

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, Juhr 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)

特殊来源有限、取材困难,同样面临道德伦理问题从而限制其实际应用^[9];脂肪干细胞和骨髓间充质干细胞表型不均一,其鉴定无明确标准,分离纯化、大量扩增面临技术缺陷或不足^[10,11]。iPSCs 获取细胞过程复杂、诱导细胞周期长,最重要的是致瘤性风险高,到目前为止很多关键问题认识不深^[12]。直接转分化技术^[6]被寄予厚望,操作程序相对简化,安全性更高,而更为重要的是为体内直接转分化提供了一种可能的方法,这对早期干预疾病、预防疾病进展具有极其重要的意义。

2 直接转分化细胞的获取

跳过多潜能阶段,直接转分化是在体内或体外将一种成熟细胞转化为另一种成熟细胞或某种细胞的前体阶段,这两种细胞可来自相同胚层,也可来自不同胚层^[13]。直接转分化最早在体外获得成功,且被转化的两种细胞来自相同的胚层。1987 年 Davis 等^[14]通过逆转录病毒将一种调控肌肉细胞发育过程的主导因子 MyoD 转染到小鼠成纤维细胞,使其分化为肌纤维细胞,表明单基因的激活就能改变细胞发育过程。随着研究技术的发展,目前存在的直接转分化的主要途径:(1)特异性转录因子:特异性转录因子在细胞内过度表达,激活在胚胎发育早期对决定细胞命运起重要作用的基因,内源性基因激活以后又通过反馈或前馈的方式激活下游转录因子,同时 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化等表观遗传学修饰也发生适应性改变,使直接转分化得以实现,最终导致细胞命运转变^[15,16]。另外,即使外源性转录因子被去除,细胞的转分化也可以维持在稳定状态,这表明转录因子起到了触发启动直接转分化的作用。通过添加特异性的转录因子获取目的细胞在直接转分化的发展中占主导地位,这可能与转录因子在普通细胞的分化发育中起重要作用有关。(2)非编码 RNA(miRNA)小分子:miRNA 是指不能翻译为蛋白质但具有调控作用的功能性 RNA 分子。研究表明,miRNA 在细胞生长及发育中发挥巨大作用,可诱导多种初始细胞向目的细胞直接转分化^[17,18]。有些神经特异性 miRNA(miRNA9,miRNA124)能够调控神经细胞的分化过程。有学者利用 miRNA124 直接将成纤维细胞转化为神经元^[19]。miRNA 在细胞分化中的作用得到越来越多的证实,而选择有效的载体是其发挥作用的关键。(3)细胞因子:是一类能在细胞间传递信息、具有免疫调节和效应功能的蛋白质或小分子多肽,通过结合细胞表面相应的细胞因子受体而发挥生物学作用,与其受体集合后启动复杂的细胞内分子间的相互作用,最终引起细胞基因转录的变化^[20]。有研究发现,IL-2 作为调节淋巴细胞生长和发育的一种细胞因子,能够改变细胞命运,使淋巴细胞(T、B、NK 细胞)能够实现转分化,但仅限于淋巴细胞系^[21]。

3 直接转分化获得神经细胞

直接转分化诱导获得的神经细胞分为两种。第一种:

直接转分化诱导获得神经元(induced neurons, iNs)。直接转分化不仅能够实现神经细胞之间的转变,而且也能够诱导体细胞分化为神经元,诱导获得的神经元具有相应的生理功能。Heinrich 等^[22]利用神经特异性转录因子 Neurog2 的过表达,将小鼠脑皮质星形胶质细胞直接转分化为谷氨酸能神经元,电生理证实此种诱导神经元能够产生功能性突触,解决了过往诱导神经元突触形成障碍^[23]的难题。Vierbuchen 等^[5]选取 19 种神经细胞种系特异性转录因子,经过不同组合诱导成纤维细胞向神经元分化,最终确定了 Ascl1、Brn2 和 Myt1l 三种转录因子能够高效地将小鼠成纤维细胞直接转分化为神经元,诱导的神经元能够产生神经特异性蛋白和动作电位,并形成功能性突触与周围的神经元产生信号通路。谱系内和谱系间的直接转分化为获取神经元提供了可能,而提高直接转分化的效率,寻找诱导神经元转化的普遍适用的方法是进一步研究的重点。第二种:直接转分化诱导获得诱导性神经干细胞(induced neural stem cells, iNSCs)。iNSCs 的诱导是研究者基于 iPSCs 获取过程复杂、耗时长久的思考,利用 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 四种诱导 iPSCs 的经典转录因子^[24]瞬时转染成纤维细胞,转染后更换神经培养基,诱导获得 iNSCs,证明了 iPSCs 并不是四种转录因子诱导的唯一结局。相对于 iNs, iNSCs 具有极强的体外增殖和分化为神经细胞的能力,诱导培养的时间和过程又大大缩短^[25]。直接转分化获取神经干细胞兼有 iNs 和 iPSCs 的优点,但其向神经元和胶质细胞分化的能力还有待进一步验证。

4 直接转分化与 SCI 修复

近来,直接转分化在动物实验中取得了巨大的进展。有研究^[26]证实四种转录因子 GATA4、HAND2、MEF2C 和 TBX5 在体内和体外都能协同性地转化小鼠尾尖成纤维细胞和心脏成纤维细胞为类心肌样细胞,改善心脏功能,并降低心肌梗死发生之后的不良心脏重塑,这极大提升了直接转分化应用于细胞移植治疗的信心。运用 ESCs 和 iPSCs 移植治疗小鼠 SCI 已有报道,并且细胞移植成功后使遭受 SCI 模拟打击小鼠的运动功能得到部分改善^[27,28]。但获取多能干细胞时间过长,易使患者错过神经修复的最佳时机,并且其致畸变风险高的问题仍在探索中。Matsui 等^[29]和 Iujin 等^[30]分别用不同的方法直接转分化诱导出神经干细胞,并证明其具有自我更新及分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的潜能,极大地提高了移植细胞与周围环境的整合和生存能力。Torper 等^[31]在鼠大脑内实现胶质细胞诱导分化为神经元,证明了神经元体内直接转分化的可行性。而在此之前,有学者将直接转分化获得的运动神经元移植到小鸡的脊髓腹侧区域中,发现神经元存活,且大约有 80% 神经元从脊髓前角神经根向周围肌肉组织伸出轴突^[6]。以上研究结果表明,无论是通过细胞移植还是体内直接转化,直接转分化所获得的神经细胞均有部分替代作用,发挥一定的功能,为 SCI 修复提供了可行的方法。

通过直接转分化移植细胞达到修复 SCI 的目的,其优势主要有:(1)诱导时间短、效率高,能在疾病早期干预,更有希望应用于临床^[31];(2)两种终末分化细胞之间的直接转化,致瘤变的风险相对低^[32];(3)能够实现体内直接转分化,在疾病的早期加以干预,防病于未然^[33]。而直接转分化应用于 SCI 修复尚需要解决以下问题:(1)植入细胞的选择。尽管 iNSCs 相比 iNs 具有更强的增殖和分化能力,但分化过程难以调节,所得少突胶质细胞比例少^[34]。(2)植入细胞的数量。移植多少数量细胞为合适,如何确定植入细胞数量,过少或过多是否引起细胞移植治疗失败^[35]。(3)植入细胞嵌合。移植的神经元能否与周围神经元形成突触联系,少突胶质细胞能否形成髓鞘^[23]。(4)损伤区瘢痕组织。损伤区形成的瘢痕组织会阻碍轴突再生及突触联系的建立,清除此瘢痕组织对细胞移植修复 SCI 是必要的^[36]。而如何实现仅清除瘢痕而不造成 SCI 再次损伤,还有待进一步研究。

5 前景展望

SCI 的修复是一项世界性的难题,由于神经细胞的不可再生性,SCI 后的各种治疗效果不佳。细胞移植技术的发展,吸引了大批的研究者致力于细胞移植修复神经损伤。直接转分化能够将患者本人的体细胞诱导为有功能的神经细胞,或直接将损伤处的胶质细胞转化为神经元^[16,22]。如诱导的神经元与损伤处微环境整合,发挥神经传导功能,其对 SCI 的修复来说将是质的飞跃,是亿万截瘫患者的福音。直接转分化技术还处于起步阶段,很多问题尚待解决^[37],如体内直接转分化成功后与体内微环境的关系,转分化后的细胞表观遗传性的稳定性等,直接转分化还不具有普适性,无论是所研究的对象细胞还是转分化的方法,人们还没有找到一种最合适的途径实现直接转分化。但直接转分化所提供的应用前景是广阔的,特别是体内直接转分化能够在疾病的早期加以干预^[31],实现“防患于未然”。对于治疗 SCI,直接转分化所提供的神经细胞有着独特的优势,随着对这项技术的不断探索,细胞移植水平的提高,直接转分化将会造福于人类。

6 参考文献

1. Krueger H, Noonan VK, Trenaman LM, et al. The economic burden of traumatic spinal cord injury in Canada[J]. *Chronic Dis Inj Can*, 2013, 33(3): 113-122.
2. Sahni V, Kessler JA. Stem cell therapies for spinal cord injury[J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(7): 363-372.
3. Furlan JC, Noonan V, Cadotte DW, et al. Timing of decompressive surgery of spinal cord after traumatic spinal cord injury: an evidence-based examination of pre-clinical and clinical studies[J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(8): 1371-1399.
4. Rabchevsky AG, Patel SP, Springer JE. Pharmacological interventions for spinal cord injury: where do we stand How might

we step forward[J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 132(1): 15-29.

5. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors [J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1035-1041.
6. Park HW, Lim MJ, Jung H, et al. Human mesenchymal stem cell-derived Schwann cell-like cells exhibit neurotrophic effects, via distinct growth factor production, in a model of spinal cord injury[J]. *Glia*, 2010, 58(9): 1118-1132.
7. Ramon-Cueto A, Munoz-Quiles C. Clinical application of adult olfactory bulb ensheathing glia for nervous system repair [J]. *Exp Neurol*, 2011, 229(1): 181-194.
8. Erceg S, Ronaghi M, Oria M, et al. Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(9): 1541-1549.
9. Salewski RP, Eftekharpour E, Fehlings MG. Are induced pluripotent stem cells the future of cell-based regenerative therapies for spinal cord injury[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222(3): 515-521.
10. Tholpady SS, Lull R, Ogle RC, et al. Adipose tissue: stem cells and beyond[J]. *Clin Plast Surg*, 2006, 33(1): 55-62.
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
12. 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.
13. Szabo E, Rampalli S, Risueno RM, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors[J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 521-526.
14. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts [J]. *Cell*, 1987, 51(6): 987-1000.
15. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors[J]. *Cell*, 2010, 142(3): 375-386.
16. 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.
17. Yoo AS, Sun AX, Li L, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons[J]. *Nature*, 2011, 476(7359): 228-231.
18. Olde Loohuis NF, Kos A, Martens GJ, et al. MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(1): 89-102.
19. Xue Y, Ouyang K, Huang J, et al. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits[J]. *Cell*, 2013, 152(1-2): 82-96.
20. Mousa A, Bakhiet M. Role of cytokine signaling during nervous system development[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7): 13931-13957.

21. Kondo M, Scherer DC, Miyamoto T, et al. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines[J]. *Nature*, 2000, 407(6802): 383-386.
22. Heinrich C, Blum R, Gascon S, et al. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons[J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(5): e1000373.
23. Berninger B, Costa MR, Koch U, et al. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(32): 8654-8664.
24. 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.
25. Kim J, Efe JA, Zhu S, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(19): 7838-7843.
26. Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors[J]. *Nature*, 2012, 485(7400): 599-604.
27. Liu S, Qu Y, Stewart TJ, et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 6126-6131.
28. 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.
29. Matsui T, Takano M, Yoshida K, et al. Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(6): 1109-1119.
30. Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, et al. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(7): 2527-2532.
31. Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, et al. Generation of induced neurons via direct conversion in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(17): 7038-7043.
32. Matsui T, Akamatsu W, Nakamura M, et al. Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: basic concepts and potential application for cell replacement therapy[J]. *Exp Neurol*, 2012.
33. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells [J]. *Nature*, 2008, 455(7213): 627-632.
34. Han DW, Tapia N, Hermann A, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4): 465-472.
35. Naghdi M, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA, et al. Improvement of contused spinal cord in rats by cholinergic-like neuron therapy[J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2013, 15(2): 127-135.
36. Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon[J]. *Neurosurg Focus*, 2008, 25(5): E2.
37. Ladewig J, Koch P, Brustle O. Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(4): 225-236.

(收稿日期:2013-06-13 修回日期:2013-07-28)

(本文编辑 李伟霞)

消息

欢迎订阅 2014 年《中国脊柱脊髓杂志》

《中国脊柱脊髓杂志》是由卫生部主管,中国康复医学会与中日友好医院主办,目前国内唯一以脊柱脊髓为内容的国家级医学核心期刊。及时反映国内外脊柱脊髓领域的科研动态、发展方向、技术水平,为临床医疗、康复及基础研究工作者提供学术交流场所。读者对象:从事脊柱外科、骨科、神经科、康复科、肿瘤科、泌尿科、放射科、基础研究及生物医学工程等相关学科的专业人员。

本刊为中国科技信息中心“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”,中科院中国科学计量评价研究中心“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”,入选北京大学“中文核心期刊要目总览”,已分别入编 Chinainfo(中国信息)网络资源系统(万方数据)及以中国学术期刊光盘版为基础的中国期刊网(中国知网),影响因子名列前茅。

2014 年本刊仍为月刊,大 16 开,正文 96 页,每月 10 日出版。全册铜版纸彩色印刷。每册定价 20 元,全年 240 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号 82-457。国外读者订阅请与中国国际图书贸易总公司中文报刊科联系(100044,北京市车公庄西路 35 号),代号:BM6688。

本刊经理部可随时为国内外读者代办邮购(免邮寄费)。地址:北京市朝阳区樱花园东街中日友好医院内,邮编:100029。经理部电话:(010)84205510。编辑部电话:(010)64284923,84205233;E-mail: cspine@263.net.cn;http:www.cspine.org.cn。