

1例脊髓延髓肌萎缩症运动神经元分化及分子病理分析

刘文竹,刘付臣

(山东大学齐鲁医院神经内科,山东 济南 250012)

摘要:目的 运用脊髓延髓肌萎缩症(spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA)患者诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)来源的运动神经元探究本病的分子病理表型。方法 提取1例SBMA患者及1例健康对照者的皮肤成纤维细胞并重编程为iPSCs;将iPSCs诱导为运动神经前体细胞(motor neurons progenitor, MNP)并分化为成熟的运动神经元(mature motor neurons, mMN);免疫荧光染色研究细胞的增殖与凋亡,检测细胞核内包涵体的形成。结果 患者,35岁,男性,主要表现为四肢近端无力、手抖以及性功能减退。骨骼肌活检显示神经源性损害病理改变。外周血毛细血管电泳检测显示雄激素受体(androgen receptor, AR)基因第1外显子CAG重复次数为44次。iPSCs均表达干性标记物,细胞核型正常,并能随机分化为三胚层细胞类型。患者iPSCs及MNP未见细胞核内包涵体,但mMN中的核内包涵体较为典型。与健康对照相比,患者MNP增殖比例下降,凋亡比例增加。结论 SBMA患者iPSCs携带致病变异,其分化的mMN含有典型的细胞核内包涵体,精准地模拟本病的分子病理特征,为后续机制研究和药物靶标发现提供理想的模型。

关键词:脊髓延髓肌萎缩症;肯尼迪病;雄激素受体基因;诱导多潜能干细胞;运动神经元

中图分类号:R746.4

文献标志码:A

Differentiation and molecular pathological analysis of motor neurons in a case of spinal muscular atrophy

LIU Wenzhu, LIU Fuchen

(Department of Neurology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

Abstract: Objective To explore the molecular pathologic phenotype of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) using motor neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) from SBMA patients. **Methods** Skin fibroblasts from one SBMA patient and one healthy control were extracted and reprogrammed into iPSCs; iPSCs were induced into motor neurons progenitor (MNP) and differentiated into mature motor neurons (mMN); immunofluorescence staining was used to study cell proliferation and apoptosis, and the formation of intranuclear inclusion bodies was detected. **Results** The patient was a 35-year-old male who presented with proximal weakness of the extremities, hand tremors, and hypogonadism. Skeletal muscle biopsy showed pathologic changes of neurogenic damage. Peripheral blood capillary electrophoresis showed 44 repeats of CAG in exon 1 of the AR gene. iPSCs all expressed stemness markers, had normal karyotypes, and were able to differentiate randomly into trichodermal cell types. No intranuclear inclusion bodies were seen in patient iPSCs and MNP, but intranuclear inclusion bodies were more typical in mMN. Compared with normal controls, the patients' MNP had an increased proportion of apoptosis and a decreased proportion of proliferation. **Conclusion** The iPSCs of SBMA patients carried pathogenic mutations, and their differentiated mMNs contained typical intranuclear inclusion bodies, which accurately mimicked the molecular pathological features of the disease and provided an ideal model for the subsequent mechanism study and drug target discovery.

Key words: Spinal and Bulbar Muscular Atrophy; Kennedy's Disease; Androgen Receptor Gene; Induced Pluripotent Stem Cells; Motor Neurons

脊髓延髓肌萎缩症(spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA)又称肯尼迪病(Kennedy's disease),以近端肢体和躯干进行性、对称性肌无力和肌萎缩为主要临床表现的X连锁隐性遗传性神经变性病^[1]。本病由雄激素受体(androgen receptor, AR)基因第1外显子中的CAG重复扩增引起,患者CAG的重复次数 ≥ 38 次^[2]。CAG密码子编码谷氨酰胺,异常扩增的CAG编码形成多聚谷氨酰胺(polyglutamine, polyQ),随后从 α -螺旋结构向 β -片层构象转变,然后形成可溶性低聚物,最后形成具有淀粉样纤维结构的不溶性聚集体,也就是核内包涵体。这些中间可溶性物质已被证实具有显著的神经毒性^[3-4]。SBMA患者通常会出现震颤、肌肉痉挛和血清肌酸激酶水平升高的表现,晚期可出现行走困难和吞咽困难等。内分泌异常也是本病主要临床表现之一^[5-8]。电生理检测主要表现为进行性和/或慢性失神经改变等广泛慢性神经源性损害^[9]。延髓和脊髓前角运动神经元变性是SBMA的主要病理改变^[10]。尸检可见脑干运动神经核和脊髓前角运动神经元变性萎缩^[11-12]。

本研究构建1例经基因诊断确诊SBMA患者的诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),并将iPSCs诱导分化为运动神经前体细胞(motor neurons progenitor, MNP)及成熟运动神经元(mature motor neurons, mMN)。患者iPSCs分化的MNP出现增殖缺陷,运动神经元含有细胞核内包涵体,精准模拟本病的分子病理特征,为后续SBMA的分子机制研究和药物靶标发现提供理想模型。

1 资料与方法

1.1 研究对象

患者,男,35岁,因四肢近端无力、手抖来我院就诊。患者一年前因乳腺发育手术治疗,性功能减退一年。舌肌有轻度萎缩,口周有肌肉跳动,右侧乳腺手术瘢痕,左侧乳腺轻度发育。家族史:舅舅可疑肯尼迪病。孕酮为0.85 nmol/L,血清肌酸激酶值为620 U/L。肌电图示:①广泛神经源性损害;②上下肢感觉神经病变。本研究样本收集及所有实验方法均符合山东大学齐鲁医院科研伦理委员会伦理审查要求【(科)伦审第2020066号】。

1.2 方法

1.2.1 肌肉活检

患者签署知情同意后,行左肱二头肌肌肉组织活检。肌肉组织在液氮预冷的异戊烷中固定。在 -25°C 的恒冷切片机内,切取 $8\ \mu\text{m}$ 厚的切片,并进行下列染色:苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)、改良Gomori(modified gomoritricrome, MGT)、还原型辅酶I四氮唑还原酶(NADH-tetrazolium reductase, NADH-TR)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)、细胞色素氧化酶C(cytochrome C oxidase, COX)、过碘酸Shiff(periodic-acid schiff stain, PAS)、油红“O”(oilred O, ORO)和三磷酸腺苷酶(ATPase, pH4.3)染色。

1.2.2 基因检测

在获得知情同意后,采集患者的外周血样本。使用基因组DNA试剂盒(北京天根生物技术有限公司)从血样中提取基因组DNA。采用PCR扩增基因组DNA,PCR扩增产物以质量浓度为3%的琼脂糖凝胶电泳,100 V电压电泳40 min,对上述电泳中出现2个电泳条带的样本进一步行毛细管电泳分析。采用核酸分析仪对PCR扩增产物进行片段分析;取20 μL 甲酰胺,0.25 μL CEQ DNA Size Standard kit-600片段作为标准内标,1 μL PCR扩增产物混匀后上样;预设程序进行电泳分离,分离条件为毛细管温度达 50°C 时, 90°C 变性120 s,2.0 kV电压下注入样本30 s,4.8 kV电压下电泳70 min,以预设的分析参数进行片段分析。

1.2.3 皮肤成纤维细胞培养

在获得患者及健康对照者知情同意后,进行肌肉活检的同时获取皮肤样本。将皮肤组织放入15 mL离心管中,加入5 mL PBS,用力摇晃清洗皮肤组织,重复5次后将皮肤组织取出。剪去脂肪组织,将皮肤组织分剪成小块放入6孔板中培养。每孔添加800 μL 含10%FBS(美国Gibco公司)与1%P/S(美国Gibco公司)的DMEM(美国Gibco公司)培养基,使皮肤组织能紧贴6孔板底。6孔板放置在 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中,每天更换培养基,直至30 d后皮肤成纤维细胞长出。

1.2.4 iPSCs重编程与运动神经元分化

用胰酶对皮肤成纤维细胞进行消化处理。用培养基将细胞沉淀重悬,并用细胞计数板进行细胞计数。取 8×10^4 个细胞加入1.5 mL EP管中再次离心

后,去上清,加入 120 μL 电转液和 8 μg 混合好的 4 种质粒(pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXWB-EBNA1)(瑞士 LONZA 公司)。用移液枪轻轻重悬细胞后,将细胞悬液转移至电转杯中,并轻磕以去除气泡。接着将电转杯放入电转仪(瑞士 LONZA 公司)中,并选择 U-023 程序进行电转操作。电转完成后,将细胞悬液转移入基质胶包被的 6 孔板中,再加入 2 mL 含 10% FBS、1% P/S 与 1% RI(美国 MedChemExpress 公司)的 DMEM 培养基。第 2 天,将培养基更换为 TeSR -E7 重编程培养基(加拿大 STEMCELL Technologie 公司)。大约 20 d 后,细胞克隆开始出现,更换为 NC target 培养基(安徽首宁生物科技有限公司)。当 iPSCs 克隆生长至足够大时,在镜下用枪头轻轻挑取单个克隆,并转移至提前用基质胶包被好的 24 孔板中,每个孔中放置一个克隆。此后每天更换新的 NC tar-

get 培养基进行培养,传代扩增。拟胚体的形成和体外分化以及运动神经元诱导方法如前所述^[13-15]。

1.2.5 核型分析

用 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 秋水仙碱处理 iPSCs 120 min,然后离心并用 25% 乙酸和 75% 甲醇固定。山东大学齐鲁医院围产医学中心对 G 带有丝分裂期染色体进行核型分析。

1.2.6 免疫荧光

用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,使用 PBS 洗涤细胞 3 次。然后用 0.1% TritonX-100 在 PBS 中渗透 30 min。用 1% 山羊血清封闭 1 h 后,加入一抗,将细胞置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜孵育。第 2 天,用 PBS 洗涤细胞 3 次,然后用二抗室温孵育 1 h。用 PBS 冲洗细胞 3 次并用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂[亚科因(武汉)生物技术有限公司]封片。一抗二抗具体信息见表 1。

表 1 抗体详细信息
Table 1 Detail information of antibodies

抗体名称	稀释比例	公司,货号
兔抗-NANOG	1:200	美国 Proteintech 公司,14295-1-AP
兔抗-SOX2	1:200	美国 Proteintech 公司,11064-1-AP
鼠抗-OCT4	1:200	美国 Proteintech 公司,60242-1-Ig
鼠抗-SSEA4	1:200	美国 Santa Cruz 公司,sc-21704
鼠抗-TRA-1-60	1:200	美国 Santa Cruz 公司,sc-21705
兔抗-SMA	1:100	英国 Abcam 公司,ab5694
鼠抗-TUBB3	1:100	美国 Proteintech 公司,66375-1-Ig
鼠抗-HNF3 β	1:200	美国 Santa Cruz 公司,sc-374376
兔抗-PAX6	1:200	美国 Proteintech 公司,12323-1-AP
兔抗-OLIG2	1:200	美国 Proteintech 公司,13999-1-AP
兔抗-CHAT	1:200	美国 Proteintech 公司,20747-1-AP
鼠抗-HB9	1:200	美国 Santa Cruz 公司,sc-515769
兔抗-Ki67	1:200	武汉爱博泰克生物科技有限公司,A23722
鼠抗-IC2	1:200	美国 Sigma-Aldrich 公司,MAB1574
山羊抗鼠 IgG (H+L) 交叉吸附二抗, Alexa Fluor 488	1:1 000	美国 Thermo Fisher 公司,A-11001
山羊抗兔 IgG (H+L) 交叉吸附二抗, Alexa Fluor 594	1:1 000	美国 Thermo Fisher 公司,A-11012

1.2.7 细胞凋亡检测

用 PBS 洗涤细胞 1 次,加入 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min。用 PBS 再次洗涤,用含 0.3% Triton X-100 的 PBS,室温孵育 5 min。按照 TdT 酶:荧光标记液为 1:9 的比例配制适量的 TUNEL 检测液(上海碧云天生物技术有限公司)充分混匀,在每个样品上加 50 μL TUNEL 检测液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次后,用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片后在荧光显微镜下观察。可以使用的激发波长范围为 450~500 nm,发射波长范围为 515~565 nm。

1.3 统计学处理

采用 Image J V1.8.0 软件对 Ki67 阳性细胞及

TUNEL 阳性细胞计数。采用 SPSS 25.0 统计软件分析数据,同时用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,患者与健康对照者两组间均数比较采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肌肉病理

肌肉活检 HE 染色示肌纤维大小中度不等,小纤维多呈长条形、角形,部分呈小圆形;可见肥大肌纤维及核袋;MGT 染色可见部分肌纤维肌膜下红染;

NADH、SDH 及 COX 染色可见较多肌纤维肌膜下深染。ATP 酶染色可见两型纤维群组化改变(图 1)。

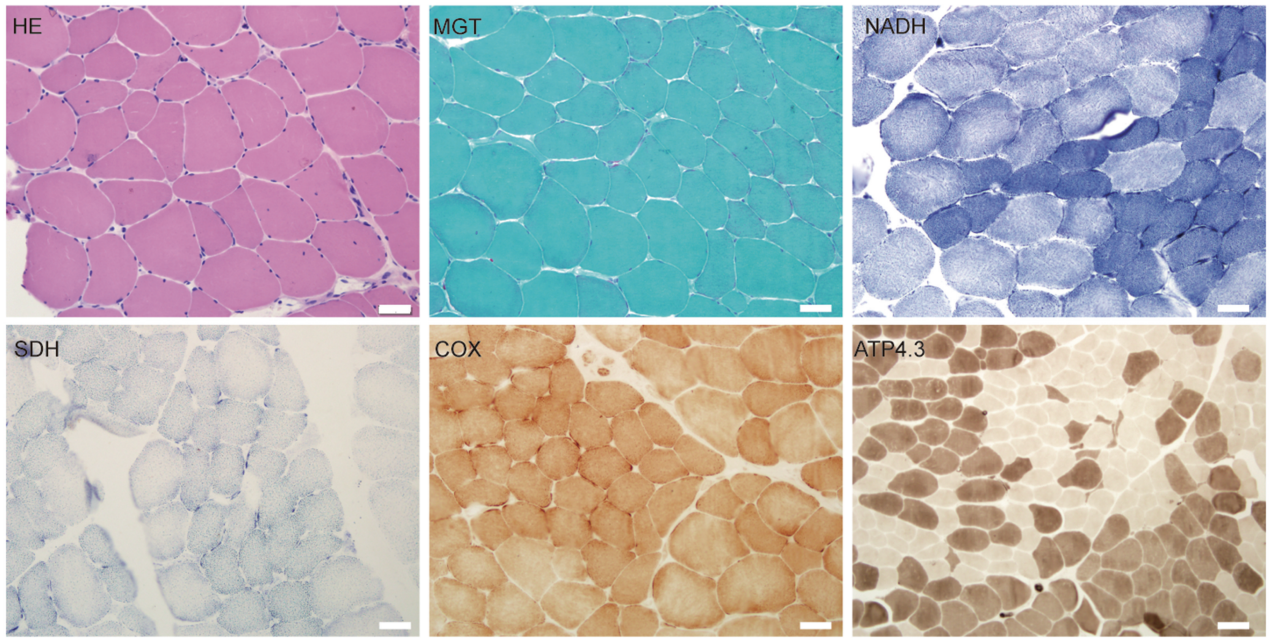


图 1 SBMA 患者肌肉活检结果代表图

SBMA 患者肌肉病理染色(HE、MGT、NADH-TR、SDH、COX、ATPase pH4.3)代表图,标尺:100 μm。

Figure 1 Representative diagram of muscle biopsy results

Muscle pathology staining of SBMA patients (HE, MGT, NADH-TR, SDH, COX, ATPase pH4.3 staining), scale bar: 100 μm.

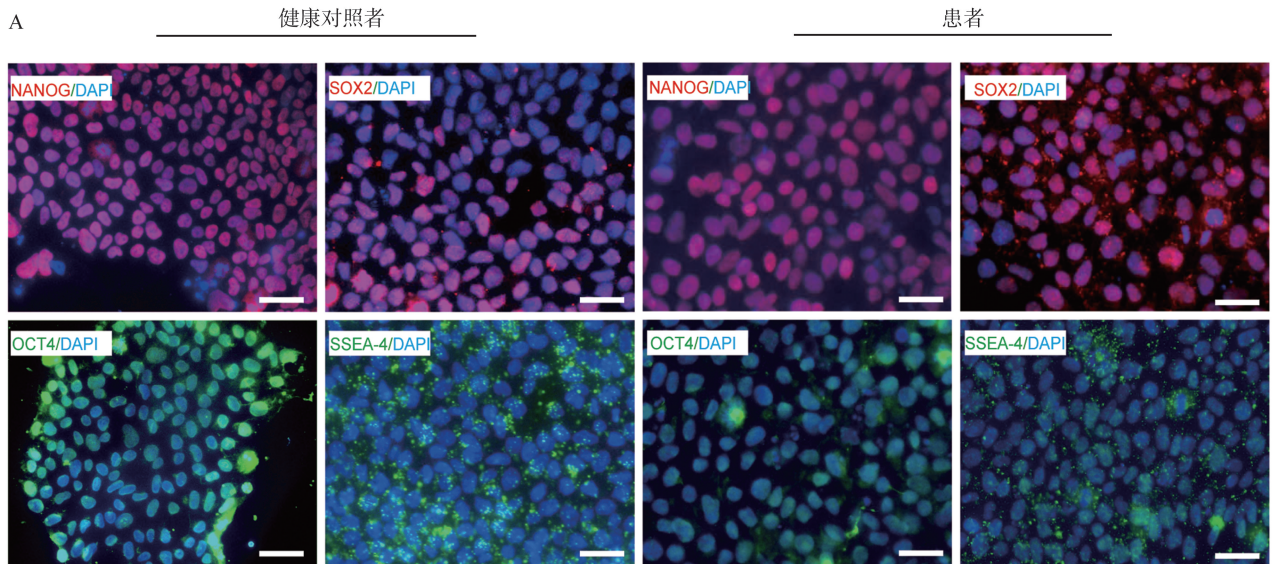
2.2 基因检测

患者外周血毛细血管电泳结果显示,DNA 长度为 331 bp,根据计算得出该样本 AR 基因 1 号外显子 CAG 重复次数为 44 次(正常人该序列的重复次数为 ≤34 次),提示患者 CAG 重复次数超出正常范围,符合肯尼迪病的诊断。

2.3 iPSCs 的鉴定

经过重编程处理,皮肤成纤维细胞成功转化为 iPSCs。通过免疫荧光染色技术,我们观察到患者与

健康对照来源的 iPSCs 表达了干细胞标志物-NANOG、SOX2、OCT4 和 SSEA-4。这表明我们构建的 iPSCs 具有多能性特征(图 2A)。iPSCs 染色体核型为 46XY,未见染色体形态异常(图 2B)。iPSCs 向 3 个胚层的分化是定向分化为相应器官细胞类型的第一步,也是作为验证 iPSCs 多向分化潜能的一个重要指标。HNF-3β、SMA、TUBB3 分别是内、中、外胚层的标记蛋白(图 2C),证明 iPSCs 具有向 3 个胚层分化的能力。



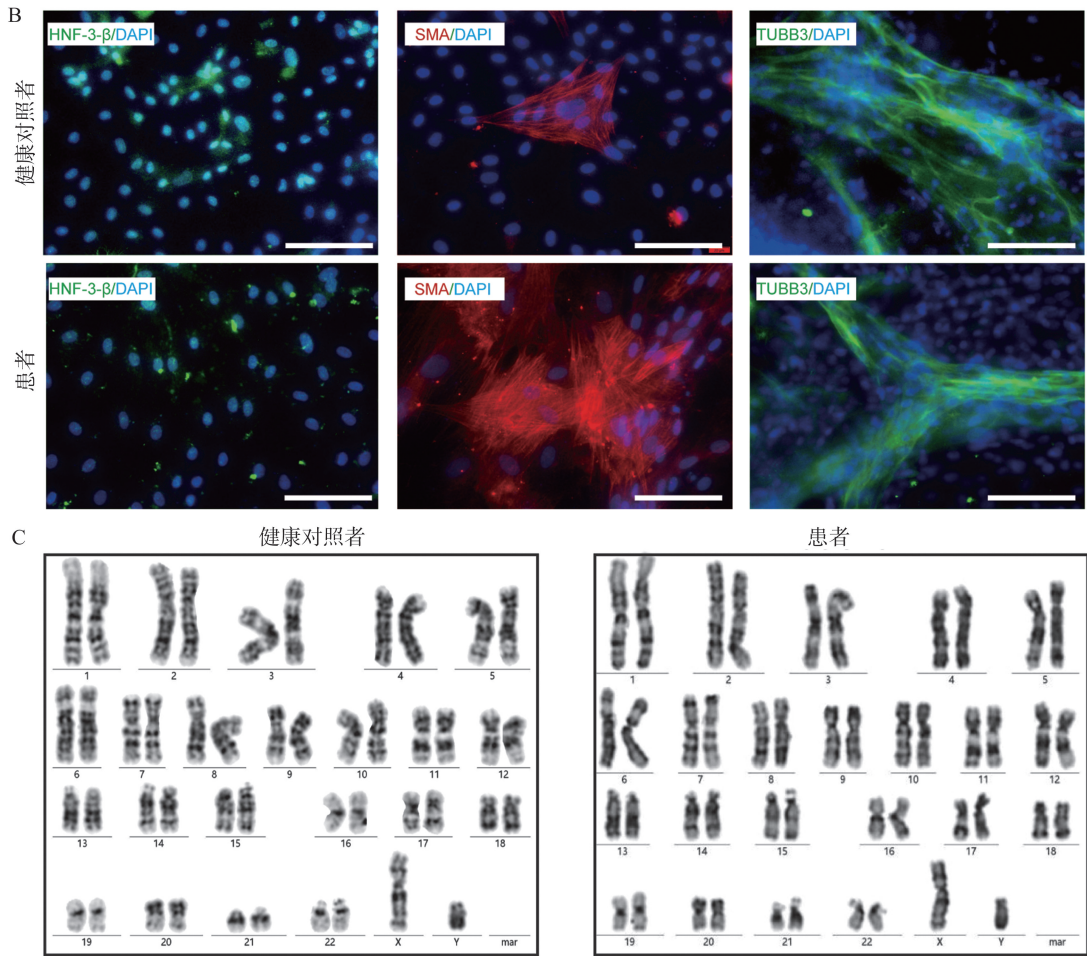


图2 iPSCs 多能性鉴定及正常核型验证

A: iPSCs 干细胞标记物染色—NANOG、SOX2、OCT4、SSEA-4, 标尺: 20 μm; B: iPSCs 多向分化潜能验证 (HNF-3β、SMA、TUBB3 分别是内、中、外胚层的标记蛋白), 标尺: 20 μm; C: iPSC 核型验证正常且均为 46XY。

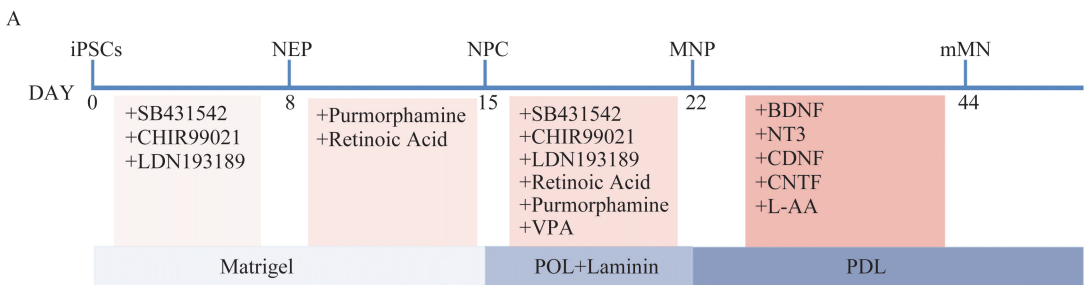
Figure 2 Identification of iPSCs pluripotency and verification of normal karyotype

A: iPSCs stemness markers staining-NANOG, SOX2, OCT4, SSEA-4, scale bar: 20 μm; B: iPSCs multidirectional differentiation potential validation (HNF-3β, SMA and TUBB3 are marker proteins of endoderm, mesoderm and ectoderm respectively), scale bar: 20 μm; C: iPSCs karyotype validation was normal and all 46XY.

2.4 运动神经元的分化

采用化学小分子诱导法, 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在体外获得运动神经元, 主要分化流程见图 3A。

Olig2 与 PAX6 是 MNP 的特异性指标, 证明 iPSCs 向 MNP 的分化(图 3B)。HB9 和 CHAT 是 mMN 的特异性标志物。结果示经过诱导分化, iPSCs 成功分化为 mMN(图 3C)。



NEP: Neuroepithelium cell, 神经上皮细胞
 NPC: Neural precursor cell, 神经前体细胞
 Matrigel: 基质胶
 Laminin: 层粘连蛋白
 POL: Poly-L-ornithine, 多聚-L-鸟氨酸溶液
 PDL: Poly-D-lysine, 多聚-D-赖氨酸

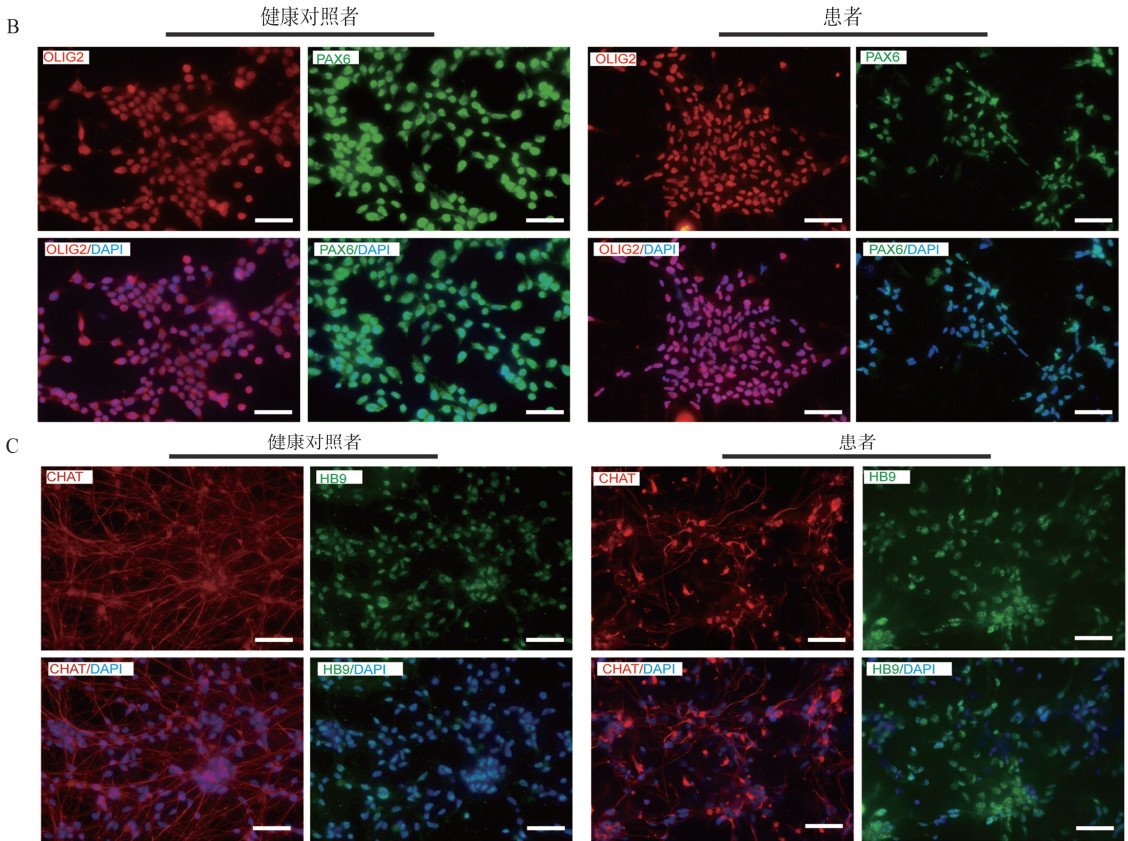


图3 iPSCs 向运动神经元分化流程与鉴定

A: iPSCs 分化为 mMN 流程图; B: 患者与健康对照者来源的 MNP 免疫荧光染色鉴定— OLIG2、PAX6, 标尺: 20 μm; C: 患者与健康对照者来源的 mMN 免疫荧光染色鉴定—CHAT、HB9。标尺: 20 μm。

Figure 3 iPSCs differentiation process to motor neurons and identification.

A: Flow chart of iPSCs differentiation to mMN; B: MNP from Patient and healthy Control (Olig 2, Pax 6); C: Immunofluorescence staining identification of mMN from Patient and healthy Control-CHAT, HB9, bar: 20 μm. Scale bar: 20 μm.

2.5 MNP 增殖检测

Ki67 是细胞核上的一种非组蛋白, 它的功能与细胞的有丝分裂有关。Ki67 的表达高低说明细胞增殖是否处于活跃状态, Ki67 的阳性率越高细胞增

殖越活跃。通过 Ki67 染色结果及统计学分析, 发现患者来源的 MNP 的细胞增殖速率明显低于对照组 ($P=0.001$)。见图 4。

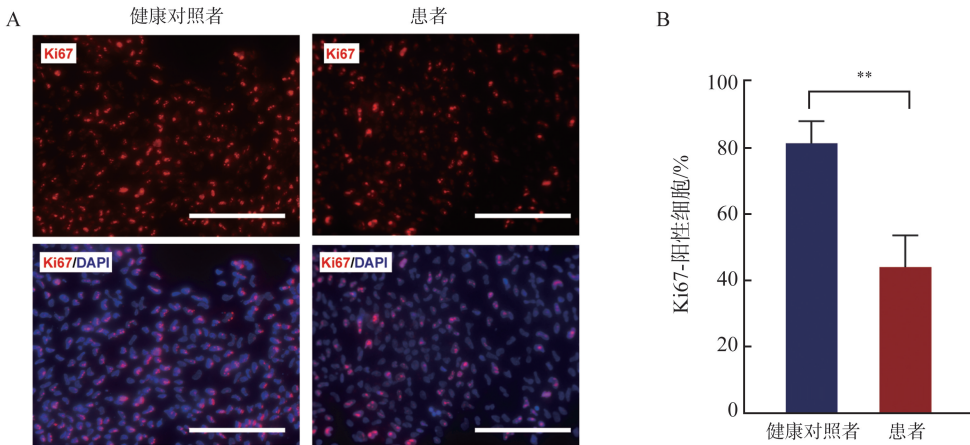


图4 MNP 增殖检测

A: 患者与健康对照者来源的 MNP Ki67 (红色) 免疫荧光染色代表图像, 标尺: 50 μm; B: Ki67 阳性细胞百分比统计图, $**P<0.01$ 。

Figure 4 MNP proliferation detection

A: MNP Ki67 (red) immunofluorescence staining representative images from patient and healthy control, scale bar: 50 μm; B: Statistical graph of the percentage of Ki67-positive cells, $**P<0.01$.

2.6 MNP 凋亡检测

在细胞凋亡过程中,染色体 DNA 双链或单链断裂产生 3'-OH 末端。TdT 酶与 3'-OH 末端结合,将荧光标记物连接到 DNA 上,实现对凋亡细胞的

检测。利用 TUNEL 染色技术,对 MNP 进行凋亡检测。在患者来源的 MNP 中,凋亡细胞的比例明显高于对照组($P=0.007$)。见图 5。

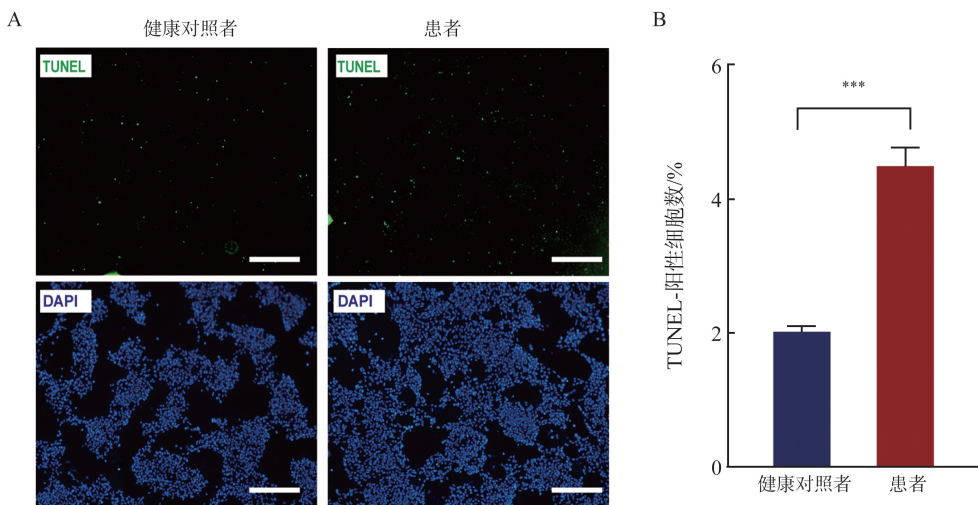


图 5 MNP 凋亡检测

A:患者与健康对照者来源的 MNP TUNEL(绿色)荧光染色代表图像,标尺:50 μm ; B:TUNEL 阳性细胞百分比统计图。*** $P<0.001$ 。

Figure 5 MNP apoptosis detection

A:MNP TUNEL (green) fluorescent staining representative images from Patient and healthy Control, scale bar: 50 μm ; B:Statistical graph of the percentage of Ki67-positive cells, *** $P<0.001$.

2.7 核内包涵体形成时期鉴定

1C2 是 polyQ 的特异性单克隆抗体,可以识别 polyQ 形成的包涵体,核内包涵体是 polyQ 疾病的统一病理标志。对 iPSCs、MNP 以及 mMN 三个阶

段的细胞应用 1C2 进行免疫荧光染色。结果显示患者来源的 iPSCs 及 MNP 未见细胞核内包涵体,而 mMN 中可以看到典型的核内包涵体(图 6)。

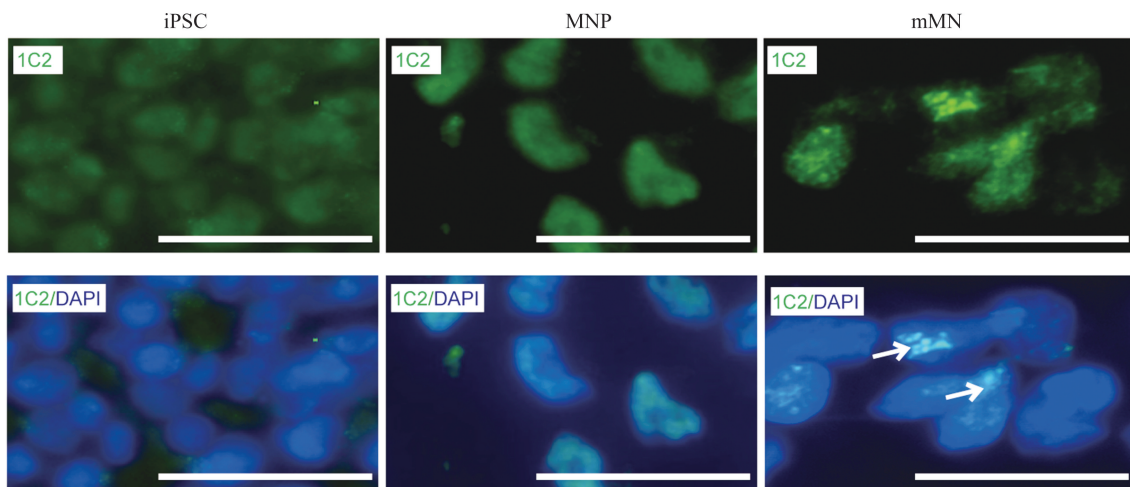


图 6 核内包涵体形成时期鉴定

iPSCs、MNP 以及 mMN 三个阶段的细胞 1C2 抗体免疫荧光染色图,白色箭头指示核内包涵体,标尺:20 μm 。

Figure 6 Identification of the intranuclear inclusion body formation period

iPSCs, MNP and mMN cells with 1C2 antibody, white arrows indicate nuclear inclusion, scale bar: 20 μm .

3 讨论

iPSCs 可以直接由患者皮肤成纤维细胞或其他

体细胞重编程产生,且具有自我更新和分化能力^[16]可分化为包括各类神经元和胶质细胞在内的数十种人体固有细胞^[17]。与其他的动物模型或工程细胞模型相比,iPSCs 来源的分化细胞在神经遗传病领

域具有独特优势,有着广泛的应用前景:①疾病建模:iPSCs来源于遗传病患者体细胞,携带致病性基因变异,可精准模拟特定基因变异在特定神经细胞中的特定病理生理过程。此外,iPSCs分化为神经元的这一动态过程也利于观察疾病的分子病理动态演变,为研究疾病的发生和发展过程提供了有力工具;②药物筛选:利用iPSCs来源的神经元可以高效地实现高通量药物筛选,测试不同药物对病变细胞特定病理变化的影响,测试候选药物的有效性和安全性,实现遗传病的个体化药物筛选和治疗;③基因编辑:利用基因编辑技术如CRISPR-Cas9,可以在iPSCs层面纠正致病性基因变异,建立基因矫正的等基因iPSCs,用于个体化的细胞移植治疗^[18]。总之,患者iPSCs来源的神经元为神经遗传病的研究提供一种强大而灵活的工具,有助于深入理解疾病机制,加速药物研发过程,并为个体化治疗提供新途径。

SBMA由AR基因第1外显子中的CAG重复扩增引起。正常人该序列的重复次数为 ≤ 34 次,患者CAG的重复次数 ≥ 38 次。AR在中枢神经系统的分布相对广泛,主要表达在大脑的多个区域,包括与性别差异、性行为、运动执行、认知功能和情绪调节相关的区域,特别是在海马体、前脑基底核、下丘脑、脑干和脊髓前角等区域^[19-20]。AR相关信号通路对运动神经元有营养支持作用。AR在运动神经元中的表达可维持运动神经元的轴突生长,促进神经损伤后的修复^[21]。在一项有关肌萎缩性侧索硬化症的研究中发现,AR表达水平的改变与疾病进展有关,补充雄激素可刺激运动神经元的损伤后修复,促进轴突和树突的发生。本研究结果表明,SBMA疾病组MNP凋亡细胞比例增多,增殖比例降低,进一步证实AR蛋白对神经元的生长、分化具有重要作用。

AR基因中异常扩增的CAG重复编码PolyQ蛋白。初始合成的PolyQ蛋白构象为 α -螺旋,然后转变为 β -折叠并形成可溶性低聚体,最终转化为不溶性淀粉样纤维结构,并在细胞内异常聚集形成细胞核内包涵体^[22]。异常聚集的PolyQ引起神经元损伤的机制包括:①细胞应激反应:异常聚集的PolyQ蛋白触发细胞应激反应,引起热休克蛋白和其他分子伴侣的上调,进一步破坏细胞内的蛋白质稳态;②细胞器功能障碍:异常聚集的PolyQ蛋白干扰细胞器的正常功能,特别是线粒体、内质网和溶酶体,导致能量代谢障碍、细胞内钙平衡失调以及细胞自噬清除机制异常;③基因表达调控受损:异常聚集的PolyQ蛋白可能与转录因子和其他基因表达调节

蛋白相互作用,干扰正常的基因表达。长期的蛋白质聚集和细胞应激最终导致神经元变性、死亡,引起神经退行性疾病的发生^[23-25]。本研究对SBMA的iPSCs、MNP以及mMN进行免疫荧光染色,动态观察包涵体的形成,结果显示只有在mMN中才有包涵体的形成。分析原因可能为:①长期累积:mMN经历较长时间的蛋白质积累;②代谢差异:mMN的代谢活动和蛋白质处理机制可能与神经干细胞不同。这些差异可能影响异常蛋白的形成、聚集和清除;③细胞应激响应的变化:随着细胞的成熟,细胞的应激响应能力可能会下降。mMN可能在处理蛋白质聚集和应对细胞应激方面有所降低;④细胞修复和清除机制的减弱:随着神经元的成熟和衰老,其自噬和蛋白酶体系统(负责清除损坏或异常蛋白的细胞机制)可能效率降低,导致异常蛋白质的积累。

综上所述,SBMA患者iPSCs携带致病变异。我们在本病MNP中发现细胞的增殖缺陷且细胞凋亡显著增加,其分化的mMN中含有典型的细胞核内包涵体。iPSCs来源的运动神经元能够精准模拟本病的分子病理特征,为后续机制研究和药物靶标发现提供理想的模型。

参考文献:

- [1] Cortes CJ, La Spada AR. X-linked spinal and bulbar muscular atrophy: from clinical genetic features and molecular pathology to mechanisms underlying disease toxicity[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1049: 103-133. doi: 10.1007/978-3-319-71779-1_5.
- [2] Borgia D, Malena A, Spinazzi M, et al. Increased mitophagy in the skeletal muscle of spinal and bulbar muscular atrophy patients[J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(6): 1087-1103.
- [3] Feng X, Luo S, Lu B. Conformation polymorphism of polyglutamine proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43(6): 424-435.
- [4] Minakawa EN, Nagai Y. Protein aggregation inhibitors as disease-modifying therapies for polyglutamine diseases[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 621996. doi: 10.3389/fnins.2021.621996.
- [5] Giorgetti E, Lieberman AP. Polyglutamine androgen receptor-mediated neuromuscular disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(21): 3991-3999.
- [6] Querin G, Bertolin C, Da RE, et al. Non-neural phenotype of spinal and bulbar muscular atrophy: results from a large cohort of Italian patients[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2016, 87(8): 810-816.

- [7] Fratta P, Nirmalanathan N, Masset L, et al. Correlation of clinical and molecular features in spinal bulbar muscular atrophy[J]. *Neurology*, 2014, 82(23): 2077-2084.
- [8] Hashizume A, Banno H, Katsuno M, et al. Quantitative assessment of swallowing dysfunction in patients with spinal and bulbar muscular atrophy[J]. *Intern Med*, 2017, 56(23): 3159-3165.
- [9] Suzuki K, Katsuno M, Banno H, et al. The profile of motor unit number estimation (MUNE) in spinal and bulbar muscular atrophy[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010, 81(5): 567-571.
- [10] Harding AE, Thomas PK, Baraitser M, et al. X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: a report of ten cases [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1982, 45(11): 1012-1019.
- [11] Sobue G, Hashizume Y, Mukai E, et al. X-linked recessive bulbospinal neuronopathy. A clinicopathological study[J]. *Brain*, 1989, 112 (Pt 1): 209-232.
- [12] Minakawa EN, Popiel HA, Tada M, et al. Arginine is a disease modifier for polyQ disease models that stabilizes polyQ protein conformation[J]. *Brain*, 2020, 143(6): 1811-1825.
- [13] Du ZW, Chen H, Liu H, et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6626. doi: 10.1038/ncomms7626.
- [14] Giandomenico SL, Sutcliffe M, Lancaster MA. Generation and long-term culture of advanced cerebral organoids for studying later stages of neural development[J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(2): 579-602.
- [15] Wang D, Zhang R, Wang Y, et al. Establishment of an induced pluripotent stem cell (iPSC) line (INND-SUi001-A) from a healthy female Chinese Han [J]. *Stem Cell Res*, 2022, 62: 102819. doi: 10.1016/j.scr.2022.102819.
- [16] Jamal A. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): where are we and where are we heading? [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2023, 69(11): 76-80.
- [17] Sato M, Takizawa H, Nakamura A, et al. Application of urine-derived stem cells to cellular modeling in neuromuscular and neurodegenerative diseases[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 297. doi: 10.3389/fnmol.2019.00297.
- [18] Petazzi P, Menendez P, Sevilla A. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout and knockin human iPSCs[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2454: 559-574. doi:10.1007/7651_2020_337.
- [19] Fernandez-Guasti A, Kruijver FP, Fodor M, et al. Sex differences in the distribution of androgen receptors in the human hypothalamus [J]. *J Comp Neurol*, 2000, 425(3): 422-435.
- [20] Li M, Sobue G, Doyu M, et al. Primary sensory neurons in X-linked recessive bulbospinal neuropathy: histopathology and androgen receptor gene expression [J]. *Muscle Nerve*, 1995, 18(3): 301-308.
- [21] Ward PJ, Davey RA, Zajac JD, et al. Neuronal androgen receptor is required for activity dependent enhancement of peripheral nerve regeneration[J]. *Dev Neurobiol*, 2021, 81(4): 411-423.
- [22] Kumar R. Role of androgen receptor polyQ chain elongation in Kennedy's disease and use of natural osmolytes as potential therapeutic targets[J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(11): 879-884.
- [23] Mazzini L, Gelati M, Profico DC, et al. Human neural stem cell transplantation in ALS: initial results from a phase I trial[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 17. doi: 10.1186/s12967-014-0371-2.
- [24] Tadesse T, Gearing M, Senitzer D, et al. Analysis of graft survival in a trial of stem cell transplant in ALS[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2014, 1(11): 900-908.
- [25] Glass JD, Hertzberg VS, Boulis NM, et al. Transplantation of spinal cord-derived neural stem cells for ALS: Analysis of phase 1 and 2 trials[J]. *Neurology*, 2016, 87(4): 392-400.

(编辑:张彩凤)