞层面的神经元数量与亚型比例调整，再到发育程序层面的时序延长与祖细胞类型创新。这些差异共同塑造了人类大脑皮层的独特性，而 MGE SVZ RGC 作为一类进化新颖的神经祖细胞，可能在维持人类皮层 GABA 能抑制性神经元产生中发挥关键作用。基于上述背景，本研究进一步通过实验手段对这一问题展开探究。

3. 实验材料及方法

3.1 人类MGE SVZ原代细胞解离

按照下表配方配制 10× Krebs 储备液，一个月内短期储存于 4°C。

试剂名	用量
NaCl	73.6 g
KCl	1.87 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1.87 g
MgCl ₂	1.142 g
CaCl ₂	2.33 g
ddH ₂ O	定容至 1 L

在配制 NbAT 培养基前按照下表配方配制 AP5 溶液储液，分装后长期保存于 -80°C。

试剂名	用量
AP5 (Sigma A5282-10MG)	50 mg
ddH ₂ O	定容至 50 ml (终浓度 1 mg/ml)

按照下表配方配制 0.5% FBS-PBS 终止液用于终止木瓜蛋白酶的消化，终止液可在 4°C 保存两个星期。

试剂名	用量
1× PBS	99.5ml
胎牛血清 (FBS) (Gibco A5256701)	0.5ml (0.5% v/v)

在收到可能会有新鲜人胚胎大脑样本可用的消息之前，提前清洗并紫外 30 分钟消毒所有人类样本专用手术器械以及操作台。在样品到达之前现用现配，按照下表配方配制人工脑脊液 (Artificial Cerebrospinal Fluid, aCSF)，提前充氧 15 分钟以上并冰浴预冷至 4°C。

试剂名	用量
10× Krebs 储备液	50 ml
Glucose	0.99 g
NaHCO ₃	1.05 g
ddH ₂ O	定容至 500 ml

在样品到达从之前现用现配，按照下表配方配制 NbAT 培养基，放置于冰上充氧 10 分钟,作为之后配置酶裂解液等试剂的基础培养基。

试剂名	用量
Neurobasal™培养基 (Gibco 21103049)	10 ml
AP5 溶液	50 μ l (终浓度 5 μ g/ml)
Trehalose (Sigma-Aldrich T0167-25G)	0.2 g (终浓度 20 mg/ml 即 2%)

在收到样品之前现用现配，按照下表配方配制木瓜蛋白酶裂解液，使用前需提前在 37°C 预热 15 分钟。

试剂名	用量
NbAT 培养基	1 ml
木瓜蛋白酶 (Worthington LK003178)	1 mg
Dnase I (50x) (Worthington LK003170)	0.02ml

在收到样品之前按照下表配方配制神经干细胞培养基，神经干细胞培养基可在两周内

试剂名	用量
DMEM/F12 (Gibco11320033)	47.5ml
GlutaMAX (Gibco35050061)	2 mM
B27 (不含维生素 A) (Gibco17504044)	2%
N2 (Gibco 17502048)	1%
青霉素-链霉素 (Gibco 15140122)	1%
human FGF-2 (PeproTech AF-100-18B)	20 ng/ml
Y27632 (1000 $\times$) (Selleck S1049)	50 μ l

短期储存于 4°C。

将获得的人类胚胎大脑样本浸泡于的人工脑脊液中在冰盒上进行手术操作，并在操作全程持续充氧。

在解剖过程中先剥离人类胚胎大脑的蛛网膜组织，随后先分离左右半球，然后根据人类胚胎脑图谱和对应的解剖学位置进行区分，选择 MGE 位置进行冠状切，切下可观察到整个 MGE 的冠状切片，并在体视显微镜镜下用精细解剖镊分离 MGE 的 VZ 和 SVZ 区域。

将分离得到的 MGE VZ 和 SVZ 组织转移至提前预热好的木瓜蛋白酶裂解液中，根据周龄越大时间越长的原则将组织于 37°C 消化 6-8 分钟，中途每隔 2 分钟轻柔颠倒混匀一次。酶解结束后立即吸走酶液，加入提前冰浴预冷的 0.5% FBS-PBS 终止液终止酶解。用移液枪轻柔吹打组织，直至细胞悬液呈匀浆状无可见组织块，全程避免产生气泡。将细胞悬液 500 G 离心 3 分钟，弃去上清，用神经干细胞培养基轻柔重悬细胞沉淀，将细胞悬液接种至未处理的 T25 细胞培养瓶中，在 37°C、5% CO₂ 的条件下培养。

将 Lenti-CAG-GFP (BrainVTA LV-0694) 按 1:100 加入培养了 2 小时以上的神经干细胞中，感染 12 小时后更换新鲜培养基，继续培养 48 小时使病毒充分表达。

3.2 小鼠原代星形胶质细胞分离及传代

按照下表配方配制 0.05% 胰蛋白酶溶液，一个月内短期储存于 4℃。

试剂名	用量
0.25% Trypsin (Gibco 25200072)	4ml
无 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 PBS (Gibco 14190144)	16ml

按照下表配方配制 0.01% 多聚-L-赖氨酸 (PLL) 包被液，一个月内短期储存于 4℃。

试剂名	用量
PLL (Beyotime ST509)	0.01% (w/v)
无菌去离子水或 PBS	溶解至工作浓度

按照下表配方配制星形胶质细胞完全培养基，两周内短期储存于 4℃。

试剂名	用量
DMEM (Gibco C11995500BT)	44ml
胎牛血清 (FBS) (Gibco A5256701)	5ml
青霉素-链霉素 (Gibco 15140122)	1ml

在解剖开始前提前清洗并紫外 30 分钟消毒所有小鼠组织专用手术器械以及操作台。

固定好目标使用的 P (postnatal day) 0-P2 的小鼠，用 75%酒精消毒小鼠头部表皮，用精细镊子解剖取出鼠脑新鲜组织，转移至置于冰盒上的 1×HBSS (Gibco 14170112) 的 10 cm 培养皿中，确保脑组织完全浸没于液体中。去除嗅球以方便剥离蛛网膜，将小鼠大脑左右半球分离，解剖去除其他部分以获得大脑皮层组织，用镊子将大脑皮层切成 6-10 小块以提高解离效率 (图 3.1)。每个离心管中的脑组织量与试剂体积有明确的对应关系：3-4 个大脑用 10 ml 1×HBSS；5 个大脑用 11 ml 1×HBSS；12 个大脑用 20 ml 1×HBSS。随后在无菌条件下加入冰冷 0.05% DNase I(Worthington LK003170)，分别用 10 ml 和 2 ml 移液管轻柔吹打脑组织各 10-15 次。然后将组织转移到胰蛋白酶溶液中，用 10 ml 移液管混合 20-30 次，于室温 22-25℃ 孵育 20 分钟。在孵育期间，用 3 ml 0.01% PLL (Beyotime ST509) 包被 T75 培养瓶以对应 3-4 个大脑，或用 PLL 包被 T25 培养瓶以对应 1-2 个大脑，包被 20 分钟后置于培养箱中备用。

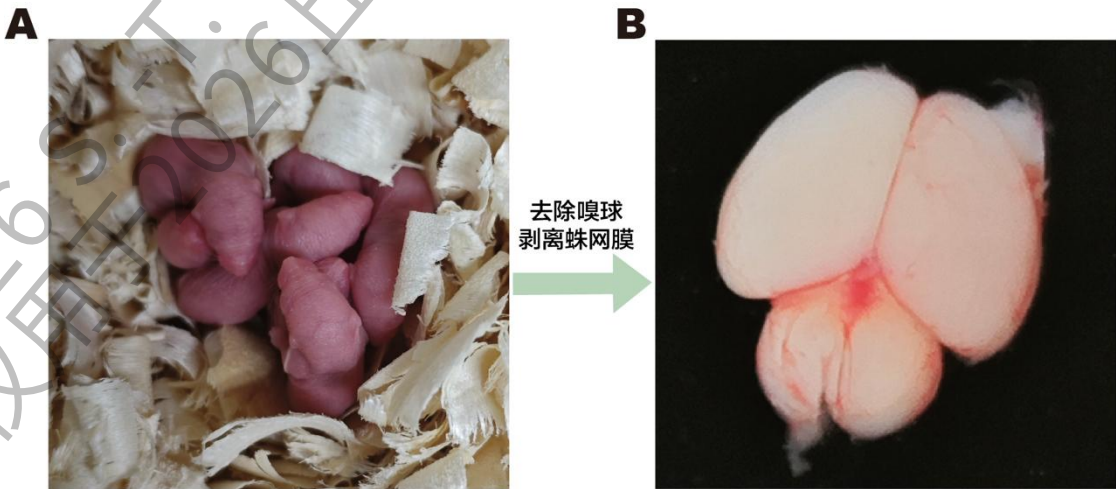


图 3.1 P0-P2 小鼠脑组织的取材与初步解剖

(A) 用于实验的 P0-P2 小鼠；(B) 取出的新鲜小鼠脑组织，去除嗅球以便后续剥离蛛网膜并进行大脑皮层组织的分离。

孵育结束后以 150 RCF 离心 10 分钟沉淀脑组织，离心后小心弃去上清。如有脑膜残留或血管污染，在沉淀顶部可见红色层，应一并丢弃，然后用 2 ml 星形胶质细胞完全培养基重悬细胞沉淀并重复离心。

吸弃培养瓶中的 PLL，用 10 ml DMEM (Gibco C11995500BT) 冲洗以完全去除残留。加入 8-10 ml 预热至 37°C 的星形胶质细胞完全培养基，将细胞悬液接种至培养瓶中，置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养。原代细胞接种后，需在第 1 天、第 2 天和第 7 天更换培养基。

培养约 10-15 天至细胞完全融合后，进行纯化步骤 (图 3.2)。首先去除 OPC：轻轻拍打培养瓶两侧数次，使 OPC 层脱离，在显微镜下确认脱落细胞后吸弃含 OPC 的培养基。加入 10 ml 星形胶质细胞完全生长培养基和 0.5 ml 冰冷 DNase I (Worthington LK003170) 以松散剩余细胞层，于 37°C 孵育 5 分钟。然后水平手动摇晃 T75 培养瓶 20-30 次以释放剩余 OPC，摇晃速度需保持平稳，过轻会导致 OPC 去除不充分，过猛则会损伤星形胶质细胞层。摇晃后将培养瓶垂直静置 30 秒使泡沫浮至表面。随后去除小胶质细胞：吸弃仍可能含有 OPC 的培养基，用 3-4 ml PBS 洗涤星形胶质细胞层。加入 3-4 ml 0.05% 胰蛋白酶，于 37°C 孵育 3-5 分钟，消化时间不得超过 5 分钟以免损伤星形胶质细胞。孵育后在显微镜下检查，如有不完全脱壁则轻拍培养瓶侧面数次。消化后加入 6-7 ml 星形胶质细胞完全生长培养基重悬细胞，转移至 15 ml 离心管中以 150 RCF 离心 10 分钟。离心期间准备 4 个无菌 10 cm 细菌培养皿，每皿加入 2 ml 星形胶质细胞完全生长培养基。离心后弃上清，用 4 ml 星形胶质细胞完全生长培养基重悬细胞，向每个培养皿中加入 1 ml 细胞悬液，于 37°C 孵育 20 分钟，此步中小胶质细胞贴附于细菌培养皿底部而星形胶质细胞不贴附。孵育后小心收集所有 4 个培养皿中含有星形胶质细胞的上清，注意倾斜培养皿从侧面收集，避免晃动导致贴壁的小胶质细胞脱落，合并转移至一个新的 10 cm 细菌培养皿中，再于 37°C 孵育 90 分钟。孵育后小胶质细胞应完全贴壁，星形胶质细胞表现为培养基中的漂浮细胞。小心将含有星形胶质细胞的上清转移至新的 T75 培养瓶中，继续培养 7-15 天至融合后用于后续实验。

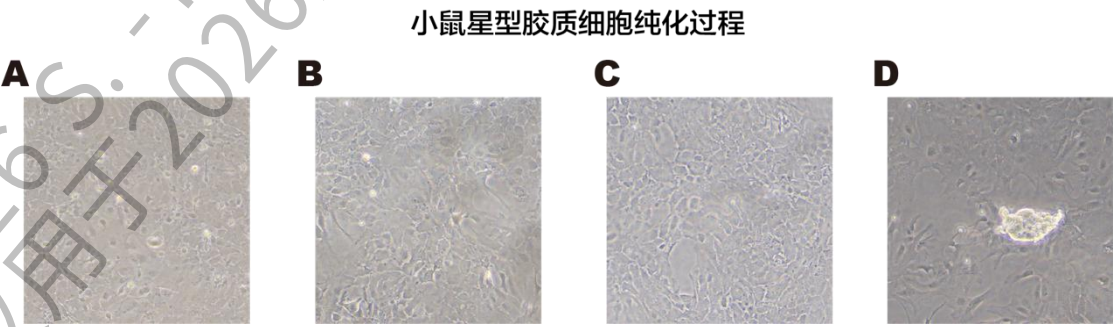


图 3.2 小鼠星形胶质细胞纯化过程

(A) 小鼠星形胶质细胞除杂前；(B) 小鼠星形胶质细胞除杂过程中；(C) 小鼠星形胶质细胞除杂后，可见细胞脱落痕迹；(D) 小鼠星形胶质细胞除杂后，可见 OPC 层细胞飘起。

3.3 小鼠原代星形胶质细胞冻存及复苏

现用现配，按照下表配方配制细胞冻存液。

试剂名	用量
-----	----

星形胶质细胞完全培养基	9ml
DMSO (Solarbio D8371-50ml)	1ml

将培养至对数生长期的星形胶质细胞加入胰蛋白酶溶液，于 37°C 孵育 20 分钟消化收集后，500G 离心 3 分钟，弃上清，用现用现配的细胞冻存液重悬细胞沉淀，调整至适当密度后分装至冻存管中。将冻存管置于程序降温盒中于 -80°C 过夜，次日转移至液氮罐中长期保存。复苏时，从液氮中取出冻存管，迅速于 37°C 水浴中快速摇晃解冻，将细胞悬液轻柔加入预热的新鲜星形胶质细胞培养基中，离心弃去上清，用新鲜星形胶质细胞完全培养基重悬后接种至 PLL 包被的 96 孔板中。

3.4 小鼠原代星形胶质细胞铺板及分裂终止

按照下表配方配制单细胞克隆培养基，两周内短期储存于 4°C。

试剂名	用量
DMEM/F12	47.5ml
GlutaMAX	2 mM
B27 (不含维生素 A)	2%
N2	1%
青霉素-链霉素	1%
human FGF-2	10 ng/ml

将纯化后的小鼠皮层星形胶质细胞接种到 0.01% PLL 包被的玻璃底 96 孔板中作为培养 MGE RGC 的饲养层细胞。小鼠皮层星形胶质细胞贴壁培养 24 小时后，用 20 μ M 阿糖胞苷 (MCE HY-13005) 处理 72 小时以终止细胞分裂。处理结束后更换新鲜星形胶质细胞完全培养基在 37°C 5% CO₂ 的条件下恢复 24 小时，然后将培养基更换为单细胞克隆培养基，以备后续细胞流式分选之后与 MGE RGC 共培养使用。

3.5 细胞流式分选人类 MGE VZ 和 SVZ RGC

将培养的感染了表达 GFP 慢病毒的人类 MGE VZ 和 SVZ 细胞用提前预热 15 分钟的 Accutase (Sigma-Aldrich A6964) 于 37°C 消化 15-20 分钟，中途每隔两分钟轻柔颠倒混匀，加入 FBS (Gibco A5256701) 终止消化后离心弃上清。将细胞沉淀用 1 $\times$ PBS 洗涤一次，然后按 1:20 比例加入 FcR 封闭剂 (Thermo 14-916-73)，冰上封闭 15 分钟。封闭后加入荧光标记抗体，具体用量为每 200 μ l 重悬体系加入 CD24-PE 抗体 (Thermo Fisher/eBioscience 12-0247-42) 2 μ l 和 PDGFR α -APC (BioLegend 323512) 抗体 2.5 μ l，冰上避光孵育 20 分钟。孵育结束后用 1 $\times$ PBS 洗涤两次，然后用含 1000x DAPI (Beyotime C1002) 的单细胞克隆培养基重悬细胞。上机前需将细胞悬液通过流式管细胞过筛。使用 BD FACS Aria SORP 流式分选仪将单个 GFP 阳性、CD24 阴性或低表达、PDGFR α 阴性和 DAPI 阴性的人类 MGE VZ RGC 或 SVZ RGC，细胞分选至预先铺有星形胶质细胞饲养层的玻璃底 96 孔板中，每孔一个细胞。分选后的 96 孔板转入培养箱在 37°C 5% CO₂ 的条件下进行单细胞克隆培养。

3.6 MGE VZ和SVZ RGC单细胞形态鉴定

单细胞分选并接种至 96 孔板后，在培养第一个 24 小时内细胞贴壁时，使用 ImageXpress Confocal HT.ai 共聚焦显微镜系统对每个孔进行全孔扫描成像，以确定初始细胞的形态并记录孔位置。形态分类标准参考人类胚胎 MGE 脑切片延时成像中对 RGC 的定义：MGE SVZ 组织来源细胞中具有单极形态且可进行有丝分裂的细胞被认为是 SVZ RGC；具有多极形态且可进行有丝分裂的细胞被认为是中间前体细胞；MGE VZ 组织来源细胞中具有双极形态并可进行有丝分裂的细胞被认为是 VZ RGC⁸。在单克隆培养实验中，可根据这一定义对初期克隆的细胞类型进行初步评估。记录完成后，将培养板放回培养箱继续培养，培养满一周后在单细胞克隆培养基中撤去 human FGF-2，然后继续培养一周。

3.7 单克隆细胞免疫荧光染色及数据获取

单细胞克隆培养两周后，吸去培养基，直接加入 4%多聚甲醛溶液室温固定 15 分钟。固定完成后弃去固定液，用 1×PBS 清洗三次每次 5 分钟。使用抗原修复液室温处理 5 分钟。用含 5%驴血清和 0.2% Triton X-100 的 PBS 作为封闭液，现配现用，室温封闭 2 小时。封闭结束后移除封闭液，加入用封闭液稀释的一抗（GABA,Merck A2052-100UL，为 1:150，GFP，aves gfp-1020

，为 1:1500，CRABP1，12588-1-AP，为 1:200，ISL1，OB-MMS016，为 1:200，EPHA5，sc-73947，为 1:200），于 4℃ 孵育 24 小时。一抗孵育结束后，用 1×PBS 洗涤三次，每次 10 分钟。然后加入用封闭液稀释的荧光二抗（rb 405 AB175651，1:1000），同时加入 Hoechst 33342 核染料（Beyotime C1022），稀释比例为 1:500，室温避光孵育 2 小时。孵育结束后用 PBS 洗涤三次，每次 10 分钟。染色结束后使用奥林巴斯 SpinSR 转盘共聚焦显微镜采集图像，图像使用 Fiji 软件进行分析处理并进行统计。

4. 实验结果

4.1 人类MGE VZ/SVZ RGC的分离和培养

为探究人类 MGE VZ RGC 和 SVZ RGC 在产生 MGE 不同谱系后代神经元中的多能性差异，我们首先建立了高效分离得到并可以长期培养两类 RGC 的单细胞分选培养体系。

(图 4.1)

为区分 VZ、SVZ 区域以确保后续所有比较分析能够明确归因于不同的 RGC 群体，我们采用物理切割的方法对两个区域进行分离。我们对获得的包括 GW11、GW14、GW20、GW24 的人类胎儿大脑进行了蛛网膜剥离和左右半球分离，以在侧视观察角度可以辨认出 GE 的大概位置，通过冠状切将人类胎儿半脑中包含有 MGE 的位置解剖为约 1 厘米至 1.5 厘米厚度的脑片，依照解剖学位置可辨认的边界确定 MGE 所在的位置，并在体视镜下通过细胞密度差异判定 VZ 和 SVZ 的界限，通过精细镊进行解剖分割，分别取出 MGE 的 VZ 组织和 SVZ 组织。操作过程全程于冰上充氧的人工脑脊液中完成（图 4.1）。

为了得到可培养的 MGE VZ 和 SVZ 的细胞，我们将取出后的组织分别剪碎为小于 1mm 的组织块，然后将组织块转移到 37°C 预热 15 分钟木瓜蛋白酶溶液中进行消化解离，轻柔吹打后在 37°C 消化 6-8 分钟，期间轻柔混匀，终止消化后离心过细胞筛，用培养基重选单细胞悬液，接种到细胞培养瓶中进行悬浮培养。

神经干细胞在贴壁培养中需要有星形胶质细胞作为饲养层细胞进行共培养，这是因为单个 RGC 在脱离原有的组织微环境后，缺乏细胞间信号支持和胞外基质提供的黏附信号，难以在低密度条件下存活和增殖。星形胶质细胞能够分泌多种神经营养因子和胞外基质成分，为 RGC 提供生长所需的微环境支持，是维持 RGC 存活和克隆形成效率的关键条件。为了能够在后期可以区分 RGC 单克隆细胞与饲养层星形胶质细胞，我们使用荧光蛋白慢病毒标记的方法使 RGC 内源表达绿色荧光蛋白，从而可以统计所有绿色荧光蛋白阳性细胞的细胞类型来衡量单细胞克隆的谱系分化能力。为此我们在悬浮培养的人类 MGE VZ 和 SVZ 细胞中 1:100 加入 Lenti-CAG-GFP 感染 12 小时，并在 48 小时荧光蛋白表达后进行流式分选（图 4.1）。

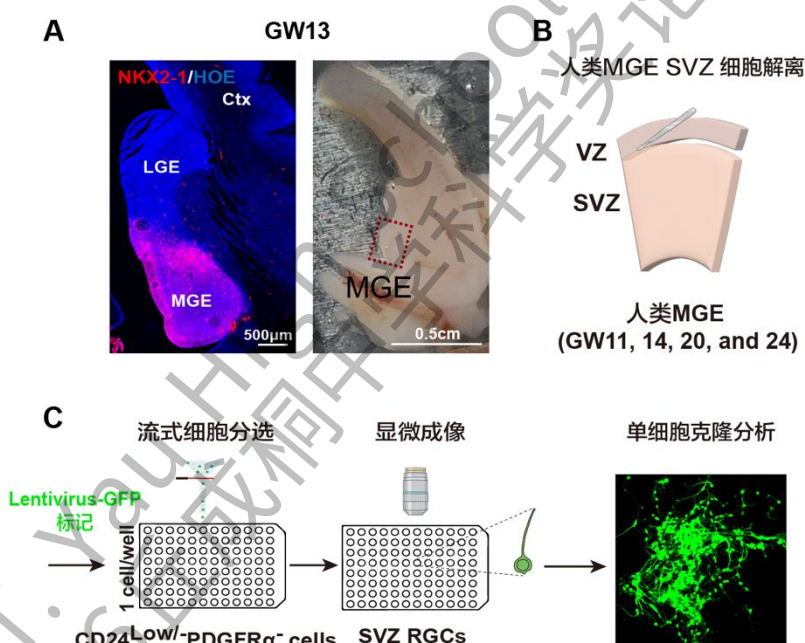


图 4.1 单细胞克隆分析实验流程

(A) 左图所示为免疫荧光染色证实的 NKX2-1 表达的人类 MGE 的解剖位置，比例尺：500μm。右图所示为取样时人类 MGE 的解剖取样区域照片。红色虚线框表示人类 MGE 解剖部位。比例尺：0.5 cm。Ctx, 皮层；MGE, 内侧神经节隆起；LGE, 外侧神经节隆起。HOE: Hoechst. (B) 图示收集了人类 GW11, GW14, GW20, GW24 的 MGE 组织，分离出 VZ 和 SVZ，解离并消化成单细胞。(C) 图示了对获得的细胞进行慢病毒感染标记、分选和单克隆培养实验的流程。比例尺：200μm。

为了能在 MGE 组织中分离的原代细胞中分选出 RGC，我们依据人类 MGE 单细胞转录组数据中不同细胞类型的表达谱，以在 RGC 中表达较低，在 IPC 和神经元以及 APC 中表达较高的表面抗原 CD24 作为表面筛选分子标记对 RGC 进行负筛，以只在 OPC 中高表达的受体 PDGFRA 为分子筛选标记以去除 OPC⁸（图 4.2）。在实验过程中，我们将培养中的绿色荧光蛋白标记的 MGE 原代细胞重新消化为单细胞悬液，封闭后使用抗 CD24 和抗 PDGFRα 的荧光标记抗体以及只能着色死细胞的 DAPI 对单细胞悬液进行荧光染色，染

色结束后通过流式细胞分选，将 CD24 低表达/阴性、PDGFR α 阴性且 DAPI 阴性的细胞群体作为目标，以分选出单个活的 MGE VZ 或 SVZ 的 RGC 接种到已铺板星形胶质细胞作为饲养层的 96 孔玻底板单个孔中，在含有 FGF-2 的神经干细胞培养基中进行单克隆培养 7 天，撤去 FGF-2 之后继续培养 7 天，以获得可以进行谱系鉴定的单细胞克隆。

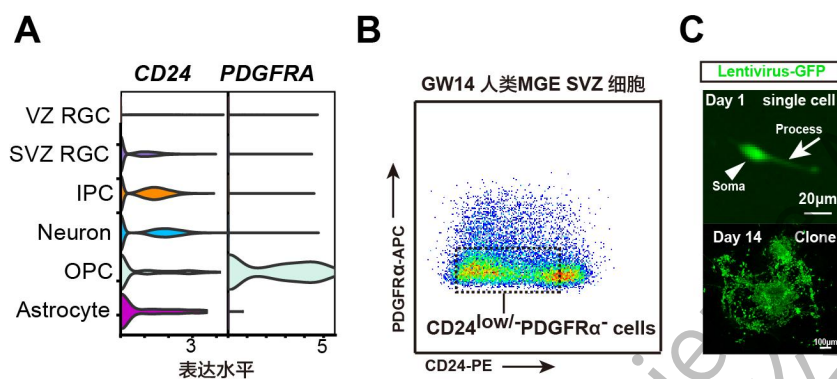


图 4.2 单细胞克隆谱系分析实验筛选标准及克隆展示

(A) 用于分选人类 MGE RGC 的分子标志物 CD24 和 PDGFR α 的表达模式。(B) MGE RGC 流式细胞术分选的门控策略，即 CD24 低表达或阴性且 PDGFR α 阴性的细胞区域。(C) 单个 MGE RGC 的形态及克隆形成能力。接种第 1 天，单个 MGE RGC 呈现典型的单极细胞形态。箭头指示细胞突起，箭头尖端指示胞体，如上图。比例尺：20 μ m；培养至第 14 天，单个细胞可增殖形成多细胞克隆。比例尺：100 μ m。

4.2 MGE VZ RGC既可以产生GABA能神经元也可以产生胆碱能神经元

人类 MGE 单细胞转录组研究中的人类 MGE VZ RGC 发育拟时序分析表明，人类 MGE VZ RGC 既可以产生 GABA 能抑制性神经元，也可以产生胆碱能神经元，而人类 MGE SVZ RGC 的神经元后代只有 GABA 能抑制性神经元⁸。为探究人类 MGE VZ RGC 是否具有产生多种谱系神经元的能力，我们首先对 VZ RGC 来源的单细胞克隆进行了谱系鉴定。

因为人类 MGE 在 GW13 之前胆碱能神经元就已产生结束⁸，因此我们选择从 GW11 的人类 MGE 组织中分离 VZ 区域，经木瓜蛋白酶消化解离后制备单细胞悬液。在对培养中的单细胞进行病毒标记使之表达荧光蛋白，通过流式细胞分选 CD24 低表达或阴性、PDGFR α 阴性和 DAPI 阴性的单个 VZ RGC，将单个 VZ RGC 分选至预先铺有星形胶质细胞饲养层的 96 孔板中。分选后的细胞通过荧光成像进一步通过形态筛选符合 RGC 形态标准的放射状极性细胞，在含有 FGF-2 的神经干细胞培养基中培养 7 天，撤去 FGF-2 后继续培养 7 天，使单个 MGE VZ RGC 有充分的时间增殖形成多细胞克隆。

我们使用两个生物学样本进行 MGE VZ RGC 单细胞克隆培养实验，一共获得 18 个培养了 14 天的单细胞克隆，平均每个克隆有 153.3 个细胞，单细胞克隆细胞数量的中位值为 68.5 个细胞。我们对其中三个克隆进行了祖细胞分子标志物 SOX2 和新生神经元分子标志物 DCX 的免疫荧光共染色，对单细胞克隆中 SOX2 阳性细胞占比的统计发现，MGE VZ RGC 单细胞克隆中平均有 28% 细胞是仍表达 SOX2 的祖细胞，其余细胞为神经元，表明培养十四天之后的单细胞克隆中依旧存在可分裂产生后代的祖细胞，但大部分细胞已经是分化的神经元，可以进行谱系鉴定（图 4.3）。

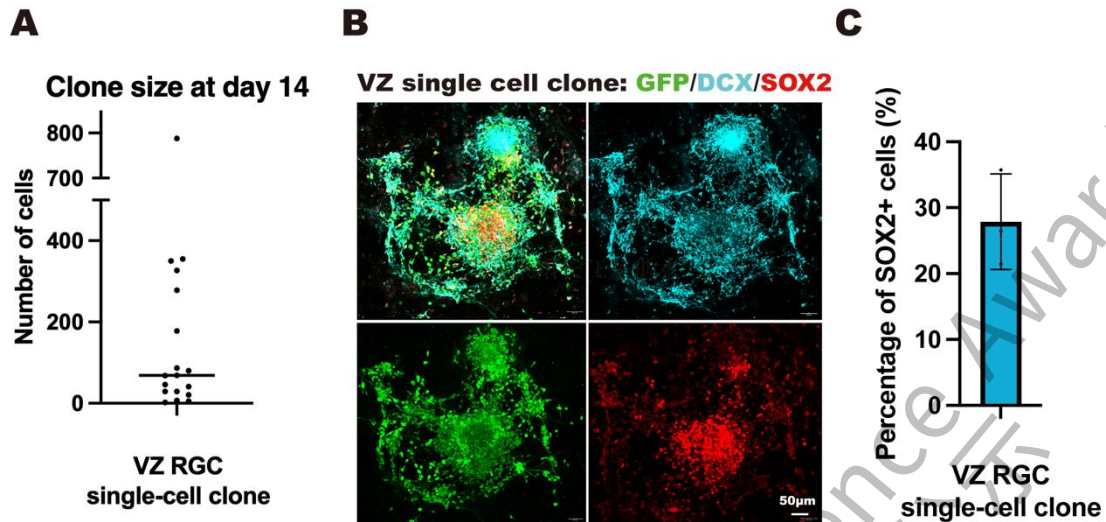


图 4.3 人类 MGE VZ RGC 单细胞克隆培养 14 天后的细胞数量

(A) 单个人类 MGE VZ RGC 培养形成的单细胞克隆的细胞数量统计。n=18 个克隆，来自 2 个样本。
(B) SOX2 和 DCX 在 MGE VZ RGC 单细胞克隆中的免疫荧光染色。比例尺：50 μ m。
(C) MGE VZ RGC 单细胞克隆中 SOX2 阳性细胞占比的统计。数据以均值 $\pm$ SEM 表示，n=3 个克隆。

为了鉴定 MGE VZ RGC 单细胞克隆的后代神经元中包含了哪些谱系的神经元，我们在培养 14 天后对 GW11 来源的 VZ RGC 单细胞克隆进行 GABA 与 ISL1 免疫荧光共染色。GABA 是 GABA 能抑制性神经元分泌的神经递质，由 GABA 能抑制性神经元特异性表达^{6,7}。ISL1 是 LIM 同源框转录因子家族的成员，在胆碱能神经元的分化和身份维持中发挥关键作用¹⁷。研究表明，ISL1 通过与 LHX8 形成转录复合物，直接结合并激活胆碱能通路基因（如乙酰胆碱合成酶和转运体）的表达，从而驱动胆碱能神经元身份的建立¹⁸。条件性敲除 ISL1 会导致前脑和脊髓中胆碱能神经元的显著减少^{17,18}。所以为了区分单细胞克隆后代神经元是 GABA 能神经元还是胆碱能神经元，我们选用 GABA 作为分子标志物对 GABA 能神经元进行标记鉴定，选取 ISL1 对胆碱能神经元进行标记。

对免疫荧光共染色结果进行统计后我们发现，MGE VZ RGC 单细胞克隆中存在仅产生 ISL1 阳性神经元即胆碱能神经元的克隆，也存在仅产生 GABA 阳性即 GABA 能神经元的克隆，表明 MGE VZ RGC 既可以产生 GABA 能谱系的后代神经元，也可以产生胆碱能谱系的后代神经元（图 4.4A）。但由于我们观察到的每个克隆内部神经元均为同质性，未发现同时存在 GABA 阳性和 ISL1 阳性细胞的克隆，表明 MGE VZ RGC 具有祖细胞多样性，存在可以产生不同谱系后代神经元的不同 MGE VZ RGC 群体，且在 MGE VZ RGC 层级祖细胞多能性就已经受到了限制，其所产生的后代神经元均为同一谱系的神经元，而非混合产生两种谱系的神经元（图 4.4A）。同样，我们也观察到仅产生 GABA 阳性神经元的克隆占多数，仅产生 ISL1 阳性神经元的克隆数量很少，与此前研究报道中 MGE 后代不同谱系神经元占比中胆碱能神经元较少的发育规律一致⁸。

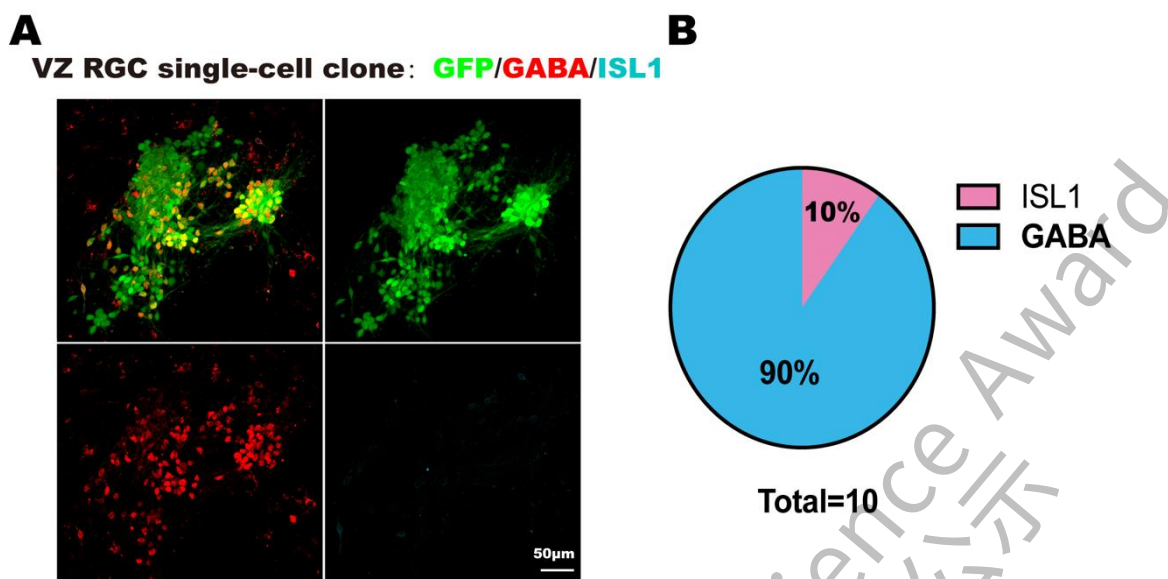


图 4.4 人类 MGE VZ RGC 单细胞克隆可以贡献产生胆碱能神经元

(A) MGE VZ RGC 单细胞克隆中 GABA 和 ISL1 的免疫荧光染色。比例尺: 50 μm 。 (B) MGE VZ RGC 单细胞克隆子代细胞类型组成的统计。n=10 个克隆, 来自 2 个样本。

4.3 MGE SVZ RGC 仅贡献于 GABA 能神经元产生

与 MGE VZ RGC 不同, 单细胞转录组拟时序分析显示人类 MGE SVZ RGC 后代中仅包含 GABA 能抑制性神经元, 而不包括胆碱能神经元, 暗示人类 MGE SVZ RGC 的潜能受到限制, 有可能仅贡献到 GABA 能抑制性神经元的数量扩增中⁸。为验证 MGE SVZ RGC 的谱系分化潜能, 我们在 VZ RGC 实验的基础上, 进一步对 SVZ RGC 的谱系分化能力进行了鉴定。

我们从 GW11、GW14、GW20 和 GW24 的人类 MGE 组织中分离 SVZ 区域, 经木瓜蛋白酶消化解离后制备单细胞悬液。以同样的标准从人类 MGE SVZ 单细胞悬液中流式细胞分选 CD24 低表达或阴性、PDGFR α 阴性和 DAPI 阴性的细胞, 将单个 MGE SVZ RGC 分选至预先铺有星形胶质细胞饲养层的 96 孔板中, 通过荧光成像筛选放射状的 RGC 作为后期培养和鉴定的对象, 以与 MGE VZ RGC 相同的培养方法进行 14 天培养, 使单个 MGE SVZ RGC 有充分的时间增殖形成多细胞克隆。

为评估 MGE 来源 RGC 经体外克隆培养后的细胞组成及分化状态, 本研究利用来自两个生物学样本的 MGE SVZ RGC 开展单细胞克隆培养。培养至第 14 天时, 共获得 50 个独立的单细胞克隆, 克隆细胞数量存在一定差异, 平均每个克隆包含 62.12 个细胞。随后, 从中随机选取 3 个克隆, 通过免疫荧光染色检测祖细胞标志物 SOX2 及新生神经元标志物 DCX 的表达情况。结果显示, 培养 14 d 后的克隆细胞群体以分化细胞为主, 仅有少部分细胞维持 SOX2 表达, 其阳性细胞比例平均约为 8%。结合 SOX2 与 DCX 的表达特征推测, 经过 14 d 培养后, 部分克隆细胞仍保留祖细胞样特征, 而克隆中的大多数细胞则已向神经元方向分化。上述结果说明, MGE SVZ RGC 来源的单细胞在体外培养过程中能够形成包含祖细胞样细胞及神经元样细胞的克隆群体, 提示其具有一定的自我维持及神经元产生潜能, 为后续开展细胞谱系及分化潜能研究提供了依据 (图 4.5)。

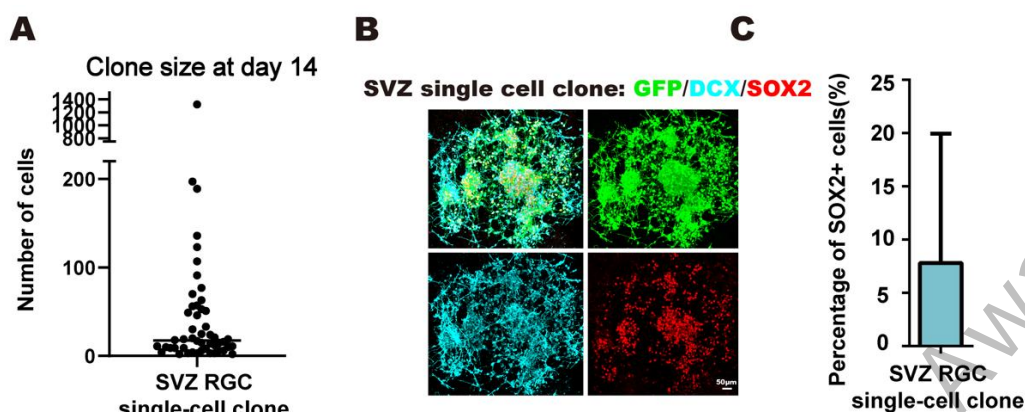


图 4.5 人类 MGE SVZ RGC 单细胞克隆培养 14 天后的细胞数量

(A) 单个人类 MGE SVZ RGC 单细胞克隆的细胞数量统计。N=50 个克隆，来自 2 个样本。(B) MGE SVZ RGC 单细胞克隆中 SOX2 和 DCX 的免疫荧光染色。比例尺：50 μ m。(C) MGE SVZ RGC 单细胞克隆中 SOX2 阳性细胞的比例。数据以均值 $\pm$ SEM 表示，n=3 个克隆。

培养 14 天后，我们对克隆中不同神经元类别分子标志物进行免疫荧光共染色，以鉴定子代细胞的类型。

为区分 MGE SVZ RGC 后代中的 GABA 能神经元与胆碱能抑制性神经元，我们同样采用了 GABA 与 ISL1 的免疫荧光共染色。对 14 个来自于不同时期 MGE SVZ RGC 的单细胞克隆的后代进行统计，结果表明所有单细胞克隆中均未检测到 ISL1 阳性的细胞，所有单细胞克隆中都只存在 GABA 阳性的细胞，表明 SVZ RGC 的后代同样具有同质性，且只产生 GABA 能神经元，不产生胆碱能神经元（图 4.6）。尽管 SVZ RGC 来自 GW11、GW14、GW20 和 GW24 多个发育阶段，克隆大小有所差异，但所有克隆的神经元后代谱系高度一致，均只产生 GABA 能神经元，表明人类 MGE SVZ RGC 在发育过程中持续特异性产生 GABA 能神经元，而不参与胆碱能抑制性神经元的产生。

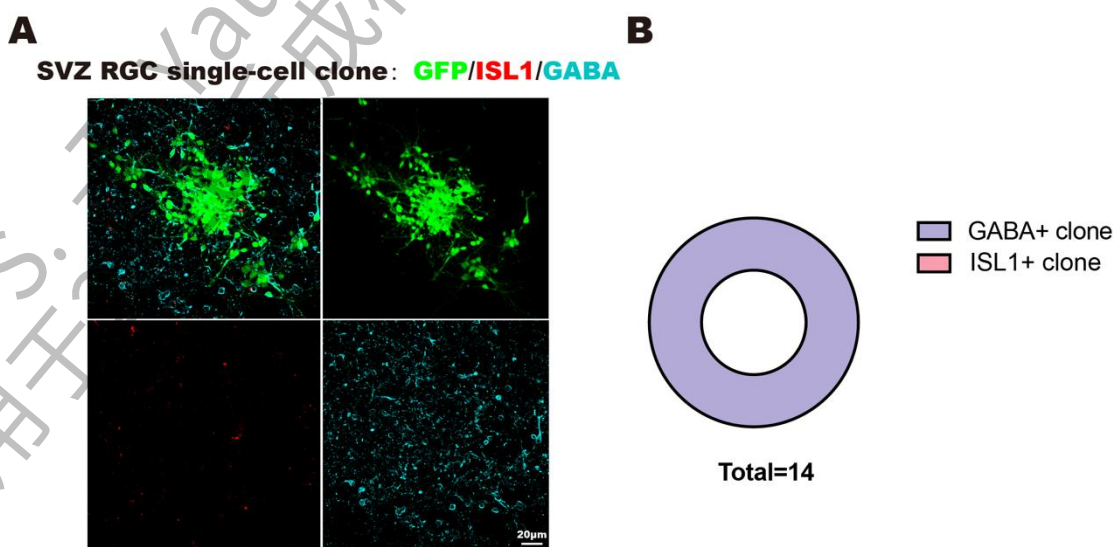


图 4.6 人类 MGE SVZ RGC 单细胞克隆只贡献产生 GABA 能神经元

(A) MGE SVZ RGC 单细胞克隆中 GABA 和 ISL1 的免疫荧光染色。比例尺：20 μ m。(B) MGE SVZ RGC 单细胞克隆子代细胞类型组成的统计。n=14 个克隆，来自 5 个样本。

由此可见，MGE SVZ RGC 在 GABA 能和胆碱能谱系的层级已发生命运限定，仅贡献于 GABA 能神经元的产生，提示其可能特异性为人类大脑 GABA 能神经元的数量扩

增提供了细胞学基础。结合 4.2 节中 VZ RGC 可产生胆碱能神经元的结果, VZ RGC 与 SVZ RGC 在谱系分化潜能上存在明确差异, 即 VZ RGC 保留了具备产生胆碱能谱系神经元能力的群体, 而 SVZ RGC 中则不具备这一祖细胞群体。

4.4 已发生命运限定的MGE SVZ RGC主要贡献于皮层GABA能神经元产生

上述实验结果表明, 在 GABA 能神经元与胆碱能神经元这一分类层级上, 人类 MGE SVZ RGC 仅产生 GABA 能神经元而不产生胆碱能神经元, 潜在贡献于人类大脑 GABA 能神经元的数量扩增。人类大脑中扩张最大的区域是大脑皮层, 那么 MGE SVZ RGC 是否是大脑皮层 GABA 能抑制性神经元扩增的祖细胞来源呢? 在 GABA 能抑制性神经元的不同谱系之间, MGE SVZ RGC 是否仍具有多能性可以同时产生皮层 GABA 能抑制性神经元和皮层下基底神经节 GABA 能抑制性神经元, 还是进一步呈现谱系倾向性? 为探究这一问题, 我们通过 CRABP1 与 EPHA5 的免疫荧光共染色, 分析每个 MGE SVZ RGC 单细胞克隆在更分化层级上的谱系分化模式。

根据此前文献的报道, EPHA5 与 CRABP1 的表达模式可用于区分三类 MGE 来源的 GABA 能抑制性神经元⁸。第一类是 EPHA5/MEF2C 类神经元, 高表达 EPHA5 而不表达 CRABP1, 对应皮层 GABA 能抑制性神经元。第二类是 LHX6/NFIA 类神经元, 同时表达 EPHA5 与 CRABP1, 特殊对应到大脑皮层 GABA 能抑制性神经元中的 PV 阳性吊灯样细胞。第三类是 CRABP1/ANGPT2 类神经元, 高表达 CRABP1 而不表达 EPHA5, 对应皮层下基底神经节的 GABA 能抑制性神经元。

我们如前所述收集了 GW11、GW14、GW20 和 GW24 的人类 MGE SVZ RGC 进行单细胞克隆培养, 在培养 14 天后进行 EPHA5 与 CRABP1 的免疫荧光共染色, 以鉴定 MGE SVZ RGC 单细胞克隆是否只产生 EPHA5/MEF2C 类神经元、LHX6/NFIA 类神经元、CRABP1/ANGPT2 类神经元中的一种, 还是可以混合产生不同类型的细胞。

我们对 24 个克隆的染色结果进行了统计。结果显示, MGE SVZ RGC 单细胞克隆中仅含有 EPHA5 阳性/CRABP1 阴性的后代细胞, 即将要分化为 EPHA5/MEF2C 类皮层 GABA 能神经元; 或仅含有 CRABP1 阳性/EPHA5 阴性的后代细胞, 即将要分化为 CRABP1/ANGPT2 类皮层下 GABA 能神经元。未发现同时含有上述两种细胞类型的克隆。这一结果进一步验证了在皮层和皮层下基底神经节 GABA 能抑制性神经元的分类层级上, 不同谱系神经元的命运特化在人类 MGE 的 RGC 阶段已经发生, 单个 SVZ RGC 的后代是单一类型的, 不会混合产生两种不同亚型的 GABA 能神经元(图 4.7)。

进一步统计发现, EPHA5 阳性/CRABP1 阴性的单细胞克隆占绝大多数, 在 24 个克隆中占 23 个, 比例约为 95.8%, 而 CRABP1 阳性/EPHA5 阴性克隆仅 1 个。这一比例分布提示 MGE SVZ RGC 主要产生 EPHA5/MEF2C 类的皮层 GABA 能抑制性神经元, 进一步支持了 SVZ RGC 在皮层抑制性神经元扩增中的贡献。值得注意的是, 本研究未检测到产生 EPHA5 与 CRABP1 双阳性 (对应于 LHX6/NFIA 类神经元) 的 MGE SVZ RGC 单细胞克隆。推测这可能与 LHX6/NFIA 类神经元在 MGE 发育中比例稀少有关, 未能在有限的克隆样本中捕获到对应的 SVZ RGC。

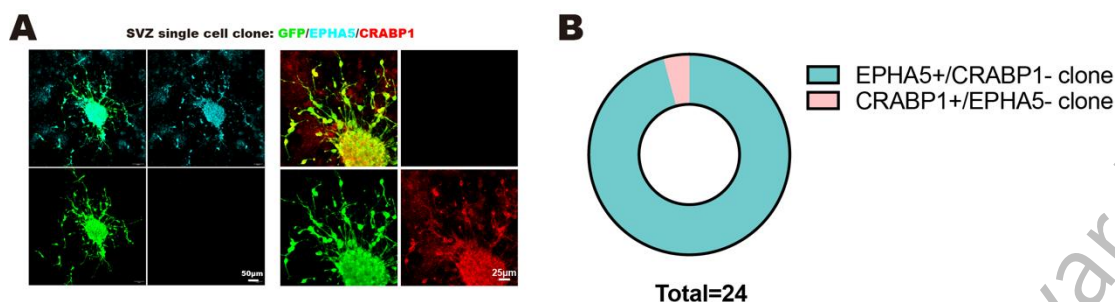


图 4.7 人类 MGE SVZ RGC 单细胞克隆子代细胞具有谱系倾向性

(A) EPHA5 和 CRABP1 在 MGE SVZ RGC 单细胞克隆中的免疫荧光染色。左图比例尺：50µm；右图比例尺：25µm。(B) 环形图所示 MGE SVZ RGC 单细胞克隆的产生子代细胞类型的统计。n=24 个克隆，来自 4 个样本

以上实验结果表明，人类 MGE VZ RGC 具有产生 GABA 能神经元或胆碱能神经元的不同祖细胞群体，而 SVZ RGC 则已发生命运限定，仅产生 GABA 能抑制性神经元，并且在皮层和皮层下基底神经节 GABA 能神经元的分类层级上进一步呈现谱系倾向性，即其主要贡献于皮层 GABA 能抑制性神经元而不是皮层下基底神经节 GABA 能神经元。这一发现表明，SVZ RGC 的出现是进化中皮层抑制性神经元扩增的重要细胞基础，为理解人类大脑皮层抑制性神经元数量的增加提供了直接的细胞学证据。

5. 总结与展望

5.1 研究工作总结

人类大脑在进化过程中形成了显著区别于其他哺乳动物的结构和功能特征。其中，大脑皮层面积的扩大、浅层神经元数量的增加、脑回折叠的增强以及抑制性神经元数量与组成比例的改变，被认为是构成人类复杂认知功能的重要细胞学基础。与兴奋性投射神经元相比，GABA 能抑制性神经元虽然数量较少，却在维持神经网络兴奋-抑制平衡、调节网络同步活动、参与神经振荡生成以及支持学习、记忆和高级认知功能等方面发挥关键作用。已有研究表明，人类大脑皮层中部分 GABA 能抑制性神经元亚群在数量和比例上较啮齿类明显增加，因此，阐明这些细胞在发育过程中的产生与扩增机制，是理解人类大脑进化及功能特化的重要切入点^{1,2,12}。

MGE 是大脑皮层 PV⁺和 SST⁺ GABA 能抑制性神经元的重要发育来源，同时也产生皮层下 GABA 能神经元及胆碱能神经元。2026 年发表于《Science》的研究通过空间转录组和单细胞转录组分析发现，人类 MGE 的 SVZ 中存在一类具有独特分子特征、形态和分裂行为的 SVZ RGC⁸。该类细胞在猕猴中存在相似群体，而在小鼠 MGE 中未发现明确对应类型，提示 SVZ RGC 可能代表灵长类大脑进化过程中出现或显著扩增的一类神经祖细胞，并可能与人类抑制性神经元数量的扩张有关。该研究进一步证明，人类 MGE SVZ RGC 能够在较长的发育时间窗口内持续产生抑制性神经元和胶质细胞，为理解人类抑制性神经元的扩增提供了新的祖细胞基础⁸。

在此基础上,为探究人类 MGE 不同类型祖细胞对 MGE 各谱系神经元产生的差异性贡献,本研究进一步应用单细胞克隆谱系分析方法,对人类 MGE VZ RGC 与 SVZ RGC 的神经元谱系发育潜能进行了直接实验验证。首先,本研究建立了涵盖人类胚胎 MGE VZ 和 SVZ 组织分离、原代细胞培养、慢病毒荧光标记、流式单细胞分选以及星形胶质细胞饲养层支持的单细胞克隆培养体系。通过 CD24 低表达/阴性、PDGFR α 阴性及 DAPI 阴性等条件筛选出单个 MGE 干细胞,并结合形态学鉴定筛选出 RGC 进行单细胞克隆培养,从而实现单个 RGC 后代组成的追踪。

本研究发现,人类 MGE VZ RGC 群体具有明显的谱系异质性。不同 VZ RGC 单细胞克隆可分别产生 GABA 阳性的 GABA 能神经元或 ISL1 阳性的胆碱能谱系神经元,但单个克隆内部未观察到两种谱系细胞的大量混合。该结果提示,VZ RGC 虽然在群体水平上具备产生不同神经元谱系的能力,但不同祖细胞的命运倾向可能在 RGC 阶段即已初步确立。换言之,MGE 神经元谱系的分化并不必然发生于 RGC 产生 IPC 之后,而可能在更早的放射状胶质细胞阶段即已表现出一定程度的命运预设。

与此相对,人类 MGE SVZ RGC 表现出更为明显的谱系限定。来源于 GW11、GW14、GW20 和 GW24 等多个发育阶段的 SVZ RGC 单细胞克隆均以产生 GABA 阳性神经元为主,实验中未检测到明确的 ISL1 阳性胆碱能神经元克隆。这表明,在 GABA 能神经元与胆碱能神经元这一层级的谱系分类上,人类 MGE SVZ RGC 已表现出明显的 GABA 能神经元命运偏向,主要产生 GABA 能神经元而非胆碱能神经元,并因此可能成为人类 GABA 能神经元数量扩增的细胞学基础。

进一步利用 EPHA5 和 CRABP1 区分不同 MGE 来源的 GABA 能神经元后,本研究观察到,24 个 SVZ RGC 单细胞克隆中有 23 个为 EPHA5 阳性、CRABP1 阴性类型,而 1 个表现为 CRABP1 阳性、EPHA5 阴性类型。前者对应的转录类型主要与皮层 GABA 能抑制性神经元相关,后者则对应皮层下 GABA 能神经元。约 95.8% 的克隆呈现前一种类型,提示人类 MGE SVZ RGC 不仅在 GABA 能神经元与胆碱能神经元之间发生了谱系限定,而且在 GABA 能神经元内部进一步表现出明显的皮层命运倾向。

据此,本研究支持一个可进一步检验的模型:VZ 与 SVZ 来源 RGC 并非在体外表现为完全等价的群体,SVZ 来源细胞较偏向 GABA 能及皮层相关表型输出。该模型与转录组推断方向相符,但两类证据的吻合不等于已经完成体内谱系关系的因果验证。

然而,从“SVZ RGC 具有皮层 GABA 能神经元生成偏向”到“SVZ RGC 驱动了人类皮层抑制性神经元的进化扩增”,中间仍存在多个尚未解决的关键证据环节。以下将从几个方面探讨本研究的局限性及未来研究方向。

5.2 外部环境因素对谱系发育的潜在影响

本研究采用小鼠皮层原代星形胶质细胞作为饲养层,并通过 FGF-2 支持单个 RGC 早期扩增,对人类 MGE VZ RGC 和 SVZ RGC 进行体外培养,以鉴定单个祖细胞的后代谱系。该体系有效解决了人类原代 RGC 单细胞存活率较低的技术难题,但同时也引入了一

个不可忽视的变量：体外培养微环境可能无法完全模拟体内神经干细胞的生长环境，不同培养条件也可能影响祖细胞的行为及其分裂分化方向。

既往研究表明，星形胶质细胞并非单纯提供物理支持，而是能够显著促进人源神经祖细胞的分化和神经元功能成熟。不同来源的星形胶质细胞所产生的影响可能存在差异。已有研究显示，新生小鼠皮层星形胶质细胞饲养层可增强人 iPSC 来源神经元的自发电活动和谷氨酸能突触传递，而同源人 iPSC 来源星形胶质细胞饲养层未产生相同促进作用¹⁹。因此，本研究观察到的克隆组成是“RGC 内在命运程序”与“体外培养环境”共同作用的结果，不能完全排除体内环境对祖细胞产生不同影响、或外源性信号进一步强化某种谱系选择的可能性。

这一问题在人类 MGE SVZ 中尤其值得关注。2024 年公布的一项预印本研究报告，微胶质细胞在晚期人类胎儿 MGE SVZ 中与 RGC 及增殖性神经母细胞具有密切的空间关系，并可通过 IGF1-IGF1R 信号促进 MGE 祖细胞增殖及 GABA 能神经元产生²⁰。这说明真实的人类 MGE 祖细胞微环境不仅包含 RGC 和星形胶质细胞，还包含微胶质细胞、神经母细胞、细胞外基质、血管相关细胞及多种旁分泌信号。当前的二维培养体系尚未重建这些因素。

未来应设置多种培养条件进行交叉验证，例如比较鼠源星形胶质细胞饲养层、人源胎脑星形胶质细胞、hPSC 来源人星形胶质细胞及无饲养层定义培养体系对 SVZ RGC 谱系输出的影响。若 SVZ RGC 在不同环境中均稳定表现出相同的 GABA 能及皮层谱系偏向，则可更有力地证明该性质主要源于细胞内在命运程序。

此外，可进一步引入 MGE 类器官和神经免疫类器官体系。相关预印本研究已能够建立包含 MGE 祖细胞及微胶质细胞的模型，并通过遗传操作证明微胶质细胞来源的 IGF1 可调节 MGE 祖细胞增殖²⁰。未来可将原代 SVZ RGC 重新置入更接近生理状态的三维 MGE 微环境中，观察其谱系输出是否保持稳定。该实验可直接回答一个关键问题：SVZ RGC 的皮层 GABA 能命运偏向究竟是细胞自主性的，还是需要特定的人类 SVZ 微环境来维持。

5.3 SVZ RGC 特殊谱系倾向的分子机制尚待阐明

本研究为 SVZ RGC 作为人类大脑皮层 GABA 能抑制性神经元扩增的潜在细胞机制提供了实验证据，但尚未回答“为何 SVZ RGC 主要产生此类细胞”这一根本问题，这是下一阶段最值得深入探究的方向之一。

SVZ RGC 与 SVZ RGC 可能在转录因子表达、染色质开放状态、细胞代谢、细胞周期调控及外源信号响应等多个层面存在差异。未来可对两类 RGC 进行 scRNA-seq 和 scATAC-seq 的单细胞多组学联合分析，以筛选与人类大脑皮层 GABA 能抑制性神经元命运调控相关的差异网络²¹。对于候选转录因子或调控分子，可进一步通过 CRISPR 敲除、CRISPRi/CRISPRa、shRNA 敲低或过表达进行因果验证。

例如，若某一转录因子在 SVZ RGC 中特异性高表达，且敲低后 SVZ RGC 开始产生更多皮层下神经元或胆碱能神经元，则可证明该因子参与 SVZ RGC 命运限制的建立。反

之，若将该因子导入 VZ RGC 后能够使其表现出 SVZ RGC 样的谱系偏向，则可进一步证实其具有足够的命运决定作用。

除细胞内在机制外，SVZ 微环境的作用同样值得重点分析。上述预印本研究提示，微胶质细胞来源的 IGF1 能够促进人类 MGE 祖细胞增殖²⁰。下一步值得探讨的问题是：这种作用是普遍增加所有 RGC 的增殖，还是选择性扩增已具备皮层命运的 SVZ RGC 亚群？若后者成立，则人类皮层抑制性神经元的增加可能并非单纯依赖于“创造新的祖细胞”，而是由“祖细胞命运特化”与“特定生态位选择性扩增”共同完成。

5.4 对人类脑进化研究的启示

本研究的更深层价值在于提供了一种理解人类大脑进化的新思路。既往关于大脑进化的研究多聚焦于兴奋性神经元和背侧皮层祖细胞，例如 oRG 的扩张被认为是灵长类皮层面积扩大和脑沟形成的重要机制^{1,2}。然而，人类高级认知能力的实现并非单纯依赖兴奋性神经元的增加，而依赖于兴奋性与抑制性神经元共同构成的复杂网络。

已有研究表明，人类神经发生具有明显的“慢时性”，不同祖细胞类型的产生时期及神经元成熟时间均显著延长^{1,12}。同时，人类 MGE SVZ 在发育过程中大幅扩展，并形成与小鼠明显不同的细胞组织模式。早期研究已指出，人类神经节隆起 SVZ 中存在大量非上皮型神经干细胞，对皮层中间神经元的产生具有重要贡献²²。最新研究进一步提出，SVZ RGC 能够在较长时间内持续维持人类抑制性神经元的产生⁸。

在此背景下，本研究结果提示，人类大脑进化可能不仅采用了“增加祖细胞数量”的策略，还可能同时采用了“增加特定命运祖细胞”的策略。换言之，SVZ 的扩张并非简单复制 VZ 已有的祖细胞，而可能建立了一个在谱系上更加偏向皮层抑制性神经元的新型祖细胞池。

未来可在人类、猕猴和小鼠之间对该机制进行系统比较。比较内容不应局限于某一细胞类型是否存在，而应进一步涵盖细胞数量、增殖能力、谱系范围及分子调控网络等维度。若猕猴 SVZ RGC 也表现出与人类相似但程度较弱的皮层 GABA 能命运倾向，而小鼠缺少对应细胞，则有助于构建更加连续的灵长类进化模型。

与此同时，也应避免将全部差异简单归因于“人类特异性”。近期综述指出，部分大型哺乳动物的 MGE 中也存在不同程度的 SVZ 扩张及特殊的神经母细胞组织形式¹²。因此，更严谨的科学问题应是：SVZ RGC 这一发育策略在哺乳动物进化过程中何时出现，在灵长类中发生了何种增强，在人类中又达到了怎样的规模。这种跨物种的定量比较，相较于简单的“有或无”判断，更有助于阐明大脑进化的细胞机制。

5.5 在神经发育疾病研究中的潜在价值

MGE 来源的 GABA 能抑制性神经元与癫痫、自闭症谱系障碍、精神分裂症及多种神经发育疾病密切相关⁷。本研究提示，不同 GABA 能神经元亚群可能在 RGC 阶段即来自具有不同命运倾向的祖细胞。因此，部分疾病的起始环节可能比传统认知更早。

未来可利用患者来源的 iPSC 建立 MGE 类器官，并检测疾病相关突变是否首先改变 SVZ RGC 的数量、增殖状态或谱系偏向。例如，若某一癫痫相关基因并未显著影响成熟神

神经元的 GABA 释放功能，却在早期使倾向于产生皮层 GABA 能抑制性神经元的 SVZ RGC 减少，则疾病的本质可能属于“祖细胞阶段细胞数量建立异常”。

这一思路也有助于解释为何部分疾病在出生多年后才出现明显症状，而病理基础可能在胎儿期即已形成。MGE 类器官与皮层类器官组装后，可同时研究祖细胞产生、切向迁移、突触整合及网络活动。近期 MGE 类器官研究已能够较为稳定地产生 PV⁺和 SST⁺相关神经元，并在与皮层类器官组装后观察到迁移和网络整合现象，为研究 MGE 谱系疾病提供了新的实验平台²³。

因此，本研究建立的 SVZ RGC 谱系框架未来可成为疾病类器官表型分析的新维度。相较于简单统计成熟 PV⁺或 SST⁺神经元的数量，更早地分析 SVZ RGC 的产生和命运决定过程，可能有助于发现真正的疾病起始阶段。

5.6 在抑制性神经元再生与细胞治疗中的潜在应用

除基础发育研究外，MGE 来源的 GABA 能神经元正逐渐成为细胞治疗的重要候选细胞类型。已有研究表明，人多能干细胞来源的 MGE 谱系 GABA 能抑制性神经元在移植后可在宿主脑内迁移、形成突触并增强局部抑制。2023 年发表于《Cell Stem Cell》的研究表明，人 ESC 来源的 MGE 谱系皮层 GABA 能抑制性神经元在慢性颞叶癫痫动物模型中能够长期存活并功能整合，显著抑制癫痫发作，为临床转化提供了临床前研究依据²⁴。后续研究通过对移植后人多能干细胞来源 MGE 型中间神经元的单核转录组、电生理及形态学分析，揭示了 SST 和 PVALB 相关亚型的出现及逐步成熟过程，为评估移植细胞的亚型组成和成熟状态提供了依据²⁵。

目前细胞治疗方案通常通过外源信号诱导 hPSC 分化为 MGE 谱系，再进一步获得 GABA 能神经元。若能明确自然发育过程中哪一类 SVZ RGC 最稳定地产生皮层 GABA 能抑制性神经元，并阐明决定该命运的关键转录调控网络，则可反向指导干细胞分化策略的设计。

对于癫痫等兴奋-抑制失衡疾病而言，能够稳定生产特定类型的皮层 GABA 能神经元具有明确的临床应用价值。但在真正进入治疗之前，仍需解决细胞纯度、长期安全性、残余增殖细胞、亚型组成及宿主环路整合等一系列问题。换言之，未来不一定需要直接利用原代人类 SVZ RGC 进行治疗，而是可以利用本研究所揭示的发育规律，设计更精准的体外细胞制造策略。目标是使 hPSC 首先进入类似“人类 SVZ RGC”的祖细胞状态，再进行大量扩增并同步分化为皮层 GABA 能神经元。这一策略可能比直接通过高浓度形态发生因子诱导终末神经元，更有利于获得特定谱系神经元用于移植治疗。

5.7 未来展望

未来研究需要进一步证明，上述祖细胞层面的差异最终产生了怎样的功能结果。应从“分子标志物阳性”推进至“迁移至皮层——成熟为特定 GABA 能亚型——建立抑制性突触——参与神经网络活动”的完整验证链，并通过跨物种比较判断该机制在灵长类及人类大脑进化中的实际贡献。

若上述目标得以实现，即可形成一条更加完整的逻辑链：进化过程中 MGE 出现并扩增新的 SVZ 祖细胞生态位；该生态位维持具有特定命运倾向的 SVZ RGC；这些祖细胞长期、持续地产生大量皮层 GABA 能抑制性神经元；增加的抑制性神经元进一步支持更大规模、更高复杂度的皮层神经网络。

该模型将大脑进化研究从宏观结构差异推进至祖细胞谱系与细胞数量产生机制的层面。同时，它也提示我们，人类大脑的复杂性可能并非单纯来源于神经元“种类更多”，而在相当程度上源于发育过程中对已有细胞类型数量、比例、产生时间及空间分布的精细调控。

因此，对人类 MGE SVZ RGC 的进一步研究，不仅能够回答皮层抑制性神经元从何而来的基础发育问题，还可能连接脑进化、神经发育疾病、脑类器官模型及抑制性神经元再生治疗等多个研究领域。随着单细胞多组学、空间组学、遗传谱系示踪、脑类器官及功能电生理技术的不断发展，未来有望从“发现一种特殊祖细胞”推进至“解析一种人类脑细胞数量扩增的完整发育机制”，从而为理解人类大脑结构与功能特化提供更为系统的细胞生物学解释。

致谢

本研究自 2025 年起在米达教授指导下于实验室持续开展。我通过查阅米达教授课题组的研究方向后，主动发送邮件与米达教授建立联系，并在此基础上进入实验室参与相关研究工作。米达教授与我的指导关系为科研指导关系，相关指导为无偿指导。在研究开展过程中，米达教授主要负责对研究方向和整体研究思路进行指导，并在实验方法、研究设计以及研究结果的理解与讨论等方面给予建议。在我进行实验和整理研究结果的过程中，米达教授针对实验中出现问题提供指导，帮助我逐步理解实验背后的研究逻辑，而不仅仅停留于对实验操作流程的执行。米达教授的指导使我能够在持续的实验实践中逐渐形成对研究问题的认识，并完成本研究的实验工作、数据整理和后续论文撰写。

林芳珍老师作为我的校内指导教师，主要参与本研究报告的论文写作与呈现环节。在我完成研究报告初稿后，林芳珍老师对论文的整体结构、语言表达、逻辑组织以及部分内容进行了审阅，并提出修改意见。我根据这些意见对论文进行了进一步修改和完善。最终论文的具体文字撰写、数据整理以及修改工作均由我完成。

本研究选题来源于米达教授课题组对人类 MGE SVZ RGC 相关研究方向的持续关注。在米达教授指导下，我通过文献阅读，学习了神经发育、MGE 来源抑制性神经元及 RGC 等相关研究背景，并参与确定具体研究方向。在实验阶段，我承担了研究工作的主要执行部分，包括实验材料的处理、细胞培养、单细胞克隆培养、免疫荧光染色、显微成像以及实验结果的整理等工作。实验过程中曾遇到细胞培养状态不稳定、细胞数量和形态存在差异、染色及成像效果不理想等问题。针对这些情况，我在米达教授的指导下逐步排查实验条件，并通过调整实验操作、重复实验以及比较不同批次实验结果等方式解决问题。在数据处理阶段，我负责实验数据的整理、统计与可视化，并根据实验结果分析不同实验组之间的差异。在此基础上，我独立完成研究报告的初稿撰写，并进一步完成研究背景、实验方法、结果、讨论及展望等部分的整理与修改。

本研究过程中还得到了实验室相关人员在实验操作和研究环境方面的帮助。在实验过程中，我还要特别感谢李晓寒博士。作为我在实验室科研实践中接触最为密切的师姐之一，她在实验操作、技术细节和科研思维等方面给予了我许多耐心而具体的指导。从最初对实验流程和操作规范并不熟悉，到逐渐能够独立完成实验，我遇到的许多具体问题都曾得到她的帮助。无论是实验操作中的细节偏差，还是实验结果出现异常时对问题原因的分析，她都愿意耐心地与我讨论，并帮助我理解实验现象背后的原因。尤其是在一些实验反复出现问题、结果不够理想的时候，她会陪我一起检查实验过程、分析可能影响结果的因素，并提醒我从实验设计和操作本身重新思考问题。这些帮助让我逐渐意识到实验并不是机械地重复一个已经确定的流程，真正重要的是在每一次实验之后认真观察结果、记录问题，并尝试解释为什么会得到这样的结果。

本研究中的实验数据均来源于我实际开展的实验及相应的数据记录，研究结果、统计分析和论文中的结论均由我根据实际实验结果完成。除上述指导和协助外，本研究不存在由其他人员代为完成实验、数据分析或论文撰写的情况。在论文初稿完成后，我使用了

DeepSeek、ChatGPT 对部分语句进行了语法检查和表达优化，使用时间主要集中在 2026 年论文撰写阶段。AI 工具仅用于语言润色，未参与研究选题、实验设计、数据获取、数据分析、结果解释及结论撰写等任何核心研究环节。

本研究凝聚了多方面的支持与帮助，在此，我谨向所有予我帮助的人致以最诚挚的感谢。

2026 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖论文公示

参考文献

1. Lancaster MA. Unraveling mechanisms of human brain evolution. *Cell*. 2024;187(21):5838-5857. doi:10.1016/j.cell.2024.08.052
2. Molnár Z, Clowry GJ, Šestan N, et al. New insights into the development of the human cerebral cortex. *J Anat*. 2019;235(3):432-451. doi:10.1111/joa.13055
3. Bystron I, Blakemore C, Rakic P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(2):110-122. doi:10.1038/nrn2252
4. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*. 2010;20(4):327-348. doi:10.1007/s11065-010-9148-4
5. Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci*. 2009;3:31. doi:10.3389/neuro.09.031.2009
6. Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O. Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron*. 2018;100(2):294-313. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.009
7. Marín O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(2):107-120. doi:10.1038/nrn3155
8. Jia L, Li X, Yan Y, et al. Subventricular zone radial glial cells maintain inhibitory neuron production in the human brain. *Science*. 2026;391(6782):eadw1803. doi:10.1126/science.adw1803
9. Rubenstein JLR, Campbell K. Neurogenesis in the basal ganglia. In: *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*. Elsevier; 2020:399-426. doi:10.1016/B978-0-12-814405-3.00018-7
10. Price DJ, Jarman AP, Mason JO, Kind PC. *Building Brains: An Introduction to Neural Development*. 2nd ed. Wiley; 2017. doi:10.1002/9781119293897
11. Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol*. 2011;71(1):45-61. doi:10.1002/dneu.20853
12. Marín O. Development of GABAergic Interneurons in the Human Cerebral Cortex. *Eur J Neurosci*. 2025;61(9):e70136. doi:10.1111/ejn.70136
13. Bandler RC, Mayer C. Deciphering inhibitory neuron development: The paths to diversity. *Curr Opin Neurobiol*. 2023;79:102691. doi:10.1016/j.conb.2023.102691
14. Herculano-Houzel S, Lent R. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *J Neurosci*. 2005;25(10):2518-2521. doi:10.1523/JNEUROSCI.4526-04.2005
15. Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*. 2009;513(5):532-541. doi:10.1002/cne.21974
16. Falcone C, Penna E, Hong T, et al. Cortical Interlaminar Astrocytes Are Generated Prenatally, Mature Postnatally, and Express Unique Markers in Human and Nonhuman Primates. *Cereb Cortex*. 2021;31(1):379-395. doi:10.1093/cercor/bhaa231
17. Elshatory Y, Gan L. The LIM-homeobox gene *Isl1* is required for the development of restricted forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci*. 2008;28(13):3291-3297. doi:10.1523/JNEUROSCI.5730-07.2008
18. Cho HH, Cargnini F, Kim Y, et al. *Isl1* directly controls a cholinergic neuronal identity in the developing forebrain and spinal cord by forming cell type-specific complexes. *PLoS Genet*. 2014;10(4):e1004280. doi:10.1371/journal.pgen.1004280
19. Lischka FW, Efthymiou A, Zhou Q, et al. Neonatal mouse cortical but not isogenic human astrocyte feeder layers enhance the functional maturation of induced pluripotent stem cell-derived neurons in culture. *Glia*. 2018;66(4):725-748. doi:10.1002/glia.23278

20. Yu D, Jain S, Wangzhou A, et al. Microglia regulate GABAergic neurogenesis in prenatal human brain through IGF1. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*. Preprint posted online October 20, 2024;2024.10.19.619180. doi:10.1101/2024.10.19.619180
21. Wang L, Wang C, Moriano JA, et al. Molecular and cellular dynamics of the developing human neocortex. *Nature*. 2025;647(8088):169-178. doi:10.1038/s41586-024-08351-7
22. Hansen DV, Lui JH, Flandin P, et al. Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. *Nat Neurosci*. 2013;16(11):1576-1587. doi:10.1038/nn.3541
23. Varela MC, Walker MP, Bok J, et al. Human Medial Ganglionic Eminence Organoids Robustly Generate Parvalbumin Interneurons and Fast-Spiking Neurons and Reveal Migratory Deficits in SLC6A1 Deficient Interneurons. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*. Preprint posted online November 14, 2025;2025.07.01.662594. doi:10.1101/2025.07.01.662594
24. Bershteyn M, Bröer S, Parekh M, et al. Human pallial MGE-type GABAergic interneuron cell therapy for chronic focal epilepsy. *Cell Stem Cell*. 2023;30(10):1331-1350.e11. doi:10.1016/j.stem.2023.08.013
25. Bershteyn M, Zhou H, Fuentealba L, et al. Human stem cell-derived GABAergic interneuron development reveals early emergence of subtype diversity and gradual electrochemical maturation. *Neuron*. 2025;113(19):3162-3184.e10. doi:10.1016/j.neuron.2025.06.010