

运动神经元特异性荧光报告系统的建立

江政云¹, 陈敏^{2,3}, 张焜^{1,2,3}

1 广东工业大学 生物医药学院, 广东 广州 510006

2 五邑大学 生物科技与大健康学院, 广东 江门 529020

3 江门市大健康国际创新研究院, 广东 江门 529080

江政云, 陈敏, 张焜. 运动神经元特异性荧光报告系统的建立. 生物工程学报, 2021, 37(11): 4095-4101.

Jiang ZY, Chen M, Zhang K. Development of a motor neurons-specific fluorescence reporter system. Chin J Biotech, 2021, 37(11): 4095-4101.

摘要: 人类诱导多能干细胞 (Human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 具有向人体多种类型细胞分化的潜能, 其定向分化的运动神经元 (Motor neurons, MNs) 是众多运动神经元疾病的重要体外模型之一。为简化 MNs 的鉴定方法, 通过慢病毒载体将 MNs 特异性启动子 HB9 及其控制下的红色荧光蛋白 (Red fluorescent protein, RFP) 基因转入 hiPSCs 分化而来的神经干细胞 (Human neural stem cells, hNSCs), 经抗生素筛选, 获得稳定的阳性细胞株 hNSCs-HB9-RFP-Puro。而后, 阳性细胞株感染过表达 MNs 定向分化转录因子的慢病毒 LV-Ngn2-Sox11-GFP 和 LV-Isl1-Lhx3-Hygro, 诱导 MNs 定向分化。诱导分化所得的细胞展现出神经元样结构, 并在特异性启动子 HB9 的作用下表达 RFP; 同时也表达神经元相关标记物 β 微管蛋白 (β -tubulin) 和乙酰胆碱转移酶 (Choline acetyltransferase, ChAT), 鉴定为成熟的 MNs。该荧光报告系统为 MNs 的定向分化及鉴定提供了一个更加直观的方法, 有效促进了 MNs 在疾病模型和药物筛选等领域的广泛应用。

关键词: 运动神经元, 诱导多能干细胞, 细胞分化, 神经干细胞

Development of a motor neurons-specific fluorescence reporter system

Zhengyun Jiang¹, Min Chen^{2,3}, and Kun Zhang^{1,2,3}

1 School of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen 529020, Guangdong, China

3 International Healthcare Innovation Institute (Jiangmen), Jiangmen 529080, Guangdong, China

Abstract: Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) have the potential to differentiate into multiple cell types. Motor neurons (MNs) differentiated from hiPSCs are important models of many motor neuron diseases. To simplify the identification of MNs, lentivirus vectors were used to transfer MNs-specific promoter HB9 and red fluorescent protein (RFP) gene into

Received: January 4, 2021; **Accepted:** May 7, 2021

Supported by: Wuyi University, China (No. 503170060206).

Corresponding author: Kun Zhang. Tel: +86-750-3296112; E-mail: kzhang@gdut.edu.cn

五邑大学, 药食同源实验室建设项目 (No. 503170060206) 资助。

网络出版时间: 2021-06-28

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210628.1349.005.html>

hiPSCs-derived human neural stem cells (hNSCs). Stable positive cells hNSCs-HB9-RFP-Puro were obtained after antibiotic selection. Subsequently, the positive cell line was infected with lentiviruses LV-Ngn2-Sox11-GFP and LV-Is11-Lhx3-Hygro, which overexpressed the MNs differentiation transcription factor, and differentiated to MNs directly. Differentiated mature MNs showed neuron-like structure, expressed RFP and neuron-related markers β -tubulin and choline acetyltransferase (ChAT) under the control of the MNs-specific promoter HB9. The fluorescence reporter system provides a visual method for directed differentiation and identification of MNs, and may promote the applications of MNs in disease models and drug screening.

Keywords: motor neuron, induced pluripotent stem cells, cell differentiation, neural stem cells

人类运动神经元疾病包括一系列退行性疾病, 如肌萎缩侧索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis) 和脊髓性肌萎缩症 (Spinal muscular atrophy) 等, 该类疾病临床表现为严重肌肉萎缩和运动功能失调, 最终导致呼吸衰竭和死亡^[1-3]。值得注意的是, 运动神经元 (Motor neurons, MNs) 的广泛死亡是最直接、最典型的病理特征^[4-7]。解析疾病机制的一个关键障碍是缺乏合适的人类 MNs 疾病模型, 而从人诱导多能干细胞 (Human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 获得 MNs 是得到疾病研究模型的重要途径^[8-9]。

获得成熟的 MNs 是一项具有意义和挑战的工作, 对人类神经发育、相关疾病建模和药物开发至关重要^[10]。目前, 主要通过两种方法将 hiPSCs 定向分化为成熟的 MNs。一个是化学小分子诱导法, 模拟人运动神经元发育过程, 在相应时间节点加入不同的小分子化合物, 可以在体外获得成熟的 MNs^[9-12]。但是, 该方法耗时冗长、操作烦琐且价格昂贵。另外一种方法是转基因法, 通过病毒等载体将 MNs 定向分化的关键基因转入 hiPSCs 或人胚胎干细胞 (Human embryonic stem cells), 可以快速高效地获得运动神经元, 该方法比小分子诱导时间缩短一半^[9,13]。无论哪种方法获得的神经元, 均需要通过免疫组织化学或者免疫荧光表征 MNs 相关标记物进行鉴定和分析。为了动态监测 MNs 的分化过程, 可视化的 MNs 荧光报告系统备受青睐^[3]。本文通过转基因技术, 在人神经干细胞 (Human neural stem cells, hNSCs) 中导入 MNs 特异性启动子 HB9 控制下的 RFP, 经嘌呤霉素筛选获得阳性细胞株 hNSCs-HB9-

RFP-Puro。该细胞株进一步过表达神经原素 2 (Neurogenin 2, Ngn2)、Y 染色体性别决定域转录因子 11 (SYR-box transcription factor 11, Sox11)、胰岛素增强子 1 (Insulin gene enhancer 1, Is11) 和 LIM 同源框 3 (LIM homeobox 3, Lhx3), 在定向分化为 MNs 的过程中, 特异性启动子 HB9 将介导红色荧光蛋白 (Red fluorescent protein, RFP) 的表达, 为运动神经元的定向分化提供了一个可视化的方法, 加速了运动神经元疾病体外模型的建立及药物的开发和筛选。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养液

hiPSCs 来自罗格斯大学细胞和 DNA 资源库 (Rutgers University Cell and DNA Repository)。神经干细胞分化培养基: Neuro basal medium 490 mL 和 Neural induction supplement 10 mL, (Cat. No. A1647801)。神经干细胞扩增培养基: Neuro basal medium 49 mL, advanced DMEM/F12 49 mL 和 Neural induction supplement 2 mL。运动神经元培养基: Neuro basal medium 24.5 mL, advanced DMEM/F12 24.5 mL, N-2 (100 \times) 0.5 mL, B-27 (50 \times) 1 mL, retinoic acid 1 μ mol/L, BDNF 10 ng/mL, GDNF 10 ng/mL, NT-3 10 ng/mL, purmorphamine 500 nmol/L 和 penicillin/streptomycin (100 \times) 0.5 mL。

1.2 慢病毒包装

慢病毒 (Lentivirus, LV) 包装采用 TaKaRa Bio Company 的 Lenti-X Packaging Single Shots Kit (货号: 631275)。重组慢病毒质粒来自 Addgene 的 pCSC-NGN2-IRES-GFP-T2A-Sox11 和 pCSC-ISL-

T2A-LHX3, 质粒编号: 90214 和 90215^[14]。参照 Lenti-X Packaging Single Shots Kit 使用手册制备慢病毒 LV-Ngn2-Sox11-GFP 和 LV-Isl1-Lhx3-Hygro。

质粒 pLVDP-HB9-RFP-Puro 的慢病毒载体来自 Addgene, 质粒编号为: 89762, 由 Stelios Andreadis 和 Pedro Lei 教授实验室开发和共享^[15-16]。HB9-RFP 来自 Addgene, 质粒编号: 37081^[17]。pLVDP-HB9-RFP-Puro 质粒包含慢病毒包装识别序列, HB9 启动子介导的 RFP 基因和 PGK 启动子介导的嘌呤霉素 (Puromycin, Puro) 抗性基因等, 通过基因工程技术合成得到。参照 Lenti-X Packaging Single Shots Kit 使用手册制备慢病毒 LV-HB9-RFP-Puro。

1.3 慢病毒感染和 hNSCs-HB9-RFP-Puro 细胞筛选

将 hiPSCs 分化得到的 hNSC 接种于 Matrigel 包被的 24 孔板, 每孔 4×10^4 个。第 2 天, 在 iPSCs 生长至约 30% 融合度时, 向神经干细胞扩增培养基中加入 200 μ L LV-HB9-RFP-Puro 病毒溶液和 polybrene (6 μ g/mL)。感染过夜, 更换新鲜的神经干细胞扩增培养基, 继续培养至细胞融合度为 50%。此时, 加入 Puro (1 μ g/mL) 筛选阳性细胞, 直至没有细胞死亡为止, 所得到的细胞全部为感染上 LV-HB9-RFP-Puro 的 hNSCs, 即阳性细胞株 hNSCs-HB9-RFP-Puro。

1.4 hNSCs 的免疫荧光染色

将 hNSCs 接种在放入 24 孔细胞培养板中的细胞爬片上, 培养至融合度达到约 60% 后, 弃去培养液, 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffered saline, PBS) 洗 2 次; 加 4% 多聚甲醛溶液, 室温固定 15 min; 而后 PBS 洗 3 次, 每次 10 min。加通透封闭液 (0.2% Triton X-100、3% 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 的 PBS), 室温通透和封闭 1 h, 去除通透封闭液, 按照 1:400 稀释一抗 Rabbit anti-Sox2 antibody (Cell Signaling Technology, 货号: 2748S) 和 Mouse anti-Pax6

antibody (ThermoFisher Scientific, 货号: MA1109), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。弃去一抗溶液, PBS 洗 3 次, 每次 10 min。根据一抗来源, 按照 1:2 000 稀释荧光二抗 Anti-rabbit IgG (H+L) 488, Cell Signaling Technology, 货号: 4412 和 Anti-mouse IgG (H+L) 555 (Cell Signaling Technology, 货号: 4409), 室温避光孵育 1 h。弃去二抗溶液, 用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min。滴加 2 μ g/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 溶液, 室温孵育 3 min。用 PBS 洗 2 次, 每次 5 min。载玻片上滴 90% 的甘油, 将细胞爬片倒扣于甘油上, 封片完成后在荧光显微镜下进行观察和拍照记录。

1.5 成熟的 MNs 的免疫组织化学显色

将 hNSCs-HB9-RFP-Puro 接种在放入 24 孔细胞培养板中的细胞爬片上, 生长至 50% 融合状态后, 感染慢病毒 LV-Ngn2-Sox11-GFP 和 LV-Isl1-Lhx3-Hygro; 次日, 更换运动神经元成熟培养基培养分化至所需时间后, PBS 洗 2 次, 之后加 4% 多聚甲醛, 室温固定 15 min; 而后 PBS 洗 3 次, 每次 10 min。加通透封闭液 (0.2% Triton X-100, 3% BSA 的 PBS), 室温通透和封闭 1 h, 去除通透封闭液, 分别孵育一抗羊抗胆碱乙酰转移酶抗体 Goat anti-choline acetyltransferase antibody (Merck Millipore, 货号: AB144P, 稀释比例为 1:200) 或小鼠抗 β -微管蛋白抗体 Mouse anti- β -tubulin antibody (Merck Millipore, 货号: T8328, 稀释比例为 1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。弃去一抗溶液, PBS 洗 3 次, 每次 10 min。孵育对应的二抗 Rabbit anti-goat IgG antibody (HRP conjugate, Merck Millipore, 货号: AP106-P, 稀释比例为 1:1 000) 或 Goat anti-mouse IgG (HRP conjugate, Merck Millipore, 货号: DC02L, 稀释比例为 1:1 000), 室温孵育 1 h。弃去二抗溶液, 用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min。滴加适量的 3-二氨基联苯胺 (3-diaminobenzidine, DAB) 显色液, 铺满细胞爬片, 置于平式摇荡仪上, 室温避光孵育 2-5 min, 直至棕褐色沉淀出现

后, 用去离子水清洗 3 次, 在空气中晾干。在显微镜下进行观察和拍照记录。

2 结果与分析

2.1 神经干细胞株 hNSCs-HB9-RFP-Puro 的建立

按照图 1 的实验流程, 将 hiPSCs 在神经干细胞分化培养基中培养 7 d, 得到 hNSCs。hNSCs 感染慢病毒 LV-HB9-RFP-Puro 过夜, 而后使用 Puro 进行筛选, 得到具有 Puro 抗性的阳性神经干细胞, 命名为 hNSCs-HB9-RFP-Puro。对 hNSCs 进行免疫荧光染色, 所得的 hNSCs 大量表达神经干细胞相关标志物 SOX2 (SRY-box transcription factor 2) 和 PAX6 (Paired box gene 6), 二者重合性好, 证明所得的 hNSCs 纯度较高^[18]。

2.2 运动神经元的定向分化和荧光报告系统的测试

Ngn2、Sox11、Isl1 和 Lhx3 是 MNs 定向分化

的关键调控因子, 大量研究通过转入这 4 个基因, 可以在体外诱导分化获得高纯度的 MNs^[19]。因此, 将阳性的神经干细胞 hNSCs-HB9-RFP-Puro 感染慢病毒 LV-Ngn2-Sox11-GFP 和 LV-Isl1-Lhx3-Hygro 进行定向分化, 并在 MNs 培养基中进一步分化 5 d 后, 得到 MNs^[14], 继续培养至第 15 天, 获得成熟的 MNs (图 2A)。在荧光显微镜下观察, 分化得到的细胞展现出神经元样结构, 并在 MNs 特异性启动子 HB9 的作用下, 成功介导了 RFP 表达。同时, 感染上 LV-Ngn2-Sox11-GFP 的细胞表达绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP), 二者具有很好的共定位 (图 2B), 说明过表达 Ngn2、Sox11、Isl1 和 Lhx3 可促进其分化。对诱导分化得到的 MNs 进行免疫组化染色 (图 2C), 发现它们表达了神经元通用标志物 β 微管蛋白 (β -tubulin) 和成熟神经元标志物乙酰胆碱转移酶 (Choline acetyltransferase, ChAT), 证明分化得到的细胞为成熟的 MNs。在对照组中, 未经慢病毒

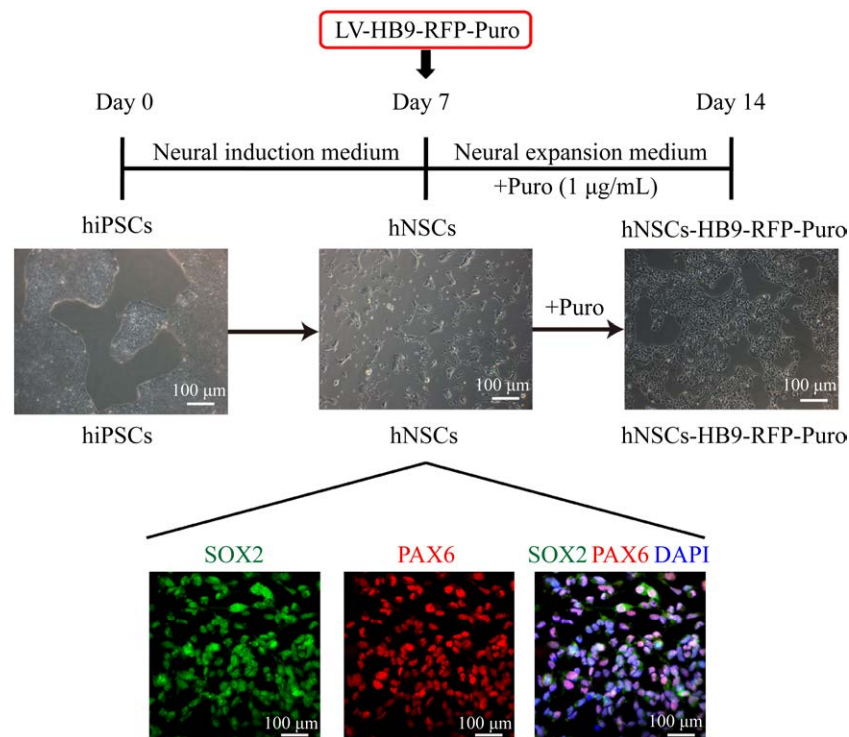


图 1 神经干细胞株 hNSCs-HB9-RFP-Puro 建立的实验流程图

Fig. 1 Flow chart of establishing the neural stem cell line hNSCs-HB9-RFP-Puro.

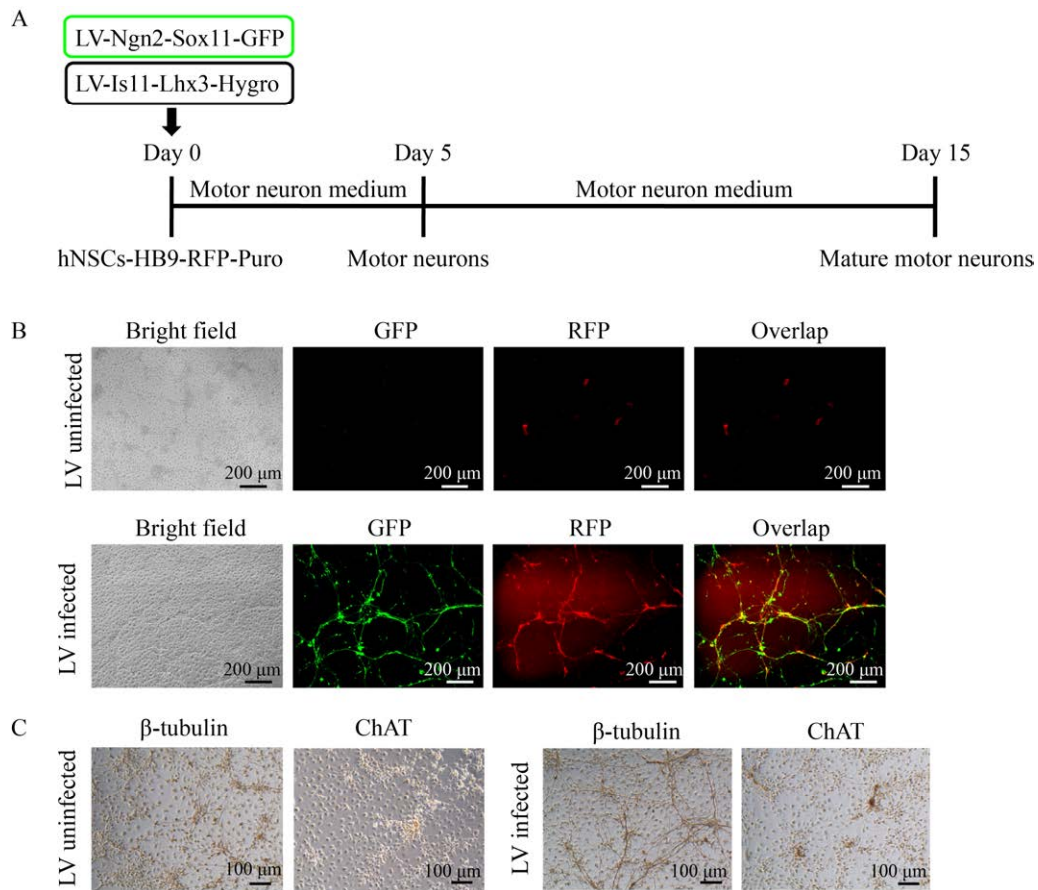


图 2 运动神经元的定向分化及特异性荧光 RFP 的表达

Fig. 2 Directed differentiation of MNs and specific expression of RFP. (A) Positive cell line hNSCs-HB9-RFP-Puro differentiated to MNs after infected with lentiviruses LV-Ngn2-Sox11-GFP and LV-Isl1-Lhx3-Hygro. MNs were cultured in motor neuron medium, mature MNs were obtained after further differentiation and maturation. (B) MNs expressed RFP from HB9 promoter control and GFP from lentivirus LV-Ngn2-Sox11-GFP on day 5 after lentivirus infection. RFP and GFP had good co-localization. Control group without lentivirus infection could not differentiate to MNs. (C) Immunohistochemistry staining of mature MNs. β -tubulin, the neuronal universal marker, and ChAT, the MNs maturation marker, were expressed in mature MNs on day 15 after lentivirus infection. Control group showed weak β -tubulin activity and no ChAT activity. Three replicates were performed for all experiments. Scale bars, B: 200 μ m, C: 100 μ m.

LV-Ngn2-Sox11-GFP 和 LV-Isl1-Lhx3-Hygro 感染的 hNSCs 在第 5 天和第 15 日均无法分化得到 MNs。

3 讨论

MNs 的病变是运动神经元疾病发病的根本原因,有关 MNs 的保护和替代治疗的研究日益受到关注^[20]。虽然相关的动物疾病模型已经得到有效

的建立,但这些动物模型尚未能完全模拟相关的人类疾病特征^[21]。值得注意的是,通过转基因技术将特异性转录因子转入病人来源的 hiPSCs 和成纤维细胞,可以分化为几乎所有类型的细胞,被认为是一种潜力强大的体外疾病模型^[22]。其中, Goto 等通过仙台病毒转入 Ngn2-Isl1-Lhx3 的 3 个转录因子,成功将健康志愿者和 ALS 病人来源的 hiPSCs 定向分化为 MNs^[23]。此外, Liu 等发

现通过慢病毒导入外源性的 Ngn2、Sox11、Isl1 和 Lhx3 至健康志愿者和 ALS 病人来源的原代成纤维细胞后,在条件性神经元诱导培养基中,也可以分化获得 MNs^[14]。HB9 是运动神经元特异性表达基因,被广泛用于干细胞来源的运动神经元的鉴定和表征。无论是小分子或是转基因诱导得到的神经元,均需要考察 HB9 的表达水平。为此, Haidet-Philips 和 Wichterle 等通过转基因技术,构建了 HB9:GFP 小鼠,而后从该小鼠中分离出携带 HB9:GFP 胚胎干细胞 (Murine embryonic stem cells, mESCs),该细胞系 mESCs-HB9-GFP 在体外诱导运动神经元定向分化过程中,特异性启动子 HB9 介导了 GFP 表达,从而可以实时观察小鼠 MNs 的分化^[24-25]。

为考察人 MNs 的分化过程,本研究通过慢病毒载体 LV-HB9-RFP-Puro,将特异性启动子 HB9 控制下的 RFP 稳定导入 hNSCs 基因组中,经 Puro 筛选,得到阳性神经干细胞株 hNSCs-HB9-RFP-Puro。在感染定向分化慢病毒 LV-Ngn2-Sox11-GFP 和 LV-Isl1-Lhx3-Hygro 后,继续培养为成熟的 MNs。所得成熟的 MNs 同时表达由 HB9 介导的 RFP 和 LV-Ngn2-Sox11-GFP 携带的 GFP,且二者具有很好的共定位。同时,对成熟的 MNs 进行免疫组化染色,其表达了神经元通用标志物 β -tubulin 和运动神经元成熟标志物 ChAT,证明该细胞为成熟的 MNs。

综上所述,本研究成功建立了运动神经元特异性荧光报告系统,可通过直接观察 RFP 和 GFP 的表达水平,判断阳性神经干细胞 hNSCs-HB9-RFP-Puro 已经定向分化为 MNs。该系统可实时观察 MNs 的定向分化、减少鉴定时间、缩短实验周期,为运动神经元疾病的治疗和药物筛选提供更快速的细胞模型方案选择。

REFERENCES

- [1] Schorling DC, Pechmann A, Kirschner J. Advances in treatment of spinal muscular atrophy — new phenotypes, new challenges, new implications for care. *J Neuromuscul Dis*, 2020, 7(1): 1-13. DOI: 10.3233/JND-190424.
- [2] Tsokolas G, Tsaousis KT, Diakonis VF, et al. Optical coherence tomography angiography in neurodegenerative diseases: a review. *Eye Brain*, 2020, 12: 73-87. DOI: 10.2147/EB.S193026.
- [3] Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE. Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci*, 2010, 33: 409-440. DOI: 10.1146/annurev.neuro.051508.135722.
- [4] Hudish LI, Bubak A, Triolo TM, et al. Modeling hypoxia-induced neuropathies using a fast and scalable human motor neuron differentiation system. *Stem Cell Rep*, 2020, 14(6): 1033-1043. DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.04.003.
- [5] 董思其, 徐和, 景乃禾, 等. 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. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(8): 1395-1405. Dong SQ, Xu H, Jing NH, et al. Human pluripotent stem cell-derived spinal cord motor neuron: from developmental biology to therapeutic applications. *Chin J Cell Biol*, 2020, 42(8): 1395-1405. DOI: 10.11844/cjcb.2020.08.0012 (in Chinese).
- [6] Payne NL, Sylvain A, O'Brien C, et al. Application of human induced pluripotent stem cells for modeling and treating neurodegenerative diseases. *New Biotechnol*, 2015, 32(1): 212-228. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.05.001.
- [7] Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, 2016, 539(7628): 197-206. DOI: 10.1038/nature20413.
- [8] Shimojo D, Onodera K, Doi-Torii Y, et al. Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *Mol Brain*, 2015, 8: 79. DOI: 10.1186/s13041-015-0172-4.
- [9] Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells*, 2009, 27(4): 806-811. DOI: 10.1002/stem.31.
- [10] Patani R. Generating diverse spinal motor neuron subtypes from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 1036974. DOI: 10.1155/

- 2016/1036974.
- [11] Li XJ, Hu BY, Jones SA, et al. Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 886-893. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0620.
- [12] Amoroso MW, Croft GF, Williams DJ, et al. Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. *J Neurosci*, 2013, 33(2): 574-586. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0906-12.2013.
- [13] Faravelli I, Bucchia M, Rinchetti P, 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. DOI: 10.1186/scrt476.
- [14] Liu ML, Zang T, Zhang CL. Direct lineage reprogramming reveals disease-specific phenotypes of motor neurons from human ALS patients. *Cell Rep*, 2016, 14(1): 115-128. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.018.
- [15] Moharil J, Lei P, Tian J, et al. Lentivirus live cell array for quantitative assessment of gene and pathway activation during myogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 2015, 10(10): e0141365. DOI: 10.1371/journal.pone.0141365.
- [16] Mistriotis P, Bajpai VK, Wang XY, et al. NANOG reverses the myogenic differentiation potential of senescent stem cells by restoring ACTIN filamentous organization and SRF-dependent gene expression. *Stem Cells*, 2017, 35(1): 207-221. DOI: 10.1002/stem.2452.
- [17] Marchetto MC, Muotri AR, Mu YL, et al. Non-cell-autonomous effect of human SOD1^{G37R} astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 649-657. DOI: 10.1016/j.stem.2008.10.001.
- [18] Ladran I, Tran N, Topol A, et al. Neural stem and progenitor cells in health and disease. *WIREs Syst Biol Med*, 2013, 5(6): 701-715. DOI: 10.1002/wsbm.1239.
- [19] Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 2002, 110(3): 385-397. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00835-8.
- [20] Tiryaki E, Horak HA. ALS and other motor neuron diseases. *Continuum (Minneapolis)*, 2014, 20: 1185-1207. DOI: 10.1212/01.CON.0000455886.14298.a4.
- [21] Arbab M, Baars S, Geijsen N. Modeling motor neuron disease: the matter of time. *Trends Neurosci*, 2014, 37(11): 642-652. DOI: 10.1016/j.tins.2014.07.008.
- [22] Sharma A, Sane H, Gokulchandran Net al. Stem cell therapy in motor neuron disease//Sibat H F. Novel aspects on motor neuron disease. London: Intech Open, 2019: 1-24. DOI: 10.5772/intechopen.87116.
- [23] Goto K, Imamura K, Komatsu K, et al. Simple derivation of spinal motor neurons from ESCs/iPSCs using sendai virus vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, 4: 115-125. DOI: 10.1016/j.omtm.2016.12.007.
- [24] Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, et al. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(9): 824-828. DOI: 10.1038/nbt.1957.
- [25] Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 2002, 110(3): 385-397.

(本文责编 郝丽芳)