

·基础研究·

## 构建具有突触传递潜能的 iPSC 源性抑制性神经网络组织

彭历芝<sup>1</sup>, 位庆帅<sup>1</sup>, 马媛媛<sup>1</sup>, 许金海<sup>2</sup>, 蒋斌<sup>2</sup>, 曾园山<sup>1,2</sup>, 曾湘<sup>1,2</sup>, 丁英<sup>1,2</sup>

(1. 中山大学中山医学院组织胚胎学与细胞生物学系, 广东 广州 510080; 2. 中山大学中山医学院广东省脑功能与脑疾病研究重点实验室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】利用人诱导多能干细胞(hiPSCs)定向分化为 $\gamma$ -氨基丁酸能(GABA)神经前体细胞后种植到脱细胞视神经(DON)材料内,以构建出具有突触形成潜能的hiPSC源性抑制性神经网络组织。为研究与治疗修复中枢神经系统损伤提供一种新的组织工程产品。【方法】采用分步定向诱导和组织工程构建技术相结合的方法。将hiPSCs体外定向诱导为GABA能神经前体细胞(hNPCs)后,种植于DON材料上三维培养,在特定神经元诱导环境下,将其进一步分化为GABA能神经元。应用透射电镜和全细胞膜片钳技术分别检测hiPSCs分化的神经元之间能否形成类突触结构,以及这些神经元是否具有自发性抑制性突触后电流。从结构与功能角度证实这些hiPSCs分化的神经元可形成具有突触传递潜能的抑制性神经网络组织。【结果】在体外将hiPSCs成功诱导出GABA能表型的抑制性神经元,且其培养28 d仍保持良好活力。透射电镜下,观察到三维材料上hiPSC源性神经细胞突起之间形成许多的细胞连接,其中一些为类突触样结构,表现为:一侧细胞突起的细胞膜稍增厚并且其内侧面胞质含有少量囊泡,形成类突触前成分的结构;其对侧为另一个细胞突起的细胞膜局部增厚,形成类突触后膜的结构。全细胞膜片钳检测可记录到已分化的hiPSC源性神经细胞具有产生动作电位和自发性抑制性突触后电流的能力。【结论】本研究表明,在体外诱导hiPSCs定向分化为GABA能神经前体细胞后种植到DON材料内三维培养,可成功构建出具有突触传递潜能的hiPSC源性抑制性神经网络组织,这将为后期研究与治疗中枢神经系统损伤提供一种新型干细胞组织工程来源的神经组织。

**关键词:**人诱导多能干细胞; $\gamma$ -氨基丁酸能神经元;神经网络组织

中图分类号:R318

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2023)01-0018-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20221220.001

### Construction of iPSC-derived Inhibitory Neural Network Tissue with Synaptic Transmission Potentials

PENG Li-zhi<sup>1</sup>, WEI Qing-shuai<sup>1</sup>, MA Yuan-huan<sup>1</sup>, XU Jin-hai<sup>2</sup>, JIANG Bin<sup>2</sup>,  
ZENG Yuan-shan<sup>1,2</sup>, ZENG Xiang<sup>1,2</sup>, DING Ying<sup>1,2</sup>

(1. Department of Histoembryology and Cell Biology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Province Key Laboratory of Brain Function and Disease, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: DING Ying; E-mail: dingying@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) into spinal cord  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-ergic progenitor cells were implanted into an decellularized optical nerve (DON) bioscaffold to construct a hiPSC-derived inhibitory neural network tissue with synaptic activities. This study aimed to provide a novel stem cell-based tissue engineering product for the study and the repair of central nervous system injury.【Methods】The

收稿日期:2022-10-26

基金项目:国家自然科学基金(81891003,81891002)

作者简介:彭历芝,硕士生,研究方向:iPSC源性抑制性神经网络构建及其治疗脊髓损伤的研究,E-mail:penglizhi1997@163.com;丁英,通信作者,副教授,E-mail:dingying@mail.sysu.edu.cn

combination of stepwise directional induction and tissue engineering technology was applied in this study. After hiPSCs were directionally induced into human neural progenitor cells (hNPCs) in vitro, they were seeded into a DON for three-dimensional culture, allowing further differentiation into inhibitory GABAergic neurons under the specific neuronal induction environment. Transmission electron microscopy and whole cell patch clamp technique were used to detect whether the hiPSCs differentiated neurons could form synapse-like structures and whether these neurons had spontaneous inhibitory postsynaptic currents, respectively, in order to validate that the hiPSC-derived neurons would form neural networks with synaptic transmission potentials from a structural and functional perspective.【Results】The inhibitory neurons of GABAergic phenotype were successfully induced from hiPSCs in vitro, and maintained good viability after 28 days of culture. With the transmission electron microscopy, it was observed that many cell junctions were formed between hiPSC-derived neural cells in the three-dimensional materials, some of which presented a synapse-like structure, manifested as the slight thickness of cell membrane and a small number of vesicles within one side of the cell junctions, the typical structure of a presynaptic component, and focal thickness of the membrane of the other side of the cell junctions, a typical structure of a postsynaptic component. According to whole-cell patch-clamp recording, the hiPSC-derived neurons had the capability to generate action potentials and spontaneous inhibitory postsynaptic currents were recorded in this biotissue.【Conclusions】The results of this study indicated that hiPSCs can be induced to differentiate into GABAergic progenitor cells in vitro and can successfully construct iPSC-derived inhibitory neural network tissue with synaptic transmission after implanted into a DON for three-dimensional culture. This study would provide a novel neural network tissue for future research and treatment of central nervous system injury by stem cell tissue engineering technology.

**Key words:** human induced pluripotent stem cells (hiPSCs);  $\gamma$ -Aminobutyric acid neurons; neural network tissue  
[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(1): 18-25]

2006年日本京都大学Yamanaka团队首次用Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4四种基因转录因子将小鼠成纤维细胞逆转去分化,重回一种与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)性质相似的干细胞,并命名为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)<sup>[1]</sup>。有报道表明iPSCs和ESCs在分子和功能上具有一定的相似性,因为它们存在类似的形态、基因表达和致癌性。但特定的启动子、重组因子和不同的遗传背景导致了两者的差异性,也体现出iPSCs的巨大潜能<sup>[2]</sup>。但在iPSCs临床试验中,还有许多挑战需要解决,如致癌性、免疫原性及细胞异质性问题<sup>[3]</sup>,其中畸胎瘤的形成是细胞移植后机体面临的最严重问题。降低畸胎瘤风险的第一步是建立有效的体外定向分化方法。本实验将人诱导多能干细胞(hiPSCs)定向诱导为 $\gamma$ -氨基丁酸能( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)能中间神经元,一方面明确了细胞命运,提高了使用的安全性及有效性,另一方面诱导其为特定类型的神经元,达到研究以及靶向治疗的目的,为后期体内移植提供可能。近年来,以干细胞为中心的组织工程技术迅速发展<sup>[4]</sup>,我们前期研究发现,脱细胞处理后的中枢神经组织可提供趋于胚胎化状态的微环境,去除了抑制神经突起生长的髓鞘成分和硫酸软骨素成分,保留了支持神经突起生长的胶原家族,层粘连蛋白家族成分<sup>[5]</sup>,成为中枢神经系统组织工程构建中的理想支架材料。虽有报道利用无血清培养基筛选法逐步将猪iPSCs定向诱导分化为前脑GABA能神经元前体细胞<sup>[6]</sup>,但目前尚未有文献报道利用hiPSC和生物材料构建具有突触传递潜能的GABA能

神经网络组织的方法。因此,在本研究中,我们首先将hiPSCs体外定向诱导为抑制性人神经前体细胞系(human neural progenitor cells, hNPCs),然后将其种植于脱细胞视神经材料上进行三维培养,使hNPCs进一步分化为抑制性GABA能神经网络组织。这种通过hiPSC和生物材料三维培养构建GABA能神经网络组织的方法有利于干细胞的定向分化及信息传递。这与GABA能神经元缺失相关的中枢神经系统疾病的研究与治疗提供了一种新型干细胞组织工程来源的神经组织。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞来源与生物工程材料 人诱导多能干细胞由中山大学干细胞与再生医学教育部重点实验室提供。视神经取自2岁成年猪(50%杜洛克血统,由西北农林科技大学动物科技学院提供)。实验动物许可证号为【SCXK(浙)2019-0001】。实验过程中对动物的处置符合《实验动物福利伦理审查指南(GB/T35892-2018)》以及中山大学动物实验中心伦理委员会的要求。

1.1.2 试剂与耗材 GelMA水凝胶(江阴司特易生物技术有限公司)、mTeSRTM1 medium(Stemcell, 85850)、Matrigel® Matrix (Corning, 354277)、Y-

27632 dihydrochloride (Tocris, 1254/1)、Mouse-anti-GABA antibody (Sigma, A0310)、Mouse-anti-Nestin antibody (abcam, ab6142)、Mouse-anti-Oct4 antibody (abcam, ab184665)、Chicken-anti-GFAP antibody (abcam, ab4674)、Rabbit-anti-Nanog antibody (abcam, ab21624)、Mouse-anti-PAX6 antibody (Sigma, AMAB91372)、Mouse-anti-PTF1A antibody (Santa Cruz Biotechnology, SC-393011)、Mouse-anti-VGLUT2 antibody (Millipore, MAB5504)、Rabbit-anti-CHAT antibody (Proteintech, 20747-1-AP)、Mouse-anti-SOX1 antibody (R&D, AF3369)、Chicken-anti-MAP2 antibody (abcam, ab5392)、羊抗小鼠 Alexa Fluor488 (abcam, ab150113)、羊抗鸡 Alexa Fluor647 (abcam, ab150171)、羊抗兔 Alexa Fluor647 (abcam, ab150079)

1.1.3 主要仪器 切片机(Thermofisher NX50, 美国), 全自动倒置荧光显微镜(Leica, DM6B, 德国), 激光共聚焦显微镜(Zeiss, LSM800, 德国), 透射电子显微镜(FEI, Tecnai Spirit Twin G2, 捷克), 集成钳制放大器(Sutter, IPA, 美国)。

## 1.2 方法

1.2.1 脱细胞视神经三维支架材料制备 参照前期技术方案<sup>[5]</sup>开展。其操作步骤为:①从猪眼球中取出视神经,新鲜猪视神经可以保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ ;②将整根的神经过切断至5 mm,浸泡于2%双抗(庆大霉素+两性霉素)的去离子水(ddH<sub>2</sub>O)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;③从4 $^{\circ}\text{C}$ 取出,浸泡于1%双抗的ddH<sub>2</sub>O,摇床(250 r/min)震荡6 h,每2 h换一次;④换3% Triton X-100 + 1%双抗 ddH<sub>2</sub>O,摇床(250 r/min)震荡12 h; ddH<sub>2</sub>O洗3次,每次10 min;⑤4%脱氧胆酸钠 ddH<sub>2</sub>O,摇床(250 r/min)震荡12 h; ddH<sub>2</sub>O洗3次,每次10 min;⑥重复(4)-(5)步骤2次;⑦DNA酶(100 $\times$ ) + RNA酶(100 $\times$ ) + MgCl<sub>2</sub>水溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床(150 r/min)震荡3 h, ddH<sub>2</sub>O洗3次,每次10 min;⑧冷冻干燥,制成脱细胞视神经材料。

1.2.2 人诱导多能干细胞(hiPSCs)复苏及培养 细胞复苏前使用Matrigel® Matrix进行铺板,在细胞培养箱中孵育2 h。从液氮罐中取出hiPSCs细胞,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中至完全融化,缓慢加入至含有4 mL mTeSRTM1培养基的15 mL的无菌离心管中,335.4 $\times g$ 离心5 min,去掉上清液,加入含有10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Y-27632 dihydrochloride 的 mTeSRTM1培养基1 mL,重悬细胞,将其种植入Matrigel® Matrix包被的孔板中,置于细胞培养箱中培养,每天更

换培养液。倒置光学显微镜下观察细胞状态,当细胞生长达到80%融合时,使用0.05% EDTA以1:6比例进行传代或进行后续分化实验。

1.2.3 人诱导多能干细胞(hiPSC)源性抑制性神经前体细胞(hNPCs)的构建 脊髓抑制神经元起源于发育中脊髓背侧的dI4结构域,基于Gong等<sup>[7]</sup>实验方案改良开展诱导分化实验。首先将培养状态良好的人诱导多能干细胞(hiPSCs)中加入SB431542 (2 mmol/L)、DMH1 (2 mmol/L)和CHIR99021 (3 mmol/L)持续诱导7 d,此时hiPSCs分化为神经上皮细胞。在诱导的第7-14 d继续加入维甲酸(RA, 0.1 mmol/L)和环丙胺(0.5 mmol/L),神经上皮细胞分化为脊髓背侧抑制性神经前体细胞。

1.2.4 构建iPSC源性抑制性神经网络组织 在无菌条件下,将7.5%(W/V)的GelMA胶和蓝光引发剂(LAP)以3:2的比例配制GelMA水凝胶。使用GelMA水凝胶将诱导的抑制性hNPCs( $1\times 10^6/10\ \mu\text{L}$ )重悬,种植入脱细胞视神经三维支架材料内,蓝光照射5 s固化。加入神经元诱导培养基(含有0.5% N2 + 1% B27 + 20  $\mu\text{g}/\text{L}$  BDNF + 20  $\mu\text{g}/\text{L}$  GDNF + 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  db-cAMP + 0.1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  RA + 200  $\mu\text{mol}/\text{L}$  AA的Neuronbasal A)继续诱导培养14 d,将祖细胞进一步诱导分化为GABA能神经元且细胞之间相互连接形成抑制性神经网络组织。诱导培养14 d后,取出三维材料置于40 g/L多聚甲醛中固定30 min后,进行横切或矢状面冷冻切片,片厚为25  $\mu\text{m}$ 。置于烘箱中烤干后,0.01 mol/L PBS漂洗3次后备用。

1.2.5 免疫荧光组织化学法染色 将培养的hiPSCs、hNPCs和hiPSC源性神经网络组织用40 g/L多聚甲醛(PFA)室温固定30 min后,用0.01 mol/L PBS漂洗3次。加入10%的山羊血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭30 min。去掉血清,分别加入一抗:anti-Oct4(1:200)、anti-Nanog(1:500)、anti-SOX1(1:500)、anti-PAX6(1:200)、anti-Nestin(1:500)、anti-PTF1A(1:200)、anti-GFAP antibody(1:400)、anti-MAP2(1:500)、anti-GABA(1:200)、anti-VGLUT2(1:500)或Anti-CHAT(1:1000)。4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。第2天复温30 min后,弃掉一抗,加入0.01 mol/L PBS漂洗3次,加入相对应的荧光二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,弃掉二抗,加入0.01 mol/L PBS漂洗3次,加入Hoechst33342,37 $^{\circ}\text{C}$ 染色15 min,常规漂洗,封片,于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.6 膜片钳检测hiPSC源性抑制性神经网络组

织内神经元的电生理特性 为了明确 hiPSC 源性神经网络的功能,我们用全细胞膜片钳方法记录培养 28 d 的 hiPSC 源性神经网络组织中分化成神经细胞膜上的钠电流,神经细胞动作电位以及微小抑制性突触后电流 (miniature inhibitory postsynaptic current, mIPSC)。膜片钳放大器为 Integrated Patch-Clamp Amplifier, IPA,并用 Igor8 软件进行信号采集且过滤频率为 1 kHz,采样频率为 50 kHz。电流钳模式下记录动作电位,电极内液成分为 (mM): 130 K-gluconate、10 KCl、10 HEPES、4 Mg<sub>2</sub>ATP、0.5 Na<sub>3</sub>GTP 和 10 Na-phosphocreatine; aCSF 存在 10 mmol/L TEA-Cl,电压钳模式下记录钠电流 (内液 140 mmol/L CsCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L HEPES)。aCSF 存在 1 μmol/L TTX, 20 μmol/L CNQX 与 100 μmol/L D, L-APV,电压钳模式下记录抑制性突触后电流 (内液 140 mmol/L CsCl, 0.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 8 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EGTA, 5 mmol/L QX-314, 10 mmol/L HEPES, 4 mmol/L Mg<sub>2</sub>ATP 和 0.5 mmol/L Na<sub>3</sub>GTP)。

1.2.7 透射电镜下观察人诱导多能干细胞源性神经元之间突触形成 将培养 28 d 的 hiPSC 源性神经网络组织支架材料用 40 g/L 戊二醛固定 30 min; 1% 锇酸钨化 1 h 后, PB 清洗 2 次, 每次 5 min; 梯度酒精处理, 依次为 50% 酒精 1×15 min、70% 酒精 1×15 min、95% 酒精 2×15 min、100% 酒精 2×15 min 和 100% 丙酮 2×15 min; 然后 50% Epon812 包埋剂浸透 2 h, 100% Epon812 包埋剂浸透过夜; 最后 100% Epon812 包埋剂包埋组织块, 60 °C 烤箱聚合 48 h。将 hiPSC 源性神经网络组织包埋块进行半薄切片, 甲苯胺蓝染色, 定位后再进行超薄切片, 经醋酸铀和柠檬酸双重染色, 电镜下观察。重点观察支架材料内细胞之间的连接, 分析突触连接形态。

### 1.3 统计学分析

在鉴定 hiPSCs 及其分化表型的每种标记物的细胞免疫荧光组化染色的细胞爬片中, 任意选取 3 个不重复的高倍视野, 计算视野中的标记物阳性的细胞百分率, 每个独立实验重复 5 次。数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理。

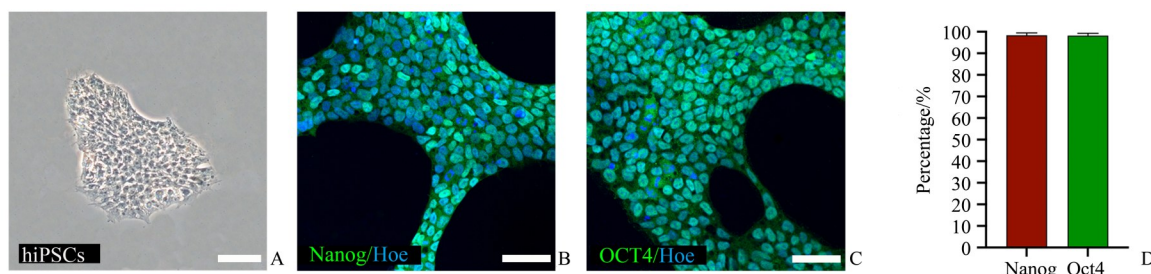
## 2 结果

### 2.1 人诱导多能干细胞的培养及鉴定

人诱导多能干细胞 (hiPSCs) 的形态及各标记物的表达情况如图 1 所示。由图可见, 在倒置相差显微镜 (图 1A) 下观察到 hiPSCs 呈扁平克隆样生长, 克隆边缘光滑, 克隆内的细胞紧密排列, 单个细胞呈圆形, 核仁明显且核质比高。免疫细胞荧光化学染色显示 hiPSCs 标记物 Nanog (图 1B) 与 Oct4 (图 1C) 高水平特异性表达。Nanog 和 Oct4 的阳性细胞百分率分别为 (98.3±1.2)% 和 (98.2±1.1)% (图 1D)。上述结果显示体外培养的 hiPSCs 具有特征性的细胞形态与标记物的表达, 可用于下一步的诱导。

### 2.2 hiPSC 源性 GABA 能神经祖细胞的培养及鉴定

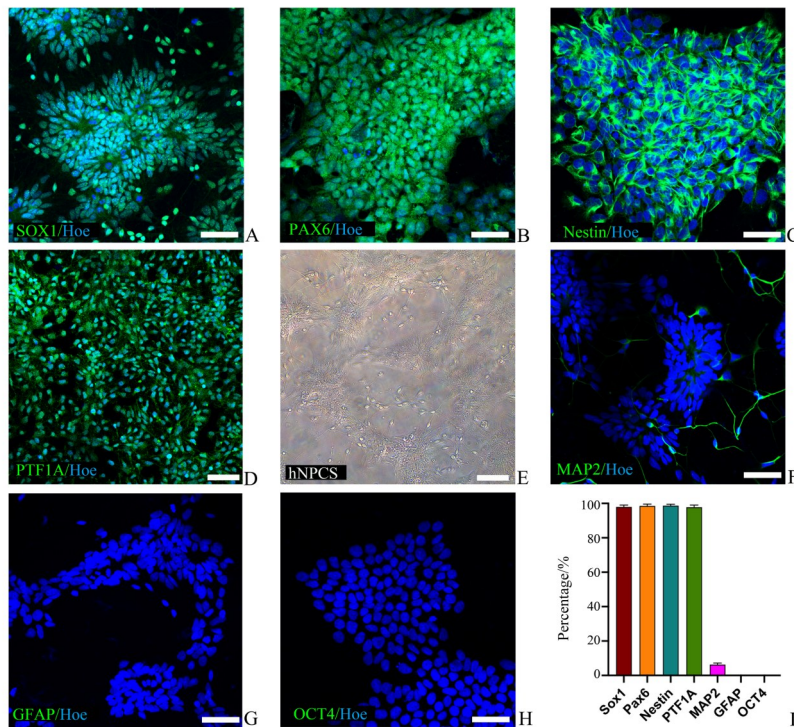
人诱导多能干细胞 (hiPSCs) 在体外诱导 14 d 后, 分化为神经上皮细胞, 继而分化为 dl4 区的人抑制性神经前体细胞 (hNPCs)。应用细胞免疫荧光化学染色鉴定神经祖细胞标记物 Pax6、Sox1、Nestin、PTF1A 的表达, 其中 PTF1A 是脊髓背侧祖细胞的标记物。结果显示, Sox1 (图 2A), Pax6 (图 2B), Nestin (图 2C) 和 PTF1a (图 2D) 在 hNPCs 细胞内高水平特异性表达。在倒置相差显微镜 (图 2E) 下观察到 hNPCs 形态较均一, 有细胞突起生长。以上结果表明利用 hiPSCs 成功诱导形成了高纯度的 hNPCs。同时, 我们也观察到有少量的 hNPCs 可自发分化为 MAP2 阳性神经元 (图 2F), 但未检测到 hNPCs 向 GFAP 阳性星形胶质细胞 (图 2G) 的分化。在 hNPCs 里也未检测 OCT4 的表达 (图 2H)。计数统计分析结果 (图 2I) 显示, Sox1、Pax6、Nestin 和 PTF1A 阳性细胞百分率分别是 (97.9±1.1)%、(98.5±1.1)%、(98.7±0.9)% 和 (97.8±1.3)%。



A. Cell morphology under inverted phase contrast microscope. B. hiPSCs expressing Nanog (green). C. hiPSCs expressing Oct4 (green). D. A bar chart showing the percentage of cells expressing Nanog or Oct4 in hiPSCs, respectively. Scale bars in A-C = 50 μm.

图 1 人诱导多能干细胞 (hiPSCs) 培养及其标记物的表达

Fig. 1 Culture of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and expression of the representative markers



The representative figures of the immunostaining positive cells for Sox1 (A), Pax6 (B), Nestin (C), and PTF1A (D). E: cell morphology of hNPCs under phase contrast microscope. F: MAP2 expression of hNPCs. G-H: GFAP and Oct4 were not detected in hNPCs. I: A bar chart showing the percentage of immunopositive cells with different markers. Scale bars in A-H = 50  $\mu\text{m}$ .

图2 hiPSCs 源性 hNPCs 细胞形态及其标记物的表达

Fig. 2 Cell morphology and expression of markers of hiPSCs derived hNPCs

### 2.3 人诱导多能干细胞源性神经元神经递质类型的检测

hiPSC 源性 hNPCs 体外向抑制性神经元诱导分化 14d 后,利用细胞免疫荧光化学染色检测 hiPSC 源性神经元  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)、胆碱乙酰转移酶(ChAT)、及谷氨酸转运蛋白 2(vGLUT2)的表达情况。染色结果表明,hiPSC 源性神经元多表达 GABA(图 3A-C,绿色荧光),少量 hiPSC 源性神经元表达 vGLUT2(图 3D-F,红色荧光),未检测到 hiPSC 源性神经元表达 ChAT 兴奋性神经递质(图 3G-H)。这些结果说明我们在体外构建了一种以抑制性神经元为主的神经网络组织。

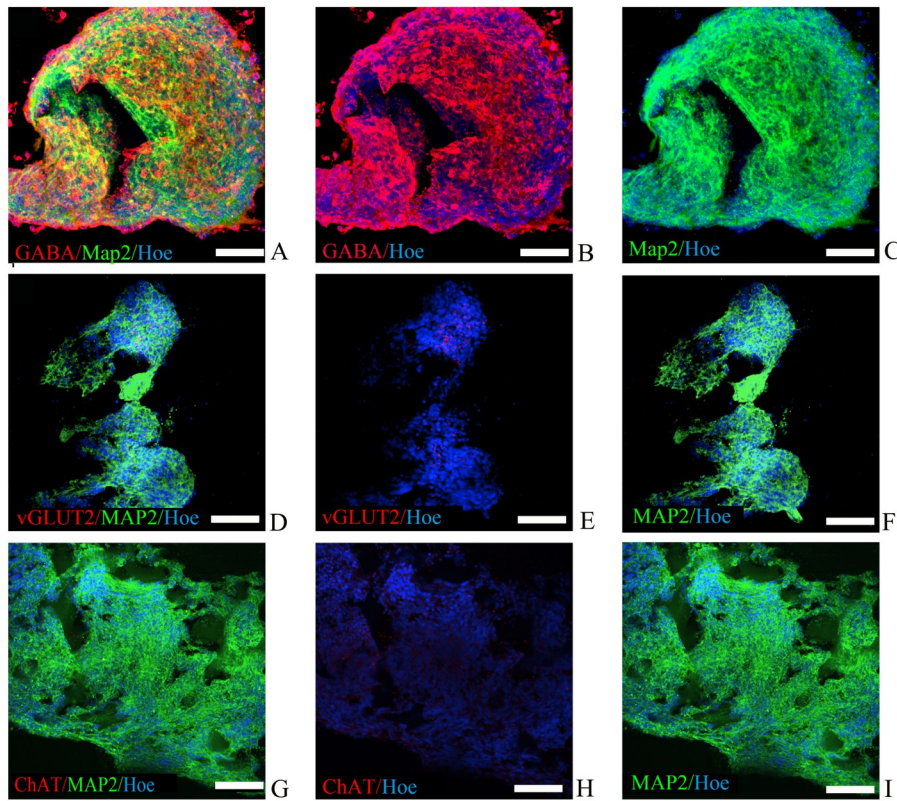
### 2.4 透射电镜下观察人诱导多能干细胞源性神经元之间突触样结构

为验证在体外所构建的 hiPSC 源性抑制性神经网络组织中的神经元之间是否存在信息传递,具有形成突触的潜能。三维材料(图 4A、B)上诱导 14 d 及二维(图 4C)条件下诱导 14 d 细胞的免疫细胞荧光化学染色显示 hiPSC 源性神经元可检测到突触前成分标记物:突触蛋白 1(Syn1),且可见神经元标记物 MAP2 阳性细胞(绿色荧光)与突触前蛋白 1(Syn1)(红色荧光)的共标(图 4A、B、C)。这些结果说明 hiPSC 源性神经网络组织具有形成突触的潜能。将 hiPSC 源性 hNPCs 种植于脱细胞视神经材料上诱导 28 d 后,40 g/L

戊二醛固定 30 min 材料,后进行透射电镜材料的处理。半薄切片甲苯胺蓝染色可观察到 hiPSC 源性细胞胞体染色(图 4D,蓝色),透射电镜下观察到 hiPSC 源性神经细胞之间的轴突,同时观察有突触小泡分布在轴突内(图 4E,红色箭头),高倍镜下可观察到长径约 50 nm 的扁平圆形小泡(图 4F,红色箭头),突触前部和突触后部相对应的细胞膜较其余部位略增厚,致密物质厚度近似,突触间隙较窄(10~20 nm)。这提示 hiPSC 源性 hNPCs 种植在 DON 三维支架材料向神经元诱导分化 28 d 后,可以分化为具有类突触传递潜能神经元,并具有抑制性突触样结构特征。

### 2.5 膜片钳检测人诱导多能干细胞源性神经元电生理特性

hiPSC 源性 hNPCs 在体外向抑制性神经元诱导培养 28 d 后,hiPSC 源性神经元可诱导出钠电流(图 5A),这证明 hiPSC 源性神经元产生动作电位的钠通道以电压依赖方式打开。体外培养 28 d 后,hiPSC 源性神经元可记录到成熟的神经元动作电位(图 5B),钳制细胞在 -70 mV,可以记录抑制性微小突触后电流(mIPSC,图 5C),当加入 PTX(可阻断 GABA<sub>A</sub>受体所介导的抑制性突触后电流)mIPSC 被有效阻断(图 5D),全细胞膜片钳记录结果提示 hiPSC 源性神经元体外诱导可以分化为成熟的 GABA 能神经元,且其具备跨突触电活动能力。



A-C: The co-labeling immunostaining of GABA (green) and MAP2 (red) showed that most hiPSC-derived MAP2<sup>+</sup> neurons were GABAergic (GABA) neurons. D-F: The co-labeling immunostaining of vGLUT2 (red) and MAP2 (green) showed that only a small portion of hiPSC-derived MAP2<sup>+</sup> neurons were vGLUT2<sup>+</sup> glutamatergic neurons. G-I: hiPSC derived MAP2<sup>+</sup> neurons were not ChAT<sup>+</sup> cholinergic neurons. Scale bars in A-I = 50  $\mu\text{m}$ .

图3 人诱导多能干细胞源性神经元表达的神经递质类型

Fig. 3 Types of neurotransmitters expressed by hiPSC-derived neurons

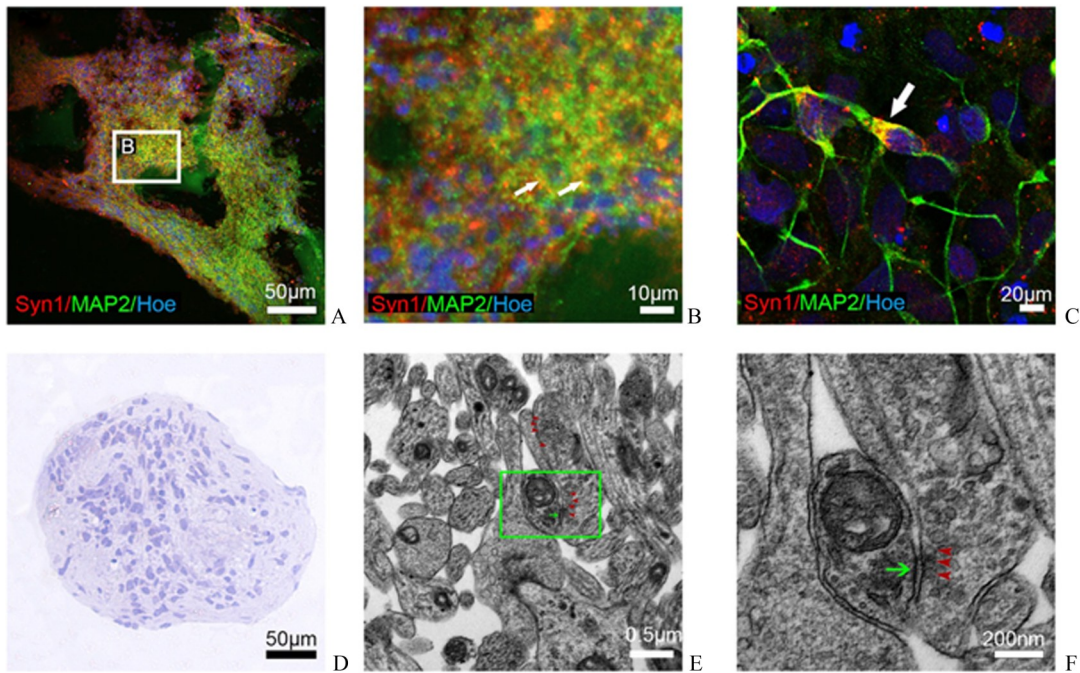
### 3 讨论

$\gamma$ -氨基丁酸能神经元(GABAergic neuron)是以GABA为递质的神经元。GABA能神经传递的失调与多种神经退行性疾病和病理生理障碍有关。例如,慢性神经性疼痛的病理生理学与癫痫类似,是由于GABA能神经元的功能丧失,导致抑制性GABA信号传导功能失调<sup>[8]</sup>。将胚胎皮质GABA能前体神经元移植到神经损伤小鼠的脊髓中可以逆转坐骨神经损伤模型和紫杉醇产生的神经性疼痛化疗模型中的超敏反应<sup>[9]</sup>。有研究证实利用ESC衍生的脊髓GABA能神经元鞘内移植到小鼠T10-T11周围的脊髓病变区域能神经元显著减轻脊髓损伤后的慢性神经性疼痛<sup>[10]</sup>。Braz等<sup>[11]</sup>利用小鼠模型证实MGE衍生的GABA可以有效逆转周围神经损伤引起的神经性疼痛及产生的机械性痛觉超敏反应,并且在神经性慢性瘙痒的Bhlhb5突变小鼠模型中具有止痒作用。GABA能神经元的移植还可以逆转运动神经元的兴奋失衡,减轻脊髓损伤引起的痉挛,并且用可激活移植的GABA神经元的氯氮平-N-氧化物可进一步减轻痉挛样反应<sup>[7]</sup>。除此之外GABA能神经元功能失调还与包括抑郁症<sup>[12-13]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[14-15]</sup>、帕金森病<sup>[16]</sup>、成瘾<sup>[17]</sup>、焦虑<sup>[18]</sup>、

精神分裂症<sup>[19]</sup>、胃食管反流病(GERD)<sup>[20]</sup>有关。体外定向分化出GABA能神经元为上述疾病的治疗提供了新思路。

生物支架材料在组织工程研究中发挥着重要的作用,合适的生物支架材料可以为组织工程的移植细胞提供一个三维的生长、营养空间,同时对损伤部位空洞进行填充和替代,进而引导轴突再生与神经环路的重建。本课题组前期实验研究集中在体外利用三维明胶海绵支架材料及大鼠或比格犬的BMSCs/NSCs构建外源性神经网络组织且获得自主知识产权<sup>[21]</sup>。但在临床转化过程中,人MSCs能否分化为遗传学上的神经元尚存在一定的争议,而使用人NSCs的临床转化中其细胞来源存在一定的伦理及法律争议。因此,hiPSCs以其多向分化的潜能、细胞来源的广泛性、无法律伦理方面的争议成为在人干细胞源性神经网络组织构建中较理想的种子细胞来源。但是,灵长类甚至人的干细胞能否在体外构建具有突触传递潜能的抑制性神经网络组织,为后续研究与治疗提供基础仍有待深入探讨。

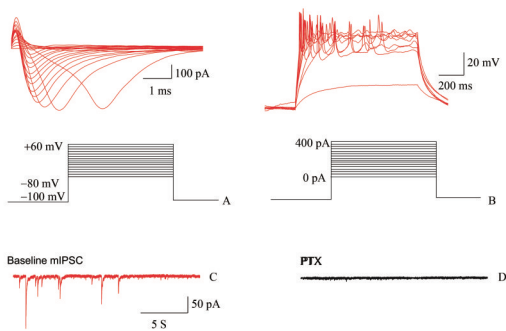
本课题组自主研发的脱细胞的猪视神经作为支架材料,它不仅去除了抑制神经纤维生长的髓鞘成分和硫酸软骨素成分,而且还保留了有利于细胞和神经纤维生长的细胞外基质、多孔隙形态特征和适宜的机械性能<sup>[5]</sup>。脱细胞视神经支架及其降解产物无毒副作用,材料来源广泛、价格



A: The expression of presynaptic marker 1 (Syn1, red) and MAP2 (green, neuronal marker) after the hiPSC-derived neural network tissue was constructed in vitro for 14 days. B: A high magnification of the boxed area in Fig 4A showed the co-labeling staining with Syn1 (red) and MAP2 (green). C: hiPSC-derived neurons were cultured under two-dimensional conditions as control. After 14 days of induction, the expression of Syn1 (red) was co-localized with MAP2 (green). D: iPSC-derived inhibitory neural network tissue was semi-thin sectioned and stained with toluidine blue. E: Transmission electron microscopy showed that the synaptic structures (green arrows) such as axons and synaptic vesicles (red arrows) between cells. F: A higher magnification of the boxed area in Fig 4E showed synaptic vesicles (red arrows) and synaptic structures (green arrows) between neurons. Scale bars in A, D = 50  $\mu\text{m}$ , B = 10  $\mu\text{m}$ , C = 20  $\mu\text{m}$ , E = 0.5  $\mu\text{m}$  and F = 200 nm

图4 hiPSC源性抑制性神经网络组织类突触形成检测

Fig. 4 hiPSC derived inhibitory neural network tissue synaptic formation detection



A: Sodium currents could be recorded in hiPSC derived neurons. B: Action potentials were recorded in whole cell mode at 28 days after hiPSC derived hNPCs were induced in the bio-tissue. C: mIPSCs were recorded at 28 days in the bio-tissue. D: PTX (GABA receptor antagonist) completely blocked mIPSC.

图5 hiPSC源性hNPCs分化为抑制性神经元的电生理特征  
Fig. 5 Electrophysiological features of hiPSC-derived hNPCs differentiating into inhibitory neurons

低廉易获得。另外, GABA能神经元信息传递的失调与多种神经退行性疾病和脊髓损伤的慢性疼痛和强直痉挛密切相关<sup>[7-16]</sup>。因此, 将hiPSCs诱导分化为抑制性GABA能神经元是治疗某些因GABA能神经元失调引起的疾病是十分有必要的。目前尚未有文献报道利用hiPSC和脱细胞猪视神经生物材料构建具有突触传递潜能的GABA能神经网络组织的方法。因此, 本研究将hiPSCs在体外预先诱导成抑制性神经前体细胞(hNPCs), 然后将其种植在脱细胞视神经支架材料上进行三维培养和GABA能神经元诱导分化, 最终成功构建了具有突触传递功能的GABA能神经网络组织。本研究提供的这种具有特定神经元表型的神经网络组织则可以规避干细胞移植带来的异位神经发生的问题, 提高干细胞治疗的安全性与有效性。综上所述, 我们在体外利用干细胞和生物支架材料成功构建出了一种具有突触形成潜能的iPSC源性抑制性神经网络组织, 这将为某些具有GABA能神经元功能失调特征的中枢神经系统疾病的治疗研究提供了一种新型干细胞组织工程神经组织。

## 参考文献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676.
- [2] Petit I, Kesner NS, Karry R, et al. Induced pluripotent stem cells from hair follicles as a cellular model for neurodevelopmental disorders [J]. *Stem Cell Res*, 2012, 8(1): 134–140.
- [3] Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4): 523–531.
- [4] Zeng X, Qiu XC, Ma YH, et al. Integration of donor mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells into host neural network after rat spinal cord transection [J]. *Biomaterials*, 2015, 53: 184–201.
- [5] Sun J-H, Li G, Wu T-T, et al. Decellularization optimizes the inhibitory microenvironment of the optic nerve to support neurite growth [J]. *Biomaterials*, 2020, 258: 120289.
- [6] Zhu H, Sun T, Wang Y, et al. Directed differentiation of porcine induced pluripotent stem cells into forebrain GABAergic neuron progenitors [J]. *J South Med Univ*, 2021, 41(6): 820–827.
- [7] Gong C, Zheng X, Guo F, et al. Human spinal GABA neurons alleviate spasticity and improve locomotion in rats with spinal cord injury [J]. *Cell Rep*, 2021, 34(12): 108889.
- [8] Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2001, 42 Suppl 3: 8–12.
- [9] Basbaum AI, Braz JM. Cell transplants to treat the "disease" of neuropathic pain and itch [J]. *Pain*, 2016, 157(2): S42–S47.
- [10] Hwang I, Hahn SC, Choi KA, et al. Intrathecal transplantation of embryonic stem cell-derived spinal GABAergic neural precursor cells attenuates neuropathic pain in a spinal cord injury rat model [J]. *Cell Transplant*, 2016, 25(3): 593–607.
- [11] Braz JM, Juarez-Salinas D, Ross SE, et al. Transplant restoration of spinal cord inhibitory controls ameliorates neuropathic itch [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(8): 3612–3616.
- [12] Jacobson LH, Vlachou S, Slattery DA, et al. The Gamma-Aminobutyric Acid B Receptor in Depression and Reward [J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83(11): 963–976.
- [13] 陈舒婷, 任力, 闵苏. 氨基酸能神经元在丙泊酚缓解抑郁模型大鼠电休克后脑损伤中的作用 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2020, 46(3): 159–165.
- [14] Chen ST, Ren L, Min S. The role of GABAergic neurons in propofol-mediated alleviation of electroconvulsive shock-induced learning and memory impairment in rats with depression after electroshock [J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2020, 46(3): 159–165.
- [15] Sun ZQ, Sun L, Tu LX. GABA(B) receptor-mediated PI3K/Akt signaling pathway alleviates oxidative stress and neuronal cell injury in a rat model of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 76(4): 1513–1526.
- [16] 钟斯然, 邝琦, 覃宁, 等. ATRNL1在阿尔茨海默病中的基因功能分析及ceRNA网络预测 [J]. *重庆医科大学学报*, 2022, 47(7): 871–876.
- [17] Zhong SR, Kuang Q, Qin N, et al. Gene function analysis of ATRNL1 and ceRNA network construction in Alzheimer's disease [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2022, 47(7): 871–876.
- [18] Tyagi RK, Bisht R, Pant J, et al. Possible role of GABA-B receptor modulation in MPTP induced Parkinson's disease in rats [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2015, 67(2): 211–217.
- [19] Maccioni P, Colombo G. Potential of GABA(B) receptor positive allosteric modulators in the treatment of alcohol use disorder [J]. *CNS Drugs*, 2019, 33(2): 107–123.
- [20] Kalinichev M, Girard F, Haddouk H, et al. The drug candidate, ADX71441, is a novel, potent and selective positive allosteric modulator of the GABA(B) receptor with a potential for treatment of anxiety, pain and spasticity [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 114: 34–47.
- [21] Glausier JR, Lewis DA. GABA and schizophrenia: Where we stand and where we need to go [J]. *Schizophr Res*, 2017, 181: 2–3.
- [22] Lehmann A, Jensen JM, Boeckxstaens GE. GABA(B) receptor agonism as a novel therapeutic modality in the treatment of gastroesophageal reflux disease [M]//Blackburn TP. *GABA(B) Receptor Pharmacology: A Tribute to Norman Bowery*. Elsevier Academic Press Inc, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, Ca 92101–4495 USA. 2010: 287–313.
- [23] Li G, Zhang B, Sun JH, et al. An NT-3-releasing bioscaffold supports the formation of TrkC-modified neural stem cell-derived neural network tissue with efficacy in repairing spinal cord injury [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(11): 3766–3781.