

背侧抑制性轴突导向蛋白的敲减对鸡胚后脑内
23C10 阳性神经纤维投射的影响

王滋怡¹ 张舒涵² 张子韧² 张文文² 胡亚男² 张三兵^{3*} 苏玉红^{2*}

(1. 河北医科大学 2019 级预防专业, 石家庄 050017; 2. 河北医科大学人体解剖学教研室, 石家庄 050017;
3. 石家庄市第三医院手足外科, 石家庄 050000)

[摘要] 目的 探讨敲减鸡胚后脑内背侧抑制性轴突导向蛋白 (draxin) 的表达对 23C10 阳性神经纤维投射特性的影响。方法 以碱性磷酸酶 (ALP) 融合蛋白与 HH21~22 阶段鸡胚后脑活组织切片体外孵育为对照组, 以 draxin-ALP 融合蛋白与 HH21~22 阶段鸡胚后脑活组织切片体外孵育为实验组, 每组 10 例, 检测鸡胚后脑内的 23C10 阳性神经纤维是否具有与 draxin 直接结合的能力; 以鸡胚后脑内空白质粒电穿孔组为对照, 以针对 draxin 表达的小干扰 RNA (siRNA) 表达载体质粒电穿孔为实验组, 每组 18 例, 观察敲减 draxin 的效果, 以及是否引起鸡胚后脑内 23C10 阳性神经纤维投射特性的改变。结果 HH21~22 阶段鸡胚后脑活组织切片内, 大部分 draxin 阳性信号与 23C10 阳性神经纤维重叠; 应用电穿孔方法导入 draxin 的 siRNA 敲减质粒后, draxin 相对表达量显著降低 ($P<0.05$); HH25~26 阶段的鸡胚后脑内, 电穿孔一侧的 23C10 阳性神经纤维的背侧区域内投射纤维分布分散 ($P<0.05$)。结论 鸡胚后脑发育过程中, draxin 可以与 23C10 阳性神经纤维直接结合, 且其在鸡胚后脑内 23C10 阳性神经纤维成束投射的形成过程中发挥重要的调控作用。

[关键词] 背侧抑制性轴突导向蛋白; 轴突投射; 后脑; 电穿孔; 免疫组织化学; 鸡胚

[中图分类号] R394.1 [文献标志码] A [DOI] 10.16098/j.issn.0529-1356.2022.04.003

Effect of draxin knockdown on the projection of 23C10-positive
neural fibers in the embryonic chick hindbrain

WANG Zi-yi¹, ZHANG Shu-han², ZHANG Zi-ren², ZHANG Wen-wen²,
HU Ya-nan², ZHANG San-bing^{3*}, SU Yu-hong^{2*}

(1. Major in Preventive Medicine of the Class of 2019, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;
2. Department of Human Anatomy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;
3. Department of Hand and Foot Surgery, the Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of the downregulation of draxin expression on the projection characteristics of 23C10-positive neural fibers in the chick embryonic hindbrain. **Methods** The *vitro* incubation of HH stages 21-22 chick embryonic hindbrain biopsy with alkaline phosphatase (ALP) protein was used as control group. The incubation of HH stages 21-22 chick embryonic hindbrain biopsy with draxin-ALP fusion protein was used as experimental group. The number of embryonic hindbrain for each group was 10. To detect whether 23C10-positive neural fibers could directly bind to draxin protein or not; In ovo electroporation using empty vector in the chick embryonic hindbrain was used as control group. In ovo electroporation with small interfering RNA (siRNA) expressing vector for reducing draxin expression in the chick embryonic hindbrain was used as experimental group. The number of embryonic hindbrain for each group was 18. The effect of the down-regulation of draxin expression and the change of projection characteristics of 23C10-positive neural fibers were observed to check whether the down-regulation of draxin expression would affect the distribution of 23C10-positive fibers. **Results** Most portion of draxin protein could overlap with 23C10-positive neural fibers in HH stages

[收稿日期] 2021-12-09 [修回日期] 2022-01-18

[基金项目] 河北省自然科学基金 (H2020206046); 河北省自然科学基金精准医学联合基金培育项目 (H2021106016); 河北医科大学省级大学生创新项目 (USIP2021114)

[作者简介] 王滋怡 (2001—), 女 (汉族), 河北省石家庄市人, 在读本科生。

* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

E-mail: 499874852@qq.com Tel: (0311) 86266654

E-mail: 234533297@qq.com Tel: (0311) 85990924

21-22 chick embryonic hindbrain biopsies; After expression of the siRNA plasmid against draxin by electroporation, the expression level of draxin protein was significantly reduced, and the distribution of 23C10-positive fibers was scattered in the dorsal hindbrain on the electroporated side at HH stages 25-26 of chick embryos ($P<0.05$). **Conclusion** Draxin protein may directly bind to 23C10-positive fibers in hindbrain, and it plays an important regulatory role in the fasciculation of 23C10-positive fibers during chick embryonic development.

[**Key words**] Draxin; Axonal projection; Hindbrain; Electroporation; Immunohistochemistry; Chick embryo

胚胎发育早期,神经管前端发育为前脑、中脑和后脑,后脑进一步形成 7、8 个菱脑原结^[1]。这种短暂的节段发育特性对于颅神经进出点的定位和神经嵴向鳃弓的迁移等是必要的。胚胎后脑内的先驱细胞是一种高度模式化的细胞群,可以表达特定的基因且具有迁移的形态特性,存在于后脑的脑室区,以及从脑室区开始下降的内侧和外侧离散细胞流中^[2]。特定路径的轴突投射建立了神经系统中固定的连接模式,并由此确定轴突到达突触目标的路径^[3,4]。因此,先驱神经元的迁移及其轴突投射对后脑发育过程至关重要。背侧抑制性轴突导向蛋白(dorsal repulsive axon guidance protein, draxin)是一种抑制性轴突生长调控因子,参与胚胎发育时期连合神经纤维、丘脑投射纤维等多种神经纤维轴突投射的抑制性调控,同时还参与胚胎脊髓神经嵴和背侧中间神经元 3 型(dorsal interneuron 3, dI3)中间神经元等细胞迁移等过程的抑制性调控^[5~10]。鸡胚后脑内过表达 draxin 可导致部分神经纤维,尤其是第Ⅸ、X 对脑神经部分神经纤维投射异常^[11]。本实验应用鸡胚后脑活组织孵育方法,观察 draxin-碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)融合蛋白 23C10 阳性纤维是否存在直接结合;应用电穿孔结合免疫组织化学等方法,观察敲减鸡胚后脑内 draxin 的表达对 23C10 阳性神经纤维投射的影响,为进一步探讨鸡胚后脑发育过程中 draxin 对神经纤维投射过程的调控作用提供实验依据。

材料和方法

1. 实验动物

白来亨鸡受精卵来源于当地种蛋场,于 38℃ 孵育箱中孵育到相应的 Hamburger & Hamilton (HH) 阶段。HH20~21 阶段为受精卵孵育 3.5 d 左右,HH25~26 阶段为受精卵孵育 4.5~5 d^[12]。用无菌注射器抽取部分蛋清后敲开蛋壳,进行相应处理。定时取出鸡胚,4℃ 条件下于 4% 多聚甲醛中固定 2 h 或过夜。

2. 实验试剂

特异性鼠抗鸡 23C10 单克隆抗体和兔抗鸡 draxin 多克隆抗体由日本熊本大学田中英明教授提供,驴抗兔 IgG-DyLight 594 抗体(ab9893)和兔抗鼠

IgG-DyLight 594 抗体(ab96873)购自 Abcam 公司。

3. 免疫组织化学染色

鸡胚后脑组织经冰上 4% 多聚甲醛固定 2 h, 30% 蔗糖脱水, OCT (Sakula Finetek 公司) 包埋, 冷冻切片厚度为 12 μm。常规清洗, 封闭, 一抗(23C10 和 draxin)以 1:300 稀释后于 4℃ 冰箱过夜。彻底清洗后加入荧光标记的二抗(IgG-DyLight 594 和 IgG-DyLight 594)以 1:300 稀释后于室温孵育 1 h, 防荧光淬灭剂封片, 观察。

4. 鸡胚后脑活体组织与 draxin-ALP 融合蛋白结合实验

Draxin-ALP 融合蛋白按以往实验方法制备^[5]。以 ALP 蛋白孵育组为对照组,以 draxin-ALP 融合蛋白孵育组为实验组。取新鲜 HH 21~22 阶段鸡胚后脑,对照组和实验组各 10 例。立即在-20℃ 条件下进行冷冻切片,厚 20 μm。切片在-20℃ 条件下经 100% 甲醇固定 8 min 后,室温条件下 PBS 清洗。常规封闭 15 min 后,对照 ALP 蛋白或 draxin-ALP 融合蛋白液室温孵育 90 min, PBS 清洗, 常规固定。70℃ 条件下烘烤切片 90 min, 以去除内源性 ALP 活性,最后按常规 ALP 显色步骤显色。

5. 电穿孔实验

针对 draxin 表达的高特异性小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 片段, 克隆入 hU6-MCS-CMV-GFP-SV40 表达载体, 最终制备成 2 g/L 的质粒 DNA。以空白 hU6-MCS-CMV-GFP-SV40 表达载体质粒电穿孔组为对照组, 针对 draxin 的 siRNA 表达载体质粒电穿孔为实验组, 每组 18 例。每张切片内以没有进行电穿孔的一侧为对照侧, 进行电穿孔侧为实验侧。敲减 draxin 表达实验中所用的特异性片段的序列为: 5'-GAGCAGGGATCATTCATTA-3'。电穿孔实验参考文献[6, 11]。简单概括为: 发育到 HH12~13 阶段的鸡胚, 水平放置后抽取部分蛋清, 敲除蛋壳顶部暴露鸡胚。向胚胎深部注射含 10% Pelican 墨水的 Tyrode's 液, 以清楚显示整个鸡胚的外形以利于操作。用微量注射法将表达目的基因序列的表达载体质粒注入鸡胚后脑节段的中央管内。经 ECM 830 型电穿孔仪间断通电 3 次, 电压强度 5 V, 点击时间 50 ms, 每次点击的间隔时间为 999 ms。用无菌胶带再次封闭蛋壳, 于 38℃ 水平位继续孵育至鸡胚发育到相应的 HH 25~26 阶段后取材固定。

结 果

1. 活体组织内部分 23C10 阳性神经纤维与 draxin-ALP 融合蛋白直接结合

为了确定 draxin 蛋白是否具有与鸡胚后脑投射纤维存在直接结合,借此调节鸡胚后脑内神经纤维定向性投射的能力,我们进行了 HH 21~22 阶段鸡胚后脑横断面活组织切片与 draxin-ALP 融合蛋白的体外结合试验,同时还进行了 23C10 特异性抗体的免疫荧光染色。蓝色信号显示 draxin-ALP 阳性标记区,红色信号显示 23C10 抗体标记阳性的神经纤维。结果显示,对照组后脑组织切片内未见任何 ALP 蛋白结合的阳性信号(图 1A,1C),同一切片的 23C10 抗体免疫荧光显色,可见 23C10 阳性的神经纤维位于后脑基底部的 外侧区域内(图 1B,1C);而实验组中后脑基底部的 外侧区域内可见大量 ALP 蛋白结合的阳性信号(图 1D,1F,1G,1I),同一切片的 23C10 抗体免疫荧光显色,可见大部分 ALP 蛋白结合的阳性信号与 23C10 抗体阳性信号重叠(图 1E,1F,1H,1I)。

2. 敲减 draxin 表达后引起同一区域内 23C10 阳性神经纤维投射异常

鸡胚后脑发育过程中,draxin 在后脑基底部的 外侧区域内表达明显^[5]。应用电穿孔方法敲减 draxin 表达。免疫荧光染色结果显示,表达 draxin 的 siRNA 敲减质粒后,鸡胚后脑基底部尤其是背外侧基底膜内,draxin 表达明显降低(图 2A,2B)。而同一张切片对照侧未见明显的 siRNA 载体质粒表达,后脑基底部内 draxin 表达显著(图 2C,2D)。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件,分别测量 draxin 阳性信号在电穿孔侧和对照侧的积分吸光度(integrated absorbance, IA),以电穿孔侧的 IA 值除以对照侧的 IA 值,得到相对 IA 值。以正常鸡胚后脑内 draxin 阳性信号在后脑两侧的 IA 值的比值,即正常鸡胚后脑内 draxin 阳性信号的相对 IA 值做为对照,应用 *t* 检验对结果进行统计学分析。结果显示,与正常鸡胚后脑内 draxin 阳性信号的相对 IA 值相比,电转 draxin 的 siRNA 质粒可使 draxin 阳性信号的相对 IA 值显著降低(图 2E, *P*<0.05)。应用 23C10 特异性抗体的免疫荧光染色结果显示,后脑基底部的 外侧区域内可见大量明显的投射纤维。用虚线标记出此区域内投射纤维所占据的范围,并沿此区域的长轴,即由外上斜向内下,借助两点将此区域分为 3 等份,分别沿此两点做垂直于长轴的直线。沿外上方的点所做的直线为 a,沿内下方的点所做的直线为 b(图 2F,2G)。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件分别测量同一侧内的 a 值和 b 值,并且计算 a 与 b 的比值

即 a/b 的相对值,应用 *t* 检验对结果进行统计学分析。结果显示,与对照侧相比,draxin siRNA 敲减质粒表达侧(电穿孔侧)的 a/b 相对值显著增加(图 2H, *P*<0.05)。此结果提示,后脑基底部区域内,23C10 阳性神经纤维的背侧部分内投射神经纤维的分布比腹侧部分内投射神经纤维的分布更加分散。

讨 论

Draxin 是一种分泌型抑制性轴突导向蛋白,其广泛表达于中枢神经系统,参与脊髓和前脑等中枢神经系统发育过程的广泛调控,其中包括对连合神经纤维等多种神经纤维投射、神经嵴和背侧中间神经元 3 型(dI3)等多种细胞特定性迁移等多种生理过程的抑制性调控^[5~11,13,14]。鸡胚后脑区域内神经嵴细胞呈链状迁移特性,其特定的迁移模式对于引导脑神经细胞建立中枢连接至关重要。多种类型的抑制性轴突导向蛋白,可以对紧密排列的神经嵴细胞流的迁移起抑制性调控作用^[15]。

前期实验结果显示,23C10 特异性抗体可以检测鸡胚后脑发育过程中多种运动和感觉神经纤维^[16]。同时,draxin 的表达和 23C10 阳性的神经纤维具有明显的时间和空间上的相关性^[11]。Draxin 分布于后脑基底区外周区,即传入和传出神经纤维投射轴突所在区域。后脑外侧基底膜内 draxin 表达明显,而此处是颅神经根与后脑相连的部位。这种表达形式提示,分布在后脑基底部内的 draxin,特别是位于外侧基底膜内的 draxin,很可能在调节颅神经纤维的定向性投射方面起重要的作用。我们的实验结果显示,大量的 23C10 阳性信号可以与 draxin-ALP 融合蛋白重叠。表明 draxin-ALP 融合蛋白可以与大部分 23C10 阳性神经纤维直接结合,从而进一步提示 draxin 在鸡胚后脑 23C10 阳性神经纤维的正常形成和投射等过程中起重要的调控作用。

鸡胚后脑内过表达 draxin 可引起多种运动和感觉神经纤维由腹侧到背侧的异常性投射,从而造成与后脑相连的第 IX 和第 X 对脑神经发育异常^[11]。当 siRNA 敲减 draxin 表达时,在胚胎后脑基底部区域内 23C10 阳性神经纤维背侧部分的排列较腹侧紊乱。表明,draxin 表达下调使其对后脑相连脑神经传出和传入神经纤维投射的排斥功能受到干扰,最终造成神经纤维轴突的规律性束状分布特性发生改变。上述过表达和敲减 draxin 表达的结果提示,draxin 在后脑组织中的表达,可能在调节脑神经正常神经纤维投射,特别是调节部分脑神经纤维的规律性束状投射特性方面具有较强的抑制作用。另外,draxin 表达下调对神经纤维轴突投射特性的微弱干扰可能与 draxin 的分泌特性有关。可能原因

是,draxin siRNA 只影响了部分 draxin 的细胞,导致了 draxin 表达的部分降低,而未受累细胞表达的 draxin 仍然可以分布到周围区域。因此,draxin 的抑制性调控功能在后脑的大部分区域内继续发挥作用。

用。综上所述,本研究为进一步探讨 draxin 在鸡胚后脑内多种神经元,尤其是 23C10 阳性神经元的正常发育进程中,能否发挥调控作用以及如何发挥调控作用提供了实验依据。

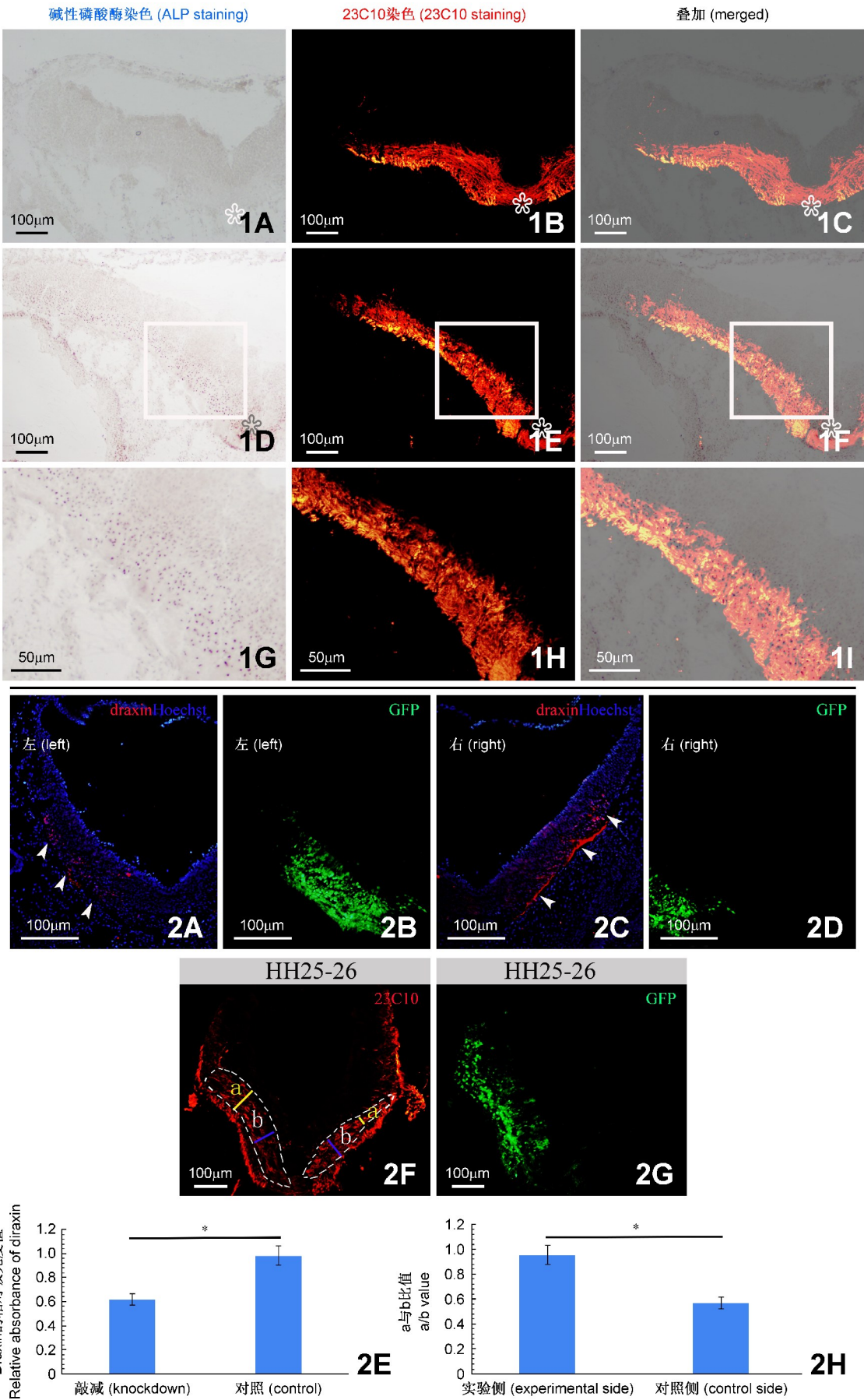


图1 23C10 阳性信号可以与 draxin-ALP 融合蛋白重叠 A~F 标尺示 100 μm; G~I 标尺示 50 μm

星号标注区域为鸡胚后脑腹侧底板区域;A. 发育至 HH21~22 阶段的鸡胚后脑与对照组 ALP 蛋白结合后免疫组织化学显色结果;在鸡胚后脑内未见明显的 ALP 阳性信号;B. 与 D 同一张切片内 23C10 抗体的免疫荧光染色结果;C. A 与 B 的重叠图;在鸡胚后脑此发育时期,可见大量 23C10 阳性结构,但是未见可以与 ALP 蛋白重叠的神经纤维轴突;D. 发育至 HH21~22 阶段的鸡胚后脑与 draxin-ALP 蛋白融合后免疫组织化学染色结果;在鸡胚后脑基底部分,可见大量的 ALP 阳性信号;E. 与 D 同一张切片内 23C10 抗体的免疫荧光染色结果;F. D 与 E 的重叠图;G. D 中方框区域的放大图;H. E 中方框区域的放大图;I. F 中方框区域的放大图;在鸡胚后脑此发育时期,可见大量 23C10 阳性结构,且大量 draxin-ALP 融合蛋白定位在 23C10 阳性的神经纤维轴突

图2 下调鸡胚后脑 draxin 表达可引起 23C10 阳性神经纤维的轻度投射异常 标尺示 100 μm

A. 电穿孔侧鸡胚后脑的 draxin 和 Hoechst 的免疫荧光双染;箭头示实验侧部分区域内 draxin 表达减弱;B. 与 A 相同部位内 GFP 阳性信号提示这一侧是 draxin 表达的敲减侧;C. 与 A 同一张切片内鸡胚后脑对照侧的 draxin 和 Hoechst 免疫荧光双染;箭头示对照侧部分区域内 draxin 表达显著;D.与 C 相同部位内 GFP 阳性信号,提示这一侧不是 draxin 表达的敲减侧;E. 柱形图显示,与对照组相比,针对 draxin 蛋白表达的 siRNA 表达载体质粒可以使 draxin 蛋白的相对 IA 值显著下降;F.发育至 HH25-26 阶段的鸡胚后脑内 draxin 敲减后,与 23C10 阳性神经纤维的腹侧区域相比,背侧区域内 23C10 阳性神经纤维分布较分散;将 23C10 阳性神经纤维区域分为 3 等份,a 是背侧分割点处神经纤维的横径,b 是腹侧分割点处神经纤维的横径;G. 与 F 同一张切片内 GFP 阳性信号,提示切片的左侧为 draxin 表达敲减区;H.柱形图显示,与对照组相比,a/b 的相对比值显著增加;左. 同一张切片的左侧;右. 同一张切片的右侧;* $P<0.05$

Fig.1 23C10-positive signals can colocate with draxin-ALP protein Bar=100 μm in A-F, Bar=50 μm in G-I

Asterisks indicating ventral floor palte of chick hindbrain; A, Control-ALP binding assay at HH stages 21-22 in chick hindbrain; No ALP signal could be detected inside the hindbrain; B, 23C10 immunostaining using the same section as A; C, Overlay of A and B; At this stage, many 23C10-positive structures were formed in the hindbrain, but no cells or axons bound the control-ALP protein; D, Draxin-ALP binding assay at HH stages 21-22 in chick hindbrain; Many ALP signals were detected in the peripheral area of the hindbrain basal zone; E, 23C10 immunostaining using the same section as D; F, Overlay of D and E; G, Higher magnification of the boxed region in D; H, Higher magnification of the boxed region in E; I, Higher magnification of the boxed region in F; At this stage, many 23C10-positive structures were formed in the hindbrain, and could colocate with draxin-ALP protein

Fig.2 Downregulation of draxin protein expression in the chick embryonic hindbrain can cause mild projection abnormalities of 23C10-positive neural fibers Bar = 100 μm

A, Double staining of draxin antibody and Hoechst immunofluorescence in chick embryonic hindbrain on electroporation side; The arrows showed the reduced draxin protein expression in some areas of the experimental side; B, GFP positive signal in the same location with A, indicating that this side was the knockdown side of draxin protein expression; C, Double staining of draxin antibody and Hoechst immunofluorescence on the control side of chick embryonic hindbrain in the same section as A; The arrows showed significant draxin expression in some areas of the control side; D, GFP positive signal in the same location as C, indicating that this side was not the knockdown side of draxin expression; E, The bar diagram shows that the relative IA value of draxin was significantly decreased by siRNA vector plasmid targeting draxin expression compared with the control group; F, After draxin protein knockdown, 23C10 positive neural fibers were distributed more dispersively in dorsal region compared with ventral region of 23C10 positive neural fibers in chick embryonic hindbrain at HH25-26 stage; The 23C10 positive region was divided into three equal parts; a, The transverse diameter of the neural fibers at the dorsal segmentation point; b, The transverse diameter of the neural fibers at the ventral segmentation point; G, GFP positive signal in the same section with F, indicating that the left side of the section was the knockdown side of draxin expression; H, The bar diagram shows that the relative ratio of a/b increased significantly compared with the control group; Left, Left side of the same section; Right, Right side of the same section; * $P<0.05$

参 考 文 献

[1] Krumlauf R, Wilkinson DG. Segmentation and patterning of the vertebrate hindbrain [J]. Development, 2021, 148 (15): dev186460.

[2] Hatanaka Y, Zhu Y, Torigoe M, et al. From migration to settlement: the pathways, migration modes and dynamics of neurons in the developing brain [J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2016, 92 (1): 1-19.

[3] Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y, et al. Cell type-specific patterned neural activity instructs neural map formation in the mouse olfactory system [J]. Neurosci Res, 2021, 170: 1-5.

[4] Wanner SJ, Priece VE. Axon tracts guide zebrafish facial branchiomotor neuron migration through the hindbrain [J]. Development, 2013, 140 (4): 906-915.

[5] Islam MS, Shinmyo Y, Okafuji T, et al. Draxin, a repulsive axon guidance protein for spinal cord and forebrain commissures [J]. Science, 2009, 323 (5912): 388-393.

[6] Du J, Zhang S, Zhao J, et al. Draxin inhibits chick trunk neural crest delamination and migrationby increasing cell adhesion [J]. Dev Growth Differ, 2021, 63 (9): 501-515.

[7] Su Y, Zhang S, Islam SM, et al. Draxin is involved in the proper development of the dI3 interneuron in chick spinal cord [J]. Dev Dyn, 2010, 239 (6): 1654-1663.

[8] Shinmyo Y, Riyadh AM, Ahmen G, et al. Draxin from neocortical neurons controls the guidance of thalamocortical projections into the neocortex [J]. Nat Commun, 2015, 6: 10232-10245.

[9] Zhang S, Su Y, Gao J, et al. A potential inhibitory function of draxin in regulating mouse trunk neural crest migration [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2017, 53 (1): 43-53.

[10] Su YH, Zhang SB, Cui HX, et al. Correlation of draxin expression and neural crest migration in chick embryonic spinal cord at different developmental stages [J]. Acta Anatomica Sinica, 2013, 44 (3): 304-308. (in Chinese)
苏玉红, 张三兵, 崔慧先, 等. 不同发育时期鸡胚脊髓内背侧抑制性轴突导向蛋白等表达和神经嵴细胞迁移之间等相关性 [J]. 解剖学报, 2013, 44 (3): 304-308.

[11] Zhang S, Cui H, Wang L, et al. Potential involvement of draxin in the axonal projection of cranial nerves, especially cranial nerve X, in the chick hindbrain [J]. J Histochem Cytochem, 2016, 64 (7):

412-424.

[12] Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo [J]. J Morph, 1951, 88(1): 49-92.

[13] Zhao JQ, Lu ChF, Du J, et al. Spatial and temporal correlation of draxin expression and neural crest migration in chick embryonic spinal cord [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2017, 33(5): 538-542. (in Chinese)
赵吉倩, 路楚凡, 杜鹃, 等. 背侧抑制性轴突导向蛋白的表达与鸡胚脊髓神经嵴细胞迁移之间的空间及时间相关性[J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(5): 538-542.

[14] Zhao JQ, Chen WY, Bai FJ, et al. The dynamic expression of Draxin

in mouse embryonic spinal cord at different developmental stages [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2019, 35(2): 122-126. (in Chinese)
赵吉倩, 陈文勇, 柏芳娟, 等. 小鼠胚胎脊髓 Draxin 蛋白表达水平的动态变化研究[J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(2): 122-126.

[15] Begbie J, Graham A. Integration between the epibranchial placodes and the hindbrain [J]. Science, 2001, 294(5542): 595-598.

[16] Obata K, Fujita SC. Developmental changes of chick cerebellar cortex revealed by monoclonal antibodies [J]. Neurosci Res, 1984, 1(2): 117-129.

(编辑 张立克)

《解剖学报》稿约

《解剖学报》创刊于 1953 年,是由中国科学技术协会主管,中国解剖学会主办,北京大学医学部承办的基础医学综合性学术期刊。

1. 本刊登载大体解剖学、神经生物学、组织学、胚胎学、细胞学、分子细胞学、生殖生物学、临床解剖学、断层影像解剖学、比较解剖学、人类学等各学科的创见性研究论著,辟有“论著”、“技术方法”、“综述”、“述评”、“研究通讯”、“书讯”、“书评”等栏目。

2. 投稿请登陆《解剖学报》网站: <http://jpxb.bjmu.edu.cn> 进入作者在线投稿系统,首次登陆请根据提示完成投稿流程。来稿须附稿件处理费 100 元和上传加盖单位公章的承诺书及受资助基金的扫描件(包括名称、基金号)以及第一作者的出生年、性别、民族、籍贯、学位、职称(本刊不接受 2 位以上的第 1 作者),课题负责人的 E-mail 地址和电话(通讯作者最多 2 人)。同时声明不涉及知识产权及保密问题。如发现一稿两用,本刊将公布该文重复发表的声明,并在 2 年内拒收第一作者的任何来稿。

3. 论著一般不超过 8000 字(包括参考文献、英文摘要、表和文内插图),每文可附插图 1 面。欢迎投 4000 字以内的短篇文章(包括中、英文摘要),结果与讨论合述,可附 1 面图。在中、英文作者姓名右上角,请用 * 表示课题负责人。“研究通讯”每篇不超过 1500 字(不附插图、表、文献及关键词)。来稿可用英文撰稿(附中文对照)。综述为约稿,不收自由投稿(综述的文献不加文题),附英文题目和中图分类号。

4. 来稿用 5 号字以 1.5 倍行距排字。正文分前言、材料和方法、结果、讨论 4 部分,各部分内用阿拉伯数字标明顺序和层次,层次最多不超过 3 级。标题应简明,尽量用中文。前言须说明研究目的,理论依据和国内外该研究的背景,总字数不超过 300 字。材料尽量融在方法中介绍,要写明名称、数量(符合统计学标准)。常用的方法,文献有记载者可引文献,有改进和创新者应写明改进的步骤。结果的数据要经统计学处理,不展开讨论,也不要引用文献。讨论应围绕结果展开,避免综述式叙述,讨论不插入图表。计量单位以 1991 年国家科委和新闻出版署共同发布的《科学技术期刊管理办法》中的国际标准、国家标准和法定计量单位为准,并注意新旧单位换算。量符号用斜体,以拉丁或希腊字母表

示,如 m (质量)、 t (时间)。单位符号用正体,以拉丁或希腊字母表示,如 kg(千克)、m(米)。图表中表示量和单位时,采用“量/单位”的标准化形式,如“t/h”(时间单位/小时)。

5. 文题力求简明,反映论文主题,一般不宜超过 20 个字,除公知公用者外,尽量不用外文缩略语。英文文题须与中文一致,以不超过 10 个实词为宜,一般不使用副题名。

6. 作者姓名书于文题下方,以不超 8 名为宜,应是参与选题、设计、实验和分析者,并能对编辑部的修改意见作核修和解释,且同意该论文发表和姓名排序。有外籍作者或使用了外国学者的资料,应附其本人同意的书面材料,外国作者单位请用原文字书写。

7. 英文摘要的作者姓名用汉语拼音(有惯用拼法的可括注),须列出与中文相符的所有作者,文中如有希腊字母及其他特殊符号,须在字旁用铅笔标注。

8. 中、英文关键词尽可能采用中国医学科学院医学情报所编译的最新版《中文医学主题词表(CMeSH)》中所列的中、英文词。如果 CMeSH 中尚无相应的词,可选惯用的自由词。关键词不超过 8 个,最后两项应为方法和材料。在中文关键词下请写出本文的图书分类号(参照中国图书馆分类法第 4 版)。

10. 表格按统计学制表原则设计,尽量使用三线表(顶线、表头线及底线)。若有合计或统计学处理(如 t 值、 P 值等),可在此行上加一条分界横线。表须插于正文内,应有表题(中、英文对照)和序号,表内数据要求同一指标的有效位数一致并与正文相符。

11. 插图依文中出现的先后编排顺序,排于正文内。请用计算机制图软件绘制,图题和图说明须中、英文对照。照片图不宜过大,以看清结构为准,图版版面不超过 170mm(宽)×200mm(高),照片分辨率应≥500dpi 并且有良好的清晰度和对比度。电子显微镜和光学显微镜照片须在左下角加标尺及标尺代表的长度。图的右下角标注图序,图说明应包括染色方法、放大倍数和(或)标尺。

12. 参考文献附于正文末,并依文中出现的先后排序、数量按需要而定,但以不超过 25 篇为宜,尽量用近 5 年的文献。文献书写格式:[期刊]:作者(1~3 作者,多位作者时,列出前 3 位,后加等)。文题.刊名,年,卷(期):起页-止页;[书籍]:作者(1~3 作者)。书名.卷次.版次.出版地:出版者,(下转第 469 页)