



• 学术动态 •

解码人类感觉神经元的发育转录特征及类器官模型构建

摘要 背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 在处理感觉信息中起着至关重要的作用, 因此了解其发育至关重要。该研究构建了人类胚胎 DRG 单细胞时空转录组图谱。该图谱揭示了细胞类型的多样性, 并强调了指导细胞命运决定的外在信号级联和内在调节层次, 包括神经元/神经胶质谱系限制, 感觉神经元分化和特异性, 以及神经元卫星胶质细胞单元的形成。此外, 该研究发现了一种富含人类的 $NTRK3^+/DCC^+$ 伤害感受器亚型, 它参与了多模式伤害感受处理。通过模拟体内信号通路的程序性激活, 成功建立了功能性的人类 DRG 类器官, 并强调了转录调节因子在非特异性感觉神经元命运决定中的关键作用。该研究阐明了支撑躯体感觉神经元多样性的多水平信号通路和转录因子调控层次, 强调了人类伤害感受器亚型的表型差异。

背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 起源于神经嵴, 是外周神经系统向中枢神经系统传递感觉信息的关键部位。随着神经嵴细胞 (neural crest cells, NCCs) 在 DRG 内的迁移和分化, 不同的感觉神经元类型以时间顺序的方式产生。第一波神经发生过程中产生大直径神经元, 其特征是神经营养受体酪氨酸激酶 3 ($NTRK3$) 和神经营养受体酪氨酸激酶 2 ($NTRK2$) 的表达。第二波主要产生小直径神经元, 表达神经营养受体酪氨酸激酶 1 ($NTRK1$)。除了感觉神经元外, DRG 还包含多种非神经元细胞, 对神经元活动的调节有独特的贡献。这些神经元和非神经元细胞发育或功能的中断可导致各种感觉障碍, 包括异常的触觉和痛觉过敏。在该研究中, 作者利用单核 RNA 测序 (snRNA-seq)、基于多路图像的转录因子序列荧光原位杂交 (TF-seqFISH) 和基于扩增的单分子荧光原位杂交 (asmFISH) 对人类胚胎 DRG 进行了研究, 以描绘驱动 NCCs 通过祖细胞和非特异性状态走向最终感觉神经或神经胶质命运的外在信号级联和内在转录调控层次。

1. 人类胚胎 DRG 的细胞异质性和发育里程碑

该研究通过构建人类胚胎 DRG 的单细胞时空转录组图谱, 揭示了细胞类型的多样性以及调控感觉神经元分化和特化的信号通路及转录因子。通过均匀流形近似和投影可视化技术, 观察了人类胚胎 DRG 细胞在不同妊娠周的细胞类型分布。为了进一步增强对空间基因表达谱的理解, 利用 TF-seqFISH 构建了 1085 个 TFs 的单细胞分辨率表达图, 重点

关注人类 DRG 的关键发育阶段 (GW8、GW10 和 GW18)。通过定量分析, 发现两个明显的神经发生波, 第一个波主要产生大型神经元, 第二个波主要产生小型神经元。此外, 还观察到胶质细胞分化的两个阶段, 卫星胶质细胞 (SGCs) 和施万细胞 (SCs) 分别在 GW12-GW15 和 GW17-GW21 期间分化。通过免疫荧光染色验证了单细胞转录组数据中推断出的发育轨迹, 显示在 GW7 时, uSN1 衍生的神经元 ($NTRK3^+/RUNX3^+/ISL1^+$, 大直径神经元谱系) 和 uSN2 衍生的神经元 ($NTRK1^+/RUNX1^+/ISL1^+$, 小直径神经元谱系) 比例相当。然而, 到 GW12 时, uSN2 衍生神经元的比例显著增加至 76%, 而 uSN1 衍生神经元的比例下降至 8%。此外, 到 GW12 时, 15.4% 的神经元被 SGCs 包围, 到 GW15 时增加到 40.9%。SCs 通过髓鞘碱性蛋白表达识别, 首次出现在 GW17, 并随后逐渐增加。

2. 信号通路和基因调控网络确保 NCCs 多重命运分化潜力

利用 RNA 速度分析重建了 NCC 衍生细胞的发育轨迹, 揭示了神经和胶质谱系的双向分化。这些细胞明显分为感觉神经元祖细胞 (SNPs) 和 SC 前体 (SCPs), SNPs 进一步分化为 uSN1 和 uSN2 亚型, 而 SCs 继续分化为 SGCs 和 SCs。通过将基因模块化并应用向量广义可加模型拟合趋势, 共识别了 9 个基因模块, 根据不同的表达趋势进一步分组: 持续下调、上调后下调、下调后上调和持续上调。这些基因模块在不同发育阶段的细胞中富集。



例如, 模块 G4 中的早期神经元谱系特异性基因主要在神经元分化的初始阶段表达, 而模块 G3 中的基因与化学突触传递相关, 从 GW7 到 GW21 表达水平增加。通过构建基因调控网络 (gene regulatory network, GRN), 寻找控制基因动态变化的关键调控子, 每个亚 GRN 对不同细胞类型显示出特定的偏好, 突出了 TFs 在细胞类型特化中的多样角色。例如, 亚 GRN6 在感觉神经前体细胞中高度富集, 而亚 GRN7 主要与 uSN1 细胞相关。通过信号通路富集分析发现 WNT (Wingless 相关整合位点) 和 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) 信号在 NCCs 中高度富集, 而视黄酸信号在 NCCs、SNPs 和 uSN1s 中富集。此外, 脑源性神经营养因子和神经营养因子 3 信号通路在 uSN1s 中富集, 神经生长因子信号通路在 uSN2s 中富集。该研究还探索了驱动两个神经发生分支的 TFs, 发现 *MEIS2* 和 *SKOR2* 对第一波神经发生至关重要, 而 *FOXO1* 在第二波神经发生中起关键作用。

3. 第一波感觉神经发生的发育过程

在第一波神经发生期间, uSN1s 分化为本体感受器 (proprioceptors) 和机械感受器 (mechanoreceptors)。通过结合伪时间分析和基因本体富集分析, 发现从 uSN1s 到本体感受器的转变中上调的基因与神经肌肉接头相关, 而上调的基因在即将成为机械感受器的细胞中主要与机械感受器分化相关。并且还识别了潜在引导这些分化路径的关键 TFs, 包括 *MEF2A* 和 *SMAD9* 对本体感受器的影响, 以及 *DRGX* 和 *SHOX2* 对机械感受器的影响。为了阐明本体感受器和机械感受器之间的功能差异, 作者分析了功能基因的表达概况。*PIEZO2* 在机械感受器中主要表达, 而 *ASIC1* 和 *ASIC2* 在本体感受器中的表达水平显著高于机械感受器, 这表明 ASIC 通道在增强本体感受器的机械敏感性中起关键作用。通过额外的聚类分析, 进一步细分了本体感受器亚型, 并探讨了参与本体感受器和机械感受器发育的潜在分子调控因子。这些发现表明, 本体感受器亚型的早期身份特化过程受到肢体间充质信号的影响, 而且本体感受器的细胞身份和功能发展在早期受到不同细胞外信号和 TF 组合的影响, 同时强调了 TFs 在塑造机械感受器功能多样性中的关键作用, 以及机械感受器的皮肤类型依赖性发育特征。

4. 伤害性感受器多样性和第二感觉神经发生波的分子逻辑

第二波神经发生启动了 C-LTMRs 和伤害性感受器 (nociceptors) 的发育。随后的分析将 uSN2 衍

生的神经元细分为 13 个亚型, 包括 12 个伤害性感受器亚型和 C-LTMRs, 每个亚型都由特定的离子通道、受体和已知的伤害性感受器特异性标记定义, 观察到某些伤害性感受器亚型表达多种感觉受体。例如, 表达 TRP 通道的 N1-N5 亚型主要涉及温度和伤害感觉的传递。N1 伤害感受器, 标记为 *KIT* 和 *TRPM8*, 可能对冷敏感。N2-N4 亚型, 特征为 *BMPRI1B*、*PROKR2*、*PTGER3* 和 *CDHR1*, 可能支配更深的组织 (如肌肉和内脏)。N6 伤害感受器, 特征为 *TRPM8*, 主要与冷感觉的检测相关。N7-N10 伤害感受器表达 *IL31RA* 和 *CYSLTR2*, 以及各种组胺和 5-羟色胺受体, 被认为参与瘙痒感觉的调节。此外, N10 伤害感受器特别表达瘙痒受体 (如 *SST*、*OSMR* 和 *TRPC3*)。有趣的是, 作者还观察到 3 个 uSN2 衍生的伤害感受器亚群共表达 *NTRK2/3*。例如, 表达 *NTRK2* 和 *GAL* 的 N5 亚型被推测为一组机械伤害感受器。N11 和 N12 均为 *NTRK3*⁺ 伤害感受器, 表达 *CHRNA7*、*GRM8*、*SCN1A*、*HRH1* 和 *TRPV1* 等受体, 表明它们参与多模态伤害感受过程。这些标记基因的共表达, 如 *asmFISH* 数据所观察到的, 证实了这些多样化的伤害感受器亚型在发育过程中的存在。通过进一步整合胚胎 DRGsnRNA-seq 数据和成年 DRGsnRNA-seq 数据, 观察到不同发育阶段到成年的表达概况具有高度一致性, 表明这些亚型在中到晚胚胎阶段就巩固了它们的转录组。

5. 非神经元细胞发育中的转录程序

在 NCCs 向胶质细胞分化的过程中, 出现了 SCPs 的过渡状态, 它们能够分化为 SGCs 和 SCs。作者使用树状图追踪了从 SCPs (*CDH19*⁺、*CDH6*⁺) 到分化的 SGCs (*APOE*⁺) 和 SCs (*PMP22*⁺) 的进展。分析关键 TFs 和基因的时序表达模式, 揭示了 SGC 相关基因的上调早于与 SCs 相关的基因, 也表明 SGC 分化先于 SC 形成。GO 富集分析显示 SGCs (c1) 和 SCs (c4) 中主要表达的基因参与细胞迁移和神经元功能成熟等过程。为了进一步阐明感觉神经元和胶质细胞之间的细胞相互作用, 使用 CellChat 分析法, 将配体-受体 (ligand-receptor, LR) 对分类为 14 个不同的模块, 揭示了不同细胞类型间通信中涉及的特 定 LR 信号通路。神经胶质单元的形成受到细胞外基质分子和特定细胞表面受体的介导, 如层黏连蛋白、胶原和 Sema 域超家族成员。值得注意的是, 在不同感觉神经元亚型中鉴定出独特的 LR 对。例如, LR9 以 *LRRRC4C* 与 *NTNG1* 的相互作用为特征, 分别在 SGCs 和机械感受器中富集。此外, SGCs 表



达 *SLIT2/3*, 它们特异性地与伤害感受器中的 *ROBO2* 结合 (LR10), 而 SGCs 中的 *SEMA4B* 与本体感受器中的 *DCBLD2* 特异性结合 (LR11)。这些细胞类型特异性的胶质-神经元相互作用通过单细胞空间转录组数据进一步确认, 表明周围 SGCs 可能在促进神经元类型特异性功能中发挥专门作用。

在 DRG 发育过程中, 驻留的巨噬细胞通过表达 *ITGAM*、*CSF1R*、*PTPRC*、*MRC1* 和 *MERTK* 等关键基因, 参与了神经元的发育和功能调节。免疫荧光染色显示了 GW10 人类 DRGs 中 P2RY12⁺ 巨噬细胞的空间分布, 表明它们与神经元的相互作用。通过量化分析, 发现 GW9 至 GW15 期间 P2RY12 和 *ISL1* 的比例逐渐增加, 进一步支持了巨噬细胞在神经元发育中的重要性。最后, 和弦图展示了巨噬细胞与感觉神经元之间的相互作用强度, 揭示了它们在神经胶质单元形成中的潜在调节作用。GO 分析结果显示, 参与相互作用对的基因在细胞黏附和吞噬作用中发挥重要作用。

6. 人和小鼠 DRG 的比较分析

利用基于时间转录组谱的广义线性模型来估计人类和小鼠样本之间的等效年龄, 使作者能够比较人类 DRG (包括 NCCs 和神经元谱系细胞) 与小鼠 DRG 的发育动态。分析显示, 从 GW7 到 GW21 的人类胚胎 DRG 的发育与小鼠 DRG 从胚胎第 12 天到出生后第 4 天的发育时间密切匹配, 表明人类的胚胎发育程序比小鼠更长。为了进一步研究基因表达谱的动态变化是否会导致发育差异, 将基因聚集成模块, 并通过富集分析将它们分配给不同的主要细胞类型。然后通过进行氧化石墨烯富集分析, 分析了主要细胞类型的特征生物学功能的时间动态。结果表明, 尽管人类和小鼠经历了相似的发育事件, 但存在时间差异。鉴于人类和小鼠疼痛感受器之间的差异表达基因数量较多, 作者将人类疼痛感受器 (GW7-GW21) 的单细胞转录组谱与小鼠疼痛感受器 (E15.5-P5) 的单细胞转录组谱整合, 揭示了特定人类和小鼠疼痛感受器亚型之间的明显对应关系。例如, 人类疼痛感受器簇 N1-N5 对应于小鼠降钙素基因相关肽 (CGRP- α 、CGRP- ε 、CGRP- η 、CGRP- γ 和 CGRP- ζ), 所有这些均参与疼痛和温度感觉。人类中的 N7-N9 簇与小鼠 *MRGPRD*⁺ 神经元相匹配, 这些神经元是多模态感觉神经元, 介导疼痛和非组胺性瘙痒。此外, 人类 N6 疼痛感受器类似于小鼠 *TRPM8*⁺ 冷热感受器, N10 疼痛感受

器类似于小鼠 *SST*⁺ 神经元, N11 疼痛感受器与小鼠 CGRP- θ 神经元相似。接下来, 探索了人类和小鼠伤害感受器之间基因表达谱的物种差异, 因为伤害感受器显示出更多的差异表达基因。首先检查了疼痛相关基因, 发现 *TRPA1*、*TRPV1*、*SCN10A*、*SCN11A* 和 *ANO5* 在人类中的表达水平高于小鼠。相比之下, 嘌呤能物质三磷酸腺苷受体 P2X2R 在小鼠中的表达高于人。值得注意的是, 瘙痒感知相关基因的表达也存在明显差异, HRH1 在人类伤害感受器中表达水平相对较高。这些观察结果强调了人类和小鼠 DRG 中独特的基因表达谱, 揭示了对感觉系统进化适应的重要见解。总体而言, 这些发现强调了人类和小鼠在基因表达和疼痛感受器细胞类型上的显著物种差异, 这对于感觉和疼痛过程至关重要。

7. 小结

使用 snRNA-seq 和单细胞 TF-seqFISH, 该研究构建了一个全面的人类胚胎 DRG 发育时空图谱, 涵盖了第一和第二孕期。该图谱使研究者们能够识别复杂的细胞亚型和谱系图, 揭示了多层级外部线索和内部 TF 层次对于人类 DRG 发育过程中命运决定的关键作用。人类感觉神经元的多样性源于严格的发育序列和复杂的层次基因调控。人类疼痛感受器表现出多样且未被表征的人类疼痛感受器亚型, 这些亚型并不完全符合现有的小鼠分类系统。这一发现突出了显著的物种特异性差异, 表明人类和小鼠在长期进化过程中已经进化出不同的感觉神经元亚型, 以适应它们独特的环境挑战。这一全面的人类 DRG 发育时空图谱为体外模拟人类 DRG 发育提供了宝贵的见解。

值得注意的是, 该研究发现分化的人类胎儿 DRG 特别需要 RA 信号来支持大直径神经元谱系。因此, 将 RA 信号纳入了 hDRGOs 的培养中, 使他们的方法与其他诱导步骤不同, 以产生多样化的感觉神经元类型和胶质细胞。hDRGOs 是推进研究者们对人类 DRG 发育和感觉神经病变潜在原因的理解的宝贵工具。尽管 hDRGOs 能够产生多种感觉神经元亚型, 但它们在模拟体内神经发生的全部复杂性方面仍面临挑战, 特别是在后期神经元亚型生成和复杂的趋化因子介导的神经元相互作用方面。

(Tian Lu, Mengdi Wang, Wei Zhou, *et al.* Decoding transcriptional identity in developing human sensory neurons and organoid modeling. *Cell*, 2024, 187(26):7374-7393.e28. 南京中医药大学医学院, 王瑞琪 译, 唐宗湘 校)