人类多能干细胞向脊髓前角运动神经元定向分化 方法研究进展:从发育生物学到临床转化

董思其1 徐和2 景乃禾2,3,4* 陈向军1*

(¹复旦大学附属华山医院神经内科,复旦大学神经病学研究所,上海 200040; ²中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生物化学与细胞生物学研究所),细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031; ³生物岛实验室(广州再生医学与健康广东省实验室),广州 510005;

4中国科学院广州生物医学与健康研究院,广州 510530)

摘要 人类多能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)包括人胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)及人诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC),它们具有向人体多种类型细胞分化的潜能。近年来,其体外定向分化为脊髓前角运动神经元的研究取得了一定进展。该文基于对神经发育的理解,回顾总结了hPSC向脊髓前角运动神经元定向分化的研究进展,并介绍了它们在研究人类神经发育、对疾病进行体外建模和细胞替代疗法方面的应用。

关键词 多能干细胞;运动神经元;神经中胚层前体细胞;细胞分化

Human Pluripotent Stem Cell-Derived Spinal Cord Motor Neuron: from Developmental Biology to Therapeutic Applications

DONG Siqi¹, XU He², JING Naihe^{2,3,4*}, CHEN Xiangjun^{1*}

 (¹Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Institute of Neurology, Fudan University, Shanghai 200040, China;
 ²Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai 200031, China;
 ³Bioland Laboratory (Guangzhou Regenerative Medicine and Health Guangdong Laboratory), Guangzhou 510005, China;
 ⁴Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

Abstract hPSC (human pluripotent stem cell) includes ESC (embryonic stem cell) and iPSC (induced pluripotent stem cell), having the potential to differentiate into a variety of human cell types. In recent years, there has been some progress in the study of its *in vitro* differentiation into spinal anterior horn motor neurons. In this perspective, the state of the field in generating spinal cord motor neuron from hPSCs were reviewed based on our fundamental understanding of neurodevelopment. Then, their applications for studying human neurodevelopment, modeling disease and cell replacement therapy were highlighted.

Keywords pluripotent stem cell; motor neuron; neural mesodermal progenitor; cell differentiation

*Corresponding authors. Tel: +86-21-54921381, E-mail: njing@sibcb.ac.cn; Tel: +86-21-52888159, E-mail: xiangjchen@fudan.edu.cn URL: http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5313

收稿日期: 2020-01-21 接受日期: 2020-03-24

上海市科委"创新行动计划"基础研究项目(批准号: 17JC1400905)和上海市"脑与类脑智能"市级重大科技专项(批准号: 2018SHZDZX01)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 021-54921381, E-mail: njing@sibcb.ac.cn; Tel: 021-52888159, E-mail: xiangjchen@fudan.edu.cn

Received: January 21, 2020 Accepted: March 24, 2020

This work was supported by the Basic Research Project of "Innovation Action Plan" of Shanghai Science and Technology Commission (Grant No.17JC1400905), and the Shanghai Municipal Science and Technology Major Project of "Brain and Brain-like Intelligence" (Grant No.2018SHZDZX01)

脊髓前角运动神经元(motor neuron, MN)是一 类直接支配骨骼肌等随意肌随意运动的终末分化细 胞,其胞体位于脊髓前角,可接受锥体系、锥体外系 及小脑系统的神经冲动,将这些冲动组合后,通过其 轴突传递到运动终板,引起肌肉收缩。人体所有的 骨骼肌活动,包括呼吸、行走及所有精细动作都有 赖于脊髓前角运动神经元的正常功能。某些神经发 育和退行性疾病如脊肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)可特异性或非特异性地导致脊髓前角 运动神经元死亡,引起运动功能障碍。这类疾病目 前尚无有效的治疗手段。近年来,基于对神经系统 发育过程和机制理解的加深,多项研究将人类多能 干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)定向分化 为MN, 这为多种MN损伤疾病的体外建模及细胞替 代治疗提供了可能。从这个角度出发,我们基于对 神经发育的理解,回顾总结了hPSC向脊髓前角运动 神经元定向分化的研究进展,并介绍了它们在研究 人类神经发育、对疾病进行体外建模和细胞替代疗 法方面的应用。

1 脊髓前角运动神经元的发育:前–后轴 和背–腹轴的模式化

脊椎动物神经系统发育始于原肠运动(gastrulation),并先后经历前后轴(rostrocaudal axis)、内外轴 (mediolateral axis)、背腹轴(dorsoventral axis)模式建 成,最后分化为区域化的神经元。其中前--后轴和背--腹轴模式化,使得神经管的每个三维区域获得特定 的解剖学形态特征,并指导发育相关基因在神经轴 各特异细胞群中定位表达。

对于前后轴模式化,目前广为接受的学说是 NIEUWKOOP于1952年提出的"活化-转化(activation-transformation)"学说。这一学说认为,在胚胎组 织者(organizer)的活化信号诱导下,外胚层向原始神 经组织,即神经板分化;在活化信号的作用下形成的 神经结构具有神经轴前部特性。随后,由发育相对 后期的中胚层提供"转化信号"——碱性成纤维细胞 生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和维生 素A类物质如维甲酸(retinoic acid, RA),引起神经轴 相对后部的分化^[1]。这一观点认为,后方化的神经系 统,比如脊髓,在获得后方化命运之前先获得了神经 轴前部命运。然而,近年来基于神经中胚层前体细 胞(neural mesodermal progenitor, NMP)的研究发现, 一些后方化的神经组织在胚胎发育早期就有独立的 来源——早期上胚层细胞可分别发育为神经板或神 经中胚层前体细胞,前者可发育为前部神经组织,包 括前脑、中脑、后脑和脊髓前部,而更后方化的脊 髓由NMP发育而来^[2](图1)。NMP是一类具有神经和 中胚层双重命运的细胞,表现为神经前体细胞标志 物性别决定区Y框蛋白2(SRY-box transcription factor 2, SOX2)、早中胚层前体标志物Brachyury(T/Bra) 双阳性,后续可分化为脊髓和轴旁中胚层。NMP最 早由TZOUANACOU等^[3]于2009年在小鼠胚胎的克 隆谱系回顾性分析中发现。随后,对于小鼠和鸡胚 从原条发生后期到尾芽发生期的发育轨迹研究,将 神经中胚层前体细胞定位于上胚层的后外侧(caudal lateral epiblast, CLE)、毗邻原条-原节交界区(nodestreak border, NSB)^[4-7]。基于此, 我们将脊髓前角运 动神经元的发育分为NMP不依赖和依赖2条途径。 早期研究多基于"活化-转化"学说,先通过抑制骨形 成蛋白(bone morphogenic protein, BMP)及转化生长 因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)信号实 现神经化,再利用维甲酸和SHH(Sonic hedgehog)处 理实现后方化和腹侧化。此方法不经由NMP阶段, 只能将hPSC分化为脊髓前端运动神经元,而更后方 化的神经元,包括支配下肢肌肉的腰、骶段神经元, 无法获得^[8]。目前,基于对NMP形成分子机制的理解, 已有多项研究成功在体外将hPSC分化为NMP,并由 此分化得到更为后方化的脊髓神经元[2]。

在胚胎的神经板时期,脊髓段横断面可分为中间的基板、两边的底板、再外侧的翼板、成神经管时的背侧中央顶板。在神经板中线下方的脊索细胞首先表达诱导信号分子SHH分泌蛋白。SHH诱导中线神经板细胞向底板分化,并诱导底板细胞合成SHH,形成向背侧扩散的浓度梯度^[10]。SHH下游转录因子可分为2类,其中II类转录因子包括Nkx6.1、Olig2和Nkx2.2,可被SHH信号激活并抑制的I类蛋白包括PAX6、Irx3、Dbx1和Dbx2的表达。I类和II类蛋白的相互抑制作用使得脊髓段神经管自背侧向腹侧形成边界清晰的5类神经前体细胞:p0、p1、p2、pMN和p3,并随着发育,形成V0~3中间神经元和运动神经元^[11-12]。其中pMN发育而来的脊髓运动神经元,根据解剖位置不同分为膈肌运动柱(phrenic motor column, PMC)、外侧运动柱(lateral motor column,



NMP: neural mesodermal progenitor; FGF, fibroblast growth factor. 图1 中枢神经系统发育的前后轴模式化示意图(根据参考文献[2,9]修改) Fig.1 Anterior-posterior patterning of central nervous system development (modified from the references [2,9])

LMC)、中间运动柱(median motor column, MMC)、 轴外运动柱(hypaxial motor column, HMC)和节前柱 (preganglionic column, PGC) 5个亚群^[10,13-15],分别支 配膈肌、四肢肌、中轴肌、体壁肌和交感神经及肾 上腺(图2)。各亚群均有特异性分子标志物。由头端 到尾端不同节段的pMN分化形成的MN亚型不同,比 如支配四肢肌的LMC仅出现在臂丛、腰丛及骶丛水 平(图2)。pMN分化到不同MN亚型的具体分子机制 尚不完全清楚,研究表明其与同源盒基因(homeobox gene, HOX)及中胚层信号调控相关^[16]。

2 MN的鉴定标志物

MN发育大致可分为神经干细胞、运动神经元 前体细胞、不成熟MN、成熟MN 4个阶段,在每个 阶段都有特定的标志物表达。在神经干细胞阶段 常见的标志物包括SOX1、SOX2、巢蛋白(nestin) 等。在SHH信号诱导下,脊髓段神经管腹侧形成运 动神经元前体pMN,并向MN分化,期间依次表达 PAX6、Olig2、Nkx6.1、Nkx6.2;其中Olig2特异性 较高,PAX6、Nkx6.1、Nkx6.2在脊髓中间神经元前 体细胞中亦表达^[17]。新生运动神经元一过性表达胰 岛素增强子结合蛋白1(insulin gene enhancer 1, Isl1)、 LIM同源框基因3(LIM homeobox 3, LHX3)、运动神 经元及胰腺同源蛋白1(MN and pancreas homeobox 1,MNX1/HB9)等标志物,随着MN逐渐成熟,开始 表达小泡乙酰胆碱转运蛋白(vesicular acetylcholine transporter, VAChT)、乙酰胆碱转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)等胆碱能标志物;非磷酸化神经 丝重链(non-phosphorylated neurofilament H, SMI-32) 也常被用于运动神经元的检测^[8]。除此之外,一些非 传统的标志物,如microRNA也被用于运动神经元的 检测——miR218目前被认为是最为特异性的运动神 经元标志物^[18]。

3 不经由NMP的脊髓运动神经元分化方法 最早对于脊髓运动神经元体外分化方法的探



PMC: 膈肌运动柱; LMC: 外侧运动柱; MMC: 中间运动柱; HMC: 轴外运动柱; PGC: 节前柱; SCG: 交感干神经节; AdrG: 肾上腺。 PMC: phrenic motor column; LMC: lateral motor column; MMC: median motor column; HMC: hypaxial motor column; PGC: preganglionic column; SCG: sympathetic chain ganglia; AdrG: adrenal gland.



索是在小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)中进行的^[19]。以"活化-转化"学说为理论依据, mESC先后经历了神经诱导、后方化和腹侧化,分化为脊髓MN。其中神经诱导通过拟胚体(embryoid body, EB)步骤实现。EB是mESC在无白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)的干细胞培养液中悬浮培养,自发聚集形成的细胞团。EB包含外、中、内三胚层命运的细胞,可在一定程度上模拟体内胚胎发育过程^[20];第2~3天的EB中可检测到部分SOX1阳性的神经上皮细胞;在第5天,可检测到神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)、βIII微管蛋白(neuronal class III β-tubulin, TUJ1)双阳性的神经元。而后方化和腹侧化则分别通过添加RA和SHH激活剂实现。

神经诱导-后方化-腹侧化这一策略随后被应用 到人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)的 诱导分化中^[8]。与mESC相似,早期研究多通过使用 撤去成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF-2)的hESC培养液悬浮培养hESC,得到EB^[20];随后 应用神经分化培养基(多含N2)培养EB,可得到PAX6 阳性的神经上皮细胞,在贴壁培养条件下,神经上皮 细胞呈环状排列,被称为神经玫瑰花结构(neural rosette),类似胚胎发育过程中的神经管。早期rosette为 PAX6阳性、SOX1阴性;晚期rosette为PAX6、SOX1双 阳性^[21]。早期研究多经过EB-rosette阶段进行hESC的 神经诱导,再挑取rosette,运用RA及SHH激活剂----包括SHH、hedgehog/smoothened激动剂(hedgehog/ smoothened agonist, SAG)与PMN(purmorphamine)进 行处理,实现后方化和腹侧化,得到MN。MN在含 多种神经营养因子[包括脑源性神经营养因子(brainderived neurotrophic factor, BDNF)、胶质细胞源性 神经营养因子(glialcellline-derived neurotrophic factor, GDNF)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)等1的培养液中逐渐成熟(图3),表达成熟神经 元标志物微管相关蛋白2(microtubule associated protein 2, MAP2)、NeuN及胆碱能标志物ChAT、VAChT,并 可发放动作电位^[21-23]。也有部分研究不经过EB阶段, 而采用高密度贴壁培养的方法得到rosette^[24-25];或不 经rosette,在悬浮培养条件下进行神经诱导^[26-27]。然而, 由于人类发育过程相较小鼠而言十分缓慢,采用这一 策略的各种分化方法均耗时较长(约1~2个月),且得到 神经元的比例普遍偏低(20%~50%)[8]。

SMAD(single mothers against decapentaplegic) 信号双抑制剂的运用为hESC的神经分化带来突破 性的进展^[8]。CHAMBERS等^[28]将BMP及TGF-β抑 制剂——Noggin和SB431542联合运用于hESC的神 经诱导,发现可得到高达80%的PAX6阳性的神经前 体细胞,相比较于传统EB法效率大大提高。后亦 有研究用LDN193189、Dorsomorphine、DMH-1或





PSC: 多能干细胞; EB: 拟胚体; MN: 运动神经元; hESC: 人胚胎干细胞; FGF-2: 成纤维细胞生长因子; RA: 维甲酸; SHH: 音猬因子。 PSC: pluripotent stem cell; EB: embryoid body; MN: motor neuron; hESC: human embryonic stem cell; FGF-2: fibroblast growth factor-2; RA: retinoic acid; SHH: Sonic hedgehog.



compound C代替Noggin。SMAD信号双抑制剂可选 择性抑制中、内胚层命运,在随后的MN的体外诱 导研究中多在早期神经诱导步骤中添加。部分研究 直接在传统的EB-rosette方法基础上添加SMAD信 号双抑制剂^[29-30](图3),后期则有研究省略了EB阶段, 而直接在贴壁培养条件下添加SMAD双抑制剂进行 神经诱导^[31-33]。SMAD信号双抑制剂的运用使得诱 导分化所得的运动神经元比例提高到约50%~70%, 在此基础上,DU等^[34]将Wnt激活剂CHIR99021(简称 CHIR)运用于MN诱导,发现可进一步将运动神经元 比例提高到95%。在图4中,我们总结了已发表的 不经由NMP的脊髓运动神经元分化方法。

4 经由NMP的脊髓运动神经元分化方法

尽管SMAD双抑制剂的运用使得脊髓运动神经元体外分化的效率大大提高,但这一类方法只能将hPSC分化为后脑及脊髓前端运动神经元,表达同源盒基因家族靠3'端基因(图1),而更后方化的神经元一包括支配下肢肌肉的腰、骶段神经元则无法获得^[8]。而神经中胚层前体细胞的发现为后方化脊髓的获得打开了新的途径。在鸡、小鼠及人类胚胎中,这一类细胞存在于上胚层的后外侧(caudal lateral epiblast, CLE)、毗邻原条-原节交界区(node-streak border, NSB)^[4-6],表现为神经前体细胞标志物SOX2及中胚层前体标志物Brachury(Bra/T)双阳性,可发育为轴旁中胚层及后方化的脊髓^[35-36]。

目前已有多项研究在体外得到了神经中胚层前体细胞,发育早期Wnt信号通路的激活被认为对NMP的形成至关重要^[36]。最早的研究描述了将以FGF-2及Activin维持培养的小鼠上胚层干细胞

(epiblast stem cell, EpiSC)用CHIR处理48 h, 可得到 一小群Bra、SOX2双阳性细胞,同时大部分细胞为 Bra、叉头样转录因子A2(forkhead box transcription factor A2, FOXA2)双阳性的中胚层前体细胞^[37]。基 因表达分析证实, CHIR导致了Wnt信号通路的激活。 随后的研究将小鼠及人ESC暴露于FGF-2和CHIR, 而不用Activin处理,可得到高达80%的Bra、SOX2 双阳性细胞。其中将mESC用FGF-2处理2天可得 到上胚层样的细胞,随后添加Wnt处理1天,可得到 NMP^[38]。诱导过程的第2~3天被认为是Wnt信号响 应的窗口期^[39]。而hESC的NMP体外诱导方式则与 mESC略有不同,多采用FGF-2和CHIR联合处理3天 的方式, CHIR在诱导的第0天开始添加直至第3天[2]。 除此之外,有研究通过从第0天撤去FGF-2,在1~3天 添加FGF8b, 2~3天添加CHIR, 可在第3天得到接近 100%的NMP,并可在体外维持最多7天^[40];亦有研究 不添加FGF-2, 而运用SB431542及CHIR处理hESC, 在第4天得到了表达后方化神经标志物及中胚层标 志物的"后方前体细胞"(caudal progenitor cell)^[41]。

体外分化得到NMP可随后通过撤去Wnt及FGF, 添加RA和/或SMAD双抑制剂得到后方化的神经元, 而同时添加SHH促进腹侧化则可得到脊髓运动神 经元^[38,40,42]。Wnt信号的持续激活可促进NMP向中 胚层分化^[38]。与传统分化方法不同,经NMP途径可 得到更后方化的神经元。其中一项研究发现,Wnt、 FGF处理3天得到的NMP维持培养7天,期间HOX基 因由3'端到5'端循序表达,而在任一时间点暴露于 维甲酸,将停止这一过程并使NMP向神经命运转 化^[40]。亦有研究用Wnt、FGF及SMAD双抑制剂对 hESC处理10天得到脊髓神经前体细胞系,在培养第



EB: 拟胚体; MN: 运动神经元; MN specification: 运动神经元命运决定,包括后方化及腹侧化; MN%: MN的近似百分比; --: 文献中未报道; HOX: 运动神经元的HOX基因表达; FGF-2: 纤维母细胞生长因子2; LIF: 白血病抑制因子; BDNF: 脑源性神经营养因子; GDNF: 胶质细胞源性神经 营养因子; CNTF: 纤毛神经营养因子; IGF-1: 胰岛素样生长因子1; RA: 维甲酸; RAR: 维甲酸受体; RXR: 维甲类x受体; SHH: 音猬因子; PMN: Sonic hedgehog通路激动剂; SAG: hedgehog/smoothened激动剂; DMH1: 选择性BMP抑制剂; compound C: dorsomorphin AMP激酶抑制剂; SB43: SB431542, TGF-β抑制剂; VPA: 丙戊酸。

EB: embryoid body; MN: motor neuron; MN specification: motor neuron specification, including posteriorization and ventralization; MN%: the approximate percentage yield of MNs; –: unreported; *HOX: HOX* expression of MNs; FGF-2: fibroblast growth factor-2; LIF: leukemia inhibitory factor; BDNF: brain-derived neurotropic factor; GDNF: glial cell line-derived neurotropic factor; CNTF: ciliary neurotropic factor; IGF-1: insulin-like growth factor 1; RA: retinoic acid; RAR: retinoic acid receptor; RXR: retinoid X receptor; SHH: Sonic hedgehog; PMN: purmorphamine, Sonic hedgehog agonist; SAG: hedgehog/smoothened agonist; DMH1: selective BMP inhibitor; compound C: dorsomorphin AMP inhibitor; SB43: SB431542, TGF-β inhibitor; VPA: valproic acid.

图4 不经由NMP的脊髓运动神经元分化方法概况(根据参考文献[8]修改) Fig.4 Comparison of published spinal MN differentiation protocols without NMP stage (modified from the reference [8])

3天可检测到中胚层标志物表达短暂性上升,提示诱导第3天的细胞经过了NMP阶段;这一细胞系可在Wnt、SB431542及SHH培养条件下持续扩增,并在撤去这些信号分子后自发分化为脊髓多种类型的细胞,包括运动神经元^[43]。我们在图5中总结了已发表

的经由NMP的脊髓运动神经元分化方法。

同时,有研究比较了未经Wnt信号处理的分化 方案(图6)。0~3天仅经FGF处理的mESC在第3~5 天分别用SHH及RA/SHH处理,分别得到前脑神经 前体细胞及后脑内脏运动神经元前体细胞,而第3



NMP: 神经中胚层前体细胞; MN: 运动神经元; MN specification: 运动神经元命运决定,包括后方化及腹侧化; NMP%: NMP的近似百分比;
MN%: MN的近似百分比; -: 文献中未报道; HOX: MN/神经前体细胞的HOX基因表达; 部分研究未报道MN命运决定和(或)MN成熟步骤; FGF-2: 纤维母细胞生长因子2; FGF8b: 纤维母细胞生长因子8b; CHIR: Wnt激活剂; BDNF: 脑源性神经营养因子; GDNF: 胶质细胞源性神经营养因子; RA: 维甲酸; PMN: Sonic hedgehog通路激动剂; SAG: Hedgehog/Smoothened激动剂; SB43: SB431542, TGF-β抑制剂; LDN: BMP抑制剂。
NMP: neural mesodermal progenitor; MN: motor neuron; MN specification: motor neuron specification, including posteriorization and ventralization; NMP%: the approximate percentage yield of NMPs; MN%: the approximate percentage yield of NMPs; MN%: the approximate percentage yield of MNs; -: unreported; HOX: HOX expression of MNs/ neural progenitor cell; some protocols do not contain MN specification and (or) MN maturation; FGF-2: fibroblast growth factor-2; FGF8b: fibroblast growth factor 8b; CHIR: Wnt agonist; BDNF: brain-derived neurotropic factor; GDNF: glial cell line-derived neurotropic factor; RA: retinoic acid; PMN: purmorphamine, Sonic hedgehog agonist; SAG: hedgehog/smoothened agonist; SB431542, TGF-β inhibitor; LDN: BMP inhibitor. **图5** 经由NMP的脊髓运动神经元分化方法概况(根据参考文献[2,8]修改)

Fig.5 Comparison of published spinal MN differentiation protocols via NMP stage (modified from the references [2,8])

天经Wnt信号处理后的ESC暴露于RA/SHH则得到 Olig2阳性脊髓运动神经元前体,3组细胞分别表达 orthodenticle人同源盒基因1(orthodenticle homeobox 1,OTX1)、OTX2/HOXA2、HOXB2、v-maf肌腱膜 纤维肉瘤癌基因同源物B(v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B, MAFB)、Epha、 Ephb/HOXB6、HOXB8、HOXC6、HOXC8、 HOXC9^[38]。RNA-seq数据提示,第3天经Wnt处理的 细胞表现出特征性NMP相关基因上调;且主成分分 析提示,前脑与后脑神经发育轨迹相近,而脊髓运动 神经元和经持续Wnt处理得到的中胚层前体具有更 相近的发育轨迹,在早期就与前两者分叉^[38]。后期 研究采用同样的分化策略,通过ATAC-seq确定了神经命运相关位点和位置信息相关位点,发现后方化相关位点与尾型同源盒转录因子(caudal related homeodomain transcription, CDX)相关,且后方化命运的确立早于神经命运的确立^[9]。

5 脊髓前角运动神经元定向分化系统在 疾病建模的应用

目前,脊髓前角运动神经元定向分化系统多用 于ALS的体外模型建立。至今为止,对ALS发病机 制的认识主要来自于尸体解剖及多种ALS疾病模型, 包括酵母、线虫、果蝇、斑马鱼等,其中最常用的



ESCs: 胚胎干细胞; bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子; SHH: 音猬因子; RA: 维甲酸; Wnt: Wnt信号通路激活剂。 ESCs: embryonic stem cells; bFGF: basic fibroblast growth factor; SHH: Sonic hedgehog; RA: retinoic acid; Wnt: Wnt agonist.

图6 ESCs向神经前体细胞及中胚层分化流程图(根据参考文献[9]修改)

Fig.6 Schematic of ESCs differentiated to neural progenitors and mesoderm (modified from the reference [9])

是携带家族性ALS致病突变的小鼠模型,比如超氧化物歧化酶SODI突变小鼠。然而,基于这些模型所发现的治疗策略在临床试验中均效果不佳,这可能与动物模型与人类存在种属差异相关^[44]。而应用患者来源的iPSC,将其分化为脊髓运动神经元(induced motor neuron, iMN),则不存在种属差异问题,可体外再现疾病表型,模拟遗传学变化和病理过程。这些患者来源的iMN可用于研究发病机制,筛选安全有效的药物。

ALS多为散发性(sALS),约10%表现为家族性 (fALS), fALS除平均发病年龄早于 sALS外, 临床表 现与sALS并无差异,因此认为其与sALS有共同的 致病机制^[8]。2008年, KEVIN EGGAN实验室^[27]首 次将fALS患者来源的iPS细胞在体外分化得到脊髓 运动神经元。随后的研究多集中在数种fALS常见 突变上,包括SOD1、反式激活反应-DNA结合蛋白 (trasactive-response DNA binding protein, TARDBP), 肉瘤融合蛋白(fused in sarcoma, FUS)、9号染色体 开放阅读框 72(chromosome 9 open reading frame 72, C9ORF72)基因等^[45]。亦有研究将sALS患者的iPSC 在体外分化得到脊髓运动神经元,其中20%患者表现 为TDP-43(transactive response DNA-binding protein of 43 kDa,为TARDBP基因编码)蛋白异常聚集,且在其 中一名患者尸解标本中发现了同样的病理改变[46]。 ALS患者来源的iMN表现为神经元过度兴奋、细胞 早期凋亡、神经丝长度减少、异常蛋白聚集等[45],基 于此,有多项研究聚焦于药物筛选。WAINGER等^[47] 发现, SOD1 A4V突变的fALS患者来源的iMN延迟整

流钾通道电流减少,运用Retigabine可激活Kv7通道, 降低神经元兴奋性并可延长神经元生存。SHI等^[48] 发现,用化合物YM201636处理*C9ORF*突变患者来源 的iMN可维持其生存。FUJIMORI等^[49]则基于fALS 患者iMN建立了神经丝长度、异常蛋白聚集、细胞 凋亡染色的多维度表型评估系统,并以此从sALS患 者iMN中筛选出Ropinirole作为潜在的治疗药物。

除ALS外,脊髓前角运动神经元定向分化系统 还被运用于SMA、腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth, CMT)等遗传性神经病的体外建模。其中 SMA是一类运动神经元生存(survival motor neuron, SMN)基因突变致SMN蛋白减少,从而导致脊髓前角 运动神经元变性的疾病,属常染色体隐性遗传病。 2009年,EBERT等^[50]将SMA患儿来源的iPSC在体外 分化为MN,并发现患者来源的iMN表现为运动神 经元选择性死亡和SMN蛋白表达减少,用己知能增 加SMN蛋白表达的药物进行处理,能够在患者iMN 中检测到SMN蛋白的表达增加。随后又有研究在 SMA患者iMN中修复SMN突变或外源性表达SMN蛋 白,均可缓解疾病表型^[51]。CMT是一类十分常见的 遗传性周围神经病,其中CMT2型又称轴索性CMT, 选择性累及周围神经——包括运动和感觉神经的轴 索,近年来亦有研究应用CMT患者来源的iMN进行 体外建模[52-53]。

6 脊髓前角运动神经元定向分化系统在 细胞替代治疗中的应用

iMN被运用于细胞替代治疗的研究,目前主要

聚焦于ALS和脊髓损伤两方面。ALS是一类特异性 累及大脑皮层、脑干及脊髓运动神经元的神经退行 性疾病,表现为进行性肌无力和肌萎缩,患者多在起 病3~5年内因呼吸衰竭去世。目前,ALS的致病机制 尚不完全清楚, 且尚无有效治疗药物。美国FDA批 准的药物利鲁唑(Riluzole)仅能延长其生存期3个月, 另一药物依达拉奉(Edaravone)则仅能在短期内改善 部分患者的症状。多种药物在 ALS动物模型上表现 出一定疗效,但在临床试验中均效果不佳,提示药物 在逆转神经元进行性死亡中可能效果有限,而细胞 替代则为ALS治疗提供了新思路。多项研究发现,多 能干细胞来源的MN可在体外与肌肉形成神经肌肉 接头;将iMN前体移植到ALS小鼠模型或运动神经元 损伤小鼠脊髓,可在脊髓前角发现移植细胞存活,且 其轴突经前根延伸至肌肉,并可与所支配肌肉形成 神经肌肉接头[54-55],使瘫痪小鼠运动功能改善[56]。尽 管在小鼠模型上展现出了一定的治疗前景,脊髓前 角运动神经元定向分化系统在ALS细胞替代治疗中 的应用亟待解决以下问题: (1)细胞移植途径; (2)需确 认移植的iMN是否能与其上游皮质脊髓束及下游肌 肉形成有功能的突触联系;(3)需在脊髓前后轴不同 位置形成不同iMN亚群:包括PMC、LMC、MMC、 HMC, 实现对不同肌群包括膈肌、四肢肌、轴旁肌、 体壁肌的控制;(4)需确认移植iMN是否对皮质脊髓 束——另一类ALS受累的细胞类型的功能亦有改善 作用[57]。

脊髓损伤多由外伤引起,表现为在损害的相应 节段出现各种运动、感觉和括约肌功能障碍,肌张 力异常及病理反射等相应改变。其中脊髓横贯性损 伤会导致在损伤平面以下,肢体的感觉和运动功能 全部丧失。对于这类患者,药物和康复治疗的作用 均十分有限,尤其是运动功能的康复尤为困难。多 项关于脊髓损伤修复的研究发现,皮质脊髓束的再 生相较于脊髓其他传导束——包括网状脊髓束、中 缝脊髓束、本体脊髓束等而言更为困难[58-59]。而皮 质脊髓束直接支配脊髓前角运动神经元,其功能与 自主运动直接相关。2016年的一项研究发现,在脊 髓横断损伤小鼠模型中移植胎鼠脊髓组织可促使皮 质脊髓束再生,与移植物形成突触联系,并可改善小 鼠运动功能;而移植胎鼠后脑或端脑组织则不能达 到理想的修复效果,这提示移植物与损伤部位前后 轴位置的同源性至关重要^[60]。hPSC向脊髓运动神经

的定向分化系统可提供大量人源性的运动神经元或神经前体细胞,或可用于脊髓损伤患者的细胞替代治疗,但传统分化方法无法得到后方化的脊髓,因此在未来应用上具有局限性。2018年,KUMAMARU等^[61]由hESC经由NMP阶段成功建成了脊髓前体细胞系,该细胞系携带后方化位置信息,可在体外无限增殖,并可在自发分化条件下分化为脊髓多种类型细胞,包括运动神经元;将该细胞系移植到脊髓损伤大鼠损伤部位可促进皮质脊髓束再生,并带来功能康复,具有广阔的应用前景。2019年2月,日本厚生劳动省专家组批准全球第一个利用iPSC来源的神经干细胞治疗脊髓损伤的临床试验,或可为脊髓损伤的治疗带来新的希望。

7 总结和展望

自2002年WICHTERLE等^[19]首次将mESC分化 为MN至今, hPSC向MN的体外诱导分化在分化时间 和效率上取得了巨大进展,分化时间从早期大于40 天缩短至最快14天; MN纯度由20%~50%提高到95%; 除此之外,近年来将对NMP的认识运用到MN分化系 统中,使得人们可以在体外得到更后方化的、支配 下肢肌肉的MN,而不仅仅局限于脊髓前端。这些进 展不仅加深了我们对中枢神经系统发育分子机制的 认识,也为运动神经元病等多种疾病的体外建模及 细胞替代治疗提供了可能。

除此之外,从运动神经元亚型上看,目前的分 化方法大多得到的是包含多种运动神经元亚型如 LMC、MMC等的混合细胞群,分化到特定亚型的 方法尚缺乏。而运动神经元病等多种疾病所累及的 MN亚型常具有偏好性,故更为精确的体外分化系统, 无论对疾病机制探索还是对细胞替代治疗都具有重 要意义。近年来研究表明,MN亚型的分化依赖于 HOX基因的调控^[16],而经NMP途径的MN分化方法可 弥补传统方法的不足,使得在体外获得特定HOX节 段的MN成为可能^[40]。将经NMP阶段的MN分化系统 运用于MN亚型分化的探索,将有望揭示MN亚型分 化的分子机制,实现特定脊髓节段、特定亚型的MN 分化。

参考文献 (References)

 NIEUWKOOP P D, NIGTEVECHT G V. Neural activation and transformation in explants of competent ectoderm under the influence of fragments of anterior notochord in urodeles [J]. J Embryol Exp Morphol, 1954, 2(3): 175-93.

- [2] HENRIQUE D, ABRANCHES E, VERRIER L, et al. Neuromesodermal progenitors and the making of the spinal cord [J]. Development, 2015, 142(17): 2864-75.
- [3] TZOUANACOU E, WEGENER A, WYMEERSCH F J, et al. Redefining the progression of lineage segregations during mammalian embryogenesis by clonal analysis [J]. Dev Cell, 2009, 17(3): 365-76.
- [4] BROWN J M, STOREY K G. A region of the vertebrate neural plate in which neighbouring cells can adopt neural or epidermal fates [J]. Curr Biol, 2000, 10(14): 869-72.
- [5] IIMURA T, POURQUIE O. Collinear activation of Hoxb genes during gastrulation is linked to mesoderm cell ingression [J]. Nature, 2006, 442(7102): 568-71.
- [6] CAMBRAY N, WILSON V. Two distinct sources for a population of maturing axial progenitors [J]. Development, 2007, 134(15): 2829-40.
- [7] OLIVERA-MARTINEZ I, HARADA H, HALLEY P A, et al. Loss of FGF-dependent mesoderm identity and rise of endogenous retinoid signalling determine cessation of body axis elongation [J]. PLoS Biol, 2012, 10(10): e1001415.
- [8] SANCES S, BRUIJN L I, CHANDRAN S, et al. Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells [J]. Nat Neurosci, 2016, 19(4): 542-53.
- [9] METZIS V, STEINHAUSER S, PAKANAVICIUS E, et al. Nervous system regionalization entails axial allocation before neural differentiation [J]. Cell, 2018, 175(4): 1105-18.
- [10] ALAYNICK W A, JESSELL T M, PFAFF S L. SnapShot: spinal cord development [J]. Cell, 2011, 146(1): 178.
- [11] BRISCOE J, PIERANI A, JESSELL T M, et al. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube [J]. Cell, 2000, 101(4): 435-45.
- [12] JESSELL T M. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes [J]. Nat Rev Genet, 2000, 1(1): 20-9.
- [13] PRASAD A, HOLLYDAY M. Development and migration of avian sympathetic preganglionic neurons [J]. J Comp Neurol, 1991, 307(2): 237-58.
- [14] PHILIPPIDOU P, DASEN J S. Hox genes: choreographers in neural development, architects of circuit organization [J]. Neuron, 2013, 80(1): 12-34.
- [15] FRANCIUS C, CLOTMAN F. Generating spinal motor neuron diversity: a long quest for neuronal identity [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(5): 813-29.
- [16] DASEN J S, TICE B C, BRENNER-MORTON S, et al. A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity [J]. Cell, 2005, 123(3): 477-91.
- [17] DAVIS-DUSENBERY B N, WILLIAMS L A, KLIM J R, et al. How to make spinal motor neurons [J]. Development, 2014, 141(3): 491-501.
- [18] AMIN N D, BAI G, KLUG J R, et al. Loss of motoneuronspecific microRNA-218 causes systemic neuromuscular failure [J]. Science, 2015, 350(6267): 1525-9.
- [19] WICHTERLE H, LIEBERAM I, PORTER J A, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons [J]. Cell, 2002, 110(3): 385-97.
- [20] ITSKOVITZ-ELDOR J, SCHULDINER M, KARSENTI D, et

al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers [J]. Mol Med, 2000, 6(2): 88-95.

- [21] LI X, DU Z, ZARNOWSKA E D, et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(2): 215-21.
- [22] LIM U M, SIDHU K S, TUCH B E. Derivation of motor neurons from three clonal human embryonic stem cell lines [J]. Curr Neurovasc Res, 2006, 3(4): 281-8.
- [23] KARUMBAYARAM S, NOVITCH B G, PATTERSON M, et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons [J]. Stem Cells, 2009, 27(4): 806-11.
- [24] SHIN S, DALTON S, STICE S L. Human motor neuron differentiation from human embryonic stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2005, 14(3): 266-9.
- [25] LEE H, SHAMY G A, ELKABETZ Y, et al. Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons [J]. Stem Cells, 2007, 25(8): 1931-9.
- [26] HU B, ZHANG S. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells [J]. Nat Protoc, 2009, 4(9): 1295-304.
- [27] DIMOS J T, RODOLFA K T, NIAKAN K K, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons [J]. Science, 2008, 321(5893): 1218-21.
- [28] CHAMBERS S M, FASANO C A, PAPAPETROU E P, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling [J]. Nat Biotechno, 2009, 27(3): 275-80.
- [29] PATANI R, HOLLINS A J, WISHART T M, et al. Retinoid-independent motor neurogenesis from human embryonic stem cells reveals a medial columnar ground state [J]. Nat Commun, 2011, 2(1): 214.
- [30] AMOROSO M W, CROFT G F, WILLIAMS D J, et al. Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells [J]. J Neurosci, 2013, 33(2): 574-86.
- [31] KISKINIS E, SANDOE J, WILLIAMS L A, et al. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1 [J]. Cell Stem Cell, 2014, 14(6): 781-95.
- [32] QU Q, LI D, LOUIS K R, et al. High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1 [J]. Nat Commun, 2014, 5(1): 3449.
- [33] DEVLIN A C, BURR K, BOROOAH S, et al. Human iPSCderived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability [J]. Nat Commun, 2015, 6: 5999.
- [34] Du ZW, CHEN H, LIU H, et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells [J]. Nat Commun, 2015, 6: 6626.
- [35] IMUTA Y, KIYONARI H, JANG C W, et al. Generation of knock-in mice that express nuclear enhanced green fluorescent protein and tamoxifen-inducible Cre recombinase in the notochord from Foxa2 and T loci [J]. Genesis, 2013, 51(3): 210-8.
- [36] GARRIOCK R J, CHALAMALASETTY R B, KENNEDY M W, et al. Lineage tracing of neuromesodermal progenitors reveals

novel Wnt-dependent roles in trunk progenitor cell maintenance and differentiation [J]. Development, 2015, 142(9): 1628-38.

- [37] TSAKIRIDIS A, HUANG Y, BLIN G, et al. Distinct Wnt-driven primitive streak-like populations reflect *in vivo* lineage precursors [J]. Development, 2014, 141(6): 1209-21.
- [38] GOUTI M, TSAKIRIDIS A, WYMEERSCH F J, et al. *In vitro* generation of neuromesodermal progenitors reveals distinct roles for wnt signalling in the specification of spinal cord and paraxial mesoderm identity [J]. PLoS Biol, 2014, 12(8): e1001937.
- [39] TURNER D A, HAYWARD P C, BAILLIE-JOHNSON P, et al. Wnt/beta-catenin and FGF signalling direct the specification and maintenance of a neuromesodermal axial progenitor in ensembles of mouse embryonic stem cells [J]. Development, 2014, 141(22): 4243-53.
- [40] LIPPMANN E S, WILLIAMS C E, RUHL D A, et al. Deterministic HOX patterning in human pluripotent stem cell-derived neuroectoderm [J]. Stem Cell Rep, 2015, 4(4): 632-44.
- [41] DENHAM M, HASEGAWA K, MENHENIOTT T, et al. Multipotent caudal neural progenitors derived from human pluripotent stem cells that give rise to lineages of the central and peripheral nervous system [J]. Stem Cells, 2015, 33(6): 1759-70.
- [42] VERRIER L, DAVIDSON L, GIERLINSKI M, et al. Neural differentiation, selection and transcriptomic profiling of human neuromesodermal progenitor-like cells *in vitro* [J]. Development, 2018, 145(16): dev166215.
- [43] KUMAMARU H, KADOYA K, ADLER A F, et al. Generation and post-injury integration of human spinal cord neural stem cells [J]. Nat Methods, 2018, 15(9): 723-31.
- [44] VAN DAMME P, ROBBERECHT W, VAN DEN BOSCH L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities [J]. Dis Model Mech, 2017, 10(5): 537-49.
- [45] GUO W, FUMAGALLI L, PRIOR R, et al. Current advances and limitations in modeling ALS/FTD in a dish using induced pluripotent stem cells [J]. Front Neurosci, 2017, 11: 671.
- [46] BURKHARDT M F, MARTINEZ F J, WRIGHT S, et al. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells [J]. Mol Cell Neurosci, 2013, 56: 355-64.
- [47] WAINGER B J, KISKINIS E, MELLIN C, et al. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patientderived motor neurons [J]. Cell Rep, 2014, 7(1): 1-11.
- [48] SHI Y, LIN S, STAATS K A, et al. Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons [J]. Nat Med, 2018, 24(3): 313-25.

- [49] FUJIMORI K, ISHIKAWA M, OTOMO A, et al. Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent [J]. Nat Med, 2018, 24(10): 1579-89.
- [50] EBERT A D, YU J, ROSE F J, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient [J]. Nature, 2009, 457(7227): 277-80.
- [51] CHANG T, ZHENG W, TSARK W, et al. Brief report: phenotypic rescue of induced pluripotent stem cell-derived motoneurons of a spinal muscular atrophy patient [J]. Stem Cells, 2011, 29(12): 2090-3.
- [52] XU J, FU Y, XIA W, et al. Generation of induced pluripotent stem cell line, ZJUCHi002-A, from Charcot-Marie-Tooth disease type 2A (CMT2A) patient with a mutation of c.752C>T in MFN2 [J]. Stem Cell Res, 2019, 36: 101411.
- [53] MARTI S, LEON M, ORELLANA C, et al. Generation of a disease-specific iPS cell line derived from a patient with Charcot-Marie-Tooth type 2K lacking functional GDAP1 gene [J]. Stem Cell Res, 2017, 18: 1-4.
- [54] HARPER J M, KRISHNAN C, DARMAN J S, et al. Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(18): 7123-8.
- [55] MILES G B, YOHN D C, WICHTERLE H, et al. Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells [J]. J Neurosci, 2004, 24(36): 7848-58.
- [56] DESHPANDE D M, KIM Y S, MARTINEZ T, et al. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells [J]. Ann Neurol, 2006, 60(1): 32-44.
- [57] LINDVALL O, KOKAIA Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders—time for clinical translation [J]? J Clin Invest, 2010, 120(1): 29-40.
- [58] LIU K, TEDESCHI A, PARK K K, et al. Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration [J]. Annu Rev Neurosci, 2011, 34: 131-52.
- [59] TUSZYNSKI M H, STEWARD O. Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS [J]. Neuron, 2012, 74(5): 777-91.
- [60] KADOYA K, LU P, NGUYEN K, et al. Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration [J]. Nat Med, 2016, 22(5): 479-87.
- [61] KUMAMARU H, KADOYA K, ADLER A F, et al. Generation and post-injury integration of human spinal cord neural stem cells [J]. Nat Methods, 2018, 15(9): 723-31.