

# 小鼠不同脑区星形胶质细胞小分子诱导转分化和基因表达差异的研究

曾鹏 花秋红 石昌杰 张儒\*

(上海市信号转导与疾病研究重点实验室, 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

**摘要** 该文旨在比较小分子化合物诱导小鼠不同脑区星形胶质细胞向神经元转分化的特性, 并利用转录组测序技术分析小鼠不同脑区星形胶质细胞的基因表达差异。以新生小鼠皮层和海马的星形胶质细胞作为起始细胞, 通过小分子化合物VCR诱导其向神经元转分化, 利用免疫荧光染色检测转分化过程中细胞形态的变化以及神经元的比例, 通过转录组测序比较两种星形胶质细胞的基因表达差异, 并对差异基因进行荧光定量PCR验证及GO富集分析。结果表明, 皮层星形胶质细胞经VCR诱导转分化为神经元的能力要显著优于海马星形胶质细胞; 转录组测序发现, 两种星形胶质细胞有12 658个基因存在差异表达, GO分析结果表明, 在皮层星形胶质细胞中高表达的基因更多地参与细胞分裂的过程, 推测差异显著基因*GAD2*、*EYA2*、*GSX2*、*INSM1*以及*GNG3*是与转分化相关的基因。该研究对星形胶质细胞向神经元转分化的机制研究具有借鉴意义。

**关键词** 星形胶质细胞; 小分子; 转分化; 转录组测序

## The Differences of Transdifferentiation Induced by Small Molecules and Gene Expression between Mouse Astrocytes from Different Brain Regions

ZENG Peng, HUA Qiuhong, SHI Changjie, ZHANG Ru\*

(Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

**Abstract** The current study aimed to compare the neuronal transdifferentiation ability induced by small molecules of astrocytes derived from different mouse brain regions, and analyze the differentially expressed genes in these astrocytes by transcriptome sequencing. Astrocytes isolated from the cortex and hippocampus of neonatal mice were induced into neuronal transdifferentiation by a small molecule cocktail, VCR. The morphological changes of cells and ratio of neurons in total cells in the process of transdifferentiation were investigated by immunofluorescence staining. Then transcriptome sequencing was carried out to compare the differences in gene expression between the two types of astrocytes. The sequencing results were further verified by qPCR and analyzed by GO analysis. The results showed that the transdifferentiation efficiency of cortical astrocytes was significantly higher than that of hippocampal astrocytes. The transcriptome sequencing results revealed that 12 658 genes were differentially expressed between the two kinds of astrocytes. GO analysis showed that genes highly expressed in cortical astrocytes were mainly involved in the process of cell division. It is speculated that some key genes, such as *GAD2*,

收稿日期: 2020-06-05 接受日期: 2020-07-17

科技部科研项目(批准号: 2017YFA0104002)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-65986852, E-mail: ru.zhang@tongji.edu.cn

Received: June 5, 2020 Accepted: July 17, 2020

This work was supported by the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2017YFA0104002)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-65986852, E-mail: ru.zhang@tongji.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5331>

*EYA2*, *GSX2*, *INSM1* and *GNG3*, significantly highly expressed in cortical astrocytes might be related to transdifferentiation. This study provides a reference for further mechanism study of regional specific astrocytes-to-neuron conversion.

**Keywords** astrocyte; small molecule; transdifferentiation; transcriptome sequencing

随着干细胞与转分化技术的发展, 细胞治疗与再生医学成为解决人类重大医学疾病的新手段。其中转分化技术由于不需要经过多能干细胞阶段而缩短了诱导时间, 并降低了致瘤的风险, 能够较高效地获得所需的细胞。因此, 越来越多科学家致力于转分化及其机理研究, 以期将细胞治疗转化到临床应用。

最近已有研究将其他类型体细胞转分化为功能性神经元以治疗神经退行性疾病<sup>[1-3]</sup>。科学家先后实现了用多个转录因子或者单个转录因子将成纤维细胞、肝细胞和星形胶质细胞等多种细胞转分化为功能性的神经元<sup>[4-7]</sup>。相较于通过基因操作过表达转录因子的方法诱导转分化, 小分子化合物诱导转分化的方式具有更高的安全性和更好的临床应用前景<sup>[8]</sup>, 同时, 小分子化合物易于合成与保存且可精确控制给药剂量和时间, 使得其在转分化的应用上具有巨大优势, 因此, 近些年也有很多研究开始使用小分子化合物诱导体细胞向神经元转分化<sup>[9-10]</sup>。同时, 神经元转分化的起始细胞也至关重要, 星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的胶质细胞, 与神经元谱系接近, 因此, 相对于成纤维细胞等成体细胞, 星形胶质细胞更适用于用作神经元转分化的起始细胞, 但是星形胶质细胞是一类时空异质性的细胞, 不同脑区不同发育阶段的星形胶质细胞在形态、功能和基因表达等方面都存在着差异<sup>[11-13]</sup>。因此, 不同来源的星形胶质细胞被诱导转分化为神经元的表现可能会存在着差异。本研究通过用小分子化合物VCR(组蛋白去乙酰化酶抑制剂VPA、GSK-3激酶抑制剂CHIR99021和TGF- $\beta$ 信号通路抑制剂Repsox)诱导新生小鼠皮层和海马区的星形胶质细胞转分化为神经元, 通过观察两种胶质细胞转分化过程中神经元形态和数目变化, 并结合转录组测序比较两种细胞的基因表达差异, 分析可能影响星形胶质细胞转分化的基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 C57BL/6小鼠购自上海斯莱克实验

动物有限责任公司, 已通过同济大学实验动物中心伦理审批(伦理号: TJAB04120101)。于同济大学实验动物中心无特定病原体级(specific-pathogen-free, SPF)条件下饲养。

1.1.2 主要试剂 细胞培养所用基础培养基及添加物购自Gibco公司; 细胞培养所使用的化合物VPA购自Calbiochem公司; CHIR99021购自Axon公司; Repsox购自BioVision公司; Rabbit-anti-DCX(doublecortin)购自Abcam公司; Rabbit-anti-Tuj1( $\beta$ -tubulin III)购自Covance公司; Rabbit-anti-GFAP(glial fibrillary acidic protein)购自DAKO公司; Mouse-anti-Nestin购自Millipore公司; 转录组测序由北京诺禾致源有限公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 星形胶质细胞的分离和培养 新生小鼠皮层星形胶质细胞的分离和培养参考之前文献报道<sup>[14]</sup>。新生24 h小鼠皮层及海马星形胶质细胞取自出生24 h内的小鼠, 取出大脑皮层和海马组织后, 用0.25%胰酶于37 °C条件下消化25 min至30 min, 每隔10 min摇晃一次。用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培养基终止胰酶消化后, DNase I于37 °C消化5 min至10 min。消化后的细胞被吹散为单细胞, 然后用40  $\mu$ m滤膜过滤。离心收集细胞(300  $\times$ g, 5 min), 用星形胶质细胞培养基重悬。培养1周左右, 将少突胶质细胞及其前体细胞去除, 用胰酶消化收集细胞后冻存于液氮中。

1.2.2 星形胶质细胞的诱导转分化 细胞复苏培养3天左右待细胞长满后, 经0.05%胰酶消化后用星形胶质细胞培养基(astrocyte medium, AM)重悬, 种入多聚赖氨酸(poly-D-lysine, PDL)包被的细胞爬片的24孔板中, 在37 °C培养箱中培养过夜(day 0), 换成添加了VCR的诱导培养基(induction medium, IM), 每4天更换一次培养基, 从第8天开始换成成熟维持培养基(maintain medium, MM), 每4天更换一次培养基。其中星形胶质细胞培养基组分为: 基础培养液DMEM/F12、10% FBS、1 $\times$  B27、10 ng/mL bFGF、10 ng/mL EGF。VCR诱导培养液组分为: 基

基础培养液 DMEM/F12、 $1 \times N2$ 、 $1 \times B27$ 、 $20 \text{ ng/mL}$  BDNF、 $20 \text{ ng/mL}$  GDNF、 $3 \text{ mmol/L}$  VPA、 $3 \text{ } \mu\text{mol/L}$  CHIR99021、 $1 \text{ } \mu\text{mol/L}$  Repsox。维持培养基组分为: 基础培养液 DMEM/F12、 $1 \times N2$ 、 $1 \times B27$ 、 $10 \text{ ng/mL}$  bFGF、 $20 \text{ ng/mL}$  BDNF、 $20 \text{ ng/mL}$  GDNF、 $400 \text{ ng/mL}$  shh、 $100 \text{ ng/mL}$  FGF8、 $20 \text{ } \mu\text{mol/L}$  抗坏血酸。

**1.2.3 免疫荧光染色** 待细胞培养至相应的时间点, 将细胞爬片用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 室温固定 15 min, 用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤三次, 用 2% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 和 0.3% Triton X-100 室温通透封闭 1 h, 一抗  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  孵育过夜。第二天, PBS 洗涤三次后, 二抗室温孵育 1 h, 再用 PBS 洗涤三次后封片。在倒置荧光显微镜 (Olympus IX71) 下采集图像数据, 用 Image Pro pPlus (version 6.0.0.260)、Adobe Photoshop CS6 (13.0 x64 版) 和 Adobe Illustrator CS6 (version 16.0.0 64-bit) 等软件对图像进行处理和统计。其中, 抗体使用浓度如下: Rabbit-anti-DCX (ab18723, 1:200)、Rabbit-anti-Tuj1 (PRB-435P, 1:1 000)、Rabbit-anti-GFAP (Z0334, 1:500)、Mouse-anti-Nestin (MAB353, 1:200)。

**1.2.4 荧光定量 PCR** 用荧光定量 PCR 检测 mRNA 的表达水平, 以 mRNA 反转录而来的 cDNA 为 PCR 模板, 采用标准曲线法进行表达水平的计算, 以小鼠 *Actin* 作为内参基因。qPCR 反应条件为:  $94 \text{ } ^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $94 \text{ } ^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $60 \text{ } ^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72 \text{ } ^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 45 个循环;  $94 \text{ } ^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $60 \text{ } ^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72 \text{ } ^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 1 个循环 (生成溶解曲线)。引物序列如下, M- $\beta$ -actin-F: 5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3'; M- $\beta$ -actin-R: 5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-3'。M-GAD2-F: 5'-GCG TTC ACA TCA GAG CAT AGT CA-3'; M-GAD2-R: 5'-CCA TAC ACG GTG GTT CCA GC-3'。M-EYA2-F: 5'-TTC CGC TAC CGT CGT GTG A-3'; M-EYA2-R: 5'-GAG TTG ATG AGA TTG AGG GCT TT-3'。M-GSX2-F: 5'-AAT GGC AAA AGG ATG AGG ACA-3'; M-GSX2-R: 5'-TGC TTC TCT GAC AGG TTT AGG TAT G-3'。M-INSM1-F: 5'-ACA TCC TGG CTT TCT ACG CG-3'; M-INSM1-R: 5'-GGA TCA CCT GTC TAT TCT CAG ACG-3'。M-GNG3-F: 5'-ATG AGT ATT GGT CAA GCA CGC A-3'; M-GNG3-R: 5'-GAA GGG GTT CTC GGA AGT GG-3'。

**1.2.5 统计** 所有实验统计数据以均数  $\pm$  标准误差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 并采用 GraphPad Prism 5.0 软件对数据进行统计分析, 两组独立实验数据之间的比较采用 Student's *t* 检验 ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  表示具有显著性差异)。

## 2 结果

### 2.1 星形胶质细胞分离培养及其鉴定

我们按照已报道的方法分离了皮层和海马的星形胶质细胞<sup>[14]</sup>, 将冻存后复苏的 P2 代星形胶质细胞作为诱导转分化的起始细胞。起始细胞的免疫荧光染色 (图 1A) 显示, 97% 以上皮层 (图 1B) 和海马 (图 1C) 的细胞表达星形胶质细胞标志物 GFAP, 但不表达神经前体细胞标志物 Nestin 以及神经元标志物 Tuj1, Western blot 结果也显示, GFAP 在皮层和海马星形胶质细胞中特异表达, 而 Nestin 和 Tuj1 在两种细胞中不表达。作为对照, Nestin 在神经前体细胞 (neural progenitor cell, NPC) 中高表达, 而 Tuj1 仅在转化诱导后的含有神经元的混合细胞 (converted cells) 中表达, 同时由于转化而来的细胞样品中仍含有未转分化的星形胶质细胞, 因而在 converted cells 组中也检测到了 GFAP 的表达 (图 1D)。以上结果说明, 分离获得的原代细胞无神经前体细胞和神经元污染, 是高纯度星形胶质细胞, 可用于后续转分化实验。

### 2.2 皮层星形胶质细胞比海马星形胶质细胞更易于被诱导转分化

参考先前的研究<sup>[15]</sup>, 我们采用小分子化合物组合 VCR 诱导小鼠皮层和海马星形胶质细胞向神经元转分化, 该体系转分化流程如图 2A 所示, P2 代星形胶质细胞在星形胶质细胞培养基 (AM) 中过夜贴壁后, 转为用含 VCR 的诱导培养基 (IM) 诱导 8 天, 然后换成含 FGF8、SHH 和 Ascorbic acid 的维持培养基 (MM) 继续培养。在 VCR 处理的过程中, 皮层和海马星形胶质细胞形态都发生了明显改变, 细胞从初始的扁平状逐渐变为细长状, 同时也伴随着细胞的死亡。随着在维持培养液中继续培养, 部分细胞开始呈现出类似神经元两极的形态。我们进一步用免疫荧光染色技术检测上述细胞中神经元标志物的表达。皮层星形胶质细胞诱导 16 天后, 神经元特异性标志物 DCX 染色阳性细胞的比例为 2% 左右, Tuj1 染色阳性细胞的比例为 2.8% 左右, 而海马的星形胶质细胞诱导 16 天后几乎检测不到 DCX 和 Tuj1 的表达。诱导

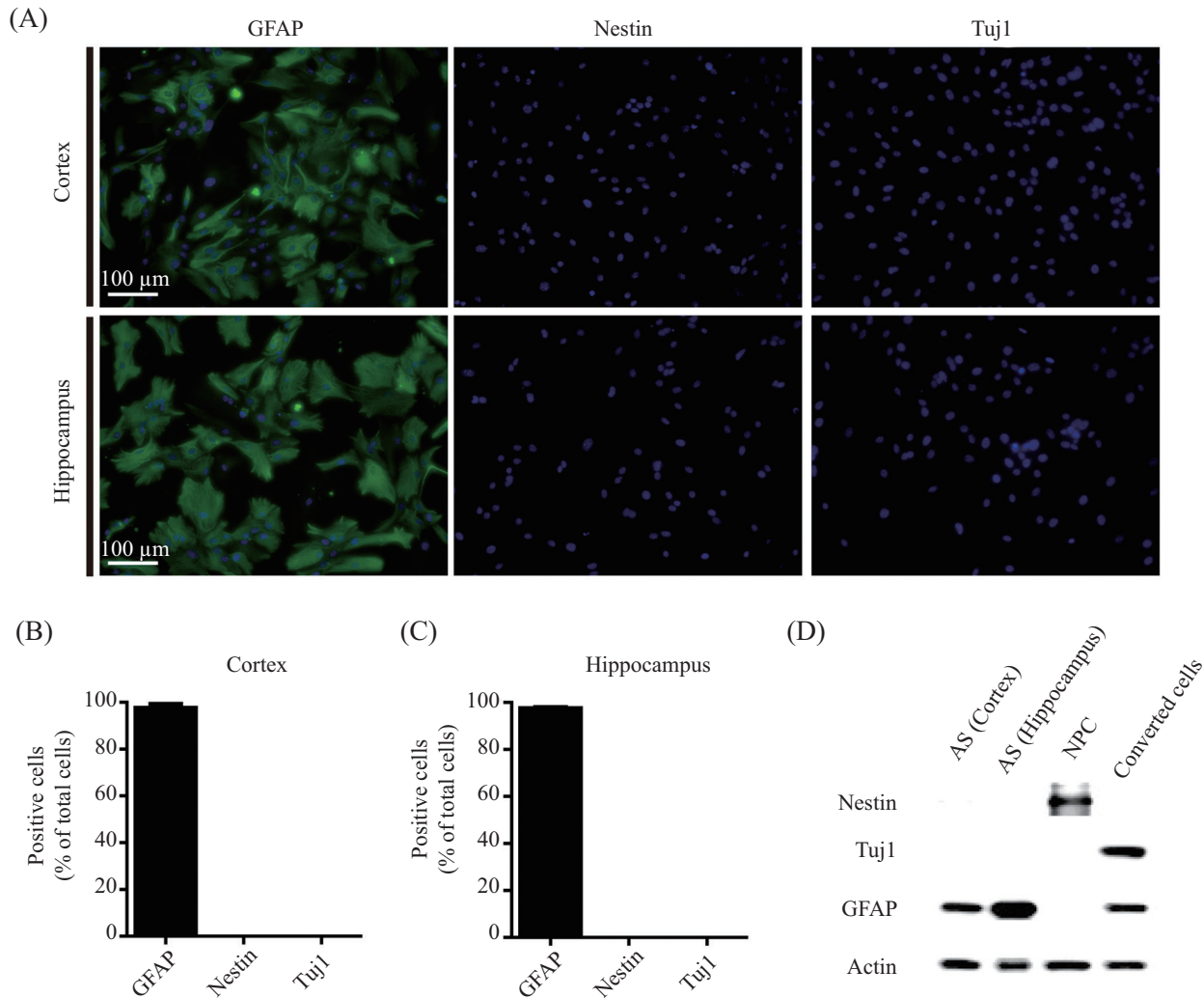


24天后,可以看到皮层星形胶质细胞组中出现形态更为成熟的神经元,免疫荧光染色结果显示,皮层星形胶质细胞组中有2.7%左右DCX阳性的细胞以及4.5%左右的Tuj1阳性的细胞,海马星形胶质细胞诱导24天后仅能检测到极少量的DCX和Tuj1阳性的细胞(图2B~图2D)。结果说明,星形胶质细胞能被VCR诱导转分化,但是不同部位星形胶质细胞VCR诱导转分化的能力存在差异,其中皮层星形胶质细胞相

比海马星形胶质细胞更易于被诱导为神经元。

### 2.3 皮层和海马星形胶质细胞转录组测序比较

为了探究可能导致皮层和海马星形胶质细胞在VCR诱导转分化过程中存在差异的原因,我们对小鼠皮层和海马的星形胶质细胞进行了转录组测序。测序结果显示,皮层和海马星形胶质细胞存在12 658个差异表达基因,其中11 797个是皮层和海马星形胶质细胞共有的(图3A)。图3B为差异表

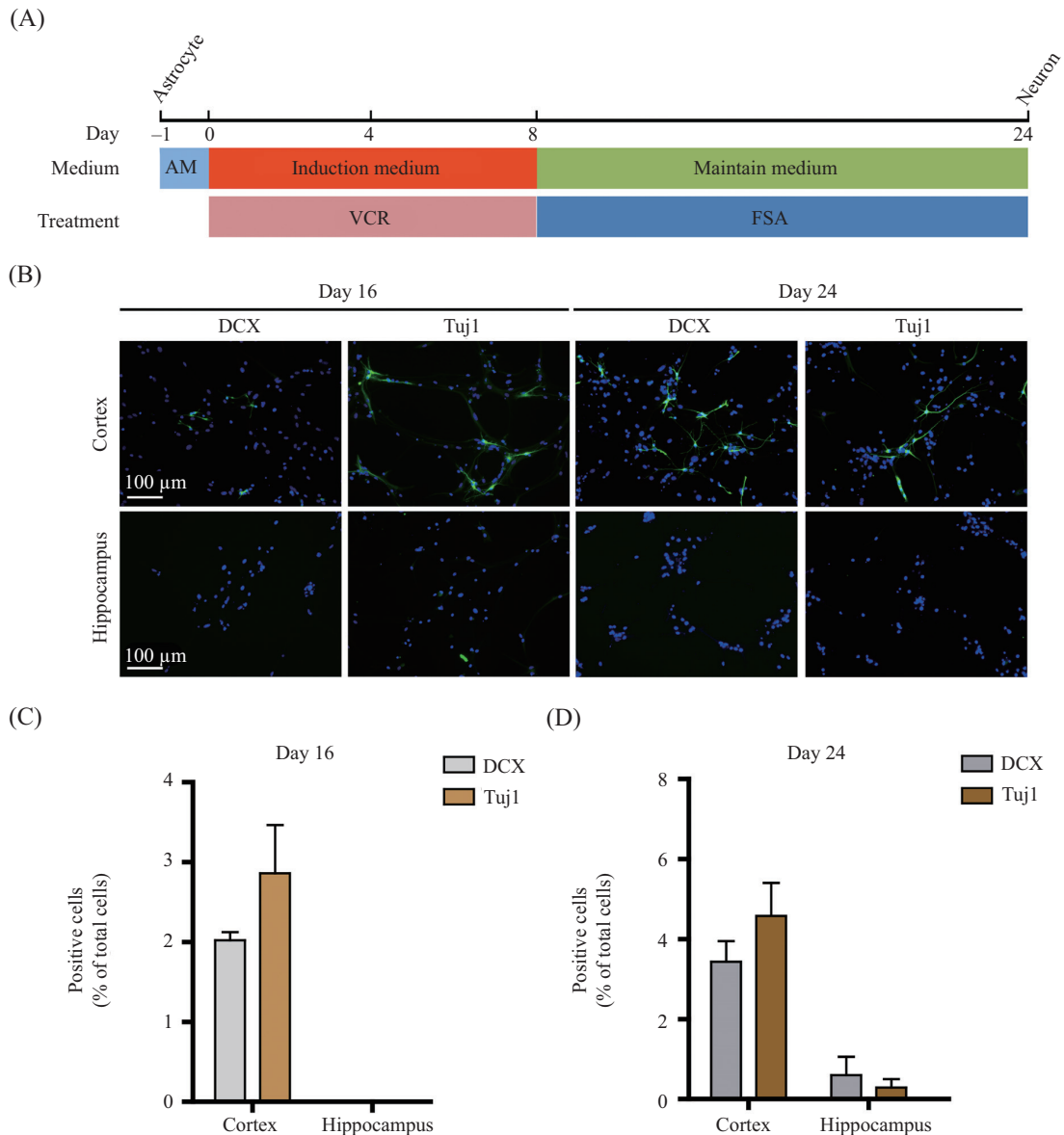


A: 细胞用所标注的一抗(星形胶质细胞的标志物GFAP、神经前体细胞的标志物Nestin、神经元的标志物Tuj1)孵育后用FITC标记的二抗进行孵育,GFAP、Nestin或Tuj1阳性信号显示为绿色。细胞核由Hoechst 33342显色为蓝色。B: 皮层星形胶质细胞中GFAP、Nestin和Tuj1阳性细胞占总细胞的比例。C: 海马星形胶质细胞中GFAP、Nestin和Tuj1阳性细胞占总细胞的比例。D: Western blot 检测皮层和海马星形胶质细胞GFAP、Nestin和Tuj1的表达。AS表示星形胶质细胞;NPC表示神经前体细胞;Converted cells表示从星形胶质细胞诱导获得的混合细胞,包括神经元和星形胶质细胞。

A: cells were incubated with the labeled primary antibody (astrocyte marker GFAP, neural precursor cell marker Nestin, neuron marker Tuj1) and then incubated with FITC-labeled secondary antibody, GFAP, Nestin or Tuj1 positive signal is shown in green. The nucleus was colored blue by Hoechst 33342. B: proportion of cortical astrocytes expressing GFAP, Nestin or Tuj1 in total cells. C: proportion of hippocampus astrocytes expressing GFAP, Nestin or Tuj1 in total cells. D: the expression of GFAP, Nestin, Tuj1 in cortical and hippocampus astrocytes detected by Western blot. AS: astrocyte; NPC: neural progenitor cell; Converted cells: mixed cells derived from astrocyte transdifferentiation, including astrocytes and neurons.

图1 皮层和海马星形胶质细胞鉴定

Fig.1 Characterization of cultured cortical and hippocampus astrocytes



A: 诱导转分化流程图。B: 皮层和海马星形胶质细胞诱导16天和24天免疫荧光染色。C: 诱导16天后DCX和Tuj1阳性细胞的比例统计。D: 诱导24天后DCX和Tuj1阳性细胞的比例统计。

A: schematic diagram of transdifferentiation process. B: immunofluorescence staining of induced cortical and hippocampus astrocytes on day 16 and day 24. C: proportion of cells expressing DCX or Tuj1 in total cells on day 16. D: proportion of cells expressing DCX or Tuj1 in total cells on day 24.

图2 VCR组合诱导星形胶质细胞转变为神经元细胞

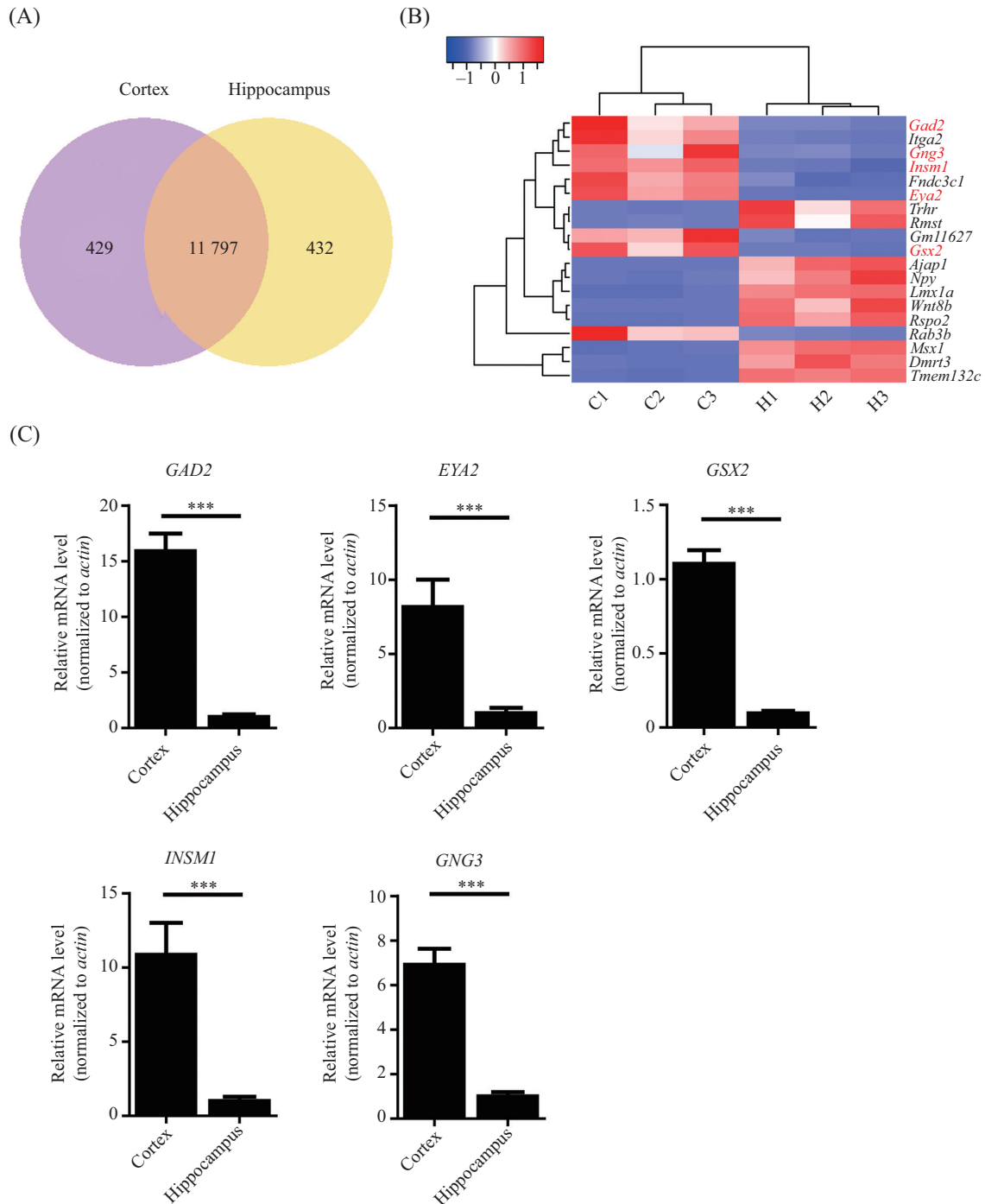
Fig.2 Astrocytes were induced into neuronal cells by VCR cocktail

达基因热图, 显示了分别在皮层和海马星形胶质细胞中差异最大的高表达的10个基因。鉴于皮层和海马星形胶质细胞具有不同的转分化能力, 我们猜测, 在皮层胶质细胞中高表达的差异基因可能在其中发挥了重要的作用。其中小鼠的*GAD2*、*EYA2*、*GSX2*、*INSM1*和*GNG3*等基因(图3B中红色标记基因)对神经前体细胞的增殖和分化起着调控作用或者对神经元的发育至关重要<sup>[16-21]</sup>, 我们选取了这5个差异表达基因作为验证测序数据可靠性的候选基

因, qPCR验证结果显示, 5个基因在皮层星形胶质细胞中高表达, 与转录组测序结果一致(图3C)。但是这些基因在皮层星形胶质细胞向神经元转分化过程中的确切作用, 还有待进一步的研究。

#### 2.4 皮层和海马星形胶质细胞转录组差异基因的GO分析

GO(gene ontology)是按照生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)对基因进行注释



A: 差异基因表达韦恩图; B: 差异表达基因热图; C: qPCR验证皮层星形胶质细胞中高表达的基因。\*\*\* $P < 0.001$ 。

A: Venn diagram of differentially expressed genes; B: heatmap of differentially expressed genes; C: verification of highly expressed genes in cortical astrocytes by qPCR. \*\*\* $P < 0.001$ .

图3 转录组测序结果中皮层和海马星形胶质细胞的基因存在表达差异

Fig.3 Differential gene expression in transcriptome sequencing between cortical and hippocampus astrocytes

和分类的。对皮层和海马星形胶质细胞转录组差异基因进行GO分析,我们发现,皮层星形胶质细胞中高表达差异基因参与生物过程主要集中在染色质分离、核分裂、DNA复制、蛋白质翻译等和细胞分裂相关的过程(表1);在细胞组分分析中,皮层星形

胶质细胞中高表达差异基因也富集于染色体、核糖体、纺锤体等(表2);分子功能也主要与微管蛋白结合、染色质结合和ATP酶活性等相关(表3)。这些生物学过程、细胞组分以及分子功能都与细胞分裂存在一定关联,因此,GO分析结果表明,皮层星形胶质

表1 皮层星形胶质细胞中高表达基因的生物学过程富集分析

Table 1 BP enrichment analysis of highly expressed genes in cortical astrocytes

ID	项目 Term	P值 P value	数量 Count
GO:0007059	Chromosome segregation	1.18E-21	81
GO:0007067	Mitotic nuclear division	2.36E-19	107
GO:0000280	Nuclear division	1.82E-18	126
GO:0000226	Microtubule cytoskeleton organization	2.95E-17	109
GO:0098813	Nuclear chromosome segregation	7.51E-14	52
GO:0000819	Sister chromatid segregation	2.91E-12	39
GO:0000070	Mitotic sister chromatid segregation	1.22E-11	36
GO:0070507	Regulation of microtubule cytoskeleton organization	1.62E-10	42
GO:0006412	Translation	3.01E-10	100
GO:0006260	DNA replication	1.17E-09	64

表2 皮层星形胶质细胞中高表达基因的细胞组分富集分析

Table 2 CC enrichment analysis of highly expressed genes in cortical astrocytes

ID	项目 Term	P值 P value	数量 Count
GO:0098687	Chromosomal region	1.47E-20	80
GO:0000775	Chromosome, centromeric region	1.55E-19	65
GO:0000793	Condensed chromosome	1.43E-17	53
GO:0022626	Cytosolic ribosome	9.25E-17	41
GO:0000779	Condensed chromosome, centromeric region	6.04E-15	25
GO:0000776	Kinetochores	6.30E-15	46
GO:0044391	Ribosomal subunit	3.65E-12	47
GO:0000777	Condensed chromosome kinetochores	1.08E-11	18
GO:0022625	Cytosolic large ribosomal subunit	2.91E-10	22
GO:0005819	Spindle	5.64E-08	51

表3 皮层星形胶质细胞中高表达基因的分子功能富集分析

Table 3 MF enrichment analysis of highly expressed genes in cortical astrocytes

ID	项目 Term	P值 P value	数量 Count
GO:0015631	Tubulin binding	1.17E-11	68
GO:0003735	Structural constituent of ribosome	5.84E-11	43
GO:0008017	Microtubule binding	4.90E-10	51
GO:0003774	Motor activity	3.53E-05	28
GO:0008094	DNA-dependent ATPase activity	8.07E-05	23
GO:0003777	Microtubule motor activity	0.000 104	18
GO:0003746	Translation elongation factor activity	0.000 203	8
GO:0016887	ATPase activity	0.000 217	70
GO:0005198	Structural molecule activity	0.000 260	73
GO:0003682	Chromatin binding	0.000 378	80

细胞相比海马的星形胶质细胞更多参与了细胞分裂的过程, 而我们在培养细胞过程中也能看到皮层星形胶质细胞具有更强的增殖能力, 这也暗示了皮层星形胶质细胞增殖能力的强弱可能影响其转分化的

效率。

### 3 讨论

神经退行性疾病 (neurodegenerative disease) 是

因大脑或脊髓的神经元功能的减弱或丧失以及细胞的凋亡而导致功能障碍的神经疾病。如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森症(Parkinson's disease, PD)以及肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)等。针对这些神经退行性疾病的不同致病机理,人们开发了不同化学药物,有的治疗方案针对多个靶点进行给药,然而效果有限。转分化技术的出现和发展,使得细胞替代治疗成为治疗这些神经退行性疾病的新途径。目前,有很多研究利用星形胶质细胞作为神经元转分化的起始细胞,并且已在体内取得了很好的转分化效果<sup>[22]</sup>。然而星形胶质细胞作为一类异质性的细胞,不同的胶质细胞间存在着巨大的差异,这也必然导致了他们在转分化过程中表现不同。有研究报道来自皮层、小脑和脊髓的星形胶质细胞增殖能力不同,并且转录因子NGN2诱导转分化的效率存在差异,增殖效率最高的皮层星形胶质细胞转分化效率最高<sup>[23]</sup>。在本研究中,我们比较了皮层和海马星形胶质细胞在小分子化合物诱导下转分化的过程,发现在小分子化合物诱导时,皮层的星形胶质细胞的转分化效率更高,并且转录组测序结果也显示,皮层星形胶质细胞的增殖能力更强,这都提示了星形胶质细胞的增殖能力可能和诱导向神经元转分化的效率存在一定的联系。

不同的星形胶质细胞转分化表现之所以不同必然与其基因表达模式相关,如果能找出影响星形胶质细胞转分化的关键基因,将有助于人们进一步理解转分化的机制。转录组测序结果显示,在皮层和海马的星形胶质细胞中存在许多差异基因,其中也存在可能影响星形胶质细胞转分化的基因,如在结果中列出的*GSX2*等基因,这些基因与前述细胞增殖相关基因是否决定皮层星形胶质细胞的转分化效率,需要进一步实验验证。

与传统的全基因组测序相比,近些年发展起来的单细胞测序技术(single cell RNA-seq)能更精确地测量基因表达水平,该技术可用于研究单个细胞的功能状态,以无偏差的方式推断和发现新的细胞类型,这有助于研究者找到不同星形胶质细胞亚群的细胞标志物或者找出影响星形胶质细胞向神经元转分化的关键基因。目前,已有单细胞测序相关研究发现,小鼠大脑中存在着七种分布在不同脑区之中并且基因表达存在差异的星形胶质细胞<sup>[24]</sup>。探究这

些不同表达模式星形胶质细胞在神经元转分化的差别,同时进一步利用单细胞测序技术探索不同脑区的星形胶质细胞的差异基因,将有助于找到影响星形胶质细胞向神经元转分化的关键基因。

本研究探索了皮层和海马星形胶质细胞转分化为神经元能力的差别,并对皮层和海马的星形胶质细胞进行转录组测序比较,探索了可能影响皮层和海马星形胶质细胞转分化的差异关键基因,对进一步探索星形胶质细胞定向转分化为神经元的机理及其临床应用具有参考价值。

### 参考文献 (References)

- [1] GAO L, GUAN W, WANG M, et al. Direct generation of human neuronal cells from adult astrocytes by small molecules [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 8(3): 538-47.
- [2] LI X, ZUO X, JING J, et al. Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 195-203.
- [3] QIAN H, KANG X, HU J, et al. Reversing a model of Parkinson's disease with in situ converted nigral neurons [J]. *Nature*, 2020, 582(7813): 550-6.
- [4] TORPER O, PFISTERER U, WOLF D A, et al. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(17): 7038-43.
- [5] GUO Z, ZHANG L, WU Z, et al. *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(2): 188-202.
- [6] PANG Z P, YANG N, VIERBUCHEN T, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors [J]. *Nature*, 2011, 476(7359): 220-3.
- [7] VIERBUCHEN T, OSTERMEIER A, PANG Z P, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors [J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1035-41.
- [8] LI W, LI K, WEI W, et al. Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(3): 270-83.
- [9] ZHANG L, YIN J C, YE H, et al. Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(6): 735-47.
- [10] YANTAO M, HANDAN X, XIAOMIN D, et al. *In vivo* chemical reprogramming of astrocytes into functional neurons [J]. *BioRxiv* 2018, doi.org/10.1101/305185.
- [11] CHABOUB L S, DENEEN B. Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development [J]. *Dev Neurosci*, 2012, 34(5): 379-88.
- [12] BAYRAKTAR O A, FUENTEALBA L C, ALVAREZ-BUYLLA A, et al. Astrocyte development and heterogeneity [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 7(1): a020362.
- [13] KHAKH B S, DENEEN B. The emerging nature of astrocyte diversity [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2019, 42: 187-207.
- [14] SCHILDGE S, BOHRER C, BECK K, et al. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes [J]. *J Vis Exp*, 2013, 71: 50079.



- [15] CHENG L, GAO L, GUAN W, et al. Direct conversion of astrocytes into neuronal cells by drug cocktail [J]. *Cell Res*, 2015, 25(11): 1269-72.
- [16] WANG J, WU Y, ZHAO F, et al. Fgf-signaling-dependent Sox9a and Atoh1a regulate otic neural development in zebrafish [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(1): 234-44.
- [17] LUNDIUS E G, SANCHEZ-ALAVEZ M, GHOCHANI Y, et al. Histamine influences body temperature by acting at H1 and H3 receptors on distinct populations of preoptic neurons [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(12): 4369-81.
- [18] SCHWINDINGER W F, MIRSHAHI U L, BAYLOR K A, et al. Synergistic roles for G-protein gamma3 and gamma7 subtypes in seizure susceptibility as revealed in double knock-out mice [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(10): 7121-33.
- [19] WACLAW R R, WANG B, PEI Z, et al. Distinct temporal requirements for the homeobox gene Gsx2 in specifying striatal and olfactory bulb neuronal fates [J]. *Neuron*, 2009, 63(4): 451-65.
- [20] LOPEZ-JUAREZ A, HOWARD J, ULLOM K, et al. Gsx2 controls region-specific activation of neural stem cells and injury-induced neurogenesis in the adult subventricular zone [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(11): 1272-87.
- [21] LORENZEN S M, DUGGAN A, OSIPOVICH A B, et al. Insm1 promotes neurogenic proliferation in delaminated otic progenitors [J]. *Mech Dev*, 2015, 138 (Pt 3): 233-45.
- [22] ZHOU H, SU J, HU X, et al. Glia-to-neuron conversion by CRISPR-CasRx alleviates symptoms of neurological disease in mice [J]. *Cell*, 2020, 181(3): 590-603.e16.
- [23] HU X, QIN S, HUANG X, et al. Region-restrict astrocytes exhibit heterogeneous susceptibility to neuronal reprogramming [J]. *Stem Cell Rep*, 2019, 12(2): 290-304.
- [24] ZEISEL A, HOCHGERNER H, LONNERBERG P, et al. Molecular architecture of the mouse nervous system [J]. *Cell*, 2018, 174(4): 999-1014.e22.