

诱导多能干细胞移植在脊髓损伤修复中的应用及研究进展

Research of induced pluripotent stem cells transplantation
for repairing of spinal cord injury

姚帅辉, 钟德君

(泸州医学院附属医院脊柱外科 646000 四川省泸州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.11.11

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-11-1015-04

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)至今仍是再生医学急需攻克的难题。尽管各种治疗手段较之前取得了一定进展,但疗效仍不能令人满意,最终导致不同程度的神经功能丧失。近几十年来,随着再生医学的发展,尤其是干细胞技术的发展,为SCI的治疗提出了新的方向。传统的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)移植缺乏足够的供体来源并涉及伦理问题和免疫排斥,而诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)有着近似 ESCs 的自我更新能力和分化潜能^[1],避免了免疫排斥反应及伦理问题。iPSCs 作为一种可直接从组织中获取并应用于自体移植的来源细胞,目前已成为国内外干细胞领域研究的热点^[2]。笔者就 iPSCs 移植在 SCI 修复中的应用及研究进展作一简要综述。

1 iPSCs 的来源和生物学特性

1.1 iPSCs 的来源

iPSCs 是直接通过重编程技术,控制特定的转录因子来表达细胞分化发展而来的。最初的 iPSCs 是使用逆转录病毒转导 POU5f1 转录因子-3/4(Oct3/4)、性别决定区 Y 框蛋白 2(Sox2)、Kruppel 样因子 4(Klf4)和原癌基因转录因子(c-Myc)基因至小鼠成纤维细胞制备而成^[3]。2007 年,有学者报道利用慢病毒为载体,通过转染 Oct4、Sox2、Nanog 及 Lin28 4 个基因,将人成纤维母细胞重编程为 iPSCs^[4]。随后 Okita 等^[5]的研究证实,利用 Nanog 表达筛选得到的 iPSCs,与利用盒蛋白 15(Fbx15)表达筛选获得的 iPSCs 相比,在形态学、表观遗传学、染色质状态、基因表达谱以及细胞类型的特异分化潜能与 ESCs 几乎完全相同。2009 年 Kim 等^[6]报道,直接导入诱导重编程基因 Oct4 就可以成功诱导出 iPSCs,由于诱导过程中不用插入 DNA,这也使得 iPSCs 的安全性进一步得到提高,为 iPSCs 的临床研究和应用做好了铺垫。尽管目前已开发出多种方法来获取

iPSCs,如病毒转导^[6]、质粒转染^[5]、游离型载体^[7]、易位系统^[8]、重组蛋白^[9]、化学方法^[10]、RNA^[11],但目前诱导效率仍较低。

1.2 iPSCs 的生物学特性

iPSCs 的主要特征是多能性,如分化为三个胚层和所有细胞类型的能力,最初的研究显示,iPSCs 和 ESCs 一样具有自我更新特性、多能性,并应用于体外疾病模型、药物筛选以及细胞替代疗法^[12]。最近研究发现 iPSCs 的另一重要特征是全能性。Zhao 等^[13]首次利用 iPSCs 通过四倍体囊胚注射得到存活并具有繁殖能力的小鼠,从而在世界上第一次证明其全能性。此外,还可以诱导来源于患者自身疾病特异性 iPSCs。2008 年 Park 等^[14]报道,使用帕金森病和亨廷顿病患者的体细胞制备出一系列疾病特异的 iPSCs,此后又制备了阿尔茨海默氏病、肌萎缩侧索硬化症及脊髓性肌萎缩病患者的 iPSCs,由此避免了来自 ESCs 方面的伦理与法律问题。

2 iPSCs 移植后的分化及修复机制

2.1 iPSCs 移植后的分化

iPSCs 可以被诱导分化为神经元,并具有相应的生理功能。如 iPSCs 可以定向诱导分化为多巴胺能神经元,通过移植到帕金森病大鼠模型后可改善疾病症状^[15]。研究者使用人类诱导多能干细胞—神经球(hiPSC-NSs)克隆细胞 201B7,移植至 T10 脊髓平面挫伤的非肥胖型糖尿病——重症联合免疫缺陷病(NOD-SCID)小鼠,移植后 hiPSC-NSs 存活、迁移,并分化为三种主要的神经细胞谱系(神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞)^[16]。Dimos 等^[17]将肌萎缩脊髓侧索硬化症患者的成纤维细胞重编程为 iPSCs,在联合应用音猬因子(sonic hedgehog, SHH)和维甲酸(RA)后可分化为神经细胞,并具有运动神经元特性,第一次证明了 iPSCs 可以分化成具有电生理活动的神经细胞。Hu 等^[18]将 iPSCs 诱导分化为脊髓运动神经元,并在不使用成神经素的情况下将 iPSCs 诱导成为神经上皮细胞,然后用维甲酸等试剂定向选择为表达少突胶质细胞系基因-2(Olig-2)的运动神经元前体细胞,这些前体细胞形成有丝分裂期,并表达同源盒基因 9(HB9)的运动神经元,相继形成有

第一作者简介:男(1986-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(0803)3165441 E-mail:yshhk@sina.cn

通信作者:钟德君 E-mail:zdj_1974@163.com

功能的运动神经元。

2.2 iPSCs 移植修复 SCI 的机制

iPSCs 移植修复 SCI 与以下机制有关:通过移植后分化的神经细胞的神经突触重建;通过少突胶质细胞的脱髓鞘轴突的髓鞘重建;通过来源于移植后分化的神经细胞并分泌神经营养因子^[19]。研究者使用人类 iPSCs 衍生的神经干细胞/前体细胞(hiPSC-NS/PC)移植至普通猕猴损伤脊髓,证实普通猕猴 SCI 中心有大块区域钙调素依赖性蛋白激酶 2a 抗体(CaMK-IIa)、神经丝蛋白-200(NF-200)和血小板内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1)免疫阳性,表明在 SCI 后移植 hiPSC-NS/PC 可促进轴突再生和血管再生^[20]。运动功能的恢复也可能与 hiPSC 衍生的神经元和宿主脊髓神经元之间突触的形成有关,也有可能在损伤区域(宿主神经元和移植衍生神经元的混合区)局部神经元之间通过递质传递信号^[16]。灵长类动物运动皮层下行纤维对运动功能恢复至关重要,通过移植 hiPSC-NS/PC 细胞可促进下行纤维轴突再生,研究者使用 RT-PCR 定量分析发现人类神经营养因子[神经营养因子 3(NT3)、NT4、睫状神经营养因子(CNTF)]的 mRNA 表达水平与宿主神经元的存活和轴突再生有关,同时血管内皮生长因子(VEGF)的 mRNA 的表达水平也显著增多,此外,NT3、NT4 和 CNTF 也促进轴突再生,VEGF 通过促进细胞生存路径和抑制细胞死亡来促进损伤区域血管再生^[21]。hiPSC-NS/PC 移植后,不仅起到替代作用,而且发挥免疫调节和神经保护作用,防止组织损伤,未分化的 NS/PC 在受损脊髓内分泌营养因子保护内源性神经细胞,防止细胞死亡、阻止胶质瘢痕形成,并伴随免疫调节分子促进内源性髓鞘再生^[22]。

有研究报道^[19],iPSCs 分化的星形胶质细胞通过提供自由生长基质,可促进神经丝蛋白-H(NF-H)和 5-羟色胺(5-HT)能纤维的再生,神经营养因子如神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)和肝细胞生长因子(HGF)对轴突再生和现有神经元存活发挥重要作用。大多数 hiPSCs 衍生成熟的神经元是 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元,通过控制运动神经元的传出和感觉神经元的传入通路、通过调节初级传入神经元递质的释放、通过运动神经元直接的突触后抑制,神经递质在脊髓内发挥重要作用,由于 SCI 后脊髓功能低下,GABA 能神经元受到抑制,并引起神经病理性疼痛状态^[23]。因此,通过移植供体 GABA 能神经元形成突触,可能对 SCI 后导致痉挛和疼痛抑制以及脊髓神经网络运动协调起重要作用。

3 iPSCs 移植后的安全性评估

Takahashi 等^[9]建立的 iPSCs 解决了相关的伦理问题,但 iPSCs 是多能干细胞,可能比 ESCs 有更高的导致肿瘤形成的风险,因为:①外源基因导入染色体;②重编程有可能不完整^[1]。Okano 等^[24]发现中枢神经系统内持续表达 iPSCs 标志物阳性未分化细胞可导致畸胎瘤形成,iPSCs 的来源对安全预测起至关重要的作用。Miura 等^[25]的研究揭

示了小鼠 iPSCs 对神经诱导分化的反应性及移植安全性的不同,主要取决于不同体细胞重编程的 iPSCs。来源于成人胃上皮细胞克隆的 iPSCs 移植至小鼠脊髓在 16 周的观察期内未发现畸胎瘤形成;相反,成人尾尖成纤维细胞(TTFs)克隆的 iPSCs 具有显著的分化抗性,在诱导分化之后神经球内仍有很多未分化细胞,移植后出现大量的畸胎瘤形成,很多小鼠短期内出现衰弱或死亡^[26]。来源于成人肝细胞诱导的 iPSCs 神经球的致瘤性处于上述两种细胞之间^[2]。Oct4 是维持 ESCs 多能性和制备 iPSCs 所必需的一个因子,hiPSC-NS/PC 移植后可表达潜在的致瘤性,然而组织学分析显示,移植的 hiPSC-NS/PC 为 Oct4 阴性,无论是 c-Myc 基因转导还是用分子探针进行重编程细胞筛选与 iPSCs 诱导分化的反应性或移植后的安全性都没有相关性^[6],说明来源于不同体细胞组织的 iPSCs 其神经诱导信号的反应性和成瘤性的巨大差异。有研究者将大鼠 iPSCs 克隆的 38C2 细胞衍生的第二代神经球(38C2-SNS)移植到脊髓损伤部位,荧光素酶生物成像显示大约有 20% 存活,移植后症状缓解而未导致肿瘤发生^[2]。将 hiPSC-NS/PC 移植至普通猕猴颈髓损伤处,12 周内未观察到肿瘤形成,所有接受移植的动物均未发现肿瘤形成的组织学证据,通过常规 MRI 检测,该研究结果也得到证实^[20]。

总之,不论使用何种方法制备的 iPSCs,基因组的不稳定性问题包括复制数量的多变性和整个染色体的异倍体对于 iPSCs 移植治疗的安全性来说都非常重要^[2]。未来研究中,hiPSC-NS/PC 的安全性和有效性还需进一步深入研究,例如,使用非人类灵长类动物 SCI 模型,特别是应评估使用不同方法重编程因子建立的 hiPSCs,如自由整合系统^[27]、脱毒系统^[5]、自由转基因系统^[28]、或使用 HLA-纯合子供体细胞来源^[29]。

4 iPSCs 的临床应用前景和面临的问题

综上所述,iPSCs 作为一种理想的来源细胞,为未来应用于临床治疗 SCI 带来了希望。最近,从人类皮肤成纤维细胞或一滴血液制备出 iPSCs 已成为可能^[30]。Son 等^[31]通过一些限定因子将小鼠和成人成纤维细胞直接诱导分化为运动神经元,这些神经元可以在体内分化为有功能的神经亚型,为进一步研究移植这些分化的神经元治疗 SCI 奠定了基础。然而,在未来 SCI 的临床治疗中为了促进 iPSCs 的应用,仍有一些问题需要解决:①获取 iPSCs 的效率。尽管获取的 iPSCs 的数量和质量不同,到目前为止获取 iPSCs 的效率仍较低(0.001%~10%)^[32]。考虑到临床应用中的巨大需求,毫无疑问因为获取率低而被限制。②iPSCs 来源的选择。不同组织来源的 iPSCs 的安全性和获取效率不完全相同^[27],因此选择适当的来源细胞是重要的。③iPSCs 的免疫反应。研究表明 iPSCs 具有免疫原性^[33],如果通过移植 iPSCs 导致免疫反应,那么宿主的免疫系统会攻击移植的细胞,这可能会导致移植失败。④iPSCs 移植的安全性。尽管目前已经进行了大量的基础研究,其结果不尽相同,

且大多都是使用啮齿类动物模型,普通狨猴的 SCI 与人类的 SCI 最相近^[20],然而这方面实验还较少,尽管一些学者初步证实移植安全性,但未来应用于临床还需进一步详细评估其安全性。

5 参考文献

- Nakamura M, Okano H. Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Res*, 2013, 23(1): 70–80.
- Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, et al. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells[J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(4): 668–676.
- 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.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917–1920.
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors [J]. *Science*, 2008, 322(5903): 949–953.
- Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells[J]. *Cell*, 2009, 136(3): 411–419.
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences[J]. *Science*, 2009, 324(5928): 797–801.
- Nagy K, Sung HK, Zhang P, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(3): 693–702.
- Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 472–476.
- Zhu S, Li W, Zhou H, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6): 651–655.
- Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6): 633–638.
- Jung YW, Hysolli E, Kim KY, et al. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies[J]. *Curr Opin Neurol*, 2012, 25(2): 125–130.
- Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. *Nature*, 2009, 461(7260): 86–90.
- Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2008, 134(5): 877–886.
- Wernig M, Zhao JP, Pruszk J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(15): 5856–5861.
- Nori S, Okada Y, Yasuda A, et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(40): 16825–16830.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons[J]. *Science*, 2008, 321(5893): 1218–1221.
- Hu BY, Zhang SC. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(9): 1295–1304.
- Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(28): 12704–12709.
- Kobayashi Y, Okada Y, Itakura G, et al. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52787.
- Shang AJ, Hong SQ, Xu Q, et al. NT-3-secreting human umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantation for the treatment of acute spinal cord injury in rats [J]. *Brain Res*, 2011, 1391: 102–113.
- Kim HM, Hwang DH, Lee JE, et al. Ex vivo VEGF delivery by neural stem cells enhances proliferation of glial progenitors, angiogenesis, and tissue sparing after spinal cord injury[J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4987.
- Kim DS, Jung SJ, Nam T S, et al. Transplantation of GABAergic neurons from ESCs attenuates tactile hypersensitivity following spinal cord injury[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(11): 2099–2108.
- Okano H. Investigation of regeneration of damaged CNS and neurological diseases mechanisms using iPS cells[J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2010, 50(11): 887.
- Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 743–745.
- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells [J]. *Science*, 2008, 321(5889): 699–702.
- Wang H, Fang H, Dai J, et al. Induced pluripotent stem cells for spinal cord injury therapy: current status and perspective[J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(1): 11–17.
- Rhee YH, Ko JY, Chang MY, et al. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2326–2335.
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(5): 409–412.
- Seki T, Yuasa S, Oda M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated

综述

脊髓损伤修复与直接转分化的研究进展

Advancement in the repairing of spinal cord injury and direct transdifferentiation

刘 丰, 王 欢, 方 煌

(华中科技大学同济医学院附属同济医院脊柱外科中心 430030 湖北省武汉市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.11.12

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-11-1018-04

由各种原因(如外伤、缺血及医源性损伤等)所致的脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)在临床上较为多见,常造成损伤平面以下感觉、运动及大小便功能障碍。现行的修复方法及药物治疗效果不佳,进展缓慢,常遗留不同程度的神经功能永久性缺失,致残率高,给个人、家庭和社会造成沉重的负担^[1]。随着生物学及分子生物学研究的不断深入,以细胞移植为代表的生物治疗为 SCI 的修复带来了曙光,尤其是近年来直接转分化的发现,显示出诱人的研究价值。笔者就 SCI 修复的现状、直接转分化细胞的获取及其应用于 SCI 修复的潜在价值等方面进行综述。

1 SCI 修复的现状

SCI 后神经细胞和神经胶质细胞因坏死或凋亡而缺失,神经传导束断裂,轴突脱髓鞘改变,而邻近未受损神经细胞再生潜能极为有限或缺乏,不能及时、有效补充缺失的神经细胞。同时局部微环境发生改变,神经胶质细胞增生失衡,诸如少突胶质细胞增生不足(该细胞产生和形成轴突髓鞘)、星形胶质细胞和小胶质细胞过度增生,阻碍轴突再生,使结构修复、重建突触联系乃至恢复功能甚为困难^[2]。

SCI 修复的方法包括手术治疗、药物治疗及生物治疗。手术治疗主要是为持续受压的脊髓减压,重建脊柱稳

定性。Furlan 等^[3]认为在 SCI 早期(<24h)进行减压术和重建脊柱稳定,对 SCI 修复有利。药物治疗主要作用于 SCI 急性期,能在一定程度上减少 SCI 继发损伤,并保护残余神经组织,但目前大部分治疗 SCI 的药物尚处于临床试验阶段,常用药物有糖皮质激素、米诺环素、促红细胞生成素及神经节苷脂等^[4]。以上两种治疗方法均效果不佳,不能弥补受损或缺失的神经细胞及再髓鞘化受损的轴突,无法重建突触联系。随着细胞生物学技术的发展,以细胞移植为代表的生物治疗为 SCI 修复带来了曙光。细胞移植治疗 SCI 的主要目标是弥补受损或缺失的神经细胞及胶质细胞。目前有研究报道采用雪旺氏细胞移植、嗅鞘细胞移植、神经干细胞移植、间充质干细胞移植、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)移植、诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)移植、直接转分化细胞移植治疗 SCI^[5]。尽管上述细胞移植方法取得了一定效果,但亦存在不足。雪旺氏细胞移植通过产生基质、分泌神经营养因子、改善局部微环境促进神经修复,但细胞迁移距离有限,不能补充缺失的神经细胞,而且需侵入自身组织获取、扩增困难,可造成供区神经功能缺损,限制其应用^[6]。嗅鞘细胞移植也面临着雪旺氏细胞类似的问题^[7]。研究表明,通过体外诱导(化学诱导如抗氧化剂等或生物诱导如细胞因子、基因导入等)使干细胞向神经细胞(包括神经元、少突胶质细胞)定向分化,移植修复实验动物 SCI 呈现出不同程度的神经功能恢复^[8]。但现行干细胞移植治疗存在以下不足: ESCs 面临免疫排斥、道德伦理问题及植入部位形成畸胎瘤风险,使其应用受限^[9];神经干细胞因部位

第一作者简介: 男(1986-), 硕士在读, 研究方向: 脊柱脊髓损伤修复

电话: (027)83665319 E-mail: sdsgliufeng@sina.com

- circulating T cells[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(1): 11-14.
31. Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons[J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(3): 205-218.
32. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(4):

- 376-388.
33. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2011, 474(7350): 212-215.

(收稿日期: 2013-05-29 末次修回日期: 2013-08-01)

(本文编辑 李伟霞)