一种用于药物神经毒性体外评价的外周神经元分化方法的建立

王美婷[1]，杨　鑫[1]，徐轶冰[2]，张艺哲[1]，汪溪洁[1*]
(1. 中国医药工业研究总院，上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203；2. 南京艾尔普再生医学科技有限公司，江苏南京 211100)

摘要：本试验探索了一种人诱导多能干细胞（hiPSC）向外周神经元定向诱导分化的方案，并用以评价药物神经毒性。采用小分子抑制剂及神经营养因子将 hiPSC 进行定向诱导分化，成功建立 hiPSC 分化的外周神经元（hiPSC-PNs）模型，并通过免疫荧光法和实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应（RT-qPCR）对其相关标志物进行鉴定，结合高内涵成像技术评价长春新碱对所得 hiPSC-PNs 的神经毒性。结果显示，所分化的 hiPSC-PNs 能表达特异性标志物，并且长春新碱显著降低了 hiPSC-PNs 的神经突长度，具有外周神经毒性风险。本试验提供了一种新的 hiPSC 向外周神经元的分化方法，提高分化效率的同时也改善了分化时程，并且 hiPSC-PNs 模型结合高内涵成像技术在药物神经毒性评价方面具有广阔的发展前景。

关键词：人诱导多能干细胞；外周神经元；长春新碱；药物神经毒性；毒性评价
中图分类号：R996　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)04-0543-10
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.04.017

Establishment of a Peripheral Neuron Differentiation Method for *in vitro* Drug-induced Neurotoxicity Evaluation

WANG Meiting[1], YANG Xin[1], XU Yibing[2], ZHANG Yizhe[1], WANG Xijie[1*]
(*1. Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Help Stem Cell Innovations Co., Ltd., Nanjing 211100*)

ABSTRACT: The directed differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) into peripheral neurons was explored in this paper, and hiPSCs was used to evaluate drug-induced neurotoxicity. The directed differentiation of hiPSCs was induced by a combination of selected small molecule inhibitors and neurotrophins, and the hiPSC-derived peripheral neurons (hiPSC-PNs) model was established successfully. After the identification of peripheral neurons relevant markers using immunofluorescence and real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), vincristine-induced neurotoxicity of hiPSC-PNs was evaluated by combining the high-content imaging technique. The results showed that hiPSC-PNs expressed the specific markers. In addition, vincristine significantly reduced the neurite length of hiPSC-PNs and had the risk of peripheral neurotoxicity. This study provided a new differentiation method in which hiPSCs could be directed to differentiate into peripheral neurons. Moreover, the new method improved the differentiation efficiency and time course. The hiPSC-PNs model combined with a high-content imaging technique could have broad prospects in drug-induced neurotoxicity evaluation.

Key Words: human induced pluripotent stem cell; peripheral neuron; vincristine; drug-induced neurotoxicity; toxicity evaluation

在脊椎动物的发育过程中，外周神经元来源于神经嵴，包括背根神经节（dorsal root ganglion，DRG）、三叉神经节等躯体感觉神经元和一些与内脏活动有关的神经元等。初级感觉神经元的胞体位于 DRG 或三叉神经节内，介导疼痛和瘙痒等躯体

收稿日期：2021-05-11
基金项目：上海市科委“科技创新行动计划”项目(19140901500)
作者简介：王美婷(1996—)，女，硕士研究生，专业方向：药物毒性评价。
通信作者：汪溪洁(1979—)，女，研究员，主要从事药物毒理学研究。
E-mail：xjwang@ncdser.com

感觉，其中小直径的无髓C纤维感觉神经元是用于疼痛和瘙痒研究的主要体外模型[1—2]。另外，许多药物会引起外周神经系统功能改变，如神经病变等[3]。目前药物诱导的神经毒性评价主要是采用啮齿类动物体外模型，然而这种模型具有一定的局限性，啮齿类动物试验结果外推至人的可靠性有限，因此充足的人源性外周神经元模型对于评价药物外周神经毒性具有十分重要的意义[4—5]。由于伦理问题，人外周神经元的来源十分有限，亟待寻找人外周神经元的体外替代模型。

人诱导多能干细胞（human induced pluripotent stem cell，hiPSC）技术是近些年的研究热点。hiPSC来源广泛，除了通过成纤维细胞、角质细胞和外周血细胞等重编程获得之外，近年来研究发现尿液细胞也可获得hiPSC，取材更方便且来源更充足[6]。此外，hiPSC规避了使用人胚胎干细胞（human embryonic stem cell，hESC）所带来的伦理道德问题，可在体外大规模产生多种人源性的细胞类型，其中分化得到的心肌细胞和肝细胞应用较广泛[7—8]。在神经科学领域，目前的研究表明，hiPSC可成功分化获得多巴胺神经元、运动神经元和胶质细胞等，并有望作为补充和替代缺损的神经元，通过临床移植进一步用于帕金森病、脊髓损伤和胶质细胞相关疾病等的治疗，为患者带来新的希望[9—11]。

目前已可通过多种方法将hiPSC成功分化为外周神经元[12—15]。早期主要采用基质细胞共培养法进行外周神经元的分化，基质细胞大多选择PA6细胞等，但由于基质细胞的存在使得培养条件不清楚、诱导时间较长且分化效率低[16]。2012年，研究人员开始转向研究单层培养法进行外周神经元的分化，从多种小分子化合物中筛选出5种小分子抑制剂的组合，成功将hiPSC分化得到外周神经元[13]。迄今为止，研究人员一直致力于优化小分子抑制剂的组合，以期得到诱导时间短且分化效率高的外周神经元，但采用这些方法分化得到的外周神经元的纯度仍需进一步提高，并且目前的分化方法操作较复杂，整个分化周期中需要较频繁地调整培养基的成分[14,17]。

在上述基础上，本课题组重新优化组合了培养基中的小分子抑制剂及神经营养因子，提出了一种新的外周神经元诱导分化方法，提高了hiPSC向外周神经元的分化效率。另外，通过反复摸索调整hiPSC神经诱导阶段使用的培养基，最终将CHAMBERS等使用的多种诱导培养基更换为一种小分子抑制剂组合的外周神经元分化培养基[13]，从而大幅简化并明显缩短了外周神经元的诱导过程。本研究建立了通过调控多种信号转导通路将hiPSC诱导分化为外周神经元的方法，并采用免疫荧光法和实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应（RT-qPCR）技术对hiPSC分化的外周神经元（hiPSC-derived peripheral neurons，hiPSC-PNs）进行形态和功能鉴定，结合高内涵成像技术用于药物神经毒性体外评价，以期获得可用于药物神经毒性评价的稳定可靠的外周神经元分化方法。

1　仪器与试药

IX73型荧光倒置显微镜（日本Olympus公司）；Nanodrop 2000型超微量分光光度计和Cellomics Array Scan VTI型高内涵细胞分析系统（美国Thermo Fisher Scientific公司）；QuantStudio 7 Flex型实时荧光定量PCR仪（美国Applied Biosystems公司）；A200型基因扩增仪（中国杭州朗基科学仪器有限公司）。

Essential 8培养基、DMEM/F12培养基、Neurobasal培养基、TrypLE Express温和胰酶、杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS）、非必需氨基酸、丙酮酸钠、GlutaMAX培养基、B-27添加剂（一种无血清的神经细胞添加剂）、二甲基亚砜（DMSO）、兔抗多能干细胞（Oct3/4）、外周神经前体细胞（Sox10）、瞬时受体电位香草酸亚型1（TRPV1）抗体、羊抗小鼠二抗、羊抗兔二抗、Hoechst 33342荧光染料、RT-qPCR引物和PowerUp SYBR Green Master Mix预混液（美国Thermo Fisher Scientific公司）；Matrigel基质胶（美国Corning公司）；小分子抑制剂PM supplement、NM-1 supplement和NM-2 supplement（南京艾尔普再生医学科技有限公司）；兔抗β微管蛋白（anti-beta Ⅲ Tubulin，Tuj-1）和兔抗外周蛋白（peripherin，PRPH）抗体（英国Abcam公司）；小鼠抗Brn3a和胰岛素增强子结合蛋白-1（insulin gene enhancer protein 1，Isl1）抗体（美国Santa Cruz Biotechnology公司）；

兔抗电压门控钠离子通道 1.7（Nav1.7）和瞬时受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 8（TRPM8）抗体［爱必信（上海）生物科技有限公司］；RNeasy Mini Kit 和 QuantiTect 逆转录试剂（德国 Qiagen 公司）；长春新碱（vincristine，上海阿拉丁生化科技股份有限公司，含量 100 mg，货号 V107236）；钙黄绿素乙酰甲酯（calcein acetoxymethyl ester，钙黄绿素 AM，北京索莱宝科技有限公司）。

hiPSC（南京艾尔普再生医学科技有限公司，编号 GI-hiPSC，货号 HELP0046）。

2 方法与结果

2.1 hiPSC 的维持培养

六孔板中提前加入用 DMEM/F12 培养基 1 ∶ 100 稀释的 Matrigel 基质胶，在培养箱中包被至少 20 min。吸弃六孔板中的 Matrigel 基质胶，加入 Essential 8 培养基，将从液氮罐中取出的 hiPSC 复苏接种于包被好的六孔板中，置培养箱中于 37 ℃、5%二氧化碳条件培养。每天更换 Essential 8 培养基，当细胞融合度为 70%～80%时进行传代或冻存。传代时用 TrypLE Express 温和胰酶在培养箱中消化 3 ～ 5 min；冻存液由 Essential 8 培养基和 DMSO（9 ∶ 1）混合配制而成。

2.2 hiPSC 向外周神经元的诱导分化

取融合度达到 70 %～ 80 %的 hiPSC，加入 TrypLE Express 温和胰酶在培养箱中消化 3 ～ 5 min，消化为单细胞后加入等体积的外周神经元分化培养基（组成为：50 % DMEM/F12+50 % Neurobasal+1%非必需氨基酸 +1 mmol/L 丙酮酸钠 + 0.5% GlutaMAX +1% B-27+1% PM supplement）终止消化，于室温条件下离心（300×*g*）5 min 得到外周神经元分化培养基重悬细胞，将其以每 1 cm^2 含细胞 2×10^4 个的密度接种于预先用 Matrigel 基质胶包被过的培养瓶中，摇晃使细胞均匀分布后放入培养箱中，设定重铺诱导当天为 D0'。D2' 时完全更换新鲜的外周神经元分化培养基，随后每天更换外周神经元分化培养基直至 D8' 或 D10'，具体时间根据 hiPSC 的形态变化而定。从 D8' 或 D10' 开始，外周神经元进入成熟阶段，将细胞消化后以每 1 cm^2 含细胞（1 ～ 1.5）$\times10^4$ 个的密度接种于预先用 Matrigel 基质胶包被过的板中，加入外周神经元成熟培养基 -1（即将外周神经元分化培养基中的 1 % PM supplement 替换为 1% NM-2 supplement），重铺成熟当天设定为 D0。D2 及 D3 时更换 50%的外周神经元成熟培养基 -1，从 D4 开始更换 75%的外周神经成熟培养基 -2（即将外周神经元分化培养基中的 1% PM supplement 替换为 1% NM-1 supplement），随后每隔 2 d 更换 75%的外周神经元成熟培养基 -2，D10 之后可用于后续试验。

hiPSC 向外周神经元分化的流程图如图 1 所示，其中 D0' 到 D10' 是细胞诱导分化阶段，根据细胞分化情况在 D8' 至 D10' 间重铺细胞，最多不超过 D12'；重铺之后为外周神经元的成熟阶段，根据需求可用于后续试验。采用 ToupView v3.7 和 Andor SOLIS VSC-04502 软件对试验数据进行图片处理，D0' 时 hiPSC 未开始分化，细胞边缘清晰光滑，透光性好，胞核较大，细胞群表现为长边、扁平且较为紧密。细胞诱导分化过程中细胞群逐渐出现突起，至 D8' 时细胞形态发生明显变化，大部分细胞具有较长的突起，出现明显的神经元特征。细胞重铺后逐渐成熟，从 D4 开始细胞胞体呈椭圆、三角或菱形，并且伸展出类轴突，随时间逐渐延长形成复杂的神经网络结构，结果显示 hiPSC 分化为成熟的外周神经元（图 2）。

2.3 免疫荧光法鉴定外周神经元标志物的表达

预先用 4 %多聚甲醛作溶剂配制含 1 %牛血清白蛋白（BSA）和 0.2 %聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）的固定封闭破膜液；用 1% BSA 作溶剂，向其中加入 Triton X-100，稀释为 0.2 % 的 Triton X-100，即得封闭液。根据各种抗体说明书分别按照不同的比例采用封闭液稀释一抗：Oct3/4（1 ∶ 100）、Sox10（1 ∶ 100）、Tuj-1（1 ∶ 900）、PRPH（1 ∶ 100）、Isl1（1 ∶ 500）、Brn3a（1 ∶ 500）、Nav1.7（1 ∶ 500）、TRPV1（1 ∶ 250）、TRPM8（1 ∶ 50），得一抗工作液。取出分化成熟至 D10 时的外周神经元细胞，用 DPBS 清洗后加入固定封闭破膜液，室温作用 20 min，然后吸弃固定封闭破膜液，用 DPBS 清

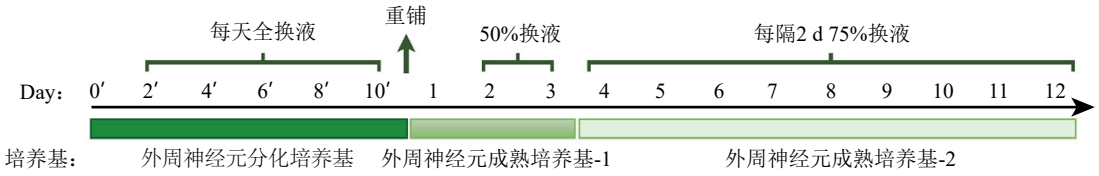


图 1　hiPSC 向外周神经元诱导分化的流程图

Fig.1　Flow Chart of Differentiation of hiPSC to Peripheral Neurons

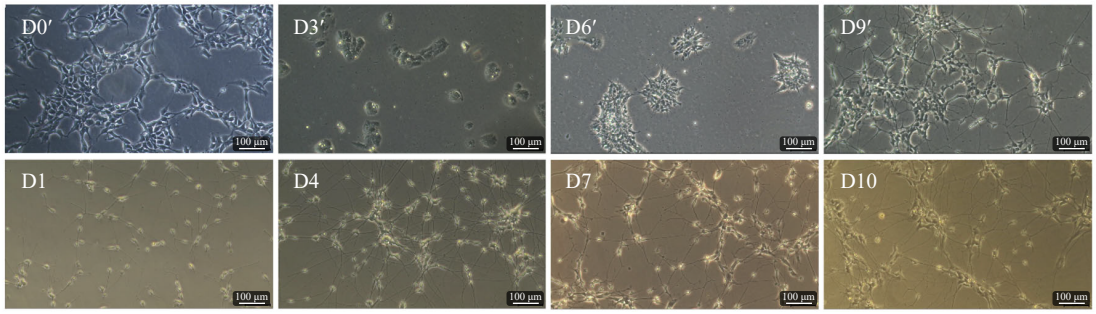


图 2　hiPSC 向外周神经元诱导分化阶段的形态学观察

Fig.2　Morphological Observations of Differentiation Stages of Peripheral Neurons Induced from hiPSC

洗后再加入一抗工作液 4 ℃孵育过夜；第二日从冰箱取出板子室温平衡 0.5 h，之后吸弃一抗工作液，用 DPBS 清洗，加入相对应的二抗工作液（按 1 ∶ 500 用封闭液稀释一抗工作液得到）室温下避光孵育 1.5 h；然后用 DPBS 清洗，加入 Hoechst 33342 工作液（按 1 ∶ 1 250 用封闭液稀释得到）染核，室温下避光孵育 20 min 后，吸弃核染液，采用荧光倒置显微镜观察细胞染色情况并拍照记录，结果见图 3。对 Tuj-1 表达阳性的细胞进行观察，随机拍摄 5 个视野，用 Image J v1.52 软件计算 Tuj-1 阳性的神经元数占视野中细胞总数的比例，即为神经元纯度；同样对 PRPH 表达阳性的细胞进行观察，随机拍摄 5 个视野，用 Image J v1.52 软件计算 PRPH 阳性的外周神经元占视野中细胞总数的比例，即为外周神经元纯度。

如图 3 所示，成熟后的 hiPSC-PNs 胞体饱满，神经突较清晰，并且突起相互交织成网状结构。hiPSC-PNs 中神经元标志物 Tuj-1 呈阳性、多能干细胞标志物 Oct3/4（图 3A），外周神经前体细胞标志物 Sox10（图 3B）呈阴性；细胞核以 Hoechst 染色体现，经过统计分析得到，hiPSC 分化的细胞中神经元的纯度基本大于 90%。此外，外周神经元标志物 PRPH、Isl1（图 3C）和 Brn3a（图 3D）阳性表明大部分细胞均成功向外周神经元分化并且神经元趋向成熟，经过统计分析得到，在 hiPSC 分化的细胞中外周神经元的纯度大于 80%，可用于相关试验研究。此外，hiPSC-PNs 还表达了伤害感受器标志物 Nav1.7（图 3E）、TRPV1（图 3F）和 TRPM8（图 3G）。

2.4　RT-qPCR 技术比较分化各阶段标志物的表达

在细胞培养的 D0'、D10'、D1、D4、D8 和 D12，采用 RT-qPCR 技术检测 hiPSC-PNs 诱导分化进程中各个时间点的伤害感受器标志物（Nav1.7 和 TRPV1）和感受神经元标志物（Isl1 和 PRPH）的表达情况。采用 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取细胞总 RNA，并用超微量分光光度计检测所提取的 RNA 的浓度及纯度。采用 QuantiTect 逆转录试剂将提取的 RNA 逆转录为 cDNA，再用 PowerUp SYBR Green Master Mix 试剂盒进行定量 RT-qPCR。目的基因引物的设计参考 PubMed GenBank 中所给

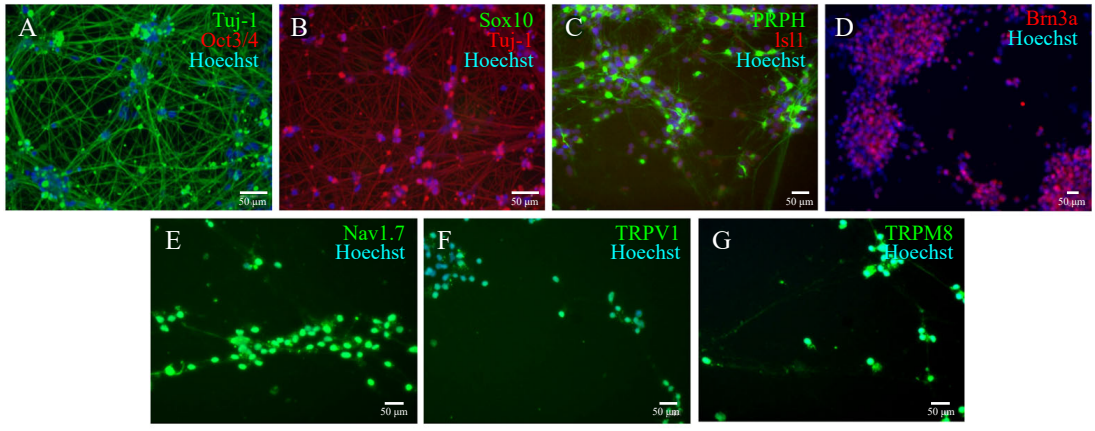
出的基因序列，所有引物均由美国 Thermo Fisher Scientific 公司合成，引物序列见表 1。将获得的 cDNA 模板用无 RNA 酶的双蒸水稀释为 20 mg/L，然后进行 RT-qPCR 反应。PCR 反应体系共 5 μl：cDNA 模板 2 μl，PowerUp SYBR Green Master Mix 2.5 μl，Forward Primer 0.25 μl，Reverse Primer 0.25 μl。PCR 反应条件为：50 ℃、2 min 循环 1 次，95 ℃、2 min 循环 1 次，95 ℃、15 s 循环 40 次，60 ℃、1 min 循环 40 次，然后进入熔解曲线。

采用 QuantStudio Real-Time PCR v1.3 软件进行统计分析并作图，发现诱导分化各时间点细胞中 4 种标志物的表达水平均总体呈增加的趋势（图 4）。感觉神经元标志物中，PRPH 从 D10' 时表达水平开始增加，在 D12 时达到最高水平（图 4A）；Isl1 的表达从 D4 开始明显增加，在外周神经元成熟阶段表达较为稳定（图 4A）。而伤害感受器标志物表达水平与感觉神经元标志物相比增加较低，Nav1.7 和 TRPV1 在外周神经元成熟阶段的表达均逐渐增加（图 4B）。结果显示，本研究中从 hiPSC 分化得到的外周神经元的感觉神经元标志物和伤害感受器标志物表达良好，可用于相关试验研究。

2.5 高内涵成像分析

长春新碱贮备液：向含有长春新碱 100 mg 的玻璃瓶中加入 DMSO 361 μl，轻轻摇晃，涡旋使完全溶解，配制成 300 mmol/L 的贮备液，分装，每支 120 μl，－20 ℃保存。

长春新碱工作液：取长春新碱贮备液，温度平衡至室温，用移液器取适量置 1.5 ml 离心管中，加入 DMSO 梯度稀释成 0.000 3、0.003、0.03、0.3、3 和 33 mmol/L 的次级贮备液，然后分别加入适量外周神经元成熟培养基 -2，依次稀释成 0.001、0.01、0.1、1、10 和 100 μmol/L 的工作液，现配现用。



A 和 B：在 hiPSC-PNs 免疫荧光染色中，神经元标志物 Tuj-1 呈阳性，多能干细胞标志物 Oct3/4 及外周神经前体细胞标志物 Sox10 呈阴性，C 和 D：外周神经元标志物 PRPH、Isl1 和 Brn3a 呈阳性，E、F 和 G：伤害感受器标志物 Nav1.7、TRPV1 和 TRPM8 呈阳性

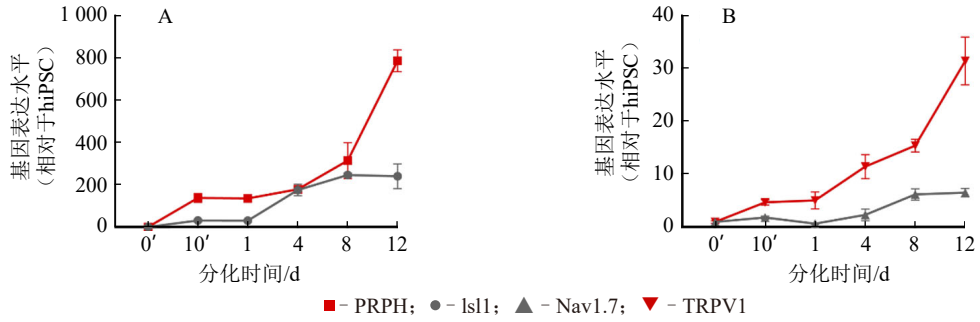
图 3 hiPSC-PNs 的特异性标志物的荧光检测

Fig.3 Immunofluorescence Evaluation of Peripheral Neuron Marker Expressions of hiPSC-PNs

表 1 PCR 引物的序列

Tab.1 Sequences of Primers for PCR

引物名称	序列（5′→3′）	
	上游引物	下游引物
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC
Nav1.7	GGTTTCAGCACAGATTCAGGTC	CCAGCTGAAAGTGTCAAAGCTC
TRPV1	AGAGTCACGCTGGCAACC	AGAGACTCTCCATCACACTGTC
Isl1	TCCCTATGTGTTGGTTGCGG	CATTTGATCCCGTACAACCTGA
PRPH	GTGCCCGTCCATTCTTTTGC	CTCTGTCACCACCTCCCCAT



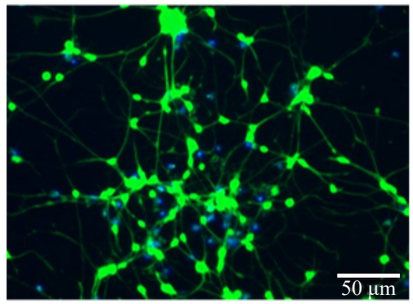
A：感觉神经元标志物相对于 hiPSC 细胞的基因表达情况，B：伤害感受器标志物相对于 hiPSC 细胞的基因表达情况

图 4　分化过程中神经元标志物相对表达情况（*n*=3）

Fig. 4　Relative Expressions of Sensory Neuron Markers and Nociceptor Markers during Differentiation (*n*=3)

在外周神经元成熟阶段，由于未完全成熟的神经元的神经突生长对毒性化合物更为敏感，因此选择在外周神经元的神经突已逐渐形成神经网络结构的 D6 时加入药物。本研究使用钙黄绿素 AM 和 Hoechst 33342 染料分别对神经元胞体和胞核染色，采用新型的 hiPSC-PNs 模型结合高内涵成像技术，研究长春新碱对 hiPSC-PNs 模型细胞活力和神经突长度的影响，以评价其诱导的外周神经毒性。

将外周神经元成熟培养基 -2 提前在室温条件下平衡 30 min，随后配制得到长春新碱工作液。吸弃 96 孔板孔内的培养基后，分别加入不同浓度的长春新碱工作液 175 μl，并以 0.3% DMSO 为对照组。经 37 ℃孵育 24 h 后，进行细胞染色以及高内涵成像拍照。从培养箱中取出经药物处理 24 h 的 96 孔板，吸弃孔中培养基，每孔加入预混染液（由 Hoechst 33342 工作液和钙黄绿素 AM 工作液照体积比 1 ∶ 1 混合制成）50 μl，室温下避光孵育 15 min。染色完成后，吸弃染液，使用 DPBS 轻轻洗涤 2 次，每孔加入 DPBS 50 μl，然后将 96 孔板放入高内涵细胞分析系统中使用 20 倍镜拍照。96 孔板每孔随机选择 25 个视野，拍照完成后，采用神经生长模块对图片中的单个细胞参数进行分析，包括细胞活力和神经突生长的测定。采用 Hoechst 33342 识别活细胞的细胞核，在通道 1 下对活的神经元进行计数，并且采用钙黄绿素 AM 对活细胞进行染色，在通道 2 下确定神经元的胞体和神经突以检测神经突长度。染色结果见图 5；对神经元进行检测分析的参数为有效神经元数量（valid neuron count）和平均神经突长度（mean neurite total length），结果见图 6。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多个不同浓度组进行比较时，采用 Levene's 检验对数据的方差齐性进行检测，若方差齐（P>0.05），则进行单因素方差分析（ANOVA）；若方差不齐（$P \leqslant 0.05$），则进一步采用 Dunnett T3 检验进行组间比较，检验水准 α=0.05，$P \leqslant 0.05$ 表示差异具有统计学意义。



绿色为钙黄绿素 AM 染色，蓝色为 Hoechst 33342 染色

图 5　hiPSC-PNs 的免疫荧光形态特征

Fig.5　Immunofluorescence Morphological Characterization of hiPSC-PNs

已知微管蛋白抑制剂长春新碱在一定浓度下不产生细胞毒性，但同时又能减少细胞神经突长度，并且临床使用时能引起明显的外周神经毒性[17—18]。采用 Thermo Scientific HCS Studio（Cellomics Scan Version 6.4.3）软件统计分析并作图，观察到经过 0.01 μmol/L 长春新碱作用 24 h 后，与阴性对照组相比，细胞存活率未显著下降，而细胞神经突长度

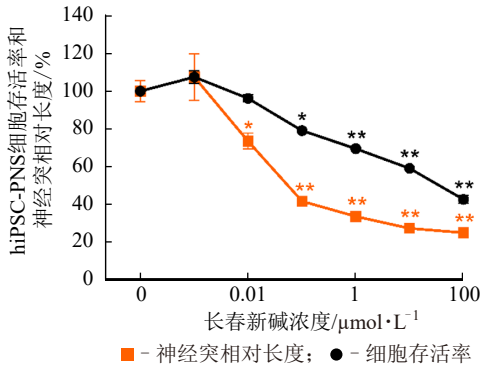


图 6 长春新碱对 hiPSC-PNs 细胞活力和神经突长度的作用（与对照组相比：* 表示 $P \leqslant 0.05$，** 表示 $P \leqslant 0.01$；n=3）

Fig.6 Effect of Vincristine on Cell Viability and Neurite Length in hiPSC-PNs (Compared with Control Group, * Represents $P \leqslant 0.05$, ** Represents $P \leqslant 0.01$; n=3)

显著下降（$P \leqslant 0.05$），表明长春新碱在 0.01 μmol/L 时还未产生细胞毒性，但已经表现出了神经毒性（图 6）。长春新碱浓度越高，减小神经突长度的作用越明显，提示该药物对 hiPSC-PNs 神经突长度的作用具有浓度依赖性。以上结果表明，本试验采用的 hiPSC-PNs 模型能反映出化合物处理前后外周神经元细胞活力和神经突长度的变化，提示本方法能够准确、稳定及灵敏地进行药物诱导的外周神经毒性评价。

3 讨论

目前文献报道的 hiPSC 向外周神经元的诱导方法主要有基质细胞共培养法、拟胚体法和单层培养法等，本研究采用了相对成熟且分化效率较高的单层培养法[12,19]。建立了一种 hiPSC 定向诱导分化为外周神经元的方法，以期获得纯度较高且相对成熟的外周神经元，为相关研究提供充足的人源性外周神经元的来源。与已有文献报道的外周神经元分化方法相比，本法不仅提高了外周神经元的分化效率，而且将 hiPSC 诱导过程中以往采用的多种培养基归为一种外周神经元分化培养基，简化分化过程的同时也缩短了诱导分化的时间。

在以往的许多研究中，由于人源性外周神经元的来源稀少，仅有少数实验室有条件采用人体直接来源的外周神经元进行相关研究，大多数研究仍采用啮齿动物或非啮齿动物来源的外周神经元，但动物与人之间存在的种属差异使得研究人员对人类外周神经系统发育以及神经病变等疾病发生机制的了解还十分有限[20—21]。本研究中使用的 hiPSC 是人外周神经元的重要来源之一，来源较为广泛，多能性与 hESC 基本相似，并且有效规避了伦理道德问题，在再生医学、新药研发和临床治疗中的应用前景十分广阔[22]。

目前已有一些研究确定了基于小分子抑制剂的组合方法可以诱导 hiPSC 分化成为外周神经元。最开始 CHAMBERS 等为了缩短 hiPSC 体外分化的时间，通过小分子抑制剂组合的作用使得 hiPSC 在 3 ～ 4 周内分化为成熟的外周神经元，并且分化效率可达 75%[13,23]。随后几年，许多研究者在此基础上进行改进，通过寻找更优的小分子抑制剂替代物、改变小分子抑制剂浓度、增加神经营养因子 3（neurotrophin-3）等，以期得到更快速、更稳定和成熟的外周神经元分化方法[24—26]。基于此，本研究采用小分子抑制剂和神经营养因子组合的分化方案使 hiPSC 可在 20 d 内分化成熟，并且得到的细胞中神经元的纯度大于 90%，外周神经元的纯度也可达到 80%以上。本方案中 hiPSC 诱导分化为外周神经元的过程更简便高效，有助于高通量筛选和药物毒性评价的研究，并且为外周神经系统相关疾病的发生机制研究和临床治疗方法提供了新的思路。

已有研究表明，双 SMAD（drosophila mothers against decapentaplegic，介导 TGF-β 家族成员的信号转导）抑制剂能有效引起 hiPSC 分化为神经元，最初使用 2 种小分子抑制剂 LDN193189 和 noggin，还有报道应用其他的小分子化合物如 SB431542 替代 noggin 且取得了一定的成果[27—28]。外周神经元分化培养基中的 LDN193189 是选择性 BMP 信号通路抑制剂，主要抑制活化素受体样激酶（activin receptor-like kinase，ALK）的活性，如 ALK2 和 ALK3。但值得注意的是，LDN193189 诱导 hiPSC 分化为外周神经元的效率很低[29]；而 SB431542 除可抑制 ALK2 和 ALK3 外，还能选择性抑制 ALK4、ALK5 和 ALK7 的磷酸化，双 SMAD 抑

制剂也被证明能有效诱导 hiPSC 神经外胚层的形成[30]；这说明 LDN193189 和 SB431542 共同发挥的抑制作用才能有效提高 hiPSC 的诱导分化效率。已有研究中，还有其他 3 个小分子抑制剂（CHIR99021、SU5402 和 RO4929097）在外周神经元分化中备受关注。另外，DAPT（一种 γ- 分泌酶抑制剂，能间接抑制 γ- 分泌酶底物 Notch 的活性，进而影响细胞信号传导和细胞分化）原先比 RO4929097 应用更多，然而有文献报道 RO4929097 比 DAPT 更能有效地阻断 Notch 信号通路从而发挥作用[17,31]。因此，为可更好地提高外周神经元的分化效率，可考虑使用 RO4929097 替代 DAPT，进行外周神经元的分化。另外，SU5402 是血管内皮生长因子（VEGF）、成纤维细胞生长因子（FGF）和血小板源性生长因子（PDGF）的酪氨酸激酶抑制剂，可进一步提高外周神经元的分化效率[32]。CHIR99021 作为 Wnt/β-catenin 通路激活药，能抑制糖原合成酶激酶 -3（GSK-3）α/β 表达，可在细胞向前脑、后脑等方向的分化中发挥精确的剂量依赖效应[33]。此外，CHIR99021 还可以和视黄酸（retinoic acid，RA）一起促进细胞向外周神经元方向进行分化，是定向诱导分化的关键因素[30,34]。在外周神经元诱导分化过程中 RA 还可调节多种神经营养因子受体的表达，在大脑生长发育中对神经元增殖及分化发挥重要作用[35]。在 D8' 到 D10' 之间进行细胞重铺开始神经元成熟阶段后，除添加神经营养因子［神经生长因子（NGF）和脑源性神经营养因子（BDNF）］促进外周神经元成熟外，还可在 D2 和 D3 加入氟尿嘧啶（5-FU）以阻断非神经元细胞的有丝分裂，从而提高外周神经元分化效率[36—38]。

本研究对分化完成后的 hiPSC-PNs 进行了形态和功能上的鉴定，并检测了不同分化阶段中 Oct3/4、Sox10、Tuj-1、外周神经元（PRPH、Isl1 和 Brn3a）和离子通道（Nav1.7、TRPV1 和 TRPM8）标志物的表达情况。RT-qPCR 的检测分析也验证了免疫荧光的结果，随诱导分化时间的延长，外周神经元逐渐成熟，感觉神经元标志物（PRPH 和 Isl1）和伤害感受器神经元标志物（Nav1.7 和 TRPV1）均上调。以上结果表明通过本分化方案可以成功将 hiPSC 定向诱导分化为外周神经元，并且在分化中仅使用了 3 种培养基，使诱导分化过程更为简单方便，也增加了可重复性。

成功获得 hiPSC-PNs 模型后，采用高内涵成像技术研究长春新碱对 hiPSC-PNs 的细胞活力和神经突长度的影响，这 2 个指标是药物外周神经毒性体外评价中较常用的指标。长春新碱是临床上常用的抗肿瘤药，可用于治疗急性淋巴细胞性白血病，疗效较好[39]，通过与微管蛋白结合，防止微管形成、促进微管裂解并抑制肿瘤细胞分裂，从而发挥抗肿瘤作用。然而，临床上约 20%的患者中会出现神经系统的剂量限制性毒性，主要与药物累积剂量有关，感觉神经和运动神经可能会受到破坏，典型症状为下肢无力、感觉障碍、步伐改变和反射减弱等[40]。已有许多研究表明，长春新碱能抑制 hiPSC 分化的神经元的神经突生长，使细胞神经突长度随浓度升高而显著降低，并且同一浓度的长春新碱作用于 hiPSC 分化的神经元后，对神经突长度缩短程度的影响高于对细胞存活率的影响[41]。本研究结果与之前 HOELTING 等采用高内涵成像技术研究不同浓度长春新碱对 hiPSC 分化的背根神经节神经突长度的影响类似[17]，即均表现为在浓度 0.1 μmol/L 时神经突长度开始明显下降，但对于细胞存活率的影响，本研究模型对长春新碱比 hiPSC 分化的背根神经节更为敏感。本研究结果显示长春新碱具有外周神经毒性风险，临床应用时值得重视。

综上所述，在定向诱导 hiPSC 分化为外周神经元的过程中，明场下可见细胞形态发生明显变化，在分化开始后 8 d 内出现神经突起，且随外周神经元逐渐成熟而形成复杂的神经网络结构。分化过程中，前期诱导分化阶段更为重要，可通过多种小分子抑制剂的组合明确 hiPSC 向神经细胞的分化方向，调节多种信号转导通路，从而得到外周神经元，并在神经营养因子作用下逐渐成熟。本研究提出了一种新的外周神经元分化方法，提高分化效率的同时也缩短了分化时程，并且结合高内涵成像技术可用于药物神经毒性体外评价，为临床用药提供参考。

参考文献：

[1] OETJEN L K, MACK M R, FENG J, *et al*. Sensory neurons co-opt classical immune signaling pathways to mediate chronic itch [J]. *Cell*, 2017, **171**(1): 217-228.

[2] FERNANDES V, SHARMA D, VAIDYA S, *et al*. Cellular and molecular mechanisms driving neuropathic pain: recent advancements and challenges [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, **22**(2): 131-142.

[3] LEHMANN H C, STAFF N P, HOKE A. Modeling chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN) *in vitro*: prospects and limitations [J]. *Exp Neurol*, 2020, **326**: 113140.

[4] KUMAR A, KAUR H, SINGH A. Neuropathic pain models caused by damage to central or peripheral nervous system [J]. *Pharmacol Rep*, 2018, **70**(2): 206-216.

[5] LARGE D. Unraveling chemotherapy-induced peripheral neuropathy: *in vitro* and *in vivo* models of sensory nerve dysfunction [J]. *J Neurosci Res*, 2018, **96**(11): 1739-1740.

[6] HUANG P, LI Y, NASSER M I, *et al*. Urine-derived induced pluripotent stem cells in cardiovascular disease [J]. *Cardiol Res Pract*, 2020, **2020**: 1-8.

[7] TANG B L. Maturing iPSC-derived cardiomyocytes [J]. *Cells*, 2020, **9**(1): 213.

[8] DAO THI V L, WU X, BELOTE R L, *et al*. Stem cell-derived polarized hepatocytes [J]. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 1677.

[9] MUNOZ S S, ENGEL M, BALEZ R, *et al*. A simple differentiation protocol for generation of induced pluripotent stem cell-derived basal forebrain-like cholinergic neurons for Alzheimer's disease and frontotemporal dementia disease modeling [J]. *Cells*, 2020, **9**(9): 2018.

[10] MAHAJANI S, RAINA A, FOKKEN C, *et al*. Homogenous generation of dopaminergic neurons from multiple hiPSC lines by transient expression of transcription factors [J]. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(12): 898.

[11] HAWROT J, IMHOF S, WAINGER B J. Modeling cell-autonomous motor neuron phenotypes in ALS using iPSCs [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, **134**: 104680.

[12] SRIMASORN S, KIRSCH M, HALLMEYER-ELLGNER S, *et al*. Increased neuronal differentiation efficiency in high cell density-derived induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2019, **2019**: 2018784.

[13] CHAMBERS S M, QI Y, MICA Y, *et al*. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, **30**(7): 715-720.

[14] UMEHARA Y, TOYAMA S, TOMINAGA M, *et al*. Robust induction of neural crest cells to derive peripheral sensory neurons from human induced pluripotent stem cells [J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 4360.

[15] CAI S, SHUM D K Y, CHAN Y S. Human induced pluripotent stem cell-derived sensory neurons for fate commitment of bone marrow stromal cell-derived schwann cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, **1739**: 149-160.

[16] POMP O, BROKHMAN I, ZIEGLER L, *et al*. PA6-induced human embryonic stem cell-derived neurospheres: a new source of human peripheral sensory neurons and neural crest cells [J]. *Brain Res*, 2008, **1230**: 50-60.

[17] HOELTING L, KLIMA S, KARREMAN C, *et al*. Stem cell-derived immature human dorsal root ganglia neurons to identify peripheral neurotoxicants [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, **5**(4): 476-487.

[18] SNYDER C, YU L, NGO T, *et al*. *In vitro* assessment of chemotherapy-induced neuronal toxicity [J]. *Toxicology In Vitro*, 2018, **50**: 109-123.

[19] XIONG C, CHUA K C, STAGE T B, *et al*. Human induced pluripotent stem cell derived sensory neurons are sensitive to the neurotoxic effects of paclitaxel [J]. *Clin Transl Sci*, 2021, **14**(2): 568-581.

[20] LEISENGANG S, OTT D, MURGOTT J, *et al*. Primary cultures from rat dorsal root ganglia: responses of neurons and glial cells to somatosensory or inflammatory stimulation [J]. *Neuroscience*, 2018, **394**: 1-13.

[21] ROSTOCK C, SCHRENK-SIEMENS K, POHLE J, *et al*. Human vs. mouse nociceptors - similarities and differences [J]. *Neuroscience*, 2018, **387**: 13-27.

[22] BINDHYA S, SIDHANTH C, SHABNA A, *et al*. Induced pluripotent stem cells: a new strategy to model human cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, **107**: 62-68.

[23] 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 Biotechnol*, 2009, **27**(3): 275-280.

[24] ANKAM S, ROVINI A, BAHETI S, *et al*. DNA methylation patterns in human iPSC-derived sensory neuronal differentiation [J]. *Epigenetics*, 2019, **14**(9): 927-937.

[25] MIS M A, YANG Y, TANAKA B S, *et al*. Resilience to pain: a peripheral component identified using induced pluripotent stem cells and dynamic clamp [J]. *J Neurosci*, 2019, **39**(3): 382-392.

[26] SCHWARTZENTRUBER J, FOSKOLOU S, KILPINEN H, *et al*. Molecular and functional variation in iPSC-derived sensory neurons [J]. *Nat Genet*, 2018, **50**(1): 54-61.

[27] YOUNG G T, GUTTERIDGE A, FOX H, *et al*. Characterizing human stem cell-derived sensory neurons at the single-cell level reveals their ion channel expression and utility in pain research [J]. *Mol Ther*, 2014, **22**(8): 1530-1543.

[28] ZHANG M, NGO J, PIROZZI F, *et al*. Highly efficient methods to obtain homogeneous dorsal neural progenitor cells from human and mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, **9**(1): 67.

[29] FUKUTA M, NAKAI Y, KIRINO K, *et al*. Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(12): e112291.

[30] TAO Y, ZHANG S C. Neural subtype specification from human pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, **19**(5): 573-586.

[31] MYERS C T, APPLEBY S C, KRIEG P A. Use of small molecule inhibitors of the Wnt and Notch signaling pathways during Xenopus development [J]. *Methods*, 2014, **66**(3): 380-389.

[32] JONES I, YELHEKAR T D, WIBERG R, *et al*. Development and validation of an *in vitro* model system to study peripheral sensory neuron development and injury [J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 15961.

[33] KIRKEBY A, GREALISH S, WOLF D A, *et al*. Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions [J]. *Cell Rep*, 2012, **1**(6): 703-714.

[34] BEJOY J, BIJONOWSKI B, MARZANO M, *et al*. Wnt-Notch signaling interactions during neural and astroglial patterning of human stem cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2020, **26**(7/8): 419-431.

[35] KANUNGO J. Retinoic acid signaling in P19 stem cell differentiation [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, **17**(9): 1184-1198.

[36] XIA B, LV Y. Dual-delivery of VEGF and NGF by emulsion electrospun nanofibrous scaffold for peripheral nerve regeneration [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, **82**: 253-264.

[37] ZHANG F, LIU C L, TONG M M, *et al*. Both Wnt/beta-catenin and ERK5 signaling pathways are involved in BDNF-induced differentiation of pluripotent stem cells into neural stem cells [J]. *Neurosci Lett*, 2019, **708**: 134345.

[38] XIE B, BECKER E, STUPAREVIC I, *et al*. The anti-cancer drug 5-fluorouracil affects cell cycle regulators and potential regulatory long non-coding RNAs in yeast [J]. *RNA Biol*, 2019, **16**(6): 727-741.

[39] JORDAN M A, THROWER D, WILSON L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by *Vinca* alkaloids [J]. *Cancer Res*, 1991, **51**(8): 2212-2222.

[40] BANACH M, JURANEK J K, ZYGULSKA A L. Chemotherapy-induced neuropathies-a growing problem for patients and health care providers [J]. *Brain Behav*, 2017, **7**(1): e00558.

[41] WING C, KOMATSU M, DELANEY S M, *et al*. Application of stem cell derived neuronal cells to evaluate neurotoxic chemotherapy [J]. *Stem Cell Res*, 2017, **22**: 79-88.