

李珂雅,白琳,高舒平,等. 脂肪干细胞向神经方向诱导分化的研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 106-110.
Li KY, Bai L, Gao SP, et al. Current status of the research on induced neural differentiation of adipose-derived stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 106-110.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.02.018

脂肪干细胞向神经方向诱导分化的研究现状

李珂雅,白琳,高舒平,秦川*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 神经退行性疾病是一类以神经元退行性病变为主要特征的疾病,目前在全球范围内频发,尚无有效的治疗措施。干细胞具有自我更新和定向分化的潜能,为神经退行性疾病中大脑功能的恢复提供了新的治疗方法。脂肪干细胞是由中胚层发育而来的多潜能干细胞,在特定的生长因子和环境诱导下可以向不同的谱系分化,同时具有获取方便、容易培养的特点,因此脂肪组织来源的干细胞在治疗神经退行性疾病方面有其独特优势。本文就神经退行性疾病概况、脂肪干细胞生物学特性及向神经方向诱导分化的研究现状以综述。

【关键词】 脂肪干细胞;神经退行性疾病;分化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 02-0106-05

Current status of the research on induced neural differentiation of adipose-derived stem cells

LI Keya, BAI Lin, GAO Shuping, QIN Chuan*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of the People's Republic of China; Beijing 100021, China)

【Abstract】 Neurodegenerative diseases are common conditions globally that involve the degeneration of neurons, for which no effective curative measures are available. Stem cells have the potential to undergo self-renewal and directional differentiation, potentially providing new therapeutic method for the recovery of brain function in neurodegenerative diseases. In recent years, with the development of stem cell biology, it has been found that adipose stem cells are pluripotent stem cells that develop from the middle germ layer, which can differentiate into different lineages upon exposure to specific growth factors and environmental conditions. They have the benefits of being easily accessible to researchers and simple to culture. Therefore, adipose tissue-derived stem cells have unique advantages in treating neurodegenerative diseases. This article provides an overview of neurodegenerative diseases, the biological characteristics of adipose-derived stem cells, and the conditions for differentiating them into the components of neural systems.

【Keywords】 adipose-derived stem cell; neurodegenerative disease; differentiation

神经退行性疾病在全球范围内频发,它们大多成沉重的负担,构成全球公共卫生问题。近年来,进展缓慢,进行性加重,具有一定致残性,给社会造随着干细胞生物学的发展和对成人神经发生的分

【基金项目】北京市自然科学基金重点项目(5171001)。
【作者简介】李珂雅(1993—),女,硕士研究生,专业:病理学与病理生理学,Email: li-keya@hotmail.com
【通信作者】秦川(1959—),女,研究员,博士生导师,研究方向:神经退行性疾病分子机制研究,Email: qinchuan@cnilas.org

子机制的研究,细胞替代疗法由于它拥有能够治愈神经退行性疾病的潜力引起了研究人员的重视。脂肪干细胞(adipose tissue-derived stem cells, ADSCs)在体内储量丰富、获取方便,已成为干细胞治疗神经退行性疾病的研究热点。本文就神经退行性疾病概况及 ADSCs 向神经方向分化的条件进行综述。

1 神经退行性疾病概况

1.1 神经退行性疾病病因

1996 年,全球疾病负担研究项目提到,神经系统疾病占全球疾病负担的 4.2%,2004 年,该项数据上升至 5.2%^[1-2]。在中国,神经系统疾病所致伤残寿命调整年(DALYs)在 2015 年达到 4948.6 万,相比 1990 年增加了 7.9%^[3]。而作为世界范围内最常见的神经退行性疾病,阿尔兹海默病是神经系统疾病所致死亡的第二位病因^[3]。

神经退行性疾病与年龄相关,如,阿尔茨海默病(Alzheimer's diseases, AD)、帕金森病(Parkinson's diseases, PD)和肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)^[4]。它们的共同特点是神经元和胶质细胞的进行性丢失^[5]。AD 是最常见的痴呆症,主要表现为前脑基底部、杏仁核、海马和大脑皮层神经元的变性和坏死。随着疾病进展,病人记忆和认知功能逐渐下降^[6]。突触前胆碱能系统的功能障碍被认为是认知障碍的原因之一。临床上用于治疗胆碱酯酶抑制剂,就是基于这一理论,以增加乙酰胆碱含量来达到治疗目的,然而这些药物也仅是延缓了大脑功能的下降^[7]。PD 是世界范围内最普遍的运动障碍性疾病和位居阿尔茨海默病之后的第二常见的神经退行性疾病。合成多巴胺的神经元大多位于黑质致密部,它的末梢延伸至纹状体,当这些位置出现超过 60%的多巴胺能神经元缺失,PD 病人即出现运动缺陷。而多巴胺能神经元的持续丢失让病人的症状越发明显^[8]。ALS 作为一种严重的神经退行性疾病,病人一般在确诊后的 5 年内死亡,其病理特征是运动神经元在大脑皮层、脑干和脊髓中逐渐丢失^[6]。笔者从众多研究当中对神经退行性疾病的病因机制有了相当的了解,然而,由于它们的不可逆转性,以及研究人员对其确切病因的认识有限,至今仍没有有效药物或治疗方法可以完全解除症状,帮助患者恢复健康^[9]。

1.2 干细胞治疗神经退行性疾病现状

干细胞是一组能够自我更新、长时间存活,具有多向分化潜能特性的细胞群。自然条件下干细胞根据其全能性不同,或者说发展进程的不同,分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、胎儿干细胞(fetal stem cells, FSCs)和成体干细胞(adult stem cells)。科研人员还研究出一种方法来诱导已分化的细胞成为多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)。

有研究表明以干细胞为基础的细胞替代疗法能够有效治疗包括 AD、PD 及 ALS 在内的大多数神经退行性疾病^[10]。目前,干细胞在治疗神经退行性疾病的大部分研究还是集中在实验动物模型阶段。而分化为特定的细胞类型,可以有效避免干细胞移植入机体后的成瘤性和过度生长。

胚胎干细胞、诱导多能干细胞诱导分化为多巴胺能神经元后植入 PD 小鼠模型,其运动出现明显改善^[11]。Kim 等^[12]将从脊髓提取的神经干细胞诱导分化为运动神经元,植入 ALS 小鼠模型 SOD1G93A,使得疾病推迟了 28 d 发作。

2 脂肪干细胞及其生物学特征

ADSCs 因脂肪组织在整形外科领域的丰富资源且脂肪组织低成本、易取得、运送方便^[13]及分离后培养能获得大量脂肪干细胞^[14]的优点受到科研人员的关注。它在细胞替代治疗中,有其独特优势,它不引起伦理道德问题也不存在胚胎干细胞带来的副作用,如免疫排斥反应及致瘤性,更是为自体治疗提供了手段。

后续研究发现,ADSCs 有多向分化潜能,在特定诱导培养条件下,ADSCs 能分化为肌上皮细胞^[15]、心肌细胞^[16]、成骨细胞^[17]、软骨细胞^[18]等,也能朝神经方向分化。ADSCs 表达包括 CD10、CD13、CD29、CD44、CD71、CD73、CD90、CD105、CD166 和 CD271 在内的表面标记物,而 CD14、CD34、CD45 为阴性^[14]。ADSCs 具有免疫调节作用,能够分泌多种细胞因子以及抗凋亡、抗氧化、抗炎症能力。在体外培养时,ADSCs 生长迅速,分化能力不随培养时间增加而降低,能在低温环境下存活。ADSCs 具有较低的免疫原性,有了这一特性,无论宿主与捐献者的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是否相匹配,移植均可进行^[14]。

ADSCs 本身就保有朝向神经方向分化的潜能^[19],在此前,Zhang 等^[20]发现 ADSCs 朝向神经方向分化后,无论是神经球增殖速率、表达的神经标记物还是分泌的神经营养因子含量都要高于骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs),这说明 ADSCs 或许是更为有效的朝向神经方向分化的一类干细胞。

由于脂肪干细胞的以上特点,体外诱导脂肪干细胞为成熟神经元进行干细胞移植治疗具有广阔的治疗前景。

3 脂肪干细胞向神经方向诱导分化的研究

ADSCs 朝向神经方向分化,常用的方法包括:(1)神经诱导培养基培养;(2)共培养;(3)基因转染;(4)电刺激。

3.1 神经培养基诱导 ADSCs 向神经方向分化

神经诱导培养基诱导培养是采用直接诱导分化或分步诱导分化法,即 ADSCs 先转分化为神经干细胞(neural stem cells, NSCs),再朝向神经细胞分化。在培养基中添加生长因子运用得较为广泛,也有添加激素类蛋白、小分子化合物等。

最近,Marei 团队^[21]将人脂肪组织来源的间充质干细胞培养至第 3 代时采用维甲酸(retinoic acid, RA)进行诱导分化,在第 6 天的时候,细胞形态开始朝向神经方向变化。这有可能是因为 RA 通过维甲酸受体激活了受体连接的维甲酸反应元件,引发了神经方向基因的转录^[22]。该团队还采用了成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor 2, FGF2)和肝素、RA 和骨形态发生蛋白-9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导的方法。结合 TH 和 ChAT 基因的上调水平,该团队认为肝素结合 FGF2 是更佳的多巴胺能神经元诱导剂,而 RA 和 FGF2、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、BMP9 混合的诱导剂对于诱导胆碱能神经元更为有效。Soheilifar 等^[23]同样采用 FGF2 诱导,他们结合了音猬因子(sonic hedgehog, SHH)、成纤维细胞生长因子-8(fibroblast growth factor 8, FGF8)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF),诱导出了能有效分泌多巴胺和表达相关基因的多巴胺能神经元。值得注意的是,检测基因中有一个是 GIRK2 基因,是黑质致密部 A9 神经元特定表达的基因,另一个是 CALB1 基因,此基因编码产生 calbindin 蛋白只在腹侧背盖区的 A10 神经元中表

达,检测发现诱导出的神经元表达 GIRK2 而不表达 CALB1,所以联合 SHH、FGF8、b-FGF 和 BDNF 的方法诱导人 ADSCs 产生出的多巴胺能神经元是 A9 神经元。BDNF 在神经元的特性和功能产生方面有附加作用^[24]。Singh^[24]等采用 FGF2 和 BDNF 协同诱导人 ADSCs,通过钙离子成像证实产生了有功能的多巴胺能神经元。

Mostafavi 等^[19]采用分步诱导分化法,将人 ADSCs 和人 BMSCs 进行对比实验,他们将这两种细胞在 b-FGF、EGF、B₂₇ 的联合诱导下先形成神经球,再在含有 B₂₇ 的神经培养基中培养成神经元样细胞。培养出的神经元样细胞表达 MAP2 和 GFAP 基因,而作为星形胶质细胞的标记物,GFAP 基因在 ADSCs 的表达量低于 BMSCs,成熟神经元标记物 MAP2 在这两种细胞中相当,由此可见,想要获得神经元样细胞,ADSCs 相较于 BMSCs 而言是更好的选择。

除了在神经培养基里添加各种细胞因子,激素类蛋白的添加,如 T3^[25]、雌激素^[26]、催产素^[27]等,也能促进 ADSCs 产生神经方向的分化。Razavi 团队^[25-26]前后试验了 T3 和雌激素协同 b-FGF、EGF、B₂₇ 对于人 ADSCs 的神经分化作用,他们均采用分步诱导分化法,发现雌二醇或许能够通过产生神经营养因子提高人 ADSCs 的增殖速率和神经分化效率,而 T3 则促进人 ADSCs 朝向神经胶质细胞分化。而催产素,作为神经垂体激素,对小鼠 ADSCs 的神经分化作用具有时间依赖性和浓度依赖性。只有在含 10⁻⁷ mol/L 催产素的神经培养基中,CHAT 的基因有表达。而 GFAP 的不表达表明,催产素诱导的神经分化直接朝向神经元而不是胶质细胞。

小分子化合物,属于化学生物学范畴,它使用方便、可控^[28],它在 ADSCs 朝向神经方向分化过程中,主要是作用于细胞信号传导通路,使细胞重编程,再定向分化。Park 等^[29]运用 TGF- β 受体抑制剂 SB431542 和选择性 BMP 信号通路抑制剂 LDN193289 分三步进行诱导。使用小分子化合物,将人 ADSCs 转分化为神经干细胞。最终超过 76% 的细胞诱导为能产生膜电位的神经元,而功能性 γ -氨基丁酸能神经元的诱导效率超过 45%。小分子化合物的使用,为 ADSCs 朝向神经方向分化提供了可重复且有效的方法。

3.2 共培养促进 ADSCs 向神经方向分化

Razavi 等^[30]首先将人 ADSCs 诱导成神经营养

因子分泌细胞,再将其制成细胞微胶囊与人 ADSCs 诱导成的神经球以 1:1 的比例共培养,最终诱导成的细胞表达的 MAP2 和 nestin 明显升高,而 GFAP 下降,表明将人 ADSCs 和神经营养因子分泌细胞共培养促进了朝向神经元的分化,这种促进作用是通过分泌神经营养因子分泌细胞分泌 BDNF、神经营养因子(nerve growth factor,NGF)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor,CNTF)等产生。

Bahmani 团队^[31]将小鼠 ES 细胞与小鼠 ADSCs 进行非接触共培养 48 h 后,再进行神经诱导 2 周,神经特定标记物的表达量多于未共培养 ADSCs。RT-PCR 检测结果显示,共培养后,小鼠 ADSCs 表达 PCNA 基因、SOX2 基因、OCT4 基因上调,这些多能性标记物的升高提示小鼠 ES 细胞分泌细胞因子和生长调节剂以增加小鼠 ADSCs 的多能性来促进其朝向神经分化。

3.3 其他促进 ADSCs 向神经方向分化的方法

除了在神经培养基中添加各类细胞因子、激素、小分子化合物,或是 ADSCs 与有分泌功能的细胞共培养促进神经方向的分化外,科研人员还采用基因转染技术,将 BDNF 和神经营养因子-3(neurotrophin-3)经由慢病毒转入 SD 大鼠的 ADSCs,再经由神经培养基诱导,其表达的 NSE 基因量有所增加^[32]。

Yang^[33]则将不同强度电刺激作用于 SD 大鼠的 ADSCs,最终筛选出最适宜脂肪干细胞神经分化的电刺激强度(1 V/cm),在此电刺激强度下,脂肪干细胞增殖活力增强,且能促进脂肪干细胞向神经方向分化。而后结合基因转染技术,将 Nurr-1 基因转入 ADSCs,发现电刺激联合 Nurr-1 基因转染作用于脂肪干细胞后能进一步提高其向神经方向分化的能力。

4 结语与展望

人类神经退行性疾病主要是由大脑或脊髓中的神经元和胶质细胞丢失引起的。在尚无有效疗法的情况下,细胞替代疗法正在成为治疗这种缺陷的创新方法。

由于人体脂肪组织分布广,含量多,在局麻条件下,较少引起病人不适便能取得,它能为干细胞替代治疗的重要来源。随着 ADSCs 研究的深入,对于它的特性,人们也有了清晰的认识:ADSCs 能分泌多量对于神经的再生修复作用来说特别重要

的生长因子,诸如 BDNF、胰岛素样生长因子和成纤维样生长因子;ADSCs 有较强的朝向神经方向分化的能力,且在朝向神经元分化过程中,ADSCs 分化过程当中出现的 GFAP 基因的下调是非常重要的;ADSCs 生长迅速、有免疫抑制特性等。因此,ADSCs 在治疗神经退行性疾病方面存有巨大潜力。

然而尽管 ADSCs 朝向神经方向的诱导方式多样,方法众多,但大多实验只是处于体外诱导阶段,且诱导后的细胞只是记录了形态变化和一些选择性的神经元特异性或神经胶质细胞特异性标记物的表达,缺乏真正细胞功能的检测,如膜电位和/或特定细胞群体(如多巴胺能神经元)的分泌功能,也缺乏一些体内实验数据的支持。探索一种更为有效的诱导方法,制备出具有功能的神经元或者神经胶质细胞,无论是从补给丢失的神经元或神经胶质细胞,从根本上治疗神经退行性疾病还是避免干细胞移植入机体后的成瘤性和过度生长均具有重大意义。

参考文献:

- [1] Janca A, Aarli JA, Prilipko L, et al. WHO/WFN Survey of neurological services: a worldwide perspective[J]. J Neurol Sci, 2006, 247(1):29-34.
- [2] Walt G. WHO's world health report 2003: shaping the future[J]. BMJ, 2004, 328(7430):6.
- [3] GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015[J]. Lancet Neurol, 2017, 16(11):877-897.
- [4] Walker LC, Diamond MI, Duff KE, et al. Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases[J]. JAMA Neurol, 2013, 70(3):304-310.
- [5] Tamanini S, Comi GP, Corti, S. In vivo transient and partial cell reprogramming to pluripotency as a therapeutic tool for neurodegenerative diseases[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(8):6850-6862.
- [6] Lo Furno D, Mannino G, Giuffrida R. Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(5):3982-3999.
- [7] Amemori T, Jendelova P, Ruzicka J, et al. Alzheimer's disease: mechanism and approach to cell therapy[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11):26417-26451.
- [8] Glavaski-Joksimovic A, Bohn MC. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in parkinson's disease[J]. Exp Neurol, 2013, 247:25-38.
- [9] Chan TM, Chen JY, Ho LI, et al. ADSC therapy in

- neurodegenerative disorders[J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(4-5):549-557.
- [10] Dantuma E, Merchant S, Sugaya K. Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 1(5):37.
- [11] Barker RA. Stem cells and neurodegenerative diseases: where is it all going? [J] *Regen Med*, 2012, 7(6):26-31.
- [12] Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases[J]. *Neuropathol*, 2013, 33(5):491-504.
- [13] Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, et al. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? [J] *Differentiation*, 2009, 77(3):221-228.
- [14] Tabatabaei Qomi R, Sheykhasan M. Adipose-derived stromal cell in regenerative medicine: a review[J]. *World J Stem Cells*, 2017, 9(8):107-117.
- [15] Garcia-Hondurilla N, Cifuentes A, Ortega MA. et al. High Sensitivity of Human Adipose Stem Cells to Differentiate into Myofibroblasts in the Presence of *C. aspersa* Egg Extract [J]. *Stem Cells Int*, 2017:9142493.
- [16] Wystrychowski W, Patlolla B, Zhuge Y, et al. Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1):84.
- [17] Fang Z, Yang Q, Xiong W, et al. Effect of CGRP-adenoviral vector transduction on the osteoblastic differentiation of rat adipose-derived stem cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e72738.
- [18] Kasir R, Vernekar VN, Laurencin CT. Regenerative engineering of cartilage using adipose-derived stem cells [J]. *Regen Eng Transl Med*, 2015, 1(2):42-49.
- [19] Mostafavi FS, Razavi S, Mardani M. et al. Comparative study of microtubule-associated protein-2 and glial fibrillary acidic proteins during neural induction of human bone marrow mesenchymal stem cells and adipose-derived stem cells[J]. *Int J Prev Med*, 2014, 5(5):584-595.
- [20] Zhang HT, Liu ZL, Yao XQ, et al. Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(10):1203-1214.
- [21] Marei HES, El-Gamal A, Althani A, et al. Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2):936-945.
- [22] Maden, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(10):755-765.
- [23] Soheilifar MH, Javeri A, Amini H, et al. Generation of dopamine-secreting cells from human adipose tissue-derived stem cells in vitro [J]. *Rejuvenation Res*, 2018, 21(4):360-368.
- [24] Singh M, Kakkar A, Sharma R, et al. Synergistic effect of bdnf and fgf2 in efficient generation of functional dopaminergic neurons from human mesenchymal stem cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10378.
- [25] Razavi S, Mostafavi FS, Mardani M, et al. Effect of T3 hormone on neural differentiation of human adipose derived stem cells [J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(8):702-710.
- [26] Razavi S, Razavi MR, Ahmadi N, et al. Estrogen treatment enhances neurogenic differentiation of human adipose derived stem cells in vitro [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(8):799-804.
- [27] Jafarzadeh N, Javeri A, Khaleghi M, et al. Oxytocin improves proliferation and neural differentiation of adipose tissue-derived stem cells [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 564:105-110.
- [28] 李文林, 张冠宇, 孙平新. 干细胞研究中的化学生物学: 学科交叉的新前沿 [J]. *第二军医大学学报*, 2017, 38(2):133-141.
- [29] Park J, Lee N, Lee J, et al. Small molecule-based lineage switch of human adipose-derived stem cells into neural stem cells and functional GABAergic neurons [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10166.
- [30] Razavi S, Razavi MR, Kheirollahi-Kouhestani M, et al. Co-culture with neurotrophic factor secreting cells induced from adipose-derived stem cells: promotes neurogenic differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440, 381-387.
- [31] Bahmani L, Taha MF, Javeri A. Coculture with embryonic stem cells improves neural differentiation of adipose tissue-derived stem cells [J]. *Neuroscience*, 2014, 272:229-239.
- [32] Ji W, Zhang X, Ji L, et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin3 on the neuronal differentiation of rat adipose-derived stem cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4):4981-4988.
- [33] Yang Y, Ma T, Ge J, et al. Facilitated Neural Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells by Electrical Stimulation and Nurr-1 Gene Transduction [J]. *Cell Transplantation*, 2016, 25(6):1177-1191.