

特约综述



刘妍, 南京医科大学药学院干细胞与神经再生研究所研究员, 博士生导师。2011年毕业于复旦大学上海医学院获理学博士学位, 2008~2013年在美国威斯康星大学从事人多能干细胞神经定向分化与再生医学的研究。本实验室研究致力于人多能干细胞向特定神经谱系的定向分化与细胞替代治疗研究、应用iPSC开展神经疾病发病机理及神经发育的研究。现在已经根据人脑发育的规律成功建立了人类多能干细胞胚胎干细胞(ESCs)和诱导多能干细胞(iPSCs)的神经分化模型。我们已经成功将hPSCs定向分化到特殊脑区和功能的神经细胞及特定脑区的类器官。我们通过人类神经元和类器官模型模拟人脑的发育疾病缺陷, 开展神经系统发病机理的研究。研究成果发表在*Nature Biotechnology*、*Cell Stem Cell*、*Nature Protocol*、*Stem Cell Reports*和*Cell Reports*等期刊。刘妍研究员目前为江苏省神经科学学会青年副主委、江苏省神经科学学会常务理事、江苏省双人人协会理事、中国细胞生物学会会员等。

<http://xy.njmu.edu.cn/5e/9f/c1866a24223/page.htm>



柴人杰, 东南大学生命科学研究院教授, 博导, 院长助理, 支部书记; 中组部青年千人计划获得者, 国家优秀青年科学基金项目获得者; 现任中国生物物理学会听觉、言语与交流分会副会长, 国际耳内科医师协会常务委员, 中国医促会耳内科分会听觉基础研究学组组长, 江苏省发育生物学会常务理事, 青年委员会主委和听觉科学专委会主委等。本实验室主要致力于神经元和内耳毛细胞的再生和保护以及神经干细胞和内耳干细胞的转录调控机制的研究。我们系统地研究了多种信号通路对于内耳干细胞和神经干细胞增殖和分化的转录调控机制; 同时结合多基因协同调控、生物材料和电刺激、磁刺激等物理调控因素有效促进神经元和毛细胞的再生和听觉功能的部分重建; 近年来, 我们也通过调控自噬、线粒体功能和氧化应激来研究如何保护噪音和药物导致的毛细胞损伤和听力损失。已在*Advanced Materials*、*Nature Communications*、*Advanced Functional Materials*、*PNAS*、*Autophagy*、*Development*等国际知名学术期刊上发表论文70余篇。

<http://ils.seu.edu.cn/2015/0331/c12702a120266/page.htm>

诱导多能干细胞在神经系统精神疾病研究中的应用

沈露萍^{1#} 董颖^{2#} 张莎莎² 胡瑶¹ 柴人杰^{2*} 刘妍^{1*}

(¹南京医科大学药学院, 南京 211100; ²东南大学生命科学研究院, 南京 210096)

国家重点研发计划重点专项(批准号: 2016YFC1306703、2015CB965000、2017YFA0103903)和东南大学-南京医科大学合作研究项目(批准号: 2017K3DN25)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 025-83790971, E-mail: yanliu@njmu.edu.cn; Tel: 025-86868467, E-mail: 101011723@seu.edu.cn

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2016YFC1306703, 015CB965000, 2017YFA0103903) and Southeast University-Nanjing Medical University Joint foundation (Grant No.JX109GSP2017K3DN25)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-25-83790971, E-mail: yanliu@njmu.edu.cn; Tel: +86-25-86868467, E-mail: 101011723@seu.edu.cn

摘要 神经系统精神疾病包含抑郁症、双相情感障碍、痴呆症、发育迟缓、精神分裂症等四百多种疾病,给个人、社会和国家带来了沉重的负担。虽然近年来对这些疾病的研究已经取得了巨大进展,但对这些疾病发生和发展机制仍然匮乏了解。随着诱导多功能干细胞技术的发展,越来越多的研究使用该技术动态模拟人类中枢系统疾病的进程和病理变化。该文介绍了诱导多功能干细胞技术并列举了其在神经精神疾病治疗中的应用。同时,该文也分析了干细胞三维培养技术并且提出了备受关注的热点研究问题。

关键词 体细胞重编程;精神疾病;诱导多能干细胞

The Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Studying Neuropsychiatric Disorders

Shen Luping^{1#}, Dong Ying^{2#}, Zhang Shasha², Hu Yao¹, Chai Renjie^{2*}, Liu Yan^{1*}

¹*School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211100, China;*

²*Institute of Life Sciences, Southeast University, Nanjing 210096, China)*

Abstract Neuropsychiatric disorders, including more than 400 diseases such as depressive disorder, bipolar affective disorder, dementia, developmental retardation and schizophrenia, imposes heavy social and economic burdens on individuals, communities and countries. Although numerous studies have made enormous progress on these diseases over the last few decades, the mechanisms of diseases still remain unknown. More and more studies have shown that the induced pluripotent stem cells (iPSCs) technology could simulate the dynamical changes during the process of central nervous system disease. In this review, we introduced iPSCs technique and enumerate current researches of neuropsychological diseases using iPSCs technique. We also discussed the technique of three-dimensional culture of stem cells and put forward several hot spots need to be further researched in this field.

Keywords somatic cell reprogramming; neuropsychiatric disorder; induced pluripotent stem cells (iPSCs)

1 神经精神系统疾病发展形势严峻

神经系统精神疾病(neuropsychiatric disorder)是感觉认识、思维、情感等精神状态以及性格、行为、心理功能发生异常和紊乱等脑功能发生障碍所引起的疾病^[1-2],主要症状有:意识障碍、运动障碍、语言和言语障碍、认知功能障碍以及情感障碍等^[3]。根据美国《精神疾病诊断与统计手册》第四版,美国精神医学学会对现有精神疾病进行分类,其包括四百种疾病,全球患病人数较多的有抑郁症、双相情感障碍、痴呆症、发育迟缓、精神分裂症等。2015年刊于《柳叶刀》的一篇报道指出,中国有1.73亿成年人患有精神疾病,其中4 300万被登记为严重心理健康问题^[4]。基于现有的我国人口总数,大约平均每8个人就有1人有精神疾病的问题。现行列为严重精神障碍进行在册管理的有:精神分裂症、偏执性精神病、分裂情感性障碍、双相情感障碍、癫痫所致

精神障碍和精神发育迟滞伴发精神障碍等6种疾病。

神经系统精神疾病的发病率逐年增长,对全球造成的经济损失也逐年上升。这不但增加了患者家庭的经济压力,也增加了国家的医疗财政支出。精神类疾病最大的危害的是对正常社会功能的侵蚀,这一表现在引入伤残调整生命年(disability adjusted of life, DALY)比较后尤为明显。伤残调整生命年是疾病死亡损失的健康生命年(years of life lost, YLLs, 即早亡所致生命年损失)和疾病伤残损失的健康生命年(years lost due to disability, YLDs)相结合的指标,是生命数量和生活质量以时间为单位的综合性指标。大部分精神类疾病发病年龄早,故产生的总损失年数较高。根据2013年,全球的神经精神疾病的伤残调整生命年(DALYs)是1.731亿年,占总疾病负担的7.1%^[5]。据国家卫生健康委员会调查,精神疾患在我国疾病总负担排名中居首位,已超过心脑血管

管、呼吸系统及恶性肿瘤等疾患。各类精神问题约占疾病(全部疾病和外伤所致残疾及劳动力丧失)总负担的1/5, 预计到2020年, 这一比率将升至1/4。并且, Vigo等^[6]的研究显示, 全球精神疾病负担很可能被低估超过1/3, 表明精神疾病的影响远比目前的统计预计值更严重。由神经系统精神疾病造成的经济损失相当于癌症医疗的成本。

2 研究困难

近几十年来, 疾病研究取得了巨大进展, 但我们对许多常见神经系统精神疾病的发生发展机制的了解依然匮乏, 与之相应的预防、诊断和治疗都不完善。与其他医疗领域相比, 这一领域的研究难点主要有以下几个方面。

首先, 神经系统精神疾病主要与人体大脑的功能障碍相关, 而对于大脑机理的研究相比于其他器官要困难。

其次, 我们对精神疾病遗传基础的认知有限, 这就增加了疾病研究的复杂性。针对双胞胎的研究表明, 神经系统精神病患者的发病与基因变异有关^[7]。例如, 躁郁症(bipolar disorder, BPD)和精神分裂症(schizophrenia, SCZ)的遗传因素风险在80%~90%之间^[8-9]。此外, 全基因组关联研究表明, 精神疾病通常是多基因的, 除了已经确定的由单基因遗传风险因素引起Rett综合征(Rett syndromes)和脆性X综合征(fragile X syndromes)外^[10], 现在所知的遗传变异仅占整体风险和疾病表型的很小一部分^[11], 而且, 这些遗传变异很多都是存在于功能未知的非编码区^[11]。

第三, 关于神经系统疾病模型的缺乏限制了神经系统精神疾病的研究。到目前为止, 有四种主要的系统来模拟人类的中枢神经系统发育和疾病。(1)啮齿动物是研究发疾病发病机理和疾病进展的最普遍的模式系统。通过基因编辑的方式, 啮齿动物可以出现人类疾病相似的症状, 探索特定基因在中枢神经系统疾病发病机制的作用。然而, 物种间的差异是利用啮齿动物模型研究人类中枢神经系统的主要障碍。根据《精神疾病诊断和统计手册》第五版(DSM-IV)中定义, 精神疾病涵盖的疾病范围广, 通常都与一系列的神经环路障碍相关, 每条通路的异常都与多个疾病表征相关。从非灵长类动物行为模型推断到特定的人类疾病是非常困难的, 并且也非常不准确, 不足以解决高级人类神经系统疾病。(2)

常规的组织学研究是使用患者活检组织和尸体解剖组织, 但这对于神经系统疾病来说也不理想。脑组织活检是高度侵入性的, 在获得方式和处理研究方面存在伦理问题。与新鲜的固定组织相比, 从尸体解剖组织入手, 可能会失去重要的信息。尸检组织通常代表神经疾病的晚期阶段, 并且很少能直接观察到在生命早期出现的病症的发病机理。另外, 尸检组织很难代表疾病进展的自然过程, 因为大多数患者在诊断后接受某种形式的医学或心理干预。并且, 尸体组织同样也不能进行基因研究, 无法针对性地进行某些基因的编辑。(3)用于神经系统疾病研究的细胞系有限, 常用的细胞系不适用于神经病学疾病的研究, 只有少数永生化的脑源性细胞系, 例如PC12或HT22细胞株。这些细胞株是转基因的人类细胞系, 通常可以在试管中繁殖和传播, 而正常的神经元不能在体外扩增。研究神经系统精神疾病, 由于无法得到适用的细胞系、活检组织和尸检标本, 从分子水平的深入研究疾病的机制成为很大的困难。(4)利用人类胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)或诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)进行动态地模拟人类中枢神经系统的疾病。通过多能干细胞诱导分化所得到的神经细胞是直接来源于相应的神经疾病患者, 所以此类神经细胞包含所来源个体的所有遗传信息。例如, 通过直接将hPSCs定向分化到谷氨酸能神经元, 建立了早期阿尔兹海默病(Alzheimer's disease)的细胞模型^[12], 通过使用患者诱导多能干细胞进行病因学研究和药物测试^[13], 基于多能干细胞的帕金森病(Parkinson's disease, PD)干细胞治疗尝试^[14], 将诱导分化的神经元进行细胞移植治疗学习记忆缺陷^[15]等。

3 利用iPS细胞模型进行疾病研究

3.1 背景介绍

Thomson等^[16]在1998年建立了从胚泡中分离人胚胎干细胞(hESC)的技术。这些细胞可以在体外无限期地维持在未分化的多能状态, 使研究人员能够生成无限数量的细胞。2006年, Yamanaka团队^[17]证明, 可以通过逆转录转录因子Oct3/4(octamer-binding transcription factor 4)、Sox2(sex determining region Y-box 2)、Klf4(Kruppel-like factor 4)和c-Myc(myelocytomatosis)从小鼠成纤维细胞产生具有胚胎干细胞特性的诱导多能干细胞iPSCs。一年后, 两

个小组都独立完成第一批人类iPSCs的建立^[18-19]。iPSCs的发现对于细胞生物学的发展和疾病的研究具有重要的里程碑意义: (1)这是第一个证明分化终末的成体细胞可以重新编程为多能状态的细胞; (2)开辟了一条新的疾病研究途径, 免于围绕胚胎干细胞(ESCs)的道德和法律争议; (3)患者来源的细胞几乎可以分化成任何同基因的细胞类型。如今, 高效且非整合重编程方式被广泛用于建立疾病模型和研究细胞替代疗法。

3.2 技术优势

iPSCs包含了供体细胞来源的整个遗传背景, 使得该技术特别适用于研究由确定的遗传错误引起的疾病。然而, 该技术的一个不足之处是, 在重编程过程中, 细胞的表观遗传变化被抹去了。这对研究神经系统精神疾病的研究提出了挑战, 因为精神疾病极大地受到环境因素影响从而对机体留下表观遗传修饰。另一种与iPSCs重编程方法相似的转分化(或直接重编程)的技术是通过使用转录因子直接诱导体细胞切换命运而不通过多能干细胞中间体, 从而规避了表观遗传学丢失问题, 例如, 直接从成纤维细胞产生功能诱导神经元(induced neurons, iNs)^[20]。而且, 转分化细胞似乎保留了其原始表观遗传信息^[21]。因此, 假设患者体细胞(如皮肤成纤维细胞)中存在的表观遗传学变化与神经精神疾病机制相关, 生成iNs可能是造成环境诱发的神经精神疾病模型的有效替代方法。

迄今为止, iPSC技术在体外建立疾病模型方面已经取得了很大的成功^[22], 研究人员利用这一技术开发药物的高通量筛选(high-throughput screening, HTS)^[23-24], 对药物毒理学进行测试^[25], 从而揭示神经系统疾病的机制^[26](图1)。通过结合基因编辑技术, iPSC技术成为研究人类神经系统疾病的强有力的工具细胞。例如, CRISPR/Cas9基因组编辑工具

通过修复或者引入突变基因, 用来探索致病基因与疾病的关系。通过利用CRISPR/Cas9技术将全基因组关联研究以及表观遗传学与iPSCs相结合来解决复杂的遗传性疾病(如帕金森病)模型的研究取得了新进展, 揭示了非编码变异体的重要作用^[27]。另外, CRISPR/Cas9可用于研究由内源基因表达的编码变体, 并且通过同基因对照的方式研究单个变体的功能, 有望进一步推进精准医学和细胞疗法^[28]。综合来看, iPSCs技术可用于解决目前神经系统精神疾病的研究障碍, 对于阐明精神疾病的分子机理具有巨大的应用潜力。

3.3 疾病模拟研究发展

研究人员最开始是将iPSCs用来模拟单基因的精神障碍, 如Rett综合征和脆性X综合征。然而, 最近的报道则使用iPSCs分化神经元来模拟非单基因的精神疾病^[29], 以及用于研究与精神疾病相关的非编码变异体的作用^[30]。在这里, 我们主要概述了最近几年中利用神经系统精神疾病患者iPSCs分化的神经元中观察到的分子和生理学表型的成果。

3.3.1 精神分裂症SCZ 精神分裂症(schizophrenia, SCZ)是一种慢性的、严重的脑部疾病, 影响着全球约1%的人口, 并给社会造成了巨大的经济损失^[31]。排除器质性精神病、精神活性物质和非成瘾物质所致的精神障碍, 当患者出现6个月以上的语言、感知、思维、社交活动障碍, 精神活动与环境的不协调, 我们就可以将其诊断为精神分裂症。一线治疗药物包括非典型抗精神病药物, 如奥氮平(Olanzapine)和利培酮(Risperidone)。精神分裂症是最早以患者iPSCs分化的神经元为疾病模型的神经精神疾病之一^[29,32]。有研究表明, 当与人类星形胶质细胞共培养时, SCZ-iPSCs分化的神经元表现出突触减少, 突触脊密度降低和谷氨酸受体表达减少^[29], 并且在神经元分化周期的最后3周内, 用多巴胺

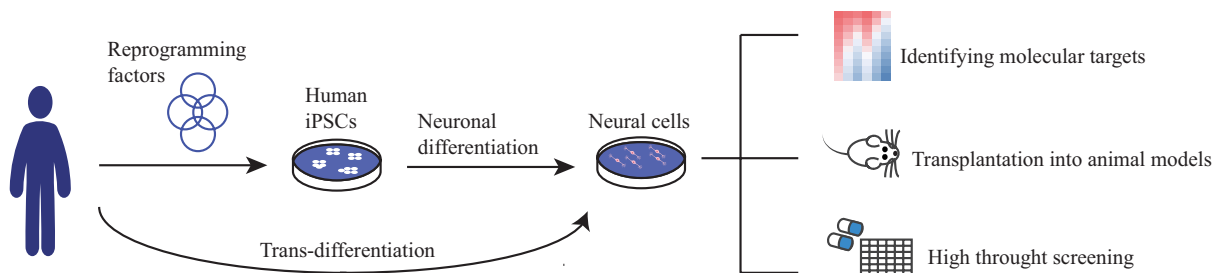


图1 基于iPSCs技术进行疾病模型建立的示意图

Fig.1 Schematic representation of induced pluripotent stem cell generation and application

能拮抗剂洛沙平(Loxapine),可以增加来自所有患者的iPSCs分化的神经元的活性,而传统的精神分裂症治疗药物氯氮平(Clozapine)、奥氮平、利培酮和硫利达嗪(Thioridazine)等并不能改善精神分裂症神经元的病理表型。这提示洛沙平(Loxapine)在治疗精神分裂症方面具有重要作用。Wen等^[26]将携带*DISC1*(disrupted in schizophrenia 1)突变基因的精神分裂症病人的体细胞重编程iPSCs细胞系,进一步分化后发现,精神分裂症病人的神经元具突触缺少的表型。约90%与突触传递和发育有关的基因失调,证明与精神障碍有关,包括抑郁症、双相障碍和精神分裂症。随后,通过使用基因编辑技术,该组建立了*DISC1*基因突变与观察到的突触缺失之间的因果关系^[26]。虽然*DISC1*基因对于精神分裂症的作用比帕金森氏病(PD)的作用要弱很多,但是hiPSCs依旧是用于研究精神分裂症的神经系统生物表型的重要工具。这些精神分裂症病例群包括在全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)中鉴定的候选基因,或者通过全基因组测序工作,与拷贝数变异(copy number variation, CNV)紧密联系^[33]。研究者应用CRISPR/Cas9技术来设计神经细胞基因,研究常见基因变异对于疾病的影响,并通过分子、细胞、电生理等手段对病人iPSCs的疾病表型进行综合分析^[34]。

另一个精神分裂症发病机制的主流理论是多巴胺失调。支持这一理论的研究表明,在杏仁核、前额叶皮层和海马等多个脑区存在多巴胺的分泌异常^[35]。Kriks等^[36]建立了一种有效的分化方案来产生中脑多巴胺能神经元,这种分化方式在小鼠、大鼠和猴子模型的神经元移植后显示出长期存活率。许多研究小组随后改进了该方案,获得精神分裂症患者来源的多巴胺能神经元^[37-38]。研究表明,来自SCZ患者的iPSCs分化的多巴胺能神经元具有的神经突触数量减少,释放的多巴胺降低,同时,这些有缺陷的神经元表现出线粒体网络结构和连接性紊乱^[38],神经元之间连接减少,神经突触数量减少,PSD-95蛋白水平和谷氨酸受体表达水平降低^[39]。这表明,线粒体功能障碍在精神分裂症的发病机制中具有关键作用,这与双相障碍的报道很相似^[40]。自2011年以来,学者们对从精神分裂症患者来源的iPSCs进行了大量研究,发现cAMP和WNT信号传导途径的相关基因表达水平改变^[37,41],总蛋白质水平和蛋白质合

成异常,核糖体和作用于翻译起始及延伸的蛋白质水平增加,细胞骨架重塑障碍和氧化应激增加等^[42]。另有研究指出,某些精神分裂症患者的iPSCs很难向多巴胺能神经元的方向分化^[37],谷氨酸能神经元无法成熟,这表明需要改进现有的分化方式,才能让这些神经元作为一个功能强大的工具来研究导致精神分裂症中多巴胺失调的因素,促进利用细胞进行高通量筛选来获得新的治疗药物,指导患者的个体化治疗。

精神分裂症的研究也将多巴胺能系统功能亢进与海马体的兴奋过度联系起来,认为潜在的可能因素是抑制性的GABA(γ -aminobutyric acid)能中间神经元数量减少^[43-44]。针对人脑标本的研究也表明,GABA能神经元的功能障碍是精神分裂症的重要成因之一。精神分裂症患者的脑组织标本发现,GABA能神经元突触减少40%,这可能是发育缺陷的一种表现^[45]。实际上,将GABA能中间神经元移植到精神分裂症的啮齿动物模型的腹侧海马中,可恢复海马功能、调整多巴胺能平衡并改善动物的行为学^[46-47]。为了更好地研究GABA能中间神经元的性质及其在疾病发病机制中的作用,刘妍课题组^[48]制定并优化了神经元分化方案,用hESCs或iPSCs产生这些神经元。这些研究提供的人源性GABA能中间神经元需要较长的成熟时间,需要长达7个月才能达到成熟的表型。体外获得GABA能中间神经元的一系列方法对基于GABA能神经元的细胞治疗有重要的指导意义,可以用于研究治疗精神分裂症^[49]和其他与GABA能神经元功能障碍相关的疾病,如抑郁症^[50]、癫痫(Epilepsy)^[51]和神经性疼痛(neuropathic pain)等。

3.3.2 双相情感障碍 双相情感障碍(bipolar disorder, BPD)的终身患病率在国际水平约为2.4%,我国患病率约为1.5%^[52]。一线治疗主要是情绪稳定剂,如锂盐和丙戊酸。在过去的两年中,多个课题组来自BPD患者和健康对照者的成纤维细胞产生的iPSCs分化得到神经元^[40,53-55]。在一项研究中,iPSCs系是来自患有双相情感障碍的两个兄弟和他们未获病的父母,来源于患者的神经元前体细胞中差异表达的基因大多数是调节神经元分化、投射和钙结合功能相关的基因^[54]。由双相情感障碍患者产生的神经元前体细胞表现出神经分化受抑制和神经元增殖减少,两者均通过选择性GSK3 β 抑制剂(一种对已知靶点进行

治疗的锂盐药物)治疗获得拯救^[54]。Mertens等^[40]得到的双相情感障碍患者来源的重编程iPSCs, 其中一半的患者对锂盐治疗有反应。iPSCs分化得到的海马齿状回颗粒样细胞表现出了线粒体改变、神经元的钙信号及突触的异常兴奋。与对照组相比, 双相情感障碍分化的神经元表现出超兴奋性表型, 神经元自发动作电位的频率较高。值得注意的是, 采用锂盐处理1周后, 线粒体基因表达和电活动超兴奋的表型得到改善, 且这一改善仅发生在来自对锂盐治疗有效的双相情感障碍患者的神经元^[40]。最近的这些研究结果表明, 线粒体信号转导在双相障碍中发挥重要作用并揭示了解释患者对锂盐治疗反应差异的潜在分子机制。体外研究与疾病相关的神经元的特定表型展现了基于iPSCs的疾病模型的重要发展前景。由于缺乏来自患者的原病发组织的进一步研究以及对神经精神疾病发病机制和作用通路的认识匮乏, 所以这些疾病表型难以判断、衡量。理想的模式是使用这样的疾病相关表型作为高通量筛选(high-throughput screening, HTS)标准, 其允许同时测试数百种化合物。有研究人员开发了一种高通量筛选方法, 用来测试人类iPSCs分化的神经元在各种小分子药物的作用下对Wnt/GSK3 β 信号系统的调节作用, 该系统通过锂盐药学的有效性治疗得到了进一步的验证^[56]。

3.3.3 抑郁症及焦虑症 重度抑郁症(major depression disorder, MDD)影响全球约3亿人, 约占全球人口的4.5%^[2]。重度抑郁症的诊断标准包括两周或两周以上的情绪低落、明显兴趣减少或与以下一项或多项标准相符合: 食欲和睡眠习惯的严重改变; 精神行动过激或迟缓; 过度内疚; 偶尔或反复出现的死亡想法。一线治疗目前包括选择性血清素再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRIs)和血清素-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors, SNRIs), 鉴于这些已知药物的作用机制, 再寻找单胺氧化酶合成和信号转导途径中的作用机制。焦虑症(anxiety disorder)影响力仅次于重度抑郁症, 影响全球人口的约4%^[2]。焦虑症包括恐慌、广泛性焦虑、强迫症、创伤后应激和恐惧症等。它们的主要表现是持续存在严重的焦虑、恐惧感或不祥的预感。一线治疗包括心理治疗以及药物(如SSRIs)的联合应用。

一直以来, 在体外尝试模拟与5-羟色胺能传递

相关的神经精神疾病未能成功。2016年, 两个研究小组独立开发了一种通过直接从人成纤维细胞转分化产生5-羟色胺能神经元的方法^[57-58]。Vadodaria等^[58]发现, 转录因子NKX2.2(NK2 homeobox 2)、FEV(ETS transcription factor)、GATA2(GATA binding protein 2)、LMX1B(LIM homeobox transcription factor 1 beta)、ASCL1(achaete-scute family bHLH transcription factor 1)和NGN2(neurogenin 2)联合过表达可直接高效地从人成纤维细胞中产生血清素能神经元, 他们称之为iSNs(induced serotonergic neurons)。iSNs显示自发动作电位, 体外能释放5-羟色胺并对选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)起作用, 利用SSRIs类药物西酞普兰(Citalopram)证明这些神经元可作为筛选治疗药物的工具^[58]。Lu等^[59]利用hESCs和成纤维细胞衍生的iPSCs, 将细胞暴露于生长因子和信号通路调节因子来产生高纯度的5-羟色胺能神经元。随后使用西酞普兰建立了利用这些神经元作为筛选血清素调节剂的工具。成熟的分化方法能够在体外获得5-羟色胺能神经元。这些5-羟色胺能神经元由患者来源的体细胞重编程而来, 它们可用于筛选新的抑郁症治疗药物并对于研究当前所用药物可能的未知机理、对于发现新的药物靶点有重要意义^[60-61]。这些新的研究方式除了研究来自抑郁症患者的5-羟色胺能神经元, 也可以用于那些被认为涉及5-羟色胺神经传递的疾病, 如焦虑症、强迫症、自闭症和进食障碍等。Vadodaria等^[58]和Lu等^[59]的研究成果将会为抑郁症和其他精神疾病有关的研究开辟新的途径。

虽然5-羟色胺调节剂目前是重度抑郁症和焦虑症的一线治疗药物, 但疾病的发病机制还与其他神经元功能障碍有关。例如, GABA能中间神经元的调节功能异常也与抑郁和焦虑情绪障碍有关^[62]。重度抑郁症患者在海马旁和颞叶中GABA受体减少^[63], 并且背外侧额叶皮层和额叶皮层中的GABA能中间神经元数量也有所减少(50%), 体积也比正常人神经元更小(18%)^[50]。通过GSK3 β 介导相关通路, 增强GABA能传递, 可以相对更有效地进行长期的抗抑郁治疗^[64-65]。GABA能中间神经元的细胞治疗已应用于动物模型, 研究证明, 细胞疗法在重度抑郁症小鼠模型中发挥治疗作用^[46,51]。

此外, 脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的缺陷在抑郁症、焦虑

症和其他神经精神疾病中均发挥作用^[66-67]。事实上, SSRI和三环类抗抑郁药的急性作用效应也需要BDNF信号传递^[68], 这表明外源性加入BDNF重组蛋白可以治疗小鼠BDNF的缺陷, 具有巨大的治疗潜力。经过慢性应激诱导后, 用过表达BDNF的人源性iPSCs衍生的神经祖细胞处理的小鼠比对照小鼠表现出更优化的神经发育模式^[69]。因此, 可以推测BDNF过表达的iPSCs分化得到的细胞可以用于精神病患者的细胞疗法。总的来说, 5-羟色胺能和GABA能神经元分化的发展将为研究这些抑郁和焦虑发病机制做铺垫, 并且有助于今后人类的细胞替代治疗。体外细胞模型也是筛选MDD和焦虑症治疗药物的重要方式, 对于靶向药物的研发和精准医疗的发展具有重要意义。

4 三维培养进行干细胞的疾病模拟

传统的从hPSCs中分化发育得到的神经元进行神经系统精神疾病的模拟, 是一种基于2D培养的系统^[70], 其优势是可以产生相对同质的细胞群, 如运动神经元、中脑多巴胺能神经元和端脑的兴奋性神经元等^[71]。现有的2D培养具有相对成熟的分化方案, 能够获得的神经元纯度也比较高^[72-73]。然而, 2D平面上培养的细胞模型不能模拟细胞在三维空间的相互作用^[74], 不能模拟由各种调节因子和自分泌信号组成的内源微环境以及由不同组织中存在的不同支架网络产生的物理力^[75], 从而导致2D的细胞模型无法模拟精神疾病不同脑区不同细胞类型间的功能紊乱^[76]。为了更好地模拟神经网络的功能结构, 在体外构建与体内生理更加相关的微环境, 近年来研究

人员开发了3D培养系统, 特别是基于材料的干细胞3D组装, 用以克服2D细胞培养的局限性^[77]。

基于材料的干细胞三维装配通常使用多孔底物, 可以支持细胞生长、分化和组织, 其方式类似于细胞如何在胚胎发生过程中生长和分化以形成多种组织^[78]。与2D培养系统不同, 3D培养系统不仅保留自然的3D细胞外基质结构, 而且更精确地模拟细胞形态、活力、迁移、增殖、分化和基因表达差异的实际微环境^[79]。因此, 3D细胞培养已成为体外干细胞研究的必要手段^[80]。目前, 许多不同形式的材料被用作支架以支持不同类型干细胞的3D培养^[81]。为了改善生物相容性或特殊用途, 支架可以进行表面改性^[82], 机械调节或生物化学功能化^[83], 所有这些改进都旨在促进不同类型干细胞的附着、增殖和分化^[84-86]。

多种因素可以控制神经干细胞(NSCs)增殖, 包括生物、化学和物理因素。3D培养表明, 在14天的过程中神经祖细胞(NPC)活性和增殖的能力增强, 并且3D石墨烯泡沫也被用于促进NSCs的增殖。此外, 使用脑源性神经营养因子(BDNF)包裹支架以提高材料的有效性, 且BDNF固定的聚ε-己内酯纳米纤维可促进皮质NSCs的增殖和分化^[87]。相对于2D培养来说, 在藻酸盐、羧甲基壳聚糖和琼脂糖的支架上培养的3D生物打印的hiPSC可以分化为由内胚层、外胚层和中胚层谱系的细胞混合物组成的胚状体或更均匀的神经组织^[88]。正如图2所示, 相对于2D培养来说, 3D培养下的干细胞具有更强的增殖和分化能力。

此外, 机械力、基底几何形状和基底刚度可影

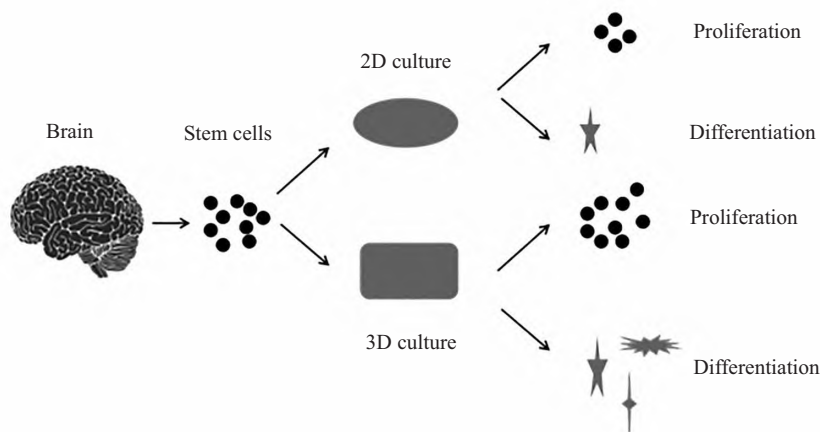


图2 3D培养比2D培养干细胞的增殖和分化能力更强

Fig.2 The proliferation and differentiation of stem cells is higher in 3D culture than 2D culture

响干细胞的分化,并可指导其生长方向^[89-90]。控制和指导干细胞的分化在疾病建模和新疗法的开发中具有巨大的作用。在3D系统中培养的干细胞特征上更像体内对应物,不同类型的支架材料的开发为人类疾病建模和潜在治疗剂筛选提供了强大的技术平台^[70]。

目前的研究已经改善了体外干细胞的存活率,然而它们与体内移植后的情况仍然大不相同。现有的技术难题是,研究者很难追踪移植后的细胞命运,包括干细胞及其子细胞的存活情况。因此,体内干细胞追踪的新型实时成像技术的发展将有利于追踪体内移植细胞。我们相信在不久的将来,基于光遗传学和一些超分辨率成像技术的发展将使移植干细胞命运的实时成像技术成为现实。

5 总结

hiPSCs技术是研究神经系统精神疾病的重要研究手段,可用于研究疾病的分子生物学和病理学机制,为疾病相关的药物筛选提供了一种有效的细胞模型。尽管iPSCs技术在体外建立疾病模型优势明显,依然存在一些限制。(1)表观遗传信息的缺失。虽然诱导得到的神经元可以更好地保留患者来源细胞的表观遗传信息,但表观遗传修饰在不同的细胞类型中有所不同,因此皮肤成纤维细胞来源的iPSCs可能无法获得与神经相关的表观遗传信息。(2)体外细胞培养的成熟度有待提升,以更好地模拟神经细胞的成熟和衰老。(3)现有的iPSCs分化方法已经产生了多种神经元亚型,但是对于神经元亚型的分化率和纯度均有待提高,对于神经元亚型与精神疾病的病理机制还有待进一步探索。(4)体细胞重编程形成iPSCs并且分化成神经元是一个相对耗时且昂贵的过程,并且也由于经费问题,会导致一些成果有样本量较少的质疑。(5)许多神经疾病的发病机制可能与神经环路的功能障碍相关,需要结合新型的材料学发展,优化培养方式。

神经系统精神疾病的影响日趋严重,iPSCs技术不仅仅对于基础医学的研究起到推动作用,对于再生医学和临床治疗也有重要的应用。运用iPSCs分化的神经元进行细胞移植,已经在动物模型中观察到在体的电生理活动。我们希望经过努力在未来使三维细胞模型系统能够更好地拟合人类大脑的复杂性和理解神经系统精神疾病的发病机制。利用

iPSCs技术将在人类理解、诊断和治疗神经系统精神疾病的能力方面取得新的突破。

参考文献 (References)

- 1 韩勇, 刘伶, 刘金同, 韩春美. 神经精神病学研究的概念与动态. 中国神经精神疾病杂志(Han Yong, Liu Ling, Liu Jintong, Han Chunmei. *Chin J Nerv Ment Dis* 2006; 32(3): 280-1,8.
- 2 Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, *et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380(9859): 2163-96.
- 3 Garcin B, Volle E, Funkiewiez A, Miller BL, Dubois B, Levy R. A mosquito bites and a butterfly flies: A specific response type of frontal patients in a similarity task. *Neuropsychologia* 2018; 117(1873-3514): 371-8.
- 4 Mental health in China: what will be achieved by 2020? *Lancet* 2015; 385(9987): 2548.
- 5 Murray CJL, Barber RM, Foreman KJ, Ozgoren AA, Abd-Allah F, Abera SF, *et al.* Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet* 2015; 386(10009): 2145-91.
- 6 Vigo D, Thornicroft G, Atun R. Estimating the true global burden of mental illness. *Lancet Psychiatry* 2016; 3(2): 171-8.
- 7 Plomin R, Owen MJ, McGuffin P. The genetic basis of complex human behaviors. *Science* 1994; 264(5166): 1733-9.
- 8 McGuffin P, Rijsdijk F, Andrew M, Sham P, Katz R, Cardno A. The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60(5): 497-502.
- 9 Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60(12): 1187-92.
- 10 Lombardi LM, Fau-Baker SA, Baker SA, Fau-Zoghbi HY, Zoghbi HY. MECP2 disorders: from the clinic to mice and back. *J Clin Invest* 2015; 125(8): 2914-23.
- 11 Gratten J, Wray NR, Keller MC, Visscher PM. Large-scale genomics unveils the genetic architecture of psychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2014; 17(6): 782-90.
- 12 Shi Y, Kirwan P, Smith J, MacLean G, Orkin SH, Livesey FJ. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med* 2012; 4(124): 124ra29.
- 13 Weick JP, Held DL, Bonadurer GF 3rd, Doers ME, Liu Y, Maguire C, *et al.* Deficits in human trisomy 21 iPSCs and neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(24): 9962-7.
- 14 Sonntag KC, Song B, Lee N, Jung JH, Cha Y, Leblanc P, *et al.* Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects. *Prog Neurobiol* 2018; 168: 1-20.
- 15 Liu Y, Weick JP, Liu H, Krencik R, Zhang X, Ma L, *et al.* Medial ganglionic eminence-like cells derived from human embryonic stem cells correct learning and memory deficits. *Nat Biotechnol* 2013; 31(5): 440-7.
- 16 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines

- derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 17 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 18 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 19 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 20 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463(7284): 1035-41.
- 21 Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 467(7313): 285-90.
- 22 Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(3): 170-82.
- 23 Lee G, Ramirez CN, Kim H, Zeltner N, Liu B, Radu C, *et al.* Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat Biotechnol* 2012; 30(12): 1244-8.
- 24 Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SS, Sandoe J, *et al.* Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep* 2014; 7(1): 1-11.
- 25 Medine CN, Lucendo-Villarin B, Storck C, Wang F, Szkolnicka D, Khan F, *et al.* Developing high-fidelity hepatotoxicity models from pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(7): 505-9.
- 26 Wen Z, Nguyen HN, Guo Z, Lalli MA, Wang X, Su Y, *et al.* Synaptic dysregulation in a human iPSC cell model of mental disorders. *Nature* 2014; 515(7527): 414-8.
- 27 Soldner F, Stelzer Y, Shivalila CS, Abraham BJ, Latourelle JC, Barrasa MI, *et al.* Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of alpha-synuclein modulates target gene expression. *Nature* 2016; 533(7601): 95-9.
- 28 Tabar V, Studer L. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nat Rev Genetics* 2014; 15(2): 82-92.
- 29 Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, *et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 473(7346): 221-5.
- 30 Roussos P, Mitchell AC, Voloudakis G, Fullard JF, Pothula VM, Tsang J, *et al.* A role for noncoding variation in schizophrenia. *Cell Rep* 2014; 9(4): 1417-29.
- 31 Montgomery W, Liu L, Stensland MD, Xue HB, Treuer T, Ascher-Svanum H. The personal, societal, and economic burden of schizophrenia in the People's Republic of China: implications for antipsychotic therapy. *Clinicoecon Outcomes Res* 2013; 5: 407-18.
- 32 Chiang CH, Su Y, Wen Z, Yoritomo N, Ross CA, Margolis RL, *et al.* Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation. *Mol Psychiatry* 2011; 16(4): 358-60.
- 33 Huang J, Perlis RH, Lee PH, Rush AJ, Fava M, Sachs GS, *et al.* Cross-disorder genomewide analysis of schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Am J Psychiatry* 2010; 167(10): 1254-63.
- 34 Hoffman GE, Schrode N, Flaherty E, Brennand KJA-Ohoo. New considerations for hiPSC-based models of neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 2018; doi: 10.1038/s41380-018-0029-1.
- 35 Kessler RM, Woodward ND, Riccardi P, Li R, Ansari MS, Anderson S, *et al.* Dopamine D2 receptor levels in striatum, thalamus, substantia nigra, limbic regions, and cortex in schizophrenic subjects. *Biol Psychiatry* 2009; 65(12): 1024-31.
- 36 Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, *et al.* Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 2011; 480(7378): 547-51.
- 37 Hartley BJ, Tran N, Ladran I, Reggio K, Brennand KJ. Dopaminergic differentiation of schizophrenia hiPSCs. *Mol Psychiatry* 2015; 20(5): 549-50.
- 38 Robicsek O, Karry R, Petit I, Salman-Kesner N, Muller FJ, Klein E, *et al.* Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. *Mol Psychiatry* 2013; 18(10): 1067-76.
- 39 Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Tran N, *et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 473(7346): 221-5.
- 40 Mertens J, Wang QW, Kim Y, Yu DX, Pham S, Yang B, *et al.* Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature* 2015; 527(7576): 95-9.
- 41 Brennand K, Savas JN, Kim Y, Tran N, Simone A, Hashimoto-Torii K, *et al.* Phenotypic differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2015; 20(3): 361-8.
- 42 Topol A, English JA, Flaherty E, Rajarajan P, Hartley BJ, Gupta S, *et al.* Increased abundance of translation machinery in stem cell-derived neural progenitor cells from four schizophrenia patients. *Transl Psychiatry* 2015; 5: e662.
- 43 Lodge DJ, Behrens MM, Grace AA. A Loss of parvalbumin-containing interneurons is associated with diminished oscillatory activity in an animal model of schizophrenia. *J Neurosci* 2009; 29(8): 2344-54.
- 44 Gilani AI, Chohan MO, Inan M, Schobel SA, Chaudhury NH, Paskewitz S, *et al.* Interneuron precursor transplants in adult hippocampus reverse psychosis-relevant features in a mouse model of hippocampal disinhibition. *Proc Natl Acad Sci US A* 2014; 111(20): 7450-5.
- 45 Fung SJ, Webster MJ, Sivagnanasundaram S, Duncan C, Elashoff M, Weickert CS. Expression of interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2010; 167(12): 1479-88.
- 46 Perez SM, Lodge DJ. Hippocampal interneuron transplants reverse aberrant dopamine system function and behavior in a rodent model of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2013; 18(11): 1193-8.
- 47 Bonora M, Wieckowski MR, Chinopoulos C, Kepp O, Kroemer G, Galluzzi L, *et al.* Molecular mechanisms of cell death: central

- implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 2015; 34(12): 1608.
- 48 Liu Y, Liu H, Sauvey C, Yao L, Zarnowska ED, Zhang SC. Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells. *Nat Protocols* 2013; 8(9): 1670-9.
- 49 Shetty AK, Bates A. Potential of GABA-ergic cell therapy for schizophrenia, neuropathic pain, and Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Brain Res* 2016; 1638(Pt A): 74-87.
- 50 Rajkowska G, O'Dwyer G, Teleki Z, Stockmeier CA, Miguel-Hidalgo JJ. GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32(2): 471-82.
- 51 Cunningham M, Cho JH, Leung A, Savvidis G, Ahn S, Moon M, *et al.* hPSC-derived maturing GABA ergic interneurons ameliorate seizures and abnormal behavior in epileptic mice. *Cell Stem Cell* 2014; 15(5): 559-73.
- 52 Zhang L, Cao XL, Wang SB, Zheng W, Ungvari GS, Ng CH, *et al.* The prevalence of bipolar disorder in China: A meta-analysis. *J Affect Disord* 2017; 207: 413-21.
- 53 Chen HM, DeLong CJ, Bame M, Rajapakse I, Herron TJ, McInnis MG, *et al.* Transcripts involved in calcium signaling and telencephalic neuronal fate are altered in induced pluripotent stem cells from bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry* 2014; 4: e375.
- 54 Madison JM, Zhou F, Nigam A, Hussain A, Barker DD, Nehme R, *et al.* Characterization of bipolar disorder patient-specific induced pluripotent stem cells from a family reveals neurodevelopmental and mRNA expression abnormalities. *Mol Psychiatry* 2015; 20(6): 703-17.
- 55 Wang JL, Shamah SM, Sun AX, Waldman ID, Haggarty SJ, Perlis RH. Label-free, live optical imaging of reprogrammed bipolar disorder patient-derived cells reveals a functional correlate of lithium responsiveness. *Transl Psychiatry* 2014; 4: e428.
- 56 Harrison PJ, Cader MZ, Geddes JR. Reprogramming psychiatry: stem cells and bipolar disorder. *Lancet* 2016; 387(10021): 823-5.
- 57 Xu Z, Jiang H, Zhong P, Yan Z, Chen S, Feng J. Direct conversion of human fibroblasts to induced serotonergic neurons. *Mol Psychiatry* 2016; 21(1): 62-70.
- 58 Vadodaria KC, Mertens J, Paquola A, Bardy C, Li X, Jappelli R, *et al.* Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts. *Mol Psychiatry* 2016; 21(1): 49-61.
- 59 Lu J, Zhong X, Liu H, Hao L, Huang CT, Sherfat MA, *et al.* Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2016; 34(1): 89-94.
- 60 Diaz SL, Doly S, Narboux-Neme N, Fernandez S, Mazot P, Banas SM, *et al.* 5-HT_{2B} receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Mol Psychiatry* 2012; 17(2): 154-63.
- 61 Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, *et al.* 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 2010; 65(1): 40-52.
- 62 Mohler H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 2012; 62 (1): 42-53.
- 63 Klumpers UM, Veltman DJ, Drent ML, Boellaard R, Comans EF, Meynen G, *et al.* Reduced parahippocampal and lateral temporal GABA-[11C]flumazenil binding in major depression: preliminary results. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37(3): 565-74.
- 64 Okamoto H, Voleti B, Banasr M, Sarhan M, Duric V, Girgenti MJ, *et al.* Wnt2 expression and signaling is increased by different classes of antidepressant treatments. *Biol Psychiatry* 2010; 68(6): 521-7.
- 65 Tyagarajan SK, Ghosh H, Yevenes GE, Nikonenko I, Ebeling C, Schwerdel C, *et al.* Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3beta-dependent phosphorylation of gephyrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(1): 379-84.
- 66 Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 2012; 64(2): 238-58.
- 67 Vithlani M, Hines RM, Zhong P, Terunuma M, Hines DJ, Revilla-Sanchez R, *et al.* The ability of BDNF to modify neurogenesis and depressive-like behaviors is dependent upon phosphorylation of tyrosine residues 365/367 in the GABA(A)-receptor gamma2 subunit. *J Neurosci* 2013; 33(39): 15567-77.
- 68 Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, *et al.* Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* 2003; 23(1): 349-57.
- 69 Liu G, Rustom N, Litteljohn D, Bobyn J, Rudyk C, Anisman H, *et al.* Use of induced pluripotent stem cell derived neurons engineered to express BDNF for modulation of stressor related pathology. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 316.
- 70 Aloysious N, Nair PD. Enhanced survival and function of islet-like clusters differentiated from adipose stem cells on a three-dimensional natural polymeric scaffold: an *in vitro* study. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(9/10): 1508-22.
- 71 Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J Biomed Sci* 2009; 16: 108.
- 72 Chua JS, Chng CP, Moe AA, Tann JY, Goh EL, Chiam KH, *et al.* Extending neurites sense the depth of the underlying topography during neuronal differentiation and contact guidance. *Biomaterials* 2014; 35(27): 7750-61.
- 73 Tyler WJ. The mechanobiology of brain function. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13(12): 867-78.
- 74 Bhang SH, Lee TJ, La WG, Kim DI, Kim BS. Delivery of fibroblast growth factor 2 enhances the viability of cord blood-derived mesenchymal stem cells transplanted to ischemic limbs. *J Biosci Bioeng* 2011; 111(5): 584-9.
- 75 Meyers J, Craig J, Odde DJ. Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. *Curr Biol* 2006; 16(17): 1685-93.
- 76 Mseka T, Bamberg JR, Cramer LP. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization. *J Cell Sci* 2007; 120 (Pt 24): 4332-44.
- 77 Yan WQ, Liu WW, Qi JY, Fang QJ, Fan ZM, Sun GY, *et al.* A three-dimensional culture system with matrigel promotes purified spiral ganglion neuron survival and function *in vitro*. *Mol Neurobiol* 2018; 55(3): 2070-84.
- 78 Guo R, Zhang S, Xiao M, Qian F, He Z, Li D, *et al.* Accelerating bioelectric functional development of neural stem cells by graphene coupling: Implications for neural interfacing with

- conductive materials. *Biomaterials* 2016; 106: 193-204.
- 79 Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* 2007; 11(5): 981-1011.
- 80 Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* 2013; 18 (5/6): 240-9.
- 81 Hong JK, Madhally SV. Next generation of electrosprayed fibers for tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17 (2): 125-42.
- 82 Kerman BE, Kim HJ, Padmanabhan K, Mei A, Georges S, Joens MS, *et al.* In vitro myelin formation using embryonic stem cells. *Development* 2015; 142(12): 2213-25.
- 83 McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004; 6(4): 483-95.
- 84 Haycock JW. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol* 2011; 695: 1-15.
- 85 Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell* 2013; 12(5): 520-30.
- 86 Lantoine J, Grevesse T, Villers A, Delhay G, Mestdagh C, Versaevol M, *et al.* Matrix stiffness modulates formation and activity of neuronal networks of controlled architectures. *Biomaterials* 2016; 89: 14-24.
- 87 Crowder SW, Prasai D, Rath R, Balikov DA, Bae H, Bolotin KI, *et al.* Three-dimensional graphene foams promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanoscale* 2013; 5(10): 4171-6.
- 88 Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126(4): 677-89.
- 89 Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30(1): 215-24.
- 90 Albrecht C, Helmreich M, Tichy B, Marlovits S, Plasenzotti R, Egerbacher M, *et al.* Impact of 3D-culture on the expression of differentiation markers and hormone receptors in growth plate chondrocytes as compared to articular chondrocytes. *Int J Mol Med* 2009; 23(3): 347-55.