

食蟹猴多功能干细胞向运动神经元定向分化

曹静 李梦佳 王芳 曾玉强 魏景宽 牛昱宇*

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

摘要 运动神经元(motor neuron, MN)是位于大脑皮层、脊髓前角、脑干等区域的一种终末分化的细胞, MN的损伤涉及多种神经退行性疾病。目前, 体内研究该类疾病面临巨大困难。因此利用体外分化手段获得成熟的MN, 对于研究神经退行性疾病的致病机制和治疗具有重大意义。非人灵长类与人具有高度相似的遗传背景, 作为一种理想动物模型已经被广泛应用于疾病的研究中。因此, 该研究利用食蟹猴(*Macaca fascicularis*)的诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 建立了成熟MN快速且高效的分化体系。该实验的分化体系共计28天, 且包括四个分化阶段, 最终90%以上的MN均处于成熟状态。四个分化阶段为: (1)iPSCs向神经上皮细胞(neuroepithelial progenitors, NEP)的分化; (2)NEP向运动神经元前体细胞(motor neuron progenitors, MNP)的分化; (3)MNP向非成熟MN的分化; (4)非成熟的MN逐渐成熟。该研究首次成功建立食蟹猴iPSCs到MN的分化体系, 并确定多聚-L-鸟氨酸和层黏连蛋白(lamina-521)双重包被的培养皿、细胞的接种密度以及ROCK抑制剂的添加可提高MN的存活率, 为今后探究运动神经元疾病的发病机制和干细胞移植治疗奠定了良好的基础。

关键词 诱导多能干细胞; 神经干细胞; 运动神经元; 神经退行性疾病

Pluripotent Stem Cells Differentiate into Motor Neurons in Cynomolgus Monkeys

CAO Jing, LI Mengjia, WANG Fang, ZENG Yuqiang, WEI Jingkuan, NIU Yuyu*

(Kunming University of Science and Technology, Kunming 50500, China)

Abstract MN (motor neuron) is a specialized type of neuron whose cell body is located in the motor cortex, brainstem, and the spinal cord. The damage of this type of cell results in many neurodegenerative diseases. So far, it is extremely difficult to study these diseases *in vivo*. Therefore, it is of great significance to study the pathogenesis and therapy of neurodegenerative diseases through the differentiation of mature MN *in vitro*. Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), as a non-human primate model, has a highly similar genetic background with humans and is widely used for the study of these diseases. We developed a method to guide the induced pluripotent stem cell of cynomolgus monkeys into an enriched population (>90%) of mature MNs in 28 days, which consists of four differentiation stages. The four stages are as follows: (1) iPSCs (induced pluripotent stem cells) were induced into NEP (neuroepithelial progenitors); (2) NEP were induced into MNP (motor neuron progenitors); (3) MNP were induced into non-mature MN; (4) non-mature MN were induced into mature MN. This study successfully estab-

收稿日期: 2019-03-19 接受日期: 2019-05-20

*通讯作者。Tel: 13769118349, E-mail: niuyy@lpbr.cn

国家重点研发计划干细胞专项(批准号: 2018YFA0108503)和云南省基础研究计划面上项目(批准号: 2018FB118)资助的课题

Received: March 19, 2019 Accepted: May 20, 2019

*Corresponding author. Tel: +86-13769118349, E-mail: niuyy@lpbr.cn

This work was supported by the National Key Research and Development Program (Grant No.2018YFA0108503) and Yunnan Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2018FB118)

网络出版时间: 2019-11-12 13:10:58

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1310.044.html>

lished a method for guiding iPSCs of cynomolgus monkeys into MN. Moreover, it showed that the poly-L-ornithine and lamina-521 double-coated dish, cell density, and the addition of ROCK inhibitor (Y27632) can contribute to the survival of MN. In summary, this study provides a basis for studying the pathogenesis and stem cell transplantation therapy of MN degenerative diseases.

Keywords induced pluripotent stem cells; neural stem cells; motor neurons; neurodegenerative diseases

运动神经元(motor neuron, MN)是一种高度特化的神经细胞,其胞体主要位于大脑皮层、脊髓前角、脑干等区域^[1],轴突(纤维)向脊髓或脊髓外延伸,直接或间接投射到肌肉或者腺体以控制它们的活动。临床上常见的MN损伤引起的神经退行性疾病主要是肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)^[2]与脊髓肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)^[3]。ALS主要是上、下运动神经元受到损害,最终导致全身的肌肉发生萎缩。SMA是由于SMN基因突变导致的常染色体隐性遗传病,主要表现为脊髓前角细胞受到损害。目前对于MN损伤性神经退行性疾病的发病机理尚不清楚,临床也缺乏有效的治疗手段。随着再生医学实验的陆续开展,利用干细胞移植修复或替换受损神经元是目前理想的治疗方案^[4-6]。因此体外获得成熟MN,能够更好地帮助我们探究神经退行性疾病的发病机理,指导我们后期针对神经退行性疾病模型采用干细胞疗法的工作。

早在2002年, Witchery等^[7]首次将小鼠胚胎干细胞分化为MN,并提出维甲酸(retinoic acid, RA)和SHH通路的抑制剂(purmorphamine, Pur)是诱导干细胞定向分化成运动神经元的重要因子。该研究分化体系模拟体内MN的发育过程,首先使干细胞发生神经化(neutralization)、随后让脊髓神经元实现尾端化(caudalization)和腹侧化(ventralization),最终得到成熟的脊髓腹侧MN。Li等^[8]于2005年首次将人胚胎干细胞体外定向分化为MN。随后相继出现许多可以获得成熟MN的分化方案^[8-9],这些分化方案可以分为EB进行分化和非EB进行分化^[10]。虽然两种方案都可以得到成熟的MN,但是依然存在分化过程繁琐、效率低(20%~30%)和耗时长(大于30天)等问题。2015年, Zhang等^[11]利用人的多功能干细胞(hPSC),在非EB的分化方法下,得到了90%以上的成熟MN,同之前的分化体系相比, Zhang等^[12]提出了在NEP分化阶段,激活了WNT(CHIR99021)信号通路,高效地实现了神经元的尾端化。另外,在MN成熟过程中加

入NOTCH信号通路的抑制剂(compound E)^[13],也极大提高MN成熟的效率,这个分化体系为之后MN的研究提供了很好的参考。

非人灵长类与人类具有高度相似的遗传背景及大脑结构,是开展脑发育及神经系统疾病最理想的实验动物,目前非人灵长类模型已被广泛应用于人类神经系统疾病的研究。但是建立非人灵长类成熟MN的报道却十分有限,所以亟须建立一个成熟的非人灵长类体外MN的分化体系。本研究首次成功建立食蟹猴iPSCs到MN的分化体系,经历28天,包括四个分化阶段,最终90%以上的MN处于成熟状态,并确定多聚-L-鸟氨酸和lamina-521双重包被的培养皿、细胞的接种密度范围以及ROCK抑制剂的添加可提高MN的存活率。本研究的方法体系,为今后探究运动神经元疾病的发病机制和成体的干细胞移植治疗奠定了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

细胞建系来源的组织出自5岁龄的食蟹猴,体质量在5~6 kg。在取动物耳尖时,先给动物注射阿托品再使用水和氯醛诱导进行麻醉。实验在取得了国际实验动物评估和认可委(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care international)认证的实验室动物实验中心开展,所有实验操作程序均经过动物使用管理委员会批准。

1.2 主要仪器及试剂

主要实验仪器和试剂包括:恒温培养箱(Thermo Scientific公司)、无菌超净工作台(Thermo Scientific公司)、显微镜(Leica公司)、移液枪(Eppendorf公司)、DMEM/F12(Gibco公司, 10565-018)、神经干细胞培养基(Invitrogen公司, 21103)、KOSR(Gibco公司, A31815-02)、PSGro-Free hPSC Medium(Stem RD公司, PGROF-500)、N2细胞培养添加剂(Invitrogen公司, 17502048)、B27细胞培养添加剂(Invitrogen公司, 17504010)、 β -巯基乙醇(Invitrogen公司, 21985-

023)、bFGF(Merk-Millipore公司, GF003AF)、ROCK抑制剂Y27632(Stem RD公司, Y001)、青霉素/链霉素(Invitrogen公司, 15140)、GlutaMax(ThermoFisher公司, 35050061)、L-抗坏血酸(Sigma-aldrich公司, A92902)。

1.3 iPSCs的获得

取合适大小的食蟹猴耳尖进行原代细胞建系,爬出来的成纤维细胞进行培养(DMEM/F12中添加10% FBS、1% PS), 重编程时挑选代次比较低的且活性强的成纤维细胞, 根据Yamanaka等^[14-15]的研究, 利用仙台病毒将四个转录因子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)转入食蟹猴的体细胞中, 使其重编程。在饲养层上长出克隆后, 挑出状态较好的克隆进行扩大培养(DMEM/F12中添加0.055 mmol/L β -巯基乙醇、4 ng/mL bFGF、15% KOSR、1% NEAA、20% PSGro-Free hPSC培养基)。

1.4 iPSCs到NEP的分化

取出状态好的iPSCs约一个35 mm培养皿, 留下1 mL旧培养基, 加入胶原酶VI(Collagenase, type IV, Gibco) 50 μ L, 放入培养箱10~15 min至细胞边缘微微卷起即可(消化前需要去除分化和状态不佳克隆)。吸掉胶原酶VI和旧培养基, 加入新鲜基本培养基(basal neuron induction medium compositions, BNIM)。轻轻拍打, 观察细胞团大小, 决定是否继续吹小或等大团块沉到底部再吹小。细胞转移到15 mL离心管里, 自然沉降, 弃上清。用BNIM重悬, 以1:3~1:4比例接种到提前一天用基质胶(matrigel, BD)包被过的培养皿上。用BNIM培养细胞, 同时培养液中加入3 μ mol/L CHIR99021(Selleck)、2 μ mol/L DMH1(Torcris)和2 μ mol/L SB431542(Selleck)。细胞培养6天, 期间观察细胞形态, 且两天换一次液。

1.5 NEP分化为MNP

取出NEP细胞, 去除上清, 用DPBS洗1遍后, 加入适量二型中性蛋白酶(disypase, invitrogen), 37 $^{\circ}$ C消化3 min, 去除中性蛋白酶, 加入新鲜的BNIM培养基, 最后细胞团用BNIM重悬, 以1:3~1:4接种在Matrigel包被过的培养皿上。同时培养基加入0.1 μ mol/L RA(Stemgent)、0.5 μ mol/L Pur(Stemgent)、1 μ mol/L CHIR99021、2 μ mol/L DMH1和2 μ mol/L SB431542, 细胞培养6天, 观察细胞形态, 且两天换一次液。此阶段的MNP在此培养基的基础上, 将CHIR99021浓度由0.1 μ mol/L增大到0.3 μ mol/L, 同时添加0.5 μ mol/L VPA, MNP可以体外扩增5代左右。

1.6 MNP产生未成熟的MN

取出MNP, 弃掉上清, 用DPBS洗1遍后, 加入1 mL中性蛋白酶, 37 $^{\circ}$ C消化3 min, 去除中性蛋白酶, 用DPBS洗1遍, 最后细胞团用BNIM重悬, 放在1.5 mL EP管中。轻抵底部吸, 上提吹下, 大团块迅速下沉。吸取细胞团放到低吸附的板子中, 悬浮培养, 重复上述吹吸过程, 若细胞团无法吹散则丢弃。培养基中加入0.5 μ mol/L RA、0.1 μ mol/L Pur。培养8天, 细胞形成神经球, 且两天换一次液。

1.7 未成熟的MN逐渐成熟

提前用多聚-L-鸟氨酸(Poly-L-ornithine, 0.1 mg/mL) 37 $^{\circ}$ C培养箱包被培养皿3 h, 后移除, 再用层黏连蛋白lamina-521(5 μ g/mL)在4 $^{\circ}$ C冰箱包被24 h。用15 mL离心管沉淀神经球, 加入适量的胶原酶(Accumax, Invitrogen), 至少要覆盖细胞球, 放置37 $^{\circ}$ C水浴锅4~7 min。取出后加入新鲜培养基(Accumax酶体积的2倍), 300 \times g离心5 min。加入1 mL BNIM, 用黄枪头轻抵管底吸吹, 按需求用BNIM将细胞球吹成单细胞或小团, 同时加入0.5 μ mol/L RA、0.1 μ mol/L Pur、0.1 μ mol/L compound E, 加入预先处理过的板子中。第二天, 观察细胞, 可以看见长出突起, 此时为未成熟MN表达HB9和MAP2, 且两天换一次液。接入细胞的8天左右, MN成熟, 出现CHAT⁺的成熟MN。

本实验中基本培养基BNIM: 48% DMEM/F-12、48%神经干细胞培养基、1 \times N2、1 \times B27、0.1 mmol/L抗坏血酸、1 \times Glutamax、1 \times 青霉素/链霉素(均购自Invitrogen公司)。

MNP冻存液: 90% FBS、10% DMSO。

1.8 细胞免疫荧光染色

用4%多聚甲醛在常温下固定细胞20 min, 然后吸掉固定液, PBS(pH8.0)洗3次, 每次5 min。室温下细胞透膜封闭40 min(0.2% Triton X-100+3% BSA), 然后吸掉透膜封闭液, PBS(pH8.0)洗3次, 每次5 min。加用1% BSA配置的一抗置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜。第二天PBS(pH8.0)洗3次后避光加二抗常温孵育2 h, 最后PBS(pH8.0)洗3次, 封片并在荧光显微镜下观察并拍照。抗体包括: Tuj-1(Abcam)、Olig2(Abcam)、Ki76(Abcam)、MAP2(Abcam)、CHAT(Abcam)、CHT1(Santa Cruz)、DAPI(Proteintech)。阳性细胞的百分比和细胞突起的统计在荧光显微镜和光显微镜下观察并且统计至少300个细胞。

1.9 数据统计

实验数据用ImageJ软件获取, 每次实验独立重复3次。显著性分析用Prism graphpad软件分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 成纤维细胞重编程为iPSCs

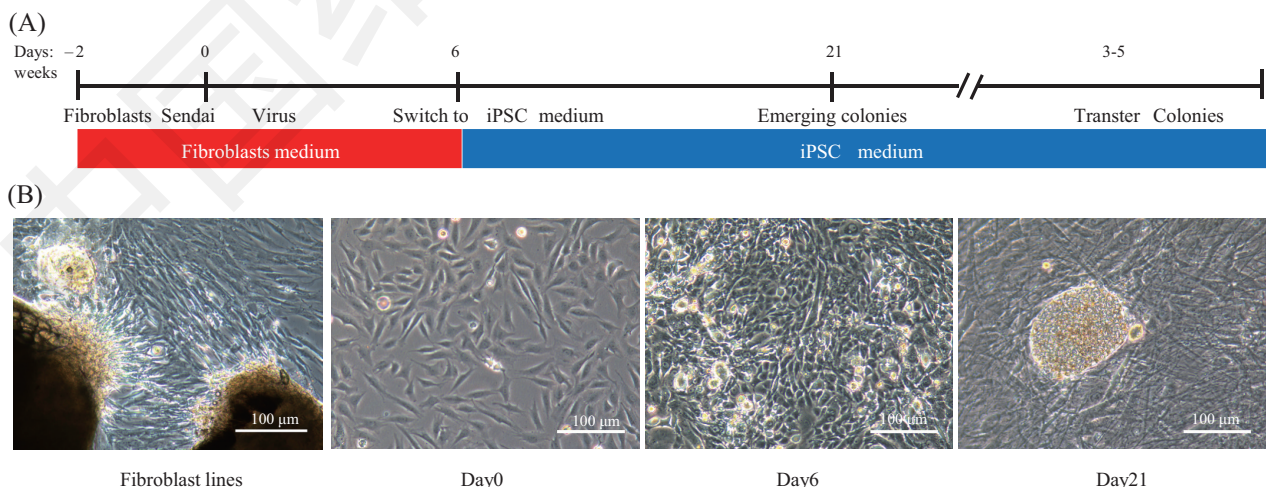
诱导多能干细胞是一种能够自我更新且具有无限分化潜能的一类细胞。迄今有很多方法将体细胞重编程为iPSCs, 其中诱导效率较高、应用广泛是Yamanaka等^[14]的研究方法。2006年, Yamanaka等^[15]利用仙台病毒载体将四个转录因子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)转入老鼠的体细胞内使其重编程, 次年, 又利用同样的方法获得人的iPSCs, 同时其他类型的细胞也获得iPSCs, 这为干细胞治疗疾病带来了巨大的希望。

本研究利用食蟹猴耳尖组织进行原代成纤维细胞建系。纤维细胞爬出后, 挑选其中代次较低及增殖能力较强的作为诱导的初始细胞。加入携带四个转录因子(Oct3/4、c-Myc、Klf4、Sox2)的仙台病毒于培养基中, 持续培养6天后, 将成纤维细胞接入提前铺好的饲养层上, 培养12天后成纤维细胞出现聚团现象, 表明成纤维细胞被部分重编程。约21天后, 饲养层开始出现小克隆, 此时的大部分成纤维细胞被完全重编程, 其重编程时间和状态如图(图1A和图1B)。Nanog、SOX2、OCT4、TAR-81等是细胞多能性的标记物, 通过细胞免疫荧光染色, 检测标记

蛋白的表达量来判断细胞的多能性。免疫染色发现, 重编程后的细胞均表达这些标记蛋白, 证明成纤维细胞被成功重编程为多能干细胞(图2)。

2.2 iPSCs体外分化成MN

2.2.1 细胞分化各阶段时间及形态观察 iPSCs向MN分化时, 首先需要注意iPSCs的初始状态, 应挑选在饲养层上克隆内细胞致密排列, 与周围细胞界限分明, 且无分化现象的iPSCs作为分化的原始细胞(图3A)。整个分化体系共计28天, 包含四个阶段(图3B)。第一阶段: 0~6天, iPSCs分化为NEP, 此时细胞呈立体的克隆状, 如(图3C, Day6)。除基本的神经分化培养基外, 培养基中加入TGF- β 信号通路的抑制剂(SB431542, 2 $\mu\text{mol/L}$)和BMP信号通路的抑制剂(DMH1, 2 $\mu\text{mol/L}$), 能够抑制细胞自噬, 同时启动神经分化^[16]。WET信号通路的激活剂(CHIR99021, 3 $\mu\text{mol/L}$)的增加, 提高了神经诱导的效率^[17]。第二阶段: 7~12天, NEP分化为MNP, 细胞逐渐呈现神经玫瑰花样结构(neural rosette)(图3C, Day12)。在第一阶段的基础上, 培养基还需加入负责调控神经元尾端化和侧腹化^[18]的维甲酸(RA, 0.1 $\mu\text{mol/L}$)和SHH通路的抑制剂(purmorphamine, 1 $\mu\text{mol/L}$)。调整CHIR99021浓度, 同时添加去乙酰化酶抑制剂(valproic acid, 0.5 $\mu\text{mol/L}$), MNP可以扩增5代并维持其原有的细胞特性。第三阶段: 13~20天, MNP向未成熟MN分化。将第二阶段的细胞用中性蛋白酶消化成小克隆, 接种在低吸附的培养皿上悬浮培养, 同时调整维甲酸和SHH通路的抑制剂的浓度(RA, 1 $\mu\text{mol/L}$; Pur,



A: 成纤维细胞重编程的时间轴; B: 成纤维细胞重编程过程(Day0、Day6及Day21)的形态特征。

A: the timeline of reprogramming fibroblast; B: the morphology of Day0, Day6 and Day21 during the reprogramming fibroblast.

图1 成纤维细胞重编程为iPSCs

Fig.1 Reprogramming Fibroblasts to iPSCs

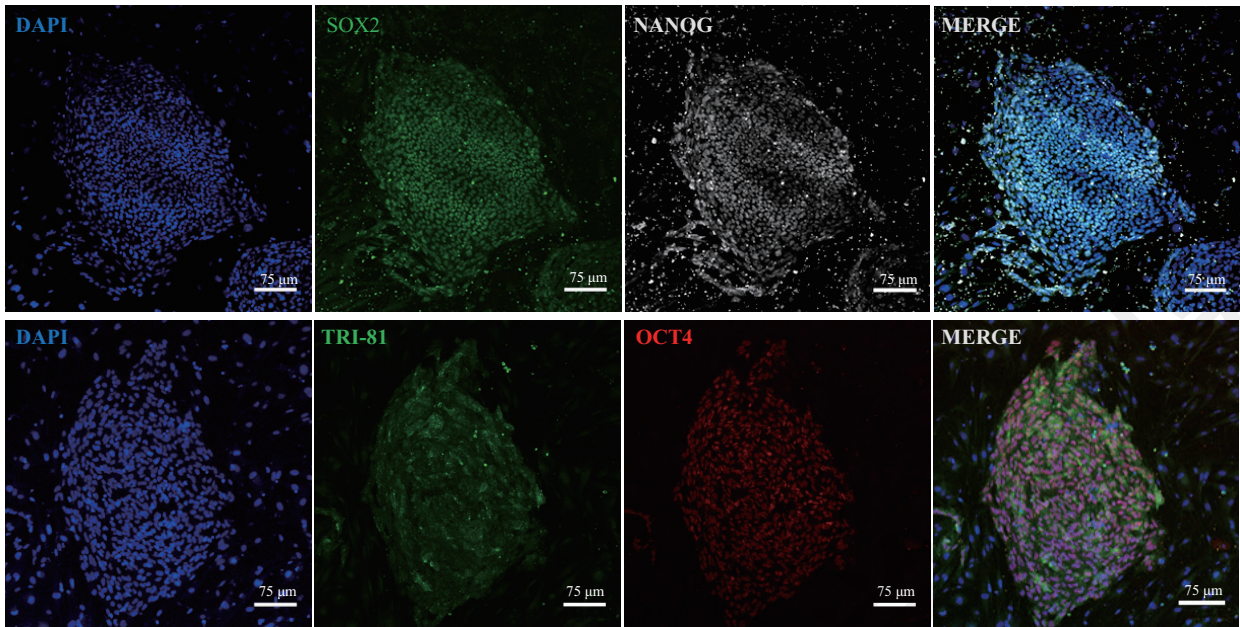
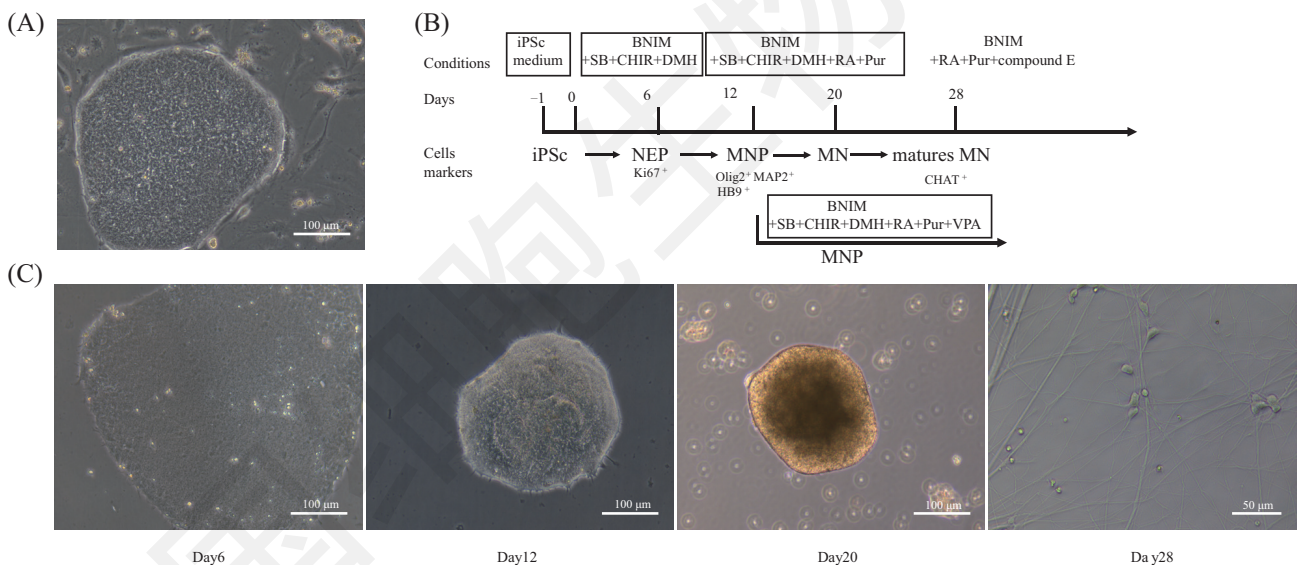


图2 iPSCs多能性的鉴定
Fig.2 Identification of iPSCs pluripotency



A: 诱导分化前iPSCs的初始形态特征; B: MN诱导分化的时间轴及对应培养条件; C: Day6(MNP)、Day12(NEP)、Day20(MN)、Day28(成熟MN)的细胞形态特征。

A: the morphology of iPSCs before differentiation; B: timeline and culture conditions of MN induced differentiation; C: the morphology of Day6 (MNP), Day12 (NEP), Day20 (MN), Day28 (matures MN).

图3 iPSCs定向分化为MN
Fig.3 iPSCs differentiation into MN

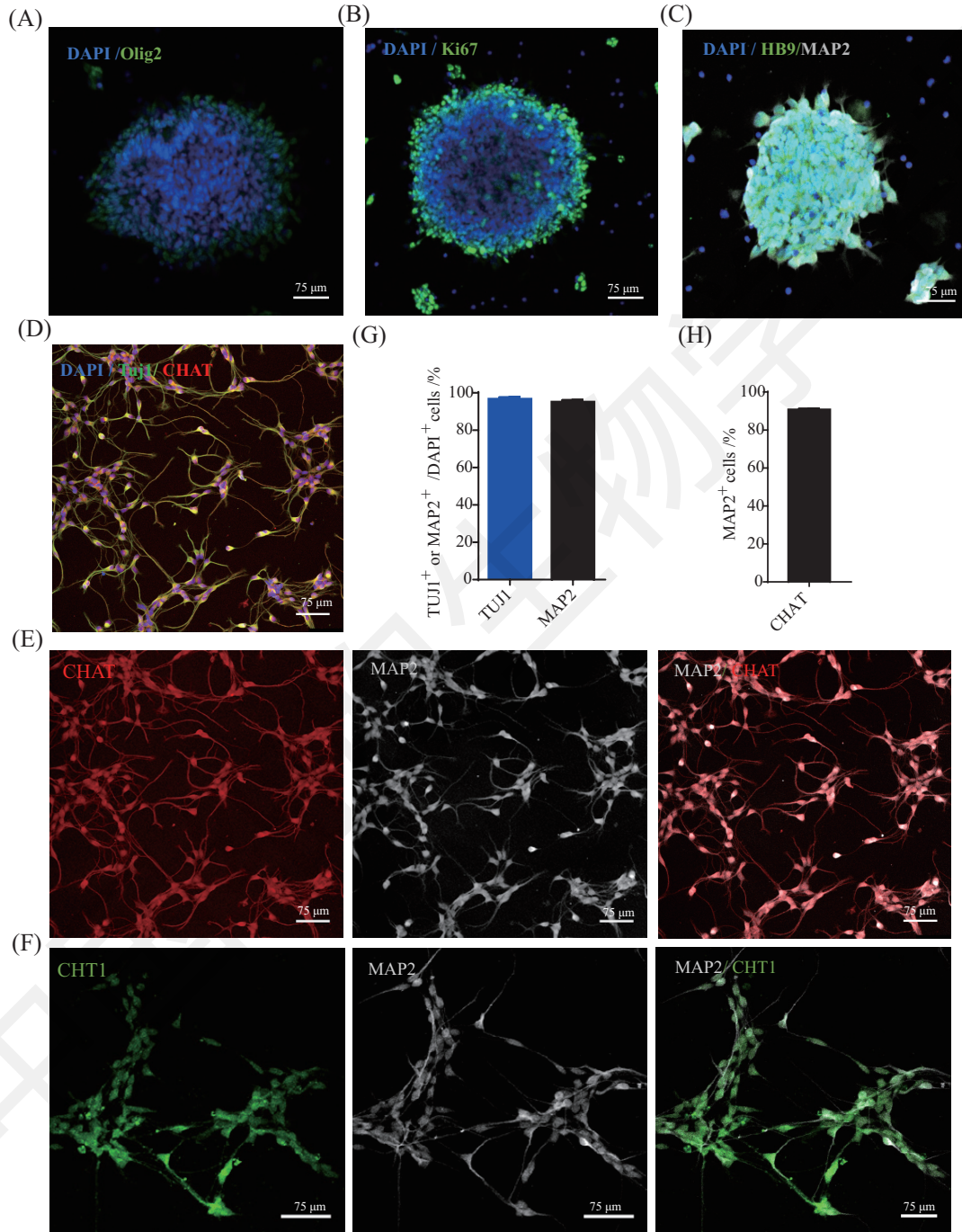
0.1 μmol/L)。细胞会聚集成大小均匀的神经球，球体紧密，四周透亮(图3C, Day20)。第四阶段: 21~28天，将神经球消化成单细胞，使其贴壁生长。此阶段MN逐渐成熟，神经元爬出突起，相互交织成网状结构(图3C, Day28)。在这个阶段，撤掉CHIR99021、SB431542、DMH1等分化因子，同时加入NOTCH信

号通路的抑制剂(compound E, 0.1 μmol/L)。

2.2.2 MN的鉴定 在MN的分化过程中会表达多种标志物，利用这些标志物可以判断分化的阶段和分化的效率。第一、二阶段，细胞表达有丝分裂的增殖蛋白Ki67^[19]，随着iPSCs向MN分化，Ki67的表达会逐渐降低。另外第二阶段，细胞表达脊髓腹侧的

标记物Olig2——调控脊髓腹侧神经上皮细胞命运的必需调节因子^[20], 且部分表达MAP2和HB9等早期的神经标记物^[21](图4A~图4C)。HB9的表达意味着MNP进入有丝分裂后(post-mitotic)阶段, 不再具有增殖能力。第三、四阶段, MNP分化成MN, 且逐渐

成熟, 表达 β -Tubulin III(TuJ1)、MAP2和CHAT^[22]。TuJ1表达于整个神经元, 包括轴突、树突和胞体; MAP2主要表达于树突, CHAT和CHT1表达于成熟的胆碱能神经元。第四阶段分化末期, 通过免疫荧光染色证明95%的细胞表达MAP2和TuJ1, 同时其中



A~C: Olig2、Ki67、MAP2及HB9在细胞分化12天(MNP)的表达; D~F: Tuj1、CHAT、CHT1及MAP2在MN分化28天的表达; G: Tuj1⁺和MAP2⁺占总细胞的比例; H: MAP2⁺占MAP2⁺的细胞比例。

A~C: expression of Olig2, Ki67, MAP2 and HB9 at 12 days of MN differentiation; D~F: expression of Tuj1, CHAT, CHT1 and MAP2 at 28 days of MN differentiation; G: the ratio of Tuj1⁺ and MAP2⁺ of total cells; H: the ratio of CHAT⁺ ratio of MAP2⁺ cells.

图4 MN的鉴定

Fig.4 Identification of MN

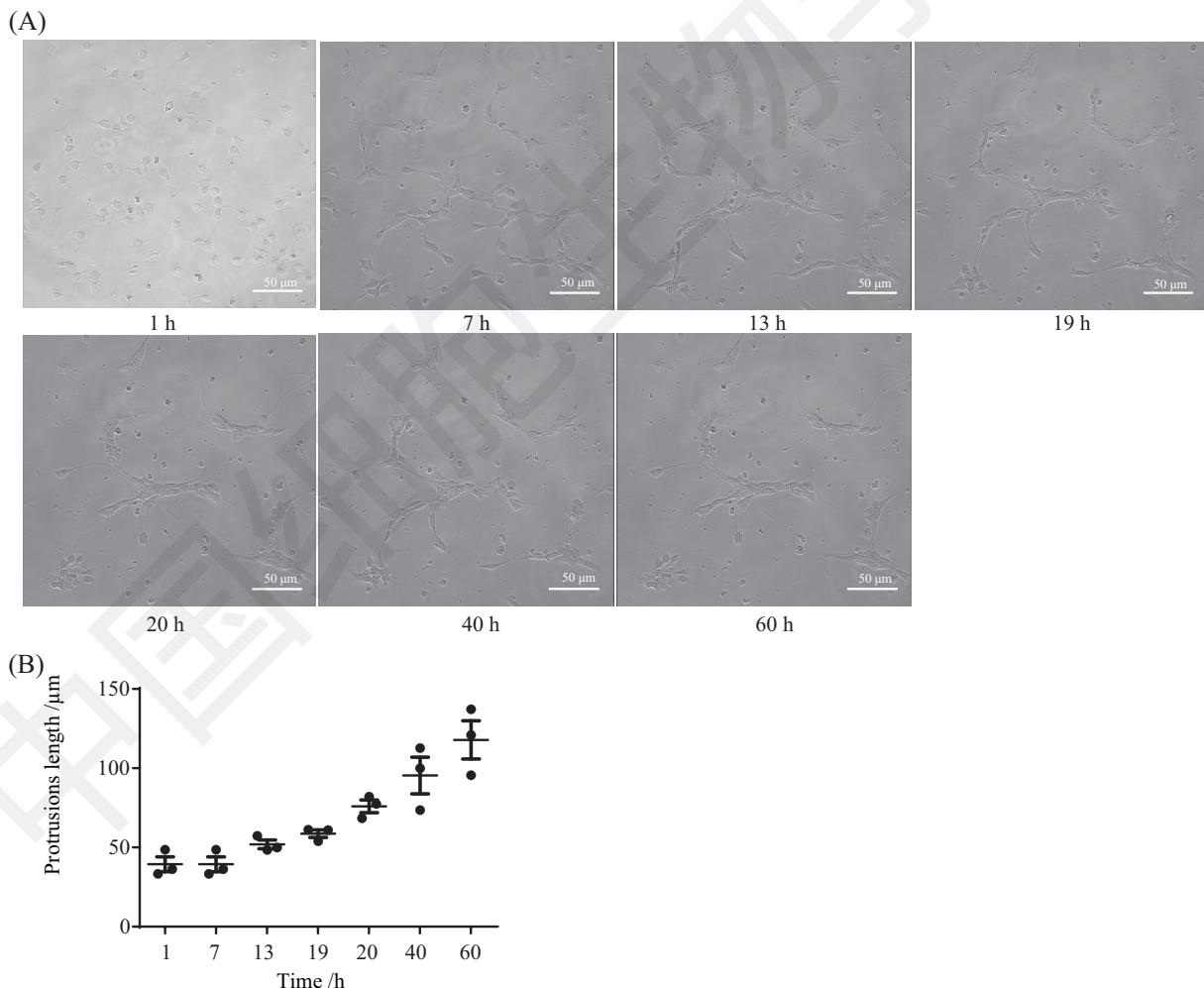
有90%的是成熟运动神经元(图4D~图4H)。以上数据表明: iPSCs在经过28天分化后, 90%以上的MN都处于成熟状态。

2.2.3 神经元突起生长速度的统计 第四阶段, 将悬浮的神经球消化成单细胞, 接种到提前包被的培养皿上。利用活细胞实时观测技术, 连续观察细胞接种后0~60 h神经元突起长度的变化。随着培养时间的延长, MN会呈现聚集成团生长(图5A), 在接种后的1 h, MN开始贴壁, 逐渐长出神经突起。通过ImageJ统计分析, 0~20 h神经突起的平均生长速度是3 $\mu\text{m}/\text{h}$, 20~60 h平均生长速度是1 $\mu\text{m}/\text{h}$ (图5B)。以上表明: 前20 h神经突起的生长速度相较于20 h后的神经突起生长速度快。我们猜测, 前20 h神经元突起的快速生长可能涉及神经元由3D到2D状态的转

换和细胞骨架的重塑。神经突起的快速生长使神经元之间迅速形成神经网络, 有利于维持细胞形态, 加强信号传导以及建立细胞之间的连接。

2.3 MN成熟阶段培养条件的优化

2.3.1 细胞外基质对MN的影响 细胞外基质主要由多糖和蛋白质组成。在细胞的培养阶段, 细胞外基质的添加可促进细胞对基质的贴附, 细胞之间的黏附和细胞内微丝的构建。常用的细胞外基质主要有: 含动物组织提取物的基质胶(matrigel)、人重组蛋白(层黏连蛋白和纤维连接蛋白)和合成基质(树脂、塑料)。重组蛋白因操作方便、成分明确、无动物源性得到更为广泛应用。在本实验的分化体系中, 第一、二分化阶段用基质胶(matrigel) 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱包被过夜, 细胞状态良好。但同样的包被条件下,

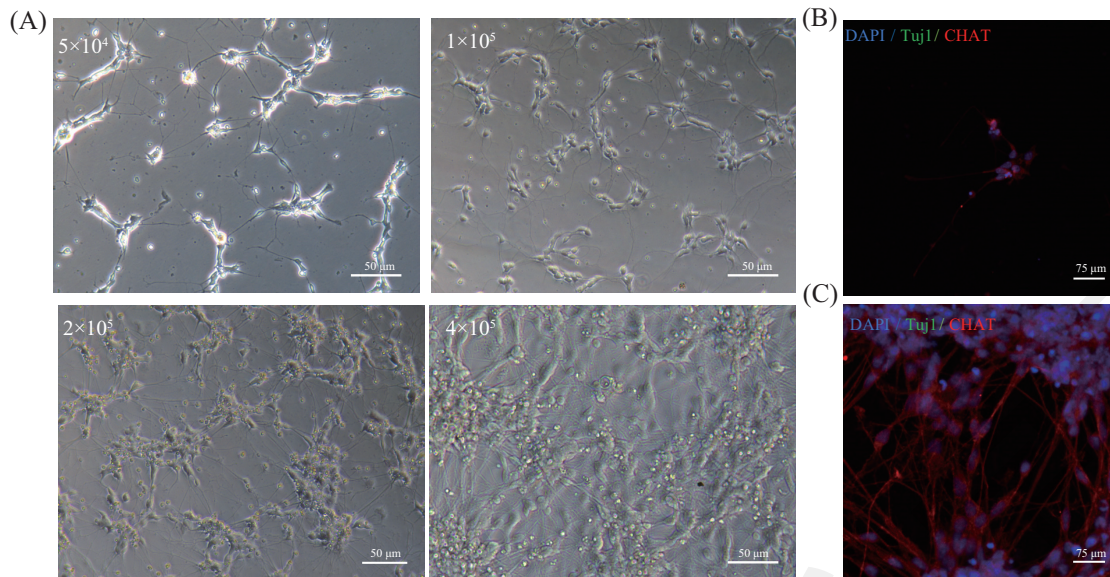


A: 在第21天, MN接种后1 h、7 h、13 h、19 h、20 h、40 h、60 h的突起的生长; B: A图中的神经突起生长的统计。

A: on the 21st day, the morphology of the cell after seeding at 1 h, 7 h, 13 h, 19 h, 20 h, 40 h, 60 h; B: statistical analysis the protrusions length of the A pictures.

图5 神经元突起的生长

Fig.5 The growth of neuronal processes



A: 在第21天, MN不同接种密度(5×10^4 个/mL、 1×10^5 个/mL、 2×10^5 个/mL、 4×10^5 个/mL)的生长状态; B、C: MN在 5×10^4 个/mL与 4×10^5 个/mL的密度时, Tuj1及CHAT的表达水平。

A: on the 21st day, the morphology of the different densities of the cells (5×10^4 /mL、 1×10^5 /mL、 2×10^5 /mL、 4×10^5 /mL); B,C: expression levels of Tuj1 and CHAT at density of 5×10^4 /mL and 4×10^5 /mL.

图6 细胞密度对MN的影响

Fig.6 Effects of the cell densities on growth and maturation of MN

第四分化阶段中的MN黏附性不强, 在细胞接种48 h后, 有部分的MN发生卷曲和漂浮现象。因此为了增加MN的黏附性, 在接种细胞前, 需要在培养皿的底部铺上特殊的细胞外基质。本实验中, 尝试了四种不同的培养外基质, 分别是: 第一组: matrigel, 37°C 培养箱包被过夜; 第二组: 层黏连蛋白(lamina-521)和多聚-L-鸟氨酸(Poly-L-ornithine, 0.1 mg/mL) 37°C 培养箱包被过夜; 第三组: 层黏连蛋白(lamina-521, $5\text{ }\mu\text{g/mL}$)在 37°C 培养箱包被3 h; 第四组: Poly-L-ornithine(0.1 mg/mL) 37°C 培养箱包被3 h后移除, 再用lamina-521($5\text{ }\mu\text{g/mL}$)在 4°C 冰箱包被24 h^[23]。通过四组实验的对比, 我们发现第四组培养外基质条件极大降低了运动神经元卷起的情况, 所以多聚-L-鸟氨酸和lamina-521的双重包培养皿被更适合MN的培养。

2.3.2 细胞接种密度对MN的影响 第四阶段, 我们发现不同的细胞接种密度对MN的生长和成熟有一定的影响。为了进一步验证这个结论, 我们对四组不同接种密度的细胞进行了比较, 分别是: 第一组: 5×10^4 个/mL; 第二组: 1×10^5 个/mL; 第三组: 2×10^4 个/mL; 第四组: 4×10^5 个/mL。通过对第8天细胞形态的观察: MN密度低于 1×10^5 个/mL时, 大部分MN死亡; MN的密度为 4×10^5 个/mL时, 细胞的轴突和树突无法伸展, 如(图6A)。同时选取了密度为 5×10^4 个/mL和 4×10^5 个/mL

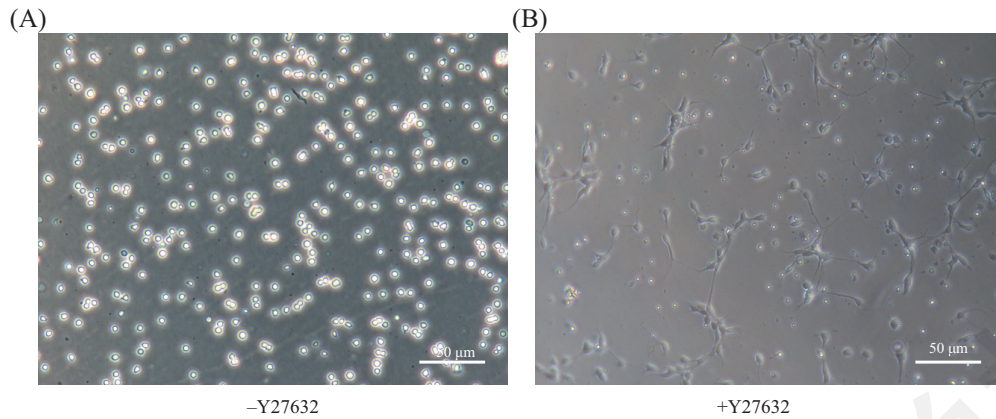
的MN进行了免疫荧光染色, 如(图6B)。我们发现当细胞接种密度在 5×10^4 个/mL至 4×10^5 个/mL之间时, 密度越高, 越利于MN的生长。初步推测, 细胞接种密度较低时, MN之间不易形成神经网络, 缺乏细胞间的交流而死亡。

2.4 Y-27632显著提高MN存活率

Y-27632是用于研究RHO相关蛋白激酶(ROCK)信号通路的一种小分子, 它可以选择性抑制ROCK的信号通路^[24-25]。添加Y-27632至无血清的胚胎干细胞培养体系中, 可以显著减少细胞诱导的凋亡, 且提高克隆的存活和效率(从~1%提高到~27%)^[26]。在经历了三个分化阶段后, MN逐渐趋于终末端细胞, 不具有增殖分化能力, 逐渐走向凋亡。第四阶段, 细胞接种的24 h后, 发现只有极小一部分MN存活(图7A)。为了提高MN的存活率, 在培养基中加入Y27632(干细胞, $10\text{ }\mu\text{mol/L}$), 于接种后2 h观察细胞状态, 90%以上的MN都可以正常生长(图7B)。ROCK抑制剂Y-27632的添加很大程度上保证了MN的高存活率。

3 讨论

运动神经元损伤引起的神经性退行性疾病主要损伤人的大脑皮层、脑干与脊髓运动神经元, 使



A: 阴性对照组(未添加Y27632); B: 添加Y27632(10 $\mu\text{mol/L}$)对MN存活性的影响, B组MN的存活率明显高于A组。
A: negative control; B: Y27632 are added (10 $\mu\text{mol/L}$), the survival rate of group B MN was significantly higher than that of group A.

图7 Y27632显著提高MN存活率

Fig.7 Y27632 significantly improves MN survival

神经肌肉连接出现紊乱, 导致控制的肌肉出现肌束震颤、自发性抽搐及自发电位。此类神经退行性疾病预后性差、发病快、致死性高。大脑中运动神经元不可再生^[27], 故很难依靠自身运动神经元的增殖进行修复。研究表明, 运动神经元损伤引起肌萎缩侧索硬化症的主要病理特征是运动神经元有毒蛋白质积累和线粒体的损伤^[28], 导致运动神经元的轴突末梢出现肿胀、胞体和轴突内的线粒体排列紊乱、线粒体的功能异常^[29]。随着再生医学的发展, 建立了啮齿类及猪等^[29-31]动物模型, 体外诱导分化为iPSCs与MN, 这些模型阐述了部分机理和治疗方法, 表明干细胞为体外探究神经退行性疾病致病机理及移植治疗带来希望。但是由于小型动物和人类遗传背景的差别, 疾病发生的早期症状和研发的药物很难适用于临床患者, 因此选取合适的模型体外诱导分化iPSCs与MN对研究神经退行性疾病至关重要。

本实验在Zhang等^[11]的研究基础上, 首次成功建立食蟹猴iPSCs到MN的分化体系。食蟹猴iPSCs经历28天包括四个不同的分化阶段后分化形成成熟MN。本实验还发现经过多聚鸟苷酸和lamina-521双重包被的培养皿、细胞的接种的密度以及ROCK抑制剂的添加将极大提高MN的存活率。这种无血清的非EB分化体系, 相较之前的分化体系, 分化过程更简单, 耗时更短, MN成熟率更高。分化体系的第二阶段, MNP可以在体外增殖5代并维持细胞原有特性, 增加了MN分化时间的灵活性。本研究分化体系的建立, 为体外探究神经系统性疾病发病机制、筛选药物、评估干细胞移植治疗的有效性和稳定性提

供了新的途径。

基于食蟹猴iPSCs的生长特性, 本实验在Zhang等^[11]的研究基础作了适当的调整, 发现N2、B27、维生素C和Glutamax等营养物质浓度的增加能够更好地维持神经元的存活和分化。N2、B27是无血清的细胞培养添加剂, 主要为细胞生长提供基本营养物质, 维持其存活和生长^[32]。在原有0.5 \times N2及0.5 \times B27的基础上提高浓度为1~2倍的N2和B27可很大程度上激活胚胎干细胞衍生的内皮细胞的增殖、分化和片层形成。VC在培养基中起抗氧化的作用, 中和增殖过程多余的自由基, 同时在干细胞中促进克隆的形成^[33]。同时, 本实验将MNP到MN的分化时间由6天延长至8天后, 得到了成熟度更高的MN。我们猜测, 食蟹猴iPSCs相较于人的hPSCs分化速度更慢。在第四阶段, 细胞适当密度的接种和ROCK抑制剂Y27632的添加极大提高了MN的存活率; Poly-L-ornithine和lamina-521的双重包被培养皿, 增强MN的黏附性, 保证了实验的顺利进行。相较于啮齿类的分化体系, 本实验利用iPSCs, 采用非EB的分化方法, 在培养体系加入了WNT信号通路的激活剂, 以及NOTCH信号通路的抑制剂, 提高了分化效率。虽然本实验只诱导分化了食蟹猴iPSCs, 没有尝试胚胎干细胞(ESC), 但是我们猜测, 根据ESC的细胞特性对分化时间和培养基作部分调整, 本研究的体系依然可以将ESC成功分化为成熟MN。另外在第四阶段, 虽然我们找到了合适的细胞外基质和凋亡抑制剂, 但是MN的黏附性和存活率低的问题依旧没有彻底解决。因此, MN诱导分化体系仍然需要进一步优化。

参考文献(References)

- 1 Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *J Med* 2017; 377(2): 162-72.
- 2 Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. Als: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 2006; 52(1): 39-59.
- 3 Naryshkin NA, Weetall M, Dakka A, Narasimhan J, Zhao X, Feng Z, *et al.* Motor neuron disease. *Smn2* splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science* 2014; 345(6197): 688-93.
- 4 Goldman SA, Nedergaard M, Windrem MS. Glial progenitor cell-based treatment and modeling of neurological disease. *Science* 2012; 338(6106): 491-5.
- 5 Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells: opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10(12): 915-29.
- 6 Han SS, Williams LA, Eggan KC. Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease. *Neuron* 2011; 70(4): 626-44.
- 7 Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002; 110(3): 385-97.
- 8 Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, *et al.* Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23(2): 215-21.
- 9 Singh Roy N, Nakano T, Xuing L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA. Enhancer-specified gfp-based facs purification of human spinal motor neurons from embryonic stem cells. *Exper Neurol* 2005; 196(2): 224-34.
- 10 Faravelli I, Bucchia M, Rinchetti P, Nizzardo M, Simone C, Fratini E, *et al.* Motor neuron derivation from human embryonic and induced pluripotent stem cells: experimental approaches and clinical perspectives. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(4): 87.
- 11 Du ZW, Chen H, Liu H, Lu J, Qian K, Huang CL, *et al.* Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2015; 6: 6626.
- 12 Xi J, Liu Y, Liu H, Chen H, Emborg ME, Zhang SC. Specification of midbrain dopamine neurons from primate pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2012; 30(8): 1655-63.
- 13 Lewis J. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9(6): 583-9.
- 14 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 63-76.
- 15 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.
- 16 Neely MD, Litt MJ, Tidball AM, Li GG, Aboud AA, Hopkins CR, *et al.* *Dmhl*, a highly selective small molecule *bmp* inhibitor promotes neurogenesis of hpsc: comparison of *pax6* and *sox1* expression during neural induction. *ACS Chem Neurosci* 2012; 3(6): 482-91.
- 17 Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human es and ips cells by dual inhibition of *smad* signaling. *Nat Biotechnol* 2009; 27(3): 275-80.
- 18 Li XJ, Hu BY, Jones SA, Zhang YS, Lavaute T, Du ZW, *et al.* Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules. *Stem Cells* 2008; 26(4): 886-93.
- 19 Scholzen T, Gerdes J. The *ki-67* protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182(3): 311-22.
- 20 Zhou Q, Wang S, Anderson DJ. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 2000; 25(2): 331-43.
- 21 Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S. Requirement for the homeobox gene *hb9* in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* 1999; 23(4): 659-74.
- 22 Mallet J, Houhou L, Pajak F, Oda Y, Cervini R, Bejanin S, *et al.* The cholinergic locus: *Chat* and *vacht* genes. *J Physiol* 1998; 92(2): 145-7.
- 23 Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, *et al.* Dopamine neurons derived from humans cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 2011; 480(7378): 547-51.
- 24 Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S. An essential part for rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* 1999; 5(2): 221-5.
- 25 Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, *et al.* Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997; 389(6654): 990-4.
- 26 Kawamata M, Ochiya T. Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(32): 14223-8.
- 27 Kesidou E, Lagoudaki R, Touloumi O, Poulatsidou KN, Simeonidou C. Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regen Res* 2013; 8(24): 2275-83.
- 28 Sheng ZH, Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: Impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13(2): 77-93.
- 29 Redler RL, Dokholyan NV. The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012; 107: 215-62.
- 30 Yang H, Wang G, Sun H, Shu R, Liu T, Wang CE, *et al.* Species-dependent neuropathology in transgenic *sod1* pigs. *Cell Res* 2014; 24(4): 464-81.
- 31 Xie Y, Zhou B, Lin MY, Wang S, Foust KD, Sheng ZH. Endolysosomal deficits augment mitochondria pathology in spinal motor neurons of asymptomatic *fals* mice. *Neuron* 2015; 87(2): 355-70.
- 32 Liu Y, Song Z, Zhao Y, Qin H, Cai J, Zhang H, *et al.* A novel chemical-defined medium with *bfgf* and *n2b27* supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346(1): 131-9.
- 33 Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, *et al.* Vitamin c enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 71-9.